



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**DUTASTERİT VE TAMSULOSİN HCL’NİN YENİ NESİL  
KOLONLAR KULLANARAK BAZI SIVI KROMATOĞRAFİK  
YÖNTEMLERLE EŞ ZAMANLI ANALİZİ VE  
OPTİMİZASYONU**

**BOĞAÇ BUĞRA BARUT**

**ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN  
Prof. Dr. BENGİ USLU**

**ANKARA  
2016**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DUTASTERİT VE TAMSULOSİN HCL’NİN YENİ  
NESİL KOLONLAR KULLANARAK BAZI SIVI  
KROMATOĞRAFİK YÖNTEMLERLE EŞ ZAMANLI  
ANALİZİ VE OPTİMİZASYONU**

**BOĞAÇ BUĞRA BARUT**

**ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN  
Prof. Dr. BENGİ USLU**

**Bu araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü’nün  
15L0237004 numaralı projesi ile desteklenmiştir.**

**2016-ANKARA**

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum "Dutasterit ve Tamsulosin HCl'nin yeni nesil kolonlar kullanarak bazı sıvı kromatografik yöntemlerle eş zamanlı analizi ve optimizasyonu" başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikri tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Boğaç Buğra BARUT

Tarih: 11.05.2016

İmza:



Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalında

Boğaç Buğra BARUT tarafından hazırlanan

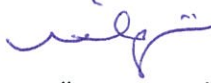
“Dutasterit ve Tamsulosin HCL'nin Yeni Nesil Kolonlar Kullanarak Bazı Sıvı  
Kromatografik Yöntemlerle Eş Zamanlı Analizi ve Optimizasyonu” adlı tez  
çalışması

Aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS Tezi olarak OY BİRLİĞİ ile kabul  
edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 11.05.2016



Prof. Dr. Feyyaz ONUR  
Ankara Üniversitesi  
Jüri Başkanı



Prof. Dr. Nilgün GÜNDEN GÖĞER  
Gazi Üniversitesi  
Raportör



Prof. Dr. Bengi USLU  
Ankara Üniversitesi  
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu  
tarafından onaylanmıştır.



Prof. Dr. Zafer KARAER  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof. Dr. Püken Akten

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Dutasterit ve Tamsulosin HCl'nin yeni nesil kolonlar kullanarak bazı sıvı kromatografik yöntemlerle eş zamanlı analizi ve optimizasyonu” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikri tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Boğaç Buğra BARUT

Tarih: 11.05.2016

İmza:

# İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vii
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	x
Çizelgeler	xiv
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
1.1.Çalışmada Kullanılacak Maddelerin Özellikleri	3
1.1.1. Dutasterit	3
1.1.1.1. Kimyasal Yapısı	3
1.1.1.2.Tanımı	4
1.1.1.3. Etki Mekanizması	4
1.1.1.4.Farmakokinetik	5
1.1.2. Tamsulosin	6
1.1.2.1.Kimyasal Yapısı	6
1.1.2.2.Tanım	7
1.1.2.3.Etki mekanizması	7
1.1.2.4.Farmakokinetik	8
1.1.3. Dutasterit ve Tamsulosin Kombinasyonunun Özellikleri	8
1.1.3.1.Etki Mekanizmaları	9
1.1.3.2.Farmokokinetik	9
1.2. Tamsulosin ve Dutasterit ile Yapılan Çalışmalar	12
1.3. Kromatografi	15
1.3.1. Ters faz kromatografisinin avantajları	18
1.3.2. Sıvı Kromatografi Cihazları	18
1.3.2.1. Hareketli Faz Hazneleri ve Çözücü Sistemleri	20
1.3.2.2. Pompa	20
1.3.2.3 Enjektör	20
1.3.2.4 Dedektörler	21
1.3.2.4.1 Maddeye Yönelik Dedektörler	21
1.3.2.4.2 Çözeltiye Yönelik Dedektörler	21
1.3.2.5. Kolon	22
1.3.3. Ultra Performanslı Sıvı Kromatografisi (UPSK)	22
1.3.3.1.Girdap difüzyonu	25
1.3.3.2.Boylamasına Difüzyon	25

1.3.4. Kolon Dolgu Materyalleri	28
1.3.4.1. Standart YPSK de Kullanılan Dolgu Materyalleri	28
1.3.4.1.1. Core Shell Silika Parçacıklar	30
1.3.4.1.1.1. Performans ve Ayırım Açısından Yeni Nesil Parçacıklar	35
<b>2. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	<b>40</b>
2.1. Genel Bilgi	40
2.2. Kullanılan Cihazlar	40
2.2.1. Yüksek Performans Sıvı Kromatografi Cihazı	40
2.2.2. Diğer Cihazlar	41
2.3. Kullanılan Diğer Kimyasal Maddeler	41
2.4. Kullanılan Çözeltiler	42
2.4.1. Kromatografik Çalışmalar	42
2.4.1.1. Çalışılan Bileşiklerin YPSK Ayırımında Kullanılan Çözeltileri	42
2.4.1.2. Stok Çözeltilerin Hazırlanışı	44
2.4.1.2.1. Standart Maddelerin Stok Çözeltisi	44
2.4.1.2.2. Serum Stok Çözeltisi	44
2.4.1.2.3. İdrar Stok Çözeltisi	45
2.5. Analitik Yöntemin Validasyonu (Yöntem Geçerlik Testleri)	45
2.5.1. Validasyonun Genel İşlemleri	45
2.5.1.1. Sistem Uygunluk Testleri	46
2.5.1.1.1. Etkin Tabaka Sayısı (N)	46
2.5.1.1.2. Kuyruklanma Faktörü (T)	46
2.5.1.1.3. Kapasite Faktörü ( <i>k</i> )	46
2.5.1.1.4. Seçicilik Faktörü ( $\alpha$ )	47
2.5.1.1.5. Ayırma Gücü ( $R_s$ )	47
2.5.2. Tipik Validasyon Karakteristikleri	48
2.5.2.1. Doğruluk (Geri Kazanım)	48
2.5.2.1.1. Referans Standart ile Karşılaştırmak	48
2.5.2.1.2. Kör Matriks Ortamına Analizi Yapılan Maddeyi İlave Etmek	48
2.5.2.1.3. Standart Ekleme Yöntemi İle Saf Madde İlavesi	49
2.5.2.2. Seçicilik	49
2.5.2.3. Kesinlik	50
2.5.2.3.1. Orta-Kesinlik	50
2.5.2.3.2. Tekrarlanabilirlik	50
2.5.2.3.3. Tekrar Elde Edilebilirlik	51
2.5.2.4. Teşhis Sınırı, Gözlenebilirlik Sınırı (TS)	51
2.5.2.5. Tayin Alt Sınırı (TAS)	51
2.5.2.6. Doğrusallık	52
2.5.2.6.1. Kalibrasyon Doğrusu (Grafiği)	52
2.5.2.7. Çalışma Aralığı	52

2.5.2.8. Kararlılık	53
2.5.2.9. Duyarlılık	53
2.5.2.10. Stabilite	53
2.5.2.11. Tutarlılık	54
2.6. Yöntem	54
2.6.1. Deneyin Yapılışı	54
2.6.2. YPSK Yönteminin Optimizasyonu	54
<b>3. BULGULAR</b>	<b>56</b>
3.1. Tamsulosin ve Dutasterit Maddeleri için Geliştirilen YPSK Yöntemine Ait Analiz Bulguları	56
3.1.1. YPSK Sisteminin Optimizasyonu	56
3.1.1.1. Sabit Faz Seçimi	56
3.1.1.2. Hareketli Fazın Belirlenmesi	60
3.1.1.2.1. Hareketli Fazın Organik Çözücü Yüzdesinin Belirlenmesi	60
3.1.1.2.2. Hareketli Faz pH'sı, Akış Hızı ve Kolon Sıcaklığının Belirlenmesi	62
3.1.1.2.3. Sistem Uygunluk Testi Sonuçları	70
3.1.1.2.4. Hızlandırılmış Bozundurma Çalışmaları	71
3.1.1.2.5. Kalibrasyon Çalışmaları	74
3.1.1.2.5. Biyolojik Numunelere Uygulama	75
<b>4. TARTIŞMA</b>	<b>78</b>
4.1. Çalışılan Bileşiklerin Sıvı Kromatografik Yöntemle Ayrılması	78
<b>5. SONUÇ ve ÖNERİLER</b>	<b>82</b>
<b>ÖZET</b>	<b>84</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>85</b>
<b>KAYNAKLAR</b>	<b>86</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>91</b>



## ÖNSÖZ

Tez kapsamında prostat tedavisinde kullanılan tamsulosin ve dutasterit etken maddelerinin yeni nesil kolonlar kullanılarak YPSK’da analizi ve optimizasyonu yapılmıştır. Tamsulosin ve dutasterit’ in karışımlarının analizi için en uygun kolon ve kolon sıcaklığı seçilmiş, hareketli faz bileşimi, pH’sı, akış hızının etkisi incelenmiş ve yeni, basit, hızlı, duyarlı, seçici bir analiz yöntemi geliştirilmiştir. Geliştirilen yöntemin yöntem geçerlilik testleri yapılarak bu maddelerin biyolojik numunelerden aynı anda analizi için uygun olduğu görülmüştür.

Öncelikle bana analitik kimyayı sevdiren, her daim yanımda olan, tecrübeleriyle yolumu aydınlatan, çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Bengi USLU’ ya sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Yüksek lisans çalışmam boyunca hep yanımda olan, tecrübeleriyle bana yol gösteren, değerli zamanını bana ayıran Dr. Mehmet GÜMÜŞTAŞ ve eşi Ayşen GÜMÜŞTAŞ’ a çok teşekkür ederim.

Değerli hocalarım, Prof.Dr. Feyyaz ONUR’a, Prof. Dr. Sibel A. ÖZKAN’a ve tezimin yazım aşamasında deneyimlerimden yararlandığım Dr. Burçin BOZAL’a ve bozundurma çalışmalarında destek aldığım kimya mühendisi Cem ERKMEN’e ve Anabilim Dalının bütün hocalarına vermiş oldukları bilgiler için ve yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Lisans ve yüksek lisans öğrenimi sürecinde benden hiçbir desteği esirgemeyen ve benim bugünlere gelmemde çok büyük katkıları olan, her zaman ve her koşulda benim yanımda olan abim Ozan Bahadır BARUT, canım annem Figen BARUT ve canım babam Cevat BARUT’a sonsuz teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan, desteğini bir an olsun esirgemeyen, hayat arkadaşım, canım eşim İnci BARUT’a sonsuz teşekkür ederim.

Bu tez çalışması Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü’nün 15L0237004 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

## SİMGELER VE KISALTMALAR

$\alpha$	Seçicilik Faktörü
ACN	Asetonitril
Bias	Bağıl Hata
BPH	Benign Prostat Hiperplazisi
BSS	Bağıl standart sapma
DHT	5-alfa-dihidrotestosterona
DUT	Dutasterit
FDA	Food and Drug Administration
FDD	Fotodiyot Dizi Dedektörü
IS	İç standart
İTK	İnce Tabaka Kromatografisi
k	Kapasite Faktörü
m	Eğim
n	Kesişim
N	Etkin Tabaka Sayısı
PSA	Prostat spesifik antijen
r	Korelasyon katsayısı
Rs	Ayırma Gücü
SUT	Sistem Uygunluk Testleri
T	Kuyruklanma Faktörü
TAM	Tamsulosin
TAS	Tayin Alt Sınırı

TS	Teşhis Sınırı, Gözlenebilirlik Sınırı
TSH	Tiroid-stimüle edici hormon
UPSK	Ultra Performanslı Sıvı Kromatografisi
UV	Ultra viyole
UV-GB	Ultra Viyole Görünür Bölge
YPSK	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi



## ŞEKİLLER

<b>Şekil 1.1.</b> Dutasterit'in kimyasal yapısı	3
<b>Şekil 1.2</b> Tamsulosinin kimyasal yapısı	6
<b>Şekil 1.3.</b> Kromatografik ayırımın genel olarak gösterilişi	16
<b>Şekil 1.4.</b> YPSK Cihazı (Çetinkaya, 2015, s:7–16)	19
<b>Şekil 1.5.</b> Sıvı-sıvı dağılım kromatografisinde çözünmüş maddenin ayırımı	22
<b>Şekil 1.6.</b> Van Deemter eşitliği	23
<b>Şekil 1.7.</b> Van deemter denklemindeki terimlerin şematize edilişi	24
<b>Şekil 1.8.</b> Girdap difüzyonunun denklemleri	25
<b>Şekil 1.9.</b> Boylamasına difüzyonun denklemleri	26
<b>Şekil 1.10.</b> UPSK cihazı	27
<b>Şekil 1.11.</b> Kolon dolgu maddeleri gelişimi	28
<b>Şekil 1.12.</b> Kolon dolgu materyallerinin ve kolonların gelişimi (Mazzeo ve ark., 2005)	29
<b>Şekil 1.13.</b> A, tipik bir core shell parçacıkların kaplanması, B, 2,6µm (sol), 1,7 µm boyutlarındaki core-shell parçacıkların SEM görüntüsü (Gritti ve ark., 2010)	32
<b>Şekil 1.14.</b> Geleneksel parçacık ve core-shell parçacık varlığında oluşan akış (Kostka ve ark.,2011)	35
<b>Şekil 1.15.</b> YPSK'da yapılan 3 farklı kolonun çalışma sonucu a) core-shell kolon kinetex 150 mm×4,60mm;5µm b)yeni nesil kolon 150 mm×4,60mm;5µm ve c) yeni nesil kolon 150 mm×4,60mm;2,5µm	37
<b>Şekil 1.16.</b> UPSK ve YPSK arasındaki farkı gösteren bir çalışmanın kromatogramı	38
<b>Şekil 2.1.</b> Sıvı kromatografide bir kromatogram	47

- Şekil 3.1.** 45°C’de, 1 mL dk<sup>-1</sup> akış hızı ile 220 nm’de, ACN: Tampon, (60:40; h/h), pH:7,0, X Terra C-18 (250 x 4,6; 5µm) kolonu ile yapılan tamsulosin (a), dutasterit (b) ve rilpivirin (IS) analizine ait kromatogram 57
- Şekil 3.2.** 45°C’de, 1 mL dk<sup>-1</sup> akış hızı ile 220 nm’de, ACN: Tampon, (60:40; h/h), pH:7,0, XSelect HSS T3 XP (150 x 4,6; 2,5 µm) kolonu ile yapılan tamsulosin (a), dutasterit (b) ve rilpivirin (IS) analizine ait kromatogram 57
- Şekil 3.3.** 45°C’de, 1 mL dk<sup>-1</sup> akış hızı ile 220 nm’de, ACN: Tampon, (60:40; h/h), pH:7,0, XBridge C-18 (150 x 4,6; 5 µm) kolonu ile yapılan tamsulosin (a), dutasterit (b) ve rilpivirin (IS) analizine ait kromatogram 58
- Şekil 3.4.** 45°C’de, 1 mL dk<sup>-1</sup> akış hızı ile 220 nm’de, ACN: Tampon, (60:40; h/h), pH:7,0, Kinetex C-18 (150 x 4,6; 5 µm) kolonu ile yapılan tamsulosin (a), dutasterit (b) ve rilpivirin (IS) analizine ait kromatogram 58
- Şekil 3.5.** Xterra C18 (250x4,6; 5µm) kolonu ile 25°C’de, pH:3,0, 1 mL dk<sup>-1</sup> akış hızı ile 220 nm’de, ACN: Tampon (50:50; h/h) ile yapılan tamsulosin (a), dutasterit (b) ve rilpivirin (IS) analizine ait kromatogram 60
- Şekil 3.6.** Xterra C18 (250x4,6; 5µm) kolonu ile 25°C’de, pH:3,0, 1 mL dk<sup>-1</sup> akış hızı ile 220 nm’de, ACN: Tampon (55:45; h/h) ile yapılan tamsulosin (a), dutasterit (b) ve rilpivirin (IS) analizine ait kromatogram 61
- Şekil 3.7.** Xterra C18 (250x4,6; 5µm) kolonu ile 25°C’de, pH:3,0, 1 mL dk<sup>-1</sup> akış hızı ile 220 nm’de, ACN: Tampon (60:40; h/h) ile yapılan tamsulosin (a), dutasterit (b) ve rilpivirin (IS) analizine ait kromatogram 61
- Şekil 3.8.** Xterra C18 (250x4,6; 5µm) kolonu ile 25°C’de, pH:3,0, 1 mL dk<sup>-1</sup> akış hızı ile 220 nm’de, ACN: Tampon (65:35; h/h) ile yapılan tamsulosin (a), dutasterit (b) ve rilpivirin (IS) analizine ait kromatogram 61
- Şekil 3.9.** Xterra C18 (250x4,6; 5µm) kolonu ile 25 °C’de, 1 mL dk<sup>-1</sup> akış hızı ile 220 nm’de, ACN: Tampon, (60:40; h/h), pH:3,0’de yapılan tamsulosin (a), dutasterit (b) ve rilpivirin (IS) analizine ait kromatogram 62
- Şekil 3.10.** Xterra C18 (250x4,6; 5µm) kolonu ile 25 °C’de, 1 mL dk<sup>-1</sup> akış hızı ile 220 nm’de, ACN: Tampon, (60:40; h/h), pH:3,5’de yapılan tamsulosin (a), dutasterit (b) ve rilpivirin (IS) analizine ait kromatogram 63
- Şekil 3.11.** Xterra C18 (250x4,6; 5µm) kolonu ile 25 °C’de, 1 mL dk<sup>-1</sup> akış hızı ile 220 nm’de, ACN: Tampon, (60:40; h/h), pH:4,5’de yapılan tamsulosin (a), dutasterit (b) ve rilpivirin (IS) analizine ait kromatogram 63

- Şekil 3.12.** Xterra C18 (250x4,6; 5µm) kolonu ile 25 °C’de, 1 mL dk<sup>-1</sup> akış hızı ile 220 nm’de, ACN: Tampon, (60:40; h/h), pH:5,0’de yapılan tamsulosin (a), dutasterit (b) ve rilpivirin (IS) analizine ait kromatogram 63
- Şekil 3.13.** Xterra C18 (250x4,6; 5µm) kolonu ile 25 °C’de, 1 mL dk<sup>-1</sup> akış hızı ile 220 nm’de, ACN: Tampon, (60:40; h/h), pH:6,0’de yapılan tamsulosin (a), dutasterit (b) ve rilpivirin (IS) analizine ait kromatogram 65
- Şekil 3.14.** Xterra C18 (250x4,6; 5µm) kolonu ile 25 °C’de, 1 mL dk<sup>-1</sup> akış hızı ile 220 nm’de, ACN: Tampon, (60:40; h/h), pH:7,0’de yapılan tamsulosin (a), dutasterit (b) ve rilpivirin (IS) analizine ait kromatogram 64
- Şekil 3.15.** 45°C’de, , 220 nm’de, ACN: Tampon, (60:40; h/h), pH:7,0, Kinetex C18 (150x4,6; 5µm) kolonu ile 0,5 mL dk<sup>-1</sup> akış hızı ile yapılan tamsulosin (a), dutasterit (b) ve rilpivirin (IS) analizine ait kromatogram 65
- Şekil 3.16.** 45°C’de, , 220 nm’de, ACN: Tampon, (60:40; h/h), pH:7,0, Kinetex C18 (150x4,6; 5µm) kolonu ile 0,75 mL dk<sup>-1</sup> akış hızı ile yapılan tamsulosin (a), dutasterit (b) ve rilpivirin (IS) analizine ait kromatogram 65
- Şekil 3.17.** 45°C’de, , 220 nm’de, ACN: Tampon, (60:40; h/h), pH:7,0, Kinetex C18 (150x4,6; 5µm) kolonu ile 1,0 mL dk<sup>-1</sup> akış hızı ile yapılan tamsulosin (a), dutasterit (b) ve rilpivirin (IS) analizine ait kromatogram 65
- Şekil 3.18.** 45°C’de, , 220 nm’de, ACN: Tampon, (60:40; h/h), pH:7,0, Kinetex C18 (150x4,6; 5µm) kolonu ile 1,5 mL dk<sup>-1</sup> akış hızı ile yapılan tamsulosin (a), dutasterit (b) ve rilpivirin (IS) analizine ait kromatogram 66
- Şekil 3.19.** 45°C’de, , 220 nm’de, ACN: Tampon, (60:40; h/h), pH:7,0, Kinetex C18 (150x4,6; 5µm) kolonu ile 2,0 mL dk<sup>-1</sup> akış hızı ile yapılan tamsulosin (a), dutasterit (b) ve rilpivirin (IS) analizine ait kromatogram 66
- Şekil 3.20.** 45°C’de, , 220 nm’de, ACN: Tampon, (60:40; h/h), pH:7,0, Kinetex C18 (150x4,6; 5µm) kolonu ile 2,5 mL dk<sup>-1</sup> akış hızı ile yapılan tamsulosin (a), dutasterit (b) ve rilpivirin (IS) analizine ait kromatogram 66
- Şekil 3.21.** 45°C’de, , 220 nm’de, ACN: Tampon, (60:40; h/h), pH:7,0, Kinetex C18 (150x4,6; 5µm) kolonu ile 3,0 mL dk<sup>-1</sup> akış hızı ile yapılan tamsulosin (a), dutasterit (b) ve rilpivirin (IS) analizine ait kromatogram 67
- Şekil 3.22.** 1 mL dk<sup>-1</sup> akış hızı ile 220 nm’de, ACN: Tampon, (60:40; h/h), pH:7,0, X Terra C-18 (250 x 4,6; 5µm) kolonu ile 25°C’de, yapılan tamsulosin (a), dutasterit (b) ve rilpivirin (IS) analizine ait kromatogram 69

- Şekil 3.23.** 1 mL dk<sup>-1</sup> akış hızı ile 220 nm’de, ACN: Tampon, (60:40; h/h), pH:7,0, X Terra C-18 (250 x 4,6; 5µm) kolonu ile 35°C’de, yapılan tamsulosin (a), dutasterit (b) ve rilpivirin (IS) analizine ait kromatogram 69
- Şekil 3.24.** 1 mL dk<sup>-1</sup> akış hızı ile 220 nm’de, ACN: Tampon, (60:40; h/h), pH:7,0, X Terra C-18 (250 x 4,6; 5µm) kolonu ile 45°C’de, yapılan tamsulosin (a), dutasterit (b) ve rilpivirin (IS) analizine ait kromatogram 70
- Şekil 3.25.** Tamsulosin için yapılan hızlandırılmış bozundurma çalışmalarına ait kromatogramlar a) HCl (0,1 M); b) NaOH (0,1 M); c) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (%3); d) Isıtma 100 °C; e) HCl (1 M); f) NaOH (1 M); h) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (%30); g) 24 Saat Etüv’de Bekletme 72
- Şekil 3.26.** Dutasterit için yapılan hızlandırılmış bozundurma çalışmalarına ait kromatogramlar a) HCL (0,1 M); b) NaOH (0,1 M); c) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (%3); d) Isıtma 100°C; e) HCl (1 M); f) NaOH (1 M); g) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (%30); h) 24 Saat Etüv’de Bekletme 73
- Şekil 3.27.** Kalibrasyon sonuçları; rilpivirin (IS) (10 µg mL<sup>-1</sup>), tamsulosin (a) ve dutasterit (b) (10, 30, 40, 50, 100 µg mL<sup>-1</sup>) 75
- Şekil 3.28.** 45°C’de, , 220 nm’de, ACN: Tampon, (60:40; h/h), pH:7,0, Kinetex C18 (150x4,6; 5µm) kolonu ile 2,0 mL dk<sup>-1</sup> akış hızı ile idrarda yapılan tamsulosin (a), dutasterit (b) ve rilpivirin (IS) analizine ait kromatogram 76
- Şekil 3.29.** 45°C’de, , 220 nm’de, ACN: Tampon, (60:40; h/h), pH:7,0, Kinetex C18 (150x4,6; 5µm) kolonu ile 2,0 mL dk<sup>-1</sup> akış hızı ile plazmada yapılan tamsulosin (a), dutasterit (b) ve rilpivirin (IS) analizine ait kromatogram 77

## ÇİZELGELER

<b>Çizelge 1.1.</b> Prostat tedavisinde kullanılan etken maddelerin sınıflandırılması	10
<b>Çizelge1.2.</b> Prostat tedavisinde kullanılan etken maddelerin Türkiye'deki preparatları	11
<b>Çizelge 1.3.</b> Yurt dışındaki Tamsulosin ve Dutasterit içeren ticari preparatlar	11
<b>Çizelge 1.4.</b> Tamsulosin ve dutasteritin YPSK kullanılarak yapılmış analizleri	12
<b>Çizelge 1.5.</b> Piyasada bulunan core-shell parçacıklı kolonlar ve özellikleri ( Ruiz ve ark., 2015)	33
<b>Çizelge 2.1.</b> Çalışılan bileşikler ve özellikleri	41
<b>Çizelge 3.1.</b> Sistem Uygunluk Parametreleri Kullanarak Sabit Fazların Karşılaştırılması	59
<b>Çizelge 3.2.</b> Sistem parametrelerine göre akış hızlarının optimizasyon sonucu	68
<b>Çizelge 3.3.</b> Optimize edilen koşullar	70
<b>Çizelge 3.4.</b> Sistem uygunluk parametreleri	71
<b>Çizelge 3.5.</b> Hızlandırılmış Bozundurma Çalışmalarına ait Sonuçlar	74
<b>Çizelge 3.6.</b> Validasyon parametreleri ve kalibrasyon sonuçları	75
<b>Çizelge 3.7.</b> Tamsulosin ve Dutasterit'in idrar ve plazmadan elde edilmiş sonuçları	77



## 1. GİRİŞ

Prostat yani Benign Prostat Hiperplazisi (BPH), özellikle 50 yaş üzeri erkek popülasyonunda çok sık karşılaşılan bir sağlık problemidir. Uzun süre yaşayan hemen her erkekte mevcut olan histolojik bir tanıdır. Kısaca açıklanması gerekirse mesanenin hemen altında, yer alan küçük beze prostat denir. İdrarın mesaneden vücut dışına atılmasını sağlayan idrar kanalını çevreler. Spermin içinde taşındığı semen sıvısını üretmekle yükümlüdür. BPH, prostat bezinin iyi huylu büyümesini ve bu büyümenin sebep olduğu idrar akımıyla ilgili problemleri tanımlar. Yaşlanma ve testosteron varlığı prostat büyümesi için gerekli olan faktörlerdir. Tedavisi için medikal ve cerrahi yöntemler olmak üzere iki farklı alternatif bulunmaktadır. Bunlardan medikal tedavi olarak nitelendirilen ilaç tedavisi büyümeyi tamamen ortadan kaldırmamakla beraber idrar kanalının genişleyip rahatlatılmasını ve yaşam kalitesini arttırmayı amaçlar. İlaç tedavisinden yanıt alınamayan durumlarda ise cerrahi tedaviler uygulanmaktadır. Tedavi edilmediği sürece idrar yolu enfeksiyonlarına ve ilerleyen basamaklarda da böbrek yetmezliğine yol açabilmektedir. Bunun yanı sıra BPH hastalarının yaşlı bir grup olmaları ve bunlarda cerrahi morbiditesinin göreceli yüksekliği nedeniyle medikal tedavi de önem taşımaktadır. Tedavisi için alfa redüktaz inhibitörleri ve alfa reseptör blokörleri kullanılmaktadır (Sayan, 2005).

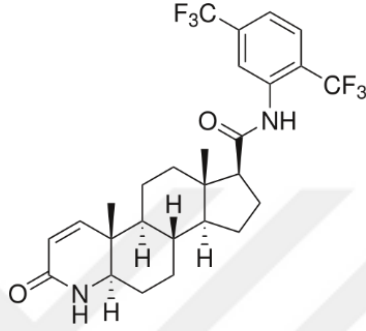
Alfa redüktaz inhibitörleri androjen baskılayıcı nitelikte bir tedavidir. Daha öncelerde kullanılan antiandrojenlerin yan etkilerinin fazlalığı dolayısıyla tedavilerde tercih edilmemişlerdir. Bunlara alternatif olarak 5 alfa redüktaz inhibitörü olan finasterit ve Dutasterit gibi etkin maddeler kullanılmaya başlanmıştır. Ayrıca BPH de idrar akımının bozulmasında iki bileşen önemlidir. Bunlar büyüyen prostata bağlı mesane çıkım obstrüksiyonunun nedeni olan statik ya da anatomik bileşen, diğeri BPH'ya bağlı artan üretral düz kas tonusunun ve vezikal kas işlev bozukluğunun neden olduğu dinamik bileşendir. Alfa blokörler daha çok dinamik komponenti hedef

almaktadırlar. Mesane boynu ve prostat yoğun biçimde alfa reseptör içerirken, detrüörde çoğunlukla muskarinik ve beta reseptörler vardır. Bu yüzden alfa blokörler detrüör kontraksiyonuna etkimeksizin prostatik üretra basıncını azaltırlar. Klinik yarar doza bağımlıdır. Klinik etkileri hızlı ve kalıcıdır. İlaç kesildiğinde belirtiler geri döner (Güvel ve ark., 2000).

Yukarıda bahsi geçen iki ilaç sınıfının kombinasyonunu içeren tedavilerin mono terapilerden daha etkin olduğu görülmektedir. Çalışma kapsamında prostat tedavisinde kullanılan Tamsulosin (TAM) ve Dutasterit (DUT) (Şekil 1.1 ve Şekil 1.2) tayini için duyarlı, hızlı, hassas, kesin, daha çevreci ve tamamen validasyonu yapılmış yüksek performanslı sıvı kromatografisi (YPSK) yöntemi geliştirilecektir. Bu yöntemler kullanarak bahsi geçen ilaç etken maddelerinin analizi için uygun koşulların geliştirilip belirlenmesi, bu ortamda miktar tayini yapılması, belirme ve tayin limitleri, tekrar edilebilirlik gibi tüm gerekli validasyon parametrelerinin elde edilmesi de amaçlanmıştır. Bunun yanı sıra in vitro şekilde biyolojik sıvılardan da (plazma ve idrar) analizler gerçekleştirilecektir.

## 1.1.Çalışmada Kullanılacak Maddelerin Özellikleri

### 1.1.1. Dutasterit



Şekil 1.1. Dutasteritin kimyasal yapısı

#### 1.1.1.1. Kimyasal Yapısı

Kapalı formülü,  $C_{27}H_{30}F_6N_2O_2$  ve açık formülü (5alfa,17beta)-N-{2,5 bis(triflorometil)fenil}-3-oxo-4-azaandrost-1en-17-karboksamid olup, molekül ağırlığı 528,53'tür. Dutaserid beyaz ya da sarımsı beyaz renkte bir tozdur. Suda çözünmez. Etanol, metanol ve polietilen glikol 400'de kolayca çözünür. 25°C'nin altındaki oda sıcaklığında ve sıkıca kapalı kaplarda saklanmalıdır (Üstünes, 2016).

### **1.1.1.2.Tanımı**

Dutasterit elli yaşın üzerindeki erkeklerin çoğunda görülen bir durum olan semptomatik selim prostat hiperplazisinin (BPH) tedavisinde oral yoldan kullanılan bir ilaçtır. Testosteronun 5-alfa-dihidrotestosterona (DHT) dönüşümünü katalize eden bir hücre içi enzim olan tip I ve II 5-alfa redüktaz enziminin selektif inhibitörüdür. Bu grupta yer alan onaylı diğer ilaç finasterit ise esas olarak sadece tip II 5-alfa redüktaz enzimini inhibe eder. Dutasteritin etkinliği finasterit'e göre daha fazladır ve eşit etkin dozlarda DHT'de daha fazla düşme sağlar. DHT derişimlerinde sağladığı azalma iki haftada %90 ve iki yılda %93 kadardır. DHT derişimindeki azalma prostat büyüklüğünde azalma, idrar akış hızında iyileşme, akut üriner retansiyon ve ameliyat riskinde azalma ile ilişkilidir. Selim prostat hiperplazisinin tedavisi için dutaserid ve alfa-blokörlerin birlikte kullanılmasına ilişkin deneyim yoktur. Dutaserid semptomatik selim prostat hiperplazisinin tedavisi için onaylanmıştır ve halen erkek tipi dazlaklığın (androjenetik alopesi) tedavisi için araştırılmaktadır. Dutaserid FDA (Food and Drug Administration) tarafından ilk kez 21 Kasım 2001'de onaylanmıştır (Üstünes, 2016).

### **1.1.1.3. Etki Mekanizması**

Prostat dokusunun gelişimini stimüle eden esas androjen 5-alfa-dihidrosteron (DHT)'dur. Dutaserid, testosteron'un 5-alfa-dihidrosteron (DHT)'ye dönüşümünü inhibe eder. Bu dönüşümden sorumlu olan enzim 5-alfa-redüktazdır. Bir intraselüler enzim olan 5-alfa-redüktazın tip I ve tip II olmak üzere iki izoformu mevcuttur. Tip II izoenzimi esas olarak üreme dokusunda (örneğin; prostat, seminal veziküller, epididimis) etkinlik gösterir ve dolaşımdaki DHT'nin üçte ikisini oluşturur. Tip I izoenzimi çoğunlukla deri ve karaciğerde aktiftir. Dutaserid selim prostat hiperplazisinin tedavisi için kullanıldığında, DHT miktarını düşürerek prostat

hipertrofisini azaltır ve idrar akışını iyileştirir. Erkek tipi saç dökülmesinde, dazlak kafa derisi minyatürize saç folikülleri içerir ve saçlı kafa derisine göre daha fazla DHT içerir. Dutaserid kafa derisi ve serum DHT derişimlerini azaltır ve böylece genetik yatkınlığı olan kimselerde androjenetik alopesi gelişimi bakımından anahtar nitelikteki bir faktörü engeller. Dutaserid insanlarda androjen reseptörlerine bağlanmaz (Üstünes, 2016).

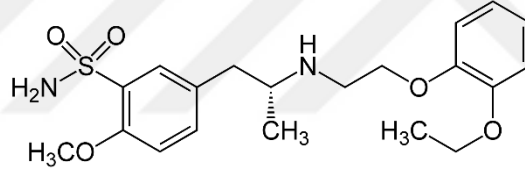
Dutasteritin farmakodinamik etkileri serum DHT düzeyinde azalma, total testosteron miktarında artma, tiroid-stimüle edici hormon (TSH) düzeyinde yükselme ve total serum prostat spesifik antijen (PSA) düzeyinde azalma şeklinde sayılabilir. Dutasterit sağlıklı gönüllülerde dolaşımda bulunan seks hormonu bağlayan globulin, estradiol, luteinleyici hormon, folikül-stimüle edici hormon, tiroksin (serbest T4) ve dehidroepiandrosteron derişimlerini değiştirmez. Hipotalamik-hipofizer-testiküler-ekseni etkilemez (Üstünes, 2016).

#### **1.1.1.4.Farmakokinetik**

Dutasterit oral yoldan kullanılır. Oral yoldan verildiğinde kısa bir dağılım fazının ardından hızla absorbe olur. Serum doruk derişimleri 2–3 saat içerisinde ortaya çıkar. Dutasteritin biyoyararlanımı yaklaşık %60 olarak hesaplanmıştır (%40–94 arası). Yiyeceklerle alındığında  $C_{maks}$  değeri %10–15 oranında azalır, fakat bunun klinik bir önemi yoktur. Sistemik dolaşıma girdiğinde, yaklaşık %99'u albumine ve alfa1-asit glikoproteine bağlanır. Dutaserit vücutta geniş ölçüde dağılır. Karaciğerde CYP3A4 enzimi ile metabolize olur. İki minör mono-hidroksilli metaboliti ve 3 ana metaboliti tanımlanmıştır. Bunlardan sadece biri ana ilaçla kıyaslanabilir aktivite gösteren 6-beta-hidroksidutasterit metabolitidir. Dutasterit ve metabolitleri esas olarak feçesle elimine edilirler (%5 değişmemiş ilaç ve %40'ı metabolitleri halinde). İdrarla atılan değişmemiş dutasterit eser miktardır (<1%). Verilen dozun %55'inin

akibeti bilinmemektedir. Kararlı durumdaki dutasterit (ortalama 40 ng mL<sup>-1</sup>) derişiminin terminal yarı-ömrü yaklaşık 5 haftadır. Günde 0,5 mg dozda verildiğinde 1 ay sonunda kararlı derişiminin %65'ine ve 3 ay sonra ise %90'ına ulaşır. Semen ve serumda kararlı derişimlerine yaklaşık 6 ayda ulaşır. Sağlıklı deneklerde 1 yıllık tedavi sonunda semedeki ortalama derişimi serum derişiminin %1,5'u kadardır. Yarı ömrünün uzun olması nedeniyle, serum dutaserid derişimleri tedaviye son verilmesinden sonra 4–6 süreyle saptanabilir sınırlar içinde (>0,1 ng mL<sup>-1</sup>) kalır. Dutaserid'in farmakokinetiği 18 yaşın altındaki hastalarda değerlendirilmemiştir. İrkin ilacın farmakokinetiği üzerindeki etkileri incelenmemiştir (Üstünes, 2016).

### 1.1.2. Tamsulosin



Şekil 1.2 Tamsulosinin kimyasal yapısı

#### 1.1.2.1. Kimyasal Yapısı

Kapalı formülü, C<sub>20</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>S ve açık formülü (-)-(R)-5-[2-[[2-(2-Etoksifenoksi)etil]-amino]propil]-2-metoksibenzen sülfonamid, monohidroklorür olup, molekül ağırlığı 408,56'dır. Tamsulosin hidroklorür 230°C'de eriyen beyaz kristaller halinde bulunur. Su ve etanolde az çözünür; glasiyal asetik asit ve etanolde hafifçe çözünür; eterde pratik olarak çözünmez. Tamsulosin 20–25°C arasındaki oda sıcaklığında saklanmalıdır (Üstünes, 2016).

### 1.1.2.2.Tanım

Tamsulosin selim prostat hiperplazisi (BPH)'nin tedavisi için oral yoldan günde tek doz halinde kullanılan bir  $\alpha$ -adrenerjik reseptör blokördür. Tamsulosin prostat bezinde bulunan  $\alpha$ -adrenerjik reseptörler üzerinde diğer  $\alpha$ -adrenerjik reseptör blokörlerine göre daha spesifik aktivite gösterdiği için daha az hipotansiyon yapar. Bu nedenle, diğer  $\alpha$ -adrenerjik reseptör blokörlerinin dozu ilk-doz etkisine bağlı aşırı cevap riskini azaltmak amacıyla yavaş yavaş artırılarak titre edilirken tamsulosin tedavisi optimum dozla başlatılabilir. Ayrıca, atenolol, enalapril ve nifedipin ile birlikte kullanıldığında önemli interaksiyon görülmemesi nedeniyle, tamsulosin hem selim prostat hiperplazisi hem de hipertansiyon sorunu olan hastalarda daha güvenli bir ilaçtır. Bununla birlikte tamsulosin hipertansiyon tedavisinde endike değildir ve diğer  $\alpha$ -adrenerjik reseptör blokörleri ile birlikte kullanılmamalıdır (Üstünes, 2016).

### 1.1.2.3.Etki mekanizması

Tamsulosin selektif bir  $\alpha_1$ -adrenerjik reseptör blokörüdür;  $\alpha_1$ -adrenerjik reseptörler üzerinde selektif antagonist aktivite gösterir.  $\alpha_1$ -adrenerjik reseptörler düz kasın kasılması ile ilişkilidirler ve prostat, prostat kapsülü, üretranın prostat içinde kalan bölümü ve mesane boynunda bol miktarda bulunurlar.  $\alpha_1$ -adrenerjik reseptörlerin  $\alpha_1A$ ,  $\alpha_1B$  ve  $\alpha_1C$  olmak üzere üç farklı alt tipi tanımlanmıştır. Bunlardan  $\alpha_1A$ -reseptörleri insan prostat düz kasının kasılmasından,  $\alpha_1B$ - ve  $\alpha_1C$ -reseptörleri ise vasküler düz kasın kontraksiyonlarından sorumludur. Prostat bezinde hem  $\alpha_1A$ - hem de  $\alpha_1B$ - reseptörleri bulunur; insan prostatındaki  $\alpha$ -reseptörlerin yaklaşık %70'i  $\alpha_1A$  alt tipidir. Tamsulosin  $\alpha_1B$ -reseptörleri ile karşılaştırıldığında  $\alpha_1A$ -reseptörlerine karşı 7–38 kat daha yüksek aktivite gösterir. Bu reseptörlerin tamsulosin tarafından bloke edilmesi mesane boynunda bulunan düz kasları gevşetir.

Sonuçta prostatın gevşemesine bağlı olarak idrarın akış hızı artar ve selim prostat hiperplazisinin semptomları azalır (Üstünes, 2016).

#### **1.1.2.4.Farmakokinetik**

Tamsulosin oral yoldan verilir. Oral yoldan aç karnına verildiğinde hemen hemen tama yakın (> 90%) absorbe olur. Tok karnına veya yemekle birlikte alınması biyoyararlanımında %30 azalmaya yol açar. Plazmada doruk derişimine ( $T_{maks}$ ) ulaşma süresi aç karnına alındığında 4–5 saat, tok karnına alındığında 6–7 saattir. Tamsulosin sistemik dolaşımında başta  $\alpha$ 1-asitglikoprotein olmak üzere plazma proteinlerine kapsamlı olarak (%94–98) bağlanır. Tamsulosin karaciğerdeki sitokrom P450 enzim sistemi tarafından metabolize edilir, fakat spesifik enzim sistemi tanımlanmamıştır. Metabolitleri idrarla atılıma uğramadan önce büyük ölçüde glukuronit ve sülfatla konjugasyona uğrarlar. Verilen dozun %10'dan azı idrarda değişmeden atılır. İlacın gönüllülerdeki eliminasyon yarı ömrü yaklaşık  $14,9 \pm 33,9$  saattir (Üstünes, 2016).

#### **1.1.3. Dutasterit ve Tamsulosin Kombinasyonunun Özellikleri**

Dutasterit ve tamsulosin kombinasyonu prostat büyümesi olan erkeklerde semptomatik selim prostat hiperplazisinin tedavisinde kullanılan iki etkin madde içerir. Dutasterit ve tamsulosinin kombine kullanımı, Alfa-Blokör Tedaviyiyle Kombinasyon çalışmasında incelenmiştir. Bu çalışmada, dutasterit ve tamsulosin kombinasyonu (n = 1611), sadece dutasterit (n = 1623) ya da sadece tamsulosin ile (n = 1611) karşılaştırılmıştır. Çalışmada, 4 yıllık süre için göreceli akut üriner retansiyon, selim prostat hiperplazisi nedeniyle cerrahi girişim ve selim prostat



hiperplazisinin ilerlemesi gibi risklerin azaltılmasında kombinasyon tedavisinin mi, yoksa tek ilaçla tedavinin mi daha etkili olduğu araştırılmıştır. Araştırmanın sonuçları, selim prostat hiperplazisi ve prostat büyümesine bağlı orta-ağır düzey alt idrar yolu semptomları olan ve hastalığın ilerleme riskinin bulunduğu erkeklerde dutasterit ve tamsulosin kombinasyonunun uzun erimli olarak kullanımını desteklemektedir. FDA, prostat büyümesi olan erkeklerde dutasterit ve tamsulosinin kombine kullanımını selim prostat hiperplazisinin semptomatik tedavisinde kullanılmak üzere Haziran 2008'de onaylanmıştır. FDA, her iki etkin maddeyi birlikte içeren kombine tek-kapsül şeklinde ticari farmasötik formu Jalyn'i Haziran 2010'da onaylamıştır (Üstünes, 2016).

#### **1.1.3.1.Etki Mekanizmaları**

Dutasterit - tamsulosin kombinasyonu selim prostat hiperplazisi olan hastalarda görülen semptomları farklı mekanizmalarla düzelten iki ilacın kombinasyonudur. Dutasterit bir 5-alfa-redüktaz inhibitörü, tamsulosin ise bir alfa-1a-adrenoreseptör antagonistidir (Üstünes, 2016).

#### **1.1.3.2.Farmokokinetik**

Dutasterit - tamsulosin kombinasyonu ağız yoluyla kullanılır. Kombinasyonda bulunan dutasterit ve tamsulosinin farmakokinetik özellikleri, ayrı olarak uygulanan dutasterit ve tamsulosinin farmakokinetik özellikleriyle benzeştir (Üstünes, 2016).

Karaciğer disfonksiyonu olan hastalarda dutasterit; tamsulosin kombinasyonu için spesifik farmakokinetik çalışmalar yapılmamıştır. Aşağıdaki bilgiler herbir etkin madde için verilmektedir. Karaciğer fonksiyon bozukluğunun dutasteritin farmakokinetik özellikleri üzerine etkileri incelenmemiştir. Bununla birlikte, büyük ölçüde karaciğerde metabolize edilen bir ilaç olan dutasterite maruziyet karaciğer fonksiyon bozukluğu olan hastalarda artabilir. Kararlı düzeyde dutasteritin yarı ömrü yaklaşık 5 haftadır, karaciğer fonksiyonları bozulmuş olan hastalarda ilaç dikkatli bir şekilde uygulanmalıdır. Orta düzey karaciğer fonksiyon bozukluğu (Child-Pugh sınıflandırması A veya B), tamsulosinin bağlı olmayan (aktif) fraksiyonunun derişimi üzerinde belirgin etki oluşturmaz. Sadece, bağlı olmayan tamsulosinin intrinsik klirensinde makul düzeyde (%32) değişiklik görülmüştür. Tamsulosinin farmakokinetik özellikleri ağır karaciğer yetmezliği olan hastalarda incelenmemiştir (Üstünes, 2016).

**Çizelge 1.1.** Prostat tedavisinde kullanılan etken maddelerin sınıflandırılması

<b>Alfa-Adrenoreseptör Antagonistleri</b>	<b>Testosteron–5-Alfa Redüktaz İnhibitörleri</b>	<b>Erektile disfonksiyonda kullanılan ilaçlar</b>	<b>Prostatda kullanılan diğer etken maddeler</b>
Tamsulosin	Finasterit	Tadalafil	Cüce palmye
Doksazosin mezilat	Dutasterit		
Terazosin hidroklorür			
Alfuzosin hidroklorür			
Silodosin			

**Çizelge 1.2.** Prostat tedavisinde kullanılan etken maddelerin Türkiye’deki preparatları

<b>Etken madde isimleri</b>	<b>Türkiye’deki preparatları</b>				
<b>Tamsulosin</b>	Flomax	Floprost	Tamidra	Tamprost	Üromax
<b>Doksazosin mezilat</b>	Doksura	Cardura	Kardozin		
<b>Terazosin hidroklorür</b>	Hytrin	Teranar			
<b>Alfuzosin hidroklorür</b>	Xalfu	Xatral			
<b>Silodosin</b>	Urorec				
<b>Finasterit</b>	Alofin	Dilaprost	Propecia	Proscar	Prosterit
<b>Dutasterit</b>	Avodart	Dutapros			
<b>Tadalafil</b>	Cialis	Lifta	Afilta	Longivo	
<b>Cüce palmye</b>	Prostagood				

**Çizelge 1.3.** Yurt dışındaki Tamsulosin ve Dutasterit içeren ticari preparatlar

Tamsulosin	Dutasterit	Tamsulosin ve Dutasteritin beraber kullanıldığı preparatlar
Urisurge	Avodart	Jalyn
Flomax	Avidart	Combodart
Flomaxtra	Avolve	Duodart
Contiflo XL	Duagen	
Bestflo	Dutas	
Urimax	Dutagen	
Pradif	Duprostat	

## 1.2. Tamsulosin ve Dutasterit ile Yapılan Çalışmalar

Aşağıdaki Çizelge 1.4’de Tamsulosin ve Dutasterit ile yapılan çalışmalar verilmiştir.

**Çizelge 1.4.** Tamsulosin ve dutasteritin YPSK kullanılarak yapılmış analizleri

Metod	Etken madde	Kolon	Dedektör	Hareketli Faz	Analiz süresi (dk)	Sistem uygunluk parametreleri				Validasyon					Uygulama	Literatür
						Rs	$\alpha$	N	T	Doğrusallık ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	TS ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	TAS ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Kesimlik (BSS %)	Doğruluk %		
YPSK	Tamsulosin Dutasterit	Phenomenex C18 kolonu (150 × 4,6 mm ,5 $\mu\text{m}$ )	UV	Metanol:su (80:20, % h/h)	-	-	-	-	-	12-36 15-45	0,002 0,0105	0,006 0,032	-	-	FP	Gegenava ve ark.2014
YPSK	Dutasterit	Symmetry C18 (4,6 × 150mm, 5 $\mu\text{m}$ , XTerra)	UV	Asetonitril: fosfat tamponu (80:20, % h/h)	7	2,9	1,1 21	5859	1,0 48	25-125	0,5	0,1	0,1 95	98,87 - 100,31	plazma	Sravan ve ark 2014
YPSK	Dutasterit Tamsulosin	Waters C-18 kolonu (250mm × 4,6 mm, 5 $\mu\text{m}$ )	UV	Asetonitril : su (90:10, h/h)	-	- 10	1,6 1,7	5765 6524	1,0 0,9	50-150 40-120	0,00017 0,00021	0,0005 0,0007	0,3 0,4	-	plazma	Mohammed 2014

**Çizelge 1.4. Devam.** Tamsulosin ve dutasteritin YPSK kullanılarak yapılmış analizleri

YPSK	Silodosin Dutasterit	Zorbax SB C8 kolonu ( 250 mm × 4,6 mm , 5 µm )	UV	Dipotasyum hidrojen fosfat tamponu:metanol:asetonitril (20:40:40,h/h/h) pH: 3,0	8,5	-	1,5 1,2	4693 8562	-	39,56 - 118,68	9,58 2,43 -	95,8 7,3	0,2 0,4	99,7 - 101,9 99,3 -	plazma	Shah ve ark 2014
YPSK	Tamsulosin Tolterodin	Hypersil BDS C18, (100 x 4,6 mm, 5µm)	UV	Fosfat tamponu;Asetonitril (65:35, h/h) pH: 3,8	4,5	-	-	-	-	1-6 10-60	0,105 0,859	0,318 2,603	0,5 0,6	98,40 - 100,42 98,16 - 99,76	FP	Siddartha ve ark 2014
YPSK	Tamsulosin Tolterodin	Inertsil ODS-V (250 × 4,6 mm, 5 µm)	UV	Asetonitril;amonyum asetat tamponu (60: 40, h/h)	8	7,5 -	0,9 0,8	7596 8332	-	0,2 - 0,6 2-6	0,004 0,003	0,013 ve 0,011	1,6 0,9	102,52 - 104,4 92,79 - 97,15	FP	Mhamunkar ve ark 2012
YPSK	Tamsulosin Dutasterit	ACE C18 (250mm,4,6mm,5µm)	FDD	Potasyum dihidrojen ortofosfat;metanol(60:40, h/h) pH: 5,2	5,5	-	-	6276 9478	1,3 1,1	-	0,038 0,032	0,127 0,106	-	-	plazma	Sravan ve ark 2014

**Çizelge 1.4. Devam.** Tamsulosin ve dutasteritin YPSK kullanılarak yapılmış analizleri

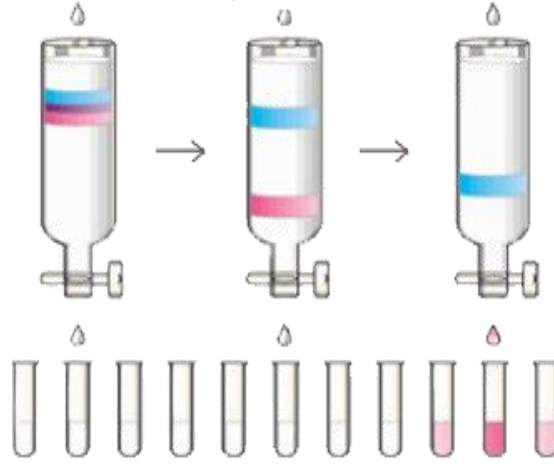
YPSK	Tamsulosin Finasterit	Phenomenex C 18	FDD	Metanol;amonyum asetat tamponu;trietilamin (79,9 :20:0,1, h/h/h)	5,5	2,9 5,3	1,1 1,3	2800 4918	1,2 1,2	0,5-16 1-5	0,2 0,5	0,5 1	0,4 0,4	99,9 100,0	Plazma	Patel ve ark 2010
İTK	Tamsulosin Finasterit	Tabaka: aluminyum- silika jel 60 F254	UV	Metanol;amonyum asetat tamponu;trietilamin (79,9 :20:0,1, h/h/h)	-	-	-	-	-	0,1-2 0,25-5	0,08 0,2	0,1 0,25	0,5 0,6	98,9 99,6	plazma	Patel ve ark 2010
YPSK	Dutasterit	Phenomenex C <sub>18</sub> kolonu (250 mm, 4,6 mm, 5 µm)	FDD	Metanol:su (90:10, h/h)	6,0	2,9	1,1	5859	1,04 8	1-12	0,5	1	0,1 95	98,87 - 100,31	plazma	Patel ve ark 2010
YPSK	Tamsulosin Dutasterit	Kinetex C18 (150x4,6; 5µm)	UV	Asetonitril:su, (60: 40, h/h) pH: 7,0	3,0	- 16,1	- 3,2	2874 10950	1,1 1,1	0,5-200 0,5-200	0,045 0,038	0,138 0,116	1,2 1,1	99,45 - 103,35 100,7 - 100,9	Plazma İdrar	Tez çalışması

### 1.3. Kromatografi

Kromatografi, fiziksel ve kimyasal özellikleri bakımından benzer maddelerin, karışımların birbirinden ayrılmasını, tanınmasını ve tayinini sağlayan, birçok yöntemi kapsayan yöntemlere verilen genel isimdir (Skoog, 1998).

Kromatografi ilk 1906 yılında bir Rus botanist olan Tswett tarafından nebatların renk verici komponentlerinin tayininde kullanılmıştır. Yaptığı çalışmada yapraklardaki klorofil maddesinin renklerine ayırmayı, CaCO<sub>3</sub> kolon ve petrol eteri kullanarak başarmıştır. Bu yüzden Latinceye renk anlamına gelen Chromo ismini kullanmıştır. Tswett renkli maddelerin ayrı bandlarını elde ettiği için metodunu «kromatografi» olarak isimlendirmiştir. Daha sonra birçok bilim adamı bu alanda çalışmalar yapmıştır. Bu bilim adamlarından Ismailov ve Shraiber 1938 yılında ilk olarak İnce Tabaka Kromatografi ile çalışmalar yapmıştır. Daha sonra 1941 yılında Martin ve Synge Gaz kromatografisi sistemi ve Sıvı kromatografi sistemi üzerine yaptığı çalışmalarla Nobel ödülü kazanmıştır. 1952 yılında ise Martin ve James Gaz kromatografisi cihaz ile ilk yayını sunmuştur. Bu çalışmalardan sonra kromatografi 1952 ve 1960 yıllar arasında hızlı bir şekilde gelişerek Analitik teknikler arasında önemli bir yer almıştır (Gumustas ve Ozkan, 2011).

Kromatografik metotların tümünde bir sabit faz ve bir de hareketli faz bulunmaktadır. Bir kolon veya düz bir yüzeyde tutturulmuş faza sabit faz; sabit faz üzerinden veya arasından geçen ve analiti içeren faza hareketli faz denir. Karışımdaki bileşenler, akış halindeki gaz veya sıvı fazla sabit faz üzerinden geçirilir; kromatografik ayırma, bileşenlerin göç hızlarına bağlı olarak gerçekleşir (Şekil 1.3) (Gumustas ve Ozkan, 2011).



**Şekil 1.3.** Kromatografik ayırımın genel olarak gösterilişi

Kromatografik ayırmada maddeler birbiriyle karışmayan iki faz arasında dağılırlar. Fazlardan birine hareketli faz diğereine ise sabit faz adı verilir. Bu iki fazın seçimi, örnek bileşenlerinin hareketli ve sabit fazlarda farklı oranlarda dağılımlarını hedefler. Örneğin kolon boyunca hareket etmesi sabit faz ve hareketli faz arasındaki kimyasal ve fiziksel dengeleri dağılımına bağlı olarak değişmektedir. Bunlar çözünürlük, elektron çifti alıcı-verici etkileşimler, iyonik etkileşimler ve hidrojen bağı oluşumu gibi olaylardır. Karışımındaki her maddenin alıkonma zamanı ( $t_R$ ); maddenin sabit veya hareketli faza olan ilgisine göre değişmektedir. Hareketli faza daha çok ilgisi olan maddeler daha hızlı hareket ederken, sabit faza daha çok ilgisi olan maddeler daha yavaş hareket ederler. Kolondan çıkan her maddenin derişim profili pik olarak adlandırılır, piklerin oluşturduğu tabloya da kromatogram denir (Hamilton ve ark., 1982; Bidlingmeyer, 1992).

Bir kantitatif analiz tekniği olan kromatografide amaç, anlamlı bir süre içinde iyi bir ayırma yapmaktır. Ayırmayı etkileyen parametreler aşağıdaki gibi özetlenebilir:

- Kolon ile ilgili olanlar (türü, boyutları)
- Hareketli faz ile ilgili olanlar (türü, bileşimi, akış hızı)
- Ölçüm ile ilgili olanlar (dedektör türü, dalga boyu vb. )
- Numune ile ilgili olanlar (numune derişimi, numune hacmi)



Kromatografik yöntemler hareketli fazın gaz ya da sıvı olmasına, sabit fazın katı ya da sıvı olmasına, kromatografik ayırımın mekanizmasına ve ayırma tekniğine göre isimlendirilirler (Adamovics, 1997; Skoog, 1998).

1. Adsorpsiyon Kromatografisi
2. İyon Çifti Kromatografisi
3. İyon Değişirme Kromatografisi
4. Eleme Kromatografisi
5. Dağılma Kromatografisi
  - 5.1. Ters-faz Sıvı Kromatografisi
  - 5.2 Normal-faz Sıvı Kromatografisi
  - 5.3 Hidrofilik Etkileşimli Sıvı Kromatografisi
6. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

Sıvı kromatografisi düzlemsel yüzeylere ve kolonlara uygulanabilen bir kromatografi tekniğidir.

Ters faz sıvı kromatografisi; çok sayıda organik bileşiği ayırabilme yeteneğinden dolayı tercihen sıklıkla kullanılan YPSK tekniğidir. Sabit faz apolardır, hareketli faz ise polar bir sıvıdır. Apolar materyallerin kolonda tutulması söz konusudur. Normal faz sıvı kromatografisinde sabit faz polar, hareketli faz ise apolar veya düşük polariteye sahiptir (Ozkan, 2012).

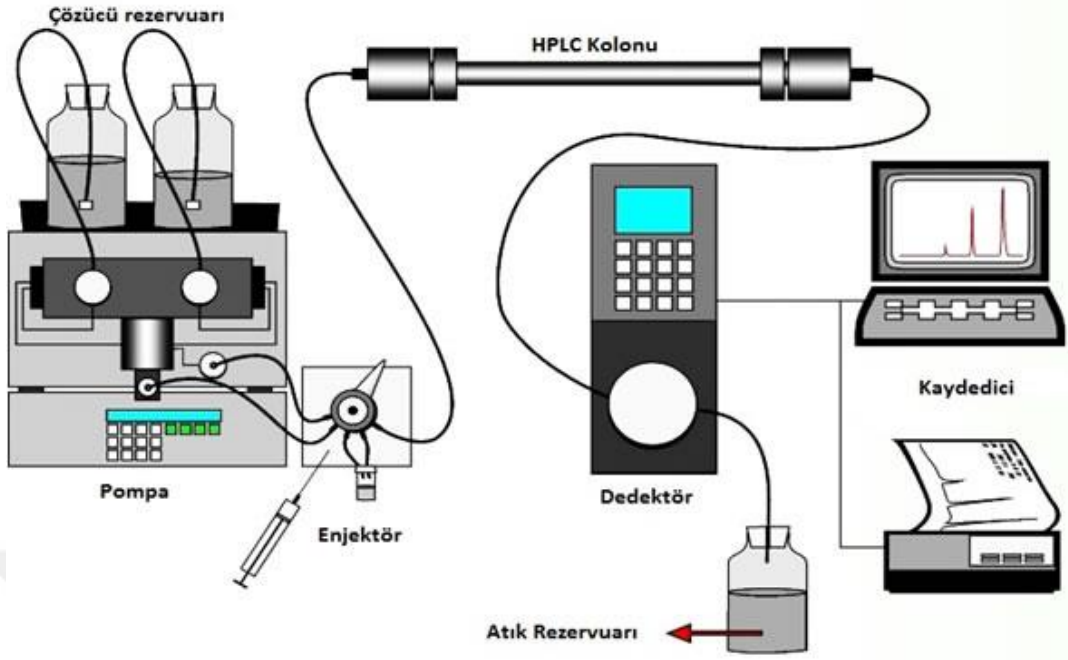
### 1.3.1. Ters faz kromatografisinin avantajları

- Normal faz kromatografide, sıvı fazın kontrolü çok önemlidir. Hareketli faz bileşimindeki küçük değişiklikler kromatogramda belirgin farklılıklara neden olabilmektedir.
- Dengeye ulaşma normal faz kromatografide, ters faz kromatografiye göre çok yavaştır.
- Normal faz kromatografide polar maddelerin elüsyonu çok yavaştır ve yayvan piklere sebep olmaktadır.
- Apolar çözücüler çok pahalıdır ve ayrıca nemden uzak tutmak oldukça zordur.

Hidrofilik etkileşim ise yeni bir teknik olup ters faz kromatografi ile normal faz kromatografisinin özelliklerini bir arada bulunduran bir tekniktir.

### 1.3.2. Sıvı Kromatografi Cihazları

YPSK için gerekli donanım, uygulanan yüksek basıncın bir sonucu olarak, diğer tip kromatografi sistemleri dikkate alındığında, daha ince işçilik gerektirir ve sonuçta daha pahalı bir cihazdır. Şekil 1.4'de yüksek performanslı sıvı kromatografi cihazı ve bu cihazın kısımları gösterilmektedir.



Şekil 1.4. YPSK Cihazı (Çetinkaya, 2015, s:7–16)

Sıvı kromatografisinin bu kadar yaygın olmasının sebepleri ise; duyarlılığı, doğru kantitatif tayinlere kolaylıkla uyarlanabilir olması, uçucu olmayan türlerin veya sıcaklıkla kolayca bozunabilen türlerin ayrılmasına uygun olması, birçok bilim dalı için ilk sırada tercih edilen bir yöntem haline gelmiştir.

YPSK'nin diğer kromatografi türlerinden üstünlükleri ise şunlardır:

- YPSK kolonu, rejenerasyon olmaksızın pek çok kez kullanılabilir.
- Bu teknik kullanıcının becerisine daha az bağımlıdır ve ayrıca tekrarlanabilirlik daha yüksektir.
- Nitel ve nicel analiz yapmak için kullanılabilir.
- Analizler oldukça kısa sürede tamamlanmaktadır.
- Duyarlılık çok yüksektir. 10 µg'lık bir örnek bile, floresans veya elektron yakalama dedektörleri kullanılarak tayin edilebilir düzeydedir.

### **1.3.2.1. Hareketli Faz Hazneleri ve Çözücü Sistemleri**

Bir YPSK cihazı, bir veya daha çok polimer bağlantı ekipmanı ile cam veya paslanmaz çelikten yapılmış hazne içermektedir. Bu hazneler çoğu zaman, çözücü haznelerde bulunabilecek tozları ve kolonda ve detektör sisteminde gaz oluşturarak bozucu etkilere sebep olan genellikle de çözünmüş oksijenin giderilmesi için bir cihaz ile donatılmıştır. Bu çözünmüş gazlar kolonda kabarcıklar oluşturarak kolonun yapısını bozabileceği gibi pik genişlemesine de sebep olmaktadır (Skoog, 1998; Hamilton, 1982).

### **1.3.2.2. Pompa**

Pompanın görevi hareketli fazın kolon boyunca akışını sağlamaktır. Kullanılan pompalar sabit hacim pompaları ve sabit basınç pompaları olmak üzere ikiye ayrılır (Skoog, 1998; Hamilton, 1982).

### **1.3.2.3 Enjektör**

YPSK analizlerinde ölçümlerin kesinliğini etkileyen faktör, numunenin kolon dolgu maddesine gönderilmesinin tekrarlanabilirliğidir. Aşırı numune yüklenmiş kolonlarda görülen bant genişlemesi de kesinliği etkileyen faktörlerdendir. Temel olarak, el ile ve otomatik olmak üzere iki tip enjektör mevcuttur. Otomatik enjeksiyon sistemleri analizciyi büyük bir zahmetten kurtararak ciddi bir zaman kaybının önlemektedir (Skoog, 1998; Hamilton, 1982).

### **1.3.2.4 Dedektörler**

Dedektör YPSK'de, cihazın en önemli kısımlarından birini oluşturur. Kolondan çıkan maddelerin derişimi kolon çıkışına yerleştirilen uygun bir dedektör ile ölçülmektedir. Genellikle tek dedektör sistemi kullanılmakla beraber, birden fazla dedektör sisteminin yer aldığı cihazlar da vardır (Skoog, 1998; Hamilton, 1982; Bidlingmeyer, 1992; Sewel, 1987; Meyer, 1988).

Genel olarak iki gruba ayrılırlar:

#### **1.3.2.4.1 Maddeye Yönelik Dedektörler**

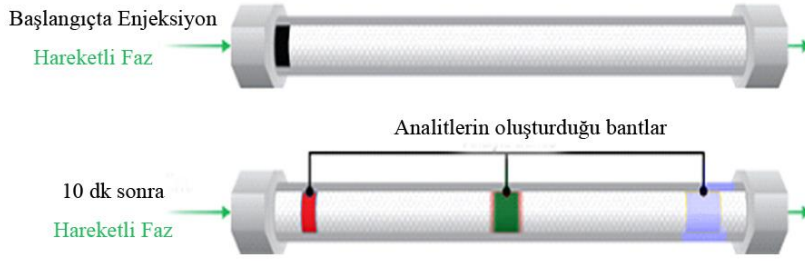
Hareketli faz içindeki maddenin özelliklerini tayin etmek için kullanılırlar. En yaygın kullanılan türleri ise; Fotometrik dedektörler (Floresans, Foto diyot dizi, Infrared), elektrokimyasal dedektörler, ayırım sonrası tepkime dedektörleri, radyoaktivite dedektörleri ve kütle spektrometreleridir (Ozkan, 2012).

#### **1.3.2.4.2 Çözeltiye Yönelik Dedektörler**

Örnek özelliklerinin ölçülmesine dayalı dedektörlerdir. Çözeltiye yönelik dedektörlere örnek olarak ise; refraktif indeks dedektörleri, dielektrik sabiti dedektörleri, iletkenlik dedektörleri, yoğunluk detektörleri verilebilir (Ozkan, 2012).

### 1.3.2.5. Kolon

Sıvı kromatografi kolonları bir YPSK cihazının en önemli parçasıdır ve genellikle paslanmaz çelikten imal edilir. Pek çok üretici tarafından üretilen analitik kolonlar 2–5 µm iç çaplı, 5–25 cm boyundadır. Tanecik çapları ise 2,5–10 µm arasında değişmektedir. Kolon dolgu maddeleri, film dolgular ve gözenekli dolgular olmak üzere iki tiptir. Sıvı kromatografisinde kullanılan en yaygın kolon dolgu maddeleri silisyum dioksittir (Ozkan ve ark., 2015). Aşağıdaki şekilde bir kolonda gerçekleşen ayırım gösterilmektedir. Kolonlar ile ilgili daha detaylı bilgi aşağıda verilecektir.



**Şekil 1.5.** Sıvı-sıvı dağılım kromatografisinde çözülmüş maddenin ayırımı

### 1.3.3. Ultra Performanslı Sıvı Kromatografisi (UPSK)

Bilindiği gibi YPSK dünyadaki tüm laboratuvarlarda yaygın olarak kullanılan bir teknolojidir. Bu teknolojinin bu kadar gelişmesindeki temel unsur paketleme materyali olarak iyi, etkili bir ayırım sağlamasıdır. Bu gelişimi sağlayan eşitlik Van Deemter tarafından ortaya koyulmuştur (Ozkan ve ark., 2015).

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu$$

**Şekil 1.6.** Van Deemter eşitliği

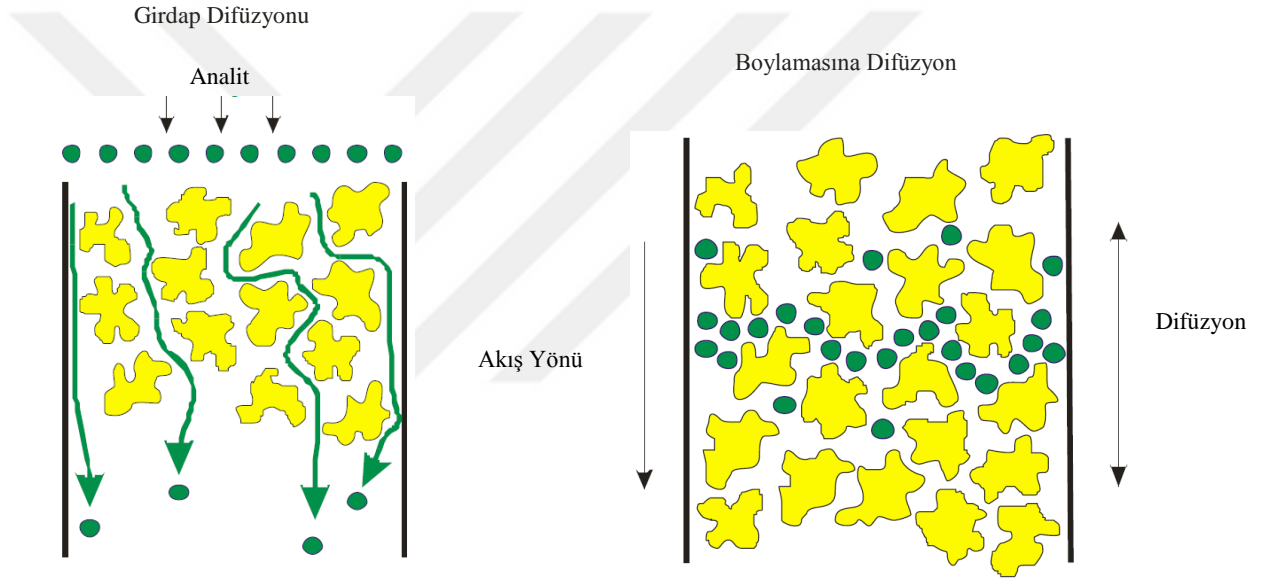
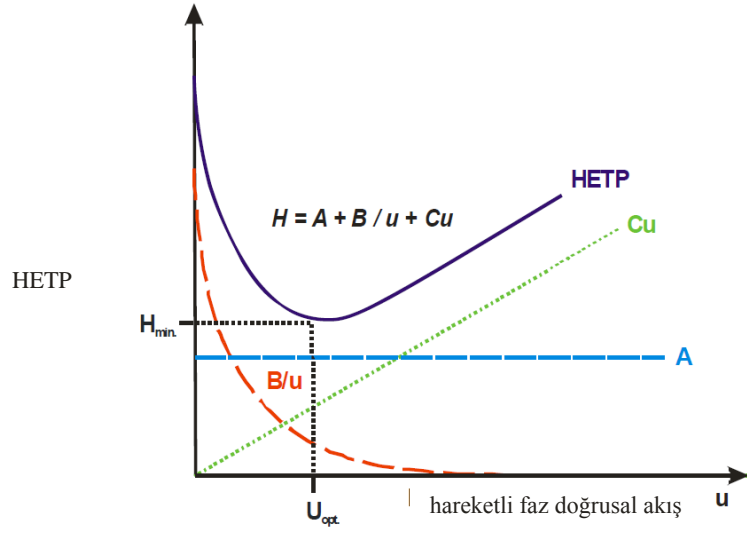
- H (HETP) = tabaka yüksekliği [m]
- A = girdap difüzyonu[m]
- B = boylamasına difüzyon [ $m^2 s^{-1}$ ]
- C = dengesiz kütle transferi [s]
- u = akış hızı [ $m s^{-1}$ ]

Kromatografik pikler kinetik olarak kontrol edilen üç işlem nedeniyle genişler.

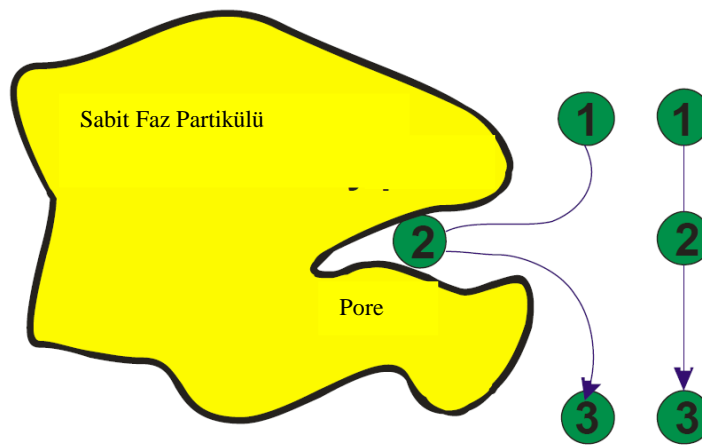
Bunlar:

- Girdap difüzyonu,
- Boylamasına difüzyon ve
- Dengesiz kütle transferidir.

Bu etkilerin büyüklüklerini akış hızı, dolgu maddesinin tanecik büyüklüğü, difüzyon hızları ve sabit fazın kalınlığı gibi kontrol edilebilen değişkenler belirler. Bu üç işlemi de kapsayacak şekilde kromatografik kolonların verimini hesaplamada kullanılabilecek çeşitli denklemler geliştirilmiştir. Bunlardan ilk bulunanı ve en basit olanı "Van Deemter" denklemdir ve gaz-sıvı kromatografisi için çıkarılmıştır; denklem, akış hızı u ile tabaka yüksekliği H arasında yaklaşık bir ilişki verir; burada A girdap difüzyonu ile B boylamasına difüzyon ile ve C dengesiz kütle transferi ile ilgili terimlerdir (Beşergil, 2002).



Dengesiz Kütle Transferi



Şekil 1.7. Van deemter denklemindeki terimlerin şematize edilişi



### 1.3.3.1.Girdap difüzyonu

Bir molekülün dolgulu bir kolondan geçerken karşılaştığı patikaların sayısı arttıkça girdap difüzyonu etkisiyle bölge genişlemesi meydana gelir. Bu patikaların uzunlukları farklıdır; bunun sonucu olarak aynı maddeye ait moleküllerin kolonda alıkonma süreleri de farklı olur. Böylece tüm moleküllerin kolonun sonuna ulaşmaları bir zaman aralığında gerçekleşir ve çıkan band da geniş bir şekil alır. Denklem'deki A miktarı girdap difüzyonun etkisini gösterir ve sabit fazın tanecik büyüklüğü, geometrisi ve kolondaki sıkışıklığı ile ilişkilidir. Birinci yaklaşım olarak A 'nın akış hızına bağlı olmadığı varsayılır ve aşağıdaki ifade yazılabilir (Beşergil, 2002);

$$A = 2\lambda d_R$$

**Şekil 1.8.** Girdap difüzyonunun denklemleri

Burada  $d_R$  ortalama tanecik çapı,  $\lambda$  sıkışıklık faktörüdür.  $\lambda$  'nın değerlerini, sabit fazın tanecik büyüklüğü aralığı ve doldurulma şekli belirler.

### 1.3.3.2.Boylamasına Difüzyon

Boylamasına difüzyon bir bandın yoğun merkez kısmındaki moleküllerin, bandın iki tarafındaki daha seyreltik bölgelere doğru göç etme eğilimlerinden kaynaklanır. Hareketli ve sabit fazların her ikisinde de oluşabilen bu tip difüzyonun yarattığı band genişlemesi oldukça fazladır. Boylamasına difüzyon hareketli fazın gaz olduğu bir ortamda çok önem kazanır, çünkü gaz fazındaki difüzyon hızlarının büyüklüğü sıvılara göre birkaç derece fazladır. Difüzyon miktarı zamanla artar; akış

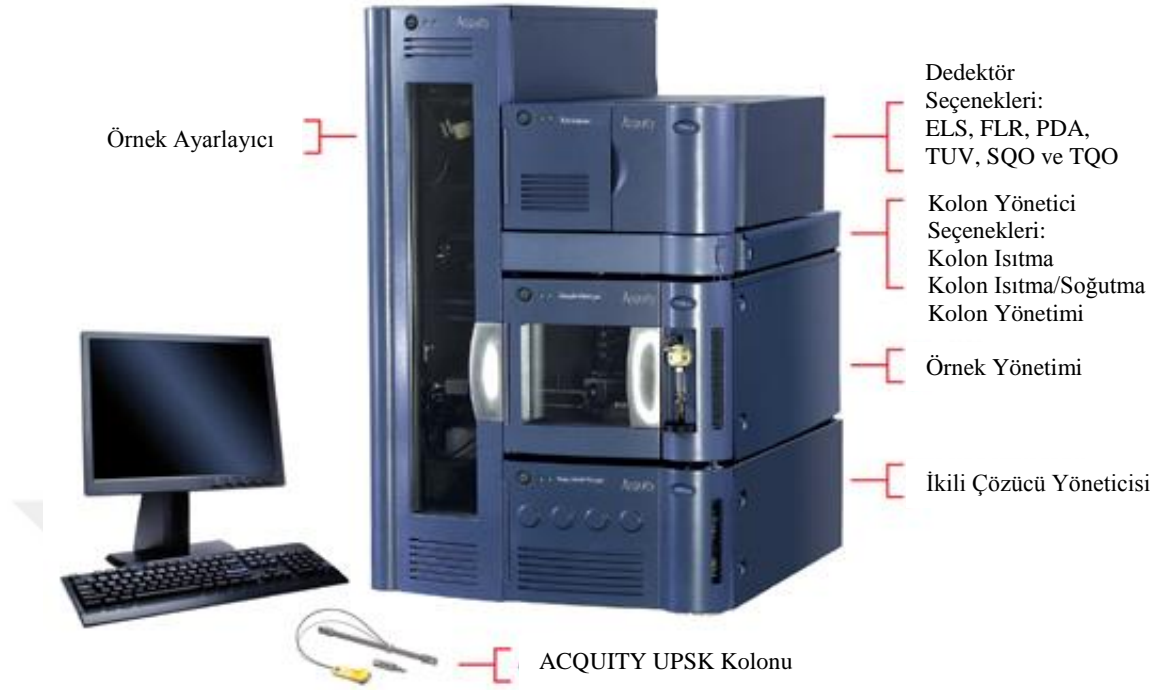
hızı azaldıkça band genişlemesi de artar. Difüzyon katsayısı aşağıdaki denklemle açıklanabilir (Beşergil, 2002);

$$B = 2\psi D_M$$

**Şekil 1.9.** Boylamasına difüzyonun denklemi

Bu denklemde,  $D_M$  hareketli fazda bulunan maddenin difüzyon katsayısı,  $\psi$  blokaj faktörüdür ve sabit fazdaki taneciklerin, serbest moleküler difüzyonu engellemelerinin bir ölçüsüdür; dolgu maddesinin tipine göre  $\psi$  değeri 0,5–0,9 aralığında değişebilir. Boylamasına difüzyonun neden olduğu band genişlemesi sıcaklığı düşürmek (böylece  $D_M$  de düşer) ve akış hızını artırmakla azaltılabilir (Ozkan ve ark., 2015).

Uzun yıllar boyunca araştırmacılar analizlerini hızlandırmak için hızlı bir sıvı kromatografi yöntemi geliştirmeye çalıştılar. Hıza olan ihtiyaç özellikle ilaç araştırma ve geliştirme laboratuvarları gibi gelişmiş laboratuvarlarda karşımıza çıkmaktadır. Bundan dolayı farklı yöntem arayışlarına girmişlerdir; kolonları kısaltmışlar ve akış hızını arttırmışlardır. Bununla beraber sıcaklığın artırılması denenmiş ve bu analitlerin dağılımını arttırmanın yanında viskozitenin azalması ve kütle transferinin artırılması gibi iki avantaj daha katmıştır. Her ne kadar bu yöntemlerle uğraşmışlarsa da standart kolon dolgu materyali boyutları küçültülmedikçe basınç arttırılsa bile zaman kazanmak ve hızlı bir analiz yapmak isterken ayırım gücünden vazgeçilmesi gerekmektedir. UPSK ile küçük parçacıklar kullanarak hızı ve pik kapasitesini yeni limitlere genişletebiliriz (Beşergil, 2002; gumustas ve ark. 2014).



**Şekil 1.10.** UPSK cihazı

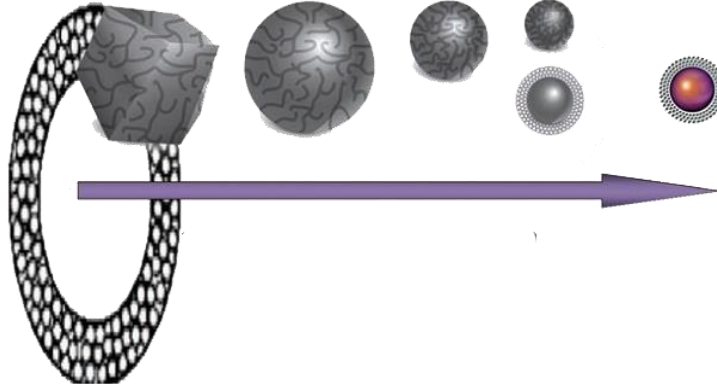
Birçok bilim adamının da kabul ettiği YPSK'nın ayrılmada bariyer oluşturması bir başka söylemle ayrılmayı yavaşlatması bugünün ultra performans sıvı kromatografisi tekniği ile kromatografik olarak genişletilmiş ve yayılmıştır. Ultra performans sıvı kromatografisi kimya ve ilaç sektöründe üretkenliği artırmış ve ayrıca üretim için daha fazla bilgi, her ürün için daha detaylı bilgi, daha fazla duyarlılık ve resolüsyon hızını artırmıştır (Ozkan ve ark., 2015).

UPSK bu özellikleriyle çok öne çıkan bir cihaz olmasına rağmen, hem cihaz hem de sarf malzemelerinin pahalı olmasından dolayı her laboratuvarında bulunmamaktadır.

### 1.3.4. Kolon Dolgu Materyalleri

#### 1.3.4.1. Standart YPSK de Kullanılan Dolgu Materyalleri

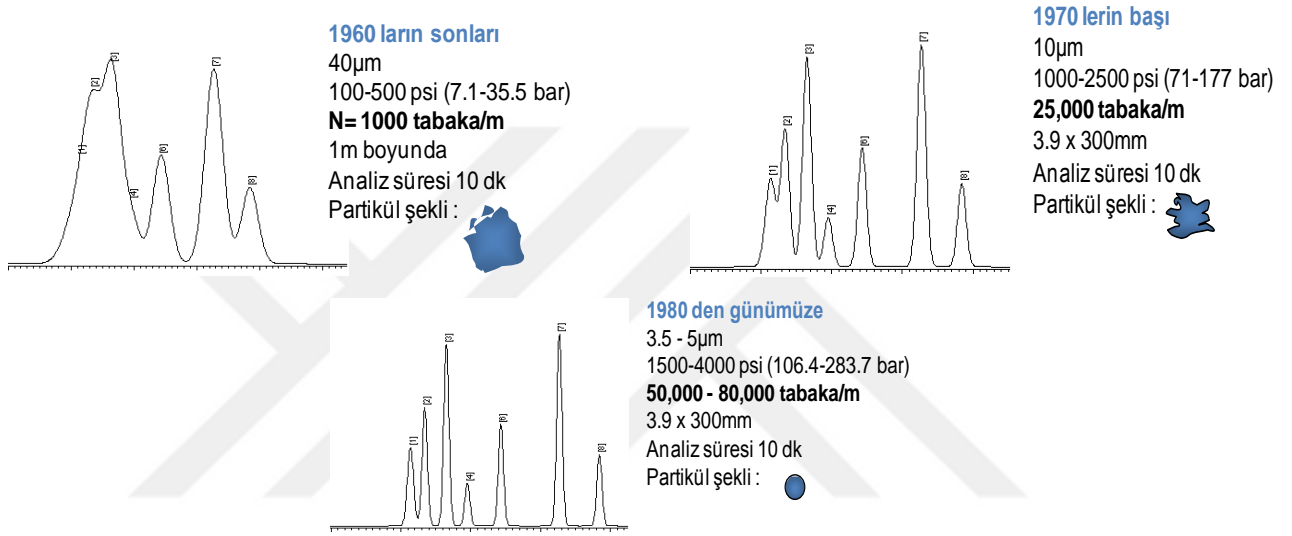
Standart YPSK de kullanılan kolon dolgu maddelerinin tiplerini ve taşıması gereken nitelikleri incelediğimizde; İyi bir kolon dolgu maddesi kararlı olmalıdır ve hem hareketli faz çözücülerine hem de örnek çözeltilere karşı inert olması gerekir. Geniş yüzey alanına, düzgün olarak dağılmış ve hareketli faza kolay erişebilir açık yapısal yüzeye sahip olması gerekir. Yüksek basınç ve yüksek akış hızlarından etkilenmemelidir. Dolgu maddesinin seçiminde tanecik biçimi, büyüklüğü, tanecik büyüklüğünün dağılımı, gözenek hacmi ve yüzey alanı gibi özellikler rol oynamaktadır. Aşağıdaki Şekil 1.11 ve Şekil 1.12’de kolon dolgu maddesinin yıllara göre değişimi gösterilmektedir.



Şekil 1.11. Kolon dolgu maddeleri gelişimi

Kolon dolgu maddeleri genellikle silika ve alümina esaslıdır. Kolon dolgu maddeleri tip olarak gözenekli (poröz), küresel (spherical), düzensiz (irregular), pellicüler (pellicular) ve mikro tiplerinde olmaktadır.

Sıvı kromatografide kullanılan gözenekli parçacıklar, çapları 2,5–10 µm arasında olan gözenekli parçacıklardır. Parçacık boyutu aralığını en aza indirmek için, araştırmalar sürmektedir. Parçacıklar genellikle silis, alümina, polistirendivinil benzen sentetik reçinesi veya bir iyon değiştirici reçineden meydana gelmektedir. Şekil 1.12 de kolon dolgu maddelerinin yıllara göre değişimi ve sonuçları gösterilmiştir.



**Şekil 1.12.** Kolon dolgu materyallerinin ve kolonların gelişimi (Mazzeo ve ark., 2005)

Sıvı kromatografisinin etkinliğini artırmak için kolon dolgu parçacıklarının boyutları giderek daha küçük hale getirilmiştir. Daha küçük parçacıkların kullanılması geliştirilmiş UPSK kolon performansını önemli ölçüde artırırken YPSK'nın klasik analitik özelliklerinin korunmasını ve artırılmasını sağlamıştır. Bu yeni akımla beraber daha çok verim sağlmasına, daha az miktarda çözücülere gerek duyulmasına karşın kullanılan küçük parçacık çapları çok yüksek geri basınca sebep olmaktadır. Bu yüksek basınçlı şartlar onlarla baş edebilecek özel ve dayanıklı malzemeler gerektirir ve bunun için yeni ekipmanlar gerekmektedir. UPSK sistemlerine özel yüksek basınç gereksiniminden de sakınmak için yüksek basınçla

sıkıntısı olmayan ve UPSK ile kıyaslanabilir yüzeysel geçirgen parçacıklar alternatif bir teknoloji olarak ortaya çıkmıştır (Salisbury, 2008). Laboratuvarlarda yıllardır bulunan geleneksel YPSK sistemleri UPSK sistemine göre ekonomik avantajlar sağlamıştır ve bundan dolayı da araştırmamızın ana konularından biri olan yeni nesil parçacıklar diğer bir deyişle core-shell parçacıkları barındıran sabit faz sistemleri, geleneksel olarak kullanılan poröz parçacıklara tam bir alternatif olmuştur (Ali ve ark., 2012).

Geçtiğimiz son 5 yıl içerisinde core shell parçacıkların davranışlarını açıklamak ve klasik poröz parçacıklarla karşılaştırmak için çok sayıda analiz yapılmıştır (Fekete ve ark., 2012; Gritti ve ark., 2012; Nunez ve ark., 2012; Wang ve ark., 2012; Guiochon ve ark., 2011; Hayes ve ark., 2014; Nesterenko ve ark., 2013; Kirkland ve ark., 2013). Core-shell parçacıklara özel analizlerin ve araştırma makalelerinin çoğu, kolonların temellerine veya analitik uygulamalarına odaklanmıştır, dolayısıyla bu çalışmada en cazip analitik yeteneğin seçiminin sağlanması ve bununla birlikte yeterli teorik altyapı ile bu yeni kolon teknolojisinden maksimum verim elde etmenin yolları örneklerle verilmiştir.

#### **1.3.4.1.1.Core Shell Silika Parçacıklar**

Poröz silika ile kaplanmış katı silika kavramı 1960'ların sonunda ilk olarak Horvath ve Kirkland tarafından önerilmiştir, fakat ilerleyen yıllarda core-shell parçacıklarının yüksek kalite standartlarında üretilmesi için birçok zorlukların üstesinden gelmek zorunda kalmıştır (Guiochon ve ark., 2011; Hayes ve ark., 2014). 2,7 µm core-shell parçacıkların üretimi ve ticarileşmesi 2006 yılına kadar beklemek zorunda kalmıştır. Halo firması 2006 yılında ilk kolonların imalatına başladığında, sıvı kromatografisindeki bu yeni teknolojinin potansiyeli çoktan açığa çıkmıştı.

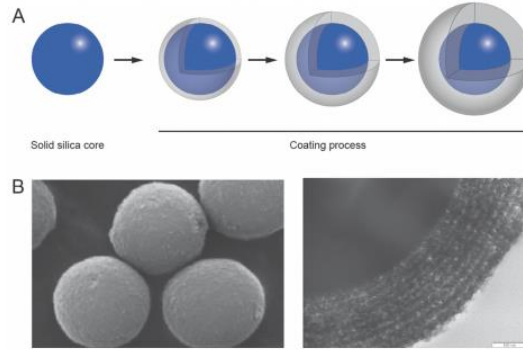
Kromatografide kullanılan core-shell parçacıklarının karakteristik yapısı iki farklı kısımdan oluşmaktadır (Şekil 1.10). İlki 0,9–3,7 µm çapa sahip içteki katı core kısımdır. Silika yerine azda olsa diğer inorganik (alüminyum, altın veya karbon) ya da organik materyaller (polimer veya polimer karışımı) kullanılabilir.

İkinci kısım ise birkaç katmandan oluşmuş ve kimyasal olarak modifiye edilmiş silikadır. Çekirdek ve kabuk birlikte toplam 1,3–5 µm arasında değişen ebatlarda çaplara sahiptirler. Kendine özgü üst üste tabakalarla kaplı porsuz silika çekirdeklerin varlığı bu parçacıkların kromatografik davranışlarına üstün karakteristik özellikleri verir.

Kromatografik parametrelerin gelişimini açıklayan bu bağlamda birçok sebep vardır, bunlar:

- Kolon permeabilitesi artırılırsa, böylece daha düşük basınçta çalışırken daha yüksek akış hızı elde edilebilmektedir.
- Bu işlem sonucunda elde edilmiş parçacıkların yüksek homojenlikte oluşu, parçacık içindeki çoklu yolların neden olduğu bant genişlemesini önlerken kolonun doldurulma işleminin daha iyi olmasını sağlamaktadır.
- Katı çekirdekler boylamsal difüzyonu azaltırlar.
- Parçacıklardaki poröz kısımların daha az oluşu, parçacık içindeki yolların ve difüzyonun neden olduğu bant genişlemesini azaltır.

Katı silika çekirdek ile ilişkili daha yüksek termal iletkenlik ısı dağılımını artırır ve böylece bant genişlemesine katkıda bulunan radyal ısı gradyanını azaltmaktadır.



**Sekil 1.13.** A, tipik bir core shell parçacıkların kaplanması, B, 2,6μm (sol), 1,7 μm boyutlarındaki core-shell parçacıkların SEM görüntüsü (Gritti ve ark., 2010)

Porözite, kromatografik davranışta dikkate değer bir etki yaratan önemli bir özelliktir (Fekete ve ark., 2012). Tamamıyla ve yüzeysel poröz parçacıkların por yapıları karşılaştırıldığında beklendiği gibi core shell parçacıklardaki toplam porözitesi tamamen poröz geleneksel silikalarınkinden daha azdır (Gritti ve ark., 2007).

Ayrıca core-shell parçacıklara sahip kolonların yüzeysel porözitesi 3 μm çapındaki geleneksel parçacıklarla dolu kolonlardan daha yüksek değere sahiptir. Diğer bir husus ise belirli bir ayırma için uygun core-shell parçacıkların seçilmesinde gözenek çapı ve analitlerin molekül ağırlığı göz önüne alınması gerekir (Fekete ve ark.,2012; Cavazzini ve ark., 2007; Gritti ve ark., 2012). Bu nedenle çoğu üretici ürünün iki türünü önerir; küçük moleküllerden makromoleküllere kadar farklı moleküler ağırlık aralıkları bünyesindeki analitleri ayırmaya yönelik 80–90 Å porlar ve 150–300 Å porlar. Çizelge 1.5’de ticari olarak uygun core-shell kolonları, markaları, parçacık büyüklüklerini, porözitelerini, kimyasal varyasyonlarını ve fizikokimyasal parametreleri gösterilmektedir (Ozkan ve ark., 2015).



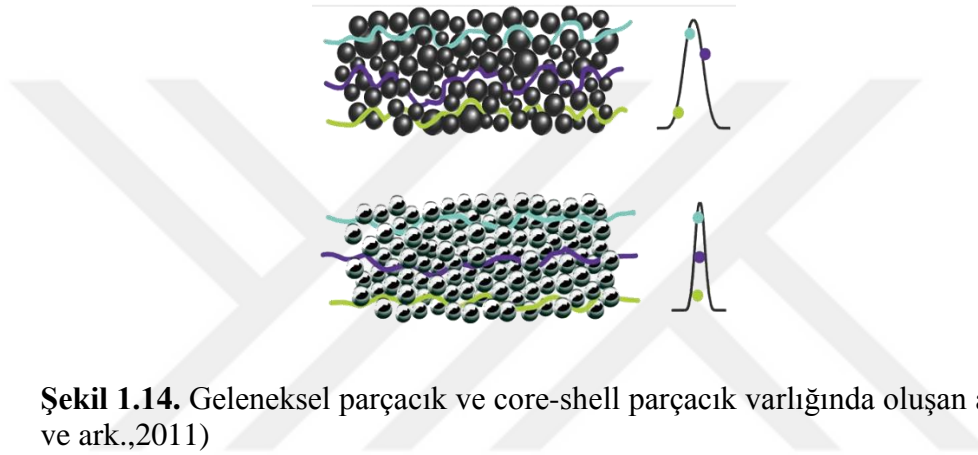
**Çizelge 1.5.** Piyasada bulunan core-shell parçacıklı kolonlar ve özellikleri (Víctor González-Ruiz ve ark., 2015)

Üretici	Ürün	Kimyası	Mevcut dış çapları (gözenekli tabaka kalınlığı) $\mu\text{m}$	Yüzey alanı	Basınç altındaki stabilitesi
Advanced Chromatography Technologies	UltraCore	95 Å: C 18, fenil-heksil	2,5 5,0	130 m <sup>2</sup> /g	1000 bar
Advanced Materials Technologies	HALO	95 Å: C 18, C 8, fenil-heksil, pentafluorofenil,RP-amit, siyano, hidrofilik etkileşim sıvı kromatografi, OH5 160 Å: C 18	4,6 (0,6) 2,7 (0,5)	150 m <sup>2</sup> /g	600 bar
Agilent	Poreshell	120 Å: C 18, C 8, fenil-heksil,SB-Aq, RP-amit, siyano, hidrofilik etkileşim sıvı kromatografi	2,7 (0,5) 5,0 (0,25)	130 m <sup>2</sup> /g	600 bar
ChromaNik	SunShell	300 Å: C3, C 8, C 18	2,6 (0,5)	150 m <sup>2</sup> /g	590 bar
Fortis Technologies	SpeedCore	90 Å: C 18, C 8, pentafluorofenil, fenil, 2-EP, hidrofilik etkileşim sıvı kromatografi amit, 2-etilpiridin 160 Å: C 18,RP-AQUA, altıgen fonksiyonlu C18, 300 Å, altıgen fonksiyonlu C18	2,6 (0,4) 5,0	140 m <sup>2</sup> /g	
Knauer Macherey-Nagel	BlueShell NucleoShell	80 Å: C 18, pentafluorofenil, difenil, hidrofilik etkileşim sıvı kromatografi	2,6 (0,5) 2,7 (0,5)	130 m <sup>2</sup> /g 130 m <sup>2</sup> /g	600 bar
Nacalai Nanologica (Glantreo)	CosmoCore Eiroshell	80 Å: C 18, C 8, hidrofilik etkileşim sıvı kromatografi	2,6 (0,5) 1,7 (0,15) 2,6 (0,4)	150 m <sup>2</sup> /g 130 m <sup>2</sup> /g	600 bar
Perkin Elmer	Brownlee SPP	95 Å: C 18, fenil-heksil, pentafluorofenil,RP-amit, hidrofilik etkileşim sıvı kromatografi 160 Å: C 18	2,7 (0,5)		

**Çizelge 1.5. Devam.** Piyasada bulunan core-shell parçacıklı kolonlar ve özellikleri (Víctor González-Ruiz ve ark., 2015)

Phenomenex	Kinetex/Aeris	Kinetex 100 Å: C 18, XB-C 18, C 8, fenil-heksil, pentafluorofenil, bifenil, hidrofilik etkileşim sıvı kromatografi Aeris peptit: C18 Aeris geniş gözenek: C 18, C 8, C 4	1,3 (0,2) 1,7 (0,23) 2,6 (0,35) 5,0 (0,67) 1,7 (0,22) 3,6 (0,5) 3,6 (0,2)	200 m <sup>2</sup> /g	1000 bar
Restek	Raptor	90 Å: C 18, bifenil	2,7 5,0	150 m <sup>2</sup> /g	600 bar
Shiseido SIELC Technologies	Capcell Core Coresep	90 Å: C 18 (polimer tabaka) 90 Å karışık mod: RP+kasyon değişimi, RP+ anyon değişimi, RP+ hidrofilik etkileşim sıvı kromatografi iyon değişimi	2,7 (0,5) 2,7	150 m <sup>2</sup> /g	
Sigma-Aldrich (Supelco)	Ascentis Express	90 Å: C 18, ES-C18-peptit, C 8, fenil heksil, pentafluorofenil,RP-amit, ES-siyano, hidrofilik etkileşim sıvı kromatografi, OH5 160 Å: C 18	5,0 (0,6) 2,7 (0,5)	135 m <sup>2</sup> /g	1000 bar
Thermo Scientific	Accucore	80 Å: C 30, C 18, gömülü amit C 18, C 8, C 4, fenil heksil, fenil-x, pentafluorofenil,üre-hidrofilik etkileşim sıvı kromatografi, amit- hidrofilik etkileşim sıvı kromatografi, aQ 150 Å: C 18, C 4, amit-hidrofilik etkileşim sıvı kromatografi	2,6 4,0	130 m <sup>2</sup> /g	1000 bar
Waters YMC Europe	Cortecs Meteoric Core	90 Å: C 18, hidrofilik etkileşim sıvı kromatografi 80 Å: C 18, C 8 160 Å: C 18	1,6 (0,24) 2,7	150 m <sup>2</sup> /g	

Dikkate alınacak diğer bir önemli faktör ise yüksek derecede iletken katı çekirdeklerin bulunması nedeniyle core-shell parçacıkların termal iletkenlik etkisinin tam poröz parçacıklarından daha yüksek olmasıdır. Böylece daha yüksek akış hızlarında oluşturulan ısı daha iyi dağıtılabilir, böylece termal gradientlerin oluşmasının önüne geçilir, kolon boyunca moleküllerin göç hızlarının homojenliğini artırır ve daha dar pik elde edilmesine olanak sağlanır (Şekil 1.14) (Kostka ve ark., 2011).



**Şekil 1.14.** Geleneksel parçacık ve core-shell parçacık varlığında oluşan akış (Kostka ve ark.,2011)

#### **1.3.4.1.1. Performans ve Ayırım Açısından Yeni Nesil Parçacıklar**

Monolitik kolonlar, core-shell kolonlar ve tamamen poröz silika kolonlar için kinetik grafiklerinin karşılaştırılması belirli bir basınç altında, analiz süresi ve kolon etkinliği açısından gerçekleştirilmektedir. Örneğin 1,7 mikrometrelik tam poröz kolon 1000 barlık bir basınca ulaşırken 2,7 mikrometrelik core-shell kolon ile aynı kromatografik performansa 600 bar basınç ile ulaşılmaktadır. Monolitik kolonda ise aynı performansa 200 bar basınçta ulaşılır (Fekete ve ark., 2009; Dioszegi ve ark.,2012).

Parçacık boyutundaki azalma analit ve sabit faz arasındaki ilişkiyi etkiler, bundan dolayı kapasite faktörü ve tüm ayırım da etkilenir. Core-shell fazının kimyasal yüzey özelliklerindeki farklılıklar daha iyi seçicilik ve alıkonma sağlamak için dikkate alınmalıdır. Core-shell parçacıklı kolonlar tamamen poröz parçacıklı kolonlara göre daha az hidrofobiktir. Bu durum core-shell parçacıkların, silika kaplı yüzey alanının küçüklüğü ile açıklanmaktadır (Abraham ve ark., 2010).

Analitin derişiminin yüksek olması, sabit fazın adsorpsiyon kapasitesinden daha yüksek olduğunda aşırı yükleme gerçekleşir. Bu da genellikle kromatogramda asimetrik ve yayvan pikler olarak ortaya çıkar. Aşırı yükleme koşullarında alıkonma faktörleri değişmiş gibi görünebilir. İki değişken sabit fazın yükleme kapasitesini sınırlamaktadır, bunlar spesifik yüzey alanı ve karbon yüküdür (Gumustas ve Ozkan, 2011).

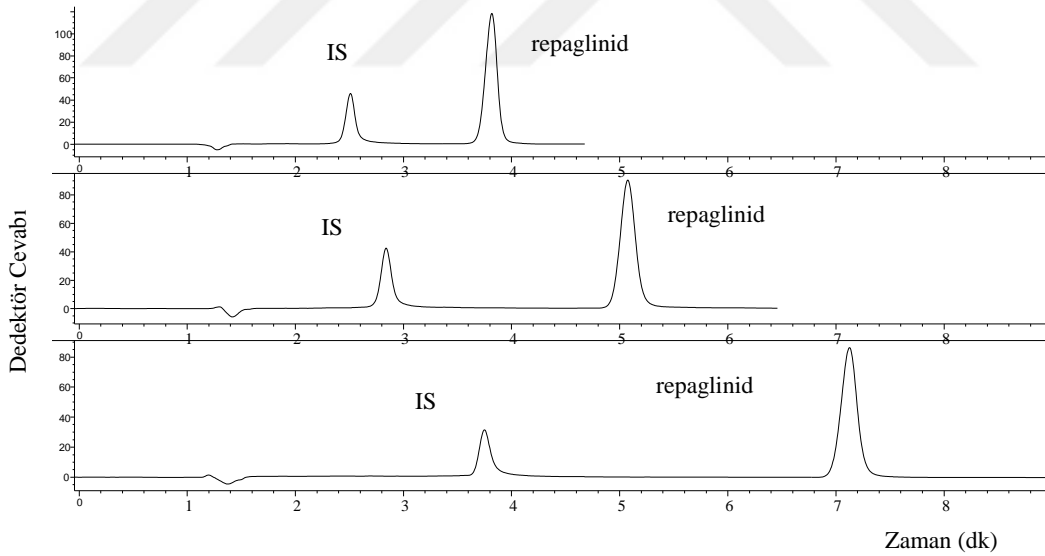
Core-shell parçacıklarla paketlenmiş kolonlar kullanılarak elde edebileceğimiz en önemli kazanç analiz başına geçen zamanındaki ve doğaya salınan organik atıklardaki azalmadır. Geleneksel kolonlarla karşılaştırıldığında core-shell kolonlarda pikler arası daha iyi bir ayırım ve performans ile analiz süresinde 4,7 dakikadan 1,8 dakikaya inmesi gibi dikkate değer bir azalma görülür. Süredeki bu azalma 3,0 mL dk<sup>-1</sup> akış hızındaki core-shell parçacıklarla dolu kolonlarda çok daha iyi bir hale gelebilir. Bu önemli ölçüde azalma da daha düşük basınç değerlerinin bir sonucudur (Badman ve ark., 2010). Geleneksel veya monolitik kolonlarla karşılaştırıldığında 1,7 µm tam poröz parçacıklar ve 2,7 µm core-shell parçacıklar için gelecek vaad eden sonuçlar elde edildiği görülmüştür (Ruta ve ark., 2010).

Bunun yanı sıra 2009'dan beri core-shell parçacıkların analitik uygulamalarını açıklayan makale sayısı gittikçe artar bi hale gelmiştir. Bu kolonların etkinlik, hassasiyet, analiz süresi ve çözücü tüketimi özelliklerinin farklı alanlardan araştırmacıların core-shell parçacıklarından yararlandığını gösterir. Ayrıca, bütçe

kısıtlamaları nedeniyle 2  $\mu\text{m}$  altındaki teknolojiyi benimseyemeyen çoğu araştırmacı mevcut aletlere uyum sağlayabilen core-shell parçacıklarla dolu kolonları kullanmaya başlamıştır.

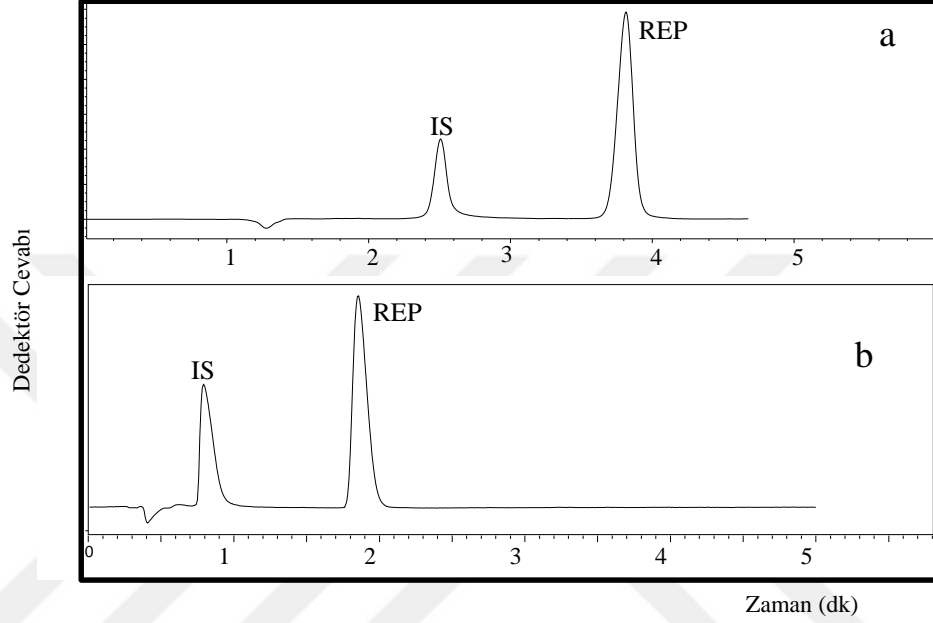
Üreticiler, ilk olarak farklı alıkonma mekanizması sağlayan bağlanmış kimyasallar ve çeşitli çaplardaki yeni core-shell sabit fazlar ile analiz yapmaya başlamıştır.

Repaglinid ile yapılan bir çalışma sonuçlarına göre; YPSK'da optimizasyon çalışmaları sonucu 3 farklı kolon denenmiş ve bu çalışmalar sonucunda core-shell kolonunun diğer yeni nesil kolonlara göre analiz süresini kısalttığı ve pik şekillerini daha keskin hale getirdiği görülmüş ve daha etkin analizler yapılmasına olanak sağlanmıştır. Şekil 1.15'de bunun verileri verilmektedir.



**Şekil 1.15.** YPSK'da yapılan 3 farklı kolonun çalışma sonucu a) core-shell kolon kinetex 150 mm $\times$ 4,60mm;5 $\mu\text{m}$  b)yeni nesil kolon 150 mm $\times$ 4,60mm;5 $\mu\text{m}$  ve c) yeni nesil kolon 150 mm $\times$ 4,60mm;2,5 $\mu\text{m}$

Aynı çalışma da UPSK kullanıldığında (Kolon; 50x2,1mm 1,8µm); UPSK, YPSK'ya göre daha çok çevre dostu olduğu bir kez daha görülmüştür. Bu çalışma esnasında 6 kat daha az çözücü harcanmıştır ve aynı zamanda analiz süresi de yarıya inmiştir.



**Şekil 1.16.** UPSK (b) ve YPSK (a) arasındaki farkı gösteren bir çalışmanın kromatogramı

Víctor González-Ruiz ve ark. (2015)'inin yaptığı çalışmada farklı koşullar altında kamptotesin ve doğal bir anti kanser ilaç olan luotonin A analoglarının ayırımında 6 farklı sabit fazın (5µm geleneksel silika ve 2,6µm core-shell parçacıklar, oktadesil, pentafluorofenil-propil ve fenil-hekzil modifikasyonları) kromatografik davranışları karşılaştırılmaktadır.

Yeni nesil kolonların diğer kolonlara göre; kısa sürede keskin pik şekilleri oluşturması, çözücü sarfiyatını azaltarak çevreci olması, daha hassas tayin sağlaması, daha kararlı alıkonma süresi ve tekrar edilebilir sonuçlar ortaya çıkarması avantajları

arasındadır. Böylece ayırım gücünde kayıp olmaksızın yüksek hızlı analizler gerçekleştirilebilmektedir.

Core-shell parçacıklar, küçük boyutlardaki tamamen poröz parçacıklara ve monolitik kolonlara çözünürlük ve etkinlik açısından eşit hatta bu iki tip kolondan daha üstün olduğunu ispatlanmıştır. Core-shell parçacıklı kolonlardan yararlanılarak birçok alanda sunulan oldukça fazla sayıda çalışma bu teknolojinin analitik kimyanın neredeyse tüm alanlarında benimsenmesinin katlanarak arttığını ortaya koymaktadır (Barwick ve Ellison, 2005).



## 2. GEREÇ VE YÖNTEM

### 2.1. Genel Bilgi

Bu bölümde tamsulosin, dutasterit ve rilpivirin (IS) bileşiklerinin sıvı kromatografik yöntemle tayini ve yine YPSK yöntemiyle bu bileşiklerin davranışlarını incelemeye kullanılan cihazlar ve kimyasallar hakkında bilgi verilmiştir.

### 2.2. Kullanılan Cihazlar

#### 2.2.1. Yüksek Performans Sıvı Kromatografi Cihazı

Çalışılan bileşiklerin sıvı kromatografik davranışlarının incelenmesinde Shimadzu marka YPSK cihazı kullanılmıştır. Sistemde, sistem kontrol ünitesi, pompa, dedektör (Foto Diyod Dizi), kolon fırını ve gaz giderme ünitesi bulunmaktadır. Çalışmada kolon fırını kullanılarak çeşitli sıcaklıklarda çalışılmıştır. Optimum koşul 45°C olarak tespit edilmiştir.

Çalışmada, X Terra C-18 (250 x 4,6; 5µm), XSelect HSS T3 XP (150 x 4,6; 2,5 µm), XBridge C-18 (150 x 4,6; 5 µm) ve Kinetex C-18 (150 x 4,6; 5 µm) kolonları kullanılmıştır. Ayırma Kinetex C-18 kolonda gerçekleştirilmiştir.



### 2.2.2. Diğer Cihazlar

- a) pH metre, Elektrot : Metleer Toledo MA 235 pH, Hanna HI 1332  
Ag/AgCl kombine cam elektrot
- b) Su banyosu : HETO CBN 8-30 ve HETO HMT 200
- c) Hassas terazi : Precisa XB 220A
- f) Manyetik karıştırıcı : Velp Scientifica
- g) Saf su cihazı : Human Corp. Zeneer Power I

### 2.3. Kullanılan Diğer Kimyasal Maddeler

Deneylerde kullanılan bütün kimyasal maddeler, analitik veya YPSK saflıktadır. Bu tezde çalışılan bileşikler Çizelge 2.1’de verilmiştir.

**Çizelge 2.1. Çalışılan bileşikler ve özellikleri**

<b>Çalışılan Bileşikler</b>	<b>Kimyasal Yapısı</b>	<b>Dalga Boyu</b>
Tamsulosin (Nobel ilaç)	$C_{20}H_{28}N_2O_5S$ 408,56 g/mol	<b>220 nm</b>
Dutasterit (Koçak ilaç)	$C_{27}H_{30}F_6N_2O_2$ 528,53 g/mol	<b>220 nm</b>
Rilpivirin (Janssen – Cılag Türkiye ilaç)	$C_{22}H_{18}N_6$ 366,42 g/mol	<b>220 nm</b>

## 2.4. Kullanılan Çözeltiler

### 2.4.1. Kromatografik Çalışmalar

#### 2.4.1.1. Çalışılan Bileşiklerin YPSK Ayırımında Kullanılan Çözeltileri

Çalışılan bileşiklerin her birinden 0,0050 g, 10 mL asetonitrilde çözülerek 500 ppm'lik stok çözeltileri hazırlanmış ve +4°C'de muhafaza edilmişlerdir. Her bir stok çözeltiden 100 ppm olacak şekilde hareketli faz ile seyreltmeler yapılmış ve hazırlanan çalışma çözeltilerinden 20 µL sıvı kromatografi cihazına enjekte edilmiştir. Her bir bileşik için üçer kez enjeksiyon yapılarak ortalama alıkonma zamanları belirlenmiştir.

Asetonitril-su ikili karışımı %50 (h/h); 1 Litrelik stok hareketli fazın hazırlanmasında 500 mL asetonitril alınmış ve üzerine 500 mL su ilave edilmiştir. Hareketli faza 15 mM derişimde olacak şekilde H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (%85 (a/a); 98 g mol<sup>-1</sup>; 1,685 g mL<sup>-1</sup>) ilave edilmiştir. Bu ortama aynı derişimde asetonitril bulunduran su-asetonitril karışımında hazırlanmış, NaOH'den (5 M), istenilen pH'ye getirmek için ilaveler yapılmıştır.

Asetonitril-su ikili karışımı %55 (h/h); 1 Litrelik stok hareketli fazın hazırlanmasında 550 mL asetonitril alınmış ve üzerine 450 mL su ilave edilmiştir. Hareketli faza 15 mM derişimde olacak şekilde H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (%85 (a/a); 98 g mol<sup>-1</sup>; 1,685 g mL<sup>-1</sup>) ilave edilmiştir. Bu ortama aynı derişimde asetonitril

bulunduran su-asetonitril karışımında hazırlanmış NaOH'den (5 M), istenilen pH'ye getirmek için ilaveler yapılmıştır.

Asetonitril-su ikili karışımı %60 (h/h); 1 Litrelik stok hareketli fazın hazırlanmasında 600 mL asetonitril alınmış ve üzerine 400 mL su ilave edilmiştir. Hareketli faza 15 mM derişimde olacak şekilde H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (%85 (a/a); 98 g mol<sup>-1</sup>; 1,685 g mL<sup>-1</sup>) ilave edilmiştir. Bu ortama aynı derişimde asetonitril bulunduran su-asetonitril karışımında hazırlanmış NaOH'den (5 M), istenilen pH'ye getirmek için ilaveler yapılmıştır.

Asetonitril-su ikili karışımı %65 (h/h); 1 Litrelik stok hareketli fazın hazırlanmasında 650 mL asetonitril alınmış ve üzerine 350 mL su ilave edilmiştir. Hareketli faza 15mM derişimde olacak şekilde H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (%85 (a/a); 98 g mol<sup>-1</sup>; 1,685 g mL<sup>-1</sup>) ilave edilmiştir. Bu ortama aynı derişimde asetonitril bulunduran su-asetonitril karışımında hazırlanmış NaOH'den (5 M), istenilen pH'ye getirmek için ilaveler yapılmıştır.

Çalışmalarda gerekli çözeltiler, kullanılacakları gün hazırlanmışlardır.

## **2.4.1.2. Stok Çözeltilerin Hazırlanışı**

### **2.4.1.2.1. Standart Maddelerin Stok Çözeltisi**

Deneyleerde kullanılan Tamsulosin ve Dutasterit 25 mg hassas bir şekilde tartılarak, 25 mL asetonitril içerisinde 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  derişimde stok çözeltileri hazırlanmıştır. İç standart olarak seçilen rilpivirin 2,5 mg tartılarak asetonitrilde çözümlenerek 25 mL'ye tamamlanarak 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  derişimde hazırlanmıştır.

### **2.4.1.2.2. Serum Stok Çözeltisi**

Serum stok çözeltisi hazırlamak için, 10 mL'lik ağzı kapaklı santrifüj tüpüne 3,2 mL insan serumu konulur. İnsan serumu üzerine, 1000 ppm'lik standart maddenin stok çözeltisinden toplam hacimde 100 ppm olacak şekilde Tamsulosin ve Dutasterit ilave edilir. Üzerine 4,8 mL asetonitril ilave edilerek serum proteinleri çöktürülür. Çözeltinin iyice karışması, Tamsulosin ve Dutasterit ile serum numunesinin iyice etkileşmesini sağlamak için 10 dakika süre ile ultrasonik banyoda karıştırılır. Daha sonra 5000 rpm'de 15 dakika süre ile santrifüj edilir, böylece serum proteinlerinin çökmesi sağlanır. Üstteki berrak çözeltiden (100 ppm'lik serum stoğundan) gerekli miktarlarda alınarak hareketli faz ile tamamlanır. Şırınga ucu filtre ile süzildükten sonra sisteme enjekte edilir.

### **2.4.1.2.3. İdrar Stok Çözeltisi**

İdrar stok çözeltisi hazırlamak için, 10 mL'lik ağzı kapaklı santrifüj tüpüne 3,2 mL sağlıklı insan idrarı konulur. Sağlıklı insan idrarı üzerine, 1000 ppm'lik standart maddenin stok çözeltisinden toplam hacimde 100 ppm olacak şekilde Tamsulosin ve Dutasterit ilave edilir. Üzerine 4,8 mL asetonyril ilave edilerek idrar proteinleri çöktürülür. Çözeltinin iyice karışması, Tamsulosin ve Dutasterit ile idrar numunesinin iyice etkileşmesini sağlamak için 10 dakika süre ile ultrasonik banyoda karıştırılır. Daha sonra 5000 rpm'de 15 dakika süre ile santrifüj edilir, böylece idrar proteinlerinin çökmesi sağlanır. Üstteki berrak çözeltiden (100 ppm'lik idrar stoğundan) gerekli miktarlarda alınarak hareketli faz ile tamamlanır. Şırınga ucu filtre ile süzöldükten sonra sisteme enjekte edilir.

## **2.5. Analitik Yöntemin Validasyonu (Yöntem Geçerlik Testleri)**

### **2.5.1. Validasyonun Genel İşlemleri**

- Cihazın kontrolü ve validasyonu (tüm donanım ve yazılımlar için geçerlidir),
- Geliştirilen yöntemin geçerliliğini kanıtlamak için veya geliştirilmiş olan bir yöntemdeki parametrelerde yapılan değişikliklerden sonra yapılan Validasyon,
- Cihaz ve ilgili yöntem seçildikten sonra ve validasyonları yapıldıktan sonra ayırma yöntemleri için gerçekleştirilen Sistem Uygunluk Testleri (SUT)'dir (Gumustas ve Ozkan, 2011).

### **2.5.1.1. Sistem Uygunluk Testleri**

#### **2.5.1.1.1. Etkin Tabaka Sayısı (N)**

Kolonun en önemli parametrelerinden biri etkin tabaka sayısıdır. Kolondan çıkan pikin sivri ve dar olması ve ayrıca piklerin birbirlerinden iyi ayrılması ile ilgilidir. N'nin sayısal değeri, analizi yapılan maddenin cinsine bağlı olduğu gibi, deney koşullarına örneğin, akış hızı, sıcaklık kolon kalitesi, dolumun tek biçimliliği gibi çeşitli etkenlere de bağlıdır. Tavsiye edilen etkin tabaka sayısı değeri ise  $N > 2000$ 'dir (Gumustas ve Ozkan, 2011).

#### **2.5.1.1.2. Kuyruklanma Faktörü (T)**

Bu faktör kromatogramdaki pikin simetrik olması ile ilgilidir. Çalışmalarda sürekli simetrik pikler seçilmelidir. Simetrik olmayan pikler seçildiğinde; doğru olmayan tabaka sayısı ve ayırım gücü sonuçları, kararlı olmayan miktar tayinleri, gözlemlenemeyen pik kuyruklanmaları ve alıkonmanın tekrarlanabilirliğinin düşük olması gibi sorunlarla karşılaşılır (Gumustas ve Ozkan, 2011).

#### **2.5.1.1.3. Kapasite Faktörü (*k*)**

Analizi yapılan maddelerin alıkonma zamanları veya alıkonma hacimleri ile hesaplanır. Kapasite faktörü uygulanan yöntemde, her maddenin kendi fiziksel ve

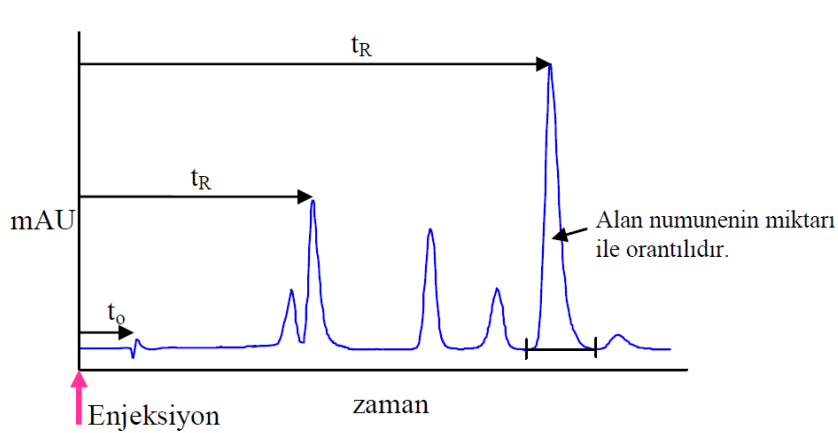
kimyasal yapısına bağlı olarak farklılıklar gösterir ve özgül bir değerdir. Kromatografik parametrelerin optimizasyonunda dikkat edilmesi gereken en önemli parametrelerden biridir (Gumustas ve Ozkan, 2011).

#### 2.5.1.1.4. Seçicilik Faktörü ( $\alpha$ )

Seçicilik, büyük oranda kullanılan sabit fazın özelliğine bağlı olarak değişiklik gösterse de hareketli faz bileşimi de seçiciliği kısmen etkileyen faktörlerden biridir (Gumustas ve Ozkan, 2011).

#### 2.5.1.1.5. Ayırma Gücü ( $R_s$ )

Kromatografik işlemlerde kolon etkinliğinin ve çözücü etkinliğinin ortak etkisi ayırma gücü kavramıyla ifade edilir. Ayırma gücünün hesaplanmasında, kapasite faktörü, tabaka sayısı ve seçicilik kullanılmaktadır (Ozkan, 2012).



Şekil 2.1. Sıvı kromatografide bir kromatogram

## **2.5.2. Tipik Validasyon Karakteristikleri**

### **2.5.2.1. Doğruluk (Geri Kazanım)**

Analiz sonucu elde edilen değerin gerçek değere yakınlığının bir ölçüsüdür. Sonuçlar ortalama % geri kazanım olarak verilir. Ortama ilave edilen analitin (analizi yapılacak madde) analiz yapılan ortamdan hangi oranda geri alınabildiğinin bir göstergesidir (Ozkan, 2012).

#### **2.5.2.1.1. Referans Standart ile Karşılaştırmak**

Geliştirilen analiz yöntemi ile 3 farklı derişimde, 3'er ölçüm alınır ve bu değerler % geri kazanım değerlerine çevrildikten sonra tümü bir arada toplanır. Sonuçlar referans kabul edilen veya basılı olan başka bir yöntem sonuçları ile istatistiksel olarak karşılaştırılır (Ozkan ve ark., 2015).

#### **2.5.2.1.2. Kör Matriks Ortamına Analizi Yapılan Maddeyi İlave Etmek**

Matriks etkisi olan numunelerle çalışıldığı zaman kullanılan bir yöntemdir. Analizi yapılacak madde boş matrikse değişik derişimlerde eklenir. Bu matriks ilaç dozaj formları için (etken maddesiz) yardımcı maddelerden, pestisit kalıntıları için pestisit ile muamele edilmemiş ekinlerden oluşur (Ozkan ve ark., 2015).



Genellikle % 50, 75, 100, 125 ve 150 oranında madde ilavesi yapılır ve her seviyede en az 3'er ölçüm yapılır. Sonuçlar % geri kazanım olarak ifade edilir ve % bağıl standart sapma ve/veya % bağıl hata (% Bias) ile beraber verilir (Ozkan ve ark., 2015).

#### **2.5.2.1.3. Standart Ekleme Yöntemi İle Saf Madde İlavesi**

Analizi yapılacak maddenin bilinen ve değişik miktarları matris içerisinde yer alan ve miktarı bilinmeyen veya daha önce tayin edilmiş aynı maddenin üzerine ilave edilir. Asıl numunedeki etken madde derişimi deney verilerinden matematiksel olarak hesaplanır. Genellikle % 25, 50, 100 oranında madde ilave etmek iyi bir yaklaşımdır. Madde ilave edilmiş ve ilave edilmemiş bütün numuneler en az 3'er defa analiz edilir. Sonuçlar ilave edilen ve ölçülen madde miktarları verilerek ifade edilir. Bu teknik, katkı maddelerinin ve yardımcı maddelerin bilinmediği durumlarda kullanılır. Sonuçların ortalamaları, % bağıl standart sapma (%BSS) ve/veya % bağıl hata (% Bias) ile beraber verilir.

#### **2.5.2.2. Seçicilik**

Analizi yapılacak maddenin, numunede bulunan girişim yapma ihtimali bulunan diğer yardımcı veya etken maddeler yanında miktarının tam ve doğru olarak tayin edilebileceğini gösteren bir parametredir (Ozkan ve ark., 2015).

### **2.5.2.3. Kesinlik**

Geliştirilen yöntemin çalışılan koşullar altında tekrarlanabilirliğinin ölçüsüdür. Yani bir numuneye aynı yöntem birçok defa uygulandığında analit için bulunan sonuçların birbirine yakınlığının ölçüsüdür.

#### **2.5.2.3.1. Orta-Kesinlik**

Orta-kesinlik laboratuvar içi deneysel farklılıkları belirten bir kesinlik ölçüsüdür. Farklı analizciler, farklı günlerde veya farklı cihazlar kullanılarak saptanabilen değerlerdir. Deneyler arası, çalışmalar arası veya günler arası kesinlik olarak tanımlanan bu değer çalışmanın tam anlamda kesinliğini belirtir. Orta-kesinliği sağlayan çalışma aynı zamanda diğer kesinlik parametrelerini de sağlamış olur. Analizi yapılacak maddenin çalışma ortamındaki çözeltisi ayrı ayrı hazırlanır ve bu çözeltilerin her birinden en az 3'er ölçüm, farklı günlerde ve/veya farklı cihazlarla ve/veya farklı analizciler ile yapılır (Prichard ve Barvick, 2007).

#### **2.5.2.3.2. Tekrarlanabilirlik**

Kısa bir zaman aralığı içerisinde aynı işlem koşulları altındaki kesinliği ifade eder. Analizi yapılacak maddenin çalışma ortamındaki çözeltisi hazırlanır ve bu çözeltilerden en az 10 ölçüm yapılır (tercihen 30–40 ölçüm yapılmalıdır). Tekrar edilebilirlik ölçüsü gün içi veya çalışma sırasındaki kesinlik olarak da adlandırılır (Ozkan ve ark., 2015).

### **2.5.2.3.3. Tekrar Elde Edilebilirlik**

Tekrar elde edilebilirlik özellikle ortak çalışma yapan farklı laboratuvarların uygulamaları sonucu elde edilen ve deneysel farklılıkları belirten bir kesinlik ölçüsüdür. Özellikle yöntem tek biçimliliği (standardizasyonu) çalışmalarında kullanılan bir kesinlik derecesidir. Geliştirilecek yöntem farklı laboratuvarlarda da aynı anda kullanılacaksa bu kesinliğin hesaplanması ve değerinin mutlaka raporda belirtilmesi gerekir. Analizi yapılacak maddenin çalışma ortamındaki çözeltisi ayrı ayrı laboratuvarlarda, farklı analizciler ile ve farklı zamanlarda (en az bir kaç gün ara ile yapılmalıdır) hazırlanır ve bu çözeltilerin her birinden en az 3'er ölçüm yapılır (Ozkan ve ark., 2015).

### **2.5.2.4. Teşhis Sınırı, Gözlenebilirlik Sınırı (TS)**

Analizi yapılan örneğin belirlediği fakat kantitatif sınırlar içerisine girmediği en alt derişimidir. Doğrudan yapılan deneylerden veya hesapla bulunabilir.

### **2.5.2.5. Tayin Alt Sınırı (TAS)**

Analizi yapılan maddenin kabul edilebilir düzeyde kesin ve doğru olarak miktarının tayin edilebileceği, doğrusallık sınırları içerisine girmeyen veya kalibrasyon eğrisinin en alt derişimini oluşturan derişim düzeyidir. Doğrudan yapılan deneylerden veya hesapla bulunabilir (Barwick ve Ellison, 2005).

### **2.5.2.6. Doğrusallık**

Derişime karşı cevabın doğru orantılı olarak artması ve çizilen grafikte noktaların düz bir çizgi üzerinde yer almasıdır. Eğim (m), kesişim (n) ve korelasyon katsayısı (r) doğrusallığı veren parametrelerdir. Bunlar analit derişiminin ölçülen değerlere karşı regresyon analizleri ile matematiksel olarak hesaplanır. Korelasyon katsayısı  $r = 0,999$  ve üzerinde ise doğrusallık sağlanmış demektir (Ozkan ve ark., 2015).

#### **2.5.2.6.1. Kalibrasyon Doğrusu (Grafiği)**

Analitin bilinen derişimleri ile cihazlarda ölçülen değerler arasındaki ilişkidir. Bir kalibrasyon eğrisi hazırlanırken seçilen derişimler daha önce yapılan çalışmalarla belirlenir. Doğrusal veya doğrusal olmayan sonuçlar elde edilebilir. Tayin alt sınırı ve Tayin üst sınırı derişimleri de dahil olmak üzere çalışma aralığında en az 5 derişim için (kör hariç) cihazdan ölçülen değerlere göre hazırlanır. Doğrusal olmayan eğriler için daha fazla standart derişimin seçilmesi uygun olur (Barwick ve Ellison, 2005).

#### **2.5.2.7. Çalışma Aralığı**

Yeterli doğruluk ve duyarlıkta doğrusallığa sahip yöntemin geçerli olduğu alt ve üst sınırlar arasında yer alan derişim aralığına çalışma aralığı denir (Ozkan ve ark., 2015).

#### **2.5.2.8. Kararlılık**

Yöntemin, analiz parametrelerindeki ufak değişimlerden etkilenmeden kalabilme kapasitesidir. Bu parametreler organik çözücü yüzdesi, pH, iyonik güç, sıcaklık gibi etkenlerdir. Kararlılık yöntemin normal kullanımındaki güvenilirliğinin bir ölçüsüdür ve yöntem geliştirilirken değerlendirilmesi gereken önemli bir parametredir (Barwick ve Ellison, 2005).

#### **2.5.2.9. Duyarlılık**

Duyarlılık, doğrusallığın geçerli olduğu aralıktaki doğru denkleminin eğimidir. Pek çok kitapta aynı zamanda tayin alt sınırı olarak tanımlanmıştır. Tayin alt sınırı ne kadar küçükse yöntem o derece duyarlıdır demektir (Ozkan ve ark., 2015).

#### **2.5.2.10. Stabilite**

Zorunlu bir validasyon parametresi olmamakla beraber yapılması tavsiye edilir. Tekrar edilebilir ve güvenilir sonuçlar elde edebilmek için numunelerin, standart maddelerin ve kullanılan çözücülerin uygun bir süre (örneğin 1 gün, 1 hafta, 1 ay veya ne kadar süreye ihtiyaç duyuluyorsa o kadar süre) stabilitesini koruması gereklidir (Barwick ve Ellison, 2005).

### **2.5.2.11. Tutarlılık**

Yöntemin gerçek kullanım koşulları altında tekrar edilebilirliğinin saptanmasıdır. Bunun için çalışmanın: aynı laboratuvarında farklı analizciler tarafından, aynı laboratuvarında farklı cihazlar tarafından gerçekleştirilmesi, reaktif ve çözücülerin markalarının değiştirilmesi, farklı günlerde ve sıcaklıklarda yapılması gibi normal test şartlarının değiştirilmesi, ayırma yöntemlerinde aynı marka ve modele sahip yeni bir kolon kullanarak tekrarlanması gereklidir (Ozkan ve ark., 2015).

## **2.6. Yöntem**

### **2.6.1. Deneyin Yapılışı**

YPSK sistemine bileşikler enjekte etmeden önce, sistemin dengelenmesi ve kanallarda bulunan havanın giderilmesi amacıyla hazırlanan hareketli faz kanallardan geçirilir. Böylece kolon şartlandırılır ve sistem basıncı uygun hale getirilir.

### **2.6.2. YPSK Yönteminin Optimizasyonu**

Geliştirilecek yöntem için en iyi ayırmanın sağlanması amacıyla optimum kromatografik koşullar saptanmıştır. Bu amaçla tamsulosin ve dutasteritin ters-faz

sıvı kromatografisiyle ayırımında; sabit faz seçimi, hareketli faz organik düzenleyici oranı (asetonitril oranı; % 50, 55, 60, 65 (h/h)), iç standart seçimi (rilpivirin), hareketli fazın pH seçimi ( 3,0; 3,5; 4,5; 5,0; 6,0; 7,0), kolon sıcaklığı (25, 35, 45°C) ve hareketli fazın akış hızının (0,5; 0,75; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 mL dk<sup>-1</sup>) etkileri incelenmiştir. Ayrıca hazırlanan çözeltilerin ne kadar süreyle kararlı olduğu da belirlenmiştir



## 3. BULGULAR

### 3.1. Tamsulosin ve Dutasterit Maddeleri için Geliştirilen YPSK Yöntemine Ait Analiz Bulguları

#### 3.1.1. YPSK Sisteminin Optimizasyonu

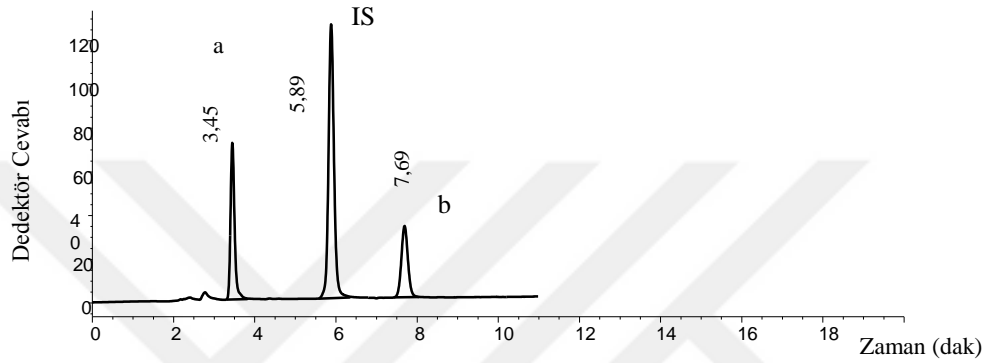
Tamsulosin ve dutasterit maddelerinin YPSK yöntemiyle analizi için en uygun kromatografik koşulların belirlenmesinde, öncelikle sabit faz özellikleri; fonksiyonel grup, tanecik çapı, silika türü açısından değerlendirilmiştir. Daha sonra hareketli faz organik düzenleyicisinin seçimi, hareketli faz organik çözücü türünün ve oranının etkisi ve akış hızının etkileri incelenmiştir. Analiz sırasında doğruluğu ve kesinliği arttırmak açısından iç standart kullanılmıştır.

##### 3.1.1.1. Sabit Faz Seçimi

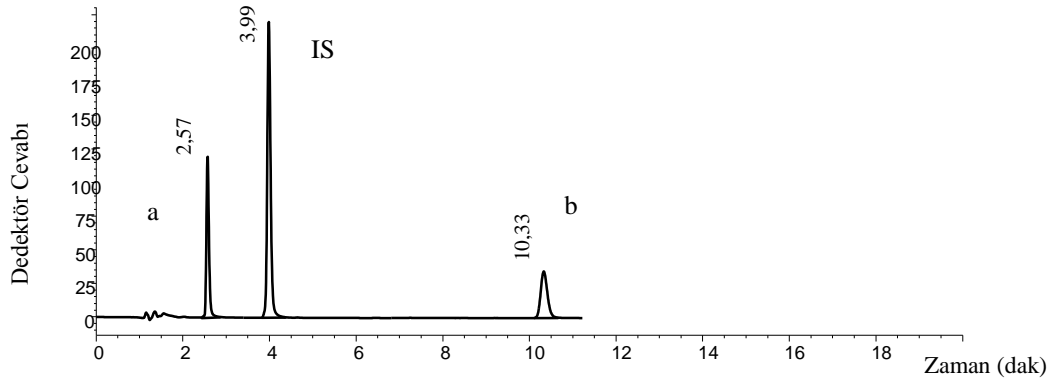
Geliştirilen yöntemde YPSK ile analiz için dört farklı sabit faz (kolon) denenmiştir. Kolon seçimi sırasında hareketli faz tampon çözeltisi olarak fosforik asit (pH 7,0), hareketli faz olarak asetonitril:su, 60:40 (h/h) oranlarında karıştırılarak kullanılmıştır. Kolon sıcaklığı 45°C, hareketli faz akış hızı 1 mL dk<sup>-1</sup> olarak belirlenmiştir.



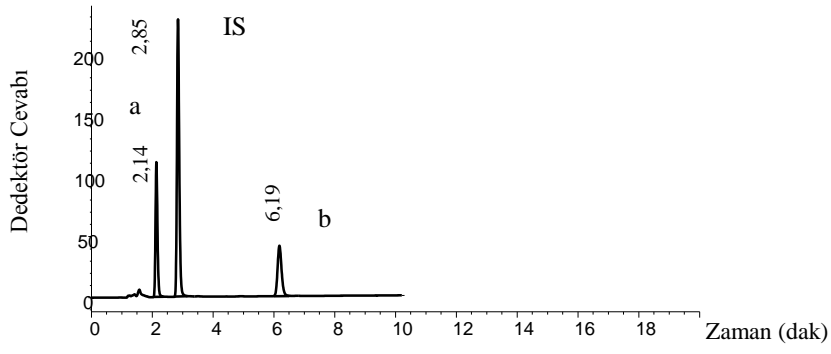
Dutasterit ve tamsulosinin yukarıda verilen şartlarla kullanılan kolonlar sırasıyla X Terra C-18 (250 x 4,6; 5µm), XSelect HSS T3 XP (150 x 4,6; 2,5 µm), XBridge C-18 (150 x 4,6; 5 µm) ve Kinetex C-18 (150 x 4,6; 5 µm) dir. Çalışılan bileşiklerin kapasite faktörleri ve kuyruklanma faktörleri Çizelge 3.1’de verilmektedir. Bu bileşikler için elde edilen alıkonma zamanları, pik şekilleri ve kuyruklanma faktörleri dikkate alınarak Kinetex C-18 kolon tercih edilmiştir.



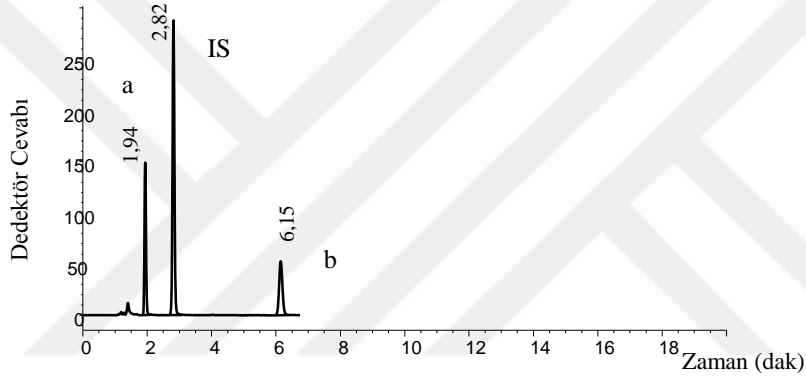
**Şekil 3.1.** 45°C’de, 1 mL dk<sup>-1</sup> akış hızı ile 220 nm’de, ACN: Tampon, (60:40; h/h), pH:7,0, X Terra C-18 (250 x 4,6; 5µm) kolonu ile yapılan tamsulosin (a), dutasterit (b) ve rilpivirin (IS) analizine ait kromatogram



**Şekil 3.2.** 45°C’de, 1 mL dk<sup>-1</sup> akış hızı ile 220 nm’de, ACN: Tampon, (60:40; h/h), pH:7,0, XSelect HSS T3 XP (150 x 4,6; 2,5 µm) kolonu ile yapılan tamsulosin (a), dutasterit (b) ve rilpivirin (IS) analizine ait kromatogram



**Şekil 3.3.** 45°C’de, 1 mL dk<sup>-1</sup> akış hızı ile 220 nm’de, ACN: Tampon, (60:40; h/h), pH:7,0, XBridge C-18 (150 x 4,6; 5 µm) kolonu ile yapılan tamsulosin (a), dutasterit (b) ve rilpivirin (IS) analizine ait kromatogram



**Şekil 3.4.** 45°C’de, 1 mL dk<sup>-1</sup> akış hızı ile 220 nm’de, ACN: Tampon, (60:40; h/h), pH:7,0, Kinetex C-18 (150 x 4,6; 5 µm) kolonu ile yapılan tamsulosin (a), dutasterit (b) ve rilpivirin (IS) analizine ait kromatogram

**Çizelge 3.1.** Sistem Uygunluk Parametreleri Kullanarak Sabit Fazların Karşılaştırılması

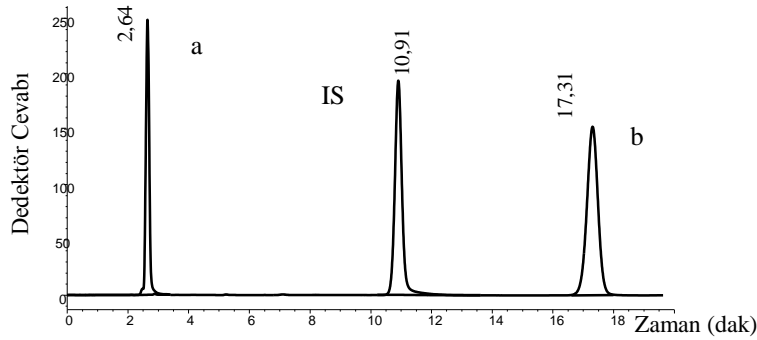
Kolon	Zaman (dk)	TAM				IS				DUT			
		N	Rs	T	$\alpha$	N	Rs	T	$\alpha$	N	Rs	T	$\alpha$
Xterra (250 x 4,6; 5 $\mu$ m)	8,5	6441	-	0,99	-	10041	11,90	1,09	3,60	11510	6,92	1,07	1,54
XSelect HSS T3 XP (150 x 4,6; 2,5 $\mu$ m)	11,0	9842	-	1,28	-	14250	11,89	1,19	2,20	22171	30,8	1,19	3,45
XBridge C18 (150 x 4,6; 5 $\mu$ m)	7,0	5408	-	1,23	-	7248	5,67	1,21	3,08	11108	18,1	1,19	4,17
Kinetex C18 (150 x 4,6; 5 $\mu$ m)	6,5	7533	-	1,09	-	11158	8,94	1,06	7,18	17536	22,73	1,09	4,26

### 3.1.1.2. Hareketli Fazın Belirlenmesi

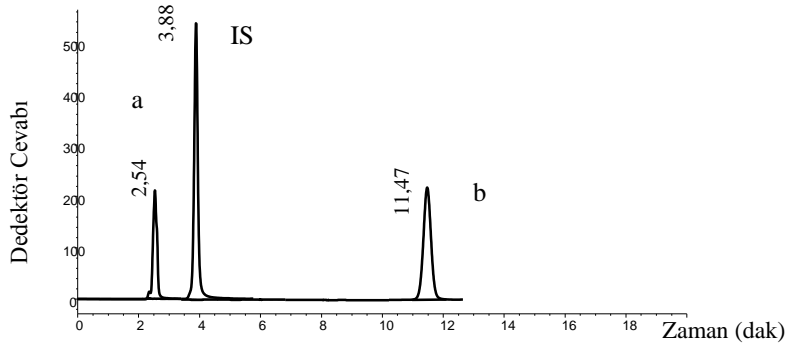
Hareketli faz bileşiminin belirlenmesinde hareketli faz organik çözücü oranının etkisi, hareketli fazın pH'sı, akış hızı ve kolon sıcaklığının etkileri incelenmiştir.

#### 3.1.1.2.1. Hareketli Fazın Organik Çözücü Yüzdesinin Belirlenmesi

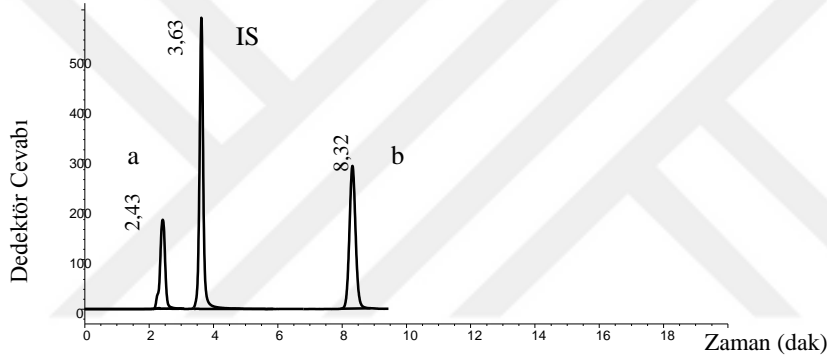
İyi bir ayırım için en uygun asetonitril oranının saptanması amacıyla hareketli faz çözücü içeriği hacimce % 50, 55, 60 ve 65 olacak şekilde değiştirilmiştir. Hareketli faz oranının incelenmesi çalışmalarında, % 0,1 H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (pH=7,0 ile 5M NaOH) içeren hareketli faz ( akış hızı 1 mL dk<sup>-1</sup>) 25°C kolon sıcaklığında kullanılmıştır.



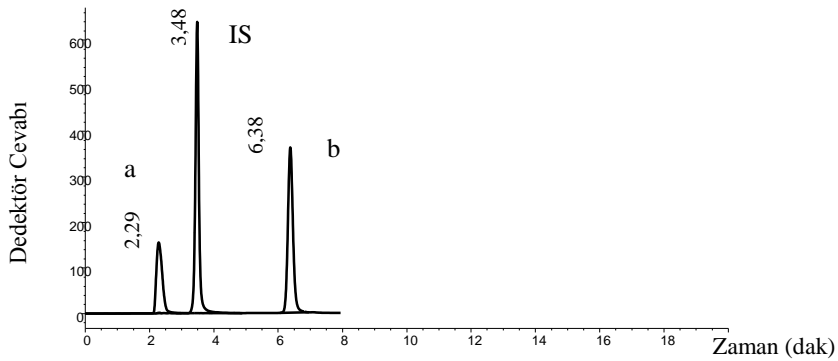
**Şekil 3.5.** Xterra C18 (250x4,6; 5µm) kolonu ile 25°C'de, pH:3,0, 1 mL dk<sup>-1</sup> akış hızı ile 220 nm'de, ACN: Tampon (50:50; h/h) ile yapılan tamsulosin (a), dutasterit (b) ve rilpivirin (IS) analizine ait kromatogram



**Şekil 3.6.** Xterra C18 (250x4,6; 5µm) kolonu ile 25°C’de, pH:3,0, 1 mL dk<sup>-1</sup> akış hızı ile 220 nm’de, ACN: Tampon (55:45; h/h) ile yapılan tamsulosin (a), dutasterit (b) ve rilpivirin (IS) analizine ait kromatogram



**Şekil 3.7.** Xterra C18 (250x4,6; 5µm) kolonu ile 25°C’de, pH:3,0, 1 mL dk<sup>-1</sup> akış hızı ile 220 nm’de, ACN: Tampon (60:40; h/h) ile yapılan tamsulosin (a), dutasterit (b) ve rilpivirin (IS) analizine ait kromatogram

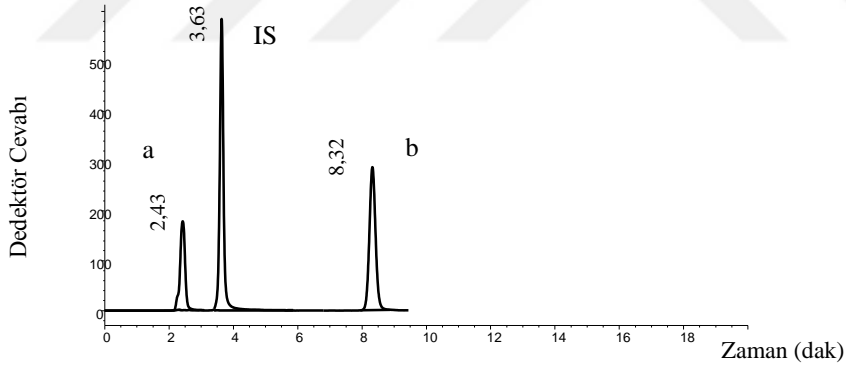


**Şekil 3.8.** Xterra C18 (250x4,6; 5µm) kolonu ile 25°C’de, pH:3,0, 1 mL dk<sup>-1</sup> akış hızı ile 220 nm’de, ACN: Tampon (65:35; h/h) ile yapılan tamsulosin (a), dutasterit (b) ve rilpivirin (IS) analizine ait kromatogram

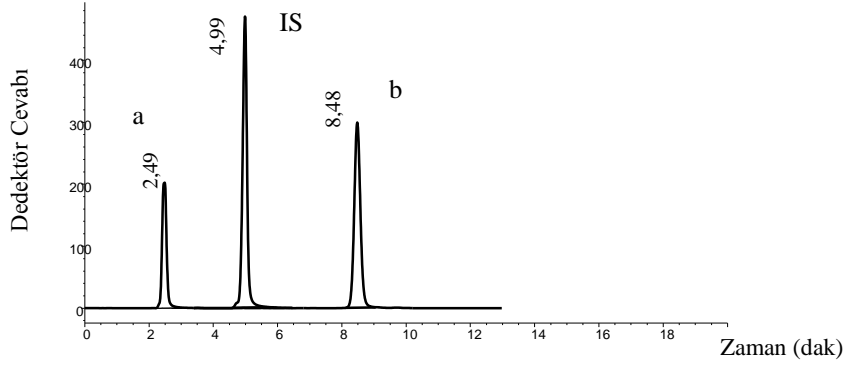
Dutasterit ve tamsulosin maddelerinin ayrı ayrı analizlerinde toplam analiz süresi göz önüne alınarak % 60 (h/h) ACN-su karışımı çalışmalarda hareketli faz olarak kullanılmıştır.

### 3.1.1.2.2. Hareketli Faz pH'sı, Akış Hızı ve Kolon Sıcaklığının Belirlenmesi

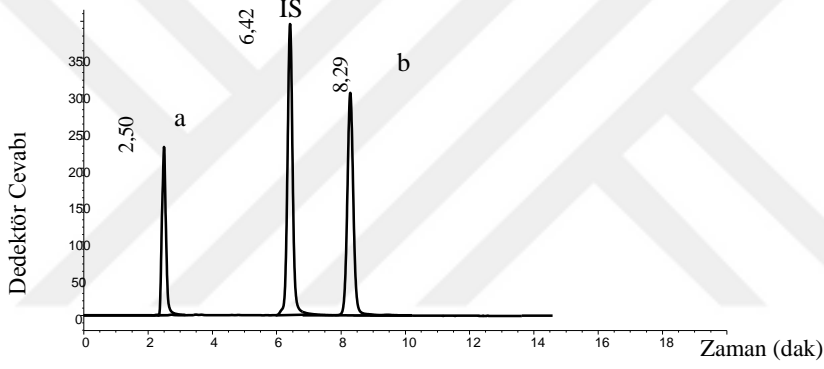
Pik şekillerinin en düzgün ve ayırımın en net olduğu pH'nın seçilmesi için, diğer koşullar sabit tutulup (%60 ACN, % 0,1 H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>; 1,0 mL dk<sup>-1</sup>) hareketli faz pH'sı 3,0; 3,5; 4,5; 5,0; 6,0 ve 7,0 değerlerine ayarlanmıştır. Pik simetriteri incelenerek pik şekillerinin en düzgün ve alıkonma zamanlarının uygun olduğu pH değeri 7 olarak seçilmiştir.



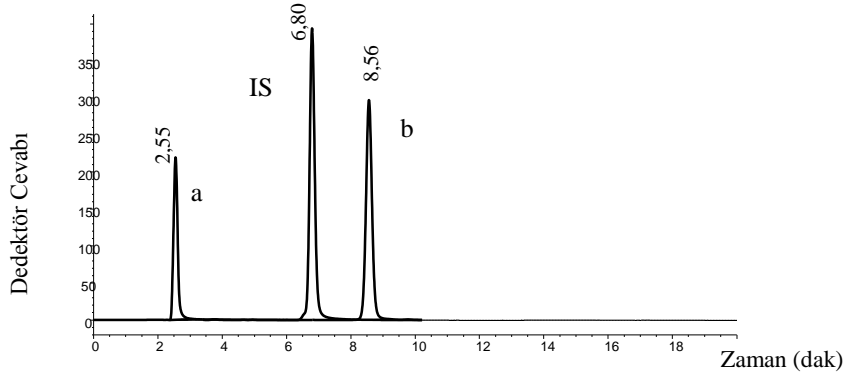
**Şekil 3.9.** Xterra C18 (250x4,6; 5µm) kolonu ile 25 °C'de, 1 mL dk<sup>-1</sup> akış hızı ile 220 nm'de, ACN: Tampon, (60:40; h/h), pH:3,0'de yapılan tamsulosin (a), dutasterit (b) ve rilpivirin (IS) analizine ait kromatogram



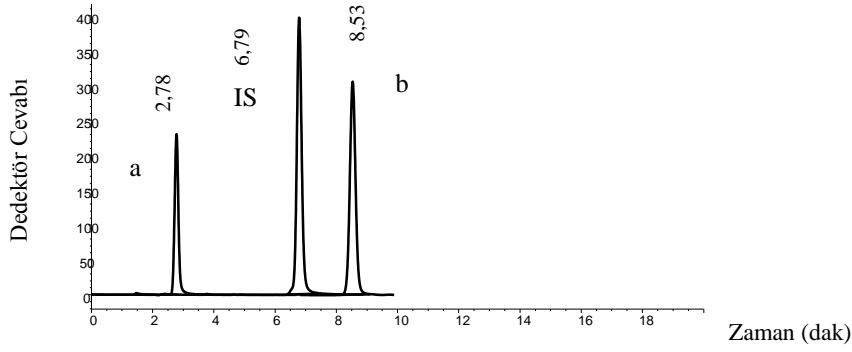
**Şekil 3.10.** Xterra C18 (250x4,6; 5 $\mu$ m) kolonu ile 25 °C’de, 1 mL dk<sup>-1</sup> akış hızı ile 220 nm’de, ACN: Tampon, (60:40; h/h), pH:3,5’de yapılan tamsulosin (a), dutasterit (b) ve rilpivirin (IS) analizine ait kromatogram



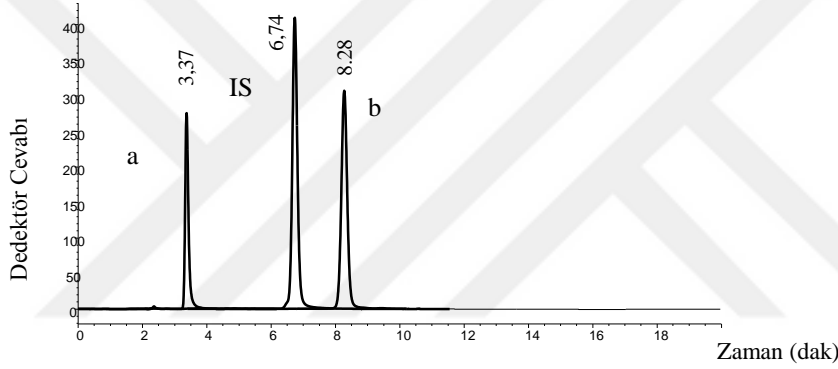
**Şekil 3.11.** Xterra C18 (250x4,6; 5 $\mu$ m) kolonu ile 25 °C’de, 1 mL dk<sup>-1</sup> akış hızı ile 220 nm’de, ACN: Tampon, (60:40; h/h), pH:4,5’de yapılan tamsulosin (a), dutasterit (b) ve rilpivirin (IS) analizine ait kromatogram



**Şekil 3.12.** Xterra C18 (250x4,6; 5 $\mu$ m) kolonu ile 25 °C’de, 1 mL dk<sup>-1</sup> akış hızı ile 220 nm’de, ACN: Tampon, (60:40; h/h), pH:5,0’de yapılan tamsulosin (a), dutasterit (b) ve rilpivirin (IS) analizine ait kromatogram



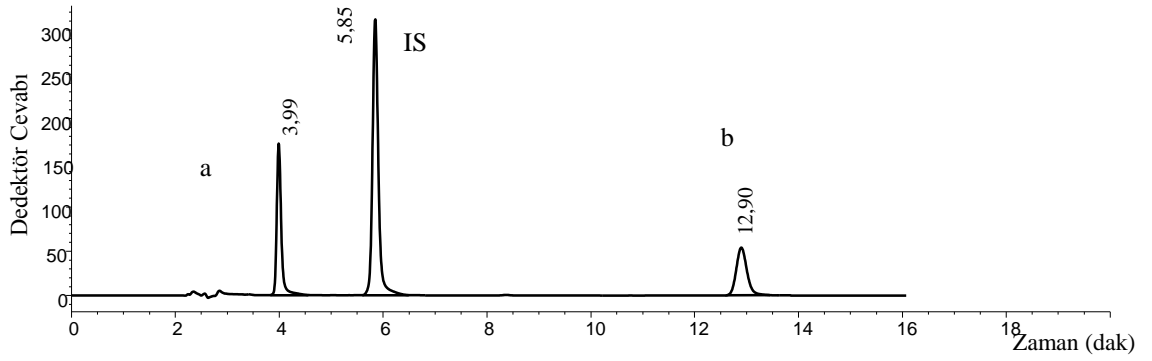
**Şekil 3.13.** Xterra C18 (250x4,6; 5µm) kolonu ile 25 °C’de, 1 mL dk<sup>-1</sup> akış hızı ile 220 nm’de, ACN: Tampon, (60:40; h/h), pH:6,0’de yapılan tamsulosin (a), dutasterit (b) ve rilpivirin (IS) analizine ait kromatogram



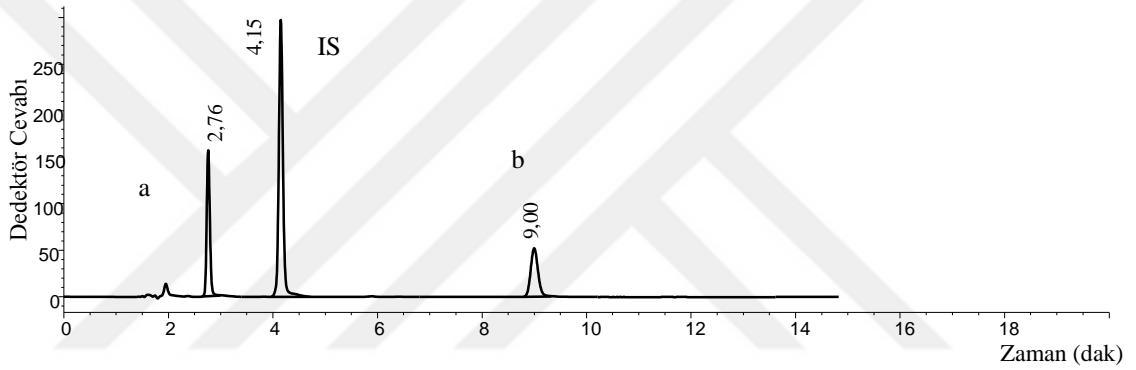
**Şekil 3.14.** Xterra C18 (250x4,6; 5µm) kolonu ile 25 °C’de, 1 mL dk<sup>-1</sup> akış hızı ile 220 nm’de, ACN: Tampon, (60:40; h/h), pH:7,0’de yapılan tamsulosin (a), dutasterit (b) ve rilpivirin (IS) analizine ait kromatogram

Dutasterit ve tamsulosin maddelerinin analizinde kullanılan hareketli faz akış hızının ayırma etkisinin incelenmesi amacıyla, asetonitril ve % 0,1 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (60:40 h/h; pH =7,0) içeren hareketli faz, 45°C kolon sıcaklığında farklı akış hızlarında YPSK sistemine verilmiştir. Sistemin basıncı da göz önüne alınarak akış hızı 0,5; 0,75; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 ve 3,0 mL dk<sup>-1</sup> olarak değiştirilmiştir. Yapılan deneyler sonucunda optimum akış hızı 2 mL dk<sup>-1</sup> olarak seçilmiş ve asetonitril oranının değiştirilmesiyle uygun kromatografik koşullar belirlenmiştir.

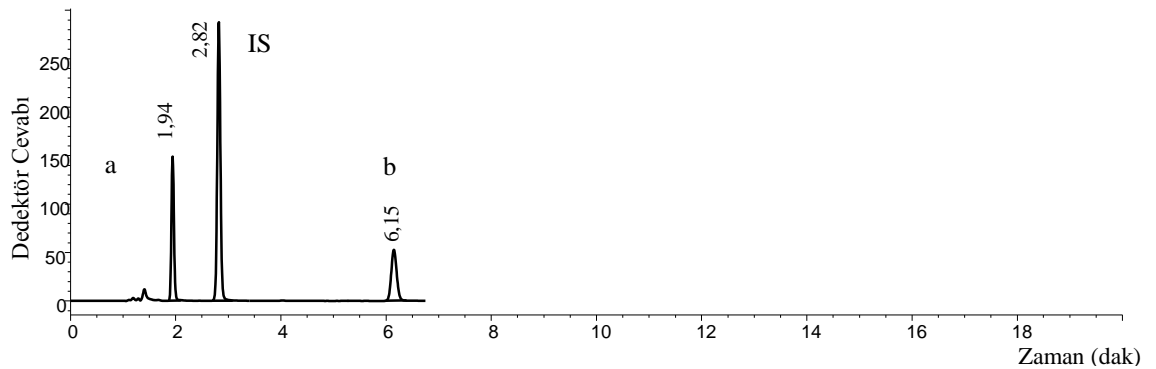




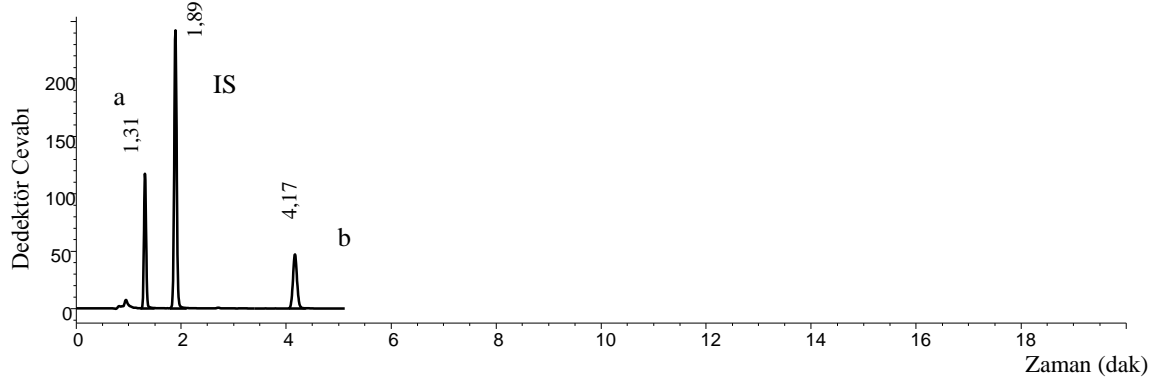
**Şekil 3.15.** 45°C'de, , 220 nm'de, ACN: Tampon, (60:40; h/h), pH:7,0, Kinetex C18 (150x4,6; 5µm) kolonu ile 0,5 mL dk<sup>-1</sup> akış hızı ile yapılan tamsulosin (a), dutasterit (b) ve rilpivirin (IS) analizine ait kromatogram



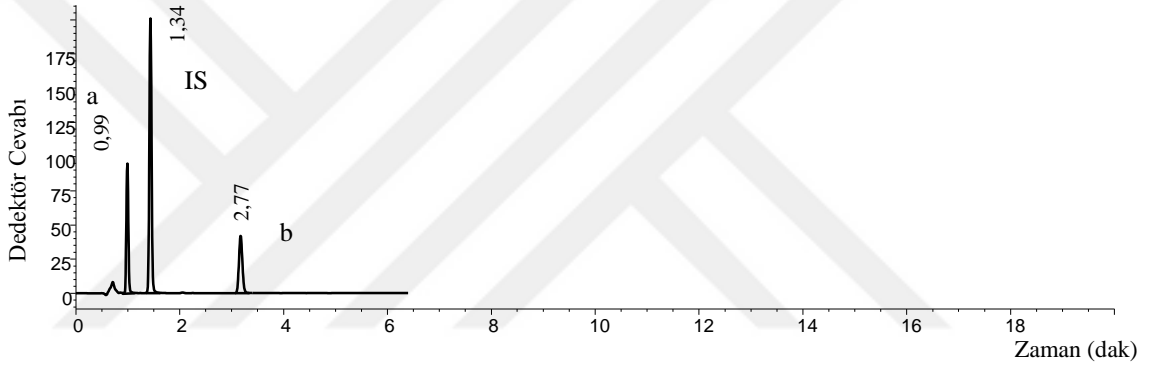
**Şekil 3.16.** 45°C'de, , 220 nm'de, ACN: Tampon, (60:40; h/h), pH:7,0, Kinetex C18 (150x4,6; 5µm) kolonu ile 0,75 mL dk<sup>-1</sup> akış hızı ile yapılan tamsulosin (a), dutasterit (b) ve rilpivirin (IS) analizine ait kromatogram



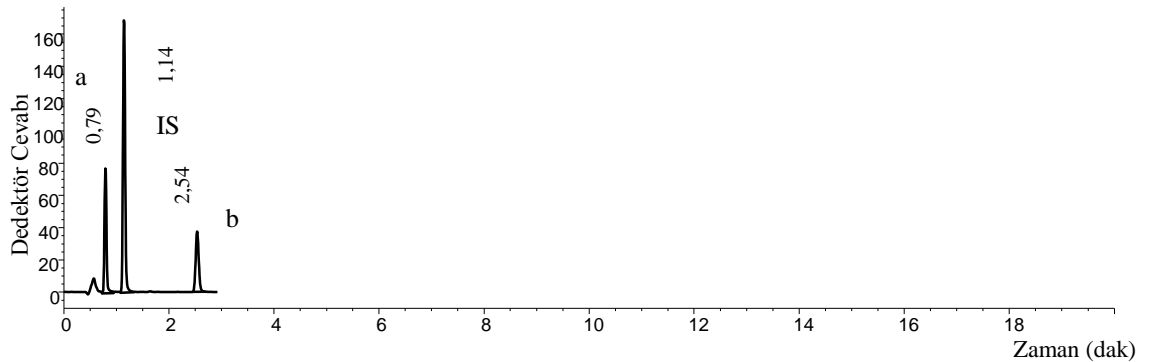
**Şekil 3.17.** 45°C'de, , 220 nm'de, ACN: Tampon, (60:40; h/h), pH:7,0, Kinetex C18 (150x4,6; 5µm) kolonu ile 1,0 mL dk<sup>-1</sup> akış hızı ile yapılan tamsulosin (a), dutasterit (b) ve rilpivirin (IS) analizine ait kromatogram



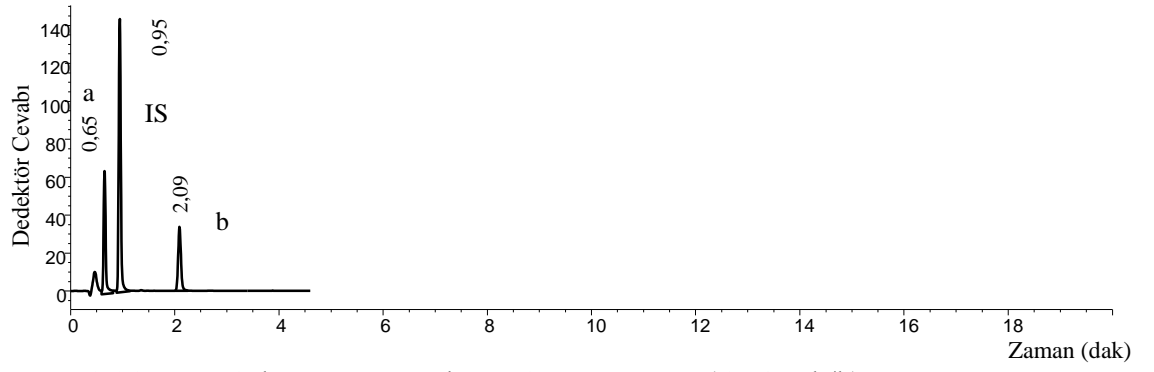
**Şekil 3.18.** 45°C’de, , 220 nm’de, ACN: Tampon, (60:40; h/h), pH:7,0, Kinetex C18 (150x4,6; 5µm) kolonu ile 1,5 mL dk<sup>-1</sup> akış hızı ile yapılan tamsulosin (a), dutasterit (b) ve rilpivirin (IS) analizine ait kromatogram



**Şekil 3.19.** 45°C’de, , 220 nm’de, ACN: Tampon, (60:40; h/h), pH:7,0, Kinetex C18 (150x4,6; 5µm) kolonu ile 2,0 mL dk<sup>-1</sup> akış hızı ile yapılan tamsulosin (a), dutasterit (b) ve rilpivirin (IS) analizine ait kromatogram



**Şekil 3.20.** 45°C’de, , 220 nm’de, ACN: Tampon, (60:40; h/h), pH:7,0, Kinetex C18 (150x4,6; 5µm) kolonu ile 2,5 mL dk<sup>-1</sup> akış hızı ile yapılan tamsulosin (a), dutasterit (b) ve rilpivirin (IS) analizine ait kromatogram

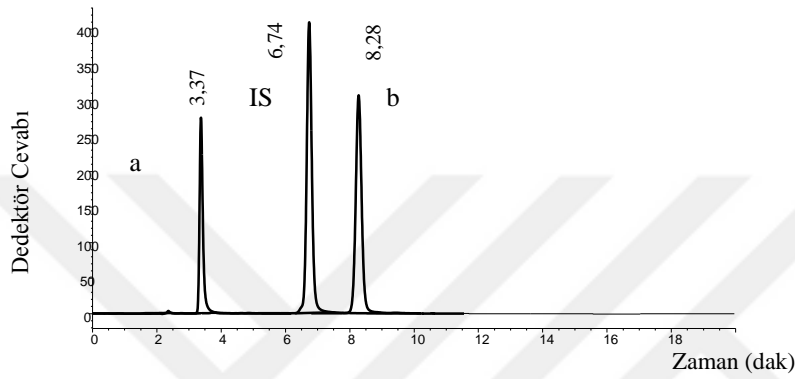


**Şekil 3.21.** 45°C'de, 220 nm'de, ACN: Tampon, (60:40; h/h), pH:7,0, Kinetex C18 (150x4,6; 5µm) kolonu ile 3,0 mL dk<sup>-1</sup> akış hızı ile yapılan tamsulosin (a), dutasterit (b) ve rilpivirin (IS) analizine ait kromatogram

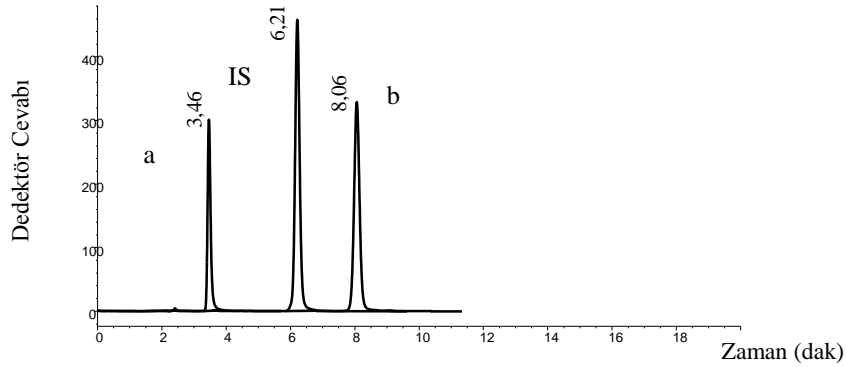
**Çizelge 3.2.** Sistem parametrelerine göre akış hızlarının optimizasyon sonucu

Akış Hızı (mL min <sup>-1</sup> )	Basınç (Bar)	TAM				IS				DUT			
		Tr	N	Rs	T	tr	N	Rs	T	tr	N	Rs	T
0,5	24	4,0	12238	-	1,30	5,85	15366	11,12	1,19	12,9	20255	25,52	1,17
0,75	37	2,77	10301	-	1,15	4,16	14946	11,32	1,14	9,00	20862	25,12	1,09
1,0	46	1,94	7533	-	1,09	2,82	11158	8,94	1,06	6,15	17536	22,73	1,09
1,5	72	1,31	4511	-	1,05	1,89	7372	6,95	1,05	4,17	14362	20,02	1,08
2,0	95	0,99	2867	-	1,04	1,34	5256	5,78	1,03	2,77	11400	17,50	1,06
2,5	120	0,79	1919	-	1,04	1,15	3577	4,73	1,02	2,54	9157	15,20	1,01
3,0	140	0,66	1376	-	1,02	0,95	2530	3,96	1,02	2,10	7295	13,18	1,01

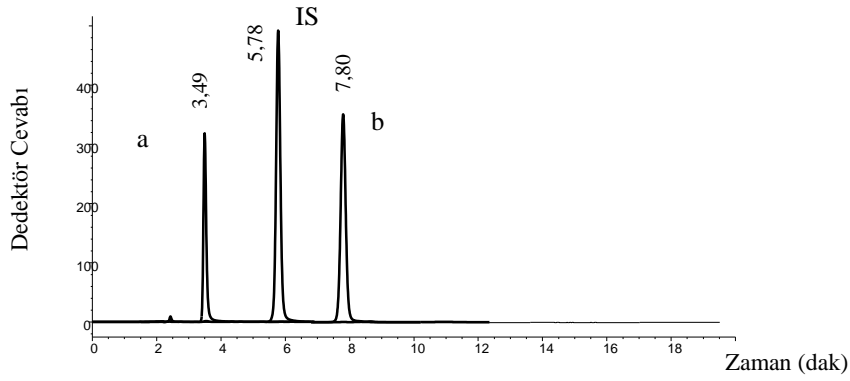
Çalışılan bileşiklerin belirlenen optimum koşullarında sıcaklığın bileşiklerin alıkonmasına etkisi incelenmiştir. Bu amaçla kolon sıcaklığı 25°C, 35°C ve 45°C olarak denenmiştir. Beklendiği gibi sıcaklığın artması bileşiklerin alıkonma sürelerini azaltmıştır. Analiz süresi kısaldığından dolayı 45°C çalışma sıcaklığı olarak belirlenmiştir.



**Şekil 3.22.** 1 mL dk<sup>-1</sup> akış hızı ile 220 nm’de, ACN: Tampon, (60:40; h/h), pH:7,0, X Terra C-18 (250 x 4,6; 5µm) kolonu ile 25°C’de, yapılan tamsulosin (a), dutasterit (b) ve rilpivirin (IS) analizine ait kromatogram



**Şekil 3.23.** 1 mL dk<sup>-1</sup> akış hızı ile 220 nm’de, ACN: Tampon, (60:40; h/h), pH:7,0, X Terra C-18 (250 x 4,6; 5µm) kolonu ile 35°C’de, yapılan tamsulosin (a), dutasterit (b) ve rilpivirin (IS) analizine ait kromatogram



**Şekil 3.24.** 1 mL dk<sup>-1</sup> akış hızı ile 220 nm’de, ACN: Tampon, (60:40; h/h), pH:7,0, X Terra C-18 (250 x 4,6; 5µm) kolonu ile 45°C’de, yapılan tamsulosin (a), dutasterit (b) ve rilpivirin (IS) analizine ait kromatogram

Optimize edilen son koşullar Çizelge 3.3’de gösterilmiştir.

**Çizelge 3.3.** Optimize edilen koşullar

<b>Kolon</b>	Kinetex C18 (150x4,6; 5µm) (Phenomenex, ABD)
<b>Hareketli faz bileşimi (h/h)</b>	Asetonitril : su , 60:40 h/h
<b>pH</b>	pH 7,0 ( 5M NaOH ile)
<b>Sıcaklık °C</b>	45 °C
<b>Akış hızı (mL dk<sup>-1</sup>)</b>	2 mL dk <sup>-1</sup>
<b>Enjeksiyon hacmi (µL)</b>	5 µL
<b>Dalga boyu (nm)</b>	220 nm
<b>İç standart</b>	rilpivirin

### 3.1.1.2.3. Sistem Uygunluk Testi Sonuçları

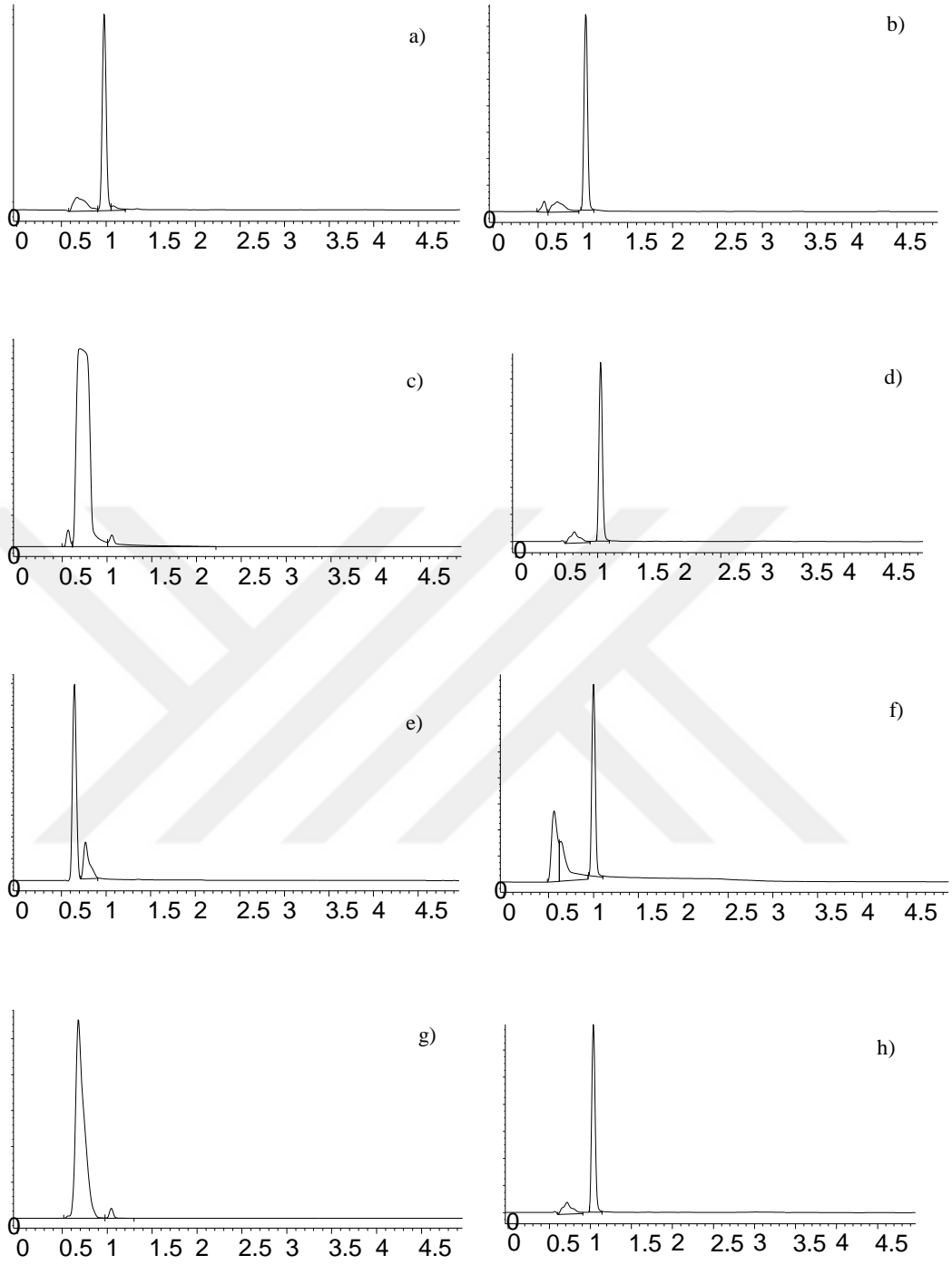
Geliştirilen analiz yöntemi için sistem uygunluk testleri YPSK-FDD (Fotodiyot dizi dedektörü) sistemine enjekte edilerek gerçekleştirilmiştir. Sistem uygunluk parametreleri 60:40(h/h) asetonitril-su; % 0,1 H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> pH =7,0; akış hızı 2 mL dk<sup>-1</sup> ve kolon sıcaklığının 45 °C olduğu koşullarda Çizelge 3.5’de verilmektedir.

**Çizelge 3.4.** Sistem uygunluk parametreleri

Parametreler	TAM	IS	DUT
Alıkonma zamanı (t <sub>R</sub> )	1,03	1,33	2,72
Kapasite faktörü (k)	0,52	0,95	3,00
Çözünürlük (R <sub>s</sub> )	-	5,52	16,13
Kolon etkinliği (N)	2874	5260	10950
Seçicilik (α)	-	1,83	3,15
Kuyruklanma faktörü	1,06	1,03	1,06

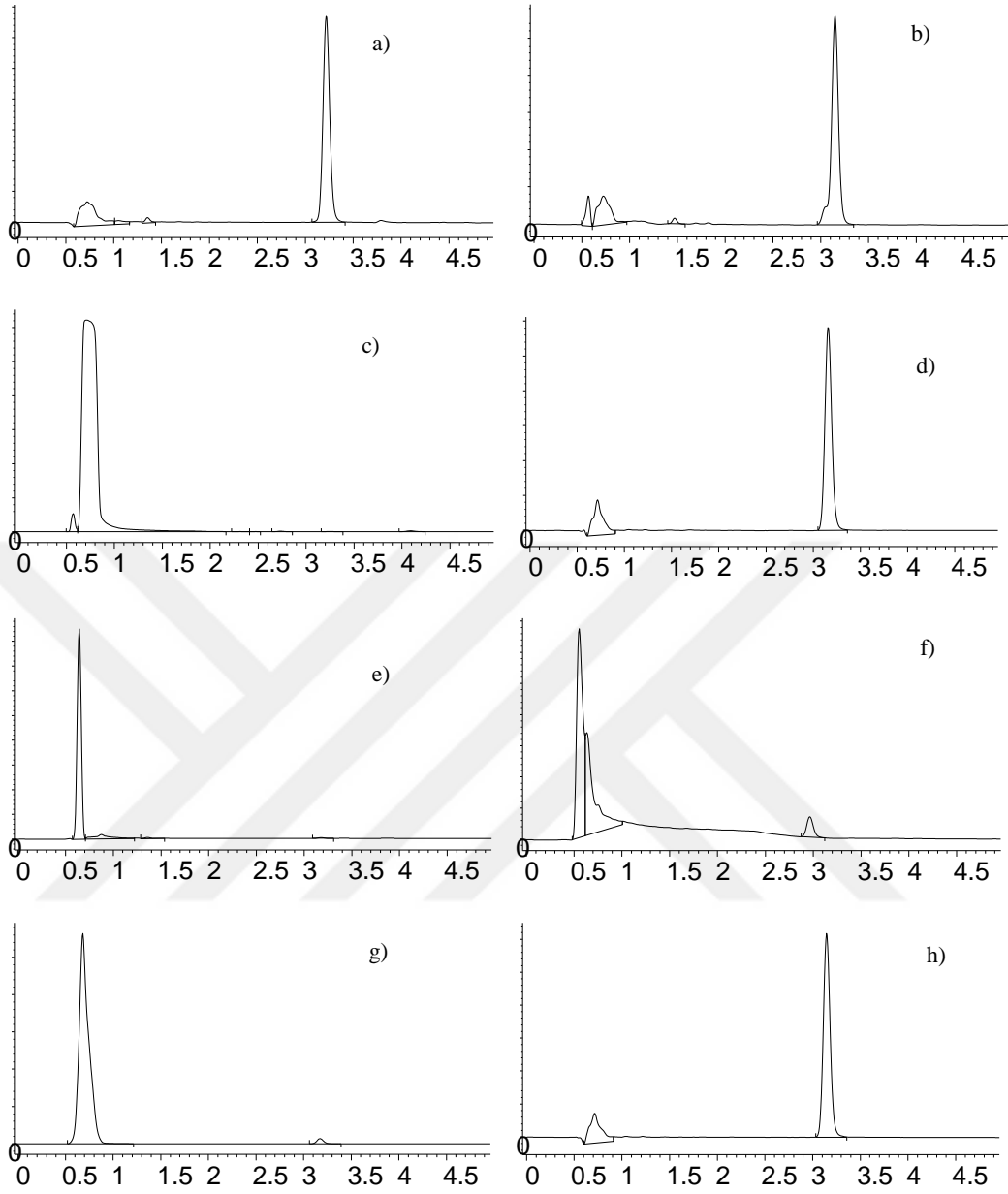
#### 3.1.1.2.4. Hızlandırılmış Bozundurma Çalışmaları

Kalibrasyon basamağından sonra yöntemin seçiciliğini göstermek için hızlandırılmış bozundurma çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bozundurma çalışmaları yapılırken standart etken maddeler belirli koşullara tabi tutulmuştur. Bu şartlar 0,1 M HCl ile asit hidrolizi, 0,1 M NaOH ile baz hidrolizi, %3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile oksidasyonu ve 6 saat katı maddenin etüv içerisinde 100°C' de bekletilmesini kapsamaktadır. Hidroliz ve oksidasyon koşulları için 60 dakika bekletilen madde çözeltileri analiz edilmiştir. Sonuçlar bozundurulmamış 50 µg mL<sup>-1</sup> standart madde ile kıyaslanarak yüzde bozunma hesapları yapılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda olası bozunma ürünleri yanında etken maddelerin analizinin mümkün olduğu görülmüştür.



**Şekil 3.25.** Tamsulosin için yapılan hızlandırılmış bozundurma çalışmalarına ait kromatogramlar a) HCl (0,1 M); b) NaOH (0.1 M); c) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (%3); d) Isıtma 100 °C; e) HCl (1 M); f) NaOH (1 M); h) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (%30); g) 24 Saat Etüv'de Bekletme





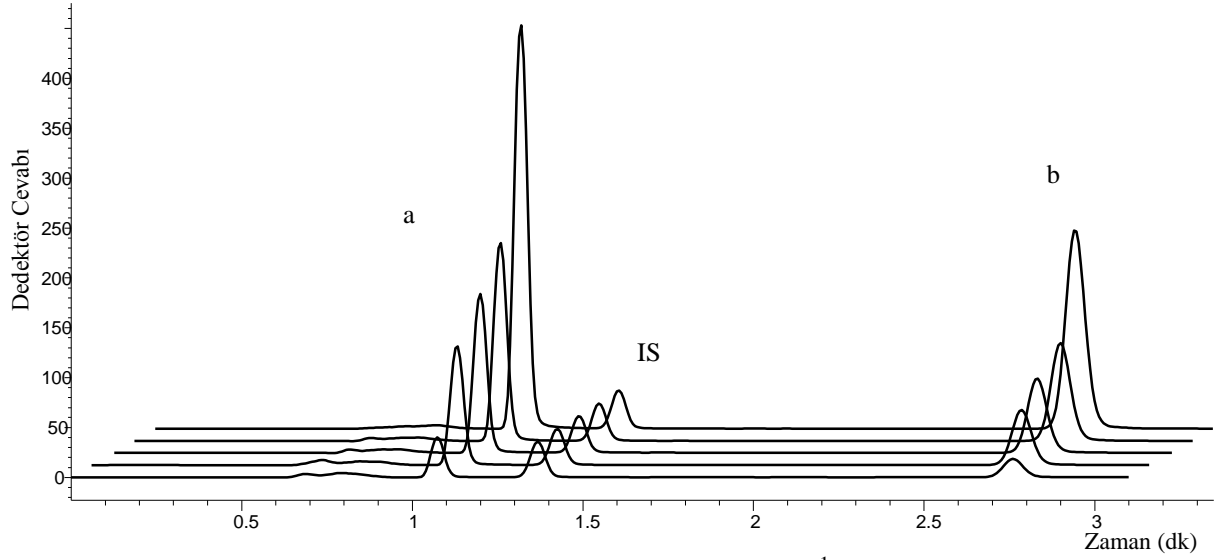
**Şekil 3.26.** Dutasterit için yapılan hızlandırılmış bozundurma çalışmalarına ait kromatogramlar a) HCL (0,1 M); b) NaOH (0,1 M); c) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (%3); d) Isıtma 100 °C; e) HCl (1 M); f) NaOH (1 M); g) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (%30); h) 24 Saat Etüv'de Bekletme

**Çizelge 3.5. Hızlandırılmış Bozundurma Çalışmalarına ait Sonuçlar**

Uygulanan Koşullar	Bozunan Madde Miktarı (%)	
	TAM	DUT
HCl (0.1 M)	6,45	3,93
NaOH (0.1 M)	56,73	74,88
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (%3)	0,0	0,0
Isıtma 100 °C	10,13	14,25
HCl (1 M)	77,62	97,21
NaOH (1 M)	67,16	90,81
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (%30)	18,34	94,99
24 Saat Etüv'de Bekletme	8,98	10,59

#### 3.1.1.2.5. Kalibrasyon Çalışmaları

Her bir bileşene ait kalibrasyon eğrileri oluşturulup yöntem validasyonu aşamasına geçilmiştir.



**Şekil 3.27.** Kalibrasyon sonuçları; rilpivirin (IS) ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), tamsulosin (a) ve dutasterit (b) ( $10, 30, 40, 50, 100 \mu\text{g mL}^{-1}$ )

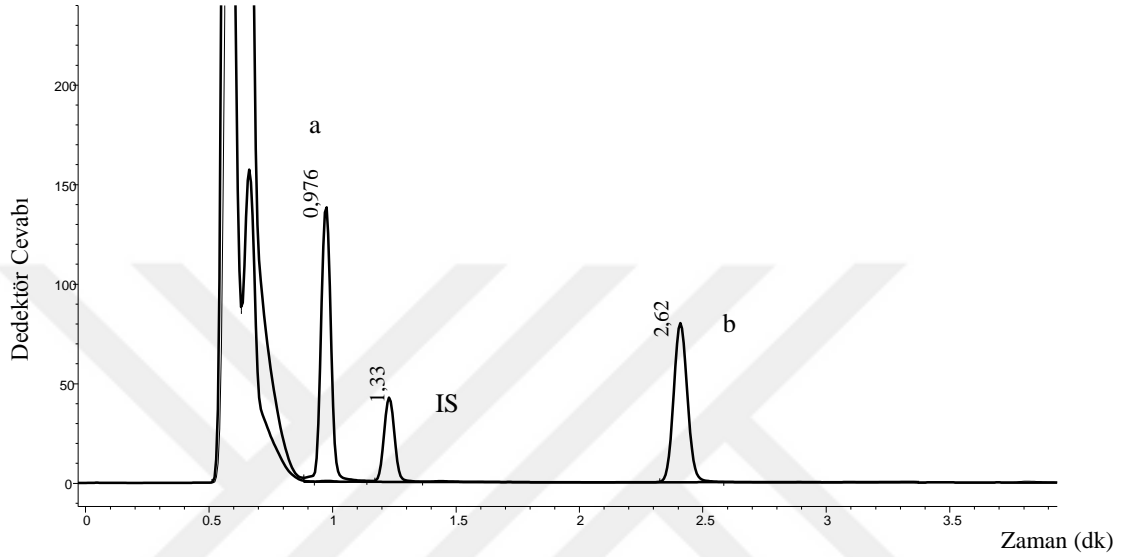
**Çizelge 3.6.** Validasyon parametreleri ve kalibrasyon sonuçları

	TAM	DUT
<b>Doğrusal aralık (<math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>)</b>	0,5–200	0,5–200
<b>Eğim</b>	0,090	0,068
<b>Kesişim</b>	0,153	0,046
<b>Tanımlayıcılık katsayısı</b>	0,999	0,999
<b>Eğimin standart hatası</b>	$8,28 \times 10^{-4}$	$5,44 \times 10^{-4}$
<b>Kesişimin standart hatası</b>	$6,22 \times 10^{-2}$	$4,26 \times 10^{-2}$
<b>Teşhis sınırı (<math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>)</b>	0,045	0,038
<b>Tayin alt sınırı (<math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>)</b>	0,138	0,116
<b>Gün içi tekrar edilebilirlik % BSS</b>	1,21	1,08
<b>Günler arası tekrar edilebilirlik % BSS</b>	1,44	1,26

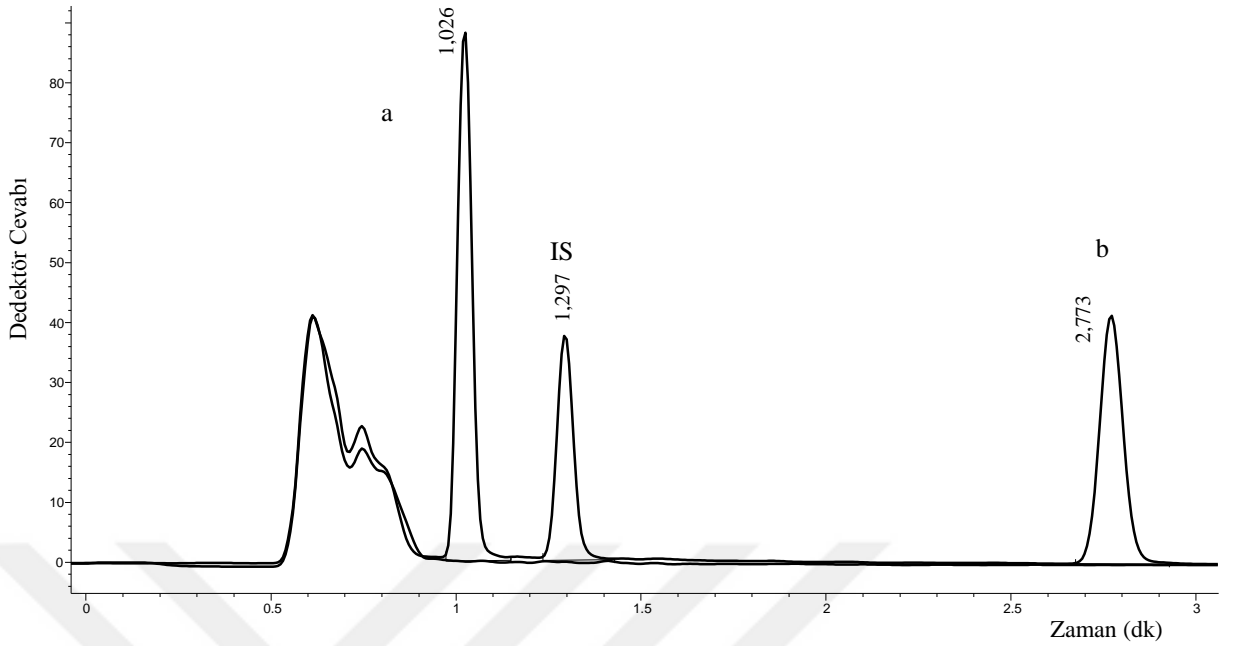
### 3.1.1.2.5. Biyolojik Numunelere Uygulama

Optimizasyonu ve validasyonu tamamlanan yöntem biyolojik numune analizleri için de kullanılmıştır. Biyolojik numuneler hazırlanırken idrar (Şekil 3.26) ve

plazmaya (3.27.) in-vitro olarak ilave edilen standart maddelere ait geri kazanım sonuçları elde edilmiştir. Geri kazanım sonuçları standart maddelere ait olan kalibrasyon denkleminde yerine yerleştirilerek hesaplanmıştır. Bunlara ait sonuçlar Çizelge 3.7.'da verilmiştir.



**Şekil 3.28.** 45°C'de, , 220 nm'de, ACN: Tampon, (60:40; h/h), pH:7,0, Kinetex C18 (150x4,6; 5µm) kolonu ile 2,0 mL dk<sup>-1</sup> akış hızı ile idrarda yapılan tamsulosin (a), dutasterit (b) ve rilpivirin (IS) analizine ait kromatogram



**Şekil 3.29.** 45°C’de, , 220 nm’de, ACN: Tampon, (60:40; h/h), pH:7,0, Kinetex C18 (150x4,6; 5µm) kolonu ile 2,0 mL dk<sup>-1</sup> akış hızı ile plazmada yapılan tamsulosin (a), dutasterit (b) ve rilpivirin (IS) analizine ait kromatogram

**Çizelge 3.7.** Tamsulosin ve Dutasteritin idrar ve plazmadan elde edilmiş sonuçları

	İdrar örneği		Plazma örneği	
	Tam	Dut	Tam	Dut
<b>Bilinen miktar (µg mL<sup>-1</sup>)</b>	10,00	10,00	10,00	10,00
<b>Bulunan miktar (µg mL<sup>-1</sup>)</b>	9,86	9,93	10,25	10,05
<b>% BSS</b>	1,08	1,76	1,73	2,00
<b>% BH</b>	1,4	0,70	-2,50	-0,50
<b>ilave edilen (µg mL<sup>-1</sup>)</b>	5,00	5,00	5,00	5,00
<b>Bulunan (µg mL<sup>-1</sup>)</b>	4,98	5,07	5,17	5,04
<b>Geri kazanım (%)</b>	99,45	100,90	103,35	100,70
<b>Geri kazanıma ait % BSS</b>	0,52	0,48	0,83	1,13
<b>% BH</b>	0,55	-0,90	-3,35	-0,70

## 4. TARTIŞMA

### 4.1. Çalışılan Bileşiklerin Sıvı Kromatografik Yöntemle Ayrılması

Tamsulosin ve dutasterit etken maddelerinin YPSK yöntemiyle analizi için en uygun kromatografik koşulların belirlenmesinde, tamsulosin ve dutasteritin kromatografik davranışları öncelikle sabit faz özellikleri; fonksiyonel grup, tanecik çapı, silika türü açısından değerlendirilmiştir. Hareketli faz organik düzenleyicisinin seçimi, hareketli faz organik çözücü türünün ve oranının etkisi ve akış hızının etkileri incelenmiştir. Analiz sırasında kısa zamanda sonuç alınabilmesi için iç standart seçimi yapılmıştır.

Geliştirilen yöntemde YPSK yöntemi ile analiz için dört farklı sabit faz (kolon) denenmiştir. Hareketli faz bileşiminin belirlenmesinde hareketli faz organik düzenleyici seçimi, hareketli faz organik bileşiminin ve oranının etkisi, hareketli faz pH ve akış hızı etkileri incelenmiştir.

Kolon seçimi sırasında öncelikle XTerra C18 (Şekil 3.1) ve XSelect HSS T3 XP (Şekil 3.2) kolonları denenmiş fakat analiz süresini uzattığından (sırasıyla analzi süreleri 8–10 dakika) dolayı tercih edilmemiştir. XBridge C18 (Şekil 3.3) kolonu ise Kinetex C18 (Şekil 3.4) kolonu gibi analizi kısa sürede ( 6 dakika) tamamlamış fakat ayırım gücü ve etkin tabaka sayısı farkından dolayı Kinetex C18 (150x4.6; 5µm) kolonu tercih edilmiştir.

Bilindiği gibi, ters faz sıvı kromatografide hareketli fazın organik çözücüsünün ve pH'sının etkisi incelenerek iyonlaşan bileşikler için ayırma optimize edilir. Hareketli faz oranının incelenmesi çalışmalarında, % 0,1 H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (pH=7,0) içeren hareketli faz (2 mL dk<sup>-1</sup>) 45°C kolon sıcaklığında kullanılmış ve hareketli fazın organik çözücü yüzdesi, %50-%65 (Hareketli fazın asetonitril miktarındaki değişimleri Şekil 3.5, Şekil 3.6, Şekil 3.7 ve Şekil 3.8' de verilmiştir) aralığında dört farklı derişimde değiştirilerek bileşiklerin alıkonmaları incelenmiştir. %60 (h/h) asetonitril-su ikili karışımında dutasterit ve tamsulosin maddelerinin ve iç standart olarak kullanılan rilpivirin tam olarak ayrıldığı belirlenmiştir.

Dutasterit ve tamsulosin analizinde kullanılan hareketli faz akış hızının ayırma etkisinin incelenmesi amacıyla, asetonitril ve % 0,1 H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (60:40 h/h; pH =7,0) içeren hareketli faz, 45°C kolon sıcaklığında farklı akış hızlarında YPSK sistemine verilmiştir. Akış hızı sistemin geri basıncı dikkate alınarak 0,5 mL dk<sup>-1</sup> (Şekil 3.15); 0,75 mL dk<sup>-1</sup> (Şekil 3.16); 1,0 mL dk<sup>-1</sup> (Şekil 3.17); 1,5 mL dk<sup>-1</sup> (Şekil 3.18); 2,0 mL dk<sup>-1</sup> (Şekil 3.19); 2,5 mL dk<sup>-1</sup> (Şekil 3.20) ve 3,0 mL dk<sup>-1</sup> (Şekil 3.21) olarak değiştirilmiştir. Bütün şartlar göze alınarak akış hızı 2 mL dk<sup>-1</sup> olarak seçilmiştir.

Tamsulosin ve dutasterit etken maddelerinin analizi için uygun pH seçiminde ise 6 farklı koşul denenmiştir. Bunlar pH: 3,0 (Şekil 3.9); pH: 3,5 (Şekil 3.10); pH: 4,5 (Şekil 3.11); pH: 5,0 (Şekil 3.12); pH: 6,0 (Şekil 3.13) ve pH: 7,0 (Şekil 3.14) dir. Yapılan bu 6 farklı deney sonucunda süreyi kısaltıp, pikleri keskinleştirdiği için pH: 7,0 uygun koşul olarak seçilmiştir.

İç standart seçimi yapılırken birçok bileşik denenmiş ve bunlardan en düzgün ve simetrik pik şeklini veren, seçicilik ve analiz süresi göz önüne alındığında ve en kısa zamanda analizi etkilemeyecek şekilde kolondan alabildiğimiz madde olan

rilpivirin seçilmiş ve bu madde iç standart (IS) olarak kullanılmıştır. Denenen diğer bileşikler, ya analizi yapılacak bileşiklerle üst üste çakışmış ya da analiz süresinin uzamasına neden olmuştur.

Sıcaklık seçimi sırasında ise Şekil 3.22, Şekil 3.23 ve Şekil 3.24'te olduğu gibi üç farklı deney yapılmıştır. Bu çalışmalarda 25°C, 35°C ve 45°C' de deneyler yapılmıştır. Yapılan bu üç deney karşılaştırıldığında, süreyi kısaltıp pikleri keskinleştirdiği için uygun koşul olarak 45°C' yi seçilmiştir.

Tez konusu seçilirken yapılan literatür taramalarında tamsulosin ve dutasterit içeren farmasötik preparatların analizi ile ilgili çalışmalara rastlanmış ancak önceden yapılan çalışmalarda core-shell partiküllü kolonlarla yapılan bir çalışma olmamıştır. Geliştirdiğimiz yöntemin gerekli optimizasyon ve validasyon işlemleri gerçekleştirilmiş ve literatürde verilen analiz koşullarından daha iyi bir geri kazanım, teşhis sınırı ve tayin alt sınırı değerlerine ulaşılmıştır. Validasyon parametreleri incelendiğinde ise yöntemin doğru, duyarlı, kararlı bir yöntem olduğu görülmektedir.

Bozundurma çalışmaları sonucunda Çizelge 3.5'te görüldüğü üzere tamsulosin ve dutasterit etken maddeleri toplam 9 koşul altında 2'şer mL olmak üzere incelenmiştir. Yapılan bu çalışmaların sonucunda tamsulosin ve dutasteritin sert koşullar altında yapılan çalışmalarda daha çok bozunduğu görülmektedir.

Geliştirilen yöntemin validasyonuna geçmeden önce sistem uygunluk parametreleri saptanmış ve elde edilen parametreler ışığında (Çizelge 3.4) yöntemin uygulanabilir olduğu bulunmuştur.



Geliştirilen yöntemin geçerliliğinin kanıtlanması amacıyla gerekli yöntem geçerlilik testleri için kaynaklarda bildirilen parametreler seçilmiş ve ilgili geçerlilik kriterleri kabul edilmiştir. Bu amaçla, validasyon çalışmalarında; doğrusallık, doğrusallık aralığı, duyarlılık, kesinlik, geri kazanım, tekrarlanabilirlik vb. parametreler incelenmiş ve istatistiksel değerlendirmeleri yapılmıştır (Gumustas ve Ozkan, 2011).

Tamsulosin ve dutasterit etken maddelerinin YPSK-UV/GB analizinde teşhis sınırı tamsulosin için; 0,045  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , dutasterit için ise 0,038  $\mu\text{g mL}^{-1}$  ve tayin alt sınırı kabul edilen BSS sınırları içinde (< %2) tamsulosin için; 0,138  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , dutasterit için ise 0,116  $\mu\text{g mL}^{-1}$  olarak saptanmıştır (Çizelge 3.6).

Tamsulosin ve dutasterit tayini için geliştirilen YPSK-UV/GB dedektör yöntemi biyolojik numunelere uygulanmış ve bu maddelerin yöneme bir etkisinin olup olmadığı da araştırılmıştır ve sonuç olarak biyolojik matrislerin analiz üzerine etkisi olmadığı görülmüştür. Bunun için geri kazanım deneyleri gerçekleştirilmiştir.

Sonuç olarak tamsulosin ve dutasteritin YPSK ile analiz yönteminde Kinetex C18 (150x4.6; 5 $\mu\text{m}$ ) kolon, 45°C kolon sıcaklığı ile hareketli faz içeriği asetonitril: su, 60: 40 (h/h) ile % 0.1 0-fosforik asit (pH 7.0 5M NaOH ile), içeren hareketli faz, 2 mL dk<sup>-1</sup> akış hızında kullanılmıştır. Çalışma dalga boyu 220 nm olarak seçilmiştir. Bu koşullarda; tamsulosin, dutasterit ve iç standart olarak seçilen rilpivirin alıkonma zamanları sırasıyla 1,03; 2,72 ve 1,33 olarak saptanmış ve analizlere bu şartlarda devam edilmiştir.

## 5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada prostat tedavisinde kullanılan tamsulosin ve dutasterit etken maddelerinin aynı anda YPSK tekniği ile analizleri için gerekli parametreler saptanmış ve bu parametreler kullanılarak da aynı anda analizleri yapılmıştır. Bu amaçla değişik kolon, akış hızı, sıcaklık, pH ve hareketli faz kullanılarak en iyi koşullar saptanmıştır. Ayrıca yeni geliştirilen küçük çaplı core-shell parçacık içeren kolonların yüksek etkinlikte ayırmalar için iyi bir alternatif olduğu tez kapsamında anlatılmıştır.

Alışlagelmiş kolonlar ile yeni nesil kolonlar karşılaştırıldığında yeni nesil kolonlar kısa sürede daha keskin pik şekilleri, hareketli faz pH değişikliklerinden sonra daha hızlı kolon şartlanması, çözücü sarfiyatını azaltarak çevreye daha az zarar vermesi ve daha hassas tayin sağlamaktadırlar. Paketleme materyallerinin parçacık büyüklüğündeki yeni eğilimleri daha az gürültü, daha istikrarlı bir akış, daha kararlı alıkonma zamanı ve daha tekrar edilebilir sonuçlar ortaya çıkarmaktadır. Böylece ayırım gücünde kayıp olmaksızın yüksek hızlı analizler gerçekleştirilebilmektedir. Küçük çaplı core-shell parçacıklara sahip kısa kolonlar çok etkin bir kromatografik performans sunabilmektedir. Core-shell parçacık içeren kolonların tamamen poröz parçacık içeren kolonların yerini almasıyla kromatografik uygulamaların bir üst seviyeye taşınacağı ileri sürülmektedir. Bununla beraber core-shell parçacıklardan daha etkin verim almak için mevcut cihazların da geliştirilmesi gerekmektedir.

Core-shell parçacıklar, küçük boyutlardaki tamamen poröz parçacıklara ve monolitik kolonlara çözünebilirlik ve etkinlik açısından eşittir hatta bu iki tip kolondan daha üstün olduğunu da kanıtlamıştır. Core-shell parçacıklı kolonlardan yararlanılarak birçok alanda sunulan oldukça fazla sayıda çalışma bu teknolojinin analitik kimyanın neredeyse tüm alanlarında benimsenmesinin katlanarak arttığını göstermektedir.

Yaptığımız çalışmaların sonucu; daha önce yapılmış olan (Sravan ve ark., 2014; Shah ve ark., 2014; Siddartha ve ark., 2014; Mhamunkar ve ark., 2012; Patel ve ark., 2010) çalışmalara göre analiz süresi oldukça kısalmıştır, ayırım gücü bakımından incelendiğinde ise önceden yapılan (Sravan ve ark., 2014; Mohammed, 2014; Mhamunkar ve ark., 2012; Patel ve ark., 2010) çalışmalara göre çok daha iyi bir ayırım yapıldığı görülmektedir, seçicilik bakımından değerlendirildiğinde çok iyi bir seçicilik ile çalışmamızı sürdürdüğümüz görülmektedir, etkin tabaka sayısı açısından bakıldığında önceden yapılan (Shah ve ark., 2014; Mhamunkar ve ark., 2012; Patel ve ark., 2010; Sravan ve ark., 2014; Mohammed, 2014) çalışmalara göre daha fazla çıkmıştır ve bunun sonucunda da deneyimizin daha iyi bir ayırımla sonuçlandığı görülmüştür. Ayrıca çözücü sarfiyatını azalttığımız için çalışma yeşil kimya alanında da önem kazanmaktadır.

Sonuç olarak elde edilen veriler ışığında, tamsulosin ve dutasteritin aynı anda analizi için hızlı, duyarlı, kesin, kolay, doğru ve herhangi bir ön ayırma işlemine gerek duyulmayan bir analiz yöntemi geliştirilmiş ve piyasa preparatlarından bu maddelerin aynı anda analizine başarılı bir şekilde uygulanabileceği düşünülmektedir.

## ÖZET

### **Dutasterit ve Tamsulosin HCl'nin Yeni Nesil Kolonlar Kullanarak Bazı Sıvı Kromatografik Yöntemlerle Eş Zamanlı Analizi ve Optimizasyonu**

Bu çalışmada yüksek performanslı sıvı kromatografi tekniği ve bu yöntemde kullanılan yeni nesil kolonların farmasötik analizlerdeki yeri anlatılmaktadır. Yeni nesil kolonların, geleneksel silika kolonlarla etkinlik, analiz süresi ve performans bakımından karşılaştırılması yapılmıştır.

Yeni nesil kolonlarda dolgu maddesi olarak kullanılan core-shell parçacıkların yapısı anlatılarak, bunların analizlere etkileri incelenmiştir.

Çalışmalar sonucunda yeni nesil core-shell silika parçacıkları içeren kolonların, analiz süresi, etkinlik ve performans yönünden geleneksel silika parçacık içeren kolonlara göre daha iyi performans gösterdiği anlaşılmıştır.

Bu yöntemde; tamsulosin ve dutasteritin Kinetex C18 (150x4.6; 5µm) kolon, 45°C kolon sıcaklığı ile hareketli faz içeriği asetonitril: su, 60: 40 (h/h) ile % 0.1 0-fosforik asit (pH 7.0 5M NaOH ile ayarlanmıştır), içeren hareketli faz, 2 mL dk<sup>-1</sup> akış hızında kullanılmıştır. Dedektör olarak UV dedektör seçilmiştir. Çalışma dalga boyu ise 220 nm olarak seçilmiştir. İç standart olarak diğer iç standartlara kıyasla daha iyi bir pik şekli, kısa alıkonma zamanı ve daha iyi bir ayırım gösteren rilpivirin seçilmiştir. Geliştirilen YPSK yöntemiyle 3 dakika gibi kısa bir süre içerisinde tamsulosin, dutasterit ve iç standart olan rilpivirinin iyi bir şekilde ayrılmasını sağlamıştır. Bu şartlar kullanılarak, tamsulosin için 1,03 dk; dutasterit için 2,72 dk ve rilpivirin için 1,33 dk alıkonma zamanı elde edilmiştir.

Tamsulosin ve dutasterit tayini için valide edilen yöntem biyolojik numunelere uygulanmış ve bu maddelerin yöntemle bir etkisinin olup olmadığı da araştırılmıştır ve sonuç olarak biyolojik matrislerin analiz üzerine etkisi olmadığı görülmüştür. Bunun için geri kazanım deneyleri gerçekleştirilmiş ve sonuç olarak biyolojik matrislerin analiz üzerine etkisi olmadığı birkez daha desteklenmiştir.

Yöntem tamamen valide edilmiştir. Geliştirilen yöntemin geçerliliğini ve uygulanabilirliğini göstermek için geri kazanım çalışması yapılmıştır. Yüksek orandaki geri kazanım; yöntemin, ilaçların formülasyonunda kullanılan katkı maddelerinden ve yardımcı maddelerden etkilenmediğini göstermektedir. Geliştirilen YPSK çalışması, hammaddede ve farmasötik formülasyonlarda tamsulosin ve dutasteritin aynı anda tayini için geliştirilmiş olan yöntem hızlı, basit, yüksek kesinlik ve doğruluktadır. Geliştirilen bu yöntem, ekonomik olduğu ve zaman kazandırdığı için, kalite kontrol laboratuvarlarında kullanılabilir.

**Anahtar Kelimeler:** Core-shell kolon, Dutasterit, İlaç analizi, Tamsulosin, Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi.

## SUMMARY

### **Simultaneous Determination and Optimization of Dutasteride and Tamsulosin HCl Using New Generation Columns Via Liquid Chromatographic Methods**

In this study high performance liquid chromatography technique and the place of new generation columns which used in this technique for the pharmaceutical analysis were described. The comparison of new generation of columns with traditional silica column according to the efficiency, analysis time and performance were reported.

The structure of core-shell particles as a filling material were explained and the effect of these particles on the analysis were examined.

As a result of the studies, it can be understood that columns which include new generation core-shell silica particles shows better performance according to the analysis time, efficiency and performance when compared to the columns that include traditional silica particles.

In this method; the Kinetex C18 (150x4.6; 5 $\mu$ m) column, 45°C column temperature, mobile phase containing acetonitrile: water, 60: 40 (v / v) with 0,1% phosphoric acid (pH 7.0 adjusted with 5 M NaOH), and 2 mL min<sup>-1</sup> flow rate were used for the simultaneous determination of tamsulosin and dutasteride. The detector was selected as UV detector and the wavelength was used as 220 nm. Rilpivirin was chosen as the internal standard because it showed a shorter retention time with better peak shape and better resolution, compared to other potential internal standards. A good resolution between dutasteride, tamsulosin and internal standard within a short analysis time such as 3 minutes was provided with the developed HPLC method. Under the these experimental conditions, the retention time was obtained as 1,03 min for tamsulosin; 1,33 min for rilpivirine and 2,72 min for dutasteride.

The validated method was applied to the biological samples for the determination of dutasteride and tamsulosin, and the effect of the biological matrices to the developed method was investigated. As a result, there is no effect from the biological matrices was seen. For this purpose recovery studies were realized and the results were support that the biological matrices did not affect the analysis.

The proposed method was fully validated. In order to demonstrate the validity and applicability of the developed HPLC method, recovery tests were carried out. High percentage recovery shows that the method is free from the interferences in the biological matrices. The present HPLC method is a rapid, simple, high precise and accurate method for the simultaneous determination of tamsulosin and dutasteride. The developed method is suitable for quality control laboratories where economy and time are essential.

**Keywords:** Core-shell column, Dutasteride, High performance liquid chromatography, pharmaceutical analysis, Tamsulosin.

## KAYNAKLAR

ABRAHİM, A., AL-SAYAH, M., SKRDLA, P. , BEREZNITSKI, Y., CHEN, Y. , WU, N., (2010). Practical comparison of 2.7 microm fused-core silica particles and porous sub-2 microm particles for fast separations in pharmaceutical process development, J.Pharm. Biomed. Anal. **51** 131–137.

ADAMOVIĆ, J. (1997). Chromatographic analysis of pharmaceuticals. 2nd Ed., Revised and Expanded Vol **74**. New York: Marcel Dekker.

ALEXANDER, A., & MA, L. (2009). Comprehensive two-dimensional liquid chromatography separations of pharmaceutical samples using dual Fused-Core columns in the 2nd dimension. J. Chromatogr. A **1216** , 1338-1345.

ALİ, I., AL-OTHMAN, Z.A. & AL-ZA'ABI, M. (2012). Superficially porous particles columns for super fast HPLC separations. Biomed, Chromatogr. **26** , 1001-1008.

ASSASSI, A. L., ROY, C.-E., PEROVİTCH, P., AUZERIE, J., HAMON, T., & GAUDIN, K. (2014). Green analytical method development. Journal of Chromatography A , 104-109.

BADMAN, E., BEARDSLEY, R., LIANG, Z., & BANSAL, S. (2010). Accelerating high quality bioanalytical LC/MS/MS assays using fused-core columns. J. Chromatogr. B **878** , 2307-2313.

BAKIRHAN-KARADAS N,GUMUSTAS M, USLU B, OZKAN SA(2015) Simultaneous determination of amlodipine besylate and rosuvastatin calcium in binary mixtures by voltammetric and chromatographic techniques

BARWICK VJ, ELLISON SLR (Eds.) (2005). The evaluation of measurements uncertainty from method validation studies. In: Validation in Chemical Measurement, Eds.: De Bievre P, Gunzler H, Springer- Verlag Pub., Heidelberg.

BIDLINGMAYER, B. (1992). Practical HPLC Methodology and Applications. John Wiley & Sons.

BEŞERGİL B. (2002) ENSTRÜMENTAL ANALİZ

CAVAZZINI, A., GRITTI, F., KACZMARSKI, K., MARCHETTI, N., & GUIOCHON, G. (2007). Mass-transfer kinetics in a shell packing material for chromatography. Anal. Chem. **79** , 5972-5979.

ÇETİNKAYA E. (2015), Inovatif kimya dergisi s: 7-16.

- COHEN, E., MAXWELL, R. J., & DONOGHUE, D. j. (1999). Automated multi-residue isolation of fluoroquinolone antimicrobials from fortified and incurred chicken liver using on-line microdialysis and high-performance liquid chromatography with programmable fluorescence detection,. *J. Chromatogr. B* **724** , 137-145.
- DIOSZEGI, T.A. , RAYNIE, D.E., (2012). Kinetic performance comparison of a capillary monolithic and a fused-core column in micro-scale liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* **1261** 107–112.
- FEKETE, S., FEKETE, J., GANZLER, K., (2009). Characterization of new types of stationary phases for fast liquid chromatographic applications, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **50** 703–709.
- FEKETE, S., & OLAH, E. (2012). Fast liquid chromatography: the domination of core-shell and very fine particles. *J. Chromatogr. A* **1228** , 57-71.
- GEGENAVA M, CHANKVETADZE L, FARKAS T, CHANKVETADZE B (2014). Enantioseparation of selected chiral sulfoxides in high-performance liquid chromatography with polysaccharide-based chiral selectors in polar organic mobile phases with emphasis on enantiomer elution order. *J Sep Sci*, **37** (9-10): 1083-1088.
- GONZALEZ RUIZ, V., OLIVES, A. I., & MARTIN, M. A. (2014). Challenging core-shell stationary phases with the separation of closely related anti-cancer compounds: performance studies and application to drug quantitation in cell cultures with multi-well plate clean-up. *Journal of Chromatography A* , 83-91.
- GONZALEZ RUIZ, V., OLIVES, A. I., & MARTIN, M. A. (2015). Core-shell particles lead the way to renewing high-performance liquid chromatography. *Trends in Analytical Chemistry* , 17-26.
- GRITTS, F., LEONARDIS, I., SHOCK, D., STEVENSON, P., SHALLIKER, A., GUIOCHON, G., (2010). Performance of columns packed with the new shell particles, Kinetex-C18, *J. Chromatogr.* **1217** 1589–1603.
- GRITTI, F., & GUIOCHON, G. (2007). Unusual behavior of the height equivalent to a theoretical plate of a new poroshell stationary phase at high temperatures. *J. Chromatogr. A* **1169** , 125-138.
- GRITTI, F., & GUIOCHON, G. (2010). Mass transfer resistance in narrow-bore columns packed with 1,7 microm particles in very high pressure liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **1217** , 5069-5083.
- GRITTI, F., TANAKA, N., & GUIOCHON, G. (2012). Comparison of the fast gradient performance of new prototype silica monolithic columns and columns packed with fully porous and core-shell particles. *J. Chromatogr. A* **1236** , 28-41.

- GRITTI, F., & GUIOCHON, G. (2014). Rapid development of core-shell column technology: accurate measurements of intrinsic column efficiency of narrow-bore columns packed with 4,6 down to 1,3  $\mu\text{m}$  superficially porous particles. *J.Chromatogr. A* **1333** , 60-69.
- GUIOCHON, G., & GRITTI, G. (2011). Shell particles, trials, tribulations and triumphs. *J. Chromatogr. A* **1218** , 1915-1938.
- GUMUSTAS M, OZKAN SA (2011). The role of and the place of method validation in drug analysis using electroanalytical techniques. *The Open Analytical Chemistry Journal*, **5**: 1-21.
- GÜMÜŞTAŞ M, USLU B, OZKAN SA, ABOUL-EENEİN HY (2014) Validated Stability-Indicating HPLC and UPLC Assay Methods for the Determination of Entacapone in Pharmaceutical Dosage Forms
- GÜMÜŞTAŞ M, COSKUN G, OZKAN SA (2014) Selective and sensitive determination of repaglinide in pharmaceuticals by voltametric and LC methods.
- GÜVEL S, KILINÇ F, KARADAĞ H (2000) Benign prostat hiperplazisi, Sürekli Tıp Eğitimi Dergisi <http://www.ttb.org.tr/sted/sted0100/st01003.html> 10.03.2016
- HAMILTON, R., & SEWEL, P. (1982). *Introduction to HPLC*. New York/USA, 69-200: 2 nd ed., Chapman and Hall, New York Inc.
- HAYES, R., AHMED, A., EDGE, T., & ZHANG, H. (2014). Core-shell particles: preparation, fundamentals and applications in high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **1357** , 36-52.
- KIRKLAND, J., SCHUSTER, S., JOHNSON, W., & BOYES, B. (2013). Fused-core particle technology in high performance liquid chromatography: an overview. *J. Pharm. Anal.* **3** , 303-312.
- KOSTKA, J., GRITTI, F., KACZMARSKI, K., & GUIOCHON, G. (2011). Modified Equilibrium-Dispersive Model for the interpretation of the efficiency of columns packed with core-shell particle. *J. Chromatogr. A* **1218** , 5449-5455.
- Mazzeo, J. R., Neue, U. D., Kele, M., and Plumb, R. S. (2005) *Analytical Chemistry* (Washington, DC) **77**, 460-467.
- MEYER, R. (1988). *Practical HPLC*. Toronto, Canada: John Wiley & Sons.
- MHAMUNKAR, S.M., VYAVAHARKAR, R.Y., BHISOIR, S.I., (2012) RP-HPLC method development and validation for the simultaneous estimation of Tamsulosin HCL and Tolterodine Tartrate in pharmaceutical dosage form



- MOHAMMAD J, LI Y-M, EL-AHMAD M, NAKAZATO K, PETTERSSON G, HJERTEN S (2014). Chiral recognition chromatography of B-blockers on continuous polymer beds with immobilized cellulase as enantioselective protein. *Chirality*, **5**: 464-470.
- NESTERENKO, E.P., NESTERENKO, P.N. , CONNOLY, D. , HE, X. , FLORIS, P. , DUFFY, E. et al. (2013). Nano-particle modified stationary phases for high-performance liquid chromatography, *Analyst* **138** 4229–4254.
- NUNEZ, O., GALLART-AYALA, H., MARTINS, C.P.B., LUCCI, P., (2012) New trends in fast liquid chromatography for food and environmental analysis, *J. Chromatogr. A* **1228** 298–323.
- OZKAN SA (2012). *Electroanalytical Methods in Pharmaceutical Analysis and Their Validation*. HNB Pub., USA, ISBN: 978-0-9664286-7-4.
- OZKAN SA, KAUFFMAN JM, ZUMAN P (2015). *Electroanalysis in Biomedical and Pharmaceutical Sciences: Voltammetry, Amperometry, Biosensors, Applications*. Springer Heidelberg, New York.
- PATEL, D.B., PATEL, N.J., PATEL, S.K., PRAJAPATI, A.M., PATEL, S.A. (2010) RP-HPLC method for the estimation of dutasteride in tablet dosage form
- PRICHARD E, BARVICK V (2007). *Quality Assurance in Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons Pub. UK.
- RUTA, J., GUILLARME, D., RUDAZ, S., & VEUTHEY, J.-L. (2010). Comparison of columns packed with porous sub-2 microm particles and superficially porous sub-3 microm particles for peptide analysis at ambient and high temperature. *J. Sep. Sci.* **33**, 2465-2477.
- SALISBURY, J.J. (2008). Fused-core particles: a practical alternative to sub-2 micron articles. *J. Chromatogr. Sci.* **46** , 883-886.
- SAYAN S (2005), Benign prostat hiperplazili hastalarda Tamsulosin ve Dutasteritin klinik ve laboratuvar parametreler üzerine etkilerinin kıyaslanması.
- SEWEL, P., CLARKE, B., & KEALEY, D. (1987). *Chromatographic separations*. New York: Wiley.
- SHAABAN, H., GORECKI, T., (2012) . Fused core particles as an alternative to fully porous sub-2 µm particles in pharmaceutical analysis using coupled columns at elevated temperature, *Anal. methods* **4** 2735–2743.

SHAH, H.P., KHANDAR, A., DESHPANDE, S., BAGADE, S., (2014) Novel RP-HPLC method for simultaneous estimation of silodosin and dutasteride in multiunit solid dosage form

SİDDARTHA, B., SUDHEER Babu, I., GUPTA, C.R., PARTHİBAN, C., (2014) Analytical method development and validation for simultaneous estimation of tamsulosin and tolterodine in bulk & pharmaceutical dosage form by RP-HPLC method

SKOOG-HOLLER-NİEMAN. (1998). Principles of Instrumental Analysis. Brooks/Cole: 5th Ed.

SRAVAN Kumar Reddy, G., ASHUTOSH Kumar, S., DEBNATH, M., RAJ Kumar, V., (2014) Analytical method development & validation for simultaneous determination of Dutasteride and Tamsulosin in bulk as well as in pharmaceutical dosage form by using RP-HPLC

ÜSTÜNES L (Ed.) (2016). RxMediaPharma interaktif ilaç bilgi kaynağı. GEMAŞ Genel Mühendislik Mekanik San. ve Tic. A.Ş., Bornova, İzmir.

VICTOR GONZALEZ-RUIZ, A. I. (2015). Core-shell particles lead the way to renewing high-performance liquid chromatography. Trends in Analytical Chemistry **64**,17- 28.

WANG, Y., AI, F., NG, S.-C. , TAN, T.T.Y (2012). Sub-2 µm porous silica materials for enhanced separation performance in liquid chromatography, J. Chromatogr. A **1228** 99–109.

Wikipedia [https://tr.wikipedia.org/wiki/T%C3%BCrk%C3%A7e\\_Wikipedi](https://tr.wikipedia.org/wiki/T%C3%BCrk%C3%A7e_Wikipedi) 02.02.2016

## ÖZGEÇMİŞ

### I. Bireysel Bilgiler

**Adı:** BOĞAÇ BUĞRA

**Soyadı:** BARUT

**Doğum yeri ve tarihi:** MERSİN, 05.01.1989

**Uyruğu:** TÜRKİYE CUMHURİYETİ

**Medeni durumu:** EVLİ

**Askerlik durumu:** TECİLLİ

**İletişim adresi ve telefonu:** ILICA MAHALLESİ SAHİL CADDESİ 228/F BARUT  
ECZANESİ MANAVGAT/ANTALYA

### II- Eğitimi (tarih sırasına göre yeniden-eskiye doğru)

2007–2012/Lisans/Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi/Eczacılık Bölümü

2004–2007/Lise/Adem Tolunay Anadolu Lisesi(Antalya)

2003–2004/Lise/Mehmet Adnan Özçelik Anadolu Lisesi(Mersin)

1995–2003/İlköğretim/ Çankaya İlköğretim Okulu(Mersin)

**Yabancı dili:** İngilizce ve Almanca

### **III- Ünvanları** (tarih sırasına göre eskiden-yeniye doğru)

Öğrenci-Eczacı

### **IV- Mesleki Deneyimi**

2008–2009/Yaz Dönemi Serbest Eczane Stajı/Alpsoy Eczanesi (Antalya)

2009–2010/ Yaz Dönemi Serbest Eczane Stajı/Yeniköy Eczanesi (Antalya)

2010–2011/ Yaz Dönemi Endüstri Stajı/ Bristol-Myers Squibb (İstanbul)

2011–2012/ Bahar Dönemi Serbest Eczane Stajı/Tepe Eczanesi (Ankara)

2012-.../Barut Eczanesi Eczacısı (Side-Antalya)

### **V- Bilimsel ilgi Alanları**

İlaç analizleri, YPSK, Yöntem validasyonu.

### **VI- Bilimsel Etkinlikleri**

#### **Sunulan Bildiriler**

1)Bengi Uslu, Ayşen Gümüşttaş, Mehmet Gümüşttaş, B.Buğra Barut, Sibel A. Özkan, HPLC 43 rd International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, HPLC 2015, 21–25 Eylül 2015, Beijing, Çin. Abstract ID.12,p.165.

2) B.Buğra Barut, Ayşen Gümüştaş, Mehmet Gümüştaş, Sibel A. Özkan, Bengi Uslu Dutasterit ve tamsulosinin eşzamanlı kromatografik analizi. 8. Ulusal Analitik Kimya Kongresi, 30 Mayıs–3 Haziran 2016 Isparta, Türkiye.

### **Projeleri**

Dutasterit ve tamsulosin HCl'nin yeni nesil kolonlar kullanarak bazı sıvı kromatografik yöntemlerle eş zamanlı analizi ve optimizasyonu, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeler Müdürlüğü, Proje No:15L0237004, Araştırmacı.

Proje Bütçesi:19,988,3 TL.

### **Verdiği Seminerler**

Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nde "Sıvı Kromatografisinde Kullanılan Yeni Nesil Kolonlar ve Özellikleri" konu başlıklı seminer 04.12.2015 tarihinde verilmiştir.