

**T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PROKAINAMİDİN FARMASÖTİK PREPARATTAN VE  
PLAZMADAN YEŞİL HPLC İLE ANALİZİ**

**Ecz. Murat ÜLGEN**

**Analitik Kimya Programı  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ANKARA**

**2022**

**T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PROKAINAMİDİN FARMASÖTİK PREPARATTAN VE PLAZMADAN  
YEŞİL HPLC İLE ANALİZİ**

**Ecz. Murat ÜLGEN**

**Analitik Kimya Programı  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. Nursabah Elif BAŞCI AKDUMAN**

**ANKARA**

**2022**

T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PROKAİNAMİDİN FARMASÖTİK PREPARATTAN VE PLAZMADAN  
YEŞİL HPLC İLE ANALİZİ

Ecz. Murat ÜLGEN

Danışman: Prof. Dr. Nursabah Elif BAŞCI AKDUMAN

Bu tez çalışması 28.01.2022 tarihinde jürimiz tarafından Analitik Kimya Programı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. İncilay SÜSLÜ  
(Hacettepe Üniversitesi)  
Tez Danışmanı: Prof. Dr. Nursabah Elif BAŞCI AKDUMAN  
(Hacettepe Üniversitesi)  
Üye: Prof. Dr. Emirhan NEMUTLU  
(Hacettepe Üniversitesi)  
Üye: Dr. Öğr. Üyesi Ayşegül DOĞAN  
(Hacettepe Üniversitesi)  
Üye: Prof. Dr. Murat PALABIYIK  
(Ankara Üniversitesi)

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun bulunmuştur.

22 Şubat 2022

Prof. Dr. Müge YEMİŞÇİ ÖZKAN  
Enstitü Müdürü

## YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan **“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”** kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi /H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü /Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. <sup>(1)</sup>
- Enstitü /Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ... ay ertelenmiştir. <sup>(2)</sup>
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. <sup>(3)</sup>

28.01.2022

Ecz. Murat ÜLGEN

*“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”*

- (1) *Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.*
- (2) *Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.*
- (3) *Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, tezin yapıldığı kurum tarafından verilir \*. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü veya fakültenin uygun görüşü üzerine üniversite yönetim kurulu tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.*  
*Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir*

*\* Tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.*

## ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof. Dr. Nursabah Elif BAŞCI AKDUMAN danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Ecz. Murat ÜLGEN

## TEŞEKKÜR

Hazırlamış olduğum tezimin her aşamasında sahip olduğu kıymetli bilgi ve birikimleriyle bana destek olan danışman hocam Prof. Dr. Nursabah Elif BAŞCI AKDUMAN'a,

Teorik ve pratik derslerde öğrettikleri değerli bilgiler için Analitik Kimya Anabilim Dalı'ndaki saygıdeğer hocalarıma,

Laboratuvar çalışmalarımda ihtiyaç duyduğum her anda yardımına koşan Yük. Kim. Cemil Can EYLEM'e,

Laboratuvar çalışmalarım için desteklerini esirgemeyen Antalya Eğitim ve Araştırma Hastanesi sorumlu eczacısı Cemile Hilal TOKMAKOĞLU'na ve mesai arkadaşlarıma,

Eğitimimin her aşamasında beni destekleyen anne ve babama,

Bu uzun ve zorlu süreçte yardımlarını esirgemeyen ablalarım Dr. Öğr. Üyesi Nazan ÜLGEN TEKEREK ve Uzm. Dr. Ayşegül ÜLGEN KUNAK ile değerli eşleri Uzm. Dr. Serhat TEKEREK ve Uzm. Dr. Tolga KUNAK'a,

Şirinlikleriyle yorgunluğumu ve stresimi alan ve moralimi yükselten sevgili yeğenlerime,

Sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

## ÖZET

**Ülgen, M., Prokainamidin Farmasötik Preparattan ve Plazmadan Yeşil HPLC ile Analizi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Programı, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2022.** İlaç analizlerinde sıklıkla kullanılan HPLC yöntemlerinde insan sağlığına ve çevreye zararlı olmayan çözücüler kullanarak, analizci ve çevre sağlığını korumak, oluşacak toksik atık bütçesini minimize etmek HPLC yeşilleştirme stratejisidir. Prokainamid (PA), terapötik penceresinin dar olması ve ciddi yan etkileri nedeniyle TDM izlemesi gerektiren antiaritmik bir ilaçtır. Bu tezde, bu türden ilaçlara bir örnek olarak PA'nın ilaç kalite kontrol ve TDM analizleri için yararlanılabilecek yeşil HPLC yöntemlerinin geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla, insan dostu etanol hareketli faz organik çözücüsü olarak seçilmiş, PA'nın farmasötik preparat ve plazmadan analizi için yeşil HPLC yöntemleri geliştirilerek valide edilmiştir. PA, Nucleodur 100-5 C8 ec (5 µm, 150 x 4,6 mm) kolondan etanol ve 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tamponu (5:95, h/h) içeren hareketli faz ile elue edilmiştir. Hareketli faz akış hızı 1,0 ml dk<sup>-1</sup>, kolon sıcaklığı 35°C ve PDA dedektör dalga boyu 279 nm'dir. Bu koşullarda PA ve IS parasetamolün alıkonma zamanları 5.0 dk ve 7.7 dk'dır. PA'nın farmasötik preparattan analizi için geliştirilen yeşil HPLC yöntemi, 1-50 µg ml<sup>-1</sup> aralığında doğrusaldır. Yöntemin en yüksek BSS ve ortalama geri kazanma değerleri, sırasıyla %0,88 ve %98,89'dur. PA'nın plazmadan yeşil HPLC ile analizi, etanolle gerçekleştirilen yumuşak bir protein çöktürmesiyle gerçekleştirilebilmiş, böylece numune hazırlama süreci de yeşilleştirilmiştir. Yöntemin LOD değeri 0,3 µg ml<sup>-1</sup>, LOQ değeri ise 0,8 µg ml<sup>-1</sup> dir. PA'nın terapötik plazma derişiminin 4–12 µg ml<sup>-1</sup> aralığında olduğu bildirilmektedir. Geliştirilen yeşil biyoanalitik yöntem, 1,5-30 µg ml<sup>-1</sup> PA derişimi aralığında doğrusal olup BSS değeri %3,3 ve ortalama geri kazanma değeri %97,27'dir. Sonuç olarak, bu tezde geliştirilen ve valide edilen yeşil HPLC yöntemleri, seçici, doğru, kesin, tekrarlanabilir ve güvenilir olup PA'nın farmasötik preparat ve TDM analizleri için uygulanabilir nitelikte ve yetenektedir.

**Anahtar kelimeler:** Yeşil kromatografi, etanol, prokainamid, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), farmasötik ve biyoanalitik analiz

## ABSTRACT

Ülgen, M., **Analysis of Procainamide from Pharmaceutical Preparation and Plasma by Green HPLC, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences, Analytical Chemistry Program, Master Thesis, Ankara, 2022.** In drug analysis, using non-hazardous solvents instead of these solvents harmful to the human and environment is a greening strategy to protect analyst and environmental health and minimize produced toxic waste budgeted. Procainamide (PA) is an antiarrhythmic drug requiring TDM due to its narrow therapeutic window and serious side effects. The aim of thesis is to develop green HPLC methods to be used in drug quality control and TDM analysis for PA as an example to this class drugs. Thus, human friendly ethanol was selected as organic solvent in mobile phase, and the green HPLC methods for the analysis of PA in pharmaceutical preparation and in plasma was developed and validated. PA was eluted from Nucleodur 100-5 C8 ec (5  $\mu\text{m}$ , 150 x 4,6 mm) column by a mobile phase containing ethanol and 50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  buffer (5:95, h/h). Mobile phase flow rate was 1,0 ml  $\text{dk}^{-1}$ , column temperature was 35  $^\circ\text{C}$  and the wavelength at PDA detector was 279 nm. Retention time for PA was 5.0 min and was 7.7 min for IS paracetamol. Green HPLC method for PA analysis in pharmaceuticals was linear in the range of 1-50  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . The highest RSD and mean recovery values for the method were 0,88% and 98,89%, respectively. In the analysis of plasma PA, sample preparation was only a smooth protein precipitation by ethanol. Thus, sample preparation step was also become green. LOD of the method was 0,3  $\mu\text{g ml}^{-1}$  and LOQ was 0,8  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . The therapeutic plasma concentration for PA has been reported in the range of 4–12  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Green bioanalytical method developed in this study was linear in the range of 1,5-30  $\mu\text{g ml}^{-1}$  PA concentration, and its BBS value was 3,3% and the mean recovery was 97,27%. As a result, the green HPLC methods developed and validated in this thesis were selective, accurate, precise, reproducible, trustable and have the quality and ability for the application in pharmaceutical and TDM analysis of PA.

**Keywords:** Green chromatography, ethanol, procainamide, high performance liquid chromatography, pharmaceutical and bioanalytical analysis



## İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xv
TABLolar	xvi
<b>1. GİRİŞ</b>	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	2
2.1. Yeşil Kimya	2
2.2. Yeşil Analitik Kimya	3
2.3. Kromatografi (5)	4
2.3.1. Kromatografi Parametreleri	8
2.3.2. Kromatografik Parametrelerin Birbiri ile İlişkisi	10
2.3.3. Kromatografide Hız Teorisi	11
2.4. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (7)	12
2.4.1. HPLC donanımı (5, 7)	12
2.5. Yeşil kromatografi (9)	23
2.6. Prokainamid	24
2.6.1. Terapötik İlaç Monitörizasyonu ve Prokainamid	29
<b>3. GEREÇLER VE YÖNTEM</b>	30
3.1. Cihazlar	30
3.2. Kimyasal Maddeler	30
3.3. Sarf Malzemeleri	31
3.4. DeneYler için Gerekli Hazırlıklar	31
3.4.1. Çözeltilerin Hazırlanması	31

3.4.2.	Farmasötik Preparattan için Analiz Çalışma Standardı, Plasebo ve Sentetik Preparat Çözeltilerinin Hazırlanması	32
3.4.3.	Plazma Standartları ve Kalite Kontrol Numunelerinin Hazırlanması	32
3.5.	Prokainamidin Farmasötik Preparattan ve Plazmadan Analizi Yöntemlerinin Validasyonu	32
3.5.1.	Özgünlük	33
3.5.2.	Gözlenebilme Sınırı ve Alt Tayin Sınırı	33
3.5.3.	Doğrusallık ve Aralık	33
3.5.4.	Doğruluk	34
3.5.5.	Kesinlik	34
3.5.6.	Sağlamlık ve Tutarlılık	34
3.5.7.	Sistem Uygunluk Testi	34
3.5.8.	Taşınma	35
3.5.9.	Matriks Etkisi	35
3.5.10.	Seyreltme Etkisi	35
3.5.11.	Kararlılık Testleri	35
3.5.12.	Kalite Kontrol (QC) Numuneleri	36
3.5.13.	Kalite Kontrol (QC) Kartları	36
<b>4.</b>	<b>BULGULAR</b>	<b>37</b>
4.1.	Yöntemin Optimizasyonu	37
4.1.1.	Hareketli Faz Bileşiminin Belirlenmesi	37
4.1.2.	Hareketli Faz Akış Hızının Belirlenmesi	40
4.1.3.	Kolon Sıcaklığının Belirlenmesi	42
4.2.	Farmasötik Preparattan Prokainamid Analiz Yönteminin Validasyonu	45
4.2.1.	Özgünlük	45
4.2.2.	Kalibrasyon Eğrisi ve Doğrusallık Aralığı	46
4.2.3.	Doğruluk ve Kesinlik	48
4.2.4.	Duyarlılık	49
4.2.5.	Geri Kazanım	50
4.2.6.	Tekrarlanabilirlik	50
4.2.7.	Sağlamlık ve Tutarlılık	51

4.2.8.	Sistem Uygunluk Testleri	53
4.3.	Plazmadan Prokainamid Analiz Yönteminin Validasyonu	53
4.3.1.	Özgünlük	53
4.3.2.	Duyarlılık	54
4.3.3.	Kalibrasyon Eğrisi ve Doğrusallık Aralığı	54
4.3.4.	Doğruluk ve Kesinlik	56
4.3.5.	Kararlılık	58
4.3.6.	Matriks Etkisi	58
4.3.7.	Taşınma	59
4.3.8.	Seyreltme Etkisi	60
4.3.9.	Geri Kazanım	61
4.3.10.	Tekrarlanabilirlik	61
4.3.11.	Kalite Kontrol Örnekleri	62
4.3.12.	Kalite Kontrol Kartı	63
<b>5.</b>	<b>TARTIŞMA</b>	<b>65</b>
5.1.	Yöntem Optimizasyonu	65
5.2.	Yöntem Validasyonu	67
5.2.1.	Farmasötik Preparattan Analiz	67
5.2.2.	Plazmadan Analiz	68
<b>6.</b>	<b>SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	<b>71</b>
<b>7.</b>	<b>KAYNAKLAR</b>	<b>72</b>
<b>8.</b>	<b>EKLER</b>	
<b>EK-1:</b>	<b>Korrelasyon Katsayısı ve Doğrusallıktan Ayrılış Önem Kontrolü</b>	
<b>EK-2:</b>	<b>İstatistiksel Hesaplamalar</b>	
<b>EK-3:</b>	<b>t-Testi</b>	
<b>EK-4:</b>	<b>Mann-Whitney U Testi</b>	
<b>EK-5:</b>	<b>Prokainamidin UV/GB Spektrumu</b>	
<b>EK-6:</b>	<b>Orjinallik Raporu Örneği</b>	
<b>EK-7:</b>	<b>Dijital Makbuz</b>	
<b>9.</b>	<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	

## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>A</b>	Absorbans
<b>ACN</b>	Asetonitril
<b>AR-GE</b>	Araştırma ve geliştirme
<b>b</b>	Hücre yol uzunluğu
<b>BSS</b>	Bağıl standart sapma
<b>c</b>	Numune derişimi (mol/litre)
<b>cm</b>	Santimetre
<b>DAD</b>	Diyot dizisi (Diode array)
<b>dk</b>	Dakika
<b>EPA</b>	ABD Çevre Koruma Kurumu (US Environmental Protection Agency)
<b>EtOH</b>	Etanol
<b>FPLC</b>	Hızlı protein sıvı kromatografisi (Fast protein liquid chromatography)
<b>GB</b>	Görünür bölge
<b>GC</b>	Gaz kromatografisi
<b>H</b>	Teorik tabaka yüksekliği
<b>HILIC</b>	Hidrofilik etkileşim kromatografisi
<b>HPLC</b>	Yüksek performans sıvı kromatografisi
<b>I</b>	Hücreden çıkan ışın şiddeti
<b>I<sub>0</sub></b>	Hücreye giren ışın şiddeti
<b>ICH</b>	Uluslararası Harmonizasyon Konferansı
<b>IS</b>	İç standart
<b>k'</b>	Kapasite faktörü
<b>L</b>	Kolon uzunluğu
<b>LC</b>	Sıvı kromatografisi
<b>LOD</b>	Gözlenebilme sınırı
<b>LOQ</b>	Alt tayin sınırı
<b>ME</b>	Matriks etkisi

<b>mg</b>	Miligram
<b>ml</b>	Mililitre
<b>mm</b>	Milimetre
<b>mM</b>	Milimolar
<b>N</b>	Teorik tabaka sayısı
<b>n</b>	Numune sayısı
<b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Sodyum dihidrojen fosfat
<b>NAPA</b>	N-asetilprokainamid
<b>nl</b>	Nanolitre
<b>nm</b>	Nanometre
<b>ODS</b>	Oktadesil
<b>PA</b>	Prokainamid
<b>PAO</b>	Pik asimetri oranı
<b>PDA</b>	Fotodiyot dizisi (Photodiode array)
<b>QC</b>	Kalite kontrol
<b>R<sub>s</sub></b>	Ayırıcılık
<b>r</b>	Korelasyon katsayısı
<b>R<sup>2</sup></b>	Tanımlayıcılık katsayısı
<b>S/G</b>	Sinyal/Gürültü oranı
<b>SFC</b>	Süperkritik akışkan kromatografisi
<b>SH</b>	Standart hata
<b>SS</b>	Standart sapma
<b>TDM</b>	Terapötik ilaç monitörizasyonu (Therapeutic drug monitoring)
<b>t<sub>R</sub></b>	Alıkonma zamanı
<b>UPLC</b>	Ultra performanslı sıvı kromatografisi (Ultra performance liquid chromatography)
<b>UV</b>	Ultraviyole
<b>W</b>	Pik genişliği
<b>W<sub>1/2</sub></b>	Pik yüksekliğinin yarısındaki pik genişliği
<b>YAK</b>	Yeşil analitik kimya

$\alpha$	Seçicilik
$\epsilon$	Molar absorptivite
$\mu\text{g}$	Mikrogram
$\bar{X}$	Ortalama

## ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Kromatografide elüsyon (6)	7
2.2. HPLC cihazının şematik gösterimi (6)	13
2.3. Prokainamidin kimyasal yapısı (21)	25
4.1. Etanol oranı ile kapasite faktörünün değişimi	37
4.2. Etanol oranı ile pik asimetri oranının değişimi	38
4.3. Etanol oranı ile teorik tabaka sayısının değişimi	38
4.4. Etanol oranı ile ayırıcılığın değişimi	39
4.5. Hareketli faz akış hızı ile kapasite faktörünün değişimi	40
4.6. Hareketli faz akış hızı ile pik asimetri oranının değişimi	41
4.7. Hareketli faz akış hızı ile teorik tabaka sayısının değişimi	41
4.8. Hareketli faz akış hızı ile ayırıcılığın değişimi	42
4.9. Kolon sıcaklığı ile kapasite faktörünün değişimi	43
4.10. Kolon sıcaklığı ile pik asimetri oranının değişimi	43
4.11. Kolon sıcaklığı ile teorik tabaka sayısının değişimi	44
4.12. Kolon sıcaklığı ile ayırıcılığın değişimi	44
4.13. Prokainamid ve IS analizi için örnek kromatogramlar	46
4.14. Farmasötik preparattan prokainamid analizi yöntemi için kalibrasyon eğrisi	47
4.15. Prokainamidin plazmadan analizi için örnek kromatogramlar	54
4.16. Plazmadan prokainamid analizi yöntemi için kalibrasyon eğrisi	55
4.17. Taşınma çalışmalarına ait kromatogramlar	60
4.18. Prokainamidin plazmadan analizi için kalite kontrol kartı	64

## TABLOLAR

<b>Tablo</b>	<b>Sayfa</b>
2.1. Kromatografik yöntemlerin sınıflandırması (5)	6
2.2. Spesifik kromatografik çalışmalarda kullanılan fonksiyonel gruplar (7)	18
2.3. Nano-LC sistemleri için çalışma aralıkları (7)	22
2.4. Prokainamid için HPLC ile analiz yöntemleri	27-28
4.1. Hareketli fazdaki etanol miktarının kromatografik parametrelere etkisi	39
4.2. Hareketli fazdaki tampon derişiminin kromatografik parametrelere etkisi	40
4.3. Akış hızının kromatografik parametrelere etkisi	42
4.4. Kolon sıcaklığının kromatografik parametrelere etkisi	45
4.5. Farmasötik preparattan prokainamid analizi kalibrasyon eğrisinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi	47
4.6. Kalibrasyon eğrisinin özellikleri	48
4.7. Farmasötik preparattan prokainamid analizi yöntemi için gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik bulguları	49
4.8. Farmasötik preparattan prokainamid analizi için geri kazanım bulguları	50
4.9. Yöntemin tekrarlanabilirlik bulguları	51
4.10. Farmasötik preparattan prokainamid analizi yöntemine ait sağlamlık bulguları	52
4.11. Farmasötik preparattan prokainamid analizi yönteminde farklı analizcilere ait analiz sonuçları	53
4.12. Prokainamidin farmasötik preparattan analizi için sistem uygunluk testi verileri	53
4.13. Plazmadan prokainamid analizi için kalibrasyon eğrisinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi	55
4.14. Kalibrasyon eğrisinin özellikleri	56
4.15. Yöntemin gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik bulguları	57
4.16. Prokainamidin plazmada kısa ve uzun dönem kararlılığı	58
4.17. Plazmadaki prokainamidin donma/çözünme kararlılık bulguları	58
4.18. Plazma örneklerinde prokainamidin matriks etkisi	59
4.19. Prokainamidin plazmadan analizinde seyrelme etkisi	61
4.20. Prokainamid için geri kazanım değerleri	61
4.21. Yöntemin tekrarlanabilirlik bulguları	62
4.22. QC numunelerinin analiz sırasındaki dağılımı	63



## 1. GİRİŞ

Geniş kullanım alanı olan kromatografik yöntemler ile hızlı ve etkili ilaç analizleri yapılmaktadır. İlaç dünyasında hem farmasötik hem biyoanalitik analiz yöntemlerinde nitel ve nicel analiz amacıyla kromatografi, özellikle de yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yaygın kullanılmaktadır. HPLC kullanımı, ilaçta araştırma ve geliştirme (AR-GE) veya rutin analiz diğer bir deyişle Kalite Kontrol analizleri, biyoyararlanım/biyoeşdeğerlik değerlendirmesi ile klinik ve tedavi izleme çalışmalarının yanı sıra, toksikoloji, kriminoloji, gıda, çevre gibi alanları da kapsamaktadır.

Geleneksel ya da son teknoloji HPLC yöntemlerinin hareketli faz içeriğinde yaygın olarak asetonitril (ACN) ve/veya metanol gibi organik çözücüler kullanılmaktadır. Kromatografik elüsyonu sağlayabilmek adına, organik düzenleyici olarak kullanılan bu çözücülerin, insan hayatı ve doğal yaşamı tehdit eden çevresel kirliliğe neden oldukları, dolayısıyla kullanım alanı buldukları bütün sistemlerden ivedilikle çıkartılması ya da kullanımlarının azaltılması çevre örgütleri tarafından tavsiye edilmektedir. Bu amaçla, ortaya çıkan ve pek çok kullanım alanı bulan çözücü değiştirme stratejisi, bir başka deyişle, kromatografik performanstan ödün vermeden hareketli fazın zararlı organik çözücü içeriğinin insan ve çevre dostu yeşil ya da daha yeşil olanlarla yer değiştirmesi uygulamaları gündemdedir.

Bu nedenle ilaç analizlerinde, çevreye ve insan sağlığına en az zarar verecek yeşil kromatografik yöntemlerin geliştirilmesi ve valide edilmesi büyük önem taşımaktadır. Bu tezde antiaritmik olarak kullanılan ve terapötik aralığı dar olan prokainamidin farmasötik ve biyoanalitik yöntemlerle analizi için yeşil HPLC yöntemlerinin geliştirilmesi ve valide edilmesi amaçlanmıştır. Çalışmanın bir amacı da hasta uyuncunun izlenmesinin zorunlu olduğu prokainamid gibi ilaçların kan düzeylerinin yeşilleştirilmiş HPLC yöntemiyle çevre ve analizci sağlığına zarar vermeden ve toksik atık yükü dolayısıyla atık yönetimi gerekliliği yaratmadan analiz edilebileceğini ortaya koymaktır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Yeşil Kimya

Çevre Koruma Ajansı, yeşil kimyayı “insan sağlığına ve çevreye zararlı maddelerin kullanımını ve üretimini azaltmak veya ortadan kaldırmak için kimyasal ürün ve proseslerin tasarımı, geliştirilmesi ve uygulanması” olarak tanımlamaktadır. Bu, yeşil kimyanın sadece kullanılan veya üretilen tehlikeli maddeleri arıtmanın yollarını bulmaya çalışmak veya daha iyi koruyucu ekipman geliştirmekle ilgili olmadığı anlamına gelir. Bunun yerine, tehlikeleri en baştan azaltmak hatta ortadan kaldırmak için yenilikçi yollar arar (1).

Paul Anastas ve John Warner (2, 3), kimyasal süreçleri tasarlarken kullanılabilir 12 kriter veya ilkeden oluşan bir liste oluşturduğu 1990'ların ortalarına kadar yeşil kimya için gerçekten bir tanım yoktu. Bunlar yeşil kimyanın 12 ilkesi olarak bilinir. Bu 12 ilke ve her birinin kısa bir açıklaması aşağıda listelenmiştir.

1. **Önleme:** Atıkları oluşturulduktan sonra işlemek veya temizlemek yerine atıkları önlemek daha iyidir.
2. **Atom Ekonomisi:** Sentetik yöntemler, proseste kullanılan tüm malzemelerin nihai ürüne dahil edilmesini en üst düzeye çıkaracak şekilde tasarlanmalıdır.
3. **Daha Az Tehlikeli Kimyasal Sentez:** Mümkün olan her yerde, insan sağlığı ve çevre için çok az veya hiç zehirli olmayan maddeleri kullanmak ve üretmek için sentetik yöntemler tasarlanmalıdır.
4. **Daha Güvenli Kimyasalların Tasarlanması:** Kimyasal ürünler, toksisitelerini en aza indirirken istenen işlevi gerçekleştirecek şekilde tasarlanmalıdır.
5. **Daha Güvenli Çözücüler ve Yardımcı Maddeler:** Yardımcı maddelerin (çözücüler, ayırma maddeleri vb.) kullanımı mümkün olduğunca gereksiz ve kullanıldığında zararsız hale getirilmelidir.
6. **Enerji Verimliliği için Tasarım:** Kimyasal süreçlerin enerji gereksinimleri, çevresel ve ekonomik etkileri nedeniyle tanınmalı ve en aza indirilmelidir. Mümkünse, sentetik yöntemler ortam sıcaklığında ve basıncında yapılmalıdır.

7. **Yenilenebilir Hammaddelerin Kullanımı:** Bir hammadde veya teknik, ekonomik olarak uygulanabilir olduğunda tükenmek yerine yenilenebilir olmalıdır.
8. **Türevlerin Azaltılması:** Gereksiz türevlendirme (blokaj gruplarının kullanımı, koruma/korumanın kaldırılması ve fiziksel/kimyasal süreçlerin geçici olarak değiştirilmesi) en aza indirilmeli veya mümkünse kaçınılmalıdır, çünkü bu tür adımlar ek reaktifler gerektirir ve atık üretebilir.
9. **Kataliz:** Katalitik reaktifler (mümkün olduğunca seçici) stokiyometrik reaktiflerden üstündür.
10. **Bozunma için Tasarım:** Kimyasal ürünler, işlevlerinin sonunda zararsız bozunma ürünlerine dönüşecek ve çevrede kalıcı olmayacak şekilde tasarlanmalıdır.
11. **Kirlilik Önleme için Gerçek Zamanlı Analiz:** Tehlikeli maddelerin oluşumundan önce gerçek zamanlı, süreç içi izleme ve kontrole izin vermek için analitik metodolojilerin daha fazla geliştirilmesi gerekmektedir.
12. **Kaza Önleme İçin Doğal Olarak Daha Güvenli Kimya:** Bir kimyasal süreçte kullanılan maddeler ve bir maddenin şekli, salınımlar, patlamalar ve yangınlar dahil olmak üzere kimyasal kaza potansiyelini en aza indirecek şekilde seçilmelidir.

## 2.2. Yeşil Analitik Kimya

Yeşil analitik kimya (YAK), 2000 yılında yeşil kimyadan ortaya çıkmıştır. Yeşil kimya içindeki bu nispeten yeni faaliyet alanı, analitik kimyacıların laboratuvar uygulamalarını daha çevre dostu hale getirmedeki rolüyle ilgilidir ve büyük ilgi görmüştür. Kimyasal analizlerin kalitesinin iyileştirilmesi için gerekli olan enstrümantasyon ve metodolojilerin geliştirilmesinin yanı sıra, kimyasal analizlerin çevre üzerindeki olumsuz etkilerinin azaltılması ve sürdürülebilir kalkınma ilkelerinin analitik kimya laboratuvarlarına uygulanmasına yönelik çalışmalar yapılmaktadır. Bu bağlamda, YAK, analitik kimyanın ilerlemesi için bir uyarıcı olarak kabul edilmelidir. Bu disiplinin geleceği için en önemli zorluk, sonuçların artan kalitesi ile analitik yöntemlerin artan çevre dostu özellikleri arasında bir uzlaşmaya varmaktır. Bu bağlamda yukarıda belirtilen yeşil kimyanın 12 ilkesinin YAK'ta uygulanabilen 4

ilkesine (1, 5, 6 ve 8 numaralı ilkeler), Gałuszka ve ark. (4) tarafından 8 yeni ilkenin eklenmesiyle ortaya çıkan YAK'nın 12 ilkesi aşağıda listelenmiştir.

1. Örnek hazırlanmasından kaçınmak için doğrudan analitik teknikler uygulanmalıdır.
2. Minimum örnek sayısı ve boyutu hedeflenmelidir.
3. *in-situ* ölçümler yapılmalıdır.
4. Analitik süreçlerin ve işlemlerin entegrasyonu, enerji tasarrufu sağlayacak ve reaktiflerin kullanımını azaltacak şekilde yapılmalıdır.
5. Otomatikleştirilmiş ve minyatürize edilmiş yöntemler seçilmelidir.
6. Türevlendirmeden kaçınılmalıdır.
7. Büyük hacimli analitik atık oluşumundan kaçınılmalı ve analitik atıkların uygun yönetimi sağlanmalıdır.
8. Bir seferde bir analit kullanan yöntemler yerine çoklu analit içeren veya çok parametrelili yöntemler tercih edilmelidir.
9. Enerji kullanımı en aza indirilmelidir.
10. Yenilenebilir kaynaktan elde edilen reaktifler tercih edilmelidir.
11. Toksik reaktifler elimine edilmeli veya değiştirilmelidir.
12. Analizcinin güvenliği artırılmalıdır.

### **2.3. Kromatografi (5)**

Kromatografi, karışımlardaki bileşenlerin ayrılması, teşhisi ve tayini için kullanılan birçok farklı ve önemli yöntemler grubunu içerir. Bütün kromatografik ayırmalarda numune gaz, sıvı veya süperkritik bir akışkan halindeki bir hareketli fazda çözülür. Daha sonra bu hareketli faz, bir kolonda veya bir katı yüzeyde sabitleştirilmiş ve kendisiyle karışmayan bir sabit faz içinden geçirilir. Sabit faz tarafından kuvvetli tutulan numune bileşenleri, hareketli fazın akışıyla çok yavaş hareket ederken, zayıf tutulan bileşenler hızlı hareket eder. Bu hareket hızlarının farklılığı sonucu, numune bileşenleri birbirlerinden nitel ve/veya nicel olarak analiz edilebilen farklı bantlar veya bölgeler şeklinde ayrılırlar.

Bütün bilim dallarında uygulama alanına sahip güçlü bir ayırma yöntemi olan kromatografi, yirminci yüzyılın başında Rus botanikçi Mikhail Tswett tarafından bulunmuş ve onun tarafından isimlendirilmiştir. Tswett bu tekniği, çok ince öğütülmüş

toz kalsiyum karbonat doldurulmuş bir cam kolondan bitki pigmentleri çözeltilerini geçirerek klorofil ve ksantofil gibi birçok bitki pigmentini ayırmada kullanmıştır. Ayrılan maddeler kolonda renkli bantlar şeklinde gözüktüğünden, yöntem, Yunanca'da "renk" anlamına gelen "chroma" ve "yazı" anlamına gelen "graphein" kelimelerden türetilen kromatografi adını vermiştir.

Son yarım asırda, birçok yeni kromatografik teknik geliştiği ve bilim insanlarının karmaşık karışımları ayırmak için daha iyi tekniklere gereksinimleri arttığı için, kromatografik uygulamalar çok büyük oranda artmıştır. Bu yöntemlerin bilime büyük katkılar yapması sonucu bu alandaki buluşlarına karşılık, 1952 yılında A. J. P. Martin ve R. L. M. Synge'ye Nobel ödülü verilmiştir. Sonraki yıllarda verilen Nobel ödüllerine temel olan çalışmaların pek çoğunda da kromatografi merkezi bir rol almaktadır.

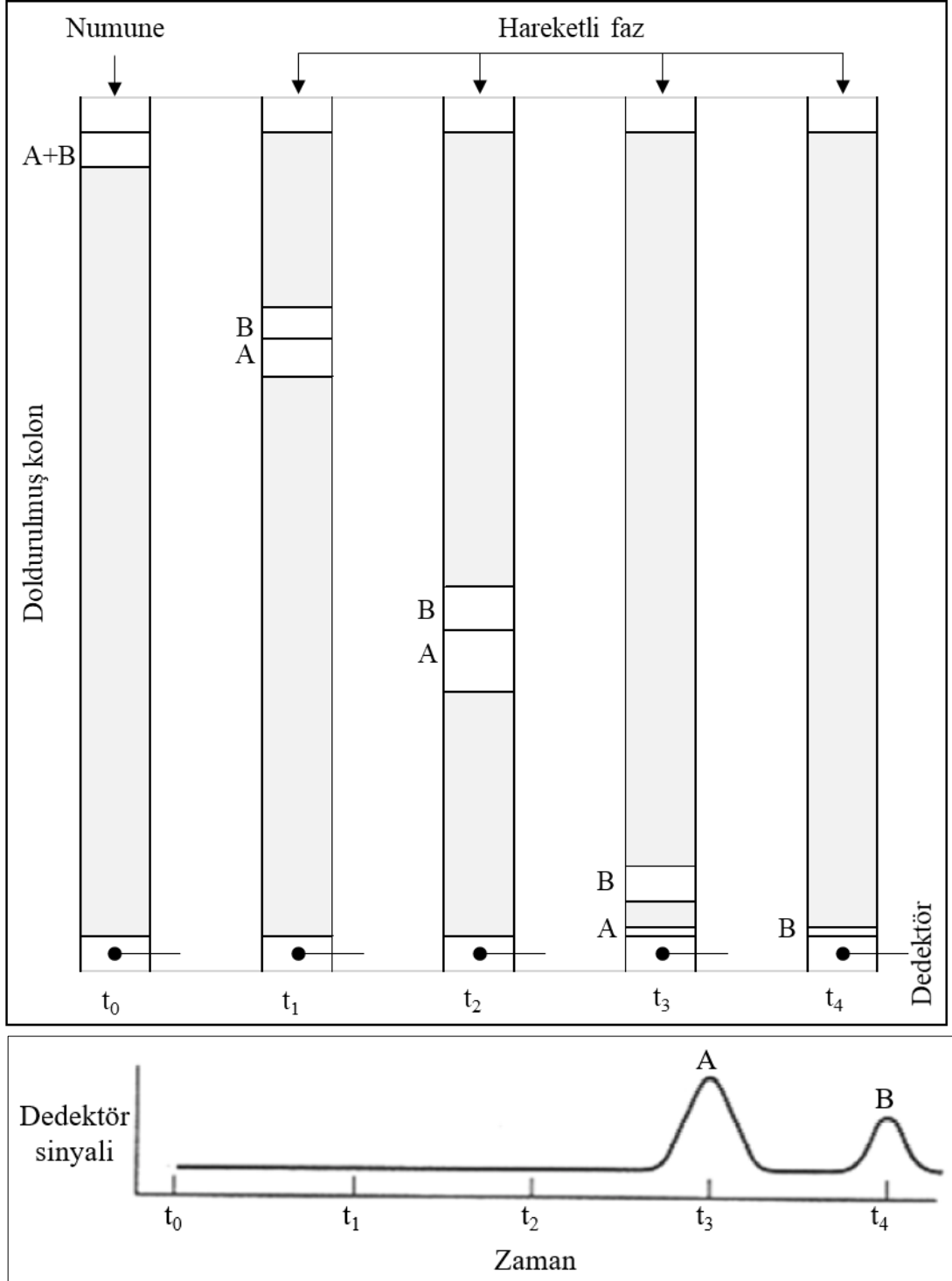
Kromatografik yöntemler iki şekilde sınıflandırılabilir. Birinci sınıflandırmada, hareketli ve sabit fazların fiziksel olarak nasıl temas ettirildikleri esas alınır. Kolon kromatografisinde sabit faz ince bir kolonda tutulur ve hareketli faz bu sabit faz arasından geçmeye zorlanır. Düzlemsel kromatografide sabit faz düz bir plaka üzerine veya bir kağıdın gözenekleri arasına tutturulur ve bu durumda hareketli faz, sabit faz arasından kılcallık etkisiyle veya yer çekimi etkisiyle hareket eder. Her iki tür kromatografinin dayandığı dengeler aynı olup, kolon kromatografisi için geliştirilmiş kuramlar düzlemsel kromatografiye de kolaylıkla uyarlanabilmektedir.

Kromatografik yöntemlerin daha temel bir sınıflandırması, kullanılan sabit ve hareketli fazların tipleri ve fazlar arasında madde aktarımını sağlayan dengelerin cinsine göre yapılır; bunlar gaz kromatografisi (GC), sıvı kromatografisi (LC) ve süperkritik akışkan kromatografisidir (SFC) (Tablo 2.1).

**Tablo 2.1.** Kromatografik yöntemlerin sınıflandırması (5)

Genel Sınıf	Özel Yöntem	Sabit Faz	Denge Türü
GC (Hareketli faz: gaz)	Gaz-sıvı	Katı yüzeye adsorplanmış sıvı	Gaz ve sıvı arasında dağılma
	Gaz-bağlı faz	Katı yüzeye bağlanmış organik türler	Gaz ve bağlı faz arasında dağılma
	Gaz-katı	Katı	Adsorpsiyon
LC (Hareketli faz: sıvı)	Sıvı-sıvı veya dağılma	Katı üzerine adsorplanmış sıvı	Karışmayan sıvılar arasında dağılma
	Sıvı-bağlı faz	Katı yüzeye bağlanmış organik türler	Sıvı veya bağlı yüzey arasında dağılma
	Sıvı-katı veya adsorpsiyon	Katı	Adsorpsiyon
	İyon değişimi	İyon değiştirici reçine	İyon değişimi
	Boyut eleme	Polimer bir katının gözeneklerindeki sıvı	Dağılma/eleme
SFC (Hareketli faz: süperkritik akışkan)		Katı yüzeyine bağlanmış organik türler	Süper kritik akışkan ile bağlı yüzey arasında dağılma

Kolon, yüzeyi sabit fazla kaplanmış ince öğütülmüş inert bir katı madde ile doldurulmuş dar bir borudur. Hareketli faz bu katı taneciklerin arasındaki boşluklardan geçer. Başlangıçta numunenin hareketli fazdaki bir çözeltisi, üst kısmından kolona dar bir bant halinde uygulanır. Bileşenler, sabit ve hareketli faz arasında dağılır. Daha sonra hareketli fazın sürekli ilave edilmesi ve numune bileşenlerinin kolon boyunca hareketinin sağlanmasıyla numune bileşenlerinin elüsyonu gerçekleşir (Şekil 2.1). Günümüz kromatografi çalışmalarında hareketli fazı sabit faz üzerinden sürekli geçirebilmek için sıvı kromatografisi ve süperkritik akışkan kromatografisinde bir pompadan, gaz kromatografisinde ise basınçlı gaz tüpünden gelen taşıyıcı gaz akışından yararlanır.



Şekil 2.1. Kromatografide elüsyon (6)

### 2.3.1. Kromatografi Parametreleri

**Alıkonma zamanı:** Analitin, numune uygulama anından dedektöre ulaşana kadar geçen süreye alıkonma zamanı ( $t_3$ ,  $t_4$  gibi) denir (Şekil 2.1). Alıkonmayan türün dedektöre ulaşması için gereken süreye ölü hacim alıkonma zamanı ( $t_0$ ) denir (5).

**Kapasite faktörü:** Bir kromatografik sistemde hareketli faz, akış hızı ya da diğer parametrelerin işlemler sırasında değişmesine bağlı olarak etkin ayrılan moleküllerin alıkonma zamanının değişmesi sonucu çalışmalar arasında moleküller farklı alıkonma zamanlarına sahip olabilirler. Söz konusu değişkenlerin etkisini ortadan kaldırmak için alıkonma zamanları normalize edilebilir. Bu amaçla kapasite faktörü veya alıkonma faktörü ( $k'$ ) ile tanımlanan ifade kullanılır ve ilgili molekülün alıkonma zamanı ile ölü hacimden hesaplanır (7).

$$k' = \frac{(t_R - t_0)}{t_0} \quad (2.1)$$

Bir madde için kapasite faktörünün 1'den çok küçük olması, bu maddenin ölü zamana çok yakın bir sürede kolondan çıkması anlamına gelmektedir. Kapasite faktörü 20-30'dan büyük olduğunda, elüsyon süresi çok uzun olur. İdealde, kromatografik ayırmalar bir karışımdaki maddelerin kapasite faktörlerinin 1-10 arasında olduğu koşullarda yapılır (5).

**Seçicilik:** Bir karışımdaki daha fazla alıkonulan maddenin kapasite faktörünün daha az alıkonulan maddenin kapasite faktörüne oranı, seçicilik ( $\alpha$ ) olarak tanımlanır.

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} = \frac{(t_{R2} - t_0)}{(t_{R1} - t_0)} \quad (2.2)$$

Analitin, sabit fazın ve hareketli fazın fiziksel ve kimyasal özelliklerine bağlı olan seçicilik, bu faktörlerin değiştirilmesi ile değiştirilebilir. Seçicilik,  $\alpha > 1$  olmalıdır ve iyileştirilmezse karışımdaki maddelerin pikleri tamamen ayıramaz (7).



**Kolon etkinliği:** Bir kromatografik kolonun etkinliği, ayrılacak maddenin kolon boyunca ilerlerken meydana gelen bant genişlemesinden etkilenir. Kolon etkinliğinin nicel bir ölçüsü olarak, teorik tabaka sayısı (N) ve teorik tabaka yüksekliği (H) olmak üzere iki terim yaygın olarak kullanılır. Bir kromatografik ayırmada  $N > 2000$  olması istenir. L, kolon uzunluğunu ifade etmek üzere, teorik tabaka sayısı ve teorik yüksekliği arasında aşağıdaki gibi bir bağıntı vardır.

$$N = \frac{L}{H} \quad (2.3)$$

Teorik tabaka sayısı, aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanır.

$$N = 16 \left( \frac{t_R}{W} \right)^2 \quad (2.4)$$

Bazı araştırmacıların daha güvenilir sonuç verdiğine inandığı bir diğer N değerini hesaplama yolunda ise pik yüksekliğinin yarısındaki pik genişliğinin ( $W_{1/2}$ ) tayini gerekmektedir. Teorik tabaka sayısı aşağıdaki eşitlik kullanılarak da hesaplanabilir (5).

$$N = 5,54 \left( \frac{t_R}{W_{1/2}} \right)^2 \quad (2.5)$$

**Ayırıcılık:** Ayırıcılık ( $R_S$ ), iki bant arasındaki uzaklığın, bant genişliği cinsinden değerini anlamına gelmektedir. Bir kolonun iki analiti ayırma yetisinin nicel bir ölçüsüdür ve  $R_S \geq 1.5$  kabul edilebilir bir ayırmayı işaret eder. Ayırıcılık aşağıdaki eşitlikle hesaplanır (5).

$$R_S = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{(w_1 + w_2)} \quad (2.6)$$

**Pik asimetri oranı (PAO):** Analitin hareketli fazdaki denge derişimi ile sabit fazdaki denge derişimi arasındaki ilişkiye doğrusallıktan sapma, nicel analizi güçleştirdiğinden ve alıkonma sürelerinin nitel analizlerde kullanımını engellediğinden kromatografik koşullar simetrik elüsyon piki sağlanacak şekilde düzenlenir. İyi bir ayırma işleminde PAO'nun 1,5'tan küçük olması istenir. Pik asimetri oranı, aşağıdaki eşitlikle hesaplanır (8).

$$PAO = \frac{CB}{CA} \quad (2.7)$$

CB: Pik yüksekliğinin %10'unda, pikin tepe noktasının izdüşümü ile pikin bitiş noktası arasındaki uzunluk

CA: Pik yüksekliğinin %10'unda, pikin bitiş noktası ile pikin tepe noktasının izdüşümü arasındaki uzunluk

### 2.3.2. Kromatografik Parametrelerin Birbiri ile İlişkisi

Hız, ayırma gücü ve kapasite faktörü birbiriyle ilişkili olduğundan bu parametrelerden herhangi birinin iyileştirilmesi diğerlerini etkiler. Bir ayırma işleminin optimizasyonu, en etkin ayırmaya ulaşıncaya kadar her bir parametrenin incelenmesi ile yapılır. Alıkonma, moleküllerin sabit faz ile etkileşim yeteneği veya matrikse olan ilgisidir. Seçicilik, minimum iki bileşik için farklı etkileşim gösteren matriksin ayırma gücüdür. Kolon verimliliği, bileşiğin kolonda hareket kolaylığıdır.

Ayırma gücü; kolon verimliliği, seçicilik ve alıkonma terimleri ile, aşağıdaki formülde belirtildiği üzere ifade edilebilir (7).

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \left( \frac{\alpha-1}{\alpha} \right) \left( \frac{k}{1+k} \right) \quad (2.8)$$

### 2.3.3. Kromatografide Hız Teorisi

Kromatografide kullanılan hız teorisi, elüsyon bantlarının genişliklerini ve biçimlerini, moleküller kolonda ilerlerken bir serbest hareket mekanizmasının geçerli olduğu varsayımı ile nicel anlamda açıklayan bir teoridir.

Normal hata eğrileri, herhangi bir tekil ölçmeye ilişkin belirsizliğin, pek çok sayıda küçük, tek başına saptanamayan ve rastgele belirsizliklerin toplamı olduğu; bu tek tek katkıların pozitif veya negatif olma ihtimallerinin eşit olduğu varsayımı ile açıklanır. Benzer şekilde, bir kromatografik bandın Gauss tipi görünüm vermesi, tek tek moleküllerin kolonda ilerlerken, rastgele hareketlerinin katkılarıyla açıklanabilir.

Kolondaki sürüklenme sırasında sabit ve hareketli faz arasında sürekli aktarılan moleküllerin her bir fazdaki kalış süreleri çok düzensizdir. Bir fazdan diğerine aktarma, enerji gerektirir ve molekül bu enerjiyi yakın çevresinden almalıdır. Böylece, bazı aktarmalardan sonra belli bir fazdaki kalış süresi çok kısa olurken, diğer bazı aktarmalardan sonra nispeten daha uzun olabilir. Sonuç olarak, bazı tanecikler şans eseri zamanlarının büyük bir kısmını hareketli fazda geçirdikleri için hızla göç ederken, diğerleri ise sabit fazda ortalamadan daha uzun süre kaldıkları için geri kalırlar. Bu tekil rastgele süreçlerin sonucunda, ortalama değer etrafına simetrik yayılmış bir hız dağılımı ortaya çıkar, bu da ortalama analit moleküllerinin davranışını gösterir.

Bant kolon boyunca ilerlerken, dağılma için daha fazla süre olması nedeniyle bant genişlemesi artar. Böylece, bant genişlemesi kolonda kalış süresi ile doğru orantılıyken hareketli faz akış hızı ile ters orantılıdır.

Bazı kromatografik pikler ideal olmayıp, bu piklerde cephe ya da kuyruk oluşumu gözlenebilir. Kuyruk oluşumunda bandın başı dik görünümde olup, sonu yayvanlaşıp kuyruklanır. Cephe oluşumunda durum tam tersidir. Kuyruk ve cephe oluşumun yaygın nedenlerinden biri dağılma sabitlerinin derişimle değişmesidir. Kolona uygulanan numune miktarı aşırı olduğunda da cephe oluşumu gözlenir. Piklerdeki bu tip yamulmalar genelde istenmeyen bir durum olup, bunlar ayırma kalitesini düşürür ve sürüklenme zamanlarının tekrarlanabilirliğini azaltır.

## **2.4. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (7)**

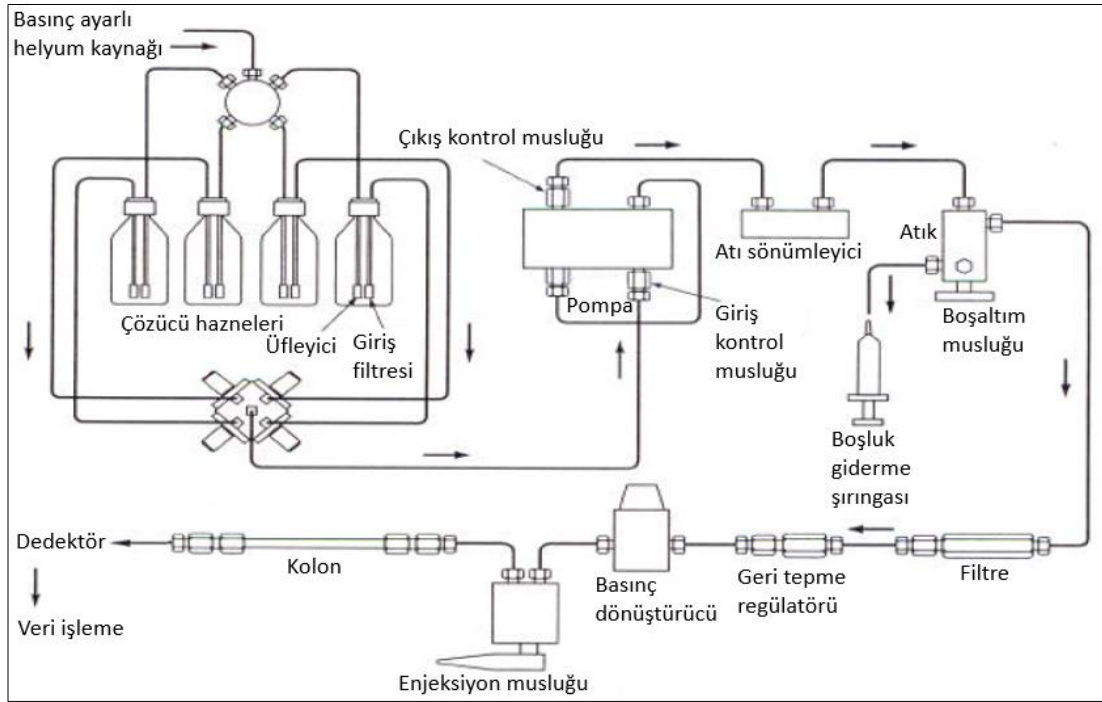
Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), biyoteknoloji ve farmasötik endüstri alanında araştırma ve geliştirme, rutin analiz ve kalite güvenliğinde uygulanan işlemlerin her basamağındaki molekülleri teşhis etmek, karakterize etmek ve saflaştırmak için kullanılan en önemli yöntemlerden biridir. Çözelti halinde, çözünür durumdaki moleküllerin ayrılması ve saflaştırılması için uygun bir yöntemdir.

HPLC, ilaçlardan proteinlere kadar uzanan geniş bir aralıkta çözünür moleküllerin saflaştırılması ve analizi için ideal olan çok yönlü ayırma tekniklerinden birisidir. Günümüzde HPLC; aminoasitler, peptitler, proteinler, karbonhidratlar, nükleik asitler ve lipitleri kapsayan biyomoleküllerin birçok sınıfının analizinde temel tekniktir.

HPLC'nin diğer tekniklere göre üstünlükleri hız, ayırma gücü, doğruluk, tekrar edilebilirlik, duyarlılık, geri kazanım, uçucu olmayan ve sıcaklıkla bozulabilen türlerin ayrılması için uygunluk ve otomasyondur.

### **2.4.1. HPLC donanımı (5, 7)**

Modern cihazlarda normal bir akış hızı elde etmek için 3-10 µm'lik dolgu maddeleriyle doldurulmuş kolonlarda birkaç yüz atmosferlik basınç uygulamaları yapılır. Bu yüksek basınç uygulaması nedeniyle HPLC cihazları, diğer kromatografi cihazlarına göre daha pahalı ve daha karmaşıktır. Tipik bir HPLC cihazının kısımları şematik olarak Şekil 2.2'de gösterilmiştir.



Şekil 2.2. HPLC cihazının şematik gösterimi (6)

### Pompalar

HPLC’de pompalar 400 bar değerine kadar olan basınçlarda ve  $\mu\text{l dk}^{-1}$ ’dan  $\text{ml dk}^{-1}$ ’a kadar geniş bir akış hızı aralığında hareketli fazı rezervuardan kolona aktaran sistemlerdir. İdeal bir HPLC pompası atısız (pulssuz) veya çok az atı ile doğru akış hızı üretmeli, bütün çözücülerle uyumlu olmalı ve sistem değişikliklerine hızla uyum sağlayabilmelidir.

HPLC’de kullanılan başlıca iki tip pompa olup, bunlar pistonlu pompalar ve vida güdümlü sürgülü pompalardır. Modern ticari HPLC cihazların büyük çoğunluğunda pistonlu pompalar kullanılır.

HPLC’de çözücü dağıtım sistemin amacı yüksek basınçlarda kolona atısı olmayan sabit ve düzenli akış sağlamaktır. Özellikle tek pistonlu pompaların neden olduğu döngüsel dalgalanmalar atı azaltıcılar ile azaltılabilir.

### Gradient Oluşturucular

İzokratik elüsyonda tek hareketli faz kullanılır ve tek pompaya gerek vardır. Tek hareketli faz ile analiz edilemeyen ve sabit faza ilgileri farklı olan maddelerin

ayırılmasında uygun alıkonma, sürüklenme ve ayırım sağlanması için birden fazla hareketli faz sistematik olarak karıştırılır. Genellikle birkaç pompadan aldığı çözücüyü karıştıran bir cihaz yardımıyla oluşturulan gradient sistem bilgisayar programı ile kontrol edilir.

*Çoklu pompalar, yüksek basınçta karıştırma:* Yüksek basınç gradientlerinde, çoklu pompalardan gelen çözücüler yüksek basınçta karıştırılır. Gradient özelliği farklı pompaların akış hızının değiştirilmesi ile kontrol edilir. Gradientin doğruluğu ve tekrar edilebilirliği akışın kesinliğine bağlıdır.

*Tekli pompalar, düşük basınçta karıştırma:* Düşük basınçta karıştırmanın kullanıldığı gradient sistemlerinde tek pompa kullanılır. Doğru oranların karışmasını sağlar. Bu sistemlerin bir sakıncası, çözücülerin karışması sırasında orijinal hacimden daha farklı bir hacim oluşması ve gaz oluşumudur.

**Karıştırıcılar:** Gradient elüsyonda tekrar edilebilirlik için çözücünün karışması önemlidir. Statik ve dinamik olmak üzere iki tip karıştırıcı bulunmaktadır.

**Gaz Giderme Ünitesi:** Bütün hareketli fazlar, özellikle floresans ve elektrokimyasal dedektörler gibi gazlara duyarlı dedektörlerin veya pompaların çalışmasını etkileyebilen çözünmüş gazlar içerir. Hareketli faz içerisinden helyum gazı geçirilerek hareketli fazda çözünmüş gazların uzaklaştırılması yaygın olarak kullanılan bir yoldur. Hareketli fazın süzülmesi sırasında vakum ve daha sonra hareketli faza belirli bir süre ultrasonikasyon uygulayarak da çözünmüş gaz giderilebilir.

### **Enjektörler**

**Manuel:** Kangal (loop) enjektörler, basınç ve akış hızında bir değişiklik olmadan geniş bir aralıktaki hacimlerin enjeksiyonunu sağlar. Kangal hacminin 2-5 katı numune hacmi kullanılarak kangalın tamamen doldurulduğu koşullarda numunenin %99'u hareketli faz ile kolona taşınır ve çalışmalar arası tekrar edilebilirlik en yüksek değerindedir.

**Otomatik Örnekleyiciler:** Otomatik numune enjeksiyonu otomatik örnekleyiciler ile gerçekleştirilir. Cihazın bu kısmı mikrolitre altı düzeylerden mililitreye kadar olan hacimlerde çok sayıda numunenin cihaza yüklenmesine olanak

sağlar. Numuneler analiz süresine bağlı olarak dakikada birkaç tane olacak sıklıkta enjekte edilebilir. Tek bir vialden çoklu enjeksiyonlar, numuneler arasında yıkama, numuneler arasında prosedürün değiştirilmesi gibi işlemler bir programlayıcı yardımıyla yapılabilir.

### **Analitik Kolon**

Kolon, HPLC sisteminde ayrılmanın gerçekleştiği yer olup, kolon dolgusu olarak kullanılan destek materyallerinin fiziksel ve kimyasal özellikleri ayrılmanın sağlanmasında önemlidir. Kolon dolguları veya destek maddeleri silikada olduğu gibi bizzat kendisi ya da polistiren ile çapraz bağlı olarak kullanılır. Destek maddeleri bazen hidrofobiklik ve iyonik yük gibi kimyasal karakteristikler kazandırmak için türevlendirilir. Sabit faz, belirli fonksiyonel gruplara olan ilgilerine göre molekülleri ayırır.

### **Fiziksel Özellikler**

Destek maddelerinin başlıca dört fiziksel parametresi; tanecik şekli, tanecik çapı, gözenek çapı ve gözeneklilik olup iyi bir dolgulu bir kolonun etkinliğinden sorumludur.

Tanecik şekli:

Dolgu tanecikleri şekil bakımından küresel tanecikler ve küresel olmayan tanecikler olmak üzere iki sınıfa ayrılır. Açısal tanecikler kolay üretim nedeniyle en ucuz olanıdır. Tanecik çapları küresel olanlara göre daha geniştir. Genellikle büyük kolonlardaki preparatif uygulamalar için kullanılan açısal tanecikler, nadiren analitik HPLC için de kullanılır. Kolona doldurulurken küresel tanecikler kadar iyi doldurulamadıkları için düşük verimlilik ve yüksek basınca neden olurlar. Küresel tanecikler, açısal taneciklere göre üstün olup, destek maddesinin homojenliğinden dolayı kolona iyi doldurulur ve iyi bir yatak oluşturur. Böyle kolonlarda akış yolu daha tekdüze olup bant genişlemesi azalmıştır. Daha tekdüze boşluklar, çalışma basıncının azalmasına ve alıkonma ile yatak kapasitesinin artmasına neden olur.

Tanecik çapı:

Verimlilik üzerine etkisi: Tanecik çapı tabaka yüksekliğine olan katkı bakımından dolgu maddelerinin en önemli fiziksel parametrelerinden biridir. Küçük tanecik çapı ile büyük olana kıyasla daha yüksek verimlilik ve dolayısıyla daha fazla ayırım elde edilir. Küçük tanecik çapları, ayırımda az bir kayıp ile daha yüksek akış hızlarının kullanımını sağlar.

Basınç üzerine etkisi: Küçük çaplı taneciklerin kullanımı, kolonda basınç artışına neden olduğundan, küçük tanecikli kolonlar basınç artışını düşük tutmak ve uygun ayırım sağlamak için 3-5 cm gibi oldukça kısa boylarda üretilirler.

Gözeneklilik: Destek maddesinin gözenekliliği, gözenek çapı ve gözeneklerin yoğunluğu açısından önemlidir. Gözenek çapı genel olarak küçük (5-10 nm), orta (10-30 nm) ve büyük ( $\geq 50$  nm) olmak üzere üç farklı boyut aralığında sınıflandırılır. Gözeneklerin yoğunluğunun fazla olması büyük gözenek hacimlerine neden olur. Gözenekli tanecikler tanecik çapı değiştirilerek üretilebilir. Düşük maliyet ve minimum basınç üretilmesi konuları dikkate alınarak çok yüksek ayırmalar için 2  $\mu\text{m}$ , preparatif ayırmalar için 100  $\mu\text{m}$  çaplarında üretilirler.

En yaygın kullanılan HPLC kolonları gözenekli dolgular içerir, ancak gözenekli olmayan türleri de üretilmiştir. Bunların tanecik çapları 1,5  $\mu\text{m}$ 'dir. Gözenekli olmayan tanecikler, gözenekler içinde alıkonan hareketli fazın neden olduğu zayıf kütle transferi ile meydana gelen bant genişlemesini ortadan kaldırır, ancak gözeneklerin uzaklaştırılması yüzey alanının ve dolayısıyla yükleme kapasitesinin azalmasına da neden olur.

### **Kimyasal Özellikler**

Silika destekler: HPLC'de kullanılan silikajel saf sodyum silikat ve bir asit veya tetraetoksisilan kullanılarak yüksek saflıkta küresel tanecikler, oldukça iyi kontrol edilebilen gözenek ve tanecik çapı elde etmek için sentezlenir. Silika hazırlamak için kullanılan iki farklı yöntem ile oldukça farklı yüzey ve fiziksel özellikler elde edilir. Sol-jel silika destekler silika solların agregatlarından hazırlanır. Genellikle A tipi silikaya göre düşük yüzey alanı, gözeneklilik ve yüzey aktiviteye sahip olan B tipi silika bu şekilde üretilir. Sol-jel silikalar çözünür silikatların



jelleştirilmesi ile hazırlanır, bu şekilde A tipi silika elde edilir ve bu tip silika B tipine göre daha asidiktir, daha büyük yüzey alanı ve gözenekli yapıya sahiptir. Ergitilmiş silika yapısı spesifik kimyasal özelliklere sahip olan birkaç farklı bağ içerir. Siloksan (Si-O-Si) bağları ağsı yapı oluşturur, taneciğe mekanik sağlamlık ve güç verir. Yüzeydeki silanol grupları izole, geminal ve visinal olmak üzere üç çeşit olup, bunların her biri siloksan kalıntısına ilave olarak spesifik kimyasal karakteristik ve reaktiviteye sahiptir. Geminal silanoller en fazla reaktif olanıdır, izole silanoller temel olarak bazik moleküllerin adsorpsiyonundan sorumludur. A tipi silika üzerinde izole silanollerin bulunması, metallerin de varlığında bazik maddeler için kullanımını sınırlar. B tipi silikalar bazik moleküller için bağl olarak daha inert bir yüzey sağlar.

Silika kromatografik bir destek olarak birçok üstünlüğe sahiptir. Silika taneciklerinin mekanik kararlılıkları iyidir, sentezlerinde gözeneklilik ve tanecik çapı kontrol edilebilir. Düşükten yükseğe gözenek aralığı, farklı mekanik kararlılık ve gözenek hacimlerine olanak sağlar. Ticari silikaların gözenek çapları 5-100 nm'dir. Silikalar, geniş bir tanecik çapı aralığında, yüksek verimlilikteki analitik çalışmalar için ( $\leq 10 \mu\text{m}$ ) ya da preparatif çalışmalar için ( $\geq 10 \mu\text{m}$ ) üretilebilir. En önemlisi silikanın yüzeyi organosilan düzenleyiciler ile kolayca ve tekrar edilebilir bir şekilde türevlendirilebilir.

Türevlendirme: HPLC kolon dolgusu olarak kullanılmadan önce silika yüzeyinin modifiye edilmesinin birkaç nedeni vardır. Bağlı fazlar, kromatografinin her bir tarzının spesifik etkileşim karakteristikleri için seçici bir kimya sunar (Tablo 2.2). Türevlendirme işlemi ile silanol yüzeyindeki spesifik olmayan etkileşimler azaltılır ya da ortadan kaldırılır. Bağlı fazlar, hareketli fazdaki aşındırıcı ajanların neden olduğu perdeleme ile silika iskeletinin kararlılığını artırır.

Silika desteğe bağlanmasına göre bağl fazlar tek tabakalı, çok tabakalı ve sandviç yapı olmak üzere üç temel grupta bulunur. Kimyasal olarak en basit bağl faz tipi fırça kaplama da denilen tek tabakalıdır. Bağl fazlar doğrudan silikaya bağlanır. Etkileşimler silika matriksinden çok uzakta gerçekleşir. İki veya üç fonksiyonlu silan biraz daha kompleks bir tabaka oluşturur. Polimerleşme, silika yüzeyinde moleküler heterojenlik yaratır. Hidrofobik etkileşimlere ek olarak polimerik bağl faz yapısı interaktif kısımlar için ayrı bir alan oluşturur, özellikle polinükleer hidrokarbonlar için

şekle bağlı seçicilik sunar. Sandviç yapı kompleksliğin daha ileri basamağı olup, bu yapıda bağlı fazlar çoklu tabakalar oluşturur. Başlangıç tabakası reaktif grup ve/veya kimyasal direnç sağlamak için silikaya bağlanır, ikinci tabaka ise istenen fonksiyonelliği sağlamak için eklenir.

Silan kimyası silika bazlı desteklerin yararlılığını değiştirmek ve artırmak için çok etkili bir araçtır. Tek tabaka kaplamada silikanın yüzeyindeki serbest hidroksiller, belirli bir fonksiyonel grup taşıyan monofonksiyonel silan ile kolayca türevlendirilebilir. Triklorosilan gibi bir reaktif kullanılarak polimerik bağlı fazlar elde edilebilir (Tablo 2.2).

Dış tabakalarında fonksiyonel gruplar içeren sandviç bağlı fazların sentezi daha karmaşıktır. Başlangıç tabakasında reaktif gruplu bir silan kullanılır ve daha sonra polimerik bir amin veya alkol ile türevlendirilir. Sandviç bağlı fazlar en çok iyon değişimi ve hidrofobik etkileşim kromatografisinde kullanılır.

**Tablo 2.2.** Spesifik kromatografik çalışmalarda kullanılan fonksiyonel gruplar (7)

R Grubu	Kromatografi Tipi
C4 (Butil) C8 (Oktil) C18 (Oktadesil, ODS)	Ters Faz
DEAE (Dietilaminoetanol) PEI (Polietilenimin) QAE (Katerneraminoetil)	Anyon Değişimi
CM (Karboksimetil) SP (Sulfopropil)	Katyon Değişimi
Gliserilpropil	Boyut Eleme
Propil (C3) Fenil	Hidrofobik Etkileşim

Silikanın sınırlamaları: HPLC’de çok kullanışlı olmalarına karşın silika destekler için bazı sınırlamalar mevcuttur. Silika pH 7’nin üzerinde çözünür ve pH 8’in üzerinde kullanılamaz. Silika çözünürlüğünün; sol-jel ya da sil-jel yapı ile ilgili kompozisyonuna, tanecik çapına, safsızlıklara, üretim işlemlerine, hidrasyonuna, yüzey alanına ve kullanılan tamponlara bağlı olduğu gösterilmiştir.

### **Koruyucu Kolon (Ön Kolon)**

Analitik kolon ile aynı fonksiyonel grubu taşıyan taneciklerden oluşan dolgu maddesini içeren koruyucu küçük bir kolondur. Geleneksel olarak, kolona tersinmez şekilde adsorbe olan bağlayıcı moleküllerden analitik kolonu korumak ve numunedeki tanecikleri süzmek için kullanılır.

### **Kolon Isıtıcıları**

Son yıllarda kolon sıcaklık kontrolü HPLC’de önemli bir konu haline gelmiştir. Havalı, su ceketli ve blok olmak üzere üç tür ısıtıcı yaygın olarak kullanılır.

### **Kolon Sabitleyici Malzemeler**

Somun ve contaların uygun olmayan kullanımı çözücü sızıntılarına, alıkonma zamanı değişikliklerine ve bant genişlemesine neden olur.

### **Dedektörler**

Kromatografi ile ayrılan herhangi bir molekül nitel ve/veya nicel olarak anlamlı sonuçlar almak için analiz edilir. Dedektörün işlevi, numune derişimi ile orantılı elektriksel bir sinyal üretmektir ve bu sinyal derişimdeki artışla doğrusal olarak artmalıdır. İdeal bir dedektörün sıcaklıktan etkilenmemesi, bant genişlemesine katkısının olmaması, kullanılan hareketli faz için sinyal üretmemesi ve numunedeki tüm analitler için derişim aralığının tamamında cevap üretmesi gereklidir. Preparatif uygulamalarda dedektör numuneye zarar vermemeli, numunenin geri kazanımına olanak sağlamalıdır. En uygun dedektörün seçiminde hareketli faz ve kromatografik sınırlamalar değerlendirilerek duyarlılık ve seçiciliğe göre karar verilir.

HPLC’de en çok kullanılan dedektörler aşağıda listelenmiştir.

1. Ultraviyole/Görünür bölge (UV/GB) dedektörler
2. Kırılma indisi (Refraktif indeks, RI) dedektörleri
3. Floresans dedektörler
4. Elektrokimyasal (EK) dedektörler
  - a. Amperometrik dedektörler
  - b. Kulometrik (yük ölçümü) dedektörler
  - c. İletkenlik (kondüktometrik) dedektörleri

5. Radyoaktivite dedektörleri
6. Işık saçılması dedektörleri
  - a. Çoklu açılı lazer ışık saçılımı (MALLS) dedektörleri
  - b. Buharlaştırılmalı ışık saçılımı (ELSD) dedektörleri
7. Kütle spektroskopisi (MS) dedektörleri

Bu tez kapsamındaki çalışmalarda UV/GB dedektörü kullanılmıştır.

**UV/GB dedektörü:** HPLC için en çok kullanılan dedektörlerdir. Sadece uygun spektral karakteristiklere sahip bileşikler saptandığı için seçici dedektörler olarak sınıflandırılır. Bu dedektörler Lambert-Beer yasasına uygun şekilde cevap üretir. Absorbans, geçen ışığın fraksiyonu ile orantılıdır.

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot c = \log \left( \frac{I_0}{I} \right) \quad (2.9)$$

Bu eşitlikte  $\varepsilon$  molar absorptivite ya da molar ekstinksiyon katsayısı,  $b$  cm biriminden hücre yol uzunluğu,  $c$  mol/litre cinsinden numune derişimi,  $I_0$  ve  $I$  sırasıyla çözücü ve analit içeren (numune) hücreden geçen ışın şiddetidir. Bir dedektörde belirli bir bileşik için ışın yolu uzunluğu ve molar ekstinksiyon katsayısının sabit olması nedeniyle absorbans sadece derişime bağlıdır.

Dedektör lambası olarak döteryum kullanıldığında 190-350 nm aralığında sürekli spektrum üretilir ve genellikle 300 nm'nin altındaki dalga boyları için kullanılır. Görünür bölge için tungsten lamba yaygın olarak kullanılır.

Sabit tek dalga boyunda çalışan dedektörler yaygın olarak civa lambasının 254 nm hattı ile çalışır ve oldukça ucuz ve duyarlıdır. Çoklu dalga boylarında çalışan dedektörler iki veya daha fazla dalga boyunda çalışma imkanı sağlayan farklı lamba ve optik filtreler sahiptir. Dalga boyu değiştirilebilen dedektörler, bir numunede bulunan farklı bileşenler için seçiciliği ve cevabı en yüksek hale getirebilmek için dalga boyu seçimine olanak sağlar. Taramalı dedektörler, akış hücresinden geçerken, analit piki için spektral bilgi toplama kapasitesine sahiptir. Tarama özelliğine sahip dedektörlerin en çok tercih edilen tipi fotodiyot dizisi (Photodiode Array, PDA) ya da

Diode Array, DAD) dedektörleridir. Spektral bilgiler kullanılarak analit ve bilinmeyen için teşhis ve pik saflığı özelliklerinin karşılaştırılması imkanı sağlar.

UV/GB dedektörlerinin üstünlükleri;

- Yüksek duyarlılık ( $10^{-11}$ - $10^{-10}$  g)
- Yüksek seçicilik
- Birçok HPLC çözücüsü ile düşük zemin sinyali üretmesi, bu yüzden gradient elüsyona uygun olması
- Numuneyi bozmaması
- Kolay çalışma imkanı

UV/GB dedektörlerinin sınırlamaları;

- Analitin absorpsiyonunun UV veya görünür bölgede olması gerekliliği
- Belirli bir dalga boyunda moleküllerin absorptivitesine bağlı olarak yanıtın değişmesi

### **Bağlantı Boruları ve Filtreler**

Bağlantı boruları kaliteli, yüksek basınçlar için paslanmaz çelik olmalıdır. Filtreler cihaz performansı için çok önemli olup, herhangi bir tanecik varlığı, kontrol ve enjeksiyon supabına, kolon ve pistonlara zarar verir. Hareketli fazın süzülmesi şarttır.

Teknolojinin ilerlemesiyle beraber, basit kromatografik sistemlerden, başta HPLC olmak üzere son derece gelişmiş kromatografi sistemleri elde edilmiştir. HPLC'ye oldukça benzer başka bir sistem olan hızlı protein sıvı kromatografisi (fast protein liquid chromatography, FPLC), kompleks karışımlardan proteinlerin ayrılmasını veya saflaştırılmasını sağlayan bir kromatografik sistemdir. HPLC'den farklı olarak daha düşük basınçlarda çalışır ve genellikle cam veya teflon bileşenlerden oluşur. Bir sıvı kromatografisi sisteminde kolon olarak, kapiler boyutta bir kolon kullanılması ve nano boyutta akış sağlayabilen pompalarla hareketli faz akış hızının  $\mu\text{l dk}^{-1}$  veya  $\text{nl dk}^{-1}$  olarak ayarlanması ile mikro-HPLC veya nano-HPLC şeklinde isimlendirilen sistemler geliştirilmiştir. Sıvı kromatografisinde en son geliştirilen sistemlerden bir diğeri de ultra performanslı sıvı kromatografisidir (ultra performance liquid chromatography, UPLC).

Hızlı protein sıvı kromatografisi FPLC: Cihaz, genellikle biyokimya ve enzimoloji alanında kullanılır. Bu yöntemde kullanılan kolonlar makromolekülleri yük, boyut, hidrofobisite veya biyotanıma esaslarına göre ayırır.

Nano-sıvı kromatografisi (Nano-LC): Nano-LC sistemleri, kapiler boyutta bir kolon ve nano boyutta akış sağlayabilen pompalar kullanılması ile geliştirilmiştir. Akış hızına ve kullanılan kolonun çapına göre nano-LC, kapiler-LC ya da mikro-LC olarak da adlandırılmaktadır. Kullanılan kapiler kolonlar ve son derece düşük hareketli faz akış hızları sayesinde küçük örnek hacimleriyle çalışılabilme, yüksek hassasiyet ve çok düşük tayin sınırları gibi birçok önemli avantaja sahip hale gelmişlerdir. Kullanılan hareketli faz hacminin mikrolitre düzeyinde olması hem analiz maliyetini düşürmekte hem de analiz sonrası atık hareketli faz eliminasyon problemini azaltmaktadır. Ayrıca kolon çapının mikro boyutta olması, klasik HPLC kolonlarında oluşan bant genişlemesi ve düşük çözünürlük problemlerini ortadan kaldırmakta ve çok daha iyi bir kromatografik ayırmaya olanak sağlamaktadır (Tablo 2.3). Bu sistemlerle birlikte kullanılan kapiler kolonlar tanecik dolgulu ya da monolitik olabilmektedir.

**Tablo 2.3.** Nano-LC sistemleri için çalışma aralıkları (7)

	Nano	Kapiler	Mikro
Akış	20-1000 nl dk <sup>-1</sup>	1-10 µl dk <sup>-1</sup>	10-50 µl dk <sup>-1</sup>
Maksimum basınç	800 bar	800 bar	800 bar
Kolon çapı	25-150 µm	150-500 µm	500-1000 µm
Bağıl duyarlık	4000	250	30
Avantaj	Duyarlık	Yükleme	Hız

Ultra performanslı sıvı kromatografisi (UPLC): UPLC, ultra yüksek hızla analiz ve ayırma sağlayan yeni tip bir sıvı kromatografi sistemidir. Bu cihazda yüksek doğruluklu 6 girişli valf sistemi kullanılmaktadır ve yaklaşık 15000 psi basınca kadar çıkılabilmektedir. Ayrıca küçük tanecik boyutlarına (2,2 µm) sahip ODS kolonları sayesinde daha keskin pikleri daha yüksek akış hızlarında da elde etmektedir. Bu yeni sistem yüksek hızın yanı sıra sonuçlarda yüksek tekrarlanabilirlik ve kesinlik imkanı da sunmaktadır.

## 2.5. Yeşil kromatografi (9)

Sıvı kromatografisi, analitik kimyadaki en fazla organik çözücü tüketimi olan yöntemlerden biridir. Bu nedenle, bu yöntemin yeşillendirilmesine çözücülerin kullanımını azaltmakla başlanabilir. ACN krizi, kromatografi çalışan bilim insanları arasında bu durumla nasıl başa çıkılacağı konusunda canlı bir tartışma başlatmıştır. ACN'den daha az toksik çözücülerin kullanımının artırılmasının çözüm sağlayabileceği konusunda bir fikir birliğine varılmış gibi görünmektedir. Son zamanlarda uzmanların bu seçenekleri uzun süreli tartışması sonucu aşağıdaki seçenekler belirlenmiştir:

**Aynı iç çapa sahip daha kısa kolonlar:** Kolon uzunluğu ( $L$ ), alıkonma zamanı ( $t_r$ ) ile doğru orantılıdır, ancak ayırıcılık, teorik tabaka sayısının ( $N$ ) karekökü (yani  $t_r$ 'nin karekökü) ile doğru orantılıdır. Kolon uzunluğunun azaltılması ve akış hızının sabit tutulması gerekli çözücü miktarını orantılı olarak azaltacaktır. Sonuç olarak, ayırıcılıkta beklenenden daha az kayıp olmuştur ve yeterli ayırım sağlanabilir. Ancak, gradiyent elüsyonu için gradiyent süresi orantılı olarak azaltılmalıdır. Koşullardaki bir değişikliğin ayırıcılık üzerinde zararlı bir etkisi olabilir, ancak bu kolaylıkla test edilebilir.

**Daha küçük taneciklere sahip daha kısa kolonlar:** Tanecik boyutundaki orantılı bir azalma, kolon uzunluğunun azalması nedeniyle ayırıcılık kaybını telafi edebilir.  $L \sim N$  olduğundan daha kısa kolonlarla çalışmak tabakalarda kayıp anlamına gelir, ancak  $N \sim 1/d_p$  ( $d_p$ , ortalama tanecik çapıdır) olduğundan tabaka sayısı artar ve ayırıcılık korunmalıdır.

**Kolon iç çapının azaltılması:** Çözücü tüketimini azaltmanın kolay bir yolu, kolon uzunluğunu azaltarak veya azaltmayarak kolonun iç çapını değiştirmektir.  $d_1$  ve  $d_n$ , daha geniş ve daha dar çaplı kolonların çapı olmak üzere azaltma faktörü  $(d_1/d_n)^2$ 'dir. Akış hızını düşürürken sabit doğrusal hızı korumak için kolon çapını azaltmak, ayırma süresinin aynı kalmasına izin verir ve yeni kromatogram orijinaline çok benzer görünmelidir. Ekstra kolon kromatografik bant genişlemesini önlemek için enjeksiyon hacmi, boru hacimleri ve dedektör akış hücresi hacminin azaltılması gerekebilir.

**Ters faz HPLC’de (RP-HPLC) farklı organik çözücülerin kullanılması:** ACN yerine kullanılacak çözücüler tetrahidrofur, izopropanol, etanol ve n-propanoldür. Bu çözücüler, HPLC uygulamaları için yüksek saflıkta mevcuttur. ACN kullanımını azaltmanın bir başka yolu, istenmeyen bileşikler HPLC kolonundan çıkarmak için farklı bir yıkama çözücüsü kullanmak olabilir.

Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Kurumu (EPA), güvenli kimyasal listesinde etanol ve izopropanol gibi çözücüler; kimyasalın, deneysel ve modellenmiş verilere dayalı olarak düşük risk kaynağı olarak doğrulandığı “yeşil” kategoride belirtirken (10), metanol ve ACN gibi çözücüler ise toksik olarak belirtmiştir (11).

**Sabit fazın tipinin veya miktarının değiştirilmesi:** Daha az hidrofobik bir sabit faz veya daha ince yüzey kaplaması ile aynı sabit fazın kullanılması organik analitlerin alıkonmasını azaltır. C18 sabit fazının C8 veya hatta C4 sabit fazı ile değiştirilmesi, RP-HPLC'deki organik modifiye edici miktarını azaltabilir ve yine de aynı tutma süresine ulaşabilir.

**İyonlaşabilir bileşikler için hareketli faz pH değerinin değiştirilmesi:** pH’ın iyonize edilebilir bileşiklerin  $pK_a$ ’sının altına düşürülmesi veya üstüne yükseltilmesi, bu bileşiklerin, organik bir çözücü kullanmaktan daha hızlı bir şekilde kolondan elüe ederek tasarruf sağlayabilir.

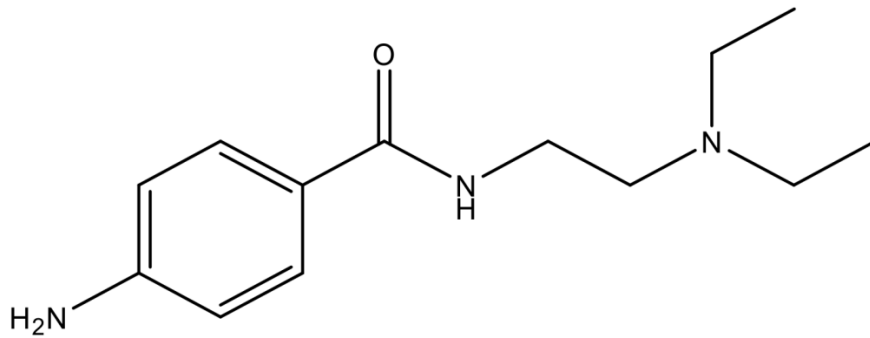
**Kolon sıcaklığının artırılması:** Yüksek sıcaklıklı HPLC, son yıllarda hızla gelişmiştir ve önemli bir yeşil kromatografi modu olarak daha kapsamlı bir işlemi hak etmektedir. Kromatograflar, HPLC’de bir optimizasyon parametresi olarak sıcaklığı sıklıkla göz ardı eder, ancak bu seçicilikte önemli bir rol oynayabilir çünkü sıvı kromatografik ayırmanın neredeyse tüm fiziksel parametreleri buna bağlıdır. İki fazlı su-organik sisteminin sıcaklığı arttıkça, alıkonma azalır. Çoğu HPLC ayırması şu anda 18-30°C arasında değişen sıcaklıklarda, yani oda sıcaklığında gerçekleştirilmektedir. Kolon sıcaklığı daha yüksekse, “yüksek sıcaklık HPLC” terimi sıklıkla kullanılır.

## 2.6. Prokainamid

Prokainamid, 60 yıldan uzun süredir supraventriküler veya ventriküler aritmiyi tedavi etmek için yaygın olarak kullanılan bir tip IA kardiyak antiaritmik ilaçtır (12, 13) ve hemodinamik olarak tolere edilen, sürekli, monomorfik ventriküler taşikardinin



tedavisinde tercih edilir (14-16). Bu terapötik endikasyonların yanı sıra, prokainamidin başka farmakolojik etkilere sahip olduğu, örneğin sisplatinin hepatotoksik ve nefrotoksik etkilerini azalttığı ve bir sıçan sepsis modelinde anti-enflamatuar etkilere sahip olduğu bildirilmiştir (17, 18). Bununla birlikte, prokainamid, hipotansiyon, polimorf ventriküler taşikardi, lupus benzeri sendrom veya agranülositoz gibi potansiyel olarak ciddi yan etkilere sahiptir ve dar terapötik penceresi ile uygulanabilirliği sınırlıdır (13, 19-21). Prokainamidin kimyasal yapısı Şekil 2.3'te gösterilmiştir.



**Şekil 2.3.** Prokainamidin kimyasal yapısı (21)

Prokainamid genellikle ağızdan toplam 3-6 g gün<sup>-1</sup> dozunda verilir. Biyoyararlanımı yüksektir ve doruk plazma konsantrasyonlarına tablet alımından 1-2 saat sonra ulaşılır. Protein bağlanması sadece %10-20'dir ve eliminasyon yarı ömrü oldukça kısadır (3-5 saat). Bu nedenle, bu ilacın uzun süreli olarak kullanılacağı durumlarda genellikle uzun etkili formülasyonlar reçete edilir. Prokainamidin yaklaşık % 40-70'i glomerüler filtrasyon ve aktif tübüler sekresyon yoluyla idrarla değişmeden atılır (22). Prokainamidin yaklaşık %16-30'u hepatic N-asetiltransferazlar tarafından asetillenerek N-asetilprokainamid'i (NAPA) oluşturur. NAPA'ya metabolizmanın oranı, "yavaş asetilatörlerde" yaklaşık %16-20 ve "hızlı asetilatörlerde" %25-30'dur (19, 23). NAPA böbrekler yoluyla atılır ve ayrıca sınırlı metabolizmaya uğrar.

Prokainamidin değişik matrislerden analizi için geliştirilmiş bazı spektrofotometrik (24), elektrokimyasal (25-27) ve spektrofotometrik (28) yöntemler ile gaz kromatografisi (29), kapiler elektroforez (30) ve Raman spektroskopisi (31)

yöntemleri bildirilmiş olup, bunların yanı sıra HPLC yöntemleri de yayınlanmıştır (Tablo 2.4).

**Tablo 2.4.** Prokainamid için HPLC ile analiz yöntemleri

Çalışma No	Yıl	Matris	Kolon	Hareketli Faz	Kolon Sıcaklığı (°C)	Akış Hızı (ml dk <sup>-1</sup> )	Dedektör	Kaynak No
1	1976	Serum	ODS-Sil-X-1 (0,5 m x 2,6 mm)	ACN : 0,2 M fosfat tamponu pH 6,0 (10 : 90, h/h)	40	2	UV 205 nm	(32)
2	1976	Plazma	µBondapak C18 (30 cm x 4 mm, 10 µm)	4 g sodyum asetat + 1000 ml distile su + 40 ml asetik asit + 50 ml ACN	Oda sıcaklığı	2	UV 254 nm	(33)
3	1977	Plazma Serum	µBondapak C18 (30 cm x 4 mm)	Metanol : su karışım (40:60, h/h) : glasiyel asetik asit (99:1, h/h)	Oda sıcaklığı	2	UV 280 nm	(34)
4	1991	Plazma	Spherisorb-hexyl (150 x 4,6 mm, 5 µm)	ACN : metanol : 15 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 3 (10:10:80, h/h/h) (+ %0,1 trietilamin)	Oda sıcaklığı	1	UV 230 nm	(35)
5	1997	Plazma	Supelcosil ABZ <sup>+</sup> Plus C18 (150 mm x 2,1 mm, 5 µm)	Metanol : 0,005 M Tris (hidroksimetil) aminometan hidroklorür (pH 7,0) (20:80, h/h)	-	0,2	UV 280 nm	(36)
6	2005	Plazma	Polaris C18 (50 mm x 3 mm, 3 µm)	ACN : % 0,1 formik asit içeren su (80:20, h/h)	40	0,2	MS 236,30 → 163,10	(37)

**Tablo 2.4.** Prokainamid için HPLC ile analiz yöntemleri (devam)

7	2009	Plazma	Cosmosil 5 C18-MS (50 mm x 4.6 mm, 5 µm)	Metanol : %0,5 formik asit (50:50, h/h)	Oda sıcaklığı	0,45	MS 236 → 163	(38)
8	2010	Serum	Kromasil C18 (250 mm x 4.6 mm, 5 µm)	0,05 M SDS : butanol pH 7,0 (1:99, h/h)	25	1	UV 280 nm	(39)
9	2011	Plazma	ShinPack C18 (100 x 4.6 mm; 5 µm)	Metanol : %0,03 (h/h) formik asit içeren 2 mM sulu amonyum asetat (33:67, h/h)	30	1	MS 236 → 163	(40)
10	2017	İdrar	Luna C18 (150 × 4,6 mm, 5 µm)	0,005 mol l <sup>-1</sup> SDS ve 0,025 mol l <sup>-1</sup> NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> tamponu (pH 5,0) karışımı : ACN 72:28 (h/h)	40	1	UV 200 nm	(41)
11	2018	Sıçan plazması	Synergi™ eter bağlı fenil polar sonradan kapatmalı, polar ters faz (150 × 2,0 mm, 4 µm)	% 1 asetik asit : metanol (76:24, h/h), pH 5,5 (% 0,01 trietilamin)	25	0,2	UV 280 nm	(21)

### 2.6.1. Terapötik İlaç Monitörizasyonu ve Prokainamid

TDM ile kandaki ilaç konsantrasyonları terapötik aralıkta tutularak hem tedaviden optimum verim alınması hem de muhtemel ilaç toksisitesi riskinin en aza indirilmesi hedeflenir. TDM, sadece ilacın kan konsantrasyonunu ölçmek ve ölçülen değeri referans aralığı ile kıyaslamak olarak değerlendirilmemelidir. TDM ile öncelikle ilaç hastanın klinik durumuna (yaş, kilo, böbrek fonksiyonu vb.) göre kişiselleştirilerek ve kullanılan diğer ilaçlar göz önünde tutularak ilacın uygun doz ve dozaj formu seçilir. İlaç kan düzeyi takibinde örnekleme zamanı, kararlı duruma ulaşılması ve istenen klinik hedef gibi faktörler değerlendirilerek, ilaçtan minimum toksisiteyle en uygun cevabın alınabilmesi için dozun uygun şekilde ayarlanması sağlanır. İlaç kan düzeyi bakılmasını gerektiren durumlar aşağıda listelenmiştir (42).

- Hastanın tedaviye uyuncunun kontrol edilmesi,
- İlaç başlandıktan sonra kararlı duruma ulaşılması,
- İlaç dozunda değişiklik yapıldıktan sonra kararlı duruma ulaşılması,
- İlacın toksisitesinden şüphelenilmesi,
- İlacın klerensinde değişiklik olmasından şüphelenilmesi,
- Tedaviye yetersiz cevap alınması,
- Olası ilaç etkileşimleri.

Prokainamid tedavisi izlenirken, önemli antiaritmik etkiye, özellikle Sınıf III aktiviteye (potasyum kanal blokajı yoluyla aksiyon potansiyelinin uzaması) sahip olan prokainamidin serum seviyesi uyuncun ve terapötik aralıkta olup olmadığının değerlendirilmesi amacıyla izlenmektedir. Hepatik ve/veya renal hastalık prokainamid atılımını etkileyeceği için bu durumda TDM göz önünde bulundurularak prokainamid dozu azaltılmalıdır. Hepatik metabolizmayı ve renal fonksiyonu etkileyen kalp yetmezliği de doz azaltılmasını gerektirebilir.

Plazmadaki prokainamid ile NAPA arasındaki oran, bireydeki asetilatör durumuna bağlı olup, yavaş asetilatörler NAPA/prokainamid oranını düşürür. Prokainamidin terapötik plazma konsantrasyonunun 4-12  $\mu\text{g ml}^{-1}$  aralığında olduğu bildirilmiştir (43).

### 3. GEREÇLER VE YÖNTEM

#### 3.1. Cihazlar

HPLC sistemi

- Gaz giderici	Shimadzu Prominence DGU-20A5
- Pompa	Shimadzu Prominence LC-20AB
- Oto örnekleme	Shimadzu Prominence SIL-20 AC HT
- Kolon bağlantı bölümü	Shimadzu Prominence CTO-20AC
- UV dedektör	Shimadzu Prominence SPD-M20A
- Veri kaydedici bağlantı modülü	Shimadzu Prominence CBM-20A
- Veri analiz programı	Shimadzu LC Solution Software

Otomatik mikropipet Socorex (10-100 µl/100-1000 µl)

pH metre Mettler Toledo MA235

Hassas terazi Mettler Toledo AG285

Ultrasonik banyo Bandelin Sonorex Super RK 514 BH

Vorteks karıştırıcı IKA Vortex Genius 3

Saf su sistemi Barnstead NanoPure Diamond

#### 3.2. Kimyasal Maddeler

Prokainamid hidroklorür	$C_{13}H_{21}N_3O.HCl$ , Sigma-Aldrich
Parasetamol	$C_8H_9NO_2$
Etanol	$C_2H_6O$ , Isolab (%99,9) HPLC Saflıkta
Sodyum dihidrojen fosfat dihidrat	$NaH_2PO_4.2H_2O$ , Merck
Benzil alkol	$C_7H_8O$
Sodyum bisülfid	$NaHSO_3$
Urasil	$C_4H_4N_2O_2$

### 3.3. Sarf Malzemeleri

Kolon	Nucleodur 100-5 C8 ec
	Tanecik çapı 5 µm, 150 x 4,6 mm

### 3.4. Deneyler için Gerekli Hazırlıklar

#### 3.4.1. Çözeltilerin Hazırlanması

**Prokainamid stok çözeltisi (1000 µg ml<sup>-1</sup>):** 10 mg prokainamid hassas terazide tartılıp 10 ml'lik balon jojeye aktarılmış, bir miktar saf suda çözüldükten sonra hacmi saf su ile 10 ml'ye tamamlanmıştır.

**Prokainamid stok çözeltisi (100 µg ml<sup>-1</sup>):** 1000 µg ml<sup>-1</sup> prokainamid stok çözeltisinden mikropipet yardımıyla 1 ml alınıp 10 ml'lik balon jojeye aktarılmış, daha sonra hacmi saf su ile 10 ml'ye tamamlanmıştır.

**Prokainamid stok çözeltisi (25 µg ml<sup>-1</sup>):** 100 µg ml<sup>-1</sup> prokainamid stok çözeltisinden mikropipet yardımıyla 2,5 ml alınıp 10 ml'lik balon jojeye aktarılmış, daha sonra hacmi saf su ile 10 ml'ye tamamlanmıştır.

**Prokainamid stok çözeltisi (200 µg ml<sup>-1</sup>):** 1000 µg ml<sup>-1</sup> prokainamid stok çözeltisinden mikropipet yardımıyla 2 ml alınıp 10 ml'lik balon jojeye aktarılmış, daha sonra hacmi saf su ile 10 ml'ye tamamlanmıştır.

**Parasetamol (iç standart, IS) stok çözeltisi (1000 µg ml<sup>-1</sup>):** 10 mg parasetamol hassas terazide tartılıp 10 ml'lik balon jojeye aktarılmış, bir miktar saf suda çözüldükten sonra hacmi saf su ile 10 ml'ye tamamlanmıştır.

**50 mM fosfat tamponu:** 15,6 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O tartılıp 2000 ml'lik balon jojeye aktarılmış, bir miktar saf suda çözüldükten sonra hacmi 2000 ml'ye saf su ile tamamlanmıştır.

**Urasil stok çözeltisi (1000 µg ml<sup>-1</sup>):** 10 mg urasil hassas terazide tartılıp 10 ml'lik balon jojeye aktarılmış, bir miktar saf suda çözüldükten sonra hacmi saf su ile 10 ml'ye tamamlanmıştır. Bu stok çözeltiden 10 µl alınıp hareketli fazla 1 ml'ye

seyreltilerek elde edilen çözelti, kromatografik sistemin ölü hacim alıkonma zamanının ( $t_0$ ) saptanmasında kullanılmıştır.

### **3.4.2. Farmasötik Preparattan Analiz için Çalışma Standardı, Plasebo ve Sentetik Preparat Çözeltilerinin Hazırlanması**

Prokainamid standartları, stok çözeltilerden hazırlanacak derişim için gereken hacimde prokainamid alınıp, üzerine 10 µl IS stok çözeltisi eklendikten sonra hareketli faz ile 1000 µl'ye seyreltilerek hazırlanmıştır.

Plasebonun hazırlanmasında, %0,9 (a/h) benzil alkol ve %0,09 (a/h) sodyum sülfid tartılıp 10 ml'lik balon jojeye aktarılmış, bir miktar suda çözüldükten sonra hacmi 10 ml'ye tamamlanıp pH 5'e ayarlanmıştır. Sentetik preparat plaseboya 10 ml de 1 g olacak biçimde prokainamid eklenerek hazırlanmıştır. Analize hazırlanmak üzere sentetik preparat çözeltisinden 10 µl alınıp hareketli faz ile 1 ml'ye tamamlanarak derişimi 1000 µg ml<sup>-1</sup> olacak şekilde seyreltilmiştir.

Plasebo ve sentetik preparat enjeksiyonlarında, bu numunelere, prokainamid standartına eklenen derişimde IS eklendikten sonra hareketli faz ile 1000 µl'ye seyreltilerek hazırlanmış ve enjeksiyon yapılmıştır.

### **3.4.3. Plazma Standartları ve Kalite Kontrol Numunelerinin Hazırlanması**

Plazma çalışma standartları ve kalite kontrol numunelerinin hazırlanması için prokainamid stok çözeltilerinden gerekli hacimde alınmış ve toplam hacim 200 µl olacak şekilde plazma ile seyreltilmiştir. Daha sonra 200 µl etanol eklenerek vorteks karıştırıcıda karıştırılmış, 15000 dev dk<sup>-1</sup>'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Her bir standardın 100 µl hacimdeki süpernatanı vialine aktarılmış, derişimi 10 µg ml<sup>-1</sup> olacak şekilde IS eklenmiş ve üzerine toplam hacim 200 µl olacak şekilde hareketli faz eklenerek analize hazır hale getirilmiştir.

## **3.5. Prokainamidin Farmasötik Preparattan ve Plazmadan Analizi Yöntemlerinin Validasyonu**

Geliştirilen farmasötik ve biyoanalitik yöntemlerin validasyonunda yasal otoriteler tarafından kabul edilen rehberler esas alınmıştır. Bu bağlamda, prokainamidin farmasötik preparattan analizi için özgünlük, doğrusalılık, doğruluk,



kesinlik, gözlenebilme sınırı, alt tayin sınırı, sağlamlık, tutarlılık ve sistem uygunluk testi çalışmaları yapılmıştır (44). Prokainamidin plazmadan analizi için kararlılık, özgünlük, doğrusallık ve aralık, doğruluk ve kesinlik, duyarlılık, matriks etkisi, seyreltme etkisi, taşınma, geri kazanım ve kalite kontrol testleri yapılmıştır (45, 46).

### **3.5.1. Özgünlük**

Prokainamidin farmasötik preparattan analizi yönteminin özgünlüğünün belirlenmesi çalışmalarında plasebo, sentetik preparat ve prokainamid ile IS içeren standart çözeltinin enjeksiyonları yapılmıştır. Plazmadan analiz yönteminde ise özgünlüğün saptanması için boş plazma, prokainamid eklenmiş plazma, prokainamid ve IS eklenmiş plazma ve prokainamid standardı enjekte edilmiştir. Her iki matrikste de elde edilen kromatogramlar görsel olarak karşılaştırılmıştır.

### **3.5.2. Gözlenebilme Sınırı ve Alt Tayin Sınırı**

Prokainamidin farmasötik preparattan ve plazmadan analizi yöntemlerinde gözlenebilme sınırı, sinyal/gürültü oranı en az 3 olduğunda saptanabilen en küçük prokainamid derişimi; alt tayin sınırı ise sinyal/gürültü oranı en az 10 olduğunda saptanan en küçük prokainamid derişimi olarak alınmıştır. Gürültü sinyali olarak farmasötik analizlerde plasebo, plazmandan analizlerde boş plazma matriks enjeksiyonlarında prokainamid alıkonma zamanındaki zemin sinyali alınmıştır.

### **3.5.3. Doğrusallık ve Aralık**

Prokainamidin preparattan analizi yönteminde, 1,0; 2,0; 5,0; 10,0; 20,0; 30,0; 40,0 ve 50,0  $\mu\text{g ml}^{-1}$  derişimindeki prokainamid standartları her bir çözeltiliye iç standart olarak 1000  $\mu\text{g ml}^{-1}$  derişimindeki parasetamol çözeltilisinden 10  $\mu\text{l}$  eklendikten sonra hareketli faz ile 1 ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır. Prokainamidin plazmadan analizi yönteminde prokainamid standartları 1,5; 2,0; 2,5; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0 ve 30,0  $\mu\text{g ml}^{-1}$  derişiminde ve IS 10  $\mu\text{g ml}^{-1}$  derişiminde olacak şekilde hazırlanmıştır. Bu standart çözeltiler, doğrusallık aralığını saptamak için analiz edilmiştir.

Prokainamidin her iki matristeki analizleri için kalibrasyon eğrileri, prokainamid derişimine karşı, prokainamid pik alanının iç standart pik alanına oranının grafiğe geçirilmesiyle oluşturulmuştur. Kalibrasyon eğrilerinin ait regresyon

denklemleri ve korelasyon katsayısı hesaplanmış, istatistiksel değerlendirilmeleri yapılmıştır (Bkz. Ek-1).

#### **3.5.4. Doğruluk**

Prokainamidin farmasötik preparattan analizinde doğruluk çalışmaları 1,0; 10,0 ve 40,0  $\mu\text{g ml}^{-1}$  derişimlerinde hazırlanan prokainamid standart çözeltiyle, plazmadan analizinde ise 1,5; 5,0; 10,0 ve 20,0  $\mu\text{g ml}^{-1}$  derişimlerinde hazırlanan plazma standartları kullanılarak yapılmıştır. Sonuçlar, % bağıl hata (BH) hesaplanarak değerlendirilmiştir (Bkz. Ek-2).

Geri kazanma çalışmalarında, farmasötik preparattan analiz için 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , plazmadan analiz için 10  $\mu\text{g ml}^{-1}$  derişiminde prokainamid standart çözeltileri hazırlanmış ve analiz edilmiştir (n = 6). Sonuçlar % geri kazanma olarak verilmiştir.

#### **3.5.5. Kesinlik**

Prokainamidin farmasötik preparattan analizinde doğruluk çalışmaları 1,0; 10,0 ve 40,0  $\mu\text{g ml}^{-1}$  derişimlerinde hazırlanan prokainamid standart çözeltiyle, plazmadan analizinde ise 1,5; 5,0; 10,0 ve 20,0  $\mu\text{g ml}^{-1}$  derişimlerinde hazırlanan plazma standartları kullanılarak yapılmıştır. Bulgular, % bağıl standart sapma (BSS) hesaplanarak değerlendirilmiştir (Bkz. Ek-2).

#### **3.5.6. Sağlamlık ve Tutarlılık**

Prokainamidin farmasötik preparattan analizi yöntemi için sağlamlık çalışmaları kapsamında, akış hızı, kolon sıcaklığı, tampon derişimi ve hareketli faz bileşiminde optimum değerlerinden bilerek yapılan küçük değişimlerin analiz sonuçlarına etkisi incelenmiştir. Tutarlılık çalışmasında ise aynı numuneyi aynı koşullarda analiz eden farklı iki analizcinin sonuçlara etkisi incelenmiştir. Bulguların istatistiksel olarak değerlendirilmesinde, sağlamlık testi için t-testi yöntemi (Bkz. Ek-3), tutarlılık testi için Mann-Whitney U testi yöntemi (Bkz. Ek-4) kullanılmıştır.

#### **3.5.7. Sistem Uygunluk Testi**

Prokainamidin farmasötik analizi yönteminin sistem uygunluğu testinde, prokainamid standart çözeltisi geliştirilen yöntem ile analiz edilmiştir. Sistem uygunluk testi için prokainamidin 10  $\mu\text{g ml}^{-1}$  derişimindeki standart çözeltinin 10

tekrarlı enjeksiyonu sonucunda elde edilen veriler kullanılmıştır. Prokainamid piki Amerikan Farmakopesi (47), Avrupa Farmakopesi (48) ve Türk Farmakopesi'nde (49) belirtilen parametre ve kriterlere göre değerlendirilmiştir.

### 3.5.8. Taşınma

Yöntem geliştirme sırasında taşınmanın en aza indirilmesi gerekmektedir. Taşınma etkisinin kontrol edilmesi amacıyla kalibrasyon eğrisinin en üst derişim değeri (ULOQ)'ndeki kalibrasyon standardından sonra boş plazma enjeksiyonu yapılmıştır.

### 3.5.9. Matriks Etkisi

Matriks etkisi çalışmalarında düşük ( $2 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) ve yüksek ( $20 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) derişimdeki QC'lerin 3 tekrarlı enjeksiyonu yapılmış ve matriks etkisi aşağıdaki denklem ile hesaplanmıştır.

$$\% \text{ ME} = \frac{\text{Standart çözeltideki prokainamid pik alanının IS pik alanına oranı}}{\text{Matriksteki prokainamid pik alanının IS pik alanına oranı}} \times 100 \quad (3.1)$$

### 3.5.10. Seyreltme Etkisi

Geliştirilen yöntemdeki seyreltme etkisinin gözlenmesi amacıyla, doğrusallık aralığının üst noktasının üzerindeki bir derişimde ( $40 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) örnek hazırlanmış, her biri, son derişimi doğrusallık aralığında olacak şekilde seyreltilmiş ve analizi yapılmıştır (n=5).

### 3.5.11. Kararlılık Testleri

Oto örnekleyici, oda sıcaklığı, kısa dönem ve uzun dönem kararlılık testleri için plazmada  $5$  ve  $15 \mu\text{g ml}^{-1}$  derişiminde hazırlanan prokainamid standartları kullanılmıştır. Her iki derişimde de hazırlanan prokainamid standartları oto örnekleyici ve oda sıcaklığındaki kararlılık testleri için 6, 12 ve 24 saat bekletilmiştir (n=3). Kısa dönem kararlılık çalışmaları için hazırlanan prokainamid standartları oda sıcaklığında, uzun dönem kararlılık çalışmaları için hazırlanan prokainamid standartları dondurucuda bekletilmiştir (n=3).

Donma-çözülme döngüsündeki kararlılık çalışmaları için plazmada 5 ve 20  $\mu\text{g ml}^{-1}$  derişiminde hazırlanan prokainamid standartları, 3 donma-erime döngüsünde incelenmiş, dondurucuda bekletilen plazma standartları oda sıcaklığında çözülüp analiz edilmiştir (n=3).

### **3.5.12. Kalite Kontrol (QC) Numuneleri**

Prokainamid için plazmada kalite kontrol numuneleri 1,5; 5,0; 10,0 ve 20,0  $\mu\text{g ml}^{-1}$  derişiminde hazırlanmış, her derişim düzeyi için 3 gün x 5 QC numunesi olacak biçimde analiz edilmiştir.

### **3.5.13. Kalite Kontrol (QC) Kartları**

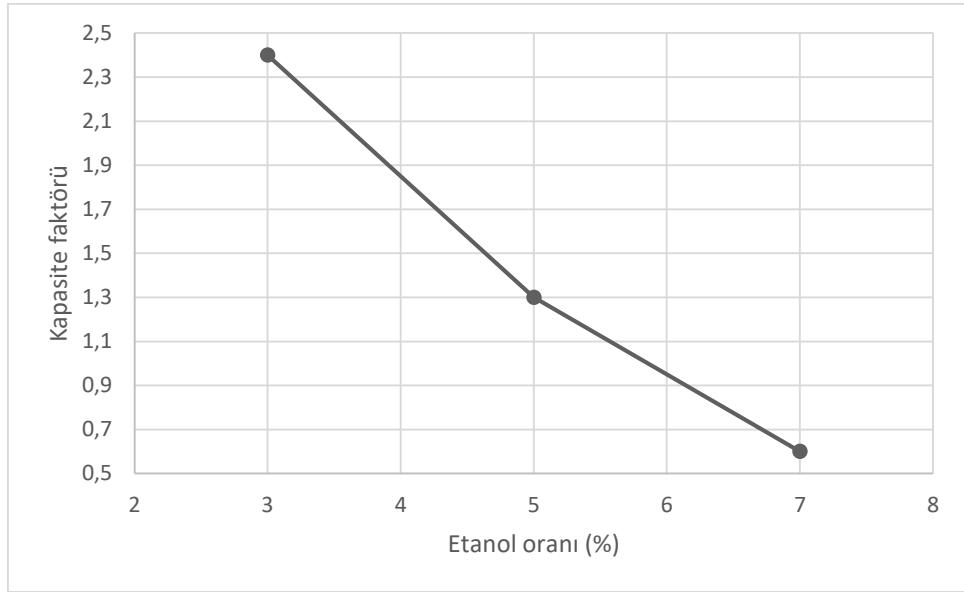
Bir biyoanalitik analiz yöntemi sonuçlarının uzun dönem güvenilirliğinin değerlendirilmesi amacıyla kullanılan kalite kontrol kartları prokainamidin plazmadan analiz yöntemi için derişimin izlenmesi ile oluşturulmuştur. Bu amaçla, prokainamid kalite kontrol numuneleri boş plazmada 10  $\mu\text{g ml}^{-1}$  derişiminde olacak biçimde hazırlanmış farklı günlerde analiz edilmiş (n=10) ve her analizde hesaplanan prokainamid derişim değeri analiz numarasına karşı grafiğe geçirilerek kalite kontrol kartı oluşturulmuştur. Prokainamid derişim değerlerinin ortalama değeri hedef değer (ortalama değer), ortalama  $\pm 2$  standart sapma aralığı uyarı bölgesi ve ortalama  $\pm 3$  standart sapma aralığı kontrol bölgesi olarak belirlenmiştir (50).

## 4. BULGULAR

### 4.1. Yöntemin Optimizasyonu

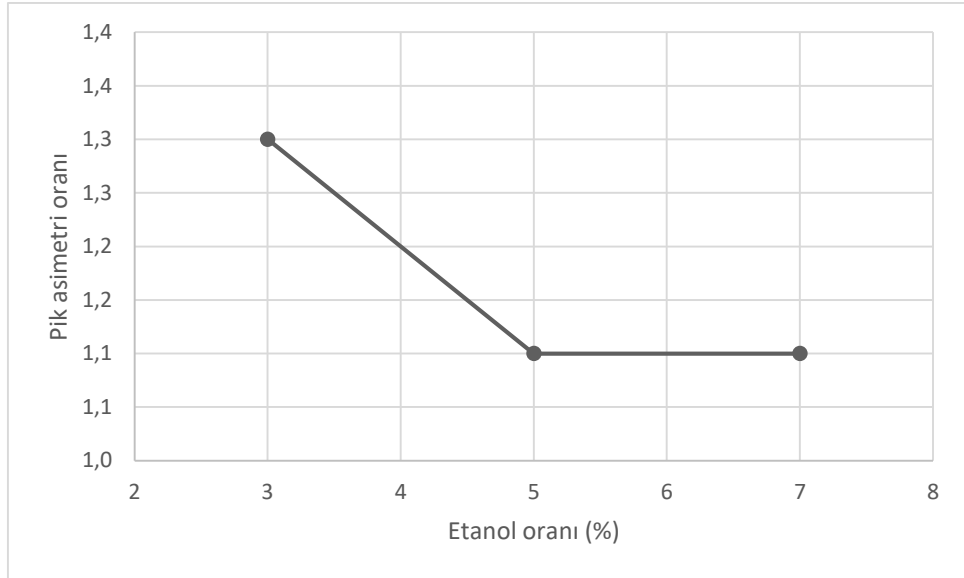
#### 4.1.1. Hareketli Faz Bileşiminin Belirlenmesi

Prokainamid elüsyonu için yeşil çözücülerden olan etanolün en uygun oranının belirlenmesi amacıyla hacimce %3, %5 ve %7 oranında etanol hareketli faza eklenerek prokainamidin kromatografik parametrelerine etkisi incelenmiştir (Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4 ve Tablo 4.1).



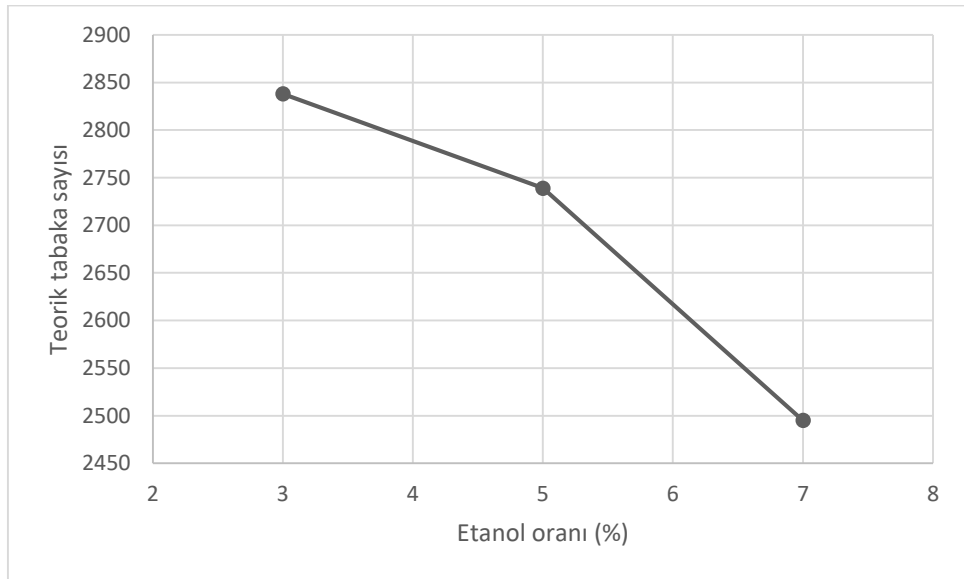
**Şekil 4.1.** Etanol oranı ile kapasite faktörünün değişimi

(Kromatografik koşullar: Tampon: 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Hareketli faz: etanol:tampon  
Akış hızı: 1,0 ml dk<sup>-1</sup>, Kolon: C8, Kolon sıcaklığı: 35°C, Dedektör: UV 279 nm)



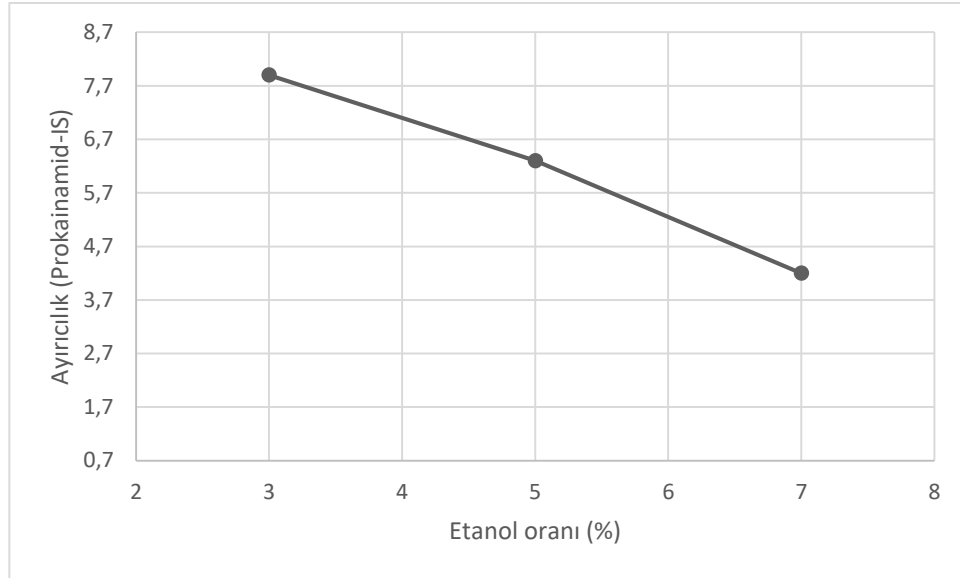
**Şekil 4.2.** Etanol oranı ile pik asimetri oranının değişimi

(Kromatografik koşullar: Tampon: 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Hareketli faz: etanol:tampon, Akış hızı: 1,0 ml dk<sup>-1</sup>, Kolon: C8, Kolon sıcaklığı: 35°C, Dedektör: UV 279 nm)



**Şekil 4.3.** Etanol oranı ile teorik tabaka sayısının değişimi

(Kromatografik koşullar: Tampon: 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Hareketli faz: etanol:tampon, Akış hızı: 1,0 ml dk<sup>-1</sup>, Kolon: C8, Kolon sıcaklığı: 35°C, Dedektör: UV 279 nm)



**Şekil 4.4.** Etanol oranı ile ayırıcılığın değişimi

(Kromatografik koşullar: Tampon: 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Hareketli faz: Tampon:etanol, Akış hızı: 1,0 ml dk<sup>-1</sup>, Kolon: C8, Kolon sıcaklığı: 35°C, Dedektör: UV 279 nm)

**Tablo 4.1.** Hareketli fazdaki etanol miktarının kromatografik parametrelere etkisi

EtOH (%)	t (dk)	k'	PAO	N	R	$\alpha$
3	7,9	2,4	1,3	2838	7,9	2,0
5	5,0	1,3	1,1	2739	6,3	2,0
7	3,6	0,6	1,1	2495	4,2	2,0

EtOH: Etanol, t: Alikonma zamanı, k': Kapasite faktörü, PAO: Pik asimetri oranı, N: Teorik tabaka sayısı, R: Ayırıcılık,  $\alpha$ : Seçicilik

Hareketli faza eklenen tampon derişiminin saptanması amacıyla yapılan çalışmalarda elde edilen veriler Tablo 4.2'de verilmiştir.

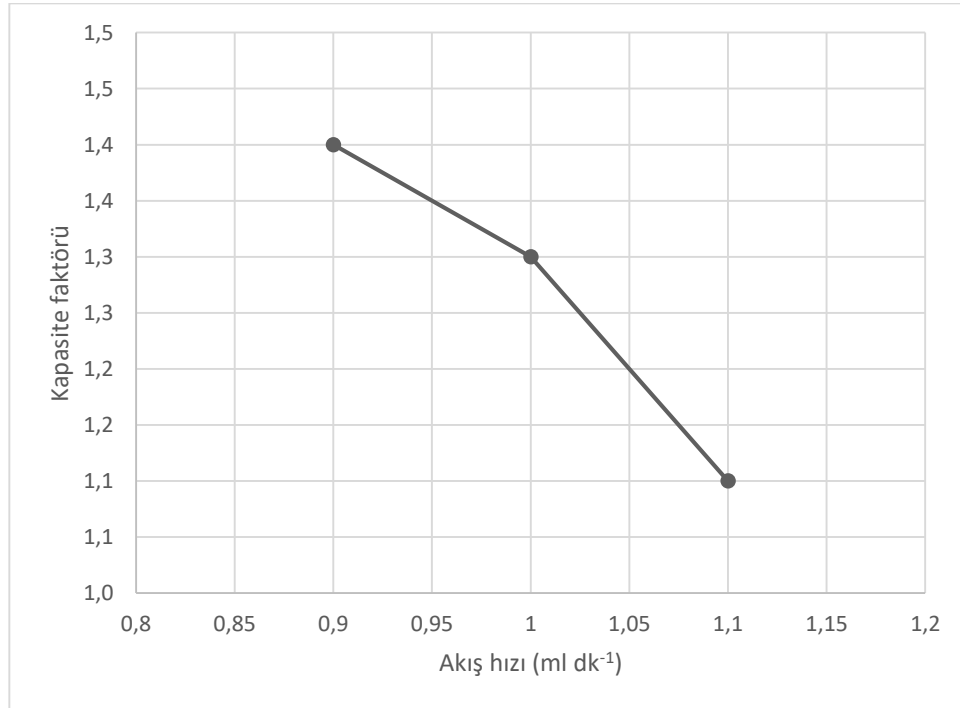
**Tablo 4.2.** Hareketli fazdaki tampon derişiminin kromatografik parametrelere etkisi

Tampon Derişimi (mM)	t (dk)	k'	PAO	N	R	$\alpha$
0	-	-	-	-	-	-
40	6,5	1,8	1,1	1754	5,3	2,0
50	5,0	1,3	1,1	2739	6,3	2,0

t: Alıkonma zamanı, k': Kapasite faktörü, PAO: Pik asimetri oranı, N: Teorik tabaka sayısı, R: Ayrıcılık,  $\alpha$ : Seçicilik

#### 4.1.2. Hareketli Faz Akış Hızının Belirlenmesi

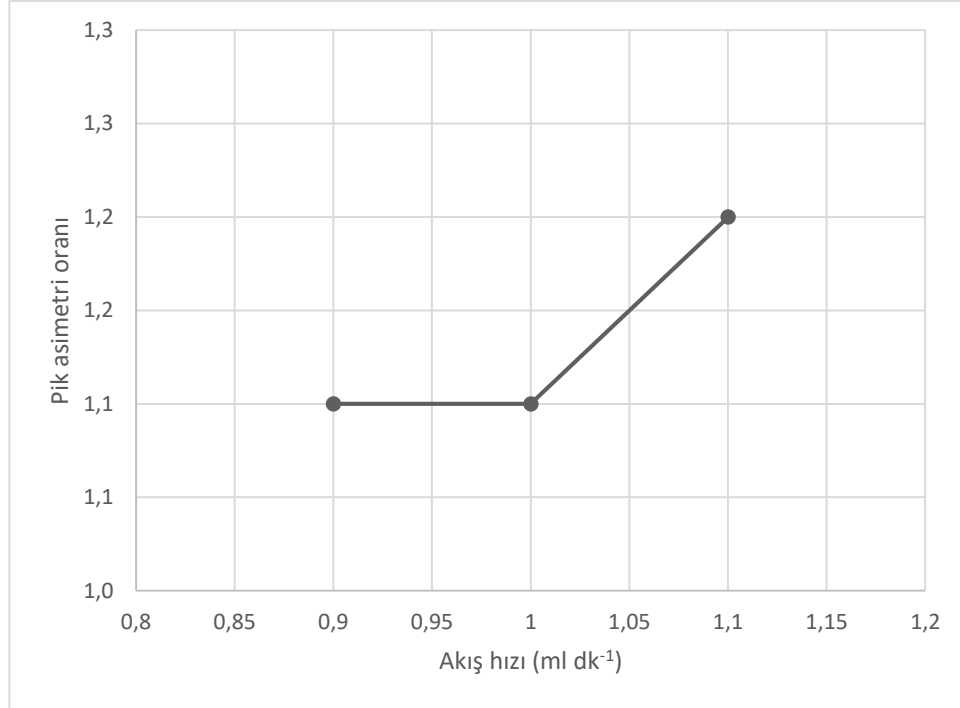
Hareketli faz akış hızının prokainamid ayırımına etkisinin incelenmesinde etanol:50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tamponu (5:95, h/h) içeren hareketli faz kullanılmıştır. Hareketli faz kolondan 0,9; 1,0 ve 1,1 ml dk<sup>-1</sup> akış hızlarında geçirilerek akış hızı değişiminin prokainamid ayırımına etkisi kromatografik parametrelerdeki değişim üzerinden incelenmiştir (Şekil 4.5, Şekil 4.6, Şekil 4.7, Şekil 4.8 ve Tablo 4.3).



**Şekil 4.5.** Hareketli faz akış hızı ile kapasite faktörünün değişimi

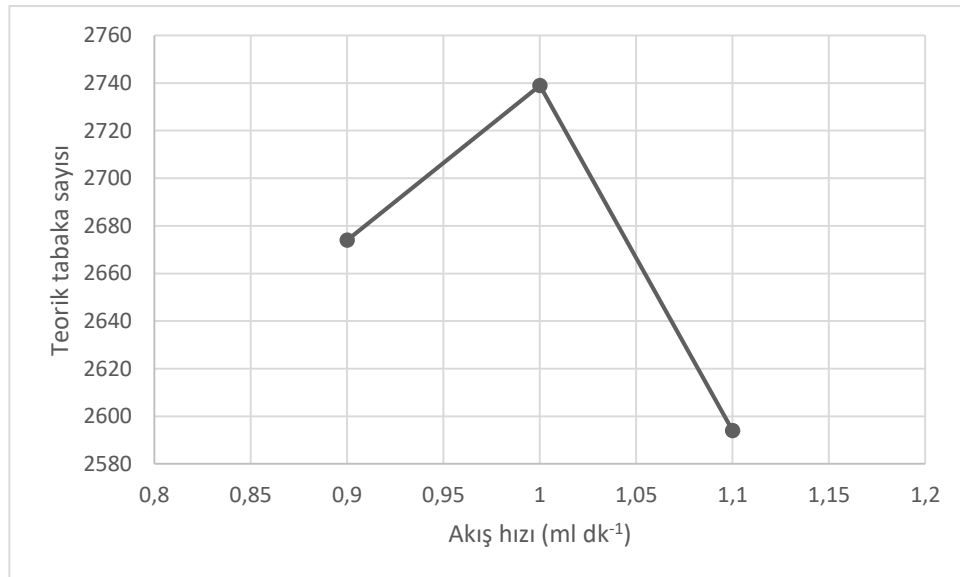
(Kromatografik koşullar: Etanol:50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (5:95, h/h),  
Kolon: C8, Kolon sıcaklığı: 35°C, Dedektör: UV 279 nm)





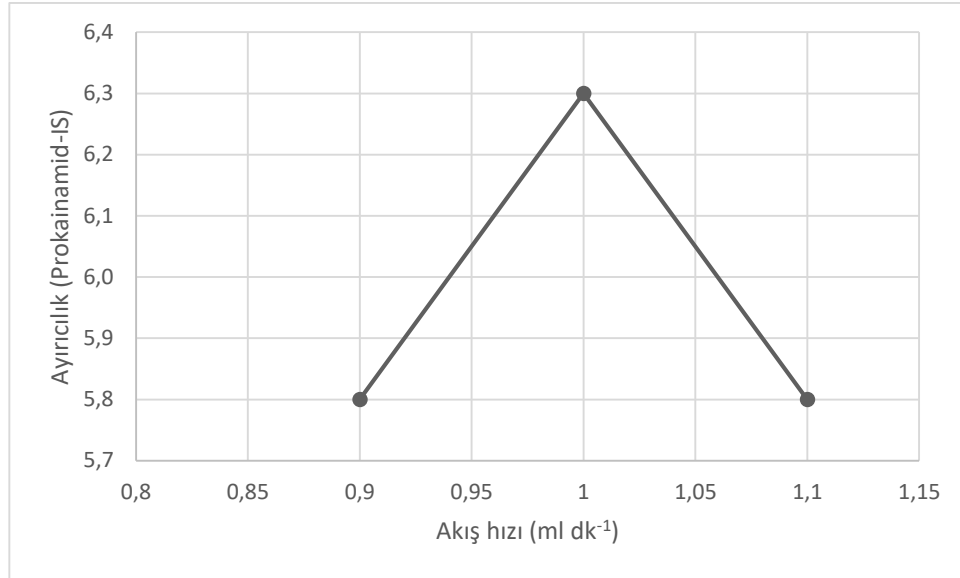
**Şekil 4.6.** Hareketli faz akış hızı ile pik asimetri oranının değişimi

(Kromatografik koşullar: Etanol:50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (5:95, h/h),  
Kolon: C8, Kolon sıcaklığı: 35°C, Dedektör: UV 279 nm)



**Şekil 4.7.** Hareketli faz akış hızı ile teorik tabaka sayısının değişimi

(Kromatografik koşullar: Etanol:50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (5:95, h/h),  
Kolon: C8, Kolon sıcaklığı: 35°C, Dedektör: UV 279 nm)



**Şekil 4.8.** Hareketli faz akış hızı ile ayırıcılığın değişimi

(Kromatografik koşullar: Etanol:50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (5:95, h/h),  
Kolon: C8, Kolon sıcaklığı: 35°C, Dedektör: UV 279 nm)

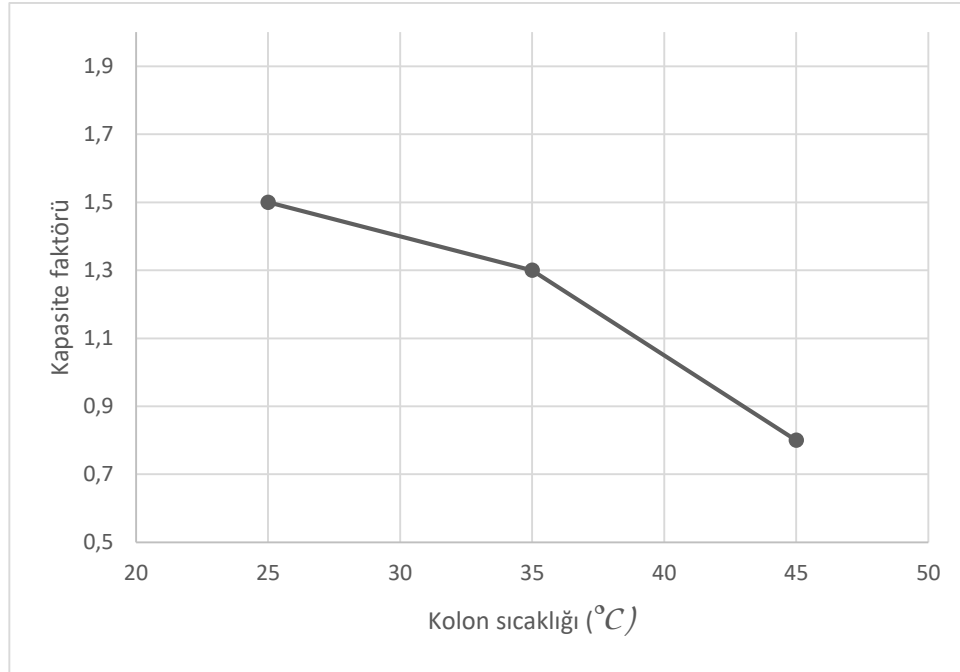
**Tablo 4.3.** Akış hızının kromatografik parametrelere etkisi

Akış hızı (ml dk <sup>-1</sup> )	t (dk)	k'	PAO	N	R	$\alpha$
0,9	5,5	1,4	1,1	2674	5,8	2,0
1,0	5,0	1,3	1,1	2739	6,3	2,0
1,1	4,5	1,1	1,2	2594	5,8	2,0

t: Alınma zamanı, k': Kapasite faktörü, PAO: Pik asimetri oranı, N: Teorik tabaka sayısı, R: Ayırıcılık,  $\alpha$ : Seçicilik

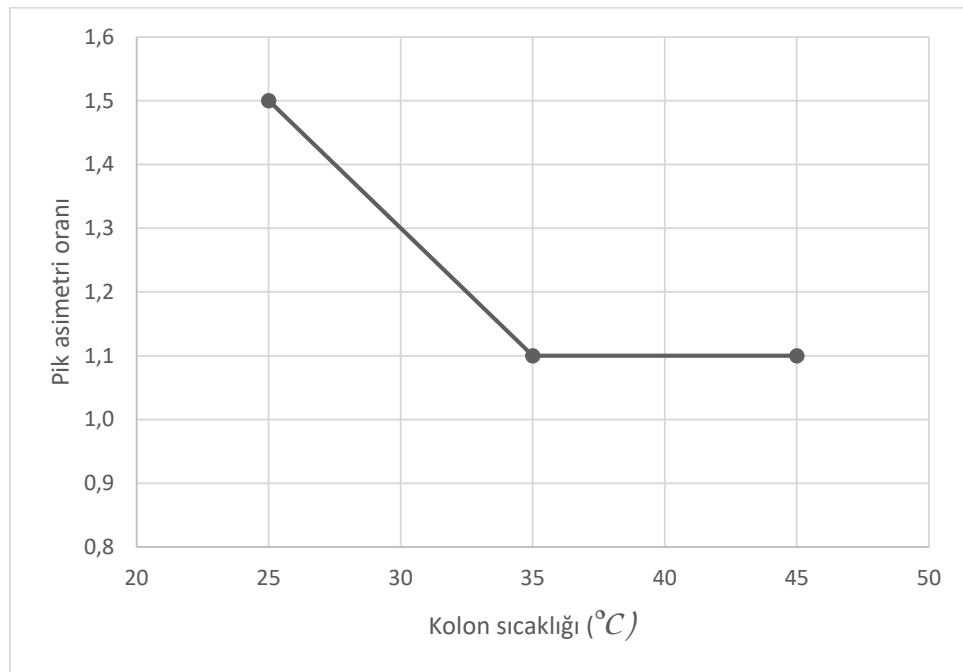
#### 4.1.3. Kolon Sıcaklığının Belirlenmesi

Kolon sıcaklığının belirlenmesi amacıyla kolon sıcaklığı 25°C, 35°C ve 45°C'ye ayarlanıp kolon sıcaklığının; prokainamidin ayırımına etkisi incelenmiştir (Şekil 4.9, Şekil 4.10, Şekil 4.11, Şekil 4.12 ve Tablo 4.4).



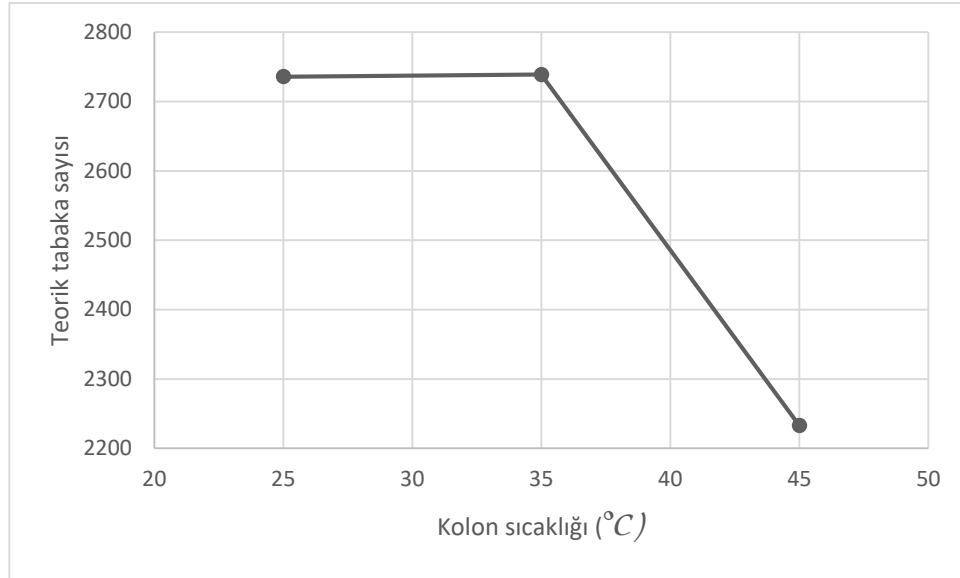
**Şekil 4.9.** Kolon sıcaklığı ile kapasite faktörünün değişimi

(Kromatografik koşullar: Etanol:50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (5:95, h/h),  
Kolon: C8, Akış hızı: 1,0 ml dk<sup>-1</sup>, Dedektör: UV 279 nm)



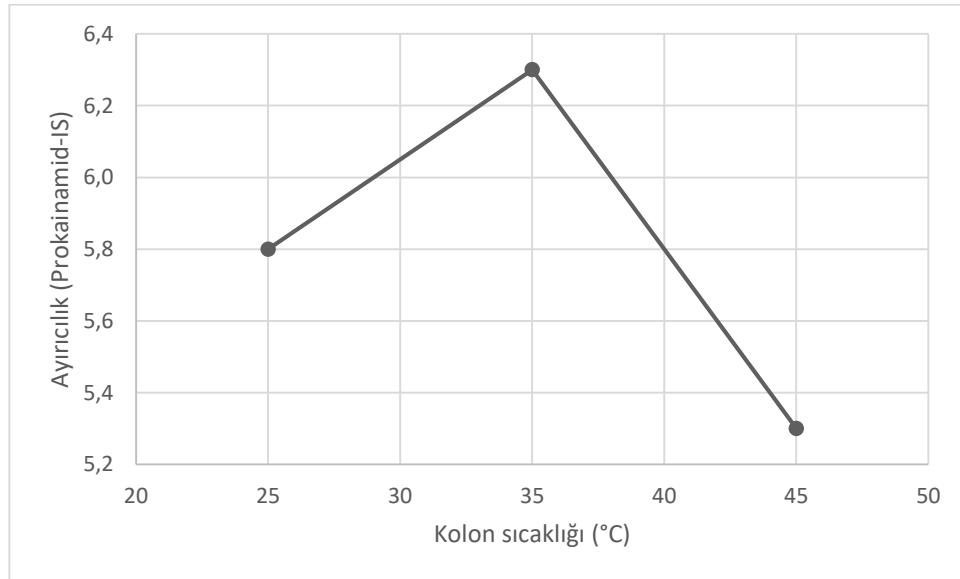
**Şekil 4.10.** Kolon sıcaklığı ile pik asimetri oranının değişimi

(Kromatografik koşullar: Etanol:50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (5:95, h/h),  
Kolon: C8, Akış hızı: 1,0 ml dk<sup>-1</sup>, Dedektör: UV 279 nm)



**Şekil 4.11.** Kolon sıcaklığı ile teorik tabaka sayısının değişimi

(Kromatografik koşullar: Etanol:50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (5:95, h/h),  
Kolon: C8, Akış hızı: 1,0 ml dk<sup>-1</sup>, Dedektör: UV 279 nm)



**Şekil 4.12.** Kolon sıcaklığı ile ayırıcılığın değişimi

(Kromatografik koşullar: Etanol:50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (5:95, h/h),  
Kolon: C8, Akış hızı: 1,0 ml dk<sup>-1</sup>, Dedektör: UV 279 nm)

**Tablo 4.4.** Kolon sıcaklığının kromatografik parametrelere etkisi

Sıcaklık (°C)	t (dk)	k'	PAO	N	R	$\alpha$
25	6,0	1,5	1,5	2736	5,8	1,9
35	5,0	1,3	1,1	2739	6,3	2,0
45	4,2	0,8	1,1	2233	5,3	2,0

t: Alıkonma zamanı, k': Kapasite faktörü, PAO: Pik asimetri oranı, N: Teorik tabaka sayısı, R: Ayırıcılık,  $\alpha$ : Seçicilik

Sonuç olarak prokainamidin yeşil HPLC ile analizinde hareketli faz olarak etanol ve 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tamponu (pH 4,7) (5:95, h/h) karışımı seçilerek akış hızı 1,0 ml dk<sup>-1</sup> ve kolon sıcaklığı 35 °C olarak ayarlanmıştır. UV dedektörde en yüksek pik alanının gözlendiği 279 nm dalga boyu seçilmiştir (Bkz. Ek-5). Bu koşullarda prokainamide ait pikin alıkonma zamanı 5,0 dk'dır.

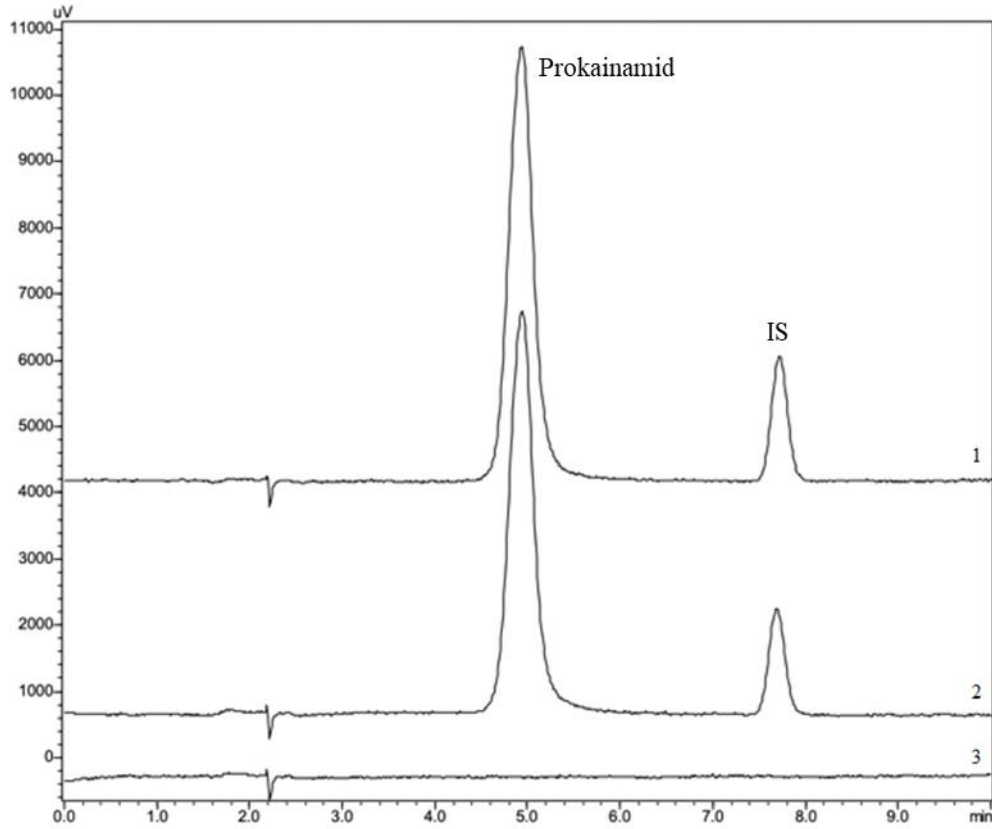
Prokainamidin yeşil HPLC ile analizinde kullanılacak iç standart (IS) olarak parasetamol denenmiştir. Prokainamid elüsyonu için belirlenen en uygun kromatografik koşullarda paraasetamol alıkonma zamanının 7,7 dk bulunması ve kromatografik pikin analiz için uygun olması (k'=2,5±0,0; PAO=1,1±0,0; N=8162±102; R=6,5±0,1, n=6) nedeniyle iç standart olarak parasetamol kullanılmasına karar verilmiştir.

Bu tez kapsamında, yeşil analitik kimya kriterlerine uygun olarak; digoksin, teofilin, fenitoin, vankomisin ve aminoglikozidler gibi TDM gerektiren prokainamidin yeşil HPLC ile analizi için kromatografik koşullar optimize edilmiştir.

## 4.2. Farmasötik Preparattan Prokainamid Analiz Yönteminin Validasyonu

### 4.2.1. Özgünlük

Yöntemin özgünlüğünün belirlenmesi amacıyla plasebo çözeltisi, sentetik preparat çözeltisi ve prokainamid standart çözeltisine ait kromatogramlar elde edilmiş ve karşılaştırılmıştır (Şekil 4.13).



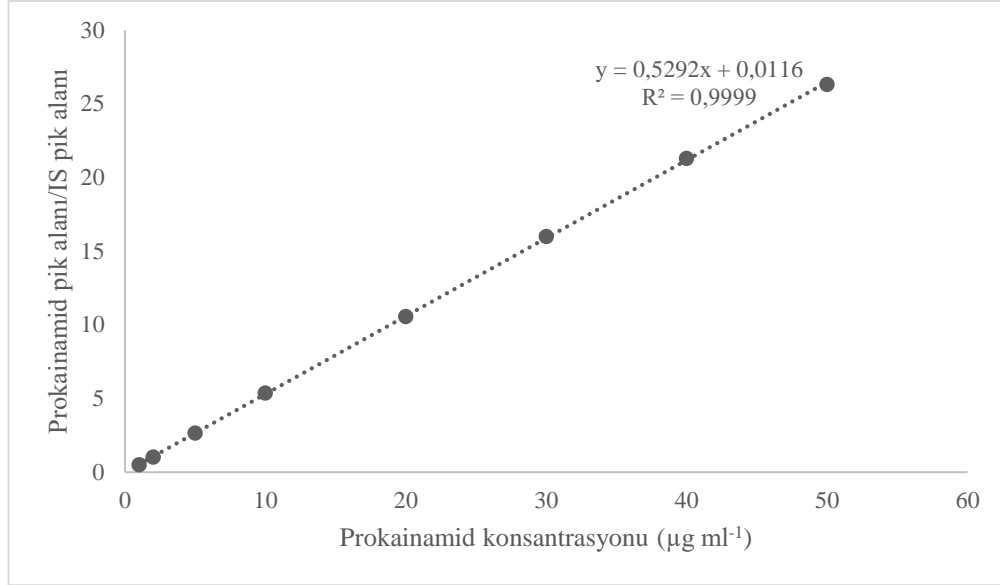
**Şekil 4.13.** Prokainamid ve IS analizi için örnek kromatogramlar: (1) Prokainamid ve IS içeren standart çözelti, (2) Sentetik preparat ve (3) Plasebo

(Kromatografik koşullar: Etanol:50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (5:95, h/h), Akış hızı: 1,0 ml dk<sup>-1</sup>, Kolon: C8, Kolon sıcaklığı: 35°C, Dedektör: UV 279 nm)

Prokainamide ait alıkonma zamanı 5,0 dk olarak bulunurken IS'ye ait alıkonma zamanı 7,7 dk olarak bulunmuştur. Prokainamid bağıl alıkonma zamanı ise 2,0 olarak hesaplanmıştır.

#### 4.2.2. Kalibrasyon Eğrisi ve Doğrusallık Aralığı

Prokainamid derişimine karşı prokainamid pik alanının iç standart (IS) pik alanına oranı grafiğe geçirildiğinde 1-50 µg ml<sup>-1</sup> aralığında doğrusal kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir (Şekil 4.14).



**Şekil 4.14.** Farmasötik preparattan prokainamid analizi yöntemi için kalibrasyon eğrisi (n=12)

Eğrinin doğrusallıktan ayrılış ve korelasyon katsayısının önem kontrol ile doğrusallıktan ayrılışın önem kontrolü istatistiksel olarak test edilmiştir (Tablo 4.5).

**Tablo 4.5.** Farmasötik preparattan prokainamid analizi kalibrasyon eğrisinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi

Korelasyon Katsayısı Önem Kontrolü						
n	r	S <sub>r</sub>	t <sub>H</sub>	t <sub>T</sub>		
12	0,9999	0,0032	316,20	2,23		
t <sub>H</sub> > t <sub>T</sub> : Korelasyon katsayısı tesadüfe bağlı bir değer değildir (p < 0,05).						
Doğrusallıktan Ayrılış Önem Kontrolü						
RKT	YOAKT	RAKT	RAKO	RKO	F <sub>H</sub>	F <sub>T</sub>
966,6678	966,7249	0,0571	0,0057	966,6678	169415,49	4,96
F <sub>H</sub> > F <sub>T</sub> : Derişim ile pik alan oranı arasındaki ilişki doğrusaldır (p < 0,05).						

Farmasötik preparattan prokainamid analizi yöntemine ait kalibrasyon eğrisinin özellikleri Tablo 4.6'da verilmiştir.

**Tablo 4.6.** Kalibrasyon eğrisinin özellikleri

Regresyon denklemleri	$y^* = 0,5292x + 0,0116$
Eğimin standart hatası	0,0084
Kesişimin standart hatası	0,0105
Korelasyon katsayısı (r)	0,9999
Tanımlayıcılık katsayısı ( $R^2$ )	0,9999
Doğrusallık aralığı ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	1 – 50
Gözlenebilirlik sınırı ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	0,1
Alt tayin sınırı ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	0,5

\* $y = ax + b$ , x: Derişim ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ), y: Pik alan oranı, a: Eğim, b: Kesişim

### 4.2.3. Doğruluk ve Kesinlik

Geliştirilen yöntemin gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik bulgularına göre gün içi ve günler arasında kesinlik ve doğruluk değerleri Tablo 4.7’de verilmiştir.



**Tablo 4.7.** Farmasötik preparattan prokainamid analizi yöntemi için gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik bulguları

Eklenen PA miktarı ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Gün İçi <sup>1</sup>		Günler Arası <sup>2</sup>	
	Bulunan miktar ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Bağıl hata (%)	Bulunan miktar ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Bağıl hata (%)
1	1,01	1,00	1,01	1,00
	1,01	1,00	1,00	0,00
	1,00	0,00	1,00	0,00
	1,01	1,00	1,00	0,00
	1,01	1,00	1,01	1,00
	1,01	1,00	1,00	0,00
$\bar{X}$	1,008 $\pm$ 0,002		1,003 $\pm$ 0,002	
SS	0,0041		0,0052	
BSS (%)	0,41		0,51	
10	9,90	-1,00	10,01	0,10
	9,86	-1,40	9,89	-1,10
	10,04	0,40	10,10	1,00
	10,02	0,20	9,95	-0,50
	10,04	0,40	10,02	0,20
	10,07	0,70	10,05	0,50
$\bar{X}$	9,988 $\pm$ 0,035		10,003 $\pm$ 0,030	
SS	0,0864		0,0742	
BSS (%)	0,86		0,74	
40	39,56	-1,10	39,48	-1,30
	40,08	0,20	40,25	0,63
	39,71	-0,72	40,53	1,33
	40,09	0,23	40,25	0,63
	40,46	1,15	40,24	0,60
	40,25	0,63	40,24	0,60
$\bar{X}$	40,025 $\pm$ 0,137		40,165 $\pm$ 0,145	
SS	0,3354		0,3544	
BSS (%)	0,84		0,88	

PA: Prokainamid,  $\bar{X}$ : Ortalama  $\pm$  standart hata, SS: Standart sapma, BSS: Bağıl standart sapma

#### 4.2.4. Duyarlılık

Prokainamidin analizi için geliştirilen bu yöntemin gözlenebilirlik sınırı (LOD)  $0,1 \mu\text{g ml}^{-1}$  (S/G: 3,2), alt tayin sınırı (LOQ) ise  $0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$  (S/G: 10,6) olarak bulunmuştur.

#### 4.2.5. Geri Kazanım

Prokainamid ve yardımcı maddeleri içeren sentetik farmasötik preparat çözeltisine ait geri kazanım değeri ortalama  $98,89 \pm 0,64$  (GA: 97,24-100,54) olarak bulunmuştur (Tablo 4.8).

**Tablo 4.8.** Farmasötik preparattan prokainamid analizi için geri kazanım bulguları (n=6)

	Bulunan ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Geri kazanım (%)
Eklene PA ( $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ )	96,58	96,58
	97,75	97,75
	99,94	99,94
	98,40	98,40
	100,67	100,67
	100,00	100,00
$\bar{X}$	$98,89 \pm 0,64$	$98,89 \pm 0,64$
SS	1,57	1,57
BSS (%)	1,59	1,59
GA	97,24-100,54	

PA: Prokainamid,  $\bar{X}$ : Ortalama  $\pm$  standart hata, SS: Standart sapma, BSS: Bağıl standart sapma, GA Güven aralığı

#### 4.2.6. Tekrarlanabilirlik

Farmasötik preparattan prokainamid analizi amacıyla geliştirilen yöntemin tekrarlanabilirliği için % BSS 0,56 olarak hesaplanmıştır (Tablo 4.9).

**Tablo 4.9.** Yöntemin tekrarlanabilirlik bulguları (n=10)

Eklenen derişim ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Bulunan derişim ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )
10 $\mu\text{g ml}^{-1}$	10,01
	9,92
	9,99
	9,93
	9,93
	9,91
	10,00
	9,92
	10,08
	10,00
	$\bar{X} = 9,97 \pm 0,02$ SS = 0,06 BSS (%) = 0,56 Standart hata = 0,02 GA = 9,93-10,01

$\bar{X}$ : Ortalama  $\pm$  standart hata, SS: Standart sapma, BSS: Bağıl standart sapma, GA Güven aralığı

#### 4.2.7. Sağlamlık ve Tutarlılık

Farmasötik preparattan prokainamid analizi için geliştirilen yöntemin sağlamlığının test edilmesi kapsamında yöntem parametreleri için en uygun (optimum) değerlerden küçük sapmaların sonuca etkilerini gösteren çalışma 10  $\mu\text{g ml}^{-1}$  derişim düzeyinde gerçekleştirilmiş, bulgulara göre en küçük  $t_H$  değeri 0,19 olarak hesaplanmıştır (Tablo 4.10).

**Tablo 4.10.** Farmasötik preparattan prokainamid analizi yöntemine ait sağlamlık bulguları (n=3)

	Bulunan ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	BSS (%)	$t_H$
Optimum koşullar	$9,94 \pm 0,06$	0,99	-
0,95 ml $\text{dk}^{-1}$	$9,99 \pm 0,10$	1,66	0,67
1,05 ml $\text{dk}^{-1}$	$10,00 \pm 0,06$	1,05	0,51
33°C	$9,98 \pm 0,04$	0,67	0,57
37°C	$9,86 \pm 0,03$	0,45	0,27
47,5 mM tampon	$9,95 \pm 0,08$	1,39	0,95
52,5 mM tampon	$10,06 \pm 0,04$	0,76	0,19
%4,75 EtOH	$9,88 \pm 0,06$	0,99	0,47
%5,25 EtOH	$9,94 \pm 0,07$	1,19	0,98

EtOH: Etanol, BSS: Bağıl standart sapma

Geliştirilen yöntemin tutarlılık çalışmaları kapsamında farklı analizciler tarafından yapılan analiz bulguları değerlendirildiğinde 1. ve 2. analizci arasındaki fark için  $p > 0,05$  bulunmuştur (Tablo 4.11).

**Tablo 4.11.** Farmasötik preparattan prokainamid analizi yönteminde farklı analizcilere ait analiz sonuçları

Eklene miktar	1. Analizci		2. Analizci	
	Bulunan miktar ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Geri kazanım (%)	Bulunan miktar ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Geri kazanım (%)
20 $\mu\text{g ml}^{-1}$	20,26	101,30	19,68	98,40
	20,37	101,85	19,93	99,65
	20,11	100,55	20,32	101,60
	20,11	100,55	20,02	100,10
	20,30	101,50	19,89	99,45
	20,27	101,35	20,01	100,05
$\bar{X}$	20,24 $\pm$ 0,04	101,18 $\pm$ 0,22	19,98 $\pm$ 0,09	99,88 $\pm$ 0,43
SS	0,11	0,53	0,21	1,05
BSS (%)	0,52	0,52	1,05	1,05
Farklı iki analizci bulguları için Mann-Whitney U Testi: U <sub>Hesap</sub> = 31, U <sub>Tablo</sub> = 29, U <sub>Hesap</sub> > U <sub>Tablo</sub> , p > 0,05				

$\bar{X}$ : Ortalama  $\pm$  standart hata, SS: Standart sapma, BSS: Bağıl standart sapma

#### 4.2.8. Sistem Uygunluk Testleri

Sistem uygunluk testleri, 10  $\mu\text{g ml}^{-1}$  konsantrasyonundaki prokainamid çözeltisinin 10 tekrarlı enjeksiyonu ile yapılmış olup sonuçlar Tablo 4.12’de verilmiştir.

**Tablo 4.12.** Prokainamidin farmasötik preparattan analizi için sistem uygunluk testi verileri

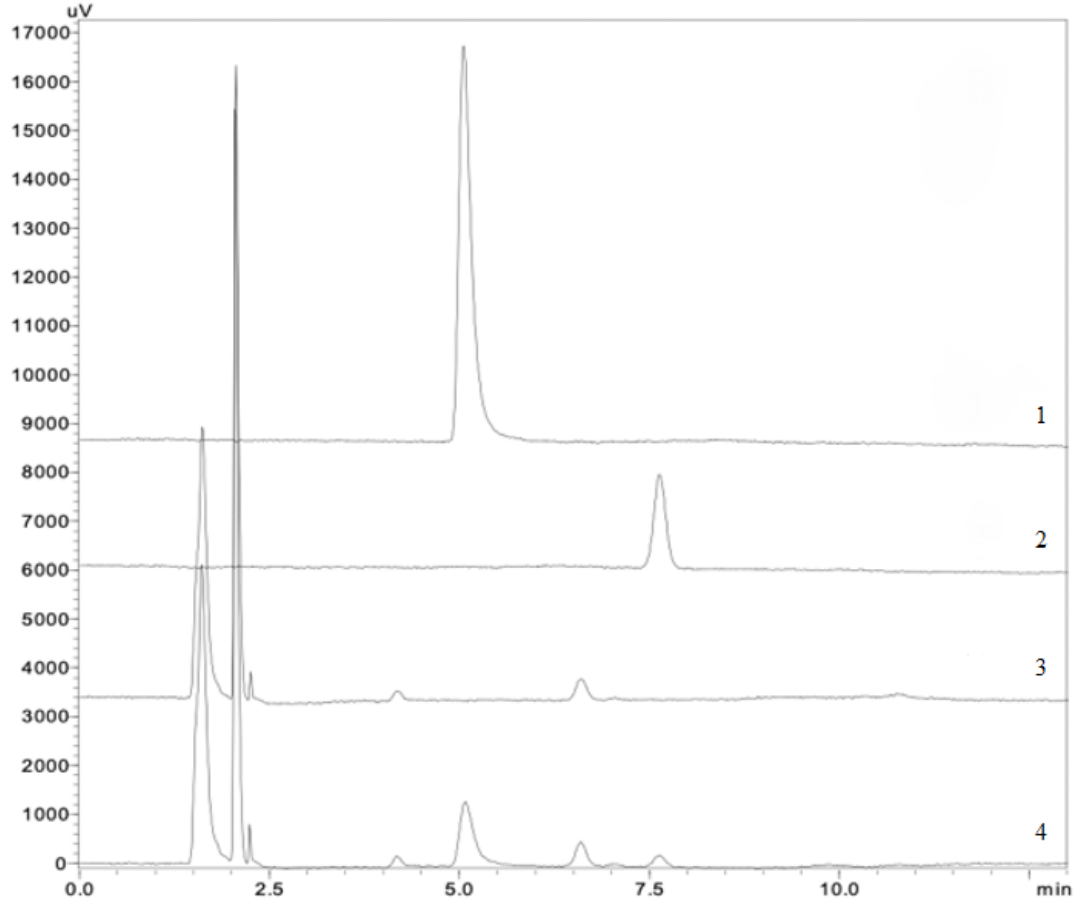
Parametre	Hesaplanan Değer
Enjeksiyon kesinliği (%)	0,5
Kapasite faktörü	1,1
Pik asimetri oranı	1,1
Teorik tabaka sayısı (N)	2739
*Ayırıcılık ( $R_s$ )	8,3

### 4.3. Plazmadan Prokainamid Analiz Yönteminin Validasyonu

#### 4.3.1. Özgünlük

Plazmadan prokainamid analizi için geliştirilen yöntemin özgünlüğünün belirlenmesi amacıyla prokainamid standart çözeltisi, iç standart çözeltisi, plazma ve

prokainamid ile iç standart içeren plazmaya ait kromatogramlar elde edilmiş ve karşılaştırılmıştır (Şekil 4.15).



**Şekil 4.15.** Prokainamidin plazmadan analizi için örnek kromatogramlar: (1) Prokainamid standart çözeltisi, (2) İç standart çözeltisi, (3) Boş plazma ve (4) Prokainamid ve iç standart içeren plazma

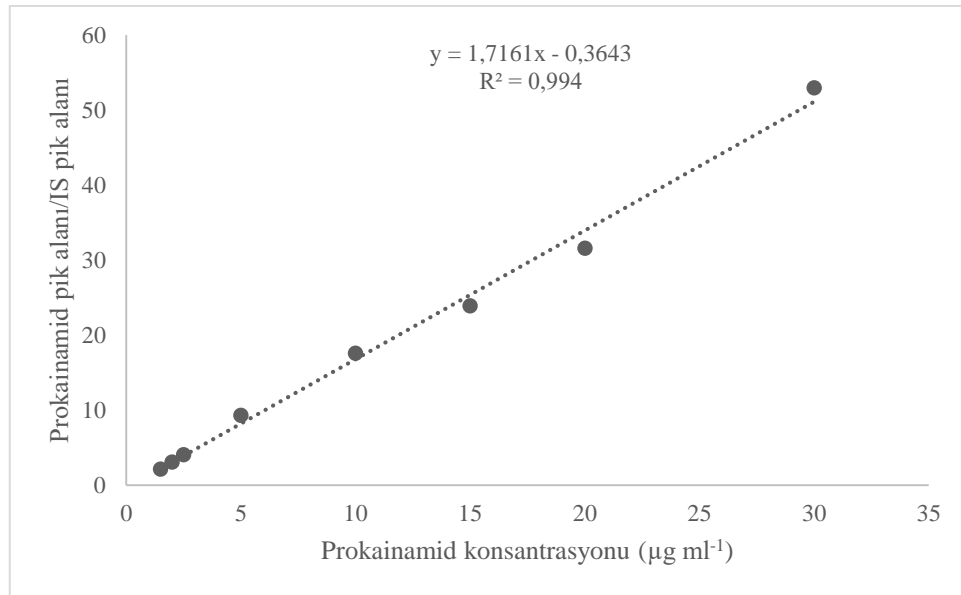
(Kromatografik koşullar: Etanol:50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (5:95, h/h), Akış hızı: 1,0 ml dk<sup>-1</sup>, Kolon: C8, Kolon sıcaklığı: 35°C, Dedektör: UV 279 nm)

### 4.3.2. Duyarlılık

Plazma analizlerinde prokainamidin yönteme ait gözlenebilme sınırı (LOD) 0,3 µg ml<sup>-1</sup> (S/G 3,1), alt tayin sınırı (LOQ) ise 0,8 µg ml<sup>-1</sup> (S/G 10,8) olarak bulunmuştur.

### 4.3.3. Kalibrasyon Eğrisi ve Doğrusallık Aralığı

Plazma analizlerinde prokainamidin doğrusallık aralığı 40 µg ml<sup>-1</sup> derişimine kadar sınınmış, korelasyon katsayısının en yüksek olduğu 1,5-30 µg ml<sup>-1</sup> aralığı kalibrasyon eğrisi olarak kullanılmıştır (Şekil 4.16).



**Şekil 4.16.** Plazmadan prokainamid analizi yöntemi için örnek kalibrasyon eğrisi

Eğrinin doğrusallıktan ayrılış ve korelasyon katsayısının önem kontrol ile doğrusallıktan ayrılışın önem kontrolü istatistiksel olarak test edilmiştir (Tablo 4.13).

**Tablo 4.13.** Plazmadan prokainamid analizi için kalibrasyon eğrisinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi

Korelasyon Katsayısı Önem Kontrolü						
N	r	S <sub>r</sub>	t <sub>H</sub>	t <sub>T</sub>		
12	0,9969	0,0245	40,70	2,23		
t <sub>H</sub> > t <sub>T</sub> : Korelasyon katsayısı tesadüfe bağlı bir değer değildir (p < 0,05).						
Doğrusallıktan Ayrılış Önem Kontrolü						
RKT	YOAKT	RAKT	RAKO	RKO	F <sub>H</sub>	F <sub>T</sub>
3045,2038	3058,4743	13,2705	1,3271	3045,2038	2294,71	4,96
F <sub>H</sub> > F <sub>T</sub> : Derişim ile pik alan oranı arasındaki ilişki doğrusaldır (p < 0,05).						

Plazmadan prokainamid analizi yöntemine ait kalibrasyon eğrisinin özellikleri Tablo 4.14'te verilmiştir.

**Tablo 4.14.** Kalibrasyon eğrisinin özellikleri

Regresyon denklemi	$y^*=1,7161x-0,3643$
Eğimin standart hatası	0,0082
Kesişimin standart hatası	0,0622
Korelasyon katsayısı (r)	0,9940
Tanımlayıcılık katsayısı ( $R^2$ )	0,9969
Doğrusallık aralığı ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	1,5 – 30
Gözlenebilme sınırı ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	0,3
Alt tayin sınırı ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	0,8

\* $y=ax+b$  x: Derişim ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ), y: Pik alan oranı, a: Eğim, b: Kesişim

#### 4.3.4. Doğruluk ve Kesinlik

Plazma analizleri için geliştirilen yöntemin gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik bulgularına göre gün içi ve günler arasında kesinlik ve doğruluk değerleri Tablo 4.15'te verilmiştir.



**Tablo 4.15.** Yöntemin gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik

Eklenen prokainamid ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Gün içi		Günler arası	
	Bulunan miktar ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Bağlı hata (%)	Bulunan miktar ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Bağlı hata (%)
1,5	1,54	2,67	1,55	3,33
	1,56	4,00	1,50	0,00
	1,51	0,67	1,48	-1,33
	1,53	2,00	1,52	1,33
	1,55	3,33	1,53	2,00
	1,52	1,33	1,51	0,67
$\bar{X}$	1,54 $\pm$ 0,01		1,52 $\pm$ 0,01	
SS	0,0187		0,0243	
BSS (%)	1,22		1,60	
5	4,86	-2,80	4,61	-7,80
	4,94	-1,20	4,75	-5,00
	4,99	-0,20	4,58	-8,40
	4,95	-1,00	4,73	-5,40
	5,03	0,60	4,95	-1,00
	5,03	0,60	4,88	-2,40
$\bar{X}$	4,97 $\pm$ 0,03		4,75 $\pm$ 0,06	
SS	0,0647		0,1455	
BSS (%)	1,30		3,06	
10	9,78	-2,20	10,62	6,20
	10,27	2,70	9,67	-3,30
	9,99	-0,10	10,26	2,60
	9,77	-2,30	10,10	1,00
	10,59	5,90	9,32	-6,80
	9,61	-3,90	10,36	3,60
$\bar{X}$	10,00 $\pm$ 0,15		10,06 $\pm$ 0,20	
SS	0,3673		0,4785	
BSS (%)	3,67		4,76	
20	20,33	1,65	20,75	3,75
	19,70	-1,50	21,36	6,80
	19,61	-1,95	18,50	-7,50
	19,48	-2,60	22,90	14,50
	20,00	0,00	22,31	11,55
	20,12	0,60	18,00	-10,00
$\bar{X}$	19,87 $\pm$ 0,13		20,64 $\pm$ 0,82	
SS	0,3285		1,9988	
BSS (%)	1,65		9,69	

$\bar{X}$ : Ortalama  $\pm$  standart hata, SS: Standart sapma BSS: Bağlı standart sapma

#### 4.3.5. Kararlılık

Plazmada 5 ve 15  $\mu\text{g ml}^{-1}$  derişiminde hazırlanan prokainamide ait oto örnekleyici, oda sıcaklığı, kısa dönem ve uzun dönem kararlılık verileri Tablo 4.16'da verilmiştir (n=3).

**Tablo 4.16.** Prokainamidin plazmada kısa ve uzun dönem kararlılığı

Prokainamid								
Ortalama Kalan Oranı (%)								
Süre (Saat)	Oto Örnekleyici		Oda Sıcaklığı		Kısa Dönem		Uzun Dönem	
	5 $\mu\text{g ml}^{-1}$	15 $\mu\text{g ml}^{-1}$	5 $\mu\text{g ml}^{-1}$	15 $\mu\text{g ml}^{-1}$	5 $\mu\text{g ml}^{-1}$	15 $\mu\text{g ml}^{-1}$	5 $\mu\text{g ml}^{-1}$	15 $\mu\text{g ml}^{-1}$
6	97,78	98,30	93,31	92,11	92,83	93,63	90,80	91,23
12	94,39	91,02	92,76	92,72				
24	92,43	91,73	91,3	91,98				

Plazmada 5 ve 20  $\mu\text{g ml}^{-1}$  derişiminde hazırlanan prokainamid standartlarının dondurucuda bekletildikten sonra oda sıcaklığında çözüldüğü 3 donma-erime döngüsüne ait kararlılık verileri Tablo 4.17'de verilmiştir (n=3).

**Tablo 4.17.** Plazmadaki prokainamidin donma/çözünme kararlılık bulguları

Prokainamid		
Döngü No	Ortalama Kalan Oranı (%)	
	5 $\mu\text{g ml}^{-1}$	20 $\mu\text{g ml}^{-1}$
1	97,20	98,90
2	98,31	96,61
3	94,66	92,09

#### 4.3.6. Matriks Etkisi

Prokainamidin 2 ve 20  $\mu\text{g ml}^{-1}$  derişim düzeylerinde ME değerinin %99,98 $\pm$ 1,73 ile %100,79 $\pm$ 0,78 arasında değiştigi bulunmuştur (Tablo 4.18).

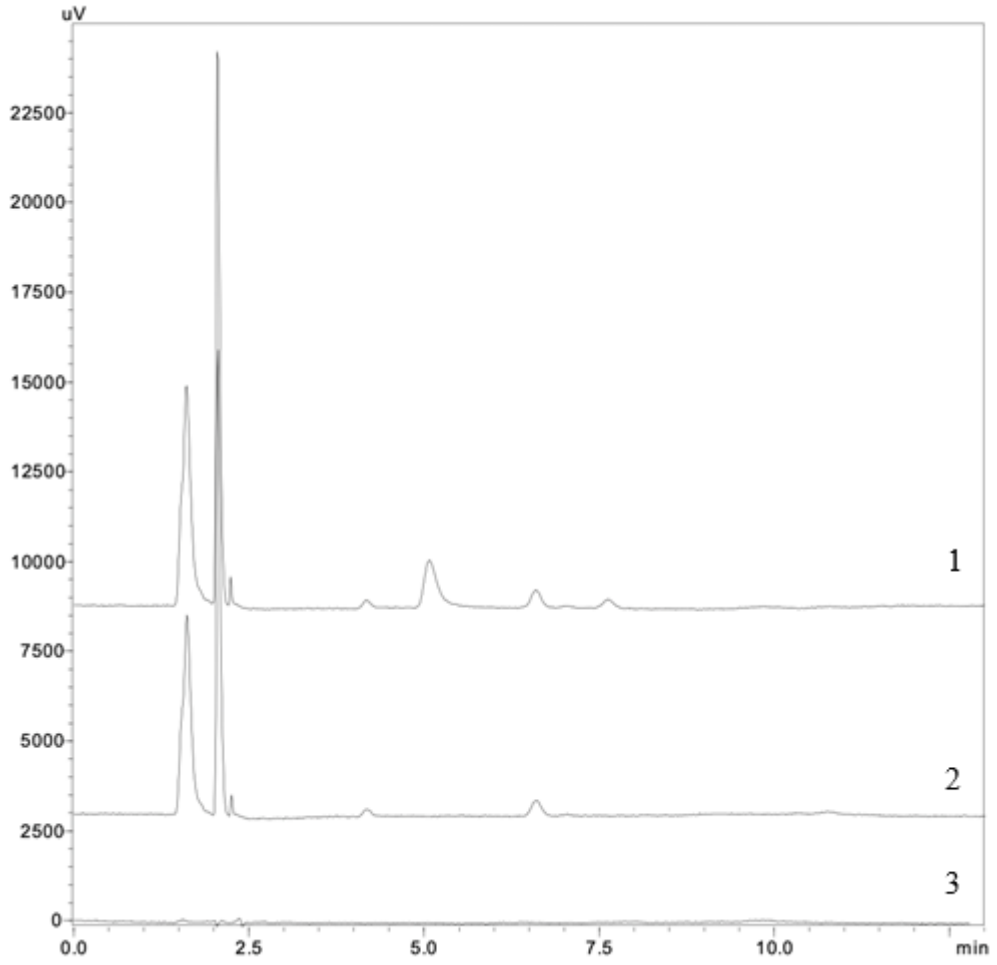
**Tablo 4.18.** Plazma örneklerinde prokainamidin matriks etkisi (n=3)

	<b>2 µg ml<sup>-1</sup></b>	<b>20 µg ml<sup>-1</sup></b>
<b>ME değeri (%)</b>	97,99	101,52
	101,15	100,78
	100,81	100,05
$\bar{X}$	99,98	100,79
SS	1,73	0,78

ME: Matriks etkisi,  $\bar{X}$ : Ortalama SS: Standart sapma

#### 4.3.7. Taşınma

Taşınma, analitik cihazda kalan önceki bir numuneden kalan analit nedeniyle ölçülen ULOQ'daki kalibrasyon standardından sonra boş numuneler analiz edilerek değerlendirilmiştir. ULOQ enjeksiyonundan sonra prokainamid ve IS için herhangi bir alıkonma süresi gözlenmemiştir (Şekil 4.17).



**Şekil 4.17.** Prokainamidin plazmadan analizinde taşınma için örnek kromatogramlar: (1) ULOQ prokainamid ( $30 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) ve IS ( $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ ), (2) Boş plazma ve (3) Hareketli faz

#### 4.3.8. Seyreltme Etkisi

Prokainamidin plazmadan analizi için geliştirilen yöntemde numune seyreltme etkisinin sonuçları  $40 \mu\text{g ml}^{-1}$  derişimi düzeyinde 1/2, 1/5 ve 1/10 seyreltme oranlarında geri kazanma oranları ortalaması %96 bulunmuştur (Tablo 4.19).

**Tablo 4.19.** Prokainamidin plazmadan analizinde seyreltme etkisi

Prokainamid			
Derişim ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Seyreltme Faktörü		
	1/2	1/5	1/10
% Kazanılan	96,15	94,39	95,34
	96,23	93,50	96,02
	96,98	98,20	96,26
	95,14	98,19	95,70
	96,01	97,85	97,18
Ortalama	96,10 $\pm$ 0,29	96,43 $\pm$ 1,02	96,10 $\pm$ 0,31
Standart Sapma	0,66	2,29	0,70
BSS	0,68	2,38	0,72

BSS: Bağıl standart sapma

#### 4.3.9. Geri Kazanım

Prokainamid içeren plazma numunesine ait geri kazanım değerleri  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$  derişim düzeyinde %93,90 – 102,68 (n=6) aralığında hesaplanmıştır (Tablo 4.20).

**Tablo 4.20.** Prokainamid için geri kazanım değerleri (n=6)

Eklene prokainamid ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Bulunan derişim ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Geri kazanım (%)
10	9,58	95,75
	10,27	102,68
	9,52	95,21
	9,88	98,78
	9,39	93,90
	9,73	97,31
$\bar{X}$	9,73 $\pm$ 0,13	97,27 $\pm$ 1,28
SS	0,31	3,15
BSS	3,23	3,23

$\bar{X}$ : Ortalama  $\pm$  Standart hata, SS: Standart sapma, BSS: Bağıl standart sapma

#### 4.3.10. Tekrarlanabilirlik

Prokainamidin plazmadan analiz için geliştirilen yeşil HPLC yöntemin tekrarlanabilirliği için BSS değeri %3,3 olarak hesaplanmıştır (Tablo 4.21).

**Tablo 4.21.** Yöntemin tekrarlanabilirlik bulguları (n=10)

<b>Eklenecek derişim</b> ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	<b>Bulunan derişim</b> ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )
10 $\mu\text{g ml}^{-1}$	9,83
	10,03
	10,04
	10,46
	9,95
	9,93
	9,81
	10,30
	9,60
	9,30
	$\bar{X} = 9,93 \pm 0,10$ SS = 0,33 BSS (%) = 3,31 Standart hata = 0,1038 GA = 9,69 - 10,16

$\bar{X}$ : Ortalama  $\pm$  standart hata, SS: Standart sapma, BSS: Bağıl standart sapma, GA Güven aralığı

#### 4.3.11. Kalite Kontrol Örnekleri

Plazmada 1,5; 5,0; 10,0 ve 20,0  $\mu\text{g ml}^{-1}$  derişim düzeyindeki prokainamid kalite kontrol (QC) numunelerine ait en yüksek % BSS = 1,77 olarak hesaplanmıştır (Tablo 4.22, n=15).

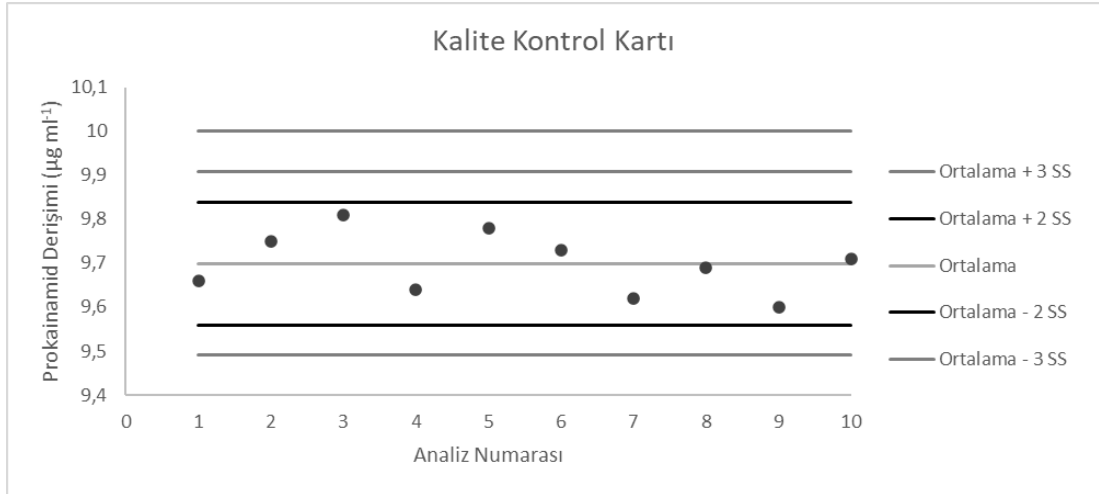
**Tablo 4.22.** QC numunelerinin analiz sırasındaki dağılımı

	Kalite Kontrol No	Derişim			
		1,5 µg ml <sup>-1</sup>	5 µg ml <sup>-1</sup>	10 µg ml <sup>-1</sup>	20 µg ml <sup>-1</sup>
Gün 1	1	1,57	4,96	9,60	19,84
	2	1,52	5,01	9,57	19,41
	3	1,56	4,98	9,54	19,75
	4	1,57	4,96	9,55	20,02
	5	1,51	4,85	9,81	19,62
Gün 2	6	1,57	5,00	9,69	20,04
	7	1,52	5,02	9,66	19,60
	8	1,56	4,99	9,62	19,95
	9	1,57	4,88	9,64	20,22
	10	1,51	4,90	9,90	19,82
Gün 3	11	1,58	4,95	9,78	20,24
	12	1,52	4,92	9,75	19,80
	13	1,56	4,89	9,71	20,15
	14	1,57	4,79	9,73	20,42
	15	1,51	4,84	9,99	20,02
	$\bar{X}$	1,55 ± 0,01	4,93 ± 0,02	9,70 ± 0,03	19,93 ± 0,07
	SS	0,03	0,07	0,13	0,27
	BSS (%)	1,77	1,40	1,33	1,37

$\bar{X}$ : Ortalama ± standart hata, SS: Standart sapma, BSS: Bağıl standart sapma

#### 4.3.12. Kalite Kontrol Kartı

Prokainamid için plazmada hazırlanan standartların 10 µg ml<sup>-1</sup> derişimindeki analizi ile oluşturulan ve bulunan derişim değerlerinin işaretlendiği kalite kontrol kartı Şekil 4.18’de verilmiştir.



**Şekil 4.18.** Prokainamidin plazmadan analizi için kalite kontrol kartı



## 5. TARTIŞMA

Kromatografi, karışımlardaki bileşenlerin ayrılması, teşhisi ve tayini için kullanılan birçok farklı ve önemli yöntemler grubunu içerir. Bu yöntemlerden HPLC farklı uygulamaları ile ilaç analizinde önemli bir yer tutar. İlaç moleküllerinin doğasını belirleyen ve kromatografik ayırma mekanizmasının temel belirleyicisi  $pK_a$ , polarite, çözünürlük gibi özellikleri daha çok ters faz sıvı kromatografisine uygun düşer. Bu nedenle, Prokainamidin (log P: 0,88,  $pK_a$ : 9,32, sudaki çözünürlük: 5050 mg L<sup>-1</sup>) HPLC ile analizinde ters faz sıvı kromatografisi uygulanmasına karar verilmiş, Nucleodur 100-5 C8 ec (5 µm, 150 x 4,6 mm) sabit faz, diğer bir deyişle analitik kolon olarak tercih edilmiştir.

### 5.1. Yöntem Optimizasyonu

HPLC ile analiz yöntemlerinde başarılı bir kromatografik ayırımın sağlanabilmesi için hareketli faz, polarite, iyonik şiddeti, akış hızı, sıcaklık gibi özelliklerinin ayarlanması gerekmektedir. Sunulan tezin yöntem optimizasyonu kısmında bu değişkenlerin başarılı bir prokainamid elüsyon için en uygun değerleri yeşilleştirme ilkeleri dikkate alınarak aranmış, optimizasyonunda hareketli fazdaki etanol oranı ve tampon derişimi, akış hızı ve kolon sıcaklığındaki değişimlerin analiz üzerindeki etkileri incelenmiştir. En uygun kromatografik ayırımı sağlayan değerlerin belirlenmesi prokainamid piki için hesaplanan kapasite faktörü,  $1 < k' < 10$ , pik asimetri oranı, PAO < 2, teorik tabaka sayısı,  $N > 2000$ , ayırıcılık  $R > 1,5$  ve seçicilik,  $\alpha > 1$  kısıtlarına temellendirilmiştir (Bölüm 2.3).

Hareketli fazdaki etanol miktarı hacimce %3, %5 ve %7 olacak biçimde değiştirilmiş, etanol oranının azalmasıyla seçicilik dışındaki bütün kromatografik parametrelerin ( $k'$ , PAO, N ve R) artış gösterdiği görülmüştür (Şekil 4.1, 4.2, 4.3. 4.4 ve Tablo 4.1). Bu değişim, hareketli faz polaritesindeki azalmaya bağlı olarak karşıma çıkmakta ve ters faz sıvı kromatografisi ilkeleri ile örtüşmektedir. Etanol oranı %3 olduğunda kromatografik parametrelerin hepsi olması gereken değerleri sağlamakta, ancak pik kuyruklanması artmaktadır. En uygun kromatografik ayırımın belirlenmesindeki bütün kabul kriterlerini sağlayan %5 etanol oranı çalışmanın devamında hareketli faz içeriği olarak seçilmiştir.

Hareketli fazda tampon bulunmadığında alıkonma gerçekleştirilememiş (Tablo 4.2), geniş bir pH aralığında yüksek tamponlama kapasitesine sahip olması nedeniyle yaygın kullanılan  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  hareketli faz bileşeni olarak tercih edilmiştir. Hareketli faza tampon eklenmesi nedeniyle iyonik şiddetin artması kısmen iyonize formda olan prokainamidin alıkonulmasını ve kromatografik bandının daralmasını sağlamıştır. Teorik tabaka sayısı ve ayırıcılık değerlerindeki artış bunu göstermektedir. Bu değerlerin en yüksek olduğu tampon derişimi, 50 mM, hareketli faz tampon derişimi olarak seçilmiştir.

Hız kuramına göre hareketli faz akış hızı ayırıcılığı doğrudan etkileyen teorik tabaka yüksekliğinde yarattığı değişim nedeniyle optimizasyon gerektirir (Bölüm 2.3). Akış hızı  $1,1 \text{ ml dk}^{-1}$  yapıldığında optimum koşula göre pik simetrisinde küçük bir bozulma olduğu gözlenmiştir.  $0,9 \text{ ml dk}^{-1}$  yapıldığında ise optimum koşula göre analiz süresinin uzayabileceği görülmüştür. Hareketli faz akış hızındaki değişimin prokainamidin kromatografik davranışına etkisi van Deemter ilkeleri çerçevesinde değerlendirildiğinde, en yüksek teorik tabaka sayısını (diğer bir deyişle en küçük teorik tabaka yüksekliğini) veren  $1,0 \text{ ml dk}^{-1}$  değeri hareketli faz akış hızı olarak belirlenmiştir.

Kromatografik ayırma mekanizmalarının temelini oluşturan pek çok fizikokimyasal olay sıcaklık bağımlıdır. Sıcaklık ters faz sıvı kromatografisindeki etkisini denge sabitini ve çözünürlüğü değiştirerek gösterebilir. Bu nedenle, sıcaklık değişimiyle prokainamid elüsyonundaki değişikliğin incelenmesi amacıyla kromatografik parametrelerin değişimi  $25\text{-}45^\circ\text{C}$  aralığında izlenmiştir (Şekil 4.9, Şekil 4.10, Şekil 4.11, Şekil 4.12 ve Tablo 4.4). Kolon sıcaklığı  $25^\circ\text{C}$  olarak ayarlandığında pik asimetri oranının  $1,5$  olduğu,  $45^\circ\text{C}$  yapıldığında ise kapasite faktörünün 1'in altına düştüğü gözlenmiştir. Bu durumda, teorik tabaka sayısının ve ayırıcılığın en yüksek ve pik asimetri oranının  $1,1$  olduğu  $35^\circ\text{C}$  kolon sıcaklığı olarak tercih edilmiştir.

Sonuç olarak, analiz süresi ve dolayısıyla kullanılan kimyasal miktarı, enerji tüketimi ve toplam analiz maliyeti de göz önünde bulundurulduğunda, ayırımın en iyi olduğu optimum kromatografik koşullar, hareketli fazdaki etanol oranı hacimce %5, tampon derişimi 50 mM, akış hızı  $1 \text{ ml dk}^{-1}$  ve kolon sıcaklığı  $35^\circ\text{C}$ 'dir.

## 5.2. Yöntem Validasyonu

Geliştirilen yöntemin validasyonu kapsamında, prokainamidin farmasötik preparattan analizi için özgünlük, doğrusallık, doğruluk, kesinlik, gözlenebilme sınırı, alt tayin sınırı, sağlamlık, tutarlılık ve sistem uygunluk testi çalışmaları ile, plazmadan analizi için kararlılık, özgünlük, doğrusallık ve aralık, doğruluk ve kesinlik, duyarlılık, matriks etkisi, seyreltme etkisi, taşınma, geri kazanım ve kalite kontrol testlerine ait sonuçları değerlendirilmiştir (44-46).

### 5.2.1. Farmasötik Preparattan Analiz

Yöntemin özgünlüğünün değerlendirilmesinde prokainamid ve iç standart içeren standart çözelti, sentetik preparat ve plasebo numunelerine ait kromatogramlar karşılaştırıldığında matriksten kaynaklanan bir girişim etkisi gözlenmemiştir (Şekil 4.13).

Prokainamid derişimine karşı prokainamidin pik alanının iç standardın pik alanına oranı grafiğe işaretlenince elde edilen kalibrasyon eğrisinin 1-50  $\mu\text{g ml}^{-1}$  aralığında doğrusal olduğu ve korelasyon katsayısının önemli bir değer olduğu istatistiksel olarak bulunmuştur. Tanımlayıcılık katsayısının 0,9999 olarak 1,000'e yakın bulunması, kalibrasyon eğrisinin doğrusal olduğunu göstermektedir (Şekil 4.14, Tablo 4.5 ve Tablo 4.6).

Prokainamidin üç farklı derişiminde yapılan gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik çalışmalarında BH ve BSS değerlerinin %2'nin altında bulunması, yöntemin doğru ve kesin olduğunu göstermektedir (51, 52) (Tablo 4.7).

Prokainamidin farmasötik preparattan analizinde LOD değeri 0,1  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , LOQ değeri ise 0,5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  olarak hesaplanmıştır. Bu da yöntemin çok küçük derişimlerde bile çalışılabilecek kadar duyarlı olduğunu göstermektedir.

Sentetik preparattaki etken maddenin analiz sonucunda ne kadarının bulunduğunu belirlemek amacıyla kullanılan geri kazanım çalışmalarında bulunan ortalama geri kazanım değeri, kabul kriteri olan %98-102 aralığına girmektedir (Tablo 4.8) (51).

Geliştirilen yöntemin tekrarlanabilirlik çalışmalarında bulunan BSS değerinin %2'nin altında bulunması, yöntemin tekrarlanabilir olduğunu göstermektedir (Tablo 4.9) (52).

Yöntemin sağlamlık çalışmalarında yöntem parametrelerinde yapılan küçük değişikliklerin miktar tayinini ne kadar etkilediği istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve sonuçların bu değişikliklerden etkilenmediği istatistiksel olarak belirlenmiştir (Tablo 4.10).

Farklı iki analizci tarafından yapılan analizlerin istatistiksel olarak karşılaştırılmış istatistiksel olarak anlamsız olduğu belirlenmiştir (Bkz. Tablo 4.11).

Yöntemin sistem uygunluk testlerinde elde edilen verilerin kullanılmasıyla bulunan değerler, prokainamid için kabul kriterlerinin (Enjeksiyon kesinliği  $\leq$  %1, kapasite faktörü  $> 2$ , pik asimetri oranı  $\leq 1,5$ ; teorik tabaka sayısı  $> 2000$  ve ayırıcılık  $> 2$ ) dördünü karşılamaktadır (Tablo 4.12). Kapasite faktörü değeri 1,1 değeri ile bilimsel kriterleri sağlamakta ancak Türk, Amerikan ve Avrupa Farmakopelerinde yer alan  $k' > 2$  değerinin altında kalmaktadır. Aynı farmakopeler sistem uygunluğu testi için bu 5 parametreden sadece ikisinin sağlanmasını farmasötik analiz için yeterli görmektedir. Ayrıca, kapasite faktöründeki, diğer bir deyişle alıkonma zamanındaki azalma toplam analiz süresinde, bağlantılı olarak harcanan zaman, tüketilen enerji, üretilen çözücü miktarında azalmaya neden olacaktır.

### 5.2.2. Plazmadan Analiz

Yöntemin özgünlüğünün değerlendirilmesinde prokainamid standart çözeltisi, iç standart çözeltisi, boş plazma ve prokainamid ile iç standart içeren plazmaya ait kromatogramlar karşılaştırıldığında matriksten kaynaklanan bir girişim etkisi gözlenmemiştir (Şekil 4.15).

Prokainamid derişimine karşı prokainamidin pik alanının iç standardın pik alanına oranı grafiğe işaretlenince elde edilen kalibrasyon eğrisinin  $1,5-30 \mu\text{g ml}^{-1}$  aralığında doğrusal olduğu ve korelasyon katsayısının önemli bir değer olduğu istatistiksel olarak bulunmuştur. Tanımlayıcılık katsayısının 0,9940 olarak 1,000'e yakın bulunması, kalibrasyon eğrisinin doğrusal olduğunu göstermektedir (Şekil 4.16, Tablo 4.13 ve Tablo 4.14).

Prokainamidin plazmadan analizinde LOD değeri  $0,3 \mu\text{g ml}^{-1}$ , LOQ değeri ise  $0,8 \mu\text{g ml}^{-1}$  olarak hesaplanmıştır. Bu da prokainamidin terapötik derişim aralığının da altında kalan çok küçük derişimlerde bile çalışılabilecek kadar duyarlı bir yöntem geliştirildiğini, bu LOD ve LOQ değerlerinin, prokainamidin plazmada izlenebilmesi için uygun olduğunu göstermektedir.

Prokainamidin dört farklı derişiminde yapılan gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik çalışmalarında BH ve BSS değerlerinin %15'in altında, yöntemin doğru ve kesin olduğunu göstermektedir (Tablo 4.15).

Prokainamid plazma standartlarının kararlılık çalışmaları sonucunda elde edilen verilerin %85-115 aralığında olması, prokainamid plazma standartlarının oto örnekleiyici ve oda sıcaklığında 24 saat boyunca kararlı olduğunu göstermektedir. Ayrıca kısa dönem, uzun dönem ve 3 donma-erime döngüsü kararlılık çalışmalarında da elde edilen verilerin %85-115 aralığında olması, prokainamid plazma standartlarının kararlı olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.16 ve Tablo 4.17).

Matriks etkisi çalışmalarından elde edilen veriler incelendiğinde, prokainamidin matriks etkisinin %15'in altında olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.18).

Taşınma çalışmalarında ULOQ enjeksiyonundan sonra prokainamid ve IS için herhangi bir alıkonma zamanının gözlenmemesi, ULOQ enjeksiyonundan kalan prokainamid ya da IS olmadığını göstermektedir (Şekil 4.17).

Yöntemin seyreltme etkisini göstermek için yapılan çalışmalardan elde edilen veriler %85-115 aralığında yer alıp bu verilerin BSS değerleri %15'in altında hesaplanmıştır (Tablo 4.19).

Prokainamid içeren plazma numunesine ait geri kazanım çalışmalarında hesaplanan BSS değerlerinin %15'in altında olması, yöntemin plazmadan analizinin yüksek kesinlikte olduğunu göstermektedir (Tablo 4.20).

Geliştirilen yöntemin tekrarlanabilirlik çalışmalarında hesaplanan BSS değerinin %15'in altında bulunması, yöntemin tekrarlanabilir olduğunu göstermektedir (Tablo 4.21).

Plazmada dört farklı derişimde hazırlanan kalite kontrol örneklerinden elde edilen veriler incelendiğinde, her derişimdeki bütün sonuçların, olması gereken değerin  $\pm\%15$ 'inde ve ortalamasının  $\pm\%15$ 'inde olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.22).

Prokainamid plazma standartlarının analizi oluşturulan kalite kontrol kartı incelendiğinde bütün sonuçların uyarı limitleri içinde olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.18).

Prokainamidin değişik matrislerden analizi için geliştirilen HPLC yöntemleri incelendiğinde numunelerin hazırlanmasında metanol (32, 35, 36, 38, 40), kloroform (33), dietil eter, benzen (34), ACN (35, 36), hekzan (37) ve butanol (39) gibi analizci ve çevre için zararlı kimyasallar kullanılmıştır. Hareketli faz bileşiminde de ACN ve metanol gibi insan ve çevre sağlığı için zararlı olan çözücüler kullanılmıştır (Bkz. Tablo 2.4). Balla ve ark. (21) tarafından geliştirilen UPLC yöntemi çok daha düşük derişimlerde çalışma imkanı sunmasına rağmen, yöntemde numune hazırlanmasında ve hareketli faz bileşiminde metanol gibi zararlı çözücüler kullanılmıştır. Ayrıca bu yöntem gerek yüksek enerji tüketimi gerek analiz maliyetinin yüksekliği nedeniyle de yeşilleştirme stratejisi ile ters düşmektedir. Geliştirilen yöntemde farmasötik preparattan ve plazmadan analizlerde numune hazırlamada ve hareketli faz bileşiminde zararsız çözücüler kullanılarak gerek yöntem gerek numune hazırlama süreci yeşilleştirilmiştir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında prokainamidin yeşil kromatografi ile farmasötik preparattan ve plazmadan analizi için yöntem geliştirilmiştir. Kromatografik koşullar optimize edilerek Nucleodur 100-5 C8 ec (150 x 4,6 mm, 5 µm) kolon, akış hızı 1,0 ml dk<sup>-1</sup> olan 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>:Etanol (95:5, h/h) bileşimdeki hareketli faz kullanılmıştır. UV dedektörün dalga boyu 279 nm olarak seçilmiştir. Çalışmada iç standart olarak parasetamol kullanılmıştır. Analiz süresi 10 dakikadır. Yöntemin hem farmasötik preparattan hem de plazmadan prokainamid analizi için validasyonu çalışmalarında, ilgili kılavuzlarda açıklanan kriterleri karşıladığı belirlenmiştir. Ayrıca, prokainamidin terapötik plazma derişiminin 4–12 µg ml<sup>-1</sup> aralığında olduğu bildirilmektedir. Dolayısıyla, bu çalışmada geliştirilen yeşilleştirilmiş biyoanalitik yöntem gereken kıstasları sağlayarak prokainamidin TDM analizleri için uygulanabilecek kapasitededir.

Temiz su kaynaklarının hızla azaldığı ve hava kirliliğinin önemli bir sorun olduğu, bunlara bağlı olarak küresel ısınmanın ve iklim değişikliğinin etkilerini daha da belirgin bir şekilde gösterdiği dünyada çevre kirliliğinin önlenmesi için çevre dostu yöntemlerin geliştirilmesi, enerji tüketiminin azaltılması ve atık yönetimi insanlığın geleceği için daha da önem kazanmıştır. Bu düşünce ile geliştirilen yöntemin gerek ilaç endüstrisinde yapılan analizlerde gerek prokainamid uygulanan hastalarda plazma prokainamid düzeylerinin takibinde halihazırda kullanılmakta olan yöntemlere çevre dostu bir alternatif olarak değerlendirilebileceği düşünülmektedir.

Bu yaklaşım, yeşil analitik kimyanın 4, 5, 6, 7, 11 ve 12 numaralı prensiplerini karşılamaktadır. Sadece TDM analiz gerektirenler için değil diğer ilaçların farklı matrislerden farklı amaçlarla analizleri için de uygulanması insan ve çevre sağlığının korunması için önerilir.

## KAYNAKLAR

1. Henrie SA. Green Chemistry Laboratory Manual for General Chemistry: CRC Press; 2015.
2. Anastas PT, Warner JC. Green Chemistry: Theory and Practice: Oxford University Press; 1998.
3. Sharma SK, Mudhoo A. Green Chemistry for Environmental Sustainability: CRC Press; 2010.
4. Galuszka A, Migaszewski Z, Namiesnik J. The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. *Trac-Trend Anal Chem.* 2013;50:78-84.
5. Skoog DA, Holler, F.J., Crouch, S.R. Enstrümantal Analiz İlkeleri. 6 ed. Ankara: Bilim Yayıncılık; 2013.
6. Skoog DA, West, D.M., Holler, F.J. Analitik Kimya Temelleri. Ankara: Bilim Yayıncılık; 1999.
7. Genç L. Kromatografik sistemler: Anadolu Üniversitesi; 2011.
8. Krstulovic AM, Brown, P.R. Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography. New York: John Wiley and Sons; 1982.
9. de la Guardia M, Garrigues S. Challenges in Green Analytical Chemistry: Royal Society of Chemistry; 2011.
10. Safer Chemical Ingredients List [Available from: <https://www.epa.gov/saferchoice/safer-ingredients>].
11. IRIS Assessments [Available from: [https://iris.epa.gov/AtoZ/?list\\_type=alpha](https://iris.epa.gov/AtoZ/?list_type=alpha)].
12. Ellenbogen KA, Wood MA, Stambler BS. Procainamide: a perspective on its value and danger. *Heart Dis Stroke.* 1993;2(6):473-6.
13. Giardina EG. Procainamide: clinical pharmacology and efficacy against ventricular arrhythmias. *Ann N Y Acad Sci.* 1984;432:177-88.
14. Bauer LA. Applied clinical pharmacokinetics. 2nd ed. New York: McGraw-Hill Medical; 2008. xiv, 826 p. p.
15. Gorgels AP, van den Dool A, Hofs A, Mulleneers R, Smeets JL, Vos MA, et al. Comparison of procainamide and lidocaine in terminating sustained monomorphic ventricular tachycardia. *Am J Cardiol.* 1996;78(1):43-6.
16. Assoc AH, Resuscitatio ILC. Guidelines 2000 for cardiopulmonary resuscitation and emergency cardiovascular care - An international consensus on science. *Circulation.* 2000;102(8):A3-I370.
17. Fenoglio C, Boncompagni E, Chiavarina B, Cafaggi S, Cilli M, Viale M. Morphological and histochemical evidence of the protective effect of procainamide hydrochloride on tissue damage induced by repeated administration of low doses of cisplatin. *Anticancer Res.* 2005;25(6B):4123-8.



18. Shih CC, Liao MH, Hsiao TS, Hii HP, Shen CH, Chen SJ, et al. Procainamide Inhibits DNA Methylation and Alleviates Multiple Organ Dysfunction in Rats with Endotoxic Shock. *PLoS One*. 2016;11(9):e0163690.
19. Roden DM, Reece SB, Higgins SB, Wilkinson GR, Smith RF, Oates JA, et al. Antiarrhythmic efficacy, pharmacokinetics and safety of N-acetylprocainamide in human subjects: comparison with procainamide. *Am J Cardiol*. 1980;46(3):463-8.
20. Strasberg B, Sclarovsky S, Erdberg A, Duffy CE, Lam W, Swiryn S, et al. Procainamide-induced polymorphous ventricular tachycardia. *Am J Cardiol*. 1981;47(6):1309-14.
21. Balla A, Cho KH, Kim YC, Maeng HJ. Simultaneous Determination of Procainamide and N-acetylprocainamide in Rat Plasma by Ultra-High-Pressure Liquid Chromatography Coupled with a Diode Array Detector and Its Application to a Pharmacokinetic Study in Rats. *Pharmaceutics*. 2018;10(2).
22. Giardina EG, Dreyfuss J, Bigger JT, Jr., Shaw JM, Schreiber EC. Metabolism of procainamide in normal and cardiac subjects. *Clin Pharmacol Ther*. 1976;19(3):339-51.
23. Reidenberg MM, Drayer DE, Levy M, Warner H. Polymorphic acetylation procainamide in man. *Clin Pharmacol Ther*. 1975;17(6):722-30.
24. Al-Tamrah S, Al-Abbad S. Spectrophotometric determination of procainamide hydrochloride using sodium periodate. *Arab J Chem*. 2015;8(5):609-13.
25. Wang K, Guan XW, Chai SG, Zou QC, Zhang XH, Zhang JZ. A novel, molecularly imprinted polymer sensor made using an oligomeric methyl silsesquioxane-TiO<sub>2</sub> composite sol on a glassy carbon electrode for the detection of procainamide hydrochloride. *Biosens Bioelectron*. 2015;64:94-101.
26. Abbar JC, Meti MD, Nandibewoor ST. Electro-Catalytic Behavior of an Antiarrhythmic Drug, Procainamide and its Electro-Analytical Applications. *J Electrochem Sci Te*. 2018;9(4):292-300.
27. AlRabiah H, Homoda A, Bakheit A, Mostafa GAE. Cyclodextrin potentiometric sensors based on selective recognition sites for procainamide: Comparative and theoretical study. *Open Chem*. 2019;17(1):1222-34.
28. Nugbienyo L, Shishov A, Garmonov S, Moskvina L, Andruch V, Bulatov A. Flow method based on liquid-liquid extraction using, deep eutectic solvent for the spectrofluorimetric determination of procainamide in human saliva. *Talanta*. 2017;168:307-12.
29. Yamaji A, Kataoka K, Oishi M, Kanamori N, Hiraoka E, Mishima M. Simultaneous determination of procainamide and N-acetylprocainamide in serum by gas chromatography with nitrogen-selective detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 1987;415:143-7.
30. Vargas G, Havel J, Hadasova E. Direct determination of procainamide and N-acetylprocainamide by capillary zone electrophoresis in pharmaceutical formulations and urine. *Journal of Chromatography A*. 1997;772(1-2):271-6.

31. Mahar N, Haroon M, Saleh TA, Al-Saadi AA. Fast and sensitive detection of Procainamide: Combined SERS and DFT modeling studies. *J Mol Liq.* 2021;343.
32. Adams RF, Vandemark FL, Schmidt G. The simultaneous determination of lidocaine and procainamide in serum by use of high pressure liquid chromatography. *Clinica Chimica Acta.* 1976;69(3):515-24.
33. Carr K, Woosley RL, Oates JA. Simultaneous quantification of procainamide and n-acetylprocainamide with high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A.* 1976;129:363-8.
34. Rocco RM, Abbott DC, Giese RW, Karger BL. Analysis for Procainamide and N-Acetyl Procainamide in Plasma or Serum by High-Performance Liquid Chromatography. *Clinical Chemistry.* 1977;23(4):705-8.
35. Verbesselt R, Tjandramaga TB, De Schepper PJ. High-performance liquid chromatographic determination of 12 antiarrhythmic drugs in plasma using solid-phase column extraction. *Ther Drug Monit.* 1991;13(2):157-65.
36. Shahdeo K, March C, Karnes HT. Postcolumn immunodetection following conditioning of the HPLC mobile phase by on-line ion-exchange extraction. *Anal Chem.* 1997;69(20):4278-82.
37. Nazare P, Massaroti P, Duarte LF, Campos DR, Marchioretto MA, Bernasconi G, et al. Validated method for determination of bromopride in human plasma by liquid chromatography--electrospray tandem mass spectrometry: application to the bioequivalence study. *J Mass Spectrom.* 2005;40(9):1197-202.
38. Pan RN, Chian TY, Kuo BPC, Pao LH. Determination of Memantine in Human Plasma by LC-MS-MS: Application to a Pharmacokinetic Study. *Chromatographia.* 2009;70(5-6):783-8.
39. Esteve-Romero J, Martinavarro-Dominguez A, Marcos-Tomas JV, Ochoa-Aranda E, Rambla-Alegre M. Direct Injection of Plasma Samples and Micellar Chromatography of Procainamide and Its Metabolite N-Acetylprocainamide. *Chromatographia.* 2010;71(3-4):273-7.
40. Cesar IC, Bastos LFS, Godin AM, Coelho MD, Araujo DP, de Fatima A, et al. Simultaneous quantitation of nicorandil and its denitrated metabolite in plasma by LC-MS/MS: application for a pharmacokinetic study. *J Mass Spectrom.* 2011;46(11):1125-30.
41. Nugbienyo L, Malinina Y, Garmonov S, Kamencev M, Salahov I, Andruch V, et al. Automated sugaring-out liquid-liquid extraction based on flow system coupled with HPLC-UV for the determination of procainamide in urine. *Talanta.* 2017;167:709-13.
42. Demirkan SK. Terapötik İlaç Monitörizasyonu. *Yoğun Bakım Dergisi.* 2007;7(3):365-9.
43. Campbell TJ, Williams KM. Therapeutic drug monitoring: antiarrhythmic drugs. *Br J Clin Pharmacol.* 2001;52 Suppl 1:21S-34S.

44. Guideline IHT, editor Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1). International conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use; 2005: Geneva Switzerland.
45. Agency EM. Guideline on bioanalytical method validation. EMEA/CHMP/EWP/192217/2009. 2011.
46. FDA U. Bioanalytical method validation guidance for industry, US Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM), Biopharmaceutics. 2018:1-44.
47. Pharmacopeia U. United States Pharmacopeia and National Formulary (USP 37–NF 32). Rockville, MD: US Pharmacopeia. 2014.
48. Commission EP. European Pharmacopoeia Ninth Edition (PhEur 9.0). European Directorate for the Quality of Medicines: Strasbourg, France. 2016.
49. Türk Farmakopesi. Ankara, Türkiye: T.C. Sağlık Bakanlığı; 2017.
50. Shewhart Control Charts, International Standard Ref. No. ISO 8258:1991, (1991).
51. Shabir GA, John Lough W, Arain SA, Bradshaw TK. Evaluation and application of best practice in analytical method validation. Journal of liquid chromatography & related technologies. 2007;30(3):311-33.
52. Ermer J, Ploss H-J. Validation in pharmaceutical analysis: Part II: central importance of precision to establish acceptance criteria and for verifying and improving the quality of analytical data. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2005;37(5):859-70.

## Ek 1. Korelasyon Katsayısı ve Doğrusallıktan Ayrılış Önem Kontrolü

Bulunan korelasyon katsayısının önemli bir katsayı mı yoksa tesadüfe bağlı bir katsayı mı olduğu test edilmiştir.

Testin yapımında işlemler:

1.  $H_0$ : Korelasyon katsayısı tesadüfe bağlı bir değerdir ( $r = 0$ ).
2. Test istatistiğinin hesaplanması:

$$T = \frac{r}{S_r}$$

$$S_r = \left[ \frac{1 - r^2}{n - 2} \right]^{1/2}$$

$S_r$ : korelasyon katsayısının standart hatası

3. Yanılma olasılığı olarak  $\alpha = 0,05$  seçilmiştir.
4. Serbestlik derecesi =  $n - 2$
5.  $\alpha = 0.05$  düzeyinde ve 4. maddede bulunan serbestlik derecesinde tablo t değerine bakılır.
6. Karşılaştırma: Hesapla bulunan t değeri tablo t değerinden büyükse  $H_0$  hipotezi reddedilir, küçükse kabul edilir.
7. Karar: Korelasyon katsayısı önemli bir değerdir, tesadüfen bulunmuş bir değer değildir ( $t =$  Hesapla bulunan değer,  $p < 0,05$ ) veya korelasyon katsayısı önemli bir değer değildir, tesadüfen bulunmuş bir değerdir ( $t =$  Hesapla bulunan değer,  $p > 0,05$ ).

## Doğrusallıktan Ayrılış Önem Kontrolü

1. Kareler toplamları bulunur:

a) Regresyon Kareler Toplamı (RKT):

$$RKT = \frac{\left[ \Sigma_{xy} - \frac{(\Sigma_x)(\Sigma_y)}{n} \right]^2}{\Sigma_x^2 - \frac{(\Sigma_x)^2}{n}}$$

b) Y Ortalamadan Ayrılış Kareler Toplamı (YOAKT):

$$YOAKT = \Sigma_y^2 - \frac{(\Sigma_y)^2}{n}$$

c) Regresyondan Ayrılış Kareler Toplamı

$$RAKT = YOAKT - RKT$$

2. Serbestlik dereceleri bulunur:

a) Regresyon Serbestlik Derecesi (RSD) = 1

b) Y Ortalamadan Ayrılış Serbestlik Derecesi

$$YOASD = n-1$$

c) Regresyondan Ayrılış Serbestlik Derecesi

$$RASD = YOASD - RSD$$

3. Kareler ortalamaları bulunur:

a) Regresyon Kareler Ortalaması  $\Rightarrow RKT / RSD$

b) Regresyondan Ayrılış Kareler Ortalaması

$$RAKO = RAKT / RASD$$

4.  $H_0$  = Derişim ile dedektör cevabı arasındaki ilişki doğrusal değildir.

5. Yanılma olasılığı  $\alpha = 0.05$  seçilmiştir.

6.  $F = RKO / RAKO$

$$F = \frac{RKO}{RAKO}$$

7.  $p = 0.05$  düzeyinde RSD ve RASD serbestlik derecelerindeki tablo F değerleri bulunur.

8. Karşılaştırma: Hesapla bulunan F değeri tablo F değerinden büyükse  $H_0$  hipotezi reddedilir, küçükse kabul edilir.

9. Karar: Derişim ile dedektör cevabı arasındaki ilişki doğrusaldır ( $F$ =Hesapla bulunan,  $p < 0,05$ ) veya doğrusal değildir ( $F$  = Hesapla bulunan,  $p > 0.05$ ).

## Ek 2. İstatistiksel Hesaplamalar

### Bağıl Standart Sapma Hesaplanması

$$BSS = \frac{SS}{\bar{X}} \times 100$$

SS: Standart Sapma

$\bar{X}$ : Aritmetik ortalama

### %Bağıl Hata Hesaplanması

$$\%Bağıl\ Hata\ (\%BH) = \frac{(Olması\ gereken\ miktar - Bulunan\ miktar)}{Olması\ gereken\ miktar} \times 100$$

### Standart Hata Hesaplanması

$$StandartHata(SH) = \frac{SS}{\sqrt{n}}$$

SS: Standart sapma

n: Ölçüm sayısı

### %Geri Kazanım Hesaplanması

$$\%Geri\ kazanım = \frac{Bulunan\ miktar}{Olması\ gereken\ miktar} \times 100$$

### Evren Ortalaması Güven Aralığının Hesaplanması

$$\mu = \bar{X} \pm S_{\bar{X}t} \quad \text{veya} \quad \bar{X} - S_{\bar{X}} < \mu < \bar{X} + S_{\bar{X}}$$

$\mu$ : Evren ortalaması

$\bar{X}$ : Örneklem ortalaması

$S_{\bar{x}}$ : Standart hata

t: Seçilen yanılma düzeyi ( $\alpha$ ) ve n-1 serbestlik derecesindeki t tablosundaki değer.



### Ek 3. t-Testi

İki ortalama arasında fark olup olmadığını test eder.

$$s^2 = [(n_1 - 1) s_1^2 + (n_2 - 1) s_2^2] / (n_1 + n_2 - 2)$$

$$t = (\bar{x}_1 - \bar{x}_2) / [s (1/n_1 + 1/n_2)^{1/2}]$$

$n_1$ : 1.yöntemin ölçüm sayısı

$n_2$ : 2.yöntemin ölçüm sayısı

$s_1$ : 1. yöntemin standart sapması

$s_2$ : 2.yöntemin standart sapması

$\bar{x}_1$ : 1. yöntemin ortalaması

$\bar{x}_2$ : 2.yöntemin ortalaması

Serbestlik derecesi=  $n_1 + n_2 - 2$

1.  $H_0$  = İki ortalama arasında fark yoktur.

2.  $\alpha=0.05$  yanılma düzeyinde ve  $n_1 + n_2 - 2$  serbestlik derecesindeki tablo t değerine bakılır.

3. Karşılaştırma: Hesapla bulunan t değeri tablo t değerinden büyükse  $H_0$  hipotezi reddedilir, küçükse kabul edilir.

4. Karar:

a) Ortalamalar arasında fark yoktur ( $t =$  Hesaplanan değer,  $p > 0,05$ ).

b) Ortalamalar arasında fark vardır ( $t =$  Hesaplanan değer,  $p < 0,05$ ).

#### Ek 4. Mann-Whitney U Testi

Parametrik test varsayımları yerine getirilmediğinde, iki bağımsız gruba ilişkin ortalamaların karşılaştırılmasında kullanılır.

Mann–Whitney U testinde, gruptaki gözlem sayılarına bağlı olarak iki farklı test istatistiği vardır. Her iki gruptaki gözlem sayıları 20 ya da daha az olduğunda test işlemleri:

$H_0$ : İki dağılım arasında fark yoktur.

$H_1$ : İki dağılım arasında fark vardır.

$$U_1 = n_1n_2 + [n_1(n_1 + 1)] / 2 - R_1$$

$$U_2 = n_1n_2 - U_1$$

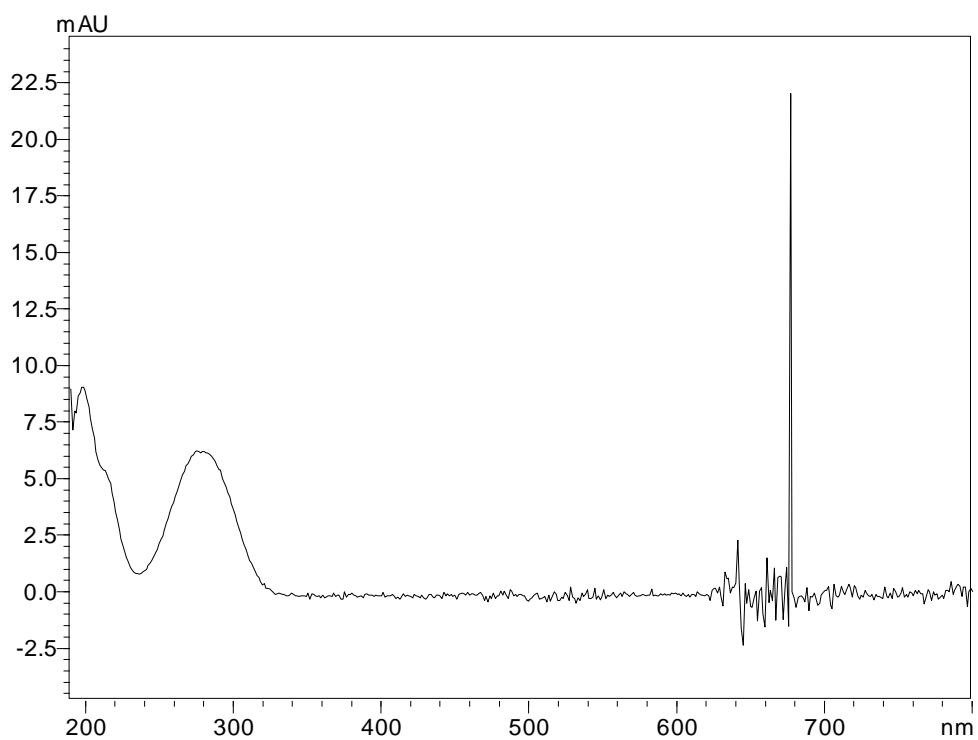
ile verilir. Burada;

$n_1$ = Birinci gruptaki gözlem sayısı

$n_2$ = İkinci gruptaki gözlem sayısı

$R_1$ = Birinci gruptaki değerlerin sıra numaralı toplamı

İstatistiksel karar için;  $U_1$  ve  $U_2$  değerinden büyük olanı seçilen  $\alpha$  yanılma düzeyindeki  $n_1$  ve  $n_2$  serbestlik dereceli  $U_{Tablo}$  istatistiği ile karşılaştırılır.  $U_{Hesap} > U_{Tablo}$  ise  $H_0$  hipotezi kabul edilir,  $U_{Tablo} > U_{Hesap}$  ise  $H_0$  hipotezi reddedilir.

**Ek 5. Prokainamidin UV/GB Spektrumu**

## Ek 6. Orijinallik Raporu Örneği

<p>Turnitin Orijinallik Raporu</p> <p>İşleme kodu: 18-Şub-2022 08:36 +03          NUMARA: 1765234586          Kelime Sayısı: 16748          Gönderildi: 1</p> <p><b>PROKAINAMİDİN FARMASÖTİK PREPARATTAN VE PLAZMADAN YEŞİL HPLC İLE ANALİZİ</b> Murat Ülgen tarafından</p>		<p>Benzerlik Endeksi</p> <p><b>%20</b></p>	<p>Kaynağa göre Benzerlik</p> <p>İnternet Sources: %20          Yayınlar: %2          Öğrenci Ödevleri: %8</p>
---	--	--	--

2% match (09-Şub-2022 tarihli öğrenci ödevleri) Submitted to Hacettepe University on 2022-02-09
1% match (10-Şub-2022 tarihli İnternet) <a href="https://acikbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20.500.12812/494176/yokAcikBilim_325610.pdf?isAllowed=y8sequence=-1">https://acikbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20.500.12812/494176/yokAcikBilim_325610.pdf?isAllowed=y8sequence=-1</a>
1% match (13-Oca-2022 tarihli İnternet) <a href="https://acikbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20.500.12812/491923/yokAcikBilim_10121038.pdf?isAllowed=y8sequence=-1">https://acikbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20.500.12812/491923/yokAcikBilim_10121038.pdf?isAllowed=y8sequence=-1</a>
1% match (10-Şub-2022 tarihli İnternet) <a href="https://acikbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20.500.12812/494810/yokAcikBilim_9002629.pdf?isAllowed=y8sequence=-1">https://acikbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20.500.12812/494810/yokAcikBilim_9002629.pdf?isAllowed=y8sequence=-1</a>
1% match (07-May-2019 tarihli İnternet) <a href="http://www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080/xmlui/bitstream/handle/11655/3715/TEZ-bas%4c4%b1lan.pdf?isAllowed=y8sequence=1">http://www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080/xmlui/bitstream/handle/11655/3715/TEZ-bas%4c4%b1lan.pdf?isAllowed=y8sequence=1</a>
1% match (07-May-2019 tarihli İnternet) <a href="http://www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080/xmlui/bitstream/handle/11655/1163/7545314e-c99-4ff5-88f4-4cbd4f41da57.pdf?isAllowed=y8sequence=1">http://www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080/xmlui/bitstream/handle/11655/1163/7545314e-c99-4ff5-88f4-4cbd4f41da57.pdf?isAllowed=y8sequence=1</a>
1% match (07-Kas-2021 tarihli İnternet) <a href="https://www.products.pcc.eu/tr/blog/yesil-kimyanin-12-ilkisi-bize-ne-ogretiyor/">https://www.products.pcc.eu/tr/blog/yesil-kimyanin-12-ilkisi-bize-ne-ogretiyor/</a>
1% match (16-Nis-2018 tarihli İnternet) <a href="http://docs.neu.edu.tr/library/6242449963.pdf">http://docs.neu.edu.tr/library/6242449963.pdf</a>
1% match (07-May-2019 tarihli İnternet) <a href="https://polen.itu.edu.tr/bitstream/11527/7407/1/13439.pdf">https://polen.itu.edu.tr/bitstream/11527/7407/1/13439.pdf</a>
1% match (07-Haz-2017 tarihli İnternet) <a href="http://documents.mx/documents/farmasotik-gelistirme-gc-halc.html">http://documents.mx/documents/farmasotik-gelistirme-gc-halc.html</a>
1% match (18-Oca-2022 tarihli İnternet) <a href="https://sp.trdizin.gov.tr/makale/7XpVME1GTxNdz09/investigation-of-the-presence-of-sildenafil-in-herbal-dietary-supplements-by-validated-hplc-method">https://sp.trdizin.gov.tr/makale/7XpVME1GTxNdz09/investigation-of-the-presence-of-sildenafil-in-herbal-dietary-supplements-by-validated-hplc-method</a>
1% match (08-Mar-2021 tarihli İnternet) <a href="http://docplayer.biz.tr/15367939-Terapotik-Ilac-Monitorizasyonu.html">http://docplayer.biz.tr/15367939-Terapotik-Ilac-Monitorizasyonu.html</a>
< 1% match (17-Şub-2022 tarihli İnternet) <a href="https://acikbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20.500.12812/55383/yokAcikBilim_9001098.pdf?isAllowed=y8sequence=-1">https://acikbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20.500.12812/55383/yokAcikBilim_9001098.pdf?isAllowed=y8sequence=-1</a>
< 1% match (17-Şub-2022 tarihli İnternet) <a href="https://acikbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20.500.12812/54486/yokAcikBilim_10183101.pdf?isAllowed=y8sequence=-1">https://acikbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20.500.12812/54486/yokAcikBilim_10183101.pdf?isAllowed=y8sequence=-1</a>
< 1% match (17-Şub-2022 tarihli İnternet) <a href="https://acikbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20.500.12812/55136/yokAcikBilim_9001068.pdf?isAllowed=y8sequence=-1">https://acikbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20.500.12812/55136/yokAcikBilim_9001068.pdf?isAllowed=y8sequence=-1</a>
< 1% match (12-Oca-2022 tarihli İnternet) <a href="https://acikbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20.500.12812/437501/yokAcikBilim_10324366.pdf?isAllowed=y8sequence=-1">https://acikbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20.500.12812/437501/yokAcikBilim_10324366.pdf?isAllowed=y8sequence=-1</a>
< 1% match (17-Şub-2022 tarihli İnternet) <a href="https://acikbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20.500.12812/55316/yokAcikBilim_304293.pdf?isAllowed=y8sequence=-1">https://acikbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20.500.12812/55316/yokAcikBilim_304293.pdf?isAllowed=y8sequence=-1</a>
< 1% match (17-Şub-2022 tarihli İnternet) <a href="https://acikbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20.500.12812/54439/yokAcikBilim_10193779.pdf?isAllowed=y8sequence=-1">https://acikbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20.500.12812/54439/yokAcikBilim_10193779.pdf?isAllowed=y8sequence=-1</a>
< 1% match (10-Şub-2022 tarihli İnternet) <a href="https://acikbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20.500.12812/459784/yokAcikBilim_10167819.pdf?isAllowed=y8sequence=-1">https://acikbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20.500.12812/459784/yokAcikBilim_10167819.pdf?isAllowed=y8sequence=-1</a>
< 1% match (10-Şub-2022 tarihli İnternet) <a href="https://acikbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20.500.12812/54420/yokAcikBilim_10214289.pdf?isAllowed=y8sequence=-1">https://acikbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20.500.12812/54420/yokAcikBilim_10214289.pdf?isAllowed=y8sequence=-1</a>
< 1% match (10-Oca-2022 tarihli İnternet) <a href="https://acikbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20.500.12812/121512/yokAcikBilim_10104103.pdf?isAllowed=y8sequence=-1">https://acikbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20.500.12812/121512/yokAcikBilim_10104103.pdf?isAllowed=y8sequence=-1</a>
< 1% match (10-Şub-2022 tarihli İnternet) <a href="https://acikbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20.500.12812/355711/yokAcikBilim_10020641.pdf?isAllowed=y8sequence=-1">https://acikbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20.500.12812/355711/yokAcikBilim_10020641.pdf?isAllowed=y8sequence=-1</a>
< 1% match (17-Şub-2022 tarihli İnternet)

## Ek 7. Dijital Makbuz



### Dijital Makbuz

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Murat Ülgen  
Ödev başlığı: PROKAİNAMİDİN FARMASÖTİK PREPARATTAN VE PLAZMADA...  
Gönderi Başlığı: PROKAİNAMİDİN FARMASÖTİK PREPARATTAN VE PLAZMADA...  
Dosya adı: Murat\_LGEN\_02.22\_R5.docx  
Dosya boyutu: 808.63K  
Sayfa sayısı: 100  
Kelime sayısı: 16,748  
Karakter sayısı: 109,012  
Gönderim Tarihi: 18-Şub-2022 08:33ÖÖ (UTC+0300)  
Gönderim Numarası: 1765234586



## ÖZGEÇMİŞ