

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

**GLİSERİL GAYAKOLAT'IN (GUAİFENEZİN)
KROMATOĞRAFİK BİR YÖNTEM İLE MİKTAR
TAYİNİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimyager Serkan AYDOĞAN

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

Temmuz 2011

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**GLİSERİL GAYAKOLAT'IN (GUAİFENEZİN)
KROMATOĞRAFİK BİR YÖNTEM İLE MİKTAR TAYİNİ**


YÜKSEK LİSANS TEZİ


Kimyager Serkan AYDOĞAN


Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA

Enstitü Bilim Dalı : ANALİTİK KİMYA

Bu tez 20 / 07 /2011 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.


Yrd.Doç.Dr. Aysel KÜÇÜK
TUNCA
Jüri Başkanı


Doç.Dr. Mustafa
İMAMOĞLU
Üye


Yrd.Doç.Dr. Suzan ÖZTÜRK
YILMAZ
Üye

TEŞEKKÜR

Beni kendisine yüksek lisans öğrencisi olarak kabul eden, eğitimim boyunca her türlü bilgi ve birikimini benimle paylaşarak her açıdan bu dönemi en verimli şekilde bitirmemi sağlayan, desteğini ve yardımlarını hiç bir zaman esirgemeyen sayın danışman hocam Yrd.Doç.Dr. Aysel KÜÇÜK TUNCA'ya,

Deneyim ve bilgilerinden yararlandığım bölüm başkanımız sayın Prof.Dr. Ali Osman AYDIN'a, Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü tüm öğretim üyeleri ve araştırma görevlilerine,

Beni bu günlere getiren, her durumda varlıklarını yanımda hissettiğim, yaşadığım hayatı daha da anlamlı kılan anneme ve babama teşekkür ediyorum.

'Gliseril Gayakolat' ın (Guaifenezin) Kromatografik Bir Yöntem ile Miktar Tayini' adlı çalışmam, SAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından 2010-50-01-060 nolu proje ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ	vii
TABLolar LİSTESİ.....	viii
ÖZET.....	ix
SUMMARY.....	x

BÖLÜM 1.

GİRİŞ.....	1
1. 1. Gliseril Gayakolat	4
1.1.1. Fiziksel ve kimyasal özellikleri.....	4
1.1.2 Gliseril Gayakolatın farmakolojik etkisi.....	4
1.1.3. Endikasyonları.....	5
1.1.4. Kontrendikasyonları.....	5
1.1.5. Yan etkileri ve ilaç etkileşimleri.....	5
1.2. Literatürde Yapılan Çalışmaların Özeti.....	5

BÖLÜM 2.

MATERYEL VE YÖNTEM.....	8
2.1. Biyoyararlanım ve Biyoeşdeğerlik.....	8
2.2. Validasyon.....	8
2.3. Analitik Yöntem Validasyonu.....	10
2.3.1. Analitik yöntem validasyon parametreleri	10
2.3.1.1. Seçicilik/Spesifiklik.....	11
2.3.1.2. Doğruluk ve geri kazanabilirlik.....	11
2.3.1.3. Kesinlik.....	11

2.3.1.4. Tutarlılık.....	12
2.3.1.5. Tanıma limiti (Limit of Detection).....	12
2.3.1.6. Miktar tayin limiti (Limit of Quantitation).....	12
2.3.1.7. Güvenilirlik.....	13
2.4. Materyaller.....	14
2.4.1. Kullanılan kimyasal maddeler.....	14
2.4.2. Kullanılan cihazlar.....	15
2.5. Kromatografik Yöntem.....	15
2.5.1. Kromatografi Mekanizmaları.....	16
2.5.1.1. Adsorpsiyon Kromatografisi.....	16
2.5.1.2. Dağılım (Partisyon) Kromatografisi.....	17
2.5.2. Kromatografik Yöntemlerin Hareketli ve Sabit Fazın Cinsine Göre Sınıflandırılması.....	17
2.5.2.1. Kağıt Kromatografisi.....	17
2.5.2.2. İnce Tabaka Kromatografisi.....	18
2.5.2.3. Kolon kromatografisi.....	19
2.5.2.4. Gaz Kromatografisi.....	19
2.5.2.5. Sıvı kromatografisi.....	20
2.5.3. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC).....	21
2.5.4. Sıvı kromatografisinin dayandığı temel parametreler.....	22
2.5.4.1. Dağılım (Partisyon) katsayısı.....	22
2.5.4.2. Alıkonma (Retensiyon) zamanı.....	22
2.5.4.3. Analitin göç hızı ve kapasite faktörü.....	23
2.5.4.4. Seçicilik faktörü ve farklı göç hızları.....	24
2.5.4.5. Ayırım gücü (Rezolüsyon, R_s).....	24
2.5.4.6. Kolon verimi.....	27
2.5.4.7. Kuyruklanma faktörü (T) ve asimetri faktörü (AS).....	29
2.5.5. Kolon performansının optimizasyonu.....	30
2.5.6. Kolon performansına etki eden değişkenler.....	30
2.5.7. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) cihazı.....	31
2.5.7.1. Hareketli (Mobil) faz haznesi.....	31
2.5.7.2. Pompalar.....	32
2.5.7.3. Akış kontrolü ve programlama sistemleri.....	34

2.5.7.4. Enjektör.....	34
2.5.7.5. Dedektörler.....	35
2.5.7.6. Kolonlar.....	40
2.5.7.7. Kaydedici.....	47
2.5.8. HPLC yönteminin avantajları.....	47
2.5.9. HPLC yönteminin dezavantajları	47
2.5.10. Yüksek performanslı sıvı kromatografisinin uygulama alanları.....	47
2.5.10.1. Saflaştırma.....	48
2.5.10.2. Kalitatif analiz.....	48
2.5.10.3. Kantitatif analiz.....	48

BÖLÜM 3.

ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	49
3.1. Kromatografik Şartlar.....	49
3.2. Standart Çözeltilerin Hazırlanması.....	49
3.3. Ticari Çözeltilerin Hazırlanması.....	50
3.4. Standart Ekleme Yöntemi Kullanılarak Standartların Hazırlanması.....	50
3.5. Plazmalı Standart Çözeltilerin Hazırlanması.....	51
3.6. Plazma İçeren Ticari Çözeltilerin Hazırlanması.....	51
3.7. Plazma Ortamında Standart Ekleme Yöntemi Kullanılarak Standart Çözeltilerin Hazırlanması.....	52
3.8. HPLC Yöntemi ile Elde Edilen Bulgular.....	52
3.8.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanması.....	52
3.8.2. Yöntemin Validasyonu.....	54
3.9. Plazma Ortamında Elde Edilen Bulgular.....	59
3.9.1. Yöntemin validasyonu.....	59

BÖLÜM 4.

SONUÇLAR.....	67
KAYNAKLAR.....	69
EKLER.....	71
ÖZGEÇMİŞ.....	76

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

%BH	: % Bağlı hata
μg	: Mikrogram
A	: Difüzyon sabiti
B	: Boyuna difüzyon sabiti
C	: Konsantrasyon
C_u	: Kütle aktarım katsayısı
dk	: Dakika
FID	: Alev iyonlaşmalı dedektör
GC	: Gaz kromatografisi
H	: Tabaka yüksekliği (cm)
k'	: Kapasite faktörü
K_A	: Dağılma (partisyon katsayısı)
L	: Litre
LOD	: Gözlenebilirlik sınırı
LOQ	: Alt tayin sınırı
mg	: Miligram
ml	: mililitre
n	: Deneme sayısı
N	: Teorik tabak sayısı
r	: Korelasyon katsayısı
RSD	: Bağlı standart sapma
R_T	: Alıkonma zamanı
SD	: Mutlak standart sapma
SS	: Standart sapma
S_m	: Regresyon doğrusu eğiminin standart sapması
S_b	: Regresyon doğrusundaki kaymanın standart sapması
u	: Çizgisel hız
W	: Pik taban genişliği

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1.	Gliseril Gayakolat'ın açık formülü	4
Şekil 2.1.	Tek bileşenli bir karışım için tipik bir kromatogram	23
Şekil 2.2	Rezolüsyon faktörünün kromatogramlara göre değişimi	25
Şekil 2.3.	Kapasite faktörünün ayırıcılık üzerine etkisi	26
Şekil 2.4.	Teorik tabaka sayısı hesabını gösterir kromatogram	27
Şekil 2.5.	Pik asimetri faktörü ve kuyruklanma faktörü hesabını gösteren kromatogram	30
Şekil 2.6.	HPLC cihazının şematik gösterimi	31
Şekil 2.7.	Anyon ve katyon değiştirici reçinelerde gerçekleşen ayırım Mekanizmaları	43
Şekil 2.8.	Reçine tipleri: (a) Mikrogözenekli reçineler, (b) Makrogözenekli reçineler, (c) Pelikular reçineler, (d) Yüzeysel gözenekli reçineleri ...	44
Şekil 3.1.	100 µg mL ⁻¹ 'lik Gliseril Gayakolat'a ait kromatogram	53
Şekil 3.2.	100 µg mL ⁻¹ 'lik plazmaya ait kromatogram	53
Şekil 3.3.	Gliseril Gayakolat / Sibutramin standart alanları oranı için hazırlanmış kalibrasyon eğrisi	54
Şekil 3.4.	Gliseril Gayakolat /Sibutramin geri kazanım alanlarının oranı için hazırlanmış kalibrasyon eğrisi	56
Şekil 3.5.	Plazma ortamında Gliseril Gayakolat / Sibutramin standart alanları oranı için hazırlanmış kalibrasyon eğrisi	59
Şekil 3.6.	Plazma ortamında geri kazanımlar için Gliseril Gayakolat standartlarından hazırlanmış kalibrasyon eğrisi	61

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 2.1.	İlaç analizlerinde değişen parametreler	14
Tablo 2.2.	Sıvı kromatografik dedektörlerin performanslarının karşılaştırılması	35
Tablo 2.3.	İyon değiştirici reçinelerin sınıflandırılması	46
Tablo 3.1.	İnternal standart analiz yöntemi ile elde edilen kalibrasyon eğrisi değerleri (1 ml internal standart çözeltisi ilavesiyle).....	55
Tablo 3.2.	Gliseril Gayakolat standart çözeltilerinin gün-içi ve günler-arası kesinlik ve tekrarlanabilirlik analiz sonuçları	55
Tablo 3.3.	İnternal standart geri kazanım miktarları için elde edilen kalibrasyon eğrisi değerleri	56
Tablo 3.4.	Gliseril Gayakolat için elde edilen geri kazanım değerleri	57
Tablo 3.5.	Ticari preparatlarda Gliseril Gayakolat için elde edilen tekrarlanabilirlik değerleri	57
Tablo 3.6.	Ticari preparatlarda Gliseril Gayakolat için elde edilen geri kazanım değerleri.....	58
Tablo 3.7.	Standart ekleme yöntemi ile elde edilen sonuçlar.....	58
Tablo 3.8.	Plazma ortamında internal standart analiz yöntemi ile elde edilen kalibrasyon eğrisi değerleri	60
Tablo 3.9.	Gliseril Gayakolat standart çözeltilerinin gün-içi ve günler-arası kesinlik ve tekrarlanabilirlik analiz sonuçları	60
Tablo 3.10.	Plazma ortamında internal standart analiz yöntemi ile elde edilen geri kazanım kalibrasyon eğrisi değerleri	61
Tablo 3.11.	Plazma ortamında Gliseril Gayakolat için elde edilen geri kazanım değerleri	62
Tablo 3.12.	Plazma ortamında ticari preparatlarda Gliseril Gayakolat için elde edilen tekrarlanabilirlik değerleri	62
Tablo 3.13.	Plazma ortamında ticari preparatlarda Gliseril Gayakolat için elde edilen geri kazanım değerleri	63

Tablo 3.14.	Plazma ortamında standart ekleme yöntemi ile elde edilen sonuçlar	63
Tablo 3.15.	Standartlar içerisinde ve plazma ortamında hazırlanmış ticari preparatlar için (100 µg/mL Gliseril Gayakolat) elde edilen t-testi verileri	64
Tablo 3.16.	Standartlar içerisinde ve plazma ortamında hazırlanmış ticari preparatlar için (100 µg/mL Gliseril Gayakolat) elde edilen F-testi verileri	65
Tablo 3.17.	Standartlar içerisinde ve plazma ortamında hazırlanmış ticari preparatlar için (100 µg/mL Gliseril Gayakolat) elde edilen ANOVA testi verileri	66

ÖZET

Anahtar kelimeler: Gliseril Gayakolat (Guafenezin), HPLC ile miktar analizi

Bu çalışmada, soğuk algınlığı ilaçlarında yaygın olarak kullanılan Gliseril Gayakolat etken maddesinin hem farmasötik preparatlarda hem de insan plazmasında miktar tayini için basit, hızlı, tekrarlanabilir, hassas ve ekonomik bir DAD (Diod Array Detector) dedektörlü RP-HPLC yöntemi geliştirilmiştir.

Yöntem geliştirildikten sonra, biyoanalitik yöntem validasyonu yapılmıştır. Bunun için kesinlik, doğruluk, özgünlük, seçicilik ve geri kazanım gibi tüm validasyon parametreleri belirlenmiş ve sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

QUANTIFICATION WITH A CHROMATOGRAPHIC METHOD OF GLYCERYL GUAIACOLATE (GUAIFENESIN)

SUMMARY

Key Words: Glyceryl Guaiacolate (Guaifenesin), Quantitative analysis with HPLC

In this study, a RP-HPLC method with DAD (Diod Array Detector) of simple, fast, repeatable, sensitive and economic was developed both in pharmaceutical preparations and human plasma for quantitative analysis of Glyceryl Guaiacolate active ingredient widely used in cold medicines.

After the method development, bioanalytical method validation was made. For this, all of the validation parameters such as precision, accuracy, specificity, selectivity and recovery were determined and the results were evaluated statistically.

BÖLÜM 1. GİRİŞ

İlaç, tıpta kullanılan ve biyolojik etkinliği olan (biyoaktif) saf bir kimyasal maddeyi ya da ona eşdeğer olan bitkisel veya hayvansal kaynaklı, standart miktarda aktif madde içeren bir karışımı ifade eder [1]. İlaçlar, tıpta çeşitli hastalıkları önlemek, tedavi etmek veya kontrol altında tutmak amacıyla kullanılırlar.

Biyolojik etkinliğe sahip (biyoaktif) saf bir kimyasal madde (etkin-aktif madde) ile bu maddenin alımını kolaylaştırarak etkisini artıran yardımcı maddelerin belirli oranlardaki karışımından elde edilirler. Yani kısaca ilaçlar iki kısımdan meydana gelir:

1. Etkin (aktif) madde (drog): Canlıda fizyolojik etki gösteren bir veya birkaç kimyasal madde karışımıdır.
2. Taşıyıcı (yardımcı madde): Etkin maddenin hasta tarafından kolay alınabilmesi veya iyi doz edilebilmesi için katılan fizyolojik etkisi olmayan kimyasal maddelerdir (glukoz, parafin, gliserin gibi).

İlaçlar her ne kadar ıstırapları dindiren, hastalık belirtilerini ortadan kaldıran bir araç ve tedavinin vazgeçilmez bir unsuru olsalar da, organizma için dışarıdan verilen yabancı bir madde olduklarını unutmamak gerekir. Ünlü bilgin Paracelsus (1493-1541)'un dediği gibi: 'Her ilaç zehirdir, hiçbir madde yoktur ki zehir olmasın; ilacı zehirden ayıran dozdur.' Önemli olan bu zehirin ne ölçüde, nasıl bir denetimle ve ne amaçla kullanıldığıdır. İlaç doğru ve yerinde kullanıldığında yararlı olabilmekte, aksi takdirde sağlığa olduğu kadar, sosyal ve ekonomik zararlara da yol açabilmektedir [2].

Tedavide kullanılan ilaçlar doğal kaynaklardan ya da sentez yoluyla elde edilir [3].

Doğal kaynaklı ilaçlar:

1. Mineral maddeler: İyot, kükürt ve demir gibi elementler serbest şekilde ilaç olarak kullanılabilirler.
2. Mikroorganizma, Mantar ve Enzimler: Sentez yoluyla elde edilemeyen bazı antibiyotikler bakteri, mantar ve enzimlerden elde edilmektedir.
3. Hayvansal Ürünler: İlk çağlardan beri hayvansal kökenli maddeler ilaç olarak kullanılmaktadır. Değişik soğukkanlı hayvanlardan da insanlarda kullanılan ilaçlar elde edilebilmektedir.
4. Bitkisel İlaçlar: Yapısında azot bulunduran bazik yapıdaki maddelerdir. Bitkisel kaynaklı ilaçlar eskiden tedavide çok kullanılıyorlardı. Ancak, sentetik yolla ilaç elde edilmeye başlanmasıyla birlikte önemlerini yitirmişlerdir.

Günümüzde tedavide kullanılan ilaçların büyük çoğunluğu, farmasötik kimya laboratuvarlarında, sentez yoluyla elde edilmektedir. Doğal yolla elde edilenlere oranla daha ekonomik olmaları ve doğal ilaçlarda görülen yan etkilerin birçoğunun elimine edilmesi, sentez yoluyla ilaç üretilmesinin hızla gelişmesine yol açmıştır.

İlaçlar, farmasötik olarak katı, yarı katı ve sıvı olarak bulunabilirler. Katı ilaçlara toz, kaşe, kapsül, tablet, pastil, sabunlar ve kalem, yarı katı ilaçlara pat, macun , yarı sıvı ilaçlara solüsyon, süspansiyon, emülsiyon, şurup, damla ve sprej örnek verilebilir.

İlaçların sınıflandırılması, kimyasal yapı, etki yeri ve kullanım amacı gibi kriterlere göre yapılmaktadır. Mesela, ağrı kesmek için kullanılan analjezik ilaçlar (analjezi ya da ağrı duyumsamama) veya cerrahi girişime elverişli tam bir duyusuzluk durumu oluşturmak için kullanılan anestezi ilaçları bunlara örnek olarak verilebilir. Ayrıca bunların dışında, soğuk algınlığı, grip gibi çeşitli üst solunum sistemi hastalıklarının tedavisi için kullanılan ilaçlar da bulunmaktadır [4].

Üst solunum yollarında görülen hastalıkların büyük bir bölümünde olduğu gibi, soğuk algınlığında da hastalık virüsleri tarafından oluşur [5].

Soğuk algınlığı ve grip virüsleri, insanlara başlıca iki yol ile bulaşırlar. Bunlardan birincisi ‘damlacık enfeksiyonu’ adı verdiğimiz yoldur. Toplum içindeki bulaşlarda en çok bu yol ile insanların hastalık etkenlerine maruz kaldıklarını görmekteyiz. Damlacık enfeksiyonu tipindeki bulaş şeklinde, virüs kaynağı, başta burun olmak üzere, hasta insanların üst solunum yollarıdır. Bu kişilerin boğaz ve burun salgılarında bulunan virüsler, konuşma, nefes alıp-verme, özellikle de öksürme ve aksırma sırasında çevreye yayılır. Bu şekilde havaya geçen ve gözle görülemeyecek kadar küçük olan damlacıklar, taşımakta oldukları virüsleri sağlam kişilere bulaştırırlar. Hastalık etkenleri taşıyan bu damlacıkların önemli bir özelliği; kapalı ortamlarda (örn; tiyatro, sinema salonları, dersane gibi) yaklaşık 3 saat kadar havada asılı kalabilmeleri ve bu sayede dolaylı yoldan, yani hasta kişiyle doğrudan temas olmaksızın üst solunum yolu enfeksiyonlarının bulaşmasında rol oynamalarıdır.

İkinci bulaşma yolu, hasta kişilerin burun ve boğaz salgılarıyla temas sonucu gerçekleşir. Bu durumda hastalık etkenlerinin yayılmasında, hasta kişilerin ellerine bulaşmış solunum yolu salgılarına temas önem kazanır. El sıkışmak, hastalara ait mendil vb. gibi maddelere dokunmak veya hastaların dokundukları kapı kollarına temas gibi fiiller, hastalığın dolaylı yoldan bulaşmasına örnek olarak verilebilir.

Sıkça rastlanılan hastalıklardan biri olan soğuk algınlığını tedavi etmek amacıyla günümüze kadar pek çok farklı türde (kapsül, tablet, enjeksiyon, şurup v.b.) ilaç üretilmiştir. Bugün için piyasada bulunan ve kullanılan ticari ilaçlardan bazılarını ve özellikle de öksürük şurubu olan cinslerini sıralamak gerekirse:

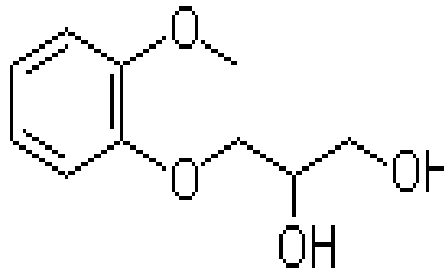
1. Benafed Şurup
2. Benical Şurup
3. Benil Ekspektoran Öksürük Şurubu
4. Benyelin Şurup
5. Bronkoflu Şurup ve
6. Antipeksin Şurubu sıralayabiliriz [6].

Bunların içinde özellikle soğuk algınlığında çokça kullanılan etken maddelerden birisi Gliseril Gayakolat'tır.

1. 1. Gliseril Gayakolat

1.1.1. Fiziksel ve kimyasal özellikleri

3-(2-metoksi-fenoksi)-propan-1,2-diol; gayakol gliseril eter, gaifenezin ve guaifenesin, Gliseril Gayakolat'ın diğer adlarıdır. Kapalı formülü ise $C_{10}H_{14}O_4$ 'dür. Molekül ağırlığı 198,22'dir. Erime noktası 77-81 °C arasında iken, kaynama noktası ise 215 °C (19 mm Hg)'dir [7]. Gliseril Gayakolat'ın yapısal formülü ise Şekil 1.3 'de görülmektedir.



Şekil 1.1. Gliseril Gayakolat'ın açık formülü

1.1.2. Gliseril Gayakolatın farmakolojik etkisi

Gayakolun gliserolle yaptığı, bronş salgısını bezler üzerindeki doğrudan etkisiyle uyaran ve genellikle balgam söktürücü ve anestezik olarak kullanılan ester bileşiğidir. Gliseril Gayakolat, solunum yolundaki mukoza salgısını arttırmak suretiyle birikmiş balgamı sulandırıp yapışkanlığını azaltarak, dışarıya atılmasını kolaylaştırır. Yüksek dozda bulantı, kusma ve uyuşukluğa neden olabilir ve santral kas gevşetici etkisi de vardır. Gayakol da aynı dozda ekspektoran olarak kullanılır. Potasyum gayasulfonat (tiokol) ekspektoran olarak kullanılırsa da insanlarda yapılan denemeler, belirgin bir etkisinin olmadığını göstermiştir.

1.1.3. Endikasyonları

Boğmaca, kızamık, üşütme ve gripal çocuk öksürükleri; akut ve kronik bronşit, anfizem ve bronkospastik solunum yolu hastalıkları ile oluşan reversibl bronkospazmaların septomatik tedavisi; pnömoni, bronkopnömoni, bronşit, trakeit, anfizem, bronşektazi, akciğer sklerozu gibi solunum yolu hastalıkları öksürüklerinin tedavisinde yardımcı olarak; şiddetli olmayan astıma, bronşialde kronik şekilde akut nöbetlerde önleyici olarak; sigara içenlerde, tozlu yerlerde çalışanlarda görülen tahriş öksürüklerinde endikedir.

1.1.4. Kontrendikasyonları

Koroner arter hastalığı, kardiyak aritmisi gibi ciddi kalp hastalığı olanlar, ileri derecede prostat hipertrofililer, hipertansiyonlu tetroksikozlu, dar açılı glokomlu hastalar, serebrovasküler yetmezliği olanlar bu ilacı kullanmamalıdır.

1.1.5. Yan etkileri ve ilaç etkileşimleri

Yüksek dozlarda mide bulantısı, kusma, terleme, taşikardi, idrar zorluğu, yorgunluk hissi ve uykusuzluk yapabilir. Kan basıncında yükselme yapabilir. Ergomtrin, metiergometrin ve oksitosin ile birlikte kullanılması ile hipertansiyon, digitalis glikozitleri ve halotan ile birlikte alındığında kalp ritmi bozuklukları ortaya çıkabilir [2].

1.2. Literatürde Yapılan Çalışmaların Özeti

M.R.Louhaichi et. al. tarafından Psödoefedrin, feniramin, guaifenesin, prilamin, klorfeniramin ve dekstrometorfan karışımını içeren grip ve soğuk algınlığı ilaçlarının kantitatif tayini için geliştirilen yöntemde HPLC kullanılmıştır. Bu bileşiklerin C₁₈ kolonda ayrılması 13 dk'da gerçekleştirilmiştir. Metanol-dihidrojenfosfat tamponundan (pH=3) (45:55, v/v) oluşan izokratik mobil faz sistemi ile çalışılmış ve 220 nm de, 1 mL/dk akış hızında tüm ölçümler alınmıştır. Kalibrasyon işlemleri için elde edilen kalibrasyon doğruları 0,998'den daha iyi korelasyon katsayıları

göstermiştir. Bu bileşiklerin farklı formlardaki grip ve soğuk algınlığı ilaçlarında (şurup, kapsül, tablet ve şase v.b.) rutin analizleri için bu yöntem başarı ile uygulanmıştır [8].

Alaa El-Gindy et. al. Guanifenesin, deskstro metofan HBr, sodyum benzoat, fenil efedrin HCl, klor fenilamin maleat, butil parapen (karışım 1) efedrin HCl ve difenhidramin HCl (karışım 2) içeren çoklu karışımlı iki farklı ilacın HPLC ve spektrofotometrik metotlarla belirlenmesi için yeni bir metot geliştirilmiştir. Karışım 1, asetonitril: 10 mM potasyum dihidrojen fosfat (pH=2,7) (40:60, v/v) içeren mobil faz karışımı bir ODS kolonu kullanılarak 214 nm'de UV detection ile belirlenmiştir. Karışım 2, siyanopropil kolon kullanılarak asetonitril: 12 mM amonyum asetat (pH=5) (40:60, v/v) içeren mobil faz karışımı ile HPLC'de analiz edilmiştir. Sonuçlar, MATLAB 5 kullanılarak PLS-1, PCR kemometrik metotları ile analiz edilmiştir. Ayrıca çift ışınlı UV-visible spektrofotometre ile 2 nm'lik spektral bant genişliği ile 280 nm/dk tarama hızında spektrumlar alınmıştır [9].

Mehdi Ansari et. al. tarafından teofilin ve guaifenesin içeren bir şurup için HPLC, türev spektrofotometrik ve türev ratio spektrofotometrik metotlar geliştirilmiştir. C₁₈ bir kolonda izokratik ters-faz sıvı kromatografisi ile metanol:su (40:60, v/v) (pH=3,0) mobil fazı içerisinde bütün ayırımLar gerçekleştirilmiştir. Kafein internal standardı kullanılarak, 280 nm'de bütün maddeler belirlenmiştir. Kalibrasyon çalışmaları için 6,9-20,1 µg/mL aralığında teofilin ve 3,7-11,1 µg/mL aralığında guaifenesinin kalibrasyon doğruları oluşturulmuştur. En az % 99,5 oranında geri kazanım değerleri elde edilmiştir. Spektroskopik çalışmalar için de bütün ölçümLer 2. Türev spektrofotometrisi ile 1. ve 2. türev ratio spektrofotometresi ile alınmıştır [10].

Xiaoyan Chen et. al. tarafından insan plazmasında parasetamol ve guaifenesinin bir arada belirlenmesi için hassas bir LC-TMS metodu geliştirilmiştir. Dietileter-diklorometan (3:2, v/v) karışımı ile plazma numuneleri ekstrakte edilmiş ve internal standart olarak ozalmid kullanılarak, C₁₈ kolonda numuneler analiz edilmiştir. 0,05-20 µg/mL parasetamol için ve 5-2000 ng/mL guaifenesin için konsantrasyon aralığı

için seçilmiştir. Metot başarılı olarak çoklu karışimli oral bir tablete uygulandıktan sonra farmakokinetik bir çalışma gerçekleştirilmiştir [11].

Mochammed Yuwono et. al. tarafından öksürük ve soğuk algınlığı tabletleri ve şuruplarında asetaminofen, fenolpropanolamin, hidroklorit, guaifenezin, klorfeniramin maleat, dektrometorfan karışımının eş zamanlı belirlenmesi için hızlı bir GC metodu geliştirilmiştir. Analitin ekstraksiyonundan sonra, etil asetat ile 2 µl ekstrak erimiş silika kapiler bir CBP1-M25-025 kolon barındıran bir GC' ye enjekte edildi. Kolon sıcaklığı 150 °C'de 5 dakika tutulduktan sonra önce 3 °C/min hızla 175 °C'ye daha sonra 10 °C/min hızla 270 °C'ye çıkarılmıştır. Enjektör ve alev iyonlaşmalı dedektörün sıcaklığı ise 300 °C'de tutulmuştur. Bu GC metodu ile pahalı olmayan, hızlı ve iyi bir doğruluk sağlanmıştır. Bu nedenle farmasötik şirketlerin kalite kontrol laboratuvarlarındaki tablet ve şurupların rutin analizlerinde kullanılabilir [12].

Bu çalışma ile literatürde mevcut olan çalışmalardan farklı olarak Gliseril Gayakolat'ın (Guafenesin) ticari preparatlarda miktar tayini gerçekleştirilmiştir. Bu maksatla, Gliseril Gayakolat içeren ticari bir ilacın (200 mg/15 mL Gliseril Gayakolat içeren Vapo ekspektoran şurup), metanol çözücü ortamında stok çözeltileri hazırlanarak, bu stok çözeltilerden bir seri standartlar hazırlanmış ve kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur. Farmasötik preparatlarda (şurup dozaj şekillerinde) ve aynı zamanda insan plazması numunelerinde, in-vitro olarak (canlı dışında) numuneler üzerlerine spike edilerek (şırınga ile üzerine katarak) yapılan bu yeni miktar analizi çalışması ile basit, ekonomik, hızlı, kesin, spesifik, tekrarlanabilir ve hassas bir DAD dedektörlü ters faz-HPLC (Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi) metodu geliştirilmiştir. Daha sonra, geliştirilen bu yöntemin plazma düzeylerinin istatistiksel olarak karşılaştırılarak değerlendirmesi için de, biyoanalitik yöntem validasyonu yapılmıştır. Geliştirilen metot, ticari preparatlarda bulunan Gliseril Gayakolat'ın çözücü ortamında ve insan plazmasında RP-HPLC-DAD metodu ile gerçekleştirildiği literatürdeki ilk çalışmadır. Ayrıca literatürde bugüne kadar, sadece bu etken maddenin HPLC ile tek başına analiz edildiğine ve plazma ortamında sıvı-sıvı ekstraksiyonsuz bir miktar analizi çalışması yapıldığına rastlanılmamıştır.

BÖLÜM 2. MATERYAL ve YÖNTEM

2.1. Biyoyararlanım ve Biyoeşdeğerlik

Biyoyararlanım, sistematik etki yapması için bir ilaçtan vücudun ne kadar yararlandığının somut bir ölçüsüdür [8]. Aynı zamanda, biyoyararlanım bir ilacın uygulanan dozaj şeklinden, genel dolaşıma geçiş hız ve derecesi olarak da ifade edilir. Biyoyararlanım standartlarının ve testlerinin temel amacı, önerilen ilacı alan bir hastanın, gerçekten önerilen ilacı, önerilen dozda ve önerilen sınırlar içerisinde aldığından emin olmak için yapılır [13].

Biyoeşdeğerlik ise aynı etken maddeyi veya maddeleri içeren iki farklı müstahzarın, bu madde veya maddelerin aynı miktarını, aynı türden farmasötik şekil içinde veya karşılaştırılabilir standartlara uyan farmasötik şekil türleri içinde içermeleri koşuluna bağlıdır [14]. Biyoeşdeğer ilaç, aynı deneysel koşullarda, tek doz veya çok doz olarak, aynı molar dozda uygulandığında, biyoyararlanımları (absorbsiyon hız ve derecesi) arasında anlamlı bir fark olmayan farmasötik eşdeğer ve farmasötik alternatif dozaj şekilleridir. Absorbsiyon dereceleri aynı veya kıyaslanabilir olmasına karşın absorpsiyon hızları farklı olan ilaçlarda, absorpsiyon hızlarındaki farklar terapötik yönden maksatlı yapılmış ve önemli değil ise, etiketinde de bu konuda açıklama bulunması koşulu ile terapötik olarak eşdeğer kabul edilebilir.

2.2. Validasyon

Validasyon, ürün kalitesine etki edebilecek tüm imkân ve işlemlerin önceden belirlenmiş spesifikasyonları sağlayacak şekilde işlendiğini garanti altına almak amacıyla yürütülen çalışmalardır [15].

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:

1. Temizlik yöntemleri validasyonu
2. Analitik yöntem validasyonu
3. Makine / Cihaz validasyonu
4. Proses validasyonu

Temizlik işleri validasyonu; imalat 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.

Cihaz validasyonu; cihazın doğru bir şekilde çalışıp çalışmadığını, fonksiyonlarını doğru bir şekilde yerine getirip getirmediğini gözlemlemek amacıyla yapılan çalışmalardır.

İlaç proses validasyonu; spesifik olarak bir ürünün araştırma kademesinden son ürün haline gelene kadar geçen sürede yapılan validasyondur [16].

2.3. Analitik Yöntem Validasyonu

Analitik yöntem validasyonu uygulanması düşünülen analitik yöntemin kabul edilebilirliğini, doğruluğunu kanıtlamak ve analitik prosedürün kantitatif ve kalitatif olarak doğru sonuçlar verdiğini belirleyen sonuçlar elde etmektir.

2.3.1. Analitik yöntem validasyon parametreleri

Validasyon parametreleri metodun uygulama amacına ve kapsamına bağlı olarak belirlenmelidir:

1. Seçicilik (spesifiklik)
2. Doğrusallık
3. Çalışma aralığı
4. Doğruluk ve geri kazanabilirlik
5. Kesinlik (tekrarlanabilirlik)
 - a. Laboratuvar içi tekrarlanabilirlik
 - b. Laboratuvarlar arası tekrarlanabilirlik
6. Tutarlılık
7. Tanıma limiti (LOD)
8. Miktar tayini limiti (LOQ)
9. Güvenilirlik

Bu parametreler birçok farklı araştırma grubu tarafından ve uluslararası komiteler tarafından tanımlanmış, literatürlerde ayrıntılı bir şekilde açıklanmıştır.

2.3.1.1. Seçicilik/Spesifiklik

Yöntemin seçiciliği; analiti, örnekte varlığı tespit edilmiş analit ile girişim yapabilen diğer bileşenlerden farklı olarak ölçme yeteneğidir. Örnek matriksinde bulunması gereken bileşenlerin yanında analiz edilecek maddelerin doğru ve özgün belirlenebilmesi, analitik yöntemlerin seçimliliğini belirler.

2.3.1.2. Doğruluk ve geri kazanabilirlik

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

1. Referans yöntemi ile numune yönteminin karşılaştırılması bir yoldur. Bu yaklaşımda, referans yönteminin belirsizliği bilinmektedir.
2. 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 matriksine konsantrasyonu bilinen hacimde ve ağırlıkta analit eklenir. Sonra matriksten, 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 matriksine, işleme konulan örneğe ve analit konsantrasyonuna bağlıdır. Bu doğruluk değerlendirilmesi, numune preparatın etkinliğini ölçmektedir.

2.3.1.3. Kesinlik

Yöntemin kesinliği, herhangi bir değer in tekrarlanabilme kabiliyeti veya bireysel test sonuçlarının birbirine yakınlığının bir derecesidir. Yöntem kesinliği, standartların onayladığı bir dizi farklı ölçümün test sonuçlarına etkisidir. Kesinlik için kabul edilen kriter analizin tipine dayanır. Eczacılıkta, kalite kontrol analizi için bağlı

standart sapma % 1'den daha iyi olan kesinlik kolaylıkla başarılabilirken, biyolojik örnek için % 15'den fazla ve diğer konsantrasyon seviyelerinde ise % 10 bağıl standart sapma ile kesinlik sağlanabilir. Çevresel ve besin örneklerinde kesinlik, daha çok örnek matrisine dayanır. Ayrıca kesinlik, analit konsantrasyonuna, analiz tekniğine bağlı olup, bağıl standart sapma % 2 ve % 20'den fazlaya kadar çeşitlilik gösterebilir.

Tekrarlanabilirlik, aynı kişi tarafından aynı şartlarda kısa zaman zarfında sabit bir örneğin belli bir yöntem kullanılarak yapılan bir dizi işlemin, kesinliği olarak tanımlanır. Tekrarlanabilirlik, aynı zamanda kesinliğin bir göstergesidir. Üç farklı matrikste en azından 5 veya 6 tayin, 2 veya 3 farklı konsantrasyonda yapılmalı ve yakın standart farklılığı hesaplanmalıdır.

2.3.1.4. 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.

2.3.1.5. Tanıma limiti (Limit of Detection)

Saptanan fakat miktarının ölçülmesinin gereksiz olduğu numunedeki etken maddenin % 95 ya da % 99 güvenirlilik 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.

2.3.1.6. Miktar tayin limiti (Limit of Quantitation)

Bir maddenin % 95 güvenirlilik 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. Kromatografi de ise kesin ölçüm veren minimum enjeksiyon miktarı olduğu belirlenmiştir. Kromatografide tipik olarak zemin gürültüsünden 10-20 katı daha yüksek bir pik gerektirdiği belirlenmiştir.

2.3.1.7. Güvenilirlik

Güvenirlik testleri, yöntemde ufak değişiklikler yapıldığı zaman sonuçların yine de uygun olduğunu göstermek için yapılmıştır. Örneğin; sıvı kromatografisinde akış hızı, dedektör dalga boyu veya mobil faz bileşiminin gerçek değerinden toleranslar ölçüsünde sapması sonucu, analizlerin bu saptamalardan ne kadar etkilenip etkilenmediği tespit edilmiştir. Kromatografik parametrelerde güvenilirlik belirlenmesi için akış hızı, kolon sıcaklığı, enjeksiyon hacmi, dedektör dalga boyu ya da mobil faz bileşimi yani çalışma aralığının içindeki değişken veya değişkenlerin kantitatif etkisi belirlenmiştir. Eğer parametrenin etkisi önceden belirlenmiş tolerans içinde ise, bu parametrenin yöntemin güvenilirlik aralığında olduğu saptanmıştır. Bu etkilerle karşılaşıldığı zaman yöntemin yeniden validasyonunun gerekliliğinin olup olmadığı belirlenmiştir. ICH dökümanlarına (Uluslararası Harmonizasyon Konferansı) göre ilaç geliştirme aşamaları sırasında yöntem üzerinde güvenilirlik değerlendirilmesinin düşünülmesi tavsiye edilmiştir [16].

Tablo 2.1. 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	+	+	-	*
Kesinlik	+	+	*	+
Tutarlılık	+	+	+	+
Tanıma limiti	+	+	+	*
Miktar tayini limiti	+	+	+	*

(*) Spesifik testlere bağlı olarak gerekirse yapılır.

2.4. Materyaller

2.4.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Bu çalışmada, tüm testleri yapılmış (saflık, erime noktası, çözünürlük v.s.) sertifikalı saf Gliseril Gayakolat standart etken maddesi, bu etken maddeyi içeren (200 mg/15 mL) ticari Vapo Ekspektoran şurup ve internal standart olarak da Sibutramin etken maddesi kullanılmıştır.

Kromatografik yöntem için HPLC grade-Merck metanol, KH_2PO_4 (Sigma-Aldrich), H_3PO_4 ve deiyonize su kullanılmıştır. Plazma çalışmalarında kullanılan dondurulmuş insan plazması ise sağlıklı bir gönüllüden temin edilmiştir.

2.4.2. Kullanılan cihazlar

HPLC çalışmaları için bir Samsung Computer'e, FCM güç kaynağına bağlı, 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 fırınından ve LC Solution programından oluşan SHIMADZU marka HPLC sistemi kullanılmıştır.

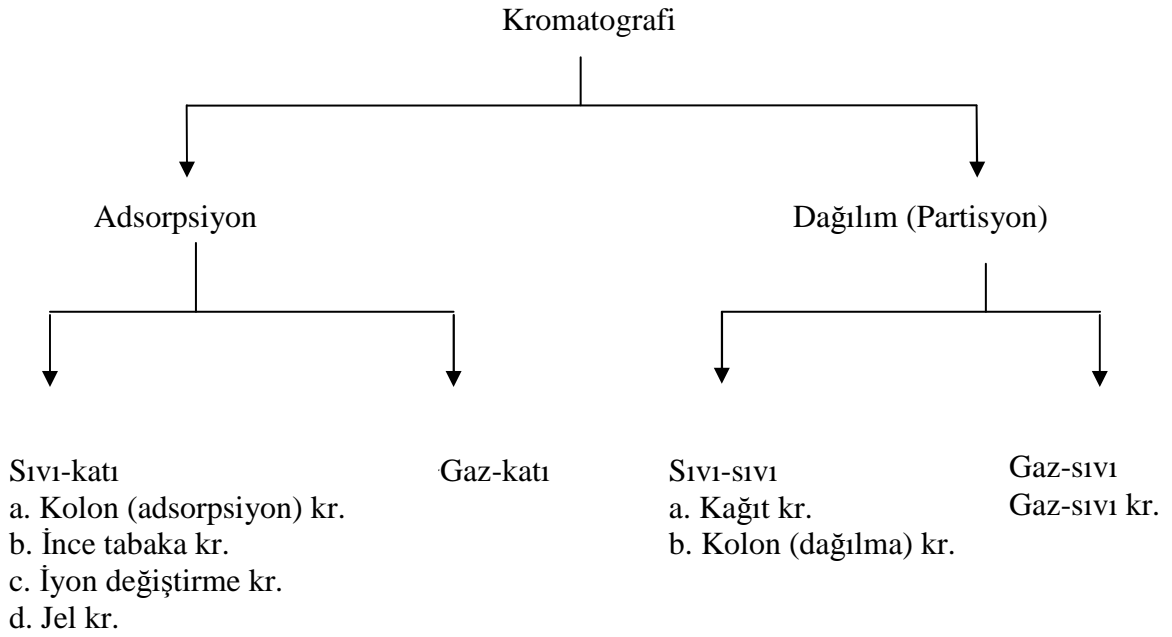
Bütün bu cihazların yanı sıra, buzdolabı (Arçelik), hassas terazi (AND GR-200), vorteks karıştırıcı (Votex 2 GENIE), vakum pompası (Rocker 300), 0,45 µm selüloz nitrat membran filtre (Sartorius Stedim Biotech), pHmetre (HANNA), santrifüj (nüve-NF200, ROTINA 420-Hettich), otomatik pipet (BIOHIT PROLINE), etüv (nüve-FN 120), ultrasonik banyo (Bandelin Sonorex), 12x32 mm 2 mL silikon septum kapaklı autosampler cam vial kiti (National Scientific CERT4000), Inertsil ODS-2 GL Sciences Inc. 5 µm (4,6x250 mm) 18C ters-faz kolonu ve plastik vial filtreleri (CHROMACOL) kullanılmıştır.

2.5. Kromatografik Yöntem

Kromatografi, birbirine yakın özellikteki madde karışımlarını ayırmak için kullanılan güçlü bir ayırma ve saflaştırma yöntemidir. Genel tanımı ise, bir karışımın sabit bir faz üzerinde (gözenekli), hareketli bir çözücü yardımıyla, karışımı oluşturan bileşiklerin farklı hareketleri sonucu bileşenlerine ayrılması olarak tanımlanır. Kromatografide sabit ve hareketli olmak üzere iki faz vardır. Sabit faz, katı ve sıvı hareketli faz ise sıvı ve gaz olabilir. Ayrımı istenen karışım hareketli faz yardımıyla sabit faz üzerinden geçirilir. Karışımı oluşturan bileşikler sabit faz tarafından farklı ölçüde tutulması nedeniyle her bir bileşik, sistemi farklı zamanlarda terk eder. Böylece bileşikleri birbirinden ayırmak, tanımak ve ayrı ayrı toplamak olasıdır.

Kromatografi farklı şekillerde sınıflandırılabilirse de, esas olarak adsorbsiyon (yüzeyde tutma) ve partisyon (dağılıma) mekanizmaları üzerinden yürür.

Kromatografik sistemleri aşağıdaki şema ile de gösterebiliriz:



2.5.1. Kromatografi Mekanizmaları

2.5.1.1. Adsorpsiyon Kromatografisi

Katı veya sıvı moleküllerin, sıvı veya gaz moleküllerini çekim kuvvetleri yardımıyla yüzeyde tutmasına adsorpsiyon denir. Burada sözü edilen adsorpsiyon, fiziksel adsorpsiyondur. Zayıf van der Waals, elektro statik çekimler ve dipol-dipol etkileşimlerine dayanır ve tersinirdir.

Adsorpsiyon kromatografisinde ayırım, karışımı oluşturan farklı bileşiklerin sabit faz yüzeyinde değişik derecede adsorbe olmaları ilkesine dayanır. Sabit faz katı, hareketli faz sıvı veya gazdır. Sabit faz olarak alümina (Al_2O_3), silikajel (SiO_2), talk ve bunun gibi gözenekli maddeler, hareketli faz olarak ise alkol, aseton, kloroform gibi bütün organik çözücüler kullanılabilir. Sabit ve hareketli fazın seçimi, ayırımı yapılacak bileşiklerin polaritesine kimyasal özelliklerine bağlı olarak yapılır. Genelde polar maddeler için polar çözücüler, apolar maddeler için de apolar çözücüler kullanılır.

Çeşitli maddelerin adsorblayıcılığı veya sabit faz üzerinde adsorblanma dereceleri farklı olduğundan, farklı yerlerde toplanırlar. En fazla adsorblanan maddelerin sürüklenmesi ve hareketleri daha zayıf ve daha yavaş, tersine az adsorblananların hareketleri ve sürüklenmeleri de hızlı olur.

2.5.1.2. Dağılım (Partisyon) Kromatografisi

Dağılım, bir karışımdaki maddelerin birden fazla çözücü içerisindeki çözünürlükleri oranında dağılmasıdır. Bu, çözücünün ve maddenin özelliklerine bağlı bir fonksiyondur.

Bu kromatografide ayırım, çözünürlük esasına göre karışımın sabit ve hareketli faz arasındaki dağılımına dayanır. Bu yöntemde, sabit sıvı faz, yüksek yüzey alanlı gözenekli bir katı destek maddesine emdirilmiştir. Hareketli faz ise sıvı veya gazdır. Ayırımı gerçekleştirilecek bileşikler, hareketli ve sabit faz sıvılarında farklı çözünürlükler. Çözünürlük farkından dolayı, bileşikler sistemi önce veya sonra terk ederler. Çözünürlüğü sabit fazda olan bileşikler sistemde daha uzun süre tutulduğu için sistemi daha geç terk ederler.

2.5.2. Kromatografik yöntemlerin hareketli ve sabit fazın cinsine göre sınıflandırılması

2.5.2.1. Kağıt kromatografisi

Uygulaması en basit ve en çok kullanılan yöntemlerden biri olan kağıt kromatografisi genellikle süzgeç kağıtları kullanılarak yapılır. Burada etkin mekanizma dağılımadır. Çünkü dağılıma kromatografisindeki sabit fazın yerini burada özel olarak yapılmış olan İngiliz Whatman, Alman Schleicher ve Schull v.b gibi markalardan oluşan bir süzgeç kağıdı almaktadır. Süzgeç kağıdı suyu çok kolay ve kuvvetle adsorbladığından yapılarında doğal olarak bir miktar su içerir ve sabit sıvı faz rolünü oynar. Kağıda uygulanan maddeler karışımının birbirlerinden ayrılmaları, kağıt üzerinde hareket eden çözücüyle kağıdın içerdiği su arasındaki dağılıma farkına bağlıdır.

Analizi yapılacak madde çözelti halinde olmalı ve katılar uygun bir çözücüde çözünmelidir. Çözeltiler belli bir konsantrasyonda olmalıdır, en az % 1'lik çözelti kullanılmalıdır.

Kağıt kromatografisinde analiz şöyle yapılır: Analizi yapılacak madde çözeltisinden ince cam kapiler ile bir miktar alınıp, istenilen ebatta kesilen whatman ya da diğer marka kromatografi kağıdının altından küçük lekeler halinde damlatılır. Kağıda hareketli fazın ilerleme sınırı işaretlenir. Hareketli faz çözücüsü, karışımdaki maddelerin yapısına ve tecrübelerle dayanılarak seçilir. Kağıt çözücüyü emer ve çözücü kağıt üzerinde ilerlerken lekenin içerdiği farklı bileşikler farklı yerlere kadar taşır. Maddeler renkliyse, lekeler kolaylıkla görünür. Renksiz bileşikler görülemeyeceği için karışımdaki bileşiklerle renk verecek özel ayıraçlar kağıda bir spreyle püskürtülür veya UV lambası altında bakılır.

Ayrılan maddeler görülür hale getirildikten sonra çözücü yardımıyla madde içerisindeki farklı bileşiklerin belli noktalara ilerlediği gözlenir. Her maddenin hareketli faz ile sürüklenmeleri farklıdır. Böylece her madde için uygulanan koşullar belirtilerek karakteristik değerler verilebilir. Buna sürüklenme derecesi veya alıkonma faktörü denir ve R_f ile gösterilir.

$$R_f = \text{Maddenin ilerlediği uzaklık (cm)} / \text{Çözücünün ilerlediği uzaklık (cm)} = a / b$$

R_f , bir madde için aynı sabit faz ve aynı çözücü için sabittir. Önceden belirlenen R_f değerleri ile bilinmeyen çözelti içerisinde hangi maddelerin bulunduğu belirlenebilir.

2.5.2.2. İnce tabaka kromatografisi

İnce tabaka kromatografisi, yapılış tekniğine göre kağıt kromatografisine benzer. Bu kromatografi türünde sabit faz olarak silikajel (SiO_2), alüminyumoksit (Al_2O_3), toz selüloz gibi maddeler kullanılır. Burada etkin mekanizma adsorbsiyondur.

İTK'de özel olarak hazırlanmış cam, alüminyum veya plastik levhalar kullanılır. Bu levhaların üzeri silikajel, alümina gibi bir adsorbanla kaplanmıştır. Bu plakalar hazır

olarak satılabildiği gibi laboratuvarında da hazırlanabilir. Cam levhaların boyutları 5x20 cm ile 20x20 cm arasında değişir. Adsorblayıcı tabakanın kalınlığı yapılacak analizin cinsine göre değişir ve bu kalınlık 0,25-2 mm arasındadır. Plakalar kullanılmadan önce 110°C'deki etüvde 2 saat kurutularak aktifleştirilir ve hemen kullanılır.

Örneklerin plakalara uygulanması ve geliştirme, kağıt kromatografisinde olduğu gibidir. İnce tabaka kromatografisinde geliştirme aşağıdan yukarıya doğru yapılır. Plakanın tanka yerleştirilmesinden önce tank atmosferinin çözücü buharıyla doymuş olmasına dikkat edilir. Ayrılan maddelerin lekelerinin belirlenmesi ve kullanılan reaktifler kağıt kromatografisinde olduğu gibidir.

2.5.2.3. Kolon kromatografisi

Kolon kromatografisi ilk uygulanan kromatografik yöntemdir ve kromatografinin başlangıcıdır. Bu kromatografide sabit faz olarak silikajel (SiO_2), selüloz, alüminyumoksit (Al_2O_3), zeolit, kalsiyum karbonat vb. gibi aktif yüzeyli maddeler, hareketli faz olarak da organik çözücüler kullanılır. Bu yöntemde ayrımı yapılacak karışım uygun bir çözücüde çözülerek bir kolon içine doldurulmuş katı sabit fazdan geçirilir. Kolonda bileşenler sabit faz tarafından adsorblanırlar. Sonra ayrılacak karışımın çözüldüğü çözücü ya da farklı polaritedeki çözücü veya çözücü karışımları kolondan geçirilerek bileşenler kolonun altından ayrı ayrı alınır. Çözücüsü buharlaştırılarak saf madde elde edilir.

2.5.2.4. Gaz kromatografisi

Gaz kromatografisi, diğer kromatografiler gibi bir karışımında bulunan maddeleri ayırmaya yarar. Diğer kromatografilere göre avantajı sonuçların çabuk elde edilmesi ve ucuz olmasıdır. Gaz kromatografisi ikiye ayrılır:

Gaz-Katı Kromatografisi: Bu kromatografide de iki faz vardır. Sabit faz olarak yarıçapı küçük uzun bir kolon içine yerleştirilmiş geniş yüzeyli dolgu maddeleri (adsorban: silikajel, alümina vb.), hareketli faz olarak da dolgu maddelerinin

arasından kolaylıkla geçebilen gaz kullanılır. Genellikle taşıyıcı gaz olarak azot veya helyum gazları kullanılır.

Gaz-Sıvı Kromatografisi: Burada sabit faz, gaz-katı kromatografisindeki geniş yüzeyli dolgu maddelerine emdirilmiş bir sıvı (yüksek mol kütleli polimerler) ve hareketli faz gazdır.

Gaz kromatografi aleti oldukça basittir. Sistem belli başlı 6 kısımdan oluşur. Ayırımı 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 her bir 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.

2.5.2.5. Sıvı kromatografisi

Yukarıda anlatıldığı gibi, hareketli fazı sıvı olan kromatografi çeşitleri; dağılma kromatografisi, adsorpsiyon kromatografisi veya sıvı-katı kromatografisi, iyon değişimi kromatografisi ve boyut eleme ve jel kromatografisidir.

Tswett'in orjinal çalışmaları da dahil ilk sıvı kromatografisi, çapı 1-5 cm ve uzunluğu 50-500 cm olan cam kolonlarda uygulanmıştır. Uygun akış hızları temin etmek için, katı sabit fazı oluşturan partiküllerin çapı, genellikle 100-150 µm aralığındaydı. Bu durumda bile, akış hızları düşüktü. Ayırma zamanları çok uzundu ve çoğu zaman birkaç saat alıyordu. Bu klasik kromatografik işlemlerini hızlandırmak için vakum veya basınç uygulama girişimleri de ayırma veriminin düşmesinden dolayı yararlı olamadı. Sıvı kromatografinin geliştiği ilk yıllarda, bilim adamları, kolon veriminin, dolguda kullanılan tanecik boyutunun azatılması ile

önemli ölçüde artacağını göstermişlerdir. Bu teknoloji, klasik yer çekimi-akışlı sıvı kromatografisinin basit cam kolonlardaki durumunun aksine, yüksek basınçta çalışan, gelişmiş cihazlara ihtiyaç göstermekteydi. Böylece YPSK ya da HPLC (Yüksek Performanslı (Basınçlı) Sıvı Kromatografisi-High Performance Liquid Chromatography) ismi, preparatif amaçla kullanılan temel yöntemlerden, daha yeni işlemleri ayırt etmek için kullanılmaya başlandı.

HPLC, bütün analitik ayırma teknikleri arasında en yaygın kullanılanıdır. Yöntemin bu kadar yaygın olmasının sebepleri, duyarlılığı, kantitatif tayinlere uygulanabilir olması, uçucu olmayan türlerin veya sıcaklıkla kolayca bozulabilen türlerin ayrılmasına uygun olması ve sanayinin, birçok bilim dalının ve halkın birinci derecede ilgilendiği ilaçlar ve gıda bileşenleri gibi maddelere geniş bir şekilde uygulanabilirliğidir.

2.5.3. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC)

Tanecik büyüklüğü ve polaritesi gibi özellikleri farklı ve çözücünün içinden kolaylıkla geçebileceği gözenek büyüklüğüne sahip olan katı bir destek maddesine sahip bir kolon içerisinde hareket kabiliyetlerine bağlı olarak bir karışımdaki maddeleri birbirinden ayırmak mümkün olabilmektedir. Kolon destek maddesinin tanecik boyutu küçüldükçe, çözücünün hareket edebileceği gözenek büyüklüğü de küçülmektedir. Hareketli fazın katı destek maddesi üzerinden kolaylıkla hareketini sağlayabilmek için uygun basıncın uygulanması gerekmektedir. Bu ihtiyaçtan dolayı Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (HPLC) geliştirilmiştir. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisinde hareketli faz sıvı, durgun faz ise katı veya katı destek maddesi üzerine tutturulmuş sıvı fazdır.

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi yöntemi, bütün analitik ayırma teknikleri arasında en yaygın olarak kullanılanıdır. Yöntemin bu kadar yaygın olmasının sebepleri, duyarlılığı, doğruluğu, kesinliği ve seçiciliğinin yüksek olması, kantitatif analizlere kolaylıkla uyarlanabilir olması, uçucu olmayan türlerin veya sıcaklıkla kolayca bozunabilen türlerin ayrılmasında uygun olması ve hepsinden de önemlisi sanayinin, birçok bilim dalının ve halkın birinci derece ilgilendiği maddelere geniş

bir şekilde uygulanabilirliğidir. Bu gibi maddelere örnek olarak; amino asitler, proteinler, nükleik asitler, hidrokarbonlar, karbonhidratlar, ilaçlar, terpenoidler, pestisitler, antibiyotikler, steroidler, metal-organik türler, çeşitli organik bileşikler sayılabilir. Kısacası, uygun dedektör, uygun kolon ve uygun hareketli faz olduğu sürece bütün kimyasal maddelerin ayrılmasında ve analizinde HPLC kullanılabilir.

2.5.4. Sıvı kromatografisinin dayandığı temel parametreler

2.5.4.1. Dağılma (Partisyon) katsayısı

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 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 ve;

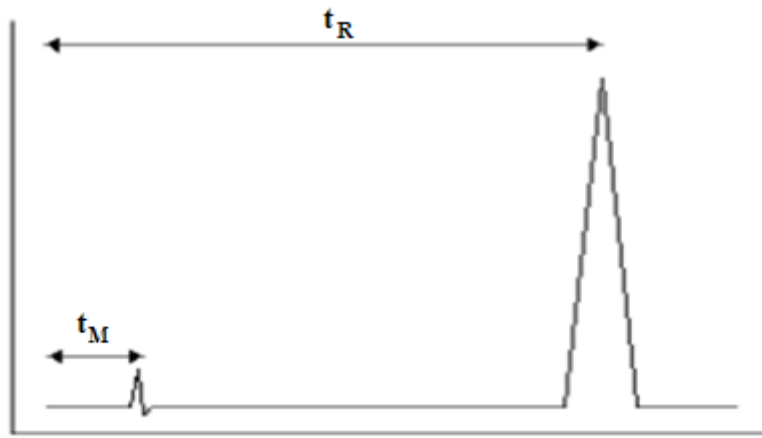
$$K = C_s / C_m \quad (2.2)$$

şeklinde gösterilir. Burada C_s , analitin durgun faz içindeki molar derişimi, C_m ise analitin hareketli faz içindeki molar derişimidir. İdeal olarak çözünen madde derişimlerinin geniş aralıkta dağılma oranı sabittir. Diğer bir deyişle; C_s doğrudan C_m ile orantılıdır.

2.5.4.2. Alıkonma (Retensiyon) zamanı

Şekil 2.1.'de tek bir analit içeren numune için tipik bir kromatogram verilmiştir. Kromatogram, dönüştürülmüş iki sinyalin oranının logaritmasının zamana karşı

çizilen grafiğinden meydana gelmiştir. Numune enjeksiyonundan sonra gelen pik için, pik süresi ölü zaman olarak adlandırılır ve t_M 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. Şekilde 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 2.1. Tek bileşenli bir karışım için tipik bir kromatogram

Analitin kolon içerisinde hareketi esnasında ortalama göç hızı V ;

$$V = L / t_R \quad (2.3)$$

olarak verilir; L kolon dolgusunun uzunluğudur. Benzer şekilde hareketli faz moleküllerinin ortalama doğrusal hızı U , şöyle verilir;

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

2.5.4.3. Analitin göç hızı ve kapasite faktörü

Kapasite faktörü k' : çözünen maddelerin kolonda göç hızlarını tanımlamakta yaygın olarak kullanılan önemli bir parametredir:

$$k' = (t_R - t_M) / t_M \quad (2.5)$$

t_R ve t_M 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. Kapasite faktörü, hareketli faz ve durgun faz bileşimlerinin değiştirilmesiyle ayarlanabilir. Her maddenin kendine özgü bir kapasite faktör değeri vardır.

2.5.4.4. Seçicilik faktörü ve farklı göç hızları

Bir karışımdaki analitlerin kapasite faktörlerinin oranı, seçicilik veya ayırım faktörü olarak adlandırılır. Bir kolondaki analitlerin seçicilik katsayısı, bir kolonun söz konusu maddeleri ne kadar iyi ayıracağına bir ölçüsüdür. Bir karışımda bulunan A ve B maddeleri bir kolonda ayrılmaya çalışılınsın. Bu sistem için seçicilik faktörü α , şu şekilde tanımlanır:

$$\alpha = K_B / K_A \quad (2.6)$$

K_A : Daha az kuvvetle tutunan veya daha hızlı olarak kolondan elue edilen A maddesi için dağılma katsayısı, K_B : Daha kuvvetli tutunan B maddesi için dağılma katsayısıdır. Bu eşitlik ile α , daima birden büyüktür. Deneysel bir kromatogramdan α 'yı belirlemek için aşağıdaki eşitlik kullanılmaktadır:

$$\alpha = [(t_R)_B - t_M] / [(t_R)_A - t_M] \quad (2.7)$$

2.5.4.5. Ayırım gücü (Rezolüsyon, R_S)

Ayırım, kantitatif kromatografi çalışmalarının başlıca gerekliliğidir. Genellikle 5 veya daha az madde içeren numunelerde bu değer 1,5'dan büyük olması kolaylıkla

sağlayabilir. Bu sonuç, maksimum kesinliğin göstergesidir. Ayırım gücü, bir kolonun eskiliğini, günler arası ayırım şartlarındaki değişiklikleri gösterir.

$$R_s = \frac{2(t_2 - t_1)}{W_1 + W_2} \quad (2.8)$$

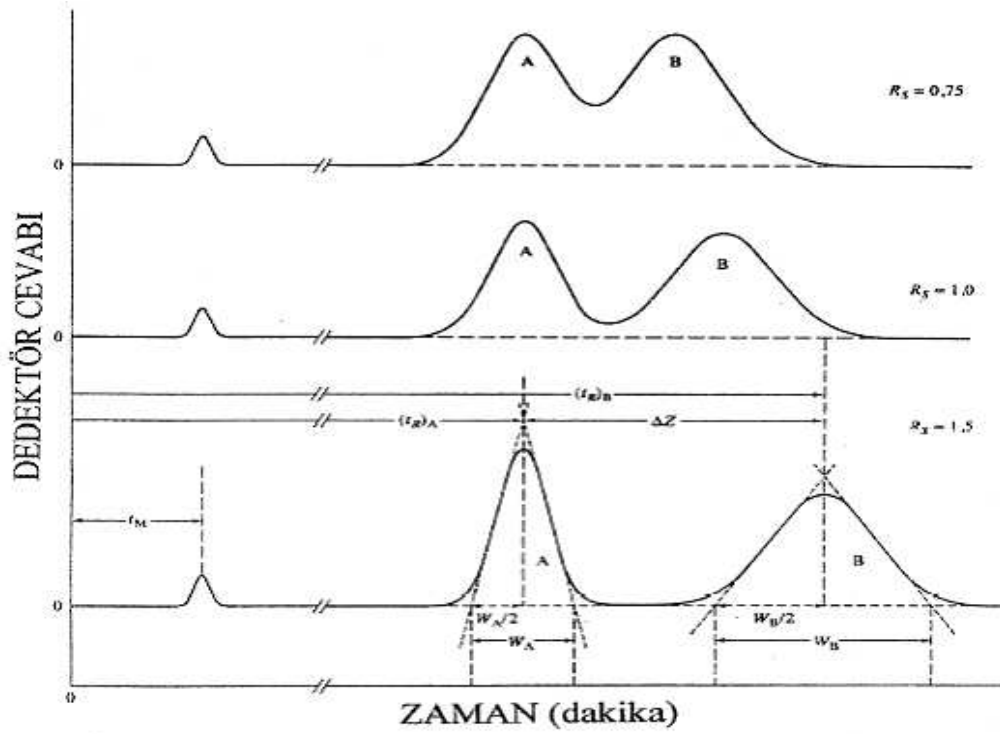
t_1 : 1. maddenin alıkonma zamanı

t_2 : 2. maddenin alıkonma zamanı

W_1 : 1. maddenin taban genişliği

W_2 : 2. maddenin taban genişliği

Genel ayırımlarda bu değer 2'nin, miktar tayini çalışmalarında 1,5'un, biyolojik sıvılardan yapılan çalışmalarda ise 1,2'nin üstünde olması kabul edilebilir değerlerdir.



Şekil 2.2. Rezolüsyon faktörünün kromatogramlara göre değişimi

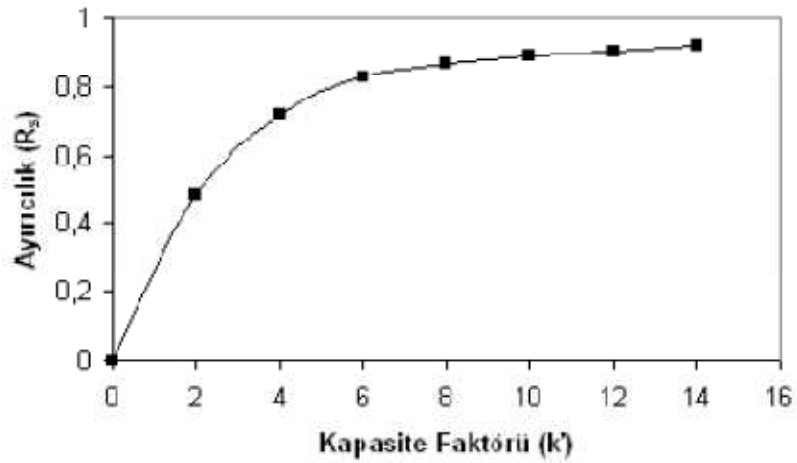
Nicel analizler için pikler arasındaki ayırıcılığın (rezolüsyon) 1,5'den büyük ($R_s \geq 1,5$) olması önerilir.

Aşağıdaki formüle göre ayırıcılığı etkileyen üç faktör; seçicilik (α), tabaka sayısı (N) ve kapasite faktörü (k')'dür.

$$R_s = 1/4 \cdot \left[\frac{(\alpha - 1)}{\alpha} \right] \cdot \left[\frac{k'}{(k'+1)} \right] \cdot \sqrt{N} \quad (2.9)$$

Etkinliğin ayırıcılık üzerine etkisi; etkinlik faktörü, akış hızı, kolon uzunluğu veya dolgu maddesinin tanecik boyutu ile değişir. Ayırıcılık, N 'nin karekökünün bir fonksiyonu olduğu için N 'deki büyük artışlar, ayırıcılıkta küçük değişiklikler meydana getirir. Etkinlik arttıkça, ayırıcılık da artar ve dar pikler elde edilir.

Kapasite faktörünün ayırıcılık üzerine etkisi; kapasite faktörünün (k'), ayırıcılığa etkisi Şekil 2.3.'de verilmiştir. Grafikten de anlaşılacağı gibi $k' = 0$ olduğunda ayırım yoktur, ayrıca k' değeri arttıkça, $k' / (k'+1) \rightarrow 1$ 'e yaklaşır ve kapasite faktöründeki artışın ayırıcılığa etkisi kalmaz. k' değerini daha fazla arttırmak, sadece alıkonma zamanını arttırır. Optimum k' değerleri 1-10 arasındadır.



Şekil 2.3. Kapasite faktörünün ayırıcılık üzerine etkisi

2.5.4.6. Kolon verimi

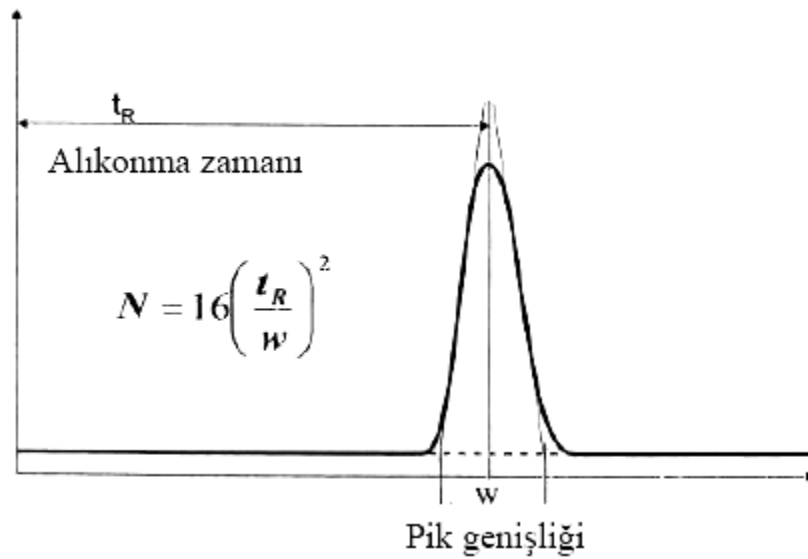
Başarılı bir kromatografinin amacı verimli bir ayırım ve dar bir kromatografik bant elde etmektir. Kromatografik kolon verimliliklerinin kantitatif ölçümünde birbiriyle bağıntılı iki terim sıkça kullanılır:

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

Bu ikisi arasındaki bağıntı aşağıdaki eşitlikle verilir:

$$N = L / H \quad (2.10)$$

Burada L, kolon dolgusunun uzunluğudur (cm). Bir kolonda tabaka yüksekliğinin azalması ve teorik tabaka sayısının artmasıyla kolon verimliliği 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.



Şekil 2.4. Teorik tabaka sayısı hesabını gösterir kromatogram

Martin ve Syng'e'in kromatografik bir kolonun birçok ayrı fakat bitişik dar tabakalardan meydana geldiğini düşünerek, teorik bir çalışmayla tabaka yüksekliği ve teorik tabaka sayısı terimlerinin ortaya çıkışına öncülük etmişlerdir. Her tabakada maddenin hareketli ve durgun faz arasında kurduğu dengenin, yeniden meydana geldiği kabul edilmiştir. Analitin kolon içerisinde hareketi, dengedeki mobil fazın bir tabakadan diğerine geçişi olarak kabul edilmiştir. Teorik tabaka sayısı şu şekilde hesaplanır:

$$N = 16 \cdot \left(\frac{t_R}{W} \right)^2 \text{ veya } N = 54,4 \cdot \left(\frac{t_R}{W_{1/2}} \right)^2 \quad (2.11)$$

Burada W, pik taban genişliğidir. Teorik tabaka sayısı N ve tabaka yüksekliği H, literatürlerde ve kromatografik cihaz üreticileri tarafından, kolon performansının bir ölçümü olarak kullanılır.

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

$$H = (A + B) / (u + C_u) \quad (2.12)$$

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. Eşitlik 2.12.'deki akış hızından bağımsız olan A değeri, madde moleküllerinin kolonda ilerlerken farklı yollar izlemesi nedeniyle büyür. Farklı uzunluktaki yolları izleyen madde moleküllerinin

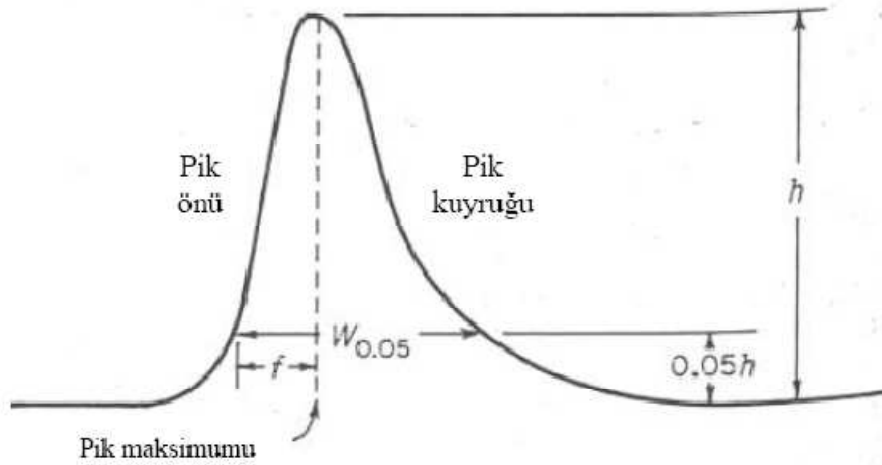
kolonda hızları da farklı olur. Bütün moleküllerin kolonun sonuna ulaşmasında bantta genişleme gözlenir. Bu olaya Eddy Difüzyonu denir. Kolon dolgu maddesinin çok küçük tanecikli olarak alınması ile A'nın değeri küçültülebilir. Formüldeki ikinci terim boyuna difüzyon terimi olup, özellikle düşük akış 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.

2.5.4.7. Kuyruklanma faktörü (T) ve asimetri faktörü (AS)

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 karşılaşılabilir.

Pik asimetrisi taban yüksekliğinin % 10'u civarında, kuyruklanma faktörü ise % 5'i civarında ölçülür. Uygun değerler pik asimetrisi için 0,95-1,2 arasında, kuyruklanma faktörü için ise 2'nin altında olmalıdır.



Şekil 2.5. Pik asimetri faktörü ve kuyruklanma faktörü hesabını gösteren kromatogram

2.5.5. Kolon performansının optimizasyonu

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 yer alan çok sayıda kütle-aktarım işlemlerinin belli hızlara sahip oluşunun bir sonucudur. Bu hızları etkileyen bazı değişkenler denetlenebilir ve ayırmaları iyileştirmek için kullanılabilir.

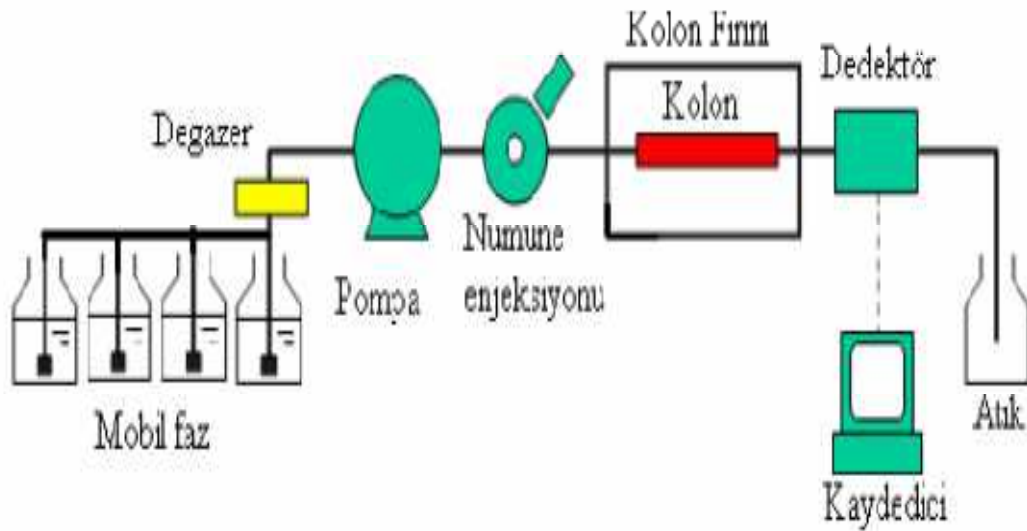
2.5.6. Kolon performansına etki eden değişkenler

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.

2.5.7. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) cihazı

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi cihazı, kendine özgü işlevlere sahip olan pompa, enjektör, kolon, dedektör ve kaydedici olmak üzere beş ana bölümden oluşan bir sistemdir.



Şekil 2.6. HPLC cihazının şematik gösterimi

2.5.7.1. Hareketli (Mobil) faz haznesi

Bir HPLC cihazı, bir veya daha fazla, her biri 200-1000 mL çözücü içeren camdan veya çelikten yapılmış hareketli faz haznesi içerir. Bu hazneler çoğu zaman kolonda veya dedektör sisteminde bozucu etkilere neden olan çözülmüş gazların (özellikle oksijen ve azot) giderilmesi için bir bölüm (gaz giderici) ile donatılmıştır. Hareketli fazın cihaza verilmeden önce süzülmesi ve çözülmüş gazların giderilmesi gerekir. 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.

Sabit bileşimde tek bir çözücü kullanılarak yapılan ayırma izokratik elüsyon olarak adlandırılır. Sisteme gönderilen hareketli faz bileşiminin veya akış hızının zamanla sürekli veya kesikli olarak değiştirilmesi ile yapılan ayırma işlemine ise gradient elüsyon denir. Elüsyon başladıktan sonra belli bir programa göre, bazen sürekli olarak, bazen de bir seri basamaklar şeklinde çözücülerin oranı değiştirilir. Ayırma etkinliği izokratik elüsyona göre daha fazla olan bu yöntemde, iki veya üç çözücü kullanılmaktadır ve bu çözücülerin polariteleri birbirinden farklıdır. Ayırma başladıktan sonra çözücülerin oranı ve cinsleri belli bir programa göre değiştirilir. Böylece karışım halinde bulunan maddelerin birbirlerinden kolayca ayrılmasını sağlanmış olur.

Modern HPLC 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, farklı kapasite faktörüne sahip madde karışımlarının alıkonma zamanları kısaltılabilmektedir.

Hareketli faz su ve/veya sulu tampon içeriyorsa, kimyasal bozunmanın yanı sıra mikrobiyolojik üreme sonucunda kolonu tıkaşabilir. Bu nedenle, HPLC analizleri sırasında taze hazırlanmış hareketli faz kullanılır.

2.5.7.2. Pompalar

Pompalar, sıkıca doldurulmuş kolon içinden hareketli fazın akışını sağlayan aletlerdir. HPLC pompalama sistemi için gerekli şartlar şunlardır:

1. 400 atm'e kadar basınç üretimi,
2. Puls içermeyen basınç çıkışı,
3. 0,1-10 mL dk⁻¹ aralığında akış hızları,
4. % 0,5 veya daha iyi bir bağıl tekrarlanabilirlikle akış kontrolü,
5. Korozyona dayanıklı parçalar (paslanmaz çelik veya teflondan yapılmış sızdırmazlık) şartlarının sağlanmış olması gerekmektedir.

Ayrıca HPLC pompaları tarafından üretilen basıncın patlama tehlikesi oluşturmaması da önemlidir. Böylece sistemin parçalarından herhangi birinde meydana gelebilecek çatlak, çözücünün dışarı sızmasından ibaret kalacaktır. Bu gibi kaçakların yangın tehlikesi oluşturma riskinden dolayı dikkatli olunmalıdır.

HPLC'de kullanılan pompa çeşitleri:

1. Pistonlu Pompalar
2. Sürgülü Pompalar
3. Pnömatik Pompalar

Pistonlu pompalar: En yaygın olarak kullanılan pompa sistemidir. Motor kontrollü bir pistonun ileri ve geri hareketiyle çözücünün pompalandığı küçük bir silindirden oluşmuştur. Sırasıyla açılıp kapanan iki küresel motor musluğu çözücünün silindir içine giriş çıkışı kontrol eden parçadır.

Sürgülü pompalar: Viskoziteden ve geri basınçtan bağımsız bir akış üreten sürgülü pompalar, bir kademeli motordan güç alan vidalı güdüm mekanizması ile kumanda edilen sızdırmaz bir sürgüsü olan silindirik kaptan ibarettir. Sınırlı çözücü kapasitesi (~250 mL) ve çözücü değiştirilmesi gerektiğinde karşılaşılan güçlükler sakıncalı olan taraflarıdır.

Pnömatik pompalar: Pahalı olmayan, pulssuz, ancak kapasitesi sınırlı olan bu tür pompalarda çıkış basıncı düşük olup, çıkış hızı çözücü viskozitesine ve kolon geri basıncına bağlıdır ve gradiyent elüsyona uygun değildirler.

2.5.7.3. Akış kontrolü ve programlama sistemleri

HPLC cihazlarında, bilgisayarla kontrol edilip, pompa çıkışına yerleştirilmiş geri tepme tıkaçı boyunca basınç düşmesini belirlemek suretiyle akış hızını tespit eden sistemler de mevcuttur. Ayrıca cihazlar çözücü bileşimini sürekli ya da basamaklı olarak değiştiren sistemlere de sahiptir.

2.5.7.4. Enjektör

HPLC 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 çok küçük olmalıdır ve sistemin basıncını düşürmeden numunenin sisteme girişinin sağlanması gereklidir.

Temel olarak, manuel ve otomatik olmak üzere iki tip enjektör vardır:

- a) 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 loopa doldurulur. Enjeksiyon konumunda loop, tekrar yüksek basınçlı ortama dönerek numuneyi sisteme aktarır.
- b) Otomatik Enjektör: 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 ve loop hacmi ile sınırlıdır.

Programlanabilen otomatik enjeksiyon sistemleri, numune loopunu doldurmak için hassas motor ile hareket ettirilen şırıngalar kullanılır. Enjektörle çekilen hacim kontrol edilerek istenilen miktarda numune loopa doldurulur. Küçük miktarlardaki numune enjeksiyonları gerçekleştirilebilmekte ve numune kayıpları minimum olmaktadır. İstenilen sayıda enjeksiyon yapmak da mümkündür.

2.5.7.5. Dedektörler

Sıvı kromatografik yöntemlerin gelişmesinde yaşanan en büyük güçlüklerden biri ideal dedektör bulabilmektedir. Sıvı kromatografide kullanılan dedektörler iki başlık altında toplanabilir:

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

Tablo 2.2. Sıvı Kromatografik Dedektörlerin Performanslarının Karşılaştırılması

Sıvı Kromatografik Dedektörler	Belirleme Sınırı
Absorbans	10 pg
Floresans	10 fg
Elektrokimyasal	100 fg
Kırma indisi	10 ng
İletkenlik	500 fg
Kütle spektrometre	1 pg
FT-IR	100 ng
Işık saçma	500 ng
Optikçe aktiflik	1 ng
Element seçici	10 ng
Foto iyonlaşma	1 pg-1 ng

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

Absorbans dedektörleri: Bu tip dedektörlerde kromatografik kolondan çıkan elementlerin takip ettiği akış hücresinin hacimleri, kolon dışı bant genişlemesini en aza indirmek amacıyla olabildiğince düşük tutulmaktadır. Örneğin; hacimler 1-10 µL ve hücre uzunluğu 2 mm arasında sıralandırılmıştır. Bu tipteki hücrelerin büyük kısmı yaklaşık 60 psi'den daha büyük basınçlarda çalışamazlar ve basınç düşürme düzeneğine gereksinim duyarlar. Absorbans dedektörlerinin çoğunluğu çift ışın yolludur. Bu ışınlardan birisi eluent hücresinden geçerken, diğeri şiddetinin azaltılması amacıyla bir filtreden geçirilir. Daha sonra bu iki ışın şiddetinin karşılaştırılması amacıyla birbirleriyle uyumlu fotoelektrik dedektörler kullanılır.

Ayrıca tek ışın demetli cihazlar da vardır. Bunlarda çözücü sisteminin şiddet ölçümleri bir bilgisayarın hafızasında depolanır ve sonunda absorbans hesabı için bu değer tekrar kullanılır.

Absorbans Dedektörleri: a) Filtreli UV Absorbans Dedektörü, b) Monokromatörlü UV Absorbans Dedektörü, c) İnfrared Absorbans Dedektörü

Filtreli UV Absorbans Dedektörleri: Işın kaynağı olarak civa lambasının kullanıldığı filtreli fotometreler, en basit ultraviyole absorpsiyon dedektörleridir. En yaygın olarak kullanılan filtreli UV absorbans dedektörleri, 254 nm dalga boyundaki ışını filtrede izole etme özelliğine sahip olanlardır. Ancak; 250, 313, 334 ve 365 nm dalga boyundaki ışınları da kullanırlar vardır. Bu tip dedektörlerin kullanımı, kullanılan dalga boyundaki ışınlardan birini absorblama özelliğine sahip analitlerle sınırlıdır. Bir kolondan elde edilen absorblayıcı türlerin teşhisinde, ışın kaynağı olarak girişim filtreli döteryum veya tungsten telli ışın kaynaklarının da kullanımı vardır.

Monokromatörlü UV Absorbans Dedektörleri: Piyasada sadece UV ışınları kullanan veya hem UV hem de görünür bölge ışınlarını kullanan optik ağıllı spektrofotometreden oluşan dedektörler vardır. Bu dedektörlerde kromatogramın tamamı tek bir dalga boyundan alınabildiği gibi, zamanla eluent pikleri birbirinden yeterince ayrıldığında her bir pike ait madde için uygun dalga boyu seçilmesi mümkündür. Filtre seçimi çoğunlukla bilgisayar kontrolü ile yapılır. En güçlü UV spektrofotometrik dedektörler, fotodiyod dizisi dedektörleridir. Bu cihazlar yaklaşık

1 saniyede spektrumun tamamı için gerekli verileri toplayabilir ve üç boyutlu bir grafik halinde türlerin teşhis ve kantitatif tayini için gerekli şartların seçimine yardımcı olacak bir spektrum sunar.

İnfrared Absorbans Dedektörleri: İki tip infrared absorbans dedektörü vardır. Bunlar:

a) Dalga boyu taramasını 3 tane yarı dairesel filtre kanatları ile yapan ve çalışma aralığı 2,5-14,5 μm veya 4000-690 cm^{-1} olan dedektörlerdir.

b) Diğeri ise Fourier dönüşümlü cihaza benzer özellikte olan infrared dedektörleridir. Bunların yapısı daha karmaşıktır. İnfrared dedektör hücreler, kullanılan NaCl pencereler hariç, yapılış bakımından UV ışınli hücrelere benzemektedirler. Hücre uzunlukları 1-3,2 mm ve hücre hacmi 1,5-10 μL arasında değişmektedir.

İnfrared dedektörlerin kullanımındaki dezavantajı, birçok kullanışlı çözücünün düşük geçirgenliğidir. Örneğin; su ve alkollerin geniş infrared absorpsiyon bantları, bu dedektörlerin birçok uygulamada kullanımını engellemektedir.

Floresans dedektörler: Floresans dedektörlerin çoğunun yapısı, florometre ve spektrofluorometrelere benzer şekilde tasarlanmıştır. Bu tip dedektörlerde floresans, uyarıcı ışına 90 derece açı ile yerleştirilmiş bir fotoelektrik dedektör yardımıyla gözlenir. Daha gelişmiş cihazlardan floresans ışımalarını izole etmek için optik ağ monokromatör kullanılır. Yine çoğunlukla uyarıcı ışın kaynağı olarak civa lambası ve yayılan ışınların belli bandını izole etmek içinde filtreler kullanılır. Gelişmiş cihazlarda kaynak olarak ksenon lambası kullanılır. Floresans dedektörlerde ayarlanabilir lazer ışın kaynağı kullanarak duyarlılığı ve seçiciliği artırma çalışmaları yapılmaktadır.

Floresans özellik gösteren ya da floresans hale getirilebilen numunelerin ayrılması ve analizinde kullanılan bir yöntemdir. Floresans dedektörlerin üstünlükleri duyarlı olmalarıdır. Bu özelliklerinden dolayı floresans özelliği bulunan numunelerdeki bileşiklerin ayrılması ve tayini için sıvı kromatografisinde de kullanılmaktadır. Floresans özelliğe sahip ilaçlar, doğal ürünler, klinik numuneler ve petrol ürünleri gibi maddelerin analizinde oldukça fazla tercih edilen yöntemlerdendir.

Kırılma indisi dedektörü: Kırılma indisi dedektöründe çözücü, kolunun yolu üzerinde bulunan hücrenin bir yarım bölmesinden geçer, eluat ise daha sonra diğer bölmesinden geçer. Bu iki bölme bir cam plakayla ayrılmıştır. Bu cam plaka, iki çözeltinin kırılma indisi birbirinden farklı ise gelen ışının kırılmasını sağlayacak açıda yerleştirilmiştir. Fotoduyarlı dedektörün yüzeyine gelen ışın demetinin yolundan sapması çıkış sinyalinin değişmesine sebep olur ve bu değişiklik yükseltilecek kaydedildiğinde kromatogram elde edilir. Kırılma indisi dedektörleri hemen hemen bütün analizlenecek maddelere cevap verebilmesi, güvenilirliği ve akış hızından etkilenmemesi nedeniyle avantajlıdır. Ancak bu tip dedektörlerle çalışılırken sıcaklığın sabit tutulması gereklidir. Sıcaklığa oldukça duyarlıdırlar ve hassasiyetleri diğer dedektörlere göre daha düşüktür.

Buharlaştırılmalı ışık saçma dedektörleri: Son yıllarda HPLC için geliştirilmiş olan bu tip dedektörlerde kolondan çıkan çözelti, sisleştirici denilen yapı içinden geçirilerek azot veya hava akımı ile ince bir sis haline dönüştürülür. Sis halindeki çözücü sıcaklık kontrollü sürüklenme borusuna gönderilir. Oradan lazer ışın demetinin içinden geçirilir. Akış yönüne dik olarak saçılan ışınlar bir silisyum fotoiyod dizi dedektör yardımıyla ölçülür. Bu tip dedektörlerin diğerlerine göre üstünlüğü buharlaşmayan bütün analitlere aynı cevabı vermesidir. Ayrıca kırılma indisi dedektörlerine göre duyarlılığı daha fazladır.

Elektrokimyasal dedektörler: Bu tip dedektörler, polarografik, kondüktometrik, kulometrik ve amperometrik olarak bölümlere ayrılabilir. Bunlardan amperometrik dedektörler daha çok kullanılmaktadırlar. Amperometrik dedektörlerde kontrollü potansiyelde elektrokimyasal değişikliğe uğrayan bileşikler, elektrot yüzeyinde oksidasyon ya da redüksiyona uğradığında, elektrottaki elektron akımı zamanın fonksiyonu olarak kaydedilir.

Bu tip dedektörlerin kullanılabilmesi için hareketli fazın elektriği iletmesi gerekmektedir. Organik çözücüler kullanıldığında, hareketli faza mutlaka akımı iletme üzere bazı maddeler katılmalıdır. Uygulanan potansiyelde çözücülerin elektrokimyasal olarak inaktif olması gerekir. Bu dedektörde en büyük problem

elektrot (camsı karbon) yüzeyinin kirlenmesidir. Optik dedektörler kadar kullanımı yaygın olmasa da duyarlılık, basitlik ve kullanım açısından daha avantajlıdır.

Kütle spektrometrik dedektörler: HPLC ile kütle spektrometriyi birbirine bağlamada ortaya çıkan temel problem, HPLC'in büyük çözücü hacimleri ile çalışması ve kütle spektrometrisinin de vakum gerektirmesidir. Bu problemi çözmek amacıyla çeşitli ara bağlantılar geliştirilmiştir. Bunlardan piyasada mevcut olan bir tanesinde kolondan çıkan elüat iki kısma ayrılır ve çok az bir kısım kütle spektrometreye gönderilir. Akış hızları 10-50 µL/dakika olan yeni mikro gözenekli kolonların kullanılmaya başlaması ile birlikte sıvı kromatografi sistemleri doğrudan kütle spektrometrik dedektöre bağlanır. Termosprey olarak adlandırılan yeni ve ümit veren bir bağlantı da, şu an piyasada bulunmaktadır.

UV-görünür bölge dedektörler: Çoğu ilaç analizinde kullanılan UV-Görünür Bölge dedektörler, maddenin ışığı absorplayıp absorplamadığını anlamak için ışık kaynağından gelen ışığın şiddetinin ölçülmesi amacıyla kullanılan dedektörlerdir. 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 içinde bir monokromatör taşıyan fotometrelerdir. Maddenin maksimum absorpsiyonunun bulunduğu dalga boyunda çalışma olanağı sağlayan bu dedektörler, hassasiyeti artırdığı için ve düşük dalga boyunda çalışabildiği için son derece kullanışlıdır.

Diyod array dedektörler (DAD dedektörler): Değişken dalga boylu UV-Görünür bölge dedektörleridir. Hem sabit hem de taramalı dalga boylarında incelemeye müsait olan dedektörlerdir. Diyod array dedektörler, seçimlilik ve hassasiyet açısından değişken dalga boylu UV dedektör ile aynı avantajlara sahiptir. Buna ek olarak;

1. Aynı anda spektrumun bütün dalga boylarında piklerin ölçümü yapılabilir.
2. Çok hızlı spektrum taraması yapılabilir ve istenilen pikin üç boyutlu kromatogramı alınabilir.
3. Birden fazla dalga boyunda kromatogramdaki piklerin UV-Görünür bölge spektrumları alınabilir.
4. Spektrumların çakıştırılması yöntemi ile pik saflığının tespiti yapılabilir.

2.5.7.6. Kolonlar

Kolonlar genellikle içi paslanmaz çelik borulardan oluşmuş sistemlerdir. Ancak bazen kalın cidarlı cam borular da kullanılır.

Analitik Kolonlar: Sıvı kromatografi kolonları, düz veya sarmal olabilirler. Kolon etkinliğindeki kayıp, dolayısıyla sarmal konfigürasyona daha az rastlanmaktadır. Kolon boyu genellikle 10-30 cm arasında olup, kolonların birbirine eklenmesi yoluyla boylarının uzatılması sağlanabilir. Kolonların iç çapı 4-10 mm, kolon dolgu maddelerinin tanecik büyüklüğü ise genellikle 5-10 µm oranındadır. Günümüzde en sık kullanılan kolon 25 cm uzunluğunda, 4,6 mm iç çapında ve 5 µm tanecik büyüklüğüne sahip kolonlardır.

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. Bu kolonlar ile 15 saniye içinde 8 farklı tipte maddenin birbirinden ayrılması mümkündür.

Koruyucu kolonlar (Guard): Analitik kolonu koruyarak daha uzun süre kullanımını sağlayan, analitik kolonun önüne yerleştirilen kısa kolondur. Görevi, partikül halindeki maddeleri, çözücü içindeki yabancı maddeleri, numune kabı içinde bulunan ve durgun faza geri dönüşümsüz olarak bağlanan maddeleri tutmak, hareketli fazı durgun faz ile doyurarak analitik kolondaki çözücü kaybının en aza inmesini sağlamaktır.

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.

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 mümkündür.

Kolon dolgu maddeleri ve özellikleri: HPLC cihazında kullanılan kolonlar, yüksek basıncı korumak için paslanmaz çelikten yapılmışlardır. Bunlar baştanbaşa 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. Geniş bir yüzey alanına düzgün olarak dağılmış ve hareketli fazla kolay etkileşebilen açık yapıya sahip olmalıdır. Yüksek basınç ve yüksek akış hızlarından etkilenmemelidir.

Kolon verimi, kolon dolgu maddesi, ortalama parçacık çapı, kolonu doldurmak için kullanılan teknikler, kolonun iç çapı ve kolonun iç yüzeyinin geometrisi gibi pek çok faktör tarafından tayin edilir. Paslanmaz çelik kolonların, malzeme özellikleri açısından en uygun kolonlar olduğu ortaya çıkmıştır. Analitik uygulamalarda 2.1, 3.2 ve 4.5 mm iç çapa sahip kolonlar 10-30 cm arasındaki uzunluklarda kullanılırlar.

Enjeksiyon sistemi-kolon ve kolon-dedektör arasındaki bağlantı borularının uzunluğunun mümkün olduğu kadar küçük tutulması istenir. Kolon çıkışına ve dedektör sistemine bağlanmış boruların en iyisi, hareketli fazla önemsiz ölçüde seyrelmeye izin veren minimum ölü hacme sahip olanıdır. Bu örnek seyrelmesini

engelleyen, 0,025-0,050 cm iç çapa sahip (çelik ve teflon) bağlantı borularının kullanılması ile başılır.

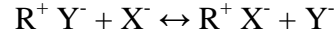
HPLC çalışmalarında sabit faz olarak genellikle silikajel kullanılır. İçerdiği SiOH grupları nedeniyle zayıf asidik özellik gösteren silikajel, bazik özellik gösteren bileşikler için bazik kuvvetlerine göre tutar. Silikajel doğrudan dolgu maddesi olarak kullanıldığı gibi, katı yüzeyine film halinde de 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.

Elementel türlendirme amacı ile kullanılan dolgu maddesi ise genellikle anyon ve katyonları tutan iyon değiştirici reçinelerdir. Bu reçinelerin kullanılması durumunda örnekte iyon halinde bulunan türlerin birbirinden ayrılması sağlanabilir. Kullanılan iyon değiştirici reçinelerin, doğrudan kolona doldurulabilen katı reçinelere olan etkilerine etki eden birçok faktör vardır. Bunlar, iyonların yükü ve büyüklüğü, pH, iyon şiddeti, kullanılan reçinenin gözenekliliği, çözücü cinsi, çözücü derişimi ve sıcaklıktır. Birkaç bileşenden oluşan bir karışımdaki her bileşen, farklı bir net yüke sahiptir ve bu yüzden kolondan ayrılması için farklı bir iyonik kuvvet gerektirir. İyonik kuvvet tamponun veya tampona eklenen tuzun artan derişimi ile artabilir. Bu, örneğin kolonda alıkonmasını azaltabilir ve bileşikler farklı tuz derişimlerinde kolondan daha kolay ayrılırlar.

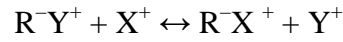
Örnek bileşenlerinin ayrılması, tamponun pH'ının değiştirilmesi ile sağlanabilir. pH, molekülün pH'sına yaklaştığında molekül kendi yükünü kaybeder ve iyon değiştiriciden kurtulur. Katyon değiştirmede, örnekler kendi pH değerlerinin altında bir pH'da tutulduğunda, tamponun pH'sının artmasıyla örnek kolondan daha çabuk ayrılır.

İyon değiştirme, iyonik türlerden birinin diğeriyle yer değiştirmesini içerir. Sabit faz, iyon değiştirici R⁺ vermek için, net pozitif yük taşıyan katı bir matriksten oluşur. Eğer anyon içeren hareketli faz kullanılırsa, R⁺ (iyon değiştirici taraf) negatif karşı

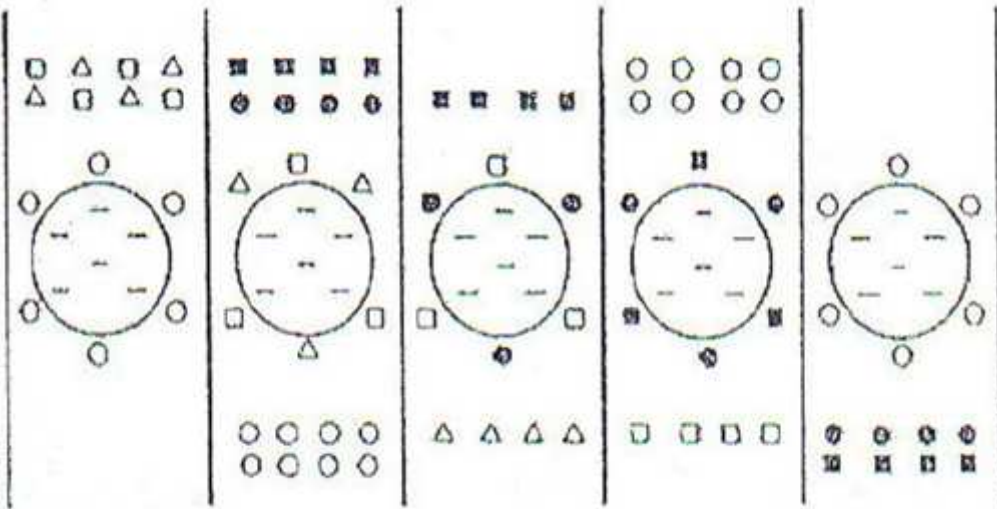
iyonu kendine doğru çeker, böylece örnek anyonları (X^-), karşı iyonlarla (Y^-) yer değiştirir.



Bu yöntem anyon değişimi içerdiğinden, anyon değiştirme olarak bilinir. Yüzey, iyon değiştirici R^- vermek için, net negatif yük taşıdığı zaman katyon değiştirme olayı meydana gelir. Karşı iyonlar (Y^+) ve örnek iyonlarının (X^+) ikisi de katyondur ve iyon değiştirme şu şekilde olur.



Anyon ve katyon değiştirici reçinelerde gerçekleşen ayırma mekanizmaları Şekil 2.7.'da görülmektedir.



Şekil 2.7. Anyon ve katyon değiştirici reçinelerde gerçekleşen ayırma mekanizmaları

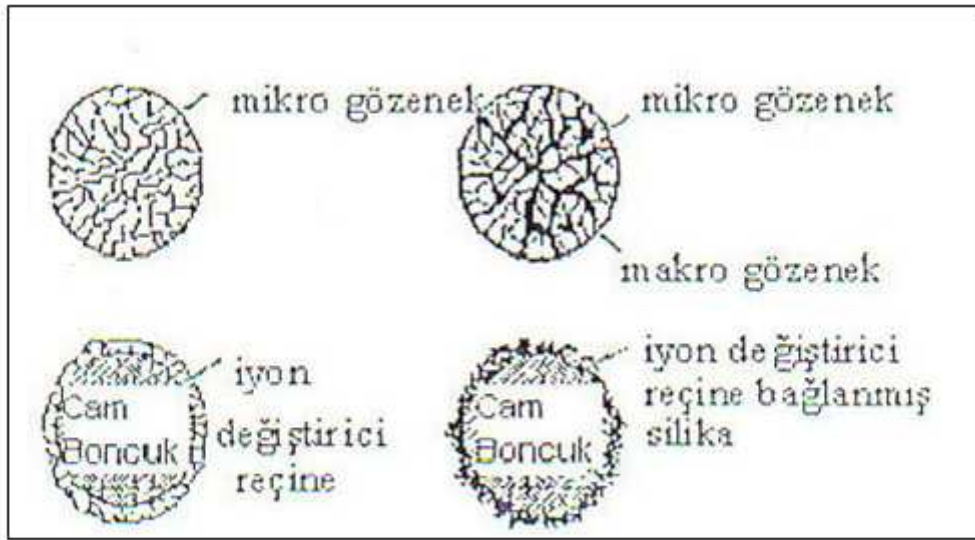
İyon değiştirme kromatografisinde, kromatografik destek maddesi, hareketli fazda iyonik çözeltilerle yer değiştirme yeteneğine sahip iyonları içerir. İyon değiştiricilerin iki tipi; bazik ve nötral maddeler için katyon değiştiriciler, asidik ve nötral maddeler için anyon değiştiricilerdir. İyon değiştiriciler kimyasal özellik ve boyut farklılıklara kadar, yapısal farklılıklarına göre de sınıflandırılırlar:

1. Mikrogözenekli veya jel yapısındaki reçineler: Bu reçineler mikro gözenekler içeren, çapraz bağlı yapısal bir ağdan oluşmaktadır. Çok küçük gözeneklere sahip olduğundan polar olmayan çözücü sistemlerinde, şişme çok düşüktür. Büyük hacimlerdeki iyonların tutunması yavaştır ve çoğu kez tersinmezdir.

2. Makrogözenekli reçineler: Bu reçineler mikrogözenekli reçinelere ek olarak, geniş büyüklükte gözenekler de içerir. Bunlar büyük iç yüzey alanlarına ve yüksek gözenekliliğe sahiptir. Büyük gözenekler, farklı büyüklükteki iyonların iyon değiştirici fonksiyonel gruplara kolayca ulaşmasını sağlayan kanallar içerir.

3. Pelikular reçineler: Bu reçineler, cam boncuklardan oluşmuş iç kısma, iyon değiştirici ince bir reçine filminin kaplanmasıyla hazırlanır. İç kısmın çapı çok küçüktür ve bu yüzden çözücülerin çok küçük miktarları için uygundur.

4. Yüzeysel gözenekli reçineler: Cam boncuklardan oluşmuş iç kısım, üzerine iyon değiştiricinin bağlandığı silika mikro küreciklerinin ince tabakasıyla çevrilir.



Şekil 2.8. Reçine tipleri: (a) Mikrogözenekli reçineler, (b) Makrogözenekli reçineler, (c) Pelikular reçineler, (d) Yüzeysel gözenekli reçineleri

HPLC destek maddeleri, hem silika temelli maddeleri hem de türevlendirilmiş hidrofilik ve hidrofobik polimerleri kapsar.

a) Polimer temelli iyon değiştiriciler: Polimer temelindeki iyon değiştirici reçinelerin polimerik iskeleti polistirene çapraz bağlanmış divilbenzenden sentezlenir. Bu iskelet genellikle bir stirendivinilbenzen (DVB) polimeri, polimetakrilat polimeri, metakrilik asit divinilbenzen (MA-DVB) polimeri veya akrilik asit divinilbenzen (A-DVB) polimeridir.

Çapraz bağlanmanın miktarı, divilbenzen miktarı ile kontrol edilir. Genellikle her 11 mol stiren için 1 mol divilbenzen kullanılır. Çapraz bağlı polimerik zincirlerin oluşturulması için yaygın biçimde p-divinilbenzen kullanılmakta birlikte, divilbenzen de aynı işlevi gurur. Polistirendivinilbenzen reğinesinin gozenekliliği ve mekanik kuvveti, çapraz bağlanma derecesinin bir fonksiyonudur. Yuksek dereceli çapraz bağlı reçineler (% 8-10) yuksek basınçta kullanılabilir, fakat kucuk çaplı reçineler (% 2-8), buyuk moleküllerin matrikse geçmesine izin verir ve oznrlğ arttırmaları. Fakat mekanik kararlılıkları düşüktür. Bu destek maddelerin avantajı pH=2-12 aralığında kararlı olmalarıdır.

Kasyon değiştiriciler, polimere asidik fonksiyonel gruplar eklenerek, anyon değiştiriciler ise bazik fonksiyonel gruplar eklenerek elde edilirler. En çok kullanılan fonksiyonel gruplar kasyon değiştiriciler için $-SO_3$ (sülfonat), anyon değiştiriciler için kuarter amin ($-N^+(CH_3)_3$) trimetil amonyum; $-N^+(CH_3)_2C_2H_4OH$ (dimetil hidroksietil amonyum) formundaki iyon değiştiricilerdir. rneğin; bir stirendivinilbenzen polimeri sülfirik asitle tepkimeye girdiğinde, $-SO_3H$ bağlı kasyon değiştirici oluşturur.

b) Silika temelli iyon değiştiriciler: Silika temelinde iyon değiştiren matriksler hidrofilitir ve polimerik tabaka oluşması için kullanılan çapraz bağlayıcılar yüzünden düşük hidrofobik tutunma gosterirler. Kucuk parçacık büyüklükleri ve sık dağılımları yüksek kaliteli bir ayırma sağlar. Gozenekli yüzeylerinden dolayı, hareketli faza nemli bir temas yüzeyi sağlarlar. Kimyasal ve mekanik olarak kararlı olan silika matriksleri, yüksek akış hızı gerektiren yüksek basına karşı iyi direnç gosterirler. pH=2,5-7 aralığındaki sulu tamponlar ve pek çok organik ozcler, matrikste şişme veya büzülme olmaksızın kullanılabilirler. Bunlar mikro ve makro reçineler arasında bir yerde düşünülür ve iyon değiştirme fazı ince polimerik ağa

monomerik bağlanmış olabilir. Silika temelindeki reçinenin avantajı, polistiren temelindeki iyon değiştirici reçineden mL kolon hacmi başına daha büyük değiştirme kapasitesine sahip olmasıdır. Bununla birlikte silika bazlı iyon değiştiricilerin birkaç sınırlaması vardır. Bunların bazik koşullar altında kullanımları sınırlıdır ve yüksek iyonik şiddet kolon ömrünü azaltır.

İyon değiştirici reçineler, polimere bağlanan asidik veya bazik fonksiyonel grupların kuvvetine göre de sınıflandırılırlar. Bu sınıflandırma kuvvetli bazik (kuvvetli anyon değiştirici), oldukça bazik, zayıf bazik, kuvvetli asidik (kuvvetli katyon değiştirici) ve zayıf asidik şeklindedir. Fonksiyonel grubun bazikliği veya asidikliği arttıkça ters yüklü örnek iyonlarını çekme gücü artar. Tablo 2.6.'de çeşitli anyon ve katyon değiştirici reçineler görülmektedir.

Tablo 2.3. İyon değiştirici reçinelerin sınıflandırılması

Sınıflandırma	Fonksiyonel Grup	Polimerik destek
Kuvvetli bazik (Kuvvetli anyon değiştirici)	Tetraalkil-amonyum hidroksit	S-DVB
	- $\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_3^+\text{Cl}^-$	S-DVB
	- $\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_3^+\text{OH}^-$	S-DVB
	Tetraalkil-amonyumklorür	S-DVB
Oldukça bazik	- $\text{N}(\text{CH}_3)_2$	S-DVB
Zayıf bazik	- NH_2	S-DVB
	- NH_2	S-DVB
Kuvvetli asidik (Kuvvetli katyon değiştirici)	- SO_3H^+	S-DVB
Zayıf asidik	- SO_3Na^+	S-DVB
	- COOH^+	S-DVB

2.5.7.7. 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.

2.5.8. HPLC yönteminin avantajları

1. Duyarlı bir yöntem olması,
2. Doğru, kantitatif tayinlere kolayca uygulanabilir olması,
3. Uçucu olmayan, sıcaklıkla kolayca bozunabilen türlerin ayrımı için uygun olması,
4. Pek çok maddeye geniş şekilde uygulanabilmesi,
5. Aynı sabit faz kullanılarak farklı hareketli faz sistemleriyle aynı anda birçok maddenin duyarlı olarak miktar tayininin yapılmasına olanak sağlaması,
6. Numunedeki maddelerin, bozulma ürünlerinin yanında miktar tayinlerine olanak sağlaması,
7. Biyolojik sıvılardan gerek ilaç etken maddelerinin, gerekse metabolitlerinin analizi için geniş bir kullanım alanına sahip olması.

2.5.9. HPLC yönteminin dezavantajları

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

2.5.10. Yüksek performanslı sıvı kromatografisinin uygulama alanları

HPLC, benzer yapılı kimyasal maddelerin ayrılması, saflaştırılması ve belirlenmesi işlemlerinde oldukça yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir.

2.5.10.1. 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 göç hızlarının yeteri derece birbirinden farklı olması gerekmektedir.

2.5.10.2. Kalitatif analiz

Az sayıda ve bilinen türleri içeren karışımlardaki bileşenlerin varlığını tanımak amacıyla HPLC yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Örneğin, tek bir kromatogramla, bir peptit parçalanmasında 30 kadar amino asit yeterince kesin bir şekilde görülebilir. 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 HPLC kolonunun NMR, infrared veya kütle spektrofotometrelerine bağlanmasıyla oluşturulan ikili cihazlar, bu sınırlamaları önemli ölçüde ortadan kaldırmıştır.

2.5.10.3. Kantitatif analiz

HPLC'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.

BÖLÜM 3. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

3.1. Kromatografik Şartlar

Geliştirilen HPLC yöntemi için izokratik pompa sistemi kullanılarak, DAD dedektörüyle 200-400 nm arası bölge taratılmış ve Gliseril Gayakolat'ın 212 nm'de maksimum absorptans gösterdiği tespit edilmiştir. 212, 224, 254, 256 ve 272 nm dalga boylarının her birinde ayrı ayrı kromatogramlar alınmış ve en uygun dalga boyu olarak 212 nm'de bütün kromatogramlar kaydedilmiştir. HPLC sisteminde yapılan denemeler sonucunda, 18C ters-faz kolonu kullanılarak, 25⁰C'lik kolon fırını sıcaklığı, 10 µL'lik enjeksiyon hacmi ve 1 mL dk⁻¹'lik akış hızı sistem için en uygun şartlar olarak seçilmiştir. Bu şartlarda alınan kromatogramlardan Gliseril Gayakolat ve Sibutramin için alıkonma zamanı için sırasıyla 4,62 ve 1,81 (RT) dk olarak tespit edilmiştir. Mobil faz için metanol-su, metanol-asetonitril, su-asetonitril, asteinitril-fosfat tamponu, metanol-fosfat tamponu gibi yüzdesi farklı kombinasyonlar (40:60, 50:50, 20:80, 5:95 gibi) kullanılarak optimize edilmiştir. Farklı mobil faz denemeleri sonucunda, en uygun izokratik mobil faz karışımı olarak tespit edilen 60:40 oranında pH=3 fosfat tamponu-metanol karışımı kullanılmıştır. Kolonu temizlemek için de, önce belli bir süre deiyonize su ile kolon yıkanarak, daha sonra 70:30 oranında metanol-deiyonize su karışımı ile yıkama periyodu tamamlanmıştır. Hazırlanan mobil faz ve diğer bütün organik çözücüler 0,47 µm'lik (nylon-47 mm) membran filtreden vakum altında süzöldükten sonra kullanılmıştır.

3.2. Standart Çözeltilerin Hazırlanması

Gliseril Gayakolat'ın stok çözeltisi, 100 mL'de 100 mg olacak şekilde metanol içerisinde 1000 µg mL⁻¹ olarak hazırlanmıştır. Gliseril Gayakolat'ın standart çözeltileri 10-100 µg mL⁻¹ konsantrasyon aralıklarında hazırlanarak, kalibrasyon eğrisi için bu stoklardan 10, 20, 30, 50, 70, 80, 90 ve 100 µg mL⁻¹ olacak şekilde kısımlar alınarak metanol ile seyreltilmiştir. Ana stoktan hazırlanan bu stoklar

üzerine 1'er mL ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) internal standart çözeltisi eklenmiş ve her biri metanol çözeltisi ile 25 mL'ye tamamlanmıştır.

İnternal standart olarak kullandığımız Sibutramin standardından da 125 mg tartılarak metanol ile 100 mL'ye tamamlanmış ($1250 \mu\text{g mL}^{-1}$) ve bu çözeltiden 1 mL alınıp, 25 mL'ye tamamlanarak, $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ lik internal standart çözeltisi hazırlanmıştır.

Geri kazanım çalışmaları için de yine aynı Gliseril Gayakolat stok çözeltisinden yeni standartlar hazırlanmıştır (10, 12,5, 20, 25, 30, 50, 60, 70, 80, 85, 90 ve $100 \mu\text{g mL}^{-1}$). Ana stoktan hazırlanan bu kısımlar üzerine 1'er mL ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) internal standart çözeltisi eklenmiş ve her biri 25 mL'ye metanol ile tamamlanmıştır.

Hazırlanan bütün standartlar, kullanılıncaya kadar $+4^{\circ}\text{C}$ 'de buzdolabında saklanmış ve kullanılmadan önce oda sıcaklığına getirilerek, vorteks ile 5-10 dk karıştırılıp kullanılmaya hazır hale getirilmiştir.

3.3. Ticari Çözeltilerin Hazırlanması

Viks Vapo Ekspektoran (15 mL'de 200 mg Gliseril Gayakolat içeren) ticari şuruptan $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$ olacak şekilde metanol ortamında bir stok çözelti hazırlanmıştır. Daha sonra vorteks iyice çözünen bu stok çözeltiden alınan belli bir miktar kısım, $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ olacak şekilde 25 mL'ye metanol ile seyreltilmiş ve aynı şekilde toplam 6 ticari şurup standardı hazırlanmıştır. Her bir ticari numuneye yine 1'er mL ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) internal standart çözeltisinden ilave edilmiştir.

3.4. Standart Ekleme Yöntemi Kullanılarak Standartların Hazırlanması

5 ayrı 25 mL'lik balon joje içerisine Gliseril Gayakolat stok çözeltisinden 15, 20, 25, 40 ve $45 \mu\text{g mL}^{-1}$ olacak şekilde ilave edilmiştir. Daha sonra aynı balon jöjelere ticari şurup stok çözeltisinden 5, 10, 25, 30 ve $35 \mu\text{g mL}^{-1}$ olacak şekilde ilave edilmiş ve hepsinin toplam $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ 'lik standartlar olması sağlanmıştır. Ayrıca yine aynı balon jöjelerin her birine 1'er mL ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) Sibutramin internal standart

çözeltilerinden katılmış ve daha sonra tüm standartlar 25 mL'ye metanol ile seyreltilmiştir.

3.5. Plazmalı Standart Çözeltilerin Hazırlanması

Sağlıklı bir gönüllüden alınan dondurulmuş insan plazması numunesi, oda sıcaklığında çözülmesi için bekletilmiştir. Plazma numuneleri, in vitro olarak standart çözeltilerden plazma üzerine ilave edilme (spike) yöntemi ile hazırlanmıştır. 1'er mL insan plazması örneklerinin her birinin üzerine (n=8) 1'er mL de internal standart eklenmiştir. Daha sonra Gliseril Gayakolat standart stok çözeltilerinden 10, 20, 30, 50, 70, 80, 90 ve 100 µg mL⁻¹ olacak şekilde kısımlar alınarak plazma numunelerinin üzerine eklenmiş ve metanol ile 25 mL'ye seyreltilmiştir. Bütün plazma numuneleri 5-10 dk vorteks ile karıştırılmıştır. Daha sonrasında bu numunelerden santrifüj tüplerine alınan kısımlar, 6000 devir dk⁻¹'da 20-30 dk santrifüjlenerek proteinlerin çökmesi sağlanmıştır. Böylece kolay bir şekilde sıvı-sıvı ekstraksiyonsuz bir şekilde tüm plazma numuneleri hazırlanmıştır.

Plazmada geri kazanım çalışmaları için de, 1'er mL plazma örnekleri üzerine Sibutramin stok çözeltilerinden 10, 12,5, 20, 25, 30, 50, 60, 70, 80, 85, 90 ve 100 µg mL⁻¹ olacak şekilde ilave edilmiştir. Yine bu standartlar üzerine 1'er mL (50 µg mL⁻¹) internal standart çözeltisi eklenerek, her biri 25'er mL'ye metanol ile tamamlanmıştır.

3.6. Plazma İçeren Ticari Çözeltilerin Hazırlanması

1'er mL plazma örnekleri üzerine, Viks Vapo Ekspektoran (120 mL'de 200 mg Gliseril Gayakolat içeren) ticari şuruptan hazırlanan stok çözeltilerden alınan 1'er mL'lik kısımlar eklenmiş ve her bir ticari numuneye yine 1'er mL (50 µg mL⁻¹) internal standart çözeltilerinden ilave edilmiştir. Daha sonra 25 mL'ye metanol ile seyreltilmiş ve aynı şekilde toplam 6 ticari kapsül standardı hazırlanmıştır.

3.7. Plazma Ortamında Standart Ekleme Yöntemi Kullanılarak Standart Çözeltilerin Hazırlanması

5 ayrı 25 mL'lik balon joje içerisine, 1'er mL plazma numunesi ve Gliseril Gayakolat stok çözeltisinden 15, 20, 25, 40 ve 45 $\mu\text{g mL}^{-1}$ olacak şekilde ilave edilmiştir. Daha sonra aynı balon jöjelere ticari şurup stok çözeltisinden 5, 10, 25, 30 ve 35 $\mu\text{g mL}^{-1}$ olacak şekilde ilave edilmiş ve hepsinin toplam 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 'lik standartlar olması sağlanmıştır. Ayrıca yine aynı balon jöjelerin her birine 1'er mL (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) internal standart çözeltisinden katılmış ve daha sonra tüm standartlar 25 mL'ye metanol ile seyreltilmiştir.

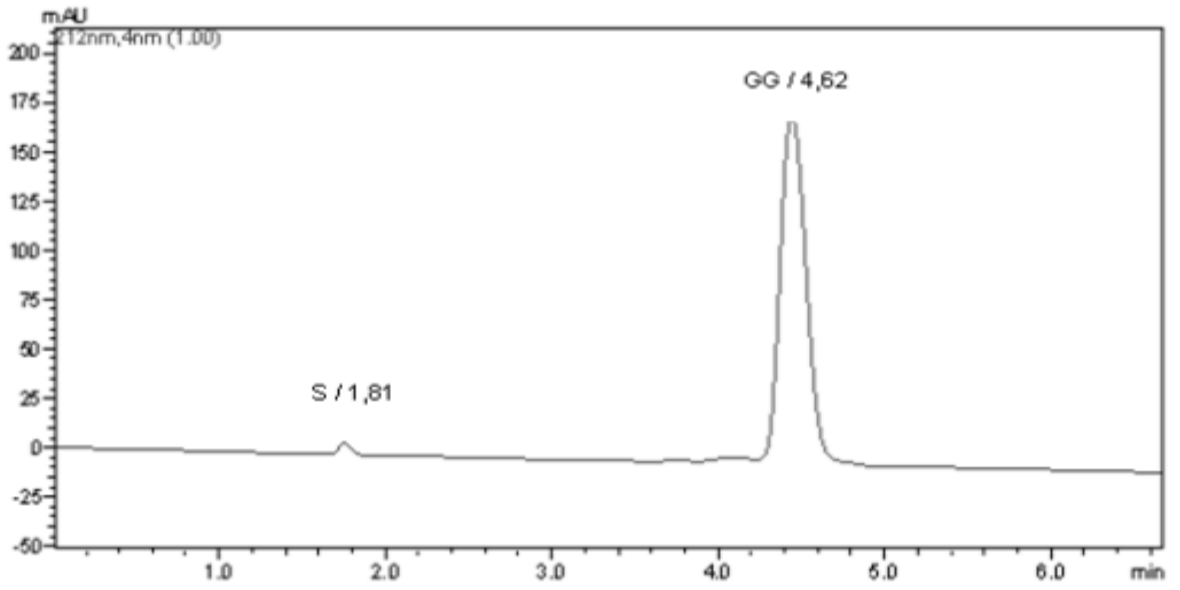
Hazırlanan bütün standartlar, kullanılıncaya kadar $+4^{\circ}\text{C}$ 'de buzdolabında saklanmış ve kullanılmadan önce de oda sıcaklığına getirilerek, vorteks ile 5-10 dk karıştırılıp, kullanılmaya hazır hale getirilmiştir.

3.8. HPLC Yöntemi ile Elde Edilen Bulgular

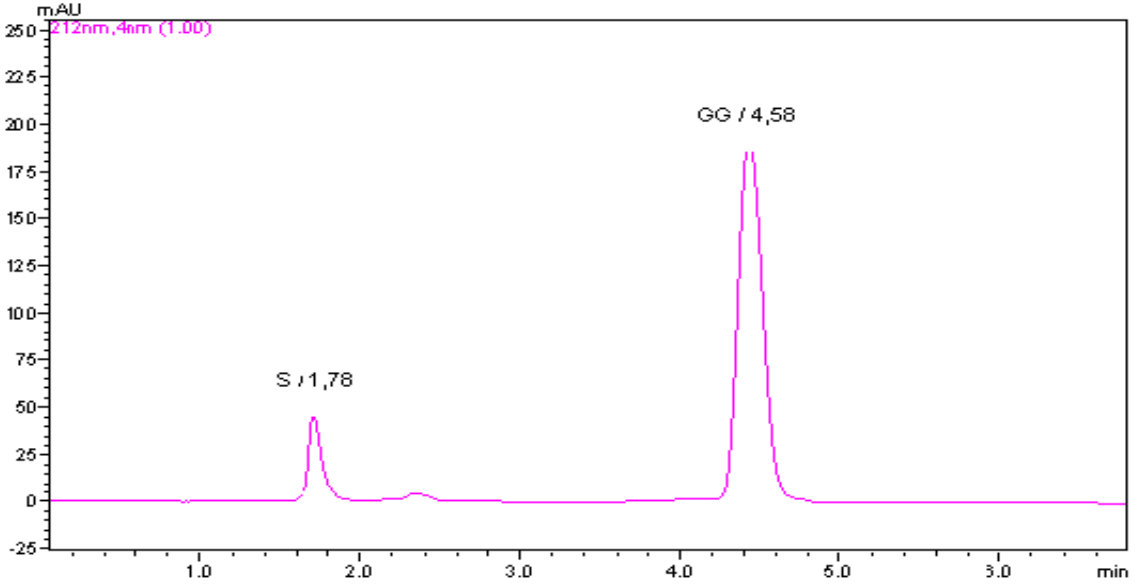
3.8.1. Standart çözeltilerin hazırlanması

1000 $\mu\text{g /mL}$ derişiminde Gliseril Gayakolat içeren ve 50 $\mu\text{g /mL}$ derişiminde internal standart içeren Sibutramin stok çözeltileri metanol içerisinde hazırlanmıştır. Gliseril Gayakolat'tan belirli miktarlarda alınıp, her biri HPLC-grade metanol ile seyreltilerek, Gliseril Gayakolat için 10, 20, 30, 50, 70, 80, 90, 100 $\mu\text{g /mL}$ derişimlerinde bir seri standart çalışma çözeltileri hazırlanmıştır. Her birine 1'er mL internal standart ilave edilmiştir. Hazırlanan tüm çözeltiler, 45 μm çapındaki filtrelerden süzülerek viallere konulmuştur.

Ölçümler için uygun dalga boyu olarak 212 nm seçilmiştir. Hazırlanan tüm standartlar, Diyot Array Dedektör ile kaydedilmiştir. Elde edilen kromatogramlar ise Şekil 3.1. ve Şekil 3.2.'de verilmiştir.



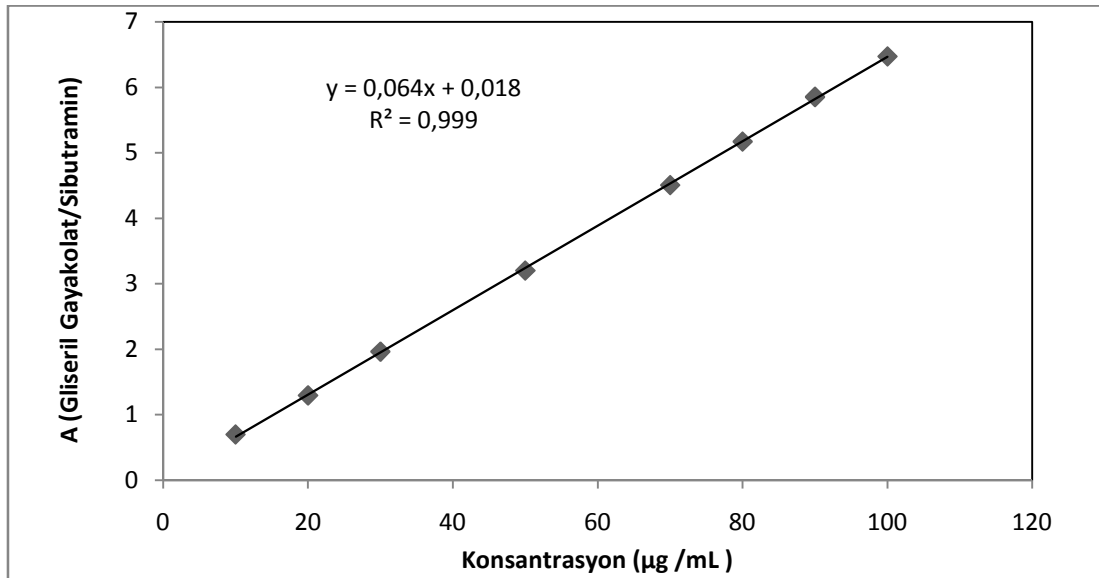
Şekil 3.1. $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ 'lik Gliseril Gayakolat'a ait kromatogram



Şekil 3.2. $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ 'lik plazmaya ait kromatogram

3.8.2. Yöntemin Validasyonu

Bu çalışmada, doğrudan kalibrasyon yönteminin yanı sıra, internal (iç) standart yöntemi ve standart ekleme yöntemleri de kalibrasyon yöntemleri olarak kullanılmıştır. Gliseril Gayakolat için 10-100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ konsantrasyon aralığında, 8 farklı standart çözeltisi kullanılarak, her bir standarda 1'er mL ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) Sibutramin internal standart çözeltisi ilavesiyle tüm standart çözeltiler metanol içerisinde hazırlanmış ve HPLC ile analiz edilmiştir. Gliseril Gayakolat / Sibutramin pik eğrileri altında kalan alan oranlarına karşı, standart konsantrasyonları grafik edilerek, kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur. Bu yöntem ile LOQ değeri 4,46 ve LOD değeri ise $1,33 \mu\text{g mL}^{-1}$ olarak bulunmuştur.



Şekil 3.3. Gliseril Gayakolat / Sibutramin standart alanları oranı için hazırlanmış kalibrasyon eğrisi

Bu eğrilerden standart çözeltiler için regresyon analizi ile elde edilen doğru denklemleri ve regresyon katsayıları hesaplanıp, oldukça iyi lineerlikler sağladıkları görülmüştür (Bakınız Tablo 3.1.).

Tablo 3.1. İnternal standart analiz yöntemi ile elde edilen kalibrasyon eğrisi değerleri (1 ml internal standart çözeltisi ilavesiyle)

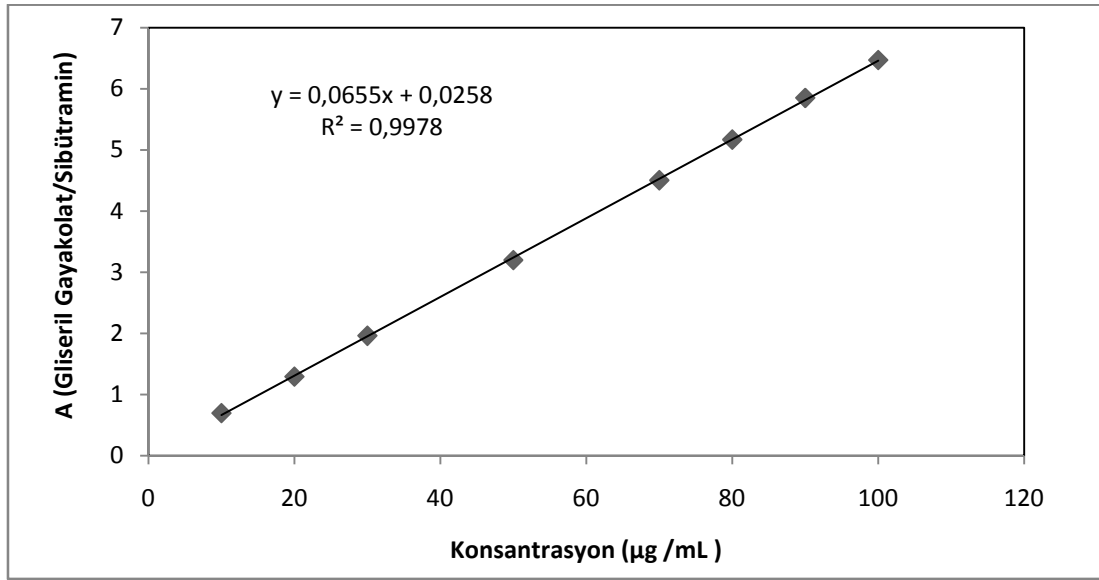
Doğrusal Aralık (µg /mL)	LR (Regresyon Doğrusu Denklemi)	R (Regresyon katsayısı)
10-100	$y = 0,0645x+0,0189$	0,9999

Yöntemin kesinliği, konsantrasyon eğrisi aralığından seçilen 3 farklı konsantrasyon ile (Gliseril Gayakolat için 20, 50 ve 90 µg /mL) gün-içi olarak belli aralıklarda toplam 6 kez (tekrarlanabilirlik için) ve 3 gün peş peşe belli aralıklarla da günler-arası kesinlik ölçümleri yapılmıştır. Gün-içi ve günler-arası kesinlik ve tekrarlanabilirlik sonuçları, bulunan değerlerin ortalaması, standart sapması ve bağlı standart sapması ile Tablo 3.2. 'de verilmiştir.

Tablo3.2.Gliseril Gayakolat standart çözeltilerinin gün-içi ve günler-arası kesinlik ve tekrarlanabilirlik analiz sonuçları (n=6)

Derişim (µg/mL)	Gün-içi				Günler-arası			
	Alan	X	SD	% RSD	Alan	X	SD	% RSD
20	390231 389023 391230 407628 386573 408711	395566	721,02	0,12	384567 389610 410845 397651 385674 405420	395627	4268,42	0,72
50	956401 960084 955422 962460 957410 975462	961206	1057 ,7	0,86	972639 963298 951220 971120 952003 962339	962103	3632,50	0,30
90	1760435 1789523 1770967 1783400 1776566 1780933	1776971	37830,2	2,05	1772313 1782094 1786101 1769009 1762961 1782552	1775838	3790,2	0,24

Ayrıca, Gliseril Gayakolat'ın 10-100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ konsantrasyon aralığında, 12 farklı standart kullanarak her bir standarda 1'er mL Sibutramin internal standart ilavesiyle tüm geri kazanım standart çözeltileri, metanol ile hazırlanmış ve HPLC ile analiz edilmiştir. Gliseril Gayakolat/Sibutramin pik eğrileri altında kalan alan oranlarına karşı, geri kazanım konsantrasyonları grafik edilerek, yeni bir kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Bu yöntem ile LOQ değeri 4,43 ve LOD değeri ise 1,33 $\mu\text{g mL}^{-1}$ olarak bulunmuştur.



Şekil 3.4. Gliseril Gayakolat /Sibutramin geri kazanım alanlarının oranı için hazırlanmış kalibrasyon eğrisi

Bu eğrilerden standart çözeltiler için regresyon analizi ile elde edilen doğru denklemleri ve regresyon katsayıları hesaplanıp, oldukça iyi lineerlikler sağladıkları görülmüştür (Bakınız Tablo 3.3.).

Tablo 3.3. İnternal standart geri kazanım miktarları için elde edilen kalibrasyon eğrisi değerleri (1 mL internal standart çözeltisi ilavesiyle) (n=6)

Doğrusal Aralık ($\mu\text{g/mL}$)	LR (Regresyon Doğrusu Denklemi)	R (Regresyon katsayısı)
10-100	$y = 0,0655x + 0,0258$	0,9978

Tablo 3.4.'de görüldüğü üzere, 10-100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ aralığındaki 12 farklı konsantrasyonda internal standart ilave edilmiş standartlardan oldukça iyi geri kazanımlar elde edilmiştir.

Tablo 3.4. Gliseril Gayakolat için elde edilen geri kazanım değerleri

Gliseril Gayakolat ($\mu\text{g/mL}$)			
Eklene ($\mu\text{g/mL}$)	Bulunan ($\mu\text{g/mL}$)	Geri Kazanım* (%)	Doğruluk BH** (%)
10	9,42	94,26	-5,8
12,5	12,64	101,12	1,12
20	21,26	106,32	1,3
25	25,48	101,94	1,92
30	30,93	103,12	3,1
50	51,19	102,37	2,38
60	62,08	103,48	3,46
70	74,89	106,99	6,98
80	82,02	102,53	2,525
85	89,65	105,47	5,47
90	91,72	101,90	1,91
100	103,83	103,83	3,83

*Geri Kazanım = Bulunan Miktar/Bilinen Miktar x 100,

** Bağıl Hata= Bulunan Miktar-Bilinen Miktar/Bilinen Miktar X 100

Yöntem, 100 mg Gliseril Gayakolat içeren ticari preparatına (şurup) uygulanmıştır. Bu preparattan metanol içerisinde 100 mg Gliseril Gayakolat ve 1 ml internal standart içecek şekilde, numuneler (6 kez tekrar edilerek) hazırlanmıştır. Bu numunelerden elde edilen sonuçlar Tablo 3.5. ve 3.6.'da gösterilmiştir.

Tablo 3.5. Ticari preparatlarda Gliseril Gayakolat için elde edilen tekrarlanabilirlik değerleri (n=6)

Gliseril Gayakolat ($\mu\text{g/mL}$)	
Eklene ($\mu\text{g/mL}$)	Bulunan ($\mu\text{g/mL}$)
50	54,62
50	53,45
50	54,75
50	54,52
50	54,25
50	54,52
SD	3,70
RSD	3,78

Tablo 3.6. Ticari preparatlarda Gliseril Gayakolat için elde edilen geri kazanım değerleri (n=6)

Gliseril Gayakolat ($\mu\text{g}/\text{mL}$)			
Eklenen ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Bulunan ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Geri Kazanım* (%)	Doğruluk BH** (%)
50	54,62	109,23	9,24
50	53,45	106,89	6,9
50	54,75	109,51	9,5
50	54,52	109,04	9,04
50	54,25	108,51	8,5
50	54,52	109,04	9,04

*Geri Kazanım = Bulunan Miktar/Bilinen Miktar x 100,

** Bağıl Hata= Bulunan Miktar-Bilinen Miktar/Bilinen Miktar X 100

Gliseril Gayakolat stok çözeltisinden 15, 20, 25, 40 ve 45 $\mu\text{g mL}^{-1}$ olacak şekilde ilave edilmiştir. Daha sonra aynı balon jöjelere ticari şurup stok çözeltisinden 5, 10, 25, 30 ve 35 $\mu\text{g mL}^{-1}$ olacak şekilde ilave edilmiş ve hepsinin toplam 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 'lik standartlar olması sağlanmıştır. Ayrıca yine aynı balon jöjelerin her birine 1'er mL (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) Sibutramin internal standart çözeltisinden katılmış ve elde edilen sonuçlar Tablo 3.7 'de görülmektedir.

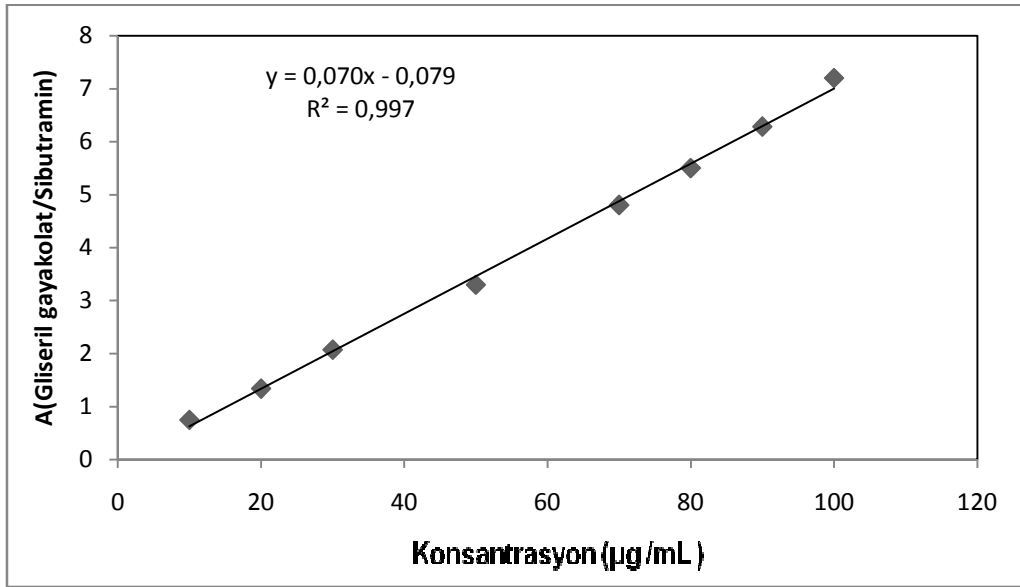
Tablo 3.7. Standart ekleme yöntemi ile elde edilen sonuçlar

Gliseril Gayakolat ($\mu\text{g}/\text{mL}$)		
Eklenen Miktar ($\mu\text{g}/\text{mL}$)		
Şurup Çözeltisi	Standart Çözelti	Bulunan Miktar ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
35	15	48,27
30	20	49,12
25	25	48,97
10	40	50,80
5	45	49,34
Ortalama Geri Kazanım (%)		98,60
Bulunan Ortalama Konsantrasyon ($\mu\text{g}/\text{mL}$)		49,12
Standart Sapma (SD)		2,32
Bağıl Standart Sapma (% RSD)		2,18

3.9. Plazma Ortamında Elde Edilen Bulgular

3.9.1. Yöntemin validasyonu

10-100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ konsantrasyon aralığında, 8 farklı standart kullanılarak, insan plazmasında (in vitro olarak) her bir standarda 1'er mL Sibutramin internal standart ilavesiyle tüm Gliseril Gayakolat standart çözeltileri metanol içerisinde hazırlanmış (spike yöntemi ile) ve HPLC ile analiz edilmiştir. Gliseril Gayakolat/Sibutramin pik eğrileri altında kalan alan oranlarına karşı, konsantrasyonlar grafik edilerek, kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Bu yöntem ile LOQ 4,21 ve LOD ise 1,26 $\mu\text{g mL}^{-1}$ olarak bulunmuştur.



Şekil 3.5. Plazma ortamında Gliseril Gayakolat / Sibutramin standart alanları oranı için hazırlanmış kalibrasyon eğrisi

Bu eğrilerden standart çözeltiler için regresyon analizi ile elde edilen doğru denklemleri ve regresyon katsayıları hesaplanıp, oldukça iyi lineerlikler sağladıkları görülmüştür (Bakınız Tablo 3.8.).

Tablo 3.8. Plazma ortamında internal standart analiz yöntemi ile elde edilen kalibrasyon eğrisi değerleri (1 ml internal standart çözeltisi ilavesiyle)

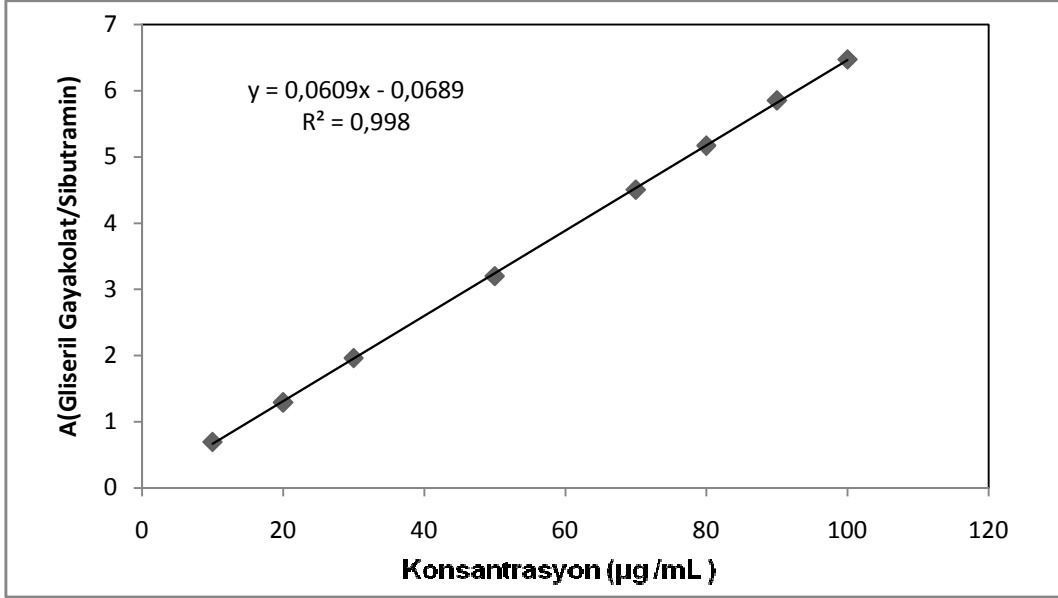
Doğrusal Aralık (µg /mL)	LR (Regresyon Doğrusu Denklemi)	R (Regresyon katsayısı)
10-100	$y = 0,0708x - 0,0795$	0,9977

Plazma ortamında yöntemin kesinliği, konsantrasyon eğrisi aralığından seçilen 3 farklı konsantrasyon ile (Gliseril Gayakolat için 20, 50 ve 90 µg /mL) gün-içi olarak belli aralıklarda toplam 6 kez (tekrarlanabilirlik için) ve 3 gün peş peşe belli aralıklarla da günler-arası kesinlik ölçümleri yapılmıştır. Gün-içi ve günler-arası kesinlik ve tekrarlanabilirlik sonuçları, bulunan değerlerin ortalaması, standart sapması ve bağıl standart sapması ile Tablo 3.9 'de verilmiştir.

Tablo 3.9. Gliseril Gayakolat standart çözeltilerinin gün-içi ve günler-arası kesinlik ve tekrarlanabilirlik analiz sonuçları (n=6)

Derişim (µg/mL)	Gün-içi				Günler-arası			
	Alan	X	SD	% RSD	Alan	X	SD	% RSD
20	394001 394566 380340 399811 380653 397563	391155	862,18	0,14	391927 381071 391294 388001 397748 384537	389096	1711,32	0,26
50	940030 946239 951123 943440 940992 945267	944515	7520,10	0,62	956553 940101 946520 940155 941404 945463	945032	7403,52	0,68
90	1802341 1803201 1795463 1805463 1807624 1798369	1802077	37262,15	1,98	1808045 1794575 1795404 1794223 1803498 1790324	1797678	32456,5	1,27

10-100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ konsantrasyon aralığında, 12 farklı standart kullanılarak, insan plazmasında her bir standarda 1'er mL Sibutramin internal standart ilavesiyle Gliseril Gayakolat tüm geri kazanım standart çözeltileri metanol içerisinde hazırlanmış ve HPLC ile analiz edilmiştir. Gliseril Gayakolat/Sibutramin pik eğrileri altında kalan alan oranlarına karşı, konsantrasyonlar grafik edilerek, kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Bu yöntem ile LOQ 4,25 ve LOD ise 5,28 $\mu\text{g mL}^{-1}$ olarak bulunmuştur.



Şekil 3.6. Plazma ortamında geri kazanımlar için Gliseril Gayakolat standartlarından hazırlanmış kalibrasyon eğrisi

Bu eğrilerden standart geri kazanım çözeltileri için regresyon analizi ile elde edilen doğru denklemleri ve regresyon katsayıları hesaplanıp oldukça iyi lineerlikler sağladıkları görülmüştür (Bkz. Tablo 3.10.).

Tablo 3.10. Plazma ortamında internal standart analiz yöntemi ile elde edilen geri kazanım kalibrasyon eğrisi değerleri (1 mL internal standart çözeltisi ilavesiyle)

Doğrusal Aralık ($\mu\text{g/mL}$)	LR (Regresyon Doğrusu Denklemi)	R (Regresyon katsayısı)
10-100	$y = 0,0609x + 0,0189$	0,998

Tablo 3.11’de de görüldüğü üzere, 10-100 µg mL⁻¹ aralığındaki 12 farklı konsantrasyonda internal standart ilave edilmiş Gliseril Gayakolat standartlarından oldukça iyi geri kazanımlar elde edilmiştir.

Tablo 3.11. Plazma ortamında Gliseril Gayakolat için elde edilen geri kazanım değerleri

Gliseril Gayakolat (µg /mL)			
Eklene (µg/mL)	Bulunan (µg/mL)	Geri Kazanım* (%)	Doğruluk BH** (%)
10	11,96	119,60	19,60
12,5	13,60	108,80	8,80
20	22,30	111,50	11,50
25	26,13	105,52	4,52
30	31,83	106,10	6,10
50	51,80	103,60	3,60
60	62,50	104,16	4,16
70	75,10	107,28	7,26
80	82,48	103,10	3,10
85	89,10	104,83	4,82
90	92,45	102,72	2,72
100	104,15	104,15	4,15

*Geri Kazanım = Bulunan Miktar/Bilinen Miktar x 100,

** Bağıl Hata= Bulunan Miktar-Bilinen Miktar/Bilinen Miktar X 100

Yöntem, plazma ortamında 100 mg Gliseril Gayakolat içeren ticari preparatına (şurup) uygulanmıştır. Bu preparattan metanol içerisinde 100 mg Gliseril Gayakolat ve 1 mL internal standart içerecek şekilde, numuneler (6 kez tekrar edilerek) hazırlanmıştır. Bu numunelerden elde edilen sonuçlar Tablo 3.12 ve 3.13 ’de gösterilmiştir.

Tablo 3.12. Plazma ortamında ticari preparatlarda Gliseril Gayakolat için elde edilen tekrarlanabilirlik değerleri (n=6)

Gliseril Gayakolat (µg /mL)	
Eklene (µg/mL)	Bulunan (µg/mL)
50	56,04
50	56,15
50	55,96
50	55,59
50	55,79
50	56,08
SD	2,90
RSD	2,60

Tablo 3.13. Plazma ortamında ticari preparatlarda Gliseril Gayakolat için elde edilen geri kazanım değerleri (n=6)

Gliseril Gayakolat ($\mu\text{g}/\text{mL}$)			
Eklenen ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Bulunan ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Geri Kazanım* (%)	Doğruluk BH** (%)
50	56,04	112,07	12,08
50	56,15	112,31	12,3
50	55,96	111,92	11,92
50	55,59	111,20	11,18
50	55,79	111,58	11,58
50	56,08	110,12	12,16

*Geri Kazanım = Bulunan Miktar/Bilinen Miktar x 100,

** Bağıl Hata= Bulunan Miktar-Bilinen Miktar/Bilinen Miktar X 100

Plazma ortamında Gliseril Gayakolat stok çözeltisinden 15, 20, 25, 40 ve 45 $\mu\text{g mL}^{-1}$ olacak şekilde ilave edilmiştir. Daha sonra aynı balon jöjelere ticari şurup stok çözeltisinden 5, 10, 25, 30 ve 35 $\mu\text{g mL}^{-1}$ olacak şekilde ilave edilmiş ve hepsinin toplam 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 'lik standartlar olması sağlanmıştır. Ayrıca yine aynı balon jöjelerin her birine 1'er mL (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) Sibutramin internal standart çözeltisinden katılmış ve elde edilen sonuçlar 3.14 'de görülmektedir.

Tablo 3.14.Plazma ortamında standart ekleme yöntemi ile elde edilen sonuçlar

Gliseril Gayakolat ($\mu\text{g}/\text{mL}$)		
Eklenen Miktar ($\mu\text{g}/\text{mL}$)		
Şurup Çözeltisi	Standart Çözelti	Bulunan Miktar ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
35	15	53,68
30	20	53,21
25	25	52,01
10	40	53,43
5	45	54,11
Ortalama Geri Kazanım (%)		106,70
Bulunan Ortalama Konsantrasyon ($\mu\text{g}/\text{mL}$)		53,29
Standart Sapma (SD)		2,30
Bağıl Standart Sapma (% RSD)		2,16

Tablo 3.15 'de görüldüğü üzere, metanol ve plazma ortamında hazırlanmış ticari preparatlar için (100 µg/mL'lik Gliseril Gayakolat) elde edilen veriler student t-testi ile karşılaştırılmıştır. Bu sonuçlara göre, t_{Tablo} değeri, $t_{\text{Hesaplanan}}$ değerinden büyük olduğu için iki yöntem arasında bir fark olmadığı sonucuna varılmıştır ($\alpha=0,05$, % 95 güvenle) (n=6).

Tablo 3.15. Standartlar içerisinde ve plazma ortamında hazırlanmış ticari preparatlar için (100 µg/mL Gliseril Gayakolat) elde edilen t-testi verileri ($\alpha=0,05$, % 95 güvenle) (n=6)

Deneme Sayısı (n=6)	Gliseril Gayakolat	
	Metanol ortamında	Plazma Ortamında
İstatistiksel Değerler		
Ortalama Değer (X)	108,71	111,62
Standart Sapma (SD)	0,94	0,76
Bağıl Standart Sapma (RSD, %)	0,87	0,68
Standart Hata	0,39	0,31
t-testi $t_{\text{hesaplanan}}$ (t_{tablo})	2,02 (2,57)	

Ayrıca Tablo 3.16 'de ise metanol ve plazma içerisindeki hazırlanmış ticari preparatlar için (100 µg/mL Gliseril Gayakolat için) elde edilen veriler F-testi ile karşılaştırılmıştır. Bu sonuçlara göre, F_{Tablo} değeri, $F_{\text{Hesaplanan}}$ değerinden büyük olduğu için kesinlikler arasında önemli bir fark olmadığı sonucuna varılmıştır ($\alpha=0,05$, % 95 güvenle) (n=6).

Tablo 3.16. Standartlar içerisinde ve plazma ortamında hazırlanmış ticari preparatlar için (100 µg/mL Gliseril Gayakolat) elde edilen F-testi verileri ($\alpha=0,05$, % 95 güvenle) (n=6)

Deneme Sayısı (n=6)	Gliseril Gayakolat	
	Metanol ortamında	Plazma Ortamında
İstatistiksel Değerler		
Ortalama Değer (X)	108,71	111,62
Standart Sapma (SD)	0,94	0,76
Bağıl Standart Sapma (RSD, %)	0,87	0,68
Standart Hata	0,39	0,31
F-testi F_{hesaplanan} (F_{tablo})	1,27 (5,05)	

Ayrıca Tablo 3.17 'de ise metanol ve plazma içerisinde hazırlanmış ticari preparatlar için (100 µg/mL Gliseril Gayakolat için) elde edilen veriler ANOVA testi ile karşılaştırılmıştır. ANOVA testine göre, P değeri $< 0,05$ olduğundan grup ortalamaları eşit değildir, yani metanol çözücüsü ve plazma ortamlarında ticari numuneler için elde edilmiş miktar analizi çalışması sonuçları birbirinden farklıdır.

Tablo 3.17. Standartlar içerisinde ve plazma ortamında hazırlanmış ticari preparatlar için (100 µg/mL Gliseril Gayakolat) elde edilen ANOVA testi verileri ($\alpha=0,05$, % 95 güvenle) (n=12)

ANOVA: TEK ETKEN						
Gruplar	Say	Toplam	Ortalama	Varyans		
Sütun 1	12	760,94	108,70	0,74		
Sütun 2	12	781,38	111,63	0,58		
ANOVA						
Varyans Kaynağı	SS	df	MS	F	P-değeri	F ölçütü
Gruplar Arasında	29	1	29,84	45,09	$2,15 \cdot 10^{-5}$	4,74
Gruplar İçinde	7,94	12	0,66			
Toplam	37,78	13				

BÖLÜM 4. SONUÇLAR

Farmasötik preparatlarda bulunan etken maddelerin en basit, en hızlı ve en ekonomik bir şekilde miktar analizlerini gerçekleştirmek, ilaç sanayisi için son derece önemlidir. Bu analizler yürütülürken, en yaygın şekilde kullanılan yöntemler Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ile yapılmış olanlardır. Genel olarak ng veya µg düzeyindeki tayinlerde, etken maddelerin tanınması ve ekonomik, hızlı ve kolay uygulanabilen bir yöntem olması dolayısıyla, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ile yapılan çalışmalar son derece talep görmektedir.

Yapılan literatür taraması sonucunda [8-12], Gliseril Gayakolat'ı tek başına içeren bir farmasötik preparat için yapılmış herhangi bir miktar analizi yöntemine rastlanılmamıştır. Ancak birden çok farklı etken maddelerin bir arada bulunduğu ilaç preparat karışımları içerisinde yapılmış miktar tayini çalışmaları mevcuttur.

Literatürde mevcut bulunan bu çalışmalardan farklı olarak, hem ticari preparatlarda hem de insan plazmasında (in-vitro olarak) Gliseril Gayakolat içeren ticari bir ilacın (200 mg/15 mL Gliseril Gayakolat içeren Vapo ekspektoran şurup) analizinin yapılabilmesi için kolay, hızlı, pratik ve ekonomik bir ters-faz DAD dedektörlü HPLC yöntemi geliştirilmiştir. Bu çalışma, hem farmasötik preparatlarda hem de insan plazmasında Gliseril Gayakolat'ın HPLC-DAD'la miktar tayinine yönelik yapılmış ilk çalışmadır. Aynı zamanda, bu çalışma daha önce gerçekleştirdiğimiz Gliseril Gayakolat etken maddesinin bir başka etken madde ile (Efedrin HCl) karışım halinde bulunduğu başka bir ticari preparatın miktar analizi çalışmasının devamı halinde olan bir çalışmadır. Plazma çalışmalarında, aynı kromatografik şartlarda, aynı yöntem ile sıvı-sıvı ekstraksiyon işlemine gerek kalmaksızın kısa zaman içerisinde, oldukça yüksek geri kazanımlar elde edilmiştir. Bu yöntemin rutin klinik kullanımda kantitatif amaçlı plazma çalışmaları için kolaylıkla kullanılabilir olması ve ayrıca kolay, ekonomik, hassas yeni bir yöntem olması tercih edilmesine olanak sağlayacaktır.

Bu çalışmalarımız esnasında, yine Gliseril Gayakolat etken maddesinin ticari bir preparatta tek başına miktar analizi için uygun bir GC-FID yöntemi de denenmiş, ancak şu anda elimizde bulunan FID dedektörünün yeterince düşük konsantrasyonları algılayamaması yüzünden, HPLC yöntemiyle karşılaştırma yapmayı düşündüğümüz çalışmamızın bu kısmı eksik kalmıştır ve sonuçlar burada verilmemiştir.

Geliştirilen yöntemin plazma düzeylerinin istatistiksel olarak karşılaştırılarak değerlendirilmesi için de, spesifiklik, hassaslık, kesinlik, tutarlılık, doğruluk ve tekrarlanabilirlik gibi bütün validasyon parametreleri uygulanarak, biyoanalitik yöntem validasyonu çalışması yapılmış ve ayrıca biyoistatistik yönünden de değerlendirilmiştir.

KAYNAKLAR

- [1] Kayaalp, S.O., Tıbbi Farmakoloji. Hacettepe-TAŞ yayını, Ankara, Eylül 2002; 11. Baskı, 80, 590, 985
- [2] İsmet Dökmeçi, Sağlık Yüksek Okullar için Farmakoloji. İstanbul medikal yayını, İstanbul, Mart 2007; 1. Baskı, 5, 120, 126, 127
- [3] İsmet Dökmeçi, Farmakoloji, Temel Kavramlar. Nobel tıp yayınevi, İstanbul, Ocak 2000; 1. Baskı, 5, 6
- [4] İsmet Dökmeçi, Farmakoloji, Temel Kavramlar. Nobel tıp yayınevi, İstanbul, Ocak 2000; 1. Baskı, 8, 9
- [5] <http://www.sagliklinik.com/soguk-alginligi.html>
- [6] <http://www.ilaclari.net/tag/oksuruk-surubu-isimleri>
- [5] <http://www.ilacpedia.com/pedrin-oksuruk-surubu>
- [6] <http://chemicaland21.com/lifescience/phar/EPHEDRINE%20HYDROCHLORIDE.htm>
- [7] <http://www.chemblink.com/products/93-14-1.htm>
- [8] LOUHAİCHİ M.R., JEBALİ S., LOUESLATİ M.H., ADHOUM N., MONSER L., Simultaneous determination of pseudoephedrine, pheniramine, guaifenesin, pyrilamine, chlorpheniramine and dextromethorphan in cough and cold medicines by high performance liquid chromatography. Talanta, 2009; 78: 991-997
- [9] EL-GİNDY A., EMARA S., MESBAH M.K., HADAD G.M., New Validated Methods for the Simultaneous Determination of Two Multicomponent Mixtures Containing Guaifenesin in Syrup by HPLC and Chemometrics-Assisted UV-Spectroscopy. Analytical Letters, 2006; 39: 2699-2723
- [10] ANSARI M., KAZEMIPOUR M., SHAHRIAR M., Simultaneous Quantitation of Theophylline and Guaifenesin in Syrup by HPLC, Derivative and Derivative Ratio Spectrophotometry for Quality Control Purposes. Iranian Journal of Pharmacology and Therapeutics, 2006; 5: 67-72

- [11] CHEN X., HUANG J., KONG Z., ZHONG D., Sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of paracetamol and guaifenesin in human plasma. *Journal of Chromatography B*, 2005; 817: 263-269
- [12] DARRYL J., H.Y. CHEUNG., A chromatographic method for rapid and simultaneous analysis of codeine phosphate, ephedrine HCl and chlorpheniramine maleate in cough-cold syrup formulation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2003; 30: 1595-1601
- [13] ANONİM, Biyoyararlanım ve biyoeşdeğerlik yasal yönü, II Ulusal Biyoyararlanım ve Biyoeşdeğerlik Sempozyumu. Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Şafak Matbaacılık, Fatum, Ankara, 17-18 Nisan 1995; 1
- [14] ANONİM, Biyoyararlanım ve biyoeşdeğerlik genel ilkeler, I. Ulusal Biyoyararlanım ve Biyoeşdeğerlik Sempozyumu. Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Şafak Matbaacılık, FATUM, Ankara, 9-10 Mayıs 1994; 197-207-208
- [15] 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
- [16] Gülhan S. (1999). "Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Validasyon Konulu Seminer" Hansen. H.A. , Emborg. C. (1992). "Experimental desing in the development and characteriation of a HPLC method for aminoacids" *Journal of Chromatography A*, 2, 171-180, 626
- [17] Turgut Gündüz, İnrümentel Analiz. Gazi kitabevi, Ankara, Şubat 2002; 6. Baskı, 1177
- [18] Turgut Gündüz, İnrümentel Analiz. Gazi kitabevi, Ankara, Şubat 2002; 6. Baskı, 1203, 1204, 1205
- [19] Skoog, D., Holler, F.J., Nieman, T.A., Enstrümentel Analiz İlkeleri, Çeviri Editörleri: Kılıç, E., Köseoğlu, F., Yılmaz, H., Bilim Yayıncılık, Ankara, 1998. 299-347, 674-766
- [20] Turgut Gündüz, İnrümentel Analiz. Gazi kitabevi, Ankara, Şubat 2002; 6. Baskı, 1180, 1181, 1182

EKLER

EK 1. İstatiksel Katsayıların Hesaplanması

Bağıl standart sapmanın hesaplanması

$$\text{Bağıl standart sapma (BSS)} = \frac{SS}{X} \times 100$$

SS: standart sapma

X: Aritmetik ortalama

% Bağıl Hata Hesaplanması

$$\% \text{ Bağıl hata (\% BH)} = \frac{(\text{Olması gereken miktar} - \text{Bulunan miktar})}{\text{Olması gereken miktar}} \times 100$$

Standart Hata Hesaplanması

$$\text{Standart hata (SH)} = \frac{SS}{\sqrt{n}}$$

SS: standart sapma

n : ölçüm sayısı

% Geri Kazanım Hesaplanması

$$\% \text{ Geri Kazanım} = \frac{\text{Bulunan miktar}}{\text{Olması gereken miktar}} \times 100$$

Evren Ortalamasının Güven Aralığının Hesaplanması

$$\mu = X \pm S_x t \quad \text{veya} \quad X - S_x \leq \mu \leq X + S_x$$

μ : Evren ortalaması

X : Örneklem ortalaması

S_x : Standart sapma

t : Seçilen yanılma düzeyi (μ) ve (n-1) serbestlik derecesindeki t tablosunda bulunan değer.

LOQ ve LOD Hesaplanması

$$\text{LOD} = 10 * SS / m$$

$$\text{LOQ} = 3 * SS / m$$

SS : Standart sapma

m : Eğim

EK 2. Tez içinde Kullanılan İstatiksel Testler

Korrelasyon Katsayısı Önem Kontrolü

Bu test ile bulunan katsayısının önemli bir katsayı mı yoksa tesadüfe bağlı bir katsayı mı olduğu anlaşılmaktadır.

1. H_0 : Korelasyon katsayısı tesadüfe bağlı bir değerdir ($r=0$).
2. Test istatistiğinin hesaplanması:

$$T = \frac{r}{Sr} \qquad Sr = \frac{\sqrt{1-r^2}}{n-2}$$

T = Test istatistiği,

r = Korrelasyon katsayısı,

Sr = Korrelasyon katsayısının standart hatası.

3. Yanılma olasılığı $\alpha = 0,05$ seçilmiştir.
4. Serbestlik derecesi = $n-2$ (n:ölçüm sayısı)
5. $\alpha = 0,05$ yanılma düzeyinde ve $n=2$ serbestlik derecesindeki tablo t değerine bakılır.
6. Karşılaştırma: Hesapla bulunan t değeri tablo t değerinden büyükse H_0 reddedilir.

Karar: a) Korrelasyon katsayısı önemli bir değerdir, tesadüfen bulunmuş bir değer değildir (t_h = hesaplanan değer, $p<0,05$).

b) Korrelasyon katsayısı önemli bir değer değildir, tesadüfen bulunmuş bir değerdir (t_h =hesaplanan değer, $p>0,05$).

Doğrusallıktan Ayrılış Önem Kontrolü

1. Kareler toplamı bulunur:

a) Regresyon Kareler Toplamı (RKT):

$$RKT = \frac{[\sum xy - \frac{(\sum x)(\sum y)}{n}]^2}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}$$

b) Y Ortalamadan Ayrılış Kareler Toplamı (YOAKT):

$$YOAKT = \sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n}$$

c) Regresyondan Ayrılış Kareler Toplamı (RAKT):

$$RAKT = YOAKT - RKT$$

2. Serbestlik derecesi bulunur:

a) Regresyon Serbestlik Derecesi (RSD) = 1

b) Y Ortalamadan Ayrılış Serbestlik Derecesi (YOASD) = n-1

c) Regresyondan Ayrılış Serbestlik Derecesi (RASD) = YOASD - RSD

3. Kareler ortamları bulunur:

a) Regresyon Kareler Ortalaması = RKT / RSD

b) Regresyon Ayrılış Kareler Ortalaması (RAKO) = RAKT / RASD

4. H_0 = Derişim ile dedektör cevabı arasındaki ilişki doğrusal değildir.

5. Yanılma olasılığı $\alpha = 0,05$ seçilmiştir.

6. $F = RKO / RAKO$

7. $p = 0,05$ düzeyinde RSD ve RASD serbestlik derecesindeki tablo F değerleri bulunur.

8. Karşılaştırma: Hesapla bulunan F değeri tablo F değerinden büyükse H_0 hipotezi reddedilir, küçükse kabul edilir.

9. Karar: a) Derişim ile dedektör cevabı arasındaki ilişki doğrusaldır. ($F_h =$ Hesaplanan değer, $p < 0,05$).

b) Derişim ile dedektör cevabı arasındaki ilişki doğrusal değildir. ($F_h =$ Hesaplanan değer, $p > 0,05$).

t-Testi

İki ortalama arasındaki fark olup olmadığını test eder.

$$s^2 = [(n_1 - 1) s_1^2 + (n_2 - 1) s_2^2] / (n_1 + n_2 - 2)$$

$$t = (x_1 - x_2) / s \cdot \sqrt{(1/n_1 + 1/n_2)}$$

n_1 : 1. yöntemin ölçüm sayısı

n_2 : 2. yöntemin ölçüm sayısı

s_1 : 1. yöntemin standart sapması

s_2 : 2. yöntemin standart sapması

x_1 : 1. yöntemin ortalaması

x_2 : 2. yöntemin ortalaması

Serbestlik derecesi = $n_1 + n_2 - 2$

1. H_0 = İki ortalama arasında fark yoktur.

2. $\alpha = 0,05$ yanılma düzeyinde ve $n_1 + n_2 - 2$ serbestlik derecesindeki tablo t değerine bakılır.

3. Karşılaştırma: Hesapla bulunan t değeri tablo t değerinden büyükse, H_0 hipotezi reddedilir, küçükse kabul edilir.

4. Karar: a) Ortalamalar arasında fark yoktur, (Hesaplanan değer, $p > 0,05$).

b) Ortalamalar arasında fark vardır, (Hesaplanan değer, $p < 0,05$).

Tek Yönlü Varyans Analizi

1. Kareler toplamları bulunur.

a) Genel kareler toplamı (GnKT)

$$GnKT = \sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}$$

b) Gruplar arası kareler toplamı (GAKT)

$$GAKT = \sum \left[\frac{(\sum x_j)^2}{n_j} \right] - \frac{(\sum x)^2}{n}$$

c) Denekler arası kareler toplamı (DAKT)

$$DAKT = \sum \left[\frac{(\text{Her bir satır toplamı})^2}{\text{Her bir satırdaki ölçüm sayısı}} \right] - \frac{(\sum x)^2}{n}$$

d) Etkileşim (hata) kareler toplamı $\Rightarrow HKT = GnKT - GAKT - DAKT$

2. Serbestlik derecesi bulunması

- a) Genel serbestlik derecesi $\Rightarrow GnSD = n_j \cdot k - 1$
- b) Gruplar arası serbestlik derecesi $\Rightarrow GASD = k - 1$
- c) Denekler arası serbestlik derecesi $\Rightarrow DASD = n_j - 1$
- d) Hata serbestlik derecesi $\Rightarrow HSD = (n_j - 1)(k - 1)$

3. Kareler ortalamasının bulunması

- a) Gruplar arası kareler ortalaması $\Rightarrow GAKO = GAKT / GASD$
- b) Denekler arası kareler ortalaması $\Rightarrow DAKO = DAKT / DASD$
- c) Hata kareler ortalaması $\Rightarrow HKO = HKT / HSD$

4. $H_0 =$ Yöntemler arasında fark yoktur.

$H_1 =$ En az bir ölçüm diğerlerinden farklıdır.

5. Yanılma olasılığı $\alpha = 0,05$ seçilmiştir.

6. $F = GAKO / HKO$

7. $\alpha = 0,05$ düzeyinde GASD ve HSD serbestlik derecelerindeki tablo F değerleri bulunur.

8. Karşılaştırma: Hesaplanan değer F (F_H) değeri tablo F (F_T) değerinden büyükse H_0 reddedilir, küçükse kabul edilir.

9. Karar: Yöntemler arasında fark yoktur ($F =$ Hesaplanan değer, $p > 0,05$) veya yöntemlerden en az biri farklıdır ($F =$ Hesaplanan değer, $p < 0,05$).

ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında İstanbul'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Leman İlköğretim Okulu'nda ve lise öğrenimini de Ümraniye Lisesi'nde tamamladı. 2005 yılında Denizli Pamukkale Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü'nü kazandı ve 2009 yılında Kimyager olarak mezun oldu. 2009 yılında ise Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisansa başladı.