

**T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FARMASÖTİK ANALİZ İÇİN HPLC'DEN UPLC'YE ANALİTİK YÖNTEM
TRANSFERİ**

**Analitik Kimya (Eczacılık) Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

Ecz. Ece ÖZCAN

Danışman Öğretim Üyesi : Prof. Dr. M. Emrah KILINÇ

İZMİR – 2013

DEĞERLENDİRME KURULU ÜYELERİ

(Adı Soyadı)

(İmza)

Başkan (Danışman)

: Prof. Dr. M. Emrah KILINÇ

.....

Üye

: Prof. Dr. Özlem SÖĞÜT

.....

Üye

: Prof. Dr. Zekerya DURSUN

.....

Üye

: Doç. Dr. Pınar KARA KADAYIFÇILAR

.....

Üye

: Doç. Dr. Dilşat ÖZKAN ARIKSOYSAL

.....

Yüksek Lisans Tezinin kabul edildiği tarih :

23.08.2013

ÖNSÖZ

Tezimi tüm aşamalarında değerli bilgi ve becerileri ile yönlendiren, çalışmalarımı tamamlamamda sonsuz desteği olan, her zaman manevi olarak yanımda hissettiğim danışman hocam Sayın Prof. Dr. M. Emrah KILINÇ'a,

İlgi ve yardımlarıyla her zaman bana destek olan, hayata bakış açımı güzelleştiren değerli hocam Analitik Kimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Özlem SÖĞÜT'e,

Bitirme tezimi yaptığım zamanlarda akademik hayatı bana sevdiren, hayatımda yeni ufuklar açan Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Özgen ÖZER'e,

Tüm Analitik Kimya Anabilim Dalı öğretim üyelerine ve başta her zaman yanımda olan çalışma arkadaşım Araş. Gör. F. Gülay DER olmak üzere tüm Araştırma Görevlisi arkadaşlarıma,

Beni hayatım boyunca destekleyip sevgilerini esirgemeyen annem babam ve ağabeyime,

Yanında her zaman güç ve huzur bulduğum Kemal Gökhan BÜLBÜL'e çok teşekkür ederim.

İZMİR / AĞUSTOS 2013

Ecz. Ece ÖZCAN

ŞEKİLLER

ŞEKİL NO	AÇIKLAMA	SAYFA NO
1	Kromatografik yöntemlerin gelişmesine yardım eden bazı önemli bilim adamları	7
2	İnce tabaka kromatografisinde ayırım şeması	8
3	Kromatogramlara ait genel değişkenler	10
4	Çözünürlük (R) değerinin kromatogramda piklerin ayırımı üzerine etkisi	13
5	Kromatogramda pik simetrisinin gösterimi	14
6	Teorik plaka sayısına ait üç farklı hesaplama formülü	15
7	Numunenin molekül ağırlığına göre kullanılacak kromatografik yöntemler	17
8	(a)Sıvı kromatografisi yöntemleri uygulamaları, (b) sınıflandırılması	19
9	Temel HPLC donanımlarını şema ile gösterilmesi	22
10	Sistem uygunluk parametrelerinin tanımlanması için temsili sinyal	61
11	Rs değerleri gösterilerek piklerin ayrılması	63
12	Çeşitli kuyruklanma faktörü değerlerinin gösterimi	64
13	Pik kuyruklanmasının kantitasyon üzerine etkisi	64
14	Alikonma zamanının teorik plaka sayısı üzerine etkisi	66
15	HPLC ve UPLC analizlerinde kullanılan standartlar olan fenilefrin(A), klorfeniramin maleat(B), asetaminofen(C) ve ibuprofen'e (D) ait açık kimyasal formüller.	70
16	50mM PBS (pH 6) tamponunda GCE elektrotla elde edilmiş 1mM parasetamol'e ait tipik DPV voltamogramı	79
17	%10-90 (h/h) MeOH-50mM PBS (pH 6) (A), %50-50 (h/h) MeOH-50mM PBS (B) ve %75-25 (h/h) MeOH-50mM PBS (C) çözümlerinde GCE elektrotla elde edilmiş 1mM parasetamol'e ait tipik DPV voltamogramları	80
18	%10-90 (h/h) Ach-50mM PBS (pH 6) (A), %30-70 (h/h) Ach-50mM PBS (B) ve %50-50 (h/h) Ach-50mM PBS (C) çözümlerinde GCE elektrotla elde edilmiş 1mM parasetamol'e ait tipik DPV voltamogramları	81
19	%30-70 (h/h) Ach-50mM PBS çözümlerinde GCE elektrotla elde edilmiş 1mM parasetamol'e ait tipik anodik (A) ve katodik (B) CV voltamogramları	82
20	50mM PBS (pH 6) tamponunda GCE elektrotla elde edilmiş 1mM klorfeniramin maleat'a ait tipik DPV voltamogramı.	83
21	%10-90 (h/h) MeOH-50mM PBS (pH 6) (A), %50-50 (h/h) MeOH-50mM PBS (B) ve %75-25 (h/h) MeOH-50mM PBS (C) çözümlerinde GCE elektrotla elde edilmiş 1mM klorfeniramin maleat'a ait tipik DPV voltamogramları.	84
22	%10-90 (h/h) Ach-50mM PBS (pH 6) (A), %30-70 (h/h) Ach-50mM PBS (B) ve %50-50 (h/h) Ach-50mM PBS (C) çözümlerinde GCE elektrotla elde edilmiş 1mM klorfeniramin maleat'a ait tipik DPV voltamogramları.	85
23	50mM PBS (pH 6) tamponunda GCE elektrotla elde edilmiş 1mM fenilefrin hidroklorür'e ait tipik DPV voltamogramı	86
24	%10-90 (h/h) MeOH-50mM PBS (pH 6) (A), %50-50 (h/h) MeOH-50mM PBS (B) ve %75-25 (h/h) MeOH-50mM PBS (C) çözümlerinde GCE elektrotla elde edilmiş 1mM fenilefrin hidroklorür'e ait tipik DPV voltamogramları	87
25	%10-90 (h/h) Ach-50mM PBS (pH 6) (A), %30-70 (h/h) Ach-50mM PBS (B) ve %50-50 (h/h) Ach-50mM PBS (C) çözümlerinde GCE elektrotla elde edilmiş 1mM fenilefrin hidroklorür'e ait tipik DPV voltamogramları.	88
26	50mM PBS (pH 6) tamponunda GCE elektrotla elde edilmiş 1mM ibuprofen'e ait tipik DPV voltamogramı	89
27	%10-90 (h/h) MeOH-50mM PBS (pH 6) (A), %50-50 (h/h) MeOH-50mM PBS (B) ve %75-25 (h/h) MeOH-50mM PBS (C) çözümlerinde GCE elektrotla elde edilmiş 1mM ibuprofen'e ait tipik DPV voltamogramları.	90
28	%10-90 (h/h) Ach-50mM PBS (pH 6) (A), %30-70 (h/h) Ach-50mM PBS (B) ve %50-50 (h/h) Ach-50mM PBS (C) çözümlerinde GCE elektrotla elde edilmiş 1mM ibuprofen'e ait tipik DPV voltamogramları	91

29	%75-25(h/h) MeOH-50mM PBS (pH 6) (A) ve %30-70 (h/h) Ach-50mM PBS (pH 9.25) (B) çözümlerinde elde edilmiş 1mM parasetamol'e ait tipik UV-Vis spektrumları.	92
30	%75-25(h/h) MeOH-50mM PBS (pH 6) (A) ve %30-70 (h/h) Ach-50mM PBS (pH 9.25) (B) çözümlerinde elde edilmiş 1mM klorfeniramin maleat'a ait tipik UV-Vis spektrumları.	93
31	%75-25(h/h) MeOH-50mM PBS (pH 6) (A) ve %30-70 (h/h) Ach-50mM PBS (pH 9.25) (B) çözümlerinde elde edilmiş 1mM fenilefrin hidroklorür'e ait tipik UV-Vis spektrumları.	94
32	. %75-25(h/h) MeOH-50mM PBS (pH 6) (A) ve %30-70 (h/h) Ach-50mM PBS (pH 9.25) (B) çözümlerinde elde edilmiş 1mM ibuprofen'e ait tipik UV-Vis spektrumları.	95
33	%75-25(h/h) MeOH-50mM PBS (pH 6) çözümlerinde oluşan Mobil Faz-1'de elde edilmiş 10-6M parasetamol ve fenilefrin hidroklorür'e ait tipik HPLC-ECD kromatogramları. Akış hızı 0,2 mL/dk, Eşalışma: +1200 mV (Ag/AgCl'e karşı), analitik kolon: Thermo ODS-2 Hypersil, 250mmx4.6mm, 5µm partikül çapı, 80Å por çapı. 20µL loop hacmi. Alıkonma zamanları: 22,60 dk fenilefrin hidroklorür ve 25,64 dk parasetamol.	96
34	%75-25(h/h) MeOH-50mM PBS (pH 6) çözümlerinde oluşan Mobil Faz-1'de elde edilmiş 10-6M parasetamol ve fenilefrin hidroklorür'e ait tipik HPLC-ECD kromatogramları. Eşalışma: +1200 mV (Ag/AgCl'e karşı), analitik kolon: Thermo ODS-2 Hypersil, 250mmx4.6mm, 5µm partikül çapı, 80Å por çapı. 20µL loop hacmi. Akış hızının kromatogramda alıkonma zamanlarına etkisi.	97
35	%75-25(h/h) MeOH-50mM PBS (pH 6) çözümlerinde oluşan Mobil Faz-1'de elde edilmiş 10-6M parasetamol ve fenilefrin hidroklorür'e ait tipik HPLC-ECD kromatogramları. Akış hızı 1,0 mL/dk, analitik kolon: Thermo ODS-2 Hypersil, 250mmx4.6mm, 5µm partikül çapı, 80Å por çapı. 20µL loop hacmi. Çalışma potansiyelinin kromatograma etkisi.	98
36	Değişik çözümlerinden oluşan mobil fazlarda elde edilmiş 10-6M parasetamol ve fenilefrin hidroklorür'e ait tipik HPLC-ECD kromatogramları. Akış hızı 1,0 mL/dk, . Eşalışma: +1200 mV (Ag/AgCl'e karşı), analitik kolon: Thermo ODS-2 Hypersil, 250mmx4.6mm, 5µm partikül çapı, 80Å por çapı. 20µL loop hacmi. Mobil faz kompozisyonunun kromatograma etkisi.	99
37	%75-25(h/h) MeOH-50mM PBS çözümlerinde oluşan mobil fazlarda elde edilmiş 10-6M parasetamol ve fenilefrin hidroklorür'e ait tipik HPLC-ECD kromatogramları. Akış hızı 1,0 mL/dk, . Eşalışma: +1200 mV (Ag/AgCl'e karşı), analitik kolon: Thermo ODS-2 Hypersil, 250mmx4.6mm, 5µm partikül çapı, 80Å por çapı. 20µL loop hacmi. Mobil faz pH değerinin kromatograma etkisi.	100
38	%75-25(h/h) MeOH-50mM PBS (pH 6.0) çözümlerinde oluşan mobil fazda elde edilmiş 10-6M parasetamol (PA) ve fenilefrin hidroklorür'e (FE) ait tipik HPLC-ECD kromatogramları. Akış hızı 1,0 mL/dk, . Eşalışma: +1200 mV (Ag/AgCl'e karşı), analitik kolon: Thermo ODS-2 Hypersil, 250mmx4.6mm, 5µm partikül çapı, 80Å por çapı. 20µL loop hacmi. Gün içi tekrarlanabilirlik çalışması (n=11).	101
39	%30-70(h/h) Ach-50mM PBS (pH 6.0) çözümlerinde oluşan mobil fazda (Mobil Faz-2) elde edilmiş 10-6M parasetamol ve fenilefrin hidroklorür'e ait tipik HPLC-ECD kromatogramı. Akış hızı 1,0 mL/dk, . Eşalışma: +900 mV (Ag/AgCl'e karşı), analitik kolon: Thermo ODS-2 Hypersil, 250mmx4.6mm, 5µm partikül çapı, 80Å por çapı. 20µL loop hacmi.	102
40	%30-70(h/h) Ach-50mM PBS (pH 6.0) çözümlerinde oluşan mobil fazda (Mobil Faz-2) elde edilmiş 10-6M parasetamol ve fenilefrin hidroklorür'e ait tipik HPLC-ECD kromatogramı. Akış hızı 1,0 mL/dk, . Eşalışma: +900 mV (Ag/AgCl'e karşı), analitik kolon: Thermo ODS-2 Hypersil, 250mmx4.6mm, 5µm partikül çapı, 80Å por çapı. 20µL loop hacmi. Gün içi tekrarlanabilirlik çalışması (n=6).	102
41	%30-70(h/h) Ach-50mM PBS (pH 6.0) çözümlerinde oluşan mobil fazda (Mobil Faz-2) elde edilmiş 10-6M parasetamol ve fenilefrin hidroklorür'e ait tipik HPLC-ECD kromatogramı. Eşalışma: +900 mV (Ag/AgCl'e karşı), analitik kolon: Thermo ODS-2 Hypersil, 250mmx4.6mm, 5µm partikül çapı, 80Å por çapı. 20µL loop hacmi. Akış hızının kromatogramda alıkonma zamanlarına etkisi.	103
42	%30-70(h/h) Ach-50mM PBS (pH 6.0) çözümlerinde oluşan mobil fazda (Mobil Faz-2) elde edilmiş 10-6M parasetamol ve fenilefrin hidroklorür'e ait tipik HPLC-ECD kromatogramı. Akış hızı 1,0 mL/dk, analitik kolon: Thermo ODS-2 Hypersil, 250mmx4.6mm, 5µm partikül çapı, 80Å por çapı. 20µL loop hacmi. Çalışma potansiyelinin kromatograma etkisi.	104

43	%30-70(h/h) Ach-50mM PBS çözgen sisteminden oluşan mobil fazda (Mobil Faz-2) elde edilmiş 10-6M parasetamol ve fenilefrin hidroklorür'e ait tipik HPLC-ECD kromatogramı. Akış hızı 1,0 mL/dk, Eçalışma: +900 mV (Ag/AgCl'e karşı), analitik kolon: Thermo ODS-2 Hypersil, 250mmx4.6mm, 5µm partikül çapı, 80Å por çapı. 20µL loop hacmi. Mobil faz pH değerinin kromatograma etkisi.	105
44	%75-25(h/h) MeOH-50mM PBS (pH 6.0) çözgen sisteminden oluşan mobil fazda elde edilmiş 10-6M parasetamol'e (PA) ait tipik UPLC-DAD kromatogramı. Akış hızı 100µL/dk. Analitik kolon: Thermo Synchronis C18, 50mmx2.1mm, 1.7µm, 100 Å por çapı. 10µL loop hacmi.	106
45	%75-25(h/h) MeOH-50mM PBS (pH 6.0) çözgen sisteminden oluşan mobil fazda elde edilmiş 10-6M fenilefrin'e (PE) ait tipik UPLC-DAD kromatogramı. Akış hızı 100µL/dk. Analitik kolon: Thermo Synchronis C18, 50mmx2.1mm, 1.7µm, 100 Å por çapı. 10µL loop hacmi.	107
46	%75-25(h/h) MeOH-50mM PBS (pH 6.0) çözgen sisteminden oluşan mobil fazda elde edilmiş 10-6M parasetamol (PA) ve fenilefrin'e (PE) ait tipik UPLC-DAD kromatogramı. Akış hızı 100µL/dk. Analitik kolon: Thermo Synchronis C18, 50mmx2.1mm, 1.7µm, 100 Å por çapı. 10µL loop hacmi.	108
47	%75-25(h/h) MeOH-50mM PBS (pH 6.0) çözgen sisteminden oluşan mobil fazda elde edilmiş 10-6M parasetamol'e (PA) ait tipik UPLC-DAD kromatogramı. Akış hızı 500µL/dk. Analitik kolon: Thermo Synchronis C18, 50mmx2.1mm, 1.7µm, 100 Å por çapı. 10µL loop hacmi.	109
48	%75-25(h/h) MeOH-50mM PBS (pH 6.0) çözgen sisteminden oluşan mobil fazda elde edilmiş 10-6M fenilefrin'e (PE) ait tipik UPLC-DAD kromatogramı. Akış hızı 500µL/dk. Analitik kolon: Thermo Synchronis C18, 50mmx2.1mm, 1.7µm, 100 Å por çapı. 10µL loop hacmi.	109
49	%75-25(h/h) MeOH-50mM PBS (pH 6.0) çözgen sisteminden oluşan mobil fazda elde edilmiş 10-6M parasetamol (PA) ve fenilefrin'e (PE) ait tipik UPLC-DAD kromatogramı. Akış hızı 500µL/dk. Analitik kolon: Thermo Synchronis C18, 50mmx2.1mm, 1.7µm, 100 Å por çapı. 10µL loop hacmi.	110
50	%75-25(h/h) MeOH-50mM PBS (pH 6.0) çözgen sisteminden oluşan mobil fazda elde edilmiş 10 ⁻⁶ M parasetamol'e (PA) ait tipik UPLC-DAD kromatogramı. Akış hızı 500µL/dk. Analitik kolon: Thermo Synchronis C18, 50mmx2.1mm, 1.7µm, 100 Å por çapı. 5µL loop hacmi.	111
51	%75-25(h/h) MeOH-50mM PBS (pH 6.0) çözgen sisteminden oluşan mobil fazda elde edilmiş 10-6M fenilefrin'e (PE) ait tipik UPLC-DAD kromatogramı. Akış hızı 500µL/dk. Analitik kolon: Thermo Synchronis C18, 50mmx2.1mm, 1.7µm, 100 Å por çapı. 5µL loop hacmi.	111
52	%75-25(h/h) MeOH-50mM PBS (pH 6.0) çözgen sisteminden oluşan mobil fazda elde edilmiş 10-6M parasetamol (PA) ve fenilefrin'e (PE) ait tipik UPLC-DAD kromatogramı. Akış hızı 500µL/dk. Analitik kolon: Thermo Synchronis C18, 50mmx2.1mm, 1.7µm, 100 Å por çapı. 5µL loop hacmi.	112
53	%75-25(h/h) MeOH-50mM PBS (pH 6.0) çözgen sisteminden oluşan mobil fazda elde edilmiş 10-6M parasetamol (PA) ve fenilefrin'e (PE) ait tipik UPLC-DAD kromatogramı. Akış hızı 200µL/dk. Analitik kolon: Thermo Synchronis C18, 50mmx2.1mm, 1.7µm, 100 Å por çapı. 5µL loop hacmi.	113
54	%75-25(h/h) MeOH-50mM PBS (pH 6.0) çözgen sisteminden oluşan mobil fazda elde edilmiş 10-6M parasetamol (PA) ve fenilefrin'e (PE) ait tipik UPLC-DAD kromatogramı. Akış hızı 300µL/dk. Analitik kolon: Thermo Synchronis C18, 50mmx2.1mm, 1.7µm, 100 Å por çapı. 10µL loop hacmi.	114
55	%75-25(h/h) MeOH-50mM PBS (pH 6.0) çözgen sisteminden oluşan mobil fazda elde edilmiş 10-6M parasetamol (PA) ve fenilefrin'e (PE) ait tipik UPLC-DAD kromatogramı. Akış hızı 300µL/dk. Analitik kolon: Thermo Synchronis C18, 50mmx2.1mm, 1.7µm, 100 Å por çapı. 10µL loop hacmi. Total Scan (A) ve Spectrum Maximum (B).	115
56	%30-70(h/h) Ach-50mM PBS (pH 6.0) çözgen sisteminden oluşan mobil fazda elde edilmiş 10-6M parasetamol (PA) ve fenilefrin'e (PE) ait tipik UPLC-DAD kromatogramı. Analitik kolon: Thermo Synchronis C18, 50mmx2.1mm, 1.7µm, 100 Å por çapı. 5µL loop hacmi. Akış hızının kromatograma etkisi 200 (A), 400 (B) ve 500 (C) µL/dk.	116

57	%30-70(h/h) Ach-50mM PBS (pH 6.0) çözgen sisteminden oluşan mobil fazda elde edilmiş 10 ⁻⁶ M parasetamol (PA) ve 5x10 ⁻⁶ M fenilefrin'e (PE) ait tipik UPLC-DAD kromatogramı. Analitik kolon: Thermo Synchronis C18, 50mmx2.1mm, 1.7µm, 100 Å por çapı. 3µL loop hacmi. Akış hızının kromatograma etkisi 100 (A) ve 500 (B) µL/dk.	117
58	%30-70(h/h) Ach-50mM PBS (pH 6.0) çözgen sisteminden oluşan mobil fazda elde edilmiş 10 ⁻⁶ M parasetamol (PA) ve 5x10 ⁻⁶ M fenilefrin'e (PE) ait tipik UPLC-DAD kromatogramı. Analitik kolon: Thermo Synchronis C18, 50mmx2.1mm, 1.7µm, 100 Å por çapı. 2µL loop hacmi. Akış hızının kromatograma etkisi 100 (A) ve 400 (B) µL/dk.	118
59	%30-70(h/h) Ach-50mM PBS (pH 6.0) çözgen sisteminden oluşan mobil fazda elde edilmiş 10 ⁻⁶ M parasetamol (PA) ve 5x10 ⁻⁶ M fenilefrin'e (PE) ait tipik UPLC-DAD kromatogramı. Analitik kolon: Thermo Synchronis C18, 50mmx2.1mm, 1.7µm, 100 Å por çapı. 2µL loop hacmi. Akış hızının kromatograma etkisi 200 (A), 300 (B) ve 400 (C) µL/dk.	119
60	%30-70(h/h) Ach-50mM PBS (pH 4.0) çözgen sisteminden oluşan mobil fazda elde edilmiş 10 ⁻⁶ M parasetamol (PA) ve 5x10 ⁻⁶ M fenilefrin'e (PE) ait tipik UPLC-DAD kromatogramı. Analitik kolon: Thermo Synchronis C18, 50mmx2.1mm, 1.7µm, 100 Å por çapı. 2µL loop hacmi. Akış hızı: 100 µL/dk.	120
61	%30-70(h/h) Ach-50mM PBS (pH 4.0) çözgen sisteminden oluşan mobil fazda elde edilmiş 10 ⁻⁶ M parasetamol (PA) ve 5x10 ⁻⁶ M fenilefrin'e (PE) ait tipik UPLC-DAD kromatogramı. Analitik kolon: Thermo Synchronis C18, 50mmx2.1mm, 1.7µm, 100 Å por çapı. 2µL loop hacmi. Akış hızı: 100 µL/dk. Total Scan (A) ve Spectrum Maximum (B).	121
62	%75-25(h/h) MeOH-50mM PBS (pH 6.0) çözgen sisteminden oluşan mobil fazda elde edilmiş 10 ⁻⁶ M parasetamol (PA) ve fenilefrin'e (PE) ait tipik kromatogramlar. Yöntem 1'in HPLC'den UPLC'ye transferi.	122
63	%30-70(h/h) Ach-50mM PBS (pH 4.0) çözgen sisteminden oluşan mobil fazda elde edilmiş 10 ⁻⁶ M parasetamol (PA) ve fenilefrin'e (PE) ait tipik kromatogramlar. Yöntem 2'nin HPLC'den UPLC'ye transferi.	123

TABLÖLAR

TABLO NO	AÇIKLAMA	SAYFA NO
1	Alınan örnek miktarına göre Analiz yöntemlerinin isimlendirilmesi	4
2	Maddenin karakteristik özelliğine göre kullanılabilcek Enstrumantel Analiz Yöntemleri	5
3	Belirlenen kategorilere göre yapılması gereken performans özellikleri	54

KISALTMA VE SEMBOLLER DİZİNİ

SEMBOL	ANLAMI
Ach	Asetonitril
Ag/AgCl	Gümüş/Gümüş Klorür Karşılaştırma Elektrodu
%CV	% Varyasyon Katsayısı
s	Standart Sapma
MeOH	Metanol
CV	Döngüsel Voltametri (Cyclic Voltammetry)
DAD	Sıralı Fotodiyot Dedektörü (Diode Array Detector)
PBS	50 mM Fosfat Tamponu Çözeltisi (pH 6,0)
DPV	Diferansiyel Puls Voltametri (Differential Pulse Voltammetry)
ECD	Elektrokimyasal Dedektör (Electrochemical Detector)
UVD	Kızılötesi Görünür Bölge dedektörü (Ultraviolet Visible Detector)
FLD	Flouresans Dedektör (Fluorescence Detector)
GCE	Camımsı Karbon Elektrot (Glassy Carbon Electrode)
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography)
UPLC	Ultra Performanslı Sıvı Kromatografisi (Ultra Performance Liquid Chromatography)
MS	Kütle dedektörü (Mass Detector)
PEEK	Polietilen Etil Keton
S/N	Sinyal /Gürültü oranı
TBAP	Tetrabutylamonyum perklorat
TEFLON	Politetrafloroetilen
THF	Tetrahidrofur
ICH	The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use
FDA	U.S. Department of Health & Human Services, U.S. Food and Drug Administration
CDER	The Center for Drug Evaluation and Research
USP	The U.S. Pharmacopeial Convention
MF1	Mobil Faz 1: %75-25 (h/h) MeOH-50mM PBS (pH=6,0)
MF2	Mobil Faz 2: %30-70 (h/h) Ach-50mM PBS (pH=4,0)

İÇİNDEKİLER

BÖLÜM I.....	1
GİRİŞ.....	1
1.1 GENEL BİLGİLER.....	4
1.1.1 ANALİTİK YÖNTEMLERİN SINIFLANDIRILMASI.....	4
1.1.1.1 KROMATOĞRAFİK YÖNTEMLER.....	6
1.1.1.1.1 KROMATOĞRAFİNİN TEMEL PRENSİP ve KABULLERİ	8
1.1.1.1.1.1 ELÜSYON	8
1.1.1.1.1.2 DAĞILMA SABİTİ.....	9
1.1.1.1.1.3 ALIKONMA ZAMANI.....	9
1.1.1.1.1.4 HACİM AKIŞ HIZI.....	10
1.1.1.1.1.5 DOĞRUSAL AKIŞ HIZI	10
1.1.1.1.1.6 ORTALAMA AKIŞ HIZI.....	10
1.1.1.1.1.7 KAPASİTE FAKTÖRÜ.....	11
1.1.1.1.1.8 AYRILMA FAKTÖRÜ	11
1.1.1.1.1.9 ÇÖZÜNÜRLÜK.....	13
1.1.1.1.1.10 PİK SİMETRİSİ.....	14
1.1.1.1.1.11 KOLON VERİMLİLİĞİ TANIMLAMA	14
1.1.1.1.1.12 TEORİK PLAKA SAYISI.....	14
1.1.1.1.2 KROMATOĞRAFİK YÖNTEMLERİN SINIFLANDIRILMASI	16
1.1.1.1.2.1 YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ	17
1.1.1.1.2.1.1 HPLC TÜRLERİ.....	20
1.1.1.1.2.1.1.1 ADSORPSİYON KROMATOĞRAFİSİ	20
1.1.1.1.2.1.1.2 DAĞILMA KROMATOĞRAFİSİ	21
1.1.1.1.2.1.1.3 İYON DEĞİŞTİRME KROMATOĞRAFİSİ.....	21
1.1.1.1.2.1.1.4 BOYUT ELEME KROMATOĞRAFİSİ	21
1.1.1.1.2.1.1.5 AFİNİTE KROMATOĞRAFİSİ	21
1.1.1.1.2.1.2 HPLC EKİPMANLARI	22
1.1.1.1.2.1.3 HPLC METODUNUN GELİŞTİRİLMESİ.....	22
1.1.1.1.2.2 ULTRA PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ	23
1.1.1.1.2.3 SIVI KROMATOĞRAFI'DE YÖNTEM GEÇERLİLİĞİ	24
1.1.1.1.2.2.1 ICH'E GÖRE YÖNTEM GEÇERLİLİĞİ	25
1.1.1.1.2.2.1.1 ICH YAPISI ve YÖNERGE OLUŞTURMA SÜRECİ	25
1.1.1.1.2.2.1.2 ICH KILAVUZU	30
1.1.1.1.2.2.1.2.1 GEÇERLİ KILINMASI GEREKEN ANALİTİK PROSEDÜR TÜRLERİ	30
1.1.1.1.2.2.1.2.2 TANIMLAR	31
1.1.1.1.2.2.1.2.2.1 ÖZGÜLLÜK	32
1.1.1.1.2.2.1.2.2.2 DOĞRUSALLIK	34
1.1.1.1.2.2.1.2.2.3 TAYİN ARALIĞI	35
1.1.1.1.2.2.1.2.2.4 DOĞRULUK	36
1.1.1.1.2.2.1.2.2.5 KESİNLİK.....	39
1.1.1.1.2.2.1.2.2.6 TAYİN SINIRI	40
1.1.1.1.2.2.1.2.2.7 NİCELEME SINIRI	42
1.1.1.1.2.2.1.2.2.8 SAĞLAMLIK.....	44
1.1.1.1.2.2.1.2.2.9 SİSTEMLİK UYGUK TESTİ	45
1.1.1.1.2.1.4.2 USP'YE GÖRE YÖNTEM GEÇERLİLİĞİ.....	46
1.1.1.1.2.1.4.2.1 GEÇERLİLİK PARAMETRELERİ	47
1.1.1.1.2.1.4.2.1.1 DOĞRULUK	47
1.1.1.1.2.1.4.2.1.2 KESİNLİK.....	48
1.1.1.1.2.1.4.2.1.3 ÖZGÜLLÜK	49
1.1.1.1.2.1.4.2.1.4 TAYİN SINIRI	50

1.1.1.1.2.1.4.2.1.5 NİCELEME SINIRI.....	51
1.1.1.1.2.1.4.2.1.6 DOĞRUSALLIK ve ÇALIŞMA ARALIĞI	52
1.1.1.1.2.1.4.2.1.7 SAĞLAMLIK	53
1.1.1.1.2.1.4.2.1.8 SİSTEM UYGUNLUĞU.....	53
1.1.1.1.2.1.4.3 CDER'E GÖRE YÖNTEM GEÇERLİLİĞİ	55
1.1.1.1.2.1.4.3.1 GEÇERLİLİK PARAMETRELERİ	55
1.1.1.1.2.1.4.3.1.1 DOĞRULUK	55
1.1.1.1.2.1.4.3.1.2 TAYİN ve NİCELEME SINIRI.....	56
1.1.1.1.2.1.4.3.1.3 DOĞRUSALLIK.....	57
1.1.1.1.2.1.4.3.1.4 KESİNLİK.....	57
1.1.1.1.2.1.4.3.1.5 TAYİN ARALIĞI	59
1.1.1.1.2.1.4.3.1.6 GERİ KAZANIM	59
1.1.1.1.2.1.4.3.1.7 SAĞLAMLIK	59
1.1.1.1.2.1.4.3.1.8 ÖRNEK ÇÖZELTİ KARARLILIĞI	60
1.1.1.1.2.1.4.3.1.9 ÖZGÜLLÜK/SEÇİCİLİK	60
1.1.1.1.2.1.4.3.1.10 SİSTEM UYGUNLUK SPESİFİKASYONLARI VE TESTLERİ	61
1.1.1.1.2.4 HPLC'DEN UPLC'YE YÖNTEM TRANSFERİ.....	67
1.1.1.1.2.4.1 Tanımı.....	67
1.1.1.1.2.4.2 Transferde dikkate alınan deneysel parametreler	67
1.1.1.1.2.4.3 Literatürdeki çalışmalar	68
1.1.1.1.2.4.4 Mevcut ticari yaklaşımlar	68
BÖLÜM II.....	70
2.1 GEREÇ ve YÖNTEM.....	70
2.1.1 KULLANILAN KİMYASAL MADDELER.....	70
2.1.1.1 STANDART MADDELER.....	70
2.1.1.1.1 YÜKSEK SAFLIKTA STANDART MADDELER.....	71
2.1.1.1.2 ANALİTİK STANDART MADDELER	71
2.1.1.1.3 REFERANS STANDART MADDELER	71
2.1.1.2 MOBİL FAZ ÇÖZELTİSİ.....	71
2.1.1.3 SEYRELTME ÇÖZELTİSİ.....	72
2.1.1.4 ELEKTROT ÖN TEMİZLİK ÇÖZELTİSİ.....	72
2.1.2 KULLANILAN DONANIM	72
2.1.2.1 HPLC DONANIMI	72
2.1.2.2 UPLC DONANIMI.....	73
2.1.2.3 ELEKTROKİMYA DONANIMI	73
2.1.2.4 SPEKTROFOTOMETRE DONANIMI.....	74
2.1.2.5 DİĞER DONANIMLAR	74
2.1.3 YÖNTEM	74
2.1.3.1 ÖN TEMİZLİK İŞLEMİ	74
2.1.3.2 ELEKTROT ÖN TEMİZLİK ÇÖZELTİSİNİN HAZIRLANMASI.....	74
2.1.3.3 CAMSI KARBON ELEKTROT ÖN TEMİZLİK İŞLEMİ.....	75
2.1.3.4 HPLC MOBİL FAZ ÇÖZELTİSİNİN HAZIRLANMASI	75
2.1.3.5 STANDART ÇÖZELTİSİNİN HAZIRLANMASI	76
2.1.3.6 ANALİZ ÇÖZELTİSİNİN HAZIRLANMASI	76
2.1.4 ÖLÇÜM İŞLEMLERİ.....	76
2.1.4.1 ELEKTROANALİTİK ÖLÇÜMLER	76
2.1.4.1.1 DÖNGÜSEL VOLTAMETRİ (CV)	76
2.1.4.1.2 DİFERANSİYEL PULS VOLTAMETRİSİ (DPV)	77
2.1.4.2 SPEKTROFOTOMETRİK ÖLÇÜMLER	77
2.1.4.3 SIVI KROMATOĞRAFİK ÖLÇÜMLER.....	77
2.1.4.3.1 HPLC ÖLÇÜM TEKNİĞİ	77
2.1.4.3.2 UPLC ÖLÇÜM TEKNİĞİ	78
2.1.4.3.3 STANDART ÇÖZELTİLERİN TAYİNİ.....	78
BÖLÜM III.....	79

3.1 BULGULAR	79
3.1.1 ELEKTROKİMYASAL BULGULAR	79
3.1.1.1 PARASETAMOL BULGULARI	79
3.1.1.2 KLORFENİRAMİN MALEAT BULGULARI	83
3.1.1.3 FENİLEFRİN HİDROKLORÜR BULGULARI	83
3.1.1.4 İBUPROFEN BULGULARI	87
3.1.2 SPEKTROSKOPİK BULGULAR	90
3.1.2.1 PARASETAMOL BULGULARI	92
3.1.2.2 KLORFENİRAMİN MALEAT BULGULARI	92
3.1.2.3 FENİLEFRİN HİDROKLORÜR BULGULARI	93
3.1.2.4 İBUPROFEN BULGULARI	94
3.1.3 KROMATOĞRAFİK BULGULAR	95
3.1.3.1 HPLC BULGULARI	96
3.1.3.2 UPLC BULGULARI	106
3.1.3.3 HPLC'DEN UPLC'YE YÖNTEM TRANSFERİ BULGULARI	122
BÖLÜM IV	124
4.1 TARTIŞMA	124
4.1.1 ELEKTROKİMYASAL BULGULARIN İNCELENMESİ	124
4.1.2 SPEKTROSKOPİK BULGULARIN İNCELENMESİ	128
4.1.3 KROMATOĞRAFİK BULGULARIN İNCELENMESİ	130
4.1.3.1 HPLC BULGULARININ İNCELENMESİ	130
4.1.3.2 UPLC BULGULARININ İNCELENMESİ	134
4.1.3.3 HPLC'DEN UPLC'YE YÖNTEM TRANSFERİ BULGULARININ İNCELENMESİ	139
BÖLÜM V	142
5.1. SONUÇ ve ÖNERİLER	142
5.2 ÖZET	143
5.3 SUMMARY	145
5.4 KAYNAKLAR	147
5.5 ÖZGEÇMİŞ	153

BÖLÜM I

GİRİŞ

Farmasötik analizlerde etkin madde tayinleri için “*altın standart yöntem*” olarak da adlandırılan sıvı kromatografi (LC) yöntemlerinden yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile ilaç etkin maddelerinin miktar tayinleri standart analitik LC yöntemlerinin kullanımıyla 1970’li yıllardan beri yapılmaktadır (7,10,13,15,19,34,35,37). Günümüz koşullarında, analiz sürelerinin kısaltılması, yöntem etkinliğinin ve çözünürlüğünün artırılması, örnek hacminin (ve dolayısıyla enjeksiyon hacminin) düşürülmesi, atık çözen (mobil faz) hacminin ve analiz giderlerinin azaltılması yönünde yoğunlaşan talepler nedeniyle konvansiyonel HPLC ile kıyaslandığında hızlı ve çok hızlı (fast, ultra fast) LC yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır (3,5,6,14,16,20,31,36,50,55). Sıvı kromatografide son yıllarda genel eğilim olarak analiz süresi onlarca dakika sürebilen HPLC yöntemlerinin yerini artık toplam analiz süresi 1-2 dakika civarında olan ultra performanslı sıvı kromatografisi (UPLC) yöntemleri almaktadır (2,4,8,9,11,12,23-26,28,32,38-41,46,48-54,56-60). Tez konusu Farmasötik Ar-Ge baz alınarak irdelendiğinde ve yeni bir ilaç etkin maddesinin geliştirilmesi için ortalama 10-15 yıl kadarlık zaman dilimine ve gene ortalama 1 milyar Amerikan doları (\$) civarı yatırıma ihtiyacı olduğu düşünüldüğünde bu amaçla yapılan Ar-Ge faaliyetlerinin maliyetlerini düşürmede ilaç etkin maddesinin ilgili analizlerinin yapıldığı analitik laboratuvarın analiz giderlerini azaltabilmesi açısından HPLC’den UPLC’ye yöntem transferinin önemi her bir etkin madde için

gerçekleştirilen yüzbinlerce analiz dikkate alındığında daha da iyi anlaşılabilir. Bahsi geçen bu ekonomik etken o kadar önemlidir ki, küresel ilaç sektörünün Ar-Ge faaliyetleri hakkındaki birçok uluslararası raporda, yeni bir ilaç molekülü geliştirmenin katlanarak artan maliyetleri sebebiyle karlılığın oranının giderek düştüğü ve Ar-Ge faaliyetlerinin maliyetinin azaltılması yoluyla verimliliğin arttırılamaması durumunda küresel ilaç sanayi şirketlerinin patent sürelerinin dolması nedeniyle kaybettikleri imtiyazların yerine yenilerinin konması için başarılı yeni ilaç moleküllerine yönelik yeterli yenilikçi (inovatif) Ar-Ge faaliyetlerini finanse edemeyeceği ortaya konmaktadır (43).

Dolayısıyla ultra performanslı sıvı kromatografisi (UPLC), yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC)'ne kıyasla göreceli olarak daha düşük tayin ve belirleme sınırları, yüksek tekrarlanabilirlik, kısa analiz süresi, sarf malzemesi tasarrufu, daha az tehlikeli atık miktarı gibi sağladığı yararlar nedeniyle son yıllarda hızla HPLC'nin yerini almaktadır (3,5,14,28,32,37,38,41,50,55). Mevcut durumda sıklıkla sorunla karşılaşılan süreç, geçerli (valide) HPLC yöntemlerinin UPLC'ye transferi aşamasıdır (13,15,39,56). Benzer analizlerin UPLC ile yapılmasının çok sayıda faydası olmakla birlikte analitik yöntemin, UPLC donanımı kullanılarak çalışılacak olması nedeniyle, yeniden deneysel olarak oluşturulması, sınanması ve geçerlilik (validasyon) testlerinin yapılması gibi başlıca sakıncaları da bulunmaktadır. Çalışmamızda her iki cihaz arasında yöntem transferi ve adaptasyonunun, hızlı, az sorunlu ve olabildiğince az deney yapılarak gerçekleştirilmesine yardımcı olmak için, tamamıyla analitik verilere dayalı bir şekilde yöntem transferinin

incelenmesi amaçlanmıştır. Tez konusunda hedeflenen iki adet model ilaç etkin maddeleri ile (fenilefrin hidroklorür-PE ve parasetamol-PA) deneysel olarak elde edilecek HPLC ve UPLC miktar tayini yöntemi bulguları incelenerek HPLC'den UPLC'ye, akış hızı, enjeksiyon hacmi, analitik kolon özellikleri, sıcaklık, mobil faz kombinasyonu, analiz zamanı gibi deneysel parametrelerin dönüştürülmesi için çalışmalar yürütülecektir. Elde edilecek verilerin ışığında yapay sinir ağlarının ve/veya kemometrik bazı yöntemlerin (PCA, vb) kullanıldığı HPLC'den UPLC'ye yöntem transferi için interaktif bir web sayfasının tez çalışmaları tamamlandıktan sonra oluşturulması düşünülmektedir. Kromatografik donanım ve sarf malzemeleri tedarikçileri olan Phenomenex (<http://www.phenomenex.com/tools/kinetexcalculator#>), Agilent (http://www.chem.agilent.com/en-US/products-services/Instruments-Systems/Liquid-Chromatography/Pages/1200infinity_cost_calculator.aspx) ve Thermo Scientific (<http://www.hplctransfer.com/IsocraticMethod.aspx>) firmaları yöntem transferi konusunda hali hazırda spesifik web siteleri oluşturmaya başlamışlardır. Devam etmekte olan tez çalışmamızın tamamlanmasından sonra yerli bir yaklaşımla benzer bir web sayfasının kullanıma sunulması hedeflenmektedir.

1.1 GENEL BİLGİLER

1.1.1 ANALİTİK YÖNTEMLERİN SINIFLANDIRILMASI

Kimyanın konusu içerisinde analitik yöntemler genel olarak ifade edildiğinde klasik ve entrumantel kimyasal analiz olmak üzere ikiye ayrılırlar. Klasik kimyasal analiz yöntemleri, gelişen teknoloji ve endüstriyle beraber veri değerleri bakımından arka planda kalmış gibi gözükse de halen analizin temelini oluşturmaktadır. Analit numunesi içindeki bileşenlerin ayırımı için çöktürme, ekstraksiyon veya damıtma işlemleri uygulanmaktadır. Analite ait olan, kaynama veya erime noktaları, standart çözücü içindeki çözünürlük değerleri, renk değişimleri en basit sonuca ulaşılan kalitatif analiz yöntemleridir. Analitin veya analitten elde edilmiş başka bir bileşiğin kütlesinin tayin edildiği “*Gravimetri*” ve ölçümü yapılan analit ile tamamen reaksiyona giren standart reaktifin kütlesi veya hacminin bulunduğu “*Titrimetri*” birçok laboratuarda kantitatif analiz amacıyla kullanılan yöntemlerdir. Entrumantel analiz, klasik kimyasal analizin yetersiz kaldığı mikro analiz yöntemlerinde tercih edilir (Tablo 1).

TABLO 1 Alınan örnek miktarına göre Analiz yöntemlerinin isimlendirilmesi

Analiz Yöntemi	Alınan Örnek Miktarı
Adi ve Makro Yöntem	100,00 mg
Yarı Mikro Yöntem	10,00 mg
Mikro Yöntem	1,00 mg
Ultra Mikro Yöntem	0,001 mg veya 1,00 µg
Submikrogram Yöntem	0,01 µg

Numune içindeki bileşenlerin yüksek verimli ayırma ve tayininde yararlanılan karakteristik özelliklerden bazıları Tablo 2' de verilmiştir.

TABLO 2 Maddenin karakteristik özelliğine göre kullanılacak Enstrumantal Analiz Yöntemleri

Karakteristik Özellikler	Enstrumantal Yöntemler
Işın Emisyonu	Emisyon spektroskopisi(x-ışınları, uv, görünür bölge, elektron auger); Flouresans, Fosforesans ve Luminesans(x-ışınları, uv ve görünür)
Işın Absorpsiyonu	Spektrofotometri ve Fotometri(x-ışınları, uv ve görünür bölge, IR); Foto Akustik Spektroskopisi; Nükleer Manyetik Rezonans
Işın Saçılması	Türbidimetri; Nefelometri; Raman Spektroskopisi
Işık Kırılması	Refraktometri; Interferometri
Işın Difraksiyonu	X-ışınları ve elektron difraksiyon yöntemleri
Işın Rotasyonu	Polarimetri; Optik rotary dispersiyon; Dairesel Dikroizm
Elektrik Potansiyeli	Potansiyometri; Kronopotansiyometri
Elektrik Yükü	Kulometri
Elektrik Akımı	Amperometri; Polarografi
Elektriksel Direnç	Kondüktometri

Analitin ölçülen özelliğine göre enstrumantal analiz üç alt başlık altında incelenir:

A) Spektral yöntemler, numune içindeki atom, molekül veya iyonların, bir enerji düzeyinden diğerine geçişleri sırasında elektromanyetik ışımının karakteristik özelliklerinde meydana gelen değişimlerin (Tablo 2) elektronik sinyallere dönüştürerek gözlenebilmesini sağlar.

B) Elektroanalitik yöntemler, Maddenin elektrik enerjisi ile etkileşimi sonucu oluşan kimyasal enerjiyi, elektronik sinyaller dönüştürerek gözlenebilmesini sağlar (Tablo 2).

C) Kromatografik yöntemler, numune içerisinde yer alan, kimyasal ve fiziksel özellikleri benzer bileşenlerin bir matris içinden geçirilmesi sonucunda, analitin yüksek verim ile diğer türlerden ayrıldığı yöntemlerdir. Analitin karakteristik özelliklerinin tespit edilmesiyle beraber kullanılan uygun bir dedektör ile yüksek duyarlılıkta analizler gerçekleştirilebilir.




1.1.1.1 KROMATOĞRAFİK YÖNTEMLER

Sıvı bir mobil fazın kullanıldığı Kromatografik yöntemlerin(Sıvı kromatografisi) tarihçesi incelendiğinde kayıtlı ilk çalışmaların 1855 yılında boyar maddelerin tanınmasında reaktif emdirilmiş filtre kâğıdı kullanımını öneren Alman Kimyacı Friedrich Ferdinand Runge, 1860 yılında maddelerin filtre kâğıdında kapiler etki nedeniyle çözgenle farklı hızlarda sürüklendiğini bildiren Christian Friedrich Schönbein ve öğrencisi Friedrich Goppelsroeder bunları takiben 1906 yılında bitkilerin renk pigmentleri ile ilgili ayırım çalışmaları bulunan Rus botanikçi Mikhail S. Tsvet⁽¹⁾ tarafından gerçekleştirildiği görülmektedir (Şekil1). Tsvet, cam kolon içerisine doldurduğu toz CaCO₃ içerisinden, bitkilerden izole ettiği bitki pigment ekstralarını geçirdiğinde, klorofil ve ksantrofil gibi birçok bitki pigmentine ait

¹Tsvet M (1906 a) Physikalisch-chemische Studien über das Chlorophyll. Die Adsorptionen. Ber Dtsch Botan Ges 24: 316-323

Tsvet M (1906 b) Adsorptionsanalyse und chromatographische Methode. Anwendung auf die Chemie des Chlorophylls. Ber Dtsch Botan Ges 24: 384-393

renk ayırımları gözlemlemiştir (40). Renk ayırımına dayanan bu yöntem ise Latince renk anlamına gelen “chroma” ve yazma anlamına gelen “graphein” sözcüklerini kullanarak “chromatographie” kromatografi adını vermiştir.

<p>Friedlieb Ferdinand Runge</p>  <p>Born 8 February 1795 Hamburg, Germany</p> <p>Died 25 March 1867 (aged 72) Oranienburg, Germany</p> <p>Residence Germany</p> <p>Nationality German</p> <p>Institutions University of Berlin, University of Breslau</p> <p>Alma mater University of Jena, University of Berlin</p> <p>Doctoral advisor Johann Wolfgang Döbereiner</p>	<p>Christian Friedrich Schönbein</p>  <p>Born 18 October 1799 Metzingen, Germany</p> <p>Died 29 August 1886 (aged 86) Baden-Baden, Germany</p> <p>Residence Germany, Switzerland</p> <p>Nationality German</p> <p>Institutions University of Basel</p> <p>Known for fuel cell, ozone, gun cotton</p>	<p>Mikhail Tsvet</p>  <p>Born 14 May 1872 Asti, Italy</p> <p>Died 26 June 1919 (aged 47)</p> <p>Nationality Russia</p> <p>Fields botany</p> <p>Known for adsorption chromatography</p>
---	--	---

ŞEKİL 1 Kromatografik yöntemlerin gelişmesine yardım eden bazı önemli bilim adamları

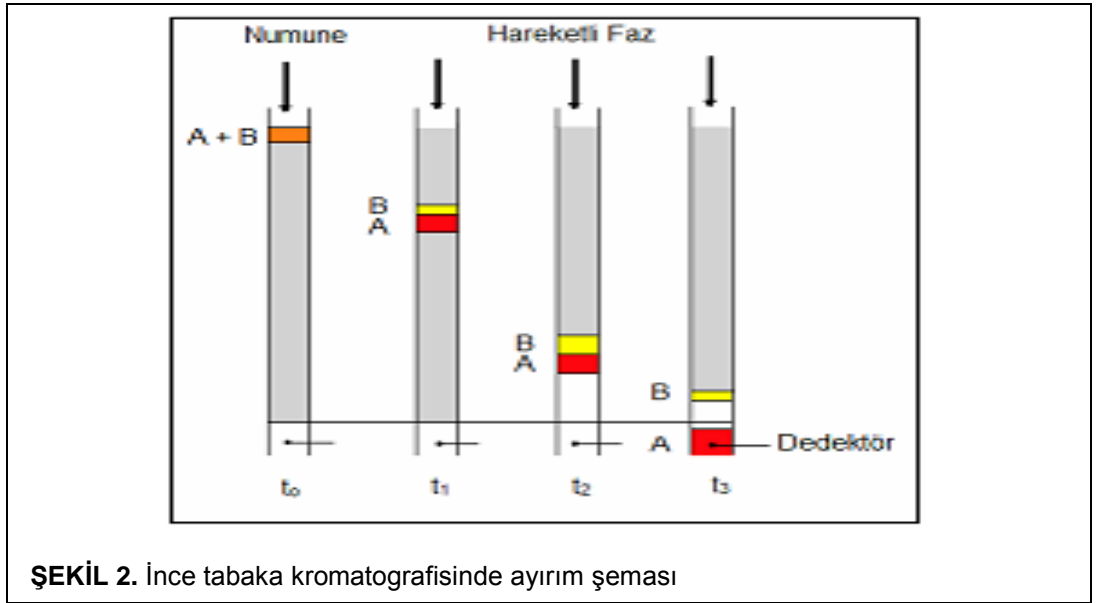
Önceleri düzlemsel yapıda sabit fazlar kullanılmış ve bu teknikler daha sonra kağıt kromatografisi ve ince tabaka kromatografisi - ITK (thin layer chromatography -TLC) olarak isimlendirilmiştir. Modern sıvı kolon kromatografisi ise 1969 yılında YBSK'nin kullanıma girmeye başlamasıyla gelişme göstermiştir. Bu yöntemlerin bilime büyük katkılar yapması sonucu bu alandaki buluşlarına karşılık 1952 yılında A. J. MARTİN ve R. L. M. SYNGE'ye Nobel ödülü verilmiştir. 1937 ve 1972 yılları arasında alınan 12 Nobel Ödülü kromatografinin önemli rol oynadığı çalışmalara verilmiştir. Şüphesiz bu sayı günümüze kadar daha da artmıştır. Son yıllarda hem birçok yeni kromatografik teknik geliştiği ve hem de bilimcilerin kompleks

karışımları ayırmak için daha iyi tekniklere gereksinimleri arttığı için, kromatografik uygulamalar büyük oranda artış göstermektedir.

1.1.1.1.1 KROMATOĞRAFİNİN TEMEL PRENSİP ve KABULLERİ

1.1.1.1.1.1 ELÜSYON

Matris'e eklenen çözücüyle maddenin taşınması işlemine "elüsyon" denir. Sıvı kromatografinin ilk örnekleri olan ince tabaka kromatografisinde, madde ilerlemesi bu yöntemle yapılırdı (Şekil 2).

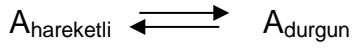


Burada dolgu maddesine tutunan numune, hareketli faz varlığında çözünerek ilerler ve bileşenleri tutunma farklılıklarına göre ayrılır. Dolgu maddesinin kolon içine tutturulduğu kolon kromatografi yöntemlerinde de temel işleyiş bu şekildedir. Numunedeki bileşenlerin etkin bir şekilde birbirinden ayrılması ve kromatografik ölçümlerde yapılan kabullerin birçoğu, maddelerin kolondaki elüsyon hızlarına bağlıdır. Bu hızlar,

maddenin hareketli ve durgun fazlar arasında dağılmasını sağlayan reaksiyonların denge sabitlerinin büyüklüğü ile belirlenir.

1.1.1.1.1.2 DAĞILMA SABİTİ

Çözünen madde için, hareketli faz ve durgun faz arasında bir denge olduğu varsayılır ise, oluşan tepkime şu şekilde ifade edilebilir;



Reaksiyonun K denge sabiti, analitin hareketli fazdaki molar derişimi c_m ve durgun fazdaki molar derişimi c_s ile doğru orantılıdır.

$$K = \frac{c_s}{c_m}$$

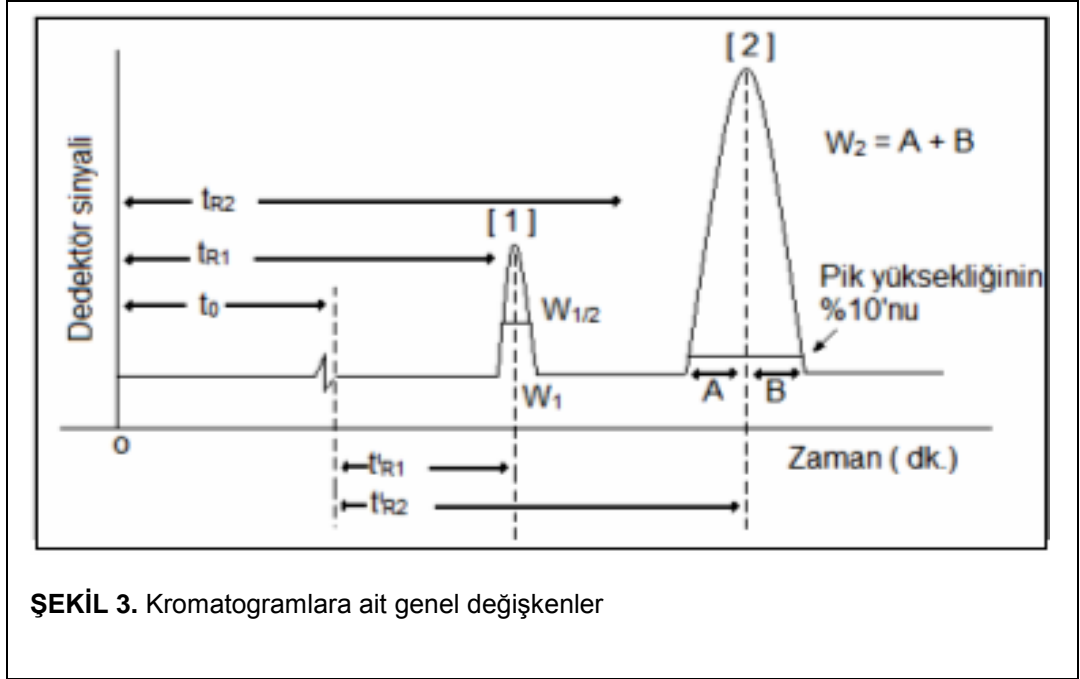
Yukarıdaki eşitliğin geçerli olduğu kromatografiye *doğrusal kromatografi* denilir. Doğrusal kromatografinin, simetrik Gauss tipi pikler vermesi ve alıkonma zamanlarının enjekte edilen analit miktarından bağımsız olması gibi özellikleri vardır.

1.1.1.1.1.3 ALIKONMA ZAMANI

Kolona enjekte edilen maddenin dedektöre ulaşması için geçen süreye, alıkonma zamanı(t_{R1}) denir (Şekil 3). Bu süre her kimyasal madde için değişir.

Burada, t_0 = kolona ait ölü zaman, t_R = alıkonma zamanı, t'_R = net alıkonma zamanını gösterir ve şu şekilde hesaplanır;

$$(t_R = t_0 + t'_R)$$



ŞEKİL 3. Kromatogramlara ait genel değişkenler

1.1.1.1.4 HACİM AKIŞ HIZI

F ile sembolize edilir. Birimi mL/dakika olup, alıkonma hacminin alıkonma zamanına bölünmesiyle hesaplanır.

1.1.1.1.5 DOĞRUSAL AKIŞ HIZI

v ile sembolize edilir. Analitin alıkonulma zamanın (t_R) kolon uzunluğunun (L) fonksiyonu olarak değişimini ifade eder.

$$v = \frac{L}{t_R}$$

1.1.1.1.6 ORTALAMA AKIŞ HIZI

u ile sembolize edilir. Mobil fazın kolondan çıkma süresi (t_0) ile kolon uzunluğu (L) arasındaki bağıntıyı ifade eder. Birimi cm/saniye'dir. Ortalama akış hızı, kolonun enine kesitinden bağımsız olup, çözücü

moleküllerinin kolon boyunca hareketleri sırasındaki ortalama hızlarını gösterir.

$$u = \frac{L}{t_0}$$

1.1.1.1.1.7 KAPASİTE FAKTÖRÜ

Alıkonma faktörü de denir ve k' ile sembolize edilir. Kolonda çözünen örneğin göç hızını açıklamada sıkça kullanılan önemli bir terimdir. Kapasite faktörünün sayısal değeri 1'den çok küçük olursa elüsyon çok hızlı olacağından alıkonma zamanının tayini zorlaşır., Kapasite faktörünün 20 – 30'dan büyük olması durumunda ise elüsyon zamanı aşırı uzun olur. İdealde, kromatografik analizler kapasite faktörünün $2 \leq k' \leq 10$ olduğu durumlarda gerçekleştirilir.

$$k'_1 = \frac{t'_{R1}}{t_0} \quad , \quad k'_2 = \frac{t'_{R2}}{t_0}$$

1.1.1.1.1.8 AYRILMA FAKTÖRÜ

Bağıl alıkonma (relative retention) olarakta adlandırılır ve “ α ” ile sembolize edilir. Sistemin, birbirini takip eden 2 maddeyi ayırma gücünün bir göstergesi olup, kapasite faktörlerinin oranıdır. Mobil ve sabit fazın özelliklerinden ve sıcaklıktan etkilenir.

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1}$$

Ayrılma faktörü, analitin hareketli faz ile durgun faz arasındaki dağılımının fonksiyonudur ve değeri birden küçük olamaz.

Bu kabul şu şekilde gösterilir;

$$k_1 = \frac{K_1 V_s}{V_M} \quad , \quad k_2 = \frac{K_2 V_s}{V_M}$$

Burada K_1 ve K_2 , bir ve iki türlerine ait dağılıma sabitlerini, V_s = Durgun fazı, V_M = Hareketli fazı göstermektedir.

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \quad \text{çözömlenirse ;}$$

$$\alpha = \frac{K_2}{K_1} \quad \text{eşitliği}$$

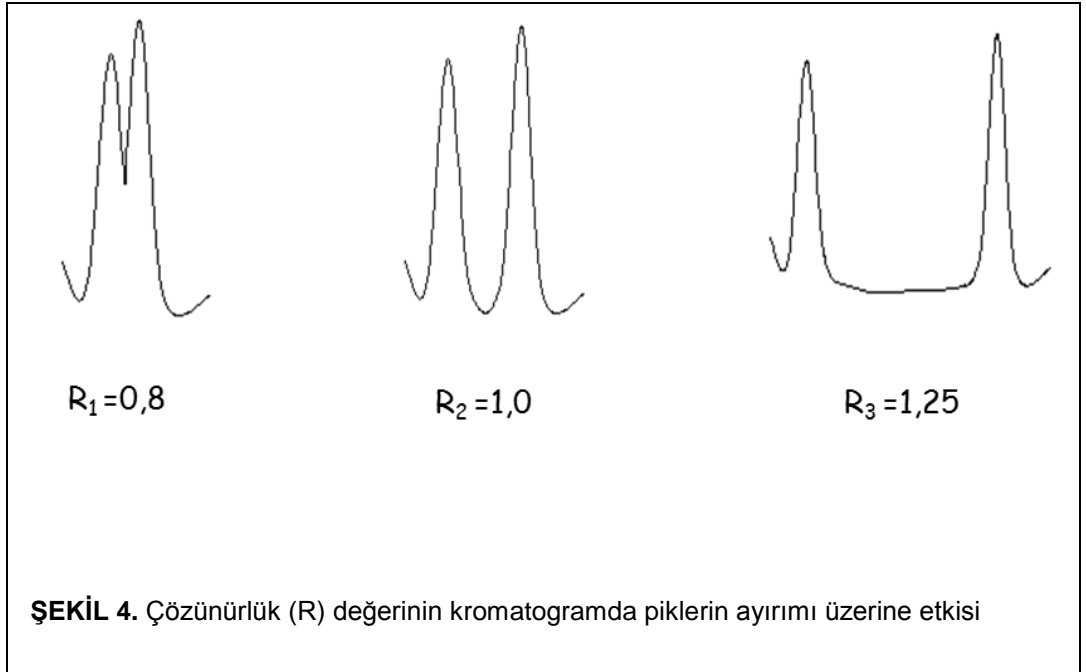
elde edilir. Burada, ikinci tür kolon içerisinde daha uzun sürede çıktığı için dağılıma sabiti birinci türe göre daha büyük olacaktır. Dolayısıyla, $K_2 > K_1$ olacağı için, $\alpha > 1$ olur.

1.1.1.1.9 ÇÖZÜNÜRLÜK

R ile sembolize edilir. Birbirini takip eden iki adet bileşene ait piklerin birbirinden ayırımlarının başarısını(oranını) gösterir. İncelen cevapların alıkonma zamanları arasındaki farkın, iki pik'e ait genişliklerin (birimi dakika) toplamına bölünmesiyle hesaplanır.

$$R = \frac{[2(t_{R2} - t_{R1})]}{W_1 + W_2}$$

Takip eden pikler için iyi bir çözünürlükten bahsedebilmek için hesaplanan R değerinin 1–1,5 civarında olması istenir (Şekil 4).



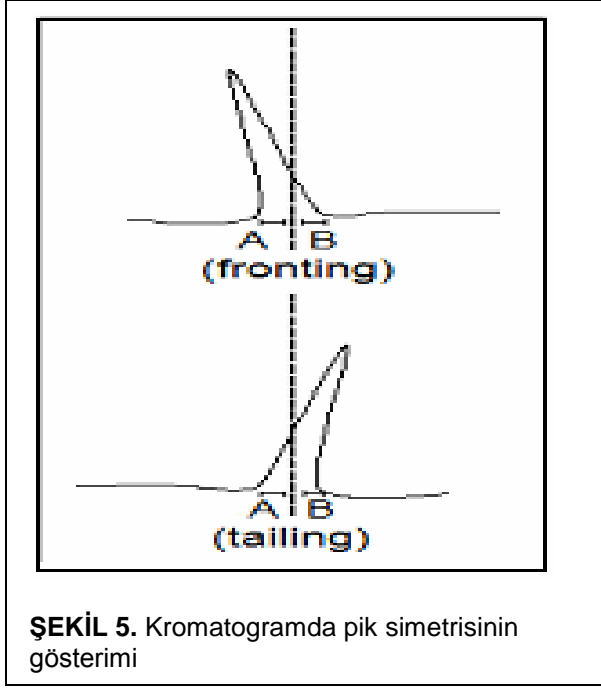
1.1.1.1.10 PİK SİMETRİSİ

Pikin simetrisi yüksekliğinin %10'lık kısmından ölçülür (Şekil 5) . İdeal

simetrinin değeri 1 olup, şu şekilde ölçülür;

$$\text{Simetri} = \frac{A}{B}$$

Simetri <1 ise pik sağa doğru yatık (fronting), Simetri >1 ise pik sola doğru yatık (tailing) olmak üzere asimetric olur



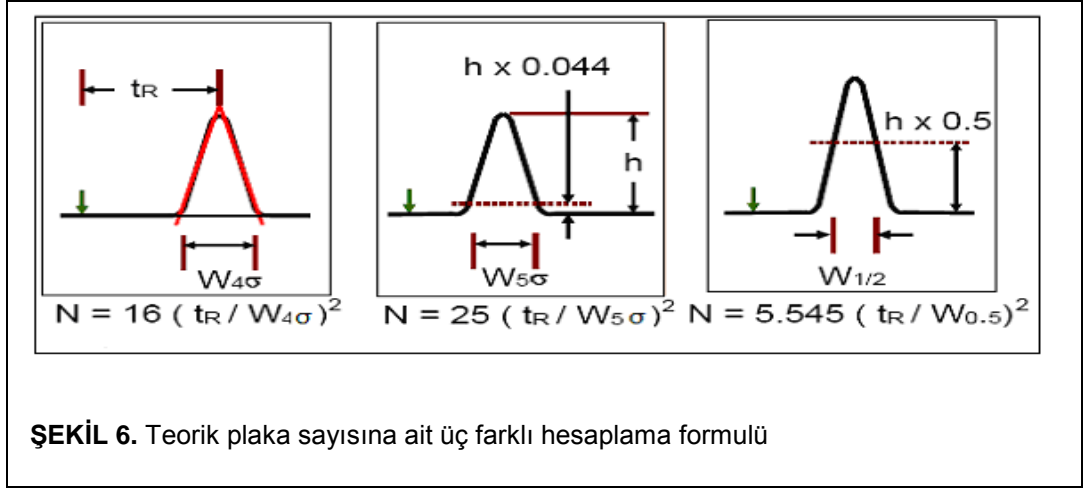
1.1.1.1.11 KOLON VERİMLİLİĞİ TANIMLAMA

Kromatografik kolonun verimliliği bant genişliği ile ilişkilendirilebilir. Numune oluşumunda yer alan bileşenlerin, durgun ve hareketli faz içerisinde dengeli bir şekilde dağıldığı varsayılır. Ancak, bazı hallerde, belli bir fazda kalış süresi diğer faza göre daha uzun veya daha kısa olabilir. Molekül sadece hareketli fazda iken ilerleyebildiği için, durgun fazda kalış süresi arttıkça bant genişliği artar.

1.1.1.1.12 TEORİK PLAKA SAYISI

Teorik plaka sayısı, tabaka yüksekliği ile ilişkilendirilebilir. Bu iki terim arasında,

$$N = L / H$$



bağıntısı vardır. Burada, L = kolon dolgusunun uzunluğu, H = tabaka yüksekliği, N = teorik plaka sayısıdır. Teorik plaka sayısı, kolonun doldurma materyalinin özellikleri ve kütle transferinin başarısı ile ilgili bir ölçüdür. Plaka sayısı arttıkça ve tabaka yüksekliği azaldıkça, kolonun ayırıcılığı artar. Martin ve Synge yapmış oldukları çalışmalarda teorik plaka sayısı ve tabaka sayısı ile ilgili bir takım kabullerde bulunmuşlardır (27).

1.1.1.1.2 KROMATOGRFİK YÖNTEMLERİN SINIFLANDIRILMASI

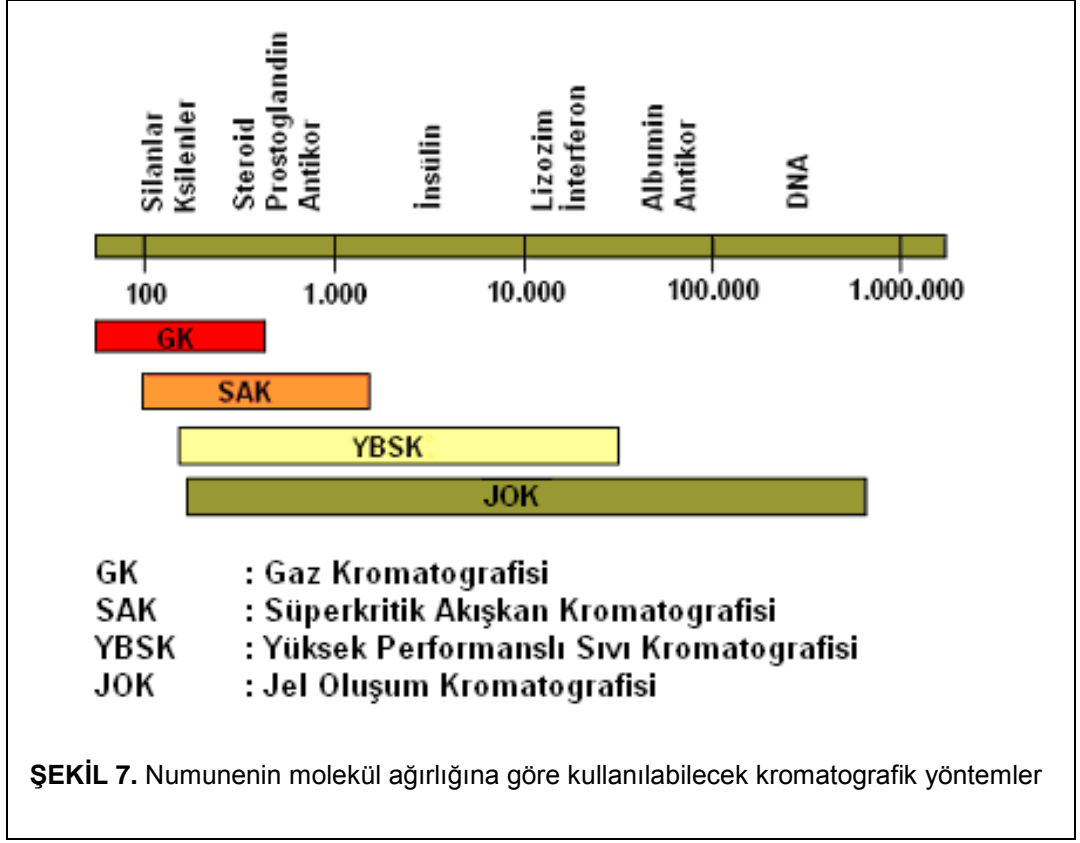
Bu yöntemlerde genel olarak, hareketli faz⁽²⁾ içindeki analit, sabit fazın⁽³⁾ bulunduğu matris içindeki ilerleme hızlarının farklı olması sonucu karışımındaki diğer bileşimlerden ayrılır. Burada, sabit fazın tutturulduğu yüzey ve hareketli fazın bileşimine göre kromatografik yöntemleri sınıflandırma gereği ortaya çıkmıştır. Sabit fazın tutturulduğu yüzeye göre “Tabaka kromatografisi” ve “Kolon kromatografisi” olmak üzere ikiye ayrılırlar.

- a) Düzlemsel kromatografi: Sabit fazın düz bir plaka veya bir kâğıdın gözeneklerine tutturulduğu ve hareketli fazın kapiler etkisi veya yerçekimi ile yürütüldüğü yöntemlerdir.
- b) Kolon kromatografisi: Burada, sabit faz kolon içerisine tutturulurken, hareketli faz basınç veya yerçekimi ile matris içerisinden geçirilir.

Hareketli fazın bileşimine göre ise “Gaz kromatografisi”, “Sıvı kromatografisi” veya “Süper kritik akışkan kromatografisi” olmak üzere üçe ayrılır. Bahsedilen bu üç yöntemin hangisinin analiz esnasında kullanılacağı, genellikle çalışılan numunenin molekül büyüklüğüyle ilişkilendirilebilir (Şekil 7).

² Analit maddesini içeren gaz veya sıvı ortam

³ Ayrımın gerçekleşeceği yüzey üzerine tutturulan, üzerinde aktif gruplar bulunan dolgu maddesi.



1.1.1.1.2.1 YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ

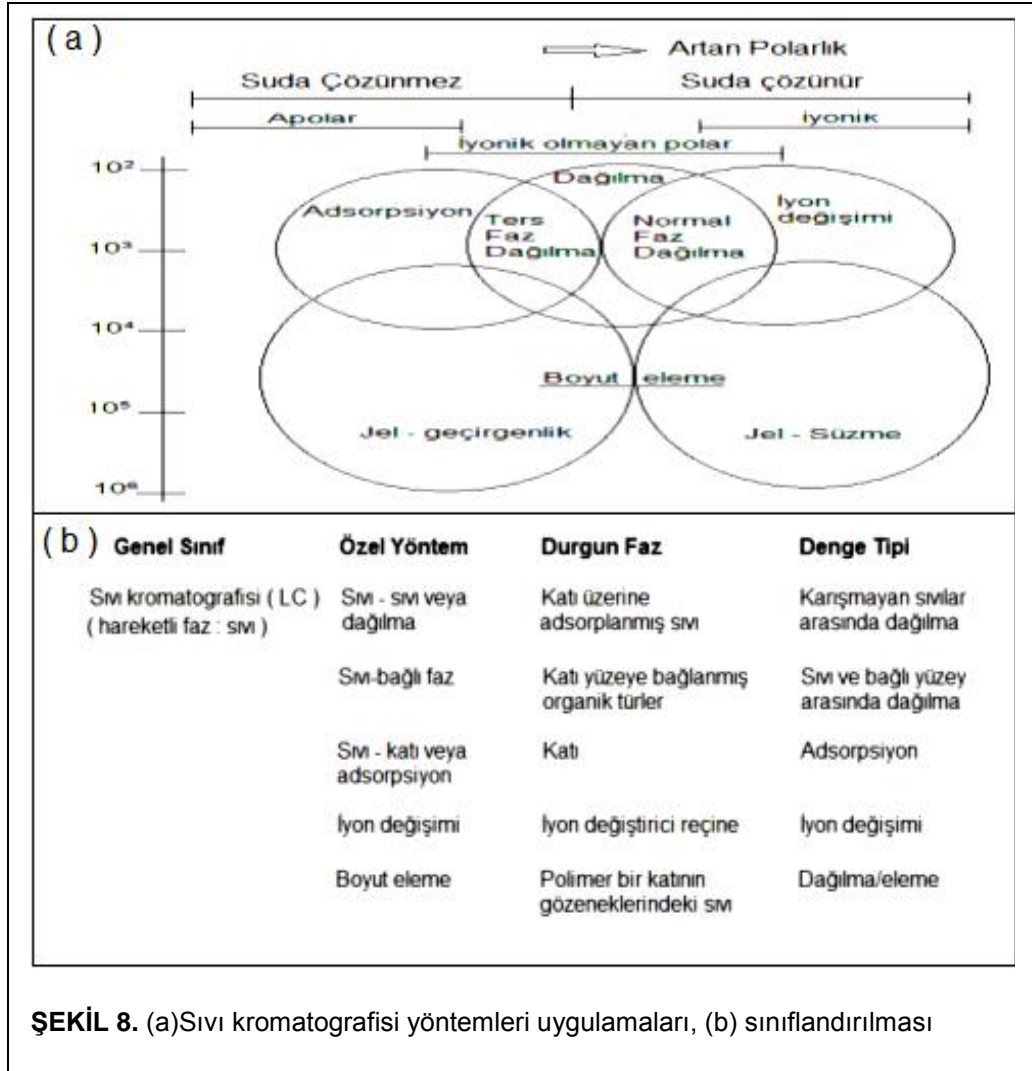
Sıvı kromatografisinin ilk uygulamalarında, kullanılan tabaka kromatografisi yöntemlerinde (Şekil 2) hareketli faz, kolon içerisinde kapiler etki veya yer çekimi ile taşınıyordu. Bu yöntemlerde analitin kolondaki ilerleme hızı dakikada milimetrenin birkaç ondalık kesri kadar oluyordu (46). Ayırma işlemlerinin uzun sürmesi nedeniyle akış hızı arttırılmak istenmiştir. Bu doğrultu da ilk olarak, dolgu maddeleri kolon içine girmiş ardından basınç veya vakumlama işlemleri ile akış hızı arttırılmıştır. Böylece, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yöntemi ortaya çıkmıştır. Artan akış hızı, analiz süresini kısaltmış fakat ayırma verimini düşürmesi nedeniyle uygulamada karşılaşılan problemler ortaya çıkmıştır. Yapılan çalışmalar sonucu dolgu maddelerinin partikül boyutlarını küçülterek verimin arttırılabileceği bulunmuştur. Gelişen teknoloji ile

beraber kolon dolgu maddelerinin partikül boyutları 3 – 10 µm arasına çekilmiş bu da kolon verimini yükseltmiştir. Zaman içinde; kısa analiz süreleri, duyarlılığı, ayırma verimindeki yükseklik, kompleks çözeltilere uygulanabilirliği ve kantitatif tayinlere uygulanabilirliği bakımından diğer sıvı kromatografi yöntemlerinden üstünlüğü gözlemlenmiş ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi adı kabul görmüştür.

Şekil 26., kolon kromatografisi yönteminde, analit maddesinin karakteristik özelliklerine göre yapılan, durgun faz seçimini ve analitin seçilen iki faz arasındaki hareketini ve bu tercihler sonrasında kullanılan özel yöntemlerin isimlerini göstermektedir.

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi, kullanılan durgun faza göre beş sınıfa ayrılır (Şekil 8b).

- a) Adsorpsiyon
- b) Dağılma
- c) İyon değiştirme
- d) Boyut eleme
- e) Afinite kromatografisi



ŞEKİL 8. (a)Sıvı kromatografisi yöntemleri uygulamaları, (b) sınıflandırılması

1.1.1.1.2.1.1 HPLC TÜRLERİ

1.1.1.1.2.1.1.1 ADSORPSİYON KROMATOĞRAFİSİ

Durgun fazın katı, hareketli fazın sıvı olduğu adsorpsiyon kromatografisi, sıvı kromatografisinde en çok kullanılan yöntemdir. Burada, çözgen maddeler polarite farklılıklarına göre yüzeye adsorbe olur.

a) Durgun fazın polar olduğu durumlar

Silis ve alüminanın durgun faz olarak kullanıldığı bu sistemde, polar fonksiyonel gruplar içeren moleküller, durgun fazdaki polar gruplarla dipol – dipol etkileşimlerine girerek yüzeye tutundukları gibi bazende yüzeydeki fonksiyonel gruplarla kimyasal bağ oluşumuna katılırlar. Kolon içinde meydana gelen bu kimyasal bağ oluşumları, alıkonma zamanlarını uzatmakla beraber genellikle tersinmez olup kolonda tıkanmalara sebebiyet verirler ya da kolon dolgu maddesinde çözünmelere neden olurlar (9).

b) Durgun fazın Apolar olduğu durumlar

Kimyasal bağlı apolar fazlar, polar durgun fazlara göre daha kolay hazırlanırlar. Durgun fazın polar olduğu normal kromatogramlarının tersine apolar olduğu için *ters faz* olarak da adlandırılır. Kullanılan durgun fazın hidrofobik olduğu bu yöntemde kuvvetli tutunmalar meydana gelir, bu da alıkonma zamanlarını arttırır. Howard ve Martin (15) yapmış oldukları çalışmadan bu yana kullanım alanları artan ters faz kolonların avantajları ve özellikleri için pek çok çalışma yapılmıştır (6, 9).

1.1.1.1.2.1.1.2 DAĞILMA KROMATOĞRAFİSİ

Sıvı – sıvı ve bağlı faz kromatografisi olmak üzere ikiye ayrılır. Adsorpsiyon kromatografisinden farklı olarak bu yöntemde durgun faz sıvıdır ve kolon dolgu maddesi yüzeyine fiziksel adsorpsiyonla tutturulmuştur. Ayırım, analizlenecek maddenin her 2 sıvıdaki çözünürlüğünün farklı olması esasına dayanmaktadır. Adsorpsiyon kromatografisine göre en önemli dezavantajı, kolonun sıklıkla rejenere edilmesi gereğidir. Ayrıca, durgun – faz farklı sıvılarda farklı çözündüğü için gradient elüsyon için uygulama zorlukları görülür.

1.1.1.1.2.1.1.3 İYON DEĞİŞTİRME KROMATOĞRAFİSİ

Yüklü bir maddenin ters yükle yüklenmiş katı bir sabit fazla tutulması prensibine dayanır. Sabit faz genellikle asit veya baz fonksiyonel grupları içermektedir. İyonların kalitatif ve kantitatif analizleri için etkili bir yöntemdir.

1.1.1.1.2.1.1.4 BOYUT ELEME KROMATOĞRAFİSİ

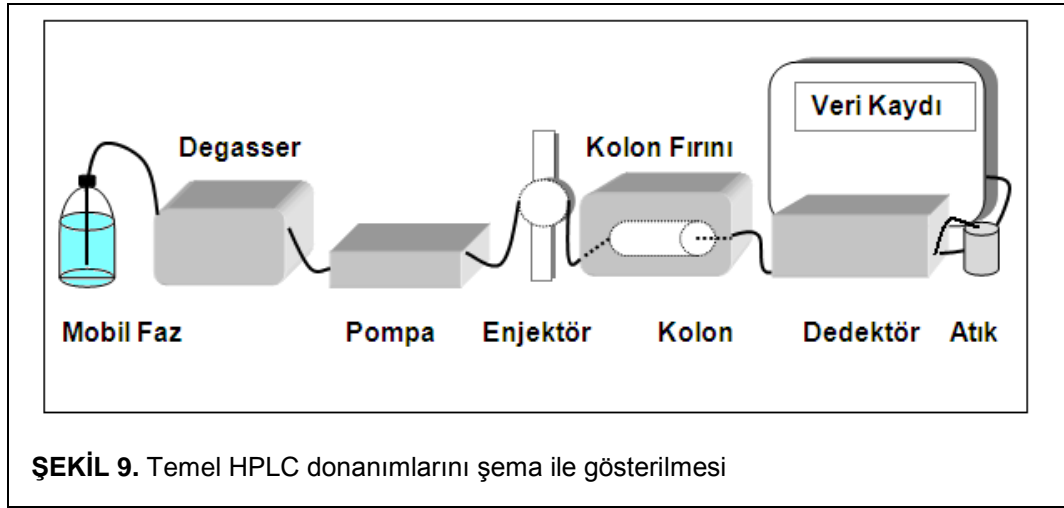
Analizlenecek maddelere ait moleküller boyutlarına göre ayrılmaktadır. Bu işlem için çok değişik por çapları içeren dolgu maddesiyle doldurulmuş kolonlar kullanılmaktadır. Böylece değişik çaplardaki porlar birer elek gibi davranarak maddeleri boyut(çaplarına) göre alıkoymaktadır.

1.1.1.1.2.1.1.5 AFİNİTE KROMATOĞRAFİSİ

Alıkonma mekanizması maddeye özgün olmakta ve anahtar-kilit modeline uygun biyolojik materyaller dolgu malzemesi olarak kullanılmaktadır. Maliyetinin çok yüksek olması nedeniyle uygulama alanı oldukça kısıtlıdır.

1.1.1.1.2.1.2 HPLC EKİPMANLARI

HPLC donanımları temel olarak; pompa, enjektör, kolon ve dedektör bileşenlerinden oluşmaktadır (Şekil 9). Zaman içinde analiz işlemlerini standardize etmek ve böylece analiz sırasında oluşan girişimleri engellemek için degazır, otomatik örnekleyici, kolon fırını, vb. gibi çok çeşitli ara aparatlar geliştirilmiştir.



ŞEKİL 9. Temel HPLC donanımlarını şema ile gösterilmesi

1.1.1.1.2.1.3 HPLC METODUNUN GELİŞTİRİLMESİ

Kullanılacak HPLC metodunun geliştirilmesi için öncelikli olarak analizin amacı ve gerekleri öne koyulmalıdır. Bu bağlamda, analitin fiziksel ve kimyasal özellikleri incelenerek kullanılacak olan dedektör, mobil faz, durgun faz ve çalışılacak olan HPLC sistemi belirlenir. Devamında ise; metodu geliştirmek için ayrılacak olan zaman, enjeksiyon başına maksimum analiz zamanı, birim zamanda incelenecek olan numune sayısı, olası analit degradasyonları (hidroliz, fotoliz, dehidrasyon, termoliz vb.) ve bozunma ürünleri öngörülmelidir. Son olarak ise geçerliliğin gereği olarak tayin sınırı, doğrusallık, doğruluk ve kesinlik parametreleri tespit edilmelidir. Bu bağlamda bahsedilen gerekler şu şekilde sıralanabilir:

- Örneğe ait fiziksel ve kimyasal özelliklerin belirlenmesi
- Örnek hazırlanmasına ait detayların belirlenmesi
- Dedektör seçiminin yapılması
- Kromatografik ayırma koşullarının saptanması
- Kromatografik koşulların optimize edilmesi
- Muhtemel problemler için özel çözüm işlemlerinin saptanması
- Rutin laboratuvar analizleri için metodun validasyonu

1.1.1.1.2.2 ULTRA PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ

UPLC kelimesi İngilizce “*Ultra Performance Liquid Chromatography*” kelimelerinin baş harflerinden oluşturulmuş bir kısaltmadır. Literatüre bakıldığında UPLC® kelimesinin kromatografik donanım ve sarf malzemeleri tedarikçisi olan Waters Corporation firmasının tescilli ticari markası olduğu görülmektedir. Bahsi geçen firma UPLC anlamında ilk donanım ve ürünlerini ticarileştirirken UPLC kelimesi içinde marka tescili almıştır. Bu sebeple literatürde UPLC kelimesinin yerine UHPLC’de aynı anlamda kullanılmaktadır. UHPLC kelimesi ise İngilizce “*Ultra High Performance Liquid Chromatography*” kelimelerinin baş harflerinden oluşturulmuş bir kısaltmadır. Ancak çoğu kaynakta sıklıkla UPLC ve UHPLC kelimeleri birbirinin yerine kullanılmaktadır. Tezimiz içerisinde kullanılacak kısaltmalarda bir kargaşaya yol açmamak için sadece UPLC kelimesi kullanılmıştır. UPLC donanımlarının temelde HPLC donanımlarının bir sonraki nesilleri olduğu kabul edilmektedir. Bununla beraber bazı donanımsal özellikler UPLC’leri HPLC’lere oldukça üstün kılmaktadır. Bu özelliklerin başında yüksek çalışma basıncı gelmektedir.

UPLC donanımları standart HPLC çalışma basıncı olan 400 Bar'ın çok üstünde 1250 Bar basınç değerlerine kadar sorunsuz şekilde çalışabilmektedirler. Bu sayede partikül büyüklüğü ve kolon iç çapı çok daha küçük analitik kolonlarla çalışılabilmektedir. Örneğin HPLC kolonları partikül çapları 5µm dolaylarındayken UPLC'lerde bu değer 1,5µm düzeyindedir. Kolon iç çapları HPLC'lerde 4-5mm iken UPLC'lerde 1-2mm dolaylarına inebilmektedir. Bu tarz tasarımsal üstünlüklerinin yanısıra UPLC kullanımı beraberinde analiz giderlerinde önemli faydalar sağlamaktadır. Analiz sürelerinin ortalama 20-40 dakika aralığında olduğu HPLC analizlerinin yanında UPLC analizlerinin süresi genellikle 2-4 dakika dolaylarında olmaktadır. Yaklaşık 10 kata kadar varan bu zaman tasarrufu az sayıda analizde belki çok önemli bulunmasa da çok sayıda örnek söz konusu olduğunda analiz giderlerinde ciddi tasarruflara olanak sağlamaktadır. Örneğin zaman sıkılaşması kısaldığından birim zamanda 10 kat daha fazla iş yapılabilir, enerji tasarrufu sağlanacak, yaklaşık 10 kat daha az miktar atık çözgen çıkması sağlanarak tehlikeli atık bertaraf işlemlerine ait maliyetlerde ciddi tasarruf sağlanabilecektir. Tüm sayılan bu faydalarının yanında özde tasarım ve kullanım prensipleri olarak UPLC'ler HPLC'lerden çığır açacak boyutta farklı tasarımlar değildir.

1.1.1.1.2.3 SIVI KROMATOGRAFI'DE YÖNTEM GEÇERLİLİĞİ

“Validasyon” kelimesi *ing.* valid = geçerli kelimesinden türetilmekle birlikte Türkçe bir ifade değildir. Adı geçen kelimenin Türkçe bilimsel literatürdeki kullanılmaya başlanan karşılığı “geçerlilik” tir. Bununla beraber hala sıklıkla “validasyon” ifadesi kullanılmaktadır. Tez çalışmalarımızın bilimsel

literatürde Türkçe terimlerin yer edinmesine katkıda bulunması açısından tezimiz genelinde “validasyon” kelimesi yerine “geçerlilik” ifadesi kullanılacaktır.

1.1.1.1.2.2.1 ICH'E GÖRE YÖNTEM GEÇERLİLİĞİ

1.1.1.1.2.2.1.1 ICH YAPISI ve YÖNERGE OLUŞTURMA SÜRECİ

Analitik yöntem geçerliliği çalışmaları tarihçe açısından incelenecek olursa bu alanda ilk yaklaşımların, Belçika/Brüksel’de 1990 yılında toplanan ve ev sahipliği Avrupa İlaç Endüstrileri ve Birlikleri Federasyonu (European Federation of Pharmaceutical Industries and Associations – EFPIA) tarafından yapılan “İnsanlarda Kullanılan İlaçların Ruhsatlandırılması İçin Teknik Gerekliliklerin Belirlenmesi Uluslararası Konferansı” (*International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use – ICH*) isimli kongrede sergilendiği görülmektedir.

ICH düzenleyici kurulları 6 farklı kuruluş tarafından oluşturulmuş bir tüzel kişiliktir. Bu kuruluşlar sırasıyla,

1. Avrupa Komisyonu: Avrupa Birliğini oluşturan 27 üye ülkeyi temsilen, Avrupa İlaç Ajansı (European Medicines Agency – EMEA)’ya ait İnsan Kullanımı için Tıbbi Ürünler Komitesi (Committee for Medicinal Products for Human Use – CHMP)
2. Avrupa İlaç Endüstrileri ve Birlikleri Federasyonu (EFPIA): Merkezi Brüksel’de bulunan Federasyon, AB’ye ait 29 Ulusal İlaç Endüstrisi Birlikleri ve Ar-Ge alanında faaliyet gösteren ileri gelen 45 ilaç

firmasının katılımıyla oluşturulmuştur. EFPIA'nın öncelikli ilgi alanları AB Komisyonu ve EMEA ile uyum içerisindedir.

3. Japonya Sağlık, İş ve Sosyal Yardım Bakanlığı: (Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan – MHLW) Japonya'da ilaç ruhsatlandırma işlemlerinin onaylanması ve yönetilmesinden sorumlu kurumdur. ICH aktivitelerine sağlanan teknik ve bilimsel katkılar konusunda düzenlemeler 2004'de kurulan İlaç ve Tıbbi Cihazlar Ajansı (PMDA) ve Sağlık Bilimleri Ulusal Enstitüsü tarafından koordine edilmektedir.
4. Japonya İlaç Üreticileri Birliği (JPMA): 20'si yabancı 75 katılımcı ile oluşturulmuş bir kurum olup tamamı temel Ar-Ge tabanlı ilaç üreticileridir. Görevleri arasında rekabete dayalı, uluslararası gelişime açık ulusal bir ilaç endüstrisinin geliştirilmesi ve uluslararası standart ve normların üye firmalarca uygulanmasının özendirilmesi gibi yenilikçi görevler bulunmaktadır. ICH ile olan ilişkiler aynı zamanda ICH Uzman Çalışma Grupları'nda (ICH Expert Working Groups) görev alan uzmanlardan kurulu özgün alt komitelerce yürütülmektedir.
5. Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA): İlaçlar, biyolojik materyeller, tıbbi cihazlar, kozmetikler ve radyolojik ürünler konusunda oldukça geniş sorumlulukları olan bir kurumdur. Dünyanın en büyük düzenleyici kurumu olarak ABD'de kullanıma sunulan tüm ilaç ve ilgili ürünleri konusunda sorumluluğu bulunmaktadır. ICH ile ilgili yükümlülükleri İlaç Değerlendirme ve Araştırma Merkezi (Center for Drug Evaluation and Research – CDER) ve Biyolojik Ürünler

Değerlendirme ve Araştırma Merkezi (Center for Biologics Evaluation and Research – CBER) tarafından koordine edilmektedir.

6. Amerikan İlaç Araştırmaları ve Üreticileri Birliği (Pharmaceutical Research and Manufacturers of America – PhRMA): Kuruluş ABD’de Ar-Ge tabanlı ilaç endüstrüsünü temsil etmektedir. Birliğe üye 67 ticari kuruluş reçetelendirilmiş ilaç formülasyonları konusunda tasarım, sentez ve üretim faaliyetlerinde, ayrıca 24 Ar-Ge merkezi de aynı konuda biyolojik araştırma faaliyetlerinde bulunmaktadır. PhRMA, teşkilat yapısında yer alan Bilimsel ve Düzenleyici Bölümünün sağladığı katkılarla ICH’in faaliyetlerine teknik girdi sağlamaktadır. PhRMA’ya üye ticari kuruluşlarından uzmanların ICH’in ilgi alanlarında faaliyet gösterebilmeleri için özel komiteler oluşturulmuştur.

ICH yöntem geçerliliği yönergelerinin oluşturulması 5 basamaklı bir işlemler serisi olup kısaca;

Adım 1: Uzman Çalışma Grubu Uzlaşma Süreci

Yönetim kurulu yeni bir konu olarak bir konsept rapor kabul ettiğinde, konsensüs oluşturma süreci başlar. Raportör, genellikle uzman çalışma grubu(Expert Working Group) (EWG) (UÇG) içindeki sanayi kuruluşlarını temsil eden saygı değer 6 üyesi arasından seçilir. Bu UÇG düzenleme ve sanayi kurumları (her bir kurum ve bölgeden oy veren bir üye), ve gözlemcilerden oluşur. Raportör, UÇG’den seçilmiş uzmanların görüşlerine ve tasarıda yer alan konulara dayanarak, kılavuz için bir ön

yazı hazırlar. Ön yazı ve güncel gözden geçirmeler yorumlamaları için UÇG üyelerine sunulur. Çoğu kez, UÇG konsültasyonu yazışmalarla yapılır. UÇG'nin yüz yüze yapılan toplantıları normalde sadece yılda iki kere yapılan yönetim kurulu toplantıları esnasında yapılır. Her Yönetim Kurulu toplantısında geçici raporlar oluşturulur. UÇG esnasında bir konsensüs olursa Uzman Sonlandırma Raporu imzalanır ve onay verilmesi için yönetim kuruluna sunulur. Belirlenen süre içerisinde UÇG üyeleri arasında bir fikir birliği oluşmaz ise yönetim kurulu harmonizasyon projesinin süresini uzatabilir, erteleyebilir veya tamamıyla yürürlükten kaldırabilir.

Adım 2: Yönetim Kurulu tarafından UÇG konsensüsünün onaylanması

Yönetim kurulu, UÇG'nin raporu göz önüne alarak, taslak kılavuz için teknik konularda yeteri kadar bilimsel konsensüs oluştuğuna karar verdiğinde Adım 2'ye ulaşılır. Bu metin Adım 2 Nihai Belgesi olarak yönetim kurulu tarafından kabul edilir.

Adım 3: Tartışma ve Düzenleyici Konsensüs

Taslak yayınlandığı üç bölgede konsültasyon konusu olur. Avrupa Birliği (CHMP taslağı veya CVMP kılavuzu), Japonya (MHLW çevirisinden sonra) ve ABD (Federal kayıtlarda taslak kılavuz olarak yayınlandıktan sonra) ve bu şekilde bu bölgelerdeki herkes bu taslak hakkında yorum yapabilir. Bu taslak, oluşum aşamasında yorumda bulunamayan ICH bölgeleri dışında kalan alanlardaki şirketler, dernekler ve yetkililere, IFPMA ve WHO

tarafından dağıtılır. Böylece taslak hakkında yorum yapma fırsatı bulurlar. Konsültasyon sonuçlarının tümü toplandıktan sonra UÇG çalışmaya devam eder. Düzenleyici kurumdan tercihen önceki raportörle aynı bölgeden olmak üzere yeni bir raportör atanır. Konsültasyon sonuçlarının 2. Adım Nihai Belge içinde yer alması için 1.Adım' açıklanan prosedür aynı şekilde uygulanır. 4.Adım Uzman belgesi olarak adlandırılan 3.Adım'ın bir sonucu olarak taslak döküman oluşturulur. Konsültasyonun bir sonucu olarak UÇG'nun düzenleyici ve sanayiye temsil eden üyeleri düzenlemeler konusunda anlaşır, 4. Adım Uzman belgesi sadece UÇG'nun düzenleyici üyeleri tarafından imzalanır ve ICH yönteminin 4. Adımı olarak kabul edilmek üzere yönetim kuruluna sunulur. Belirlenen süre içerisinde UÇG üyeleri arasında bir fikir birliği oluşmaz ise yönetim kurulu harmonizasyon projesi için belirlenen bu süreyi uzatabilir, güncel tasarıyı geri çekebilir ve prosesin tekrar 1.Adımdan ele alınmasını isteyebilir veya projeyi tamamıyla erteleyebilir ya da geri çekebilir.

Adım 4: Harmonize edilmiş 3 Partili(AB, JAPONYA, ABD) ICH kılavuzunun Adaptasyonu

Teknik konular üzerinde yeteri kadar bilimsel konsensüs olduğu Yönetim Kurulu tarafından kabul edildiğinde Adım 4'e ulaşılır. Bir endüstri partisi, konsensüste revize edilmiş taslaktan sapmalar olduğu için kılavuzun kabulüne şiddetli bir şekilde itiraz eder ise düzenleyici partiler, revize edilmiş taslağın ileri bir konsültasyonda değerlendirilmesini onaylayabilirler. Bu durumda, UÇG tartışmaları tekrar başlatılabilir. Adım 4

Nihai Belge harmonize edilmiş 3 partili bir ICH kılavuzu olarak ICH'nin düzenleyici partileri için Yönetim Kurulu tarafından onaylanır.

Adım 5: Yürürlüğe Geçirme

Harmonize edilmiş 3 partili ICH kılavuzu prosesin düzenleyici uygulamalarını içeren son adımı için acilen yürürlüğe konur. AB, Japonya ve ABD içerisinde, bu adım diğer bölgesel düzenleyici kılavuzlar ve gereksinimler için geçerli olan benzer ulusal/bölgesel prosedürlere göre yapılır. Yapılan düzenleyici hareketler ve uygulanma tarihleri hakkında geri bildirimler ICH sekretaryası tarafından yönetim kuruluna raporlanır ve ICH resmi internet sitesinde yayınlanır.

1.1.1.1.2.2.1.2 ICH KILAVUZU

Avrupa Komisyonu, Japonya ve Amerika'daki düzenleyiceler ve birçok sayıdaki kompendalar arasında sıklıkla karşılaşılan farklılıklar arasında köprü kurmak için bazı terim ve tanımlar bu kılavuzda açıklanmıştır. Kılavuzda yer alan parametreler gözetilerek analitik bir prosedürün geçerli kılınmasındaki hedef, istenilen sonuç için geliştirilen yöntemin uygun olduğunun gösterilmesidir.

1.1.1.1.2.2.1.2.1 GEÇERLİ KILINMASI GEREKEN ANALİTİK

PROSEDÜR TÜRLERİ

- A. Tanımlama testleri; Örnek içerisindeki bir analitin kesin bir şekilde tanımlanması amaçlanır. Bu normal olarak bir örnek özelliğinin

(spektrum, kromatografik davranış, kimyasal reaktivite, vb. gibi) bir referans standarda ait aynı özelliğin karşılaştırılmasıyla yapılır.

B. Safsızlık testleri (safsızlık içeriği için kantitatif testler ve safsızlık kontrolü için sınır testleri); Her iki test için de, örneğin saflık özelliklerinin tam olarak yansıtılması amacıyla yapılır.

C. Müstahzar ürün, etkin madde veya müstahzar ürün içindeki seçilen diğer bileşen örnekleri içindeki etkin parçaların(active moiety) kantitatif testler; kimyasal analiz prosedürleri, verilen bir örnek içinde var olan analitin tayinini amaçlar. Bu döküman içinde, Kimyasal analiz yöntemi: etkin madde içindeki ana bileşen(ler)in kantitatif tayini olarak kabul edilmiştir. Müstahzar ürünler, etkin ve diğer seçilen bileşen(ler) içinde benzer geçerlilik parametreleri uygulanabilir. Yine aynı şekilde dissolüsyon testleri içinde bu parametreler kullanılabilir.

Müstahzar ürün için dissolüsyon testi veya etkin madde için partikül büyüklüğü tayin testi gibi bir çok sayıda analitik prosedür olmasına rağmen, bunlar analitik prosedürlerin geçerliliği üzerine yayınlanan ilk metin içerisinde yer almazlar. Yukarıda tanımlanan analitik prosedürlerin geçerliliği kılavuzda listelenen prosedürlerin geçerliliği kadar önemli olmamakla beraber bir sonraki döküman içerisinde tanımlanabilirler.

1.1.1.1.2.2.1.2.2 TANIMLAR

Analitik Prosedür, uygulanan analitik yöntemin nasıl yapıldığını gösterir. Uygulanan her analitik test için gerekli basamakların detayları verilmelidir. Örnek, referans standart ve reaktiflerin hazırlanmasının açıklanması,

cihazların kullanımı, kalibrasyon eğrisinin oluşturulması, hesaplamalar için kullanılan formüllerin kullanım vb. gösterilmedi

1.1.1.1.2.2.1 ÖZGÜLLÜK

Var olması beklenen safsızlıklar, bozunma ürünleri, matris, vb., gibi bileşenler içinde analitin tam olarak tayin edilebilme yeteneğidir.

Özgüllük parametresi tanımlama testlerinin geçerliliği, safsızlıkların tayini ve kantitatif analiz sırasında araştırılmalıdır. Analitik bir prosedürün belirlenen analit(tam ayırıcılık) için özel olduğunu göstermek her zaman mümkün değildir. Bu durumda gerekli ayırıcılık seviyesine ulaşmak için 2 ve ya daha fazla analitik prosedürün bir kombinasyonun kullanılması tavsiye edilir.

A. Tanımlama Testleri (Identification Tests):

Geçerli tanımlama testleri, örnek içinde bulunma olasılığı olan benzer yapıları bileşikler arasında ayırım yapmak için gereklidir. Bir prosedürün ayırıcılığı, analiti içeren örneklerden alınan pozitif sonuçlarla(bilinen bir referans madde ile karşılaştırılarak olabilir) analiti içermeyen örneklerden alınan negatif sonuçlar birleştirilerek onaylanabilir. Buna ek olarak, tanımlama testi, analite yapısal olarak benzer veya çokça yakın olan maddelere uygulanarak onlar için pozitif sonuç alınmadığı gösterilmelidir. Girişim yapma potansiyeli olan türler sağlam bilimsel yargılara dayanılarak seçilir.

B. Kantifikasyon ve Safsızlık Test(ler)i:

Kromatografik prosedürler için, temsili kromatogramlar özgülüğü göstermek için kullanılmalıdır ve bileşenler ayrı ayrı uygun bir şekilde etiketlenmelidir. Diğer ayırma teknikleri için benzer kabuller verilmelidir. Kromatografideki kritik ayırmlar uygun bir seviyede incelenmelidir. Kritik ayırmlar için özgülük, elusyon süreleri birbirine yakın iki bileşenin çözünürlükleri verilerek gösterilebilir.

Özgül olmayan bir kantitatif analiz yöntemi kullanıldığı durumda, diğer destekleyici analitik prosedürler genel özgülüğü göstermek için kullanılmalıdırlar. Örneğin, etkin madde salımı için kantitafi analiz yöntemi olarak titrasyon metodu seçildiği durumda, titrasyon metodunun kombinasyonu ve uygun bir test metodu kullanılabilir.

Kabuller, kantitatif analizler ve safsızlık testlerinin her ikisi içinde benzerdir.

- **Safsızlık varlığında**

Kantitatif analizler için, safsızlık ve/veya yardımcı maddeler varlığında analitin ayrıldığı gösterilmelidir; pratikte, bu saf maddeler ile birlikte uygun bir seviyede safsızlık ve/veya yardımcı madde şırınga edilmesiyle deney sonuçlarının bu maddelerin varlığından etkilenmediğinin gösterilmesiyle yapılır(Safsızlık şırınga edilmeyen saf maddelerin deney sonuçlarıyla kıyaslanarak).

- **Safsızlık olmadığı durumlarda**

Safsızlık veya bozunma ürünü standartları temin edilemiyorsa, özgülük, safsızlıkları veya bozunma ürünlerini içeren örneklerin test sonuçları iyi

karakterize edilmiş bir prosedür(farmakopiel metod veya geçerli kılınmış diğer analitik prosedür) ile karşılaştırılarak gösterilebilir. Bu durumda, örnekler ilgili stres koşulları (ışık, ısı, nem, asid/baz hidrolizi ve oksidasyon) altında depo edilir.

Pik saflığı testleri analitin kromatografik pikinin bir bileşenden daha fazla pike ait olmadığını göstermek için faydalı olabilir (DAD veya MS gibi dedektörler kullanılarak).

1.1.1.1.2.1.4.1.2.2.2 DOĞRUSALLIK

Doğrusallık parametresi analitik prosedürün tayin aralığı içinde gösterilmelidir. Doğrusallık doğrudan etkin madde (stok standart çözeltilerin seyreltilmesiyle) ve/veya müstahzara ait bileşenlerden tartılarak önerilen prosedüre göre hazırlanmış sentetik karışımlar üzerinden çalışılabilir. Doğrusallık, analit derişiminin bir fonksiyonu olarak yanıt sinyallerinin görsel izlenmesiyle takip edilebilir. Eğer doğrusal bir ilişki tespit edilirse test sonuçları uygun bir istatistiksel yöntem ile (örneğin en küçük kareler metodu ile regresyon doğrusunun çizilmesi ve ilgili korelasyon katsayısı ve doğru denkleminin hesaplanması) değerlendirilir. Bazı özel durumlarda analiz sonuçlarıyla örnek derişimleri arasında doğrusallığın sağlanabilmesi için bir takım ön matematiksel işlemler (dönüşümler) gerekebilmektedir. Standardizasyon amaçlı yapılan bu işlemlerde belirli bir grup veriden örneğin standart sapma değeri çıkarılmakta ve elde edilen sonuçlar aritmetik ortalamaya bölünmektedir. Bunun gibi yapılan bu matematiksel dönüşümler istatistiksel amaçlı ticari

yazılımların hepsinde “veri indirgenmesi - data reduction” veya “standardize-standardize et” gibi değişik komut ve menü isimleri altında mevcuttur. Regresyon doğru denklemi ve korelasyon katsayısı üzerinden doğrusallığın ölçülmesi ve kıyaslanması mümkün olabilmektedir. Doğrusallık hakkında yorum yapılırken, korelasyon katsayısı, y eksenini keşişme noktası, regresyon doğrusunun eğimi, karelerin artık toplamı (*ing. Residual sum*) gibi veriler gösterilmeli ayrıca veriler grafiklerle sunulmalıdır. İlave olarak gerçek veri noktalarının regresyon doğrusundan sapmasına ait analiz doğrusallığın incelenmesinde yarar sağlamaktadır. İmmünoassay gibi bazı analitik yöntemler verilerin dönüşümü sonrası çoğu zaman doğrusallık göstermedikleri için analitik yanıt, örnekte yer alan analitin derişiminin uygun bir fonksiyonu olarak tanımlanmalıdır. Doğrusallığın kontrolü için en az 5 farklı derişim değeri ICH tarafından önerilmektedir.

1.1.1.1.2.1.4.1.2.2.3 TAYİN ARALIĞI

Analitik bir prosedürün tayin aralığı; örnek içindeki analitin tanımlanan doğruluk ve kesinlik parametrelerinde tayin edilebilen üst ve alt derişimleri arasındaki aralıktır(üst ve alt derişimlerini de içerir). Analitik prosedürün uygun bir seviyede kesinliğe, doğruluğa ve doğrusallığa sahip olduğunu gösterir.

Belirlenen tayin aralığı doğrusallık çalışmaları sonucunda tespit edilir ve uygulanacak prosedürün amacına bağlıdır. Tayin aralığı, geliştirilen analitik yöntem analit içeren bir örneğe uygulandığında veya analitik

yöntemin belirlenmiş uç aralıklarında çalışıldığında doğrusallığın, doğruluğun ve kesinliğin kabul edilebilir bir derecesini sağladığının belirlenmesiyle onaylanır.

Aşağıdaki belirlenmiş minimum aralıklar göz önünde tutulmalıdır.

- Etkin bir madde veya bitmiş bir ürün için yapılan Kantifikasyon testleri için: test derişimin $\pm\%20$ üzerinde
- Benzer içerik için(For content uniformity): Dozaj formunun niteliğine göre daha geniş bir uygulama aralığı seçilmezse, test derişiminin minimum $\pm\%30$ aralıklarını kapsamalıdır,
- Dissolüsyon testleri için: Belirlenen aralığın $\pm\%20$ üzerinde
- Safsızlık tayini için: Safsızlığın rapor edilen bir seviyesinden spesifikasyonun $\%120$ 'sine kadar
- Nadiren güçlü olan veya toksik üreten veya beklenmedik farmakolojik etkileri olan bilinen safsızlar için, tayin ve niceleme sınırı safsızlıkların kontrol edildiği seviyeye orantılı olmalıdır.

Kantifikasyon ve saflık tahlili birlikte yapılıyorsa ve sadece bir $\%100$ standart kullanılmışsa, doğrusallık safsızlığın rapor edilen seviyesinden Kantifikasyon tahlili spesifikasyonlarının $\%120$ 'si için olan aralığı kapsamalıdır.

1.1.1.1.2.1.4.1.2.2.4 DOĞRULUK

Analitik bir prosedürün doğruluğu, gerçek olduğu kabul edilen bir değer veya referans olarak kabul edilmiş bir değer ile analiz sonucunda bulunan değerlerin yakınlıklarının bir ölçüsü olarak tanımlanır.

Doğruluk parametresi, analitik prosedürün belirlenen tayin aralığı içinde gösterilmelidir.

A. Kantifikasyon testleri

A. Etkin madde

Doğruluğun belirlenmesinde birçok metod kullanılır:

- Bilinen bir saflıktaki analit (örn. Referans madde) için analitik bir prosedür uygulanarak ;
- Önerilen analitik prosedürün sonuçları ile doğruluğu tanımlanmış iyi karakterize edilmiş ikinci bir metodun sonuçlarının karşılaştırılması;
- Kesinlik, doğrusallık ve özgüllük sağlandığında doğruluk parametresinin sağlandığı kabul edilebilir.

B. Müstahsar ürün

- Müstahsar ürün bileşenlerinin sentetik karışımları (analiz edilmesi için eklenmiş bilinen miktarda analit) için analitik prosedürün uygulanması
- Müstahsar ürünün tüm bileşenlerinin örneklerini elde etmenin mümkün olmadığı durumlarda, müstahsar ürüne analitin bilinen miktarının eklenmesi veya elde edilen

sonuçların doğruluğu tanımlanmış iyi karakterize edilmiş ikinci bir metodun sonuçlarıyla karşılaştırılması kabul edilebilir;

- Kesinlik, doğrusalılık ve özgüllük sağlandığında doğruluk parametresinin sağlandığı kabul edilebilir.

B. Safsızlıklar(kantitasyon)

Doğruluk bilinen miktarda safsızlık enjekte edilen örnekler üzerinden değerlendirilmelidir.

Gerçek safsızlıklar ve/veya bozunma ürünlerinin örneklerini elde etmenin mümkün olmadığı durumlarda, elde edilen sonuçların bağımsız bir prosedür ile karşılaştırılması kabul edilebilir.

Her bir safsızlığın ayrı ayrı veya hepsinin birden nasıl tanımlanmış olduğu açık bir şekilde gösterilmelidir (örn, ağırlık/ağırlık veya yüzde alan), her durumda asıl analit dikkate alınır.

C. Tavsiye edilen veri

Doğruluk, belirlenen tayin aralığında 3 derişim seviyesinin üzerinde minimumun 9 veri alınarak değerlendirilmelidir (örn, 3 derişim noktası için 3 tekrar).

Doğruluk örnek içine eklenen bilinen miktarda analitin analizi yapılarak veya ortalama ve güven aralıkları ile beraber verilen kabul edilmiş gerçek

değer arasındaki fark olarak geri kazanım yüzdesi şeklinde rapor edilmelidir.

1.1.1.1.2.1.4.1.2.2.5 KESİNLİK

Analitik bir prosedürün kesinliği, tanımlanan koşullar altındaki benzer homojen örneğin çoklu örneklerinden elde edilen bir dizi ölçüm arasındaki yakınlığın bir ölçüsüdür. Kesinlik tekrar edilebilirlik (reproducibility), günler arası kesinlik (intermediate precision) ve tekrarlanabilirlik olmak üzere üç seviyede ifade edilebilir. Kesinlik homojen, otantik örnekler kullanılarak incelenmelidir. Ancak, saf bir örneğin elde edilmesinin mümkün olmadığı durumlarda, yapay olarak hazırlanmış örnek veya örnek çözeltisi kullanılabilir. Analitik bir prosedürün kesinliği genelde bir dizi ölçümün varyansı, standart sapması veya varyasyon katsayısı olarak tanımlanır.

A. Tekrarlanabilirlik

Tekrarlanabilirlik, kısa bir zaman aralığında aynı analiz koşulları altındaki kesinlik olarak tanımlanır. Tekrarlanabilirlik analiz içi (*intra-assay*) kesinlik olarak da ifade edilebilir.

Tekrarlanabilirlik aşağıdakiler kullanılarak değerlendirilmelidir:

- Prosedür için belirlenen aralıkta minimum 9 tayini kapsmalıdır (örn., 3 derişim noktasının her biri için 3 tekrar yapılmalıdır.);
- Minimum 6 tayin için verilerin %100 test derişimi seviyesinde olmalıdır.

B. Günler arası kesinlik

Günler arası kesinlik, laboratuvar içindeki varyasyonlar olarak tanımlanır: farklı günler, farklı analist, farklı ekipmanlar, vb.

Kullanılması amaçlanan prosedürün şartlarına bağlı olarak günler arası kesinliğin genişletilmesi değerlendirilebilir. Rastgele olarak meydana gelen olayların analitik prosedürün kesinliğine olan etkisi başvuru sahibi tarafından değerlendirilmelidir. Farklı günler, analistler, ekipmanlar, vb. gibi tipik varyasyonlar çalışılmalıdır. Bu etkilerin herbirinin ayrı ayrı çalışılması gerekli değildir. Bunun yerine deneysel bir tasarı (matris) kullanılabilir.

C. Tekraredilebilirlik

Tekrar edilebilirlik, laboratuvar (metodolojinin standardizasyonu uygulanması için kullanılan işbirlikçi laboratuvarlar) arası kesinlik olarak tanımlanır.

Tekraredilebilirlik, laboratuvarlar arası bir çalışmanın ortalaması alınarak değerlendirilir. Tekraredilebilirlik, analitik bir prosedürün standardizasyonunun yapılması durumunda (örn., farmakopiler içindeki prosedüre eklenmesi için) düşünülmelidir.

D. Tavsiye edilen veriler

Standart sapma, bağıl standart sapma(varyasyon katsayısı) ve güven aralığı kesinliğin araştırılan her bir parametresi için rapor edilmelidir.

1.1.1.1.2.1.4.1.2.2.6 TAYİN SINIRI

Her bir analitik prosedürün tayin sınırı, örnek içindeki analitin nicel olarak tam bir değer ifade etmesine gerek olmadan tayin edilebilen en düşük miktarıdır. Tayin sınırının belirlenmesi için entrumantel veya entrumantel prosedürlere dayanan pek çok uygulama vardır.

A. Görsel değerlendirme baz alınarak

Görsel değerlendirme enstrumantel ve enstrumantel olmayan metodların her ikisi içinde kullanılabilir. Tayin sınırı analitin bilinen derişimleri ile örnek analizi yapılarak ve güvenilir seviyede tayin edilebilen analitin en düşük seviyesinin bulunmasıyla belirlenir.

B. Sinyal/Gürültü baz alınarak

Bu yaklaşım sadece taban çizgisinde gürültü var olan analitik prosedürler için uygulanabilir. Sinyal/gürültü oranı tayini, analiti bilinen düşük derişimlerini içeren örnekler ile kör örnek sinyalleri karşılaştırarak ve analitin güvenilir şekilde tespit edilebilen minimum derişiminun belirlenmesiyle yapılır. Kabul edilebilir tahmini tayin sınırı için Sinyal/Gürültü oranının genelde 3:1 veya 2:1 arasında olduğu kabul edilir.

C. Eğrinin ve Cevabın standart sapması baz alınarak

Tayin sınırı(DL) aşağıdaki şekilde tanımlanabilir:

$$DL = 3.3 \sigma / S$$

Burada, σ = cevabın standart sapması, S= kalibrasyon eğrisinin eğimini ifade eder. Eğim "S", analitin kalibrasyon eğrisinden hesaplanabilir.

S'nin hesaplanması:

- **Kör çözeltilisinin standart sapmasına baz alınarak**

Kör çözeltilisinin verdiği analitik cevabın büyüklü uygun bir sayıdaki kör örneklerinin analizi ve kör cevaplarının standart sapmalarının hesaplanmasıyla ölçülür.

- **Kalibrasyon eğrisi baz alınarak**

Spesifik bir kalibrasyon eğrisi analit içeren örnekler kullanılarak DL aralığı içinde incelenmelidir. Regresyon doğrusunun y-kesim noktasının standart sapması veya regresyon doğrusunun artık standart sapması (*the residual standart deviation*) standart sapma olarak kullanılabilir.

D. Tavsiye edilen veriler

Tayin sınırının belirlenmesi için kullanılan metod ve tayin sınırı gösterilmelidir. DL görsel değerlendirme veya sinyal/gürültü oranı baz alınarak belirlenmiş ise, savunma (justification) için ilgili kromatogramların sunumu kabul edilebilir olduğu varsayılır. Tayin sınırı için tahmini bir değer hesaplama veya ekstrapolasyon yoluyla belirlendiği durumlarda, Bu tahmini değer daha sonra tayin sınırına yakın olduğu bilinen veya tayin sınırı seviyesinde hazırlanan uygun bir sayıdaki örneklerin analizi ile test edilebilir

1.1.1.1.2.1.4.1.2.2.7 NİCELEME SINIRI

Her bir analitik prosedürün tayin sınırı, uygun kesinlik ve doğruluk ile kantitatif olarak tayin edilebilen örnek içindeki analitin en düşük miktarıdır. Özellikle safsızlık ve/veya bozunma ürünlerinin tayini için kullanılan niceleme sınırı, matris içindeki düşük seviyedeki bileşikler için yapılan kantitatif analizin bir parametresidir.

Niceleme sınırının belirlenmesi için enstrumantel veya enstrumantel prosedürlere dayanan pek çok uygulama vardır.

A. Görsel değerlendirme baz alınarak

Görsel değerlendirme enstrumantel ve enstrumantel olmayan metodların her ikisi içinde kullanılabilir. Tayin sınırı analitin bilinen derişimleri ile örnek analizi yapılarak ve kabul edilebilir doğruluk ve kesinlikte ölçülebilen analitin en düşük seviyesinin bulunmasıyla belirlenir.

B. Sinyal/gürültü yaklaşımı baz alınarak

Bu yaklaşım sadece taban çizgisinde gürültü var olan analitik prosedürler için uygulanabilir. Sinyal/gürültü oranı tayini, analiti bilinen düşük derişimlerini içeren örnekler ile kör örnek sinyalleri karşılaştırarak ve analitin güvenilir şekilde tespit edilebilen minimum derişiminun belirlenmesiyle yapılır. Tipik sinyal/gürültü oranı 10:1 'dir.

C. Eğrinin veya cevabın standart sapması baz alınarak

Niceleme sınırı(QL) aşağıdaki şekilde tanımlanabilir:

$$QL = 10 \sigma / S$$

Burada, σ = cevabın standart sapması, S = kalibrasyon eğrisinin eğimini ifade eder. Eğim "S", analitin kalibrasyon eğrisinden hesaplanabilir.

- **Kör çözeltisinin standart sapması baz alınarak**

Kör çözeltisinin verdiği analitik cevabın büyüklüğü uygun bir sayıdaki kör örneklerinin analizi ve kör cevaplarının standart sapmalarının hesaplanmasıyla ölçülür.

- **Kalibrasyon eğrisi baz alınarak**

Spesifik bir kalibrasyon eğrisi analit içeren örnekler kullanılarak QL aralığı içinde incelenmelidir. Regresyon doğrusunun y-kesim noktasının standart sapması veya regresyon doğrusunun artık standart sapması (*the residual standart deviation*) standart sapma olarak kullanılabilir.

D. Tavsiye edilen veriler

Niceleme sınırının belirlenmesi için kullanılan metod ve niceleme sınırı gösterilmelidir. Niceleme sınırı daha sonra niceleme sınırına yakın olduğu bilinen veya niceleme sınırı seviyesinde hazırlanan uygun sayıdaki örneklerin analizi ile test edilmelidir.

1.1.1.1.2.1.4.1.2.2.8 SAĞLAMLIK

Sağlamlık, farklı laboratuvarlar(iş birlikçi değil) da geliştirilen metodun tanımlanan parametrelerinde varyasyonlara gidilmesi ile sağlanır.

Ölçümler analitik koşullardaki değişimlere duyarlı ise, analitik koşullar uygun bir şekilde kontrol edilmelidir veya prosedür alınan tedbirleri

içermelidir. Bir seri sistem uygunluk parametresi ne zaman kullanılırsa kullanılsın analitik yöntemin geçerliliğinin sağlanmasının kabulü sağlamlık deneylerinin değerlendirilmesinin bir sonucudur.

Tipik değişimlerin örnekleri şunlardır:

- Analitik çözeltinin kararlılığı
- Ekstraksiyon zamanı

Sıvı kromatografisi kullanımı durumunda, tipik değişimlerin örnekleri şunlardır:

- Mobil faz pH değerindeki değişimlerin etkisi
- Mobil faz bileşimindeki değişimlerin etkisi
- Farklı kolon(farklı seri numaraları ve/veya üreticiler)
- Sıcaklık;
- Akış hızı

Gaz kromatografisi kullanılması durumunda, tipik değişimlerin örnekleri şunlardır:

- Farklı kolonlar (farklı seri numaraları ve/veya üreticiler)
- Sıcaklık;
- Akış hızı

1.1.1.1.2.1.4.1.2.2.9 SİSTEMLİK UYGUK TESTİ

Sistem uygunluk testi bir çok analitik prosedürün ayrılmaz bir parçasıdır. Testler ekipmanın, elektroniklerin, analitik operasyonların ve örneklerin

ayrılmaz bir sistem oluşturmuş gibi değerlendirilerek analiz edilmesi konseptine dayanır. Belirli bir prosedüre göre kurulacak sistem uygunluk test parametreleri geçerli kılınan prosedürün türüne bağlıdır.

1.1.1.1.2.1.4.2 USP'YE GÖRE YÖNTEM GEÇERLİLİĞİ

Amerikan Farmakopesi (Cilt 30, 1997 – USP 30 NF 25)'ne göre yeni geliştirilen yöntemlere ait yöntem geçerliliği (metod validasyonu) başvurularının Amerikan Farmakopesi Uzmanlar Konseyi tarafından incelenebilmesi için öncelikle yeterli düzeyde veri içeriyor olmalıdır. Bu bağlamda çoğunlukla analitik işlemlerin kesin ve tam bir şekilde tanımlanması, işlemlere duyulan ihtiyacın belirtilmesi ve geçerliliğin sağlandığına dair dökümantasyonların sağlanması gerekmektedir. Geçerliliği sınanacak yönteme göre değişmekle beraber USP'ye göre geçerlilik için başvuruların başlıca 3 bölümden oluşması esastır;

- A. Gerekçe (Rationale): Bu kısımda işleme ait ihtiyacı ve geçerliliği çalışılacak işlemin yapabildikleri ve bu yöntemin diğerlerine tercih edilmesinin nedenlerini tanımlanmalıdır.
- B. Önerilen Analitik Yöntem (Proposed Analytical Procedure): Bu kısım işinde uzman kişilerin sonuçları aynen tekrarlayabileceği şekilde analitik yöntemin eksiksiz tanımını ve standart operasyon prosedürlerini içermelidir.
- C. Veri (Data Elements): Tüm analitik işlemler için analitik geçerlilik ile ilgili dökümantasyonu ve deneysel verilerin özetini (grafik, şekil, tablo, vb) içermelidir.

USP'ye göre rutin analitik yöntem geçerliliği çalışmalarında kullanılan deneysel parametreler USP'deki Tablo1'de verilmiştir. Bu parametreler sırasıyla; Doğruluk, kesinlik, özgünlük, tayin sınırı, niceleme sınırı, doğrusallık, tayin aralığı ve sağlamlık şeklindedir.

1.1.1.1.2.1.4.2.1 GEÇERLİLİK PARAMETRELERİ

1.1.1.1.2.1.4.2.1.1 DOĞRULUK

Tanım: Bir analitik yöntemin doğruluğu o yöntem ile elde edilen verinin gerçek değere yakınlığı şeklinde tanımlanabilir.

Tayini: USP' ye göre doğruluk parametresinin tayini,

- A. Etkin madde tayini,
- B. Formülasyon içerisinde ilaç etkin maddesi tayini,
- C. Safsızlıkların tayini

gibi 3 farklı kategoride incelenmektedir.

- A. Etkin madde tayininde tanımlanan yöntemin, hem analizlenecek etkin madde hem de aynı etkin maddeye ait referans standart maddenin tayininde kullanılması ve elde edilen sonuçların karşılaştırılması ile gerçekleştirilir.
- B. Tanımlanan yöntem ile içerisine tayin aralığına uygun etkin madde eklenmiş ilaç formülasyonuna ait sentetik karışımın tayininin gerçekleştirilmesiyle doğruluk parametresi kontrol edilebilir. Eğer sentetik karışımın hazırlanması mümkün değil ise aynı işlem, ticari olarak satılan formülasyona tayin aralığına uygun etkin madde ilave edilerek de yapılabilir.

C. Etkin madde çözeltilisine veya ilaç formülasyonu çözeltilisine belirlenen miktarlarda safsızlık eklenerek tayin edilmelidir. Safsızlıkları ve bozunma ürünlerini elde etmek mümkün değilse analizler sonucunda elde edilen verilen bağımsız bir prosedürün sonuçlarıyla kıyaslanmalıdır.

Doğruluk numune içerisine eklenen bilinen miktarda analitin geri kazanımının yüzdesi olarak veya güven sınırları içindeki ortalama ve kabul edilen gerçek değer arasındaki fark olarak gösterilebilir. USP bu konuda yapılacak tekrar sayısı ve kullanılacak farklı derişim değerleri için ICH'i referans almaktadır. Buna göre 3 farklı derişim değeri için 9'ar okuma yapılması önerilmektedir.

1.1.1.1.2.1.4.2.1.2 KESİNLİK

Tanım: Analitik bir yöntemin kesinliği, homojen bir örnekten alınan her bir numune için tekrar edilen yönteme ait test sonuçları arasındaki uyumun derecesidir. Analitik bir yöntemin kesinliği genellikle bir dizi ölçümün standart sapması veya bağıl standart sapması (relative standard deviation or coefficient of variation) olarak ifade edilir. Kesinlik, normal çalışma koşulları altında analitik bir yöntemin tekrarlanabilirlik veya tekraredilebilirlik olarak da tanımlanabilir. Burada tekraredilebilirlik, analitik yöntemin aynı çalışma koşullarını sağlayabilen farklı laboratuvarlarda kullanılmasıyla sağlanır. Dayanıklılık olarak da kabul edilen günler arası tekraredilebilirlik ise analiz yöntemin geliştirildiği laboratuvarında, aynı çalışmada bazı çeşitlemeler yapılarak sağlanır (farklı operatör, farklı günler, farklı ekipmanlar). Tekrarlanabilirlik parametresi ise kısa zaman

periyotları içerisinde analitik yöntemin aynı laboratuvarında, aynı operatör ve ekipmanlarla birlikte kullanılmasını gerektirir.

Tayini: Analitik yöntemin kesinliği, istatistiksel olarak geçerli standart sapmanın veya bağıl standart sapmanın tahmini değerlerini hesaplayabilmek için homojen bir örnekten alınan yeterli sayıda numunenin tayin edilmesiyle saptanır.

ICH'e göre analitik yöntemin tekrarlanabilirlik parametresinin sağlanabilmesi için belirlenen derişim aralığında minimum dokuz anlamlı veri (3 farklı derişimde en az 3 tekrar) elde edilmesi gerekir.

1.1.1.1.2.1.4.2.1.3 ÖZGÜLLÜK

Tanım: ICH kılavuzu özgünlüğü, analitin safsızlık, bozulma ürünleri ve matris bileşenleri varlığında net bir şekilde tayin edilebilme yeteneği olarak tanımlar.

A. Tanımlama Testi: Analitin kimyasal yapısının ispatlanması

B. Safılık Testi: Uygulanan tüm analitik yöntemin analite ait tüm safsızlık içeriğine(Ağır metal limiti, Uçucu organik safsızlıklar) dair kesin bir rapor verdiği ispat edilmesi.

C. Deney: Bir numune içindeki analitin içeriğine dair tam bir sonuç vermelidir.

Tayini: Nitel analiz esnasında, moleköl yapıları benzer bileşiklerin ayırt edilmesiyle gerçekleştirilir. Analit ve moleköl yapıları yakın (gereklilik halinde moleköl yapısı bilinen referans bir madde kullanılır) bileşenlerin varlığında yapılan analiz sonrası alınan veriler ile analit içermeyen numune

için yapılan veriler karşılaştırılarak yöntemin geçerliliği hakkında yargıya varılır.

Safsızlıklar için analitik bir yöntem geliştirildiği bir durumda, özgüllük parametresi sağlamak için numune içerisine uygun miktarda safsızlıkla beraber etkin madde enjekte edilir ve bu safsızlıklara ait uygun doğruluk ve kesinlik parametreleri tanımlanır.

Analiz esnasında, özgüllük parametresinin gereği olarak uygulanan analitik yöntemin safsızlıktan ve ara maddelerden etkilenmediğinin gösterilmesi gerekir. Pratikte bu uygun miktarda safsızlık veya ara madde standardı ile beraber etkin madde enjekte edilerek elde edilen sonuçların safsızlık ve ara maddelerden bağımsız olduğunun gösterilmesiyle yapılır. Fakat bu standartların bulunmadığı durumlarda özgüllük parametresi test sonuçlarının, iyi bir şekilde tanımlanmış(farmakope veya geçerli edilmiş bir yöntem) safsızlık ve bozunma ürünlerini içeren ikincil bir metolla kıyaslanmasıyla gösterilir.

Kromatografik bir yöntemin kullanıldığı durumlarda elde edilen kromatogramlar seçicilik parametresinin bir derecesi olarak tanımlanır, ve bu kromatogramlarda gözlenen pikler uygun bir şekilde işaretlenmelidir. Burada pikin birden fazla bileşik içermediğinin gösterilmesi için saflık testi yapılabilir.

1.1.1.1.2.1.4.2.1.4 TAYİN SINIRI

Tanım: Belirlenen deneysel koşullar altında numune içerisinde, güvenilir bir şekilde tayin edilebilen minimum analit miktarıdır.

Tayini: Geliştirilen yöntemin resmi yöntem olarak değerlendirmek üzere sunulması durumunda, tayin sınırının belirlemek çok da gerekli değildir. Bunun yerine tayin sınırının, gereken tayin seviyesinin altında ve üstündeki analitin bilinen derişimuyula numune analizi için yeteri kadar düşük olduğunun gösterilmesi gerekir. Örneğin, %0,1 saflık seviyesinde bir tayin yapılması gerekiyorsa geliştirilen yöntem ile bu saflık seviyesinde güvenilir bir şekilde tayin yapılabildiği gösterilmelidir.

Uygulanan enstrumantel analitik yöntem sonucu alınan sinyalde gürültü gözlenmesi durumunda, analite ait gözlenebilen minimum derişim değeri için elde edilen sinyalle kör çözeltisine ait sinyal karşılaştırılır. Genellikle kabul edilebilir sinyal/gürültü oranı 2:1 veya 3:1 'dir.

1.1.1.1.2.1.4.2.1.5 NİCELEME SINIRI

Tanım: Niceleme sınırı, numune matrisi içinde bulunan etkin madde yığını içindeki safsızlıklar ve bitmiş ilaç içindeki bozunma ürünleri gibi düşük miktardaki bileşikler için yapılan kantitatif ölçümlerin bir göstergesidir.

Tayini: Enstrumantel bir yöntem için, kabul edilebilir doğruluk ve kesinlik değerlerinde analiz edilebilen analitin minimum derişim noktasının gösterilmesi gerekir. Geliştirilen yöntemin resmi yöntem olarak değerlendirmek üzere sunulması durumunda, niceleme sınırının belirlemek çok da gerekli değildir. Bunun yerine niceleme sınırının, gereken tayin seviyesinin altında ve üstündeki analitin bilinen derişimuyula numune analizi için yeteri kadar düşük olduğunun gösterilmesi gerekir. Örneğin, tablet başına 0,1 mg analit seviyesinde analizin yapılması

gerekirse geliştirilen yöntem ile bu analit seviyesinde güvenilir bir şekilde tayin yapılabildiği gösterilmelidir.

Uygulanan enstrumantel analitik yöntem sonucu alınan sinyalde gürültü gözlenmesi durumunda, analite ait gözlenebilen minimum derişim değeri için elde edilen sinyalle kör çözeltilisine ait sinyal karşılaştırılır. Kabul edilebilir sinyal/gürültü oranı 10:1 'dir.

1.1.1.1.2.1.4.2.1.6 DOĞRUSALLIK ve ÇALIŞMA ARALIĞI

Doğrusallık Tanımı: Analitik bir yöntemin doğrusallığı, verilen bir aralık içerisinde değişen analit konsantrasyonuyla orantılı bir şekilde değişen test sonuçlarının kesin bir şekilde alınabilme yeterliliğidir.

Çalışma Aralığı Tanımı: Yazılan yöntem kullanılarak, uygun bir seviyedeki kesinlik, doğruluk ve doğrusallığın belirlenmesiyle analitin alt ve üst sınırlarını kapsayan analitik bir yöntemin aralığı saptanır.

Doğrusallığın ve Çalışma Aralığının Tayini: Doğrusallık, ilk olarak analit derişiminun bir fonksiyonu olan sinyaller kromatogram üzerine işaretlenerek görsel olarak incelenmelidir. İnceleme sonucunda doğrusal bir ilişki gözlenirse test sonuçları istatistiksel metodlar kullanılarak analiz edilir(En küçük kareler metodu kullanılarak regresyon doğrusu çizilir.). Regresyon doğrusundan elde edilen veriler(Korelasyon katsayısı, y-intercept, regresyon doğrusunun eğimi) kullanılarak doğrusallığın derecesi matematiksel olarak hesaplanabilir.

Doğrusallığın sağlanması için minimum 5 konstrasyon noktasında kullanılmalıdır. Aynı zaman bazı minimum aralıklar şunlar olmalıdır:

Etkin madde deneyi: Test derişiminun %80'den %120'ye kadar değişen aralığında çalışılmalıdır.

Safsızlık tayini: Kabul kriterinin %50'den %120'ye kadar değişen aralığında çalışılmalıdır.

1.1.1.1.2.1.4.2.1.7 SAğLAMLIK

Tanımı: Analitik bir yöntemin sağlamlığı, yöntem dökümantasyonunda listelenen yönteme ait parametrelerdeki küçük ama etkili değişimlerden etkilenmeden kalma kapasitesinin bir ölçüsüdür ve yöntemin normal kullanılırken yeterliliğinin bir ölçüsüdür. Sağlamlık parametresi, analitik bir yöntem geliştirilirken tanımlanabilir.

1.1.1.1.2.1.4.2.1.8 SİSTEM UYGUNLUğU

Yapılan analizlerde elde edilen sonuçlar şüpheli çıkıyorsa sistemin uygunluğu kontrol edilmelidir. İlk olarak Sağlamlık ve Dayanıklılık parametrelerinden elde edilen veriler incelenir. Sonuçlarda sapmalara neden olan tipik değişkenlerin başında analitik çözeltinin dayanıklılığı, farklı ekipman kullanımı ve farklı operatör tarafından analiz yapılması gelir. Sıvı kromatografinin kullanıldığı durumlarda, mobil fazın pH'ı, mobil faz bileşimi, aynı marka kolon kullanılmasına rağmen kolonun farklı bir tedarikçiden alınması, çalışma ısısı ve akış hızında meydana gelen değişimler sonuçlarda sapmalara neden olmaktadır.

Validasyon için Gerekli Öğeler:

Geliştirilen her yöntem içindeki tahmin edilemez değişkenlerden ötürü aslında her bir yöntemin kendine ait validasyon parametreleri

belirlenmelidir. Burada sadece genel olarak kategorilendirilen testler için hangi geçerlilik parametrelerine sahip olması gerektiği gösterilmektedir.

Kategori 1: Bitmiş eczacılık ürünleri içerisindeki etkin madde yığınlarının veya aktif korucu maddelerin temel bileşenlerinin nicel analizi için kullanılan analitik yöntemler.

Kategori 2: Bitmiş eczacılık ürünleri içerisindeki etkin madde yığınlarının veya bozunma bileşiklerinin safsızlarının tanımlanması için kullanılan analitik yöntemler. Bu yöntemler nicel analiz deneyleri ve limit testlerini içerir.

Kategori 3: Performans özelliklerinin tanımlanması için kullanılan analitik yöntemler(Dissolüsyon testleri, ilaç salınım testleri gibi.).

Kategori 4: Tanımlama testleri

TABLO 3. Belirlenen kategorilere göre yapılması gereken performans özellikleri

Analitik Performans Özellikleri	Kategori 1	Kategori 2		Kategori 3	Kategori 4
		Nicel	Limit Testleri		
Doğruluk	Evet	Evet	*	*	Hayır
Kesinlik	Evet	Evet	Hayır	Evet	Hayır
Özgüllük	Evet	Evet	Evet	*	Evet
Tayin Sınırı	Hayır	Hayır	Evet	*	Hayır
Niceleme Sınırı	Hayır	Evet	Hayır	*	Hayır
Doğrusallık	Evet	Evet	Hayır	*	Hayır
Çalışma Aralığı	Evet	Evet	*	*	Hayır

* Yapılan testin özelliklerine göre belki gerekebilir

1.1.1.1.2.1.4.3 CDER'E GÖRE YÖNTEM GEÇERLİLİĞİ

Kromatografik test metodları geliştirilirken meydana gelen karışıklığın giderilmesi için İlaç Araştırma ve Değerlendirme Merkezi (Center for Drug Evaluation and Research) Kromatografik Yöntemlerin Geçerliliği (Validation of Chromatographic methods) adıyla Kasım 1994 tarihinde teknik bir inceleme kılavuzu yayınlamıştır. Buna göre, metod sağlamlık ve dayanıklılık parametrelerini sağlamak için operatör tarafından geliştirilmeli ve oluşturulan bu metod geçerli kılınmalıdır. Geliştirilen bu metod başka bir operatör tarafından, farklı yer ve zamanda, eşdeğer ekipmanlarla ve analitin bozunma süresi boyunca tekrar edilebilmelidir.

1.1.1.1.2.1.4.3.1 GEÇERLİLİK PARAMETRELERİ

Bu kılavuzda parametreler ters-faz HPLC tekniği kullanılarak UV absorbansı ölçebilen analizlerle ilişkilendirilmiştir. Yine burada tanımlanan parametreler diğer analiz metodları içinde kullanılabilir.

1.1.1.1.2.1.4.3.1.1 DOĞRULUK

Doğruluk, deneysel değerlerin gerçek değere olan yakınlığının ölçüsüdür.

Metod geçerliliği için analitik verilerin ve Çalışılan örnekler için yayınlanan kılavuzda da değinildiği gibi, analitik İlaç etkin maddeleri ve müstahsarlar için yapılarına doğruluk çalışmalarında tayin edilen miktarın gerçek değerinin 80%, 100%, 120% seviyelerinde olması önerilir.

Müstahsarlar için genellikle plasebo formülasyonuna ağırlıkça veya hacimce bilinen miktarda ilacın eklenmesiyle doğrusal aralıkta analit tayini yapılır. Tablet, fitil, transdermal bant gibi formülasyonlar için etkin madde

ile yardımcı maddeler arasındaki potansiyel etkileşimlerin değerlendirilmesiyle bulunur.

Öneriler:

Geri kazanım verilerinin, en az üç tekrar için, her seviyede belirtilen aralıkta (%80, %100, %120) olması önerilir. Ortalama doğruluğun tahmini bir değeridir, BSS ise bir örnek analiz kesinliğidir.

1.1.1.1.2.1.4.3.1.2 TAYİN ve NİCELEME SINIRI

Tayin Sınırı: Deneysel koşullar altında numune içerisinde miktardan bağımsız olarak tayin edilebilen analitin en düşük miktarıdır.

Niceleme Sınırı: Deneysel koşullar altında numune içerisinde kabul edilebilir kesinlik ve doğrulukla tayin edilebilen en düşük analit miktarıdır.

UV dedektörlerle çalışılırken yıllar geçtikçe kademeli olarak lambanın duyarlılığın azalması veya dedektör üreticisinden kaynaklanan gürültü seviyesi farklılıkları nedeniyle düşük miktardaki bileşiklerin tayin kesinliğinden emin olmak zordur. Düşük miktarlarda çalışılırken her seferinde tayin ve niceleme sınırlarının ulaşılabilir olduğu test metodu ile gösterilmelidir. USP, tayin ve niceleme sınırını gürültü seviyesi terimi üzerinden değerlendirirse de analit tayini için kullanılan dedektör değiştiğinde gürültü seviyesinde de değişiklikler gözleneceği için bu bakış açısı pek pratik değildir. Niceleme sınırının tayini için yapılan deneylerde referans standart madde kullanılması tavsiye edilir.

Mobil faz çözeltisi seyreltme çözeltisinden farklı ise taban çizgisinde(baseline) dalgalanmalar gözlenebilir. Bu durumda taban

çizgisindeki bu gürültülerin ilgisiz pik olarak değerlendirilmemesine dikkat edilmelidir.

Öneriler:

- a. Niceleme sınırındaki ver tekrarlanabilirlik analizi ve enjeksiyon tekrarlanabilirlik analizi verileri.
- b. Niceleme sınırı düzeyinde referans standart madde kullanımı.

1.1.1.1.2.1.4.3.1.3 DOĞRUSALLIK

Safsızlık pikinin, ilgili etkin maddeye ait olanın yüzdesi olarak gözleendiği durumlarda, derişim eğrisinin doğrusal olmayan bir aralığında çalışılmış ise safsızlığın gözlenen değeri, safsızlığın teorik değerini gerçek bir şekilde yansıtmayabilir. Safsızlığın ve ilişkili olduğu maddenin absorpsiyon dalga boyunun aynı olduğu durumlarda safsızlığa ait referans standart maddesi kullanılmalıdır.

Öneriler:

Çalışılan doğrusal aralık, test metodunun amacına göre değişir. Birçok durumda regresyon katsayısı “n” $\geq 0,999$ olmalıdır. Grafik üzerinde eğrinin kesim noktaları ve eğri denklemi gösterilmelidir.

1.1.1.1.2.1.4.3.1.4 KESİNLİK

Aynı analitik koşullar altında yapılan bir dizi ölçüm için kesinlik, verilerin birbirlerine olan yakınlığının ölçüsüdür. CDER kesinlik için ICH'i referans göstermiştir. Buna göre kesinlik üç parametreden oluşur: tekrarlanabilirlik, günlerarası tekraredilebilirlik, tekraredilebilirlik.

A. Tekrarlanabilirlik:

a) Enjeksiyon tekrarlanabilirliği

Duyarlılık, numune içerisindeki analitin derişimindeki küçük değişimleri tayin etme yeteneğidir. Duyarlılık, tekrar edilebilirlik spesifikasyonları monitörize edilerek kısmi olarak kontrol edilebilir. Duyarlılık veya kesinlik saf bir numunenin çoklu enjeksiyonları yapılarak ölçülür. Elde edilen bilgiler geçerlilik verilerinin ve sistem uygunluğu testinin bir parçasıdır. % olarak varyasyon katsayısındaki değişimi ya da BSS gibi spesifikasyonlar, analizin varyasyonlar sınırlarının tanımlanması için kullanılır.

Öneriler:

Metod geçerliliğinin bir parçası olarak bağlı standart sapma(BSS) değeri %1'den küçük olan minimum 10 enjeksiyon yapılmalıdır. Bu sayı ilaç salınımı ve kararlılık çalışmaları için en düşük "n" değeri için $n \geq 5$ olmalıdır. Düşük seviyedeki safsızlıklar için yüksek varyasyonlar kabul edilebilir.

b) Analiz tekrarlanabilirliği (Analysis repeatability)

Bir örneğin çoklu ölçümlerini içeren, aynı analiz koşulları altında aynı operatör tarafından yapılan tayinin bağlı standart sapması olarak tanımlanır.

B. Günler arası tekrar edilebilirlik:

Geliştirilen metodun benzer örneklerin analizi yapıldığında aynı sonucu verdiğinin gösterilmesidir. Zamana ve kaynaklara bağlı olarak metod farklı günlerde, farklı operatör tarafından veya farklı enstrümanlar kullanılarak test edilebilir.

Öneriler: Doğruluk, geliştirilen metodun kesinlik parametresini gösterir.

C. Tekrar edilebilirlik:

ICH'in tanımı baz alınmıştır. Buna göre tekraredilebilirlik, farklı laboratuarlarda aynı metod kullanılarak yapılan analitin analizinde elde edilen verilerin birbirlerine olan yakınlığının dolayısıyla kesinliğinin bir ölçüsüdür.

1.1.1.1.2.1.4.3.1.5 TAYİN ARALIĞI

Çalışılan analitin yüksek ve düşük seviyeleri arasındaki aralıktır.

1.1.1.1.2.1.4.3.1.6 GERİ KAZANIM

Geri kazanım, ortamdaki analizi yapılan bileşik miktarının, bileşiğin teorik miktarına oranının yüzdesi olarak ifade edilir. İlgili bileşik(ler) için tam geri kazanım elde edilmelidir. Ekstraksiyon prosedürü boyunca, ilgili bileşik basit bir sulu çözeltiden kompleks krem formülasyonlarına vs. kadar değişen aralıklardaki matris formülasyonu içindeki yardımcı maddelerden ekstre edilmelidir. Genelde, basit bir örnek hazırlama prosedürü geri kazanımın düşük bir varyasyonunda sonuç verir.

1.1.1.1.2.1.4.3.1.7 SAĞLAMLIK

Sağlamlık parametresi ICH'e göre tanımlanmıştır. Buna göre metod parametrelerindeki küçük fakat istemli olarak yapılan değişimlerden etkilenmeden kalma kapasitesinin bir ölçüsü olarak tanımlanmıştır. Kolon yaşı, kolon tipi, kolon sıcaklığı, mobil faz çözeltisi içindeki tamponun pH'sı, reaktifler gibi.

Öneriler:

Sağlamlık için yapılan çalışmalardan elde edilen veriler, genelde sunulmamasına karşın, metod geçerliliğinin bir parçası olarak yapılması önerilir.

1.1.1.1.2.1.4.3.1.8 ÖRNEK ÇÖZELTİ KARARLILIĞI

Otomatik örnekleyici kullanılan birçok laboratuarda, örnekler gece boyunca analiz çözeltisi içinde kalmaktadır. Bu doğrultuda özellikle hidroliz veya fotoliz ile bozunmaya uğrayan ilaçlar için çözelti kararlılığının gösterilmesi gerekmektedir.

Öneriler:

Normal laboratuvar koşulları altında test yönteminin dayanıklılığı için örnek çözelti kararlılığı verilerle desteklenmelidir. Tavsiye edilen çözelti kararlılığı minimum 24 saat olmalıdır. Çözelti hazırlanmasının uzun sürdüğü ve hazırlanan çözeltinin depolanması gibi durumlarda kararlılık göstergesi uzatılmalıdır.

1.1.1.1.2.1.4.3.1.9 ÖZGÜLLÜK/SEÇİCİLİK

Analit ortamdaki diğer ilgisiz bileşenlerle girişim yapmamalı ve onlardan iyi bir şekilde ayrılmalıdır. Temsili bir yüksek basınçlı sıvı kromatogramı elde edilmelidir ve bu kromatogramda analizi yapılan bileşiğin ilgisiz bileşiklerin her birinden ayrıldığı bilinen bileşikler ve ya stres testinden elde edilen bozunma ürünleri eklenerek gösterilmelidir.

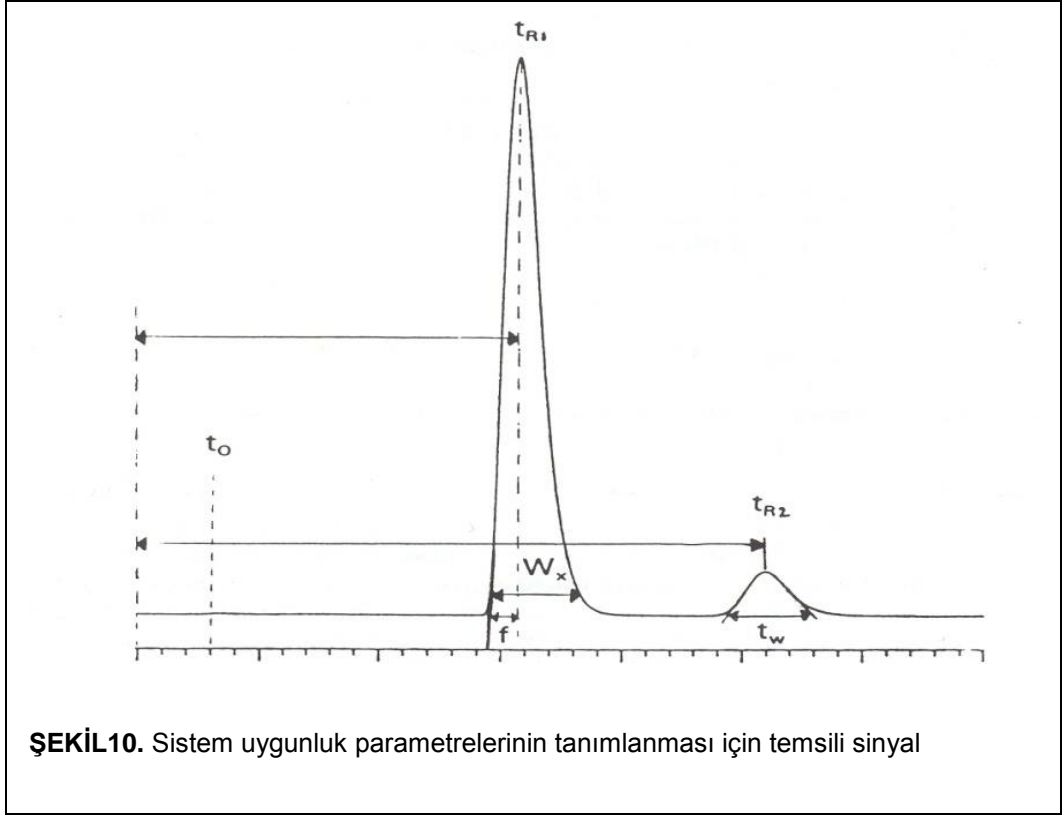
Pik saflığı foto diyot dedektör kullanılarak tayin edilebilir. Pikin saf olmadığı durumlarda, analit pikinin altında düşük miktarlarda var olan ilgisiz bileşikler analitin UV spektrumuna girişim yapmayabilir veya etki etmeyebilir.

Öneriler:

Safsızlık test metodu, koruyucu(lar), vb. ile ilgili plasebo örneklerini içeren koşullarına maruz kalmış ve kalmamış örnekler için temsili kromatogramlar sunulmalıdır. Seçiciliği göstermek için temsili yüksek performanslı sıvı kromatogram(lar)ı ilgisiz bileşiğin bilinen miktarı eklenerek sunulmalıdır.

1.1.1.1.2.1.4.3.1.10 SİSTEM UYGUNLUK SPESİFİKASYONLARI VE TESTLERİ

Bu bölümdeki açıklamalar aşağıdaki şekil üzerinden yapılmıştır.



W_x = Pike ait taban genişliği(taban çizgisinden %5 veya %10 yükseklikteki)

f = Pik maksimumu ile W_x genişliğinin başlangıç noktası arasındaki uzaklık

t_0 = boş hacmin veya analiz bileşiği içermeyen çözeltinin kolonu terk etmesi için geçen süre

t_R = Analitin alıkonma zamanı

t_W = İkincil bir pikin taban çizgisi seviyesinde ölçülen taban genişliği

A. Kapasite faktörü (k')

$$k' = (t_R - t_0) / t_0$$

Kapasite faktörü, ölü hacim göz önünde tutulmak kaydıyla ilgili pikin nerede olduğunun bir ölçüsüdür.

Öneriler:

İlgili pik diğer piklerden ve ölü hacimden iyi bir şekilde ayrılmalıdır.

Genelde kapasite faktörü için değerin $k' > 2$ olması istenir.

B. Kesinlik/Enjeksiyon tekrar edilebilirliği

BSS olarak tanımlanan enjeksiyon kesinliği örnek analizi sırasında yüksek basınçlı sıvı kromatograf sisteminin tesisatının, kolonunun veya çevresel koşullarının performansını gösterir. Örnek hazırlanması aşamasındaki değişimler bu konu başlığı altında değerlendirilemez.

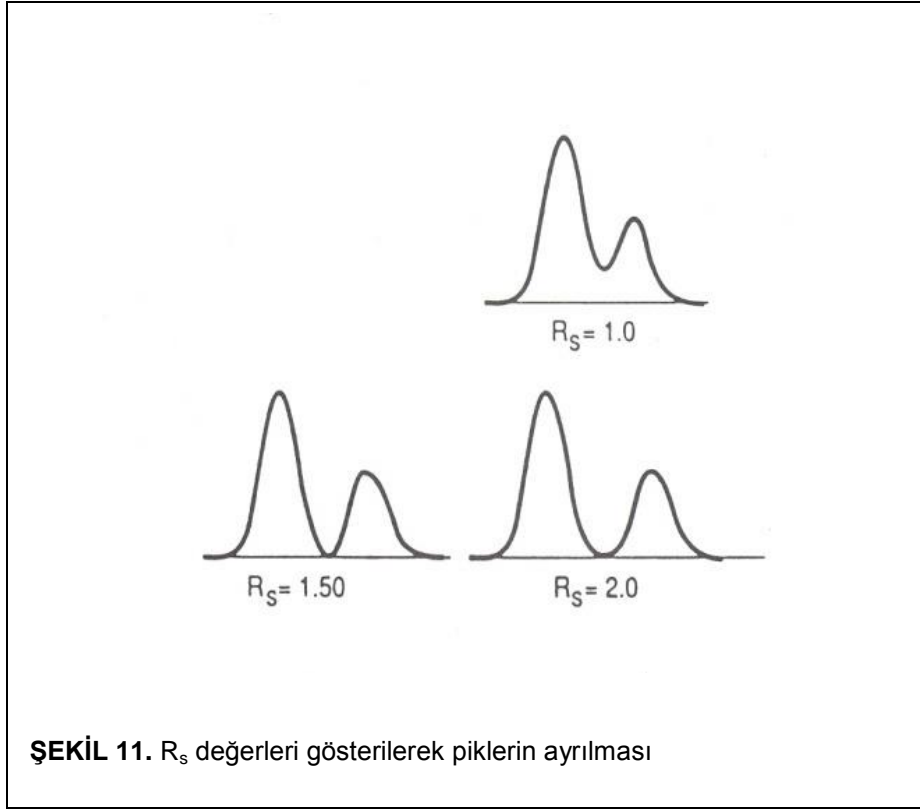
Öneriler:

$n \geq 5$ değeri için $BSS \leq \%1$ olmalıdır.

C. Bağlı alıkonma

$$\alpha = k'_1 / k'_2$$

Bağlı alıkonma iki pikin bağlı konumunun bir ölçüsüdür. (R_s) kadar gerekli bir parametre değildir.



D. Çözünürlük

$$R_s = (t_{R2} - t_{R1}) / \frac{1}{2} (t_{W1} + t_{W2})$$

R_s , İki pikin birbirlerinde ne kadar iyi bir şekilde ayrıldığıнын ölçüsüdür. Birbirine yakın alıkonma zamanına sahip pikler ile çalışılıyor ise bu parametre çok yararlıdır. R_s çalışılan iki bileşiğin oranında minimal derecede etkilenir.

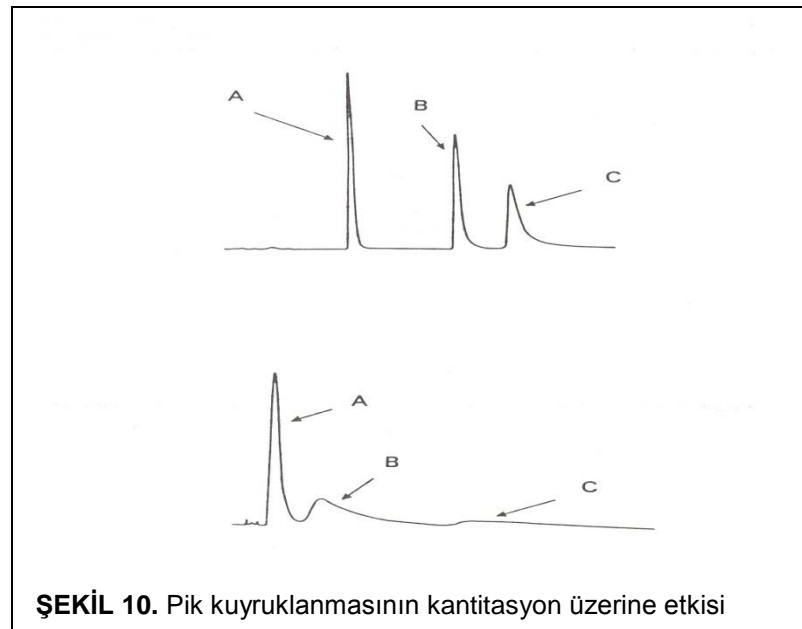
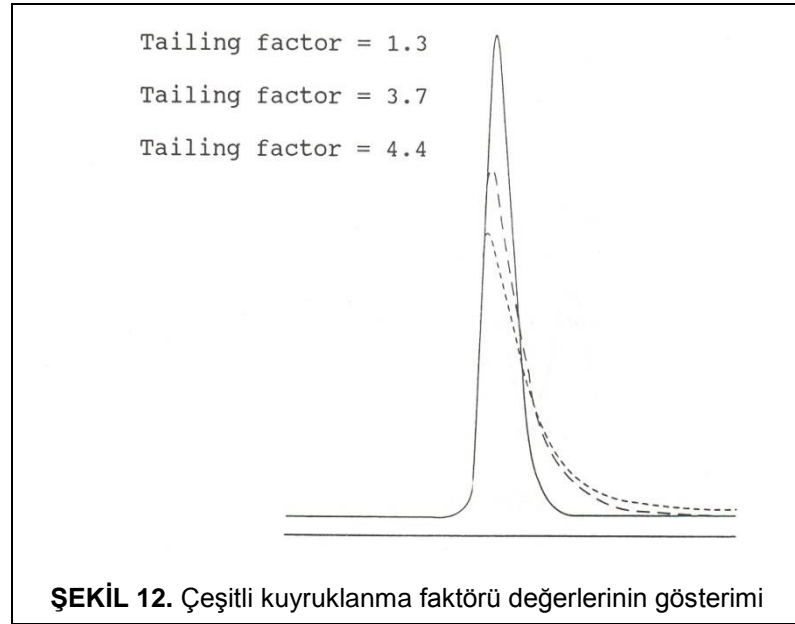
Öneriler:

İlgili pik ve alıkonma zamanlarının çakışma olasılığı en yüksek pik (safsızlık, yardımcı madde, bozunma ürünü, iç standart, vb.) arasındaki R_s değerinin > 2 olması istenir.

E. Bant genişlemesi / Kuyruklanma Faktörü (Tailing Factor – T)

$$T = W_x / 2f$$

Pik taban alanının simetrik olmayan bir şekilde artmasıyla, pikin nerde ve ne zaman bittiğinin belirlenmesinde ve dolayısıyla pik altında kalan alanın hesaplanmasında entegratörün karşılaştığı zorluklar nedeniyle kantitasyonun doğruluğu düşer. İlgilenilen pikin alanın en iyi şekilde hesaplanması için entegratör değişkenleri analist tarafından önceden ayarlanmalıdır. Aşağıdaki şekiller kuyruklanma faktörü ile ilgilidir.



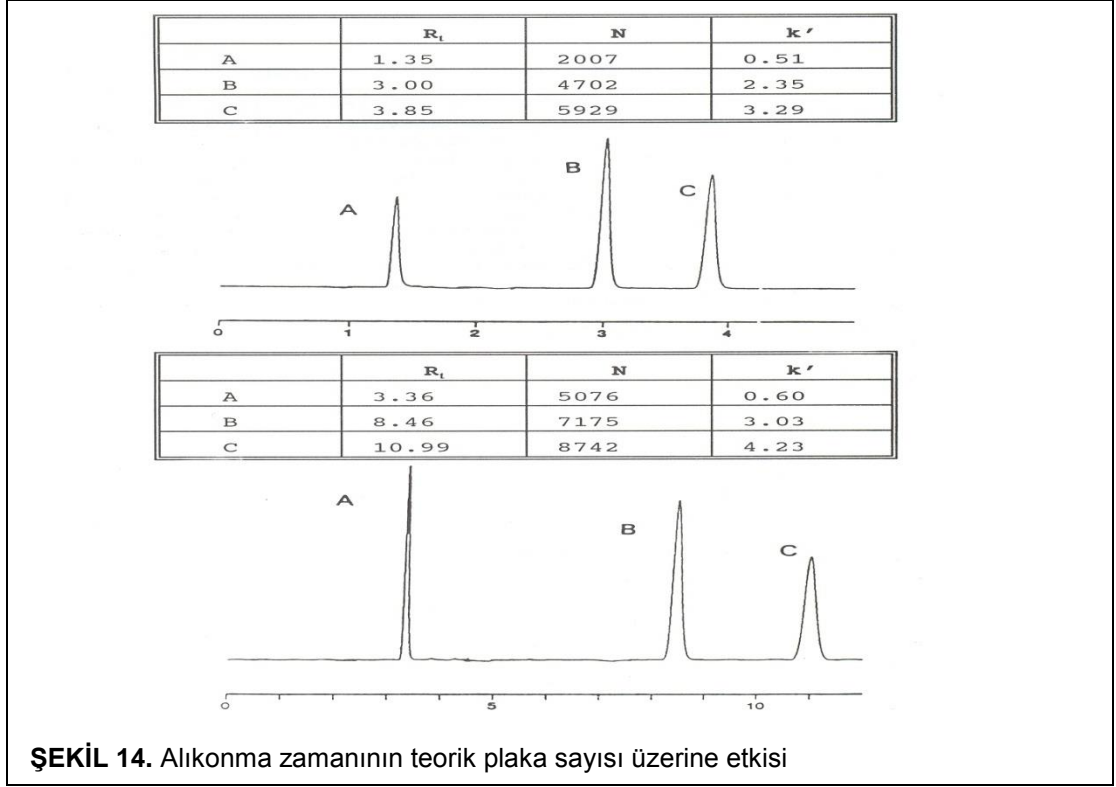
Öneriler:

Optimum analiz için $T \leq 2$ olmalıdır.

F. Teorik Plaka Sayısı (N)

$$N = 16 (t_R / t_W)^2 = L/H$$

Teorik plaka numarası kolon verimliliğinin bir ölçüsüdür. Bu da bize birim çalışma süresinde kaç pik bulunabileceğini gösterir. Burada H, veya teorik bir plakanın eşdeğer yüksekliği olan tabaka yüksekliğini gösterir. L ise kolonun uzunluğunu gösterir. Pik pozisyonu, kolon partikül büyüklüğü, mobil faz akış hızı, kolon sıcaklığı, mobil fazın viskozitesi ve analitin molekül ağırlığı parametreleri N veya H değerlerini etkileyebilir. Şekil 51 iki farklı kromatografik koşul altında A,B ve C türlerine ait cevapları göstermektedir. B türüne ait pik incelendiğinde pik görünümleri aynı olduğu durumda bile teorik plaka değerlerinin farklı olduğu gözlenir.



Öneriler:

Teorik plaka sayısı elüsyon zamanına bağlı olsa da N değeri > 2000 olmalıdır.

Dikkat edilmesi gereken genel noktalar:

1. Örnek ve standart mobil faz içinde çözülmelidir. Eğer bu mümkün değilse, mobil faz çözeltisi ile seçilen organik çözücünün polariteleri arasında çok fark olmasından kaçınılmalıdır.
 2. Örnek ve standart derişimleri aynı değilse yakın olmalıdır.
 3. Analitik prosedür boyunca örnekler standartlarla işaretlenmelidir.
- enjeksiyon öncesi örneklerin filtrasyonu zaman zaman gözlenmelidir. Filtrasyon kolonun tıkanmasına yol açabilecek partikülleri uzaklaştıracaktır.

1.1.1.1.2.4 HPLC'DEN UPLC'YE YÖNTEM TRANSFERİ

1.1.1.1.2.4.1 Tanımı

Geliştirme ve geçerlilik (validasyon) işlemleri tamamlanmış ve tanımlandığı enstrümental analiz tekniğine ait analitik bir cihazda sorunsuz çalıştığı bilinen bir analitik yöntemin gene aynı enstrümental analiz tekniğine ait bir başka cihaza (farklı model, marka veya nesil) uyarlanmasına ve sorunsuz analiz yapılabilmesi için ilgili geliştirme ve geçerlilik çalışmalarının yapılmasına “**yöntem transferi**” denilmektedir.

1.1.1.1.2.4.2 Transferde dikkate alınan deneysel parametreler

Sıvı kromatografik tekniklerde HPLC'den UPLC'ye yöntem transferi çalışmalarında deneysel bazda değiştirilerek kromatograma etkisinin incelendiği başlıca deneysel değişkenler belirli olmakla birlikte belirlenmiş standart bir çalışma sırası veya önceliği bulunmamaktadır. Literatürde takip edilen sıralamalar ve tez çalışmalarımızdan edindiğimiz deneyimler ile aşağıdaki sıralamanın faydalı olacağını düşünmekteyiz;

- 1) Değişken 1: Akış hızı (HPLC için mL/dk, UPLC için µL/dk düzeyinde)
- 2) Değişken 2: Mobil faz kombinasyonu (% h/h içeriği)
- 3) Değişken 3: Mobil faz pH değeri (örneğin C18 gibi silisyum tabanlı analitik kolonlarda pH 2-3-4-5-6-7 aralığı)
- 4) Değişken 4: Analitik kolon özellikleri (her seferde tek parametre değiştirmek koşuluyla kolon boyu, kolon iç çapı, kolon dolgu maddesi partikül büyüklüğü, por çapı, dolgu maddesi)

- 5) Değişken 5: Dedektör özellikleri (mümkünse aynı fiziksel özelliklerin kıyaslanabilmesi için aynı tip dedektör kullanılmalıdır. Örneğin ECD için duyarlılık, çalışma potansiyeli, tayin modu, vb. DAD için duyarlılık, spektrum aralığı, S/N oranı, vb)
- 6) Değişken 6: Analiz süresi (run time). Piklerin ayırımının bozulmaması ön koşuluyla (minimum $R \geq 1,5$) analiz sürelerinin takibi.
- 7) Değişken 7: Genel olarak sistem uygunluk testleri. Örneğin kromatogram çözünürlüğü (R), pik simetrisi, alıkonma zamanları (t_R), alıkonma faktörleri, vb.

1.1.1.1.2.4.3 Literatürdeki çalışmalar

Literatürde direkt olarak HPLC/UPLC yöntem transferi konusuyla ilgili veya başka konularla ilgili olup yöntem transferine de değinen sınırlı sayıda çalışma mevcuttur (3,13,15,24,32,35,39,40,41,48,53,56,59,60). Bunlardan sadece 4 tanesi HPLC'den UPLC'ye yöntem transferi ile ilgili olup detaylı deneysel verileri ve analitik tartışmaları içermektedir (13,15,35,39). Bu çalışmalardan 3 tanesi aynı grubun eseri olup Guillarme ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir (13,15,39). Guillarme ve arkadaşları yöntem transferi konusunu izokratik (13) ve gradient (15) mobil fazlar için ayrı ayrı irdelemişlerdir.

1.1.1.1.2.4.4 Mevcut ticari yaklaşımlar

Kromatografik sistemlerde yöntem transferi ile ilgili yapılan çalışmalar ve firmalarca yayımlanan uygulama notları (aplikasyon notları) baz alınarak

kromatografi konusunda çalışanların ineraktif olarak kullanabilecekleri az sayıda web sayfası tasarımı, ilgili kromatografi donanım ve sarf malzemeleri satıcısı firmalar tarafından, yapılarak kullanıma sunulmuştur.

Bu firmalar ve ilgili web sayfalarının detayları aşağıdaki gibidir;

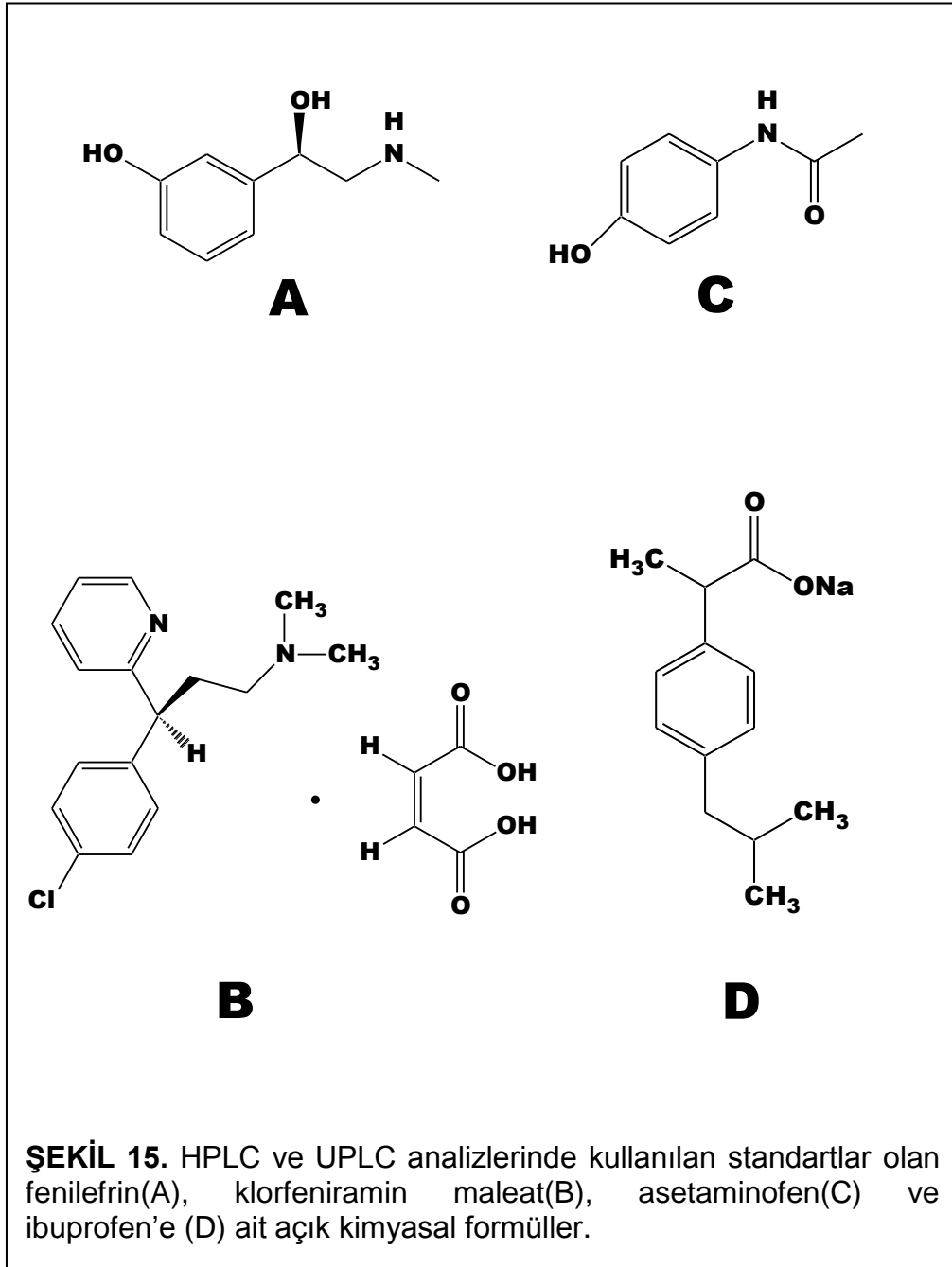
- 1) Phonemex (<http://www.phenomenex.com/tools/kinetexcalculator#>)
- 2) Agilent (http://www.chem.agilent.com/en-US/products-services/Instruments-Systems/Liquid-Chromatography/Pages/1200infinity_cost_calculator.aspx)
- 3) Thermo Scientific (<http://www.hplctransfer.com/IsocraticMethod.aspx>)
- 4) Waters Cooperation (http://www.waters.com/waters/en_TR/HPLC-to-UPLC%3A-Easy-Transfer/nav.htm?cid=10140762)
- 5) Sigma-Aldrich (Supelco) (<http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/hplc/method-transfer-calculator.html>)

BÖLÜM II

2.1 GEREÇ ve YÖNTEM

2.1.1 KULLANILAN KİMYASAL MADDELER

2.1.1.1 STANDART MADDELER



ŞEKİL 15. HPLC ve UPLC analizlerinde kullanılan standartlar olan fenilefrin(A), klorfeniramin maleat(B), asetaminofen(C) ve ibuprofen'e (D) ait açık kimyasal formüller.

2.1.1.1.1 YÜKSEK SAFLIKTA STANDART MADDELER

- 1) Acetaminophen, CAS [103-90-2], FW: 151.17g/mol, minimum 99.0%, Sigma-Aldrich, A7085-100G, Batch #: 115K0098
- 2) (R)-(-)-Phenylephrine hydrochloride, CAS [61-76-7], FW: 203.67g/mol, 100%, Sigma-Aldrich, P6126-100G, LOT #: 031M1736V
- 3) (±)-Chlorpheniramine maleate, CAS [113-92-8], FW: 390.86g/mol, 100%, Sigma-Aldrich, C3025-100G, LOT #: 058K0097V
- 4) Ibuprofen sodium salt, CAS [31121-93-4], FW:228.266g/mol, ≥98%, Fluka, I1892-100G, LOT #: BCBJ1499V
- 5) Ibuprofen (base), CAS [51146-56-6], FW: 206.28g/mol, ≥99.0%, Fluka, 58635, 10g, LOT&Filling Code: 1303685 33806079

2.1.1.1.2 ANALİTİK STANDART MADDELER

- 1) Acetaminophen, 98.5%, Sigma-Aldrich, A3035-1VL, LOT #: 051M5015V
- 2) (R)-(-)-Phenylephrine hydrochloride, 98.2%, Sigma-Aldrich, P8155-1VL, LOT #: 041M8738V

2.1.1.1.3 REFERANS STANDART MADDELER

- 1) Acetaminophen, 99.2%, Sigma-Aldrich, A3035-1VL (1g/vial), LOT #: 045K8800
- 2) (±)-Chlorpheniramine maleate, 99.8%, Sigma-Aldrich, C5172-1VL (250mg/vial), LOT #: 074K8803
- 3) (R)-(-)-Phenylephrine hydrochloride, 99.2%, Sigma-Aldrich, P8155-1VL (250mg/vial), LOT #: 123K8806
- 4) Chlorpheniramine maleate, 99.5%, Fluka, PHR1016-500MG, LOT #: P500016
- 5) Ibuprofen, 99.9%, Fluka, PHR1004-1G, LOT #: P500004

2.1.1.2 MOBİL FAZ ÇÖZELTİSİ

Bu aşamada HPLC ve UPLC analizleri için kullanılan çözgen maddeler HPLC yöntemi için kabul edilen saflık derecesinde olup Sigma – Aldrich'in MeOH (Metanol) ve Merck'in Ach (Asetonitril) çözgenleri kullanılmıştır. 50mM PBS çözeltisinin hazırlanmasında ultra saf su ve analitik saflıkta KH_2PO_4 ile K_2HPO_4 veya NaH_2PO_4 ile NaHPO_4 susuz (anhidrik) tuzları kullanılmıştır. Tartım hesaplamaları şu şekildedir:

KH_2PO_4 : 1,36 g/L + K_2HPO_4 : 6,96 g/L = 1L suda çözülür veya NaH_2PO_4 : 1,19 g/L + NaHPO_4 : 5,67 g/L = 1L suda çözülür.

2.1.1.3 SEYRELTME ÇÖZELTİSİ

HPLC saflığında *Sigma – Aldrich*'in MeOH (metanol) ve *Merck*' in Ach (asetonitril) çözümleri kullanılmıştır.

2.1.1.4 ELEKTROT ÖN TEMİZLİK ÇÖZELTİSİ

Sigma-Aldrich'in %95–99 (ağ/ağ) H_2SO_4 (Sülfürik asit) çözgeni kullanılmıştır. Elektrot yüzeyini temizlemek için Al_2O_3 (Alümina) temizlik çözeltisi sağlanmıştır.

2.1.2 KULLANILAN DONANIM

2.1.2.1 HPLC DONANIMI

Yapılan bu çalışmada Agilent 1100 serisi HPLC sistemi kullanılmıştır. Sistem oluşumunda yer alan bileşenler şunlardır:

- İzokratik pompa (G1310A isocratic pump)
- 20 μL loop hacimli manüel enjektör (G1328A Rheodyne 7725i)
- Analitik Kolonlar:
 - 1) Macherey-Nagel marka 250/4,6 Nucleosil C18 100-5 (Seri No. 2065339, Parti No. 21302092)
 - 2) Hichrom marka 250/4,6 Nucleosil C18 250-5 (Seri No. HI-5C18-3086, Parti No. Y1102)
 - 3) Thermo marka ODS-2 Hypersil, 250mmx4.6mm, 5 μm partikül çapı, 80Å por çapı
- ECD (HP1049 A programmable electrochemical detector),

- Kromatografik veri işleyici yazılımı (HP Chemstation for LC Rev. 06.03[509]).

2.1.2.2 UPLC DONANIMI

Tez çalışmalarında kullanılan UPLC sistemi Thermo Accela serisi olup, 1250 pompa (60057-60111, seri no: 925182), 5 µL loop'lu otomatik örnekleyici (60057-60020, seri no: 750653), 5 cm LightPipe™ akış hücreli PDA dedektör (60057-60141, seri no: 940128) ve kromatografik yazılımdan (Thermo Xcalibur 2.1.0.1139) oluşmaktadır. UPLC sistemiyle birlikte kullanılan analitik kolon Thermo Synchronis C18 model olup boyutsal özellikleri, 50mm (uzunluk) x 2,1mm (iç çap), 1,7µm (partikül çapı), 100 Å (por çapı) şeklindedir. UPLC analizlerinde HPLC analizlerinde kullanılan mobil fazlar aynen kullanılmıştır; Mobil Faz1: MeOH-50mM PBS 75-25% (h/h) ve Mobil Faz2: Ach-50mM PBS 30-70% (h/h) şeklindedir.

2.1.2.3 ELEKTROKİMYA DONANIMI

Kullanılan elektrokimyasal donanım Bioanalytical Systems (BAS, West Lafayette, USA) 100B/W electrochemical workstation potentiostat (seri no: 1511) olup C3 hücre standı (cell stand) (seri no: 1306) ve PA-1 düşük akım modülü (preamplifier low current module) (seri no: 983) ile birlikte çalıştırılmıştır. Elektrokimyasal hücredeki ölçüm çözeltisinde bulunan çözünmüş oksijen (O₂), saf azot gazı (N₂) kullanılarak uzaklaştırılmıştır. N₂ ile muamalenin etkili olabilmesi için elektrokimyasal hücre, Teflon®(PEEK) adaptör ile dış ortamdan yalıtılmış ve bu sayede uzaklaştırılan çözünmüş O₂'nin hücre içerisine ortam atmosferi ile tekrar geri dönmesi engellenmiştir. Kullanılan Teflon®(PEEK) adaptörün bir fonksiyonu da kullanılan üçlü elektrot

sistemini taşımaktadır. Üçlü elektrot sistemi için kullanılan elektrotlar Ag/AgCl referans elektrodu(BAS RE-5B with flexible connector, part # MF-2052), platin tel yardımcı elektrot (BAS, 6cm with gold-plated connector, part # MW-4130) ve camsi karbon çalışma elektrodu'dur(BAS GCE, 3.0 mm dia., part # MF-2012).

2.1.2.4 SPEKTROFOTOMETRE DONANIMI

Thermo Evolution Array spektrofotometre (seri no: EA 1002017) ve Thermo VISIONcollect (v. 1.5) yazılımı

2.1.2.5 DİĞER DONANIMLAR

- Manyetik karıştırıcı (NÜVE – MK 20)
- Hassas Terazî (A&D HR – 120, seri no: 12202311)
- Ultrasonik Su Banyosu (Bandelin Sonorex – Grate-Typ RK 52, seri no: 311.00025818.014)

2.1.3 YÖNTEM

2.1.3.1 ÖN TEMİZLİK İŞLEMİ

Deneyde kullanılan cam aparatlar önce üçer kez şebeke suyu ile temizlendi. Ardından üçer kez saf su ile temizlendikten sonra üç kez de metanol çözügeni ile temizlendi.

2.1.3.2 ELEKTROT ÖN TEMİZLİK ÇÖZELTİSİNİN HAZIRLANMASI

Elektrotlara ait ön temizlik çalışmaları 0,5 M H₂SO₄ çözeltisinde gerçekleştirildi. Bu amaçla 10 mL 0,5 M H₂SO₄ çözeltisi hazırlayabilmek için yüzdesi %95–99 (ağ/ağ) ve yoğunluğu 1,840 g/dm³ olan stok H₂SO₄

çözeltisinden 0,280 mL alınarak hacimle (10 mL) HPLC saflığında su ile tamamlandı.

2.1.3.3 CAMSI KARBON ELEKTROT ÖN TEMİZLİK İŞLEMİ

GCE yüzeylerindeki safsızlıkların temizlenmesi ve giderilmesi işlemidir. Bu amaçla çalışmamızda, GCE'un fiziksel temizliği önce alimuna (Al_2O_3) süspansiyonu damlatılmış parlatma bezi yüzeyine sürtülerek 1 dakika boyunca Ön temizlik işleminin ikinci basamağı olarak GCE'a 0,5 M H_2SO_4 çözeltisinde, 30 saniye, +1.9 V (Ag/AgCl' e⁻ karşı) potansiyel uygulandı. Bu şekilde yükseltgenerek temizlenen safsızlıklar giderildi. Daha sonra 10 dakika süreyle(kararlı voltamogram elde edilinceye kadar) -0,25 V ile +1.1 V aralığında 100 mV/saniye'lik tarama hızıyla dönüşümlü voltametri uygulandı. Böylece hem negatif potansiyelde indirgenen safsızlıklar hem de pozitif potansiyelde yükseltgenen safsızlıklar temizlendi. Ön temizlik işleminin son basamağı olarak GCE ultrasonik su banyosunda 5 dakika süreyle temizlendi. Ön temizlik işlemi tamamlanan elektrotlar distile suyla yıkanarak kullanıma hazır hale getirildi.

2.1.3.4 HPLC MOBİL FAZ ÇÖZELTİSİNİN HAZIRLANMASI

UPLC analizlerinde HPLC analizlerinde kullanılan mobil fazlar aynen kullanılmıştır; Mobil Faz1: MeOH-50mM PBS 75-25% (h/h) ve Mobil Faz2: Ach-50mM PBS 30-70% (h/h) şeklindedir. MF1 mobil faz hazırlama aşamasında ilk aşamada 750 mL MeOH ve 250 mL 50mM PBS (pH 6,0) çözümleri kalibre edilmiş mezür ile alınarak mobil faz şişesi içerisine aktarıldı ve burada homojen bir şekilde karışması sağlandı. Son olarak HPLC mobil faz çözeltisi off-line de-gaz sistemi içerisinde (ultrasonik su banyosu) 30

dakika süreyle çözülmüş gazlarından kurtarılarak de-gaz işlemi gerçekleştirildi. MF2 için de benzer işlemler gerçekleştirilmiştir. Burada 1L için alınan prosiyonlar 300 mL Ach ve 700 mL 50mM PBS (pH 6,0) çözgenleridir.

2.1.3.5 STANDART ÇÖZELTİSİNİN HAZIRLANMASI

Standardizasyon aşamasında kullanılan her bir standart reaktifinin 10^{-4} M'lık 100mL'lik çözeltileri mobil faz içerisinde çözülerek hazırlandı. Ardından hazırlanan bu çözeltiler, kalibrasyon noktası elde etmek için mobil faz çözeltisi ile istenilen oranda seyreltilerek 5×10^{-5} , 10^{-5} ve 10^{-6} M'lık standart çözeltiler elde edildi. Yapılan seyreltme işlemlerinde maksimum duyarlılık için pipet kullanımlarına sınırlandırma getirildi.

Yapılan işlemler esnasında hazırlanan standart çözeltilerinin ısı ve ışık ile teması minimize edilmeye çalışıldı. Bu bağlamda hazırlanan çözeltiler alüminyum folyo ile sarılı ve kar dolu başka bir kap içerisinde buzdolabında bekletildi. 1'er saat aralarla kap içerisindeki kar tazelandı.

2.1.3.6 ANALİZ ÇÖZELTİSİNİN HAZIRLANMASI

2.1.4 ÖLÇÜM İŞLEMLERİ

2.1.4.1 ELEKTROANALİTİK ÖLÇÜMLER

2.1.4.1.1 DÖNGÜSEL VOLTAMETRİ (CV)

GCE ile standart maddelerin yükseltgenme potansiyellerinin ölçülmesi amacıyla, $24 \pm 2^\circ\text{C}$ 'de, 0 ve +1500 V aralığında (Ag/AgCl'e karşı), 50 mV/saniye'lik tarama hızıyla, 1 veya 5 mM standart maddesi içeren 10 mL'lik mobil faz çözeltisi içerisinde çalışıldı. Mobil faz olarak MF1 ve MF2 çözeltileri kullanılmıştır. Elde edilen veriler bin. dosyası halinde kaydedildi.

2.1.4.1.2 DİFERANSİYEL PULS VOLTAMETRİSİ (DPV)

GCE ile standart maddelerin yükseltgenme potansiyellerinin ölçülmesi amacıyla, $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de, 0 ve +1500 V aralığında (Ag/AgCl'e karşı), 50 mV/saniye'lik tarama hızıyla, 1 veya 5 mM standart maddesi içeren 10 mL'lik mobil faz çözeltisi içerisinde çalışıldı. Mobil faz olarak MF1 ve MF2 çözeltileri kullanılmıştır. Elde edilen veriler binary (.BIN) dosyası halinde kaydedildi.

2.1.4.2 SPEKTROFOTOMETRİK ÖLÇÜMLER

Spektrofotometrik analizler $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta yapılmıştır. Mobil faz olarak MF1 ve MF2 çözeltileri kullanılmıştır. Ölçümler esnasında 200 – 600 nm aralığında spektrum kaydı alınmıştır. PDA özelliğine sahip spektrofotometre sayesinde istenilen dalgaboyunda tayinlerin sonradan gerçekleştirilmesi mümkün olabilmektedir. Elde edilen veriler Thermo Vision Collect yazılımıyla kaydedilmiştir.

2.1.4.3 SIVI KROMATOGRAFIK ÖLÇÜMLER

2.1.4.3.1 HPLC ÖLÇÜM TEKNİĞİ

HPLC analizleri, $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta, 1,0 mL/dk akış hızında, C18 analitik kolon ile mobil faz olarak MF1 ve MF2 çözgen sistemleri varlığında, 20µL sabit hacimli manuel enjektör vasıtasıyla gerçekleştirilmiştir. Analiz aşamasında kullanılan elektrokimyasal dedektör (ECD) ile çalışma potansiyeli olarak +1200 (MF1) veya +900 (MF2) mV'da (Ag/AgCl elektroduna karşı, 0,5µA full scale) çalışılmıştır. ECD ile amperometri modunda kayıt alınarak analit maddesinin yükseltgenme değerleri ölçüldü. Çalışmada kullanılan mobil faz bileşimi, de-gaz işleminden geçirildi. Ayırımı yapılan tüm bileşiklerin tanımı, standardının özgül alıkonma zamanlarına (retention time, t_R) göre

gerçekleştirildi. Kullanılan analitik kolon: Thermo ODS-2 Hypersil, 250mmx4.6mm, 5µm partikül çapı, 80Å por çapı.

2.1.4.3.2 UPLC ÖLÇÜM TEKNİĞİ

UPLC analizleri, 24±2°C sıcaklıkta, 100-500 µL/dk akış hızı aralığında, C18 analitik kolon ile mobil faz olarak MF1 ve MF2 çözgen sistemleri varlığında, 2-10µL değişken hacimli otomatik enjektör vasıtasıyla gerçekleştirilmiştir. Kullanılan analitik kolon: Thermo Synchronis C18, 50mmx2.1mm, 1.7µm, 100 Å por çapı.

2.1.4.3.3 STANDART ÇÖZELTİLERİN TAYİNİ

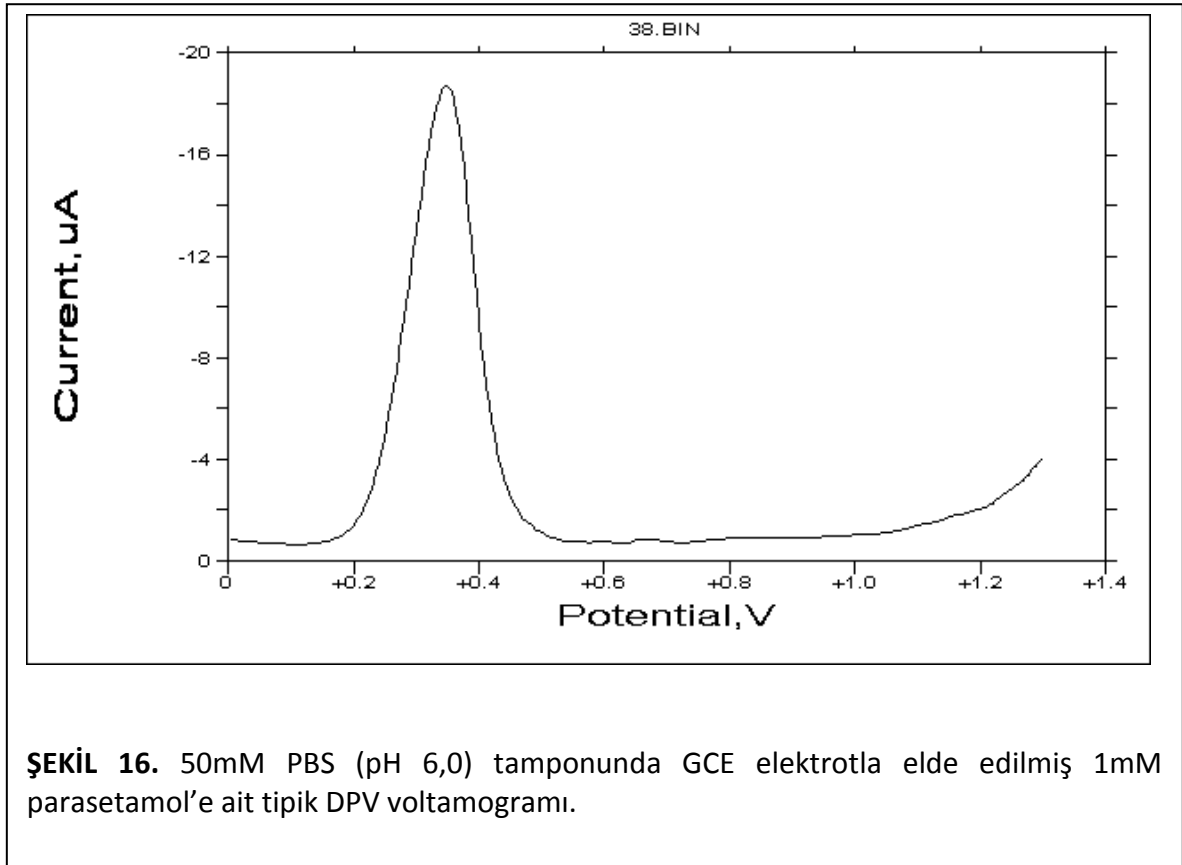
Analiz işlemlerine geçilmeden önce kör enjeksiyonu yapıldı. HPLC sisteminin basıncı ve ortam ısısı kontrol edilerek analiz koşulları optimize edildi. Başlangıçta, numuneye ait alıkonma zamanı ve absorpsiyon maksimumunu tayini için yüksek bir derişim değerinde enjeksiyon yapıldı ve sonuçlar kaydedildi. Her bir derişim noktası için tespit edilen parmak izi değerleri için ECD dedektörden alınan yanıtların ortalama, standart sapma ve bağıl standart sapma değerleri hesaplandı.

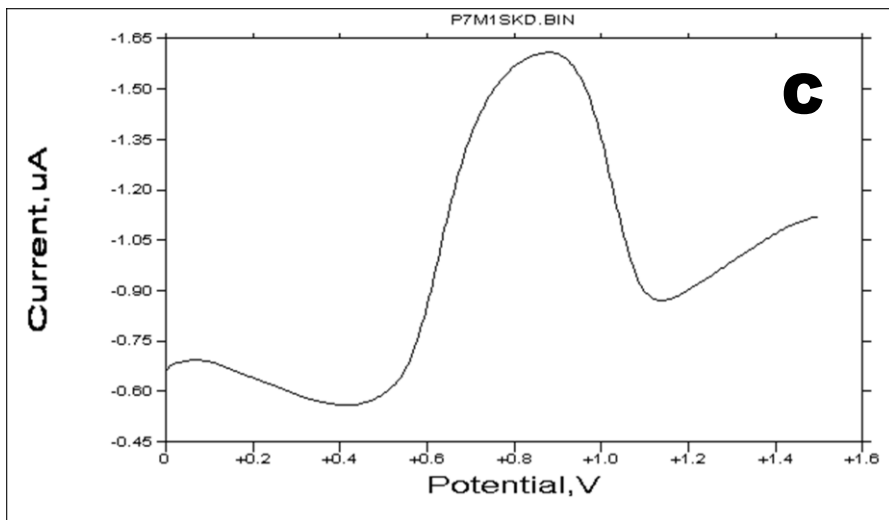
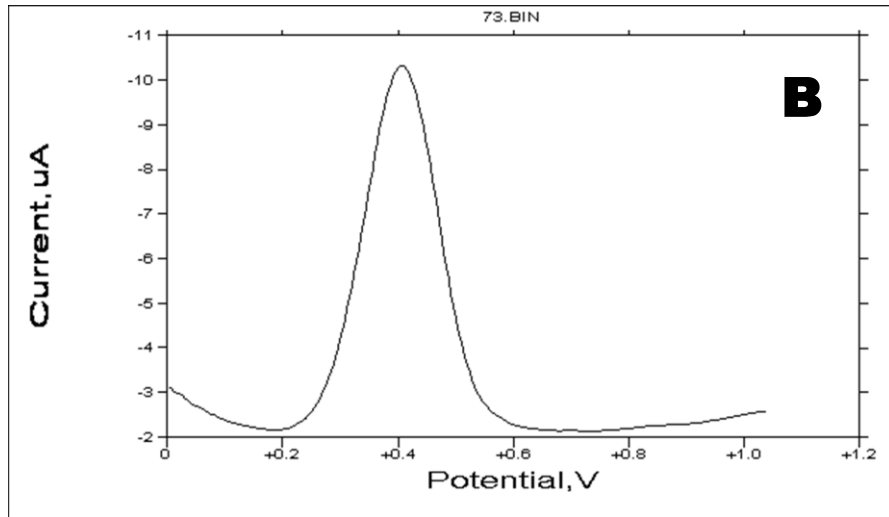
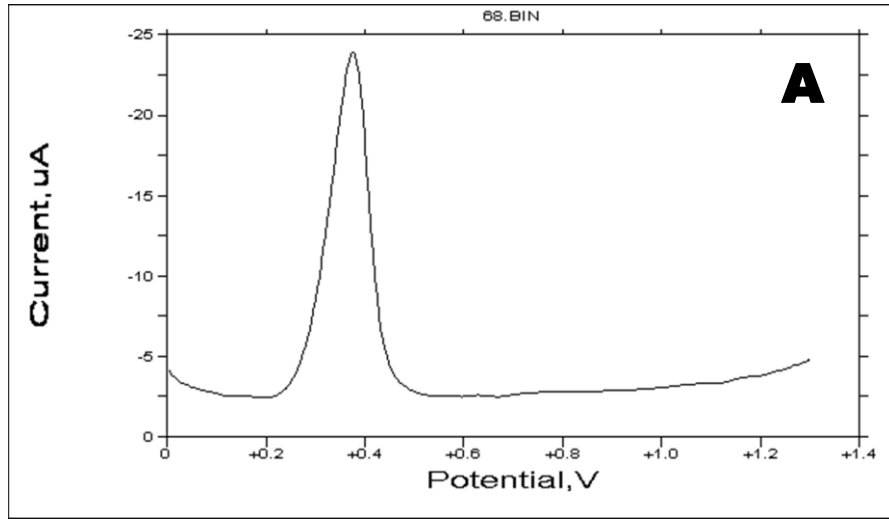
BÖLÜM III

3.1 BULGULAR

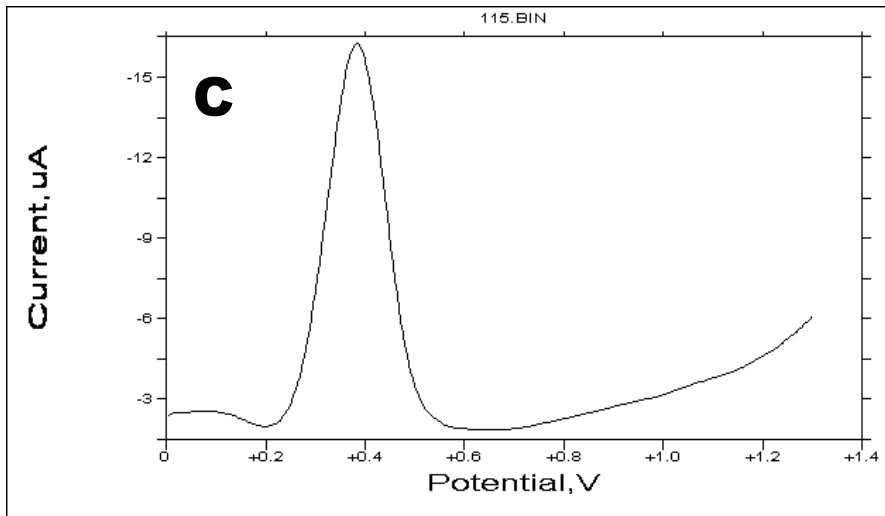
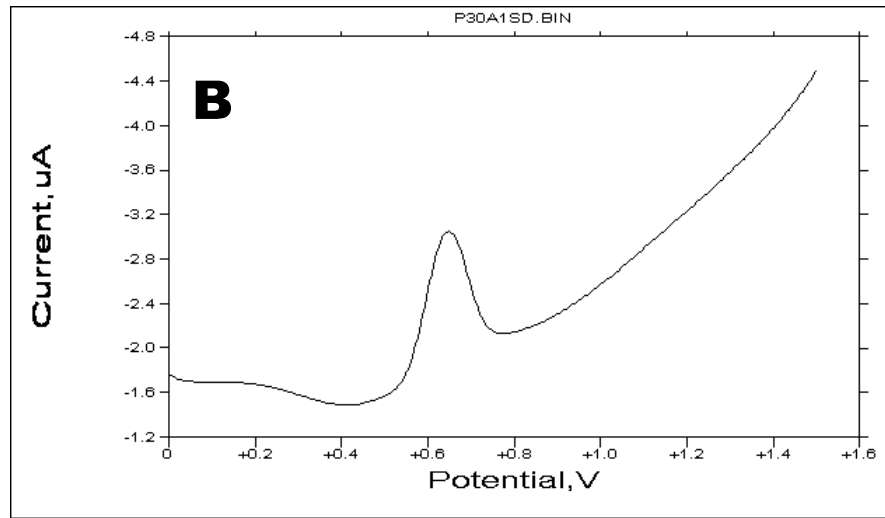
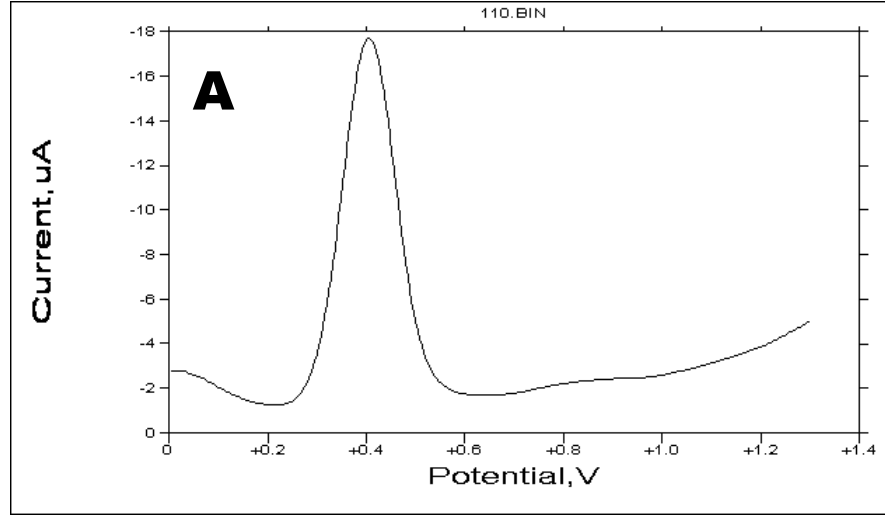
3.1.1 ELEKTROKİMYASAL BULGULAR

3.1.1.1 PARASETAMOL BULGULARI

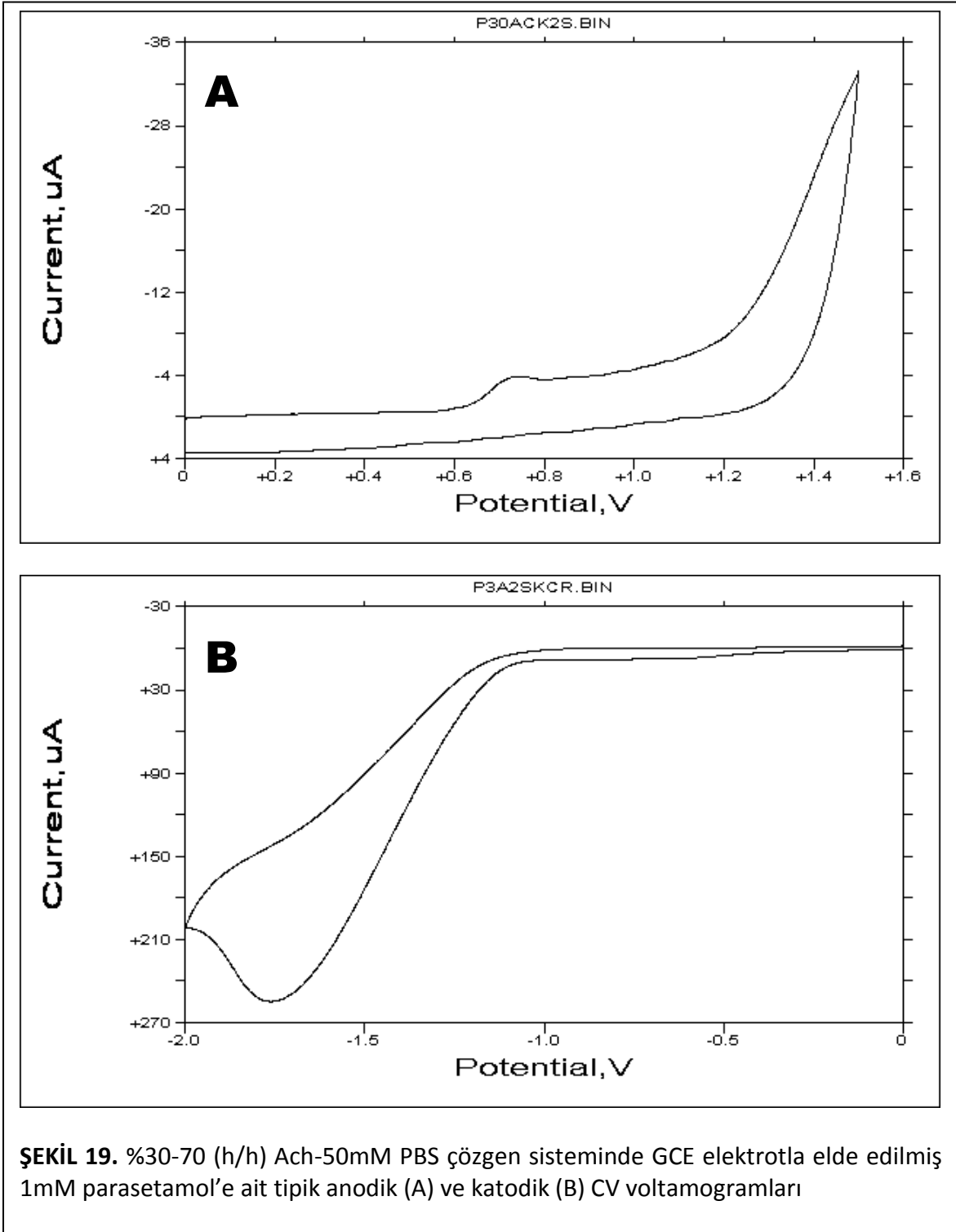




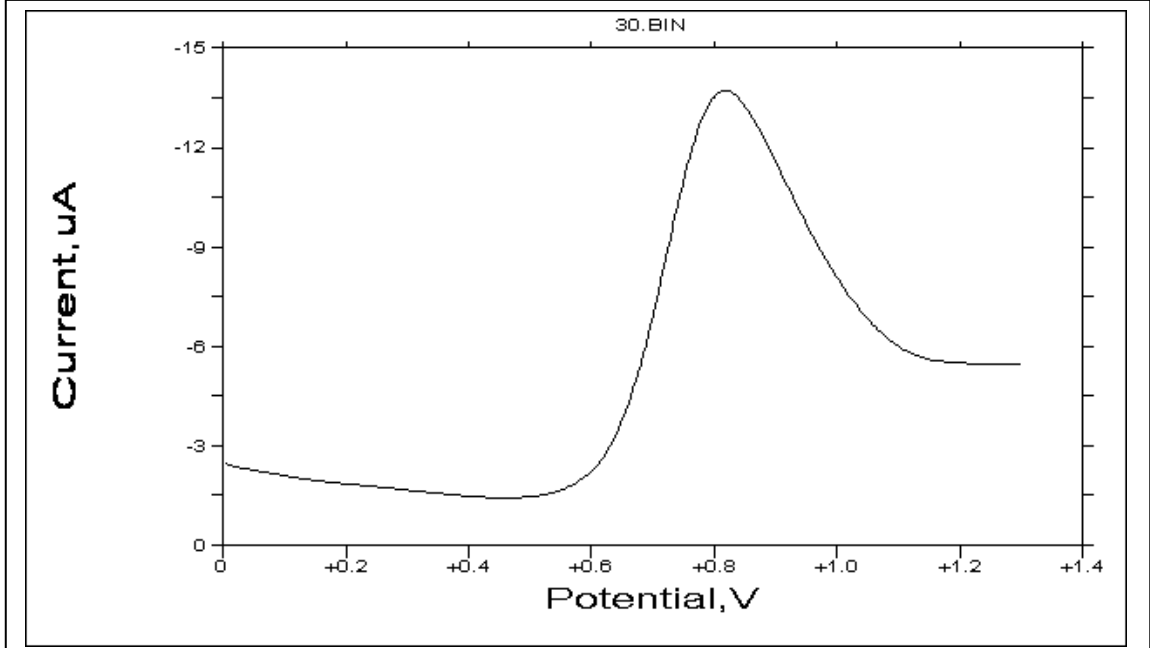
ŞEKİL 17. %10-90 (h/h) MeOH-50mM PBS (pH 6,0) (A), %50-50 (h/h) MeOH-50mM PBS (B) ve %75-25 (h/h) MeOH-50mM PBS (C) çözümlerinde GCE elektrotla elde edilmiş 1mM parasetamol'e ait tipik DPV voltamogramları.



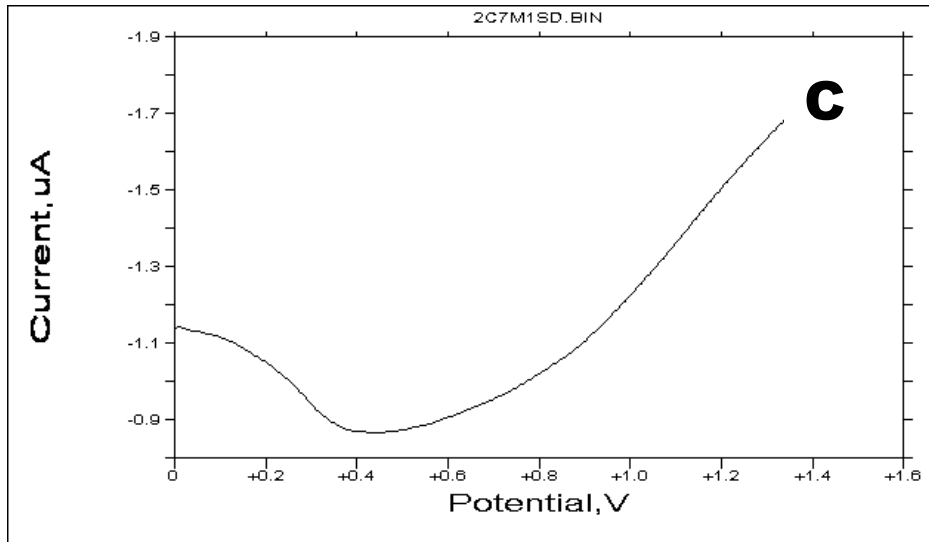
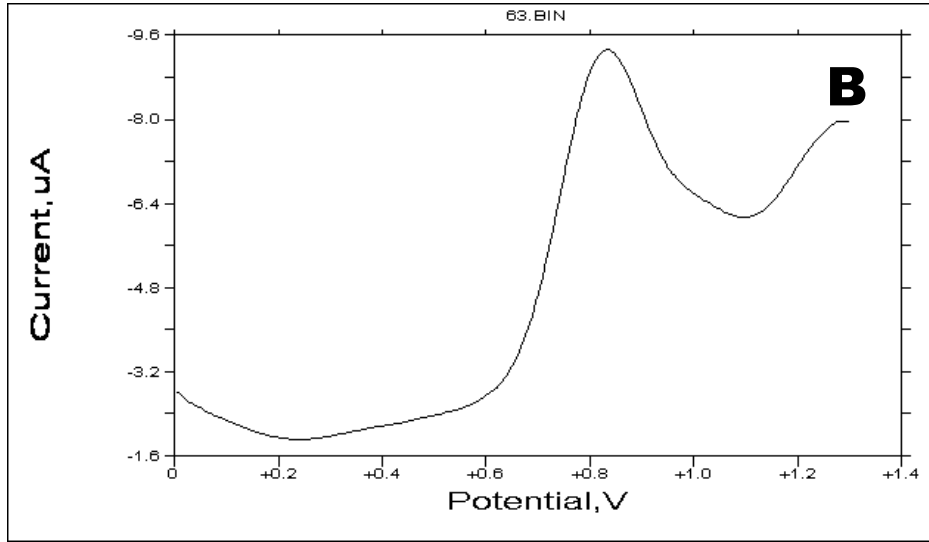
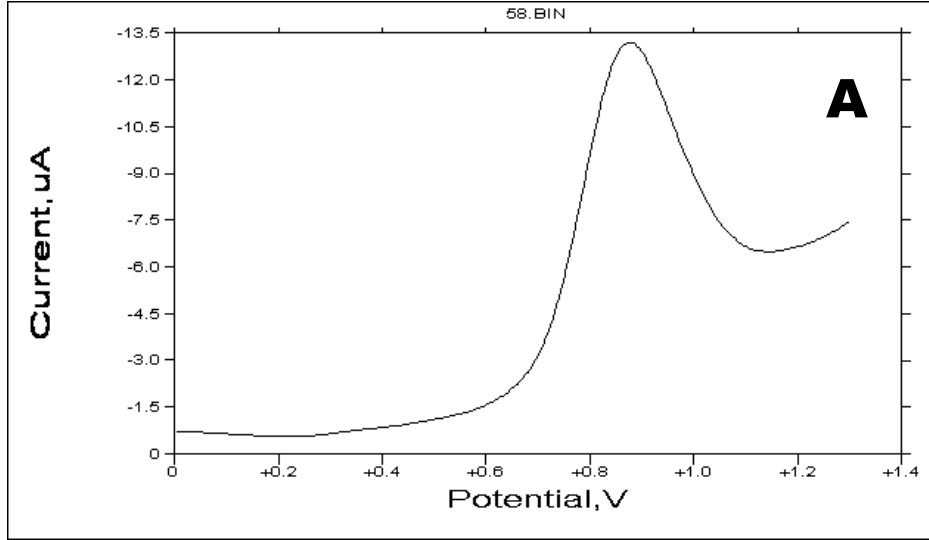
ŞEKİL 18. %10-90 (h/h) Ach-50mM PBS (pH 6,0) (A), %30-70 (h/h) Ach-50mM PBS (B) ve %50-50 (h/h) Ach-50mM PBS (C) çözgenlerinde GCE elektrotla elde edilmiş 1mM parasetamol'e ait tipik DPV voltamogramları.



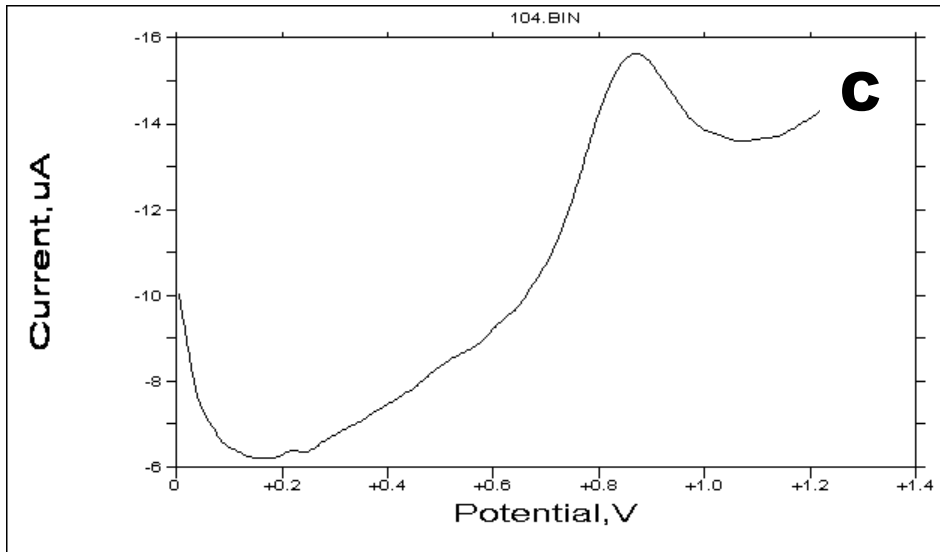
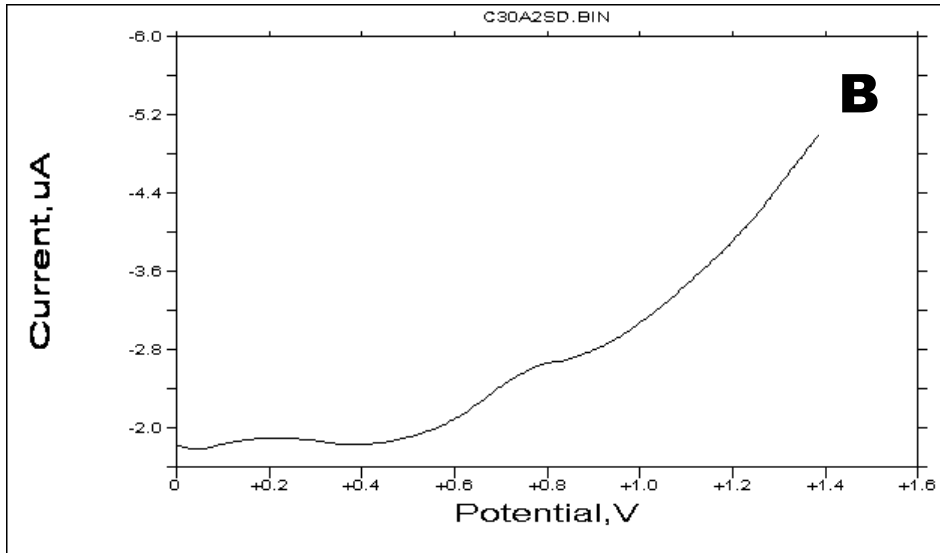
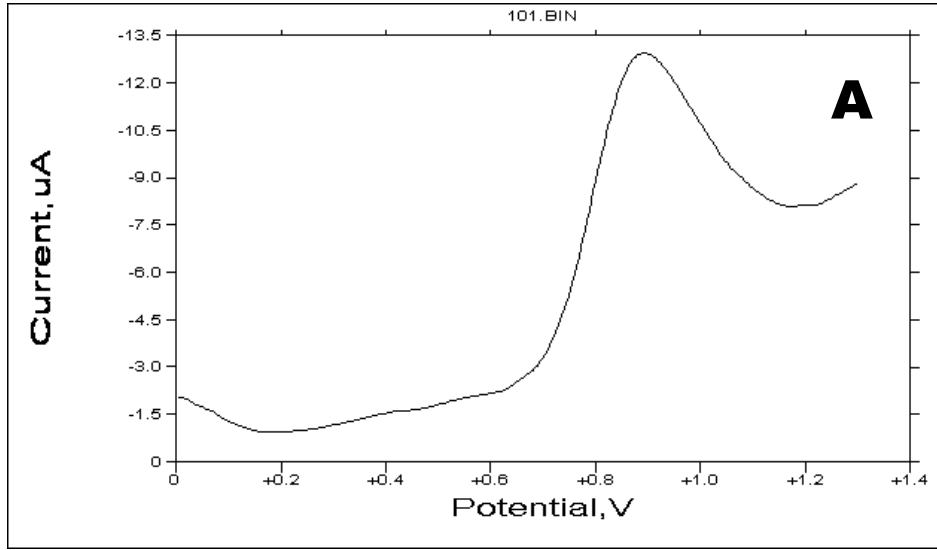
3.1.1.2 KLORFENİRAMİN MALEAT BULGULARI



ŞEKİL 20. 50mM PBS (pH 6,0) tamponunda GCE elektrotla elde edilmiş 1mM klorfeniramin maleat'a ait tipik DPV voltamogramı.

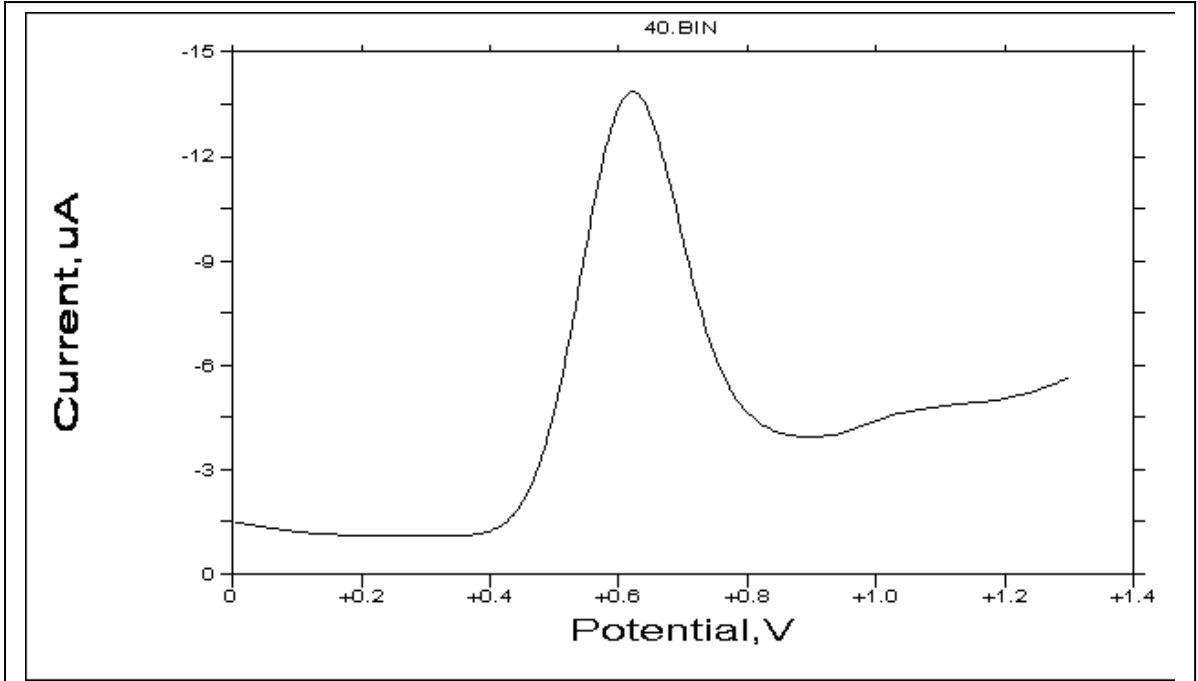


ŞEKİL 21. %10-90 (h/h) MeOH-50mM PBS (pH 6,0) (A), %50-50 (h/h) MeOH-50mM PBS (B) ve %75-25 (h/h) MeOH-50mM PBS (C) çözümlerinde GCE elektrotla elde edilmiş 1mM klorfeniramin maleat'a ait tipik DPV voltamogramları.

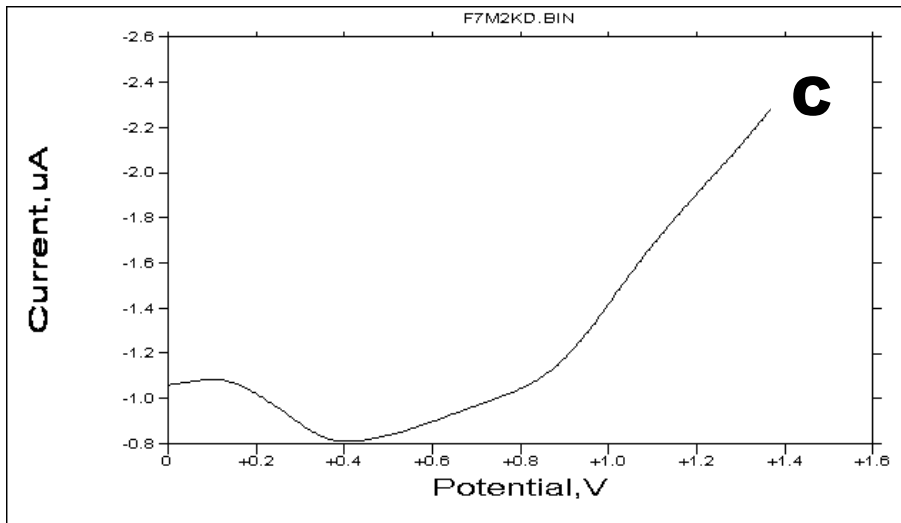
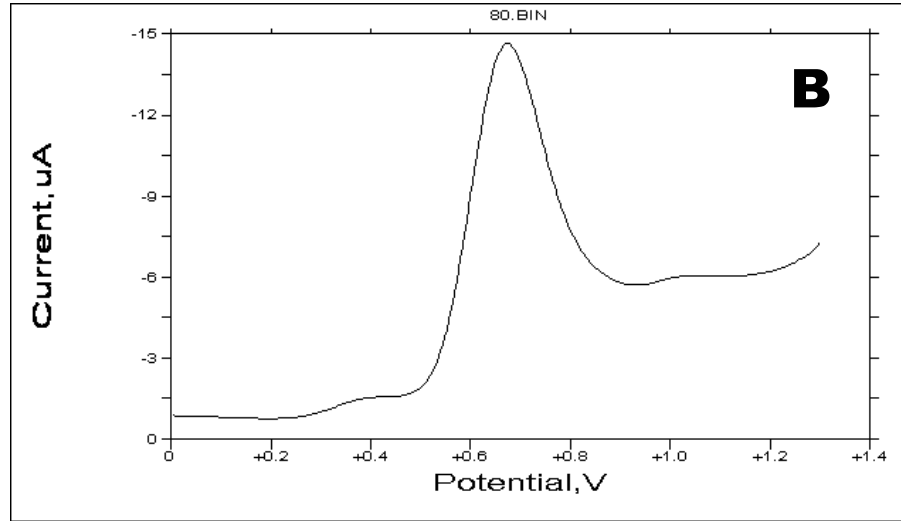
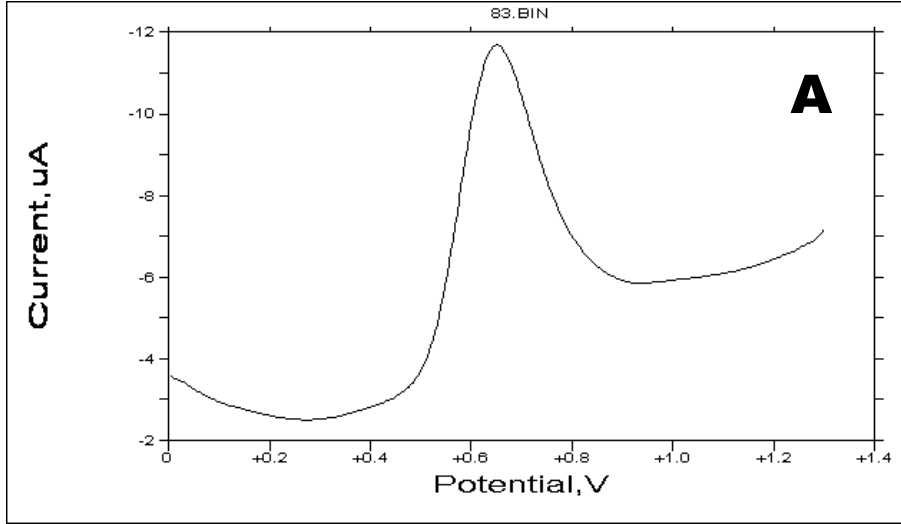


ŞEKİL 22. %10-90 (h/h) Ach-50mM PBS (pH 6,0) (A), %30-70 (h/h) Ach-50mM PBS (B) ve %50-50 (h/h) Ach-50mM PBS (C) çözümlerinde GCE elektrotla elde edilmiş 1mM klorfeniramin maleat'a ait tipik DPV voltamogramları.

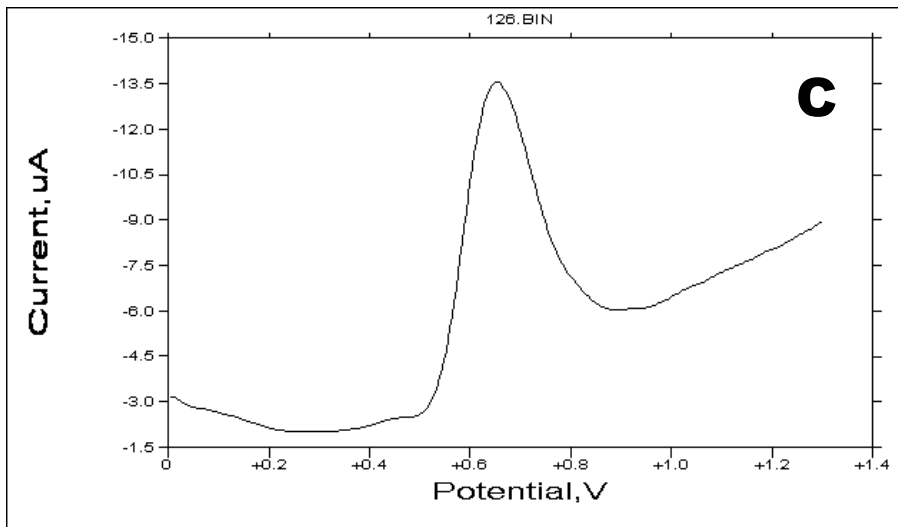
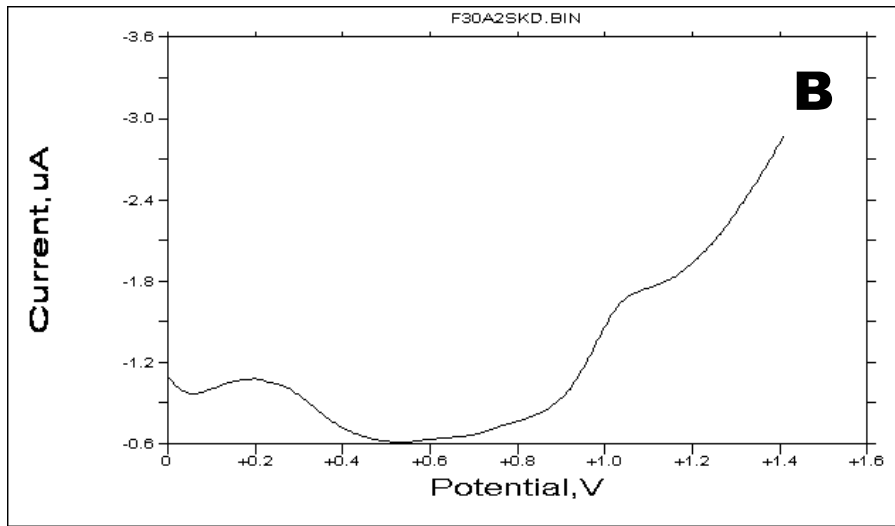
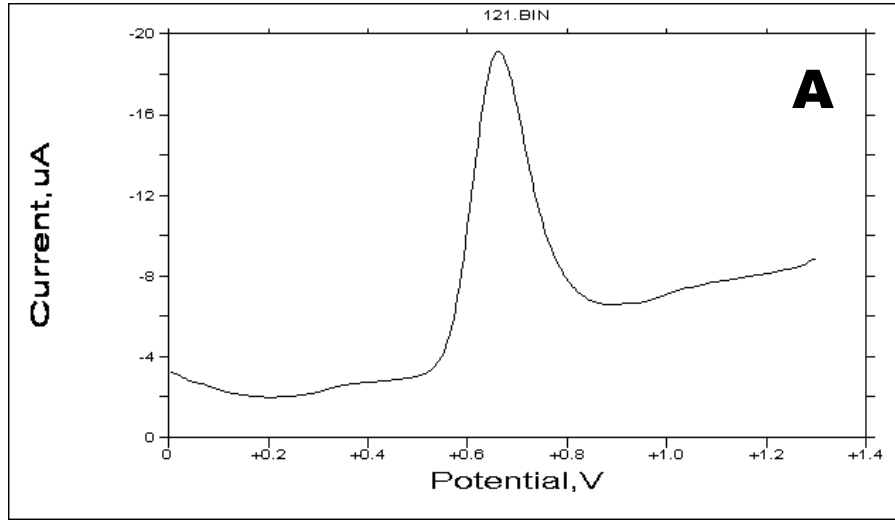
3.1.1.3 FENİLEFRİN HİDROKLORÜR BULGULARI



ŞEKİL 23. 50mM PBS (pH 6,0) tamponunda GCE elektrotla elde edilmiş 1mM fenilefrin hidroklorür'e ait tipik DPV voltamogramı.

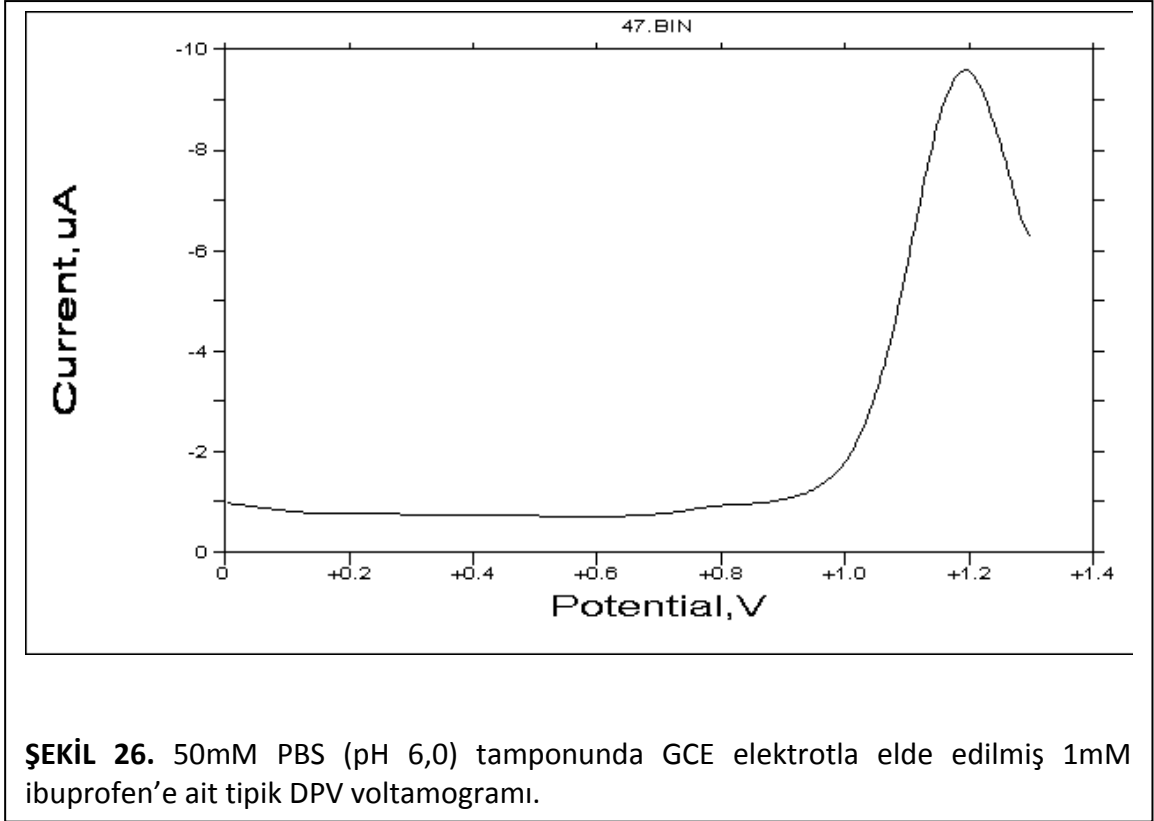


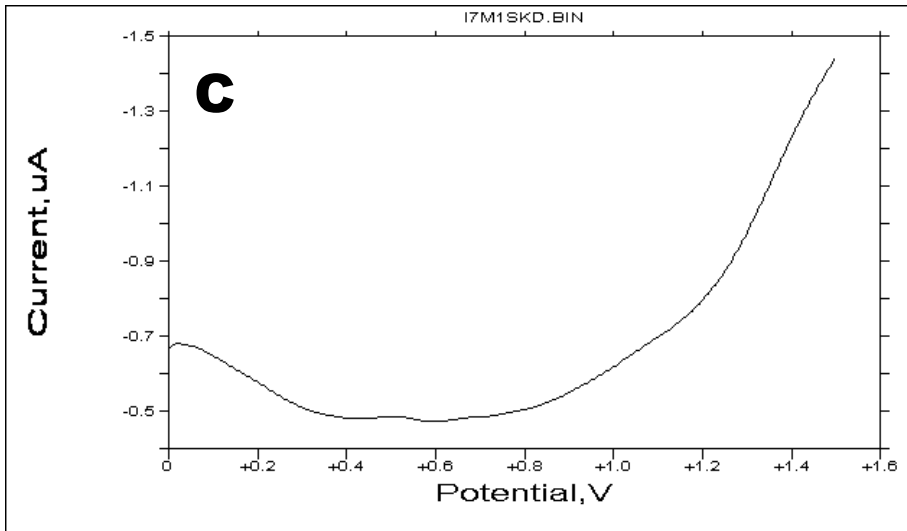
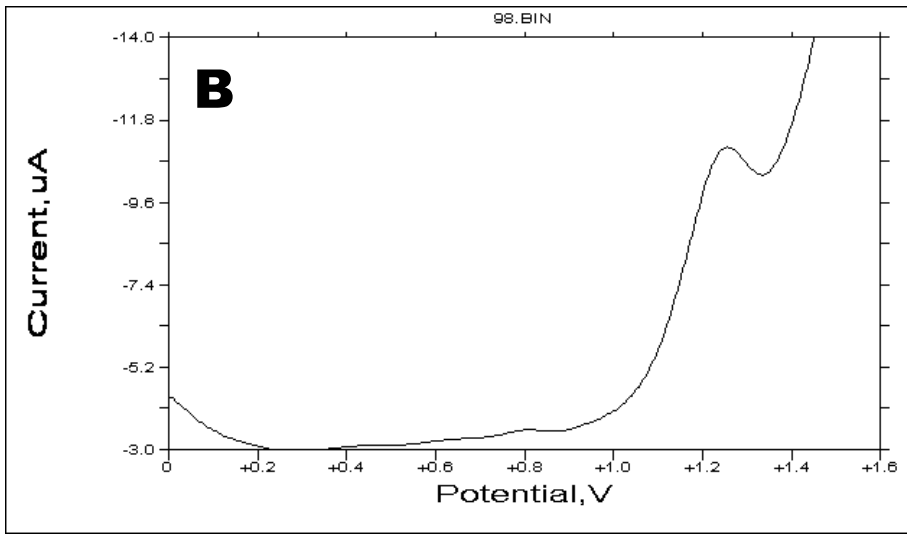
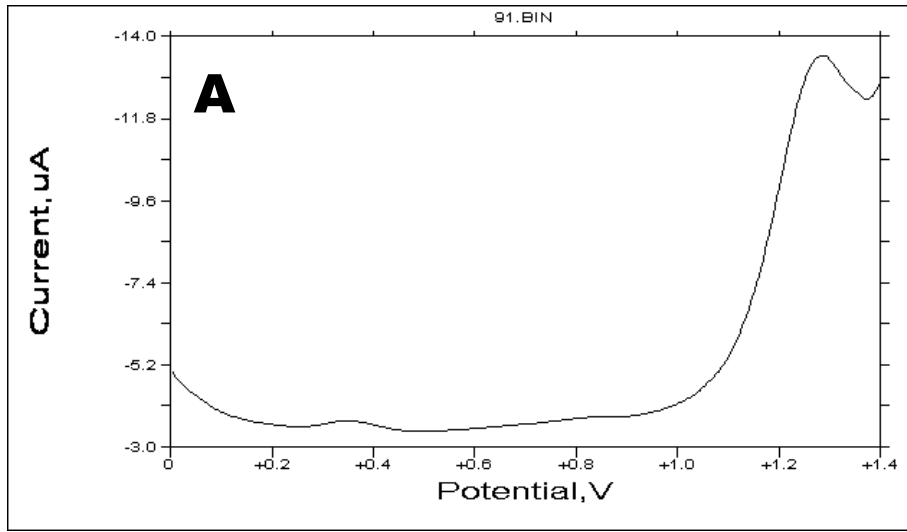
ŞEKİL 24. %10-90 (h/h) MeOH-50mM PBS (pH 6,0) (A), %50-50 (h/h) MeOH-50mM PBS (B) ve %75-25 (h/h) MeOH-50mM PBS (C) çözümlerinde GCE elektrotla elde edilmiş 1mM fenilefrin hidroklorür'e ait tipik DPV voltamogramları.



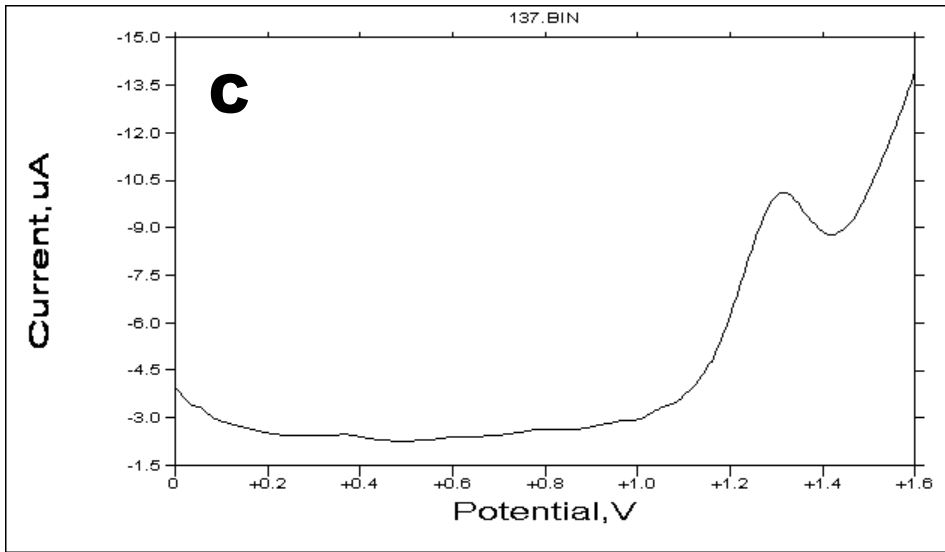
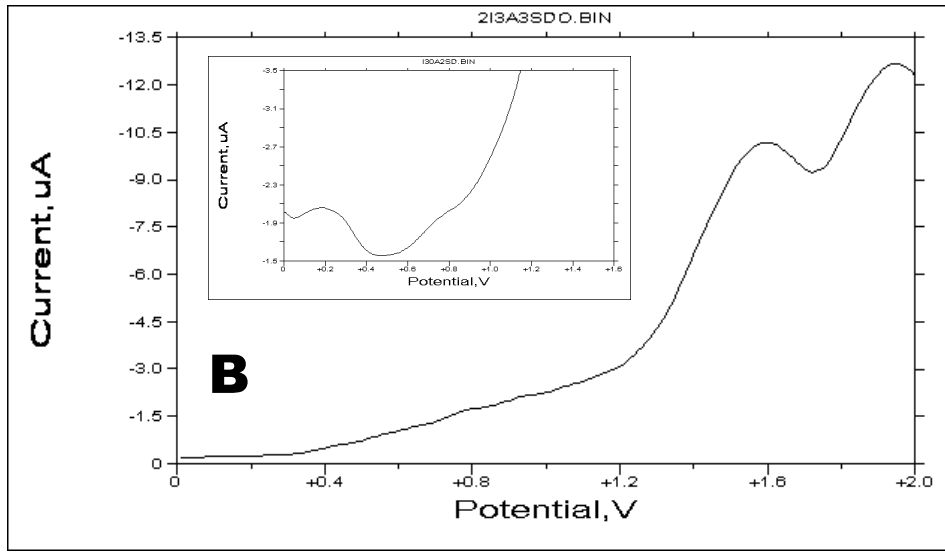
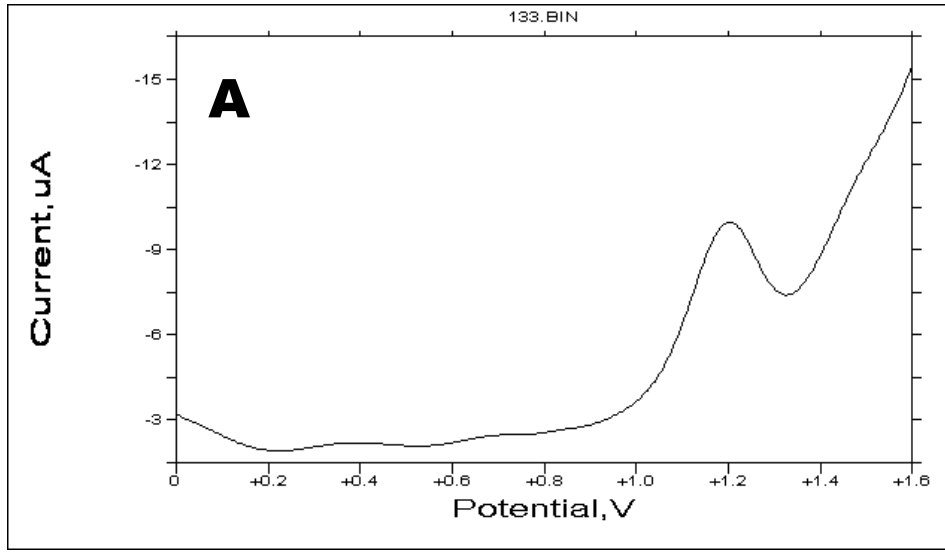
ŞEKİL 25. %10-90 (h/h) Ach-50mM PBS (pH 6,0) (A), %30-70 (h/h) Ach-50mM PBS (B) ve %50-50 (h/h) Ach-50mM PBS (C) çözenlerinde GCE elektrotla elde edilmiş 1mM fenilefrin hidroklorür'e ait tipik DPV voltamogramları.

3.1.1.4 İBUPROFEN BULGULARI





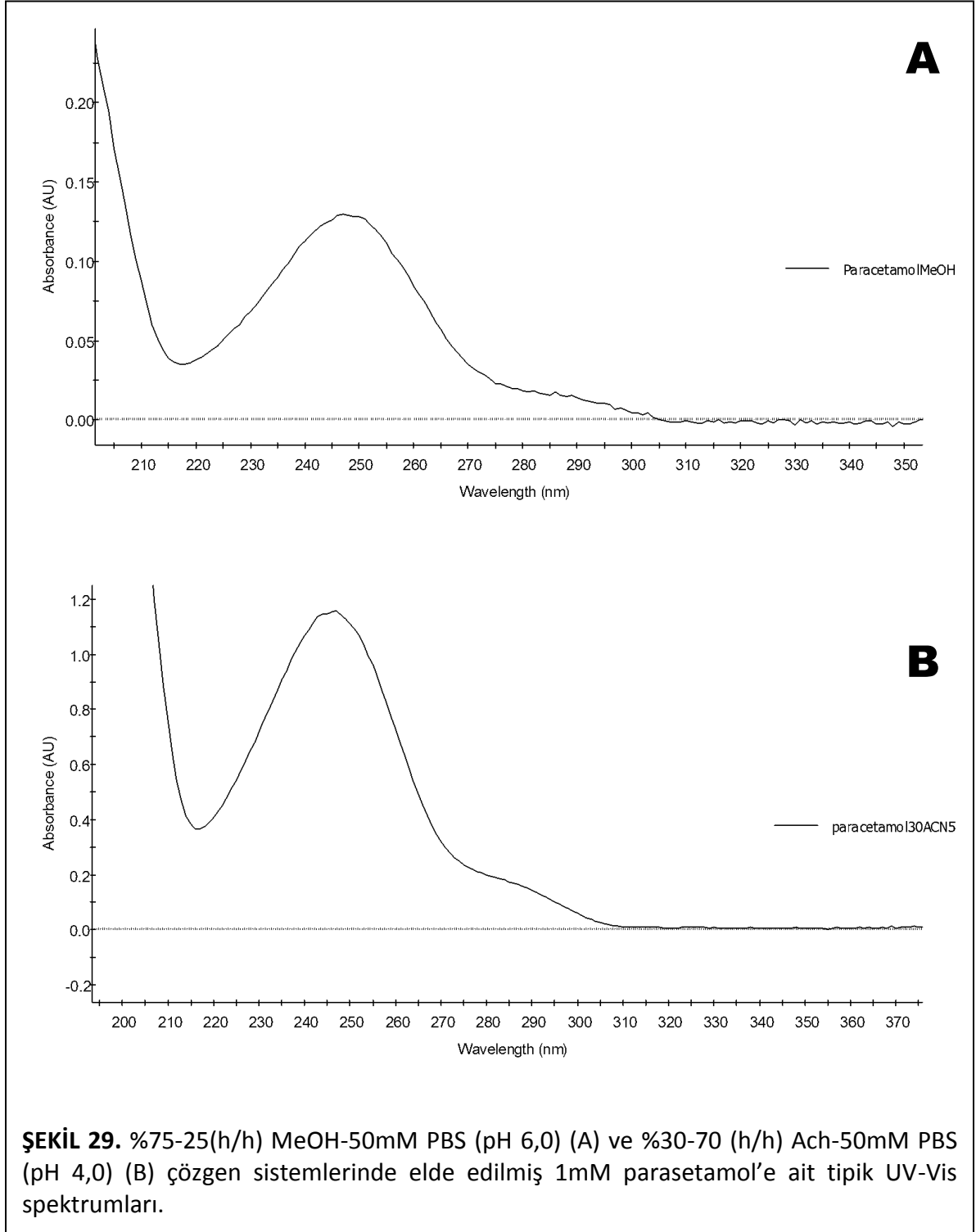
ŞEKİL 27. %10-90 (h/h) MeOH-50mM PBS (pH 6,0) (A), %50-50 (h/h) MeOH-50mM PBS (B) ve %75-25 (h/h) MeOH-50mM PBS (C) çözgenlerinde GCE elektrotla elde edilmiş 1mM ibuprofen'e ait tipik DPV voltamogramları.



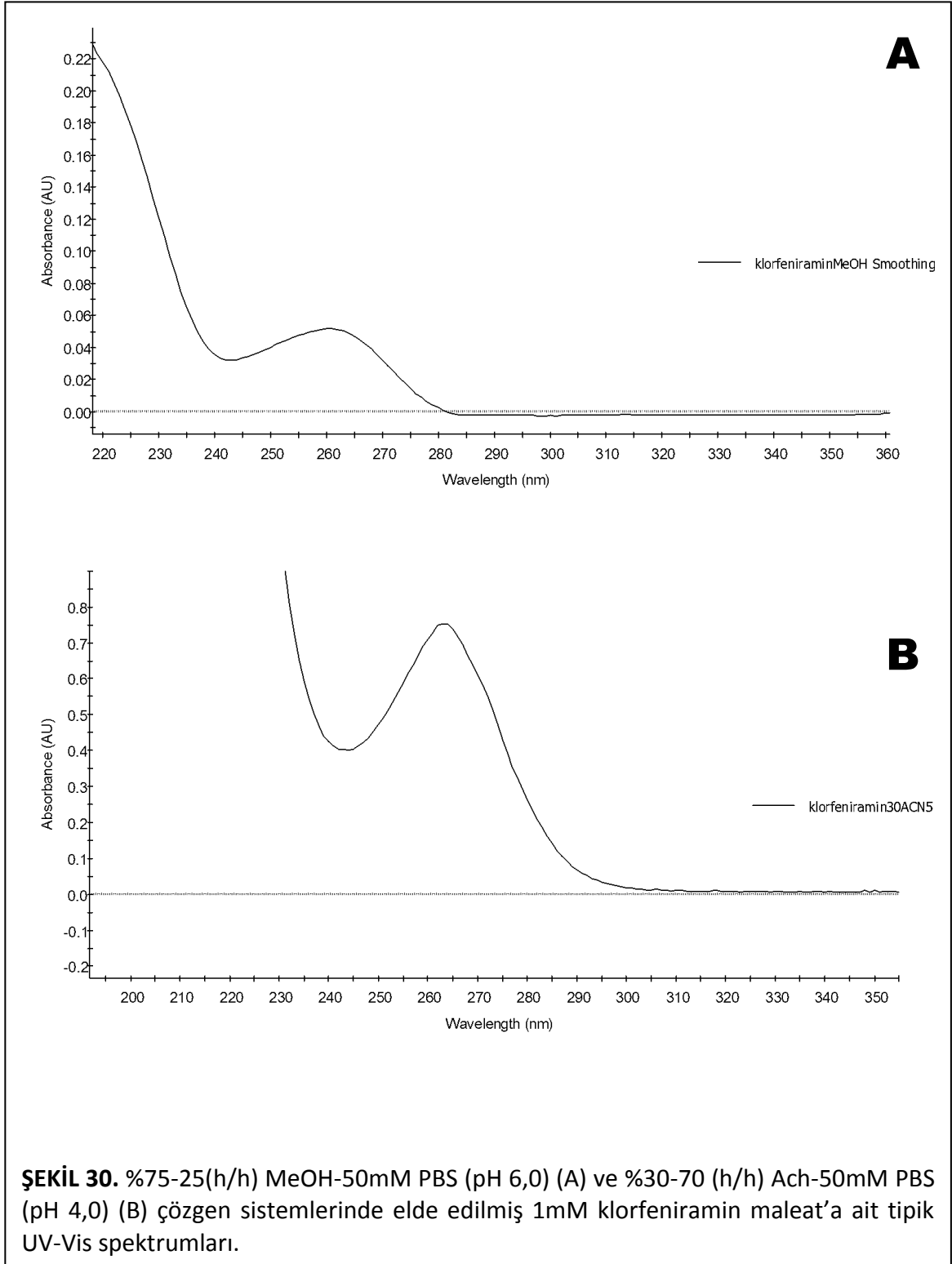
ŞEKİL 28. %10-90 (h/h) Ach-50mM PBS (pH 6,0) (A), %30-70 (h/h) Ach-50mM PBS (B) ve %50-50 (h/h) Ach-50mM PBS (C) çözümlerinde GCE elektrotla elde edilmiş 1mM ibuprofen'e ait tipik DPV voltamogramları.

3.1.2 SPEKTROSKOPİK BULGULAR

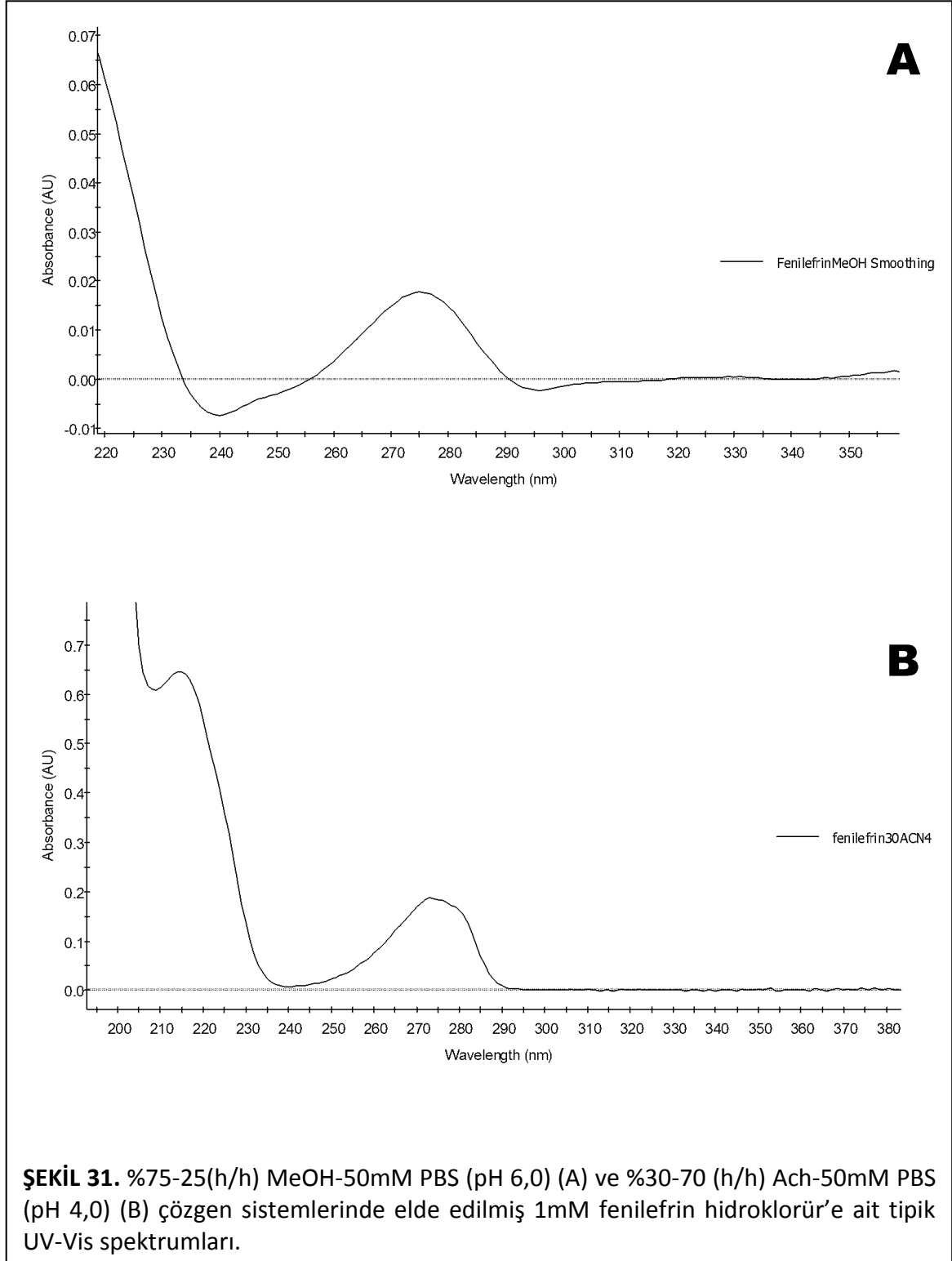
3.1.2.1 PARASETAMOL BULGULARI



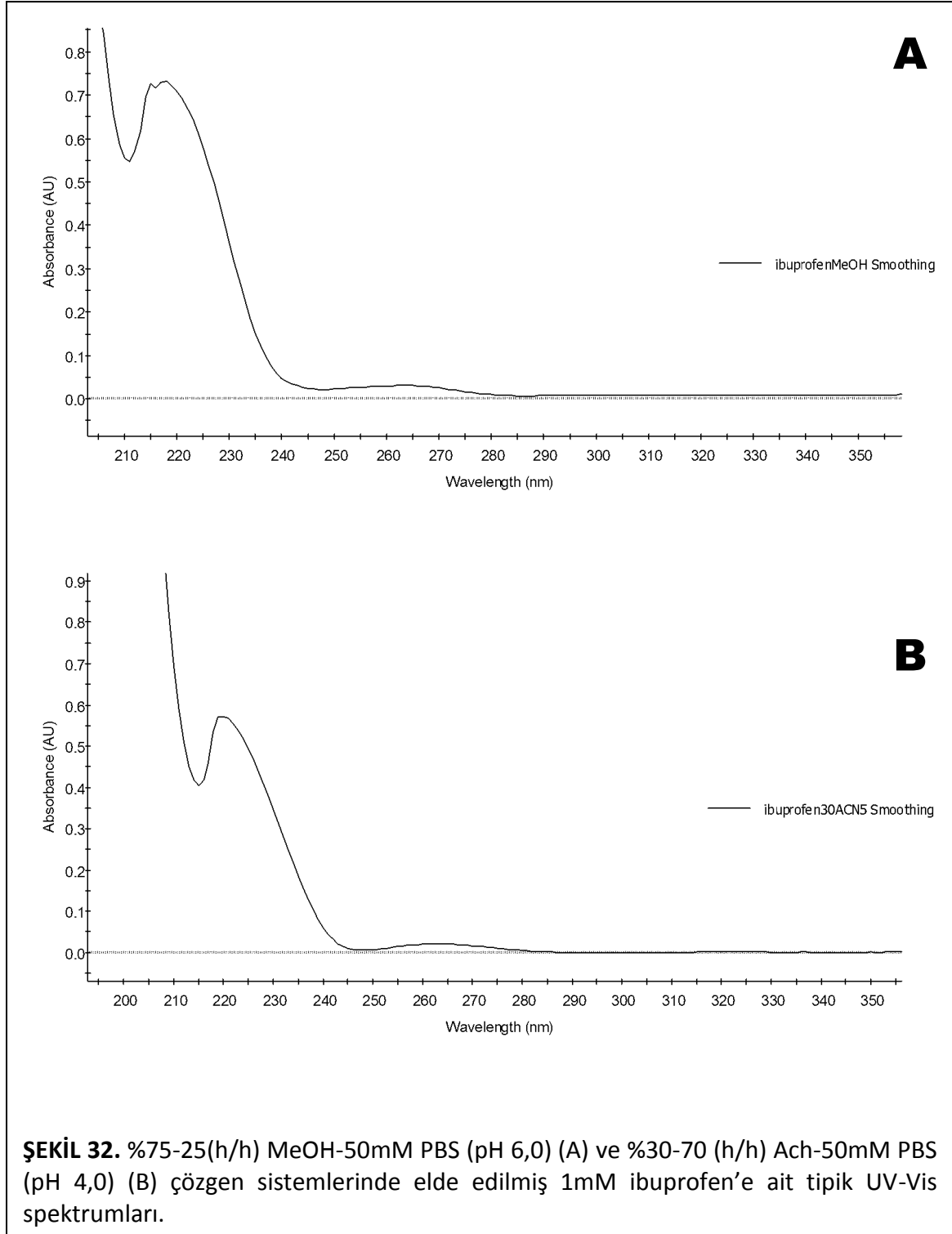
3.1.2.2 KLORFENİRAMİN MALEAT BULGULARI



3.1.2.3 FENİLEFRİN HİDROKLORÜR BULGULARI

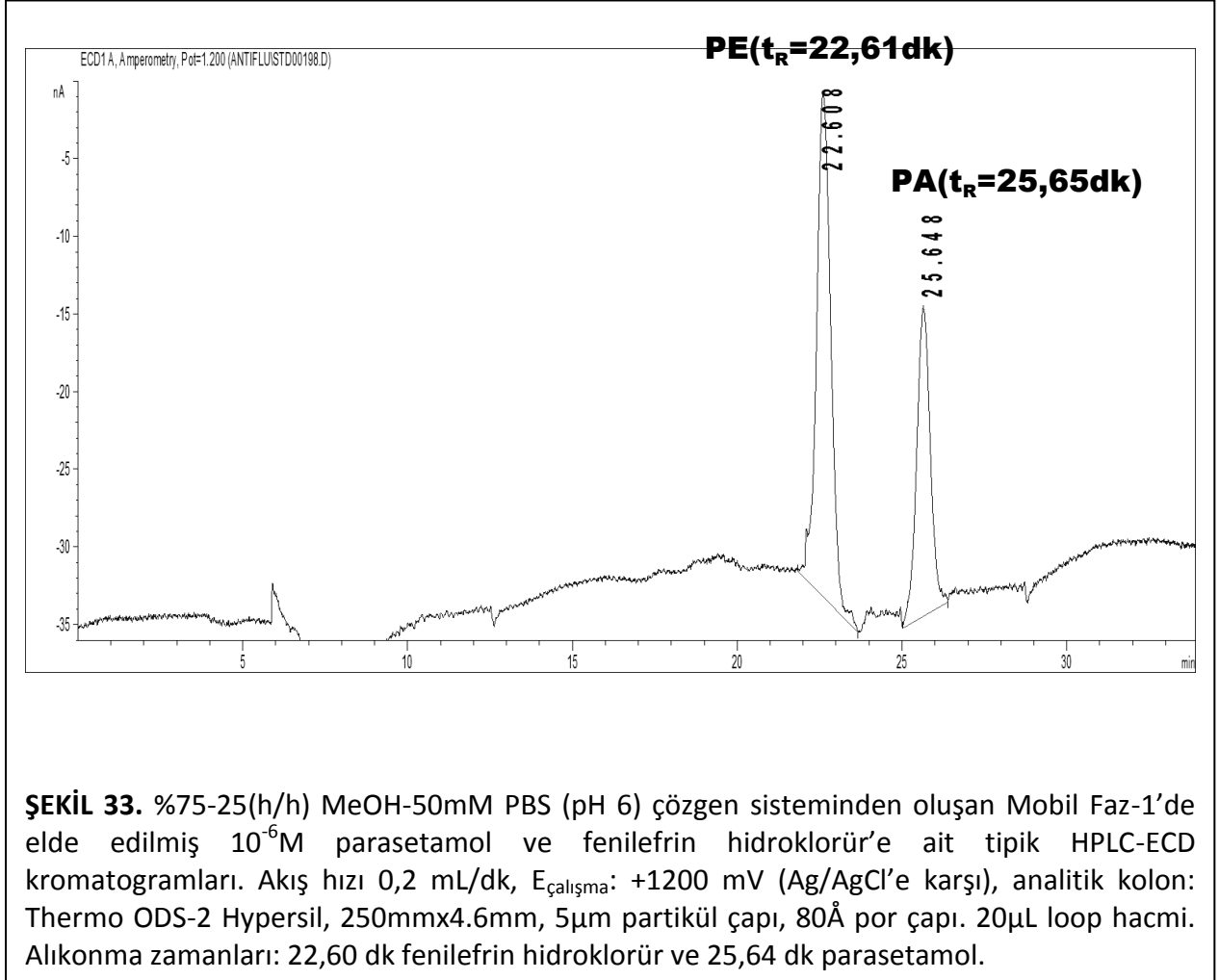


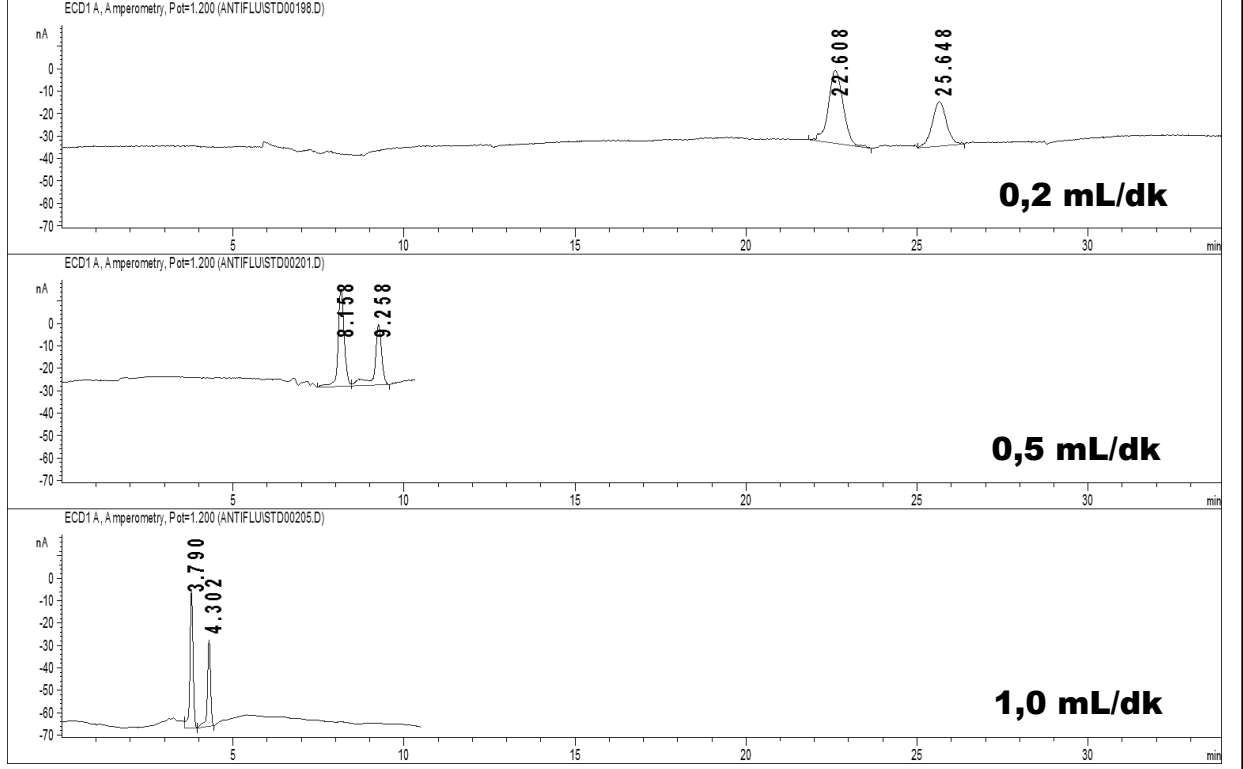
3.1.2.4 İBUPROFEN BULGULARI



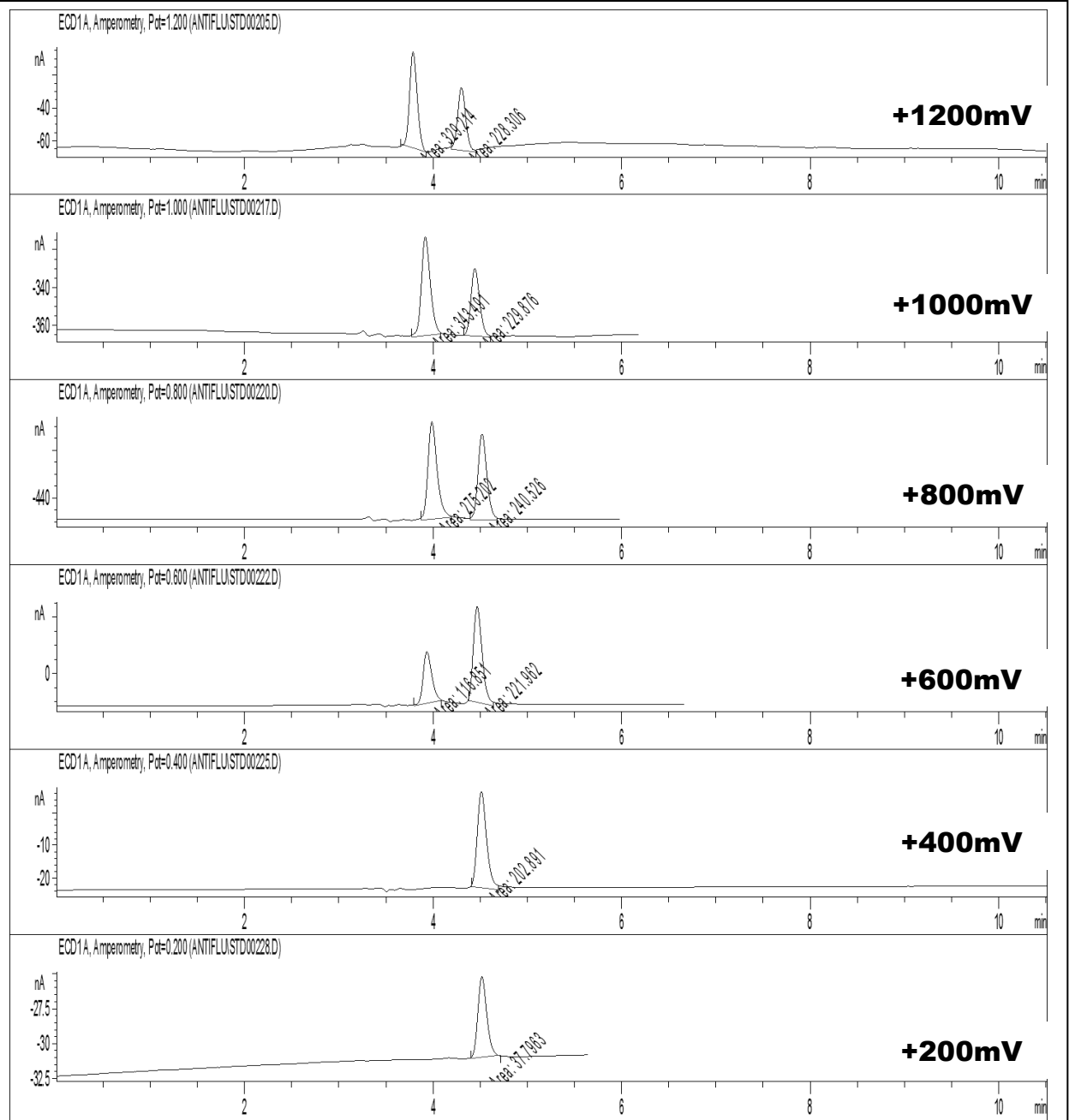
3.1.3 KROMATOĞRAFİK BULGULAR

3.1.3.1 HPLC BULGULARI

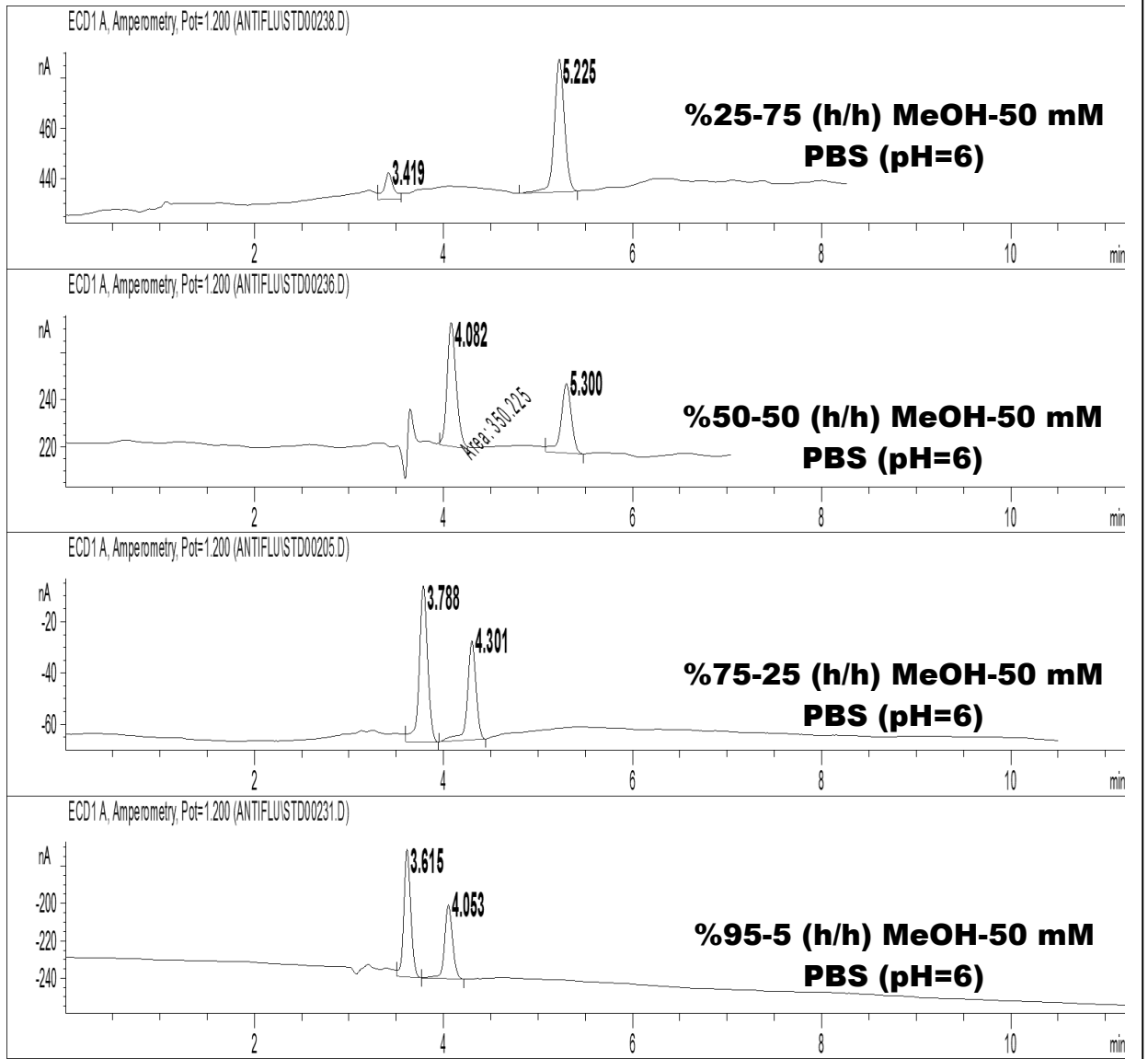




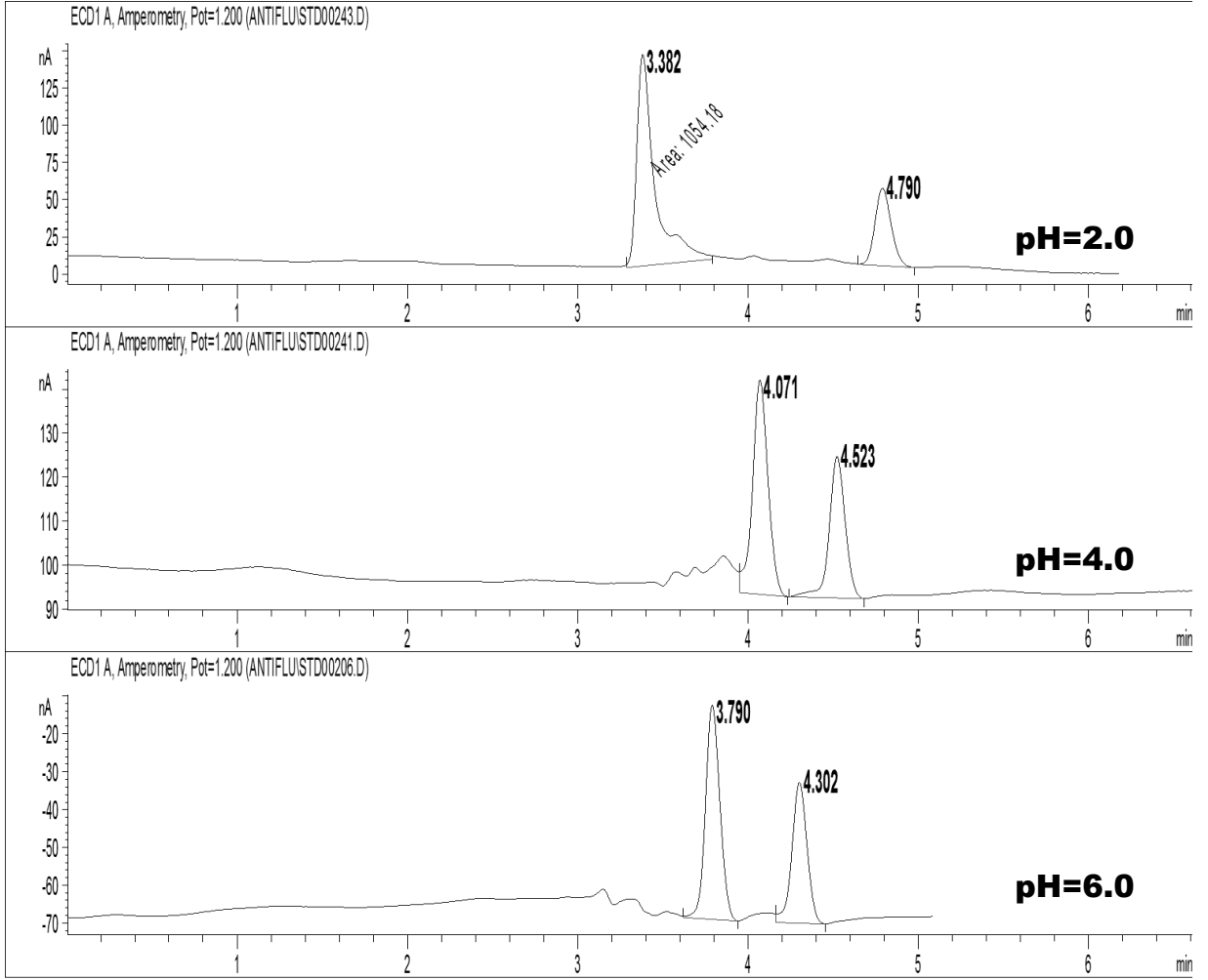
ŞEKİL 34. %75-25(h/h) MeOH-50mM PBS (pH 6) çözgen sisteminden oluşan Mobil Faz-1'de elde edilmiş 10^{-6} M parasetamol ve fenilefrin hidroklorür'e ait tipik HPLC-ECD kromatogramları. $E_{\text{çalışma}}$: +1200 mV (Ag/AgCl'e karşı), analitik kolon: Thermo ODS-2 Hypersil, 250mmx4.6mm, 5 μ m partikül çapı, 80Å por çapı. 20 μ L loop hacmi. Akış hızının kromatogramda alıkonma zamanlarına etkisi.



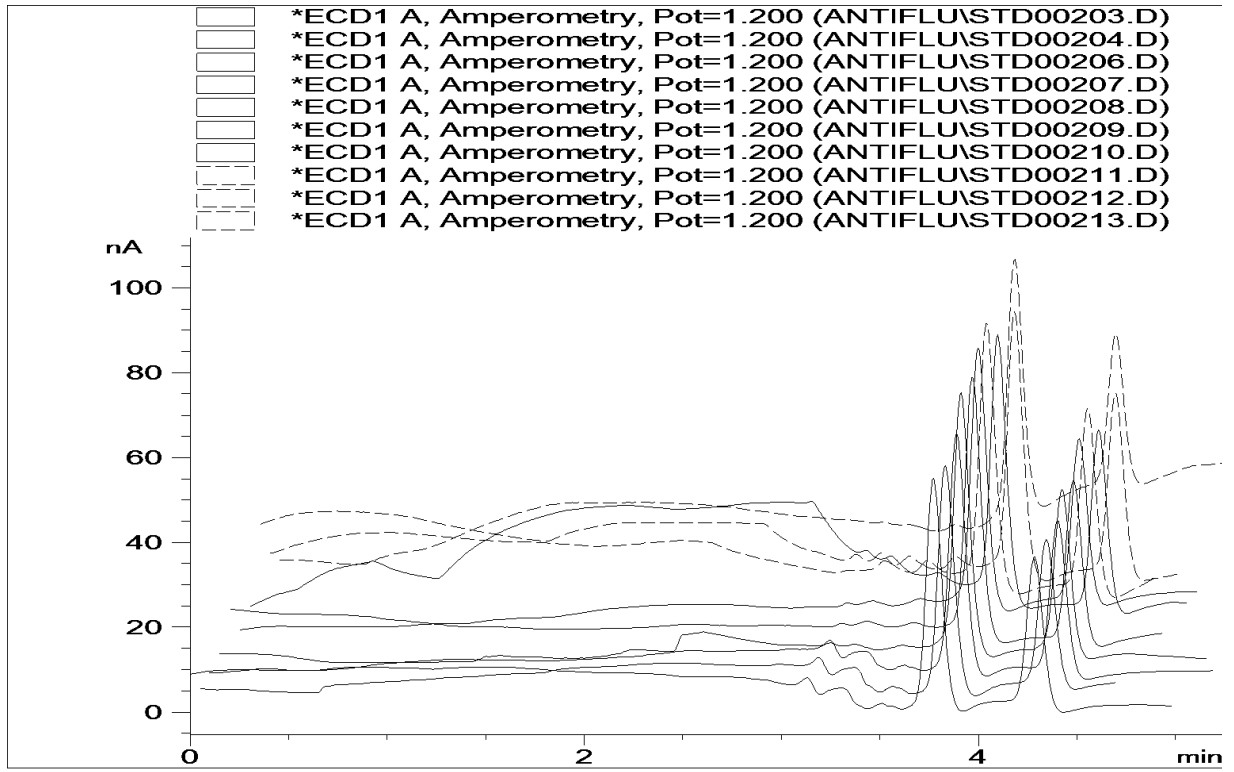
ŞEKİL 35. %75-25(h/h) MeOH-50mM PBS (pH 6) çözgen sisteminden oluşan Mobil Faz-1’de elde edilmiş 10^{-6} M parasetamol ve fenilefrin hidroklorür’e ait tipik HPLC-ECD kromatogramları. Akış hızı 1,0 mL/dk, analitik kolon: Thermo ODS-2 Hypersil, 250mmx4.6mm, 5 μ m partikül çapı, 80Å por çapı. 20 μ L loop hacmi. Çalışma potansiyelinin kromatograma etkisi.



ŞEKİL 36. Değişik çözgen sistemlerinden oluşan mobil fazlarda elde edilmiş 10^{-6} M parasetamol ve fenilefrin hidroklorür'e ait tipik HPLC-ECD kromatogramları. Akış hızı 1,0 mL/dk, . $E_{\text{çalışma}}$: +1200 mV (Ag/AgCl'e karşı), analitik kolon: Thermo ODS-2 Hypersil, 250mmx4.6mm, 5 μ m partikül çapı, 80Å por çapı. 20 μ L loop hacmi. Mobil faz kompozisyonunun kromatograma etkisi.

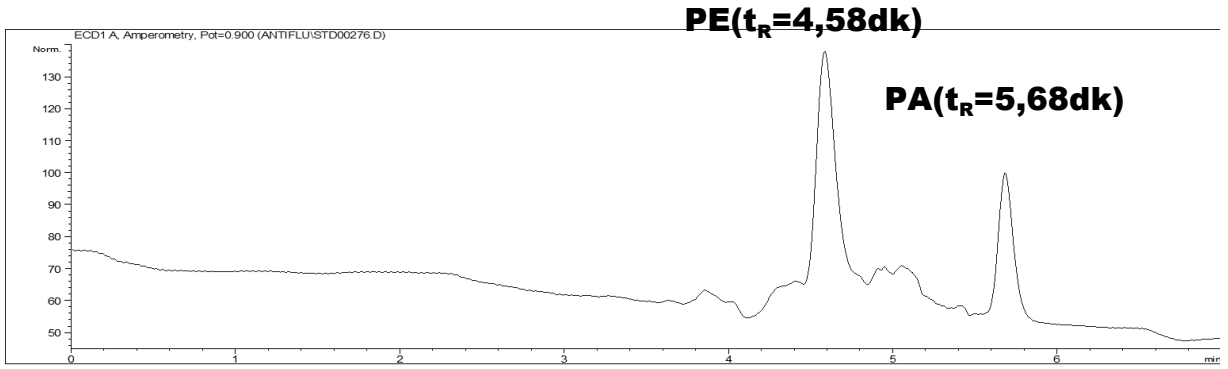


ŞEKİL 37. %75-25(h/h) MeOH-50mM PBS çözgen sisteminden oluşan mobil fazlarda elde edilmiş 10^{-6} M parasetamol ve fenilefrin hidroklorür'e ait tipik HPLC-ECD kromatogramları. Akış hızı 1,0 mL/dk, . E_{çalışma}: +1200 mV (Ag/AgCl'e karşı), analitik kolon: Thermo ODS-2 Hypersil, 250mmx4.6mm, 5µm partikül çapı, 80Å por çapı. 20µL loop hacmi. Mobil faz pH değerinin kromatograma etkisi.

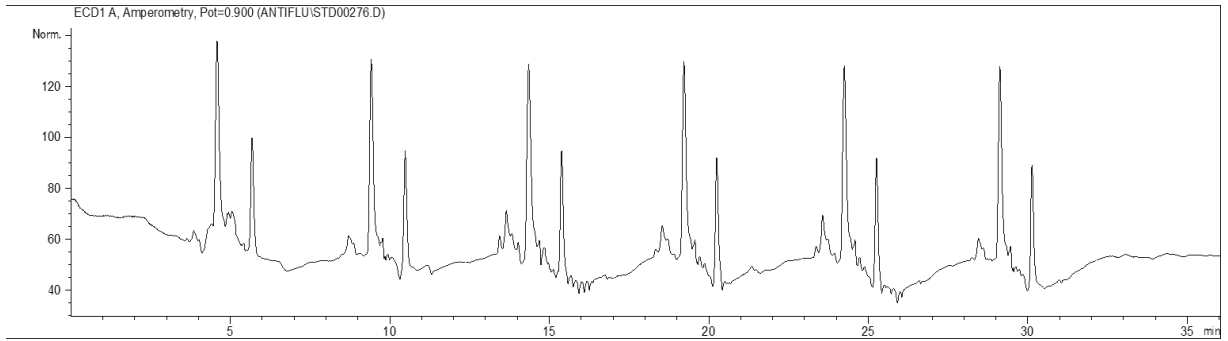


Dosya Adı	t _R (Fe) - pik simetrisi	t _R (Pa) / pik simetrisi	Fe pik yüksekliği-alanı	Pa pik yüksekliği-alanı	Ort alan±s (Fe)	Ort alan±s (Pa)
STD00203.D	3,77-0,84	4,29-1,23	54,8-316,7	36,6-249,8	345,29±19,2 (%CV=5,56)	234,94±15,0 (%CV=6,38)
STD00204.D	3,78-0,83	4,29-1,20	54,1-318,8	35,8-246,3		
STD00205.D	3,78-0,86	4,30-0,89	59,8-350,1	37,5-215,1		
STD00206.D	3,79-0,85	4,30-0,98	56,7-333,6	37,2-229,7		
STD00207.D	3,77-0,85	4,29-1,15	60,7-348,7	39,9-258,2		
STD00208.D	3,77-0,93	4,29-1,09	62,1-376,0	38,9-242,0		
STD00209.D	3,80-0,84	4,31-0,88	59,1-330,6	37,6-209,8		
STD00210.D	3,90-0,88	4,41-0,91	62,0-370,4	42,0-240,1		
STD00211.D	3,79-0,81	4,31-0,95	61,1-353,5	42,4-240,2		
STD00212.D	3,90-0,81	4,31-0,89	59,4-330,2	42,1-239,0		
STD00213.D	3,91-0,83	4,32-0,92	60,9-369,6	36,0-214,2		

ŞEKİL 38. %75-25(h/h) MeOH-50mM PBS (pH 6.0) çözgen sisteminden oluşan mobil fazda elde edilmiş 10^{-6} M parasetamol (PA) ve fenilefrin hidroklorür'e (FE) ait tipik HPLC-ECD kromatogramları. Akış hızı 1,0 mL/dk, $E_{\text{çalışma}}$: +1200 mV (Ag/AgCl'e karşı), analitik kolon: Thermo ODS-2 Hypersil, 250mmx4.6mm, 5 μ m partikül çapı, 80Å por çapı. 20 μ L loop hacmi. Gün içi tekrarlanabilirlik çalışması (n=11).

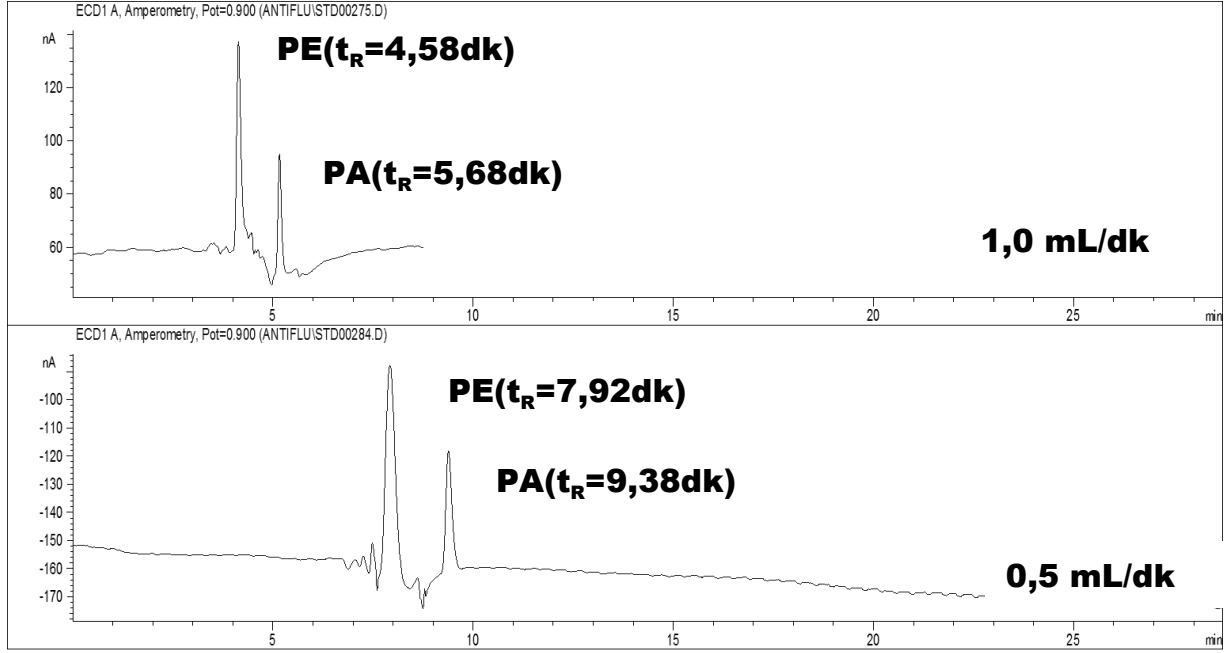


ŞEKİL 39. %30-70(h/h) Ach-50mM PBS (pH 6.0) çözgen sisteminden oluşan mobil fazda (Mobil Faz-2) elde edilmiş 10^{-6} M parasetamol ve fenilefrin hidroklorür'e ait tipik HPLC-ECD kromatogramı. Akış hızı 1,0 mL/dk, . $E_{\text{çalışma}}$: +900 mV (Ag/AgCl'e karşı), analitik kolon: Thermo ODS-2 Hypersil, 250mmx4.6mm, 5 μ m partikül çapı, 80Å por çapı. 20 μ L loop hacmi.

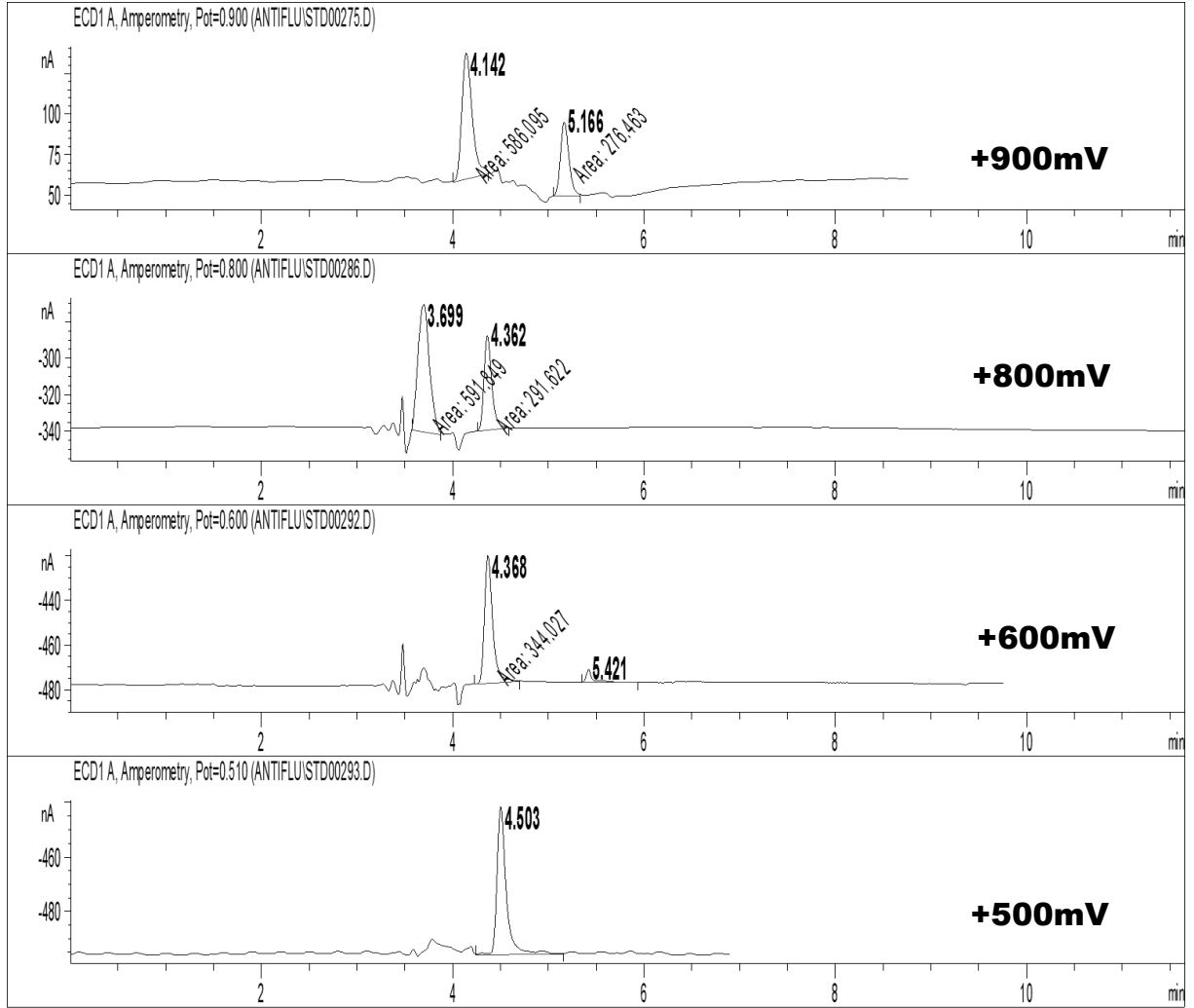


Dosya Adı	Pa pik yüksekliği-alanı	Fe pik yüksekliği-alanı	Ort alan \pm s (Pa)	Ort alan \pm s (Fe)	Ort yük. \pm s (Pa)	Ort yük. \pm s (Fe)
STD00276.D	72,9-581,1	45,6-295,9	607,43 \pm 32,51 (%CV=5,35)	320,86 \pm 28,03 (%CV=8,73)	74,9 \pm 0,93 (%CV= 1,24)	48,97 \pm 2,63 (%CV=5,37)
	75,3-591,2	45,7-288,9				
	75,3-675,9	51,0-357,4				
	75,5-605,4	51,2-345,9				
	74,8-609,8	52,1-342,0				
	75,6-581,2	48,2-295,1				

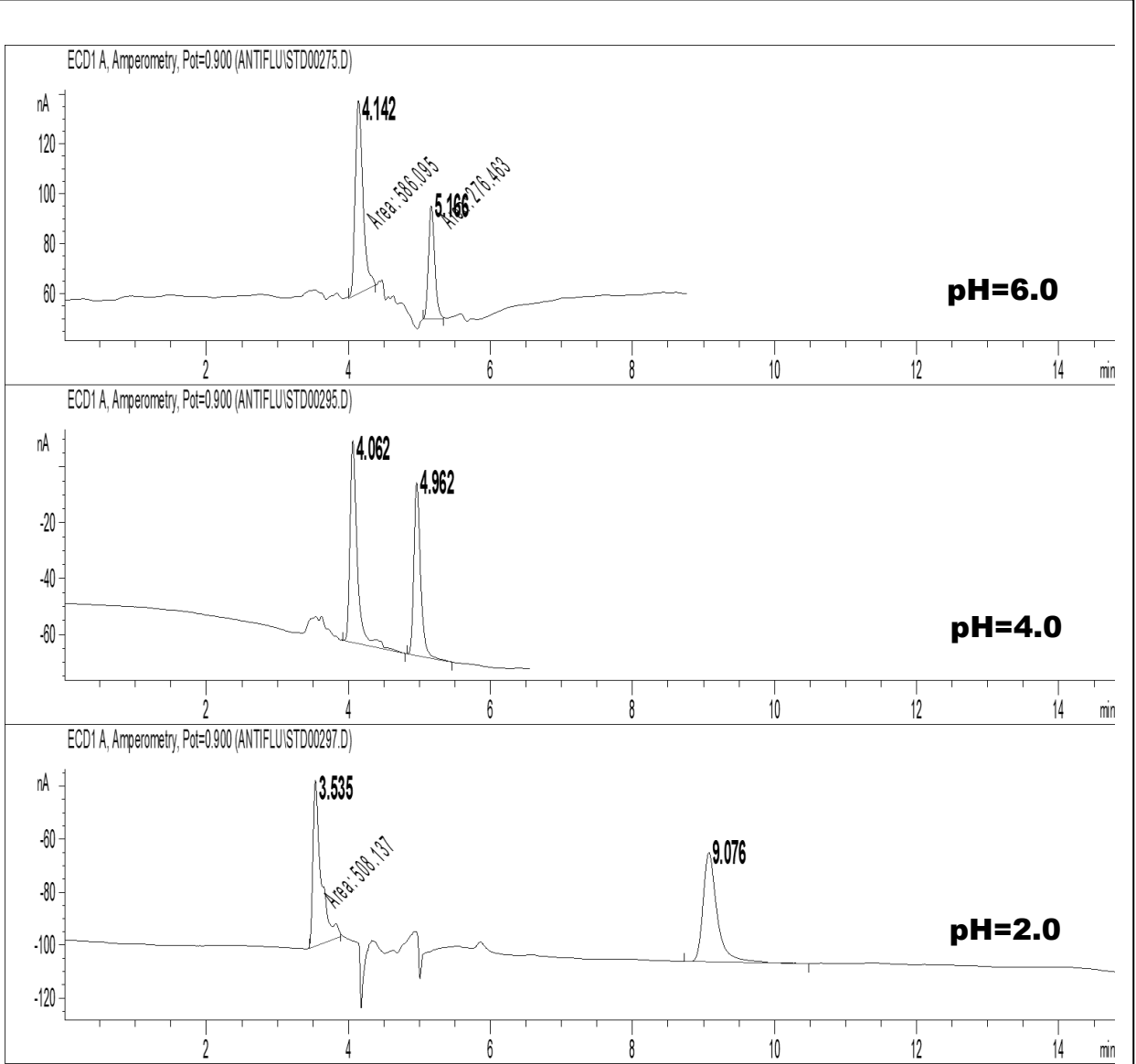
ŞEKİL 40. %30-70(h/h) Ach-50mM PBS (pH 6.0) çözgen sisteminden oluşan mobil fazda (Mobil Faz-2) elde edilmiş 10^{-6} M parasetamol ve fenilefrin hidroklorür'e ait tipik HPLC-ECD kromatogramı. Akış hızı 1,0 mL/dk, . $E_{\text{çalışma}}$: +900 mV (Ag/AgCl'e karşı), analitik kolon: Thermo ODS-2 Hypersil, 250mmx4.6mm, 5 μ m partikül çapı, 80Å por çapı. 20 μ L loop hacmi. Gün içi tekrarlanabilirlik çalışması (n=6).



ŞEKİL 41. %30-70(h/h) Ach-50mM PBS (pH 6.0) çözgen sisteminden oluşan mobil fazda (Mobil Faz-2) elde edilmiş 10^{-6} M parasetamol ve fenilefrin hidroklorür'e ait tipik HPLC-ECD kromatogramı. E_{çalışma}: +900 mV (Ag/AgCl'e karşı), analitik kolon: Thermo ODS-2 Hypersil, 250mmx4.6mm, 5µm partikül çapı, 80Å por çapı. 20µL loop hacmi. Akış hızının kromatogramda alıkonma zamanlarına etkisi.

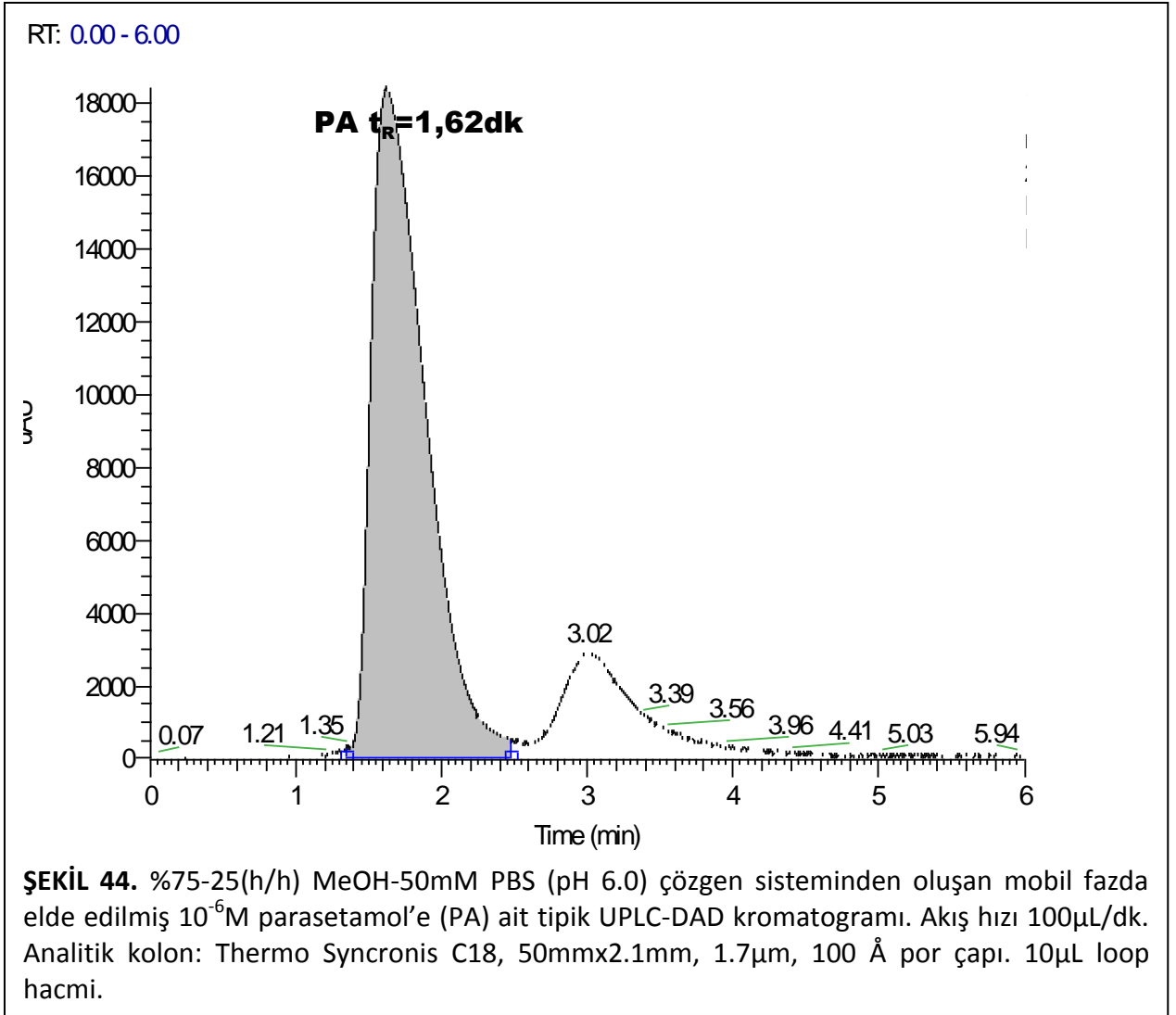


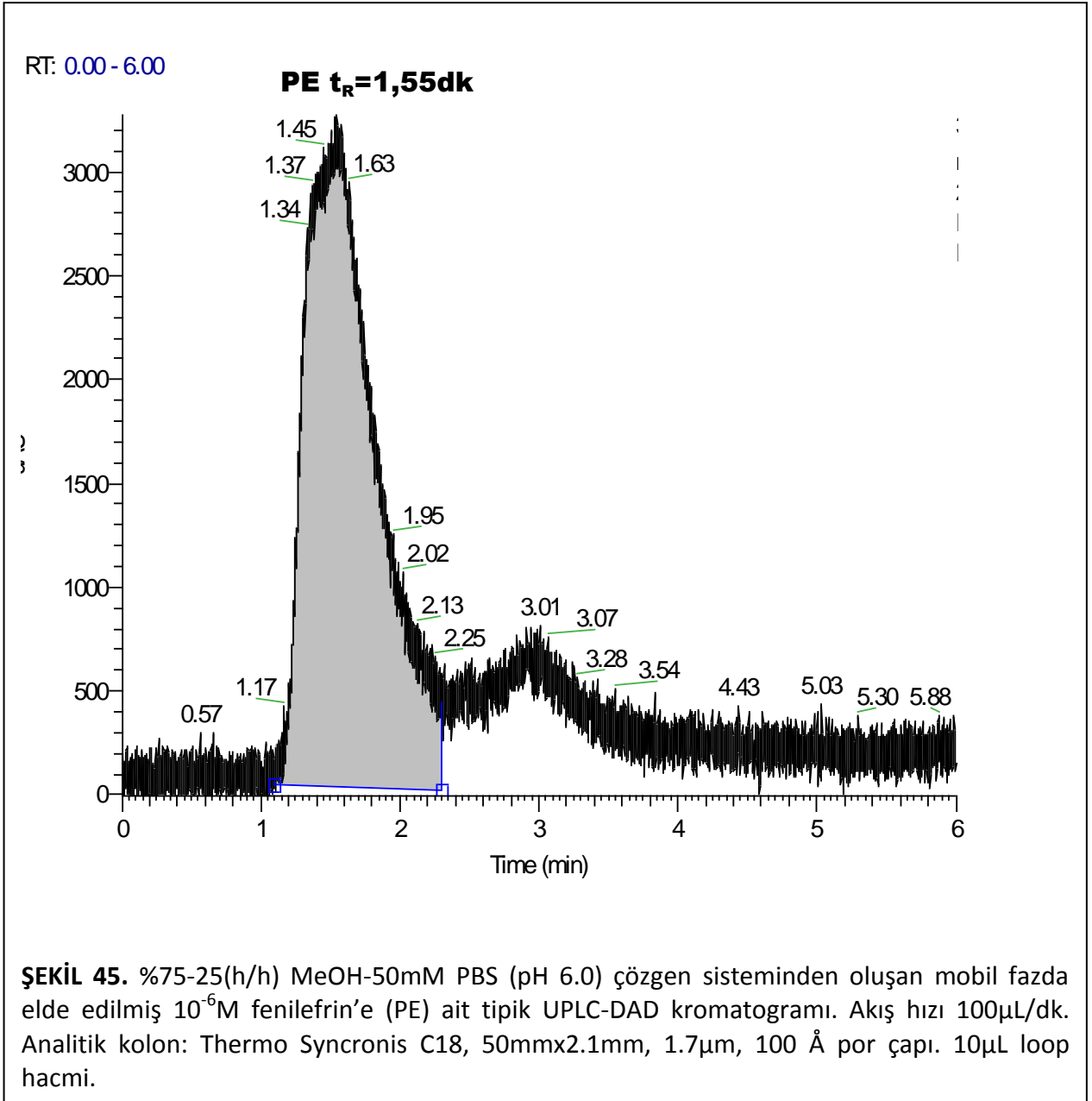
ŞEKİL 42. %30-70(h/h) Ach-50mM PBS (pH 6.0) çözgen sisteminden oluşan mobil fazda (Mobil Faz-2) elde edilmiş 10^{-6} M parasetamol ve fenilefrin hidroklorür'e ait tipik HPLC-ECD kromatogramı. Akış hızı 1,0 mL/dk, analitik kolon: Thermo ODS-2 Hypersil, 250mmx4.6mm, 5 μ m partikül çapı, 80Å por çapı. 20 μ L loop hacmi. Çalışma potansiyelinin kromatograma etkisi.

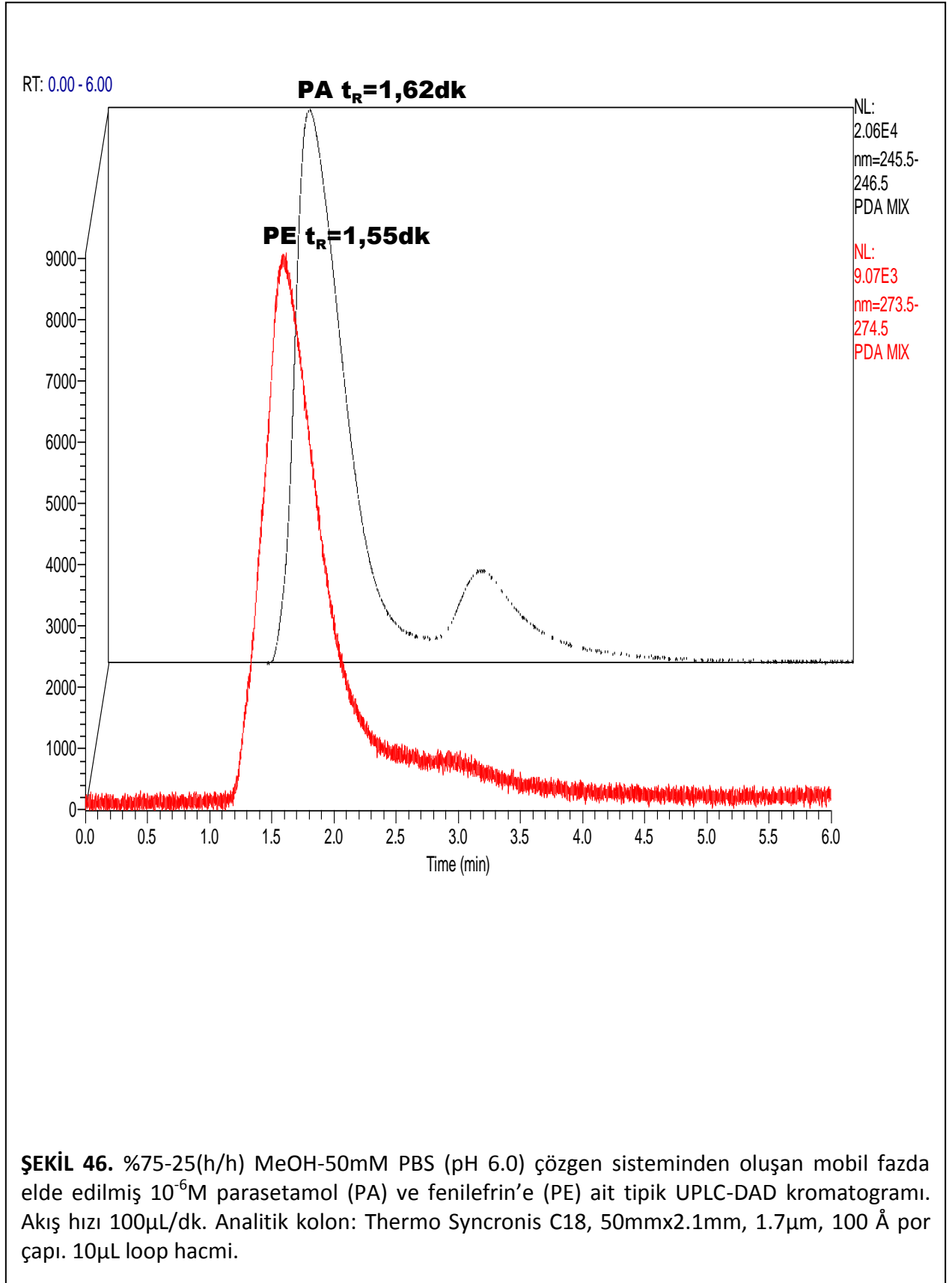


ŞEKİL 43. %30-70(h/h) Ach-50mM PBS çözgen sisteminden oluşan mobil fazda (Mobil Faz-2) elde edilmiş 10^{-6} M parasetamol ve fenilefrin hidroklorür'e ait tipik HPLC-ECD kromatogramı. Akış hızı 1,0 mL/dk, $E_{\text{çalışma}}: +900$ mV (Ag/AgCl'e karşı), analitik kolon: Thermo ODS-2 Hypersil, 250mmx4.6mm, 5 μ m partikül çapı, 80Å por çapı. 20 μ L loop hacmi. Mobil faz pH değerinin kromatograma etkisi.

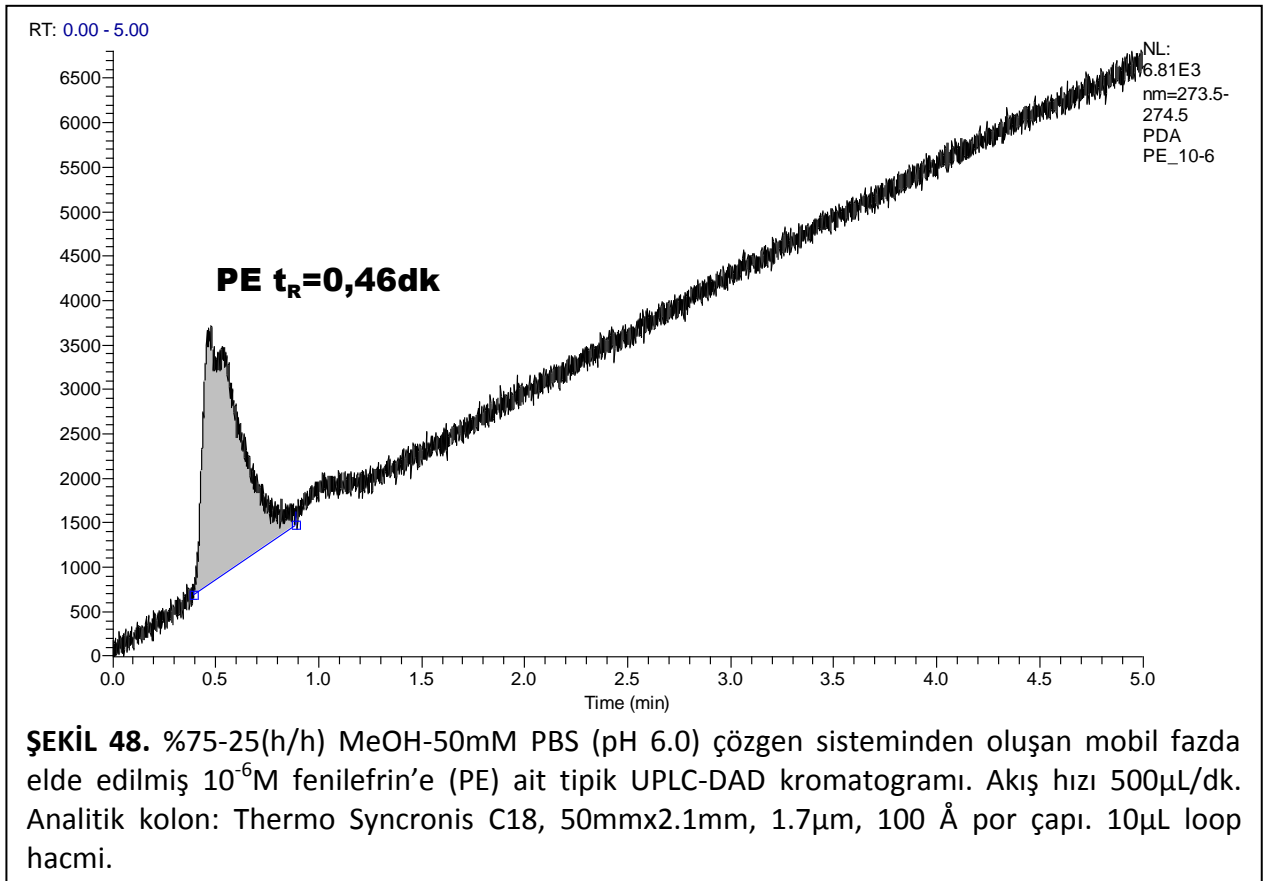
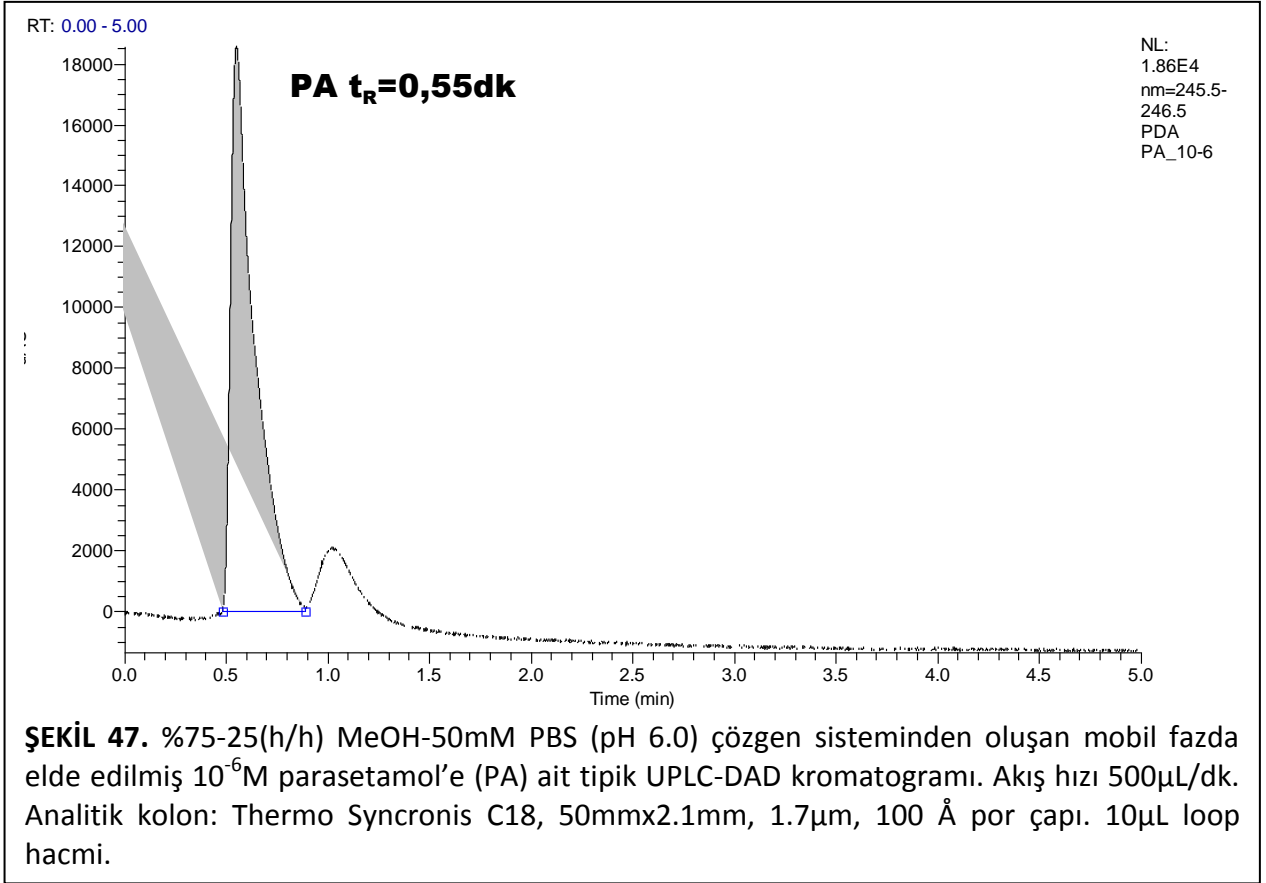
3.1.3.2 UPLC BULGULARI







ŞEKİL 46. %75-25(h/h) MeOH-50mM PBS (pH 6.0) çözgen sisteminden oluşan mobil fazda elde edilmiş $10^{-6}M$ parasetamol (PA) ve fenilefrin'e (PE) ait tipik UPLC-DAD kromatogramı. Akış hızı 100 μ L/dk. Analitik kolon: Thermo Synchronis C18, 50mmx2.1mm, 1.7 μ m, 100 Å por çapı. 10 μ L loop hacmi.



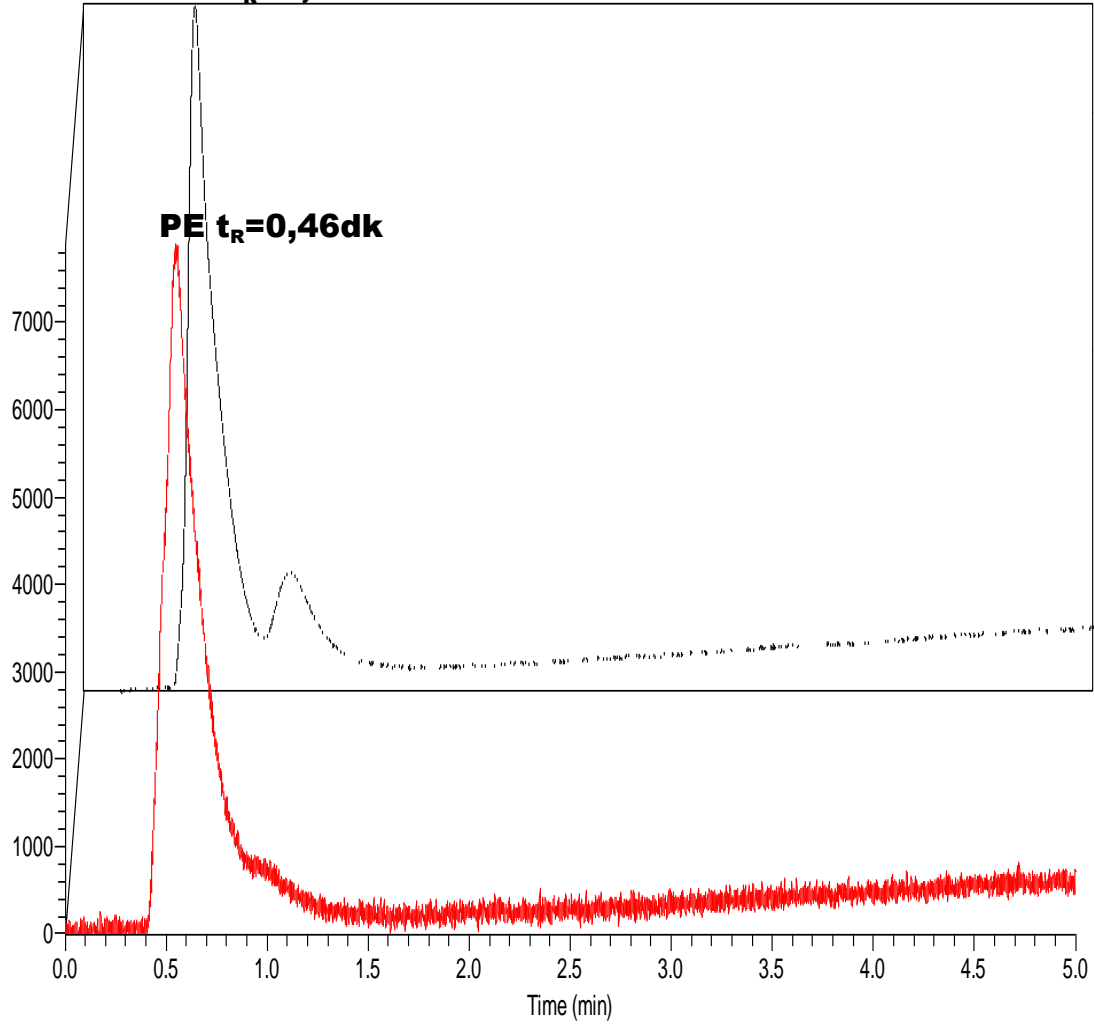
RT: 0.00 - 5.00

PA $t_R=0,55dk$

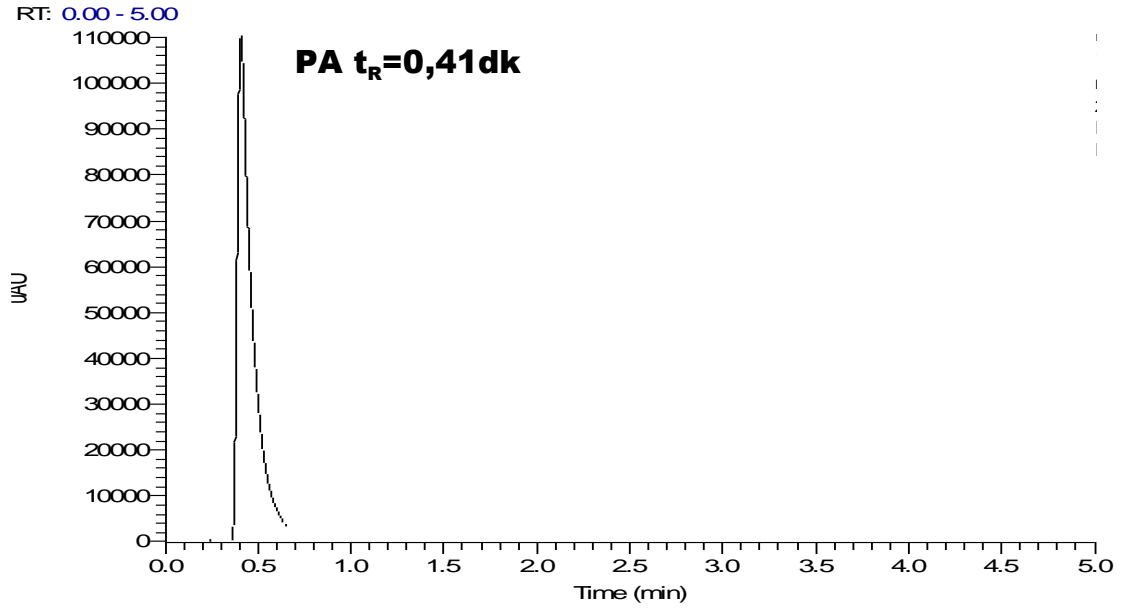
NL:
1.98E4
nm=245.5-
246.5
PDA MIX

PE $t_R=0,46dk$

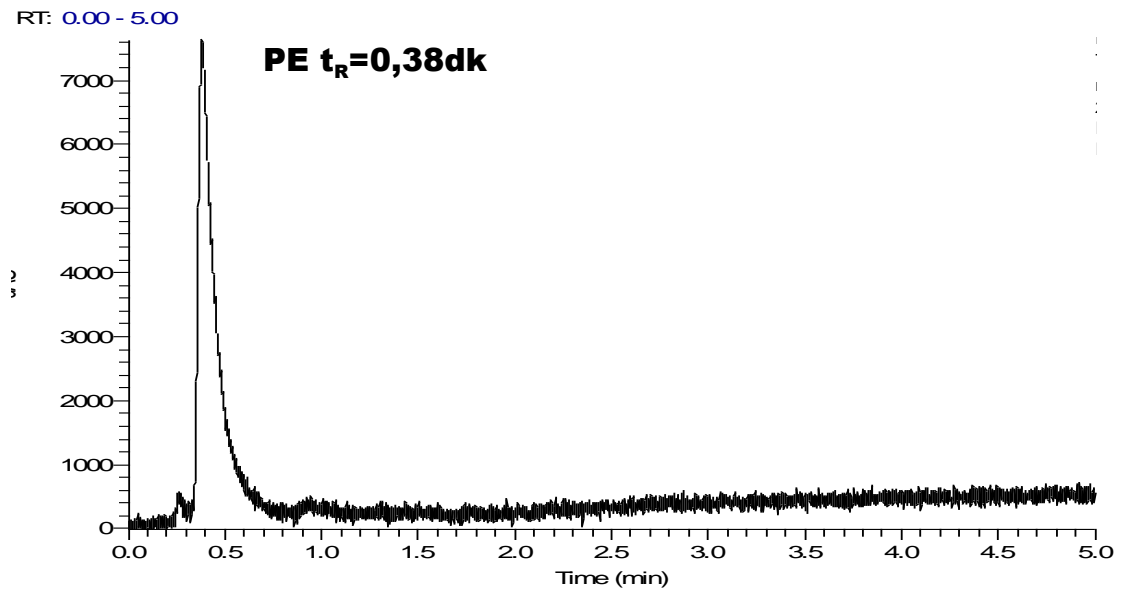
NL:
7.89E3
nm=273.5-
274.5
PDA MIX



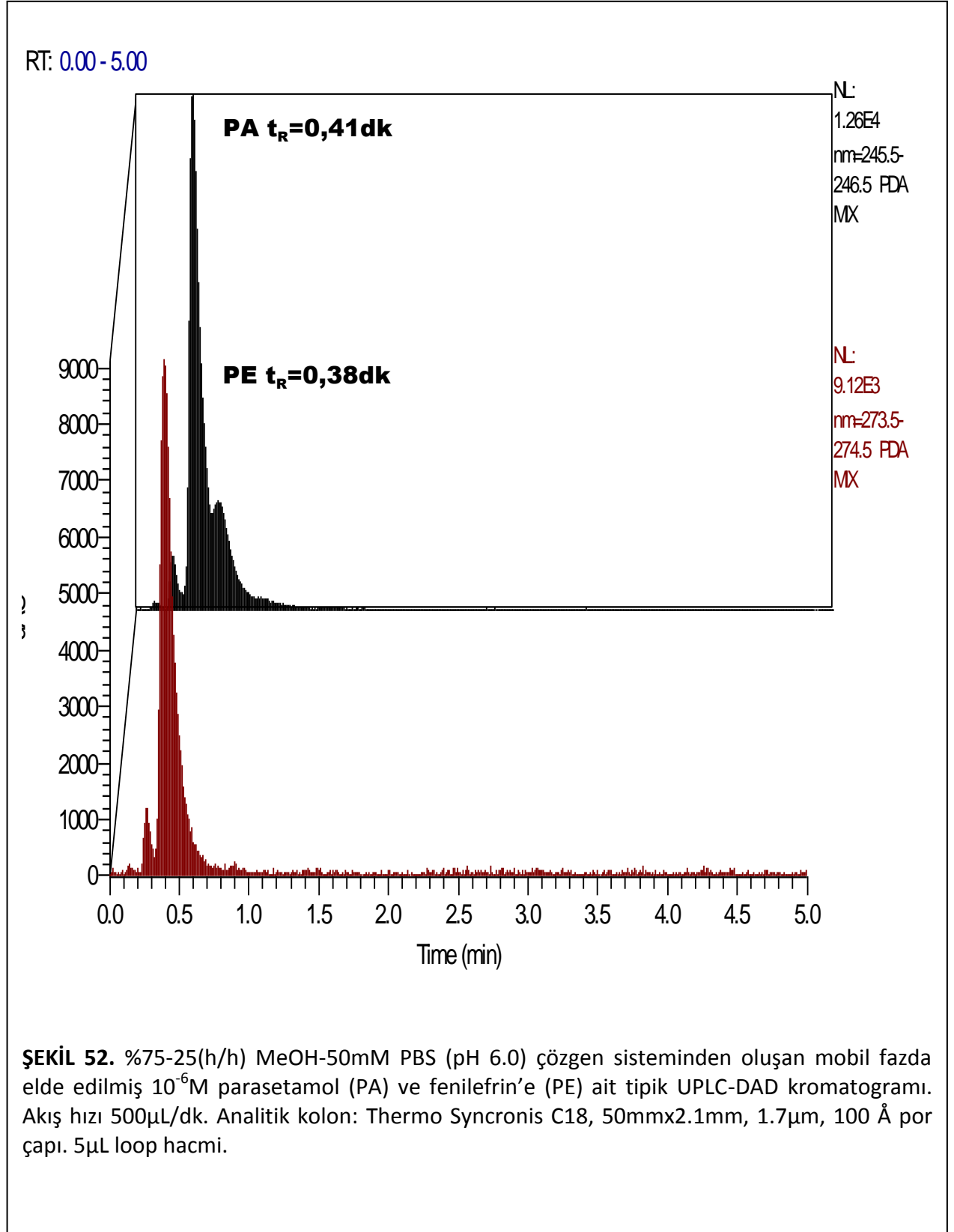
ŞEKİL 49. %75-25(h/h) MeOH-50mM PBS (pH 6.0) çözgen sisteminden oluşan mobil fazda elde edilmiş $10^{-6}M$ parasetamol (PA) ve fenilefrin'e (PE) ait tipik UPLC-DAD kromatogramı. Akış hızı 500 μ L/dk. Analitik kolon: Thermo Synchronis C18, 50mmx2.1mm, 1.7 μ m, 100 Å por çapı. 10 μ L loop hacmi.



ŞEKİL 50. %75-25(h/h) MeOH-50mM PBS (pH 6.0) çözgen sisteminden oluşan mobil fazda elde edilmiş $10^{-6}M$ parasetamol'e (PA) ait tipik UPLC-DAD kromatogramı. Akış hızı $500\mu L/dk$. Analitik kolon: Thermo Synchronis C18, 50mmx2.1mm, $1.7\mu m$, 100 \AA por çapı. $5\mu L$ loop hacmi.

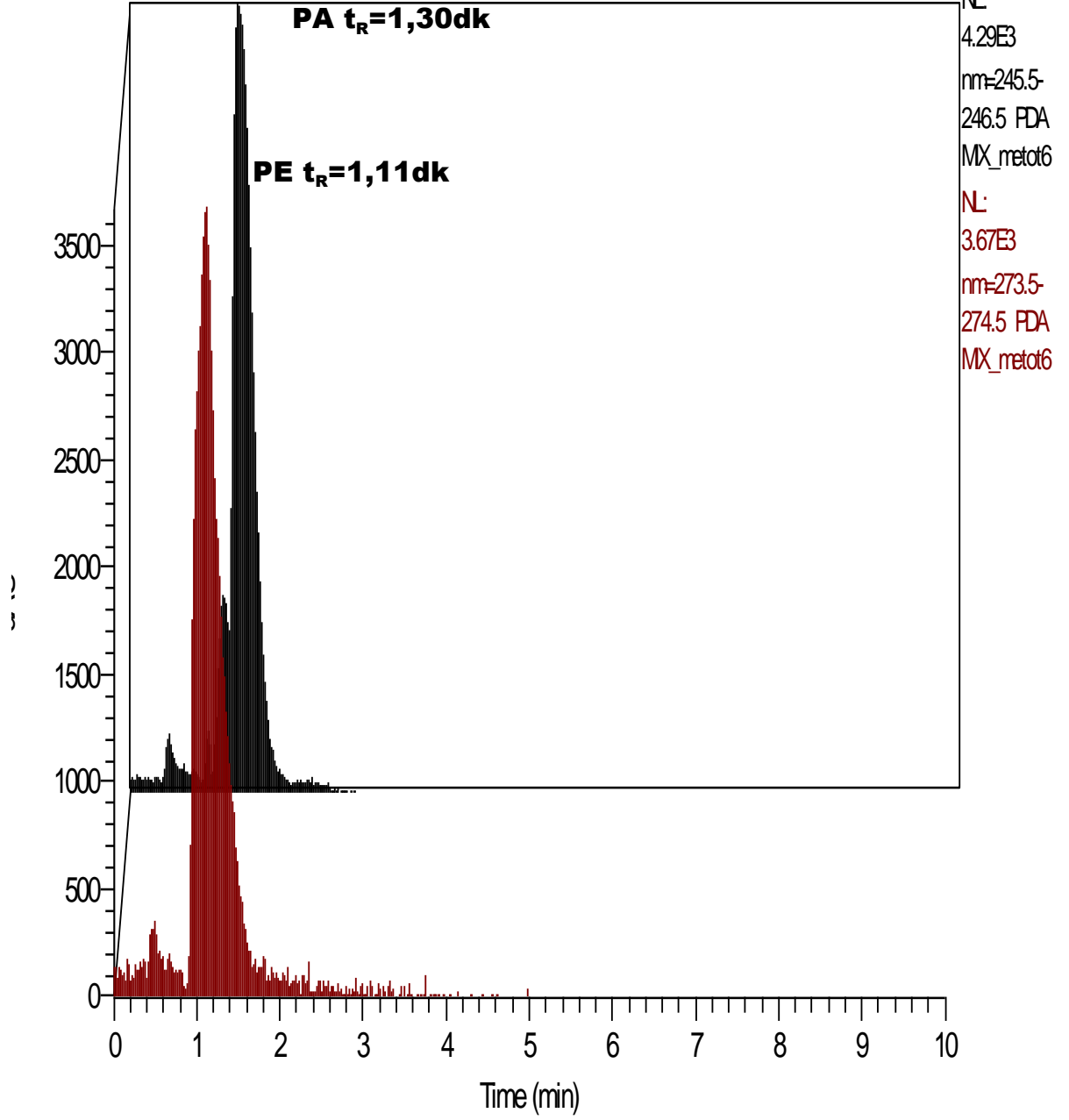


ŞEKİL 51. %75-25(h/h) MeOH-50mM PBS (pH 6.0) çözgen sisteminden oluşan mobil fazda elde edilmiş $10^{-6}M$ fenilefrin'e (PE) ait tipik UPLC-DAD kromatogramı. Akış hızı $500\mu L/dk$. Analitik kolon: Thermo Synchronis C18, 50mmx2.1mm, $1.7\mu m$, 100 \AA por çapı. $5\mu L$ loop hacmi.

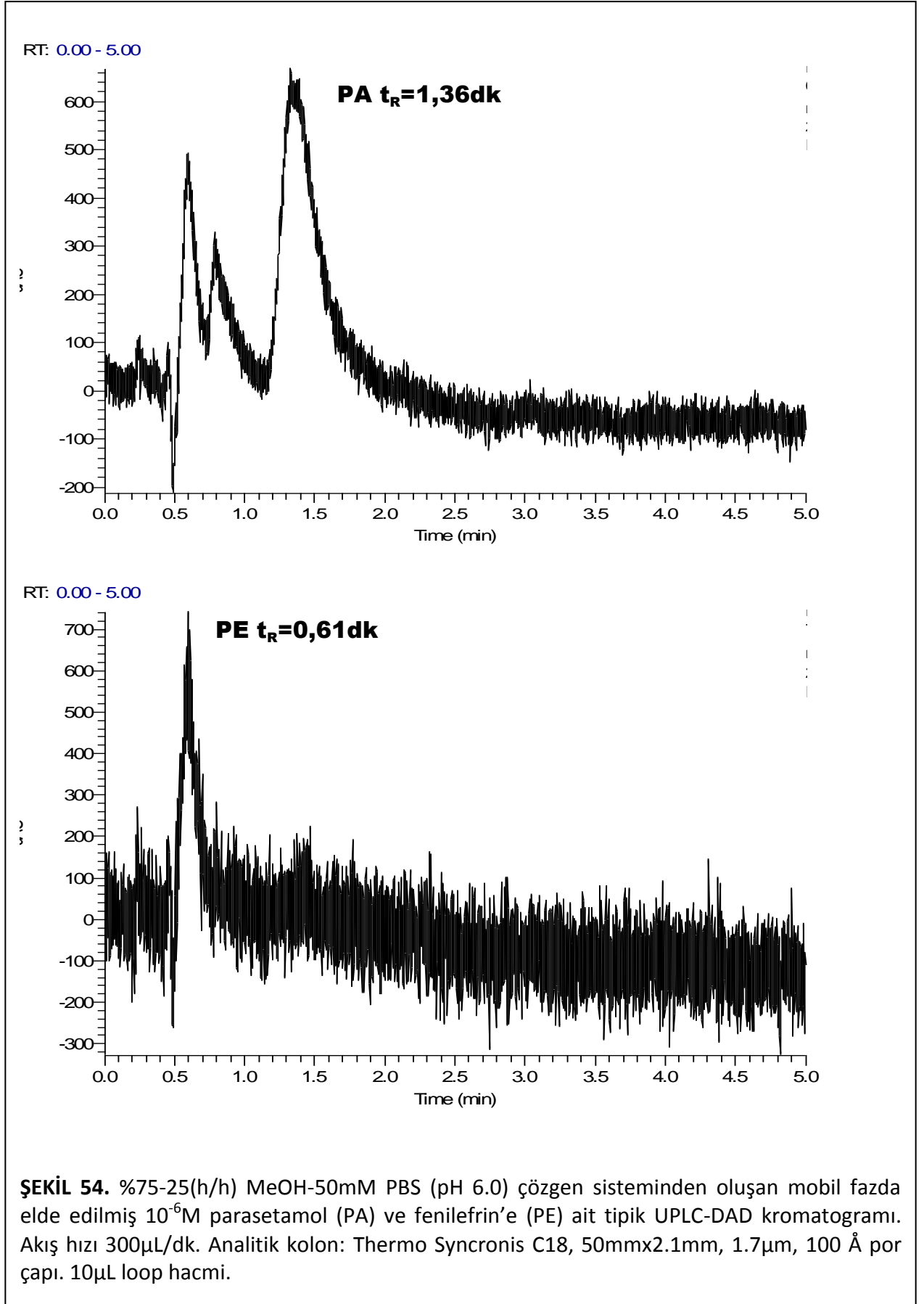


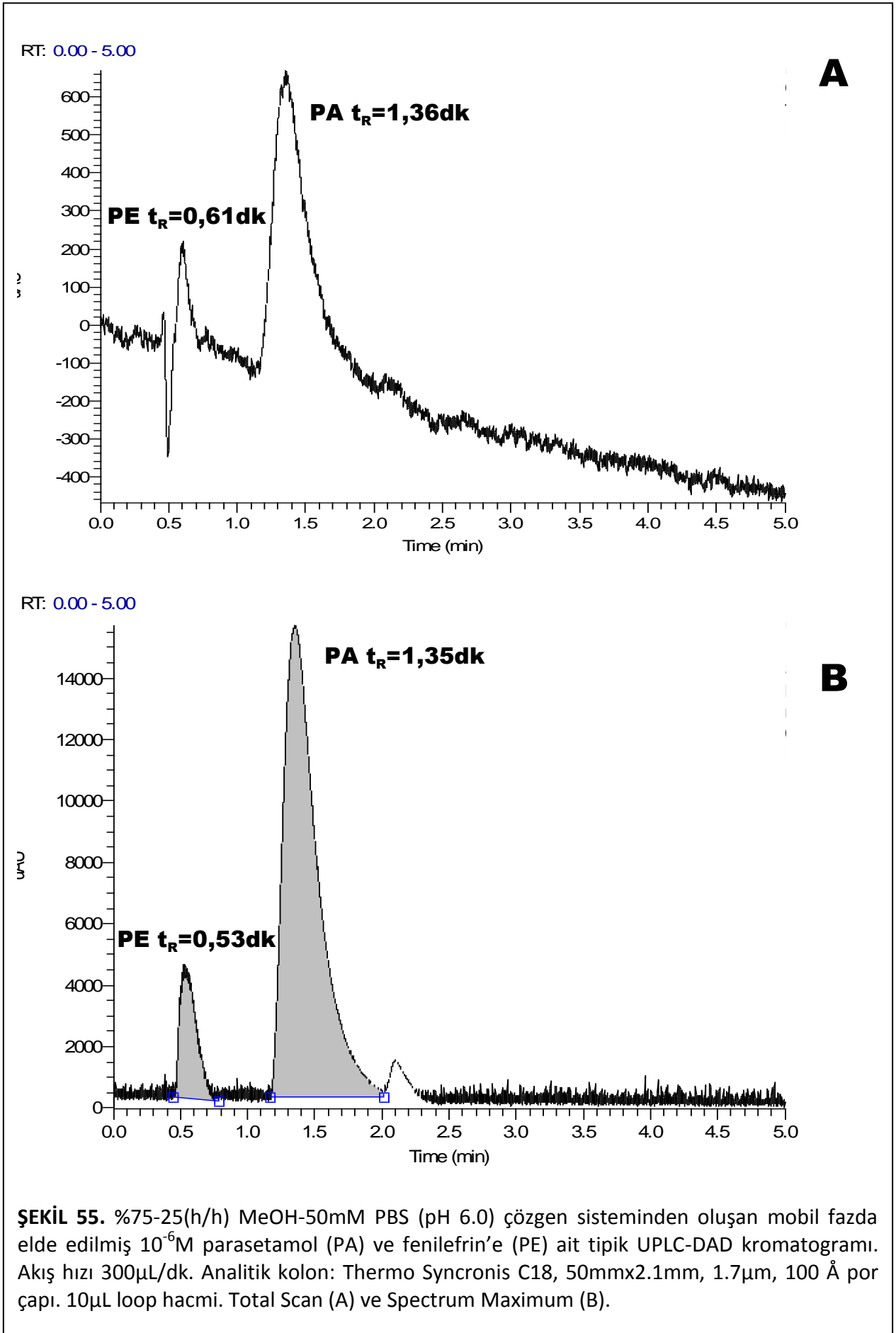
ŞEKİL 52. %75-25(h/h) MeOH-50mM PBS (pH 6.0) çözgen sisteminden oluşan mobil fazda elde edilmiş $10^{-6}M$ parasetamol (PA) ve fenilefrin'e (PE) ait tipik UPLC-DAD kromatogramı. Akış hızı $500\mu L/dk$. Analitik kolon: Thermo Synchronis C18, $50mm \times 2.1mm$, $1.7\mu m$, 100 \AA por çapı. $5\mu L$ loop hacmi.

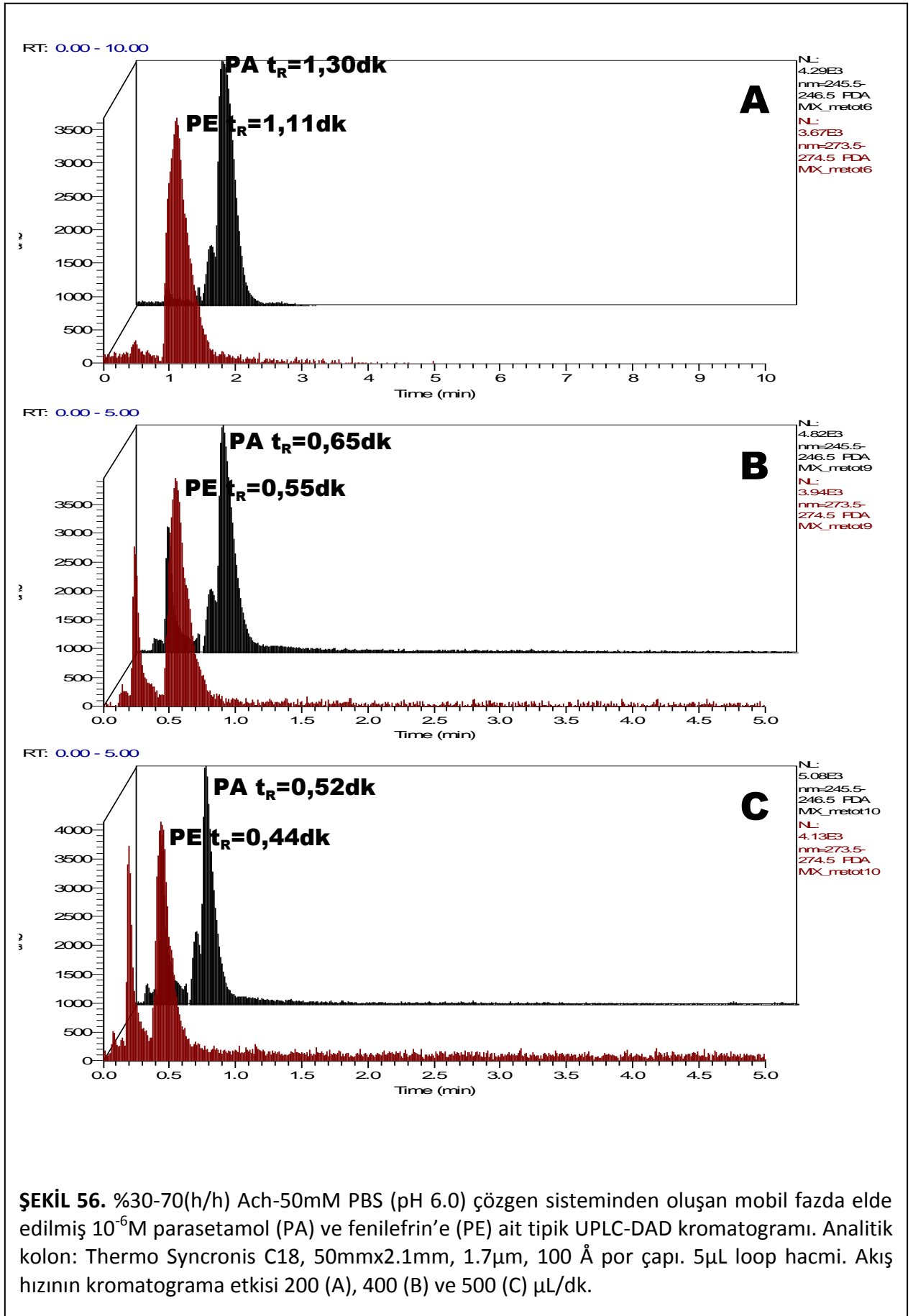
RT: 0.00 - 10.00

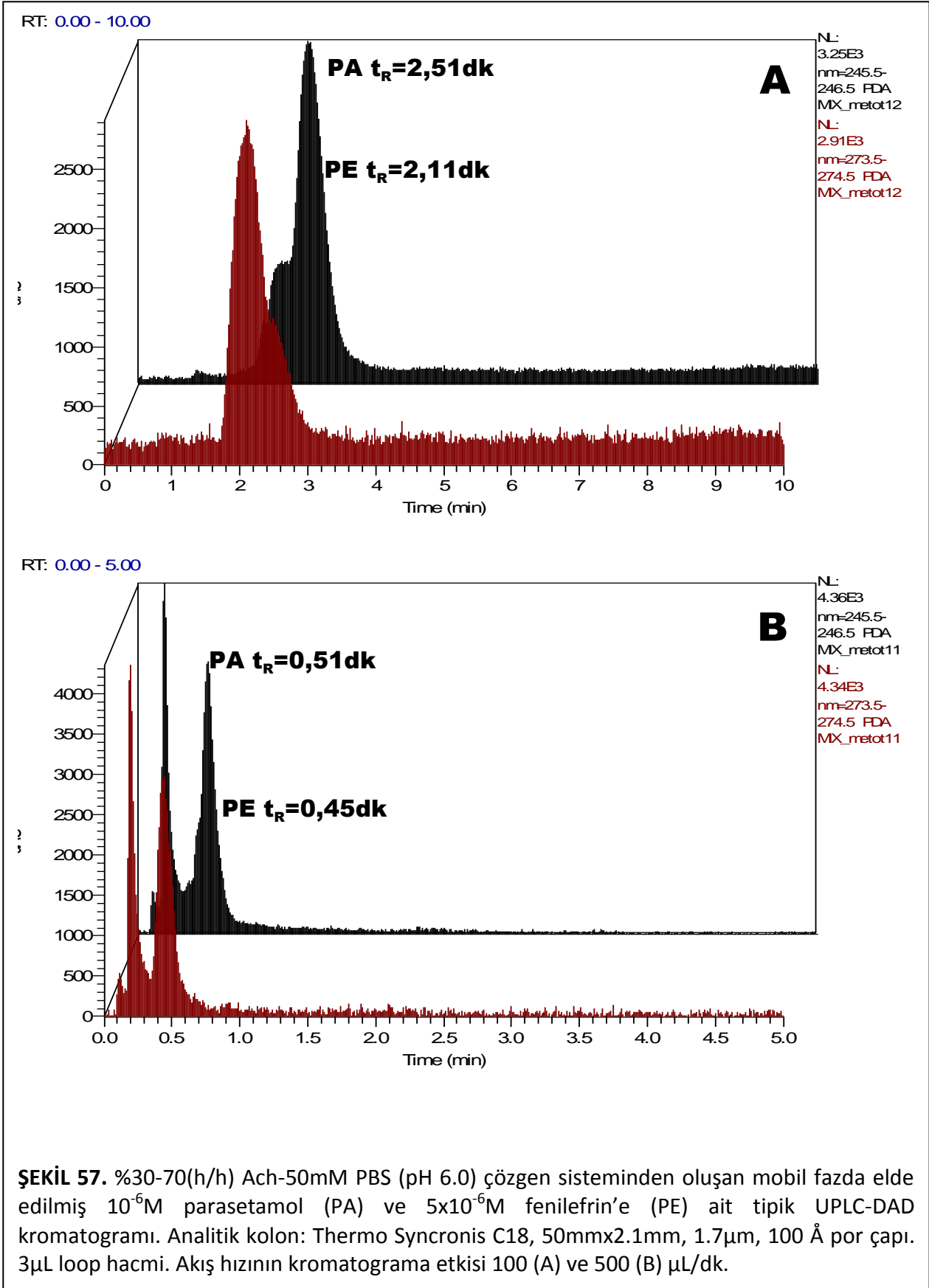


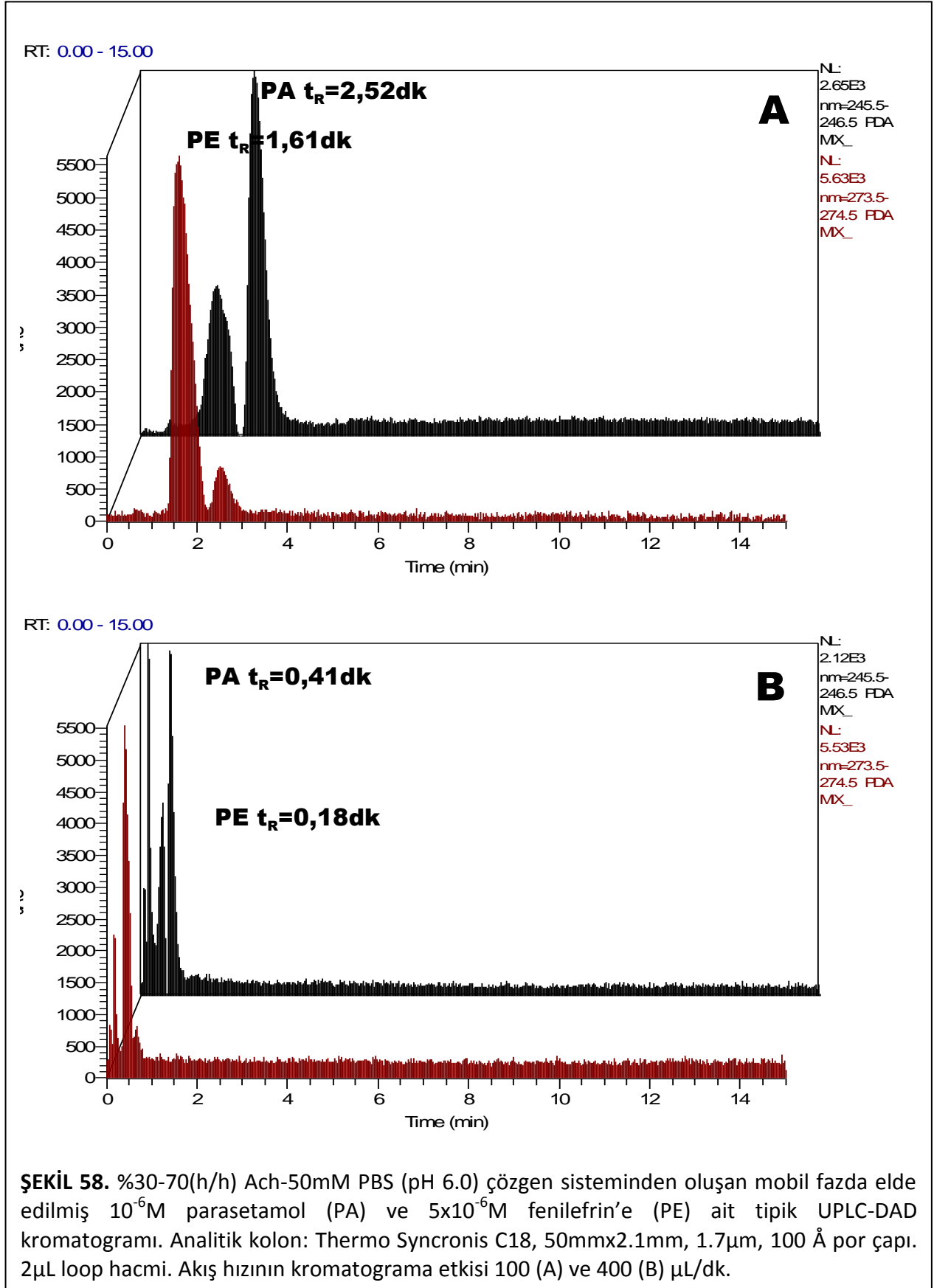
ŞEKİL 53. %75-25(h/h) MeOH-50mM PBS (pH 6.0) çözgen sisteminden oluşan mobil fazda elde edilmiş $10^{-6}M$ parasetamol (PA) ve fenilefrin'e (PE) ait tipik UPLC-DAD kromatogramı. Akış hızı 200 μ L/dk. Analitik kolon: Thermo Synchronis C18, 50mmx2.1mm, 1.7 μ m, 100 Å por çapı. 5 μ L loop hacmi.

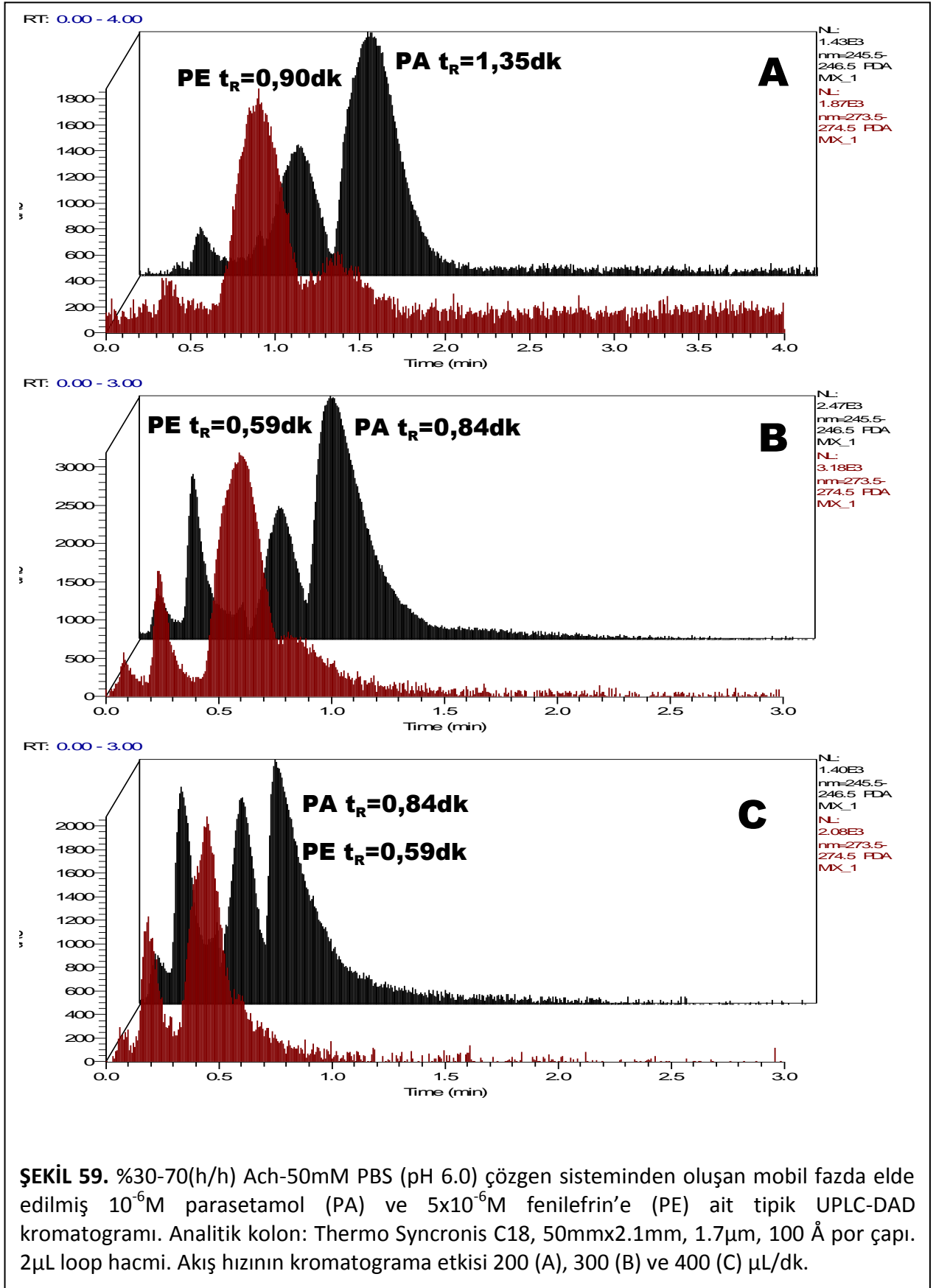






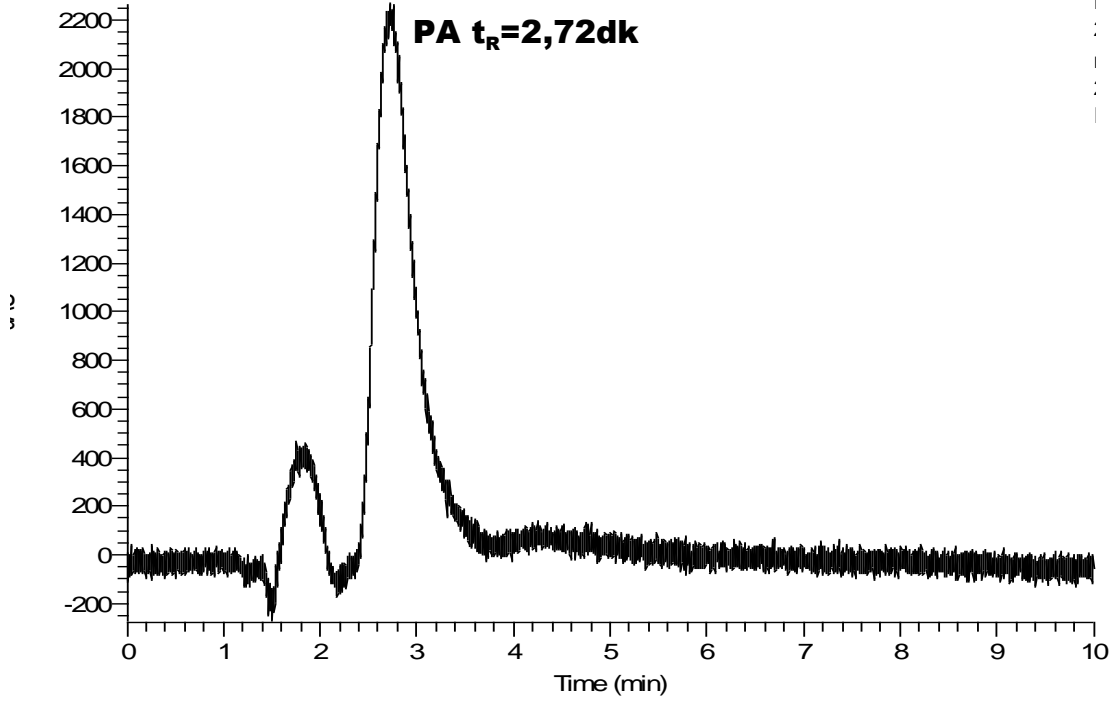




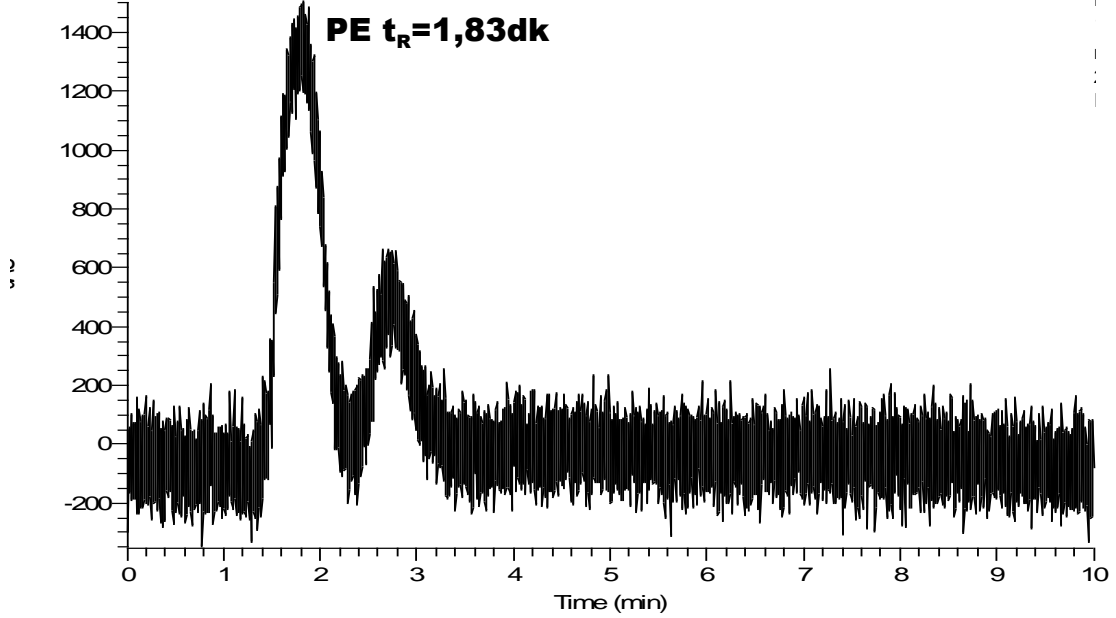


ŞEKİL 59. %30-70(h/h) Ach-50mM PBS (pH 6.0) çözgen sisteminden oluşan mobil fazda elde edilmiş $10^{-6}M$ parasetamol (PA) ve $5 \times 10^{-6}M$ fenilefrin'e (PE) ait tipik UPLC-DAD kromatogramı. Analitik kolon: Thermo Synchronis C18, 50mmx2.1mm, 1.7 μ m, 100 Å por çapı. 2 μ L loop hacmi. Akış hızının kromatograma etkisi 200 (A), 300 (B) ve 400 (C) μ L/dk.

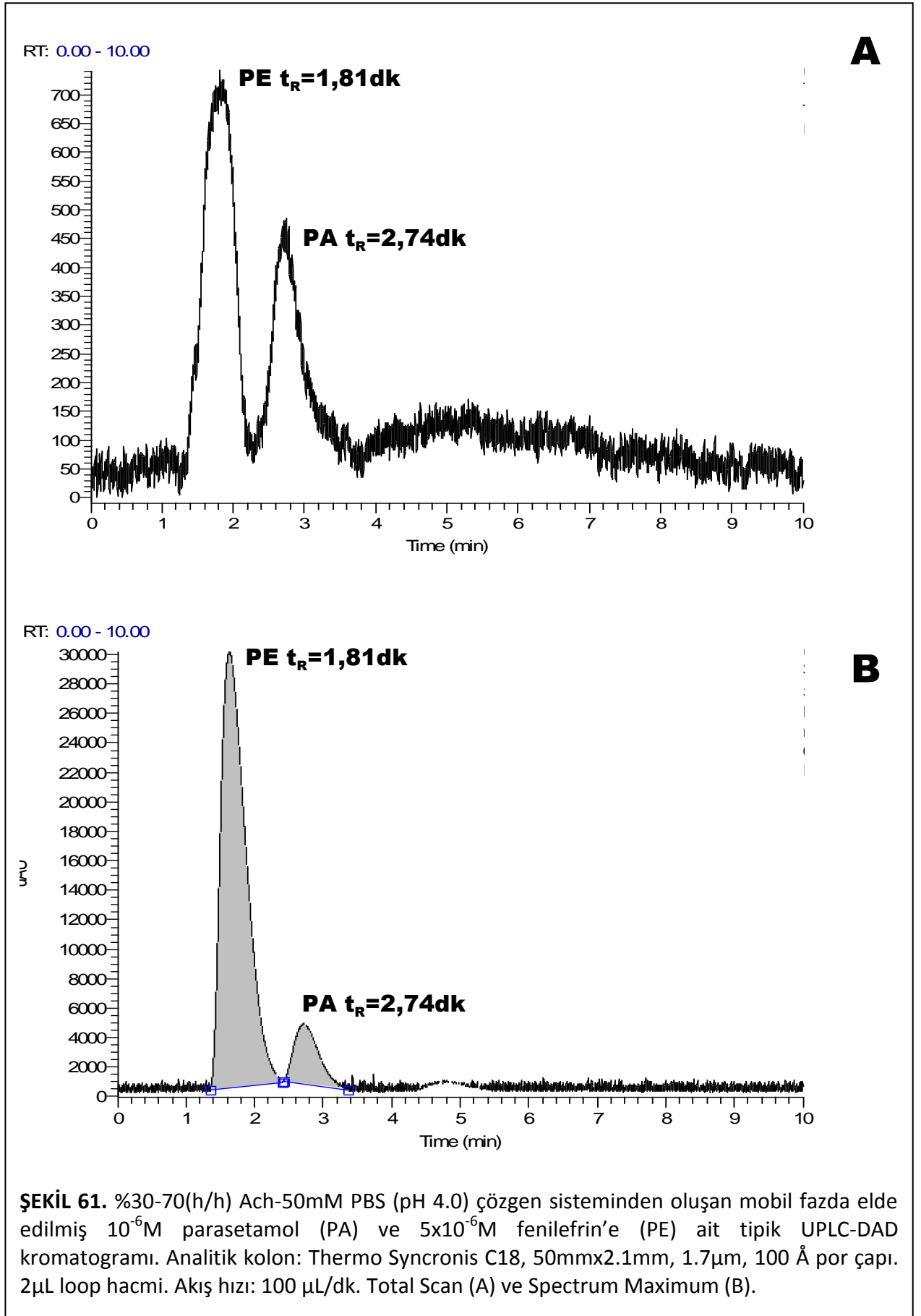
RT: 0.00 - 10.00



RT: 0.00 - 10.00

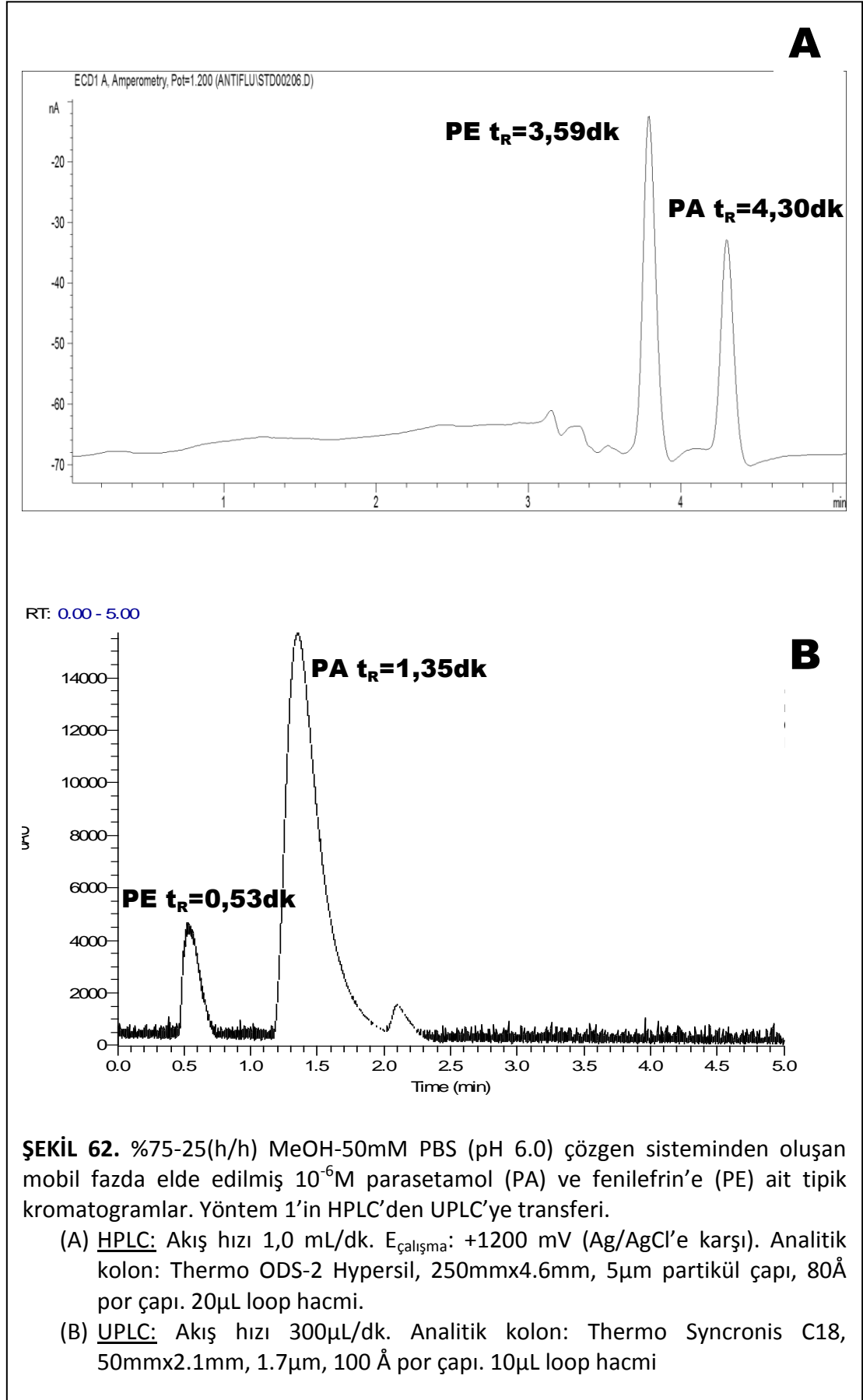


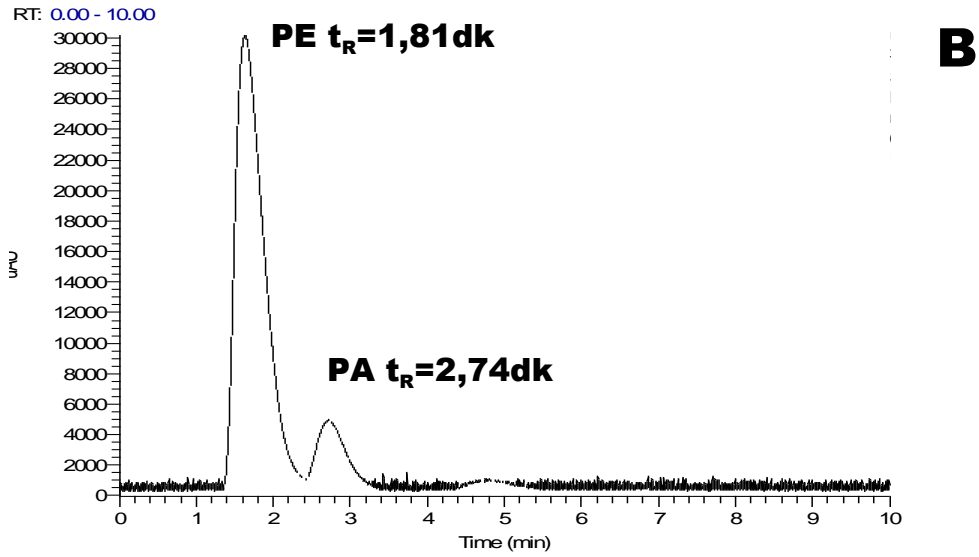
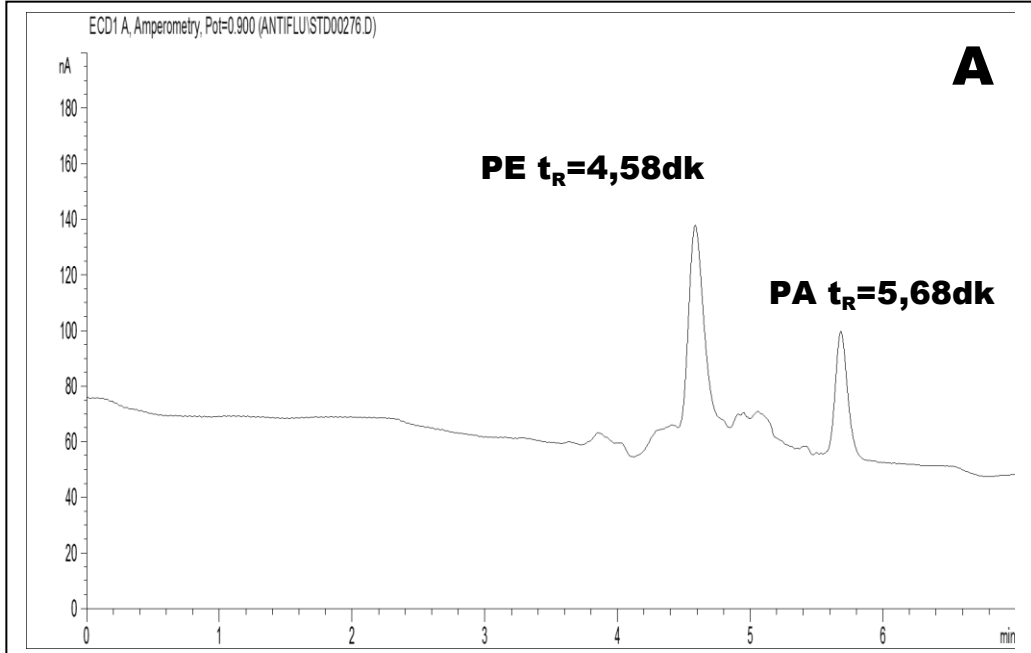
ŞEKİL 60. %30-70(h/h) Ach-50mM PBS (pH 4.0) çözgen sisteminden oluşan mobil fazda elde edilmiş $10^{-6}M$ parasetamol (PA) ve $5 \times 10^{-6}M$ fenilefrin'e (PE) ait tipik UPLC-DAD kromatogramı. Analitik kolon: Thermo Synchronis C18, 50mmx2.1mm, 1.7 μ m, 100 Å por çapı. 2 μ L loop hacmi. Akış hızı: 100 μ L/dk.



ŞEKİL 61. %30-70(h/h) Ach-50mM PBS (pH 4.0) çözgen sisteminden oluşan mobil fazda elde edilmiş $10^{-6}M$ parasetamol (PA) ve $5 \times 10^{-6}M$ fenilefrin'e (PE) ait tipik UPLC-DAD kromatogramı. Analitik kolon: Thermo Synchronis C18, 50mmx2.1mm, 1.7 μ m, 100 Å por çapı. 2 μ L loop hacmi. Akış hızı: 100 μ L/dk. Total Scan (A) ve Spectrum Maximum (B).

3.1.3.3 HPLC'DEN UPLC'YE YÖNTEM TRANSFERİ BULGULARI





ŞEKİL 63. %30-70(h/h) Ach-50mM PBS (pH 4.0) çözgen sisteminden oluşan mobil fazda elde edilmiş $10^{-6}M$ parasetamol (PA) ve fenilefrin'e (PE) ait tipik kromatogramlar. Yöntem 2'nin HPLC'den UPLC'ye transferi.

(A) HPLC: Akış hızı 1,0 mL/dk. $E_{çalışma}$: +900 mV (Ag/AgCl'e karşı). Analitik kolon: Thermo ODS-2 Hypersil, 250mmx4.6mm, 5 μ m partikül çapı, 80Å por çapı. 20 μ L loop hacmi.

(B) UPLC: Akış hızı 300 μ L/dk. Analitik kolon: Thermo Synchronis C18, 50mmx2.1mm, 1.7 μ m, 100 Å por çapı. 10 μ L loop hacmi

BÖLÜM IV

4.1 TARTIŞMA

4.1.1 ELEKTROKİMYASAL BULGULARIN İNCELENMESİ

Tez çalışmalarının başlangıcında belirlenen model ilaç etkin maddelerinin elektrokimyasal karakterizasyonu için CV ve DPV deneyleri gerçekleştirilmiştir. Şekil 16'da 50 mM PBS tamponunda (pH 6,0) GCE elektrotla elde edilmiş 1 mM parasetamol'e ait tipik DPV voltamogramı verilmiştir. Pik potansiyeli +340 mV dolaylarında olan belirgin bir anodik yükseltgenme piki mevcuttur. Şekil 17'de de benzer şekilde ancak farklı oranlardaki MF1 çözgen sisteminde 1mM parasetamol için elde edilen DPV voltamogramları görülmektedir. %10-90, 50-50 ve 75-25 (h/h) MeOH-50mM PBS oranları denenmiş olup elde edilen pik potansiyelleri farklı olup sırasıyla, +370, +400 ve +870mV dolaylarındadır. 1mM parasetamol'ün farklı oranlardaki MF2 çözgeninde elde edilmiş DPV voltamogramları ise Şekil 18'de verilmiştir. Gözlemlenen redoks pik potansiyelleri gene farklı olup, %10-90, 30-70 ve 50-50 (h/h) Ach-50mM PBS oranları için sırasıyla, +400, +650 ve +370 mV dolaylarındadır. 1mM parasetamol için hem MF1 ve hem MF2 çözgen sistemleri için optimum oranlar DPV verileriyle elde edilmiştir. Buna göre ECD dedektör için (HPLC analizlerinde) MF1 için %75-25 (h/h) MeOH-50mM PBS, MF2 için ise %30-70 (h/h) Ach-50mM PBS oranı en optimum karışım oranlarıdır. Bu sebeple analitik yöntem geçerliliği çalışmaları başta olmak üzere hem HPLC ve hem de UPLC analizlerinde tespit edilen bu mobil faz kombinasyonlarında çalışılacaktır. %30-70 (h/h) Ach-50mM PBS oranı ile MF2 ile benzer şekilde 1 mM parasetamol için hem anodik ve hem

de katodik potansiyel aralıklarında elde edilmiş tipik CV voltamogramları Şekil 19'daki gibidir. Beklenildiği üzere CV ve DPV voltamogramları (Şekil 18B ve Şekil 19) %30-70 (h/h) Ach-50mM PBS çözgen sisteminde (MF2) birbirine paralel redoks pik potansiyellerine sahiptir ($\cong +650$ mV, Ag/AgCl'e karşı).

Benzer şekilde 1mM klorfeniramin maleat (CPM) için elde edilen DPV voltamogramı Şekil 20'deki gibidir. 50 mM PBS tamponunda (pH 6,0) GCE elektrotla elde edilmiş redoks pik potansiyeli +800mV dolaylarındadır. Şekil 21'de 1mM CPM için ancak farklı oranlardaki MF1 çözgen sisteminde elde edilen DPV voltamogramları görülmektedir. %10-90, 50-50 ve 75-25 (h/h) MeOH-50mM PBS oranları denenmiş olup elde edilen pik potansiyelleri farklı olup sırasıyla, +850, +820 ve +100mV dolaylarındadır. 1mM CPM'nin farklı oranlardaki MF2 çözgeninde elde edilmiş DPV voltamogramları ise Şekil 22'de verilmiştir. Gözlemlenen redoks pik potansiyelleri gene farklı olup, %10-90, 30-70 ve 50-50 (h/h) Ach-50mM PBS oranları için sırasıyla, +850, +790 ve +850 mV dolaylarındadır. 1mM CPM için hem MF1 ve hem MF2 çözgen sistemleri için optimum oranlar DPV verileriyle elde edilmiştir. Buna göre ECD dedektör için (HPLC analizlerinde) MF1 için %75-25 (h/h) MeOH-50mM PBS, MF2 için ise %30-70 (h/h) Ach-50mM PBS oranı en optimum karışım oranlarıdır. Dolayısıyla hem HPLC ve hem de UPLC analizlerinde tespit edilen bu oranlarda çalışılacaktır.

1mM fenilefrin hidroklorür (PE) için 50 mM PBS tamponunda (pH 6,0) GCE elektrotla elde edilmiş DPV voltamogramına (Şekil 23) ait redoks pik potansiyeli +600mV dolaylarındadır. Şekil 24'de 1mM PE için ancak farklı oranlardaki MF1 çözgen sisteminde elde edilen DPV voltamogramları

görülmektedir. %10-90, 50-50 ve 75-25 (h/h) MeOH-50mM PBS oranları denenmiş olup elde edilen pik potansiyelleri farklı aynı olup sırasıyla, +650, +650 ve +100mV dolaylarındadır. 1mM PE'nin farklı oranlardaki MF2 çözgeninde elde edilmiş DPV voltamogramları ise Şekil 25'de verilmiştir. Gözlemlenen redoks pik potansiyelleri gene farklı olup, %10-90, 30-70 ve 50-50 (h/h) Ach-50mM PBS oranları için sırasıyla, +650, +1050 ve +650 mV dolaylarındadır. 1mM PE için hem MF1 ve hem MF2 çözgen sistemleri için optimum oranlar DPV verileriyle elde edilmiştir. Buna göre ECD dedektör için (HPLC analizlerinde) MF1 için %75-25 (h/h) MeOH-50mM PBS, MF2 için ise %30-70 (h/h) Ach-50mM PBS oranı en optimum karışım oranlarıdır. Dolayısıyla hem HPLC ve hem de UPLC analizlerinde tespit edilen bu oranlarda çalışılacaktır.

1mM ibuprofen (IB) için 50 mM PBS tamponunda (pH 6,0) GCE elektrotla elde edilmiş DPV voltamogramına (Şekil 26) ait redoks pik potansiyeli +1100mV dolaylarındadır. Şekil 27'de 1mM IB için ancak farklı oranlardaki MF1 çözgen sisteminde elde edilen DPV voltamogramları görülmektedir. %10-90, 50-50 ve 75-25 (h/h) MeOH-50mM PBS oranları denenmiş olup elde edilen pik potansiyelleri farklı aynı olup sırasıyla, +1250, +1250 ve +500mV dolaylarındadır. 1mM IB'nin farklı oranlardaki MF2 çözgeninde elde edilmiş DPV voltamogramları ise Şekil 28'de verilmiştir. Gözlemlenen redoks pik potansiyelleri gene farklı olup, %10-90, 30-70 ve 50-50 (h/h) Ach-50mM PBS oranları için sırasıyla, +1200, +1600 ve +1300 mV dolaylarındadır. 1mM IB için hem MF1 ve hem MF2 çözgen sistemleri için optimum oranlar DPV verileriyle elde edilmiştir. Buna göre ECD dedektör için (HPLC analizlerinde) MF1 için %75-25 (h/h) MeOH-50mM PBS, MF2 için ise %30-70 (h/h) Ach-

50mM PBS oranı en optimum karışım oranlarıdır. Dolayısıyla hem HPLC ve hem de UPLC analizlerinde tespit edilen bu oranlarda çalışılacaktır. Bilimsel literatürde PA, PE, CPM ve IB'nin GCE elektrot kullanılarak DPV ve CV ile tayinine yönelik çok sayıda makaleye rastlanmaktadır. En güncel olan 2013 yılında gerçekleştirilen çalışmalar dikkate alındığında;

Raoo ve arkadaşları (1), fonksiyonilize edilen çok duvarlı carbon nanotüplerle (fMWCNT) modifiye edilmiş ve edilmemiş GCE elektrotlarla insan idrarı, salyası ve farmasötik örneklerde PA analizi gerçekleştirmişlerdir. 5×10^{-6} M PA için 0,1M PBS çözgen sisteminde (pH 7,0) elde edilen CV ve DPV voltamogramlarından elde edilen redoks pik potansiyelleri +350 mV dolaylarında olup PA'e ait tezimiz bulgularıyla uyum içerisindedir.

Wang ve arkadaşlarının gene 2013 yılında yayımlanan bir çalışmalarında (61), grafen-kitosan (GR-CS) modifiye edilmiş ve edilmemiş GCE elektrotla PA tayinleri için DPV ve CV yöntemleri geliştirmişlerdir. Özel bir çeşit fosfat tamponu olan Britton-Robinson tamponu ile (pH 7,0) PA'e ait redoks pik potansiyellerini +245mV dolaylarında tespit etmişlerdir.

Nasirizadeh ve arkadaşları (33), imidazol türevli çoklu duvarlı karbon nanotüp (IMWCNT) modifiye GCE elektrot ile 0,15M PBS'de (pH 7,0) PA'ya ait redoks pik potansiyelini +400mV dolaylarında tespit etmişlerdir.

Kong ve arkadaşları (18), 10^{-5} M PE için poli(4-aminobenzen sülfonik asit) ile modifiye edilmiş GCE elektrot ile 0,05M asetik asit/sodyum asetat tamponunda (pH 5,0) redoks pik potansiyelini +890 mV dolaylarında tespit etmişlerdir.

Zhang ve arkadaşları (62), 2×10^{-5} M PE için 0,1M PBS tamponunda (pH 7,1), 100mV/saniye'lik tarama hızında, çoklu duvarlı karbon nanotüp (MWCNT)

modifiye GCE elektrot ile redoks pik potansiyelini +700 mV dolaylarında tespit etmişlerdir.

Muralidharan ve arkadaşları (30), 250 ppb CPM için 100 mV/saniye'lik tarama hızında, polipirol ve poli(3,4-etilendioksityofen) ile modifiye edilmiş GCE elektrotla, özel bir çeşit fosfat tamponu olan Britton-Robinson tamponu ile (pH 6,0) redoks pik potansiyelini +625 mV dolaylarında tespit etmişlerdir.

Her ne kadar literatürden örnek olarak alınan yukarıdaki güncel çalışmalarda tezimizle bire bir aynı çözgen sistemi kullanılmamışsa da, olabildiğince benzer ve yaklaşık aynı pH değerlerindeki fosfat tamponu sistemleri kullanılmıştır. Bu çalışmalarda elde edilen bulgular tezimizle uyum içerisindedir. Ayrıca tezimizin bu bölümünde yer alan elektrokimyasal bulguların amacı sadece HPLC-ECD için öncül voltametrik bulguların elde edilmesi olduğundan mevcut literatürle çok detaylı bir kıyaslamaya gidilmemiştir.

4.1.2 SPEKTOSKOPIK BULGULARIN İNCELENMESİ

1mM PA için MF1 yani %75-25 (h/h) MeOH-50mM PBS (pH 6,0) çözgen sisteminde ve MF2 yani %30-70 (h/h) Ach-50mM PBS (pH 6,0) çözgen sisteminde elde edilen tipik kızılötesi görünür bölge (UV-Vis) absorpsiyon spektrumu Şekil 29'daki gibidir. PA için maksimum dalga boyu (λ_{maks}) MF1 ve MF2 içerisinde 246 nm olarak tespit edilmiştir. Dolayısıyla UPLC sistemine entegre olan DAD dedektörde tespit edilen bu maksimum dalga boyu (λ_{maks}) değeri monitörize edilerek, 200-600nm aralığında spektrum kaydı yapılmasının uygun olduğu tespit edilmiştir.

Benzer şekilde 1mM CPM, PE ve IB için MF1 ve MF2 çözgen sistemlerinde elde edilen tipik kızılötesi görünür bölge (UV-Vis) absorpsiyon spektrumları

sırasıyla Şekil 30, 31 ve 32'deki gibidir. CPM için maksimum dalga boyu (λ_{maks}) MF1 ve MF2 içerisinde 265 nm olarak tespit edilmiştir. PE için bu değerler 274 nm, IB için ise 220 nm dolaylarındadır.

Dolayısıyla CPM, PE ve IB için de UPLC sistemine entegre olan DAD dedektörde tespit edilen bu maksimum dalga boyu (λ_{maks}) değerleri monitörize edilerek, 200-600nm aralığında spektrum kaydı yapılmasının uygun olduğu tespit edilmiştir. Tezimizin bu bölümünde yer alan absorbanz spektroskopisi bulgularının amacı sadece UPLC-DAD için öncül spektroskopik bulguların elde edilmesi olduğundan mevcut literatürle çok detaylı bir kıyaslamaya gidilmemiştir. Bununla beraber 2005 yılı sonrası yayımlanan güncel çalışmalara bakıldığında;

Meloun ve arkadaşları (29), PA ve PE için çözügene (seyreltik sulu perklorik asit çözeltileri) ait farklı pH değerlerinin absorbanz maksimasına etkisini incelemişler ve PA için ve PE için ortam pH değerinin 8'in altında olması durumunda maksimum absorbanzın gerçekleştiği dalga boyu (λ_{maks}) 240 nm dolaylarında rapor etmişlerdir.

Abdollahi ve arkadaşları (22), PA ve IB için geliştirdikleri spektrofotometrik tayin yönteminde 10'ar ppm'lik derişimde IB ve PA için maksimum absorbanzın gerçekleştiği dalga boyu (λ_{maks}) sırasıyla 220 ve 245nm olarak tespit edilmiştir. Kullanılan çözügen sistemi metanol:0,1M HCl sulu çözeltilisi olup 3:1 (h/h) oranında hazırlanmıştır.

Kaura ve arkadaşları (21), CPM için saf suda geliştirdikleri spektrofotometrik ölçümlerde maksimum absorbanzın gerçekleştiği dalga boyu (λ_{maks}) 261,6 nm olarak tespit edilmiştir.

Rote ve arkadaşları (45), PA için maksimum absorbansın gerçekleştiği dalga boyunu (λ_{maks}) çözen olarak metanolün kullanıldığı spektrofotometrik çalışmalarında 248,8 nm olarak tespit etmişlerdir.

Patel ve arkadaşları (42), PBS tamponunda (pH 6,8) PA için maksimum absorbansın gerçekleştiği dalga boyunu (λ_{maks}) 243 nm olarak tespit etmişlerdir. Tüm bu çalışmalarda elde edilen bulgular tezimizde elde edilen deneysel bulgularla paralellik göstermektedir.

4.1.3 KROMATOGRFİK BULGULARIN İNCELENMESİ

4.1.3.1 HPLC BULGULARININ İNCELENMESİ

Kromatografik bulgular elde edilirken yöntem transferinin HPLC'den UPLC'ye yapılması planlandığından kronolojik olarak ilk önce HPLC bulgular elde edilmiştir. HPLC ile gerçekleştirilen tüm analizlerde seçilen model analitler olan iki adet etkin maddeye (parasetamol – PA ve fenilefrin hidroklorür – PE) ait standartlar ve temelde iki farklı mobil faz ile izokratik koşullarda çalışılmıştır. Kullanılan ilk mobil faz olan MF1'in içeriği %75-25 (h/h) MeOH-50mM PBS (pH 6,0), kullanılan ikinci mobil faz olan MF2'nin içeriği ise %30-70 (h/h) Ach-50mM PBS (pH 6,0)'den oluşmaktadır. Şekil 33'de MF1 mobil fazıyla elde edilmiş 10^{-6} M PE ve PA için ilk HPLC kromatogramı görülmektedir. Buna göre, 0,2mL/dk'lık akış hızında 20µL enjeksiyonla, C18 dolgu maddesine sahip boyutları 250mmx4.6mm, 5µm partikül çapı, 80Å por çapı olan analitik bir kolonda PE ve PA için elde edilen alıkonma zamanları sırasıyla 22,61 dakika ve 25,65 dakikadır. Göreceli olarak ardışık pikler birbirinden oldukça net bir şekilde ayrılmışlardır ($R \geq 1,5$), ancak analiz süresi (run time) ortalama 35 dakikadır. HPLC analizleri için kabul edilebilir bir değer

olsa da tekrar sayısının yüksek olacağı çalışmalarda (tezimiz gibi) daha kısa analiz süresinin elde edilmeye çalışılması daha uygun olacaktır. Daha kısa analiz süresini elde etmek için farklı mobil faz (hepri MF1 için) akış hızlarının kromatograma etkisi Şekil 34'de incelenmiştir. Buna göre, 0,2mL/dakikalık akış hızında sırasıyla PE ve PA için 22,61 ve 25,65 dakika olan alıkonma zamanları 0,5mL/dakikalık akış hızında 8,16 ile 9,53 dakikaya düşerken 1,0mL/dakikalık akış hızındaysa 3,79 ve 4,30 dakikaya kadar gerilemektedir. HPLC ile elde edilen il analiz süresi olan 35 dakika ise ortalama 5 dakikaya kadar indirilmiştir. Dedektör özelliklerinin kromatograma etkisi ise Şekil 35'de incelenmiştir. HPLC bulgularını elde ettiğimiz dedektör olan ECD ile +200, 400, 600, 800, 1000 ve 1200 mV'da tayin gerçekleştirilerek kromatogramda yer alan pikler takip edilmiştir. Buna göre +800mV ve üzerindeki çalışma potansiyellerinde pik yanıtlarında (pik yüksekliği veya pik alanı) belirgin bir değişim (artış) olmazken, +800 mV'un altındaki çalışma potansiyellerinde sadece +600 mV'da yaklaşık %50 oranında azalan bir PE yanıtı gözlenirken PA yanıtında bir değişim olmamıştır. Denenen çalışma potansiyel değerleri arasında +600 mV PE yanıtı alınabilen son potansiyel olup +400 ve +200 mV'de PE yanıtı alınamamıştır, bununla beraber PA yanıtında da %50'den fazla düşüş görülmektedir. Şekil 35'de yer alan çalışma potansiyeli deneylerinden elde edilen verilere göre MF1 için optimum çalışma potansiyeli +1200 mV (Ag/AgCl karşılaştıma elektroduna karşı) olarak belirlenmiştir. MF1 için mobil faz kombinasyonunun HPLC kromatogramına etkisi Şekil 36'da özetlenmiştir. MF1 mobil fazını oluşturan çözgen sistemleri olan MeOH ve 50 mM PBS (pH 6,0)'nin değişen hacim oranlarında karışımlarıyla çalışılmıştır. Buna göre %25-75, %50-50, %75-25 ve %95-5 (h/h) oranlarında MeOH-

50mM PBS'den oluşan MF1 Mobil fazları hazırlanmıştır. Bu mobil fazlara karşılık gelen alıkonma zamanlarıysa PE ve PA için sırasıyla 3,42 ile 5,23 dakika, 4,08 ile 5,30 dakika, 3,79 ile 4,30 dakika ve 3,62 ile 4,05 dakikadır. Optimum mobil faz kombinasyonu Şekil 36'da özetlenen veriler baz alınarak %75-25 (h/h) MeOH-50 mM PBS (pH=6,0) olarak belirlenmiştir. Mobil faz pH değerinin kromatograma etkisi Şekil 37'de verilmiştir. Buna göre, çalışılan pH değerleri olan 2,0 – 4,0 – 6,0 için alıkonma zamanları PE ve PA için sırasıyla 3,38 ile 4,79 dakika, 4,07 ile 4,52 dakika ve 3,79 ile 4,30 dakika olarak gerçekleşmiştir. İncelenen pH değerleri arasında pik ayrımı en fazla pH 2,0'da gerçekleşirken diğer iki değer olan pH 4,0 ile 6,0'da göreceli olarak daha az ayırım gözlenmektedir. Bununla beraber hem analiz süresinin kısaldığı ve hem de çözünürlüğün bozulmadığı pH değeri 6,0'dır. Buna göre MF1 için optimum pH değeri 6,0 olarak belirlenmiştir. Tekrarlanabilirlik parametresinin incelenmesi Şekil 38'de gün içi tekrarlanabilirlik çalışmasıyla gerçekleştirilmiştir. Şekil 38'de MF1 için çok sayıda (n=11) analiz manuel olarak ardışık şekilde enjekte edilmiştir. Enjekte edilen PE ve PA standartlarının elde edilen pik alanı, yüksekliği ve simetri değerleri Şekil 38'de gömülü olan tabloda özetlenmiştir. Buna göre, PE için pik alanları baz alındığında standart sapma $\pm 19,2$ ve % varyasyon katsayısı (%CV) 5,56 olarak hesaplanmıştır. Aynı değerler PA için ise $\pm 15,0$ ve 6,38 düzeylerindedir. ECD'nin tasarımı gereği karşılaştığı en büyük sorun olan ve sıklıkla gözlemlenen elektrot yüzeyi kirlenme problemi dikkate alındığında ardışık enjeksiyonlara (n=11) ait istatistiksel bu değerlerin kabul edilebilir olduğu söylenebilir. İkinci mobil faz olan MF2 ile gerçekleştirilen tayinlere ait ilk kromatogram Şekil 39'da verilmiştir. %30-70 (h/h) Ach-50mM PHS (pH

6,0) çözügen karışımından oluşan MF2 ile PE ve PA için elde edilen alıkonma zamanları sırasıyla, 4,58 ve 5,68 dakika olarak gerçekleşmektedir. Aynı HPLC dosyası içerisinde gerçekleştirilen ardışık enjeksiyonlarla (n=6) gün içi tekrarlanabilirlik çalışması gerçekleştirilmiştir (Şekil 40). Buna göre, PA ve PE için sırasıyla standart sapma ve %CV değerleri $\pm 35,51$ ve $\%5,35$ ile $28,03$ ve $\%8,73$ olarak gerçekleşmiştir. Aynı değerler pik yükseklikleri baz alındığında $0,93$ ve $\%1,24$ ile $2,63$ ve $\%5,37$ olarak gerçekleşmiştir. Bu sonuçlardan da anlaşılacağı üzere MF2 ile PE ve PA miktar tayinleri analizleri için pik yüksekliği pik alanına göre daha kesin sonuçlar vereceğinden kalibrasyon eğrisinin elde edilmesinde tercih edilmelidir. MF2 ile mobil faz akış hızının kromatograma etkisinin incelendiği veriler Şekil 41'de verilmiştir. $0,5$ ve $1,0$ mL/dakikalık akış hızlarında PE ve PA için alıkonma zamanları sırasıyla $4,58$ ile $5,68$ ve $7,92$ ile $9,38$ dakika olarak gerçekleşmektedir. $0,5$ mL/dakikalık akış hızında ardışık pikler $1,46$ dakikalık bir zaman farkıyla birbirinden ayrılırken $1,0$ mL/dakikalık akış hızında bu durum $1,10$ dakika olarak gerçekleşmektedir. Her iki akış hızında da kromatogramın çözünürlüğü ardışık iki piki ayırmak için yeterlidir ($R \geq 1,5$). ECD dedektöre ait çalışma potansiyelinin kromatograma etkisine ait veriler Şekil 42'de verilmiştir. Buna göre, $+900$, 800 , 600 ve 500 mV değerlerinde 10^{-6} M'lık PE ve PA içeren karışım standart örneği sisteme enjekte edilmiştir. $+900$ ve 800 mV değerlerinde PE ve PA yanıtlarında herhangi bir farklılık görülmezken $+600$ ve 500 mV'da PE yanıtı alınamamaktadır. Şekil 42'deki veriler ışığında MF2 ile ECD dedektör için optimum çalışma potansiyelinin $+900$ mV (Ag/AgCl karşılaştırma elektroduna karşı) olduğu saptanmıştır. MF2 ile mobil faz pH değerinin kromatograma etkisi Şekil 43'deki verilerle özetlenmiştir. İncelenen

pH değerleri arasında pH 2,0'da ayırım gereğinden fazla artmakta ve ikinci pik olan PA'nın alıkonma zamanı 9,07 dakikaya kadar çıkmaktadır. Diğer yandan pH 4,0 ile 6,0 değerleri arasında kromatogram Őekli ve çözünürlüğü açısından bir fark bulunmamaktadır. Şekil 43'de elde edilen her üç kromatogramda da sağlana ayırım kantitatif analiz için oldukça yeterlidir ($R \geq 1,5$). Bununla beraber analiz süresinin yaklaşık 2 kat uzuyacağı pH 2,0 değeri bu bakımdan anlamlı bir tercih olmayacaktır. Elde edilen veriler ışığında MF2 ile gerçekleştirilen çalışmaların MF1 ile kıyaslanabilmesi için optimum pH değerinin MF2 için de 6,0 olmasına karar verildi.

Literatürde PA ve PE etkin maddeleri için çok sayıda HPLC alışması bulunmaktadır. Tezimizin HPLC bulguları literatürde yer alan çalışmalarla bu aşamada kıyaslamalı olarak incelenmemiştir. Bunun yerine tez çalışmalarımızın nihai ve asıl hedefi olan HPLC'den UPLC'ye yöntem transferinin her iki mobil faz olan MF1 ve MF2 ile gerçekleştirilmesi ile ilgili verilerin elde edilmesi ile ilgili literatürdeki çalışmalarla karşılaştırmalı kıyaslama "4.1.3.3 HPLC'DEN UPLC'YE YÖNTEM TRANSFERİ BULGULARININ İNCELENMESİ" başlığı altında detaylı Şekilde verilmiştir.

4.1.3.2 UPLC BULGULARININ İNCELENMESİ

UPLC ile gerçekleştirilen tayinlerde de aynen HPLC'de olduğu gibi aynı standart etkin maddeler (PE ve PA) ve MF1 ile MF2 kullanılarak çalışılmıştır. HPLC'den farklı olarak ECD yerine sistemle entegre olan DAD dedektör ile çalışılmıştır. PE için 274, PA için ise 246 nm'de kayıt alınmıştır. Ayrıca tüm analizler boyunca 200-600nm arasında spektrum kayıdı yapılmıştır. Şekil 44'de %75-25 (h/h) MeOH-50mM PBS (pH 6,0)'den oluşan MF1 ile elde edilmiş 10^{-6} M PA enjeksiyonuna ait kromatogram görölmektedir.

100µL/dakikalık akış hızında PA için alıkonma zamanı 1,62 olarak gerçekleşmiştir. 3,02'de gelen pik ise MF1'de oluşan bozunma ürünü veya kirlilik olarak tanımlanabilir. UPLC çalışmalarında kullanılan analitik kolon boyutları, C18, 50mmx2.1mm, 1.7µm ve 100Å por çapı, şeklinde olup Şekil 44 UPLC'de elde edilen ilk veri olarak 10µL'lik loop hacmiyle elde edilmiştir. Aynı koşullarda PE için elde edilen kromatogram Şekil 45'de verilmiştir. Alıkonma zamanı 1,55 dakika olarak gerçekleşmektedir. Elde edilen alıkonma zamanlarının 1,55 ve 1,62 dakika gibi oldukça yakın değerler olması nedeniyle ilk UPLC verilerinde yeterli düzeyde pik ayırımı gözlenememiştir. Şekil 46'da 274nm'de elde edilen PE ve 246nm'de elde edilen PA pikleri üst üste çakıştırıldığında yeterli ayırımın gerçekleşmediği ve PE pikinin PA pikinin solunda bir omuzcuk şeklinde kaldığı görülmektedir. Akış hızının 500µL/dakika'ya çıkarılması ile kromatogramda PE ve PA için gözlemlenen piklerin alıkonma zamanları sırasıyla 0,46 ve 0,55 dakika olarak gerçekleşmektedir (Şekil 47 ve 48). Bu şekilde analiz süresi toplamda %60 oranında azalırken pik ayırımları beklenildiği gibi hala yetersiz düzeyde kalmaktadır. Piklerin üst üste çakıştırılmasıyla elde edilen Şekil 49'dan da görülebileceği üzere PE piki gene PA pikinin solunda ayrılmadan omuzcuk şeklinde kalmaktadır. Şekil 49 benzeri üst üste çakıştırılan kromatogramlar aslında standart karışımına ait tek bir enjeksiyonun ürünü olup 200-600 nm aralığında total spektrum kaydı alındığından PE ve PA için ilgili dalgaboyları olan 274 ve 246nm'deki absorpsiyon değerleri total spektrumdan UPLC yazılımı kullanılarak elde edilebilmektedir. Şekil 50 ve 51'de ise sırasıyla 10⁻⁶M PA ve PE standartları için gene 500µL/dakika'lık akış hızında ancak bu sefer 10µL yerine 5 µL'lik loop hacmiyle elde edilen kromatogramlar

görülmektedir. Alıkonma zamanları PE ve PA için sırasıyla 0,38 ve 0,41 dakika olarak gerçekleşmiştir. Loop hacminin %50 küçültülmesi kromatogram üzerindeki kütle yükünü azaltarak otomatikman birim zamanda ayrımı yapılacak tanecik sayısını da teorik olarak %50 azaltmıştır. Bu durumda ayrımın az da olsa olumlu etkilenmesi beklenir. Şekil 52'de 200-600nm aralığında kaydedilen toplam spektrumdan elde edilen 274 ve 246nm'deki kromatogramların üstüste çakıştırılmasıyla ayrımın beklenildiği gibi anlamlı şekilde olumlu etkilendiği görülememektedir. Ancak akış hızının 500µL/dakika'dan 200µL/dakika'ya düşürülmesi durumunda (Şekil 53) ayrımın loop hacminin de %50 azaltılmış bulunması nedeniyle (10µL yerine 5µL) olumlu yönde etkilendiği görülmektedir. Şekil 49 ve 52'de 0,09 ile 0,03 dakika düzeylerinde olan ayrımın Şekil 53'de 0,19 dakikaya yükseldiği saptanmıştır. MF1 mobil fazı ile yapılan çalışmalara mobil faz akış hızının kromatograma etkisinin incelenmesiyle devam edilmiştir. Şekil 54'de 300µL/dakika'lık akış hızında ve 10µL loop hacminde PE ve PA için elde edilmiş kromatogramlar görülmektedir. Alıkonma zamanları sırasıyla 0,61 ve 1,36 dakika olarak gerçekleşmiştir. DAD dedektörden aynı verilerin "toplam tarama" (total scan) ve "en yüksek spektrum" (spectrum maximum) modunda alınmasıyla karışım standart enjeksiyonuyla başarılı ayrımın gerçekleştirildiği kromatogram Şekil 55'deki gibi elde edilmiştir. Şekil 55 UPLC analizlerinde MF1 ile PE ve PA için elde edilen optimum kromatogramdır. Buna göre, alıkonma zamanları sırasıyla 0,53 ve 1,35 dakika olarak gerçekleşmiştir. Ayrım (ardışık iki pikin alıkonma zamanlarının farkı) "toplam tarama" modunda 0,75 dakika, "en yüksek spektrum" modundaysa 0,82 dakika olarak gerçekleşmiştir. MF1 ile UPLC kullanılarak elde edilen Şekil 55, gene MF1 ile

HPLC kullanılarak elde edilen Şekil 38 ile mukayese edildiğinde yöntemin başarılı şekilde HPLC'den UPLC'ye transfer edildiği anlaşılmaktadır.

UPLC ile gerçekleştirilen çalışmalarda denenen diğer mobil faz olan MF2 ile elde edilen veriler Şekil 56'dan itibaren verilmiştir. Şekil 56'da 200, 400 ve 500µL/dakika'lık akış hızında, 5µL loop hacminde, 10⁻⁶M PE ve PA için elde edilmiş kromatogramlar görülmektedir. Elde edilen alıkonma zamanları mobil faz akış hızına göre sırasıyla 1,11 ve 1,30 dakika, 0,55 ve 0,65 dakika, 0,44 ve 0,52 dakika olarak gerçekleşmiştir. 5µL yerine 3µL kullanılarak loop hacminin daha da aşağıya çekilmesinin kromatogramlara etkisi Şekil 57'de görülmektedir. 3µL'lik enjeksiyonla 100 ve 500µL/dakika'lık akış hızlarında alıkonma zamanları PE ve PA için sırasıyla 2,11 ile 2,51 dakika ve 0,45 ile 0,51 dakika olarak gerçekleşmiştir. Akış hızının yaklaşık 5 kat azaltılmasıyla alıkonma zamanları da beklenildiği üzere yaklaşık 5 kat artmıştır. Akış hızının etkisi ayrıca Şekil 58'de de görülmektedir. Burada da 100 ve 400 µL/dakika'lık akış hızının kromatograma etkisi özetlenmektedir. 100 ve 400 µL/dakika'lık akış hızlarında ve 3µL yerine 2µL loop hacminde, alıkonma zamanları 5x10⁻⁶M PE ve 10⁻⁶M PA için sırasıyla 1,61 ile 2,52 dakika ve 0,18 ile 0,41 dakika olarak saptanmıştır. 200, 300 ve 400 µL/dakika'lık akış hızlarında 2µL loop hacmiyle kromatogramdaki değişimler Şekil 59'da özetlenmiştir. Buna göre, 5x10⁻⁶M PE ve 10⁻⁶M PA için alıkonma zamanları sırasıyla 0,90 ile 1,35 dakika, 0,59 ile 0,84 dakika ve gene 0,59 ile 0,84 dakika olarak tespit edilmiştir. Her üç kromatogramda da ardışık iki pikin ayırımı başarılı şekilde gerçekleştirilmiştir (R_Z≥1,5). Mobil fazın (MF2) pH değerinin değişiminin kromatograma yansması ile ilgili tekrarlanabilir ve anlamlı veriler elde edilememiştir (gösterilmemiştir). Ayrıca HPLC çalışmasından farklı

olarak UPLC çalışmasında ECD yerine DAD ile çalışıldığından çalışma potansiyelinin kromatograma etkisi gibi bir deneysel parametre mevcut değildir. Akış hızı ve loop hacmindeki oynamalar ile elde edilen veriler ışığında 2 μ L loop hacmi ve 100 μ L/dakika'lık akış hızının optimum değerler olabileceği düşünülerek bu değerlerle de veriler elde edilmiştir (Şekil 60 ve 61). Şekil 60'da 200-600nm aralığında yapılan spektrum kaydından 5x10⁻⁶M PE için 274nm ve 10⁻⁶M PA için 246nm'de 2 boyutlu (2D) kromatogramlar elde edildiğinde alıkonma zamanlarının sırasıyla 1,83 ve 2,72dakika olduğu saptanmıştır. Benzer şekilde "toplam tarama" (total scan) ve "en yüksek spektrum" (spectrum maximum) modunda aynı verilerle tekrar kromatogramlar elde edildiğinde yeni alıkonma zamanları "toplam tarama" ve "en yüksek spektrum" modlarında 5x10⁻⁶M PE ve 10⁻⁶M PA için sırasıyla 1,81 ve 2,74dakika olarak gerçekleşmiştir. Şekil 61 MF2 ile UPLC analizlerinde PE ve PA tayini için elde edilmiş optimum kromatogramı göstermektedir. Dolayısıyla Şekil 39 ile kıyaslandığında HPLC'den UPLC'ye MF2 ile de başarılı bir şekilde yöntem transferinin gerçekleştirildiği görülmektedir.

Tezimizin UPLC bulguları literatürde yer alan çalışmalarla bu aşamada kıyaslamalı olarak incelenmemiştir. Bunun yerine tez çalışmalarımızın nihai ve asıl hedefi olan HPLC'den UPLC'ye yöntem transferinin her iki mobil faz olan MF1 ve MF2 ile gerçekleştirilmesi ile ilgili verilerin elde edilmesi ile ilgili literatürdeki çalışmalarla karşılaştırmalı kıyaslama "4.1.3.3 HPLC'DEN UPLC'YE YÖNTEM TRANSFERİ BULGULARININ İNCELENMESİ" başlığı altında detaylı şekilde verilmiştir.

4.1.3.3 HPLC'DEN UPLC'YE YÖNTEM TRANSFERİ BULGULARININ İNCELENMESİ

Tez çalışmalarımızın nihai ana hedefi olan HPLC'den UPLC'ye yöntem transferinin her iki mobil faz olan MF1 ve MF2 ile gerçekleştirilmesi ile ilgili veriler Şekil 62 ve 63'de özetlenmektedir. Buna göre %75-25(h/h) MeOH-50mM PBS (pH6,0) mobil fazı ile (MF1) izokratik koşullarda C18 tabanlı dolgu maddesine sahip ve boyutları 250mmx4.6mm, 5µm partikül çapı ve 80Å por çapına sahip bir HPLC kolonu 20µL loop hacmi ve 1.0mL/dakika'lık akış hızıyla kullanılarak elde edilen optimum bir HPLC kromatogramını aynı ayırım gücüyle ve aynı mobil fazla (MF1) UPLC'ye transfer etmek için kullanılması gereken aynı dolgu maddesine sahip analitik kolonun boyutları 50mmx2.1mm, 1.7µm partikül çapı ve 100Å por çapı olmalı ve analiz 10µL loop hacmi ve 300µL/dakika'lık akış hızıyla yürütülmelidir.

Tez çalışmalarımız esnasında çalışılan diğer mobil faz olan (MF2) %30-70 (h/h) Ach-50mM PBS (pH=4.0) mobil fazıyla izokratik koşullarda C18 tabanlı dolgu maddesine sahip ve boyutları 250mmx4.6mm, 5µm partikül çapı ve 80Å por çapına sahip bir HPLC kolonu 20µL loop hacmi ve 1.0mL/dakika'lık akış hızıyla kullanılarak elde edilen optimum bir HPLC kromatogramını aynı ayırım gücüyle ve aynı mobil fazla (MF1) UPLC'ye transfer etmek için kullanılması gereken aynı dolgu maddesine sahip analitik kolonun boyutları 50mmx2.1mm, 1.7µm partikül çapı ve 100Å por çapı olmalı ve analiz 10µL loop hacmi ve 300µL/dakika'lık akış hızıyla yürütülmelidir.

Literatürde direkt olarak HPLC/UPLC yöntem transferi konusuyla ilgili veya başka konularla ilgili olup yöntem transferine de değinen sınırlı sayıda çalışma mevcuttur (3,13,15,24,32,35,39,40,41,48,53,56,59,60). Bunlardan

sadece 4 tanesi HPLC'den UPLC'ye yöntem transferi ile ilgili olup detaylı deneysel verileri ve analitik tartışmaları içermektedir (13,15,35,39). Bu çalışmalardan 3 tanesi aynı grubun eseri olup Guillarme ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir (13,15,39). Guillarme ve arkadaşları yöntem transferi konusunu izokratik (13) ve gradient (15) mobil fazlar için ayrı ayrı irdelenmişlerdir. İzokratik koşullardaki çalışmaları kıyaslama maksadıyla incelendiğinde bahsi geçen çalışmada da mobil faz akış hızı, loop hacmi ve analitik kolon boyutları gibi deneysel değişkenlerle çalışıldığı anlaşılmıştır. Guillarme ve arkadaşları UPLC için yeni enjeksiyon hacminin, mobil faz akış hızının ve analiz süresinin hesaplanabilmesi için tahminleme yapmaya yarım formüller belirlemişlerdir (13). Buna göre HPLC'de kullandığımız ilgili deneysel değişkenlere ait sayısal verileri ilgili formüllerde yerlerine koyduğumuzda UPLC için yeni enjeksiyon hacmimizin 0,077 μ L, mobil faz akış hızımızın 600 μ L/dakika ve analiz süremizin (run time) 1,66 dakika olarak hesaplandığı görülmüştür. Kullanılan formüller, tanımlarına göre, mobil fazların HPLC ve UPLC'de aynı olması durumunda hem MF1 ve hem de MF2 için geçerlidir. Sonuç olarak teorik olarak hesaplanan yeni değerler tezimizde deneysel olarak elde ettiğimiz UPLC değişkenlerinden farklı olmakla beraber mantıksal bir ilişki içerisindedir. UPLC verilerimize göre bu değerler tarafımızdan 10 μ L enjeksiyon hacmi, 300 μ L/dakika akış hızı ve analiz süresi 3dakika olarak tespit edilmiştir. Eğer teorik hesaplamadaki gibi akış hızı 300 yerine 600 μ L/dakikaya çekilirse analiz süresinin de yarı yarıya kısılması yani 1,5 dakika dolaylarına gerilemesi beklenebilir. HPLC'de 20 μ L olan enjeksiyon (loop) hacmi Guillarme ve arkadaşlarının formülleri kullanıldığında UPLC için tezimizin deneysel bulgusu olan 10 μ L'den farklı

olarak 0,077 μ L olarak hesaplanmaktadır. Sonuç olarak HPLC/UPLC yöntem transferlerinde formüller ve denklemler kullanılarak istenilen yeni değişkenlerin hesaplamalar yoluyla tespiti kanımızca hala belirli oranda hatayı bünyesinde barındırmaktadır. Dolayısıyla standart koşullar altında elde edilmiş çok daha fazla sayıda deneysel veriye ihtiyaç duyulmakta olduğu anlaşılmaktadır.

BÖLÜM V

5.1. SONUÇ ve ÖNERİLER

Tez çalışmalarımız sırasında nihai ana hedefi olan HPLC'den UPLC'ye yöntem transferinin her iki mobil faz olan MF1 ve MF2 ile yapılması başarıyla gerçekleştirilmiştir. Bu bağlamda elde edilen veriler, yöntem transferinin yapılabilişliğini göstermesi bakımından önemlidir. Ancak, transferi gerçekleştirilen her iki yönteminde her iki cihazla da (HPLC ve UPLC) analitik geçerlilik (validasyon) çalışmalarının tamamlanması uygun olacaktır. Hali hazırda elde edilen veriler bu anlamda çok az ve kısmi veriler içermektedir. Ayrıca daha fazla sayıda deneysel parametrenin deneysel değişkenler olarak kullanılmasıyla daha fazla sayıda deney yapılarak daha kesin ve anlamlı veriler elde edilmelidir. Bu sayede HPLC'den UPLC'ye yöntem bilgileri olarak, akış hızı, loop hacmi, analitik kolon özellikleri, sıcaklık, mobil faz kombinasyonu ve özellikleri, analiz zamanı gibi deneysel parametrelerin dönüştürülmesi için belirli denklemler ve katsayıların belirlenmesi mümkün olabilecektir. Elde edilecek verilerin ışığında yapay sinir ağlarının ve/veya kemometrik bazı analiz yöntemlerin (PCA, vb) kullanıldığı HPLC'den UPLC'ye yöntem transferi için interaktif bir web sayfasının oluşturulması düşünülmelidir. Kromatografik donanım ve sarf malzemeleri tedarikçileri olan Phonemex, Agilent ve Thermo Scientific firmaları yöntem transferi konusunda hali hazırda spesifik web siteleri oluşturmaya başlamışlardır. Bahsi geçen bu çalışmaların da gerçekleştirilmesiyle yerli bir yaklaşımla benzer bir web sayfasının kullanıma sunulması hedeflenmelidir.

5.2 ÖZET

Ultra performanslı sıvı kromatografisi (UPLC), yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC)'ne kıyasla göreceli olarak sağladığı daha düşük tayin ve belirleme sınırları, yüksek tekrarlanabilirlik, kısa analiz süresi, sarf malzemesi tasarrufu, daha az tehlikeli atık miktarı gibi sağladığı yararlar nedeniyle son yıllarda hızla HPLC'nin yerini almaktadır. Mevcut durumda sıklıkla sorunla karşılaşılan süreç geçerli (valide) HPLC yöntemlerinin UPLC'ye adaptasyonu aşamasıdır. Tez çalışmamızda her iki cihaz arasında yöntem transferi ve adaptasyonunun, hızlı, az sorunlu ve olabildiğince az deney yapılarak gerçekleştirilmesi için, tamamıyla analitik verilere dayalı, bir transfer çalışmasının yapılması amaçlanmıştır. HPLC ile ilaç etkin maddelerinin miktar tayinleri standart analitik LC yöntemlerin kullanımıyla 1970'li yıllardan beri yapılmakta ancak çalışma sayısı UPLC'nin kullanıma girmesiyle son yıllarda hızlı bir azalma göstermektedir. Benzer analizlerin UPLC ile yapılmasının çok sayıda faydası olmakla birlikte analitik yöntemin UPLC donanımı kullanılarak çalışılacak olması nedeniyle yeniden deneysel olarak oluşturulması, sınanması ve geçerlilik (validasyon) testlerinin yapılması gibi başlıca sakıncaları da bulunmaktadır. Tez konusunun nihai ana hedefi model olarak seçilen iki adet ilaç etkin maddesi (fenilefrin hidroklorür ve parasetamol) için HPLC'de geliştirilen 2 farklı yöntemin (MF1 ve MF2 mobil fazlarını kullanan) UPLC'ye transfer edilmesidir. Bu amaçla kolon boyutları, mobil faz ve dedektör özellikleri, akış hızı, loop hacmi, analiz zamanı vb değişkenler ile çalışılarak kromatogramlara etkileri saptanmaya çalışılmıştır. MF1 olarak %75-25 (h/h) MeOH-50mM PBS (pH 6,0), MF2 olarak ise %30-70 Ach-50mM PBS (pH 4,0) ile çalışılmıştır. MF1 mobil fazıyla

izokratik koşullarda C18 tabanlı dolgu maddesine sahip ve boyutları 250mmx4.6mm, 5µm partikül çapı ve 80Å por çapına sahip bir HPLC kolonu 20µL loop hacmi ve 1.0mL/dakika'lık akış hızıyla kullanılarak elde edilen optimum bir HPLC kromatogramını aynı ayırım gücüyle ve aynı mobil fazla (MF1) UPLC'ye transfer etmek için kullanılması gereken aynı dolgu maddesine sahip analitik kolonun boyutları 50mmx2.1mm, 1.7µm partikül çapı ve 100Å por çapı olmalı ve analiz 10µL loop hacmi ve 300µL/dakika'lık akış hızıyla yürütülmelidir. Tez çalışmalarımız esnasında çalışılan diğer mobil faz olan (MF2) %30-70 (h/h) Ach-50mM PBS (pH=4.0) mobil fazıyla da izokratik koşullarda aynı aynı sonuçlara ulaşılarak yöntem transferi gerçekleştirilmiştir.

5.3 SUMMARY

Ultrapformance liquid chromatography (UPLC) because of the advantages it has in comparison to high performance liquid chromatography (HPLC), such as lower detection and quantification limits, higher reproducibility, shorter run time, savings in consumables, decreased amount of hazardous waste, is replacing HPLC in the recent years. In the current status the most problematic process is the adaptation stage of the valid HPLC methods to UPLC. In our thesis study, to perform a transfer work which is completely based on analytical data is aimed to perform the transfer and adaptation of method between both instruments in a fast and less problematic way which requires fewer practical experiments. Quantification of drug substances with HPLC is being performed since 1970s with the use of standard LC methods but with the UPLC entering service the number of works is rapidly decreasing in the last decade. Even though performing similar analysis with UPLC has various major advantages, it also has some leading disadvantages such as the need of the development, test and validation of the same HPLC method on UPLC, as the method will be used operating the UPLC hardware. The final major aim of the thesis subject is the transfer of two different methods of HPLC analysis (using MF1 and MF2 mobile phases) of two model drug substances (phenylephrine hydrochloride and paracetamol) to UPLC. For this purpose, variables such as column sizes, properties of mobile phases and detectors, flow rate, loop volume and analysis run time are studied to determine their effects on chromatograms. As MF1 75-25% (v/v) MeOH-50mM PBS (pH 6.0) and as MF2 30-70% Ach-50mM PBS (pH 4.0) were used. To transfer an optimum HPLC chromatogram obtained with MF1

mobile phase in isocratic conditions with an C18 analytical column of 250mmx4.6mm, 5 μ m particule size and 80Å pore size, with a 20 μ L loop volume at a flow rate of 1.0 mL/minute to UPLC with the same resolution in the same MF1 mobile phase, the C18 column needed has to have the sizes 50mmx2.1mm, 1.7 μ m particule size and 100Å pore size and the analysis should be performed at 10 μ L loop volume and 300 μ L/minute flow rate. Similar results were repeated again in isocratic conditions with 30-70% (v/v) Ach-50mM PBS (pH=4.0) which was the other mobile phase studied in the thesis (MF2).

5.4 KAYNAKLAR

- 1) Amiri-Aref M., Raof J. B., Ojani R. (2013). Electrocatalytic oxidation and selective determination of an opioid analgesic hethadone in the presence of acetaminophen at a glassy carbon electrode modified with functionalized multi-walled carbon nanotubes: Application for human urine, saliva and pharmaceutical samples analysis, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 109:287-293.
- 2) Avula B., Wang Y.H., Rumalla C.S., et al. (2011). Analytical Methods for Determination of Magnoflorine and Saponins from Roots of *Caulophyllum Thalictroides(L.)Michx.* Using UPLC, HPLC and HPTLC, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 56:895-903.
- 3) Chen S., Kord A. (2009). Theoretical and Experimental Comparison of Mobile Phase Consumption between Ultra-High-Performance Liquid Chromatography and High Performance Liquid Chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1216:6204-6209.
- 4) Cheng J., Weijun K., Yun L., etl al. (2010). Development and Validation of UPLC Method for Quality Control of *Curcuma Longa Linn.*:Fast Simultaneous Quantitation of Three Curcuminoids, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 53:43-49.
- 5) Chesnut S.M., Salisbury J.J. (2007). The Role of UHPLC in Pharmaceutical Development, *J.Sep. Sci.*, 30:1183-1190.
- 6) Churchwell M., Twaddle N.C., Meeker L., et al. (2005). Improving LC-MS Sensitivity Through Increases in Chromatographic Performance: Comparisons of UPLC-ES/MS/MS to HPLC-ES/MS/MS, *Journal of Chromatography B*, 825:134-143.
- 7) Collin H., Guicon. G. (1997). Introduction to reversed-phase high-performance liquid-chromatography, *Journal of Chromatography A*, 141 – 289.
- 8) Dongre V.G., Karmuse P.P., Rao P.P. et al. (2008). Development and Validation of UPLC Method for Determination of Primaquine Phosphate and its Impurities, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 46: 236-242.
- 9) Duriot B.C., Doreau M., Noziere P., et al. (2010). Simultaneous Quantification of Carotenoids, Retinol, and Tocopherols in Forages, Bovine Plasma, and Milk:Validation of a Novel UPLC Method, *Anal Bioanal Chem.*, 397:777-790.
- 10) Engelhardt H. (1979). High Performance liquid chromatography, Springer: 96 – 128.
- 11) Fiechter g., Mayer H.K. (2011). Characterization of Amino Acid Profiles of Culture Media via Pre- Column 6-Aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl Carbamate Derivatization and Ultra Performance

- Liquid Chromatography, *Journal of Chromatography B*, 879:1353-1360.
- 12) Fiechter G., Mayer H.K. UPLC Analysis of Free Amino Acids in Wines: Profiling of on-less Aged Wines, *Journal of Chromatography B*, 879:1361-1366.
 - 13) Guillarme D., Nguyen D.T.T., Rudaz S., et al. (2007). Method Transfer for Fast Liquid Chromatography in Pharmaceutical Analysis: Application to Short Columns Packed With Small Particle. Part I: Isocratic Separation, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 66:475-482.
 - 14) Guillarme D., Nguyen D.T.T., Rudaz S., et al. (2007). Recent Developments in Liquid Chromatography- Impact on Qualitative and Quantitative Performance, *Journal of Chromatography A*, 1149: 20-29.
 - 15) Guillarme D., Nguyen D.T.T., Rudaz S., et al. (2008). Method Transfer for Fast Liquid Chromatography in Pharmaceutical Analysis: Application to Short Columns Packed With Small Particle. Part II: Gradient Experiments, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 68:430-440.
 - 16) Hsieh Y., Duncan C.J.G., Lee S., et al. (2007). Comparison of Fast Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometric Methods for Simultaneous Determination of Cladribine and Clofarabine in Mouse Plasma, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 44:492-497.
 - 17) Howard G.A., Martin A.J.P. (1950). The Separation of the C12-C18 Fatty Acids by Reversed-phase, *Biochemical Journal*, 532 – 538.
 - 18) Huang F., Jin G., Liu Y., et al. (2008). Sensitive determination of phenylephrine and chlorprothixene at poly(4-aminobenzene sulfonic acid) modified glassy carbon electrode, *Talanta*, 74:1435-1441.
 - 19) Iriarte G., Gonzalez O., Ferreiros N., et al. (2009). Validation of a Fast Liquid Chromatography-UV Method for the Analysis of Drugs Used in Combined Cardiovascular Therapy in Human Plasma, *Journal of Chromatography B*, 877:3045-3053.
 - 20) Jin Y., Xue X., Shi H., et al. (2008). HPLC and UPLC Switch for TCM Analysis, *Mode Tradit Chin Med Mater Med*, 10(1):80-84.
 - 21) Kaura A. K., Gupta V., Kaura M., et al. (2013). Spectrophotometric determination of chlorpheniramine maleat and phenylpropanolamine hydrochloride by “two wavelengths method”, *Journal of Pharmacy Research*, 7:404-408.
 - 22) Khoshayand M. R., Abdollahi H., Shariatpanahi M., et al. (2008). Simultaneous spectrophotometric determination of paracetamol, ibuprofen and caffeine in pharmaceuticals by chemometric methods, *Spectrochimica Acta Part A*, 70:491-499.
 - 23) Kivilompolo M., Hyötylainen T. (2008). Comparison of Separation Power of Ultra Performance Liquid Chromatography and

- Comprehensive Two-Dimensional Liquid Chromatography in the Separation of Phenolic Compounds in Beverages, *J. Sep. Sci.*, 31:3466-3472.
- 24) Leandro C.C., Hancock P., Fussell R., et al. (2006). Comparison of Ultra-Performance Liquid Chromatography and High-Performance Liquid Chromatography for the Determination of Priority Pesticides in Baby Foods by Tandem Quadrupole Mass Spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1103:94-101.
 - 25) Liu H., Du Z., Yuan Q. (2009). A Novel Rapid Method for Simultaneous Determination of Eight Active Compounds in Silymarin Using a Reversed-Phase UPLC-UV Detector, *Journal of Chromatography B*, 877:4159-4163.
 - 26) Liu H., Zhang Y., Li Q., et al. (2011). Quantification of Lutein and Zeaxanthin in Marigold (*Tagetes Erecta* L.) and Poultry Feed by Ultra-Performance Liquid Chromatography and High Performance Liquid Chromatography, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 34:2653-2663.
 - 27) Martin A.J.P., Randall S.S. (1951), *Biochemical Journal*, 49: 293.
 - 28) Mayer H.K., Fiechter G., Fischer E. (2010). A New Ultra-Pressure Liquid Chromatography Method for the Determination of Biogenic Amines in Cheese, *Journal of Chromatography A*, 1217:3251-3257.
 - 29) Meloun M., Syrový T., Vrána A. (2005). The thermodynamic dissociation constants of losartan, paracetamol, pheylephrine and quinine by the regression analysis of spectrophotometric data, *Analytica Chimica Acta*, 533:97-110.
 - 30) Muralidharan B., Gopu G., Laya S., et al. (2011). A study on preparation and use of nano polypyrrole and nano poly (3,4-ethylenedioxythiophene) coated glassy carbon electrode for the determination of antihistamine in pharmaceutical and urine sample, *Materials Sciences and Application*, 2:957-963.
 - 31) Murray G.J., Danaceau J.P. (2009). Simultaneous Extraction and Screening of Diuretics, Beta-Blockers, selected Simultants and Steroids in Human Urine by HPLC-MS/MS and UPLC-MS/MS, *Journal of Chromatography B*, 877:3857-3864.
 - 32) Nanduri V.V.S.S.R., Adapa V.S.S.P., Kura R.R. (2012). Development and Validation of Stability- Indicating HPLC and UPLC Methods for the Determination of Bicalutamide, *Journal of Chromatographic Science*, 50:316-323.
 - 33) Nasirizadeh N., Shekari Z., Zare H. R., et al. (2013). Electrosynthesis of an imidazole derivative and its application as a bifunctional electrocatalyst for simultaneous determination of ascorbic acid, adrenaline, acetaminophen and tryptophan at a multi-walled carbon nanotubes modified electrode surface, *Biosensors and Bioelectronics*, 41:608-614.

- 34) Natishan T.K. (2011). Developments in Fast Liquid Chromatographic Analysis of Pharmaceuticals, Taylor & Francis, 43:1133-1156.
- 35) Noetzli M., Ansermot N., Dobrinas M., et al. (2012). Simultaneous Determination of Antidementia Drugs in Human Plasma: Procedure Transfer From HPLC-MS to UPLC-MS/MS, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 64-65: 16-25.
- 36) Nordstrom A., O'Maille G., Qin C., et al. (2006). Nonlinear Data Alignment for UPLC-MS and HPLC-MS Based Metabolomics: Quantitative Analysis of Endogenous and Exogenous Metabolites in Human Serum, Anal. Chem., 78: 3289-3295.
- 37) Novakova L., Matysova L., Solich P. (2006). Advantages of Application of UPLC in Pharmaceutical Analysis, Talanta 68:908-918.
- 38) Novakova L., Solichova D., Solich P. (2006). Advantages of Ultra Performance Liquid Chromatography Over High- Performance Liquid Chromatography: Comparison of Different Analytical Approaches During Analysis of Diclofenac Gel, J. Sep. Sci., 29:2433-2443.
- 39) Novakova L., Veuthey J.L., Guillarme D. (2011). Practical Method Transfer From High Performance Liquid Chromatography to Ultra-High Performance Liquid Chromatography: The Importance of Fractional Heating, Journal of Chromatography A, 1218:7971-7981.
- 40) Olsovska J., Jelinkova M., Man P., et al. (2007). High-Throughput Quantification of Lincomycin Traces in Fermentation Broth of Genetically Modified Streptomyces spp. Comparison of Ultra-Performance Liquid Chromatography and High- Performance Liquid Chromatography with UV Detection, Journal of Chromatography A, 1139:214-220.
- 41) Ortega N., Romero M.P., Macia A., et al. (2010). Comparative Study of UPLC-MS/MS and HPLC-MS/MS to Determine Procyanidins and Alkaloids in Cocoa Samples, Journal of Food Composition and Analysis, 23:298-305.
- 42) Patel D.M., Sardhara B.M, Thumbadiya D.H., et al. (2012). Development and validation of spectrophotometric method for simultaneous estimation of paracetamol and lornoxicam in different dissolution media, Pharmaceutical Methods, 3(2):98-101.
- 43) Paul S.M, Mytelka D.S, Dunwiddie C.T. et al. (2010). How to improve R&D producibility: the pharmaceutical industry's grand challenge, Nature Reviews 9:203-214.
- 44) Robards K., Haddad R.R., Jackson P.E. (2004), Principles and Practice of Modern Chromatographic Methods, Elsevier Academic Press, 24 – 300.
- 45) Rote A. R., Kumbhoje P. A., Bhambar R.S. (2012), UV-visible spectrophotometric simultaneous estimation of paracetamol and nabumetone by AUC method in combined tablet dosage form, Pharmaceutical Methods, 3(1):40-43.

- 46) Rowe B., Schmidt J., Smith L.A. et al. Rapid Product Analysis and Increased Sensivity for Quantitative Determinations of Botulinum Neurotoxin Proteolytic Activity, *Analytical Biochemistry*, 396:188-193.
- 47) Skoog D.A., West D.M.,; Holler F.J. (1996) *Fundamental of Analytical Chemistry*, Harcourt Brace College Publishers.
- 48) Spacil Z., Novakova L., Solich P. (2008). Analysis of Phenolic Compounds by High Performance Liquid Chromatography and Ultra Performance Liquid Chromatography, *Talanta* 76: 189-199.
- 49) Suarez M., Romero M.P., Ramo T. et al. (2009). Methods for Preparing Phenolic Extracts from Olive Cake for Potential Application as Food Antioxidants, *J. Agric. Food Chem.*, 57:1463-1472.
- 50) Swartz M.E. (2005). UPLC: An Introduction and Review, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 28: 1253-1263.
- 51) Wang G., Hsieh Y., Cui X., et al. (2006). Ultra-Performance Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometric Determination of Testosterone and its Metabolites in In Vitro Samples, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 20:2215-2221.
- 52) Wang J., Li H., Jin C., et al. (2008). Development and Validation of a UPLC Method for Quality Control of Rhubarb-Based Medicine: Fast Simultaneous Determination of Five Anthraquinone Derivates, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 47:765-770.
- 53) Wang J., Lung D. (2007). Analyses of Macrolide Antibiotic Residues in Eggs, Raw Milk, and Honey Using Both Ultra-Performance Liquid Chromatography/Quadrupole Time-of-Fight Mass Spectrometry and High-Performance Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom*, 21:3213-3222.
- 54) Wilson I.D., Nicholson J.K., Perez J.C., et al. (2005). High Resolution" Ultra Performance" Liquid Chromatography Coupled to oa-TOF Mass Spectrometry as a Tool for Differential Metabolic Pathway Profiling in Functional Genomic Studies, *Journal of Proteome Research*, 4:591-598.
- 55) Wren S.A.C., Tchelitcheff P. (2006). Use of Ultra-Performance Liquid Chromatography in Pharmaceutical Development, *Journal of Chromatography A*, 1119:140-146.
- 56) Wu T., Wang C., Wang X., et al. (2008). Comparison of UPLC and HPLC for Analysis of 12 Phthalates, *Chromatographia*, 68:803-806.
- 57) Wu Y., Engen J.R. (2006). Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) Further Improves Hydrogen/Deuterium Exchange Mass Spectrometry, *American Society for Mass Spectrometry*, 14:163-167.
- 58) Yu K., Little D., Plumb R., et al. (2006). High-Throughput Quantification for a Drug Mixture in Rat Plasma-a Comparison of Ultra Performance Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry with High-Performance Liquid Chromatography/Tandem Mass

Spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 20:544-552.

- 59) Zhao X., Wang W., Wang J., et al. (2006). Urinary Profiling Investigation of Metabolites with cis-diol Structure from Cancer Patients Based on UPLC-MS and HPLC-MS as well as Multivariate Statistical Analysis, *J.Sep. Sci.*, 29:2444-2451.
- 60) Zhau J., Zhao J., Yuan H., et al. (2007). Comparison of UPLC and HPLC for Determination of trans-10Hydroxy-2Decenoic Acid Content in Royal Jelly by Ultrasound-Assisted Extraction with Internal Standard, *Chromatographia*, 66:185-190.
- 61) Zheng M., Gao F., Wang Q., et al. (2013). Electrocatalytical oxidation and sensitive determination of acetaminophen on glassy carbon electrode modified with graphene-chitosan composite, *Materials Science and Engineering C*, 33:1514-1520.
- 62) Zhu Y., Zhang Z., Zhao W., et al. (2006). Voltammetric behavior and determination of phenylephrine at a glassy carbon electrode modified with multi-wall carbon nanotubes, *Sensors and Actuators B*, 119:308-314.

5.5 ÖZGEÇMİŞ



ECZ. ECE ÖZCAN'IN ÖZGEÇMİŞİ

DÜZENLEME TARİHİ : AĞUSTOS 2011

1) KİŞİSEL BİLGİLER

Adı : ECE

Soyadı : ÖZCAN

Doğum Yeri : Pütürge, MALATYA

Doğum Tarihi : 28.05.1988

Cinsiyeti : Bayan

Uyruğu : T.C.

Medeni Durumu : Bekar

Ev Adresi : Ergene Mah.454/1 Sok. Çelik Apt. K:6 D:17 Bornova
İZMİR

İş Adresi : Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya
Anabilim Dalı 35100 Bornova – İZMİR

Tel. Numaraları : 0.232.311 3974 (İş)
0.505.322 49 80 (GSM)

Faks : 0.232.388 52 58 (İş)

E-Posta : ecz.ecece@hotmail.com

Sürücü Belgesi : B sınıfı - 2007

2) ÖĞRENİM DURUMU

2006-2011: Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

2002-2006: Çorum Anadolu Öğretmen Lisesi

1999-2002: Çorum Dumlupınar İ.Ö.O.

1994-1999: Çorum Bahçelievler İ.Ö.O.

3) YABANCI DİL BİLGİSİ

<u>Yabancı dil</u>	<u>Öğrendiği yer</u>	<u>Okuma</u>	<u>Yazma</u>	<u>Konuşma</u>
İNGİLİZCE	Çorum Ana. Öğrt. Lisesi	İyi	iyi	İyi
	İzmir Türk-Ame. Dern.	İyi	iyi	İyi

ÜDS Puanı : 58.75 (Nisan 2011)

Ege Üniv. Yab. Diller Böl.

İng. Haz. Birimi Yeterlik Sınavı Puanı : 84 (Ekim 2006)

4) STAJ/DENEYİMLER

STAJLAR:

2008 - 15 saat	Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Uygulama Eczanesi
2008 - 2 ay	Sevda Eczanesi – ÇORUM
2009 - 1 ay	Sevda Eczanesi – ÇORUM
2010 - 1 ay	Volkan Eczanesi – ÇORUM
2011 - 4 ay	Duru Eczanesi - İZMİR

5) DİĞER ÖZELLİKLER-BAŞARILAR-ETKİNLİKLER

ÜYESİ OLUNAN DERNEK VE KURULUŞLAR :

ATATÜRKÇÜ DÜŞÜNCE DERNEĞİ (ÇORUM ŞUBESİ)

E.Ü. MEZUNLAR DERNEĞİ (İZMİR)

KATILINAN KURS VE SEMİNERLER:

- 1) 2010 yılında Atık İlaç Hareketi için fakültemiz adına görev aldım.
- 2) 2010 yılında İstanbul ilaç fabrikaları ziyaretlerine katıldım.
- 3) 2009 ve 2011 yıllarında İstanbulda düzenlenen Farmavizyon Eczacılık Fuarı'na katıldım.
- 4) 2008-2009 EUPSG (Ege University Pharmaceutical Students' Group: Ege Üniversitesi Eczacılık Öğrencileri Grubu) yürütme kurulunda eğitim ve bilgilendirmeden sorumlu olarak faaliyet gösterdim.
- 5) 2007 ve 2008 yıllarında Ankara' da düzenlenen Hasta Bilgilendirme Yarışması' na iki kere fakültemiz adına izleyici olarak katıldım.
- 6) 2006 yılında öğrenci temsilcisi olarak seçildim.
- 7) 2006-2011 yıllarında Ege Eczacılık Günleri'ne katılıp görev aldım.
- 8) Eylül 2011 de Araştırma Görevlisi olarak Ege Üniversitesi Analitik Kimya Anabilim Dalı'nda göreve başladım.
- 9) 25-29.09.2011 tarihinde Çeşme'de düzenlenen 9.Uluslar Arası Elektrokimya Kongresi'ne poster bildirili olarak katıldım.

- 10)19-24.03.2012 tarihleri arasında Farmasötik Bilimler Araştırma Laboratuvarı'nda Thermo firması tarafından düzenlenen " MSQ Plus LC-MS Sistemi " eğitimine katıldım.
- 11)09-13.04.2012 tarihleri arasında Farmasötik Bilimler Araştırma Laboratuvarı'nda Thermo firması tarafından düzenlenen " DSQ II GC-MS Sistemi " eğitimine katıldım.
- 12)27.04.2012 tarihinde Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Fizik Bölümü'nde antteknik firması tarafından düzenlenmiş olan " HPLC & GCMS " seminerine katıldım.
- 13)07-11.05.2012 tarihleri arasında Farmasötik Bilimler Araştırma Laboratuvarı'nda Thermo firması tarafından düzenlenen " TSQ Quantum Access Max LC/MS/MS Sistemi " eğitimine katıldım.
- 14)06-07.05. 2012 tarihleri aralığında Cevahir Otel Convention Center , İstanbul 'da düzenlenmiş olan " Spektrum II Tamamlayıcı Bakış Açılılarıyla İlaç Endüstrisi ve Eczane " isimli toplantıya katıldım.
- 15)22-25.05.2012 tarihleri aralığında Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü tarafından İnciraltı/İzmir'de düzenlenmiş olan "Oksidatif Stres, DNA hasarı, DNA onarımı ve Hastalıklarla İlişkisi" konulu teorik ve uygulamalı kursa katıldım.
- 16)16-20.07.2012 07-11.05.2012 tarihleri arasında Farmasötik Bilimler Araştırma Laboratuvarı'nda Thermo firması tarafından düzenlenen "Accela UHPLC Sistemi" eğitimine katıldım.
- 17)03-07.09.2012 tarihleri arasında Farmasötik Bilimler Araştırma Laboratuvarı'nda Thermo firması tarafından düzenlenen "Focus GC Sistemi" eğitimine katıldım.
- 18)12-16.11.2012 tarihleri arasında Farmasötik Bilimler Araştırma Laboratuvarı'nda Thermo firması tarafından düzenlenen "Evolution Array UV-VIS Spektrofotometre Sistemi" eğitimine katıldım.
- 19)17.02.2013 -26.05.2013 tarihleri arasında Kıbrıs Yakın Doğu Üniversitesi ile anlaşmalı olarak Analitik Kimya Öğrenci Laboratuvarı'nda çalıştım.
- 20)07 Mayıs 2013 tarihinde İzmir Ege Palas Otel' de gerçekleştirilen Merck Millipore Laboratuvar Kimyasalları & Ekipmanları Müşteri Semineri' ne katıldım.
- 21)19-22 Haziran 2013 tarihleri arasında Uludağ üniversitesi ve Hacettepe Üniversitesi Fen Fakülteleri Kimya Bölümleri tarafından ortaklaşa düzenlenen Kromatografi 2013 Kongresi' ne poster bildirili olarak katıldım.

BİTİRME TEZİ:

Yaşlanma karşıtı peptitler – 2011, (Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Özgen ÖZER)

YAYINLAR (SCI-Expanded Makaleler) :

- 1) G. YALCIN, H. ILERI, S. KUNDAKCI, A. YESILYURT, G. DER, E. OZCAN, E. KILINC, "Design of an electrochemical sensor based on the electropolymerization of hydroxyboronic acids on glassy carbon electrodes for the voltammetric determination of fluoride", **ELECTROANALYSIS**, 2013, submitted.
- 2) A. YESILYURT, G. YALCIN, S. KUNDAKCI, H. ILERI, G. DER, E. OZCAN, E. KILINC, "The use of Some Hydroxybenzenboronic Acid Derivatives in the Spectrofluorometric Determination of Fluoride", **JOURNAL OF FLUORESCENCE**, 2013, submitted.
- 3) G. DER, E. OZCAN, E. KILINC, "Simultaneous LC Detection of Urinary 8OHdG, 2dU and 5HMU; A Triple Detector Validation Approach for a Group of Oxidative Stress Biomarker", **JOURNAL OF LIQUID CHROMATOGRAPHY AND RELATED TECHNOLOGIES**, 2013, submitted

YAYINLAR (BİLDİRİLER) :

- 1) G. DER, E. OZCAN, E. KILINC, "Evaluation of electrochemical and spectroscopic detector performances for the simultaneous determination of chlorfeniramin maleate, phenylephrine hydrochloride and acetaminophen in anti-flu combined pharmaceutical preparations", **9th International Electrochemistry Meeting in Turkey**, 25-29 September 2011, Altinyunus Hotel, Cesme – Izmir, Turkey
- 2) G. DER, E. OZCAN, E. KILINC, "Employment of a group of catechins and flavonoids as scavengers of hydroxyl radical; application approach in chronoamperometric detection in liquid chromatography", **9th International Electrochemistry Meeting in Turkey**, 25-29 September 2011, Altinyunus Hotel, Cesme – Izmir, Turkey
- 3) E. ÖZCAN, G. DER, E. KILINC, "Bir grup ilaç etkin maddesi için HPLC'den UPLC'ye yöntem transferi", **13. Ulusal Kromatografi Kongresi, Kromatografi 2013**, 19-22 Haziran 2013, Uludağ Üniversitesi, BURSA. Poster bildirisi PS-177, syf 205.

BİLGİSAYAR KULLANIM TECRÜBESİ :

- Windows XP, Vista, 7
- MS Office (MS Word, MS Excel, MS PowerPoint, MS Photo Editor)
- MINITAB® Release 14.13. (Minitab Inc.)
- Internet (Netscape 4.04, MS Explorer 7.0)
- Chemstation (Agilent Technologies)
- Rx-Media Pharma
- Orta Düzey Donanım Bilgisi

SPORTİF ETKİNLİKLER :

- Basketbol
- Amatör Yüzme
- Amatör Masa Tenisi

HOBİ VE SOSYAL AKTİVİTELER :

- Doğa Dağcılık Yürüyüşleri ve Tracking
- Türk Sanat Müziği Enstrümanları (Keman) Çalmak
- Latin Dansları(Salsa,Bachata)
- Roman Okumak(Romantik Drama)