



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**YENİ NESİL HILIC KOLON KULLANILARAK BAZI
ANTİVİRAL İLAÇLARIN FARMASÖTİK DOZAJ
ŞEKİLLERİNDEN SIVI KROMATOĞRAFİSİ İLE
ANALİZİ**

Cem ERKMEN

**ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Bengi USLU**

**ANKARA
2017**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YENİ NESİL HILIC KOLON KULLANILARAK BAZI
ANTİVİRAL İLAÇLARIN FARMASÖTİK DOZAJ
ŞEKİLLERİNDEN SIVI KROMATOĞRAFİSİ İLE
ANALİZİ**

Cem ERKMEN

**ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. Bengi USLU

Bu araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeler Müdürlüğü'nün
16L0237001 proje numarası ile desteklenmiştir

ANKARA

2017

Etik Beyan

Ankara Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Yeni nesil HILIC kolon kullanılarak bazı antiviral ilaçların farmasötik dozaj şekillerinden sıvı kromatografisi ile analizi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikri tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: CEM ERKMEN

Tarih: 13.01.2017

İmza: 

Kabul ve onay

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalında
CEM ERKMEN tarafından hazırlanan
“Yeni nesil HILIC kolon kullanılarak bazı antiviral ilaçların farmasötik dozaj
şekillerinden sıvı kromatografisi ile analizi” adlı tez çalışması
Aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS Tezi olarak OY BİRLİĞİ/~~OY~~
~~ÇOKLUĞU~~ ile kabul/~~ret~~ edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:13.01.2017



Prof. Dr. Feyyaz ONUR
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı



Doç. Dr. H. Eda ŞATANA KARA
Gazi Üniversitesi
Raportör



Prof. Dr. Bengi USLU
Ankara Üniversitesi
Üye

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

Prof. Dr. K. Zafer KARAER
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	iii
Kabul ve onay	iv
İçindekiler	v
Önsöz	vii
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	x
Çizelgeler	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Virüsler	1
1.2. İmmün Yetmezlik Virüsüne Etkili İlaçlar (Antiretroviral İlaçlar) ve Antiretroviral Tedavi	3
1.2.1. Yüksek Aktiviteli Antiretroviral Tedavi (HAART)	5
1.2.2. Antiretroviral Tedavide Kullanılan Rejimler	7
1.2.2.1. Standart Birinci Basamak Rejimi	7
1.2.2.2. Alternatif Birinci Basamak Rejimi	7
1.2.2.3. İkinci Basamak Rejim	8
1.3. Tez Kapsamında Kullanılan İlaç Etken Maddelerine Ait Bilgiler	8
1.3.1. Nükleozid Ters Transkriptaz İnhibitörleri (NRTİ)	8
1.3.1.1. Abakavir	9
1.3.1.2. Lamivudin	10
1.3.1.3. Zidovudin	11
1.4. Tez Maddeleri ile Yapılmış Literatürdeki Çalışmalar	12
2. GEREÇ VE YÖNTEM	16
2.1. Gereç	16
2.1.1. Tez Kapsamında Kullanılan Etken Maddeler	16
2.1.2. Kullanılan Araç ve Gereçler	17
2.1.3. Kullanılan Sabit Fazlar	17
2.1.4. Kullanılan Kimyasal Maddeler	18
2.1.5. Standart Madde Çözeltilerinin Hazırlanışı	18
2.1.6. Trizivir Tablet Çözeltilisinin Hazırlanışı	19
2.1.7. Geri Kazanım Çalışmaları için Çözeltilerin Hazırlanışı	19
2.1.8. Hareketli Faz Çözeltilerinin Hazırlanışı	19
2.2. Yöntem	20
2.2.1. Kromatografi	20
2.2.2.1. Adsorpsiyon Kromatografisi	22
2.2.2.2. Dağılma Kromatografisi	23
2.2.2.3. Ters-faz Sıvı Kromatografisi	24
2.2.2.4. Normal-faz Sıvı Kromatografisi	24
2.2.2.5. Hidrofilik Etkileşim Sıvı Kromatografisi (HILIC)	25
2.2.2.5.1. HILIC Yönteminin Tarihçesi	28
2.2.2.5.2. HILIC Yönteminin Mekanizması	28
2.2.2.5.3. HILIC Yönteminde Kullanılan Sabit Fazlar	31
2.2.2.5.4. HILIC Yönteminde Kullanılan Hareketli Fazlar	34

2.2.3. Yüksek Başarımli Sıvı Kromatografisi (YBSK)	36
2.2.3.1. Hareketli Faz Hazneleri ve Çözücü Muamele Sistemleri	37
2.2.3.2. Pompalama Sistemleri	38
2.2.3.3. Numune Enjeksiyon Sistemleri	39
2.2.3.4. Sıvı Kromatografi Kolonları	39
2.2.3.4.1. Analitik Kolonlar	40
2.2.3.4.2. Koruyucu Kolonlar	40
2.2.3.4.3. Kolon Dolgu Maddelerinin Tipleri	41
2.2.3.5. Dedektörler	42
2.2.3.5.1. Foto Diyot Dizi Dedektör (FDD)	43
2.2.4. Kromatografide Temel Parametreler ve Sistem Uygunluk Testleri (SUT)	44
2.2.4.1. Kromatografik Analizlerde Yöntem Geçerlik Testleri	47
2.2.4.2. Validasyonun Genel İşlemleri	48
2.2.4.2.1. Seçicilik	49
2.2.4.2.2. Doğrusallık ve Aralık	50
2.2.4.2.3. Teşhis Sınırı (TS, LOD) ve Tayin Alt Sınırı (TAS, LOQ)	51
2.2.4.2.4. Kesinlik	52
2.2.4.2.5. Doğruluk (Geri Kazanım)	53
2.2.4.2.6. Sağlamlık	55
2.2.4.2.7. Tutarlılık	55
2.2.4.2.8. Stabilitate	56
3. BULGULAR	57
3.1. Abakavir, Lamivudin ve Zidovudin Maddeleri için Geliştirilen HILIC Yöntemine Ait Analiz Bulguları	57
3.1.1. HILIC Yönteminin Optimizasyonu	57
3.1.1.1. Hareketli Fazdaki Organik Çözücü ve Tampon Çözeltinin Yüzdelerinin Belirlenmesi	57
3.1.1.2. Tampon Çözelti Molaritesinin Belirlenmesi	61
3.1.1.3. Sabit Fazın Seçimi	65
3.1.1.4. Kolon Sıcaklığının Belirlenmesi	68
3.1.1.5. Farklı Tampon Çözeltilerin Analizleri	70
3.1.1.6. Akış Hızı Optimizasyonu	72
3.1.1.7. pH Belirleme Çalışmaları	76
3.1.2. Sistem Uygunluk Testlerinin Sonuçları	78
3.1.3. Hızlandırılmış Bozundurma Çalışmalarına Ait Sonuçlar	79
3.1.4. Kalibrasyon Çalışmalarına Ait Sonuçlar	86
3.1.3. Geri Kazanım Çalışmalarına Ait Sonuçlar	87
4. TARTIŞMA	89
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	95
ÖZET	96
SUMMARY	97
KAYNAKLAR	98
ÖZGEÇMİŞ	105

ÖNSÖZ

Tez çalışmalarım kapsamında AIDS tedavisinde kullanılan abakavir, lamivudin ve zidovudin etken maddelerinin yeni nesil HILIC kolonlar kullanılarak YBSK’da analizi ve optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Abakavir, lamivudin ve zidovudin’in eş zamanlı 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 bir analiz yöntemi geliştirilmiştir. Geliştirilen yöntem için yöntem geçerlilik testleri ve validasyon çalışmalarında yapılarak bu maddelerin farmasötik dozaj şekillerinden eş zamanlı analizi için uygun olduğu görülmüştür.

Yüksek lisans eğitimime başladığımdan beri her daim yanımda olan, sabrı ve ilgisini hiç eksik etmeyen, bilgi ve tecrübeleri ile bana yol gösteren, değerli danışman hocam Prof. Dr. Bengi USLU’ ya sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Değerli bilgi ve deneyimleri ile bana yardımcı olan, manevi desteğini hiç esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Sibel A. Özkana’a çok teşekkür ederim.

Yüksek lisans çalışmalarım süresince bilgi ve tecrübeleri ile bana hep yardımcı olan, her koşulda değerli zamanını bana ayıran, bir abi gibi manevi desteğini hiç eksik etmeyen Dr. Mehmet GÜMÜŞTAŞ ve eşi Ayşen GÜMÜŞTAŞ’ a çok teşekkür ederim.

Yüksek lisans öğrenimim süresince sağladıkları katkılardan dolayı Analitik Kimya Anabilim Dalı’nın öğretim üyelerine teşekkürlerimi sunarım.

Desteklerini hiç eksik etmeyen Dr. Sevinç KURBANOĞLU, Dr. Burçin BOZAL-PALABIYIK, Nurgül KARADAŞ-BAKIRHAN, Leyla KARADURMUŞ, Dr. M. Gökhan ÇAĞLAYAN, Dr. Burcu DOĞAN-TOPAL, Engin ER ve Z. Ceren ERTEKİN-ÖZKAN’a çok teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca sevgilerini hep hissettiğim, her kararında bana destek ve yardımcı olan, bana her zaman inanan ve güvenen annem Müjgan ERKMEN, babam Yusuf ERKMEN ve kardeşim Can ERKMEN’e hep yanımda oldukları için çok teşekkür ederim.

Bu tez çalışması Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü’nün 16L0237001 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

SİMGELER VE KISALTMALAR

α	Seçicilik Faktörü
ACN	Asetonitril
ABC	Abakavir
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome-Edinilmiş Bağışıklık Eksikliği Sendromu
Bias	Bağıl Hata
BPH	Benign Prostat Hiperplazisi
BSS	Bağıl Standart Sapma
CRİ	Ko-reseptör İnhibitörleri
FDA	Food and Drug Administration – Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FDD	Fotodiyot Dizi Dedektörü
Fİ	Füzyon İnhibitörleri
HAART	Yüksek Aktiviteli Antiretroviral Tedavi
HILIC	Hidrofilik Etkileşim Sıvı Kromatografisi
HIV	Human Immunodeficiency Virus - İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü
ICH	International Conference on Harmonization- Uluslararası Uyum Konferansı
İNİ	İntegraz İnhibitörleri
k	Kapasite Faktörü
LC	Sıvı Kromatografisi
LMV	Lamivudin
m	Eğim
MS	Kütle Spektrometri

n	Kesişim
N	Etkin Tabaka Sayısı
NNRTİ	Non-Nükleozid Ters Transkriptaz Enzim İnhibitörleri
NRTİ	Nükleozid Ters Transkriptaz İnhibitörleri
NtRTİ	Nükleotid Ters Transkriptaz İnhibitörleri
PI	Proteaz İnhibitörleri
r	Korelasyon katsayısı
Rs	Ayırma Gücü
SUT	Sistem Uygunluk Testleri
T	Kuyruklanma Faktörü
TAS	Tayin Alt Sınırı
TS	Teşhis Sınırı, Gözlenebilirlik Sınırı
t _R	Alıkonma zamanı
UV	Ultra viyole
UV-GB	Ultra Viyole-Görünür Bölge
USP	United States Pharmacopeia – Amerika Birleşik Devletleri Farmakopesi
YBSK	Yüksek Başarımli Sıvı Kromatografisi
ZDV	Zidovudin
WHO	World Health Organization - Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. HIV'in şematik görüntüsü (Kumar ve ark., 2007)	1
Şekil 1.2. HIV'in replikasyon siklusu: 1. Tutunma, 2. Füzyon (kapsidin soyulması ve nükleokapsidin hücre içine girişi), 3. Ters transkripsiyon, 4. cDNA sentezi, 5. İntegrasyon (proviral DNA oluşumu), 6. mRNA ve viral RNA sentezi, 7. Viral proteinlerin sentezi, 8. Özyapı oluşumu, 9. Salınım. (Küçükoğlu ve ark., 2009).	3
Şekil 1.3. Zidovudin'nin etki mekanizması	9
Şekil 2.1. Kromatografik ayrımların temeli	20
Şekil 2.2. Farklı yöntemler ile HILIC'in kombinasyonu (Buszewski ve ark., 2012)	26
Şekil 2.3. Normal faz ve ters faz yöntemlerinin tamamlayıcısı HILIC (Adams ve ark., 2014)	27
Şekil 2.4. Scopus endeksli 'HILIC' ile 'HILIC ve ilaç analizleri' terimleri için toplam yayın sayısı	27
Şekil 2.5. HILIC yönteminde ayırım mekanizması (Buszewski ve Noga., 2012)	29
Şekil 2.6. HILIC yönteminde moleküller arası etkileşimler (https://www.thermofisher.com/tr)	30
Şekil 2.7. YBSK cihazının şematik gösterimi (Perkin- Elmer Corporation, Norwalk, CT).	36
Şekil 2.8. YBSK cihazından alınmış örnek bir kromatogram (Gümüştas., 2009)	45
Şekil 3.1. Kinetex HILIC (150 mm x 4,6 mm x 2,6 μ m)kolon, 25 °C, 1 mL dk ⁻¹ akış hızı, pH: 6,68, 280 nm dalga boyu, hareketli faz: ACN: Tampon - 20mM Amonyum asetat (h/h) (80/20) (a), (85/15) (b), (88/12) (c), (90/10) (d), (92/8) (e), (95/5) (f) ile yapılan çalışmalara ait kromatogramlar	58
Şekil 3.2. Kinetex HILIC (150 mm x 4,6 mm x 2,6 μ m) kolon, 25 °C, 1mL dk ⁻¹ akış hızı pH:6,68, 280 nm dalga boyu, hareketli faz: ACN: Tampon- (5 mM) (a), (10 mM) (b), (20 mM) (c), (40 mM) (d), (50 mM) (e), (100 mM) (f) Amonyum asetat (h/h) (80/20) ile yapılan çalışmalara ait kromatogramlar	62

- Şekil 3.3.** Kinetex HILIC (150 mm x 4,6 mm x 2,6 μ m) kolon(a), Kinetex HILIC (150 mm x 4,6 mm x 5 μ m) kolon(b), XBridge HILIC (150 mm x 4,6 mm x 2,5 μ m) kolon(c), ZIC HILIC (250 mm x 4,6 mm x 5 μ m) kolon(d), 25°C, 1mL dk⁻¹ akış hızı, pH:6,68, 280 nm dalga boyu, hareketli faz: ACN: Tampon- 100 mM Amonyum asetat (h/h) (80/20) ile yapılan çalışmalara ait kromatogramlar 66
- Şekil 3.4.** Kinetex HILIC (150 mm x 4,6 mm x 2,6 μ m)kolon, 25°C (a), 35°C (b), 45°C (c) 1mL dk⁻¹ akış hızı, pH:6,68, 280 nm dalga boyu, hareketli faz: ACN: Tampon- 100 mM Amonyum asetat (h/h) (80/20) ile yapılan çalışmalara ait kromatogramlar 69
- Şekil 3.5.** Kinetex HILIC (150 mm x 4,6 mm x 2,6 μ m)kolon, 1mL dk⁻¹ akış hızı, pH:6,68, 280 nm dalga boyu, hareketli faz: ACN: Tampon- 20 mM Amonyum asetat (a), 100 mM Amonyum format (b) (h/h) (80/20) ile yapılan çalışmalara ait kromatogramlar 71
- Şekil 3.6.** Kinetex HILIC (150 mm x 4,6 mm x 5 μ m)kolon, 0,5 mL dk⁻¹ (a), 0,75 mL dk⁻¹ (b), 1 mL dk⁻¹ (c), 1,25 mL dk⁻¹ (d), 1,5 mL dk⁻¹ (e), 2 mL dk⁻¹ (f) akış hızı, pH:6,68, 280 nm dalga boyu, hareketli faz: ACN: Tampon- 100 mM Amonyum asetat (h/h) (80/20) ile yapılan çalışmalara ait kromatogramlar 73
- Şekil 3.7.** Kinetex HILIC (150 mm x 4,6 mm x 2,6 μ m)kolon, 1 mL dk⁻¹ akış hızı, pH:5,50 (a), pH:6,68 (b), pH:7,8 (c), 280 nm dalga boyu, hareketli faz: ACN: Tampon- 100 mM Amonyum asetat (h/h) (80/20) ile yapılan çalışmalara ait kromatogramlar 76
- Şekil 3.8.** Bozundurma koşulları: 3 saat sıcak su banyosunda bekletme (a), 6 saat UV ışık altında bekletme (b), 12 saat etüvde bekletme (c), 12 saat 0,1 N HCl ile asit hidrolizi (d), 12 saat 0,1 N NaOH ile baz hidrolizi (e), 12 saat % 0,3' lük H₂O₂ ile oksidasyon (f) analizlerine ait kromatogramlar 80
- Şekil 3.9.** Bozunma koşullarında zamana bağlı olarak etken maddelerin % bozunma grafikleri; sıcak su banyosunda bekletme (a), UV ışık altında bekletme (b), 80 °C etüvde bekletme (c), 0,1 N HCl ile asit hidrolizi (d), 0,1 N NaOH ile baz hidrolizi (e), % 0,3' lük H₂O₂ ile oksidasyon (f) 83
- Şekil 3.10.** Kalibrasyon sonuçları; Piklerin geliş sırasıyla ZDV, ABC ve LMV için 5 (a), 10 (b), 20 (c), 40 (d), 50 (e) μ g mL⁻¹ 86
- Şekil 3.11.** Optimize edilen koşullarda tablet numunesi (a), tablet numunesi üzerine eklenen % 25 oranında etken madde ilavesi (b), tablet numunesi üzerine eklenen % 50 oranında etken madde ilavesi (c), tablet numunesi üzerine eklenen % 100 oranında etken madde ilavesi (d), tablet numunesi üzerine eklenen % 150 oranında etken madde ilavesi (e) ile yapılan analiz sonuçlarına ait kromatogramlar 87

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1.	7 farklı ilaç sınıfında kullanılan ilaç etken maddeleri	6
Çizelge 1.2.	Abakavir'in özellikleri	10
Çizelge 1.3.	Lamivudin'in özellikleri	11
Çizelge 1.4.	Zidovudin'in özellikleri	11
Çizelge 1.5.	Tez maddeleri ile yapılmış literatürdeki çalışmalar	12
Çizelge 2.1.	Kullanılan etken maddeler	16
Çizelge 2.2.	Kullanılan piyasa preparatı	16
Çizelge 2.3.	Çalışmalarda kullanılan kolonların özellikleri	17
Çizelge 2.4.	Çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler	18
Çizelge 2.5.	Kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması	22
Çizelge 2.6.	Ters ve Normal faz sıvı kromatografilerin karşılaştırılması	25
Çizelge 2.7.	HILIC yönteminde kullanılabilen sabit fazların farklı yapılarını göstermektedir.	32
Çizelge 2.8.	SUT parametreleri	46
Çizelge 2.9.	Validasyon parametreleri	48
Çizelge 3.1.	Sistem uygunluk testlerine göre hareketli faz bileşiminin karşılaştırılması	61
Çizelge 3.2.	Sistem uygunluk testlerine göre tampon çözelti molaritesinin karşılaştırılması	65
Çizelge 3.3.	Sistem uygunluk testlerine göre kolonların karşılaştırılması	68
Çizelge 3.4.	Sistem uygunluk testlerine göre kolon sıcaklıklarının karşılaştırılması	70
Çizelge 3.5.	Sistem uygunluk testlerine göre tampon çözelti türlerinin karşılaştırılması	72
Çizelge 3.6.	Sistem uygunluk testlerine göre akış hızlarının karşılaştırılması	76
Çizelge 3.7.	Sistem uygunluk testlerine göre pH değerlerinin karşılaştırılması	78
Çizelge 3.8.	Optimize edilen koşullar	78

Çizelge 3.9. SUT parametreleri	78
Çizelge 3.10. Kalibrasyon hesapları sonucunda bulunan validasyon parametreleri	86
Çizelge 3.11. Geri kazanım çalışmalarına ait sonuçlar	88

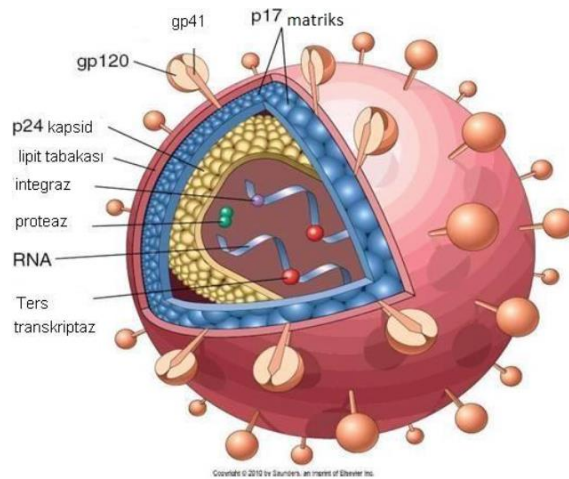


1. GİRİŞ

1.1. Virüsler

Virüsler basit yapıda ve oldukça küçük mikroorganizmalardır. Bu yüzden, bilim insanları uzunca süre virüslerin farkına varamamışlardır. Başlarda virüslerin neden olduğu hastalıkların nedeni bakteriler olarak düşünülmüş ancak, elektron mikroskopunun keşfiyle bu hastalıkların virüslerden kaynaklandığı anlaşılmıştır. Virüslerin hücre yapısı insan, hayvan ya da bakteri gibi canlıların hücre yapısından farklıdır ve yaşamlarını devam ettirebilmek için insan, hayvan, bitki ya da farklı canlıların hücrelerine yerleşmelidirler. Bunun sebebi ise virüslerin tek başlarına enerji üretememeleridir.

Virüslerin yapısı üzerinde glikoprotein molekülleri bulunan çift katlı lipid membran tabakası ile membran tabakası içerisindeki protein tabakası ve çekirdek kısmını oluşturan genetik materyalden oluşmaktadır. Virüslerin genetik materyalleri DNA ya da RNA'dan oluşur, bu yüzden de DNA virüsleri veya RNA virüsleri olarak iki grupta sınıflandırılır (Kayaalp, 2012).



Şekil 1.1. HIV'in şematik görüntüsü (Kumar ve ark., 2007)

Virüsler özgüldürler ve kendilerine afinite gösteren belli başlı hücrelere yerleşirler. Örnek olarak, uçuk virüsü ağızdaki epitel doku hücrelerine yerleşirken AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome-Edinilmiş Bağışıklık Eksikliği Sendromu) virüsü kanın akyuvar hücrelerine yerleşir. Virüsler hücreye yerleştiğinde öncelikle hücrenin zarını eritir sonrasında oluşan boşluktan hücreye kendine ait nükleik asidini bırakarak hücrenin yönetimini eline alır. İlk olarak hücreye kendi nükleik asitlerinin ve proteinlerinin kopyalarını sentezletir. Ardından yeni virüslerin oluşmasını sağlar. Hücre içinde oluşan virüsler hücreyi patlatır ve dışarı çıkarak yeni hücrelere saldırıda bulunurlar.

İnsanlara çok sayıda virüs bulaşabilmektedir fakat bunların az bir kısmı hastalıklara sebep olmaktadır. Virüslerin sebep olduğu hastalıkların bir kısmı aşı ile bağışıklık artırılarak (aktif immünizasyonla) önlenirken, bir kısmı da edilgen yollarla (pasif immünizasyonla) kontrol altına alınabilir. Ayrıca bağışıklık sistemi zayıfladığı zaman, patojen olmamasına rağmen birçok virüs hastalığa sebep olmaktadır.

Kanser tedavilerinde kullanılan ilaçların bağışıklık sistemini azaltması, organ nakillerinden sonra bağışıklık sisteminin bilerek zayıflatılması durumlarında ve AIDS'in artan boyutlarda ortaya çıkması virüslerin görülme sıklığını artırmıştır. Bu gibi durumlar da virüs infeksiyonlarının tedavilerinde kullanılan antiviral ilaçların geliştirilmesi yönünde teşvik edici olmuştur (Kayaalp, 2012).

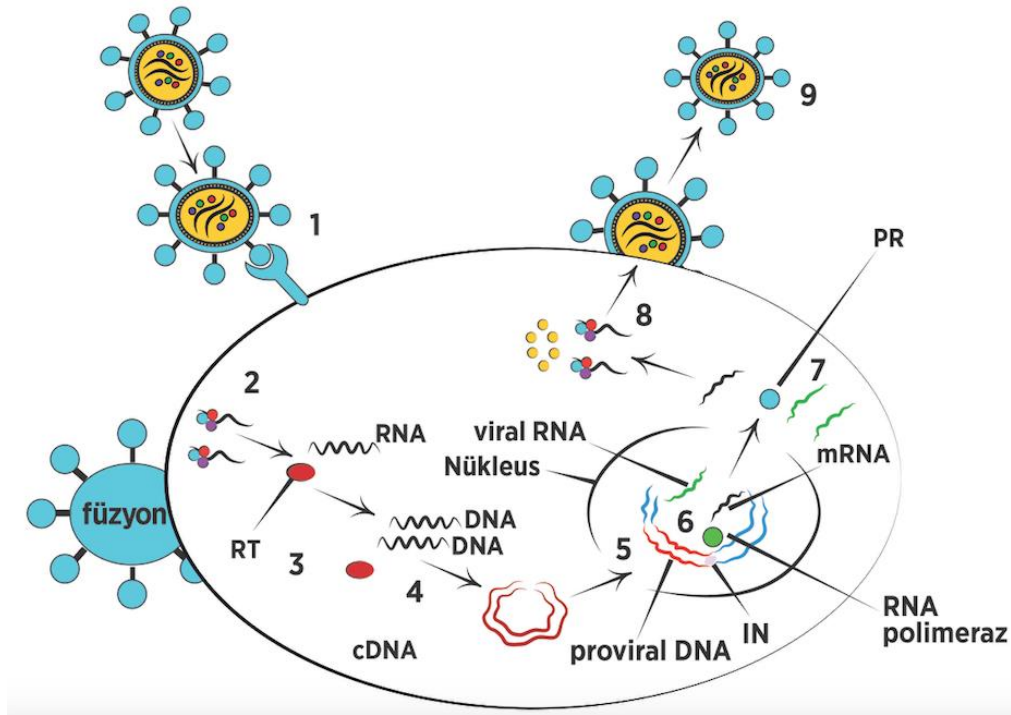
Antiviral ilaçlar beş ayrı grupta sınıflandırılabilir:

- Herpesvirüslere etkili ilaçlar,
- AIDS hastalığından sorumlu olan HIV'e (Human Immunodeficiency Virus-İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü) etkili ilaçlar,
- Influenza ve diğer solunum yolu virüslerine etkili ilaçlar,
- Hepatit B ve C virüslerine etkili ilaçlar,
- İmmün faktörler (immün globülini preparatları).

1.2.İmmün Yetmezlik Virüsüne Etkili İlaçlar (Antiretroviral İlaçlar) ve Antiretroviral Tedavi

AIDS bağışıklık sisteminin etkisiz hale gelmesine neden olan enfeksiyon hastalığıdır.

AIDS hastalığının etiyolojisi HIV virüsüdür. Bu virüs, insan vücudunu hastalıklara karşı koruyan direnç mekanizmasını, bağışıklık sistemini, etkisiz hale getirmektedir. Bağışıklık sistemi etkisiz hale geldiğinde, insan vücudu kolayca mücadele edemediği birçok hastalık etkeni ile baş edememektedir. Bu nedenle basit enfeksiyonlar dahi ölümlerle sonuçlanabilmektedir. AIDS hastalarının büyük çoğunluğu bağışıklık sistemleri etkisiz hale geldiği için basit enfeksiyonlar yüzünden hayatlarını kaybetmişlerdir (Kaya, 2008; Küçüköğlu ve ark. 2009).



Şekil 1.2. HIV'in replikasyon siklusu: 1. Tutunma, 2. Füzyon (kapsidin soyulması ve nükleokapsidin hücre içine girişi), 3. Ters transkripsiyon, 4. cDNA sentezi, 5. İntegrasyon (proviral DNA oluşumu), 6. mRNA ve viral RNA sentezi, 7. Viral proteinlerin sentezi, 8. Özyapı oluşumu, 9. Salınım. (Küçüköğlu ve ark., 2009).

HIV'in moleküler biyolojisini anlamak için yapılan çalışmalar, AIDS tedavilerinde kullanılan antiretroviral ilaçların keşiflerine yol açmıştır. Tedavilerde kullanılan antiretroviral ilaçlar AIDS'li hastaların yaşam süresini uzatmaktadır, ancak bu ilaçlar virüsü tamamen yok edemediklerinden hastalar viral replikasyonu baskılayabilmek için ilaçları ömür boyu kullanmaktadırlar (Lever, 2009; Küçüköğlu ve ark., 2009).

AIDS teşhisi konan her hastanın öncelikle detaylı bir şekilde tıbbi öyküsü alınır ve ardından fiziksel muayenesi ve birtakım laboratuvar testleri yapılır. Tüm bu işlemler HIV enfeksiyonunun ne durumda olduğunu ve enfeksiyona eşlik eden ko-enfeksiyonun varlığını belirlemek için yapılmaktadır. AIDS hastalığı şüphesiyle başvuran her yeni hastaya HIV antikor testi, CD4 hücrelerinin sayısı, plazma HIV RNA'sının düzeyi, tam kan sayımı ve idrar analizi testleri yapılmalıdır. Ayrıca kronik enfekte hastalara tedavi öncesi direnç testleri uygulanması ve cinsel sebepler yüzünden hastalık riski taşıyan ya da riskli davranışları bulunan kişilere Chlamydia trachomatis ve Neisseria gonorrhoea testleri yapılmalıdır.(Aberg ve ark., 2004; Küçüköğlu ve ark., 2009).

AIDS tedavisinin etkisi için tedavi öncesi ilk olarak CD4 hücre sayısı ve viral yük değerlerine bakılmalıdır (Kaufmann ve ark., 2003; Küçüköğlu ve ark., 2009) . Çünkü HIV enfeksiyonu, vücudun bağışıklık sisteminde rol oynayan CD4 lenfosit hücrelerinin fonksiyonlarının bozulmasına ve sayılarının azalmasına neden olmaktadır (Küçüköğlu ve ark., 2009).

Viral yük ise kanda bulunan HIV miktarını göstermektedir ve 1 mL kandaki HIV'in miktarını belirtir. Kanında HIV tespit edilen fakat miktarı tespit edilemeyecek kadar az olan kişilerde viral yük sıfırdır (Küçüköğlu ve ark., 2009).

AIDS hastalığı ilerledikçe her gün yaklaşık olarak 1 milyar viral partikül dolaşıma dahil olur. CD4 lenfosit sayısı ile viral yük arasında ters bir ilişki vardır. Bağışıklık sisteminde görevli olan akyuvar hücrelerinde (CD4 lenfositler) HIV bulunması, bu hücrelerin fonksiyonlarının bozulmasına yol açar. Böylece akyuvarların sayısı azalır ve insan vücudu, bağışıklık sisteminin kolayca üstesinden

gelebildiği basit enfeksiyonlarla artık savaşamayacak duruma gelir. Bu yüzden bağışıklık sistemi zayıflar ve hasta ölür (Horowitz,1998.; Küçüköğlu ve ark., 2009) .

Antiretroviral tedavinin başlıca hedefleri;

- Viral yükü maksimum seviyede ve uzun süreli baskılamak,
- İmmunolojik fonksiyonları korumak ve iyileştirmek,
- Yaşam kalitesini arttırmak,
- HIV'e bağlı morbidite ve mortaliteyi azaltmaktır (Mocroft ve ark. 1998; Palella ve ark. 1998; Küçüköğlu ve ark., 2009).

1.2.1. Yüksek Aktiviteli Antiretroviral Tedavi (HAART)

HIV enfeksiyonunun ilerlemesi, virüs yükündeki artış ve CD4 hücrelerinin sayısındaki azalma ile direkt ilişkilidir (Çetinkaya ve ark., 1998; Küçüköğlu ve ark., 2009).

Bugün AIDS tedavisi için standart tedavi haline gelmiş olan Highly Active Anti-Retroviral Therapy (Yüksek Aktiviteli AntiRetroviral Tedavi, HAART), ilk olarak 1996 yılında uygulanmaya başlamıştır. HAART, viral yükte belirgin bir azalma ve CD4 hücre sayısında artma sağlar (Hammer ve ark., 2008; Küçüköğlu ve ark., 2009).

Günümüze kadar HIV enfeksiyonunun biyolojisi ve patogenezi ile ilgili yeni bilgiler elde edilmiş ve bu bilgiler doğrultusunda yeni tedavi yöntemleri de gündeme gelmiştir. Uygulanan tedavi yönteminin ne derece etkin olduğunu anlamak için virüs yükündeki azalma (viral RNA, proviral DNA vb.) ve immün fonksiyonlardaki düzelmeler (CD4 sayısı, β -2 mikroglobulin vb.) ilk izlenilmesi gereken değerlerdir (Çetinkaya ve ark., 1998; Küçüköğlu ve ark., 2009).

Günümüzde, HAART'ta 7 farklı ilaç sınıfı bulunmaktadır:

- Nükleozid Ters Transkriptaz İnhibitörleri (NRTİ)
- Nükleotid Ters Transkriptaz İnhibitörleri (NtRTİ)
- Non-Nükleozid Ters Transkriptaz Enzim İnhibitörleri (NNRTİ)
- Proteaz İnhibitörleri (Pİ)
- Füzyon İnhibitörleri (Fİ)
- Ko-reseptör İnhibitörleri (CRİ)
- İntegraz İnhibitörleri (İNİ)

7 farklı ilaç sınıfında kullanılan ilaç etken maddeleri Çizelge 1.1'de listelenmiştir.

Çizelge 1.1. 7 farklı ilaç sınıfında kullanılan ilaç etken maddeleri

NRTİ	NtRTİ	NNRTİ	Pİ	Fİ	CRİ	İNİ
Abakavir	Tenofovir	Delavirdin	Amprenavir	Enfuvirtidin	Maravirok	Raltegravir
Didanozin		Efavirenz	Atazanavir			Dolutegravir
Embtrisitabin		Etravirin	Darunavir			
Lamivudin		Nevirapin	Fosamprenavir			
Stavudin		Rilpivirin	İndinavir			
Zidovudin			Lopinavir			
Zalsitabin			Nelfinavir			
			Ritonavir			
			Sakuinavir			
			Tipranavir			

1.2.2. Antiretroviral Tedavide Kullanılan Rejimler

HAART’de uygun tedavi yöntemleri seçilirken aşağıdaki faktörler dikkate alınmaktadır:

- İlaç formülasyonun yoğunluğu, özellikle sabit doz kombinasyonlarının etkinliği,
- Ürün ve önerilen doz için, ulusal ilaç düzenleyici otoriteler tarafından ruhsat verilmesi,
- Toksisite profili,
- Laboratuvar izleme şartları,
- Fırsatçı enfeksiyonlar (Hepatit B, vb.),
- Doğum potansiyeli olan ya da hamile kadınların özel durumları,
- Tedavinin maliyeti ve etkinliği.

Antiretroviral tedavi için Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından önerilen birinci ve ikinci basamak olmak üzere iki tane tedavi rejimi bulunmaktadır (Küçüköğlu ve ark., 2009) .

1.2.2.1. Standart Birinci Basamak Rejimi

WHO tarafından yetişkin ve genç hastalar için standart birinci basamak rejiminin 2 NRTİ + 1 NNRTİ ya da 1 NtRTİ + 1 NRTİ + 1 NNRTİ’den oluştuğu halen önerilmektedir. Bu öneri, klinik testler ve fizibilite raporları ile de onaylanmıştır. Birinci basamak rejimde kullanılan ilaç grupları, ikinci basamak rejimlerdeki ilaç gruplarına göre genellikle daha ucuz, etkili ve geniş formülasyonlara sahiptir (Calmy ve ark., 2006; Küçüköğlu ve ark., 2009).

1.2.2.2. Alternatif Birinci Basamak Rejimi

2003 yılında yapılan çalışmalarla, tedavi başlangıcında standart birinci basamak rejimin alternatifi olarak üçlü NRTİ rejimlerinin kullanılabileceği anlaşılmıştır. Bu rejimler, ikinci basamak rejimdeki Pİ’leri korumak ve NNRTİ’lere bağlı ek

komplikasyonlara karşı önlem alınması gerektiğinde kullanılan birinci basamak rejiminin alternatifidir (Küçükoğlu ve ark., 2009).

1.2.2.3.İkinci Basamak Rejim

İkinci basamak rejiminde temel prensip, NRTİ'ler ile destekli Pİ'lerin kombine edilerek kullanılmasıdır.

İkinci basamak rejimin alternatif tedavisi, sadece alternatif birinci basamak rejimi (üçlü NRTİ kombinasyonu) kullanıldığı zaman ikinci basamak rejimin düzenlenmesi için kullanılır (Küçükoğlu ve ark., 2009).

1.3. Tez Kapsamında Kullanılan İlaç Etken Maddelerine Ait Bilgiler

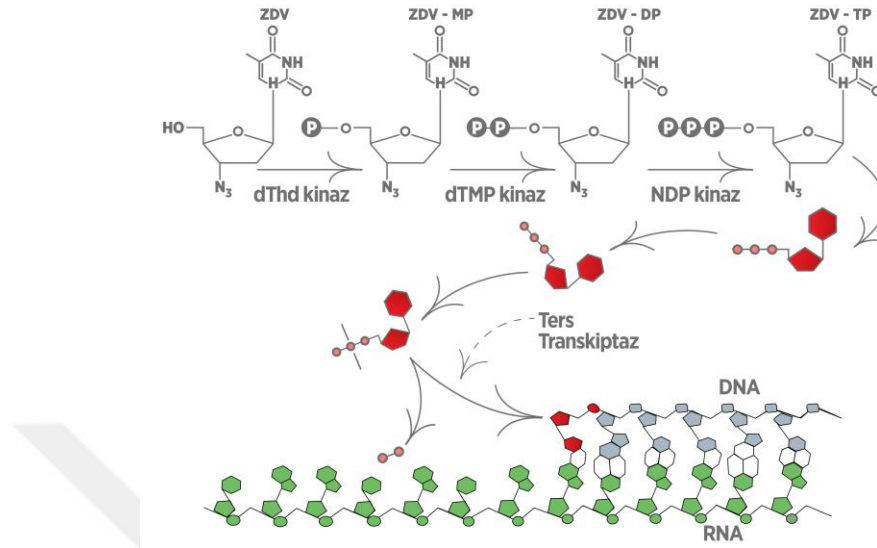
Tez kapsamında NRTİ'lerden Abakavir (ABC), Lamivudin (LMV) ve Zidovudin (ZDV) ile çalışılmıştır.

1.3.1.Nükleozid Ters Transkriptaz İnhibitörleri (NRTİ)

NRTİ'ler, HIV'de bulunan ters transkriptaz enziminin katalitik bölgesi ile etkileşim göstermektedir (De Clercq, 2007; Küçükoğlu ve ark., 2009). Bu gruptaki ilaçlarda, 2',3'-dideoksinükleozid (ddN) analogu bulunmaktadır ve bu ilaçların etki mekanizmaları da birbirlerine benzerdir. NRTİ'ler hücre içine girdikten sonra, sırasıyla 5'-monofosfata (ddNMP), 5'-difosfata (ddNDP) ve 5'-trifosfatlarına (ddNTP) dönüşmektedirler. Bu işlem, ddNMP'nin, normal deoksinükleozit trifosfatın (dNTP) rekabetçi inhibitörü/alternatif substratı olarak işlev görmesinden önce olur (De Clercq, 2009; Küçükoğlu ve ark., 2009).

Normal substratın rekabetçi bir inhibitörü olarak ddNTP, normal substratın DNA zinciri ile birleşmesini inhibe eder ve ddNMP halinde alternatif bir substrat olarak bu zincire katılır. Böylece zinciri sonlandırıcı olarak işlev görür. Bu etki

mekanizması Şekil 1.3.'de ZDV için örneklendirilmiştir (Mitsuya ve ark., 1985; Furman ve ark., 1986; Küçüköğlu ve ark., 2009).

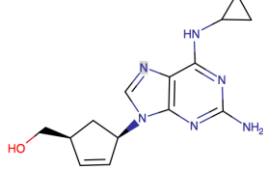


Şekil 1.3. Zidovudin'nin etki mekanizması (Mitsuya ve ark., 1985; Furman ve ark., 1986; Küçüköğlu ve ark., 2009)

1.3.1.1. Abakavir

Abakavir viral yükü, 1 ay içinde yaklaşık olarak 1.4 log düşüren bir guanozin analogudur. Abakavir hücre içinde forforillenerek, yüksek bir yarılanma ömrü olan “karbovir trifosfat” a dönüşür. Abakavir çok güçlü bir nükleozid olup en çok korkulan yan etkisi hipersensitivite sendromudur. Bu sendrom ateş, çok az belirgin deri döküntüsü, boğaz ağrısı, bulantı, kusma, baş ağrısı, kas ve eklem ağrıları ile kendisini belli eder (Alpsar, 2011; Hoffman ve ark., 2007; Afacan ve ark., 2007).

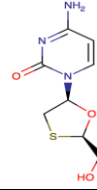
Çizelge 1.2. Abakavir'in özellikleri

Yapısı		
Kapalı Formülü	$C_{14}H_{18}N_6O$	
Sistemik Adı	4-[2-amino-6-(siklopropil amino)-9-H-pürin-9-yl]-2-siklopenten-1-metanol sülfat	
Molekül Ağırlığı	286.3323 g mol ⁻¹	
Erime Noktası	165 °C	
Sudaki Çözünürlüğü	1.21 mg mL ⁻¹	

1.3.1.2.Lamivudin

1996 yılında, beşinci NRTİ olarak Avrupa'da ruhsat almıştır. Lamivudin iyi derecede tolere edilen bir sitidin analogudur. Önemli dezavantajlarından birisi ise hızlı direnç gelişimidir. Bir nokta mutasyonu olan M184V etkililik kaybına neden olabilmektedir. Monoterapide bu mutasyon sadece bir kaç hafta sonra muhtemelen direnç gelişimine neden olur. LMV'nin tam etkisi ancak diğer NRTİ'ler ile kombine halde kullanıldığında ortaya çıkar (Alpsar, 2011; Hoffman ve ark., 2007).

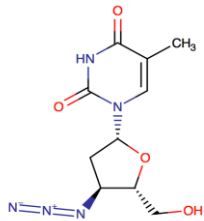
Çizelge 1.3. Lamivudin'in özellikleri

Yapısı	
Kapalı Formülü	$C_8H_{11}N_3O_3S$
Sistemik Adı	2', 3'-dideoksi-3'-tiyasitidin
Molekül Ağırlığı	229.226 g mol ⁻¹
Erime Noktası	160-162 °C
Sudaki Çözünürlüğü	2.76 mg mL ⁻¹

1.3.1.3. Zidovudin

1987 yılında satışa sunulan ilk antiretroviraldir. ZDV monoterapisi, keşfedildiği yıllarda beklenti fazla olsa da uzun süreli bir etki sağlayamamıştır. ZDV bugün de pek çok rejimin (Combivir®, Trizivir®) bir parçası olarak ve önleyici tedavilerde kullanılmaktadır. Anemi ve lökopeni yapma özelliği vardır. Ayrıca baş ağrısı ve miyopatiye neden olur, nadir görülen bir yan etkisi de tırnaklarda siyah renk pigmentleşmesidir (Alpsar, 2011; Hoffman ve ark., 2007).

Çizelge 1.4. Zidovudin'in özellikleri

Yapısı	
Kapalı Formülü	$C_{10}H_{13}N_5O_4$
Sistemik Adı	3',-azido-3', deoksitimidin
Molekül Ağırlığı	267.2413 g mol ⁻¹
Erime Noktası	113-115 °C
Sudaki Çözünürlüğü	16.3 mg mL ⁻¹

1.4. Tez Maddeleri ile Yapılmış Literatürdeki Çalışmalar

Çizelge 1.5. Tez maddeleri ile yapılmış literatürdeki çalışmalar

Etken Madde	Yöntem	Kolon	Hareketli Faz	Analiz Süresi (dk)	Dedektör	Sistem Uygunluk Testi Parametreleri			Yöntem Geçerlilik Testi Parametreleri					Kaynak
						R _s	α	N	Doğrusal Aralık (ng mL ⁻¹)	TS (ng mL ⁻¹)	TAS (ng mL ⁻¹)	KESİNLİK (BSS %)	Doğruluk (%)	
Abakavir	Sıvı kromatografi-kütle spektrometri (LC-MS/MS)	Synergy polar ters faz C18 (150 mm x 20 mm x 4 µm)	%0,1 formik asit içeren su: 0,1 formik asit içeren metanol	6,9 dk	MS	-	-	-	4-500	-	-	-8,47	104	Kromdijk ve ark, 2013
Lamivudin				3,9 dk		-	-	-	20-2500	-	-	5,36	111	
Zidovudin				7,1 dk		-	-	-	20-2500	-	-	-0,05	98	
Abakavir	Ters faz sıvı kromatografisi	Inertsil ODS-3V (250 x 4,6 mm, 5,0 µm)	Amonyum dihidrojen fosfat ve diamonyum hidrojen fosfat tamponu: Metanol	58,8 dk	FDD	-	-	-	-	-	-	-	-	Reddiah ve ark, 2012
Lamivudin				19,8 dk		-	-	-	-	-	-	-	-	
Zidovudin				45,4 dk		-	-	-	-	-	-	-	-	
Lamivudin	Ters faz sıvı kromatografisi	Nucleodur C18 (250 x 4,6 mm, 5µm)	Amonyum asetat: Metanol (60:40; h/h)	4,01	-	-	-	4151	24-36	-	-	0,40	100,31	Santhosam ve ark, 2013
Zidovudin				7,5		-	-	6259	48-72	-	-	0,38	100,79	
Lamivudin	Sıvı kromatografi-kütle spektrometri (LC/MS/MS)	C18 (150 x 3,9 mm, 5µm)	Amonyum asetat: Metanol (70:30; h/h)	2,9	MS	-	-	-	50-25000	-	-	Plazma Örneği: 6,44	-	Bartlett ve ark, 2005
Zidovudin				6,1		-	-	-	50-25000	-	-	Plazma Örneği: 7,33	-	
Abakavir	Ters faz sıvı kromatografisi	Hichrom RP-select B column (250 x 4,6 mm; 5µm)	Amonyum asetat:Metanol	12,17	-	-	-	10351	25000-200000	1210	3666	0,44	99,78	Palavan ve ark, 2013
Lamivudin				1,88		-	-	2491	12500-100000	861	2610	0,23	100,16	
Zidovudin				4,37		-	-	6910	25000-200000	1057	3202	0,24	99,58	

Çizelge 1.5. (devam) Tez maddeleri ile yapılmış literatürdeki çalışmalar

Lamivudin	Ters faz sıvı kromatografisi	ODS C ₁₈ (150 x 4,6 mm, 3.5µm)	Amonyum asetat: Asetonitril: Metanol (50:30:20; h/h/h)	2,4	UV	-	-	-	-	1300	3950	-	99,47	Prashanthi ve ark, 2016
Zidovudin				3,3		-	-	-	-	3970	12030	-	99,13	
Abakavir Sülfat	Ters faz sıvı kromatografisi	Luna C ₁₈ (150 x 4,6 mm, 5µm)	Metanol:Su (70:30; h/h)	3,49	UV	-	-	-	2000-12000	4,9	15	0,62	99,83-100,83	Sudha ve ark, 2010
Lamivudin				2,54		-	-	-	2000-12000	26,8	18,4	0,71	99,18-101	
Abakavir	Ters faz sıvı kromatografisi	Hypersil C ₁₈ (250 x 4,6 mm, 5µm)	%0,1 potasyum dihidrojen fosfat içeren Su:Metanol (70:30; h/h)	6,36	UV	-	-	-	500-400000	13	44	1,23	100,6	Rao ve Raja, 2011
Lamivudin				3,85		-	-	-	500-400000	70	230	2,00	99,5	
Zidovudin				8,06		-	-	-	500-400000	30	102	0,98	99,66	
Abakavir	Ters faz sıvı kromatografisi	HiQ Sil C ₁₈ V (250 x 4,6 mm, 5µm)	Potasyum dihidrojen orto-fosfat:Metanol (45:55; h/h)	4,39	UV	6	-	5337	5000-140000	-	-	0,59	99,44	Rao ve ark, 2010
Lamivudin				3,85		4	-	2978	5000-250000	-	-	0,43	99,56	
Zidovudin				1,26		5	-	8652	5000-250000	-	-	0,47	100,41	
Lamivudin	Ters faz sıvı kromatografisi	AltimaC ₁₈ (150*4,6mm, 5µm)	Amonyum asetat:Metanol (80:20; h/h)	3,46	UV	-	-	3189	37500-112500	-	-	0,23	98,50	Kumar ve ark, 2010
Zidovudin				13,31		-	-	7852	75000-225000	-	-	0,37	98,90	
Abakavir	Sıvı kromatografisi	Zorbax C ₁₈ (150*4,6mm, 5µm)	Metanol:Su:Fosfat Tamponu (80:10:10; h/h/h)	2,90	FDD	-	-	-	500-3000	11,01	33,36	-	<u>Serum numunesi analizi için</u> 99,89	Özkan ve ark, 2007
Lamivudin				2,52		-	-	-	500-5000	95,65	90,47	-	98,41	
Zidovudin				6,52		-	-	-	500-5000	41,18	124,79	-	100,70	

Çizelge 1.5. (devam) Tez maddeleri ile yapılmış literatürdeki çalışmalar

Lamivudin	YBSK	Spherisorb (150 x 4,6mm, 5µm)	Metanol:Su:Asetonitril (70,20,10, h/h/h)	2,06	UV-VIS	-	-	-	25-50000	0,98	3,3	<u>Tekrarlanabilirlik için</u> 0,70	<u>Tablet numunesi için</u> 99,54	Özkan ve Uslu, 2002
Zidovudin				3,36		-	-	-	150-50000	4,9	16	0,93	99,63	
Lamivudin	Elektrokinetik kromatografi	Polymicro, Phoenix, Silika kapiler (72 cm x 75µm)	90 mM SDS ve% 5 (h / h) asetonitril içeren 12,5 mM sodyum tetraborat dekahidrat ve 15 mM borik asit	12,9	UV-VIS	-	-	-	10000-80000	2500	7600	-	≥ %99,72	Sekar ve Azhaguvel, 2005
Zidovudin				14,9		-	-	-	10000-100000	2000	5800	-	≥ %99,72	
Lamivudin	Elektrokinetik kromatografi	Dış çapı 363 ± 10 µm ve iç çapı 75 ± 3 µm olan 64.6 cm uzunluğunda poliimid kaplı silika	50 mM SDS,% 30 metanol ve % 5 içeren pH 9,8'de 5 mM sodyum tetraborat	10,8	-	-	-	-	-	0,011	0,077	-	109,1	Gras ve ark, 2012
Zidovudin				12,7		-	-	-	-	0,009	0,029	-	107,7	
Abakavir	HILIC	Kinetex HILIC (150 mm x 4,6 mm x 2,6 µm)	Asetonitril:100 mM Amonyum asetat (80:20, h/h)	2,0	FDD	3,26	2,46	7959	500-100000	40	120	<u>Tekrarlanabilirlik için</u> 0,92	102,4	Tez Çalışması
Lamivudin				2,10		2,61	1,48	9921	500-100000	30	90	0,77	98,0	
Zidovudin				1,65		-	-	6548	500-100000	20	80	1,15	96,0	

1.5. Tezin Amacı

Hızla gelişen dünyada her geçen gün bilim alanında yeni gelişmeler olmasına rağmen 2016 yılının ilk aylarında ortaya çıkan Zika virüsü gibi birçok etken insan sağlığını tehdit etmektedir. İnsan vücuduna yerleşen çeşitli virüsler yaşam şartlarını olumsuz etkileyecek birçok hastalığa sebep olmaktadır. Hastalıkların tedavilerinin başında ilaç kullanımı gelmektedir. Bu tez kapsamında AIDS tedavisinde kullanılan antiretroviral ilaçların kısa sürede analizlerini sağlayan, kolonların kullanıldığı tamamen valide edilmiş ekonomik ve çevreci sıvı kromatografisi yöntemi geliştirilmesi amaçlanmaktadır.



2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Tez Kapsamında Kullanılan Etken Maddeler

Tez çalışmalarında kullanılan tüm kimyasallar, safsızlıklardan gelebilecek hataları engellemek için analitik ve kromatografik saflıklarda kullanılmıştır.

Çizelge 2.1. Kullanılan etken maddeler

Etken Madde	Firma
Abakavir	NOBEL İLAÇ SAN. VE TİC. A.Ş
Lamivudin	GLAXOSMITHKLINE İLAÇLARI SAN. VE TİC. A.Ş.
Zidovudin	NOBEL İLAÇ SAN. VE TİC. A.Ş

Çizelge 2.2. Kullanılan piyasa preparatı

Etken Madde	Firma	Piyasa Preparatı	Dozaj Formu	İçeriği
Abakavir + Lamivudin + Zidovudin	GLAXOSMITHKLINE İLAÇLARI SAN. VE TİC. A.Ş.	Trizivir®	Tablet	300 mg Abakavir + 300 mg Zidovudin + 150 mg Lamivudin

2.1.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

- YBSK sistemi: Agilent 1100 (Santa-Clara, CA, ABD)
- G1315B foto diyot dizi detektörü (FDD)
- Manyetik karıştırıcı: Ikamag RH (Jange and Kungel IKA-Labor Technic)
- Elektronik hassas terazi: Shimadzu Libror AEG –220
- Vorteks
- pH metre: Model 526 (WTW, Avusturya) ve kombine elektrot sistemi (cam elektrot-referans elektrot)
- Ultrasonik su banyosu (Nüve, Türkiye)
- Mikro hacimli otomatik pipetler (Axygen®, Interlab, Türkiye)
- Farklı hacimlere sahip deney tüpleri, balon jojeler ve sarf malzemeler

2.1.3. Kullanılan Sabit Fazlar

Tez çalışmalarında kullanılan sabit fazlar ve özellikleri Çizelge 2.3’de özetlenmiştir.

Çizelge 2.3. Çalışmalarda kullanılan kolonların özellikleri

Kolon Adı	Uzunluğu (mm)	İç Çapı (mm)	Partikül Çapı (µm)	Kimyasal Yapısı	Firma
Kinetex HILIC 100A	150	4.6	2.6	Saf silika	Phenomenex (Torrance, CA)
Kinetex HILIC 100A	150	4.6	5	Saf silika	Phenomenex (Torrance, CA)
XBridge BEH HILIC	150	4.6	2.5	Etilen köprülü hibrit	Waters (LiKrom, Türkiye)
ZIC-HILIC	250	4.6	5	Zwitteriyonik fonksiyonel grup içeren silika	Merck Darmstadt, Almanya)

2.1.4. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Hareketli fazların hazırlanmasında kullanılan organik çözücüler kromatografik saflıkta ve diğer kimyasal analitik saflıktadır.

Çizelge 2.4. Çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler

Kimyasal Madde	Firma
Asetonitril	SIGMA-ALDRICH (Interlab, İstanbul, Türkiye)
Amonyum Asetat	SIGMA-ALDRICH (Interlab, İstanbul, Türkiye)
Amonyum Format	SIGMA-ALDRICH (Interlab, İstanbul, Türkiye)
Hidroklorik Asit	MERCK MILLIPORE Darmstadt, Almanya)
Sodyum Hidroksit	MERCK MILLIPORE (Darmstadt, Almanya)
Hidrojen Peroksit	MERCK MILLIPORE Darmstadt, Almanya)

2.1.5. Standart Madde Çözeltilerinin Hazırlanışı

Tez kapsamında kullanılan ABC, LMV ve ZDV eş zamanlı olarak aynı konsantrasyonlarda hazırlanmıştır: Hassas analitik terazi ile tartım sonucu üç maddenin de derişimi % 80 asetonitril ve %20 su karışımında ile çözülerek 0.1 mg mL⁻¹ olarak ayarlanmıştır. Her bir madde için balon jojelere aynı miktarda çözücü ekleyip, tam olarak çözünmeyi sağlamak için 10 dakika kadar ultrasonik banyoda bekletilmiştir. Hacimleri tamamlanan çözeltiler vorteksle iyice karıştırıldıktan sonra gerekli seyreltmeler yapılarak, 10 µL enjeksiyon hacmi ile sisteme verilmiştir.

2.1.6. Trizivir Tablet Çözeltisinin Hazırlanışı

300 mg Abakavir, 300 mg Zidovudin ve 150 mg Lamivudin içeren tablet çözeltisinin hazırlanması için, 3 adet Trizivir® tablet hassas olarak tartılarak (4.07562 g) havanda toz haline getirilmiştir. Homojen olan toz karışımdan 300 mg Abakavir'e eş değer miktarda tartım alınarak (45,29 mg) 100 mL'ye asetonitril:su (80:20;h/h) ile balon joje içerisinde tamamlanmış ve tam olarak çözünmeyi sağlamak için ultrasonik banyoda 5-10 dakika kadar bekletilmiştir. Son aşamada çözelti selüloz şırınga filtreden (0,45 µm) geçirilerek viallere aktarılmış ve analiz edilmiştir.

2.1.7. Geri Kazanım Çalışmaları için Çözeltilerin Hazırlanışı

Farmasötik dozaj formu içindeki yardımcı katkı maddelerinin etken maddelerin analizinde girişim etkisinin olup olmadığını belirlemek için 3 etken maddenin bulunduğu farmasötik dozaj formu üzerinde geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla dozaj formuna ait stok çözeltinin bilinen sabit miktarının üzerine % 25, % 50, % 100 ve % 200 oranlarında saf etken madde ilavesi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlardan dozaj formuna eklenen saf madde miktarlarının ne kadarının tayin edilebildiği yani ne kadarının geri kazanılabildiği hesaplanmıştır.

2.1.8. Hareketli Faz Çözeltilerinin Hazırlanışı

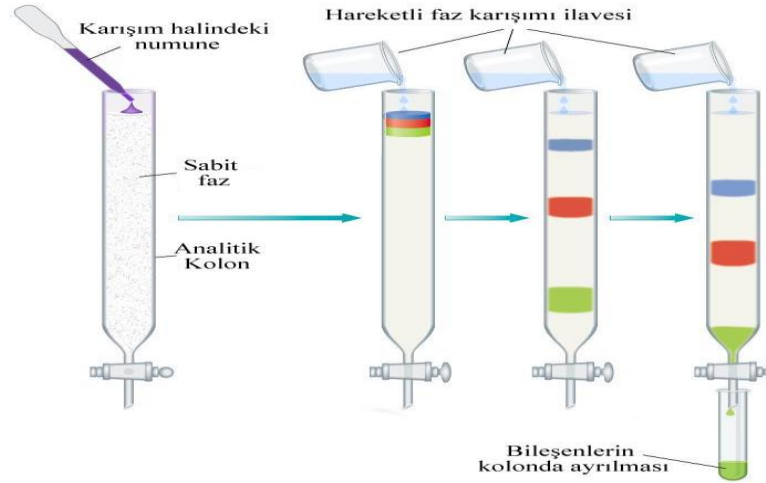
Analizler için öncelikle tampon çözelti olarak artan derişimlerde (5 mM-100 mM) amonyum asetat çözeltileri hazırlanmıştır. Kromatografik saflıkta asetonitril ve tampon çözelti, farklı oranlarda (80:20; h/h, 90:10; h/h) gradiyent olarak sisteme verilmiştir.

2.2. Yöntem

2.2.1. Kromatografi

Kromatografi terimi bir karışımda bulunan maddelerin, biri sabit diğeri hareketli faz olmak üzere birbiri ile karışmayan iki fazlı bir sistemde ayrılması, saflaştırılması, teşhisi ve tayini işlemlerinin genel adıdır.

Kromatografi yöntemi ilk kez Rus botanikçi Mikhail Tswett tarafından geliştirilmiştir. Tsweet bu yöntemi bitki pigmentlerinin renkli bileşenlerini ayırmakta kullanmıştır. Kullandığı kolonda renkli bantlar oluştuğunu gözlemiştir. Renkli bantların oluşmasından dolayı renk anlamına gelen ‘chroma’ ve yazma anlamına gelen ‘graphein’ kelimeleri ile yöntem kromatografi adını almıştır (Skoog ve ark., 1998; Hamilton ve Sewel, 1982; Bidlingmeyer, 1992 ve Gümüştas, 2009).



Şekil 2.1. Kromatografik ayrımların temeli

Kromatografik ayrımlarda analizi yapılacak madde veya maddeler, gaz, sıvı veya süper kritik bir akışkan olan hareketli faz ile sistemde taşınmaktadır. Hareketli faz, katı bir yüzey veya kolonda sabitleştirilmiş ve hareketli faz ile karışmayan bir sabit faz içerisinden geçirilmektedir. Bu fazların seçimlerinde, bileşenlerin hareketli ve sabit fazlarda farklı oranlarda dağılması veya çözünmesi temel alınır. Numune

içerisindeki bileşenler ile sabit faz arasında bazı fiziksel ve kimyasal etkileşimler olmaktadır. Bu etkileşimlere örnek olarak çözünürlük, elektron çifti alıcı-verici etkileşimler, iyonik etkileşimler ve hidrojen bağı oluşumu gibi etkileşimler verilebilmektedir (Skoog ve ark., 1998; Hamilton ve Sewel, 1982; Bidlingmeyer, 1992 ve Gümüştaş, 2009).

2.2.2. Kromatografik Yöntemlerin Sınıflandırılması

Bugün onlarca temel kromatografik yöntemlerinden başka hemen her gün yeni katılımlarla kromatografik yöntem sayısı artmaktadır. Bu nedenle tek bir sınıflandırma ile kromatografik yöntemleri sıralamak gerçekçi olmayacaktır. Çeşitli kromatografi kitaplarında kromatografik yöntemler farklı şekillerde sınıflandırılmaktadır. Sınıflandırmalarda değişik kriterler temel alınmaktadır (Demirci ve ark., 2009).

Sınıflandırmalarda alınan kriterler:

- Kromatografik ortamın fiziksel şekli
- Örneğin kromatografik ortama veriliş biçimi
- Kromatografik ayırma mekanizması
- İki fazın polarlık durumları
- İki fazın fiziksel durumu

Çizelge 2.5. Kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması

Ortamin Fiziksel Durumuna Göre	Kolon Kromatografisi
	Düzlem Kromatografi
Örneğin Kromatografik Ortama Veriliş Şekline Göre	Öncül (Frontal)
	Yer Değiştirme (Displacement)
	Sürüklenme ile Yürütme (Elusyon)
Ayrım Mekanizmasına Göre	Dağılma (Partisyon) Kromatografi
	Dışa Soğurma (Adsorpsiyon) Kromatografi
	İyon Değiştirme Kromatografi
	İyon-Çifti Kromatografi
	Molekül Seçme (Jel Filtrasyon) Kromatografi
	İlgi (Affinite) Kromatografi
İki Fazın Polarlık Durumuna Göre	Normal Faz Kromatografi
	Ters Faz Kromatografi
	Hidrofilik Etkileşim Kromatografi
Fazların Fiziksel Şekline Göre	Gaz Kromatografi
	*Gaz-Sıvı Kromatografi
	*Gaz-Katı Kromatografi
	Sıvı Kromatografi
	*Sıvı-Sıvı Kromatografi
	*Sıvı-Katı Kromatografi
	*İyon Değiştirme Kromatografi
	*Molekül Seçme Kromatografi
	Süperkritik Akışkan Kromatografi

2.2.2.1. Adsorpsiyon Kromatografisi

Bu kromatografi çeşidi bir sıvı/gaz-katı kromatografisidir. Bu yöntem örnek bileşenlerinin sabit faz yüzeyine tutunma özelliğine dayanır. Adsorpsiyon esnasında çözücü içerisindeki maddeler adsorbe ya da desorbe olabilmektedir. Adsorpsiyon ve desorpsiyon hızlarının farkı toplam adsorpsiyon hızı olarak tanımlanmaktadır ve adsorpsiyon ve desorpsiyon hızları birbirine eşit olduğunda sistem denge halindedir. Sistem dengede iken madde kolon boyunca sabit hızla ilerlemektedir. Bir A çözüneninin sabit faz ile hareketli faz arasındaki kütle aktarımı aşağıdaki eşitlikle ifade edilebilir.

$$A_{Hareketli\ Faz} = A_{Sabit\ Faz} \quad (\text{Eşitlik 2.1.})$$

Çözünenin adsorpsiyon katsayısı veya dağılma katsayısı (K); maddenin sabit fazdaki molar derişiminin (C_1), maddenin hareketli fazdaki derişimine (C_2) oranı ile tanımlanmaktadır.

$$K = \frac{C_1}{C_2} \quad (\text{Eşitlik 2.2.})$$

K değeri çok büyük ise, karışım içindeki madde sabit faz tarafından daha iyi tutunmaktadır ve K değeri daha düşük maddelere göre kolon boyunca daha yavaş ilerlemektedir. K değeri küçük ise madde hareketli faza daha ilgilidir bu yüzden madde kolon boyunca daha hızlı ilerlemektedir (Skoog ve ark., 2013; Hamilton ve Sewel, 1982; Bidlingmeyer, 1992; Gümüştas, 2009).

2.2.2.2. Dağılma Kromatografisi

Dağılma kromatografisi sıvı-sıvı kromatografisi olarak da bilinmektedir. Dağılma kromatografisinin temeli ise maddelerin birbiri ile karışmayan iki sıvı faz arasında dağılması ilkesine dayanır. Sıvı fazlardan biri katı bir yüzey üzerindeki kolon dolgu maddesinin üzerine tutturulmuş ince bir sıvı film tabakası olan sabit faz iken, diğer sıvı faz hareketli fazdır. Karışım da bulunan maddelerin sabit faz içerisinde kısmen çözünmesi gerçekleşmektedir. Dağılma kromatografisinde, karışım da bulunan maddelerin sabit faz içerisindeki çözünürlükleri fazla iken hareketli faz içerisindeki çözünürlükleri ise az olmalıdır. Aksi takdirde maddelerin ayrımı tam olarak gerçekleşmez ve hareketli faza olan ilgilerinden dolayı kolondan dışarı atılırlar. Ayrıca hem sabit faz hemde hareketli faz farklı polariteye sahip oldukları için örnek moleküllerinin çözünürlükleri de farklı olabilmektedirler (Hamilton ve Sewel, 1982; Bidlingmeyer, 1992; Gümüştas, 2009; Fanali ve ark., 2013).

2.2.2.3. Ters Faz Sıvı Kromatografisi

Ters faz sıvı kromatografisi hareketli fazın polaritesinin sabit fazın polaritesine göre daha fazla polar olduğu kromatografi türüdür. Ters faz sıvı kromatografisinde kimyasal olarak bağlanmış fonksiyonel grupları taşıyan sabit fazlar (ODS-18 karbon atomu zincirinden oluşan oktadesilsilan) sıkça kullanılmaktadır. Bu kolonların yanı sıra fonksiyonel grup olarak daha kısa zincirli olan (C_8 , C_2 gibi), fenil ve siyano (CN) bağlı sabit fazlar da kullanılmaktadır.

Ters faz sıvı kromatografisinde hareketli fazın bileşeni olan tampon çözeltiler de son derece önemlidir. Tampon çözeltiler hazırlanırken kullanılan su oldukça saf olmalıdır. Hareketli fazın bir diğer önemli bileşeni ise, suyla karışabilen organik çözücülerdir. Hareketli fazlarda kullanılan organik çözücülerden bazıları su, metanol veya asetonitril gibi çözücülerdir.

Ters faz sıvı kromatografisi çoğunlukla apolar maddelerin ayrımı için tercih edilmektedir. Uzun alkil zincirine sahip olan sabit fazlar (C_{18}) daha apolar maddelerin ayrılmasında kullanılırken, kısa alkil zincirli olan sabit fazlar (C_8 , C_2) ise polar maddelerin ayrılmasında kullanılmaktadır. Buna göre polar olan maddeler uzun alkil zincirine sahip sabit fazlarda daha az tutunuyorken, apolar maddeler de kısa alkil zincirlerine sahip sabit fazlarda daha az tutunmaktadırlar (Hamilton ve Sewel, 1982; Sewel ve ark., 1987; Bidlingmeyer, 1992; Meyer, 1988; Fanali ve ark., 2013; Gümüştas, 2009).

2.2.2.4. Normal Faz Sıvı Kromatografisi

Normal faz sıvı kromatografisi sabit fazın hareketli faza göre daha polar olduğu kromatografi türüdür. Hareketli faz bileşeni olarak genellikle hekzan, metilen klorür, dietil eter ve kloroform gibi apolar çözücüler kullanılmaktadır. Bu kromatografi türünde en çok tercih edilen sabit fazlar ise; silika ve alüminadır. Ters ve normal faz sıvı kromatografilerinin farklılıkları Tablo-2-2’de özetlenmiştir

(Hamilton ve Sewel, 1982; Sewel ve ark., 1987; Bidlingmeyer, 1992; Meyer, 1988 ve Skoog ve ark., 1998).

Çizelge 2.6. Ters ve Normal faz sıvı kromatografilerin karşılaştırılması

	Normal Faz	Ters Faz
Sabit Fazın Polaritesi	Yüksek	Düşük
Hareketli Fazın polaritesi	Düşükten Ortaya	Ortadan Yüksekçe
Alıkonma Sırası	En az polar önce	En polar önce
Hareketli Faz Polarite Artışının Etkisi	Elüsyon zamanını azaltır	Elüsyon zamanını artırır

İlaçlar genellikle apolar yapıdadırlar. Bu yüzden ilaç analizlerinde ters faz sıvı kromatografisi yöntemi normal faz sıvı kromatografisi yöntemine göre daha çok tercih edilmektedir. Ayrıca kromatografik ayırma etkili olan solvofobik olaylar, hareketli faz bileşeni olarak kullanılan organik çözücülerin ucuz olması, analizlerde sulu tampon çözeltilerin oranlarının yüksek tutulabilmesi gibi sebeplerden dolayı da ters faz sıvı kromatografisi daha çok tercih edilmektedir (Gümüştas., 2009).

2.2.2.5. Hidrofilik Etkileşim Sıvı Kromatografisi (HILIC)

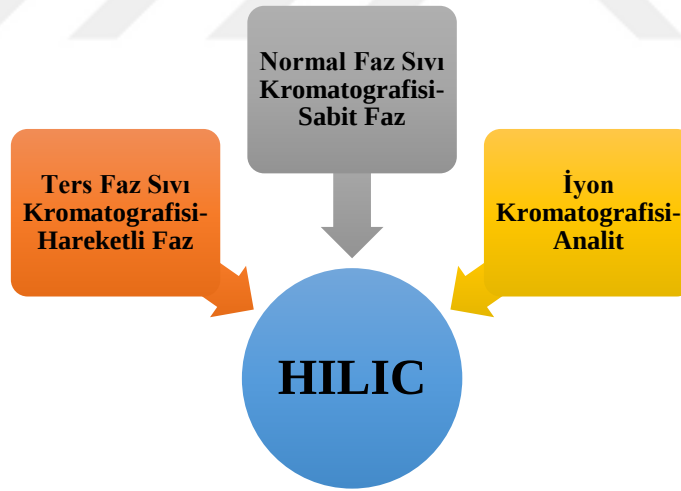
1970'lerden bu yana, bir ayırma tekniği olarak YBSK'nın kullanılması analitik bilimlerde önemli ilerlemeler sağlamıştır. Polar hareketli fazlarla apolar sabit fazları kullanarak yapılan ters faz ayırımı, bu kromatografik tekniğin uygulanmasını büyük ölçüde arttırmıştır. Günümüzde YBSK ayırımlarının yaklaşık % 70'i ters faz sıvı kromatografi yöntemi ile gerçekleştirilmektedir.

Ters faz sıvı kromatografi yönteminin bu kadar çok kullanılmasının nedenleri birçok madde ve bileşikte geniş uygulanabilirliği ve yeni sabit fazların sürekli geliştirilmesinden kaynaklanmaktadır. Fakat ters faz yöntemindeki hala bazı dezavantajları vardır. Yüksek polariteye sahip olan bileşikler ve bazik bileşiklerin analizi YBSK'nın başlangıcından beri sorun teşkil etmektedir. Birçok polar bileşiği, analiz etmek çok zordur, çünkü en inert kolonlar kullanılsa dahi, yüksek

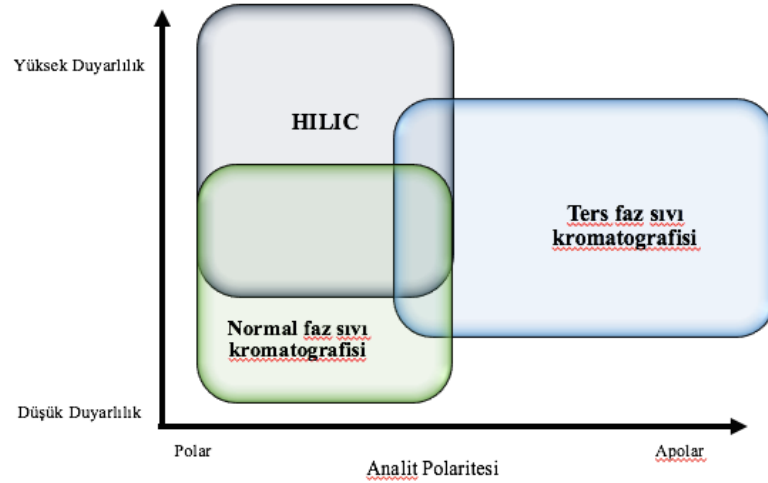
konsantrasyonlarda sulu tampon çözeltilere ihtiyaç duyarlar ve analizler düzgün olmayan pik şekilleri ile sonuçlanır.

Bir diğer ayırma yöntemi olan normal faz sıvı kromatografide, polar bileşikleri analiz ederken asimetrik pikler meydana gelmektedir ve analiz sonuçlarında istenilen verimler alınamaz.

Hidrofilik Etkileşim Sıvı Kromatografisi (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography-'HILIC') polar bileşiklerin analizi için son yıllarda daha da gelişen alternatif bir yöntemdir. HILIC, normal faz yönteminde kullanılan sabit fazlar ile ters faz yönteminde kullanılan hareketli fazların kombine edildiği bir yöntem olarak tanımlanabilir. Bu nedenle, HILIC'in tipik uygulamalarında, saf veya kimyasal olarak modifiye edilmiş silika veya polar polimerler gibi sabit fazlar kullanılırken ,% 30'a kadar su içeren asetonitril, metanol gibi polar organik çözücülerin kullanıldığı hareketli fazlar kullanılır (Gama ve ark., 2012).

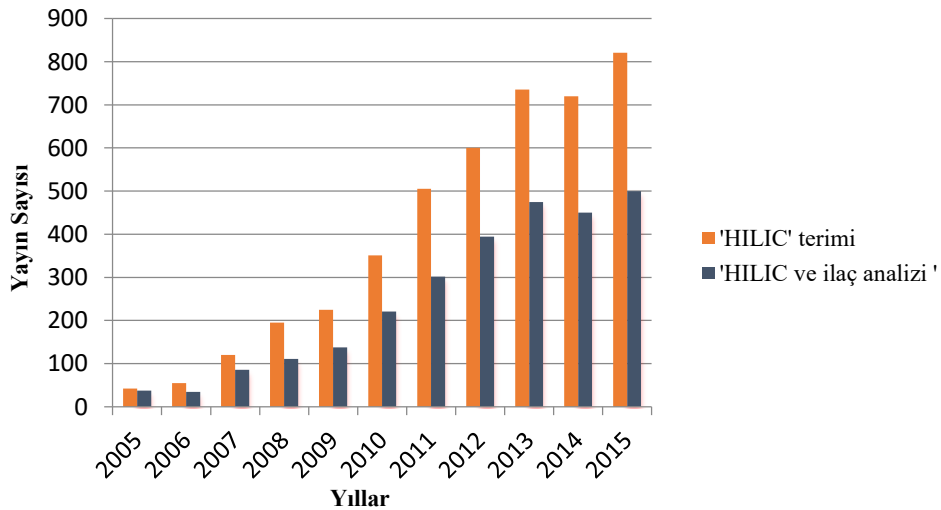


Şekil 2.2. Farklı yöntemler ile HILIC'in kombinasyonu (Buszewski ve ark., 2012)



Şekil 2.3. Normal faz ve ters faz yöntemlerinin tamamlayıcısı HILIC (Adams ve ark., 2014)

HILIC'in uygulamaları, ilaçların gelişimine katkıda bulunan maddelerin (örn., biyolojik belirteçler, nükleozidler, insan ve bitkisel metabolitler, farmasötik maddeler, proteinler vs.) ve diğer bir çok maddenin ayrılmasını içerir. HILIC uygulamalarında görülen artış, kimya, moleküler biyokimya, metabolomik ve diğer alanlarda bu konuyla ilgili yayınların artmasıyla anlaşılmıştır ve HILIC'in ayırma yöntemi olarak özellikle 2000'li yılların sonlarına doğru araştırmacılar tarafından giderek daha çok benimsendiği anlaşılmıştır.



Şekil 2.4. Scopus endeksli 'HILIC' ile 'HILIC ve ilaç analizleri' terimleri için toplam yayın sayısı

2.2.2.5.1. HILIC Yönteminin Tarihçesi

1990 yılında Alpert, polar analitlerin analizinde polar bir sabit faz ile nispeten apolar bir mobil fazın kullanıldığı ayırma yöntemi olarak HILIC terimini önerdi (Alpert., 1990). 1975 yılında Linden ve Lawhead, sabit faz olarak amin grupları ile kimyasal olarak modifiye edilmiş silika ve hareketli faz olarak ACN ve su karışımı kullanarak sakkaritlerin ayırmasını çok başarılı bir şekilde tarif etmişlerdir (Linden ve Lawhead., 1975). Aynı yıl Palmer, sakkaritlerin analizi için amin esaslı kolonlarda ACN ve suyun çözücü kullanıldığı benzer bir çalışmayı yürütmüştür (Gama ve ark., 2012). Bu nedenlerle, diğer yazarlar, Alpert'in 1990 yılındaki anlayışından önce HILIC'in bir ayırma yöntemi olarak uygulamalarını zaten göstermişlerdir.

İlk analizlerde polar analitler olarak karbonhidratların ayrımları amin modifiye veya saf silika kolonlarda çalışıldığında, Alpert'in amino asitler ile peptitlerin ayrılması üzerine çalışmasında, bir organik katyon değişim polimeri ve nötr bir polimerik kaplama ile kaplı bir silika kolonun kullanıldığını tarif etmiştir.

Bu çalışma, saf silika haricindeki sabit fazların HILIC yönteminde kullanılabileceğini, ancak HILIC için uygun sabit fazların hepsinin polar özelliklere sahip olması gerektiğini doğrulamıştır. Ayrıca Alpert, deneysel olarak, farklı kolon tipleri ve farklı analitlerin ayrımlarını ortak bir mekanizma ile açıklanabileceğini ortaya koyan ilk kişidir.

Alpert'dan sonra HILIC yöntemine dahil mekanizmalar hakkında çeşitli çalışmalar başlatılmıştır (Gama ve ark., 2012).

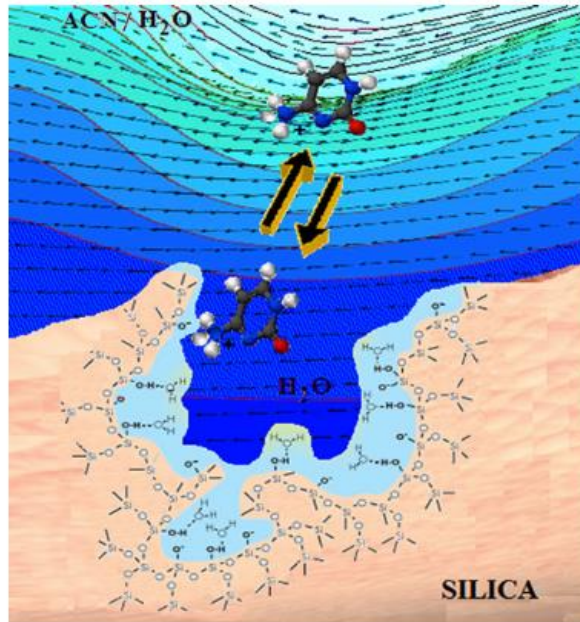
2.2.2.5.2. HILIC Yönteminin Mekanizması

HILIC yönteminin ayırma mekanizmasını inceleme çalışmaları ilk olarak karbonhidratların analizleriyle başlamıştır. Çünkü karbonhidratların HILIC için ideal analitler olduğu düşünülüyordu.

Bazı araştırmacılar, HILIC'in mekanizmasını, polar analitlerin ayrımında sabit faz yüzeyindeki polar gruplar ile analitlerin hidroksil gruplarının etkileşimine dayanarak açıkladılar. Normal faz kromatografide olduğu gibi önerdikleri ayrım mekanizması adsorpsiyona dayanıyordu. Ancak bu fikirler hidroksil gruplarına sahip analitlerle sınırlı kalmıştır. Zaman içerisinde daha iyi fikirler adsorpsiyon mekanizmasının değiştirilmesine yol açtı.

Bir çok araştırmacı saf ve amin modifiyeli kolonlar kullanarak karbonhidratların ayrımını inceledikten sonra, HILIC için en uygun mekanizmanın dağılma (partisyon) olduğu sonucuna vardı.

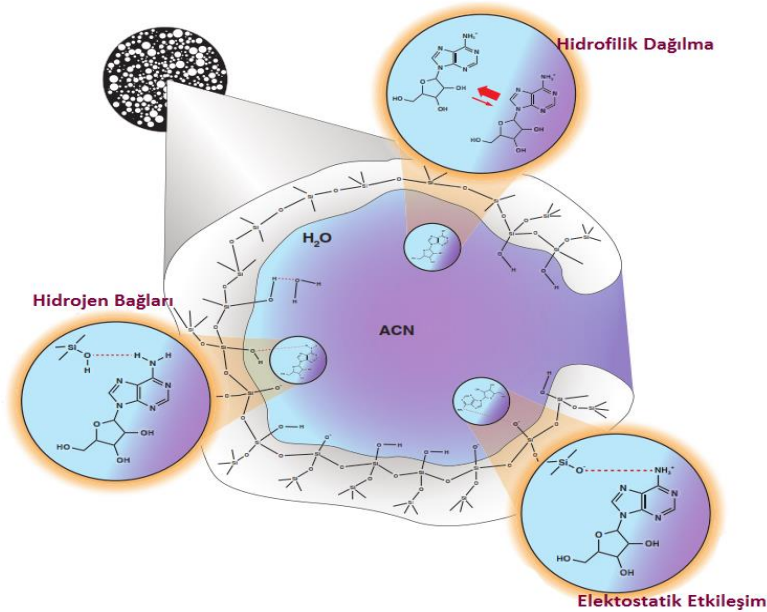
Daha sonraları Alpert günümüzde de kabul edilen karmaşık mekanik ayrım mekanizmasını önerdi. Bu mekanizma sabit fazın yüzeyinde oluşan su tabakasının farklı gruplarının polar gruplarla etkileşiminden bahsediyordu. Bu mekanizmada polar analit iki faz arasında dağılmaya (partisyon) uğramaktadır. Polar analitler oluşan yarı hareketsiz sulu faz daha çok ilgilidirler çünkü analitler oluşan sulu fazda daha iyi çözünmektedirler (Gama ve ark., 2012).



Şekil 2.5. HILIC yönteminde ayrım mekanizması (Buszewski ve Noga., 2012)

Orth ve Engelhardt hareketli fazda su oranının artmasının, sabit faz yüzeyinde tutulan su oranının artabileceğini göstermişlerdir ve sabit faz üzerindeki polar gruplara bağlı olarak doyma sınırına kadar su kalınlığının arttığını açıklamışlardır (Gama ve ark., 2012). Bu sonuçları tekrar analiz eden Hemström ve Irgum hareketli fazda artan su oranı ile çözünenin alıkonmasının azaldığı sonucuna varmıştır (Hemström ve Irgum,2006). Çünkü, ayırım dağılma mekanizmasına bağlıydı ve hareketli fazdaki su oranı artarken oluşan su tabakasıyla benzer özellikler göstermekteydi. Bu durum çözünenin hareketli faza olan ilgisinin artacağı ve sonuç olarak alıkonmasının azalacağını göstermektedir. Bu yüzden alıkonma çözünenin polaritesiyle doğru, hareketli fazın polaritesiyle ters orantılıdır.

HILIC yönteminin ayırım mekanizması hala tam olarak bilinmemektedir. Moleküller arası kuvvetler sayesinde (elektrostatik etkileşimler, hidrojen bağları, dipol-dipol etkileşimleri ve zayıf hidrofobik etkileşimler gibi) HILIC yönteminin ayırım mekanizmasının hem adsorpsiyona hem de dağılmaya bağlı olduğu gözlenmiştir. Bu mekanizma çok modlu mekanizma olarak tanımlanmıştır. Çünkü hem hidrofilik hem de hidrofobik etkileşimleri içeriyordu ve kimyasal yapılarında birden fazla fonksiyonel grup içeren analitler için uygundu.



Şekil 2.6. HILIC yönteminde moleküller arası etkileşimler (<https://www.thermofisher.com/tr>)

Dinh ve arkadaşları farklı kimyasal özelliklere sahip bir çok kolon denemişler ve HILIC mekanizmasında hem adsorpsiyon hem de dağılmanın önemini göstermişler (Dinh ve ark., 2011). Karatapanis ve arkadaşları suda çözünen bir vitaminin analizinde hem adsorpsiyon hem de dağılma mekanizmalarının gerçekleştiğini kanıtlamışlardır (Karatapanis ve ark., 2011).

Çok modlu ayırım mekanizması HILIC için kabul edilmesine rağmen halen çoğu araştırmacı dağılım mekanizmasının önemini vurgulamaktadır (Gama ve ark., 2012).

2.2.2.5.3. HILIC Yönteminde Kullanılan Sabit Fazlar

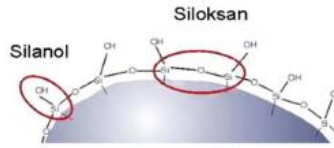
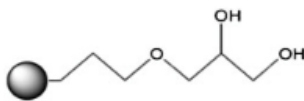
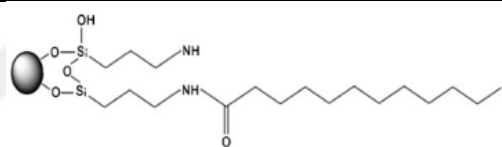
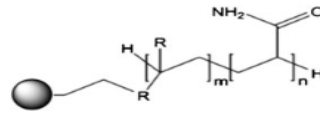
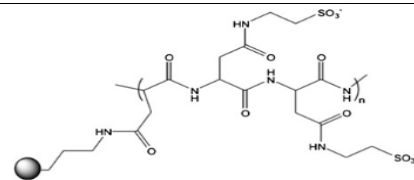
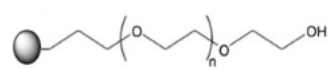
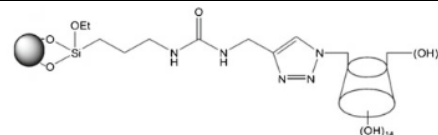
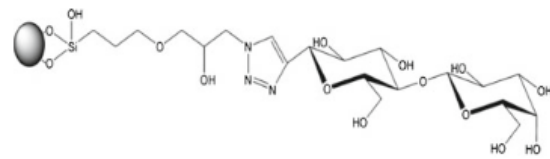
Araştırmacılara göre HILIC yöntemi ayırımlarında herhangi bir polar sabit kullanılabilir. Tipik bir HILIC sabit fazı saf silika veya birçok polar fonksiyonel grup ile modifiye edilmiş silika jellerden oluşur.

HILIC yönteminin ayırımlarının ilk nesli 1975 yılında başlamıştır. Bu yıllarda Linden ve Lawhead karbonhidratları, amin-silika esaslı sabit fazda, Bondapak (Waters, Milford, MA, ABD) asetonitril ve su karışımıyla (75:25 v/v) ayırtmıştır (Linden ve Lawhead., 1975).

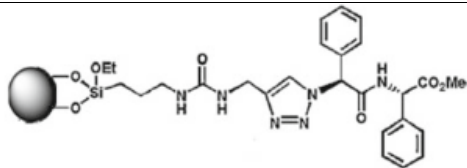
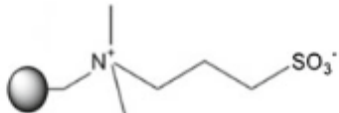
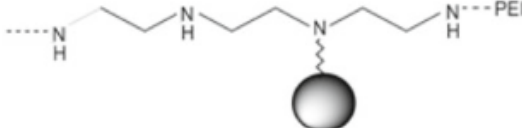
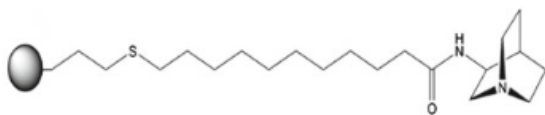
Daha sonraları HILIC yönteminde DIOL ve amit-silika kolonlar kullanılmaya başlandı. TSK jel Amit-80'in üreticisi olan Tosoh'a göre, amit-silika kolonları 1985 yılından beri mevcuttur. Bu kolonlar, silika jel'e kimyasal olarak bağlanmış iyonik olmayan karbamoil gruplarından oluşmaktadır ve yaygın olarak amit bağlı silika kolonlar olarak bilinmektedir (Buszewski ve Noga., 2012). Yoshida bu kolonları peptitlerin ayrılmasına uyguladıktan sonra, amit-silika kolonların HILIC yöntemi için kullanılabilir olduğu sonucuna varmıştır (Buszewski ve Noga., 2012).

Son 15 yılda HILIC yönteminde hidrojen bağları, dipol-dipol etkileşimleri ve Van der Waals etkileşimleri gibi farklı etkileşimleri bir arada içeren kolonların uygulamalarına geçildi. Dolayısıyla, HILIC yönteminde kullanılan sabit fazların yapısal varyasyonları, ters faz sıvı kromatografi kolonlarına göre genişlemeye başlamıştır.

Çizelge 2.7. HILIC yönteminde kullanılabilen sabit fazların farklı yapılarını göstermektedir.

Siloksanlar, az miktarda metal içeren (veya içermeyen) silanoller gibi işlevsel gruplar içeren katalizör olmayan silika sabit fazlar	
DIOL bağlı fazlar	
Siyano bağlı fazlar	
Amin bağlı fazlar	
Alkilamid	
Amit bağlı fazlar	
Poli (süksinimid) türevlerinin polimerik yapıları	
Polietilen glikol / silika (HS PEG)	
β-siklodekstrin	
Sakkaritler	

Çizelge 2.7. (devam) HILIC yönteminde kullanılabilen sabit fazların farklı yapılarını göstermektedir.

Dipeptit	
Zitteriyonik sülfobetain bağlı fazlar (ZIC-HILIC)	
Katyonik değiştiriciler bağlanmış fazlar	
Anyonik değiştiriciler bağlanmış fazlar	

Kimyasal olarak modifiye edilmiş kolonların aksine, saf silika kolonların HILIC yönteminde bazı avantajları vardır. Silika eriyiklerinin çökeltilmesiyle hazırlanan silika kolonlar asidiktir ve yüzeylerindeki silanol grupları sayesinde bazı kompleksler oluşur bu da analitlerin kolonda güçlü bir şekilde tutunmasını sağlar. Havadaki silika çözeltilerinin toplanmasıyla oluşan silika kolonlar çok düşük miktarda metal içerirler. Bu kolonlar orta ve daha yüksek pH değerlerinde (en azından pH 9'a kadar) daha kararlıdır ve özellikle bazik numuneler için daha iyi ayrımlar sağlarlar.

HILIC'de kullanılan DIOL, amin, amit ve diğer modifiye kolonlar genellikle ters faz ayrımlar için kullanılan C18 kolonları gibi silika yüzeyinin kimyasal olarak modifiye edilmesi ile hazırlanır.

Kimyasal olarak bağlanmış DIOL bağlı kolonlar, yüksek polarite ve hidrojen bağlama özellikleri gösterir ve reaksiyona girmemiş artık silanolden başka iyonlaşabilir gruplar içermez bu durumda bu kolonların HILIC yöntemi için uygun olduğunu gösterir. Bazı analitler genellikle silika üzerindeki silanol grupları ile

hidrojen bağlanması ve iyon değişim etkileşimleri sayesinde güçlü bir şekilde tutunurken, asidik bileşikler bazen geri dönüşümsüz adsorpsiyona neden olabilen amin silika kolonlarına artan afiniteler gösterirler.

Zwitteriyonik sülfalkilbetain kolonları da HILIC yönteminde kullanılmaktadır. Sülfalkilbetain bağlı kolonlar suyun hidrojen bağıyla güçlü bir şekilde adsorbe edilmesine ve sabit faz yüzeyinde oluşan su tabakasını kontrol ederek HILIC mekanizmasında büyük ölçüde rol oynar.

HILIC ayrımları üzerinde kolon sıcaklığının etkisi genellikle ters faz ayrımlara göre oldukça azdır. Yine de moleküllerin yapısına bağlı olarak bu durum değişebilmektedir.

Ters faz yönteminde analitin alıkonması sıcaklık arttıkça azalırken HILIC ayrımlarında alıkonma hemen hemen sıcaklıktan bağımsızdır (Buszewski ve ark., 2012).

2.2.2.5.4. HILIC Yönteminde Kullanılan Hareketli Fazlar

HILIC yönteminde polar sabit fazın yüzeyinde su açısından zengin bir tabaka oluşmaktadır. Araştırmacılar hareketli faz ve su açısından zengin fazın s_{10}/s_{11} ekstraksiyon sistemi oluşturduğuna sıklıkla inanmaktadır ve analitin bu iki tabaka arasında dağıldığını savunmaktadır.

HILIC yönteminde su içeriği çok önemlidir. Hareketli fazdaki su yüzdesi % 5 ve % 40 arasında değişebilir ancak sulu tabakanın oluşumu için minimum % 2 olması gerekmektedir.

HILIC yöntemi için tipik bir hareketli faz, az miktarda su ile asetonitril (ACN) gibi suyla karışabilen organik çözücülerden oluşur. Ayrıca aynı alıkonma

zamanlarına sahip olabilmek için yüksek derişimlerde alkoller de kullanılabilirlerdir.

Hareketli faz için uygun organik çözücüler seçilirken çözücülerin elüsyon kuvvetleri dikkate alınmaktadır. HILIC yönteminde sıklıkla kullanılan çözücüler ve elüsyon kuvvetleri aşağıdaki gibidir.

Aseton < İzopropanol < Propanol < Asetonitril < Etanol < Dioksan < DMF < Metanol < Su.

ACN'nin düşük viskozite ve düşük basınçlarda etkin bir ayırım gerçekleştirme gibi olumlu karakteristikleri özellikleri, onu HILIC'de en çok kullanılan çözücü haline getirmiştir. Diğer organik çözücülere göre ACN kullanmanın diğer bir avantajı, hidrojen bağlarının oluşumunu desteklemeyen kimyasal yapısıdır. Dolayısıyla, ACN'nin kullanılması, çözücü ve su molekülleri arasındaki rekabeti önleyebileceği için oldukça umut vericidir.

HILIC yönteminde ya yüksek oranda organik çözücü ile izokratik sistem ya da yüksek oranda organik çözücü ile başlayan ve yüksek oranda sulu çözücüyle biten gradiyent sistemler kullanılabilirlerdir.

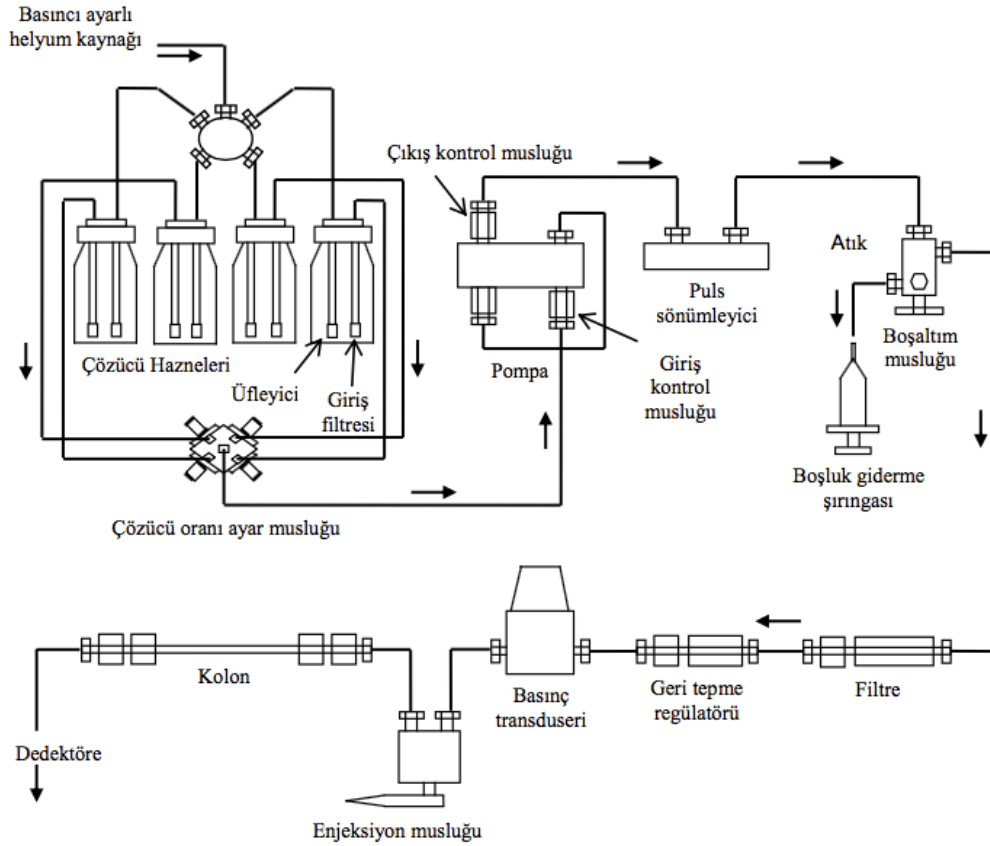
Hareketli fazda tamponların veya asitlerin varlığı, dağılma ve adsorpsiyon mekanizmalarına müdahale ederek HILIC'teki ayrılmalar üzerinde büyük bir etkiye neden olabilmektedir. Analitin iyonlaşması, kromatografik analizin pH'sının bir fonksiyonu olarak değişime uğrar. Dahası, sabit faza bağlı polar gruplar, bu grupların pKa değerine bağlı olarak iyonize olabilirler. Böylece, elektrostatik etkileşimler artabilir veya azalabilir ve bu durumda bazı analitlerin alıkonması etkilenir.

HILIC yöntemindeki hareketli fazların en önemli dezavantajı su içeriğidir. Yüksek su içeriği ile, hidrofobik etkileşimler göz ardı edilemez ve hidrofilik

etkileşimleri etkileyerek polar analitlerin alıkonmasını azaltır (Buszewski ve ark., 2012).

2.2.3. Yüksek Başarımlı Sıvı Kromatografisi (YBSK)

Modern sıvı kromatografisi sistemlerinde genel olarak kullanılan ve 2 ile 10 μm arasında tanecik boyutlarına sahip dolgu maddeleri bulunan kolonlar ile uygun sıvı akış hızları elde edebilmek için, yüzlerce atm'lık pompa basınçlarına gerek olmaktadır. Bu yüksek basınçların bir sonucu olarak gelişen YBSK için gerekli donanımlar, diğer kromatografi sistemleri ile karşılaştırıldığında, daha ince işçilik gerektirdiği daha pahalıdır. Şekil 2.7. tipik bir yüksek başarımlı sıvı kromatografisinin önemli parçalarını şematik olarak göstermektedir (Skoog ve ark., 1998).



Şekil 2.7. YBSK cihazının şematik gösterimi (Perkin- Elmer Corporation, Norwalk, CT).

2.2.3.1. Hareketli Faz Hazneleri ve Çözücü Muamele Sistemleri

Modern bir YBSK cihazında, her biri 200-1000 mL çözücü içerebilen camdan veya çelikten yapılmış hazneler bulunmaktadır. Genellikle bu haznelerde, kolonda ve dedektör sisteminde gaz oluşturarak kolon veya sistemlerde bozucu etkilere sebep olan çözünmüş gazların (genellikle oksijen ve azot) giderilmesi için bir cihaz bulunmaktadır. Oluşan bu gaz kabarcıkları bant genişlemesine yol açarak hatalı analiz sonuçlarına ayrıca, dedektörün performansının düşmesine de sebep olurlar. Gaz giderme düzeneği, vakum pompası sistemi, damıtma sistemi ve çözücüyü ısıtıp karıştıran bir parçadan oluşabileceği gibi, Şekil 2.7.'deki gibi düşük çözünürlükteki inert bir gazın küçük kabarcıkları yardımıyla, çözünmüş gazları sürükleyen basit bir üfleyici de olabilir. Bu sistemlerde, çözücü içerisinde bulunabilecek toz ve partikül halindeki maddelerin pompa ve enjeksiyon sistemlerine zarar vermemesi veya kolonu tıkamaması için, toz ve partikül maddeleri süzmeye yarayan bir süzme düzeneği de bulunurlar. Gaz gidericilerin ve süzme düzeneğinin, Şekil 2.7.'de görüldüğü gibi, YBSK sisteminin ana parçası olması gerekli değildir. Örneğin, çözücüyü hazneye doldurmadan önce uygulanacak uygun bir yöntem, çözücüyü vakum altında bir milipor süzgeçten süzmektir. Böyle bir uygulama, süspansiyon halindeki maddeleri uzaklaştırmanın yanı sıra gazları da gidermektedir.

Sabit bileşimde tek bir çözücü kullanılarak yapılan ayırmalar izokratik elüsyon olarak adlandırılır. Bir diğer elüsyon yöntemi de gradiyent elüsyondur. Gradiyent elüsyonda polariteleri birbirinden farklı, iki veya üç çözücü sistemi kullanılmaktadır. Genellikle, ayırım verimliliği gradiyent elüsyon ile büyük ölçüde artırılır. Gradiyent elüsyonda, elüsyon başladıktan sonra, belli bir programa göre, bazen sürekli olarak ve bazen de bir seri basamaklar halinde, zamana bağlı olarak çözücülerin oranları değiştirilebilmektedir. Günümüzdeki modern YBSK sistemleri çözücülerin hacimsel oranlarını zamanla doğrusal veya üstel olarak değiştirebilecek şekilde, iki veya daha fazla hazneden aldığı çözücülerini bir karıştırma ortamında sürekli olarak değişen hızlarda bir araya getirebilen sistemlerle donatılmıştır (Skoog ve ark., 1998).

2.2.3.2. Pompalama Sistemleri

Bir YBSK pompalama sistemi için gerekli şartlar oldukça sıkıdır ve şunları içermektedir:

- 400 atm'e kadar basınç üretimi,
- Puls içermeyen basınç çıkışı,
- 0,1-10 mL dakika⁻¹ aralığında akış hızları,
- % 0,5 veya daha iyi bir bağıl tekrarlanabilirlikle akış kontrolü,
- Korozyona dayanıklı parçalar (paslanmaz çelik veya teflondan yapılmış sızdırmazlık).

YBSK sistemlerinde her birinin kendine göre üstünlük ve sakıncaları bulunan üç tip pompa kullanılmaktadır.

Bunlar;

- Pistonlu pompalar,
- Şırınga veya sürgülü pompalar
- Pnömatik veya sabit basınç pompalarıdır.

Pistonlu pompalar, ticari olarak satılan YBSK sistemlerinin yaklaşık %90'ında kullanılmaktadır. Bu pompalar motor kontrollü bir pistonun ileri ve geri hareketiyle çözücünün pompalandığı küçük bir silindirden meydana gelmiştir. Sürgülü pompalar ise bir kademeli motordan güç alan vidalı güdüm mekanizması ile kumanda edilen sızdırmaz bir sürgüsü olan, şırınga benzeri silindirik bir kaptan oluşmaktadır.

Pompalama sistemlerinin bir parçası olarak birçok ticari cihaz, bilgisayar ile kontrol edilen, pompa çıkışına yerleştirilmiş bir geri tepme tıkaçı boyunca basınç düşmesini belirleyen akış hızını ölçen bir sistemle donatılmıştır. Sinyalin önceden ayarlanmış değerindeki herhangi bir değişme, pompanın motorunun hızını artırmakta

veya azaltmakta kullanılır. Birçok cihaz, çözücünün bileşimini ya sürekli ya da basamaklı olarak değiştiren bir sisteme de sahiptir. Örneğin; Şekil 2.7.'de görülen cihaz, ön program ile ve dört tane çözücüyü sürekli değişen oranlarda karıştırabilen bir oranlama musluğu içermektedir (Skoog ve ark., 1998).

2.2.3.3. Numune Enjeksiyon Sistemleri

Çoğu zaman, sıvı kromatografisinde ölçümlerin kesinliğinin belirleyici faktörü, numunenin kolon dolgu maddesine sevkini tekrarlanabilirliğidir. Aşırı numune yüklemesi yapılan kolonlarda görülen bant genişlemesi de kesinliği etkilemektedir. Bu yüzden, numune enjeksiyonun hacmi, mikrolitrenin birkaç ondalığından belki 500 μL 'ye kadar oldukça küçük olmalıdır. Dahası, sistemin basıncını düşürmeksizin numunenin sisteme girişinin sağlanması gereklidir.

Sıvı kromatografide numune enjeksiyonu için en yaygın kullanılan yöntem numune giriş sarımlarının kullanılması esasına dayanmaktadır. Birçok sıvı kromatografi cihazının ayrılmaz bir parçası olan bu sarımlar, değiştirilebilir nitelikte olup 5 μL 'den 500 μL 'ye kadar değişen hacimlerde numune hacmi seçimine olanak tanımaktadır. Bu tipteki numune alma halkaları, 7000 psi basınca kadar, binde birkaç bağıl hata verecek kesinlikle numunenin kolona uygulanabilmesini sağlamaktadır. Hacmi 0.5-5 μL arasında olan halkaları bulunan mikro numune enjeksiyon muslukları da mevcuttur (Skoog ve ark., 1998).

2.2.3.4. Sıvı Kromatografi Kolonları

Sıvı kromatografi sistemlerinde düzgün iç çaplı paslanmaz çelik borulardan yapılmış veya nadiren kalın cidarlı cam borulardan yapılan kolonlar kullanılmaktadır.

2.2.3.4.1. Analitik Kolonlar

YBSK'de kullanılan kolonların büyük çoğunluğu boyu 10-30 cm arasında değişmektedir. Kolonlarının iç çapları genellikle 4-10 mm; yaygın olarak kullanılan kolon dolgu maddelerinin tanecik büyüklüğü ise 5-10 μm arasındadır. Günümüzde belki de en çok, 25 cm uzunluğunda, 4,6 mm iç çapında ve 5 μm tanecik büyüklüğüne sahip dolgu maddesi doldurulmuş kolonlar kullanılmaktadır. Bu tip kolonlar 40000-60000 teorik plaka metre⁻¹ içerirler.

Son yıllarda, üreticiler daha küçük boyutlarda, yüksek başarımlı kolonlar üretmektedirler. Bu gibi kolonların iç çapı 1-4,6 mm ve 3-5 μm tanecik büyüklüğündeki dolgu maddesi ile doldurulmuş olabilir. Çoğu zaman boyları 3-7,5 cm kadar kısadır. Bu gibi kolonlar 100000 teorik plaka metre⁻¹ içerirler. Ayrıca hız ve minimum çözücü sarfıyatı avantajları vardır. Son özellik oldukça önemlidir, çünkü sıvı kromatografi için gerekli olan yüksek saflıktaki çözücüler, temin edilmesi ve daha sonra atılması oldukça pahalıya mal olan çözücülerdir (Skoog ve ark., 1998).

2.2.3.4.2. Koruyucu Kolonlar

YBSK sistemlerinde kullanılan analitik kolonların kullanım ömürlerini artırmak için, analitik kolonlardan önce genellikle kısa bir kolon yerleştirilir. Bu kısa kolonların görevi, sadece partikül halde bulunan maddeleri ve çözücü içerisindeki yabancı maddeleri tutmak değil, aynı zamanda numune içinde bulunan ve sabit faza tersinmez olarak bağlanan bileşenleri de tutmaktır. İlave olarak, sıvı kromatografide kullanılan koruyucu kolonlar, hareketli fazı sabit faz ile doyurarak analitik kolondaki çözücü kaybının en aza indirilmesine yardımcı olur. Aynı sistem kullanılan koruyucu kolon dolgu maddesinin bileşimi ile analitik kolonunki çok benzer olmalıdır; bununla beraber, basınç düşüşünü en aza indirmek için tanecik boyutu genellikle daha büyüktür. Koruyucu kolonlar kirlendiği zaman tekrar yeni dolgu maddesi ile doldurulmalı veya aynı tipteki bir yenisi ile değiştirilmelidir. Böylece, daha pahalı

olan analitik kolonu korumak için emniyet kolonu feda edilmektedir (Skoog ve ark., 1998).

2.2.3.4.3. Kolon Dolgu Maddelerinin Tipleri

Sıvı kromatografisinde temel olarak iki tip kolon dolgu maddesi kullanılmaktadır. Bunlar,

- Film dolgular
- Gözenekli dolgulardır.

Film dolgular, küresel, gözeneksiz, çapları 30-40 µm olan cam veya polimer tanelerinde oluşurlar. Bu tanelerin yüzeyine, silis, alümina, polistiren-divinil benzen sentetik reçinesi veya bir iyon değiştirici reçineden oluşan ince bir gözenekli film kaplanmıştır. Bazı uygulamalar için, bu yüzeye, absorpsiyon ile yüzeye tutunan uygun bir sıvı, sabit bir faz olarak ilave bir katman halinde kaplanır. Alternatif olarak, organik bir yüzey katman oluşturmak üzere kimyasal işleme tabi tutulabilir. Günümüzde, taneler, zarlı dolgular daha çok koruyucu kolonlarda kullanılmakta, analitik kolonlarda kullanılmamaktadır.

Sıvı kromatografide kullanılan gözenekli partiküller, çapları 3-10 µm arasında olan gözenekli partiküllerdir. Belli boyutlardaki bir partikül için, partikül boyutu aralığını en aza indirmek için, her türlü gayret sarfedilmektedir. Partiküller, silis, alümina, polistiren-divinil benzen sentetik reçinesi veya bir iyon değiştirici reçineden meydana gelmiştir. Silis, sıvı kromatografide en yaygın olarak kullanılan bir dolgu maddesidir (Skoog ve ark., 1998).

2.2.3.5. Dedektörler

Dedektörler, elektromanyetik dalga formundaki enerji akısını ölçülebilir niceliklere çeviren ve kayıt edilmesini sağlayan cihazlardır. Sıvı kromatografi için ideal bir dedektör aşağıdaki özelliklere sahip olmalıdır.

- Yeterli derecede duyarlılık
- İyi bir kararlılık ve tekrarlanabilirlik
- Geniş bir doğrusal çalışma aralığı
- Akış hızından bağımsız küçük cevap zamanı
- Yüksek güvenilirlik ve kullanım kolaylığı
- Bant genişlemesini azaltmak amacıyla, minimum iç hacimde olmalıdır.

Sıvı kromatografi sistemlerinde kullanılan dedektörler temel olarak iki tipdir (Skoog ve ark., 1998).

- Yığın özelliği dedektörleri, hareketli fazın kırma indisi, dielektrik sabiti veya yoğunluğu gibi analit tarafından değiştirilen yığın özelliklere cevap veren dedektörlerdir.
- Analit özelliği dedektörleri, analitin UV absorbanası, floresans şiddeti veya difüzyon akımı gibi hareketli fazın sahip olmadığı bazı özelliklerine cevap veren dedektörlerdir.

Analit özelliği yani maddeye yönelik dedektörler hareketli faz içindeki maddenin özelliklerini tayin ederler ve en yaygın kullanılan türleri aşağıda verilmiştir (Skoog ve ark., 1998):

- Fotometrik dedektörler (UV/GB, Floresans, Dizi diyot, Infrared)
- Elektrokimyasal dedektörler
- Ayırım sonrası tepkime dedektörleri
- Radyoaktivite dedektörleri
- Kütle spektrometreleri

Yığın özelliği yani çözeltiye yönelik dedektörler; örnek özelliklerinin ölçülmesine yönelik dedektörlerdir ve aşağıdaki şekilde sınıflandırılabilir (Skoog ve ark., 1998):

- Refraktif indeks dedektörleri
- Dielektrik sabiti dedektörleri
- İletkenlik dedektörleri
- Yoğunluk dedektörleri

Tez kapsamındaki çalışmalarda Foto diyot dizi dedektör kullanıldığından bu dedektör için bilgiler verilmiştir.

2.2.3.5.1. Foto Diyot Dizi Dedektör (FDD)

Foto diyot dizi dedektörlerde polikromatik ışın kullanılmaktadır. Işın kaynağı olarak tungsten veya döteryum lambaları kullanılmaktadır. Işık kaynağından çıkan polikromatik ışınlar akış hücresine geldikten sonra optik ağız üzerinde dağılır ve çok sayıda diyottan oluşan foto diyot dizisi üzerine düşmektedir.

FDD 200 ile 700 nm arası dalga boyu aralığını 0.1 s aralıklarla tespit edebilme özelliğine sahiptir. Bu yüzden analizlerde FDD ile birden fazla dalga boyunda okuma yapılabilmektedir. FDD ile cevap piklerinin saf olup olmadığına ya da pik girişiminin olup olmadığına da bakılabilmektedir (Gümüştas, 2009).

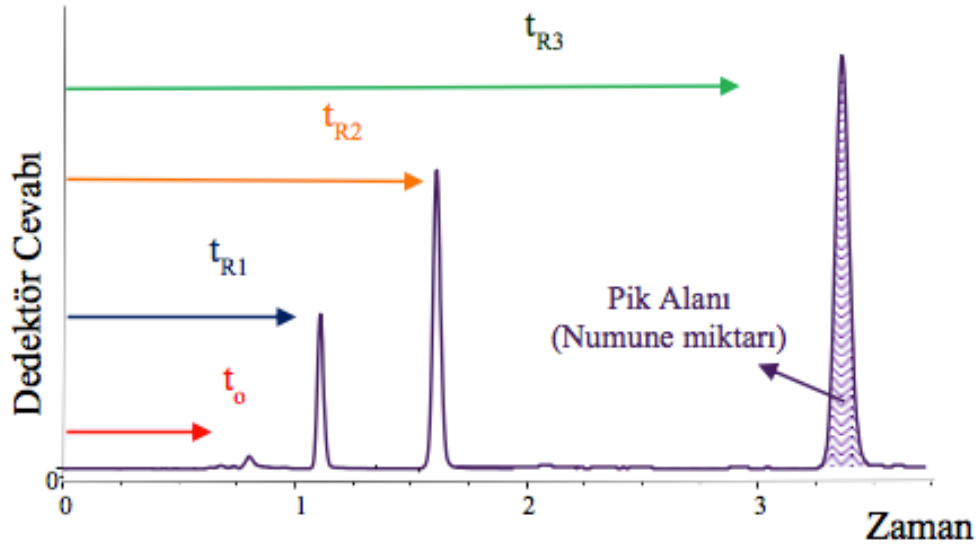
FDD'nin avantajları aşağıda sıralanmıştır.

- Seçilen bütün dalga boylarında okumalar aynı anda yapılabilmektedir.
- Maksimum absorbansın olduğu dalga boyu tek bir enjeksiyonla bulunabilmektedir.
- Kromatografik olarak ayrılamayan piklerin nicel analizi yapılabilmektedir (Gümüştas, 2009).

2.2.4. Kromatografide Temel Parametreler ve Sistem Uygunluk Testleri (SUT)

YBSK sisteminin analiz sonuçlarında gözle izlenebilen ilk parametreler; alıkonma zamanı, pik alanı, pikin şekli gibi parametrelerdir. Bir kromatogramda ilk izlenen parametre pik şeklindedir. İdeal pik şekli keskin, iki tarafının eşit ve dar olanıdır (Şekil 2.9). Numunenin kolona enjekte edilmesinden sonra, dedektöre gelen cevap sinyali bir pik olarak görülür. Bu sinyalin çıkış zamanı aynı zamanda alıkonma zamanı (t_R) olarak da adlandırılır ve nitel analizlerin belirleyici faktörüdür. Numune içinde bulunan her bir analitin farklı alıkonma zamanları vardır. Hareketli fazdan kaynaklanan piklerin çıktığı zaman ise ölü zaman veya ölü hacim (t_0) olarak adlandırılır (Fanali ve ark., 2013 ve Kromidas, 2005). Ters faz sıvı kromatografik yöntemlerde ölü zamanı belirlemek için urasil, potasyum bromür gibi polarlığı çok yüksek olan bileşikler kullanılmaktadır.

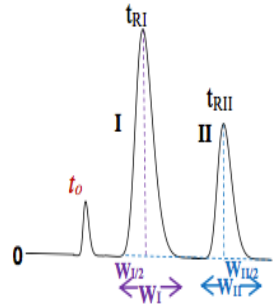
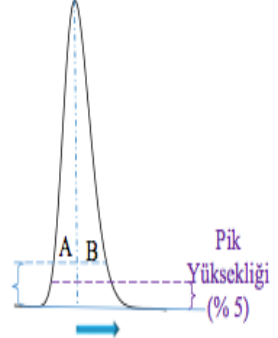
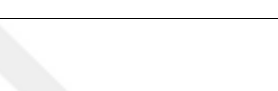
Sistem uygunluk testleri kromatografik ve diğer ayırma yöntemlerinde, yöntemin yeterli doğruluk ve kesinlikte olduğunu belirlemek için yapılmaktadır ve bu testlerin gerçekleştirilmesiyle kromatografik bir sistemin analize ne ölçüde uygun olduğu kanıtlanmış olur. Bu testler Uluslararası Uyum Konseyi (The International Council for Harmonisation (ICH)) Amerikan Gıda ve İlaç Birliği (FDA) ve Amerikan Farmakopesi (USP) ve diğer farmakopeler tarafından yapılması önerilen testlerdir. Sistemdeki akış hızı, pH, okuma yapılacak dalga boyu, hareketli faz bileşiminden kaynaklı en ufak bir değişiklik için, sistem uygunluk testlerinin yeni sistem için tekrar gözden geçirilmesi gerekmektedir (Gümüştas, 2016; Chan ve ark., 2004; Grdinic ve Vukovic, 2004; Hajicostas, 2003; Hibbert, 2007; Huber, 2007; ICH-Q2A, 2005; ICH-Q2B, 2005; Kromidas, 2005; Prichard ve Barvick, 2007; Swartz ve Krull, 1997; Torbeck, 2007; US FDA, 1983; US FDA, 2000; USP 37, 2014 ve Werner ve ark., 2006, European Pharmacopoeia, 2014).



Şekil 2.8. YBSK cihazından alınmış örnek bir kromatogram (Gümüştas., 2009)

Bir kromatogramın yorumlanması ve SUT parametrelerinin (Çizelge 2.8.) limit değerlerinin içinde olup olmadığının belirlenmesinde temel olarak alıkonma zamanı ve pik genişliği esas alınır. Çizelge 2.8’de Amerikan Farmakopesi tarafından tanımlanan SUT parametreleri, bu parametrelerin nasıl hesaplanacağı ve limit değerleri gösterilmiştir.

Çizelge 2.8. SUT parametreleri

SUT Parametresi	Sembolü	Formülü	Limit	Açıklama
Kapasite Faktörü	k	$k = \frac{t_R - t_0}{t_0}$	$1 \leq k \leq 10$	
Seçicilik	α	$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t_{R2} - t_{R0}}{t_{R1} - t_{R0}}$	$\alpha > 1$	
Ayrım Gücü	R_S	$R_S = 1.18 \times \frac{t_2 - t_1}{W_{10.5} + W_{20.5}}$	$R_S > 1.5$	
Kuyruklanma Faktörü	T	$T = \frac{A + B}{A}$	$2 \leq$	
Pik Asimetresi	A_S	$A_S = \frac{B}{A}$	$0.95 \leq A_S \leq 2$	
Teorik Tabaka Sayısı	N	$N = 16 \left[\frac{t_R}{W} \right]^2$	$N > 2000$	
Pik Alanının Tekrar Edilebilirliği	% BSS	$\% BSS = \frac{SS}{\bar{X}} \times 100$	$\% BSS < 1.5$	

Çizelge 2.8'e bakıldığında, k değeri büyük ise, bileşen sabit fazda iyi tutulmaktadır ve kolon boyunca yavaş ilerlemektedir. k değeri çok küçük ise, analit çözücü pikinden ayıramamaktadır, çok büyük olması ise analiz süresinin uzun olduğunu göstermektedir. Seçicilik (α), sabit faz ve hareketli fazın özelliklerine göre değişiklik göstermektedir ve daima 1'den büyük olmalıdır.

SUT'un en önemli parametresi teorik tabaka sayısıdır. Çünkü bu değer analiz sonucunun verimi ile direkt ilgilidir. N'nin sayısal değeri, analizi yapılan maddenin cinsine, akış hızı, sıcaklık, pH ve kolonun ömrü gibi deneysel koşullara bağlıdır.

Kromatografik işlemlerde kolon ve çözücünün ortak etkisi ayırma gücü (rezolüsyon) olarak ifade edilir. Ayırma gücünün hesaplanmasında, kapasite faktörü, etkin tabaka sayısı ve seçicilikten yararlanılmaktadır. Peş peşe gelen iki pik için R_S değeri 1,5 ve üstünde iken ayırım tam olarak gerçekleşmiş demektir.

Kuyruklanma faktörü ve pik asimetrisi parametreleri incelenen analit pikinin eğriliğini, sağ veya sol tarafa dayalı olup olmadığını ve keskinliğini belirleyebilmek için kullanılan parametrelerdir. Uzun süre kullanılmış kolonlarda kuyruklanma daha sık görülmekte ve doğru sonuçlar vermemektedir. Pik asimetrisi, pik taban yüksekliğinin % 10'u, kuyruklanma faktörü ise % 5'i civarından ölçülerek hesaplanmaktadır.

Bir kromatografik yöntemde analizi yapılan madde pikinin alanının ve pik yüksekliğinin, belirlenen koşullardaki tekrar edilebilirliği yöntemin kesinliğinin ifadesidir. Bu parametre analizi yapılan maddenin en az 5-6 defa sisteme peş peşe enjeksiyonunun verilmesinden sonra elde edilen pik alanları ve pik yüksekliklerinin bağıl standart sapması (% BSS) olarak hesaplanır.

2.2.4.1. Kromatografik Analizlerde Yöntem Geçerlik Testleri

Araştırma geliştirme faaliyetlerinin yürütüldüğü ve kalite kontrol işlemlerinin uygulandığı her alanda, kullanılan tüm analiz, yöntem ve uygulamaların, doğru, tekrarlanabilir ve belirlenen parametreler içerisinde ölçülebilir olması etkinlik ve güvenilirlik açısından son derece önemlidir. Yöntem geçerliliği (validasyon) ise bu özelliklerin uluslararası standartlarda olduğunu göstermektedir (Gümüştas, 2016; Crowter, 2001; Ermer, 2005; Haider, 2002; Hartmann ve ark., 1998; ICH-Q2A, 2005; ICH-Q2B, 2005; Kromidas, 2005; Lee, 2004; US FDA, 1983; US FDA, 2000 ve USP 37, 2014).

İlaç etken maddelerin, saf hallerinin, farmasötik dozaj formlarından ve biyolojik numunelerden analizlerinde kullanılan yöntemler analitik yöntemler olarak tanımlanmaktadır. Bu yöntemler kullanılırken ilaçlar saf halde veya çeşitli safsızlıkları ile birlikte bulunabilirler. Bu yöntemlerin kullanılabilir olması için iyi karakterize edilmesi ve güvenilir sonuçların elde edilebildiği tamamen geçerli olan analitik yöntemlerin geliştirilmesi şarttır.

Aşağıdaki çizelgede farklı klavuzlara göre yapılması gereken validasyon parametreleri verilmiştir.

Çizelge 2.9. Validasyon parametreleri

Gerekli Validasyon Parametresi		ICH	USP
Seçicilik		✓	✓
Doğrusallık		✓	✓
Aralık		✓	✓
TS		✓	Sadece sınır testlerinde
TAS		✓	Sadece kantitatif çalışmalarda
Kesinlik	Tekrarlanabilirlik	✓	✓
	Gün için tekrar edilebilirlik	✓	-
	Günler arası tekrar edilebilirlik	✓	-
	Doğruluk	✓	✓
Sağlamlık		Tavsiye edilir	✓
Tutarlılık		Tavsiye edilir	✓
Çözelti Stabilitesi		✓	Tavsiye edilir
Duyarlılık		Tavsiye edilir	✓

2.2.4.2. Validasyonun Genel İşlemleri

Validasyon, herhangi bir analitik yöntemin güvenilirliğini ortaya koymak için de kullanılmaktadır. Ayrıca bir laboratuvarın analitik verilerinin ne kadar güvenilir olduğunu anlamak için o laboratuvarda kullanılan yöntemlerin validasyonlarında şarttır (Ozkan, 2012). Validasyonun geçerliliği için aşağıda belirtilen işlemlerin ve tanımlamaların yapılması gereklidir (Haider, 2002; Hartmann ve ark., 1998; Kromidas, 2005; USP 37, 2014; US FDA, 1983; US FDA, 2000; Ozkan, 2012 ve Ozkan ve ark., 2015; Gümüştas, 2016).

- Cihaz/Ekipman Kalite Kontrolü: Bu kontrole bütün cihazların donanımsal ve yazılımsal kontrolleri yapılır,
- Rutin analizde kullanılacak bir analizin veya yöntem parametrelerinde herhangi bir değişiklik yapılan metodun validasyonu,
- Ayırma yöntemlerinin validasyonu için gerekli olan ve çalışma sırasında, günler arasında ve numunelerin analizleri sırasında uygulanan Sistem Uygunluk Testleri (SUT) ve ilgili parametrelerinin saptanması.

ICH (International Council on Harmonization: Uluslararası uyum konseyi) ve Farmakopeler tarafından stabilite, işlem analizleri, tanıma, saflık, ilaç etken maddesinin etkinliğini, salım testleri ve kabul testleri gibi basamaklar için detaylı bilgiler verebilen yeni analitik yöntemlere gerekli validasyon parametreleri ve bu parametrelerin sahip olması gereken değerler önerilmiş ve kabul edilmiştir. Validasyon, tek başına bir yöntemin uygulanması için düşünülmemelidir. Bir analitik yöntem kullanımı süresince her zaman ve her yerde geçerliliğini korumalıdır. Bir analiz yöntemi, etkinlik parametreleri ile karakterize edilir. Bu etkinlik değerleri çeşitli kılavuzlar ve farmakopelerde belirtilen değerleri sağlamalıdır (Chan ve ark., 2004; Crowter, 2001; ICH-Q2A, 2005; ICH-Q2B, 2005; Lee, 2004; USP 37, 2014; Riley ve Rosanske, 1996; Swartz ve Krull, 1997; Snyder ve ark., 1997; Ahuya ve Scypinski, 2001; Lunte ve Radzik, 1996; Adamovics, 1997; Braggio ve ark., 1996; Shabir, 2003; Papadoyannis ve Samanidou, 2004; Ermer, 2001; Mc Dowell, 1999; Ermer ve Miller, 2005; De Bievre ve Gunzler, 2005 ve Vessman, 1996; Gümüştas, 2016).

2.2.4.2.1. Seçicilik

Seçicilik, analizi yapılan numunede var olan ve analizi yapılan maddeyle girişim yapabilecek ilgili bileşenlerin (safsızlık, bozunma ürünleri veya ortamdan gelebilecek) yanında analiz edilmek istenilen maddenin ölçülebilmesidir. Seçicilik, kromatografik sistemlerin validasyonunun en önemli parametresidir. Çünkü seçiciliğin olmadığı bir yöntemde başka hiçbir parametrenin öneminden

bahsedilemez. Seçiciliğin yeterli düzeyde olmaması durumunda, yöntemin doğrusallığı, doğruluğu ve kesinliği hakkında yanlış bilgiler elde edilir.

Seçiciliğin belirlenmesi için birkaç farklı yol vardır:

- Bütün bilinen veya girişim yapmasından şüphe edilen maddeler (benzer maddeler, dozaj formu içindeki yardımcı maddeler gibi) aynı anda kolona enjekte edilir ve geliştirilen yöntemle analiz edilir ve ayırım gücü değerlerine bakılır ($R_s \geq 2,0$ olmalıdır).
- Geliştirilen kromatografik yöntemin şartlarında ufak değişiklikler yapılır, (çözelti bileşimi, tampon çözelti pH'si, sıcaklık gibi) Bu değişikliklerin pik performansına olan etkileri takip edilir.
- Kullanılan FDD dedektörü ile yazılım vasıtasıyla pik saflıkları kontrol edilir. Mevcut sinyalin altında bir sinyal daha olup olmadığından emin olunabilir (Barwick ve Ellison, 2005; Bliener, 2006; Branch, 2005; Casro ve ark., 2005; Chan, 2004; Chan ve ark., 2004; Christian, 2004; Crowter, 2001; Ermer ve Ploss, 2005; Görög, 2007; Grdinic ve Vukovic, 2004; Gumustas ve Ozkan 2011; Haider, 2002; Hartman ve ark., 1998; Hibbert, 2007; ICH-Q2A, 2005; ICH-Q2B, 2005; Konieczka, 2007; Lee, 2004; Majcen, 2003; Prichard ve Barvick, 2007; Riley ve Rosanske, 1996; Shabir, 2003; Snyder ve ark., 1997; Switaj-Zawadka ve ark., 2005; Thompson ve ark., 2002 ve Van Locco ve ark., 2002; Gümüştas, 2016).

2.2.4.2.2. Doğrusallık ve Aralık

Doğrusallık analit derişiminin bir fonksiyonudur ve sinyallerin grafiksel olarak yorumlanması ile belirlenir. Eğim (m), kesişim (n) ve korelasyon (R^2) katsayısı doğrusallığı veren parametrelerdir.

Bu parametreler analit derişiminin ölçülen sinyallere karşı regresyon analizleri kullanılarak matematiksel olarak hesaplanır. Doğrusallık, korelasyon katsayısının 0,999 ve üzerinde olması durumunda sağlanmış demektir.

Doğrusallığı belirlemek için stok çözeltiden en az 5 farklı derişim hazırlanır ve analiz sonuçları çözelti derişimlerine karşı grafiğe geçirilir. Grafiğe geçirilen noktalar bulunan eğilim çizgisi üzerine denk gelmeli veya çok yakınından geçmelidir. Böylelikle r veya R^2 değerleri de 1'e yaklaşmış olur. Doğrusallık sonuçları raporlanırken eğim ve kesişim değerlerinin % BSS'leri veya standart hataları da hesaplanarak verilmelidir.

Aralık ise doğruluğu ve duyarlılığı yeterli kabul edilen bir yöntemin geçerli olduğu alt ve üst sınırlar arasında yer alan derişim aralığı olarak adlandırılmaktadır. Her nicel yöntemde çalışma aralığı mutlaka belirlenmelidir. Genellikle çalışmalarda en iyi performansı veren çalışma aralığı hedeflenen seviyelerin % 50'si ile % 150'si arasındadır (Ozkan, 2012; Gumustas ve Ozkan, 2011 ve Ozkan ve ark., 2015; Gümüştas, 2016).

2.2.4.2.3. Teşhis Sınırı (TS, LOD) ve Tayin Alt Sınırı (TAS, LOQ)

Bir numune içinde analizi yapılacak bileşenin (analit) teşhis edilebilen, ancak kabul edilebilir bir belirsizlikle miktar tayini yapılamayan en düşük derişimi TS olarak ifade edilir. TAS ise doğru bir şekilde tayin edilebilen cevabı veren en küçük analit derişimini ifade eder. Bu değerler birkaç yolla bulunabilir veya hesaplanabilir. Bunlar, görsel değerlendirme, sinyal-gürültü oranı ve cevabın standart sapması ve eğim kullanılarak hesaplanması yöntemleridir.

Görsel yöntem ile hazırlanabilecek en düşük derişimdeki çözelti hazırlanır ve sisteme enjekte edilir bu işlem bileşenin sinyalinin belirdiği fakat alan okumasının yapılamadığı en düşük seviyenin saptanmasına kadar devam eder.

İkinci yöntem için yapılan deneylerden elde edilen kromatogramlardaki sinyal/gürültü oranları kullanılır. Bunun için analitin bilinen düşük derişimdeki çözeltilerinden elde edilen cevaplar, şahit (kör) çözelti cevapları ile karşılaştırılır.

Sinyalin gürültüye oranının 3 olduğu derişim TS ve 10 olduğu derişim TAS olarak kabul edilir.

Eşitlik 2.3. ve eşitlik 2.4’de s standart sapmayı, m ise ilgili kalibrasyon doğrusunun eğimini ifade etmektedir. Bu eşitlikler aynı zamanda eğri fonksiyonuna bağlı olarak TS, TAS ve duyarlılık arasındaki ilişkiyi de göstermektedir (Gumustas ve Ozkan, 2011 ve Ozkan, 2012; Gümüştas, 2016).

$$TS = \frac{3,3 \times s}{m} \quad (\text{Eşitlik 2.3.})$$

$$TAS = \frac{10 \times s}{m} \quad (\text{Eşitlik 2.4})$$

2.2.4.2.4. Kesinlik

Analiz için geliştirilen yöntemin gerçek çalışma koşullarındaki tekrarlanabilirliğinin ölçüsüdür. Kesinlik sonuçları % BSS olarak verilmelidir.

Kesinlik üç aşamada incelenir:

- Enjeksiyonlar arası tekrarlanabilirlik (tekrar edilebilirlik),
- Orta kesinlik,
- Tekrar elde edilebilirlik

Tekrarlanabilirlik, kısa sürelerde aynı numune veya çözeltiler kullanılarak aynı şartlar altında elde edilen kesinlik parametresidir. Ayrıca enjeksiyonun tekrarlanabilirliği olarak da adlandırılır. Elde edilecek % BSS değeri ≤ 1.0 olmalıdır. Bu değer eser element analizlerinde, biyolojik numunelerde ve safsızlık tayinlerinde % 5’e kadar kabul edilebilir seviyededir.

Orta kesinlik, laboratuvar içi deneysel farklılıkları belirtmektedir. Çalışmalar arası, deneyler arası veya gün içi kesinlik olarak da tanımlanabilir. Analit çözeltisi aynı günde ve/veya farklı analizciler tarafından hazırlanır. Hazırlanan çözeltilerin her birinden en az 3'er defa ölçüm yapılır. Orta kesinlik sonuçları %BSS kullanılarak ifade edilir ve $\% BSS \leq 2$ olmalıdır. Eğer biyolojik numunelerle çalışılıyorsa bu kesinlik derecesini veren % BSS değerleri % 10-15'e kadar çıkabilmektedir.

Tekrar elde edilebilirlik, yöntemlerin farklı şartlarda, farklı günlerde, farklı laboratuvarlardaki kullanımının kesinliğini belirtir. Tekrar elde edilebilirlik kriteri $\% BSS \leq 2$ olmalıdır. Ancak safsızlık veya eser madde analizlerinde bu oran % 10-15'e kadar kabul edilebilir seviyededir (Gümüştas, 2016).

2.2.4.2.5. Doğruluk (Geri Kazanım)

Doğruluk, validasyon çalışmalarının en zor ve en önemli parçasıdır. Analiz sonucu elde edilen değer gerçek (referans) değere ne kadar yakın olduğunun ölçüsüdür. Doğruluk sonuçları ortalama % geri kazanım cinsinden ifade edilir. Ortama ilave edilen saf maddenin, analiz yapılan ortamdan hangi oranda geri alınabildiğinin göstergesidir. Geri kazanım çalışmaları en az 3 değişik derişimde yapılır; bunlar genellikle hedef değerin % 25, % 50 ve % 100'üne eşdeğer olacak derişim değerleri seçilerek kullanılır. Seçilen herbir derişim değeri için en az 5 tekrarlı analiz yapılmalıdır ve bunun sonucunda geri kazanım sonuçları % 100'üne kadar yakınsa yöntemin o kadar doğru olduğu düşünülür.

Doğruluk bir takım yaklaşımlarla saptanıp, gösterilebilir. Bunlar:

- Kesin doğrusallık ve seçicilik,
- Elde edilen sonuçların, geçerli ve bağımsız başka bir yöntem ile kıyaslanması,
- Analizi yapılacak gerçek numuneye uygulanması,
- İlaç numunesine veya matris ortamına etken maddeyi standart ekleme ile ilave edip, geri kazanımının bulunmasıdır.

Kör matriks ortamına analizi yapılan maddenin ilavesi: Matriks etkisi olan numunelerle çalışıldığı zaman tercih edilir. Analitin boş ortama farklı derişimlerde eklenmesiyle gerçekleştirilir. Bu analizlere örnek olarak ilaç etken madde analizleri için, etken madde içermeyen fakat yardımcı maddelerin olduğu ortam kullanılabilir. Genellikle % 50, 75, 100, 125 ve 150 oranında madde ilavesi yapılır ve her derişim değerinde en az 3'er ölçüm yapılır. Bu işlemlerin sonuçları % geri kazanım olarak ifade edilir ve % BSS ve/veya % bağıl hata (BH) (% Bias) ile beraber raporlanır. Referans standart bir yöntem kullanarak sonuçların kıyaslanması: Geliştirilen analiz yöntemi ile 3 farklı derişimde, 3'er ölçüm alınır ve bu değerler % geri kazanım değerlerine çevrildikten sonra tümü bir araya getirilir. Her iki yönteme ait analiz sonuçları istatistiksel olarak kıyaslanır. Bu işlem yapılırken Student t ve F testleri kullanılır. t testi ile iki yöntemle elde edilen sonuçların ortalamaları arasındaki farklar, F testi ile de standart sapmalar arasındaki farklar karşılaştırmalı olarak rapor edilir. Bulunan değerler, teorik değerler ile karşılaştırılır, karşılaştırma sonucunda hesaplanarak elde edilen değerler çizelgede yer alan teorik değerlerden küçük veya bu değere yakın ise geliştirilen yöntemin en az referans olarak kabul edilen yöntem kadar hassas olduğu kanısına varılır. Sonuçların ortalamaları, aşağıdaki eşitliklerde görülen % bağıl standart sapma (% BSS) ve/veya % bağıl hata (BH) (% Bias) ile beraber verilir.

Standart ekleme yöntemi ile saf madde ilavesi: Boş bir matriks bulunmayan durumlarda bu yöntem sıklıkla tercih edilir. Analizi yapılacak maddenin bilinen ve farklı miktarları matriks içerisinde yer alan ve miktarı bilinmeyen veya daha önce

tayin edilmiş aynı maddenin üzerine ilave edilir. Asıl numunedeki etken madde derişimi deney verilerinden matematiksel olarak hesaplanır. Genellikle % 25, 50, 100 oranında madde ilave etmek iyi bir yaklaşımdır. Genellikle, katkı maddelerinin ve yardımcı maddelerin bilinmediğı durumlarda kullanılır. Sonuçların ortalamaları, % BSS ve/veya % BH ile beraber raporlanır (Gümüştaş, 2016).

$$\% BSS = \frac{SS}{\bar{X}} \times 100 \quad (\text{Eşitlik 2.5.})$$

$$\% BH = \frac{GD - \bar{X}}{GD} \times 100 \quad (\text{Eşitlik 2.6.})$$

2.2.4.2.6. Sağlamlık

Geliştirilen bir kromatografik yöntemin analiz parametrelerindeki ufak değişimlerden etkilenmeden uygulanabilmesinin göstergesidir. Bu parametreler organik çözücü yüzdesi, pH, iyonik güç, dalga boyu, akış hızı ve sıcaklık gibi etkenlerdir (Gümüştaş, 2016).

2.2.4.2.7. Tutarlılık

Tutarlılık, kullanılan yöntemin gerçek pratik koşullar altında tekrar edilebilirliğinin saptanmasıdır ve tekrar edilebilirlik ve tekrar elde edilebilirlik gibi değerlerle de yakından alakalıdır (Heyden ve Massart, 1996). Bunun için çalışma, aynı laboratuvarı bulunan farklı analizciler, farklı cihazlar tarafından gerçekleştirilmelidir. Bunun yanında kullanılan reaktif ve çözücülerin markalarının ve üretim serilerinin değiştirilmesi gibi normal analiz koşullarının değiştirilmesi, aynı marka ve modele sahip yeni bir kolon kullanarak tekrarlanması gereklidir. Özellikle yöntemin farklı bir laboratuvarı gerçekleştirildiği durumlarda bu parametre son derece önemlidir ve elde edilen sonuçlar % BSS değeri ile ifade edilir (Ozkan, 2012; Gümüştaş, 2016).

2.2.4.2.8. Stabilite

Bu parametre genellikle çalışılan analitlerin kararlılığı ile alakalıdır. Analitin farklı koşullar altında ne kadar süre kararlı kalabildiğini bize gösterir. Stabilite çalışmaları sonucunda yöntemin seçiciliği de tekrar denenmiş olur. Özellikle meydana gelebilecek bozunma ürünlerinin etken madde yanında tayin edilebildiğinin bir göstergesidir. 4 farklı şekilde stabilite çalışmaları yapılabilmektedir:

- Kısa süreli stabilite
- Uzun süreli stabilite
- Dondurma-çözme stabilitesi
- Hızlandırılmış bozunurma çalışmaları

Kısa süreli stabilite çalışmalarında farklı derişim seviyelerinden alınan örnekler oda sıcaklığında çözülür ve 4-24 saat aralığında bu ortamda kalması sağlanır. Bu işlem sonrasında sonuçlar taze hazırlanmış çözelti ile karşılaştırılır.

Uzun süreli stabilite çalışmalarında kullanılan etken maddenin ne kadar süre kararlı kaldığı ölçülür. 3, 6 ve 12 aylık zaman dilimlerinde ölçümler alınır ve taze çözelti sonuçları ile karşılaştırılır.

Dondurma-çözme stabilitesi üç döngü üzerinden gerçekleştirilir. Üç farklı derişimdeki çözeltiler istenilen sıcaklıkta 24 saat süre ile dondurulur. Daha sonra kendiliğinden çözülmesi için beklenir ve bu işlem 2 defa daha tekrarlandıktan sonra analiz yapılarak sonuçlar karşılaştırılır.

Hızlandırılmış bozunma çalışmaları kullanılarak etken maddenin hızlı bir biçimde bozulması sağlanır ve bu sayede safsızlıkların veya bozunma sonucu oluşan ürünlerin analize etkisi incelenir (Gümüştas, 2016).

3. BULGULAR

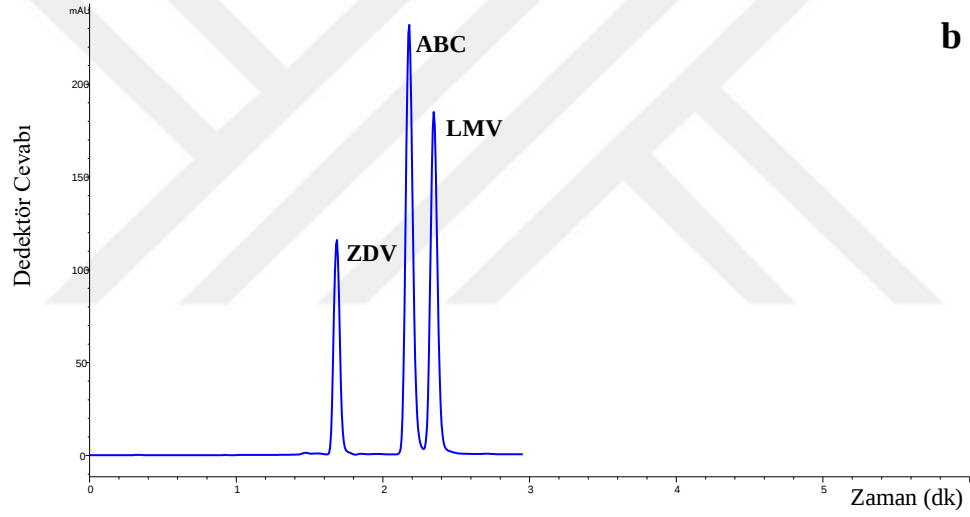
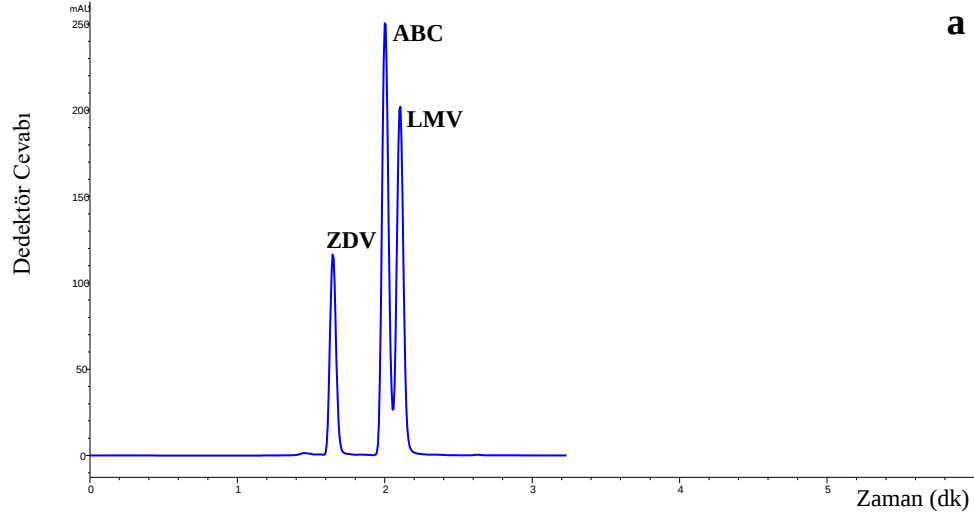
3.1. Abakavir, Lamivudin ve Zidovudin Maddeleri için Geliştirilen HILIC Yöntemine Ait Analiz Bulguları

3.1.1. HILIC Yönteminin Optimizasyonu

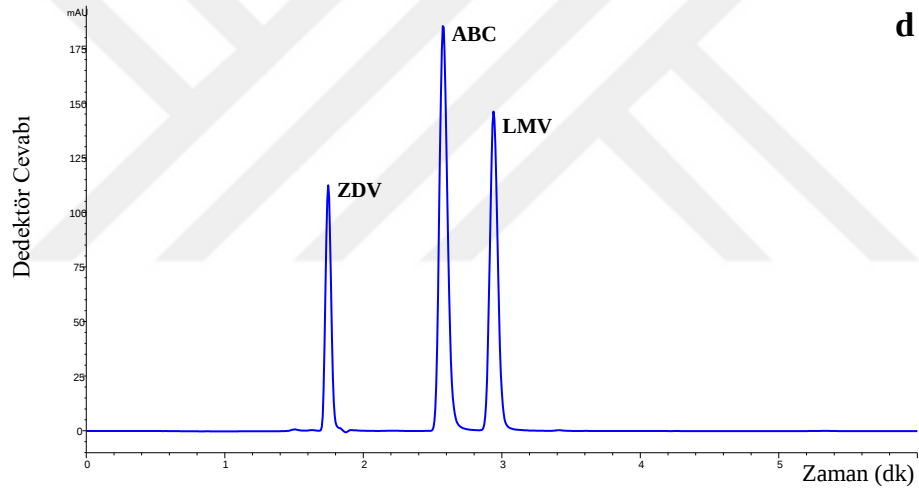
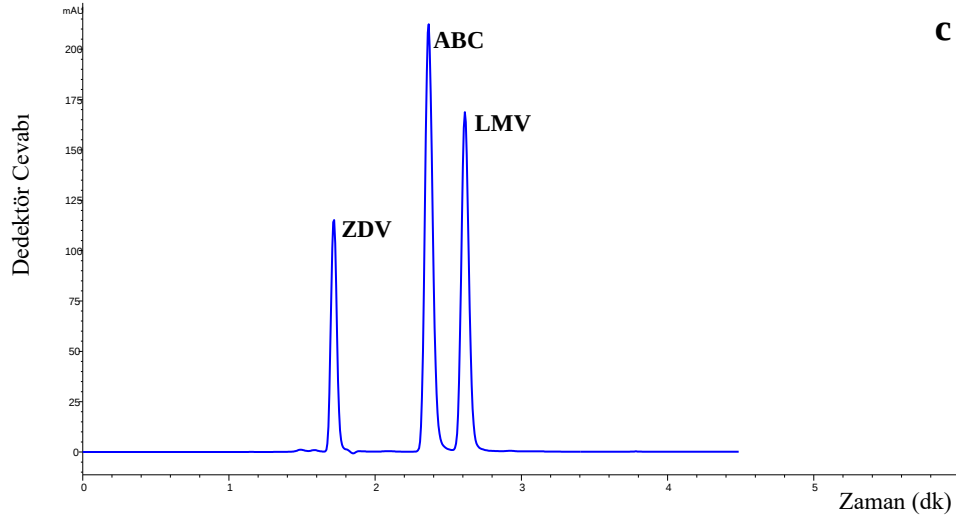
ABC, ZDV ve LMV maddelerinin eş zamanlı olarak HILIC yöntemiyle analizi için en uygun kromatografik koşulların belirlenmesine hareketli faz bileşiminin denemeleriyle başlanmıştır. Daha sonra hareketli fazın bileşeni olan tampon çözeltinin molarite değişiminin analiz sonucuna etkisini inceleme çalışmaları yapılmıştır. Farklı sabit fazlar denenerek sabit fazın fonksiyonel grubunun ve partikül boyutlarının etkisi incelenmiştir.

3.1.1.1.Hareketli Fazdaki Organik Çözücü ve Tampon Çözeltinin Yüzdelерinin Belirlenmesi

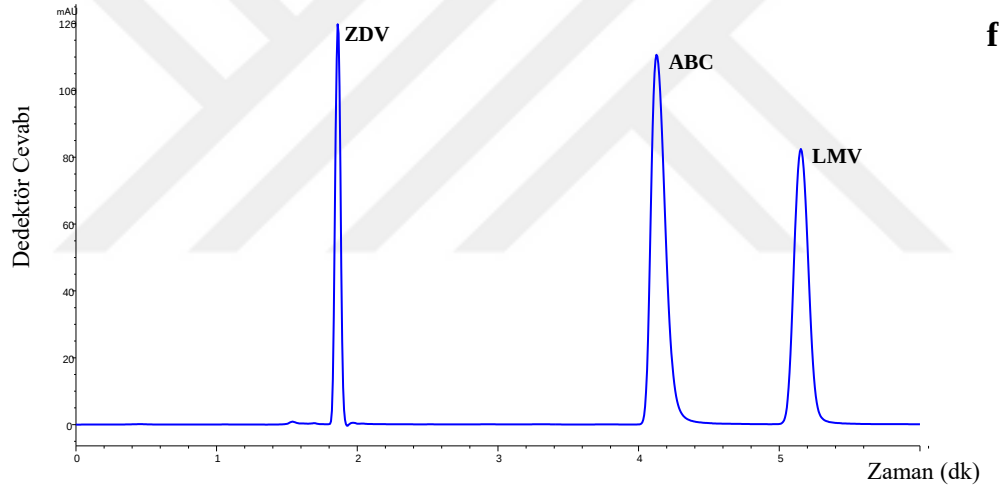
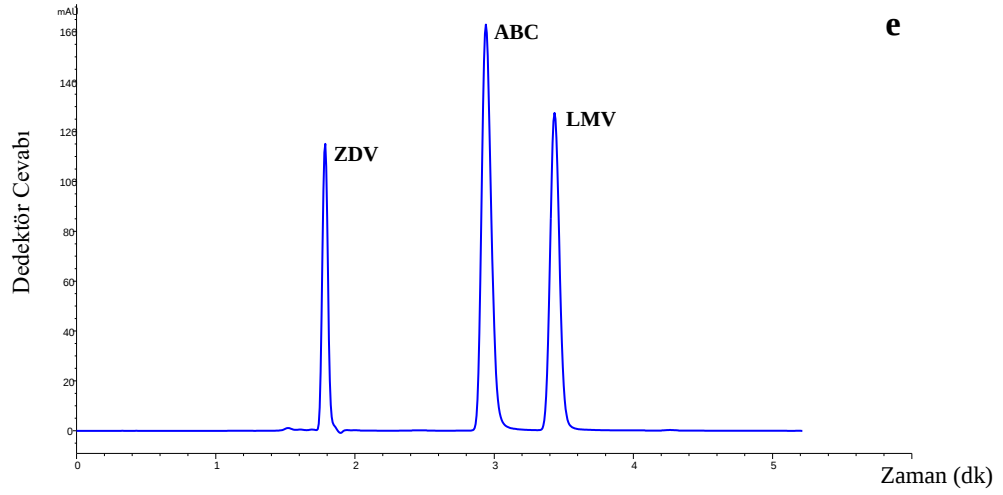
HILIC yönteminde, SUT parametrelerine bağlı olarak iyi bir ayırım yapılabilmesi için ACN ve su yüzdesi son derece önemlidir. En uygun ACN oranının bulunabilmesi için hareketli fazın organik çözücü içeriği hacimce % 80, 85, 88, 90, 92, 95 ve 98 olarak değiştirilmiştir. Bu çalışmalar Kinetex HILIC (150 mm x 4,6 mm x 2,6 μ m) kolonda 25 °C’de 1 mL dk⁻¹ akış hızı ve 10 μ L enjeksiyon hacmiyle yapılmıştır. Tampon çözelti olarak 20 mM amonyum asetat kullanılmıştır.



Şekil 3.1. Kinetex HILIC (150 mm x 4,6 mm x 2,6 μ m)kolon, 25 °C, 1 mL dk⁻¹ akış hızı, pH: 6,68, 280 nm dalga boyu, hareketli faz: ACN: Tampon - 20mM Amonyum asetat (h/h) (80/20) (a), (85/15) (b), (88/12) (c), (90/10) (d), (92/8) (e), (95/5) (f) ile yapılan çalışmalara ait kromatogramlar



Şekil 3.1. (devam) Kinetex HILIC (150 mm x 4,6 mm x 2,6 μ m)kolon, 25 °C, 1 mL dk⁻¹ akış hızı, pH: 6,68, 280 nm dalga boyu, hareketli faz: ACN: Tampon - 20mM Amonyum asetat (h/h) (80/20) (a), (85/15) (b), (88/12) (c), (90/10) (d), (92/8) (e), (95/5) (f) ile yapılan çalışmalara ait kromatogramlar



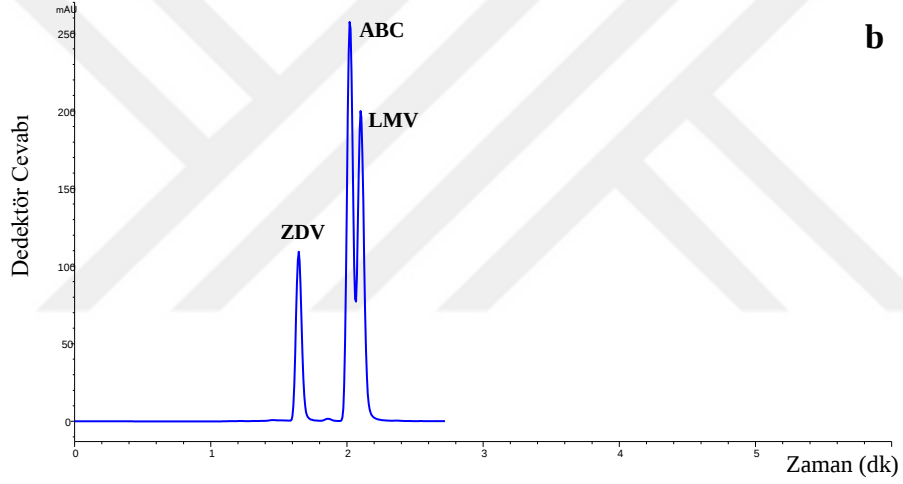
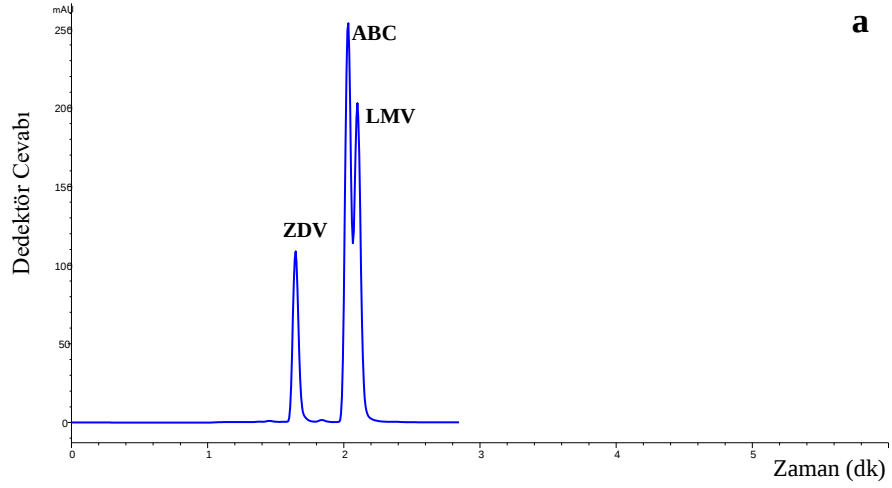
Şekil 3.1. (devam) Kinetex HILIC (150 mm x 4,6 mm x 2,6 μ m)kolon, 25 °C, 1 mL dk⁻¹ akış hızı, pH: 6,68, 280 nm dalga boyu, hareketli faz: ACN: Tampon - 20mM Amonyum asetat (h/h) (80/20) (a), (85/15) (b), (88/12) (c), (90/10) (d), (92/8) (e), (95/5) (f) ile yapılan çalışmalara ait kromatogramlar

Çizelge 3.1. Sistem uygunluk testlerine göre hareketli faz bileşiminin karşılaştırılması

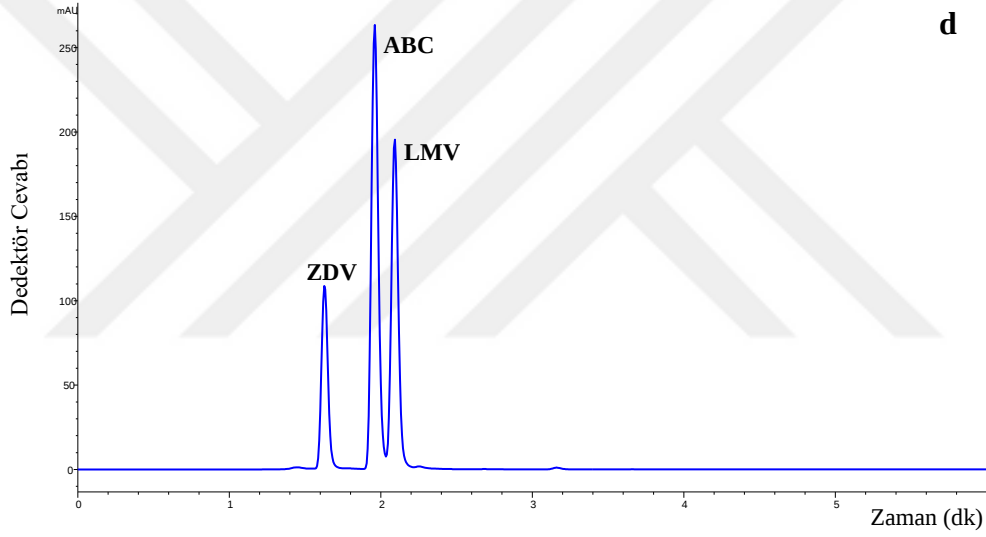
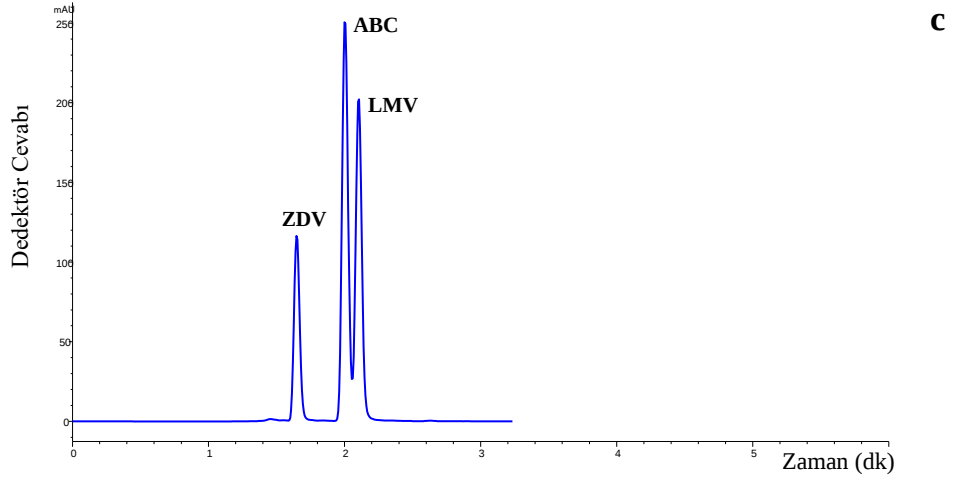
Hareketli Faz ACN Yüzdesi	ZDV				ABC				LMV			
	t_R (dk)	N	R_S	α	t_R (dk)	N	R_S	α	t_R (dk)	N	R_S	α
% 80	1,62	6757	-	-	1,98	10023	4,409	3,084	2,05	11038	1,266	1,192
% 85	1,68	7392	-	-	2,17	9224	5,836	3,645	2,34	10983	1,881	1,248
% 88	1,71	7891	-	-	2,36	9270	7,374	4,67	2,61	11621	2,56	1,292
% 90	1,74	7999	-	-	2,57	8908	8,852	4,441	2,93	11884	3,358	1,34
% 92	1,78	8595	-	-	2,93	8302	11,193	5,802	3,43	11832	3,873	1,353
% 95	1,85	9872	-	-	4,12	7518	17,066	8,301	5,15	11178	5,343	1,397
% 98	1,97	11998	-	-	14,29	10608	39,216	32,89	17,39	11280	4,98	1,236

3.1.1.2. Tampon Çözelti Molaritesinin Belirlenmesi

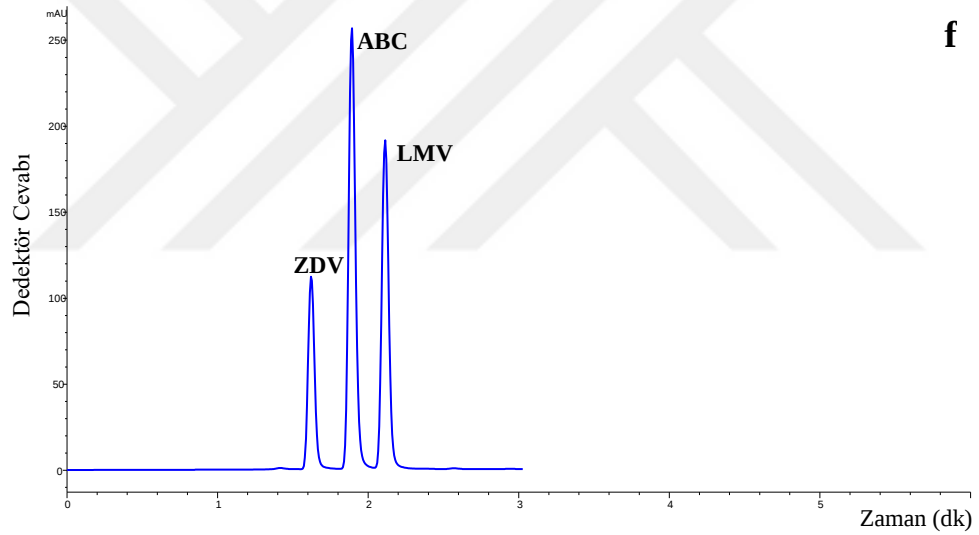
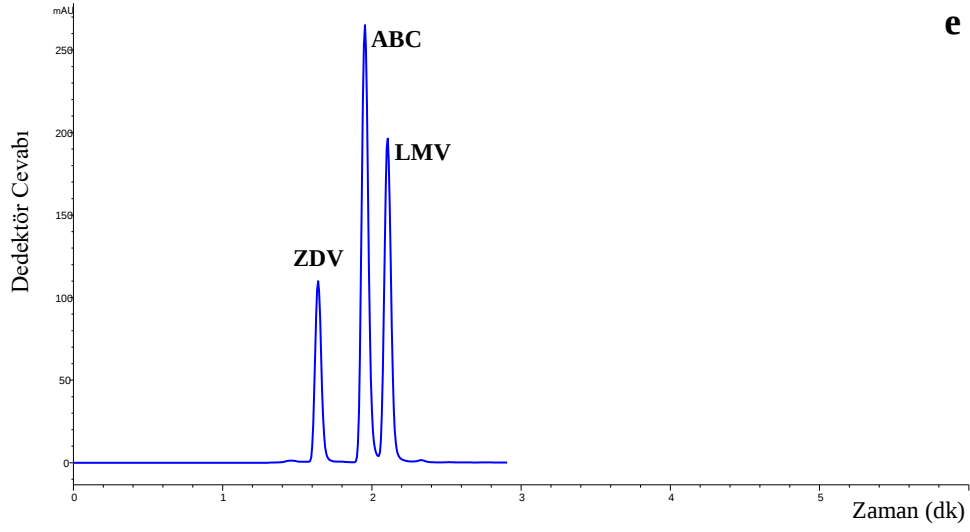
Tampon çözeltinin molaritesinin analize etkisini incelemek için hareketli faz bileşimi, kolon, sıcaklık ve akış hızı parametreleri sabit tutularak artan konsantrasyonlarda amonyum asetat tampon çözeltisi kullanılarak çalışmalar yapılmıştır.



Şekil 3.2. Kinetex HILIC (150 mm x 4,6 mm x 2,6 μm) kolon, 25 $^{\circ}\text{C}$, 1mL dk⁻¹ akış hızı pH:6,68, 280 nm dalga boyu, hareketli faz: ACN: Tampon- (5 mM) (a), (10 mM) (b), (20 mM) (c), (40 mM) (d), (50 mM) (e), (100 mM) (f) Amonyum asetat (h/h) (80/20) ile yapılan çalışmalara ait kromatogramlar



Şekil 3.2. (devam) Kinetex HILIC (150 mm x 4,6 mm x 2,6 μ m) kolon, 25 °C, 1mL dk⁻¹ akış hızı pH:6,68, 280 nm dalga boyu, hareketli faz: ACN: Tampon- (5 mM) (a), (10 mM) (b), (20 mM) (c), (40 mM) (d), (50 mM) (e), (100 mM) (f) Amonyum asetat (h/h) (80/20) ile yapılan çalışmalara ait kromatogramlar



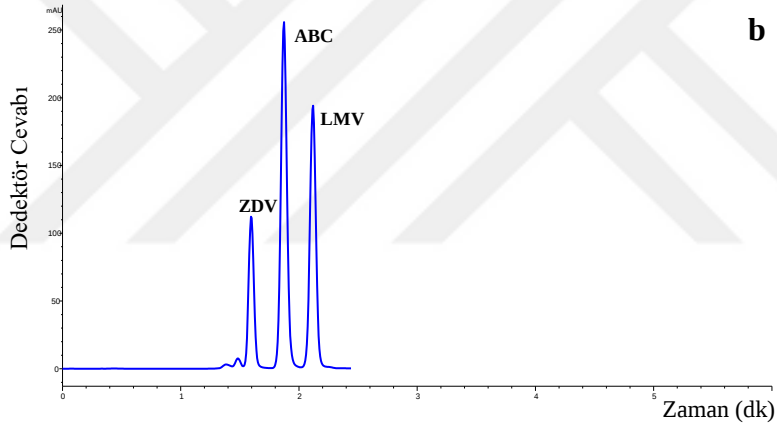
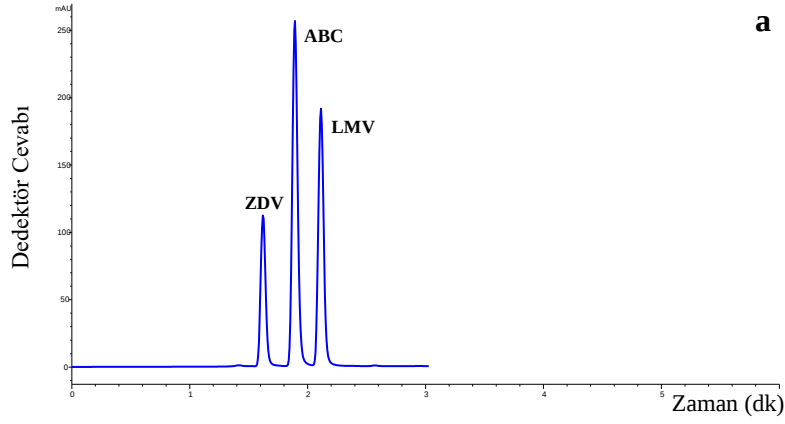
Şekil 3.2. (devam) Kinetex HILIC (150 mm x 4,6 mm x 2,6 μ m) kolon, 25 °C, 1mL dk⁻¹ akış hızı pH:6,68, 280 nm dalga boyu, hareketli faz: ACN: Tampon- (5 mM) (a), (10 mM) (b), (20 mM) (c), (40 mM) (d), (50 mM) (e), (100 mM) (f) Amonyum asetat (h/h) (80/20) ile yapılan çalışmalara ait kromatogramlar

Çizelge 3.2. Sistem uygunluk testlerine göre tampon çözelti molaritesinin karşılaştırılması

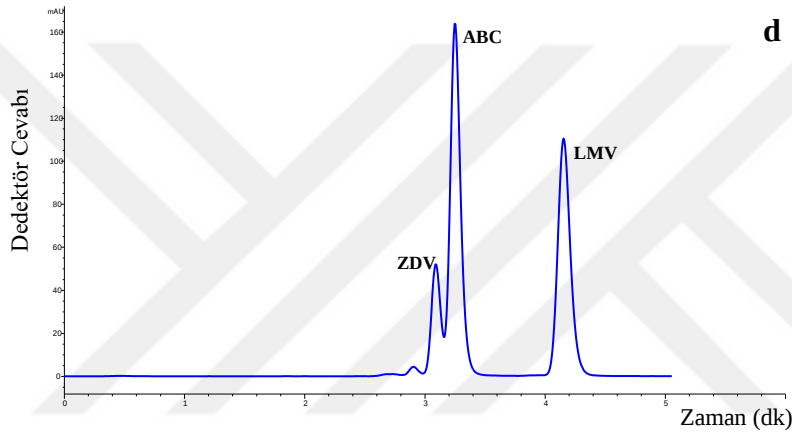
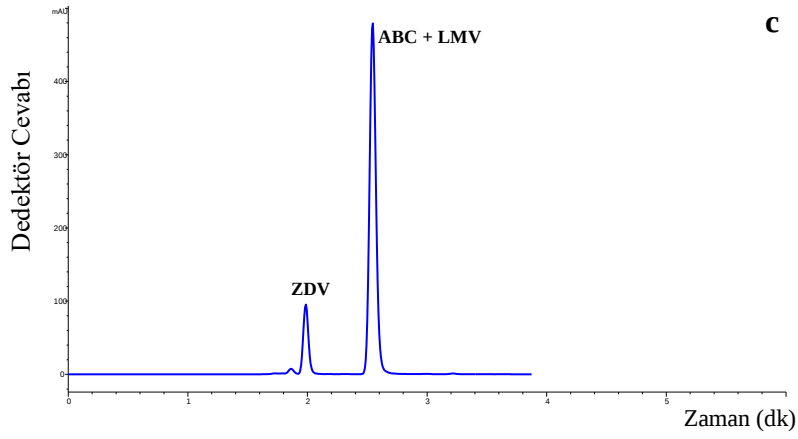
Tampon Çözelti Molaritesi	ZDV				ABC				LMV			
	t_R (dk)	N	R_S	α	t_R (dk)	N	R_S	α	t_R (dk)	N	R_S	α
5 mM	1,64	6871	-	-	2,02	7352	3,09	4,42	2,09	11487	1,12	0,91
10 mM	1,64	6721	-	-	2,03	8771	4,49	3,22	2,10	10699	1,09	1,14
20 mM	1,62	6757	-	-	1,98	10023	4,40	3,084	2,05	11038	1,26	1,192
40 mM	1,63	6774	-	-	1,96	8535	4,01	2,92	2,09	9727	1,54	1,26
50 mM	1,63	6657	-	-	1,95	8710	3,81	2,85	2,10	10178	1,81	1,31
100 mM	1,65	6548	-	-	2,00	7959	3,26	2,46	2,10	9921	2,61	1,48

3.1.1.3. Sabit Fazın Seçimi

Hareketli faz bileşimi ve tampon çözelti molaritesi belirlendikten sonra kolon (sabit faz) sıcaklığı, akış hızı ve enjeksiyon hacimleri sabit tutularak 4 farklı kolonda denemeler yapılmıştır. Bu kolonların özellikleri seçilirken partikül boyutunun, farklı paketleme materyallerinin ve kolon uzunluğunun analiz sonuçlarına etkisini inceleyebilmek esas alınmıştır.



Şekil 3.3. Kinetex HILIC (150 mm x 4,6 mm x 2,6 μm) kolon(a), Kinetex HILIC (150 mm x 4,6 mm x 5 μm) kolon(b), XBridge HILIC (150 mm x 4,6 mm x 2,5 μm) kolon(c), ZIC HILIC (250 mm x 4,6 mm x 5 μm) kolon(d), 25°C, 1mL dk⁻¹akış hızı, pH:6,68, 280 nm dalga boyu, hareketli faz: ACN: Tampon- 100 mM Amonyum asetat (h/h) (80/20) ile yapılan çalışmalara ait kromatogramlar



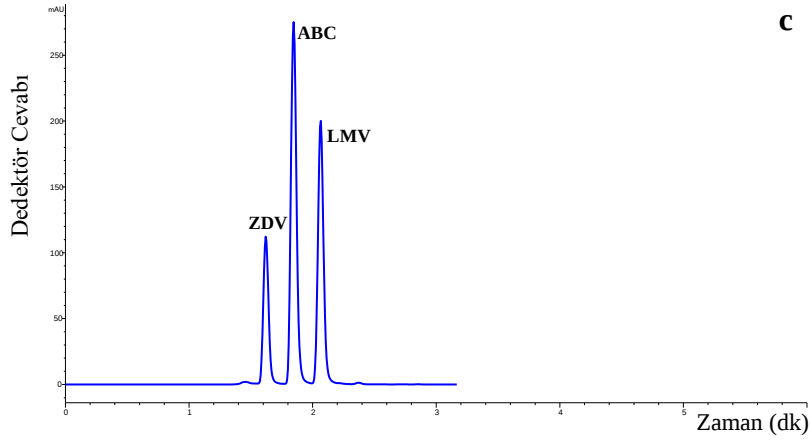
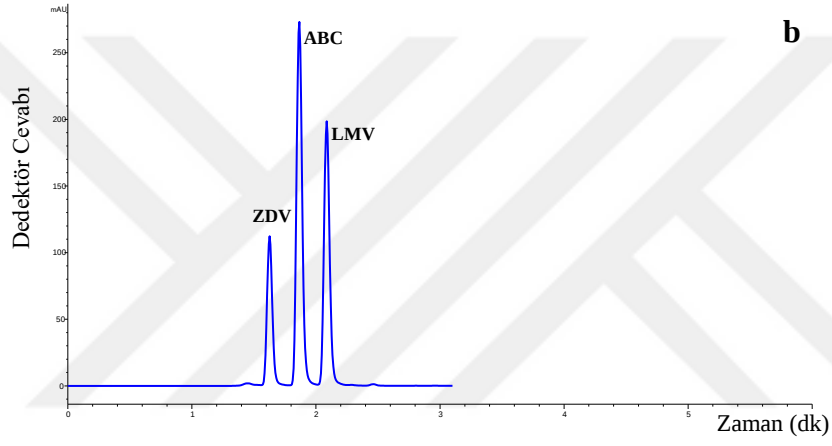
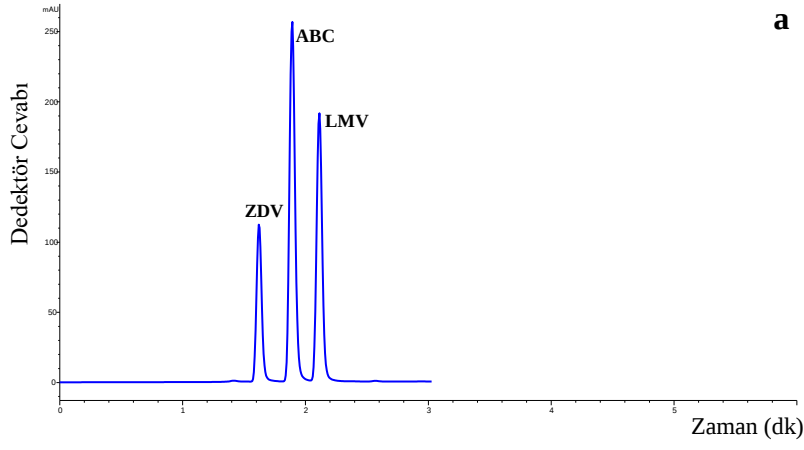
Şekil 3.3. (devam) Kinetex HILIC (150 mm x 4,6 mm x 2,6 μm) kolon(a), Kinetex HILIC (150 mm x 4,6 mm x 5 μm) kolon(b), XBridge HILIC (150 mm x 4,6 mm x 2,5 μm) kolon(c), ZIC HILIC (250 mm x 4,6 mm x 5 μm) kolon(d), 25°C, 1mL dk⁻¹ akış hızı, pH:6,68, 280 nm dalga boyu, hareketli faz: ACN: Tampon- 100 mM Amonyum asetat (h/h) (80/20) ile yapılan çalışmalara ait kromatogramlar

Çizelge 3.3. Sistem uygunluk testlerine göre kolonların karşılaştırılması

Kolon	B _{sıncı} (bar)	ZDV				ABC				LMV			
		t _R (dk)	N	R _S	α	t _R (dk)	N	R _S	α	t _R (dk)	N	R _S	α
Kinetex HILIC (150 mm x 4,6 mm x 2,6 μ m)	108	1,65	6548	-	-	2,00	7959	3,26	2,46	2,10	9921	2,61	1,48
Kinetex HILIC (150 mm x 4,6 mm x 5 μ m)	52	1,59	5977	-	-	1,87	6359	3,12	2,39	2,12	8489	2,63	1,51
XBridge HILIC (150 mm x 4,6 mm x 2,5 μ m)	110	1,98	9456	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ZIC HILIC (250 mm x 4,6 mm x 5 μ m)	89	3,09	6964	-	-	3,25	7010	1,05	1,44	4,15	7813	5,24	2,73

3.1.1.4. Kolon Sıcaklığının Belirlenmesi

HILIC yönteminin ayırım mekanizmasında sıcaklığın analiz sonuçlarına etkisini incelemek için deneysel tüm parametreler sabit tutularak artan sıcaklıklarda analizler yapılmıştır.



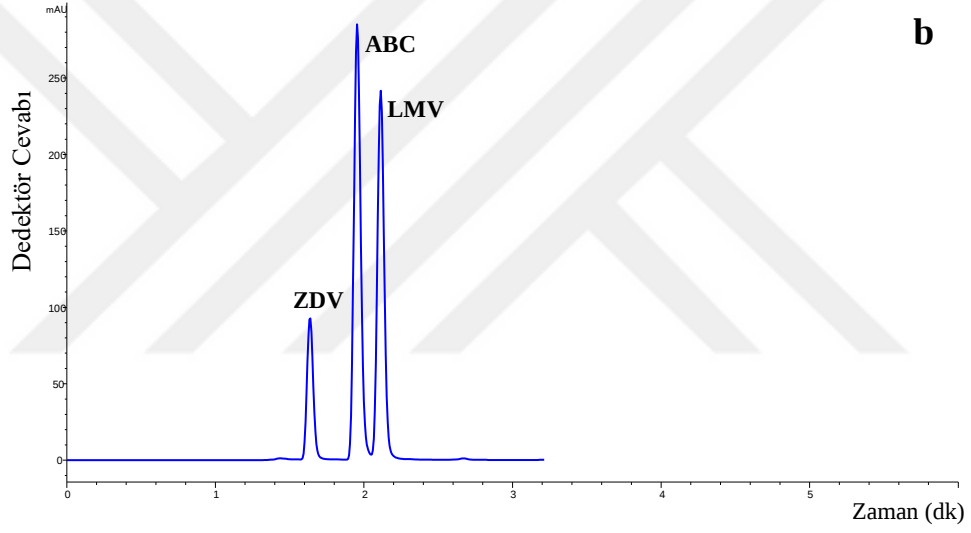
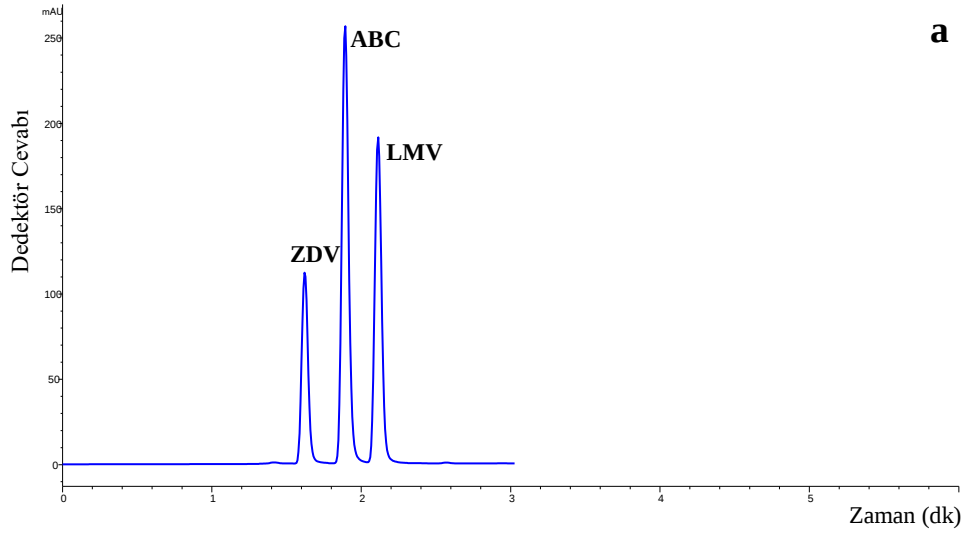
Şekil 3.4. Kinetex HILIC (150 mm x 4,6 mm x 2,6 μ m)kolon, 25°C (a), 35°C (b), 45°C (c) 1mL dk⁻¹ akış hızı, pH:6,68, 280 nm dalga boyu, hareketli faz: ACN: Tampon-100 mM Amonyum asetat (h/h) (80/20) ile yapılan çalışmalara ait kromatogramlar

Çizelge 3.4. Sistem uygunluk testlerine göre kolon sıcaklıklarının karşılaştırılması

Kolon Sıcaklığı	ZDV				ABC				LMV			
	t_R (dk)	N	R_S	α	t_R (dk)	N	R_S	α	t_R (dk)	N	R_S	α
25°C	1,65	6548	-	-	2,00	7959	3,26	2,46	2,10	9921	2,61	1,48
35 °C	1,65	6501	-	-	2,01	7809	2,94	2,41	2,10	9978	2,63	1,54
45 °C	1,64	6398	-	-	2,01	7866	2,86	2,40	2,09	10075	2,63	1,52

3.1.1.5. Farklı Tampon Çözeltilerin Analizleri

Daha önceki çalışmalarda tampon çözelti olarak amonyum asetat çözeltisi kullanılmıştır. Tez çalışmalarının bu aşamasında tampon çözelti türünün analiz sonuçlarına etkisini incelemek için tüm deneysel parametreler sabit tutularak amonyum asetat ve amonyum format çözeltileri ile analizler yapılmıştır.



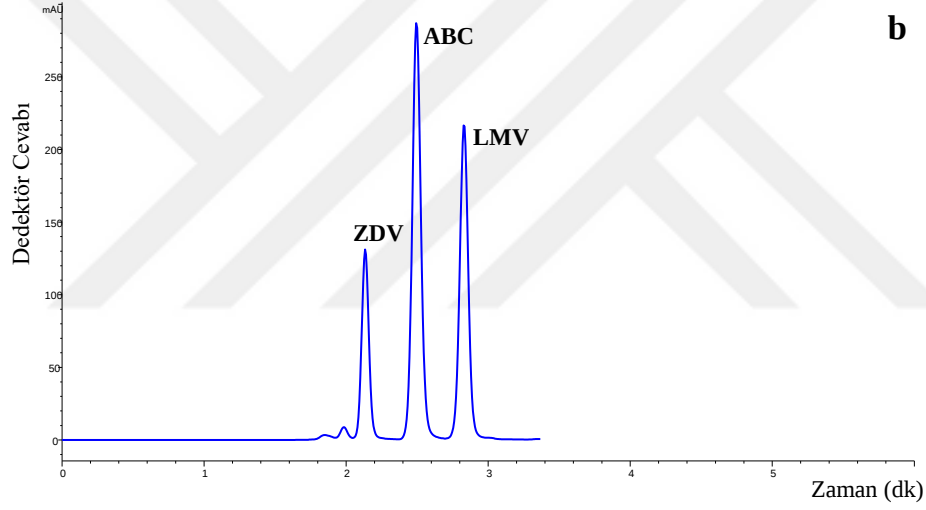
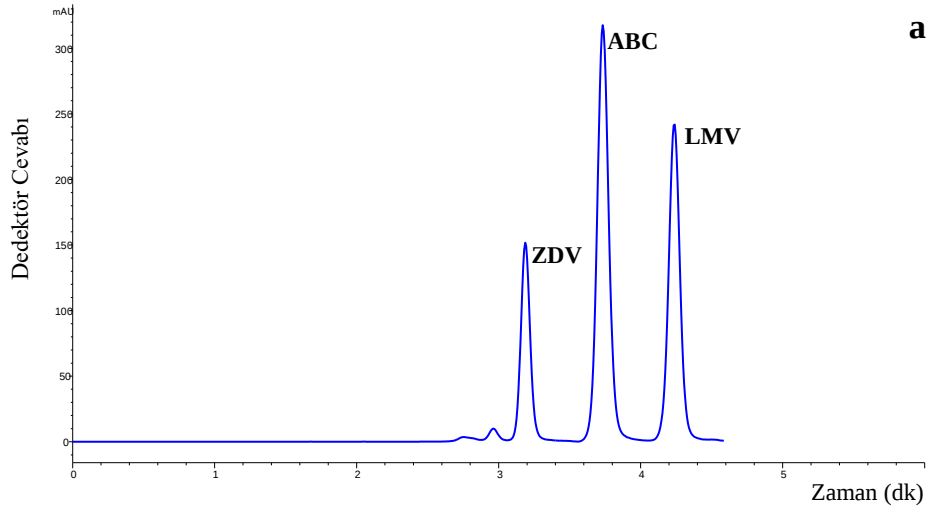
Şekil 3.5. Kinetex HILIC (150 mm x 4,6 mm x 2,6 μm) kolon, 1 mL dk^{-1} akış hızı, pH:6,68, 280 nm dalga boyu, hareketli faz: ACN: Tampon- 20 mM Amonyum asetat (a), 100 mM Amonyum format (b) (h/h) (80/20) ile yapılan çalışmalara ait kromatogramlar

Çizelge 3.5. Sistem uygunluk testlerine göre tampon çözelti türlerinin karşılaştırılması

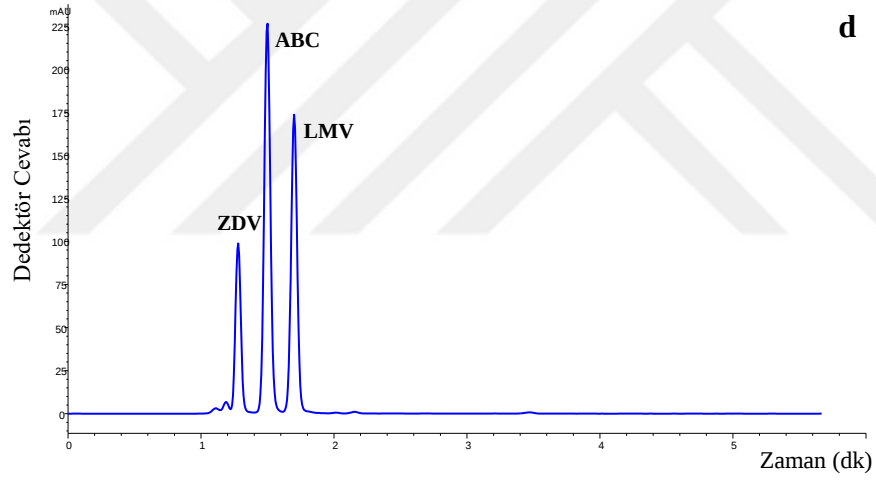
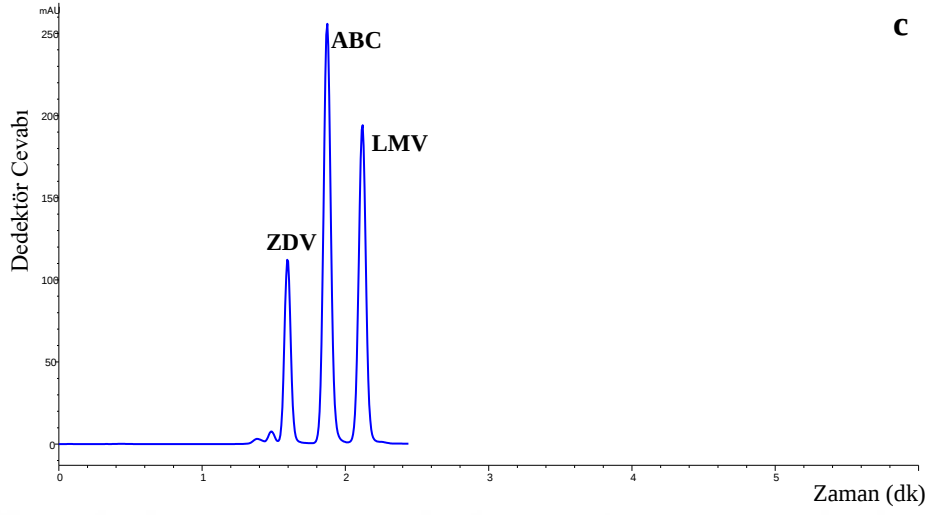
Tampon Çözelti	ZDV				ABC				LMV			
	t_R (dk)	N	R_S	α	t_R (dk)	N	R_S	α	t_R (dk)	N	R_S	α
Amonyum asetat	1,65	6548	-	-	2,00	7959	3,26	2,46	2,10	9921	2,61	1,48
Amonyum format	1,65	6621	-	-	2,05	7789	3,44	1,42	2,09	9875	2,09	1,42

3.1.1.6. Akış Hızı Optimizasyonu

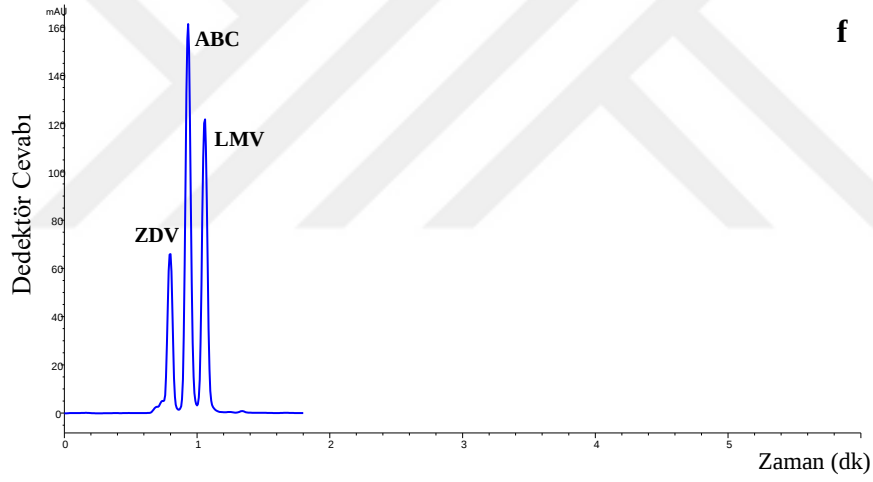
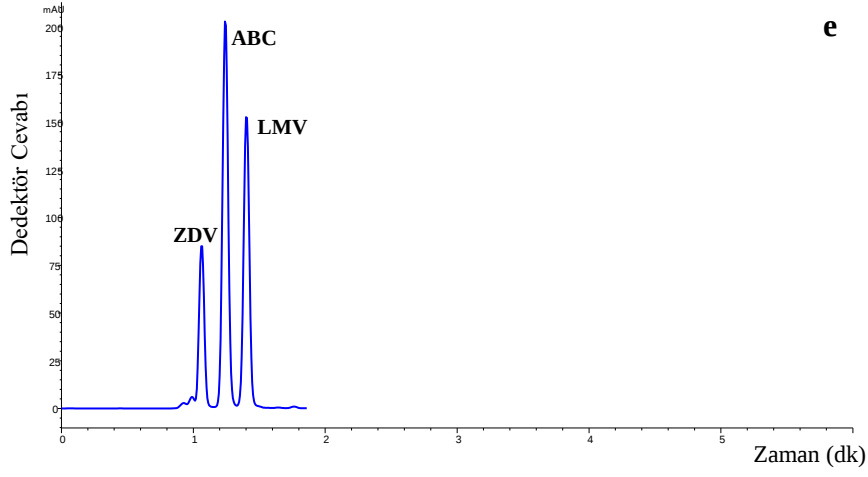
Sabit faz seçimi çalışmaları sonucunda Kinetex HILIC (150 mm x 4,6 mm x 5 μ m) kolonun 1 mL dk⁻¹ akış hızında diğer kolonlara göre daha düşük basınç değeri sağladığı görülmüştür. Analiz süresini kısaltabilmek için bu kolon da akış hızı denemeleri yapılmıştır.



Şekil 3.6. Kinetex HILIC (150 mm x 4,6 mm x 5 μ m)kolon, 0,5 mL dk⁻¹ (a), 0,75 mL dk⁻¹ (b), 1 mL dk⁻¹ (c), 1,25 mL dk⁻¹ (d), 1,5 mL dk⁻¹ (e), 2 mL dk⁻¹ (f) akış hızı, pH:6,68, 280 nm dalga boyu, hareketli faz: ACN: Tampon- 100 mM Amonyum asetat (h/h) (80/20) ile yapılan çalışmalara ait kromatogramlar



Şekil 3.6. (devam) Kinetex HILIC (150 mm x 4,6 mm x 5 μ m)kolon, 0,5 mL dk⁻¹ (a), 0,75 mL dk⁻¹ (b), 1 mL dk⁻¹ (c), 1,25 mL dk⁻¹ (d), 1,5 mL dk⁻¹ (e), 2 mL dk⁻¹ (f) akış hızı, pH:6,68, 280 nm dalga boyu, hareketli faz: ACN: Tampon- 100 mM Amonyum asetat (h/h) (80/20) ile yapılan çalışmalara ait kromatogramlar



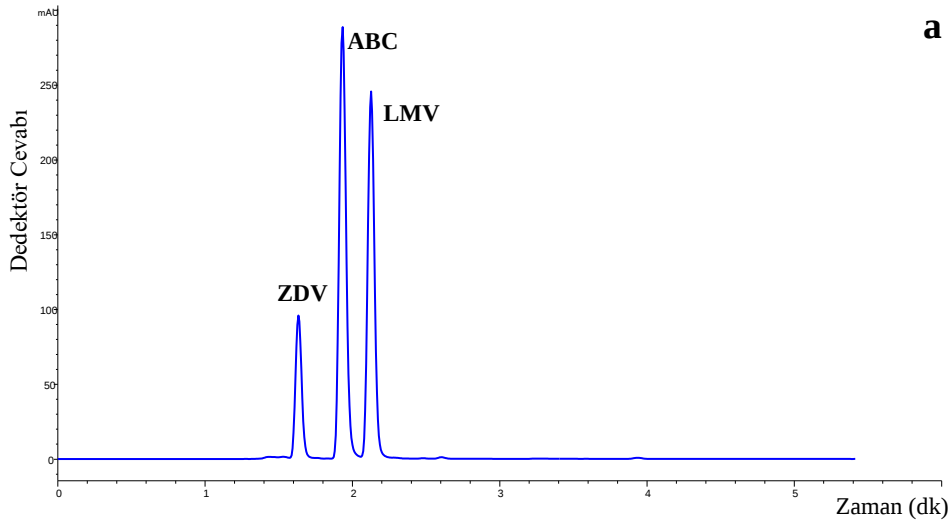
Şekil 3.6. (devam) Kinetex HILIC (150 mm x 4,6 mm x 5 μ m) kolon, 0,5 mL dk⁻¹ (a), 0,75 mL dk⁻¹ (b), 1 mL dk⁻¹ (c), 1,25 mL dk⁻¹ (d), 1,5 mL dk⁻¹ (e), 2 mL dk⁻¹ (f) akış hızı, pH:6,68, 280 nm dalga boyu, hareketli faz: ACN: Tampon- 100 mM Amonyum asetat (h/h) (80/20) ile yapılan çalışmalara ait kromatogramlar

Çizelge 3.6. Sistem uygunluk testlerine göre akış hızlarının karşılaştırılması

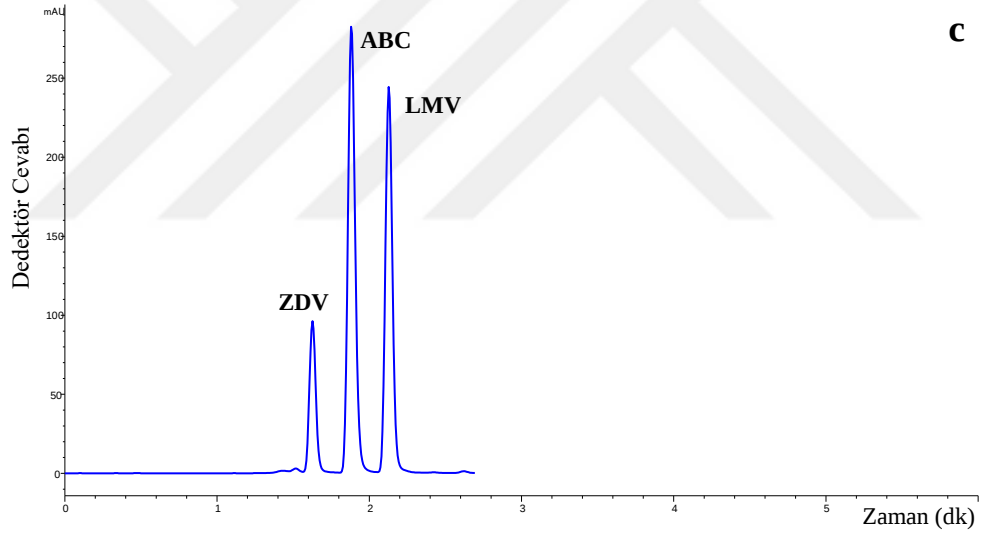
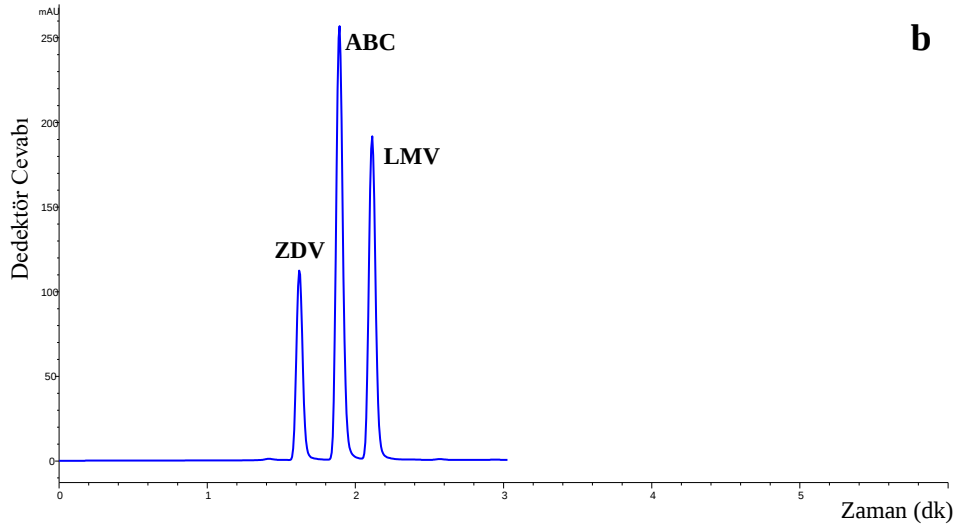
Akış hızı (mL dk ⁻¹)	ZDV				ABC				LMV			
	t _R (dk)	N	R _S	α	t _R (dk)	N	R _S	α	t _R (dk)	N	R _S	α
0,5	3,18	11659	-	-	3,73	10560	4,13	2,43	4,23	13957	3,47	1,54
0,75	2,13	8326	-	-	2,49	8363	3,55	2,37	2,82	10884	3,06	1,53
1	1,59	5977	-	-	1,87	6359	3,12	2,39	2,12	8489	2,63	1,51
1,25	1,28	4128	-	-	1,50	4814	2,85	2,37	1,70	6591	2,23	1,51
1,5	1,06	2873	-	-	1,24	3742	2,28	2,37	1,4	4537	1,98	1,51
2	0,79	2027	-	-	0,93	2380	1,83	2,39	1,05	3061	1,63	1,53

3.1.1.7. pH Belirleme Çalışmaları

Belirlenen tampon çözelti, kolon, akış hızı, sıcaklık optimizasyonundan sonra tampon çözelti pH'sının analiz sonucuna etkisi incelenmiştir. Tampon çözeltinin pH'sı asetik asit ile 5,50'a ayarlanarak ve sodyum hidroksit ile 7,78'e ayarlanarak pH deneme çalışmaları yapılmıştır.



Şekil 3.7. Kinetex HILIC (150 mm x 4,6 mm x 2,6 µm)kolon, 1 mL dk⁻¹ akış hızı, pH:5,50 (a), pH:6,68 (b), pH:7,8 (c), 280 nm dalga boyu, hareketli faz: ACN: Tampon-100 mM Amonyum asetat (h/h) (80/20) ile yapılan çalışmalara ait kromatogramlar



Şekil 3.7. (devam) Kinetex HILIC (150 mm x 4,6 mm x 2,6 μ m) kolon, 1 mL dk⁻¹ akış hızı, pH:5,50 (a), pH:6,68 (b), pH:7,8 (c), 280 nm dalga boyu, hareketli faz: ACN: Tampon- 100 mM Amonyum asetat (h/h) (80/20) ile yapılan çalışmalara ait kromatogramlar

Çizelge 3.7. Sistem uygunluk testlerine göre pH değerlerinin karşılaştırılması

pH	ZDV				ABC				LMV			
	t_R (dk)	N	R_S	α	t_R (dk)	N	R_S	α	t_R (dk)	N	R_S	α
5,50	1,63	6395	-	-	1,93	7558	3,61	2,63	2,12	9823	2,26	1,40
6,68	1,65	6548	-	-	2,00	7959	3,26	2,46	2,10	9921	2,61	1,48
7,78	1,62	6452	-	-	1,89	7524	3,04	2,42	2,13	9879	2,83	1,56

Optimizasyon çalışmaları sonucu optimize edilen koşullar Çizelge 3.8’ de verilmiştir.

Çizelge 3.8. Optimize edilen koşullar

Parametre	Optimize Edilen Koşullar
Kolon	Kinetex HILIC (150 mm x 4,6 mm x 2,6 μ m)
Hareketli faz bileşimi	ACN: Tampon- 100 mM Amonyum asetat (h/h) (80/20)
pH	6,68
Sıcaklık ($^{\circ}$ C)	25 $^{\circ}$ C
Akış hızı (mL dk ⁻¹)	1 mL dk ⁻¹
Enjeksiyon hacmi (μ L)	10 μ L
Dalga boyu (nm)	280 nm

3.1.2. Sistem Uygunluk Testlerinin Sonuçları

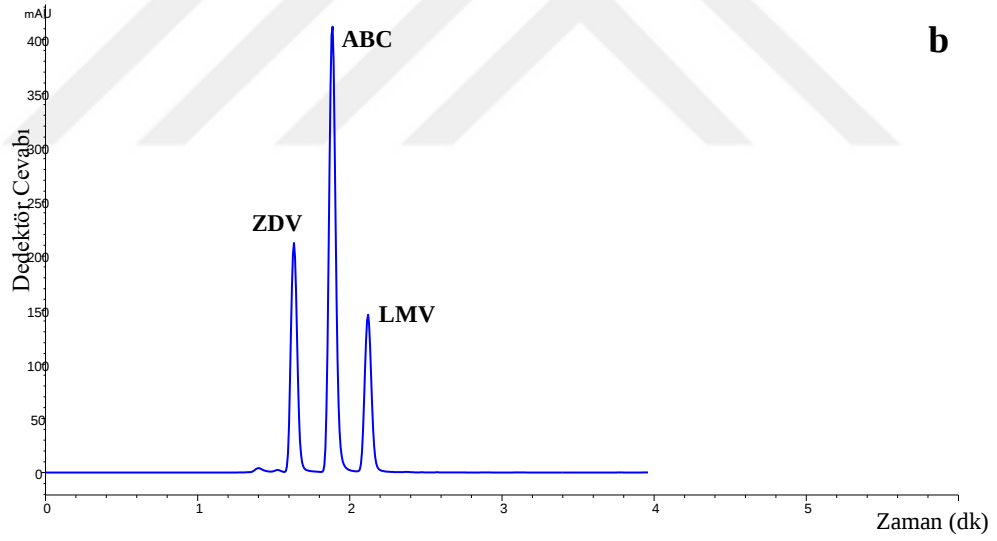
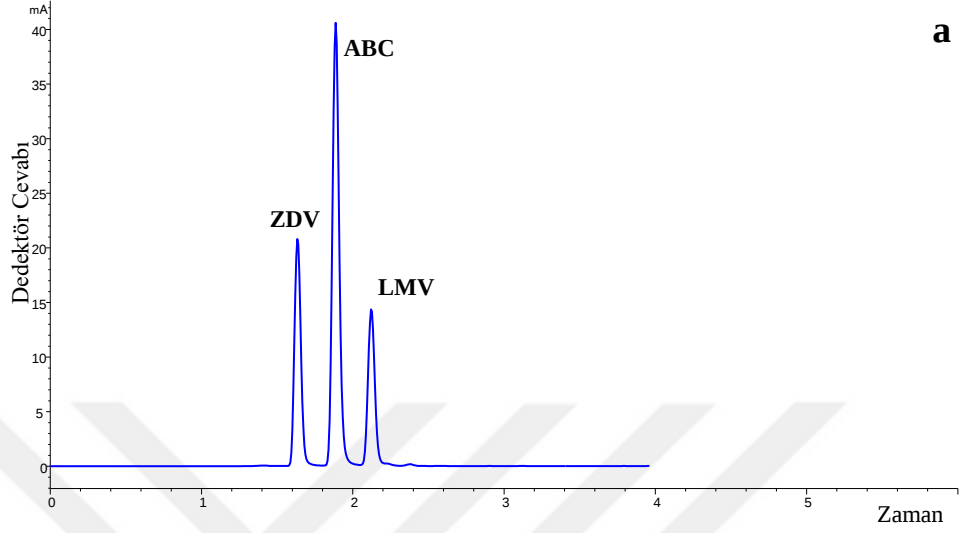
Geliştirilen HILIC yöntemi YBSK-FDD (Fotodiyot dizi dedektörü) sistemine enjekte edilmiştir. SUT parametreleri optimize edilen koşullarda hesaplanmış ve Çizelge 3.9’da verilmiştir.

Çizelge 3.9. SUT parametreleri

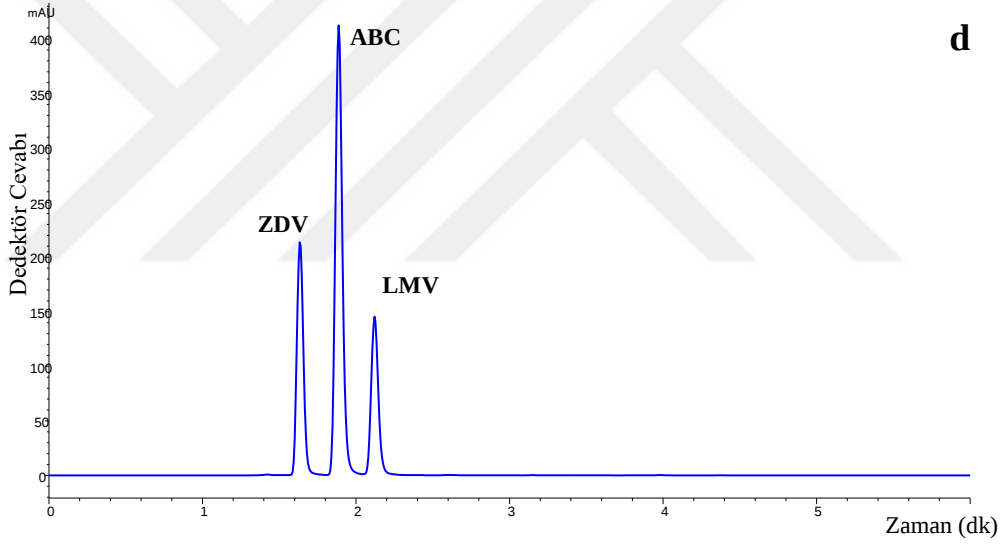
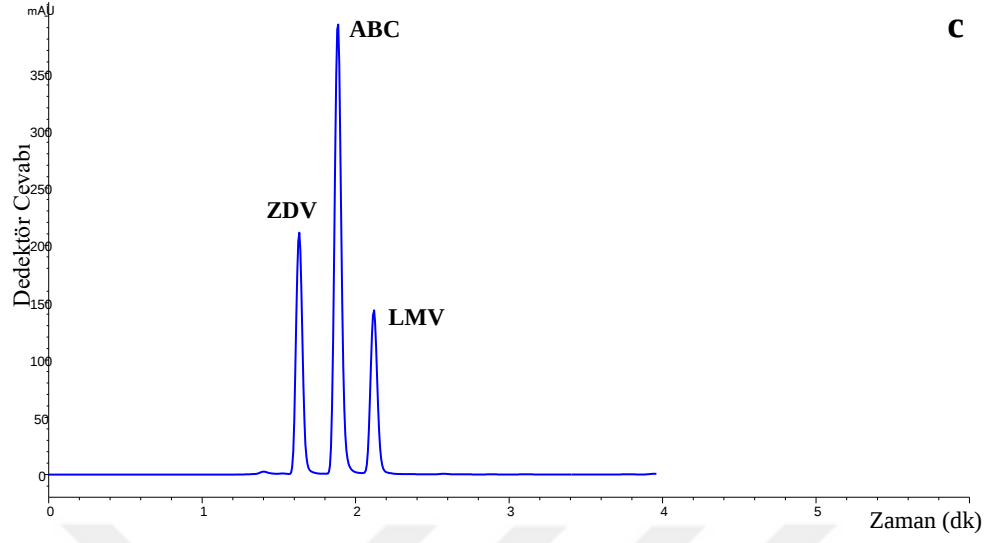
Parametre	ZDV	ABC	LMV
Alıkonma zamanı (t_R)	1,65	2,00	2,10
Kapasite faktörü (k)	0,14	0,38	0,45
Ayrım Gücü (R_S)	-	3,26	2,61
Kolon etkinliği (N)	6548	7959	9921
Seçicilik (α)	-	2,46	1,48
Kuyruklanma faktörü (T)	0,71	0,88	0,90

3.1.3. Hızlandırılmış Bozundurma Çalışmalarına Ait Sonuçlar

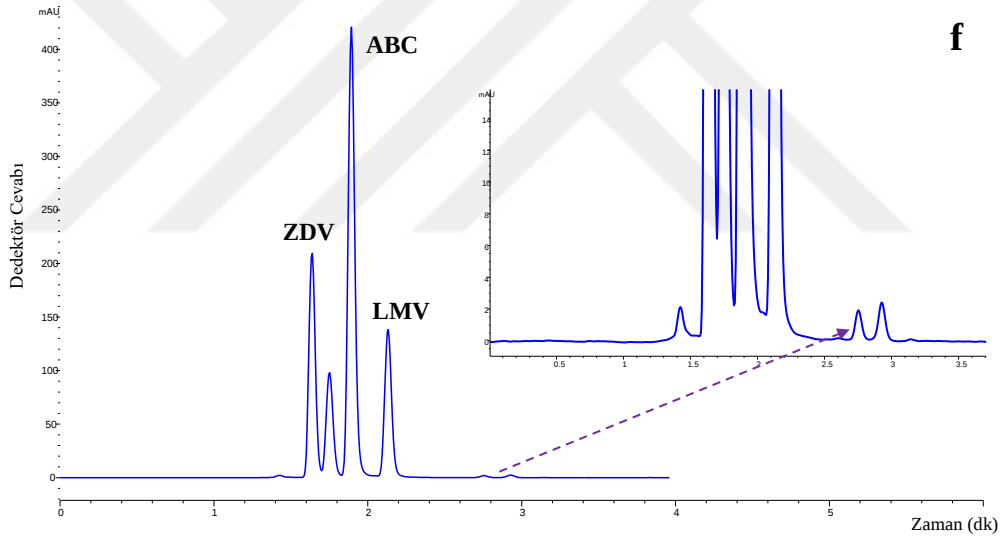
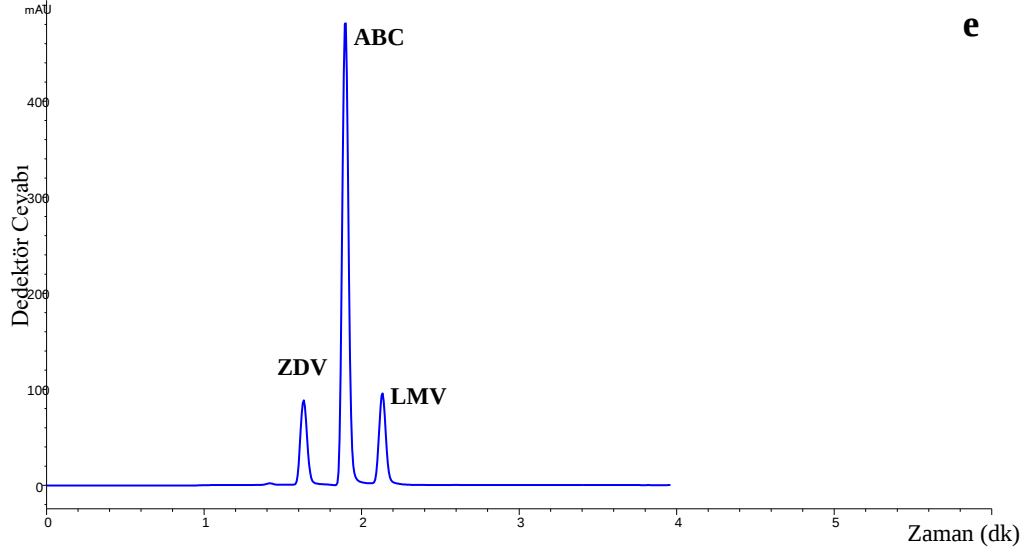
Yöntem kalibrasyonu çalışmalarından sonra yöntemin seçiciliğini belirleyebilmek için TRİZİVİR® tablet formu üzerinden hızlandırılmış bozundurma çalışmaları yapılmıştır. Bozundurma çalışmaları tabletlerin ezilerek toz hale getirilmesinden sonra belirli koşullara tabi tutularak yapılmıştır. Bu koşullar tablet çözeltisinin 0,1 N HCl ile asit hidrolizi, 0,1 N NaOH ile baz hidrolizi, % 0,3' lük H₂O₂ ile oksidasyon, toz maddenin 254 nm UV ışık altında bekletilmesi, toz maddenin 80 °C' de etüv içerisinde bekletilmesi ve tablet çözeltisinin 80 °C' de sıcak su banyosunda bekletilmesidir. Sonuçlar bozundurulmamış 50 µg mL⁻¹ LMV'ye eşdeğer tablet çözeltisi ile karşılaştırılmış ve yüzde bozunma olarak hesaplanmıştır. Hızlandırılmış bozundurma çalışmaları sonucunda muhtemel bozunma ürünleri ile birlikte etken maddelerinin eş zamanlı olarak analizinin yapılabileceği görülmüştür.



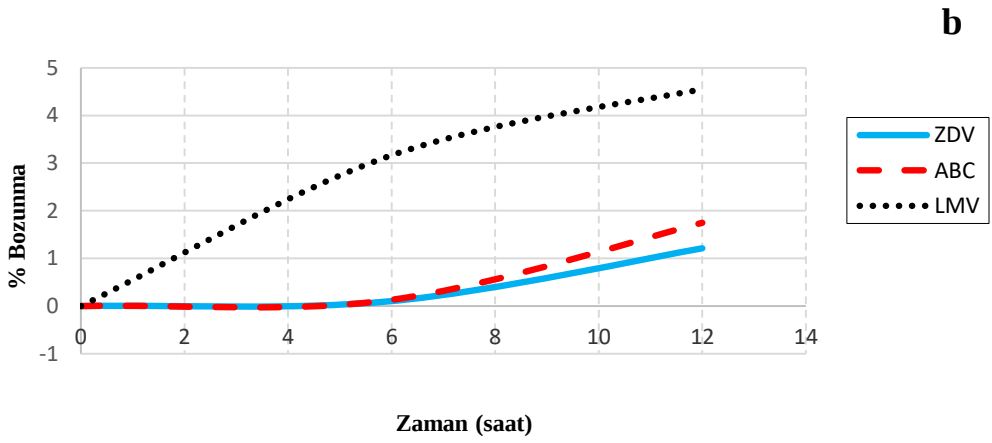
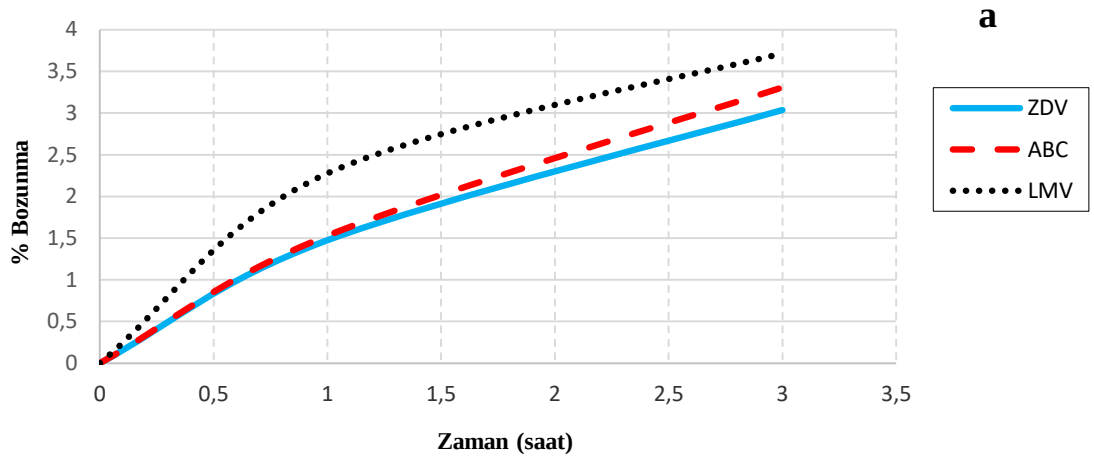
Şekil 3.8. Bozundurma koşulları: 3 saat sıcak su banyosunda bekletme (a), 6 saat UV ışık altında bekletme (b), 12 saat etüvde bekletme (c), 12 saat 0,1 N HCl ile asit hidrolizi (d), 12 saat 0,1 N NaOH ile baz hidrolizi (e), 12 saat % 0,3' lük H_2O_2 ile oksidasyon (f) analizlerine ait kromatogramlar



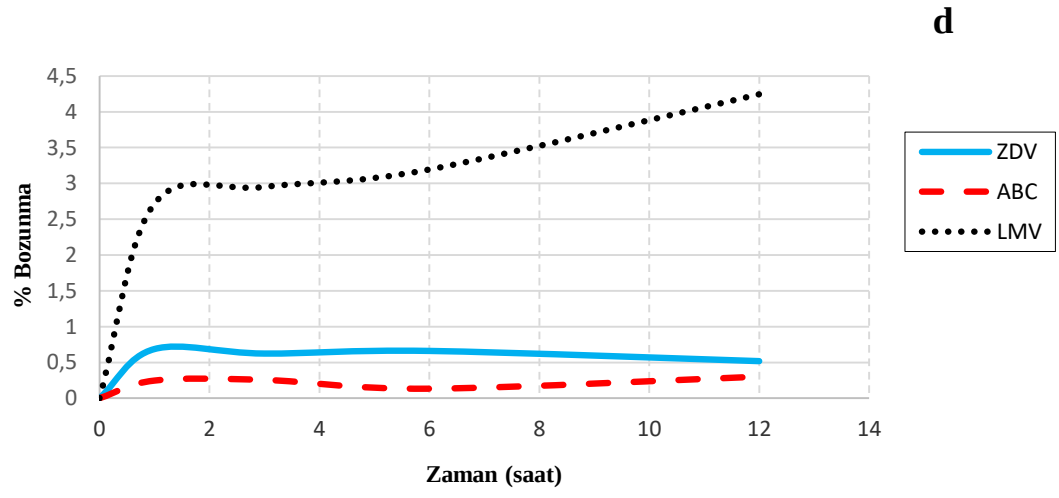
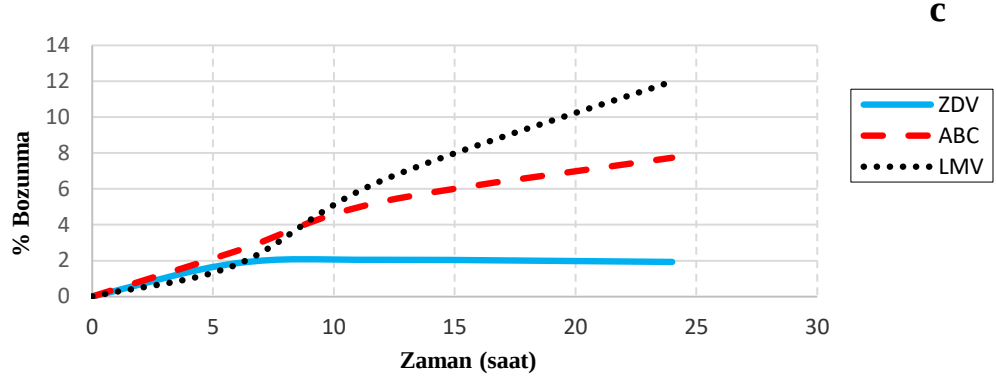
Şekil 3.8. (devam) Bozundurma koşulları: 3 saat sıcak su banyosunda bekletme (a), 6 saat UV ışık altında bekletme (b), 12 saat etüvde bekletme (c), 12 saat 0,1 N HCl ile asit hidrolizi (d), 12 saat 0,1 N NaOH ile baz hidrolizi (e), 12 saat % 0,3' lük H_2O_2 ile oksidasyon (f) analizlerine ait kromatogramlar



Şekil 3.8. (devam) Bozundurma koşulları: 3 saat sıcak su banyosunda bekletme (a), 6 saat UV ışık altında bekletme (b), 12 saat etüvde bekletme (c), 12 saat 0,1 N HCl ile asit hidrolizi (d), 12 saat 0,1 N NaOH ile baz hidrolizi (e), 12 saat % 0,3' lük H_2O_2 ile oksidasyon (f) analizlerine ait kromatogramlar

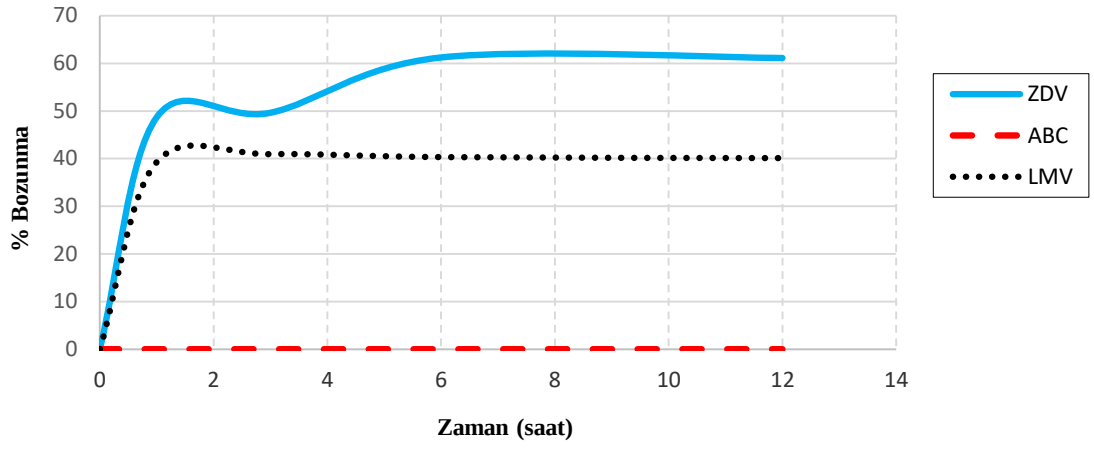


Şekil 3.9. Bozunma koşullarında zamana bağlı olarak etken maddelerin % bozunma grafikleri; sıcak su banyosunda bekletme (a), UV ışık altında bekletme (b), 80 °C etüvde bekletme (c), 0,1 N HCl ile asit hidrolizi (d), 0,1 N NaOH ile baz hidrolizi (e), % 0,3' lük H_2O_2 ile oksidasyon (f)

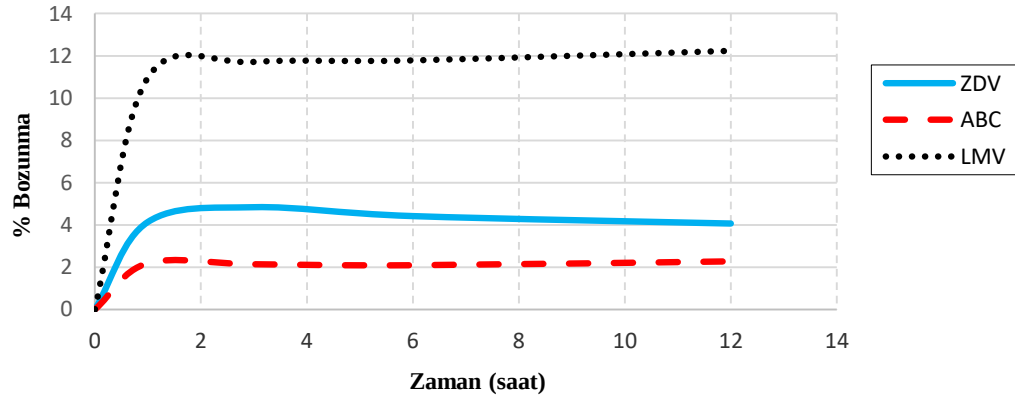


Şekil 3.9. (devam)Bozunma koşullarında zamana bağlı olarak etken maddelerin % bozunma grafikleri; sıcak su banyosunda bekletme (a), UV ışık altında bekletme (b), 80 °C etüvde bekletme (c), 0,1 N HCl ile asit hidrolizi (d), 0,1 N NaOH ile baz hidrolizi (e), % 0,3' lük H₂O₂ ile oksidasyon (f)

e



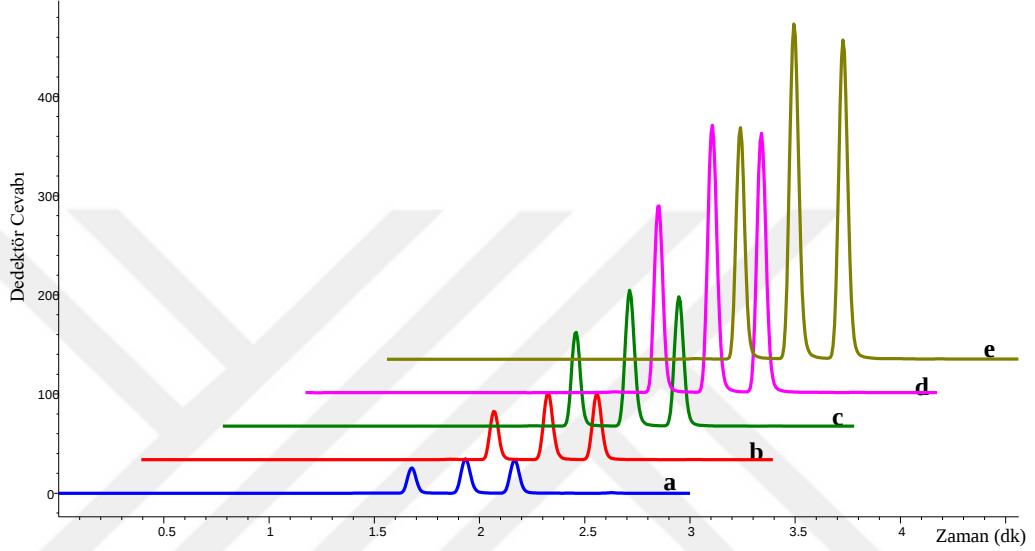
f



Şekil 3.9. (devam)Bozunma koşullarında zamana bağlı olarak etken maddelerin % bozunma grafikleri; sıcak su banyosunda bekletme (a), UV ışık altında bekletme (b), 80 °C etüvde bekletme (c), 0,1 N HCl ile asit hidrolizi (d), 0,1 N NaOH ile baz hidrolizi (e), % 0,3' lük H_2O_2 ile oksidasyon (f)

3.1.4. Kalibrasyon Çalışmalarına Ait Sonuçlar

Tez çalışmalarının bu aşamasında her bir etken madde artan konsantrasyonlarda hazırlanıp sisteme enjekte edilmiştir. Analiz sonuçları ile kalibrasyon eğrileri oluşturulmuş ve yöntem validasyonu gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.10. Kalibrasyon sonuçları; Piklerin geliş sırasıyla ZDV, ABC ve LMV için 5 (a), 10 (b), 20 (c), 40 (d), 50 (e) $\mu\text{g mL}^{-1}$

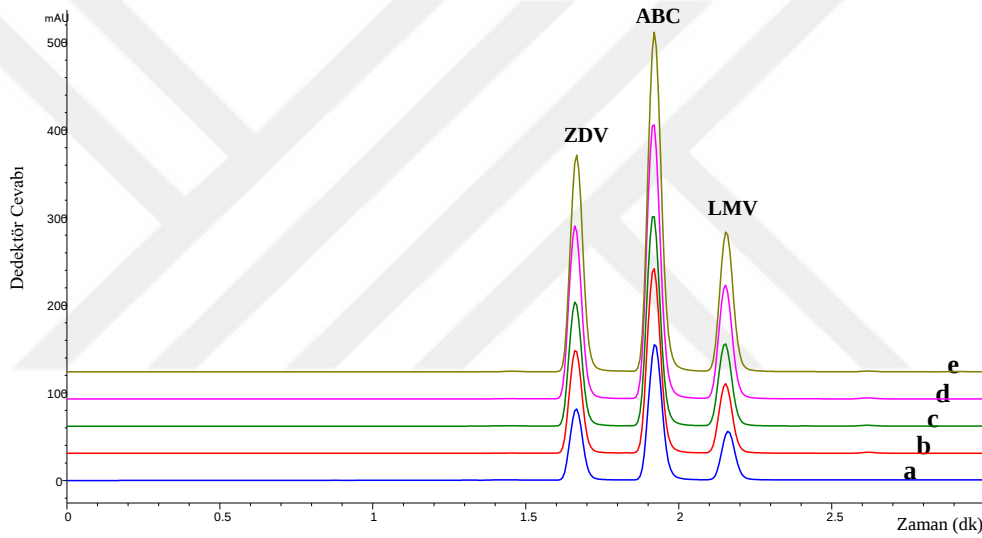
Çizelge 3.10. Kalibrasyon hesapları sonucunda bulunan validasyon parametreleri

Validasyon Parametresi	ZDV	ABC	LMV
Doğrusal aralık ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,5-100	0,5-100	0,5-100
Eğim	12,86	22,70	17,31
Kesişim	-4,04	1,65	-0,41
Korelasyon katsayısı	0,999	0,999	0,999
Eğimin standart hatası	0,045	0,09	0,062
Kesişimin standart hatası	2,38	4,32	3,14
Teşhis sınırı ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,04	0,03	0,02
Tayin alt sınırı ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,12	0,09	0,08
Gün içi tekrar edilebilirlik % BSS*	1,15	0,92	0,77
Günler arası tekrar edilebilirlik % BSS*	0,83	1,17	0,65

*5 tekrarlı analiz sonuçlarıdır

3.1.3. Geri Kazanım Çalışmalarına Ait Sonuçlar

Yöntem optimizasyonu ve validasyonu tamamlandıktan sonra yöntem üç etken maddenin bir arada bulunduğu TRİZİVİR® tablet numunesi analizleri için de kullanılmıştır. Bu çalışmalar standart maddelerin artan miktarlarda TRİZİVİR® tablet üzerine (Şekil 3.11) in-vitro olarak ilave edilmesiyle yapılmıştır. Geri kazanım çalışmalarına ait sonuçlar standart maddelerin kalibrasyon denklemlerinde yerlerine yerleştirilerek hesaplanmıştır. Geri kazanım çalışmalarının sonuçları Çizelge 3.11’de verilmiştir.



Şekil 3.11. Optimize edilen koşullarda tablet numunesi (a), tablet numunesi üzerine eklenen % 25 oranında etken madde ilavesi (b), tablet numunesi üzerine eklenen % 50 oranında etken madde ilavesi (c), tablet numunesi üzerine eklenen % 100 oranında etken madde ilavesi (d), tablet numunesi üzerine eklenen % 150 oranında etken madde ilavesi (e) ile yapılan analiz sonuçlarına ait kromatogramlar

Çizelge 3.11. Geri kazanım çalışmalarına ait sonuçlar

	ZDV	ABC	LMV
Bilinen miktar ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	20	20	10
Bulunan miktar ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	19,84	19,5	10,1
BSS (%) [*]	0,31	0,24	0,42
BH (%)	0,8	2,5	1,0
İlave edilen miktar ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	5	5	2,5
Bulunan miktar ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	4,9	5,12	2,4
Geri kazanım (%)	98,0	102,4	96,0
Geri kazanıma ait BSS (%) [*]	0,46	0,79	0,83
Geri kazanıma ait BH (%)	2,0	-2,4	-4,0

^{*}5 tekrarlı analiz sonuçlarıdır

4. TARTIŞMA

1970’li yıllarda karbonhidratların analizleriyle başlayan HILIC yöntemi zaman içerisinde nükleositlerin, insan ve bitki metabolitlerinin ve proteinlerinde analizlerinde kullanılmaya başlandı. 1990’lı yıllara gelindiğinde HILIC yönteminin polar bileşiklerin ayrımında etkili olduğu anlaşıldı.

Polar olan ilaç etken maddelerini ters faz yada normal faz sıvı kromatografi yöntemleriyle analiz etmek zordur. Çünkü polar bileşikler için normal faz yönteminde kullanılan çözücüler uygun değilken ters faz yönteminde ise sabit fazın hareketli faza göre daha apolar olmasından dolayı bileşikler kolonda tutunamadan çıkmaktadır.

Abakavir, lamivudin ve zidovudin etken maddelerinin analizleri için öncelikleri kimyasal özelliklerine bakılmıştır. Bu etken maddelerin polarite değerini belirten pK değerleri incelendiğinde analizlerinde, HILIC yönteminin uygulanabileceğine karar verilmiştir. Üç etken maddenin HILIC yöntemiyle eş zamanlı analizi için en uygun kromatografik koşulların belirlenmesine öncelikle hareketli fazdaki organik çözücü ve tampon yüzdelерinin belirlenmesiyle başlanmıştır. Literatür araştırmaları sonucu tampon çözelti olarak amonyum asetat ve karakteristik özelliklerinde dolayı organik çözücü olarak asetonitrile karar verilmiştir. Başlangıçta 20 mM olarak hazırlanan amonyum asetat çözeltisi ile saf asetonitril gradiyent olarak sisteme verilmiştir. Asetonitril yüzdesi sırasıyla 80, 85, 88, 90, 92, 95, 98 oranlarında denenmiştir. Analizler sonucu artan asetonitril oranı ile analiz süresinin, ayırım gücünün ve kolon etkinliğinin arttığı görülmüştür (Çizelge 3.1.). Ayrıca organik çözücü yüzdesinin artması ile analiz süresinin uzaması arasındaki ilişkinin ters faz sıvı kromatografi yönteminde olduğu gibi HILIC yönteminde de geçerli olduğu görülmüştür.

Tampon çözelti molaritesinin analiz sonucuna etkisini inceleme çalışmaları 5, 10, 20, 40, 50 ve 100 mM olarak hazırlanan amonyum asetat tampon çözeltilerinin yüzde 20 sisteme enjekte edilmesiyle yapılmıştır. Analiz sonuçları incelendiğinde (Çizelge 3.2.) konsantrasyon miktarı arttıkça analiz süresi değişmeksizin abakavir ve lamivudin etken maddelerinin birbirinde daha iyi ayrıldığı anlaşılmıştır.

HILIC yöntemi analizlerinde hareketli fazın su içeriği % 2 ile % 30 oranında değişebilmektedir. Tez çalışmamız sırasında tampon çözeltinin oranı % 30'a kadar arttırılmış fakat bu değerlerde pik şekilleri bozulmuş ve piklerde kuyruklanmalar başlamıştır.

Tampon çözelti molaritesi ve organik çözücü ile tampon çözelti yüzdelerinin belirlenmesi çalışmaları sonucunda hem kabul edilebilir değerlerde ayırım sağlamak hem de daha az organik atık kullanmak amacıyla hareketli faz bileşimi asetonitril: 100 mM-amonyum asetat (80:20,h/h) olarak belirlenmiştir.

Geliştirilen yöntemde hareketli faz bileşimi ve tampon çözelti molaritesi belirlendikten sonra kolon (sabit faz) sıcaklığı, akış hızı ve enjeksiyon hacimleri sabit tutularak 4 farklı kolonda denemeler yapılmıştır. Bu kolonların özellikleri seçilirken partikül boyutunun, farklı paketleme materyallerinin ve kolon uzunluğunun analiz sonuçlarına etkisini inceleyebilmek esas alınmıştır.

Geliştirilen HILIC yönteminde dört farklı sabit faz (kolon) denenmiştir. Kolon denemeleri öncelikle kolon dolgu maddelerinin tanecik boyutunun analiz sonuçlarına etkisinin karşılaştırılmasıyla başlamıştır. Kinetex HILIC (150 mm x 4,6 mm x 2,6 μ m) ve Kinetex HILIC (150 mm x 4,6 mm x 5 μ m) kolonları denenmiştir. 2,6 μ m tanecik boyutuna sahip kolonda, hareketli fazın sabit faz ile etkileşim alanı büyüdüğü için kolon etkinliği ve hareketli fazın belirli bir hızla geçebilmesi için sistem basıncının arttığı görülmüştür (Çizelge 3.3). Bir sonraki denemede Kinetex HILIC (150 mm x 4,6 mm x 2,6 μ m) kolon ile XBridge (150 mm x 4,6 mm x 2,5 μ m) kolon karşılaştırılmıştır. Bu deneme sonucu, kolon boyutlarının aynı olması durumunda bile kolon paketleme materyallerinin farklı olmasının analizi süresini ve ayırımı nasıl

etkilediği görülmüştür (Çizelge 3.3). Daha sonra farklı boyutlara ve paketleme malzemelerine sahip ZIC HILIC (250 mm x 4,6 mm x 5 μ m) kolon denenmiş ve analizler için en uygun kolonun Kinetex HILIC (150 mm x 4,6 mm x 2,6 μ m) veya Kinetex HILIC (150 mm x 4,6 mm x 5 μ m) olabileceği anlaşılmıştır.

Ters faz yönteminde kolon sıcaklığının değişmesi analiz süresi, pik şekli gibi parametrelere etki ederken HILIC yönteminde bu etki görülmemektedir. Çünkü ters faz yönteminin mekanizmasında sıcaklık değişimlerinin etkisi entalpi ile açıklanırken HILIC yönteminin mekanizmasında sıcaklık değişimlerinin etkisi entropi ile açıklanmaktadır. Kolon sıcaklığı denemeleri 25 °C, 35 °C ve 45 °C’de yapılmıştır. Analizler sonucu üç değerde de aynı analiz süresi ve birbirine yakın değerlerde ayırım gücü ve etkinlik sağladığı görülmüştür (Çizelge 3.4). Fazladan enerji harcamamak için kolon sıcaklığına 25 °C olarak karar verilmiştir.

HILIC yönteminde en çok kullanılan tampon çözeltiler amonyum asetat ve amonyum format tampon çözeltileridir. Optimizasyon aşamasında amonyum asetat ile yapılan çalışmalar amonyum format içinde tekrarlanmıştır. Aynı deneysel koşullarda amonyum asetat çözeltisinin kullanılması amonyum format çözeltisine göre daha iyi ayırım sağladığı için (Çizelge 3.5.) tampon çözelti olarak amonyum asetatın kullanılmasına devam edilmiştir.

Kolon denemeleri sırasında 1 mL dk⁻¹ akış hızında yapılan deneylerde Kinetex HILIC (150 mm x 4,6 mm x 2,6 μ m) kolonda 108 bar basınç gözlenirken Kinetex HILIC (150 mm x 4,6 mm x 5 μ m) kolonda 52 bar basınç gözlenmiştir. Akış hızı arttırılarak analiz süresinin kısaltılması düşünülmüş ve Kinetex HILIC (150 mm x 4,6 mm x 5 μ m) kolonda 0,5, 0,75, 1, 1,25, 1,5 ve 2 mL dk⁻¹ akış hızlarında denemeler yapılmıştır. SUT parametrelerinin kabul değerleride dikkate alındığında 2 mL dk⁻¹ hızında 1,05 dakika gibi kısa bir sürede üç maddeninde analiz edilebileceği görülmüştür. Fakat çalışmaların bir sonraki aşaması olan bozunma çalışmalarında olası bozunma ürünlerinin etken maddelere girişim yapmasını engellemek ve daha etkin sonuçlar verdiği için analizler için Kinetex HILIC (150 mm x 4,6 mm x 2,6 μ m) kolon uygun görülmüştür.

Optimizasyon çalışmalarının son aşamasında tampon çözelti pH'sının analiz sonucuna etkisine bakılmıştır. Tampon çözeltinin pH'sı asetik asit ile 5,50'a ayarlanarak ve sodyum hidroksit ile 7,78'e ayarlanarak pH deneme çalışmaları yapılmıştır. Analiz sonuçlarına bakıldığında üç farklı pH'da analiz süresinin ve ayırım güçlerinin çok değişmediği gözlemlendiği için tampon çözeltinin pH'sının değişmemesi uygun görülmüştür.

Geliştirilen HILIC yönteminin optimizasyon çalışmaları tamamlandıktan sonra sistem uygunluk parametreleri belirlenmiş olup bulunan parametreler doğrultusunda (Çizelge 3.9) yöntemin uygulanabilir olduğu kanıtlanmıştır ve optimizasyon çalışmaları sonunda yöntem validasyonu aşamasına geçilmiştir.

Tablet numunesi üzerinden bozundurma ürünlerinin analize etkisini incelemek için bozundurma çalışmaları yapılmıştır. Şekil 3.9' da görüldüğü üzere tablet numunesi hafif stres koşulları (0,1 N HCl ile asit hidrolizi, 0,1 N NaOH ile baz hidrolizi, % 0,3' lük H₂O₂ ile oksidasyon), sıcak su banyosunda bekletme, UV ışık altında bekletme ve 80 °C etüvde bekletme koşullarına tabi tutulmuştur. Sıcak su banyosunda bekletme, UV ışık altında bekletme ve 0,1 N HCl ile asit hidroliz koşullarında maddelerin neredeyse bozunmadığı fakat diğer koşullarda belirli oranlarda bozunduğu görülmüştür. Analizler sonucu 6 farklı bozunma ortamında da bozunma ürünleri etken maddelere girişim yapmamıştır. Bu yüzden geliştirilen yöntem etken maddelerin muhtemel bozunma ürünleri ile birlikte analizi içinde uygundur.

Geliştirilen HILIC yönteminin geçerliliğinin kanıtlanabilmesi için gerekli olan yöntem geçerlilik testlerinin parametreleri seçilmiş ve parametrelerin geçerlilik kriterleri dikkate alınmıştır. Bu amaçla, validasyon çalışmalarının, doğrusal aralık, duyarlılık, kesinlik, geri kazanım, tekrarlanabilirlik gibi parametreleri bulunduktan sonra istatistiksel olarak değerlendirilmeleri yapılmıştır.

Geliştirilen yöntemin doğruluğunun bulunması için üç etken maddenin bir arada bulunduğu farmasötik dozaj formu üzerine ilave edilen etken maddeler ile geri kazanım çalışmaları yapılmış ve gerekli parametreler hesaplanmıştır (Çizelge 3.11).

Yapılan literatür araştırmaları sonucu üç etken maddeninde eş zamanlı olarak analizinin olduğu çalışma sayısının az olduğu görülmüştür. Literatür çalışmaları kısmında üç etken maddenin veya bunlarda ikisinin eş zamanlı olarak analizinin yapıldığı çalışmalara yer verilmiş ve yöntem bunlarla kıyaslanmıştır. Geliştirilen HILIC yönteminin sonucu daha önce yapılmış olan (Kromdijk ve ark, 2013; Reddiah ve ark, 2012; Santhosam ve ark, 2013; Bartlett ve ark, 2005; Palavan ve ark, 2013; Prashanthi ve ark, 2016; Sudha ve ark, 2010; Rao ve Raja, 2011; Rao ve ark, 2010; Kumar ve ark, 2010; Özkan ve ark, 2007; Özkan ve Uslu, 2002; Sekar ve Azhaguvel, 2005 ve Gras ve ark, 2012) çalışmalarıyla kıyaslandığında analiz süresinin kısaldığı görülmüştür. Yöntemimiz ve çalışmalar (Santhosam ve ark, 2013; Palavan ve ark, 2013; Prashanthi ve ark, 2016; Rao ve ark, 2010 ve Kumar ve ark, 2010) kolon etkinliği açısından kıyaslandığında daha iyi sonuçlar vermektedir. Ters faz sıvı kromatografisi ve HILIC yöntemi kıyaslandığında kolonda alıkonan maddelerin elüsyon sıraları terstir. Tez çalışması ve Özkan ve ark, 2007 çalışması karşılaştırıldığında da bu durum kanıtlanmış olmaktadır. Ayrıca yöntemde % 80 oranında asetonitril kullanıldığı halde Santhosam ve ark, 2013; Prashanthi ve ark, 2016 ve Sudha ve ark, 2010 çalışmalarına göre daha az organik çözücü sarfıyatı gerçekleştirilmiştir. Bu yüzden yöntemin çevreci bir yöntem olduğu da düşünülmektedir.

Abakavir, lamivudin ve zidovudin tayini için geliştirilen HILIC yöntemi üç etkenin bir arada bulunduğu farmasötik dozaj formuna da uygulanmıştır. Yardımcı maddelerin ve safsızlıkların yönteme bir etkisinin olup olmadığı incelenmiş ve sonuç olarak bu maddelerin analiz üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı görülmüştür.

Sonuç olarak abakavir, lamivudin ve zidovudin etken maddelerinin eş zamanlı olarak HILIC yöntemi ile analizi Kinetex HILIC (150x4,6m; 2,6µm) kolonda, 25 °C kolon sıcaklığında ve 1 mL dk⁻¹ akış hızında gerçekleştirilmiştir. Kullanılan hareketli fazın içeriği asetonitril: 100 mM amonyum asetat tamponu, 80: 20 (h/h) dir. Çalışma

yapılan dalga boyu 280 nm olarak seçilmiş ve enjeksiyon hacmi 10 µL'dir. Bu koşullarda; abakavir, lamivudin ve zidovudin'in alıkonma zamanları sırasıyla 2,00, 2,10 ve 1,65 dakika olarak bulunmuştur. Geliştirilen yöntemde üç madde içinde doğrusal olarak 0,5-100 µg mL⁻¹, abakavir, lamivudin ve zidovudin için teşhis sınırı sırasıyla 0,03, 0,02, 0,04 µg mL⁻¹, tayin alt sınırı ise kabul edilen % BSS sınırları içinde (< %2) sırasıyla 0,09, 0,08 ve 0,12 µg mL⁻¹ olarak bulunmuştur.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma kapsamında AIDS tedavisinde kullanılan abakavir, lamivudin ve zidovudin etken maddelerinin yeni nesil HILIC kolonlar kullanılarak YBSK yöntemi ile analizleri için gerekli parametreler bulunmuş ve bu parametrelere bağlı olarak da eş zamanlı analizleri yapılmıştır. Bu amaçla hareketli faz organik çözücü yüzdesi, tampon çözelti molaritesi, kolon, akış hızı, sıcaklık ve pH kullanılarak analizler için en iyi koşullar belirlenmiştir. Ayrıca yeni nesil HILIC kolonların polar bileşiklerin ayrımı için iyi bir alternatif olduğuna tez kapsamında değinilmiştir.

Tez konusu seçiminden önceki literatür taramalarında abakavir, lamivudin ve zidovudin içeren farmasötik preparatların analizi ile ilgili çalışmaların mevcut olduğu görülmüştür. Ancak önceki çalışmalarda bu maddelerin HILIC kolonlarla yapılan hiç bir çalışmasına rastlanmamıştır. Optimizasyon ve validasyon işlemleri tamamlanarak geliştirilen yöntemimizde literatürdeki birçok analiz yöntemine göre daha iyi ve etkin bir ayırım ve daha iyi geri kazanım, teşhis sınırı ve tayin alt sınırı değerleri elde edilmiştir. Hesaplanan validasyon parametreleri doğrultusunda ise geliştirilen yöntemin doğru, duyarlı, kararlı bir yöntem olduğu söylenebilmektedir.

Ters faz sıvı kromatografisi kolonları ile yeni nesil HILIC kolonlar karşılaştırıldığında yeni nesil HILIC kolonlar polar bileşiklerin analizlerini kısa sürede gerçekleştirerek, sıcaklık ve pH gibi deneysel parametrelerin değiştirilmesine gerek duyulmaksızın, daha etkin bir ayırım ve daha hasas tayin sağlamaktadır.

Sonuç olarak bulunan veriler doğrultusunda, abakavir, lamivudin ve zidovudin etken maddelerinin eş zamanlı analizi için hızlı, duyarlı, kesin, kolay uygulanabilir, doğru, ekonomik ve herhangi bir ön ayırma işlemi gerektirmeyen analiz yöntemi geliştirilmiştir. Geliştirilen analiz yönteminin farmasötik dozaj formundan bu maddelerin eş zamanlı analizine başarılı bir şekilde uygulanabilir olduğu istatistiksel olarak gösterilmiştir.

ÖZET

Yeni Nesil HILIC Kolon Kullanılarak Bazı Antiviral İlaçların Farmasötik Dozaj Şekillerinden Sıvı Kromatografisi İle Analizi

Bu projenin amacı AIDS tedavisinde kullanılan ilaç etken maddelerinden abakavir, lamivudin ve zidovudin'in tayini için yeni nesil HILIC kolonları kullanılarak bir sıvı kromatografik yöntem geliştirmektir. Bu sebeple, çeşitli sabit fazlar denenerek maddelerin ayırımları için en iyi sabit faz belirlenmiştir. Diğer taraftan farklı hareketli faz kompozisyonları, farklı derişimlerde tampon çözeltiler, sıcaklık, akış hızı etkileri gibi deney şartları da optimize edilmiştir. Kinetex HILIC (150x4.6; 2.6 µm) (Phenomenex, ABD) kolon ve asetronitril: tampon çözelti (100 mM, amonyum asetat), 80: 20 (h/h) hareketli faz kompozisyonu kullanılarak iyi bir kromatografik ayırma ulaşılmıştır. Analizler 25°C, 1mL dk⁻¹ akış hızında ve 280 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir.

Araştırmalar sonucunda optimum çalışma şartlarında, hızlı, basit, duyarlı, doğru, kesin, çevreci ve tamamen valide edilmiş analiz yöntemi geliştirilmiştir. Önerilen hızlı ve duyarlı HILIC yöntemi nükleozid ters transkriptaz inhibitörlerinden abakavir, lamivudin, zidovudin'in eş zamanlı miktar tayinleri için zaman almayan numune hazırlama işlemine sahip olmasından dolayı kalite kontrol laboratuvarlarında kolayca uygulanabilecektir. Geliştirilen stabilite göstergeli yöntem ilaç numunesine de uygulanmıştır. Böylece ilaç numuneleri gibi kompleks matrislerde yöntemin uygulanabilirliği de gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Abakavir, HILIC, İlaç analizi, Lamivudin, Zidovudin

SUMMARY

Liquid Chromatographic Analysis of Some Antiviral drugs by Using New Generation HILIC Columns From Their Pharmaceutical Dosage Forms

The aim of the project to develop a liquid chromatographic method using the new generation HILIC columns for the identification of abacavir, lamivudine and zidovudine from the drug active substances used in the treatment of AIDS. For this reason, 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 phase compositions, buffer solutions at different concentrations, temperature, flow rate effects are also optimized. A good chromatographic separation was achieved using Kinetex HILIC (150x4.6; 2.6 μm) (Phenomenex, USA) column and acetonitrile: buffer solution (100 mM, ammonium acetate), 80:20 (v / v) mobile phase composition. The separation was carried out at a flow rate of 25 ° C, 1 mL min⁻¹ and a detection wavelength of 280 nm.

As a result of this study, fast, simple, sensitive, accurate, precise, environmentally and fully validated analysis method has been developed under optimum working conditions. The proposed rapid and sensitive HILIC method will be readily applicable in quality control laboratories since without a time-consuming sample preparation procedure for simultaneous quantification of nucleoside reverse transcriptase inhibitors like abacavir, lamivudine, zidovudine. The developed stability-indicating method was also applied to the pharmaceutical dosage forms. Thus, the feasibility of the method in complex matrices such as drug samples has also been demonstrated.

Key Words: Abacavir, Drug analysis, HILIC, Lamivudine, Zidovudine

KAYNAKLAR

- ABERG, J.A., GALLANT, J.E., ANDERSON, J., OLESKE, J.M., LIBMAN, H., CURRIER, J.S., STONE, V.E., and KAPLAN, J.E., (2004). Primary care guidelines for the management of persons infected with human immunodeficiency virus: recommendations of the HIV Medicine Association of the Infectious Diseases Society of America, *Clin. Infect. Dis*, **39**: 609-629,
- AFACAN Y, MENTEŞ UT. (2007) AIDS Tedavisi. *J Int Med Sci* **3(28)**.
- AJ, ALPERT. (1990). Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. *J. Chromatogr.*, **499**: 177
- ALNOUTI, Y., LEWIS, S. R., WHITE, C. A., and BARTLETT, M. G. (2005). Simultaneous determination of zidovudine and lamivudine from rat tissues by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **19(4)**: 503-508.
- ALPSAR, D. (2011). HIV-1 pozitif eşcinsellerde virus tiplendirmesi ve direnç belirlenmesi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- ARES, M., BERNAL, J., (2012). Hydrophilic interaction chromatography in drug analysis, *Central European Journal Of Chemistry*, **10**: 534-553.
- BIDLINGMEYER, B.A. (1992). *Practical HPLC Methodology and Applications*. New York: John Wiley & Sons, Inc., 69-200.
- BLIENER, D.M. (2006). *Validating chromatographic methods: A practical guide*. Danvers, Wiley- Interscience Pub.
- BRACH, S.K. (2005). Guidelines from the International Conference on Harmonisation (ICH). *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **38**: 798-805.
- BUSZEWSKI, B., NOGA, S., (2012). Hydrophilic liquid chromatography (HILIC) – A powerful separation technique, *Analytical And Bio Analytical Chemistry*, **402**: 231-247.
- CALMY, A., PINOGES, L., SZUMILIN, E., ZACHARIAH, R., FORD, N., FERRADINI, L., (2006). Médecins Sans Frontieres “Generic fixed-dose combination antiretroviral treatment in resource-poor settings: multicentric observational cohort” *AIDS*, **20**: 1163-1169,
- ÇAM, M., HIŞI, Y. (2008). Kromatografi tarihi, *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, **2**: 19-27.
- CASRO, M., BOLFARINE, H., GALEA-ROJAS, M.M., CASTILHO, V. (2005). An exact test for analytical bias detection. *Anal. Chim. Acta*, **538**: 375.
- ÇETİNKAYA, Y., ÜNAL, S. (1998). HIV enfeksiyonunda antiretroviral tedavi. In *Güncel bilgiler ışığında HIV/AIDS*, Ünal S. (Ed.), (1. Baskı), Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi, 173-196,

- CHAN, C.C. (Ed.) (2004). Potency Method Validation. In: *Analytical Method Validation and Instrument Performance Verification*, Eds.: Chan CC, Lam H, Lee YC, Zhang XM, New Jersey: Wiley- Interscience Pub.
- CHEN, L., CHEN, H. and SHEN, M. (2014).Hydrophilic interaction chromatography combined with tandem mass spectrometry method for the quantification of tobramycin in human plasma and its application in a pharmacokinetic study. *Journal of Chromatography B*, **973**: 39–44.
- CHRISTIAN, G.D. (Eds.) (2004). *Analytical chemistry*. 6th Ed., John Wiley & Sons Inc., New Jersey.
- CHRISTIAN HOFFMAN, JÜRGEN K. ROCKSTROH, BERND SEBASTIAN KAMPS (2007) *HIV Medicine 2007*. Flying Publisher.
- CROWTER J.B. (Ed.) (2001). Validation of pharmaceutical methods. In: *Handbook of modern pharmaceutical analysis*, Eds.: Ahuja S, Scypinski S. San Diego: Academic Press.
- De CLERCQ, E. (2007). “Anti-HIV drugs” Verh. K. Acad. *Geneesk. Belg*, **69**: 81-104,
- De CLERCQ, E. (2009). “Anti-HIV drugs: 25 compounds approved within 25 years after the discovery of HIV” *Int. J. Antimicrob. Agents*, **33**: 307-320
- DEMIRCI, A., ÖZCİMDER, M. (2009). *Kromatografik Yöntemler*. Ankara:Kurban Matbaacılık.
- DHARMARAJ SANTHOSAM, E., ADIYAMAN, S., SENTHILKUMAR, M., (2013). Simultaneous Estimation of Lamivudine, Zidovudine and Nevirapine from Bulk and Tablet Dosage Form. *International Journal Of Pharmaceutical And Chemical Sciences*. **2(4)**:1883-1887
- DINH, N.P., JONSSON, T., IRGUM, K., (2011). Probing the interaction mode in hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1218 (**20**): 5880-5891
- ERMER, J. (Ed.) (2005). Fundamentals of Validation in Pharmaceutical Analysis. In: *Method Validation in Pharmaceutical Analysis*, Eds.: Ermer J, Miller JH., Wiley: VCH Publishers.
- WEINHEIM. E. J, MILLER, JHMcB (2005). *Method Validation in Pharmaceutical Analysis*. 1st Ed., Weinheim: WileyVCH Publishers.
- ERMER J, PLOSS HJ (2005). Validation in pharmaceutical analysis. Part II: Central importance of precision to establish acceptance criteria and for verifying and improving the quality of analytical data. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **37**: 859.
- ESSAID, D., CHAMINADE, P., MAILLARD, P., and KASSELOURI, A. (2015). Lipophilicity of porphyrins and their retention in IAM, C8–C18 and HILIC chromatographic systems. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **114**: 227-240.
- European Pharmacopoeia (2014) 8th Ed. Council of Europe, Strasbourg.
- FANALI S, HADDAD PR., POOLE C, SCHOENMAKERS P and LLOYD DK (2013). *Liquid Chromatography: Fundamentals and Instrumentation*. Elsevier, USA.

- FURMAN, P.A., FYFE, J.A., St CLAIR, M.H., WEINHOLD, K., RIDEOUT, J.L., FREEMAN, G.A., LEHRMAN, S.N., BOLOGNESI, D.P., BRODER, S., MITSUYA, H., BARRY, D.W. (1986). "Phosphorylation of 3'-azido-3'-deoxythymidine and selective interaction of the 5'-triphosphate with human immunodeficiency virus reverse transcriptase" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**: 8333-8337.
- GAMA, M. R., da COSTA SILVA, R. G., COLLINS, C. H., and BOTTOLİ, C. B. (2012). Hydrophilic interaction chromatography. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **37**, 48-60.
- GÖRÖĞ S (2007). The changing face of pharmaceutical analysis. *Trac-Trends Anal. Chem.*, **26**: 12-17.
- GRAS, A., YEGLES, M., KARASI, J. C., SCHMIT, J. C., SEGUIN-DEVAUX, C., and SCHNEIDER, S. (2012). Simultaneous quantification of zidovudine, stavudine, lamivudine and nevirapine by micellar electrokinetic capillary chromatography. *In Annales de Toxicologie Analytique*, **24(4)**: 177-183.
- GRDINIC, V., VUKOVIC, J. (2004). Prevalidation in pharmaceutical analysis, part 1, Fundamentals and critical discussion. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **35**: 489-512
- GÜMÜŞTAŞ, M (2009). *Anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörü ve kalsiyum kanal blokörü kombinasyonu ilaçların yüksek performanslı sıvı kromatografi yöntemi ile aynı anda analizi*. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Ankara.
- GÜMÜŞTAŞ, M. (2016). *Beta agonist ilaç etken maddelerin kiral davranışlarının incelenmesi*, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara.
- GÜMÜŞTAŞ, M., USLU, B., OZKAN, S.A., ABOUL-ENEIN, H. (2014B). Validated Stability-Indicating HPLC And UPLC Assay Methods For The Determination Of Entacapone In Pharmaceutical Dosage Forms. *Chromatographia*, **77**: 1721-1726.
- HAJICOSTAS, E. (2003). *Validation of Analytical Methods*. Springer-Verlag Pub., Berlin.
- HAMILTON, R.J., SEWEL, P.A. (1982). *Introduction to HPLC*. 2nd Ed., Chapman and Hall, New York. 1-160.
- HAMMER, S.M., ERON, J.J. Jr., REISS, P., SCHOOLEY, R.T., THOMPSON, M.A., WALMSLEY, S., CAHN, P., FISCHL, M.A., GATELL, J.M., HIRSCH, M.S., JACOBSEN, D.M., MONTANER, J.S., RICHMAN, D.D., YENİ, P.G., VOLBERDING, P.A., (2008). International AIDS Society-USA "Antiretroviral treatment of adult HIV infection: 2008 recommendations of the International AIDS Society-USA panel, *JAMA*, **300**: 555-570,
- HARTMANN, C., SMEYERS-VERBEKE, J., MASSART, D.L. and McDOWALL, R.D. (1998). Validation of bioanalytical chromatographic methods. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **17**: 193.
- HEMSRTOM, P., IRGUM, K. (2006). Hydrophilic interaction chromatography. *J. Sep. Sci.* **29**:1784-1821

- HIBBERT, D.B. (2007). *Quality Assurance in the Analytical Chemistry Laboratory*. Oxford University Press, Inc., New York.
- HOROWITZ, H.W., TELZAK, E.E., SEPKOWITZ, K.A., and WORMSER, G.P., (1998). Human immunodeficiency virus infection. Part I, *Dis. Mon*, **44**: 545-606,
- HUBER L (2007). *Validation and Qualification in Analytical Laboratories*. 2nd Ed., Informa Healthcare USA, Inc., New York.
- 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).
- İnternet: <http://www.who.int/hiv/pub/guidelines/artadultguidelines.pdf> (10.09.2016)
- KAHSAY, G., SONG, H., SCHEPDAEL, A.V., CABOOTER, D. (2014).Hydrophilic İnteraction Chromatography (HILIC) in the analysis of antibiotics, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **87**:142-154.
- KARATAPANIS, AE., FIAMEGOS, YC. and STALIKAS, C.D. (2011).A revisit to the retention mechanism of hydrophilic interaction liquid chromatography using model organic compounds. *J Chromatogr A*. 1218**(20)**:2871-2879.
- KAUFMANN, G.R., PERRIN, L., PANTALEO, G., OPRAVİL, M., FURRER, H., TELENTİ, A., HİRSCHHEL, B., LEDERGERBER, B., VERNAZZA, P., BERNASCONİ, E., RİCKENBACH, M., EGGER, M., BATTEGAY, M., (2003). Swiss HIV Cohort Study Group, “CD4 T-lymphocyte recovery in individuals with advanced HIV-1 infection receiving potent antiretroviral therapy for 4 years: the Swiss HIV Cohort Study” *Arch. Intern. Med*, **163**: 2187-2195,
- KAWACHI, Y., IKEGAMI, T., TAKUBO, H., IKEGAMI, Y., MİYAMOTO, M., and TANAKA, N. (2011). Chromatographic characterization of hydrophilic interaction liquid chromatography stationary phases: hydrophilicity, charge effects, structural selectivity, and separation efficiency. *Journal of chromatography A*, 1218**(35)**: 5903-5919.
- KAYA, E. (2008). *HEPT bileşik serisinin HIV-1 inhibitörü olarak elektron konformasyon-genetik algoritma (EC-GA) yöntemi ile QSAR incelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kayseri.
- KAYAALP, O. (2012). *Akılclı tedavi yönünden tıbbi farmakoloji*. Ankara: Pelikan Tıp ve Teknik Kitapçılık.
- KONIECZKA, P. (2007). The Role of and the Place of Method Validation in the Quality Assurance and Quality Control (QA/QC) System. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **37(3)**: 173-190.
- KROMDIJK, W., PEREIRA, S. A., ROSING, H., MULDER, J. W., BEIJNEN, J. H., & HUITTEMA, A. D. R. (2013). Development and validation of an assay for the simultaneous determination of zidovudine, abacavir, emtricitabine, lamivudine, tenofovir and ribavirin in human plasma using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, **919**: 43-51.

- KROMIDAS, S. (2008). *HPLC Made to Measure: A Practical Handbook for Optimization*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- KROMIDAS, S. (Ed.) (2005). *More Practical Problem Solving in HPLC*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA Publishers.
- KUMAR, D. A., RAO, G. S., and RAO, J. V. L. N. (2010). Simultaneous determination of lamivudine, zidovudine and abacavir in tablet dosage forms by rp hplc method. *Journal of Chemistry*, **7(1)**: 180-184.
- KUMAR, V., ABBAS, A. K., FAUSTO, N., & MITCHELL, R. N. (2007). Chapter 5 - Diseases of the Immune System. In Robbins Basic Pathology, 8th Edition (pp. 107 - 172). Philadelphia: Saunders, an imprint of Elsevier Inc. also available.
- LEVER, A.M.L. (2009). HIV: the virus, *Medicine*, **37**: 313-316,
- LIU, K. K., ZHANG, W., LEE, Y. H., LIN, Y. C., CHANG, M. T., SU, C. Y. and LAI, C. S. (2012). Growth of large-area and highly crystalline MoS₂ thin layers on insulating substrates. *Nano letters*, **12(3)**: 1538-1544.
- LINDEN, J.C., LAWHEAD, C.L., (1975). Liquid chromatography of saccharides. *Journal of Chromatography A*, **105**:125-133
- LONG, Z., JIN, Y., LIU, X., GUO, Z., SHEN, A., HU, X., WU, N., (2015). 'Quantitative Analysis Of Five Antiviral Drugs By Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography-Charged Aerosol Detection', *Chinese Journal Of Chromatography/ Zhongguo HUA XUE HUI*, **33**: 938-942 .
- MAJCEN, N. (2003). A need for clearer terminology and guidance in the role of reference materials in method development and validation. *Accred. Qual. Assur.*, **8**: 108-122.
- MITSUYA, H., WEINHOLD, K.J., FURMAN P.A., St. CLAIR, M.H., LEHRMAN, S.N., GALLO, R.C., BOLOGNESI, D., BARRY, D.W., BRODER, S. (1985). "3'-Azido-3'-deoxythymidine (BW A509U): an antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus in vitro" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**: 7096-7100,
- MOCROFT, A., VELLA, S., BENFIELD, T.L., CHIESI, A., MILLER, V., GARGALIANOS, P. (1998). d'Arminio Monforte, A., Yust, I., Bruun, J.N., Phillips, A.N., Lundgren, J.D., "Changing patterns of mortality across Europe in patients infected with HIV-1. EuroSIDA Study Group" *Lancet*, **352**: 1725-1730.
- OZKAN, S.A. (2012). *Electroanalytical Methods in Pharmaceutical Analysis and Their Validation*. USA: HNB Publishers.
- OZKAN S.A., KAUFFMAN, J.M., and ZUMAN, P. (2015). *Electroanalysis in Biomedical and Pharmaceutical Sciences: Voltammetry, Amperometry, Biosensors, Applications*. Springer Heidelberg, New York.
- PALAVAN, C., RAMPRASAD, L. A., VARAPRASAD, J., and SESHAGIRIRAO, J. V. L. N. (2013). A New RP-HPLC Method for the Simultaneous Estimation of Abacavir, Lamivudine and Zidovudine in Tablet Dosage Forms. *American Journal of PharmTech Research*, **13**: 1.

- PALELLA, F.J. Jr., DELANEY, K.M., MOORMAN, A.C., LOVELESS, M.O., Fuhrer, J., SATTEN, G.A., ASCHMAN, D.J., HOLMBERG, S.D., (1998) "Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators, *N. Engl. J. Med*, **338**: 853-860,
- PRICHARD E BARVICK, V. (2007). *Quality Assurance in Analytical Chemistry*. UK: John Wiley & Sons Pub.
- PRICHARD, E., BARVICK, V. (2007). *Quality Assurance in Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons Pub. UK.
- RAJA, T., RAO, A. L. (2011). Development and validation of RP-HPLC method for the estimation of abacavir, lamivudine and zidovudine in pharmaceutical dosage form. *International Journal of Pharm Tech Research*, **3(2)**: 852-857.
- RILEY CM, ROSANSKE TW (Eds.) (1996). *Development and Validation of Analytical Methods*. Oxford: Pergamon Press.
- RISLEY, D. S., MAGNUSSON, LARS-ERIK P. R. M., ABURUB. A.(2013). Analysis of magnesium from magnesium stearate in pharmaceutical tablet formulations using hydrophilic interaction liquid chromatography with nano quantity analyte detection, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **78–79**:112–117.
- SAVAŞER, A., GORALER, S., TAŞÖZ, A., USLU, B., LİNGEMAN, H., and ÖZKAN, S. A. (2007). Determination of abacavir, lamivudine and zidovudine in pharmaceutical tablets, human serum and in drug dissolution studies by HPLC. *Chromatographia*, **65(5-6)**: 259-265.
- SEKAR, R., & AZHAGUVEL, S. (2005). Simultaneous determination of HIV-protease inhibitors lamivudine and zidovudine in pharmaceutical formulations by micellar electrokinetic chromatography. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, **39(3)**: 653-660.
- SHABIR GA (2003). Validation high performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *J. Chromatogr. A*, **987**: 57-66.
- SKOOG, D.A., HOLLER, F.J. and CROUCH, S.R. (2007). *Principles of Instrumental Analysis*, Thomson Brooks/Cole.
- SKOOG DA, HOLLER FJ, NIEMAN TA (1998). *Principles of Instrumental Analysis*. 5th Ed., Brooks/Cole Thompson Learning, USA.
- SNYDER LR, KIRKLAND JJ, GLAYCH JL (1997). *Practical HPLC Method Development*, 2nd Ed., John Wiley & Sans Inc., New York.
- SUDHA, T., RAVIKUMAR, V. R., and HEMALATHA, P. V. (2010). Validated HPTLC method for simultaneous determination of lamivudine and abacavir sulphate in tablet dosage form. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, **1(11)**: 107.

- SULUKAN, E. E., KÜÇÜKOĞLU, K., & GÜL, H. İ. (2009). AIDS ve tedavisinde kullanılan ilaçlar. *Ankara Ecz. Fak. Derg.* 38 (1): 47 - 78
- SUZANNE, L. PARKER, JEFFREY LIPMAN, JASON, A. ROBERTS, STEVEN, C. WALLIS, (2015) A simple LC–MS/MS method using HILIC chromatography for the determination of fosfomycin in plasma and urine: Application to a pilot pharmacokinetic study in humans, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **105**: 39–45
- SWARTZ, M.E, KRULL, I.S. (1997). *Analytical Method Development and Validation*. Marcel Dekker, New York.
- SWITAJ-ZAWADKA, A, KONIECZKA, P, PRZYK, E, NAMIESNIK, J (2005). Calibration in metrological approach. *Anal. Lett.*, **38**: 353-376.
- THOMPSON, M., ELLISON, SLR., and WOOD, R. (2002). Harmonized guidelines for validation of. methods of analysis. *Pure Appl. Chem.*, **74**: 835-855.
- TORBECK, L.D. (Ed.) (2007). *Pharmaceutical and Medical Device Validation by Experimental Design*. New York: Informa Healthcare USA.
- TÜRKER, N., ÖRMEN, B. (2006). Antiretroviral tedavi, (*Turkish Journal of Infection*) 20(3): 207-217
- 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,. (2000). Analytical Procedures and Method Validation: Chemistry, Manufacturing and Controls, Federal Notices 5, 776.
- USLU, B., ÖZKAN, S. A. (2002). Determination of lamivudine and zidovudine in binary mixtures using first derivative spectrophotometric, first derivative of the ratio-spectra and high-performance liquid chromatography–UV methods. *Analytica Chimica Acta*, 466(1): 175-185.
- VAN LOCCO J, ELSKENS M, CROUX C, BEERNAERT H (2002). Linearity of calibration curves: use and misuse of correlation coefficient. *Accred. Qual. Assur.*, **7**: 281-285.
- VENKATA REDDIAH, C.H., RAMA DEVI, P., MUKKANTI, K. and SRINIVASARAO, K. (2012) Development and validation of stability indicating HPLC method for lamivudine, zidovudine and abacavir in tablet dosage forms, *Int.J.Pharm.Phytopharmacol Res.*, **1(5)**: 247-256,
- WERNER, F., VERA D, GERHILD, D. (2006). *Quality Assurance in Analytical Chemistry, Applications in Environmental, Food and Materials Analysis, Biotechnology and Medical Engineering*. Wiley-VCH, Weinheim.

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı : CEM
Soyadı : ERKMEN
Doğum yeri ve tarihi : KEÇİÖREN, 07.01.1991
Uyruğu : TÜRKİYE CUMHURİYETİ
Medeni durumu : BEKAR
Askerlik durumu : TECİLLİ
İletişim adresi ve telefonu : MEBUSEVLERİ MAHALLESİ ERGİN SOKAK
26/10 ÇANKAYA/ANKARA
Elektronik Posta : cmrkmn@gmail.com

II- Eğitimi

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

2009–2014/Lisans/Gazi Üniversitesi Mühendislik Fakültesi/Kimya Mühendisliği
Bölümü (Ankara)

2005–2009/Lise/Tuzluca Yır Anadolu Lisesi(Ankara)

1997–2005/İlköğretim/ Maltepe İlköğretim Okulu(Ankara)

Yabancı dili: İngilizce ve Fransızca

III- Ünvanları

Kimya Mühendisi

IV- Mesleki Deneyimi

2011–2012/Yaz Dönemi Laboratuvar Stajı/ Sigma Beton Laboratuvar Hizmetleri ve
Ticaret Limited Şirketi (Ankara)

2012–2013/ Yaz Dönemi Stajı/ ASELSAN AŞ (Ankara)

2016-.../ Argis İlaç San. ve Tic. Ltd. Şti.-Kalite kontrol uzmanı (Ankara)

V- Bilimsel ilgi Alanları

İlaç analizleri, YBSK, Yöntem validasyonu.

VI- Bilimsel Etkinlikleri

Sunulan Bildiriler

- 1) Cem Erkmen, Mehmet Gümüştas, Bengi Uslu, Sibel A. Özkan, Oseltamivir'in Farmasötik Dozaj Formlarından Tayininde Core-shell Parçacıkların Etkisi. 8. Ulusal Analitik Kimya Kongresi, 30 Mayıs–3 Haziran 2016 Isparta, Türkiye.
- 2) Cem Erkmen, Mehmet Gümüştas, Bengi Uslu, Sibel A. Özkan, The Role Of HILIC Separation For The Simultaneous Determination Of Some Antivirals 27rd International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis 13–16 Kasım 2016, Çin.

Projeleri

Yeni nesil HILIC kolon kullanılarak bazı antiviral ilaçların farmasötik dozaj şekillerinden sıvı kromatografisi ile analizi, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeler Müdürlüğü, Proje No: 16L0237001, Araştırmacı.
Proje Bütçesi:16.000 TL.

Verdiği Seminerler

“Hidrofilik Etkileşim Kromatografi ve İlaç Analizlerinde Uygulamaları” konu başlıklı 10.05.2016 tarihinde Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı’da seminer verilmiştir.