

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

**İKİLİ BİR KARIŞIMIN ŞURUP DOZAJ
FORMLARINDA VE İNSAN PLAZMASINDA
KROMATOĞRAFİK OLARAK MİKTAR ANALİZİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimyager Esin İMAMOĞLU

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

OCAK 2011

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İKİLİ BİR KARIŞIMIN ŞURUP DOZAJ
FORMLARINDA VE İNSAN PLAZMASINDA
KROMATOĞRAFİK OLARAK MİKTAR ANALİZİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimyager Esin İMAMOĞLU

Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA BÖLÜMÜ

Enstitü Bilim Dalı : ANALİTİK KİMYA

Bu tez 31 / 01 / 2011 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.

**Yrd. Doç. Dr.
Aysel KÜÇÜK
Jüri Başkanı**



**Prof. Dr.
Mustafa Şahin DÜNDAR
Üye**



**Yrd. Doç. Dr.
Dilek ANGIN
Üye**



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezindeki çalışmaların planlanması, yürütülmesi ve sonuçlandırılmasında yakın ilgi ve desteğini gördüğüm Danışman Hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Aysel KÜÇÜK'e teşekkür eder saygılarımı sunarım.

Bölümümüzdeki araştırma laboratuvarımızda bulunan Shimadzu Marka HPLC'yi çalışmalarımızın bitimine kadar kullanmamıza olanak sağlayan Prof. Dr. Ahmet TUTAR'a ve Doç. Dr. Abdil ÖZDEMİR'e teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuar çalışmaları sırasında, her türlü konuda yardımlarına başvurduğum ve benden yardımlarını esirgemeyen Sakarya Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü öğretim üyeleri ve araştırma görevlilerine de teşekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca, tez konumu oluşturan Gliseril Gayakolat ve Efedrin HCl etken madde standartlarını ve Pedrin ticari ilacını temin etmem konusundaki yardımlarından dolayı Aroma İlaç A.Ş.'ye de teşekkür etmek isterim.

Bu günlere gelmemi sağladıkları için sevgi ve desteklerini hep arkamda hissettiğim sevgili aileme de en içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

| | |
|------------------------------------------------------------|------|
| TEŞEKKÜR..... | ii |
| İÇİNDEKİLER..... | iii |
| SİMGELER KISALTMALAR..... | vi |
| ŞEKİLLER LİSTESİ..... | vii |
| TABLolar LİSTESİ..... | x |
| ÖZET..... | xiii |
| SUMMARY..... | xiv |
| BÖLÜM 1. | |
| GİRİŞ..... | 1 |
| 1.1. Gliseril Gayakolat..... | 3 |
| 1.1.1. Fiziksel ve kimyasal özellikleri..... | 3 |
| 1.1.2. Gliseril gayakolatın farmakolojik özellikleri..... | 4 |
| 1.1.3. Endikasyonları..... | 5 |
| 1.1.4. Kontrendikasyonları..... | 5 |
| 1.1.5. Yan etkileri ve ilaç etkileşimleri..... | 5 |
| 1.2. Efedrin HCl..... | 5 |
| 1.2.1. Fiziksel ve kimyasal özellikleri..... | 5 |
| 1.2.2. Efedrin hidroklorürün farmakolojik özellikleri..... | 6 |
| 1.2.3. Yan etkileri..... | 7 |
| 1.3. Gliseril Gayakolat ve Efedrin HCl..... | 8 |
| 1.3.1. Gliseril gayakolat/efedrin'in yan etkileri..... | 8 |
| 1.4. Literatürde Yapılan Çalışmaların Özeti..... | 9 |

BÖLÜM 2.

| | |
|-----------------------------------------------------------------|----|
| MATERYAL ve YÖNTEM..... | 13 |
| 2.1. Biyoyararlanım ve Biyoeşdeğerlik | 13 |
| 2.2. Validasyon..... | 14 |
| 2.3. Analitik Yöntem Validasyonu..... | 15 |
| 2.3.1. Analitik yöntem validasyonunda kapsam | 16 |
| 2.3.2. Analitik yöntem validasyon aşamaları | 17 |
| 2.3.3. Analitik yöntem validasyon parametreleri | 18 |
| 2.3.3.1. Seçicilik/Spesifiklik..... | 20 |
| 2.3.3.2. Doğruluk ve geri kazanabilirlik..... | 20 |
| 2.3.3.3. Kesinlik..... | 21 |
| 2.3.3.4. Tutarlılık..... | 22 |
| 2.3.3.5. Nitel tayin limiti..... | 22 |
| 2.3.3.6. Nicel tayin limiti..... | 23 |
| 2.3.3.7. Güvenilirlik..... | 23 |
| 2.4. Materyaller..... | 24 |
| 2.4.1. Kullanılan kimyasal maddeler..... | 24 |
| 2.4.2. Kullanılan cihazlar..... | 24 |
| 2.5. Kromatografik Yöntemler..... | 25 |
| 2.5.1. Kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması..... | 25 |
| 2.5.1.1. Partisyon kromatografisi..... | 26 |
| 2.5.1.2. Adsorpsiyon kromatografisi..... | 32 |
| 2.5.1.3. Boyut eleme kromatografisi | 32 |
| 2.5.1.4. İyon-değişim kromatografisi..... | 33 |
| 2.5.1.5. Kağıt ve ince tabaka kromatografisi..... | 34 |
| 2.5.1.6. Kolon kromatografisi..... | 35 |
| 2.5.1.7. Gaz kromatografisi..... | 35 |
| 2.5.1.8. Sıvı kromatografisi..... | 36 |
| 2.5.2. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi..... | 37 |
| 2.5.3. Sıvı kromatografisinin dayandığı temel parametreler..... | 38 |
| 2.5.3.1. Dağılma (Partisyon) katsayısı..... | 38 |
| 2.5.3.2. Alıkonma (Retensiyon) zamanı..... | 39 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.5.3.3. Analitin göç hızı ve kapasite faktörü..... | 40 |
| 2.5.3.4. Seçicilik faktörü ve farklı göç hızları..... | 40 |
| 2.5.3.5. Ayırım gücü (Rezolüsyon, RS)..... | 41 |
| 2.5.3.6. Kolon verimi | 43 |
| 2.5.3.7. Kuyruklanma Faktörü (T) ve Asimetri Faktörü..... | 46 |
| 2.5.4. Kolon performansının optimizasyonu | 46 |
| 2.5.5. Kolon performansına etki eden değişkenler..... | 47 |
| 2.5.6. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) cihazı | 47 |
| 2.5.6.1. Hareketli (Mobil) faz haznesi | 48 |
| 2.5.6.2. Pompalar | 49 |
| 2.5.6.3. Akış kontrolü ve programlama sistemleri..... | 50 |
| 2.5.6.4. Enjektörler..... | 50 |
| 2.5.6.5. Dedektörler..... | 51 |
| 2.5.6.6. Kolonlar..... | 56 |
| 2.5.6.7. Kaydedici..... | 63 |
| 2.5.7. HPLC yönteminin avantajları | 63 |
| 2.5.8. HPLC yönteminin dezavantajları..... | 64 |
| 2.5.9. Yüksek performanslı sıvı kromatografisinin uygulama alanları. | 64 |
| 2.5.9.1. Saflaştırma | 64 |
| 2.5.9.2. Kalitatif analiz | 65 |
| 2.5.9.3. Kantitatif analiz | 65 |
| | |
| BÖLÜM 3. | |
| ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA..... | 66 |
| 3.1. Kromatografik Şartlar..... | 66 |
| 3.2. Standart Çözeltilerin Hazırlanması..... | 66 |
| 3.3. Ticari Çözeltilerin Hazırlanması..... | 67 |
| 3.4. Standart Ekleme Yöntemi Kullanılarak Standart Çözeltilerinin Hazırlanması..... | 67 |
| 3.5. Plazmalı Standart Çözeltilerin Hazırlanması..... | 68 |
| 3.6. Plazma İçeren Ticari Çözeltilerin Hazırlanması..... | 68 |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.7. Plazmada Standart Ekleme Yöntemi Kullanılarak Standart Çözeltilerinin Hazırlanması | 68 |
| 3.8. HPLC Yöntemi ile Elde Edilen Bulgular | 69 |
| 3.8.1. Standart çözeltilerin hazırlanması | 69 |
| 3.8.2. Yöntemin validasyonu | 71 |
| 3.8.2.1. Doğrusallık aralığı ve kalibrasyon eğrileri | 71 |
| 3.8.2.2. Kesinlik ve tekrarlanabilirlik | 72 |
| 3.8.2.3. Geri kazanım | 74 |
| 3.8.2.4. Yöntemin farmasötik preparatlara uygulanması..... | 75 |
| 3.8.2.5. Standart ekleme yöntemi ile elde edilen sonuçlar..... | 76 |
| 3.8.3. Plazma çalışmaları | 77 |
| 3.8.3.1. Plazma standart çözeltilerin hazırlanması | 77 |
| 3.8.4. Plazmada yöntem validasyonu | 79 |
| 3.8.4.1. Doğrusallık aralığı ve kalibrasyon eğrileri | 79 |
| 3.8.4.2. Kesinlik ve tekrarlanabilirlik | 80 |
| 3.8.4.3. Geri kazanım | 82 |
| 3.8.4.4. Yöntemin farmasötik preparatlara uygulanması..... | 83 |
| 3.8.4.5. Standart ekleme yöntemi ile elde edilen sonuçlar..... | 84 |
| | |
| BÖLÜM 4. | |
| SONUÇLAR..... | 88 |
| | |
| KAYNAKLAR | 90 |
| EKLER..... | 94 |
| ÖZGEÇMİŞ..... | 99 |

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

| | |
|----------------|-------------------------------------------|
| % BH | : % Bağıl Hata |
| µg | : Mikrogram |
| A | : Çoklu akış yolları ve Eddy difüzyonu |
| B | : Boyuna difüzyon |
| C | : Konsantrasyon |
| C _u | : Fazlar arasındaki kütle aktarımı |
| DAD | : Diyot Array Dedektör |
| dk | : Dakika |
| fg | : femtogram |
| GMP | : İyi İmalat Uygulamaları |
| H | : Tabaka yüksekliği (cm) |
| HPLC | : Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi |
| ICH | : Uluslararası Harmonizasyon Konferansı |
| k' | : Kapasite faktörü |
| K _A | : Dağılma (partisyon) katsayısı |
| L | : Kolon dolgusunun uzunluğu (cm) |
| L | : Litre |
| LC | : Sıvı Kromatografisi |
| LOD | : Gözlenebilirlik sınırı |
| LOQ | : Alt tayin sınırı |
| mg | : Miligram |
| mL | : Mililitre |
| mM | : Milimolar |
| n | : Deneme sayısı |
| N | : Teorik tabaka sayısı |
| ng | : Nanogram |
| NMR | : Nükleer Manyetik Rezonans |

| | |
|----------------|----------------------------------------------------|
| pg | : Pikogram |
| r | : Korelasyon katsayısı |
| R _s | : Rezolüsyon |
| RSD | : Bağıl Standart Sapma |
| RT | : Alıkonma zamanı |
| SD | : Mutlak standart sapma |
| SH | : Standart Hata |
| SS | : Standart Sapma |
| S _m | : Regresyon doğrusu eğiminin standart sapması |
| S _b | : Regresyon doğrusundaki kaymanın standart sapması |
| u | : Çizgisel hız |
| V | : Ortalama göç hızı |
| W | : Pik taban genişliği |
| α | : Seçicilik katsayısı |

TABLolar LİSTESİ

| | | |
|-------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tablo 2.1. | İlaç analizlerinde yöntemlere göre değişen parametreler..... | 19 |
| Tablo 2.2. | Normal faz ve ters faz sıvı kromatografisinin karşılaştırılması..... | 28 |
| Tablo 2.3. | Zıt faz karşı iyon tipleri ve uygulamaları..... | 30 |
| Tablo 2.4. | Ayrılan madde tipine göre hareketli faz pH secimi..... | 31 |
| Tablo 2.5. | Sıvı Kromatografik Dedektörlerin Performanslarının Karşılaştırılması..... | 52 |
| Tablo 2.6. | İyon değiştirici reçinelerin sınıflandırılması..... | 63 |
| Tablo 3.1. | HPLC-DAD sisteminde Gliseril Gayakolat standart çözeltileri için elde edilmiş istatistiksel analiz sonuçları (212 nm'de) (n=6)..... | 72 |
| Tablo 3.2. | HPLC-DAD sisteminde Efedrin HCl'ün standart çözeltilerinin istatistiksel analiz sonuçları (212nm'de) (n=6)..... | 72 |
| Tablo 3.3. | Gliseril Gayakolat standart çözeltilerinin gün-içi ve günler-arası kesinlik ve tekrarlanabilirlik analiz sonuçları (n=6)..... | 73 |
| Tablo 3.4. | Efedrin HCl standart çözeltilerinin gün-içi ve günler-arası kesinlik ve tekrarlanabilirlik analiz sonuçları (n=6)..... | 73 |
| Tablo 3.5. | Gliseril Gayakolat ve Efedrin HCl için elde edilen geri kazanım değerleri..... | 75 |
| Tablo 3.6. | Farmasötik preparatlarda Gliseril Gayakolat ve Efedrin HCl için elde edilen tekrarlanabilirlik değerleri (n=6)..... | 75 |
| Tablo 3.7. | Farmasötik preparatlarda Gliseril Gayakolat ve Efedrin HCl için elde edilen geri kazanım değerleri (n=6)..... | 76 |
| Tablo 3.8. | Standart ekleme yöntemi ile elde edilen sonuçlar..... | 77 |
| Tablo 3.9. | HPLC-DAD sisteminde plazmalı Gliseril Gayakolat standart çözeltileri için elde edilmiş istatistiksel analiz sonuçları (212 nm'de) (n=6)..... | 80 |
| Tablo 3.10. | HPLC-DAD sisteminde plazmalı Efedrin HCl'ün standart | |

| | | |
|-------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| | çözeltilerinin istatistiksel analiz sonuçları (212nm'de) (n=6)..... | 80 |
| Tablo 3.11. | Plazma içerisindeki Gliseril Gayakolat standart çözeltilerinin gün- içi ve günler-arası kesinlik ve tekrarlanabilirlik analiz sonuçları (n=6)..... | 81 |
| Tablo 3.12. | Plazma içerisindeki Efedrin HCl standart çözeltilerinin gün-içi ve günler-arası kesinlik ve tekrarlanabilirlik analiz sonuçları (n=6).... | 81 |
| Tablo 3.13. | Plazmalı ortamda Gliseril Gayakolat ve Efedrin HCl için elde edilen geri kazanım değerleri..... | 83 |
| Tablo 3.14. | Plazma içerisindeki farmasötik preparatlarda Gliseril Gayakolat ve Efedrin HCl için elde edilen tekrarlanabilirlik değerleri (n=6)... | 84 |
| Tablo 3.15. | Plazma içerisindeki farmasötik preparatlarda Gliseril Gayakolat ve Efedrin HCl için elde edilen geri kazanım değerleri (n=6)..... | 84 |
| Tablo 3.16. | Plazmada standart ekleme yöntemi ile elde edilen sonuçlar..... | 85 |
| Tablo 3.17. | Standartlar içerisinde ve plazma ortamında hazırlanmış ticari preparatlar için (100µg/mL Gliseril Gayakolat ve 15 µg /mL Efedrin HCl) elde edilen t-testi verileri ($\alpha=0,05$, % 95 güvenle) (n=6)..... | 86 |
| Tablo 3.18. | Standartlar içerisinde ve plazma ortamında hazırlanmış ticari preparatlar için (100 µg/mL Gliseril Gayakolat ve 15 µg /mL Efedrin HCl) elde edilen F-testi verileri ($\alpha=0,05$, % 95 güvenle) (n=6)..... | 87 |
| Tablo 3.19. | Standartlar içerisinde ve plazma ortamında hazırlanmış ticari preparatlar için (100 µg/mL Gliseril Gayakolat ve 15 µg /mL Efedrin HCl) elde edilen ANOVA testi verileri ($\alpha=0,05$, % 95 güvenle) (n=12)..... | 87 |

ŞEKİLLER LİSTESİ

| | | |
|-------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 1.1. | Gliseril Gayakolat'ın açık formülü..... | 4 |
| Şekil 1.2. | Gliseril Gayakolat'ın su içerisindeki 100 µg/mL'lik çözeltisinin UV spektrumu..... | 4 |
| Şekil 1.3. | Efedrin Hidroklorür'ün açık formülü..... | 6 |
| Şekil 1.4. | Efedrin HCl'ün su içerisindeki 50 µg/mL'lik çözeltisinin UV spektrumu..... | 6 |
| Şekil 2.1. | Hareketli ve sabit fazlara göre sınıflandırma..... | 26 |
| Şekil 2.2. | Adsorpsiyon kromatografisi dengesi..... | 32 |
| Şekil 2.3. | Tek bileşenli bir karışım için tipik bir kromatogram..... | 39 |
| Şekil 2.4. | Rezolüsyon faktörünün kromatogramlara göre değişimi..... | 42 |
| Şekil 2.5. | Kapasite faktörünün ayırıcılık üzerine etkisi..... | 43 |
| Şekil 2.6. | Teorik tabaka sayısı hesabını gösterir kromatogram..... | 44 |
| Şekil 2.7. | Pik asimetri faktörü ve kuyruklanma faktörü hesabını gösteren kromatogram..... | 46 |
| Şekil 2.8. | HPLC cihazının şematik gösterimi..... | 47 |
| Şekil 2.9. | Anyon ve katyon değiştirici reçinelerde gerçekleşen ayırım mekanizmaları..... | 60 |
| Şekil 2.10. | Reçine tipleri: (a) Mikrogözenekli reçineler, (b) Makrogözenekli reçineler, (c) Pelikular reçineler, (d) Yüzeysel gözenekli reçineleri..... | 61 |
| Şekil 3.1. | 90 µg /mL'lik Gliseril Gayakolat'a ait kromatogram..... | 70 |
| Şekil 3.2. | 20 µg /mL'lik Efedrin HCl'e ait kromatogram..... | 70 |
| Şekil 3.3. | 47,5 µg /mL'lik Efedrin HCl ve 35 µg /mL'lik Gliseril Gayakolat ait kromatogram..... | 70 |
| Şekil 3.4. | HPLC-DAD sisteminde Gliseril Gayakolat'ın standart çözeltilerinin kalibrasyon eğrisi..... | 71 |

| | | |
|-------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 3.5. | HPLC-DAD sisteminde Efedrin HCl'ün standart çözeltilerinin kalibrasyon eğrisi..... | 71 |
| Şekil 3.6. | Plazmalı ortamda 80 µg /mL'lik Gliseril Gayakolat'a ait kromatogram..... | 78 |
| Şekil 3.7. | Plazmalı ortamda 40 µg /mL'lik Efedrin HCl'e ait kromatogram.. | 78 |
| Şekil 3.8. | Plazmalı ortamda 17,5 µg /mL Efedrin HCl ve 75 µg /mL'lik Gliseril Gayakolat'a ait kromatogram..... | 78 |
| Şekil 3.9. | HPLC-DAD sisteminde plazmalı ortamda hazırlanan Gliseril Gayakolat çözeltilerinin kalibrasyon eğrisi..... | 79 |
| Şekil 3.10. | HPLC-DAD sisteminde plazmalı ortamda hazırlanan Efedrin HCl çözeltilerinin kalibrasyon eğrisi..... | 79 |

ÖZET

Anahtar kelimeler: Gliseril Gayakolat, Efedrin HCl, Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi

Bu çalışmada, soğuk algınlığı ilaçlarında yaygın olarak kullanılan Gliseril Gayakolat ve Efedrin HCl etken maddelerinin hem farmasötik preparatlarda hem de insan plazmasında RP-HPLC-DAD (ters faz-yüksek performanslı sıvı kromatografisi-Diyod sıralı dedektörle) tekniğiyle bir tayin yöntemi geliştirilmesi planlanmıştır. Bu amaçla, bu iki etken maddeyi içeren ticari bir ilacın (Pedrin şurup, 100 mg Gliseril Gayakolat ve 15 mg Efedrin HCl/5 mL) in-vitro olarak insan plazmasındaki miktar tayini için basit, hızlı, tekrarlanabilir, hassas ve ekonomik bir DAD (Diyod Array Detector) dedektörlü HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi) yöntemi geliştirilmiştir.

Her iki etken maddeyi aynı anda analiz edebilen bu miktar tayini yönteminin hem farmasötik preparatlarda ve hem de sıvı-sıvı ekstraksiyonuna gerek kalmadan insan plazmasındaki uygunluğu belirlendikten sonra, validasyon işlemi yapılmıştır. Validasyon sırasında özgünlük, seçicilik, doğruluk, geri kazanım, tekrarlanabilirlik gibi parametreler belirlenmiş ve sonuçlar istatistiksel olarak hesaplanmıştır.

SYRUP DOSAGE FORMS OF A BINARY MIXTURE AS THE QUANTITY AND CHROMATOGRAPHIC ANALYSIS OF HUMAN PLASMA

SUMMARY

Key Words: Ephedrine HCl, Guaifenesin, High Performance Liquid Chromatography

In this study, the development of a new quantitative determination method with RP-HPLC-DAD (reverse phase-high performance liquid chromatography-Diyod array detector) technique was planned both in pharmaceutical preparations and human plasma for Ephedrine HCl and Guaifenesin active ingredients widely used in cold medicines. For this purpose, simple, rapid, reproducible, sensitive and economical with a DAD (Diyod Array Detector) detector-HPLC (High Performance Liquid Chromatography) method was developed for the quantitative determination as in-vitro in human plasma of a commercial drug.

At the same time, analytical method validation process was made after development of analysis both in pharmaceutical preparations and in human plasma without the need for liquid-liquid extraction of this quantitative determination method that could be analyzed simultaneously both active substances. During the validation, all the parameters were determined such as selectivity, specificity, accuracy, recovery, repeatability and the results were evaluated statistically.

BÖLÜM 1. GİRİŞ

İlaç, tıpta kullanılan ve biyolojik etkinliği olan (biyoaktif) saf bir kimyasal maddeyi ya da ona eşdeğer olan bitkisel veya hayvansal kaynaklı, standart miktarda aktif madde içeren bir karışımı ifade eder [1]. İlaçlar her ne kadar ızdırapları dindiren, hastalık belirtilerini ortadan kaldıran bir araç ve tedavinin vazgeçilmez bir unsuru olsalar da, organizma için dışarıdan verilen yabancı bir madde olduklarını unutmamak gerekir. Ünlü bilgin Paracelsus (1493-1541)'un dediği gibi: 'Her ilaç zehirdir, hiçbir madde yoktur ki zehir olmasın; ilacı zehirden ayıran dozdur.' Önemli olan bu zehirin ne ölçüde, nasıl bir denetimle ve ne amaçla kullanıldığıdır. İlaç doğru ve yerinde kullanıldığında yararlı olabilmekte, aksi takdirde sağlığa olduğu kadar, sosyal ve ekonomik zararlara da yol açabilmektedir [2].

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

Üst solunum yollarında görülen hastalıkların büyük bir bölümünde olduğu gibi, soğuk algınlığında da hastalık virüsler tarafından oluşur [3]. Soğuk algınlığı hafif kırgınlık, burun akıntısı, hapşırma gibi belirtileri ile kendini gösteren, çok fazla halsizliğe yol açmadığından dolayı yatak istirahati gerektirmeyen bir hastalıktır ve grip ile kesinlikle karıştırılmamalıdır. Grip ise, influenza adı verilen bir virüs tarafından oluşturulan, ani olarak 39°C üzerinde ateş, şiddetli kas ve eklem ağrıları, halsizlik, bitkinlik, titreme, baş ağrısı ve kuru öksürük gibi belirtiler ile başlayan bir enfeksiyon hastalığıdır. Daha sonra hastalık tablosuna boğaz ağrısı, burun akıntısı, hapşırma, gözlerin akması ve kanlanması gibi belirtiler de eklenir ve bazı vakalarda

da karın ağrısı, bulantı, kusma görülebilir. Ateşin 39°C'nin üzerinde olması, şiddetli kas ağrıları ve halsizlik nedeniyle hastalığı ayakta geçirmek olanaksızlaşmakta ve hastaları mutlaka 3-7 gün yatağa mahkum etmektedir. Yaklaşık bir hafta içinde belirtiler kaybolmakta, ancak halsizlik belirtilerin kaybolmasından sonra da devam etmekte, hatta 2 hafta kadar sürebilmektedir [4].

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

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

Öksürük hava yollarının temizlenmesine yönelik refleks bir davranıştır. Çoğunlukla rahatsız bir sesin çıkmasına neden olacak havanın sert ve şiddetli bir şekilde dışarı verilmesiyle sonuçlanır. Hava yollarındaki tıkanıklığa toz, duman, gaz, çeşitli yiyecekler ya da başka bir yabancı cisim sebep olabilir veya bunlar viral enfeksiyona da (hava yollarının iltihabına) yol açabilir ki bu sorunu daha da kötüleştirir. Öksürüğün çok çeşitleri vardır, ama iki kategoride toplanır; produktif (balgamlı öksürük) veya nonproduktif (kuru öksürük). Produktif bir öksürüğü akciğerlerdeki

sıvı sekresyonlarını uyuyarak gevşeten bir ekspektoranla tedavi edebilirsiniz. Nonprodüktif bir öksürük için ise beyindeki öksürük refleksine etkili bir baskılayıcı (supressan) ajan kullanmak gerekebilir. Basitçe öksürme gereksinimine direnmek faydalı olabilir. Çıkartılacak balgam varmış gibi hissetmenize yol açan yanlıgı nonprodüktif öksürüğe, ağrılı nefes borusuna ve ileri rahatsızlığa neden olabilir [3]. Sıkça rastlanılan hastalıklardan biri olan soğuk algınlıgını tedavi etmek maksadıyla günümüze kadar pek çok farklı türde (kapsül, tablet, enjeksiyon, şurup v.b.) ilaç üretilmiştir. Bugün için piyasada bulunan ve kullanılan ticari ilaçlardan bazılarını ve özellikle de öksürük şurubu olan cinslerini sıralamak gerekirse:

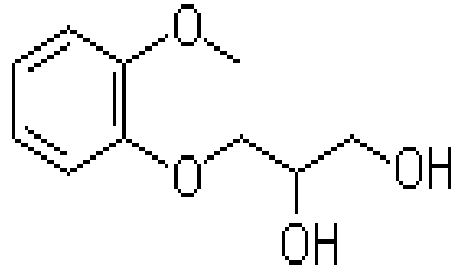
- Brodil şurup
- Pedrin şurup
- Benil Ekspektoran Öksürük Şurubu
- Gayaben Şurup
- Bromeksin Şurup
- Bronkoflu Şurup
- Antipeksin Şurubu sıralayabiliriz [5].

Bunların içinde özellikle soğuk algınlıgında çokça kullanılan etken madde karışımlarından ikisi Gliseril gayakolat ve Efedrin hidroklorür'dür.

1. 1. Gliseril Gayakolat

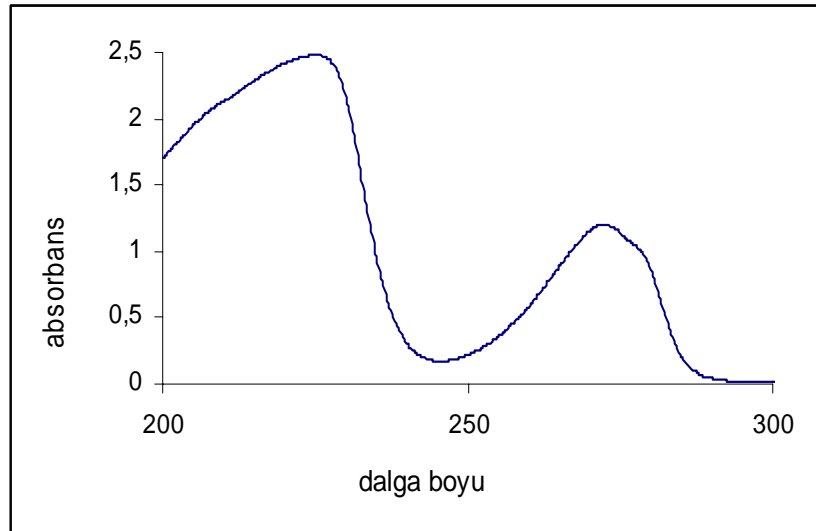
1.1.1. Fiziksel ve kimyasal özellikleri

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



Şekil 1.1. Gliseril Gayakolat'ın açık formülü

Gliseril gayakolat'ın su içerisinde UV spektrumu alındığında, 272 nm'de bir maksimum verdiği görülmektedir (Şekil 1.4.).



Şekil 1.2. Gliseril Gayakolat'ın su içerisindeki 100 µg/mL'lik çözeltisinin UV spektrumu

1.1.2. Gliseril gayakolatın farmakolojik etkisi

Gayakol'un gliserolla yaptığı esterdir. Bronş salgısını, bezler üzerindeki direkt etkisi ile stimüle eder. Ekspektoran olarak erişkinlerde günde 4 kez 200 mg dozunda verilmesi tavsiye edilir. Gliseril gayakolat, solunum yolundaki mukoza salgısını arttırmak suretiyle birikmiş balgamı sulandırıp yapışkanlığını azaltarak dışarıya atılmasını kolaylaştırır. Yüksek dozda bulantı, kusma ve uyuşukluğa neden olabilir ve santral kas gevşetici etkisi de vardır. On iki yaşından küçüklerde kullanılması tavsiye edilmez. Bu ilacı alanlarda idrarda 5-HIAA ve VMA testleri yanlış pozitif sonuç verir. Gayakol da aynı dozda ekspektoran olarak kullanılır. Potasyum

gayasulfonat (tiokol) ekspektoran olarak kullanılırsa da insanlarda yapılan denemeler, belirgin bir etkisinin olmadığını göstermiştir.

1.1.3. Endikasyonları

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

1.1.4. Kontrendikasyonları

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

1.1.5. Yan etkileri ve ilaç etkileşimleri

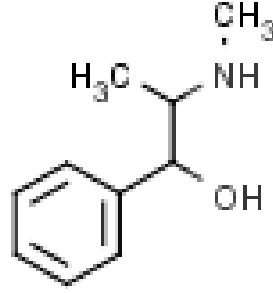
Yüksek dozlarda mide bulantısı, kusma, terleme, taşikardi, idrar zorluğu, yorgunluk hissi ve uykusuzluk yapabilir. Kan basıncında yükselme yapabilir. Ergomtrin, metiergometrin ve oksitosin ile birlikte kullanılması ile hipertansiyon, digitalis glikozitleri ve halotan ile birlikte alındığında kalp ritmi bozuklukları ortaya çıkabilir [2, 8].

1.2. Efedrin HCl

1.2.1. Fiziksel ve kimyasal özellikleri

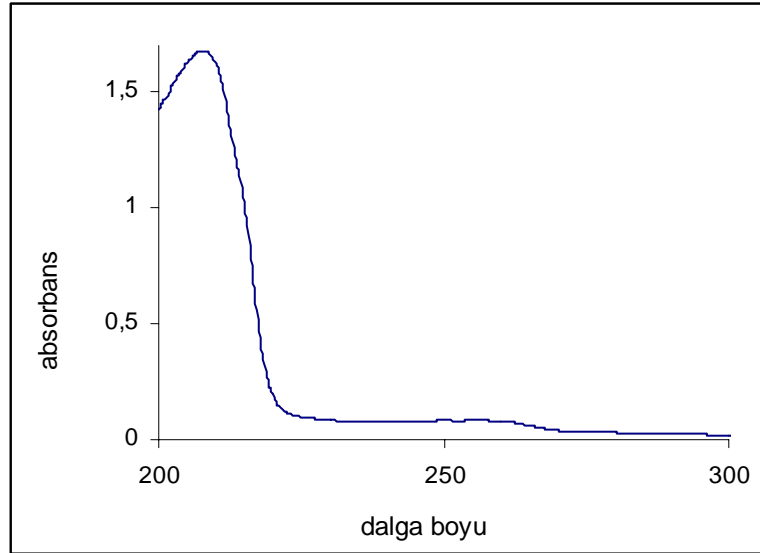
(1S,2S)-2-metillamino-1-fenilpropan-1-ol hidroklorür'ün kimyasal formülü $C_6H_5CH[CH(NHCH_3)CH_3]OH \cdot HCl$, molekül ağırlığı ise 201,70'dir [6]. Efedrin

Hidroklorür'ün ($C_{10}H_{15}NO$) yapısal formülü ise Şekil 1.1.'de gösterilmiştir. Renksiz, kokusuz ya da sadece amin kokusunda, acı lezzetli beyaz billuri bir bileşiktir. Karakteristik reaksiyonlar göstermektedir. Efedrin suda az; etanol, eter ve kloroformda ise çok çözünürken, Efedrin Hidroklorür ise suda kolay çözünür. Efedrin hidroklorür'ün erime noktası $182-186\text{ }^{\circ}C$ 'dir [7].



Şekil 1.3. Efedrin Hidroklorür'ün açık formülü

Efedrin HCl'in su içerisinde UV spektrumu alındığında, 256 nm 'de bir maksimum verdiği görülmektedir (Şekil 1.2.).



Şekil 1.4. Efedrin HCl'ün su içerisindeki $50\text{ }\mu\text{g/mL}$ 'lik çözeltisinin UV spektrumu

1.2.2. Efedrin Hidroklorürün farmakolojik özellikleri

Çin'de en az iki bin yıldan beri halk ilacı olarak kullanılan Ephedra türü bir bitkiden elde edilmiştir. Periferik etkinliğinin niteliği bakımından adrenaline benzer; ancak

gravimetrik etki gücü adrenaline göre düşüktür; fakat etki süresi daha uzundur. İlk olarak 1920'lerde elde edilmiş olan bir alkaloiddir. Bronkodilatörler sınıfına girer. Bronkodilatör ilaçlar, bronş ve bronşiyollerin düz kaslarını gevşetmek suretiyle hava yollarının resistansını düşüren ilaçlardır. Bronkodilatörlerin tümüne yakını feniletülenamin türevidirler. 3,4-dihidroksifeniletülenamin türevleri veya diğer adıyla katekolaminler sadece direkt etki gösterirler.

Efedrin, spinal anesteziye veya epidural anesteziye bağlı hipotansiyonun düzeltilmesi için mL'de 3 mg ilaç içeren seyreltilmiş solüsyonu yavaş i.v. enjeksiyonla 9 mg'a kadar verilir ve gerekirse 3-4 dakikada bir tekrarlanır (maksimum 30 mg). Nazaldekonjestan sprey veya burun damlası şeklinde % 0,5'lik (bebeklerde ve küçük çocuklarda % 0,25'lik) solüsyonu olarak kullanılır. Akut bronşit olgularında kullanılan antitusif formülasyonlara katılabilir. İlaç olarak sülfat veya hidroklorür tuzu kullanılır. Psikomotor stimülan etkisi nedeniyle keyif verici olarak kötüye kullanılabilir.

Efedrin HCl, bronşlardaki beta reseptörlerinin sitimilasyonu sonucu astım, bronşit, amfizem ve bronşektazi gibi hastalıklarda bronş düz adalesini gevşetmek suretiyle gösterdiği bronkodilatör etkiyle hastaların daha rahat nefes almasını sağlar. Ayrıca solunum yolu konjestiyonunu giderir [8].

1.2.3. Yan etkileri

Pseudoephedrin ve Fenilpropanolamin oral yolla verilir ve hem α -1 hem de α -2 adrenoseptör agonist aktiviteleri bulunur. Ephedrin'in ayrıca β adrenoseptörler üzerine etkisi de vardır. Fenilefedrin topikal olarak kullanılır ve α -1 adrenerjik reseptör aktivitesi vardır. Kaşıntı, aksırık veya nazal sekresyon üzerine etkisi yoktur. Fenilefedrin, fenilpropanolamin ve guaifenesin'in kombinasyonu plasebo ile karşılaştırıldığında minimal yan etki ile beraber önemli ölçüde nazal semptomları azalttığı gösterilmiştir. Acrivastine ile beraber psödoefedrinin kombinasyonu mevsimsel allerjik rinitte plaseboya ve yalnız psödoefedrin kullanımına oranla çok daha etkili olduğu gözlenmiştir.

Adrenoseptör agonistlerinin sistemik kullanımı sonucu; yorgunluk hali, ajitasyon, uyku bozuklukları, taşikardi, angina pectoris, hipertansiyon, baş ağrısı ve sık mixion gibi yan etkilerle sonuçlanabilir. Oral adrenoseptör agonistleri koroner kalp hastalığı, tirotoksikozis, glokom ve diabetli hastalarda kullanılmamalıdır [2, 9].

1.3. Gliseril Gayakolat ve Efedrin HCl

Guaifenesin (Gliseril Gayakolat)/Efedrin balgam söktürücü ve bronşları genişletici bir kombinasyondur. Efedrin bronş kaslarını gevşeterek bronşları genişletir. Ayrıca burun koridorlarındaki damarları sıkar ve şişmeyi azaltır. Guaifenesin ise hava yollarındaki mukusu (sümük) gevşetir, yapışkanlığını azaltır ve dışarı daha kolay atılmasını sağlar. Guaifenesin/Efedrin böylece daha rahat nefes almayı sağlar ve öksürükleri daha verimli hale getirir.

Guaifenesin/Efedrin kombinasyonu aşağıdaki durumlar ile ilgili bir ilaçtır:

- Sigara içenlerde ve tozlu yerlerde çalışanlarda görülen öksürük,
- Soğuk algınlığı, grip, boğmaca ve kızamık ile birlikte görülen öksürük,
- Bazı solunum yolu rahatsızlıkları ile birlikte görülen öksürük ve solunum yollarında tıkanma (zatürre, bronşit ve diğer solunum yolu rahatsızlıkları),
- Şiddetli olmayan nefes darlığında görülen nöbetleri önleme.

1.3.1. Gliseril Gayakolat /Efedrin'in yan etkileri

Alerjik reaksiyon belirtileri olan şu sıkıntılardan herhangi bir ya da birkaçına sahipseniz acil sağlık yardımı alınız: ürtiker (kurdeşen); nefes almada zorluk; yüzde, dudaklarda, dil ya da boğazda şişkinlik gibi. Şu şekilde ciddi durumlar da görülebilir ki bunlar; idrar yapma zorluğu, hızlı veya düzensiz kalp atışları, ani hastalık nöbeti (sara gibi), titreme. Daha hafif yan etkiler de görülebilir ki bunlar; bulantı, kusma, karın ağrısı, iştah kaybı, baş ağrısı, sinirlilik, uykusuzluk [5].

1.4. Literatürde Yapılan Çalışmaların Özeti

Adnan Manassra et. al. [11] tarafından sıvı dozaj formlarında bulunan pseudoefedrin HCl, kodein fosfat ve triprolidin HCl üçlü karışımının HPLC UV ile bir arada belirlenmesi için yeni bir yöntem geliştirilmiştir. Sabit faz olarak C₁₈ kolon ve mobil faz olarak metanol:asetat tamponu (pH=6,9) ve asetonitril karışımının (85:5:10, v/v) kullanıldığı bu yöntemde, akış hızı 1,5 mL/dk ve enjeksiyon hacmi 5 µL alınmış ve 254 nm dalga boyunda tüm kromatogramlar alınmıştır. Kısa zamanda, hızlı ve basit bir izokratik elüsyon gerçekleştirilmiştir.

M.R.Louhaichi et. al. [12] tarafından psödoefedrin, feniramin, guaifenesin, prilamin, klorfeniramin ve dekstrometorfan karışımını içeren grip ve soğuk algınlığı ilaçlarının kantitatif tayini için geliştirilen yöntemde HPLC kullanılmıştır. Bu bileşiklerin C₁₈ kolonda ayrılması 13 dk'da gerçekleştirilmiştir. Metanol-dihidrojenfosfat tamponundan (pH=3) (45:55, v/v) oluşan izokratik mobil faz sistemi ile çalışılmış ve 220 nm de, 1 mL/dk akış hızında tüm ölçümler alınmıştır. Kalibrasyon işlemleri için elde edilen kalibrasyon doğruları 0,998'den daha iyi korelasyon katsayıları göstermiştir. Bu bileşiklerin farklı formlardaki grip ve soğuk algınlığı ilaçlarında (şurup, kapsül, tablet ve şase v.b.) rutin analizleri için bu yöntem başarı ile uygulanmıştır.

Habib Bagheri et. al. [13] tarafından idrar numunelerinde efedrin'in HPLC-UV ile belirlenmesi için sıvı-sıvı mikroekstraksiyon yöntemi geliştirilmiştir. Toluen/benzen (50:50, v/v) karışımı içinde ilk ekstraksiyon yapılmış, analit organik fazda asılı kalmış asidik mikrodamlı çözeltisi (pH=2) içine geri ekstrakte edilmiştir. Daha sonra ekstrakt HPLC sistemine direk olarak enjekte edilmiştir. 0,01-50 mg/L aralığındaki kalibrasyon eğrisi için 0,998 regresyon katsayısı elde edilmiştir. LOD ve LOQ sırasıyla 5 ve 10 µg/mL olarak bulunmuştur. Yöntem, 5 mg'lık tek bir oral ilaç dozu tatbikinden sonra idrar numunelerindeki efedrin'in belirlenmesi için uygulanmıştır.

Alaa El-Gindy et. al. [14] guanifenesin, deskstro metofan HBr, sodyum benzoat, fenil efedrin HCl, klor fenilamin maleat, butil parapen (karışım 1) efedrin HCl ve difenhidramin HCl (karışım 2) içeren çoklu karışımlı iki farklı ilacın HPLC ve

spektrofotometrik metotlarla belirlenmesi için yeni bir metot geliştirilmişlerdir. Karışım 1, asetonitril: 10 mM potasyum dihidrojen fosfat (pH=2,7) (40:60, v/v) içeren mobil faz karışımı bir ODS kolonu kullanılarak 214 nm'de UV detection ile belirlenmiştir. Karışım 2 ise siyanopropil kolon kullanılarak asetonitril: 12 mM amonyum asetat (pH=5) (40:60, v/v) içeren mobil faz karışımı ile HPLC'de analiz edilmiştir. Sonuçlar, MATLAB 5 kullanılarak PLS-1, PCR kemometrik metotları ile analiz edilmiştir. Ayrıca çift ışınlı UV-visible spektrofotometrede 2 nm'lik spektral bant genişliği ile 280 nm/dk tarama hızında spektrumlar alınmıştır.

Mehdi Ansari et. al. [15] tarafından teofilin ve guaifenesin içeren bir şurup için HPLC, türev spektrofotometrik ve türev ratio spektrofotometrik metotlar geliştirilmiştir. C₁₈ bir kolonda izokratik ters-faz sıvı kromatografisi ile metanol:su (40:60, v/v) (pH=3,0) mobil fazı içerisinde bütün ayırımılar gerçekleştirilmiştir. Kafein internal standartı kullanılarak, 280 nm'de bütün maddeler belirlenmiştir. Kalibrasyon çalışmaları için 6,9-20,1 µg/mL aralığında teofilin ve 3,7-11,1 µg/mL aralığında guaifenesinin kalibrasyon doğruları oluşturulmuştur. En az % 99,5 oranında geri kazanım değerleri elde edilmiştir. Spektroskopik çalışmalar için de bütün ölçümler 2. Türev spektrofotometrisi ile ve 1. ve 2. türev ratio spektrofotometresi ile alınmıştır.

Martha L. Gay. et. al. [16] efedrin alkaloidleri ve sinefedrinin belirlenmesi için sıvı kromatografisi-tandem mass spektrometresi metodunu kullanmışlardır. Sinefedrin ve efedrin alkaloidleri ürünlerden ekstrakte edilerek ölçülmüştür. Sinefedrin, efedrin ve psödoefedrin belirlenerek mukayese edilmiştir. % 2 asetik asit 4 mM amonyum asetat ve % 3 asetonitril den oluşan mobil faz sıvı kromatografi sistemine verilmiştir.

Xiaoyan Chen, et. al. [17] tarafından insan plazmasında parasetamol ve guaifenesinin bir arada belirlenmesi için hassas bir LC-TMS metodu geliştirilmiştir. Dietileter-diklorometan (3:2, v/v) karışımı ile plazma numuneleri ekstrakte edilmiş ve internal standart olarak ozalmid kullanılarak, C₁₈ kolonda numuneler analiz edilmiştir. 0,05-20 µg/mL parasetamol için ve 5-2000 ng/mL ise guaifenesin olarak konsantrasyon aralığı için seçilmiştir. Metot başarılı olarak çoklu karışım bir oral tablette uygulandıktan sonra farmakokinetik bir çalışma gerçekleştirilmiştir.

Darryl J . Hood. et. al. [18] tarafından kodein fosfat, efedrin HCl ve klorfenilamin maleat içeren bir soğuk algınlığı şurubu formülasyonu için hızlı bir LC kromatografik metot geliştirilmiştir. Zorbaks XDB C₈ kolon kullanılarak, metanol-glasiyal asetik asit- trietilamin (980:15:6, v/v) ve su-glasiyal asetik asit- trietilamin (980:15:6, v/v) içeren iki ayrı mobil faz sisteminde gradiyent elüsyon ile ayırım gerçekleştirilmiştir. UV absorbas dedektörü ile 254 nm' de bütün ölçümler alınmıştır. Daha sonra metot valide edilmiştir.

Zühre Şentürk. et. al. [19] tabletlerdeki teofilin ve efedrin HCl miktarlarını ratio-spekto spektrofotometresi ve LC kromatografisi ile analiz etmişlerdir. Bu ikili karışımın absorpsiyon spektrumları sırasıyla 231,8 ve 250,3 nm'de alınmıştır. Türev spektrofotometresi çalışmaları için 1. türev metodu kullanılmıştır. Bir ters-faz kolonunda metanol:su (40:60, v/v) (pH=3) mobil faz karışımı kullanılarak 217 nm'de sıvı kromatografi çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Teofilin için 5-150 µg/mL efedrin için ise 15-75 µg/mL konsantrasyon aralıklarında lineerlik çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Nevin Erk, [20] efedrin HCl ve teofilinin farmasötik formüllerde diferansiyel türev spektroskopisi ile belirlenmesini gerçekleştirmiştir. Türev spektrofotometresi metodu bu ikili karışım için sıfır çaprazlama ölçüm tekniği ile yapılmıştır. 1. türev değerleri sırasıyla 262,4 nm ve 256,3 nm'de ölçülmüştür. Bu çalışma, ikili karışımın çözücü ekstraksiyonsuz belirlenmesini sağlamıştır.

Dragana Boberic'-Borojevic et. al. [21] tarafından efedrin HCl, teofilin, papaverin HCl ve hidrokzin HCl tabletlerindeki çoklu karışım RP-LC'de analiz edilmiştir. Nukleosil C₁₈ kolonda gradiyent elüsyon ile 220 nm ve 240 nm'de ayırımlar gerçekleştirilmiştir. Asetonitril-su (5:95, v/v) (pH=2,40) mobil faz karışımı kullanılarak 1,5 mL/dk akış hızında tüm ölçümler alınmıştır.

Nobuyuki Okamura, et. al. [22] tarafından efedrin, psödoefedrin, norefedrin ve metilefedrin karışımını içeren kampo ilaçlarının HPLC ile analizi yapılmıştır. Analizler, Wakosil C₁₈ kolonda su, asetonitril ve sodyum dodesil sülfat (65:34:0,4)

mobil faz karışımı ile izokratik elüsyon yapılarak, 1 mL/dk akış hızında ve 210 nm'de UV belirlemesi ile 25 dk'da gerçekleştirilmiştir.

Feyyaz Onur ve Nevin Acar, efedrin HCl'ün farmasötik preparatlarda dördüncü türev UV spektrofotometresi ile miktar tayinini gerçekleştirmişlerdir. Numuneler 0,1 N HCl içerisinde çözülmüştür. 200-280 nm arasında bütün spektrumlar alınmıştır [23].

Bu çalışma ile literatürde mevcut bulunan çalışmalardan farklı olarak, Gliseril Gayakolat (Guaifenesin) ve Efedrin HCl'ün ikisinin bir arada miktar tayini gerçekleştirilmiştir. Bu maksatla, Gliseril Gayakolat ve Efedrin Hidroklorür içeren ticari bir ilacın (Pedrin şurup, 100 mg Gliseril Gayakolat/5mL ve 15 mg/5mL Efedrin Hidroklorür), metanol çözücü ortamında stok çözeltileri hazırlanarak, bu stok çözeltilerden bir seri standartlar hazırlanmış ve kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur. Farmasötik preparatlarda (şurup dozaj şekillerinde) ve aynı zamanda insan plazması numunelerinde, in-vitro olarak (canlı dışında) numuneler üzerlerine spike edilerek (şırınga ile üzerine katarak) yapılan bu yeni miktar analizi çalışması ile basit, ekonomik, hızlı, kesin, spesifik, tekrarlanabilir ve hassas bir DAD dedektörlü ters faz-HPLC (Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi) metodu geliştirilmiştir. Daha sonra, geliştirilen bu yöntemin plazma düzeylerinin istatistiksel olarak karşılaştırılarak değerlendirmesi için de, biyoanalitik yöntem validasyonu yapılmıştır. Geliştirilen metot, Efedrin HCl ve Gliseril Gayakolat'ın ikisinin bir arada bulunarak, aynı anda analizinin RP-HPLC-DAD metodu ile gerçekleştirildiği literatürdeki ilk çalışmadır. Ayrıca literatürde bugüne kadar, sadece bu iki etken maddenin bir arada HPLC ile analiz edildiğine ve plazma ortamında sıvı-sıvı ekstraksiyonsuz bir miktar analizi çalışması yapıldığına rastlanılmamıştır.

BÖLÜM 2. MATERYAL ve YÖNTEM

2.1. Biyoyararlanım ve Biyoedeğerlik

Biyoyararlanım, sistematik etki yapması açısından bir ilaçtan vücudun ne kadar yararlandığının somut bir ölçüsüdür [8]. Aynı zamanda, biyoyararlanım bir ilacın uygulanan dozaj şeklinden, genel dolaşıma geçiş hız ve derecesi olarak da ifade edilebilir.. Biyoyararlanım standartlarının ve testlerinin temel amacı, önerilen ilacı alan bir hastanın, gerçekten önerilen ilacı, önerilen dozda ve önerilen sınırlar içerisinde aldığından emin olmaktır [24].

Biyoedeğerlik ise aynı etken maddeyi veya maddeleri içeren iki farklı müstahzarın, bu madde veya maddelerin aynı miktarını, aynı türden farmasötik şekil içinde veya karşılaştırılabilir standartlara uyan farmasötik şekil türleri içinde içermeleri koşuluna bağlıdır [25]. Biyoedeğer ilaç, aynı deneysel koşullarda, tek doz veya çok doz olarak, aynı molar dozda uygulandığında, biyoyararlanımları (absorbsiyon hız ve derecesi) arasında anlamlı bir fark olmayan farmasötik eşdeğer ve farmasötik alternatif dozaj şekilleridir. Absorbsiyon dereceleri aynı veya kıyaslanabilir olmasına karşın absorpsiyon hızları farklı olan ilaçlarda, absorpsiyon hızlarındaki farklar terapötik yönden maksatlı yapılmış ve önemli değil ise, etiketinde de bu konuda açıklama bulunması koşulu ile terapötik olarak eşdeğer kabul edilebilirler [24].

Amerika ve Avrupa'nın hemen her ülkesinde, gerek yeni buluşların ve gerekse bunların jeneriklerinin biyoyararlılık ve biyoedeğerlik bakımından kontrol edilmesi gerekliliğini kabul edilmiştir. Bu doğaldır, çünkü yeni buluşların tedavi edici müdahaleleri ve dozajları, bu ilaçların biyoyararlılıkları üzerine inşa edilmekte ve jenerik ilaçların aynı tedavi edici etkiyi göstermeleri beklenmekte ve aranmaktadır.

Biyoeşdeğerlik bilindiği gibi tedavinin orjinal ilaçtaki gibi olmasını belirlemek için uygulanır. Burada iki unsur vardır: Birincisi jenerik ilaç piyasaya verildiğinde, orjinal ilaçla biyoeşdeğer olmalıdır. İkincisi ise jenerik ilaç ömrü bitinceye kadar, yani son kullanma tarihine kadar orjinal ilaçla biyoeşdeğerliğini devam ettirmelidir. Bunun tespiti için geniş bir literatür taraması yapılmalı, klinik bulgular toplanmalı, teknik geliştirme yapılmalı, üretim, kalite kontrol v.b. gibi orjinal firmanın veya referans etken maddelerin veya kullanılacak etken maddenin karşılaştırması yapılmalı ve bu maksatla fiziksel, kimyasal ve biyolojik denemeler yapılmalıdır [25].

2.2. Validasyon

Validasyon, ürün kalitesine etki edebilecek tüm imkân ve işlemlerin önceden belirlenmiş spesifikasyonları sağlayacak şekilde işlendiğini garanti altına almak amacıyla yürütülen çalışmalardır [26].

Validasyon;

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

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

İlaç endüstrisinde uygulanan validasyon çeşitleri:

- Temizlik yöntemleri validasyonu
- Analitik yöntem validasyonu
- Makine / Cihaz validasyonu
- Proses validasyonu

Temizlik işleri validasyonu; imalat alanında bulunan tüm imalatla ilgili cihazların temizlenmesinde uygulanacak olan validasyon işlemleridir.

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

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

İlaç proses validasyonu; spesifik olarak bir ürünün araştırma kademesinden son ürün haline gelene kadar geçen sürede yapılan validasyondur [27].

2.3. Analitik Yöntem Validasyonu

Analitik yöntem validasyonu tasarlanmış analitik yöntemin kabul edilebilirliğini kanıtlamak ve aynı zamanda analitik prosedürün kantitatif ve kalitatif olarak doğru sonuçlar verdiğini belirleyen sonuçlar elde etmektir. Kısacası, analiz yönteminde kullanılacak olan tüm parametreleri ve yapılacak tüm işlemleri tanımlar [26].

Yöntem validasyonu hazırlanırken dikkat edilmesi gereken hususlar şunlardır.;

- a. Yöntem validasyonu, rutin çalışmalarda kullanılan örnek, reaktif veya standartların laboratuardaki deneyimlerini göstermeli,
- b. Kullanılan reaktifler ve standartlar, bileşenin saflığı ve doğruluğu için kontrol edilmeli,
- c. Bir validasyon planı hazırlanmalı ve adım adım hangi aşamaların yapılacağı belirtilmeli,

- d. Özel bir yöntemin validasyonu; örnekler ya da bilinmeyen örnek ile aynı özellik gösteren standartlarla laboratuvar deneylerinde çalışılmalı, hazırlık ve yürütme ve validasyon protokolü izlenmeli,
- e. Bir yöntemin validasyonu, analizin gerektirdiği koşullardan ayrılmamalı ve sapmamalı ve ayrıca yeni bir analitik yöntemin validasyonu ve geliştirilmesi bu süreç içinde tekrarlanabilir olabilmeli,
- f. Her validasyon çalışması sırasında yöntem anahtar parametreleri belirlenmeli ve sonra gelen bütün validasyon adımlarında bu parametreler kullanılmalı, her defasında tekrarlanan çalışmaları minimuma indirgemeli ve yöntem koşulları sağlandıktan sonra bir sonraki çalışmalara geçilmeli,
- g. Yukarıdaki tüm koşullarla birlikte validasyon kriterlerinin belirlenmesinin gerekliliği de ortaya çıkmıştır.

Bu kriterler ise;

1. Etken madde (ler),
2. Matriks (katı maddeleri),
3. Yöntemin kalitatif veya kantitatif olması,
4. Tanıma ve miktar limitleri,
5. Çalışma aralığı,
6. Kesinlik ve tekrarlanabilirlik özellikleri,
7. Cihaz tipi ve konumudur.

2.3.1. Analitik yöntem validasyonunda kapsam

Analitik Yöntem Validasyonu, yöntemin belirlenen amaç için uygun olduğunu ve yöntemin kapsamını göstermelidir. Aynı zamanda yöntemin performans özelliklerindeki içermelidir. Yöntemin kabul edilebilir limitlerini içeren bir planda izlemelidir. Farklı tiplerde donanım ve yöntemin yürütüleceği yerin farklı koşullarda olduğunu da belirtmelidir.

Farmakopede kayıtlı olan validasyon yöntemleri 3 grupta toplanır:

1. Etken madde analiz yöntemi; hammadde veya bitmiş ürün içindeki koruyucu maddeler dâhil aktif maddenin tayininde kullanılan yöntemlerdir.
2. Safsızlık yöntemi; hammaddedeki safsızlıkları veya bitmiş ürünlerdeki parçalanma ürünlerini tayin etmeye yarayan yöntemlerdir.
3. Bitmiş ürün analiz yöntemi; performans özelliklerini tayin için kullanılan yöntemlerdir.

Yöntemin performans özellikleri, tasarlanmış yöntemin kullanımına göre olmalıdır. Örneğin; yöntem kalitatif ise cihazın tüm dinamik alanını kapsayan yöntemin doğrusallığının kontrolüne ve validasyonuna gerek olmadığı görülmüştür. Eğer validasyon verileri uygun gözüküyorsa, ya yöntemin kendisi, ya donanımı, ya analiz tekniği ya da kabul edilebilir limitleri değiştirilmelidir. Sonuçta yöntem gelişimi ve validasyonu tekrarlanabilen bir süreçtir. Örneğin; yöntem kantitatif ise ölçümlerde iki pik arasındaki ayırma gücü 2,5 (rezolüsyon) yada daha fazla olmalıdır. Eğer daha az ise sıvı kromatografisindeki mobil faz bileşimleri için daha fazla optimizasyona gerek duyulur. Validasyonda tatmin edici sonuçlar, iyi performans sağlayan cihazlarla sağlanabilir. Bir aleti yöntemin validasyonunda kullanılmadan önce, aletin performansı, genel özellikleri belli olan standartlar kullanılarak doğrulanmalıdır. Yönteme ait kritik özellikler için özel bakım ve ilgi gösterilmelidir. Validasyon parametrelerinde kullanılan materyal, belirteç ve referanslar, düzen ve temizliği için sürekli olarak kontrol edilmelidir.

2.3.2. Analitik yöntem validasyon aşamaları

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

1. İlk olarak bir validasyon protokolü seçilir.
2. Uygulama ve amaç belirlenir, yöntemin kapsamı ve onun validasyon kriterleri belirlenir. Bu validasyon kriterleri önceden dikkat edilmesi gereken noktalar

bölümünde belirtilen bileşenler, matrisler, analizin kalitatif yada kantitatif oluşu, tanıma ve miktar limitleri, çalışma aralığı, kesinlik ve doğruluk, donanım tipi ve analiz ortamıdır.

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

2.3.3. Analitik yöntem validasyon parametreleri

Validasyon deneylerinin sırası hakkında resmi bir yönerge yoktur ve en uygun sıra yöntemin kendi özelliğine bağlıdır. Yöntem validasyonu için parametreler, farklı kuruluşlarda, uluslararası komitelerde ve literatürlerde çeşitli şekillerde tanımlanmıştır. Maalesef bazı tanımlar farklı organizasyonlar arasında farklı şekildedir. Farmasötik uygulamalar için International Conference on Harmonization gibi bazı organizasyonlar tarafından belirlenen aşağıda sırasıyla verilen parametreler izlenmelidir [28]:

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

9. Güvenilirlik

İlaç analizlerinde genel olarak 3 yöntem kullanılır:

1. Hammadde veya bitmiş ürün içindeki koruyucular dâhil aktif maddenin tayininde kullanılan yöntemler,
2. Hammadedeki safsızlıkları veya bitmiş ürünlerdeki parçalanma ürünlerini tayin etmeye yarayan yöntemler,
3. Ürünün performans özelliklerinin tayini için kullanılan yöntemler.

Bu 3 yöntemin amacına göre valide edilecek parametreler de farklılık göstermektedir. Tablo 2.1.'de bu yöntemlere göre değişen parametreler gösterilmektedir.

Tablo 2.1. İlaç analizlerinde yöntemlere göre değişen parametreler

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

(*) Spesifik testlere bağlı olarak gerekirse yapılır.

2.3.3.1. Seçicilik/Spesifiklik

Spesifiklik, genellikle tek bir analit için üretilen yönteme karşılıktır. Seçicilik ise birbirinden ayırt edilen ya da edilemeyen kimyasal içerikler için kullanılmıştır. Kısacası; katkı maddeleri, değişik interferanslar varlığında analitin doğru olarak ölçebilen seçiciliğini tanımlar. Sıvı kromatografisinde seçicilik optimum ayırma ve kolon koşullarının seçimiyle elde edilmiştir. Seçiciliğin üstünlüğü, kullanılan analiz yönteminde sadece o etken maddeye özgü ve spesifik olduğunu ifade etmelidir. Bizim yöntemimiz sadece etken maddeyi ölçebilmeli ve diğerleri ile reaksiyon vermemelidir. Burada amaç, ilacın içindeki yardımcı maddeler ile etken maddenin ve bilinen bozunma ürünleri veya safsızlıkların birbirinden ayrı bir şekilde tanımlanabilir olmasıdır. Bunun için özellikle LC'de (Sıvı Kromatografisi) uygun kolon ve kromatografi koşulları (mobil faz bileşimi, kolon sıcaklığı ve dedektör dalga boyu gibi) seçilmelidir [29].

2.3.3.2. Doğruluk ve geri kazanabilirlik

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

1. Referans yöntemi ile numune yönteminin karşılaştırılması bir yoldur. Bu yaklaşımda, referans yönteminin belirsizliği bilinmektedir.
2. Doğruluk, konsantrasyonları bilinen bir numunenin analizi yolu ile de tayin edilebilir. Örneğin; bir sertifikalı numune ve ölçülmüş doğru değer kıyaslanır. % geri kazanım, bulunan sonuçların gerçek değere yakınlığının ölçülmesidir. Elimizde sertifikalı örnek bulunmuyorsa, boş numune matriksine konsantrasyonu bilinen hacimde ve ağırlıkta analit eklenir. Sonra matriksten, analitin ekstraksiyonu sonucu elde edilen analitin standart çözeltilere göre geri kazanımları hesaplanır. Bu sayede plaseboya ilave edilen etken maddenin tam olarak geri kazanıp kazanılmadığı anlaşılır. Elde edilen geri kazanım değerleri % 100 ± 3 limitleri içinde olmalıdır. Ama analit konsantrasyonu çok düşük olduğu zaman bu sınır genişler. Beklenen geri kazanım, numune matriksine, işleme

konulan örneğe ve analit konsantrasyonuna bağlıdır. Bu doğruluk değerlendirilmesi numune preparatın etkinliğini ölçmektedir [27].

2.3.3.3. Kesinlik

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

1. Tekrarlanabilirlik
2. Laboratuvar içi tekrarlanabilirlik
3. Laboratuvarlar arası tekrarlanabilirlik

Tekrarlanabilirlik : Bir analistin laboratuvarında bir cihaz ile kısa zamanda analizi gerçekleştirdiğinde elde edilen sonuç tutarlılığıdır. En azından 5 yada 6 saptama, 3 farklı matriks, 2 yada 3 farklı konsantrasyon ile analiz gerçekleştirilmeli ve % RSD hesaplanmalıdır. Kesinlik için kabul edilebilir kriter, yapılan bir çok tip analizin türüne bağlıdır. Farmasötik analizlerde kalite kontrolde % 2 RSD kolayca başarılır. Oysa biyolojik numunelerde duyarlılık konsantrasyon limitlerinde yaklaşık % 15 ve diğer konsantrasyon düzeylerinde % 10'dur. Çevresel ve gıda numunelerinde kesinlik matrikse, analit konsantrasyonuna ve analiz tekniklerine bağlıdır. RSD % 2-20 arasında değişmektedir.

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

içi tekrarlanabilirlik validasyonunun amacı; analiz sona erdiğinde aynı laboratuarda, yöntemin aynı sonuçları doğrulamış olmasıdır.

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

- Oda içindeki sıcaklık ve nem farklılıkları,
- Farklı tecrübe ve farklı gayretteki analistler,
- Farklı özellikteki donanım (Örneğin; HPLC'deki alıkonma hacmi)
- Malzeme ve aletlerdeki koşulların varyasyonları, (Örneğin; HPLC'deki mobil faz karışımı, pH, akış oranı v.b. gibi)
- Farklı şirketlerin kolonları
- Çözücüler, belirteçler ve farklı kalitedeki aletler olarak belirlenmiştir [29].

2.3.3.4. Tutarlılık

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

2.3.3.5. Nitel tayin limiti

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

2.3.3.6. Nicel tayin limiti

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

2.3.3.7. Güvenilirlik

Güvenirlilik testleri, yöntemde ufak değişiklikler yapıldığı zaman sonuçların yine de uygun olduğunu göstermek için yapılmıştır. Örneğin; sıvı kromatografisinde akış hızı, dedektör dalga boyu veya mobil faz bileşiminin gerçek değerinden toleranslar ölçüsünde sapması sonucu analizlerin bu sapmalardan ne kadar etkilenip etkilenmediği tespit edilmiştir. Kromatografik parametrelerde güvenilirlik belirlenmesi için akış hızı, kolon sıcaklığı, enjeksiyon hacmi, dedektör dalga boyu ya da mobil faz bileşimi yani çalışma aralığının içindeki değişken veya değişkenlerin kantitatif etkisi belirlenmiştir. Eğer parametrenin etkisi önceden belirlenmiş tolerans içinde ise, bu parametrenin yöntemin güvenilirlik aralığında olduğu saptanmıştır. Bu etkilerle karşılaşıldığı zaman yöntemin yeniden validasyonunun gerekliliğinin olup olmadığı belirlenmiştir. ICH dökümanlarına (Uluslararası Harmonizasyon Konferansı) göre ilaç geliştirme aşamaları sırasında yöntem üzerinde güvenilirlik değerlendirilmesinin düşünülmesi tavsiye edilmiştir [30].

2.4. Materyaller

2.4.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Tüm testleri yapılmış (saflık, erime noktası, çözünürlük v.s.) sertifikalı saf Gliseril Gayakolat ve Efedrin HCl standartları ve Gliseril Gayakolat (100 mg/5 mL) ve Efedrin HCl (15 mg/5 mL) ikili etken madde karışımını içeren ticari Pedrin şurup Türkiye'deki Aroma İlaç A.Ş.'den temin edilmiştir.

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

2.4.2. Kullanılan cihazlar

HPLC çalışmaları için bir Samsung Computer'e, FCM güç kaynağına bağlı, SIL-20A HT Prominence Auto Sampler, SPD-M20A Prominence DAD dedektör, LC-20 AD Prominence Liquid Chromatography, DGU-20 A5 Prominence degazer, CTO-10AS VP Kolon fırınından ve LC Solution programından oluşan SHIMADZU marka HPLC sistemi kullanılmıştır.

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

2.5. Kromatografik Yöntemler

Kromatografi, kimyasal bileşenlerin ayrılması, tanınması ve tayini için yaygın olarak kullanılan analitik bir yöntemdir. Bütün kromatografik yöntemlerde ortak olarak bir sabit faz ve bir de hareketli faz vardır. Akış halinde gaz veya sıvı bir fazla birlikte karışımdaki bileşenler, sabit faz üzerinden geçirilir ve bileşenlerin göç hızlarına bağlı olarak ayırma gerçekleşir [31].

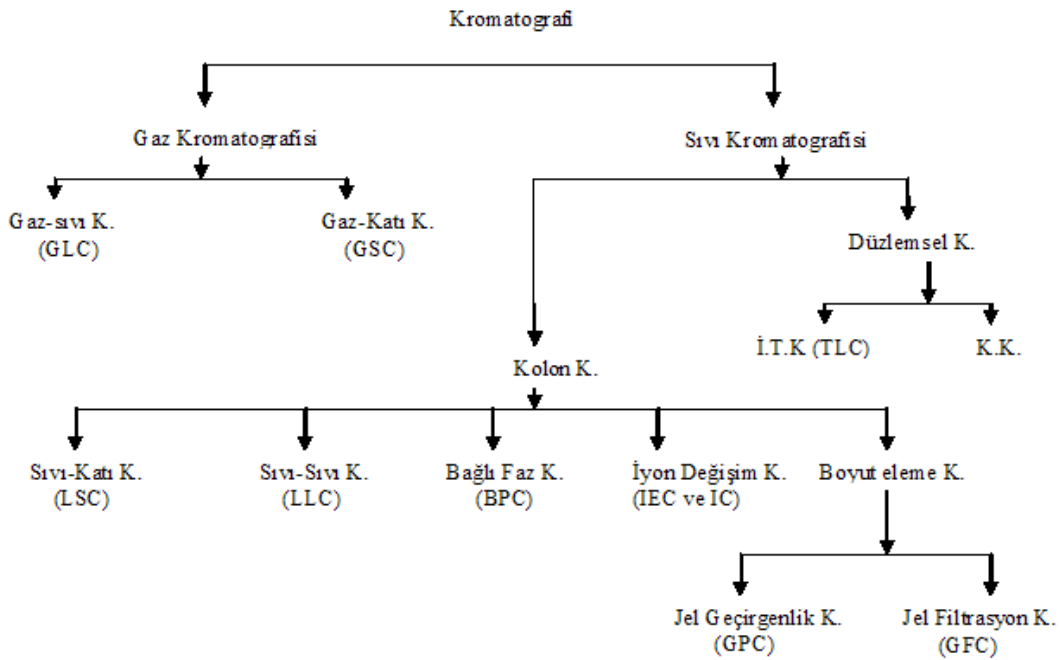
1892'de Reed tarafından ortaya atılmış olan ilk teoride, kolon yardımı ile bir karışımın ayrılabilmesi söylenmiştir. 1906 yılında ise, Tswett adlı araştırmacı kolon kromatografisini kullanarak klorofil pigmentlerine ayırmıştır. Adsorban olarak CaCO_3 'ün kullanıldığı bu ayırım ile ilk kez katı-sıvı kromatografisi kullanılmıştır. 1938'de Türk asıllı Rus araştırmacı olan Izmailov ince tabaka kromatografisini keşfetmiş ve bu yöntem 1950 yılında Stahl tarafından pratikte kullanılış şekli olarak tanıtılmıştır. 1941'de Martin-Syngé kolon dağılma kromatografisi esaslarından bahsetmiş ve böylelikle sıvı-sıvı kromatografisi ortaya çıkmıştır. 1952'de Martin-James gaz-sıvı kromatografisini geliştirmiş ve diğer yöntemlerden farklı olarak hareketli fazda gaz kullanmış ve bu çalışma Nobel ödülüne layık görülmüştür. 1967 yılında Huber ve Hulsman adlı araştırmacılar, kolon teknolojisini geliştirerek yüksek performanslı pompa sistemleri ve duyarlı dedektörlerin kullanılması ile yüksek performanslı sıvı kromatografisinin temellerini ortaya atmışlardır [32].

2.5.1. Kromatografik yöntemlerinin sınıflandırılması

Kolon kromatografisinde sabit faz, dar bir kolona doldurulur ve hareketli faz basınç yardımıyla bu sabit faz içerisinden geçmeye zorlanır. Düzlemsel kromatografide ise, sabit faz düz bir plaka üzerine tutturulur ve hareketli faz sabit fazın üzerinden kapiler ve yer çekimi etkisi yardımıyla hareket eder. Bunun dışında kromatografik yöntemler ayırma işlemlerinin farklılığına göre çok daha değişik şekillerde sınıflandırılabilir:

1. Teorik Sınıflandırma
 - a) Partisyon Kromatografisi
 - b) Adsorpsiyon Kromatografisi

- c) Boyut Eleme Kromatografisi
 - d) İyon Değişim Kromatografisi
2. Pratik Sınıflandırma
- a) Kâğıt Kromatografisi
 - b) İnce Tabaka Kromatografisi
 - c) Kolon Kromatografisi
 - d) Gaz Kromatografisi
 - e) Sıvı Kromatografisi



Şekil 2.1. Hareketli ve sabit fazlara göre sınıflandırma

2.5.1.1. Partisyon (dağılma) kromatografisi

Dağılma kromatografisi, eylemsiz (inert) bir destek malzemesine tutturulmuş veya destek katıya kimyasal olarak bağlanmış sıvı bir sabit faz ile sıvı hareketli faz arasında maddelerin dağılması esasına dayanır. Ayrılacak maddeler sabit ve hareketli faz arasında dağılma katsayılarına göre dağılırlar. Bu dağılma sonucunda farklı hızlarda göçerler ve ayırma gerçekleşir. Çözünen madde kolonda sadece hareketli fazla taşındığından, ortalama göç hızı, çözünen maddelerin hareketli fazda geçirdiği zamanın sabit fazda geçirdiği zamana oranına bağlıdır. Sabit faz tarafından kuvvetli

tutulan türler için bu oran küçük, hareketli fazda tutulma büyük ise aynı oran büyüktür [33].

Bu teknik sıvı-sıvı ve sıvı-bağlı faz kromatografi olmak üzere iki alt sınıfa ayrılabilir. İki teknik arasındaki fark, katı parçacıklar yüzeyine sabit fazın tutturulmasındaki metot farkından kaynaklanır. Sıvı-sıvı tekniğinde, sabit faz katı yüzeyine fiziksel adsorpsiyonla; bağlı faz tekniğinde ise kovalent kimyasal bağlarla tutunur. Bağlı faz dolgu maddeleri, fiziksel olarak yüzeye tutturulmuş dolgulara göre daha kararlı olma gibi bir üstünlüğe sahiptir. Yüzeye fiziksel olarak tutturulan fonksiyonel gruplar, zamanla hareketli fazda çözünerek sürüklenir ve etkisizleştirilebilir. Bağlı faz dolgu maddelerinin sakıncası ise; biraz daha sınırlı numune kapasitesine sahip olmalarıdır [32].

Sabit faz ile hareketli fazın polaritelerine göre normal faz ve ters faz sıvı kromatografisi olmak üzere iki tip dağılma kromatografisinden söz edilebilir:

Normal faz sıvı kromatografisi : Sabit faz polaritesi, hareketli faz polaritesinden daha yüksek olduğu durumda sıvı kromatografisi normal faz olarak tanımlanır. Normal faz HPLC’de sıklıkla kullanılan kolon dolgu maddeleri silika veya alumina, kullanılan hareketli fazlar ise daha düşük polariteli hekzan, izo-propil, metilen klorür, metil butil eter, kloroform ve bunların karışımları olabilir [25]. Silika üzerine farklı polaritelerdeki $-CN$, $-NO_2$ ve $-NH_2$ gibi gruplar bağlanarak, farklı sabit fazlar elde edilebilir. Normal faz sıvı kromatografisi ile polarlığı en az olan madde kolondan en önce elue olur [32].

Ters faz sıvı kromatografisi : Sabit faz polaritesinin hareketli faz polaritesinden düşük olduğu bu yöntemde polarlığı en çok olan madde kolondan önce elue olur. Bu yöntem apolar sabit fazda tutunmayı tercih eden maddeleri ayırmada başarılıdır. Alkil zincirlerinin kimyasal olarak bağlanmasıyla oluşturulan sabit fazlardan en sık kullanılanı oktil veya oktadesil silan bağlı dolgu maddeleridir. Bu tür dolgu maddelerinde uzun zincirli hidrokarbon grupları parçacık yüzeyine dik ve birbirine paralel şekilde yerleştirilerek apolar bir yüzey elde edilmiş olur. C_8 veya daha kısa zincirli hidrokarbonlar, sikloheksil ve fenil bağlı sabit fazlar da kullanılmaktadır.

Fenil grupları alkil gruplarına göre daha polardır [34]. Hareketli faz ise çeşitli derişimlerde metanol, asetonitril veya terahidrofuran gibi çözücülerini içeren sulu çözeltilerdir.

Ters-faz sıvı ve normal-faz sıvı kromatografisinde madde, polaritesinin sabit faz polaritesine yakınlığına göre kolonda alıkonulur ve hareketli faz polaritesine yakın olan maddeler kolonu önce terk eder (Bakınız Tablo 2.2.).

Tablo 2.2. Normal faz ve ters faz sıvı kromatografisinin karşılaştırılması

| | | |
|---------------------------------|----------------|-----------------|
| Sabit Faz Polaritesi | Yüksek | Düşük |
| Hareketli Faz Polaritesi | Ortadan düşüğe | Ortadan yükseğe |
| Elüsyon sırası | Azpolar önce | Polar önce |

HPLC ile ilaç analizi yapabilmek için yaygın olarak dağılma kromatografisi uygulanır. Bu kromatografi türünde uygun bir analiz yapabilmek için maddenin belli bir çözücünde çözülmüş olması gerekir. Maddenin apolar veya polar olmasına göre maddenin polaritesine yakın bir sabit faz seçilir. Örneği oluşturan bileşenlerin iyi ayrılabilmesi için sabit faz ile hareketli faz polaritesi farklı olmalıdır. İlaç analizlerinde ilaçların genellikle kısmen apolar maddeler olmalarından dolayı ters faz sıvı kromatografisi tercih edilir.

İyon çifti (veya eşleşmiş iyon) kromatografisi, iyonik türlerin ayrılması ve tayini için kullanılan bir tür ters faz dağılma kromatografisidir. Hareketli faz metanol, asetonitril gibi bir organik çözücü içeren sulu tampon ve tayin edilecek bileşik ile zıt yüklü karşıt iyon içeren bir iyonik bileşikten meydana gelmiştir [31, 32]. Karşıt iyon analitle birleşerek ters faz dolgu maddesi ile alıkonulabilen nötral iyon çifti oluşturan bir iyondur. Karşıt iyonlar numune iyonlarının polar olamayan sabit fazda alıkonmasını arttıracak alkil grupları içerirler. İyonize olabilen maddelerin dağılma kromatografisiyle iyi bir ayrımı genellikle sorunludur. Hareketli faz pH'nın denetlenmesiyle sulu ortamda iyonlaşabilen bu maddelerin ters faz kolonla ayrımı sağlanabilir. Bu işleme iyon bastırma denir ve hareketli faz pH'ı analitin pKa değerine yakın olduğunda pH'da yapılan küçük değişiklikler alıkonma suresinde

büyük değişikliklere yol açabilir. İyon bastırma tekniği, analitin kuvvetli asidik ($pK_a \leq 3$) ve kuvvetli bazik ($pK_a \geq 8$) olduğu koşullarda uygulanır. Ancak aşırı pH değerleri çelik kolonda korozyona, bağlanmış sabit fazın ayrılmasına veya silika destek maddesinin çözülmesine neden olabilir. Böyle durumlarda, hareketli faza, karşı iyon adı verilen maddeler eklenerek kromatografik ayırım iyileştirebilir. Hareketli faza eklenen iyon; ya iyon çifti oluşturarak ya da ayrılan madde ile kromatografik etkileşme için yarışarak veya dolgu maddesindeki silanol uçlarını dinamik olarak kapatarak kromatografik ayırımı gerçekleştirebilirler. Bazı durumlarda, hareketli faza iyon çifti oluşturucu madde eklemek kromatografik ayırımı sağlayacak tek yoldur.

İyon çifti oluşumunda esas olarak üç model vardır. Bunlar;

1. İyon-çifti modeli: İyon çifti oluşum modelinde, iyon çifti oluşumu sulu hareketli fazda meydana gelir ve daha sonra oluşan yüksüz iyon çifti ters faz kolona tutunur. Alıkonma iyon çiftinin polaritesine bağlıdır. Eğer iyon çifti oluşturucu uzun zincirli bir alkilden oluşuyorsa, oluşan iyon çifti daha az polardır ve sabit faza daha fazla eğilim göstereceğinden alıkonma artar.
2. Dinamik iyon değiştirme modeli: Dinamik iyon değiştirici modelinde, iyon çifti oluşturucunun hidrofobik kısmı hidrofobik sabit faza adsorblanır ve kolonun bir iyon değiştirici olarak davranmasına neden olur. İyon çifti oluşturucunun zincir uzunluğu ne kadar fazla olursa, kolonun iyon değiştirici olarak davranması da o kadar fazla olur ve iyonik bileşiklerin alıkonması gelişir.
3. İyon etkileşme modeli: Karşı iyonun hareketli faz ile sabit faz arasında ikincil bir tabaka oluşturduğu ve bu tabakanın yüzeyindeki yük yoğunluğundan dolayı iyonik etkileşimler ve apolar yüzeye tutunma kuvvetleri aracılığıyla ayrılan madde ile etkileştiği ileri sürülmektedir. Hareketli faza eklenebilecek karşı iyonlar ve bazı uygulamaları aşığıda özetlenmiştir (Tablo 2.3.) [33].

Tablo 2.3. Zıt faz karşı iyon tipleri ve uygulamaları

| Karşı iyon tipi | Uygulaması |
|----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|
| Kuaterner aminler (tetraetil, tetrametil, trimetilamonyum) | Kuvvetli asitler, sulfolanmış boyalar, karboksilik asitler, hidrokortizon ve tuzlar |
| Bis-(2-etilhekzil) fosfat | Fenoller |
| Tersiyer aminler (triethylamin) | Sulfonatlar, karboksilik asitler |
| Alkil sulfonik asitler (metan, pentan, hekzan, heptan veya hekzan sulfonik asit) | Kuvvetli ve zayıf bazlar, benzalkonyum tuzları, katekolaminler, peptidler, opium alkaloidleri |
| Perklorik asit | Geniş bir pH aralığında aminler, peptidlerle güçlü iyon çifti oluşumu |
| Alkil sulfonatlar (oktil, desil, dodesil) | Sulfonik asit benzeri etki |

İyon çifti oluşturucu maddeler sabit faz yüzeyindeki artık silanol gruplarını da örterek pik kuyruklanmasını engeller ve pik keskinliğini arttırmırlar. İyon çifti oluşturucu maddeler genel olarak, kuaterner aminler, tersiyer aminler, alkil sulfonik asitler, alkil sulfonatlardır. İyon çifti kromatografisi ile iyonik veya iyonize olabilen maddeler ayrılabilir.

İyon çifti oluşumuna etki eden faktörler:

1. Karşı iyon tipi ve ayrılan maddeyle etkileşme derecesi,
2. Karşı iyonun boyutu,
3. Karşı iyon derişimi,
4. Ortamın pH'ı,
5. Hareketli fazdaki organik çözücü tipi ve miktarı,
6. Sıcaklık,
7. Sabit faz yüzeyinin karşı iyonla kaplanma derecesidir.

İyon çifti oluşturucu maddenin derişimi, hareketli fazda yeterli miktarda karşı iyon bulunabilmesi ve sabit faz yüzeyindeki artık silanol gruplarının tamamen kaplanabilmesi için önemlidir. Özellikle pik simetrisi bozuk olan maddeler için sabit

fazın tamamen kaplanması istenir. Karşı iyonun zincir uzunluğu ve hareketli fazdaki derişimi yeterliyse bağılı fazın çok yüksek oranda kaplanması beklenir. Karşı iyon derişimindeki değişim, alıkonma suresini ve buna bağılı olarak kapasite faktörünü değiştirirken, secicilik bu değişimden belirgin olarak etkilenmez.

İyonize olmayıp yük kazanmayan maddeler kısa zincirli ($^5C-^8C$) iyon çifti oluşturucu maddelerle etkileşmeye girmez. Bunların alıkonma sureleri ve pik simetrisi değişmez. Bu nedenle hareketli fazın pH'ı hem ayrılan maddenin hem de karşı iyonun en fazla iyonlaştığı değerde tutulmalıdır. En yüksek alıkonma suresi, ayrılan madde ve iyon çifti oluşturucu madde tamamen iyonlaştığında elde edilir. İyon çifti oluşturucu maddenin iyonlaşma hızı yüksekse, alıkonmayı maddenin iyonlaşma hızı denetler. Ayrılan madde tipine göre uygun hareketli faz pH aralıkları Tablo 2.4'de verilmiştir [35].

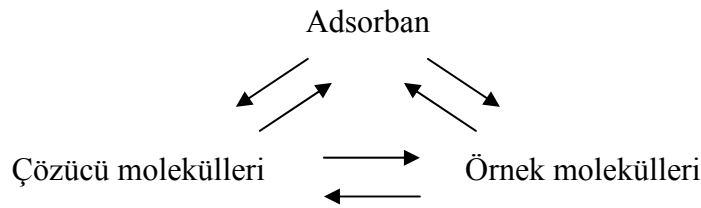
Tablo 2.4. Ayrılan madde tipine göre hareketli faz pH seçimi

| Ayrılan madde tipi | Hareketli faz pH aralığı | Sonuç |
|---------------------------------|--------------------------|-----------------------------------|
| Kuvvetli asitler ($pK_a < 2$) | 2 -7,4 | Bu pH aralığında madde iyonlaşır. |
| Zayıf asitler ($pK_a > 2$) | 6 -7,4 | Bu pH aralığında madde iyonlaşır. |
| | 2 -5 | Maddenin iyonlaşması bastırılır. |
| Kuvvetli bazlar ($pK_a > 8$) | 2 -8 | Bu pH aralığında madde iyonlaşır. |
| Zayıf bazlar ($pK_a < 8$) | 2 -5 | Bu pH aralığında madde iyonlaşır. |
| | 6 -7,4 | Maddenin iyonlaşması bastırılır. |

Hareketli faza ilave edilen iyon çiftleri polaritesi düşük olan sabit faz tarafından absorplanır. İyonize olmuş maddeler bu iyon çiftleri ile iyonik etkileşime girerek kolonda tutunurlar. Maddelerin alıkonmaları ilave edilen iyon çifti reaktifinin derişimi ile değişir. İyon çifti reaktiflerinin 8C ve ^{18}C sabit fazları ile etkileşimi güçlü olduğundan bu teknikle en çok kullanılan sabit fazlardır.

2.5.1.2. Adsorpsiyon kromatografisi

Adsorpsiyon kromatografisi, bir sıvı/gaz–katı kromatografisidir. Ayırım, sıvı veya gaz olan hareketli bir faz ile ayrılacak molekülleri tersinir olarak adsorblayan katı bir sabit faz arasında gerçekleşir. Ayrılacak madde molekülleri hareketli fazdaki çözücü molekülleri ile sabit faz (adsorban) üzerindeki tutunma yerleri için yarışır. Bu süreç, bir dizi dengeyi içine alır (Şekil 2.2.).



Şekil 2.2. Adsorpsiyon kromatografisi dengesi

Bir örnek molekülünün, sabit bir faz tarafından adsorplanması için bir çözücü molekülünün yüzeyden uzaklaşması gerekir. Eğer adsorban polar bir madde ise (silika veya alümina gibi) apolar moleküller yüzeye az eğilim gösterirler ve sabit fazda alıkonmazlar. Polar fonksiyonel gruplara veya hidrojen bağı yapma kapasitesine sahip moleküller yüzeye güçlü etkileşim gösterirler ve daha uzun süre alıkonurlar. Polar maddeler hidrojen bağı oluşturabilirken, apolar maddelerin ayrılmasında baskın olan London dağılma kuvvetleridir. Polar maddelerin ayrılmasında polar sabit fazlar, apolar maddelerin ayrılmasında apolar sabit fazlar kullanılmaktadır [33, 36].

2.5.1.3. Boyut eleme kromatografisi

Jel geçirgenlik veya jel süzme kromatografi adı verilen bu kromatografi çeşidi, özellikle yüksek mol kütleli türlere uygulanabilen güçlü bir tekniktir. Dolgu maddeleri, çözünen madde ve çözücü moleküllerinin içine diffüzlenebileceği düzgün bir gözenek ağı içeren küçük boyutlu silis veya polimer partiküllerden meydana gelmiştir. Gözenekler içinde moleküller etkin bir şekilde yakalanır ve hareketli faz akımı ile uzaklaştırılır. Gözenek içinde ortalama kalma süresi, analit molekülünün etkin büyüklüğüne bağlıdır.

Jel süzme kromatografisinde, sulu çözücüler ve hidrofilik dolgu maddeleri kullanılırken, jel süzme kromatografisinde polar olmayan organik çözücüler ve hidrofobik dolgu maddeleri kullanılır. Eleme sınırı birkaç bin olan bir jel, proteinleri, amino asitlerden ve düşük mol kütleli peptitlerden kolayca ayırabilir. Diğer uygulamaları ise, homologların ve oligomerlerin ayrılması, büyük polimer veya doğal ürünlerin mol kütlelerinin veya mol kütlesi dağılımının hızlı bir şekilde tayin edilmesidir.

2.5.1.4. İyon–değişim kromatografisi

Çoğu zaman iyon kromatografisi olarak da adlandırılan bu kromatografi çeşidi, iyon değiştirici reçinelerin kullanımına dayanan iyonların ayrılması ve tayini için modern ve etkili bir yöntemdir. Daha önceden bu teknikte kullanılan stiren ve divinilbenzenin kopolimerizasyonu ile oluşan gözenekli polimerik taneciklerin, analit moleküllerin mikro gözeneklerden geçmesi, polimer matriksindeki difüzyonun yavaş olması ve matriksin sıkıştırılabilmesinden dolayı yeni tip dolgu maddeleri geliştirilmiştir. Bunlardan biri yüzeyi bağlı olarak büyük, gözenekli olmayan küresel sentetik iyon değiştirici reçine ile kaplanmış cam veya polimer tanelerden meydana gelen zar kaplamalı yatak dolgusudur. İkinci bir tipteki dolgu maddesi, adsorbsiyon kromatografide kullanılan silisten ibaret gözenekli mikropartiküllerin, iyon değiştiricinin ince bir filmi ile kaplanmasıyla hazırlanır. İyon değiştirme kromatografinin inorganik uygulamaları elüent baskılayıcı kolonlu iyon–değişim kromatografisi ve tek kolonlu iyon kromatografisi kullanılarak gerçekleştirilir. Bu kromatografi çeşidi ilaçlar ve bunların metabolitleri, serumlar, gıda koruyucu maddeler, vitamin karışımları, şekerler ve farmasötik preparatlar gibi çok farklı organik ve biyokimyasal sistemlere uygulanmaktadır.

İyon eleme kromatografisi, iyonlardan çok nötral türlerin ayrılmasından dolayı tam bir iyon kromatografisi çeşidi olmamasına rağmen, iyon–değişim kolonlar kullanılmaktadır. Bu kromatografi çeşidi, süt, kahve, şarap ve diğer ticari gıda ürünleri gibi çok sayıdaki maddenin teşhisi ve tayini için kullanılabilir.

2.5.1.5. Kâğıt ve ince tabaka kromatografisi

Düzlemsel kromatografi yöntemleri, ince tabaka kromatografisi, kağıt kromatografisi ve elektro kromatografisi içermektedir. Bunların her biri düzgün, ya kendi kendini destekleyen ya da bir cam, plastik veya metal yüzeye kaplanmış sabit bir fazın ince bir tabakasını kullanır. Hareketli faz ise, sabit faz içinde kapiler etkisi ile hareket eder ve bazen yer çekimi bazen de elektriksel potansiyel bu harekete yardım eder. Tipik ince tabaka ayırmaları, iyice öğütülmüş partiküllerden meydana gelen ince ve yapışık bir tabaka ile kaplanmış düzgün bir cam veya plastikten yapılmış plakalarda gerçekleştirilir. Numune plakalara uygulandıktan sonra, hareketli faz ile doyurulmuş bir yürütme kabı içerisinde, mobil faza daldırılmış plakalar üzerinde yürütülür. Yürütme sıvısı, küçük partiküller arasında kapiler etkileşme olayı ile yukarı tırmanır. Yürütücü çözücü, plaka uzunluğunun yarısını veya üçte ikisini geçtikten sonra plaka çıkartılır ve kurutulur. Daha sonra bu plaka üzerine iyot ya da sülfürik asit çözeltileri sprey halinde püskürtülerek veya sabit faza floresan özellikli bir madde emdirildikten sonra plakaların ultraviyole ışığı altına tutulmasıyla numune bileşenlerinin yeri saptanır.

Kalitatif uygulamalar, başlangıç noktasından itibaren lekenin uzaklığının, sıvı ön cephesinin uzaklığına oranı olan geciktirme faktörü ya da R_f değerinin hesaplanmasıyla gerçekleştirilir. Bilinmeyen madde ve standart için elde edilen R_f değerlerinin karşılaştırılması, numunedeki bir bileşenin belirlenmesi için kuvvetli deliller ortaya koyar. Kantitatif uygulamalar ise, plaka üzerindeki lekenin kazınması, analitin sabit fazdan ekstraksiyonu ve analitin uygun fiziksel veya kimyasal bir yöntemle ölçülmesiyle, tarayıcı bir dansitometrenin, lekenin yaydığı floresans veya yansıma ışınlarının ölçülmesiyle ya da lekelerin alanının standarda ait lekenin alanı ile karşılaştırılmasıyla gerçekleştirilebilir [31].

2.5.1.6. Kolon kromatografisi

Kromatografik metotlardan olan kolon kromatografik yöntemler ise; sıvı, gaz ve süper kritik akışkanlı olmak üzere üç kısımda sınıflandırılabilir. Böyle bir sınıflandırma; hareketli ve sabit fazların fiziksel olarak nasıl temas ettikleri esas alınarak, hareketli ve sabit fazların cinsine ve bileşenlerin iki faz arasındaki dengesine dayanır. Birinci kromatografi türünde hareketli faz sıvı, ikincisinde gaz ve üçüncüsündeyse süper kritik bir akışkandır. Kolon kromatografisinde, sabit faz ince bir kolonda tutulur ve hareketli faz basınç altında bu sabit fazın arasından geçmeye zorlanır.

Elüsyon işlemi, bir kolondan sürekli taze çözücü geçirildikten sonra, çözülmüş bileşenin sabit faz boyunca hareket ettirilerek ayrılması ve kolon sonunda toplanmasıdır. Kolona katılan hareketli faz, numunenin bir bölümünü içeren çözücüyü kolonda ilerlemeye zorlar ve bu arada hareketli fazla sabit fazın yeni bölümleri arasında numune tekrar bölüşülür. Kolona sürekli çözücünün verilmesi, hareketli ve sabit faz arasında sürekli madde aktarımı yaparak, çözünen madde moleküllerini kolondan aşağıya taşır. Fakat çözünen madde hareketi sadece hareketli fazda olduğu için, çözünen maddelerin kolonda göç ettiği ortalama hızı, onun hareketli fazda geçirdiği zaman ile orantılıdır. Sabit fazın kuvvetle tuttuğu maddeler kolondan daha geç elüe olurlar [33].

2.5.1.7. Gaz kromatografisi

Gaz kromatografisi de, öteki kromatografi dalları gibi bir karışımda bulunan maddeleri ayırmaya yarar. Bu kromatografi dalında da, sabit ve hareketli olmak üzere iki faz mevcuttur. Bu teknikte He, N₂, Ne ve Ar gibi inert gazlar taşıyıcı gaz olarak kullanılmaktadır. Bundan dolayı, öteki kromatografi dallarında olanın aksine bu kromatografi dalında ayrılmaları istenen maddelerle sabit faz arasında hiçbir etkileşme olmaz. Hareketli fazın görevi sadece maddeleri taşımaktır. Bu bilgiler ışığında gaz kromatografisini tanımlayacak olursak, uçucu olan veya uçucu hale getirilebilen maddelerin belirli bir sıcaklıkta, bir taşıyıcı gaz yardımıyla, sabit bir faz içinde ayrılmaları esasına dayanan kromatografik bir yöntemdir. Maddelerin

ayrılmasında gaz kromatografisini uygulayabilmek için maddelerin gaz halinde ya da kolaylıkla gazlaştırılabilmesi gerekmektedir.

Sabit faz, bir katı veya bir katı yüzeyine adsorplanmış (katıya emdirilmiş) bir sıvı olabilir. Buna göre gaz kromatografisi ikiye ayrılır:

1. Sabit fazı sıvı olan gaz-sıvı kromatografisi (GLC)
2. Sabit fazı katı olan gaz-katı kromatografisi (GSC)

Gaz-sıvı kromatografisi, gözenekli inert bir yüzeye sıvı polimer veya siloksan bileşiğinin emdirilerek, geniş yüzey alanı oluşturması ile meydana getirilen sıvı sabit faz ve hareketli fazı gaz olan, temeli dağılım dengesine dayanan bir kromatografi türüdür. Gaz-sıvı kromatografisi daha çok kullanılır. Bu kromatografi tekniğinde 0,3-0,5 mm çapında kapiler kolonların kullanılması da mümkündür.

Gaz-katı kromatografisinde ise, maddeler katı faz üzerinde ve belirli sıcaklıklarda adsorpsiyon-desorpsiyon esasına dayanarak ayrılırlar. Bu yöntemle elde edilen pikler genelde kuyrukludur. Kuyruklu piklerin genelde birbirlerinden ayrılması oldukça güçtür. Bundan dolayı gaz-katı kromatografisi genellikle çok az kullanılır. Kullanılması da daha çok küçük moleküllü maddelerin ayrılmasında etkili olur [37-39].

2.5.1.8. Sıvı kromatografisi

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

Tswett'in orjinal çalışmaları da dahil ilk sıvı kromatografisi, çapı 1-5 cm ve uzunluğu 50-500 cm olan cam kolonlarda uygulanmıştır. Uygun akış hızları temin etmek için, katı sabit fazı oluşturan partiküllerin çapı, genellikle 100-150 µm aralığındaydı. Bu durumda bile, akış hızları düşüktü. Ayırma zamanları çok uzundu ve çoğu zaman birkaç saat alıyordu. Bu klasik kromatografik işlemleri hızlandırmak

için vakum veya basınç uygulama girişimleri de ayırma veriminin düşmesinden dolayı yararlı olamadı. Sıvı kromatografinin geliştiği ilk yıllarda, bilim adamları, kolon veriminin, dolguda kullanılan tanecik boyutunun azatılması ile önemli ölçüde artacağını göstermişlerdir. Bu teknoloji, klasik yer çekimi-akışlı sıvı kromatografisinin basit cam kolonlardaki durumunun aksine, yüksek basınçta çalışan, gelişmiş cihazlara ihtiyaç göstermekteydi. Böylece YPSK ya da HPLC (Yüksek Performanslı (Basınçlı) Sıvı Kromatografisi-High Performance Liquid Chromatography) ismi, preparatif amaçla kullanılan temel yöntemlerden, daha yeni işlemleri ayırt etmek için kullanılmaya başlandı.

HPLC, bütün analitik ayırma teknikleri arasında en yaygın kullanılanıdır. Yöntemin bu kadar yaygın olmasının sebepleri, duyarlılığı, kantitatif tayinlere uygulanabilir olması, uçucu olmayan türlerin veya sıcaklıkla kolayca bozulabilen türlerin ayrılmasına uygun olması ve sanayinin, birçok bilim dalının ve halkın birinci derecede ilgilendiği ilaçlar ve gıda bileşenleri gibi maddelere geniş bir şekilde uygulanabilirliğidir [31].

2.5.2. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC)

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

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi yöntemi, bütün analitik ayırma teknikleri arasında en yaygın olarak kullanılanıdır. Yöntemin bu kadar yaygın olmasının sebepleri, duyarlılığı, doğruluğu, kesinliği ve seçiciliğinin yüksek olması, kantitatif

analizlere kolaylıkla uyarlanabilir olması, uçucu olmayan türlerin veya sıcaklıkla kolayca bozunabilen türlerin ayrılmasında uygun olması ve hepsinden de önemlisi sanayinin, birçok bilim dalının ve halkın birinci derece ilgilendiği maddelere geniş bir şekilde uygulanabilirliğidir. Bu gibi maddelere örnek olarak; amino asitler, proteinler, nükleik asitler, hidrokarbonlar, karbonhidratlar, ilaçlar, terpenoidler, pestisitler, antibiyotikler, steroidler, metal-organik türler, çeşitli organik bileşikler sayılabilir. Kısacası, uygun dedektör, uygun kolon ve uygun hareketli faz olduğu sürece bütün kimyasal maddelerin ayrılmasında ve analizinde HPLC kullanılabilir.

2.5.3. Sıvı kromatografisinin dayandığı temel parametreler

2.5.3.1. Dağılma (Partisyon) katsayısı

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

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

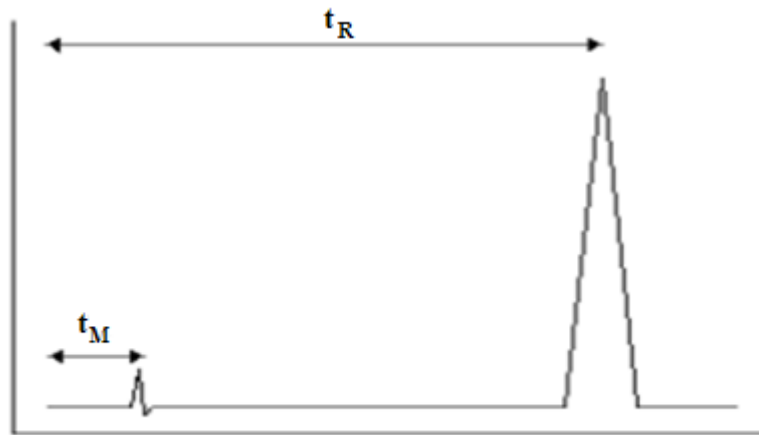
Bu reaksiyonun denge sabiti K 'ya, dağılma (partisyon) oranı veya dağılma (partisyon) katsayısı adı verilir ve;

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

şeklinde gösterilir. Burada C_s , analitin durgun faz içindeki molar derişimi, C_m ise analitin hareketli faz içindeki molar derişimidir. İdeal olarak çözünen madde derişimlerinin geniş aralıkta dağılma oranı sabittir. Diğer bir deyişle; C_s doğrudan C_m ile orantılıdır [31, 40].

2.5.3.2. Alıkonma (Retensiyon) zamanı

Şekil 2.3.'de tek bir analit içeren numune için tipik bir kromatogram verilmiştir. Kromatogram, dönüştürülmüş iki sinyalin oranının logaritmasının zamana karşı çizilen grafiğinden meydana gelmiştir [33]. Numune enjeksiyonundan sonra gelen pik için, pik süresi ölü zaman olarak adlandırılır ve t_M ile gösterilir. Ölü zaman, hareketli fazın ortalama göç hızını verir ve analit piklerinin tanınmasında önemli rol oynar. Numune içinde veya hareketli fazda çoğu zaman kolonda tutulmayan bir tür olabilir. Yoksa bile diğer piklerin tanınmasına yardımcı olmak için böyle bir tür ortama katılabilir. Şekilde sağ taraftaki pik bir analit türüne aittir. Numunenin enjeksiyonu ile bu pikin dedektöre ulaşması için geçen süreye alıkonma (tutulma) zamanı denir ve t_R simgesiyle gösterilir.



Şekil 2.3. Tek bileşenli bir karışım için tipik bir kromatogram

Analitin kolon içerisinde hareketi esnasında ortalama göç hızı V ;

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

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

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

2.5.3.3. Analitin göç hızı ve kapasite faktörü

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

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

t_R ve t_M değerleri kromatogramlardan kolayca bulunur. Çözünen bir madde için kapasite faktörü birden çok küçük ise, ayrılma hızlı gerçekleşir ve alıkonma zamanının doğru olarak belirlenmesi zor olur. Öte yandan kapasite faktörü 20-30 gibi bir sayıdan daha büyük olursa, ayrılma zamanı gereksiz bir şekilde uzun olur. İdeal bir ayırma da kapasite faktörü değerinin 1-5 arasında olması gerekmektedir. Kapasite faktörü, hareketli faz ve durgun faz bileşimlerinin değiştirilmesiyle ayarlanabilir. Her maddenin kendine özgü bir kapasite faktör değeri vardır.

2.5.3.4. Seçicilik faktörü ve farklı göç hızları

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

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

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

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

2.5.3.5. Ayırım gücü (Rezolüsyon, RS)

Ayırım, kantitatif kromatografi çalışmalarının başlıca gerekliliğidir. Genellikle 5 veya daha az madde içeren numunelerde bu değerin 1,5'dan büyük olması kolaylıkla sağlayabilir. Bu sonuç, maksimum kesinliğin göstergesidir. Ayırım gücü, bir kolonun eskiliğini, günler arası ayırım şartlarındaki değişiklikleri gösterir.

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

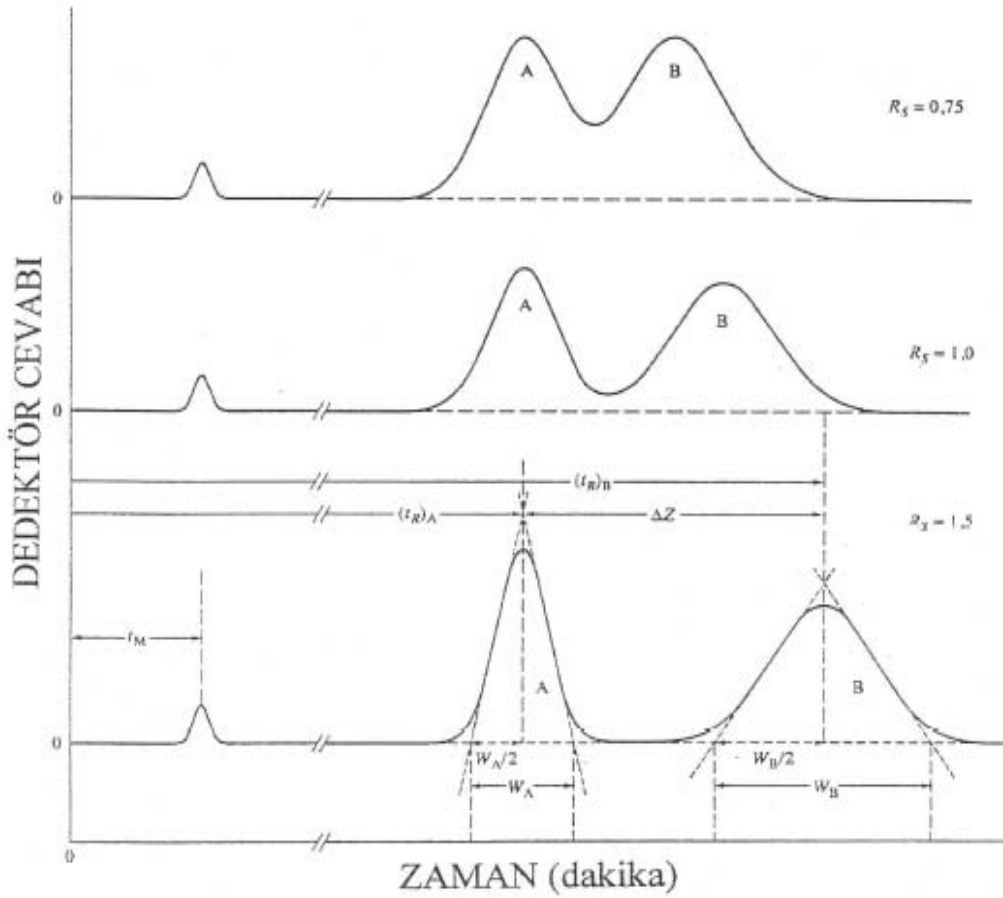
t_1 : 1. maddenin alıkonma zamanı

t_2 : 2. maddenin alıkonma zamanı

W_1 : 1. maddenin taban genişliği

W_2 : 2. maddenin taban genişliği

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



Şekil 2.4. Rezolüsyon faktörünün kromatogramlara göre değişimi

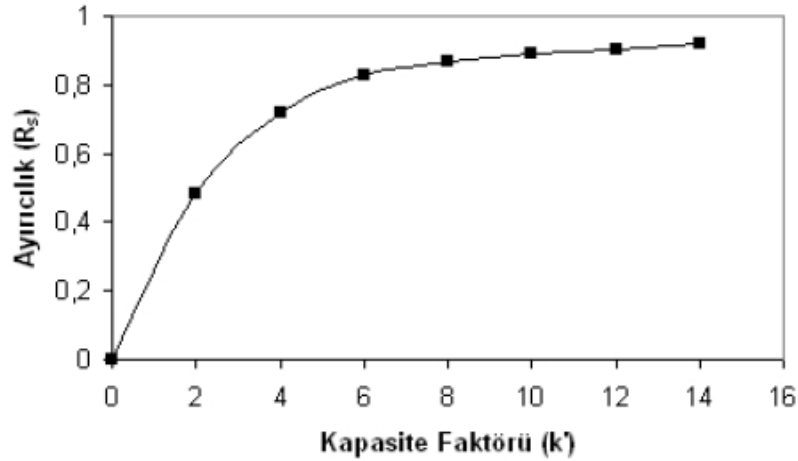
Nicel analizler için pikler arasındaki ayırıcılığı (rezolüsyon) 1,5'den büyük ($R_s \geq 1,5$) olması önerilir.

Eşitlik 2.9'a göre ayırıcılığı etkileyen üç faktör; seçicilik (α), tabaka sayısı (N) ve kapasite faktörü (k')'dür.

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

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

Kapasite faktörünün (k'), ayırcılığa etkisi Şekil 2.5'de verilmiştir. Grafikten de anlaşılacağı gibi $k' = 0$ olduğunda ayırım yoktur, ayrıca k' değeri arttıkça, $k' / (k'+1) \rightarrow 1$ 'e yaklaşır ve kapasite faktöründeki artışın ayırcılığa etkisi kalmaz. k' değerini daha fazla arttırmak, sadece alıkonma zamanını arttırır. Optimum k' değerleri 1-10 arasındadır [35, 41].



Şekil 2.5. Kapasite faktörünün ayırcılık üzerine etkisi

2.5.3.6. Kolon verimi

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

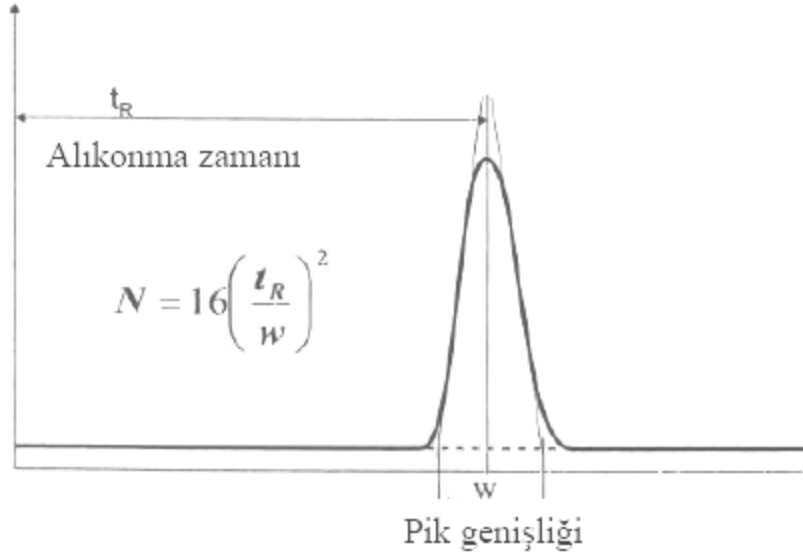
1. Tabaka yüksekliği, H (Plate Height)
2. Teorik tabaka sayısı, N (Number of Theoretical Plate)

Bu ikisi arasındaki bağıntı aşağıdaki eşitlikle verilir:

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

Burada L, kolon dolgusunun uzunluğudur (cm). Bir kolonda tabaka yüksekliğinin azalması ve teorik tabaka sayısının artmasıyla kolon verimliliği artar. Hareketli ve durgun fazların bileşimi, kolon dolgu maddesinin tanecik büyüklüğü ve kolon çapına

bağlı olarak kolonun tipi kolon verimliliğine etki etmektedir. Kolon dolgu maddesinin tanecik çapı küçüldükçe, kolon tabaka sayısı artmakta ve bu da kolon verimliliğini artırmaktadır.



Şekil 2.6. Teorik tabaka sayısı hesabını gösterir kromatogram

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

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

Burada W, pik taban genişliğidir. Teorik tabaka sayısı N ve tabaka yüksekliği H, literatürlerde ve kromatografik cihaz üreticileri tarafından, kolon performansının bir ölçümü olarak kullanılır [31].

Kromatografik kolondaki ayırma olaylarına matematiksel bir yaklaşım, 1950’li yıllarda Hollandalı kimya mühendisi Van Deemter’in kendi adı ile anılan eşitliğin bulunması ile sonuçlanan incelemeleri ile başlamıştır (Eşitlik 2.12).

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

H: Teorik tabaka yüksekliği (cm)

A: Çoklu akış yolları ve Eddy difüzyonu

B: Boyuna difüzyon

C_u: Fazlar arasındaki kütle aktarımı

u: Çizgisel hız

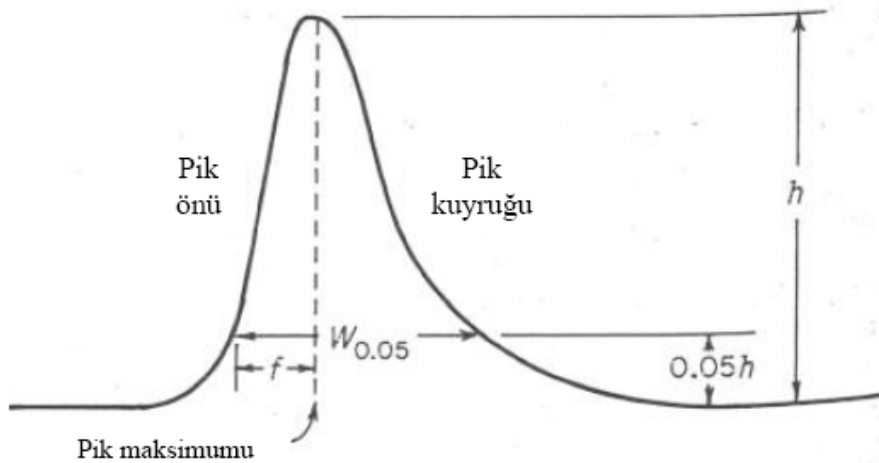
Bir kromatografi kolonunun verimli çalışması için önce bu kolon için kullanılacak optimum akış hızının saptanması gerekir. H değerinin küçültülmesi için bir dizi önlem alınarak kolonun etkinliği arttırılabilir. Eşitlik 2.12’deki akış hızından bağımsız olan A değeri, madde moleküllerinin kolonda ilerlerken farklı yollar izlemesi nedeniyle büyür. Farklı uzunluktaki yolları izleyen madde moleküllerinin kolonda hızları da farklı olur. Bütün moleküllerin kolonun sonuna ulaşmasında bantta genişleme gözlenir. Bu olaya Eddy Difüzyonu denir. Kolon dolgu maddesinin çok küçük tanecikli olarak alınması ile A’nın değeri küçültülebilir. Formüldeki ikinci terim boyuna difüzyon terimi olup, özellikle düşük akış hızlarında önem kazanır. Bu terimin katkısı, bileşenlerin hareketli faz içindeki difüzyon katsayılarının değerleri ile doğru orantılı olarak artar. B’nin değeri kolon sıcaklığının azaltılması ile küçülür. Kolona basınç uygulayarak da B’nin değerinin küçültülmesi mümkündür. Formülün üçüncü terimi yüksek akış hızlarında önem kazanan kütle aktarımı terimidir. Akış hızı arttıkça, bileşenlerin iki faz arasında dağılma dengelerine ulaşabilmeleri için gereken süre azalır ve dolayısı ile dağılma dengesine tam olarak erişilemez. Bu terimdeki C değerinin küçültülebilmesi için hareketli sıvı fazın viskozitesinin az olması, kolon sıcaklığının arttırılması, sabit faz ince bir sıvı film ile kaplıysa, bu filmin kalınlığının çok küçük bir değere sahip olması gerekir [35, 41].

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

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

1. Doğru olmayan tabaka sayısı ve ayırım gücü sonuçları
2. Kararlı olmayan miktar tayinleri
3. Gözlemlenemeyen pik kuyruklanmaları
4. Alıkonmanın tekrarlanabilirliğinin düşük olması gibi sorunlarla karşılaşılabilir.

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



Şekil 2.7. Pik asimetri faktörü ve kuyruklanma faktörü hesabını gösteren kromatogram

2.5.4. Kolon performansının optimizasyonu

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

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

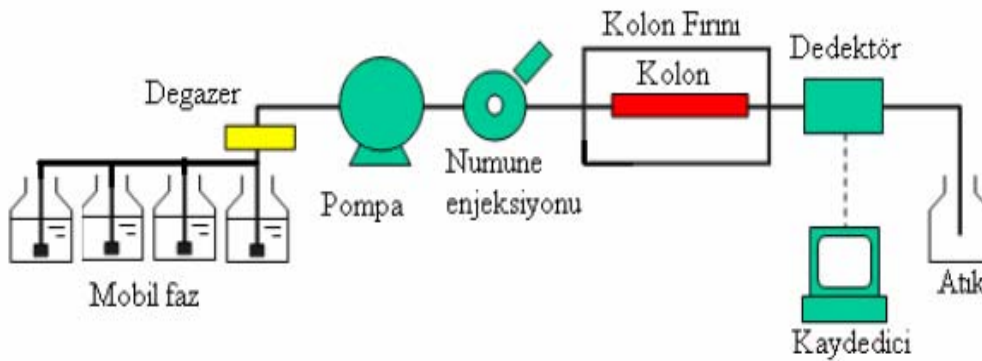
Bant genişlemesi ve dolayısıyla kolon verimliliğinin kaybı, çözünen bileşenlerin kolon içerisinde göçleri sırasında yeralan çok sayıda kütle-aktarım işlemlerinin belli hızlara sahip oluşunun bir sonucudur. Bu hızları etkileyen bazı değişkenler denetlenebilir ve ayırmaları iyileştirmek için kullanılabilir.

2.5.5. Kolon performansına etki eden değişkenler

İstenilen ayırmayı sağlamak için optimum koşullar araştırılırken α , k' ve N (veya H) gibi temel parametrelerin az ya da çok birbirinden bağımsız olarak ayarlanabileceği unutulmamalıdır. Böylece α ve k' , en kolay sıcaklık ve hareketli fazın bileşimindeki oynamalar ya da değişik bir kolon dolgusu kullanılarak değiştirilebilir. Herhangi bir çalışmada, teorik tabaka sayısı, kolon boyunun değiştirilmesi, tabaka yüksekliği, hareketli fazın akış hızı, kolon dolgu maddesi tane büyüklüğü, hareketli fazın viskozitesi ve sabit fazı oluşturan absorbe edilmiş sıvı filmin kalınlığı gibi parametreler değiştirilerek iyi bir ayırım gerçekleştirilebilir [31, 40, 42].

2.5.6. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) cihazı

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



Şekil 2.8. HPLC cihazının şematik gösterimi

2.5.6.1. Hareketli (Mobil) faz haznesi

Bir HPLC cihazı, bir veya daha fazla sayıda, her biri 200-1000 mL arasında çözücü içeren camdan veya çelikten yapılmış hareketli faz haznesi içerir. Bu hazneler çoğu zaman kolonda veya dedektör sisteminde bozucu etkilere neden olan çözülmüş gazların (özellikle oksijen ve azot) giderilmesi için bir bölüm (gaz giderici) ile donatılmıştır. Hareketli fazın cihaza verilmeden önce süzülmesi ve çözülmüş gazların giderilmesi gerekmektedir. Süzme işlemi için 0,45-0,6 µm çapında membran veya teflon filtreler kullanılır. Bu uygulama, süspansiyon halindeki maddeleri uzaklaştırmanın yanı sıra gazları da giderir. Sistemde gaz giderici yoksa hareketli fazdaki gazları uzaklaştırmak amacıyla ultrasonik banyoda (ultrasonikatör) bekletme veya çözücünden inert bir gaz geçirme işlemleri uygulanabilir.

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

Modern HPLC cihazları, çözücülerin hacimsel oranı zamanla doğrusal olarak veya üstel olarak değiştirilebilecek şekilde, iki veya daha fazla haznedeki çözücüleri bir karıştırma odasında sürekli olarak değişen oranlarda bir araya getiren sistemlerle donatılmıştır. İzokratik elüsyon ile ayrılamayan maddeler gradient elüsyonla ayrılabilen, farklı kapasite faktörüne sahip madde karışımlarının alıkonma zamanları kısaltılabilmektedir.

Hareketli faz su ve/veya sulu tampon içeriyorsa, kimyasal bozunmanın yanı sıra mikrobiyolojik üreme sonucunda kolonu tıkaşabilir. Bu nedenle, HPLC analizleri sırasında taze hazırlanmış hareketli faz kullanılır [31, 34, 35].

2.5.6.2. Pompalar

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

1. 400 atm'e kadar basınç üretimi,
2. Puls içermeyen basınç çıkışı,
3. 0.1-10 mL dk⁻¹ aralığında akış hızları,
4. % 0.5 veya daha iyi bir bağıl tekrarlanabilirlikle akış kontrolü,
5. Korozyona dayanıklı parçalar (paslanmaz çelik veya teflondan yapılmış sızdırmazlık) şartlarının sağlanmış olması gerekmektedir.

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

HPLC'de kullanılan pompa çeşitleri:

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

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

Sürgülü pompalar : Vizkoziteden ve geri basınçtan bağımsız bir akış üreten sürgülü pompalar, bir kademeli motordan güç alan vidalı güdüm mekanizması ile kumanda edilen sızdırmaz bir sürgüsü olan silindirik kaptan ibarettir. Sınırlı çözücü kapasitesi

(~ 250 mL) ve çözücü değiştirilmesi gerektiğinde karşılaşılan güçlükler sakıncalı olan taraflarıdır.

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

2.5.6.3. Akış kontrolü ve programlama sistemleri

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

2.5.6.4. Enjektörler

HPLC analizlerinde ölçümlerin kesinliğini belirleyen faktör, numunenin kolon dolgu maddesine gönderilmesinin tekrarlanabilirliğidir. Aşırı numune yüklenmiş kolonlarda görülen bant genişlemesi de kesinliği etkiler. Bu yüzden kullanılan hacim çok küçük olmalıdır ve sistemin basıncını düşürmeden numunenin sisteme girişinin sağlanması gereklidir.

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

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

b) Otomatik Enjektör: Basit otomatik enjektörlerde, manuel enjeksiyon valfine benzer bir valf kullanılır. Bu sistemde numune şişesine azot basıncı uygulayarak loop

doldurulur ve valfin dönmesi ile numune enjekte edilir. Enjeksiyon hacmi sabittir ve loop hacmi ile sınırlıdır.

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

2.5.6.5. Dedektörler

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

- a) Yığın Özellikli Dedektörler: Bunlar analit tarafından değiştirilen yığın özelliklerine cevap verirler. Hareketli fazın kırılma indisi, dielektrik sabiti ve yoğunluğu gibi özelliklerinin değişimi sonucu ölçüm yapılır.
- b) Analit Özellikli Dedektörler: UV absorbanı, floresans şiddeti gibi analitin sahip olduğu, fakat hareketli fazın sahip olmadığı özelliklere cevap verirler. Bu özelliklerdeki değişimler ölçülerek sonuç elde edilir.

Tablo 2.5. Sıvı Kromatografik Dedektörlerin Performanslarının Karşılaştırılması

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

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

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

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

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

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

Monokromatörlü UV Absorbans Dedektörleri: Piyasada sadece UV ışınları kullanan veya hem UV hem de görünür bölge ışınlarını kullanan optik ağılı spektrofotometreden oluşan dedektörler vardır. Bu dedektörlerde kromatogramın tamamı tek bir dalga boyundan alınabildiği gibi, zamanla eluent pikleri birbirinden yeterince ayrıldığında her bir pike ait madde için uygun dalga boyu seçilmesi ile mümkündür. Filtre seçimi çoğunlukla bilgisayar kontrolü ile yapılır. En güçlü UV spektrofotometrik dedektörler, fotodiyod dizisi dedektörleridir. Bu cihazlar yaklaşık 1 saniyede spektrumun tamamı için gerekli verileri toplayabilir ve üç boyutlu bir grafik halinde türlerin teşhis ve kantitatif tayini için gerekli şartların seçimine yardımcı olacak bir spektrum sunar.

İnfrared Absorbans Dedektörleri: İki tip infrared absorbans dedektörü vardır. Bunlar: a) Dalga boyu taramasını 3 tane yarı dairesel filtre kanatları ile yapan ve çalışma aralığı 2,5-14,5 μm veya 4000-690 cm^{-1} olan dedektörlerdir [33]. b) Diğeri ise Fourier dönüşümlü cihaza benzer özellikte olan infrared dedektörleridir. Bunların yapısı daha karmaşıktır. İnfrared dedektör hücreler, kullanılan NaCl pencereler hariç, yapılış bakımından UV ışınlı hücrelere benzemektedirler. Hücre uzunlukları 1–3,2 mm ve hücre hacmi 1,5–10 μL arasında değişmektedir.

İnfrared dedektörlerin kullanımındaki dezavantajı, birçok kullanışlı çözücünün düşük geçirgenliğidir. Örneğin; su ve alkollerin geniş infrared absorpsiyon bantları, bu dedektörlerin birçok uygulamada kullanımını engellemektedir [33, 43].

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

Floresans özellik gösteren ya da floresans hale getirilebilen numunelerin ayrılması ve analizinde de kullanılan bir yöntemdir. Floresans dedektörlerin üstünlükleri duyarlı olmalarıdır. Bu özelliklerinden dolayı floresans özelliği bulunan numunelerdeki bileşiklerin ayrılması ve tayini için sıvı kromatografisinde de kullanılmaktadır. Floresans özelliğe sahip ilaçlar, doğal ürünler, klinik numuneler ve petrol ürünleri gibi maddelerin analizinde oldukça fazla tercih edilen yöntemlerdendir [33, 44].

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

Buharlaştırılmalı ışık saçma dedektörleri : Son yıllarda HPLC için geliştirilmiş olan bu tip dedektörlerde kolondan çıkan çözelti, sisleştirici denilen yapı içinden geçirilerek azot veya hava akımı ile ince bir sis haline dönüştürülür. Sis halindeki çözücü sıcaklık kontrollü sürüklenme borusuna gönderilir. Oradan lazer ışın demetinin içinden geçirilir. Akış yönüne dik olarak saçılan ışınlar bir silisyum fotoiyod dizi dedektör yardımıyla ölçülür. Bu tip dedektörlerin diğerlerine göre üstünlüğü buharlaşmayan bütün analitlere aynı cevabı vermesidir. Ayrıca kırılma indisi dedektörlerine göre duyarlılığı daha fazladır [33].

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

Bu tip dedektörlerin kullanılabilmesi için hareketli fazın elektriği iletmesi gerekmektedir. Organik çözücüler kullanıldığında, hareketli faza mutlaka akımı iletme üzere bazı maddeler katılmalıdır. Uygulanan potansiyelde çözücülerin elektrokimyasal olarak inaktif olması gerekir. Bu dedektörde en büyük problem elektrot (camsı karbon) yüzeyinin kirlenmesidir. Optik dedektörler kadar kullanımı yaygın olmasa da duyarlılık, basitlik ve kullanım açısından daha avantajlıdır.

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

UV-görünür bölge dedektörler : Çoğu ilaç analizinde kullanılan UV-Görünür Bölge dedektörler, maddenin ışığı absorplayıp absorplamadığını anlamak için ışık kaynağından gelen ışığın şiddetinin ölçülmesi amacıyla kullanılan dedektörlerdir. Bunlar iki tiptir: Sabit dalga boylu dedektörler; basit bir dedektör olup, dalga boyunun seçimi için farklı interferanslı filtreler kullanılır. Bu dedektörlerde genellikle UV kaynağı olarak civa lambası kullanılır. Bunun dışında alternatif ışık kaynakları ile daha değişik dalga boylarını gözlemekte mümkündür.

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

Diyod sıralı dedektörler : Değişken dalga boylu UV-Görünür Bölge dedektörlerdir. Hem sabit hem de taramalı dalga boylarında incelemeye müsait olan dedektörlerdir. Diyod array dedektörler, seçimlilik ve hassasiyet açısından değişken dalga boylu UV dedektör ile aynı avantajlara sahiptir. Bunlara ek olarak;

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

2.5.6.6. Kolonlar

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

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

Son yıllarda hız ve minimum çözücü sarfıyatı bakımından diğer kolonlara göre üstünlük sağlayan daha küçük boyutlarda yüksek hız ve yüksek performanslı kolon üretimi de söz konusudur. Bu kolonlar ile 15 saniye içinde 8 farklı tipte maddenin birbirinden ayrılması mümkündür [33, 43, 44].

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

Bu emniyet kolonunun tanecik boyutu, basınç düşüşünü en aza indirmek amacıyla genellikle büyüktür. Emniyet kolonundaki dolgu maddesi analitik kolondaki dolgu maddelerinin benzeridir. Emniyet kolonu kirlendiği zaman yenisiyle değiştirilmek suretiyle daha pahalı olan analitik kolonun korunması sağlanır [33, 44].

Kolon termostatları : Kolonların sıcaklığını kontrol etmek gerekli olmakla birlikte genellikle kolonlar oda sıcaklığında kullanılırlar. Ancak kolon sıcaklığı sabit tutulduğu zaman elde edilen kromatogramların daha iyi olduğu gözlenmiştir. Buna dayalı olarak, kolonların sıcaklığının 100-150⁰C'ye kadar her sıcaklıkta sabit tutabilen kolon ısıtıcıları ve kolonların bağlı bulunduğu sabit sıcaklıktaki bir su banyosu tarafından beslenen su ceketini kullanımı da mümkündür.

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

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

Enjeksiyon sistemi-kolon ve kolon-dedektör arasındaki bağlantı borularının uzunluğunun mümkün olduğu kadar küçük tutulması istenir. Kolon çıkışına ve dedektör sistemine bağlanmış boruların en iyisi, hareketli fazla önemsiz ölçüde seyrelmeye izin veren minimum ölü hacme sahip olanıdır. Bu örnek seyrelmesini engelleyen, 0,025-0,050 cm iç çapa sahip (çelik ve teflon) bağlantı borularının kullanılması ile başarılıdır.

HPLC çalışmalarında sabit faz olarak genellikle silikajel kullanılır. İçerdiği SiOH grupları nedeniyle zayıf asidik özellik gösteren silikajel, bazik özellik gösteren bileşikler bazlık kuvvetlerine göre tutar. Silikajel doğrudan dolgu maddesi olarak kullanıldığı gibi, katı yüzeyine film halinde de kaplanabilir. Asidik özellik gösteren bileşiklerin ayrılmasını sağlayan, yani bazik özellik taşıyan bir kolon dolgu maddesi de aluminadır. Bu dolgu maddesi de katı bir yüzeye film halinde kaplanarak kullanılır.

Elementel türlendirme amacı ile kullanılan dolgu maddesi ise genellikle anyon ve katyonları tutan iyon değiştirici reçinelerdir. Bu reçinelerin kullanılması durumunda

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

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

İyon değiştirme, iyonik türlerden birinin diğeriyle yer değiştirmesini içerir. Sabit faz, iyon değiştirici R⁺ vermek için, net pozitif yük taşıyan katı bir matriksten oluşur. Eğer anyon içeren hareketli faz kullanılırsa, R⁺ (iyon değiştirici taraf) negatif karşı iyonu kendine doğru çeker, böylece örnek anyonları (X⁻), karşı iyonlarla (Y⁻) yer değiştirir:

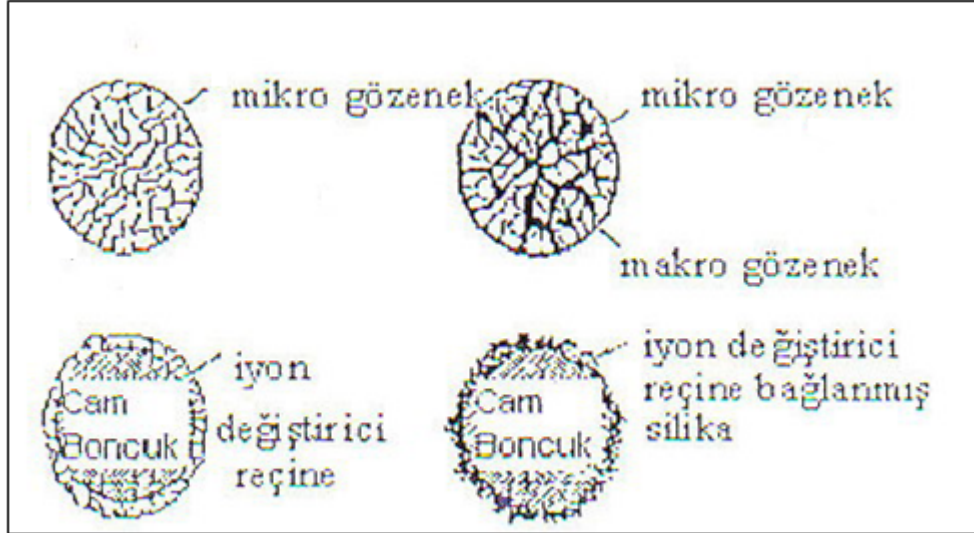


Bu yöntem anyon derişimi içerdiğinden, anyon değiştirme olarak bilinir. Yüzey, iyon değiştirici R⁻ vermek için, net negatif yük taşıdığı zaman katyon değiştirme olayı meydana gelir. Karşı iyonlar (Y⁺) ve örnek iyonlarının (X⁺) ikisi de katyondur ve iyon değiştirme şu şekilde olur:



Anyon ve katyon değiştirici reçinelerde gerçekleşen ayırma mekanizmaları Şekil 2.9.'da görülmektedir.

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



Şekil 2.10. Reçine tipleri: (a) Mikrogözenekli reçineler, (b) Makrogözenekli reçineler, (c) Pelikular reçineler, (d) Yüzeysel gözenekli reçineleri

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

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

Çapraz bağlanmanın miktarı, divilbenzen miktarı ile kontrol edilir. Genellikle her 11 mol stiren için 1 mol divilbenzen kullanılır. Çapraz bağlı polimerik zincirlerin oluşturulması için yaygın biçimde p-divinilbenzen kullanılmakta birlikte, divilbenzen de aynı işlevi görür. Polistirendivinilbenzen reçinesinin gözenekliliği ve mekanik kuvveti, çapraz bağlanma derecesinin bir fonksiyonudur. Yüksek dereceli çapraz bağlı reçineler (% 8-10) yüksek basınçta kullanılabilir, fakat küçük çaplı reçineler (% 2-8), büyük moleküllerin matrikse geçmesine izin verir ve çözünürlüğü arttırırlar.

Fakat mekanik kararlılıkları düşüktür. Bu destek maddelerin avantajı pH=2-12 aralığında kararlı olmalarıdır.

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

b) Silika temelli iyon değiştiriciler: Silika temelinde iyon değiştiren matriksler hidrofilitir ve polimerik tabaka oluşması için kullanılan çapraz bağlayıcılar yüzünden düşük hidrofobik tutunma gösterirler. Küçük parçacık büyüklükleri ve sık dağılımları yüksek kaliteli bir ayırma sağlar. Gözenekli yüzeylerinden dolayı, hareketli faza önemli bir temas yüzeyi sağlarlar. Kimyasal ve mekanik olarak kararlı olan silika matriksleri, yüksek akış hızı gerektiren yüksek basınca karşı iyi direnç gösterirler. pH=2,5-7 aralığındaki sulu tamponlar ve pek çok organik çözücüler, matrikste şişme veya büzülme olmaksızın kullanılabilirler. Bunlar mikro ve makro reçineler arasında bir yerde düşünülür ve iyon değiştirme fazı ince polimerik ağa monomerik bağlanmış olabilir. Silika temelindeki reçinenin avantajı, polistiren temelindeki iyon değiştirici reğineden mL kolon hacmi başına daha büyük değiştirme kapasitesine sahip olmasıdır. Bununla birlikte silika bazlı iyon değiştiricilerin birkaç sınırlaması vardır. Bunların bazik koşullar altında kullanımları sınırlıdır ve yüksek iyonik şiddet kolon ömrünü azaltır.

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

Tablo 2.6. İyon değiştirici reçinelerin sınıflandırılması

| Sınıflandırma | Fonksiyonel Grup | Polimerik destek |
|--------------------------------------------------|----------------------------------------------------|------------------|
| Kuvvetli bazik (Kuvvetli anyon değiştirici) | Tetraalkil-amonyum hidroksit | S-DVB |
| | $-\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_3^+\text{Cl}^-$ | S-DVB |
| | $-\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_3^+\text{OH}^-$ | S-DVB |
| | Tetraalkil-amonyumklorür | S-DVB |
| Oldukça bazik | $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ | S-DVB |
| Zayıf bazik | $-\text{NH}_2$ | S-DVB |
| | $-\text{NH}_2$ | S-DVB |
| Kuvvetli asidik (Kuvvetli kation değiştirici) | $-\text{SO}_3^-\text{H}^+$ | S-DVB |
| Zayıf asidik | $-\text{SO}_3^-\text{Na}^+$ | S-DVB |
| | $-\text{COOH}^+$ | S-DVB |

2.5.6.7. Kaydedici

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

2.5.7. HPLC yönteminin avantajları

1. Duyarlı bir yöntem olması,
2. Doğru ve kantitatif tayinlere kolayca uygulanabilir olması,

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

2.5.8. HPLC yönteminin dezavantajları

1. Ekonomik olarak pahalı sabit faz ve hareketli faz sistemlerine gereksinim göstermektedir.
2. Hareketli faz sistemlerinin mutlaka pahalı membran sistemlerinden süzülmesi gerekmektedir [32].

2.5.9. Yüksek performanslı sıvı kromatografisinin uygulama alanları

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

2.5.9.1. Saflaştırma

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

2.5.9.2. Kalitatif analiz

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

2.5.9.3. Kantitatif analiz

HPLC'nin çalışmalarda çok kullanılması, onun kantitatif analizlerde kullanılabilir olmasından kaynaklanmaktadır. Kantitatif analizde, analit pik yüksekliği veya pik alan değerleri derişime karşı grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi elde edilir. Sonra bilinmeyen maddenin derişimi kalibrasyon eğrisi yardımıyla bulunur [38, 39].

BÖLÜM 3. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

3.1. Kromatografik Şartlar

Geliştirilen HPLC yöntemi için izokratik pompa sistemi kullanılarak, UV-DAD dedektörüyle 200-400 nm arası bölge taratılmış ve Gliseril Gayakolat ile Efedrin HCl'ün 212 nm'de maksimum absorpsiyon gösterdiği tespit edilmiştir. 212, 224, 254, 256 ve 272 nm dalga boylarının her birinde ayrı ayrı kromatogramlar alınmış ve en uygun dalga boyu olarak 212 nm'de bütün kromatogramlar kaydedilmiştir. HPLC sisteminde yapılan denemeler sonucunda, 18°C ters-faz kolonu kullanılarak, 25°C 'lik kolon fırını sıcaklığı, 10 μL 'lik enjeksiyon hacmi ve 1 mL dk^{-1} 'lik akış hızı sistem için en uygun şartlar olarak seçilmiştir. Bu şartlarda alınan kromatogramlardan Gliseril Gayakolat ve Efedrin HCl için alıkonma zamanı için sırasıyla 6.45, 3.98 (RT) dk olarak tespit edilmiştir. Mobil faz için metanol-su, metanol-asetonitril, su-asetonitril, asetonitril-fosfat tamponu, metanol-fosfat tamponu gibi yüzdesi farklı kombinasyonlar (40:60, 50:50, 20:80, 5:95 gibi) kullanılarak optimize edilmiştir. Farklı mobil faz denemeleri sonucunda, en uygun izokratik mobil faz karışımı olarak tespit edilen 60:40 oranında pH=3 fosfat tamponu-metanol karışımı kullanılmıştır. Kolonu temizlemek için de, önce belli bir süre deiyonize su ile kolon yıkanarak, daha sonra 70:30 oranında metanol-deiyonize su karışımı ile yıkama periyodu tamamlanmıştır. Hazırlanan mobil faz ve diğer bütün organik çözücüler 0,47 μm 'lik (nylon-47 mm) membran filtreden vakum altında süzöldükten sonra kullanılmıştır.

3.2. Standart Çözeltilerin Hazırlanması

Gliseril Gayakolat'ın stok çözeltisi 100 mL'de 125 mg olacak şekilde, Efedrin HCl'ün stok çözeltisi ise 100 mL'de 62,5 mg olacak şekilde metanol içerisinde hazırlanmıştır. Standart çözeltiler ise Gliseril Gayakolat ve Efedrin HCl'ün sırasıyla 30-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 15-50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, konsantrasyon aralıklarında hazırlanarak, kalibrasyon

eğrisi için bu stoklardan Gliseril Gayakolat için 30-40-50-60-70-80-90-100 µg /mL, Efedrin HCl için ise 15-20-25-30-35-40-45-50 µg /mL, olacak şekilde kısımlar alınarak metanol ile 25'er mL'ye seyreltilmiştir.

Geri kazanım çalışmaları için Gliseril Gayakolat (30-35-40-50-55-60-70-75-80-85-90-100 µg/mL) ve Efedrin HCl (15-17,5-20-22,5-25-30-32,5-35-40-45-47,5-50 µg/mL) için yeni standartlar hazırlanmıştır. Ana stoktan hazırlanan bu çözeltiler 25'er mL'ye metanol ile tamamlanmıştır.

Hazırlanan bütün standartlar, kullanılıncaya kadar +4°C'de buzdolabında saklanmış ve kullanılmadan önce oda sıcaklığına getirilerek, vorteks ile 5-10 dk ile karıştırılıp kullanılmaya hazır hale getirilmiştir.

3.3. Ticari Çözeltilerin Hazırlanması

Pedrin adlı ticari şurupdan 1250 µg/mL Gliseril gayakolat ve 625 µg /mL Efedrin HCl olacak şekilde kısımlar alınmış (5 mL'de) ve metanol içerisinde stok çözeltiler hazırlamak için, bu çözeltiler 5-10 dk vortekslenmiştir. Daha sonra iyice çözünen bu stok çözeltilerden alınan belli bir miktardaki kısım, 100 µg/1.25 mL Gliseril Gayakolat, 15 µg/1.25 mL Efedrin HCl içerecek şekilde alınarak, toplam 6 ticari şurup standardı hazırlanmıştır.

3.4. Standart Ekleme Yöntemi Kullanılarak Standart Çözeltilerinin Hazırlanması

25 mL'lik balon joje içerisine Gliseril Gayakolat ve Efedrin HCl stok çözeltilerinden sırasıyla 52, 60, 68, 76, 84 µg/mL ve 7.8, 9, 10.2, 11.4, 12.6 µg/mL olacak şekilde ilave edilerek, 5 ayrı çözelti hazırlanmıştır. Daha sonra aynı balon jojeler içerisine ticari stok çözeltisinden de Gliseril Gayakolat için 16, 24, 32, 40, 48 µg/mL Efedrin HCl için ise 2.4, 3.6, 4.8, 6, 7.2 µg/mL olacak şekilde ilave edilmiş ve hepsinin toplam 100 µg/mL Gliseril Gayakolat ve toplam 15 µg/mL Efedrin HCl standartları olması sağlanmıştır. Daha sonra her biri 25 mL'ye metanol ile seyreltilmiştir.

3.5. Plazmalı Standart Çözeltilerin Hazırlanması

İnsan plazması, doğal olarak çözünmesi için oda sıcaklığında bekletilmiştir. Plazma numuneleri, in vitro olarak standart çözeltilerden plazma üzerine ilave edilmesi (spike) yöntemi ile hazırlanmıştır. 1'er mL insan plazması üzerine Gliseril Gayakolat ise 30-40-50-60-70-80-90-100 µg/mL, Efedrin HCl 15-20-25-30-35-40-45-50 µg/mL olacak şekilde eklenip 25 mL'ye metanol ile seyreltilerek, her ikisi için ayrı ayrı 8 standart çözelti hazırlanmış ve kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur. Bütün plazma numuneleri 5-10 dk vorteks ile karıştırılmıştır. Daha sonra bu numunelerden santrifüj tüplerine alınan kısımlar 6000 devir dk⁻¹'da 20-30 dk santrifüjlenerek proteinlerin çökmesi sağlanmıştır. Böylece ekstraksiyonsuz bir şekilde tüm plazma numuneleri kolayca hazırlanmıştır.

Plazmalı geri kazanım çalışmalarının için de; 1'er mL plazma örnekleri üzerine Gliseril Gayakolat için 30-35-40-50-55-60-70-75-80-85-90-100 µg/mL ve Efedrin HCl için ise 15-17.5-20-22.5-25-30-32.5-35-40-45-47.5-50 µg/mL olacak şekilde stok çözeltilerinden ilave edilmiştir ve her biri ayrı ayrı 25 mL'ye metanolla seyreltilmiştir.

3.6. Plazma İçeren Ticari Çözeltilerin Hazırlanması

1'er mL plazma örnekleri üzerine, Pedrin (100 mg/5 mL Gliseril Gayakolat ve 15 mg/5 mL Efedrin HCl içeren) ticari şurupdan hazırlanan stok çözeltilerden alınan yine 1,25'er mL'lik kısımlar eklenilerek, her biri metanol ile 25 mL'ye seyreltilmiştir ve aynı şekilde 6 adet ticari standart numune hazırlanmıştır.

3.7. Plazmada Standart Ekleme Yöntemi Kullanılarak Standart Çözeltilerinin Hazırlanması

5 ayrı 25 mL'lik balon jöje içerisine, 1'er mL plazma numunesi ve üzerlerine Gliseril Gayakolat ve Efedrin HCl ve stok çözeltilerinden sırasıyla 52, 60, 68, 76, 84 µg/mL ve 7.8, 9, 10.2, 11.4, 12.6 µg/mL olacak şekilde standartlardan alınan miktarlar ilave edilmiştir. Daha sonra aynı balon jöjelere ticari stok çözeltilerinden yine Gliseril

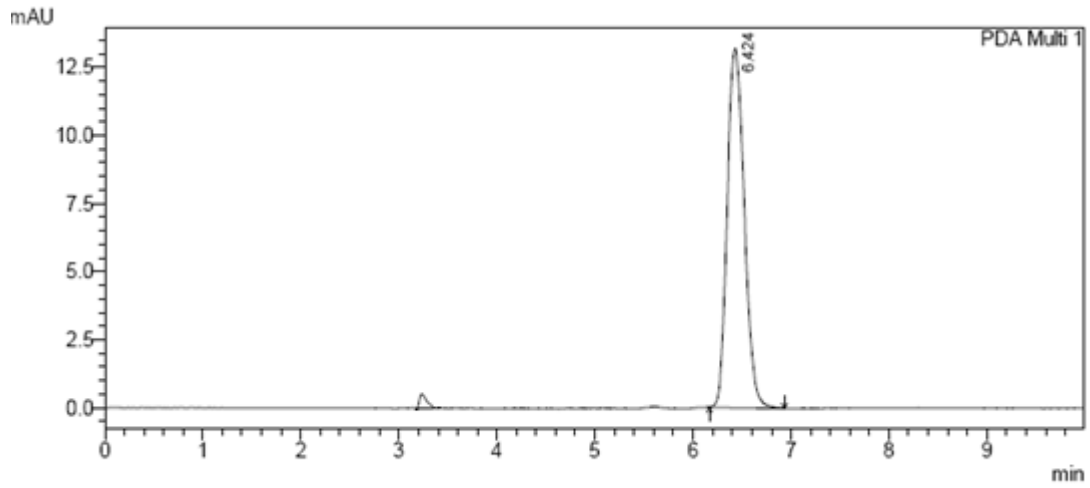
Gayakolat için ise 16, 24, 32, 40, 48 µg/mL ve Efedrin HCl için 2.4, 3.6, 4.8, 6, 7.2 µg/mL olacak şekilde miktarlar ilave edilmiştir ve her biri metanol ile 25 mL'ye seyreltilmiştir. Hepsinin içerisinde toplam 100 µg/mL Gliseril Gayakolat ve 15 µg/mL Efedrin HCl bulunması sağlanmıştır.

Hazırlanan bütün standartlar, kullanılıncaya kadar +4°C'de buzdolabında saklanmış ve kullanılmadan önce de oda sıcaklığına getirilerek, vorteks ile 5-10 dk karıştırılıp, kullanılmaya hazır hale getirilmiştir.

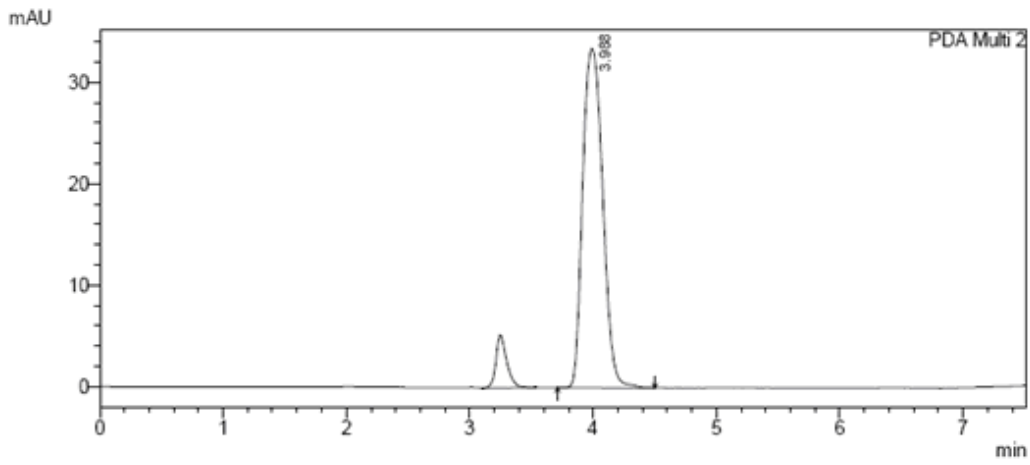
3.8. HPLC Yöntemi ile Elde Edilen Bulgular

3.8.1. Standart çözeltilerin hazırlanması

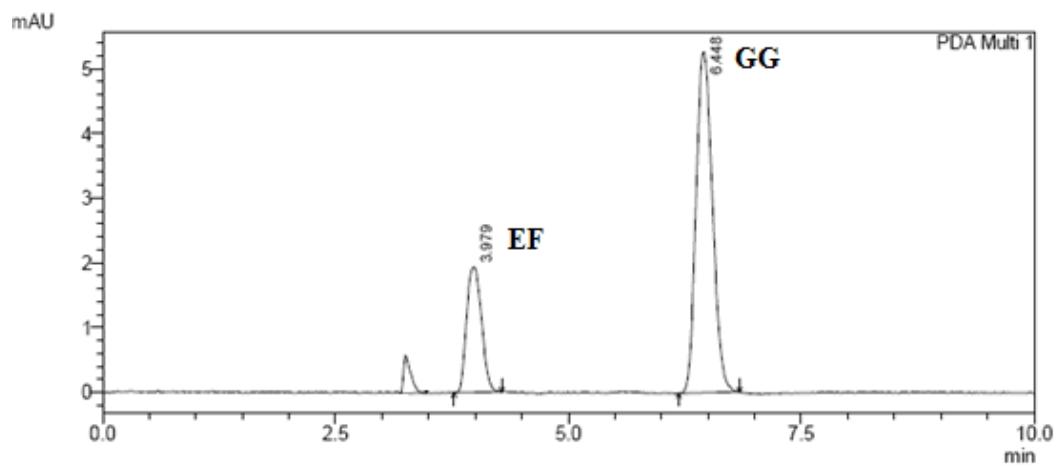
1250 µg /mL derişiminde Gliseril Gayakolat ve 625 µg /mL derişiminde Efedrin HCl olacak şekilde metanol içerisinde her iki etken maddenin stok çözeltileri hazırlandı. Bu stok çözeltilerden belirli miktarlarda alınıp, her biri HPLC-grade metanol ile seyreltilerek, Gliseril Gayakolat için 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 µg /mL derişimlerinde ve Efedrin HCl için de 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 µg /mL derişimlerinde bir seri standart çalışma çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan tüm çözeltiler, 45 µm çapındaki filtrelerden süzülerek viallere konuldu. Cihazda 200-272 nm dalga boyu aralığında tarama yapıldı ve ölçümler için uygun dalga boyu olarak 212 nm seçildi. Hazırlanan çalışma çözeltilerinin sinyalleri Diyot Array Dedektör ile kaydedildi. Elde edilen kromatogramların bazıları Şekil 3.1., Şekil 3.2. ve Şekil 3.3.'de verilmiştir.



Şekil 3.1. 90 µg/mL'lik Gliseril Gayakolat'a ait kromatogram



Şekil 3.2. 20 µg/mL'lik Efedrin HCl'e ait kromatogram

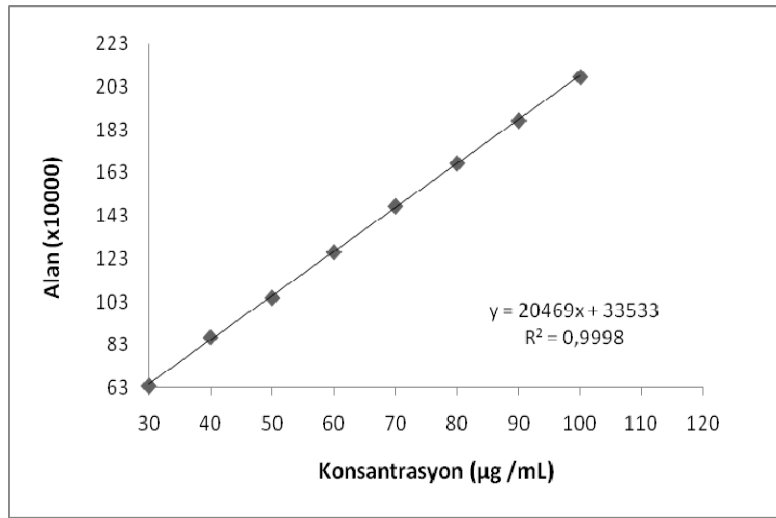


Şekil 3.3. 47,5 µg/mL'lik Efedrin HCl ve 35 µg/mL'lik Gliseril Gayakolat ait kromatogram

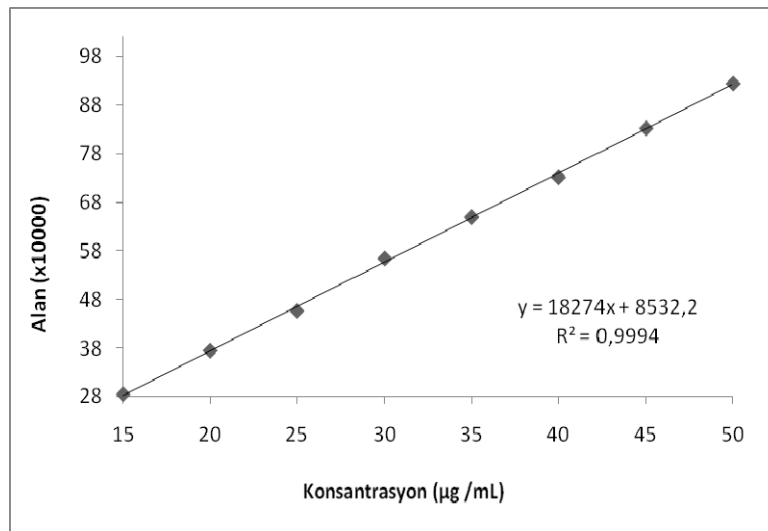
3.8.2. Yöntemin validasyonu

3.8.2.1. Doğrusallık aralığı ve kalibrasyon eğrileri

Kalibrasyon eğrileri, Gliseril Gayakolat ve Efedrin HCl'ün derişimlerine karşı elde edilen pik alanlarının grafiğe geçirilmesi ile hazırlanmıştır.



Şekil 3.4. HPLC-DAD sisteminde Gliseril Gayakolat'ın standart çözeltilerinin kalibrasyon eğrisi



Şekil 3.5. HPLC-DAD sisteminde Efedrin HCl'ün standart çözeltilerinin kalibrasyon eğrisi

Standart Gliseril Gayakolat ve Efedrin HCl çözeltileri için elde edilen regresyon denklemleri, regresyon katsayıları, eğimleri ve kaymalarının standart sapmaları Tablo 3.1. ve Tablo 3.2.'de verilmiştir.

Tablo 3.1. HPLC-DAD sisteminde Gliseril Gayakolat standart çözeltilerinden elde edilmiş istatistiksel analiz sonuçları (212 nm'de) (n=6)

| Doğrusal Aralık (µg /mL) | LR (Regresyon Doğrusu Denklemi) | S_b | S_m | r (Regresyon katsayısı) |
|---------------------------------|----------------------------------------|----------------------|----------------------|--------------------------------|
| 30-100 | $y = 20469x + 33533$ | 607848,67 | 8238,71 | 0,9998 |

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

Tablo 3.2. HPLC-DAD sisteminde Efedrin HCl'ün standart çözeltilerinden elde edilmiş istatistiksel analiz sonuçları (212nm'de) (n=6)

| Doğrusal Aralık (µg /mL) | LR (Regresyon Doğrusu Denklemi) | S_b | S_m | r (Regresyon katsayısı) |
|---------------------------------|----------------------------------------|----------------------|----------------------|--------------------------------|
| 15-50 | $y = 18274x + 8532,2$ | 18825,54 | 8165,09 | 0,9994 |

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

3.8.2.2. Kesinlik ve tekrarlanabilirlik

Yöntemin kesinliği, konsantrasyon eğrisi aralığından seçilen 3 farklı konsantrasyon ile (Gliseril Gayakolat için 30, 60 ve 90 µg /mL, Efedrin HCl için 20, 30 ve 40 µg /mL) gün-içi olarak belli aralıklarda toplam 6 kez (tekrarlanabilirlik için) ve günler-arası kesinlik için ise 3 gün peş peşe belli aralıklarla ölçümler alınmıştır. Gün-içi ve günler-arası kesinlik ve tekrarlanabilirlik sonuçları, bulunan değerlerin ortalaması, standart sapması ve bağıl standart sapması şeklinde Tablo 3.3.'de verilmiştir.

Tablo 3.3. Gliseril Gayakolat standart çözeltilerinin gün-içi ve günler-arası kesinlik ve tekrarlanabilirlik analiz sonuçları (n=6)

| Derişim (µg/mL) | Gün-içi | | | | Günler-arası | | | |
|--------------------|----------------------------------------------------------------|---------|----------|-------|----------------------------------------------------------------|----------|---------|-------|
| | Alan | X | SD | % RSD | Alan | X | SD | % RSD |
| 30 | 639620 638879 639899 638640 637904 638620 | 638927 | 728,08 | 0,11 | 634620 636479 637006 627647 632498 640389 | 634773,2 | 4368,41 | 0,69 |
| 60 | 1271941 1251477 1270886 1252608 1250343 1269206 | 1261077 | 10577,58 | 0,84 | 1251941 1251477 1256158 1255851 1249279 1246858 | 1251927 | 3638,92 | 0,29 |
| 90 | 1950400 1856342 1860136 1858815 1859334 1854689 | 1873286 | 37832,54 | 2,02 | 1856342 1860136 1860125 1862761 1856136 1866023 | 1860254 | 3791,01 | 0,20 |

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

Tablo 3.4. Efedrin HCl standart çözeltilerinin gün-içi ve günler-arası kesinlik ve tekrarlanabilirlik analiz sonuçları (n=6)

| Derişim (µg/mL) | Gün-içi | | | | Günler-arası | | | |
|--------------------|----------------------------------------------------------|--------|---------|-------|----------------------------------------------------------|--------|---------|-------|
| | Alan | X | SD | % RSD | Alan | X | SD | % RSD |
| 20 | 375658 375338 375167 374279 374546 373739 | 374788 | 724,03 | 0,19 | 377306 377806 378236 375713 375658 375338 | 376676 | 1253,90 | 0,33 |
| 30 | 565229 564493 565988 564022 563221 563309 | 564377 | 1089,74 | 0,19 | 566628 567766 567469 570051 565229 564493 | 566939 | 1982,58 | 0,35 |
| 40 | 731452 732442 731856 727636 734004 733408 | 731800 | 2250,27 | 0,31 | 736852 736866 737339 736883 731452 732442 | 735306 | 2626,77 | 0,36 |

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

Metanol içerisinde alınan ölçümlerde, Gliseril Gayakolat'ın gün-içi RSD'leri % 0,11-2,02 değerleri arasında bulunurken, Efedrin HCl için RSD'ler % 0,10-0,67 arasında bulunmuştur. Günler-arası RSD'lerin ise Gliseril Gayakolat için % 0,20-0,69 değerleri arasında ve Efedrin HCl için ise, % 0,33- 0,36 değerleri arasında değiştiği tespit edilmiştir. Bu hesaplanan değerlerden elde edilen tayin edilebilen en küçük derişim, yani miktar tayin limiti olan LOQ değerleri; Gliseril Gayakolat için 4,06 µg/mL ve Efedrin HCl için ise 3,23 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Tespit sınırı olarak tayin edilen LOD ise Gliseril Gayakolat için 1,12 µg/mL, Efedrin HCl için ise 0,97 µg/mL olarak tespit edilmiştir. Her iki etken madde için gün-içi ve günler-arası RSD'lerin oldukça iyi kesinlikler verdiği de gözlenmiştir. Kesinlik tayini için gün-içi ve günler-arası ölçümlerdeki RSD'lerin < % 10 ve LOQ'nin de < % 20 olması ve ayrıca doğruluk için günler-arası ortalama değer (X), gerçek değer \pm % 15 içinde ve LOQ'nun da \pm % 20'den fazla sapmaması koşulunu sağladığı tespit edilmiştir. Duyarlılık için ise, günler-arası RSD değerleri içinde, LOQ'in < % 20 olduğu ve değerlerin kendi aralarında tekrarlanabilirliği sağladığı da tespit edilmiştir.

3.8.2.3. Geri kazanım

Farmasötik preparattan geri kazanım çalışmaları, stok çözeltilerden belirli hacimlerde katılarak hazırlanan bir seri standart çözeltisiyle yapılmıştır. Gliseril Gayakolat için 30, 35, 40, 50, 55, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 100 µg /mL konsantrasyonlarında ve Efedrin HCl için ise 15, 17.5, 20, 22.5, 25, 30, 32.5, 35, 40, 45, 47.5, 50 µg /mL konsantrasyonlarında olacak şekilde 25 ml'lik balon jojeler içerisinde metanol ile 12 farklı geri kazanım çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan bu çözeltilerde Gliseril Gayakolat ve Efedrin HCl'ün eklenen miktarları HPLC'de elde edilmeye çalışılmıştır. Sonuçlar Tablo 3.5.'de verilmiştir.

Tablo 3.5. Gliseril Gayakolat ve Efedrin HCl için elde edilen geri kazanım değerleri

| Gliseril Gayakolat (µg /mL) | | | | Efedrin HCl (µg /mL) | | | |
|--------------------------------|--------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------|-------------------------|-------------------------|
| Eklene n (µg/mL) | Bulunan (µg/mL) | Geri Kazanım* (%) | Doğruluk BH** (%) | Eklene n (µg/mL) | Bulunan (µg/mL) | Geri Kazanım* (%) | Doğruluk BH** (%) |
| 30 | 29,69 | 98,97 | -1,03 | 15 | 15,51 | 103,41 | 3,40 |
| 35 | 34,94 | 99,83 | -0,17 | 17,5 | 18,70 | 106,86 | 6,86 |
| 40 | 38,21 | 95,52 | -4,47 | 20 | 19,00 | 95,04 | -5,00 |
| 50 | 48,80 | 97,59 | -2,40 | 22,5 | 23,18 | 103,03 | 3,02 |
| 55 | 54,75 | 99,54 | -0,45 | 25 | 24,07 | 96,28 | -3,72 |
| 60 | 58,96 | 98,27 | -1,73 | 30 | 28,80 | 96,00 | -4,00 |
| 70 | 67,13 | 95,90 | -4,10 | 32,5 | 31,93 | 98,24 | -1,75 |
| 75 | 73,37 | 97,82 | -2,17 | 35 | 34,79 | 99,40 | -0,60 |
| 80 | 79,21 | 99,02 | -0,99 | 40 | 39,93 | 99,81 | -0,18 |
| 85 | 82,45 | 97,00 | -3,00 | 45 | 43,00 | 95,57 | -4,44 |
| 90 | 89,85 | 99,83 | -0,17 | 47,5 | 44,95 | 94,62 | -5,37 |
| 100 | 102,32 | 102,32 | 2,32 | 50 | 49,73 | 99,46 | -0,54 |

*Geri Kazanım = Bulunan Miktar/Bilinen Miktar x 100, ** Bağı l Hata= Bulunan Miktar-Bilinen Miktar/Bilinen Miktar X 100

3.8.2.4. Yöntemin farmasötik preparatlara uygulanması

Yöntem, 100 mg Gliseril Gayakolat ve 15 mg Efedrin HCl/5 mL içeren Pedrin ticari preparatına (şurup) uygulanmıştır. Bu preparattan metanol içerisinde 100 mg Gliseril Gayakolat ve 15 mg Efedrin HCl içerecek şekilde, numuneler (6 kez tekrar edilerek) hazırlanmıştır. Bu numunelerden elde edilen tekrarlanabilirlik, SD ve RSD değerleri Tablo 3.6.'da ve % geri kazanımlar, kesinlik ve doğruluk değerleri ise Tablo 3.7.'de özetlenmiştir.

Tablo 3.6. Farmasötik preparatlarda Gliseril Gayakolat ve Efedrin HCl için elde edilen tekrarlanabilirlik değerleri (n=6)

| Gliseril Gayakolat (µg /mL) | | Efedrin HCl (µg /mL) | |
|--------------------------------|--------------------|-------------------------|--------------------|
| Eklene n (µg/mL) | Bulunan (µg/mL) | Eklene n (µg/mL) | Bulunan (µg/mL) |
| 100 | 107,83 | 15 | 14,83 |
| 100 | 100,15 | 15 | 14,33 |
| 100 | 101,68 | 15 | 14,69 |
| 100 | 99,42 | 15 | 14,21 |
| 100 | 101,48 | 15 | 14,47 |
| 100 | 107,68 | 15 | 14,89 |
| SD | 3,75 | SD | 0,28 |
| RSD | 3,64 | RSD | 1,89 |

Tablo 3.7. Farmasötik preparatlarda Gliseril Gayakolat ve Efedrin HCl için elde edilen geri kazanım değerleri (n=6)

| Gliseril Gayakolat (µg /mL) | | | | Efedrin HCl (µg /mL) | | | |
|--------------------------------|--------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------|-------------------------|-------------------------|
| Eklene n (µg/mL) | Bulunan (µg/mL) | Geri Kazanım* (%) | Doğruluk BH** (%) | Eklene n (µg/mL) | Bulunan (µg/mL) | Geri Kazanım* (%) | Doğruluk BH** (%) |
| 100 | 107,83 | 107,83 | 7,83 | 15 | 14,83 | 98,89 | -1,13 |
| 100 | 100,15 | 100,15 | 0,15 | 15 | 14,33 | 95,51 | -4,47 |
| 100 | 101,68 | 101,68 | 1,68 | 15 | 14,69 | 97,93 | -2,07 |
| 100 | 99,42 | 99,42 | -0,58 | 15 | 14,21 | 94,76 | -5,27 |
| 100 | 101,48 | 101,48 | 1,48 | 15 | 14,47 | 96,49 | -3,53 |
| 100 | 107,68 | 107,68 | 7,68 | 15 | 14,89 | 99,25 | -0,73 |

*Geri Kazanım = Bulunan Miktar/Bilinen Miktar x 100, ** Bağlı Hata= Bulunan Miktar-Bilinen Miktar/Bilinen Miktar X 100

3.8.2.5. Standart ekleme yöntemi ile elde edilen sonuçlar

Gliseril Gayakolat stok çözeltisinden (52, 60, 68, 76, 84 µg /mL) belirli hacimlerde ve Efedrin HCl stok çözeltisinden de (7.8, 9, 10.2, 11.4, 12.6 µg /mL) yine belirli hacimlerde 5 ayrı miktar çekilerek, ticari şurup stok çözeltisinden ise Gliseril Gayakolat için 48, 40, 32, 24, 16 µg /mL ve Efedrin HCl için ise 7.2, 6, 4.8, 3.6, 2.4 µg /mL olacak şekilde miktarlar alınarak üzerlerine ilave edilmiştir. Hepsinin toplam 100 µg /mL Gliseril Gayakolat ve 15 µg /mL Efedrin HCl standartları olması sağlanmıştır. Katılan Gliseril Gayakolat ve Efedrin HCl standartları ile birlikte eklenen ticari standartlardan elde edilen geri kazanım, SD ve RSD değerleri Tablo 3.8.'de görülmektedir.

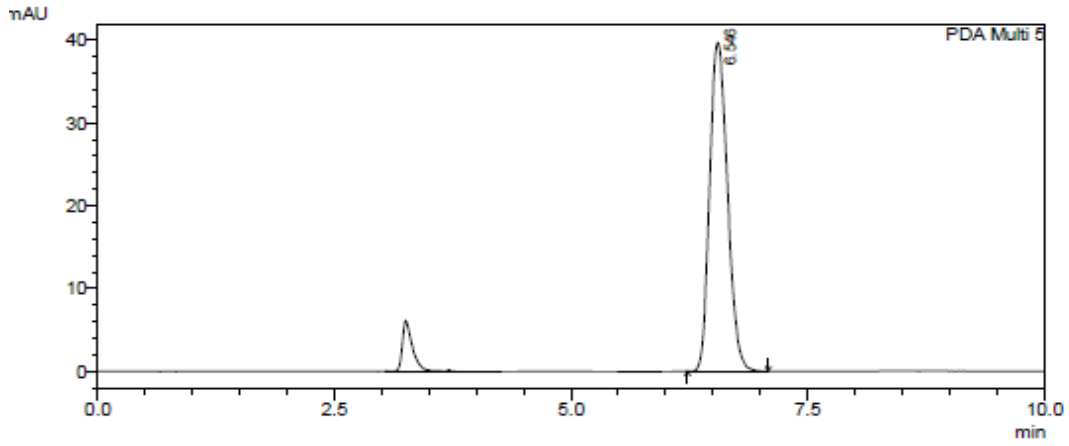
Tablo 3.8. Standart ekleme yöntemi ile elde edilen sonuçlar

| Gliseril Gayakolat ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | | | Efedrin HCl ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | | |
|--------------------------------------------------------------------------------|---------------------|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------|---------------------|
| Eklenen Miktar ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | | | | Eklenen Miktar ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | |
| Şurup Çözeltilisi | Standart Çözelti | Bulunan Miktar ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | Bulunan Miktar ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | Şurup Çözeltilisi | Standart Çözelti |
| 48 | 52 | 98,83 | 14,37 | 7,2 | 7,8 |
| 40 | 60 | 103,55 | 15,02 | 6,0 | 9,0 |
| 32 | 68 | 104,28 | 15,41 | 4,8 | 10,2 |
| 24 | 76 | 103,88 | 15,30 | 3,6 | 11,4 |
| 16 | 84 | 103,23 | 15,01 | 2,4 | 12,6 |
| Ortalama Geri Kazanım (%) | | 102,76 | 100,13 | | |
| Bulunan Ortalama Konsantrasyon ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | | 102,76 | 15,02 | | |
| Standart Sapma (SD) | | 2,23 | 0,40 | | |
| Bağıl Standart Sapma (% RSD) | | 2,17 | 2,67 | | |

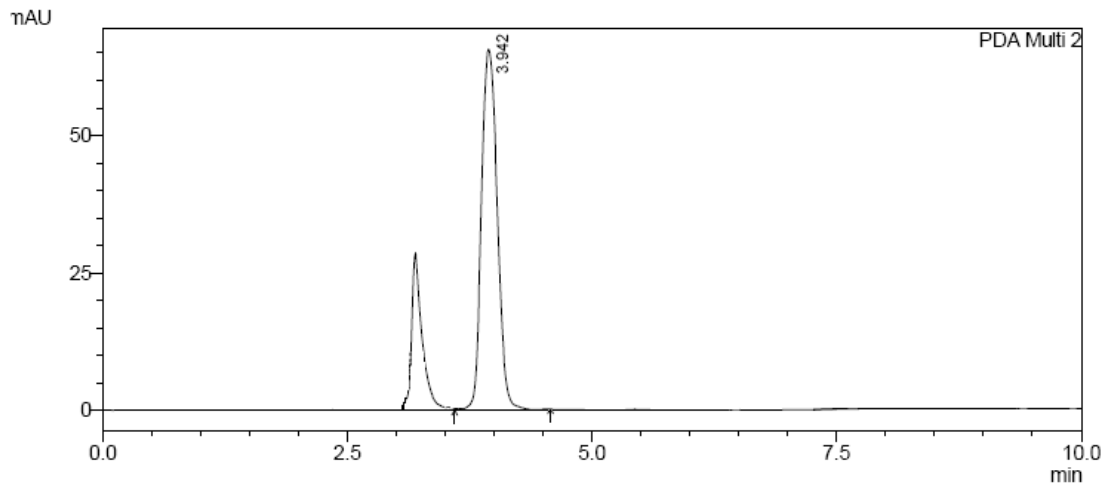
3.8.3. Plazma çalışmaları

3.8.3.1. Plazma standart çözeltilerin hazırlanması

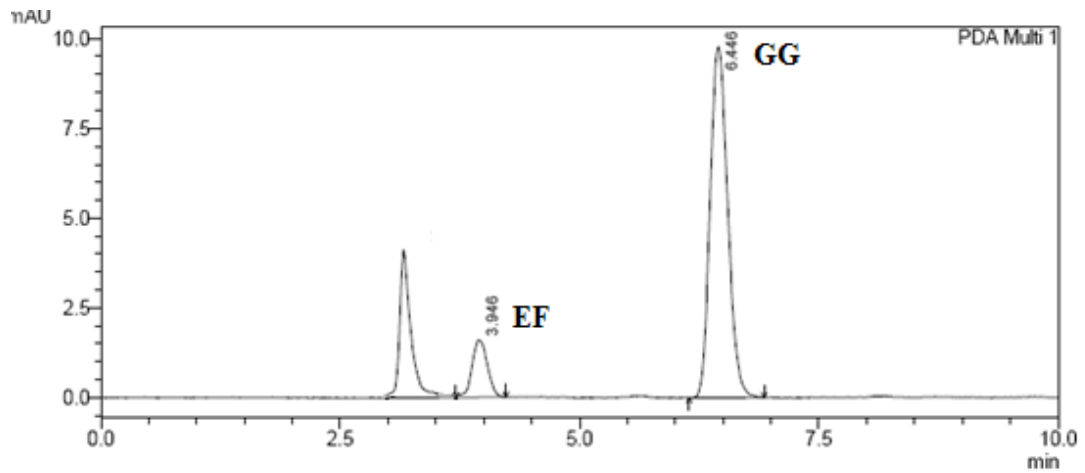
1250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ derişimde hazırlanmış olan Gliseril Gayakolat stok çözeltisi ve 625 $\mu\text{g}/\text{mL}$ derişimde hazırlanmış olan Efedrin HCl stok çözeltisinden plazma numunesine belirli miktarlarda eklenerek bir seri standart çözeltiler (30-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Gliseril Gayakolat ve 15-50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Efedrin HCl) hazırlanmıştır. Ekleme işlemi (spike) Santrifüj yapıldıktan sonra, hiçbir sıvı-sıvı ekstrasyon işlemine gerek kalmadan elde edilen ekstraktlar HPLC-DAD sistemine enjekte edilerek, kromatogramları alınmıştır (Şekil 3.6, Şekil 3.7 ve Şekil 3.8.). Daha sonra bu yeni plazmalı standartlardan elde edilen kromatogram verilerinden alanlardan kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur.



Şekil 3.6. Plazmalı ortamda 80 µg /mL'lik Gliseril Gayakolat'a ait kromatogram



Şekil 3.7. Plazmalı ortamda 40 µg /mL'lik Efedrin HCl'e ait kromatogram

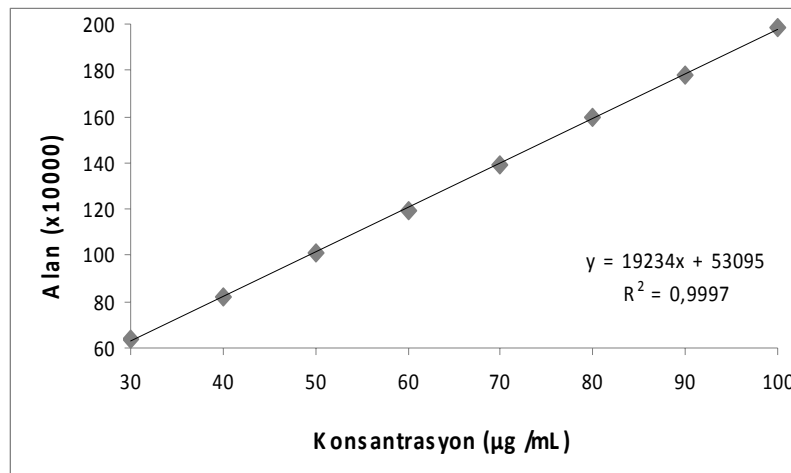


Şekil 3.8. Plazmalı ortamda 17,5 µg /mL Efedrin HCl ve 75 µg /mL'lik Gliseril Gayakolat'a ait kromatogram

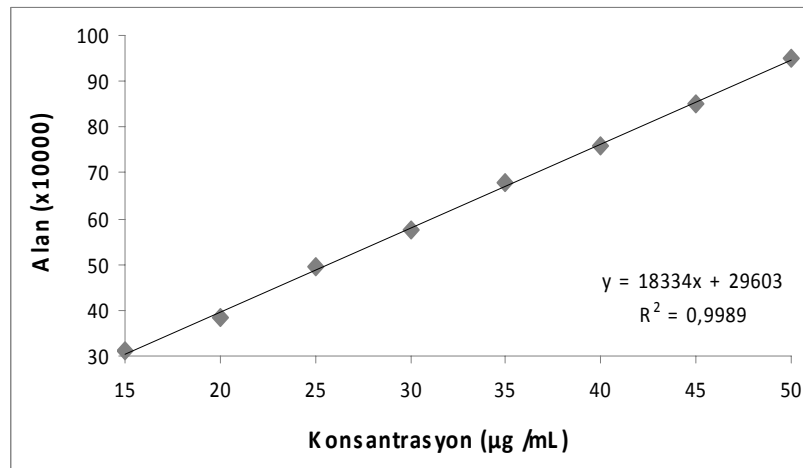
3.8.4. Plazmada yöntem validasyonu

3.8.4.1. Doğrusallık aralığı ve kalibrasyon eğrileri

Kromatogramlar, plazmadan ekstrakte edilen 30-100 µg /mL derişim aralığında Gliseril Gayakolat ve 15-50 µg /mL derişim aralığında Efedrin HCl çözeltilerinden ayrı ayrı elde edilmiştir. Kalibrasyon eğrileri ise çözeltilerin derişimlerine karşı okunan pik alan değerlerinin grafiğe geçirilmesi ile elde edilmiştir (Şekil 3.9. ve 3.10.).



Şekil 3.9. HPLC-DAD sisteminde plazmalı ortamda hazırlanan Gliseril Gayakolat çözeltilerinin kalibrasyon eğrisi



Şekil 3.10. HPLC-DAD sisteminde plazmalı ortamda hazırlanan Efedrin HCl çözeltilerinin kalibrasyon eğrisi

Standart Gliseril Gayakolat ve Efedrin HCl çözeltileri için elde edilen regresyon denklemleri, regresyon katsayıları, eğimleri ve kaymalarının standart sapmaları Tablo 3.9. ve Tablo 3.10.'de verilmiştir.

Tablo 3.9. HPLC-DAD sisteminde plazmalı Gliseril Gayakolat standart çözeltileri için elde edilmiş istatikselsel analiz sonuçları (212 nm'de) (n=6)

| Doğrusal Aralık (µg /mL) | LR (Regresyon Doğrusu Denklemi) | S _b | S _m | r (Regresyon katsayısı) |
|--------------------------|---------------------------------|----------------|----------------|-------------------------|
| 30-100 | $y = 19234x + 53095$ | 345091810,90 | 4677334,60 | 0,9997 |

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

Tablo 3.10. HPLC-DAD sisteminde plazmalı Efedrin HCl'ün standart çözeltilerinin istatikselsel analiz sonuçları (212nm'de) (n=6)

| Doğrusal Aralık (µg /mL) | LR (Regresyon Doğrusu Denklemi) | S _b | S _m | r (Regresyon katsayısı) |
|--------------------------|---------------------------------|----------------|----------------|-------------------------|
| 15-50 | $y = 18334x + 29603$ | 1975606,39 | 107108,60 | 0,9989 |

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

3.8.4.2. Kesinlik ve tekrarlanabilirlik

Yöntemin kesinliği plazmalı çözeltilere ait konsantrasyon eğrisi aralığından seçilen 3 farklı konsantrasyon ile Gliseril Gayakolat (30-60-90 µg /mL), Efedrin HCl için (20-30-40 µg /mL) belirli konsantrasyonlarda tekrarlanabilirlik için gün-içi ve günler-arası kesinlik değerleri belirlenmiştir. Bu değerleri belirlemek için; gün içinde belirli aralıklarla 6 kez ve 3 gün peş peşe belli aralıklarla 6 kez ölçülerek kesinlik çalışmaları yapılmıştır. Gün-içi ve günler-arası kesinlik ve tekrarlanabilirlik sonuçları, bulunan değerlerin ortalaması, standart sapması ve bağıl standart sapması ile verilmiştir. Sonuçlar Tablo 3.11. ve 3.12.'de özetlenmiştir.

Tablo 3.11. Plazma içerisindeki Gliseril Gayakolat standart çözeltilerinin gün-içi ve günler-arası kesinlik ve tekrarlanabilirlik analiz sonuçları (n=6)

| Derişim (µg/mL) | Gün-içi | | | | Günler-arası | | | |
|--------------------|----------------------------------------------------------------|-----------|----------|----------|----------------------------------------------------------------|-----------|----------|----------|
| | Alan | X | SD | % RSD | Alan | X | SD | % RSD |
| 30 | 638620 640856 638849 638510 639035 639029 | 639149,80 | 862,48 | 0,14 | 639903 638721 637598 635984 638620 640856 | 638613,70 | 1711,65 | 0,27 |
| 60 | 1199481 1196221 1185428 1197161 1178539 1195348 | 1192030 | 8197,70 | 0,69 | 1181923 1193109 1194453 1182258 1199481 1196221 | 1191241 | 7403,02 | 0,62 |
| 90 | 1798543 1709950 1797958 1796978 1795767 1795196 | 1782399 | 37832,54 | 2,02 | 1793888 1727577 1770025 1785744 1798543 1790950 | 1777788 | 26487,45 | 1,49 |

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

Tablo 3.12. Plazma içerisindeki Efedin HCl standart çözeltilerinin gün-içi ve günler-arası kesinlik ve tekrarlanabilirlik analiz sonuçları (n=6)

| Derişim (µg/mL) | Gün-içi | | | | Günler-arası | | | |
|--------------------|----------------------------------------------------------|-----------|---------|----------|----------------------------------------------------------|-----------|---------|----------|
| | Alan | X | SD | % RSD | Alan | X | SD | % RSD |
| 20 | 384008 386643 386577 384838 382052 386466 | 385097,30 | 1842,81 | 0,48 | 384008 386643 385762 380590 385452 392296 | 387458,50 | 3246,00 | 0,84 |
| 30 | 570711 575055 576733 570485 573447 576932 | 573893,80 | 2849,21 | 0,50 | 580711 572055 571744 570408 572771 574262 | 573658,50 | 3679,45 | 0,64 |
| 40 | 760387 767459 759978 759433 750467 761066 | 759798,30 | 5438,36 | 0,72 | 759433 750467 761646 765756 762166 760112 | 761596,70 | 2271,05 | 0,30 |

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

Metanol içerisinde hazırlanan plazmalı standart çözeltilerin ölçümlerinde, Gliseril Gayakolat'ın gün-içi RSD'leri % 0,12-2,00 değerleri arasında bulunurken, Efedrin HCl'nin gün-içi RSD'leri ise % 0,083-0,72 değerleri arasında tespit edilmiştir. Günler-arası RSD'lerin ise Gliseril Gayakolat için % 0,27-1,49 değerleri arasında ve Efedrin HCl için ise, % 0,30-0,84 değerleri arasında değiştiği de belirlenmiştir. Plazma çalışmalarında, Gliseril Gayakolat ve Efedrin HCl'nin kalibrasyon eğrileri üzerindeki en küçük derişimin altında bulunan derişimlerde bir seri standart çözeltiler hazırlanmıştır ve kromatogramları alınmıştır. Kromatogramlarda pik yüksekliğinin gürültü yüksekliğine oranının (sinyal/gürültü oranının) 3 katı olduğu derişim, gözlenebilir sınır değeri olarak ve 10 katı olduğu derişim ise tayin alt sınır değeri olarak belirlenmiştir. Bu belirlenen değerler, tayin edilebilen en küçük derişim olan yani miktar tayin limiti denilen LOQ değeri, Gliseril Gayakolat için 4,36 µg /mL ve Efedrin HCl için 4,34 µg /mL olarak hesaplanmıştır. Tespit sınırı olan LOD değeri ise Gliseril Gayakolat için 1,31 µg /mL, Efedrin HCl için ise 1,30 µg /mL olarak tespit edilmiştir.

3.8.4.3. Geri kazanım

Geri kazanım çalışmaları, 1'er mL plazma numuneleri üzerine standart çözeltilerden belirli hacimlerde katılarak hazırlanan yeni bir seri çözelti üzerinde yapılmıştır. Gliseril Gayakolat için 30, 35, 40, 50, 55, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 100 µg /mL konsantrasyonlarında ve Efedrin HCl için ise 15, 17.5, 20, 22.5, 25, 30, 32.5, 35, 40, 45, 47.5, 50 µg /mL konsantrasyonlarında olacak şekilde 25 mL'lik balon jöjeler içerisinde metanol ile 12 farklı geri kazanım çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan bu çözeltilerde Gliseril Gayakolat ve Efedrin HCl'ün eklenen miktarları HPLC'de elde edilmeye çalışılmıştır. Sonuçlar Tablo 3.13.'de verilmiştir.

Tablo 3.13. Plazmalı ortamda Gliseril Gayakolat ve Efedrin HCl için elde edilen geri kazanım değerleri

| Gliseril Gayakolat (µg /mL) | | | | Efedrin HCl (µg /mL) | | | |
|--------------------------------|--------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------|-------------------------|-------------------------|
| Eklenen (µg/mL) | Bulunan (µg/mL) | Geri Kazanım * (%) | Doğruluk BH** (%) | Eklenen (µg/mL) | Bulunan (µg/mL) | Geri Kazanım* (%) | Doğruluk BH** (%) |
| 30 | 31,55 | 105,17 | 5,17 | 15 | 16,91 | 112,75 | 12,73 |
| 35 | 34,60 | 98,85 | -1,14 | 17,5 | 17,79 | 101,64 | 1,66 |
| 40 | 41,53 | 103,82 | 3,82 | 20 | 22,27 | 106,34 | 11,35 |
| 50 | 48,59 | 97,19 | -2,82 | 22,5 | 21,38 | 95,03 | -4,98 |
| 55 | 56,75 | 103,19 | 3,18 | 25 | 25,96 | 103,85 | 3,84 |
| 60 | 60,93 | 101,56 | 1,55 | 30 | 31,63 | 105,43 | 5,43 |
| 70 | 72,33 | 103,33 | 3,33 | 32,5 | 33,79 | 103,98 | 3,97 |
| 75 | 72,01 | 96,02 | -3,99 | 35 | 36,34 | 103,83 | 3,83 |
| 80 | 83,87 | 104,84 | 4,84 | 40 | 38,06 | 95,16 | -4,85 |
| 85 | 81,92 | 96,37 | -3,62 | 45 | 46,88 | 104,18 | 4,18 |
| 90 | 92,35 | 102,61 | 2,61 | 47,5 | 48,04 | 104,18 | 1,14 |
| 100 | 105,92 | 105,92 | 5,92 | 50 | 51,54 | 103,08 | 3,08 |

*Geri Kazanım = Bulunan Miktar/Bilinen Miktar x 100, ** Bağlı Hata= Bulunan Miktar-Bilinen Miktar/Bilinen Miktar X 100

3.8.4.4. Yöntemin farmasötik preparatlara uygulanması

Yöntem, 100 mg Gliseril Gayakolat ve 15 mg Efedrin HCl/5 mL içeren Pedrin ticari preparatına (şurup) uygulanmıştır. Bu preparattan metanol içerisinde, 100 mg Gliseril Gayakolat ve 15 mg Efedrin HCl içerecek şekilde, 1'er mL plazma numunesi içeren 25'lik balon jojelerin içerisine 1,25'er mL tüm standartlardan ilave edilerek numuneler (6 kez tekrar edilerek) hazırlanmıştır. Bu numunelerden elde edilen tekrarlanabilirlik, SD ve RSD değerleri Tablo 3.14.'de ve % geri kazanımlar, kesinlik ve doğruluk değerleri ise Tablo 3.15.'de özetlenmiştir.

Tablo 3.14. Plazma içerisindeki farmasötik preparatlarda Gliseril Gayakolat ve Efedrin HCl için elde edilen tekrarlanabilirlik değerleri (n=6)

| Gliseril Gayakolat (µg /mL) | | Efedrin HCl (µg /mL) | |
|--------------------------------|--------------------|-------------------------|--------------------|
| Eklenen (µg/mL) | Bulunan (µg/mL) | Eklenen (µg/mL) | Bulunan (µg/mL) |
| 100 | 104,73 | 15 | 14,59 |
| 100 | 104,92 | 15 | 14,64 |
| 100 | 109,03 | 15 | 15,06 |
| 100 | 108,30 | 15 | 15,26 |
| 100 | 108,95 | 15 | 15,03 |
| 100 | 107,18 | 15 | 14,73 |
| SD | 1,95 | SD | 1,80 |
| RSD | 1,82 | RSD | 1,81 |

Tablo 3.15. Plazma içerisindeki farmasötik preparatlarda Gliseril Gayakolat ve Efedrin HCl için elde edilen geri kazanım değerleri (n=6)

| Gliseril Gayakolat (µg /mL) | | | | Efedrin HCl (µg /mL) | | | |
|--------------------------------|--------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------|-------------------------|-------------------------|
| Eklenen (µg/mL) | Bulunan (µg/mL) | Geri Kazanım* (%) | Doğruluk BH** (%) | Eklenen (µg/mL) | Bulunan (µg/mL) | Geri Kazanım* (%) | Doğruluk BH** (%) |
| 100 | 104,73 | 104,73 | 4,73 | 15 | 14,59 | 97,22 | -2,73 |
| 100 | 104,92 | 104,92 | 4,92 | 15 | 14,64 | 97,56 | -2,4 |
| 100 | 109,03 | 109,03 | 9,03 | 15 | 15,06 | 100,40 | 0,4 |
| 100 | 108,30 | 108,30 | 8,3 | 15 | 15,26 | 101,67 | 1,73 |
| 100 | 108,95 | 108,95 | 8,95 | 15 | 15,03 | 100,20 | 0,2 |
| 100 | 107,18 | 107,18 | 7,18 | 15 | 14,73 | 98,19 | -1,8 |

*Geri Kazanım = Bulunan Miktar/Bilinen Miktar x 100, ** Bağlı Hata= Bulunan Miktar-Bilinen Miktar/Bilinen Miktar X 100

3.8.4.5. Standart ekleme yöntemi ile elde edilen sonuçlar

Gliseril Gayakolat'ın 1250 µg /mL'lik stok çözeltisinden (52, 60, 68, 76, 84 µg /mL) belirli hacimlerde ve Efedrin HCl'in 625 µg /mL'lik stok çözeltisinden (7.8, 9, 10.2, 11.4, 12.6 µg /mL) belirli hacimlerde 5 ayrı miktar numune alınıp, ticari şurup stok çözeltisinden yine Gliseril Gayakolat'tan 48, 40, 32, 24, 16 µg /mL ve Efedrin HCl'den 7.2, 6, 4.8, 3.6, 2.4 µg /mL olacak şekilde kısımlar alınıp, bunların hepsinin toplam 100 µg /mL'lik Gliseril Gayakolat ve 15 µg /mL'lik Efedrin HCl standartları olması sağlanmıştır. Plazmaya katılan Gliseril Gayakolat ve Efedrin HCl standartları ile birlikte katılan ticari preparatlardan elde edilen geri kazanım, SD ve RSD değerleri Tablo 3.16'da görülmektedir.

Tablo 3.16. Plazmada standart ekleme yöntemi ile elde edilen sonuçlar

| Gliseril Gayakolat ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | | | Efedrin HCl ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | | |
|--------------------------------------------------------------------------------|---------------------|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------|---------------------|
| Eklenen Miktar ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | | | | Eklenen Miktar ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | |
| Şurup Çözeltilisi | Standart Çözelti | Bulunan Miktar ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | Bulunan Miktar ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | Şurup Çözeltilisi | Standart Çözelti |
| 48 | 52 | 106,35 | 15,60 | 7,2 | 7,8 |
| 40 | 60 | 106,44 | 15,22 | 6 | 9,0 |
| 32 | 68 | 106,54 | 15,57 | 4,8 | 10,2 |
| 24 | 76 | 106,33 | 15,34 | 3,6 | 11,4 |
| 16 | 84 | 111,56 | 14,93 | 2,4 | 12,6 |
| Ortalama Geri Kazanım (%) | | 107,44 | 102,21 | | |
| Bulunan Ortalama Konsantrasyon ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | | 107,44 | 15,33 | | |
| Standart Sapma (SD) | | 2,30 | 0,47 | | |
| Bağıl Standart Sapma (% RSD) | | 2,14 | 3,05 | | |

Tablo 3.17'de görüldüğü üzere, standartlar içerisinde ve plazma ortamında hazırlanmış ticari preparatlar için ($100 \mu\text{g}/\text{mL}$ Gliseril Gayakolat $15 \mu\text{g}/\text{mL}$ Efedrin HCl) elde edilen veriler t-testi ile kıyaslanmıştır. t_{Tablo} değeri, $t_{\text{Hesaplanan}}$ değerinden büyük olduğu için iki yöntem arasında bir fark olmadığı sonucuna varılmıştır ($\alpha=0,05$, % 95 güvenle) ($n=6$).

Tablo 3.17. Standartlar içerisinde ve plazma ortamında hazırlanmış ticari preparatlar için (100µg/mL Gliseril Gayakolat ve 15 µg /mL Efedrin HCl) elde edilen t-testi verileri ($\alpha=0,05$, % 95 güvenle) (n=6)

| Deneme Sayısı (n=6) | Gliseril Gayakolat | | Efedrin HCl | |
|-----------------------------------------------------------------------------------|--------------------|--------|-------------|--------|
| | Standart | Plazma | Standart | Plazma |
| İstatistiksel Değerler | | | | |
| Ortalama Değer (\bar{X}) | 103,04 | 107,19 | 97,14 | 99,21 |
| Standart Sapma (SD) | 3,75 | 1,95 | 1,84 | 1,80 |
| Bağıl Standart Sapma (RSD, %) | 3,64 | 1,82 | 1,89 | 1,81 |
| Standart Hata | 1,53 | 0,75 | 0,80 | 0,73 |
| t-testi $t_{\text{hesaplanan}}$ (t_{tablo}) | 2,10 (2,57) | | 1,60 (2,57) | |

Ayrıca Tablo 3.18’de ise ticari preparatlar için standartlar içerisinde ve plazma içerisindeki hazırlanmış ticari preparatlar için (100 µg/mL Gliseril Gayakolat 15 µg/mL Efedrin HCl) elde edilen veriler F-testi ile kıyaslanmıştır. F_{Tablo} değeri, $F_{\text{Hesaplanan}}$ değerinden büyük olduğu için kesinlikler arasında önemli bir fark olmadığı sonucuna varılmıştır ($\alpha=0,05$, % 95 güvenle) (n=6).

Tablo 3.18. Standartlar içerisinde ve plazma ortamında hazırlanmış ticari preparatlar için (100 µg/mL Gliseril Gayakolat ve 15 µg /mL Efedrin HCl) elde edilen F-testi verileri ($\alpha=0,05$, % 95 güvenle) (n=6)

| Deneme Sayısı (n=6) | Gliseril Gayakolat | | Efedrin HCl | |
|-------------------------------------------------------------|--------------------|--------|-------------|--------|
| | Standart | Plazma | Standart | Plazma |
| İstatistiksel Değerler | | | | |
| Ortalama Değer (\bar{X}) | 103,04 | 107,19 | 97,14 | 99,21 |
| Standart Sapma (SD) | 3,75 | 1,95 | 1,84 | 1,80 |
| Bağıl Standart Sapma (RSD, %) | 3,64 | 1,82 | 1,89 | 1,81 |
| Standart Hata | 1,53 | 0,80 | 0,75 | 0,73 |
| F-testi $F_{\text{hesaplanan}}(F_{\text{tablo}})$ | 3,71 (5,05) | | 1,04 (5,05) | |

Tablo 3.19. Standartlar içerisinde ve plazma ortamında hazırlanmış ticari preparatlar için (100 µg/mL Gliseril Gayakolat ve 15 µg /mL Efedrin HCl) elde edilen ANOVA testi verileri ($\alpha=0,05$, % 95 güvenle) (n=12)

| ANOVA: TEK ETKEN | | | | | | |
|------------------|--------|---------|----------|---------|----------|----------|
| Gruplar | Say | Toplam | Ortalama | Varyans | | |
| Sütun 1 | 12 | 1201,07 | 100,10 | 17,42 | | |
| Sütun 2 | 12 | 1238,35 | 103,20 | 20,55 | | |
| ANOVA | | | | | | |
| Varyans Kaynağı | SS | df | MS | F | P-değeri | F ölçütü |
| Gruplar Arasında | 57,91 | 1 | 57,91 | 3,05 | 0,095 | 4,30 |
| Gruplar İçinde | 417,64 | 22 | 18,98 | | | |
| Toplam | 475,55 | 23 | | | | |

ANOVA testine göre, P değeri > 0,05 olduğundan grup ortalamaları eşittir ve karşılaştırma yapmaya gerek yoktur.

BÖLÜM 4. SONUÇLAR

Analitik çalışmalarda iki ya da daha fazla etken madde içeren farmasötik preparatlar için herhangi bir ayırma işlemi yapılmaksızın aynı anda analizlerini basit, hızlı ve ekonomik bir şekilde gerçekleştirmek, ilaç sanayisi için son derece önemlidir. Kombine preparatların analizinde, günümüzde pahalı ve yüksek teknoloji cihazlar ve yöntemler kullanılmaktadır. Bu sebepten dolayı, analizciler daha hızlı, daha kolay ve daha ekonomik yöntemler tercih etmektedirler. Bu yöntemlerden en yaygın şekilde kullanılanı ise Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ile yapılmış olanlarıdır. Genel olarak ng veya µg düzeyindeki tayinlerde, bir karışımı içeren tüm etken maddelerin aynı anda ayrılması ve ekonomik, hızlı ve kolay uygulanabilen bir yöntem olması dolayısıyla, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ile yapılan çalışmalara talep artmaktadır.

Literatür taraması sonucunda [11-23], Gliseril Gayakolat ve Efedrin HCl'ün sadece ikisini bir arada içeren bir karışım için yapılmış herhangi bir miktar analizi yöntemine rastlanılmamıştır. Ayrıca literatürde, diğer etken maddelerinin yanı sıra, bu iki etken maddeden herhangi birini de içeren bir karışım için ya da sadece bu iki etken maddeden herhangi birisini tek başına içeren bir preparat için yapılmış miktar tayini çalışmaları mevcuttur.

Literatürde mevcut bulunan bu çalışmalardan farklı olarak, hem ticari preparatlarda hem de insan plazmasında (in-vitro olarak) Gliseril Gayakolat ve Efedrin HCl içeren ticari bir karışımın (Pedrin şurup, 15 mg/5 mL Efedrin HCl ve 100 mg/5 mL Gliseril Gayakolat) bu etken maddelerinin aynı anda analizinin yapılabilmesi için kolay, hızlı, pratik ve ekonomik bir ters-faz DAD dedektörlü HPLC yöntemi geliştirilmiştir. Bu çalışma, hem farmasötik preparatlarda hem de insan plazmasında Gliseril Gayakolat ve Efedrin HCl'ün HPLC-DAD yöntemiyle miktar tayinine yönelik yapılmış ilk çalışmadır. Plazma çalışmalarında sıvı-sıvı ekstraksiyon işlemine gerek

kalmaksızın kısa zaman içerisinde, oldukça yüksek geri kazanımlar elde edilmiştir. Rutin klinik kullanımda kantitatif amaçlı plazma çalışmaları için kolaylıkla kullanılabilir olması ve ayrıca kolay, ekonomik, hassas ve yeni bir yöntem olması bu yöntemin tercih edilmesine olanak sağlayacaktır.

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

KAYNAKLAR

- [1] KAYAALP, S.O., Tıbbi Farmakoloji. Hacettepe-TAŞ yayını, 11. Baskı, Ankara, Eylül 2002; 80, 590, 985.
- [2] DÖKMECİ, İ., Sağlık Yüksek Okullar için Farmakoloji. İstanbul medikal yayını, 1. Baskı, İstanbul, Mart 2007; 5, 120, 126, 127.
- [3] <http://www.sagliklinik.com/soguk-alginligi.html> (Kasım 2010)
- [4] <http://www.baglarbal.com/soguk-alginligi.htm> (Kasım 2010)
- [5] <http://www.ilacpedia.com/pedrin-oksuruk-surubu> (Aralık 2010)
- [6] <http://chemicaland21.com/lifescience/phar/EPHEDRINE%20HYDROCHLORIDE.htm> (Aralık 2010)
- [7] ERGENÇ, N., GÜRSOY A., ATEŞ Ö., İlaçların Tanınması ve Kantitatif Tayini. İstanbul Üniversitesi yayını, 5. Baskı, İstanbul, 1999; 5.
- [8] <https://www.ilacpedia.com/prospektus/pedrin-oksuruk-surubu> (Aralık 2010)
- [9] <http://kbb.uludag.edu.tr/allerjikrinit.htm> (Kasım 2010)
- [10] <http://www.chemblink.com/products/93-14-1.htm> (Kasım 2010)
- [11] MANASSRA A., KHAMİS M., EL-DAKİKİY M., ABDEL-QADER Z., AL-RİMAWİ F., Simultaneous HPLC analysis of pseudophedrine hydrochloride, codeine phosphate, and triprolidine hydrochloride in liquid dosage forms. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2010; 51: 991-993.
- [12] LOUHAİCHİ M.R., JEBALİ S., LOUESLATİ M.H., ADHOUM N., MONSER L., Simultaneous determination of pseudoephedrine, pheniramine, guaifenesin, pyrilamine, chlorpheniramine and dextromethorphan in cough and cold medicines by high performance liquid chromatography. Talanta, 2009; 78: 991-997.
- [13] BAGHERİ H., KHALİLİAN F., AHANGAR L.E., Liquid-liquid-liquid microextraction followed by HPLC with UV detection for quantitation of ephedrine in urine. J. Sep. Sci. Department of Chemistry, Sharif University of Technology, Tehran, Iran, 2008; 31: 3212-3217.

- [14] EL-GİNDY A., EMARA S., MESBAH M.K., HADAD G.M., New Validated Methods for the Simultaneous Determination of Two Multicomponent Mixtures Containing Guaiphenesin in Syrup by HPLC and Chemometrics-Assisted UV-Spectroscopy. *Analytical Letters*, 2006; 39: 2699-2723.
- [15] ANSARI M., KAZEMIPOUR M., SHAHRIAR M., Simultaneous Quantitation of Theophylline and Guaifenesin in Syrup by HPLC, Derivative and Derivative Ratio Spectrophotometry for Quality Control Purposes. *Iranian Journal of Pharmacology and Therapeutics*, 2006; 5: 67-72.
- [16] GAY M.L., NIEMANN R.A., MUSSER S.M., An Isotopically Labeled Internal Standard Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method for Determination of Ephedrine Alkaloids and Synephrine in Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006; 54: 285-291.
- [17] CHEN X., HUANG J., KONG Z., ZHONG D., Sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of paracetamol and guaifenesin in human plasma. *Journal of Chromatography B*, 2005; 817: 263-269.
- [18] DARRYL J., H.Y. CHEUNG., A chromatographic method for rapid and simultaneous analysis of codeine phosphate, ephedrine HCl and chlorpheniramine maleate in cough-cold syrup formulation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2003; 30: 1595-1601.
- [19] ŞENTÜRK Z., ERK N., ÖZKAN S.A., AKAY C., CEVHEROĞLU Ş., Determination of theophylline and ephedrine HCl in tablets by ratio-spectra derivative spectrophotometry and LC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2002; 29: 291-298.
- [20] ERK N., Assay of ephedrine hydrochloride and theophylline in pharmaceutical formulations by differential-derivative spectroscopy. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2000; 23: 255-261.
- [21] DARRYL J., H.Y. CHEUNG., A chromatographic method for rapid and simultaneous analysis of codeine phosphate, ephedrine HCl and chlorpheniramine maleate in cough-cold syrup formulation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2003; 30: 1595-1601.
- [22] OKAMURA N., MİKİ H., HARADA T., YAMASHİTA S., MASAOKA Y., NAKAMOTO Y., TSUGUMA M., YOSHİTOMİ H., YAGİ A. Simultaneous determination of ephedrine, pseudoephedrine, norephedrine and methylephedrine in Kampo medicines by high-performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 1999; 20: 363-372.

- [23] ONUR F., ACAR N., Efedrin Hidroklorürün Farmasötik Preparatlarda Dördüncü Türev UV Spektrofotometrisi ile Miktar Tayini. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi, 1988; 18.cilt 1. Sayı: 92-99.
- [24] ANONİM, Biyoyararlanım ve Biyoeşdeğerlik Yasal Yönü, II Ulusal Biyoyararlanım ve Biyoeşdeğerlik Sempozyumu. Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Şafak Matbaacılık, FATUM, Ankara, 17-18 Nisan 1995; 1.
- [25] ANONİM, Biyoyararlanım ve Biyoeşdeğerlik Genel İlkeler, I. Ulusal Biyoyararlanım ve Biyoeşdeğerlik Sempozyumu. Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Şafak Matbaacılık, FATUM, Ankara, 9-10 Mayıs 1994; 197-207-208.
- [26] Parasetamol, kafein ve propifenazon içeren tabletlerin HPLC yöntemi ile analizinin faktöriyel tasarım ile optimize edilmesi. Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Analitik Kimya Programı, 2007.
- [27] SCHAUWECHWR, P., FREI R. W., Chromatography LC Magazine 14, (1977).
- [28] HUBER, L., Validation of Analytical Methods Review And Strategy, Advanstar Communication for Publication in LC/GC International, (2001).
- [29] SNYDER, L.R., KIRLKLAND, J. J., "Introduction to Modern LC". (1979): 91, 334.
- [30] GÜLHAN, S., "Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Validasyon Konulu Seminer" (1999); HANSEN, H.A., EMBORG, C., "Experimental desing in the development and characteriation of a HPLC method for aminoacids" Journal of Chromatography A, (1992); 2, 171-180, 626.
- [31] SKOOG, D., HOLLER, F.J., NİEMAN, T.A., Enstrümental Analiz İlkeleri, Çeviri Editörleri: KILIÇ, E., KÖSEOĞLU, F., YILMAZ, H., Bilim Yayıncılık, Ankara, 1998; 299-347, 674-766.
- [32] SKOOG, D., WEST, D., HOLLER, F.J., Analitik Kimya Temelleri, Bilim Yayıncılık, 7. Baskı, 2. Cilt, Ankara (1999); 299-351, 675-777.
- [33] HAMİLTON, R.J., SEWELL, P.A., Introduction to High Performance Liquid Chromatography, Second Edition, Chapman and Hall, USA, 1982; 45,46.
- [34] MEYER, V.R., Practical High Performance Liquid Chromatography (V. Cottrell, Cev.): John Wiley and Sons (1988).
- [35] KRSTULOVIC, A.M., BROWN, P.R., Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography: Theory, Practice and Biomedical Applications,

John Wiley & Sons, USA, 1982.

- [36] SEWELL, P.A., CLARKE, B., KEALEY, D., Chromatographic Separations, John Wiley & Sons, Great Britain, 1987.
- [37] TUNÇBİLEK, İ., Gaz kromatografisi-kütle spektrometresi tekniği kullanılarak doping amacıyla kullanılan hidroksietil nişastanın (hes) idrardan analizi üzerine bir çalışma. Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans tezi Ankara , 2005.
- [38] SKOOG, D.A., LEARY, J.J., Principles of Instrumental Analysis, 4th Edition. Harcourt Brace College Publishers, New York, 1992; 116, 134-139.
- [39] GÜNDÜZ, T., İnrümentel Analiz, Gazi Kitapevi, Altıncı Baskı, Ankara 2002; 101-229, 1116-1357.
- [40] DEMİRKAYA, F., Karbamazepinin UV-Visible spektrofotometri ve HPLC yöntemleriyle miktar analizi. Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans tezi Erzurum. 2003.
- [41] BİDLİNGMEYER, B.A., Practical HPLC Methodology and Applications, John Wiley & Sons, USA, 1992.
- [42] YENİLMEZ L., Yüksek performanslı sıvı kromatografisi ve ilaç analizlerindeki nuygulamaları, 2006 Tezsiz Yüksek Lisans Dönem Ödevi'nden alınmıştır (Yenilmez, 2006).
- [43] ADAMOVICS. J.A., Chromatographic Analysis of Pharmaceuticals 2. Edition Revised and Expanded Marcel Dekker. New York (1997): 135-184.
- [44] CHRISTIAN, G.D., Analytical Chemistry. 6th Edition. John Wilwy & Sons Inc., New Jersey, (2004).

EKLER

EK 1. İstatiksel Katsayıların Hesaplanması

Bağıl standart sapmanın hesaplanması

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

SS: standart sapma

X: Aritmetik ortalama

% Bağıl Hata Hesaplanması

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

Standart Hata Hesaplanması

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

SS: standart sapma

n : ölçüm sayısı

% Geri Kazanım Hesaplanması

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

Evren Ortalamasının Güven Aralığının Hesaplanması

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

μ : Evren ortalaması

X : Örneklem ortalaması

S_x : Standart sapma

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

EK 2. Tez içinde Kullanılan İstatiksel Testler

Korrelasyon Katsayısı Önem Kontrolü

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

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

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

T = Test istatistiği,

r = Korrelasyon katsayısı,

Sr = Korrelasyon katsayısının standart hatası.

3. Yanılma olasılığı $\alpha = 0,05$ seçilmiştir.
4. Serbestlik derecesi = $n-2$ (n:ölçüm sayısı)
5. $\alpha = 0,05$ yanılma düzeyinde ve $n=2$ serbestlik derecesindeki tablo t değerine bakılır.
6. Karşılaştırma: Hesapla bulunan t değeri tablo t değerinden büyükse H_0 reddedilir.
7. Karar: a) Korrelasyon katsayısı önemli bir değerdir, tesadüfen bulunmuş bir değer değildir (t_h = hesaplanan değer, $p<0,05$).
b) Korrelasyon katsayısı önemli bir değer değildir, tesadüfen bulunmuş bir değerdir (t_h =hesaplanan değer, $p>0,05$).

Doğrusallıktan Ayrılış Önem Kontrolü

1. Kareler toplamı bulunur:

a) Regresyon Kareler Toplamı (RKT):

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

b) Y Ortalamadan Ayrılış Kareler Toplamı (YOAKT):

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

c) Regresyondan Ayrılış Kareler Toplamı (RAKT):

$$RAKT = YOAKT - RKT$$

2. Serbestlik derecesi bulunur:

a) Regresyon Serbestlik Derecesi (RSD) = 1

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

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

3. Kareler ortalamaları bulunur:

a) Regresyon Kareler Ortalaması = RKT / RSD

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

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

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

6. $F = RKO / RAKO$

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

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

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

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

t-Testi

İki ortalama arasındaki fark olup olmadığını test eder.

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

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

n_1 : 1. yöntemin ölçüm sayısı

n_2 : 2. yöntemin ölçüm sayısı

s_1 : 1. yöntemin standart sapması

s_2 : 2. yöntemin standart sapması

x_1 : 1. yöntemin ortalaması

x_2 : 2. yöntemin ortalaması

Serbestlik derecesi = $n_1 + n_2 - 2$

1. $H_0 =$ İki ortalama arasında fark yoktur.

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

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

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

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

Tek Yönlü Varyans Analizi

1. Kareler toplamları bulunur.

a) Genel kareler toplamı (GnKT)

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

b) Gruplar arası kareler toplamı (GAKT)

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

c) Denekler arası kareler toplamı (DAKT)

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

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

2. Serbestlik derecesi bulunması

a) Genel serbestlik derecesi $\Rightarrow GnSD = n_j \cdot k - 1$

b) Gruplar arası serbestlik derecesi $\Rightarrow GASD = k - 1$

c) Denekler arası serbestlik derecesi $\Rightarrow DASD = n_j - 1$

d) Hata serbestlik derecesi $\Rightarrow HSD = (n_j - 1)(k - 1)$

3. Kareler ortalamasının bulunması

a) Gruplar arası kareler ortalaması $\Rightarrow GAKO = GAKT / GASD$

b) Denekler arası kareler ortalaması $\Rightarrow DAKO = DAKT / DASD$

c) Hata kareler ortalaması $\Rightarrow HKO = HKT / HSD$

4. $H_0 =$ Yöntemler arasında fark yoktur.

$H_1 =$ En az bir ölçüm diğerlerinden farklıdır.

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

6. $F = GAKO / HKO$

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

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

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

ÖZGEÇMİŞ

Esin İMAMOĞLU, 1986 yılında Sakarya'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Orhangazi İlköğretim Okulu'nda ve lise öğrenimini de Ali Dilmen Lisesi'nde tamamladı. 2004 yılında Kütahya Dumlupınar Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü'nü kazandı ve 2008 yılında Kimyager olarak mezun oldu. 2009 yılında ise Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisansa başladı.