



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



# **SEFPROZİLİN TAYİNİ İÇİN ELEKTROKİMYASAL VE STABİLİTE GÖSTERGELİ KROMATOĞRAFİK YÖNTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ**

**Ayşenur ORTAK**

**DİSİPLİNLERARASI ADLİ ECZACILIK ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN  
Prof. Dr. Bengi USLU**

**ANKARA  
2023**

TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SEFPROZİLİN TAYİNİ İÇİN ELEKTROKİMYASAL VE  
STABİLİTE GÖSTERGELİ KROMATOĞRAFİK  
YÖNTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ

Ayşenur ORTAK

DİSİPLİNLERARASI ADLİ ECZACILIK ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN  
Prof. Dr. Bengi USLU

ANKARA

2023

## ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Sefprozilin Tayini için Elektrokimyasal ve Stabilité Göstergeli Kromatografik Yöntemlerin Geliştirilmesi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı :Ayşenur ORTAK

Tarih :23.01.2023

İmza :

## KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Disiplinlerarası Adli Eczacılık  
Anabilim Dalında Ayşenur ORTAK tarafından hazırlanan “Sefprozilin Tayini İçin  
Elektrokimyasal ve Stabilit  Göstergeli Kromatografik Yöntemlerin Geliştirilmesi”  
adlı tez çalışması aşığıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak OY  
BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 23.01.2023

İmza  
Prof. Dr. Aylin ÜSTÜNDAĞ  
Ankara Üniversitesi  
Jüri Başkanı

İmza  
Prof. Dr. Bengi USLU  
Ankara Üniversitesi  
 ye

İmza  
Doç. Dr. Ayşegül DOĞAN  
Hacettepe Üniversitesi  
 ye

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

İmza  
Prof. Dr. Fügen AKTAN  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

# İÇİNDEKİLER

|                                                                                                  |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Etik Beyan                                                                                       | ii  |
| Kabul ve Onay                                                                                    | iii |
| İçindekiler                                                                                      | iv  |
| Önsöz                                                                                            | vii |
| Simgeler ve Kısaltmalar                                                                          | ix  |
| Şekiller                                                                                         | xii |
| Çizelgeler                                                                                       | xv  |
| <br>                                                                                             |     |
| <b>1. GİRİŞ</b>                                                                                  | 1   |
| 1.1. Sefalosporinler                                                                             | 1   |
| 1.2. Sefalosporinlerin Sınıflandırılması                                                         | 2   |
| 1.2.1. Sefprozil                                                                                 | 2   |
| 1.2.2. Sefprozilin Etki Alanı                                                                    | 3   |
| 1.2.3. Sefprozilin Farmakokinetik Özellikleri                                                    | 4   |
| 1.2.4. Sefprozilin Pozolojisi ve Uygulama Şekli                                                  | 4   |
| 1.3. Sefprozil ile Yapılmış Literatürdeki Analiz Çalışmaları                                     | 5   |
| <br>                                                                                             |     |
| <b>2. GEREÇ ve YÖNTEM</b>                                                                        | 12  |
| 2.1. Gereç                                                                                       | 12  |
| 2.1.1. Tez Çalışmalarında Kullanılan Kimyasal Malzemeler                                         | 12  |
| 2.1.2. Kullanılan Araç ve Gereçler                                                               | 14  |
| 2.1.2.1. Voltametrik Analizde Kullanılan Araç ve Gereçler                                        | 14  |
| 2.1.2.2. Kromatografik Analizde Kullanılan Araç ve Gereçler                                      | 14  |
| 2.1.3. Kullanılan Çözeltilerinin Hazırlanması                                                    | 15  |
| 2.1.3.1. Voltametrik Analiz İçin Standart Madde Çözeltilerinin Hazırlanması                      | 15  |
| 2.1.3.2. Kromatografik Analiz İçin Standart Madde Çözeltilerinin Hazırlanması                    | 15  |
| 2.1.3.3. Voltametrik Analiz İçin İdrar Stoğu Hazırlanması                                        | 15  |
| 2.1.3.4. Kromatografik Analiz İçin Serum ve İdrar Stoğunun Hazırlanması                          | 16  |
| 2.1.3.5. Sefprozil Tablet Çözeltisinin Hazırlanması                                              | 16  |
| 2.1.3.6. Voltametrik Analizde Tabletten Geri Kazanım Çalışmaları için Çözeltilerin Hazırlanması  | 17  |
| 2.1.3.7. Voltametrik Analizde İdrardan Geri Kazanım Çalışmaları İçin Çözeltilerin Hazırlanması   | 17  |
| 2.1.3.8. Kromatografik Analizde Geri Kazanım Çalışmaları için Çözeltilerin Hazırlanması          | 17  |
| 2.1.3.9. Voltametrik Analiz İçin Tampon Çözeltilerin Hazırlanması                                | 18  |
| 2.1.3.10. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi İçin Hareketli Faz Çözeltilerinin Hazırlanması | 19  |
| 2.1.3.11. Stabilité Testleri İçin Numune Hazırlanması                                            | 19  |
| 2.2. Yöntem                                                                                      | 19  |
| 2.2.1. Voltametri                                                                                | 19  |
| 2.2.2. Polarografi                                                                               | 21  |
| 2.2.3. Voltametriye Kullanılan Elektrotlar                                                       | 22  |

|                                                                                                       |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.2.3.1. Karşılaştırma (Referans) Elektrotları                                                        | 22 |
| 2.2.3.2. Çalışma Elektrotları                                                                         | 22 |
| 2.2.3.3. Karşıt Elektrotlar                                                                           | 23 |
| 2.2.4. Camı Karbon Elektrotun Temizlenmesi                                                            | 24 |
| 2.2.5. Voltametrik Teknikler                                                                          | 24 |
| 2.2.5.1. Dönüştürümlü Voltametri                                                                      | 24 |
| 2.2.5.2. Diferansiyel Puls Voltametrisi                                                               | 25 |
| 2.2.5.3. Kare Dalga Voltametrisi                                                                      | 26 |
| 2.2.5.4. Sıyırma Voltametrisi                                                                         | 27 |
| 2.2.2. Kromatografi                                                                                   | 27 |
| 2.2.2.1. Kromatografik Yöntemlerin Sınıflandırılması                                                  | 27 |
| 2.2.2.1.1. Dağılma Kromatografisi                                                                     | 29 |
| 2.2.2.1.2. Ters Faz Sıvı Kromatografisi                                                               | 29 |
| 2.2.2.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi                                                      | 29 |
| 2.2.2.2.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisinde Uygulama Aşamaları                              | 30 |
| 2.2.2.2.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Cihazının Bölümleri                                | 30 |
| 2.2.2.2.3. Ekstraksiyon İşlemi                                                                        | 32 |
| 2.2.2.3. Kromatografide Sistem Uygunluk Testleri Parametreleri (SUT)                                  | 32 |
| 2.2.2.3.1. Alıkonma zamanı ( $t_R$ )                                                                  | 34 |
| 2.2.2.3.2. Kuyruklanma (T) ve Asimetri Faktörü (As)                                                   | 34 |
| 2.2.2.3.3. Kapasite Faktörü (k)                                                                       | 35 |
| 2.2.2.3.4. Seçicilik ( $\alpha$ )                                                                     | 35 |
| 2.2.2.3.5. Teorik Tabaka Sayısı (N)                                                                   | 36 |
| 2.2.2.3.6. Ayrım Gücü ( $R_s$ )                                                                       | 36 |
| 2.2.2.3.7. Pik Alanının Tekrar Edilebilirliği                                                         | 36 |
| 2.2.2.4. Kimyasal Analizlerde Yöntem Geçerlik Testleri                                                | 37 |
| 2.2.2.4.1. Seçicilik                                                                                  | 37 |
| 2.2.2.4.2. Doğrusallık ve Aralık                                                                      | 38 |
| 2.2.2.4.3. Yakalama Sınırı ve Tayin Alt Sınırı                                                        | 38 |
| 2.2.2.4.4. Kesinlik                                                                                   | 39 |
| 2.2.2.4.5. Doğruluk                                                                                   | 39 |
| 2.2.2.4.6. Sağlamlık                                                                                  | 40 |
| 2.2.2.4.7. Tutarlılık                                                                                 | 40 |
| 2.2.2.4.8. Stabilitate                                                                                | 41 |
| <b>3. BULGULAR</b>                                                                                    | 42 |
| 3.1. Sefprozilin Elektrokimyasal Analiz Çalışmaları                                                   | 42 |
| 3.1.1. Sefprozilin Dönüştürümlü Voltametri Çalışmaları                                                | 42 |
| 3.1.2. Sefprozilin Diferansiyel Puls Voltametrisi Çalışmaları                                         | 47 |
| 3.1.3. Hız Taraması                                                                                   | 51 |
| 3.1.4. Geliştirilen Yöntemlerle Yapılan Analiz Çalışmaları                                            | 55 |
| 3.1.5. Geliştirilen Voltametrik Tekniklerin Uygulamaları                                              | 58 |
| 3.1.5.1. Geliştirilen Yöntemin Farmasötik Dozaj Şekillerine Uygulanması ve Geri Kazanım Çalışmaları   | 58 |
| 3.1.5.2. Geliştirilen Voltametrik Yöntemle Sefprozilin İdrardan Analizi ve % Geri Kazanım Çalışmaları | 60 |
| 3.2. Sefprozilin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yöntemi ile Analiz Çalışmaları               | 63 |

|                                                                         |     |
|-------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.2.1. Sefprozilin Dalga Boyu Taraması                                  | 63  |
| 3.2.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yönteminin Optimizasyonu | 63  |
| 3.2.2.1. Sabit faz seçimi                                               | 64  |
| 3.2.2.2. İç standart seçimi                                             | 66  |
| 3.2.2.3. Tampon Çözeltilerin Seçilmesi                                  | 67  |
| 3.2.2.4. Tampon Çözeltilerin Derişiminin Belirlenmesi                   | 70  |
| 3.2.2.5. Organik Çözücünün Seçilmesi                                    | 71  |
| 3.2.2.6. Mobil Fazda Organik Çözücü Oranının Belirlenmesi               | 72  |
| 3.2.2.7. pH Belirleme Çalışmaları                                       | 75  |
| 3.2.2.8. Sıcaklığın Belirlenmesi                                        | 76  |
| 3.2.2.9. Akış Hızının Belirlenmesi                                      | 77  |
| 3.2.3. Sistem Uygunluk Testlerinin Sonuçları                            | 79  |
| 3.2.4. Kalibrasyon ve Validasyon Çalışmalarına Ait Sonuçlar             | 80  |
| 3.2.5. Geri Kazanım Çalışmaları                                         | 85  |
| 3.2.6. Hızlandırılmış Bozunma Çalışmaları                               | 87  |
| <b>4. TARTIŞMA</b>                                                      | 98  |
| <b>5. SONUÇ ve ÖNERİLER</b>                                             | 105 |
| <b>ÖZET</b>                                                             | 107 |
| <b>SUMMARY</b>                                                          | 108 |
| <b>KAYNAKLAR</b>                                                        | 109 |
| <b>ÖZGEÇMİŞ</b>                                                         | 114 |

## ÖNSÖZ

Sefprozil (SFP), geniş spektrumlu, 2. nesil sefalosporin grubu bir beta laktam antibiyotiktir. Bu tez çalışmasında SFP' nin tayini için hem elektrokimyasal hem de kromatografik analiz yöntemleri geliştirilmesi planlanmıştır. SFP biyolojik olarak aktif *cis* ve *trans* diyastereoizomerin, 90:10 oranında karışımından oluşur. İzomerlerin ayrımı, etkinliklerinin farklı oluşu sebebiyle gerek klinik açıdan gerekse ilaç endüstrisi açısından çok büyük önem taşımaktadır ve bunun için yüksek performanli sıvı kromatografisi (YPSK) optimizasyonu ve SFP' nin izomerlerinin analizi gerçekleştirilmiştir. Hem *cis*-SFP hem *trans*-SFP' nin analizi için en uygun hareketli faz bileşimi belirlenmiş, farklı kolonlar, kolon sıcaklıkları, akış hızı, pH ve tampon çözelti türleri denenerek yöntem için en uygun şartlar seçilmiş ve yeni, basit, hızlı, duyarlı, seçici ve çevreci bir analiz yöntemi geliştirilmiştir. Geliştirilen yöntem için yöntem geçerlilik testleri ve validasyon çalışmaları da yapılarak SFP' nin farmasötik dozaj şekillerinden, idrar ve sentetik serum örneğinden analizi için uygulanabilirliği araştırılmıştır.

SFP elektroaktif bir ilaç etken maddesi olup, bu tez kapsamında yükseltgenme yönünde verdiği cevabı incelenmiştir. Uygun elektrokimyasal yöntem ve ortam belirlendikten sonra geliştirilen yöntemle SFP' nin farmasötik dozaj formlarından ve insan idrar örneğinden analizine uygulanabilirliği araştırılmıştır.

Yüksek lisans eğitimim boyunca çalışmalarımın bilimsellik dahilinde yürümesini sağlayan, yüksek lisans öğrenimim boyunca her konuda bana destek ve cesaret veren, tecrübeleriyle ışık tutan danışman hocam sayın Prof. Dr. Bengi USLU' ya sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Çalışmalarım süresinceengin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, desteğini esirgemeyen, her konuda bana hoşgörü ve sabırla yardımcı olan değerli hocam Dr. Burçin BOZAL PALABIYIK' a çok teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca desteğini esirgemeyen, her konuda bana hoşgörü ve sabırla yardımcı olan sayın Dr. Cem ERKMEN' e çok teşekkür ederim.

Anabilim dalımız öğretim üyelerine ve araştırma görevlilerine yardımları ve anlayışlarından dolayı teşekkür ederim.

Yardımları ve manevi desteği için sevgili arkadaşım Tarık KURBAN' a çok teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca sonsuz ilgi ve sevgileri ile verdiğim her kararda bana destek olan, bana her zaman inanan, güvenen, hep yanımda olan moral veren anneme, babama ve kardeşlerime yaşamıma kattıkları tüm güzellikler için çok teşekkür ederim.

## SİMGELER VE KISALTMALAR

|           |                                                                          |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------|
| $\alpha$  | Seçicilik                                                                |
| A         | Amper                                                                    |
| ACN       | Asetonitril                                                              |
| BH        | Bağıl Hata                                                               |
| BRT       | Britton-Robinson Tamponu                                                 |
| BSS       | Bağıl Standart Sapma                                                     |
| CFP       | Cefprozil                                                                |
| CKE       | Camsı Karbon Elektrot                                                    |
| cm        | Santimetre                                                               |
| dk        | Dakika                                                                   |
| DPV       | Diferansiyel Puls Voltametrisi                                           |
| DV        | Dönüşümlü Voltametri                                                     |
| $E_p$     | Potansiyel Değeri                                                        |
| FDA       | Food and Drug Administration (Gıda ve İlaç İdaresi Kurumu)               |
| g         | Gram                                                                     |
| GD        | Gerçek Değer                                                             |
| HPLC      | High Performance Liquid Chromatography                                   |
| ICH       | International Conference On Harmonization (Uluslararası Uyum Konferansı) |
| IS        | İç Standart                                                              |
| $I_p$     | Akım Değeri                                                              |
| k         | Kapasite Faktörü                                                         |
| KDV       | Kare Dalga Voltametrisi                                                  |
| kg        | Kilogram                                                                 |
| L         | Litre                                                                    |
| $\lambda$ | Dalga Boyu                                                               |
| M         | Molar                                                                    |
| MS        | Kütle Spektrometrisi                                                     |
| m         | Eğim                                                                     |

|                |                                                                         |
|----------------|-------------------------------------------------------------------------|
| mg             | Miligram                                                                |
| mL             | Mililitre                                                               |
| mm             | Milimetre                                                               |
| mM             | Milimolar                                                               |
| ms             | milisaniye                                                              |
| mV             | Mili Volt                                                               |
| $\mu$ A        | Mikro Amper                                                             |
| $\mu$ g        | Mikrogram                                                               |
| $\mu$ L        | Mikrolitre                                                              |
| n              | Kesişim                                                                 |
| N              | Teorik Tabaka Sayısı                                                    |
| nm             | nanometre                                                               |
| ppm            | Milyonda Bir birim (parts per million)                                  |
| PAR            | Parasetamol                                                             |
| r              | KorelasyonKatsayısı                                                     |
| rpm            | Dakikadaki Devir Sayısı (Revolutions per Minute)                        |
| R              | Determinasyon Katsayısı                                                 |
| Rs             | Ayrım Gücü                                                              |
| SFA            | Sefazolin                                                               |
| SFK            | Sefaklor                                                                |
| SFP            | SFP                                                                     |
| SFT            | Seftazidim                                                              |
| SS             | Standart Sapma                                                          |
| SUT            | Sistem Uygunluk Testleri                                                |
| t              | Zaman                                                                   |
| T              | Kuyruklanma Faktörü                                                     |
| t              | Alıkonma Zamanı                                                         |
| t <sub>0</sub> | Ölü Zaman                                                               |
| TAS            | Tayin Alt Sınırı                                                        |
| USP            | United States Pharmacopeia – Amerika Birleşik Devletleri<br>Farmakopesi |
| UV-GB          | Ultra Viyole-Görünür Bölge                                              |

|       |                                                |
|-------|------------------------------------------------|
| V     | Volt                                           |
| W     | Pik Taban Genişliği                            |
| YPİTK | Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi |
| YPSK  | Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi        |
| YS    | Yakalama Sınırı                                |



## ŞEKİLLER

|                                                                                                                                                                                         |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 1.1.</b> SFP' nin kimyasal yapısı                                                                                                                                              | 2  |
| <b>Şekil 2.1.</b> Tez çalışmasında voltametrik analizlerde kullanılan üç elektrotlu hücre sistemi                                                                                       | 23 |
| <b>Şekil 2.2.</b> Dönüşümlü voltametrde uygulanan potansiyel-zamanın grafiği ve oluşan voltamogram.                                                                                     | 25 |
| <b>Şekil 2.3.</b> DPV'de potansiyel-zaman grafiği ve elde edilen voltamogram.                                                                                                           | 26 |
| <b>Şekil 2.4.</b> KDV'de potansiyel- zaman grafiği ve elde edilen voltamogram.                                                                                                          | 26 |
| <b>Şekil 2.5.</b> Bir YPSK sistemini meydana getiren bölümlerin şematik diyagramı.                                                                                                      | 30 |
| <b>Şekil 2.6.</b> Kuyruklanma ve asimetri faktörünün pik üzerinde ölçülme yerleri.                                                                                                      | 35 |
| <b>Şekil 2.7.</b> Ayırma gücü gösterim piki.                                                                                                                                            | 36 |
| <b>Şekil 3.1.</b> $1 \times 10^{-4}$ M SFP' nin farklı pH'larda BRT içerisinde, $100 \text{ mV s}^{-1}$ tarama hızında elde edilen dönüşümlü voltamogramları.                           | 43 |
| <b>Şekil 3.2.</b> $1 \times 10^{-4}$ M SFP' nin farklı pH' larda fosfat tamponları içerisinde, $100 \text{ mV s}^{-1}$ tarama hızında elde edilen dönüşümlü voltamogramları.            | 44 |
| <b>Şekil 3.3.</b> $1 \times 10^{-4}$ M SFP' nin farklı pH'lardaki asetat tamponları içerisinde, $100 \text{ mV s}^{-1}$ tarama hızında elde edilen dönüşümlü voltamogramları.           | 45 |
| <b>Şekil 3.4.</b> $1 \times 10^{-4}$ M SFP' nin sülfürik asit ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) çözeltilerinde, $100 \text{ mV s}^{-1}$ tarama hızında elde edilen dönüşümlü voltamogramları. | 46 |
| <b>Şekil 3.5.</b> $1 \times 10^{-4}$ M SFP' nin sülfürik asit ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) çözeltilerinde elde edilen DP voltamogramları.                                                | 47 |
| <b>Şekil 3.6.</b> $1 \times 10^{-4}$ M SFP' nin fosfat tamponları içindeki DP voltamogramları.                                                                                          | 47 |
| <b>Şekil 3.7.</b> $1 \times 10^{-4}$ M SFP' nin BRT içindeki DP voltamogramları.                                                                                                        | 48 |
| <b>Şekil 3.8.</b> $1 \times 10^{-4}$ M SFP' nin asetat tamponları içindeki DP voltamogramları.                                                                                          | 48 |
| <b>Şekil 3.9.</b> $1 \times 10^{-4}$ M SFP' nin DPV ile asit, asetat, fosfat ve BR tamponlarında çeşitli pH'larda elde edilen pik akımlarının grafiği                                   | 49 |
| <b>Şekil 3.10.</b> $1 \times 10^{-4}$ M SFP' nin DPV ile asit, asetat, fosfat ve BR tamponlarında farklı pH'larda okunan potansiyel değerleri grafiği                                   | 50 |
| <b>Şekil 3.11.</b> $1 \times 10^{-4}$ M SFP derişiminde, $500\text{-}10 \text{ mV s}^{-1}$ hız aralığında pH 3,0 BRT'de yapılan ölçümlerin voltamogramları                              | 52 |

|                                                                                                                                                                                                                                                         |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 3.12.</b> $1 \times 10^{-4}$ M SFP' nin pH 3,0 BRT'de 10-500 mV s <sup>-1</sup> tarama hızları arasında elde edilen dönüşümlü voltamogramlara ait logv –logip grafiği                                                                          | 53 |
| <b>Şekil 3.13.</b> $1 \times 10^{-4}$ M SFP' nin pH 3,0 BRT'de 10-500 mV s <sup>-1</sup> tarama hızları arasında elde edilen dönüşümlü voltamogramlara ait ip-v <sup>1/2</sup> grafiği                                                                  | 54 |
| <b>Şekil 3.14.</b> SFP' nin pH 3,0 BRT'de $4 \times 10^{-6}$ - $8 \times 10^{-5}$ M arasındaki derişimlerde elde edilen DP voltamogramları                                                                                                              | 56 |
| <b>Şekil 3.15.</b> SFP' nin DPV ile, $4 \times 10^{-6}$ - $8 \times 10^{-5}$ M arasındaki derişimlerde elde edilen ortalama akım-derişim grafiği                                                                                                        | 57 |
| <b>Şekil 3.16.</b> SFP'nin pH 3,0 BRT'de idrar numunesi kalibrasyon voltamogramları                                                                                                                                                                     | 61 |
| <b>Şekil 3.17.</b> SFP' nin idrar numunesinden analiz edilen $4 \times 10^{-5}$ , $2 \times 10^{-5}$ , $1 \times 10^{-5}$ , $8 \times 10^{-6}$ , $6 \times 10^{-6}$ , $4 \times 10^{-6}$ M derişimlerdeki ölçümlerine ait ortalama akım-derişim grafiği | 61 |
| <b>Şekil 3.18.</b> SFP'nin absorpsiyon spektrumu                                                                                                                                                                                                        | 63 |
| <b>Şekil 3.19.</b> Kolon seçimi                                                                                                                                                                                                                         | 64 |
| <b>Şekil 3.20.</b> Kolon seçimi                                                                                                                                                                                                                         | 66 |
| <b>Şekil 3.21.</b> IS optimizasyonu                                                                                                                                                                                                                     | 67 |
| <b>Şekil 3.22.</b> Tampon çözeltinin optimizasyonu                                                                                                                                                                                                      | 67 |
| <b>Şekil 3.23.</b> Tampon çözeltinin optimizasyonu                                                                                                                                                                                                      | 69 |
| <b>Şekil 3.24.</b> Tampon çözelti (amonyum asetat) derişimi optimizasyonu                                                                                                                                                                               | 70 |
| <b>Şekil 3.25.</b> Organik çözücü optimizasyonu (Asetonitril ve metanol, sırasıyla)                                                                                                                                                                     | 71 |
| <b>Şekil 3.26.</b> Organik çözücü oranı optimizasyonu                                                                                                                                                                                                   | 73 |
| <b>Şekil 3.27.</b> Tampon çözelti optimizasyonu A: pH 5,0 B: pH 6,5 C: pH 8,0                                                                                                                                                                           | 75 |
| <b>Şekil 3.28.</b> Kolon sıcaklığı optimizasyonu                                                                                                                                                                                                        | 76 |
| <b>Şekil 3.29.</b> Akış hızının belirlenmesi.                                                                                                                                                                                                           | 77 |
| <b>Şekil 3.30.</b> Belirlenen optimum kromatografik koşullarda <i>cis</i> -SFP, <i>trans</i> -SFP ve PAR'ın kromatogramı.                                                                                                                               | 79 |
| <b>Şekil 3.31.</b> SFP standart madde için optimize koşullarda kalibrasyon kromatogramı.                                                                                                                                                                | 80 |
| <b>Şekil 3.32.</b> Optimize koşullarda standart etken madde kalibrasyon grafikleri.                                                                                                                                                                     | 80 |
| <b>Şekil 3.33.</b> Optimize edilen koşullarda yapılan, serum kalibrasyon kromatogramı                                                                                                                                                                   | 81 |

|                                                                                                                                           |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 3.34.</b> Optimize koşullarda serum örneğinden SFP tayini kalibrasyon grafikleri.                                                | 81 |
| <b>Şekil 3.35.</b> Optimize koşullarla elde edilen, idrardaki kalibrasyon kromatogramları                                                 | 82 |
| <b>Şekil 3.36.</b> Optimize koşullarda idrar örneğinden SFP tayini kalibrasyon grafikleri                                                 | 82 |
| <b>Şekil 3.37.</b> Optimize kromatografik koşullardaki kromatogramın seçiciliği.                                                          | 84 |
| <b>Şekil 3.38.</b> Geri kazanım çalışmalarına ait kromatogramlar.                                                                         | 86 |
| <b>Şekil 3.39.</b> Asidik bozunma koşullarında SFP' nin standart etken madde ve tablet formunun kromatogramları.                          | 89 |
| <b>Şekil 3.40.</b> SFP' nin standart etken madde ve tablet formunun bazık ortamda bozunma çalışması kromatogramları.                      | 91 |
| <b>Şekil 3.41.</b> SFP' nin etken madde ve ticari tablet formunun oksidatif koşullarda bozunma kromatogramları.                           | 93 |
| <b>Şekil 3.42.</b> SFP' nin toz etken madde ve ticari tablet formunun yüksek sıcaklık ve nem altında elde edilen bozunma kromatogramları. | 95 |
| <b>Şekil 3.43.</b> SFP' nin toz etken madde ve ticari tablet formunun fotolitik bozunma şartlarında elde edilen kromatogramları.          | 97 |

## ÇİZELGELER

|                                                                                                                                                                                 |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Çizelge 1.1.</b> SFP için literatürlerdeki geliştirilmiş analiz yöntemlerinin karşılaştırması                                                                                | 9  |
| <b>Çizelge 2.1.</b> Kullanılan standart madde                                                                                                                                   | 12 |
| <b>Çizelge 2.2.</b> Tayinlerde üzerinde çalışılan ilaç dozaj formu ve birim doz içeriği                                                                                         | 12 |
| <b>Çizelge 2.3.</b> Voltametrik analizde çözeltilerin hazırlanmasında kullanılan kimyasal maddeler                                                                              | 13 |
| <b>Çizelge 2.4.</b> Kromatografik analizde çözeltilerin hazırlanmasında kullanılan kimyasal maddeler                                                                            | 13 |
| <b>Çizelge 2.5.</b> Kromatografik Yöntemlerin Kategorilendirilmesi (Erkmen, 2017)                                                                                               | 28 |
| <b>Çizelge 2.6.</b> SUT parametreleri (Gümüştas, 2016)                                                                                                                          | 34 |
| <b>Çizelge 3.1.</b> $1 \times 10^{-4}$ M SFP' nin DPV ile asit, asetat, fosfat ve BR tamponlarında farklı pH'larda okunan akım ( $I_p$ ) değerleri                              | 49 |
| <b>Çizelge 3.2.</b> $1 \times 10^{-4}$ M SFP' nin DPV ile asit, asetat, fosfat ve BR tamponlarında farklı pH'larda okunan potansiyel ( $E_p$ ) değerleri                        | 50 |
| <b>Çizelge 3.3.</b> $1 \times 10^{-4}$ M SFP' nin pH 3,0 BRT'de $500-10 \text{ mV s}^{-1}$ tarama hızları arasındaki akım ve potansiyel değerleri                               | 52 |
| <b>Çizelge 3.4.</b> DPV ile optimize edilen değerlerde, değişen derişimlerde üçer ölçümle elde edilen ortalama akım ( $I_{p_{ort}}$ ) ve potansiyel ( $E_{p_{ort}}$ ) değerleri | 56 |
| <b>Çizelge 3.5.</b> SFP' nin pH 3,0 BRT içerisinde DPV ile elde edilen akım-derişim eğrisine ait doğrusallık analizi verileri ve validasyon parametreleri.                      | 57 |
| <b>Çizelge 3.6.</b> Ultracef® 500 mg tabletlerin pH 3,0 BRT'de DPV yöntemiyle tayin verileri                                                                                    | 59 |
| <b>Çizelge 3.7.</b> pH 3,0 BRT içerisinde SFP içeren Ultracef® tabletler için geri kazanım sonuçları                                                                            | 60 |
| <b>Çizelge 3.8.</b> SFP' nin idrardan elde edilen kalibrasyon eğrisine ait regresyon analizi sonuçları ve gerekli validasyon parametreleri.                                     | 62 |
| <b>Çizelge 3.9.</b> SFP' nin idrar numunesinden geri kazanım verileri                                                                                                           | 62 |
| <b>Çizelge 3.10.</b> SUT' a göre tampon çözeltilerin karşılaştırılması.                                                                                                         | 69 |
| <b>Çizelge 3.11.</b> SUT' a göre tampon çözeltinin derişiminin karşılaştırılması.                                                                                               | 70 |

|                                                                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Çizelge 3.12.</b> SUT' a göre organik çözücülerin karşılaştırması                                                 | 71 |
| <b>Çizelge 3.13.</b> SUT' a göre mobil faz oranının karşılaştırılması                                                | 72 |
| <b>Çizelge 3.14.</b> Tampon çözeltinin pH'ının SUT' a göre karşılaştırması                                           | 75 |
| <b>Çizelge 3.15.</b> SUT' a göre kolon sıcaklığının karşılaştırılması                                                | 76 |
| <b>Çizelge 3.16.</b> Sistem uygunluk testlerine göre akış hızının karşılaştırılması.                                 | 78 |
| <b>Çizelge 3.17.</b> Belirlenen kromatografik çalışma koşulları.                                                     | 78 |
| <b>Çizelge 3.18.</b> Optimum kromatografik koşullardaki sistem uygunluk parametreleri                                | 79 |
| <b>Çizelge 3.19.</b> <i>cis</i> -SFP ve <i>trans</i> -SFP için kalibrasyon verilerinin istatistiksel değerlendirmesi | 83 |
| <b>Çizelge 3.20.</b> Kasıtlı değişiklikler altında yöntemin sağlamlığını kontrol etme çalışmasının sonuçları.        | 84 |
| <b>Çizelge 3.21.</b> Ticari tablet formu, serum ve idrar numunelerinden analizleri için geri kazanım sonuçları       | 87 |
| <b>Çizelge 3.22.</b> Asidik ortamda bozunma çalışması sonuçları.                                                     | 90 |
| <b>Çizelge 3.23.</b> Alkali ortamda bozunma çalışması sonuçları                                                      | 92 |
| <b>Çizelge 3.24.</b> SFP' nin ticari tablet ve standart etken madde şeklinin oksidatif koşullarda bozunma yüzdeleri  | 93 |
| <b>Çizelge 3.25.</b> 80 °C etüv ve 80 °C sıcak su banyosunda bekletme çalışmasına ait bozunma sonuçları              | 96 |
| <b>Çizelge 3.26.</b> UV ışıkla bozunma çalışması sonuçları.                                                          | 97 |

# 1. GİRİŞ

Antibiyotikleri uygun doz ve sürede kullanmak gelişen antibiyotik direnci sebebiyle gün geçtikçe daha büyük önem arz etmektedir. İlaç dozu artırıldığında etkisi de artar ama maksimum seviyeye ulaştıktan sonra doz daha da artırılsa farmakodinamik etkinin yerini dönüşümsüz toksik etki alır. SFP tayini için geliştirilecek analiz yöntemleriyle biyolojik sıvılardaki miktarını belirlemek, SFP' nin toksikokinetiğini belirlemeyi sağlayarak, organ hasarını minimuma indirmek konusunda yardımcı olabilir. SFP' nin olası toksik etkilerini tespit amacıyla farmakokinetik parametrelerin belirlenmesinde kullanılmak üzere biyolojik numunelerden analizi üzerine çalışılması adli ve klinik eczacılıkta yol gösterici olacaktır. Bu tez çalışmasında 2. kuşak sefalosporin grubu antibiyotik olan sefprozilin tayini için (SFP) hem elektrokimyasal hem de kromatografik analiz yöntemi geliştirilmesi ve valide edilmesi hedeflenmiştir. Ayrıca kromatografik analiz stabilite göstergeli yapılmıştır. SFP'nin hızlandırılmış bozunma çalışmalarıyla stabilitesi ve yöntemin seçiciliği incelenmiştir. SFP'nin voltametrik analizi üzerine yapılan ilk çalışma olması ve kromatografik analizin yüksek hassasiyetle ve hızlı yapılabilecek şekilde geliştirilmiş olması bu tezin özgün yönlerini ve literatüre katkılarını göstermektedir.

## 1.1. Sefalosporinler

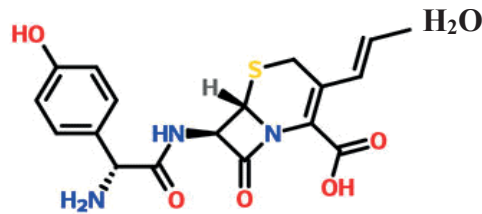
Sefalosporinler 1960'lerde kullanıma sunulmalarından bu yana, düşük toksisite oranları, nispeten geniş aktivite spektrumu ve uygulama kolaylığı sebebiyle yaygın olarak kullanılan  $\beta$ -laktam antibiyotiklerdir. *Cephalosporium acrimonium* mantarından elde edildiği için bu ismi almıştır. Penisilin ve sefalosporin, kimyasal yapıları bakımından farklılık gösteren  $\beta$ -laktam antibiyotiklerdir. Sefalosporin, heterosiklik bir  $\beta$ -laktam-dihidrotiazin, penisilin ise heterosiklik  $\beta$ -laktam ve tiyazolidin halkalarına sahiptir. Sefalosporinler genellikle alerjik reaksiyon veya direnç durumunda penisiline alternatif olarak reçete edilirler. Etki mekanizmaları diğer

$\beta$ -laktam antibiyotiklerle aynıdır, bakteri hücre duvarının sentezinde rol alan proteinleri inhibe ederek lizise sebep olurlar. Sefalosporinler bu şekilde bakterisidal etki gösterirler (Feier ve ark., 2017; Marshall ve ark., 1999).

## 1.2. Sefalosporinlerin Sınıflandırılması

Sefalosporinler, gram negatif bakterilere karşı aktivite spektrumlarına göre sınıflandırılır. Genel olarak, 1. nesil sefalosporinlerde yüksek gram pozitif aktivite vardır, sonraki nesil sefalosporinlere doğru gidildikçe daha düşük gram pozitif aktivite ama bununla birlikte daha yüksek gram negatif aktivite söz konusudur. Sefalosporinlerden 1. nesil olanlar, dar bir gram negatif spektruma sahiptir. Daha çok gram pozitif bakterilere, özellikle *Staphylococcus aureus*'a karşı etkilidir. Sefoksitin, sefmetazol gibi 2. nesil sefalosporinler, anaeroblara karşı en iyi aktiviteye sahiptir. SFP ise 2. nesil bir sefalosporindir, 3. nesil bileşikler, gram negatif bakterilere karşı yüksek aktiviteye sahiptir. Kan beyin bariyerini daha kolay geçen 4. nesil sefalosporinler ve daha dirençli bakterilere karşı geliştirilmiş 5. nesil sefalosporinler de bulunmaktadır (Arsalan ve ark., 2017; Molavi, 1991).

### 1.2.1. Sefprozil



Şekil 1.1. SFP' nin kimyasal yapısı

-Kimyasal İsmi:

((6R,7R)-7-[(R)-2-amino-2-(p-hidroksifenil) asetamido]-8-okso-3-[(E) -prop-1-enil]-5-tiya-1-azabisiklo [4.2.0] okt-2-en-2-karboksilik asit)

-Kapalı Formülü:  $C_{18}H_{19}N_3O_5S \cdot H_2O$

-Molekül Ağırlığı: 407,4 g.mol<sup>-1</sup>

-Kimyasal yapısı Şekil 1.1' de görülen, beyaz ila sarı renkli kristal bir tozdur. Suda ve metanolde az çözünür, alkolde kendiliğinden çözünmez.

SFP, geniş spektrumlu, antibakteriyel etkinliğe sahip, 2. nesil bir sefalosporindir. Biyolojik olarak aktif *cis* ve *trans* diyastereoizomerin, 90:10 oranında karışımından oluşur. Diyastereoizomerler, ayna görüntüleri ile ilişkili olmayan stereoizomerler olarak tanımlanır. İlaç etkinliği açısından, SFP' nin bu iki izomeri, gram-pozitif organizmalara karşı benzer antibakteriyel aktivite gösterir. Ancak gram negatif organizmalara karşı farklı antibakteriyel aktiviteleri vardır. Gram negatif organizmalar için *cis*-SFP' nin *trans*-SFP' den en az altı kat daha etkili olduğu bilinmektedir. İleriye dönük yan etkilerden kaçınmak ve daha iyi bir yararlanım için farmakokinetik parametrelerin her SFP izomeri için ayrı ayrı hesaplanmasının gerekmesi nedeniyle iki izomerin de aynı anda ayrı ayrı tespitini yapabilen tekniklere ihtiyaç vardır (Brampton, 2019; Jeong ve ark., 2020).

### 1.2.2. Sefprozilin Etki Alanı

SFP, bakteri hücre duvarının iç zarında bulunan penisilin bağlayıcı proteinlere bağlanır ve inaktive eder. Penisilin bağlayıcı proteinler, bakteri hücre duvarının yapımının son aşamalarında rol oynayan enzimlerdir. Penisilin bağlayıcı proteinlerin inaktivasyonu, transpeptidaz enzimlerinin inhibisyonu ile sonuçlanır, böylece bakteri hücre duvarı sağlamlığı için gerekli peptidoglikan zincirlerinin sentezine engel olur. Bu, bakteri hücre duvarının zayıflamasına neden olur ve hücre lizisine neden olur. Özellikle gram-pozitif organizmalar olan *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* ve *Streptococcus agalactiae*'ye ve yalnızca metisiline duyarlı olan *Staphylococcus aureus* suşlarına karşı etkilidir. SFP ayrıca *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus influenzae*, birçok *Enterobacteriaceae*, *Moraxella catarrhalis*, ve belirli anaerobik organizmalara karşı orta derecede etkilidir ve bazı  $\beta$ -laktamazların hidrolizine karşı dayanıklıdır. Farenjit, bademcik iltihabı, komplike olmayan

bakteriyel sinüzit, deri enfeksiyonları, komplike olmayan idrar yolu enfeksiyonları ve orta kulak iltihabında endikedir (Jeong ve ark., 2020; Wiseman ve Benfield, 1993).

### 1.2.3. Sefprozilin Farmakokinetik Özellikleri

- Emilim: SFP oral alındığında yaklaşık %95 oranında emilmektedir. Yemeklerle veya antiasitle alımı ilacın biyoyararlanımı üzerinde önemli ölçüde değişiklik yapmamaktadır.
- Dağılım: İlaç derişimi kanda 2-20 µg/mL arasındayken plazma proteinlerine %36 oranında bağlanma göstermektedir. Ortalama plazma yarılanma ömrü 1,3 saat olmakla beraber dağılım hacmi 0,23 L/kg' dır.
- Metabolizasyon: Büyük ölçüde metabolize olmamaktadır.
- Eliminasyon: Tüm vücut klerens hızı 3 mL/dk/kg, böbrek klerens hızı 2,3 mL/dk/kg'dır. Uygulanan dozun yaklaşık %60 kadarı idrar ile atılmaktadır.

Karaciğer yetmezliği durumundan etkilenmemekle beraber böbrek yetmezliği olan hastalarda SFP eliminasyonu önemli ölçüde azaldığından, kreatinin klerensi <30 mL/dk olan kişilerde dozun %50 oranında azaltılması önerilir. (Barriere, 1992; Üstüneş, 2022).

### 1.2.4. Sefprozilin Pozolojisi ve Uygulama Şekli

Yetişkinlerde ve 12 yaşından büyük çocuklarda farenjitte, tonsilitte, deri enfeksiyonlarında ve idrar yolu enfeksiyonlarında 24 saatte bir defa 500 mg, sinüzitte ve alt solunum yolu enfeksiyonlarında sabah akşam olmak üzere günde iki kere 500 mg uygulanır. *Streptococcus pyogenes*' e bağlı gelişen hastalıklarda ilaç tedavisi yarıda bırakılmamalı, SFP ile tedaviye en az 10 gün boyunca devam edilmelidir. Çocuklarda (6 ay-12 yaş) cilt enfeksiyonlarında günde bir defa 20 mg/kg, farenjit, tonsilit ve sinüzitte 12 saatte bir 7,5 mg/kg, otitis mediada 12 saatte bir 15 mg/kg, uygulanır. Beta-hemolitik streptokok enfeksiyonlarında, ilaç tedavisi yarıda

bırakılmamalı, 10 gün boyunca devam edilmelidir (Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu, 2022).

### 1.3. Sefprozil ile Yapılmış Literatürdeki Analiz Çalışmaları

Bu tez çalışmasında SFP' nin analizi için enstrümantal analiz yöntemlerinden kromatografik ve elektrokimyasal yöntemlerin geliştirilmesine odaklanılmıştır. SFP' nin literatürlerde elektrokimyasal yöntemlerle yapılmış herhangi bir analizi bulunmamaktadır. Elektrokimyasal tekniklerin kromatografî, spektrofotometri vb. diğerlerine göre temel avantajı, daha uygun maliyetle ekipman gerektirmesi, daha az çözücü kullanımı, ön ayırıştırma gerektirmemesi, daha hızlı olması ve bazı durumlarda daha büyük bir hassasiyet göstermesidir. Bu tez çalışması kapsamında SFP' nin tayini için üç elektrotlu hücre sistemiyle DPV ve DV metodları kullanılarak voltametrik analiz yöntemi geliştirilmiştir. Daha önce voltametrik yöntemlerle analizi üzerine çalışılmadığından geliştirilen voltametrik analiz yöntemi SFP' nin hızlı, kolay ve hassas tayini açısından özgün ve öncü bir çalışmadır. Bu geliştirilen yöntem SFP' nin farmasötik dozaj formu ve idrar örnekleri üzerinde başarıyla uygulanmıştır.

Literatürde, SFP veya *cis*-SFP ve *trans*-SFP' nin dozaj formları ve biyolojik sıvılardan tayini için spektrofotometrik yöntemler (Gadkariem ve ark., 2009; Jadhay ve ark., 2013), YPSK (Can, 2011; Park ve ark., 2004; He ve ark., 2018), sıvı kromatografisi- kütle spektrometrisi (LC-MS/MS) (Liu ve ark., 2016) ve yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi (YPTK) (Gawande ve Bothara, 2014; Jagapathi ve Seshagiri, 2008) yöntemleri geliştirilmiştir.

Bu tez çalışmasında, iç standart (IS) olarak parasetamol (PAR) kullanılarak ticari tablet, serum ve idrar örneklerinden SFP izomerlerinin analizi için basit, seçici ve güvenilir bir ultraviyole ışık (UV) dedektörlü YPSK yöntemi geliştirilmiştir. Geliştirilen kromatografik yöntemle daha kısa sürede ve daha yüksek hassasiyetle SFP' nin *cis* ve *trans* formlarının yüksek duyarlılıkla analiz edilebilmesi bu çalışmanın literatüre katkısını ortaya koymaktadır.

Liu ve ark. (2016) LC-MS/MS yöntemiyle insan plazmasındaki SFP diyastereoizomerlerinin belirlenmesi için bir yöntem geliştirmiştir. SFP diyastereomerlerinin ayrımı için IS olarak sefaleksinin kullanıldığı bu çalışmada, tayin alt sınırı (TAS) ve yakalama sınırı (YS) bu tezde elde edilen sonuçlardan iyi olmamakla birlikte analiz süresi hemen hemen aynıdır. Liu ve ark.'nın çalışması SFP formülasyonlarının biyoeşdeğerliğinin, gelecekteki çalışmalarda analit olarak yalnızca *cis*-SFP kullanılarak değerlendirilebileceğini önermektedir.

Park ve ark. (2004) yaptığı YPSK ile analiz çalışmasında bir C8 kolonu kullanmış olup mobil faz, asetonitril:glasiyel asetik asit:distile sudan (5,5:1,75:92,75 h/h) oluşmaktadır. Ters faz kromatografi yöntemiyle ayırım sağlanmış olan bu çalışmada toplam analiz süresi 20 dk'dır. Analiz süresi uzunluğu ve kompleks mobil faz bileşimi bu yöntemin dezavantajlarıdır.

He ve ark. (2018) yaptığı çalışmada YPSK-MS/MS sistemi ile *cis*- SFP ve *trans*-SFP, serumdan %0,5 formik asit ve asetonitrilden oluşan bir gradyan programı kullanılarak ters faz sıvı kromatografisi yöntemiyle 4 dk içinde bir C18 kolonunda ayrılmıştır. Bu tez çalışmasının bu çalışmaya üstünlüğü ise daha geniş doğrusallık aralığı ve hassasiyeti olarak ifade edilebilir (Çizelge 1.1).

Can'ın (2011) yaptığı çalışmada tabletlerden SFP' nin belirlenmesi için bir ters fazlı YPSK yöntemi anlatılmıştır. SFP diastereoizomerlerinin ve kafeinin (IS) ayrılması, farklı yüzey kimyalarına sahip iki sabit fazda aynı analitik ve enstrümantal koşullar uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan kolonlar monolitik silika Merck Chromolith Performance RP-18 ve geleneksel C18 silika Phenomenex Synergi Hydro RP kolonlarıdır. Toplamda 10 µL numune sisteme enjekte edilmiş ve 1,0 mL/dk akış hızında su:asetonitril (90:10, h/h) kullanılarak ayrıştırılmıştır. Analizler, yüksek özgüllüğe sahip diyot dizi dedektörü kullanılarak 200 nm'de tespit edilmiştir. SFP diyastereoizomerleri ve kafein, C18 kolonu kullanılarak 13 dk içinde analiz edilirken, monolitik kolon için 5 dk'dan daha az süre yeterli olmuştur.

Jagapathi ve Seshagiri'nin (2008) yaptığı YPİTK çalışmasında sabit faz olarak, silika jel G 60F254 (20 cm x 10 cm) ile önceden kaplanmış alüminyum plakalar, hareketli faz olarak, 4:4.4:3.2:3:0,8 (h/h) oranında kloroform: metanol: toluen: dietil amin: su karışımı kullanılarak SFP' nin analizi sağlanmış ve bu yöntem tablet formunda da uygulanmıştır. Analizde SFP, sabit faz olarak görev yapan 20x10 cm boyutlarındaki İTK plakası üzerinde mobil fazın etkisiyle yükselmiştir. Daha sonrasında döteryum lambasıyla 286 nm'de görüntülenmiştir. Karışık mobil faz bileşimi ve SFP' nin izomerlerini analiz etmemesi bu yöntemin dezavantajlarıdır.

SFP monohidratın bozunma ürünlerinin tanımlanması için yapılan bir YPİTK çalışmasında Gawande ve Bothara (2014), ICH kılavuzu Q1A (R2) tarafından önerilen çeşitli bozunma koşullarına göre SFP monohidratın stabilitesini belirlemiştir. Hidrolitik, oksidatif, fotolitik ve termal stres koşulları için hızlandırılmış bozunma çalışmaları yapılmıştır. İlaç, tüm stres koşulları altında bozunmaya duyarlı bulunmuştur. Sabit faz olarak silika jel 60 F254 ile önceden kaplanmış alüminyum plakalar, mobil faz olarak etil asetat:aseton:metanol:su:glasiyel asetik asit (7,5:2.5:2.5:1.5:0,5 h/h) kullanılmıştır. Dansitometrik analiz 280 nm'de gerçekleştirilmiştir. Doğrusal regresyon analizi verileri, SFP monohidrat için 200–5000 ng derişim aralığında iyi bir doğrusal ilişki göstermiştir. Yöntem, tablet dozaj formundaki ilacın analizi için başarıyla uygulanmıştır. Çeşitli stres koşulları altında oluşan üç bozunma ürünü, YPİTK ile izole edilmiş ve kütle spektroskopisi çalışmalarıyla karakterize edilmiştir.

Literatür taramasında YPİTK yöntemiyle SFP' nin izomerlerinin tespit edilmemiş olup bu yöntemin genellikle SFP' nin bozunma ürünlerini tespit etmek amacıyla kullanıldığı görülmüştür (Gawande ve Bothara, 2014; Jagapathi ve Seshagiri, 2008).

Gadkariem ve ark. (2009) SFP' nin saf etken madde ve tablet formundan tayini için iki valide edilmiş, basit spektrofotometrik yöntem geliştirmiştir. Birinci yöntem SFP' nin askorbik asitle reaksiyona girerek sarı renkli bir ürün oluşturup 408 nm'de maksimum absorbands göstermesine dayanmaktadır. Yöntem 2, SFP' nin askorbik

asitle reaksiyonu için optimum koşulların incelenmesi sırasında, SFP çözeltisine 0.1 N NaOH eklendiğinde soluk bir renk oluştuğunun fark edilmesiyle gelişmiştir. Oda sıcaklığında zamanla rengin yoğunluğunun arttığı gözlemlenmiştir ki bu SFP' nin NaOH ile bozunmasından kaynaklanmaktadır. Bu gözlem, yazarları farklı konsantrasyonlarda (0,2 N, 0,5 N ve 1,0 N) SFP' nin NaOH ile reaksiyonunu incelemeye ve reaksiyonun doğrudan kantitatif bir yöntem olarak olası kullanımını araştırmaya yöneltmiştir. SFP bu yöntemde 486 nm'de maksimum absorbans göstermiştir. Gadkariem ve ark. (2009) geliştirdiği bu yöntemde SFP' nin analizi yapılmış ve bozunma davranışını incelemek için ICH Q1 AR2 kılavuzlarına göre hızlandırılmış bozunma çalışmaları değerlendirilmiştir.

Jadhav ve ark. (2013) yaptığı çalışmada SFP' nin saf etken madde ve farmasötik dozaj formunun UV spektrofotometrik yöntemle tayini sağlanmış olup SFP' nin stres koşullarında bozunma davranışı da incelenmiştir. SFP 280 nm'de absorbans göstermiştir.

Bu tez kapsamında YPSK sistemi ile SFP' nin izomerlerinin standart etken maddeden, idrardan ve serumdan analizi üzerine çalışmalar yapılmıştır. Farmasötik dozaj formuna da başarıyla uygulanması ilaç numuneleri gibi içinde yardımcı maddeler ve dolgu malzemeleri bulunan ortamlarda da yöntemin uygulanabilirliğini göstermiştir (Çizelge 1.1).

**Çizelge 1.1.** SFP için literatürlerdeki geliştirilmiş analiz yöntemlerinin karşılaştırması

| Analit           | Yöntem                       | İç Standart               | Doğrusallık Aralığı             | YS/TAS                                                          | Tatbik Alanı | t <sub>R</sub> (dk) | Kaynak                                |
|------------------|------------------------------|---------------------------|---------------------------------|-----------------------------------------------------------------|--------------|---------------------|---------------------------------------|
| <b>SFP</b>       | Spektrofotometri             | -                         | 2-10 µg mL <sup>-1</sup>        | YS: 1.00 µg/mL <sup>-1</sup><br>TAS: 1.92 µg/mL <sup>-1</sup>   | Tablet       | -                   | Jadhav Kiran ve ark. (2013)           |
| <b>SFP</b>       | Spektrofotometri (1. Yöntem) | -                         | 5-25 µg mL <sup>-1</sup>        | YS: 0,96 µg mL <sup>-1</sup><br>TAS: 3.21 µg mL <sup>-1</sup>   | Tablet       | -                   | Gadkariem Elrasheed A. ve ark. (2009) |
|                  | Spektrofotometri (2. Yöntem) |                           |                                 | YS: 0,93 µg mL <sup>-1</sup><br>TAS: 3,089 µg mL <sup>-1</sup>  |              |                     |                                       |
| <b>SFP</b>       | YPİTK                        | -                         | 400-2000 ng spot <sup>-1</sup>  | YS: 133 ng spot <sup>-1</sup><br>TAS: 400 ng spot <sup>-1</sup> | Tablet       | -                   | Jagapathi ve Seshagiri (2008)         |
| <b>SFP</b>       | YPİTK                        | -                         | 200-5000 ng spot <sup>-1</sup>  | YS: 52 ng spot <sup>-1</sup><br>TAS: 75 ng spot <sup>-1</sup>   | Tablet       | -                   | Gawande ve Bothara (2014)             |
| <b>cis-SFP</b>   | YPSK-UV                      | Sefaloridin (tr: 16,5 dk) | 0,1-25 µg mL <sup>-1</sup>      | TAS: 0,1 µg mL <sup>-1</sup>                                    | Serum        | 8,5                 | Tae-Hwan Park ve ark. (2004)          |
| <b>trans-SFP</b> |                              |                           | 0,02-2,5 µg mL <sup>-1</sup>    | TAS: 0,02 µg mL <sup>-1</sup>                                   |              | 11,5                |                                       |
| <b>cis-SFP</b>   | YPSK-MS/MS                   | Sefaleksine (tr: 3,85 dk) | 0,125-16,0 µg mL <sup>-1</sup>  | TAS: 0,125 µg mL <sup>-1</sup>                                  | Serum        | 2,98                | Min Liu ve ark. (2016)                |
| <b>trans-SFP</b> |                              |                           | 0,0403-1,72 µg mL <sup>-1</sup> | TAS: 0,0403 µg mL <sup>-1</sup>                                 |              | 4,22                |                                       |
| <b>cis-SFP</b>   | YPSK-UV                      | Kafein (tr: 4,21 dk)      | 0,1-2,5 µg mL <sup>-1</sup>     | YS: 0,03 µg mL <sup>-1</sup>                                    | Tablet       | 2,21                | Nafiz O. Can (2011)                   |
| <b>trans-SFP</b> |                              |                           |                                 | TAS: 0,092 µg mL <sup>-1</sup>                                  |              | 2,85                |                                       |
| <b>cis-SFP</b>   |                              | Kafein (tr: 12,2 dk)      |                                 | YS: 0,032 µg mL <sup>-1</sup>                                   |              | 4,12                |                                       |

**Çizelge 1.1. Devam.** SFP için literatürlerdeki geliştirilmiş analiz yöntemlerinin karşılaştırması

| Analit            | Yöntem     | İç Standart                       | Doğrusallık Aralığı            | YS/TAS                                                            | Tatbik Alanı | t <sub>R</sub> (dk) | Kaynak                    |
|-------------------|------------|-----------------------------------|--------------------------------|-------------------------------------------------------------------|--------------|---------------------|---------------------------|
| <i>trans</i> -SFP | YPSK-UV    | Kafein (t <sub>R</sub> : 12,2 dk) | 0,1–2,5 µg mL <sup>-1</sup>    | TAS: 0,096 µg mL <sup>-1</sup>                                    |              | 6,21                | Nafiz O. Can (2011)       |
| <i>cis</i> -SFP   | YPSK-MS/MS | İzotop SFP (SFP-D4)               | 0,025–15 µg mL <sup>-1</sup>   | TAS: 0,025 µg mL <sup>-1</sup>                                    | Serum        | 2,07                | Guodong He ve ark. (2018) |
| <i>trans</i> -SFP |            |                                   | 0,014–1,67 µg mL <sup>-1</sup> | TAS: 0,014 µg mL <sup>-1</sup>                                    |              | 2,36                |                           |
| <i>cis</i> -SFP   | YPSK-UV    | PAR (t <sub>R</sub> : 3,55 dk)    | 0,009-90 µg mL <sup>-1</sup>   | YS: 0,0025 µg mL <sup>-1</sup><br>TAS: 0,0085 µg mL <sup>-1</sup> | Tablet       | 2,42                | Tez Çalışması (2022)      |
|                   |            |                                   | 0,009-90 µg mL <sup>-1</sup>   | YS: 0,0026 µg mL <sup>-1</sup><br>TAS: 0,0086 µg mL <sup>-1</sup> | Serum        |                     |                           |
|                   |            |                                   | 0,09-90 µg mL <sup>-1</sup>    | YS: 0,026 µg mL <sup>-1</sup><br>TAS: 0,087 µg mL <sup>-1</sup>   | İdrar        |                     |                           |
| <i>trans</i> -SFP |            |                                   | 0,001-10 µg mL <sup>-1</sup>   | YS: 0,0003 µg mL <sup>-1</sup><br>TAS: 0,001 µg mL <sup>-1</sup>  | Tablet       | 2,84                |                           |
|                   |            |                                   | 0,001-10 µg mL <sup>-1</sup>   | YS: 0,0003 µg mL <sup>-1</sup><br>TAS: 0,001 µg mL <sup>-1</sup>  | Serum        |                     |                           |
|                   |            |                                   | 0,01-10 µg mL <sup>-1</sup>    | YS: 0,003µg mL <sup>-1</sup><br>TAS: 0,01 µg mL <sup>-1</sup>     | İdrar        |                     |                           |

Bu tez çalışmasında SFP' nin tayini için hem elektrokimyasal hem de kromatografik analiz yöntemleri geliştirilmesi amaçlanmıştır. Hem *cis*-SFP hem de *trans*-SFP antimikrobiyal aktiviteye sahiptir, ancak güçleri oldukça farklıdır. Bu nedenle, farmakokinetik ve biyoeşdeğerlik çalışmaları için her iki izomeri aynı anda belirlemek amacıyla hassas, yüksek ayırım gücünde ve hızlı analiz sağlayan kolonların kullanıldığı, çevre dostu ve ekonomik bir stabilite göstergeli YPSK yöntemi

geliştirilmesi ve bu yöntemin SFP' nin izomerlerini farmasötik dozaj formundan, serum ve idrar örneklerinden analiz etmede kullanılması hedeflenmiştir.

Miktar tayini için kullanılmasının yanı sıra vücuda alındığında nasıl metabolize olabileceği hakkında bilgi edinilmesi için voltametrik olarak SFP' nin analiz yönteminin geliştirilmesi ve valide edilmesi amaçlanmıştır. Bu yöntemle SFP'nin farmasötik dozaj formu ve idrar örneklerinden analizinin yapılması da planlanmıştır. Bu madde üzerinde daha önce yapılmış bir voltametrik tayin çalışmasının bulunmaması tezin özgün tarafıdır.



## 2. GEREÇ ve YÖNTEM

### 2.1. Gereç

#### 2.1.1. Tez Çalışmalarında Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Saflık kontrolü amacıyla deneylerde kullanılan SFP' nin UV-Görünür Bölge (GB) spektrumu alınmıştır. Bu sonuç firmanın analiz sertifikasıyla karşılaştırılarak maddenin bu çalışma için uygun olduğu belirlenmiştir.

Çalışmada kullanılan standart madde (Çizelge 2.1), ilaç dozaj formu (Çizelge 2.2), kimyasallar (Çizelge 2.3, Çizelge 2.4) ve nerden elde edildikleri belirtilmiştir.

**Çizelge 2.1.** Kullanılan standart madde

| Standart Madde Adı | Üretici Firma Adı                            |
|--------------------|----------------------------------------------|
| SFP                | Nobel İlaç Sanayii ve Ticaret Anonim Şirketi |

**Çizelge 2.2.** Tayinlerde üzerinde çalışılan ilaç dozaj formu ve birim doz içeriği

| Madde adı | Müstahzar Adı | Farmasötik Şekli | Birim Doz İçeriği |
|-----------|---------------|------------------|-------------------|
| SFP       | Ultracef      | Tablet           | 500 mg            |

**Çizelge 2.3.** Voltametrik analizde çözeltilerin hazırlanmasında kullanılan kimyasal maddeler

| <b>Kimyasal Maddenin Adı</b> | <b>Üretici Firmanın Adı</b>                                                   |
|------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| Sülfürik asit                | Merck                                                                         |
| <b>Kimyasal Maddenin Adı</b> | <b>Üretici Firmanın Adı</b>                                                   |
| Hidroklorik asit             | Merck                                                                         |
| Sodyum hidroksit             | Sigma-Aldrich                                                                 |
| Asetonitril                  | Sigma-Aldrich                                                                 |
| Metanol                      | Sigma-Aldrich                                                                 |
| Borik asit                   | Pancreac                                                                      |
| Fosforik asit                | Sigma-Aldrich                                                                 |
| Glasiyel asetik asit         | Merck                                                                         |
| Sodyum dihidrojen fosfat     | Sigma-Aldrich                                                                 |
| Sodyum asetat trihidrat      | Sigma-Aldrich                                                                 |
| Alumina                      | BASi                                                                          |
| İdrar numunesi               | Herhangi bir ilaç kullanmamış, sağlıklı gönüllü insanlardan temin edilmiştir. |

**Çizelge 2.4.** Kromatografik analizde çözeltilerin hazırlanmasında kullanılan kimyasal maddeler

| <b>Kimyasal Maddenin Adı</b> | <b>Üretici Firmanın Adı</b>                                                   |
|------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| Seftazidim                   | Sigma-Aldrich                                                                 |
| PAR                          |                                                                               |
| Sefazolin                    |                                                                               |
| Sefaklor                     |                                                                               |
| Asetonitril                  |                                                                               |
| Metanol                      |                                                                               |
| Amonyum asetat               |                                                                               |
| Amonyum format               |                                                                               |
| Sodyum asetat                |                                                                               |
| Sentetik serum               |                                                                               |
| İdrar numunesi               | Herhangi bir ilaç kullanmamış, sağlıklı gönüllü insanlardan temin edilmiştir. |

## **2.1.2. Kullanılan Araç ve Gereçler**

### **2.1.2.1. Voltametrik Analizde Kullanılan Araç ve Gereçler**

SFP etken maddesinin elektrokimyasal davranışlarının incelenerek idrarda ve farmasötik dozaj şekillerinde tayin edilmesi için geliştirilen çalışmalar Autolab PGSTAT204 elektrokimyasal analizörü kullanılarak üç elektrotlu sistem ile gerçekleştirilmiştir.

Voltametrik deneylerde çalışma elektrodu olarak camsi karbon elektrot (CKE) (BASi,  $\phi = 3$  mm), referans elektrot olarak Ag/AgCl (BASi, MF 2052) elektrodu, karşıt elektrot olarak Pt telin (BASi, MF 1032) kullanıldığı üç elektrotlu sistem ile çalışılmıştır (Şekil 2.1).

Çözeltilerin hazırlanması ve karıştırılması için ultrasonik banyo (ISOLAB) ve vorteks karıştırıcı (ISOLAB) kullanılmıştır. İdrar örnekleri ile yapılan analiz çalışmalarında santrifüj cihazı (Nüve NF 200), çözeltilerin pH'ını ölçmek için SevenCompact™ pH/IonS220 (Mettler Toledo, Switzerland) pH metre kullanılmıştır. Sulu çözeltiler Millipore Milli-Q® sistem cihazından alınan distile su ile hazırlanmış olup tartımlar Radwag marka hassas terazi ile yapılmıştır. Sıvı ölçümü ve eklenmesinde Axigen® marka mikro pipetler kullanılmıştır.

### **2.1.2.2. Kromatografik Analizde Kullanılan Araç ve Gereçler**

Millipore Milli-Q® system saf su cihazından alınan distile su (Millipore, Milford, MA, ABD) gerekli çözeltilerin hazırlanmasında ve temizlik için kullanılmıştır. Kromatografik analiz, UV-GB dedektörü, pompa, kolon fırını ve otomatik örnekleyiciden oluşan bir Shimadzu Prominence-i LC-2030C marka YPSK cihazında gerçekleştirilmiştir. Spektrofotometrik deney, çalışma dalga boyunu belirlemek için

sabit yarıık genişliğine (2 nm) sahip 1 cm kuvars hücreler bulunan Agilent Cary 60 UV-GB spektrofotometre ile gerçekleştirilmiştir.

### **2.1.3. Kullanılan Çözeltilerinin Hazırlanması**

#### **2.1.3.1. Voltametrik Analiz İçin Standart Madde Çözeltilerinin Hazırlanması**

pH taraması çalışmaları  $1 \times 10^{-4}$  M SFP ile gerçekleştirilmiştir. Stok SFP çözeltisi 50 mL balon joje içerisinde derişimi  $1 \times 10^{-3}$  M olacak şekilde hazırlanmıştır. Bu amaçla 20,35 mg SFP tartılıp distile suda çözülmüş olup bu çözeltiden mikropipetle 1 mL alınıp istenen tampon çözelti ile 10 mL'ye tamamlanarak  $1 \times 10^{-4}$  M SFP elde edilmiştir.

#### **2.1.3.2. Kromatografik Analiz İçin Standart Madde Çözeltilerinin Hazırlanması**

Derişimi  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  olan stok SFP hazırlayabilmek için  $0,9 \text{ mg mL}^{-1}$  *cis*-SFP ve  $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$  *trans*-SFP distile su ile ve IS olarak  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  PAR distile suyla ayrı ayrı hazırlanmış ve  $+4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır. Vorteksle iyice karıştırıldıktan sonra  $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$  PAR içeren *cis*-SFP ve *trans*-SFP' nin standart çözeltileri, stok çözeltiden distile su ile seyreltilerek hazırlanmıştır.

#### **2.1.3.3. Voltametrik Analiz İçin İdrar Stoğu Hazırlanması**

Tam tartılmış 40,74 mg SFP, 10 mL distile suda çözülerek  $1 \times 10^{-2}$  M SFP çözeltisi elde edilmiştir. İdrar stoğu hazırlamak için 3,6 mL idrar, 5,4 mL asetonitril, 1 mL  $1 \times 10^{-2}$  M SFP çözeltisi santrifüj tüpünde birleştirilerek 15 dk ultrasonik banyoda bekletildikten sonra 15 dk 5000 rpm de santrifüj edilmiştir. İdrar proteinlerinin

ökmesi sağlanmış olur ve üstteki berrak çözeltiden 1 mL alınarak pH 3,0 BRT 10 mL'ye tamamlayana kadar eklenerek derişimi  $1 \times 10^{-4}$  M olan SFP içeren idrar stoğu elde edilmiştir.

0,9 mL idrar, 1,35 mL asetonitril, 0,25 mL çözücü (su) kullanılarak da  $1 \times 10^{-3}$  M destek idrar (kör) stoğu elde edilmiştir. İdrar çözeltileri, gönüllü sağlıklı ve hiçbir ilaç kullanmayan insanlardan alınan idrar örnekleriyle hazırlanmıştır.

#### **2.1.3.4. Kromatografik Analiz İçin Serum ve İdrar Stoğunun Hazırlanması**

Serum numunelerinden *cis*-SFP, *trans*-SFP ve PAR ekstraksiyonu için basit bir tek adımlı sıvı-sıvı ekstraksiyonu yapılmıştır. SFP ve PAR'ın stok çözeltisinin 1,5 mL'si, 3,0 mL seruma eklenmiş ve yaklaşık 10 saniye karıştırılmıştır. Daha sonra saf asetonitril (4,0 mL) eklenip ve 5000 rpm'de oda sıcaklığında 15 dk santrifüj edilmiştir. Ardından süpernatant alınarak, stok solüsyonu elde etmek için 0,45 µm'lik plastik şırınga filtresinden geirilmıştir. Kalibrasyon çözeltileri, bu stok çözeltiden distile suyla bir seri halinde seyreltilerek hazırlanmıştır. Ayrıca etken maddenin idrar numunelerinden analizi için kalibrasyon çözeltileri de benzer şekilde hazırlanmıştır.

#### **2.1.3.5. Sefprozil Tablet özeltisinin Hazırlanması**

Her bir tablet 500 mg SFP içermektedir. Voltametrik analiz için de kromatografik analizler için de 10 adet tablet, havanda homojen bir toz yığını haline getirilecek şekilde ezilip karıştırıldıktan sonra voltametrik analizler için  $1 \times 10^{-3}$  M SFP' ye eşdeğer miktarda tam tartılmıştır (33,66 mg), kromatografik analiz için ise 500 mg SFP' ye eşdeğer bir kısım doğru bir şekilde tartılmış ve ayrı ayrı balon jöjelerde distile su ile 30 mL' ye tamamlanmıştır. İyice çözünmesi için, 15 dk ultrasonik banyoda tutulmuş sonra da 50 mL' ye distile suyla tamamlanıp iyice

karıştırılarak hazırlanmıştır. Stok çözelti hazırlamak için elde edilen bu çözelti, YPSK çalışması için şırınga filtresi (0,45 µm) kullanılarak süzölmüştür.

Hazırlanan  $1 \times 10^{-3}$  M derişimindeki stok SFP çözeltisinden 200 µL alınıp pH 3,0 Britton-Robinson tamponu (BRT) ile tüpte 10 mL hacme tamamlanarak  $2 \times 10^{-5}$  M derişiminde çözelti elde edilmiş ve voltametrik analiz yöntemiyle tablette yapılacak çalışmalar için bu çözelti kullanılmıştır.

#### **2.1.3.6. Voltametrik Analizde Tabletten Geri Kazanım Çalışmaları için Çözeltilerin Hazırlanması**

Geri kazanım çalışmaları için tabletten hazırlanan  $1 \times 10^{-3}$  M stok çözeltiden 200 µL, saf etken maddeden hazırlanan  $1 \times 10^{-3}$  M stok çözeltiden 200 µL alınıp 10 mL'ye pH 3,0 BRT ile tamamlanarak  $4 \times 10^{-5}$  M derişiminde çözelti hazırlanmıştır.

#### **2.1.3.7. Voltametrik Analizde İdrar Numunesinden Geri Kazanım Çalışmaları için Çözeltilerin Hazırlanması**

Geri kazanım çalışmaları için idrardan hazırlanan  $1 \times 10^{-4}$  M stok çözeltiden 800 µL, saf etken maddeden hazırlanan  $1 \times 10^{-4}$  M stok çözeltiden 200 µL alınıp 10 mL'ye pH 3,0 BRT ile tamamlanarak  $1 \times 10^{-5}$  M derişiminde çözelti hazırlanmıştır.

#### **2.1.3.8. Kromatografik Analizde Geri Kazanım Çalışmaları için Çözeltilerin Hazırlanması**

Geri kazanım çalışmaları için önceden analiz edilmiş ve miktarı bilinen numunenin üzerine %150, %100, %50 ve %25 oranlarında standart etken madde eklenmiştir. Nihai miktara  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ 'e ulaşmak için tüm çözeltilere gerekli miktarda

IS eklenmiştir. Bu çalışma SFP' nin farmasötik dozaj formu, serum ve idrar numuneleri için ayrı ayrı yapılmıştır.

#### **2.1.3.9. Voltametrik Analiz İçin Tampon Çözeltilerin Hazırlanması**

*Fosfat tamponu:* pH 6,0 pH 7,0 ve pH 8,0 fosfat tamponlarını elde etmek için 15,601 g mono sodyum fosfat distile su ile çözülerek 500 mL'ye distile su ile tamamlanmış ve istenen pH'larda tamponlar elde edilmiştir.

pH 2,0 ve pH 3,0 fosfat tamponlarını elde etmek için 6,75 mL fosforik asit alınıp distile suda çözülerek 500 mL'ye distile su ile tamamlanmış ve pH metre yardımıyla istenen pH'lara ayarlanmıştır.

*Asetat Tamponu:* 28,6 mL asetik asit distile suda çözülerek 500 mL'ye distile su ile tamamlanmış ve 5 M NaOH çözeltisiyle pH 3,7; 4,7 ve 5,7 değerlerine ayarlanmıştır.

*BRT:* 2,3 mL glasiyel asetik asit, 2,47 g borik asit ve 2,7 mL fosforik asit distile su ile çözüldükten sonra 1 L'ye tamamlanmış ve pH 2,0-10,0 aralığında pH'lara ayarlanarak çalışılmıştır.

*5 M NaOH Çözeltisi:* 20 g NaOH tartılarak distile su ile beherde karıştırılıp yıkanarak balon jojeye alınıp 100 mL'ye tamamlanmıştır. Yukarıda belirtilen tamponları, istenen pH'lara ayarlamada bu çözelti kullanılmıştır.

### **2.1.3.10. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi İçin Hareketli Faz Çözeltilerinin Hazırlanması**

Derişimleri 5 mM'den 40 mM'a artan amonyum asetat çözeltileri, tampon çözelti olarak kullanılmıştır. Saf asetonitril %5-15 oranında olacak şekilde tampon çözeltide denenmiş ve gradiyent olarak sisteme verilmiştir.

### **2.1.3.11. Stabilit  Testleri İçin Numune Hazırlanması**

Bozunma deneyleri için numuneler 1-12 saat stres faktörüne maruz kaldıktan sonra, 50 µg mL<sup>-1</sup> lik derişime distile su ile seyreltilerek hazırlanmış ve ölçülmüştür. Distile su, maruz kalma süresi boyunca SFP ile bir arada tutulmuştur.

## **2.2. Yöntem**

Bu  alışmada SFP' nin analizi için elektroanalitik yöntemlerden dönüşümlü voltametri (DV) ve diferansiyel puls voltametrisi (DPV) teknikleriyle, kromatografik analiz yöntemi olarak ise YPSK-UV sistemi ile analiz yöntemi geliştirilmiştir.

### **2.2.1. Voltametri**

Elektroanalitik yöntemler; etkin maddelerin elektrokimyasal özelliklerinin incelendiği seçici, az miktarda numune ve az miktarda çözücü ile çalışılabilen, çevreci, ekonomik ve kolay yöntemlerdir. Voltametrizde analiz edilmek istenen maddeler destek elektrolit adı verilen tampon çözeltisine eklenerek kalitatif, kantitatif    mler gerçekleştirilir.

Voltametri ve polarografi elektroanalitik yöntemlerin iki temel türüdür. Deneyde kullanılan kullanılan elektrodun katı elektrot olduğu bu yönteme 'voltametri' adı

verilir. Voltametrinde tampon çözelti içerisinde çalışma elektroduna potansiyel uygulanır ve uygulanan potansiyele karşı elektrodun vermiş olduğu akım incelenir. Akım-potansiyel grafiğine ‘*voltamogram*’ denir (Gosser, 1993; Uçar, 2019).

Genellikle ilaç etken maddeleri elektroaktif maddelerdir ve elektrokimyasal yöntemlerle tayini mümkündür, pratikliğinden dolayı da sıklıkla kullanılmaktadır. Bu çalışmada uygulanan yöntem olan voltametri, elektrokimyasal hücredeki akım-potansiyel ilişkileri yoluyla ve kontrollü bir potansiyelde bir elektrodun akım-zaman tepkisi ile çözelti içeriğini incelemek için kullanılır (Kounaves, 1997).

Voltametrik tekniklerin analitik avantajları, hem inorganik hem de organik türler için çok geniş bir doğrusal derişim aralığı ( $10^{-1}$  ila  $10^{-12}$  M) ile mükemmel hassasiyet, çok sayıda çözücü ve elektrolitle çalışma imkanı, analiz için geniş bir sıcaklık aralığı, hızlı analiz süreleri (saniyeler), birkaç analitin eşzamanlı tayini, kinetik ve mekanik parametreleri belirleme yeteneği, bilinmeyen parametrelerin değerlerini makul bir şekilde tahmin etme yeteneği ve küçük akımların ölçülebilmesidir (Kounaves, 1997).

Elektrokimyasal hücrede analiz sırasında maddenin çözültiden elektrot yüzeyine taşınması üç şekilde olur. Bu elektron geçişi yolları, konveksiyon, göç (migrasyon) ve difüzyondur. Göç etme yoluyla elektriksel aktarımda iyonlar bu alanın etkisiyle kendi yüküne ters yükteki elektrotlara doğru çekilirler. Yani anyonlar anoda, katyonlar katoda doğru göç eder. İyonların elektriksel alandaki hareket hızları, çalışılan ortamdaki yönlenme biçimine ve iyon büyüklüğüne bağlıdır (Brett ve Brett, 1993; Bozal, 2009).

Difüzyon, miktar farklılığından kaynaklı olarak gelişir, hücredeki çözültiden elektrot yüzeyine iyon aktarımı ifade eder. Difüzyonla kütle aktarımının hızı, elektrot yüzeyiyle çözelti arasındaki derişim değişikliğinden kaynaklanır ve ilaç etken maddesi ile çözücünün türüne bağlıdır. (Brett ve Brett, 1993; Bozal, 2009).

Konveksiyon, karıştırma veya elektrotun döndürülerek yüzeyinden geçen çözeltinin akışıyla yani mekanik hareketle olan elektron taşınması yöntemidir. Bu yöntemlerden sadece difüzyonla elektron aktarımında akım derişimle doğru orantılı olduğu için voltametrde iyonların elektrot yüzeyine sadece difüzyonla taşınması tercih edilir (Brett ve Brett, 1993; Bozal, 2009).

### 2.2.2. Polarografi

Polarografi voltametrinin ilk bulunan ve kullanılan tipidir. Bu yöntemde kullanılan çalışma elektrodu, cam ince bir borudan akarak büyüyen ve belirli bir büyüklüğe eriştiğinde kopup damlamasıyla analizin yapıldığı bir civa elektrottur. Ölçüm sonucu meydana gelen gerilim-akım grafiğine '*polarogram*' denir. Karşılaştırma elektrodu ve karşıt elektrot voltametrdekiyle aynıdır. Polarografide oluşan her damlada yeni temiz bir metal yüzey oluşmaktadır. Bu da yüksek tekrar edilebilirlikte ve sağlıklı sonuçlar sağlar. Civa elektrodu kolaylıkla imal edilebilir. Bunlar gibi birçok avantajının yanında civa buharının toksik olması, civanın damlatılmasında kullanılan kılcalların tıkanabilmesi, damlama süresinin ayarlanmasının zorluğu gibi dezavantajları da vardır. Polarografik yöntemde civa elektrotları, 22,0 V' a kadar geniş bir katodik potansiyel aralığında kullanılabilme avantajına sahiptir. Bununla birlikte, anodik aralık için civanın kolayca yükseltgenmesi nedeniyle kapasiteleri sınırlıdır. Polarografinin bir başka kısıtlayıcı özelliği de artık akım vermesidir. Yükleme akımı da denilebilen artık akım, çözeltideki analit hariç diğer türlerin elektrokimyasal aktivitesinden kaynaklanan arka plan akımı olarak kabul edilebilir. Artık akım, klasik damlayan civa polarografide en düşük tayin miktarını  $10^{-5}$  M civarında sınırlar. Bundan daha düşük derişimlerde, maddenin analizine imkan tanımaz çünkü difüzyon akımı, artık akımdan daha düşük kalır, ölçülemez (Tunçel ve ark., 1984; Uslu ve Ozkan, 2007)

### 2.2.3. Voltametrinde Kullanılan Elektrotlar

Voltametrik analizlerde çoğunlukla üçlü elektrot sistemi kullanılmaktadır. Bu tez kapsamında kullanılacak olan hücrede de analiti içeren destek elektrolite daldırılmış üç elektrot bulunur (Şekil 2.1). Bunlar; çalışma elektrodu, karşılaştırma elektrodu ve karşıt elektrottur. Çalışma elektrotu ile karşılaştırma (referans) elektrotu arasına gerilim uygulanırken, karşıt elektrot ile çalışma elektrodu arasında meydana gelen akım ölçülür (Brett ve Brett, 1993; Bozal, 2009).

#### 2.2.3.1. Karşılaştırma (Referans) Elektrotları

Potansiyeli, incelenen çözeltide bulunan analitin veya diğer iyonların derişiminden bağımsız olup analiz süresince değişmez sabit kalır. En çok kullanılan referans elektrotlar kalomel elektrot ( $\text{Hg}_2\text{Cl}_2/\text{Hg}$ ) ve gümüş/gümüş klorür ( $\text{Ag}/\text{AgCl}$ ) elektrotlardır (Şekil 2.1.)(Brett ve Brett 1993; Dayton ve ark. 1980; Harris 2005 ve Wang ve Schultze 1996).

#### 2.2.3.2. Çalışma Elektrotları

Voltametrik tekniklerin performansı çalışma elektroduna bağlıdır. Analit, çalışma elektrotunun yüzeyinde yükseltgenir veya indirgenir. Maddeler çalışma elektrodu üzerinde indirgeniyorsa katodik akım, yükseltgeniyorsa anodik akım oluşur. Voltametrinde çalışma elektrodu olarak katı elektrotlar kullanılır. Katı elektrotlar genel olarak teflon veya geliştirilmiş güç ve sertlik sergileyen bir floropolimer olan Kel-F gibi inert maddeden yapılmış bir tüpün içine gömülü altın, platin ya da karbon gibi bir elektrot malzemesinin kısa silindirik bir çubuğundan oluşur. Uygulaması kolay, modifiye edilerek geliştirilebilir, iyi iletkenlikte ve nispeten ucuzdur. Karbon bazlı elektrotlar geniş bir potansiyel aralığında çalışmaya müsaittir. Oluşan artık akımın çok düşük olması nedeniyle de elektroanalitik uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu tezde kullanılan karbon elektrot olan camsı karbon elektrot

(CKE) (Şekil 2.1), kimyasal olarak inert yapıdadır ve gazlara karşı geçirimsizlik göstermek, pratikte gaz sızdırmamak, son derece düşük gözeneklilik sergilemek ve elektriği iletmek gibi avantajlara sahiptir. Kolay monte edilir, parlatılabilir ve tüm yaygın çözücülerle uyumludur. Ayrıca tekrarlanabilir bir performans sergiler. CKE ile aktivasyonu sağlamak ve yüksek kesinlikte sonuçlara ulaşmak için çeşitli ön işlemler yapılmaktadır. Bu işlemlerden biri olan parlatma işlemi bu tez çalışmasında kullanılmıştır. Uygun yapıya sahip olduğundan her çalışma öncesi yüzeyi alümina ile parlatılarak temizlenebilmektedir (Brett ve Brett 1993; Dayton ve ark. 1980; Harris 2005 ve Wang ve Schultze 1996).

### 2.2.3.3. Karşıt Elektrotlar



**Şekil 2.1.** Tez çalışmasında voltametrik analizlerde kullanılan üç elektrotlu hücre sistemi

Elektriğin, çalışma elektroduna aktarılmasını sağlayan elektrotlardır. Çalışma elektrodunda yükseltgenme oluyorsa karşıt elektrotta tam tersi yani indirgenme gerçekleşir. Karşıt elektrot olarak nadiren Au ya da grafit kullanılsa da genellikle Pt elektrot kullanılır (Şekil 2.1). Genellikle üzerinde biriken potansiyel ölçülmez ve böylece çalışma elektrodunun potansiyelini kontrol eder (Brett ve Brett 1993; Çalık, 2017; Dayton ve ark. 1980; Harris 2005 ve Wang ve Schultze 1996).

#### **2.2.4. Camsı Karbon Elektrotun Temizlenmesi**

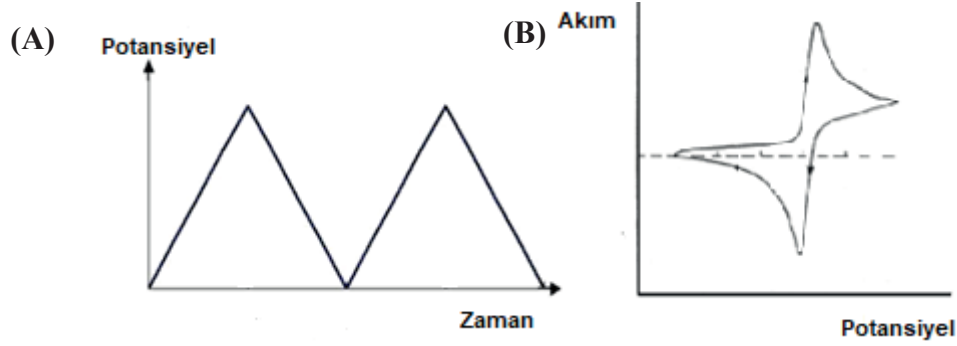
Tekrar edilebilir sonuçlar elde etmek için voltametrik ölçümlere başlamadan önce çalışma elektrodu temizlenmektedir. Bu amaçla yumuşak yüzeyli parlatma pedi yüzeyi distile suyla yıkandıktan sonra ıslak haldeyken üzerine toz halde alumina dökülüp belirli sayıda dairesel hareketlerle CKE temizlenmiştir. Her bir temizlemeden sonra elektrot yüzeyi distile su ile yıkanmıştır. Her ölçüm öncesi bu işlem tekrarlanarak elektrot yüzeyindeki adsorbe olmuş organik ve inorganik kirlilikler temizlenmiş yani ölçümü bir önceki ölçümlerin etkilememesi ve yüksek hassasiyetle gerçekleşmesi sağlanmış olur (Bozal, 2009).

#### **2.2.5. Voltametrik Teknikler**

Yaygın olarak kullanılan voltametrik teknikler, diferansiyel puls voltametrisi, sıyırma voltametrisi, dönüşümlü voltametri ve kare dalga voltametrisidir (Kounaves, 1997)

##### **2.2.5.1. Dönüşümlü Voltametri**

İlaç aktif bileşiklerinin oksidasyon/redüksiyon mekanizması hakkında önemli bilgiler sağlamak için kullanılan dönüşümlü voltametrizde potansiyel önce artırılır ardından ilk değere döndürülür (Şekil 2.2). Burada, uygulanan potansiyele karşı akım ölçülür. Hızlı bir şekilde analiz yapılan bu yöntemin hassasiyetinin düşük olması daha çok kalitatif analizlerde kullanılmasını gerektirir. Dönüşümlü voltametri tekniğinde, farklı tarama hızlarında ölçümler yapılarak elektron transferine eşlik eden kimyasal reaksiyon olayları belirlenebilir. (Kounaves, 1997; Uslu ve Ozkan, 2011).



**Şekil 2.2.** Dönüşümlü voltametrde uygulanan potansiyel-zamanın grafiği ve oluşan voltamogram.

(A): potansiyel-zaman grafiği; (B): elde edilen voltogram

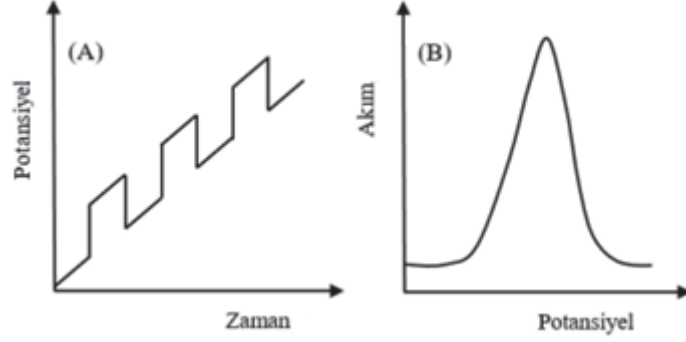
Elektrokimyasal tepkimelerde elektroaktif tür ve çalışma elektrodu arasındaki elektron transferi, çözelti ve elektrot ara yüzeyinde gerçekleşiyorsa difüzyon kontrollü, elektron transferi elektrot yüzeyinde gerçekleşiyorsa adsorpsiyon kontrollü gerçekleşiyor demektir. Kullanılan elektrot yüzeyinde oluşan elektrokimyasal reaksiyon tersinir, yarı tersinir ve tersinmez olarak gruplandırılabilir (Canbaz, 2008).

DV ile gerçekleşen reaksiyon mekanizması anlaşılabilir. Pozitif ya da negatif alandan yalnızca birinde pik varsa tersinmez bir reaksiyon gerçekleşiyor demektir. Her iki alanda da pik varsa, reaksiyon tersinirdir diyebiliriz (Agin ve Atal, 2019; Bozal, 2009 ve Erden, 2009).

#### 2.2.5.2. Diferansiyel Puls Voltametrisi

DPV, voltametrik hücreye zamanla doğrusal olarak artan bir potansiyel verilerek, bu yöntemde akım iki kez ölçülmekte ve belli bir zaman aralığıyla puls uygulanmaktadır (Şekil 2.3). Tam olarak pulsun başladığı anda ve pulsun bitmesine yakın akım değerleri ölçülerek farkı alınır. DPV’de faradayik akımın büyük olması ve faradayik olmayan artık akımın düşük olması diğer voltametrik yöntemlere kıyasla DPV’de daha fazla hassasiyet sağlar. Analitin  $10^{-8}$  M kadar düşük derişimlerde ölçülmesine izin verir. Puls genliği ve potansiyel tarama hızının seçimindeki denge, yöntemin hassasiyeti için önem arz etmektedir. Daha büyük puls genliği seçilmesi

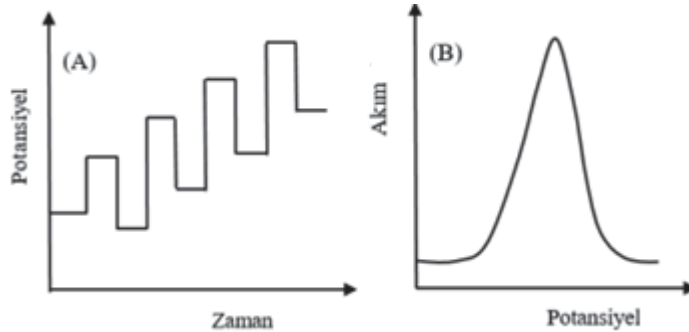
daha geniş piklerle sonuçlanır. Hız olarak  $5 \text{ mV.s}^{-1}$  ve 25-50 mV'lik puls genlikleri yaygın olarak kullanılmakla birlikte analite, çözücülere göre optimize edilir (Bozal, 2009; Erden, 2009; Kounaves, 1997; Uslu ve Ozkan 2011 ve Wang ve Schultze 1996).



**Şekil 2.3.** DPV’de potansiyel-zaman grafiği ve elde edilen voltamogram. (A): potansiyel-zaman grafiği; (B): elde edilen voltamogram

#### 2.2.5.3. Kare Dalga Voltametri

Çalışma elektrodu üzerine simetrik kare dalgalar şeklinde bir potansiyel uygulanır (Şekil 2.4). İleri ve geri yönde uygulanan pulsların bitişlerinde akım değerleri ölçülerek birbirinden çıkartılıp akım tespit edilir. DPV’den farkı daha hızlı ve hassas olmasıdır çünkü bu voltametri yönteminde artık akımın etkisi minimuma indirilmiştir (Agin ve Atal, 2019; Bozal, 2009; Erden, 2009; Kounaves, 1997 ve Uslu ve Ozkan, 2011).



**Şekil 2.4.** KDV’de potansiyel- zaman grafiği ve elde edilen voltamogram. (A): potansiyel-zaman grafiği; (B): elde edilen voltamogram

#### 2.2.5.4. Sıyırma Voltametrisi

Son derece düşük algılama ve belirleme limitleriyle (yaklaşık  $10^{-12}$ – $10^{-10}$  M) farmasötik analizlerde yaygın kullanımı olan bir yöntemdir. Duyarlılığı artırmak amacıyla geliştirilmiş iki aşamalı bir tekniktir. İlk aşamada analitin ufak bir kısmı, elektrot yüzeyinde biriktirilir, sonrasında yüzeyde biriken elektro aktif madde DPV ya da KDV ile ölçülerek akım-potansiyel eğrilerinden yola çıkılmasıyla miktar analizi gerçekleştirilir. (Cheize ve ark., 2012; El-Shahawi ve ark., 2013; Uslu ve Ozkan, 2011 ve Wang ve Schultze 1996).

#### 2.2.2.Kromatografi

Kromatografi temel amacı hedeflenen numune/numunelerin ayırımının yapılması ve miktarının ölçülmesi olan bir yöntemdir. Örneğin kolonda tutulması ve ilerlemesi durumu yani analizi, kolon maddesi ve hareketli faz arasındaki elektron çifti alıcı-verici ya da iyonik etkileşimler ve hidrojen bağı oluşumu gibi olaylarla gerçekleşir (Bidleymeyer, 1993; Hamilton ve Sewell, 1982 ve Hupe ve ark., 1992).

Kromatografinin en çok kullanılan, tercih edilen çeşidi ise bir sıvı kromatografisi olan YPSK'dır. Bu ayırma tekniğinde mobil faz, analiz edilecek numuneleri çözmek için kullanılır. Mobil fazda çözünmüş olan numune kolondan geçerken kolonun içindeki farklı türde parçacıklar içeren sabit kısım tarafından tutulur. (Bidleymeyer, 1993; Hamilton ve Sewell 1982; Hupe ve ark., 1992 ve Tesio ve Robledo, 2021).

##### 2.2.2.1. Kromatografik Yöntemlerin Sınıflandırılması

Kromatografik yöntemlerin sınıflandırılmasında, fazların polarlığı, türü, moleküllerin adsorpsiyon, dağılma ve iyon değiştirme gibi özellikleri ve tekniğin uygulama yöntemi gibi özellikler temel alınarak Çizelge 2.5'teki gibi bir sınıflandırma yapılabilir. (Erkmen, 2017).

**Çizelge 2.5.** Kromatografik Yöntemlerin Kategorilendirilmesi (Erkmen, 2017)

|                                           |                                                                                                                                                                                        |
|-------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| AYRIM<br>MEKANİZMASINA<br>GÖRE            | Adsorbsiyon Kromatografisi<br>Dağılma Kromatografisi<br>İyon-Değiştirme Kromatografisi<br>Jel Filtrasyon Kromatografisi<br>İlgi (Affinite) Kromatografisi<br>İyon Çifti Kromatografisi |
| FAZ TİPİNE<br>GÖRE                        | Sıvı Kromatografisi<br><br>Gaz Kromatografisi                                                                                                                                          |
| UYGULANAN<br>TEKNİĞE GÖRE                 | Kolon Kromatografisi (YPSK, Gaz kromatografisi)<br>Düzlem Kromatografi (İnce Tabaka Kromatografi ve Kağıt Kromatografisi)                                                              |
| İKİ FAZIN<br>POLARLIK<br>DURUMUNA<br>GÖRE | Normal Faz Kromatografi<br>Ters Faz Kromatografi                                                                                                                                       |

Kromatografik temelli yöntemlerin değişik faktörlere göre farklı sınıflandırmaları olduğu görülmektedir. Bu tezde sıvı kromatografi temelli YPSK tekniği ve fazların polarlığına göre de ters faz sıvı kromatografisi yöntemi uygulanmıştır.

#### **2.2.2.1.1. Dağılma Kromatografisi**

Hareketli faz da sabit faz da sıvı olduğundan sıvı-sıvı kromatografisi olarak da bilinir. Sabit fazdaki katı yüzey inert bir sıvı tabakasıyla kaplanarak çok daha yüksek ayırma verimleri elde edilmesini sağlar. Bu mekanizmada tutulma zamanı tamamen çözünenin hareketli ve sabit fazlardaki çözünürlüğüne yani dağılma katsayısına bağlıdır. Sabit fazda daha yüksek oranda çözünenler maddeler kolonda tutulma eğiliminde olduğundan yavaş ilerlerken, hareketli fazda çok çözünenler daha hızlı ilerler. Dağılma kromatografisi, hareketli ve sabit fazın polaritesinin birbirine göre farklılığına dayanan iki gruba ayrılır, normal-faz ve ters-faz sıvı kromatografisi (Gümüştas, 2016; McGuffin, 2004).

#### **2.2.2.1.2. Ters Faz Sıvı Kromatografisi**

Maddenin tutulma mekanizması analit ile sabit faz arasındaki hidrofobik etkileşimlere dayanmaktadır. Normal faz sıvı kromatografisinin aksine ters-faz sıvı kromatografisinde mobil fazın polaritesi sabit faza göre nispeten daha yüksektir. En polar madde kolondan en önce çıkar. İlaçların genellikle apolar yapıda olması, mobil faz bileşeni olarak kullanılan organik çözücülerin uygun maliyetinde olması, ters faz sıvı kromatografisinin, ilaç analizlerinde kullanım sebepleridir. Genellikle mobil faz bileşeni olarak asetonitril, metanol ve su kullanılır. Mobil fazın polaritesi azalırsa bu durum alıkonma zamanını kısaltır. Alıkonma zamanıyla mobil fazın polaritesi doğru orantılıdır (Gümüştas, 2009; Vailaya ve Horváth, 1998).

#### **2.2.2.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi**

YPSK, yüksek basınç altında hareketli faz ile sabit faz arasında maddelerin dağılma esasına dayanan bir kromatografi çeşididir. Yüksek duyarlılığı, kolay uygulanabilmesi, uçucu olmayan/sıcaklıkla kolay bozulabilen maddelerin ayırma olarak sağlaması ve geniş kullanım alanına sahip olması nedeniyle analitik ayırma

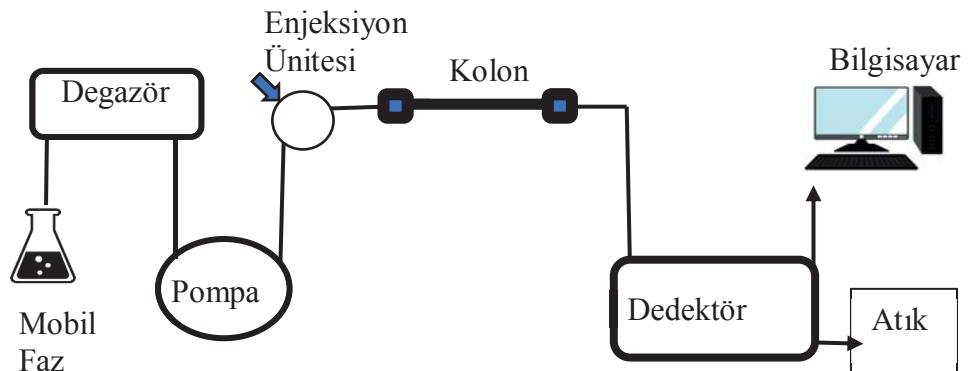
yöntemleri arasında en yaygın kullanılan yöntemdir. Ayrıca kullanıcıya daha az bağımlı olduğu için kullanıcı kaynaklı hatalar en aza iner ve yüksek tekrar edilebilirliktedir (Gümüştas, 2009).

#### 2.2.2.2.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisinde Uygulama Aşamaları

Test edilecek madde/maddeler uygun bir çözücüde çözülür. Çözünen karışım kolona enjekte edilir. Numunedeki bileşenlerin ayrımı sabit faz olan kolonda gerçekleşmektedir. Uygulanan basınçla karışım ve mobil fazdan oluşan sıvı kolon boyunca hareket eder. Maddeler, mobil ve sabit fazla etkileşimlerine göre kolonda farklı hızlarda ilerler ve ayrı zamanlarda kolondan çıkar. Ayrım sağlanmış olur, miktarlarının tayini için ise dedektör kullanılır. Numunelerin özelliklerine göre farklı dedektörlerden uygun olanı seçilir. Dedektör tarafından kaydedilen ve bilgisayar aracılığıyla analizi yapılan sinyallerin tamamı kromatogram olarak adlandırılır (Eser ve Dinçel, 2018).

#### 2.2.2.2.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Cihazının Bölümleri

YPSK cihazı genel olarak, mobil faz (çözücü) şişeleri, degazör, pompa, enjeksiyon ünitesi, kolon, dedektör ve bilgisayardan oluşur (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Bir YPSK sisteminin meydana getiren bölümlerin şematik diyagramı.

Degazör, mobil faz içerisindeki çözünmüş gazların ölçümleri etkilememesi için giderilmesini sağlar. Çözültide gaz bulunması pompa ve kolonda sorunlara da neden olabilmektedir. Pompa, mobil fazın sistem içerisinde belirli bir hızla akışını sağlar. Bir analiz sırasında pompa, sabit içerikte çözücünün geçmesini sağlıyorsa bu sisteme izokratik sistem denir. Basit ayrımlar için kullanılır. Farklı polaritede iki veya daha fazla çözücü içeren mobil faz bileşimi zamanla değişiyorsa buna gradyan sistem denir. Kompleks karışımların ayrımı için ve içeriği bilinmeyen karışımlarda analiz yöntemi geliştirme amacıyla daha çok tercih edilir. Enjeksiyon ünitesi, numunenin kolona gönderilmesini sağlayan bölümdür. Manuel ise numune enjeksiyona çekilip bir valf yardımıyla sisteme verilir. Otomatikse cihaz bunu kendisi yapar. Kolon, içi silika veya polimer gibi maddelerle kaplanmış paslanmaz çelik borudur. Sabit faz olarak görev almakta ve analitlerin ayrımını sağlamaktadır. Sistemdeki kolon fırını da kolonu istenilen sıcaklıkta tutmaya yarar. Dedektör, kolondan çıkan bileşenleri tespit etmeyi ve bunların miktarlarını belirlemeyi sağlar. Zamana karşı dedektör cevabı grafiği oluşturulur. Buna kromatogram denir ve bilgisayar üzerinden incelenir. Dedektörler, hassaslık, doğruluk ve kararlılıkta önemli bir rol oynar. YPSK' da kromatografik ayırmadan sonra analitleri tespit etmeye yarayan, UV dedektörleri, floresans dedektörleri, foto diyot dizisi dedektörleri, IR dedektörler, elektrokimyasal dedektörler, kırılma indisi dedektörleri ve MS dedektörleri gibi çeşitli dedektörler bulunmaktadır. UV dedektörler, YPSK uygulamalarında en yaygın kullanılanlardır. Bu tez çalışmasında UV/GB dedektörü kullanılmıştır (Ahuja ve Dong, 2005; Eser ve Dinçel, 2018; Gümüştas, 2009; Kellner ve ark., 2004; Skoog ve ark., 2007).

UV-GB dedektörleri maddelerin UV ve GB alanlarındaki ışınların elektromanyetik radyasyonunu absorbe etmesiyle çalışır. 180-650 nm aralığında ışığı absorplayabilen maddeler için kullanılır. Mevcut UV-GB dedektörleri, tek dalga boyu, değişken dalga boyu ve fotodiyot dizisi dedektörleri çeşitlerinden oluşur. Değişken dalga boyu ve foto diyot dizisi dedektörleri, sabit dalga boyu dedektöründen daha fazla esneklik ve farklı dalga boylarında izleme kolaylığı sunar. Fotodiyot dizisi dedektörü, analizciye ayrıştırılan analitin bir UV veya UV/GB spektrumunu sağlaması

bakımından tektir. Polimerlerde karışan piklerin ve renkli türlerin varlığının saptanmasında kullanıma elverişlidir (Smith ve ark., 2020).

Sabit dalga boylu UV dedektörde lambanın türüne göre değişen tek bir dalga boyunda ışık kullanılır. Düşük basınçlı civa buharı (254 nm) lambası en çok kullanılan lambadır. Değişken dalga boylu dedektörde dalga boylu aralığı geniş bir kaynak kullanılır. Genellikle kullanılanlar döteryum veya ksenon deşarj lambasıdır. (Islek ve ark., 2017)

#### **2.2.2.2.3. Ekstraksiyon İşlemi**

Kromatografik sisteme analiti vermeden önce analiz edilecek maddeyi matriks numunenin içinden özütleyp istenmeyen bileşenlerinden (kirliliklerinden) uzaklaştırmak amacıyla numunelerin ön işleminden geçirilmesi gerekir, bu amaçla ekstraksiyon işlemi uygulanır. İki çeşit ekstraksiyon yöntemi mevcuttur: Sıvı-sıvı ekstraksiyon ve katı-faz ekstraksiyon. Bu tez çalışmasında kullanılmış olan sıvı-sıvı ekstraksiyonu bir analitin ayrışması için birbirine karışmayan iki (ya da daha fazla) çözücünün arasındaki rekabete dayanan bir ayırma işlemidir. Analitin dağılımına etki eden en önemli kimyasal özellikleri de polarite ve pH'dır (Houck ve Siegel, 2009).

#### **2.2.2.3. Kromatografide Sistem Uygunluk Testleri Parametreleri (SUT)**

Kromatografik analizlerde uygun kromatografik koşulların belirlenmesi için çalışılan dalga boylu, kolon, tampon çözeltisi, tampon çözeltinin molaritesi ve pH'ı, mobil faz oranı, organik çözücü, enjeksiyon hacmi, sıcaklık, akış hızı gibi çeşitli parametrelerin optimize edilmesi gerekmektedir (Erkmen, 2017).

Kromatogramdan incelenebilen parametreler pik şekli, alıkonma zamanı ve pik alanı gibi parametrelerdir. Düzgün bir pik, dar, keskin uçlu ve simetrik olmalıdır. Bir kromatogramdaki piklerin değerlendirilmesi ve SUT değerlerinin uygun sınırlar içinde

mi belirlenmesi için esas olarak maddenin tutulma zamanı ve pik alanı ölçülür (Erkmen, 2017).

Sistem uygunluk testleri, analiz esnasında sistemin optimum şartlarda ve yüksek verimle çalıştığını göstermek için kullanılan değerlendirmelerdir. Yöntemin doğruluk ve kesinliğini belirlemek için yapılmaktadır. Bu testler Amerikan Gıda ve İlaç Birliği (FDA), Uluslararası Uyum Konferansı (International Conference on Harmonization, ICH) tarafından ve Amerika Farmakopesi'nde yapılması önerilen testlerdir (Erkmen, 2017).

YPSK sisteminde analiz sonuçlarını yani kromatogramı değerlendirmek, karşılaştırmak için irdelenmesi gereken ve dolayısıyla yöntem geliştirmenin temelini oluşturan başlıca parametreler şunlardır:

Alıkonma Zamanı ( $t_R$ ),  
Kuyruklanma (T), Asimetri Faktörü ( $A_s$ ),  
Etkin Tabaka Sayısı (N),  
Kapasite Faktörü (k),  
Seçicilik ( $\alpha$ ),  
Ayırma Gücü ( $R_s$ ).  
Pik Alanının Tekrar Edilebilirliği

Çizelge 2.6'da Amerikan Farmakopesi tarafından tanımlanan SUT parametreleri, bu parametrelerin hesaplanmasında kullanılan denklemler ve sonucun hangi değerler arasında olması gerektiği verilmiştir (USP 37, 2014).

**Çizelge 2.6.** SUT parametreleri (Gümüştas, 2016)

| SUT Parametresi                    | Gösterim Şekli | Olması İstenen Değer Aralığı | Hesaplama Yöntemi                                                        |
|------------------------------------|----------------|------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| Kapasite faktörü                   | k              | $1 \leq k \leq 10$           | $k = \frac{t_R - t_0}{t_0}$                                              |
| Seçicilik faktörü                  | $\alpha$       | $\alpha > 1$                 | $\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t_{R_2} - t_{R_0}}{t_{R_1} - t_{R_0}}$ |
| Ayrım gücü                         | Rs             | $Rs > 1,5$                   | $Rs = 1,18 \times \frac{t_2 - t_1}{\frac{W_1}{2} + \frac{W_2}{2}}$       |
| Kuyruklanma faktörü                | T              | $T \leq 2$                   | $T = \frac{A - B}{A}$                                                    |
| Asimetri faktörü                   | $A_s$          | $0,95 \leq A_s \leq 2$       | $A_s = \frac{B}{A}$                                                      |
| Teorik tabaka sayısı               | N              | $N > 2000$                   | $N = 16 \left( \frac{t_R}{W} \right)^2$                                  |
| Pik alanının tekrar edilebilirliği | % BSS          | $\% BSS < 1,5$               | $\% BSS = \frac{SS}{X} \times 100$                                       |

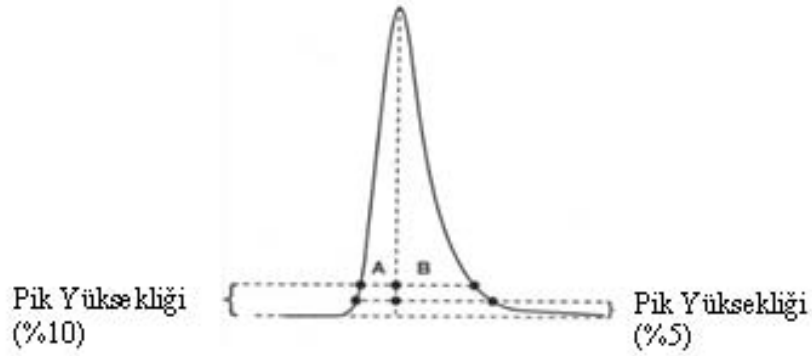
#### 2.2.2.3.1. Alıkonma zamanı ( $t_R$ )

Madde kolona enjekte edildikten sonra kolonda farklı etmenlere göre sürüklenir ve kolondan çıkıp dedektörce algılanır, bu geçen süreye alıkonma zamanı ( $t_R$ ) denir. Maddelerin kolondaki göçünü ifade eder. Hareketli fazın alıkonma zamanı olarak da adlandırılan ölü zaman ( $t_0$ ), sabit fazla etkileşmeyen bir maddenin kolonu terk etmesi için geçen süredir (Gümüştas, 2016; McGuffin, 2004; Vitha, 2016).

#### 2.2.2.3.2. Kuyruklanma (T) ve Asimetri Faktörü ( $A_s$ )

Kuyruklanma ve asimetri faktörü, incelenen madde pikinin sağa ya da sola doğru eğik olup olmadığını belirleyebilmek amacı ile kullanılır. Pik asimetrisi, pikin en

altının %10 yukarisından A ve B alanları pik tepesinden aşağıya çizilen bir çizgi yardımıyla oluşturularak, kuyruklanma faktörü ise pik yüksekliğinin %5'indeki seviyeden ölçülür (Şekil 2.6). Olması gereken değer aralıkları ve hesaplanma formülleri Çizelge 2.6'da verilmiştir (Gümüştas, 2016; McGuffin, 2004 ve Vitha, 2016).



Şekil 2.6. Kuyruklanma ve asimetri faktörünün pik üzerinde ölçülme yerleri.

#### 2.2.2.3.3. Kapasite Faktörü (k)

Maddelerin bağıl alıkonmasının bir ifadesidir yani  $t_R$  ile  $t_0$ 'ın farkının  $t_0$ 'a oranı şeklinde hesaplanır (Çizelge2.6). Bir analit için k birden küçükse analit kolonda çok hızlı ilerliyor demektir. Alıkonma zamanı çok kısa olur ve ölü zamandan ayrımı mümkün olmaz. Buna karşılık, 10-15 olursa da analiz süresi çok uzun olur, dolayısıyla 1-10 arasında olması idealdir (Gümüştas, 2016; McGuffin, 2004 ve Vitha, 2016).

#### 2.2.2.3.4. Seçicilik ( $\alpha$ )

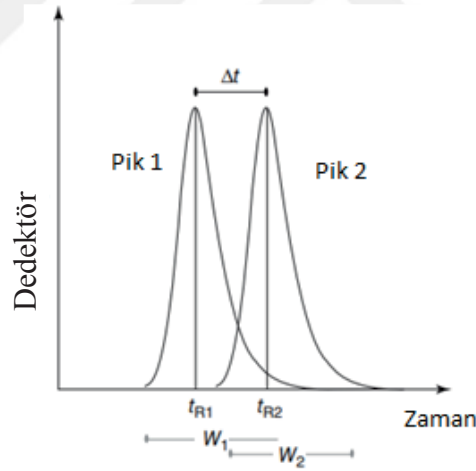
İki analiti ayırmak için kapasite faktörleri birbirinden farklı olmalıdır. Kapasite faktörleri oranına göre ne derece ayrıldıkları belirlenir ve bu da seçiciliğin göstergesidir (Çizelge 2.6). Seçicilik, kullanılan sabit faz ve hareketli faza göre değişiklik gösterir. Kolonda daha çok tutunan maddenin kapasite faktörünün daha az tutunan maddeninkine oranı olduğundan, 1'den büyük bir değerdir (Gümüştas, 2016; McGuffin, 2004 ve Vitha, 2016).

#### 2.2.2.3.5. Teorik Tabaka Sayısı (N)

Pikin simetrik olması, yayvan olmaması ve piklerin birbirinden analize uygun şekilde ayrılması istenir. İyi bir verimlilik anlamına geldiğinden tabaka sayısının olabildiğince yüksek olması arzu edilir. Alıkonma zamanının pik genişliğine oranıyla ilişkilidir (Çizelge 2.6) (McGuffin, 2004; Vitha, 2016).

#### 2.2.2.3.6. Ayrım Gücü ( $R_s$ )

İki pikin ne derece ayrıldığının kantitatif bir ölçüsüdür. Birbirini takip eden pikler için  $R_s$  değeri 1,5 ve üzeri ise iki pikin net olarak birbirinden ayrıldığı söylenir. İki pikin  $t_R$  lerinin farkının piklerin yarı genişlikleri ( $W/2$ ) toplamına oranıyla ilişkilidir (Çizelge 2.6) (Kromidas, 2016; Purnell, 1960).



**Şekil 2.7.** Ayrım gücü gösterim piki.

$t_{R1}$  : 1. pikin tutulma zamanı,  $t_{R2}$ : 2. pikin tutulma zamanı,  $W_1$ : 1. pikin genişliği,  $W_2$ : 2. pikin genişliği

#### 2.2.2.3.7. Pik Alanının Tekrar Edilebilirliği

Bir analiz yönteminde analitin pik alanının ve yüksekliğinin tekrar edilebilirliği yöntemin kesinliğinin göstergesidir. Geliştirilen analiz yöntemiyle analitin en az 5-6

defa ölçülmesiyle elde edilen pik yükseklikleri veya alanlarının standart sapmasının ortalama değere oranıyla, % BSS olarak hesaplanır (Eşitlik 2.1.)(Çizelge 2.6) (Erkmen, 2017).

$$\%BSS = \frac{SS}{\bar{X}} \times 100 \quad (2.1.)$$

SS: Standart sapma

$\bar{X}$ : Ortalama Değer

#### 2.2.2.4. Kimyasal Analizlerde Yöntem Geçerlik Testleri

Etkilerin olduğundan fazla veya eksik tahmin edilmesine, yanlış yorumlara ve asılsız sonuçlara yol açmayacak şekilde güvenilir sonuçlar elde etmek bilimsel çalışmaların temelidir. Güvenilirlik için, klinikte veya adli toksikolojide kullanılacak yeni analitik yöntemler, dikkatli bir yöntem geliştirmeyi ve ardından yöntemin kapsamlı bir validasyonunu gerektirir. Yöntemin, doğru, kesin ve yüksek verimli olması güvenilirlik açısından oldukça önemlidir. Metot validasyonunun öneminden dolayı, analitik kimya alanında, bu konuda çeşitli uluslararası kuruluşlar ve konferanslar tarafından bir dizi kılavuz belge yayınlanmıştır (Peters ve ark., 2007).

##### 2.2.2.4.1. Seçicilik

Maddenin safsızlıklar, bozunma ürünleri veya başka kimyasal maddelerle birlikteyken ölçülen derişiminin, aynı miktardaki saf ve tek başına olduğu halinin ölçümüne göre ne kadar doğru tespit edildiğinin göstergesidir. Birden fazla analitin olduğu numunelerde girişim derecesinin bir ölçüsüdür. Girişim yapma olasılığı bulunan maddelerin birlikte analizi yapılp  $R_s$  değerlerine bakılır. ( $R_s \geq 2,0$  olmalıdır.) (Ozkan, 2012; Chan ve ark., 2004 ve Riley, 1996).

#### 2.2.2.4.2. Doğrusallık ve Aralık

Yöntemin doğrusal olduğu aralık, her bir standart için niceliksel olarak doğru sonuçlar verdiği derişim aralığını bulmak için tespit edilir. Geliştirilen yöntemin geçerli olduğu alt ve üst sınır belirlenmek için en az 5 derişim ölçülmelidir. Belirli derişimlerden sonra doğrusal eğriye uygun olmayan sonuçlar çıkabilir, değerler sapma gösterebilir. Analiz yönteminde artan derişimlere karşı alınan cevap eğrisinde korelasyon katsayısı 1'e ne derece yakın ise cevap değerleri çizilen doğrunun o derece üzerinde yer alıyor demektir ve doğrusallık sağlanmış olur. (ICH-Q2A, 2005; ICH-Q2B, 2005; McPolin, 2009; Ozkan, 2012 ve Ozkan ve ark., 2015).

#### 2.2.2.4.3. Yakalama Sınırı ve Tayin Alt Sınırı

YS analitin nicel olarak tayin edilemeyen ama varlığı teşhis edilebilen en düşük derişimidir. Deneysel olarak bulunabilir veya doğrudan aşağıdaki denklemle hesaplanabilir (Eşitlik 2.2.):

$$YS = 3,3 \times \frac{SS}{m} \quad (2.2.)$$

Bu formüllerdeki SS, kalibrasyondaki en düşük derişimin 3 tekrarlanan sonucunun standart sapması, m ise kalibrasyon eğrisinin eğim değeridir.

TAS, numunenin kesin ve doğru olarak ölçülebilen en düşük miktardır. Doğrudan deneylerden bulunabilir ya da hesaplama yolu ile belirlenmesinde;

$$TAS = 10 \times \frac{SS}{m} \quad (2.3.)$$

denklemleri kullanılır (Eşitlik 2.3.).

Bu formüllerdeki m, kalibrasyon eğrisinin eğimidir. SS ise kalibrasyondaki en düşük derişimin 3 tekrarlanan sonucunun standart sapmasıdır (Bozal, 2009; Ozkan, 2012 ve Riley, 1996).

#### **2.2.2.4.4. Kesinlik**

Bir analitik prosedürün kesinliği saçılma derecesini ifade edip, belirtilen koşullar altında aynı numunenin en az 5-6 ölçümünün sonuçlarının birbirine yakınlığıdır. Kesinlik %BSS olarak ifade edilir. Kesinlik üç yöntemle analiz edilir: gün içi tekrarlanabilirlik, günler arası tekrarlanabilirlik (ara kesinlik) ve tekrar elde edilebilirlik (standardizasyon). Tekrarlanabilirlik aynı laboratuvar ve aynı gün içerisinde yapılan ölçümlerin ne kadar yakın sonuçlar verdiğinin göstergesidir. Ara kesinlik aynı laboratuvar içerisindeki (gün, analizci ya da cihaz değişikliği gibi) farklılıkların sonuçları ne kadar değiştirdiğinin ifadesidir. Tekrar elde edilebilirlik çalışmalarıyla ise laboratuvar değişikliğinde sonuçlarda oluşan farklılıklar gözlenebilir. Tekrarlanabilirlik için %BSS'nin 1'den küçük ya da en fazla 1'e eşit olması beklenir ve biyolojik numuneler için %5 seviyelerine kadar uygundur. Ara kesinlik ve tekrarlanabilirlik için ise %BSS'nin 2'ye eşit veya 2'den küçük olması istenir. Biyolojik numuneler için ise 10-15'e kadar çıkması normal kabul edilir (Bozal, 2009; Chan, ve ark., 2004 ve The USP 24, 2000).

#### **2.2.2.4.5. Doğruluk**

Analitik yöntemle tayin edilen değerlerin gerçek (referans) değerlere yakınlığının göstergesi olup geri kazanım olarak da ifade edilir. Doğruluk sonuçları ortalama % geri kazanım olarak verilir ve %BSS ve %BH ile de değerlendirilir (Eşitlik 2.5 ve Eşitlik 2.4). Analiz edilmek üzere sisteme eklenen maddenin ne kadar geri elde edilebildiğini gösterir. Geri kazanım hesabı farklı derişimlerden (doğrusallık aralığındaki düşük, orta ve yüksek değerlerde) yapılır. Her bir derişim için en az 5 tekrarlı ölçümler yapılır ve sonucun %100'e yakınlığı yöntemin doğruluğunu belirler.

Geri kazanım çalışmaları 3 farklı şekilde yapılabilir. Bunlar, referans bir yöntem ile kıyaslamak, kör matriks ortamına tayin edilmek istenen maddeyi eklemek ve standart ekleme metodu ile saf madde ilavesidir (Bozal, 2009; ICH-Q2A, 2005 ve Swartz ve Krull, 2012).

$$\% BSS = \frac{SS}{\bar{X}} \times 100 \quad (2.4.)$$

$$\%BH = \frac{GD - \bar{X}}{GD} \times 100 \quad (2.5.)$$

SS: Standart sapma

GD: Gerçek Değer

$\bar{X}$ : Ortalama Değer

#### **2.2.2.4.6. Sağlamlık**

Kararlılık da denen, analitik bir prosedürün sağlamlığı, yöntem parametrelerindeki küçük ama kasıtlı değişikliklerden ne kadar etkilendiğinin bir ölçüsüdür. Çok etkilenmemesi beklenir. Geliştirilen yöntemin güvenilirliğinin bir göstergesidir. (ICH Q2B, 2005).

#### **2.2.2.4.7. Tutarlılık**

*Ara kesinlik*'e benzer şekilde yöntemin gün, laboratuvar, analizci, cihaz, ya da sıcaklık gibi değişkenler değiştirilerek yapılan ölçümlerdeki tekrar edilebilirliğinin belirlenmesidir. %BSS ile ifade edilir. ICH' ye göre zorunlu olarak yapılması gereken işlemler grubuna dahil değildir (Bozal, 2009; Gümüştaş, 2016 ve Ozkan, 2012).

#### 2.2.2.4.8. Stabilit 

Numunelerin, kullanılan       lerin ve standart maddelerin uygun bir süre kararlı kalarak tekrar edilebilirlik ve güvenilirliği sağlaması gerekmektedir. Hızlandırılmış bozunma çalışmalarıyla analitin bozunması sağlanır ve bunun deneylere etkisi incelenir. Bu  alışmalar, potansiyel bozunma ürünleri üreterek, bir analitik yöntemin bir aktif maddeyi ve onun bozunma ürünlerini  l me yeteneğini değerlendirmek için de kullanılır. Metodun validasyonu sırasında aktif maddenin yaklaşık %10 ila %30 bozunmasını sağlamak için aktif madde, asit, baz, ısı, ışık ve oksitleyici ajana maruz bırakılır. Bu  alışmalar aynı zamanda bir ilaç ürününü geliştirmek için formülasyon geliştirme, üretim, paketleme ve saklama şartlarını belirlemede yardımcı olur. Hızlandırılmış bozunma çalışmalarının yürütülmesi, kararlılık gösteren metodun geliştirilmesini ve doğrulanmasını, ilaç maddelerinin, bozunma ürünlerinin, bozunma yollarının belirlenmesini, ilaç farmasötik formu analizlerinde ilgili formülasyonlardaki bozunma ürünlerinin ilaca karşı ayırt edilmesini sağlar (Gümüştaş, 2016; Patil, 2017).

### 3. BULGULAR

#### 3.1. Sefprozilin Elektrokimyasal Analiz Çalışmaları

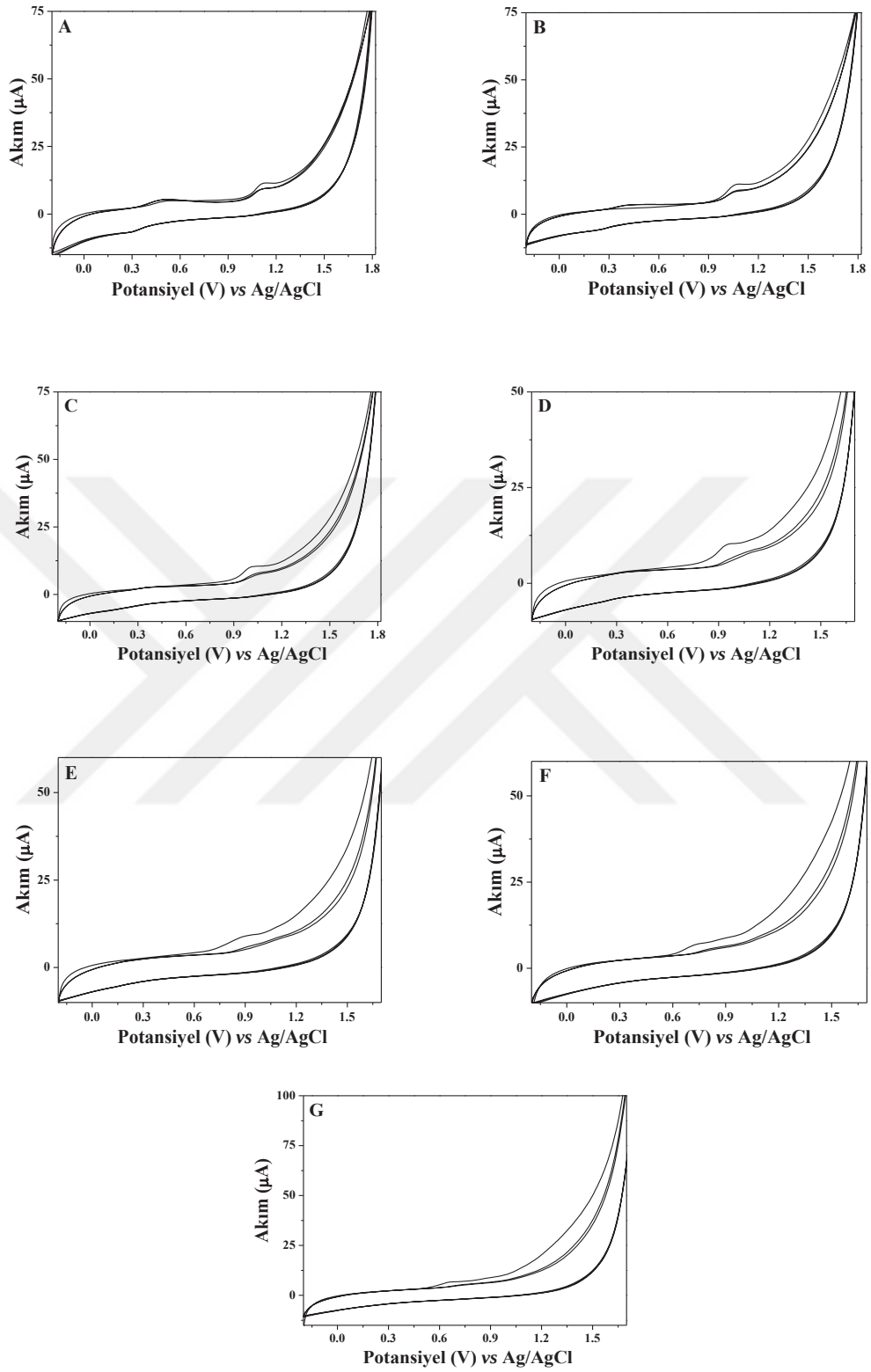
SFP' nin yükseltgenme özelliğine dayanarak voltametrik yöntemlerle analizi yapılmıştır. SFP için DV ve DPV teknikleri kullanılarak farklı tamponlarla değişen pH'larda yapılan kapsamlı çalışmalarla analiz için en uygun yöntem ve ortam araştırılarak basit, hassas ve tekrarlanabilir bir voltametrik analiz yöntemi geliştirilmiştir.

Autolob PGSTAT204 elektrokimyasal analizörü kullanılarak karşıt elektrot olarak Pt telin (BASi, MF 1032), çalışma elektrodu olarak CKE (BASi,  $\phi=3$  mm) ve referans elektrot olarak Ag/AgCl elektrodun (BASi, MF 2052) kullanıldığı üç elektrotlu sistem ile çalışılmıştır.

DPV ve DV teknikleri ile farklı pH'larda tamponlar içerisinde SFP' nin elektrokimyasal davranışı yükseltgenme yönünde incelenmiştir. Destek elektroliti olarak 0,1 M ve 0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 2,0-10,0 arasındaki BRT, pH 2,0-8,0 arasındaki fosfat tamponları ve pH 3,7-5,7 arasındaki asetat tamponları kullanılmıştır. DV ile hız taraması çalışmaları  $1 \times 10^{-4}$  M SFP derişiminde, 10-500 mV s<sup>-1</sup> hız aralığında pH 3,0 BRT'de yapılmıştır. Ticari tabletler ve (bünyesine yakın zamanda ilaç almamış olan, sağlıklı gönüllü insanlardan alınan) idrar örnekleri üzerine bu geliştirilen analiz yöntemleri başarıyla uygulanmıştır.

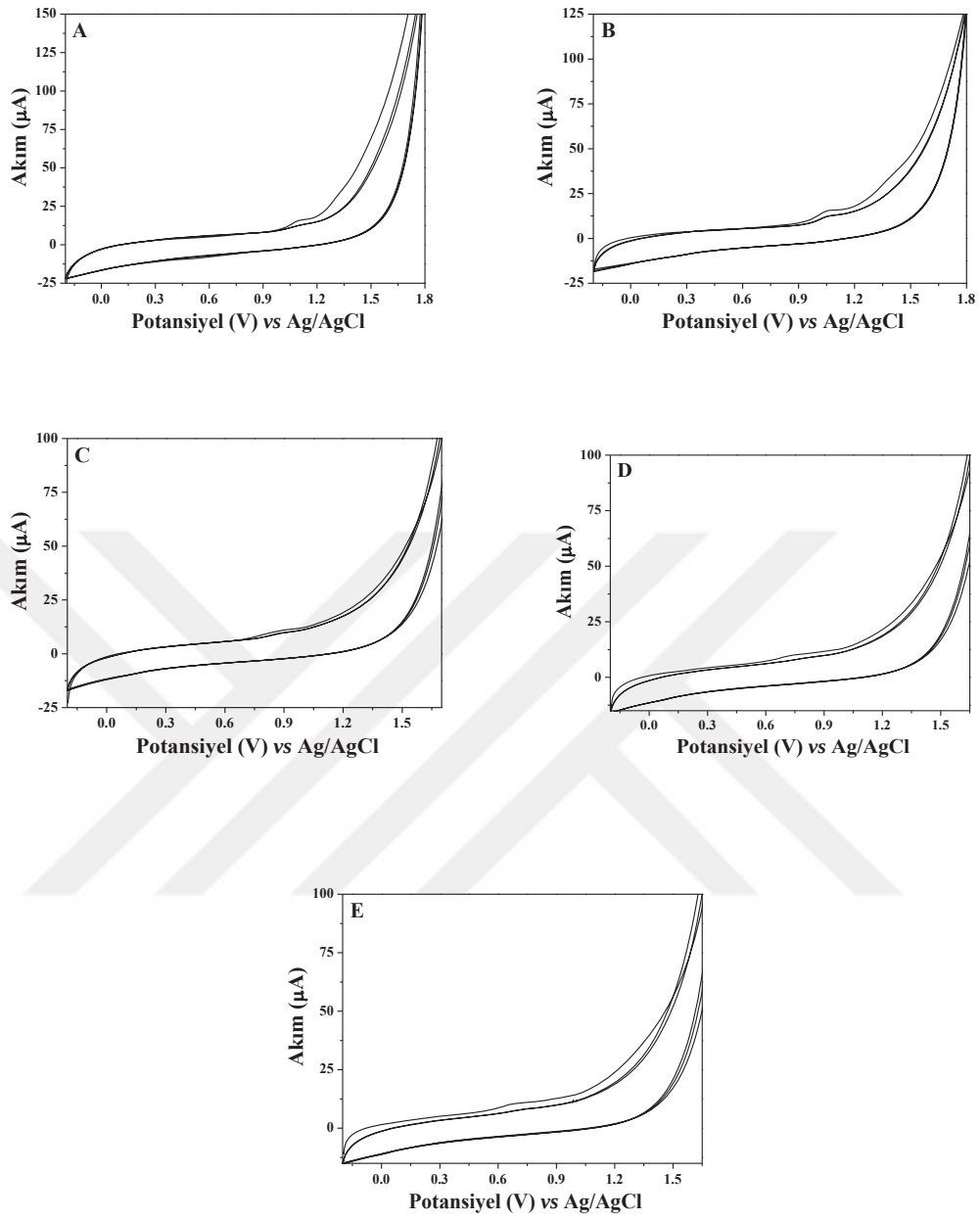
##### 3.1.1. Sefprozilin Dönüşümlü Voltametri Çalışmaları

DV ile  $1 \times 10^{-4}$  M SFP ile 100 mV s<sup>-1</sup> tarama hızında pH 2,0 3,0 4,0 5,0 6,0 7,0 8,0 BRT (Şekil 3.1), pH 2,0 3,0 6,0 7,0 8,0 fosfat tamponu (Şekil 3.2), ve pH 3,7 4,7 5,7 asetat tamponu (Şekil 3.3) ve 0,1 M ve 0,5 M sülfürik asit (Şekil 3.4) içerisinde yapılan elektrokimyasal analizler sonucu elde edilen voltamogramlar kaydedilmiştir.

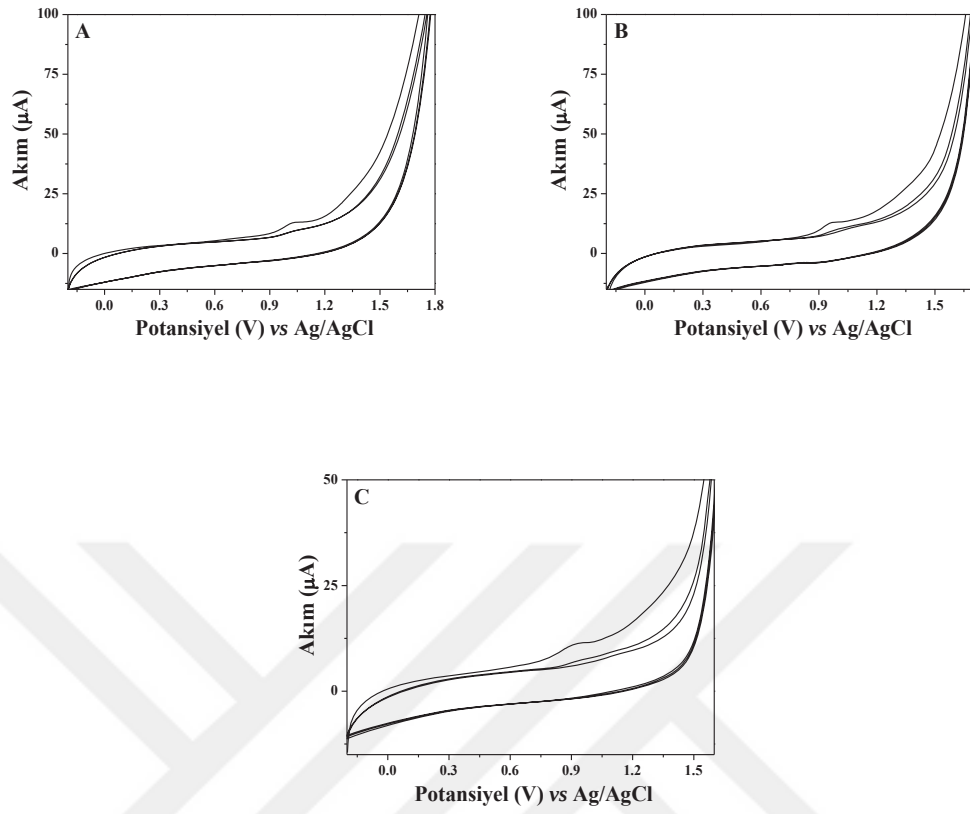


**Şekil 3.1.**  $1 \times 10^{-4}$  M SFP' nin farklı pH'larda BRT içerisinde, 100 mV s<sup>-1</sup> tarama hızında elde edilen dönüşümlü voltamogramları.

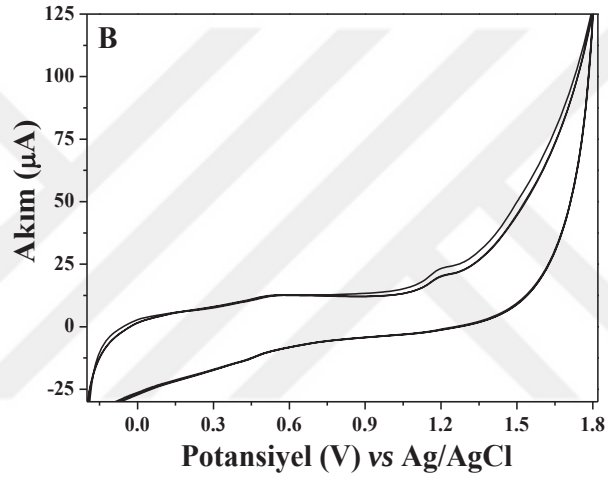
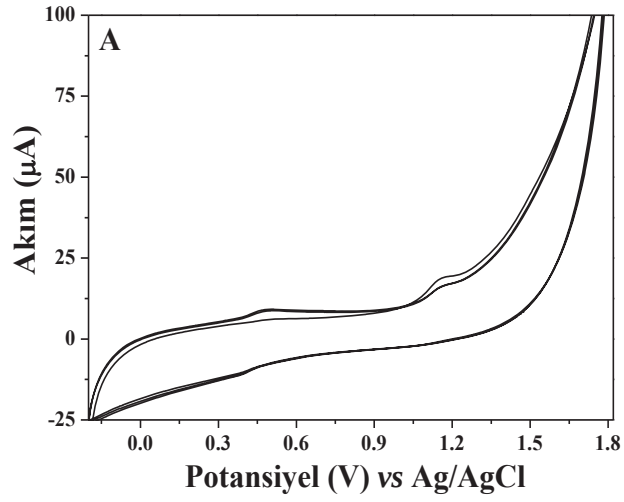
(A) pH 2,0 BRT; (B) pH 3,0 BRT; (C) pH 4,0 BRT; (D) pH 5,0 BRT; (E) pH 6,0 BRT; (F) pH 7,0 BRT (G) pH 8,0 BRT



**Şekil 3.2.**  $1 \times 10^{-4}$  M SFP' nin farklı pH' larda fosfat tamponları içerisinde,  $100 \text{ mV s}^{-1}$  tarama hızında elde edilen dönüşümlü voltamogramları.  
(A) pH 2,0 fosfat (B) pH 3,0 fosfat (C) pH 6,0 fosfat (D) pH 7,0 fosfat ve (E) pH 8,0 fosfat



**Şekil 3.3.**  $1 \times 10^{-4}$  M SFP' nin farklı pH'lardaki asetat tamponları içerisinde,  $100 \text{ mV s}^{-1}$  tarama hızında elde edilen dönüşümlü voltamogramları.  
(A) pH 3,7 asetat (B) pH 4,7 asetat ve (C) pH 5,7 asetat

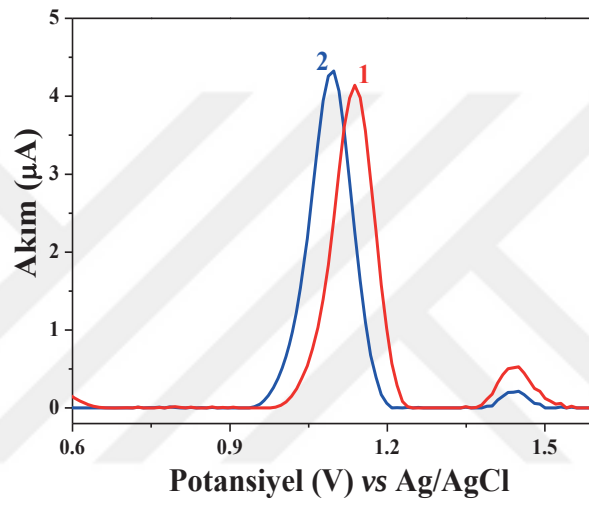


**Şekil 3.4.**  $1 \times 10^{-4}$  M SFP' nin sülfürik asit ( $H_2SO_4$ ) çözeltilerinde,  $100 \text{ mV s}^{-1}$  tarama hızında elde edilen dönüşümlü voltamogramları.  
(A) 0,1 M (pH 0,3) sülfürik asit ve (B) 0,5 M (pH 1) sülfürik asit

pH değeri yükseldikçe piklerin daha düşük potansiyellere kaydığı ve yayvanlaştığı gözlenmiştir. Bu da analiz için düşük pH'larda analizin daha elverişli olduğunu göstermektedir.

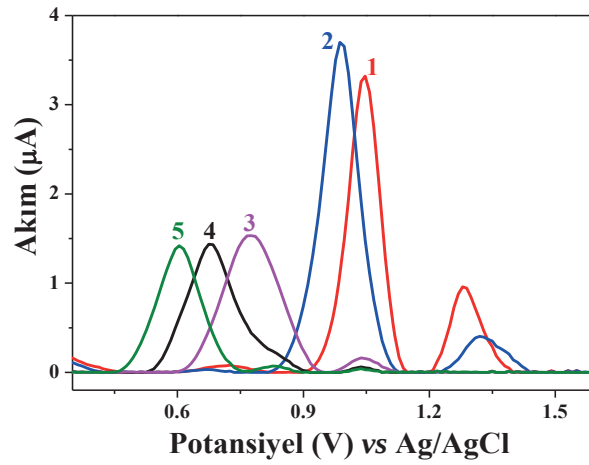
### 3.1.2. Sefprozilin Diferansiyel Puls Voltametrisi Çalışmaları

Tez kapsamında DPV tekniğiyle pH taraması puls yüksekliği 50 mV, puls genişliği 50 ms olmak üzere 20 mV/s tarama hızında yapılmıştır. Bunun için DV çalışmalarında yapıldığı gibi 0,1 M (pH 0,3) ve 0,5 M (pH 1,0) sülfürik asit ( $H_2SO_4$ ) (Şekil 3.5), pH 2,0 3,0 6,0 7,0 8,0 fosfat tamponu (Şekil 3.6), pH 2,0 3,0 4,0 5,0 6,0 7,0 8,0 9,0 10,0 BRT (Şekil 3.7) ve pH 3,7 4,7 5,7 asetat tamponu (Şekil 3.8) içerisinde yapılan pH taraması çalışmalarının voltamogramları kaydedilmiştir.



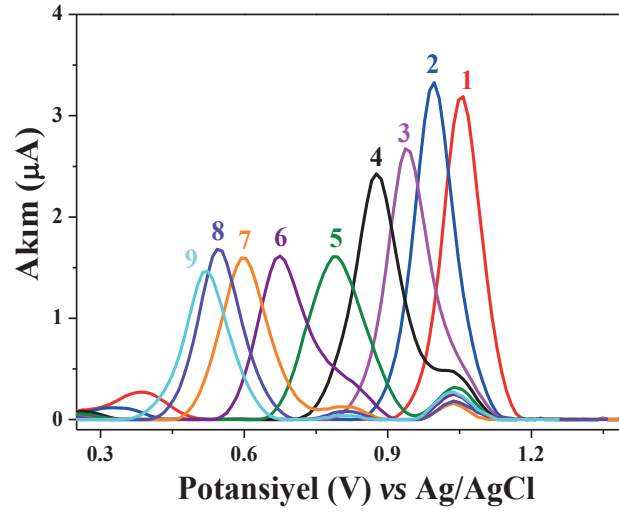
**Şekil 3.5.**  $1 \times 10^{-4}$  M SFP' nin sülfürik asit ( $H_2SO_4$ ) çözeltilerinde elde edilen DP voltamogramları.

(1) pH 0,3; ve (2) pH 1



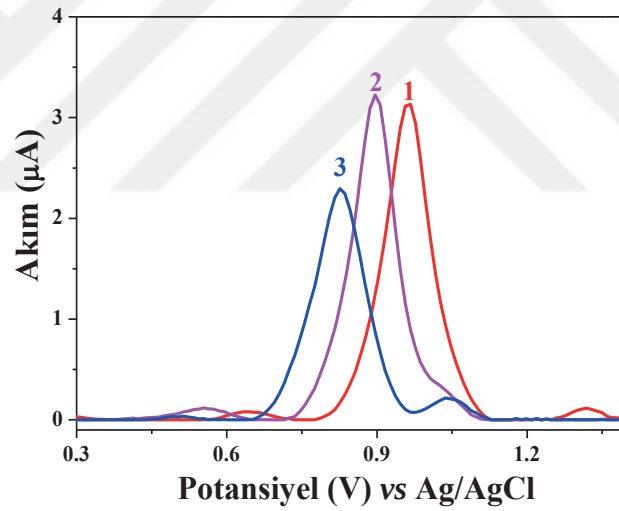
**Şekil 3.6.**  $1 \times 10^{-4}$  M SFP' nin fosfat tamponları içindeki DP voltamogramları.

(1) pH 2,0; (2) pH 3,0; (3) pH 6,0; (4) pH 7,0 ve (5) pH 8,0



**Şekil 3.7.**  $1 \times 10^{-4}$  M SFP' nin BRT içindeki DP voltamogramları.

(1) pH 2,0; (2) pH 3,0; (3) pH 4,0; (4) pH 5,0; (5) pH 6,0; (6) pH 7,0; (7) pH 8,0; (8) pH 9,0; (9) pH 10,0



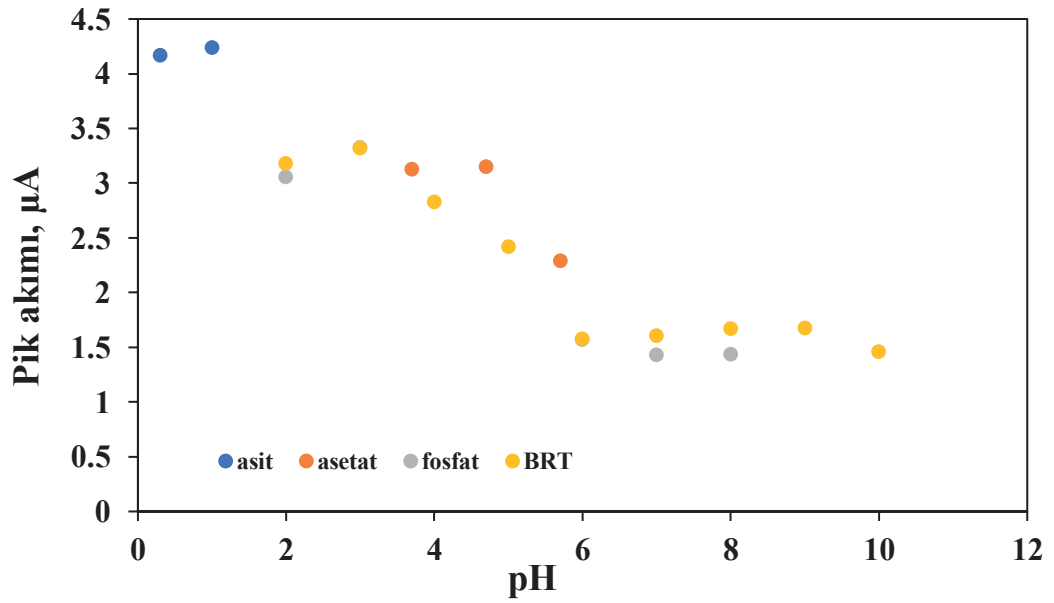
**Şekil 3.8.**  $1 \times 10^{-4}$  M SFP' nin asetat tamponları içindeki DP voltamogramları.

(1) pH 3,7; (2) pH 4,7; (3) pH 5,7

DPV ile; pH'ın ve destek elektroliti cinsinin potansiyel üzerine etkisini daha rahat görebilmek amacıyla,  $1 \times 10^{-4}$  M SFP için tampon çözeltiler içinde alınan DPV ölçümleri ile pik potansiyeli ( $E_p$ ) ve pik akımı ( $I_p$ ) değerleri, Çizelge 3.1 ve Çizelge 3.2' de pH değerlerine karşı verilmiş ve grafikleri gösterilmiştir (Şekil 3.9, Şekil 3.10).

**Çizelge 3.1.**  $1 \times 10^{-4}$  M SFP' nin DPV ile asit, asetat, fosfat ve BR tamponlarında farklı pH'larda okunan akım (İp) değerleri

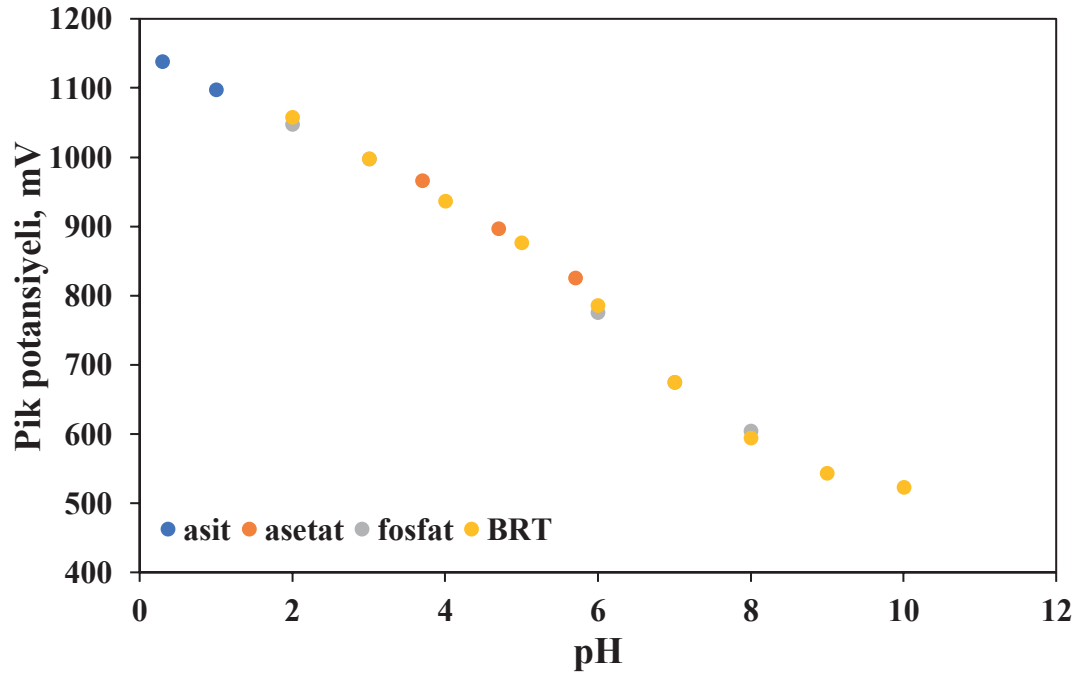
| pH   | İp (µA) |        |        |      |
|------|---------|--------|--------|------|
|      | asit    | asetat | fosfat | BRT  |
| 0,30 | 4,17    |        |        |      |
| 1    | 4,24    |        |        |      |
| 2    |         |        | 3,06   | 3,18 |
| 3    |         |        | 3,33   | 3,32 |
| 3,70 |         | 3,13   |        |      |
| 4    |         |        |        | 2,83 |
| 4,7  |         | 3,15   |        |      |
| 5    |         |        |        | 2,42 |
| 5,7  |         | 2,29   |        |      |
| 6    |         | 1,53   | 1,57   | 1,58 |
| 7    |         | 1,43   |        | 1,61 |
| 8    |         | 1,44   |        | 1,67 |
| 9    |         |        |        | 1,68 |
| 10   |         |        |        | 1,46 |



**Şekil 3.9.**  $1 \times 10^{-4}$  M SFP' nin DPV ile asit, asetat, fosfat ve BR tamponlarında çeşitli pH'larda elde edilen pik akımlarının grafiği

**Çizelge 3.2.**  $1 \times 10^{-4}$  M SFP' nin DPV ile asit, asetat, fosfat ve BR tamponlarında farklı pH'larda okunan potansiyel ( $E_p$ ) değerleri

| pH  | $E_p$ (mV) |        |        |      |
|-----|------------|--------|--------|------|
|     | Asit       | asetat | fosfat | BRT  |
| 0,3 | 1138       |        |        |      |
| 1   | 1097       |        |        |      |
| 2   |            |        | 1047   | 1057 |
| 3   |            |        | 997    | 997  |
| 3,7 |            | 966    |        |      |
| 4   |            |        |        | 936  |
| 4,7 |            | 896    |        |      |
| 5   |            |        |        | 876  |
| 5,7 |            | 825    |        |      |
| 6   |            | 775    | 775    | 785  |
| 7   |            | 674    |        | 674  |
| 8   |            | 604    |        | 594  |
| 9   |            |        |        | 543  |
| 10  |            |        |        | 523  |



**Şekil 3.10.**  $1 \times 10^{-4}$  M SFP' nin DPV ile asit, asetat, fosfat ve BR tamponlarında farklı pH'larda okunan potansiyel değerleri grafiği

Pik potansiyelinin pH'ın yükselmesiyle birlikte sıfıra daha yakın pozitif potansiyellere kayması “konjuge baz, asit forma göre daha düşük pozitif potansiyellerde yükseltgenir” temel prensibine göre ortaya çıkar.

Şekil 3.10'da da görülmekle birlikte SFP' nin pH incelemelerine bakıldığında Ep- pH grafiği iki denklemle ifade edilebilmektedir (Eşitlik 3.1 ve Eşitlik 3.2):

$$E_p \text{ (mV)} = -64,453 \text{ pH} + 1179,1 \quad r = -0,985 \quad (\text{pH } 0,3\text{-}7,0 \text{ arası}) \quad (3.1.)$$

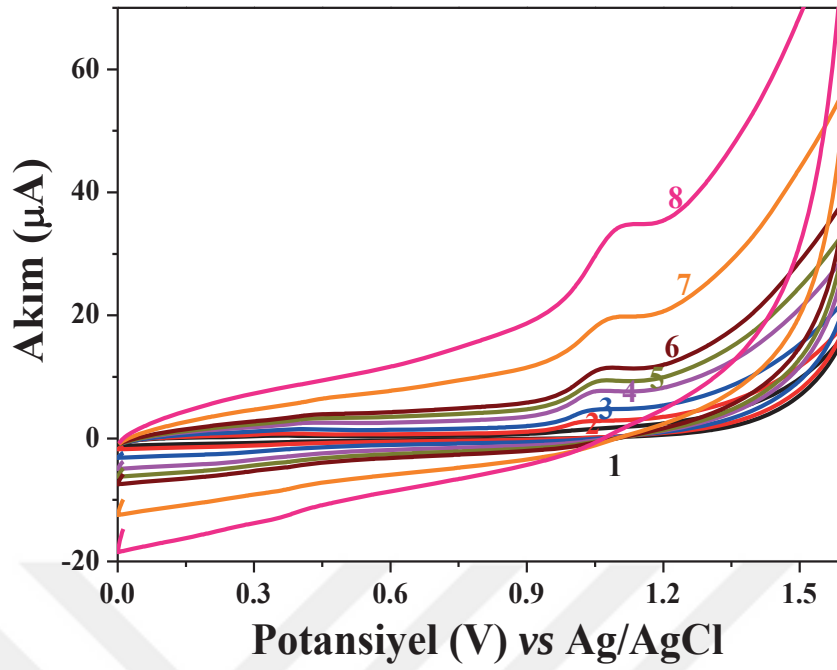
$$E_p \text{ (mV)} = -51,4 \text{ pH} + 1022,9 \quad r = -0,975 \quad (\text{pH } 7,0\text{-}10,0 \text{ arası}) \quad (3.2.)$$

Ep-pH eğrileri, ilaçların pKa değerleri etrafında kırılma gösterir (Doğan-Topal ve ark. 2013). Yapılan analizlere göre SFP için pKa değerinin 7,0 civarında olduğu düşünülmektedir. Literatürde SFP için verilen  $pK_{a1}=3,53$  ve  $pK_{a2} = 7,43$ 'tür. Burada görüldüğü gibi SFP için deneysel pKa değeri 7,0 olup, literatür pKa değerlerine yakın bulunmuştur (AboulMagd , 2021).

### 3.1.3. Hız Taraması

Yapılan pH taramaları sonucu akımın en yüksek ve piklerin en düzgün olduğu ortam olduğundan pH 3,0 BRT, analiz çalışmalarının yapılabileceği en uygun tampon olarak seçilmiştir.

DV ile hız taraması çalışmaları  $1 \times 10^{-4}$  M SFP derişiminde,  $10\text{-}500 \text{ mV s}^{-1}$  hız aralığında pH 3,0 BRT'de yapılmıştır (Şekil 3.11) ve değerlendirmeler için gerekli veriler Çizelge 3.3'de verilmiş.

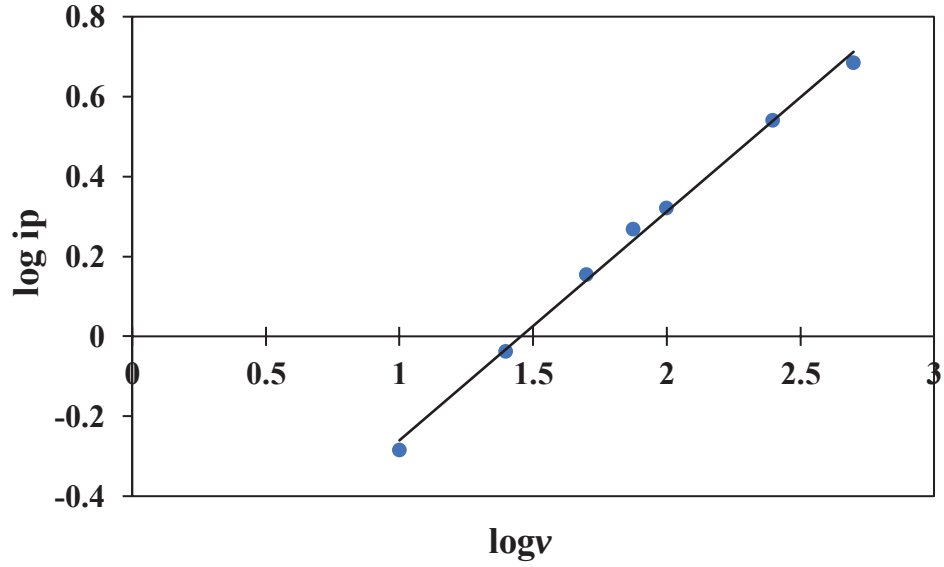


**Şekil 3.11.**  $1 \times 10^{-4}$  M SFP derişiminde, 500-10  $\text{mV s}^{-1}$  hız aralığında pH 3,0 BRT’de yapılan ölçümlerin voltamogramları

(1) destek (2) 10  $\text{mV s}^{-1}$ ; (3) 25  $\text{mV s}^{-1}$ ; (4) 50  $\text{mV s}^{-1}$ ; (5) 75  $\text{mV s}^{-1}$ ; (6) 100  $\text{mV s}^{-1}$ ; (7) 250  $\text{mV s}^{-1}$ ; (8) 500  $\text{mV s}^{-1}$ .

**Çizelge 3.3.**  $1 \times 10^{-4}$  M SFP’ nin pH 3,0 BRT’de 500-10  $\text{mV s}^{-1}$  tarama hızları arasındaki akım ve potansiyel değerleri

| Tarama Hızı | $V^{1/2}$ | İp    | Ep(mV) | logİp  | logv  |
|-------------|-----------|-------|--------|--------|-------|
| 500         | 22,360    | 4,84  | 1074   | 0,684  | 2,698 |
| 250         | 15,811    | 3,48  | 1053   | 0,541  | 2,397 |
| 100         | 10        | 2,095 | 1046   | 0,321  | 2     |
| 75          | 8,660     | 1,86  | 1039   | 0,269  | 1,875 |
| 50          | 7,071     | 1,43  | 1036   | 0,155  | 1,698 |
| 25          | 5         | 0,918 | 1025   | -0,037 | 1,397 |
| 10          | 3,162     | 0,52  | 1015   | -0,283 | 1     |



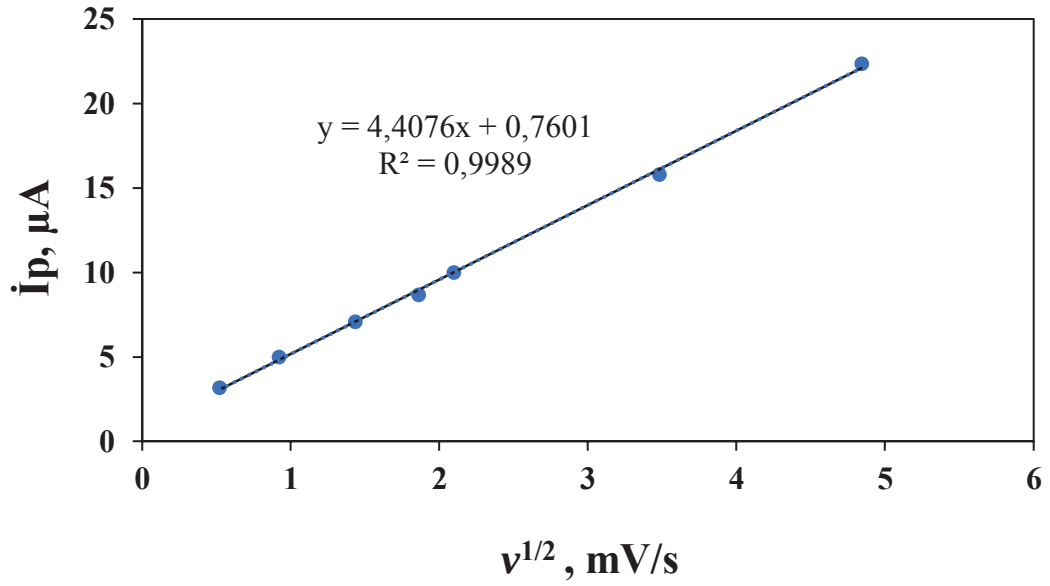
**Şekil 3.12.**  $1 \times 10^{-4}$  M SFP' nin pH 3,0 BRT'de  $10-500 \text{ mV s}^{-1}$  tarama hızları arasında elde edilen dönüşümlü voltamogramlara ait  $\log v - \log i_p$  grafiği

$1 \times 10^{-4}$  M SFP' nin pH 3,0 BRT' de  $10-500 \text{ mV s}^{-1}$  tarama hızları arasındaki ölçümlere ait  $\log v - \log i_p$  grafiğinin doğru denklemi (Şekil 3.12)(Eşitlik 3.3):

$$\log i_p (\mu\text{A}) = 0,5723 \log v (\text{mVs}^{-1}) - 0,8325 \quad (r = 0,998 ; n=7) \quad (3.3.)$$

olarak bulunmuştur.

$1 \times 10^{-4}$  M SFP' nin pH 3,0 BRT'de  $10 \text{ mVs}^{-1}$  'den  $500 \text{ mVs}^{-1}$  'ye kadar artan hızlarda ölçümlerinden çizilen  $\log v - \log i_p$  grafiğinin eğim değerinin 1'e değil de 0,5'e yakın olduğu (Şekil 3.12) ve potansiyelin, hızın artmasıyla birlikte 59 mV daha pozitif potansiyele kaydığı görülmüştür (Çizelge 3.3).



**Şekil 3.13.**  $1 \times 10^{-4}$  M SFP' nin pH 3,0 BRT'de 10-500  $\text{mV s}^{-1}$  tarama hızları arasında elde edilen dönüşümlü voltamogramlara ait  $i_p-v^{1/2}$  grafiği

$1 \times 10^{-4}$  M SFP' nin pH 3,0 BRT'de 10-500  $\text{mV s}^{-1}$  tarama hızları arasındaki voltamogramlara ait  $i_p-v^{1/2}$  grafiği için doğru denklemi (Şekil 3.13):

$$i_p(\mu\text{A}) = 4,4076 v^{1/2} + 0,7601 \quad (r = 0,999 ; n=7) \quad (3.4.)$$

olarak bulunmuştur.

Kontrollü bir difüzyon elektrot tepkimesinde  $i_p-v^{1/2}$  ilişkisi doğrusal olurken  $i_p-v$  grafiğinde ise üstel bir artış beklenmektedir. İdeal şartlarda; adsorpsiyon kontrollü bir pikte  $i_p-v$  grafiği doğrusaldır, ayrıca  $\log i_p-\log v$  grafiğinin eğimi reaksiyon difüzyon kontrollü olduğu durumlarda eğim 0,5 olur. Adsorbsiyon kontrollü gerçekleşiyorsa eğim 1 olur (Laviron ve ark., 1980).

$1 \times 10^{-4}$  M SFP' nin pH 3,0 BRT'de 10-500  $\text{mV s}^{-1}$  tarama hızları arasındaki voltamogramlarına ait  $i_p-v^{1/2}$  ilişkisinin doğrusal olması ve eğimin 0,5'e yakın olması (Şekil 3.13) difüzyon kontrollü reaksiyon gerçekleştiğini göstermektedir.

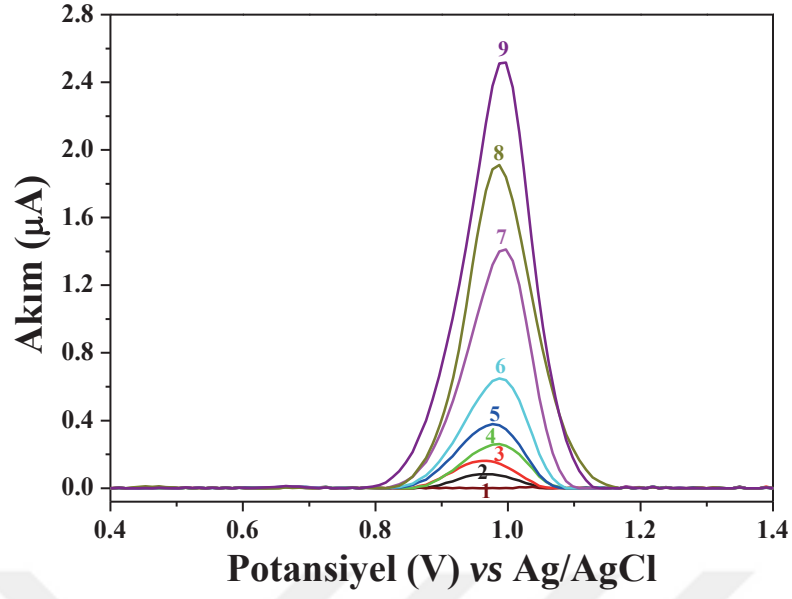
DV çalışmalarında geri tarama yönünde herhangi bir pikin gözlenmemesi ve pik potansiyelinin tarama hızının artmasıyla daha pozitif değerlere kayması elektrot tepkimesinin tersinmez olduğunu göstermektedir.  $1 \times 10^{-4}$  M SFP' nin pH 3,0 BRT'de  $10-500 \text{ mV s}^{-1}$  tarama hızları arasındaki voltamogramlarda tarama hızı arttıkça pik akımlarının arttığı ve pik potansiyellerinin daha anodik potansiyellere kaydığı gözlemlendi (Çizelge 3.3). (Bard ve Faulkner 2001; Greef ve ark. 1990 ve Nicholson ve Shain 1964).

#### 3.1.4. Geliştirilen Yöntemlerle Yapılan Analiz Çalışmaları

DPV değişkenleri olarak; tarama hızı  $20 \text{ mV s}^{-1}$ , puls yüksekliği  $50 \text{ mV}$  ve puls genliği  $50 \text{ ms}$  seçilmiştir ve  $0,0 -1,8 \text{ V}$  arasında tarama yapılmıştır. DV taramaları  $-0,2 -1,8 \text{ V}$  arasında, 3 siklus olarak,  $100 \text{ mVs}^{-1}$  tarama hızında gerçekleştirilmiştir. Bu parametreler ile DV ve DPV ile çeşitli pH'larda alınan ölçümler sonucu; pH'ın ve destek elektroliti optimizasyonu çalışması ile en uygun tamponun pH 3,0 BRT olduğuna karar verilmiştir.

Yapılan pH taraması çalışmaları sonucu DPV yöntemi, SFP' nin voltametrik analizi için yüksek akım ve en sivri ve yüksek pik şeklinin elde edildiği pH 3,0 BRT ile yapılmak üzere uygun bir yöntem olarak kullanılmıştır.

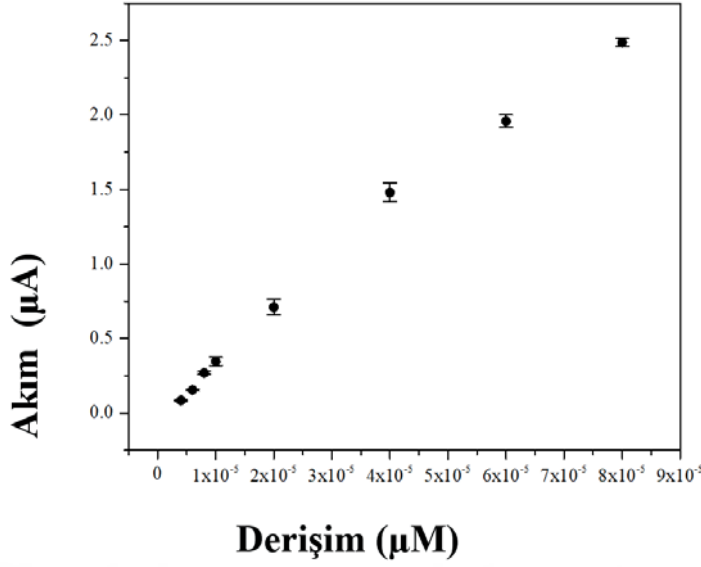
Derişimin, potansiyel ve akım üzerindeki etkisini görmek amacıyla kalibrasyon çalışması yapılmış ve pH 3,0 BRT çözeltisinde  $4 \times 10^{-6} - 8 \times 10^{-5} \text{ M}$  arasındaki derişimlerde voltamogramlar kaydedilmiştir (Şekil 3.14). Derişimlerde üçer ölçüm alınıp SFP' ye ait piklerin ortalama akım ve potansiyeli Çizelge 3.4' te verilmiştir.



**Şekil 3.14.** SFP' nin pH 3,0 BRT'de  $4 \times 10^{-6}$ - $8 \times 10^{-5}$  M arasındaki derişimlerde elde edilen DP voltamogramları  
**(1)** destek; **(2)**  $4 \times 10^{-6}$  M; **(3)**  $6 \times 10^{-6}$  M; **(4)**  $8 \times 10^{-6}$  M; **(5)**  $1 \times 10^{-5}$  M; **(6)**  $2 \times 10^{-5}$  M; **(7)**  $4 \times 10^{-5}$  M; **(8)**  $6 \times 10^{-5}$  M; **(9)**  $8 \times 10^{-5}$  M.

**Çizelge 3.4.** DPV ile optimize edilen değerlerde, değişen derişimlerde üçer ölçümle elde edilen ortalama akım ( $\bar{I}_{p_{ort}}$ ) ve potansiyel ( $E_{p_{ort}}$ ) değerleri

| Derişim (M)        | $\bar{I}_{p_{ort}}$ | $E_{p_{ort}}$ |
|--------------------|---------------------|---------------|
| $4 \times 10^{-6}$ | 0,086               | 966           |
| $6 \times 10^{-6}$ | 0,154               | 966           |
| $8 \times 10^{-6}$ | 0,269               | 976           |
| $1 \times 10^{-5}$ | 0,346               | 976           |
| $2 \times 10^{-5}$ | 0,71                | 976           |
| $4 \times 10^{-5}$ | 1,48                | 997           |
| $6 \times 10^{-5}$ | 1,958               | 997           |
| $8 \times 10^{-5}$ | 2,487               | 997           |



**Şekil 3.15.** SFP' nin DPV ile,  $4 \times 10^{-6}$ - $8 \times 10^{-5}$  M arasındaki derişimlerde elde edilen ortalama akım-derişim grafiğı

Çizelge 3.4'teki tabloya ait grafik Şekil 3.15'te verilmiştir. SFP'nin DPV ile,  $4 \times 10^{-6}$ - $8 \times 10^{-5}$  M arasındaki derişimlerde elde edilen piklerinin akım-derişim eğrisine ait (Şekil 3.15) regresyon analizi verileri ve değerlendirilmiş validasyon parametreleri Çizelge 3.5'te verilmiştir. Çizelge 3.5'te verilen YS ve TAS değerleri bölüm 2.2.2.4.3'te belirtilen formüllere göre hesaplanmıştır.

**Çizelge 3.5.** SFP' nin pH 3,0 BRT içerisinde DPV ile elde edilen akım-derişim eğrisine ait doğrusallık analizi verileri ve validasyon parametreleri.

|                           | DPV                                     |
|---------------------------|-----------------------------------------|
| Ölçüm Potansiyeli (mV)    | 997                                     |
| Doğrusallık Aralığı (M)   | $4 \times 10^{-6}$ - $8 \times 10^{-5}$ |
| Eğim ( $\mu A M^{-1}$ )   | 32057,36                                |
| Kesişim ( $\mu A$ )       | 0,0224                                  |
| Korelasyon Katsayısı      | 0,996                                   |
| Eğimin Standart Hatası    | 1220,47                                 |
| Kesişimin Standart Hatası | 0,04769                                 |
| YS (M)                    | $4,16 \times 10^{-7}$                   |

**Çizelge 3.5. Devam.** SFP' nin pH 3,0 BRT içerisinde DPV ile elde edilen akım-derişim eğrisine ait regresyon analizi verileri ve validasyon parametreleri.

|                                                       | DPV                   |
|-------------------------------------------------------|-----------------------|
| TAS (M)                                               | $1,26 \times 10^{-6}$ |
| Akımın gün içi tekrarlanabilirliği (%BSS)*            | 1,69                  |
| Akımın günler arası tekrarlanabilirliği (%BSS)*       | 2,08                  |
| Potansiyelin gün içi tekrarlanabilirliği (%BSS)*      | 0,29                  |
| Potansiyelin günler arası tekrarlanabilirliği (%BSS)* | 0,58                  |

\*Akım ve potansiyel için yapılan tekrar edilebilirlik çalışmaları  $2 \times 10^{-5}$  M derişime ait 5 değerden elde edilmiştir.

### 3.1.5. Geliştirilen Voltametik Tekniklerin Uygulamaları

SFP için geliştirilen DPV tekniği ile ticari preparatlar ve insan idrar numunelerinde analiz ve geri kazanım çalışmaları yapılmıştır.

#### 3.1.5.1. Geliştirilen Yöntemin Farmasötik Dozaj Şekillerine Uygulanması ve Geri Kazanım Çalışmaları

Bölüm 2.1.3.5' de belirtildiği gibi hazırlanan  $2 \times 10^{-5}$  M derişiminde Ultracef® tablet çözeltileri elektrokimyasal hücreye koyularak, standart çözeltilerle aynı koşullarda voltamogramlar kaydedilmiştir. Standart etken madde için hazırlanmış olan kalibrasyon grafiğindeki doğru denkleminde akım değerleri yerine koyularak preparatlardaki SFP miktarı hesaplanmıştır (Çizelge 3.6). %BH ve %BSS, Bölüm 2.2.2.4.5'te belirtilen formüllere göre hesaplanmıştır:

**Çizelge 3.6.** Ultracet<sup>®</sup> 500 mg tabletlerin pH 3,0 BRT’de DPV yöntemiyle tayin verileri

| Numune No        | Tabletten Analizle Bulunan<br>Madde Miktarı (500 mg) |
|------------------|------------------------------------------------------|
| 1                | 497,39                                               |
| 2                | 499,73                                               |
| 3                | 500,51                                               |
| 4                | 496,61                                               |
| 5                | 500,51                                               |
| X <sub>ort</sub> | 498,95                                               |
| SS               | 1,63                                                 |
| %BSS             | 0,32                                                 |
| %BH              | 0,20                                                 |

Tablet formülasyonunda etken madde dışındaki maddelerin etken maddenin tayini üzerine etkisini belirlemek amacıyla tabletten geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. Geri kazanım çalışmaları için 2.1.3.6. bölümde belirtildiği üzere hazırlanan  $4 \times 10^{-5}$  M derişimde çözeltilerin voltamogramları alınmıştır. Sonuçta, tartılan saf madde miktarının ne ölçüde tayin edilebildiği hesaplanmıştır.

Voltamogramlardan elde edilen pik akımları, Şekil 3.15’te görülmekte olan eğrinin kalibrasyon denkleminde yerine koyularak derişimler bulunmuş, sonra da %BSS, %BH ve % ortalama geri kazanım hesaplanmıştır (Çizelge 3.7).

**Çizelge 3.7.** pH 3,0 BRT içerisinde SFP içeren Ultracef® tabletler için geri kazanım sonuçları

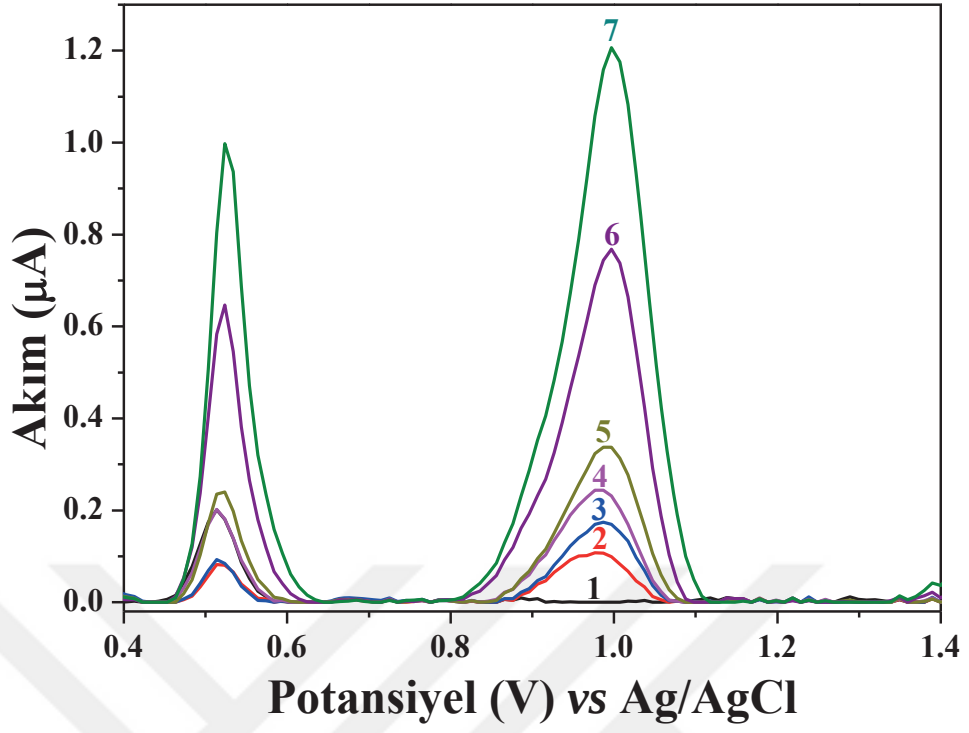
|                             | DPV   |
|-----------------------------|-------|
| Eklenen madde miktarı (mM)  | 20    |
| Bulunan madde miktarı (mM)* | 21,33 |
| %Ortalama geri kazanım*     | 102,7 |
| %BSS                        | 1,55  |
| %BH                         | -2,7  |

\*5 değerden hesaplanmıştır.

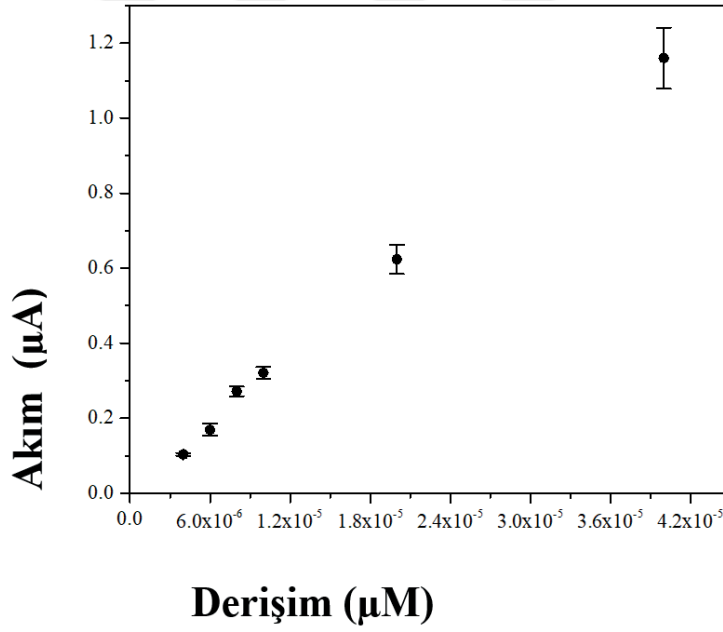
### **3.1.5.2. Geliştirilen Voltametrik Yöntemle Sefprozilin İdrar Numunesinden Analizi ve % Geri Kazanım Çalışmaları**

Bölüm 2.1.3.3’ te anlatıldığı üzere idrar stoğu ve destek için kör çözelti hazırlanır. SFP’ nin idrardan analiz edilen  $4 \times 10^{-6}$ ,  $6 \times 10^{-6}$ ,  $8 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-5}$ ,  $2 \times 10^{-5}$ ,  $4 \times 10^{-5}$  derişimlerdeki ölçümlerine ait voltamogramlar Şekil 3.16’da verilmiştir. Her derişimde üç ölçüm alınıp ortalaması hesaplanarak çizilen akım-derişim grafiğı ise Şekil 3.17’ de verilmiştir. Kalibrasyon eğrisine ait regresyon analizi sonuçları ve gerekli tekrarlanabilirlik verileri de Çizelge 3.8’ de verildiğı gibidir.

İdrar geri kazanım çözeltileri Bölüm 2.1.3.7’ de anlatıldığı gibi hazırlanmıştır. İdrardan yapılan analiz çalışmalarına ait SFP’ nin geri kazanım ve tekrarlanabilirlik, TAS, YS gibi verileri Çizelge 3.8 ve Çizelge 3.9’ da verilmiştir. Geliştirilen yöntemin tekrar edilebilirlik düzeyini anlayabilmek için pik akımları ve potansiyelleri için gün içi ve günler arası tekrar edilebilirlik çalışmaları yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar pik akımları ve pik potansiyelleri için tekrar edilebilirliğı yüksek olduğunu kanıtlamaktadır.



**Şekil 3.16.** SFP'nin pH 3,0 BRT'de idrar numunesi kalibrasyon voltamogramları  
(1) destek; (2)  $4 \times 10^{-6}$  M; (3)  $6 \times 10^{-6}$  M; (4)  $8 \times 10^{-6}$  M; (5)  $1 \times 10^{-5}$  M; (6)  $2 \times 10^{-5}$  M; (7)  $4 \times 10^{-5}$  M.



**Şekil 3.17.** SFP'nin idrar numunesinden analiz edilen  $4 \times 10^{-5}$ ,  $2 \times 10^{-5}$ ,  $1 \times 10^{-5}$ ,  $8 \times 10^{-6}$ ,  $6 \times 10^{-6}$ ,  $4 \times 10^{-6}$  M derişimlerdeki ölçümlerine ait ortalama akım-derişim grafiği

**Çizelge 3.8.** SFP' nin idrardan elde edilen kalibrasyon eğrisine ait regresyon analizi sonuçları ve gerekli validasyon parametreleri.

|                                                       | <b>DPV</b>                            |
|-------------------------------------------------------|---------------------------------------|
| Ölçüm Potansiyeli (mV)                                | 997                                   |
| Doğrusallık Aralığı (M)                               | $4 \times 10^{-6} - 4 \times 10^{-5}$ |
| Eğim ( $\mu A M^{-1}$ )                               | 27788,5                               |
| Kesişim ( $\mu A$ )                                   | 0,0265                                |
| Korelasyon Katsayısı                                  | 0,996                                 |
| Eğimin Standart Hatası                                | 1134,07                               |
| Kesişimin Standart Hatası                             | 0,02646                               |
| YS (M)                                                | $4,15 \times 10^{-7}$                 |
| TAS (M)                                               | $1,26 \times 10^{-6}$                 |
| Akımın gün içi tekrarlanabilirliği (%BSS)*            | 2,47                                  |
| Akımın günler arası tekrarlanabilirliği (%BSS)*       | 2,86                                  |
| Potansiyelin gün içi tekrarlanabilirliği (%BSS)*      | 0,10                                  |
| Potansiyelin günler arası tekrarlanabilirliği (%BSS)* | 0,20                                  |

\*Akım ve potansiyel için yapılan tekrar edilebilirlik çalışmaları  $8 \times 10^{-6}$  M derişime ait 5 değerden elde edilmiştir.

**Çizelge 3.9.** SFP' nin idrar numunesinden geri kazanım verileri

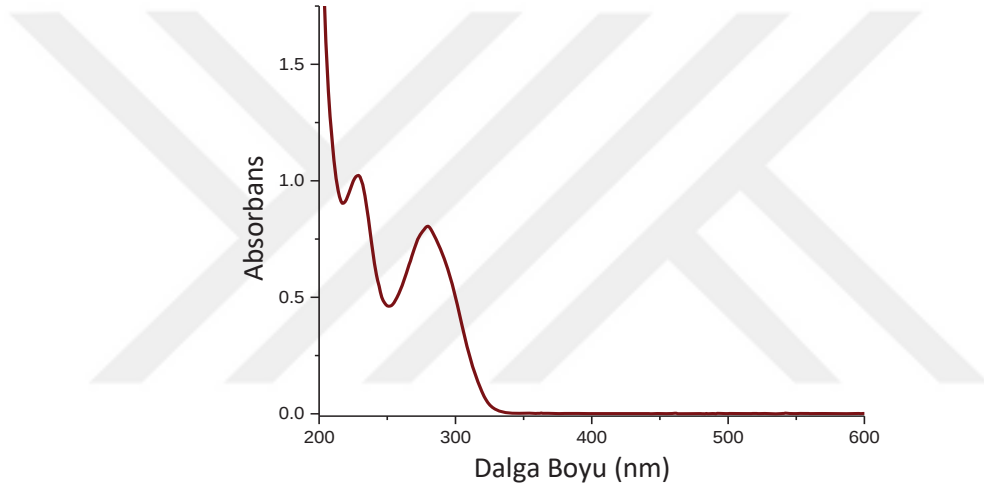
|                         | <b>DPV</b>            |
|-------------------------|-----------------------|
| Eklenen derişim (M)     | $1 \times 10^{-5}$    |
| Bulunan derişim (M)*    | $1,03 \times 10^{-5}$ |
| %Ortalama geri kazanım* | 103,16                |
| %BSS                    | 1,48                  |
| %BH                     | -3,17                 |

\*5 değerden hesaplanmıştır.

### 3.2. Sefprozilin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yöntemi ile Analiz Çalışmaları

#### 3.2.1. Sefprozilin Dalga Boyu Taraması

SFP, suda 280 nm'de maksimum dalga boyuna ( $\lambda_{max}$ 'a) sahiptir. Tek başına veya iç standartla birlikte 280 nm'de SFP' nin saptanması için kabul edilebilir bir yanıt elde edilmiştir (Şekil 3.18).



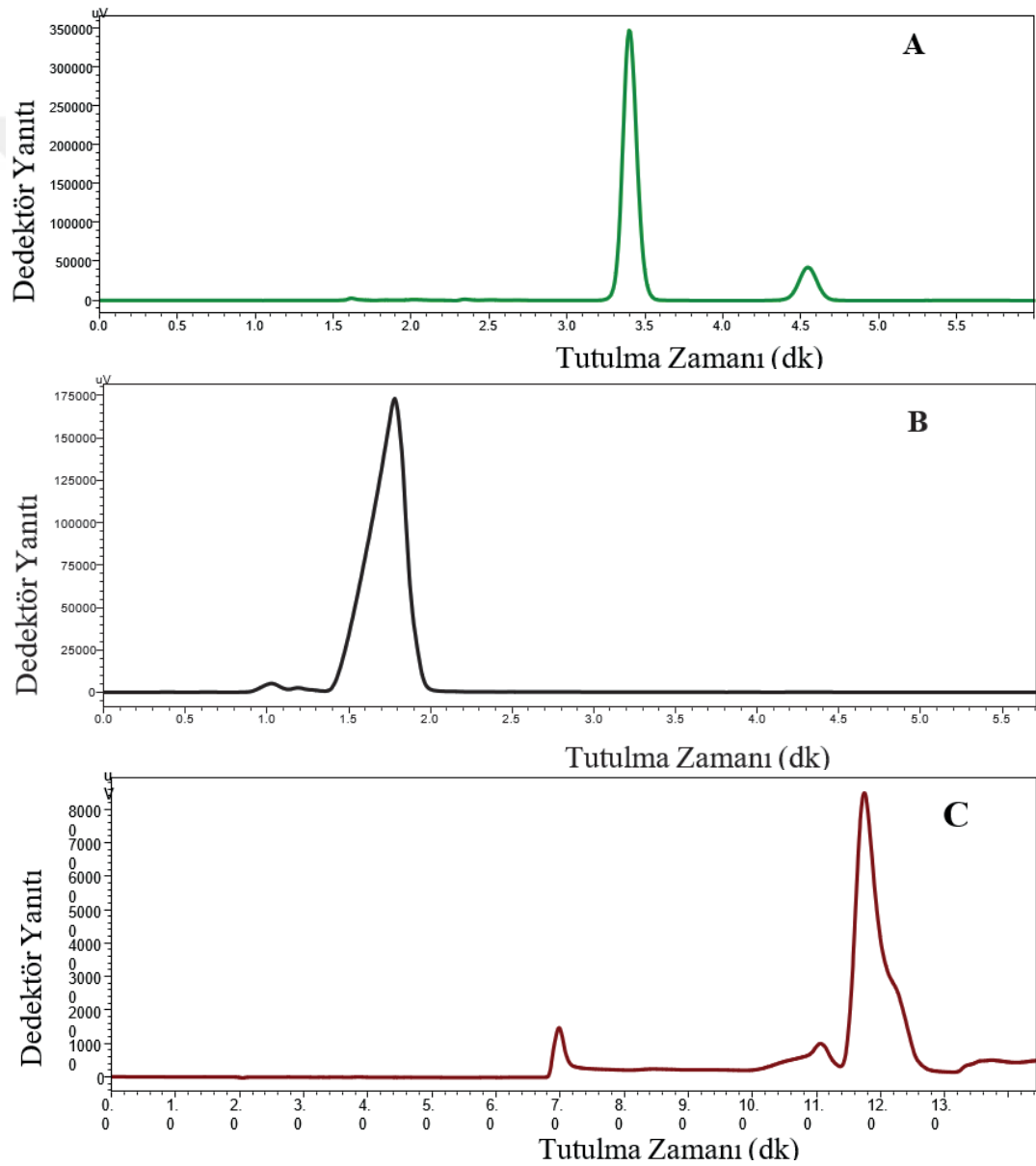
Şekil 3.18. SFP'nin absorpsiyon spektrumu

#### 3.2.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yönteminin Optimizasyonu

YPSK yönteminin optimizasyonu için uygun kolon, iç standart, tampon çözelti ve organik çözücü seçimi yapılmıştır. Tampon çözeltinin derişimi belirlenmiş ve mobil fazda organik çözücü oranı optimize edilmiştir. En uygun pH, sıcaklık ve akış hızı da diğer parametrelerde yapıldığı gibi SUT' a göre değerlendirilerek optimize edilmiştir.

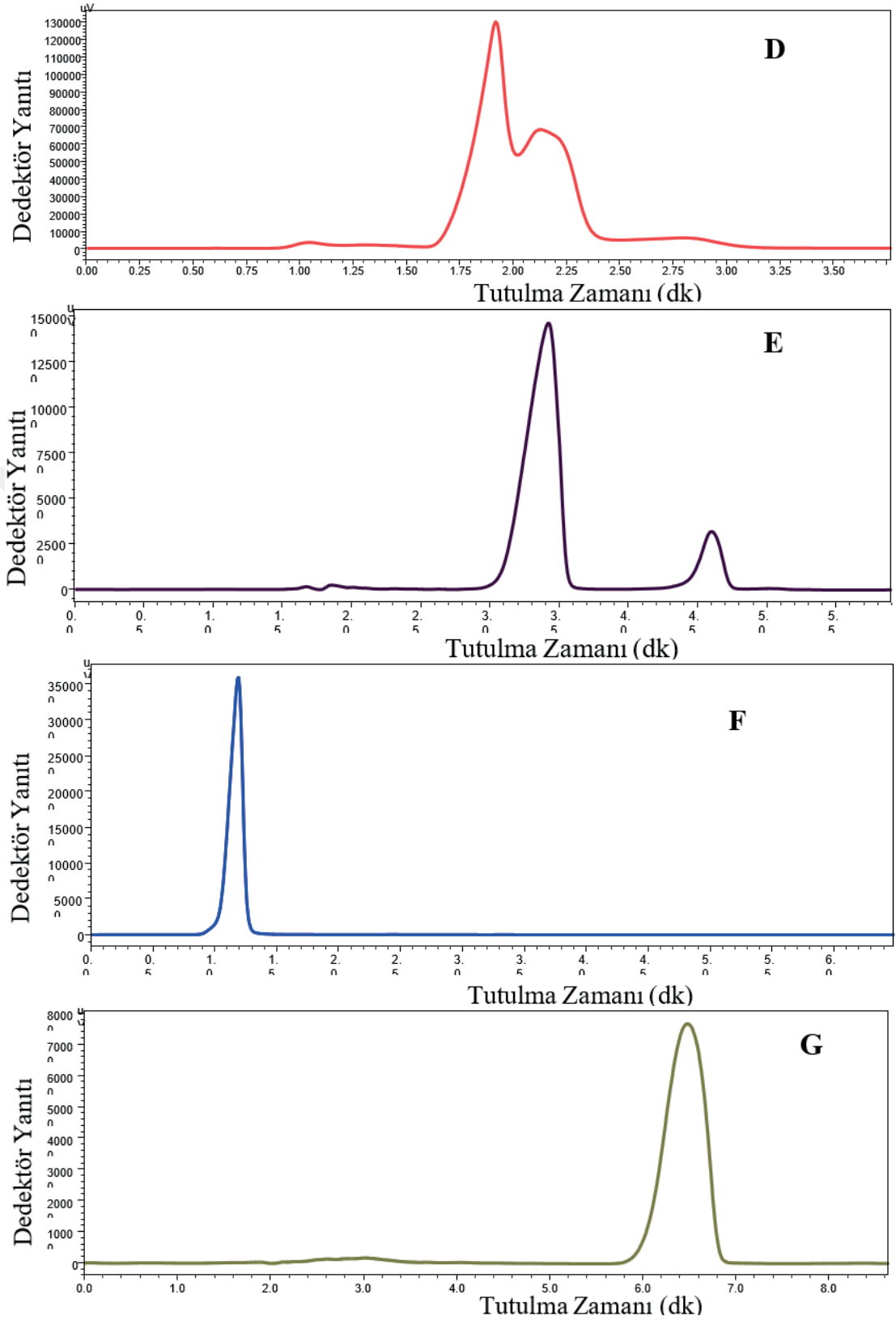
### 3.2.2.1. Sabit faz seçimi

Sabit faz yani kolon seçimi, YPSK' de hassas bir ayırım için çok önemlidir. Bu çalışmada, farklı dolgu malzemelerine sahip yedi adet kolonun kinetik performansı, en uygun sabit fazı seçmek için karşılaştırılmıştır. Şekil 3.19'daki kromatogramlar, aynı uzunluk ve partikül boyutuna sahip farklı kolonlarda elde edilen ayırma verimini göstermektedir. Tüm çalışmalar aynı koşullar altında gerçekleştirilmiştir.



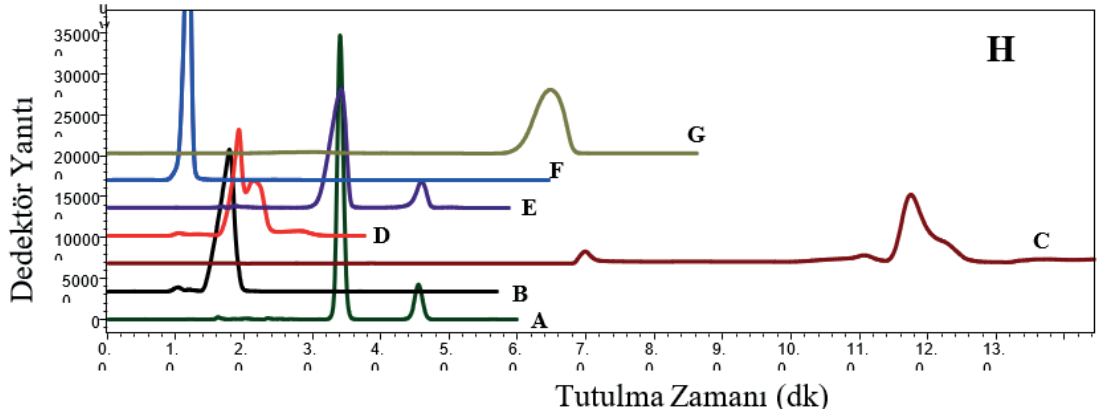
Şekil 3.19. Kolon seçimi

A: ACE 5 C8 (150 mm x 4,6 mm; 5  $\mu$ m), B: SphereClone C6 (150 mm x 4,6 mm; 5  $\mu$ m), C: Xbridge C18 (150 mm x 4,6 mm; 5  $\mu$ m),



**Şekil 3.19. Devam.** Kolon seçimi

**D:** Agilent Zorbax SB- C18 (150 mm x 4,6 mm; 5  $\mu$ m), **E:** Kinetex C18 (150 mm x 4,6 mm; 5  $\mu$ m), **F:** Hichrom-Nucleosil C18 (150 mm x 4,6 mm; 5  $\mu$ m), **G:** ACE 5 C18 (150 mm x 4,6 mm; 5  $\mu$ m),



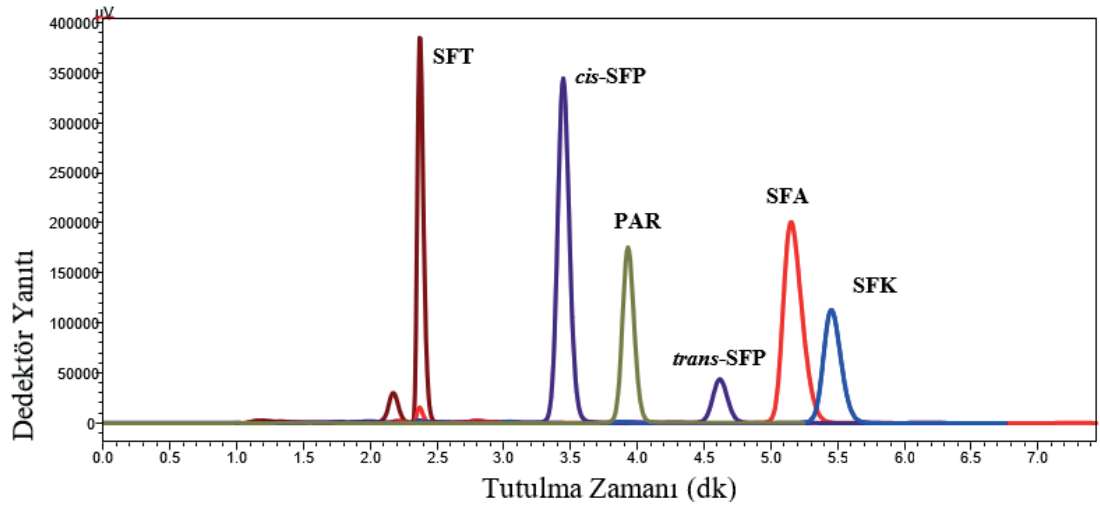
**Şekil 3.20.** Kolon seçimi

**H:** Tüm Kromatogramların Birlikte Gösterimi

SphereClone C6, Xbridge C18, Hichrom-Nucleosil C18 ve ACE 5 C18 kolonları iyi bir ayırma için uygun değildir. Agilent Zorbax SB-C18 kolonuyla kabul edilebilir ayırım gücü değeri sağlanamamıştır. Ayrıca, Kinetex C18 kolonu *cis*-SFP için yüksek kuyruklanma göstermiştir. Bundan dolayı, ACE 5 C8 kolonu, yüksek, kesin, simetrik pik vermesi ve izomerleri yüksek ayırım gücüyle tespit etmesi nedeniyle seçilmiştir (Şekil 3.20).

#### 3.2.2.2. İç standart seçimi

Yöntem geliştirme sırasında, uygun IS seçmek için sisteme SFP ile seftazidim (SFT), PAR, sefazolin (SFA) ve sefaklor (SFK) enjekte edilmiştir. Analizler aynı şartlarda yapılmıştır. SFT ve SFA' da fazladan pikler varken, SFK ile analiz süresi artmıştır (Şekil 3.21).

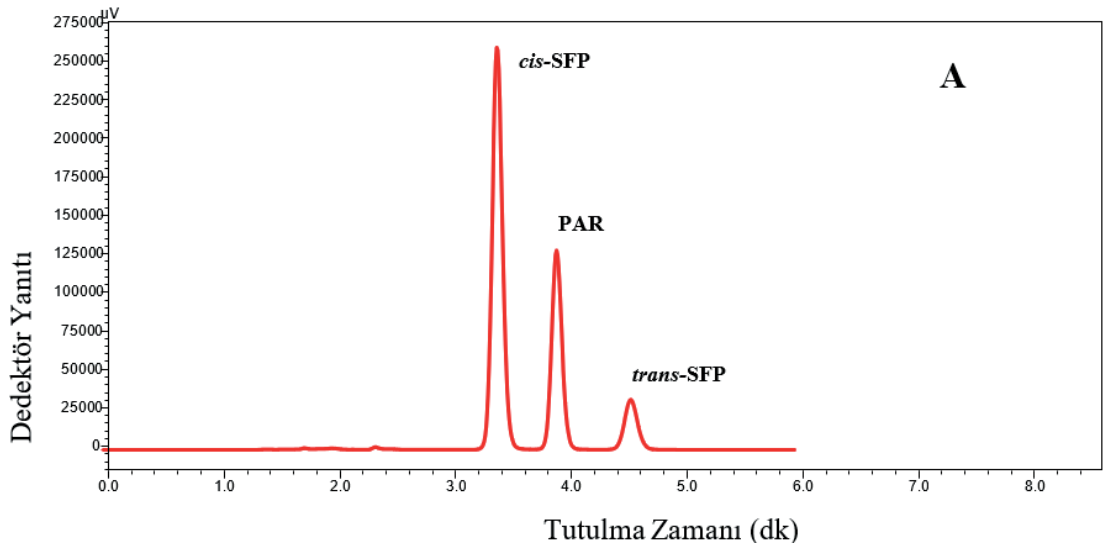


Şekil 3.21. IS optimizasyonu

SFT: Seftazidime, PAR: Parasetamol, SFA: Sefazolin, SFK: Sefaklor

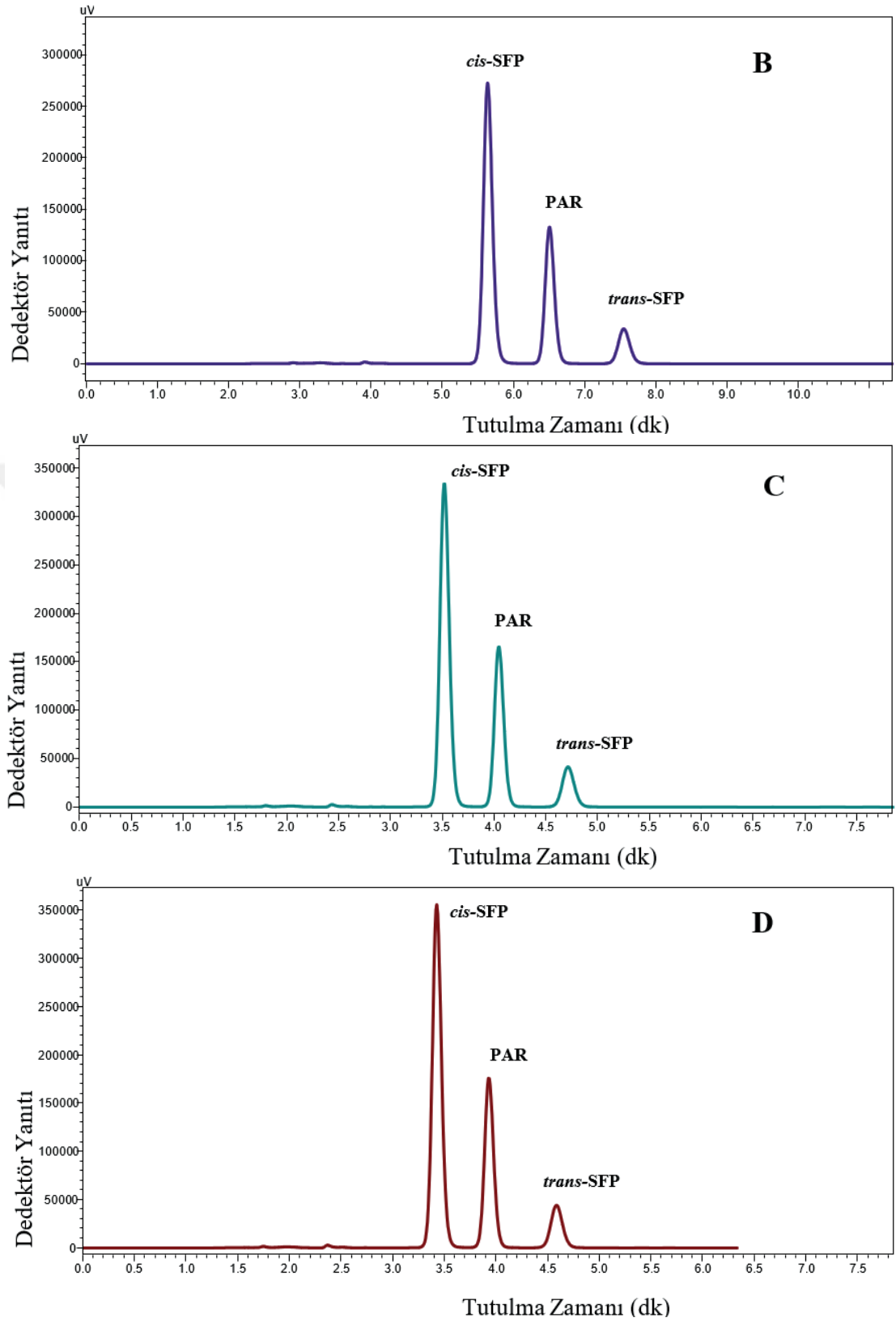
### 3.2.2.3. Tampon Çözeltilinin Seçilmesi

YPSK ayrımlarını etkileyen bir diğer önemli parametre, tampon çözeltisidir. Uygun tampon çözeltisini belirlemek için aynı şartlar altında amonyum asetat, su, amonyum format ve sodyum asetat ile analizler yapılmış ve kromatogramlar verilmiştir (Şekil 3.22).

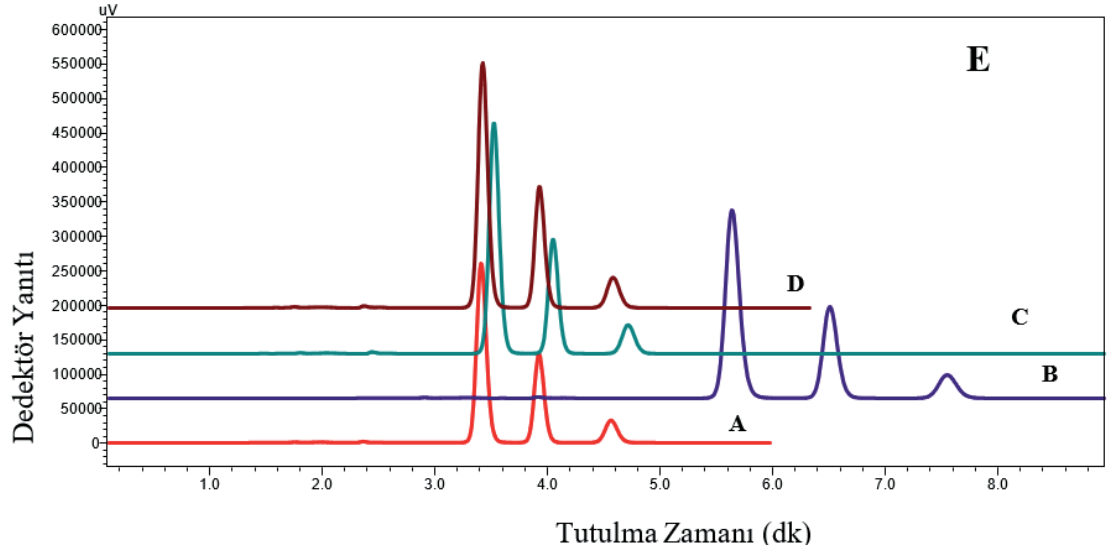


Şekil 3.22. Tampon çözeltinin optimizasyonu

A: Sodyum Asetat,



**Şekil 3.22. Devam.** Tampon çözeltinin optimizasyonu  
**B:** Amonyum Format, **C:** Su, **D:** Amonyum Asetat,



**Şekil 3.23.** Tampon çözeltinin optimizasyonu

**E:** Bir arada gösterim (**A:** Sodyum Asetat, **B:** Amonyum Format, **C:** Su, **D:** Amonyum Asetat)

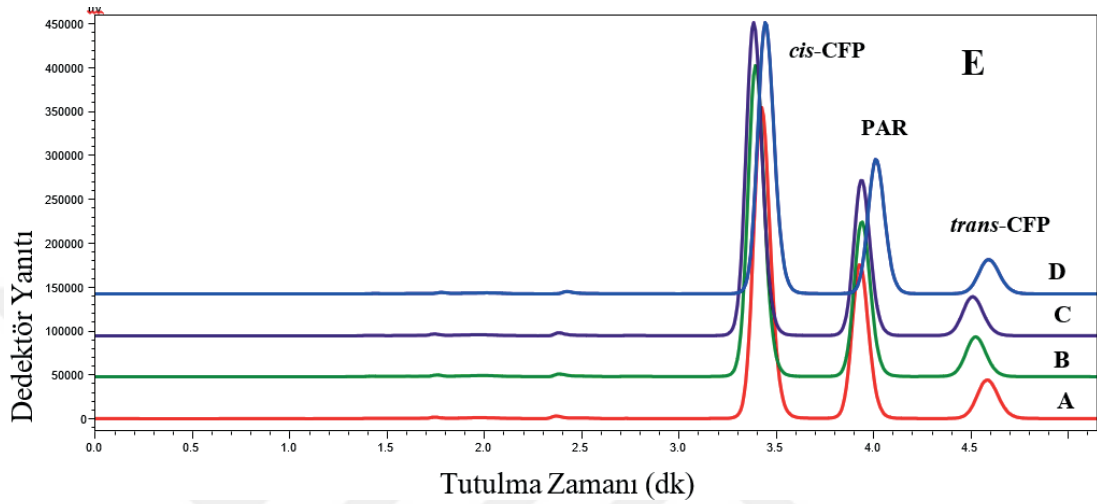
Sonuçlara göre, bu tamponlarda ayırım gücü hemen hemen aynı olmakla birlikte amonyum format kullanıldığında analiz süresinin uzadığı görülmektedir (Çizelge 3.10). Amonyum asetate kullanıldığında, su ve sodyum asetate kullanıldığındakinden daha yüksek pikler elde edilmiştir (Şekil 3.23).

**Çizelge 3.10.** SUT' a göre tampon çözeltilerin karşılaştırılması.

| Tampon Çözelti   | SUT Parametresi           | Amonyum asetate | Su   | Amonyum format | Sodyum asetate |
|------------------|---------------------------|-----------------|------|----------------|----------------|
| <b>cis-SFP</b>   | <b>t<sub>R</sub> (dk)</b> | 3,42            | 3,52 | 5,37           | 3,41           |
|                  | <b>N</b>                  | 5898            | 5967 | 8275           | 5894           |
|                  | <b>R<sub>s</sub></b>      | -               | -    | -              | -              |
|                  | <b>k</b>                  | 1,28            | 1,35 | 0,79           | 1,27           |
|                  | <b>α</b>                  | -               | -    | -              | -              |
|                  | <b>t</b>                  | 1,09            | 1,09 | 1,11           | 1,09           |
| <b>PAR</b>       | <b>t<sub>R</sub> (dk)</b> | 3,93            | 4,05 | 6,51           | 3,93           |
|                  | <b>N</b>                  | 7842            | 7976 | 10805          | 7815           |
|                  | <b>R<sub>s</sub></b>      | 2,84            | 2,89 | 3,49           | 2,89           |
|                  | <b>k</b>                  | 1,62            | 1,70 | 1,17           | 1,62           |
|                  | <b>α</b>                  | 1,27            | 1,26 | 1,48           | 1,26           |
|                  | <b>t</b>                  | 1,09            | 1,09 | 1,10           | 1,09           |
| <b>trans-SFP</b> | <b>t<sub>R</sub> (dk)</b> | 4,58            | 4,71 | 7,55           | 4,57           |
|                  | <b>N</b>                  | 6982            | 6993 | 9604           | 7020           |
|                  | <b>R<sub>s</sub></b>      | 3,30            | 3,28 | 3,73           | 3,25           |
|                  | <b>k</b>                  | 2,05            | 2,14 | 1,50           | 2,05           |
|                  | <b>α</b>                  | 1,27            | 1,26 | 1,19           | 1,27           |
|                  | <b>t</b>                  | 1,07            | 1,07 | 1,09           | 1,10           |

### 3.2.2.4. Tampon Çözeltinin Derişiminin Belirlenmesi

5 mM ile 40 mM aralığında artan derişimlerde kromatogramlar alınarak Amonyum asetatın derişimi, incelenmiştir (Şekil 3.24).



Şekil 3.24. Tampon çözelti (amonyum asetat) derişimi optimizasyonu  
A: 5 mM, B: 10 mM, C: 20 mM, D: 40 mM.

Sonuçlar arasında önemli bir fark bulunmadığından (Çizelge 3.11) 5 mM amonyum asetat seçilmiştir.

Çizelge 3.11. SUT' a göre tampon çözeltinin derişiminin karşılaştırılması.

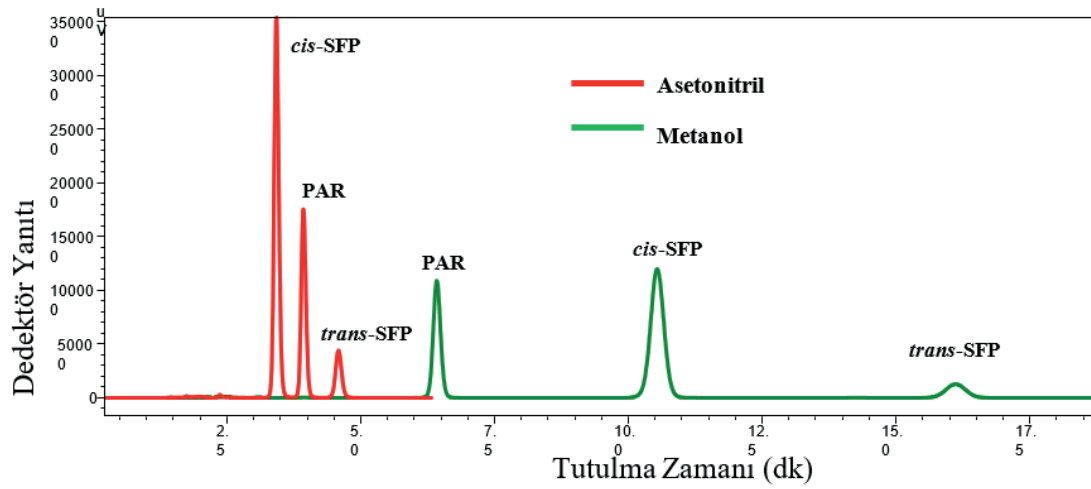
| Tampon Çözeltinin Derişimi |                           | 5 mM | 10 mM | 20 mM | 40 mM |
|----------------------------|---------------------------|------|-------|-------|-------|
| <b>cis-SFP</b>             | <b>t<sub>R</sub> (dk)</b> | 3,42 | 3,39  | 3,38  | 3,44  |
|                            | <b>N</b>                  | 5898 | 5918  | 5925  | 5942  |
|                            | <b>R<sub>S</sub></b>      | -    | -     | -     | -     |
|                            | <b>k</b>                  | 1,28 | 1,28  | 1,28  | 1,29  |
|                            | <b>α</b>                  | -    | -     | -     | -     |
|                            | <b>t</b>                  | 1,09 | 1,08  | 1,09  | 1,09  |
| <b>PAR</b>                 | <b>t<sub>R</sub> (dk)</b> | 3,93 | 3,94  | 3,94  | 4,01  |
|                            | <b>N</b>                  | 7842 | 7945  | 7905  | 8007  |
|                            | <b>R<sub>S</sub></b>      | 2,84 | 3,11  | 3,17  | 3,20  |
|                            | <b>k</b>                  | 1,62 | 1,62  | 1,62  | 1,67  |
|                            | <b>α</b>                  | 1,27 | 1,27  | 1,27  | 1,30  |
|                            | <b>t</b>                  | 1,09 | 1,08  | 1,08  | 1,09  |

**Çizelge 3.11. Devam.** SUT' a göre tampon çözeltinin derişiminin karşılaştırılması.

| Tampon Çözeltinin Derişimi |            | 5 mM | 10 mM | 20 mM | 40 mM |
|----------------------------|------------|------|-------|-------|-------|
| <i>trans</i> -SFP          | $t_R$ (dk) | 4,58 | 4,52  | 4,51  | 4,59  |
|                            | N          | 6982 | 7033  | 6969  | 7094  |
|                            | $R_s$      | 3,30 | 3,01  | 2,93  | 2,97  |
|                            | k          | 2,05 | 2,01  | 2,01  | 2,06  |
|                            | $\alpha$   | 1,27 | 1,24  | 1,24  | 1,23  |
|                            | t          | 1,07 | 1,06  | 1,03  | 1,10  |

### 3.2.2.5. Organik Çözücünün Seçilmesi

Pik şekli ve tutulma süresi esas olarak organik fazdan etkilenir. Mobil faz için organik çözücüler olarak asetonitril ve metanol incelenmiştir. Optimum organik çözücü olarak, elde edilen dar ve keskin pik şekilleri (Şekil 3.25) ve daha kısa analiz süresi (Çizelge 3.12) nedeniyle, asetonitril seçilmiştir.



**Şekil 3.25.** Organik çözücü optimizasyonu (Asetonitril ve metanol, sırasıyla)

**Çizelge 3.12.** SUT' a göre organik çözücülerin karşılaştırması

|                 |            | Asetonitril |     |            | Metanol |
|-----------------|------------|-------------|-----|------------|---------|
| <i>cis</i> -SFP | $t_R$ (dk) | 3,42        | PAR | $t_R$ (dk) | 6,42    |
|                 | N          | 5898        |     | N          | 8943    |
|                 | $R_s$      | -           |     | $R_s$      | -       |
|                 | k          | 1,28        |     | k          | 1,57    |
|                 | $\alpha$   | -           |     | $\alpha$   | -       |
|                 | t          | 1,09        |     | t          | 1,05    |

**Çizelge 3.12. Devam.** SUT' a göre organik çözücülerin karşılaştırması.

|                  |                           | Asetonitril |                  |                           | Metanol |
|------------------|---------------------------|-------------|------------------|---------------------------|---------|
| <b>PAR</b>       | <b>t<sub>R</sub> (dk)</b> | 3,93        | <b>cis-SFP</b>   | <b>t<sub>R</sub> (dk)</b> | 10,54   |
|                  | <b>N</b>                  | 7842        |                  | <b>N</b>                  | 7509    |
|                  | <b>R<sub>S</sub></b>      | 2,84        |                  | <b>R<sub>S</sub></b>      | 10,98   |
|                  | <b>k</b>                  | 1,62        |                  | <b>k</b>                  | 3,22    |
|                  | <b>α</b>                  | 1,27        |                  | <b>α</b>                  | 2,05    |
|                  | <b>t</b>                  | 1,09        |                  | <b>t</b>                  | 1,00    |
| <b>trans-SFP</b> | <b>t<sub>R</sub> (dk)</b> | 4,58        | <b>trans-SFP</b> | <b>t<sub>R</sub> (dk)</b> | 16,11   |
|                  | <b>N</b>                  | 6982        |                  | <b>N</b>                  | 7546    |
|                  | <b>R<sub>S</sub></b>      | 3,30        |                  | <b>R<sub>S</sub></b>      | 9,30    |
|                  | <b>k</b>                  | 2,05        |                  | <b>k</b>                  | 5,44    |
|                  | <b>α</b>                  | 1,27        |                  | <b>α</b>                  | 1,69    |
|                  | <b>t</b>                  | 1,07        |                  | <b>t</b>                  | 0,99    |

### 3.2.2.6. Mobil Fazda Organik Çözücü Oranının Belirlenmesi

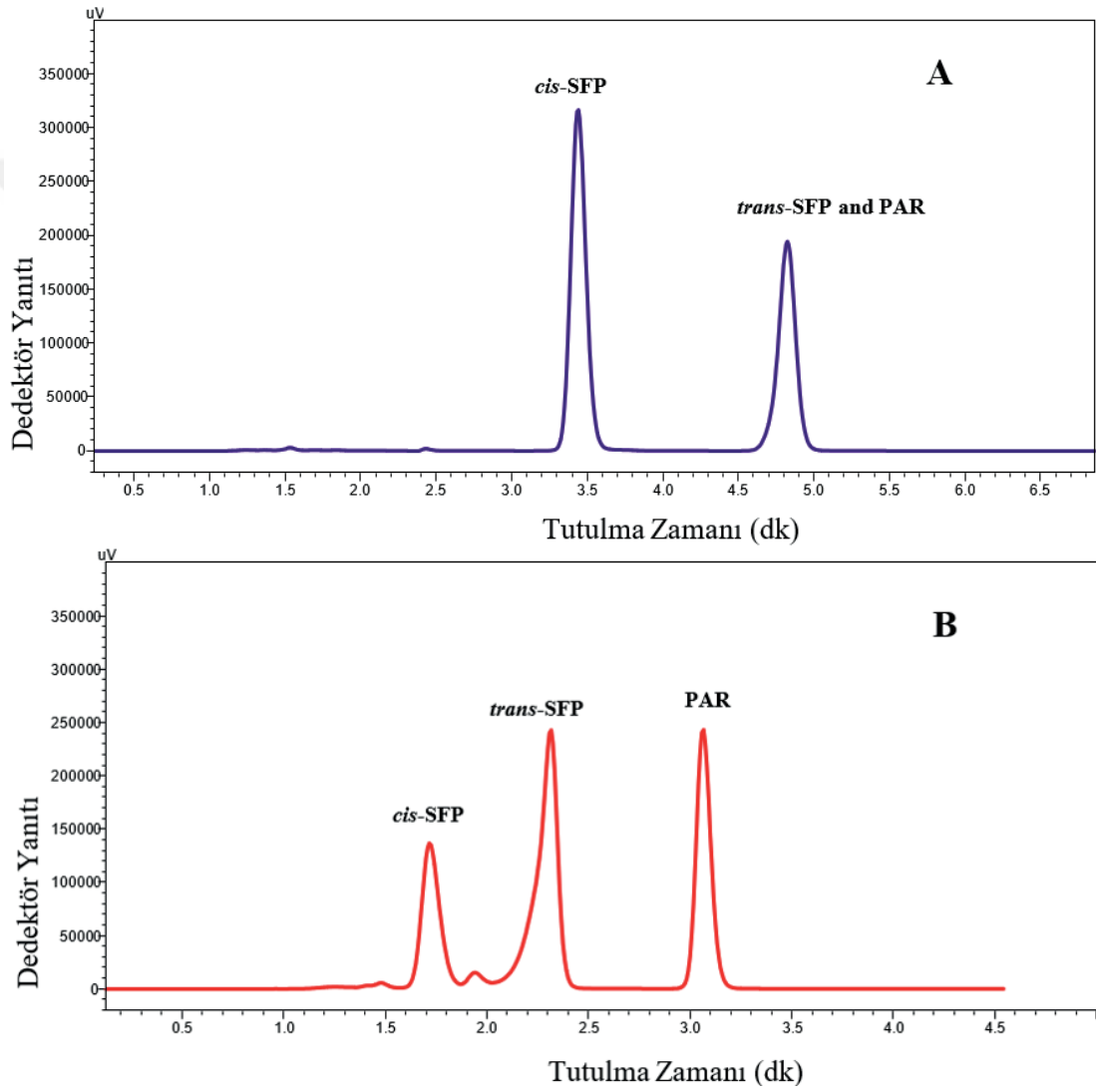
Bu çalışmada mobil fazın organik bileşeni olan asetonitril % 5 ile % 15 aralığında incelenmiştir (Şekil 3.26). % 5'in altında asetonitril kullanıldığında, daha uzun tutulma süresi (yaklaşık 8,5 dakikada *trans*-SFP piki gelmiştir) gösterirken, asetonitril oranının % 15'in üzerine çıkması ekstra pikler çıkmasına neden olmuştur. Ayrıca, %7,5 asetonitril kullanılması, *trans*-SFP piki ile PAR piki (Şekil 3.26A) arasında örtüşmeye neden olmuştur, en iyi ayrılma %10 asetonitrille elde edilmiştir (Çizelge 3.13).

**Çizelge 3.13.** SUT' a göre mobil faz oranının karşılaştırılması

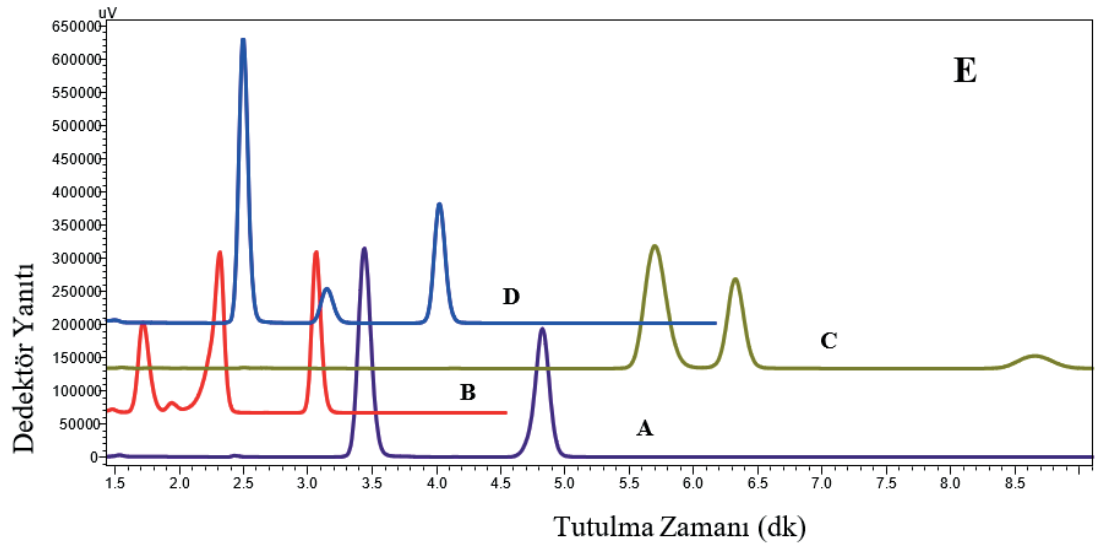
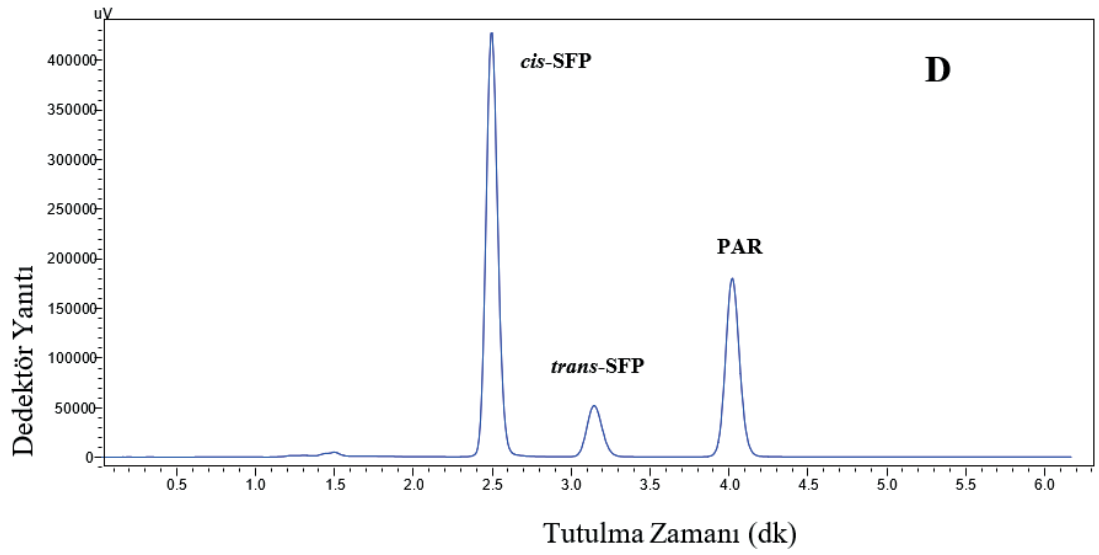
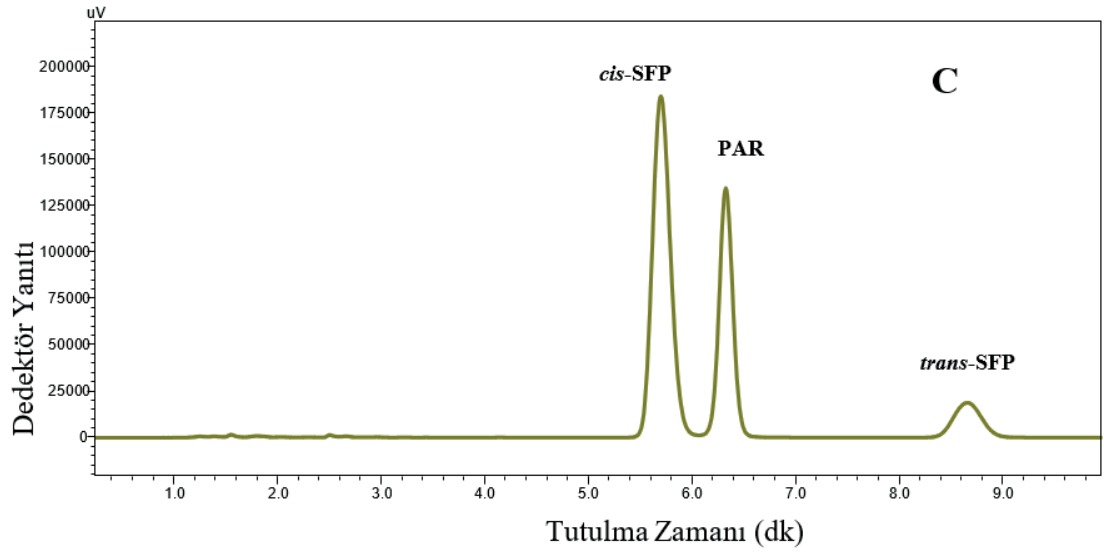
| Tampon Çözelti: Asetonitril (h/h) |                           | 90:10 | 92.5:7.5 | Tampon Çözelti: Asetonitril (h/h) |                           | 95:5 |
|-----------------------------------|---------------------------|-------|----------|-----------------------------------|---------------------------|------|
| <b>cis-SFP</b>                    | <b>t<sub>R</sub> (dk)</b> | 2,50  | 3,44     | <b>cis-SFP</b>                    | <b>t<sub>R</sub> (dk)</b> | 5,70 |
|                                   | <b>N</b>                  | 4298  | 4763     |                                   | <b>N</b>                  | 4745 |
|                                   | <b>R<sub>S</sub></b>      | -     | -        |                                   | <b>R<sub>S</sub></b>      | -    |
|                                   | <b>k</b>                  | 1.27  | -        |                                   | <b>k</b>                  | 2,80 |
|                                   | <b>α</b>                  | -     | -        |                                   | <b>α</b>                  | -    |
|                                   | <b>t</b>                  | 1,10  | 1,09     |                                   | <b>t</b>                  | 1,14 |
| <b>trans-SFP</b>                  | <b>t<sub>R</sub> (dk)</b> | 3,15  | 4,82     | <b>PAR</b>                        | <b>t<sub>R</sub> (dk)</b> | 6,33 |
|                                   | <b>N</b>                  | 4278  | -        |                                   | <b>N</b>                  | 9923 |
|                                   | <b>R<sub>S</sub></b>      | 3,77  | -        |                                   | <b>R<sub>S</sub></b>      | 2,14 |
|                                   | <b>k</b>                  | 1,86  | -        |                                   | <b>k</b>                  | 3,22 |
|                                   | <b>α</b>                  | 1,46  | -        |                                   | <b>α</b>                  | 1,15 |
|                                   | <b>t</b>                  | 1,09  | -        |                                   | <b>t</b>                  | 1,03 |

**Çizelge 3.13. Devam.** SUT' a göre mobil faz oranının karşılaştırılması

| Tampon Çözelti: Asetonitril (h/h) |            | 90:10 | 92,5:7,5 | Tampon Çözelti: Asetonitril (h/h) |            | 95:5 |
|-----------------------------------|------------|-------|----------|-----------------------------------|------------|------|
| PAR                               | $t_R$ (dk) | 4,02  | 4,82     | <i>trans</i> -SFP                 | $t_R$ (dk) | 8,66 |
|                                   | N          | 8284  | -        |                                   | N          | 4657 |
|                                   | $R_s$      | 4,75  | -        |                                   | $R_s$      | 6,12 |
|                                   | k          | 2,65  | -        |                                   | k          | 4,77 |
|                                   | $\alpha$   | 1,43  | -        |                                   | $\alpha$   | 1,48 |
|                                   | t          | 1,08  | -        |                                   | t          | 1,06 |



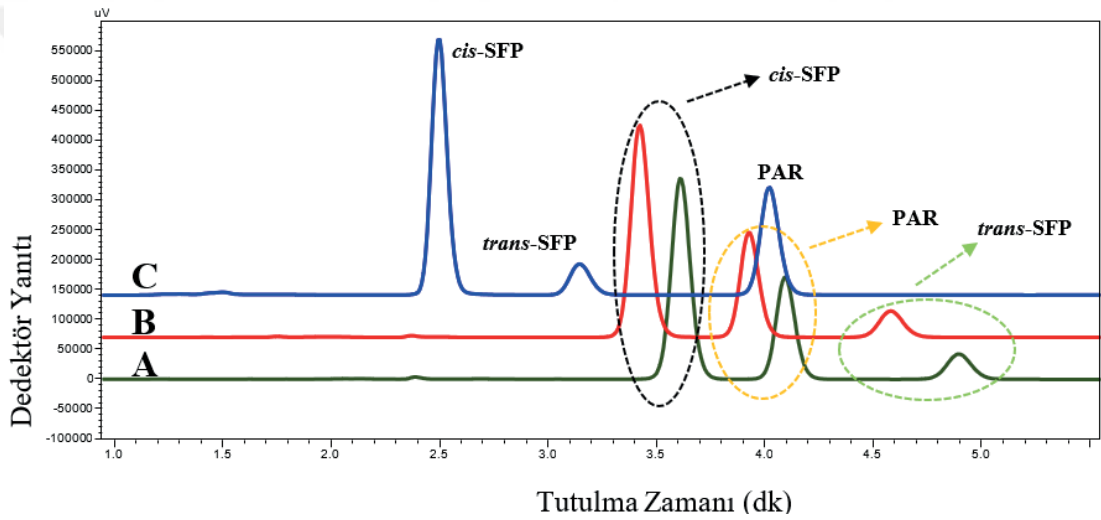
**Şekil 3.26.** Organik çözücü oranı optimizasyonu  
(Tampon çözelti (%): Asetonitril (%)) **A:** 92,5:7,5, **B:** 85:15,



**Şekil 3.26. Devam.** Organik çözücü oranı optimizasyonu (Tampon çözelti (%): Asetonitril (%))  
**C:** 95:5, **D:** 90:10, **E:** Kromatogramların bir arada gösterimi

### 3.2.2.7. pH Belirleme Çalışmaları

Mobil fazın pH'ı, araştırılan bileşiklerin kromatografik davranışlarını etkileyebilir. SFP çok güçlü bir bazik bileşiktir (pKa'ya göre). Bu nedenle, kolonun pH aralığı dikkate alınarak ilk deney için farklı pH'lar (5,0, 6,5 ve 8,0) seçilmiştir. Tamponun pH'ını değiştirmenin *cis*-SFP ve *trans*-SFP' nin tutulma süresi ve dolayısıyla ayrımı üzerinde büyük etkilere sahip olduğu bulunmuştur (Şekil 3.27). Sonuçlara göre (Çizelge 3.14) tampon pH' ı 8,0' e ayarlandığında, *cis*-SFP, *trans*-SFP ve PAR'ın en iyi ayrımı elde edilmiştir.



Şekil 3.27. Tampon çözelti optimizasyonu A: pH 5,0 B: pH 6,5 C: pH 8,0

Çizelge 3.14. Tampon çözeltinin pH'ının SUT' a göre karşılaştırması

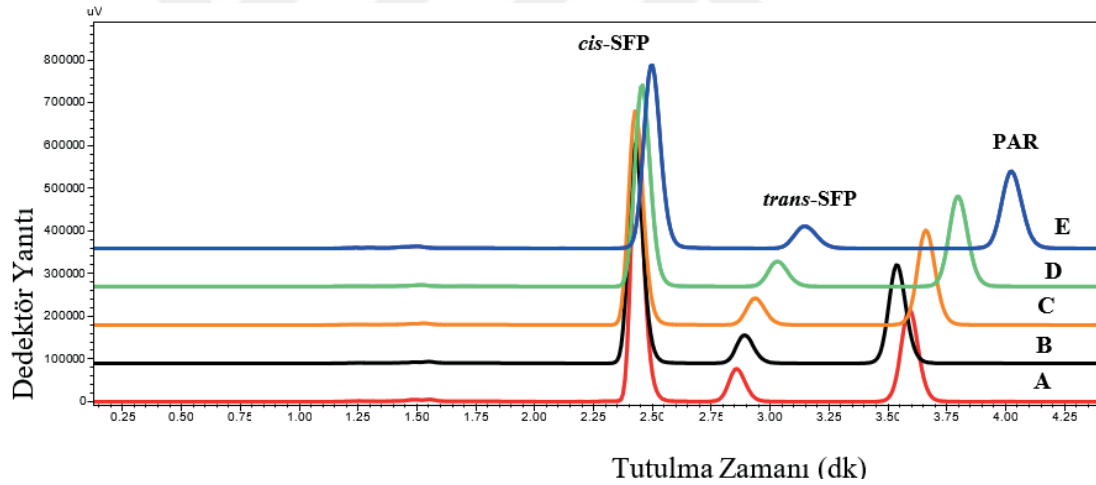
|                | SUT parametreleri         | pH 5.0 | pH 6.5 |                  | SUT Parametreleri         | pH 8.0 |
|----------------|---------------------------|--------|--------|------------------|---------------------------|--------|
| <b>cis-SFP</b> | <b>t<sub>R</sub> (dk)</b> | 3,61   | 3,42   | <b>cis-SFP</b>   | <b>t<sub>R</sub> (dk)</b> | 2,50   |
|                | <b>N</b>                  | 6202   | 5898   |                  | <b>N</b>                  | 4298   |
|                | <b>R<sub>s</sub></b>      | -      | -      |                  | <b>R<sub>s</sub></b>      | -      |
|                | <b>k</b>                  | 1,41   | 1,28   |                  | <b>k</b>                  | 1,27   |
|                | <b>α</b>                  | -      | -      |                  | <b>α</b>                  | -      |
|                | <b>t</b>                  | 1,05   | 1,09   |                  | <b>t</b>                  | 1,10   |
| <b>PAR</b>     | <b>t<sub>R</sub> (dk)</b> | 4,10   | 3,93   | <b>trans-SFP</b> | <b>t<sub>R</sub> (dk)</b> | 3,15   |
|                | <b>N</b>                  | 8148   | 7842   |                  | <b>N</b>                  | 4278   |
|                | <b>R<sub>s</sub></b>      | 2,69   | 2,84   |                  | <b>R<sub>s</sub></b>      | 3,77   |
|                | <b>k</b>                  | 1,73   | 1,62   |                  | <b>k</b>                  | 1,86   |
|                | <b>α</b>                  | 1,23   | 1,27   |                  | <b>α</b>                  | 1,46   |
|                | <b>t</b>                  | 1,07   | 1,09   |                  | <b>t</b>                  | 1,09   |

**Çizelge 3.14. Devam.** Tampon çözeltinin pH'ının SUT' a göre karşılaştırması

|           | SUT parametreleri | pH 5.0 | pH 6.5 |     | SUT Parametreleri | pH 8.0 |
|-----------|-------------------|--------|--------|-----|-------------------|--------|
| trans-SFP | $t_R$ (dk)        | 4,90   | 4,58   | PAR | $t_R$ (dk)        | 4,02   |
|           | N                 | 7096   | 6982   |     | N                 | 8284   |
|           | $R_s$             | 3,97   | 3,30   |     | $R_s$             | 4,75   |
|           | k                 | 1,27   | 2,05   |     | k                 | 2,65   |
|           | $\alpha$          | 0,73   | 1,27   |     | $\alpha$          | 1,43   |
|           | t                 | 1,05   | 1,07   |     | t                 | 1,08   |

### 3.2.2.8. Sıcaklığın Belirlenmesi

Sıcaklık, 25 °C-45 °C arasında değiştirilerek kromatogramlar kaydedilmiştir (Şekil 3.28). 45 °C' ye kadar artan sıcaklığın daha iyi kolon verimi bulunmuştur (Çizelge 3.15). Bu nedenle, optimum kolon sıcaklığı olarak 45 °C seçilmiştir.



**Şekil 3.28.** Kolon sıcaklığı optimizasyonu

A: 45 °C, B: 40 °C, C: 35 °C, D: 30 °C, E: 25 °C

**Çizelge 3.15.** SUT' a göre kolon sıcaklığının karşılaştırılması

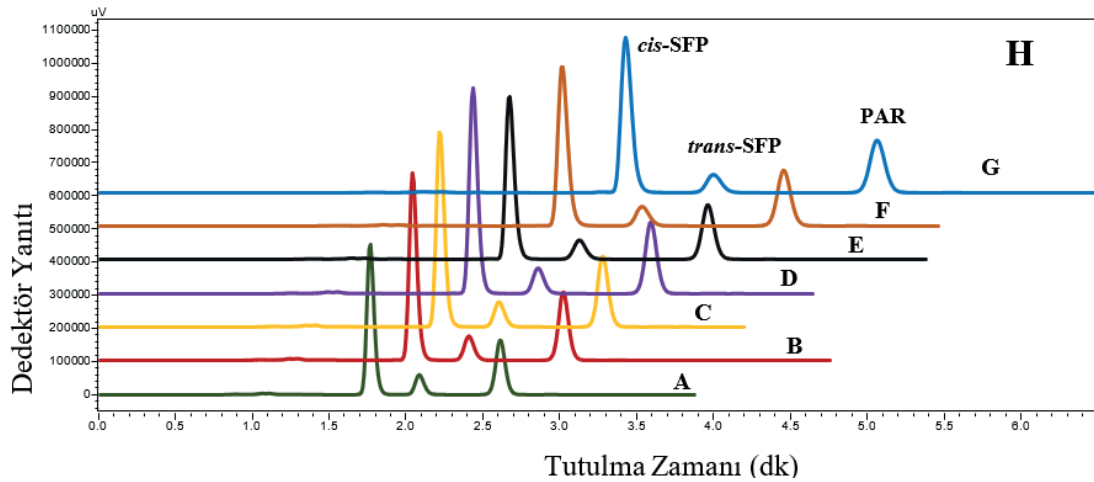
| Sıcaklık |            | 25 °C | 30 °C | 35 °C | 40 °C | 45 °C |
|----------|------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| cis-SFP  | $t_R$ (dk) | 2,50  | 2,45  | 2,43  | 2,42  | 2,42  |
|          | N          | 4298  | 4786  | 5156  | 5383  | 6468  |
|          | $R_s$      | -     | -     | -     | -     | -     |
|          | k          | 1,27  | 1,27  | 1,27  | 1,27  | 1,27  |
|          | $\alpha$   | -     | -     | -     | -     | -     |
|          | t          | 1,10  | 1,11  | 1,14  | 1,13  | 1,22  |

**Çizelge 3.15. Devam. SUT' a göre kolon sıcaklığının karşılaştırılması**

| Sıcaklık         |                           | 25 °C | 30 °C | 35 °C | 40 °C | 45 °C |
|------------------|---------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| <b>trans-SFP</b> | <b>t<sub>R</sub> (dk)</b> | 3,15  | 3,03  | 2,94  | 2,89  | 2,84  |
|                  | <b>N</b>                  | 4278  | 4907  | 5151  | 5524  | 5948  |
|                  | <b>R<sub>S</sub></b>      | 3,77  | 3,65  | 3,40  | 3,22  | 3,14  |
|                  | <b>k</b>                  | 1,86  | 1,75  | 1,67  | 1,62  | 1,58  |
|                  | <b>α</b>                  | 1,46  | 1,38  | 1,32  | 1,28  | 1,24  |
|                  | <b>t</b>                  | 1,09  | 1,10  | 1,12  | 1,12  | 1,13  |
| <b>PAR</b>       | <b>t<sub>R</sub> (dk)</b> | 4,02  | 3,80  | 3,66  | 3,54  | 3,55  |
|                  | <b>N</b>                  | 8284  | 8328  | 8222  | 8298  | 8554  |
|                  | <b>R<sub>S</sub></b>      | 4,75  | 4,52  | 4,46  | 4,17  | 4,83  |
|                  | <b>k</b>                  | 2,65  | 2,45  | 2,27  | 2,21  | 2,23  |
|                  | <b>α</b>                  | 1,43  | 1,40  | 1,36  | 1,36  | 1,41  |
|                  | <b>t</b>                  | 1,08  | 1,09  | 1,08  | 1,09  | 1,06  |

### 3.2.2.9. Akış Hızının Belirlenmesi

Son olarak, akış hızının 0,7'den 1,4 mL dk<sup>-1</sup>'e değişimi araştırıldı (Şekil 3.29) ve 1,0 mL dk<sup>-1</sup> in altındaki değerlerin analiz süresini artırdığı, 1,0 mL dk<sup>-1</sup> in üzerindeki akış hızının ise kolon verimini ve dedektör yanıtını azalttığı bulundu (Çizelge 3.16). En ideal akış hızı 1,0 mL dk<sup>-1</sup> olmak üzere belirlenmiştir.



**Şekil 3.29. Akış hızının belirlenmesi.**

A: 1,4 mL dk<sup>-1</sup>; B: 1,2 mL dk<sup>-1</sup>; C: 1,1 mL dk<sup>-1</sup>; D: 1,0 mL dk<sup>-1</sup>; E: 0,9 mL dk<sup>-1</sup>; F: 0,8 mL dk<sup>-1</sup>; G: 0,7 mL dk<sup>-1</sup>

**Çizelge 3.16.** Sistem uygunluk testlerine göre akış hızının karşılaştırılması.

| Akış hızı |                     | 0,7 mL<br>dk <sup>-1</sup> | 0,8 mL<br>dk <sup>-1</sup> | 0,9 mL<br>dk <sup>-1</sup> | 1,0 mL<br>dk <sup>-1</sup> | 1,1 mL<br>dk <sup>-1</sup> | 1,2 mL<br>dk <sup>-1</sup> | 1,4 mL<br>dk <sup>-1</sup> |
|-----------|---------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| cis-SFP   | t <sub>R</sub> (dk) | 3,43                       | 3,01                       | 2,67                       | 2,42                       | 2,22                       | 2,04                       | 1,76                       |
|           | N                   | 8800                       | 7780                       | 7457                       | 6468                       | 5869                       | 5365                       | 4664                       |
|           | R <sub>s</sub>      | -                          | -                          | -                          | -                          | -                          | -                          | -                          |
|           | k                   | 0,49                       | 0,63                       | 0,62                       | 1,27                       | 1,02                       | 0,85                       | 0,6                        |
|           | α                   | -                          | -                          | -                          | -                          | -                          | -                          | -                          |
|           | t                   | 1,28                       | 1,26                       | 1,28                       | 1,22                       | 1,22                       | 1,21                       | 1,20                       |
| trans-SFP | t <sub>R</sub> (dk) | 4,00                       | 3,53                       | 3,13                       | 2,84                       | 2,61                       | 2,41                       | 2,09                       |
|           | N                   | 7446                       | 6704                       | 6014                       | 5948                       | 5393                       | 4985                       | 4420                       |
|           | R <sub>s</sub>      | 3,45                       | 3,36                       | 3,20                       | 3,14                       | 2,99                       | 2,95                       | 2,80                       |
|           | k                   | 0,74                       | 0,91                       | 0,90                       | 1,58                       | 1,37                       | 1,19                       | 0,9                        |
|           | α                   | 1,61                       | 1,44                       | 1,45                       | 1,24                       | 1,35                       | 1,40                       | 1,50                       |
|           | t                   | 1,17                       | 1,14                       | 1,11                       | 1,13                       | 1,09                       | 1,12                       | 1,09                       |
| PAR       | t <sub>R</sub> (dk) | 5,06                       | 4,45                       | 3,96                       | 3,55                       | 3,28                       | 3,02                       | 2,61                       |
|           | N                   | 10554                      | 10015                      | 9286                       | 8554                       | 7980                       | 7588                       | 6317                       |
|           | R <sub>s</sub>      | 5,57                       | 5,25                       | 5,13                       | 4,83                       | 4,67                       | 4,47                       | 4,10                       |
|           | k                   | 1,20                       | 1,41                       | 1,40                       | 2,23                       | 1,98                       | 1,74                       | 1,37                       |
|           | α                   | 1,62                       | 1,54                       | 1,55                       | 1,41                       | 1,45                       | 1,46                       | 1,53                       |
|           | t                   | 1,05                       | 1,07                       | 1,07                       | 1,06                       | 1,06                       | 1,08                       | 1,06                       |

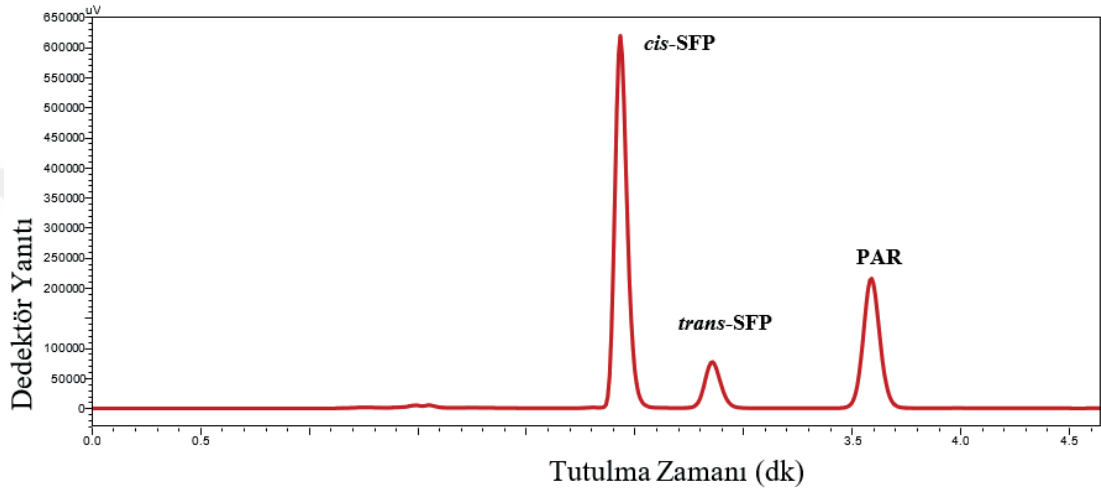
Yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda geliştirilen kromatografik yönteme ait çalışma koşulları Çizelge 3.17’de verilmiştir.

**Çizelge 3.17.** Belirlenen kromatografik çalışma koşulları.

| Parametre                        | Kromatografik Koşullar                                |
|----------------------------------|-------------------------------------------------------|
| Kolon                            | ACE 5 C8 (150 mm x 4,6 mm x 5 µm) kolonu              |
| Hareketli faz bileşimi           | Asetonitril : Tampon-5mM Amonyum asetat (h/h) (90/10) |
| pH                               | 8,0                                                   |
| Sıcaklık (°C)                    | 45 °C                                                 |
| Akış hızı (mL dk <sup>-1</sup> ) | 1 mL dk <sup>-1</sup>                                 |
| Enjeksiyon hacmi (µL)            | 15 µL                                                 |
| Dalga boyu (nm)                  | 280 nm                                                |

### 3.2.3. Sistem Uygunluk Testlerinin Sonuçları

Bu optimize edilmiş yöntemle, *cis*-SFP, *trans*-SFP ve PAR YPSK cihazına enjekte edilmiştir. Çizelge 3.17' de belirtilen koşullarda gerçekleşen analizi gösteren kromatogram Şekil 3.30' da sunulmuştur. Sistem uygunluk parametreleri Çizelge 3.18'de açıklanmıştır.



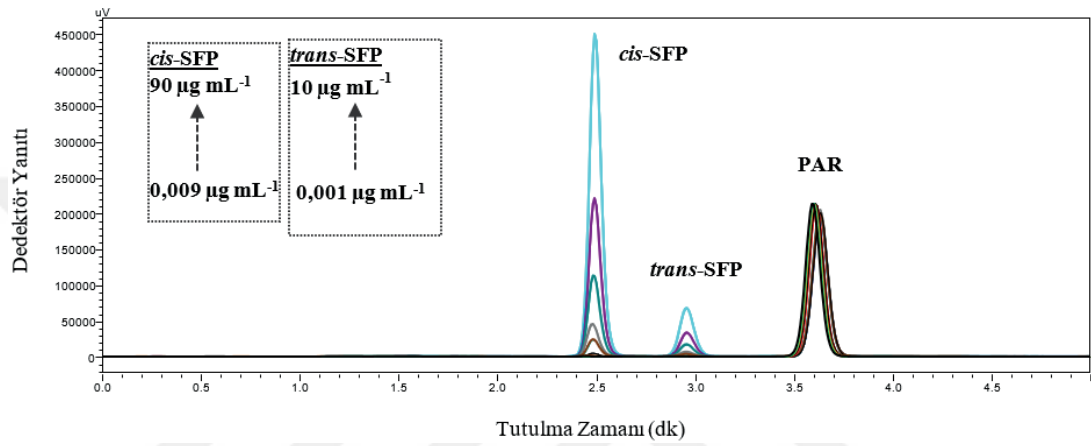
Şekil 3.30. Belirlenen optimum kromatografik koşullarda *cis*-SFP, *trans*-SFP ve PAR'ın kromatogramı.

Çizelge 3.18. Optimum kromatografik koşullardaki sistem uygunluk parametreleri

| PARAMETRELER                   | <i>cis</i> -SFP | <i>trans</i> -SFP | PAR  |
|--------------------------------|-----------------|-------------------|------|
| Tutulma Zamanı (dk)            | 2,42            | 2,84              | 3,55 |
| Kapasite faktörü (k)           | 1,27            | 1,58              | 2,23 |
| Ayrım gücü ( $R_s$ )           | -               | 3.14              | 4.83 |
| Tabaka sayısı (N)              | 6468            | 5948              | 8554 |
| Seçicilik faktörü ( $\alpha$ ) | -               | 1,24              | 1,41 |
| Kuyruklanma faktörü (t)        | 1,22            | 1,13              | 1,06 |

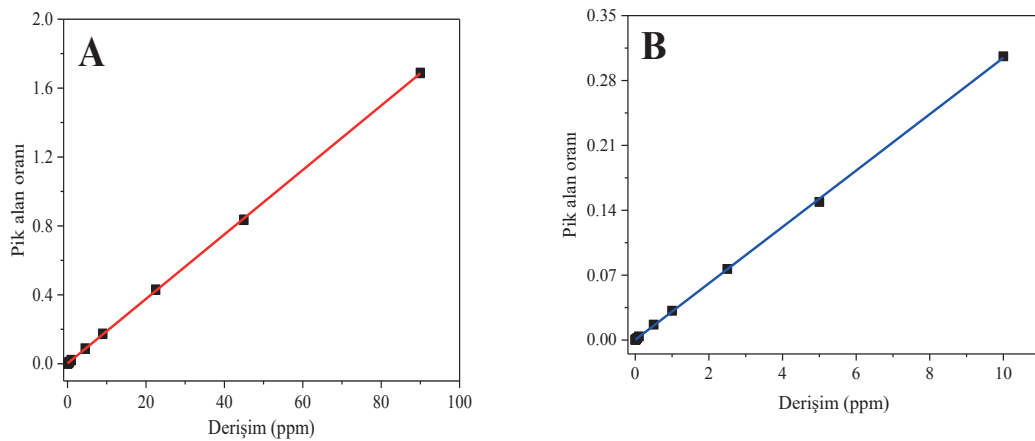
### 3.2.4. Kalibrasyon ve Validasyon Çalışmalarına Ait Sonuçlar

Farklı derişimlere yanıtın doğrusallığını göstermek için SFP standart etken madde için TAS'a yakın değerlerden başlanarak  $90 \mu\text{g mL}^{-1}$  *cis*-SFP,  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  *trans*-SFP'ye kadar değişen derişim seviyelerinde ölçümler alınmıştır (Şekil 3.31). Bu kalibrasyon çalışması serum ve idrar için de yapılmıştır.



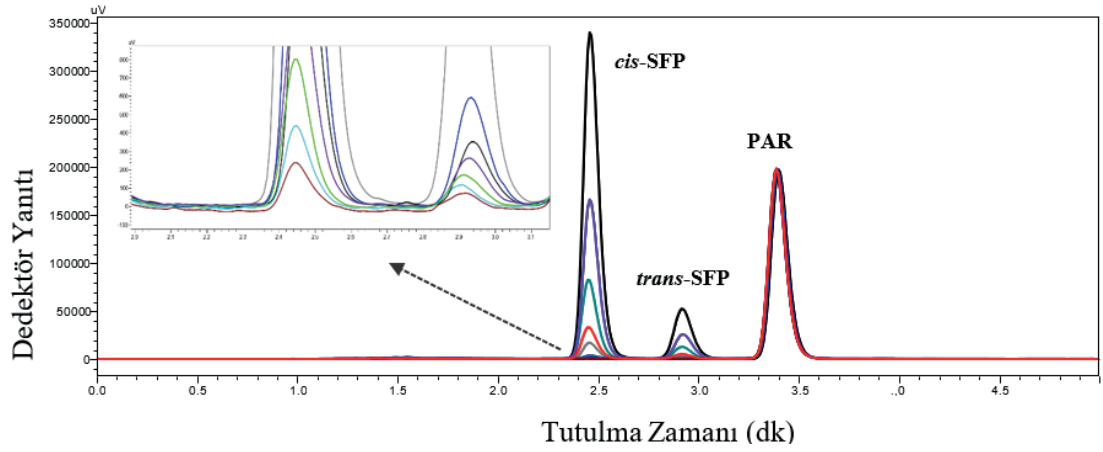
Şekil 3.31. SFP standart madde için optimize koşullarda kalibrasyon kromatogramı.

Optimize edilen kromatografik koşullarda standart etken madde kalibrasyon grafiği *cis*-SFP için 0,009-90 ppm, *trans*-SFP için 0,001-10 ppm doğrusallık aralığında verilmiştir (Şekil 3.32). Bu kalibrasyon çalışması biyolojik örneklerde de yapılmıştır.



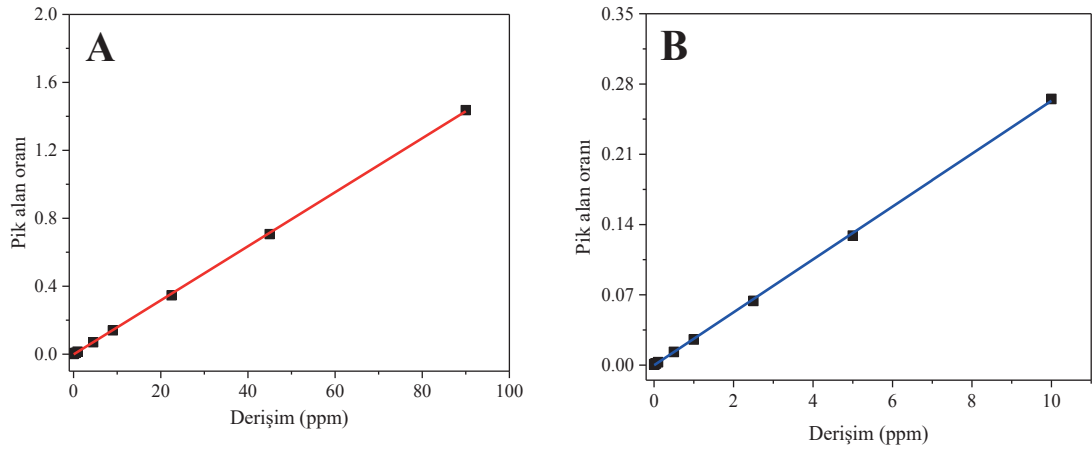
Şekil 3.32. Optimize koşullarda standart etken madde kalibrasyon grafikleri.

(A) *cis*-SFP için 0,009-90 ppm, (B) *trans*-SFP için 0,001-10 ppm doğrusallık aralığında kalibrasyon

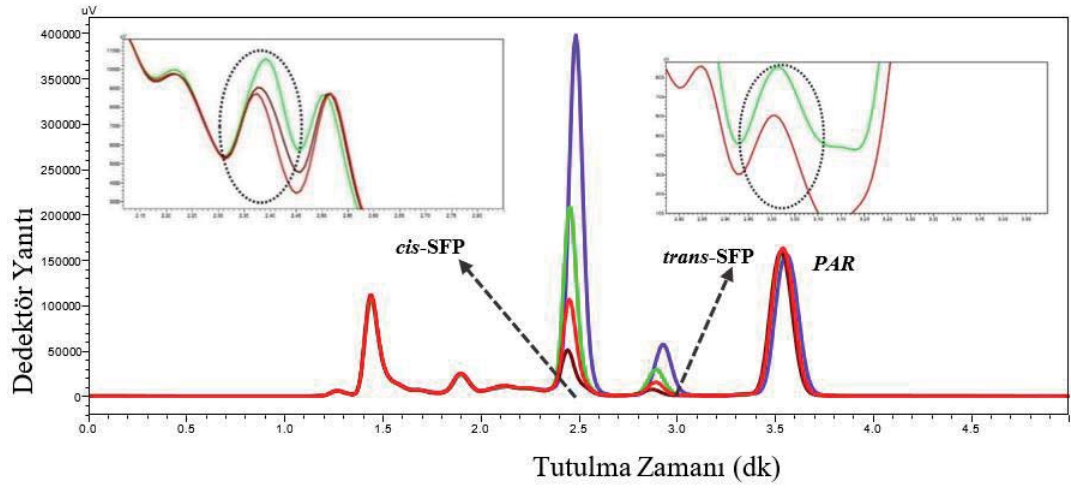


**Şekil 3.33.** Optimize edilen koşullarda yapılan, serum kalibrasyon kromatogramı

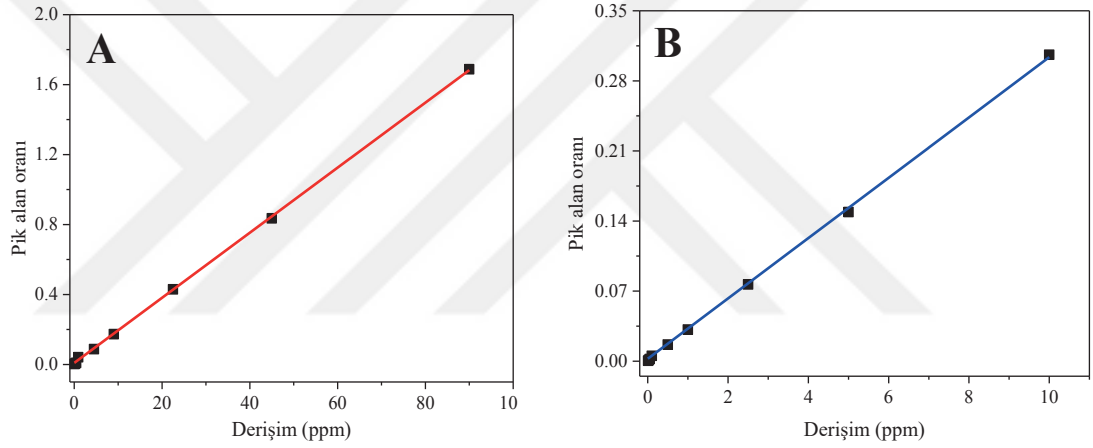
Optimize edilen kromatografik koşullarda serum numunesinden kalibrasyon grafiği *cis*-SFP için 0,009-90 ppm, *trans*-SFP için 0,001-10 ppm doğrusallık aralığında verilmiştir (Şekil 3.34). Optimize koşullarda idrar örneğinden SFP tayini kalibrasyon grafikleri *cis*-SFP için 0,09-90 ppm, *trans*-SFP 0,01-10 ppm doğrusallık aralığında verilmiştir (Şekil 3.36). Serum ve idrar numunelerinde kalibrasyon kromatogramları Şekil 3.33 ve Şekil 3.35'te gösterilmiştir.



**Şekil 3.34.** Optimize koşullarda serum örneğinden SFP tayini kalibrasyon grafikleri. (A) *cis*-SFP için 0,009-90 ppm, (B) *trans*-SFP 0,001-10 ppm doğrusallık aralığında kalibrasyon



**Şekil 3.35.** Optimize koşullarla elde edilen, idrardaki kalibrasyon kromatogramları



**Şekil 3.36.** Optimize koşullarda idrar örneğinden SFP tayini kalibrasyon grafikleri  
(A) *cis*-SFP için 0,09-90 ppm, (B) *trans*-SFP 0,01-10 ppm doğrusallık aralığında kalibrasyon

Kalibrasyon eğrileri için lineer regresyon verileri standart etken madde, serum numunesi ve idrar numunesinden analiz için doğrusallık aralığında iyi bir ilişki göstermiş olup kalibrasyon parametreleri Çizelge 3.19' da verilmiştir. Tüm matrislerde korelasyon katsayısı 0,999 bulunmuştur. Ayrıca YS ve TAS değerleri, geliştirilen yöntemin literatürdeki yöntemlerden daha hassas olduğunu göstermektedir.

*cis*-SFP, *trans*-SFP ve PAR' ın kromatografik analizi için geliştirilen prosedür, doğrusallık, YS, TAS, kesinlik, doğruluk, seçicilik ve sağlamlık açısından ICH Q2(R1) ve FDA' ya göre doğrulanmıştır.

**Çizelge 3.19.** *cis*-SFP ve *trans*-SFP için kalibrasyon verilerinin istatistiksel değerlendirmesi

| Validasyon Parametreleri                      | Standart etken madde  |                       | Serum                |                       | İdrar                 |                       |
|-----------------------------------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
|                                               | <i>cis</i> -SFP       | <i>trans</i> -SFP     | <i>cis</i> -SFP      | <i>trans</i> -SFP     | <i>cis</i> -SFP       | <i>trans</i> -SFP     |
| Doğrusallık aralığı ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) | 0,009-90              | 0,001-10              | 0,009-90             | 0,001-10              | 0,09-90               | 0,01-10               |
| Eğim                                          | 0,0187                | 0,0304                | 0,0159               | 0,0263                | 0,0175                | 0,0246                |
| Kesişim                                       | 0,0022                | 0,0004                | -0,0011              | $-9 \times 10^{-5}$   | 0,0145                | 0,0051                |
| Korelasyon katsayısı                          | 0,999                 | 0,999                 | 0,999                | 0,999                 | 0,999                 | 0,999                 |
| Eğimin standart hatası                        | $4,43 \times 10^{-5}$ | $1,39 \times 10^{-4}$ | $5,8 \times 10^{-5}$ | $1,35 \times 10^{-4}$ | $1,45 \times 10^{-4}$ | $1,58 \times 10^{-4}$ |
| Kesişimin standart hatası                     | 0,0014                | $1,8 \times 10^{-4}$  | 0,0018               | $4,67 \times 10^{-5}$ | 0,005                 | $6,07 \times 10^{-4}$ |
| YS ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )                  | 0,0025                | 0,0003                | 0,0026               | 0,0003                | 0,026                 | 0,003                 |
| TAS ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )                 | 0,0085                | 0,001                 | 0,0086               | 0,001                 | 0,087                 | 0,01                  |
| Gün içi tekrarlanabilirlik (%BSS) *           | 0,753                 | 0,502                 | 0,100                | 0,242                 | 0,302                 | 0,318                 |
| Günler arası tekrarlanabilirlik (%BSS) *      | 1,210                 | 0,853                 | 0,841                | 0,734                 | 0,847                 | 0,737                 |

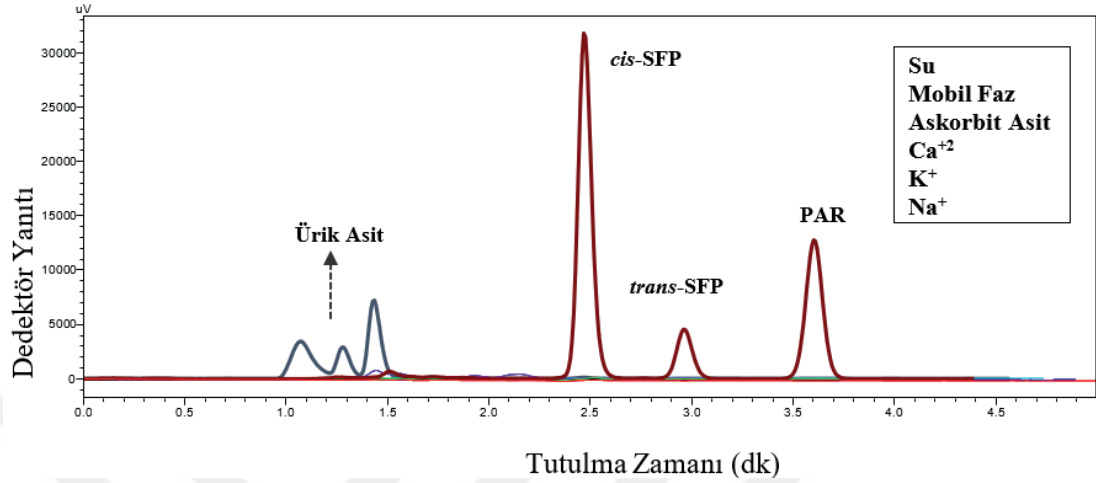
\* 5 tekrardan elde edilmiştir.

Tekrarlanabilirlik, *cis*-SFP ve *trans*-SFP' nin üç farklı derişiminin her birinden beş tekrarla (%BSS) hesaplanarak belirlenmiştir. Önerilen yöntemin kesinliği, Çizelge 3.19' da belirtildiği üzere %BSS değerlerinin 2' den az olmasıyla gösterilmiştir.

Geliştirilen yöntemin doğruluğu, saf etken maddenin ticari tablet, serum ve idrardan yapılan analizinde doğrusallık aralığında dört farklı derişimde *cis*-SFP ve *trans*-SFP' nin beş ölçümünün ortalama % geri kazanımlarının hesaplanmasıyla belirlenmiştir. Geri kazanım çalışmaları bölümünde verilmiştir.

Seçiciliği, analitlerle birlikte su, mobil faz çözeltisi, askorbik asit, ürik asit,  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{K}^{+}$ ,  $\text{Na}^{+}$ , ilaçsız serum ve ilaçsız idrar enjekte edilmesiyle değerlendirilmiştir. *cis*-SFP, *trans*-SFP ve PAR pikleriyle girişim yapan hiçbir pik bulunmadığı görülmüştür bu da

yöntemin SFP için seçici olduğunu birlikte kolona verilen maddelere rağmen analizinde herhangi bir etkiye neden olmadığını göstermektedir (Şekil 3.37).



Şekil 3.37. Optimize kromatografik koşullardaki kromatogramın seçiciliği.

Ayrıca, kasıtlı ufak değişiklikler altında SFP analiz edilerek yöntemin sağlamlığı gösterilmiştir. Dalga boyundaki ( $\pm 2,0$ ), sıcaklıktaki ( $\pm 2,0$ ) ve akış hızındaki ( $\pm 0,1$ ) kasıtlı ufak değişiklikler, yöntemin sağlamlığını analiz etmek için hesaplanan %BSS verileri ile değerlendirilmiş ve sonuç olarak, küçük değişikliklerin, optimize edilmiş kromatografik yöntemi önemli ölçüde etkilemediği görülmüştür (Çizelge 3. 20).

Çizelge 3.20. Kasıtlı değişiklikler altında yöntemin sağlamlığını kontrol etme çalışmasının sonuçları.

| Değişen koşullar                   | Tutulma zamanı (dk) |                   | Dedektör yanıtı (derişim $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) |                   |
|------------------------------------|---------------------|-------------------|--------------------------------------------------|-------------------|
|                                    | <i>cis</i> -SFP     | <i>trans</i> -SFP | <i>cis</i> -SFP                                  | <i>trans</i> -SFP |
| Akış hızı: 1,1 mL dk <sup>-1</sup> | 2,30                | 2,74              | 99,95                                            | 9,50              |
| ss                                 | 0,006               | 0,007             | 0,36                                             | 0,18              |
| %BSS                               | 0,27                | 0,26              | 0,37                                             | 1,89              |
| Akış hızı: 1,0 mL dk <sup>-1</sup> | 2,50                | 2,99              | 101,72                                           | 10,20             |
| ss                                 | 0,006               | 0,008             | 0,21                                             | 0,19              |
| %BSS                               | 0,25                | 0,27              | 0,21                                             | 1,87              |

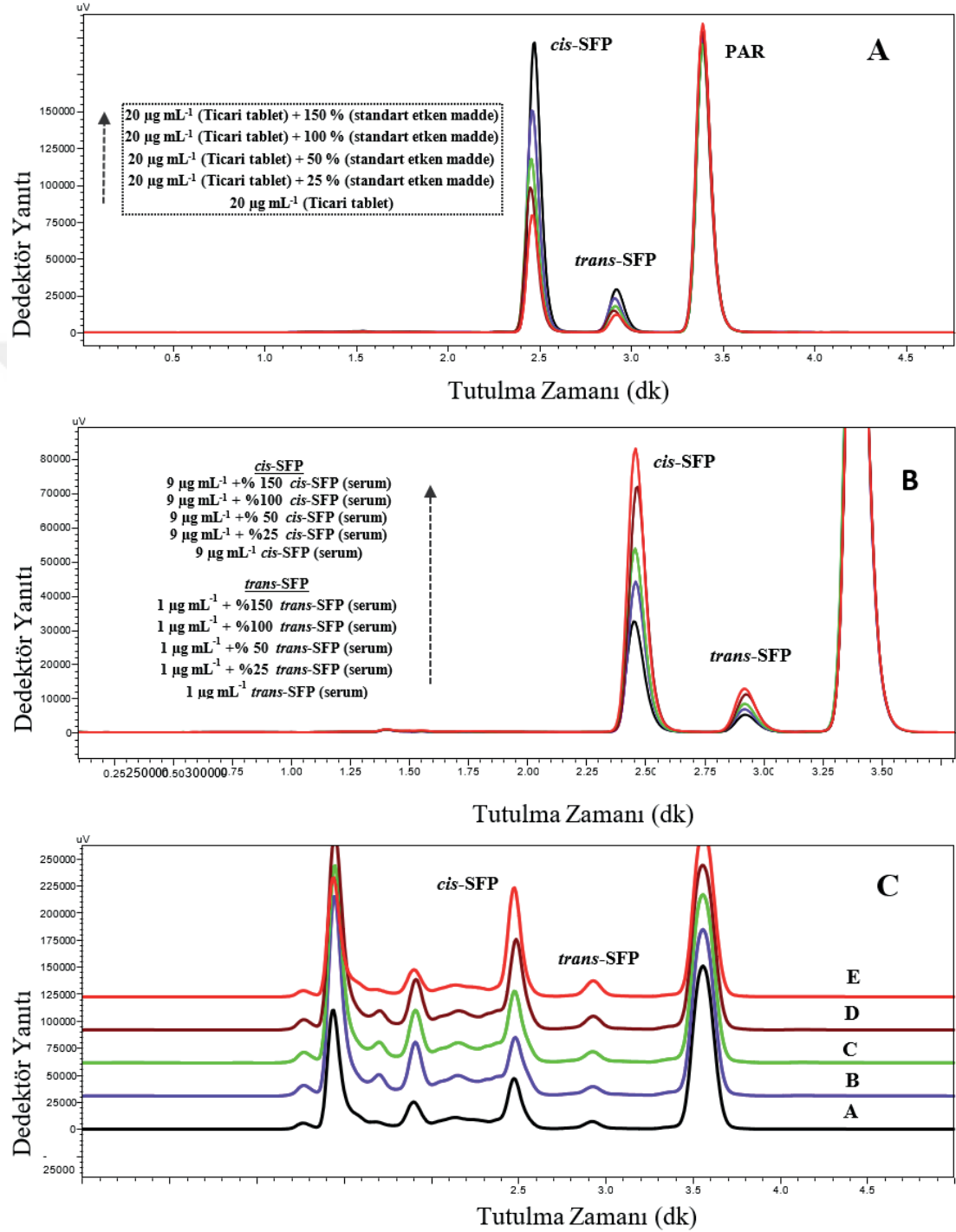
**Çizelge 3.20. Devam.** Kasıtlı değişiklikler altında yöntemin sağlamlığını kontrol etme çalışmasının sonuçları.

| Değişen koşullar                   | Tutulma zamanı (dk) |                   | Dedektör yanıtı (derişim $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) |                   |
|------------------------------------|---------------------|-------------------|--------------------------------------------------|-------------------|
|                                    | <i>cis</i> -SFP     | <i>trans</i> -SFP | <i>cis</i> -SFP                                  | <i>trans</i> -SFP |
| Akış hızı: 0,9 mL dk <sup>-1</sup> | 2,81                | 3,32              | 99,61                                            | 9,34              |
| ss                                 | 0,016               | 0,017             | 0,35                                             | 0,18              |
| %BSS                               | 0,57                | 0,54              | 0,35                                             | 1,95              |
| Sıcaklık: 43 °C                    | 2,55                | 3,04              | 98,50                                            | 10,37             |
| ss                                 | 0,011               | 0,007             | 0,66                                             | 0,11              |
| %BSS                               | 0,43                | 0,25              | 0,67                                             | 1,09              |
| Sıcaklık: 45 °C                    | 2,50                | 2,99              | 101,72                                           | 10,20             |
| ss                                 | 0,006               | 0,008             | 0,21                                             | 0,19              |
| %BSS                               | 0,25                | 0,27              | 0,21                                             | 1,87              |
| Sıcaklık: 47 °C                    | 2,41                | 2,86              | 98,78                                            | 10,85             |
| ss                                 | 0,009               | 0,012             | 0,36                                             | 0,19              |
| %BSS                               | 0,37                | 0,41              | 0,37                                             | 1,78              |
| Dalga boyu: 278 nm                 | 2,50                | 2,98              | 101,06                                           | 9,96              |
| ss                                 | 0,004               | 0,011             | 0,15                                             | 0,19              |
| %BSS                               | 0,16                | 0,39              | 0,14                                             | 1,91              |
| Dalga boyu: 280 nm                 | 2,50                | 2,99              | 101,72                                           | 10,20             |
| ss                                 | 0,006               | 0,008             | 0,21                                             | 0,19              |
| %BSS                               | 0,25                | 0,27              | 0,21                                             | 1,87              |
| Dalga boyu: 282 nm                 | 2,51                | 2,96              | 101,06                                           | 9,96              |
| ss                                 | 0,008               | 0,01              | 0,15                                             | 0,19              |
| %BSS                               | 0,32                | 0,39              | 0,14                                             | 1,92              |

### 3.2.5. Geri Kazanım Çalışmaları

Yöntemin en uygun şartlarını belirledikten ve valide ettikten sonra yöntemin doğruluğunu göstermek için idrar, serum ve farmasötik dozaj formundan SFP numuneleri ile geri kazanım çalışmaları standart ekleme yöntemiyle saf madde ilave edilerek yapılmıştır (Şekil 3.38). Geri kazanım çalışmaları için çözeltiler bölüm 2.1.3.8.'de anlatıldığı gibi hazırlanmıştır. Geri kazanımın hesaplanması için elde edilen sonuçlardan numunenin bilinen etken madde miktarının farkı alınarak, eklenen

saf madde miktarının ne kadarının analiz edilebildiği belirlenmiştir. % geri kazanım değerleri %97,33-108,39 arasında bulunmuştur.



**Şekil 3.38.** Geri kazanım çalışmalarına ait kromatogramlar.  
 (A) Standart etken madde, (B) serum ve (C) idrar

Çizelge 3.21. Ticari tablet formu, serum ve idrar numunelerinden analizleri için geri kazanım sonuçları

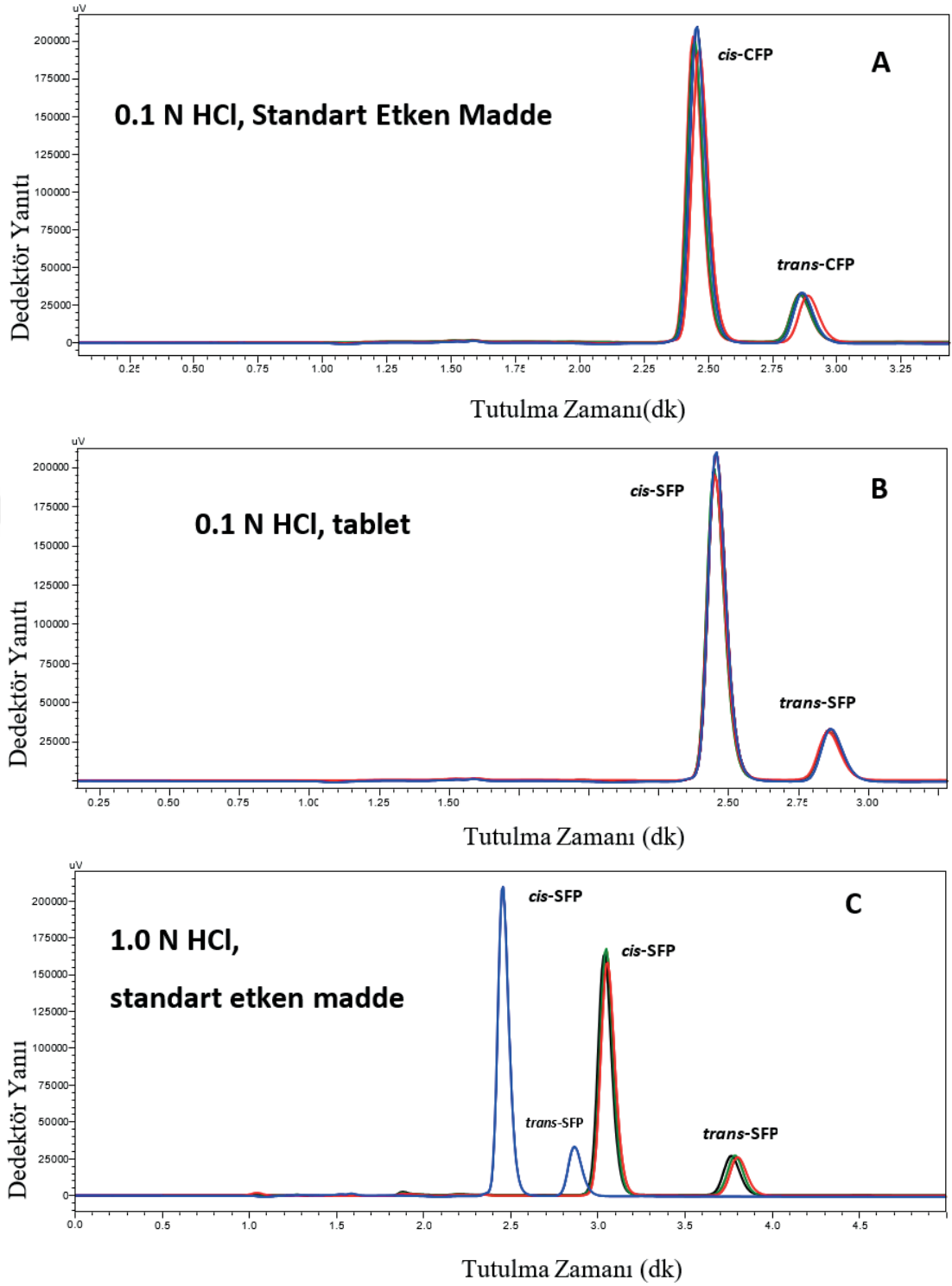
| Parametreler                                   | Ticari Tablet Formu |           |           |         |           |         |           |           | Serum   |           |           |         |           |         |           |           | İdrar   |           |           |           |           |           |           |           |
|------------------------------------------------|---------------------|-----------|-----------|---------|-----------|---------|-----------|-----------|---------|-----------|-----------|---------|-----------|---------|-----------|-----------|---------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
|                                                | cis-SFP             | trans-SFP | trans-SFP | cis-SFP | trans-SFP | cis-SFP | trans-SFP | trans-SFP | cis-SFP | trans-SFP | trans-SFP | cis-SFP | trans-SFP | cis-SFP | trans-SFP | trans-SFP | cis-SFP | trans-SFP | trans-SFP | trans-SFP | trans-SFP | trans-SFP | trans-SFP | trans-SFP |
| Bilinen Madde Miktarı (µg mL <sup>-1</sup> )   | 18,00               | 2,00      |           | 9,00    |           |         |           | 1,00      | 9,00    |           |           |         |           | 9,00    |           |           |         |           |           |           |           |           | 1,00      |           |
| Analizde Bulunan Miktar (µg mL <sup>-1</sup> ) | 18,02               | 1,96      |           | 8,75    |           |         |           | 0,97      |         |           |           |         |           | 9,15    |           |           |         |           |           |           |           |           | 0,99      |           |
| BSS(%) *                                       | 1,10                | 0,06      |           | 0,03    |           |         |           | 0,62      |         |           |           |         |           | 1,13    |           |           |         |           |           |           |           |           | 1,27      |           |
| BH(%)                                          | 0,11                | -2,00     |           | -2,77   |           |         |           | -3,00     |         |           |           |         |           | 1,66    |           |           |         |           |           |           |           |           | -1,00     |           |
| Eklenen miktar (µg mL <sup>-1</sup> )          | 4,50                | 18,00     | 27,00     | 0,50    | 1,00      | 2,00    | 3,00      | 2,25      | 4,50    | 9,00      | 13,50     | 0,25    | 0,50      | 1,00    | 1,50      | 2,25      | 4,50    | 9,00      | 13,50     | 0,25      | 0,50      | 1,00      | 1,50      |           |
| Bulunan miktar (µg mL <sup>-1</sup> )          | 4,57                | 18,57     | 27,14     | 0,45    | 0,99      | 1,97    | 2,91      | 2,17      | 4,52    | 8,88      | 13,27     | 0,30    | 0,56      | 1,03    | 1,60      | 2,84      | 5,44    | 10,06     | 14,24     | 0,22      | 0,48      | 1,02      | 1,55      |           |
| Geri Kazanım (%)                               | 100,2               | 101,8     | 101,58    | 100,32  | 98,16     | 99,83   | 99,16     | 99,20     | 99,25   | 100,13    | 99,32     | 99,00   | 104,29    | 103,89  | 101,44    | 103,83    | 105,23  | 106,93    | 105,87    | 97,33     | 98,3      | 101,01    | 101,86    |           |
| Geri kazanımın BSS <sub>1</sub> (%) *          | 0,32                | 0,12      | 0,04      | 0,89    | 0,04      | 0,36    | 0,19      | 1,50      | 1,16    |           | 0,01      | 0,17    | 1,44      | 0,46    | 0,78      | 0,28      | 0,74    | 1,10      | 0,87      | 1,36      | 0,24      | 0,55      | 0,81      |           |
| Geri kazanımın BH <sub>1</sub> (%)             | 0,31                | 1,58      | 0,31      | -2,00   | -0,33     | -0,75   | -1,80     | -8,00     | 0,44    |           | -1,33     | -1,70   | 20,00     | 12,00   | 3,00      | 6,67      | 26,22   | 20,88     | 11,78     | -12,00    | -4,00     | 2,00      | 3,33      |           |

\* 5 tekrardan elde edilmiştir.

### 3.2.6. Hızlandırılmış Bozunma Çalışmaları

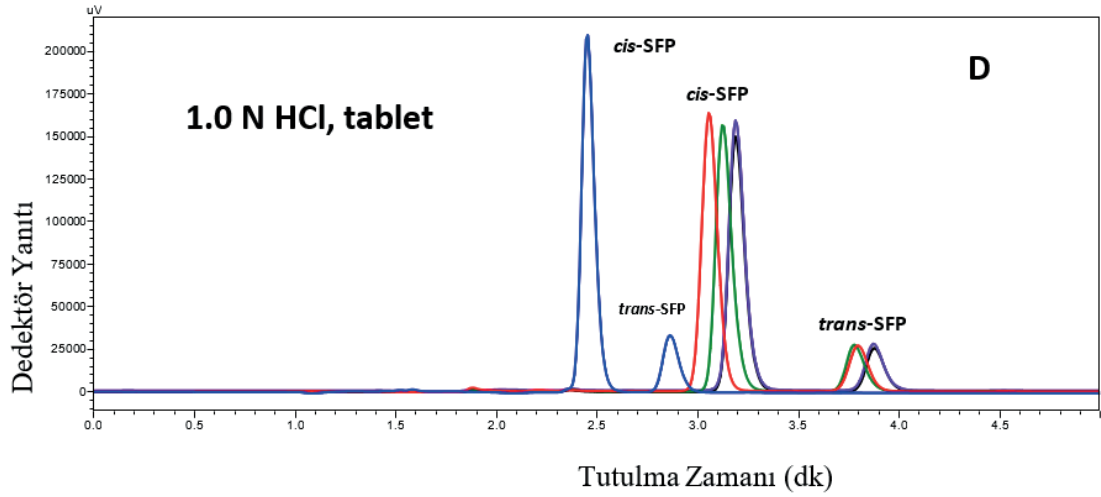
Stabilite göstergeli miktar tayini için hızlandırılmış bozunma çalışmalarıyla SFP tayin edilmiştir. Standart etken maddenin ve ticari tablet formunun stabilite özelliklerini aydınlatmak ve geliştirilen analiz yönteminin seçiciliğini göstermek için yapılan bu bozunma çalışmalarında SFP, 1,0 N ve 0,1 N HCl ile asitle hidroliz, 0,1 N ve 1,0 N NaOH ile bazik hidroliz, % 0,3' lük ve %3,0 'lük  $H_2O_2$  ile oksidasyon, 80 °C sıcak su banyosunda bekleterek sıcaklık ve nem ile bozundurma, UV ışık altında bekletmeyle fotodegradasyon çalışması ve 80 °C etüvde bekletme ile yüksek sıcaklıkla hızlandırılmış bozunma çalışmaları yapılmıştır. Stres faktörlerine 1-12 saat maruz bırakılarak belirli aralıklarla analiz yapılmak suretiyle meydana gelen bozunma tespit edilmiştir. Bazı koşullarda 12 saate kalmadan etken maddenin tamamı bozunmuş geri kazanım sıfıra düşmüştür. Analiz edilecek numuneler bölüm 2.1.3.11.'de anlatıldığı gibi  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  derişimde olacak şekilde hazırlanmıştır. Daha sonra ise tüm bozunma çözeltileri,  $45 \mu\text{g mL}^{-1}$  *cis*-SFP ve  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  *trans*-SFP içeren standart  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  SFP çözeltileri ile karşılaştırılmış ve pik alanlarında meydana nicel değışikliklerden yola çıkarak yüzde bozunma olarak hesaplanmıştır.

Öncelikle asidik hidrolizle bozunmasını tespit etme çalışmaları yapılmıştır. Sefalosporinlerin genel özelliğı olarak asidik koşullarda bozunmaya bazik koşullardaki bozunmaya göre daha dayanıklıdır. *cis*-SFP ve *trans*-SFP hem 0,1 N HCl (Şekil 3.39A ve B) hem de 1,0 N HCl (Şekil 3.39C ve D) ile asit hidrolizi sonucu nispeten stabilite göstermiştir. 12 saat sonunda farklı asidik koşullarda tablet ve saf etken madde formundaki *cis* ve *trans*-SFP'nin bozunma oranının %6,16-14,11 arasında değıştiğı tespit edilmiştir. Tablet üzerinden yapılan hızlandırılmış bozunma çalışmalarında *cis*-SFP , 12 saat sonra 0.1 N HCl'de Çizelge 3.22' de gösterildiğı gibi yaklaşık %14 bozunmuştur.



**Şekil 3.39.** Asidik bozunma koşullarında SFP' nin standart etken madde ve tablet formunun kromatogramları.

**A:** 0,1 N HCl, standart SFP **B:** 0,1 N HCl, SFP tablet, **C:** 1,0 N HCl, standart SFP



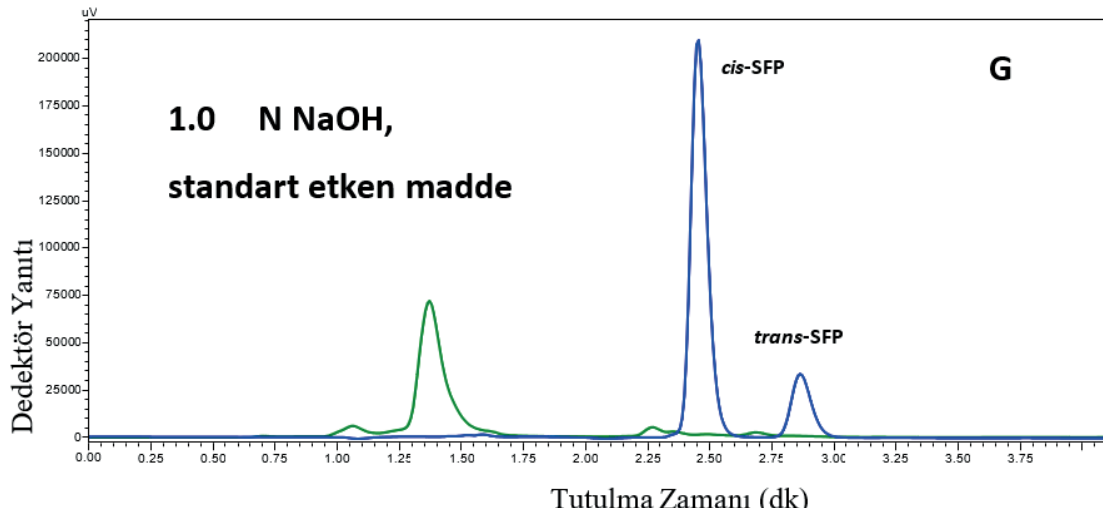
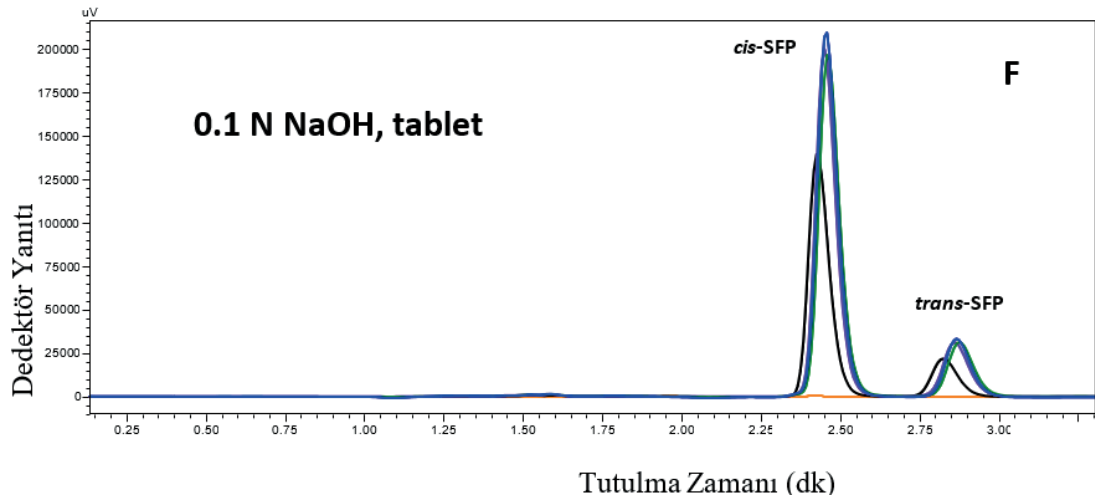
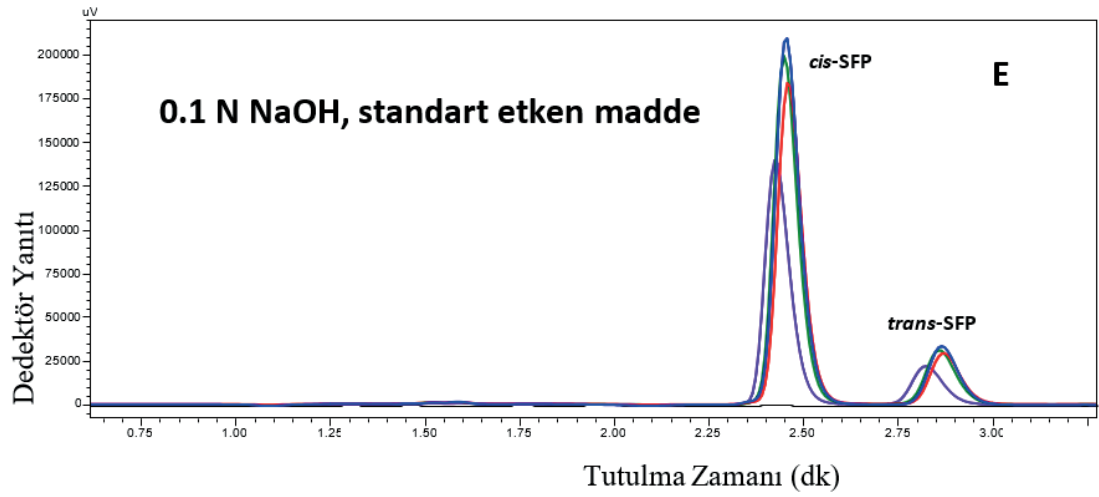
**Şekil 3.39. Devam.** Asidik bozunma koşullarında SFP' nin standart etken madde ve tablet formunun kromatogramları.

**D:** 1,0 N HCl, SFP tablet

**Çizelge 3.22.** Asidik ortamda bozunma çalışması sonuçları.

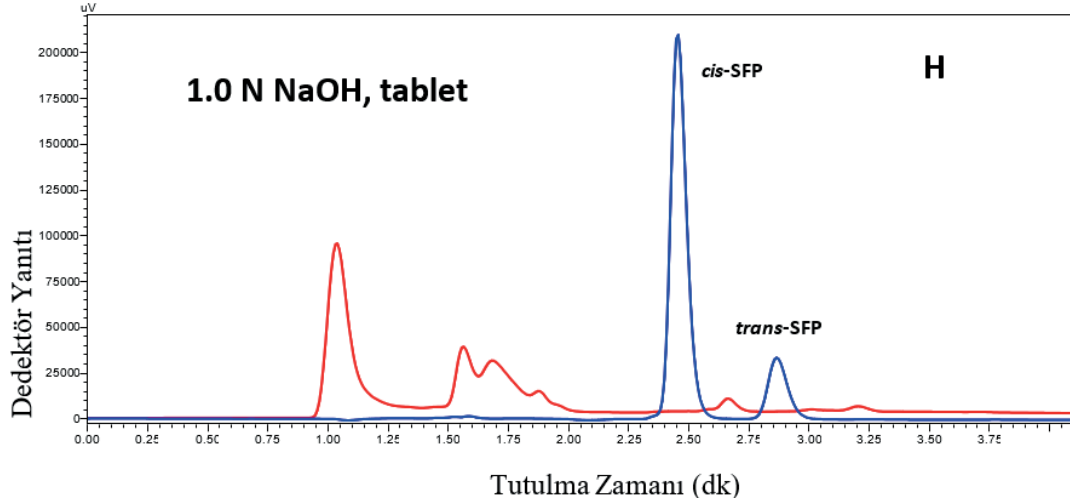
| Koşullar/<br>Bekletme<br>süresi | 0.1 N HCl<br>(standart etken<br>madde) |                       | 0.1 N HCl (tablet)  |                       | 1.0 N HCl<br>(standart etken<br>madde) |                       | 1.0 N HCl<br>(tablet) |                       |
|---------------------------------|----------------------------------------|-----------------------|---------------------|-----------------------|----------------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
|                                 | <i>cis</i> -<br>SFP                    | <i>trans</i> -<br>SFP | <i>cis</i> -<br>SFP | <i>trans</i> -<br>SFP | <i>cis</i> -<br>SFP                    | <i>trans</i> -<br>SFP | <i>cis</i> -<br>SFP   | <i>trans</i> -<br>SFP |
| 1 Saat                          | 1,18                                   | 1,80                  | 8,37                | 4,33                  | 5,86                                   | 4,69                  | 5,55                  | 4,33                  |
| 3 Saat                          | 4,22                                   | 3,57                  | 10,91               | 6,99                  | 5,71                                   | 5,23                  | 5,65                  | 5,47                  |
| 6 Saat                          | 5,65                                   | 3,23                  | 12,54               | 7,64                  | 5,68                                   | 6,44                  | 6,46                  | 6,48                  |
| 12 Saat                         | 6,66                                   | 6,16                  | 14,11               | 8,28                  | 6,52                                   | 6,60                  | 8,60                  | 7,02                  |

*cis*-SFP ve *trans*-SFP, alkali koşullar altında maksimum bozunma göstermiştir (Şekil 3.40). Bazik hidroliz için 0,1N NaOH kullanıldığında, *cis*-SFP ve *trans*-SFP 12 saat sonra yaklaşık %100 bozunurken, 1,0 N NaOH kullanıldığında *cis*-SFP ve *trans*-SFP 1 saat sonra yaklaşık %100 bozunmuştur (Çizelge 3.23). Bu, *cis*-SFP ve *trans*-SFP' nin alkali hidrolizine karşı çok hassas olduğunu gösterir.



**Şekil 3.40.** SFP'nin standart etken madde ve tablet formunun bazik ortamda bozunma çalışması kromatogramları.

**E:** 0,1 N NaOH, standart SFP **F:** 0,1 N NaOH,SFP tablet **G:** 1,0 N NaOH,standart SFP



**Şekil 3.40. Devam.** SFP' nin standart etken madde ve tablet formunun bazik ortamda bozunma çalışması kromatogramları.

**H:** 1,0 N NaOH, SFP tablet

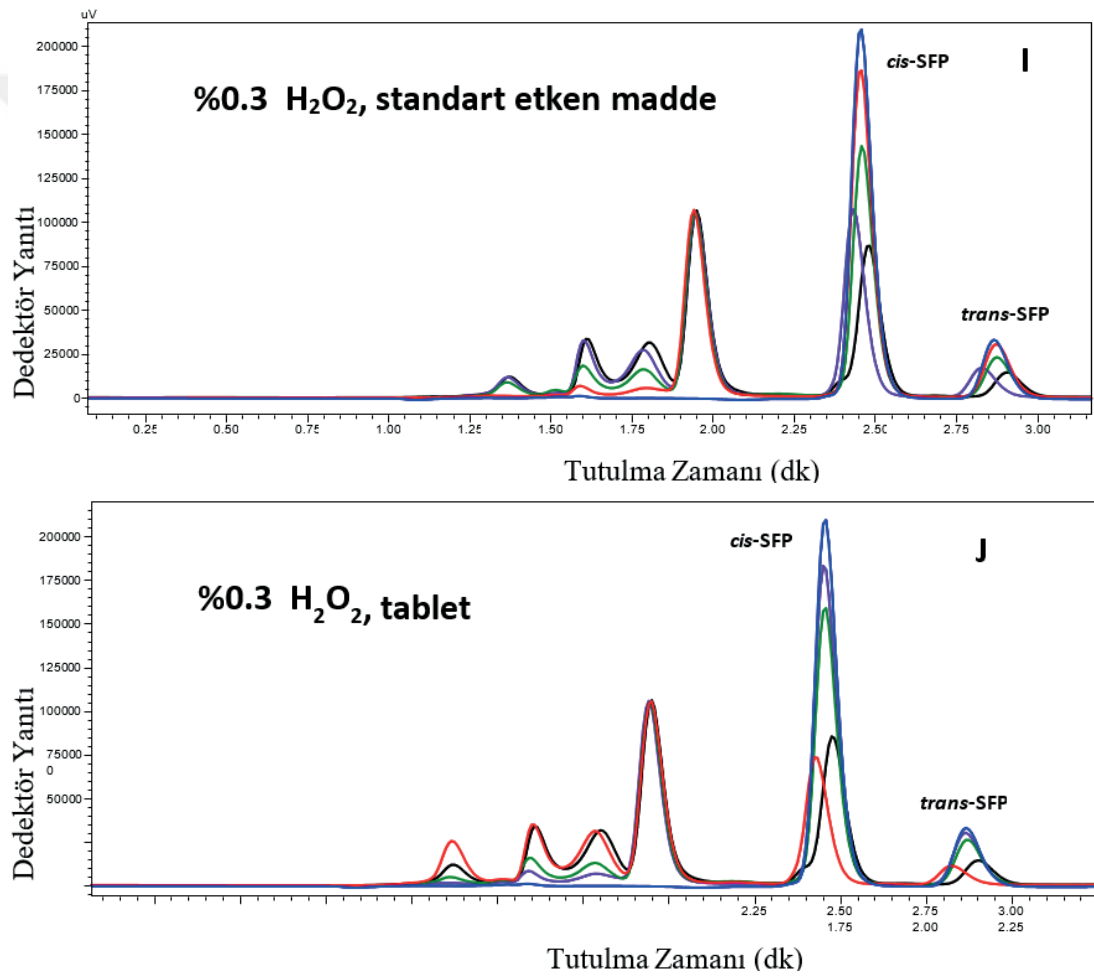
**Çizelge 3.23.** Alkali ortamda bozunma çalışması sonuçları

| Koşullar/<br>Bekletme<br>süresi | 0.1 N NaOH<br>(standart etken<br>madde) |                       | 0.1 N NaOH<br>(tablet) |                       | 1.0 N NaOH<br>(standart etken<br>madde) |                       | 1.0 N NaOH<br>(tablet) |                       |
|---------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|
|                                 | <i>cis</i> -<br>SFP                     | <i>trans</i> -<br>SFP | <i>cis</i> -<br>SFP    | <i>trans</i> -<br>SFP | <i>cis</i> -<br>SFP                     | <i>trans</i> -<br>SFP | <i>cis</i> -<br>SFP    | <i>trans</i> -<br>SFP |
| 1 Saat                          | 8,88                                    | 5,60                  | 4,51                   | 2,11                  | 100                                     | 100                   | 100                    | 100                   |
| 3 Saat                          | 11,35                                   | 8,37                  | 5,80                   | 2,76                  | -                                       | -                     | -                      | -                     |
| 6 Saat                          | 26,31                                   | 24,16                 | 32,93                  | 30,91                 | -                                       | -                     | -                      | -                     |
| 12 Saat                         | 99,96                                   | 99,92                 | 99,95                  | 99,72                 | -                                       | -                     | -                      | -                     |

*cis*-SFP ve *trans*-SFP' nin, oksidatif koşullara karşı daha hassas olduğu görülmüştür. %0,3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>' de, *cis*-SFP ve *trans*-SFP 12 saat sonra yaklaşık %67 bozunurken, %3,0 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>' de *cis*-SFP ve *trans*-SFP 6 saat sonra %100 bozunmuştur (Çizelge 3.24) Bu, *cis*-SFP ve *trans*-SFP' nin alkali koşullara olduğu gibi oksidatif bozunma koşullarına da çok duyarlı olduğunu gösterir, kromatogramları Şekil 3.41' de verilmiştir.

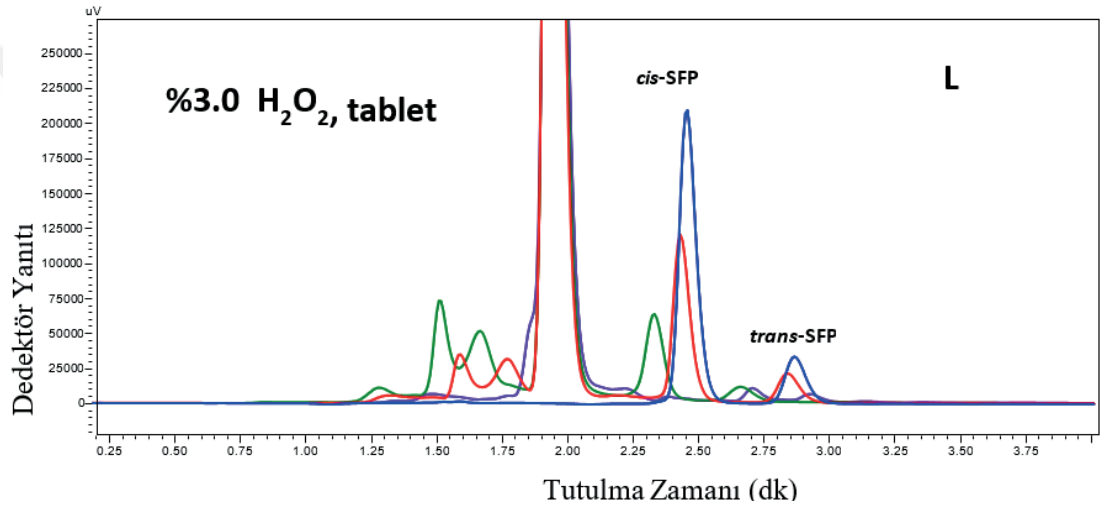
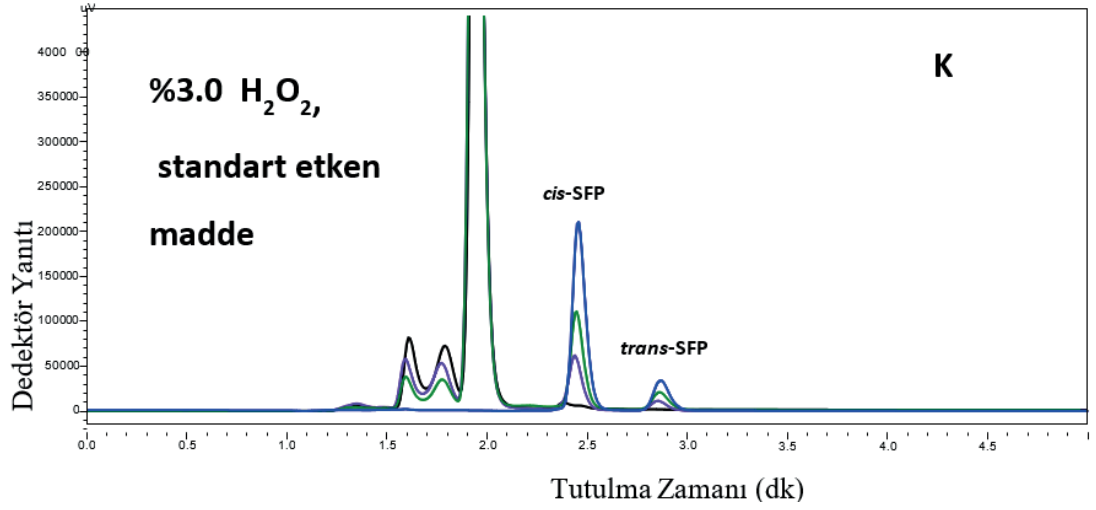
**Çizelge 3.24.** SFP' nin ticari tablet ve standart etken madde şeklinin oksidatif koşullarda bozunma yüzdeleri

| Koşullar/<br>Bekletme<br>süresi | %0.3 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (standart<br>etken madde) |                   | %0.3 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub><br>(tablet) |                       | %3.0 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (standart<br>etken madde) |                   | %3.0 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub><br>(tablet) |                       |
|---------------------------------|--------------------------------------------------------------|-------------------|------------------------------------------------|-----------------------|--------------------------------------------------------------|-------------------|------------------------------------------------|-----------------------|
|                                 | <i>cis</i> -SFP                                              | <i>trans</i> -SFP | <i>cis</i> -<br>SFP                            | <i>trans</i> -<br>SFP | <i>cis</i> -SFP                                              | <i>trans</i> -SFP | <i>cis</i> -<br>SFP                            | <i>trans</i> -<br>SFP |
| 1 Saat                          | 9,66                                                         | 4,21              | 10,89                                          | 5,87                  | 42,16                                                        | 25,52             | 44,22                                          | 35,61                 |
| 3 Saat                          | 23,13                                                        | 18,64             | 43,19                                          | 48,57                 | 70,39                                                        | 68,05             | 64,90                                          | 53,15                 |
| 6 Saat                          | 46,64                                                        | 45,12             | 52,45                                          | 52,89                 | 100                                                          | 100               | 100                                            | 100                   |
| 12 Saat                         | 50,50                                                        | 51,65             | 67,08                                          | 62,33                 | -                                                            | -                 | -                                              | -                     |



**Şekil 3.41.** SFP' nin etken madde ve ticari tablet formunun oksidatif koşullarda bozunma kromatogramları.

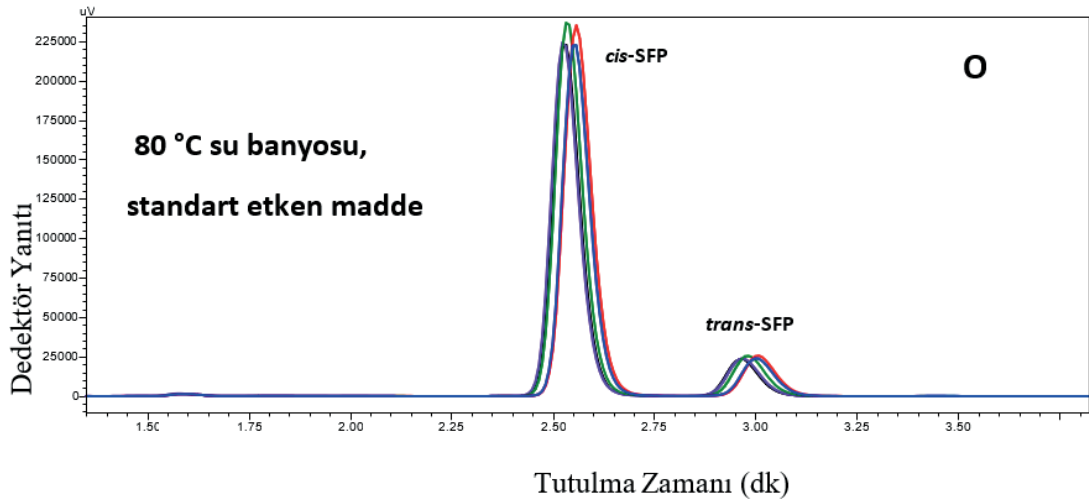
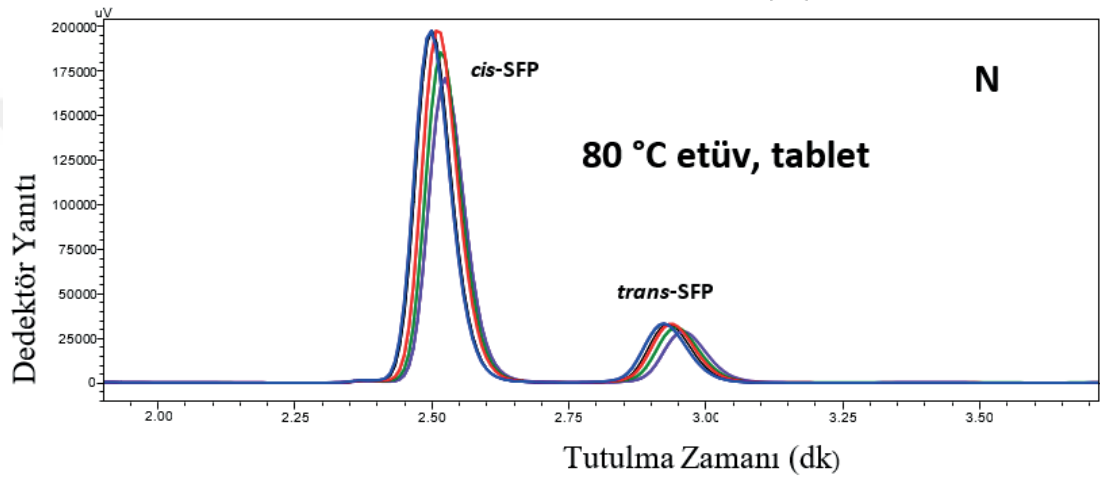
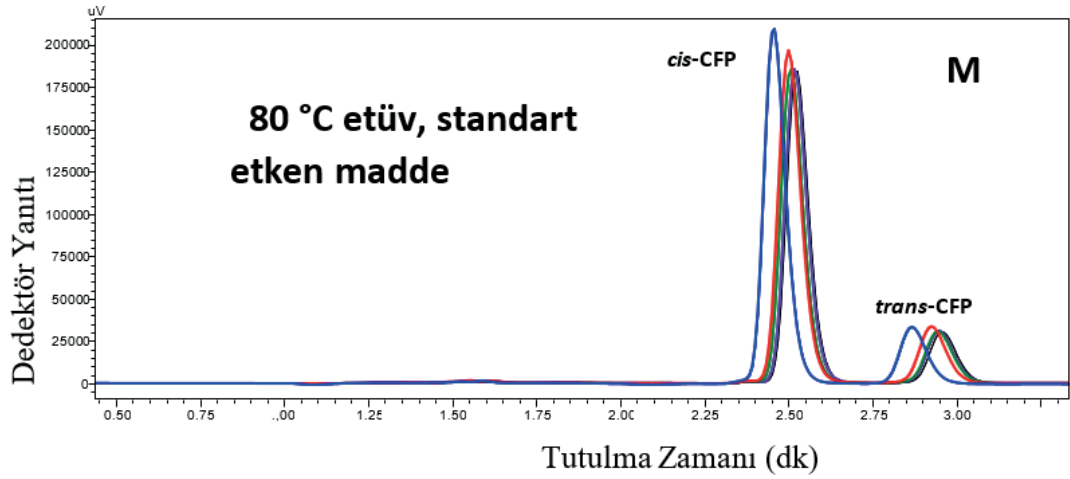
**I:** %0,3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- standart etken madde, **J:** %0,3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> , tablet



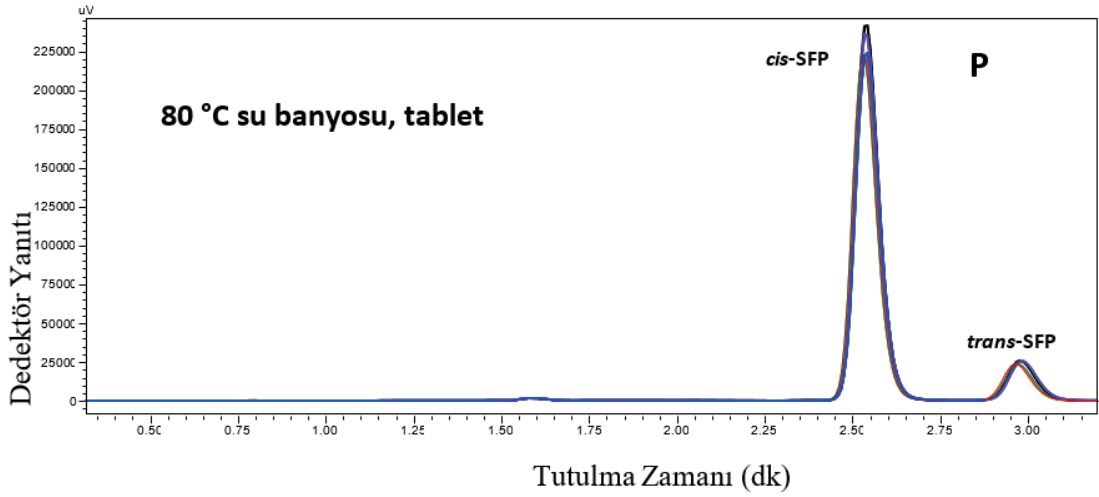
**Şekil 3.41.Devam.** SFP' nin etken madde ve ticari tablet formunun oksidatif koşullarda bozunma kromatogramları.

**K:** %3,0 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, standart etken madde, **L:** %3,0 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, tablet

*cis*-SFP ve *trans*-SFP' yi 80°C etüvde bekleterek sadece yüksek sıcaklığın, 80°C su banyosunda bekleterek yüksek sıcaklık ve nemin etkisi gözlenmiştir. *cis*-SFP ve *trans*-SFP etüvde de su banyosunda da bekletmede nispeten kararlı kalmakla beraber zamanla bozunması artmaktadır (Şekil 3.42).



**Şekil 3.42.** SFP' nin toz etken madde ve ticari tablet formunun yüksek sıcaklık ve nem altında elde edilen bozunma kromatogramları.  
**M:** Standart etken madde 80 °C etüv, **N:** SFP ticari tablet, 80 °C etüv, **O:** standart etken madde, 80°C su banyosu



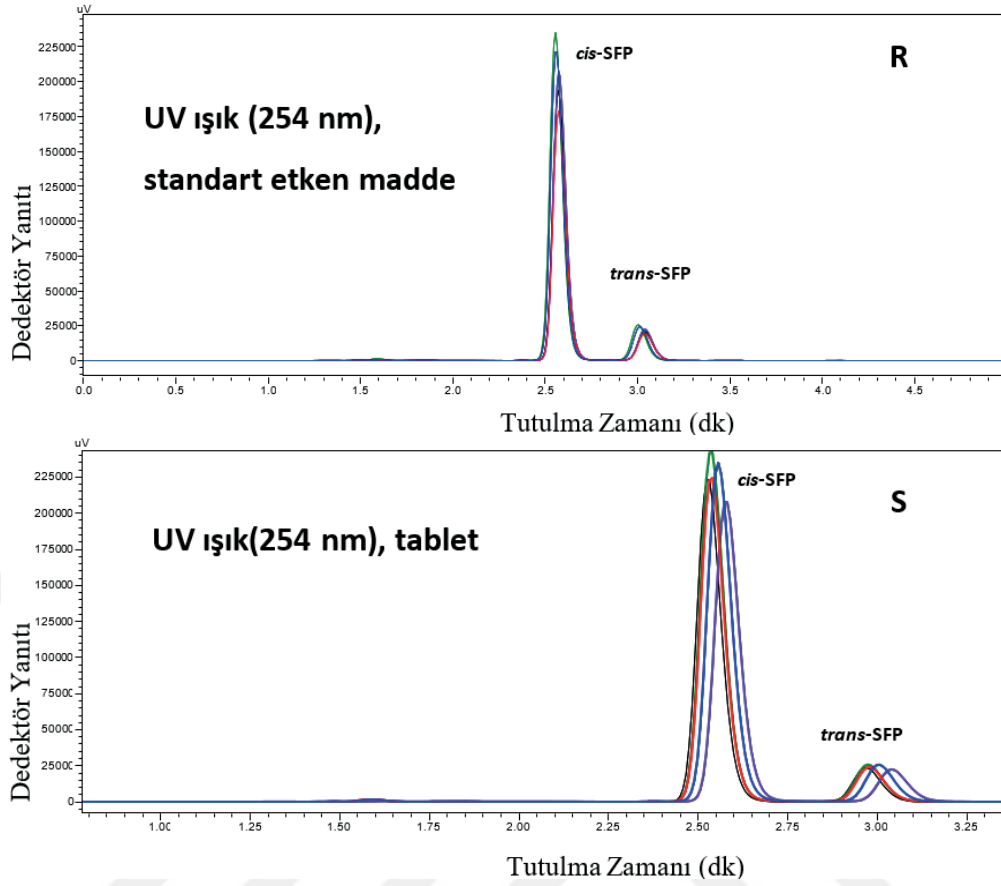
**Şekil 3.42.Devam** SFP’ nin toz etken madde ve ticari tablet formunun yüksek sıcaklık ve nem altında elde edilen bozunma kromatogramları.

**P:** SFP ticari tablet, 80 °C sıcak su banyosu

**Çizelge 3.25.** 80 °C etüv ve 80 °C sıcak su banyosunda bekletme çalışmasına ait bozunma sonuçları

| Koşullar/Bekletme süresi | 80 °C etüv (standart etken madde) |                   | 80 °C etüv (tablet) |                   | 80 °C sıcak su banyosu (standart etken madde) |                   | 80 °C sıcak su banyosu (tablet) |                   |
|--------------------------|-----------------------------------|-------------------|---------------------|-------------------|-----------------------------------------------|-------------------|---------------------------------|-------------------|
|                          | <i>cis</i> -SFP                   | <i>trans</i> -SFP | <i>cis</i> -SFP     | <i>trans</i> -SFP | <i>cis</i> -SFP                               | <i>trans</i> -SFP | <i>cis</i> -SFP                 | <i>trans</i> -SFP |
| 1 Saat                   | 3,68                              | 3,37              | 0,13                | 0,07              | 0,24                                          | 0,48              | 0,21                            | 0,04              |
| 3 Saat                   | 10,15                             | 10,02             | 0,16                | 2,12              | 6,66                                          | 1,31              | 4,35                            | 5,74              |
| 6 Saat                   | 10,83                             | 9,98              | 7,32                | 6,89              | 6,29                                          | 5,26              | 6,26                            | 6,53              |
| 12 Saat                  | 10,88                             | 10,01             | 13,89               | 13,42             | 6,30                                          | 5,91              | 6,70                            | 7,06              |

Son olarak, *cis*-SFP ve *trans*-SFP, UV ışığa maruz bırakılarak fotodegradasyon çalışmaları yapılmıştır. Maruziyet süresi arttıkça uğradığı bozunma artmıştır. (Şekil 3.43) Sonuçlara göre, tablet formunun UV ışık altında bekletmeye karşı stabilite gösterdiği, saf toz haldeki etken maddenin zamanla bozunmaya uğradığı tespit edilmiştir (Çizelge 3.26).



**Şekil 3.43.** SFP' nin toz etken madde ve ticari tablet formunun fotolitik bozunma şartlarında elde edilen kromatogramları.

**R:** Standart etken madde, UV ışık, **S:** SFP ticari tablet, UV ışık

**Çizelge 3.26.** UV ışıkla bozunma çalışması sonuçları.

| Koşullar/<br>Bekletme<br>süresi | UV ışık (254 nm) (standart etken<br>madde) |                   | UV ışık (254 nm) (tablet) |                   |
|---------------------------------|--------------------------------------------|-------------------|---------------------------|-------------------|
|                                 | <i>cis</i> -SFP                            | <i>trans</i> -SFP | <i>cis</i> -SFP           | <i>trans</i> -SFP |
| 1 Saat                          | 4,95                                       | 4,58              | 0,36                      | 0,34              |
| 3 Saat                          | 10,81                                      | 10,63             | 6,24                      | 7,06              |
| 6 Saat                          | 16,73                                      | 16,35             | 6,92                      | 7,06              |
| 12 Saat                         | 22,82                                      | 22,27             | 9,53                      | 8,26              |

#### 4. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasıyla başta amaçlandığı üzere, ikinci kuşak sefalosporin grubu antibiyotik olan SFP' yi tayin için hem elektrokimyasal hem kromatografik analiz yöntemleri geliştirilmiştir.

Bu çalışma kapsamında SFP' nin tayini için, voltametrik bir yöntem, ilk kez geliştirilmiş sonra bu yöntem hem tablet de hem idrar numunelerine başarıyla uygulanmıştır.

SFP' nin elektrokimyasal yükseltgenme davranışı üç elektrotlu hücre sistemiyle, çalışma elektrotu olarak bir karbon elektrot olan CKE kullanılarak pH 2,0 – 10,0 aralığında ayarlanan çeşitli tamponlarda DV ve DPV teknikleri kullanılarak incelenmiştir.

Voltametrik analiz için yapılan pH taramasında pH 'ın yükselmesinin analizi olumsuz etkilediği, pikin yüksekliğinin azalması ve yayvanlaşmasından yola çıkılarak anlaşılmıştır. Düşük pH'larda ise daha keskin daha simetrik ve akım değeri daha yüksek olan pikler gözlenmiştir. Bu nedenle de düşük pH değerlerinde analizlerin yapılması planlanmıştır.

pH taraması sonuçlarına göre hazırlanan Ep-pH grafiğinde elektroaktif grubun asit-baz formunun pKa değerinin 7,0 civarında olduğu bu değerin de literatür değeri olan 7.43 e oldukça yakın olduğu görülmektedir.

pH taramalarına göre en iyi çalışma ortamı olarak pik şekli, potansiyeli ve akımına bakılarak pH 3,0 BRT seçilmiştir.

Daha sonra DV ile hız taraması çalışmaları  $1 \times 10^{-4}$  M SFP derişiminde, 10-500 mV s<sup>-1</sup> hız aralığında pH 3,0 BRT ile yapılmıştır. Hız taraması çalışmaları İp ile

$v^{1/2}$  arasında doğru orantılı bir ilişki olduğu saptanmıştır. Hız taraması sonucunda çizilen  $\log i_p$ - $\log v$  grafiğinin eğim değerinin 0,5'e yakın olması ve  $i_p$ -  $v^{1/2}$  ilişkisinin doğrusal olması reaksiyonun difüzyon kontrollü gerçekleştiğini göstermiştir. DV çalışmalarında geri tarama yönünde herhangi bir pikin gözlenmemesi ve pik potansiyelinin tarama hızının artmasıyla birlikte daha pozitif potansiyele kayması, elektrot tepkimesinin tersinmez olduğunu göstermiştir.

Standart etken maddeyle kalibrasyon çalışması  $4 \times 10^{-6}$ - $8 \times 10^{-5}$  M aralığında yapılmış olup pik akımı-derişim grafiği için her derişim için 3 ölçüm alınıp akım ortalamaları kullanılmıştır. Derişim arttıkça pik akımı da artmış ve akım- derişim eğrisine ait korelasyon katsayısı 0,996 olarak bulunmuştur. YS değeri  $4,16 \times 10^{-7}$ , TAS değeri ise  $1,26 \times 10^{-6}$  M olarak hesaplanmıştır.

SFP' nin, Ultracet® 500 mg tabletlerden tayini için DPV yöntemi geliştirilmiştir. Yöntemin doğruluğunu incelemek adına tabletten geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. %102,7 geri kazanım sağlanan bu çalışmalara ait %BSS değeri 1,55 bulunmuştur. Geri kazanım çalışmaları sonuçlarına göre ilaç katkı maddelerinin analizde herhangi bir girişim etkisinin olmadığı görülmüş ve yöntemin doğruluğu gösterilmiştir.

Akımın gün içi tekrarlanabilirliği, akımın günler arası tekrarlanabilirliği, potansiyelin gün içi tekrarlanabilirliği ve potansiyelin günler arası tekrarlanabilirliği sırasıyla % 1,69, % 2,08, %0,29 ve % 0,58 olarak bulunmuş olup bu değerler yöntemin kesin olduğunu göstermektedir. Yapılan tekrar edilebilirlik deneylerinde %BSS'nın böyle düşük sonuçlarda elde edilmesi, SFP içeren tablet dozaj formunda, geliştirilen bu analiz yöntemiyle miktar tayini çalışmalarının yapılabileceğini göstermiştir.

İdrar numunesi içinde yapılan kalibrasyon deneyleri için her derişim üç tekrarlı ölçülüp akımları için ortalamaları alınmıştır. SFP' nin idrar numunesinde,  $4 \times 10^{-6}$ - $4 \times 10^{-5}$  M doğrusallık aralığında yapılan analizinde  $I_{p_{ort}}$ -derişim değerlerine ait korelasyon katsayısı 0,996 olarak bulunmuştur. YS  $4,15 \times 10^{-7}$  ve TAS  $1,26 \times 10^{-6}$  bulunmuş olup yöntemin yüksek hassasiyette analize imkan verdiği görülmüştür. Akımın gün içi yapılan ölçümlerde ve farklı günlerde yapılan ölçümlerdeki

tekrarlanabilirliği için %BSS değerleri 2,47 ve 2,86 olarak, potansiyelin gün içi yapılan ölçümlerde ve farklı günlerde yapılan ölçümlerdeki tekrarlanabilirliği için BSS değerleri 0,10 ve 0,20 olarak bulunmuştur. Bu %BSS değerleri pik akımı ve pik potansiyeli hususunda yöntemin tekrar edilebilirliğin iyi olduğunu göstermektedir. Yapılan tekrar edilebilirlik deneylerinde iyi sonuçların elde edilmesi, SFP için DPV kullanılarak idrar numunesinden miktar tayini yapılabileceğini göstermiştir. İdrar numunelerinden geri kazanım çalışmaları sonucu elde edilen %BSS değerinin 1,48 olması bu geliştirilen yöntemle idrardan yüksek doğrulukla SFP analizi yapılabileceğini gösterir. SFP'nin tayini için tamamen valide edilmiş bir voltametrik analiz yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntem SFP içeren tablet formlarına ve insan idrar numunelerine kolay, hızlı ve doğrudan uygulanabilmektedir.

SFP' nin izomerlerinin basit, hızlı ve verimli ayrımı için stabilite göstergeli kromatografik yöntem geliştirilmiştir. Kromatografik analiz için kolon seçimi, iç standart seçimi, tampon çözelti seçimi, organik çözücü seçimi gibi parametrelerin optimizasyonu yapılmıştır. Tampon çözeltinin derişimi belirlenmiş ve mobil fazda organik çözücü oranı optimize edilmiştir. En uygun pH, sıcaklık ve akış hızı da diğer parametrelerde yapıldığı gibi SUT'a göre değerlendirilerek belirlenmiştir. Kromatografik çalışma koşulları belirlendikten sonra analizler yapılarak kalibrasyon çalışmaları yapılmıştır.

Farklı yedi kolonla yapılan analizler sonucu en yüksek pik alanı sağlaması, keskin, simetrik pikler vermesi ve SFP' nin iki izomerinin yüksek ayırım gücüyle analizine olanak tanınması sebebiyle ACE 5 C8 kolonu seçilmiştir.

IS olarak sisteme SFT, PAR, SFA ve SFK enjekte edilmiştir. SFT ve SFA' da ekstra pikler çıkmış, SFK ise kolondan geç çıkarak analiz süresinin artmasına sebep olmuştur. Bu sebeple IS olarak PAR kullanılmıştır.

Amonyum asetat, su, amonyum format ve sodyum asetat ile yapılan tampon çözelti optimizasyonunda amonyum formatın analiz süresini artırdığı görülmüştür. Amonyum asetat ile yapılan analizde su ve sodyum asetatla yapılanlardan daha yüksek

pikler elde edildiğinden amonyum asetat seçilmiştir. Amonyum asetatın 5mM-40 mM aralığında değişen derişimi SUT parametreleriyle karşılaştırılarak incelenmiştir. Sonuçlar arasında önemli bir fark bulunmadığından 5 mM amonyum asetat kullanılmıştır.

Pik şekli ve tutulma süresi esas olarak organik çözücünden etkilenir. Mobil faz için organik çözücüler olarak asetoneitril ve metanol incelenmiştir. Asetoneitril ile daha dar ve yüksek pikler elde edilmesi ve daha kısa analiz süresi gibi avantajları sebebiyle, organik çözücü olarak asetoneitril seçilmiştir. Asetoneitril oranı %5'in altında olduğunda tutulma süresi artmıştır, %15' in üzerinde olduğunda da SFP piklerinde kuyruklanmaya sebep olmaktadır. Oran %7,5 olduğunda PAR ve *trans*-SFP'nin ayrı ayrı analizi sağlanamamış, piklerde örtüşme olmuştur. En yüksek pik ve en iyi ayırım %10 asetoneitrille sağlanmıştır.

pH optimizasyonu için kolonun pH aralığı dikkate alınarak farklı pH'lar (5,0, 6,5 ve 8,0) denenmiştir. Tampon çözeltinin pH' ının analitlerin tutulma zamanı ve ayırımı üzerinde çok etkili olduğu görülmüş, SUT' a göre karşılaştırması yapılmış ve ayırım gücü daha yüksek olduğundan pH 8 seçilmiştir.

Optimizasyon çalışmalarının son aşamasında akış hızının analiz sonucuna etkisine bakılmıştır. Akış hızının 1,0 mL dk<sup>-1</sup> in altında olmasının daha uzun alıkonma sürelerine neden olduğu, 1,0 mL dk<sup>-1</sup>'in üzerindeki akış hızının ise kolon verimini ve pik yüksekliğini azalttığı tespit edilmiştir. Akış hızı için optimum değer 1,0 mL dk<sup>-1</sup>'dir.

Daha sonra YPSK yönteminin parametreleri ve sistem uygunluk parametreleri belirlenmiştir. SUT sonuçları ile yöntemin uygulanabilir olduğu görülmüştür. Bu çalışmalar tamamlandıktan sonra yöntem validasyonu aşamasına geçilmiştir.

Serum örneğinden analizde ve standart etken madde analizinde *cis*-SFP için 0,009 µg mL<sup>-1</sup> *trans*-SFP için 0,001 µg mL<sup>-1</sup>'den başlayarak, 90 µg mL<sup>-1</sup> *cis*-SFP ve

10 µg mL<sup>-1</sup> *trans*-SFP' ye kadar değişen derişim seviyeleri, idrar örneğinden analizde *cis*-SFP için 0,09 -90 µg mL<sup>-1</sup>, *trans*-SFP için 0,01-10 µg mL<sup>-1</sup> aralıklarında analiz yapılarak bu aralıkta sonuçların doğrusal olduğu görölmüştür. Tüm matrislerde korelasyon katsayısı 0,999 bulunmuştur ki bu da çalışmanın yüksek doğrusallıkta gerçekleştiğini göstermektedir. Ayrıca YS ve TAS değerleri, geliştirilen yöntemin literatürdeki yöntemlerden daha duyarlı olduğuna işaret etmektedir. Gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik çalışmalarında %BSS değerlerinin biyolojik numunelerden analizde bile %1 civarındadır. Bu durum yöntemin kesin olduğunu göstermektedir.

IS olarak PAR'ın bulunduğu çalışmada farmasötik dozaj formu üzerine ilave edilen %25, %50, %100, %150 oranında standart SFP ile geri kazanım verimi hesaplanmış ve ilgili parametreler değerlendirilmiştir. Aynı şekilde idrar ve serum numunelerinden geri kazanım çalışmaları yapılarak geliştirilen analiz yöntemlerinin doğruluğu gösterilmiştir. %BSS değerlerinin %2'den düşük olması yöntemin yüksek doğrulukta gerçekleştiğini göstermiştir.

Geliştirilen analiz yönteminin seçiciliği, analitlerle birlikte su, mobil faz çözültisi, askorbik asit, ürik asit, Ca<sup>+2</sup>, K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, ilaçsız serum ve ilaçsız idrar enjekte edilmesiyle değerlendirilmiştir. *cis*-SFP, *trans*-SFP ve PAR pikleriyle girişim yapan herhangi bir pik bulunmadığından yöntemin seçici olduğu belirtilmiştir.

Yöntemin sağlamlığı da, dalga boyundaki (±2.0), sıcaklıktaki (±2.0) ve akış hızındaki (±0.1) kasıtlı değişikliklerin sonucunda %BSS değerlendirilerek kanıtlanmıştır. Elde edilen %BBS değerlerinin %2' nin altında çıkması yöntemin ufak değişikliklerden etkilenmediğini göstermiştir.

Kromatografik analiz yöntemi için validasyon çalışmaları kapsamında yöntemin; doğrusallık, kesinlik, geri kazanım, tekrarlanabilirlik, sağlamlık gibi parametrelerine ait sonuçlarının istatistiksel değerlendirmesi yapıp uygun olduğu bulunmuştur.

Ayrıca stabilite göstergeli yöntem çalışmaları kapsamında, hızlandırılmış bozunma çalışmalarıyla standart etken madde ve Ultracef® tablet formu 50µg mL<sup>-1</sup> derişimde olacak şekilde hazırlanarak, hidroliz (Asit, Baz); oksidasyon (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile); ışııkta bozunma (UV ışıık altında beklemesi); sıcaklık (tabletlerin 80 °C etüvde ve 80 °C su banyosunda beklemesi) işlemlerine maruz bırakılmış ve zamanla azalan *cis*-SFP ve *trans*-SFP miktarı incelenmiştir. Sonuçlar bozunma işlemleri uygulanmamış aynı miktarda SFP içeren (45 µg mL<sup>-1</sup> *cis*-SFP ve 5 µg mL<sup>-1</sup> *trans*-SFP içeren standart 50µg mL<sup>-1</sup> SFP) çözelti ile karşılaştırılmış ve pik alanlarındaki değışim oranlanarak bozunma değeriendirilmiştir.

Hem tablet numunesi hem saf etken madde asit hidrolizine karşı nispeten dayanıklı bulunmuştur. Etken madde ve tablet 0,1 N NaOH'da 12 saatte %100 bozunmuş, 1,0 N NaOH'da 1 saatte %100 bozunmuştur. Bazik hidrolize karşı çok hassas olduğu görölmüştür. %0,3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'de, etken madde ve tabletteki *cis*-SFP ve *trans*-SFP yüzde geri kazanımı 12 saat sonra yaklaşık %68 azalırken, %3,0 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>' de *cis*-SFP ve *trans*-SFP pikleri 6 saat sonra %100 azalmıştır. Oksidasyona karşı da çok hassas olduğu görölmüştür. *cis*-SFP ve *trans*-SFP' yi 80°C etüvde bekleterek sadece yüksek sıcaklığın, 80°C su banyosunda bekleterek yüksek sıcaklık ve nemin etkisi gözlemlenmiştir. *cis*-SFP ve *trans*-SFP etüvde de su banyosunda da bekletmede nispeten kararlı kalmakla beraber bozunma yüzdesi zamanla artmaktadır. Son olarak, *cis*-SFP ve *trans*-SFP, UV ışıığa maruziyet süresi arttıkça bozunmaya uğramıştır. Sonuçlara göre, tablet formunun UV ışıık altında bekletmeye karşı daha dayanıklı olduğu, standart etken maddenin daha hızlı bir şekilde fotodegradasyona uğradığı tespit edilmiştir.

Bozunma çalışmaları incelendiğinde *cis*-SFP ve *trans*-SFP' nin özellikle bazik hidroliz ve oksidasyona karşı çok hassas olduğu görölmüştür. Diğer stres koşullarında nispeten kararlı olmakla beraber zamanla bozunmaktadır.

Bu çalışma kapsamında, voltametrik analizle SFP' nin tayini ve geliştirilen yöntemin validasyonu sağlanmış, idrar numunesi ve farmasötik dozaj formunda uygulaması başta hedeflendiği üzere başarıyla gerçekleştirilmiştir. SFP' nin

diastereoizomerlerinin kromatografik yöntemlerle analizi için güvenilir, hassas, hızlı, kolay ve stabilite göstergeli bir YPSK yöntemi geliştirilmesi ve bu yöntemin validasyonu, en başta planlandığı üzere başarıyla gerçekleştirilmiş, ayrıca SFP' nin izomerlerinin farmasötik dozaj formu, idrar ve serumdan analizi de sağlanmıştır.

Yapılan literatür araştırmaları sonucu SFP' nin tayini için geliştirilen herhangi bir voltametrik analizin olmadığı görülmüştür. SFP' nin tayin edilmiş olduğu kromatografik çalışmalara literatür çalışmaları kısmında yer verilmiş ve bu çalışmada geliştirilen YPSK yöntemi, SFP'nin izomerlerinin ayrımını sağlayan çalışmalarla kıyaslandığında hem hızlı, hem hassas bir yöntem olmasıyla farkını ortaya koyduğu görülmektedir (Park ve ark., 2004; Liu ve ark., 2016; Can, 2011 ve He ve ark., 2018). Geliştirilen YPSK yöntemi literatürde bulunan (Park ve ark., 2004; Liu ve ark., 2016) kromatografi çalışmalarıyla kıyaslandığında daha kısa sürede SFP' nin izomerlerini analiz ettiği görülmüştür. Tamamen valide edilmiş yüksek duyarlılıkta, hızlı, kolay, yüksek doğruluk, kesinlik, seçicilik gösteren bu yöntem SFP' nin tablet formundan ve biyolojik numunelerden (idrara ve serum) analizinde başarıyla uygulanmıştır. Ayrıca bu tez kapsamında geliştirilen stabilite göstergeli yöntem, SFP' yi yüksek doğruluk ve kesinlikte, bozunma ürünlerinden, üretim safsızlıklarından ve yardımcı maddelerden etkilenmeden tayin etmektedir.

## 5. SONUÇ ve ÖNERİLER

SFP' nin izomerlerinin analizi için geliştirilen YPSK yönteminde, IS olarak PAR kullanılarak bir ACE 5 C8 (150 mm x 4,6 mm x 5 um) kolonu ile 45 °C' de analiz gerçekleştirilmiştir. Hareketli faz 5 mM amonyum asetat (pH 8.0'a ayarlanmıştır): asetonitrilden (90:10 h/h) oluşmaktadır. Mobil faz, 1 mL dk<sup>-1</sup>'lik sabit bir akış hızıyla sistemden geçmektedir. Bu, SUT parametrelerine göre optimize edilen şartlarda gerçekleşen analizler için enjeksiyon hacmi 15 µL'dir ve analitler 280 nm'de UV dedektör ile saptanmıştır.

Seçicilik, kalibrasyonun doğrusallığı, YS, TAS, doğruluk, gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik, geri kazanım ve hızlandırılmış bozunma çalışmaları metod validasyonunun bir parçası olarak incelenmiştir. Ayrıca, kasıtlı ufak değişiklikler altında SFP analiz edilerek yöntemin sağlamlığı gösterilmiştir.

*cis*-SFP, *trans*-SFP ve PAR için  $t_R$  sırasıyla 2,42 2,84 3,55 olarak bulunmuştur. Geliştirilen yöntemde doğrusallık aralığı saf etken madde ve serumda *cis*-SFP için 0,009-90 µg mL<sup>-1</sup>, *trans*-SFP için 0,001-10µg mL<sup>-1</sup> 'dir. İdrardan analiz çalışmasında *cis*-SFP için 0.09-90 µg mL<sup>-1</sup> *trans*-SFP için 0.01-10 µg mL<sup>-1</sup>'dir. İnsan serum ve idrar örneklerinde *cis* ve *trans*-SFP' yi belirlemek için kullanılan YPSK yöntemi, geri kazanım çalışmalarında %BSS değerlerinin %97,33-106,93 aralığında bulunmasıyla yüksek doğrulukla gerçekleştiğini kanıtlamıştır.

DV ve DPV ile pH taramaları yapılarak analizler için en uygun tampon çözeltinin pH 3,0 BRT olduğu tespit edilmiştir. Hız taramasıyla elde edilen veriler analizdeki reaksiyonun difüzyon kontrollü gerçekleştiğini göstermektedir. DV çalışmalarında geri tarama yönünde herhangi bir pikin gözlenmemesi ve pik potansiyelinin tarama hızının artmasıyla daha pozitif değerlere kayması elektrot tepkimesinin tersinmez olduğunu göstermektedir.

DPV ile yapılan kalibrasyon çalışmasıyla  $4 \times 10^{-6}$ - $8 \times 10^{-5}$  M doğrusallık aralığında standart etken maddenin ölçümleri alınmış ve YS  $4,16 \times 10^{-7}$  ve TAS  $1,26 \times 10^{-7}$  olarak hesaplanmıştır. İdrar numunesinden analiz çalışmalarında ise YS  $4,15 \times 10^{-7}$  ve TAS  $1,26 \times 10^{-7}$  olarak bulunmuştur.

Voltametrik analizde farmasötik dozaj formu ve idrarda yapılan tekrar edilebilirlik, geri kazanım çalışmalarında uygun sonuçlar elde edilmesi SFP içeren ticari preparatlarda ve idrarda, DPV ile geliştirilen bu analiz yönteminin miktar tayininde kullanılabileceğini göstermiştir.

Varılan sonuç şudur ki geliştirilen voltametrik analiz yöntemi ekonomik, hızlı, kolay, hassas, seçici, kesin olması, analizler için yüksek miktarda etken madde kullanımını gerektirmemesi ve ekstraksiyon, süzme gibi ön işlemlere lüzum duyulmadan hızlıca analiz yapılabilmesi gibi kazançlı özelliklerinden dolayı literatürde verilen yöntemlere alternatif olarak kullanılabilir.

Elde edilen bütün bu verilere göre geliştirilen yöntemlerin, SFP' nin farmasötik dozaj formlarından ve idrar numunelerinden DPV yöntemi ile, SFP' nin izomerlerinin ise YPSK kullanılarak tablet dozaj formundan, serum numunesi içinden ve idrar numunelerinden analizinde kullanılabileceği önerilmektedir.

## ÖZET

### Sefprozilin Tayini için Elektrokimyasal ve Stabilité Göstergeli Kromatografik Yöntemlerin Geliştirilmesi

Bu tezde SFP' nin tayini için elektrokimyasal ve SFP' nin izomerlerinin tayini için stabilite göstergeli kromatografik analiz yöntemleri geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu çalışma SFP' nin voltametrik analizini açıklayan ilk çalışmadır. İlk olarak SFP'nin elektrokimyasal davranışı CV ve DPV kullanılarak BR, fosfat, asetat tamponları ve 0,1 M ve 0,5 M sülfürik asitte 2,0 ila 10,0 pH aralığında ayrı ayrı incelenmiştir. Deneyler, SFP' nin oksidasyon reaksiyonunu incelemek için pH 3 BRT'de geniş bir tarama aralığında (10-500 mVs<sup>-1</sup>) gerçekleştirilmiştir. SFP, CKE ile tersinmez ve difüzyon kontrollü olarak yükseltgenmiştir. DPV ile miktar tayini çalışmaları yapılmıştır. Yöntemin doğruluğu, kesinliği, duyarlılığı, gün içi ve günler arası tekrar edilebilirliği istatistiksel olarak araştırılmıştır. SFP' nin izomerlerinin tayini için IS olarak PAR'ın kullanıldığı bir YPSK yöntemi geliştirilmiş ve valide edilmiştir. Öncelikle çeşitli sabit fazlar denenerek maddelerin ayrımları için en iyi sabit faz belirlenmiştir. Diğer taraftan farklı hareketli fazlar, farklı derişimlerde tampon çözelti, pH, sıcaklık, akış hızı etkileri gibi deney şartları da optimize edilmiştir. ACE 5 C8 (150 mm x 4,6 mm x 5 µm) kolon ve asetonitril: tampon çözelti (5 mM, amonyum asetat), 90: 10 (h/h) hareketli faz kompozisyonu kullanılarak iyi bir kromatografik ayrıma ulaşılmıştır. SFP' nin diastreomerlerinin ayrımı 45°C, 1 mL dk<sup>-1</sup> akış hızında ve 280 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. Bu koşullarda *cis*-SFP, *trans*-SFP ve PAR'ın tutulma zamanı sırasıyla 2,42 2,84 3,55 dir. YPSK yöntemi, ICH kılavuzlarına göre valide edilmiş ve hızlandırılmış bozunma çalışmaları (oksidasyon, UV ışığı, asit, baz ve sıcaklık) sonucunda, gerçekleştirilen yöntemin SFP için yüksek seçiciliğe sahip olduğu belirlenmiştir. Önerilen voltametrik ve stabilite göstergeli kromatografik yöntemler, farmasötik dozaj formlarında başarıyla uygulanmıştır. Böylece analiz sonuçlarının yardımcı maddelerden etkilenmediği ve ilaç numunelerine uygulanabilirliği gösterilmiştir. Her iki yöntemin validasyonu yapılmış ve sentetik biyolojik numunelerden analiz için uygulanabilirliği gösterilmiştir. Geliştirilen yöntemler hızlı, seçici, hassas, güvenilir ve çevre dostu yöntemlerdir.

**Anahtar Sözcükler:** Elektroanalitik Yöntemler, İlaç Analizi, Sefprozil, Voltametri, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi.

## SUMMARY

### Development of Electrochemical and Stability-Indicating Chromatographic Methods for Determination of Cefprozil

In this thesis, it is aimed to develop an electrochemical method for the determination of CFP and a stability indicating chromatographic analysis method for the determination of CFP's isomers. This study is the first voltammetric study describing determination of CFP. Firstly, the electrochemical behavior of CFP was examined separately over a pH range from 2,0 to 10,0 in BR, phosphate, acetate buffers and 0,1 M and 0,5 M sulfuric acid using cyclic voltammetry and differential pulse voltammetry. Experiments were performed in a wide scanning range ( $10\text{-}500\text{ mVs}^{-1}$ ) in pH 3 BR buffer, to examine the oxidation reaction of CFP. CFP was oxidized irreversibly and by diffusion-controlled at glassy carbon electrode. Quantification studies with differential pulse voltammetry were carried out. The accuracy, precision, sensitivity, repeatability and reproducibility of the method was investigated statistically. A high performance liquid chromatography (HPLC) method, using paracetamol as the internal standard, was developed and validated for the determination of CFP's diastereoisomers. Firstly, the best stationary phase for the separation of substances has been determined by testing various stationary phases. On the other hand, experimental conditions such as different moving phases, buffer solutions at different concentrations, pH, temperature, flow rate effects are also optimized. A good chromatographic separation was achieved using ACE 5 C8 (150 mm x 4,6 mm x 5  $\mu\text{m}$ ) column and acetonitrile: buffer solution (5 mM, ammonium acetate), 90:10 (v / v) mobile phase composition. The separation of CFP diastereomers was carried out at a flow rate of  $1\text{ mL min}^{-1}$ ,  $45^{\circ}\text{C}$ , and a detection wavelength of 280 nm. Under these conditions, the retention time of cis-CFP, trans-CFP and PAR is 2,42 2,84 3,55, respectively. The HPLC method was validated according to the International Conference on Harmonization (ICH) guidelines and as a result of difficult degradation studies (oxidation, UV light, acid, base and temperature), the method was determined to have high selectivity for CFP. The proposed voltammetric and stability-indicating chromatographic methods have been successfully applied in pharmaceutical dosage forms. Thus, it has been shown that the analysis results are not affected by the excipients and its applicability to drug samples. Both methods were validated and their applicability for analysis from synthetic biological samples will be demonstrated. The developed methods are fast, selective, sensitive, reliable and environmentally friendly methods.

**Keywords:** Cefprozil, Drug Analysis, Electroanalytical Methods, Voltammetry, High-Performance Liquid Chromatography

## KAYNAKLAR

- ABOULMAGD AM, ABDELWAHAB NS, ABDELRAHMAN MM, ABDEL-RAHMAN HM, FARİD NF. (2021). Lipophilicity study of different cephalosporins: Computational prediction of minimum inhibitory concentration using salting-out chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **206**: 114358.
- AGİN F, ATAL S (2019). Electroanalytical Determination of the Anti-inflammatory Drug Tenoxicam in Pharmaceutical Dosage Forms/Anti-enflamatuvar İlac Tenoksikamin Farmasotik Dozaj Formlarından Elektroanalitik Miktar Tayini. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, **16**(2):184-191.
- AHUJA S, DONG MW (2005). *Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC*, 3-211.
- ARSALAN A, IQBAL A, SYED ABİD A (2017). Cefaclor: clinical, biochemical, analytical and stability aspects. *Advances in medicine and biology*, **123**:1-52.
- BARRİERE SL (1992). Pharmacology and pharmacokinetics of cefprozil. *Clinical infectious diseases*, **14**:184-188.
- BAYRAÇ C, CAMIZCI G (2020). Hplc metodu ile patulin tayininde tek laboratuvar metot validasyon çalışması. *Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, **9**(1):285-296.
- BİDLİNGMEYER BA (1993). *Practical HPLC Methodology And Applications*, 27-380.
- BOZAL B (2009). *Lornoksikam'ın Elektroanalitik İncelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- BOZAL PALABIYIK B (2015). *Yeni Nesil Nanosensör Tasarımı ve Antiparkinson İlaç Analizlerinde Kullanımı*, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- BRAMPTON ON (2019). Product monograph: cefprozil tablets.
- BRETT CMA, BRETT AMO (1993). *Electrochemistry, Principles, Methods and Applications*. Oxford University Press: New York, 22-136.
- CAN NO (2011). HPLC determination of cefprozil in tablets using monolithic and C18 silica columns. *Journal of separation science*, **34**(16-17): 2223-2231.
- CANBAZ D (2008). *Zolmitriptan'ın elektroanalitik incelenmesi ve tayini*, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

- CHAN CC, LAM H, LEE YC, ZHANG XM (Eds.). (2004). *Analytical method validation and instrument performance verification*, John Wiley & Sons Inc., New Jersey.
- CHEİZE M, SARTHOU G, CROOT PL, BUCCIARELLİ E, BAUDOUX AC, BAKER AR (2012). Iron organic speciation determination in rainwater using cathodic stripping voltammetry. *Anal Chim Acta* **736**: 45-54.
- DAYTON MA, BROWN JC, STUTTS KJ, WİGHTMAN RM (1980). Faradaic electrochemistry at microvoltammetric electrodes. *Analytical Chemistry*, **52(6)**:946-950.
- DEMİR F (2013). *Ftalosiyanınların elektrokimyasal ve spektroeletrokimyasal karakterizasyonu ve elektrokimyasal uygulama alanlarının belirlenmesi*, Doktora Tezi, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- DOGAN-TOPAL B, BOZAL-PALABIYIK B, USLU B, OZKAN S A (2013). Multi-walled carbon nanotube modified glassy carbon electrode as a voltammetric nanosensor for the sensitive determination of anti-viral drug valganciclovir in pharmaceuticals. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **177**: 841-847.
- EL-SHAHAWİ MS, BASHAMMAKH AS, AL-SİBAAİ AA, BAHADARAH EA (2013). Analysis of spironolactone residues in industrial wastewater and in drug formulations by cathodic stripping voltammetry. *J Pharm Anal* **3**: 137-143
- ERDEN S (2009). *Ateşli Silah Atış Artıklarında Voltametrik Sıyırma Yöntemleri ile Antimon, Baryum ve Kurşunun Tayini*, Doktora Tezi, Ankara üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- ERKMEN C (2017). *Yeni Nesil Hılc Kolon Kullanılarak Bazı Antiviral İlaçların Farmasötik Dozaj Şekillerinden Sıvı Kromatografisi ile Analizi*, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara
- ESER B, DİNÇEL AS (2018). Kromatografiye giriş, yüksek performanslı sıvı kromatografi kullanımında basit ipuçları. *Sağlık Hizmetleri ve Eğitimi Dergisi*, **2(2)**: 51-57.
- FEİER B, GUİ A, CRİSTEA, C, SĂNDULESCU R (2017). Electrochemical determination of cephalosporins using a bare boron-doped diamond electrode. *Analytica chimica acta*, **976**: 25-34
- GADKARİEM EA, MUTASİM MM, İBRAHİM KE, EL-OBEİD HA. (2009). Spectrophotometric methods for the determination of cefprozil in bulk and dosage form. *International Journal of Biomedical Science: IJBS*, **5(3)**:267.
- GAWANDE V, BOTHARA K (2014). Identification, isolation, and characterization of unknown degradation products of cefprozil monohydrate by high-performance thin-layer chromatography. *JPC-Journal of Planar Chromatography-Modern TLC*, **27(5)**: 372-376.

GOSSER DK (1993). *Cyclic Voltammetry: Simulation and Analysis of Reaction Mechanisms* **43**: 12-72.

GÜMÜŞTAŞ M (2016) *Beta Agonist İlaç Etken Maddelerin Kiral Davranışlarının İncelenmesi*, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

HAMILTON RJ, SEWELL PA (1982). *Introduction to High Performance Liquid Chromatography*, 1-12.

HE G, MAİ L, WANG X (2018). Development and validation of an HPLC-MS/MS method for rapid simultaneous determination of cefprozil diastereomers in human plasma. *International Journal of Analytical Chemistry*.

HOUCK MM, SİEGEL JA (2009). *Fundamentals of forensic science*. Academic Press.

HUPE KP, NCNAIR H, BIDLINGMEYER B, ARMSTRONG D, SCOTT RW, WIDMER S (1992). Chromatography 1992: a snapshot of the present. **10**(3): 238-255.

International Conference on Harmonization (ICH) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology (2005). Genova. Q2A (R1)

International Conference on Harmonization (ICH) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology (2005). Genova. Q2B (R1).

ISLEK DS, ISAT E, CENGİZ S (2017). Determining malpractice by ink aging method. *Medicine*, **6**(1): 136-8.

JADHAV K, DHAMECHA D, ASNANİ G, BHALEKAR V, LAHOTİ S. (2013). Application of UV spectrophotometric method to study stress degradation behavior of cefprozil. *Chronicles of Young Scientists*, **4**(2): 158-158.

JAGAPATHI RV, SESHAGIRI RJVLN (2008). High performance thin layer chromatographic method for estimation of cefprozil in tablet dosage form. *E-Journal of Chemistry*, **5**(3): 427-430.

JEONG SH, JANG JH, CHO HY, LEE YB (2021). Pharmacokinetic comparison with different assays for simultaneous determination of cis-, trans-cefprozil diastereomers in human plasma. *Journal of Pharmaceutical Analysis*.

KELLNER R, MERMET JM, OTTO M, VALCARCEL M, WİDMER HM (2004). *Analytical Chemistry: A Modern Approach To Analytical Science*.

KOUNAVES SP (1997). Voltammetric techniques. *Handbook of Instrumental Techniques For Analytical Chemistry*, 709-726.

KROMİDAS S (Ed.). (2016). *The HPLC Expert: Possibilities And Limitations Of Modern High Performance Liquid Chromatography*, 61-231.

- LAVIRON, E., ROULIER, L., DEGRAND, C., (1980). A multiplayer model for the study of space distributed redox modified electrodes: Part II theory and application of linear potential sweep voltammetry for a simple reaction. *J. Electroanal. Chem.* **112**: 11-23
- LIU M, MA JY, ZHANG Y, WANG X, ZHAO H, DU A, YANG M, MENG L, DENG M, LIU, H (2016). An LC-MS/MS method for simultaneous determination of cefprozil diastereomers in human plasma and its application for the bioequivalence study of two cefprozil tablets in healthy Chinese volunteers. *Biomedical Chromatography*, **30**(3): 288-293.
- MARSHALL WF, BLAIR JE (1999, February). The cephalosporins. In *Mayo Clinic Proceedings*, **74**( 2): 187-195.
- MCGUFFIN, VL (2004). Theory of chromatography. In *Journal of Chromatography Library*, **69**: 1-93
- MCPOLIN O (2009). *An introduction to HPLC for pharmaceutical analysis*.
- MOLAVI A (1991). Cephalosporins: rationale for clinical use. *American family physician*, **43**(3): 937-948.
- OZKAN SA (2012). *Electroanalytical methods in pharmaceutical analysis and their validation*. HNB publishing.
- OZKAN SA, KAUFFMANN JM, ZUMAN P (2015). *Electroanalysis in biomedical and pharmaceutical sciences: voltammetry, amperometry, biosensors, applications*. Springer.
- PARK TH, KIM JK, JEE JP, PARK JS, KIM CK (2004). HPLC method for simultaneous determination of cefprozil diastereomers in human plasma. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, **36**(1): 243-248.
- PATIL MPN (2017). HPLC Method Development. *Journal of Pharmaceutical Research and Education*, **1**(2):243-260.
- PETERS FT, DRUMMER OH, MUSSHOFF F(2007). Validation of new methods. *Forensic science international*, **165**(2-3): 216-224.
- PURNELL JH (1960). Correlation of separating power efficiency of gas-chromatographic columns, *Journal of the Chemical Society*, 1268-1274.
- SKOOG DA, HOLLER FJ, CROUCH SR (2017). *Principles of Instrumental analysis* **47**(4-5):571-815.
- SMITH CG, GRAHAM JD, BUZANOWSKI WC, ISKANDARANI Z, SHERMA J (2020). *CRC Handbook of Chromatography: Polymers*.

SWARTZ ME, KRULL IS (2012). *Handbook of analytical validation*.

TESİO AY, ROBLEDO SN (2021). Analytical determinations of luteolin. *BioFactors*, **47**(2): 141-164.

TÜRKİYE İLAÇ VE TIBBİ CİHAZ KURUMU (2022), [<https://titck.gov.tr/storage/kubKtAttachments/MX8O6D0zdVewC.pdf>]. Erişim Tarihi: 05.10.2022

UÇAR M (2019). *Bor Katkılı Elmas Elektrot Kullanarak Progesteron Hormonunun Elektroanalitik İncelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Batman Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Batman

US FDA Technical Review Guide: Development of New Stereoisomeric Drugs (1992).

US FDA Technical Review Guide: Validation of Chromatographic Methods, Center for Drug Evaluation and Research (1983). Rockville, MD.

US FDA, Technical Review Guide: Analytical Procedures and Method Validation: Chemistry, Manufacturing and Controls Federal Notices (2000). **5**: 776.

USLU B, OZKAN SA (2007). Electroanalytical application of carbon based electrodes to the pharmaceuticals. *Analytical Letters*, **40**(5): 817-853.

USLU B, OZKAN SA (2011). Electroanalytical methods for the determination of pharmaceuticals: a review of recent trends and developments. *Analytical letters*, **44**(16): 2644-2702.

USP 37-NF 32 (2014) (The United States Pharmacopeia). The Official Compendia of Standards. United States Pharmacopeial Convention, Rockville.

USTUNES L (Ed.) (2022). RxMediaPharma interaktif ilaç bilgi kaynağı. GEMAŞ Genel Mühendislik Mekanik San. ve Tic. A.Ş., Bornova, İzmir.

VAİLAYA A, HORVÁTH C (1998). Retention in reversed-phase chromatography: partition or adsorption?. *Journal of Chromatography A*, **829**(1-2): 1-27.

VİTHA MF (2016). *Chromatography: Principles And Instrumentation* **185**.

WANG J, SCHULTZE JW (1996). Analytical Electrochemistry, **35**(17):67-115.

WISEMAN LR, BENFIELD P (1993). Cefprozil. *Drugs*, **45**(2): 295-317.