TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İKİLİ KARIŞIM HALİNDE BULUNAN ANTİBİYOTİKLERİN AYNI ANDA TAYİNİ İÇİN GÜVENİLİR KROMATOGRAFİK VE SPEKTROFOTOMETRİK YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ

Yağız GÜRBÜZER

ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Nevin ERK

ANKARA
2025

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İKİLİ KARIŞIM HALİNDE BULUNAN ANTİBİYOTİKLERİN AYNI ANDA TAYİNİ İÇİN GÜVENİLİR KROMATOGRAFİK VE SPEKTROFOTOMETRİK YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ

Yağız GÜRBÜZER

ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Nevin ERK

ANKARA

2026

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum "İkili Karışım Halinde Bulunan Antibiyotiklerin Aynı Anda Tayini için Güvenilir Kromatografik ve Spektrofotometrik Yöntem Geliştirilmesi" başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikri/hipotez tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Yağız Gürbüzer

Tarih:

İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Anabilim Dalında
Yağız Gürbüzer tarafından hazırlanan
"İkili Karışım Halinde Bulunan Antibiyotiklerin Aynı Anda Tayini için Güvenilir Kromatografik ve Spektrofotometrik Yöntem Geliştirilmesi" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 09.01.2026

Prof. Dr. Bengi USLU
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Nevin ERK
Ankara Üniversitesi
Üye

Doç. Dr. Gizem TIRIS
Bezmialem Vakıf Üniversitesi
Raportör

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

Prof. Dr. Fügen AKTAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

İkili Karışım Halinde Bulunan Antibiyotiklerin Aynı Anda Tayini için Güvenilir Kromatografik ve Spektrofotometrik Yöntem Geliştirilmesi

Bu çalışma, hayvancılıkta, veteriner ilaçlarda ve insanda sıkça kullanımı görülen Spiramisin ve Metronidazol'ün Morötesi – Görünür Bölge Türev Spektrofotometride Modifiye Büyüklük Çıkarma (DS – MAS, Derivative Spectroscopy – Modified Amplitude Subtraction) metodu kullanılarak tayin edilmesini sağlayan bir metot geliştirilmesi ve geliştirilen bu metodun YPSK – DAD kullanılarak, bu tez kapsamında geliştirilmiş diğer bir metodun karşılaştırmasını kapsamaktadır. Ayrıca Morötesi – GB Spektrofotometre'de doğrudan tarama modu kullanılarak elde edilen verilerin neden bu iki maddenin eş zamanlı tayini için uygun olmadığı da verilerle gösterilmiştir. Geliştirilen her iki yöntem de ICH Q2 (R2) kılavuzu baz alınarak valide edilmiştir. Geliştirilen spektroskopik yöntem için Shimadzu UV1800 spektrofotometre ve Hellma 10.0mm kuvars küvetler kullanılmıştır. Program olarak ise Shimadzu UV-Probe 2.70 kullanılmış ve elde edilen spektrumların 1. dereceden türevi alınmıştır. Yöntemde çözücü olarak %10'luk etanol kullanılmıştır. Validasyon kapsamında kesinlik, özgünlük, sistem uygunluk, doğruluk ve doğrusallık çalışılmıştır. Spiramisin ve Metronidazol 1 µg/mL ve 17,5 µg/mL aralığında çalışılmış, doğrusal bir ilişki elde edilmiştir. Doğruluk parametresi, geri elde olarak %10, %100 ve %175 noktalarında çalışılmıştır. Çalışılan tüm validasyon parametreleri ise başarıyla beklenen limitleri karşılamıştır. YPSK – DAD metodu ise Agilent 1290 Infinity II HPLC sistemi ve Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C18 (Rapid Resolution, 150 mm x 4,6 mm, 3,5µm) kolon ile 60°C, 0.95mL/dk akışta, 232nm'de ve 5µL'lik enjeksiyon hacmi ile valide edilmiştir. Metotta 20 mM potasyum dihidrojen fosfat çözeltisinin fosforik asit ile pH'sının 2.8'e ayarlandığı tampon 85:15 (h/h) oranında asetonitril ile karıştırılmış ve hareketli faz A olarak kullanılmıştır. Hareketli faz B ise %100 asetonitril çözeltisi olarak belirlenmiş ve gradyan bir analiz hazırlanmıştır. Analiz süresi 17 dakika olarak ayarlanmıştır. YPSK metodunun validasyonu için kesinlik, günler arası kesinlik, doğruluk, doğrusallık, özgünlük, sistem uygunluk ve sağlamlık parametreleri çalışılmıştır. Doğrusallık 100 µg/mL ve 1500 µg/mL aralğında her iki etkin madde için lineer bulunmuştur ve doğruluk çalışması %10, %100 ve %150 noktalarında geri elde olarak çalışılmıştır. Geliştirilen metodun sağlamlığı, kolon sıcaklığı, hareketli fazdaki organik oranı, akış hızı ve dalga boyunda yapılan küçük değişikliklerle kanıtlanmış ve validasyonda çalışılan her bir parametre limitleri başarıyla karşılamıştır. Çalışma kapsamında, ayrıca, piyasada bulunmayan Spiramisin ve Metronidazol kombinasyonlu enjeksiyonluk sıvı için dört farklı formülasyon önerilmiş ve her iki metotta geliştirilen ürünlerden en az biri tayin edilmiştir. İki ürünün eş zamanlı tayininin iki farklı cihazda analizini içermesi ve piyasada bulunmayan yeni ürünler önermesi açısından, bu çalışma, literatüre önemli ve özgün bir katkı sunmayı amaçlamış ve Spiramisin ve Metronidazol'ün tayininde karşılaşılan zorluklara bir çözüm sunmuştur.

Anahtar Sözcükler: Metronidazol, Morötesi – GB Spektrofotometri, Spiramisin, Türev Spektroskopi, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

SUMMARY

Development of Reliable Chromatographic and Spectrophotometric Methods for the Simultaneous Determination of Antibiotics Present in Binary Mixtures

This study comprises the development of a method enabling the determination of Spiramycin and Metronidazole, which are frequently used in animal husbandry, veterinary pharmaceuticals, and in humans, by employing the Derivative Spectroscopy – Modified Amplitude Subtraction (DS–MAS) method in Ultraviolet–Visible Region Derivative Spectrophotometry, as well as the comparison of this developed method with another method established within the scope of this thesis using RP-HPLC–DAD. In addition, it is demonstrated with data why the results obtained through direct scanning mode in UV–Vis spectrophotometry are not suitable for the simultaneous determination of these two substances. Both developed methods were validated based on the ICH Q2 (R2) guideline. For the developed spectroscopic method, a Shimadzu UV-1800 spectrophotometer and Hellma 10.0 mm quartz cuvettes were used. Shimadzu UV-Probe 2.70 was employed for data acquisition, and first-derivative spectra of the obtained spectra were generated. A 10% ethanol solution was used as the solvent in the method. Within the scope of validation, precision, specificity, system suitability, accuracy, and linearity were evaluated. Spiramycin and Metronidazole were studied in the range of 1 µg/mL to 17.5 µg/mL, and a linear relationship was obtained. The accuracy parameter was studied at 10%, 100%, and 175% levels as recovery. All validation parameters examined met the expected limits successfully. The RP-HPLC–DAD method was validated using an Agilent 1290 Infinity II HPLC system and an Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C18 column (Rapid Resolution, 150 mm × 4.6 mm, 3.5 µm) at 60°C, with a flow rate of 0.95 mL/min, detection at 232 nm, and an injection volume of 5 µL. In the method, a buffer solution of 20 mM potassium dihydrogen phosphate, whose pH was adjusted to 2.8 with phosphoric acid, was mixed with acetonitrile in an 85:15 (v/v) ratio and used as mobile phase A. Mobile phase B was designated as 100% acetonitrile, and a gradient analysis was prepared. The analysis time was set to 17 minutes. For the validation of the RP-HPLC method, precision, inter-day precision, accuracy, linearity, specificity, system suitability, and robustness parameters were evaluated. Linearity was found to be linear for both active substances in the range of 100 µg/mL to 1500 µg/mL, and the accuracy study was performed at 10%, 100%, and 150% levels as recovery. The robustness of the developed method was demonstrated through small variations in column temperature, organic ratio of the mobile phase, flow rate, and wavelength, and each parameter studied within validation successfully met the specified limits. Within the scope of the study, four different formulation proposals were also developed for an injectable solution containing the Spiramycin and Metronidazole combination, which is not available on the market, and at least one of the developed products was determined by both methods. In terms of involving the analysis of the simultaneous determination of the two products on two different instruments and proposing new products that are not available on the market, this study aims to provide a significant and original contribution to the literature and offers a solution to the challenges encountered in the determination of Spiramycin and Metronidazole.

Keywords: Derivative Spectroscopy, High Performance Liquid Chromatography, Metronidazole, Spiramycin, UV – Vis Spectroscopy

ZUSAMMENFASSUNG

Entwicklung zuverlässiger chromatographischer und spektrophotometrischer Methoden zur gleichzeitigen Bestimmung von in binären Mischungen vorliegenden Antibiotika

Diese Studie umfasst die Entwicklung einer Methode, die die Bestimmung von Spiramycin und Metronidazol, welche häufig in der Tierhaltung, in veterinärmedizinischen Arzneimitteln und beim Menschen verwendet werden, mittels des Derivative Spektroskopie – Modified Amplitude Subtraction (DS–MAS)-Verfahrens im Ultraviolett–Sichtbaren Bereich ermöglicht, sowie den Vergleich dieser entwickelten Methode mit einer weiteren im Rahmen dieser Dissertation entwickelten Methode unter Verwendung von RP-HPLC–DAD. Zudem wird anhand von Daten gezeigt, warum die mit dem Direkt-Scan-Modus im UV–Vis-Spektrophotometer erhaltenen Ergebnisse für die gleichzeitige Bestimmung dieser beiden Substanzen ungeeignet sind. Beide entwickelten Methoden wurden gemäß der ICH Q2 (R2)-Leitlinie validiert. Für die entwickelte spektroskopische Methode wurden ein Shimadzu UV-1800 Spektrophotometer und Hellma-Quarzküvetten mit 10,0 mm verwendet. Als Software wurde Shimadzu UV-Probe 2.70 eingesetzt, und die erhaltenen Spektren wurden in ihre erste Ableitung überführt. Als Lösungsmittel wurde eine 10%ige Ethanollösung verwendet. Im Rahmen der Validierung wurden Präzision, Spezifität, Systemtauglichkeit, Richtigkeit und Linearität untersucht. Spiramycin und Metronidazol wurden im Bereich von 1 µg/mL bis 17,5 µg/mL untersucht, wobei eine lineare Beziehung erhalten wurde. Der Parameter der Richtigkeit wurde bei 10%, 100% und 175% als Wiederfindung geprüft. Alle untersuchten Validierungsparameter erfüllten erfolgreich die erwarteten Grenzwerte. Die RP-HPLC–DAD-Methode wurde unter Verwendung eines Agilent 1290 Infinity II HPLC-Systems und einer Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C18-Säule (Rapid Resolution, 150 mm × 4,6 mm, 3,5 µm) bei 60°C, mit einer Flussrate von 0,95 mL/min, einer Detektionswellenlänge von 232 nm und einem Injektionsvolumen von 5 µL validiert. In der Methode wurde eine Lösung aus 20 mM Kaliumdihydrogenphosphat, deren pH-Wert mit Phosphorsäure auf 2,8 eingestellt wurde, mit Acetonitril im Verhältnis 85:15 (v/v) gemischt und als mobile Phase A verwendet. Die mobile Phase B bestand aus 100% Acetonitril, und es wurde ein Gradientenprogramm erstellt. Die Analysendauer wurde auf 17 Minuten eingestellt. Für die Validierung der RP-HPLC-Methode wurden Präzision, Präzision zwischen den Tagen, Richtigkeit, Linearität, Spezifität, Systemtauglichkeit und Robustheit untersucht. Die Linearität wurde für beide Wirkstoffe im Bereich von 100 µg/mL bis 1500 µg/mL als linear befunden, und die Richtigkeitsprüfung wurde bei 10%, 100% und 150% als Wiederfindung durchgeführt. Die Robustheit der entwickelten Methode wurde durch kleine Änderungen der Säulentemperatur, des organischen Anteils der mobilen Phase, der Flussrate und der Wellenlänge nachgewiesen, und jeder im Rahmen der Validierung untersuchte Parameter erfüllte erfolgreich die Grenzwerte. Im Rahmen der Studie wurden zudem vier verschiedene Formulierungsvorschläge für eine Injektionslösung, die die Kombination Spiramycin–Metronidazol enthält und nicht auf dem Markt erhältlich ist, entwickelt, und mindestens eines der entwickelten Produkte konnte mit beiden Methoden bestimmt werden. In Bezug darauf, dass die gleichzeitige Bestimmung der beiden Produkte auf zwei verschiedenen Geräten analysiert wurde und neue, nicht auf dem Markt verfügbare Produkte vorgeschlagen wurden, zielt diese Studie darauf ab, einen bedeutenden und originellen Beitrag zur Literatur zu leisten und eine Lösung für die bei der Bestimmung von Spiramycin und Metronidazol auftretenden Schwierigkeiten zu bieten.

Schlüsselwörter: Derivativspektroskopie, Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, Metronidazol, Spiramycin, UV–Vis-Spektroskopie

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan ii
Kabul ve Onay iii
Özet iv
Summary v
Zusammenfassung vi
İçindekiler vii
Önsöz ix
Simgeler ve Kısaltmalar x
Şekiller xi
Çizelgeler xiv

1. GİRİŞ 1
1.1. Spiramisin ve Metronidazol 1
1.2. Spiramisin ve Metronidazol'ün Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri 3
1.2.1. Spiramisin'in Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri 3
1.2.2. Metronidazol'ün Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri 4
1.2.3. Spiramisin ve Metronidazol'ün Farmakodinamik Özellikleri 4
1.2.4. Spiramisin ve Metronidazol'ün Farmakokinetik Özellikleri 5
1.2.5. Spiramisin ve Metronidazol'ün Kullanım Şekilleri 5
1.3. Spiramisin ve Metronidazol İçin Uygulanmış Analiz Yöntemleri 6
1.4. Tez Kapsamında Kullanılan Yöntemler 6
1.4.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (YPSK) 6
1.4.2. Ters Faz Kromatografisi (Reversed-Phase Chromatography – RP Chromatography) 8
1.4.3. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisindeki Önemli Parametreler 8
1.4.4. Kromatografiyi Etkileyen Faktörler 12
1.5.1. Lambert – Beer Yasası 14
1.5.2. Beer Yasasından Sapmalar 17
1.5.3. Morötesi – Görünür Bölge Spektrofotometreler 18
1.5.4. Türev Spektrofotometri (Derivative Spectrophotometry – DS) 20
1.5.5. Türev Spektrofotometrinin Avantajları 23
1.5.6. Türev Spektrofotometrinin Dezavantajları 23
1.5.7. Türev Spektrofotometri Büyüklük Çıkarma Metodu (Modified Amplitude Subtraction Method, DS – MAS) 23
1.6. Analitik Metot Validasyonu 24
1.6.1. Özgünlük ve Seçicilik 24
1.6.2. Doğrusallık ve Aralık 24
1.6.3. Kesinlik 25
1.6.4. Doğruluk 25
1.6.5. Sağlamlık 25

2. GEREÇ VE YÖNTEM 27
2.1. Tez Kapsamında Kullanılan Reaktifler ve Etkin Maddeler 27
2.2. Tez Kapsamında Kullanılan Cihazlar, Programlar ve Gereçler 28
2.3. Yöntem 29
2.3.1. Morötesi – Görünür Bölge Spektroskopisi Metodu 29
2.3.2. Ürünlerin Hazırlanışı 29
2.3.3. Morötesi – GB Spektroskopisi Metodu Çözeltilerinin Hazırlanışı 30
2.3.3.1. Doğrusallık Çözeltilerinin Hazırlanışı 30
2.3.3.2. Kesinlik Çözeltilerinin Hazırlanışı 31

2.3.3.3. Doğruluk Çözeltilerinin Hazırlanışı 32
2.3.3.4. Özgünlük Çözeltilerinin Hazırlanışı 32
2.3.4. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Metodu 32

3. BULGULAR 33
3.1. Morötesi – Görünür Bölge Spektroskopisi Metodu 33
3.1.1. Doğrudan Morötesi – Görünür Bölge Spektroskopisi Sonuçları 33
3.1.1.1. Özgünlük Çalışması 33
3.1.1.2. Doğrusallık Çalışması 35
3.1.1.3. Kesinlik Çalışması 40
3.1.1.4. Doğruluk Çalışması 44
3.1.2. Morötesi – Görünür Bölge Türev Spektrofotometri Metodu Sonuçları 46
3.1.2.1. Türev Spektroskopisi Özgünlük Çalışması 48
3.1.2.2. Türev Spektroskopisi Doğrusallık Çalışması 50
3.1.2.3. Türev Spektroskopisi Kesinlik Çalışması 56
3.1.2.4. Türev Spektroskopisi Doğruluk Çalışması 58
3.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Metodu (YPSK – HPLC) 60
3.2.1. YPSK – Özgünlük Çalışması 61
3.2.3. YPSK – Kesinlik Çalışması 67
3.2.4. YPSK – Doğruluk Çalışması 72
3.2.5. YPSK – Sağlamlık Çalışması 73

4. TARTIŞMA 75
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 79
KAYNAKLAR 81
ÖZGEÇMİŞ **Error! Bookmark not defined.**

ÖNSÖZ

Spiramisin ve Metronidazol birçok alanda kullanımı olan iki antibiyotiktir. Bu iki etkin maddenin tayini hem gelişmekte olan antibiyotik rezistansı hem de piyasadaki ürünlerin analizi veya kalite kontrol amaçlı kontrolü için önemlidir. Ayrıca kombinasyon olarak kullanımı yaygın olan bu iki maddenin ayrı ayrı enjeksiyonluk sıvı formları bulunmasına karşın ortak bulundukları sıvı bir enjeksiyonluk dozaj formu bulunmamaktadır. Bu tez, belirtilen iki maddenin eş zamanlı tayini için Morötesi – GB'de türev spektrofotometrisi kullanılarak tayininin, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisinde literatürde bulunan metotlardan daha kısa analiz süresine sahip, Spiramisin ile Metronidazol'ün aynı anda tayininin ve piyasada kombinasyonlarının oluşturulabilmesi için formülasyonunun geliştirilmesini içermektedir. Yapılan bu çalışmalarla birden fazla soruna çözüm üretilmesi amaçlanmaktadır.

Tecrübesi ile beni yönlendiren ve bilgi birikimiyle beni aydınlatan, yeni bakış açıları kazanmamı sağlayan danışman hocam Prof. Dr. Nevin ERK'e teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım boyunca benden desteğini bir an bile esirgemeyen, sabrı ve ilgisiyle beni ayakta tutan eşim Gamze Nur Gürbüzer'e minnettarlığımı sunarım.

Ayrıca bu tezi yazmamda ve çalışmalarımı sürdürmemde bana destek olan Elixir İlaç Ar-Ge ve Gen İlaç ve Sağlık Ürünleri A.Ş.'ye destekleri için tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

α	Seçicilik
A	Absorbans
A_s	Pik Simetrisi
b	Küvet Yolu Uzunluğu
BSS	Bağıl Standart Sapma
c	Konsantrasyon
CRS	Certified Reference Standard
DAD	Diode Array Detector
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DS – MAS	Derivative Spectroscopy – Modified Amplitude Subtraction
E	Enerji
ε	Molar Absorptivite
f	%5 Yükseklikte Pik Genişliği
GB	Görünür Bölge
h	Planck Sabiti
H	Teorik Plaka Yüksekliği
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
I/I_0	Işık Şiddeti
ICH	International Council for Harmonization
k	Tutunma Faktörü
λ	Dalga Boyu
N	Teorik Plaka Sayısı
nm	Nanometre
R	Rezolüsyon
T	Transmittans
t_0	Ölü Zaman
t_R	Tutunma Süresi
ν	Frekans
V_0	Ölü Hacim
V_R	Tutunma Hacmi
w	Pik Genişliği
WHO	World Health Organization – Dünya Sağlık Örgütü
YPSK	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Spiramisin'in molekül yapısı. 3
Şekil 1.2. Metronidazol'ün molekül yapısı. 4
Şekil 1.3. Tutunma faktörü 9
Şekil 1.4. Seçicilik Faktörü 9
Şekil 1.5. Teorik Plaka Sayısı 9
Şekil 1.6. Rezolüsyon'un tutunma faktörü bakış açısından formülü 10
Şekil 1.7. Rezolüsyonun sistem parametreleri bakış açısından formülü 10
Şekil 1.8. Kromatogramdaki pik şekli tipleri. I) Rezolüsyonu yüksek, keskin pikler yüksek seçicilik ve verim, II) Rezolüsyonun düşük olduğu keskin piker düşük seçicilik, yüksek verim, III) Rezolüsyon yüksek geniş pikler, yüksek seçicilik ve düşük verim, IV) Düşük rezolüsyon ve geniş pikler, düşük seçicilik ve düşük verim demektir. 11
Şekil 1.9. Pik Simetrisi 11
Şekil 1.10. Van Deemter Eşitliği 12
Şekil 1.11. Teorik Plaka Yüksekliği 12
Şekil 1.12. Elektromanyetik Dalga 13
Şekil 1.13. Plank Eşitlikleri 13
Şekil 1.14. Dalga Boyu – Enerji İlişkisi 14
Şekil 1.15. Elektromanyetik Dalga Spektrumu 15
Şekil 1.16. Transmittans 16
Şekil 1.17. %Transmittans 16
Şekil 1.18. Absorbans 16
Şekil 1.19. Beer Yasası 16
Şekil 1.20. Lambert Yasası 16
Şekil 1.21. Absorbansın Molar Absorptivite ile Hesaplanması 17
Şekil 1.22. Eklenebilirlik Yasası 17
Şekil 1.23. Morötesi – Görünür Bölge Spektrofotometrenin Temel Bileşenleri 18
Şekil 1.24. Absorbansın n. Dereceden Türevi 20
Şekil 1.25. Absorbansın 1. Dereceden Türevi 21
Şekil 1.26. Absorbansın 2. Dereceden Türevi 21
Şekil 1.27. Absorbansın 3. Dereceden Türevi 21
Şekil 1.28. Türevin Eklenebilirlik Yasası'yla Birleşimi 21
Şekil 1.29. n. Dereceden Türev Spektrumlarına Örnekler, D0; Sıfırıncı dereceden türevin spektrumu, D1; Birinci dereceden türevi alınmış spektrum, D2; İkinci dereceden türevi alınmış spektrum, D3; Üçüncü dereceden türevi alınmış spektrum, D4; Dördüncü dereceden türevi alınmış spektrum, D5; Beşinci dereceden türevi alınmış spektrum. 22
Şekil 3.1. Spiramisin'in maksimum absorbansı, y-ekseni absorbans ve x-ekseni dalga boyu 34
Şekil 3.2. Metronidazol'ün maksimum absorbansı, y-ekseni absorbans ve x-ekseni dalga boyu 35

Şekil 3.3. Spiramisin'in Morötesi – GB metodunda doğrudan tarama modundaki doğrusallığı 36
Şekil 3.4. Metronidazole'ün Morötesi – GB metodunda doğrudan tarama modundaki doğrusallığı 37
Şekil 3.5. Spiramisin'in 232nm'deki doğrusallık çözeltisi piklerinin üst üste "Overlay" modundaki görüntüsü, y-ekseni absorbans, x-ekseni dalga boyu 38
Şekil 3.6. Metronidazol'ün 319nm'deki doğrusallık çözeltisi piklerinin üst üste "Overlay" modundaki görüntüsü, y-ekseni absorbans, x-ekseni dalga boyu 39
Şekil 3.7. Metronidazol'ün Morötesi – GB metodunda 229nm'deki girişim yapan pikinin doğrudan tarama modundaki doğrusallığı 40
Şekil 3.8. İki Standart Arasındaki Uyumun Hesaplanması 41
Şekil 3.9. % Miktar Tayininin Hesaplanması 41
Şekil 3.10. % Miktar Tayini Hesaplamasının Detaylı Hesaplaması 41
Şekil 3.11. Morötesi – GB Türev Spektroskopisinde Spektrumların Türevini Alırken Kullanılan Paramatreler 47
Şekil 3.12. Spiramisin'in Türevi Alınan Spektrumu ve Grafiğin 0'ı Kestiği Nokta (232nm), y-ekseni dA/dλ, x-ekseni dalga boyu 48
Şekil 3.13. Metronidazol'ün Türevi Alınan Spektrumu ve Grafiğin 0'ı Kestiği Nokta (319nm), y-ekseni dA/dλ, x-ekseni dalga boyu 49
Şekil 3.14. Metronidazol'ün Türevi Alınan Spektrumu ve Grafiğin 0'ı Kestiği Nokta (229nm), y-ekseni dA/dλ, x-ekseni dalga boyu 50
Şekil 3.15. Spiramisin'in Türevi Alınan Spektrumdaki Değerlerle Elde Edilen Kalibrasyon Eğrisi ve Doğrusallığı, y-ekseni dA/dλ, x-ekseni Konsantrasyon (1ppm, 5ppm, 7.5ppm, 10ppm, 15ppm, 17.5ppm) 52
Şekil 3.16. Metronidazol'ün Türevi Alınan Spektrumdaki Değerlerle Elde Edilen Kalibrasyon Eğrisi ve Doğrusallığı, y-ekseni dA/dλ, x-ekseni Konsantrasyon (1ppm, 5ppm, 7.5ppm, 10ppm, 15ppm, 17.5ppm) 52
Şekil 3.17. Metronidazol Türevi Alınan Spektrumda 229nm'deki Değerlerle Elde Edilen Kalibrasyon Eğrisi ve Doğrusallığı, y-ekseni dA/dλ, x-ekseni Konsantrasyon (1ppm, 5ppm, 7.5ppm, 10ppm, 15ppm, 17.5ppm) 53
Şekil 3.18. Türevi Alınan Spektrumlarda Spiramisin için Elde Edilen Grafiklerin Overlay modundaki Görüntüsü, y-ekseni dA/dλ, x-ekseni dalga boyu (1ppm, 5ppm, 7.5ppm, 10ppm, 15ppm, 17.5ppm) 54
Şekil 3.19. Türevi Alınan Spektrumlarda Metronidazol için Elde Edilen Grafiklerin Overlay modundaki Görüntüsü, y-ekseni dA/dλ, x-ekseni dalga boyu (1ppm, 5ppm, 7.5ppm, 10ppm, 15ppm, 17.5ppm) 55
Şekil 3.20. Türevi Alınan Spektrumlarda Metronidazol için Elde Edilen Grafiklerin Overlay modundaki Görüntüsü ve 229nm'de 0'ı Kestiği Nokta, y-ekseni dA/dλ, x-ekseni dalga boyu (1ppm, 5ppm, 7.5ppm, 10ppm, 15ppm, 17.5ppm) 56
Şekil 3.21. Spiramisin'in kromatogramı, y-ekseni sinyal, x-ekseni dakika 61
Şekil 3.22. Metronidazol'ün kromatogramı, y-ekseni sinyal, x-ekseni dakika 61
Şekil 3.23. Spiramisin CRS'in kromatogramı, y-ekseni sinyal, x-ekseni dakika 62

Şekil 3.24. YPSK'da Spiramisin Piklerinin Toplamının Doğrusallığı, y-ekseni Pik Alanı, x-ekseni Konsantrason (ppm) (100ppm, 250ppm, 500ppm, 750ppm, 1000ppm, 1500ppm ve 1750ppm noktaları) 64
Şekil 3.25. YPSK'da Spiramisin I Piklerinin Doğrusallığı, y-ekseni Pik Alanı, x-ekseni Konsantrason (ppm) (100ppm, 250ppm, 500ppm, 750ppm, 1000ppm, 1500ppm ve 1750ppm noktaları) 65
Şekil 3.26. YPSK'da Spiramisin II Piklerinin Doğrusallığı, y-ekseni Pik Alanı, x-ekseni Konsantrason (ppm) (100ppm, 250ppm, 500ppm, 750ppm, 1000ppm, 1500ppm ve 1750ppm noktaları) 65
Şekil 3.27. YPSK'da Spiramisin III Piklerinin Doğrusallığı, y-ekseni Pik Alanı, x-ekseni Konsantrason (ppm) (100ppm, 250ppm, 500ppm, 750ppm, 1000ppm, 1500ppm ve 1750ppm noktaları) 66
Şekil 3.28. YPSK'da Metronidazol Piklerinin Doğrusallığı, y-ekseni Pik Alanı, x-ekseni Konsantrason (ppm) (100ppm, 250ppm, 500ppm, 750ppm, 1000ppm, 1500ppm ve 1750ppm noktaları) 66

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Elektromanyetik Dalga Spektrumu 14
Çizelge 2.1. Kullanılan Reaktifler ve Standartlar 28
Çizelge 2.2. Kullanılan Cihazlar 29
Çizelge 2.3. Kullanılan Programlar 29
Çizelge 2.4. Kullanılan Kolonlar 29
Çizelge 2.5. Çalışılan Konsantrasyon Aralığı 31
Çizelge 3.1. Spiramisin ve Metronidazol'ün Doğrusallık Çalışıldığı Konsantrasyon Aralığı **Error! Bookmark not defined.**
Çizelge 3.2. Morötesi – GB Doğrudan Tarama Modunda Doğrusallık Sonuçları 40
Çizelge 3.3. Morötesi – GB Doğrudan Tarama Modunda Sistem Uygunluğun Değerlendirilmesi 41
Çizelge 3.4. Morötesi – GB Doğrudan Tarama Modunda Spiramisin'in Gerçek Absorbansının Hesaplanması 42
Çizelge 3.5. Morötesi – GB Doğrudan Tarama Modunda Spiramisin ve Metronidazol'ün Kesinliği 43
Çizelge 3.6. Morötesi – GB Doğrudan Tarama Modunda F002 Formülasyonunun Değerlendirilmesi 44
Çizelge 3.7. Morötesi – GB Doğrudan Tarama Modunda Doğruluk Parametresi için Spiramisin'in Gerçek Absorbansının Doğrusallıkta Kullanılan Kalibrasyon Eğrisinden Elde Edilmesi 45
Çizelge 3.8. Morötesi – GB Doğrudan Tarama Modunda Doğruluk Parametresinin Spiramisin için Değerlendirilmesi 45
Çizelge 3.9. Morötesi – GB Doğrudan Tarama Modunda Doğruluk Parametresinin Metronidazol için Değerlendirilmesi 46
Çizelge 3.10. Spiramisin ve Metronidazol'ün Türevi Alınan Spektrumlardaki Maxima Değerleri ve Çalışılan Konsantrasyonlar 51
Çizelge 3.11. Metronidazol'ün 229nm'de Türevi Alınan Spektrumlardaki Maxima Değerleri ve Çalışılan Konsantrasyonlar 51
Çizelge 3.12. Morötesi – GB Türev Spektroskopisinde Doğrusallık Sonuçları 53
Çizelge 3.13. Morötesi – GB Türev Spektroskopisinde Spiramisin, Metronidazol ve F002A'nın Kesinlik Sonuçlarının Değerlendirilmesi 57
Çizelge 3.14. Morötesi – GB Türev Spektroskopisinde Doğruluk Parametresi için Spiramisin'in Gerçek Değerinin Bulunması 58
Çizelge 3.15. Morötesi – GB Türev Spektroskopisinde Doğruluk Parametresinin Spiramisin ve Metronidazol için Değerlendirilmesi 59
Çizelge 3.16. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisinde Çalışılan Kromatografik Şartlar 60
Çizelge 3.17. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisinde Sistem Uygunluk Parametreleri (%BSS) 62
Çizelge 3.18. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisinde Sistem Uygunluk Parametreleri Kuyruklanma Faktörü) 62
Çizelge 3.19. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisinde Sistem Uygunluk Parametreleri Teorik Plaka Sayısı) 63

Çizelge 3.20. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisinde Doğrusallık Parametresinde Çalışılan Konsantrasyonlar 63
Çizelge 3.20. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisinde Doğrusallık Çalışmasının Sonuçları 64
Çizelge 3.21. YPSK'da Spiramisin ve Metronidazol için Çalışılan Kesinlik Parametresi Sonuçları 67
Çizelge 3.22. YPSK'da Kesinlik Parametresinin F001A Formülasyonundaki Sonuçları 68
Çizelge 3.22. YPSK'da Kesinlik Parametresinin F001B Formülasyonundaki Sonuçları 69
Çizelge 3.23. YPSK'da Kesinlik Parametresinin F002A Formülasyonundaki Sonuçları 69
Çizelge 3.24. YPSK'da Kesinlik Parametresinin F002B Formülasyonundaki Sonuçları 70
Çizelge 3.25. YPSK'da Spiramisin ve Metronidazol'ün Ara Kesinlik Sonuçları 71
Çizelge 3.26. YPSK'da Spiramisin ve Metronidazol'ün Doğruluk Parametresi Sonuçları 72
Çizelge 3.26. YPSK'da Sağlamlık Parametresinde Çalışılan Koşullar 73
Çizelge 3.27. YPSK'da Sağlamlık Parametresinde Spiramisin ve Metronidazol Sonuçları 73

1. GİRİŞ

1.1. Spiramisin ve Metronidazol

Spiramisin ilk olarak 1954 senesinde *Streptomyces ambofaciens* adlı bir bakteriden izole edilmiş 16 üyeli makrolid bir antibiyotiktir ve Spiramisn I, II ve III adlı üç ana bileşenden oluşan bir karışımdır. Karışımdaki Spiramisin I oranı, karışımın yaklaşık %80'ini oluşturmaktadır ve *Toxoplasma gondii*'ye karşı gösterdiği güçlü antibakteriyel aktiviteden dolayı yaygın olarak kullanılmaktadır. (Wang vd., 2024, s: 14; Santos vd., 2022, s: 421-422) Spiramisin'in üretimi Streptomyces ambofaciens'in fermantasyonu ile gerçekleşir ve fermantasyon çoğunlukla mısır meserasyon sıvısı, glukoz, kalsiyum karbonat, sodyum klorür ve magnezyum sülfat gibi bileşenlerden oluşturulur. (Zeid, 1980, s: 444-445)

Gram-pozitif organizmalara karşı etkili olan Spiramisin, güçlü gastroinstestinal toleransı, dokulara karşı yüksek afinitesi ve düşük yan etkisi sebebiyle çokça tercih edilmektedir. (Wang vd., 2024, s: 14; Zeid 1980, s: 443) Ayrıca Metronidazol ile karışımı da daha kapsayıcı bir antibakteriyel etki göstermesi için geliştirilmiştir. (Khattab vd., 2010, s: 37)

Hayvanların, özellikle kanatlı hayvanların, beslenmesinde, veteriner hekimlikte domuzlarda görülen ishal ve solunum yolu hastalıkları, sığırlarda mastitis ve köpeklerde diş hastalıkları gibi çeşitli enfeksiyonların tedavisinde Spiramisin yoğun bir şekilde tercih edilmektedir. (De Briyne, 2014)

Yararlarının yanı sıra, hayvanlarda yaygın kullanımı görülen Spiramisin, Avrupa Birliği tarafından 1997'de *Tylosin Fosfat Virginiamycin*, *Çinko Bacitracin* ve *Avoparcin*'le beraber büyütücü (growth promoter) olarak kullanımı engellenmiştir. Bu engele rağmen halen yoğun bir şekilde büyütücü, tedavi ya da hastalıkları önleyici olarak birçok ülke tarafından kullanılmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) de önerdiği üzere, gereksiz antibiyotik kullanımına, toksik etkileri önlemek ve antibiyotik rezistans gelişimini engellemek adına engel olunması gerekmektedir. (Bacanlı, 2024) Bu sebeplerden, bu tür antibiyotiklerin takibinin mümkün ve yapılıyor olması gerekmektedir.

Ayrıca bu tür antibiyotik kalıntılarını içeren et, karaciğer, böbrek ve süt gibi besinler tüketildiğinde alerjik reaksiyonlara sebep olma olasılığının yanında bağırsak mikrobiyotasında değişme de sebep olabilir veya idrar ya da dışkı yoluyla atıldıktan, gübre olarak kullanıldıktan sonra toprağa ve yeraltı sularına karışarak tekrardan insana ulaşma potansiyelini beraberinde getirebilir. (Larsson, 2014, s: 108-110)

Spiramisin'le kombinasyonu kullanılan Metronidazol ise anaerobik bakteri ve protozoa enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan, Nitromidazol ailesine ait bir ilaçtır ve trikomoniyaz, amebiyaz ve giyardiyaz gibi paraziter hastalıkların tedavisinde kullanıldığı gözlenmektedir. (Brogden vd., 1978, s: 388)

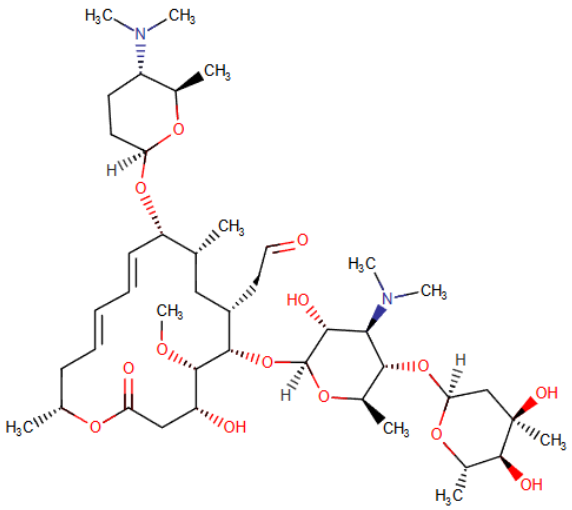
Metronidazol, oral, rektal veya damar yoluyla uygulanabilir ve vücutta iyi dağılır beyin omurilik sıvısına kolay geçer ve beyin içindeki apselerin içinde tedavi edici dozlara ulaşabilir. Özellikle kolorektal cerrahi, apandisit ve histerektomi gibi operasyonlardan önce ve sonra kullanımı enfeksiyonu önemli ölçüde azaltır ve anaerobik enfeksiyonları neredeyse tamamen ortadan kaldırabilir. Kadın genital sistemindeki anaerobik enfeksiyonların tedavisinde de başarı göstermiştir. (Brogden vd., 1978, s: 388, 407)

Metronidazol'ün Spiramisin ile kombinasyonu tablet formülasyon olarak geliştirilmiş ve bu kombinasyon iki ilacın birbirini tamamlayıcı özelliklerinden yararlanması için ağız ve diş sağlığı veya üst solunum yolu enfeksiyonlarında görülen bakterilere karşı kullanılmıştır. (Khattab vd., 2010, s: 37)

1.2. Spiramisin ve Metronidazol'ün Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri

1.2.1. Spiramisin'in Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri

Spiramisin'in molekül yapısı:



Şekil 1.1. Spiramisin'in molekül yapısı.

Kapalı formülü: $C_{43}H_{74}N_2O_{14}$

Molar kütle: 843.065g/mol

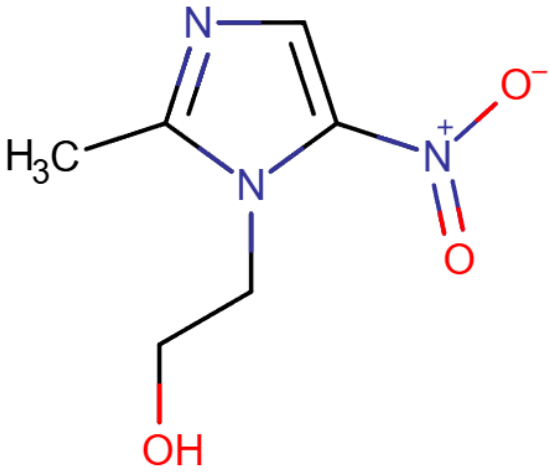
IUPAC isimlendirmesi: (4R,5S,6R,7R,9R,10R,11E,13E,16R)-10-{[(2R,5S,6R)-5-(dimetilamino)-6-metiltetrahidro-2H-pyran-2-yl]oksi}-9,16-dimetil-5-metoksi-2-okso-7-(2-oksoetil)oksasikloheksadeka-11,13-dien-6-yl 3,6-dideoksi-4-O-(2,6-dideoksi-3-C-metil-α-L-ribo-heksopiranosil)-3-(dimetilamino)-α-D-glukopiranosit

Görünüş: Beyazımsı, hafif sarı toz

Erime noktası: 134-137°C

1.2.2. Metronidazol'ün Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri

Metronidazol'ün Molekül Yapısı:



Şekil 1.2. Metronidazol'ün molekül yapısı.

Kapalı formülü: $C_6H_9N_3O_3$

Molar kütle: 171.156g/mol

IUPAC isimlendirmesi: 2-(2-Metil-5-nitro-1H-imidazol-1-yl)etanol

Görünüş: Kristalimsi beyaz toz

Erime noktası: 159-163°C

1.2.3. Spiramisin ve Metronidazol'ün Farmakodinamik Özellikleri

Spiramisin'in etki mekanizması protein sentezinin inhibisyonu ve dolayısıyla hücre ölümünü tetikleyici aktivite göstermesi şeklinde özetlenebilir. Spiramisin ribozomdaki 50S alt birimine bağlanarak protein sentezini engeller ve hücre ölümüne sebep olur. Bu birimin memelilerde bulunmaması sebebiyle de seçici bir ilaç olarak aktivite göstermektedir. (Zeid, 1980, s: 449-450)

Protein sentezinin inhibisyonu sayesinde bakteriyostatik etki gösterir ve bakterilerin çoğalmasını durdurur veya direkt olarak ölümüne sebep olur, enfeksiyon kontrol altında tutulur. Ayrıca Spiramisin düşük konsantrasyonlarda da bakterilerle etkileşime girerek gecikmeli bir etki gösterir. Bu sayede vücuttaki seviye düştükten sonra bile etki gösterebilmektedir. (Zeid, 1980)

Metronidazol'ün etki mekanizması ise hücreye difüzyon yoluyla girmesi ile başlar. İlaç hücre içine girdikten sonra bulundurduğu nitro grubunun indirgenmesi sayesinde hücre içinde aktifleşir. Bu olay yalnızca anaerobik veya mikroaerofilik organizmalarda gerçekleşir. Nitro grubunun indirgenmesiyle nitroso serbest radikali oluşur ve hücre içinde sitotoksik ürünler meydana gelir. Oluşan sitotoksik ürünler mikroorganizmanın DNA'sıyla etkileşime geçer ve hasara yol açar. Sonuç olarak DNA'nın parçalanmasıyla hücre ölümü gerçekleşir. Ayrıca bu süreçte DNA'ya verilen hasarın yanı sıra organizmanın enzimleri de inaktive olur ve hücre faaliyetlerini sürdüremez hale gelir. (Löfmark vd., 2010, s: S19)

Metronidazole amip ve protozoa enfeksiyonlarıyla beraber anaerobik bakterilerden kaynaklanan enfeksiyonları tedavi ederken de kullanılan anti-enfektif bir ilaçtır. Bunun yanında Spiramisin ise gram-pozitif bakterilere karşı yüksek etkinlik gösteren makrolid bir antibiyotiktir. İki madde birleştiğinde tamamlayıcı sinerjik bir etki gösterir ve tablet formunda formülasyonları bulunmaktadır. (Khattab vd., 2010, s: 37)

1.2.4. Spiramisin ve Metronidazol'ün Farmakokinetik Özellikleri

Metronidazol oral uygulamalardan sonra plazmadaki maksimum konsantrasyonuna 1-2 saat içinde ulaşır. Dolaşımdaki plazmanın %20'sinden düşük bir miktarı plazmadaki proteinlere bağlıdır ve bu sebeple protein bağlanması düşüktür. Günde dört kez 500 mg'lık alımda dördüncü dozdan önce ulaşılan konsantrasyon 21.4mg/mL olmuştur. (Brogden vd., 1978, s: 399)

Spiramisin ile yapılan bir çalışma, 42 tavuk üzerinde yapılan değerlendirmede ise oral veya intravenöz alımda (17mg/kg), plazma örnekleri 48. saate kadar toplanmış ve incelenmiştir. Yapılan incelemeye göre Spiramisin konsantrasyonu 29.94 ± 4.74 seviyelerine kadar çıkmıştır. (Elazab vd., 2021)

Beyin omurilik sıvısı, safra, kemik, apse ve diğer dokularda, Metronidazol tüm dokularda bakterisidal seviyelere ulaşmaktadır. Spiramisin ise dokulara karşı olan yüksek afinitesi sayesinde akciğerler, karaciğer ve böbreklere kolayca dağılabilmektedir. (Maher ve Youssef, 2009)

1.2.5. Spiramisin ve Metronidazol'ün Kullanım Şekilleri

Metronidazol'ün kullanımı birçok yol ile gerçekleştirilebilir. Geliştirilen formülasyonları oral, intravenöz, vajinal jel veya krem, rektal fitil veya lavman, topikal krem veya jel şekillerinde bulunabilir. (Löfmark, 2010)

Spiramisin ise yaygın olarak oral tablet formunda bulunmaktadır ve metronidazol ile oral tablet şeklinde kombinasyonları görülmektedir. (Khattab, 2010)

1.3. Spiramisin ve Metronidazol İçin Uygulanmış Analiz Yöntemleri

Literatürde hem Spiramisin ve Metronidazol için ayrı ayrı metotlar hem de ortak metotlar bulunmaktadır. Bu iki molekül için de genellikle sıvı kromatografisi kullanılmıştır.

Örneğin; Santos ve arkadaşları (2022) Spiramisin'in tayini için bir Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi yöntemi geliştirmiştir ve metotta hareketli faz olarak %0.1'lik fosforik asit çözeltisi ve metanolün 67:33 (h/h) oranında bir karışımını kullanmışlardır. 1mL/dk hızda, 250 mm×4.6 mm×5 µm boyutlarında C8 bir kolon ile 232 nm dalga boyunda 16 dakikalık bir metot elde etmişlerdir.

Khattab ve arkadaşları (2010) ise Spiramisin ve Metronidazol'ün tablet ve bulk toz formlarında Morötesi ve Görünür Bölge Spektrofotometride analizini gerçekleştirmiş ve 254 nm'lik dalga boyunda analizlerini yürütmüşlerdir.

Maher ve Youssef (2009) çalışmalarıyla Spiramisin ve Metronidazol'ün tablet formundaki analizini Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisinde gerçekleştirmiş ve 250 mm×4.6 mm×5 µm boyutunda C18 bir kolon kullanmışlardır. Hareketli faz olarak pH'sı 2.4'e ayarlanmış fosfat tamponunun 70:30 (h/h) oranında asetonitril ile bir karışımı kullanılmış ve 232 nm dalga boyunda analiz edilmiştir.

Saleh ve arkadaşları (2021) sütten elde edilmiş Spiramisin'in tayinini Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ile gerçekleştirmiş ve 150 mm×4.6 mm×3.5 µm boyutunda C18 Eclipse kolon kullanmışlardır. 232 nm dalga boyunda gerçekleştirilen analizde pH'sı 2.8'e ayarlanmış fosfat tamponunın 8:2 (h/h) oranında asetonitril ile bir karışımı kullanılmıştır.

1.4. Tez Kapsamında Kullanılan Yöntemler

1.4.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (YPSK)

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography – HPLC) bir karışımdaki bileşenlerin ayrımında ve tanımlanmasında kullanılan, ayrıca bu bileşenlerin kantitatif tayinin yapılmasına olanak sağlayan, bir mobil faz ve sabit fazın fiziksel etkileşimine dayanan bir yöntemdir. Prensip temel olarak, numunedeki bileşenlerin farklı denge sabitlerine sahip olmaları dolayısıyla kolon içinde birbirilerinden farklı davranmalarına dayanır. Bunun sonucunda, mobil faz içinde çözünmüş olan bileşenler kolondaki sabit faz ile

etkileşime girerek kolonda farklı sürelerde tutunur ve farklı sürelerde kolondan çıkarlar. (Snyder vd., 2010)

Yüksek basınç ile kolona verilen mobil fazın içinde kolona giren bileşenler kolonda tutunur ve bu etkileşimin derecesine bağlı olarak farklı tutunma sürelerine sahip olur. Tutunma süresi ise bir bileşenin kolona girdiği andan dedektöre ulaştığı ana kadar geçen süreye denir. Bu özellik mobil fazın içeriğine, sabit fazın yapısına ve bileşenin kimyasal özelliklerine gibi parametrelere bağlıdır. (Guiochon vd., 2006)

Tipik bir Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi cihazı başlıca; solvent, pompa, enjektör, kolon, dedektör ve veri kayıt birimi parçalarından oluşmaktadır. Pompa, solventi (mobil fazı) belirlenen hızda kolondan geçirir. Bu sırada enjektör numuneden, kolona gidecek olan mobil fazın içeriğine enjeksiyon sağlar ve ayrılmak istenen bileşenler sabit faz ile etkileşime girmek üzere sisteme verilir. (Snyder vd., 2010)

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi kullanılan tekniklere göre farklı isimlendirilebilir. Örneğin Normal Faz Kromatografisinde sabit faz genellikle polar özellik gösteren bir maddeden oluşur. Böyle bir sistemde mobil faz apolar veya düşük polar özellikteki bir organik çözücüden oluşur. Bu sayede ayrılmak istenen bileşenler sabit faz ile etkileşime girer ve ölçüme olanak sağlayan tutunma süreleri elde edilir. Bu yöntemde kullanılan organik çözücülerin uçucu ve toksik olmasından, ayrıca doğaya zararlı olmasından dolayı bu yöntem günümüzde daha az kullanılmaktadır. (Snyder vd., 2010)

Günümüzde sıklıkla Ters Faz kromatografisi kullanılmaktadır ve bu teknikte sabit faz genellikle apolar silika partiküllerden oluşmaktadır. Mobil faz ise polar özellik gösteren bir çözücüdür. Genellikle su ve organik çözücülerden oluşan karışımlar kullanılır. Farmasötik ürünlerin analizinde, biyolojik örneklerdeki küçük moleküllerin tespitinde veya gıda analizlerinde çokça tercih edilmektedir ve bu yöntemde suyun kullanılıyor olması çevre açısından da olumlu seçenek sunmaktadır. (Snyder vd., 2010)

İyon Değişim kromatografisi tekniği ise bileşenlerin yüklerindeki farklılıklara dayanır ve bu sabit faz pozitif yüklü veya negatif yüklü anyon değiştiricilerden ya da katyon değiştiricilerden oluşur. Bu yöntemde tutunma süresini bileşenlerin pH'sı veya pI'sı belirler. Bu yöntem proteinlerin ve plazmanın analizini oldukça kolaylaştırmaktadır. (Jungbauer ve Hahn, 2009, s: 351-352)

Bu yöntemlere ek olarak Boyut Dışlama Kromatografisi, bileşenleri boyutlarına göre ayırmayı sağlayan başka bir tekniktir. Bu teknikte sabit faz, kontrollü por genişliğine sahip olan moleküllerle doldurulmuştur ve bileşenler bu porlardan boyutlarına göre önce veya sonra geçerler. Boyut Dışlama Kromatografisinde tutunma süresi genellikle akış hızına bağlıdır. Moleküller sabit fazda adsorplanmadığından entropik bir süreç sonucunda bileşenler kolonda hareket ederler. (Fekete vd., 2014, s: 162)

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ayrıca sabit fazın doğasına göre de gruplanabilir. Adsorpsiyon Kromatografisi buna bir örnek olup ayrımın, kolonda, sürekli adsorpsiyon ve desorpsiyonuna dayanır. Partisyon (Dağılım) Kromatografisinde ayrım mobil fazın sabit fazdaki dağılımına dayanmaktadır. İyon Değiştirme Kromatografisi'nde sabit faz, ayrılmak istenen bileşenin tersi yüklü bir maddeden oluşmaktadır. Boyut Dışlama Kromatografisi'nde ise kolon dolgu maddesinin kontrollü ve belli bir boyuttaki partiküllerle doldurulması ile oluşturulur. (Belanger vd., 1997, s: 38-39)

1.4.2. Ters Faz Kromatografisi (Reversed-Phase Chromatography – RP Chromatography)

Kromatografi tekniği ortaya çıktıktan sonra uzun bir süre yüksek polar karakter gösteren yüzeye sahip moleküller, görece daha düşük polariteye sahip veya apolar mobil fazlar kullanılarak ayrılmıştır. Horvath (1964) kimyasal olarak modifiye edilmiş bir yüzey elde ederek ana analit-yüzey etkileşimini polar mobil faz ile apolar maddelerin ayrımına çevirmiştir. Sabit faz ve mobil faz etkileşimi ele alındığında, bu teknik öncelerde kullanılan etkileşim biçimini tersine döndürmüştür. Sıvı kromatografinin bu yeni yöntemine ise bu sebeple "Ters Faz Kromatografisi" adı verilmiştir. Ters Faz Kromatografisi, günümüzde açık ara en çok kullanılan kromatografik yöntemdir. Bunun en temel sebeplerinden biri birbirine oldukça benzeyen bileşenleri kolayca ayırabilecek seçiciliğe sahip olmasıdır. (Kazevich, 2007; Horvath ve Melander, 1977)

1.4.3. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisindeki Önemli Parametreler

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi'nde her spesifik analit bir pik ile tanımlanmıştır. Eğer sabit faz ile numune arasında güçlü bir etkileşim yoksa pikler genellikle simetriktir ve klasik bir Gaussian eğridir. Pikin tepe noktasının, cihazın enjeksiyonu aldığı ilk ana olan uzaklığı pikin Alıkonma Süresi'ni (Retention Time – t_R) verir ve bu özellik bu spesifik sistemde, analit için karakteristiktir. Analitin alıkonma süresi, mobil fazın akış hızına, akış hızının sabit olup olmamasına direkt olarak bağlıdır ve mobil fazın alıkonma hacmi V_R ile gösterilir. (Kazevich, 2007, s: 15)

Analit sisteme sabit faz ile etkileşmese bile sisteme enjekte edildikten hemen sonra dedektörde görünmez. Bir YPSK kolonu, küçük partiküllerden oluşan porlu bir içeriğe sahiptir ve bu porlar halihazırda çözücü ile doludur. Analit sisteme verildikten sonra bu çözücünün de kolondan çıkması ve analitin dedektöre ulaşması gerekir. Analiz başlarken içeride bulunan bu çözücüye Ölü Hacim (Void Volume) adı verilir. Analitin tutunma derecesi iki parametreye bağlıdır: i) analitin gerçek manada sabit faz ile etkileştiği süre, ii) mobil faz içinde çözünmüş olan bileşenin kolondan geçerken gerçekte geçirdiği süre. Total tutunma süresi ve kalma süresi arasındaki fark, indirgenmiş tutunma süresini (t'_R) verir ve analitin tutunma hacmi ile ölü hacim arasındaki fark ise indirgenmiş tutunma hacmini (V'_R) verir. Buna göre;

$$k = \frac{V_R - V_0}{V_0} = \frac{V'_R}{V_0} = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

Şekil 1.3. Tutunma faktörü

Bu parametreler kullanılarak tutunma faktörü, k, bulunur. Eğer iki farklı sistemde, kolon dolgu maddesi, mobil faz, akış hızı gibi parametreler aynı ise bu iki sistemin tutunma faktörü aynı olmalıdır. Bu sayede iki laboratuvar ya da sistem arasındaki benzerlik ölçülebilir. (Kazevich, 2007, s:17-18)

Bu denklemden yola çıkarak bir sistemin farklı iki bileşeni ayırabilme gücü de ölçülebilir. Buna "Seçicilik" adı verilir ve α ile gösterilir. Seçicilik, iki analitik tutunma faktörünün birbirine oranı veya indirgenmiş tutunma sürelerinin oranı olarak tanımlanabilir;

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t_{R_2} - t_0}{t_{R_1} - t_0}$$

Şekil 1.4. Seçicilik Faktörü

Seçicilik normal şartlar altında bileşenlerin sabit faz ile olan etkileşiminin doğasına bağlıdır. (Kazevich, 2007) Seçiciliğe ek olarak bir analizin kalitesini ölçmek için kolonun verimliliğine bakabiliriz. Bunu ölçmek için kullanılan kolonun plakalara bölündüğü varsayılır ve bu plakaların yüksekliğinin ne kadar küçük olduğu veya sayılarının ne kadar fazla olduğu kolonun verimliliğini gösterir. Bu varsayımsal plakaların sayısı (N) şu şekilde hesaplanır;

$$N = 16\,(^{t_R}/_{W})^2$$

Şekil 1.5. Teorik Plaka Sayısı

Burada t_R tutunma süresi, w pikin genişliği. Kolonun verimliliği kolon dolgu maddesinin homojenliği, akış hızı gibi parametrelere bağlı olabilir. Yüksek verimliliğe sahip kolon daha dar pikler verir ve seçiciliğin düşük olduğu durumlarda da daha iyi sonuçlar verilmesini sağlar. (Belanger, 1997; Kazevich, 2007)

Bunlara göre iki pikin tepe noktasının birbirinden ne kadar uzak olduğu seçiciliğin bir özelliğidir ve her bir pikin genişliği kullanılan kolonun verimi hakkında, dolayısıyla analizin verimliliği hakkında bilgi verir. Aynı şekilde iki pikin birbirinden uzaklığının başka bir ölçüsü de "Rezolüsyon" (Ayırıcılık) ile ölçülebilir. Bu parametre iki pikin birbirine olan zamansal uzaklığının genişliklerinin ortalamasına bakılmasıyla elde edilebilir. (Kazevich, 2007) Buna göre;

$$R\ (Rezolüsyon) = 2\ \frac{t_{R_2} - t_{R_1}}{w_2 - w_1}$$

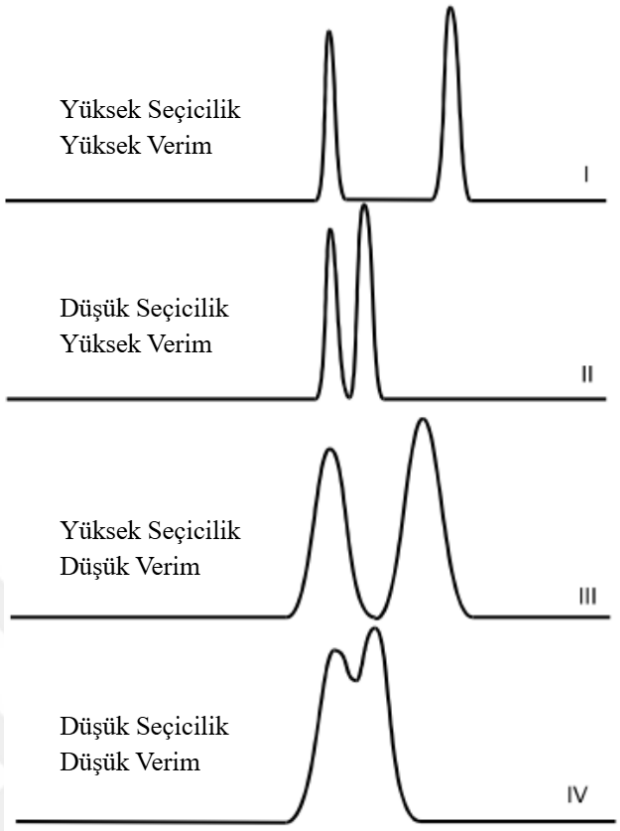
Şekil 1.6. Rezolüsyon'un tutunma faktörü bakış açısından formülü

denklemi ile gösterilir veya kolonu etkileyen faktörler göz önünde bulundurulduğunda;

$$R\ (Rezolüsyon) = \left(\frac{\sqrt{N}}{4}\right) \cdot \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha}\right) \cdot \left(\frac{k_2}{k_2 + 1}\right)$$

Şekil 1.7. Rezolüsyonun sistem parametreleri bakış açısından formülü

şeklinde de gösterilebilir. Burada N, teorik plaka sayısı; α, seçicilik ve k_2, sonra çıkan bileşenin tutunma katsayısıdır. (Anderson vd., 2016, s: 29) Bu denklem göz önünde bulundurulduğunda rezolüsyonu kontrol etmek için üç parametre incelenebilir. Rezolüsyonu arttırmak için N, yani teorik plaka sayısı, k, tutunma katsayısı ve α, seçicilik arttırılabilir. Teorik plaka sayısının artması için verimi daha yüksek bir kolon kullanılabilir veya kolonun uzunluğu arttırılabilir; tutunma katsayısını arttırmak için incelenen bileşenlerin tutunma süreleri arttırılabilir ve seçiciliği arttırmak için daha seçici bir kolon veya daha uygun bir mobil faz kullanılabilir. (Anderson vd., 2016; Kazevich, 2007)



Şekil 1.8. Kromatogramdaki pik şekli tipleri. I) Rezolüsyonu yüksek, keskin pikler yüksek seçicilik ve verim, II) Rezolüsyonun düşük olduğu keskin pikler düşük seçicilik, yüksek verim, III) Rezolüsyon yüksek geniş pikler, yüksek seçicilik ve düşük verim, IV) Düşük rezolüsyon ve geniş pikler, düşük seçicilik ve düşük verim demektir.

Ayrıca sistemin doğru bir şekilde analiz yaptığının başka bir ölçüsü olarak pik simetrisi de gözden geçirilebilir. Bunu ölçmek için pikin %5 yükseklikteki genişliğine bakılır ve bu yükseklikten indirilen dik doğrunun bu genişlikteki önü ve arkası arasındaki mesafe incelenir. Buna göre;

$$A_s(Simetri) = \frac{W_{\%5\ Yükseklikte}}{2f}$$

Şekil 1.9. Pik Simetrisi

Burada w, %5 yükseklikteki pik genişliği ve f, bu yükseklikte pikin iki ucundan indirilen diklerin birbirine olan uzaklığıdır. Bu denklemin sonucu A_s=1 ise, pik simetriktir, A_s< 1 ise pik cepheleme yapmaktadır ve A_s>1 ise pik kuyruklanmaktadır şeklinde yorumlanabilir. (Epshtein, 2020, s: 521)

1.4.4. Kromatografiyi Etkileyen Faktörler

Kromatografide ayrım, çözücüye (mobil faza), sabit faza ve bileşenin doğasına bağlı olduğundan fiziksel koşullar analizde direkt olarak etkilidir. Van Deemter eşitliği kolonun etkinliğinin değerlendirilmesinde ve bunu etkileyen parametrelerin gösterilmesinde oldukça önemli bir yer tutar. Dolayısıyla hem sabit fazın yapısı hem de mobil faz ile ilgili bilgi verir. (Ravisankar vd., 2019)

$$H = A + \frac{B}{v} + Cv$$

Şekil 1.10. Van Deemter Eşitliği

Bu eşitliğe göre H, kolonun içinde bulunan teorik olarak hesaplanan plakaların her birinin yüksekliği; v, mobil fazın akış hızı; A, akış ile bağlantılı dağılmanın katkısı, Eddy difüzyonu; B, moleküler difüzyondan türetilen bir katsayı ve C, hareketli faz ile sabit faz arasındaki kütle transferini ifade eder. (Siouffi, 2006)

Kolonun etkinliğinin arttırılması H değerinin, yani plaka yüksekliğinin düşmesi ile elde edilir. Kolon uzunluğunun sabit kaldığı düşünüldüğünde plaka yüksekliğinin küçük olması teorik plakanın daha yüksek bulunmasını sağlar. Daha yüksek teorik plaka sayısı değeri ise kolonun etkinliğinin daha iyi olduğunun bir göstergesidir. Bu, daha küçük partiküllü kolonlarla gerçekleştirilebilir.

$$H = \frac{L}{N}$$

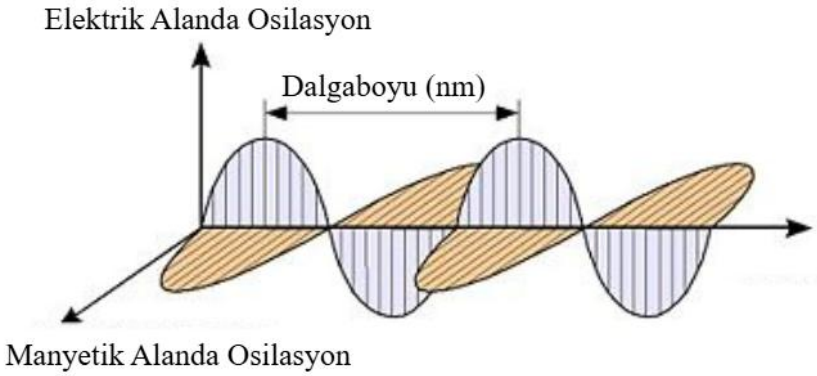
Şekil 1.11. Teorik Plaka Yüksekliği

Plakanın yüksekliği ise aynı zamanda kolonun uzunluğunun teorik plaka sayısına bölünmesi ile de bulunabilir. N değeri bir kolondaki farazi katman sayısını gösterdiğinden kolonun uzunluğu ile birbirine oranı bu katmanların yüksekliğini verir. (Ravisankar vd., 2019)

1.5. Morötesi – Görünür Bölge Spektroskopisi (Ultraviolet – Visible Spectroscopy / UV-Vis Spectroscopy)

Bu teknikte bir çözeltideki bileşenlerin belli bir dalga boyunda gelen ışığı absorplamasıyla karakteristik spektrum bantlarının elde edilmesi amaçlanır. Fonksiyonel gruplar veya moleküller belirli bir dalga boyundaki gelen ışığı absorplar ve hem kalitatif hem kantitatif analize olanak sağlar. (Chen, 2024)

Spektroskopi elektromanyetik radyasyonun (ışığın) madde ile olan etkileşimini incelediğinden ışığın doğası bu teknikte önemlidir. Elektromanyetik dalgalar madde ile etkileşimde absorplanabilir, yansıyabilir veya kırılabilir; madde ile etkileşiminde ise enerji kaybederler. Bir elektromanyetik dalga, elektrik yüklü bir parçacığın elektrik alanda titreşmesi ve dolayısıyla manyetik olarak da yüklü olarak manyetik alanda titreşmesinin kesişiminden oluşmaktadır. (Bhattacharjee, 2023; Chen, 2024)



Şekil 1.12. Elektromanyetik Dalga

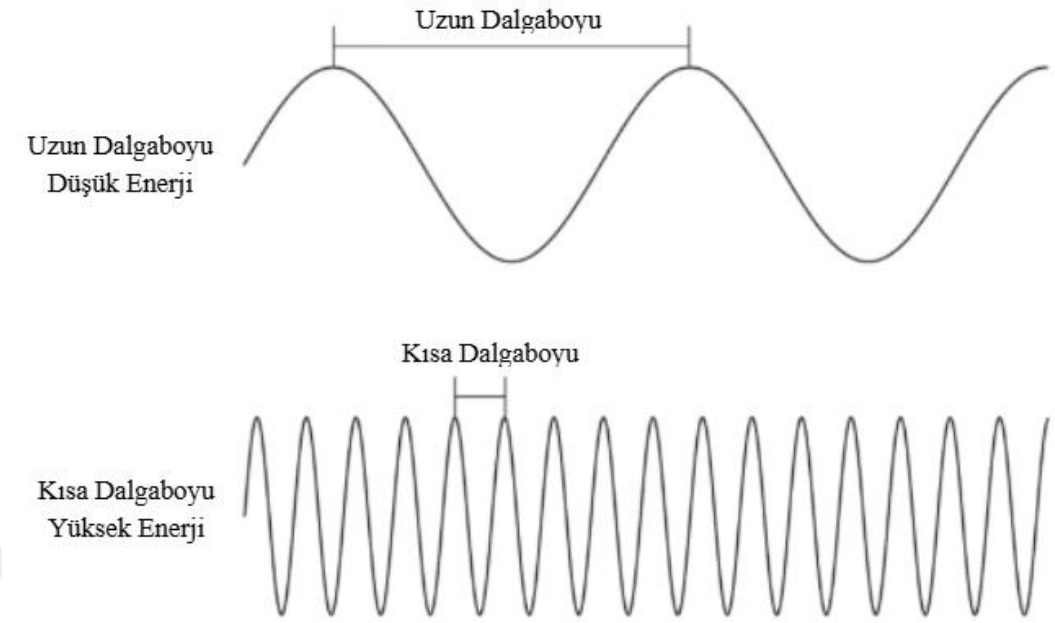
Işığın dalga boyu (wavelength), titreşim yaptığı alandaki ardışık dalgaların tepelerinin birbirine olan uzaklığıdır ve dalga boyu küçüldükçe ışığın enerjisi artar. Her dalganın bir zaman biriminde yaptığı osilasyon sayısı ise o ışığın frekansını belirler. Işığı meydana getiren fotonun enerjisi ise direkt olarak ışığın dalga boyu ve frekansı ile bağlantılıdır.

$$E = h\nu$$

$$E = \frac{hc}{\lambda}$$

Şekil 1.13. Planck Eşitlikleri

Burada ν, ışığın frekansı ve λ, ışığın dalga boyunu temsil eder. Enerjiyi hesaplarken, h ise Planck sabitini ifade etmektedir ve 6.626 x 10^{-34} joule/saniye olarak kabul edilir; c ise ışık hızıdır. Bu denklemde de görüldüğü üzere daha dalga boyu enerji ile ters orantılıdır ve daha kısa dalga boyları daha yüksek enerjiyi ifade eder; frekans ise enerji ile doğru orantılıdır ve daha yüksek frekanslar daha yüksek enerjiyi gösterir. Daha yüksek frekans, ayrıca, fotonun daha hızlı osilasyon yaptığını da gösterir. (Vitha, 2018)



Şekil 1.14. Dalga Boyu – Enerji İlişkisi

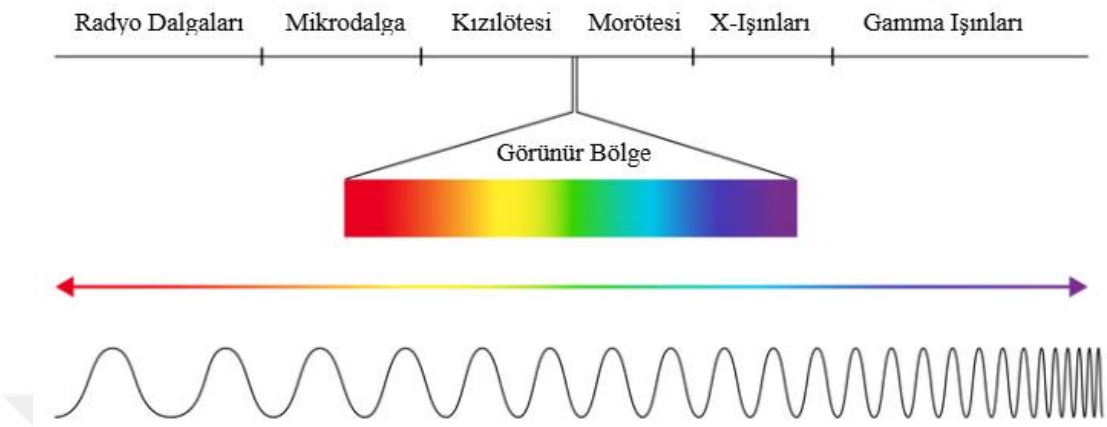
1.5.1. Lambert – Beer Yasası

Elektromanyetik dalgalar dalga boylarına veya frekanslarına göre belirli gruplara ayrılarak incelenebilir;

Çizelge 1.1. Elektromanyetik Dalga Spektrumu

Spektrumun İsmi	Dalga Boyu	Frekans
Radyo Dalgaları	100Mm – 1 m	3 Hz – 300 MHz
Mikrodalga	1 m – 1 mm	300 MHz – 300 GHz
Kızılötesi (Infrared)	1 mm – 750 nm	300 GHz – 400 THz
Görünür Bölge	750 nm – 400 nm	400 THz – 800 THz
Morötesi (Ultraviyole)	400 nm – 1 nm	10^{15} Hz – 10^{17} Hz
X-Işınları	1 nm – 1 pm	10^{17} Hz – 10^{20} Hz
Gamma Işınları	1 pm – 0.0001 pm	10^{20} Hz - 10^{24} Hz

Elektromanyetik dalga, radyo dalgaları, mikrodalga, kızılötesi, görünür bölge, morötesi, x-ışınları ve gamma ışınları olarak gruplandırılabilir. (Bhattacharjee, 2023)



Şekil 1.15. Elektromanyetik Dalga Spektrumu

Madde ile etkileşime giren foton maddenin iç enerjisinde artışa sebep olur ve tür temel halden daha uyarılmış hale geçer. Fotonun tüm enerjisinin madde tarafından absorplandığı varsayılırsa, fotonun enerjisi, maddenin katmanları arasındaki seviye farkının enerjisine eşit olmalıdır. Her maddenin kuantlaşmış enerji seviyeleri arasındaki fark o maddeye has olduğundan, fotonun enerjisinin absorplandığı dalga boyu da maddeye karakteristiktir. Daha sonra absorplanan bu enerji bir foton olarak atom veya molekülden çıkar ve buna emisyon denir. Maddedeki uyarılmış hal çok kısa sürer ve emisyon ile madde temel hale tekrar döner. Madde absorpsiyonda aldığı enerjiyi ısı veya ışık olarak verebilir. Morötesi veya görünür bölgede absorpsiyon yapmış bir madde, aldığı enerjinin büyük bir bölümünü genellikle bir fotonun emisyonu şeklinde açığa çıkarır. Uyarılmış halin doğasına bağlı olarak bu olay floresans veya fosforesans olarak adlandırılabilir. (Penner, 2017)

Morötesi-Görünür Bölge Spektroskopisi, bu prensibe dayanarak maddenin ışığı absorplama oranına göre hesaplanır. Numune olarak sisteme verilen çözeltinin içindeki maddenin miktarı, maddeye gönderilen ışığın absorplanmasının oranıyla doğru orantılıdır. Maddeye karakteristik dalga boyunda gönderilen ışık, içerideki maddenin miktarına bağlı olarak belli oranda ışığın geçmesine engel olacağından çıkan ışığın miktarı giren ışığa oranla azalmış olacaktır. (Akash, 2019, s: 31) Giren ışığın şiddetinin, absorplanmasıyla beraber değişmesi geçirgenliği yani transmittansı verir. Transmittans;

$$T = \frac{I}{I_0}$$

Şekil 1.16. Transmittans

olarak gösterilir. Transmittans ayrıca % Transmittans olarak da belirlenebilir ve bu;

$$\%\, T = \frac{I}{I_0}\, x\, 100$$

Şekil 1.17. %Transmittans

şeklinde hesaplanır. Sisteme giren ışığın şiddetiyle çıkan ışığın şiddeti arasındaki oran ayrıca absorbans olarak da hesaplanabilir. Bu ikisi arasındaki ilişkiyi ise;

$$A = -log_{10} = \frac{I}{I_0}$$

Şekil 1.18. Absorbans

denklemi göstermektedir. Bu denklemden anlaşılacağı üzere absorbansın düşük olması sisteme giren ışığın çoğunun girdiği şiddette çıktığı ve yüksek olması giren ışığın, içerideki maddeler tarafından absorplandığı anlamına gelir. (Hardesty ve Attili, 2010)

Morötesi-Görünür Bölge Spektroskopisi, bu prensiple çalışır ve Beer-Lambert yasası olarak adlandırılır. Bu yasaya göre absorpsiyon ve konsantrasyon arasında lineer bir ilişki bulunmaktadır ve aradaki bu oran lineer kaldığı sürece bu yasa kabul edilmektedir. 0.01M'dan büyük numuneler genellikle bu yasadan sapmaya sebep olur. Ayrıca gelen ışığın monokromatik bir ışık olmaması halinde veya sistemin dışından gelen harici bir ışık olması halinde de sapmalar gözlenmektedir. (Chen, 2024) Beer-Lambert Yasası, Beer Yasası ve Lambert Yasası'nın birleştirilmesiyle oluşturulmuştur. Buna göre Beer Yasası;

$$I = Ie^{-klc}$$

Şekil 1.19. Beer Yasası

şeklinde gösterilir ve monokromatik bir ışığın konsantrasyonla eksponansiyel düşüşünü gösterir. Lambert Yasası ise;

$$I = Ie^{-k2l}$$

Şekil 1.20. Lambert Yasası

şeklinde gösterilir ve ışığın, içinden geçtiği ortamın kalınlığı arttıkça şiddetinin bununla orantılı düştüğünü belirtir. Bu iki yasa birleştirildiğinde ışık şiddetinin, geçtiği ortamın uzunluğu ve o ortamda bulunan türlerin konsantrasyonuyla olan ilişkisi ortaya çıkar. Absorbans, ortam ve konsantrasyon arasındaki ilişkiye bakıldığında, absorpsiyon yapan türün konsantrasyonu veya molar absorptivitesi de kullanılarak bu şekilde bir hesap yapılabilir;

$$A = -log_{10}\frac{I}{I_0} = \varepsilon\ x\ b\ x\ c$$

Şekil 1.21. Absorbansın Molar Absorptivite ile Hesaplanması

Bu denklemde ε, molar absorptivite; b, küvetin santimetre cinsinden uzunluğu ve c ışık hızıdır. Denkleme göre molar absorptivitenin katsayısı M^{-1}. cm^{-1} olarak bulunur. (Hardesty ve Attili, 2010) Bu ilkeler Beer-Lambert Yasası'nın temelini oluşturmaktadır. Yasaya uyan bileşenlerden oluşan bir çözelti, bileşenler arasında etkileşim olmadığı varsayılırsa, bu türlerin absorbanslarının toplamı kadar absorpsiyon yapar. Buna Katılabilirlik Yasası, Eklenebilirlik Yasası (Law of Additivity) adı verilir. Buna göre;

$$A = [(\varepsilon_1\ x\ c_1) + (\varepsilon_2\ x\ c_2) + \cdots + (\varepsilon_n\ x\ c_n)] = A_1 + A_2 + \cdots + A_n$$

Şekil 1.22. Eklenebilirlik Yasası

Absorpsiyon yapan birden fazla tür içeren bir çözeltinin küvet yolu uzunluğu 1 cm olduğu varsayılırsa cevap olarak vereceği absorbans bu şekilde hesaplanabilir. Absorbans, bu sebeple çözelti içindeki türlerin absorpladığı miktarın toplamıdır. (Marczenko ve Balcerzak, 2000, s: 29)

1.5.2. Beer Yasasından Sapmalar

Beer Yasası, belirli koşullar altında iyi çalışıyor olmasına karşın bazı sınırlamalara tabidir. Yüksek konsantrasyondaki çözeltilerle çalışırken Beer Yasası geçersiz sayılabilir ve farklı sebeplerden kaynaklanabilir. Örneğin yüksek derişimdeki bir çözeltideki moleküller birbirine yakın olacaktır ve bu durum moleküllerin yük dağılımını değiştirebilir ve dolayısıyla absorpsiyon yapabilme özelliklerinde değişime sebep olabilir veya çözelti içinde çözünen farklı türler birbirileriyle etkileşime girerek molar absorptivitelerinde değişime sebep olabilirler; bu tür parametrelerle direkt ilgili olan bu yasa, bu tip koşullar altında sapmalar gösterebilir. Dahası, hazırlanan çözelti, ışığın geçtiği ortamın kırılma indisini değiştiriyorsa bu da Beer Yasası'nda sapmaya sebep olabilir. (Skoog vd., 2013, s: 339)

Beer Yasası, yalnızca monokromatik bir ışığın varlığında düzgün çalışmaktadır. Molar absorptivitesi farklı iki farklı tür içeren bir sistemde doğru çalışamaz. Molar absorptiviteler arasındaki farkın artması doğrusal bir sonuçtan uzaklaşmaya sebep olur. Başka kaynaktan gelen veya cihazdaki aynalardan yansıyan diğer kaçak ışınların varlığında da Beer Yasası durumdan etkilenebilir. Bu tip ışınlar hedeflenen monokromatik ışıktan farklı dalga boyunda ise sapmalar gözlenecektir. (Skoog vd., 2013, s: 342)

Spektrofotometrede yapılan analizde kullanılan küvetlerin eş olmaması halinde de sapmalar gözlenmektedir. Tek ışın yollu cihazlarda aynı küvetin kullanılması veya çift ışın yollu cihazlarda eşlenik küvetlerin kullanılması ile sorun çözülebilir. Bu sapma sonucunda kalibrasyon grafiği çizilen eğri, orijinden geçmez ve sapmaya sebep olur. (Skoog vd., 2013, s: 343)

Çözeltide bulunan elektrolitlerin sayısı da Beer Yasası'ndan sapmalara sebep olabilir. Çözelti içindeki yüksek orandaki elektrolitler maksimum absorbans yapılan dalga boyunda kaymaya sebep olabilir ve molar absorptivitede değişikliğe sebep olabilir. Çözeltinin pH'sı da Beer Yasası'nın düzgün çalışması için önemli bir etkendir. Çözeltinin pH'sındaki değişimler içeriğindeki moleküllerde değişime sebep olabileceğinden kuralda sapmalara sebep olabilir. (Sudharshan ve Swetha, 2023)

1.5.3. Morötesi – Görünür Bölge Spektrofotometreler

Tipik bir Morötesi – Görünür Bölge Spektrofotometri cihazı belirli temel bileşenlerden oluşur; ışık kaynağı, monokromatör, numune kabı veya küvet, dedektör ve kaydedici başlıca parçalar arasında sayılabilir. (Jespersen, 2006)



Şekil 1.23. Morötesi – Görünür Bölge Spektrofotometrenin Temel Bileşenleri

Morötesi – Görünür Bölge spektrofotometrelerde, görünür bölgedeki ışık kaynakları genellikle kara cisim ışıması yapan bir tungsten lambadan meydana gelir. Bu tip lambalarda dalga boyu tungsten telin sıcaklığına göre değişiklik gösterir ve bu sayede istenilen dalga boylarında ışık elde edilir. Morötesi bölgedeki lambalar ise yüksek-basınçlı cıva lambalarından, ksenon lambalardan, düşük basınçlı döteryum veya hidrojen lambalarından oluşabilir. Cıva ve ksenon lambalar, içeriğinde bulunan iletken gaza uygulanan elektrik akımı sayesinde ışık meydana getirir. Elektrik akımı sayesinde uyarılan gaz molekülleri temel hale

dönerken, analiz edilen elemente özel dalga boyunda emisyon yapar ve bu sayede analiz edilen molekül gelen ışığı absorplar. Hidrojen ve döteryum lambalar ise daha düşük sıcaklıklarda çalışır ve sürekli ışın kaynağı olarak kullanılır. Bu tip lambalarda hidrojen veya döteryum atomları elektronik olarak uyarılır ve atomların emisyonuyla ışık elde edilir. Döteryum lambalar, hidrojen lambalarından 3 ila 5 kat daha güçlüdür ve yaydıkları ışığın şiddeti daha yüksektir. Hidrojen lambalarından daha pahalı olmalarına karşın oldukça sık kullanılmaktadır ve oldukça dayanıklıdır. Bu tip lambalar 190nm ve 370nm arasında ışık yaymaktadırlar. (Jespersen, 2006; Sudharshan ve Swetha, 2023)

Monokromatörler slitlerden, aynalardan veya lenslerden ve ışığı dağıtıcı bir mekanizmadan oluşur. Dağıtıcıda dalga boylarına ayrılan ışık aynalardan yansıtılarak veya lenslerden odaklanarak slitlere gönderilir ve uygun dalga boyundaki ışın ile analiz yapılır. (Marczenko ve Balcerzak, 2000, s: 31)

Kaynaktan gelen ışık monokromatörde ayrıldıktan sonra küvete, ölçüm kabına, numuneye gönderilir. Numunenin bulunduğu bu kaplar kuvars veya erimiş silikadan yapılır ve ışığın geçtiği yüzeyler ışığın geliş yönüne dik şekildedir. Bu sayede gelen ışık yansımadan küvetten geçer. Işığın geçtiği yol boyunca olan küvet uzunlukları genellikle 1cm olmakla beraber çeşitlilik gösterebilirler. Görünür bölgede yapılan analizler için plastikten üretilmiş küvetler de kullanılabilir. (Skoog vd., 2013, s: 351)

Işık, numune kabında bir kısmı absorplandıktan sonra dedektöre ulaşır ve ulaşan fotonların enerjisi dedektörde elektrik enerjisine dönüştürülerek sinyal olarak kaydedilir. Bu dönüşüm fotohücreler, fotoçoğaltıcılar, fotorezistörler ve fotodiyotlar aracılığıyla gerçekleştirilebilir. Örneğin fotohücreler ve fotoçoğaltıcılarda, yüzeylerinde bulunan fotona karşı hassas olan katotlar gelen fotonun enerjisi ile elektron saçar ve saçılan elektronlar anota doğru geçerken bir elektrik akımı oluşturur. Ortaya çıkan elektrik enerjisinin miktarı dedektöre ulaşan fotonların miktarı ile doğru orantılıdır ve dolayısıyla numunenin konsantrasyonu hakkında bilgi verir. Fotorezistörlerde ve fotodiyotlarda ise fotonlar, fotonlara karşı hassas maddelerden oluşan dedektöre düşer ve bu olay bir elektrik akımı açığa çıkarır. Elektrik akımının şiddeti gelen ışığın miktarıyla doğru orantılıdır. Bu şekilde veri kaydedilir ve konsantrasyon belirlenir. (Marczenko ve Balcerzak, 2000, s: 32)

Spektrofotometreler ışığın geçtiği yolun sayısına göre Tek Işınlı (Single Beam) veya Çift Işınlı (Double Beam) Spektrofotometreler olarak ayrılabilir. Bu iki spektrofotometre ışığın ayrıldığı noktada farklılık gösterirler. Tek ışınlı cihazlarda, ışık tek bir yol üzerinden çıkar, numune kabına ve dedektöre ulaşır. Çift ışınlı cihazlarda ise ışık, kaynaktan çıktıktan

sonra ikiye ayrılır ve aynı şiddette hem referans kaba hem de test çözeltisinin bulunduğu kaba düşer. Çıkan iki ışık da dedektör tarafından okunur. (Skoog vd., 2013, s: 351)

Tek ışınlı spektrofotometrelerde küvet önce bir referans çözeltiyle doldurulur, kullanılan çözücü olabilir ve I_0 değeri ölçülür. Bu sayede absorbans sıfırlanır. Daha sonrasında kap boşaltılır ve numune konur. Ardından numunenin I değeri ölçülür ve dolayısıyla analiz edilmek istenen bileşenin absorbansına ulaşılır. Çift ışınlı spektrofotometrelerde ise iki küvet bulunur ve referans kabı sürekli olarak sisteme verilen numuneye karşı ölçülür. Sonuç olarak hem I_0, hem de I değeri aynı anda ölçülür ve absorbans hesaplanır. (Jespersen, 2020)

1.5.4. Türev Spektrofotometri (Derivative Spectrophotometry – DS)

Türev spektrofotometri, normal bir Morötesi – Görünür Bölge spektrofotometri analizinden elde edilen absorbans/dalga boyu grafiğinin türevinin alınmasına dayanan bir tekniktir. (Karpinska, 2012, s; 254) Bu teknikte çok bileşenli analizlerdeki türleri ayırmak için elde edilen grafiğin birinci veya daha yüksek mertebedeki türevleri alınır ve üst üste gelen absorbans pikleri ayrılır. Bu sayede daha yüksek seçicilikte analizler gerçekleştirilebilir ve karışım halinde bulunan türlerin ek ayırma yöntemlerine veya proseslerine gerek kalmadan ayrılabilir. (Sowjanya vd., 2019)

Bu teknik Lambert-Beer Yasası'na ve Eklenebilirlik Yasası'na (Law of Additivity) uyar ve türevin değeri yine konsantrasyonla doğru orantılıdır. Birçok bileşenden oluşan bir türev spektrumunda, türev değerlerinin toplamı da yine tüm bileşenlerin toplamına denktir. Yani;

$$A = \varepsilon \; x \; b \; x \; c$$

şeklinde hesaplanan absorbans değerinin n. dereceden türevi;

$$\frac{d^n A}{d\lambda^n} = c \; x \; b \; x \; \frac{d^n \varepsilon}{d\lambda^n} = \; D^n$$

Şekil 1.24. Absorbansın n. Dereceden Türevi

Buna göre, birinci dereceden türevi,

$$\frac{dA}{d\lambda} = -c\ x\ b\ x\ \frac{d\varepsilon}{d\lambda}$$

Şekil 1.25. Absorbansın 1. Dereceden Türevi

olarak ifade edilir. İkinci dereceden türevi;

$$\frac{d^2A}{d\lambda^2} = -c^2\ x\ b^2\ x\ \left(\frac{d\varepsilon}{d\lambda}\right)^2 - -c\ x\ b\ x\ \left(\frac{d^2\varepsilon}{d\lambda^2}\right)$$

Şekil 1.26. Absorbansın 2. Dereceden Türevi

Eşitliğin üçüncü dereceden türevi;

$$\frac{d^3A}{d\lambda^3} = -c\ x\ b\ x\ \left(\frac{d^3\varepsilon}{d\lambda^3}\right) + 3c^2\ x\ b^2\ x\ \left(\frac{d\varepsilon}{d\lambda}\right)\left(\frac{d^2\varepsilon}{d\lambda^2}\right) - c^3\ x\ b^3\left(\frac{d\varepsilon}{d\lambda}\right)^3$$

Şekil 1.27. Absorbansın 3. Dereceden Türevi

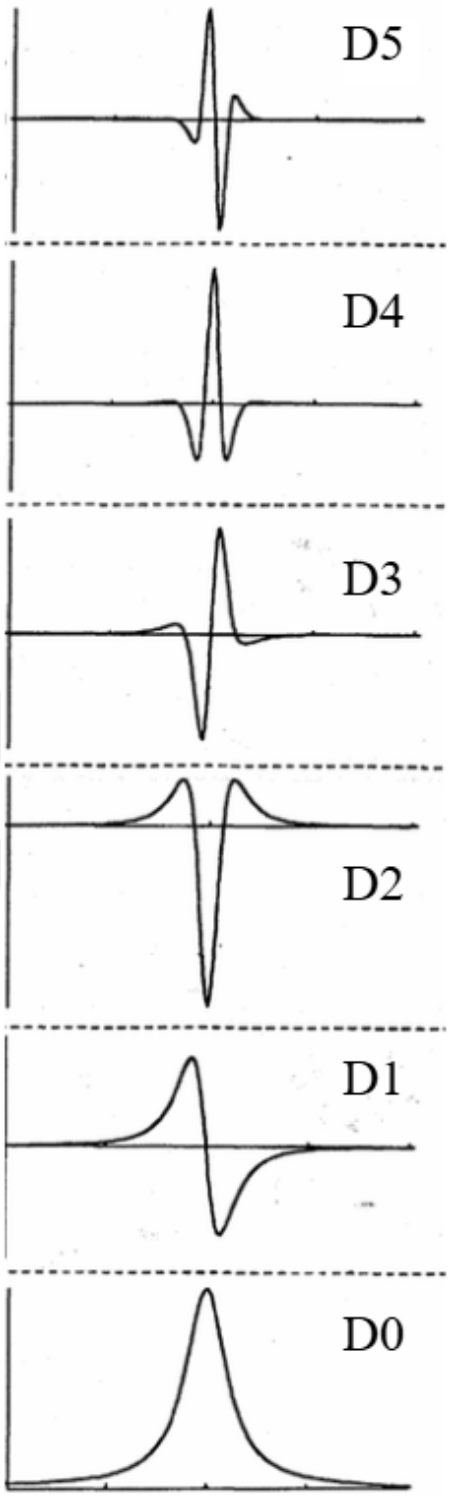
şeklinde ifade edilir. Eklenebilirlik Yasası da göz önünde bulundurulduğunda n. dereceden türevi alınan ifadelerin toplamı karışımın toplamının türevine eşittir;

$$D^n_{Karışım} = D^n_1 + D^n_2 + \cdots + D^n_x$$

Şekil 1.28. Türevin Eklenebilirlik Yasası'yla Birleşimi

Denklemde D^n_x, x'inci bileşenin n'inci türevini ifade etmektedir. (Kus vd., 1996)

Absorbans/dalga boyu grafiği çizilen spektrumların türevi alınmış grafikleri ise şu şekilde gösterilebilir;



Şekil 1.29. n. Dereceden Türev Spektrumlarına Örnekler, D0; Sıfırıncı dereceden türevin spektrumu, D1; Birinci dereceden türevi alınmış spektrum, D2; İkinci dereceden türevi alınmış spektrum, D3; Üçüncü dereceden türevi alınmış spektrum, D4; Dördüncü dereceden türevi alınmış spektrum, D5; Beşinci dereceden türevi alınmış spektrum.

Türev spektrofotometride türevi alınan grafikteki geniş pikler küçülürken dar pikler keskinleşir ve ayrımın yapılması kolaylaşır. Her pik için alınan türevin bir fazlası kadar türev piki gözlenir. Buna göre her bir pikin n. türevindeki pik sayısı n+1 şeklinde ifade edilir. (Dixir ve Ram, 1985)

1.5.5. Türev Spektrofotometrinin Avantajları

Türev Spektrofotometrinin en büyük avantajı üst üste gelen ve girişim yapan piklerinin ayrımının sağlanabiliyor olmasıdır. Piklerin ayrılmasının yanı sıra analiz edilmek istenen bileşenler impüritelerin varlığında da saptanabilir. Yüksek bir seçicilik ve hassasiyet sağlar. Küçük ve keskin piklerin daha görünür olmasını sağlar. Zaman kazandırır ve daha ekonomiktir. Bunun sebebi, ayrılması gereken bileşenlerin başka bir prosese gerek olmadan türevleriyle ayrılabilir hale getirilmesindendir. (Kus vd., 1996; Sowjanya vd., 2019)

1.5.6. Türev Spektrofotometrinin Dezavantajları

Türev spektrofotometrisi küçük ve keskin pikleri büyütür, bu sebeple gürültülü spektrumlarda hatalarla karşılaşılabilir. Bunu engellemek için düzeltme (smoothing) uygulanabilir. Doğru parametreler uygulanmazsa hedeflenen bazı pikler kaybolabilir ya da yanlış pikler ortaya çıkabilir. Doğru bir türev spektrumu elde etmek için en optimal değerler seçilmelidir. (Uddin, 2012, s: 266)

1.5.7. Türev Spektrofotometri Büyüklük Çıkarma Metodu (Modified Amplitude Subtraction Method, DS – MAS)

Aynı anda analiz edilen A ve B etkin maddelerinden, A tek bir dalga boyunda maksimum absorbans verirken B, aynı anda hem A ile aynı dalga boyunda hem de başka bir dalga boyunda absorbans veriyorsa ve A maddesi ile verdiği dalga boyu spektrumda girişim yapıyorsa MAS metodu kullanılabilir. Bu metoda göre, geniş bir dalga boyu aralığında taranan iki bileşenin absorbansa karşı dalga boyu çizilen spektrum grafiklerinin birinci dereceden türevi alınır ve türevi alınan spektrumdaki pik yükseklikleri girişim yapan noktalarda birbirinden çıkarılarak tek noktada maksimum absorbans yapan A maddesine ait bir büyüklük bulunur. Bu büyüklükler ile A'nın konsantrasyonu arasında doğrusal bir ilişki kurularak iki madde analiz edilir. Bu sayede Morötesi – Görünür Bölge Spektroskopisi'nde girişim yapmakta olan iki farklı etken madde kolaylıkla analiz edilebilir. (Sowjanya, 2019, s: 6)

1.6. Analitik Metot Validasyonu

Geliştirilen analitik metotların geçerli olduğunu kanıtlamak için gerekli olan kriterler ICH Q2(R2) kılavuzunda belirtilmektedir. Uluslararası düzeyde metot validasyonlarının hem farmasötik ürünleri analiz etmek için kullanılan kalite kontrol metotları hem de biyofarmasötik analizler için geliştirilen validasyon çalışmalarını standardize etmekte önemli bir yeri vardır. Geliştirilen analitik metotların tekrarlanabilirliği, doğruluğu ve tutarlılığını göstermek için gerekli olan temel validasyon parametrelerini belirtir. (ICH, 2023)

1.6.1. Özgünlük ve Seçicilik

Özgünlük ve seçicilik, ortaya konan analitik metotta ayrılmak istenen hedef bileşenin girişim olmadan başarılı bir şekilde tespit edilebildiğini gösteren parametredir. Eğer ortaya konan analitik metot özgün değil ise uygunluk seçicilik ile gösterilebilir ve bunun için hedeflenen bileşenin, amaca uygun bir biçimde tespit edilebildiğini göstermek için başka metotlarla karşılaştırılarak kanıtlanabilir. Her koşulda bileşenin uygun bir şekilde analiz edilebildiğini göstermek için yeterli ayrımın yapılabildiği kanıtlanmalıdır. Bu amaca ulaşabilmek için gerekirse, birden fazla bileşen içeren sistemler için iki veya daha fazla prosedür oluşturulabilir. (ICH, 2023)

Geliştirilen metoda göre bileşenin girişim yapmadığı farklı şekillerde gösterilebilir. Örneğin impürite veya saflık metotları için, kromatografide, piklerin birbirinden yeterince ayrıldığını göstermek için rezolüsyon parametresi gösterilebilir veya miktar tayini ya da potens çalışmalarında impüriteler; 1) etken madde veya yardımcı madde strese sokularak bozulabilir ya da impüriteler elde bulunuyorsa test edilen çözeltiye eklenerek iki pik arasında rezolüsyona bakılabilir, 2) pikin saflığı gösterilerek girişim olmadığı gösterilebilir veya eklenen veya oluşturulan impüritelerin varlığında ana pikin durumdan etkilenmediği kromatogram üzerinde gösterilebilir. (ICH, 2023)

1.6.2. Doğrusallık ve Aralık

Analizde ölçülen cevap ile hazırlanan testlerin konsantrasyonları arasında ilişki kurulmasını sağlayan parametreye doğrusallık veya lineerlik adı verilir. Tekrarlanabilirliğin kanıtlanabilmesi açısından önemli bir parametredir. Doğrusallığın kanıtlanabilmesi için belirlenen derişimlerde hazırlanan test çözeltilerinden alınan sinyaller ile oluşturulan kalibrasyon eğrisinin doğrusal regresyon analizi sonucunda R^2 değerinin 0.999'dan büyük olması ideal olarak kabul edilir. (ICH, 2023)

1.6.3. Kesinlik

Analitik metot validasyonu yapılırken kesinlik çalışması, yapılan analizde alınan cevaplar arasındaki varyasyonu gösterir. Geliştirilen analitik metot eğer impüriteleri kapsıyorsa, bu impüriteler için de araştırma yapılması önerilir. Kesinlik çalışması, ürünün veya maddenin homojen bir karışımını içeren örnekler üzerinden yapılır. Eğer çalışılan numuneler direkt olarak bulunamıyorsa yapay olarak da hazırlanarak test edilebilir. Bu aşamada tekrarlanabilirlik iki farklı şekilde kanıtlanabilir. Seçeneklerden biri, belirlenen aralıktaki derişimlerdeki üç farklı noktada 3'er adet test çözeltisinin hazırlanmasıyla sağlanabilir. Bu seçeneğin haricinde testi içeren %100'lük homojen testlerle de kesinlik çalışması gerçekleştirilebilir. (ICH, 2023)

1.6.4. Doğruluk

Analitik bir metodun doğruluğu, yapılan testlerinin sonuçlarının belirlenmiş gerçek değere olan yakınlığıyla ölçülür. Bu çalışmada test çözeltileri aralık olarak belirlenmiş konsantrasyonlarda analiz edilmelidir ve sonuçlar içeriğe eklenmiş olan miktara yakın bulunmalıdır. Numuneler hazırlanırken, belirlenmesi amaçlanan hedef bileşen, sonuç olarak belirlenmiş matrisle beraber hazırlanmalıdır. Örneğin bitmiş bir farmasötik ürün için geliştirilmiş analitik metot validasyonunda, etken madde bitmiş üründeki plaseboyu da içerecek şekilde hazırlanarak test edilmelidir. (ICH, 2023)

1.6.5. Sağlamlık

Geliştirilen analitik metodun sağlamlığı validasyon kapsamında test edilmelidir. Metodun, metot parametrelerinin varyasyonlarıyla, bu parametrelerdeki ufak değişikliklerle test edilesi, geliştirilmiş olan metodun güvenilirliğini ve dolayısıyla sağlamlığını kanıtlamalıdır. Bu parametreler geliştirilen metodun yapılış şekline göre değişiklik gösterebilir. (ICH, 2023)

Bu çalışmanın amacı sıvı preparatlarda Spiramisin ve Metronidazol'ün aynı anda tayinine olanak sağlayan bir Morötesi Spektrofotometri metodu ve karşılaştırma amacıyla yine aynı iki ilaç maddesinin aynı anda tayinine olanak sağlayacak bir Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (High Performance Liqiud Chromatography) metodu geliştirmektir. Bahsedildiği üzere hayvanlarda da sıklıkla kullanımı gözlenen bu maddeler özellikle tarımda kullanıldığında içme suyu kaynaklarına veya atık sulara karışarak eser miktarda tekrardan kullanımına yol açabilmektedir. Ayrıca piyasadaki süt vb. ürünlerde de takibi yapılmaktadır. Bu açılardan bakıldığında bu iki ilacın sıvı preparatlarda tayin edilmesi önemlidir. Geliştirilen metotların bu tür durumlarda kullanılabiliyor olması, hızlı, kesinliği yüksek ve doğru sonuç vermesi amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Tez Kapsamında Kullanılan Reaktifler ve Etkin Maddeler

Tez kapsamında bir adet Morötesi – Görünür Bölge Spektroskopisi ve bir adet de Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi için toplamda iki adet metot geliştirildi. Bu metotlar oluşturulurken Morötesi – Görünür Bölge Spektroskopisi metodunda kullanılan Etanol, Supelco'dan (Sigma-Aldrich) temin edilmiştir. Kullanılan ultra saf su Milli-Q cihazından elde edildi.

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi metodu oluşturulurken hareketli fazların hazırlanmasında kullanılan Potasyum Dihidrojen Fosfat, SRL'den temin edildi. Aynı şekilde hareketli fazların hazırlanmasında kullanılan %85 orto-Fosforik Asit, Supelco'dan (Sigma-Aldrich) tedarik edildi. Yine hareketli fazda kullanılan Asetonitril J.T. Baker'dan tedarik edildi. Kullanılan ultra saf su, Morötesi – Görünür Bölge Spektroskopisi metodu ile aynı şekilde elde edildi.

Ürünlerin hazırlanmasında kullanılan Etanol ve ultra saf su belirtildiği gibi Morötesi – Görünür Bölge Spektroskopisi metodunda kullanılanlar ile aynı şekilde tedarik edildi. Ürünlerin hazırlanmasında kullanılan Benzil Alkol Supelco'dan (Sigma-Aldrich) ve N,N-Dimetilasetilamit (Pharma Grade) ise PanReac & AppliChem'den tedarik edildi.

Hem ürünlerin üretiminde kullanılan hem de metotların geliştirilmesinde kullanılan Spiramisin, Topfond (Çin) firmasından elde edildi. Aynı şekilde ürünlerde ve metotların geliştirilmesinde kullanılan Metronidazol, Hubei Hongyuan (Çin) firmasından tedarik edildi.

Çizelge 2.1. Kullanılan Reaktifler ve Standartlar

Madde Adı	CAS-No.	Firma
Spiramisin	8025-81-8	Topfond
Spiramisin CRS	00CtKn-S1100000	European Pharmacopeia
Metronidazol	443-48-1	Hubei Hongyuan
Benzil Alkol	100-51-6	Supelco
N,N-Dimetilasetilamit	143145.1612	PanReac&AppliChem
Metanol	67-56-1	J.T. Baker
Etanol	64-17-5	Supelco
Asetonitril	75-05-8	J.T. Baker
%85 orto-Fosforik Asit	7664-38-2	Supelco
Potasyum Dihidrojen Fosfat %99,5	7778-77-0	SRL Chem
Ultra Saf Su	-	Merck Milli-Q Integral 10

2.2. Tez Kapsamında Kullanılan Cihazlar, Programlar ve Gereçler

Morötesi – Görünür Bölge Spektroskopi metodu Shimadzu 1800 Series Dual Beam (Japonya) kullanılarak geliştirildi Hellma marka 1 santimetre uzunluğundaki kuvars küvetler kullanıldı. Yapılan analizlerden elde edilen ham veriler UV Probe 2.70 (Shimadzu, Japonya) kullanılarak işlendi ve anlamlı hale getirildi.

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi metodu geliştirilirken Agilent 1290 Infinity II Series cihazı kullanıldı. Kromatografik kolon olarak Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C18 kullanıldı. Analizlerden elde edilen ham veriler Open Lab (Agilent) programı kullanılarak işlendi ve anlamlı hale getirildi.

Çözeltiler ve ürünler hazırlanırken Heidolph marka vorteks cihazı ve Bandelin marka ultrasonik banyo çözeltilerin düzgün karıştırılması için kullanıldı. Çözeltiler hazırlanırken kullanılan balon jojeler, mezürler ve beherler Isolab'dan temin edildi. Çözeltileri seyreltirken ise Eppendorf Research Plus mikropipet kullanıldı.

Çizelge 2.2. Kullanılan Cihazlar

Cihaz Adı	Model	Marka
Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Cihazı	1290 Infinity II	Agilent
Morötesi – GB Spektrofotometre	UV1800	Shimadzu
pH-metre	SevenExcellence	Mettler Toledo
Hassas Terazi	XPR205	Mettler Toledo
Vorteks Cihazı	Reax Top	Heidolph Instruments
Mikropipet	Research Plus	Eppendorf
Ultrasonik Banyo	-	Bandelin

Çizelge 2.3. Kullanılan Programlar

Metot Adı	Program Adı	Marka
Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi	OpenLab	Agilent
Morötesi – GB Spektrofotometri	UV-Probe 2.70	Shimadzu

Çizelge 2.4. Kullanılan Kolonlar

Kolon Adı	Kolon Özellikleri	Marka
ZORBAX Eclipse XDB-C18	Rapid Resolution 150 x 4.6mm, 3.5µm	Agilent

2.3. Yöntem

2.3.1. Morötesi – Görünür Bölge Spektroskopisi Metodu

Morötesi – Görünür Bölge Spektroskopi metodu geliştirilirken çözücü olarak %10'luk etanol hazırlandı. Yüksek saflıktaki etanol kullanılarak 10:90 (Etanol: Ultra Saf Su, h/h) oranında ultra saf su karıştırıldı ve %10'luk etanol elde edildi. Validasyon çalışmaları için Spiramisin ve Metronidazol'ün %100'lük derişimi en uygun absorbansı bu konsantrasyonda verdiğinden 10 µg/mL (ppm) olarak belirlendi. Bu metotta base-line ve oto-sıfırlama %10'luk etanol çözeltisi kullanılarak yapıldı ve çözücüden gelmesi olası olan absorbans pikleri engellendi.

2.3.2. Ürünlerin Hazırlanışı

Spiramisin piyasada enjeksiyonluk sıvı halinde farklı marka seçeneklerinde bulunmaktadır. Örneğin Spirotek 600 000UI/mL Injectible Solution ve Spirovet 600 000UI/mL Injectible Solution olarak piyasada satılmaktadır. Metronidazol ise Turkfleks %0.5

Metronidazol I.V. İnfüzyonluk Sıvı olarak 5mg/mL olacak şekilde ve Fladazol %0.5 Injectible Solution şeklinde piyasada bulunabilir.

Piyasada bu iki ürünü aynı anda enjeksiyonluk sıvı formunda içeren herhangi bir formülasyon bulunmamaktadır. Tablet formunda ise piyasada örneklerine rastlanmaktadır. Sıkça beraber kullanılan bu iki ürünün özellikle veteriner ilaç sektöründe kombinasyon halinde kullanımına sıkça rastlanmaktadır. Bu sebeple bu çalışma bu etken maddeyi aynı anda içeren sıvı enjeksiyonluk bir formülasyon önermektedir ve geliştirilen metotla uygunluğunu göstermektedir.

Formülasyon olarak iki farklı yöntem denendi ve ilk olarak çözücü olarak N,N-Dimetilasetilamit kullanılarak 300 000UI/mL Spiramisin ve 2.5mg/mL Metronidazol içeren bir ürün geliştirildi. Bu ürün iki farklı versiyon olacak şekilde koruyucu olan ve olmayan varyasyonlarda üretildi. Koruyucu olarak ise Benzil Alkol kullanıldı. Final ürünler 50mL'lik flakonlara konuldu ve hacim olarak da 50mL'lik üretildi. Uygun miktarda Spiramisin ve Metronidazol tartılarak N,N-Dimetilasetilamitte çözüldü. Oluşturulan çözelti ikiye ayrıldı ve bir kısma koruyucu olarak Benzil Alkol eklendi. Çözeltilerin kalan hacmi ultra saf su ile tamamlandı ve ürünler şişelendi. Su ile tamamlanırken karışımın çökmemesi için su yavaş eklendi ve eklenirken fazların homojen bir şekilde karışması beklendi.

Diğer formülasyon ise %10'luk Etanol ile hazırlandı ve hem doz hem hazırlanış bir önceki formülasyon ile aynı tutuldu. Sonuç olarak dört farklı formülasyon elde edildi ve bunlardan ikisi piyasada Spiramisin ürünlerinde görüldüğü gibi Benzil Alkol koruyucu olarak kullanarak hazırlandı. Çözücü olarak %10'luk Etanol güvenli bir oran olarak görüldüğü için çözücü olarak seçildi ve etken maddelerin sudaki çözünürlüğünün düşük olmasından dolayı piyasada bulunan ürünlerin yarısını içerecek şekilde hazırlandı ve maddelerin çözücüde iyi çözünmesi sağlandı.

2.3.3. Morötesi – GB Spektroskopisi Metodu Çözeltilerinin Hazırlanışı

2.3.3.1. Doğrusallık Çözeltilerinin Hazırlanışı

Metot valide edilirken hazırlanan doğrusallık çözeltileri için Spiramisin ve Metronidazol ayrı ayrı 10mg/100mL olacak şekilde çözelti haline getirildi ve bu çözeltiler stok olarak kullanıldı. Yapılan denemelerde %100'lük derişim 10ppm olarak belirlendi. Bu derişimdeki absorbansın 0.0-1.0 absorbans aralığında güvenli bir noktada olması ve doğrusallık veya doğruluk parametreleri çalışılırken daha yüksek derişimlere çıkılmasına olanak sağlamasından dolayı metodun %100'lük derişimi 10ppm olarak belirlendi. Çalışma

ise 6 farklı nokta seçilerek analiz edildi. Çözücü olarak %10'luk Etanol kullanıldı ve cihaz bu çözücü kullanılarak base-line alındı ve oto-sıfırlama yapıldı.

Çizelge 2.5. Çalışılan Konsantrasyon Aralığı

Oran (%)	Derişim
10%	1ppm (µg/mL)
50%	5ppm (µg/mL)
75%	7.5ppm (µg/mL)
100%	10ppm (µg/mL)
150%	15ppm (µg/mL)
175%	17.5ppm (µg/mL)

Hazırlanan stok çözeltiden (100ppm), %10'luk çözeltiyi oluşturmak için 0.1mL alındı ve 10mL'lik balonda çözücü ile hacmine tamamlandı. %50'lik çözelti için stoktan 0.5mL, %75'lik çözelti için stoktan 0.75mL, %100'lük çözelti için stoktan 1.0mL, %150'lik çözelti için stoktan 1.5mL ve %175'lik çözelti için stoktan 1.75mL alınarak 10mL balonlarda hacimlerine çözücü ile ayrı ayrı tamamlandı.

2.3.3.2. Kesinlik Çözeltilerinin Hazırlanışı

Kesinlik çalışmasında standart olarak Spiramisin ve Metronidazol ayrı ayrı 10mg tartıldı ve 100mL'lik balonda hacmine çözücü (%10'luk Etanol) ile tamamlandı. Daha sonra bu çözeltilerden 1mL alınarak ayrı ayrı 10mL'lik balonlarda hacmine tamamlandı. (10ppm Spiramisin ve 10ppm Metronidazol) Bu çözeltilerden ikişer defa hazırlandı ve ilk hazırlanan standartlar 6 defa, daha sonra hazırlanan standartlar 2 defa okutularak bu standartlar arasındaki uyum, cihazın tekrarlanabilirliğinin ve analizlerin doğruluğunun ölçülmesi için değerlendirildi. Ayrıca ilk hazırlanan standartların ardışık 6 kere yapılan okumalarının kendi içlerinde bağıl standart sapma değeri incelendi ve bu değerlerin %2.0'dan küçük olması beklendi.

Test çözeltileri Spiramisin ve Metronidazol'ün karışımı olarak hazırlandı. 10mg Spiramisin ve 10mg Metronidazol aynı 100mL'lik balonda hacmine çözücü ile tamamlandı. Bu çözeltiden 1mL alınarak 10mL'lik balonda hacmine çözücü ile tamamlandı. Bu çözelti ICH'in de önerdiği gibi 6 kez hazırlandı ve analiz edilen standartlara karşı okutuldu. Analiz edilen çözeltilerin % miktar tayini sonuçlarının %95-105 aralığında olması ve kendi içlerinde bağıl standart sapmalarının %5'ten düşük olması beklendi.

Daha sonra %10'luk etanolle hazırlanan ürünlerden koruyucu içermeyen versiyon aynı derişimde olacak şekilde; üründen 0.2mL alınıp 100mL'lik balonda çözücü ile hacmine tamamlanarak analiz edildi. Bu test çözeltisinden 6 kez hazırlandı ve % miktar tayininin %95-105 aralığında olması, kendi içindeki bağıl standart sapmasının %5'ten düşük olması beklendi.

2.3.3.3. Doğruluk Çözeltilerinin Hazırlanışı

Doğruluk çalışması ile kesinlik çalışması ardışık yapıldığından, kesinlik çalışmasında kullanılan standart çözeltileri doğruluk parametresinde de kullanılmıştır. Doğruluk parametresi için gerekli test çözeltileri ise doğrusallık çalışmasında belirlenmiş olan en düşük derişim, %100'lük derişim ve en yüksek derişimden 3'er kez hazırlandı ve analiz edildi. Buna göre en düşük %10'luk derişimli 1ppm'lik çözeltiden 3 kez, %100'lük derişimli 10ppm'lik çözeltiden 3 kez ve %175'lik derişimli 17.5ppm'lik çözeltiden 3 kez hazırlandı. Her 3 grubun kendi içindeki % miktar tayininin %95-105 aralığında olması ve kendi içlerindeki bağıl standart sapmanın %5'ten düşük olması beklendi.

2.3.3.4. Özgünlük Çözeltilerinin Hazırlanışı

Özgünlük parametresinin, analiz edilen etkin maddelerin doğru maddeler olduğunu kanıtlaması gerektiğinden ve Morötesi – Görünür Bölge Spektroskopisi metodunda maddelerin maksimum absorbans yaptığı dalga boylarının bu maddelere spesifik olmasından dolayı bu metot haricinde özgünlüğü göstermek için başka bir yönteme ihtiyaç duyulmamıştır. Spiramisin ve Metronidazol'ün morötesi bölgedeki spektrumlarını gösteren, kesinlik ve doğruluk parametrelerinde kullanılmış 10ppm'lik standart çözeltileri özgünlük parametresi için gösterilmiştir.

2.3.4. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Metodu

Literatürde hem Metronidazol hem Spiramisin için ayrı ayrı veya ortak YPSK metotları bulunmaktadır. Spiramisin, 3 ana komponentten (Spiramisin I, Spiramisin II ve Spiramisin III) oluştuğundan dolayı, sadece Spiramisin için geliştirilen metotlar çoğunlukla bu komponentleri birbirinden ayırmak için uzun tutulmakta. Bu çalışmada geliştirilen YPSK metodu bunlar göz önünde bulundurularak ve bu sorunları çözemeye yönelik geliştirilmiştir. Metotta YPSK ve DAD dedektörün kombine olduğu bir cihaz kullanılmıştır.

3. BULGULAR

3.1. Morötesi – Görünür Bölge Spektroskopisi Metodu

3.1.1. Doğrudan Morötesi – Görünür Bölge Spektroskopisi Sonuçları

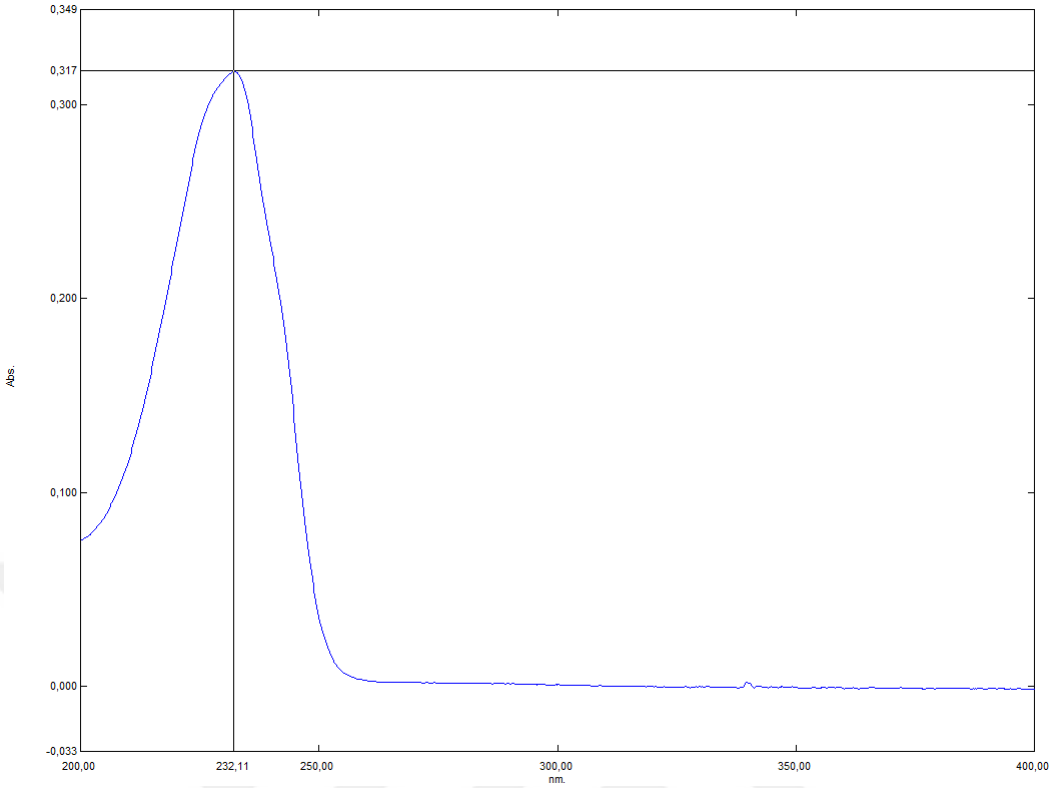
Hem Spiramisin hem de Metronidazol içeren sıvı preparatların tayin edilmesindeki zorlukları görmek için Morötesi – GB Spektroskopisi sonuçları öncelikle doğrudan tarama yoluyla elde edilmiştir. Bu iki maddenin oluşturulan tayin yöntemiyle düzgün çalışabildiğini göstermek için çözeltiler her seride sadece bir maddeyi içerecek şekilde farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış ve kendi içindeki lineer ilişki ortaya konmuştur.

Kesinlik çalışması yapılırken, iki maddenin ayrı olduğu iki farklı seri standart hazırlanmıştır. Test çözeltilerinin içindeki miktar bilindiğinden hesaplanan % miktar tayini kalibrasyon eğrisi üzerinden değil, standartlara karşı çalışılarak bulunmuştur. Test çözeltileri, Spiramisin ve Metronidazol'ün karışımı olarak hazırlanmıştır. Doğruluk test çözeltileri ise üç farklı derişimde hazırlanmış olup yine aynı standartlara karşı değerlendirilmiş ve gerçek miktarlar belirlenmiştir.

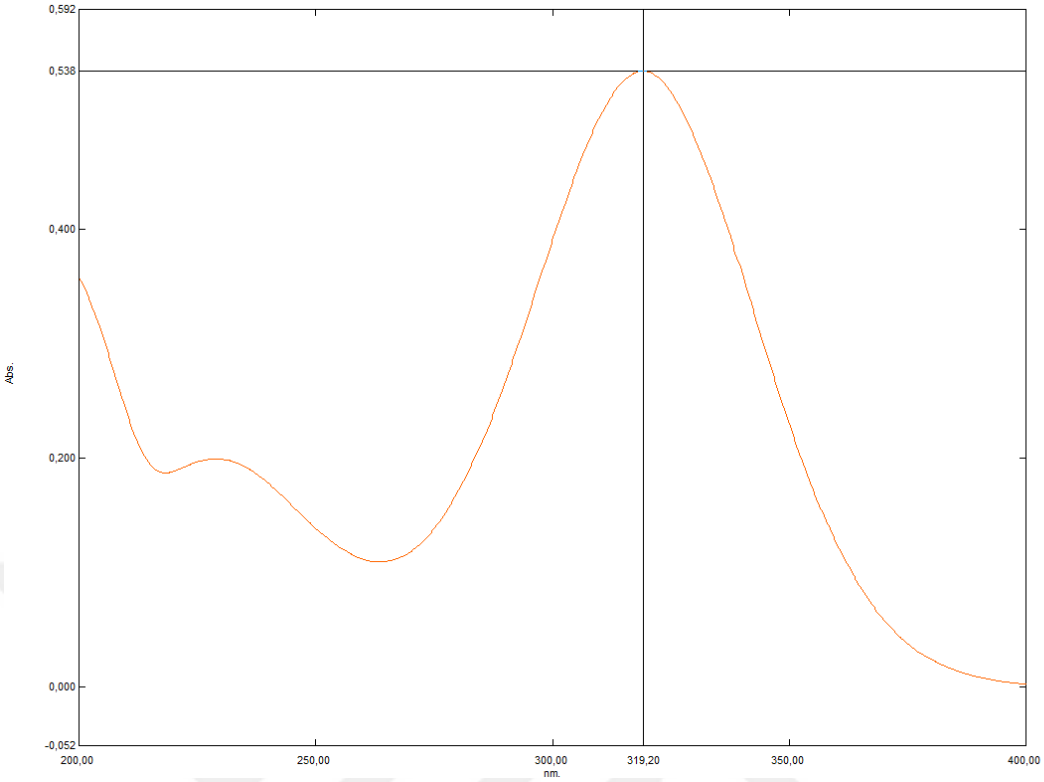
3.1.1.1. Özgünlük Çalışması

Özgünlük çalışması Spiramisin ve Metronidazol'ün %100'lük derişimde hazırlanmış çözeltilerinin 200-400nm arasında maksimum absorbans değerlerinin taranması ile elde edilmiştir. Çözücü olarak %10'luk Etanol kullanılmış ve base-line çözücü ile sıfırlanmıştır.

Çalışmaya göre Spiramisin 232nm'de, Metronidazol ise 319nm'de maksimum absorbans göstermiştir. Çalışmada görüldüğü üzere Metronidazol, maksimum absorbans verdiği 319nm haricinde 200-260nm arasında da absorbans yapmıştır. Bu aralık aynı zamanda Spiramisin'in maksimum absorbans yaptığı 232nm ile girişim yapmaktadır.



Şekil 3.1. Spiramisin'in maksimum absorbansı, y-ekseni absorbans ve x-ekseni dalga boyu



Şekil 3.2. Metronidazol'ün maksimum absorbansı, y-ekseni absorbans ve x-ekseni dalga boyu

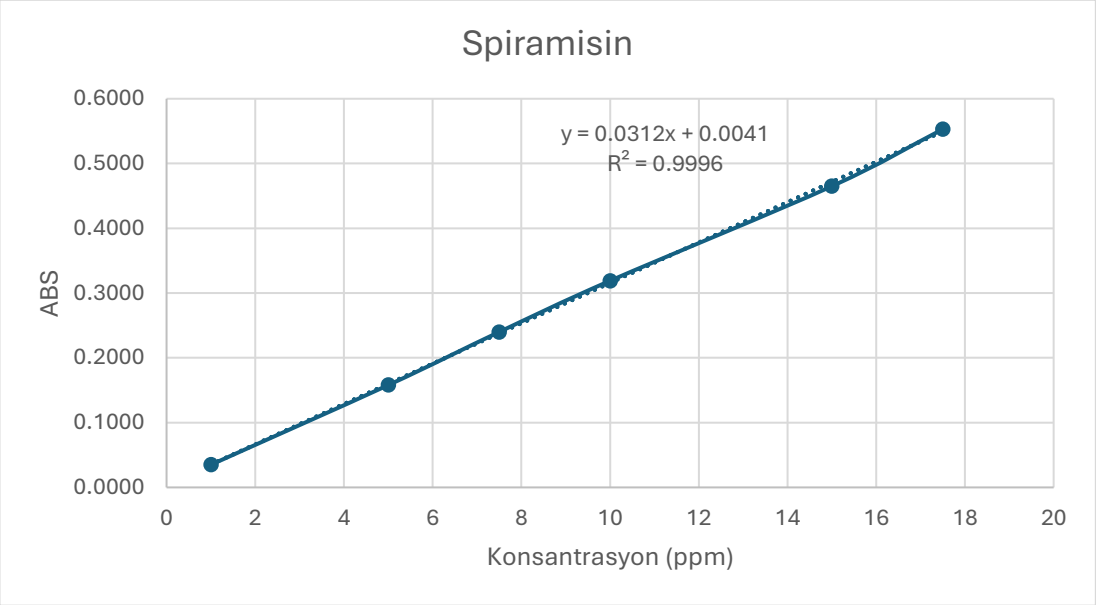
3.1.1.2. Doğrusallık Çalışması

Doğrusallık iki tür için de ayrı ayrı hazırlanmış ve iki tür için de aynı konsantrasyonlar çalışılmıştır. Buna göre 1ppm, 5ppm, 7.5ppm, 10ppm, 15ppm ve 17.5ppm olmak üzere 6 farklı nokta analiz edilmiştir. Spiramisin 10.00mg ve Metronidazol 10.06mg tartılmış ve çözelti hazırlanışlarında belirtildiği şekilde hazırlanmıştır.

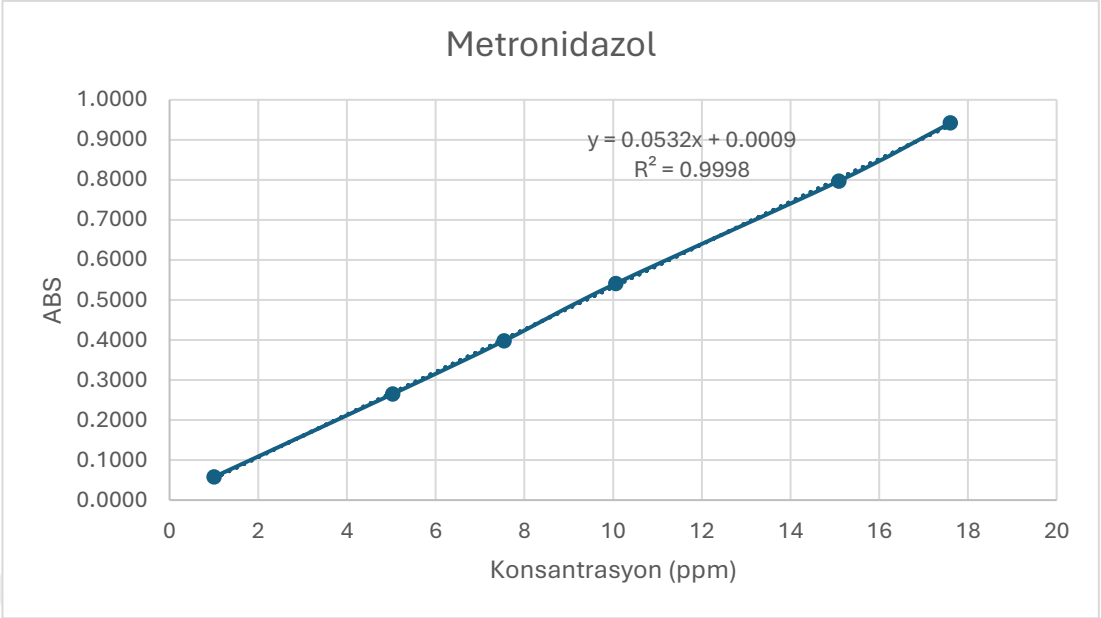
Çizelge 3.1. Spiramisin ve Metronidazol'ün Doğrusallık Çalışıldığı Konsantrasyon Aralığı

Spiramisin		
Oran	Konsantrasyon (ppm)	Absorbans
10%	1	0.0350
50%	5	0.1580
75%	7.5	0.2400
100%	10	0.3190
150%	15	0.4650
175%	17.5	0.5530
Metronidazol		
Oran	Konsantrasyon (ppm)	Absorbans
10%	1	0.0580
50%	5	0.2650
75%	8	0.3980
100%	10	0.5410
150%	15	0.7970
175%	18	0.9420

Doğrusallık çalışmaları sonucunda, belirlenen konsantrasyonlara karşılık gelen absorbans değerleri yukarıdaki tablolarda gösterilmiştir. Çıkan sonuçlara göre çizilen Absorbans/Konsantrasyon grafiklerinin R^2 değerleri Spiramisin ve Metronidazol için sırasıyla 0.9996 ve 0.9998 bulunmuştur.

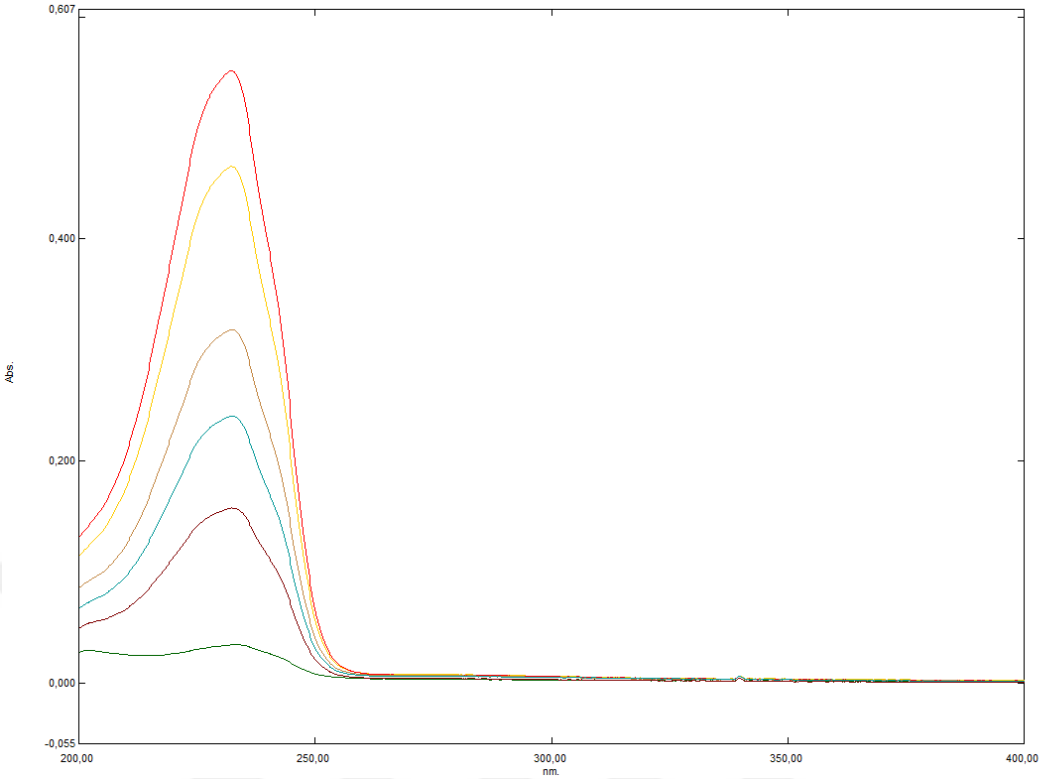


Şekil 3.3. Spiramisin'in Morötesi – GB metodunda doğrudan tarama modundaki doğrusallığı (1ppm, 5ppm, 7.5ppm, 10ppm, 15ppm ve 17.5ppm)

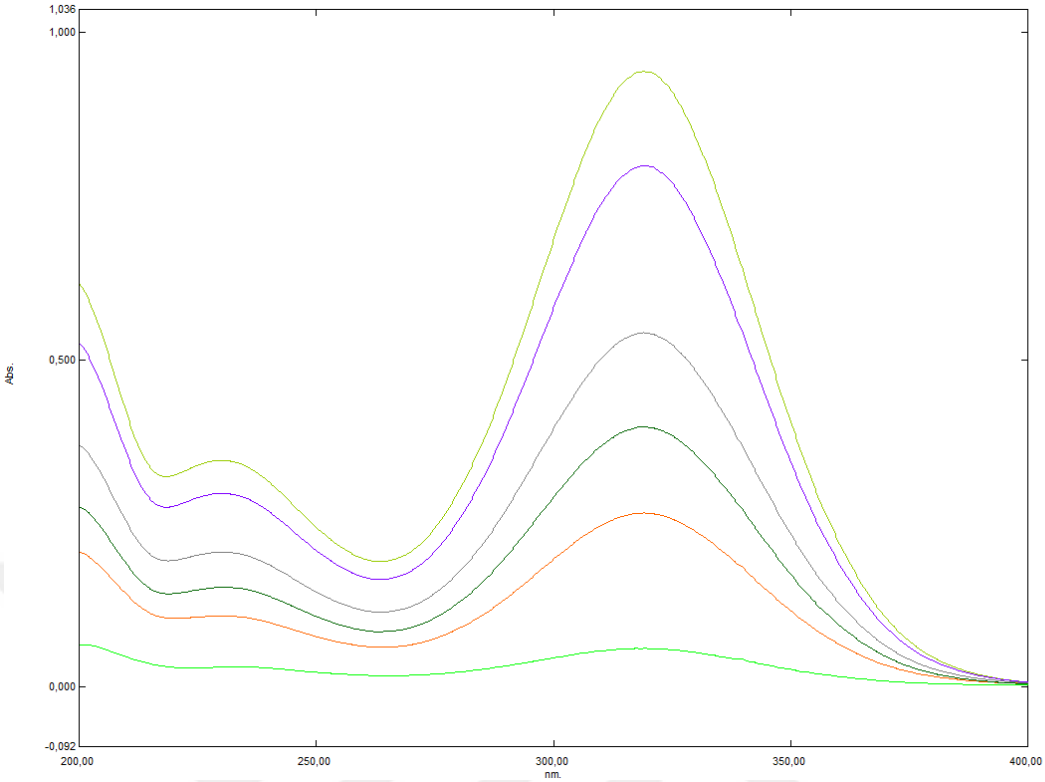


Şekil 3.4. Metronidazole'ün Morötesi – GB metodunda doğrudan tarama modundaki doğrusallığı (1ppm, 5ppm, 7.5ppm, 10ppm, 15ppm ve 17.5ppm)

Grafikleri oluşturulan veriler ile bir regresyon analizi yapıldığında x değişkenine göre hesaplanan p-değeri, Spiramisin ve Metronidazol için sırasıyla 0.000000061 ve 0.000000022 olarak bulunmuştur. Analizin geçerliliği için bu değerin 0.05'ten küçük olması beklenmektedir. Buna göre; $p\text{-değeri}_{Spiramisin} < 0.05$ ve $p\text{-değeri}_{Metronidazol} < 0.05$ diyebiliriz. R^2 değerinin ise ideal olarak 0.999'dan büyük olması beklenmektedir ve ulaşılan sonuçlar bu koşulu karşılamaktadır.

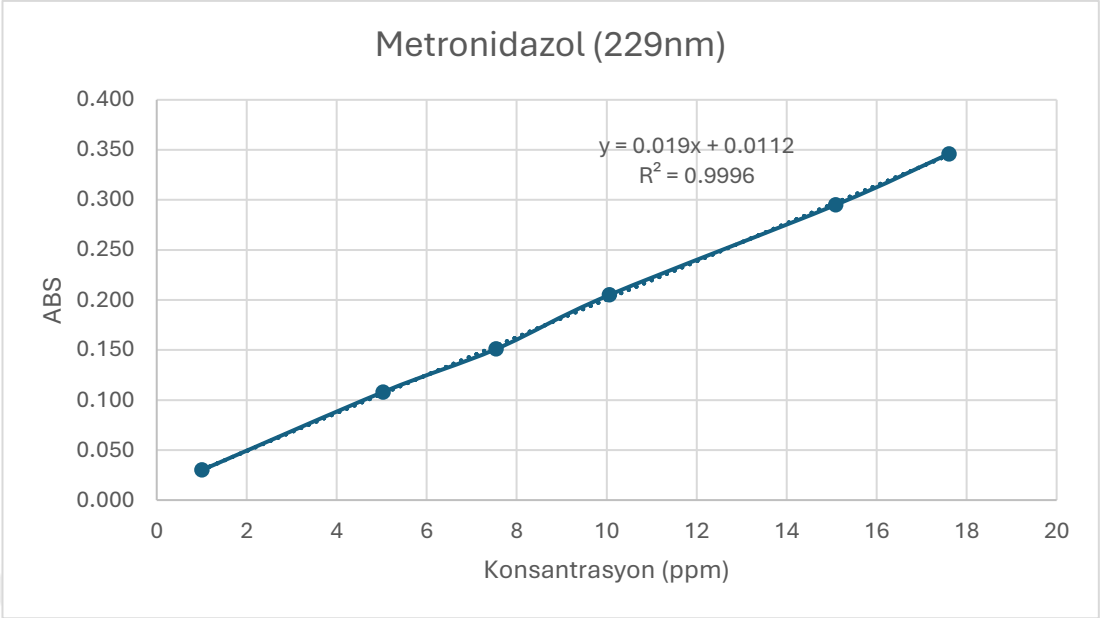


Şekil 3.5. Spiramisin'in 232nm'deki doğrusallık çözeltisi piklerinin üst üste "Overlay" modundaki görüntüsü, y-ekseni absorbans, x-ekseni dalga boyu (1ppm, 5ppm, 7.5ppm, 10ppm, 15ppm ve 17.5ppm)



Şekil 3.6. Metronidazol'ün 319nm'deki doğrusallık çözeltisi piklerinin üst üste "Overlay" modundaki görüntüsü, y-ekseni absorbans, x-ekseni dalga boyu (1ppm, 5ppm, 7.5ppm, 10ppm, 15ppm ve 17.5ppm)

Spiramisin'in ve Metronidazol'ün doğrusallık verileri 232 ve 319nm'de yaptıkları maksimum absorbans piklerine göre alınmış ve kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur. Oluşturulan grafiklere ve grafiğin regresyon analizine göre sonuçlar limitleri karşılamaktadır. Metronidazol'ün istenmeyen dalga boyu aralığında yaptığı absorbans ise spektrumda gösterilmiştir. Metronidazol'ün absorbans verdiği diğer nokta incelendiğinde ise bu alanın tepe noktasının 229nm olduğu görülmektedir. Aynı derişimlerden elde edilen spektrumlar incelendiğinde Absorbans/Konsantrasyon ilişkisi bu şekilde bulunmuştur;



Şekil 3.7. Metronidazol'ün Morötesi – GB metodunda 229nm'deki girişim yapan pikinin doğrudan tarama modundaki doğrusallığı (1ppm, 5ppm, 7.5ppm, 10ppm, 15ppm ve 17.5ppm)

Metronidazol'ün 229nm'deki değerlendirmesinin Absorbans/Konsantrasyon grafiği değerlendirildiğinde ise R^2 değeri 0.9996 olarak bulunmuştur. Ayrıca x değişkenine göre incelenen p-değeri ise 0.000000063 bulunmuştur, yani p-değeri$_{\text{Metronidazol (229nm)}} < 0.05$. Tüm sonuçlar değerlendirildiğinde bu şekilde bir tablo ortaya çıkmıştır;

Çizelge 3.2. Morötesi – GB Doğrudan Tarama Modunda Doğrusallık Sonuçları

	Spiramisin	Metronidazol (319nm)	Metronidazol (229nm)
R^2	0.9996	0.9998	0.9996
Korelasyon Katsayısı	0.9998	0.9999	0.9998
p-değeri	$6.1x10^{-8}$	$2.2x10^{-8}$	$6.3x10^{-8}$
Kesişim	0.0041	0.0009	0.0112

Spiramisin ve Metronidazol'ün doğrusallık çalışmaları değerlendirildiğinde konsantrasyon ve absorbans arasındaki ilişki açıkça görülmektedir ve tüm limitleri karşılamaktadır.

3.1.1.3. Kesinlik Çalışması

Kesinlik çalışması için hazırlanan Spiramisin ve Metronidazol standartları ayrı ayrı ve 10ppm olacak şekilde 2'şer kere analiz edilmiştir. Sistem uygunluk parametresi olarak her iki standart setinin kendi içindeki % bağıl standart sapması, % BSS, (% RSD, % Relative Standard

Deviation) 5.0'dan düşük olmalıdır. Ayrıca 2'şer olarak hazırlanan standartların birbirine karşı uyumu da %95.0 - 105.0 aralığında olmalıdır. Standart uyumunun hesaplanışı şu şekildedir;

$$\%\ Uyum = \frac{Absorbans_{Standart\ 1}}{Absorbans_{Standart\ 2}}\ x\ \frac{Konsantrasyon_{Standart\ 2}}{Konsantrasyon_{Standart\ 1}}\ x\ \%100$$

Şekil 3.8. İki Standart Arasındaki Uyumun Hesaplanması

Bu sayede aynı derişimde hazırlanan iki standardın uyumu ölçülür ve sistemin doğru çalıştığına dair bilgi edinilir. İkinci standart, birinci standardın uyumunu kontrol etmek için kullanıldıktan sonra, birinci standart test çözeltilerinin derişimini ölçmek için kullanılır. Test çözeltilerinin % miktar tayini ise bu şekilde hesaplanır;

$$\%\ Miktar\ Tayini = \frac{Absorbans_{Test}}{Absorbans_{Standart\ 1}}\ x\ \frac{Konsantrasyon_{Standart\ 1}}{Konsantrasyon_{Test}}\ x\ \%100$$

Şekil 3.9. % Miktar Tayininin Hesaplanması

Bu çalışmada standart ve test çözeltisinde kullanılan hammaddeler aynı kaynaktan kullanıldığı için potens değeri hesaba katılmamıştır. Potens değerinin kullanılması gerektiği durumda hesaplama bu şekilde yapılabilir;

$$= \frac{Absorbans_{Test}}{Absorbans_{Standart\ 1}}\ x\ \frac{Tartım\ (mg)_{Standart\ 1} x\ Dilüsyon\ Faktörü\ (mL^{-1})\ x\ Potens}{Tartım\ (mg)_{Test}\ x\ Dilüsyon\ Faktörü\ (mL^{-1})}\ x\ \%100$$

Şekil 3.10. % Miktar Tayini Hesaplamasının Detaylı Hesaplaması

Hesaplamanın sonucunda elde edilen verilerin arasındaki %BSS 5.0'dan küçük olmalı ve hesaplanan % miktar tayini sonuçlarının her biri %95.0 - 105.0 aralığında olmalıdır.

Çizelge 3.3. Morötesi – GB Doğrudan Tarama Modunda Sistem Uygunluğun Değerlendirilmesi

Sistem Uygunluk (Spiramisin)		
Ortalama Absorbans Birincil standart	%BSS Birincil Standart	% Uyum
0.317	0.2	99.6
Sistem Uygunluk (Metronidazol)		
Ortalama Absorbans Birincil standart	%BSS Birincil Standart	% Uyum
0.539	0.1	99.8
Sistem Uygunluk (Metronidazol 229nm)		
Ortalama Absorbans Birincil standart	%BSS Birincil Standart	% Uyum
0.200	0.4	100.0

Sistem koşulları, limit parametrelere göre değerlendirildiğinde, belirlenen derişimlerin Morötesi – GB Spektrofotometri metoduna göre güvenli bir noktada maksimum absorbans yaptıkları görülmekte. (0.0 – 1.0 ABS) Ayrıca her bir standart setinde birincil standardın ikincil standarda karşı değerlendirilmesindeki uyum Spiramisin ve Metronidazol için sırasıyla %99.6 ve %99.8 şeklinde bulunmuştur, ki bu değerler %95.0-105.0 aralığında, metodun yüksek güvenilirlikle çalışabileceğini göstermiştir. Ayrıca her bir sette birincil standardın kendi içindeki %BSS'si Spiramisin ve Metronidazol için sırasıyla %0.2 ve %0.1 olarak bulunmuştur ve metodun tekrarlanabilirliğini kanıtlamıştır.

Doğrusallık çalışmasında da gösterildiği gibi Metronidazol 319nm'de yaptığı absorbans haricinde 200-260nm arasında da absorbans piki vermektedir. Bu aralıkta yaptığı absorbansın tepe noktası sistem uygunluğunun belirlendiği standart çözeltilerde de gösterildiği üzere 229nm'de gelmektedir. 229nm'de Metronidazol'ün yaptığı absorbanstan elde edilen Doğrusallık çalışmasına ait doğru denklemi, Spiramisin ve Metronidazol'ün beraber kullanıldığı test çözeltilerinde konsantrasyonu kullanarak Metronidazol'ün yaptığı girişimi gidermek için kullanılmıştır. Metronidazol'ün doğrusallığı hem 229nm'de hem 319nm'de yüksek geldiğinden konsantrasyondan elde edilen farazi absorbans değeri, Eklenebilirlik Yasası da göz önünde bulundurularak Spiramisin'in test çözeltisi içindeki derişimini bulmak için kullanılmıştır. Buna göre Metronidazol'ün her bir test çözeltisi içindeki konsantrasyonu, 229nm'deki absorbans değerini bulmak için kullanıldığında hem Spiramisin hem de Metronidazol için sonuçlar aşağıdaki gibi bulunmaktadır;

Çizelge 3.4. Morötesi – GB Doğrudan Tarama Modunda Spiramisin'in Gerçek Absorbansının Hesaplanması

		Spiramisin'in Absorbansı		
Test	Metronidazol Kons. (ppm)	ABS ($Metronidazol_{229nm}$)	Toplam Absorbans	Gerçek Absorbans (Spiramisin)
1	10.03	0.202	0.491	0.289
2	10.11	0.203	0.507	0.304
3	9.98	0.201	0.505	0.304
4	10.09	0.203	0.515	0.312
5	10.03	0.202	0.514	0.312
6	10	0.201	0.506	0.305

Metronidazol'ün 229nm'deki Absorbans/Konsantrasyon kalibrasyon eğrisinden elde edilen doğrudan alınan absorbans değerleri aynı bölgede gelen toplam absorbans değerinden çıkarılarak Spiramisin'in gerçek absorbans değeri bulunmuştur. Buradan elde edilen sonuçlarla Spiramisin'in miktar tayini hesaplanırsa;

Çizelge 3.5. Morötesi – GB Doğrudan Tarama Modunda Spiramisin ve Metronidazol'ün Kesinliği

Spiramisin Kesinlik Çalışması					
Test	Tartım (mg)	Hesaplanan Değer (mg)	% Miktar Tayini	% Ortalama	%BSS
1	9.64	9.12	94.65	96.37	1.46
2	10.03	9.58	95.52		
3	10.00	9.60	95.96		
4	10.04	9.85	98.06		
5	10.04	9.85	98.10		
6	10.02	9.62	95.96		
Metronidazol Kesinlik Çalışması					
Test	Tartım (mg)	Hesaplanan Değer (mg)	% Miktar Tayini	% Ortalama	%BSS
1	10.03	9.82	97.94	99.95	1.08
2	10.11	10.16	100.49		
3	9.98	10.01	100.30		
4	10.09	10.07	99.76		
5	10.03	10.14	101.11		
6	10.00	10.01	100.10		

Yapılan kesinlik çalışmasında metodun uygunluğunun gösterilmesi için etkin madde kullanılarak hazırlanan test çözeltileri analiz edilmiştir. Ayrıca metodun bu etkin maddelerle üretilen enjeksiyonluk sıvı bir ürün örneğiyle de uygunluğu gösterilmiş ve ortalamanın %95.0-105.0 aralığında olup %BSS'sinin %5.0'dan küçük olduğu her iki etkin madde için gösterilmiştir. Bu çalışma yapılırken Metronidazol'ün 229nm'deki absorbansı ürün içeriğine göre hesaplanmış ve Spiramisin'in absorbans yaptığı bölgedeki toplam absorbans değerinden çıkarılmıştır.

Çizelge 3.6. Morötesi – GB Doğrudan Tarama Modunda F002 Formülasyonunun Değerlendirilmesi

F002A Spiramisin Kesinlik Çalışması					
Test	İçerik (mg/mL)	Hesaplanan (mg/mL)	% Miktar Tayini	% Ortalama	%BSS
1	5.24	4.84	92.40	98.32	4.32
2		4.89	93.30		
3		5.28	100.83		
4		5.32	101.43		
5		5.30	101.13		
6		5.28	100.83		
F002A Metronidazol Kesinlik Çalışması					
Test	İçerik (mg/mL)	Hesaplanan (mg/mL)	% Miktar Tayini	% Ortalama	%BSS
1	5.00	4.75	95.04	97.72	2.08
2		4.76	95.23		
3		4.92	98.41		
4		4.95	98.97		
5		4.96	99.15		
6		4.98	99.53		

3.1.1.4. Doğruluk Çalışması

Doğruluk çalışması kapsamında test çözeltileri ICH'te de belirtildiği gibi "Doğrusallık ve Aralık" çalışması ise belirlenmiş en düşük, orta ve en yüksek derişimlerde 3'er adet hazırlanarak test edilmiştir. Test edilen her derişimdeki grubun kendi içindeki %BSS'sinin %5.0'dan küçük olması ve yine her grubun kendi içinde %95.0-105.0 aralığında olması beklenmiştir. Çalışma yapılırken Spiramisin ve Metronidazol karışım halinde bulunduğundan, Spiramisin pikinin altındaki girişim göz önünde bulundurularak, Metronidazol'ün doğrusallığının kanıtlandığı çalışmadan elde edilen 229nm'deki Absorbans/Konsantrasyon kalibrasyon eğrisinin grafiğini kullanarak, Doğruluk parametresindeki Metronidazol'ün her bir düzeydeki derişiminden absorbans değerleri elde edilmiş ve Spiramisin'in olduğu bölgede gelen toplam absorbans değerlerinden çıkarılmıştır. Buna göre Spiramisin'in gerçek absorbans değeri ve kalibrasyon eğrisinden elde edilen Metronidazol'ün 229nm'deki absorbansı bu şekildedir;

Çizelge 3.7. Morötesi – GB Doğrudan Tarama Modunda Doğruluk Parametresi için Spiramisin'in Gerçek Absorbansının Doğrusallıkta Kullanılan Kalibrasyon Eğrisinden Elde Edilmesi

	Spiramisin'in Absorbansı			
Test	Metronidazol Kons. (ppm)	Absorbans ($Metronidazol_{229nm}$)	Toplam Absorbans	Gerçek Absorbans (Spiramisin)
%10 - 1	1.00	0.030	0.054	0.024
%10 - 2	1.01	0.030	0.053	0.023
%10 - 3	1.00	0.030	0.054	0.024
%100 - 1	10.09	0.203	0.506	0.303
%100 - 2	10.03	0.202	0.503	0.301
%100 - 3	10.00	0.201	0.496	0.295
%175 - 1	17.78	0.349	0.886	0.537
%175 - 2	17.54	0.344	0.897	0.553
%175 - 3	17.50	0.344	0.898	0.554

Buradan elde edilen değerlerle Spiramisin'in çözeltilerinden elde edilen değerlere göre Doğrusallık parametresi değerlendirildiğinde bu sonuçlara ulaşılmaktadır;

Çizelge 3.8. Morötesi – GB Doğrudan Tarama Modunda Doğruluk Parametresinin Spiramisin için Değerlendirilmesi

Test	Absorbans	Spiramisin (mg)	% Miktar Tayini	Hesaplanan Değer (mg)	Ortalama (%)	%BSS
%10 - 1	0.024	9.70	77.22	7.57		
%10 - 2	0.023	9.72	73.32	7.26	75.86	2.90
%10 - 3	0.024	9.76	77.05	7.57		
%100 - 1	0.303	10.04	95.23	9.56		
%100 - 2	0.301	10.04	94.65	9.50	94.23	1.34
%100 - 3	0.295	10.02	92.81	9.31		
%175 - 1	0.537	10.15	95.37	9.68		
%175 - 2	0.553	10.01	99.52	9.97	98.14	2.44
%175 - 3	0.554	10.04	99.52	9.99		

Bu çalışmada doğrudan yapılan Mortötesi – GB taramasının düşük derişimlerde yetersiz kaldığı görülmektedir. Doğruluk parametresi için her bir düzeyde %95.0-105.0 aralığında olması beklenen sonuçlar %10 konsantrasyon düzeyinde %75.86, %100 düzeyinde %94.23 olarak hesaplanmıştır.

Spiramisin ile aynı konsantrasyon seviyelerinde incelenen Metronidazol ise spektrumdan elde edilen absorbans değerleri ile hesaplandığında sonuçlar bu şekilde bulunmuştur;

Çizelge 3.9. Morötesi – GB Doğrudan Tarama Modunda Doğruluk Parametresinin Metronidazol için Değerlendirilmesi

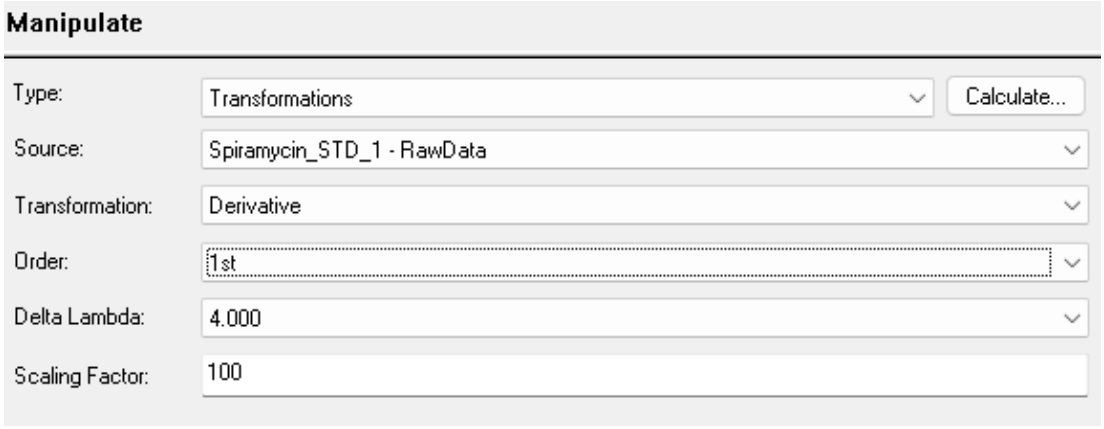
Test	Absorbans	Metronidazol (mg)	% Miktar Tayini	Hesaplanan Değer (mg)	Ortalama (%)	%BSS
%10 - 1	0.054	10.03	100.55	10.08		
%10 - 2	0.053	10.11	97.90	9.90	101.08	3.44
%10 - 3	0.056	9.98	104.79	10.46		
%100 - 1	0.535	10.09	99.02	9.99		
%100 - 2	0.545	10.03	101.48	10.18	99.70	1.56
%100 - 3	0.528	10.00	98.61	9.86		
%175 - 1	0.946	10.16	99.37	10.10		
%175 - 2	0.946	10.02	100.75	10.10	100.36	0.86
%175 - 3	0.946	10.00	100.96	10.10		

Üç farklı konsantrasyon seviyesinde 3'er kez analiz edilen Metronidazol uygulanan direkt Morötesi – GB taramasından elde edilen spektrumlara göre limitlere uygun sonuç vermiştir. %BSS değerleri ise %5.0'ın altında bulunmuş ve sonuçların her biri gerçek değere yakın sonuçlar vermiştir.

3.1.2. Morötesi – Görünür Bölge Türev Spektrofotometri Metodu Sonuçları

Türev Spektrofotometri metodunda doğrudan yapılan Morötesi – GB Spektroskopisinden elde edilen Absorbans/Dalga Boyu spektrum grafiklerinin 1. dereceden türevi alınmıştır ve sonuçlar tekrar hesaplanarak Spiramisin ve Metronidazol piklerinin ayırt edilebilirliği değerlendirilmiş, metot valide edilmiştir. Türev Spektroskopisinden elde edilen sonuçlar Modifiye Büyüklük Çıkarma (Modified Amplitude Subtraction – MAS) yöntemi ile değerlendirilmiş ve Spiramisin ile Metronidazol piklerinin 200-260nm aralığında yaptığı girişim giderilmiştir.

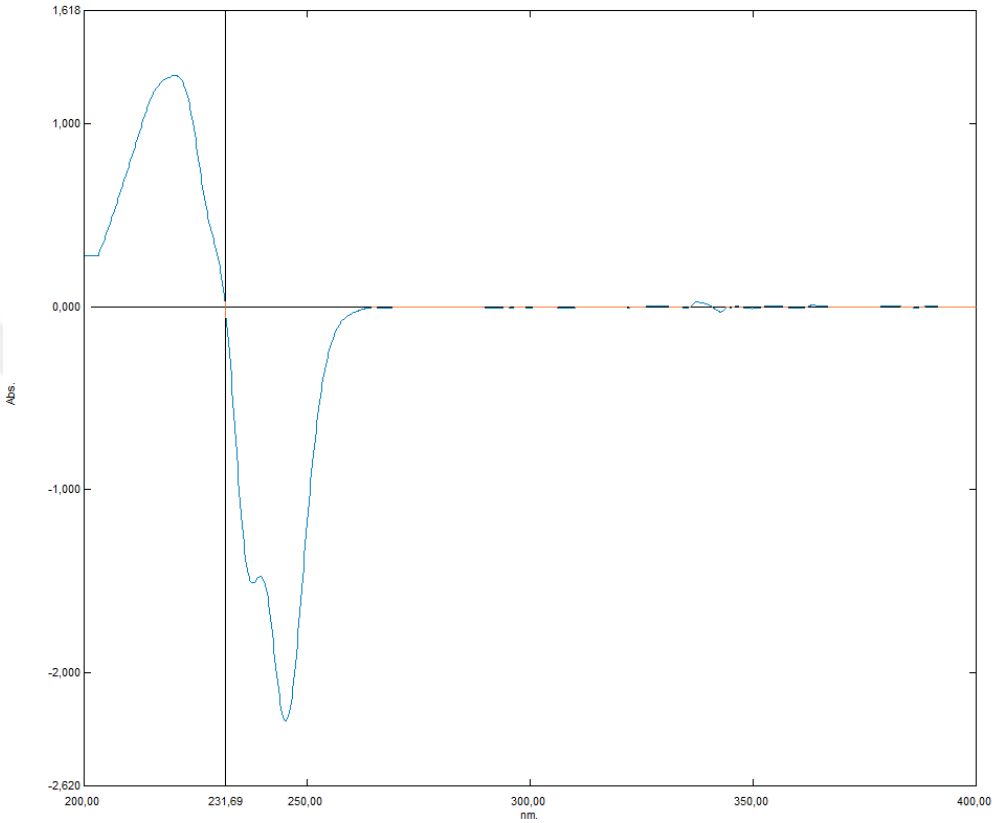
Türevi alınan spektrumların tamamı UV Probe 2.70 (Shimadzu) programında aşağıdaki metot ile yeniden hesaplanmıştır.



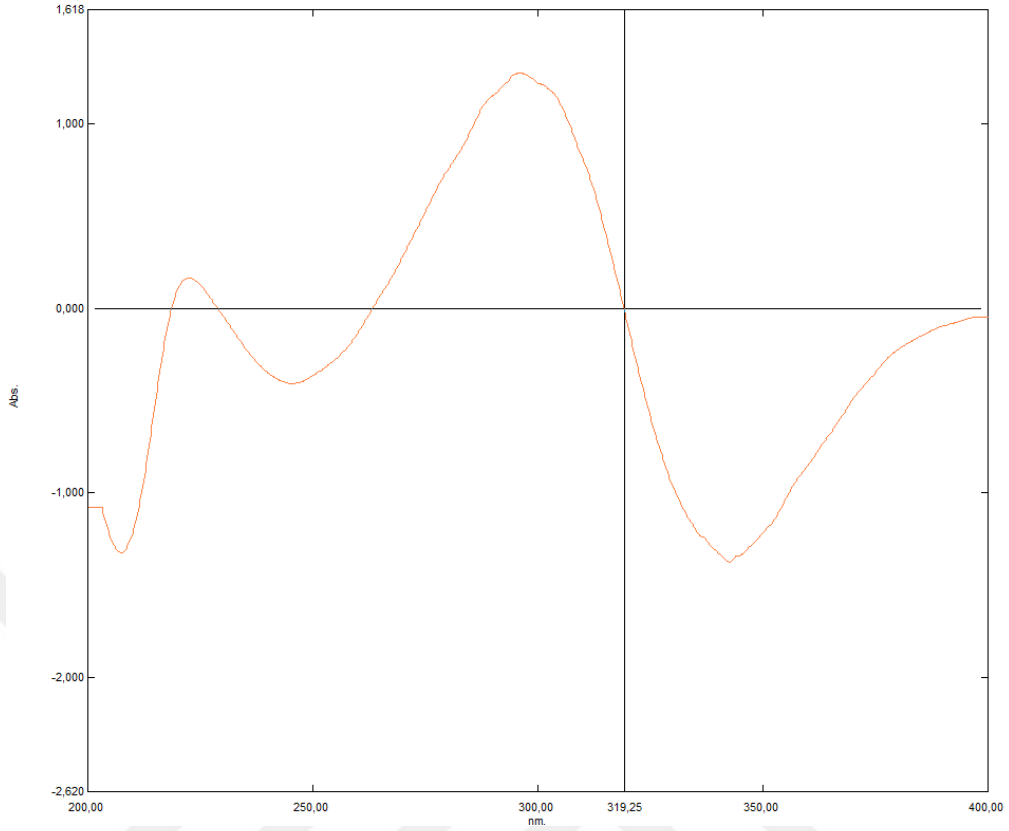
Şekil 3.11. Morötesi – GB Türev Spektroskopisinde Spektrumların Türevini Alırken Kullanılan Parametreler

3.1.2.1. Türev Spektroskopisi Özgünlük Çalışması

Özgünlük, doğrudan tarama metodundan elde edilen spektrumların 1. dereceden türevi alınarak incelenmiştir. Koşulların aynı olması açısından %100'lük derişimde hazırlanmış çözeltilerin spektrumlarının türevi kullanılmıştır.

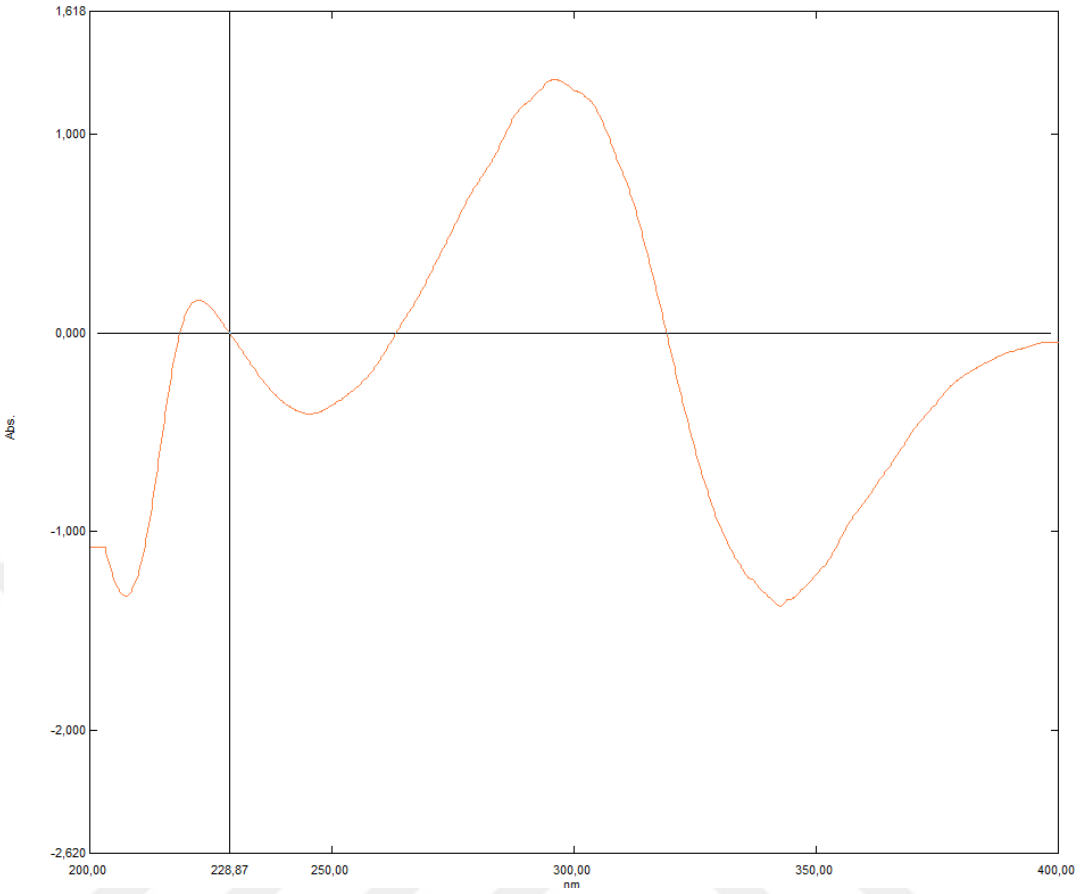


Şekil 3.12. Spiramisin'in Türevi Alınan Spektrumu ve Grafiğin 0'ı Kestiği Nokta (232nm), y-ekseni dA/dλ, x-ekseni dalga boyu



Şekil 3.13. Metronidazol'ün Türevi Alınan Spektrumu ve Grafiğin 0'ı Kestiği Nokta (319nm), y-ekseni dA/dλ, x-ekseni dalga boyu

Spiramisin ve Metronidazol'ün 1. dereceden türevi alınmış spektrum grafikleri incelendiğinde 1. dereceden türev grafiklerinin karakteristik özelliği olan maxima ve minima noktaları her bir bileşen için görülmektedir. Bu iki nokta arasında grafiğin x-ekseninde 0'ı kestiği nokta, bileşenin, doğrudan yapılan taramadaki tepe noktasını göstermektedir. Buna göre Spiramisin'in 232nm'de Metronidazol'ün ise 319nm'deki varlığı türev spektrumunda görülmektedir.



Şekil 3.14. Metronidazol'ün Türevi Alınan Spektrumu ve Grafiğin 0'ı Kestiği Nokta (229nm), y-ekseni dA/dλ, x-ekseni dalga boyu

Ayrıca Metronidazol'ün türev spektrumu incelendiğinde Spiramisin ile girişim yaptığı 229nm'deki varlığı da tespit edilebilir. İki bileşenin x-ekseninde 0'ı kestiği noktanın farklı olması, bileşenlerin aynı noktada absorbans vermediğini fakat geniş absorbans pikleri olmasından dolayı girişim yaptığını göstermiştir. Eklenebilirlik Yasası'nın türev spektroskopisinde de geçerli olmasından dolayı DS – MAS (Derivative Spectroscopy – Modified Amplitude Subtraction, Türev Spektroskopisi – Modifiye Büyüklük Çıkarma) metodu kullanılırken de Metronidazol'ün bilinen derişimlerde verdiği türev spektrumundan elde edilen değerler Spiramisin'in türev spektrumu değerinden çıkartılarak hesap yapılmıştır.

3.1.2.2. Türev Spektroskopisi Doğrusallık Çalışması

Doğrusallık çalışması, Özgünlük parametresinde de olduğu gibi doğrudan tarama yapılan spektrumların 1. dereceden türevlerinin alınması ile elde edilmiştir. Elde edilen türevlerdeki maxima değerleri bileşenlerin ilgili analizlerinde hesaplamalarda kullanılmıştır. Buradan hareketle Spiramisin ve Metronidazol için elde edilen sonuçlar bu şekildedir;

Çizelge 3.10. Spiramisin ve Metronidazol'ün Türevi Alınan Spektrumlardaki Maxima Değerleri ve Çalışılan Konsantrasyonlar

Spiramisin'		
Oran	Konsantrasyon (ppm)	dA/dλ
10%	1	0.0810
50%	5	0.5770
75%	7.5	0.9070
100%	10	1.2140
150%	15	1.8110
175%	17.5	2.1660

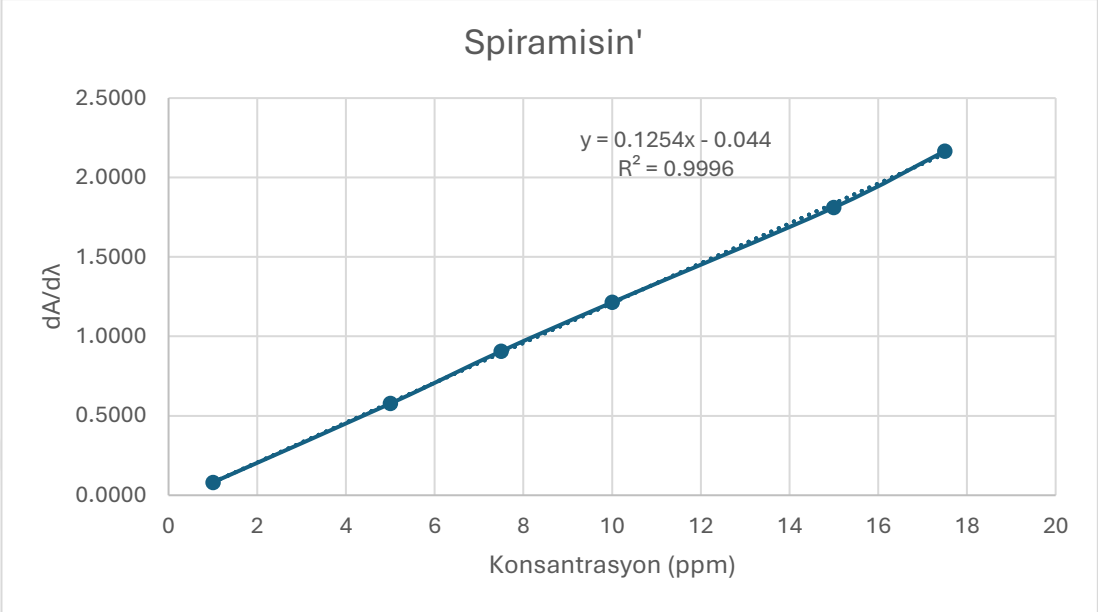
Metronidazol'		
Oran	Konsantrasyon (ppm)	dA/dλ
10%	1	0.1290
50%	5	0.6160
75%	8	0.9310
100%	10	1.2560
150%	15	1.8710
175%	18	2.2170

Spiramisin ve Metronidazol gösterildiği derişim düzeylerinde çalışılmıştır ve 1. dereceden türevi alınan Absorbans/Dalga Boyu spektrumlarının sonucunda elde edilen maxima değerleri bu şekildedir. Ayrıca 229nm'deki türevlerinden elde edilen maxima değerleri de Metronidazol için aynı konsantrasyon düzeylerinde incelenmiştir. Metronidazol'ün 229nm'deki absorbansı, maksimum absorbans yaptığı alan kadar büyük olmadığından, düşük derişimlerdeki çalışma, Doğruluk parametresinin de çalışıldığı en alt nokta hariç çıkartılmıştır ve bu sayede daha doğrusal bir eğri elde edilmiştir. Buna göre Metronidazol'ün 229nm'deki çalışılan konsantrasyonları ve elde edilen değerler aşağıdaki gibidir;

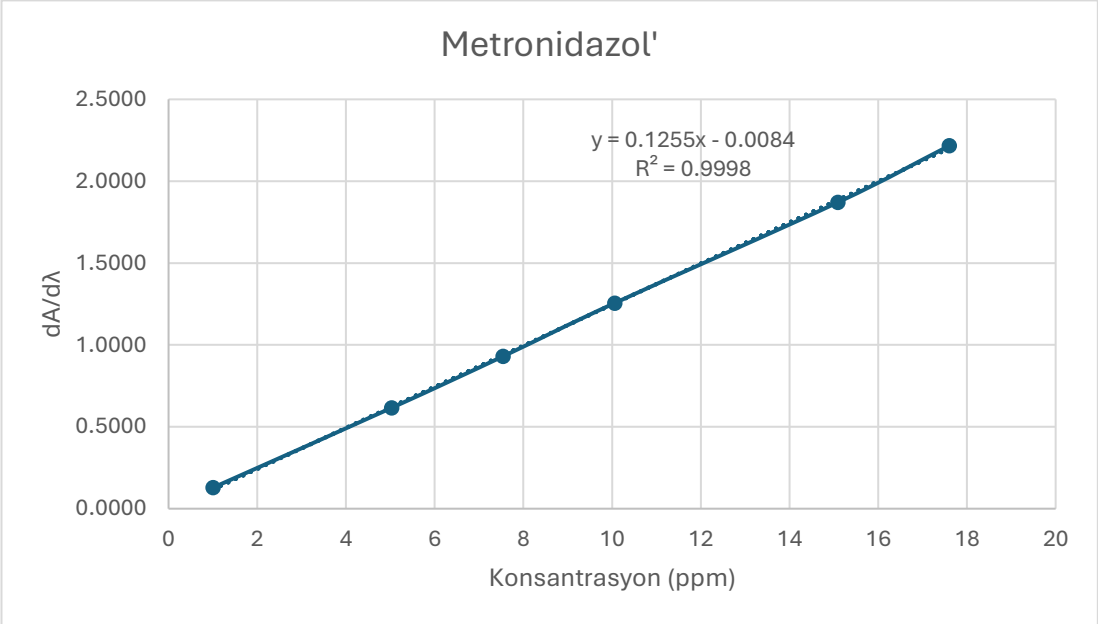
Çizelge 3.11. Metronidazol'ün 229nm'de Türevi Alınan Spektrumlardaki Maxima Değerleri ve Çalışılan Konsantrasyonlar

Metronidazol' (229nm)		
Oran	Konsantrasyon (ppm)	dA/dλ
10%	1	0.020
75%	8	0.125
100%	10	0.170
150%	15	0.255
175%	18	0.299

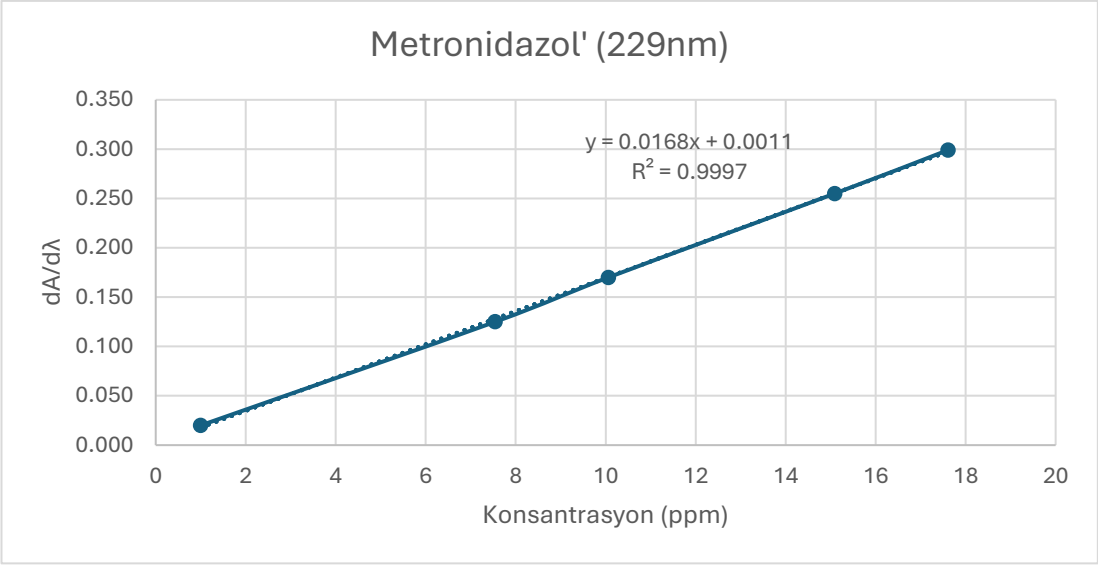
Elde edilen tüm değerlerle (dA/dλ)/Konsantrasyon grafiği oluşturulursa bu tablolar ortaya çıkmaktadır;



Şekil 3.15. Spiramisin'in Türevi Alınan Spektrumdaki Değerlerle Elde Edilen Kalibrasyon Eğrisi ve Doğrusallığı, y-ekseni dA/dλ, x-ekseni Konsantrasyon (1ppm, 5ppm, 7.5ppm, 10ppm, 15ppm, 17.5ppm)



Şekil 3.16. Metronidazol'ün Türevi Alınan Spektrumdaki Değerlerle Elde Edilen Kalibrasyon Eğrisi ve Doğrusallığı, y-ekseni dA/dλ, x-ekseni Konsantrasyon (1ppm, 5ppm, 7.5ppm, 10ppm, 15ppm, 17.5ppm)



Şekil 3.17. Metronidazol Türevi Alınan Spektrumda 229nm'deki Değerlerle Elde Edilen Kalibrasyon Eğrisi ve Doğrusallığı, y-ekseni dA/dλ, x-ekseni Konsantrasyon (1ppm, 7.5ppm, 10ppm, 15ppm, 17.5ppm)

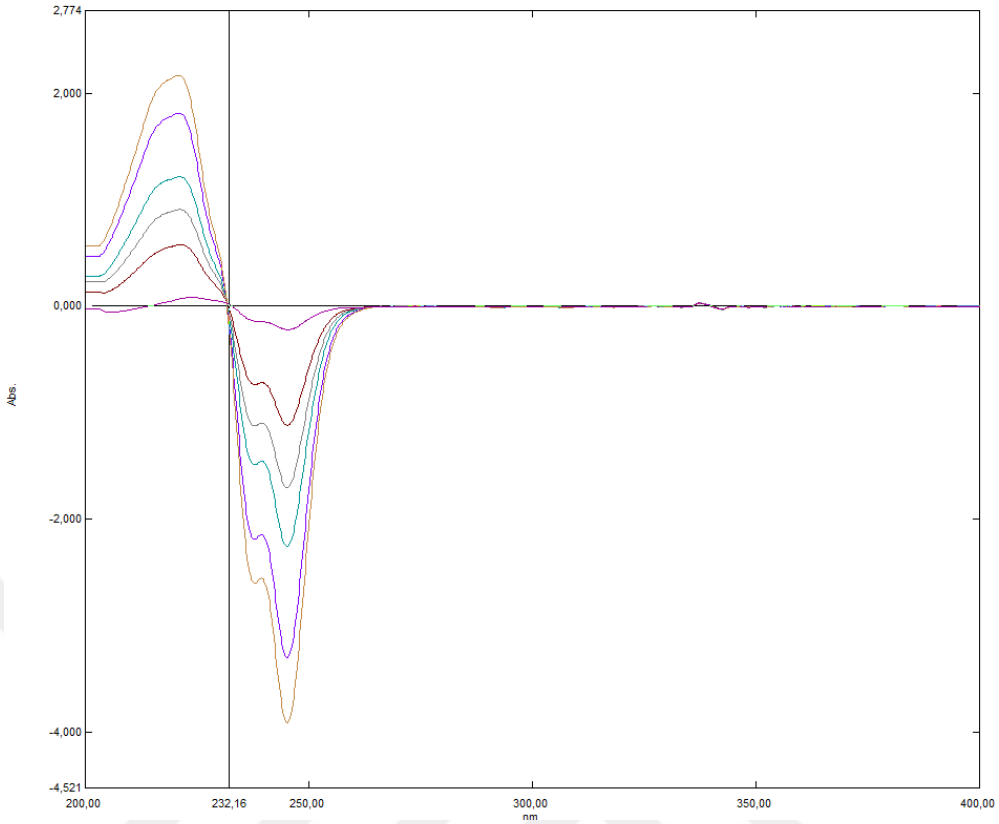
Bu grafiklerden elde edilen doğrunun regresyon analizi sonuçları ise her bir bileşen için bu şekildedir;

Çizelge 3.12. Morötesi – GB Türev Spektroskopisinde Doğrusallık Sonuçları

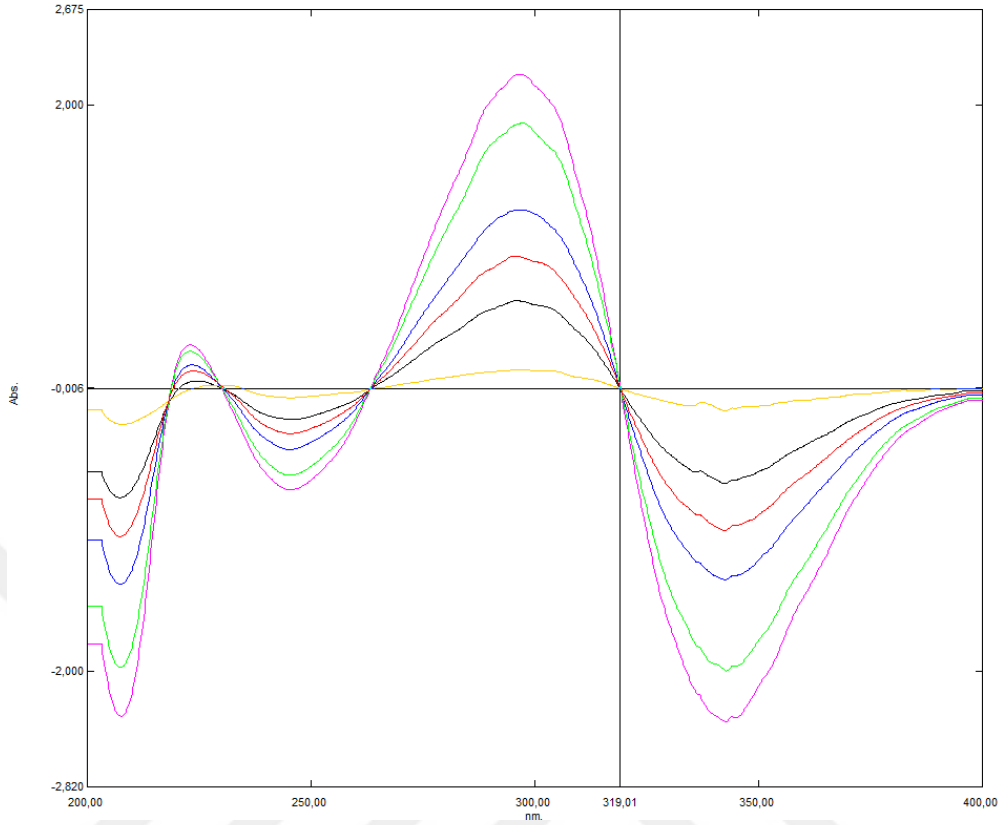
	Spiramisin'	Metronidazol' (319nm)	Metronidazol' (229nm)
R^2	0.9996	0.9998	0.9997
Korelasyon Katsayısı	0.9998	0.9999	0.9998
p-değeri	$4.8x10^{-8}$	$1.9x10^{-8}$	$2.7x10^{-6}$
Kesişim	-0.044	0.0084	0.0011

Yapılan çalışma Spiramisin ve Metronidazol'ün (319nm ve 229nm) çalışılan konsantrasyon aralığında doğrusal olduğunu göstermiştir. Doğrudan taramadan elde edilen verilerde olduğu gibi bu çalışmada da R^2 ve Korelasyon Katsayısı 0.999'dan büyük, p-değeri 0.05'ten küçük olarak bulunmuştur. Ayrıca kesişim (intercept) değerleri incelendiğinde kalibrasyon doğrularının orijini kestiği noktanın 0'a yakın olması da çalışmanın doğrusallığını kanıtlamıştır.

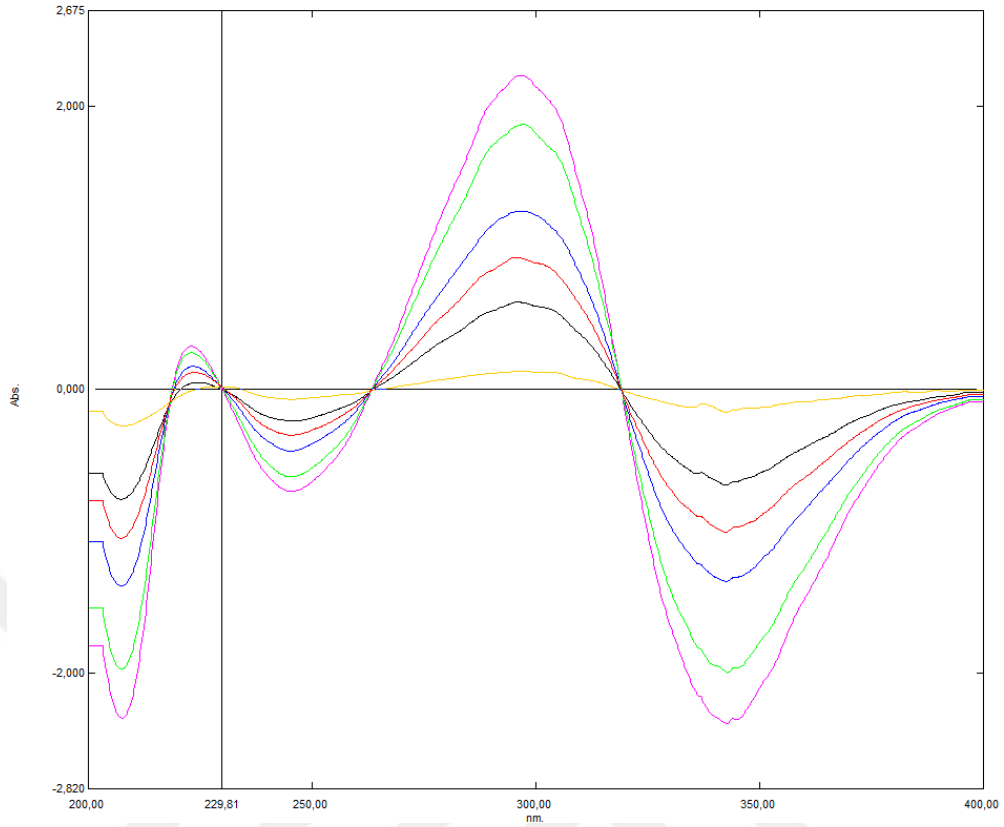
Doğrusallık hesaplamasında kullanılan spektrumların her bir düzeyde üst üste konmasıyla elde edilen grafiklerde de gösterildiği üzere Spiramisin ve Metronidazol absorbans yaptıkları noktalarda grafik üzerinde x-ekseninde 0 noktasından geçmektedir.



Şekil 3.18. Türevi Alınan Spektrumlarda Spiramisin için Elde Edilen Grafiklerin Overlay modundaki Görüntüsü, y-ekseni dA/dλ, x-ekseni dalga boyu (1ppm, 5ppm, 7.5ppm, 10ppm, 15ppm, 17.5ppm)



Şekil 3.19. Türevi Alınan Spektrumlarda Metronidazol için Elde Edilen Grafiklerin Overlay modundaki Görüntüsü, y-ekseni dA/dλ, x-ekseni dalga boyu (1ppm, 5ppm, 7.5ppm, 10ppm, 15ppm, 17.5ppm)



Şekil 3.20. Türevi Alınan Spektrumlarda Metronidazol için Elde Edilen Grafiklerin Overlay modundaki Görüntüsü ve 229nm'de 0'ı Kestiği Nokta, y-ekseni dA/dλ, x-ekseni dalga boyu (1ppm, 5ppm, 7.5ppm, 10ppm, 15ppm, 17.5ppm)

3.1.2.3. Türev Spektroskopisi Kesinlik Çalışması

Türev spektroskopisi kesinlik çalışması, 1. dereceden türevi alınan kesinlik çözeltilerinin doğrudan taramalarının spektrumları üzerinden hesaplanmıştır. Önceki çalışmada gösterildiği gibi Eklenebilirlik Yasası'ndan yararlanılarak Spiramisin'in maksimum absorbans yaptığı bölgedeki Metronidazol absorbansının maxima değeri Spiramisin'in maxima değerinden çıkarılmıştır ve standart ile arasındaki uyuma bakılmıştır.

Türevi alınan standart çözeltilerinin arasındaki uyum Spiramisin için %100.67 ve Metronidazol için %99.36 olarak hesaplanmıştır. Birincil standartların kendi içindeki %BSS'si ise Spiramisin ve Metronidazol için sırasıyla %0.39 ve %0.45 olarak bulunmuştur ve sistemin doğruluğunu göstermiştir. Buna göre sonuçlar bu şekildedir;

Çizelge 3.13. Morötesi – GB Türev Spektroskopisinde Spiramisin, Metronidazol ve F002A'nın Kesinlik Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Spiramisin' Kesinlik Çalışması					
Test	Tartım (mg)	Hesaplanan Değer (mg)	% Miktar Tayini	% Ortalama	%BSS
1	9.64	9.63	99.87	100.52	1.45
2	10.03	9.92	98.94		
3	10.00	10.04	100.36		
4	10.04	10.27	102.25		
5	10.04	10.27	102.33		
6	10.02	9.95	99.35		
Metronidazol' Kesinlik Çalışması					
Test	Tartım (mg)	Hesaplanan Değer (mg)	% Miktar Tayini	% Ortalama	%BSS
1	10.03	9.87	98.39	100.05	1.01
2	10.11	10.21	100.98		
3	9.98	10.04	100.63		
4	10.09	10.15	100.63		
5	10.03	10.07	100.44		
6	10.00	9.92	99.24		
F002A Spiramisin' Kesinlik Çalışması					
Test	Tartım (mg/mL)	Hesaplanan Değer (mg)	% Miktar Tayini	% Ortalama	%BSS
1	5.24	4.96	94.60	95.09	2.55
2		4.81	91.74		
3		4.88	93.17		
4		5.01	95.58		
5		5.11	97.53		
6		5.13	97.91		
F002A Metronidazol' Kesinlik Çalışması					
Test	Tartım (mg/mL)	Hesaplanan Değer (mg)	% Miktar Tayini	% Ortalama	%BSS
1	5.00	5.08	101.52	99.39	1.70
2		5.08	101.52		
3		4.90	97.95		
4		4.90	97.95		
5		4.95	98.98		
6		4.92	98.43		

Çalışmaya göre tüm test grupları verilen limitleri karşılamıştır ve %BSS 5.0'dan düşük, hesaplanan miktar tayinleri ise %95.0-105.0 aralığındadır. Hem doğrudan tarama modunda hem de türev ile çalışılan kesinlik parametresinin sonuçlarını karşılaştırmak için bir türev spektrofotometriye karşı doğrudan tarama modundan alınan sonuçlar birer grup olarak

alınırsa Spiramisin ve Spiramisin'in türevi arasındaki t-testinin değeri $4x10^{-6}$ olarak bulunur ve bu bulunan p değerinin 0.05'ten küçük olması bu iki grubun analizi arasında anlamlı bir fark olduğunu gösterir. Test, Metronidazol için yapıldığında ise değer 0.74 olarak bulunmuştur ve iki grup arasında bir fark bulunmamıştır. Aynı işlem F002A ürününde çalışılan Spiramisin-Spiramisin'in türevi ve Metronidazol-Metronidazol'ün türevi olarak incelendiğinde değerler sırasıyla; 0.07 ve 0.32 olarak bulunmuştur. Buna göre etkin madde üzerinden çalışılan Spiramisin dışındaki gruplarda anlamlı bir fark bulunmamıştır.

3.1.2.4. Türev Spektroskopisi Doğruluk Çalışması

Doğruluk çalışması, doğrudan taramadan elde edilen Doğruluk parametresindeki gibi, Eklenebilirlik Yasası'na uyarak, Doğrusallık çalışmasından elde edilen Metronidazol'ün 229nm'deki absorbansının Doğrusallık'taki kalibrasyon eğrisinden türetilen eğrinin denklemi ile her bir derişim için hesaplanıp Spiramisin'in toplam absorbansından çıkartılarak hesaplanmıştır. Hesaplamada ise Kesinlik parametresindeki standartların değeri kullanılmıştır. Öncelikle Metronidazol'ün türev spektrumundan 229nm'deki büyüklüğü elde edilmiş ve Spiramisin'in elde edilen değerlerinden çıkartılarak gerçek yüksekliği hesaplanmıştır.

Çizelge 3.14. Morötesi – GB Türev Spektroskopisinde Doğruluk Parametresi için Spiramisin'in Gerçek Değerinin Bulunması

	Spiramisin'in Gerçek Değeri			
Test	Metronidazol Kons. (ppm)	Büyüklük (dA/dλ) (Metronidazol'$_{229nm}$)	Toplam Büyüklük	Gerçek Büyüklük (Spiramisin')
%10 – 1	1.00	0.018	0.135	0.117
%10 – 2	1.01	0.018	0.135	0.117
%10 – 3	1.00	0.018	0.139	0.121
%100 – 1	10.09	0.171	1.442	1.271
%100 – 2	10.03	0.170	1.416	1.246
%100 – 3	10.00	0.169	1.436	1.267
%175 – 1	17.78	0.300	2.509	2.209
%175 – 2	17.54	0.296	2.521	2.225
%175 – 3	17.50	0.295	2.521	2.226

Buradan elde edilen değerlerle doğruluk hesaplanırsa, Spiramisin ve Metronidazol için aşağıdaki gibi bir tablo elde edilir;

Çizelge 3.15. Morötesi – GB Türev Spektroskopisinde Doğruluk Parametresinin Spiramisin ve Metronidazol için Değerlendirilmesi

Test	Büyüklük (dA/dλ)	Spiramisin (mg)	% Miktar Tayini	Hesaplanan Değer (mg)	Ortalama (%)	%BSS
%10 - 1	0.024	9.70	95.19	9.23		
%10 - 2	0.023	9.72	94.89	9.22	95.99	1.73
%10 - 3	0.024	9.76	97.91	9.56		
%100 - 1	0.303	10.04	99.89	10.03		
%100 - 2	0.301	10.04	97.93	9.83	99.19	1.10
%100 - 3	0.295	10.02	99.74	9.99		
%175 - 1	0.537	10.15	98.11	9.96		
%175 - 2	0.553	10.01	100.21	10.03	99.42	1.15
%175 - 3	0.554	10.04	99.94	10.03		
Test	Büyüklük (dA/dλ)	Metronidazol (mg)	% Miktar Tayini	Hesaplanan Değer (mg)	Ortalama (%)	%BSS
%10 - 1	0.054	10.03	100.52	10.08		
%10 - 2	0.053	10.11	100.51	10.16	101.48	1.65
%10 - 3	0.056	9.98	103.41	10.32		
%100 - 1	0.535	10.09	98.82	9.97		
%100 - 2	0.545	10.03	101.39	10.17	99.82	1.38
%100 - 3	0.528	10.00	99.24	9.92		
%175 - 1	0.946	10.16	99.75	10.13		
%175 - 2	0.946	10.02	101.14	10.13	100.57	0.72
%175 - 3	0.946	10.00	100.80	10.08		

Ortaya çıkan sonuçlara göre metot, düşük derişimler de dahil olmak üzere %5.0'ın oldukça altında %BSS değerine sahip olup her bir düzeyde %95.0-105.0 aralığındadır. Çalışılan derişim düzeylerinde her bir test de kendi içinde %95.0-105.0 limitini karşılamaktadır ve bütün veriler toplandığında metodun doğruluğu bu parametre ile kanıtlanmıştır.

3.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Metodu (YPSK – HPLC)

Yüksek Performanslı Sıvı kromatografisi metodu Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C18 kolonla Agilent 1290 Infinity II Series cihazda çalışılmıştır. Kolon 4.6 x 150mm 3.5µm Rapid Resolution özelliklerine sahip bir kolondur ve 0.95 mL/dk akış hızında 60°C'de çalışılmıştır.

Mobil faz, daha iyi bir ayrım için gradyan olarak belirlenmiştir. Gradyanda kullanılan hareketli fazlar Mobil Faz A ve Mobil Faz B olarak adlandırılmıştır. Kullanılan hareketli fazlardan Mobil Faz B, %100 asetonitril olarak kullanılmıştır. Mobil Faz A ise 2.72g potasyum dihidrojen fosfatın 1 litre ultra saf suda çözündükten sonra fosforik asit ile pH'ının 2.8'e ayarlanması ile elde edilen fosfat tamponunun asetonitril ile 85:15 (h/h) oranındaki karışımı olarak hazırlanmıştır.

Çözeltiler hazırlanırken seyreltme çözeltisi olarak ultra saf su ve metanolün 70:30 (h/h) oranında karışımı kullanılmıştır.

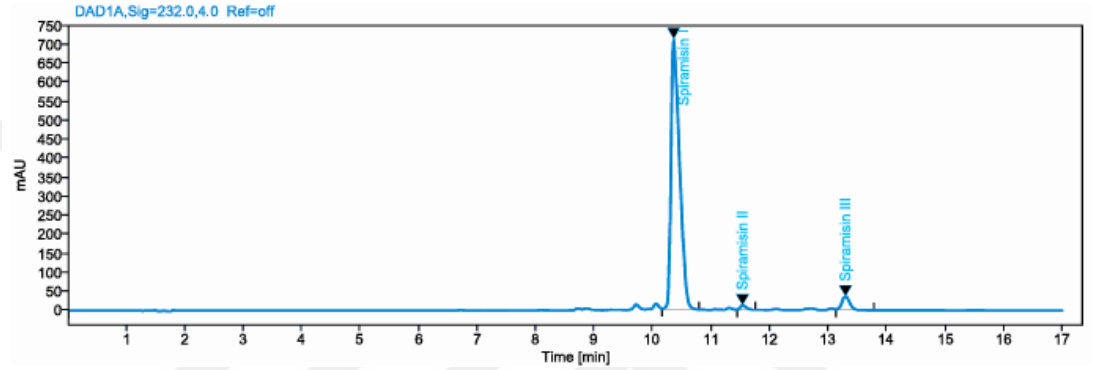
Çizelge 3.16. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisinde Çalışılan Kromatografik Şartlar

Kromatografik Şartlar		
Akış Hızı:	0.95mL/dk	
Kolon Sıcaklığı:	60°C	
Enjeksiyon Hacmi:	5µL	
Dalga Boyu:	232nm	
Gradyan:		
t (dk)	Mobil Faz A (%)	Mobil Faz B (%)
0	100	0
3	100	0
6	92	8
9	85	15
9.25	80	20
15	85	15
17	92	8

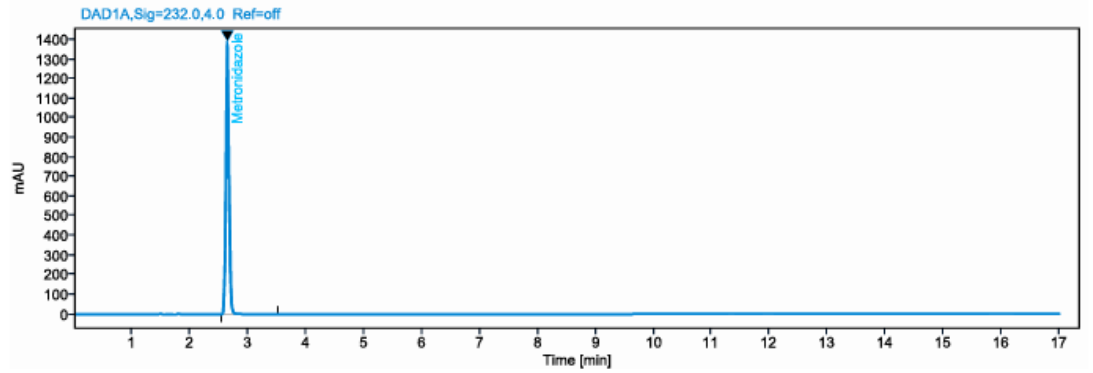
Spiramisin, üç ana bileşenden oluşmaktadır; Spiramisin I, Spiramisin II ve Spiramisin III. Spiramisin I, bu karışımın %80'den fazlasını oluşturmaktadır. İkinci en yüksek orandaki bileşen Spiramisin III, karışımda %10'dan daha az ve Spiramisin II, karışımda %5'ten daha az bulunur. Spiramisin II ve Spiramisin III piklerinin Spiramisin I ve Metronidazol pikinden çok daha küçük olmasından dolayı parametreler, Spiramisin'in tüm bileşenlerinin toplamı alınarak hesaplanmıştır.

3.2.1. YPSK – Özgünlük Çalışması

Spiramisin ve Metronidazol'ün özgünlüğü, hem kullanılan etkin maddelerin Morötesi – GB metodundaki spektrum taramalarında verdiği maksimum absorbans yaptıkları dalga boylarının gösterilmesiyle, hem de YPSK'da hazırlanan standart çözeltilerinin pik saflıklarının ölçülmesi ile gösterilmiştir. Ayrıca Spiramisin, Avrupa Farmakopesi'nden (EP – Ph. Eur.) temin edilen ve standart ile aynı derişimde hazırlanarak, geliştirilen metotla enjeksiyon verilmiş ve karşılaştırma yapılmıştır. CRS (Certified Reference Standard) ve kullanılan sekonder standardın karşılaştırılması ile de Spiramisin'in özgünlüğü ayrıca kanıtlanmıştır.

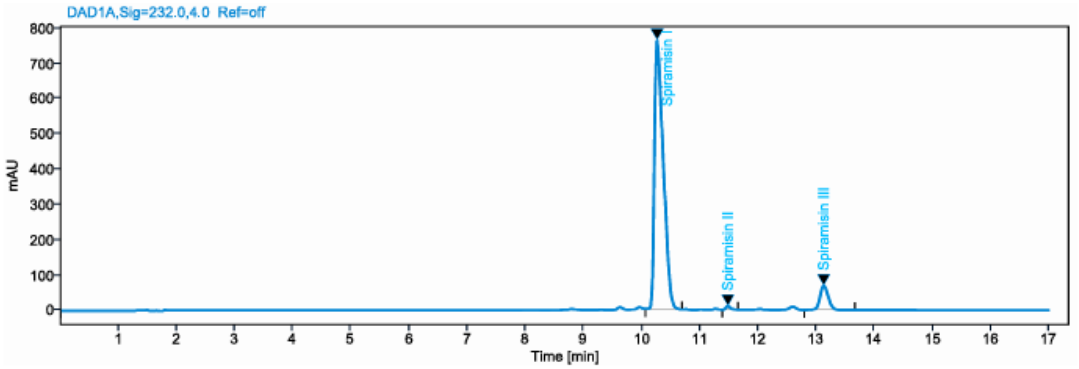


Şekil 3.21. Spiramisin'in kromatogramı, y-ekseni sinyal, x-ekseni dakika



Şekil 3.22. Metronidazol'ün kromatogramı, y-ekseni sinyal, x-ekseni dakika

Aynı koşullarda test edilen ve 1000ppm olarak hazırlanan Spiramisin CRS ise bu şekildedir;



Şekil 3.23. Spiramisin CRS'in kromatogramı, y-ekseni sinyal, x-ekseni dakika

Belirlenen metot parametreleriyle yapılan analize göre Metronidazol ve Spiramisin I'in alıkonma süreleri sırasıyla 2.6 ve 10.3 olarak belirlenmiştir. Spiramisin II ve Spiramisin III'ün Spiramisin I'e göre bağıl alıkonma süreleri (RRT, Relative Retention Time) ise sırasıyla 1.12 ve 1,28 olarak belirlenmiştir.

Ayrıca Özgünlük parametresi içinde Sistem Uygunluk parametresi, Kuyruklanma Faktörü, Teorik Plaka Sayısı ve standardın kendi içindeki %BSS'si olarak değerlendirilmiştir. Her bir bileşen sisteme verilen ardışık 6 enjeksiyon üzerinden hesaplanmıştır.

Çizelge 3.17. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisinde Sistem Uygunluk Parametreleri (%BSS)

%BSS				
Metronidazol	Toplam Spiramisin	Spiramisin I	Spiramisin II	Spiramisin III
0.07%	0.18%	0.19%	0.95%	0.24%

Çizelge 3.18. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisinde Sistem Uygunluk Parametreleri Kuyruklanma Faktörü)

	Kuyruklanma Faktörü			
	Metronidazol	Spiramisin I	Spiramisin II	Spiramisin III
	1.1	1.8	1.3	1.0
	1.1	1.7	1.4	1.1
	1.1	1.7	1.4	1.1
	1.1	1.7	1.4	1.0
	1.1	1.7	1.4	1.0
	1.2	1.7	1.4	1.1
Ortalama	1.1	1.7	1.4	1.1

Çizelge 3.19. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisinde Sistem Uygunluk Parametreleri Teorik Plaka Sayısı)

	Teorik Plaka Sayısı			
	Metronidazol	Spiramisin I	Spiramisin II	Spiramisin III
	10313.6	22659.1	68337.2	46074.2
	10302.2	22590.4	66112.1	45910.6
	10310.5	22652.4	66436.2	45861.9
	10302.4	22822.7	66666.3	45635.1
	10300.8	22711.7	66394.2	45582.5
	10199.9	22529.8	67047.7	45377.8
Ortalama	10288.2	22661.0	66832.3	45740.4

İncelenen parametrelerden Kuyruklanma Faktörünün 2.0'dan küçük olması, Teorik Plaka Sayısının 2000'den büyük olması ve %BSS'nin 2.0'dan küçük olması beklenmiştir. Verilen ardışık 6 enjeksiyondan toplanan verilerin ortalaması ise bu limitleri karşılamıştır ve sistem uygun kabul edilmiştir.

3.2.2. YPSK – Doğrusallık Çalışması

Doğrusallık, geliştirilen metotla her iki etkin madde için ayrı ayrı 7 noktada çalışılmıştır.

Çizelge 3.20. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisinde Doğrusallık Parametresinde Çalışılan Konsantrasyonlar

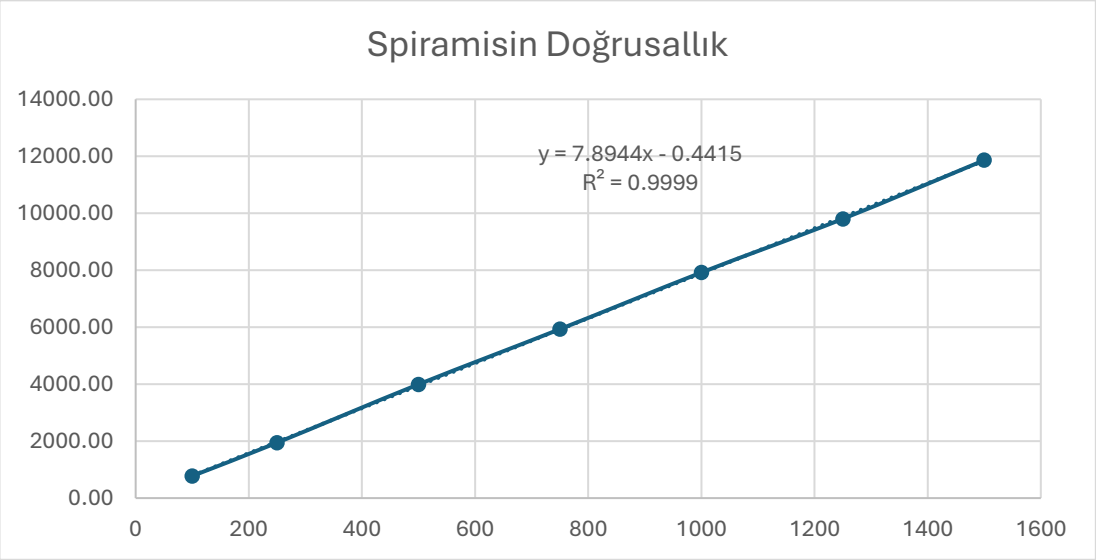
Oran (%)	Derişim
10%	100ppm (µg/mL)
25%	250ppm (µg/mL)
50%	500ppm (µg/mL)
75%	750ppm (µg/mL)
100%	1000ppm (µg/mL)
125%	1250ppm (µg/mL)
150%	1500ppm (µg/mL)

Çalışılan bu derişimlerden elde edilen veriler, Metronidazol için aşağıdaki gibidir;

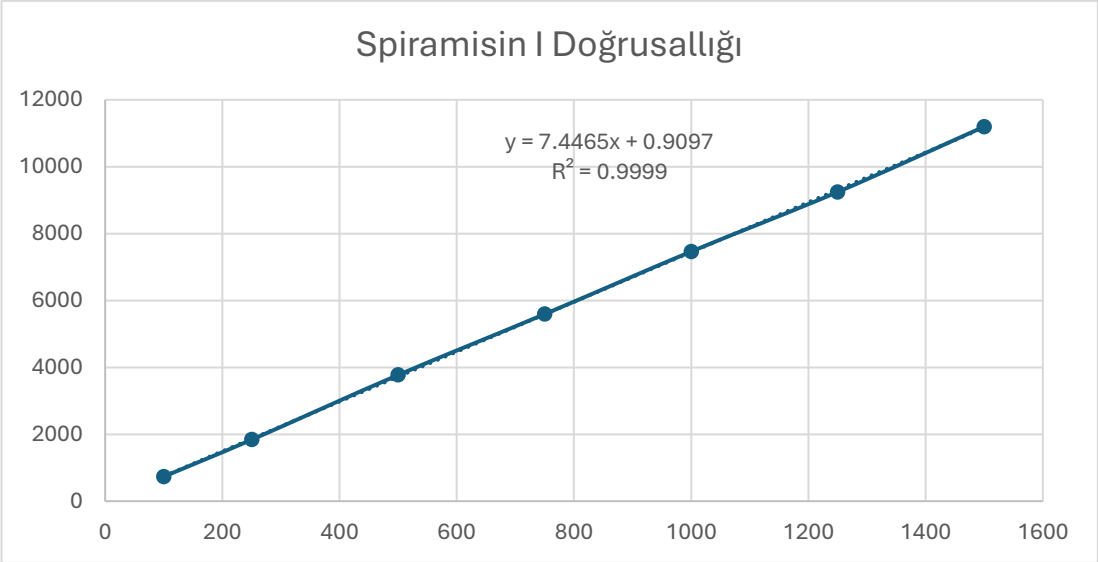
Çizelge 3.20. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisinde Doğrusallık Çalışmasının Sonuçları

	Toplam Spiramisin	Spiramisin I	Spiramisin II	Spiramisin III	Metronidazol
R^2	0.9999	0.9999	0.9992	0.9993	1.0000
Korelasyon Katsayısı	1.0000	0.9999	1.0000	1.0000	1.0000
p-Değeri	$2.2x10^{-11}$	$2.9x10^{-11}$	$6.4x10^{-9}$	$4.5x10^{-9}$	$2.6x10^{-12}$
Kesişim	-0.4415	0.9097	-1.8853	0.534	16.895

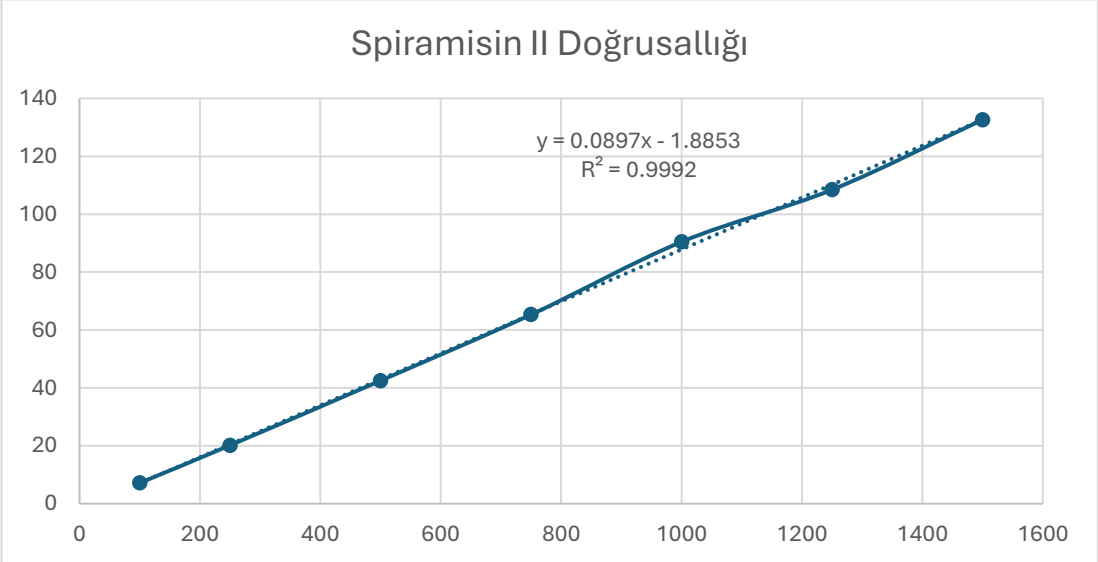
Sonuçlar tüm limitleri karşılamaktadır ve Spiramisin'in her bir bileşenin de kendi içinde doğrusal olduğu kanıtlanmıştır. Elde edilen verilerle oluşturulan ve regresyon analizi yapılan grafikler ise aşağıdaki gibidir;



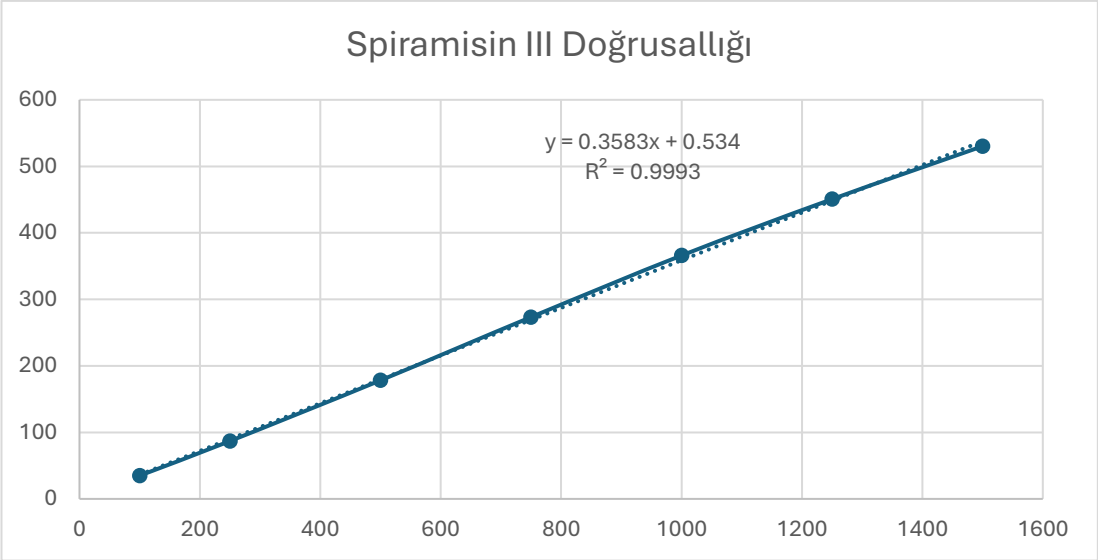
Şekil 3.24. YPSK'da Spiramisin Piklerinin Toplamının Doğrusallığı, y-ekseni Pik Alanı, x-ekseni Konsantrasyon (ppm) (100ppm, 250ppm, 500ppm, 750ppm, 1000ppm, 1500ppm ve 1750ppm noktaları)



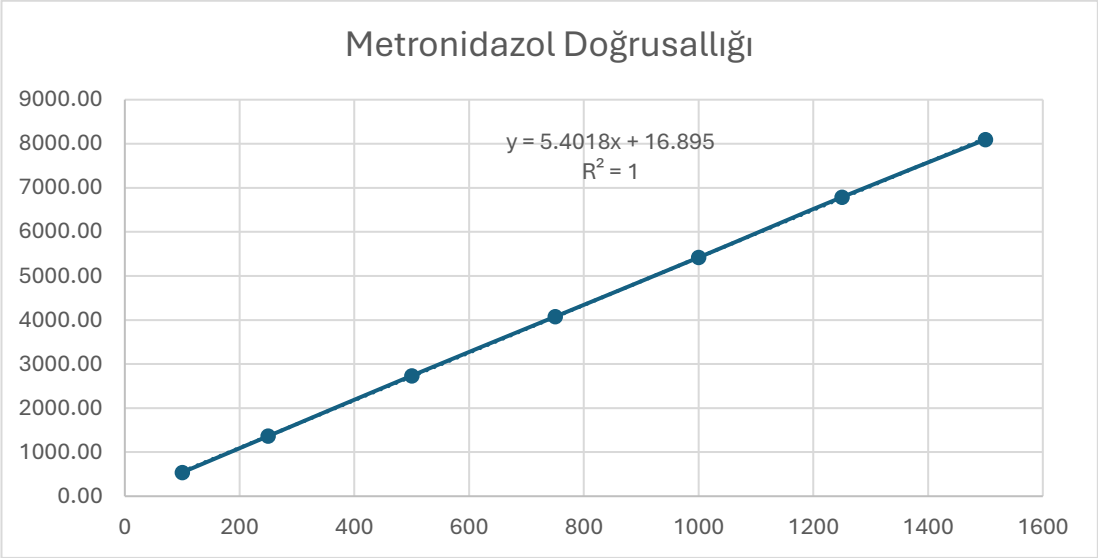
Şekil 3.25. YPSK'da Spiramisin I Piklerinin Doğrusallığı, y-ekseni Pik Alanı, x-ekseni Konsantrasyon (ppm) (100ppm, 250ppm, 500ppm, 750ppm, 1000ppm, 1500ppm ve 1750ppm noktaları)



Şekil 3.26. YPSK'da Spiramisin II Piklerinin Doğrusallığı, y-ekseni Pik Alanı, x-ekseni Konsantrasyon (ppm) (100ppm, 250ppm, 500ppm, 750ppm, 1000ppm, 1500ppm ve 1750ppm noktaları)



Şekil 3.27. YPSK'da Spiramisin III Piklerinin Doğrusallığı, y-ekseni Pik Alanı, x-ekseni Konsantrasyon (ppm) (100ppm, 250ppm, 500ppm, 750ppm, 1000ppm, 1500ppm ve 1750ppm noktaları)



Şekil 3.28. YPSK'da Metronidazol Piklerinin Doğrusallığı, y-ekseni Pik Alanı, x-ekseni Konsantrasyon (ppm) (100ppm, 250ppm, 500ppm, 750ppm, 1000ppm, 1500ppm ve 1750ppm noktaları)

Doğrusallık çalışmasına göre; hem Spiramisin üç bileşenin toplamı olarak, hem de her bir bileşenin kendi içindeki Alan/Konsantrasyon oranı olarak değerlendirilmiş ve bu dört incelemede de doğrusal bulunmuştur. Spiramisin II ve Spiramisin III'ün alanlarının Spiramisin I'e göre çok küçük olmasından dolayı ise R^2 değerleri daha düşük bulunmuştur. Metronidazol de ayrıca değerlendirilmiş ve metoda göre doğrusal olduğu kanıtlanmıştır.

3.2.3. YPSK – Kesinlik Çalışması

Kesinlik çalışması Özgünlük parametresinde incelenen standardın 6 enjeksiyonu üzerinden hesaplanmış ve ikincil bir standarda karşı (aynı derişimde) uyumu incelenmiştir. Daha sonra hem etkin maddelerin %100'lük derişimdeki karışımı hazırlanmış, hem de üretilen formülasyonlar belirlenen metottaki konsantrasyona denk gelecek şekilde çözelti haline getirilerek sisteme verilmiştir. Daha önce sistem uygunluğuna bakılan standartların ise ikincil standartlarına karşı uyumu Spiramisin ve Metronidazol için sırasıyla %100.1 ve %98.6 olarak hesaplanmıştır. Uyum için limit ise %98.0 - %102.0 olarak belirlenmiştir ve bu limit karşılanmıştır.

Spiramisin hesaplanırken miktar tayini üç bileşenin toplamı üzerinden değerlendirilmiştir. Bu yüzden standart uyumu hesaplanırken üç bileşenin iki farklı standarttaki toplamları incelenmiştir. Fakat doğrusallığı gösterilen bu üç bileşenin ayrı ayrı da uyumlu olduğunu göstermek için bir hesaplama yapıldığında Spiramisin I, Spiramisin II ve Spiramisin III'ün iki standarttaki karşılıklı uyumu sırasıyla %100.1, %100.1 ve %100.2 olarak bulunmuştur. Yani sistem her bir bileşen için de kendi içinde uyumludur. Fakat çok küçük alanlar üzerinden yapılan değerlendirmeler çok daha hassas olduğundan, bu alanlar toplanarak değerlendirilmiştir. Buna göre yapılan hesaplamalardan çıkan sonuçlar hem Spiramisin hem de Metronidazol için aşağıdaki gibidir;

Çizelge 3.21. YPSK'da Spiramisin ve Metronidazol için Çalışılan Kesinlik Parametresi Sonuçları

Spiramisin Kesinlik Çalışması					
Test	Alan	Konsantrasyon (ppm)	%Miktar Tayini	Ortalama (%)	%BSS
1	7713.81	1014.0	98.9	99.0	0.6
2	7759.90	1011.0	99.8		
3	7608.30	1005.0	98.4		
4	7615.99	1002.0	98.8		
5	7653.67	1010.0	98.5		
6	7714.30	1005.0	99.8		
Metronidazol Kesinlik Çalışması					
Test	Alan	Konsantrasyon (ppm)	%Miktar Tayini	Ortalama (%)	%BSS
1	5396.81	1000.0	100.6	100.5	0.5
2	5445.13	1016.0	99.9		
3	5384.68	1002.0	100.1		
4	5388.48	1001.0	100.3		
5	5437.70	1005.0	100.8		
6	5460.50	1005.0	101.2		

Yapılan çalışmada, %BSS'nin 2.0'dan küçük olması ve hesaplanan değerin %98.0 – 102.0 aralığında olması beklendi. Elde edilen verilerle hesaplanan değerlerle limitler karşılanmıştır ve metodun kesinliği kanıtlanmıştır.

Geliştirilen metot, önerilen formülasyonlar F001A, F001B, F002A ve F002B için uygulandığında ise sonuçlar aşağıdaki gibidir;

Çizelge 3.22. YPSK'da Kesinlik Parametresinin F001A Formülasyonundaki Sonuçları

F001A Spiramisin Kesinlik Çalışması						
Test	Tartım (mg/mL)	Alan	Hesaplanan Değer (mg)	% Miktar Tayini	Ortalama (%)	%BSS
1	5.24	8049.97	5.23	99.83	98.55	0.87
2		7908.99	5.14	98.08		
3		7871.24	5.12	97.61		
4		8004.66	5.20	99.26		
5		7895.21	5.13	97.91		
6		7950.46	5.17	98.59		
F001A Metronidazol Kesinlik Çalışması						
Test	Tartım (mg/mL)	Alan	Hesaplanan Değer (mg)	% Miktar Tayini	Ortalama (%)	%BSS
1	5.00	5413.32	5.04	100.86	99.62	0.86
2		5323.09	4.96	99.18		
3		5297.33	4.94	98.70		
4		5384.22	5.02	100.32		
5		5306.67	4.94	98.87		
6		5355.71	4.99	99.79		

Çizelge 3.22. YPSK'da Kesinlik Parametresinin F001B Formülasyonundaki Sonuçları

F001B Spiramisin Kesinlik Çalışması						
Test	Tartım (mg/mL)	Alan	Hesaplanan Değer (mg)	% Miktar Tayini	Ortalama (%)	%BSS
1	5.24	8254.49	5.36	102.36	101.39	0.52
2		8132.22	5.28	100.85		
3		8173.91	5.31	101.36		
4		8161.70	5.30	101.21		
5		8147.51	5.29	101.04		
6		8186.25	5.32	101.52		
F001B Metronidazol Kesinlik Çalışması						
Test	Tartım (mg/mL)	Alan	Hesaplanan Değer (mg)	% Miktar Tayini	Ortalama (%)	%BSS
1	5.07	5545.18	5.17	101.91	101.59	0.35
2		5496.01	5.12	101.00		
3		5544.63	5.17	101.90		
4		5527.03	5.15	101.57		
5		5514.75	5.14	101.35		
6		5539.46	5.16	101.80		

Çizelge 3.23. YPSK'da Kesinlik Parametresinin F002A Formülasyonundaki Sonuçları

F002A Spiramisin Kesinlik Çalışması						
Test	Tartım (mg/mL)	Alan	Hesaplanan Değer (mg)	% Miktar Tayini	Ortalama (%)	%BSS
1	4.71	7191.18	4.67	99.33	99.41	0.42
2		7237.92	4.70	99.97		
3		7153.13	4.65	98.80		
4		7217.38	4.69	99.69		
5		7204.15	4.68	99.51		
6		7177.62	4.66	99.14		
F002A Metronidazol Kesinlik Çalışması						
Test	Tartım (mg/mL)	Alan	Hesaplanan Değer (mg)	% Miktar Tayini	Ortalama (%)	%BSS
1	5.11	5577.410	5.20	101.73	101.50	0.45
2		5594.010	5.21	102.03		
3		5524.700	5.15	100.77		
4		5576.010	5.20	101.70		
5		5570.660	5.19	101.60		
6		5547.670	5.17	101.18		

Çizelge 3.24. YPSK'da Kesinlik Parametresinin F002B Formülasyonundaki Sonuçları

F002B Spiramisin Kesinlik Çalışması						
Test	Tartım (mg/mL)	Alan	Hesaplanan Değer (mg)	% Miktar Tayini	Ortalama (%)	%BSS
1	4.91	7512.85	4.88	99.51	98.84	0.71
2		7388.63	4.80	97.86		
3		7513.19	4.88	99.51		
4		7439.42	4.83	98.53		
5		7420.93	4.82	98.29		
6		7498.81	4.87	99.32		
F002B Metronidazol Kesinlik Çalışması						
Test	Tartım (mg/mL)	Alan	Hesaplanan Değer (mg)	% Miktar Tayini	Ortalama (%)	%BSS
1	4.96	5442.10	5.07	102.17	101.40	0.71
2		5346.77	4.98	100.38		
3		5423.96	5.05	101.83		
4		5388.40	5.02	101.16		
5		5369.51	5.00	100.81		
6		5434.00	5.06	102.02		

Valide edilen metot kalite kontrol amaçlı kullanımlara uygun olduğunun gösterilmesi amacıyla ve aynı zamanda önerilen formülasyonlarla üretilen ürünlerin tayin edilebilirliğinin kanıtlanması amacıyla, kesinlik parametresi ile tayin edilmiş ve sonuçların validasyon için de verilen tüm limitleri karşıladığı görülmüştür. Buna göre her 4 formülasyon da hem Spiramisin hem de Metronidazol için ayrı ayrı tayin edilmiş ve validasyonda kullanılan standartlara karşı hesaplanmıştır. Buradan elde edilen sonuçlar validasyon limitlerinde olduğu gibi %98.0-102.0 aralığında olup %BSS'si 2.0'ın altındadır. Spiramisin, validasyonda da belirtildiği gibi üç bileşenin toplamı üzerinden hesaplanmıştır.

Daha sonra tekrarlanabilirlik açısından uygun olduğunun kanıtlanması amacıyla kesinlik, günler arası olarak çalışılmış ve 6 test enjeksiyonu, ayrıca hazırlanmış standartlar üzerinden tekrar hesaplanmıştır. Sistem uygunluk, yeni hazırlanan testler üzerinden tekrardan incelenmiş ve limitlere uygun bulunmuştur. Tekrarlanabilirlik olarak çalışılan ara kesinlik parametresi ise birinci gün ve ikinci gün arasındaki farkın değerlendirilmesi amacıyla iki günden de toplanan 12 enjeksiyon üzerinden hesaplanmış hem ortalama hem de %BSS incelenmiştir. Buna göre sonuçlar aşağıdaki gibidir;

Çizelge 3.25. YPSK'da Spiramisin ve Metronidazol'ün Ara Kesinlik Sonuçları

Spiramisin Ara Kesinlik Çalışması					
Test	Alan	Konsantrasyon (ppm)	%Miktar Tayini	Ortalama (%)	%BSS
1	7713.81	1014.0	98.9	99.2	0.5
2	7759.90	1011.0	99.8		
3	7608.30	1005.0	98.4		
4	7615.99	1002.0	98.8		
5	7653.67	1010.0	98.5		
6	7714.30	1005.0	99.8		
7	7731.13	1010.0	99.1		
8	7762.62	1005.0	100.0		
9	7676.98	1004.0	98.9		
10	7732.94	1007.0	99.4		
11	7763.51	1007.0	99.8		
12	7731.99	1005.0	99.6		
Metronidazol Ara Kesinlik Çalışması					
Test	Alan	Konsantrasyon (ppm)	%Miktar Tayini	Ortalama (%)	%BSS
1	5396.81	1000.0	100.6	100.3	0.4
2	5445.13	1016.0	99.9		
3	5384.68	1002.0	100.1		
4	5388.48	1001.0	100.3		
5	5437.70	1005.0	100.8		
6	5460.50	1005.0	101.2		
7	5441.27	1009.0	99.9		
8	5445.29	1010.0	99.8		
9	5419.13	1003.0	100.0		
10	5446.78	1007.0	100.2		
11	5452.43	1005.0	100.5		
12	5452.75	1008.0	100.2		

3.2.4. YPSK – Doğruluk Çalışması

Doğruluk, Doğrusallık ve Aralık parametresinde belirlenen derişimlerden yola çıkarak %10, %100 ve %150'lik derişimlerde, 100ppm, 1000ppm ve 1500ppm olarak; her düzeyde 3'er test çözeltisi olacak şekilde hazırlanmıştır. Testler Kesinlik parametresinde kullanılan standartlar üzerinden hesaplanmıştır, bu yüzden Kesinlik'te verilen sistem uygunluk parametreleri Doğruluk çalışması için de gösterilmiştir. Spiramisin ise Kesinlik'te olduğu gibi Spiramisin I, Spiramisin II ve Spiramisin III'ün toplamı olarak hesaplanmıştır. Yapılan Doğruluk çalışmasında her iki bileşen de çalışılan her konsantrasyon düzeyinde tüm limitleri karşılamıştır ve hesaplanan içerik miktarlarıyla tartım arasındaki yakınlık geri elde yüzdesinin ne kadar yüksek olduğunu göstermiştir. Elde edilen verilerle Spiramisin ve Metronidazol hesaplandığında sonuçlar aşağıdaki gibidir;

Çizelge 3.26. YPSK'da Spiramisin ve Metronidazol'ün Doğruluk Parametresi Sonuçları

Spiramisin Doğruluk Çalışması						
Test	Alan	Spiramisin (mg)	% Miktar Tayini	Hesaplanan (mg)	Ortalama (%)	%BSS
%10 - 1	762.75	5.01	99.09	4.96		
%10 - 2	753.47	4.98	98.48	4.90	99.22	0.82
%10 - 3	768.85	5.00	100.08	5.00		
%100 - 1	7713.21	9.99	100.51	10.04		
%100 - 2	7741.16	10.03	100.47	10.08	100.10	0.67
%100 - 3	7714.00	10.11	99.32	10.04		
%150 - 1	11536.17	15.05	99.78	15.02		
%150 - 2	11651.22	15.17	99.98	15.17	99.96	0.17
%150 - 3	11544.63	15.01	100.12	15.03		
Metronidazol Doğruluk Çalışması						
Test	Alan	Metronidazol (mg)	% Miktar Tayini	Hesaplanan (mg)	Ortalama (%)	%BSS
%10 - 1	536.85	5.01	99.84	5.00		
%10 - 2	553.63	5.09	101.34	5.16	100.53	0.75
%10 - 3	544.25	5.05	100.41	5.07		
%100 - 1	5483.74	10.12	100.98	10.22		
%100 - 2	5450.43	10.07	100.86	10.16	100.60	0.56
%100 - 3	5374.42	10.02	99.95	10.02		
%150 - 1	8061.38	15.11	99.42	15.02		
%150 - 2	8026.64	15.01	99.65	14.96	99.53	0.12
%150 - 3	8103.05	15.17	99.54	15.10		

3.2.5. YPSK – Sağlamlık Çalışması

Sağlamlık parametresi, sistemin küçük değişimlere karşı dayanıklılığını göstermesi amacıyla hazırlanan %100'lük derişimde hazırlanan standart üzerinden kuyruklanma faktörü ve teorik plaka sayısı incelenerek değerlendirilmiştir. Küçük değişiklikler ise akış hızı, kolon sıcaklığı, dalga boyu ve hareketli faz A içindeki organik oranı üzerinden yapılmıştır.

Çizelge 3.26. YPSK'da Sağlamlık Parametresinde Çalışılan Koşullar

	Sağlamlık Çalışması			
	Kolon Sıcaklığı	Akış Hızı	Dalga Boyu	Organik Oranı
Koşul 1	60°C	0.95 mL/dk	232 nm	86:14 (Tampon:Asetonitril, h/h)
Koşul 2	60°C	0.95 mL/dk	232 nm	84:16 (Tampon:Asetonitril, h/h)
Koşul 3	60°C	0.95 mL/dk	231 nm	85:15 (Tampon:Asetonitril, h/h)
Koşul 4	60°C	0.95 mL/dk	233 nm	85:15 (Tampon:Asetonitril, h/h)
Koşul 5	60°C	0.94 mL/dk	232 nm	85:15 (Tampon:Asetonitril, h/h)
Koşul 6	60°C	0.96 mL/dk	232 nm	85:15 (Tampon:Asetonitril, h/h)
Koşul 7	59°C	0.95 mL/dk	232 nm	85:15 (Tampon:Asetonitril, h/h)
Koşul 8	61°C	0.95 mL/dk	232 nm	85:15 (Tampon:Asetonitril, h/h)

Bu çalışmada 60°C olan kolon sıcaklığı 59°C ve 61°C arasında incelnemiştir. 0.95mL/dk olan akış hızı 0.94mL/dk ve 0.96mL/dk olarak, 232nm olan dalga boyu 231 ve 233 nm olarak ve 85:15 (Tampon:Asetonitril, h/h) oranına sahip olan hareketli faz A 86:14 ve 84:16 (Tampon:Asetonitril, h/h) olarak incelenmiştir. Bu koşullardaki değerlendirmeler sonucunda kuyruklanma faktörü ve teorik plaka sayısına bakılmıştır.

Çizelge 3.27. YPSK'da Sağlamlık Parametresinde Spiramisin ve Metronidazol Sonuçları

	Sağlamlık Çalışması Sonuçları			
	Spiramisin		Metronidazol	
	Teorik Plaka Sayısı	Kuyruklanma Faktörü	Teorik Plaka Sayısı	Kuyruklanma Faktörü
Koşul 1	43173.6	1.5	10677.6	1.1
Koşul 2	19532.9	1.8	10162.3	1.1
Koşul 3	22608.6	1.8	10551.9	1.1
Koşul 4	22731.3	1.8	10529.0	1.1
Koşul 5	22611.6	1.8	10477.1	1.1
Koşul 6	24064.0	1.7	10699.7	1.1
Koşul 7	23756.1	1.7	10533.3	1.1
Koşul 8	23886.7	1.7	10679.7	1.0

Sağlamlıkta çalışılan her bir koşulda, Spiramisin en büyük pik olan Spiramisin I üzerinden değerlendirilmiştir. Buna göre küçük değişiklik uygulanan her 8 koşulda hem Spiramisin hem de Metronidazol için kuyruklanma faktörü ve teorik plaka sayısı limitleri karşılamıştır. Kuyruklanma faktörünün 2.0'dan küçük, teorik plaka sayısının ise 2000'den büyük olması beklenmiştir.

4. TARTIŞMA

Spiramisin ve Metronidazol kombinasyonları halinde veya tek tek, antibiyotik ve antifungal etkileri için sıklıkla kullanılmaktadır. Spiramisin'in türevlerinin ise anti-kanser etkileri günümüzde araştırılmaya devam edilmektedir. Ayrıca hayvancılıkta ve veteriner ilaçlarda da bu iki etkin maddenin kullanımı yaygın bir şekilde görülmektedir. Hayvanlarda ağız ve diş sağlığı da dahil olmak üzere geniş bir skalada etki gösteren Metronidazol ve doku penetrasyonu yüksek olan ve Metronidazol gibi etkili olan Spiramisin'in ortak kullanımı aynı anda hem aerobik hem de aneorobik bakterilerle savaşmakta güçlü birer seçenektirler. Hayvancılıkta görülen yaygın kullanım ise bu maddelerin tespitini zorunlu kılmakla beraber, bu tespit metotlarının kolay, hızlı ve ucuz olması gerekliliğini arttırmaktadır. Bu ilaçlar ile tedavi gören hayvanların daha sonra besin olarak tüketilmesi ve buradan insan vücuduna geçmesi antibiyotik rezistansı açısından kritik bir öneme sahiptir ve dolayısıyla bu maddelerin tayinini daha da önemli hale getirmektedir. Özellikle fazlaca safsızlığı veya türevi bulunan Spiramisin gibi bileşenlerin tayini, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi gibi ayrım gerektiren cihazlarda uygulanabilirliği, analiz sürelerinin bu maddeleri ayırabilmek için yeterli kalmaması açısından zorlaştırmaktadır. Yapılan bu çalışma ise bu sorunlar için bir çözüm sunmakta ve hem Yüksek Performanslı Sıvı kromatografisi için seçici, doğruluğu yüksek ve literatürdeki metotlara kıyasla göreceli olarak daha kısa bir analiz süresi vermekte, hem de bahsedilen ayrım problemini ortadan kaldırarak Türev Spektroskopisi'nde çok daha hızlı bir metot ortaya koymaktadır. Halihazırda YPSK'da analizi zor olan Spiramisin'in, Metronidazol ile kombinasyonu ise, analiz süresini kısaltmak için Morötesi – GB spektroskopisini tercih etmek isteyen analist için bir girişim problemi oluşturarak, analizi ve doğru sonuç almayı zorlaştırmaktadır. Tüm bu açılardan değerlendirildiğinde, geliştirilen bu iki metot, yaygın kullanıma sahip olan bu iki maddenin analizi için hem YPSK'da hem de Morötesi – GB Spektroskopisinde yüksek duyarlılıkta, kesinlikte ve doğrulukta analiz yapma olanağı sunmaktadır. Bu amaçlarla geliştirilen bu iki metot, ICH Q2(R2)'ye göre valide edilmiş ve doğrudan Morötesi – GB Spektroskopisine karşı üstünlüğüne özellikle değinilmiştir.

YPSK ve Morötesi – GB Spektroskopisi metotları haricinde çalışmada çözüm bulunmasına çalışılan başka bir problem de sıklıkla beraber kullanılan bu iki etkin maddenin ayrı ayrı sıvı (enjeksiyonluk veya infüzyonluk), kombine bir şekilde tablet formunda bulunduğu halde, enjeksiyonluk çözelti (injectible solution) formunda aynı anda bulunmamasıdır. İkisinin ortak bulunduğu bir enjeksiyonluk çözelti formülasyonu üretmek için öncelikle iki maddenin de ortak çözündüğü çözücüler incelendi. Yeterli çözünme sağlanması için N,N-Dimetilasetilamit ve %10'luk etanol çözeltisi çözücü olarak belirlendi.

Çözünmede problem yaşanmaması adına çözeltideki derişim 5mg/mL olarak çalışıldı. N,N-Dimetilasetilamit içeren formülasyon grubu F001 ve %10'luk etanol içeren formülasyon F002 olarak adlandırıldı. Daha sonra bu iki gruba koruyucu olarak %2 oranına denk gelecek şekilde Benzil Alkol eklendi ve bu koruyucu içeren gruba F001B ve F002B adı verildi. Çalışmada koruyucu içermeyen çözeltiler ise F001A ve F002A olarak adlandırıldı. Her bir formülasyon bozunmayı önlemek, havadan ve ışıktan korumak için kırmızı tıpalı amberli flakonlara kondu ve çalışma boyunca bu şekilde saklandı. F001 grubu, N,N-Dimetilasetilamidin morötesi bölgede, Spiramisin'in maksimum absorbans yaptığı noktada çok yüksek absorbans vermesinden ve analizi imkansızlaştırmasından dolayı çalışılamamış olsa da %10'luk etanolün çözücü olarak kullanıldığı F002A serisi başarılı şekilde analiz edilmiştir ve sonuçlar, limitleri karşılaşmıştır. Oluşturulan formülasyonların tamamı ise YPSK'da başarılı bir şekilde analiz edilmiştir ve önerilen formülasyonların piyasada kullanımı olasılığında, kalite kontrol analizlerinin mümkün olduğunu göstermiştir.

Türev Spektroskopisi metodu geliştirilirken doğrudan tarama yapılan analizlerdeki problemlere odaklanılmıştır ve girişim yapan iki molekülün doğru bir şekilde analiz edilmesi amaçlanmıştır. Birinci dereceden türevi alınan spektrumların doğası gereği piklerde küçülme gerçekleştiğinden metot üzerinde "Scaling Factor", 100 olarak belirlenmiştir ve bu sayede pikler analiz edilebilir bir seviyeye getirilmiştir. Ayrıca 1ppm'de çalışılan çözeltiler için uygun bir pik yüksekliği sağlanmıştır. Çözücü seçimi ise ürüne göre yapılmış ve %10'luk etanol, başka bir çözücüden gelmesi olası girişimi engellemiş, aynı zamanda üründen gelecek olan çözücünün spektrumunun da base-line olarak alınmasını sağlamıştır. Veriler UV-Probe 2.70 (Shimadzu) programında değerlendirilmiş ve doğrudan taraması yapılan Absorbans/Dalga Boyu grafiklerinin türevleri alınarak, yeni grafikler üzerinde y-eksenine ($dA/d\lambda$) denk gelen pik yükseklikleri (maxima), hesaplamaların yapılacağı yeni değerler olarak kabul edilmiştir.

YPSK-DAD metodu geliştirilirken iki molekülün analizi için sıklıkla kullanılan C-18 sabit fazı seçilmiştir. (Saleh vd., 2021; Tashtoush vd., 2008) Hareketli fazda kullanılan tamponun pH'sı ise hem kolonlar için güvenli bir noktada olması hem de iki bileşenin de iyonlaştığından ve mobil faz içinde dağıldığından emin olunması için 2.8 olarak seçilmiştir. Kolon sıcaklığı ise öncelikle daha düşük sıcaklıklarda yapılan denemelerde, özellikle Spiramisin'de görülen yayvan pikler nedeniyle 60°C olarak belirlenmiş ve hem kuyruklanma faktöründe hem de ayrımda uygun ve keskin bir pik şekli yakalanmıştır. Akış hızı ise Metronidazol'ün 1mL/dk'da yapılan denemelerde ölü zamana çok yakın çıkmasından dolayı 0.95mL/dk olarak belirlenmiş ve pikin güvenli bir noktaya gelmesi sağlanmıştır. Daha sonra Spiramisin'in türevlerinin ve impüritelerinin birbirinden ayrılması için gradyan geçiş için

birçok deneme yapılmıştır. Bu denemelerde 85:15 oranında pH 2.8 fosfat tamponu, asetonitril karışımından sisteme giren asetonitrilin yavaşça yükseltildiği bir gradyan uygun ayrımı sağlamıştır. Ayrıca organik fazın keskin bir şekilde yükseltilmesinin önüne geçilerek base-line'daki bozulmalara engel olunmuştur. Pik şekillerinin düzgün olması ve overloaded piklerden kaçınmak için enjeksiyon hacmi 5µL olarak çalışılmıştır.

Geliştirilen her iki metot da ICH Q2(R2)'deki önerilere uygun olarak valide edilmiştir. Özgünlük, Doğrusallık ve Aralık, Kesinlik ve geri elde olarak çalışılan Doğruluk limitler dahilinde tamamlanmıştır. YPSK-DAD metodunda ise ek olarak Sağlamlık parametresi de çalışılmıştır. Morötesi – GB spektroskopisi, 190-400nm aralığında tarama (scan) modunda çalışıldığından, bu metot için sağlamlığın değerlendirileceği bir parametre belirlenmemiştir.

Limit olarak; a) YPSK-DAD metodu için, i) özgünlük parametresinde sistem uygunluk için standartların ardışık 6 enjeksiyonda %BSS'nin 2.0'dan küçük olması, hazırlanan iki standardın birbirine karşı uyumun %98.0-102.0 aralığında olması, kuyruklanma faktörünün değerlendirilen her pik için 2.0'dan küçük olması, teorik plaka sayısının değerlendirilen her pik için 2000'den büyük olması, ve pik saflığının 0.98'den büyük olması ii) doğrusallıkta R^2 ve Korelasyon Katsayısının 0.999'dan büyük olması, x değişkenine göre p-değerinin 0.05'ten küçük olması, iii) kesinlik parametresinde ortalamanın %98.0-102.0 aralığında olması ve %BSS'nin 2.0'dan küçük olması, iv) geri elde olarak çalışılan doğruluk parametresinde çalışılan her konsantrasyon düzeyinde testlerin kendi içindeki %BSS'nin 2.0'dan küçük olması ve %98.0-102.0 aralığında olması, v) sağlamlık parametresinde çalışılan her bir koşulda analiz edilen standartların her biri için kuyruklanma faktörünün 2.0'dan küçük olması ve teorik plaka sayısının 2000'den yüksek olması, vi) ara kesinlik parametresinde tekrarlanabilirliği ölçmek için günler arası verilen tüm 12 çözeltinin %BSS'sinin %2.0'dan küçük olması ve ölçümlerin %98.0-102.0 aralığında olması; b) Morötesi – GB spektroskopisi ve türev spektroskopisi metotlarında i) özgünlük parametresinde sistem uygunluk için standartların ardışık 6 enjeksiyonda %BSS'nin 2.0'dan küçük olması, hazırlanan iki standardın birbirine karşı uyumun %95.0-105.0 aralığında olması, ii) doğrusallıkta R^2 ve Korelasyon Katsayısının 0.999'dan büyük olması, x değişkenine göre p-değerinin 0.05'ten küçük olması, iii) kesinlik parametresinde ortalamanın %95.0-105.0 aralığında olması ve %BSS'nin 5.0'dan küçük olması, iv) geri elde olarak çalışılan doğruluk parametresinde çalışılan her konsantrasyon düzeyinde testlerin kendi içindeki %BSS'nin 5.0'dan küçük olması ve %95.0-105.0 aralığında olması beklenmiştir.

Yapılan validasyonlarda YPSK-DAD metodu ve Türev Spektroskopisi metodu başarılı bir şekilde limitleri karşılarken doğrudan tarama modunda çalışılan Morötesi – GB metodu doğruluk parametresinde %10'luk düşük derişimde limitin çok altında sonuç alınmıştır. Türev Spektroskopisi – Modifiye Büyüklük Çıkarma (DS – MAS) metodu ile doğrudan tarama Morötesi – GB metotları karşılaştırıldığında her parametrede Türev Spektroskopisi'nin %BSS'nin daha düşük ve sonuçların gerçek değere daha yakın olduğu açıkça görülmektedir. Girişim yapan iki bileşenin ayrımı haricinde de Türev Spektroskopisi, doğrudan tarama moduna göre üstünlük göstermiş ve uygun bir şekilde analiz edilmiştir.

Hem halihazırda kombinasyonları bulunan iki farklı maddenin ortak kullanımı için yeni bir dozaj formu önerilmesi, hem Spiramisin ve Metronidazol'ün aynı anda daha kısa sürede YPSK'da tayin edilebilmesi, bu iki maddenin aynı anda bulunduğu sıvı formdaki çözeltilerde ve formülasyonlarda çok daha hızlı, kesin ve çözücülüğü yüksek bir şekilde analiz edilmesini sağlamak için Morötesi – GB Spektrofotometri'de DS – MAS yöntemiyle bir metodun geliştirilmesi amacıyla yapılan bu çalışma, başarılı bir şekilde tamamlanmış ve valide edilmiştir. Çalışmada önerilen formülasyonlar ve metotlarla, bu dozaj formlarında veya metoda uygun koşullarda ticari farmasötik ürünlerin de analiz edilebileceği gösterilmiştir.

Bu çalışma, daha önce de bahsedildiği üzere sıklıkla kullanılan bu iki etkin maddenin hem enjeksiyonluk sıvı dozaj formunda üretimi, hem YPSK-DAD ile tayini hem de Morötesi – GB Spektrofotometre ile tayini açısından önemli bir katkı sunmaktadır. Gerek YPSK'daki analiz süresi ile gerekse Türev Spektroskopisi'ndeki ayrım yeteneği sayesinde uygulanabilirlik açısından üstün özellikler göstermektedir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışma Spiramisin ve Metronidazol'ün ortak sıvı preparatlarının Türev Spektrofotometrideki analizini doğrudan tarama modunda yapılan Morötesi – GB metoduyla ve mümkün olabilecek en kısa şekilde geliştirilmeye çalışılan YPSK metodu ile karşılaştırmak için yapılmıştır. Her bir metodu ayrı ayrı incelediğimizde; doğrudan tarama yapılan Morötesi – GB analizinde düşük derişimlerde metodun düzgün çalışmadığı açıkça görülmektedir. Kullanımı hayvanlarda da yoğun bir şekilde görülen bu maddelerin atık sulara, tarım arazilerine veya yiyeceklere karıştığını düşündüğümüzde bu maddelerin düşük konsantrasyonlardaki analizinin önemi yüksektir. (Lofrano vd., 2018) Bu sebeple sıvı preparatlar üzerinden çalışılan bu metot göz önünde bulundurulduğunda, örneğin, atık sudan hazırlanan ve bu iki maddeyi içeren bir numune doğrudan tarama ile test edilmeye çalışılırsa uygun sonuçlar elde edilmesi zor olacaktır. Öte yandan Türev Spektroskopisi ile bu açıdan doğrudan tarama moduna göre üstünlük sağlamaktadır. Bu iki maddenin analitik olarak ayrılabilir olması ve test edilebilir olması bu metot ile mümkün olabilir ve daha düşük derişimlerde analiz gerçekleştirilebilir.

YPSK metodunu incelersek, kromatogramlarda görülen birçok impürite veya farklı formların varlığında dahi metot, yüksek kesinlik göstermektedir. Literatürdeki metotlar incelendiğinde, büyük çoğunluğu sadece Spiramisin veya sadece Metronidazol için olmakla beraber, yalnız Spiramisin'in analiz edildiği metotlar, geliştirilen metottan genellikle daha uzun sürmektedir. Bu durum hem enerji hem de kaynak harcanması açısından dezavantaj oluşturmaktadır. Kullanılan reaktiflerin çoğunun herhangi bir analitik laboratuvarında bulunan basit maddeler olması, analiz süresinin kısa olması ve kullanılan iki etkin maddeyi aynı anda analiz edebiliyor olması açısından oldukça avantajlıdır. Ayrıca kullanımı yaygın olan bu iki antibiyotiğin aynı anda analiz edilmesi kritik bir öneme sahiptir.

YPSK metodu, Türev Spektroskopisi metodu ile karşılaştırıldığında ise hem reaktif hem süre açısından Türev Spektroskopisi, halihazırda avantaj sağlamış olan YPSK metoduna karşı da güçlü yönler taşımaktadır. Metotta tuz veya asit gibi reaktifler bulunmamakla beraber, YPSK kolonu veya direkt YPSK gibi pahalı cihaz ve malzemeler gerektirmeden basit bir çift yönlü Morötesi – GB spektroskopisi, etanol ve su ile çok daha anlık analiz yapılabilmesini sağlamaktadır. Her iki metodun da ham verilerin işlenmesi sürecinden geçtiğini düşünürsek, Morötesi – GB spektrofotometrinin anlık gerçekleştirilmesi gereken bir analizde daha hızlı, daha ucuz ve YPSK ile aynı doğruluk ve hassasiyette analiz imkanı sunduğu açıktır.

Çalışılan metotlardan YPSK, 100ppm (µg/mL) ile 1500ppm (µg/mL) aralığında çalışılmıştır. Morötesi – GB spektrometride ise 1ppm (µg/mL) ile 17.5ppm (µg/mL) aralığında çalışılmıştır. Çalışmadaki asıl amaç Türev Spektroskopisi ile Spiramisin ve Metronidazol'ü aynı anda tayin etmek ve üretilen ürünleri kalite kontrol analizlerinde YPSK ile tayin edebilmenin yanı sıra bu iki etkin maddeyi daha düşük derişimlerde daha hızlı analiz edebilmek ve bu sayede piyasadaki ürünlerin analizinin haricinde bilinçli kullanım dışında alınabilecek dozları da tespit edebilmektir. Çalışma, şu an belirlenen konsantrasyonlarda bu ihtiyacı tam olarak karşılamasa da daha hassas bir yöntem ile, geliştirilmiş bu metotlar karşılaştırılabilir ve bu problemlerin çözümünün önünü açabilir. Bu çalışma, ayrıca, kullanılan antibiyotiklerin çeşitliliği ve yoğunluğu düşünüldüğünde atık su gibi kompleks matrisler içeren çözeltilerin içindeki girişim yapan türlerin ayrılması açısından da literatüre önemli bir katkı sağlayabilir.

KAYNAKLAR

(ICH) I. C. H. (2023, 2023) *Validation of Analytical Procedures Q2(R2)*, Retrieved 18.11.2025 from https://www.ich.org/page/quality-guidelines

Akash, M. S. H., & Rehman, K. (2019). Ultraviolet-visible (UV-VIS) spectroscopy. In *Essentials of pharmaceutical analysis* (pp. 29-56). Singapore: Springer Nature Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-96-5996-8

Alaboodi, A. S., Kadhim, S. A., & Hussein, A. S. (2025). Ultraviolet-Visible Spectroscopy, Importance, Principle, Structure and Most Important Applications: A Study Review. *Int. J. Nov. Res. Phys. Chem. Math*, *12*, 53-60. https://doi.org/10.5281/zenodo.14965556

Anderson, J., Berthod, A., Pino, V., & Stalcup, A. M. (2016). *Analytical separation science, 5 volume set* (Vol. 5). John Wiley & Sons.

Bacanlı, M.G. The two faces of antibiotics: an overview of the effects of antibiotic residues in foodstuffs. *Arch Toxicol 98, 1717–1725 (2024).* https://doi.org/10.1007/s00204-024-03760-z

Belanger, J. M., Paré, J. J., & Sigouin, M. (1997). High performance liquid chromatography (HPLC): principles and applications. In *Techniques and instrumentation in analytical chemistry* (Vol. 18, pp. 37-59). Elsevier. https://doi.org/10.1016/S0167-9244(97)80011-X

Bhattacharjee, P. K. (2023). Fundamental to electromagnetic waves. *International Journal of Trend in Scientific Research and Development*, *7*, 454-462.

Brogden, R.C. Heel, T. M. Speight & G. S. Avery (1978), Metronidazole in Anaerobik Infections: A Review of its Activity, Pharmacokinetics and Therapeutic Use, *Australasian Drug Information Services, Drugs 16: 387-417 (1978,)* https://doi.org/10.2165/00003495-197816050-00002

Chen, Z. (2024). Application of uv-vis spectroscopy in the detection and analysis of substances. In *3rd International Conference on Biotechnology, Life Science and Medical Engineering*.

De Briyne, J. Atkinson, L. Pokludova & S. P. Borriello Antibiotics used most commonly to treat animals in Europe (2014), *Veterinary Record 2014* https://doi.org/10.1136/vr.102462

Dixit, L., & Ram, S. (1985). Quantitative analysis by derivative electronic spectroscopy. *Applied Spectroscopy Reviews*, *21*(4), 311-418. https://doi.org/10.1080/05704928508060434

Elazab, S. T., Elshater, N. S., Hashem, Y. H., Al-Atfeehy, N. M., Lee, E.-B., Park, S.-C., & Hsu, W. H. (2021). Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Modeling of Spiramycin against *Mycoplasma synoviae* in Chickens. *Pathogens*, *10*(10), 1238. https://doi.org/10.3390/pathogens10101238

Epshtein, N. A. (2020). System suitability requirements for liquid chromatography methods: controlled parameters and their recommended values. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, *54*(5), 518-525. https://doi.org/10.1007/s11094-020-02231-w

Fekete, S., Beck, A., Veuthey, J. L., & Guillarme, D. (2014). Theory and practice of size exclusion chromatography for the analysis of protein aggregates. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, *101*, 161-173. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.04.011

Guiochon, G., Shirazi, D. G., & Felinger, A. (2006). *Fundamentals of preparative and nonlinear chromatography*. Academic Press.

Hardesty, J. H., & Attili, B. (2010). Spectrophotometry and the Beer-Lambert Law: An important analytical technique in chemistry. *Collin College, Department of Chemistry*, 1-6.

Horvath, C., & Melander, W. (1977). Liquid chromatography with hydrocarbonaceous bonded phases; theory and practice of reversed phase chromatography. *Journal of Chromatographic Science*, *15*(9), 393-404. https://doi.org/10.1093/chromsci/15.9.393

Jespersen, N. (2006). General principles of spectroscopy and spectroscopic analysis. *Comprehensive Analytical Chemistry*, *47*, 111-155. https://doi.org/10.1016/S0166-526X(06)47005-7

Jungbauer, A., & Hahn, R. (2009). Ion-exchange chromatography. *Methods in enzymology*, *463*, 349-371. https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63022-6

Karpinska, J. (2012). Basic principles and analytical application of derivative spectrophotometry. *Macro to nano spectroscopy, book edited by Jamal Uddin*, 253-256.

Kazakevich, Y. (2007). HPLC theory. *HPLC for pharmaceutical scientists*, 25-74. https://doi.org/10.1016/S0149-6395(07)80008-0

Khattab, N. K. Ramadan, M. A. Hegazy & N. S. Ghoniem (2010) Simultaneous determination of metronidazole and spiramycin in bulk powder and in tablets using different spectrophotometric techniques *Drug Test. Analysis 2010, 2, 37-44,* https://doi.org/10.1002/dta.83

Kus, S., Marczenko, Z., & Obarski, N. (1996). Derivative UV-VIS spectrophotometry in analytical chemistry. *Chem. Anal*, *41*(6), 889-927.

Larsson, D. G. Antibiotics in the environment (2014), *Upsala Journal of Medical Sciences. 2014; 119: 108-112,* https://doi.org/10.3109/03009734.2014.896438

Lofrano, G., Libralato, G., Casaburi, A., Siciliano, A., Iannece, P., Guida, M., ... & Carotenuto, M. (2018). Municipal wastewater spiramycin removal by conventional treatments and

heterogeneous photocatalysis. *Science of the total environment*, *624*, 461-469. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.12.145

Löfmark, C. Edlund & C. E. Nord (2014) Metronidazole Is Still the Drug of Choice for Treatment of Anaerobic Infections, *Department of Laboratory Medicine, Division of Clinical Microbiology, Karolinska University Hospital, Stochholm, Sweden, CID 2010:50 (Suppl 1),* https://doi.org/10.1086/647939

Maher, H. M. & Youssef, R. M. (2009) Development of Validated Chromatographic Methods fort he Simultaneous Determination of Metronidazole and Spiramycin in Tablets. *Chromatographia 2009, 69, February (No. 3/4).* https://doi.org/10.1365/s10337-008-0865-2

Marczenko, Z., & Balcerzak, M. (2000). Principles of spectrophotometry. In *Analytical Spectroscopy Library* (Vol. 10, pp. 26-38). Elsevier. https://doi.org/10.1016/S0926-4345(00)80066-8

Penner, M. H. (2017). Basic principles of spectroscopy. In *Food analysis* (pp. 79-88). Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-45776-5_6

Ravisankar, P., Anusha, S., Supriya, K., & Kumar, U. A. (2019). Fundamental chromatographic parameters. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res*, *55*(2), 9.

Saleh, H., Elhenawee, M., Hussien, E. M., Ahmed, N., & Ibrahim, A. E. (2021). Validation of HPLC-UV multi-residue method for the simultaneous determination of tetracycline, oxytetracycline, spiramycin and neospiramycin in raw milk. *Food Analytical Methods*, *14*(1), 36-43. https://doi.org/10.1007/s12161-020-01838-9

Santos, L. A. dos Santos, M. B. De Araujo & R. Bonfilio (2022) Multivariate Optimization and Validation of HPLC Method for Determination of Spiramycin I in Tablets *Chromatographia (2022) 85:421-431, https://doi.org/10.1007/s10337-022-04153-z*

Siouffi, A. M. (2006). About the C term in the van Deemter's equation of plate height in monoliths. *Journal of Chromatography A*, *1126*(1-2), 86-94. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.05.036

Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2013). *Enstrümantal Analiz İlkeleri 6. Baskı* (E. Kılıç, H. Yılmaz, Çev.) Ankara: Bilim Yayınları

Snyder, L. R., Kirkland, J. J., & Dolan, J. W. (2011). *Introduction to modern liquid chromatography*. John Wiley & Sons.

Sowjanya, G., Ganapaty, S., & Sara, A. L. M. A. S. (2019). Derivative Uv Spectroscopic approaches in multicomponent analysis–A review. *Int J Pharm Pharm Sci*, *11*(2), 1-11.

Sudharshan, N., & Swetha, V. (2023). UV-visible spectroscopy: a comprehensive review on instrumentation. *World Journal of Pharmaceutical Research*, *12*(19), 1342-1363.

Tashtoush, B. M., Jacobson, E. L., & Jacobson, M. K. (2008). Validation of a simple and rapid HPLC method for determination of metronidazole in dermatological formulations. *Drug development and industrial pharmacy*, *34*(8), 840-844. https://doi.org/10.1080/03639040801928598

Uddin, J. (Ed.). (2012). *Macro to nano spectroscopy*. BoD–Books on Demand, IntechOpen.

Vitha, M. F. (2018). *Spectroscopy: Principles and instrumentation*. John Wiley & Sons.

Wang, J. Cheng, H. Wen, T. Hou, F. Luo, Y. Wang, X. Xu, Y. Liu, Y. Zhao & X. Liang (2024) Synthesis, anticancer and antibacterial evaluation of novel spiramycin-acylated derivatives *RSC Adv., 2024, 14, 38898,* https://doi.org/10.1039/d4ra03126a

Zeid, A. M. Khalil & M. Rabei (1980) Spiramycin, a Macrolide Antibiotic *Zbl. Bakt. II Abt. 135 (1980), 443-453,* https://doi.org/10.1016/S0323-6056(80)80102-9