1. GİRİŞ

1.1. Kromatografi ve Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (YPSK)

Kimyasal bir karışımı oluşturan farklı yapıdaki maddelerin birbiri ile karışmayan, hareket eden faz ile (gaz veya sıvı) sabit (duran) (katı veya sıvı) iki faz arasındaki partisyon (dağılım) dengelerine dayanarak ayrılmasını ve aynı zamanda bu maddelerin kalitatif ve kantitatif analizini sağlayarak geniş kullanım alanı bulan bir ayırma yöntemidir.

1892'de Reed tarafından ortaya atılmış olan ilk teoride, kolon yardımı ile bir karışımın ayrılabileceği söylenmiştir. 1906 yılında Tswett adlı araştırmacı kolon kromatografisini kullanarak klorofili pigmentlerine ayırmıştır. Adsorban olarak $CaCO_3$'in kullanıldığı bu ayırım ile ilk kez katı-sıvı kromatografisi kullanılmıştır. 1938'de Türk asıllı Rus araştırıcı olan Izmailov ince tabaka kromatografisini keşfetmiş ve bu yöntem 1950 yılında Stahl tarafından pratikte kullanılış şekli tanıtılmıştır. 1941'de Martin-Synge kolon dağılma kromatografisi esaslarından bahsetmiş ve sıvı-sıvı kromatografisi ortaya çıkmıştır.1952'de Martin-James gaz-sıvı kromatografisini geliştirmiş ve diğer yöntemlerden farklı olarak hareketli fazda gaz kullanılmış ve bu çalışma Nobel ödülüne layık görülmüştür. 1967 yılında Huber ve Hulsman adlı araştırıcılar kolon teknolojisini geliştirerek yüksek performanslı pompa sistemleri ve duyarlı dedektörlerin kullanılması ile yüksek performanslı sıvı kromatografisinin temellerini ortaya atmışlardır.

1966-69 yılları arasında ince partiküllü dolgu maddeleri, dar kolonlar ve kolona yüksek basınç uygulayarak sıvı kromatografisi daha da geliştirilmiştir.

Sıvı kromatografisi terimi;
- Sıvı-sıvı (partisyon, dağılma)
- Sıvı- katı (adsorbsiyon)
- Moleküler eleme (jel filtrasyon, jel permeasyon)

- İyon değiştirme kromatografisini içine alan geniş bir kavramdır. (Kılıç ve Köseoğlu, 1999).

Kromatografi bir ayırma tekniği yani maddelerin farklı göç etmelerine (migrasyon) dayalı bir yöntemdir. Burada numune bileşimindeki maddeler durgun faz tarafından seçilip ayrılarak tutulurlar. Ayırım, numune bileşenlerinin birbiri ile karışmayan fazlardaki denge dağılımının farkına dayanır. Numune bileşenleri hareketli fazda bulunur ve kromatografik sistemde göç ederler. Denge dağılımı göçün hızına bağlıdır. Durgun fazı tercih eden bileşikler hareketli fazı seçenlerden daha yavaş ilerlerler. Bundan dolayı denge dağılımındaki farklılıkların bir sonucu olarak ilerleme (göç hızlarındaki) farkı bileşenlerin ayrılmasına neden olur. Bunların sonucu olarak kromatografiyi şöyle sınıflayabiliriz.

Katı-sıvı kromatografisi = Katı bir madde polar adsorban (Silikajel, Al_2O_3 vb) tarafından maddelerin adsorbe edilmeleri esasına dayanır. (Örneğin: İnce Tabaka Kromatografisi)

Partisyon (dağılma) kromatografisi = Katı bir maddenin birbirleriyle karışmayan iki sıvı arasındaki partisyonu (dağılması) esasına dayanır. Burada da bir sabit, bir hareketli faz vardır. Durgun faz ilk olarak gaz kromatografisinde kullanılanlara göre hazırlanmıştır. Katı bir tutucu tanecikleri üzerine sıvı (vizkoz bir sıvı) maddenin kaplanması sonucu elde edilen durgun fazın kullanıldığı sistem sıvı-sıvı kromatografisi olarak adlandırılmaktadır.

Günümüzde daha yeni teknikler de kullanılmaktadır. Bu tekniklerde durgun faz, inert olarak katı bir desteğe kimyasal bağla bağlanmıştır. Böylece daha iyi ayırım veren uzun ömürlü dolgu maddeleri hazırlanmıştır. Bunlara, bağlı faz kromatografi (banded phase chromatography, BPC) adı verilmektedir.

BPC

Normal faz	(Normal phase)	→ Sabit faz polaritesi	>	Hareketli faz polaritesi
Ters faz	Reversed phase)	→ Hareketli faz polaritesi	>	Sabit faz polaritesi

İyon tutucu kromatografi: Dolgu maddelerinin iyonik kısmı ile mobil faz arasındaki iyonların değişimi (tutulması) esasına dayanır. Stirendivinilbenzen kopolimerlerden oluşan ve fonksiyonel gruplar ilave edilmiş reçineler bu amaçla kullanılır. Bunların sülfonik asit, kuaterneramin türevi olanları da mevcuttur.

Kromatografiyi faz tiplerine göre kısaca şematik olarak özetlersek:

1) Gaz
   a) Gaz-Sıvı (GLC)
   b) Gaz-Katı (GSC)

2) Sıvı
   a) Sıvı-sıvı- (LLC) – Partisyon kromatografisi
      (= Dağılma kromatografisi)
   b) Sıvı-katı – (LSC) – Adsorbsiyon kromatografisi

Sıvı kromatografisi sabit faz üzerinden ayırımın gerçekleştiği ve hareketli fazın sıvı olduğu bir kromatografi sistemidir.

YPSK'da ise mobil faz kolona yüksek bir giriş basıncı ile verilir (4000 psi). Basınçlı bir pompa ile mobil faz kolona gönderilir. Sabit faz sıvı veya katı olabilir. Önemli olan geniş bir yüzey alanına sahip olmasıdır.

YPSK'da I- Çözücü

II- Dolgu maddesi çeşitlerine göre pratikte 6 tip ayırma mekanizması vardır.

1- LSC (sıvı-katı adsorbsiyon kromatografisi)

2- LLC (Sıvı-sıvı partisyon kromatografisi)

3- IEC (İyon değiştirme kromatografisi)

4- GFC-GPC (Jel filtrasyon-jel permeasyon kromatografisi)

5- PIC (İyon çifti kromatografisi)

6- PLC (Preperatif sıvı kromatografisi)

Yüksek basınçlı pompa sistemlerinin ve yüksek duyarlıkta dedektörlerin kullanılması yanında kolon teknolojisindeki gelişmelerinde sonucu olarak kromatografik tekniklerin en eskisi olarak bilinen kolon kromatografisinin yerini, 1965'den sonra analizin çok kısa sürede tamamlanması, ayırımın yeterince fazla olması ve az miktarda maddeye gereksinim göstermesi gibi özelliklerden dolayı yüksek performanslı sıvı kromatografisi (=YPSK) almıştır.

YPSK, kompleks karışımları yüksek bir duyarlılıkla bileşenlerine ayıran bir her bir bileşiğinde kalitatif ve kantitatif analizini sağlayan bir tekniktir. Molekül ağırlığı 50-20 milyon arasında olan bütün organik bileşiklerin analizi bu sistemle gerçekleştirilebilir. Elde edilen sonuçların kesin ve tekrarlanabilir olması bu yöntemi üstün kılmaktadır (Kılıç ve Köseoğlu, 1999; Kılıç ve ark, 1997; Christian, 2004; Yıldız ve Genç, 1993).

Kromatografik Yöntemlerin Karşılaştırılması

1960-1970 li yıllardan sonra Gaz ve YPSK klasik kromatografinin yerini almıştır. 1965'lerden sonra Gaz kromatografisi en fazla kullanılan bir yöntemdi. Gaz kromatografisinin bazı avantajları vardır. Bunlar;

- aynı kolon pek çok kez kullanılabilir,

- zaman birimine düşen tabaka sayısı fazladır, zaman kısadır,

- ayrılma iyi olmaktadır,

- kantitatif analizlerin kesin sonuç vermesi ve yine kütle spektrometrisi gibi yöntemlerle birlikte kullanılabilmektedir.

Dezavantajı ise;

- Mutlaka uçucu maddelerle çalışmak gerekiyor olmasıdır. Madde ya doğrudan uçucu olmalıdır veya kullanılan numunenin uçucu türevleri hazırlanmalıdır. Gaz kromatografisinin kullanım alanları kısıtlıdır. Çünkü bileşiklerin bir çoğu uçucu değildir. Uçucu türevlerini hazırlamak zordur, bu türevler bozulabilmektedirler.

YPSK yöntemi ile Gaz kromatografisi yöntemini karşılaştıracak olursak;

1. Gaz kromatografisinde analizi yapılacak maddenin uçucu olması veya uçucu türevinin hazırlanması gerekir. YPSK'da böyle bir işleme gerek yoktur. YPSK'da maddenin hareketli fazda çözünmesi yeterlidir.

2. GK'de molekül ağırlığı 2-500 kadar olanlar, YPSK'da ise 50-2 milyona kadar olanların analizi yapılabilir.

3. YPSK'da kolonda çözücü sistemi değiştirilerek birçok maddenin analizi aynı anda yapılabilir. Gaz kromatografisinde ise farklı maddelerin analizi için kolon değiştirilmelidir.

4. YPSK'da yüksek ısıda bozunan maddelerin ayırımı da yapılabilir. GK'de yüksek ısıda bozunan maddeler incelenemez.

5. GK'de teorik plaka sayısını artırmak için genelde kolonun boyu artırılır. Bu da ayırım süresini artırır. YPSK'da ise dolgu maddesinin partikül büyüklüğü değiştirilebilir ve teorik plaka sayısını artırmak için "recycle" denilen maddeyi kolondan birkaç kez geçirmek mümkündür.

6. GK'de çözücünün resolusyona etkisi ya hiç yoktur ya da azdır. YPSK'da ise önemlidir. GK'de taşıyıcı gazın seçimi, dedektör tipine bağlıdır. Azot veya Helyum kullanımı ayırımı etkilemez. YPSK'da hareketli fazın seçimi ve bileşimi ayırımı etkiler.

7. Preparatif analizlerde GK'ye oranla YPSK daha başarılıdır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Cihazlarının Yapısı ve Kısımları:

Şekil 2.1. Bir YPSK cihazının şeması (Kılıç ve Köseoğlu, 1999)

2.2. Hareketli Faz Hazneleri ve Çözücü Muamele Sistemleri

Hazne: Camdan veya çelikten yapılabilir 200-1000 mL hacminde çözücü içermeye elverişli yapıdır. Hazne çoğu zaman gaz giderici ve süzme düzeneği denilen ancak ana parça olmayan cihazlarla donatılmış olabilir. Gaz giderici, kolonda ve dedektörde gaz oluşturarak bant genişlemesi, dedektör performansına olumsuz etki gibi bozucu etkilere sebep olan çözünmüş gazların giderilmesini sağlar. (Kılıç ve Köseoğlu,

1999; Christian, 2004; Kissinger ve Heineman, 1996) Adamovics, 1997; Synder ve ark, 1997).

Gaz giderme düzeneği: Vakum pompa sistemi, damıtma sistemi, çözücüyü ısıtıp karıştıran bir sistem, çözünmüş gazları inert bir gazın küçük kabarcıkları yardımıyla üfleyen bir sistem ve süzme düzeneğinden oluşan bir yapıya sahip olabilir. Süzme düzeneği, çözücü içinde bulunabilecek toz ve partiküllerin pompaya veya enjeksiyon sistemine zarar vermemesi için kullanılır.

İzokraktik elüsyon: Sabit bileşimde tek bir çözücü veya çözücü karışımı kullanılarak yapılan ayırma yöntemidir.

Gradiyent elüsyon: Ayırma etkililiği izokraktik elüsyona göre daha fazla olan bu yöntemde iki yada üç çözücü kullanılmaktadır ve bu çözücülerin polariteleri birbirinden farklıdır. Ayırım başladıktan sonra çözücülerin oranı ve cinsleri belli bir programa göre değiştirilir. Böylece karışım halinde bulunan maddelerin birbirlerinden kolayca ayrılmaları sağlanmış olur.

Modern YPSK cihazlarında, çözücülerin hacimsel oranları üstel yada doğrusal olarak değiştirilebilecek şekilde iki veya daha fazla hazneden aldığı çözücüleri bir karıştırma odasında sürekli olarak değişen hızlarda bir araya getiren sistemler görmek mümkündür. (Kılıç ve Köseoğlu 1999; Christian, 2004; Adamovics, 1997; Synder ve ark 1997).

2.3. Pompalama Sistemleri

Bir YPSK pompalama sisteminde;

* 400 atm'e kadar basınç üretimi

* Puls içermeyen basınç çıkışı

* 0,1-10 mL / dakika aralığında akış hızları

* %0.5 veya daha iyi bir bağıl tekrarlanabilirlikte akış kontrolü

* Korozyona dayanıklı parçalar (Paslanmaz çelik veya teflondan yapılmış sızdırmazlık.) şartlarının tanımlanmış olması gereklidir.

Ayrıca YPSK pompaları tarafından üretilen basıncın patlama tehlikesi oluşturmaması da önemlidir. Böylece sistemin parçalarından herhangi birinde meydana gelebilecek çatlak çözücünün dışarı sızmasından ibaret kalacaktır. Bu gibi kaçakların da yangın tehlikesi oluşturmasından dolayı dikkatli olunmalıdır.

Pompa Çeşitleri: 1) Pistonlu Pompalar

2) Sürgülü Pompalar

3) Pnömatik Pompalar

2.3.1. Pistonlu Pompalar:

En yaygın olarak kullanılan pompa sistemidir. Motor kontrollü bir pistonun ileri ve geri hareketiyle çözücünün pompalandığı küçük bir silindirden oluşmuştur. Sırasıyla açılıp kapanan iki küresel motor musluğu çözücünün silindir içine giriş çıkışı kontrol eden parçadır. (Kılıç ve Köseoğlu 1997; Kılıç ve Köseoğlu 1999).

Şekil 2.2. YPSK'da pistonlu pompa (Kılıç ve Köseoğlu, 1997).

2.3.2. Sürgülü Pompalar

Vizkoziteden ve geri basınçtan bağımsız bir akış üreten sürgülü pompalar, bir kademeli motordan güç alan vidalı güdüm mekanizması ile kumanda edilen sızdırmaz bir sürgüsü olan silindirik kaptan ibarettir. Sınırlı çözücü kapasitesi (~250 mL) ve çözücü değiştirilmesi gerektiğinde karşılaşılan güçlükler sakıncalı taraflarıdır. (Kılıç ve Köseoğlu, 1997).

2.3.3. Pnömatik Pompalar:

Pahalı olmayan, pulssuz, ancak kapasitesi sınırlı olan bu tür pompalarda çıkış basıncı düşük olup, çıkış hızı çözücü vizkozitesine ve kolon geri basıncına bağlıdır. Gradiyent elüsyona uygun değildirler. (Kılıç ve Köseoğlu, 1997).

2.3.4. Akış Kontrolü ve Programlama Sistemleri:

YPSK cihazlarında bilgisayarla kontrol edin, pompa çıkışına yerleştirilmiş geri tepme tıkacı boyunca basınç düşmesini belirlemek suretiyle akış hızını tespit eden

sistemler mevcuttur. Ayrıca cihazlar çözücü bileşimini sürekli yada basamaklı olarak değiştiren sistemlere de sahiptir.

2.4. Numune Enjeksiyon Sistemleri:

Sıvı Kromatografik ölçümlerin kesinliği, kolon dolgu maddesine aşırı yükleme yapmadan dolayısıyla bant genişlemesine neden olmadan, ayrıca sistemin basıncını düşürmeden numune sevkinin tekrarlanabilmesiyle bağlantılıdır. İlk ve en basit numune verme düzeneği elastomerik septumlardan şırınga ile enjeksiyon sistemiydi. Bu sistem basit olmasından dolayı avantajlı olmasına rağmen tekrarlanabilirlik oranının düşük olması nedeniyle yeni yöntemlerin gelişmesine sebep olmuştur.

Sıvı kromatografisinde numune vermek için kullanılan en yaygın yöntem değiştirilebilir nitelikte numune giriş sarımlarının kullanılması yöntemidir. Bu sarımlarda numune hacmi 5 μL den 500 μL ye kadar olabilir. Ayrıca mikronumune enjeksiyon muslukları da mevcuttur.

Şekil 2.3. Sıvı kromatografide numune sarımı. (Kılıç ve Köseoğlu, 1997)

2.5. Dedektörler:

Sıvı kromatografik yöntemlerin gelişmesinde yaşanan en büyük güçlüklerden biri ideal dedektör bulabilmektedir.

Sıvı kromatografide kullanılan dedektörler 2 başlık altında toplanabilir.

a) Yığın Özellikli Dedektörler: Bunlar analit tarafından değiştirilen yığın özelliklerine cevap verirler. Hareketli fazın kırma indisi, dielektrik sabiti, yoğunluğu gibi özelliklerinin değişimi sonucu ölçüm yapılır.

b) Analit Özellikli Dedektörler: U.V absarbansı, floresans şiddeti, …vb. analitin sahip olduğu ama hareketli fazın sahip olmadığı özelliklere cevap verirler. Bu özelliklerdeki değişimler ölçülerek sonuç elde edilir.

Tablo 2.1. Sıvı Kromatografik Dedektörlerin Performanslarının Karşılaştırılması (Kılıç ve Köseoğlu 1997).

Sıvı Kromatografik Dedektörler	**Belirleme Sınırı**
Absorbans	10 pg
Floresans	10 fg
Elektrokimyasal	100 fg
Kırma indisi	10 ng
İletkenlik	500 pg
Kütle spektrometre	1 pg
FT-IR	100 ng
Işık saçma[e]	500 ng
Optikçe aktiflik	1 ng
Element seçici	10 ng
Fotoiyonlaşma	1 pg-1 ng

Bilimsel araştırmalarda en çok kullanılan dedektör tipleri; UV absorbans, floresans, kırma indisi, elektrokimyasal ve kütle spektrometrisi dedektörleridir.

2.5.1 Absorbans Dedektörleri

Şekil 2.4. YPSK için ultraviyole dedektör hücresi. (Kılıç ve Köseoğlu, 1997)

Bu tip dedektörlerde kromatografik kolondan çıkan elementlerin takip ettiği akış hücresinin, hacimleri, kolon dışı bant genişlemesini en aza indirmek amacıyla olabildiğince düşük tutulmaktadır. Örneğin; Hacimler 1-10 μL ve hücre uzunluğu 2-10 mm arasında sıralandırılmıştır. Bu tipteki hücrelerin büyük kısmı yaklaşık 60 psi'den daha büyük basınçlarda çalışamazlar, basınç düşürme düzeneğine gereksinim duyarlar. Absorbans dedektörlerinin çoğunluğu çift ışın yolludur. Bu ışınlardan birisi eluent hücresinden geçerken diğeri şiddetinin azaltılması amacıyla bir filtreden geçirilir. Daha sonra bu iki ışın şiddetinin karşılaştırılması amacıyla birbirleriyle uyumlu fotoelektrik dedektörler kullanılır.

Kromatogram, dönüştürülmüş iki sinyalin oranının logaritmanın zamana karşı çizilen grafiğinden meydana gelir.

Ayrıca tek ışın demetli cihazlar da vardır. Burada çözücü sisteminin şiddet ölçümleri bir bilgisayarın hafızasında depolanır ve sonunda absorbans hesabı için bu değer tekrar kullanılır.

Absorbans Dedektörleri: a) Filtreli UV Absorbans Dedektörü

b) Monokromatörlü UV Absorbans Dedektörü

c) İnfrared Absorbans Dedektörü

2.5.1.1. Filtreli UV Absorbans Dedektörü:

Işın kaynağı olarak civa lambasının kullanıldığı filtreli fotometreler en basit ultraviyole absorbsiyon dedektörleridir. En yaygın kullanılan filtreli UV absorbans dedektörleri 254 nm dalga boyundaki ışını filtrede izole etme özelliğine sahip olanlardır. Ancak; 250, 313, 334 ve 365 nm dalga boyundaki ışınların da kullanımı vardır. Bu tip dedektörlerin kullanımı kullanılan dalga boyundaki ışınlardan birini absorblama özelliğine sahip analitlerle sınırlıdır. Bir kolondan elde edilen absorblayıcı türlerin teşhisinde ışın kaynağı olarak girişim filtreli döteryum veya tungsten telli ışın kaynaklarının da kullanımı vardır.

2.5.1.2. Monokromatörlü UV Absorbans Dedektörleri:

Piyasada; - Sadece UV ışınları kullanılan veya hem UV hem de görünür bölge ışınlarını kullanan optik ağlı spektrofotometreden oluşan dedektörler vardır. Bu dedektörlerde kromatogramın tamamı tek bir dalga boyundan alınabildiği gibi zamanla eluent pikleri birbirinden yeterince ayrıldığında her bir pike ait madde için uygun dalga boyu seçilmesi mümkündür. Filtre seçimi çoğunlukla bilgisayar kontrolü ile yapılır. En güçlü UV spektrofotometrik dedektörler fotodiyod dizisi dedektörleridir. Bu cihazlar yaklaşık 1 saniyede spektrumun tamamı için gerekli verileri toplayabilir ve üç boyutlu bir grafik halinde türlerin teşhis ve kantitatif tayini için gerekli şartların seçimine

yardımcı olacak bir spektrum sunar. (Kılıç ve Köseoğlu, 1997. Synder ve ark, 1997; Christian, 2004).

2.5.1.3. İnfrared Absorbans Dedektörleri:

2 tip infrared absorbans dedektörü vardır. Bunlar:

a) Dalga boyu taramasını 3 tane yarı dairesel filtre kanatları ile yapılan ve çalışma aralığı 2,5-14,5 μm veya 4000-690 cm^{-1} olan dedektörler. (Kılıç ve Köseoğlu, 1997).

b) Fourier dönüşümlü cihaza benzer infrared dedektörleridir. Bunların yapısı daha karmaşıktır. İnfrared dedektör hücreler kullanılan NaCI pencereler hariç yapılış bakımından UV ışınlı hücrelere benzemektedirler.

Hücre uzunlukları 3,2 – 1mm ve hücre hacmi 1,5 - 10μL arasında değişmektedir.

İnfrared dedektörlerin kullanımındaki dezavantajı – birçok kullanışlı çözücünün düşük geçirgenliğidir. Örneğin; su ve alkollerin geniş infrared absorbisyon bantları, bu dedektörlerin birçok uygulamada kullanımını engellemektedir.(Kılıç ve Köseoğlu, 1997; Christian, 2004).

2.5.2. Floresans Dedektörler

Floresans dedektörlerin çoğunun yapısı florometre ve spektroflorometrelere benzer şekilde tasarlanmıştır. Bu tip dedektörlerde floresans, uyarıcı ışına 90 derece açı ile yerleştirilmiş bir dedektör yardımıyla gözlenir. Daha gelişmiş cihazlardan floresans

ışımasını izole etmek için optik ağ monokromatör kullanılır. Yine çoğunlukla uyarıcı ışın kaynağı olarak civa lambası ve yayılan ışınların belli bandını izole etmek içinde filtre kullanılır. Gelişmiş cihazlarda kaynak olarak ksenon lambası kullanılır. Floresans dedektörlerde ayarlanabilir lazer ışın kaynağı kullanarak duyarlılığı ve seçiciliği artırma çalışmaları yapılmaktadır. (Kılıç ve Köseoğlu, 1997; Christian, 2004).

Floresans dedektörlerin üstünlükleri duyarlı olmalarıdır. Bu özelliklerinden dolayı floresans özelliği bulunan numunelerdeki bileşiklerin ayrılması ve tayini için sıvı kromatografi de kullanılmaktadır.

2.5.3. Kırılma İndisi Dedektörü:

Kırılma indisi dedektöründe çözücü kolunun yolu üzerinde bulunan hücrenin bir yarım bölmesinden geçer, eluat ise daha sonra diğer bölmesinden geçer. Bu iki bölme bir cam plakayla ayrılmıştır. Bu cam plaka, iki çözeltinin kırılma indisi birbirinden farklı ise gelen ışının kırılmasını sağlayacak açıda yerleştirilmiştir. Fotoduyarlı dedektörün yüzeyine gelen ışın demetinin yolundan sapması çıkış sinyalinin değişmesine sebep olur ve bu değişiklik yükseltilerek kaydedildiğinde kromatogram elde edilir. Kırılma indisi dedektörleri hemen hemen bütün analizlenecek maddelere cevap verebilmesi, güvenilirliği, akış hızından etkilenmemesi nedeniyle avantajlıdır.

Ancak bu tip dedektörlerle çalışılırken sıcaklığın sabit tutulması gereklidir. Sıcaklığa oldukça duyarlıdırlar ve hassasiyetleri diğer dedektörlere göre daha düşüktür.

Şekil 2.5. Differansiyel kırılma indisi dedektörünün şeması (Kılıç ve Köseoğlu, 1997).

2.5.4. Buharlaştırmalı Işık Saçma Dedektörleri

Son yıllarda YPSK için geliştirilmiş olan bu tip dedektörlerde kolondan çıkan çözelti sisleştirici denilen yapı içinden geçirilerek azot veya hava akımı ile ince bir sis haline dönüştürülür. Sis halindeki çözücü sıcaklık kontrollü sürükleme borusuna gönderilir. Oradan lazer ışın demetinin içinden geçirilir. Akış yönüne dik olarak saçılan ışınlar bir silisyum fotodiyod dizi dedektör yardımıyla ölçülür. Bu tip dedektörlerin diğerlerine göre üstünlüğü buharlaşmayan bütün analitlere aynı cevabı vermesidir. Ayrıca kırma indisi dedektörlerine göre duyarlılığı daha fazladır. (Kılıç ve Köseoğlu, 1997).

2.5.5. Elektrokimyasal Dedektörler

Elektrokimyasal dedektörler polarografik, kondüktometrik, kulometrik ve amperometrik olarak bölümlere ayrılabilir ve amperometrik dedektörler daha çok kullanılmaktadır. Amperometrik dedektörlerde kontrollü potansiyelde elektrokimyasal

değişikliğe uğrayan bileşikler elektrod yüzeyinde oksidasyon ya da redüksiyona uğradığında elektrodaki elektron akımı zamanın fonksiyonu olarak kaydedilir.

Bu tip dedektörlerin kullanılabilmesi için hareketli fazın elektriği iletmesi gerekmektedir. Organik çözücüler kullanıldığında hareketli faza mutlaka akımı iletmek üzere bazı maddeler katılmalıdır. Uygulanan potansiyelde çözücülerin elektrokimyasal inaktif olması gerekir. Bu dedektörde en büyük problem elektrot (camsı karbon) yüzeyinin kirlenmesidir.

Optik dedektörler kadar kullanımı yaygın olmasa da duyarlılık, basitlik, kullanışlılık bakımından daha avantajlıdır.

Şekil 2.6. YPSK için amperometrik ince tabakalı dedektör hücresi

2.5.6. Kütle Spektrometrik Dedektörler

YPSK ile kütle spektrometriyi birbirine bağlamada ortaya çıkan temel problem, YPSK'nın büyük çözücü hacimleri ile çalışması ve kütle spektrometrisinin de vakum gerektirmesidir. Bu problemi çözmek amacıyla çeşitli ara bağlantılar geliştirilmiştir. Bunlardan piyasada mevcut olan bir tanesinde kolondan çıkan eluat iki kısma ayrılır ve

çok az bir kısım kütle spektrometreye gönderilir. Akış hızları 10-50 μL/dk olan yeni mikrogözenekli kolonların kullanılmaya başlaması ile birlikte sıvı kromatografi sistemleri doğrudan kütle spektrometrik dedektöre bağlanır.

Termosprey olarak adlandırılan yeni ve ümit veren bir bağlantı şu an piyasada bulunmaktadır.

2.6. Kolonlar

Kolonlar genellikle içi paslanmaz çelik borulardan oluşmuştur ancak bazen kalın cidarlı cam borularda kullanılır.

2.6.1. Analitik Kolonlar

Sıvı kromatografi kolonları düz veya sarmal olabilirler. Kolon etkinliğindeki kayıp dolayısıyla sarmal konfigürasyona daha az rastlanmaktadır. Kolon boyu genellikle 10-30 cm arasında olup, kolonların birbirine eklenmesi yoluyla boylarının uzatılması sağlanabilir. Kolonların iç çapı 4-10 mm , kolon dolgu maddelerinin tanecik büyüklüğü ise genellikle 5-10 μm oranındadır. Günümüzde en sık kullanılan kolon 25 cm uzunluğunda 4,6 mm iç çapında ve 5 μm tanecik büyüklüğüne sahip kolondur.

Son yıllarda hız ve minimum çözücü sarfiyatı bakımından diğer kolonlara göre üstünlük sağlayan daha küçük boyutlarda yüksek hız ve yüksek performanslı kolon üretimi de sözkonusudur. Bu kolonlar ile 15 sn içinde 8 farklı tipte maddenin birbirinden ayrılması mümkündür. (Kılıç ve Köseoğlu, 1997; Christian 2004; Kissinger ve Heineman 1996; Adamovics, 1997).

2.6.2. Koruyucu Kolonlar

Analitik kolonu koruyarak daha uzun süre kullanımını sağlayan, analitik kolonun önüne yerleştirilen kısa kolondur. Görevi, partikül halindeki maddeleri, çözücü içindeki yabancı maddeleri, numune kabı içinde bulunan ve durgun faza geri dönüşümsüz olarak bağlanan maddeleri tutmak, hareketli fazı durgun faz ile doyurarak analitik kolondaki çözücü kaybının en aza inmesini sağlamaktır.

Emniyet kolununda tanecik boyutu basınç düşüşünü en aza indirmek amacıyla genellikle büyüktür. Emniyet kolonundaki dolgu maddesi analitik kolondaki dolgu maddelerinin benzeridir. Emniyet kolonu kirlendiği zaman yenisiyle değiştirilmek suretiyle daha pahalı olan analitik kolunun korunması sağlanır. (Kılıç ve Köseoğlu, 1997; Christian 2004).

2.6.3. Kolon Termostatları

Kolonların sıcaklığını kontrol etmek gerekli olmakla birlikte genellikle kolonlar oda sıcaklığında kullanılırlar. Ancak kolon sıcaklığı sabit tutulduğu zaman elde edilen kromatogramların daha iyi olduğu gözlenmiştir. Buna dayalı olarak, kolonların sıcaklığını 100-150°C'ye kadar her sıcaklıkta sabit tutabilen kolon ısıtıcıları ve kolonların bağlı bulunduğu sabit sıcaklıktaki bir su banyosu tarafından beslenen su ceketi kullanımı mümkündür.

2.7. Kolon Dolgu Maddeleri ve Özellikleri

YPSK cihazında kullanılan kolonlar, yüksek basıncı korumak için paslanmaz çelikten yapılmışlardır. Bunlar baştan başa düzgün bir iç çapa sahiptirler ve ticari olarak değişik büyüklüklerde mevcutturlar. Bir kromatografik sistemin performansı, kolonda gerçekleştirilen ayırma ile yani kolon dolgu maddesinin seçilmesi ve kullanılmasıyla

tayin edilir. İyi bir kolon dolgu maddesi kararlı olmalıdır ve hem hareketli faz çözücülerine hem de örnek çözeltilere karşı inert olmalıdır. Geniş bir yüzey alanına düzgün olarak dağılmış ve hareketli fazla kolay etkileşebilen açık yapılı bir yüzeye sahip olmalıdır. Yüksek basınç ve yüksek akış hızlarından etkilenmemelidir.

Kolon verimi; kolon dolgu maddesi, ortalama parçacık çapı, kolonu doldurmak için kullanılan teknikler, kolonun iç çapı ve kolonun iç yüzeyinin geometrisi gibi pek çok faktör tarafından tayin edilir. Paslanmaz çelik kolonların, malzeme özellikleri açısından en uygun kolonlar olduğu ortaya çıkmıştır. Analitik uygulamalarda, 2.1 mm, 3.2 mm ve 4.5 mm iç çapa sahip kolonlar 10-30 cm arasındaki uzunluklarda kullanılırlar.

Enjeksiyon sistemi-kolon ve kolon-dedektör arasındaki bağlantı borularının uzunluğunun mümkün olduğu kadar küçük tutulması istenir. Kolon çıkışına ve dedektör sistemine bağlanmış boruların en iyisi, hareketli fazla önemsiz ölçüde seyrelmeye izin veren minimum ölü hacme sahip olanıdır. Bu örnek seyrelmesini engelleyen, 0.025-0.05 cm iç çapa sahip (çelik ve teflon) bağlantı borularının kullanılmasıyla başarılır.

YPSK çalışmalarında sabit faz olarak genellikle silikajel kullanılır. İçerdiği SiOH grupları nedeniyle zayıf asidik özellik gösteren silikajel, bazik özellik gösteren bileşikleri bazlık kuvvetlerine göre tutar. Silikajel doğrudan dolgu maddesi olarak kullanıldığı gibi bir katı yüzeyine film halinde kaplanabilir. Asidik özellik gösteren bileşiklerin ayrılmasını sağlayan, yani bazik özellik taşıyan bir kolon dolgu maddesi de aluminadır. Bu dolgu maddesi de katı bir yüzeye film halinde kaplanarak kullanılır.

Elementel türlendirme amacı ile kullanılan dolgu maddesi ise genellikle anyon veya katyonları tutan iyon değiştirici reçinelerdir. Bu reçinelerin kullanılması durumunda örnekte iyon halinde bulunan türlerin birbirinden ayrılması sağlanabilir. Kullanılan iyon değiştirici reçineler doğrudan kolona doldurulabilen katı reçinelere olan ilgilerine etki eden birçok faktör vardır. Bunlar; iyonların yükü ve büyüklüğü, pH, iyon

şiddeti, kullanılan reçinenin gözenekliliği, çözücü cinsi, çözücü derişimi ve sıcaklıktır. Birkaç bileşenden oluşan bir karışımdaki her bileşen, farklı bir net yüke sahiptir ve bu yüzden kolondan ayrılması için farklı bir iyonik kuvvet gerektirir. İyonik kuvvet tamponun veya tampona eklenen tuzun artan derişimiyle artabilir. Bu, örneğin kolonda alıkonmasını azaltabilir ve bileşikler farklı tuz derişimlerinde kolondan daha kolay ayrılırlar.

Örnek bileşenlerinin ayrılması, tamponun pH'ının değiştirilmesiyle sağlanabilir. pH, molekülün pH'sına yaklaştığında molekül kendi yükünü kaybeder ve iyon değiştiriciden kurtulur. Katyon değiştirmede, örnekler kendi pH değerlerinin altında bir pH'da tutulduğunda, tamponun pH'ının artmasıyla örnek kolondan daha çabuk ayrılır.

İyon değiştirme, iyonik türlerden birinin diğeriyle yer değiştirmesini içerir. Sabit faz, iyon değiştirici R^+ vermek için, net pozitif yük taşıyan katı bir matriksten oluşur. Eğer anyon içeren hareketli faz kullanılırsa, R^+ (iyon değiştirici taraf) negatif karşı iyonu kendine doğru çeker, böylece örnek anyonları (X^-), karşı iyonlarla (Y^-) yer değiştirir.

$$R^+Y^- + X^- = R^+X^- + Y^-$$

Bu yöntem anyon değişimini içerdiğinden, *anyon değiştirme* olarak bilinir.

Yüzey, iyon değiştirici R^- vermek için, net negatif yük taşıdığı zaman *katyon değiştirme* olayı meydana gelir. Karşı iyonlar (Y^+) ve örnek iyonlarının (X^+) ikisi de katyondur ve iyon değiştirme şu şekilde olur:

$$R^-Y^+ + X^+ = R^-X^+ + Y^+$$

Anyon ve katyon değiştirici reçinelerde gerçekleşen ayırma mekanizmaları Şekil 2.7'de görülmektedir.

Şekil 2.7. Anyon ve katyon dağıtıcı reçinelerde gerçekleşen ayırma mekanizmaları

İyon değiştirme kromatografisinde, kromatografik destek maddesi, hareketli fazda iyonik çözeltilerle yer değiştirme yeteneğine sahip iyonları içerir. İyon değiştiricilerin iki tipi; bazik ve nötral maddeler için katyon değiştiriciler, asidik ve nötral maddeler için anyon değiştiricilerdir.

İyon değiştiriciler kimyasal özellik ve boyut farklılıklara kadar, yapısal farklılıklarına göre de sınıflandırılırlar.

I. Mikrogözenekli veya jel yapısındaki reçineler: Bu reçineler mikro gözenekler içeren, çapraz bağlı yapısal bir ağdan oluşmaktadır. Çok küçük gözeneklere sahip olduğundan polar olmayan çözücü sistemlerinde, şişme çok düşüktür. Büyük hacimlerdeki iyonların tutunması yavaştır ve çoğu kez tersinmezdir.

II. Makrogözenekli reçineler: Bu reçineler mikrogözenekli reçinelere ek olarak, geniş büyüklükte gözenekler de içerir. Bunlar büyük iç yüzey alanlarına ve yüksek gözenekliliğe sahiptir. Büyük gözenekler, farklı büyüklükteki iyonların iyon değiştirici fonksiyonel gruplara kolayca ulaşmasını sağlayan kanallar içerir.

III. Pelikular reçineler: Bu reçineler, cam boncuklardan oluşmuş iç kısma, iyon değiştirici ince bir reçine filminin kaplanmasıyla hazırlanır. İç kısmın çapı çok küçüktür ve bu yüzden çözücülerin çok küçük miktarları için uygundur.

IV. Yüzeysel gözenekli reçineler: Cam boncuklardan oluşmuş iç kısım, üzerine iyon değiştiricinin bağlandığı silika mikroküreciklerinin ince tabakasıyla çevrilir.

(a) Mikrogözenekli reçineler;
(b) Makrogözenekli reçineler;
(c) Pelikular reçineler;
(d) Yüzeysel gözenekli reçineler.

Şekil 2.8. Reçine tipleri

YPSK destek maddeleri hem silika temelli maddeleri hem de türevlendirilmiş hidrofilik veya hidrofobik polimerleri kapsar.

a) Polimer temelli iyon değiştiriciler: Polimer temelindeki iyon değiştirici reçinelerin polimerik iskeleti polistirene çapraz bağlanmış divinilbenzenden sentezlenir. Bu iskelet genellikle bir stirendivinilbenzen (DVB) polimeri, polimetakrilat polimeri, metakrilik asit divinilbenzen (MA-DVB) polimeri veya akrilik asit divinilbenzen (A-DVB) polimeridir. Bunlardan stirendivinilbenzen polimerinin oluşturulması aşağıdaki şekilde gerçekleştirilir.

Şekil 2.9. Stirendivinilbenzen polimerinin oluşumu

Çapraz bağlanmanın miktarı, divinilbenzen miktarı ile kontrol edilir. Genellikle her 11 mol stiren için 1 mol divinilbenzen kullanılır. Çapraz bağlı polimerik zincirlerin oluşturulması için yaygın biçimde p- divinilbenzen kullanılmakla birlikte, m-divinilbenzen de aynı işlevi görür. Polistirendivinilbenzen reçinesinin gözenekliliği ve mekanik kuvveti, çapraz bağlanma derecesinin bir fonksiyonudur. Yüksek dereceli çapraz bağlı reçineler (%8-10) yüksek basınçta kullanılabilir, fakat küçük çapları yüzünden, makro moleküllerin geçmesine izin vermezler. Düşük dereceli çapraz bağlı reçineler (%2-8), büyük moleküllerin matrikse geçmesine izin verir ve çözünürlüğü arttırırlar. Fakat mekanik kararlılıkları düşüktür. Bu destek maddelerinin avantajı, pH 2 – pH 12 aralığında kararlı olmalarıdır.

Katyon değiştiriciler, polimere asidik fonksiyonel gruplar eklenerek, anyon değiştiriciler ise bazik fonksiyonel gruplar eklenerek elde edilirler. En çok kullanılan fonksiyonel gruplar katyon değiştiriciler için $–SO_3^-$ (sülfonat), anyon değiştiriciler için kuarter amin ($-N^+(CH_3)_3$ trimetilamonyun; $-N^+ (CH_3)_2C_2H_4$ OH dimetil hidroksietil amonyum) formundaki iyon değiştiricilerdir. Örneğin bir stirendivinilbenzen polimeri sülfürik asitle tepkimeye girdiğinde $–SO_3H$ bağlı katyon değiştirici oluşturur:

Şekil 2.10. Stirendivinilbenzen polimerinden $–SO_3H$ bağlı katyon değiştirici oluşum reaksiyonu

b) Silika temelli iyon değiştiriciler: Silika temelinde iyon değiştiren matriksler hidrofiliktir ve polimerik tabaka oluşması için kullanılan çapraz bağlayıcılar yüzünden düşük hidrofobik tutunma gösterirler. Küçük parçacık büyüklükleri ve sık dağılımları yüksek kaliteli bir ayırma sağlar. Gözenekli yüzeylerinden dolayı, hareketli faza önemli bir temas yüzeyi sağlarlar. Kimyasal ve mekanik olarak kararlı olan silika matriksleri, yüksek akış hızı gerektiren yüksek basınca karşı iyi direnç gösterirler. 2.5-7 pH aralığındaki sulu tamponlar ve pek çok organik çözücüler, matrikste şişme veya büzülme olmaksızın kullanılabilirler. Bunlar mikro ve makro reçineler arasında bir yerde düşünülür ve iyon değiştirme fazı ince polimerik ağa monomerik bağlanmış olabilir. Silika temelindeki reçinenin avantajı, polistiren temelindeki iyon değiştirici reçineden, mL kolon hacmi başına daha büyük değiştirme kapasitesine sahip olmasıdır. Bununla birlikte silika bazlı iyon değiştiricilerin birkaç sınırlaması vardır. Bunların bazik koşullar altında kullanımları sınırlıdır ve yüksek iyonik şiddet kolon ömrünü azaltır.

İyon değiştirici reçineler, polimere bağlanan asidik veya bazik fonksiyonel grupların kuvvetine göre de sınıflandırılırlar. Bu sınıflandırma kuvvetli bazik (kuvvetli

anyon değiştirici), oldukça bazik, zayıf bazik, kuvvetli asidik (kuvvetli katyon değiştirici) ve zayıf asidik şeklindedir. Fonksiyonel grubun bazikliği veya asidikliği arttıkça ters yüklü örnek iyonlarını çekme gücü artar. Tabloda çeşitli katyon ve anyon değiştirici reçineler görülmektedir.

Tablo 2.2. Çeşitli İyon Değiştirici Reçineler

Sınıflandırma	**Fonksiyonel grup**	**Polimerik destek**
Kuvvetli bazik	Tetraalkil-amonyum hidroksit	S-DVB
(kuvvetli anyon değiştirici)	$-CH_2N(CH_3)_3^+Cl^-$	S-DVB
	$-CH_2N(CH_3)_3^+OH^-$	S-DVB
	Tetraalkil-amonyumklorür	S-DVB
Oldukça bazik	$-N(CH_3)_2$	S-DVB
Zayıf bazik	$-NH_2$	S-DVB
	$-NH_2$	S-DVB
Kuvvetli asidik	$-SO_3^-H^+$	S-DVB
(kuvvetli katyon değiştirici)		
	$-SO_3^-Na^+$	S-DVB
Zayıf asidik	$-COO^-H^+$	S-DVB

Tablo 2.3. Düşük Molekül Ağırlıklı (≤1000) Örnekler için Seçilmesi Greken Sabit Faz

Tablo 2.4. Yüksek Moleküllü (polimerler) Örnekler için Seçilmesi Gereken Sabit Faz

2.8. Sistem Uygunluk Testleri (SUT)

Kromatografik yöntemlerin bir parçasıdır. SUT yöntemin kabul edilebilir doğruluk ve kesinlikte olduğunu belirtir. Gerekli işlem ve hesaplamalar yöntem geliştirilmesi ve validasyon işlemlerinin tamamlanmasından sonra veya işlemler sırasında yapılır.

Örneğin SUT'nin bir parçası olan alıkonma zamanının tekrarlanabilirliği (%BBS) validasyon sırasında yapılır (Kılıç ve Köseoğlu, 1997; Christian 2004; Riley ve Rosanske, 1996).

Amerikan Farmakopesi 24 Tarafından Tanımlanan Sut Parametreleri (USP 24)

1. Teorik Tabaka (Plaka) Sayısı (N)
2. Kuyruklanma Faktörü (T)
3. Kapasite Faktörü (k)
4. Seçicilik Faktörü (α)
5. Ayırım Gücü (Resolution) (Rs)
6. Pik Yüksekliği veya Alanının %BSS'ı

Bu kriterlerden en az 2 tanesinin gerekli şartları sağlaması yöntemin sistem uygunluğunu göstermektedir (Riley ve Rosanske, 1996; USP 24).

2.8.1. Teorik Tabaka Sayısı (N):

Kolonun en önemli parametresidir. Kolondan çıkan pikin sivri ve dar olması ve piklerin birbirlerinden iyi ayrılması ile ilgilidir. N'nin sayısal değeri, analizi yapılan

maddenin cinsine bağlı olduğu gibi, deney koşullarına örneğin, akış hızı, sıcaklık, kolon kalitesi, dolumun tek biçimliliği gibi çeşitli faktörlere de bağlıdır.

Tavsiye edilen değer N > 2000 dir.

t_R = Maddenin alıkonma zamanı

W = Elde edilen pikin taban genişliği

2.8.2. Kuyruklanma Faktörü (T) ve Asimetri Faktörü (A_s):

Bu faktör pikin simetrik olması ile ilgilidir. Çalışmalarda daima simetrik pikler seçilmelidir. Simetrik olmayan piklerder:

1. Doğru olmayan tabaka sayısı ve ayırım gücü sonuçları,
2. Kararlı olmayan miktar tayinleri,
3. Gözlemlenemeyen pik kuyruklanmaları,
4. Alıkonmanın tekrarlanabilirliğinin düşük olması gibi sorunlarla karşılaşılır.

Pik asimetrisi (A_s) taban yüksekliğinin %10'u civarında, kuyruklanma faktörü (T) de %5'i civarında ölçülür (Şekil 2.11). Bu durumlarla karşılaşmamak için A_s'nin 0.95 – 1.2 arasında; T'nin de $T \leq 2$ olması istenir.

Şekil 2.11 Asimetri ve kuyruklanma faktörü

2.8.3. Kapasite Faktörü (k′):

Analizi yapılan maddelerin alıkonma zamanları veya alıkonma hacimleri yardımı ile hesaplanır. Kolonun performansı ve alıkonmanın uzun süreli tekrarlanabilirliği ile ilgilidir.

t_r/ V_r: Maddenin Alıkonma Zamanı/Hacmi

t_0/V_0 : Hareketli Fazın Alıkonma Zamanı/Hacmi

Elde edilen k′ değerinin genel çalışmalarda 2-8;

eser madde miktar tayininde 1-3 ve

stabilite belirleyici çalışmalarda k′>4 olması istenir.

2.8.4. Seçicilik Faktörü (α) :

Bağıl alıkonmayı ifade eder.

t_1: 1. Maddenin alıkonma zamanı

t_2: 2. Maddenin alıkonma zamanı

t_0: Hareketli fazın alıkonma zamanı

2 pikin elde edildiği sistemlerde (ikili karışım veya madde ve iç standardın kullanıldığı karışımlar için) kullanılır. Genel olarak $\alpha > 1$ olması istenir.

2.8.5. Ayırım Gücü (Resolution R_s):

Ayırım kantitatif kromatografi çalışmalarının başlıca gerekliliğidir. Genellikle 5 veya daha az madde içeren numunelerde $R_s > 1.5$ kolaylıkla sağlanabilir.

$R_s > 1.5$ maksimum kesinliğin göstergesidir. R_s bir kolonun eksiliğini, günler arası ayırım şartlarındaki değişiklikleri gösterir.

Şekil 2.12. İkili karışımlarda ayırım gücü parametreleri

t_1 : 1. Maddenin alıkonma zamanı

t_2: 2. Maddenin alıkonma zamanı

W_1: 1. Maddenin taban genişliği

W_2: 2. Maddenin taban genişliği

Genel ayırımlarda $R_s > 2.0$

Miktar Tayini çalışmalarında $R_s > 1.5$

Biolojik sıvılardan yapılan çalışmalarda $R_s > 1.2$

değerleri kabul edilebilir değerlerdir.

2.8.6. Pik Alanı veya Yüksekliğinin Tekraredilebilirliği (%BSS):

En az 6 defa tekrarlanan deneyler sonucu elde edilen pik alanı veya yüksekliklerinin bağıl standard sapmalarının (%BSS) hesaplanması ile elde edilir.

Genel ayırımlarda %BSS < %1.5

Biyolojik sıvılardan yapılan çalışmalarda %BSS < %5.0

Eser madde miktar tayininde %BSS değeri %5-15

kabul edilebilir değerlerdir.

3. BULGULAR

3.1. YPSK de Çalışma Koşulları

YPSK ile çalışırken;

* Kullanılan çözücülerin çok saf olması gerekir. Aksi taktirde istenmeyen pikler açığa çıkmaktadır.

* Hem hareketli fazda hem de kolonun doldurulması sırasında dolgu materyali arasında hava kabarcığı bulunmamalıdır.

* Kullanılan su bidistile olmalı ve 48 saat içinde tüketilmelidir.

* Hareketli faz olarak bir tampon çözelti veya karışımı kullanılıyorsa taze hazırlanmalı, günlük çalışma sonunda kolon distile su ile yıkanmalı ve sonra kolondan organik çözücü (metanol gibi) geçirilmelidir.

Ön hazırlıkları tamamlanmış kolon cihaza takılıp, tampon, pompa, dedektör, kaydedici ayarlanır. Kolon içerisinden 5-10 mL mobil faz geçirildikten sonra ortalama 20 μL enjekte edilir ve kromatogram alınır. Alınan bu ilk kromatograma bakıp akış hızında, hassasiyette ya da enjeksiyon hacminde gerekli düzenlemeler yapılır. Pikler yine istenen nitelikte değilse hareketli faz karışım oranları ya da bileşimi değiştirilir. Bununla da sonuç alınamıyorsa kolonda bozulma olup, olmadığına bakılır.

YPSK'nın en önemli kısmı kolon olduğundan kolonun ömrünü uzatmak için uygun hareketli faz ve uygun pH ile çalışma yapmak gerekir. Analiz çözeltisinin enjeksiyondan önce süzülmesi ya da santrifüj edilmesi gerekebilir. Kolon uzun süre kullanılmayacaksa uygun çözücü ile yıkanmalı, çatlamaları önlemek için sıkıca

kapatılıp, devamlı ıslak kalması sağlanmalı, oda sıcaklığında fiziksel darbelere maruz kalmayacak şekilde saklanmalıdır.

3.2. YPSK nın Uygulama Alanları ve İlaç Analizlerinde Kullanımlarına Örnekler:

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi bütün ayırma teknikleri arasında en yaygın kullanılanlardandır. Yöntemin bu kadar yaygın olmasının sebepleri duyarlılığı, doğruluğu, kantitatif tayinlere kolaylıkla uygulanabilir olması, uçucu olmayan türlerin veya sıcaklıkla kolayca bozunabilen türlerin ayrılmasına uygun olması ve hepsinden de önemlisi sanayinin, birçok bilim dalının birinci derecede ilgilendiği maddelere geniş bir şekilde uygulanabilirliğidir. Bu gibi maddelere örnek olarak; proteinler, aminoasitler, nükleik asitler, hidrokarbonlar, karbonhidratlar, terpenoidler, pestisitler, çeşitli organik ve inorganik bileşikler, antibiyotikler, steroidler ve diğer ilaçlar sayılabilir. Bu konuda yapılmış çok sayıda araştırma olduğu için sadece seçilmiş bazı çalışmalar burada verilmiştir.

YPSK nın İlaç Analizlerinde Kullanımlarına Örnekler:

Kishida ve Furusawa (2005) yaptıkları bir çalışmada Sulfomonometoksin, Sulfadimetoksin ve bunların Hidroksi /N^4- asetil metabolitlerini tavuk plazması dokusu ve yumurtasından tayin etmişlerdir. Bunun için etanol: %1 lik asetik asit karışımını 10:90 ve 20:80 karışımında hareketli faz olarak kullanmışlardır. DAD dedektöründen yararlanmışlardır. Tayin alt sınırı 30 ng/g veya ng/mL den daha düşük bulunmuştur.

Patil ve Bodhankar (2005) insan serumdan lamotrigine, Fenobarbiton, Karbamazepin ve Fenitoin adlı maddeleri tayin etmişlerdir. İnsan serumunda bu antiepileptik ilaçların tayini için basit ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemini kullanılmıştır. Serumu asetonitrille karıştırdıktan sonra santifüjlemişlerdir.

Santrifuj işleminden sonra yukarıda biriken sıvıdan alınmış ve Novapak C-18 kolona enjekte edilmiştir. Burada kullanılan hareketli faz; Fosfat tamponu: metanol: aselanitril: aseton (55:22:12:11) karışımıdır. pH 7 ye ayarlanmıştır ve 210 nm dalga boyunda UV dedektörü kullanılmıştır.

Özkan ve ark (2005) Abakavir'in ilaç dozaj formlarından, insan serumundan tayini ve tabletlerden çözünme hızı tayinleri için ters faz YPSK yöntemi geliştirmişlerdir. Hareketli faz kompozisyonu olarak metanol: asetonitril: 0, 015 M KH_2PO_4 (36: 2.6: 61, 4; h/h/h) karışımını pH 6.9'a ayarlayarak kullanmışlardır. Kolon olarak Waters Spherisorb ODSI (250 x 4.6 mm; 5μm partikül büyüklüğü) kolonunu ve iç standart olarak kateprofeni kullanmışlardır. Foto diyot dizisi dedektörünün kullanıldığı bu çalışmada 284 nm dalga boyu ile çalışılmıştır. Toplan 10 dakikalık süre içerisinde analiz bitmektedir. 0.010-20 μg mL^{-1} derişim aralığında doğrusallık saptanmış ve teşhis sınırı olarak 0,00093 μg mL^{-1} bulunmuştur.

Colombo ve arkadaşları (2005) tek çekirdekli perifer kan hücrelerindeki anti-Hiv ilaç etken maddelerini (İndavir, amprenavir, sequinavir, ritonavir, nilvanivir, lopinavir, atazenavir, efevirenz ve nevirapin) sıvı kromatografi tandom kütle spektrometri yöntemi ile tayin etmişlerdir. Bu yöntemde klozapin internal standart olarak kullanılmıştır. Elde edilen örneklerin kantitatif tayini için; elektrospray iyonizasyon triple quadrupole kütle spektrometresi yöntemi kullanmışlardır. Savaşer ve ark (2004), piroksikam'ın insan serumundan, tabletlerden ve farmakokinetik çalışmalarda tayini çin kullanılabilecek bir yöntem geliştirmişlerdir. Ters faz YPSK-UV yönteminden oluşan bu çalışmada 250 mm x 4.6 mm ve 5 μm partikül büyüklüğüne sahip spherisorp analitik kolon ve asetonitril: metanol: 0.04 M KH_2PO_4 (40: 10: 50; h/h/h) (pH 3.8) hareketli fazı kullanılmıştır. 330 nm dalga boyunun kullanıldığı bu çalışma için hareketli faz içerisinde 0,01 – 10 μg . mL^{-1}, serum içerisinde 0,025 – 5 μg. mL^{-1} arasında doğrusallık elde edilmiştir. Bu yöntem gönüllü deneklerden alınan numunelere de uygulanmış ve farmakokinetik profil ve parametreler saptanmıştır.

Ertürk ve arkadaşları (2003) tabletlerde ve bitmemiş ilaçlarda Atorvastatin ve safsızlıkları YPSK yöntemi ile tayin etmişlerdir. Bu çalışmada gradient ters faz YPSK ve UV dedektörü kullanmışlardır. Metanol veya asetonitril ve su karışımı gibi bazı solvan sistemleri test edilmiş, farklı pH larda tampon sistemleri hazırlamış ve benzer maddelerin kapasite faktörlerini tüm test edilmiş sistemlerde hesaplamışlardır. Luna C18 kolon, asetonitril – amonyum asetat tampon pH 4 – tetrahidrofuran (hareketli faz) kullanarak en iyi ayrımı gerçekleştirmişlerdir. Örnekler 1 mL/dk^{-1} akış hızı ile 248 nm de dedekte edilmiştir.

Mabrouk ve arkadaşları (2003) Loratadin ve Psödoefedrin sülfat'ı farmasotik formülasyonlarda ters faz sıvı kromatografi ve türev spektrofotometri yöntemlerini kullanarak tayin etmişlerdir. 247 nm de gerçekleşen, hareketli faz sisteminin (metanol : su : fosforikasit : amonyum dihidrojen fosfat) (220 : 300 : 2 : 3) (h / h/ h / g) olarak kullanıldığı, BondaPak C_{18} kolon tipi ile yapılan yüksek basınçlı sıvı kromatografi işleminde mobil faz olarak asetonitril seçilmiştir. Loratadinin kalibrasyon grafiği (5 – 100 μg. mL^{-1}) konsantrasyonlarda minimum 0,5 μg. mL^{-1} konsantrasyonlarda, psödoefedrin sülfatın ise kalibasyon grafiği (120 – 1200μg. mL^{-1}) konsantrasyonlarda, minimum 60 μg. mL^{-1} konsantrasyonlarda görülebilir.

Mabrouk ve arkadaşları (2003) Furosemid ve propranonol HCI'i Ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografi yöntemiyle analiz etmiştir. 0.02 M Potasyum dihidrojen fosfat + asetonitril h/h 80:20 asetonitril karışımı hareketli faz, UV 235 mm UV dedektör ve C18 nükleosil kolon kullanılmıştır. pH : 4.5 olarak belirlenmiştir. Tavşan plazmasındaki furosemidin teşhisi için propranolal internal standart olarak kullanmak suretiyle bu yöntem uygulanmıştır. Furosemidin (0,1 – 200 μg. mL^{-1}), propranonol HCl in (5-200 μg. mL^{-1}) konsantrasyonlarda tayini yapılmıştır.

Mayer ve arkadaşları (2003) yaptıkları bir çalışmada diklofenak adlı ilaç etken maddesinin teşhisinde YPSK – UV yöntemi kullanılmış ve tandem – kütle spektrometri yöntemleri ile de karşılaştırmışlardır. Topikal olarak kullanılan diklofenakın

uygulandığı derinin altındaki yağ tabakasından numune alınmış ve iki farklı yöntem farklı laboratuarlarda uygulanmıştır. Uygulanan birinci yöntem YPSK – UV : 280 nm de ikinci yöntem ise YPSK-MS tir. Uygulanan YPSK – UV ve YPSK – MS yöntemi düşük konsantrasyonlarda ve yüksek hassasiyetle teşhis yapma imkanı sağlamıştır. YPSK – UV biyolojik örneklerde diklofenakın teşhisi yapılamamıştır. YPSK – MS, YPSK – UV yöntemine göre daha fazla tercih edilmektedir. Daha hassas, daha kesin ve kısa sürede analiz yapabilme özelliği vadır.

Bonoto ve arkadaşları (2003) YPSK elektrospray kütle spektrometri yöntemini kullanarak plazmada İbuprofen'in enansioselektivite tayinini yapmışlardır. Plazma örnekleri sıvı – sıvı ekstraksiyon ile hazırlanmıştır. Hareketli faz olarak Metanol : su sabit faz olarak tris – (3,5 – dimetil fenilkarbamat) amiloz kullanılmıştır.

Arancibia ve arkadaşları (2003) Nitrofurantoin ve Nitrofurantoin'in idrardaki toksik metabolitinin süperkritik sıvılarla ekstraksiyonu ile elde edilen numunenin, UV dedektörü kullanarak YPSK yöntemi ile nitel tayinini gerçekleştirmişlerdir. Nitrofurantoin ve toksik metabolitinin standart solüsyonu eldesi için aprotik ortamda elektrokimyasal indirgenmesi yapıldıktan sonra yükseltgenmesi yapılmıştır.

Nitrofurantoin ve toksik metabolitinin YPSK analizlerinde UV dedektör kullanılmış ve 310 nm'de çalışılmıştır.

Garcia ve arkadaşları (2003) YPSK yöntemini kullanarak plazmadaki Klazepin, loksapin, Zuklopentiksol, Flupentiksol adlı dört adet antipsikotik etkili ilaç etken maddesini tayin etmişlerdir. İç standart olarak dihidrodibenzazepin C18 kolon ve UV dedektör kullanılmıştır.

Zendelovska ve Stafilov (2003) insan plazmasında SPE kullanarak Ranitidin ve Simetidin teşhisinde kullanılmak üzere bir YPSK yöntemini geliştirmişlerdir. UV

dedektör tipi ve Lichrocart Lichrosphar 60 RP-select B kolon tipi kullanılarak yayılan çalışmada iç standart olarak famotidin seçilmiştir.

Lee ve arkadaşları (2003) insan vücut sıvılarındaki benzodiazepininlerin tayinini YPSK – Kütle Spektrometri yöntemini kullanarak gerçekleştirmişlerdir. Etizolam, Brotizolam, Lorazepam materyal olarak kullanılmış bu maddelerin analizi hem plazma hem de idrarda yapılmıştır.

Zawilla ve arkadaşları (2003) farmasötik formülasyon ve saf haldeki Meloxicam'ın tayinini gerçekleştirmişlerdir. YPSK-UV dedektörlü yöntemle 100 – 500 mikrogram derişimdeki maddeler tayin edilebilmiştir.

Gandhimathi ve arkadaşları (2003) dozaj formlarından YPSK yöntemini kullanarak aspirin ve izosorbit 5 – mononitratın tayinini yapmışlardır. Hareketli faz olarak su : metanol, Therma Quest C18 tipi kolon, UV tipi dedektör kullanılmıştır. İç standart olarak klorzoksazon seçilmiştir.

Torrealday ve arkadaşları (2003) YPSK flurometrik dedektör yöntemini kullanarak Angiotensin II reseptör antagonisti olan Telmisartan'ın idrarda tayinini gerçekleştirmiştir. Hareketli faz olarak fosfat tamponu: asetonitril, Novapak C18 tipi kolon kullanılmıştır. 305 ve 364 nm'de UV tipi dedektör kullanılarak oda sıcaklığında ayırım gerçekleştirilmiştir.

Bazylak ve Nagels (2003) farmasötik formülasyonlarda Klenbuterol, ambroksol ve bromheksin'in YPSK yöntemi ile teşhisini yapmışlardır Asetonitril: etanol: perklorikasit (60 : 2 : 38) (h / h / h), potansiyometrik dedektör hareketli faz ve seçilerek yapılan çalışmada siyano ters faz YPSK kullanılmıştır.

Kmetec ve Roskar (2003) anne sütünde Tramadol'un YPSK yöntemi ile tayinini yapmışlardır. Burada sıvı-sıvı ekstraksiyon işlemi uygulanarak hekzan ile ekstre edildikten sonra, sulu fazla ekstraksiyon yapılmak suretiyle örnek hazırlanmıştır. İç standart olarak metapralol'un kullanımı uygun bulunmuştur.

Zainaghi ve arkadaşları (2003) YPSK yöntemi ile yaşlılık depresyonunda kullanılan Paroksetini tayin etmişlerdir. Hareketli faz olarak 0.05 mol.L^{-1} sodyum fosfat tamponu (pH: 5): asetonitril (50:50) kullanılmıştır. Ayırım ters faz YPSK kullanılarak izokratik şartlarda yapılmıştır. 205 nm dalga boyunda UV dedektör kullanılmıştır. Bu yöntemin oldukça etkin olduğu gözlenmiştir. Hasta başka ilaçlar kullanıyor durumda olsa bile seçici bir yöntem olarak önerilmiştir.

Yasu Furukori ve arkadaşları (2003) insan plazmasında antipsikotik bir ajan olan perospiron ve onun melabolitlerini YPSK yöntemi ile tayin etmişlerdir. Ekstraksiyon için 2 mL plazma, kloroform-hekzan ile 30:70 oranında ekstraksiyonu yapılmıştır. İki tip kolon kullanılmıştır. Bunlardan biri temizleme amacıyla, diğeri ise ayırım için kullanılmıştır. Pikler floresans dedektörle uyarma dalga boyu 315 nm ve emisyon dalga boyu 405 nm'de kullanılmış ve ayırma süresi 30 dakikada gerçekleşmiştir. Bu analiz yöntemi 0,1 – 100 ng /mL^{-1} derişimlerde uygun olmuştur.

Titier ve arkadaşları (2003) plazmada antipsikotikler ve haloperidol tayininde YPSK yöntemini fotodiyot dizisi dedektörü ile kullanmışlardır. Antipsikotik maddeler olarak, Risperidon, 9-hidroksi risperidon, olanzapin, klozapin ve haloperidol kullanılmıştır. C_{18} kolon ve asetonitril: fosfat tamponu (pH 3.8) hareketli faz olarak kullanılmıştır.

Foto diyot dizisi dedektörün sırayla 260, 280, 240 nm dalga boylarında kullanıldığı bu yöntemde tüm ilaçlar için tayin limiti 5 ng/mL^{-1} dir.

Segall ve arkadaşları (2003) antifungal aktiviteye sahip olan 5H- benzo [a] karbazol'ün YPSK ile analizini yapmışlardır. Ters faz YPSK ve UV dedektörü ile yapılan bu analizin süresi 11 dakika olarak önerilmiştir. 254 nm dalga boyu seçilmiştir.

Wang ve arkadaşları (2003) fare plazma mikro düzeydeki örneklerinde paklitakselin YPSK kullanarak tayinini yapmışlardır. 2'- metilpaklitaksel iç standart olarak kullanılarak katı-faz ekstraksiyon yöntemi yapılmıştır. ODS C_{18} kolonu ve asetonitril: metanol: amonyum asetat tamponu (48. 5: 16.5 : 35) hareketli faz olarak kullanılmıştır. 0.8 mL. dak^{-1} akış hızı ve 227 nm dalga boyundaki UV dedektörü bu yöntem için uygun bulunmuştur.

Radhakrishna ve arkadaşları (2003) yaptıkları bir çalışmada YPSK ve spektrofotometrik yöntemlerle montelukast ve loratidin'i tayin etmişlerdir C_{18} tipi kolon sabit faz, sodyum fosfat tamponu pH: 3,7: asetonitril (20:80) çözücü sistemi hareketli faz, UV 225 nm dedektör, kullanılarak yapılan çalışmada akış hızı 1,0 mL. dak^{-1} olarak tespit edilmiştir. 5-metil 2-nitrofenol iç standart olarak seçilmiştir.

Alvarez-Lueje ve arkadaşları (2003) yaptıkları bir çalışma da seçici YPSK yöntemini kullanarak Lerkanidipin adlı ilaç etken maddesini tabletlerden tayin etmişlerdir. Ters faz - YPSK yönteminde UV dedektör 356 nm de; elektrokimyasal dedektör 1000 mV potansiyelde tayin yapılmıştır. Uygulanan yöntem, analiz edilecek ilaçlar için seçici ve yeterli olmakla birlikte, tablet içeriğinde yer alan dolgu maddeleri sistemin seçiciliği için sorun yaratmamaktadır.

Fare plazma ve beyinin mikrodiyalizinde bulunan triazolamin semi-mikro kolon YPSK analizi ve itrakonazol ile etkileşimlerinin araştırılması çalışması Nakashima ve arkadaşları (2003) tarafından yapılmıştır. C_{18} kolon ve 222 nm dalga boyunda ayırım gerçekleşmiştir. (25 mg/kg) itrakonazol ve (2.5 mg/kg) triazolam'ın uygulama sonraki beyin mikrodiyalizinde triazolamin pik konsantrasyonu (C_{max}) ve eğrilerin içindeki alan 3.4 defa artmıştır.

Epilepsi hastaların plazmasında okskarbazepin ve metabolitlerin katı-faz ekstraksiyonundan sonra sıvı kromatografik tayini Mandrioli ve arkadaşları (2003) tarafından yürütülen çalışmada YPSK - UV ve katı faz ekstraksiyonu yöntemi uygulanmıştır. Ayrımlar ters faz kolon C_{18} ve hareketli faz olarak fosfot tamponu: asetonitril: metenol: trietilamin karışımı (pH 3.5) kullanılmıştır. Bu kromatografik şartlarda okskarbazepin ve metabolitlerin ayrımları 9 dakikada gerçekleşmiştir. Tayinin sınırı 15 ng. mL^{-1} dir. Bu yöntem kronik hastalarda uygulanmıştır.

İnsan plazmasında, sıvı kromatografisi kullanılarak Fluoksetin ve norfluoksetin enansiomerlerin tayinindeki çalışma Gatti ve arkadaşları (2003) tarafından yapılmıştır. Önce ekstraksiyonla ön saflaştırma işlemi yapılmıştır. Bu çalışmada Chiralcel ODR kolon ve hareketli faz olarak potasyum heksaflorofosfat: asetonitril karışımı kullanılmıştır. Tayin 227 nm'de olmuştur.

Fare saçı ve plazmasında ters faz sıvı kromatografisi elektrospray iyonizasyon kütle spektroskopisi kullanılarak hipnotik benzodiazepinler (alprazalam, estazolam ve midazalom) ve metabolitlerin tayini Toyo'oka ve arkadaşları (2003) tarafından yapılmıştır. YPSK-ES-KS ayrımları semi mikro kolon ile gerçekleşmiştir. Asetonitril-su (% asetik asitli) solvan sistemi kullanılarak elüsyon işlemi yapılmıştır. Bu yöntem, 5 gün boyunca ve günde iki kez intra peritonal olarak benzodiazepinler verildikten sonra Dark Agouti tip farelerin saçlarına uygulanmıştır. İlaçlar ve kendi metabolitleri saçta tayin edilebilmiştir. Alprazolam'dan 1- hidroksialprozolam ve 4-hidroksialprazolam estazolam'dan 8-kloro -6Fenil-4H- [1, 2, 4] triazolo [4, 3-a] [1,4] benzodiazepin -4-one, midazolam'dan 1-hidroksimidazolam ve 4-hidroksimidazolam.

Farmasötik Formülasyonlarında Klotrimazol, Ketokonazol ve Flukonazolun kromatografik tayinleri için Abdel - Moety ve arkadaşları (2003) tarafından yapılan çalışmada bu maddelerin saf ve ilaç halindeyken YPSK analizleri için bir yöntem geliştirilmiştir. Ayrımlar; ters faz kolon (Bondapak C_{18}), hareketli faz olarak asetonitril : 25mM trishidroksimetil aminometan (fosfat temponu pH 7) (55:45) karışımı

kullanılarak UV 260 nm'da gerçekleşmiştir. Bu üç maddelerin akış hızları değiştirilerek bu maddeler birbirlerine iç standart olmasını sağlamıştır.

Farmasötik dozaj formlarında metronidazol mikonazol'un Ters faz – YPSK kullanılarak tayini, Özkan ve arkadaşları (2003) tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada UV dedektörü kullanılmıştır. C_{18} ters faz kolonunun kullanıldığı bu çalışmada, hareketli faz olarak metanol: su (40: 60), akış hızı 1 ml. dak^{-1} ve iç standart olarak sulfametoksazol kullanılmıştır. Fotodiyot dizisi dedektörü 250 nm dalga boyuna ayarlanarak kullanılmıştır. Doğrusallık sınırı 10-70 μg. mL^{-1} metronidazol için, 1-20 μg. mL^{-1} mikonazol için saptanmıştır. Bu çalışmada vajinal ovüller kullanılmıştır.

İnsan Plazması ve Farmasötik Formülasyonunda Arilpropiyonik asit gurubu (non-steroidal anti-inflamatuar) ilaçlar'ın YPSK-UV yöntemi kullanılarak tayinleri Sun ve arkadaşları (2003) tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada izokraktik ayrımlar ODS kolon (250 x 4,6 mm) ile ortam sıcaklığında gerçekleşmiştir. Hareketli faz olarak ise asetonitril: fosfat tamponu: metanol: tetrohidrofuran çözelti sistemi kullanılmıştır. İç standart olarak mefenamik asit kullanılmıştır. Farmasötik formülasyonunda ilaçların %96.8-101.9 oranlarında bulunduğu tespit edilmiştir. Önceden 100 mikrolitre insan plazma örneklerinetil asetat kullanılarak sıvı-sıvı-ekstraksiyonu uygulanmıştır. Tayin sınırları 11.5-75 n. mL^{-1} olarak saptanmıştır.

Özkan ve Uslu (2002) yaptıkları çalışmada AIDS hastalığının tedavisinde kullanılan lamivudin için hızlı, kolay, duyarlı ve tamamen valide edilmiş bir analiz yöntemi geliştirmişlerdir. Geliştirdikleri bu yöntemi ilaç dozaj formlarına ve insan serumuna uygulamışlardır. Çalışmada C_{18} kolonu, metanol: su (75: 25; h/h) hareketli fazını ve deflazakortu iç standart olarak, kullanmışlardır. 265 nm dalga boyunun kullanıldığı bu çalışmada toplam 6 dakika analiz süresi belirlenmiştir.

Uslu ve Özkan (2002), ikili karışım halinde bulunan Lamivudin ve Zidovudin'in aynı anda analizi için ters faz YPSK yöntemi geliştirmişlerdir. Lamivudin

için 1-50 μg. mL^{-1}, Zidovudin için 2-100 μg. mL^{-1} aralığında doğrusallık elde edilmiştir. 265 nm dalga boyu ölçüm için kullanılmıştır. Metanol: su: asetonitril (70: 20: 10; h/h/h) karışımı 0.9 mL. dak^{-1} akış hızında kullanılmıştır. Yöntem tamamen valide edilmiş ve yöntemin tablet ve seruma uygulanabilirliği gösterilmiştir.

Trapp ve ark (2002) geliştirdikleri YPSK yöntemi ile, oksazepam'ın enansiyomerizasyon bariyerinde doğrudan hesaplama ve bilgisayarda tarama ile yaptığı çalışmada sabit faz olarak Nucleodex-β-PM (permethylated β-cyclodekstrin) (silika ile bağlı) hareketli faz olarak fosfat tamponu: methanol (6:4) karışımını kulanmışlardır.

Kromatografların değerlendirilmesi iki yolla yapılmış, birincisinde doğrudan hesaplama yolu, bu da bilgisayar kullanılmadan yapılmış, ikincisi ise bilgisayar programı ile modelleme yardımıyla yapılmıştır.

İnsan plazmasında ibuprofenin sıvı kromatografik yönteminin validasyonu için Farrar ve arkadaşlarının (2002) yaptıkları çalışmada, katı faz ekstraksiyonundan yararlanılmıştır. İç Standart Naproxen'dir. Katı faz ekstraksiyonundan sonra, numuneler injekte edilmeden önce 48 saat boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir. UV dedektörden yararlanılan bu yöntemde, doğrusallık aralığı olarak 0.78 – 100 μg. mL^{-1} ve tayin alt limiti 1.56 μg. mL^{-1} olarak bulunmuştur. Tekrar edilebilirlik düşük konsantrasyonda (4.5 μg. mL^{-1}), orta konsantrasyonda (40 μg. mL^{-1}) yüksek konsantrasyonlarda (85 μg. mL^{-1}) gerçekleşmiştir.

Sıvı-sıvı ekstraksiyon ile sıvı kromatografisi kullanılarak plazmadaki omeprazol ve iki metabolitinin tayinleri Gonzalez ve arkadaşları (2002) tarafından yürütülmüştür . Bu çalışmada omeprazol, hidroksiomeprazol, amoprazol sülfon analizi yapılmıştır. Ekstraksiyon için fosfat tamponu + dikloromethane : ether (95:5) karışımı kullanılmıştır. Kolon olorak Utrasfer ODS C_{18}, hareketli faz olarak acetonitrile: fosfat tamponu (24:76, pH8) : nonylamin % 0,015, ve iç standart olarak fenacetin

kullanılmıştır. UV dedektör 302 nm ye ayarlanmıştır. Omeprazol 9.5 dakikada, hidroksiomeprazol 3.25 dakikada, omeprazol sülfon 7.04 dakikada, iç standart (Fenasetin) ise 6,27 dakikada belirmiştir.

Radhakrishna ve arkadaşları (2002) astım tedavisinde kullanılan zafirlukastın tayini için YPSK ve derivative spektrofotometrik yöntemlerini kullanmışlardır. YPSK ile tayinde, UV dedektörü ile 225 nm de pik elde etmişler, RP_{18} kolonu ve mobil faz olarak asetonitril ve 0.01M potarsum dihidrojen fosfat (pH = 3,5) kullanılmıştır.

İç standart olarak Indol kullanılmıştır.

Hertzog ve arkadaşları (2002), losartan potasyum, hidroklorotiyazid ve onların bozunma ürünlerinin analizi için, stabilite çalışmaları ile valide edip geliştirdikleri YPSK metodunu kullanmışlardır. Bu etkin maddeleri içeren tabletlerde yaptıkları çalışmanın sonucunda geliştirdikleri YPSK metodu ile oldukça hassas olarak ayırım yaptıklarını belirtmişlerdir.

Verma ve Garg (2002), isosorbit monohidrat (IMN) ve bu etkin maddeyi içeren formülasyonlarda bu maddelerin analizi için valide edilmiş, ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisini kullanmışlardır. C_{18} kolonu kullanmışlar ve stabilite çalışmaları sonucu geliştirdikleri metod sayesinde başarı ile IMN'nin analizi edilebileceğini belirtmişlerdir.

Milano ve arkadaşları (2002), Oksikonazol içeren farmasötik preparatlarda etkin madde analizi için YPSK metodunu kullanmışlardır. Tablet, losyon ve krem tipi preparatlarda oksikonazol bu yöntemle kantitatif olarak tayin edilebilmektedir. Metod validasyonu çalışmaları sonucu, analiz edilebileceği aralık, doğrusallık, hassasiyet, doğruluk, geri kazanım tutarlılık, LOQ ve LOD değerleri uygun bulunmuştur. Ters-faz kromatografi ile yapılan bu analizde (C_8 kolonu ve hareketli faz olarak metanol:0.02M

Amonyum asetat tamponu (85:15 h/h) kullanılmış olup akış hızı dakikada 1mL olarak alınmıştır. 254 nm de UV dedektörü ile madde dedekte edilmiştir. Kalibrasyon eğrisinde 40-140 μg. mL^{-1} aralıkta doğrusallık bulunmuştur. Metodun hassasiyeti için bağıl standart sapma değerleri kremlerde %0.71, losyonlarda ise %1.57 olarak hesaplanmıştır. Gün içinde ve günler arası hassasiyet çalışmalarında BSS değerleri sırasıyla %0.57 ve %1.34 olarak bulunmuştur. Geri kazanım sonuçları ise losyonlarda %98.84-%102.2 arasında, kremlerde ise %100.54-101.59 bulunmuştur. Elde edilen kromatogramlar göstermiştir ki, Oksikonazol bozunma ürününden iyi bir şekilde ayrılmaktadır.

Santagati ve arkadaşları (2002) yaptıkları çalışmalarında amfetamin ve 4-hidroksinorepirefrin adlı metabolitinin tayini için elektrokimyasal dedektörlü YPSK metodu kullanmışlardır. Hypersil ODS RP-18 ters faz kolonu ve metanol-NaH_2PO_4 tamponu (pH=5.5) (30:70) harketli fazı kullanılan yöntemde, grafit elektrot kullanılarak, + 600mV'da ürünler dedekte edilebilmiştir. Analiz edilebilen doğrusallık aralığı 10-40 nmol standart eğrilerden elde edilen doğrusal regresyon sonuçlarından korelasyon katsayılarının 0.99dan daha büyük olduğu bulunmuştur.

Franeta ve arkadaşları (2002) Malophenum tabletlerindeki Asetilsalisilik asit, parasetamol, kafein ve fenbarbitali geliştirdikleri YPSK metodu ile tayin etmişlerdir. C_{18} kolonu, Asetonitril: su (25:75 h/h) karışımının fosforik asit ile pH=2.5'a ayarlanması ile elde edilen hareketli faz ve 2mL/dak^{-1} akış hızı ile 207 nm de UV dedektörü ile tayinleri yapılmıştır. Validasyon parametreleri ise; doğrusallık ($r > 0.998$) günler arası kesinlik (doğruluk) (BSS: %0.36-1.89) ve gün içi kesinlik (doğruluk) (BSS: %0.58-2.18), hassasiyet (LOD = 9×10^{-5} – $1,7 \times 10^{-4}$ mg/mL) ve LOQ = $2,5 \times 10^{-4}$ – $5,6 \times 10^{-4}$ mg/mL) doğruluk (%98,35 – 99.14) ve tekraredilebilirliklerinde gerikazanım değerleri = %98.74 – 102.0 değerleri asetilsalisik asit için, parasetamol için ise % 98.25 – 102.12, kafein için %98.15 – 102.3 olup sonuçları yeterli ve geliştirdikleri metodun hızlı ve hassas ve de kontrolleri için oldukça uygun olduğunu bildirmişlerdir.

Storms ve Stewart (2002) Prokain ve Prilokain'in ilaç kombinasyonlarındaki ayrılmaları için, geliştirdikleri YPSK metodunu uygulamışlardır. Geliştirdikleri metodun temelini oluşturan stabilite çalışmaları sonuçları USP 24'de yer alan monografları için oldukça faydalı olmuştur. Hareketli faz olarak fosfat tamponu (pH=3): Acetonitril (80 : 20 $^{h}/_{h}$) karışımı ve 254 nm de UV dedektörü kullanılarak 1 mL.dak^{-1} akış hızında deneyler yapılmıştır.

Oliveira ve arkadaşları (2002) parasetamol ve onun temel metabolitlerinin plazma düzeylerinde analizleri için basit YPSK yöntemi geliştirmişlerdir. Geliştirdikleri YPSK metodunda UV dedektörü kullanılmıştır. Parasetamol ile tedavi edilmiş deneklerden alınmış 20 μL lik kan numunelerinde parasetamol analizi sonuçlarında yakalama sınırı 600 pg, gün içi ve gün arası kesinlik, doğruluk değerleri sırasıyla % 7,1 ve % 3,2 olarak bulunmuştur.

Garg ve arkadaşları (2002) Urasil (U) ve dihidrourasilin (UH_2) plazma düzeylerinin tayini için geliştirdikleri YPSK metodunda C18 Spherisorb ODS2 kolonu, iç standart olarak 4 – klorourasil kullanmışlardır. 257, 220 ve 268 nm. dalga boylarında çalışılmış ve uygun kromatogramlar elde edilmiştir. Tayin limiti U için 0,02 μM, UH_2 için ise 0,1 μM olarak 0,5 ml plazma örneğinde bulunmuştur.

Karpinsko ve Starczewska (2002) adlı araştırmacılar, 252 nm de UV dedektörlü ters faz YPSK metodu ile bazı trisiklik antidepresanlar ve nöroleptikleri onların dörtlü karışımlarından tayin edebilmişlerdir. Analiz için C18 kolonu hareketli faz olarak da asetonitril: 0,01 M trietilamin (1:1) karışımı kullanılarak 0,9 mL.dak^{-1} akış hızında çalışmışlardır. pH = 2,7 'ye ayarlanmıştır. Alıkonma süreleri impramin, amitriptilin, klorprotiksen ve tiyoridazin için sırasıyla 5,8 ; 6,5 ; 8,3 ; 10,8 dakika olarak bulunmuştur. Analiz sonuçları imipramin ve amitriptilin 15 ppm, klorprotiksen 12 ppm ve tiyoridazin 10 ppm olarak farmasötik preparatlardan tayin edilebileceklerini göstermiştir.

Ruperez ve arkadaşları (2002) antihistaminik bir ilaç olan loratadin ile onları yedi adet bozunma ürünlerinin ayrılmaları ve kalite kontrolleri için bir YPSK metodu geliştirmişlerdir. Ters faz kolonu, hareketli faz olarak metanol: fosfat tamponu (pH = 7) ve 244 nm de UV dedektörü kullanılarak deneyler yapılmıştır.

Pajchel ve arkadaşları (2002) kapiler elektroforez metodu ile analizleri yapılabilen bazı antibiyotikler için geliştirdikleri YPSK yöntemini alternatif yöntem olarak ilgili yayınlarında açıklamışlardır. Fosfat-borat tamponu (pH:8.66) hareketli faz olarak kullanılmıştır. Metod validasyonu yapılmıştır. Amoksilin 0.05-3.03 μg. mL^{-1} ve ampisilin 0.05-3.08 μg. mL^{-1}, klavulanik asit 0.02-2.02 μg. mL^{-1} ve sulbaktam 0.05-2.08 mg/mL olarak tayin aralıkları tespit edilmiş ve tekrar edilebilirlik, doğruluk ve kesinlikleri değerlendirilmiştir. Bu yeni metod hızlı, ucuz ve sınırlı tüketilen organik çözücüler bakımından karşılaştırıldığında alternatif YPSK metodu bu antibiyotiklerin analizinde kullanılmıştır. Student –t test sonuçları her iki metod arasında fark olmadığını göstermiştir. Amoksilin ve klavulonik asit için elde edilen hesaplanan t değerleri sırasıyla 0.32 ve 1.62; ampisilin ve sulbaktam için ise sırasıyla 0.67 ve 1.93 bulunmuş ve bu değerlerin tablo t değerlerinden daha küçük oldukları için farkın anlamsız olduğunu bildirmişlerdir.

El-Ragehy ve arkadaşları (2002) loratadin'in hem saf hem de farmasötik preperatlarında ve bozunma ürünlerinin tayininde uygulamış oldukları dört analiz yönteminden birisi de YPSK metodu olmuştur. 250 nm dalga boyunda dedeksiyon yapılan bu yöntemde mobil faz olarak asetonitril: ortofosforik asit (35:65 v/v) sistemi ve iç standart olarak benzofenon kullanılmıştır. YPSK yönteminde tayin aralığı olarak 5.00-50.00 μg. mL^{-1} bulunmuştur.

Shen ve arkadaşları (2002) şizofreni tedavisinde kullanılan klozopin (CZP) ve risperidon (RSP) ile bunların metabolitlerinin hastaların plazmasındaki kantitatif tayinleri için (YPSK-UV) ultraviyole dedektörlü yüksek performanslı sıvı kromatografisi tekniğini önermişlerdir. Plazma örneklerinin ekstraksiyon aşamasından

sonra, C_{18} kolonundaki ayrılmaları, metanol-su-dimetilamin, 60:40:0.04 (v:v:v) hareketli faz yardımıyla olmuştur. Gün içi ve günler arası duyarlık ve doğruluk açısından yapılan deney sonuçlarına göre BSS değerleri sırasıyla %8.2 ve %5.6 dan daha az bulunmuştur. 1 mL plazma örneğinin LOD değeri CZP için 2.0 $ng.mL^{-1}$, metabolitlerinden (CZPN-oxide) 0.2 $ng.mL^{-1}$) ikincisi olan NCZ için ise 1.0 $ng.mL^{-1}$ bulunmuştur. RSP için LOD değerleri 1.0 $ng.mL^{-1}$, metabolitininki (9-OHRSP) ise 0.5 $ng.mL^{-1}$ olarak saptanmıştır. Kalibrasyon eğrileri Doğrusal bulunmuştur. ($r \geq 0.988$)

Fan ve Stewart (2002) zidovudine (AZT) / lamivudin (3TC) / nevirapin adlı ilaçların insan plazmasındaki tayinleri için iyon-çifti YPSK yöntemini önermişlerdir. Plazma örneklerine katı faz ekstraksiyonu uygulandıktan sonra, ters faz kolon üzerinde 265 nm dalga boyunda UV dedektör ve hareketli faz olarak 20 mN sodyum fosfat tamponu: asetonitril 8mN 1-oktansülfonik asit sodyum tuzu içeren (pH = 3.2) (86:14 h/h) sistemi yardımıyla ayrılmaları sağlanmıştır. Aprobarbital iç standart olarak seçilmiştir. Metod validasyonu sonuçlarına göre, AZT için aralık 57.6-2880 $ng.mL^{-1}$, 3TC için 59.0-17650 $ng.mL^{-1}$ ve nevirapin için 53.2-13300 $ng.mL^{-1}$ bulunmuştur. Doğruluk ve kesinlik açısından günler arası ve güç içi yapılan deney sonuçları sırasıyla %0.1-11 ve %0.4-14 arasında bulunmuştur. Plazmadan analitlerin ve IS için ekstraksiyonları sonucu %92 den büyük olduğu bulunmuştur. Bu üçlü ilaç sistemi ile tedavi gören AIDS hastaları için farmakokinetik çalışmalarında önerilen analiz yönteminin kullanılabileceği bildirilmektedir.

Levert ve arkadaşları (2002) antiepileptik etkili olan okskarbazin (Trileptal) ve onun aktif metabolitinin insan serumunda YPSK tekniği ile tayin etmişlerdir. İlacın serumdan ekstraksiyonu asetonitril ile yapılmıştır. Yöntemde C_{18} ters faz kolon ve UV dedektör (240 nm) kullanılmıştır. Okskarbazin için teşhis sınırı değeri 0.58 $\mu g.mL^{-1}$ ve geri kazanım %105.15 olarak bulunmuştur.

Raggi ve arkadaşları (2002) antidepresan olarak kullanılan reboksetin adlı ilacın insan plazmasından analizinde YPSK yöntemini seçmişlerdir. YPSK yönteminde

UV ve florimetrik dedektörler ile çalışmıştır. C_8 ters faz kolon ve asetonitril-sulu tetrametilamonyum perklorat tampon sistemini hareketli faz olarak kullanmışlardır. Florimetrik dedektör ile çalıştıklarında tayin alt sınırı ng.mL^{-1}; teşhis sınırı = 4 ng.mL^{-1} olarak bulunmuştur. Florimetrik metot reboksetin 9-fluorenil metilkloroformat ile ön kolonda türevlendirilmiştir. Plazma örnekleri katı faz ekstraksiyonu ile ön işlem görmektedir. Uygulanan her iki metod için elde edilen kesinlik BSS < %4,5 ve doğruluk ortalama geri kazanım > %94 sonuçlarının oldukça yeterliği olduğu bildirilmiştir.

Bajad ve arkadaşları (2002) piperin ve ketokonazol adlı enzim inhibitörlerinin fare plazmasında ve hepatoksit kültüründeki analizleri için basit ve hızlı olarak geliştirdikleri bir YPSK yöntemi önermişlerdir. Analiz C_{18} kolonda, 1mL.dak^{-1} akış hızında ve hareketli faz olarak 25 mM KH_2PQ, (pH = 4.5): asetonitril (50:50) kullanılarak yapılmıştır. Foto diyot dizisi dedektörün kullanıldığı yöntemde piperin için 340 nm, ketokonazol için 231 nm de ölçüm yapılmıştır.Tayin limitleri ise piperin için 2ng, ketokonazol için 4 ng olarak bulunmuştur. Piperinin tayin alt sınırı değeri 10ng, ketokonazol'ün ise 12 ng tespit edilmiş ve gün içi ile günler arası yapılan deney sonuçları değerleri %8 den daha az bulunmuştur.

Özkan (2001) yaptığı bir çalışmada Losarton potasyun ve hidroklorotiyazid'in aynı anda tayinini 232 nm dalga boyuna ayarlanmış UV dedektörü ile gerçekleştirmiştir. C_{18} ters faz kolonu ve 0,01 M KH_2PO_4: asetonitril (65:35) hareketli fazını, 1.0 mL.dak^{-1} akış hızında kullanmıştır. Losarton ve hidroklorotiyazit için doğrusallık aralığı sırası ile 25-10.000 ng.mL^{-1} ve 50-10.000 ng.mL^{-1} olarak bulunmuştur. Şekil 3.1'de de görülebileceği gibi Losartan, hidroklorotiyazit ve iç standart olarak kullanılan furosemit insan serumunda kolayca birbirlerinden ayrılmaktadır. Teşhis sınırı olarak Losartan için 1,02 ng.mL^{-1} ve hidroklorotiyazit için 4.49 ng.mL^{-1} saptanmıştır. Waters izokratik YPSK sisteminin kullanıldığı bu çalışmada kullanılan C_{18} kolon 150 x 4.6 mm boyutlarında ve 5μm partikül içermektedir. Geliştirilen yöntem tablet dozaj formuna ve serum numunelerine uygulanmış ve elde edilen sonuçlar ve geri kazanım değerleri ile de yöntemin uygulanabilirliği kanıtlanmıştır.

Şekil 3.1 Losartan (1000 ng.mL^{-1}); hidroklorotiyazid (1000 ng.mL^{-1}) ve iç standart furosemit (1000 ng.mL^{-1}) ile insan serumundan elde edilen kromatogram.

Özkan ve arkadaşları (2001) yaptıkları çalışmada, geniş spektrumlu antibiyotiklerden meropenem için ters faz YPSK yöntemi geliştirmişlerdir. Bu çalışmada C_{18} kolonunu ve 15 mMKH_2PO_4: asetonitril: metanol (84:12:4; h/h/h) karışımını hareketli faz olarak kullamışlardır. 307,6 nm dalga boyunda UV dedektörle çalışmışlardır. Doğrusallığı 50-10.000 ng.mL^{-1} aralığında saptanmışlardır. Geliştirilen yöntemi farmasötik dozaj formuna, serum ve idrara uygulamışlardır.

4. TARTIŞMA

Sıvı kromatografisi düzlemsel yüzeylere ve kolonlara uygulanabilen bir kromatografi türüdür. İlaç analizlerinde ve klinik analizlerde en çok kullanılan teknik ters faz sıvı kromatografisidir. Bunun nedenleri: Normal faz kromatografide sıvı fazın kontrolü çok önemli ve kritiktir. Hareketli fazdaki ufak değişiklikler, kromatograma belirgin şekilde yansır. Dengeye ulaşma normal faz kromatografide çok yavaştır. Normal faz kromatografide polar maddelerin elüsyonu çok yavaş olur. Bu yavaşlıkta piklerin yayılmasına ve genişlemesine sebep olur. Ayrıca apolar çözücüler çok pahalıdır.

YPSK, yapıları benzer kimyasal türlerin ayrılması için güçlü ve kullanışlı bir araçtır. Ayrıca ayrılan türlerin kalitatif ve kantitatif tayinleri için de kullanılmaktadır. Bu maddelerin alıkonma zamanları yardımı ile kalitatif, pik alanı veya yüksekliklerinin derişimle orantılı oluşundan kantitatif tayin yapılabilir. İç standart kullanılan yöntemlerde, maddenin pik alanı veya yüksekliği, iç standardın pik alanı veya yüksekliğine bölünür ve elde edilen alan oranları, derişimle birlikte değerlendirilir.

Kantitatif YPSK analizlerinde en çok kullanılan yöntem, bilinmeyen bileşimine benzer bir dizi standart çözelti hazırlamaktır. Bundan sonra kromatogramlar alınır ve pik alanı veya yüksekliği veya alan veya yükseklik oranları derişime karşı grafiğe geçirilir. Bu grafiğin kesim noktasının sıfıra yakın olması istenmektedir. Numuneler küçük hacimli olup (μL), bu tip küçük hacimlerin tekrarlanabilirliğinden kaynaklanan sorunlarla karşılaşılabilir.

İç standardın kullanımı en iyi kesinliği sağlaması açısından çok önemlidir. Bu sayede standart ve numune çözeltilerinin enjeksiyonu, akış hızı ve kolon şartlarındaki değişiklikten kaynaklanan belirsizlikler en aza indirilebilir. Bu tekniğin başarıya ulaşabilmesi için iç standart pikinin analizi yapılan numune pikinden ayrılması gereklidir.

YPSK, verimli, yüksek seçicilikte ve geniş uygulama alanı olan bir tekniktir. Çok küçük miktarda numunelerle çalışılır. Uçucu olmayan ve ısıya dayanıklı olmayan maddelere de uygulanması, inorganik iyonların da analizlerinde kullanılabilmesi üstünlükleridir.

YPSK cihazı günümüzde hemen bütün analiz laboratuarında yer almaktadır. Bu cihazla, ilaç analizleri, çevre analizleri, klinik analizler ve farmakokinetik çalışmalar başarı ile gerçekleştirilebilmektedir. Bu yöntemle yapılmış çalışmalar oldukça fazla olduğu için, bu çalışmaların arasından seçim yapılarak belli araştırmalar bu ödev kapsamı içinde verilmiştir. Bu teknikle tekli veya çoklu maddelerin birbirlerinden ve/veya bulundukları ortamlardan ayırımları kolayca sağlanmaktadır.

5. SONUÇ

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi karışımların ayrılması ve aynı anda tayin edilebilmeleri için geliştirilmiş en yaygın olarak kullanılan analiz tekniğidir. YPSK yöntemi ile analizi yapılan bileşiğin/bilşiklerin, kompleks ortamlardan, biyotransformasyon çalışmalarında, biyoyararlanım ve farmakokinetik çalışmalardan analizleri mümkün olmaktadır. Genel olarak ng veya μg düzeyinde tayinler yapılabilmektedir. YPSK yöntemi ile yapılan çalışmalar giderek artmaktadır. En fazla kullanımı olan ters faz YPSK tekniği ve UV dedektörüdür. YPSK yöntemi, yüksek duyarlık, seçicilik ve hızlı ayırımı nedeniyle ve az miktarda numuneye ihtiyaç duyduğu için sıklıkla tercih edilmektedir. Kullanılan dedeksiyon tekniğine göre tayin sınırlarında pg düzeyine kadar inilebilmesi de bir avantajıdır. Analizi yapılacak olan ilaç etken maddelerinin bozunma ürünleri veya metabolitlerinin de ayrılarak aynı anda analiz edilebilmesi üstünlüğü olarak belirtilebilir.

YPSK, başta ilaç endüstrisi, çevre analizleri, klinik analizler, enantiomer analizleri, biyoyararlanım ve farmakokinetik çalışmalar olmak üzere pek çok alanda yaygın bir kullanım alanına sahiptir. YPSK ile birlikte kullanılan dedektörler ve bunların hassasiyetleri geliştikçe bu tekniğin uygulama alanları daha da artacaktır.

ÖZET

Yüksek performanslı sıvı kromatografi ve ilaç analizlerindeki uygulamaları YPSK ilaç analizlerinde ve ilaç endüstrisinde tam otomatik sistemleri ve kolonlarının çeşitliliği açısından çok yaygın bir kullanım alanına sahiptir. Bu teknik, mükemmel kantitatif doğruluk, hassasiyet ve geniş bir doğrusallık aralığına sahiptir. YPSK ilaç geliştirmede, ön-klinik çalışmalarında, klinik geliştirmede ve bitmiş ürün analizlerinde kullanılmaktadır. Ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi, modern sıvı kromatografik teknikler arasında, ilaç analizlerinde en çok kullanılan yöntemdir. UV dedektörlü yöntemin ilaç analizlerindeki kulanımında en çok C_8 ve C_{18} kolonlarından katı faz olarak yararlanılmaktadır. Diğer YPSK dedektörleri, floresans, elektrokimyasal, kırılma indisi, kütle, infrared, buharlaştırmalı ışık saçma'dır. YPSK metodu, ilaç endüstrisinde yöntemin tutarlılığı ve doğruluğunun saptanmasında kritik rol oynamaktadır. Hızlı YPSK yöntemleri, analiz zamanının kısaltılmasında ve yüksek hassasiyetle analiz edilmesini sağlayacak şekilde sürekli gelişmektedir. İşlevsel YPSK metodları en çok ilaç analizlerinde, miktar tayinlerinde, safsızlık tayinlerinde, stabilite ve işlem anındaki analizlerde kullanılmaktadır.

Anahtar Sözcükler: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi, ilaç analizleri, dedektörler.

ABSTRACT

High Performance Liquid Chromatography and its Application to Drug Analysis

HPLC is used extensively in the pharmaceutical industry and drug analysis due to the availability of fully automated systems, and wide variety of column stationary phases. This technique has excellent quantitative precision, accuracy, and broad linear dynamic range. HPLC is used in drug discovery, pre-clinical, and clinical development and finished product analysis. Reverse phase high performance liquid chromatography is the most widely used mode of modern liquid chromatography in drug analysis. C_8 and C_{18} column are most commonly used as the stationary phases pharmaceutical analysis with UV detection. Other HPLC dedectors used for drug analysis are fluorescence, electrochemical, refractive index, mass, infrared, evaporative light scattering. HPLC methods play a critical role in ensuring the ruggedness and accuracy of methods used in the pharmaceutical industry. Rapid HPLC methods have made significant progress in reduction of analysis times and management of high throughput analysis. The functional types of HPLC methods, which are typically used in drug analysis are assay, impurity, stability and in-proces?

Key Words: High performance Liquid chromatography, drug analysis, dedectors.

KAYNAKLAR

ABDEL-MOETY, E.M., KHATTAB, F.I., KELANI, K.M., ABOU AL-ALAMEIN, A.M. (2003) Chromatographic determination of clotrimazole, ketoconazole and fluconazole in pharmaceutical formulations II. Farmaco. 57, 931 – 938.

ADAMOVICS, J.A. 1997. Chromatographic Analysis of Pharmaceuticals, 2nd Edition, Revised and Expanded, Marcel Dekker, New York.

AKAY, C., ÖZKAN, S. A., ŞENTÜRK, Z., CEVHEROĞLU, Ş. (2003) Simultaneous determination of metronidazole and miconazole in pharmaceutical dosage forms by RP – HPLC. II. Farmaco, 57, 953-957.

ALVAREZ-LUEJE,A., PUJOL, S., SQUELLA, J.A., NUNEZ-VERGARA, L.J. (2003) A selective HPLC method for determination of lercanidipine in tablets. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 31, 197-200.

ARANCIBIA, V., VALDERRAMA,M., MADARIAGA, A., ZUNIGA, M.C., SEGUNA, R. (2003) Extraction of nitrofurantoin and its toxic metabolite from urine by supercritical fluids. Quantitation by high performance liquid chromatography with UV detection, Talanta, 61, 377-383.

BAJAD, S., JOHRI, K.R., SINGH, K., SINGH, J., BEDI, L., K. (2002) Simple high performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of ketokonazole and piperine in rat plasma and hepatocyte culture. Journal of Chromatography A, 949, 43-47.

BAZYLAK, G., NAGELS, L.J. (2003) Simultaneous high-throughput determination of clenbuterol, ambroxol and bromhexine in pharmaceutical formulations by HPLC with potentiometric detection. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 32, 887-903.

BONOTO, P.S., DEL LAMA, M.P.F.M., COUVALHO, R. (2003) Enantioselective determination of ibuprofen in plasma by high-performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. Journal of Chroma tography B. 796., 413-420 .

CHRISTIAN, G.D., 2004. Analytical Chemistry, 6th Edition, John Wiley & Sons Inc., New Jersey.

COLOMBO, S., BEGUIN, A., TELENTI, A., BIOLLAZ, J., BUCLIN; T., RACHAT, B., DECOSTERD, L.A. (2005) Intracellular measurements of anti-HIV drugs indinavir, amprenavir, saquinavir, ritonavir, nelfinavir, lopinavir, atazanavir, efavirenz and nevirapine in peripheral blood mononuclear cells by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry Journal of Chomotography B.:819, 259-276.

EL RAGEHY, A.N., BADAWEY, M.A. (2002) EL-KHATEEB, Z.S. Stability indicating methods for the determination of loratadine in the presence of its degradation product. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 28, 1041-1053.

ERTÜRK, S., AKTAŞ, E.S., ERSOY, L., FIÇIOĞLU, S.(2003) An HPLC method for the determination of atorvastatin and its impurities in bulk drug and tablets.

FAN, B., STEWART, T. (2002) Determination of zidavudine / lamivudine / nevirapine in human plasma using ian-pair HPLC. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 28, 903-908.

FARRAR, H., LETZIG, L., GILL, M. (2002) Validation of a liquid chromatographic method for the determination of ibuprofen in human plasma. Journal of Chromatography B. 780, 341-348.

FRANETA, J.T., AGBABA, D., ERİC, S., PAVKOV, S., ALEKSC, M., VLADİMİROV, S. (2002) HPLC assay of acetylsalicylic acid, paracetamol, caffeine and phenobarbital in tablets. II Formaco. 57, 709-713.

GANDHIMATHI, M., RAVI, T.K., ABRAHAM, A., THOMAS, R. (2003) Simultaneous determination of aspirin and isosorbide 5-mononitrate in formulation by reversed phase high pressure liquid chromatography. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 32, 1145-1148.

GARCIA, L.G., FARFAR-BARAS,I., PEHOURCQ, F., JARRY, C. (2003) Simultaneous determination of four antipsychotic drugs in plasma by high-performance liquid chromatography. Application to management of acute intoxications. Journal of Chromatography B. 795, 257-264.

GARG, M.B., SEVESTER, C.J., SAKOFF, A.J., ACKLAND, P.S., (2002) Simple liquid chromatographic method for the determination of uracil and dihydrouracil plasma levels: a potential pretreatment predictor of 5-fluorouracil toxicity. Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences. 774, 223-230.

GATTI, G., BONOMI, I., MARCHISELLI, R., FATTORE, C., SPINA, E., SCORDO, G., PACIFICI, R., PERUCCA, E. (2003) Improved enantioselective assay for the determination of fluoxetine and norfluoxetine enantiomers in human plasma by liquid chromatography. Journal of Chromatograph B. 784, 375-383.

GONZALEZ, H.M., ROMERO, E.M., CHAVEZ, T.J., PEREGRINA, V.Q., HOYO-VADILLO, C. (2002) Phenotype of CYP2C19 and CYP3A4 by determination of omeprazole and its two main metabolites in plasma using liquid chromatography with liquid-liquid extraction. Journal of Chromatography B. 780, 459-465.

HERTZOG, L.D., MC CAFFERTY, F.J., FANG, X., TYRRELL, J.R., REED, A.R. (2002) Losarton potassium, hydrochlorothiazide, and their degredation products. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 30, 747-760.

KARPINSKA, J., STARCZEUSKA, B. (2002) Simultaneous LC determination of some antidepressants combined with neuroleptics. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 29, 519-525.

KILIÇ, E., KÖSEOĞLU, F. 1997, Enstrümental Analiz İlkeleri, Birinci Baskı, Bilim Yayıncılık, Ankara.

KILIÇ,E., KÖSEOĞLU, F. 1999. Analitik Kimya Temelleri, 7. Baskı, 2. Cilt, Bilim Yayıncılık, Ankara.

KISHIDA, K., FURUSAWA, N. (2005) Simultaneous determination of sulfamonomethoxine, sulfadimethoxine, and their hydroxy/*N*4-acetyl metabolites with gradient liquid chromatography in chicken plasma, tissues, and eggs. Talanta, 67. 54-58.

KISSINGER, P.T., HEINEMAN, W.R. 1996, Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry, 2nd Edition, Revised and Expanded, Marcel Dekker, New York.

KMETEC, V., ROSKAR, R. (2003) HPLC determination of tramadol in human breast milk. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 32, 983-989.

LEE,X.P., KUMAZAWA, T., SATO, J., SHOJI, V., HASEGAWA, C., KARIBE, C., ARINOBU, T., SENO, H., SATO, K. (2003) Simple method for the determination of benzodiazepines in human body fluids by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. Analytica Chimica Acla. 492, 223-231.

LEVERT, H., ODAU, P., ROBERT, H. (2002) LC determination op oxcarbazepine and its active metabolite in human serum. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 28, 517-528.

MABROUK, M.M., EL-SAHARTY, H.M., HAMMAD, S., WAHBI, A.A.M. (2003) Simultaneous high-performance liquid chromatographic assay of furosemide and propranolol HCL and its application in a pharmacokinetic study. Journal of Pharmaceutical and Biometical Analysis. 33. 699-709.

MANDRIOLI, R., GHEDINI, N., ALBANI, F., KENNDLER, E., RAGGI, M.A. (2003) Liquid chromatographic determination of oxcarbazepine and its metabolites in plasma of epileptic patients after solid-phase extraction. Journal of Chromatography B. 783, 253-263.

MAYER, X.B., NAMIRANIAN, K., DEHGHANYAR, P., STRAH, R., MASCHER, H., MÜLER, M. (2003) Comparison of UV and tandem mass spectrometric detection for the high-performance liquid chromatographic determination of diclofenac in microdialysis samples. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 33. : 745-754.

MILANO, J., MARSCH, M.L., CARDOSA, S.G. (2002) LC method for the analysis of oxcinazole in pharmaceutical formulations. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 30, 175-180.

NAKASHIMA, K., YAMAMOTO, K., AL-DIRBASHI, O.Y., KADDOUMI, A., NAKASHIMA, M.N. (2003) Semi-micro column HPLC of triazolam in rat plasma and brain microdialysate and its application to drug interaction study with itraconazole. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 30, 1809-1816.

OLIVEIRA, E.J., WATSON, G.D., MARTON, N.S. (2002) A simple microanalytical technique for the determination of paracetamol and its main metabolites in blood spots. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 29, 803-809.

ÖZKAN SA, (2001) Simultaneous Determination of losartan potassium and hydrochlorothiazide from tablets and Human serum by RP-HPLC. Journal of Liquid.Chromatography & Related Technology, 24(15) 2337-2346.

ÖZKAN, S.A., USLU,B (2002) Rapid HPLC Assay for Lamivudine in Pharmaceuticals and Human Serum. Journal of Liquid. Chromatography & Related Technology, 25(9), 1447-1456.

ÖZKAN, Y., KÜÇÜKGÜZEL,İ, ÖZKAN, SA, ABOUL-ENEIN, H.Y, (2001) A rapid, sensitive high performance Liquid chromatographic method for the determination of meropenem in pharmaceutical dosage form, human serum and urine. Biomedical. Chromatography 15., 263-266.

ÖZKAN, Y., SAVAŞER, A., ÖZKAN, S.A (2005), Simple and reliable HPLC Method of Abacavir determination in Pharmaceuticals, Human Serum and Drug Dissolution Studies from Tablets. Journal of Liquid Chromatography & Related Tecnology. 28, 423-427.

PAJCHEL, G., PAWLOWSKI, K., TYSKI, S. (2002) CE versus LC for simultaneous determination of amoxicillin/clavulanic acid and ampicillin/sulbactam in pharmaceutical formulations for injections. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 29, 75-81.

PATIL, K.M., BODHANKAR, 5.L. (2005) Simultaneous determination of lamotrigine, phenobarbitone, carbamazepine and phenytoin in human serum by high-performance liquid chromatography. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, In Pres, Corrected.

RADHAKRISHNA, T., NARASARAJU, A., RAMAKRISHNA, M., SATYANARAYANA, A. (2003) Simultaneous determination of montelukast and loratadine by HPLC and derivative spectrophotometric methods. Journal of Pharmaceutical and Bromedical Analysis. 31, 359-368.

RADHAKRISHNA, T., SATYANARAYANA, J., SATYANARAYANA A. (2002) Determination of zafirlukast by stability indicating LC and derivative spectrophotometry. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 30, 695-703.

RAGGI, A.M., MANDRIOLI, R., CASAMENTI, G., VOLTERRA, V., PINZAUTI, S. (2002) Determination of reboxetine, a recent antidepressant drug in human plasma by means of two high-performance liquid chromatography methods. Journal of Chromatography A. 949, 23-33.

RILEY, C.M., ROSANSKE, T.W, (1996). Development and Validation of Analytical Methods. 1st Ed. Pergaman Pres, Elsevier Science Ltd., New York.

RUPEREZ, J.F., FERNANDEZ, H., BOUBAS, C. (2002) LC determination of loratidine and related impurities. Journal of Pharmacutical and Biomedical Analysis. 29, 35-41.

SANTAGATI, N. A., FERRARA, G., MARRAZZO, A., RONSISVALLE, G. (2002) Simultaneous determination of amfetamine an one of its metabolites by HPLC with electrochemical detection. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 30, 175-180.

SAVAŞER, A., KARATAŞ, A., ÖZKAN, Y., YÜKSEL, N., ÖZKAN, S.A., BAYKARA, T. (2004) Validated LC Determination of the piroxicam β-Cyclodextrin Inclusion Complex in Tablets and in Human Plasma. Chromatographia, 59, 555-560.

SEGALL, A.I., VITALE, M.F., PEREZ, V.L., PİZZORNO, M.T. (2003) HPLC analysis of 5H-benzo [a] carbazole with antifungal activity. Journal Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 31, 1021-1026.

SHEN, L.Y., WU, L.H., KO, K.W., WU, M.S. (2002) Simultaneous determination of clazapine, clazapine Noxide, N-desmethylclazapine, risperidone, and ghydnoxyrisperitone in plasma by high performance liquid chramatography with ultraviolet detection. Analytica Chimica Acta. 460, 201-208.

STORMS, L.., STEWART T.J. (2002) Stability-indicating HPLC assays for the determination of prilocaine and procaine drug combinations. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 30, 49-58.

SUN, Y., TAKABA, K., KİDO, H., NAKASHIMA, M.N., NAKASHIMA, K. SIMULTANEOUS (2003) Determination of arylpropionic acidic non-steroidal anti-inflammatory drugs in pharmaceutical formulations and human plasma by HPLC with UV detection. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 30, 1611-1619.

SYNDER, L.R., KIRKLAND, J.J., GLAJCH, J.L. 1997 Practical HPLC Method Development. 2nd Ed., John Wiley & Sons, Inc. New York.

THE UNITED STATES PHARMACOPOEIA (USP 24) 2000, 24rd Ed (CD-ROM), Easton, Rand Mc Nally, Tounton, M.A.

TITIER, K., BOUCHET, S., PEHOURCG, F., MOORE, N., MOLIMARD, M. (2003) Hihg-performance liquid chromatographic method with diode array detection to identify and quantify atypical antipsychotics and haloperidol in plasma after overdose. Journal of Chromatography B. 788, 179-185.

TORREALDAY, N., GONZALEZ, L., ALONSO, R.M., JIMENEZ, R.M., LASTRA, E.O. (2003) Experimental design approach for the optimisation of a HPLC fluorimetric method for the quantitation of the angiotensin II receptor antagonist telmisartan in urine. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 32, 847-857.

TOYO'OKA, T., KAMAKI, Y., KANBARI, M., KATO, M., NAKAHARA, Y. (2003) Determination of hypnotic benzodiazepines (alprazolam, estazolam, and midazolam) and their metabolites in rat hair and plasma by reversed-phase liquid-chromatography with electrospray ionization mass spectrometry. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 30, 1773-1787.

TRAPP,O., TRAPP, G., SCHURIG, V. (2002) Direct calculation and computer simulation of the enantiomerization barrier of oxazepam in dynamic HPLC experiments –a comparative study. Journal of Biocheumical and Biophysical Methods. 54, 315-326.

USLU, B., ÖZKAN, S.A. (2002) Determination of Lamixudine and zidovudine in binary mixtures using first derivative spectrophotometric, first derivative of the ratio-spectra and high-performance Liquid Chromatography-UV methods. Analytical.Chimica. Acta, 466, 175-185.

VERMA R. K., GARG S. (2002) Valitaded Hihg Performance Liquid Chromatographic method for analysis of İsosorbide monanitrate in bulk material and extended release formulations. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 30, 583-591.

WANG, L.Z., HO, P.C., LEE, H.S., VADI, H.K., CHAN, V.W., YUNG, C.S. (2003) Quantitation of paclitaxel in micro-sample rat plasma by a sensitive reversed-phase HPLC assay. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 31, 283-289.

YASUI-FURUKORI, N., INOUE, V., TATEISHI, T. (2003) Determination of a new atypical antipsychotic agent perospirone and its metabolite in human plasma by automated column-switching high- performance liquid chromatography. Journal of Chromotography 789, 239-245.

YILDIZ, A., GENÇ, Ö. 1993. Enstrümantal Analiz, Hacettepe Üniversitesi Yayınları, Ankara.

ZAINAGHI, I.A., LANCHOTE, V.L., QUEIROZ, R.H.C. (2003) Determination of paroxetine in geriatric depression by high-performance liquid chromatography. Pharmacological Research. 48, 217-221.

ZAWILLA, N.H, MOHAMMAD, M.A.A., ELKOUSY, M.M., EL-MOGHAZY ALY, S.M. (2003) Determination of meloxicam in bulk and pharmaceutical formulations. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 32, 1135-1144.

ZENDELOVSKA, D., STAFILOV, T. (2003) Development of an HPLC method for the determination of ranitidine and cimetidine in human plasma following SPE. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 33, 243-249.

ÖZGEÇMİŞ

24.12.1977 Ankara doğumluyum. Çiğiltepe İlkokulu, Çalışkanlar Ortaokulu ve Yıldırım Beyazıd Lisesi mezunuyum. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesinde lisans eğitimimi tamamladıktan sonra, A.Ü. E.F. Analitik Kimya A.B.D'da tezsiz yüksek lisansa başladım. Emekli Sandığı Sağlık İşleri Daire Başkanlığı, Türk Eczacıları Birliği, Tokat SSK Hastanesi, Tokat İl Sağlık Müdürlüğü'nde görev yaptım. Halen S.B. İlaç ve Eczacılık Genel Müdürlüğünde eczacı olarak görev yapmaktayım. Dört çocuklu bir ailenin son üyesi olarak, anne ve babamla birlikte örnek mahallesinde ikamet etmekteyim.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi karışımların ayrılması ve aynı anda tayin edilebilmeleri için geliştirilmiş en yaygın olarak kullanılan analiz tekniğidir. YPSK yöntemi ile analizi yapılan bileşiğin/bilşiklerin, kompleks ortamlardan, biyotransformasyon çalışmalarında, biyoyararlanım ve farmakokinetik çalışmalardan analizleri mümkün olmaktadır. Genel olarak ng veya μg düzeyinde tayinler yapılabilmektedir. YPSK yöntemi ile yapılan çalışmalar giderek artmaktadır. En fazla kullanımı olan ters faz YPSK tekniği ve UV dedektörüdür. YPSK yöntemi, yüksek duyarlık, seçicilik ve hızlı ayırımı nedeniyle ve az miktarda numuneye ihtiyaç duyduğu için sıklıkla tercih edilmektedir. Kullanılan dedeksiyon tekniğine göre tayin sınırlarında pg düzeyine kadar inilebilmesi de bir avantajıdır. Analizi yapılacak olan ilaç etken maddelerinin bozunma ürünleri veya metabolitlerinin de ayrılarak aynı anda analiz edilebilmesi üstünlüğü olarak belirtilebilir.

YPSK, başta ilaç endüstrisi, çevre analizleri, klinik analizler, enantiomer analizleri, biyoyararlanım ve farmakokinetik çalışmalar olmak üzere pek çok alanda yaygın bir kullanım alanına sahiptir. YPSK ile birlikte kullanılan dedektörler ve bunların hassasiyetleri geliştikçe bu tekniğin uygulama alanları daha da artacaktır.

ÖZET

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Ve İlaç Analizlerindeki Uygulamaları

YPSK ilaç analizlerinde ve ilaç endüstrisinde tam otomatik sistemleri ve kolonlarının çeşitliliği açısından çok yaygın bir kullanım alanına sahiptir. Bu teknik, mükemmel kantitatif doğruluk, hassasiyet ve geniş bir doğrusallık aralığına sahiptir. YPSK ilaç geliştirmede, ön-klinik çalışmalarında, klinik geliştirmede ve bitmiş ürün analizlerinde kullanılmaktadır. Ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi, modern sıvıkromatografik teknikler arasında, ilaç analizlerinde en çok kullanılan yöntemdir. UV dedektörlü yöntemin ilaç analizlerindeki kulanımında en çok C_8 ve C_{18} kolonlarından katı faz olarak yararlanılmaktadır. Diğer YPSK dedektörleri, floresans, elektrokimyasal, kırılma indisi, kütle, infrared, buharlaştırmalıışık saçma'dır. YPSK metodu, ilaç endüstrisinde yöntemin tutarlılığı ve doğruluğunun saptanmasında kritik rol oynamaktadır. Hızlı YPSK yöntemleri, analiz zamanının kısaltılmasında ve yüksek hassasiyetle analiz edilmesini sağlayacak şekilde sürekli gelişmektedir. İşlevsel YPSK metodları en çok ilaç analizlerinde, miktar tayinlerinde, safsızlık tayinlerinde, stabilite ve işlem anındaki analizlerde kullanılmaktadır.

Anahtar Sözcükler: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi, ilaç analizleri, dedektörler.

SUMMARY

High Performance Liquid Chromatography and its Application to Drug Analysis

HPLC is used extensively in the pharmaceutical industry and drug analysis due to the availability of fully automated systems, and wide variety of column stationary phases. This technique has excellent quantitative precision, accuracy, and broad linear dynamic range. HPLC is used in drug discovery, pre-clinical, and clinical development and finished product analysis. Reverse phase high performance liquid chromatography is the most widely used mode of modern liquid chromatography in drug analysis. C_8 and C_{18} column are most commonly used as the stationary phases pharmaceutical analysis with UV detection. Other HPLC dedectors used for drug analysis are fluorescence, electrochemical, refractive index, mass, infrared, evaporative light scattering. HPLC methods play a critical role in ensuring the ruggedness and accuracy of methods used in the pharmaceutical industry. Rapid HPLC methods have made significant progress in reduction of analysis times and management of high throughput analysis. The functional types of HPLC methods, which are typically used in drug analysis are assay, impurity, stability and in-proces?

Key Words: High performance Liquid chromatography, drug analysis, dedectors.

KAYNAKLAR

ABDEL-MOETY, E.M., KHATTAB, F.I., KELANI, K.M., ABOU AL-ALAMEIN, A.M. (2003) Chromatographic determination of clotrimazole, ketoconazole and fluconazole in pharmaceutical formulations *II. Farmaco.* 57, 931 – 938.

ADAMOVICS, J.A. 1997. Chromatographic Analysis of Pharmaceuticals, 2nd Edition, Revised and Expanded, Marcel Dekker, New York.

AKAY, C., ÖZKAN, S. A., ŞENTÜRK, Z., CEVHEROĞLU, Ş. (2003) Simultaneous determination of metronidazole and miconazole in pharmaceutical dosage forms by RP – HPLC. *II. Farmaco,* 57, 953-957.

ALVAREZ-LUEJE,A., PUJOL, S., SQUELLA, J.A., NUNEZ-VERGARA, L.J. (2003) A selective HPLC method for determination of lercanidipine in tablets. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,* 31, 197-200.

ARANCIBIA, V., VALDERRAMA,M., MADARIAGA, A., ZUNIGA, M.C., SEGUNA, R. (2003) Extraction of nitrofurantoin and its toxic metabolite from urine by supercritical fluids. Quantitation by high performance liquid chromatography with UV detection, *Talanta*, 61, 377-383.

BAJAD, S., JOHRI, K.R., SINGH, K., SINGH, J., BEDI, L., K. (2002) Simple high performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of ketokonazole and piperine in rat plasma and hepatocyte culture. *Journal of Chromatography A,* 949, 43-47.

BAZYLAK, G., NAGELS, L.J. (2003) Simultaneous high-throughput determination of clenbuterol, ambroxol and bromhexine in pharmaceutical formulations by HPLC with potentiometric detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 32, 887-903.

BONOTO, P.S., DEL LAMA, M.P.F.M., COUVALHO, R. (2003) Enantioselective determination of ibuprofen in plasma by high-performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography B.* 796., 413-420 .

CHRISTIAN, G.D., 2004. Analytical Chemistry, 6th Edition, John Wiley & Sons Inc., New Jersey.

COLOMBO, S., BEGUIN, A., TELENTI, A., BIOLLAZ, J., BUCLIN; T., RACHAT, B., DECOSTERD, L.A. (2005) Intracellular measurements of anti-HIV drugs indinavir, amprenavir, saquinavir, ritonavir, nelfinavir, lopinavir, atazanavir, efavirenz and nevirapine in peripheral blood mononuclear cells by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry *Journal of Chomotography B.*:819, 259-276.

EL RAGEHY, A.N., BADAWEY, M.A. (2002) EL-KHATEEB, Z.S. Stability indicating methods for the determination of loratadine in the presence of its degradation product. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 28, 1041-1053.

ERTÜRK, S., AKTAŞ, E.S., ERSOY, L., FIÇIOĞLU, S.(2003) An HPLC method for the determination of atorvastatin and its impurities in bulk drug and tablets. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 33,1017-1023.*

FAN, B., STEWART, T. (2002) Determination of zidavudine / lamivudine / nevirapine in human plasma using ian-pair HPLC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 28, 903-908.

FARRAR, H., LETZIG, L., GILL, M. (2002) Validation of a liquid chromatographic method for the determination of ibuprofen in human plasma. *Journal of Chromatography B.* 780, 341-348.

FRANETA, J.T., AGBABA, D., ERİC, S., PAVKOV, S., ALEKSC, M., VLADİMİROV, S. (2002) HPLC assay of acetylsalicylic acid, paracetamol, caffeine and phenobarbital in tablets. *II Formaco.* 57, 709-713.

GANDHIMATHI, M., RAVI, T.K., ABRAHAM, A., THOMAS, R. (2003) Simultaneous determination of aspirin and isosorbide 5-mononitrate in formulation by reversed phase high pressure liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 32, 1145-1148.

GARCIA, L.G., FARFAR-BARAS,I., PEHOURCQ, F., JARRY, C. (2003) Simultaneous determination of four antipsychotic drugs in plasma by high-performance liquid chromatography. Application to management of acute intoxications. *Journal of Chromatography B.* 795, 257-264.

GARG, M.B., SEVESTER, C.J., SAKOFF, A.J., ACKLAND, P.S., (2002) Simple liquid chromatographic method for the determination of uracil and dihydrouracil plasma levels: a potential pretreatment predictor of 5-fluorouracil toxicity. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences.* 774, 223-230.

GATTI, G., BONOMI, I., MARCHISELLI, R., FATTORE, C., SPINA, E., SCORDO, G., PACIFICI, R., PERUCCA, E. (2003) Improved enantioselective assay for the determination of fluoxetine and norfluoxetine enantiomers in human plasma by liquid chromatography. *Journal of Chromatograph B.* 784, 375-383.

GONZALEZ, H.M., ROMERO, E.M., CHAVEZ, T.J., PEREGRINA, V.Q., HOYO-VADILLO, C. (2002) Phenotype of CYP2C19 and CYP3A4 by determination of omeprazole and its two main metabolites in plasma using liquid chromatography with liquid-liquid extraction. *Journal of Chromatography B.* 780, 459-465.

HERTZOG, L.D., MC CAFFERTY, F.J., FANG, X., TYRRELL, J.R., REED, A.R. (2002) Losarton potassium, hydrochlorothiazide, and their degredation products. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 30, 747-760.

KARPINSKA, J., STARCZEUSKA, B. (2002) Simultaneous LC determination of some antidepressants combined with neuroleptics. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 29, 519-525.

KILIÇ, E., KÖSEOĞLU, F. 1997, Enstrümental Analiz İlkeleri, Birinci Baskı, Bilim Yayıncılık, Ankara.

KILIÇ,E., KÖSEOĞLU, F. 1999. Analitik Kimya Temelleri, 7. Baskı, 2. Cilt, Bilim Yayıncılık, Ankara.

KISHIDA, K., FURUSAWA, N. (2005) Simultaneous determination of sulfamonomethoxine, sulfadimethoxine, and their hydroxy/N4-acetyl metabolites with gradient liquid chromatography in chicken plasma, tissues, and eggs. *Talanta,* 67. 54-58.

KISSINGER, P.T., HEINEMAN, W.R. 1996, Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry, 2nd Edition, Revised and Expanded, Marcel Dekker, New York.

KMETEC, V., ROSKAR, R. (2003) HPLC determination of tramadol in human breast milk. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 32, 983-989.

LEE,X.P., KUMAZAWA, T., SATO, J., SHOJI, V., HASEGAWA, C., KARIBE, C., ARINOBU, T., SENO, H., SATO, K. (2003) Simple method for the determination of benzodiazepines in human body fluids by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta.* 492, 223231.

LEVERT, H., ODAU, P., ROBERT, H. (2002) LC determination op oxcarbazepine and its active metabolite in human serum. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 28, 517-528.

MABROUK, M.M., EL-SAHARTY, H.M., HAMMAD, S., WAHBI, A.A.M. (2003) Simultaneous high-performance liquid chromatographic assay of furosemide and propranolol HCL and its application in a pharmacokinetic study. *Journal of Pharmaceutical and Biometical Analysis.* 33. 699-709.

MANDRIOLI, R., GHEDINI, N., ALBANI, F., KENNDLER, E., RAGGI, M.A. (2003) Liquid chromatographic determination of oxcarbazepine and its metabolites in plasma of epileptic patients after solid-phase extraction. *Journal of Chromatography B.* 783, 253-263.

MAYER, X.B., NAMIRANIAN, K., DEHGHANYAR, P., STRAH, R., MASCHER, H., MÜLER, M. (2003) Comparison of UV and tandem mass spectrometric detection for the high-performance liquid chromatographic determination of diclofenac in microdialysis samples. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 33. : 745-754.

MILANO, J., MARSCH, M.L., CARDOSA, S.G. (2002) LC method for the analysis of oxcinazole in pharmaceutical formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 30, 175-180.

NAKASHIMA, K., YAMAMOTO, K., AL-DIRBASHI, O.Y., KADDOUMI, A., NAKASHIMA, M.N. (2003) Semi-micro column HPLC of triazolam in rat plasma and brain microdialysate and its application to drug interaction study with itraconazole. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 30, 18091816.

OLIVEIRA, E.J., WATSON, G.D., MARTON, N.S. (2002) A simple microanalytical technique for the determination of paracetamol and its main metabolites in blood spots. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 29, 803-809.

ÖZKAN SA, (2001) Simultaneous Determination of losartan potassium and hydrochlorothiazide from tablets and Human serum by RP-HPLC. *Journal of Liquid.Chromatography & Related Technology,* 24(15) 2337-2346.

ÖZKAN, S.A., USLU,B (2002) Rapid HPLC Assay for Lamivudine in Pharmaceuticals and Human Serum. *Journal of Liquid. Chromatography & Related Technology,* 25(9), 1447-1456.

ÖZKAN, Y., KÜÇÜKGÜZEL,İ, ÖZKAN, SA, ABOUL-ENEIN, H.Y, (2001) A rapid, sensitive high performance Liquid chromatographic method for the determination of meropenem in pharmaceutical dosage form, human serum and urine. *Biomedical Chromatography* 15., 263-266.

ÖZKAN, Y., SAVAŞER, A., ÖZKAN, S.A (2005), Simple and reliable HPLC Method of Abacavir determination in Pharmaceuticals, Human Serum and Drug Dissolution Studies from Tablets. *Journal of Liquid Chromatography & Related Tecnology.* 28, 423-427.

PAJCHEL, G., PAWLOWSKI, K., TYSKI, S. (2002) CE versus LC for simultaneous determination of amoxicillin/clavulanic acid and ampicillin/sulbactam in pharmaceutical formulations for injections. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 29, 75-81.

PATIL, K.M., BODHANKAR, 5.L. (2005) Simultaneous determination of lamotrigine, phenobarbitone, carbamazepine and phenytoin in human serum by high-performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, In Pres, Corrected.*

RADHAKRISHNA, T., NARASARAJU, A., RAMAKRISHNA, M., SATYANARAYANA, A. (2003) Simultaneous determination of montelukast and loratadine by HPLC and derivative spectrophotometric methods. *Journal of Pharmaceutical and Bromedical Analysis.* 31, 359-368.

RADHAKRISHNA, T., SATYANARAYANA, J., SATYANARAYANA A. (2002) Determination of zafirlukast by stability indicating LC and derivative spectrophotometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 30, 695-703.

RAGGI, A.M., MANDRIOLI, R., CASAMENTI, G., VOLTERRA, V., PINZAUTI, S. (2002) Determination of reboxetine, a recent antidepressant drug in human plasma by means of two high-performance liquid chromatography methods. *Journal of Chromatography A.* 949, 23-33.

RILEY, C.M., ROSANSKE, T.W, (1996). Development and Validation of Analytical Methods. 1st Ed. Pergaman Pres, Elsevier Science Ltd., New York.

RUPEREZ, J.F., FERNANDEZ, H., BOUBAS, C. (2002) LC determination of loratidine and related impurities. *Journal of Pharmacutical and Biomedical Analysis.* 29, 35-41.

SANTAGATI, N. A., FERRARA, G., MARRAZZO, A., RONSISVALLE, G. (2002) Simultaneous determination of amfetamine an one of its metabolites by HPLC with electrochemical detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 30, 175-180.

SAVAŞER, A., KARATAŞ, A., ÖZKAN, Y., YÜKSEL, N., ÖZKAN, S.A., BAYKARA, T. (2004) Validated LC Determination of the piroxicam β-Cyclodextrin Inclusion Complex in Tablets and in Human Plasma. *Chromatographia,* 59, 555-560.

SEGALL, A.I., VITALE, M.F., PEREZ, V.L., PİZZORNO, M.T. (2003) HPLC analysis of 5H-benzo [a] carbazole with antifungal activity. *Journal Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 31, 1021-1026.

SHEN, L.Y., WU, L.H., KO, K.W., WU, M.S. (2002) Simultaneous determination of clazapine, clazapine Noxide, N-desmethylclazapine, risperidone, and ghydnoxyrisperitone in plasma by high performance liquid chramatography with ultraviolet detection. *Analytica Chimica Acta.* 460, 201-208.

STORMS, L.., STEWART T.J. (2002) Stability-indicating HPLC assays for the determination of prilocaine and procaine drug combinations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 30, 49-58.

SUN, Y., TAKABA, K., KİDO, H., NAKASHIMA, M.N., NAKASHIMA, K. SIMULTANEOUS (2003) Determination of arylpropionic acidic non-steroidal anti-inflammatory drugs in pharmaceutical formulations and human plasma by HPLC with UV detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 30, 1611-1619.

SYNDER, L.R., KIRKLAND, J.J., GLAJCH, J.L. 1997 Practical HPLC Method Development. 2nd Ed., John Wiley & Sons, Inc. New York.

THE UNITED STATES PHARMACOPOEIA (USP 24) 2000, 24rd Ed (CD-ROM), Easton, Rand Mc Nally, Tounton, M.A.

TITIER, K., BOUCHET, S., PEHOURCG, F., MOORE, N., MOLIMARD, M. (2003) Hihg-performance liquid chromatographic method with diode array detection to identify and quantify atypical antipsychotics and haloperidol in plasma after overdose. *Journal of Chromatography B.* 788, 179-185.

TORREALDAY, N., GONZALEZ, L., ALONSO, R.M., JIMENEZ, R.M., LASTRA,

E.O. (2003) Experimental design approach for the optimisation of a HPLC fluorimetric method for the quantitation of the angiotensin II receptor antagonist telmisartan in urine. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 32, 847-857.

TOYO'OKA, T., KAMAKI, Y., KANBARI, M., KATO, M., NAKAHARA, Y. (2003) Determination of hypnotic benzodiazepines (alprazolam, estazolam, and midazolam) and their metabolites in rat hair and plasma by reversed-phase liquid-chromatography with electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 30, 1773-1787.

TRAPP,O., TRAPP, G., SCHURIG, V. (2002) Direct calculation and computer simulation of the enantiomerization barrier of oxazepam in dynamic HPLC experiments –a comparative study. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods.* 54, 315-326.

USLU, B., ÖZKAN, S.A. (2002) Determination of Lamixudine 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, 175-185.

VERMA R. K., GARG S. (2002) Valitaded Hihg Performance Liquid Chromatographic method for analysis of İsosorbide monanitrate in bulk material and extended release formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 30, 583-591.

WANG, L.Z., HO, P.C., LEE, H.S., VADI, H.K., CHAN, V.W., YUNG, C.S. (2003) Quantitation of paclitaxel in micro-sample rat plasma by a sensitive reversed-phase HPLC assay. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 31, 283-289.

YASUI-FURUKORI, N., INOUE, V., TATEISHI, T. (2003) Determination of a new atypical antipsychotic agent perospirone and its metabolite in human plasma by automated column-switching high- performance liquid chromatography. *Journal of Chromotography* 789, 239-245.

YILDIZ, A., GENÇ, Ö. 1993. Enstrümantal Analiz, Hacettepe Üniversitesi Yayınları, Ankara.

ZAINAGHI, I.A., LANCHOTE, V.L., QUEIROZ, R.H.C. (2003) Determination of paroxetine in geriatric depression by high-performance liquid chromatography. *Pharmacological Research.* 48, 217-221.

ZAWILLA, N.H, MOHAMMAD, M.A.A., ELKOUSY, M.M., EL-MOGHAZY ALY,

S.M. (2003) Determination of meloxicam in bulk and pharmaceutical formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 32, 11351144.

ZENDELOVSKA, D., STAFILOV, T. (2003) Development of an HPLC method for the determination of ranitidine and cimetidine in human plasma following SPE. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 33, 243-249.

ÖZGEÇMİŞ

I. Bireysel Bilgiler

Adı	: Lalezar
Soyadı	: Yenilmez
Doğum yeri ve tarihi	: Ankara - 24.12.1977
Uyruğu	: T.C.
Medeni Durumu	: Bekar
İletişim adresi ve telefonu	: Babür Cad. 44/3 Telsizler / ANKARA 0312 318 96 96

II. Eğitimi **:**

Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Ankara Yıldırım Beyazıt Lisesi
Ankara Çalışkanlar Ortaokulu
Ankara Çiğiltepe İlkokulu

III. Mesleki Deneyimi **:** T.C. Emekli Sandığı Sağlık İşleri Daire Başkanlığı - ANKARA
Türk Eczacıları Birliği
Tokat SSK Hastanesi
Tokat İl Sağlık Müdürlüğü
S.B. İlaç ve Eczacılık Genel Müdürlüğü