

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ÇOKLU İLAÇ KARIŞIMLARINDA ETKEN MADDELERİN
KANTİTATİF TAYİNLERİ İÇİN METOD GELİŞTİRME**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimyager Ayşenur KORKMAZ

Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA

Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Abdil ÖZDEMİR

Aralık 2006

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ÇOKLU İLAÇ KARIŞIMLARINDA ETKEN MADDELERİN
KANTİTATİF TAYİNLERİ İÇİN METOD GELİŞTİRME**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimyager Ayşenur KORKMAZ

Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA

Bu tez .. / .. /2007 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.

.....
Jüri Başkanı

.....
Üye

.....
Üye

TEŞEKKÜR

Tezin hazırlanması aşamasında bana her türlü desteği veren, gösterdiği iyi niyet ve sabırdan dolayı danışman hocam sayın Yrd. Doç. Dr. Abdil ÖZDEMİR `e ve laboratuvar çalışmalarımnda yardımını esirgemeyen Sakarya Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü öğretim üyeleri ve araştırma görevlilerine teşekkürü bir borç bilirim.

Hayatımda yaptığım her şeye ve bana destek oldukları için çok sevgili aileme; annem Havva KORKMAZ ve babam Şaduman KORKMAZ' a candan teşekkür ederim.

Ayşenur KORKMAZ
Aralık 2006, ADAPAZARI

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	viii
TABLOLAR LİSTESİ.....	ix
ÖZET.....	x
SUMMARY.....	xi
BÖLÜM 1.	
GİRİŞ.....	1
BÖLÜM 2.	
ETKEN MADDELERİN YAPISI VE ÖZELLİKLERİ.....	3
2.1. Amoksisilinin Yapısı Ve Özellikleri.....	3
2.2. Klavulanik Asitin Yapısı Ve Özellikleri.....	4
BÖLÜM 3.	
SPEKTROSKOPİK YÖNTEMLERLE MİKTAR TAYİNİ.....	5
3.1. İlaç Etken Maddelerinin UV Spektroskopisi ile Miktar Tayini	6
3.1.1. Beer Kanununda Sapmalar.....	7
3.1.2. Karışımların Analizi.....	8
3.2. İlaç Etken Maddelerinin Görünür Bölgede Miktar Tayini.....	11
BÖLÜM 4.	
TÜREV SPEKTROFOTOMETRİSİ.....	13
4.1. Türev Tekniğinin Gelişimi.....	13
4.2. Teorik Önemi.....	14

4.2.1. Optik metot.....	15
4.2.2. Düşük sıcaklık spektroskopisi.....	15
4.2.3. Hesaplama metotları.....	16
4.2.3.1. Eğriye uydurma metodu.....	16
4.2.3.2. Sayısal çok bileşenli analiz.....	16
4.2.3.3. Fourier yöntemi.....	18
4.3. Türev Alma ve Türev Spektrumu.....	19
4.4. Analitik Bandların Türevleri.....	23
4.5. Türev ve Çift Dalga Boylu Spektrofotometri.....	26
4.5.1. Türev Spektrumlarının Uygulamaları.....	27
BÖLÜM 5.	
ESI-MS	
(ELEKTROSPREY İYONİZASYON-KÜTLE SPEKTROMETRİSİ).....	28
BÖLÜM 6.	
HPLC (YÜKSEK PERFORMANS SIVI KROMATOĞRAFİSİ).....	31
6.1. HPLC Cihazının Çalışma Prensipleri.....	31
6.2. Kromatografide Kantitatif Çalışmalar.....	32
6.2.1. Kolondaki madde kaybı.....	32
6.2.2. Dedektör cevabı.....	33
6.3. HPLC’de Çalışma Koşullarının Saptanması.....	33
6.4. Kantitatif Analiz.....	35
6.4.1. İnternal standart yöntemi.....	37
6.4.2. Eksternal standart yöntemi.....	38
6.4.3. Standart ekleme yöntemi.....	38
6.5. HPLC ile Yapılan İlaç Analizi.....	40
BÖLÜM 7.	
DENEYSEL KISIM.....	41
7.1. Enstrümantasyon Ve Mobil Faz.....	41
7.2. Ticari Tablet Formülasyonu.....	41

7.3. Standart Çözeltiler.....	42
7.4. Tablet Analizi.....	42
BÖLÜM 8.	
SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	43
8.1. Birinci Türev Metodu.....	48
8.2. ESI-MS Metot.....	49
8.3. HPLC Metodu.....	50
8.4. Metot Validasyonu.....	51
8.5. Sonuçlar.....	56
KAYNAKLAR.....	57
ÖZGEÇMİŞ.....	60

SİMGELER VE KISATMALAR LİSTESİ

$^{\circ}\text{C}$: Santigrad Derece
mm	: Milimetre
μm	: Mikrometre
nm	: Nanometre
mg	: Miligram
μg	: Mikrogram
mL	: Mililitre
μL	: Mikrolitre
A	: Absorbans
A_{max}	: Maksimum Absorbans
λ_{max}	: Maksimum Dalga Boyu
ϵ	: Molar Absorptivite
λ	: Dalga Boyu
σ	: Sigma
T	: Transmittans
I_0	: Giren Işığın Şiddeti
I	: Çıkan Işığın Şiddeti
C	: Konsantrasyon
a	: Absorptivite
Q	: Absorptivite oranı
l	: Yol Uzunluğu
m	: Eğim
b	: Doğrunun y Eksenini Kestiği Nokta
d	: Birinci Türev
d^2	: İkinci Türev
S	: Hassasiyet
RC	: Resistans-Sığa Devresi
AMX	: Amoksisilin

KL _V	: Klavulanik Asit
CL _N	: Klindamisin
ASP	: Aspirin
ESI-MS	: Elektrosprey İyonizasyon Kütle Spektrometrisi
HPLC	: Yüksek Performans sıvı Kromatografisi
ESI	: Elektrosprey İyonizasyon
UV	: Ultraviyole
UV-VIS	: Ultraviyole Görünür
IR	: İnfrared (Kızılötesi)
SNR	: Sinyal Gürültü Oranı
S _c	: Konsantrasyonun Standart Sapması
S _m	: Eğimin Standart Sapması
S _y	: Regresyon Oranı
S _b	: Regresyon Denkleminin Eğimi
N	: Kalibrasyon İçin Yapılan Ölçüm Sayısı
L	: Örnek İçin Yapılan Ölçüm Sayısı
DAD	: Diyot Array Dedektör
IS	: İnternal Standart
LOD	: Tayin Limitleri
LOQ	: Kuantifikasyon Limitleri
CL	: Güvenlik Limiti
SE	: Standart Hata
ANOVA	: Varyansın Analizi

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Amoksisilin trihidrat ;C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₅ S3H ₂ O.....	3
Şekil 2.2. Potasyum klavulanat; C ₈ H ₈ NO ₅ K.....	4
Şekil 3.1. Dalga boyu - absorptivite grafiği.....	9
Şekil 4.1. Üç pikin üst üste gelmesi.....	17
Şekil 4.2. Fourier için bir eğri üzerinde noktalar.....	18
Şekil 4.3. Belirtilen noktalarda eğrinin noktaları.....	19
Şekil 4.4. Işığın bir örnekten geçerken şiddetindeki azalma.....	20
Şekil 4.5. σ ve FWHM'nin sistematik çizimi.....	24
Şekil 4.6. Analitik bandın Gauss olarak hesaplanması.....	25
Şekil 4.7. İki bileşenli bir karışımın absorpsiyon spektrumu.....	26
Şekil 4.8. Bir türev spektrumunun standart bir geçirgenlik spektrumuyla kıyaslanması.....	27
Şekil 5.1. Pozitif iyon modunda elektrosprey oluşumu.....	28
Şekil 5.2. Elektrosprey tekniğinde bir protein ve ligandın gaz fazına taşınmasındaki basamaklar.....	29
Şekil 5.3. Bir elektrosprey aletinin kütle ile birleşimi ve iyon yolu kademeleri.	30
Şekil 6.1. Standart ilave eğrisi.....	40
Şekil 8.1. Suda AMX (---) ve KLV (—) absorpsiyon spektrumları.....	44
Şekil 8.2. Suda AMX (---) ve KLV (—) birinci türev spektrumları.....	45
Şekil 8.3. Suda AMX 35 µg/mL, KLV 5 µg/mL ve IS 30 µg/mL tablet formülasyonunun negatif iyon ESI-MS spektrumları.....	46
Şekil 8.4. Suda AMX 35 µg/mL, KLV 5 µg/mL ve IS 30 µg/mL tablet formülasyonunun pozitif iyon ESI-MS spektrumları.....	48
Şekil 8.5. Suda AMX ve KLV HPLC kromatogramı.....	49

TABLolar LİSTESİ

Tablo 8.1. Üç farklı metottan elde edilen kalibrasyon grafiklerinin istatistiksel sonuçları.....	52
Tablo 8.2. Uygulanan kalibrasyon teknikleri ile farklı sentetik karışımlarda AMX ve KLV tayini için elde edilen geri kazanımlar.....	53
Tablo 8.3. Önerilen kalibrasyon teknikleri tarafından ticari tablete uygulanan standart ekleme metodunun sonuçları.....	54
Tablo 8.4. Önerilen kalibrasyon metotları tarafından farmakolojik dozaj formlarında elde edilen sonuçlar.....	55

ÖZET

Anahtar kelimeler: Amoksisilin, Potasyum klavulanat, Birinci türev, Elektrosprey kütle spektrofotometrisi, HPLC.

Sentetik karışımlarda ve farmakolojik tabletlerde amoksisilin trihidrat (AMX) ve potasyum klavulanatın (KLV) eş zamanlı tayini için üç değişik metot tanımlanmaktadır. İlk metot; zero-crossing ölçme metodu ile birinci türev ultraviyole spektrofotometrisine dayanır. İkinci metot; elektrosprey iyonizasyon kullanılarak kütle spektrofotometri metodunu esas alır. Elektrosprey çalışmaları için internal standart olarak negatif ve pozitif iyon modlarında sırasıyla aspirin (ASP) ve klindamisin (CLN) kullanıldı. Kalibrasyon fonksiyonu birinci türev metodunda kullanılan konsantrasyon aralıklarında kuruldu. AMX ve KLV analizi için ($\lambda=220\text{nm}$) ultraviyole dedektörü içeren ters faz yüksek performans sıvı kromatografik bir metot geliştirildi. Kromatografi 0,8 mL/min akış hızında pompalanan fosfat tampon-asetonitrilden (40:60, v/v) oluşan mobil fazın C-18 kolonun üzerinden yürütülmesi ile gerçekleştirildi. Uygulanan metotlar seçicilik, tayin limiti, geri kazanım, kesinlik ve doğruluk göz önünde tutularak değerlendirildi. Her iki ilaç için metotlar; AMX için 21–49 $\mu\text{g/mL}$ ve KLV için 3-7 $\mu\text{g/mL}$ aralıklarında seçici, linear ($R \approx 0,99$), kesin (geri kazanım=100–105%) ve doğru (<3% R.S.D.) bulundu. Her üç metot için de tayin ve kuantifikasyon limitleri belirlendi.

COMPARATIVE STUDY OF ELECTROSPRAY MASS SPECTROMETRY AND FIRST DERIVATIVE METHOD AND VALIDATION BY HPLC METHOD

SUMMARY

Keywords: Amoxicillin; Potassium klavulanate; First derivative; Electrospray mass spectrometry; HPLC.

Three different methods are described for the simultaneous determination of amoxicillin trihydrate (AMX) and potassium klavulanate (KLV) in synthetic mixtures and pharmaceutical tablets. The first method depends on first-derivative ultraviolet spectrophotometry with zero-crossing measurement method. The second method is based on mass spectrometric method utilizing electrospray ionization. For the electrospray studies in negative and positive ion modes, aspirin (ASP) and clindamycin (CLN) were used, respectively as internal standards for quantification. The calibration function was established in the same concentration ranges that were used for the first derivative method. A reversed-phase high performance liquid chromatographic (RP-HPLC) method involving ultraviolet detection ($\lambda = 220$ nm) was developed for analysis of AMX and KLV. Chromatography was carried out on C-18 column with mobile phase comprising of phosphate buffer-acetonitrile (40:60, v/v) pumped at flow rate of 0,8 mL/min. The proposed methods have been validated with regard to selectivity, detection limit, recovery, accuracy and precision. For both drugs, methods were found to be selective, linear ($R \approx 0,99$), accurate (recovery = 100–105%) and precise (<3% R.S.D.) in the range of 21–49 $\mu\text{g/mL}$ for AMX and 3–7 $\mu\text{g/mL}$ for KLV. The limit-of-detection and limit-of-quantification of the method were determined for three methods.

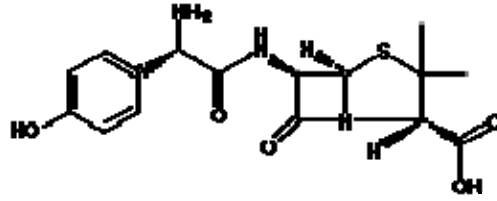
BÖLÜM 1. GİRİŞ

Çoklu karışımların ayırım yapılmadan analizi farmakolojik, gıda, adli ve diğer birçok değişik alanda çok büyük bir öneme sahiptir. Kemometrik metotlar ön ayırma işlemini gerektirmeden bileşiklerin çoklu karışımlarının analizine olanak veren sayısal metotlardır [1-6]. Sayısal metotların uygulanması ileri derecede matematiksel teorinin bilinmesini gerektirir ve birçok kimyager bunların detaylarına inmek istemez. Kolay ve hızlı veri analizi için; karışımların çakışan spektrumları üzerinde türev metotları [7-12] olarak adlandırılan grafik metotları kullanılır. Grafik metotlar karışımlar için ön ayırma gerektirmemesine rağmen ilave olarak her bir spektrumun türevini alma gibi matematiksel hesaplamalar gerektirir. Son zamanlarda farmakoloji alanında, kütle spektrometresi özellikle ilaçların kantitatif çalışmaları için sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır [13-18]. Kütle spektrometresi özellikle HPLC ile birleşince kantitatif çalışmalar için iyi sonuçlar vermektedir. HPLC'nin kütle spektrometresi ile birlikte kullanılması elektrosprey iyonlaşma tekniğini kullanmayı gerektirir. Elektrosprey iyonlaşma kütle spektrometresi (ESI-MS) olarak adlandırılan bu teknik yumuşak bir iyonlaşma tekniği olarak bilinir ve uygulanan voltaja bağlı olarak molekül parçalanmaları minimum miktara indirilebilmektedir. ESI-MS tekniği hiçbir ayırma tekniği gerektirmez. İyonlaşma metoduna bağlı olarak, kütle spektrometresi ile yapılan kantitatif çalışmalarda değişik yollar izlenmek zorundadır. Örneğin; elektron çarpma iyonlaşma metodu çok fazla moleküler parçalanmaya yol açar ve hesaplamaları zorlaştırır, ama moleküler parçalanma sonucu oluşan belirgin iyonlar kantitatif çalışmalar için kullanılabilir. Elektrosprey gibi daha yumuşak iyonlaşma metotları kullanılarak hiçbir ayırmaya gerek olmaksızın bir internal standart kullanarak karışımların veya tekli bileşiklerin miktar tayinini yapmak daha mümkündür. Kromatografik metotlar farmakolojide kalitatif ve kantitatif çalışmalarda sıkça kullanılmaktadır. HPLC bu alanda kullanılan en temel metottur. Bu metodun dezavantajları çok pahalı olması, ekstra çalışma gerektirmesi, zaman alıcı olması ve bazen karışımların ayrılmasının mümkün olmamasıdır.

Bu çalışmada AMX ve KLV'nin sentetik karışımlarda ve ilaç formülasyonlarındaki ikili karışımlarının kantitatif olarak çözümlenmesi için üç farklı metot geliştirildi. AMX ve KLV'nin tabletlerdeki miktarları arasındaki fark bu bileşiklerin farmakolojik preparatlarda spektrofotometrik metotlarla kantitatif olarak tayin edilmesini zorlaştırır. Önerilen metotlar bu gibi problemleri çözerek olumsuz etkileri ortadan kaldırmaktadır. Spektrofotometrik ve kromatografik metotlar farmakolojide çok iyi bilinen metotlardır ama ESI-MS metodu bu alanda tam olarak bilinip kullanılmamaktadır. Bu çalışmanın ana amacı; spektrofotometrik ve ESI-MS metot geliştirmek, aynı bileşikler için elde edilen sonuçları karşılaştırmak ve metotların avantajlarını ve eksiklerini tartışmak, son olarak ta bu metotları HPLC kullanarak doğrulamaktır.

BÖLÜM 2.ETKEN MADDELERİN YAPILARI VE GENEL ÖZELLİKLERİ

2.1. Amoksisilin yapı ve genel özellikleri

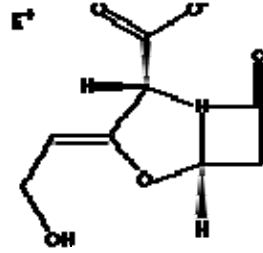


Şekil 2.1. Amoksisilin trihidrat; $C_{16}H_{19}N_3O_5 \cdot 3H_2O$

Ampisilin, penisilin ailesinin bir üyesi olan yarı sentetik bir antibiyotiktir. Gram negatif bakterilerin sebep olduğu enfeksiyonlara karşı tedavilerde kullanılan penisilinlerin kullanılabilirliğini ve faydalarını genişletmek için yaygın spektrumlu penisilinler (ampisilin, amoksisilin, karbenisilin ve trikarsillin) geliştirildi. Bu 6-aminopenisillanik asitin merkez yapısına asit radikalleri bağlanarak yapılır. Kimyasal olarak D-(-)-6-(2-amino-2-fenilasetamido)-3,3-dimetil-7-oxo-4-thia-1-azabicyclo[3.2.0]heptan-2-karboksilikasit trihidrat'tır. En sık kullanılan doğal penisilin olan penisilin G'ye benzer bir etkiyle ampisilin (veya alfa-aminobenzilpenisilin) mide asitlerine karşı daha dayanıklıdır ve bundan dolayı ağız yoluyla kullanılabilir; ayrıca bu bakterilerin belirgin ırklarına karşı daha aktiftir. Düzenli olarak yaygın bilinen üriner enfeksiyonların tedavisinde, bazı solunum yolu enfeksiyonlarının ve *Hemophilus influenzae*'nin (bakteriyel menenjitlerin bilinen en yaygın sebebi) birçok ırkının ampisiline karşı dirençli olmasına ve diğer birçok ilaçla birlikte kullanılmasına rağmen çocuklardaki bakteriyel menenjitlerin tedavisinde kullanılır. Ampisilin ciltte tahrişe neden olan alerjik reaksiyonlar gibi yan etkileri diğer penisilinleriyle benzerdir. Bu gruptaki diğer ilaçlara alerjisi olan insanlar ampisiline de reaksiyon verir. Derideki tahrişin tekrar oranı diğerlerine göre ampisilinde daha yüksektir. Amoksisilin ise ampisiline benzeyen, birçok gram pozitif ve gram negatif mikroorganizmaya karşı bakteriyel etkisi olan geniş spektrumlu bir antibiyotiktir. Kimyasal olarak; (2S,5R,6R)-6-[(R)-(-)-2-amino-2-(p-

hidroksifenil)asetamido]-3,3-dimetil-7-oxo-4-thia-1-azabicyclo[3.2.0]heptan-2-karboksilik asit trihidrattır. Amoksisilin de tifoid ve enterik ateşte olduğu gibi gram negatif çubuk bakterilerin sebep olduğu üriner enfeksiyonların tedavisinde kullanılır.

2.2. Klavulanik Asidin Yapısı ve Genel Özellikleri



Şekil 2.2. Potasyum klavulanat; $C_8H_8NO_5K$

Antibiyotiklerin etkisini arttıran beta laktamaz inhibitörüdür ve beta laktamaz organizmaların sebep olduğu enfeksiyonların tedavisinde penislinlerle (daha çok amoksisilinle) kombinasyon olarak kullanılır. Beta laktamaz enzimler bazı bakteriler tarafından üretilir ve beta laktam antibiyotiklere direnç yeteneğine sahiptir. Bu enzimler beta laktam halkasını açarak antibiyotiklerin antibakteriyel özelliklerini deaktive ederler. Beta laktamaz inhibitörleri kendi kendilerine düşük antimikrobiyel fonksiyonlara sahiptir ve gerçek bir beta laktam antibiyotik ile birleşirler. Beta laktam inhibitörlerin fonksiyonları; aktif olmayan bir molekül oluşturmak üzere beta laktamaz enzimlerine bağlamaktır, böylece gerçek beta laktam antibiyotik yıktığı bakteri duvarından girer. Beta laktamaz inhibitörleri klavulanik asit, sulbaktam ve tazobaktamı kapsar.

BÖLÜM 3. SPEKTROSKOPİK YÖNTEMLERLE MİKTAR TAYİNİ

Tüm spektroskopik analizler, madde çözeltisinden geçen enerji miktarı ile madde içermeyen çözücünden geçen enerji miktarının karşılaştırılmasına dayanır ve böylece tayin edilen T değeri,

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (3.1)$$

sonrasındaki hesaplamalarda kullanılır [20].

$$\log \frac{1}{T} = A \quad (3.2)$$

$$\log \frac{I_0}{I} = A \quad (3.3)$$

Bir spektrofotometrenin geçen ışın alanı genlikle 100 eşit birime bölünmüş olup % geçirgenliği onda birine kadar okuma olanağı vardır; bununla beraber konsantrasyon tüm skala üzerinde aynı doğrulukla tayin edilemez. Analizlerde T değeri 0,6 ile 0,2 arasında yer almalı, ancak konsantrasyondaki % hatanın minimuma inebilmesi için ideal absorbans değeri 0,434 olmalı ve bunun için de çözeltiler, absorbans değeri yaklaşık 0,45 olacak şekilde hazırlanmalı, pratikte ise bu değer 0,3'den az 0,6'dan çok olmamalıdır [20].

3.1. İlaç Etken Maddelerinin Ultraviyole Spektroskopisi Yardımı İle Miktar Tayini

İlaç preparatlarının çoğunda, etken maddenin miktar tayini için yapılan işlemler genel olarak şöyle sıralanabilir [20];

1. Analiz yapılacak ilaç etken maddesi, billurlandırma ya da başka bir yolla saflaştırılmalıdır. İlaç etken maddelerinin çoğu için aranan standartlar, farmakopeler, ilaç formüllerleri ya da literatürde bulunabilir.
2. UV ışığı absorplamayan, spektral saflıkta bir çözücü seçilir. Aletin bir küveti bu çözücü ile doldurulup spektrofotometreye yerleştirilir ve alet % 100 T okumak üzere ayarlanır.
3. İlaç etken maddesi, seçilen çözücüde çözülür ve bu çözeltinin bir kısmı spektrofotometrenin ikinci küvetine doldurulduktan sonra aletteki yerine yerleştirilir. Maddenin absorpsiyon spektrumu ya elle ya da varsa aletin yazıcısı ile çizilir. Genel bir kural olarak çözeltinin nihai konsantrasyonu, 10 mg/L olmalıdır. Eğer absorptivite (a) değeri için ilgili literatür ya da farmakopelerde bir kayıt varsa, o da dikkate alınarak elde edilen spektrum incelenir ve maddenin maksimum enerjisi absorbe ettiği dalga boyu saptanır; sonraki tüm tayinler bu dalga boyunda yapılır. Örneğin pH'ı 8 olan 10 mg/L konsantrasyondaki fenilbutazon çözeltisinin 265 nm'deki absorptivite değeri (a) ~66, absorbansı (A) ise 0,64'tür.
4. Analizde çözücünün etkisi dikkate alınmalıdır. Örneğin fenilbutazon için absorbans değeri, pH 3 – 6 arasında süratle değişir; pH 1 veya 2'de tayin yapılabilir ama fenilbutazon asidik bir madde olduğundan çözünürlüğü alkali ortamda daha fazladır. Bu nedenle çözeltinin pH'ı 7 ya da 7'den büyük olursa 265 nm'de okunan absorptivite değeri nispeten sabit kalır. Çözücü seçimi, ilaç preparatında absorpsiyonu etkileyen diğer maddelerin varlığı da göz önüne alınarak yapılır. Örneğin fenilefrin HCl, pH 6 tamponunda çözündürülüp 272 nm'de absorptivitesi tayin edildiğinde bulunan değer düşük olacaktır. Çünkü vasokonstrüktör madde içeren bazı sulu preparatlara ilave edilen metilparaben, bu dalga boyunda biraz ışık enerjisi absorbe etmekte, yani okunan absorbans (A) hem metilparaben hem de fenilefrin hidroklorüre ait olmaktadır. Bu koşullar altında fenilefrin HCl'in

konsantrasyonu hesaplanmayacağından pH'ı 13'e getirmek suretiyle 272 nm'deki absorpsiyon maksimumu yüksek dalga boylarına kaydırılırken 237 nm'de absorbansı daha büyük olan yeni bir maksimum ortaya çıkar ve metilparabenin bu yeni dalga boyunda absorpsiyonu çok az olduğundan, fenilefrin HCl'in konsantrasyonu (C), 237 nm'de hassas olarak tayin edilebilir.

5. Maksimum absorpsiyonun görüldüğü dalga boyunda ilaç etkin maddesinin farklı konsantrasyonlardaki çözeltilerin absorbans (A) değerini ölçmek suretiyle absorptivite (a) tayin edilir. Eğer absorbans ve konsantrasyon arasındaki doğrusal bir orantı varsa, yani Beer kanuna uyuyorsa, bir grafik kağıdı üzerinde absorbansa karşı konsantrasyon işaretlenerek grafik çizildiğinde düz bir çizgi elde edilir. Tayinlerde genellikle literatürde verilmiş olan absorptivite değerleri kullanılır. Bu değerler hassas olarak tayin edilmiş olmakla beraber, aletler arasında farklar olduğu için genellikle bunların bizzat tayin edilmesi uygun olur: bu amaçla farmakopelerdeki spektrofotometrik teşhis ve miktar tayinlerinin çoğu, uygun referans standartlarla karşılaştırmak suretiyle yapılır.

6. Bir preparattaki belirli bir aktif maddenin miktarı tayin edilirken, absorpsiyonu etkileyecek başka maddeler ya da kirlilikler de bulunabileceğinden, çözeltiyi hazırlamadan önce bu yan maddelerin (ekstraksiyon, kromatografi, destilasyon vb. yöntemlerle) aktif maddeden ayrılması ve ancak bundan sonra aktif maddenin uygun bir çözücüye alınarak absorpsiyonunun ölçülmesi gerekir.

3.1.1. Beer kanunundan sapmalar

Bir çözeltinin konsantrasyonu ile absorbansı arasındaki orantı her zaman doğrusal olmayabilir ya da ikisi arasında orantılı bir durum bulunmayabilir. Genellikle miktar tayini doğrusal orantının var olduğu sınırlı bir alan içinde yapılabilir, yani ancak bu alan içinde Beer kanuna uyma söz konusudur. Beer kanunundan sapmalar ise çözeltinin tabiatından ileri gelebildiği gibi, çözeltideki kimyasal değişmelerden de ileri gelebilir [19].

3.1.2. Karışımların analizi

Birden çok ilaç ham maddesi içeren bir karışımın herhangi bir dalga boyundaki absorpsiyonunu ölçmek suretiyle karışımdaki maddelerin miktarını tayin etmeye olanak yoktur. Çünkü okunan absorpsiyon değeri maddelerden herhangi birinin değil, karışımdaki tüm maddelerin ortak absorpsiyon değeridir. Bununla beraber, örneğin eğer ikili bir karışımdaki maddeler birbirleri ile reaksiyon vermiyorsa ve maddelerin her biri ayrı ayrı Beer kanununa uyuyorsa, bunların absorpsiyonunu, kendilerine ait dalga boylarında ayrı ayrı ölçmek suretiyle, miktar tayinleri yapılabilir [20].

Karışımdaki maddeler x ve y, absorpsiyonların ölçüldüğü dalga boyları ise λ_2 ve λ_4 ; λ_2 'deki absorpsiyon A_2 ; λ_4 'deki absorpsiyon da A_4 olsun. λ_2 'deki toplam absorpsiyon (A_2), x ve y'nin absorpsiyonlarının toplamına eşittir; bundan dolayı

$$A_2 = a_5 C_y + a_2 C_x \quad (3.4)$$

benzer şekilde λ_4 'deki toplam absorpsiyon

$$A_4 = a_1 C_y + a_6 C_x \quad (3.5)$$

olacaktır [19].

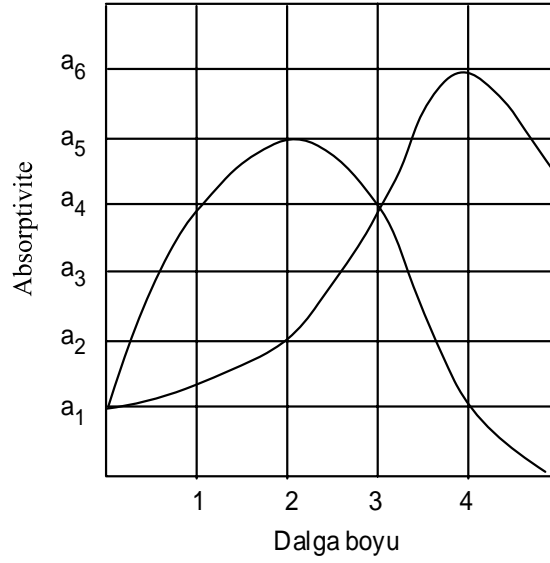
Bu denklemlerde C_x ve C_y bilinmeyenler olduğuna göre iki bilinmeyenli denklemin çözümü uygulanıp, (3.4) a_1 , (3.5) a_5 ile çarpılır:

$$\begin{aligned} a_1 A_2 &= a_1 a_5 C_y + a_1 a_2 C_x \\ \mu a_5 A_4 &= \mu a_1 a_5 C_y - \mu a_5 a_6 C_x \\ \hline a_1 A_2 - a_5 A_4 &= a_1 a_2 C_x - a_5 a_6 C_x \\ a_1 A_2 - a_5 A_4 &= C_x (a_1 a_2 - a_5 a_6) \end{aligned} \quad (3.6)$$

Sonuçta;

$$C_x = \frac{a_1 A_2 - a_5 A_4}{a_1 a_2 - a_5 a_6} \quad (3.7)$$

bulunur [19].



Şekil 3.1. Dalga boyu - absorptivite grafiği

C_y 'yi bulmak için C_x 'ler götürülür, ancak bu kez (3.4) x a_6 'nın işareti değiştirilir:

$$\begin{aligned} \mu a_6 A_2 &= \mu a_5 a_6 C_y - \mu a_2 a_6 C_x \\ a_2 A_4 &= a_1 a_2 C_y + a_2 a_6 C_x \\ \hline a_2 A_4 - a_6 A_2 &= a_1 a_2 C_y - a_5 a_6 C_y \end{aligned} \quad (3.8)$$

Karışımın analizi yapılmadan önce λ_2 ve λ_4 'de x ve y için absorptivite değerleri tayin edilmelidir. Bulunan bu değerler eşitliklerde yerine konur. Karışımın λ_2 ve λ_4 'deki absorbansı okunduktan sonra C_x ve C_y hesaplanır [19].

İkili karışımlar, ancak aşağıda belirtilen önlemler alındıktan sonra analiz edilebilir.

1. Saf maddelerin spektral verileri bilinmelidir.
2. Bileşenlerin absorptivite değerleri doğru olarak tayin edilmelidir.
3. Denklemlerin doğru çözümü için bileşenlerin absorptivite değerleri, seçilen dalga boylarında birbirlerinden yeterince farklı olmalıdır.
4. Karışımın absorbans değeri doğru olarak tayin edilmelidir.

1 ve 4'te belirtilenlere 2 ve 3'te belirtilenlerden daha kolaylıkla uyulabilir. Eğer analiz için seçilen dalga boylarından birinde, maddelerden biri çok az ışık enerjisini absorpluyorsa absorptivite değerlerini tayin etmek güçtür. Bundan başka eğer bir bileşenin spektral karakteristikleri diğerinkine yakın ise, analiz için seçilen dalga boylarındaki absorptivite değerleri benzer olacak ve bu koşullarda denklemler doğru olarak çözülemeyecektir [19].

Eğer bütün dalga boylarında Beer kanununa uygunluk saptanırsa, iki dalga boyu için tayin edilen absorbans değerlerinin oranı sabit bir sayı olacak ve bu durum, x maddesi için daha önce verilen spektral karakteristikler kullanıldığında λ_4 'de

$$A_4 = a_6 b C_x \quad (3.9)$$

$$A_3 = a_4 b C_x \quad (3.10)$$

formülleri ile belirlenebilecektir. Bu örnekte iki absorbans değerinin oranı

$$Q = \frac{A_4}{A_3} = \frac{a_6 b C_x}{a_4 b C_x} = \frac{a_6}{a_4} = \frac{4}{3} \quad (3.11)$$

iki değer oranına (yani absorptivite oranına) eşit olup sabit bir sayıdır ve bu Q ile gösterilir. Q değeri çözeltinin konsantrasyonuna ve kalınlığına bağımlı olmadığından farmasötik önemi olan maddelerin saflığını tayin için kullanılabilir ve bu nedenle NF ve USP de birçok ilaç etken maddesinin Q değerleri birer sabit olarak verilmiştir (Aminosalisilik asit, noskapin, promazin HCl vb.) [19].

3.2. İlaç Etken Maddelerinin Görünür Bölgede Miktar Tayini

Görünür bölgede absorpsiyonu olan herhangi bir ilaç maddesinin (renkli ya da renklendirilmiş madde çözeltisi) miktar tayini, maddenin belli konsantrasyondaki çözeltisinden, seçilen uygun bir dalga boyunda (400 – 800 nm arasında) ışık geçirilerek yapılabilir. Bu tayinlerde Lambert-Beer kanunu geçerlidir.

Seçilen dalga boyunda maddenin gösterdiği absorbans ölçüldükten sonra aşağıda gösterilen yollardan biri izlenerek madde miktarı hesaplanır [19].

1. Eğer maddenin E % 1,1cm değeri literatürde varsa;

$$E\%1,1cm = \frac{Ax10}{cb} \quad (3.12)$$

$$c = \frac{Ax10}{E\%1,1cmxb} \quad (3.13)$$

A:Absorbans

c: Konsantrasyon

b: Tabaka Kalınlığı

formülünden yararlanılır ve bulunan madde miktarından yüzde saflık miktarına geçilir.

2. Referans standart yardımı ile madde miktarı iki şekilde hesaplanabilir:

a) Miktar tayini yapılacak madde, yani istenen koşullarda (dalga boyu, slit açıklığı, tabaka kalınlığı ve çözücü) referans standart ile karşılaştırılır. Her ikisinden hazırlanan çözeltilerin absorbansları boşluğa karşı ölçülür ve aşağıdaki formülden yararlanılarak madde miktarına geçilir.

$$\frac{C_x}{C_s} = \frac{A_x}{A_s} \quad (3.14)$$

$$C_x = \frac{A_x}{A_s} x C_s \quad (3.15)$$

C_x : Miktarı bilinmeyen maddenin konsantrasyonu

C_s : Standart maddenin konsantrasyonu

A_x : Miktarı bilinmeyen maddenin absorbanası

A_s : Standart maddenin absorbanası

b) Referans standardın değişik konsantrasyonlu çözeltileri hazırlanır ve bunların seçilen dalga boyuna absorbanları okunur. Absorbans ordinat olmak üzere ölçü eğrisi (kalibrasyon eğrisi) çizilir. Sonra bilinmeyen örnekten hazırlanan çözeltinin absorbanası ölçülür ve ordinatta işaretlenir. Bu noktadan kalibrasyon eğrisine bir dik çıkılır. Dikin eğriyi kestiği noktadan apsise dik inilerek madde miktarı bulunur. Yüzde saflık miktarı hesaplanır [19].

BÖLÜM 4. TÜREV SPEKTROFOTOMETRİSİ

4.1. Türev Tekniğinin Gelişimi

Türevleme ile elektrik sinyallerinin çözülmesi metodu yaklaşık yetmiş yıllık bir geçmişe sahiptir. 1920'lerin başlarında Lord Rutherford gaz-uyarma potansiyellerinin kütle spektrometrik çalışmalarındaki süreksizliklerinin tayini için birinci türev tekniğini önerdi.

Bu metod 1953'te Singleton ve Collier elektronikteki gelişmelerin avantajlarını kullanıp IR türev spektrofotometresini kurana kadar unutulmuştu. Onlar bir IR spektrofotometresini ikinci derece spektrumlar üreten analog bir cihazla modifiye edip bu fikir için patent aldılar. Aynı zamanda, Hammond ve Price dalga boyu-modülasyon prensibini ileri sürdü ve Giese ve French bunu fotosentetik sistemlerin birinci derece görünür spektrumlarını çalışmak için adapte ettiler.

Ayrıca, 1953'te Morrison diferansiyel eğrileri ($\Delta i (V) / \Delta V$) kullanarak birinci ve ikinci derece türevleri hesapladı. Bunlar küçük aralıklarda ($\Delta V=0,05V$) çıkarma ile elde edildi ve gerçek türevlere en iyi yaklaşımlardı. Enstrumentasyonun karmaşıklığı ve elektronik cihazların yetersiz sinyal gürültü oranı (SNR) bütün bunlara neden oldu ama birkaç bilim adamı bu metodu reddetti. 1966'da Meister ikinci türev (d^2) için pratik bir resistans-sığa devresi (RC) geliştirdi ki diğer fotokimyacılar, gibi bitki fotokimyasında problemleri başarı ile araştırdı.

1953'te Singleton ve Collier halen ikinci ve daha yüksek türevlerin daha dar band genişlikleri vermesi gerektiğini önermişlerdi; aynı zamanda; onlar deneysel ispatı sağlamakta yetersizdiler çünkü o zamanlarda ekipmanları bu taslak için yeterince gelişmiş değildi. Martin hesaplanan Lorentzian bandları için teorik temeli doğruladı ve 1968'de Morrey dijital bir bilgisayarla Gaussian, Student T_3 ve Lorentzian dağılım

fonksiyonlarının birinci dereceden dördüncü dereceye kadar türevlerini elde etti. Morrey bunun yanı sıra sentetik karışımlardaki örtüşen bandların dördüncü derece türevinin ikinciye göre daha yüksek çözünürlük verdiğini gösterebildi.

Savitzky ve Golay dalgalanan verilerin türevlenmesi ve düzeltilmesi için en küçük kareler prosedürlerini kullandı. Butler ve Hopkins fotosentetik karışımları çalışmak için bilgisayar destekli yaklaşımı rutin ikinci ve dördüncü derece türev spektrumlarının oluşturulması şeklinde geliştirdi. Daha yüksek dereceli türevler spektrumlarını ($n > 2$; HODS) sistematik ve yoğun olarak laboratuvarında inceledi. 1978'de yüksek kalitede UV-VIS türev spektrumlarını online ölçüm yaparak henüz yeni geliştirilmiş, düşük gürültülü RC devresi olan, düşük geçirgen filtreli ve düzleme modülü olan cihaz aracılığıyla dokuzuncu dereceye kadar üreten ilklerdendi.

Fell ikinci derece türevleri üretmek amacıyla online bağlanmış analog cihazlarını kullandı. Butler dijital metodlarla altıncı ve sekizinci derece spektrumları hesapladı ve Sasaki on üçüncü dereceye kadar boyaların üst düşümlü türev spektrumlarını dijital metotlar kullanarak çalıştı.

Yıllar geçtikçe ticari olarak elde edilebilir türev cihazları geliştirildi. Şu anda pratik olarak bütün yeni spektrofotometreler en az ikinci derece türev sistemine uyumlu, birçoğu en çok dördüncü derece ve bazıları altı hatta dokuzuncu dereceye kadar çıkabilmektedir.

4.2. Teorik Önemi

Sarmal spektrumların açık çözülmesi için birçok metot vardır. En önemli olanlar kısaca bu bölümde işlenmiştir.

4.2.1. Optik metot

Monokromatör sliti ışık kaynağının band genişliğini sınırlayan bir faktördür. Bu yüzden slit aralığının daraltılması doğrusal olarak spektral çözünürlüğü artırır, fakat ışık enerjisi üstel ikinci derece ile azalır. Optik bölgedeki aralık uzaması aynı zamanda çözünürlüğü arttırmaktadır. Tersinir olarak ışık enerjisi ışık kaynağı ile çoğaltıcı arasındaki uzaklığın karesi ile azalır. Şüphesiz optik ağda mm başına ne kadar çok çizgi varsa çözünürlük o kadar fazla yüksek olacak ve optik ağ çözünürlük sınırına 2000-2400 çizgi sınırlarında ulaşılacaktır.

Belirli bir süre önce çok dar band genişliğine sahip lazerler geliştirildi. Daha önceleri belirli bir noktaya odaklanmış lazer ışığı odaklanmış noktadaki maddelerin bozunmasına neden olmakta bundan da öte lazer tarafından yayılan ışının dalga boyu çok küçük bir aralıkta değiştirilebilmekteydi (50–100 nm) [48].

4.2.2. Düşük sıcaklık spektroskopisi

Düşük sıcaklıklar, komşu moleküller arasındaki enerji alışverişini azaltır. Bazı maddelerin absorpsiyon bandları sıvı halde oda sıcaklığında ölçüldüğünde gaz fazındaki gibi keskin bandlar elde edilir. Buna ilave olarak absorpsiyon band yüksekliği soğutulmuş bir katı buz kristal yapısına yerleştirildiğinde düşebilir. Bu durum zayıf bandların gözlemlenmesinde yararlı bir durumdur. Band yüksekliğindeki artış ise ışığın geçtiği yoldaki uzamadan kaynaklanır ve aynı zamanda katı yapı içerisindeki mikro kristal yapılar yansıma yoluyla bu artışı etkileyen sebeplerdendir [21]. Eğer band genişliği düşük sıcaklıklarda düşürülürse analiz için birbirleriyle örtüşmeyen uygun bandlar elde edilir.

Pratik ölçümlerde, maddelerin spektrumlarının alınması için özel aletlerin kullanılması gerekir. Bir Dewar kabı iki düzlemsel silika diski etrafına yerleştirilebilir. Kuru azot gazı akımı bu pencereler üzerinde oluşacak yoğunlaşmayı önleyebilir. Diğer bir yöntemde ise fiber optik kablolar kullanılarak, vakum altında yine iki silika disk arasında ölçümler gerçekleştirilebilir. Temel olarak sıvı azot ve helyum soğutucu maddeler olarak kullanılır [21].

4.2.3. Hesaplama metotları

4.2.3.1. Eğriye uydurma metodu

Eğriye uydurma metodu görsel pik tanınmasına en uygun yaklaşımı vermektedir. Fakat bu açık bir şekilde bilinen bir profil fonksiyonunu gerektirir. Bunun için en yüksek nokta bulunur. Daha sonra spektrum profil fonksiyonu yardımı ile ana bileşenlerin teorik spektrumları hesaplanır. Daha sonra en küçük kareler metodunun başarısız olduğu noktalarda belirli değerlere ulaşmak için spektruma ilave pikler eklenir. Eğer en küçük kareler toplamı yeterince küçükse hesaplamalara devam edilir.

Büyük belirsizlikleri ortadan kaldırmak için pik profilleri ve pik sayısı kesin olmalıdır. Piklerin birbiri üzerine örtüşmesi halinde pik şekline, yüksekliğine ve genişliğine bağlı olarak pik sayısını değiştirir.

4.2.3.2. Sayısal çok bileşenli analiz

Eğer birbiri üzerine örtüşmüş üç pik düşünülürse ve her üçünün ayrı ayrı saf standart absorpsiyon spektrumu bilinirse Lambert-Beer yasasına göre herhangi bir dalga boyundaki absorpsiyon (A) her bir maddenin ayrı absorpsiyonları toplamına eşittir. Bu durum matematiksel olarak ifade edilirse;

$$A_{\lambda_1} = c_A \epsilon_{\lambda_1,A} + c_B \epsilon_{\lambda_1,B} + c_C \epsilon_{\lambda_1,C} \quad (4.1)$$

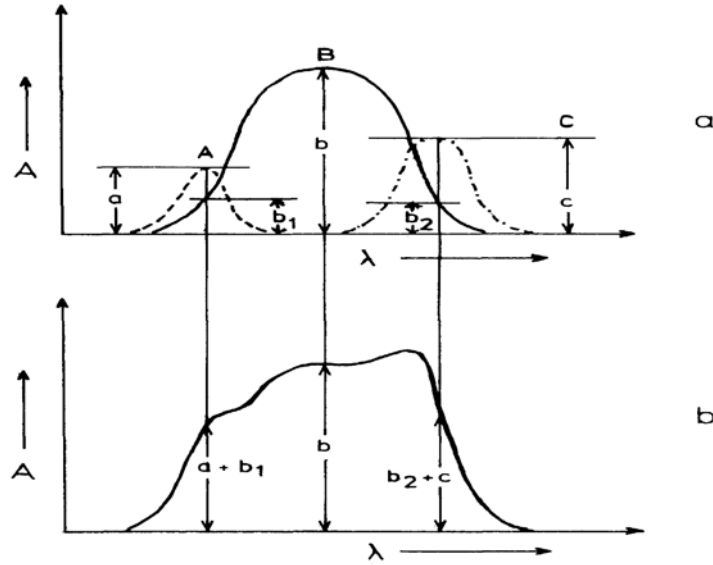
c_A , c_B ve c_C parametreleri aranan değerlerdir, bu yüzden problemin çözümü için üç denklem gereklidir;

$$A_{\lambda_2} = c_A \epsilon_{\lambda_2,A} + c_B \epsilon_{\lambda_2,B} + c_C \epsilon_{\lambda_2,C} \quad (4.2)$$

$$A_{\lambda_3} = c_A \epsilon_{\lambda_3,A} + c_B \epsilon_{\lambda_3,B} + c_C \epsilon_{\lambda_3,C} \quad (4.3)$$

Pratikte çok bileşenli analiz için genel olarak iki yol vardır. a) Ölçülen dalga boyu sayısı ve denklem sayısı madde sayısına eşittir. b) Tersi durumda ise ölçülen dalga boyu sayısı ve kullanılan denklemlerin sayısı madde sayısını geçebilir.

Her iki durumda, eğer en uygun nokta seçilirse bilinmeyen madde ve açıklanamayan bir zemin sinyali bulunmaması durumunda çok kesin sonuçlar elde edilir. Karışık spektrumları doğru bir şekilde çözmenin bir yolu türev hesaplamaları kullanmaktır. Her bir standart spektrum çözücü spektrumu ile birlikte birinci, ikinci ve daha yüksek derecedeki bir türeve dönüştürülür.



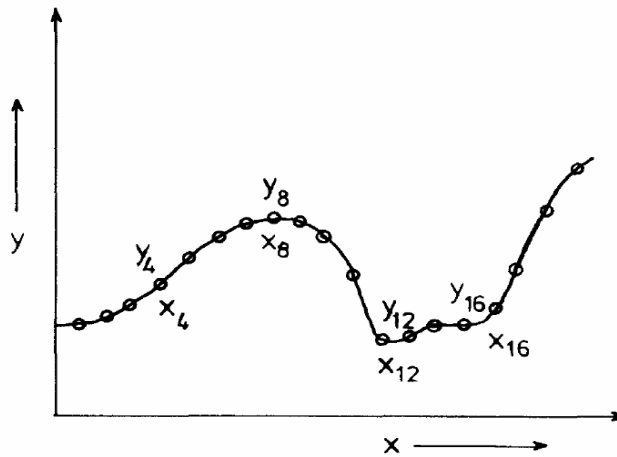
Şekil 4.1. Üç pikin üst üste gelmesi

a) Tek pik A (---), B (___), ve C (-.-.)

b) Toplu şekilde kullanılan denklem sayısı (denklem sayısı madde sayısını belirtir), eğer doğru nokta alınırsa bilinmeyen madde veya karışım her iki durumdan da bulunabilir

4.2.3.3. Fourier yöntemi

Karışık sinyallerin çözümü için alternatif bir sayısal metot da, eğrilerin frekans spektrumlarını analiz eder. Fourier transform analizi olarak adlandırılan bu metot deneysel olarak oluşturulmuş sinyallerin sinüs ve kosinüs fonksiyonlarını kullanır. İlk olarak eşit aralıklarla yerleşmiş $2m$ noktaları seçilir.



Şekil 4.2. Fourier için bir eğri üzerinde noktalar; simetriden sinüs ve cosinüs bulunur

Bu durum sinüs ve kosinüs fonksiyonlarının simetrik oluşunu sağlayacağından çözüm için avantaj sağlayacaktır. Fourier analizinde en karışık operasyon:

$$f(x) = a \sum_{n=1}^{\infty} (a_n \cos nx + b_n \sin nx), n = 1 - \infty \quad (4.4)$$

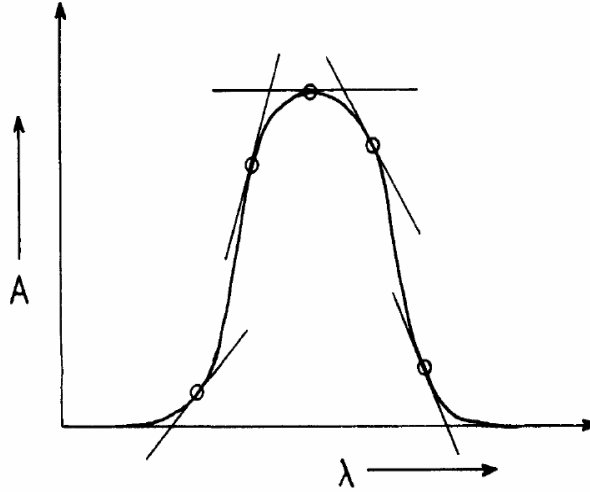
Bu denklem Fourier katsayıları olan a ve b ' nin hesaplanmasında kullanılır;

$$a_n = \frac{1}{m} \sum_{i=0}^{2m-1} y_i \cos \frac{ni}{m}, n=1,2,\dots,m \quad (4.5)$$

$$b_n = \frac{1}{m} \sum_{i=0}^{2m-1} y_i \sin \frac{ni}{m}, n=1,2,\dots,(m-1) \quad (4.6)$$

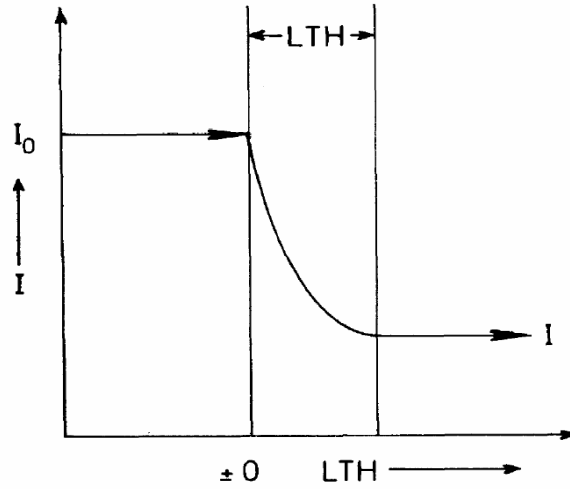
4.3. Türev Alma ve Türev Spektrumu

Spektrumların birden fazla türevlerinin alınması spektrumların daha iyi analizini ve çizgileri düzelterek daha da belirginleştirmesini ve zemin spektrumundan gelen gürültülerin giderilmesini sağlamaktadır. Bu teknik ya doğrudan ya da sayısal algoritmalarla elde edilen eğrilere uygun fonksiyonlar elde edildikten sonra uygulanır. Bir eğrinin veya onun matematiksel fonksiyonunun türevinin alınması basit bir bütün bölgeye ait eğim hesabıdır. Aynı yolla, şekil 4.3' teki spektrumun türevini almak mümkündür. Spektroskopide ölçülen değer, bir önceki örneğin ışık şiddetinin (I) bir sonraki örneğin ışık şiddetine (I_0) olan oranıdır.



Şekil 4.3. Belirtilen değerlerde eğrinin noktaları

Bu oran aktarım oranı olup $I/I_0=T$ olarak gösterilir. Homojen saydam bir örnekten geçen ışığın şiddetindeki düşüş lineer değildir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Işığın bir örnekten geçerken şiddetindeki azalma;

LTH: Çizgi kalınlığı (=yol uzunluğu l); I : ışık şiddeti; I_0 :Başlangıçtaki ışık şiddeti

I ile çözünmüş saydam sıvı konsantrasyonu ve I ile bir katı arasındaki ilişki Bauguer-Lambert-Beer kanunuyla verilmiştir.

$$\frac{I_{\lambda}}{I_{0,\lambda}} = e^{-cl\epsilon_{\lambda}} = T_{\lambda} \quad (4.7)$$

c : çözelti konsantrasyonu

l : yol uzunluğu

ϵ_{λ} : molar absorpsiyon katsayısı (λ dalga boyunda)

T_{λ} : λ dalga boyunda aktarım

Genellikle dalga boyları aralığına uygun I_0 şiddeti, bir otomatik kontrol düzeneğiyle veya otomatik elektronik yükseltme ayarıyla veya ışık kaynağının geriliminin otomatik kontrolüyle sabit tutulur. Eşitlik (4.7)'nin doğal logaritmasının alınmasıyla;

$$\ln I_{\lambda} - I_{0,\lambda} = -cl\epsilon_{\lambda} \quad (4.8)$$

Bu ifadenin diferansiyeli alınırsa;

$$\frac{d(\ln I)}{d\lambda} = -cl \frac{d\varepsilon}{d\lambda} \quad (4.9)$$

I_0 sabit ise :

$$\frac{d(\ln I_0)}{d\lambda} = 0 \quad (4.10)$$

Ve

$$\frac{d \ln I}{d\lambda} = \frac{1}{I} \quad (4.11)$$

Eşitlik (4.7)'nin birinci türevi aşağıdaki gibi elde edilir.

$$\frac{dI}{d\lambda} \cdot \frac{1}{I} = -cl \frac{d\varepsilon}{d\lambda} \quad (4.12)$$

Birinci türev direkt olarak her dalga boyundaki konsantrasyona orantılıdır. Ölçümün duyarlılığı çekme noktaları yakınında yüksektir ve $d\varepsilon/d\lambda$ değeri en uçtadır.

İkinci türev alındığında aşağıdaki denklem bulunur.

$$\frac{d^2 I}{d\lambda^2} \cdot \frac{1}{I} = c^2 l^2 \left(\frac{d\varepsilon}{d\lambda} \right)^2 - cl \frac{d^2 \varepsilon}{d\lambda^2} \quad (4.13)$$

ε 'nin ilk türevi ($d\varepsilon/d\lambda$) sifira eşittir. İkinci türev lineer olarak konsantrasyonla orantılı olacaktır. Aksi halde hiçbir lineer ilişki bulunmaz ve özel kalibrasyon eğrisi gerekli olur. Ek olarak, $d^2\varepsilon/d\lambda^2$ 'nin uç değerleri için ölçüm duyarlılığı yüksek olur [21].

Lineer oransallık sadece $d\varepsilon/d\lambda$ ve $d^2\varepsilon/d\lambda^2$ değerleri sifir olarak alınırsa kullanılır. Bu sebepten, aktarım spektrofotometri ile ölçülebilen fiziksel bir büyüklük olmasına

rağmen, aktarımın türevleri daha az kullanılır. Diğer büyüklükler mesela absorpsiyon A , $\log A$ veya konsantrasyon (c) türevli büyüklüklerdir. Bunlar temel büyüklük (T)'den hesaplanırlar. Daha yüksek türevler aynı yolla bulunabilir. Yukarıda geçen absorpsiyon (A), aşağıdaki gibi tanımlanır.

$$A = \log_{10} I_0/I = \log_{10} \frac{1}{T} = cl\varepsilon' \quad (4.14)$$

ε' çözeltinin absorpsiyon molar katsayısıdır.

$$\varepsilon' = \varepsilon / 2,303 \quad (4.15)$$

I_0 sabit tutulursa birinci türev için;

$$\frac{dA}{d\lambda} = cl \frac{d\varepsilon'}{d\lambda} \quad (4.16)$$

ve ikinci türev için;

$$\frac{d^2 A}{d\lambda^2} = cl \frac{d^2 \varepsilon'}{d\lambda^2} \quad (4.17)$$

n. derece türev için;

$$\frac{d^n A}{d\lambda^n} = cl \frac{d^n \varepsilon'}{d\lambda^n} \quad (4.18)$$

Her durumda A 'nın bütün türevleri c konsantrasyonuna lineer oransal olur. Bu türevsel spektrumların açıklanması ve hesaplanması için büyük bir avantajdır. Bu

yüzden pratikte A'nın türevleri yaygın olarak üretilir; ama T'nin türevleri daha seyrek. Bazen A'nın türevinin alınması türevlerin konsantrasyona lineer olmayan bağımlılığını verebilir. Bu Beer kanununa uyulmadığında uygulanabilir. Örnek olarak, madde molekülleri arasında veya maddeyle çözücü arasında etkileşim oluşması veya ortak pik ya da tam tersi durumların olması ana sinyalleri etkiler, bu durumda daha düşük veya daha yüksek derece türev alma hesaplanır [21].

4.4. Analitik Bandların Türevleri

Analitik band olarak bilinen bir absorpsiyon bandı yaklaşım formülleri ile daha doğru tanımlanır. Bandın absorpsiyonu A, λ dalga boyunda aşağıdaki gibidir.

$$A_{\lambda} = A_{\max} e^{-cx^2} \quad (4.19)$$

λ_{\max} 'daki absorbans A_{\max}

c: konsantrasyon

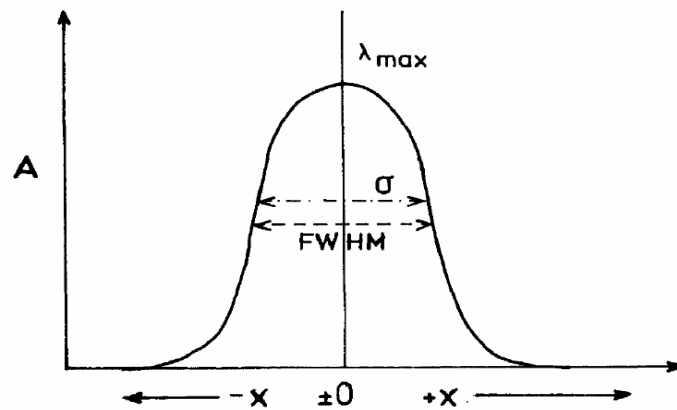
x: $(\lambda - \lambda_{\max})$

x'e göre 1. ve 2. türev alınırsa:

$$\frac{dA_{\lambda}}{d\lambda} = d^1 = (-2)Cx \cdot A_{\lambda} \quad (4.20)$$

$$\frac{d^2A_{\lambda}}{d\lambda^2} = d^2 = 2C(2Cx^2 - 1) \cdot A_{\lambda} \quad (4.21)$$

c sabit iken iki farklı bandın yarı genişliği dikkate alınır. Şekil 4.5' te yarı genişlik için iki farklı yol izlenir.



Şekil 4.5. σ ve FWHM'nin sistematik çizimi

- FWHM (yarı max. genişliği), maximum yarı yükseklikte
- σ , artıp azalan noktalar arasındaki band genişliği analitik band için orijine simetrik koordinat çizilir

Artan azalan noktada;

$$d^1 = d^2 = 0 \quad (4.22)$$

$$x_\sigma = \sqrt{\frac{1}{2C}} \quad (4.23)$$

FWHM noktası için, $A_\lambda = 0,5 \cdot A_{\lambda_{\max}}$

$$x_{\text{FWHM}} = \sqrt{\frac{\ln 2}{C}} \quad (4.24)$$

Sabit c için $x_{\text{FWHM}} = 0,5 \cdot \text{FWHM}$ ve $x_\sigma = 0,5 \cdot \sigma$ olmak üzere;

$$C_{\text{FWHM}} = \frac{4 \ln 2}{(\text{FWHM})^2} \quad (4.25)$$

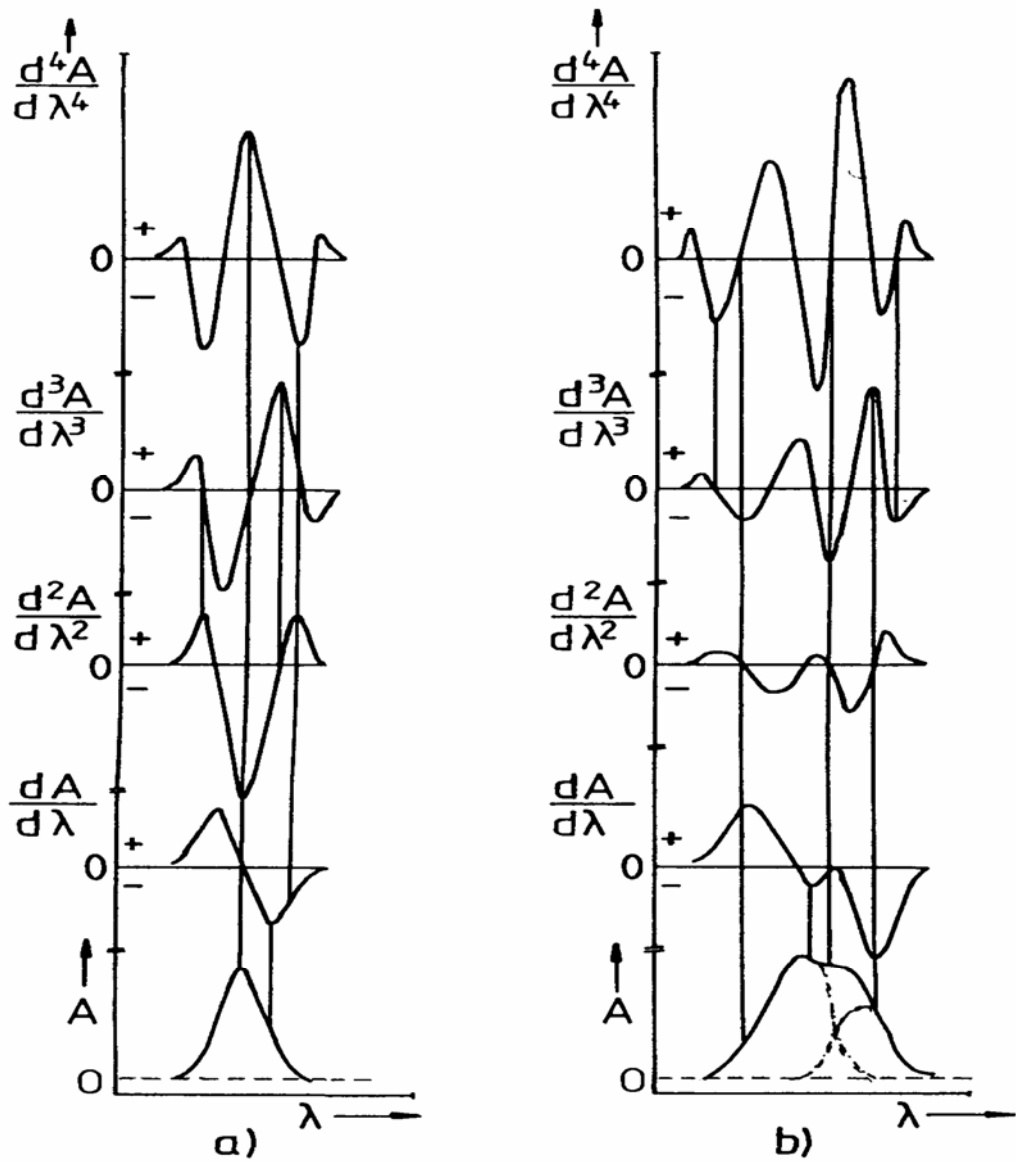
Ve

$$C_\sigma = \frac{2}{\sigma^2} \quad (4.26)$$

FWHM her zaman σ^2 dan büyüktür.

$$\frac{\text{FWHM}}{\sigma} = \sqrt{2 \cdot \ln 2} = 1,177 \quad (4.27)$$

Sonuç olarak;



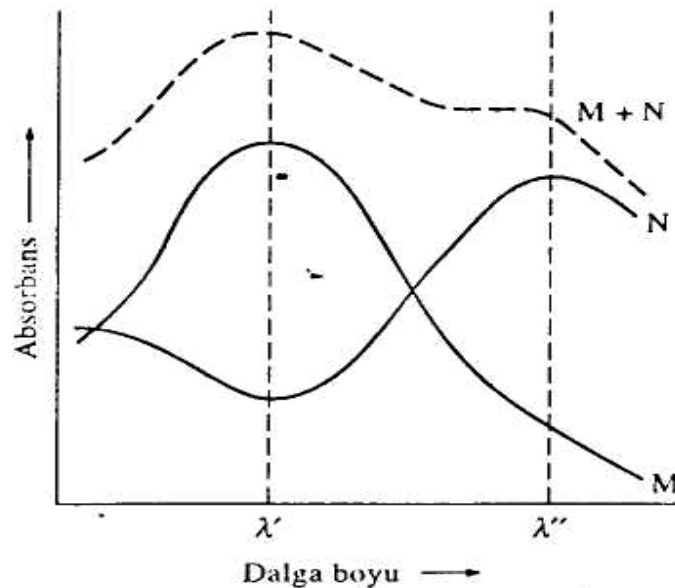
Şekil 4.6. Analitik bandın Gauss olarak hesaplanması

a) Birinci eğri dördüncü türeve kadar

b) Birinci eğrinin dördüncü türevinin iki gauss bandında üstten görüntüsü [21]

4.5. Türev ve Çift Dalga Boylu Spektrofotometri

Türev spektrofotometride, absorbans ya da geçirgenliğin dalga boyuna göre birinci veya daha yüksek dereceden türevi dalga boyuna karşı kaydedilerek spektrum çizilir. Çoğu kez bu eğriler, normal bir spektrumda görülmeyen spektral ayrıntıları ortaya çıkarırlar. Buna ek olarak, bazen bozucu maddeler varlığında bir analitin derişiminin ölçümü daha kolay ya da daha doğru olarak yapılabilir. Ne yazık ki, spektrumunun üstünlükleri, türev eldesine eşlik eden sinyal/gürültü oranının düşürülmesi ile en azından kısmen ortadan kalkar ancak, ultraviyole ve görünür bölgenin çoğu kısmında sinyal /gürültü oranı, ciddi bir sınırlandırıcı faktör değildir; türev spektrumlarından işte burada en fazla yararlanır. Türev spektrofotometresinin bir diğer dezavantajı ise gerekli cihazın daha pahalı oluşudur. Türev spektrumlarını elde etmek için çeşitli yöntemler kullanılır. Mikroişlemci kontrollü dijital spektrofotometreler için türev alma işlemi sayısal olarak, analog cihazlarla spektral verilerin türevleri, uygun bir işlemsel yönetici devresiyle elde edilebilir. Üçlü bir işlem, dalga boyu modülasyonu ile gerçekleştirilir [22].

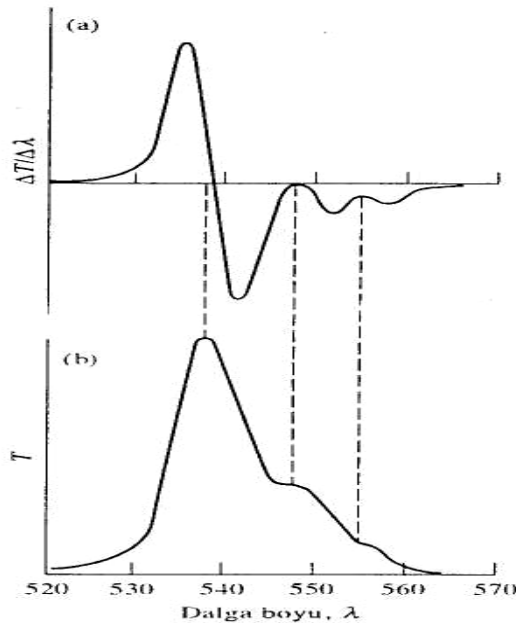


Şekil 4.7. İki bileşenli bir karışımın absorpsiyon spektrumu; düşey kesikli çizgilerle, iki bileşenin tayininde en uygun dalga boyları olan λ' ve λ'' gösterilmektedir

4.5.1. Türev Spektrumlarının Uygulamaları

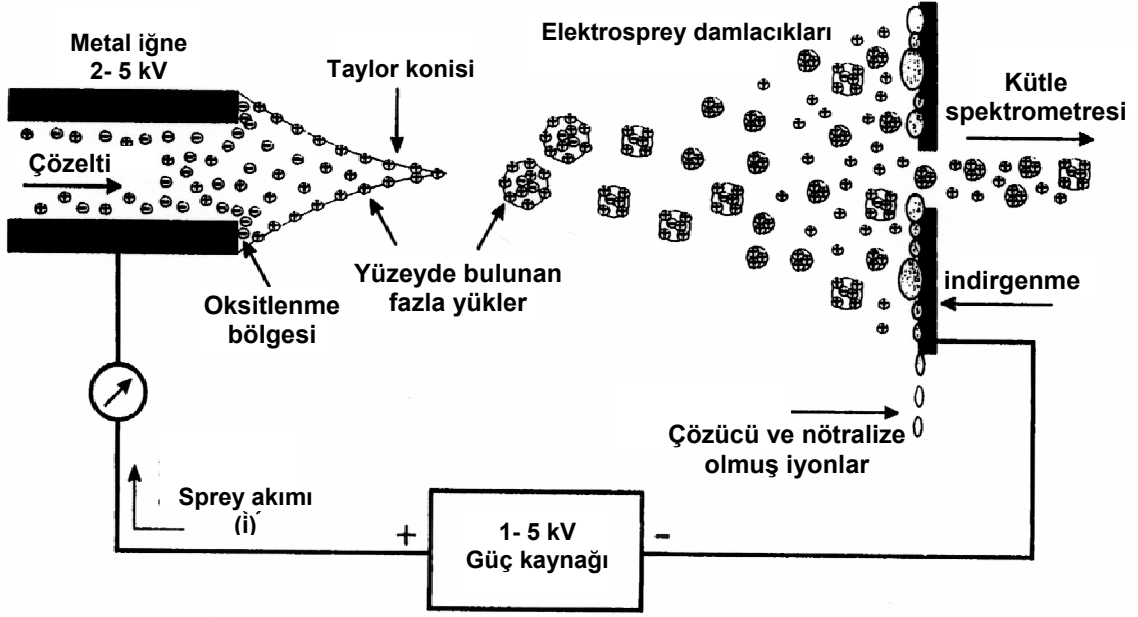
Ultraviyole ve görünür bölgelerde türev spektroskopinin en önemli uygulamalarından pek çoğu, spektrumları birbiriyle çakışan bileşiklerin farklılandırılmasını mümkün kılan türev spektrumunun kullanıldığı kalitatif tayinlerle ilgilidir. Şekil 4.8 üç adet çakışan absorpsiyon pikinden oluşan bir spektrumun ayrıntılarını bir türev eğrisinin nasıl ortaya koyabildiğini göstermektedir. Çift-dalga boylu spektrofotometri, özellikle ışığın saçılması ile bir absorpsiyon spektrumunun ayrıntılarının karmaşık hale geldiği durumlarda, bulanık çözeltilerdeki analitlerin ultraviyole/görünür alan absorpsiyon spektrumlarının eldesinde belirgin yarar sağlamıştır.

Çift dalga boylu spektrofotometri aynı zamanda spektral bir girişim varlığında bir analitin tayin edilmesinde de yararını kanıtlamıştır. Burada, cihaz tarayıcı olmayan modda çalıştırarak, girişim yapan türün aynı molar absorptivite değerlerini gösterdiği iki dalga boyunda absorpsiyon ölçümü yapılır. Bunun tersine, analit bu dalga boylarından birinde, diğerine nazaran daha kuvvetli absorpsiyon yapmalıdır. Bu durumda fark absorpsiyon, analit derişimi ile doğru orantılıdır [22].



Şekil 4.8.(a) Bir türev spektrumunun, (b) standart bir geçirgenlik spektrumuyla kıyaslanması

BÖLÜM 5. ELEKTROSPREY İYONLAŞMA KÜTLE SPEKTROMETRESİ METODU

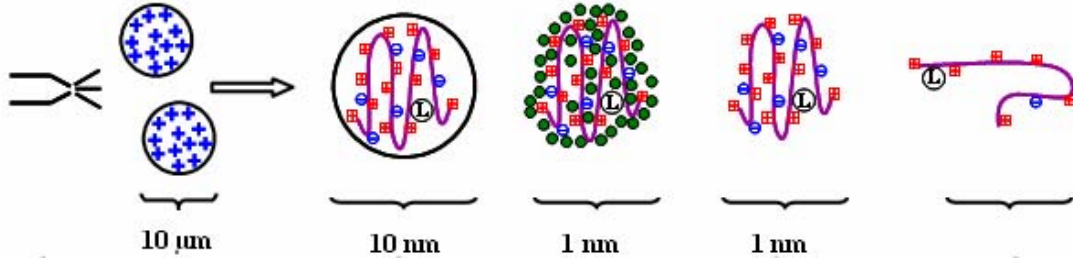


Şekil 5.1. Pozitif iyon modunda elektrosprey oluşumu

Elektrosprey iyonlaşma (ESI) tekniği kütle spektrometrelerinde iyon oluşturmak için kullanılan bir tekniktir. Genellikle büyük polar moleküllerin iyonlaştırılmasında moleküler parçalanmanın önüne geçebilmek için kullanılan yumuşak bir iyonlaşma tekniğidir.

Bu teknikte çözelti, üzerine potansiyel uygulanmış çok küçük bir metal kapilerden sabit bir hacim oranında geçmesi sağlanır. İlgilenilen molekülü içeren çözücünün uçuculuğunun fazla olması gerekir. Eğer çözelti herhangi bir tampon içeriyorsa veya herhangi bir asit ya da baz ilavesi gerekiyorsa onlarında uçucu olanlardan seçilmesi gerekir. Çözelti içerisinde moleküller iyon halinde ya proton kazanmış ya da proton kaybetmiş olarak bulunurlar. Metal kapiler herhangi bir yüklenildiğinde çözelti içerisindeki aynı yüklü iyonlar hızla dışarıya doğru itilecektir. Bu kuvvetle itme sonucu çapı 10 μm olan aerosoller oluşacaktır. Bu aerosollerin kendilerine karşı

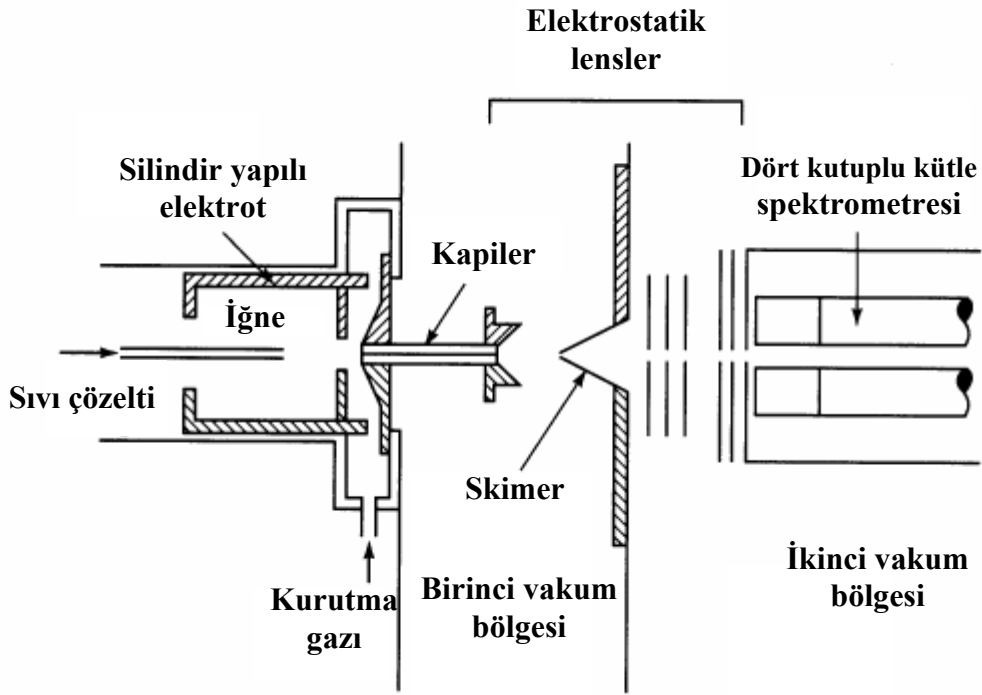
gelen ısıtılmış azot gazı ile karşılaşması sonucu solvent buharlaşacak ve küçülen taneciklerdeki yük yoğunluğu artması kolombik itmelerin artmasına neden olacak ve daha küçük taneciklerin oluşmasını sağlayacaktır. Bu işlem solventin taneciklerden tamamen uzaklaşmasına kadar devam edecektir. Oluşan iyonlar kütle analizörleri içerisinde seçildikten sonra dedektörlere gönderilecektir.



Şekil 5.2. Elektrosprey tekniğinde bir protein ve ligandın gaz fazına taşınmasındaki basamaklar

Elektrosprey iyonlaşma prosesinde elde edilecek iyon türüne göre pozitif veya negatif voltaj uygulanır. Pozitif iyonlaşmada, ilgi duyulan molekül yapısına bir veya birden fazla proton bağlanmasıyla spektrum elde edilmesini sağlarken, negatif iyonlaşma modunda, ilgi duyulan molekül bir veya daha fazla proton kaybederek spektrumlar elde edilir.

ESI çoğunlukla tek başına kullanılmaz, HPLC ile bir birine bağlı halde kullanılan bir iyonlaşma tekniğidir. HPLC ile kullanılmasında ortaya çıkan olumsuz durumlardan biri, HPLC de karışım içeriklerinin birbirinden ayrılması için uzun bir süre ve fazladan kimyasal kullanımı gerektirmesidir. Fazla miktarda çözücü ve çözünen maddelerin kütle spektrometresi içerisine gitmesi istenmeyen durumlardan biridir.



Şekil 5.3. Bir elektrosprey aletinin kütle ile birleşimi ve iyon yolu kademeleri

ESI-MS son yıllarda kantitatif analizlerde başvurulan metotlardan biridir. Tüm iyonlaşma metotları kantitatif analizlerde olumlu sonuç vermese de, ESI metodu numunenin sürekli olarak sisteme gönderildiği bir metot olduğundan kullanılacak bir internal standart ile kantitatif çalışmalara olanak sağlamaktadır. Birden fazla değişik iyon aynı anda analiz edilmesi gerektiğinde bu tür çalışmalarda bu iyonların iyonlaşma yüzdelerinin bir birini etkilememesi gerekmektedir. Yeterince düşük konsantrasyonlarda yapılacak çalışmalar ile bu tür problemlerin önüne geçme imkanı vardır.

ESI-MS metodu ile yapılacak çalışmalarda HPLC de izlenen yöntem izlenir. Hazırlanan kalibrasyon çözeltileri içerisine internal standart ilave edildikten sonra spektrumlar alınır ve her bir spektrum için maddelerin pik yükseklikleri internal standart pik yüksekliğine bölünerek normalize edilmiş pikler elde edilir. Bu elde edilen değerlerle konsantrasyonlar grafiğe geçirildiğinde elde edilen doğru denklemi bilinmeyen madde miktarlarını bulmak için kullanılacaktır.

BÖLÜM 6. YÜKSEK PERFORMANS SIVI KROMATOĞRAFİSİ (HPLC)

Yüksek performans sıvı kromatografisi bir örnekte bulunan bileşiklerin analitik veya preparatif olarak ayrılmasına ve ayrıca bileşiklerin kalitatif ve kantitatif tayinine, izolasyonuna imkan veren hızlı, hassas ve güvenilir bir tekniktir.

Yüksek performans sıvı kromatografisi, bütün ayırma metotları arasında en çok kullanılandır. Bunun nedeni, bu metodun:

- 1) Hassas olması,
- 2) Sıcaklığa hassas olan maddelere de uygulanabilmesi,
- 3) Doğruluk dereceleri ve kesinlikleri yüksek sonuçlar vermesidir [23].

6.1. HPLC Cihazının Çalışma Prensibi

Yüksek performans sıvı kromatografisi, çalışma prensibi temel olarak örnek uygun çözücü (mobil faz) içinde çözülmesi ve bu karışımın yüksek basınç altında dolgulu (sabit faz) çelik kolondan geçirilmesi esasına dayanır.

Hareketli faz, sisteme akış kontrol edilebilen bir piston pompası vasıtasıyla bir rezervuardan pompalanır. Pompa ile kolon arasında yer alan enjeksiyon valfi analizi yapılacak örneğin kolana verilmesini sağlar. Örnek, yükleme durumunda enjekte edildikten sonra valf, enjeksiyon pozisyonuna çevrilir. Bileşikler, kullanılan kromatografik yöntemle göre polarite farklılıklarından dolayı kolonun farklı hızlarda terk ederler. Kolondan çıkan hareketli faz bir dedektöre gelir ve yazıcıda pik şeklinde kromatogram halinde kaydedilir. Bileşiğin kolondan çıktığı zaman alıkonma zamanıdır [23].

6.2. Kromatografide Kantitatif Çalışmalar

Kromatografide kantitatif çalışmalar çok hassas bir şekilde yapılabilir. İçi standartlarla $\pm 0,1\%$ mertebesinde hassasiyete ulaşılabilir. Çağdaş kromatografi cihazları hem ayırma işlemi yapar, hem de aynı zamanda bileşenlerin kantitatif analizlerini mümkün kılar [24].

6.2.1. Kolondaki madde kaybı

Bandı oluşturan malzemeler ne şekilde tayin edilirse edilsin, burada ortaya başka bir köklü sorun çıkar. Aşırıya kaçan durumlarda karışımın içindeki bazı maddelerin tamamıyla sıyrılmaları mümkün olamaz. Başka bir deyimle madde analiz sırasında yüksek oranda kayba uğrar. Bunun analiz sırasında geri kazanılması oranı %0 'dır. Olağanüstü durumlarda kalitatif analizi de madde kaybından dolayı yapmak mümkün olamaz. Birkaç istisna dışında kaybedilen maddenin deneysel olarak tayinin yapmak ta mümkün olamaz (Bunun bir istisnası radyoaktif etiketli bir bileşiğin kolon üzerinde ölçülebildiği hallerdir).

Geriye dönüştürülemez bir absorpsiyonu tayin etmenin yolu örneğin sıyrılan bileşenlerinin çoklu örnek durumunda tutulma karakteristiklerindeki ilerleyen değişimleri gözlemektir. Geri dönüşümsüz olarak bağlanan bileşenler kolonun üst tarafındaki yüzeysel bölgeleri işgal ederler ve bunun neticesinde kolonun karakteristiği değişime uğrar. Her örnek enjeksiyonu kolon karakteristiğini değiştirir ve sıyrılan bileşenlerin tutulma süreleri uygulanan her enjeksiyonla birlikte değişime uğrar.

Kalitatif ve kantitatif analizin başka bir yoldan yapılması, ayırma işlemi sırasında kimyasal değişime uğrayan bileşikler için hatalı sonuçlara neden olabilir. Bunlara örnek olarak ayrışma katalizleri, izomerizasyon ve yapısal değişiklikler gösterilebilir. Bu bölüme son verirken tüm bileşenlerin %100 verimle tayin edilebilmeleri için kimyasal açıdan değişikliğe uğramamaları gerektiğini belirtmek gerekir [24].

6.2.2. Dedektör cevabı

Kromatografi yönteminin hassasiyeti ve tayin limitleri tamamen kullanılan dedektörün karakteristiklerine bağlıdır. Dedektörün seçimi yalnız kromatografi şartlarına değil, analizi yapılacak bileşiklerin kimyasal ve fiziksel karakteristiklerine, konsantrasyonlarına ve kullanılacak örneğin ebadına bağlıdır. Kantitatif analizin en kolay yolu, dedektörün her bileşik için vereceği ve her bileşik için lineer olan çıkış verilerinin bir diyagrama taşınmasıdır. Matematiksel olarak bu aşağıdaki basit eşitlikle ifade edilebilir.

$$\text{Dedektör cevabı} = S_{\text{Bileşik}} \cdot [\text{Bileşik}]$$

S hassasiyeti ifade eder. Örneğin iki bileşik aynı hassasiyette ise ve enjekte edilen örnekte eşit konsantrasyonlarda bulunuyorlarsa, sıyırma bandı sonradan genişlemeye başlar (daha fazla seyreltme) ve müteakip bandın pik cevabı daha önce sıyırılmış olandan daha küçük olur [24].

6.3. HPLC’de Çalışma Koşullarının Saptanması

HPLC’de analiz yapabilmek için ayrılacak bileşiğin polar ya da nonpolar çözücülerde çözünebilmesi gerekmektedir; bileşiğin yapısına uyan bir kolon, dedektör ve mobil faz seçilmekte, ayrıca mobil faz seçiminde kolonun dolgu materyali de dikkate alınmaktadır.

HPLC’de kullanılacak çözücülerin ve inorganik tuzların saflığı da çok önemlidir; çünkü çözücüler içindeki safsızlıklar, düzgün bir baseline elde edilememesine ve istenmeyen piklerin çıkmasına, ayrıca dolgu materyalinin yüzeyinde tutulup kromatografik alıkonmanın değişmesine, pompa filtresinin gözeneklerinin ve boruların tıkanmasına neden olmaktadır.

Mobil fazda çözülmüş havada problem oluşturan etmenlerden biridir. Bu hava, pompa başında bir kabarcık oluşturursa mobil fazın akışını azaltacak ya da durduracaktır; dedektörde oluşan kabarcık ise sahte pikler meydana getirecektir. Mobil fazın uçucu çözücülerden ibaret bir karışım olması durumunda havayı kovarken çözücü oranlarının değişmemesine dikkat edilmelidir. Mobil faz hazırlandıktan, manyetik bir karıştırıcı yardımı ile 5-10 dakika karıştırıldıktan ve ultrasonik banyoda havası kovulduktan sonra uygun filtrelerden vakum uygulanarak süzülmesi gereklidir. Sulu karışımları hazırlamak için kullanılan suda ayırmayı etkileyeceği için bu su özel bir itina ile cam kaplarda iki kez destile edilmek suretiyle hazırlanmış olmalı ve 48 saat içinde tüketilmelidir.

Mobil faz olarak tampon çözelti kullanılması halinde, bu çözeltilerin taze hazırlanmış olması, o günlük çalışmanın sonunda kolonun destile su ile yıkanması ve sonra kolondan organik çözücü geçirilmesi gerekmektedir. Tampon çözeltiler içinde küf ve bakteri üremesi, diğer mobil fazlara göre çok daha hızlı olduğundan ve ayrıca tampon çözelti içindeki maddeler kolon içinde kristallenerek kolonu tıkayacaklarından bu çözeltilerin kolon içinde bırakılmamasına özel bir dikkat göstermek yerinde olur.

Çözeltilerin enjeksiyon için hazırlanmasında kullanılacak çözücülerin seçimi de önem arz etmekte ve ayrılacak analiz örneğinin mobil fazda çözünebilmesi için ideal durum olmaktadır. Eğer ayrılacak örnek mobil fazda iyi çözünmüyorsa, bu takdirde mobil fazla karışabilen ve dedektör cevabı küçük olan bir çözücüde çözüldükten sonra sisteme enjekte edilmektedir. Bu ikinci durum söz konusu ise omuzlu ve geniş piklerin oluşumunu önlemek için enjeksiyon hacmi küçük tutulmalıdır.

Ön hazırlıklar tamamlandıktan sonra çalışma için seçilmiş kolon, doldurulduğu yönde cihaza takılır; pompa, dedektör ve kaydedici, çalışma koşullarının gerektirdiği biçimde ayarlanır, kolon içinden 5-10 mL mobil faz geçirildikten sonra ideal hacim olan 20µL solüt sisteme enjekte edilir ve kromatogram alınır. Alınan bu ilk kromatogram incelenerek daha iyi bir kromatogram elde edebilmek için akış hızında, hassasiyette ya da enjeksiyon hacminde gerekli değişiklikler yapılır. Bu değişikliklere karşın pik ya da pikler gerek şekil gerekse çözümlenme bakımından

istenen nitelikte değilse mobil fazda değişiklik yapmak, bununla da istenen sonuç alınamıyorsa kullanılan kolonda bozunma olup olmadığına bakmak, ayrıca en uygun kolonun seçildiğinden emin olmak gerekir. HPLC çalışmalarında kolon, aletin beyni olduğundan, ömrünü uzatmak üzere bazı önlemler alınmakta ve bu önlemler arasında uygun bir mobil faz ile uygun pH'ın seçimi en önemli yeri almaktadır [25].

6.4. Kantitatif Analiz

Bir maddenin tüm bileşenleri birbirinden ayrılmışlarsa, bunların miktar analizleri için muhtelif teknikler kullanılabilir. Her bir bileşen ayrı bir fraksiyon olarak toplanabilir ve bu fraksiyonların her birinde tek tek kantitatif analiz yapılır. Kantitatif analiz titrasyon işlemi veya başka tür bir cihazla yapılabilir. Hangi analiz yöntemi kullanılırsa kullanılsın, fraksiyondaki bir bileşenin mutlak miktarı, fraksiyon hacmi ile konsantrasyonların matematiksel çarpımlarına eşittir. Ancak bu ortalama konsantrasyon, genellikle daha kolay olarak fraksiyonları toplamadan da ölçülebilir. Ölçüm küçük orandaki bir sıvının dedektör içinden geçtiği sırada yapılır. Çıkış cevabı lineerdir, maddenin konsantrasyonu zamana göre çizilmiş grafiğin altındaki alanla orantılıdır [24].

Kantitatif analiz yapılırken lineer regresyon metodundan faydalanılır. Lineer regresyon veya en küçük kareler yöntemi, iki değişkenin korelasyonunu belirlemek için kullanılır. Verinin bir seti y eksenini üzerinde diğer seti x eksenini üzerinde gösterilir ve en küçük kareler metodu ile bir doğru elde edilir. Spektrofotometrik analiz için doğrusal lineer ilişki teorisi Lambert-Beer yasası olarak adlandırılır.

Bu yasa çözültedeki çözünen türleri ile onların konsantrasyonlarını ve numune hücresinin ışık yolunu elektromanyetik ışının absorbansına bağlar. Analizin yapılacağı bir dalga boyu ile absorbans spektrumunda bir maksimum seçilmesi genellikle iki nedenden dolayı seçilir:

En yüksek tepe noktası molar absorptivitenin en yüksek olduğu değeri gösterir ve dolayısıyla bu değer de analizin duyarlılığının bir göstergesidir ve şu şekilde gösterilir:

$$A = \epsilon c l$$

A, çözünenin absorpsiyonudur.

$$A = -\log T$$

T, transmittans (geçirgenlik),

ϵ , çözünenin molar absorptivitesi,

l, hücrenin ışık yolu uzunluğu,

c, çözünenin konsantrasyonudur.

HPLC analiz yönteminin ilk aşaması bilinen analit konsantrasyonları içeren standart çözelti serileri hazırlamak, bu serilerin kromatogramlarını ölçmek ve kalibrasyon eğrisini çizmektir. Elde edilen kalibrasyon denklemi $y = m x + b$ şeklinde yazılır. Bu eşitlik Beer kuralının deneysel versiyonudur.

$$A = m c + b$$

Burada m; eğimi, b; doğrunun y eksenini kestiği noktayı göstermektedir.

Bilinmeyen konsantrasyonu bulmak normal olarak yeterli değildir. Sonucun ispatlanabilmesi için bazı deliller olmalıdır. İspatın genel ölçümü standart sapmadır. Konsantrasyon, bilinmeyen kalibrasyon eğrisine dayandığından, sonucun standart sapması kalibrasyon eğrisinin ispatının aynı parantez içine alınmasıyla hesaplanır.

$$s_c = \frac{s_r}{m} \sqrt{\frac{1}{L} + \frac{1}{N} + \frac{s_m^2 (\bar{y}_c - \bar{y})^2}{m^2 s_r^2}}$$

Kalibrasyon eğrisinden, (S_c) hesaplanan bilinmeyen bir konsantrasyonun standart sapması eğimin standart sapmasına (S_m), regresyon oranına (S_y), kalibrasyon eğrisi için yapılan ölçümlerin sayısına (N) ve örneğin kaç kere ölçülmüş olduğuna (L) bağlıdır. Hassasiyet aynı zamanda kalibrasyon eğrisinin merkezinden yapılan ve $(\bar{Y}_c - \bar{y})^2$ olarak ifade edilen ölçüm aralığının karesine de bağlıdır [24].

Sıvı kromatografisinde, kromatogramdaki piklerin alanı ya da yüksekliği, miktar tayini yapılacak maddenin konsantrasyonu ile doğrusal bir ilişki içinde olduğu zaman yani dedektör cevabı ile konsantrasyon arasında doğrusal ilişki olması halinde üç yolla miktar tayini yapılmaktadır. Bunlar internal standart yöntemi, eksternal standart yöntemi ve standart ilavesi yöntemidir.

6.4.1. İnternal standart yöntemi

Bu yöntemde yapı bakımından analizi yapılacak örneğe benzeyen, farklı alıkonma zamanına sahip olan ve miktarı bilinen bir standart, solütle birlikte sisteme enjekte edilmekte ve bu suretle örnek hazırlamadan, cihazdan, teknikten vb. gelen hatalar minimuma inmektedir. İnternal standardın pik alanı (ya da pik yüksekliği) ile karışımdaki analizi istenen maddenin pik alanı (ya da pik yüksekliği) kıyaslanarak miktar tayini yapılmaktadır.

Bir internal standart için gerekli koşullar şu şekilde sıralanmaktadır:

- 1) Karışımın içerdiği maddelere ait tüm pikler için kullanılabilir olmalıdır.
- 2) Karışımdaki tek bir maddenin analizi yapılacaksa internal standardın alıkonma zamanı, bu maddenin alıkonma zamanına yakın olmalıdır.
- 3) Madde piki (ya da pikleri) ile yakın konsantrasyona ve benzer dedektör cevabına sahip olmalıdır.

- 4) Örnekteki maddelerle reaksiyon vermemelidir.
- 5) Çok saf olmalı ve kolayca sağlanabilmelidir.

İnternal standart yönteminde hem kalibrasyon eğrisi hazırlamak hem de cevap faktörü elde etmek için internal standart dışında analizi istenen madde veya maddelerin referans standartlarına da gerek vardır. Bu amaçla internal standart ve referans standart maddenin bilinen miktarını içeren bir karışım hazırlanır ve cihaza enjekte edilir.

Kalibrasyon eğrisi çizmeye yarayan diğer bir yöntemde ise, internal standart ile referans maddenin stok çözeltilerinden seyreltme yapılmakta ve her birine aynı miktarda (ortalama bir değerde) internal standart ilavesinden sonra enjeksiyon yapılmakta; pik alanları oranı (A_x/A_{is}) ordinata, konsantrasyonlar absise yazılarak hazırlanan kalibrasyon eğrisi ile de miktar tayin edilmektedir [25].

6.4.2. Eksternal standart yöntemi

Bu yöntemde, ya miktar tayini yapılacak maddeye ait referans standardın belli miktarları sisteme enjekte edilerek bir kromatogram elde edilip bilinmeyen pik alanı (ya da pik yüksekliği) ile kıyaslanır ya da referans standardın değişik konsantrasyonlardaki bir seri çözeltisi hazırlanır ve her biri aynı hacimde olmak koşulu ile sisteme enjekte edilir; pik alanları (ya da pik yükseklikleri) kullanılmak suretiyle bir kalibrasyon eğrisi çizilir ve bilinmeyen pik alanından (ya da pik yüksekliğinden) miktara geçilir [25].

6.4.3. Standart ekleme yöntemi

Kalibrasyon eğrileri içeriği bilinen standartlarla analitin kütle, hacim veya konsantrasyonunun grafiğidir. Gelen sinyaller neticesinde absorbans, elektromanyetik ışımının emilsiyon şiddeti, elektrokimyasal hücrenin potansiyeli veya akımı, kromatografik pik alanı vb. değerler ölçülebilir. Veriler genellikle

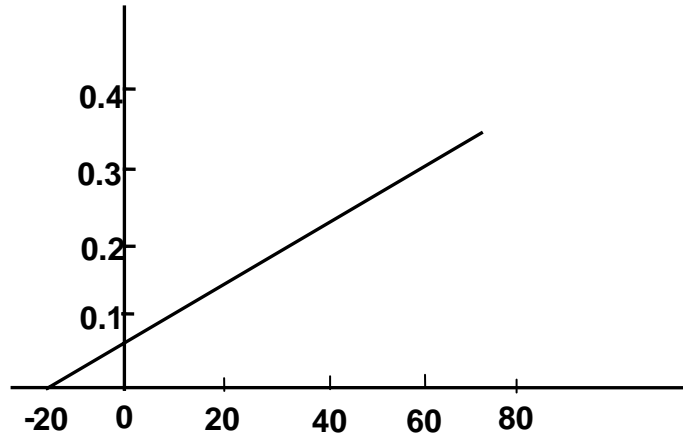
doğrudan grafiğe aktarılır. Grafik üzerinde doğrusal bir çizgi elde edilmiş fakat bazı noktalar dışarıda kalıyorsa lineer regresyon analizi ile en optimum doğru elde edilebilir. Kalibrasyon grafiklerinin kullanımı kolaydır. Çünkü numune içindeki analit konsantrasyonu eğriden kolayca okunabilir veya eğrinin doğrusal olduğu yerdeki faktörü kullanılarak hesaplanabilir.

Kalibrasyon eğrisi yönteminde saf su içinde çözündürülmüş saf bileşiklerden elde edilen standart çözeltiler kullanılır. Diğer taraftan örneğin içinde bulunan bilinmeyen diğer maddeler ve diğer bileşik matrisleri analiz işlemi üzerinde girişimlerde bulunarak büyük sistematik hataların yapılmasına neden olurlar. Buna matris etkisi denir ve bunu önlemenin iki yolu vardır.

Bunlardan bir tanesi standart çözeltilerin içine bilinmeyen örnekte bulunduğu tahmin edilen maddeleri katmaktır. Bu yöntemin zorluğu bilinmeyen çözelti içindeki yabancı maddelerin ne olduklarını tahmin etmektir, zira matris bazen çok karmaşık bir karışım olabilir.

Daha genel bir yaklaşım da saf çözücü ve saf bileşik yerine örnekten bir standart hazırlamaktır. Burada bilinmeyen çözeltinin absorbansı ölçülür, içine belli miktarda bilinen bir bileşik ilave edilir ve ölçüm tekrarlanır. İki çözelti ilave yapılmadan önce ve ilaveden sonra aynı içeriğe sahip olmalıdırlar. Ayrıca içeriğe uygunluk sağlamak için bilinmeyen çözeltilerden pipetle birbirine eşit miktarlar alınıp, iki dereceli erlenmayer şişesine aktarılır ve ikisine de su ilave edilerek aynı hacme getirilir. Analizi yapılacak çözeltilere belirli miktarlarda konsantrasyonu bilinen bir madde ilave edilir ve bu işleme Standart Ekleme yöntemi adı verilir.

Genel olarak kalibrasyon eğrisi yönteminde örneğe muhtelif standart ilavesi ile oluşturulan eğride en düzgün doğru elde edilir. X-ekseni ilave edilen standardın konsantrasyonu ise (Spike konsantrasyonu) Beer Kanununa göre eğrinin lineer olması gerekir [24].



Şekil 6.1. Standart Ekleme Eğrisi Doğrunun y eksenini kestiği nokta bilinmeyen örneğin standart ilavesi yapılmadan verdiği absorbanstır. Bilinmeyen örneğin konsantrasyonu x-kesintisinden hesaplanabilir

6.5. HPLC ile Yapılan İlaç Analizi

Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi, değişik alanlarda karşılaşılan birçok analiz sorununa çözüm getirmek üzere son 20 yıldır başarıyla kullanılmakta; farmöstik endüstrideki önemi ise, ilaç etken maddesinin tek halde ya da preparat içindeki analizini hızlı, duyarlı ve güvenilir bir şekilde yapabilmesinden kaynaklanmaktadır. Bu analizler saflık, kalite kontrolü, stabilite tayini ve reaksiyona girmemiş sentez ilkel maddelerinin saptanması alanlarını kapsamakta, örneğin izoniyazid ve hidralazin içindeki hidrazin, aspirin içindeki salisilik asit ve diğer safsızlıklar vb. HPLC yardımı ile kolayca saptanabilmektedir.

Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi, biyolojik materyaldeki ilaç ve ilaç metabolitlerinin analizine de olanak sağlamakta ve bu bağlamda plazmadaki ilaç düzeyinin saptanması, doz ayarlanması, biyoyararlılık gibi konulara ait çalışmalar yapılmaktadır. Bu tür çalışmalarda kullanılacak örnek, diğer metotlara göre daha kolay hazırlanabilmekte ve proteinler çöktürüldükten, partiküller süzöldükten sonra cihaza verilebilmekte, bazı durumlarda örneğin idrarla çalışırken sadece süzme işlemi bile örneği cihaza enjekte etmek için genellikle yeterli olmaktadır.

BÖLÜM 7. DENEYSEL KISIM

7.1. Enstrumentasyon ve Mobil Faz

Absorpsiyon ölçümleri için Shimadzu UVPC yazılımı yüklenmiş bir Shimadzu UV-240 çift ışınlı UV-VIS spektrofotometresi kullanıldı. Ölçümlerde 1 nm slit aralığı kullanıldı ve spektrumlar 0,1 nm aralıklarla elde edildi. Verilerin düzenlenmeleri, regresyonlar ve istatistiksel analizler için UVPC ve EXCEL yazılımları kullanıldı.

ESI-MS ölçümleri Finnigan LCQ iyon trap MS (San Jose, CA, USA) cihazıyla yapıldı ve Xcalibur (v. 1.2) yazılımı ile elde edilen sonuçlar değerlendirildi. Standart bir Finnigan elektrosprey aleti pozitif ve negatif iyon modunda çalıştırıldı. Kütle ölçümleri için çalışma koşulları; kapiler sıcaklığı, 200 °C; kapiler voltajı, (\pm) 20,0 V; iyon sprej voltajı, (\pm) 4,5 kV; çözücü buharlaştırıcı gaz akış hızı 20 birim olarak seçildi.

Kromatografik çalışmalarda bir Agilent 1100 HPLC (Agilent Technologies, Inc., California, USA) sistemi kullanıldı. Bu sistem dörtlü bir pompa sistemi, otomatik numune verici, termostatlı kolon kompartımanı ve diyot array dedektörüne (DAD) sahiptir. Elde edilen verileri işlemek için Hewlett-Packard tarafından yazılan HP Chem Station yazılımı kullanıldı. Karışımların ayrılması ise Waters Symmetry® C18 kolonu (5 μ m 4,6 x 150 mm) kullanılarak gerçekleştirildi. Akış hızı 0,8 mL/min ve enjeksiyon hacmi 20 μ L olarak kullanıldı. Hareketli faz günlük olarak hazırlandı ve 0,45 μ m membran filtreden geçirilerek süzüldü.

7.2. Ticari Tablet Formülasyonu

Metot geliştirme için 875 mg AMX, 125 mg KLV içeren bir ticari tablet formülasyonu (I. E. ULAGAY, TURKEY tarafından üretilmiş Croxilex®-BID 1000 mg kaplı tabletler Batch no.401006) kullanıldı. Bütün önerilen metotlar bu tablet

üzerinde uygulandı. AMX, KLV, ASP ve CLN Türk Farmakoloji firmaları tarafından sağlandı.

7.3. Standart Çözeltiler

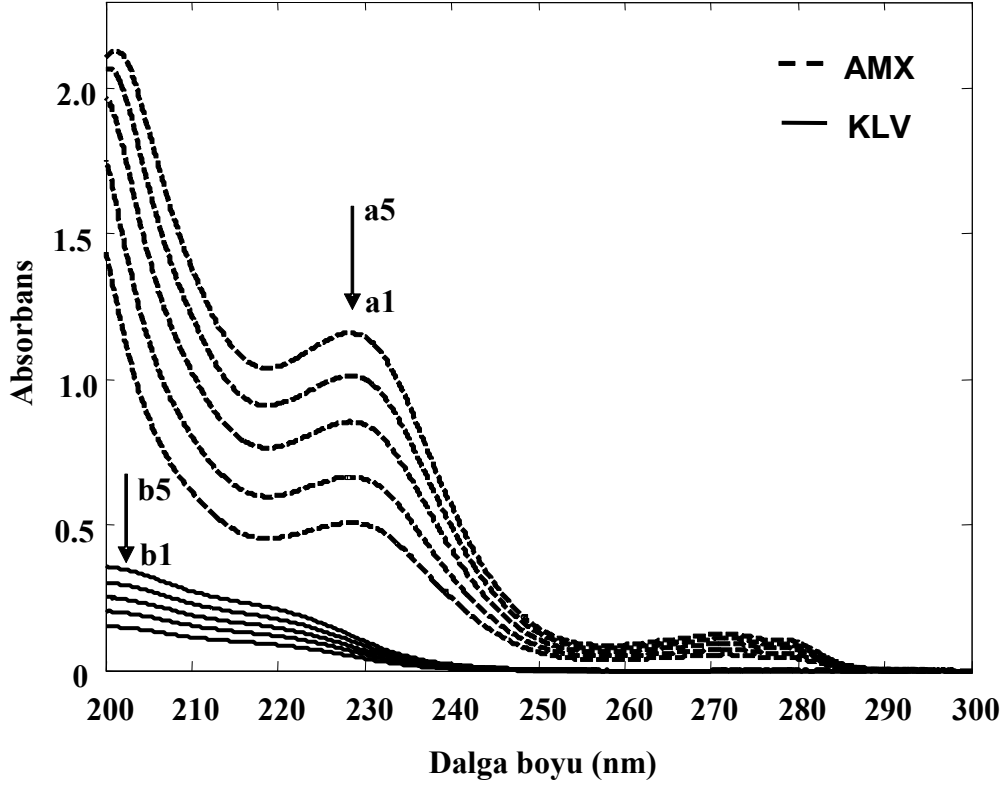
35 mg/100 mL AMX, 25 mg/100 mL KLV, 30 mg/100 mL ASP ve 30 mg/100 mL CLN içeren stok çözeltiler su ile hazırlandı. Oluşacak bozunmalardan dolayı meydana gelecek hataları önlemek amacıyla deneyin her seti için taze çözeltiler hazırlandı. AMX için 21-49 µg/mL ve KLV için 3-7 µg/mL içeren çözeltilerin standart bir serisi stok çözeltiler kullanılarak hazırlandı. Üç metot için aynı konsantrasyon aralığındaki çözeltiler kullanıldı. ESI-MS çalışmaları için 30 µg/mL internal standart (IS) her bir çözeltiye eklendi. Bütün kalibrasyon denklemleri üç farklı ölçüm kullanılarak elde edildi ve final sonuçları bunların ortalaması alınarak elde edildi.

7.4. Tablet Analizi

Tablet çözeltisi hazırlanmasında, 10 tablet tartıldı ve bir havanda toz haline getirildi. Bu 10 tabletin ortalamalarından bir tablet miktarı kadar tartılarak 100 ml kalibreli bir volumetrik şişede 100 ml su içerisinde çözüldü. Hazırlanan çözeltiler 0,45 µm tek kullanımlık membran filtrelerden süzüldü. Final çözeltisi deneysel çalışmalar için çalışılacak konsantrasyon aralığına seyreltildi.

BÖLÜM 8. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Şekil 8.1 AMX ve KLV'nin her ikisinin suda alınmış absorpsiyon spektrumlarıdır. Bileşiklerin absorpsiyon spektrumları iki etken maddenin dramatik konsantrasyon farklarını gösterir ve her iki bileşik için çakışan spektrumlarının spektrofotometrik çözümlenmesi için bazı kısıtlamalar getirir. Bu karışım tabletlerin her iki etken maddesinin kantitatif tayini için metotların avantajını gösteren mükemmel bir modeldir. Birinci türev metodu bir karışım içindeki etken maddelerin çözümlenmesini sağlayan sıfır kesim noktası [7-12] kullanır. Sıfır kesim noktası metodu karışımların çakışan spektrumları için dezavantajlara sahiptir. Çalışılan dalga boylarında bazı küçük kaymalar olması ve türev spektrum piklerinin genellikle çalışılan dalga boylarına uygun düşmemesi riskleri vardır ki bu durumun spektrumun eğimi çok yüksek olduğu zaman kesinlik ve doğrulukta kayıp ve düşük hassaslığa neden olması gibi tehlikeleri vardır [19].

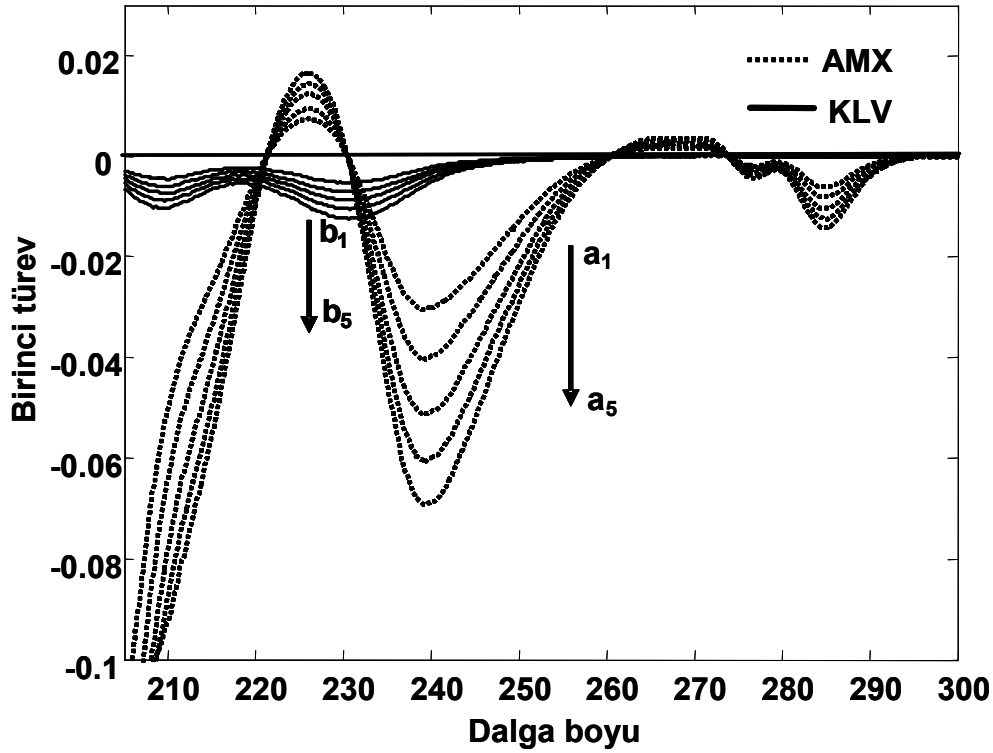


Şekil 8.1. Suda AMX (---) ve KLV (—) absorpsiyon spektrumları
 a1 - a5 ; 21 $\mu\text{g/mL}$ ' den 49 $\mu\text{g/mL}$ ' ye AMX konsantrasyonlarını gösterir
 b1 - b5 ; 3 $\mu\text{g/mL}$ ' den 7 $\mu\text{g/mL}$ ' ye KLV konsantrasyonlarını gösterir

Şekil 8.2 AMX ve KLV için kalibrasyon aşamasında birinci türev spektrumlarını gösterir. AMX uygun kalibrasyon için yeterli sinyal yoğunluğunu sağlarken, KLV daha iyi bir kalibrasyon için yeterli açıklığı göstermez. Birinci türev ayrıca spektrumun gürültü seviyesini de artırır ve bu durum belirli sıfır kesim noktalarında sinyal yoğunluğunun okunmasını daha da zorlaştırır.

Türev spektrumlarında sinyalin gürültüye oranını ve pik şeklini etkileyen ana parametrelerden biri $\Delta\lambda$ değeridir. Bu parametre iyi çözümlenmiş geniş bir pik vermesi için iyileştirilmiş olmalıdır örneğin; tayinde yüksek hassaslık ve iyi seçicilik vermesi gibi. Daha yüksek $\Delta\lambda$ değerlerinde sinyal-gürültü oranı daha iyileşir böylece türev spektrumundaki iniş çıkışlar azalır. Ayrıca, eğer $\Delta\lambda$ değeri aşırı yüksek olursa ikinci

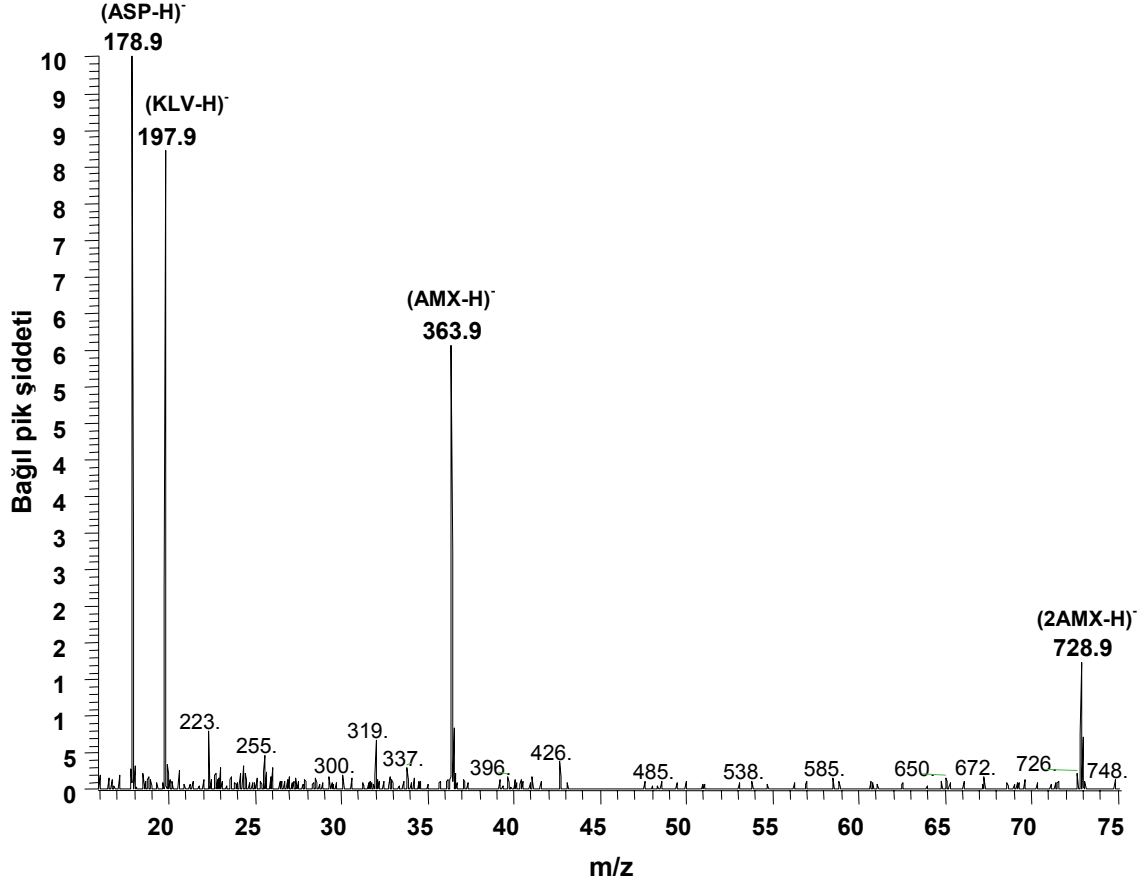
türevin spektral yoğunluğu kötüye gider. $\Delta\lambda$ 'nın çeşitli değerleri test edildi ve uygun sinyal-gürültü oranını vermesi amacıyla $\lambda=5$ nm seçildi.



Şekil 8.2. Suda AMX (---) ve KLV (—) birinci türev spektrumları
 a1 - a5 ; 21 $\mu\text{g/mL}$ ' den 49 $\mu\text{g/mL}$ ' ye AMX konsantrasyonlarını gösterir
 b1 - b5 ; 3 $\mu\text{g/mL}$ ' den 7 $\mu\text{g/mL}$ ' ye KLV konsantrasyonlarını gösterir

Türev spektrofotometrisi bir spektral eğrinin matematiksel türevlerinden birinin çizilmesi ve hesaplanmasını kapsar. Böylece, çok bileşenli sistemlerin çözülmesi, azaltılmış örnek türbidimetresi ve spektral detayların azaltılması gibi birçok analitik probleme uygun çözümler getirir. Başka yerlerde de türev spektrofotometrisinin teorik kısmını bulmak mümkündür [7-12]. Türev-UV spektrofotometrisinin çözülmesinin arttırılması ilaçların tayinleri için avantaj olarak kullanılır. Bilindiği gibi daha yüksek dereceli türevler daha sivri pik genlikleri, ama verilen bir eğri için bant genişliği daha düşük türev absorbans birimleri verir [19]. Türev derecesinin en iyi seçimi geniş perdelemelerin daha çok azaldığı zamandır. Bizim durumumuzda KLV için verdiği düşük absorpsiyon değerlerinden dolayı birinci türev seçildi.

Şekil 8.3 internal standart varlığında söz konusu bileşiklerin negatif iyon ESI-MS spektrumlarını gösterir. Spektrumlar hiçbir ön ayırma tekniği olmaksızın alındı.

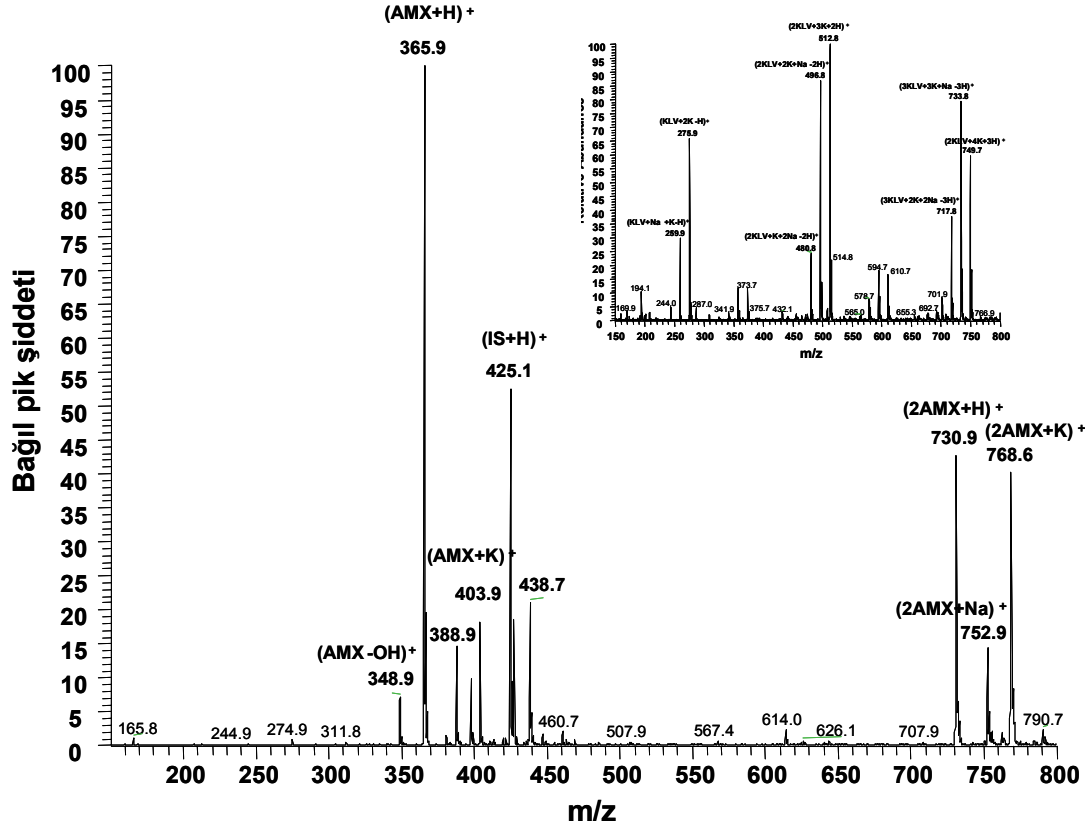


Şekil 8.3. Suda AMX 35 µg/mL, KLV 5 µg/mL ve IS 30 µg/mL tablet formülasyonunun negatif iyon ESI-MS spektrumları MS koşulları: negatif ESI modu; ısıtılmış kapiler sıcaklığı, 200 °C; kapiler voltajı, -4,5 kV; çözücü buharlaştırıcı gaz akış hızı, 20 birim

Spektrumlardaki bütün pikler tespit edildi ve pik yükseklikleri kantitatif çalışmalar için kullanıldı. Çalışma parametreleri üç bileşiğin karışım çözeltisi 5 µL/min bir hacimle kütle spektrometrisine direkt enjekte edilmesiyle belirlendi. Değişik kütle spektrometrik koşullar (ESI probe sıcaklığı, kapiler voltajı ve koni voltajı) araştırıldı. ESI probe sıcaklığı kabul edilebilir en düşük sıcaklığa ayarlandı (200 °C). Kapiler voltajı internal standart varlığında AMX ve KLV tayini için -4,5 kV'ta sabit tutuldu. AMX'da kütle spektrumu elektrosprey kaynağındaki iyonizasyondan sonra m/z 363.9'te deprotona

olmuş türler, $[AMX-H]^-$, verdi. KLV'nin negatif iyon ESI spektrumu m/z 197.9'de deprotona bir pik verdi, $[KLV-H]^-$. Kantitatif çalışmalar için m/z 178.9'de internal standardın deprotona bir moleküler iyonu, $[M-H]^-$, kaydedildi. Bu çalışmada bu iki bileşiğin negatif iyon ESI-MS spektrumları tablet içeriğinden hiçbir perdeleme olmadığını kanıtlamak için alındı. 728.9 amu'da gösterilen pik çözeltideki AMX $[2AMX-H]^-$ 'nin dimer oluşturduğunu gösterir ve bu pikin yoğunluğu konsantrasyon arttıkça artar. Bu durum aynı zamanda çözeltideki AMX'un miktarını kantitatif olarak belirlemek için başka bir fırsat verir. Aynı zamanda pozitif iyon modunda çalışılarak başka bir ESI-MS metodu geliştirildi. Temel olarak, KLV pozitif iyon modunda kendi başına birçok potasyum ve sodyum kompleksleri oluşturur. AMX gibi diğer potasyum kapalı bileşikler KLV'nin ESI-MS spektrum profilini değiştirdi ve görülmesini imkansız hale getirdi.

Pozitif iyon modunda, KLV'nin miktarını tayin etmek için AMX'un potasyum kompleksini kullandık. Çünkü AMX'a bütün potasyum KLV tarafından sağlanmış olacak ve $[AMX+K]^+$ 'nin pik yoğunluğu kantitatif çalışmalar için kullanılabilir olacaktır. Şekil 4 tablet içeriğinin pozitif iyon modunda spektrumlarını gösterir ve set içi spektrumlar KLV'nin sudaki pozitif iyon ESI-MS spektrumlarını gösterir. Pozitif iyon modunda CLN'yi internal standart olarak kullandık. Bu antibiyotiği seçmemizin nedeni hiçbir sodyum veya potasyum kompleksi oluşturmamasıydı bu durumda kantitatif çalışmaların pozitif iyon modunda yapılması mümkün oldu. CLN çok iyi pozitif iyon spektrumu vermesine rağmen, hiç negatif iyon spektrumu vermez dolayısıyla negatif iyon çalışmaları için ASP kullandık. Spektrumlar kantitatif ESI-MS çalışmalarında neden negatif iyon modunun esas metod olarak seçildiği hakkında bilgi verdi. Bunun sebebi pozitif iyon modundaki spektrumlarda KLV pikinin yokluğu ve temel olarak kantitatif çalışmalar için basit MS spektrumları vermesidir.



Şekil 8.4. Suda AMX 35 µg/mL, KLV 5 µg/mL ve IS 30 µg/mL tablet formülasyonunun pozitif iyon ESI-MS spektrumları İç resim suda KLV pozitif iyon spektrumlarını gösterir MS koşulları: pozitif ESI modu; ısıtılmış kapiler sıcaklığı, 200 °C; kapiler voltajı, 4,5 kV; çözücü buharlaştırıcı gaz akış hızı, 20 birim

Şekil 8.5’de her iki bileşiğin kromatogramı gösterildi. Elde edilen kromatogram birbirini perdeleyen hiçbir pik olmadığını gösterdi. AMX ve KLV’in alıkonma zamanları sırasıyla 2,2 ve 4,5 dakikaydı. Rutin örnek analizinde 6 dakikalık kromatografik yürütme süresi yeterliydi. Bu kromatografik çalışmada internal standart kullanılmadı. Her bir kromatografik yürütmenin normalizasyonu için toplam pik alanları kullanıldı.

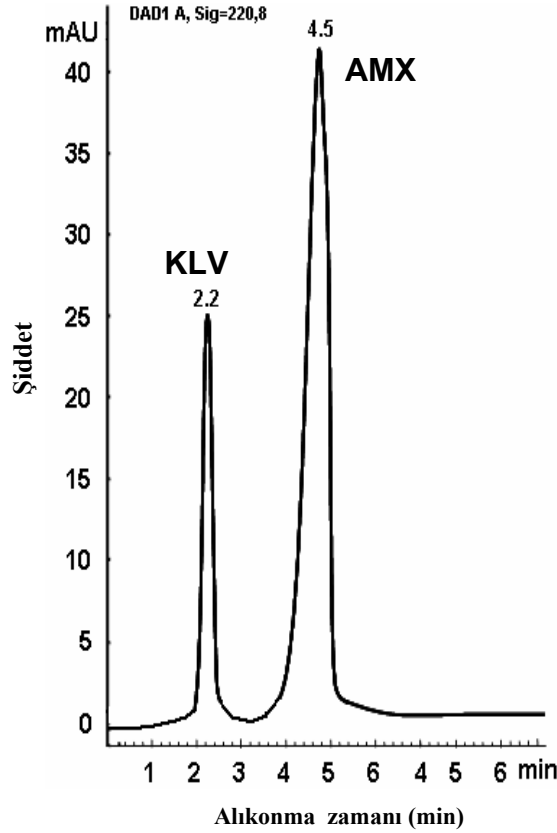
8.1. Birinci Türev Metodu

Spektrumların türevleri $\Delta\lambda=5$ nm aralıklarla hesaplandı ve sonuçta elde edilen spektrum Şekil 8.2’de gösterildi. En iyi kalibrasyon denklemi için farklı $\Delta\lambda$ değerleri denendi ama hesaplamalar için en uygun olarak $\Delta\lambda=5$ nm değeri bulundu. Bileşiklerin absorpsiyon spektrumlarının türevi alındıktan sonra iki farklı kalibrasyon denklemi kurabilmek için sıfır kesim noktaları belirlendi. Her bir bileşik için sentetik karışımlarda ve tabletlerde

konsantrasyon hesaplamalarında kullanılabilen düz çizgiyi veren diğer bileşiğin absorpsiyon değerlerine karşılık gelen konsantrasyonların grafiği çizildi. Aynı metot diğer bileşik için de uygulandı. İkili bir karışımdaki AMX ve KLV miktarları sinyallere orantılı olacak şekilde bulundu ve kalibrasyon denklemlerinin istatistiksel parametreleri Tablo 8.1’de özetlendi.

8.2. ESI-MS Metot

İki ilacın negatif ve pozitif iyon ESI-MS spektrumları ve internal standartları sırasıyla Şekil 8.3 ve Şekil 8.4’te gösterildi. Negatif iyon spektrumunda ASP internal standart olarak kullanıldı.



Şekil 8.5. Suda AMX ve KLV HPLC kromatogramı; kromatogramlar en yüksek konsantrasyonlarda alındı (Her iki ilaç için KLV için 7 µg/mL ve AMX için 49 µg/mL)

Spektrumlarda bileşiklerin hepsini ve ek pikleri görmek mümkündür. AMX çözeltide protone olmuş dimer verir, bu yüzden biz de en iyi kalibrasyon denklemlerini elde etmek için aynı bileşik için ilgili bütün pikleri yoğunluklarını birbirine ekleyerek dahil ettik. Pozitif iyon ESI-MS internal standart olarak CLN'yi kullandı dolayısıyla ek pikler oluşturdu ve biz hesaplamalar için aynı prosedürü uyguladık. Elektrosprey temel olarak; ısıtılan kapiler sıcaklığı, kapiler voltajı, skimer voltajı ve ESI kaynağındaki diğer birçok parametreye bağlı olarak değişik pikler üretti. Bu çalışmada ESI kaynağı en iyi iyonlaşma sağlamak, büyük molekül toplulukları oluşumunu önlemek, kolay iyonlaşabilen madde engellemelerini gidermek ve iyonların parçalanmalarını önlemek için optimize edildi. Kalibrasyon prosedürü için AMX, KLV ve IS'in kalibrasyon standartları analiz edildi. AMX ve KLV'in pik yükseklikleri IS pik yüksekliğine bölünerek normalize edildi. Bu normalize edilmiş değerlerle konsantrasyonlar arasında doğrusal bir ilişki olduğu gözlemlendi ve ilgili doğru denklemleri Tablo 8.1'de gösterildi. Bütün durumlarda kalibrasyon eğrilerinde geri hesaplanan konsantrasyonlar nominal değerlerin 5 %'i içindeydi ve konsantrasyon ve elde edilen dedektör sinyalleri arasındaki ilişki doğrusal model kabul edilebilir bulundu.

8.3. HPLC Metodu

Şekil 8.4'te verilen kromatogram 21-49 µg/mL AMX ve 3-7 µg/mL KLV konsantrasyonlarına karşılık gelir. Dedektör karşılığı pik alanı olarak ölçüldü. Kromatografik ayırma Waters Symmetry ® C18 Column 5 µm 4,6 x 150 mm kolonunda, oda sıcaklığında ve 0.1 M fosfat tampon (pH=8) ve asetonitril (v/v, 60:40)' den oluşan mobil fazda gerçekleştirildi. Akış hızı 20 µL enjeksiyon hacmi ile 0,8 mL/min olarak ayarlandı. Çalışmalar sırasında internal standart kullanılmadı. Kalibrasyonlar için bütün pikler her bir kromatogramdaki her bir ilacın pik alanına karşılık toplam alanı kullanılarak normalize edildi. Bütün enstrümental ve deneysel parametreler söz konusu metotlar için en iyi sinyal-gürültü oranını elde etmek için iyileştirildi. Türev hesaplamaları için türev işleminden sonra azalan yoğunluklara bağlı olarak bileşiklerin sinyal yoğunlukları önemlidir. ESI-MS durumu için kütle

spektrometrisinin düşük tayin limitine bağlı olarak sinyal yoğunluğu problem olmaz. Bu metotta sağlam bir metot elde etmek için önemli parametreler zeltilerin hazırlanması ve ESI kaynak parametreleridir.

8.4. Metot Validasyonu

Her iki ilaç için de; AMX için 21–49 $\mu\text{g/mL}$, KLV için 3–7 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyon aralıkları üzerinden beş noktalı kalibrasyon eğrileri oluşturuldu. Bu konsantrasyon aralığı spektrofotometrik metot geliştirme için kullanılan ve absorpsiyon çalışmaları için beklenen ilaç konsantrasyonu baz alınarak seçildi. ESI-MS ve HPLC alışmaları ilaçların iyileştirilmiş pik alanlarına karşılık konsantrasyonların grafiği çizildi ve konsantrasyon aralıkları içinde doğrusallık bulundu. Saf ilaçların ve karışımların regresyon denklemleri arasında benzerlik gözlemlendi ki bu da bir ilacın varlığında diğerinin tahmininde herhangi bir perdeleme olmayacağını göstermektedir. Kalibrasyon grafiklerinden regresyon denklemleri eğimin (S_b) ve kesimin (S_a)' standart sapmaları hesaplandı. Kalibrasyon grafiklerinin doğrusallıkları ve absorpsiyon lmlerinin Beer kanunlarına uyumu regresyon denklemlerinin korelasyon katsayılarının (r) yüksek değerleri sayesinde kanıtlandı. Tablo 1'de elde edilen kalibrasyon denklemleri ve hata değerleri gösterilmiştir. Saf formdaki AMX ve KLV için ve her iki ilacın sentetik karışımları için ve tabletlerin içerikleri için geri kazanım yoluyla uygulanan metotların kesinliği ve seçiciliği kanıtlandı. Sentetik karışımları hazırlamak için kalibrasyon için kullanılan stok zelteleri seyreltildi. Metotların yüzde geri kazanımları $100 \pm 5\%$ civarında bulundu (Tablo 8.2).

Tablo 8.1. Üç farklı metottan elde edilen kalibrasyon grafiklerinin istatistiksel sonuçları

Metot	İlaç	λ	Regresyon denklemi	r	SE(m)	SE(n)	SE(r)
D	AMX	284.4	$A = -2.91E-04C_{AMX} - 1.20E-05$	0.9997	6.15E-06	2.24E-04	1.36E-04
	KLV	230.4	$A = 8.88E-04C_{KLV} - 1.76E-02$	0.9991	2.12E-06	2.21E-04	1.34E-04
ESI-MS NEGATİF	AMX	-	$A = 3.56E-02C_{AMX} - 2.95E-01$	0.9957	1.40E-03	4.91E-02	2.99E-02
	KLV	-	$A = 7.67E-02C_{KLV} - 2.72E-01$	0.9919	4.00E-03	4.15E-02	2.52E-02
ESI-MS POZİTİF	AMX	-	$A = 6.67E-02C_{AMX} - 2.03E-01$	0.9965	2.30E-03	8.29E-02	5.04E-02
	KLV	-	$A = 1.95E-01C_{KLV} - 8.81E-01$	0.9981	4.90E-03	5.11E-02	3.11E-02
HPLC	AMX	220	$A = 2.46E-02C_{AMX} - 1.93E-01$	0.9991	5.91E-04	2.15E-02	1.31E-02
	KLV	220	$A = 2.06E-02C_{KLV} - 6.40E-03$	0.9973	8.75E-04	9.10E-03	5.50E-03

- D = Birinci türev
C = Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)
A = AMX ve KLV için seçilen dalga boylarında genlikler
r = Regresyon katsayısı
SE(r) = Doğrusal regresyonun standart hatası
SE(m) = Eğimin standart hatası
SE(n) = Kesimin standart hatası

Farmakolojik tabletteki içeriğin perdelemeleri üç metotla detaylı şekilde çalışıldı. Bu yüzden bu iki bileşiği içeren standart ekleme tekniği ticari tabletlere uygulandı. Standart ekleme metodunun uygulanmasında uygulanan metotların standart hataları, standart sapmaları ve nispi standart sapmaları altı sonuç için hesaplandı ve Tablo 8.3' te gösterildi. Elde edilen sonuçlara göre, bu metotlar için iyi bir kesinlik ve doğruluk olduğu gözlemlendi. Sonuç olarak iki bileşiğin analizinde tablet içeriği engellemeye neden olmaz. Bu sonuçlar aynı zamanda tablet içeriğinin çok fazla perdeleme etkisi olmadığını kanıtlar.

Tablo 8.2. Uygulanan kalibrasyon teknikleri ile farklı sentetik karışımlarda AMX ve KLV tayini için elde edilen geri kazanımlar

Eklenen	BULUNAN										% Geri Kazanım							
	D		ESI-MS NEGATİF		ESI-MS POZİTİF		HPLC		D		ESI-MS NEGATİF		ESI-MS POZİTİF		HPLC			
AMX	KLV	AMX	KLV	AMX	KLV	AMX	KLV	AMX	KLV	AMX	KLV	AMX	KLV	AMX	KLV	AMX	KLV	
49	5	47.66	4.76	49.84	4.90	49.21	5.17	48.49	4.85	97.3	95.2	101.7	97.9	104.5	102.8	99.0	96.9	
42	5	42.19	4.74	42.63	5.09	42.22	5.06	41.61	4.85	100.5	94.8	101.5	101.8	101.0	107.4	99.1	97.0	
35	5	34.98	5.17	35.72	5.05	35.43	5.05	34.67	4.79	99.9	103.4	102.1	101.0	102.2	97.7	99.1	95.8	
28	5	28.17	5.00	27.59	5.03	27.60	5.01	28.00	4.81	100.6	100.0	98.5	100.6	97.9	100.6	100.0	96.1	
21	5	20.83	4.84	20.86	5.15	21.23	4.98	20.99	4.88	99.2	96.7	99.3	102.9	100.1	106.4	99.9	97.6	
35	7	34.64	6.69	35.75	6.93	35.57	7.16	34.80	6.74	99.0	95.5	102.1	99.0	103.1	103.7	99.4	96.2	
35	6	35.18	5.92	35.77	6.01	35.85	5.89	35.16	5.90	100.5	98.7	102.2	100.1	101.7	101.4	100.5	98.3	
35	5	34.77	4.85	35.56	5.00	35.36	5.13	34.85	4.79	99.3	96.9	101.6	100.0	102.3	103.2	99.6	95.7	
35	4	34.89	4.23	35.22	4.12	35.43	4.09	34.68	4.00	99.7	105.6	100.6	103.0	100.9	97.5	99.1	99.9	
35	3	35.35	2.95	35.22	3.11	35.29	3.09	34.41	3.03	101.0	98.1	100.6	103.5	99.6	105.5	98.3	100.9	
49	4	48.25	4.18	49.65	4.00	49.28	4.15	47.95	3.92	98.5	104.4	101.3	99.9	102.8	95.7	97.9	97.8	
42	5	43.48	5.23	42.91	5.09	42.49	5.04	41.81	4.80	103.5	104.6	102.2	101.8	98.7	97.3	99.5	95.9	
28	6	27.64	6.17	27.58	6.11	27.81	5.89	28.21	5.96	98.7	102.8	98.5	101.8	99.8	99.0	100.7	99.2	
21	7	20.79	6.83	20.99	7.00	21.09	7.15	21.09	6.87	99.0	97.5	99.9	100.0	100.9	102.6	100.4	98.1	
									ORTALAMA		99.8	99.6	100.9	101.0	101.1	101.5	99.5	97.5
									SD		1.46	3.84	1.33	1.61	1.81	3.66	0.80	1.62
									RSD		1.47	3.85	1.32	1.59	1.79	3.60	0.81	1.66

SD = Standart sapma

RSD = Bağıl standart sapma

Tablo 8.3. Önerilen kalibrasyon teknikleri tarafından ticari tablete uygulanan standart ekleme metodunun sonuçları

	D		ESI-MS NEGATİF		ESI-MS POZİTİF		HPLC	
	AMX	KLV	AMX	KLV	AMX	KLV	AMX	KLV
ORTALAMA	34.9	4.83	34.85	4.91	35.21	5.04	34.65	4.83
SD	1.22	0.13	0.92	0.06	1.52	1.59	0.09	0.11
RSD	3.5	1.31	2.63	0.64	1.51	1.58	0.27	1.16
SE	0.71	0.07	0.53	0.04	0.62	0.65	0.05	0.06
CL(0.05)	2.81	0.29	2.11	0.14	1.22	1.27	0.22	0.26

Tayin limitleri (LOD) ve kantitatif (nicelendirme) limitler (LOQ) kalibrasyon verilerinden hesaplandı ve Tablo 8.4'te gösterildi. LOD ve LOQ metodun hassaslığına karar verir. LOD analitin tespit edilen en küçük konsantrasyonu iken LOQ minimum ölçülebilen konsantrasyondur. AMX ve KLV için bunlar sırasıyla 0,87 ve 0,47 $\mu\text{g mL}^{-1}$ düzeylerindedir. LOQ değerleri AMX ve KLV için sırasıyla 2,01 ve 0,99 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 'dir. Metodun seçiciliği farmakolojik preparasyonun test edilmesiyle tespit edilir. Bu sonuçlar her iki tayin ve kantitatif limitlerinin kabul edilebilir aralıkta olduğunu gösterdi. Tablo 8.4 AMX ve KLV'nin dört metot için LOD ve LOQ değerleri hakkında detaylı bilgi gösterir.

Ticari tablet denemelerinde uygulanan metotlar değerlendirildi. Altı eşdeğer numune tayini yapıldı. Her iki ilacın geri kazanımları için uygun sonuçlar elde edildi (Tablo 8.4) ve tablet içerikleri ile iyi uyuma içindeydi. Türev spektrofotometrik metodunun validasyonu için sonuçlar HPLC metodundan alınan sonuçlarla karşılaştırıldı. Ticari tablet için sonuçlar Tablo 8.4' te verildi. Bir yol üç metot tarafından elde edilen tablet sonuçlarına ANOVA (varyansın analizi) uygulandı. Test sonuçları Tablo 8.4' te tablollaştırıldı. Hesaplanan F değerleri metotlar arasında çok fazla farklılık olmadığını kanıtlayacak şekilde tablollaştırılmış F değerlerinden daha düşük bulundu.

Bu çalışmada sunulan bütün prosedürler AMX ve KLV'nin karışımlarının laboratuvar örnekleriyle iyi bir kesinlik ve doğrulukla ölçülmesini mümkün kılar. Sonuçlar ESI-MS metodunun uygulamalarının küçük absorpsiyon değeri olan ilaçların ölçülmesi için önemli bir avantaj sağladığını gösterir. Metodun avantajı temel olarak kolaylığından kaynaklanır. Ayrıca bu hızlı ve ekonomik bir metottur.

Tablo 8.4. Önerilen kalibrasyon metotları tarafından farmakolojik dozaj formlarında elde edilen sonuçlar

	D		ESI-MS NEGATİF		ESI-MS POZİTİF		HPLC	
	AMX	KLV	AMX	KLV	AMX	KLV	AMX	KLV
ORTALAMA:	35.05	4.81	34.7	4.96	35.2	5.05	34.2	4.82
SD	0.99	0.07	0.77	0.13	1.99	0.63	0.08	0.11
RSD	2.82	0.73	2.21	1.28	1.98	0.62	0.22	1.19
SE	0.57	0.04	0.44	0.07	0.81	0.26	0.04	0.07
CL(0.05)	2.26	0.16	1.76	0.29	1.59	0.5	0.17	0.26
ANOVA	0.5344	0.9217	0.5344	0.9217	0.5344	0.9217	0.5344	0.9217
F _{teorik}	3.6823	3.6823	3.6823	3.6823	3.6823	3.6823	3.6823	3.6823
LOD	0.8752	0.6258	0.7713	0.3255	0.6534	0.5674	0.7821	0.475
LOQ	2.0056	1.5095	1.8939	0.995	1.9546	1.2342	2.0772	1.1389

İlaç içeriği (mg) : Tablet başına 875 mg AMX,125 mg KLV

Değerler 25 kez seyreltilmiş konsantrasyon değerlerini gösterir

Sonuçlar her bir metot için 6 kopyanın ortalamasından elde edildi

SE: Standart hata

CL: Güvenirlilik limiti

Aynı zamanda kantitatif çalışmalar için uygun internal standart bulma, kompleks oluşumları ve iyon baskıları gibi bazı kısıtlamalara sahiptir. Gösterilen deneysel sonuçlar doğru, kesin ve hassas olarak doğrulanan metotların kullanılabilirliği, tekrar edilebilirliği ve güvenilirliği için tam kanıt sağlar. Sonuçlardan, HPLC'nin diğer ikisinden daha iyi sonuçlar verdiği açıktır ama genellikle metot geliştirme için masraf ve ekstra zaman tüketimi getirir ve bazen bu bileşikleri birbirinden ayırmak mümkün olmaz. Uygulanan iki metot işlem prosedürlerinin detaylı bilgisini gerektirmez.

Bundan dolayı bu metot diğer daha fazla zaman tüketici kromatografik tekniklerle kıyaslandığında hızlı ve ekonomiktir.

8.5. Sonuçlar

Bu çalışmanın amacı uygulanan spektrofotometrik metotları ESI-MS metotlarıyla karşılaştırmak, ESI-MS metodunun kalibrasyonlar için daha fazla seçicilik verecek şekilde farmakolojik alanda kullanılabilir olduğunu göstermek ve HPLC değerleri ile sonuçlarımızı doğrulamaktır. UV spektrumunda AMX ve KLV kombinasyonları büyük farklılıklar göstermediği ve KLV fazla absorpsiyon yapmadığı halde kantitatif çalışmalar için birinci türev metodunun kullanılabilir olduğu gösterildi. ESI-MS iki aktif bileşik arasında dramatik konsantrasyon farklılığından etkilenmeksizin daha iyi ve çeşitli pikler vermektedir. Bu iki bileşiğin hiçbir n ayırma ve piklere içerik etkisi olmadan hem birinci türev hem de ESI-MS metotları kullanılarak kolayca ölçülebildiği gösterildi. Geliştirilen HPLC metodu aynı zamanda elde edilen sonuçların, dağılım çalışmaları ve tablet analizi için kabul edilebilir aralıklar içinde olduğunu kanıtlamaktadır.

KAYNAKLAR

- [1] KRAMER, R. 1998. Chemometric Techniques for Quantitative Analysis. 51. Marcel Dekker Inc., New York.
- [2] PATRICK, W. C., BEEBE, K. R., and KOWALSKI B. R. 1987. Multicomponent Analysis Using an Array of Piezoelectric Crystal Sensors. Analytical Chemistry 59. 1529
- [3] ADAMS, M.J., 1995. Chemometrics in Analytical Spectroscopy. 187. The Royal Society of Chemistry, Thomas Graham House, Science Park, Cambridge.
- [4] MARTENS, H. and Naes, T. 1991. Multiserial Calibration, Wiley, Chichester, UK.
- [5] HAALAND, D. M., THOMAS, E. V. 1988. Anal. Chem. Partial least-squares methods for spectral analyses. 2. Application to simulated and glass spectral data. 60: 1202-1208.
- [6] COWE I.A., MCNICOL J.W., CUTHBERTSON D.C., 1998. Principal component analysis: a chemometric approach to the analysis of near infrared spectra Analyst, 110, 1233. Analytical Proceedings, 27: 61.
- [7] STROJEK, J. W., YATES, D., and KUWANA, T., 1975. Derivative spectrophotometry. Application to trace sulfur dioxide analysis Anal. Chem. 47:1050.
- [8] GREEN, G. L. and O'HAVER, T. C. 1974. Derivative luminescence spectrometry. Anal. Chem. 46:2191.
- [9] BERZAS NEVADO, J. J., CABANILLAS C. G. and SALINAS, F. 1992. Spectrophotometric resolution of ternary mixtures of salicylaldehyde, 3-hydroxybenzaldehyde and 4- hydroxybenzaldehyde by the derivative ratio spectrum-zero crossing method. Talanta.39: 547-553
- [10] O'HAVER, T.C., GREEN, G.L.1976. Numerical error analysis of derivative spectrometry for the quantitative analysis of mixtures. Anal. Chem. 48:312.
- [11] O'HAVER. T. C., FELL. A. F., SMITH, G., GANS, P., SNEDDON, J., BEZUR, L., MICHEL, R. G., OTTAWAY, J. M., MILLER, J. N.,

- AHMAD, T. A., BRIAN P., 1982. Derivative spectroscopy and its applications in analysis. *Anal. Proc.*, 19:22.
- [12] MORELLI B., 1988. First and second derivative spectrophotometric assay of mixtures of cefuroxime and cephalexin. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 6:199.
- [13] NEEDHAM, S. R., COLE, M. J., and FOU DA, H. G., 1998. Direct plasma injection for high-performance liquid chromatographic–mass spectrometric quantitation of the anxiolytic agent., *Journal of Chromatography: Biomedical Applications*, 718:87-94.
- [14] CHOWDHURY, S. K., LAUDICINA D., BLUMENKRANTZ N., WIRTH M. and ALTON K. B., 1999. An LC/MS/MS method for the quantitation of MTIC (5-(3-*N*-methyltriazen-1-yl)-imidazole-4-carboxamide), a bioconversion product of temozolomide, in rat and dog plasma, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 19: 659-668.
- [15] KESKI-HYNNILÄ, H., RAANAa, K., FORSBERG, M., MÄNNISTÖ, P., TASKINEN, J. and KOSTIAINEN, R., 2001. Quantitation of entacapone glucuronide in rat plasma by on-line coupled restricted access media column and liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 759:227-236.
- [16] DING, L., LI, L., TAO, P., YANG, J., and ZHANG, Z., 2002. Quantitation of tamsulosin in human plasma by liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 767:75-81.
- [17] HAN, X., 2002. Characterization and Direct Quantitation of Ceramide Molecular Species from Lipid Extracts of Biological Samples by Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Analytical Biochemistry*, 302:199-212.
- [18] KOCH, D. E., ISAZA, R., CARPENTER, J. W. and HUNTER, R. P. 2004. Simultaneous extraction and quantitation of fentanyl and norfentanyl from primate plasma with LC/MS detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 34:577-584.
- [19] ERGENÇ, N., GÜR SOY, A., ATEŞ, Ö., İlaçların Tanınması ve Kantitatif Tayini, 4. Baskı, İstanbul Üniversitesi Yayınları, İstanbul, 1989.
- [20] C. CAZAUBON, J. GOUGAT, F. BOUSQUET, et al., *J. Farmak ol. Exp. Ther.* 265 (1993) 826 834.
- [21] TALSKY, G, *Derivative Spectrophotometry*, Germany, 1994.
- [22] SKOOG, A.D., HOLLER, F.J. ve NIEMAN, T.A., *Analitik Kimya Temelleri*, 7. baskı, Bilim yayıncılık, Ankara, 1999.

- [23] GÜNDÜZ , T., İnrümental Analiz, Gazi Kitabevi Ankara 1999, (1225-1273)
- [24] DANIEL C. HARIS, W., H., FREEMAN, Quantitative Chemical Analysis Seventh Edition(Michelson Laboratory, China Lake) (Avail. 6/2006) May 2006,928, (4-7)
- [25] SKOOG, D., A., LEARY, J., J., “Principles of Instrumental Analysis, Forty Edition” Printed in the United States of America© by Saunders College Publishing Orlando 1992, (726-733)

ÖZGEÇMİŞ

1983 yılında Sakarya ili Adapazarı ilçesinde doğan Ayşenur KORKMAZ; ilk, orta ve lise öğrenimini Adapazarı'nda tamamladı. 1999 yılında Abant İzzet Baysal Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi İngilizce Kimya bölümünü kazandı ve 2003 yılında bu bölümden mezun oldu. 2004 Bahar yarıyılında Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim dalında Yüksek Lisans öğrenimine başladı. Halen Düzce ilinde İngilizce Öğretmeni olarak görev yapmaktadır.