TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOLUTEGRAVİR İÇEREN FARMASÖTİK PREPARATLAR İÇİN ANALİZ YÖNTEMLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ

Mehmet Soner BAY

ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Nevin ERK

ANKARA
2026

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOLUTEGRAVİR İÇEREN FARMASÖTİK PREPARATLAR İÇİN ANALİZ YÖNTEMLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ

Mehmet Soner BAY

ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Nevin ERK

ANKARA

2026

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum "Dolutegravir İçeren Farmasötik Preparatlar için Analiz Yöntemlerinin Geliştirilmesi" başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir.
Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Mehmet Soner BAY
Tarih:
İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Analitik Kimya Anabilim Dalında

Mehmet Soner Bay tarafından hazırlanan "Dolutegravir İçeren Farmasötik Preparatlar için Analiz Yöntemlerinin Geliştirilmesi" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ/OY ÇOKLUĞU ile kabul/ret edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

……Üniversitesi

Jüri Başkanı

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

……Üniversitesi

Raportör

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

…….Üniversitesi

Üye

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

……Üniversitesi

Üye

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

…….Üniversitesi

Üye

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

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

Dolutegravir İçeren Farmasötik Preparatlar için Analiz Yöntemlerinin Geliştirilmesi

Doktora tez çalışması kapsamında, sentetik ve ticari preparatlardan hazırlanan çözeltilerdeki Dolutegravir (DTG), Abakavir (ABC) ve Lamivudin (3TC) etken maddelerinin nicel ve nitel analizine yönelik iki farklı analitik yöntem geliştirilmiştir: Spektrofotometrik analiz ve yüksek performanslı sıvı kromatografi (YPSK). Geliştirilen yöntemler, bu etken maddelerin doğru hassas ve seçici bir şekilde tayin edilmesine olanak tanımış ve analitik performans parametreleri açısından yüksek başarı göstermiştir. Spektrofotometrik analizde, Dolutegravir ve Lamivudin içeren karışımlarda bu iki etken maddenin absorbans maksimaları birbirine yakın olduğu için etken madde miktarlarını tayin etmek için absorbans düzeltme (AD) yöntemi ve indüklenmiş ikili dalgaboyu (İİD) yöntemleri kullanılmıştır. Bu yöntemler vasıtasıyla DTG ve 3TC'nin doğru, hızlı ve ekonomik biçimde tayini gerçekleştirilmiştir. YPSK analizlerinde hazırlanan kalibrasyon çözeltileri derişim aralığı DTG için 5-200 µg/mL, 3TC için 5-600 µg/mL ve ABC için 5-900 µg/mL aralığında olup 5 µL enjeksiyonlar yapılmış ve her bir etken madde için pik alanları kendi λmaks'larında (DTG için λ1:258 nm, 3TC için λ2:278 nm ve ABC için λ3:294 nm) okunarak elde edilen alanlara karşı ilgili derişimler grafiğe geçirilmiştir. Korelasyon katsayısı, yakalama sınırı ve tayin alt sınırı değerleri DTG için sırasıyla 0,9987 , 4,0 µg/mL ve 12,2 µg/mL, 3TC içi sırasıyla 0,9997, 6,8 µg/mL ve 20,6 µg/mL ve de ABC için sırasıyla 0,9997, 9,5 µg/mL ve 28,7 µg/mL olarak bulunmuştur. Spektrofotometrik analizler için hazırlanan kalibrasyon çözeltileri ise DTG için 3,0-24,0 µg/mL ve 3TC için 3,0-30,0 µg/mL aralığında idi. Absorbans Düzeltme (AD) yöntemi ile elde edilen kalibrasyon grafiğine ait korelasyon katsayısı, yakalama sınır ve tayin alt sınırı değerleri DTG için sırasıyla 0,99988, 0,23 µg/mL ve 0,70 µg/mL, 3TC için ise sırasıyla 0,99987, 0,30 µg/mL ve 0,91 µg/mL olarak bulunmuştur. İndüklenmiş İkili Dalgaboyu (İİD) yöntemi elde edilen kalibrasyon grafiğine ait korelasyon katsayısı, yakalama sınır ve tayin alt sınırı değerleri DTG için sırasıyla 0,99639, 1,27 µg/mL ve 3,86 µg/mL, 3TC için ise sırasıyla 0,99992, 0,24 µg/mL ve 0,73 µg/mL olarak bulunmuştur. Her üç etken maddenin sentetik ve farmasötik dozaj formları kullanılarak hazırlanan çözeltileri ile, optimize edilmiş kolon ve hareketli faz şartlarında bir arada tayini amaçlayan YPSK de geliştirilmiş olup yöntemin özellikle karmaşık örnek matrislerinde yüksek çözünürlük ve ayırım kabiliyeti sunarak, DTG, ABC ve 3TC'nin matris bileşenlerinden bağımsız ve aralarında net bir ayırım sağlanarak tayini mümkün kılınmıştır. Sonuç olarak, tez kapsamında geliştirilen spektrofotometrik ve kromatografik analiz yöntemleri, bu ve benzer antiviral ilaçların hem tek başlarına hem de bir arada doğruluk, güven, seçicilik ve düşük ve yüksek derişimlerde bile analizi için yenilikçi, çevreci, zaman tasarrufu ve kullanıcı kolaylığı sağlayan güvenilir yaklaşımlar sunmuştur.

Anahtar Sözcükler: Abakavir, Dolutegravir, Lamivudin, Ters Faz Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi, UV-Gör. Spektrofotometri

SUMMARY

Development of Analytical Methods for Dolutegravir-Containing Pharmaceutical Preparations

As part of a doctoral thesis, two different analytical methods were developed for the quantitative and qualitative analysis of Dolutegravir (DTG), Abacavir (ABC), and Lamivudin (3TC) in solutions prepared from synthetic and commercial preparations: Spectrophotometric analysis and high-performance liquid chromatography (HPLC). The developed methods allowed for the accurate, sensitive, and selective determination of these active substances and demonstrated high success in terms of analytical performance parameters. In spectrophotometric analysis, since the absorbance maxima of Dolutegravir and Lamivudin are close to each other in mixtures containing these two active substances, the absorbance correction (ACM) method and induced dual wavelength (IDWM) methods were used to determine the amounts of the active substances. Through these methods, the accurate, rapid, and economical determination of DTG and 3TC was achieved. In HPLC analyses, the prepared calibration solutions had concentration ranges of 5-200 µg/mL for DTG, 5-600 µg/mL for 3TC, and 5-900 µg/mL for ABC. 5 µL injections were administered, and the peak areas for each active substance were read at their respective λmaxes (λ_1:258 nm for DTG, λ_2:278 nm for 3TC, and λ_3:294 nm for ABC). The corresponding concentrations were plotted against these areas. The correlation coefficient, of the calibration graph, LOD and LOQ values were found to be 0.9987, 4.0 µg/mL, and 12.2 µg/mL for DTG and 0.9997, 6.8 µg/mL, and 20.6 µg/mL for 3TC and 0.9997, 9.5 µg/mL, and 28.7 µg/mL for ABC respectively. The calibration solutions prepared for spectrophotometric analyses were in the range of 3.0-24.0 µg/mL for DTG and 3.0-30.0 µg/mL for 3TC. The correlation coefficient, LOD and LOQ values of the calibration graph obtained by the Absorbance Correction (ACM) method were found to be 0.99988, 0.23 µg/mL, and 0.70 µg/mL for DTG and 0.99987, 0.30 µg/mL, and 0.91 µg/mL for 3TC, respectively. The correlation coefficient of the calibration graph, LOD and LOQ values obtained by the Induced Dual Wavelength (IDWM) method were found to be 0.99639, 1.27 µg/mL, and 3.86 µg/mL for DTG and 0.99992, 0.24 µg/mL, and 0.73 µg/mL for 3TC, respectively. The developed HPLC method aims to determine all three active substances together using solutions prepared with their synthetic and pharmaceutical dosage forms, under optimized column and mobile phase conditions. This method offers high resolution and separation capability, especially in complex sample matrices, enabling the determination of DTG, ABC, and 3TC independently of matrix components and with clear separation between them. In conclusion, the spectrophotometric and chromatographic analysis methods developed within the scope of this thesis offer innovative, environmentally friendly, time-saving, and user-friendly approaches for the analysis of these and similar antiviral drugs, both individually and in combination, providing accuracy, reliability, selectivity, and ease of use even at low and high concentrations.

Keywords: Abacavir, Dolutegravir, Lamivudine, Reverse Phase High-Performance Liquid Chromatography, UV-Vis. Spectrophotometry.

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan ii
Kabul ve Onay iii
Özet iv
İçindekiler vi
Önsöz viii
Simgeler ve Kısaltmalar ix
Şekiller xiii
Çizelgeler xiv

1. GİRİŞ 1
1.1. Giriş ve Amaç 1
1.1.1. HIV ve AIDS Hakkında Genel Bilgi 1
1.1.1.1. HIV ve AIDS'in Tarihi 1
1.1.1.2. HIV'in Bulaşma Yolları 1
1.1.1.3. AIDS'in Tedavisi 3
1.1.1.4. AIDS'in Küresel Durumu 3
1.2. Tez Kapsamında Kullanılan Antiretroviral Etken Maddeler ile İlgili Bilgiler 4
1.2.1. Dolutegravir 4
1.2.1.1. Dolutegravir'in Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri 5
1.2.1.2. Dolutegravir'in Farmakolojik Özellikleri 5
1.2.1.3. Dolutegravir'in Yan Etkileri 6
1.2.2. Lamivudin 7
1.2.2.1. Lamivudin'in Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri 7
1.2.2.2. Lamivudin'in Farmakolojik Özellikleri 8
1.2.2.3. Lamivudin'in Yan Etkileri 9
1.2.3. Abakavir 10
1.2.3.1. Abakavir'in Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri 10
1.2.3.2. Abakavir'in Farmakolojik Özellikleri 11
1.2.3.2. Abakavir'in Yan Etkileri 12
1.3. Dolutegravir, Lamivudin ve Abakavir Eş Zamanlı Tayini İçin Günümüze Kadar Uygulanmış Olan Analiz Yöntemleri 12
1.4. Tez Kapsamında Kullanılan Yöntemler 17
1.4.1. Kromatografik Ayırma Yöntemleri 17
1.4.1.1. Tanımlar 17
1.4.1.2. Sıvı Kromatogrfisi ve Temel Bileşenleri 24
1.4.1.3. YPSK'nin Avantajları 28
1.4.1.4. YPSK'nin Dezavantajları 29
1.4.2. Spektrofotometrik Yöntemler 29
1.4.2.1. Spektrofotometrik Yöntemlerin Temel Prensipleri ve Beer-Lambert Yasası 29
1.4.2.2. Ultraviyole ve Görünür Bölge (UV-GB) Spektroskopi 30
1.4.2.3. Basit Bir Spektrofotometre Cihazının Temel Bileşenleri 31
1.4.2.4. Spektrofotometrik Yöntemlerin Uygulamaları 32
1.4.2.4.1. Eşzamanlı Denklem Yöntemi 33
1.4.2.4.2. Absorans Düzeltme Yöntemi 34
1.4.2.4.3. Çift Dalgaboyu Yöntemi 34
1.4.2.4.4. İndülenmiş Çift Dalgaboyu Yöntemi 36

2. GEREÇ VE YÖNTEM 37
2.1. Gereçler 37
2.1.1. Kullanılan Kimyasallar ve Referans Maddeler 37
2.1.2. Kullanılan Analitik Cihazlar ve Ekipmanlar 37
2.2. Deneysel Koşulların Optimizasyonu 38
2.2.1. YPSK İçin Deneysel Koşulların Optimizasyonu 38

2.2.2. Spektrofotometrik Yöntemler İçin Deneysel Koşulların Optimizasyonu 39
2.3. Analitik Yöntem Geliştirme ve Validasyon Çalışmaları 39
2.3.1. YPSK Geliştirme ve Validasyon Çalışmaları 39
2.3.1.1. Doğrusallık ve Kalibrasyon Eğrileri için Standart Çözeltilerin Hazırlanması 39
2.3.1.2. Kesinliğin Araştırılması (Güniçi ve Günler Arası) 41
2.3.1.3. Doğruluğun Araştırılması (Geri Kazanım) 42
2.3.1.4. Sağlamlığın Araştırılması 43
2.3.1.5. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması 43
2.3.1.6. Zorlanmış Bozunma Çalışmaları 44
2.3.2. Spektrofotometrik Yöntemlerin Geliştirilmesi ve Validasyon Çalışmaları 45
2.3.2.1. Doğrusallık ve Kalibrasyon Eğrileri için Standart Çözeltilerin Hazırlanması 45
2.3.2.2. Absorbans Düzeltme Yöntemi 46
2.3.2.3. İndüklenmiş İkili Dalgaboyu Yöntemi 47
2.3.2.4. Doğruluğun Araştırılması (Geri Kazanım) 47
2.3.2.5. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması 48

3. BULGULAR 50
3.1. YPSK ile Elde Edilen Bulgular 50
3.1.1. Etken Madde Kromatogram ve Spektrumları 51
3.1.2. Kalibrasyon Eğrileri 52
3.1.3. Tekrarlanabilirlik 53
3.1.4. Kesinlik 54
3.1.4.1. Güniçi Deney Sonuçları 54
3.1.4.2. Günlerarası Deney Sonuçları 55
3.1.5. Doğruluk; Geri Kazanım Deney Sonuçları 56
3.1.6. Sağlamlığın Araştırılması Deney Sonuçları 57
3.1.7. Zorlanmış Bozunma Deney Sonuçları 58
3.1.7.1. Termal Bozunma 58
3.1.7.2. Asidik Bozunma 59
3.1.7.3. Bazik Bozunma 59
3.1.7.4. Oksidatif Bozunma 60
3.1.8. Miktar Tayini Verileri 61
3.2. Spektrofotometrik Yöntemler ile Elde Edilen Bulgular 62
3.2.1. Etken Madde Spektrumları 62
3.2.2. Kalibrasyon Eğrileri 63
3.2.3. Doğruluk; Geri Kazanım Deney Sonuçları 65
3.2.4. Miktar Tayini Verileri 66

4. TARTIŞMA 67
5. SONUÇ ve ÖNERİLER 70
KAYNAKLAR 72
ÖZGEÇMİŞ 76

ÖNSÖZ

Doktora tezi kapsamında, HIV integraz inhibitörü ve nükleosid ters transkriptaz inhibitörleri grubuna dâhil olan Dolutegravir, Lamivudin ve Abakavir'i bir arada içeren tablet formundaki preparatlarından miktar tayini için yüksek basınçlı sıvı kromatografik ve UV-GB spektrofotometrik yöntemler geliştirilmesi hedeflenmiştir. Geliştirilen yöntemlerin Türkiye ilaç piyasasına giren preparatlara uygulanması amaçlanmıştır.

Ders dönemim ve tez çalışmalarım sırasında değerli katkılarıyla çalışmalarıma yön veren, gerek kişiliği gerekse de bilimsel nitelikleriyle örnek aldığım sayın hocam Prof. Dr. Nevin ERK'e emekleri ve sonsuz destek ve anlayışı için teşekkürü borç bilirim.

Doktora eğitimim ve tez dönemim boyunca anlayış ve destekleriyle yanımda olan, motivasyon kaynağım aileme, öncelikle eşim Serap BAKIR BAY, oğlum Eczacı adayı Efe BAY ve kızım Defne BAY'a, teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimim, tez dönemim boyunca ve yaptığım çalışmalar boyunca yardımlarını esirgemeyen, tavsiye, öngörü ve destekleriyle beni motive eden çalışma arkadaşlarım Bil. Uzm. Ecz. Emine ÇİLOĞLU, Bil. Uzm. Ecz. Zerrin ACAR, Bil. Uzm.Ecz. Ayşe Asena GENÇ, Dr. Wiem BOUALI, Uzm. Ecz Çiğdem Aybüke ÖZATA, Ecz. Elif Naz ÖVEN ve Uzm. Ecz. Marwah NASER'e teşekkürlerimi sunarım.

SİMGELER VE KISALTMALAR

3TC	Lamivudin
a	Absorbtivite ($L.g^{-1}.cm^{-1}$)
α	Ayırım faktörü (Kromatografik yöntem)
A	Absorbans değeri
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ABC	Abakavir
ACN	Asetonitril
AD	Absorbans düzeltme
ADE	Olumsuz ilaç olayları
AIDS	Edinilmiş bağışıklık yetersizliği sendromu
ARV	Anti-retroviral
As	Simetri faktörü (Kromatografik yöntem)
ATC	Anatomik ve Terapötik Kimyasal Sınıflandırma Sistemi
AZT	Zidovudin
b	Işığın örnek içinde adığı yol (cm)
BDK	Boyut dışlama kromatografi
BH	Bağıl hata
BOS	Beyin-omurilik sıvısı
BSS	Bağıl standart sapma
cm	Santimetre
C	Derişim ($g.L^{-1}$)
°C	Derece (Celcius)
CAD	Yüklü aeorosol dedektörü
CBV-TP	Karbovir-5-trifosfat
CCR5	C-C kemokin reseptörü tip 5
CD4+	Beyaz kan hücreleri
CDC	ABD Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezi
CYT	Sitokrom P450
DAD	Diode-array dedektör
dk	Dakika
Dm	Kütle dağılım faktörü
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DTG	Dolutegravir
ε	Epsilon, molar absorptivite değeri ($L.mol^{-1}.cm^{-1}$)
EAA	Serum-ilaç konsantrasyonu zaman eğrisi

ECD	Elektrokimyasal dedektör
eGFR	Tahmini glomerüler filtrasyon hızı
ELISA	Enzim bağlantılı immunosorbent yöntemi
ELSD	Buharlaştırmalı ışık saçılma dedektörü
F	Akış hızı, $mLdk^{-1}$ (BDK)
FDA	Gıda Güvenliği ve Beslenme Merkezi
g	Gram
GA	Genetik algoritma
h	Planck sabiti ($6,62 \times 10^{-34}$ J.s)
h	Pik yüksekliği (Kromatografik yöntem)
h/2	Pik yarı yüksekliği (Kromatografik yöntem)
H	Teorik tabaka yüksekliği (Kromatografik yöntem)
HAART	Yüksek etkili anti-retrovital tedavi
HBsAg	Hepatit B virüsü yüzey antijeni
HBV	Hepatit B virüsü
HIV	İnsan bağışıklık yetmezliği virüsü
HLA	İnsan lökosit antijeni
Hp	Küçük olan pikin ekstrapole edilmiş baseline çizgisi üzerindeki yüksekliği (Kromatografik yöntem)
Hv	Küçük ve büyük pikleri ayıran eğrinin en alçak noktasında ekstrapole edilmiş baseline üzerindeki yükseklik (Kromatografik yöntem)
I	Örnekten çıkan ışımanın şiddeti (cd, Spektroskopik yöntem)
I_0	Örneğe gelen ışımanın şiddeti (cd, Spektroskopik yöntem)
IC90	% 90 oranında inhibisyon sağlanan derişim
ICH	Uluslararası Uyum Konferansı
ILS	Ters en küçük kareler yöntemi
INSTI	İntegraz iplik transfer inhibitörü
IR	Kızılötesi
İİD	İndüklenmiş ikili dalgaboyu
İTK	İnce tabaka kromatografi
IUPAC	Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği
K	Dağılma katsayısı (Kromatografik yöntem)
k	Alıkonma faktörü (Kromatografik yöntem)
k’	Kapasite faktörü (Kromatografik yöntem)
K_0	Dağılım sabiti (BDK)
KC	Dağılım sabiti
λ	Lamda, Işımanın dalga boyu (nm)
L	Kolon uzunluğu (Kromatografik yöntem)
L,l	Litre

LogP	Dağılım katsayısı (logaritmik değer)
m	Metre
M	Molarite (mol L^{-1}.)
Ma	Molekül ağırlığı (g)
MALS	Çok açılı ışık saçılım dedektörü
MeOH	Metanol
MS	Kütle dedektörü
µg	Mikrogram
mg	Miligram
mL	Mililitre
µm	Mikrometre
mm	Milimetre
√	Nü, Işımanın frekansı (s^{-1})
N	Teorik plaka sayısı (Kromatografik yöntem)
NRTI	Nükleosid RT inhibitörleri
OBR	Optimize edilmiş arka plan
OCT	Organik katyon taşıyıcı
PDA	Fotodiyot dedektör (Kromatografik yöntem)
pKa	Asidik iyonlaşma katsayısı
PLS	Kısmi en küçük kareler
PPI	Proton pompası inhibitörleri
ppm	Milyonda bir birim
PrEP	Temas öncesi profilaksi
p/v	Pik/vadi oranı Kromatografik yöntem)
r	Korelasyon katsayısı
R	Rezolüsyon (Kromatografik yöntem)
R_f	Alıkonma faktörü (Kromatografik yöntem)
RF	Geciktirme faktörü
rG	Ayarlanmamış bağıl alıkonma (Kromatografik yöntem)
RI	Refraktif indis
RNA	Ribonükleik asit
R_{REL}	Bağıl gecikme (Kromatografik yöntem)
Rs	Rezolüsyon (Kromatografik yöntem)
Rt	Alıkonma zamanı (Kromatografik yöntem)
RT	Ters transkriptaz
s	Saniye
S/N	Sinyal/gürültü oranı
SNP	Tek nükleotid polimorfizmleri
SK-KS	Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometre

SS	Standart sapma
T	Transmittans (Geçirgenlik)
t	Zaman (kromatografik yöntem)
t_0	Ölü zaman (Kromatografik yöntem)
t_0	Önce gelen pikin alıkonma süresi (BDK)
t_M	Alıkonma süresi (BDK)
t_R	İlgili pikin alıkonma süresi (BDK)
tt	Toplam mobil faz süresi (BDK)
TAS	Tayin alt sınırı
TF-YPSK	Ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografi
TF-UPSK	Ters faz ultra basınçlı sıvı kromatografi
TP	Trifosfat
t_R	Alıkonma zamanı (Kromatografik yöntem)
t_w	Pik taban genişliği (Kromatografik yöntem)
UDP	Üridindifosfat
UGT	UDG-glukuronosiltransferaz
UNAIDS	Birleşmiş Milletler HIV/AIDS programı
UPSK	Ultra performanslı sıvı kromatografi
UV	Ultraviyole (Morötesi)
UV-GB	Ultraviyole ve görünür bölge
V_0	Alıkonmayan bileşen için alıkonma hacmi (BDK)
V_D	Dağılım hacmi (Farmakoloji)
V_D	Bekleme hacmi (BDK)
$V_{D/F}$	Dağılım hacmi/emilim kesri (Farmakoloji)
V_H	Ölü Hacim (Kromatografik yöntem)
V_M	Alıkonma hacmi (Kromatografik yöntem)
V_R	Alıkonma hacmi (Kromatografik yöntem)
YP-ITK	Yüksek performanslı ince tabaka kromatografi
YPSK	Yüksek performanslı sıvı kromatografi
tM	Alıkonma süresi (Kromatografik yöntem)
TS	Teşhis sınırı ($\mu g.mL^{-1}$)
Wh	Yüksekliğin yarısındaki pik genişliği (Kromatografik yöntem)
Wi	Dönüm noktasındaki pik genişliği (Kromatografik yöntem)

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Dolutegravir'in Kimyasal Yapısı 5
Şekil 1.2. Lamivudin'in Kimyasal Yapısı 8
Şekil 1.3. Abakavir'in Kimyasal Yapısı 10
Şekil 1.4. Avrupa Farmakopesi güncel versiyonunda verilen örnek kromatogram 18
Şekil 1.5. Avrupa Farmakopesi güncel versiyonunda verilen pik-vadi oranı için örnek şekil 19
Şekil 1.6. Avrupa Farmakopesi güncel versiyonunda verilen bağıl gecikme gösterimi için örnek şekil 20
Şekil 1.7. Avrupa Farmakopesi güncel versiyonunda verilen alıkonma zamanı ve pik genişliği ile rezolüsyon arasındaki ilişkiyi gösteren örnek şekil 22
Şekil 1.8. Avrupa Farmakopesi güncel versiyonunda verilen örnek referens çözelti kromatogramı 23
Şekil 1.9. Avrupa Farmakopesi güncel versiyonunda verilen örnek kör çözelti kromatogramı 23
Şekil 1.10. Avrupa Farmakopesi güncel versiyonunda verilen simetri faktörü hesabı için örnek kromatogram 24
Şekil 1.11. Temel bileşenleri ile tipik bir YPSK cihazının şematik gösterimi 24
Şekil 1.12. Temel bileşenleri ile tipik bir çift ışık yollu spektrofotometre cihazının şematik gösterimi 31
Şekil 1.13. Tipik UV-GB spektrumu 34
Şekil 1.14. Çift dalga boyu yönteminde çalışılacak dalgaboylarının seçimi 35
Şekil 2.1. DTG ve 3TC için seçilen dalgaboylarının gösterimi 46
Şekil 3.1. Optimum analiz koşullarında elde edilen DTG kromatogram ve spektrumu 51
Şekil 3.2. Optimum analiz koşullarında elde edilen 3TC kromatogram ve spektrumu 51
Şekil 3.3. Optimum analiz koşullarında elde edilen ABC kromatogram ve spektrumu 52
Şekil 3.4. YPSK ile elde edilen DTG kalibrasyon grafiği 52
Şekil 3.5. YPSK ile elde edilen 3TC kalibrasyon grafiği 53
Şekil 3.6. YPSK ile elde edilen ABC kalibrasyon grafiği 53
Şekil 3.7. MeOH içerisinde hazırlanmış DTG ve 3TC içeren çözeltiye ait 200-400 nm arasında kaydedilen spektrum 62
Şekil 3.8. AD yöntemi ile elde edilen DTG kalibrasyon grafiği 63
Şekil 3.9. AD yöntemi ile elde edilen 3TC kalibrasyon grafiği 64
Şekil 3.10. İİD yöntemi ile elde edilen DTG kalibrasyon grafiği 64
Şekil 3.11. İİD yöntemi ile elde edilen 3TC kalibrasyon grafiği 65

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. YPSK için kalibrasyon çözeltileri hazırlığı 40
Çizelge 2.2. YPSK için hazırlanan kalibrasyon çözeltileri derişimleri 40
Çizelge 2.3. YPSK için DTG geri kazanım çözeltileri hazırlığı 42
Çizelge 2.4. YPSK için 3TC geri kazanım çözeltileri hazırlığı 42
Çizelge 2.5. YPSK için ABC geri kazanım çözeltileri hazırlığı 43
Çizelge 2.6. YPSK için optimize edilmiş parametreler ve gerçekleştirilmesi planlanan değişim değerleri 43
Çizelge 2.7. Ticari preparatlar kullanılarak hazırlanan numune çözeltileri 44
Çizelge 2.8. Spektrofotometrik yöntemler için kalibrasyon çözeltileri hazırlığı 45
Çizelge 2.9. Spektrofotometrik yöntemler için hazırlanan kalibrasyon çözeltileri derişimleri 45
Çizelge 2.10. Spektrofotometrik yöntemler için DTG geri kazanım çözeltileri hazırlığı 48
Çizelge 2.11. Spektrofotometrik yöntemler için 3TC geri kazanım çözeltileri hazırlığı 48
Çizelge 2.12. Ticari preparatlar kullanılarak hazırlanan numune çözeltileri 48
Çizelge 3.1. Optimize edilmiş YPSK parametreleri 50
Çizelge 3.2. YPSK ile oluşturulan kalibrasyon grafikleri için elde edilen doğru denklemlerine ait istatistiksel veriler 53
Çizelge 3.3. YPSK ile standart çözeltinin ardışık altı enjeksiyonundan elde edilen alanlar ve hesaplanan SS ve BSS değerleri 54
Çizelge 3.4. YPSK ile elde edilen gün içi deney sonuçları 55
Çizelge 3.5. YPSK ile elde edilen günler arası deney sonuçları 56
Çizelge 3.6. YPSK ile elde edilen geri kazanım değerleri 57
Çizelge 3.7. YPSK için optimize edilmiş parametreler ile ve değişiklikler sonrası elde edilen veriler 58
Çizelge 3.8. YPSK ile elde edilen termal bozunma çalışması sonuçları 59
Çizelge 3.9. YPSK ile elde edilen asidik bozunma çalışması sonuçları 59
Çizelge 3.10. YPSK ile elde edilen alkali bozunma çalışması sonuçları 60
Çizelge 3.11. YPSK ile elde edilen oksidatif bozunma çalışması sonuçları 60
Çizelge 3.12. YPSK ile "Triumeq 50/600/300 mg Film Kaplı Tablet" miktar tayini verileri ve sonuçları 61
Çizelge 3.13. YPSK ile "Dovato 50/300 mg Film Kaplı Tablet" miktar tayini verileri ve sonuçları 61
Çizelge 3.14. YPSK ile "Tivicay 25 mg Film Kaplı Tablet" miktar tayini verileri ve sonuçları 62
Çizelge 3.15. AD yöntemi ile elde edilen kalibrasyon grafiği verileri 63
Çizelge 3.16. İİD yöntemi ile elde edilen kalibrasyon grafiği verileri 64
Çizelge 3.17. Spektrofotometrik yöntemler ile elde edilen kalibrasyon grafiklerinin istatistiksel değerlendirilmesi 65
Çizelge 3.18. Spektrofotometrik yöntemler ile elde edilen geri kazanım çalışması sonuçları 66

Çizelge 3.19. Spektrofotometrik yöntemler ile elde edilen "Dovato 50/300 mg Film Kaplı Tablet" miktar tayini verileri ve sonuçları 66
Çizelge 4.1. Literatürdeki mevcut yöntemler ve tez kapsamında geliştirilen yöntemler için bir karşılaştırma çizelgesi 68
Çizelge 4.2. DTG için geliştirilen yöntemlerin karşılaştırmalı değerlendirilmesi 69
Çizelge 4.3. 3TC için geliştirilen yöntemlerin karşılaştırmalı değerlendirilmesi 69

1. GİRİŞ

1.1. Giriş ve Amaç

Bu tez çalışmasında Dolutegravir, Lamivudin ve Abakavir'i tek başına ya da bir arada içeren farmasötik preaparatlarda bu etken maddelerin eş zamanlı tayinlerinin gerçekleştirilmesi, bu amaçla YPSK ve Spektrofotometrik yöntemlerin geliştirilerek ulusal ve uluslararası kılavuzlar rehberliğinde geçerli kılınması amaçlanmıştır. Bu amaçla geliştirilen yöntemlerin hem mevcut yöntemler ile hem de oluşacak yeni yöntemler ile karşılaştırılması da planlanmıştır.

1.1.1. HIV ve AIDS Hakkında Genel Bilgi

HIV (Human Immunodeficiency Virus), insan bağışıklık yetmezliği virüsüdür. Bu virüs, bağışıklık sisteminin hücrelerine saldırarak vücudun enfeksiyonlarla savaşma yeteneğini zayıflatır. AIDS (Acquired Immunodeficiency Syndrome), edinilmiş bağışıklık yetmezliği sendromudur ve HIV enfeksiyonunun ileri evresinde ortaya çıkar. AIDS, bağışıklık sistemi ciddi şekilde zayıflamış bireylerde çeşitli fırsatçı enfeksiyonlar ve kanserlerin gelişmesine neden olabilir (Bowen vd., 2016).

1.1.1.1. HIV ve AIDS'in Tarihi

HIV/AIDS ilk kez 1981 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde tanımlandı. Kaliforniya ve New York'ta bir grup homoseksüel erkekte nadir görülen enfeksiyonlar ve Kaposi sarkomu vakaları tespit edildi (Curran ve Jaffe, 2011). 1983 yılında, AIDS'e neden olan virüs olan HIV izole edildi. 1987 yılında, HIV enfeksiyonunu kontrol altına almak için ilk anti-retroviral ilaç olan AZT (Zidovudin) onaylandı. 1995-1996 yıllarında, Yüksek Etkili Anti-Retroviral Tedavi (HAART) olarak bilinen kombinasyon tedavisi geliştirildi. 2001 yılında, HIV/AIDS tedavisinde kullanılan ilaçların jenerik versiyonları piyasaya sürüldü. 2012 yılında, HIV enfeksiyonunu önlemek için kullanılan ilk koruyucu ilaç olan PrEP (Pre-Exposure Prophylaxis) onaylandı (Arts ve Hazuda, 2012).

1.1.1.2. HIV'in Bulaşma Yolları

Cinsel yolla bulaş; HIV enfeksiyonunun yayılmasındaki en temel faktör cinsel ilişkidir. Korunmasız gerçekleştirilen vajinal, anal veya oral her türlü cinsel aktivite, virüsün geçişine zemin hazırlar. Özellikle kan veya genital salgılarla temasın gerçekleştiği durumlarda

risk kaçınılmazdır ve bireylerin bu virüse karşı doğal bir bağışıklığı bulunmamaktadır. Enfekte bir partnerle yaşanan tek bir cinsel temas dahi bulaş için yeterli olabilirken, temas sıklığının artması riski doğru orantılı olarak yükseltmektedir (Galvin ve Cohen, 2004). Epideminin ilk yıllarında bulaşın ağırlıklı olarak homoseksüel ilişki yoluyla gerçekleştiği düşünülse de, güncel veriler vakaların %55-60'ının heteroseksüel temas kaynaklı olduğunu ortaya koymaktadır (Castilla vd., 2005)

Kan ve kan ürünleri ile bulaş; Virüsün kanda yüksek konsantrasyonda bulunması, HIV taşıyıcılarından alınan kan ve kan ürünlerini ciddi bir bulaş kaynağı haline getirmektedir. 1985 yılında antikor testlerinin kullanıma girmesiyle birlikte, transfüzyon öncesi tarama yapmak küresel bir zorunluluk haline gelmiştir (German Advisory Committee Blood, 2016). Türkiye'de ise 1987 yılından itibaren tüm kan ürünleri hastaya verilmeden önce ELISA yöntemiyle taranmaktadır. Bu prosedür sayesinde kan yoluyla bulaş oranları önemli ölçüde azalmıştır (Gurol vd., 2006). Buna rağmen, virüsün tespit edilemediği "pencere dönemi" veya acil durumlarda test edilmeden yapılan uygulamalar nedeniyle, düşük oranda da olsa risk devam etmektedir.

Anneden bebeğe bulaş; HIV pozitif bir anneden bebeğe virüs geçişi; gebelik süreci, doğum esnası veya doğum sonrası emzirme yoluyla gerçekleşebilmektedir. Tedbir alınmadığı takdirde bu oran %20-30 civarındadır. Ancak, gebeliğin son üç ayında anneye ve doğumdan sonra bebeğe uygulanan antiretroviral tedavilerin yanı sıra doğumun elektif sezaryen ile gerçekleştirilmesi, bulaş riskini %8-10 seviyelerine kadar düşürebilmektedir (Volmink and Marais, 2008).

Sağlık personeline bulaş; Sağlık çalışanları, enfekte vücut sıvılarıyla mukoza teması veya iğne batması gibi yaralanmalar sonucu HIV riski altındadır. İğne batmasıyla gerçekleşen bulaşlarda; iğnenin lümen çapının genişliği, doku içine derin batması ve üzerinde kan bulunması riski artıran faktörler olup, ortalama bulaş ihtimali %0,2-0,5 arasındadır (Goel vd., 2017). Kaynak hastanın serokonversiyon evresinde veya hastalığın ileri aşamalarında olması, yüksek virüs yükü nedeniyle riski katlamaktadır. Mukoza yoluyla temaslarda ise risk yaklaşık %0,1 olarak bildirilmekle birlikte, temas eden sıvının miktarı ve maruziyet süresi belirleyicidir (Gonzalez vd., 2019).

Enjektör ve tıbbi aletlerle bulaş; Özellikle damar içi madde bağımlıları, enjektör ve iğnelerin ortak kullanımı nedeniyle virüsün doğrudan kan dolaşımına girmesine yol açtığından, en yüksek risk gruplarından birini oluşturmaktadır.

1.1.1.3. AIDS'in Tedavisi

Mevcut tıbbi olanaklarla HIV enfeksiyonunu tamamen ortadan kaldıran radikal bir tedavi henüz geliştirilememiş olsa da, virüsün replikasyonunu (çoğalmasını) baskılayan farmakolojik ajanlar bulunmaktadır. "Antiretroviral" olarak adlandırılan bu ilaçlarla uygulanan tedavi protokolleri, virüsü vücuttan tam olarak temizleyemese de klinik tabloyu olumlu yönde değiştirmektedir (Desai vd., 2012). Yapılan çalışmalar, tedavinin semptomların ortaya çıkış süresini geciktirdiğini, CD4+ hücre sayılarını artırdığını ve özellikle yoğun tedavi protokolleriyle hastaların yaşam süresini uzattığını göstermektedir. Tedavinin birincil klinik hedefi viral yükü saptanamayacak düzeylere indirmektir; şayet mevcut rejimle bu hedefe ulaşılamıyorsa ve alternatif ilaç seçenekleri varsa tedavi protokolü değiştirilmelidir (Feinberg, 2011).

Güncel yaklaşımda, CD4+ hücre sayısına bakılmaksızın, semptomatik veya asemptomatik ayrımı yapılmadan tüm HIV pozitif bireyler için ömür boyu sürecek antiretroviral tedavi önerilmektedir. Tedaviye yeni başlayacak (naif) hastalarda, tercihen farklı ilaç sınıflarından üçlü kombinasyonlar (en az iki sınıf) esas alınır. Genellikle iki adet nükleozid revers transkriptaz inhibitörünün (NRTI) temel oluşturduğu bu rejime; bir integraz inhibitörü, ritonavir/kobisistat ile güçlendirilmiş bir proteaz inhibitörü ya da bir non-nükleozid revers transkriptaz inhibitörü eklenmesi standarttır. Özellikle integraz inhibitörü içeren kombinasyonlar; yüksek virolojik etkinlikleri, kullanım kolaylıkları ve daha tolere edilebilir yan etki profilleri sayesinde güncel tedavi kılavuzlarında ilk tercih olarak öne çıkmaktadır. Tedavi planlaması yapılırken bireysel faktörler titizlikle değerlendirilmeli ve kişiye özgü en uygun rejim belirlenmelidir (Feinberg, 2011).

HIV tedavisinin yönetimi, literatüre eklenen yeni bilgiler ve artan ilaç çeşitliliği nedeniyle giderek daha kompleks bir yapıya bürünmektedir. İlaçların potansiyel yan etkileri, tedavi şemalarının karmaşıklığı ve en kritik risk olan hatalı kullanım sonucu gelişebilecek ilaç direnci, sürecin hassasiyetini artırmaktadır. Bu riskleri minimize etmek adına, hem tedaviye başlarken hem de süreç devam ederken hasta eğitimine büyük önem verilmeli ve hastalar tedavinin sürdürülebilirliği konusunda detaylıca bilinçlendirilmelidir (Manfredi, 2002).

1.1.1.4. AIDS'in Küresel Durumu

AIDS'e neden olan virüs olan HIV, dünyanın en ciddi halk sağlığı sorunlarından biridir. Ancak, yeni HIV enfeksiyonlarını durdurma ve HIV'li herkesin HIV tedavisine

erişimini sağlama konusunda küresel bir taahhüt vardır. UNAIDS'ten dünya genelinde HIV ile ilgili en son istatistikler aşağıda verilmiştir.

HIV pozitif kişi Sayısı: 2023'te dünya genelinde HIV ile yaşayan 39,9 milyon kişi vardır. Bunlardan 38,6 milyonu yetişkin (>15 yaş) ve 1,4 milyonu çocuktur (<15 yaş). Ayrıca, %53'ü bayan bireylerdir (Joint United Nations Programme on HIV/AIDS, UNAIDS, 2025).

Dünya çapında HIV'li kişilerin yaklaşık %84'ü test yaptırmış ve HIV durumlarını biliyor durumda. Test, tedaviye erişim için gerekli ilk adımdır (hiv.gov, 2025).

Yeni HIV enfeksiyonları: Dünya çapında tahmini 1,3 milyon kişi 2023 yılında HIV'e yakalanmıştır, bu da 2010'dan bu yana yeni HIV enfeksiyonlarında % 39'luk ve 1995'teki zirveden bu yana % 60'lık bir düşüş anlamına gelmektedir. Yeni HIV enfeksiyonları veya "HIV insidansı", bir yıl gibi belirli bir süre içinde yeni HIV edinen kişilerin tahmini sayısını ifade eder ve bu, bir yıl içinde HIV teşhisi konulan kişi sayısından farklıdır. (Bazı kişilerde HIV pozitif olabilir ancak bunu bilmiyor olabilir.) Kadınlar ve kızlar 2023'te tüm yeni HIV enfeksiyonlarının % 44'ünü oluşturmaktadır (hiv.gov, 2025).

HIV testi ve HIV durumu bilgisi: Dünya genelinde HIV ile yaşayan insanların yaklaşık %86'sı 2023'te HIV durumlarını bilmektedirler. Yaklaşık 5,4 milyon kişi HIV'e yakalandıklarını bilmiyor ve yine de HIV test hizmetlerine erişmeleri gerekmektedir. HIV testi, HIV önleme, tedavi, bakım ve destek hizmetlerine giden temel bir kapıdır. Küresel hedef ise 2025 yılına kadar HIV statüsünün farkındalığının %95 olmasıdır (hiv.gov, 2025).

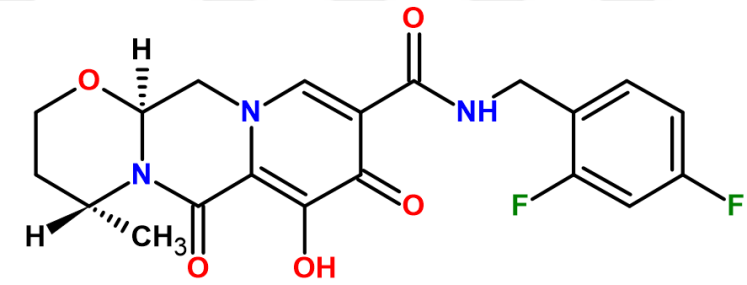
1.2. Tez Kapsamında Kullanılan Antiretroviral Etken Maddelerle İlgili Bilgiler

1.2.1. Dolutegravir

Dolutegravir, insan immün yetmezlik virüsü (HIV) enfeksiyonunun tedavisi için onaylanan en yeni integraz zincir transfer inhibitörüdür. Dolutegravir, daha önce raltegravir veya elvitegravir başarısızlığı olanlar da dâhil olmak üzere hem tedavi görmemiş hem de tedavi görmüş hastalarda mevcut tedavi rejimlerine eşdeğer veya daha üstündür. Tutarlı etkinlik, mükemmel tolere edilebilirlik ve seyrek ilaç-ilaç etkileşimleri, Dolutegravir'in iki nükleotid ters transkriptaz inhibitörleriyle birlikte formülasyonunu çekici bir tedavi seçeneği haline getirir (Kandel ve Walmsley, 2015).

1.2.1.1. Dolutegravir'in Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Dolutegravir, kapalı formülü $C_{20}H_{19}F_2N_3O_5$ olan ve 419,4 g/mol molekül ağırlığına sahip bir bileşiktir. Bileşiğin IUPAC isimlendirmesi (4R,12aS)-N-(2,4-difluorobenzil)-7-hidroksi-4-metil-6,8-diokso-3,4,6,8,12,12a-heksahidro-2H-pirido[1′,2′:4,5]pirazino[2,1-b][1,3]oksazin-9-karboksamid'dir. Dolutegravir, beyazdan açık sarıya kadar değişen renkte, toz formunda bir maddedir. Bileşiğin erime noktası 190–193 °C aralığında olup, suda az çözünürken dimetil sülfoksit (DMSO) ve etanolde iyi derecede çözünürlük göstermektedir. Lipofilisiteyi ifade eden logP değeri 2,2 olup, pKa değeri 8,2 olarak bildirilmektedir. Dolutegravir, stabilitesinin korunması amacıyla −20 °C'de ve hava geçirmeyen ambalajlar içerisinde saklanmalıdır. Dünya Sağlık Örgütü'nün Anatomik Terapötik Kimyasal (ATC) sınıflandırmasına göre J05AJ03 kodu ile tanımlanmaktadır (Kandel ve Walmsley, 2015).



Şekil 1.1. Dolutegravir'in kimyasal yapısı

1.2.1.2. Dolutegravir'in Farmakolojik Özellikleri

Dolutegravir monoterapisi alan HIV-1 ile enfekte kişiler, mL başına HIV-1 RNA kopyalarındaki azalmayla birlikte antiviral aktivitede hızlı ve doza bağlı bir azalma göstermiştir. Antiviral yanıt, son dozdan sonra 3 ila 4 gün süreyle korunmuştur. Klinik çalışmalarda elde edilen sürekli yanıt, Dolutegravir'in sıkı bağlanmaya ve daha uzun dissosiyatif yarılanma ömrüne sahip olduğunu ve bu sayede dirence karşı yüksek bir bariyer oluşturduğunu göstermektedir. Kombinasyon terapisi (Ripivirin ve Dolutegravir), integraz iplikçik transfer inhibitörü mutasyonları veya rilpivirin direnci olmaksızın önceki üç ilaçlı tedavilerde bulunan aynı viral baskılamayı sunmaktadır (Min vd., 2011).

Dolutegravir, şu anda ABD FDA tarafından pazarlama onayı için incelenmekte olan ikinci nesil bir integraz iplik transfer inhibitörüdür (INSTI). Dolutegravir'in vahşi tip virüs için in vitro, proteinle ayarlanmış %90 inhibitör derişimi (IC90) 0,064 µg/ml'dir ve hâlihazırda pazarlanan INSTI'ler, raltegravir ve elvitegravire direnç sağladığı bilinen geniş bir viral fenotip yelpazesinde in vitro anti-HIV-1 aktivitesini korur. Dolutegravir, 13 ila 14

saatlik bir yarı ömre (t½) sahiptir ve tek bir dozun ardından 30 saatten fazla bir süre boyunca in vitro, proteine göre ayarlanmış IC90 üzerindeki derişimleri korur. Ek olarak Dolutegravir, Raltegravir ve Elvitegravir ile karşılaştırıldığında nispeten düşük kişiler arası değişkenliğe sahiptir. Antiviral aktivitenin dip derişim (Ctrough) değerleriyle güçlü bir şekilde ilişkili olduğu bir plazma maruziyet-yanıt ilişkisi iyi tanımlanmıştır. Faz III çalışmaları, daha önce antiretroviral (ARV) kullanmamış hastalarda Dolutegravir'in antiviral aktivitesini efavirenz ve raltegravir ile karşılaştırarak değerlendirmiş ve her iki durumda da Dolutegravir'in daha hızlı ve sürekli virolojik baskılanma sağladığını bulmuştur (Min vd., 2011). Ek olarak, INSTI'ye dirençli olduğu bilinen mutasyonları olan hastalarda Dolutegravir aktivitesine ilişkin çalışmalar olumlu olmuştur; bu da Dolutegravir'in çeşitli INSTI dirençli fenotiplerde aktiviteyi koruduğunu göstermektedir. Şu anda pazarlanan INSTI'lere çok benzer şekilde Dolutegravir çok iyi tolere edilir. Dolutegravir renal taşıyıcı olan organik katyon taşıyıcı 2'yi inhibe ettiğinden, kreatinin tübüler sekresyonunun azalması serum kreatinin düzeyinde ilerleyici olmayan artışlara yol açar. Bu serum kreatinin artışları, glomerüler filtrasyon hızının azalması veya ilerleyici böbrek yetmezliği ile ilişkili değildir. Dolutegravir'in majör ve minör metabolik yolları sırasıyla UDP glukuronosiltransferaz (UGT)1A1 ve sitokrom (CYP)3A4'tür ve CYP izozimlerini ne indükler ne de inhibe eder. Dolayısıyla Dolutegravir orta düzeyde bir ilaç etkileşim profiline sahiptir. Ancak antasitler Dolutegravir plazma maruziyetini önemli ölçüde azaltır ve Dolutegravir dozundan 2 saat önce veya 6 saat sonra ayrılmalıdır. Özetle Dolutegravir, öngörülebilir bir farmakokinetik profil ve iyi tanımlanmış bir maruziyet-yanıt ilişkisi sergileyen ikinci nesil INSTI'lerin ilkidir. Dolutegravir, bazı sınıf dirençli mutasyonların varlığına rağmen aktivitesini korur ve ARV deneyimi olmayan ve ARV deneyimi olan hastalarda hızlı ve sürekli virolojik baskılanma sağlar. Klinik olarak Dolutegravir, antiretroviral rejimlerin yaygın olarak kullanılan bir bileşeni olmaya hazırlanıyor (Cottrell vd., 2013).

1.2.1.3. Dolutegravir'in Yan Etkileri

Genel olarak, Dolutegravir iyi tolere ediliyor olarak değerlendirilmektedir. Tübüler sekresyonun inhibisyonu nedeniyle serum kreatinininde değişiklikler görülmesine rağmen, renal glomerüler fonksiyon etkilenmemiştir. Günde bir kez Dolutegravir alan hastalarda en sık gözlenen ADE'ler mide bulantısı, ishal, baş dönmesi, nazofarenjit ve baş ağrısı olup, olayların çoğu hafif veya orta şiddette olarak bildirilmiştir. Günde iki kez doz rejimlerinde, en sık bildirilen ADE'ler ishal, mide bulantısı ve baş ağrısıdır. Sağlıklı yetişkinlerde lipid/karaciğer kimyasında önemli bir anormallik gözlenmemiştir. Dolutegravir ile tedavi edilen gruptaki

hastalarda yan etki nedeniyle çalışmanın kesilmesi genellikle düşük ila nadirdir (Drew Hill vd., 2018).

Dolutegravir, öncelikli olarak UGT1A1 ve daha az önemli olarak CYP450 3A4 aracılığıyla metabolize edilir. Terapötik dozlarda Dolutegravir, CYP veya UGT enzimlerinin inhibitörü değildir. Bu metabolizma mekanizması nedeniyle Dolutegravir ile ilaç-ilaç etkileşimleri sınırlıdır. Birkaç çalışma, Dolutegravir ile diğer ART ve diğer ilaçlar arasındaki potansiyel ilaç etkileşimlerini araştırmıştır. İn vivo çalışmalar, Dolutegravir için Atazanavir sülfat, Ritonavir, Darunavir etanolat, Lopinavir, Fosamprenavir kalsiyum, Entekavir veya Tenofovir disoproksil fumarat içeren tedavilerle kombinasyon halinde kullanıldığında doz ayarlamalarının gerekli olmadığını göstermektedir. Nevirapinin, enzim indüksiyonu sonucunda Dolutegravir düzeylerini düşürdüğü gösterilmiştir ve Dolutegravir ile birlikte uygulanmamalıdır. Etravirin tek başına Dolutegravir düzeylerini önemli ölçüde azaltabilir ve bu kombinasyondan kaçınılmalıdır. Ancak Dolutegravir, Ritonavir destekli proteaz inhibitörleriyle birlikte verilirse Etravirin ile birlikte uygulanabilir. Diğer ART ile kombinasyon halinde kullanıldığında, terapötik rejimin diğer bileşenleriyle ilgili etkileşimlere dikkat edilmelidir (Kandel ve Walmsley, 2015).

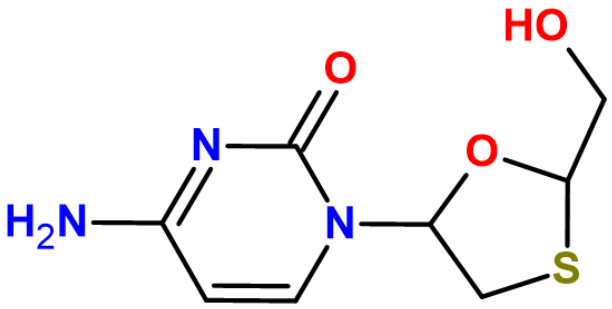
1.2.2. Lamivudin

2'-deoksi-3'-tiyasitidinin negatif enantiyomeri olan Lamivudin (3TC), insan immün yetmezlik virüsü tip 1 (HIV-1) enfeksiyonunun tedavisinde diğer ajanlarla kombinasyon halinde ve hepatit B virüsü (HBV) enfeksiyonunun tedavisinde monoterapi olarak kullanılan bir dideoksinükleozid analoğudur. Lamivudin, viral ters transkriptazı rekabetçi bir şekilde inhibe ederek ve proviral DNA zincir uzantısını sonlandırarak HIV-1 ve HBV replikasyonunu önleyen aktif anabolit olan Lamivudin 5'-trifosfatı oluşturmak için hücre içi kinazlarla anabolik fosforilasyona uğrar (Lau vd., 2000).

1.2.2.1. Lamivudin'in Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Lamivudin, kapalı formülü $C_8H_{11}N_3O_3S$ olan ve 229,3 g/mol molekül ağırlığına sahip bir nükleozid analoğudur. Bileşiğin IUPAC isimlendirmesi 4-amino-1-[(2R,5S)-2-(hidroksimetil)-1,3-oksatiolan-5-il]-2(1H)-pirimidinon şeklindedir. Lamivudin, beyazdan bej renge kadar değişen toz formunda bir maddedir. Erime noktası yaklaşık 177 °C olup, suda, dimetil sülfoksit (DMSO) ve etanolde iyi derecede çözünürlük göstermektedir. Hidrofilik karakterini yansıtan logP değeri −1,4 olarak bildirilmiş olup, pKa değeri 8,2'dir. Stabilitesinin korunması amacıyla 2–8 °C'de ve hava geçirmeyen ambalajlarda saklanması önerilmektedir.

Dünya Sağlık Örgütü'nün Anatomik Terapötik Kimyasal (ATC) sınıflandırmasına göre Lamivudin J05AF05 kodu ile tanımlanmaktadır (Perry ve Faulds, 1997).



Şekil 1.2. Lamivudinin kimyasal yapısı

1.2.2.2. Lamivudin'in Farmakolojik Özellikleri

Lamivudin trifosfat, ters transkriptaza bağlanmak için deoksisitidin trifosfat ile rekabet eder ve bu 3TC-trifosfat (3TC-TP) formunun viral DNA'ya dâhil edilmesi, zincirin sonlandırılmasıyla sonuçlanır. Lamivudin ağızdan uygulandığında (12 saatte bir 150 mg) sürekli olarak IC50 değerlerinin üzerinde olan plazma derişimlerine ulaşır (Johnson vd., 1999).

2'-deoksi-3'-tiyasitidinin negatif enantiyomeri olan Lamivudin (3TC), insan immün yetmezlik virüsü tip 1 (HIV-1) enfeksiyonunun tedavisinde diğer ajanlarla kombinasyon halinde ve hepatit B virüsü (HBV) enfeksiyonunun tedavisinde monoterapi olarak kullanılan bir dideoksinükleozid analoğudur. Lamivudin, viral ters transkriptazı rekabetçi bir şekilde inhibe ederek ve proviral DNA zincir uzantısını sonlandırarak HIV-1 ve HBV replikasyonunu önleyen aktif anabolit olan Lamivudin 5'-trifosfatı oluşturmak üzere hücre içi kinazlarla anabolik fosforilasyona uğrar. Lamivudinin farmakokinetiği HIV-1 veya HBV enfeksiyonu olan hastalarda ve sağlıklı gönüllülerde benzerdir. İlaç, oral uygulamadan sonra hızla emilir ve maksimum serum derişimlerine genellikle dozdan 0,5 ila 1,5 saat sonra ulaşılır. Mutlak biyoyararlanım yetişkinlerde ve çocuklarda sırasıyla yaklaşık % 82 ve % 68'dir. Serum ilaç derişim-zaman eğrisi (EAA) altındaki alanla ölçülen Lamivudin sistemik maruziyeti, gıdayla birlikte uygulandığında değişmemektedir. Lamivudin toplam vücut sıvısına geniş ölçüde dağılır; intravenöz uygulamayı takiben ortalama görünür dağılım hacmi (Vd) yaklaşık 1,3 L/kg'dır. Gebe kadınlarda anne serumu, amniyotik sıvı, göbek kordonu ve yenidoğan serumundaki Lamivudin derişimleri benzerdir; bu da ilacın plasentaya serbestçe yayıldığını gösterir. Doğum sonrası kadınlarda Lamivudin anne sütüne geçer. Lamivudin'in beyin omurilik sıvısındaki (BOS) derişimi düşük ila orta düzeydedir; dozdan 2 ila 4 saat sonra

ölçülen yetişkinlerde serum derişimlerinin %4 ila 8'i ve çocuklarda serum derişimlerinin % 9 ila 17'sidir. Böbrek fonksiyonu normal olan hastalarda ana bileşiğin yaklaşık %5'i, farmakolojik olarak aktif olmayan trans-sülfoksit metabolitine metabolize edilir. Böbrek yetmezliği olan hastalarda idrarda geri kazanılan trans-sülfoksit metabolitinin miktarı, muhtemelen azalan Lamivudin atılımının bir fonksiyonu olarak artar. Oral dozun yaklaşık %70'i böbreklerden değişmemiş ilaç olarak atıldığından, böbrek yetmezliği olan hastalarda dozun azaltılması gerekir. Karaciğer yetmezliği Lamivudin'in farmakokinetiğini etkilemez. Tek intravenöz dozları takiben sistemik klerens ortalama 20 ila 25 L/saattir (yaklaşık 0,3 L/saat/kg). Lamivudin'in baskın atılım yarı ömrü yaklaşık 5 ila 7 saattir ve aktif 5'-trifosfat anabolitinin in vitro hücre içi yarı ömrü, HIV-1 ve HBV hücre hatlarında sırasıyla 10.5 ila 15,5 saat ve 17 ila 19 saattir. İlaç etkileşim çalışmaları, trimetoprimin EAA'yı arttırdığını ve Lamivudinin renal klerensini azalttığını, ancak Lamivudinin trimetoprimin dağılımını etkilemediğini göstermiştir. Diğer çalışmalar Lamivudin ile Zidovudin arasında veya Lamivudin ile interferon-alfa-2b arasında anlamlı bir etkileşim olmadığını göstermiştir. Metabolize edilen ve/veya yüksek oranda proteine bağlanan bileşiklerle ilaç-ilaç etkileşimi potansiyeli sınırlıdır (Johnson vd., 1999).

1.2.2.3. Lamivudin'in Yan Etkileri

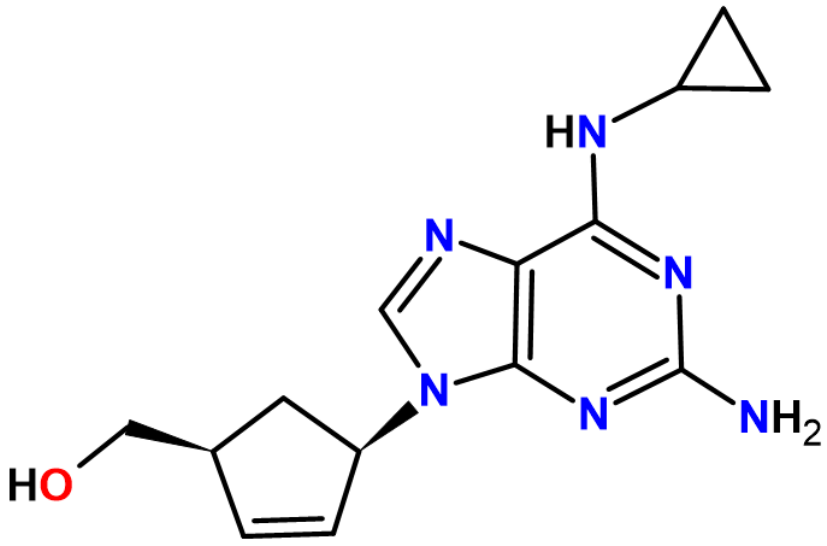
Lamivudin oral tablet kullanımı sırasında hafif ya da ciddi yan etkiler ortaya çıkabilmektedir. Daha sık gözlenen yan etkiler arasında öksürük, ishal, tükenmişlik, baş ağrısı, halsizlik (genel rahatsızlık hissi), burun akıntısı gibi üst solunum yolu semptomları ve bulantı yer almaktadır. Bununla birlikte, Lamivudin kullanımı bazı hastalarda ciddi yan etkilere de neden olabilmektedir. Bu ciddi yan etkiler arasında laktik asidoz ve şiddetli karaciğer büyümesi bulunmakta olup, bu durumlar mide ağrısı, ishal, sığ solunum, kas ağrısı, zayıflık ile üşüme veya baş dönmesi hissi gibi belirtilerle kendini gösterebilmektedir. Ayrıca pankreatit gelişimi görülebilmekte ve bu durumda mide şişkinliği, karın ağrısı, bulantı, kusma ve karın bölgesinde hassasiyet gibi semptomlar ortaya çıkabilmektedir. Lamivudin kullanımına bağlı olarak aşırı duyarlılık reaksiyonları veya anafilaksi gelişmesi de mümkündür; bu tür reaksiyonlar ani veya şiddetli döküntü, solunum güçlüğü ve kurdeşen ile karakterizedir. Karaciğer hastalığı gelişimi de bildirilen ciddi yan etkiler arasında yer almakta olup, koyu renkli idrar, iştah kaybı, belirgin yorgunluk, sarılık (cildin sararması), bulantı ve mide bölgesinde hassasiyet gibi belirtilerle ortaya çıkabilmektedir. Bunun yanı sıra, bağışıklık sisteminin etkilenmesine bağlı olarak mantar enfeksiyonları, zatürre veya tüberküloz gibi enfeksiyonların görülme riski de artabilmektedir (Roca vd., 2000; Roca vd., 1999).

1.2.3. Abakavir

Abakavir, diğer antiretroviral ilaçlarla birlikte HIV-1 enfeksiyonunu tedavi etmek için kullanılan FDA onaylı bir ilaçtır. Diğer nükleosid ters transkriptaz inhibitörleri (NRTI'ler) gibi, Abakavir kullanımı da tipik olarak diğer HIV ilaçlarıyla birleştirilir. Abakavir'in monoterapi olarak kullanılması önerilmemektedir. Abakavir tablet veya solüsyon şeklinde ağızdan alınabilmektedir ve 3 aydan büyük hastalar için onaylanmış bir tedavi seçeneğidir. Genellikle Abakavir, Abakavir/Lamivudin/Zidovudin, Abakavir/Dolutegravir/Lamivudin ve Abakavir/Lamivudin gibi diğer HIV ilaçları ile birlikte verilir (Fernandez ve Munir, 2024).

1.2.3.1. Abakavir'in Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Abakavir, kapalı formülü $C_{14}H_{18}N_6O$ olan, 286,3 g/mol molekül ağırlığına sahip bir nükleozid analoğudur. IUPAC adı [(1S,4R)-4-[2-amino-6-(siklopropilamino)pürin-9-il]siklopent-2-en-1-il]metanol olan Abakavir, fiziksel olarak beyazdan bej renge kadar değişen toz formunda bulunmaktadır. Madde, 20–25 °C'de, hava geçirmeyen ambalajlarda saklanmalıdır. Abakavir'in erime noktası 165 °C olup, suda, DMSO'de ve etanolde çözünürlük göstermektedir. Lipofilisite göstergesi olan LogP değeri 1,2, pKa değeri ise 5,0 olarak rapor edilmiştir. Anatomik Terapötik Kimyasal (ATC) sınıflandırma sistemine göre J05AF05 kodu altında yer almaktadır.



Şekil 1.3. Abakavir'in kimyasal yapısı

1.2.3.2. Abakavir'in Farmakolojik Özellikleri

Abakavir'in konakçı hücreler içindeki etki mekanizmasının stilize edilmiş bir tasviri yol şeklinde verilmiştir. Karbovir 5'-trifosfat (CBV-TP), Abakavir'in aktif formunu temsil eder ve HIV ters transkriptazın (HIV-RT) etkisini bloke ederek çalışır. HIV, konakçı hücrenin mevcut genetik mekanizmasının yanı sıra viral RNA'yı alıp onu çift sarmallı DNA'ya dönüştürmekten sorumlu olan viral enzim ters transkriptazından yararlanarak çoğalır. Viral DNA daha sonra konakçı DNA'ya dâhil edilebilir ve bu noktada konakçı makine, DNA'yı viral RNA'ya dönüştürebilir. Viral RNA daha sonra viral proteinlere çevrilir ve bunlar bir araya gelerek HIV virüsünü oluşturur. CBV-TP, bir guanozin analoğu görevi görür ve HIV-RT tarafından viral RNA'dan üretilen nükleotid zincirine dâhil olmak için rekabet eder. Diğer NRTI'lar farklı nükleozidlerin türevleri olarak hareket edebilir ve aynı tür inhibisyona yol açabilir. Bunun örnekleri didanozin ve adenosin, zalsitabin ve sitidin ve zidovudin ve timidindir. CBV-TP'nin nükleotit zincirine dâhil edilmesinden sonra, riboz şekeri üzerinde sonraki nükleozitlerin ekleneceği 3'-OH'nin olmaması, viral DNA sentezini sürdürür (Barbarino vd., 2014).

CBV-TP, DNA polimerazları a, β, y ve ε ile karşılaştırıldığında ters transkriptaz için oldukça seçici olduğundan bu rol için özellikle uygundur. Gerçekten de DNA polimerazlar α, β, γ ve ε için Ki değerleri, HIV-RT için Ki değerinden sırasıyla 90, 2900, 1200 ve 1900 kat daha yüksektir. Ters transkriptaz için bu seçicilik, DNA polimerazlar inhibe edildiğinde ortaya çıkan potansiyel toksik yan etkileri önler. Birçok antiretroviral NRTI, laktik asidoz ve hepatik steatoz gibi mitokondriyal fonksiyon bozukluğuna atfedilen bir dizi olumsuz olayla ilişkilidir. Bunun, mitokondriyal DNA polimeraz γ'nın bu ilaçlar tarafından inhibisyonundan kaynaklandığına, mitokondriyal DNA replikasyonunun değişmesine ve sonuçta mitokondriyal miyopati ve toksisiteye yol açtığına inanılmaktadır. Abakavir en düşük polimeraz γ inhibisyonuna sahipken, zalsitabin, didanosin ve stavudin en yüksek seviyededir (Yuen vd., 2008).

Abakavir, HIV enfeksiyonunun tedavisinde kullanılan karbosiklik bir nükleozid ters transkriptaz inhibitörüdür ve günde bir kez 600 mg veya günde iki kez 300 mg doz rejimleriyle uygulanır. Oral uygulamadan sonra hızla emilir, biyoyararlanımı yaklaşık %83 olup farmakokinetiği 300–1200 mg/gün aralığında doğrusaldır. Günde tek doz ve iki doz rejimleri sonrası toplam maruziyet benzer olup, gıda alımı Abakavir maruziyetini anlamlı düzeyde etkilemez. Abakavir ekstravasküler alanlara yayılır, plazma proteinlerine orta düzeyde bağlanır ve büyük oranda karaciğerde inaktif metabolitlere dönüşerek metabolize edilir; değişmeden idrarla atılımı düşüktür. Terminal yarı ömrü yaklaşık 1,5 saat olmakla birlikte,

antiviral etkinlikten sorumlu olan hücre içi aktif metaboliti karbovir-5′-trifosfatın uzun yarı ömrü (>20 saat) günde tek doz kullanımını desteklemektedir. Böbrek yetmezliği Abakavir farmakokinetiğini anlamlı ölçüde etkilemezken, hafif karaciğer yetmezliği olan hastalarda doz azaltımı gerekebilmektedir. Abakavir sitokrom P450 enzimleriyle anlamlı etkileşime girmediğinden, klinik açıdan önemli ilaç-ilaç etkileşimleri sınırlıdır (Yuen vd., 2008).

1.2.3.3. Abakavir'in Yan Etkileri

Abakavir kullanımı ciddi ve yaşamı tehdit edebilen yan etkilere neden olabilmektedir. Bu yan etkiler arasında en önemlileri aşırı duyarlılık (alerjik) reaksiyonlar, kanda laktik asit birikimi (laktik asidoz) ve karaciğer ile ilişkili problemlerdir. Abakavir tedavisi alan bireylerde, ölümle sonuçlanabilen ciddi aşırı duyarlılık reaksiyonları bildirilmektedir. Özellikle HLA-B*5701 gen varyasyonuna sahip bireylerde bu tür reaksiyonların görülme riski belirgin şekilde artmaktadır ve bu nedenle tedavi öncesinde bu genetik varyasyonun varlığı bir kan testi ile değerlendirilebilmektedir (Nolan, 2009). Abakavir kullanımı sırasında ateş, döküntü, bulantı, kusma, ishal, karın ağrısı, genel rahatsızlık hissi, aşırı yorgunluk, vücut ağrıları, nefes darlığı, öksürük veya boğaz ağrısı gibi belirtilerin yer aldığı farklı belirti gruplarından iki veya daha fazlasının birlikte görülmesi durumunda tedavinin derhal kesilmesi ve sağlık kuruluşuna başvurulması önerilmektedir. Bunun yanı sıra, laktik asidoz gelişimine işaret edebilecek zayıflık veya belirgin yorgunluk, olağandışı kas ağrıları, nefes darlığı veya hızlı solunum, bulantı ve kusma ile birlikte mide ağrısı, soğuk veya mavimsi renkte el ve ayaklar, baş dönmesi ile hızlı ya da düzensiz kalp atışı gibi semptomların ortaya çıkması halinde acil tıbbi değerlendirme gerekmektedir. Abakavir kullanımına bağlı karaciğer fonksiyon bozuklukları da görülebilmekte olup, bu durumda ciltte veya göz aklarında sararma (sarılık), koyu renkli idrar, açık renkli dışkı, birkaç gün veya daha uzun süren iştah kaybı, bulantı, kusma, karın bölgesinin sağ üst kısmında ağrı veya hassasiyet ile kaşıntı gibi belirtiler gözlenebilmektedir (Hetherington vd., 2001).

1.3. Dolutegravir, Lamivudin ve Abakavir Eş Zamanlı Tayini İçin Günümüze Kadar Uygulanmış Olan Analiz Yöntemleri

Prava vd. (2017), Lamivudin, Abakavir ve Dolutegravir'in bir arada analiz edilebildiği bir ters faz YPSK geliştirmişlerdir. Bu yöntemde elde edilen alıkonma zamanları sırasıyla 2,2 dakika, 2,9 dakika ve 7,4 dakika olarak gözlenmiştir. Regresyon katsayısı r^2 değeri Lamivudin, Abakavir ve Dolutegravir için 0,999 olarak, ortalama geri kazanım yüzdeleri ise sırasıyla %100,04, %99,73 ve %100,29 olarak hesaplanmıştır. Yönteme ait tekrarlanabilirlik ve ara

kesinlik için % BSS değerleri ≤ 2 olarak bulunmuş, çözelti kararlılığı çalışmaları ise Lamivudin, Abakavir ve Dolutegravir için hazırlanan çözeltilerin 24 saate kadar kararlı olduğunu göstermiştir (Prava vd., 2017).

Serag vd. (2022), Dolutegravir, Lamivudin ve Abakavir içeren kombine dozaj formundaki üçlü antiretroviral ilaç etken maddelerinin eş zamanlı tayini için kemometrik tekniklerle birleştirilmiş, basit bir spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir. Kemometrik teknik olarak kısmi en küçük kareler (PLS) ve genetik algoritma (GA), kullanarak, bu etken maddeler için farklı derişimlerde kısmi faktöriyel deneysel tasarımlar uygulamışlar, 25 örnek içeren kalibrasyon ve 13 örnek içeren doğrulama setleri ile çalışmışlardır. Kalibrasyon ve doğrulama setlerinin sıfırıncı dereceden UV spektrumlarını ölçerek ve daha sonra daha ileri kemometrik analize tabi tutarak değişken seçim prosedürleri ile/ve olmaksızın kısmi en küçük kareler, yani genetik algoritma (GA), bu karışımların UV spektral örtüşmesini çözmek için kullanılmıştır. Bu kemometrik tekniklerin doğruluk ve öngörü yetenekleri açısından performansını karşılaştırmak için çapraz doğrulama ve harici doğrulama yöntemlerini uygulamışlar, Dolutegravir modellemesi için altı latent değişkenin, Lamivudin modellemesi için dört latent değişkenin ve Abakavir modellemesi için üç latent değişkenin uygun değer olduğu bulmuşlardır. Önerilen bu kemometrik yöntemlerin laboratuvarda hazırlanan karışımlarda ve farmasötik preparatlarda Dolutegravir, Lamivudin ve Abakavir'in eş zamanlı tayini için güvenilir bir şekilde uygulanabilir olduğunu ve birçok antiretroviral farmasötik preparatın üretim içi kontrol testlerinde ve kalite kontrol analizlerinde değerli ve önemli analitik araçlar olarak konumlanabileceğini öne sürmüşlerdir (Serag vd., 2022).

Pal vd. (2016), Abakavir, Lamivudin ve Dolutegravir'in tablet dozaj formunda eş zamanlı tayini için basit ve hızlı bir YPSK geliştirilmiş ve geçerli kılmışlardır. Yöntem, polar olmayan bir analitik kolon (Kromasil 250 mm × 4,5 mm, 5 µm), hareketli faz olarak tampon ve asetonitril karışımı (65:35; h/h) ve akış için 1 mL/dakika izokratik elüsyonla, kromatografik sisteme 10 µL numune ve standart çözeltiler enjekte edilmesini içeriyordu. 30 °C'ye ayarlanmış kolon fırını içerisindeki analitik kolonda ayrılan ilaç etken maddeleri 257 nm'ye ayarlanmış bir PDA dedektörü kullanılarak tespit edilmiştir. Üç etken maddenin alıkonma süreleri ise Lamivudin, Abakavir ve Dolutegravir için sırasıyla 2,250 dakika, 2,734 dakika ve 9,633 dakika olarak tespit edilmiştir. Doğrusallık aralıkları sırasıyla 15-90 ppm, 30-180 ppm ve 2,5-15 ppm olarak, teşhis sınırı değerleri 0,08 µg, 0,06 µg, 0,03 µg ve tayin alt sınırı değerleri ise sırasıyla 0,2 µg, 0,19 µg ve 0,10 µg olarak bulunmuştur. Yöntem tüm etken maddeler için 0,999 korelasyon katsayısı sergilemiş ve özgül, hassas, tekrarlanabilir, kesin, hızlı ve basit olarak değerlendirilmiştir (Pal vd., 2016).

Dave ve Desai (2018), Abakavir sülfat, Lamivudin hidroklorür ve Dolutegravir sodyum içeren laboratuvarda hazırlanmış çözeltilerin eş zamanlı tayini için YP-İTK (Yüksek performanslı ince tabaka kromatografi) yöntemi geliştirmişler ve bu yöntemi Uluslararası Uyum Konferansı (ICH) yönergelerine göre geçerli kılmışlardır. Yöntem geliştirme ve optimizasyonuna yardımcı olmak için 23 tam faktöriyel tasarım kullanılmıştır. Sabit faz olarak önceden kaplanmış silika jel alüminyum YP-İTK plağı 60 F254 ve hareketli faz olarak etil asetat-etanol-aseton-amonyak (4,478:0,740:0,50:0,15, h/h/h/h) kullanılarak etkili kromatografik ayırma elde edilmiştir. Optimize edilmiş tank doyma süresi 30 dakika olarak belirlenmiş, Dansitometrik tarama, 267 nm'lik bir algılama dalga boyunda absorbans-yansıma modunda gerçekleştirilmiştir. Tasarıma göre kalite yaklaşımı, her üç faktörün, yani etil asetat hacmi, etanol hacmi ve aseton hacminin, her bir ilacın kromatografik tepki geciktirme faktörü (RF) üzerindeki etkisini değerlendirmek için uygulanmış, Abakavir, Lamivudin ve Dolutegravir'in RF değerleri sırasıyla 0,65, 0,34 ve 0,26 olarak bulunmuştur. Kalibrasyon eğrilerinin, Abakavir için bant başına 4,8, 7,2, 9,6, 12,0 ve 14,4 µg, Lamivudin için bant başına 2,4, 3,6, 4,8, 6,0 ve 7,2 µg ve Dolutegravir için bant başına 0,4, 0,6, 0,8, 1,0 ve 1,2 µg derişimlere sahip bağımsız olarak tartılmış standart çözeltiler alınarak doğrusal olduğu gösterilmiştir. Abakavir için yakalama sınırı (YS) ve tayin alt sınırı (TAS) değerleri sırasıyla bant başına 0,9972 µg ve bant başına 3,0218 µg, Lamivudin için bant başına 0,2544 µg ve bant başına 0,7711 µg ve Dolutegravir için bant başına 0,1004 µg ve bant başına 0,3043 µg olarak bulunmuştur. Geliştirilen yöntemle elde edilen % geri kazanım değerleri ise sırasıyla Abakavir için %98,0955-100,9813, Lamivudin için %98,2616-99,9900 ve Dolutegravir için %98,4666-101,3000 aralığında bulunmuştur. Önerilen yöntemin yeni, basit, doğru, tekrarlanabilir ve sağlam olduğu gösterilmiştir (Dave ve Desai, 2018).

Silinski vd. (2025), Abakavir, Dolutegravir ve Lamivudin'i aynı anda ölçmek için bir yöntem geliştirmeye ve geçerli kılmaya çalışmışlardır. Yöntem, plazma, fetal, plasenta, beyin veya kalp homojenatının protein çökelmesini ve ardından ultra performanslı sıvı kromatografi-tandem kütle spektrometrisi ile tayini içeriyordu. Yetişkin Sprague Dawley sıçan plazmasında, yöntem ABC/DTG/3TC için 10/15/5 ila 10.000/15.000/5000 ng/mL aralığında doğrusaldı ($r \geq 0,99$) ve geri kazanım tüm derişim seviyelerinde üç analit için de ≥ %92 idi. Yakalama sınırı (YS) ABC, DTG ve 3TC için sırasıyla 2,22, 3,69 ve 0,978 ng/mL idi. 20/30/10, 400/600/200 ve 5000/7500/2500 ng/mL'de hazırlanan standartlar için gün içi ve günler arası hassasiyet ≤ %8,7 bağıl standart sapma (BSS) ve bağıl hata (BH) ≤ %12,0 olarak bulunmuştur. 40/60/20 µg/mL kadar yüksek matris standartları kalibrasyon aralığına (BH ≤ ± %3,5 ve BSS ≤ %2,4) seyreltilebilmiştir. Yöntem sıçan maternal plazması ve fetal, plasenta, beyin ve kalp homojenatları (ortalama BH ≤ ± %15,0 ve BSS ≤ %8,6) için değerlendirilmiş, analit stabilitesi,

farklı sıcaklıklarda 2 gün boyunca çıkarılan plazmada ve en az 32 gün boyunca -80°C'de saklanan çeşitli matrislerde (0. Gün derişimlerinin % 80-113'ü) gösterilmiştir. Tüm bu veriler ışığında, bu basit ve etkili yöntemin toksikoloji çalışmalarından elde edilen sıçan matrislerinde ABC, DTG ve 3TC'nin tayini için uygun olduğu değerlendirilmiştir. Geliştirilen yöntemin diğer biyolojik matrislere ve türlere (örn. insan) kolayca uyarlanabileceği iddia edilmiştir (Silinski vd., 2025).

Rathod vd. (2023), tablet formunda Abakavir sülfat, Lamivudin ve Dolutegravir sodyum içeren prepartlarda miktar tayini için özellikle "klasik en küçük kare", "ters en küçük kare" (ILS)", "kısmi en küçük kare" ve "ana bileşen regresyonu" gibi çok değişkenli kemometrik yöntemler geliştirmişlerdir. Geliştirilen yöntemde kalibrasyon ve doğrulama setleri kesirli faktöriyel tasarım kullanılarak oluşturulmuş, 32 üçlü kalibrasyon seti karışımı ve 16 doğrulama seti karışımı hazırlanmıştır. Absorbans veri matrisi, 27 farklı dalga boyunda 230 ila 308 nm ($\Delta\lambda$ = 3 nm) aralığında absorbans ölçülerek oluşturulmuştur. Modeller MATLAB 2018, Minitab 16.1.1 ve MS Excel 2010 yardımıyla geliştirilmiş olup elde edilen geri kazanım değerleri düşük standart sapmayla %100'e yakın olarak bulunmuştur. Geliştirilen kemometrik modeller arasında ILS'nin en uygun yöntem olduğu gösterilerek, üçlü karışımın toplam absorbansı ölçüldüğü ve eş zamanlı tahminde kullanılabildiği için geleneksel yöntemlerden daha doğru ve hassas olduğu belirlenmiştir (Rathod vd., 2023).

Khaleel ve Abdul Rahaman (2015), Abakavir, Lamivudin ve Dolutegravir'in bulk formunda ve farmasötik dozaj formlarında stabilite çalışmaları ve eş zamanlı miktar tayini için yeni, basit, kesin, seçici, doğru ve hızlı ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntem geliştirmişler ve geçerli kılmışlardır. Kromatografik ayırım için Inertsil ODS 250×4,6 mm, 5µm partikül boyutlu kolon kullanılmış olup optimize edilmiş mobil faz, pH 3,0 fosfat tamponu: asetonitril: metanol (50:20:30 h/h/h) karışımı şeklindedir. Akış hızı 1,0 mL/dakika olarak belirlenmiş ve eluentler PDA dedektörü kullanılarak 257 nm'de tespit edilmiştir. Lamivudin, Abakavir ve Dolutegravir'in alıkonma süreleri sırasıyla 2,169, 2,676 ve 6,367 dakika olarak bulunmuştur. Lamivudin, Abakavir ve Dolutegravir için geri kazanım değerleri ise % 98,01-101,5, % 99,20-101,67 ve % 98,35-102,14 aralığında gerçekleşmiştir. Derişimlere karşı pik alanları ile elde edilen kalibrasyon eğrisi Lamivudin için 15 -90 µg/ml, Abakavir için 30-180 µg/ml ve Dolutegravir için 2,5-15 µg/mL aralığında iyi doğrusallık göstermiştir. Lamivudin, Abakavir ve Dolutegravir için asit hidrolizi, bazik hidroliz, oksidasyon, termal, fotokimyasal ve UV gibi çeşitli stres koşulları altında bozunma çalışmaları da incelenmiş olup tüm bozunma piklerinin farklı alıkonma süreleri sergiledikleri gösterilmiştir. Geliştirilen bu yöntem ICH yönergelerine göre geçerli kılınmıştır (Khaleel ve Rahaman, 2015).

Dhanwate vd. (2019), tablet formunda Lamivudin ve Dolutegravir sodyumun eş zamanlı tayini için basit, kesin, doğru, hızlı ve hassas bir YPSK geliştirmiştir. Kromatografik ayırma, UV dedektörlü yüksek performanslı sıvı kromatografi kullanılarak izokratik modda bir Waters C18 kolonunda (150×4.6mm, tanecik boyutu 5µ) elde edilmiştir. Hareketli faz, tampon (ortofosforik asit kullanılarak saf suyun pH'sı 3,0'a ayarlanmış), asetonitril ve metanolden (55:35:10 h/h/h) oluşuyordu, akış hızı ve enjeksiyon hacmi sırasıyla 1,1ml/dakika ve 20 µL idi ve tespit, bir UV dedektörü kullanılarak 260 nm'de gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen yöntem doğrusallık, doğruluk, hassasiyet, sağlamlık, teşhis alt sınırı ve tayin alt sınırı açısından ICH Q2B yönergelerine göre geçerli kılınmıştır. Lamivudin ve Dolutegravir sodyum için doğrusallığın sırasıyla 18-90 µg/mL ve 3-15 µg/mL aralığında olduğu ve korelasyon katsayısının (r)> 0,99 olduğu bulunmuştur. Piyasada ticari olarak mevcut formülasyon için yapılan miktar tayini sonuçları ise Lamivudin ve Dolutegravir sodyum için sırasıyla %99,75 ve %99,09 olarak bulunmuştur. Lamivudin ve Dolutegravir sodyum için geri kazanım değerleri ise sırasıyla % 80 seviyesinde % 99,63 ve % 99,75, % 100 seviyesinde % 99,37 ve % 99,78 ve % 120 seviyesinde % 100,15 ve % 100,47 olarak bulunmuştur (Dhanwate vd., 2019).

Babu vd. (2024), Abakavir, Dolutegravir ve Lamivudin'in bulk halde ve farmasötik dozaj formunda tayini için yeni bir analitik yaklaşım oluşturmuştur. Dörtlü gradyan pompaya sahip Waters YPSK sistemi, Agilent TC-C18 (2) 5µm, 4,6 mm x 250 mm analitik kolon, metanol:su (70:30; h/h) içeren 1 mL/dakika akışla geçen mobil faz ve 257 nm'ye ayarlanmış PDA dedektörden oluşan analitik yöntemin hassas, kesin ve doğru olduğu gösterilmiştir. Analiz oda sıcaklığında gerçekleştirilmiş, Abakavir, Dolutegravir ve Lamivudin'in alıkonma süreleri sırasıyla 2,6, 2,9 ve 6,6 dakika olarak bulunmuştur. Yöntemin doğruluğunun Abakavir için %99,95-%100,01, Dolutegravir için %99,95-% 100,13 ve Lamivudin için % 99,95-% 100,04 aralığında hesaplanmış, her üç molekül için BSS değerleri % 2'den küçük bulunmuştur. Teşhis ve tayin alt sınırları sırasıyla 0,57 µg/mL ve 1,89 µg/mL olarak elde edildi. Yöntem için elde edilen doğrusal derişim aralığı Abakavir için 150-450 µg/mL, Doltegravir için 12,5-37,5 µg/mL ve Lamivudin için 75-225 µg/mL olarak bulunmuştur (Babu vd.).

Dubey ve Duggirala (2018), balk ve tablet dozaj formlarında Lamivudin, Abakavir ve Dolutegravir'in eş zamanlı tayini için basit, hızlı, hassas ve etkili bir ters faz ultra performans sıvı kromatografik yöntemi (TF-UBSK) geliştirmişlerdir. Kromatografik ayırım Zodiac SIL RP C18 (4,6 mm × 250 mm, 3,0 µm) kolon ile fosfat tamponu (pH 3,0) ve metanol (30:70 h/h) hareketli faz ile sağlanmıştır. Akış hızı 0,25 mL/dakika, tespit dalgaboyu 260 nm olarak

optimize edilmiş olup analiz oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Standart ve numuneler hareketli faz ile hazırlanmıştır. Lamivudin, Abakavir ve Dolutegravir için alıkonma zamanları (Rt) sırasıyla 1,763, 2,247 ve 3,175 dakika olarak bulunmuştur. Çalışma aralıkları ise sırasıyla 15-75 µg/mL, 30-150 µg/mL ve 2.5-12.5 µg/mL aralığında olup doğrusal yanıtlar elde edilmiştir. Teşhis sınırları sırasıyla 0,021, 0,330 ve 0,038 µg/mL, tayin alt sınırları ise sırasıyla 0,056, 1,320 ve 0,095 µg/mL olarak bulunmuştur. Geliştirilen TF-UBSK yönteminin farmasötik dozaj formalarında Lmivudin, Abakavir ve Dolutegravir'in analizinde etkili, uygun ve elverişli olduğu sonucuna varılmıştır (Dubey ve Duggirala, 2018).

1.4. Tez Kapsamında Kullanılan Yöntemler

1.4.1. Kromatografik Ayırma Teknikleri

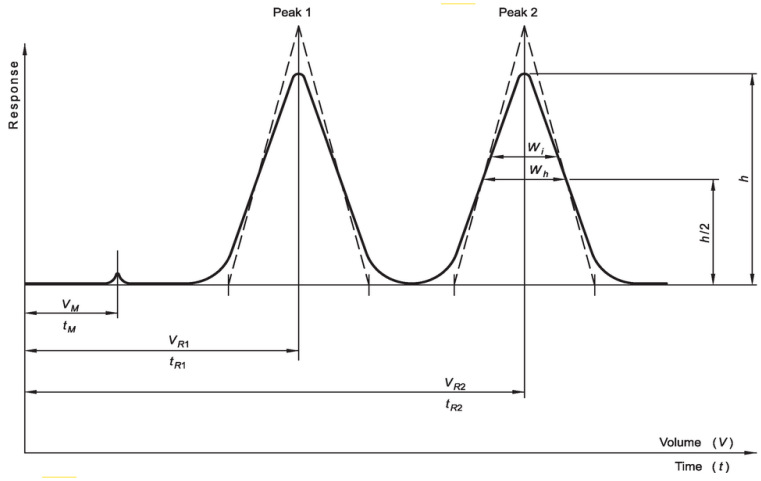
Bu bölüm altında verilen bilgi, şekil ve terimler ve bu terimlere ait formül ve açıklamalar Avrupa Farmakopesi online versiyon *"2.2.46 Chromatographic Seperation Techniques"* bölümünden derlenmiştir. Kromatografik ayırma teknikleri, bir numunedeki bileşenlerin sabit ve hareketli olmak üzere iki faz arasında farklı oranlarda dağılım göstermesine dayanan çok aşamalı ayırma yöntemleridir. Sabit faz, katı bir materyal ya da bir katı veya jel üzerine desteklenmiş sıvı bir fazdan oluşabilmekte olup, kolona paketlenmiş, ince bir tabaka halinde yayılmış veya film şeklinde dağıtılmış olarak kullanılabilmektedir. Hareketli faz ise gaz veya sıvı formunda olabilir. Ayırma işlemi; adsorpsiyon, kütle dağılımı (paylaşım), iyon değişimi gibi mekanizmalara ya da moleküllerin boyut, kütle ve hacim gibi fiziko-kimyasal özelliklerindeki farklılıklara dayalı olarak gerçekleşmektedir.

1.4.1.1. Tanımlar

Kromatografik sistemlerde sistem uygunluğu ve kabul kriterleri aşağıda tanımlanan parametreler kullanılarak belirlenir. Bazı ekipmanlarda, sinyal-gürültü oranı ve çözünürlük gibi belirli parametreler üretici tarafından sağlanan yazılım kullanılarak hesaplanabilir. Yazılımda kullanılan hesaplama yöntemlerinin Avrupa Farmakopesi gerekliliklerine eşdeğer olduğundan emin olunmalı ve durum böyle değilse gerekli düzeltmeler yapılmalıdır.

Kromatogram, kromatografik sistemi terk eden bileşen derişimi için elde edilen dedektör tepkisinin veya bu bileşenin derişiminin bir ölçüsü olarak kullanılan diğer bir birime karşı zaman veya hacmin grafiksel bir gösterimidir. İdeal olarak, kromatogramlar bir temel çizgi üzerinde bir Gauss pikleri dizisi olarak gösterilir (Şekil 1.4.). Bu kromatogramda V_M terimi alıkonma hacmini, t_M alıkonma süresini ifade etmektedir. Birinci pike ait alıkonma

hacmi V_{R1}, alıkonma süresi ise t_{R1} olarak tanımlanırken, ikinci pike ait alıkonma hacmi V_{R2} ve alıkonma süresi t_{R2} şeklinde gösterilmiştir. Piklerin geometrik özellikleri incelendiğinde, Wh yüksekliğin yarısındaki pik genişliğini, Wi ise dönüm noktasındaki pik genişliğini temsil etmektedir. Ayrıca h pik yüksekliğini, h/2 ise pik yarı yüksekliğini ifade eden parametrelerdir.



Şekil 1.4. Avrupa Farmakopesi güncel versiyonunda verilen örnek kromatogram (https://pheur-online.edqm.eu/home/)

Dağılım katsayısı, boyut dışlama kromatografide bir bileşenin kolondan elüsyon davranışı, dağılım katsayısı olarak adlandırılan bir parametre ile tanımlanır. Bu katsayı, bileşiğin kolonda ne ölçüde tutulduğunu ve hareketli faz ile durağan faz arasındaki dağılımını nicel olarak ifade eder. Dağılım katsayısı, ilgili pikin alıkonma süresi, önce elüsyona giren bileşiğin alıkonma süresi ve toplam mobil faz geçiş süresi kullanılarak hesaplanır. Bu parametre, analitin kolondaki tutulma derecesini değerlendirmede önemli bir ölçüt olup, boyut dışlama kromatografide ayırma mekanizmasının anlaşılmasına katkı sağlar.

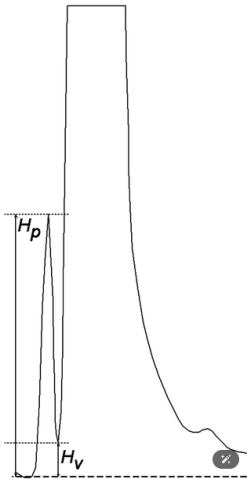
Bekleme hacmi (D), (ayrıca V_D olarak da ifade edilir ve gradyen gecikme hacmi olarak da bilinir), eluentlerin buluştuğu nokta ile kolonun girişi arasındaki hacimdir. Avrupa farmakopesinde bekleme (gecikme) hacmi hesaplamak için bir prosedür mevcuttur.

Gecikme süresi (t_M), tutulmayan bir bileşenin elüsyonu için gereken süre (Şekil 1.4. başlangıç ölçeği dakika veya saniye cinsindendir). Boyut dışlama kromatografide, "tutulmayan bir bileşiğin tutulma süresi (t_0)" terimi kullanılır.

Alıkonma hacmi (V_M), tutulmayan bir bileşiğin kolondan elüe olması için gerekli olan mobil faz hacmini ifade eden önemli bir kromatografik parametredir. Bu büyüklük, ilgili bileşiğin alıkonma süresi ile sistemin akış hızına bağlı olarak belirlenir ve bir analitin

kolondaki davranışının değerlendirilmesinde kullanılır. Boyut dışlama kromatografide, özellikle kolona tutunmayan bileşikler için bu hacim genellikle V_0 (boşluk hacmi) olarak adlandırılır ve sistemin ölü hacmini temsil eder. Bu parametre, kolonun etkin hacminin belirlenmesi ve ayırma mekanizmasının yorumlanması açısından önemli bilgiler sağlar.

Pik, kromatografide tek bir bileşenin veya birbirinden tam olarak ayrılmamış iki ya da daha fazla bileşenin kolondan elüe edilmesi sonucunda dedektörde oluşan sinyali temsil eden kromatogramın bir bölümüdür. Bir pikin büyüklüğü, analitin miktarını yansıtan pik alanı ya da pik yüksekliği (h) ile nicel olarak ifade edilebilir. Ayırımın yeterliliğini değerlendirmek için kullanılan önemli parametrelerden biri ise pik-vadi oranıdır (p/v). Bu parametre, iki pik arasında baz çizgisine tam olarak ulaşılamayan durumlarda rezolüsyon yerine sistem uygunluğunu değerlendirmek amacıyla kullanılır. Pik-vadi oranının belirlenmesinde, Hp küçük pikin ekstrapole edilmiş baz çizgisi üzerindeki yüksekliğini, Hv ise küçük ve büyük piki ayıran eğrinin en düşük noktasında, yine ekstrapole edilmiş baz çizgisi üzerindeki yüksekliği temsil eder. Bu oran, pikler arasındaki ayırımın kalitesini nicel olarak ortaya koyar.

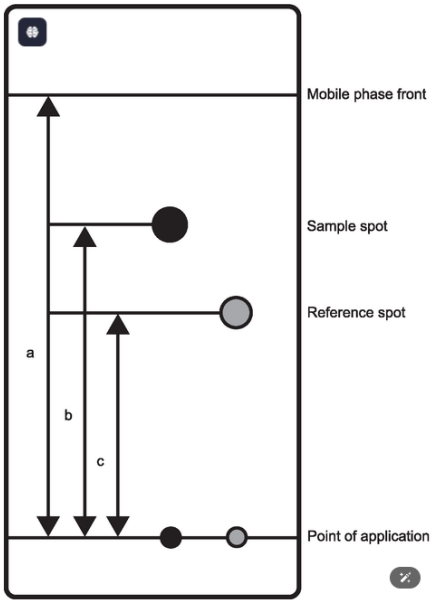


Şekil 1.5. Avrupa Farmakopesi, güncel versiyonunda verilen pik-vadi oranı için örnek şekil (https://pheur-online.edqm.eu/home/).

Plaka sayısı ya da teorik plaka sayısı (N), bir kromatografik kolonun ayırma performansını ve dolayısıyla verimliliğini nicel olarak ifade eden temel bir parametredir. İzotermal, izokratik veya izodens koşullar altında elde edilen kromatografik veriler kullanılarak hesaplanan bu değer, bir pikin alıkonma süresi ile pik şekline bağlı olarak belirlenir. Bu bağlamda t_R, ilgili pikin tepe noktasına karşılık gelen alıkonma süresini, Wh ise pikin yarı yüksekliğindeki genişliğini (h/2) temsil eder. Teorik plaka sayısı, kolon uzunluğu arttıkça yükselme eğilimindedir; bu durum daha iyi ayırım ve daha yüksek kolon verimliliği

anlamına gelir. Ancak kolon uzunluğunun artması analiz süresini de uzattığından, pratik uygulamalarda kolon seçimi yapılırken ayırma verimliliği ile analiz süresi arasında uygun bir denge kurulması gerekmektedir.

Bağıl gecikme, düzlemsel kromatografide bir bileşiğin hareketli faza göre göç davranışını tanımlamak için kullanılan önemli bir parametredir ve ilgi duyulan bileşiğin kat ettiği mesafenin bir referans bileşiğin kat ettiği mesafeye oranı olarak ifade edilir. Bu bağlamda mobil fazın ilerleme mesafesi a ile gösterilirken, analitin göç mesafesi b ve referans bileşenin göç mesafesi ile tanımlanır. Bağıl gecikme değeri, farklı bileşenlerin kromatografik ortamda birbirlerine göre ne kadar ilerlediğini nicel olarak ortaya koyar ve bu sayede bileşiklerin ayırım davranışlarının karşılaştırılmasına ve sistemin ayırma performansının değerlendirilmesine olanak sağlar.



Şekil 1.6. Avrupa Farmakpesi, güncel versiyonunda verilen bağıl alıkonma zamanları için örnek şekil (https://pheur-online.edqm.eu/home/)

Bağıl Alıkonma (R), kromatografik ayırmada bir bileşiğin alıkonma davranışının referans bir bileşiğe göre karşılaştırılmasını sağlayan bir parametre olup, aşağıda verilen eşitlik kullanılarak hesaplanmaktadır. Bu eşitlikte tRi, ilgilenilen pikin alıkonma süresini; tRst, referans pikin (genellikle analizi yapılan maddeye ait pik) alıkonma süresini; tM ise sistemin bekleme süresini ifade etmektedir. Bağıl alıkonma değeri, piklerin göreceli konumlarının

değerlendirilmesinde ve ayırma performansının karşılaştırılmasında kullanılmaktadır. $R = (t_{Ri}-t_M) / (t_{Rst}-t_M)$

Ayarlanmamış bağıl alıkonma (R_G), eğer denklikten bekleme süresi yani çözücü piki alıkonma zamanı çıkarılırsa denklik aşağıdaki şekline dönüşür ve ayarlanmamış bağıl alıkonma adını alır. Aksi söylenmedikçe bir monografta verilen bağıl alıkonma zamanları "ayarlanmamıştır."

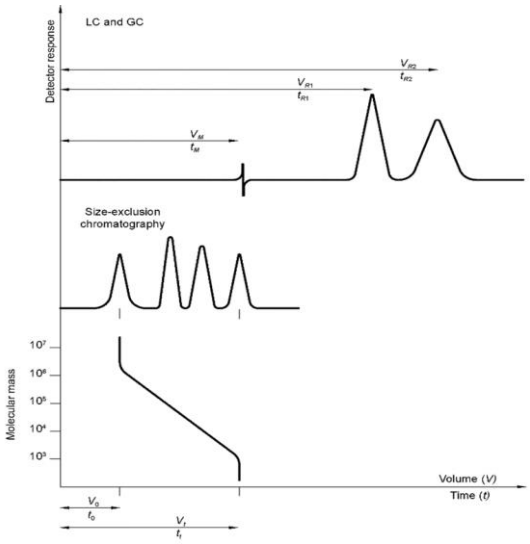
Rezolüsyon, iki farklı bileşene ait pikler arasındaki rezolüsyon (Rs), kromatografik ayırmanın kalitesini ifade eden temel bir parametredir ve iki pik arasındaki ayırım derecesini nicel olarak tanımlar. Rezolüsyon, ikinci pikin alıkonma süresinin birinci pikin alıkonma süresinden büyük olması koşulu ($tR_2 > tR_1$) altında, piklerin alıkonma süreleri (tR_1 ve tR_2) ile yarı yükseklikte ölçülen pik genişlikleri (Wh_1 ve Wh_2) kullanılarak hesaplanır. Bu parametre, piklerin birbirinden ne kadar iyi ayrıldığını gösterir ve özellikle sistem uygunluğu ile yöntem performansının değerlendirilmesinde önemli bir ölçüttür. Rezolüsyon aşağıdaki eşitlikle ifade edilir: $Rs = 1{,}18\ (t_{R2} - t_{R1}) / (W_{h1} + W_{h2})$.

Alıkonma faktörü (*k),* aynı zamanda kapasite faktörü (k′) veya kütle dağılım faktörü (Dm) olarak da adlandırılan ve bir bileşiğin sabit faz ile hareketli faz arasındaki dağılımını nicel olarak tanımlayan temel bir kromatografik parametredir. Bu faktör, bir bileşiğin sabit fazda tutulan miktarının hareketli fazda bulunan miktarına oranını ifade eder ve teorik olarak dağılım sabiti (K_C) ile sabit fazın hacmi (V_S) ve hareketli fazın hacmi (V_M) kullanılarak tanımlanabilir. Pratikte ise alıkonma faktörü, kromatogramdan elde edilen alıkonma süresi (t_R) ile sistemin gecikme süresi ya da ölü zamanı (t_M) kullanılarak hesaplanır. Bu parametre, bir analitin kolonda ne kadar süre tutulduğunu ve hareketli fazla karşılaştırıldığında sabit faza olan ilgisini gösterir. Alıkonma faktörünün uygun bir aralıkta olması hem yeterli ayırmanın sağlanması hem de makul analiz sürelerinin elde edilmesi açısından büyük önem taşır.

Alıkonma zamanı (t_R), örneğin sisteme enjekte edilmesinden dedektörde oluşturduğu en büyük yanıt için geçen süre arasındaki zaman farkı (Şekil 1.7., baseline ölçeğinin dakika ya da saniye cinsinden, zaman olduğu unutulmamalıdır).

Alıkonma hacmi (V_R), bir bileşenin sistemden ayrılması için egereken hareketli faz hacmi. Bu değer, alıkonma zamanı (t_R) ve mL/dakika cinsinden akış hızı (F) ile aşağıdaki formül yardımıyla hesaplanır: $V_R = t_R \times F$.

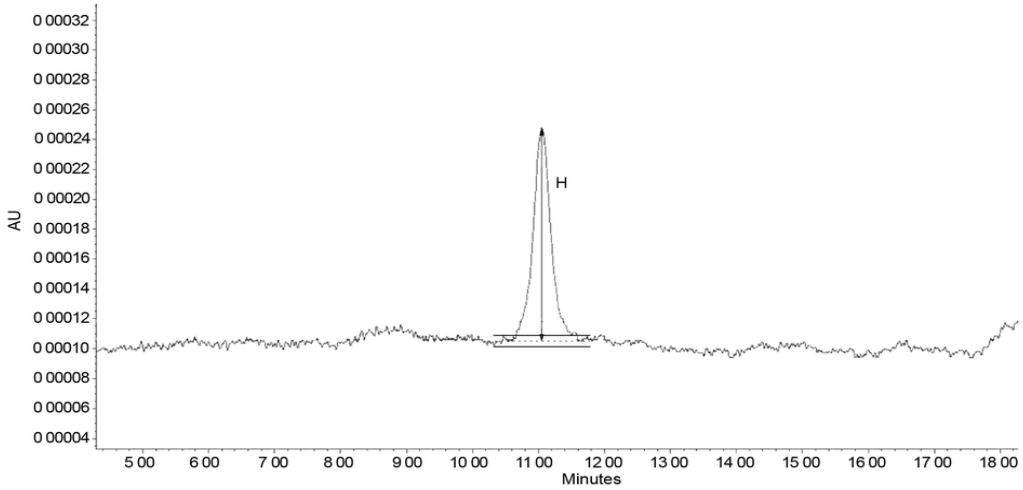
Tutulmayan bir bileşiğin alıkonma zamanı (t0), boyut dışlama kromatografide, molekülleri en büyük jel gözeneklerinden daha büyük olan bir bileşenin tutulma süresidir (Şekil 1.7.).



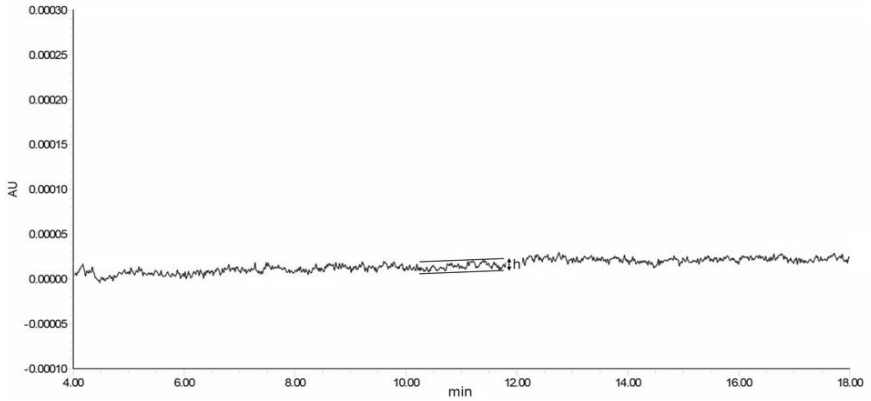
Şekil 1.7. Avrupa Farmakopesi, güncel versiyonunda verilen alıkonma zamanı ve pik genişliği ile rezolüsyon arasındaki ilişkiyi gösteren örnek şekil (https://pheur-online.edqm.eu/home/)

Ayırım faktörü (α), kromatografik bir sistemde iki komşu bileşiğin birbirinden ne kadar iyi ayrıldığını tanımlayan temel bir parametredir ve bu değer, iki pik için hesaplanan alıkonma faktörlerinin oranı olarak ifade edilir. Ayırım faktörü, ikinci elüe olan bileşiğin alıkonma faktörünün (k_2) birinci elüe olan bileşiğin alıkonma faktörüne (k_1) oranı şeklinde tanımlanır. Tanımı gereği α her zaman 1'den büyük bir değerdir ve değerin büyümesi, iki bileşiğin kromatografik davranışlarının birbirinden daha farklı olduğunu, dolayısıyla ayırımın daha iyi gerçekleştiğini gösterir. Ayırım faktörü, özellikle kolon ve hareketli faz seçiminde, iki analitin göreceli tutulma derecelerinin karşılaştırılmasında önemli bir kriter olarak kullanılmaktadır.

Sinyal-gürültü oranı (S/N), kromatografik ölçümlerde bir analitik sinyalin arka plan gürültüsüne göre ne kadar güvenilir olduğunu gösteren temel bir parametredir. Referans çözelti için elde edilen kromatogramda ilgili bileşene ait pikin tepe yüksekliği (H) ve kör çözeltide belirlenen gürültü seviyesi (h) kullanılarak hesaplanır. Referans çözelti kromatogramında sinyalin belirlenmesi Şekil 1.8'de, kör çözeltide gürültünün tayini ise Şekil 1.9'da gösterilmektedir. Gürültü, kör çözeltide veya referans çözeltide, ilgili pikin alıkonma zamanını ortalayacak şekilde seçilen bir zaman aralığında ekstrapole edilmiş taban çizgisine göre ölçülen pik yüksekliklerinin ortalaması olarak tanımlanır.

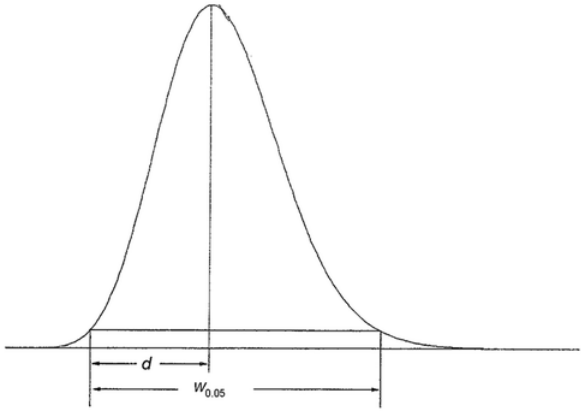


Şekil 1.8. Avrupa Farmakopesi, güncel versiyonunda verilen S/N için örnek referens çözelti kromatogramı (https://pheur-online.edqm.eu/home/)



Şekil 1.9. Avrupa Farmakopesi, güncel versiyonunda verilen S/N için örnek kör çözelti kromatogramı (https://pheur-online.edqm.eu/home/)

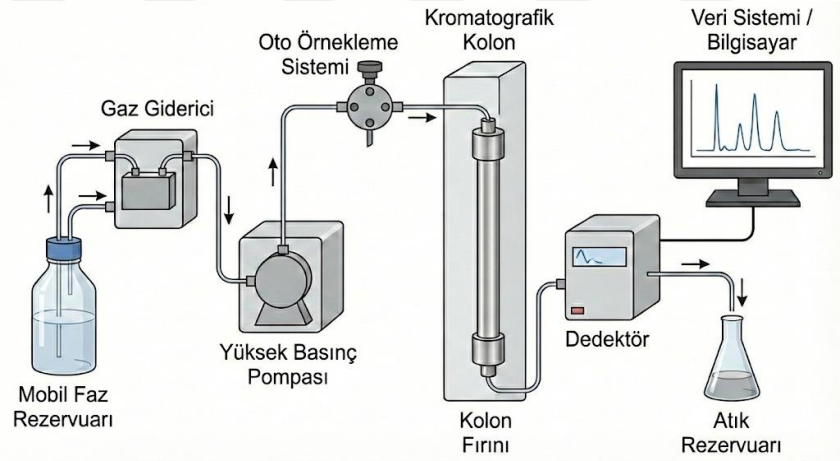
Simetri faktörü (As), bir kromatografik pikin ideal simetrik şekilden ne ölçüde saptığını gösteren ve aynı zamanda asimetri faktörü ya da kuyruklanma faktörü olarak da adlandırılan önemli bir sistem uygunluk parametresidir. Bu parametre, pikin ön ve arka taraflarının dengeli olup olmadığını nicel olarak ifade eder ve kromatografik ayırmanın kalitesi hakkında bilgi verir. Avrupa Farmakopesi'nde tanımlandığı şekilde simetri faktörü, pikin yüksekliğinin %5'i seviyesinde ölçülen pik genişliği (w0,05) ile pikin tepe noktasından bu seviyeye çizilen dikme ile pikin arka sınırı arasındaki mesafe (d) kullanılarak hesaplanmaktadır. Buna göre As değeri, w0,05 / 2d oranı ile ifade edilir. Bu büyüklüklerin kromatogram üzerindeki geometrik karşılıkları Şekil 1.10'da gösterilmiştir. As değerinin 1'e yakın olması pikin simetrik olduğunu, 1'den büyük değerler ise pikte kuyruklanma olduğunu göstermektedir.



Şekil 1.10. Avrupa Farmakopesi, güncel versiyonunda verilen simetri faktörü hesabı için örnek kromatogram (https://pheur-online.edqm.eu/home/)

Sistem tekrarlanabilirliğ, yanıtın tekrarlanabilirliği, üçden az olmayan, ardıl enjeksiyonlar ile elde edilen referans çözelti ile elde edilen dedektör yanıtlarının (genellikle alan) yüzde bağıl standart sapması ile ifade edilir.

1.4.1.2. Sıvı Kromatografi ve Temel Bileşenleri



Şekil 1.11. Temel bileşenleri ile tipik bir YPSK cihazının şematik gösterimi

Bu başlık altında verilen bilgiler Avrupa Farmakopesi online versiyon (11.8) "*2.2.29. Liquid Chromatography*" bölümünden derlenmiştir.

Sıvı kromatografi (SK); sıvı haldeki hareketli fazın, bir kolon içerisine yerleştirilmiş sabit fazdan geçirilmesi esasına dayanan analitik bir yöntemdir. Bu teknik, ayrıştırılacak bileşenlerin, birbiriyle karışmayan iki faz arasındaki dağılım farklılıklarından yararlanarak işlev görür.

SK esas olarak adsorpsiyon, kütle dağılımı, iyon değişimi, boyut dışlama veya stereokimyasal etkileşim mekanizmalarını kullanarak bileşenlerin ayırımını sağlar. Aksi belirtilmediği sürece, aşağıdaki tüm bilgiler hem standart sıvı kromatografi hem de daha küçük parçacık boyutlu kolonlar (örneğin 2,0 µm altı) kullanan sıvı kromatografi sistemleri için geçerlidir.

İkinci sistem, daha yüksek basınçlara (tipik olarak 100 MPa'ya kadar, yaklaşık 15.000 psi) dayanabilen, daha düşük kolon dışı bant genişlemesi oluşturan, geliştirilmiş gradyan karışımı sağlayan ve dedeksiyon sisteminde daha yüksek örnekleme hızına izin veren gelişmiş bir enstrümantasyon gerektirmektedir. Bir sıvı kromatografi sistemi genel olarak pompa sistemi, örnekleme sistemi, kromatografik kolon, bir veya birden fazla dedektör ile veri toplama ve işletim sisteminden oluşmaktadır. Kromatografik kolon, analiz sırasında sıcaklığın sabit tutulmasını sağlamak amacıyla genellikle kolon fırını olarak adlandırılan bir ünitede muhafaza edilmektedir.

Hareketli faz bir veya daha fazla kaynaktan sağlanır ve örnekleme sistemine pompalanır, ardından genellikle sabit bir hızda kolondan geçirilir ve dedektör(ler)e ulaşır.

Pompa, SK pompa sistemleri, mobil fazı kontrollü bir akış hızında iletir. Basınç dalgalanmaları, örneğin basınçlı çözücünün bir darbe sönümleme cihazından geçirilmesiyle en aza indirilmelidir. Kullanılan hatlar ve bağlantılar, pompalama sistemi tarafından üretilen basınçlara dayanabilir. SK pompaları, hareketli faz içerisine sıkışmış hava kabarcıklarının sistemden uzaklaşmasını sağlayabilecek ek birimler de içerebilir.

Mikroişlemcilerle yönetilen pompa mekanizmaları, önceden belirlenen bir protokol çerçevesinde hareketli fazın sisteme aktarımını sağlar. Bu aktarım, faz bileşiminin sabit tutulduğu izokratik elüsyon veya zamanla değiştirildiği gradyan elüsyon şeklinde gerçekleştirilebilir.

Gradyan elüsyon durumunda, birden fazla hareketli faz kaynağından gelen çözücü(ler) birleşerek sisteme iletilir. Bu birleşme/karışma işlemi, pompanın(ların) düşük veya yüksek basınç tarafında gerçekleştirilebilir.

Örnekleme (Enjeksiyon), numunenin hareketli faz akışına entegrasyonu ve kolona transferi, yüksek basınca dayanıklı özel enjeksiyon sistemleri aracılığıyla gerçekleştirilir. Bu süreçte, manuel ya da otomatik örnekleyici (otosampler) ile kontrol edilen, sabit veya ayarlanabilir hacimli cihazlardan yararlanılır. Özellikle manuel enjeksiyonlarda, örnekleme

döngüsünün (loop) tam olarak doldurulmaması, enjekte edilen hacmin hassasiyetinde sapmalara neden olabilir.

Sabit Faz, Sıvı kromatografide birden fazla sabit faz türü vardır, bunlar:

Normal faz kolon, polar sabit faz ve polar olmayan hareketli faz kombinasyonudur. Yaygın olarak silika veya alümina kullanılır, burada ayırma sabit fazdaki adsorpsiyondaki farklılıklara ve/veya hareketli faz ile sabit faz arasındaki kütle dağılımına dayanır (dağılma kromatografi);

Normal faz ve ters faz kolon, polar olmayan sabit faz ve polar hareketli faz kombinasyonu. Kullanılan malzeme polimerlerden, silika veya gözenekli grafitten hazırlanmış ve şekillerde kimyasal olarak modifiye edilmiş desteklerdir. Burada ayırım esas olarak moleküllerin dağılma farklılıklarına dayanır;

İyon değişim kolonu, asidik veya baz içeen gruplara sahip polimerik yapılar veya polimerlerdir. Burada ayırım analize esas, ayrılacak iyonlar ile hareketli fazda bulunan iyonlar arasındaki rekabete dayanır;

Boyut dışlama kolonu, boyut dışlama kromatografide gözenekli silika veya polimerlerik destek malzemeleri kullanılır, burada ayırım sterik dışlamaya karşılık gelen moleküllerin hacimleri arasındaki farklılıklara dayanır;

Enantiyomerik kolon, enantiyomerlerin ayrılması için özel olarak modifiye edilmiş sabit fazlar.

Ayırım çoğunlukla durağan fazın kimyasal modifiye edilmiş silika olduğu ters fazlı sıvı kromatografi yöntemine dayanır. Destek malzemenin yüzeyi, yani silikanın silanol grupları, destek yüzeyindeki çeşitli aktif noktaları kaplayan kovalent bağlanmış silil analogları üretmek için çeşitli silan reaktifleriyle reaksiyona sokulur.

Üretici tarafından aksi belirtilmediği sürece, silika bazlı ters fazlı kolonlarında sistemin kararlılığı açısından kullanılan hareketli fazın pH'sı 2,0 ila 8,0 aralığında olmalıdır.

Normal faz kromatografi uygulamalarında sistem; apolar bir hareketli faz ile polar karakterdeki bir sabit fazın kombinasyonuna dayanır. Sabit faz olarak genellikle saf (modifiye edilmemiş) silika tercih edilebileceği gibi, siyanopropil veya diol gibi kimyasal işlemlerle polarite kazandırılmış modifiye silika türleri de kullanılmaktadır.

Analitik ayırım için, en yaygın kullanılan sabit fazların parçacık boyutu 2 µm ile 10 µm arasında değişir. Parçacıklar küre şeklinde veya düzensiz şekillerde olabilir ve değişen gözenekliliğe ve özgül yüzey alanına sahip olabilir. Bu özellikler sabit fazın kromatografik ayırım yeteneğine katkıda bulunur. Ters faz yaklaşımda, sabit fazın doğası, bağlanma derecesi (karbon yüklemesi olarak ifade edilir) ve sabit fazın modifiye olmadan kalan silanol gruplarının kapatılıp kapatılmamış olması (yani, kalan silanol gruplarının bir kısmı silillenmiş) ek belirleyici faktörlerdir. Özellikle bazik maddelerin piklerinin kuyruklanmasının başlıca sebebi destek yüzeyinde modifiye edilmeden kalan silanol gruplarının mevcudiyetidir.

Gözenekli parçacıklara ek olarak, yüzeysel olarak gözenekli veya monolitik malzemeler kullanılabilir.

Hareketli faz, normal faz sıvı kromatografide genellikle düşük polariteli organik çözücüler kullanılır. Hareketli fazda kullanılan çözücülerde su istenmeyen bir safsızlıktır ve su içeriği, yüksek tekraralanabilirlik sağlamak için kontrol altında tutulmalıdır.

Ters faz sıvı kromatografide ise genellikle organik çözücüler ve/veya farklı bileşenler (tamponlama tuzları, türevlendirme ajanı vb) içeren su içeren mobil fazlar kullanılır.

Hareketli faz bileşenleri genellikle 0,45 µm'den büyük parçacıkları (veya sabit faz 2,0 µm'nin altındaki parçacıklardan oluştuğunda ve özel dedektörler, örneğin ışık saçılım dedektörleri kullanıldığında 0,2 µm'den büyük parçacıkları) gidermek için uygun filtreler yardımıyla süzülür.

Birden fazla çözücü içeren hareketli fazların hazırlığında, aksi (kütlece) belirtilmedikçe her bir bileşenin hacmi ayrı ayrı ölçülür ve ardından karıştırılır. Alternatif bir yöntem olarak, çözücüler ayrı pompalardan çekilerek, istenen karışım oranını otomatik ayarlayan valf sistemleri (oranlama vanaları) aracılığıyla cihaz içinde birleştirilebilir. Analiz sürecinde, özellikle dedektör hücresi veya kolon girişinde gaz kabarcığı oluşumunu engellemek kritiktir. Bu nedenle çözücüler sisteme verilmeden önce; helyum veya azot gibi inert gazların geçirilmesi, ultrasonik işlem uygulanması ya da hat içi vakum/membran degazörleri kullanılması suretiyle çözünmüş gazlardan arındırılmalıdır.

Hareketli fazın hazırlanması için çözücüler normalde stabilizatörlerden arındırılmıştır ve bir UV (DAD, PDA) dedektör kullanılıyorsa, tespit dalga boyunda ışık absorplayan herhangi bir tür içermemelidir. Kullanılan çözücüler ve diğer bileşenler uygun kalitede olmalıdır. Özellikle, *kromatografi için su R,* bileşenlerden biri su veya sulu bir çözelti

olduğunda mobil fazların hazırlanması için kullanılır. Gerekli pH'ın ayarlamaları karışıma değil, hareketli fazın sulu bileşenine yapılır. Tampon çözelti veya tuzlu çözeltiler kullanılıyorsa, analiz tamamlandıktan sonra tuzların kristalleşmesini önlemek için sistemin tuz kalıntılarından arındırılması için yapılacak yıkama işlemleri su ve hareketli fazın organik kısmının küçük bir oranı (%5 h/h) karışımıyla gerçekleştirilir.

Hareketli fazlar, örneğin iyon çifti kromatografi için bir karşı iyon veya akiral sabit faz kullanan kiral kromatografi için bir kiral seçici gibi başka bileşenler içerebilir.

Dedektörler, analizlerde en sık başvurulan tespit sistemleri, diyot dizisi (diode array) teknolojisini de kapsayan UV ve Görünür Bölge (UV-GB) spektrofotometrelerdir. Ancak analitin özelliğine göre; floresan, kütle spektrometrisi (MS), diferansiyel refraktometre (RI), elektrokimyasal (ECD), buharlaşmalı ışık saçılımı (ELSD), yüklü aerosol (CAD), çok açılı ışık saçılımı (MALS), radyoaktivite dedektörleri veya iletkenlik ölçümü yapan diğer elektrokimyasal sistemler de kullanılabilmektedir.

Avrupa Farmakopesi tüm bu bilgiler ışığında, bir sıvı kromatografi analizini aşağıda verilen özet direktifler ile başlatır;

Kolonu, 20-25 °C'de veya monografta belirtilen sıcaklıkta, stabil bir baseline elde edilene kadar, öngörülen mobil faz ve akış hızıyla dengeleyin. İncelenecek maddenin çözeltisini/çözeltilerini ve gerekli referans çözeltisini/çözeltilerini hazırlayın. Çözeltiler çözünmemiş/katı parçacıklardan arındırılmış olmalıdır. Genel bölüm 2.2.46'da (Kromatografik ayırma teknikleri) açıklanan sistem uygunluğunu değerlendirme kriterlerinden gerekli olanları kontrol edin, yine aynı bölümde izin verilen limitler dahilinde gerekirse ayarlamaları (metod üzerinde izin verilen değişiklikler) yaparak sistem uygunluğunu sağlayarak analize başlayın.

1.4.1.3. YPSK'nin Avantajları

Gelişen teknoloji ile, analite özgü yeni dedektörlerin kullanılabilmesi sayesinde sıvı kromatografi yöntemlerinde yüksek duyarlılık elde edilmektedir. Analiz süresinin diğer dolaylı analiz yöntemlerine kıyasla daha kısa olması, yöntemin önemli avantajlarından biridir. Ayrıca, sistemlerin büyük ölçüde otomatize edilmiş olması kullanıcı kaynaklı hataları en aza indirmektedir. Kullanılan analitik kolonlar, farklı analitler için geniş bir kullanım esnekliği sunmakta olup, uygun koşullarda kullanıldıkları ve saklandıkları takdirde yenilenmelerine gerek kalmaksızın defalarca kullanılabilmektedir. Gaz kromatografi ile karşılaştırıldığında ise,

hareketli fazın sıvı olması ve ayırma işlemine doğrudan katkı sağlaması ile daha düşük sıcaklıklarda çalışılabilmesi önemli avantajlar sunmaktadır. Bu durum, yaygın olarak kullanılan asetonitril ve metanol gibi çözücülerin sırasıyla 82 °C ve 64,7 °C olan kaynama noktaları dikkate alındığında, yöntem açısından belirgin bir üstünlük oluşturmaktadır (Dong, Wichael W., 2013)

1.4.1.4. YPSK'nin Dezavantajları

Yüksek performanslı sıvı kromatografi (YPSK) birçok avantaja sahip olmakla birlikte bazı sınırlılıklar da içermektedir. Yöntem, tek başına kullanıldığında her zaman kesin tanılama için yeterli olmayabilir ve karmaşık örneklerde tüm analit bileşenlerinin birbirinden tamamen ayrılması her koşulda mümkün olmayabilir. Ayrıca, düşük sıcaklıklarda gaz fazına geçen veya uçucu özellik gösteren analitler için uygun bir teknik değildir. YPSK sistemlerinde hareketli ve zamanla aşınmaya maruz kalan parçaların bulunması, düzenli bakım ve kalibrasyon gerekliliğini beraberinde getirmekte ve bu durum bakım maliyetlerini artırmaktadır. Gerekli bakım, onarım ve kalifikasyonu yapılmamış cihazlar ise analizlerin gerçekleştirilememesine veya hatalı sonuçların elde edilmesine yol açabilmektedir (Dong, Wichael W., 2013).

1.4.2. Spektrofotometrik Yöntemler

1.4.2.1. Spektrofotometrik Yöntemlerin Temel Prensipleri ve Beer-Lambert Yasası

Ultraviyole ve görünür bölge (UV-GB) spektroskopi, atomların, moleküllerin ve iyonların ultraviyole (yaklaşık 180–400 nm) ve görünür (yaklaşık 400–800 nm) dalga boyu aralığında ışığı absorplama yeteneğine dayanan yaygın bir analitik tekniktir. Bu absorpsiyon, moleküllerdeki elektronların daha düşük enerjili orbitallerden daha yüksek enerjili orbitallere uyarılması sonucu meydana gelen elektronik geçişlerle ilişkilidir. Elektronik enerji seviyelerinin titreşimsel ve dönme alt seviyeleriyle birlikte bulunması nedeniyle, UV-GB spektroskopide genellikle keskin çizgiler yerine geniş emilim bantları gözlenir. Bu bantlar, moleküllerde bulunan fonksiyonel gruplar ve bağ yapıları için karakteristik bilgiler sağlar (Wenzel, T.J., vd. 2013)

UV-GB spektroskopik ölçümlerde, bir numune belirli dalga boylarında ışığa maruz bırakılır ve numuneden geçen ışığın şiddetindeki azalma ölçülür. Işık absorplayan bir madde içeren çözeltiye ışık gönderildiğinde, çözeltinin belirli dalga boylarındaki ışığı kısmen absorpladığı gözlenir. Numuneye gönderilen ışığın şiddeti ile numuneden geçen ışığın şiddeti

arasındaki bu azalma, absorbans olarak tanımlanır ve numunenin ışığı ne ölçüde absorpladığını nicel olarak ifade eder (Wenzel, T.J., vd. 2013).

Absorbans ile analitin derişimi arasındaki ilişki, spektrofotometrik analizlerin temelini oluşturan Beer–Lambert yasası ile açıklanmaktadır. Bu yasa, sabit deneysel koşullar altında absorbansın, analitin derişimi ve ışığın örnek içerisinden geçtiği yol uzunluğu ile doğru orantılı olduğunu ifade eder ve aşağıdaki eşitlik ile tanımlanır:

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c$$

Burada A absorbansı, ε molar absorptiviteyi, l ışık yolunun uzunluğunu ve c analitin derişimini göstermektedir. Molar absorptivite, bir maddenin belirli bir dalga boyunda ışığı absorplama kapasitesini tanımlayan ve elektronik geçiş olasılığının bir ölçüsü olarak kabul edilen karakteristik bir parametredir. UV-GB spektroskopide absorbans birimsiz bir büyüklük olup, molar absorptivite genellikle $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ birimiyle ifade edilir (Wenzel, T.J., vd. 2013).

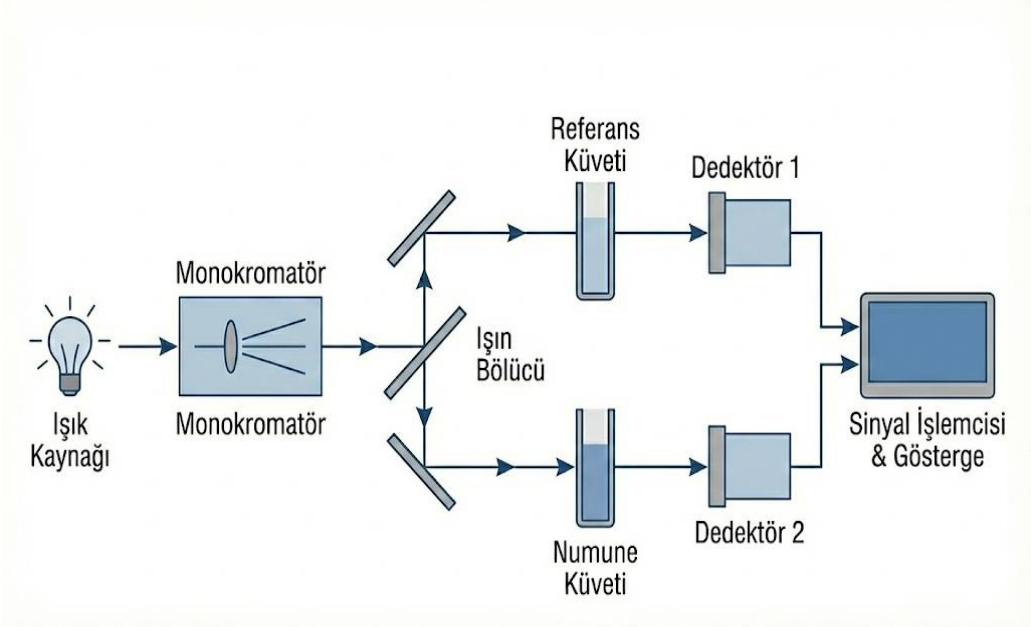
Beer–Lambert yasası, absorbans ile derişim arasında doğrusal bir ilişki öngörmesine rağmen, bu doğrusal ilişkinin yalnızca belirli bir derişim aralığında geçerli olduğu bilinmektedir. Analitin çözücü ile etkileşimi, zamanla bozunması, diğer türlerle reaksiyona girmesi gibi kimyasal etkenler ile çözeltide askıda parçacıkların bulunması veya çözücünün buharlaşması gibi fiziksel etkenler doğrusal ilişkiden sapmalara neden olabilir. Ayrıca yüksek derişimlerde absorbans-derişim ilişkisinin doğrusal olmaktan çıktığı gözlenmektedir. Bu nedenle spektrofotometrik analizlerde, Beer–Lambert yasasının geçerli olduğu doğrusal derişim aralığının belirlenmesi ve analizlerin bu aralıkta gerçekleştirilmesi büyük önem taşımaktadır (Wenzel, T.J., vd. 2013).

1.4.2.2. Ultraviyole ve Görünür Bölge (UV-GB) Spektroskopi

UV-GB bölge spektroskopi, diğer adıyla elektronik spektroskopi, elektronik geçiş spektrumlarının gözlendiği, 200-400 nm aralığındaki UV bölge ve 400-700 nm aralığındaki görünür bölgeyi ifade eder. Adından da anlaşılacağı üzere görünür bölgede absorpsiyon yapan türler renklidir ve absorpladığı dalgaboyuna karşılık gelen renk bileşiğin sahip olduğu rengin tamamlayıcı rengindedir (Wenzel, T.J., vd. 2013).

UV-GB spektroskopide, ışık ile uyarılan elektronlar, ışığın enerjisinin bir kısmını soğurarak bir elektronik seviyeden diğerine geçerler. Bu davranış atomlar ve iyonlar için karakteristik ve belirli bir düzende gerçekleşir ve bu şekilde elde edilen pikler keskindir ancak

moleküller için elektronik emilimin yanı sıra molekülde gözlenen dönme ve titreşme hareketleri de ışık emilmesine katkıda bulunarak elde edilen piklerin keskinliği azalmasına neden olur. Işık absorplanması nedeniyle oluşan pik ışık apsorplayan türde mevcut elektronun bulunduğu yörüngeyi terk ederek daha üst enerji seviyesindeki bir yörüngeye çıkması nedeniyle oluşmaktadır. Bu olay genellikle molekülün belirli bir fonksiyonel gruba ait bir davranıştır ve bu fonksiyonel grup/lar kromofor olarak adlandırılır. Aynı molekülde birden fazla kromofor grup var ise ölçülen absorpsiyon bu grupların her birinden kaynaklı absorpsiyon değerlerinin toplamına eşit olacaktır, bu davranış toplanabilirlik kuralı olarak isimlendirilir. Bu kural birden fazla ışık absorplayan tür içeren çözeltiler için de geçerlidir (Wenzel, T.J., vd. 2013).



Şekil 1.12. Temel bileşenleri ile çift ışık yollu spektrofotometre cihazının şematik gösterimi

1.4.2.3. Basit bir Spektrofotometre Cihazının Temel Bileşenleri

Işık kaynağı: UV-VIS bölge için sürekli ışıma yapan kaynaklar kullanılmaktadır. UV bölge için Hidrojen (H_2) ve Döteryum (D_2) ve elektriksel boşalım lambaları yaygın olarak kullanılan ışık kaynaklarıdır ve 180 - 380 nm arasında ışık üretme kabiliyetine sahiptirler. Ancak, UV-VIS bölgenin tümünde (150-700 nm) iş görebilen Ksenon (Xe) ve Civa (Hg) buhar lambaları da kullanılmaktadır. IR bölge (320-3000 nm) için ise Tungsten (W) flaman lambası kullanılır(Wenzel, T.J., vd. 2013).

Monokromatör: Prizma ve optik ağ yardımı ile çoklu dalgaboyuna sahip ışığı tek dalgaboyuna döndürmek amacıyla tasarlanmış düzeneklerdir (Wenzel, T.J., vd. 2013).

Yarık (Slit): Monokromatörde elde edilen ışık tayfında istenilen dalgaboyundaki ışığın geçmesine izin verecek şekilde tasarlanmış yarıktır. Yarığın düzgün çalışması elde ediln spektrumun şekli, pikin yapısı ve keskinliği ve ölçüm duyarlığı, sinyal/gürültü oranı gibi parametreleri doğrudan etkiler (Wenzel, T.J., vd. 2013).

Ayna: Çift ışın yollu (double beam) cihazlarda, monokromatörden gelip yarıktan geçen ışığı eşit şiddette iki parçaya bölerek ışık apsorplayan türlere sahip numune/standart içeren hücreden ve çözücü ya da kör içeren referans hücreden aynı anda geçmelerini sağlayan düzeneklerdir (Wenzel, T.J., vd. 2013).

Ölçüm Küvetleri: Çalışılması düşünülen bölgeye göre seçilen, farklı maddelerden yapılmış, ışık yolu uzunluğu belirli ve sabit olan içerisine numune, standart, kör çözeltileri konulan kaplardır. Görünür bölgede çalışılacak ise bu bölgedeki ışığın geçmesine izin veren cam küvet kullanımı yeterli olurken hem UV, hem görünür hem de IR bölgedeki ışığı geçiren kuvartz hücreler diğer çalışmalar için daha uygundur (Wenzel, T.J., vd. 2013).

Çalışma Hücresi: Numune ya da standart içeren küvetlerin konduğu kısımdır (Wenzel, T.J., vd. 2013).

Referans hücre: Çift ışık yollu spektrofotometrelerde, analiz boyunca çözücü ya da örnek körü içeren bir küvet ikinci hücrede tutularak dedektörün buradan gelen absorbansı sürekli ölçülen absorbanstan çıkarması sağlanır. Bu hücereye referans hücresi adı verilir ve yapısı numune ölçüm hücresi ile aynıdır (Wenzel, T.J., vd. 2013).

Dedektör, ışık kaynağından yayılan enerjinin küvetten geçmeden önceki ve geçtikten sonraki yoğunluk farkını analiz eden bileşendir. Bu sayede numunenin absorbans (soğurma) veya transmitans (geçirgenlik) değerleri belirlenir. İdeal bir dedektörün; fotonlara karşı yüksek hassasiyet göstermesi, ışık şiddetiyle lineer (doğru orantılı) bir sinyal üretmesi, çalışma kararlılığına (stabilite) sahip olması ve mümkün olan en kısa sürede yanıt verebilmesi gerekmektedir (Wenzel, T.J., vd. 2013).

1.4.2.4. Spektrofotometrik Yöntemlerin Uygulamaları

Aynı anda birden fazla etkin maddeyi barındıran kombine farmasötik dozaj formları terapötik ürünlerde köklü ve önemli bir rol oynar. Akılcı bir şekilde formüle edildiğinde, sabit

kombinasyonlu ilaçlar daha fazla kolaylık, daha düşük maliyet ve bazen daha fazla etkinlik ve güvenlik sağlayabilir (Crout, 1974). Çok sayıda bileşene sahip numunelerin analizi modern analizde büyük bir zorluk teşkil eder (Bozdoğan vd., 1992). Çok bileşenli analiz, klinik kimya, ilaç analizi, safsızlık kontrolü vb. alanlarda son yıllardar analitik kimyacılar için en çekici konulardan biri haline gelmiştir. Çok bileşenli analiz için; spektrofotometrik yöntemler, kromatografik yöntemler ve elektroforez gibi farklı analitik teknikler uygulanabilir (Ojeda ve Rojas, 2004).

İlgi duyulan analitlerin çoğu dozaj formlarında aynı spektral bölgede absorbans veren diğer etken madde molekülleri ile birlikte bulunduğundan, klasik UV spektral ölçümleri çoğunlukla bunların tayini için kullanılamaz (Korany vd., 1985). Ekstraksiyon gibi geleneksel yöntemlerin kullanımı ise oldukça zordur çünkü ekstraksiyon teknikleri büyük miktarlarda çözücü kullanımı gerektirir, buna analit kaybı ve/veya kontaminasyonu ve etkin maddenin tam olarak ekstrakte edilememe riski eşlik eder. Ekstraksiyon işlemi pahalı ve zaman alıcı olabilir (Bozdoğan vd., 1992). UV spektrofotometrik teknikler esas olarak çok bileşenli analizler için kullanılır, böylece girişim riski azaltılır ve artan sayıda analitin belirlenmesine olanak sağlama gibi zahmetli görevi başarılabilir kılar ve sonuç olarak analiz süresi ve maliyetini azaltır (Saldanha vd., 2000).

Çok bileşenli UV spektrofotometrik yöntemler, emilim spektrumlarının kaydedilmesine ve matematiksel olarak işlenmesine dayanmaktadır ve bazı avantajlar sunarlar. Bunlar; analiz öncesinde gerçekleştirilmesi elzem olan ekstraksiyon işlemine gerek kalmaması, spektral verilerin kolaylıkla elde edilmesi, işlemin hızlı, doğru ve basit olması, 10^{-4} ila 10^{-5} M gibi düşük derişimlerdeki yakalama sınırı ve orta ila yüksek dereceler ile ifade edilebilece seçiciliğe sahip olmaları ve hem organik hem de inorganik sistemlere geniş uygulanabilme avantajlarlarıdır (Skoog vd., 1998)

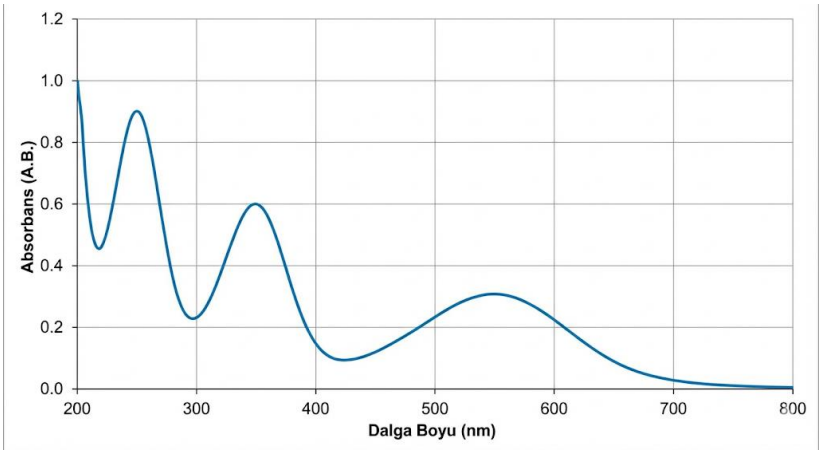
1.4.2.4.1. Eşzamanlı Denklem Yöntemi

Eş zamanlı denklem yöntemi, her biri diğerinin maksimum absorbsiyon dalga boyunda ışık absorplayabilen iki farklı etken maddeyi aynı anda tayin etmeye olanak sağlayan bir UV-GB spektrofotometrik yöntemdir. Bu yöntem, iki bileşenli bir karışımda her bir bileşenin iki farklı dalga boyundaki absorbsiyon katkılarının toplam absorbansa additif olarak yansıdığı varsayımına dayanmaktadır. Yöntemin uygulanabilmesi için, her iki etken maddenin iki seçilen dalga boyundaki özgül absorbans değerlerinin bilinmesi ve karışımın aynı dalga boylarındaki toplam absorbanslarının ölçülmesi gerekmektedir. Bu bilgiler kullanılarak,

karışımdaki her bir bileşenin derişimi matematiksel olarak hesaplanabilmektedir. Hesaplamalar, ölçüm yapılan küvetin ışık yolunun sabit olduğu kabulüne dayanır. Eş zamanlı denklem yönteminin güvenilir şekilde uygulanabilmesi için bazı koşulların sağlanması gerekmektedir. Özellikle, bileşenlerin maksimum absorbsiyon dalga boylarının birbirinden yeterince farklı olması ve bileşenler arasında kimyasal bir etkileşimin bulunmaması önemlidir. Bu koşullar sağlandığında, karışıma ait toplam absorbansın, bileşenlerin bireysel absorbanslarının toplamı olduğu varsayımı geçerli kabul edilir. Ayrıca, yöntemin maksimum hassasiyetle uygulanabilmesi için bileşenlerin bağıl derişimleri ve absorbans oranlarının belirli sınırlar içerisinde olması gerekmektedir. Bu kriterler, her iki etken maddenin de analitik olarak güvenilir biçimde tayin edilebilmesini sağlamaktadır (Beckett ve Stenlake, 2001).

1.4.2.4.2. Absorbans Düzeltme Yöntemi

Absorbans düzeltme yöntemi, her iki etken maddenin kendi absorbans maksimalarında (λmax) eş zamanlı tayinini sağlayan basit bir spektrofotometrik yöntemdir, bu yöntem eş zamanlı denklem yönteminin bir modifikasyonudur. Burada, etken maddenin nitel tayini A (%1, 1 cm) ile gerçekleştirilir ve diğer etken maddenin nitel tayini ise absorbans faktörü kullanılarak diğer etken maddenin absorbansının çıkarılmasıyla gerçekleştirilir (Lotfy vd., 2015).

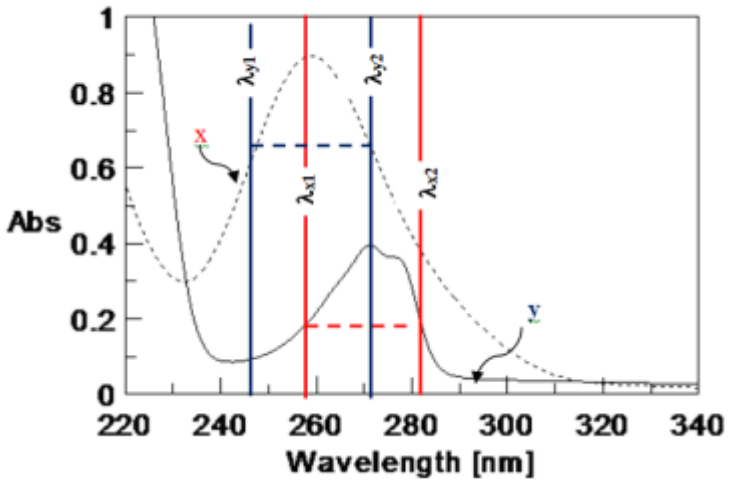


Şekil 1.13. Tipik bir UV-GB spektrumu

1.4.2.4.3. Çift Dalgaboyu Yöntemi

Çift dalga boyu yöntemi karışım spektrumundaki iki nokta arasındaki absorbans farkını (ΔA) ölçerek bir bileşenin girişim yapan diğer bir bileşenin varlığında analiz edilmesini

kolaylaştırır. Bu yöntemde (şekil 1.14); bileşenlerden analizi yapılacak bileşen olarak kabul edilirken, diğeri ise sadece girişim yapan bileşen olarak kabul edilir. Bu yöntemin temeli, girişim yapan bileşenin aynı absorbansı gösterdiği (ΔA sıfıra eşittir) ve analizi yapılacak bileşenin derişimle önemli bir absorbans farkı gösterdiği iki dalga boyunun belirlenmesidir. Karışımın spektrumundaki iki nokta arasındaki ΔA, girişim yapan bileşenden bağımsız olarak analizi yapılacak bileşenin derişimi ile doğru orantılıdır (Jain vd., 2010).



Şekil 1.14. Çift dalga boyu yönteminde çalışılacak dalgaboylarının seçimi (Mabrouk vd., 2014)

Çift dalga boyu yönteminin en önemli avantajlarından biri, ölçüm özgüllüğünü artırmasıdır. İki farklı dalga boyunun kullanılması, kirleticilerden, yardımcı maddelerden veya arka plan sinyallerinden kaynaklanan girişimlerin etkisini azaltarak hedef analitin daha seçici bir şekilde tayin edilmesine olanak sağlamaktadır. Bu yaklaşım, özellikle girişim yapan kimyasalların varlığında, analitlerin iki dalga boyundaki absorbans veya emisyon değerlerinin karşılaştırılması yoluyla daha yüksek doğruluk elde edilmesini mümkün kılmaktadır. Ayrıca, spesifik olmayan etkileşimlerden ve arka plan gürültüsünden kaynaklanan katkıların minimize edilmesi sayesinde hedef analite ait sinyalin güçlendirilmesi sağlanmakta ve böylece yöntemin hassasiyeti artırılmaktadır (Mabrouk vd., 2014).

Buna karşın, çift dalga boyu yönteminin bazı dezavantajları da bulunmaktadır. Tek dalga boyuna dayalı yöntemlere kıyasla, her iki dalga boyu için ayrı kalibrasyon eğrileri veya denklemlerinin oluşturulması gerekliliği, yöntemin kalibrasyon sürecini daha karmaşık hale getirmektedir. Ayrıca, çift dalga boyunda ölçüm yapabilen optik sistemlere sahip donanım ihtiyacı, daha yüksek cihaz maliyetleri ve bakım gereksinimlerine yol açabilmektedir. Her ne kadar girişimler büyük ölçüde azaltılsa da, örtüşen emilim spektrumları veya spektral

artefaktlar ölçüm doğruluğunu olumsuz etkileyebilmektedir. Bunun yanı sıra, karmaşık spektral özelliklere veya zayıf tanımlanmış emilim bantlarına sahip analitler için yöntemin uygulanabilirliği sınırlı olabilmektedir. Çift dalga boyu analizlerinde elde edilen verilerin değerlendirilmesi, tek dalga boyu tekniklerine göre daha karmaşık olup, doğru sonuçların elde edilmesi için gelişmiş veri işleme yaklaşımları ve uzman yazılımlar gerekebilmektedir. Son olarak, yöntemin tekrarlanabilirliğini sağlamak amacıyla sıcaklık, pH ve örnek hazırlama koşulları gibi deneysel parametrelerin dikkatle kontrol edilmesi ve optimize edilmesi gerekmektedir (O'Brien vd., 2022).

1.4.2.4.4. İndüklenmiş Çift Dalgaboyu Yöntemi

İki farklı etken maddeyi aynı anda içeren bir çözeltide, girişim yapan maddenin eşit absorbanslarına sahip iki farklı dalga boyu (λ_1 ve λ_2) bulunmuyorsa, aşırı örtüşen bu sıfırıncı dereceden absorpsiyon spektrumları için indüklenmiş çift dalgaboyu (İİD) yöntemi uygulanır. Yine aynı sebepten bu şekilde iki aktif bileşen içeren çözeltilerde geleneksel çift dalga boyu yöntemi uygulanamaz ve bu dalga boylarında girişim yapan maddenin eşitlik faktörü hesaplanır.

Bu yöntemle, sıfırıncı dereceden spektrumları birbirinden ayrılamayan iki etken madde içeren çözeltilerin iki farklı dalga boyundaki (λ_1 ve λ_2) absorbans verileri ile analiz edilmesine olanak sağlamaktadır. Burada absorbans farkı ΔA ($A_1 - FA_2$) sıfıra eşit değildir. Bu dalga boylarında karışan maddenin bir eşitlik faktörü ($F \neq 1$) hesaplanır (Lotfy vd., 2017).

Bu tez çalışmasında Dolutegravir, Lamivudin ve Abakavir'i tek başına ya da bir arada içeren farmasötik preaparatlarda bu etken maddelerin eş zamanlı tayinlerinin gerçekleştirilmesi, bu amaçla YPSK ve Spektrofotometrik yöntemlerin geliştirilerek ulusal ve uluslararası kılavuzlar rehberliğinde geçerli kılınması amaçlanmıştır. Bu amaçla geliştirilen yöntemlerin hem mevcut yöntemler ile hem de oluşacak yeni yöntemler ile karşılaştırılması da planlanmış olup bu amaçla düzenlenen tablolar tatmin edici sonuçlar sunmuştur.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Gereçler

2.1.1. Kullanılan Kimyasallar ve Referans Maddeler

YPSK analizlerinde metanol (CH_3OH, Sigma-Aldrich, Katalog No: 34851), trifloroasetik asit (Sigma-Aldrich, Katalog No: A7262), trietilamin (Merck, Sigma-Aldrich, Katalog No: 695092), hidrojen peroksit (H_2O_2), sodyum hidroksit (NaOH) ve hidroklorik asit (HCl) kullanılmıştır. Spektrofotometrik analizlerde çözücü olarak metanol (Sigma-Aldrich, Katalog No: 34860) tercih edilmiştir. Çalışmada referans maddeler olarak Abakavir, Dolutegravir ve Lamivudin kullanılmıştır. Türkiye ilaç piyasasında bulunan farmasötik preparatlardan Triumeq® 50 mg/600 mg/300 mg film kaplı tablet çalışmaya dâhil edilmiştir. Ülkemizde yalnızca bu dozda ruhsatlandırılmış olmasına rağmen, aynı üretici tarafından geliştirilen ve FDA ile EMA tarafından onaylanmış, farklı dozlarda etken maddeler içeren Triumeq PD oral süspansiyon tabletleri (60 mg Abakavir, 5 mg Dolutegravir ve 30 mg Lamivudin) de mevcuttur. Triumeq® 50 mg/600 mg/300 mg film kaplı tablet, ağızdan uygulanan bir preparat olup her tablette 52,6 mg Dolutegravir sodyum (50 mg Dolutegravir'e eşdeğer), 702 mg Abakavir sülfat (600 mg Abakavir'e eşdeğer) ve 300 mg Lamivudin içermektedir; yardımcı maddeleri arasında D-mannitol, mikrokristalize selüloz, povidon K29/32, sodyum nişasta glikolat, magnezyum stearat ve Opadry II Mor 85F90057 (polivinil alkol kısmi hidrolize, titanyum dioksit, makrogol/PEG, talk, siyah demir oksit ve kırmızı demir oksit) yer almaktadır. Ayrıca yöntemin farklı ticari preparatlara uygulanabilirliğini değerlendirmek amacıyla Dolutegravir ve Lamivudini birlikte içeren Dovato® 50/300 mg film kaplı tablet ile yalnızca Dolutegravir içeren Tivicay® 25 mg film kaplı tablet de tez çalışmasına dâhil edilmiştir.

2.1.2. Kullanılan Analitik Cihazlar ve Ekipmanlar

YPSK analizlerinde Dionex Ultimate Focused 3000 sıvı kromatografi sistemi, diyot dizi dedektör (DAD) ile birlikte kullanılmıştır. Ayırma işlemleri Spherisorb ODS2 C18 (3,5 µm, 4,6 × 100 mm) analitik kolon üzerinde gerçekleştirilmiştir. Tartım işlemleri için Sartorius MSU224S-000-DU/2013 model analitik terazi, pH ölçümleri için Seven Compact pH/Ion S220 pH metre kullanılmıştır. Numune hazırlama aşamalarında Ultrasonic LC60H ultrasonik ve ısıtmalı su banyosu, Wisestir Multi Hotplate manyetik karıştırıcı ve etüv kullanılmıştır.

Spektrofotometrik analizlerde ise Shimadzu UV-1601 model UV-Vis spektrofotometre kullanılmış olup, tartım ve karıştırma işlemlerinde Sartorius MSU224S-000-DU/2013 analitik terazi ve Wisestir Multi Hotplate manyetik karıştırıcıdan yararlanılmıştır.

2.2. Deneysel Koşulların Optimizasyonu

2.2.1. YPSK için Deneysel Koşulların Optimizasyonu

YPSK için, yaklaşım olarak üç etken maddeyi de çözen, asidik ve bazik tampon çözeltiler hazırlanmasına karar verildi. Farklı tampon çiftleri ve organik çözücü karışımları denendikten sonra pH: 3,5 in altındaki bir tampon çözelti ve organik çözücü olarak metanol kullanılmasına karar verildi.

Üç etken maddeyi kısa sürede ayırmak ve kolondan en fazla verimi almak için yarışıcı baz olan trietilamin ve iyon çifti oluşturucu ajan olan tifloroasetik asit ile tampon çözeltinin kurulması düşünüldü. Benzer analizlerde hacimce 1:1000 TFA kullanıldığı göz önünde bulundurularak bu çözeltiye artan miktarlarda TEA eklenerek denemeler yapıldı. Nihayetinde iki litrede 2,0 mL TFA içeren sulu çözeltiye 3,5 mL TEA eklenerek elde edilen çözeltinin kullanılmasına karar verildi, bu çözeltinin pH'sı her denemede 3,15 olarak ölçüldü.

İlk denemeler yukarıda verilen tampon çözelti ve asetonitril veya metanol (50:50; h/h) karışımının mobil faz olarak kullanıldığı C8 ve C18 kolonlarda gerçekleştirilmiş, ayırımın ve pik şekillerinin daha iyi olmasından dolayı metanol ile devam edilmesine karar verilmiştir. Analiz süresini kısaltmak ve ideal pik şekline ulaşmak amacıyla artan metanol oranları ile C18 kolonlar ile denemelere devam edilmiş ve Spherisorb ODS2 C18, (3,5 µm 4.6x100 mm) kolonun bu üç etken maddeyi aynı anda ayırmaya yeterli olduğu gözlenmiştir.

Pek çok deneme sonucunda izokratik yaklaşımla bu üç etken maddeyi anlamlı rezolüsyon değerleri ile ayırmak mümkün olmadığı için gradyen yaklaşıma geçilmiştir. Bu sayede göreceli olarak oldukça kısa süre içerisinde analizin tamamlanması sağlanmıştır.

Bu anlamda farklı akış değerleri denenmiş, 1,2 mL/dk. akış hızının hem analiz süresini yeteri kadar kısa tuttuğu hem de tolere edilebilir bir basınç değeri oluşturduğu gözlenmiştir.

Analiz için farklı hacimlerde enjeksiyonlar yapılmış, yeni nesil cihazların düşük enjeksiyon hacimlerinde bile tekrarlanabilir alanlar üretmesi avantajından faydalanılarak enjeksiyon hacmi minimal düzeyde tutulmaya, kolona aşırı miktarda madde yüklenmemeye çalışılmıştır.

Çalışma dalgaboyları seçilirken her üç etkin madde için λ_{maks} değerleri kullanılmış, bu sayede her üç etken madde için maksimum yanıt alımı sağlanmıştır. Bu amaçla YPSK cihazı spektrum modunda çalıştırılarak enjeksiyonlar yapılmış ve elde edilen kromatogram ve spektrumlar değerlendirilmiştir.

YPSK cihazında metot oluşturulurken gün içi ve günler arası çalışmalar göz önünde bulundurularak iki farklı metot yazılmış ancak sadece oto örnekleyici kısmının sıcaklığı farklı girilmiştir (20^oC ve 5^oC).

Kolon sıcaklığının analiz boyunca sabit tutulması öngörülmüş, farklı sıcaklık değerleri ile denemeler yapılmış, kolon ve analitler arasındaki etkileşimi en üst düzeyde tutacak ancak analizi etkilemiyecek, etken maddelerin bozunmasına yol açmayacak bir sıcaklık seçilmiştir. Optimize edilmiş değerler ve diğer cihaz parametreleri çizelge 3.1.'de verilmiştir.

2.2.2. Spektrofotometrik Yöntemi için Deneysel Koşulların Optimizasyonu

Dolutegravir ve Lamivudin içeren karışımlarda etken madde miktarlarını tayin etmek için absorbans düzeltme (AD) yöntemi ve İndüklenmiş ikili dalgaboyu (İİD) yöntemleri kullanılmıştır.

Yapılan pek çok deneme, bu üç etken maddenin benzer absorbans maksimaları ve örtüşen spektrumlar sergilemeleri nedeniyle başarısızlıkla sonuçlanmasına karşın alternatif, hızlı, ekonomik bir metot geliştirme amacıyla denemelere devam edilerek hedefte Dolutegravir ve Lamivudin bırakılmış ve denemelere aşağıda verilen iki spektrofotometrik uygulama ile devam edilebilmiştir.

2.3. Analitik Yöntem Geliştirme ve Validasyon Çalışmaları

2.3.1. YPSK Geliştirme ve Validasyon Çalışmaları

2.3.1.1. Doğrusallık ve Kalibrasyon Eğrileri için Standart Çözeltilerin Hazırlanması

Metodun doğrusal aralığının belirlenmesi ve elde edilen deney sonuçlarının sağlıklı ve doğru şekilde yorumlanabimesi için aralıkları doğru ve olabildiğince analizi kapsayacak bir kalibrasyon çözeltisi serisi planlanmıştır. Bu amaçla aşağıda verilen çözeltiler hazırlanmıştır.

DTG stok çözeltisi; 52,62 mg (50 mg Dolutegravir'e eşdeğer) Dolutegravir sodyum CRS hassas şekilde tartılarak 10,0 mL'lik balon jojeye alınmış, daha sonra çözücü olarak

seçilen hareketli faz A ve hareketli faz B karışımında (50:50; h/h) çözülerek hacmine yine aynı çözücü ile tamamlanmıştır (5000 µg/mL).

3TC stok çözeltisi; 40 mg Lamivudine CRS hassas şekilde tartılarak 20,0 mL'lik balon jojeye alınmış, daha sonra çözücü olarak seçilen hareketli faz A ve hareketli faz B karışımında (50:50; h/h) çözülerek hacmine yine aynı çözücü ile tamamlanmıştır (2000 µg/mL).

ABC stok çözeltisi 46,8 mg (40 mg Abakavir'e eşdeğer) Abakavir sülfat CRS hassas şekilde tartılarak 10,0 mL'lik balon jojeye alınmış, daha sonra çözücü olarak seçilen hareketli faz A ve hareketli faz B karışımında (50:50; h/h) çözülerek hacmine yine aynı çözücü ile tamamlanmıştır (2000 µg/mL). Hazırlanan stok çözeltiler deney boyunca 5°C'de ışıktan korunarak saklanmıştır.

Daha sonra aşağıdaki çizelgede (Çizelge 2.1) verilen hacimlerde stok çözeltilerden alınarak yine aynı tabloda verilen final hacimlere dilüsyonlar yapılarak kalibrasyon serisi için çözeltiler hazırlanmıştır. Elde edilen derişimler çizelge 2.2'de verilmiştir. Hazırlanan çözeltiler 0,22 µm membran filtrelerden süzülerek YPSK viallerine alınmış ve her seferinde analitik kolona 5 µL standart çözeltileri enjekte edilmiştir. Tüm pikler için pik alanları kaydedilerek. pik alanlarına karşı derişimler grafiğe geçirilmiş, böylelikle her üç etken madde için kalibrasyon eğrileri çizdirilmiştir. Analizlerde kalibrasyon grafiğinden elde edilen doğru denklemlerinin kullanılması planlanmıştır.

Çizelge 2.1. YPSK için kalibrasyon çözeltileri hazırlığı

No	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**
DTG stok çözeltiden alınan, µL	20	50	100	250	500	750	1000
3TC stok çözeltiden alınan, µL	12.5	50	125	375	500	750	1500
ABC stok çözeltiden alınan, µL	25	125	375	750	1000	1250	1500
Final hacim mL	50	50	50	50	50	50	50

Çizelge 2.2. YPSK için hazırlanan kalibrasyon çözeltileri derişimleri

No	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**
C DTG, µg/mL	2.0	5.0	10.0	25.0	50.0	75.0	100.0
C 3TC, µg/mL	5.0	20.0	50.0	150.0	200.0	300.0	600.0
C ABC, µg/mL	10.0	50.0	150.0	300.0	400.0	500.0	600.0

2.3.1.2. Kesinliğin Araştırılması (Gün İçi ve Günler Arası)

Kesinliğin değerlendirilmesi amacıyla, orta derişime karşılık gelen kalibrasyon çözeltisinin (seviye 4) ardışık altı enjeksiyonundan elde edilen pik alanlarına karşılık gelen derişimler kullanılarak ortalama, standart sapma ve kesinliği ifade eden BSS değerleri hesaplanmıştır.

Kesinliğin gün içi ve günler arası düzeyde ayrıntılı olarak incelenmesi amacıyla, kalibrasyon çalışmaları için hazırlanan 3, 4 ve 5 numaralı çözeltiler (orta derişimler) kullanılarak deneyler gerçekleştirilmiştir. Bu çözeltiler, gün içi ve günler arası deneylerde kullanılmak üzere iki ayrı grup halinde viallenmiş; birinci grup çözeltiler karanlıkta ve oda sıcaklığında (20 °C), ikinci grup çözeltiler ise karanlıkta ve 5 °C'de saklanmıştır. Gün içi çalışmalar kapsamında, 0, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 20 ve 24. saatlerde elde edilen pik alanları kaydedilmiştir. Günler arası çalışmalar ise birinci günden beşinci güne kadar geçen zaman aralığında gerçekleştirilmiştir. Elde edilen pik alanları, kalibrasyon grafiğinden elde edilen doğru denklemlerinde yerine konularak hesaplamalar yapılmıştır.

Bu kapsamda, sırasıyla 50, 150 ve 200 µg/mL Lamivudin (3TC), 150, 300 ve 400 µg/mL Abakavir (ABC) ve 10, 25 ve 50 µg/mL Dolutegravir (DTG) içeren üç farklı derişim seviyesinde çözeltiler hazırlanmış ve iki ayrı çalışma grubu oluşturulmuştur. Birinci grup çözeltiler karanlıkta ve 5 °C'de, ikinci grup çözeltiler ise karanlıkta ve 20 °C'de saklanmıştır. Gün içi kesinlik deneylerinde, hazırlanan çözeltiler hazırlandıktan sonra 2, 4, 6, 8, 12, 16, 20 ve 24. saatlerde sisteme enjekte edilmiştir. Gün içi deneyler yalnızca 5 °C'de saklanan çözeltiler üzerinden gerçekleştirilmiştir. Elde edilen pik alanları, ilgili etken maddeye ait kalibrasyon grafiğinden elde edilen doğru denklemlerinde yerine konularak karşılık gelen derişimler hesaplanmıştır.

Günler arası kesinlik deneylerinde ise, gün içi deneylerde de kullanılan ve sırasıyla 50, 150 ve 200 µg/mL 3TC, 150, 300 ve 400 µg/mL ABC ve 10, 25 ve 50 µg/mL DTG içeren üç farklı seviyede hazırlanan çözeltiler değerlendirilmiştir. Bu çözeltiler de iki ayrı çalışma grubu halinde planlanmış; birinci grup çözeltiler karanlıkta ve 5 °C'de, ikinci grup çözeltiler ise karanlıkta ve 20 °C'de saklanmıştır. Planlanan çalışma kapsamında, çözeltiler hazırlandıktan sonraki 24. saatte (1. gün) başlanarak beş gün boyunca her gün aynı saatte enjeksiyonlar gerçekleştirilmiştir. Elde edilen pik alanları, ilgili etken maddeye ait kalibrasyon grafiğinden elde edilen doğru denklemlerinde yerine konularak karşılık gelen derişimler hesaplanmıştır.

2.3.1.3. Doğruluğun Araştırılması (Geri Kazanım)

Önerilen YPSK metodunun doğruluğunu araştırmak amacı ile geri kazanım çalışmaları planlanmıştır. Bu amaçla üç etken madde için ikisinin orta derişimde tutulduğu, geri kazanımı incelenecek etken maddenin orta derişimine göre % 50, % 100 ve % 150 değerine karşılık gelen derişimlerde sentetik çözeltiler hazırlanmıştır.

Dolutegravir Geri Kazanım: ABC ve 3TC orta derişiminde (150 ve150 µg/mL) DTG için orta derişiminin (25 µg/mL) %50 (12,5 µg/mL), %100 (25 µg/mL) ve %150 (37,5 µg/mL) çözeltiler hazırlanmıştır (Çizelge 2.3.)

Çizelge 2.3. YPSK için DTG geri kazanım çözeltileri hazırlığı

No	**%50**	**%100**	**%150**
ABC Stoktan alınan, µL	600	600	600
3TC Stoktan alınan, µL	1200	1200	1200
DTG Stoktan alınan, µL	250	500	750
Final Hacim, mL	20	20	20
Final DTG Derişim, µg/mL	12,5	25	37,5

Lamivudin Geri Kazanım: ABC ve DTG orta derişiminde (150 µg/mL ve 25 µg/mL) 3TC için orta derişiminin (150 µg/mL) %50 (75 µg/mL), %100 (150 µg/mL) ve %150 (225 µg/mL) aralığında çözeltiler hazırlanmıştır (Çizelge 2.4.)

Çizelge 2.4. YPSK için 3TC geri kazanım çözeltileri hazırlığı

No	**%50**	**%100**	**%150**
ABC	600	600	600
DTG Stoktan alınan, µL	500	500	500
3TC Stoktan alınan, µL	600	1200	1800
Final Hacim, mL	20	20	20
Final 3TC Derişim, µg/mL	75	150	225

Elde edilen pik alanları kalibrasyon eğrisinden elde edilen doğru denkleminde yerine koyularak derişimler hesaplanmış, hesaplanan derişimler teorik değerlerine bölünerek % geri kazanım sonuçları elde edilmiştir.

Abakavir Geri Kazanım: DTG ve 3TC orta derişiminde (25 ve 150 µg/mL) ABC için orta derişiminin (150 µg/mL) %50 (75 µg/mL), %100 (150 µg/mL) ve %150 (225 µg/mL) aralığında çözeltiler hazırlanmıştır (Çizelge 2.5.)

Çizelge 2.5. YPSK için ABC geri kazanım çözeltileri hazırlığı

No	%50	%100	%150
ABC Stoktan alınan, µL	300	600	900
3TC Stoktan alınan, µL	1200	1200	1200
DTG Stoktan alınan, µL	500	500	500
Final Hacim, mL	20	20	20
Final ABC Derişim, µg/mL	75	150	225

2.3.1.4. Sağlamlığın Araştırılması

Yöntemin sağlamlığının araştırılması amacıyla geliştirilen yöntem parametrelerinde kasıtlı küçük değişiklikler yapılmış ve yapılan değişikliklerin geri kazanım değerleri, simetri faktörü ve teorik tabaka sayısı gibi nitel ve sistem uygunluk parametreleri üzerinden orijinal yöntem ile kıyaslanarak değerlendirilmesi planlanmıştır. Planlanan değişim parametreleri aşağıdaki çizelgede (Çizelge 2.6.) paylaşılmıştır.

Çizelge 2.6. YPSK için optimize edilmiş parametreler ve gerçekleştirilmesi planlanan değişim değerleri

Parametre	Akış Hızı, mL/dk	Hareketli Faz B Oranı, %	Dalgaboyu, nm	Kolon Sıcaklığı ºC	Hareketli Faz A pH
Optimize Değer	1,2	-	258, 278 ve 294	40	3,15
Değişim	± 0,1	± 2	± 2	± 2	± 0,2

2.3.1.5. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması

Yöntemin piyasada ticari olarak mevcut farmasötik dozaj formlarına da uygulanması amaci ile Ankara'da yerel bir eczaneden alınan ve her film kaplı tablette; 52,6 mg Dolutegravir sodyum (50 mg Dolutegravir'e eşdeğer), 702 mg Abakavir sülfat (600 mg Abakavir'e eşdeğer) ve 300 mg Lamivudin içeren Triumeq film kaplı tabletler kullanılmıştır. Bu tabletlerden 20 tanesi deney öncesi analitik terazide tartılarak ortalama ağırlık hesaplanmış, daha sonra bir havan içerisinde ezilerek homojen bir toz karışım elde edilmiş ve bu homojen karışımdan bir tablet ağırlığına eşdeğer tablet tozu tartılarak 100,0 mL'lik balon jojeye alınmış üzerine yaklaşık 80 mL çözücü karışımı eklenerek ve ultrasonik banyo/manyetik karıştırıcı yardımıyla çözülmüş ve ardından hacmine yine çözücü karışımı ile tamamlanmıştır. Daha sonra bu çözeltiden 2,0 mL alınarak 20,0 mL'lik balon jojeye alınmış yine çözücü karışımı ile hacmine tamamlanmıştır. Elde edilen çözelti YPSK vialine alınmadan önce 0,22 µm PVDF enjektör ucu filtre yardımıyla süzülmüştür.

Yöntemi farklı preparatlara uygulamak amacı ile bu üç etken maddeyi aynı anda içermeyen ancak DTG ve 3TC'i bir arada içeren (Dovato 50 ve 300 mg film kaplı tablet) ve sadece DTG içeren (Tivicay® 25 mg film kaplı tablet) ticari preparatlar da tez çalışmasına dâhil edilmiştir. Bu ticari preparatlara da yukarıda anlatılan numune hazırlama prosedürü uygulanmış olup dilüsyon faktörleri ve final numune çözeltisi derişimleri aşağıda verilmiştir.

Çizelge 2.7. Ticari preparatlar kullanılarak hazırlanan numune çözeltileri

Preparat	Seyrelme Katsayısı	ABC µg/mL	DTG µg/mL	3TC µg/mL
Triumeq	1:1000	600	50	300
Dovato	1:1000	-	50	300
Tivicay	1:500	-	50	-

YPSK cihazına enjekte edilen numune çözeltisine ait pik alanlarının ortalaması hesaplanarak kalibrasyon eğrisi çalışmasından elde edilen denklemde yerlerine konmuş ve numune içerisindeki etken madde miktarları hesaplanmıştır.

2.3.1.6. Zorlanmış Bozunma Çalışmaları

Hızlandırılmış stabilite (ya da zorlanmış bozunma) çalışmaları için kalibrasyon çözeltilerinin orta derişimlerine karşılık gelen seviye 4 çözeltileri (DTG: 25 µg/mL, ABC: 100 µg/mL ve 3TC: 150 µg/mL) kullanılmıştır. Yapılan işlemler aşağıda verilmiştir.

Termal bozunma; 25 µg/mL DTG, 100 µg/mL ABC ve 150 µg/mL 3TC: içeren çözeltiden 2 mL alınarak YPSK vialine konmuş, 70°C'de bir saat ve iki saat bekletilerek sisteme enjekte edilmiştir. Enjeksiyon sonucu elde edilen pik alanları kalibrasyon grafiğinden elde edilen denklemde yerine konarak gözlenen derişimler hesaplanmıştır.

Asidik bozunma; 25 µg/mL DTG, 100 µg/mL ABC ve 150 µg/mL 3TC: içeren çözeltiden 1 mL alınarak üzerine 1 mL 0,1 M HCl çözeltisi eklenerek YPSK vialine konmuş, oda sıcaklığında ve karanlıkta bir saat ve iki saat bekletilerek sisteme enjekte edilmiştir. Enjeksiyon sonucu elde edilen pik alanları kalibrasyon grafiğinden elde edilen denklemde yerine konarak dilüsyon faktörü de hesaba dahil edilerek gözlenen derişimler hesaplanmıştır.

Alkali bozunma; 25 µg/mL DTG, 100 µg/mL ABC ve 150 µg/mL 3TC: içeren çözeltiden 1 mL alınarak üzerine 1 mL 0,1 M NaOH çözeltisi eklenerek YPSK vialine konmuş, oda sıcaklığında ve karanlıkta bir saat ve iki saat bekletilerek sisteme enjekte edilmiştir. Enjeksiyon sonucu elde edilen pik alanları kalibrasyon grafiğinden elde edilen denklemde yerine konarak dilüsyon faktörü de hesaba dahil edilerek gözlenen derişimler hesaplanmıştır.

Oksidatif bozunma; 25 µg/mL DTG, 100 µg/mL ABC ve 150 µg/mL 3TC: içeren çözeltiden 1 mL alınarak üzerine 1 mL % 3 H_2O_2 çözeltisi eklenerek YPSK vialine konmuş, oda sıcaklığında ve karanlıkta bir saat ve iki saat bekletilerek sisteme enjekte edilmiştir. Enjeksiyon sonucu elde edilen pik alanları kalibrasyon grafiğinden elde edilen denklemde yerine konarak dilüsyon faktörü de hesaba dahil edilerek gözlenen derişimler hesaplanmıştır.

2.3.2. Spektrofotometrik Yöntemlerin Geliştirilmesi ve Validasyon Çalışmaları

2.3.2.1. Doğrusallık ve Kalibrasyon Eğrileri için Standart Çözeltilerin Hazırlanması

Spektrofotometrik analizler için: 15,0 mg DTG ve 15,0 mg 3TC hassas bir şekilde tartılarak 50,0 mL'lik balon jojeye alındı ve bir miktar metanol eklenerek çözüldü daha sonra hacmine MeOH ile tamamlandı. Bu aşamada her iki etken maddenin stok çözelti derişimi 300 µg/mL olarak hesaplandı. Daha sonra aşağıdaki tabloda verilen şekilde kalibrasyon için çözeltiler hazırlandı.

Çizelge 2.8. Spektrofotometrik yöntemler için kalibrasyon çözeltileri hazırlığı

No	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**
DTG stok çözeltiden alınan, µL	500	833	1.333	2.000	2.500	3.333	4.000
3TC stok çözeltiden alınan, µL	500	1.333	2.000	2.500	3.333	4.000	5.000
Final hacim mL	50	50	50	50	50	50	50

Çizelge 2.9. Spektrofotometrik yöntemler için hazırlanan kalibrasyon çözeltileri derişimleri

No	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**
C DTG, µg/mL	3,0	5,0	8,0	12,0	15,0	20,0	24,0
C 3TC, µg/mL	3,0	8,0.0	12,0	150.0	20,0	24,0	30,0

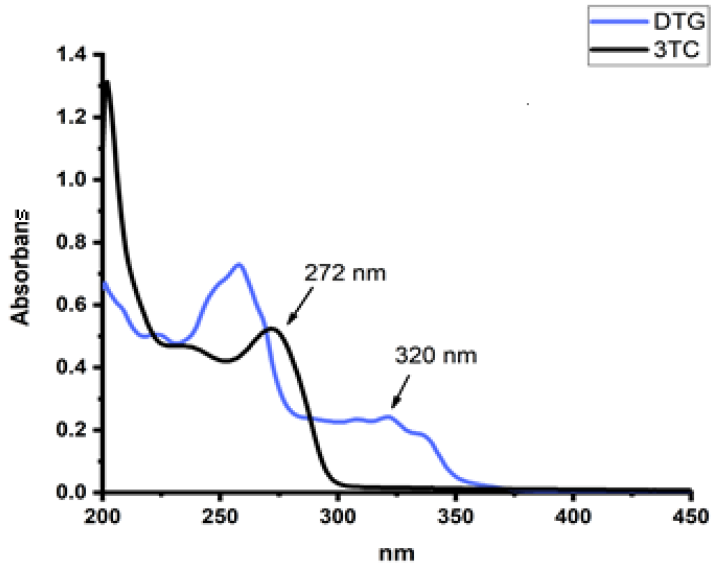
Hazırlanan kalibrasyon grafiği çözeltileri kuvartz küvetlere alınarak 200-400 nm aralığındaki spektrumları kaydedilmiş ve elde edilen spektrumlar aşağıda verilen yöntemler ile değerlendirilmiştir.

2.3.2.2. Absorbans Düzeltme Yöntemi

Yöntemi uygulamak için aktif bileşenlerden biri olan DTG'nin faktör değeri bulundu. Faktör değerini bulmak için DTG'nin 272,0 nm dalga boyundaki absorbansı 320,0 nm'deki absorbans değerine bölündü. Dalga boyunu seçmek için 3TC'nin maksimum absorbansa sahip olduğu ve diğer aktif bileşenin (DTG) de girişim yaptığı 272,0 nm dalga boyu seçildi. Diğer dalga boyu (320,0 nm) belirlenirken DTG'nin absorbansının mevcut olduğu ve diğerinin (3TC) mevcut olmadığı dalga boyu seçildi. Seçilen dalga boyları Şekil 2.1.'de gösterilmektedir.

Yöntem bu iki etken maddeyi içeren çözeltilere uygulanırken, karışımın spektrumunda 320,0 nm dalga boyundaki absorbans değeri hesaplanan faktör değeri ile çarpılır. Böylece 272,0 nm dalga boyundaki DTG'in düzeltilmiş absorbans değeri elde edilir. DTG derişimi 272,0 nm dalga boyunda elde edilen ve düzeltilerek elde edilen absorbans değerleri ile oluşturulan kalibrasyon grafiğinden hesaplanmıştır.

Diğer aktif bileşen olan 3TC'i belirlemek için, DTG'nin daha önce hesaplanan absorbansı, karışımın 272,0 nm'deki absorbans değerinden çıkarılmıştır. Kalibrasyon eğrisi 272,0 nm'de ölçülen absorbans değerleri kullanılarak oluşturulmuştur.



Şekil 2.1. DTG ve 3TC için seçilen dalgaboylarının gösterimi

2.3.2.3. İndüklenmiş İkili Dalgaboyu Yöntemi

Bu yöntem, seçilen iki dalga boyu arasındaki girişim yapan maddenin absorbansının ortadan kaldırılmasına dayanır. Geleneksel çift dalga boyu yönteminin (DWM) aksine, bu

yöntem, girişim yapan maddenin absorbans farkının (ΔA) sıfıra eşit olmadığı durumlarda uygulanır. Öncelikle iki farklı dalga boyu, λ_1 ve λ_2 seçilir. 3TC'nin seçilen iki dalga boyundaki etkisini yok etmek için, 3TC'nin seçilen iki dalga boyundaki (258,0 nm ve 272,0 nm) sıfırıncı dereceden spektrumunun eşdeğerlik faktörü (F_{3TC}) hesaplanır. Eşitlik faktörünü hesaplamak için, seçilen dalga boylarındaki absorbans değerleri birbirine bölünür. Sonuç olarak, karışımın spektrumunda seçilen iki dalga boyu arasındaki absorbans farkı, DTG maddesinin derişimi ile doğru orantılıdır. DTG derişimi, regresyon denklemi kullanılarak hesaplanır. Denklem, DTG'nin sıfırıncı dereceden spektrumlarının absorbans farkı değerlerinin derişime karşı çizilmesiyle elde edilir. Aktif bileşen 3TC'nin konsantrasyonunu hesaplamak için yukarıda verilen prosedür kullanılarak. 3TC derişimi, iki seçilmiş dalga boyunda (272,0 ve 240,0 nm) sıfırıncı dereceden DTG'nin eşdeğerlik faktörü (F_{DTG}) kullanılarak hesaplanır.

Kalibrasyon grafiklerinden elde edilen doğru denklemleri istatistiksel olarak değerlendirilmiş, deneysel sürecin ileriki aşamalarında kullanılmaları uygun görülmüştür. Ayrıca bu veriler ile ICH rehberi Q2R2 "*4.2.2 Validation of lower range limits*" başlığı altındaki "*4.2.2.2 Based on the Standard Deviation of a Linear Response and a Slope*" kısmından faydalanarak tayin alt sınırı (TAS) ve yakalama sınırları (YS) da hesaplanmıştır. Elde edilen veriler çizelge 3.12.'de verilmiştir.

2.3.2.4. Doğruluğun Araştırılması (Geri Kazanım)

Önerilen spektrofotometrik metotların doğruluğunu araştırmak amacı ile geri kazanım çalışmaları planlanmıştır. Bu amaçla DTG ve 3TC etken maddeleri için birinin orta derişimde tutulduğu, geri kazanımı incelenecek diğer etken maddenin orta derişimine göre % 50, % 100 ve % 150 değerine karşılık gelen derişimlerde sentetik çözeltiler hazırlanmıştır.

Dolutegravir geri kazanım; 3TC orta derişiminde (15,0 µg/mL) DTG için orta derişiminin (12,0 µg/mL) %50 (6,0 µg/mL), %100 (12,0 µg/mL) ve %150 (18,0 µg/mL) çözeltiler hazırlanmıştır (Çizelge 2.9.)

Çizelge 2.10. Spektrofotometrik yöntemler için DTG geri kazanım çözeltileri hazırlığı

No	**%50**	**%100**	**%150**
3TC Stoktan alınan, µL	2500	2500	2500
DTG Stoktan alınan, µL	1000	2000	3000
Final Hacim, mL	50	50	50
Final DTG Derişim, µg/mL	6,0	12,0	18,0

Lamivudin geri kazanım; DTG orta derişiminde (12,0 µg/mL) 3TC için orta derişiminin (15,0 µg/mL) %50 (7,5 µg/mL), %100 (15,0 µg/mL) ve %150 (22,5 µg/mL) çözeltiler hazırlanmıştır (Çizelge 2.10.)

Çizelge 2.11. Spektrofotometrik yöntemler için 3TC geri kazanım çözeltileri hazırlığı

No	**%50**	**%100**	**%150**
3TC Stoktan alınan, µL	1250	2500	3750
DTG Stoktan alınan, µL	2000	2000	2000
Final Hacim, mL	50	50	50
Final 3TC Derişim, µg/mL	7,5	15,0	22,5

2.3.2.5. Yöntemin Farmasötik preparatlara Uygulanması

Yöntemin piyasada ticari olarak mevcut farmasötik dozaj formlarına da uygulanması amaci ile yurtdışından temin edilen Dovato film kaplı tablet (50 mg DTG ve 300 mg 3TC içerir) kullanılmıştır. Bu tabletlerden 20 tanesi deney öncesi analitik terazide tartılarak ortalama ağırlık hesaplanmış, daha sonra bir havan içerisinde ezilerek homojen bir toz karışım elde edilmiş ve bu homojen karışımdan bir tablet ağırlığına eşdeğer tablet tozu tartılarak 100,0 mL'lik balon jojeye alınmış üzerine yaklaşık 80 mL MeOH eklenerek ve ultrasonik banyo/manyetik karıştırıcı yardımıyla çözülmüştür. Daha sonra hacmine yine MeOH ile tamamlanan stok çözelti yine MeOH kullanılarak 1/150 oranında seyreltilmiş ve final çözelti analiz edilmeden önce 0,22 µm PVDF enjektör ucu filtre yardımıyla süzülmüştür (3,33 µg/mL DTG ve 20,0 µg/mL 3TC).

Çizelge 2.12. Ticari preparat kullanılarak hazırlanan numune çözeltisi

Preparat	**Seyrelme Katsayısı**	**ABC µg/mL**	**DTG µg/mL**	**3TC µg/mL**
Dovato	1:15000	-	3,33	20,0

Elde edilen çözeltinin spektrumunda 320,0 nm dalga boyundaki absorbans değeri hesaplanan faktör değeri ile çarpılır..Böylece 272,0 nm dalga boyundaki DTG'in düzeltilmiş

absorbans değeri elde edilir. DTG derişimi 272,0 nm dalga boyunda elde edilen ve düzeltilerek elde edilen absorbans değerleri ile oluşturulan kalibrasyon grafiğinden hesaplanmıştır.

Diğer aktif bileşen olan 3TC'i belirlemek için, DTG'nin daha önce hesaplanan absorbansı, karışımın 272,0 nm'deki absorbans değerinden çıkarılmıştır. Kalibrasyon eğrisi 272,0 nm'de ölçülen absorbans değerleri kullanılarak oluşturulmuştur.

3. BULGULAR

3.1. YPSK ile Elde Edilen Bulgular

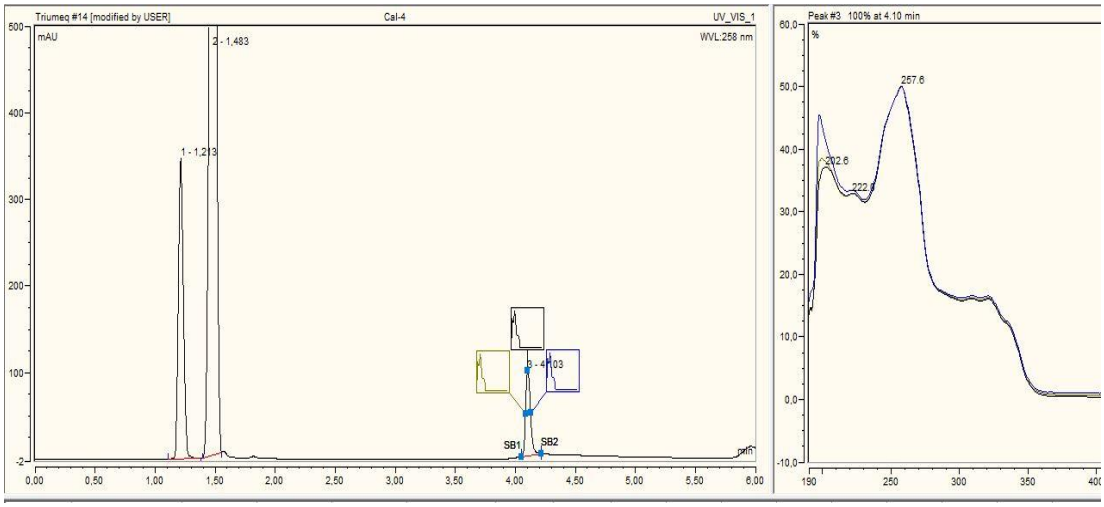
DTG, 3TC ve ABC tayini için optimize edilen YPSK analiz parametreleri Çizelge 3.1'de ayrıntılı olarak sunulmuştur.

Çizelge 3.1. Optimize edilmiş YPSK parametreleri

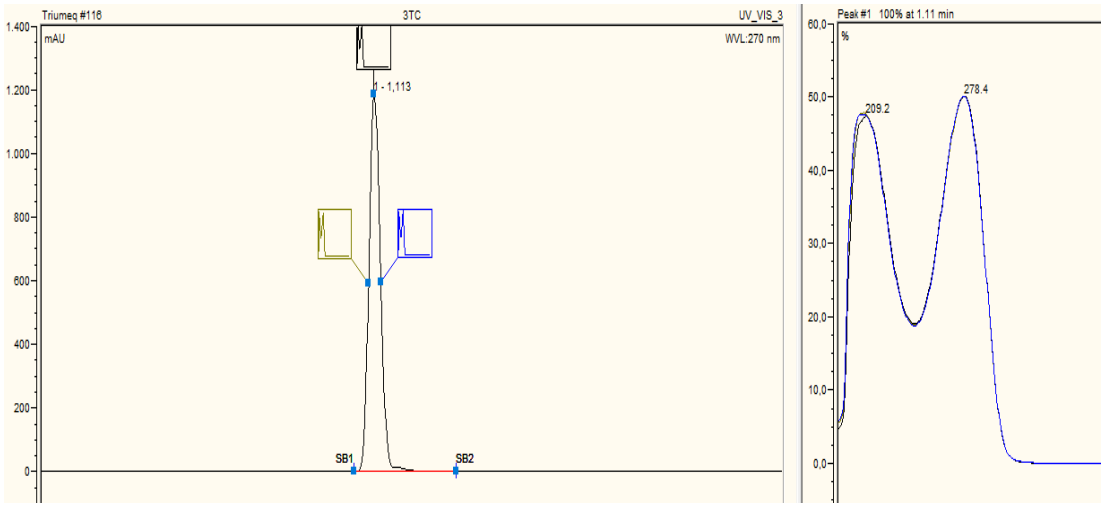
Analitik Kolon	Waters Spherisorb® ODS2 C18 3.5µm 4,6x100 mm	
Hareketli Faz A	0,175 % TEA ve 0,1 % TFA in water	
Hareketli Faz B	Metanol	
Akış Hızı, mL/dk	1,2	
Enjeksiyon hacmi, µL	5 µL	
T_{kolon} ^{o}C	40	
$T_{oto\ örnekleyicir}$ ^{o}C	20 ve 5	
Çalışma Süresi, dk.	6	
Analiz Dalgaboyları, nm	λ_1:258 (DTG), λ_2:278 (3TC), λ_3:294	
Gradyen Akış Değerleri		
Zaman, dk.	**% (h/h) Hareketli Faz A**	**% (h/h) Hareketli Faz B**
0.0	50	50
2.0	50	50
2.1	0	100
4.0	0	100
4.2	50	50
6.0	50	50

3.1.1. Etken Madde Kromatogram ve Spektrumları

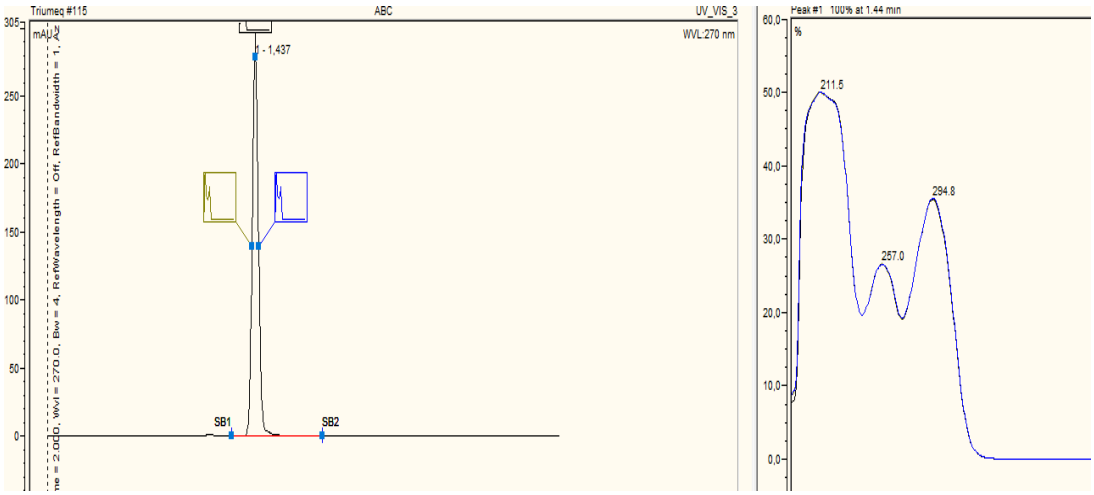
Geliştirilen YPSK yönteminin değerlendirilmesi amacıyla, DTG, 3TC ve ABC etken maddelerine ait kromatogram ve UV spektrumları optimum analiz koşulları altında elde edilmiştir. DTG, 3TC ve ABC'nin kromatogramlarında iyi çözünmüş, simetrik pikler gözlenmiş ve herhangi bir girişim tespit edilmemiştir (Şekil 3.1–3.3). Elde edilen UV spektrumlarının her bir etken maddeye özgü karakteristik absorbans özelliklerini yansıttığı ve literatürle uyumlu olduğu belirlenmiştir. Bu bulgular, geliştirilen yöntemin etken maddelerin eşzamanlı tayini için uygun olduğunu göstermektedir.



Şekil 3.1. Optimum analiz koşullarında elde edilen DTG kromatogram ve spektrumu



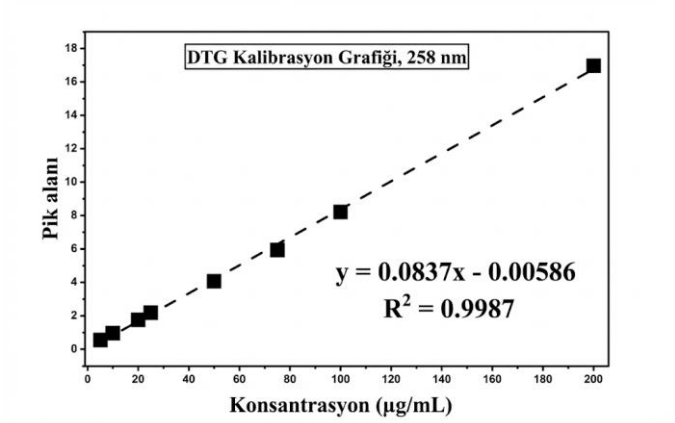
Şekil 3.2. Optimum analiz koşullarında elde edilen 3TC kromatogram ve spektrumu



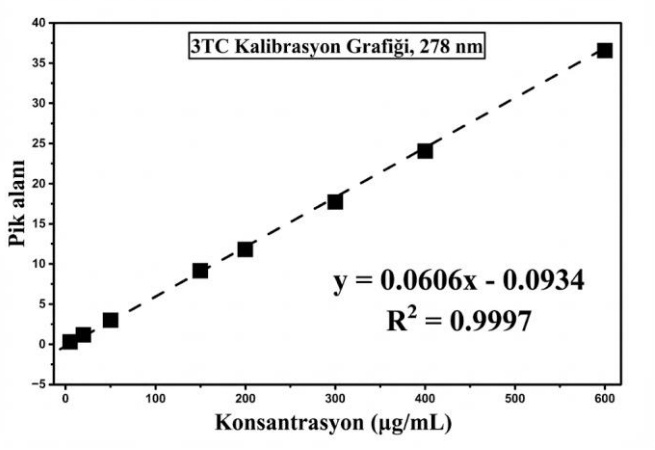
Şekil 3.3. Optimum analiz koşullarında elde edilen ABC kromatogram ve spektrumu

3.1.2. Kalibrasyon Eğrileri

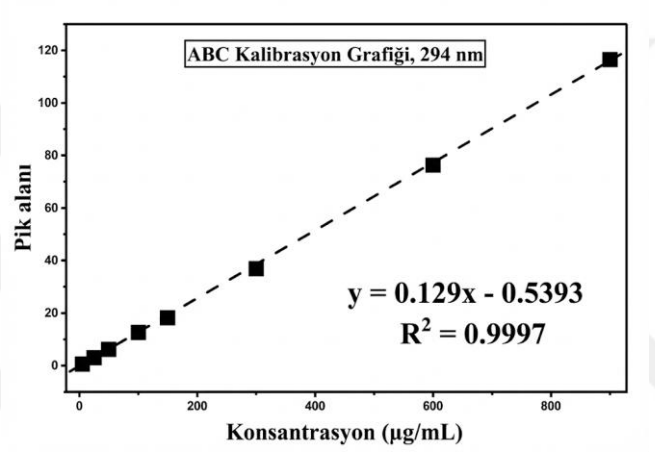
Kalibrasyon eğrisi için standart çözeltiler planlanırken piyasada ticari olark mevut preparatın birim formülü de göz önünde bulundurularak derişimlere karar verilmiştir. Bu amaçla yöntemin safsızlık analizlerinde de kullanılabilmesi için olabildiğince düşük derişimlerden fazladan ilave seyreltme işlemlerine gerek kalmayacak şekilde miktar tayini analizlerinde de kullanılabilmesi için olabildiğince yüksek derişim aralığında çalışması düşünülmüştür. Bu amaçla çizelge 2.3' de verilen standart çözeltileri hazırlanarak (DTG için 5-200 µg/mL, 3TC için 5-600 µg/mL ve ABC için 5-900 µg/mL aralığında) 5 µL enjeksiyonlar yapılmış ve her bir etken madde için pik alanları kendi λ_{maks}'larında (DTG için λ_1:258 nm, 3TC için λ_2:278 nm ve ABC için λ_3:294 nm) okunarak elde edilen alanlara karşı ilgili derişimler grafiğe geçirilmiştir. Elde edilen kalibrasyon grafikleri şekil 3.4., 3.5. ve 3.6.'da oluşan doğru denklemleri ve elde edilen istatistiksel veriler ise Çizelge 3.1.'de verilmiştir.



Şekil 3.4. YPSK ile elde edilen DTG kalibrasyon grafiği



Şekil 3.5. YPSK ile elde edilen 3TC kalibrasyon grafiği



Şekil 3.6. YPSK ile elde edilen ABC kalibrasyon grafiği

Çizelge 3.2. YPSK ile oluşturulan kalibrasyon grafikleri için elde edilen doğru denklemlerine ait istatistiksel veriler

Etken Madde	Çalışma Aralığı (µg/mL)	R^2	SS	YS (µg/mL)	TAS (µg/mL)
DTG	5,0 - 200,0	0,9987	0,102	4,0	12,2
3TC	5,0 - 600,0	0,9997	0,125	6,8	20,6
ABC	5,0 - 900,0	0,9997	0,371	9,5	28,7

3.1.3. Tekrarlanabilirlik

Sistemin tekrarlanabilirliği orta derişimlerdeki (seviye 4) standart çözeltisinin ardışık altı enjeksiyonu ile kontrol edilmiştir. Elde edilen veriler ve hesaplanan bağıl standart sapma değerleri Çizelge 3.3.'de verilmiştir. DTG, 3TC ve ABC için BSS değerleri sırasıyla %1,05, %0,28 ve %0,27 olarak bulunmuştur. Tüm etken maddeler için BSS değerlerinin %2'nin

altında olduğu görülmüş olup, bu sonuçlar yöntemin iyi bir tekrarlanabilirliğe sahip olduğunu göstermektedir.

Çizelge 3.3. YPSK ile standart çözeltinin ardışık altı enjeksiyonundan elde edilen alanlar ve hesaplanan SS ve BSS değerleri

No	**DTG**	**3TC**	**ABC**
1	4,7586	31,4106	111,9374
2	4,7252	31,5271	112,2356
3	4,6767	31,3474	111,75
4	4,659	31,2858	111,5017
5	4,6243	31,3303	111,4565
6	4,6595	31,3075	111,5774
Ort.	4,683883	31,36812	111,7431
SS	0,049204	0,088758	0,299408
BSS	1,05	0,28	0,27

3.1.4. Kesinlik

Sistem kesinliği gün içi ve günler arası çalışmalar ile kontrol edilmiştir. Elde edilen veriler ve hesaplanan bağıl standart sapma değerleri Çizelge 3.4. ve 3.5.'de verilmiştir.

3.1.4.1. Güniçi Deney Sonuçları

Sırasıyla 50, 150 ve 200 µg/mL Lamivudin (3TC), 150, 300 ve 400 µg/mL ABC ve 10, 25 ve 50 µg/mL DTG içeren üç farklı seviyede çözeltiler hazırlanmış ve iki ayrı çalışma grubu planlanmıştır. İlk grup çözeltiler karanlıkta ve 5 °C'de ikinci grup çözeltiler ise yine karanlıkta ve 20 °C'de saklanmıştır. Gün içi deneylerde hazırlanan çözeltiler hazırlandıktan sonra 2, 4, 6, 8, 12, 16, 20 ve 24. saatlerde enjeksiyonlar yapılarak gerçekleştirilmiştir. Gün içi deneyler sadece 5 °C'de saklanan çözeltiler üzerinden gerçekleştirilmiştir. Elde edilen pik alanları ilgili etken maddenin kalibrasyon grafiğinden elde edilen doğru denkleminde yerine konarak karşılık gelen derişimler hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar ve bu sonuçlara dair standart sapma verileri Çizelge 3.4.'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.4. YPSK ile elde edilen gün içi deney sonuçları

3TC 5 °C	**Seviye 1**	**Seviye 2**	**Seviye 3**
2. Saat	94,62	103,53	100,30
4. Saat	94,89	103,77	99,86
6. Saat	94,90	103,79	99,35
8. Saat	94,69	103,75	99,11
12. Saat	94,69	103,71	98,88
16. Saat	94,45	103,84	98,69
20. Saat	96,35	105,11	101,31
24. Saat	96,23	105,53	101,33
SS	0,75	0,75	1,04
BSS	**0,79**	**0,72**	**1,04**
ABC 5 °C	**Seviye 1**	**Seviye 2**	**Seviye 3**
2. H	98,76	102,71	106,24
4.H	98,82	102,52	105,18
6.H	98,76	102,33	104,46
8. H	98,60	102,34	104,28
12. H	98,53	102,34	104,04
16.H	98,06	102,43	104,01
20. H	99,95	103,50	106,35
24.H	99,80	103,95	106,44
SS	0,64	0,62	1,07
BSS	**0,65**	**0,60**	**1,02**
DTG 5 °C	**Seviye 1**	**Seviye 2**	**Seviye 3**
2. H	97,44	95,23	96,88
4.H	97,12	95,92	98,58
6.H	97,47	96,61	98,12
8. H	96,32	96,68	99,45
12. H	98,49	98,52	100,35
16.H	100,06	98,86	98,86
20. H	100,50	100,00	102,10
24.H	99,75	101,13	102,43
SS	1,55	2,08	1,93
BSS	**1,58**	**2,13**	**1,94**

3.1.4.2. Günler Arası Deney Sonuçları

Günler arası deneyler gün içi deneyler ile aynı sayı derişimdeki çözeltiler ile iki farklı grupta gerçekleştirilmiştir. İlk grup karanlıkta ve 5^{o}C'de saklanan çözeltiler, ikinci grup ise karanlıkta ve 20^{o}C'de saklanan çözeltileri içermektedir. Analizler 24. saatte (1. gün) ve 5 gün boyunca aynı saatte enjeksiyonlar yapılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen pik alanları ilgili

etken maddenin kalibrasyon grafiğinden elde edilen doğru denkleminde yerine konarak karşılık gelen derişimler hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar ve bu sonuçlara dair standart sapma verileri Çizelge 3.5.'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.5. YPSK ile elde edilen günler arası deney sonuçları

	Seviye 1	**Seviye 2**	**Seviye 3**		**Seviye 1**	**Seviye 2**	**Seviye 3**
3TC 5 °C				**3TC 20 °C**			
Gün 1	96,23	105,53	101,33	**Gün 1**	95,97	103,43	101,47
Gün 2	101,65	104,94	102,48	**Gün 2**	96,66	104,80	101,08
Gün 3	96,06	101,28	100,31	**Gün 3**	96,39	105,52	102,41
Gün 4	97,68	104,05	102,58	**Gün 4**	97,11	105,65	102,45
Gün 5	96,82	103,16	102,22	**Gün 5**	95,46	102,39	100,32
SS	2,30	1,67	0,96	**SS**	0,63	1,41	0,91
BSS	**2,35**	**1,61**	**0,94**	**BSS**	**0,65**	**1,35**	**0,90**
ABC 5 °C				**ABC 20 °C**			
Gün 1	99,75	103,95	106,44	**Gün 1**	100,04	102,14	101,47
Gün 2	101,61	99,63	105,40	**Gün 2**	99,80	103,01	105,83
Gün 3	99,60	99,81	104,98	**Gün 3**	99,60	103,53	106,98
Gün 4	101,14	102,30	106,97	**Gün 4**	100,20	103,61	107,16
Gün 5	100,13	101,80	106,04	**Gün 5**	98,72	102,92	104,78
SS	0,88	1,81	0,79	**SS**	0,58	0,59	2,32
BSS	**0,88**	**1,78**	**0,75**	**BSS**	**0,58**	**0,57**	**2,20**
DTG 5 °C				**DTG 20 °C**			
Gün 1	99,80	101,13	102,43	**Gün 1**	103,95	102,28	103,84
Gün 2	107,02	103,44	104,49	**Gün 2**	101,57	104,66	105,21
Gün 3	107,56	100,78	103,73	**Gün 3**	99,60	104,52	105,79
Gün 4	106,69	103,42	106,88	**Gün 4**	100,41	103,37	104,69
Gün 5	102,61	103,12	102,28	**Gün 5**	99,79	103,21	101,16
SS	3,39	1,31	1,87	**SS**	1,79	0,99	1,81
BSS	**3,24**	**1,28**	**1,80**	**BSS**	**1,77**	**0,96**	**1,74**

3.1.5. Doğruluk, Geri Kazanım Deney Sonuçları

Önerilen YPSK doğruluğu yapılan geri kazanım çalışmaları ile değerlendirilmiş olup bu amaçla orta derişimine göre %50, %100 ve %150 derişimdeki sentetik çözeltiler hazırlananmıştır. Elde edilen veriler çizelge 3.6.'da verilmiştir. ABC için geri kazanım değerleri %99,2–%100,9 aralığında, DTG için %99,0–%100,6 aralığında ve 3TC için %100,1–%100,7 aralığında bulunmuştur. Tüm etken maddeler ve tüm derişim seviyeleri için geri kazanım değerlerinin kabul edilebilir sınırlar içinde olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar, geliştirilen YPSK yönteminin yüksek doğrulukta ve güvenilir sonuçlar verdiğini göstermektedir.

Çizelge 3.6. YPSK ile elde edilen geri kazanım değerleri

No/Seviye	**% 50**	**% 100**	**%150**
ABC Geri Kazanım			
1	56,1865	109,4968	160,1236
2	55,0123	109,299	160,5523
3	55,0236	109,854	160,5863
Ortalama	55,4075	109,5499	160,4207
% Geri Kazanım	99,2	100,9	99,4
DTG Geri Kazanım			
1	2,33835	4,8526	7,2965
2	2,3295	4,8852	7,3156
3	2,31215	4,9106	7,2958
Ortalama	2,3267	4,8828	7,3026
% Geri Kazanım	99,8	100,6	99,0
3TC Geri Kazanım			
1	15,8852	30,2682	44,8563
2	15,8523	30,1658	45,0165
3	15,8265	30,3217	44,9856
Ortalama	15,8547	30,2519	44,9528
% Geri Kazanım	100,5	100,1	100,7

3.1.6. Sağlamlığın Araştırılması

Yöntemin sağlamlığının araştırılması amacıyla geliştirilen yöntem parametrelerinde kasıtlı küçük değişiklikler yapılmış ve yapılan değişikliklerin geri kazanım değerleri, simetri faktörü ve teorik tabaka sayısı gibi nitel ve sistem uygunluk parametreleri üzerinden orijinal yöntem ile kıyaslanarak değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler aşağıdaki çizelgede (Çizelge 3.7.) paylaşılmıştır.

Çizelge 3.7. Optimize edilmiş parametreler ile ve değişiklikler sonrası elde edilen veriler

Parametre	Değişim Koşulu	3TC GK (%)	ABC GK (%)	DTG GK (%)	3TC As	ABC As	DTG As	3TC Plaka	ABC Plaka	DTG Plaka
Standart Koşullar	-	99.8	100.2	99.5	1,08	1,10	1,05	4125	3724	40500
Akış Hızı, mL/dk (1,2 mL/dk)	- 0.1 mL	99.4	100.5	99.2	1,07	1,10	1,05	4196	3668	40440
	+ 0.1 mL	99.6	99.8	99.7	1,08	1,11	1,04	4180	3689	40466
Mobil Faz Oranı, % (Gradyen)	- %2HF $_B$	98.9	100.1	99.1	1,11	1,09	1,05	4267	3721	40355
	+ %2HF $_B$	100.1	100.4	99.9	1,09	1,09	1,05	4215	3704	40370
Dalga Boyu, nm (258, 278 ve 294 nm)	258 -2 nm			99.3			1,06			40296
	258+2 nm			99.6			1,07			40208
	278-2 nm	99.6			1,08			4098		
	278+2 nm	100.2			1,09			4087		
	294-2 nm		99.9			1,10			3756	
	294+2 nm		100.3			1,11			3752	
T_{kolon} (40 ºC)	-2 ºC	99.2	99.8	99.7	1,08	1,11	1,07	4125	3567	40456
	+2 ºC	99.6	100.1	100.2	1,07	1,09	1,05	4125	3590	40875
pH (3,15)	-0.2	99.2	99.9	99.4	1,09	1,10	1,06	4125	3678	40478
	+0.2	99.9	100.1	99.8	1,10	1,10	1,07	4125	3708	40369

3.1.7. Zorlanmış Bozunma Deney Sonuçları

3.1.7.1. Termal Bozunma

YPSK yöntemi ile gerçekleştirilen termal bozunma çalışmasında, DTG, 3TC ve ABC içeren örnekler 50 °C'de 1 ve 2 saat süreyle termal strese maruz bırakılmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 3.7'de sunulmuştur. 50 °C'de 1 saatlik uygulama sonucunda etken maddelerin yüzde içerik değerleri 3TC için %101,72, ABC için %101,53 ve DTG için %107,73 olarak bulunmuştur. Termal stres süresi 2 saate çıkarıldığında ise yüzde içerik değerlerinin sırasıyla 3TC için %103,90, ABC için %102,50 ve DTG için %109,90'a yükseldiği gözlenmiştir. Bu sonuçlar, uygulanan termal koşullar altında etken maddelerde belirgin bir bozunma oluşmadığını ve geliştirilen YPSK yönteminin termal stres koşullarında da güvenilir sonuçlar verdiğini göstermektedir.

Çizelge 3.8. YPSK ile elde edilen termal bozunma çalışması sonuçları

Termal Bozunma	**3 TC**	**ABC**	**DTG**
Seviye 4- 50 ºC 1 Saat	30,2965	109,8523	5,2166
Seviye 4- 50 ºC 1 Saat	31,1528	110,5113	5,2703
Ortalama	30,72465	110,1818	5,24345
% İçerik	101,72	101,53	107,73
Seviye 4- 50 ºC 2 Saat	31,2272	110,6832	5,2733
Seviye 4- 50 ºC 2 Saat	31,532	111,691	5,4377
Ortalama	31,3796	111,1871	5,3555
% İçerik	103,9	102,5	109,9

3.1.7.2. Asidik Bozunma

Asidik bozunma çalışmaları kapsamında, DTG, 3TC ve ABC içeren örnekler 0,1 M HCl ortamında 1 ve 2 saat süreyle bekletilmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 3.8'de verilmiştir. 0,1 M HCl'de 1 saatlik asidik stres uygulaması sonrasında, 3TC ve DTG için yüzde içerik değerleri sırasıyla %59,5 olarak bulunmuştur. Aynı koşullarda ABC'ye ait pik tespit edilememiştir. Asidik bozunma süresi 2 saate çıkarıldığında, 3TC ve DTG için yüzde içerik değerlerinin sırasıyla %77,0 ve %75,8'e yükseldiği belirlenmiştir. Bu bulgular, asidik koşullar altında etken maddelerde belirgin bozunma meydana geldiğini ve özellikle ABC'nin asidik ortama karşı daha hassas olduğunu göstermektedir.

Çizelge 3.9. YPSK ile elde edilen asidik bozunma çalışması sonuçları

Asit Bozunma	**3 TC**	**ABC**	**DTG**
Seviye 4-0,1 M HCl 1 Saat	19,2507	değerlendirilemedi	2,9121
Seviye 4-0,1 M HCl 1 Saat	17,8238	değerlendirilemedi	2,7086
Ortalama	18,5373	değerlendirilemedi	2,81035
% İçerik	59,5	değerlendirilemedi	59,5
Seviye 4-0,1 M HCl 2 Saat	23,7446	değerlendirilemedi	3,6329
Seviye 4-0,1 M HCl 2 Saat	23,7172	değerlendirilemedi	3,6316
Ortalama	23,7309	değerlendirilemedi	3,63225
% İçerik	77,0	değerlendirilemedi	75,8

3.1.7.3. Alkali Bozunma

Alkali bozunma çalışmaları kapsamında, DTG, 3TC ve ABC içeren örnekler 0,1 M NaOH ortamında 1 ve 2 saat süreyle bekletilmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 3.9'da sunulmuştur. 0,1 M NaOH'de 1 saatlik alkali stres sonrasında, 3TC ve DTG için yüzde içerik değerleri sırasıyla %47,6 ve %57,5 olarak bulunmuştur. Aynı koşullarda ABC'ye ait pik tespit edilememiştir. Alkali stres süresi 2 saate çıkarıldığında, 3TC ve DTG için yüzde içerik

değerlerinin sırasıyla %62,4 ve %72,9'a yükseldiği belirlenmiştir. Bu sonuçlar, alkali koşullar altında etken maddelerde belirgin bozunma meydana geldiğini ve özellikle ABC'nin alkali ortama karşı yüksek hassasiyet gösterdiğini ortaya koymaktadır.

Çizelge 3.10. YPSK ile elde edilen **a**lkali bozunma çalışması sonuçları

Alkali Bozunma	**3 TC**	**ABC**	**DTG**
Seviye 4- 0,1 M NaOH 1 Saat	15,92	değerlendirilemedi	2,837
Seviye 4- 0,1 M NaOH 1 Saat	14,2835	değerlendirilemedi	2,5798
Ortalama	15,10175	değerlendirilemedi	2,7084
% İçerik	47,6	değerlendirilemedi	57,5
Seviye 4- 0,1 M NaOH 2 Saat	19,3876	değerlendirilemedi	3,5218
Seviye 4- 0,1 M NaOH 2 Saat	19,3457	değerlendirilemedi	3,4582
Ortalama	19,3667	değerlendirilemedi	3,4900
% İçerik	62,4	değerlendirilemedi	72,9

3.1.7.4. Oksidatif Bozunma

Oksidatif bozunma çalışmaları kapsamında, DTG, 3TC ve ABC içeren örnekler %3 H_2O_2 ortamında 1 ve 2 saat süreyle bekletilmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 3.10'da verilmiştir. %3 H_2O_2'de 1 saatlik oksidatif stres sonrasında, 3TC, ABC ve DTG için yüzde içerik değerleri sırasıyla %82,3, %63,0 ve %68,8 olarak bulunmuştur. Oksidatif stres süresi 2 saate çıkarıldığında, yüzde içerik değerlerinin 3TC için %92,5, ABC için %71,5 ve DTG için %77,4'e yükseldiği gözlenmiştir. Bu bulgular, oksidatif koşullar altında etken maddelerde bozunma meydana geldiğini, ancak bozunmanın asidik ve alkali koşullara kıyasla daha sınırlı düzeyde olduğunu göstermektedir.

Çizelge 3.11. YPSK ile elde edilen oksidatif bozunma çalışması sonuçları

Oksidatif Bozunma	**3 TC**	**ABC**	**DTG**
Seviye 4- % 3 H_2O_2 1 Saat	26,6461	73,7359	3,4609
Seviye 4- % 3 H_2O_2 1 Saat	23,6099	65,4624	3,0967
Ortalama	25,128	69,59915	3,2788
% İçerik	82,3	63,0	68,8
Seviye 4- % 3 H_2O_2 2 Saat	28,1281	78,6828	3,6995
Seviye 4- % 3 H_2O_2 2 Saat	27,9926	78,3406	3,7296
Ortalama	28,0604	78,5117	3,7146
% İçerik	**92,5**	**71,5**	**77,4**

3.1.8. Miktar Tayini Verileri

Geliştirilen YPSK Türkiye ilaç piyasasında bulunan Triumeq 50/600/300 mg, Dovato 50/300 mg ve Tivicay 25 mg film kaplı tabletlerin etken madde miktarlarının tayini amacıyla uygulanmıştır. Elde edilen analiz sonuçları Çizelge 3.11–3.13'te sunulmuştur. Triumeq tabletleri için DTG, 3TC ve ABC'nin yüzde içerik değerleri sırasıyla %100,9, %99,7 ve %100,1 olarak bulunmuştur. Dovato tabletlerinde DTG ve 3TC için yüzde içerik değerleri sırasıyla %101,9 ve %99,9 olarak hesaplanmıştır. Tivicay tabletlerde ise DTG için yüzde içerik değeri %100,9 olarak belirlenmiştir. Tüm farmasötik preparatlar için elde edilen bağıl standart sapma değerlerinin (4 enjeksiyon için) %2'nin altında olduğu görülmüş olup, bu durum geliştirilen YPSK'nin tekrarlanabilir ve güvenilir olduğunu göstermektedir.

Çizelge 3.12. YPSK ile "Triumeq 50/600/300 mg Film Kaplı Tablet" miktar tayini verileri ve sonuçları

Triumeq 50/600/300 mg Film Kaplı Tablet (DTG/ABC/3TC)			
No	DTG Alanları	3TC Alanları	ABC Alanları
1	4,8852	30,1681	107,1734
2	4,8562	30,1826	108,7919
3	4,8925	30,0984	109,4539
4	4,9536	30,1052	109,3664
Ortalama	4,8969	30,1386	108,6964
SS	0,0409	0,0430	1,0569
BSS	0,84	0,14	0,97
İçerik %	**100,9**	**99,7**	**100,1**

Çizelge 3.13. YPSK ile "Dovato 50/300 mg Film Kaplı Tablet" miktar tayini verileri ve sonuçları

Dovato 50/300 mg Film Kaplı Tablet (DTG/3TC)		
No	DTG Alanları	3TC Alanları
1	4,9852	30,1658
2	4,9256	30,0232
3	4,8952	30,5269
4	4,985	30,0685
Ortalama	4,9478	30,1961
SS	0,0449	0,2284
BSS	0,91	0,76
İçerik %	**101,9**	**99,9**

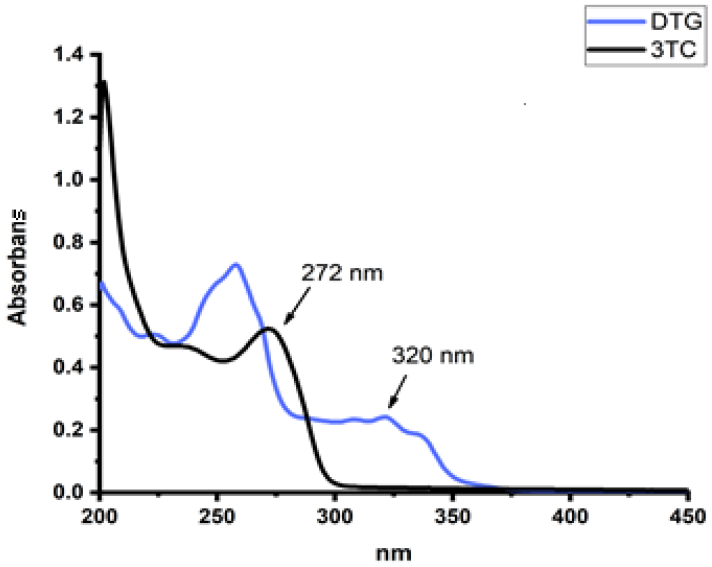
Çizelge 3.14. YPSK ile "Tivicay 25 mg Film KaplıTablet" miktar tayini verileri ve sonuçları

Tivicay 25 mg Film KaplıTablet (DTG)	
No	DTG Alanları
1	4,8265
2	4,9023
3	4,9236
4	4,9452
Ortalama	4,8994
SS	0,0517
BSS	1,05
İçerik %	**100,9**

3.2. Spektrofotometrik Yöntemler ile Elde Edilen Bulgular

3.2.1. Etken Madde Spektrumları

MeOH içerisinde hazırlanan Dolutegravir (DTG) ve Lamivudin (3TC) içeren çözeltiye ait UV spektrumu 200–400 nm dalga boyu aralığında kaydedilmiş olup elde edilen spektrum Şekil 3.7'de sunulmuştur. Spektrumlar incelendiğinde, 3TC'nin maksimum absorbansının 272 nm'de, DTG'nin ise 320 nm'de olduğu belirlenmiştir. Bu dalga boylarının etken maddeler için karakteristik olduğu ve analizlerde yeterli duyarlılık sağladığı gözlenmiştir.



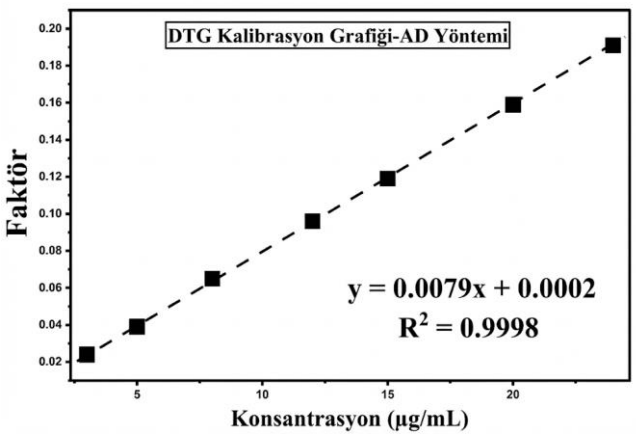
Şekil 3.7. MeOH içerisinde hazırlanmış DTG ve 3TC içeren çözeltiye ait 200-400 nm arasında kaydedilen spektrum

3.2.2. Kalibrasyon Eğrileri

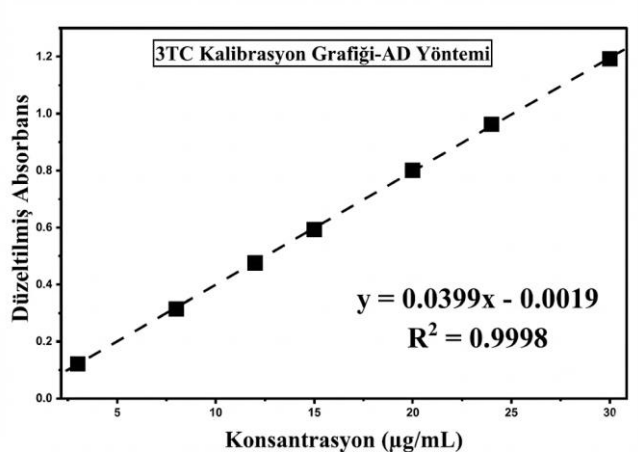
Kalibrasyon çözeltileri için hazırlanan standart çözeltiler planlanırken ticari olarak mevut preparatın (Dovato ve Tivicay) birim formülü de göz önünde bulundurularak derişimlere karar verilmiştir. Bu amaçla çizelge 2.9' da verilen standart çözeltiler hazırlanarak (DTG için 3,0-24,0 µg/mL ve 3TC için 3,0-30,0 µg/mL aralığında) 200 -400 nm aralığında elde edilen spektrumlar kaydedilmiş ve AD ve İİD yöntemleri uygulanarak elde edilen düzeltilmiş absorbans değeri, faktör vb. veriler derişimlere karşı grafiğe geçirilmiştir. AD yöntemi ile elde edilen kalibrasyon grafikleri şekil 3.8.; 3.9.'da İİD yöntemi ile elde edilen kalibrasyon grafikleri ise şekil 3.10 ve 3.11.'de, elde edilen ölçüm verileri çizelge 3.14've 3.15'de, oluşan doğru denklemleri ve istatistiksel veriler ise Çizelge 3.15.'de verilmiştir.

Çizelge 3.15. AD yöntemi için elde edilen kalibrasyon grafiği verileri

C_{DTG} µg/mL	F_{DTG}	C_{3TC} µg/mL	$A_{DüzeltilmiŞ}$
3	0,024	3	0,121
5	0,039	8	0,314
8	0,065	12	0,476
12	0,096	15	0,593
15	0,119	20	0,801
20	0,159	24	0,962
24	0,191	30	1,192



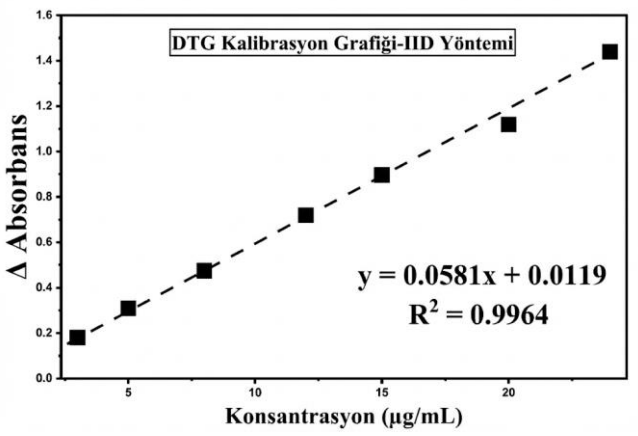
Şekil 3.8. AD yöntemi ile elde edilen DTG kalibrasyon grafiği



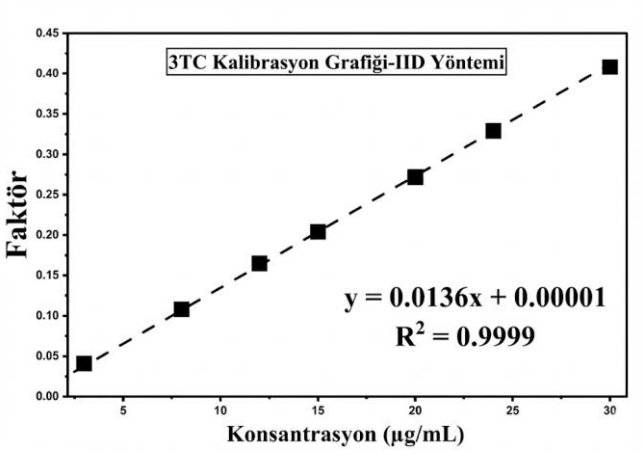
Şekil 3.9. AD yöntemi ile elde edilen 3TC kalibrasyon grafiği

Çizelge 3.16. İİD yöntemi için elde edilen kalibrasyon grafiği verileri

C_{DTG} µg/mL	ΔAbs	C_{3TC} µg/mL	F_{3TC}
3	0,181	3	0,041
5	0,309	8	0,108
8	0,475	12	0,165
12	0,719	15	0,204
15	0,896	20	0,272
20	1,1189	24	0,329
24	1,439	30	0,408



Şekil 3.10. İİD yöntemi ile elde edilen DTG kalibrasyon grafiği



Şekil 3.11. İİD yöntemi ile elde edilen 3TC kalibrasyon grafiği

Çizelge 3.17 Spektrofotometrik yöntemler ile elde edilen kalibrasyon grafiklerinin istatistiksel değerlendirmesi

Yöntem	Etken Madde	Çalışma Aralığı (µg/mL)	R^2	SS	YS (µg/mL)	TAS (µg/mL)
AD	**DTG**	3,0 - 24,0	0,999880	0,0006	0,23	0,70
	3TC	3,0 - 30,0	0,999874	0,0036	0,30	0,91
İİD	**DTG**	3,0 - 24,0	0,996389	0,0224	1,27	3,86
	3TC	3,0 - 30,0	0,999918	0,0010	0,24	0,73

3.2.3. Doğruluk, Geri Kazanım Deney Sonuçları

AD ve İİD yöntemleri kullanılarak gerçekleştirilen geri kazanım çalışmalarına ait sonuçlar Çizelge 3.17'de sunulmuştur. %50, %100 ve %150 derişim seviyelerinde yapılan analizlerde, AD yöntemi ile elde edilen DTG ve 3TC için geri kazanım değerlerinin sırasıyla % 99,5-% 100,1 ve % 99,6-%100,3 aralığında, İİD yöntemi ile ise DTG ve 3TC için elde edilen geri kazanım değerlerinin sırasıyla %98,9-%100,6 ve %99,7-%100,1 aralığında olduğu belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar, AD ve İİD yöntemlerinin her iki etken madde için de yeterli doğrulukta ve güvenilir sonuçlar verdiğini göstermektedir.

Çizelge 3.18. Spektrofotometrik yöntemler ile elde edilen geri kazanım çalışmaları sonuçları

Seviye	**% 50**	**% 100**	**%150**
DTG Geri Kazanım, %			
AD Yöntemi	99,8	100,1	99,5
İİD Yöntemi	98,9	100,6	100,2
3TC Geri Kazanım, %			
AD Yöntemi	99,6	100,3	99,7
İİD Yöntemi	99,7	100,1	99,9

3.2.4. Miktar Tayini Verileri

Ticari olarak mevcut preparat (Dovato tablet; 50 mg Dolutegravir ve 300 mg Lamivudin içeren) kullanılarak AD ve İİD yöntemleri ile miktar tayini çalışmalarına ait sonuçlar çizelge 3.18'de verilmiştir. AD yöntemi ile DTG ve 3TC için yüzde içerik değerleri sırasıyla %100,2 ve %99,8 olarak bulunurken, İİD yöntemi ile elde edilen değerler DTG için %100,1 ve 3TC için %99,9 olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar, her iki spektrofotometrik yöntemin de ticari preparatların miktar tayini için uygun ve güvenilir olduğunu göstermektedir.

Çizelge 3.19. Spektrofotometrik yöntemler ile "Dovato 50/300 mg Film Kaplı Tablet" miktar tayini sonuçları

Dovato 50/300 mg Film Kaplı Tablet (DTG/3TC)		
Yöntem	DTG, %	3TC %
AD	100,2	99,8
İİD	100,1	99,9

4. TARTIŞMA

Yapılan doktora tezi kapsamında, HIV/AIDS tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir antiretroviral Dolutegravir (DTG), yine aynı amaçla kullanılan bir NRTI (lnükleosid analog ters transkriptaz inhibitörleri) olan Lamivudin (3TC) ve bir diğer bir NRTI olan Abakavir (ABC) adlı önemli etken maddelerin spektrofotometrik ve kromatografik yöntemlerle hassas, seçici ve ekonomik bir şekilde tayini başarıyla gerçekleştirilmiştir. Tezin önerisi kapsamında vurgulanan hedeflere ulaşılmış ve her üç etken madde ve bu etken maddeleri tek başına ya da bir arada içeren ticari farmasötik preparatlar için geliştirilen yöntemler ICH rehberleri doğrultusunda geçerli kılınarak başarıyla uygulanmıştır. Yöntemlerin performans parametrelerinin kıyaslandığı Çizelge 4.1. ve Çizelge 4.2, her bir yöntemin yakalama sınırı, tayin alt sınırı, doğrusal aralık ve geri kazanım oranları gibi önemli özelliklerini sunmaktadır.

Spektrofotometrik analizlerde bu üç etken maddenin bir arada tayini mevcut denemelerde gerçekleştirilememiş olsa da DTG ve 3TC için oldukça seçici, doğrusal yanıt veren, tatmin edici geri kazanım değerlerine sahip iki alternatif spektrofotometrik metod geliştirilmiştir. Söz konusu AD (absorbans düzeltme) yöntemi ve İİD (indüklenmiş ikili dalgaboyu) yöntemi ile çizdirilen kalibrasyon grafiklerinde oldukça yüksek korelasyon katsayıları elde edilmiştir. Bu iki yöntem sunduğu oldukça düşük yakalama sınırı ve tayin alt sınırı değerleri ile de dikkat çekicidir. Yine bu iki alternatif yöntem sergiledikleri yüksek geri kazanım oranları ile yöntemin uygulanabilirliği açısından tatmin edici bir performans sergilemişlerdir. Geliştirilen her iki yöntem, düşük maliyetli olmaları ve daha kısa ve pratik analiz süreci sunmasıyla rutin analizler için uygun bir alternatif olarak değerlendirilmiştir.

YPSK geliştirilmesi aşamasında ise yöntemin her üç etken madde için yüksek ayırım kapasitesine ve geniş bir çalışma derişimi aralığına sahip olması hedeflenmiştir. Mevcut yöntemlerin yaklaşık 15-30 dakikalık gradyen programlar içermesi düşünüldüğünde mevcut yöntemin sunduğu 6 dakikalık analiz süresinin gerçek bir avantaj sağladığı görülecektir. Aynı zamanda bu ters faz YPSK her üç etken maddeyi tek başlarına ya da bir arada geniş bir derişim aralığında analiz etmeye olanak sağlamaktadır. Özetle ICH rehberleri doğrultusunda geçerli kılınan bu yöntem; sunduğu kısa analiz süresi, geniş çalışma aralığı, yüksek tekrarlanabilirlik ve formülasyondaki yardımcı maddelerden etkilenmeme avantajlarıyla öne çıkmıştır.

Çizelge 4.1. Literatürdeki mevcut yöntemler ve tez kapsamında geliştirilen yöntemler için bir karşılaştırma çizelgesi

Yazar	Yöntem	Mevcut Yöntemin Dezavantajı	Geliştrilen Yöntemlerin Avantajı
Prava vd. (2017)	YPSK-PDA	Uzun analiz süresi (11 dakika), düşük derişim aralığında çalışma (3TC;15-90ppm,ABC; 30 -180 ppm ve DTG; 2.5- 15 ppm)	6 dakikada biten analiz, Yüksek derişim aralığında çalışma (3TC;5-600 µg/mL, ABC; 5 -900 µg/mL, ve DTG; 5- 200 µg/mL,).
Serag vd. (202)	UV-GB Kemometri	25 kalibrasyon 13 doğrulama seti ile analiz	7 adet kalibrasyon çözeltisi ile analiz
Pal vd. (2016)	YPSK	Dar çalışma aralığı (3TC;15-90 ppm, ABC; 30 -180 ppm ve DTG; 2.5- 15 ppm) ve yüksek simetri faktörü (3TC;1,26, ABC;1,53 ve DTG;1,22)	Geniş çalışma aralığı (3TC;5-600 µg/mL, ABC; 5 -900 µg/mL, ve DTG; 5- 200 µg/mL,) ve yüksek simetri faktörü (3TC;1,08, ABC;1,10 ve DTG;1,05)
Silinski vd. (2025)	SK-MS	Yüksek cihaz maliyeti	Düşük cihaz maliyeti
Khaleel ve Abdul Rahaman (2015)	YPSK-PDA	Uzun analiz süresi (10 dakika), düşük derişim aralığında çalışma (3TC;15-90 ppm, ABC; 30 -180 ppm ve DTG; 2.5- 15 ppm) ve yüksek simetri faktörü (3TC;1,34, ABC;1,51 ve DTG;1,12)	Yukarıda verildi
Dhanwate vd. (2019)	YPSK-PDA	Sadece iki etken madde, Düşük çalışma aralığı (3TC: 18-90 µg/mL, DTG 3-15 µg/mL)	Üç etken madde, daha yüksek çalışma aralığı
Babu vd. (2024)	YPSK PDA	Yüksek analiz süresi (15 dakika), dar çalışma aralığı (3TC;75-225 µg/mL, ABC; 150 -450 µg/mL ve DTG; 12.5-37,5 µg/mL)	Yukarıda verildi
Dubey ve Duggirala (2018)	TF-UPSK-PDA	Dar derişim aralığı (3TC;15-75 µg/mL, ABC; 30 -150 µg/mL, ve DTG; 2,5- 12,5 µg/mL,) ve yüksek simetri faktörü (3TC;1,23, ABC;1,25 ve DTG;1,29), RP-SIL kolon.	Yukarıda verildi, klasik C_{18} kolon kullanımı

Çizelge 4.2. DTG için geliştirilen yöntemlerin karşılaştırmalı değerlendirmesi

Parametre	**YPSK**	**AD Yöntemi**	**İİD Yöntemi**
Çalışma Aralığı	5,0 - 200,0	3,0 – 24,0	3,0 – 24,0
YS (µg/mL)	4,0	0,23	1,27
TAS (µg/mL)	12,2	0,70	3,86
Uygulama Matriksi	Tablet	Tablet	Tablet
Geri Kazanım (%)	99,0 – 100,6	99,5 – 100,1	98,9 – 100,6
Avantajlar	Seçici, Kısa analiz süresi Geniş çalışma aralığı	Seçici, Kısa analiz süresi Kısmen çevre dostu	Seçici, Kısa analiz süresi Kısmen çevre dostu

Çizelge 4.3. 3TC için geliştirilen yöntemlerin karşılaştırmalı değerlendirmesi

Parametre	**YPSK**	**AD Yöntemi**	**İİD Yöntemi**
Çalışma Aralığı	5,0 - 600,0	3,0 – 30,0	3,0 – 30,0
YS (µg/mL)	6,8	0,30	0,24
TAS (µg/mL)	20,6	0,91	0,74
Uygulama Matriksi	Tablet	Tablet	Tablet
Geri Kazanım (%)	100,1 – 100,7	99,6 – 100,3	99,7 – 100,1
Avantajlar	Seçici, Kısa analiz süresi Geniş çalışma aralığı	Seçici, Kısa analiz süresi Kısmen çevre dostu	Seçici, Kısa analiz süresi Kısmen çevre dostu

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışması kapsamında, her üçü de Dünya Sağlık Örgütü (WHO) temel ilaçlar listesinde kendisine yer bulmuş olan etken maddeler Dolutegravir (DTG), Lamivudin (3TC) ve Abakavir'in (ABC) tek başına (Tivicay®), ikisini (Dovato®) ya da üçünü (Triumeq®) bir arada içeren farmasötik dozaj formlarında hızlı, ucuz, basit, seçici ve yüksek hassasiyetle analizi için yöntemler geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla öncelikle bir YPSK geliştirilmesi üzerinde durulmuş, kullanıcı dostu, kısa analiz süresine rağmen geniş bir derişim aralığında yüksek geri kazanım ve tekrarlanabilir sonuçlar üreten bir ters faz YPSK geliştirilmiştir. Söz konusu yöntem ICH kılavuzlarına göre valide edilmiş ve sadece miktar tayini değil safsızlık ve stabilite analizlerinde de kullanılabilirliği gösterilmiştir.

Geliştirilen ve geçerli kılınan YPSK, her üç etken maddenin matriksten etkilenmeden farmasötik dozaj formlarında tayini ve tespiti için yüksek çözünürlük, doğruluk ve hassasiyet sağlamaktadır.

Sonuç olarak, bu çalışmada geliştirilen YPSK, sentetik olarak ve farmasötik preparatlar kullanılarak hazırlanan örneklerde DTG, 3TC ve ABC'in tayin ve tespiti için etkili ve güvenilir analiz yöntemi olarak gelecek vaadetmektedir. Geliştirilen bu analiz yöntemi, düşük tespit limitleri, yüksek doğruluk, maliyet etkinlik ve pratik uygulanabilirlik gibi üstün performans özellikleriyle öne çıkmıştır.

Ancak aynı amaçla ve daha ucuz ve basit donanımlarla da bu analizlerin yapılabilmesine olanak sağlaması açısından çalışmalara spektrofotometrik yöntemler de eklenmeye çalışılmıştır. Gerek etken maddelerin benzer spektrumlar vermesi gerekse üç etken maddenin aynı anda analizi için kurulması gereken matematiksel denklemlerin karmaşıklığı nedeniyle sadece DTG ve 3TC üzerine yoğunlaşılarak çalışmalar bu iki etken madde üzerinde gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada uygun çözücü ve derişim aralığı belirlemekten öte bu iki etken maddeyi aynı anda tayin etmeye yönelik yeni spektrofotometrik yaklaşımlar da araştırılmıştır.

Uzun denemeler ve matematiksel yaklaşımlar sonunda her iki etken madde için "absorbans düzeltme yöntemi" (AD) ve "indüklenmiş ikili dalgaboyu yöntemi" (İİD) ile yüksek doğrusallık, uygun çalışma aralığı ve yüksek geri kazanım değerleri yakalanmıştır. Çalışmalar bu iki yenilikçi spektrofotometrik yöntem ile tamamlanmış ve DTG ve 3TC'in eş zamanlı tayini için kısmi validasyonu gerçekleştirilmiştir. Her iki yöntem, özellikle düşük

derişimlerde bile yüksek doğrulukla sonuç elde edilmesini mümkün kılmaktadır. Söz konusu yöntemler pratikte hızlı, ekonomik ve kolay uygulanabilir bir alternatif sunmaktadır.

Bu tez çalışmasında geliştirilen bu yöntemlerin, ilaç endüstrisi, AR-GE laboratuvarları, üniversiteler ve klinik raşatırma laboratuvarları için önemli bir potansiyele sahip olduğu ve fırsatlar sunduğu gözlemlenmiştir. Geliştirilen YPSK diğer antiviral, antiretroviral ve NRTI ilaç etken maddeleri için de bir potansiyele sahip olduğu ve bu etken maddeler için de kullanabilirliğinin araştırılması için ek çalışmalar yapılması önerilmektedir. Diğer yandan yenilikçi spektrofotometrik yaklaşımlar bu ve benzer ilaç kombinasyonları için her zaman ucuz ve hızlı alternatif analitik yöntemler olarak zengin bir poıtansiyele sahiptirler. Gerek matematiksel denklemler gerekse kemometrik yaklaşımlar ile bir arada kullanımı ile spektrofotometrik yöntemler her zaman güçlü bir alternatif olmaya devam edecektir.

Tüm bu avantajlara ek olarak, ACN, MeOH gibi klasik çözücüler yerine etanol ve saf su gibi çevreye zararı daha az, nispeten ucuz çözücü ve çözücü karışımlarının da analiz süreçlerine dâhil edilmesi, daha basit ve çevreci tampon çözeltiler çalışılması ve yeni metotlarda bu bileşenlere daha fazla yer verilmesi hem analiz sektörünün hem araştırmacıların hem de çevreye duyarlı, bilinçli toplumun hayalidir. Bu amaçla bu tez kapsamında yapılan denemelerin, geçerli kılınan metotların bu alternatif çözücü ve kimyasallar ile geliştirilmesi, bu amaçla yeni deneysel koşullar planlanması ve oluşturulması daha yaşanabilir bir dünya için elzemdir.

KAYNAKLAR

Arts, E. J., & Hazuda, D. J. (2012). HIV-1 antiretroviral drug therapy. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *2*(4), a007161. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a007161

Babu, D. C., Rao, K. H., Harsha, G. S. S., Alekhya, D., Sirisha, V., Narwariya, S. S., & Aleesha, S. Simultaneous stability indicating rp-hplc method development and validation of abacavir, dolutegride and lamivudine in bulk and pharmaceutical formulation.

Barbarino, J. M., Kroetz, D. L., Altman, R. B., & Klein, T. E. (2014). PharmGKB summary: abacavir pathway. *Pharmacogenetics and genomics*, *24*(5), 276-282. https:// doi.org/10.1097/FPC.0000000000000040

Beckett, A., & Stenlake, J. (2001). Practical Pharmaceutical Chemistry: Part II. 4th. *London: Bloomsbury Publ.*, *2001*, 281-306.

Bowen, L. N., Smith, B., Reich, D., Quezado, M., & Nath, A. (2016). HIV-associated opportunistic CNS infections: pathophysiology, diagnosis and treatment. *Nature Reviews Neurology*, *12*(11), 662-674. https://doi.org/10.1038/nrneurol.2016.149

Bozdoğan, A., Acar, A. M., & Kunt, G. K. (1992). Simultaneous determination of acetaminophen and caffeine in tablet preparations by partial least-squares multivariate spectrophotometric calibration. *Talanta*, *39*(8), 977-979. https://doi.org/10.1016/0039-9140(92)80281-H

Castilla, J., Del Romero, J., Hernando, V., Marincovich, B., García, S., & Rodríguez, C. (2005). Effectiveness of highly active antiretroviral therapy in reducing heterosexual transmission of HIV. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, *40*(1), 96-101. 10.1097/01.qai.0000157389.78374.45

Cottrell, M. L., Hadzic, T., & Kashuba, A. D. (2013). Clinical pharmacokinetic, pharmacodynamic and drug-interaction profile of the integrase inhibitor dolutegravir. *Clinical pharmacokinetics*, *52*(11), 981-994. https://doi.org/10.1007/s40262-013-0093-2

Crout, J. R. (1974). Fixed combination prescription drugs: FDA policy. *The Journal of Clinical Pharmacology*, *14*(5-6), 249-254. https://doi.org/10.1002/j.1552-4604.1974.tb02309.x

Curran, J. W., & Jaffe, H. W. (2011). AIDS: the early years and CDC's response. *MMWR: Surveillance Summaries*, *60*(suppl 4), 64-69.

Dave, K., & Desai, S. (2018). Factorial design for development of a high-performance thin-layer chromatography method for the simultaneous estimation of abacavir sulfate, lamivudine hydrochloride, and dolutegravir sodium. *JPC–Journal of Planar Chromatography–Modern TLC*, *31*(6), 489-495. https://doi.org/10.1556/1006.2018.31.6.9

Desai, M., Iyer, G., & Dikshit, R. (2012). Antiretroviral drugs: critical issues and recent advances. *Indian journal of pharmacology*, *44*(3), 288-298. 10.4103/0253-7613.96296

Dhanwate, S., Pachauri, A., Ghode, P., & Khandelwal, K. (2019). Development and validation of analytical method for the estimation of lamivudine and dolutegravir sodium in dosage form. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, *11*(8), 2886-2890.

Dong, Michael W. LCGC North America-06-01-2013 Volume 31 Issue 6

Drew Hill, A., Clayden, P., Thorne, C., Christie, R., & Zash, R. (2018). Safety and pharmacokinetics of dolutegravir in HIV-positive pregnant women: a systematic review. In (Vol. 4, pp. 66-71): Elsevier. https://doi.org/10.1016/S2055-6640(20)30247-8

Dubey, S., & Duggirala, M. (2018). Simultaneous estimation of lamivudine, abacavir and dolutegravir by UPLC method. *Int. J. App. Pharm*, *10*(1), 46-52.

Feinberg, J. (2011). Current and Future Treatment Guidelines for HIV. In *HIV and Liver Disease* (pp. 15-21). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1712-6_3

Fernandez, J. V. B., & Munir, A. (2024). Abacavir. In *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing.

Galvin, S. R., & Cohen, M. S. (2004). The role of sexually transmitted diseases in HIV transmission. *Nature Reviews Microbiology*, *2*(1), 33-42. https://doi.org/10.1038/nrmicro794

German Advisory Committee Blood , S. A. o. P. T. b. B. (2016). Human immunodeficiency virus (HIV). *Transfusion medicine and hemotherapy*, *43*(3), 203-222.

Goel, V., Kumar, D., Lingaiah, R., & Singh, S. (2017). Occurrence of needlestick and injuries among health-care workers of a tertiary care teaching hospital in North India. *Journal of laboratory physicians*, *9*(01), 020-025.

Gonzalez, S. M., Aguilar-Jimenez, W., Su, R.-C., & Rugeles, M. T. (2019). Mucosa: Key interactions determining sexual transmission of the HIV infection. *Frontiers in immunology*, *10*, 144. https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00144

Gurol, E., Saban, C., Oral, O., Cigdem, A., & Armagan, A. (2006). Trends in hepatitis B and hepatitis C virus among blood donors over 16 years in Turkey. *European journal of epidemiology*, *21*(4), 299-305. https://doi.org/10.1007/s10654-006-0001-2

Hetherington, S., McGuirk, S., Powell, G., Cutrell, A., Naderer, O., Spreen, B., Lafon, S., Pearce, G., & Steel, H. (2001). Hypersensitivity reactions during therapy with the nucleoside reverse transcriptase inhibitor abacavir. *Clinical therapeutics*, *23*(10), 1603-1614. https://doi.org/10.1016/S0149-2918(01)80132-6

Jain, J., Patadia, R., Vanparia, D., Chauhan, R., & Shah, S. (2010). Dual wavelength spectrophotometric method for simultaneous estimation of drotaverine hydrochloride and aceclofenac in their combined tablet dosage form. *Int J Pharm Pharm Sci*, *2*(4), 76-79.

Johnson, M. A., Moore, K. H., Yuen, G. J., Bye, A., & Pakes, G. E. (1999). Clinical pharmacokinetics of lamivudine. *Clinical pharmacokinetics*, *36*(1), 41-66. https://doi.org/10.2165/00003088-199936010-00004

Kandel, C. E., & Walmsley, S. L. (2015). Dolutegravir–a review of the pharmacology, efficacy, and safety in the treatment of HIV. *Drug design, development and therapy*, 3547-3555. https://doi.org/10.2147/DDDT.S84850

Khaleel, N., & Rahaman, S. A. (2015). A validated stability indicating RP-HPLC method for simultaneous determination of abacavir, lamivudine and dolutegravir in bulk and pharmaceutical dosage form. *World J Pharm Res*, *4*(7), 1453-1476.

Korany, M., Wahbi, A., Mandour, S., & Elsayed, M. (1985). Determination of certain drugs in multicomponent formulations by first derivative ultraviolet spectrophotometry. *Analytical Letters*, *18*(1), 21-34. https://doi.org/10.1080/00032718508066922

Lau, D. T. Y., Khokhar, M. F., Doo, E., Ghany, M. G., Herion, D., Park, Y., Kleiner, D. E., Schmid, P., Condreay, L. D., & Gauthier, J. (2000). Long-term therapy of chronic hepatitis B with lamivudine. *Hepatology*, *32*(4), 828-834.

Lotfy, H. M., Fayez, Y. M., Tawakkol, S. M., Fahmy, N. M., & Shehata, M. A. E.-A. (2017). Spectrophotometric determination for the binary mixture of clotrimazole and dexamethasone in pharmaceutical dosage form. *Analytical Chemistry Letters*, *7*(1), 30-42. https://doi.org/10.1080/22297928.2017.1279985

Lotfy, H. M., Saleh, S. S., Hassan, N. Y., & Salem, H. (2015). Novel two wavelength spectrophotometric methods for simultaneous determination of binary mixtures with severely overlapping spectra. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *136*, 1786-1796. https://doi.org/10.1016/j.saa.2014.10.084

Mabrouk, M. M., Hammad, S. F., El-Fatatry, H. M., & El-Malla, S. F. (2014). Spectroscopic methods for determination of dexketoprofen trometamol and tramadol HCl. *Pharm Analysis Quality Assurance*, *4*, 276-282.

Manfredi, R. (2002). HIV disease and advanced age: an increasing therapeutic challenge. *Drugs & aging*, *19*(9), 647-669. https://doi.org/10.2165/00002512-200219090-00003

Min, S., Sloan, L., DeJesus, E., Hawkins, T., McCurdy, L., Song, I., Stroder, R., Chen, S., Underwood, M., & Fujiwara, T. (2011). Antiviral activity, safety, and pharmacokinetics/pharmacodynamics of dolutegravir as 10-day monotherapy in HIV-1-infected adults. *Aids*, *25*(14), 1737-1745. 10.1097/QAD.0b013e32834a1dd9

Nolan, D. (2009). HLA-B* 5701 screening prior to abacavir prescription: clinical and laboratory aspects. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*, *46*(3), 153-165. https://doi.org/10.1080/10408360902937817

O'Brien, C. M., Bishop, K. W., Zhang, H., Xu, X., Shmuylovich, L., Conley, E., Nwosu, K., Duncan, K., Mondal, S. B., & Sudlow, G. (2022). Quantitative tumor depth determination using dual wavelength excitation fluorescence. *Biomedical optics express*, *13*(11), 5628-5642. https://doi.org/10.1364/BOE.468059

Ojeda, C. B., & Rojas, F. S. (2004). Recent developments in derivative ultraviolet/visible absorption spectrophotometry. *Analytica Chimica Acta*, *518*(1-2), 1-24. https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.05.036

Pal, N., Rao, A. S., & Ravikumar, P. (2016). Simultaneous HPLC method development and validation for estimation of Lamivudine, Abacavir and Dolutegravir in combined dosage form with their stability studies. *Asian journal of chemistry*, *28*(2), 273.

Perry, C. M., & Faulds, D. (1997). Lamivudine: a review of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in the management of HIV infection. *Drugs*, *53*(4), 657-680. https://doi.org/10.2165/00003495-199753040-00008

Prava, R., Seru, G., Pujala, V. K., & Lagu, S. B. (2017). RP-HPLC method development and validation for the simultaneous determination of lamivudine, abacavir and dolutegravir in pharmaceutical dosage forms. *World Journal of Pharmaceutical Sciences*, 168-181.

Rathod, S., Patel, P., & Patel, N. (2023). Chemometrics Assisted Spectrophotometric Method Development and Validation for Simultaneous Estimation of Abacavir, Lamivudine and Dolutegravir in Dosage Form. *Ind. J. Pharm. Edu. Res*, *57*(2), 570-582. 10.5530/ijper.57.2.70

Roca, B., Gomez, C., & Arnedo, A. (2000). Adherence, side effects and efficacy of stavudine plus lamivudine plus nelfinavir in treatment-experienced HIV-infected patients. *Journal of Infection*, *41*(1), 50-54. https://doi.org/10.1053/jinf.2000.0678

Roca, B., Gómez, C. J., & Arnedo, A. (1999). Stavudine, lamivudine and indinavir in drug abusing and non-drug abusing HIV-infected patients: adherence, side effects and efficacy. *Journal of Infection*, *39*(2), 141-145. https://doi.org/10.1016/S0163-4453(99)90006-3

Saldanha, T. C., de Araújo, M. C. U., Neto, B. B., & Chame, H. C. (2000). Simultaneous Analysis of Co2+, Cu2+ Mn2+, Ni2+ and Zn2+ in The Ultraviolet Region Using 4-(Pyridil-2-AZO) Resorcinol and Multivariate Calibration. https://doi.org/10.1080/00032710008543117

Serag, A., Hasan, M. A., Tolba, E. H., Abdelzaher, A. M., & Elmaaty, A. A. (2022). Analysis of the ternary antiretroviral therapy dolutegravir, lamivudine and abacavir using UV spectrophotometry and chemometric tools. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *264*, 120334. https://doi.org/10.1016/j.saa.2021.120334

Silinski, M. A. R., Gilliam, J. A., Apoian, J., Fletcher, B. L., Fernando, R. A., & Waidyanatha, S. (2025). HIV combination drug therapies: development and validation of an LC–MS-MS method for simultaneous quantitation of abacavir, dolutegravir, and lamivudine in rat matrices in support of toxicology studies. *Journal of Analytical Toxicology*, *49*(5), 332-339. https://doi.org/10.1093/jat/bkaf016

Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (1998). *Principles of instrumental analysis* (Vol. 203). Saunders college publishing Philadelphia.

Volmink J, Marais B. HIV: mother-to-child transmission. BMJ Clin Evid. 2008 Feb 5;2008:0909. PMID: 19450331; PMCID: PMC2907958.

Wenzel, T. J. (2013). Douglas A. Skoog, Donald M. West, F. James Holler, and Stanley R. Crouch: Fundamentals of analytical chemistry, international ed. *Solutions of Fundamentals of Analytical Chemistry, Student Edition

Yuen, G. J., Weller, S., & Pakes, G. E. (2008). A review of the pharmacokinetics of abacavir. *Clinical pharmacokinetics*, *47*(6), 351-371. https://doi.org/10.2165/00003088-200847060-00001

https://www.hiv.gov/federal-response/pepfar-global-aids/global-hiv-aids-overview.

https://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet

https://pheur-online.edqm.eu/home/

https://database.ich.org/sites/default/files/ICH_Q2-R2_Document_Step2_Guideline_2022_0324.pdf