

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

**BAZI ANTİVİRAL İLAÇLARIN FARMASÖTİK DOZAJ
ŞEKİLLERİNDEN VE PLAZMADAN SIVI KROMATOĞRAFİSİ
İLE NİCEL ANALİZLERİ**

Dr. Ecz. Mehmet Emre ÖZDEMİRHAN

**Analitik Kimya Programı
DOKTORA TEZİ**

ANKARA

2025

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

**BAZI ANTİVİRAL İLAÇLARIN FARMASÖTİK DOZAJ
ŞEKİLLERİNDEN VE PLAZMADAN SIVI KROMATOĞRAFİSİ
İLE NİCEL ANALİZLERİ**

Dr. Ecz. Mehmet Emre ÖZDEMİRHAN

**Analitik Kimya Programı
DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Emirhan NEMUTLU**

**ANKARA
2025**

**BAZI ANTİVİRAL İLAÇLARIN FARMASÖTİK DOZAJ ŞEKİLLERİNDEN
VE PLAZMADAN SIVI KROMATOĞRAFİSİ İLE NİCEL ANALİZLERİ**

Uzm. Ecz. Mehmet Emre ÖZDEMİRHAN

Danışman: Prof. Dr. Emirhan NEMUTLU

Bu tez çalışması 13.02.2025 tarihinde jürimiz tarafından “Analitik Kimya Programı”nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: *Prof. Dr. Sibel A. ÖZKAN*

Ankara Üniversitesi

Üye: *Prof. Dr. Nursabah Elif BAŞCI AKDUMAN*

Hacettepe Üniversitesi

Üye: *Prof. Dr. İncilay SÜSLÜ*

Hacettepe Üniversitesi

Üye: *Prof. Dr. Nafiz Öncü CAN*

Anadolu Üniversitesi

Üye: *Prof. Dr. Mustafa ÇELEBİER*

Hacettepe Üniversitesi

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

13 Mart 2025

Prof. Dr. Müge YEMİŞCİ 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.

o Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. (1)

o Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 6 ay ertelenmiştir. (2)

o Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir.

13/02/2025

Mehmet Emre ÖZDEMİRHAN

“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 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. Emirhan NEMUTLU danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Dr.Ecz. Mehmet Emre ÖZDEMİRHAN

TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışmamın yürütülmesinde bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren ve hiçbir desteğini esirgemeyen Prof. Dr. Sayın Emirhan NEMUTLU'ya,

Yüksek Lisans eğitimimde yoluma ışık tutan Prof. Dr. Sayın Nafiz Öncü CAN'a ve eczacılık eğitimimin her aşamasında bana katkı sağlayan değerli hocalarıma,

Tez izleme komitesinde yer alarak değerli katkılarda bulunan Prof. Dr. Sayın Sedef KIR, Prof. Dr. Sayın Nilgün GÜNDEMEN GÖĞER, Prof. Dr. Sayın Nursabah Elif BAŞCI AKDUMAN ve Prof. Dr. Sayın İncilay SÜSLÜ'ye,

Yayın ve tez çalışmalarındaki önemli katkıları ve değerli fikirleri için Öğr. Gör. Dr. Sayın Gürkan ÖZEN'e

Ekstraksiyon çalışmalarında bilgi ve desteğini her zaman paylaşan Doç. Dr. Sayın Ezel BOYACI'ya ve analizlerde kullanılan fiberleri sentezleyen, ekstraksiyon alanındaki tecrübelerini paylaşan Yük. Kim. Sayın Şeyma KIR'a,

Klinik çalışmaların yapılmasına olanak sağlayan Doç. Dr. Sayın Ahmet Çağkan İNKAYA'ya ve antivirallerin hastalara verilmesinde ve numune alınmasında gösterdiği özenden dolayı Arş. Gör. Dr. Sayın Merve ARASLAN'a,

Analitik Kimya Anabilim Dalı bünyesindeki hocalarıma ve çalışma arkadaşlarıma,

Etken madde sağlayarak bilime katkı veren Ali Raif İlaç Sanayi A.Ş., Atabay Kimya Sanayi ve Tic. A.Ş., İLKO İlaç San. ve Tic. A.Ş., Nobel İlaç Sanayii ve Ticaret A.Ş., Polifarma İlaç San. ve Tic. A.Ş. ve World Medicine İlaç San. ve Tic. A.Ş. İlaça,

Enerjisiyle beni motive tutan can dostum Dr. Ecz. Aykut DEDE'ye

Tez çalışmam boyunca beni destekleyen ve hep yanımda olan sevgili eşim Seher'e ve tüm aileme teşekkürlerimi sunarım.

Babama

ÖZET

Özdemirhan M.E., Bazı Antiviral İlaçların Farmasötik Dozaj Şekillerinden ve Plazmadan Sıvı Kromatografisi ile Nicel Analizleri, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Programı Doktora Tezi, Ankara, 2025.

Antiviral ilaçlar, insan sağlığını tehdit eden viral enfeksiyonların tedavisinde hayati öneme sahiptir. Bu ilaçların geliştirilmesi ve kullanıma sunulması sürecinde, kalite kontrol analizlerinin büyük bir titizlikle yapılması gerekmektedir. Bu tez çalışmasında, antiviral ilaçların analizine yönelik farmasötik dozaj şekillerinden ve plazma örneklerinden analizleri için iki farklı yöntem geliştirilmiştir. İlk olarak, altı antiviral ilacın (emtrisitabin, entekavir, favipiravir, gansiklovir, valasiklovir ve valgansiklovir) eş zamanlı olarak tayin edilmesi için yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi geliştirilmiştir. Geliştirilen HPLC yöntemi, 50 mM fosfat tamponu (pH 4): asetonitril (90:10, h/h) hareketli fazı kullanılarak Exsil™ Mono 100 C18 kolonunda, 0.5 mL/dakika akış hızı ile gerçekleştirilmiştir. UV dedeksiyonu 215 nm'de yapılmıştır. Yöntem, Uluslararası Uyumlaştırma Konseyi (ICH) Q2(R2) kılavuzlarına göre valide edilmiş ve yöntemin doğrusal ($R^2 > 0.9938$), hassas, kesin ($< \%1.97$ BSS), doğru ($< \%1.34$ BH) ve sağlam olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, yöntemin çevresel etkisi (AGREE puanı: 0.79), pratikliği (BAGI indeksi: 85) ve sürdürülebilirliği (Beyazlık değeri: 74.7) açısından da başarılı olduğu gösterilmiştir. Son olarak geliştirilen yöntem ticari preparatlara uygunlamış ve elde edilen sonuçların etiket içeriği ile uyumlu olduğu gösterilmiştir. İkinci olarak, dokuz antiviral ilacın (asiklovir, emtrisitabin, entekavir, gansiklovir, lamivudin, lopinavir, oseltamivir, valasiklovir ve valgansiklovir) plazmadan analizleri için Katı Faz Mikro Tüketme (SPME) ile Sıvı Kromatografisi Tandem Kütle Spektrometrisi (LC-MS/MS) yöntemi geliştirilmiştir. LC-MS/MS yöntemi C8 kolon kullanılarak %0.1 formik asit içeren su ve asetonitril hareketli fazlarının gradient elüsyon uygulaması ile gerçekleştirilmiştir. Hareketli faz akış hızı 0.35 mL/dakika ve kolon sıcaklığı 40 °C'ye ayarlanmıştır. SPME-LC-MS/MS yöntemi ICH 10M kılavuzuna göre valide edilmiştir. Geliştirilen yöntem 5-1000 ng/mL aralığında doğrusal ($R^2 > 0.99$) bulunmuştur. LOD değerleri 2 - 48 ng/mL arasında değişirken, LOQ değerleri 10 - 1.45 ng/mL arasında bulunmuştur. Gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk değerleri %15'ten düşük bulunmuştur. Ayrıca, yöntemin küçük değişimlere karşı kararlı olduğu sağlamlık çalışması ile gösterilmiştir. Geliştirilen SPME-LC-MS/MS yöntemi, hasta örneklerinde başarıyla uygulanmıştır. Sonuç olarak, bu tez çalışmasında geliştirilen her iki yöntem de antiviral ilaç analizlerinde güvenilir ve etkili sonuçlar sunmaktadır. Geliştirilen bu yöntemlerin, antiviral ilaçların kalitesinin kontrolünde ve tedavi süreçlerinin izlenmesinde önemli bir rol oynayacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Antiviral, katı faz mikro tüketme (SPME), sıvı kromatografisi, plazma, farmasötik ürünler.

ABSTRACT

Özdemirhan M.E., Quantitative Analysis of Some Antiviral Drugs from Pharmaceutical Dosage Forms and Plasma by Liquid Chromatography, Hacettepe University Graduate School Health Sciences Pharmacy Department of Analytical Chemistry Doctor of Philosophy Thesis, Ankara, 2025. Antiviral drugs are crucial in the treatment of viral infections that pose a threat to human health. During the development and implementation of these drugs, quality control analyses must be carried out with great care. In this thesis, two different methods were developed for the analysis of antiviral drugs from pharmaceutical dosage forms and plasma samples. First, a high-performance liquid chromatography (HPLC) method was developed for the simultaneous determination of six antiviral drugs (emtricitabine, entecavir, favipiravir, ganciclovir, valacyclovir, and valganciclovir). The developed HPLC method was performed using a 50 mM phosphate buffer (pH 4): acetonitrile (90:10, v/v) mobile phase on an Exsil™ Mono 100 C18 column at a flow rate of 0.5 mL/minute. UV detection was performed at 215 nm. The method was validated according to the International Council for Harmonisation (ICH) Q2(R2) guidelines and was found to be linear ($R^2 > 0.9938$), sensitive, precise (RSD < 1.97%), accurate (bias < 1.34%), and robust. Furthermore, the method was shown to be successful in terms of its environmental impact (AGREE score: 0.79), practicality (BAGI index: 85), and sustainability (whiteness value: 74.7). Finally, the developed method was applied to commercial preparations and the results obtained were shown to be in agreement with the label content. Secondly, a Solid Phase Microextraction (SPME) coupled with Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) method was developed for the analysis of nine antiviral drugs (acyclovir, emtricitabine, entecavir, ganciclovir, lamivudine, lopinavir, oseltamivir, valacyclovir and valganciclovir) from plasma. The LC-MS/MS method was performed using a C8 column with a gradient elution of water and acetonitrile mobile phases containing 0.1 % formic acid. The mobile phase flow rate was set at 0.35 mL/minute and the column oven temperature was set to 40°C. The SPME-LC-MS/MS method was validated according to the ICH 10M guideline. The developed method was found to be linear ($R^2 > 0.99$) in the range of 5-1000 ng/mL. The LOD values ranged from 2 to 48 ng/mL, while the LOQ values ranged from 10 to 1.45 ng/mL. Intra-day and inter-day precision and accuracy values were found to be less than 15%. In addition, the robustness study showed that the method was stable against small changes. The developed SPME-LC-MS/MS method was successfully applied to patient samples. In conclusion, both methods developed in this thesis provide reliable and effective results in the analysis of antiviral drugs. It is believed that these developed methods will play an important role in the quality control of antiviral drugs and in the monitoring of treatment processes.

Key Words: Antiviral, solid phase microextraction (SPME), liquid chromatography, plasma, pharmaceuticals.

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	xvii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Antiviral İlaçlar	3
2.1.1. Sınıflandırmaları	3
2.1.2. Etki Mekanizmaları	5
2.1.3. Direnç ve Klinik Kullanımları	6
2.1.4. Yan Etkileri	8
2.1.5. Kimyasal Yapıları	9
2.1.6. Çözünürlük Özellikleri	10
2.2. Ayırma Teknikleri	17
2.2.1. Sıvı-Katı Tüketme	17
2.2.2. Sıvı-Katı Mikro Tüketme (SPME)	18
2.2.3. Sıvı Kromatografisi	20
2.2.4. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) [80-82]	21
2.3. Kromatografide Temel Parametreler [80-83]	26
2.3.1. Alıkonma Zamanı ve Kapasite Faktörü	26
2.3.2. Seçicilik	27
2.3.3. Kolon Etkinliği	27
2.3.4. Ayırıcılık	28
2.3.5. Pik Simetrisi	28
2.4. Analitik Yöntemlerin Yeşilliği, Maviliği ve Beyazlığı	29

2.4.1. Yeşillik	29
2.4.2. Mavilik	32
2.4.3. Beyazlık	33
3. GEREÇ VE YÖNTEM	36
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	36
3.2. Kullanılan Cihazlar	36
3.3. Kullanılan Cam ve Sarf Malzemeler	37
3.4. Çözeltilerin Hazırlanması	37
3.5. Antivirallerin Farmasötik Dozaj Şeklinden Analizleri	40
3.5.1. Numune Hazırlanması	40
3.5.2. Plasebo Numuneler	40
3.5.3. Kromatografik Şartlar	41
3.5.4. Farmasötik Preparattan Analizler için Validasyon Çalışmaları	42
3.5.5. Yöntemin Yeşillik, Mavilik ve Beyazlığı	44
3.6. Antivirallerin Plazma Örneklerinden LC-MS/MS ile Analizleri	44
3.6.1. SPME Polimer Sentezleri:	44
3.6.2. SPME	46
3.6.3. Kalibrasyon Eğrilerinin Hazırlanması	47
3.6.4. Numunelerin Hazırlanması	47
3.6.5. Analiz Yöntemi	48
3.6.6. Kromatografik Koşullar	48
3.6.7. Plazmadan Analizler için Validasyon Çalışmaları	49
4. BULGULAR	53
4.1. Farmasötik Dozaj Şekillerinden Antivirallerin Analizleri İçin HPLC Yöntemi Bulguları	53
4.1.1. HPLC Yönteminin Optimizasyon Çalışmaları	53
4.1.2. Validasyon	58
4.1.3. Antivirallerin Farmasötik Dozaj Şekillerinden Analizleri	64
4.1.4. Yöntemin Yeşillik, Mavilik ve Beyazlığı	65
4.2. Plazmadan Antivirallerin Analizleri İçin SPME-LC-MS/MS Yöntemi Bulguları	67
4.2.1. LC-MS/MS Yöntem Optimizasyonu	67

4.2.2. Sistem Uygunluğu	69
4.2.3. SPME Optimizasyon alışmaları	69
4.2.4. Validasyon	76
5. TARTIşMA	86
5.1. Farmasötik Dozaj şekillerinden Antivirallerin Analizleri İçin HPLC Yöntemi	86
5.1.1. Yöntem Optimizasyonu	86
5.1.2. Validasyon	90
5.2. Plazmadan Antivirallerin Analizleri İçin LC-MS/MS Yöntemi	95
5.2.1. LC-MS/MS Yöntem Optimizasyonu	95
5.2.2. SPME Yöntem Optimizasyonu	96
5.2.3. LC-MS/MS Yöntem Validasyonu	101
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	106
7. KAYNAKLAR	
8. EKLER	
EK-1: Sağlık Bilimleri Araştırma Etik Kurulu - Kurul Kararı	
EK-2: Tez alışması Orijinallik Raporu	
EK-3: Tez alışması Orijinallik Raporu - Dijital Makbuz	
9. ÖZGEçMİş	

SİMGELER VE KISALTMALAR

ACN	Asetonitril
ANOVA	Tek Yönlü Varyans Analizi
As	Asimetri Oranı
ASI	Asiklovir
BSS	Bağıl Standart Sapma
cm	Santimetre
D	Dağılma Katsayısı
DAD	Dizi Diyot Dedektör
dak	Dakika
EMT	Emtrisitabin
ENT	Entekavir
FAV	Favipiravir
GAN	Gansiklovir
GC	Gaz Kromatografisi
h	Hacim
H	Eşdeğer Teorik Tabaka Yüksekliği
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
ICH	Uluslararası Uyumlaştırma Konseyi
IS	İç Standart
k	Dağılma Katsayısı
k'	Kapasite Faktörü
kg	Kilogram
L	Litre
LC	Sıvı Kromatografisi
LC-MS/MS	Sıvı Kromatografisi-Tandem Kütle Spektrometrisi
LLOQ	Düşük Alt Tayin Sınırı
LOD	Gözlenebilme Sınırı
LOQ	Alt Tayin Sınırı
m	Metre
MA	Moleküler Ağırlık
MeOH	Metanol

mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
mm	Milimetre
MRM	Çoklu Reaksiyon İzleme
MS	Kütle Spektrometrisi
N	Etkinlik (Teorik Tabaka Sayısı)
ng	Nanogram
nm	Nanometre
P	Partisyon Katsayısı
pKa	Asitlik Ayrışma Sabiti
PP	Polipropilen
r	Korelasyon Katsayısı
R²	Tanımlayıcılık Katsayısı
RE	Bağlı Hata
RP-HPLC	Ters Faz Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
Rs	Ayrılcılık
RSD	Bağlı Standart Sapma
s	Saniye
SAX	Kuvvetli Anyon Değiştirici
SCX	Kuvvetli Katyon Değiştirici
SH	Standart Hata
SIM	Seçici İyon İzleme
SPE	Katı Faz Tüketme
SS	Standart Sapma
t_R	Alıkonma Zamanı
USP-NF	Amerika Birleşik Devletleri Farmakopesi
UV	Ultraviyole (Morötesi)
UV/GB	Ultraviyole/Görünür Bölge
VAL	Valasiklovir
VLG	Valgansiklovir
WAX	Zayıf Anyon Değiştirici

WCX	Zayıf Katyon Değiştirici
α	Seçicilik
μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Tez çalışmasında kullanılan antivirallerin kimyasal yapıları	11
2.2. HPLC cihazı kısımlarının şematik gösterimi	21
2.3. Kapasite faktörünün hesaplanması	26
2.4. Pik asimetri oranının hesaplanması	29
4.1. Antiviral standart çözeltilerin UV spektrumları	53
4.2. Hareketli fazdaki ACN oranının alıkonma zamanları üzerindeki etkisi	54
4.3. Hareketli faz pH değerinin antivirallerin çeşitli sistem uygunluk parametreleri üzerindeki etkisi	56
4.4. Hareketli fazın tampon derişiminin antivirallerin alıkonma zamanları üzerindeki etkisi	57
4.5. Kolon sıcaklığı (°C) antivirallerin alıkonma zamanları üzerindeki etkisi	58
4.6. Optimum kromatografik şartlar altında antiviraller için elde edilen kromatogram.	59
4.7. Optimum kromatografik şartlar altında elde edilen kromatogramlar: (A) Her bir antiviral için plasebo çözeltileri (B) LOQ seviyelerinde hazırlanan standart çözelti	61
4.8. Optimum kromatografik şartlarda analiz edilen farmasötik tablet (100 µg/mL antiviral içeren çözelti) örneklerinin temsili kromatogramı.	65
4.9. Geliştirilen yöntemin sürdürülebilirlik değerlendirmesi: A) AGREE puanı, B) AGREEprep puanı, C) BAGI indeksi ve D) RGB12 Beyazlık puanı.	66
4.10. Optimum koşullar altındaki antiviral standartlarına ait (1 µg/mL) LC-MS/MS kromatogramları	68
4.11. Farklı fiberlerin antivirallerin geri kazanımlarına etkisi	70
4.12. Antivirallerin tüketiminde desorpsiyon çözeltilisinin etkisi; A) HLB ve B) HLB-SCX fiberleri	71
4.13. Antivirallerin tüketiminde ikinci kez gerçekleştirilen desorpsiyon çözeltilisi içindeki % antiviral miktarı; A) HLB ve B) HLB-SCX fiberleri	72
4.14. Antivirallerin tüketiminde desorpsiyon zamanının etkisi; A) HLB ve B) HLB-SCX fiberleri	73
4.15. Antivirallerin tüketiminde pH etkisi; A) HLB ve B) HLB-SCX fiberleri	74
4.16. Antivirallerin SPME'den analizlerinde tüketme zamanının etkisi	75
4.17. Seyreltme etkisinin antivirallerin tüketimine etkisi	76
4.18. Antiviral standart çözeltilerinin LLOQ derişimindeki LC-MS/MS kromatogramları	77

4.19. Boş plazma kromatogramlarına ait LC-MS/MS kromatogramları	78
4.20. Tüm antivirallere ait donma çözünme kararlılık çalışmaları	80
4.21. Antivirallerin LC-MS/MS analizlerinde seyreltme bütünlüğü etkisi	84
4.22. Antivirallerin LC-MS/MS analizlerinde elde edilen taşınma etkisi kromatogramları	85

TABLOLAR

Tablo	Sayfa
2.1. ATC/DDD İndeksine göre antiviral ilaçların sınıflandırılması	4
2.2. Tez çalışmasında kullanılan antivirallerin fiziksel ve kimyasal özellikleri	10
2.3. Antiviral etken maddelerin çözünürlük özellikleri	12
2.4. Tez kapsamında çalışılan antivirallerin farmasötik dozaj şekillerinden ve biyolojik materyallerden analizleri	14
2.5. Analitik ayrımlardaki faz transferleri.	17
3.1. Sağlık çalışması için parçalı faktöriyel tasarım	43
3.2. Sağlık çalışmaları için parametreler ve seviyeleri	44
3.3. Hastaların demografik bilgileri	47
3.4. LC-MS/MS analizleri için gradient elüsyon şartları	49
3.5. LC-MS/MS analiz parametreleri.	49
3.6. Sağlık çalışması için parçalı faktöriyel tasarım	51
3.7. Sağlık çalışmaları için parametreler ve seviyeleri	51
4.1. HPLC yöntemine ait kromatografik şartlar	54
4.2. HPLC yöntemine ait sistem uygunluk sonuçları	59
4.3. Antiviral analizlerinden ANOVA ile elde edilen doğrusallık parametreleri	62
4.4. Gün içi – günler arası kesinlik ve doğruluk değerleri	63
4.5. HPLC yönteminin geri kazanım çalışmalarının sonuçları	63
4.6. Her değişkenin antivirallerin alıkonma zamanları için p değerleri	64
4.7. Antiviral içeren farmasötik dozaj şekillerinin analizinde HPLC ile elde edilen sonuçlar	65
4.8. Antivirallere ait optimum MRM değerleri	67
4.9. LC-MS/MS yöntemine ait sistem uygunluk sonuçları (n=6)	69
4.10. SPME optimizasyon çalışmalarında kullanılan desorpsiyon çözeltileri	71
4.11. Antiviral analizlerinden ANOVA ile elde edilen doğrusallık parametreleri	81
4.12. LC-MS/MS yöntemi için gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk değerleri	81
4.13. LC-MS/MS yöntemi için plazmadan geri kazanım çalışmaları sonuçları (n=4)	82
4.14. Her değişkenin antivirallerin alıkonma zamanları için p değerleri	83
4.15. Her değişkenin antivirallerin pik alan için p değerleri	83

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Virüsler genellikle submikroskopik bakterileri geçirmeyen filtrelerden geçebilen, tek tip nükleik asit ile protein bir kılıf içeren enfeksiyona sebep olan ajanlardır. Virüsler hücre içi zorunlu parazitlerdir. Virologların çalışmaları sonucu virüsler 50 familya altında toplanmış ve sınıflandırmasında Viral nükleik asit tipi (DNA veya RNA), nükleik asitin yapısı (halkasal, doğrusal, tek-çift zincirli) ve zarf olup olmaması gibi üç önemli özellik göz önüne alınmıştır [1].

Virüslerin çoğalması tüm canlılardan farklı olarak kendisine özgü bir yolla gerçekleşir. Zorunlu bir hücre içi mikroorganizma olan virüsün replikasyonu, kendisine uygun bir konak hücreye tutunması ile başlar hücre içerisine giriş, kapsidin soyulması, biyosentez, virüsün toplanması, olgunlaşma basamaklarını takiben oluşturulan birçok yeni virüs parçacığının konak hücreden ayrılması ile son bulur. Virüsler birçok enfeksiyonun yanı sıra kanserin oluşumunda da önemli rol oynar [2].

Virüsler, insanlarda soğuk algınlığı, grip, suçiçeği, uçuklar, kuduz, Ebola, AIDS (HIV), kuş gribi ve hepatit gibi birçok ciddi hastalığa neden olmaktadır [2]. Bununla birlikte, akut solunum yolu hastalıklarına yol açan en önemli etkenlerdendir. Bu hastalıklar insanlarda yüksek oranda görülebilmekte, ciddi derecede iş gücü kaybıyla ve hatta ölümle sonuçlanabilmekte, her yıl dünya genelinde iki milyondan fazla kişinin hayatını kaybetmesine neden olmaktadır. Günümüzde sağlık alanındaki ilerleyen teknolojiyle virüs enfeksiyonlarına karşı antiviral ilaçların kullanımı devam etmektedir [2].

İlk antiviral ilaç olan idoksuridin 1963 yılında onaylandığından beri, enfeksiyon kaynaklı hastalıkların tedavisi için çeşitli işlevsel gruba ayrılan 90 antiviral ilaç resmen onaylanmıştır [3]. Antiviral ilaçlar, Anatomik Terapötik Kimyasal Sınıflandırma Sistemi'nde (ATC/DDD İndeksi), aktif bileşenlerine, etkiledikleri sisteme, farmakolojik ve kimyasal özelliklerine göre on iki ayrı gruba sınıflandırılır [4, 5]. Çalışmamızda, Türkiye'de lisanslanmış 5 gruptan (iç standart molnupiravir ile birlikte) on bir antiviral madde kullanılmıştır [6].

Bu tez çalışmasının temel amacı, antiviral ilaçların analizinde yeni yöntemler geliştirerek, ilaçların kalitesinin kontrolünü ve tedavi süreçlerinin izlenmesini daha etkin hale getirmektir. Literatürde antiviral ilaçların çoğunlukla tek tek analiz edildiği, eş zamanlı analiz yöntemlerinin ise sınırlı olduğu görülmüştür. Bu nedenle, bu çalışmada hem farmasötik formülasyonlardaki hem de insan plazmasındaki antiviral ilaçların tayini için iki ayrı yöntem geliştirilmesi ve valide edilmesi planlanmıştır.

Bu amaçla çalışmanın ilk aşamasında, altı antiviral ilacın (EMT, ENT, FAV, GAN, VAL ve VLG) eş zamanlı olarak analiz edilebilmesi ve kromatografik davranışlarının belirlenmesi için HPLC yöntemi geliştirilmesi ve farmasötik dozaj şekillerinde analizlerinin gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır.

Çalışmanın ikinci aşamasında, dokuz antiviral ilacın (ASI, EMT, ENT, GAN, LAM, LOP, OSE, VAL ve VLG) insan plazmasındaki derişimlerinin ölçülmesi için SPME-LC-MS/MS yönteminin geliştirilmesi planlanmıştır. Bu amaçla uygun sorbent, çözelti ve tüketme sürelerinin optimize edilmesi amaçlanmıştır. Geliştirilen bu yöntem ile tedavi sürecinde antiviral ilaçların plazma derişimlerinin takip edilerek doz ayarlamalarının yapılmasına ve tedavi etkinliğinin izlenmesine olanak sağlanması planlanmıştır. Ayrıca ilk kez SPME'ler seçilen antiviral ilaçların plazmadan analizleri için geliştirilmiştir.

Geliştirilen her iki yöntemin de validasyon çalışmaları yapılarak güvenilirlik ve doğruluklarının kanıtlanması planlanmıştır. Bu sayede, antiviral ilaçların analizinde daha hızlı, hassas ve güvenilir sonuçlar elde edilmesi amaçlanmıştır. Bu çalışma, antiviral ilaçların kalitesinin kontrolüne ve tedavi süreçlerinin iyileştirilmesine önemli katkılar sağlayacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Antiviral İlaçlar

Soğuk algınlığı, grip, suçiçeği, herpes, kuduz, Ebola, AIDS (HIV), kuş gribi ve hepatit gibi hastalıkları kapsayan viral enfeksiyonlar, insan sağlığı için önemli bir tehdit oluşturmaktadır. Özellikle akut solunum yolu hastalıkları, oldukça yaygındır ve iş kaybı, kalıcı sakatlık ve ölüm dahil olmak üzere ciddi sonuçlara yol açabilmektedir. Her yıl, iki milyondan fazla insan bu enfeksiyonlar nedeniyle dünya genelinde hayatını kaybetmektedir. Tarih, kızamık, grip, HIV, SARS, Ebola ve Lassa humması gibi yıkıcı viral salgınlarla doludur ve her biri önemli morbidite ve mortaliteye neden olmuştur [7, 8]. SARS-CoV-2 virüsü tarafından neden olan yakın tarihli COVID-19 pandemisi, virüslerin yıkıcı potansiyelini, hızlı küresel yayılımı ve pnömoni ve organ yetmezliği gibi ciddi komplikasyonlar geliştirme potansiyeli ile daha da vurgulamaktadır. Geçmişteki bu viral salgınlar, dünya sağlığı için sürekli bir tehdit oluşturan bu virüslere karşı etkili tedavi yöntemleri bulmak için sürekli araştırma yapmanın ve yeni ilaçlar geliştirmenin ne kadar önemli olduğunu açıkça göstermiştir [9].

COVID-19 pandemisi sırasında klorokin, favipiravir, remdesivir ve molnupiravir gibi ilaçlar tedavide önemli bir rol oynamıştır [10]. Sağlık teknolojisindeki ilerlemeler, çok çeşitli viral enfeksiyonlara karşı antiviral ilaçların geliştirilmesini ve kullanımını sürdürmektedir. Günümüzde, sağlık alanındaki ilerleyen teknoloji ile birlikte, viral enfeksiyonlara karşı antiviral ilaçların kullanımı devam etmektedir.

2.1.1. Sınıflandırmaları

Antiviral ilaçlar aktif bileşenleri, etki gösterdiği sistem, farmakolojik ve kimyasal özelliklerine göre Anatomik Terapötik Kimyasal Sınıflandırma Sisteminde (ATC/DDD Index) on iki ayrı grupta sınıflandırılmıştır (Tablo 2.2.1) [4, 5].

Tablo 2.1. ATC/DDD İndeksine göre antiviral ilaçların sınıflandırılması

Grup *	Antiviral
J05AA Tiyosemikarbazonlar	Metisazon
J05AB Nükleozit ve nükleotit hariç ters transkriptaz inhibitörleri	Asiklovir, idoksuridin, vidarabin, gansiklovir, famsiklovir, valasiklovir, sidofovir, pensiklovir, valgansiklovir, brivudin, remdesivir, brinsidofovir, molnupiravir
J05AC Siklik aminler	Rimantadin, tromantadin
J05AD Fosfonik asit türevleri	Foskarnet, fosfonet
J05AE Proteaz inhibitörleri	Sakuinavir, indinavir, ritonavir, nelfinavir, amprenavir, fosamprenavir, atazanavir, tipranavir, darunavir, ensitrelevir, nirmatrelvir, ritonavir
J05AF Nükleozit ve nükleotit ters transkriptaz inhibitörleri	Zidovudin, didanozin, zalsitabin, stavudin, lamivudin, abakavir, tenofovir disoproksil, adefovir dipivoksil, emtrisitabin, entekavir, telbivudin, klevudin, tenofovir alafenamit
J05AG Nükleozit olmayan ters transkriptaz inhibitörleri	Nevirapin, delavirdin, efavirenz, etravirin, rilpivirin, doravirin, elsulfavirin
J05AH Nöraminidaz inhibitörleri	Zanamivir, oseltamivir, peramivir, laninamivir
J05AJ İntegraz inhibitörleri	Raltegravir, elvitegravir, dolutegravir, kabotegravir
J05AP HCV enfeksiyonlarında kullanılanlar	Ribavirin, telaprevir, boseprevir, faldaprevir, simeprevir, asunaprevir, daklatasvir, sofosbuvir, dasabuvir, elbasvir, grazoprevir, koblopasvir, ravidasvir, narlaprevir, sofosbuvir-ledipasvir, dasabuvir-ombitasvir-paritaprevir-ritonavir, ombitasvir-paritaprevir-ritonavir, elbasvir-grazoprevir, sofosbuvir-velpatasvir, sofosbuvir-velpatasvir-voksilaprevir, glesaprevir-pibrentasvir, daklatasvir-asunaprevir-beklabuvir
J05AR HIV enfeksiyonlarında kullanılanlar, kombinasyonlar	Zidovudin-lamivudin, lamivudin-abakavir, tenofovir disoproksil-emtrisitabin, zidovudin-lamivudin-abakavir, zidovudin-lamivudin-nevirapin, emtrisitabin-tenofovir disoproksil-efavirenz, stavudin-lamivudin-nevirapin, emtrisitabin-tenofovir disoproksil-rilpivirin, emtrisitabin-tenofovir disoproksil-elvitegravir-kobisistat, lopinavir-ritonavir, lamivudin-tenofovir disoproksil-efavirenz, lamivudin-tenofovir disoproksil, lamivudin-abakavir-dolutegravir, darunavir-kobisistat, atazanavir-kobisistat, lamivudin-raltegravir, emtrisitabin-tenofovir alafenamit, emtrisitabin-tenofovir alafenamit-elvitegravir-kobisistat, emtrisitabin-tenofovir alafenamit-rilpivirin, emtrisitabin-tenofovir alafenamit-biktegravir, dolutegravir-rilpivirin, emtrisitabin-tenofovir alafenamit-darunavir-kobisistat, atazanavir-ritonavir, lamivudin-tenofovir disoproksil-doravirin, lamivudin-dolutegravir, darunavir-ritonavir, lamivudin-tenofovir disoproksil-dolutegravir, stavudin-lamivudin, emtrisitabin-tenofovir alafenamit-dolutegravir
J05AX Diğer antiviraller	Moroksidin, lizozim, inozin pranobeks, plekonaril, enfuvirtit, maravirok, maribavir, umifenovir, enisamium iodit, letermovir, tiloron, pentanedioik asit imidazolil etanamit, ibalizumab, tekovirimat, baloksavir marboksil, amenamevir, favipiravir, bulevirtit, fostemsavir, lenakapavir, riamilovir, labuvirtit

* J Antienfektifler, sistemik kullanım için, J05 Antiviraller, sistemik kullanım için, J05A Direkt etkili antiviraller

Bunlardan nükleozit ve nükleotit ters transkriptaz inhibitörleri, nükleozit olmayan ters transkriptaz inhibitörleri, nükleozit ve nükleotit hariç ters transkriptaz inhibitörleri, proteaz inhibitörleri, nöraminidaz inhibitörleri, integras inhibitörleri, HCV enfeksiyonlarında kullanılanlar, HIV enfeksiyonlarında kullanılanlar ve diğer antiviraller olmak üzere dokuz gruba ait antiviral ilaçların Türkiye’de ruhsatlı müstahzarları bulunmakta ve kullanılmaktadır [6].

2.1.2. Etki Mekanizmaları

Antiviral ilaçlar son yıllara kadar RNA virüslerine etkili olanlar ve DNA virüslerine etkili olanlar olmak üzere iki grupta sınıflandırılmışlardır. Ancak, virüsün konakçıda hastalık oluşturma evreleri ve bu evrelerde rol oynayan biyokimyasal mekanizmaların ayrıntılı bir şekilde öğrenilmesinden sonra böyle bir sınıflandırmanın yeterli olduğu anlaşılmıştır. Antiviral bileşikler mekanizmalarına göre şu şekilde de sınıflandırılabilirler [11]:

- Virüs Giriş Aşamasını Engelleyen İlaçlar: Virüsün konak hücre yüzeyindeki spesifik reseptörlere bağlanması, füzyasyonu (membran kaynaşması) ve hücreye girişini bloke eder.
- Kapsidin Açılması İnhibitörleri: Virüs hücre içine girdikten sonra, kapsidini açarak genetik materyalinin serbest kalmasını ve replikasyon sürecini inhibe eder.
- Viral Nükleik Asit Replikasyonunu Engelleyen İlaçlar: Virüsün genetik materyalinin (RNA veya DNA) sentezini, transkripsiyonunu veya replikasyonunu durdurur.
 - Nükleozit/ Nükleotit Analogları: Viral polimeraz tarafından yanlışlıkla eklenerek zincir uzamasını sonlandırır (örneğin, herpesvirüslerde asiklovir).
 - Non-nükleozit Analoglar: Polimerazın aktif bölgesine bağlanarak ya da konformasyonunu değiştirerek fonksiyonunu engeller.
- Viral Proteaz İnhibitörleri: Birçok virüs, genomlarından ürettikleri uzun polipeptidleri, olgun ve fonksiyonel proteinlere bölmek zorundadır. Proteaz

inhibitörleri, bu kesme (proteoliz) işlemini durdurarak virüsün olgunlaşmasını engellerler.

- Viral Enzim ve Fonksiyonel Bileşenlerin Diğer Aşamalarını Hedef Alan İlaçlar:

- Nöraminidaz İnhibitörleri: Özellikle influenza virüslerinde, yeni oluşan virüs partiküllerinin konak hücreden ayrılmasını (budding) ve yayılmasını sağlayan nöraminidaz enzimini inhibe ederler.

- Entegrasyon İnhibitörleri: Retrovirüslerde, örneğin HIV’de, virüs DNA’sının konak hücre genomuna entegrasyonunu engeller.

- Viral Montaj ve Salınım Aşamasını Engelleyen İlaçlar: Virüs partiküllerinin montajlanması, olgunlaşması veya konak hücreden salınması aşamalarını hedef alarak enfeksiyonun yayılmasını azaltır. Bu aşamayı hedef alan ajanlar, özellikle bazı yeni geliştirilen antiviral stratejiler arasında yer almaktadır.

2.1.3. Direnç ve Klinik Kullanımları

Antiviral tedavide ilaç direnci önemli bir halk sağlığı sorunudur. Bu direnç, kalıcı viral replikasyon ve uzun süreli ilaç maruziyetinin dirençli suşların seçilmesine yol açtığı immün sistemi baskılanmış hastalarda ortaya çıkabilmektedir. İlaç direncinin sonuçları, ikinci basamak antiviral ajanların kullanımında bulunan toksisiteden, şiddetli hastalığa ve hatta (etkili bir alternatif tedavi bulunmadığında ilerleyici viral enfeksiyondan dolayı) ölüme kadar uzamaktadır. Bilimsel teknoloji, antiviral direncin bu yakın mekanizmalarından bir kısmını tanımlamış olsa da, virüslerin daha büyük evrimsel eğilimleri belirsizliğini korumaktadır. Mutasyonları, rekombinasyon oranlarını, bulaşmanın demografik geçmişlerini ve antiviral ilaç tedavisine viral adaptasyon sırasında seçici kuvvetleri değerlendirmek için yeni ölçütler geliştirilmiştir. Genotiple ilgili analizlerin doğru yorumlanması için çeşitli mutasyonların verdiği direnç ve çapraz direnç seviyelerinin anlaşılması gerekmektedir. İlaç tedavisine karşı viral direncin tanımlanması, belirgin viral değişikliklerin (fenotipik direnç) bir dizi antiviral ilaca bağlanmasıyla mümkündür.

Antiviral direnci azaltmak için ilaç uygulamasını optimize etme, direnç mekanizmaları bilgisine dayalı alternatif tedavi seçme ve yeni antiviraller geliştirme ihtiyacı vardır [11].

Tez kapsamında analiz edilen antivirallerin direnç mekanizmaları aşağıda özetlenmiştir.

Asiklovir ve valasiklovir: Direnç, immünokompetan bireylerde nadirdir ancak immün sistemi baskılanmış hastalarda ortaya çıkabilir. Direnç genellikle viral timidin kinaz genindeki mutasyonları içermekte ve bu da ilaç aktivasyonunun azalmasına neden olmaktadır [12, 13].

Emtrisitabin ve tenofovir disoproksil fumarat: Bu ilaçlar HIV ve HBV için kullanılır. Emtrisitabin için M184V/I ve tenofovir için K65R gibi direnç mutasyonları etkinliği azaltabilir. Direnci önlemek için genellikle kombinasyon tedavisi kullanılmaktadır [14-16].

Entekavir: Yüksek genetik bariyeri nedeniyle direnç daha az yaygındır. Ancak, özellikle daha önce lamivudin direnci olan hastalarda ortaya çıkabilmektedir [14, 15].

Favipiravir ve molnupiravir: Bu yeni antiviral ajanlar, influenza ve SARS-CoV-2 gibi RNA virüslerine karşı potansiyel göstermiştir. Direnç mekanizmaları hala araştırılmaktadır, ancak RNA virüslerindeki hızlı mutasyon oranları önemli bir zorluk teşkil etmektedir [17].

Gansiklovir ve valgansiklovir: Sitomegalovirus direnci genellikle UL97 kinaz genindeki veya UL54 DNA polimeraz genindeki mutasyonlardan kaynaklanmaktadır ve bu da ilaç aktivasyonunun veya bağlanması azalmasına yol açmaktadır [13, 18].

Lamivudin: HBV tedavisinde direnç yaygındır ve viral polimeraz genindeki M204V/I gibi mutasyonlar görüldüğünden, alternatif ilaçların veya kombinasyon tedavilerinin kullanılmasını gerektirmektedir [15, 19].

Lopinavir: HIV tedavisinde kullanılan bu ilaç için direnç, ilaç bağlanmasını ve etkinliğini azaltabilen proteaz genindeki mutasyonları içermektedir. Direnci önlemek için diğer antiretrovirallerle kombinasyon tedavisi uygulanmaktadır [20].

Oseltamivir: Gripteki direnç, esas olarak ilaç bağlanmasını azaltan H275Y gibi nöraminidaz genindeki mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. Grip mevsimlerinde izleme ve alternatif tedaviler esastır [13].

Tenofovir disoproksil fumarat: Bu ilaç için direnç daha az yaygındır ancak uzun süreli kullanımda, özellikle diğer nükleozit analoglarına karşı daha önce direnci olan hastalarda ortaya çıkabilmektedir [14, 15].

2.1.4. Yan Etkileri

Birçok antiviral ilaç, ateş, yorgunluk ve kas ağrıları gibi gribe benzer semptomlara neden olabilmektedir. Bu semptomlar genellikle doza bağlıdır ve geri döndürülebilir. Hematolojik anormalliklere anemi, nötropeni ve trombositopeni gibi durumlar dahildir. Nöropsikiyatrik semptomlar: sinirlilikten şiddetli depresif sendromlara kadar uzanmaktadır. Bu yan etkileri yönetmek için antidepresanlar kullanılabilir [21, 22].

Asiklovir ve valasiklovir: Genellikle iyi tolere edilir ancak özellikle önceden böbrek rahatsızlığı olan hastalarda böbrek toksisitesine neden olabilmektedir [23-25].

Emtrisitabin ve lamivudin: Bu ilaçlar iyi tolere edilir ancak ilaç dirençli viral suşların ortaya çıkmasına neden olabilmekte ve bu da etkinliklerini azaltabilmektedir [21, 22].

Entekavir: Genellikle iyi tolere edilir ve minimal yan etkilere sahiptir ancak diğer antiviraller gibi nadir durumlarda laktik asidoza neden olabilmektedir [21, 22].

Gansiklovir ve valgansiklovir: Bu ilaçlar nötropeni ve trombositopeni dahil olmak üzere önemli hematolojik nefrolojik toksisiteye neden olabilmektedir [23-25].

Lopinavir: Yaygın yan etkiler arasında ishal ve mide bulantısı gibi gastrointestinal sorunlar ve potansiyel karaciğer toksisitesi bulunmaktadır [26].

Oseltamivir: Genellikle iyi tolere edilir ancak mide bulantısı, kusma ve nadir durumlarda nöropsikiyatrik olaylara neden olabilmektedir [23-25].

Molnupiravir: Sınırlı veri mevcuttur ancak genellikle iyi tolere edilir ve önemli kardiyovasküler etki bildirilmemiştir [28].

Bu ilaçların hematolojik, nöropsikiyatrik ve nefrolojik yan etkileri yönetilebilmektedir. Filgrastim gibi hematopoietik büyüme faktörlerinin kullanımı nötropeniyi yönetmede, seçici serotonin geri alım inhibitörleri gibi antidepresanlar nöropsikiyatrik olarak faydalı olabilmektedir [21, 22]. Nefrotoksik antiviral kullanan hastalar için serum kreatinin, fosfatemi ve proteinürinin düzenli olarak izlenmesi önemlidir [27]. Hasta güvenliğini ve tedavi etkinliğini sağlamak için antiviral ilaçların yan etkilerinin ve plazma düzeylerinin izlenmesi ve yönetilmesi son derece önemlidir.

2.1.5. Kimyasal Yapıları

Antiviral ilaçlar, virüslerin çoğalmasını, yaşam döngülerinin belirli aşamalarını hedef alarak engellemesi için tasarlanmıştır. Bu ilaçların kimyasal yapıları, etki mekanizmalarını ve etkinliklerini belirlemede kritik öneme sahiptir. Tez çalışmasında kullanılan on bir adet antiviralin kimyasal yapısı Şekil 2.1’de [29], fiziksel ve kimyasal özellikleri Tablo 2.2’de [29-33] verilmiştir.

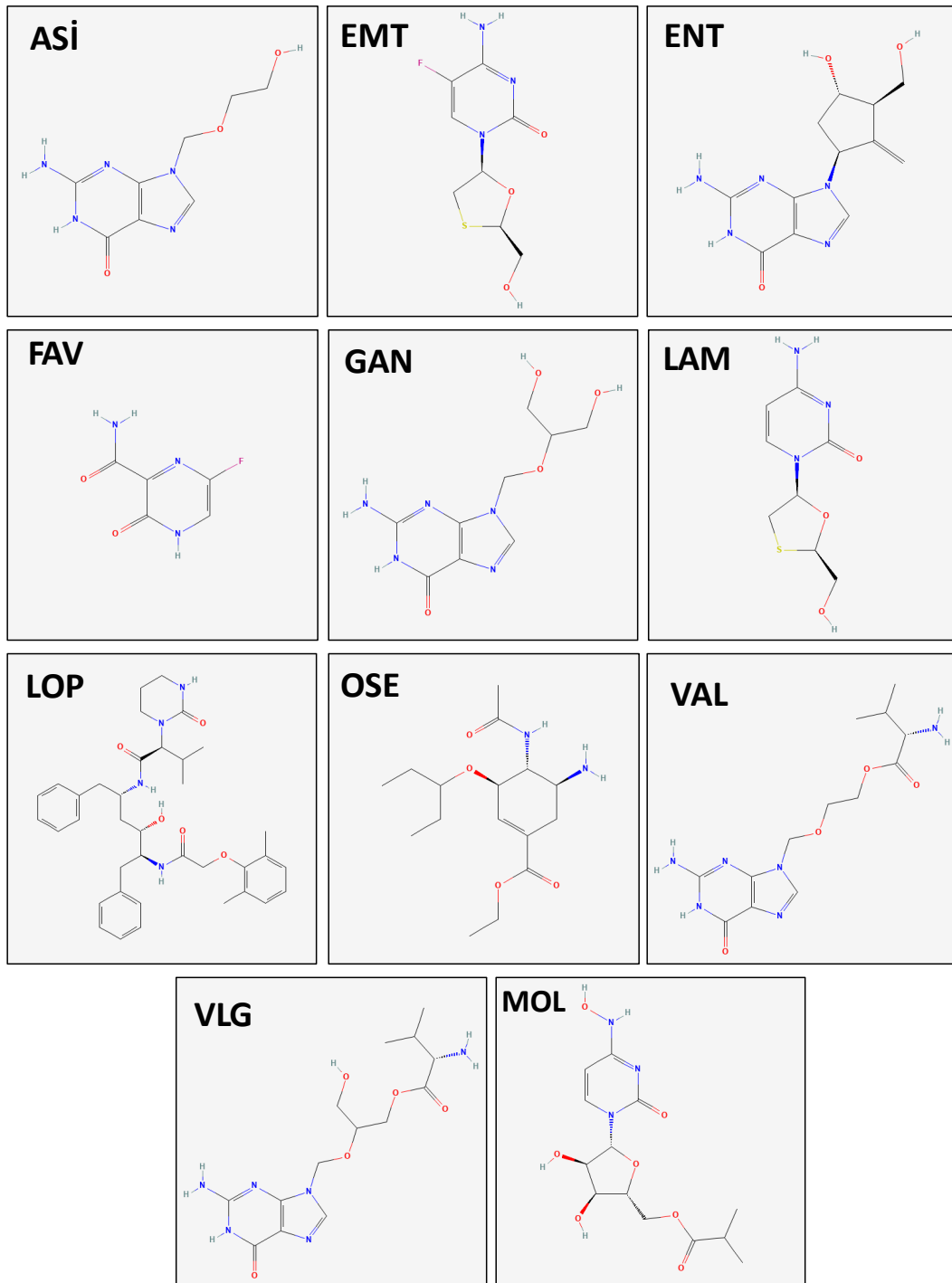
Tablo 2.2. Tez çalışmasında kullanılan antivirallerin fiziksel ve kimyasal özellikleri

	Kapalı formül	LogD	LogP	Çözünürlük (g/L)	MA (g/mol)	pKa
ASI	C ₈ H ₁₁ N ₅ O ₃	-1.46	-1.76	9.08	225.2	2.27 ve 9.25
EMT	C ₈ H ₁₀ FN ₃ O ₃ S	-0.73	-0.41	0.268	247.3	5.47
ENT	C ₁₂ H ₁₅ N ₅ O ₃	-0.80	-0.96	6.59	277.3	12.00
FAV	C ₅ H ₄ FN ₃ O ₂	-0.00	0.78	8.7	157.1	9.39
GAN	C ₉ H ₁₃ N ₅ O ₄	-1.72	-2.06	11.5	255.23	10.16
LAM	C ₈ H ₁₁ N ₃ O ₃ S	-1.00	-0.71	2.76	229.26	14.29
LOP	C ₃₇ H ₄₈ N ₄ O ₅	5.24	6.26	0.00192	628.8	13.39
OSE	C ₁₆ H ₂₈ N ₂ O ₄	-1.07	1.50	0.686	312.4	7.7
VAL	C ₁₃ H ₂₀ N ₆ O ₄	-3.17	-0.88	3.55	324.34	11.99
VLG	C ₁₄ H ₂₂ N ₆ O ₅	-3.14	-1.28	4.79	354.36	11.98
MOL	C ₁₃ H ₁₉ N ₃ O ₇	-0.76	-0.17	5.77	329.31	8.21

D: dağılma katsayısı, P: partiyon katsayısı, MA.: moleküler ağırlık.

2.1.6. Çözünürlük Özellikleri

Elde edilen etken maddelerin çözünürlük özelliklerinin incelenmesi kapsamında analiz sertifikaları ile birlikte Avrupa Farmakopesi (EP), İngiliz Farmakopesi (BP), Amerika Birleşik Devletleri Farmakopesi (USP-NF), Hint Farmakopesi (IP) ve Japon Farmakopesi (JP) gibi uluslararası geçerliliği olan güncel farmakopelerdeki monograflar da taranarak ideal çözücüler hakkında bilgi edinilmiştir (Tablo 2.3). Ayrıca kromatografik ayırma kullanılan çözücü sistemler için farmakopelerde bulunan hareketli faz bileşimleri verilmiştir (Tablo 2.7.2). Değerlendirmeler ışığında analizlerde maddelerin çözündürülmesi için su veya metanol kullanılmasına karar verilmiştir.



Şekil 2.1. Tez çalışmasında kullanılan antivirallerin kimyasal yapıları

Tablo 2.3. Antiviral etken maddelerin çözünürlük özellikleri

	Analiz sertifikası	EP	BP	USP	IP	JP
ASI	-	Suda az çözünür, etanolde (%96) çok az çözünür, heptanda hemen hemen hiç çözünmez. Mineral asit ve alkali hidroksitlerin seyreltik çözeltilerinde çözünür.	+	+	+	Suda az çözünür ve etanolde (%99.5) çok az çözünür. 0.1 mol/L HCl TS ve seyreltik sodyum hidroksit TS içerisinde çözünür.
EMT	Metanol ve suda kolay çözünür, diklorometanda hemen hemen hiç çözünmez.	-	-	-	Suda çözünür. Metanolde zor çözünür.	-
ENT	Su, susuz etanol ve heptanda hemen hemen hiç çözünmez. Su ve metanolde çok az çözünür.	Suda, susuz etanolde ve heptanda hemen hemen hiç çözünmez, metanolde az çözünür.	+	+	-	-
FAV	ACN ve metanolde zor çözünür, su ve etanolde az çözünür.	-	-	-	-	+
GAN	Nemçeker	Suda az çözünür, etanolde (%96) çok az çözünür. Mineral asit ve alkali hidroksitlerin seyreltik çözeltilerinde çözünür.	+	+	-	-
LAM	-	Suda çözünür, metanolde zor çözünür, etanolde (%96) az çözünür.	+	+	Suda çözünür. Metanolde zor çözünür.	-
LOP	Metanol ve alkolde kolay çözünür, izopropanolde çözünür, suda hemen hemen hiç çözünmez.	Suda hemen hemen hiç çözünmez, metanol ve metilen klorürde çok çözünür.	+	+	Metanol ve diklorometanda kolay çözünür; suda hemen hemen hiç çözünmez.	-
MOL	-	-	-	-	-	-
OSE	Su ve metanolde kolay çözünür. Metilen klörürde hemen hemen hiç çözünmez.	Su ve metanolde kolay çözünür. Metilen klörürde hemen hemen hiç çözünmez.	+	+	Suda çözünür.	-
VAL	Suda çözünür. Diklorometanda çözünmez.	Suda kolay çözünür, susuz etanolde az çözünür.	+	+	-	Suda kolay çözünür, etanolde (%99.5) çok az çözünür. 0.05 mol/L hidroklorik asit TS de çözünür.
VLG	Suda kolay çözünür. Metanolde zor çözünür.	-	-	+	-	-

+ : İlgili etken madde farmakopede bulunur ama çözünürlüğü hakkında bilgi içermez. - : İlgili etken madde farmakopede bulunmaz.

Bilimsel kaynaklarda antivirallerin farmasötik ürünlerden ve biyolojik materyallerden analizlerine rastlanmaktadır. Bu çalışmaların çoğu tek bir antiviral ilacın analizine odaklanmıştır [34-69], birkaç tanesi iki veya daha fazla antiviral ilacın eş zamanlı analizini içermektedir [36, 44, 53, 55, 62, 63, 69]. Bu analizlerde kullanılan yöntemler ultraviyole-görünür spektrofotometri [58], florimetri [35, 54], kapiler elektroforez [62, 63], yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC-UV/FD) [35, 37-40, 42, 43, 46-49, 51, 55, 56, 59-62, 64-66, 70, 71], sıvı kromatografisi-kütle spektrometrisi (LC-MS) [36, 41, 50, 53, 57, 67, 68], ve yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi (HPTLC-UV) [34] gibi kromatografik teknikler kullanılarak antiviral ilaçların nicel analizi için bildirilmiştir. Antiviral ilaçların analizlerinde kullanılan yöntemler Tablo 2.4’de özetlenmiştir.

Tablo 2.4. Tez kapsamında çalışılan antivirallerin farmasötik dozaj şekillerinden ve biyolojik materyallerden analizleri

İlaç	Matriks	Yöntem	Numune Hazırlama	Hareketli Faz	Doğrusallık	LOD/LOQ	% Geri Kazanım	Kay.
ASI	Mikropartikül	RP-HPLC (PDA)	DMSO:ACN (20:80 h/h)	ACN: %0.1 Fosforik asit: MeOH (50:40:10, h/h)	0.5-30 µg/mL	83.6 ng/mL 109.5 ng/mL	101.7-104.1	[72]
ASI VAL	Dozaj Şekilleri	RP-HPLC (UV)	Çözme	%0.1 Amonyum asetat tamponu:ACN (95:5, h/h).	1-100 µg/mL, 1-100 µg/mL	-	98.6-100.8, 99.1-101.5	[65]
ASI VAL	Glossina pallidipes	LC-MS/MS	SPE (MeOH)	ACN:Su:FA	ASI: 0.1-25 ng/mL VAL: 0.5-25 ng/mL	LOQ: 0.1ng/mL	95.4-99.0, 91.0-97.0	[67]
EMT	Dozaj Şekilleri	RP-HPTLC NP-HPTLC	Çözme	RP-HPTLC: MeOH:Su; NP-HPTLC: Toluen: MeOH	30–800 ng/mL	10.3 ng/band 30.9 ng/band	100.8-98.3	[34]
EMT	Plazma	HPLC (Florometrik)	Protein çöktürme (ACN)	ACN:Su:FA	0.025-2.5 µg/mL (R ² =.9999)	0.01 mg/L 5 mg/L	107	[35]
EMT	Plazma	LC-MS/MS	Protein çöktürme (ACN)	MeOH:Su:FA	2-1000 ng/mL (R ² =0.9999)	LOD: 1 ng/mL	68.5	[36]
EMT	Tablet	HPLC (DAD)	Çözme	ACN:Fosfat Tamponu	25-250 µg/mL	0.01 µg/mL 0.03 µg/mL	99.1-101.2	[37]
EMT	Dozaj Şekilleri	HPLC (UV)	Çözme	MeOH:Su:Trietilamin	20-240 µg/mL	0.02 µg/mL 0.06 µg/mL	92.3-129.8	[38]
EMT	Tablet	HPLC (PDA)	Dissolüsyon	ACN:Su:FA	0.25-20 µg/mL (R ² =0.999)		100.6	[39]
EMT	Kuru kan (DBS)	LC-MS/MS	Sıvı-sıvı tüketme (MeOH)	MeOH:Su:FA	5-1000 ng/mL (R ² >0.99)	LOQ: 5 ng/mL	99.9-101.6	[73]
EMT	Plazma İdrar	HPLC (Florometrik)	Sıvı-sıvı tüketme (%6 TCA)	25 mM Fosforik asit (pH 3): MeCN (89:11, h/h)	0.1-1.0 µg/mL	LLOQ 2.5 ng/mL	101.9-98.8	[40]
ENT	Tablet, Plazma	HPLC (UV/Vis)	Saf madde ve tablet çözme, plazma örnekleri	ANC: 10 mM Fosfat Tamponu (80:20, h/h)	0.039-100 µg/mL (R ² >0.996)	0.0097 mg/mL 0.039 µg/mL -	82.0-89.9	[74]
ENT	Tablet	RP-HPLC (UV/Vis)	Çözme	ACN: Potasyum dihidrojen fosfat tamponu (pH3.4), (40:60, h/h)	0-70 µg/mL (R ² >0.991)	0.05 µg/mL 0.15 µg/mL	98.98-99.57	[43]
ENT	Plazma	UPLC-MS/MS	Protein çöktürme (ACN)	ACN:Su:FA	-	0.039 ng/mL 0.02 ng/mL	88.8	[44]

Tablo 2.5. (Devam) Tez kapsamında çalışılan antivirallerin farmasötik dozaj şekillerinden ve biyolojik materyallerden analizleri

ENT	Çeşitli Çevresel Matrisler	UPLC-MS/MS	Katı Faz Tüketme (SPE)	ACN:Su:FA	2-200 ng/mL (R ² >0.993)	0.49 ng/mL 1.64 ng/mL	91-116	[45]
FAV	Saf Madde, Dozaj Şekilleri	RP-HPLC (UV/Vis)	Saf madde ve dozaj şekli çözme	ACN: Potasyum dihidrojen fosfat tamponu (pH3.5), (10:90, h/h)	50-250 µg/mL	2.186 µg/mL 6.626 µg/mL	100.2-100.3	[46]
FAV	Dozaj Şekilleri	HPLC (UV/Vis)	Çözme	ACN: 50 mM Potasyum dihidrojen fosfat tamponu (pH2.3), (10:90, h/h)	10–100 µg/mL (r2, 0.9999)	1.2 µg/mL 3.6 µg/mL	99.19-100.17	[47]
FAV	Tablet	HPLC-DAD	Çözme	25.0 mM fosfat tamponu (pH 3.5): MeOH: ACN (62:28:10, h/h)	6.25–250.00 µg/mL (r2, 0.9999).	1.02 µg/mL 3.01 µg/mL	101.3	[48]
FAV	Tablet Plazma	Micellar HPLC Spektroflorimetrik	Çözme Protein çöktürme (ACN)	0.02 M Brij-35: 0.15 M SDS: 0.02 M disodyum hidrojen fosfat (pH 5.0)	0.02–0.35 µg/mL (r2, 0.999)	0.004 µg/mL 0.011 µg/mL	101.7	[49]
FAV	Serum	LC-MS/MS	Protein çöktürme (ACN)	MeOH:Su:Formik Asit	1-1000 ng/mL (R ² =0.999)	0.045 µg/mL 0.135 µg/mL	99.8-110.1	[50]
FAV	Plazma	RP-HPLC	Protein çöktürme (ACN)	MeOH: Su (35:65, h/h)	0.2-3.2 µg/mL	LOQ 0.72 µg/mL	97.6-100.2	[51]
FAV	Tablet	Micellar HPLC	Dissolüsyon	0.1 M SDS: 0.01 M Brij-35, : 0.02 M monobazik potasyum fosfat (pH 3.1)	0.5–50.0 µg/mL	0.04 µg/mL 0.12 µg/mL	99.99	[52]
ASI GAN	Serum	LC-MS/MS	Protein çöktürme (ACN)	ACN:Su:Formik Asit	ASI:2-1000 ng/mL GAN:5-1000 ng/mL	LOD: 0.5 ng/mL	95- 97.1 95- 99.8	[53]
GAN	Plazma, Serum	HPLC (Florometrik)	Protein çöktürme (ACN)	ACN:Su:FA	0.0400-4.00 µg/mL (R ² =0.9999)	LLOQ: 0.0400 µg/mL	97.4-105	[54]
ASI GAN	Plazma	HPLC (Florometrik)	Protein çöktürme (ACN)	TFA(0.08 %V/V):MeOH	ASI 20-2000 ng/mL GAN 20-2000 ng/mL	LOD:20 ng/ml LOD:20 ng/mL	93.91 97.42	[55]
VLG	Serum, Tablet, Ham madde	RP-HPLC	Protein çöktürme (ACN),Saf madde ve tablet çözme	ACN:MeOH:KH ₂ PO ₄ (0.02M) (40:20:40; h/h/h) (pH 5.0)	10–30,000 ng/mL	LOD:1.73 ng/mL LOQ:5.77 ng/mL	100.17 100.56	[56]
GAN VLG	Plazma	HILIC-MS/MS	Protein çöktürme (ACN)	Su/MeOH 15/85 (h/h) (A) Su/AC 10/90 (h/h) (B) 5 mM amonyum format %0,2 formik asit	16-40000 ng/mL 4-10000 ng/mL	16 ng/mL 4 ng/mL	86.2-91.6 79.7-85.8	[57]

Tablo 2.6. (Devam) Tez kapsamında çalışılan antivirallerin farmasötik dozaj şekillerinden ve biyolojik materyallerden analizleri

VLG	Saf Madde, Dozaj Şekilleri	UV-GB	Saf madde ve dozaj şekli çözme	Su	1-6 µg/mL	LOD:0.0522 µg/mL LOQ:0.1589 µg/mL	99.4-100.4	[58]
VLG	Saf Madde	HPLC	Saf madde	0.1% TFA:MeOH	-	LOD:%0.004 LOQ:% 0.013	90-95	[59]
VLG	Saf Madde, Dozaj Şekilleri	UPLC-PDA	Saf madde ve tablet çözme	ACN:KH ₂ PO ₄ (0.02M) (55:45 h/h)	25-150 µg/ml	LOD: 0.933 LOD:2.827 µg/ml	98-102	[60]
GAN ASI	Plazma	HPLC (Florometrik)	Protein çöktürme (ACN)	ACN:Su:Formik Asit	ASI 0.1-10 µg/mL GAN 0.1-10 µg/mL	LOD:25 ng/mL LOQ:100 ng/mL	99.2-10	[61]
VLG	Dozaj Şekilleri	Kapiler Elektroforez (CE) HPLC	Dozaj şekli çözme	CE: Fosfat tamponu HPLC: ACN:Su:NaH ₂ PO ₄ 90:10 (h/h)	-	0.04–0.1 µM	-	[62]
VAL	Dozaj Şekilleri	Miseller Elektrokinetik Kromatografisi	Dozaj şekli çözme	Sodyum Borat, Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)	VAL 1-100 µg/mL ASI 0.5-50 µg/mL	LOD: 0.032 µg/mL LOD:0.013 µg/mL	96.5-99.79 98.8-102	[63]
VAL	Tablet	RP-HPLC	Tabletleri çözme	MeOH:Su	6-90 µg/mL (R ² =0.999)	LOD: 3.4 µg/mL	99.9-100.4	[64]
VAL ASI	Dozaj Şekilleri	HPLC	Dozaj şekli çözme	MeOH:Su	2-8 µg 0.026-0.077 µg	LOD: 0.15 µg/mL	99.2	[66]
VAL ASI	Plazma	LC-MS/MS	Protein çöktürme (ACN)	%0.1 FA:MeOH	ASI 0.005-1.75 µg/mL VAL 0.5-10.22 µg/mL	LOQ: 48 ng/mL LOQ: 5 ng/mL	84 92.2	[68]

2.2. Ayırma Teknikleri

Analiz edilecek bir maddenin yapısının incelenmesi, safsızlıkların uzaklaştırılması ya da fiziksel özelliklerinin belirlenmesi için ayırma teknikleri uygulanır. Bu tekniklerde analiz edilecek madde ve ortamda bulunan diğer maddeler farklı fazlarda (katı, sıvı, gaz) olacak şekilde ayrılır. Ayırma işlemi öncesinde genellikle tüm maddeler aynı fazda bulunurken, işlem sonucunda analiz edilecek madde ya da diğerleri farklı bir faza aktarılır.

Analitik kimyada genellikle çözelti fazı tercih edilir. Ancak örneklerin sıvı olması şart değildir; katı örnekler de uygun çözücüler yardımıyla sıvı faza dönüştürülür. Ayırma işlemleri dokuz olası faz transferi ile gerçekleştirilir (Tablo 2.5).

Tablo 2.7. Analitik ayırmalardaki faz transferleri.

İlk Faz	Son Faz	Analitik Teknik
Sıvı	Katı	Çöktürme, iyon değişim kromatografisi
	Sıvı	Sıvı-sıvı tüketme, sıvı kromatografisi
	Gaz	Distilasyon
Gaz	Katı	Adsorpsiyon, gaz-katı kromatografisi
	Sıvı	Absorpsiyon, gaz-sıvı kromatografisi
	Gaz	Gaz difüzyonu (izotop ayırımı)
Katı	Katı	Manyetik ayırım
	Sıvı	Perkolasyon
	Gaz	Süblimleşme

Tez çalışması kapsamında sıvı-katı mikro tüketme ve sıvı kromatografisi ile deneyler gerçekleştirildiğinden bu teknikler hakkında ayrıntılı bilgi aşağıda verilmiştir.

2.2.1. Sıvı-Katı Tüketme

Sıvı-katı tüketme (SPE), bir numunedeki analitlerin sıvı bir karışımdan katı bir sabit faz üzerine seçici olarak tutulması prensibine dayanarak ayrılması işlemidir. SPE, hem basit bir teknik olması hem de birçok alanda uygulanabilirliği nedeniyle yaygın bir şekilde kullanılan bir ayırma yöntemidir. Bu işlemde, analitler ya sabit faz üzerinde tutulup safsızlıklar elüe edilir ya da safsızlıklar tutulup analit elüe edilerek ayrılır.

SPE Sisteminin Temel Bileşenleri: SPE sisteminde temel olarak üç ana unsur bulunur. İlk olarak, matriks, numunenin çözelti halindeki ortamını ifade eder. İkinci unsur, sorbent olarak adlandırılan ve analitleri seçici bir şekilde tutan katı sabit faz malzemesidir. Son olarak, analit ise ayırma işleminin hedefindeki kimyasal maddelerdir.

SPE İşlem Adımları: SPE işlemi birkaç temel adımdan oluşur. İlk adım olan numunenin hazırlanması, numunenin uygun bir çözücü ile çözelti haline getirilmesi, iyonik kuvvetin ayarlanması ve analitin çözeltide serbest hale getirilmesini içerir. İkinci adımda, sabit faz uygun bir çözücüyle yıkanarak aktif hale getirilir; bu işlem şartlandırma olarak adlandırılır. Ardından, numunenin yüklenmesi aşamasında numune çözeltisi sabit faz üzerine yavaş bir akışla uygulanır. Dördüncü adım olan yıkama sırasında safsızlıklar sabit fazdan uzaklaştırılırken analit sabit fazda tutulur. Son olarak, elüsyon aşamasında analit, uygun bir çözücü kullanılarak sabit fazdan geri kazanılır.

SPE'nin Avantajları: Bu yöntemin önemli avantajları arasında kolay uygulanabilirlik, hızlı sonuç elde etme, az miktarda çözücü kullanımı, yüksek geri kazanım oranları ve geniş uygulama alanları bulunur. SPE, çevre, gıda, biyokimya ve toksikoloji gibi birçok alanda etkili bir ayırma yöntemi olarak kullanılmaktadır.

2.2.2. Sıvı-Katı Mikro Tüketme (SPME)

SPME, SPE'ye benzeyen ancak çok daha hassas ve mikro ölçekli bir yöntemdir. Bu teknikte, analitler bir fiber üzerine seçici olarak adsorbe edilir ve fiber üzerindeki maddeler analiz için kullanılır.

SPE, bir sıvı karışımda çözünen veya süspansiyon halindeki bileşiklerin, fiziksel ve kimyasal özelliklerine göre bu karışımdaki diğer bileşiklerden ayrıldığı, izole edildiği veya saflaştırıldığı bir katı-sıvı ekstraksiyon tekniğidir. Analitik laboratuvarlarda, analiz için numuneleri yoğunlaştırmak ve saflaştırmak için SPE kullanılmaktadır. SPE, idrar, kan, su, içecekler, toprak ve hayvan dokusu dahil olmak

üzere çok çeşitli matrislerden ilgi çekici analitleri izole etmek için kullanılabilir [75, 76].

SPE, bir sıvıda çözülmüş veya süspansiyon halinde bulunan maddelerin (hareketli faz) küçük bir kolonun içindeki katı bir dolguya olan afinitesini kullanır ve numunenin içinden geçirilir (sabit faz) ve bir karışımı istenen ve istenmeyen bileşenlere ayırır. Temel olarak, numunedeki istenen analitler veya istenmeyen safsızlıklar sabit fazda tutulur. Sabit fazdan geçen kısım, istenen analitleri veya istenmeyen safsızlıkları içerip içermediğine bağlı olarak toplanır veya atılır. Sabit fazda tutulan kısım istenen analitleri içeriyorsa, sabit fazın uygun bir elüentle durulandığı ek bir adımda toplanmak üzere sabit fazdan çıkarılabilmektedirler[77].

SPME, su ve toprak örneklerinde kirletici, pestisit ve ilaçların belirlenmesi gibi çevresel analizlerde, gıda ürünlerinde bulaş, katkı maddeleri ve diğer analitlerin tespitinde, ilaç ve metabolitlerinin biyolojik sıvılardaki analizlerinde, biyolojik örneklerde biyobelirteçlerin belirlenmesi gibi klinik analizlerde olmak üzere çeşitli alanlarda uygulanmaktadır [78].

Hedef analitler için yüksek seçicilik sağlaması, nispeten basit ve hızlı bir numune hazırlama tekniği olması, gerekli numune hacmini en aza indirmesi ve bulaş riskini azaltması ve çok düşük miktarlarda çözücü kullanılması dolayısıyla çevre dostu bir teknik olması avantajları arasında gösterilebilmektedir [79].

SPME'nin Temel Bileşenleri: SPME sisteminde fiber, analitlerin adsorplandığı katı fazı ifade eder. Fiberin kaplaması, analitlerin hidrofobik, polar ya da iyonik özelliklerine göre seçilir. Numune ortamı ise analizin sıvı ya da gaz halindeki ortamını tanımlar.

SPME İşlem Adımları: İlk aşama olan fiberin numuneye daldırılması, fiberin numune çözeltisine veya gaz ortamına yerleştirilmesini içerir. İkinci aşamada adsorpsiyon işlemi gerçekleşir ve analitler fiber üzerine adsorbe edilir. Son olarak, termal desorpsiyon aşamasında fiber kromatografik analiz için enjeksiyon portuna yerleştirilir ve adsorplanan analitler termal olarak desorbe edilir.

SPME'nin Avantajları: SPME, çözücü kullanmadan ayırma yapabilmesi, çok küçük miktarlardaki analitleri tespit edebilmesi ve taşınabilirliği sayesinde sahada kullanım imkânı sağlamasıyla öne çıkar. Bu yöntem, çevre analizleri, adli tıp, gıda analizi ve ilaç sektörü gibi çeşitli alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır.

2.2.3. Sıvı Kromatografisi

Sıvı kromatografisi, kimyasal karışımlardaki bileşenlerin ayrılması, tanımlanması ve miktarının belirlenmesi için kullanılan yaygın bir tekniktir. Hareketli faz sıvı ya da gaz, sabit faz ise genellikle katı bir malzemedir.

Kromatografinin Sınıflandırılması: Bunun için ayrılma mekanizması da dahil olmak üzere bir çok yöntem vardır. Ancak yaygın kullanımda hareketli faz biçimine göre olan sınıflandırma tercih edilmektedir. Buna göre:

- Gaz Kromatografisi (GC)
- Sıvı Kromatografisi (LC)

GC-MS ve LC-MS analizleri ise bu kromatografi kolonlarının MS ile birleştirildiği yöntemlerdir [46].

Ayırma mekanizmasına göre sıvı kromatografisi; adsorpsiyon, dağılma, iyon çifti oluşumu, iyon değiştirme, moleküler eleme ve afinite kromatografisi olarak sınıflandırılır.

- Adsorpsiyon Kromatografisi: Bileşenlerin sabit faz yüzeyine adsorplanması esasına dayanır.
- Dağılma Kromatografisi: Sabit ve hareketli faz arasındaki dağılma farklarına dayanarak ayırma yapılır.
- İyon Çifti Kromatografisi: İyonize maddelerin hareketli fazdaki iyon çiftleri ile etkileşimlerine dayanır.

- İyon Değişim Kromatografisi: İyonik bileşiklerin sabit fazdaki zıt yüklerle etkileşim göstermesi prensibine dayanır.
- Moleküler Eleme Kromatografisi: Maddelerin molekülerinin boyutlarına göre ayrılması esasına dayanır.
- Afinite Kromatografisi: Antijen-antikor gibi biyokimyasal etkileşimlere dayanan seçici bir tekniktir.

2.2.4. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) [80-82]

HPLC cihazı, karmaşık karışımlardaki bileşenlerin ayrılması, tanımlanması ve miktarının belirlenmesi için kullanılan güçlü bir analitik tekniktir. Temel bileşenleri; pompa, enjektör, kolon, dedektör ve kaydedici olup, Şekil 2.2'de şematik olarak gösterilmiştir. Bu bileşenlerin görevleri şu şekilde özetlenebilir:

Şekil 2.2. HPLC cihazı kısımlarının şematik gösterimi

Pompa: HPLC sisteminin kalbidir ve hareketli fazın sabit bir hızda ve basınçta kolona aktarılmasını sağlar. Pompa, ayırma işleminin tekrarlanabilirliği ve hassasiyeti için hayati bir role sahiptir. Pompa türleri genellikle izokratik (sabit çözücü oranı) ve gradyan (çözücü oranlarının zamana bağlı değişimi) olmak üzere ikiye ayrılır:

- İzokratik pompalar: Sürekli aynı bileşime sahip bir hareketli faz kullanır. Daha basit analizlerde tercih edilir.
- Gradyan pompalar: Farklı çözücüler arasındaki oranı zamanla değiştirir. Daha karmaşık karışımların analizinde kullanılır. Bu pompalar, genellikle 1-400 bar

arası yüksek basınç sağlayabilir ve hassas akış hızlarıyla (örneğin 0.1-5 mL/dak) çalışır.

Enjektör: Numunenin kolona hassas bir şekilde ve doğru miktarda verilmesini sağlayan bir sistemdir. HPLC sistemlerinde numune enjekte etmenin iki ana yolu vardır:

- Manuel enjektör: Operatör tarafından, bir şırınga kullanılarak numune sisteme enjekte edilir.
- Otomatik numune yükleyiciler (Otoörnekleyici): Çok sayıda numunenin sıralı şekilde ve otomatik olarak yüklenmesini sağlar. Numunenin doğru bir şekilde enjekte edilmesi, analiz doğruluğunu artırır ve tekrarlanabilir sonuçlar elde edilmesine katkı sağlar.

Kolon: HPLC sisteminde analitlerin ayrılmasının gerçekleştiği temel bileşendir. Genellikle paslanmaz çelikten üretilmiş bir tüp şeklinde olan kolonlar, uzunluk, çap ve sabit faz partikül boyutu gibi özellikleriyle farklı analiz ihtiyaçlarına uygun şekilde tasarlanmıştır. Çoğu kolon, 50-250 mm uzunluğunda ve 2-4.6 mm çapında olup, bu boyutlar kullanılan analizin türüne göre değişiklik gösterebilir. Kolonun içindeki sabit faz malzemesi, genellikle 3-10 µm arasında partikül boyutuna sahiptir. Daha küçük partikül boyutları, analitlerin sabit fazla temas yüzeyini artırarak daha iyi bir ayırma sağlar. Kolon, analitlerin sabit faz ve hareketli faz ile etkileşimleri sonucunda ayrılmasını sağlar. Bu ayrılma işlemi, genellikle analitlerin polaritesine, boyutuna veya diğer fiziksel ve kimyasal özelliklerine dayanır. Kolonun tasarımı ve dolgu malzemesi, analiz türüne ve hedeflenen ayırma performansına göre seçilir.

Dedektör: Kolondan çıkan maddelerin tespiti için kullanılır. HPLC sisteminin en önemli parçalarından biridir ve iki grup altında toplanırlar: Maddeye yönelik dedektörler ve çözeltiye yönelik dedektörler.

Maddeye yönelik dedektörler: Hareketli faz içerisindeki maddenin spesifik özelliklerini tayin eden dedektörlerdir. Bu grupta en yaygın kullanılan dedektör türleri

şunlardır: fotometrik dedektörler (örneğin UV, GB ve IR fotometreleri), floresans dedektörler, elektrokimyasal dedektörler, ayırım sonrası tepkime dedektörleri, radyoaktivite dedektörleri ve kütle spektrometreleri. Bu dedektörler, analitlerin fiziksel veya kimyasal özelliklerini algılayarak hareketli fazdaki maddelerin varlığını ve miktarını belirler.

Çözeltiyeye yönelik dedektörler: Hareketli faz içerisindeki maddeye değil, çözeltinin fiziksel özelliklerine odaklanır. Bu dedektörler, çözeltinin özelliklerine spesifik algılama yapar ve şu şekilde sınıflandırılabilir: refraktif indeks dedektörleri, dielektrik sabiti dedektörleri, kondüktivite dedektörleri ve yoğunluk dedektörleri. Her iki dedektör türü de analitin belirlenmesi için farklı yaklaşımlar sunsa da, analizlerin hassasiyeti ve doğruluğu açısından kritik öneme sahiptir. Dedektör seçimi, analiz edilen numunenin türüne ve hedeflenen ölçüm duyarlılığına bağlı olarak yapılır.

Bu çalışmada UV/GB ve MS dedektörü kullanıldığından, bu dedektör hakkında bilgi verilecektir.

UV/GB Dedektör

HPLC sistemlerinde en yaygın kullanılan dedektör tipi UV/GB (Ultraviyole/Görünür Bölge) dedektörleridir. Bu dedektörler, birçok organik bileşiğin ultraviyole ve görünür ışığı yüksek derecede absorplaması nedeniyle yüksek duyarlılıkla ölçüm yapma yeteneğine sahiptir. UV/GB dedektörleri, sıcaklık ve akış hızı değişikliklerine fazla duyarlı olmadıkları için gradyan elüsyon işlemleri için idealdir. Bu dedektörler, sabit dalga boylu ya da değişken dalga boylu olabilir.

Değişken dalga boylu dedektörler içerisinde Dizi Diyot Dedektör (DAD) UV/GB dedektörlerinin gelişmiş bir türüdür ve yüksek hassasiyetli optik sistemi sayesinde geniş bir dalga boyu aralığında analiz yapabilir. Sistem, döteryum lambasından yayılan polikromatik ışığı akış hücresinin üzerine yönlendirir ve ışığı optik ağda dağıtarak foto diyot dizisine yollar. Bu sayede DAD, 200-900 nm dalga boylu aralığında ölçüm yapabilir ve 0.1 saniyelik aralıklarla veri toplayabilir. Aynı

anda birden fazla dalga boyunda ölçüm alabilmesi sayesinde DAD, özellikle kromatografik piklerin saflık kontrolü ve piklerin yapısal analizi için sıkça tercih edilir.

Aynı anda tüm dalga boylarında pik ölçümü yapması, tek enjeksiyonla en yüksek dalga boylarını saptayabilmesi ve birden fazla dalga boyunda kromatogramları oluşturulabilmesi DAD'ın dikkat çeken özellikleri arasında yer alır. Ayrıca kromatografik olarak tam ayrılamamış piklerin nicel analizini yapabilir, farklı referans dalga boyları kullanarak maddelerin ayrılmasını sağlayabilir ve spektrumların çakıştırılması yöntemiyle pik saflığını tespit edebilir. Bu özellikler, DAD'ın kromatografik analizlerde hassasiyet ve doğruluk sağlama açısından vazgeçilmez bir araç olmasını sağlar. Hem yapısal analiz hem de spektral bazlı veri toplama yetenekleri sayesinde DAD, HPLC sistemlerinde yaygın olarak tercih edilen bir dedektördür.

Kütle Spektrometresi (MS)

Analitlerin kütle-yük oranına (m/z) göre tespit edilmesini sağlayan son derece güçlü ve hassas bir dedektör olarak kullanılır. LC-MS sistemi, LC'nin yüksek performanslı ayırma kapasitesini, MS'in moleküler yapı ve bileşen tanımlama yeteneğiyle birleştirir. Bu kombinasyon, özellikle karmaşık karışımlarda hem analitlerin nitel hem de nicel analizini gerçekleştirmek için tercih edilir.

LC-MS sisteminin temel çalışma prensibi, LC'de ayrılmış olan bileşenlerin MS dedektörüne taşınması, burada iyonize edilmesi, kütle-yük oranlarına göre ayrılması ve dedektör tarafından tespit edilmesidir. İyonizasyon işlemi için genellikle iki ana teknik kullanılır:

Elektrosprey İyonizasyon (ESI): Özellikle polar ve iyonik bileşiklerin analizinde kullanılır. Sıvı şeklindeki analit, yüksek voltaj altında ince bir sprej şeklinde püskürtülerek iyonize edilir.

Atmosferik Basınç Kimyasal İyonizasyon (APCI): Daha az polar veya non-polar bileşiklerin analizinde uygundur. Analit, bir ısıtma mekanizması ile buharlaştırılır ve ardından iyonize edilir.

MS, analitlerin iyonize edilmiş şeklini kütle-yük oranlarına göre ayırır ve her bir bileşiğin spesifik spektrumunu oluşturur. Bu spektrum, analitin moleküler yapısı, kütlesi ve kimyasal özellikleri hakkında bilgi sağlar. Hatta bazı MS cihazlarında tandem kütle spektrometresi (MS/MS) kullanılarak, analitler birden fazla defa parçalanabilir ve daha ayrıntılı yapı bilgisi elde edilebilir. Bu özellik, LC-MS sistemini hem spesifik hem de çok hassas bir analiz yöntemi haline getirir.

LC-MS'nin başlıca avantajları arasında düşük derişimdeki analitlerin tespit edilebilmesi, moleküler kütle ve yapı tanımlaması yapabilmesi, yüksek duyarlılık ve seçicilik sunması bulunur. Ayrıca, sistem aynı anda birden fazla bileşiğin tespit edilmesine olanak tanır. Bu nedenle, HPLC-MS, farmasötik analizlerden çevresel kirlilik tespitine, biyoteknolojik ürünlerin karakterizasyonundan gıda analitiklerine ve adli bilimlere kadar geniş bir uygulama alanına sahiptir.

Örneğin, farmasötik sektöründe ilaçların metabolitlerinin tespiti ve biyoyararlanım çalışmaları için yaygın olarak kullanılırken, çevresel analizlerde su, hava ve toprak örneklerinde iz seviyesindeki kirleticilerin tespiti için de kullanılmaktadır. Ayrıca, biyomoleküler çalışmalarda proteinler, peptitler, nükleik asitler gibi biyolojik makromoleküllerin karakterizasyonunda etkili bir yöntemdir. Adli tıpta ise, toksikolojik analizlerde ilaçlar, zehirler ve diğer kimyasal maddelerin tanımlanması ve miktarlarının belirlenmesinde önemli bir rol oynar.

Sonuç olarak, LC-MS, eczacılık, kimya, biyokimya ve biyoteknoloji alanlarında hem araştırma hem de uygulamalı analizlerde vazgeçilmez bir araçtır. Karmaşık matrislerde bile spesifik analitlerin yüksek hassasiyetle tespit edilebilmesi, bu yöntemi modern analitik kimyanın en güçlü tekniklerinden biri haline getirmiştir.

Kaydedici: Dedektörün ürettiği sinyalleri toplayan, işleyen ve analiz eden bir birimdir. Modern HPLC sistemlerinde bu görev genellikle bilgisayar tabanlı yazılımlar tarafından gerçekleştirilir. Kaydedici, kromatogram adı verilen grafiksel bir çıktı oluşturur. Bu kromatogramda X eksenini zamanı, Y eksenini ise dedektör sinyali yoğunluğunu ifade eder. Kromatogramın analizi, analitlerin kalitatif (nitel) ve kantitatif (nicel) özelliklerinin belirlenmesini sağlar.

2.3. Kromatografide Temel Parametreler [80-83]

2.3.1. Alıkonma Zamanı ve Kapasite Faktörü

Numunenin enjeksiyonundan sonra dedektöre ulaşması için geçen zamana alıkonma zamanı denir (t_R). Alıkonma zamanı terimi yerine alıkonma hacmi (V_R) de kullanılır. Bir maddenin alıkonma hacmi bir bileşenin sabit fazdan elüe olması için gerekli olan hareketli faz hacmi olup alıkonma zamanı ve hacimsel akış hızı (F)'ndan hesaplanabilir.

$$V_R = t_R \times F \quad (2.1)$$

Bir maddenin alıkonma hacmi, ölü hacim (V_0) terimini içerecek biçimde de tanımlanabilir. Kapasite faktörü (k') olarak bilinen bu kavram Eşitlik 2.2'de verilmiştir (Şekil 2.18).

$$k' = (V_R - V_0) / V_0 \quad (2.2)$$

Elüsyon sırasında hacimsel akış hızı (F) sabitse eşitlik;

$$k' = (t_R - t_0) / t_0 \quad (2.3)$$

biçiminde yazılabilir. Kolon ile herhangi bir etkileşmeye girmeyen maddeler V_0 ' da elüe edilirler. Eşitlik 2.2 ve 2.3'te V_0 ve t_0 sırası ile ölü hacim ve ölü zaman olarak tanımlanmıştır.

Şekil 2.3. Kapasite faktörünün hesaplanması

Kapasite faktörü her maddenin kendine özgüdür ve bir karışımı oluşturan bileşikleri seçici olarak ayıran kromatografik sistemin seçiminde göz önünde tutulan en önemli parametredir. Uygun bir hareketli faz-sabit faz çifti seçildiğinde belirli bir karışımdaki her bir bileşen için farklı kapasite faktörü değerleri elde edilir. Genellikle hareketli faz bileşimi değiştirilerek kapasite faktörü ayarlanır. Akış hızı değişikliklerinde, alıkonma zamanı değişir fakat kapasite faktörü sabit kalır [81].

2.3.2. Seçicilik

İki maddeye ait kapasite faktörü oranı seçicilik (α) veya ayırım faktörü olarak adlandırılır ve aşağıdaki eşitlikle verilir.

$$\alpha = k'_2 / k'_1 = (t_{r2} - t_0) / (t_{r1} - t_0) \quad (2.4)$$

Bu eşitlikte, k'_1 kısa alıkonma zamanlı maddenin, k'_2 ise daha uzun alıkonma zamanlı maddenin kapasite faktörü olarak tanımlanmıştır. Seçicilik, esas olarak sabit faz özelliklerine bağlıdır ancak hareketli faz bileşimi de seçiciliği etkiler.

2.3.3. Kolon Etkinliği

Kolon etkinliği, pik genişliği ile ilgilidir. Etkinliği yüksek olan kolonlar, dar pikler verirler ve bu kolonlarla maddeleri ayırmak daha kolaydır. Başarılı bir kromatografinin asıl amacı verimli bir ayırım ve dar bir kromatografik bant elde etmektir. Kolon etkinliğinin ölçüsü kolonun eşdeğer teorik tabaka sayısı (N)'dır ve aşağıdaki eşitlikle verilir;

$$N = 16 \times (t_R / w)^2 \quad (2.5)$$

Bu eşitlikte w , elüsyon pik yüksekliğinin % 10'undaki pik taban genişliğidir.

Kolon etkinliği eşdeğer teorik tabaka yüksekliği (H) ile de gösterilebilir ve kolon uzunluğunun (L) teorik tabak sayısına (N) bölünmesiyle hesaplanır (Eşitlik 2.6).

$$H = L/N \quad (2.6)$$

Etkinlik; kolon uzunluğunun, partikül boyutunun ve akış hızının bir fonksiyonudur. Bu parametrelerin değişimi kolonun basıncını da etkiler. Bunun yanında kolon uzunluğu ve akış hızının değişimi alıkonma zamanını da değiştirir.

2.3.4. Ayırıcılık

Kromatografik işlemlerde kolon etkinliği ve çözücü etkinliğinin ortak etkisi ayırıcılık kavramıyla ifade edilir. Ayırıcılık genel olarak aşağıdaki eşitlikle verilmektedir:

$$R_s = 2 \times \frac{(t_{R2} - t_{R1})}{(w_1 + w_2)} \quad (2.7)$$

2.3.5. Pik Simetrisi

Analitin hareketli fazdaki denge derişimi (C_m) sabit fazdaki denge derişimine (C_s) karşı grafiğe geçirildiğinde bir dizi izoterm elde edilir. İdeal durumlarda $K=C_s/C_m$ sabit olduğu için kromatografik bant bütün derişimlerde aynı hızda hareket eder ve simetrik (gauss) bir elüsyon piki elde edilir.

Pik simetrisinin belirlenmesinde kullanılan pik asimetri oranı aşağıdaki eşitlik yardımıyla hesaplanır.

$$A_s = B / A \quad (2.8)$$

B ve A uzunlukları Şekil 2.21'de tanımlanmıştır. İyi bir ayırma işleminde, pik asimetri oranının 1.00 ile 1.25 arasında olması istenir [84].

Şekil 2.4. Pik asimetri oranının hesaplanması

2.4. Analitik Yöntemlerin Yeşilliği, Maviliği ve Beyazlığı

Bir analitik yöntemin Yeşillik (Greenness), Mavilik (Blueness), ve Beyazlık (Whiteness) kavramları, çevresel sürdürülebilirlik, insan sağlığı üzerindeki etkiler ve genel kalite gibi yönlerden yöntemin değerlendirilmesi için kullanılan kavramlardır. Bu terimler, analitik kimyada sürdürülebilirlik, güvenlik ve metodolojinin bütüncül değerlendirilmesine odaklanan modern yaklaşımların bir parçasıdır:

2.4.1. Yeşillik

Yeşillik, bir analitik yöntemin çevresel sürdürülebilirliğini ifade eder. Bu kavram, analitik yöntemlerin çevresel etkisini değerlendirmek için geliştirilmiştir ve genellikle yeşil kimya prensipleri ile ilişkilidir. Bir yöntemin ne kadar "yeşil" olduğunu belirlemek için şu faktörler değerlendirilir:

- Zararlı kimyasalların kullanımı ve miktarı
- Atık miktarı ve atığın çevresel etkisi
- Enerji tüketimi (yüksek enerji gerektiren cihazlar veya süreçler)
- Yenilenebilir kaynakların kullanımı
- Çözücülerin ve reaktiflerin çevre dostu olup olmadığı

Örneğin, su bazlı bir solvent kullanan, düşük enerji tüketimi gerektiren ve minimum atık üreten bir yöntem, "yeşil" olarak kabul edilir. "Analitik Yeşil Kimya" (Green Analytical Chemistry - GAC), bu prensiplere odaklanan bir alt disiplindir.

Analitik yöntemlerin çevresel etkisini değerlendirmek için bir çok yazılım mevcuttur. Bu yazılımları içerisinde AGREEprep , numune hazırlama yöntemlerinin çevresel etkisini değerlendirmek için tasarlanmış ilk yeşil metrik aracıdır ve 2022 yılında IUPAC üyeleri tarafından tanıtılmıştır. Yeşil Numune Hazırlama (Green Sample Preparation - GSP) prensipleri temel alınarak geliştirilen AGREEprep, atık minimizasyonu, enerji tüketimi, tehlikeli maddelerin kullanımı, otomasyon ve operatör güvenliği gibi on farklı kriteri değerlendirir. Her bir değerlendirme adımı, en kötü performansı temsil eden 0 ile en iyi performansı temsil eden 1 arasında bir puan alır. Bu kriterler, literatürde bildirilen geleneksel ve en yeni numune hazırlama yöntemlerinin deneysel koşulları dikkate alınarak belirlenmiştir. Her bir kriterin, toplam puana katkıda bulunacak şekilde varsayılan bir ağırlığı vardır. Her kriterden alınan puanlar ağırlıklandırılır ve toplam puan 0 ile 1 arasında bir değer olarak hesaplanır. Bu toplam puan, 1'e yaklaştıkça optimum performansı ya da numune hazırlama adımının bulunmamasını ifade eder. Sonuçlar, her yöntemin güçlü ve zayıf yönlerini vurgulayan sezgisel bir dairesel piktogramda görselleştirilir.

Kriterlerin Tanımları:

1. Numune hazırlamayı *in situ* olarak gerçekleştirmeyi tercih etme:

Numunenin doğrudan numune alma noktasında veya numune alma ile entegre şekilde hazırlanmasını önceliklendirir. Bu, malzeme ve enerji kullanımını en aza indirir ve numunenin taşınması sırasında bozulma risklerini azaltır. Pasif örnekleyiciler ve *in vivo* yöntemler gibi *in situ* yaklaşımlar, yeşil uygulamalarda en yüksek puanı alır.

2. Daha güvenli çözücüler ve reaktifler kullanma:

Toksik olmayan, daha az tehlikeli ya da çözücüsüz ve reaktifsiz yöntemlerin kullanılmasını teşvik eder. Daha çevre dostu çözücü ve reaktifler, daha yüksek puan alır ve tehlikeli madde kullanımını en aza indiren yöntemler tercih edilir.

3. Sürdürülebilir, yeniden kullanılabilir ve yenilenebilir malzemeler hedefleme: Yenilenebilir, biyolojik bazlı veya yeniden kullanılabilir malzemelerin kullanımını değerlendirir. Bu kriter, tükenbilir kaynaklara bağımlılığı azaltır ve uzun ömürlü veya tekrar kullanıma uygun malzemelere öncelik verir.

4. Atığı en aza indirme: Numune hazırlama sırasında oluşan atık miktarını, örneğin çözücü, reaktif ve tek kullanımlık malzemeler gibi, azaltmaya odaklanır. Daha az atık üreten yöntemler çevresel performansı doğrudan artırır.

5. Numune, kimyasal ve malzeme miktarlarını en aza indirme: Numune boyutunun ve kullanılan malzemelerin miktarını, analitik doğruluktan ödün vermeden azaltmayı teşvik eder. Daha az giriş miktarı, maliyetleri, enerji tüketimini ve atık üretimini düşürür.

6. Numune işleme verimini artırma: Belirli bir zaman biriminde işlenen numune sayısını değerlendirir ve verimliliği artırmayı hedefler. Daha hızlı veya paralel işleme teknikleri daha yüksek puan alır.

7. Adımları entegre etme ve otomasyonu teşvik etme: Süreç adımlarının birleştirilmesini ve iş akışlarının otomasyonunu destekler. Bu, zaman, malzeme kaybı, enerji tüketimi ve insan müdahalesini azaltır. Entegre ve otomatik sistemler, hataları ve zararlı maddelere maruz kalmayı azaltarak Yeşilliği artırır.

8. Enerji tüketimini en aza indirme: Enerji verimliliğini değerlendirir ve numune başına minimum enerji gerektiren yöntemleri tercih eder. Daha düşük enerji gereksinimine sahip teknikler, sürdürülebilir uygulamalarla uyumludur ve daha yüksek puan alır.

9. Numune hazırlama sonrası analiz için en yeşil yapılandırmayı seçme: Numune hazırlama sonrası, enerji ve reaktif tüketimi en düşük olan analitik tekniklerin kullanımını teşvik eder. Daha basit ve daha az kaynak tüketen yapılandırmalar önceliklidir.

10. Operatör için güvenli prosedürler sağlama: İnsan sağlığına yönelik riskleri en aza indirmeye odaklanır ve operatörlerin toksik, korozif veya reaktif

kimyasallara maruz kalmasını azaltır. Daha güvenli çalışma koşulları sağlayan yöntemler daha yüksek puan alır.

Bu kriterler, AGREEprep aracının hem çevresel sürdürülebilirliği hem de kullanıcı güvenliğini önceliklendiren bütüncül bir değerlendirme sistemi sunduğunu göstermektedir.

2.4.2. Mavilik

Mavilik, bir analitik yöntemin insan sağlığı üzerindeki güvenliği ve zararsızlığını ifade eder. Yöntemin laboratuvar personeline, kullanıcıya veya dolaylı yoldan topluma sağladığı güvenlik, bu kategoride değerlendirilir. Şu unsurlar dikkate alınır:

Mavilik, analitik bir yöntemin **kullanıcı güvenliği ve insan sağlığına uygunluğunu** değerlendiren bir kriterdir. Bu konsept, yöntemlerin laboratuvar çalışanları üzerindeki doğrudan etkilerini inceleyerek, kimyasalların toksisite seviyeleri, fiziksel riskler ve kullanıcı ergonomisi gibi faktörleri göz önünde bulundurur. Blueness, özellikle laboratuvar güvenliği ve çalışan sağlığına odaklanır ve yöntemin operatörler için ne kadar güvenli olduğunu temsil eder.

Mavilik Değerlendirmesinde Kullanılan Parametreler:

1. Kimyasal Güvenlik: Yöntemin kullanılan kimyasalların toksik, kanserojen veya reaktif özelliklerini içerip içermediği incelenir. Daha az zararlı kimyasalların tercih edilmesi, blueness puanını artırır.

2. Fiziksel Riskler: Yangın, patlama veya laboratuvar kazalarına neden olabilecek tehlikeler değerlendirilir. Daha güvenli çalışma koşulları sağlayan yöntemler daha yüksek puan alır.

3. Maruz Kalma Seviyesi: Operatörlerin toksik veya tehlikeli maddelere doğrudan maruz kalma ihtimali analiz edilir. Otomasyonun artması ve manuel müdahalenin azalması, blueness açısından olumlu değerlendirilir.

4. Ergonomi ve Kullanım Kolaylığı: Yöntemin operatörlerin rahat kullanabileceği şekilde tasarlanmış olması, fiziksel zorlanma riskini azaltır ve kullanıcı dostu çözümler sunar.

5. Koruyucu Ekipman İhtiyacı: Yöntemin uygulanabilmesi için özel koruyucu ekipman gereksinimi olup olmadığına bakılır. Daha az koruyucu ekipman gerektiren ve düşük riskli yöntemler daha yüksek blueness puanı elde eder.

BAGI, yukarıda belirtilen kriterleri birleştirerek 0 ile 1 arasında bir skor oluşturur. 1, yöntemin çevresel olarak en dost canlısı ve sürdürülebilir olduğunu ifade eder. Bu skor, yöntemin çevresel etkilerini azaltan yeşil kimya prensiplerine ne kadar uygun olduğunu gösterir.

Mavilik, analitik yöntemlerin sadece çevresel sürdürülebilirliğini değil, aynı zamanda laboratuvar kullanıcılarının güvenliği ve sağlığını da koruyan yöntemlerin seçilmesini destekler. Bu kavram, daha az riskli, daha ergonomik ve kullanıcı dostu yöntemlerin benimsenmesine yardımcı olur. Yüksek blueness skoru, yöntemin güvenli çalışma koşulları sunduğunu ve operatörlerin sağlık risklerini minimuma indirdiğini gösterir.

2.4.3. Beyazlık

Beyazlık, analitik bir yöntemin Beyaz Analitik Kimya (White Analytical Chemistry - WAC) prensiplerine uygunluğunu ifade eder ve genellikle RGB12 algoritması kullanılarak değerlendirilir. Bu algoritma, yöntemin performansını çok boyutlu bir perspektifte değerlendirerek çevresel sürdürülebilirlik, kullanıcı güvenliği, maliyet etkinliği ve genel analitik kalite gibi farklı parametreleri ele alır. Beyazlık, analitik yöntemlerin yalnızca çevre dostu ve güvenli olmasını değil, aynı zamanda bilimsel doğruluk ve kalite standartlarına uygunluğunu da temsil eder.

RGB12 Algoritması Kullanılarak Değerlendirilen Parametreler:

1. **Doğruluk** : Yöntemin gerçek sonuçlara ne kadar yakın olduğunu ölçer.
2. **Kesinlik**: Aynı numuneyle yapılan tekrar ölçümlerdeki varyasyonu değerlendirir.
3. **Doğrusallık**: Analitin derişimine bağılı olarak elde edilen ölçümlerin doğrusal bir ilişki gösterip göstermediğini inceler.
4. **Gözlenebilme Sınırı (LOD)**: Yöntemin tespit edebileceği en düşük analit miktarını belirler.
5. **Alt Tayin Sınırı (LOQ)**: Analitin miktarının kesin olarak ölçülebileceği en düşük derişimi ifade eder.
6. **Numune Hazırlama** : Numune hazırlama işlemlerinin basitliği, otomasyon seviyesi, atık üretimi ve kimyasal kullanımını değerlendirir.
7. **Enerji Verimliliği**: Yöntemin enerji tüketimini değerlendirir; daha düşük enerji gereksinimi, daha yüksek puan anlamına gelir.
8. **Atık Azaltımı**: Yöntemin çevreye zararlı atık miktarını en aza indirip indirmedini inceler.
9. **Kullanıcı Güvenliği**: Yöntemin laboratuvar personelinin toksik, reaktif veya tehlikeli maddelere maruz kalmasını ne derece minimize ettiğini analiz eder.
10. **Maliyet Etkinliği**: Yöntemin ekonomik uygulanabilirliği ve maliyet-fayda dengesi göz önüne alınır.
11. **Uygulama Esnekliği**: Yöntemin farklı matrislerde ve analitlerde uygulanabilme kapasitesini değerlendirir.
12. **Sürdürülebilirlik**: Çözücü, reaktif ve enerji kaynaklarının yenilenebilirliği ve genel çevresel sürdürülebilirliği ölçer.

RGB12 algoritması, bu 12 parametreyi değerlendirerek bir yöntemin genel Beyazlık puanını 0 ile 1 arasında hesaplar. 0, yöntem performansının zayıf olduğunu, 1 ise optimum bir performans ve tam WAC uyumluluğunu ifade eder.

Bu algoritma, analitik yöntemlerin çevresel etkilerini, operatör güvenliğini ve bilimsel doğruluğunu bütüncül bir şekilde değerlendirmeye olanak tanır. Böylece, çevresel sürdürülebilirlik, güvenlik ve analitik performansın bir arada optimize edilmesine yönelik rehberlik sağlar. Bir yöntemin "beyaz" olması, onun güvenilir, doğrulanmış ve çeşitli uygulamalar için uygun olduğunu gösterir. Beyazlık, analitik yöntemin bilimsel bütünlüğünü ve uygulama değerini temsil eder.

Bütünsel Değerlendirme

Bu üç kavram birlikte, bir analitik yöntemin yalnızca bilimsel ve teknik olarak etkili olup olmadığını değil, aynı zamanda çevreye olan etkisini, kullanıcı güvenliğini ve genel kalite düzeyini dikkate alır. Modern analitik kimyada, bu tür bütünsel değerlendirmeler giderek daha önemli hale gelmiştir. Özellikle Yeşil Analitik Kimya ve sürdürülebilirlik hedefleri doğrultusunda, yöntemlerin Yeşillik, Mavilik ve Beyazlık özelliklerini optimize etmek, çevre dostu, güvenli ve güvenilir yöntemlerin geliştirilmesini teşvik eder.

Bu kavramların yöntem değerlendirme araçlarıyla (ör. Analytical Eco-Scale, AGREE metric gibi) ölçülebilir hale getirilmesi, yöntemlerin objektif karşılaştırılmasını da sağlar.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

• Asetik asit	Merck
• Asetonitril (MeCN) ($\geq 99.9\%$ saflığı)	Sigma-Aldrich
• Asiklovir (ASI) (99.0%)	Polifarma İlaç San.
• Metanol (MeOH) ($\geq 99.9\%$ saflığı)	Sigma-Aldrich
• Potasyum dihidrojen fosfat (98.0-100.5%)	Merck
• Hidroklorik asit	Merck
• Emtrisitabin (EMT) (99.5%)	İLKO İlaç San..
• Entekavir monohidrat (ENT) (101.4%)	İLKO İlaç San..
• Favipiravir (FAV) (101.18%) ve	Atabay Kimya San.
• Oseltamivir fosfat (OSE) (99.84%)	Atabay Kimya San.
• Gansiklovir sodyum (GAN) (100.3%),	World Medicine San.
• Lopinavir (LOP) (98.6%)	World Medicine İlaç San.
• Valasiklovir hidroklorür (VAL) (99.2%)	World Medicine İlaç San.
• PBS Tablet (pH 7.2-7.6)	Sigma-Aldrich
• Amonyak (NH ₃) (28-30%)	Sigma-Aldrich
• Sodyum hidroksit	Merck
• Lamivudin (LAM) (100.0%)	Nobel İlaç San.
• Molnupiravir (MOL)	Optimus Drugs
• Valgansiklovir hidroklorür (VLG) (100.2%)	Ali Raif İlaç Sanayi
• Sodyum fosfat monobazik monohidrat ($\geq 99.0\%$)	Sigma Aldrich
• Formik asit ($> 98\%$)	Merck

3.2. Kullanılan Cihazlar

• HPLC-1	(Shimadzu LC-20 AB)
▪ Pompa	(Shimadzu LC-20AB)
▪ Oto örnekleyici	(Shimadzu SIL 20AC HT)
▪ Kolon fırını	(Shimadzu CTO 20AC)
▪ Dizi diyot dedektör	(Shimadzu SPD- M20A)
• HPLC-2	(Hitachi Organizer)
▪ Pompa	(Hitachi Pump L-2130)
▪ Otoörnekleyici	(Hitachi Autosampler L-2200)
▪ Kolon fırını	(Hitachi Column Oven L-2300)
▪ UV dedektör	(Hitachi UV Detector L-2400)
• LC-MS/MS	(Shimadzu 8030 MS/MS)
▪ Pompa	(Shimadzu LC-20AB)
▪ Otoörnekleyici	(Shimadzu LC20QTV)
▪ Kolon fırını	(Shimadzu LC10)
▪ Kütle spektrometresi	(Shimadzu 8030)
• Hassas terazi	(Mettler Toledo AG 285)
• Milli-Q su cihazı	(Barnstead NanoPure Diamond)
• Otomatik mikropipet	(Ependorf 10-100 μ l ve 100-1000 μ l)

- pH metre (Mettler Toledo MA 235)
- Santrifüj (Hettich, EBA 20)
- Hassas terazi (Mettler Toledo AG 285)
- Terazi (Shimadzu Libror EB-330 H)
- Ultrasonik banyo (Bandelin Sonorex RK 514 BH)
- Vorteks karıştırıcı (Heildoph Reax Top)
- UV-GB spektrometresi (Agilent 8453 UV)
- Fluorimetri (Shimadzu RF-6000)

3.3. Kullanılan Cam ve Sarf Malzemeler

- Cam pipet (1-10 mL'lik, pyreks®)
 - Balonjoje (5-1000 mL'lik, pyreks®)
 - Beher (Çeşitli hacimlerde)
 - SPME sorbentleri
 - Hidrofilik-lipofilik dengeli (HLB)
 - Hidrofilik-lipofilik dengeli - kuvvetli anyon değiştirici (HLB-SAX)
 - Hidrofilik-lipofilik dengeli - kuvvetli katyon değiştirici (HLB-SCX)
 - Polidimetilsiloksan (PDVB)
 - Poli(metakrilik asit) (poly(methacrylic acid) (PMAA)
 - Membran filtre (Titan 0.45 µm)
 - Şırınga
 - Vialler (vida kapaklı, 1.5 mL)
 - İnsertler (200 µL)
 - Mezürler (50 ve 100 mL)
 - Ependorf tüpler (1.5 ve 2 mL)
 - Balonjojeler (5, 10, 100 ve 500 mL)
 - Kolonlar
 - Exsil™ Mono 100 C18 (150 mm × 4.6 mm, 3 µm; Exmere Ltd., Carnforth, Birleşik Krallık)
 - Zorbax SB-C8 (3.0 × 50 mm 1.8 µm; Agilent, Kaliforniya, ABD)
- Milli-Q su arıtma sisteminden (Merck KGaA, Darmstadt, Almanya) elde edilmiştir.

3.4. Çözeltilerin Hazırlanması

Stok ASI çözeltisi (1000 µg/mL): 10.0 mg standart ASI tartılıp 10 mL'lik balonjojeye aktarılmış ve yaklaşık 5 mL su ile çözüldükten sonra 10 mL'ye su ile tamamlanmıştır.

Stok EMT çözeltisi (1000 µg/mL): 10.0 mg standart EMT tartılıp 10 mL'lik balonjojeye aktarılmış ve yaklaşık 5 mL su ile çözüldükten sonra 10 mL'ye su ile tamamlanmıştır.

Stok ENT çözeltisi (1000 µg/mL): 10.0 mg standart ENT tartılıp 10 mL'lik balonjojeye aktarılmış ve yaklaşık 5 mL MeOH ile çözüldükten sonra 10 mL'ye MeOH ile tamamlanmıştır.

Stok FAV çözeltisi (1000 µg/mL): 10.0 mg standart FAV tartılıp 10 mL'lik balonjojeye aktarılmış ve yaklaşık 5 mL su ile çözüldükten sonra 10 mL'ye su ile tamamlanmıştır.

Stok GAN çözeltisi (1000 µg/mL): 10.0 mg standart GAN tartılıp 10 mL'lik balonjojeye aktarılmış ve yaklaşık 5 mL su ile çözüldükten sonra 10 mL'ye su ile tamamlanmıştır.

Stok LAM çözeltisi (1000 µg/mL): 10.0 mg standart LAM tartılıp 10 mL'lik balonjojeye aktarılmış ve yaklaşık 5 mL su ile çözüldükten sonra 10 mL'ye su ile tamamlanmıştır.

Stok LOP çözeltisi (1000 µg/mL): 10.0 mg standart LOP tartılıp 10 mL'lik balonjojeye aktarılmış ve yaklaşık 5 mL MeOH ile çözüldükten sonra 10 mL'ye MeOH ile tamamlanmıştır.

Stok MOL çözeltisi (1000 µg/mL): 10.0 mg standart MOL tartılıp 10 mL'lik balonjojeye aktarılmış ve yaklaşık 5 mL su ile çözüldükten sonra 10 mL'ye su ile tamamlanmıştır.

Stok OSE çözeltisi (1000 µg/mL): 10.0 mg standart OSE tartılıp 10 mL'lik balonjojeye aktarılmış ve yaklaşık 5 mL su ile çözüldükten sonra 10 mL'ye su ile tamamlanmıştır.

Stok VAL çözeltisi (1000 µg/mL): 10.0 mg standart VAL tartılıp 10 mL'lik balonjojeye aktarılmış ve yaklaşık 5 mL su ile çözüldükten sonra 10 mL'ye su ile tamamlanmıştır.

Stok VLG çözeltisi (1000 µg/mL): 10.0 mg standart VLG tartılıp 10 mL'lik balonjojeye aktarılmış ve yaklaşık 5 mL su ile çözüldükten sonra 10 mL'ye su ile tamamlanmıştır.

Bütün stok çözeltiler 1 mL'lik kısımlar halinde bölünerek -20 °C'de saklanmıştır. 10.00, 1.00 ve 0.10 µg/mL derişimdeki çözeltiler stoklardan seyreltilerek günlük hazırlanmıştır.

50 mM Fosfat Tamponu Çözeltisi: 3.4 gram potasyum dihidrojen fosfatın 500 mL ultra saf suda çözülmesiyle 50 mM fosfat tamponu hazırlanmıştır. Hazırlanan çözelti bir membran filtreden (47 mm çapında, 0.45 µm gözenek boyutlu) süzölmüştür. Tampon çözeltileri günlük olarak hazırlanmış ve fosfat tamponunun pH değeri 1M HCl veya 1M NaOH çözeltileri kullanılarak ayarlanmıştır.

PBS (pH 7.4) çözeltisinin hazırlanması: Bir adet PBS tablet 200 mL suda çözünerek PBS çözeltisi hazırlanmıştır (pH:7.4).

%0.1 FA çözeltisi: 500 mL'lik bir balonjojeye hacme kadar ultra saf su alınmış ve üzerine 50.0 µL FA eklenmiştir.

%0.1 FA içeren ACN çözeltisi: 500 mL'lik bir balonjojeye hacme kadar ACN alınmış ve üzerine 50.0 µL FA eklenmiştir.

Desorpsiyon çözeltisi 1: Otomatik mikropipet ile 4.0 mL ACN, 4.0 mL MeOH, 2.0 mL ultra saf su çekilerek 10 mL'lik balonjojeye aktarılmış ve üzerine 10.0 µL FA eklenmiştir.

Desorpsiyon çözeltisi 2: Otomatik mikropipet ile 4.0 mL ACN, 4.0 mL MeOH, 2.0 mL ultra saf su çekilerek 10 mL'lik balonjojeye aktarılmış ve üzerine 10.0 µL NH₃ eklenmiştir.

Desorpsiyon çözeltisi 3: Otomatik mikropipet ile 8.0 mL ACN, 2.0 mL ultra saf su çekilerek 10 mL'lik balonjojeye aktarılmış ve üzerine 10.0 µL FA eklenmiştir.

Desorpsiyon çözeltisi 4: Otomatik mikropipet ile 8.0 mL MeOH, 2.0 mL ultra saf su çekilerek 10 mL'lik balonjojeye aktarılmış ve üzerine 10.0 µL FA eklenmiştir.

Desorpsiyon çözeltisi 5: Otomatik mikropipet ile 5.0 mL ACN, 5.0 mL ultra saf su çekilerek 10 mL'lik balonjojeye aktarılmış ve üzerine 10.0 µL FA eklenmiştir.

3.5. Antivirallerin Farmasötik Dozaj Şeklinden Analizleri

3.5.1. Numune Hazırlanması

Her bir antiviral tablet dozu için ayrı ayrı on tablet tartılmış ve toz haline getirilmiştir. FAV, VAL ve VLG için tabletlerine eş değer miktar tartılarak ve 100 mL hacimli balonjojeye aktarılmıştır. 75 mL su:ACN (90:10, h/h) karışımı eklenmiş ve balonjoje 15 dak boyunca sonikasyona tabi tutularak aynı çözücü ile hacme tamamlanmıştır. Antiviral çözeltilerin uygun hacimleri alınarak 50 mL hacimli balonjojede suyla seyreltilmiş ve son derişim 100 µg/mL olarak elde edilmiştir. Antiviral çözeltilerin uygun hacimleri alınarak 50 mL hacimli balonjojede suyla seyreltilmiş ve son derişim 100 µg/mL olarak elde edilmiştir. ENT tabletine eş değer miktar tartılarak ve 5 mL hacimli balonjojeye aktarılmıştır. 4 mL MeOH eklenmiş ve şişe 15 dak boyunca sonikasyona tabi tutularak aynı çözücü ile hacme tamamlanarak 100 µg/mL derişim elde edilmiştir. Son olarak, örnek çözeltiler geliştirilen HPLC yöntemiyle analiz edilmiştir.

3.5.2. Plasebo Numuneler

Plasebo formülasyonları, ilgili aktif farmasötik bileşenlerinin fiziksel ve kimyasal özelliklerini yakından taklit etmek için dikkatlice geliştirilmiş, analitik validasyon ve geri kazanım çalışmalarında tutarlılık sağlanmıştır. Her antiviral ilacın plasebosu, farmasötik ürünün bileşimini taklit etmek için belirli yardımcı maddeler kullanılarak formüle edilmiştir. Yardımcı maddelerin hassas bir şekilde tartılması ve iyice karıştırılmasıyla tüm formülasyonlarda tekdüzelik ve homojenlik sağlanmıştır.

EMT plasebo tablet içeriği laktoz monohidrat, mikrokristalin selüloz, önceden jelatinize edilmiş mısır nişastası, kroskarmeloz sodyum, magnezyum stearat ve Opadry II Blue (32K205003) kullanılarak hazırlanmıştır.

ENT plasebo tablet içeriği, laktoz monohidrat (sığır kaynaklı), mikrokristalin selüloz 101 ve 102, PVP K-30, krospovidon, magnezyum stearat ve Instacoat Universal White (A05R00009) içermiştir.

FAV plasebo tablet içeriği povidon, kolloidal silikon dioksit, krospovidon, sodyum stearil fumarat ve Opadry Yellow kullanılarak hazırlanmıştır.

GAN enjeksiyon çözeltileri NaOH kullanılarak hazırlanmıştır.

VAL plasebo tablet içeriği mikrokristalin selüloz, krospovidon, povidon K90, magnezyum stearat, susuz kolloidal silika, hidrokispropilmetilselüloz, titanyum dioksit, polietilen glikol 400, polisorbata 80 ve karnauba mumu ile formüle edilmiştir.

VLG plasebo tablet içeriği mikrokristalin selüloz, povidon K-30, krospovidon, stearik asit ve Opadry Pink (15B24005) ile hazırlanmıştır.

Bu formülasyonlar, farmasötik analiz sırasında analitik işlemlerin güvenilirliğini ve doğruluğunu garanti ederek yöntem geliştirme için temel kontroller sağlamıştır.

3.5.3. Kromatografik Şartlar

Hareketli faza izokratik olarak 50 mM fosfat tamponu (pH 4) ve ACN (90:10, h/h) karışımı uygulanmıştır. Hareketli fazın karıştırılması, analiz sırasında bir kuaterner gradyan pompası yardımıyla yapılmıştır. Akış hızı 0.5 mL/dak, enjeksiyon hacmi 5 µL, kolon sıcaklığı 30 °C, otomatik örnekleyci sıcaklığı 15 °C olarak ayarlanmıştır. UV tespiti 215 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir.

3.5.4. Farmasötik Preparattan Analizler için Validasyon Çalışmaları

Önerilen yöntemin geçerlilik parametreleri (sistem uygunluğu, kararlılık, doğrusallık, duyarlılık, doğruluk, kesinlik, seçicilik ve sağlamlık) ICH Q2(R2) [85] kılavuzuna göre değerlendirilmiştir.

Sistem uygunluğu

Sistem uygunluk testleri, EMT, ENT, FAV, GAN, VAL ve VLG'nin 10.0 µg/mL çözeltisi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Uygunluk, alıkonma zamanları (Rt), kapasite faktörleri (ka), teorik tabaka sayıları (N), ayırım gücü (Rs) ve kuyruklanma faktörleri (TF) hesaplanarak değerlendirilmiştir. Ölü zamanı belirlemek için urasil enjeksiyonu kullanılmıştır.

Kararlılık

EMT, ENT, FAV, GAN, VAL ve VLG'nin (10.0 µg/mL) kararlılığı, soğutulmuş örnekler ile (+4°C) otomatik örnekleyici (+15°C) koşullarında değerlendirilmiştir. Buzdolabında saklanan stok çözeltileri beş hafta boyunca ikişer kez analiz edilmiş, otomatik örnekleyici kararlılığı 0, 6 ve 12. saatlerde değerlendirilmiştir.

Duyarlılık

Yöntem duyarlılığı, her bir analit için sırasıyla 3:1 ve 10:1 sinyal-gürültü oranlarına dayalı olarak tespit sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ) belirlenerek değerlendirilmiştir.

Doğrusallık

Kalibrasyon eğrileri her bir antiviral için sekiz ayrı derişimde standart çözeltiler ile oluşturulmuştur. Kalibrasyon eğrileri her bir antiviralin pik alanının antiviral derişimine karşı grafiğe geçirilmesiyle oluşturulmuştur.

Yöntemlerin doğrusallığı; kalibrasyon eğrilerinin istatistiksel olarak (ANOVA testi) değerlendirilmesi ile kontrol edilmiştir. ANOVA testi ile korelasyon katsayısının önemi ve regresyon katsayılarının sıfırdan farklı olup olmadığı değerlendirilmiştir.

Kesinlik ve Doğruluk

Gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk, EMT, ENT, FAV, GAN, VAL ve VLG'nin dört derişim seviyesinde (LOQ, düşük, orta ve yüksek) üçlü örneklerinin analiz edilmesiyle değerlendirilmiştir. Gün içi ölçümler aynı gün, günler arası ölçümler ise üç ardışık gün boyunca gerçekleştirilmiştir. Kesinlik, bağıl standart sapma (BSS%) kullanılarak, doğruluk ise bağıl hata (BH) kullanılarak belirlenmiştir. Ayrıca, yöntem doğruluğunun daha iyi değerlendirilmesi için geri kazanım çalışmaları da gerçekleştirilmiştir.

Seçicilik

Yöntemin seçiciliği, plasebo örneklerinin kromatogramlarının karşılaştırılmasıyla değerlendirilmiştir.

Sağlamlık

Yöntem sağlamlığı deneysel tasarım yaklaşımıyla değerlendirilmiştir (Tablo 3.1). Takip eden parametreler dar bir aralıkta değiştirilmiştir (Tablo 3.2). Bu değişikliklerin etkisi ANOVA testi kullanılarak değerlendirilmiştir.

Tablo 3.1. Sağlamlık çalışması için parçalı faktöriyel tasarım

	ACN (%)	pH	Akış hızı (mL/dak)	Kolon sıcaklığı (°C)	Tampon derişimi (mM)
1	-1	1	-1	1	-1
2	-1	1	1	1	-1
3	1	1	1	-1	1
4	1	-1	1	-1	1
5	1	-1	-1	1	1
6	-1	1	1	-1	-1
7	-1	-1	-1	-1	-1
8	1	-1	1	1	1
9	-1	-1	-1	-1	-1
10	1	-1	1	1	1
11	1	1	-1	-1	1
12	1	1	-1	1	1
13	0	0	0	0	0

Tablo 3.2. Sağlık çalışmaları için parametreler ve seviyeleri

Parametre	Seviye		
	-1	0	+1
ACN (%)	9	10	11
pH	3.9	4	4.1
Akış hızı (mL/dak)	0.49	0.50	0.51
Kolon sıcaklığı (°C)	29	30	31
Tampon derişimi (mM)	49	50	51

3.5.5. Yöntemin Yeşillik, Mavilik ve Beyazlığı

Yöntemin Yeşillığı AGREE ve AGREEprep araçları kullanılarak değerlendirilirken, pratikliği BAGI endeksi ile değerlendirilmiştir. Sürdürülebilirlik performansı, Beyaz Analitik Kimya prensiplerine uygun olarak Beyazlığı ölçmek için RGB12 algoritması kullanılarak belirlenmiştir.

3.6. Antivirallerin Plazma Örneklerinden LC-MS/MS ile Analizleri

Antivirallerin plazmadan analizleri SPME fiberleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Fiberler Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü öğretim üyesi Doç. Dr. Ezel Boyacı ve ekibi tarafından sentezlenmiştir.

3.6.1. SPME Polimer Sentezleri:

HLB Parçacıklarının Sentezi

HLB parçacıklarının sentezi çöktürme polimerizasyonu ile gerçekleştirilmiştir. 150.0 mL ACN ve 50.0 mL toluen, manyetik karıştırıcı kullanılarak üç boyunlu bir balonda karıştırılır, ardından, 1.0 mL N-vinilpirolidon, 4.0 mL divinilbenzen ve 50.0 mg 2,2'-azobis(2-metilpropionitril) (AIBN) eklenmiştir. Daha sonra, polimerizasyon tepkimesi 80°C'de bir yağ banyosunda 24 saat boyunca 250 rpm hızda karıştırılarak gerçekleştirilmiştir. Polimerizasyon işlemi tamamlandıktan sonra, HLB parçacıkları MeOH ile yıkanmış ve 24 saat kurumaya bırakılmıştır [86].

Polimetakrilik Asit (PMAA) Parçacıklarının Sentezi:

Polimetakrilik asit (PMAA) parçacıkları da başlatıcı olarak 0.090 g 2,2'-azobis(2-metilpropionitril) (AIBN) ve çapraz bağlayıcı ajan olarak 20.0 mmol trimetilolpropan trimetakrilat (TRIM) ile 200.0 mL ACN içinde 8.0 mmol MAA kullanılarak çöktürme polimerizasyonu ile sentezlenmiştir. Karışım 24 saat boyunca 70°C'de polimerleştirilmiştir. Sentez tamamlandıktan sonra, parçacıklar MeOH ile yıkanmış ve kurutulmuştur [87].

HLB-SCX Parçacıklarının Hazırlanması

HLB-SCX parçacıkları, sentezlenen HLB parçacıklarının modifikasyonu ile hazırlanmıştır. Bu modifikasyon için HLB parçacıkları 1,2 dikloroetan'da ıslatılmıştır. Bu arada, 10.0 mL asetik anhidrit, 3.0 mL derişik sülfürik asit ve 10.0 mL 1,2 dikloroetan'ın -20°C'de karıştırılmasıyla asetil sülfat *in situ* olarak sentezlenmiş ve çözelti açık sarı olana kadar karıştırılmıştır. Renk değişikliğinden sonra, balon soğuk banyodan çıkarılmış ve oda sıcaklığına getirilmiştir. HLB süspansiyonu balona eklenmiş ve bu karışım HLB'nin sülfonasyonunu tamamlamak için oda sıcaklığında 3 saat bekletilmiştir. Daha sonra, deiyonize su kullanılarak tepkime sonlandırılmış, fonksiyonlandırılmış parçacıklar su ile yıkanmış ve 24 saat kurutulmuştur [86].

HLB/SAX Parçacıklarının Sentezi

HLB/SAX parçacıkları, HLB sentez protokolünün hafif modifikasyonu ile sentezlenmiştir. Farklı olarak, vinilbenziltrimetil amonyumklorür (VBTMAC) ilk adımda üçüncü monomer olarak eklenmiştir. Bu şekilde, kuaterner amonyum grupları HLB yapısına dahil edilmiştir.

HLB sentezinde olduğu gibi, 150.0 mL ACN ve 50.0 mL toluen, manyetik karıştırıcı kullanılarak üç boyunlu bir balonda karıştırılmıştır. VBTMAC monomeri de bu aşamada eklenmiştir. Ardından, 1.0 mL N-vinilpirolidon, 4.0 mL divinilbenzen ve 50.0 mg 2,2'-azobis(2-metilpropionitril) (AIBN) eklenmiş ve polimerizasyon tepkimesi 80°C'de bir yağ banyosunda 24 saat boyunca 250 rpm hızda karıştırılarak

gerçekleştirilmiştir. Polimerizasyon işlemi tamamlandıktan sonra, HLB/SAX parçacıkları MeOH ile yıkanmış ve 24 saat kurumaya bırakılmıştır.

PDVB Nanopartiküllerinin Sentezi

PDVB nanopartikülleri mini emülsiyon polimerizasyonu kullanılarak sentezlenmiştir. 0.90 g yüzey aktif madde sodyum dodesil sülfat (SDS) 12.0 mL suda çözülmüştür. Bu arada, 0.05 g AIBN (başlatıcı), 0.162 mL heksadekan (HD) (ko-stabilizatör) ve 3.0 mL DVB karıştırılmış ve SDS içeren şişeye dökülmüştür. Daha sonra karışım 990 rpm hızda 30 dakika karıştırılmıştır. Bundan sonra, ön polimer çözeltisinin homojen bir emülsiyonunu elde etmek için, karışım 3 dakika boyunca bir sonotrot prob kullanılarak ultrasonik banyoda bekletilmiştir ve elde edilen emülsiyon, polimerizasyonun gerçekleşmesi için 18 saat boyunca 990 rpm hızda 72°C'deki bir yağ banyosunda tutulmuştur. Polimerizasyon işlemi tamamlandıktan sonra, parçacıklar MeOH ile yıkanmış ve 24 saat kurutulmuştur [88].

SPME Fiberlerinin Hazırlanması

Daldırma yöntemiyle kaplamada, tüketme faz parçacıklarını nitinol telin yüzeyine sabitlemek için biyouyumlu bir bağlayıcı olarak poliakrilonitril (PAN, 150 kDa) kullanılmıştır. Tüketme faz parçacıkları, kaplama bulamacını elde etmek için DMF içinde çözünen PAN ile karıştırılmıştır.

Daldırma yöntemi, fiberin bulamaç içine daldırılması, fiberin bulamaçtan bilinen sabit bir hızda çekilmesi ve çözücünün buharlaşması için fiberin kurutulması dahil olmak üzere üç aşamayı içerir. Bu çalışma için, kaplama uzunluğu 9 mm olarak ayarlanırken, kaplama kalınlığı 15 µm'dir.

3.6.2. SPME

SPME için HLB fiberleri kullanılmıştır. Tüketme öncesinde sorbentin en az 24 saat ön koşullandırması yapılmıştır. Sonrasında fiberler 1 mL'lik numune içine daldırılmış ve oda sıcaklığında ve 1000 rpm hızda 30 dakika boyunca tüketme işlemine

tabi tutulmuştur. Desorpsiyon çözeltisine daldırılmadan önce bir saniye ultra saf su içinde hızlıca durulanmıştır. Desorpsiyon işlemi, 100 µL desorpsiyon çözeltisinde (ACN:MeOH:su:FA 4:4:2:0.01, h/h) oda sıcaklığında 1000 rpm hızda 15 dakika boyunca gerçekleştirilmiştir. Validasyon çalışmalarında ve hasta plazma örneklerinde desorpsiyon çözeltisine iç standart (1 ppm MOL) eklenerek tüketme işlemi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen elüsyon çözeltisi LC-MS/MS analizlerinden önce 100 µL %0.1 FA içeren su ile seyreltilmiş ve sonrasında analiz edilmiştir.

3.6.3. Kalibrasyon Eğrilerinin Hazırlanması

Boş plazma numuneleri üzerinde antivirallerin stok çözeltilerinden uygun hacimde antiviraller eklenerek 8 noktadan oluşacak şekilde hazırlanmıştır. Hazırlanan plazma standartlarından 1 mL alınmış ve 1.5 mL'lik viallere aktarılmıştır. Sonrasında SPME işlemi uygulanmıştır.

3.6.4. Numunelerin Hazırlanması

Hasta plazma numunelerinden 1 mL alınmış ve 1.5 mL'lik viallere aktarıldıktan sonra SPME ile tüketme işlemi uygulanmıştır.

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalından temin edilen hasta plazmalarına dair demografik bilgiler paylaşılmıştır (Tablo 3.3).

Tablo 3.3. Hastaların demografik bilgileri

	Hasta 1	Hasta 2	Hasta 3	Hasta 4	Hasta 5
Hasta kodu:	AY	AA	ECG	HS	İY
Cinsiyet	Erkek	Erkek	Erkek	Erkek	Erkek
Yaş (yıl)	27	48	23	30	33
Boy (cm)	184	173	190	171	177
Ağırlık (kg)	83	75	75	73	71
Antiviral ilaç adı:	Tenofovir disoproksil - EMT - dolutegravir	Tenofovir alafenamit - EMT - biktgravir	Tenofovir alafenamit - EMT - biktgravir	Dolutegravir - LAM	Dolutegravir - LAM
Antiviral ilacın dozu (mg):	200 (EMT)	200 (EMT)	200 (EMT)	300 (LAM)	300 (LAM)
Antiviral kullanım günü:	600 gün	9 gün	120 gün	1400 gün	4000 gün
İlacın uygulama yolu:	Oral	Oral	Oral	Oral	Oral
İlacın uygulama zamanı:	1 saat önce	12 saat önce	15 saat önce	17 saat önce	10 saat önce

3.6.5. Analiz Yöntemi

Antiviral analizleri optimize edilen LC-MS/MS yöntemi ile gerçekleştirilmiştir.

Optimizasyon Çalışmaları

MS/MS Koşullarının Optimizasyonu

MS/MS yönteminin optimizasyonunda kullanılmak üzere her bir antiviral standardı (1 µg/mL) stok çözeltisinden %0.1 formik asit: %0.1 formik asit içeren asetonitril (1:1, h/h) çözeltisi ile seyreltilerek hazırlanmıştır. Hazırlanan standart çözeltiler LC-MS/MS sistemine doğrudan 0.35 mL/dak akış hızında %0.1 formik asit: %0.1 formik asit içeren asetonitril (1:1, h/h) hareketli faz kullanılarak sırasıyla enjekte edilmiştir. MRM koşullarının optimizasyonu için aşağıdaki adımlar izlenmiştir:

1. İyonizasyon Modu ve Öncü İyonların Belirlenmesi: Metabolit standart çözeltileri MS sisteminde pozitif ve negatif modda analiz edilerek uygun iyonizasyon modu ve metabolitlere ait moleküler iyonları belirlenmiştir.

2. Parçalanma İyonlarının Belirlenmesi: Aynı çözeltiler, seçilen iyonizasyon modunda farklı çarpışma enerjileri kullanılarak parçalanma ürünleri belirlenmiştir.

3. Çarpışma Enerjisi ve Dört Kutuplu Voltajların Optimizasyonu: Seçilen parçalanma iyonunun en yüksek sinyal şiddetinde elde edilebilmesi için her bir metabolite ait çarpışma enerjisi ve dört kutuplu voltajlar (Q1 ve Q3) optimize edilmiştir.

3.6.6. Kromatografik Koşullar

Hareketli faz, ikili gradient pompa ile %0.1 FA içeren su ile %0.1 FA içeren MeCN analiz sırasında karıştırılarak oluşturulmuştur. Hareketli fazın bileşenlerinin her biri 0.45 µm filtreden süzöldükten sonra ultrasonik banyoda 15 dak tutularak gazı uzaklaştırılmıştır. Analiz sırasında uygulanan gradient elüsyon şartları Tablo 3.1'de verilmiştir. Akış hızı 0.35 mL/dak, enjeksiyon hacmi 5 µL ve kolon sıcaklığı 40°C

olarak belirlenmiştir. Analizler Zorbax SB-C8 (3.0 × 50 mm 1.8 µm; Agilent, Kaliforniya, ABD) kolonda gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.4. LC-MS/MS analizleri için gradient elüsyon şartları

Zaman (dak)	%0.1 FA (%)	%0.1 FA içeren ACN (%)
0	80	20
5	40	60
6	40	60
6.3	80	20
10	80	5

Tablo 3.5. LC-MS/MS analiz parametreleri.

Parametre	Birim
Nebulizer gaz akışı	3 L/dak
İyon kaynağı sıcaklığı	400 °C
Kolon sıcaklığı	40 °C
İyon kaynağı	Elektrosprey
İyon tarama şekli	MRM

3.6.7. Plazmadan Analizler için Validasyon Çalışmaları

Önerilen yöntemin geçerlilik parametreleri (sistem uygunluğu, kararlılık, doğrusallık, duyarlılık, doğruluk, kesinlik, seçicilik ve sağlamlık) ICH 10M kılavuzuna göre değerlendirilmiştir [89].

Sistem uygunluğu

Sistem uygunluk testleri, her bir antiviralden 1.0 µg/mL içeren karışım çözeltisi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Uygunluk, alıkonma zamanları (Rt), kapasite faktörleri (ka), teorik tabaka sayıları (N), ayırım gücü (Rs) ve kuyruklanma faktörleri (TF) hesaplanarak değerlendirilmiştir. Ölü zamanı belirlemek için urasil enjeksiyonu kullanılmıştır.

Kararlılık

Antivirallerin (1.0 µg/mL) kararlılığı, otoörnekleyici ve dondur çöz döngüsünde değerlendirilmiştir. Otomatik örnekleyici kararlılığı 0, 6 ve 12. saatlerde, 3 kez ise dondur-çöz döngüsü için değerlendirilmiştir.

Duyarlılık

Yöntem duyarlılığı, her bir analit için sırasıyla 3:1 ve 10:1 sinyal-gürültü oranlarına dayalı olarak tespit sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ) belirlenerek değerlendirilmiştir.

Doğrusallık

Kalibrasyon eğrileri plazma içerisine sekiz ayrı derişimde standart çözelti eklenerek her bir antiviral için oluşturulmuştur. Kalibrasyon eğrisi her bir antiviralin pik alanının IS'nin pik alanına bölünmesiyle elde edilen değerlerin antiviral derişimine karşı grafiğe geçirilmesiyle oluşturulmuştur.

Yöntemlerin doğrusallığı; kalibrasyon eğrilerinin istatistiksel olarak (ANOVA testi) değerlendirilmesi ile kontrol edilmiştir.

Kesinlik ve Doğruluk

Gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk, antivirallerin dört derişim seviyesinde (LOQ, düşük, orta ve yüksek) üçlü örneklerinin analiz edilmesiyle değerlendirilmiştir. Gün içi ölçümler aynı gün, günler arası ölçümler ise üç ardışık gün boyunca gerçekleştirilmiştir. Kesinlik, bağıl standart sapma (%BSS) kullanılarak, doğruluk ise bağıl hata (%BH) kullanılarak belirlenmiştir. Ayrıca, yöntem doğruluğunun daha iyi değerlendirilmesi için geri kazanım çalışmaları da gerçekleştirilmiştir.

Seçicilik

Yöntemin seçiciliği, boş plazma örneklerinin kromatogramlarının karşılaştırılmasıyla değerlendirilmiştir.

Sağlamlık

Yöntem sağlamlığı deneysel tasarım yaklaşımıyla değerlendirilmiştir. Bu amaçla 8 deneyle parçalı faktöriyel tasarım kullanılmıştır (Tablo 3.5). Takip eden parametreler dar bir aralıkta değiştirilmiştir (Tablo 3.6). Bu değişikliklerin etkisi ANOVA testi kullanılarak değerlendirilmiştir.

Tablo 3.6. Sağlamlık çalışması için parçalı faktöriyel tasarım

	Sudaki FA (%)	ACN'deki FA (%)	Akış Hızı (mL/dak)	Sıcaklık (°C)
1	-1	-1	-1	-1
2	-1	-1	+1	+1
3	-1	+1	+1	-1
4	-1	+1	-1	+1
5	+1	-1	+1	-1
6	+1	-1	-1	+1
7	+1	+1	-1	-1
8	+1	+1	+1	+1

Tablo 3.7. Sağlamlık çalışmaları için parametreler ve seviyeleri

Parametre	Seviye		
	-1	0	+1
Sudaki FA (%)	0.09	0.10	0.11
ACN'deki FA (%)	0.09	0.10	0.11
Akış Hızı (mL/dak)	0.34	0.35	0.36
Sıcaklık (°C)	39	40	41

Taşınma Etkisi

En yüksek derişim olan 5 µg/mL antiviral standart karışımı sistemine enjekte edilmiş, ardından taşınma etkisi potansiyelini değerlendirmek için desorpsiyon çözeltisi analiz edilmiştir. Taşınma etkisi, boş örnekteki kalan antiviral miktarının, 5 µg/mL standardaki antiviralin derişimi ile karşılaştırılarak hesaplanmıştır.

Seyreltme Etkisi

Bu çalışmada, analitik yöntemin seyreltme etkileri, çeşitli seyreltme faktörleriyle (örneğin, 1:2, 1:5, 1:10) kullanılarak hazırlanmıştır (n=5). Seyreltme işlemi boş plazma ile gerçekleştirilmiştir. Analiz sonuçlarının doğruluğu ve kesinliği değerlendirilmiştir.

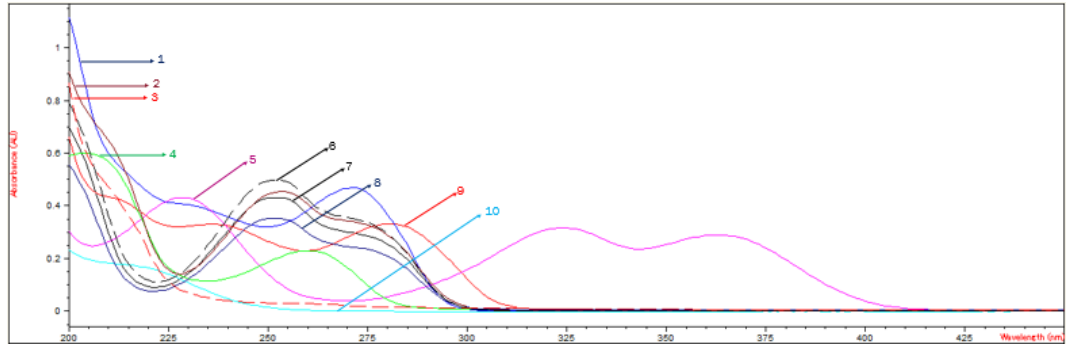
Matriks Etkisi

Matriks etkisi, biyolojik matrislerin (örneğin kan, plazma, idrar) analitik ölçüm üzerindeki etkilerini ifade eder. Matriks, analitin sinyalini baskılayabilir veya artırabilir, bu da yanlış sonuçlara yol açabilir. Matris etkisi, farklı kaynaklardan (en az 6 farklı kaynaktan) alınan numunelerle test edilmelidir. Yöntemin doğruluğu nominal derişimin $\pm\%15$ içinde ve hassasiyeti (CV) $\%15$ 'i geçmemelidir. Matris etkisi varsa, matris uyumlu kalibrasyon veya örnek hazırlama modifikasyonları gibi düzeltici önlemler alınabilir.

4. BULGULAR

4.1. Farmasötik Dozaj Şekillerinden Antivirallerin Analizleri İçin HPLC Yöntemi Bulguları

Antivirallerin aynı anda analizler için uygun dalga boyunun seçilmesi için her bir antiviralin UV spektrumu alınmıştır (Şekil 4.1.). Tüm antivirallerin absorbans gösterdiği 215 nm HPLC analizlerinde kullanılmak üzere seçilmiştir.



1.	LAM	3.	LOP	5.	FAV	7.	VLG	9.	EMT
2.	ENT	4.	TDF	6.	GAN	8.	VAL	10.	OSE

Şekil 4.1. Antiviral standart çözeltilerin UV spektrumları

4.1.1. HPLC Yönteminin Optimizasyon Çalışmaları

Sabit Faz Seçimi

Antiviral ilaç karışımı için etkili bir kromatografik ayırım yöntemi geliştirmek amacıyla kapsamlı bir optimizasyon çalışması yürütülmüştür. Çalışmanın odak noktası, analiz süresini en düşük değere çekerken yakın elüsyon zamanı problemini çözmek olmuştur. Bilimsel kaynaklara dayanarak, antiviral ayırımı için yaygın olarak kullanılan oktadesil silan sabit fazı ve fosfat tamponu içeren bir ters faz sistemi seçilmiştir [68, 83]. Optimizasyon sırasında kullanılan kromatografik koşullar Tablo 4.1.'de verilmiştir.

Tablo 4.1. HPLC yöntemine ait kromatografik şartlar

Sabit faz:	Exsil Mono 100 C18 (150 mm × 4.6 mm, 3 µm)
Hareketli faz:	Asetonitril (ACN) : Fosfat tamponu (50 mMol)
Akış hızı:	0.5 mL/dak
Enjeksiyon hacmi:	10 µL
Kolon sıcaklığı:	30.0 °C

Organik çözücü seçimi

Yaygın olarak kullanılan iki organik değiştirici, MeOH ve ACN antiviral ilaç karışımının ayırımı için karşılaştırılmıştır. Yapılan denemelerde ACN ile daha hızlı bir ayırım sağlandığı için çalışmalarda seçilmiştir. Sonrasında hareketli faz içerisindeki ACN miktarı optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla ACN: fosfat tamponu (pH 4.5) bileşimi 10:90, 20:80 ve 30:70 (h/h) oranları kullanılarak test edilmiştir. Farklı ACN:tampon oranlarının etkisi Şekil 4.2’de gösterilmiştir. Analizler sonucunda %10 ACN oranı hareketli faz bileşimi olarak seçilmiştir.

Şekil 4.2. Hareketli fazdaki ACN oranının alıkonma zamanları üzerindeki etkisi

pH optimizasyonu

Antivirallerin kromatografik davranışlarını belirlemek için izokritik modda (ACN : 50 mM fosfat tamponu 10:90, h/h) farklı pH'larda (2.5, 3.5, 4.5, 5.5 ve 6.5) analizler gerçekleştirilmiştir. pH değerlerinin antivirallerin çeşitli sistem uygunluk parametreleri üzerindeki etkileri Şekil 4.3'de sunulmuştur. Hareketli fazın pH değeri 2.5 değerinden 4.5 değerine doğru kaydıka, antivirallerin alıkonma zamanlarında artış gözlenmiştir. Hareketli fazın pH değeri 4.5 değerinden 6.5 değerine doğru kaydıka, VAL ve VLG maddeleri alıkonma zamanlarında artış gözlenmiş, diğere antivirallerin alıkonma zamanlarında ise azalma gözlenmiştir.

GAN ve VLG etken maddelerinin N ve k' değerleri pH 4.5 değerine yaklaştıkça artış göstermiş, pH 4.5 değerinden uzaklaştıkça da azalma eğilimi göstermiştir. ENT bunun tam tersi bir davranış göstermiş en yüksek N ve k' değerlerine pH 4.5 değerinden uzaklaştıkça ulaşmıştır. FAV, EMT ve VAL için N ve k' değerleri pH 2.5 ve 5.0 değeri arasında ciddi değışiklik göstermemekle birlikte pH 4.5 değerine kadar artan bir ivme göstermiştir.

Şekil 4.3. Hareketli faz pH değerinin antivirallerin çeşitli sistem uygunluk parametreleri üzerindeki etkisi

Tampon derişimi optimizasyonu

Hareketli fazdaki tampon derişiminin etkisi, 20 mM, 50 mM ve 80 mM olmak üzere üç farklı derişim kullanılarak incelenmiştir. Tampon derişiminin pik şekillerine etkisi şekil 4'te verilmiştir.

şekil 4.4. Hareketli fazın tampon derişiminin antivirallerin alıkonma zamanları üzerindeki etkisi

Kolon sıcaklığı optimizasyonu

Kolon sıcaklığının etkisi, 25°C, 30°C ve 40°C sıcaklıklarında değerlendirilmiş ve antivirallerin ayırımına etkisi şekil 4.5'de sunulmuştur.

Şekil 4.5. Kolon sıcaklığı (°C) antivirallerin alıkonma zamanları üzerindeki etkisi

Optimum kromatografik şartlar

Optimizasyon çalışmaları sonucunda, hareketli faz için 50 mM fosfat tamponu (pH 4): ACN karışımı (90:10, h/h), akış hızı için 0.5 mL/dak ve kolon sıcaklığı için 30°C optimum koşullar olarak belirlenmiştir. Bu koşullar altında, antiviral ilaçların kromatografik ayrımı Şekil 4.6'da gösterilmiştir. Antiviraller 10 dakika içinde ayrılmıştır.

4.1.2. Validasyon

Seçilen antiviral ajanlar için kapsamlı bir doğrulama çalışması yürütülmüştür. Tüm analitler 215 nm dalga boyunda izlenmiştir. Validasyon protokolü sistem uygunluğu, kararlılık, duyarlılık, doğrusallık, kesinlik, doğruluk, seçicilik ve sağlamlık gibi temel parametreleri değerlendirmiştir.

Şekil 4.6. Optimum kromatografik şartlar altında antiviraller için elde edilen kromatogram.

Sistem uygunluğu

EMT, ENT, FAV, GAN, VAL ve VLG olmak üzere altı antiviral ilaç için geliştirilen HPLC yönteminin sistem uygunluk parametreleri Tablo 4.2’de özetlenmiştir. Urasil enjeksiyonu kullanılarak ölü zaman 2.0 dakika olarak belirlenmiştir. Her bir analit için alıkonma zamanı (t_R), kapasite faktörü (k'), teorik plaka sayısı (N), ardışık pikler arasındaki ayırıcılık (R_s) ve kuyruklanma faktörü (TF) gibi önemli kromatografik parametreleri verilmiştir.

Tablo 4.2. HPLC yöntemine ait sistem uygunluk sonuçları

	t_R	k'^a	N	R_s^b	TF
GAN	3.30	0.65	2546	-	1.28
VLG	3.72	0.86	12218	2.12	2.35
VAL	4.10	1.05	8750	2.43	1.63
ENT	4.83	1.41	10459	3.99	1.47
EMT	6.13	2.06	12522	6.39	1.36
FAV	7.09	2.54	13271	4.13	1.39

^a Ölü zaman aynı koşullarda urasil enjeksiyonu ile bulunmuştur: $t_0=2.0$ dak

^b Ayırım gücü ardışık pikler arasında hesaplanmıştır.

Kararlılık

Altı antiviral ilacın (EMT, ENT, FAV, GAN, VAL ve VLG) kararlılığı, +4°C'de uzun süreli buzdolabı koşullarında ve 15°C'de kısa süreli otoörnekleyici koşullarında değerlendirilmiştir. 10.0 µg/mL derişimdeki standart çözeltiler kullanılarak yapılan analizlerde, %10'u aşan derişim değışiklikleri kararsızlık olarak kabul edilmiştir [90].

Buzdolabı koşullarında, EMT bir hafta içinde %14-16 oranında belirgin bir bozulma göstermiştir. ENT ve FAV ise aynı sürede %11-12 oranında orta düzeyde bozulmaya uğramıştır. Buna karşılık, GAN, VAL ve VLG, beş haftalık buzdolabı saklama süresi boyunca %5'ten az bozulma ile iyi bir kararlılık profili sergilemiştir.

Otomatik örnekleme kararlılığı, taze hazırlanmış çözeltilerin 0, 6 ve 12. saatlerde analiz edilmesiyle değerlendirilmiştir. Tüm altı antiviral ilaç (EMT, ENT, FAV, GAN, VAL ve VLG), otomatik örnekleme içinde en az 12 saat boyunca kararlı kalmıştır.

Seçicilik

Geliştirilen HPLC yönteminin seçiciliğı, LOQ düzeyindeki EMT, ENT, FAV, GAN, VAL ve VLG standart çözeltileri içeren kromatogramların, plasebo örnekleriyle karşılaştırılmasıyla değerlendirilmiştir (Şekil 4.7).

Duyarlılık

Yöntem duyarlılığı, her bir analit için sırasıyla 3:1 ve 10:1 sinyal-gürültü oranlarına dayalı olarak LOD ve LOQ belirlenerek değerlendirilmiştir. En yüksek BSS değeri % 1.96, en yüksek bağıl hata değeri % 1.33 olarak bulunmuştur.

Doğrusallık

Doğrusallık, LOQ değerinden 150 veya 200 µg/mL'ye kadar değişen on üç kalibrasyon standardı kullanılarak değerlendirilmiştir. Kalibrasyon eğrileri, her antiviralin pik alanının doğrusal regresyon kullanılarak karşılık gelen derişimine göre çizilmesiyle oluşturulmuştur.

Kalibrasyon eğrilerinin ANOVA analizlerinden türetilen p, R², LOD ve LOQ değerleri Tablo 4.3'de verilmiştir.

Şekil 4.7. Optimum kromatografik şartlar altında elde edilen kromatogramlar: (A) Her bir antiviral için plasebo çözeltileri (B) LOQ seviyelerinde hazırlanan standart çözelti

Tablo 4.3. Antiviral analizlerinden ANOVA ile elde edilen doğrusallık parametreleri

	Eğim	p Değeri (Eğim)	Kesim	p Değeri (Kesim)	R ²	LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)	S/G
GAN	35966	7.301 10 ⁻¹⁹	110520	0.2509	0.9991	0.48	1.45	87.5
VLG	15992	2.050 10 ⁻⁸	128285	0.2803	0.9938	0.24	0.72	29.5
VAL	21676	1.772 10 ⁻¹⁶	17370	0.2442	1.0000	0.37	1.09	40.0
ENT	121708	8.040 10 ⁻¹⁵	-205684	0.8133	0.9995	0.09	0.28	59.0
EMT	78144	1.160 10 ⁻²⁰	-477.13	0.2973	1.0000	0.02	0.05	10.0
FAV	72533	7.703 10 ⁻¹⁷	-102322	0.8034	0.9996	0.06	0.17	20.5

Kesinlik ve Doğruluk

Geliştirilen yöntemin gün içi ve günler arası kesinliği, EMT, ENT, FAV, GAN, VAL ve VLG'nin standart çözeltileri kullanılarak değerlendirilmiştir. Her analitin belirlenen doğrusal aralıktaki üç derişimi ve LOQ değerlerini kapsayacak şekilde dört farklı derişimde hazırlanmıştır. Gün içi kesinlik, tek bir günde her derişim seviyesinin altı tekrarının analiz edilmesiyle değerlendirilirken, günler arası kesinlik, üç ardışık gün boyunca her derişim seviyesinde altı tekrarın analiz edilmesiyle değerlendirilmiştir.

Yöntemin doğruluğu, ENT, FAV, VAL ve VLG için standart ekleme yöntemi kullanan geri kazanım çalışmaları yoluyla değerlendirilmiştir. Tablet çözeltilere (100 µg/mL), 120, 140 ve 160 µg/mL'lik son derişimlere ulaşmak için üç derişim seviyesinde ekleme yapılmıştır. Farmasötik dozaj şekillerinin elde edilemediği GAN ve EMT için, her analitten 50 µg/mL içeren plasebo çözeltiler hazırlanarak geri kazanım çalışmaları yürütülmüştür. Bu plasebo çözeltilere daha sonra üç derişim seviyesine (60, 100 ve 120 µg/mL) ulaşmak için standart eklenmiştir.

Geliştirilen HPLC yöntemi için gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk Tablo 4.4 ve 4.5'de verilmiştir.

Tablo 4.4. Gün içi – günler arası kesinlik ve doğruluk değerleri

	Derişim (µg/mL)	Gün içi (n = 6)		Günler arası (n = 6)	
		Doğruluk (% BH)	Kesinlik (% BSS)	Doğruluk (% BH)	Kesinlik (% BSS)
GAN	1.45	0.27	1.81	1.33	1.25
	5	-0.13	1.10	-0.09	0.18
	100	1.07	0.14	-0.03	1.71
	200	-1.18	0.20	-1.22	0.15
VLG	0.72	0.18	0.26	0.21	0.30
	1.00	-0.11	1.19	0.08	0.22
	100	1.06	0.16	-0.10	1.20
	140	0.15	1.21	0.19	1.25
VAL	1.09	0.25	0.18	1.30	0.24
	5.00	-0.15	1.13	-0.12	0.20
	100	-1.08	0.10	-1.06	1.18
	200	0.04	0.15	0.13	0.22
ENT	0.28	0.23	0.27	0.26	0.32
	1.00	-0.07	0.16	0.09	1.21
	100	-1.15	1.13	-0.10	1.19
	150	-0.21	0.18	-0.16	0.24
EMT	0.05	0.30	0.22	0.35	0.27
	1.00	-0.18	0.15	-0.14	1.81
	100	0.09	1.38	1.06	0.22
	150	1.13	0.20	0.16	0.18
FAV	0.17	-1.28	0.16	0.39	0.06
	5.00	-0.31	1.22	-0.35	0.17
	100.0	0.09	1.96	1.33	1.19
	200.0	1.05	0.24	0.37	0.29

Tablo 4.5. HPLC yönteminin geri kazanım çalışmalarının sonuçları

	Başlangıç miktarı (µg/mL)	Eklene miktar (%), n = 6	Bulunan ortalama miktar (µg/mL) ± SE	Ortalama geri kazanım (%)	RSD (%)
GAN	50	60	80.01	100.01	0.43
		100	99.67	99.67	1.23
		140	120.30	100.25	1.63
VLG	100	20	117.74	98.12	0.242
		40	140.36	100.26	0.69
		60	159.39	99.62	1.24
VAL	100	20	118.44	98.70	0.16
		40	139.23	99.45	0.91
		60	159.55	99.72	0.99
ENT	100	20	120.04	100.03	1.19
		40	139.92	99.943	1.28
		60	162.90	101.81	0.88
EMT	50	60	81.28	101.60	1.26
		100	100.27	100.27	1.73
		140	119.84	99.87	1.49
FAV	100	20	120.70	100.58	1.27
		40	139.00	99.29	1.55
		60	159.92	99.95	0.74

Sağlamlık

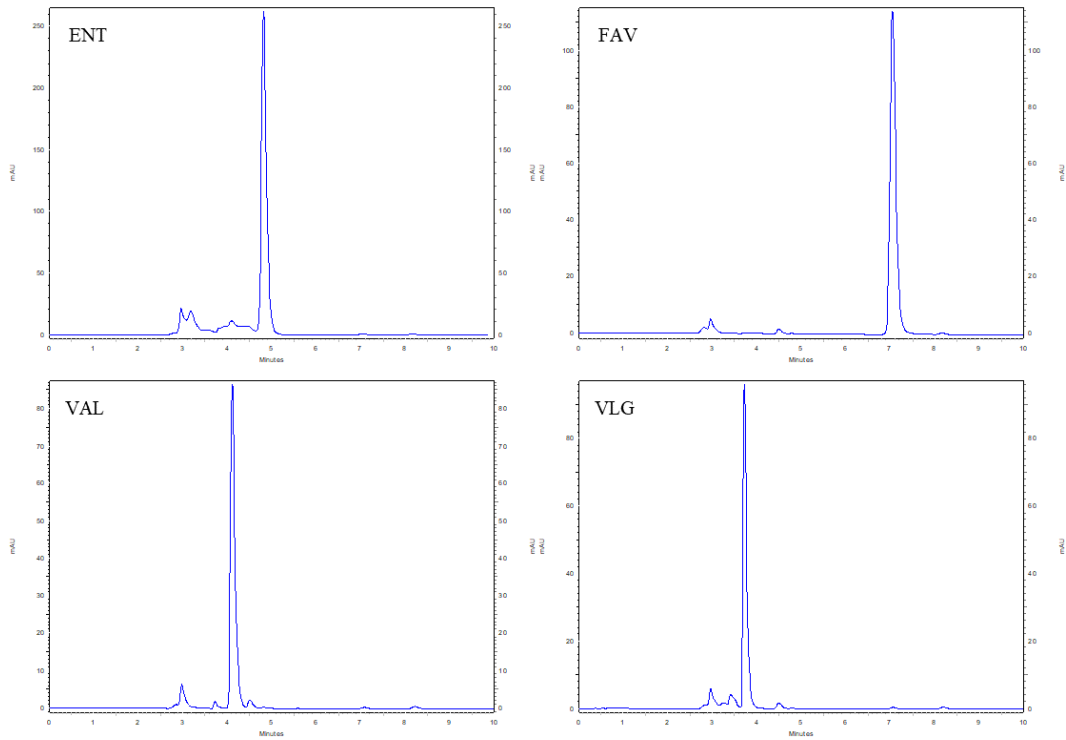
Temel deneysel parametrelere kasıtlı, küçük değişiklikler getirilmiş, bunların pik alanları ve alıkonma zamanları üzerindeki etkileri on üç aşamalı parçalı faktöriyel tasarım ile değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar ANOVA kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir (Tablo 4.6).

Tablo 4.6. Her değişkenin antivirallerin alıkonma zamanları için p değerleri

	Sabit	Organik faz %	Tampon derişimi	pH	Akış hızı (mL/dak)	Sıcaklık (°C)
GAN	<0.000	0.031	0.640	0.483	0.342	0.475
VLG	<0.000	0.856	0.908	0.183	0.189	0.158
VAL	<0.000	0.429	0.882	0.121	0.485	0.178
ENT	<0.000	0.180	0.808	0.320	0.473	0.163
EMT	<0.000	0.074	0.851	0.254	0.519	0.172
FAV	<0.000	0.438	0.895	0.118	0.465	0.171

4.1.3. Antivirallerin Farmasötik Dozaj Şekillerinden Analizleri

ENT, FAV, VAL ve VLG içeren farmasötik dozaj şekilleri, örnek hazırlamada açıklanan prosedür ile analiz edilmiştir. Analizler en uygun koşullar altında gerçekleştirilerek her tablet üç bağımsız tayinle analiz edilmiştir. Elde edilen kromatogramlar ve sonuçlar Şekil 8'de ve Tablo 4.7'de sunulmuştur.



Şekil 4.8. Optimum kromatografik şartlarda analiz edilen farmasötik tablet (100 µg/mL antiviral içeren çözelti) örneklerinin temsili kromatogramı.

Tablo 4.7. Antiviral içeren farmasötik dozaj şekillerinin analizinde HPLC ile elde edilen sonuçlar

Antiviral	Etiket miktarı (mg), n = 6	Bulunan (mg)	%BH	%BSS
FAV	200	199.4	-0.34	1.22
VLG	450	458	1.78	0.47
VAL	500	515	3.00	0.91
ENT	0.50	0.499	-0.20	1.76

4.1.4. Yöntemin Yeşillik, Mavilik ve Beyazlığı

Geliştirilen yöntemin çevresel etkisi, pratikliği ve genel sürdürülebilirliği, birkaç yerleşik ölçüt kullanılarak değerlendirilmiştir. Geliştirilen yöntemle ait sürdürülebilirlik değerlendirmeleri ile ilgili sonuçlar Şekil 4.9'da gösterilmiştir.

Yöntemin "Yeşilliği", Yeşil Analitik Kimya prensiplerini temsil eden dairesel piktogramlar kullanan varsayılan değerler [91, 92], kullanılarak AGREE ve AGREEprep ile değerlendirilmiş; her biri 0-1 (1 en çevre dostu) puan almıştır. Bu yöntemin dikkate değer bir avantajı, azaltılmış çözücü tüketimi ve daha kısa analiz

süreleri ile karakterize edilen, Yeşil Analitik Kimya prensipleriyle uyumlu, çevre dostu yaklaşımdır.

Şekil 4.9. Geliştirilen yöntemin sürdürülebilirlik değerlendirmesi: A) AGREE puanı, B) AGREEprep puanı, C) BAGI indeksi ve D) RGB12 Beyazlık puanı.

Pratikliği ve uygulamayı (Mavilik) değerlendirmek için BAGI aracı kullanılmıştır [93]. Bu araç, verim, otomasyon, maliyet ve numune verimliliği dahil olmak üzere on ölçütü 1 (en kötü) ile 100 (en iyi) arasında bir ölçekte nicel olarak değerlendirmektedir.

Ayrıca, Beyaz Analitik Kimya (WAC) prensiplerine uyumu temsil eden "Beyazlık" RGB12 algoritması kullanılarak değerlendirilmiştir [94]. Bu algoritma, üç kategoride (kırmızı, yeşil ve mavi) sürdürülebilirlikle ilgili 12 ölçüt içermektedir.

4.2. Plazmadan Antivirallerin Analizleri İçin SPME-LC-MS/MS Yöntemi Bulguları

4.2.1. LC-MS/MS Yöntem Optimizasyonu

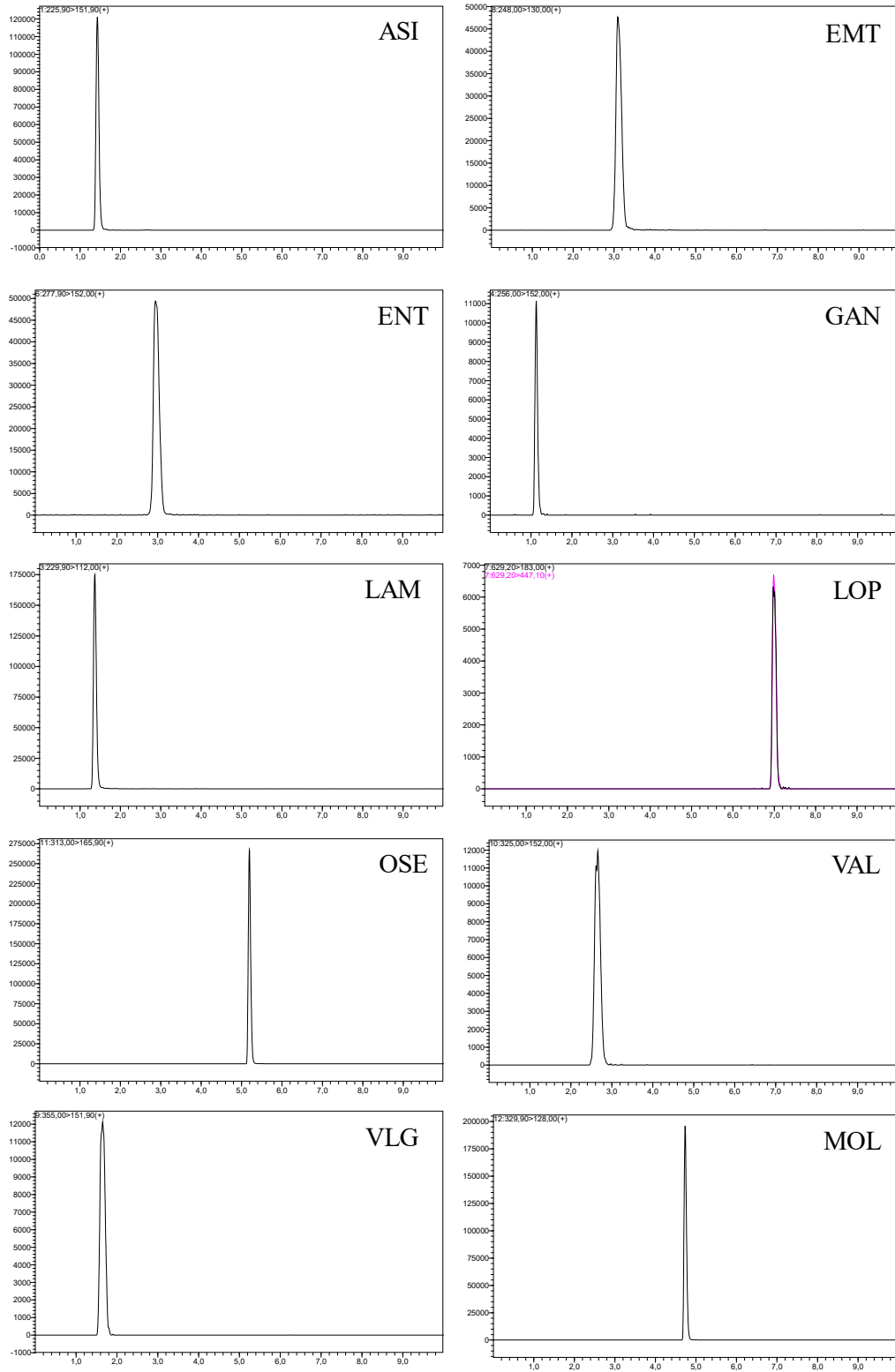
Antivirallerin LC-MS/MS ile analizlerinin gerçekleştirilmesi için ilk önce MRM parametreleri optimize edilmiştir. Bu amaçla 1 µg/mL'lik standart çözeltiler sisteme enjekte edilmiş ve MRM değerleri belirlenmiştir (Tablo 4.8).

Kromatografik ayırimda kullanılacak sabit fazın belirlenmesi amacıyla ilk önce C18 (50×2.1 mm, 3 µm) ve C8 (3.0×50 mm 1.8 µm) kolonlar denenmiştir. Antiviraller için en uygun alikoma zamanı C8 kolon ve 0.35 mL/dak hızda gradient elüsyonla, 40 °C kolon sıcaklığı ve 1 µL enjeksiyon hacmi kullanılarak elde edilmiştir (Şekil 4.10).

Tablo 4.8. Antivirallere ait optimum MRM değerleri

Antiviral	MRM geçişleri (m/z)	Q1* (V)	Çarpışma Enerjisi	Q3* (V)
ASİ	225.9>151.9	-11	-13	-16
LAM	229.9>112.0	-11	-12	-25
GAN	256.0>152.0	-10	-35	-18
LOP	629.20183.0	-22	-24	-13
EMT	248.0>130.0	-12	-10	-29
ENT	277.9>152.0	-13	-20	-17
VLG	355.0>151.9	-10	-19	-16
VAL	325.0>152.0	-12	-19	-16
OSE	313.0>165.9	-11	-22	-19
MOL (IS)	329.9>128.0	-12	-17	-27

* Kuadropol 1 ve 3 için geçiş voltajları.



Şekil 4.10. Optimum koşullar altındaki antiviral standartlarına ait (1 µg/mL) LC-MS/MS kromatogramları

4.2.2. Sistem Uygunluğu

Geliştirilen yöntemin optimum analiz koşulları altında sistem uygunluğu, enjeksiyon kesinliği, kapasite faktörü (k'), teorik plaka sayısı (N) ardışık pikler arasındaki ayırıcılık (R_s) ve kuyruklanma faktörü (TF) parametreleri açısından değerlendirilmiştir (Tablo 4.9.).

Tablo 4.9. LC-MS/MS yöntemine ait sistem uygunluk sonuçları ($n=6$)

	t_R	k'^a	N	R_s^b	TF
GAN	1.13	1.27	24792	-	1.20
LAM	1.37	1.74	30268	1.78	1.16
ASI	1.43	1.87	32271	0.42	1.14
VLG	1.64	2.27	15474	1.11	1.33
VAL	2.56	4.11	41055	3.97	1.23
ENT	2.82	4.64	45412	1.12	1.29
EMT	2.96	4.93	45549	0.58	1.34
MOL (IS)	4.72	8.44	491154	9.54	1.21
OSE	5.19	9.39	587444	3.90	1.15
LOP	7.08	13.15	616737	13.36	1.31

^a Ölü zaman aynı koşullarda urasil enjeksiyonu ile bulunmuştur: $t_0=0.5$ dak

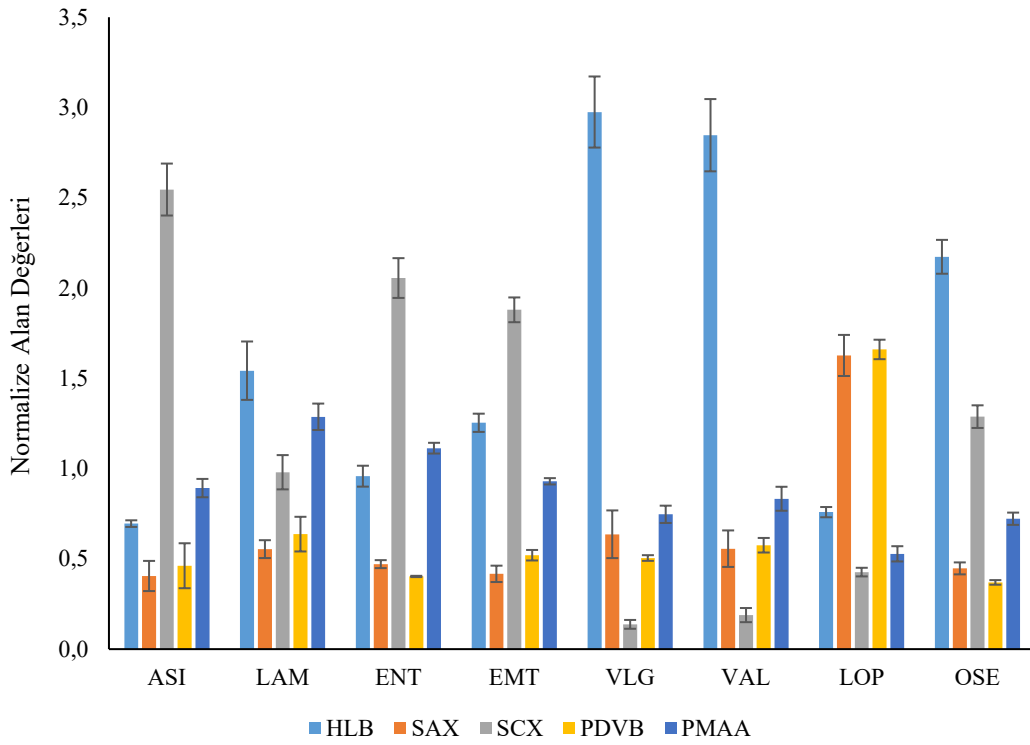
^b Ayırım gücü ardışık pikler arasında hesaplanmıştır.

4.2.3. SPME Optimizasyon Çalışmaları

Antivirallerin plazmadan en yüksek verimde analizlerini gerçekleştirebilmek için SPME tipi, desorpsiyon çözeltileri içeriği, desorpsiyon zamanı, tüketme fazın pH değeri, tüketme zamanı ve seyreltme etkisi olmak üzere altı parametre ele alınmıştır. Seyreltme etkisi hariç diğer tüm optimizasyon basamaklarında antivirallerin fosfat tuz tamponu içerisinde (PBS) hazırlanan $1 \mu\text{g/mL}$ standart çözeltileri SPME optimizasyon çalışmalarında kullanılmıştır. Seyreltme etkisi boş plazma örneklerinden gerçekleştirilmiştir. Elde edilen alan değerleri ölçeklendirilerek grafikleştirilmiştir.

Fiber Seçimi

SPME yöntemi optimizasyonu için ilk olarak fiber seçimi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla HLB, HLB-SAX, HLB-SCX, PDVB ve PMAA fiberleri antiviral ilaçların analizlerinde denenmiştir. Tüketme faz analizlerinde en uygun görülen HLB ve HLB-SCX fiberleri ile optimizasyon çalışmalarına devam edilmiştir (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. Farklı fiberlerin antivirallerin geri kazanımlarına etkisi

Desorpsiyon Çözeltisi Optimizasyonu

Analitlerin SPME fiberlerinden tam olarak desorpsiyonunu sağlamak için farklı desorpsiyon çözücülerini değerlendirilmiştir. Desorpsiyon çözeltileri, ACN, MeOH, ultra saf su, FA ve amonyakın (NH_3) çeşitli oranlardaki kombinasyonları ile hazırlanmıştır (Tablo 4.10). Her bir desorpsiyon çözeltisinden 100 μL 'lik kısımlar, 200 μL 'lik insertlerin içine eklenmiştir.

En az 24 saat önceden ön koşullandırması yapılmış HLB ve HLB-SCX fiberleri kullanılmıştır. 2 saatlik tüketme işleminin ardından, her iki fiber tipinden üçer tekrar olacak şekilde fiberler, hazırlanan desorpsiyon çözeltilerine daldırılmadan önce bir saniye ultra saf su içinde hızlıca durulanmıştır. Desorpsiyon işlemi, oda sıcaklığında ve 1000 rpm hızda bir karıştırıcı üzerinde sürekli çalkalama ile 2 saat boyunca gerçekleştirilmiştir.

Desorpsiyon işleminin tamamlanıp tamamlanmadığını değerlendirmek için, ilk desorpsiyon adımından hemen sonra, taze desorpsiyon çözeltileri ve aynı HLB ve

HLB-SCX fiberleri kullanılarak, ilk desorpsiyonla aynı koşullar korunarak ikinci bir desorpsiyon adımı uygulanmıştır. Hem birinci hem de ikinci desorpsiyon adımlarından elde edilen desorpsiyon çözeltilerinde antiviral miktarları LC-MS/MS sistemi kullanılarak analiz edilmiştir (Şekil 4.12 ve 13).

Tablo 4.10. SPME optimizasyon çalışmalarında kullanılan desorpsiyon çözeltileri

Çözücü	Oranları (%h/h)				
	Çözelti 1 (A)	Çözelti 2 (B)	Çözelti 3 (C)	Çözelti 4 (D)	Çözelti 5 (E)
ACN	40	40	80	-	50
MeOH	40	40	-	80	-
Ultra saf su	20	20	20	20	50
FA	0.1	-	0.1	0.1	0.1
NH ₃	-	0.1	-	-	-

Şekil 4.12. Antivirallerin tüketiminde desorpsiyon çözeltisinin etkisi; A) HLB ve B) HLB-SCX fiberleri

Şekil 4.13. Antivirallerin tüketiminde ikinci kez gerçekleştirilen desorpsiyon çözeltisi içindeki % antiviral miktarı; A) HLB ve B) HLB-SCX fiberleri

Desorpsiyon Zamanı Optimizasyonu

Analitlerin ideal desorpsiyon koşullarını belirlemek amacıyla, 5, 15, 30, 60 ve 120 dakika gibi farklı desorpsiyon süreleri HLB ve HLB-SCX fiberleri ile test edilmiştir. Çözelti 1 (A), desorpsiyon çözücüsü olarak kullanılmış ve her bir desorpsiyon işlemi için 100 µL kullanılmıştır. Desorpsiyon işlemi sonrasında elde edilen çözeltiler LC-MS/MS ile analiz edilmiştir (Şekil 4.14).

Şekil 4.14. Antivirallerin tüketiminde desorpsiyon zamanının etkisi; A) HLB ve B) HLB-SCX fiberleri

Tüketme Fazının pH Optimizasyonu

Tüketme fazın optimum pH değerini belirlemek amacıyla, PBS çözeltisinin pH değeri 3.0, 5.0, 7.4 ve 9.0 olarak ayarlanmıştır. Bu pH ayarlamaları, 0.1 M HCl ve 0.1 M NaOH çözeltileri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hedef bileşikler, nihai 10 ppm derişim elde edilecek şekilde, farklı pH değerlerine sahip PBS çözeltileri ile seyreltilmiştir. Desorpsiyon süresi olarak 30 dakika ve çözücüsü Çözelti 1 (A) kullanılmıştır. Normalize edilmiş pik alan değerleri kullanılarak elde edilen sonuçlar Şekil 4.15’de sunulmuştur.

Şekil 4.15. Antivirallerin tüketiminde pH etkisi; A) HLB ve B) HLB-SCX fiberleri

Tüketme Zamanı Optimizasyonu

Analitler için ideal tüketme süresini belirlemek amacıyla, 5, 15, 30, 60, 120 ve 240 dakikalık tüketme zamanları, HLB ve HLB-SCX fiberleri kullanılarak test edilmiştir. Antiviral standartlar plazmada 10 ppm olacak şekilde çözülerek ekstraksiyon çözeltisi hazırlanmıştır. Desorpsiyon çözeltisi olarak Çözelti A kullanılmıştır. En az bir gün önceden şartlandırılmış HLB fiberleri ile üçer tekrarlı olarak gerçekleştirilen ekstraksiyon işlemlerinin ardından, fiberler 1 saniye süreyle ultra saf suya daldırılmış ve ardından desorpsiyon çözeltisine aktarılmıştır.

Desorpsiyon, oda sıcaklığında 1000 rpm hızda karıştırılarak 30 dakika süreyle gerçekleştirilmiştir. Desorpsiyon sonrası elde edilen çözeltiler LC-MS/MS cihazı ile analiz edilmiştir. Normalize edilmiş pik alan değerlerine göre elde edilen sonuçlar Şekil 4.16'da verilmiştir.

Şekil 4.16. Antivirallerin SPME'den analizlerinde tüketme zamanının etkisi

Seyreltme Etkisi

SPME ile numune hazırlanmasında iyonik şiddet ve ve protein-analit etkileşimleri tüketme sürecini etkileyen önemli faktörlerdir. Analitler için seyreltmenin tüketme üzerine etkisini belirlemek amacıyla plazmada 10 ppm olacak şekilde çözülerek ekstraksiyon çözeltisi hazırlanmış ve sonrasında PBS kullanılarak 1:1 ve 1:2 seyreltilmiş ve HLB fiberleri kullanılarak tüketme işlemi gerçekleştirilmiştir. Desorpsiyon çözeltisi olarak Çözelti A, desorpsiyon süresi 30 dakika ve tüketme süresi 30 dakika kullanılmıştır. Desorpsiyon sonrası elde edilen çözeltiler LC-MS/MS cihazı ile analiz edilmiş ve sonuçlar Şekil 4.17'de verilmiştir.

Şekil 4.17. Seyreltme etkisinin antivirallerin tüketimine etkisi

4.2.4. Validasyon

Seçilen antiviral ajanlar için kapsamlı bir validasyon çalışması yürütülmüştür. Tüm analitler belirlenen MRM parametrelerinde analiz edilmişlerdir. Validasyon protokolü sistem uygunluğu, kararlılık, duyarlılık, doğrusallık, kesinlik, doğruluk, seçicilik, sağlamlık, taşınma etkisi, matriks etkisi ve seyreltme etkisi değerlendirmiştir.

Sistem Uygunluğu

On antiviral ilacın (GAN, ASI, LAM, VLG, VAL, ENT, FAV, EMT, OSE ve LOP) 1.0 µg/mL standart çözeltileri kullanılarak yapılan sistem uygunluk testi sonuçları Tablo 4.9'da verilmiştir. Her bir analit için alıkonma zamanı (t_R), kapasite faktörü (k'), teorik plaka sayısı (N) ve kuyruklanma faktörü (TF) gibi önemli kromatografik parametreleri verilmiştir.

Seçicilik

Geliştirilen LC-MS/MS yönteminin seçiciliği, LLOQ düzeyindeki standart çözeltileri içeren kromatogramların (Şekil 4.18), boş plazma örnekleriyle karşılaştırılmasıyla değerlendirilmiştir (Şekil 4.19).

Şekil 4.18. Antiviral standart çözeltilerinin LLOQ derişimindeki LC-MS/MS kromatogramları

Şekil 4.19. Boş plazma kromatogramlarına ait LC-MS/MS kromatogramları

Kararlılık

HPLC yönteminde validasyon çalışmaları gerçekleştirilmeyen antiviral ilaçların (ASI, LAM, LOP ve OSE) kararlılıkları +4°C'de buzbulabında uzun süreli ve otoörnekleyicide kısa süreli olmak üzere iki farklı saklama koşulu altında değerlendirilmiştir. Tüm kararlılık değerlendirmeleri 1.0 µg/mL derişimde standart çözeltiler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Derişimde %10'u aşan bir değişiklik bozunmayı göstermiştir [90].

Her antiviral ilacın bireysel stok çözeltileri hazırlanmış ve +4°C'de saklanmıştır. Önceden belirlenmiş zaman noktalarında (1, 2, 3 ve 4 hafta), her stok çözeltilisinden çıkarılan bölüntüler oda sıcaklığına dengelenerek ve iki kez analiz edilmiştir. Ölçülen derişimler, taze hazırlanmış çözeltilerin derişimleri ile karşılaştırılmıştır. LOP etken maddesinin +4°C'de buzbulabında 1 ay içinde bozulduğu, ASI, LAM ve OSE antivirallerinin +4°C'de buzbulabında en az 1 ay kararlı kaldığı görülmüştür.

Otomatik örnekleme kararlılığı, taze hazırlanmış çözeltilerin 0, 6, 12. ve 24. saatlerde analiz edilmesiyle değerlendirilmiştir. Tüm antiviral ilaçlar otomatik örnekleme içinde en az 24 saat boyunca kararlı kalmıştır. Donma-çözülme kararlılığı için taze hazırlanmış standart karışım çözeltisi (1 µg/mL) ile karşılaştırılmış ve sonuçlar Şekil 4.20'de verilmiştir.

Şekil 4.20. Tüm antivirallere ait donma çözünme kararlılık çalışmaları

Duyarlılık

Antiviraller için LOD ve LLOQ değerleri Tablo 4.11’de verilmiştir . Ayrıca LLOQ düzeyindeki her bir antiviral için BSS ve BH değerleri Tablo 4.12’de verilmiştir.

Doğrusallık

Doğrusallık, LLOQ değerinden 1 veya 5 µg/mL'ye kadar değişen sekiz kalibrasyon standardı kullanılarak değerlendirilmiştir. Kalibrasyon eğrileri, her antiviralin derişiminin pik alanı ile iç standardın pik alanı oranına karşılık gelen şekilde oluşturulmuştur. Elde edilen kalibrasyon eğrileri ve ANOVA analizi sonuçları Tablo 4.11’de verilmiştir.

Tablo 4.11. Antiviral analizlerinden ANOVA ile elde edilen doğrusallık parametreleri

	Eğim	p değeri (Eğim)	Kesim	p değeri (Kesim)	R ²	LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)	S/G
GAN	1.8611	0.0432	0.0792	0.2391	0.9917	0.020	0.0625	12.9
ASI	0.8191	0.0481	0.0519	0.0599	0.9913	0.0100	0.0313	40.0
LAM	3.5479	0.0167	0.2308	0.0941	0.9901	0.0020	0.0075	57.4
VLG	0.7877	0.0009	0.1545	0.0511	0.9944	0.0020	0.0072	13.8
VAL	1.1641	0.0006	0.1079	0.1253	0.9982	0.0020	0.0070	23.8
ENT	1.1867	0.0004	1.0920	0.0002	0.9969	0.0003	0.0009	10.0
EMT	1.8611	0.0031	0.0792	0.0774	0.9917	0.0104	0.0313	37.7
OSE	13.500	0.0003	0.6525	0.2365	0.9994	0.0104	0.0313	20.6
LOP	353.32	9.3x10 ⁻⁸	-0.4020	0.5303	0.9904	0.0003	0.0010	4413.6

Kesinlik ve Doğruluk

Geliştirilen yöntemin gün içi ve günler arası kesinliği plazma örneklerine LOQ düzeyinde ve doğrusal aralık içerisindeki üç farklı derişimde olmak üzere dört farklı derişimde hazırlanmıştır. Gün içi kesinlik, tek bir günde her derişim seviyesinin altı tekrarının analiz edilmesiyle değerlendirilirken, günler arası kesinlik, üç ardışık gün boyunca her derişim seviyesinde altı tekrarın analiz edilmesiyle değerlendirilmiştir (Tablo 4.12 ve 4.13).

Tablo 4.12. LC-MS/MS yöntemi için gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk değerleri

	Derişim (µg/mL)	Gün içi (n = 6)		Günler arası (n = 6)	
		Doğruluk (%BH)	Kesinlik (%BSS)	Doğruluk (%BH)	Kesinlik (%BSS)
GAN	0.063	11.6	5.43	-0.19	4.3
	0.125	0.83	5.49	4.28	2.35
	0.500	-3.11	13.22	-0.08	11.38
	1.000	-3.24	10.12	1.65	11.63
ASI	0.031	12.19	2.84	-3.67	14.55
	0.125	-10.48	5.17	12.21	8.53
	0.500	5.94	4.86	4.62	5.46
	1.000	10.22	13.17	-7.47	14.28
LAM	0.007	4.92	4.14	3.83	12.73
	0.125	10.17	15.27	-7.11	14.35
	0.500	-11.56	4.41	-9.83	4.83
	1.000	7.28	0.85	8.31	5.08
VLG	0.007	-1.63	13.00	2.63	0.88
	0.125	8.22	8.16	-7.16	9.25
	0.500	5.21	5.42	5.06	3.17
	1.000	0.87	14.45	-3.89	17.89

Tablo 4.13. (Devam) LC-MS/MS yöntemi için gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk değerleri

VAL	0.007	-11.11	9.83	-3.74	1.40
	0.125	9.24	2.83	10.54	0.47
	0.500	5.19	2.51	5.71	1.13
	1.000	1.13	1.5	-5.29	2.41
ENT	0.001	7.43	0.01	4.29	2.28
	0.125	6.01	15.29	2.17	14.03
	0.500	12.99	11.09	13.31	11.53
	1.000	4.88	5.82	5.19	3.05
EMT	0.031	17.55	9.98	1.42	11.25
	0.125	18.21	9.63	14.16	10.47
	0.500	10.44	7.82	3.67	5.09
	1.000	10.98	3.52	3.49	3.07
OSE	0.001	2.15	13.83	4.11	10.91
	0.125	-5.17	2.29	3.67	6.48
	0.500	-2.45	12.09	-4.72	16.94
	1.000	15.24	1.54	2.64	8.77
LOP	0.001	3.58	0.18	-6.15	4.55
	0.125	16.13	3.41	12.04	0.84
	0.500	-12.13	4.41	-8.27	1.11
	1.000	3.15	0.16	-7.37	4.01

Tablo 4.14. LC-MS/MS yöntemi için plazmadan geri kazanım çalışmaları sonuçları (n=4)

	% Geri kazanım (n=4)	%BSS
GAN	106.5	0.7
ASI	112.4	9.3
LAM	89.8	3.4
VLG	104.9	1.3
VAL	92.3	6.1
ENT	83.4	2.9
EMT	87.8	0.5
OSE	100.0	3.8
LOP	106.4	1.5

Sağlamlık

Temel deneysel parametrelere kasıtlı, küçük değişiklikler getirilmiş, bunların pik alanları ve alıkonma zamanları üzerindeki etkileri on üç aşamalı parçalı faktöriyel tasarım ile değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar ANOVA analizi ile değerlendirilmiştir (Tablo 4.14 ve 4.15).

Tablo 4.15. Her değişkenin antivirallerin alıkonma zamanları için p değerleri

	Sabit	Sudaki FA (%)	ACN'deki FA (%)	Akış Hızı (mL/dak)	Sıcaklık (°C)
GAN	1.99x10 ⁻⁶	0.2291	0.2019	0.0431	0.2122
ASI	2.39x10 ⁻⁷	0.9669	0.5896	0.5559	0.1538
LAM	1.33x10 ⁻⁵	0.1557	0.9221	0.6804	0.1414
VLG	1.60x10 ⁻⁶	0.9002	0.5654	0.5349	0.6531
VAL	3.33x10 ⁻⁸	0.6183	0.9928	0.1899	0.2929
ENT	1.57x10 ⁻⁷	0.2412	0.6603	0.6895	0.6344
EMT	4.91x10 ⁻⁷	0.4667	0.3441	0.9508	0.3278
OSE	4.26x10 ⁻¹⁰	0.5379	0.5964	0.5864	0.0919
LOP	4.19 x10 ⁻¹⁰	0.9263	0.0884	0.3367	0.9038

Tablo 4.16. Her değişkenin antivirallerin pik alan için p değerleri

	Sabit	Sudaki FA (%)	ACN'deki FA (%)	Akış Hızı (mL/dak)	Sıcaklık (°C)
GAN	0.0001	0.7324	0.6567	0.7734	0.5588
ASI	0.0001	0.4717	0.6275	0.9752	0.4113
LAM	7.80x10 ⁻⁸	0.0670	0.2962	0.6148	0.0630
VLG	0.0002	0.4030	0.9630	0.8211	0.5800
VAL	0.0004	0.6196	0.9688	0.7707	0.6011
ENT	2.05x10 ⁻⁵	0.7403	0.7857	0.5252	0.1281
EMT	9.50x10 ⁻⁷	0.1456	0.5604	0.1276	0.8049
OSE	2.46x10 ⁻⁶	0.5734	0.5711	0.4562	0.3456
LOP	0.0039	0.0864	0.1176	0.3139	0.1743

Matriks Etkisi

Matriks etkisi parametresi için artan derişimlerde antiviraller plazmaya ve PBS çözeltilisine eklenmiş ve SPME-LC-MS/MS yöntemi ile analiz edilmiştir. Geri kazanım değerleri %85 ile %106 arasında bulunmuştur (Tablo 4.13).

Seyreltme Bütünlüğü Etkisi

LC-MS/MS yöntemin seyreltme bütünlüğü etkisi, antivirallerin plazmada hazırlanan 2 ppm derişimiyle değerlendirilmiştir. Yüksek derişimdeki bu çözeltili 1:2, 1:5 ve 1:10 oranlarında yine plazmayla seyreltilerek analiz edilmiştir (Şekil 4.21.). Elde edilen değerler %91.60- % 108.14 aralığındadır.

Şekil 4.21. Antivirallerin LC-MS/MS analizlerinde seyreltme bütünlüğü etkisi

Taşınma Etkisi

Bu çalışmada, analitik metodun taşınma etkileri, antivirallerin 1 ppm derişimiyle değerlendirilmiştir. Validasyon, ICH M10 kılavuzlarına uygun olarak gerçekleştirilmiş ve önerilen uygulamalar doğrultusunda titizlikle takip edilmiştir. En yüksek derişim standardı sistemine enjekte edilmiş, ardından taşınma etkisi potansiyelini değerlendirmek için boş örnekler analiz edilmiştir. Taşınma etkisine ait kromatogramlar Şekil 4.22’de verilmiştir. Kromatogramlarda hiçbir etken madde için pik gözlenmemiştir. LOP sinyali olarak değerlendirilebilecek pik alanı LOQ piki alanının %2’sinden daha küçük bir değere sahiptir.

Şekil 4.22. Antivirallerin LC-MS/MS analizlerinde elde edilen taşınma etkisi kromatogramları

5. TARTIŞMA

Bu tez çalışması kapsamında antiviral ilaçların farmasötik dozaj şekillerinden ve plazma örneklerinden analizler için HPLC ve LC-MS/MS yöntemleri geliştirilmiştir.

5.1. Farmasötik Dozaj Şekillerinden Antivirallerin Analizleri İçin HPLC Yöntemi

5.1.1. Yöntem Optimizasyonu

Antiviral ilaç karışımının etkin bir şekilde kromatografik ayrımını sağlamak amacıyla kapsamlı bir optimizasyon çalışması yürütülmüştür. Bu optimizasyon stratejisinin temel amacı, analitlerin yakın elüsyon zamanı sorununu çözmek ve eş zamanlı olarak analiz süresini en aza indirmek olmuştur. Bu nedenle farmasötik ürünlerin analizlerde hızlı ve güvenilir yöntemlerin geliştirilmesi için optimizasyon çalışmaları büyük önem taşımaktadır. Bu amaçla HPLC yöntemi etkileyen kromatografik parametreler (sabit faz seçimi, hareketli faz bileşimleri vd.) optimize edilmiştir.

Sabit Faz Seçimi

Literatürde yapılan bilimsel kaynak araştırmaları, antiviral bileşiklerin ayrılmasında ters faz (RP) kromatografisi tekniğinin yaygın olarak tercih edildiğini ortaya koymuştur. Oktadesil silan (C18) sabit fazlarının ve hareketli faz olarak fosfat tampon çözeltilerinin kullanımı, antiviral ilaçların etkili ayrımı için sıklıkla rapor edilmiştir [68, 83]. Bu nedenle, bu çalışmada da antiviral ilaç ayırmaları için oktadesil silan bazlı bir kolon (150 mm × 4.6 mm, 3 µm) ve fosfat tamponu içeren bir sistem temel alınmıştır.

Organik Çözücü Seçimi

Hareketli fazdaki organik çözücü tipi ve miktarı, hareketli fazın polaritesini ve elüsyon gücünü doğrudan etkileyerek analitlerin tutulmasını ve seçiciliğini belirler.

Tez çalışmasında yaygın olarak kullanılan iki organik çözücü olan MeOH ve ACN karşılaştırılmıştır. ACN ile gerçekleştirilen analizler MeOH'a göre daha iyi bir analiz sağlamıştır. Özellikle, kritik analit çifti olan VAL ve VLG, MeOH'un hareketli faz kullanılarak yapılan denemelerde yetersiz ayırıcılık göstermiştir. Bu durumda MeOH bu iki analiti etkili bir şekilde ayırmada yetersiz kalmıştır. ACN'e geçiş yapıldığında ise, pik şekillerinde ve ayrılmalarında önemli iyileşmeler gözlemlenmiştir. Bu yüzden ACN hareketli faz için organik çözücü olarak seçilmiştir.

ACN'in en uygun organik çözücü olarak belirlenmesinin ardından, hem verimli bir ayırma sağlamak hem de analiz süresini en aza indirmek amacıyla ideal ACN:tampon oranının belirlenmesine geçilmiştir. Bu amaçla, ACN fosfat tampon oranı farklı (10:90, 20:80 ve 30:70, h/h) üç hareketli faz kullanılarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.2). Beklentilere paralel olarak, hareketli fazdaki ACN oranının artırılması, tüm analitler için alıkonma zamanlarında genel bir azalmaya neden olmuştur. Bu gözlem, ters fazlı sıvı kromatografisinin temel prensipleriyle tam uyumluluk göstermektedir. Zira, hareketli fazdaki organik düzenleyici derişiminin artırılması, hareketli fazın genel polaritesini düşürmekte, bu da analitlerin sabit faz ile olan etkileşimlerinin zayıflamasına ve dolayısıyla daha hızlı elüsyona yol açmaktadır. Ancak, ACN yüzdesindeki artışın ayırıcılık üzerindeki etkisi, analit çiftleri arasında farklılıklar göstermiştir. Bu durum, analiz süresi ile çözünürlük arasında dikkatli bir dengeleme yapılması gerekliliğinden dolayı %10'luk ACN oranı optimum değer olarak belirlenmiştir.

pH Optimizasyonu

Hareketli fazın pH değeri, HPLC yöntemlerinde analit iyonizasyonunu, tutulmasını ve seçiciliğini önemli ölçüde etkileyen kritik bir parametredir [95]. Bu nedenle, antiviral ilaçların alıkonma zamanları üzerindeki pH etkisini detaylı bir şekilde incelemek amacıyla, pH 2.5 ile 6.5 aralığında analizler gerçekleştirilmiştir. Test edilen pH aralığında, analitlerin tutulma davranışlarında belirgin farklılıklar gözlemlenmiştir (Şekil 4.3). Bu farklılıklar, farklı pH değerlerinde antivirallerin iyonlaşma durumlarındaki değişikliklerden kaynaklanmaktadır. İyonlaşma durumundaki değişimler, analitlerin polaritesini ve dolayısıyla sabit faz ile olan

etkileşimlerini önemli ölçüde etkileyerek alıkonma zamanlarını doğrudan etkilemektedir.

Değişen hareketli faz pH koşullarında (2.5-6.5) alıkonma zamanlarıyla ortaya çıkan antiviral analitlerin kromatografik davranışı, kendi pKa değerleriyle yakından ilişkilidir. Ters fazlı sıvı kromatografisinde, belirli bir pH değerinde öncelikle nötr veya düşük iyonizasyon durumunda bulunan analitler, sabit fazla (C18) daha güçlü hidrofobik etkileşimler sergilemekte ve bu da daha uzun alıkonma süreleri ile sonuçlanmaktadır. Aksine, iyonize formdaki analitler, daha polar hale gelerek daha kısa alıkonma süreleri göstermektedir. Örneğin, EMT için gözlemlenen eğilim, pH 4.5 civarında alıkonma zamanında bir zirve göstermesi, EMT'nin 5.47'lik pKa değeriyle uyumlu bir şekilde, bu pH civarında iyonizasyonunun azaldığını düşündürmektedir. Yüksek pKa değerlerine sahip VAL, ENT ve VLG (sırasıyla 7.47, 8.00 ve 11.98), test edilen pH aralığında en düşük alıkonma zamanı değişimlerini sergilemiş, bu da bu analitlerin bu pH aralığında çoğunlukla iyonize olmayan formda bulunduğunu göstermektedir. FAV (pKa 5.1) ve GAN (pKa 9.4) ise pH'a bağlı alıkonma davranışı sergilemiş ve en aza indirilmiş iyonizasyon nedeniyle pH 4.5 civarında en yüksek alıkonmayı göstermiştir. Bu bulgular, hareketli faz pH'nın analit iyonizasyonunu, dolayısıyla tutunmayı ve seçiciliği modüle etmedeki temel rolünü açıkça vurgulamaktadır. Bu durum, optimize edilmiş HPLC yöntemlerinin geliştirilmesinde kritik bir öneme sahiptir. En iyi ayırımın pH 4'te elde edilmesi nedeniyle, pH 4, bu çalışma için en uygun pH değeri olarak belirlenmiştir (Şekil 4.3).

Tampon Derişimi Optimizasyonu

Hareketli fazdaki tampon derişimi, kromatografik performansı etkileyen bir diğer önemli faktördür. Tampon derişimi, pik şeklini, çözünürlüğü ve genel kromatografik verimliliği etkileyebilir. Bu etkiyi sistematik olarak değerlendirmek amacıyla, analizler 20 mM, 50 mM ve 80 mM olmak üzere üç farklı fosfat tamponu derişiminde gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.4). Elde edilen sonuçlar, tampon derişiminin, incelenen antiviral ilaçların pik şeklini önemli ölçüde değiştirmedeğini göstermiştir. Ancak, daha yüksek tampon derişimlerinin, kolon performansını zamanla olumsuz etkileyebilecek tuz birikimine neden olabileceği düşünülmüştür. Bu nedenle, HPLC

sisteminde tuz birikimini minimize etmek ve kabul edilebilir bir performans seviyesini korumak amacıyla, tampon derişimi olarak 50 mM seçilmiştir.

Kolon Sıcaklığı Optimizasyonu

Kolon sıcaklığı, HPLC'de analit difüzyonunu, kütle transferini ve nihayetinde pik şeklini ve çözünürlüğü etkileyen bir diğer kritik parametredir. Sıcaklığın antiviral ilaç karışımının kromatografik davranışı üzerindeki etkisini ayrıntılı olarak incelemek amacıyla, analizler 25°C, 30°C ve 40°C olmak üzere üç farklı kolon sıcaklığında gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.5).

Yapılan çalışma, kolon sıcaklığının artırılmasının genellikle alıkonma zamanlarında kısaltmaya yol açtığını, ancak diğer kromatografik parametreler üzerindeki etkisinin analitten analite farklılık gösterdiğini ortaya koymuştur. Bazı bileşikler için, daha yüksek sıcaklıklar etkinliğin artmasına katkıda bulunurken, diğerleri için etkinlikte azalma veya nispeten değişmezlik gözlemlenmiştir. Alıkonma zamanları, etkinlik ve pik simetrisinin genel bir değerlendirmesi sonucunda, 30°C'lik bir kolon sıcaklığı, optimum çalışma sıcaklığı olarak belirlenmiştir.

Optimum Kromatografik Şartlar

Yukarıda detaylandırılan optimizasyon çalışmalarına dayanarak, hareketli faz için 50 mM fosfat tamponu (pH 4): ACN karışımı (90:10, h/h), akış hızı için 0.5 mL/dak ve kolon sıcaklığı için 30 °C optimum koşullar olarak belirlenmiştir. Bu optimize edilmiş koşullar altında, antiviral ilaç karışımının etkili bir şekilde ayrılması 10 dakika içinde gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.6). Optimum koşullar altında elde edilen kromatogram, geliştirilen yöntemin antiviral ilaçların eş zamanlı analizi için uygun çözünürlük ve pik şekli sağladığını göstermektedir.

5.1.2. Validasyon

Sistem Uygunluğu

Geliştirilen HPLC yönteminin EMT, ENT, FAV, GAN, VAL ve VLG olmak üzere altı antiviral ilacın eş zamanlı analizi için sistem uygunluk parametreleri Tablo 4.2'de sunulmuştur. Sistem uygunluğu, analitik yöntemin tekrarlanabilirliği ve güvenilirliği açısından kritik bir öneme sahiptir. Tabloda yer alan veriler, t_R , k' , N , R_s ve TF gibi temel performans göstergelerini içermektedir.

Alıkonma zamanı, analitin kolondan geçerek dedektöre ulaşması için geçen süredir. Alıkonma zamanlarının tekrarlanabilirliği, yöntemin hassasiyeti ve doğruluğu için önemlidir. Analitlerin alıkonma zamanları 3.30 dak (GAN) ile 7.09 dak (FAV) arasında değişmektedir. Alıkonma zamanlarının tutarlılığı ($RSD < \%2$) yöntemin kararlılığı ve güvenilirliği için önemlidir. Alıkonma zamanlarında büyük değişikliklerin olmaması, yöntemin sorunsuz olduğunun göstergelerinden biridir.

Kapasite faktörü, analitin kolonda ne kadar süre tutulduğunu gösteren bir parametredir ve analitlerin çözünürlüğünü etkiler. Kapasite faktörü tüm analitler için 0.65 (GAN) ile 2.54 (FAV) arasında değişmektedir. Değerleri 1'den küçük çıkan GAN ve VLG analitleri kolonda yeterince tutulmamıştır.

Teorik plaka sayıları ise VLG için en yüksek 12218'den, GAN için en düşük 2546'ya kadar değişmektedir. Genel olarak yüksek teorik plaka sayıları, kolon verimliliğinin iyi olduğunu ve keskin, iyi tanımlanmış pikler elde edildiğini göstermektedir.

Ayrırcılık değerleri, sistemin birbirine yakın elüsyon yapan bileşikleri ayırma yeteneğini gösterir ve bu değerler 2.12 (VLG-VAL) ile 6.39 (EMT-FAV) arasında değişmektedir. Genellikle 2'nin üzerindeki ayrırcılık değerleri, bazal ayırımın sağlandığını ve güvenilir nicel analiz için yeterli olduğunu gösterir. Antiviraller için tüm ayrırcılık değerleri 2'nin üzerinde olup, yöntemin zorlu analit çiftlerini bile başarıyla ayırdığını kanıtlamaktadır (Tablo 4.2).

Kuyruklanma faktörü değerleri, pik simetrisinin kabul edilebilir sınırlar (ideal olarak 1.0 civarında) içerisinde olduğunu göstermektedir. Özellikle VLG için 2.35'lik değer, hafif bir kuyruklanmaya işaret etse de, diğer analitlerde gözlenen 1.28-1.63 aralığı kabul edilebilir düzeydedir. Sonuç olarak, sistem uygunluk parametrelerin geliştirilen HPLC yönteminin, altı antiviral ilacın eş zamanlı analizi için gerekli sistem uygunluğuna sahip olduğunu ve analitik performansının güvenilir ve tekrarlanabilir sonuçlar elde etmek için yeterli olduğunu göstermektedir.

Kararlılık

Bu çalışmada, altı antiviral ilaç olan EMT, ENT, FAV, GAN, VAL ve VLG'nin kararlılıkları, 10 ppm'lik standart çözeltilerinden hem uzun süreli buzdolabı koşullarında (+4°C) hem de kısa süreli otomatik örnekleyici koşullarında (15°C) incelenmiştir. Uzun süreli kararlılık çalışmaları, bu ilaçların çözelti halinde saklama koşullarından farklı derecelerde etkilendiğini ortaya koymaktadır. Özellikle EMT, sadece bir haftalık buzdolabında saklama sonrasında dahi %14-16 gibi önemli bir derişim kaybı göstermiştir. Bu durum, EMT'nin bu koşullar altında hidroliz veya oksidasyon gibi bozunma tepkimelerine karşı hassas olduğunu göstermektedir. Benzer şekilde, ENT ve FAV da bir hafta içinde %11-12'lik bir derişim azalmasıyla orta düzeyde bir kararsızlık sergilemiştir. Analitik sonuçların güvenilirliği ve doğruluğu açısından, bu ilaçlar bir haftadan uzun süreli saklanmamalıdır.

Diğer yandan, GAN, VAL ve VLG, beş haftaya kadar uzanan buzdolabında saklama süresince %5'in altında bir derişim değişikliği göstererek, bu koşullar altında kararlı bir profili sergilemişlerdir. Bu durum, söz konusu ilaçların, uzun süreli çalışmalarda veya numune biriktirme gerektiren durumlarda, buzdolabında saklanabileceğini göstermektedir. Otoörnekleyici kararlılığı açısından ise, altı antiviral ilacın tamamı 15°C'de en az 12 saat boyunca kararlı kalmıştır. Bu bulgu, geliştirilen yöntemin otoörnekleyici kullanımı için uygun olduğunu ve analiz süresince numunelerin otoörnekleyici içerisinde 12 saat beklemesinden kaynaklanabilecek önemli bir bozulma riskinin olmadığını göstermiştir.

Seçicilik

Plasebo ve standart maddelere ait kromatogramlar geliştirilen yöntemin seçiciliğini göstermektedir (Şekil 4.7). Plasebo kromatogramlarından, hiçbir girişim gözlenmemiştir (Şekil 4.7A). İlaçların alıkonma zamanlarında (standart kromatogramındaki piklerle belirtilen) plasebo kromatogramında pik bulunmaması, yöntemin, matriks bileşenlerinden kaynaklanabilecek herhangi bir girişim olmaksızın, hedef antivirallerin seçici olarak belirleyebildiğini göstermiştir. Bu sonuçlar, geliştirilen yöntemin, bu antiviral ilaçların farmasötik dozaj şekillerinden doğru ve güvenilir bir şekilde analizi için seçici olduğunu göstermiştir.

Doğrusallık

Antiviral ilaçlar LOQ değerinden 150 veya 200 µg/mL'ye kadar doğrusal olduğu görülmüş ve geliştirilen HPLC yöntemin doğrusallığı ANOVA analizi sonuçları ile değerlendirilmiştir (Tablo 4.3). Tüm antiviraller için korelasyon katsayısı (R^2) değerleri 0.9938 ile 1.0000 arasında değişmektedir. Bu değerler, tüm ilaçlar için kalibrasyon eğrilerinin mükemmel bir doğrusallık sergilediğini ve analit derişimi ile pik alanı arasında güçlü bir doğrusal ilişki olduğunu göstermiştir.

ENT ve EMT için elde edilen yüksek eğim değerleri (121708 ve 78144), bu analitler için yöntemin daha yüksek hassasiyete sahip olduğunu göstermiştir. Eğimlerin p değeri değerlerine bakıldığında, tüm analitler için değerler oldukça düşüktür (2.050×10^{-8} ile 1.160×10^{-20}). Bu da eğimlerin istatistiksel ($p < 0.05$) olarak anlamlı olduğunu ve dolayısıyla kalibrasyon eğrilerinin eğimlerinin tesadüfen oluşmadığını kanıtlamıştır.

Bununla birlikte, kesim değerlerinin p değerleri, 0.24 ile 0.81 arasında değişmekte ve istatistiksel ($p > 0.05$) olarak sıfırdan farklı olmadıklarını göstermiştir.

LOD ve LOQ değerleri, yöntemin hassasiyetini gösteren önemli parametrelerdir. LOD değerleri 0.02 ile 0.48 µg/mL arasında, LOQ değerleri ise 0.05 ile 1.45 µg/mL arasında değişmiştir (Tablo 4.3). Bu değerler, geliştirilen yöntemin eser

miktardaki analitleri bile tespit edebilecek ve ölçebilecek kadar hassas olduğunu göstermiştir. Ayrıca LOQ düzeyindeki kesinlik ve doğruluk değerlerinin %15'den küçük olması belirlenen LOQ değerlerinde doğru ve kesin analizler yapılabileceğini göstermektedir [85] (Tablo 4.4).

Kesinlik ve Doğruluk

Kesinlik değerlendirmesinde, gün içi ve günler arası BSS değerleri sırasıyla %0.06-%1.96 ve %0.01-%1.81 arasında değişerek, tüm analitler ve derişimler için kabul edilebilir sınırlar içerisinde kalmıştır (Tablo 4.4). Doğruluk, BH ve geri kazanım çalışmaları ile değerlendirilmiştir (Tablo 4.5). Gün içi ve günler arası BH değerleri sırasıyla -1.28 ile +1.13 ve -1.22 ile +1.33 arasında değişerek kabul edilebilir sınırlar içerisinde. Geri kazanım çalışmaları %98.12-%101.81 arasında sonuçlar vererek yöntemin analitleri matriksten doğru bir şekilde geri kazanabildiğini göstermiştir. Sonuç olarak, elde edilen tüm veriler, geliştirilen HPLC yönteminin yüksek doğrusallığa, hassasiyete, kesinliğe ve doğruluğa sahip olduğunu ve bu sayede antiviral ilaçların rutin analizlerinde güvenle kullanılabileceğini desteklemiştir.

Sağlamlık

Geliştirilen HPLC yönteminin sağlamlığı, gösterilen çeşitli parametreler ve bunların seviyelerinde yapılan küçük değişiklikler kullanılarak deneysel tasarım kullanılarak değerlendirilmiştir (Tablo 3.5 ve 3.6). Bu parametreler arasında hareketli fazdaki ACN yüzdesi, pH, akış hızı, kolon sıcaklığı ve tampon derişimi yer almaktadır. Bu parametreler, -1, 0 ve +1 seviyelerinde değiştirilmiş ve analitlerin alıkonma zamanlarına olan etkileri incelenmiştir. Tablo 4.6'da sunulan p değerleri, bu derişimlerin analitlerin alıkonma zamanları üzerindeki istatistiksel anlamlılığını değerlendirmek için kullanılmıştır. Sonuç olarak, sabit faktörün p değeri tüm analitler için <0.000 iken, diğer tüm parametrelerin p değerleri analitten analite değişmekle birlikte, genellikle 0.05'ten yüksek değerlerdir. Sadece organik faz yüzdesinin GAN'ın ayırımında etkili bir parametre ($p=0.031$) olduğu görülmüştür. Diğer analitler için ise 0.05 ten yüksek değerler vermiştir. Hiçbir analitte tampon derişimi, akış hızı ve sıcaklık parametreleri anlamlı bir etki göstermemiştir.

Bu sonuçlar genel olarak, geliştirilen yöntemin, test edilen deneysel parametreler için düşük değişkenliğe sahip olduğunu ortaya koymuştur. Özellikle tampon derişimi, pH, akış hızı ve sıcaklık gibi parametrelerin küçük değişimlerinin alıkonma zamanları üzerinde anlamlı bir etkisi olmaması, yöntemin bu faktörlere karşı oldukça sağlam olduğunu ve küçük yöntemsel varyasyonlara karşı dayanıklı olduğunu göstermiştir. Ancak, organik faz yüzdesinin bazı analitlerde anlamlı etkiye sahip olması, bu parametrenin kontrol altında tutulmasının yöntem güvenilirliği açısından önemini vurgulamıştır.

Antivirallerin Farmasötik Dozaj Şekillerinden Analizleri

Geliştirilen HPLC yöntemi farmasötik dozaj şekillerine uygulanmış ve elde edilen kromatogramlar ve analiz sonuçları sırasıyla Şekil 4.8 ve Tablo 4.7’de verilmiştir. Analiz sonuçları incelendiğinde %BH ve %BSS değerlerinin sırasıyla %3 ve 1.76’dan küçük olduğu görülmüştür. Bu değerler yöntemin doğru, kesin ve ve tekrarlanabilir sonuçlar üretebildiğini göstermiştir.

Yöntemin Yeşillik, Mavilik ve Beyazlığı

Şekil 4.9’da sunulan sonuçlar, geliştirilen HPLC yönteminin sürdürülebilirlik özelliklerini kapsamlı bir şekilde değerlendirmek için kullanılan üç farklı yöntemin bulgularını göstermektedir. Bu yöntemler, yöntemin çevresel etkisini (Yeşillik), pratik uygulanabilirliğini (Mavilik) ve genel sürdürülebilirlik profili (Beyazlık) ayrı ayrı ele alınmıştır.

Geliştirilen yöntemin Yeşillik değerlendirmesi için AGREE ve AGREEprep hesaplama araçları kullanılmıştır. AGREE puanı 0.79 olarak bulunurken, AGREEprep puanı 0.59 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.9A ve B). AGREE skoru, yöntemin çevresel etkiyi azaltma prensipleriyle uyumunu değerlendirirken, AGREEprep skoru ise numune hazırlama aşamasının Yeşilliğini ele almaktadır. Bu skorlar, her iki değerlendirme için de, 1'e ne kadar yakın olunursa, yöntemin o kadar çevreci olduğunu ifade etmektedir. Elde edilen bu değerler, geliştirilen HPLC yönteminin ve kullanılan örnek hazırlama aşamasının, önemli ölçüde sürdürülebilir ve çevre dostu olduğunu

göstermiştir. Özellikle AGREE sonucunun 0.79 olması, yöntemin Yeşillik prensipleriyle uyumluluğunun yüksek olduğunu göstermektedir.

Yöntemin pratik uygulanabilirliği ve verimliliği, BAGI (Blueness Assessment for Greenness of Analytical Methods) indeksi ile değerlendirilmiştir (Şekil 4.9C). BAGI değerlendirmesi, analitik yöntemin değerlendirme türü, analit sayısı, donanım gereksinimleri, numune etkinliği, hazırlanan numune gereksinimleri, analiz yüzdesi, kullanılan reaktifler/malzemeler, ön deriştirme ihtiyacı, otomasyon potansiyeli ve numune hacmi gibi pratiklik kriterlerini nicel olarak ele almaktadır. Yöntem için hesaplanan BAGI indeksi 85 olarak bulunmuştur (Şekil 4.9C). Bu sonuç, geliştirilen yöntemin yüksek verimlilik, düşük maliyet, kolay otomasyon ve pratik uygulanabilirlik potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir.

Yöntemin genel sürdürülebilirlik düzeyi, RGB12 algoritması kullanılarak belirlenmiş ve Şekil 4.9D sunulmuştur. Bu algoritma, yöntemin analitik performansı (kırmızılık), çevre dostu olma durumu (Yeşillik) ve pratik verimliliği (Mavilik) gibi çeşitli parametrelerini birlikte değerlendirerek yöntemin “Beyazlık” değerini, yani sürdürülebilirlik ilkelerine ne derece uygun olduğunu ortaya koymaktadır. Bu değerlendirme sonucunda elde edilen Beyazlık değeri 74.7 olarak tespit edilmiştir. Bu değer, geliştirilen yöntemin, Beyaz Analitik Kimya ilkeleriyle uyumlu olduğunu göstermiştir.

5.2. Plazmadan Antivirallerin Analizleri İçin LC-MS/MS Yöntemi

5.2.1. LC-MS/MS Yöntem Optimizasyonu

Antivirallerin LC-MS/MS ile analizlerinin gerçekleştirilmesi için ilk önce MRM parametreleri optimize edilmiş ardından kromatografik koşullar test edilmiştir. Optimum kromatografik şartların belirlenmesi için farklı özellikte analitik kolonlar, hareketli fazlar ve gradiyent elüsyon programları denenmiş ve analiz sonuçları değerlendirilmiştir.

Kromatografik ayırimda kullanılacak sabit fazın belirlenmesi amacıyla ilk olarak ters faz C18 denenmiştir. C18 ile yapılan analizlerde polar olan ASI çok erken elüe olmuştur. Ayrıca OSE ve LAM'ın ise C18 kolonda düşük polaritelerinden dolayı çok geç elüe olduğu görülmüştür. Tüm bu durumlardan dolayı C8 kolon sabit faz olarak seçilmiştir. Böylece ASI'in daha geç elüe olması sağlanırken OSE ve LAM'in daha erken elüe olması sağlanmıştır. Farklı gradient elüsyon programları test edilmiştir. ACN oranının %5'ten başlayıp %60'a çıktığı gradient elüsyon programı ile keskin pikler ve sağlıklı bir ayırım elde edilmiştir (Şekil 4.10).

Geliştirilen LC-MS/MS yönteminin uygunluğu on antiviralin alıkonma zamanı, ayırıcılığı, enjeksiyon tekrarlanabilirliği, kapasite faktörü, kuyruklanma faktörü ve teorik tabaka sayısı esas alınarak değerlendirilmiştir (Tablo 4.9). Sistem uygunluk testi için antivirallerin 1 µg/mL derişimdeki standart karışım çözeltisinin altı tekrarlı enjeksiyonu sonucunda elde edilen veriler kullanılmıştır. Elde edilen değerler kabul ölçütleri (kapasite faktörü>2, kuyruklanma faktörü≤1.5, ayırıcılık ≥1.5 ve teorik tabaka sayısı>2000) içinde (GAN'ın kapasite faktörü hariç) bulunmuş olup sistemin hedeflenen antivirallerin analizi için uygun olduğu belirlenmiştir.

5.2.2. SPME Yöntem Optimizasyonu

Fiber Seçimi

Antivirallerin plazmadan en yüksek verimde analizlerini gerçekleştirebilmek için 5 farklı sorbent içeren SPME fiberleri kullanılmıştır. Bu bağlamda, HLB, HLB-SAX, HLB-SCX, PDVB ve PMAA fiberleri antiviral ilaçlar (ASI, EMT, ENT, LAM, LOP, OSE, VAL ve VLG) için test edilmiştir. Analizler sonucunda elde edilen alan değerleri ölçeklendirilerek karşılaştırılmıştır (Şekil 4.11). Her bir analit için, kullanılan fiber tipine bağlı olarak farklı tüketme verimi sergilediği görülmüştür. Özellikle HLB fiberinin, birçok analit için en yüksek verime ulaşarak, genel olarak en etkili tüketme performansını gösterdiği görülmüştür. HLB-SCX fiberi de bazı analitler (özellikle ASI ve ENT) için yüksek verim sunmuştur, ancak diğer analitler için etkinliği değişkenlik göstermiştir. PDVB ve PMAA fiberleri ise genel olarak daha düşük verim göstermiş ve bu nedenle tüm analitler için etkili bir seçenek olarak kabul edilmemiştir.

Bir yüzey aktif maddenin hidrofilik (su seven) ve lipofilik (yağ seven) özelliklerinin dengesini yapısında barındıran HLB fiberi ile yapılan analizlerde en yüksek verim VAL ve VLG maddelerinde alınmıştır. VAL ve VLG hidrofilik moleküller oldukları için HBL fiberinin hidrofilik bölgeleriyle hidrojen bağları, dipol-dipol ve iyon-dipol etkileşimleri gibi zayıf etkileşime girmişlerdir. HBL fiberinin hidrofilik-lipofilik dengesi ve fonksiyonel grupları, bu etkileşimlerin gücünü ve türünü pozitif yönde etkilemiştir.

ASI, EMT ve ENT zayıf bazik molekülleri pH durumuna bağlı olarak pozitif yüklü katyonlar haline gelebilmektedir. HBL-SCX fiberinin negatif yüklü sülfonat grupları, bu pozitif yüklü ilaç molekülleriyle iyon değiştirme etkileşimleri kurmuş ve böylece zayıf bazik özellik gösteren hidrofilik ASI, EMT ve ENT molekülleri en yüksek etkileşimi HBL-SCX fiberlerinde göstermişlerdir.

LOP, zayıf bazik bir molekül olduğu için, pH'a bağlı olarak pozitif yüklü bir katyon haline gelebilmektedir. Bu halde HBL-SAX fiberinin pozitif yüklü kuaterner amonyum grupları ile anyon değiştirme etkileşimi kuramaz fakat, yüksek pH değerlerinde LOP negatif yüklü bir anyon haline geldiğinde, HBL-SAX ile iyon değiştirme etkileşimi kurması mümkün olmuştur. Ayrıca LOP molekülünün hidrofobik kısımları HBL-SAX liflerinin hidrofobik kısımları ile etkileşime girmiştir. LOP, PDVB fiberinin hidrofobik yüzeyi ile hidrofobik etkileşimler ve van der Waals kuvvetleri gibi etkileşimler kurmuştur. LOP molekülünün hidrofobik yapısı PDVB lifleri ile güçlü etkileşimlere girmiştir. Zayıf bazik hidrofobik bir moleküle sahip olan LOP, diğerlerine göre PDVB ve HBL-SAX fiberleri ile daha yüksek bir etkileşime sahip olmuştur.

Bu deneysel bulgular, HLB ve HLB-SCX fiberlerinin, geniş bir antiviral ilaç yelpazesi için etkili birer seçenek olduğunu, ancak belirli analitler için diğer fiber türlerinin de dikkate alınabileceğini göstermiştir. Bu nedenle, optimizasyon çalışmaları için HLB ve HLB-SCX fiberleri seçilmiştir.

Desorpsiyon Çözeltisi Optimizasyonu

HLB ve HLB-SCX fiberleri için beş farklı desorpsiyon çözeltisi (A, B, C, D ve E) kullanarak desorpsiyon çözeltisinin etkileri incelenmiştir. Her iki fiber tipi için de desorpsiyon çözeltisi seçimine bağlı olarak analit geri kazanımları değişkenlik göstermiştir (Şekil 4.12). HLB fiberi ile yapılan tüketmelerde, ASI ve GAN analitleri için çözelti B'nin, ENT analiti için çözelti E'nin, diğer analitler için genellikle çözelti A'nın en yüksek normalize edilmiş alan değerlerine ulaştığı gözlemlenmiştir. HLB-SCX fiberi kullanıldığında ise, ASI, GAN, VLG ve VAL için çözelti B, LAM ve EMT için çözelti D, LOP için çözelti A, ENT, OSE ve MOL için çözelti E'nin daha iyi sonuçlar verdiği görülmüştür. Ancak genel olarak HLB fiberi HLB-SCX'e kıyasla daha yüksek geri kazanımlar sunmuştur. Ayrıca HLB-SCX fiberi iç standart olarak kullanılan MOL için yeterli düzeyde geri kazanım sağlamamıştır.

HLB fiberi, ikinci desorpsiyon sonuçlarına göre, HLB-SCX'e kıyasla daha düşük yüzdeli taşınma değerleri sergileyerek daha verimli bir ilk desorpsiyon adımı sunmuştur (Şekil 4.13). HLB fiberi ile LOP ve EMT neredeyse tamamen desorbe olurken, HLB-SCX fiberi ASI, VAL ve VLG için daha düşük performans göstermiştir. Bu da HLB'nin genel olarak daha dengeli bir desorpsiyon sağladığını ve HLB-SCX için bazı analitlerde desorpsiyon koşullarının optimize edilmesi gerektiğini göstermiştir.

Bu değerlendirmeler sonucunda, farklı analitler için farklı desorpsiyon çözeltileri optimizasyonu yapılabilsede, genel olarak HLB fiberi ile daha yüksek ve daha geniş analit yelpazesini kapsayan geri kazanımlar elde edildiği görülmüştür. Bu nedenle, HLB fiberi ile yapılan tüketmelerde çözelti A'nın, tüm analitler için kabul edilebilir düzeyde geri kazanımlar sunması ve bu doğrultuda analiz sürelerinin en aza indirilmesi amacıyla, sonraki analizlerde desorpsiyon çözeltisi olarak çözelti A'nın kullanılmasına karar verilmiştir.

Desorpsiyon Zamanı Optimizasyonu

Çözelti A kullanılarak HLB ve HLB-SCX fiberleri için farklı desorpsiyon zamanlarının geri kazanım üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir (Şekil 4.14). Her iki fiber tipi için de, desorpsiyon zamanının artması ile analit geri kazanımlarında genel olarak bir artış gözlenmekle birlikte, belirli analitlerde bu etki oldukça değişkenlik göstermiştir. Özellikle HLB fiberi için, LOP analiti desorpsiyon süresinin 30 dakikaya kadar artmasıyla normalize edilmiş alan değerlerinde önemli artışlar sergilemiştir. Ancak, diğer analitler için daha kısa desorpsiyon zamanlarında (30 dak veya daha az) da benzer geri kazanımlar elde edilmiştir. HLB-SCX fiberi ile yapılan desorpsiyon çalışmalarında ise, LOP, OSE, VAL ve VLG analitleri için 120 dakikalık desorpsiyon zamanlarında daha yüksek geri kazanımlar görülmüştür. Ancak, diğer analitlerde daha kısa sürelerde daha yüksek normalize edilmiş alan değerleri elde edilmiştir. Bu durum, farklı analitlerin desorpsiyon kinetiklerinin fiber tipine göre farklılık gösterdiğini işaret etmektedir.

Bu analizler genel olarak desorpsiyon zamanının optimizasyonunun analitlere özgü olarak yapılması gerekliliğini vurgulamaktadır. Ancak HLB fiberi ile 15 dakikalık desorpsiyon süresinin çoğu analit için kabul edilebilir geri kazanımlar sağladığı ve bu sürenin toplam analiz süresini kısaltma konusunda önemli bir avantaj sunması sebebiyle sonraki optimizasyon denemelerinde bu süre sabitlenmiştir.

Tüketme Fazının pH Optimizasyonu

Tüketme fazının pH değeri, antiviral fiberlerden geri kazanımı üzerindeki etkisini incelemiştir. Bu amaçla, farklı pH seviyelerinde (3.0, 5.0, 7.4 ve 9.0) tüketme işlemleri gerçekleştirilmiştir. Her bir antiviral için geri kazanımın pH değerine bağlı olarak önemli ölçüde değiştiği görülmüştür (Şekil 4.15). HLB fiberi kullanıldığında, ASI, LAM, GAN, ENT, EMT, VLG, VAL ve OSE için en yüksek normalize edilmiş alan değerleri genellikle pH 7.4'te elde edilirken, LOP için pH 5.0'da daha iyi geri kazanımlar sağlanmıştır. HLB-SCX fiberi için ise, pH 3.0'da LAM, pH 7.4'te ASI, GAN, ENT, EMT ve OSE, pH 9.0'da ise LOP, VAL ve VLG en yüksek geri

kazanımları göstermiştir. Bu durum, farklı analitlerin ve fiberlerin iyonik etkileşimlerinin pH'ya bağlı olarak farklılaştığını göstermiştir.

Bu sonuçlar, tüketme verimliliğinin, antivirallerin iyonlaşma durumu ve fiber yüzeyi arasındaki elektrostatik etkileşimlerden etkilendiğini göstermiştir. Bu nedenle, optimum tüketme koşulları için, her bir analitin asidik veya bazik karakterine göre optimum pH değerinin belirlenmesi önemlidir. Tüm analitler için tek bir pH değeri ile optimum sonuçlar alınamaması sebebiyle, çok yönlü bir yaklaşım izlenmiş ve geniş bir analit yelpazesini hedefleyen bir genel yöntem geliştirmek amacıyla, HLB fiberi için pH 7.4 ile çalışılmasına karar verilmiştir. Bu tercih, çoğu analit için kabul edilebilir geri kazanımların elde edildiği ve fizyolojik pH olması nedeniyle seçilmiştir.

Tüketme Zamanı Optimizasyonu

HLB fiberi kullanılarak plazmadan farklı ekstraksiyon sürelerinin (5, 15, 30, 60, 120 ve 240 dak) antivirallerin tüketme verimi üzerine etkisi incelenmiştir (Şekil 4.16). Grafik, tüketme süresinin artmasıyla birlikte bazı analitlerde (LOP ve OSE) geri kazanımlarda önemli artışlar görülse de, genel olarak çoğu analit için 30 dakikadan sonra verimin plato yaptığı ve uzun sürelerin daha fazla verimlilik artışı sağlamadığı görülmüştür (Şekil 4.16). LAM, , ENT, EMT ve VLG analitleri için en yüksek geri kazanımlar, genellikle 30 dakika veya daha kısa sürelerde elde edilirken, GAN ve LOP için 120, VAL ve OSE için 240 dakikalık ekstraksiyon süreleri daha iyi sonuçlar vermiştir. Bu sonuçlara dayanarak, 30 dakikalık bir ekstraksiyon süresi, birçok analit için yeterli geri kazanım sağladığı ve analiz süresini daha kısa tuttuğu için en uygun olarak belirlenmiş ve sonraki deneylere bu süre kullanılarak devam edilmiştir.

Seyreltme Etkisi

Seyreltme işlemi, iyonik şiddeti azaltmanın yanı sıra protein etkileşimlerini de zayıflatarak tüketim verimliliğini artırabilir. Ancak, seyreltme oranının belirlenmesinde analit derişimi ve matriks etkisi gibi diğer faktörler de dikkate alınmalıdır. En iyi sonuçları elde etmek için ekstraksiyon parametrelerinin optimize edilmesi önemlidir. Bu amaçla plazma örnekleri seyreltilmeden ve seyreltilerek

analizler gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.17). Seyreltmeden yapılan çalışmalarda daha yüksek bir normalize alan değeri elde edildiği için analizlerin plazma örnekleri seyreltilmeden uygulanmasına karar verilmiştir.

5.2.3. LC-MS/MS Yöntem Validasyonu

Geliştirilen SPME-LC-MS/MS yönteminin validasyonu sistem uygunluğu, kararlılık, duyarlılık, doğrusallık, kesinlik, doğruluk, seçicilik, sağlamlık, taşınma etkisi, matriks etkisi ve seyreltme etkisi ile değerlendirmiştir.

Sistem Uygunluğu

Geliştirilen LC-MS/MS yönteminin ASI, EMT, ENT, GAN, LAM, LOP, OSE, VAL ve VLG olmak üzere dokuz antiviral ilacın eş zamanlı analizi için sistem uygunluk parametreleri Tablo 4.9'da sunulmuştur. Sistem uygunluğu, analitik yöntemin tekrarlanabilirliği ve güvenilirliği açısından kritik bir öneme sahiptir. Tabloda yer alan veriler, t_R , k' , N, R_s ve TF gibi temel performans göstergelerini içermektedir.

Kapasite faktörü, analitin kolonda ne kadar süre tutulduğunu gösteren bir parametredir ve analitlerin çözünürlüğünü etkiler. Kapasite faktörü tüm analitler için 1.27 (GAN) ile 13.15 (FAV) arasında değişmektedir. Bütün değerlerin 1'den büyük çıkması analitlerin kolonda yeterince tutulduğunu göstermiştir. OSE ile en yüksek kapasite faktörüne sahip LOP analitlerinin çözünürlükleri ve kolon ile etkileşimleri diğer maddelere göre yüksek olmuştur.

Teorik plaka sayıları ise LOP için en yüksek 616737'den, VLG için en düşük 15474'e kadar değişmektedir. Genel olarak yüksek teorik plaka sayıları, kolon verimliliğinin iyi olduğunu ve keskin, iyi tanımlanmış pikler elde edildiğini göstermektedir.

Ayırıcılık değerleri, sistemin birbirine yakın elüsyon yapan bileşikler ayırma yeteneğini gösterir ve bu değerler 0.42 (LAM-ASI) ile 13.36 (OSE-LOP) arasında

değişmektedir. Genellikle 2'nin üzerindeki ayırıcılık değerleri, bazal ayırımın sağlandığını ve güvenilir nicel analiz için yeterli olduğunu gösterir. LC-MS/MS sisteminde çoklu dalga boylarında eş zamanlı gözlem yapılabildiği için ayırıcılık hayati bir öneme sahip olmamıştır.

Kuyruklanma faktörü değerleri, pik simetrisinin kabul edilebilir sınırlar (ideal olarak 1.0 civarında) içerisinde olduğunu göstermektedir. Özellikle VLG (1.33) ve EMT (1.34) değerleri çok hafif bir kuyruklanmaya işaret etse de, diğer analitlerde gözlenen 1.14-1.31 aralığı kabul edilebilir düzeydedir. Sonuç olarak, sistem uygunluk parametrelerin geliştirilen LC-MS/MS yönteminin, dokuz antiviral ilacın eş zamanlı analizi için gerekli sistem uygunluğuna sahip olduğunu ve analitik performansının güvenilir ve tekrarlanabilir sonuçlar elde etmek için yeterli olduğu görülmektedir.

Seçicilik

Geliştirilen LC-MS/MS yönteminin seçiciliği, Şekil 4.18'de sunulan kromatogramlar incelenerek değerlendirilmiştir. Bu kapsamda, LOQ düzeyindeki standart çözeltiler ve boş plazma örnekleri karşılaştırılmıştır. Boş plazma kromatogramlarında, hedef antiviralin alıkonma zamanlarında herhangi bir girişim pikine rastlanmamıştır. Bu bulgu, yöntemin seçici olduğunu ve matriks kaynaklı girişimlerden arınmış olduğunu, dolayısıyla endojen bileşenler veya yaygın kullanılan yardımcı maddeler nedeniyle yanlış pozitif sonuç riskini ortadan kaldırarak, hedef bileşikler biyolojik matrikslerde doğru bir şekilde ölçebildiğini doğrulamaktadır.

Kararlılık

Çalışmamızın ilk aşamasında geliştirilen HPLC yönteminde validasyon çalışmaları gerçekleştirilmeyen antiviral ilaçlar için yapılan kararlılık testleri, +4°C'de buzdolabında uzun süreli saklama koşullarında önemli bulgular sunmuştur. LC-MS/MS analizlerinde kullanılan ASI, OSE, LAM, MOL ve LOP 1.0 µg/mL derişimdeki su ve metanoldeki çözeltiler kullanılarak yapılan değerlendirmelerde, tüm antiviral ilaçların otomatik örnekleyici içerisinde en az 24 saat boyunca stabil kaldığı görülmüştür. Donma-çözülme kararlılığında bütün antivirallerin 3 döngü içerisindeki

miktarlarının %80'den büyük olduğu görülmüştür (Şekil 4.19). Bu da antivirallerin en az 3 döngü için kararlı olduğunu göstermiştir.

Duyarlılık

LOD ve LOQ değerleri, yöntemin hassasiyetini gösteren önemli parametrelerdir. LOD değerleri 0.02 ile 0.48 µg/mL arasında, LOQ değerleri ise 0.05 ile 1.45 µg/mL arasında değişmiştir (Tablo 4.11). LLOQ değeri sinyal ve gürültü değerinin en az 10 olduğu ve yeterli kesinlik ve doğruluğun sağlandığı (BH <%20 ve BSS <%20) değerler belirlenmiştir. Seçilen LLOQ düzeyindeki her bir antiviral için BSS ve BH değerleri Tablo 4.12'de verilmiştir.

Doğrusallık

Antiviral ilaçlar LOQ değerinden 1 µg/mL'ye kadar doğrusal olduğu görülmüş ve geliştirilen SPME-LC-MS/MS yöntemin doğrusallığı ANOVA analizi sonuçları ile değerlendirilmiştir (Tablo 4.11). Korelasyon katsayısı (R^2) değerleri, tüm analitler için 0.9901 ile 0.9994 arasında değişmekte olup, kalibrasyon eğrilerinin geniş bir derişim aralığında derişim ve alan oranları arasında doğrusal bir ilişki sergilediğini doğrulamıştır. Eğimlerin p değerleri (0.048 ile 9.3×10^{-8} arasında), regresyon modelinin eğiminin istatistiksel olarak anlamlı olduğunu ve bağımsız değişken (derişim) ile bağımlı değişken (alan oranı) arasında anlamlı bir ilişki olduğunu göstermiştir.

Kesinlik ve Doğruluk

Geliştirilen SPME-LC-MS/MS yönteminin genel olarak kabul edilebilir kesinlik ve doğruluk değerleri sergilediği görülmüştür (Tablo 4.12). Yöntem, birçok analit için hem gün içi hem de günler arası değerlendirmelerde, <%15 BH ve <%15 BSS olan kabul edilebilir sınırlar içinde kalmıştır.

Tablo 4.13'te sunulan plazmadan geri kazanım çalışmaları, geliştirilen SPME-LC-MS/MS yönteminin, test edilen antiviral ilaçların matriksten etkin bir şekilde geri

kazanılmasını sağladığını göstermiştir. Çoğu analit için geri kazanım değerleri, genellikle kabul edilebilir olarak değerlendirilen %85 ile %115 aralığında yer almıştır. Bu sonuçlar, geliştirilen yöntemin, antiviral ilaçların plazmadan güvenilir ve doğru sonuçlar sağlayarak analiz edilebileceğini göstermiştir.

Sağlamlık

Geliştirilen LC-MS/MS yönteminin sağlamlık çalışması deneysel tasarım ile gerçekleştirilmiştir (Tablo 3.5). Bu tablolarda, farklı faktörlerin (hareketli fazdaki ACN yüzdesi, pH, akış hızı ve kolon sıcaklığı) antiviral ilaçların alıkonma zamanları ve pik alanları üzerindeki etkileri incelenmiştir.

Genel olarak faktörlerin tamamının p değerleri 0.05'ten büyüktür (Tablo 4.14-15). Bu, test edilen faktörlerde yapılan küçük değişikliklerin alıkonma zamanları ve pik alanları üzerinde üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi olmadığını göstermiştir. Bu sonuçlar, geliştirilen LC-MS/MS yönteminin yüksek bir sağlamlığa sahip olduğunu ve analitik performansın, test edilen parametrelerdeki küçük değişikliklerden önemli ölçüde etkilenmediğini ortaya koymuştur.

Taşınma Etkisi

Taşınma etkisi, boş örnekteki kalan analiz maddesinin, en yüksek standardın derişimi ile karşılaştırılması ile hesaplanmıştır. Yöntem, ICH M10 kriterlerine göre validasyon sürecinden geçirilmiş ve taşınma etkilerinin kabul edilebilir eşik değerinin altında, genellikle en yüksek derişimin %5'inden az olduğu doğrulanmıştır.

Matriks Etkisi

Matriks etkisi parametresi plazmaya ve PBS çözeltilerinden eklenen antivirallerin analizleri sonucunda elde edilen geri kazanımlar üzerinden değerlendirilmiştir. Tüm antiviraller için geri kazanım değerlerinin %85 ile %106 arasında olması matriks etkisinin olmadığı göstermiştir (Tablo 4.13). Matriks etkisi özellikle endojen maddelerin varlığında analitlerin sinyallerinin değişmesine

(artma/azalma) neden olmaktadır. Matriks etkisi genellikle uygun numune hazırlama tekniği ile en aza indirilebilir. Tez çalışmasında örneklerin küçük hacimlerde ve seçici bir numune hazırlama tekniği ile hazırlanmış olması matriks etkisini en aza indirmiştir.

Seyreltme Bütünlüğü Etkisi

Plazmayla seyreltmeye bağlı olarak yapılan analizlerde geri kazanım değerleri %100 civarındadır (şekil 4.22). Bu durum geliştirilen yöntemin seyreltme işleminden etkilenmediğini göstermektedir.

Antivirallerin Hasta Plazmalarından Analizleri

 EMT, ikisi LAM kullanmakta olan beş hasta plazmasından alınan örneklere geliştirilen yöntem başarıyla uygulanmıştır. Plazmalarda EMT için 0.99 ile 0.12 ppm arası, LAM için 0.54 ve 0.60 ppm derişimleri llmştr.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmanın ilk aşamasında altı antiviral ilacın (EMT, ENT, FAV, GAN, VAL ve VLG) kromatografik davranışları incelenmiş ve farmasötik dozaj şekillerinden eş zamanlı nicel analizleri için valide edilmiş, hızlı ve oldukça etkili bir HPLC yöntem geliştirilmiştir. Optimize edilmiş yöntem, daha önce yayınlanmış yöntemlere kıyasla daha kısa sürede (8 dakika) içinde temel ayrımı başarmaktadır. Mükemmel doğrusalılık, hassasiyet, doğruluk, kesinlik ve sağlamlık göstererek, farmasötik ürünlerin rutin kalite kontrolü ve seri serbest bırakma testleri için oldukça uygulanabilir haldedir.

Yeşillik, Mavilik ve Beyazlığın kapsamlı değerlendirmeleri, yöntemin çevresel etki, pratiklik ve sürdürülebilirlik açısından güçlü performansını göstererek, antiviral analiz için sürdürülebilir ve etkili bir yaklaşım olarak potansiyelini vurgulamaktadır.

Yöntem, ticari olarak temin edilebilen farmasötik formülasyonlara başarıyla uygulanmış ve temel antiviral ilaçların kalite kontrolü için pratik olarak uygunluğu doğrulanmıştır. Bu yaklaşım, güvenilirliği artırmış, analiz süresini azaltmış ve farmasötik kalite güvence iş akışlarında daha yüksek verim sağlamıştır.

Tezin ikinci kısmında ise dokuz antiviralin (ASI, EMT, ENT, GAN, LAM, LOP, OSE, VAL ve VLG) plazmadan analizi için SPME-LC-MS/MS yöntemi geliştirilmiş ve geçerli kılınmıştır. Antivirallerin plazmadan analizleri için farklı sorbentler denenmiş ve seçilen sorbentler ile ileri düzeyde optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen SPME fiberleri ile kısa sürede matriks etkisi olmadan analizler gerçekleştirilebilmiştir.

Geliştirilen analiz yöntemi biyoanalitik validasyon parametreleri açısından değerlendirildiğinde yöntemin dokuz antiviralin plazmadan analizi için doğrusal, duyarlı, kesin, doğru, seçici ve sağlam olduğu sonucuna varılmıştır.

Optimize edilen SPME-LC-MS/MS yöntemi Hacetepe Üniversitesi Enfeksiyon Hastalıklarında tedavi görenlerden alınan plazma örneklerinde

gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen SPME-LC-MS/MS yöntemi klinik laboratuvarlarda antvirallerin rutin analizlerinde kolaylıkla kullanılabilir bir yöntemdir. İlaç kan düzeyinin belirlenmesi hastalarda doz sıklığının belirlenmesine ve hastaların etkin tedaviye ulaşmasına katkı sağlayabilecektir.

7. KAYNAKLAR

1. Prescott, L.M., *Highlights of the 42nd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC)*. Body Posit, 2002. 15(7): p. 16-20.
2. Şahin, F. and S. Demir, *Virüsler, viral pandemileri etkileyen faktörler ve sonuçları*. Muzaffer Şeker, Ali Özer ve Cem Korkut. Türkiye Bilimler Akademisi, 2020: p. 55-76.
3. De Clercq, E. and G. Li, *Approved Antiviral Drugs over the Past 50 Years*. Clin Microbiol Rev, 2016. 29(3): p. 695-747.
4. Chen, L., et al., *A hybrid method for prediction and repositioning of drug Anatomical Therapeutic Chemical classes*. Mol Biosyst, 2014. 10(4): p. 868-77.
5. organization, w.h. 2024; Available from: https://www.who.int/health-topics/cardiovascular-diseases#tab=tab_1.
6. *Turkish Medicines and Medical Devices Agency*. 2024 December 22; Available from: <https://www.titck.gov.tr/dinamikmodul/85>.
7. Patrick, G.L., *An introduction to medicinal chemistry*. 2023: Oxford university press.
8. Wohl, S., S.F. Schaffner, and P.C. Sabeti, *Genomic analysis of viral outbreaks*. Annual review of virology, 2016. 3(1): p. 173-195.
9. Xu, Y., Y. Chen, and X. Tang, *Guidelines for the diagnosis and treatment of coronavirus disease 2019 (COVID-19) in China*. Global Health & Medicine, 2020. 2(2): p. 66-72.
10. Mutlu, O., İ. Uygun, and F. Erden, *Drugs used in the treatment of coronavirus disease (COVID-19)*. 2020.
11. Locarnini, S. and S. Bowden, *Drug resistance in antiviral therapy*. Clinics in liver disease, 2010. 14(3): p. 439-459.
12. Griffiths, P.D., *A perspective on antiviral resistance*. J Clin Virol, 2009. 46(1): p. 3-8.
13. Shafer, R.W., S. Einav, and S.W. Chou, *Mechanisms of Resistance to Antiviral Agents*. Manual of Clinical Microbiology, 9th Ed, 2007: p. 1689-1704.
14. Zoulim, F. and S. Locarnini, *Management of treatment failure in chronic hepatitis B*. J Hepatol, 2012. 56 Suppl 1: p. S112-22.
15. Sheldon, J., E.C.R. Sarmiento, and V. Soriano, *[Resistance in hepatitis B virus]*. Enferm Infecc Microbiol Clin, 2008. 26 Suppl 7: p. 49-55.
16. Keefe, E.B., et al., *Chronic hepatitis B: preventing, detecting, and managing viral resistance*. Clin Gastroenterol Hepatol, 2008. 6(3): p. 268-74.
17. Hiscox, J.A., et al., *Shutting the gate before the horse has bolted: is it time for a conversation about SARS-CoV-2 and antiviral drug resistance?* J Antimicrob Chemother, 2021. 76(9): p. 2230-2233.

18. Demin, M.V., et al., [Resistance to antiviral drugs in human viruses from the subfamily Betaherpesvirinae]. *Vopr Virusol*, 2022. 67(5): p. 285-294.
19. Bartholomeusz, A. and S.A. Locarnini, *Antiviral drug resistance: clinical consequences and molecular aspects*. *Semin Liver Dis*, 2006. 26(2): p. 162-70.
20. Afani, S.A. and O.A. Gallardo, [Antiretroviral resistance in human immunodeficiency virus infection]. *Rev Chilena Infectol*, 2011. 28(5): p. 461-9.
21. Vcev, A., [Treatment of the side effects of antiviral therapy]. *Acta Med Croatica*, 2005. 59(5): p. 469-72.
22. Vcev, A., [Management of side effects during antiviral therapy]. *Acta Med Croatica*, 2009. 63(5): p. 463-7.
23. Othumpangat, S., S.D. Ray, and J.D. Noti, *Antiviral Drugs*. Side Effects of Drugs Annual: A Worldwide Yearly Survey of New Data in Adverse Drug Reactions, Vol 38, 2016. 38: p. 261-281.
24. Othumpangat, S. and J.D. Noti, *Antiviral Drugs*. Worldwide Yearly Survey of New Data in Adverse Drug Reactions, 2018. 40: p. 345-361.
25. Cani, E., T.E. Park, and R. Kavanagh, *Antiviral drugs*. Side Effects of Drugs Annual 41: A Worldwide Yearly Survey of New Data in Adverse Drug Reactions, 2019: p. 301-319.
26. *Cobicistat + elvitegravir + emtricitabine + tenofovir*. Two new drugs, but no progress. *Prescrire Int*, 2013. 22(142): p. 233-5.
27. Asirvatham, E.S., et al., *A review of Tenofovir Disoproxil Fumarate associated nephrotoxicity among People Living with HIV: Burden, risk factors and solutions*. *Clinical Epidemiology and Global Health*, 2024. 25.
28. Chen, E. and L. Xi, *Cardiovascular adverse effects of antiviral therapies for COVID-19: Evidence and plausible mechanisms*. *Acta Pharmacol Sin*, 2024.
29. Kim, S., et al., *PubChem 2025 update*. *Nucleic Acids Research*, 2025. 53(D1): p. D1516-D1525.
30. Knox, C., et al., *DrugBank 6.0: the DrugBank Knowledgebase for 2024*. *Nucleic Acids Res*, 2024. 52(D1): p. D1265-D1275.
31. Town, W.G., *The Merck index 13.2 CD-ROM edition from CambridgeSoft*. *J Chem Inf Comput Sci*, 2004. 44(5): p. 1883-5.
32. *Editorial: ChemSpider--a tool for Natural Products research*. *Nat Prod Rep*, 2015. 32(8): p. 1163-4.
33. *2007 Scifinder data calculated by using Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software V8.14 for Solaris ((C) 1994–2007 ACD/Labs)*.
34. Alam, P., et al., *Quantitative Analysis of Emtricitabine in Dosage Forms Using Green RP-HPTLC and Routine NP-HPTLC Methods—A Contrast of Validation Parameters*. *ACS omega*, 2020. 5(51): p. 33470-33477.
35. Droste, J., R. Aarnoutse, and D. Burger, *Determination of emtricitabine in human plasma using HPLC with fluorometric detection*. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 2007. 30(18): p. 2769-2778.

36. Gomes, N.A., et al., *Liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) method for simultaneous determination of tenofovir and emtricitabine in human plasma and its application to a bioequivalence study*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2008. 48(3): p. 918-926.
37. Gummaluri, R., T. Parthasarathi, and G. Anjanamadhulika, *Simultaneous method for determination of emtricitabine, tenofovir disoproxil fumarate, elvitegravir and cobicistat in tablets by HPLC*. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2016. 78(4): p. 532-7.
38. Jampala, R.R., V.K. Kumar, and A.R. Nemala, *Development and application of liquid chromatographic method for simultaneous determination of Elvitegravir, Tenofovir disoproxil fumarate, Emtricitabine, and Cobicistat in fixed dosage form*. Pharmaceutical Methods, 2014. 5(1): p. 7-13.
39. Jayapalu, K., H. Malipeddi, and A. Chinnasamy, *Chromatographic separation and in vitro dissolution assessment of tenofovir disoproxil fumarate, emtricitabine and nevirapine in a fixed dose combination of Antiretrovirals*. Journal of Applied Pharmaceutical Science, 2014. 4(11): p. 076-080.
40. Ramaswamy, A. and A.S.A.G. Dhas, *Development and validation of analytical method for quantitation of Emtricitabine, Tenofovir, Efavirenz based on HPLC*. Arabian Journal of Chemistry, 2018. 11(2): p. 275-281.
41. Zheng, J.-H., et al., *Quantitation of tenofovir and emtricitabine in dried blood spots (DBS) with LC–MS/MS*. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 2014. 88: p. 144-151.
42. Ashraf, M., et al., *HPLC Determination of Entecavir in Pure, Tablet Dosage Form and Spiked Plasma*. Journal of the Chemical Society of Pakistan, 2017. 39(1).
43. Kumar, B.R. and K. Subrahmanyam, *A New Validated Stability-Indicating RP-HPLC Method for the Determination of Entecavir*. Journal of Global Trends in Pharmaceutical Sciences, 2014. 5(3): p. 1833-38.
44. De Nicolo, A., et al., *UPLC-MS/MS method for the simultaneous quantification of anti-HBV nucleos(t)ides analogs: Entecavir, lamivudine, telbivudine and tenofovir in plasma of HBV infected patients*. J Pharm Biomed Anal, 2015. 114: p. 127-32.
45. Yao, L., et al., *Development and validation of sensitive methods for simultaneous determination of 9 antiviral drugs in different various environmental matrices by UPLC-MS/MS*. Chemosphere, 2021. 282: p. 131047.
46. Ali, S.N.S., et al., *Analytical method development and validation and forced degradation stability-indicating studies of Favipiravir by RP-HPLC and UV in bulk and pharmaceutical dosage form*. Journal of Pharmaceutical Research International, 2021. 33(48B): p. 254-271.
47. Bulduk, İ., *HPLC-UV method for quantification of favipiravir in pharmaceutical formulations*. Acta Chromatographica, 2021. 33(3): p. 209-215.
48. Marzouk, H.M., et al., *A novel stability-indicating HPLC-DAD method for determination of favipiravir, a potential antiviral drug for COVID-19 treatment;*

- application to degradation kinetic studies and in-vitro dissolution profiling.* Microchemical Journal, 2022. 172: p. 106917.
49. Mikhail, I.E., et al., *Green micellar solvent-free HPLC and spectrofluorimetric determination of favipiravir as one of COVID-19 antiviral regimens.* Microchemical Journal, 2021. 165: p. 106189.
 50. Onmaz, D.E., et al., *Development and validation of a sensitive, fast and simple LC-MS/MS method for the quantitation of favipiravir in human serum.* Journal of Chromatography B, 2021. 1176: p. 122768.
 51. V Duse, P. and K. G Baheti, *Bioanalytical method development and validation for the determination of favipiravir in spiked human plasma by using RP-HPLC.* Journal of Pharmaceutical Research International, 2021. 33(47A): p. 275-281.
 52. Sharaf, Y.A., et al., *Two Green Micellar HPLC and Mathematically Assisted UV Spectroscopic Methods for the Simultaneous Determination of Molnupiravir and Favipiravir as a Novel Combined COVID-19 Antiviral Regimen.* Molecules, 2022. 27(7).
 53. Alffenaar, J., et al., *Determination of ganciclovir and acyclovir in human serum using liquid chromatography-tandem mass spectrometry.* Journal of Applied Bioanalysis, 2018. 4(5): p. 175-186.
 54. Chu, F., et al., *A rapid, sensitive HPLC method for the determination of ganciclovir in human plasma and serum.* Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 1999. 21(3): p. 657-667.
 55. Dao, Y.-j., Z. Jiao, and M.-k. Zhong, *Simultaneous determination of aciclovir, ganciclovir, and penciclovir in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection.* Journal of Chromatography B, 2008. 867(2): p. 270-276.
 56. Dogan-Topal, B., B. Uslu, and S. Ozkan, *Development and validation of an RP-HPLC method for determination of valganciclovir in human serum and tablets.* Chromatographia, 2007. 66: p. 97-101.
 57. Heinig, K., et al., *Determination of Ganciclovir and its prodrug Valganciclovir by hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry.* Journal of Chromatography B, 2011. 879(5-6): p. 436-442.
 58. HG, S., *New uv spectrophotometric method for development and validation of valganciclovir hydrochloride in bulk and pharmaceutical dosage forms.* International Journal of Chemical & Pharmaceutical Analysis, 2020. 7(2).
 59. Kumar, R.S., et al., *Development of a RP-LC method for a diastereomeric drug valganciclovir hydrochloride by enhanced approach.* Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 2012. 70: p. 101-110.
 60. Mondal, S., et al., *A New Stability Indicating Ultra Performance Liquid Chromatography-PDA Method for the Estimation of Valganciclovir in Bulk and Tablet Dosage Form.* Pharmaceutical Methods, 2018. 9(2).
 61. Perrottet, N., et al., *Determination of aciclovir and ganciclovir in human plasma by liquid chromatography-spectrofluorimetric detection and stability studies in blood samples.* Journal of Chromatography B, 2007. 852(1-2): p. 420-429.

62. Sanlı, S., N. Sanlı, and C. Lunte, *Determination and validation of capillary electrophoretic and liquid chromatographic methods for concurrent assay of valganciclovir and lamivudine in pharmaceutical formulations*. *Current Pharmaceutical Analysis*, 2017. 13(1): p. 31-38.
63. Al Azzam, K.M., et al., *Assay and stability-indicating micellar electrokinetic chromatography method for the simultaneous determination of valacyclovir, acyclovir and their major impurity guanine in pharmaceutical formulations*. *Biomedical Chromatography*, 2010. 24(5): p. 535-543.
64. Ganesh, M., et al., *RP-HPLC estimation of valacyclovir HCl in tablet formulation*. *Asian Journal of Chemistry*, 2011. 23(3): p. 1317.
65. Holkar, G., et al., *Determination of assay and peak purity evaluation of acyclovir and valacyclovir by RP-HPLC method*. *Int. J. Theor. Appl. Sci*, 2012. 4: p. 56-65.
66. Palacios, M., et al., *Validation of an HPLC method for the determination of valacyclovir in pharmaceutical dosage*. *Journal of Liquid chromatography & related technologies*, 2005. 28(5): p. 751-762.
67. Sasanya, J., et al., *Analysis of the antiviral drugs acyclovir and valacyclovir-hydrochloride in tsetse flies (*Glossina pallidipes*) using LC-MSMS*. *Journal of Chromatography B*, 2010. 878(26): p. 2384-2390.
68. Yadav, M., et al., *Stability evaluation and sensitive determination of antiviral drug, valacyclovir and its metabolite acyclovir in human plasma by a rapid liquid chromatography-tandem mass spectrometry method*. *Journal of Chromatography B*, 2009. 877(8-9): p. 680-688.
69. Singh, O., et al., *Determination of valganciclovir and ganciclovir in human plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometric detection*. *Clin Biochem*, 2011. 44(10-11): p. 907-15.
70. RAO, N.M. and D.G. Sankar, *Simultaneous quantification of novel antiretroviral drug combination by stability-indicating high performance liquid chromatography method*. *Indian J Pharm Sci*, 2016. 78(6): p. 755-762.
71. Suzuki, K., et al., *Improvement of sensitivity and selectivity of high-performance liquid chromatography for anti-retroviral drugs (non-reverse transcriptase inhibitors) by diamond-electrode electrochemical and fluorescence detection*. *Journal of Chromatography A*, 2009. 1216(15): p. 3117-3121.
72. Jéssica Brandão Reolon, M.B., Sandra Elisa Haas, Eduardo André Bender, Marcelo Donadel Malesuik, Leticia Marques Colomé, *Development and validation of high-performance liquid chromatography method for simultaneous determination of acyclovir and curcumin in polymeric microparticles*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2018. 8(01): p. 136-141.
73. Zheng, J.H., et al., *Quantitation of tenofovir and emtricitabine in dried blood spots (DBS) with LC-MS/MS*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2014. 88: p. 144-151.
74. Ashraf, M., et al., *HPLC Determination of Entecavir in Pure, Tablet Dosage Form and Spiked Plasma*. *Journal of the Chemical Society of Pakistan*, 2017. 39(1): p. 1-5.

75. Hennion, M.C., *Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography*. J Chromatogr A, 1999. 856(1-2): p. 3-54.
76. Augusto, F., et al., *New materials and trends in sorbents for solid-phase extraction*. Trac-Trends in Analytical Chemistry, 2013. 43: p. 14-23.
77. Buszewski, B. and M. Szultka, *Past, Present, and Future of Solid Phase Extraction: A Review*. Critical Reviews in Analytical Chemistry, 2012. 42(3): p. 198-213.
78. Agatonovic-Kustrin, S., et al., *Solid-Phase Microextraction Techniques and Application in Food and Horticultural Crops*. Molecules, 2023. 28(19).
79. Zhang, Q., et al., *Solid-phase microextraction technology for in vitro and in vivo metabolite analysis*. Trends Analyt Chem, 2016. 80: p. 57-65.
80. Kaiser, R.E., Oelrich, E., , *Optimization in HPLC*. 1981, Germany.
81. Sadek, P.C., *Troubleshooting HPLC systems*. 2000: John Wiley & Sons. Inc.
82. Smith. R.M., *Gas and Liquid Chromatography in Analytical Chemistry*. . 1988, UK.
83. Krstulovic, A.M., Brown, P.R., , *Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography Theory, Practice and Biomedical Applications*. 1982, USA: John Wiley & Sons. Inc.
84. Hanai, T., *HPLC: a practical guide*. 1999, Cambridge: Royal Society of Chemistry.
85. Guideline, I., *Validation of analytical procedures Q2 (R2)*. ICH: Geneva, Switzerland, 2024.
86. Lendor, S., et al., *Solid phase microextraction-based miniaturized probe and protocol for extraction of neurotransmitters from brains in vivo*. Analytical chemistry, 2019. 91(7): p. 4896-4905.
87. Özyurt, E.G., et al., *A molecularly imprinted polymer as solid phase extraction sorbent for ketoprofen determination in water and artificial serum prior to HPLC*. Turkish Journal of Chemistry, 2022. 46(6): p. 1853-1865.
88. Migenda, J., et al., *Mesoporous Poly (divinylbenzene) Fibers Based On Crosslinked Nanoparticles*. Macromolecular Chemistry and Physics, 2018. 219(5): p. 1700471.
89. Guideline, I.H., *ICH guideline M10 on bioanalytical method validation and study sample analysis*. European Medicines Agency: Amsterdam, The Netherlands, 2023.
90. Causon, R., *Validation of chromatographic methods in biomedical analysis viewpoint and discussion*. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 1997. 689(1): p. 175-180.
91. Pena-Pereira, F., W. Wojnowski, and M. Tobiszewski, *AGREE-Analytical GREEnness Metric Approach and Software*. Anal Chem, 2020. 92(14): p. 10076-10082.

92. Wojnowski, W., et al., *AGREEprep—analytical greenness metric for sample preparation*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2022. 149: p. 116553.
93. Manousi, N., et al., *Blue applicability grade index (BAGI) and software: a new tool for the evaluation of method practicality*. Green chemistry, 2023. 25(19): p. 7598-7604.
94. Nowak, P.M., R. Wietecha-Posłuszny, and J. Pawliszyn, *White analytical chemistry: an approach to reconcile the principles of green analytical chemistry and functionality*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2021. 138: p. 116223.
95. Özen, G., E. Palaska, and E. Nemitlu, *Determination of Acidity Constant (pKa), Lipophilic Partition (LogP) and Distribution Coefficients (LogD) Values of Some 3-(2-Phenylethyl)-Tetrahydro-2H-1, 3, 5-Thiadiazine-2-Thione-5-Acetic Acid Derivatives*. Cumhuriyet Science Journal, 2024. 45(4): p. 673-682.

8. EKLER

EK-1: Sağlık Bilimleri Araştırma Etik Kurulu - Kurul Kararı

Tarih: 10/12/2024 16:39
Sayı: E-16969557-030-04-00003914524

00003914524

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ARAŞTIRMA ETİK KURULU

KURUL KARARI

<u>OTURUM TARİHİ</u>	<u>OTURUM SAYISI</u>	<u>KARAR SAYISI</u>
27.11.2024	2024/20	2024/20-74
Araştırma Numarası : SBA 24/1038		Değerlendirme Tarihi : 22.10.2024

Üniversitemiz Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Emirhan NEMUTLU'nun sorumlu araştırmacı olduğu, Doç. Dr. Ahmet Çağkan İNKAYA, Arş. Gör. Dr. Merve ARASLAN ile birlikte çalışacakları ve Uzm. Ecz. Mehmet Emre ÖZDEMİRHAN'ın doktora tezi olan, SBA 24/1038 kayıt numaralı "*Bazı Antiviral İlaçların Farklı Numune Hazırlama Teknikleri Kullanılarak Plazmadan Sıvı Kromatografisi ile Nicel Analizleri*" başlıklı araştırma önerisi gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup, 28 Kasım 2024 – 28 Mart 2025 tarihleri arasında geçerli olmak üzere etik açıdan **uygun bulunmuştur**.

Çalışma tamamlandığında sonuçlarını içeren bir rapor örneğinin Etik Kurulumuza gönderilmesi gerekmektedir.

Prof. Dr. Nüket
PAKSOY ERBAYDAR
Kurul Başkanı

Prof. Dr. Mehmet Özgür
UYANIK
Kurul Üyesi

Prof. Dr. Ayşe
KİN İŞLER
Kurul Üyesi

Prof. Dr. Burcu Balam
DOĞU
Kurul Üyesi

Prof. Dr. Tolga
YILDIRIM
Kurul Üyesi

Prof. Dr. İpek
GÜRBÜZ
Kurul Üyesi

Doç. Dr. Merve
BATUK
Kurul Üyesi

Doç. Dr. Gülten
IŞIK KOÇ
Kurul Üyesi

Doç. Dr. İbrahim Halil
ÖNCEL
Kurul Üyesi

Doç. Dr. Hayriye
HIZARCIOĞLU GÜLŞEN
Kurul Üyesi

Doç. Dr. Burcu
ERSÖZ ALAN
Kurul Üyesi

Dr. Öğr. Üyesi Melike Hacer
ÖZKAN
Kurul Üyesi

Dr. Öğr. Üyesi Müge
DEMİR
Kurul Üyesi

Dr. Öğr. Üyesi Güneş
GÜNER
Kurul Üyesi

Dr. Öğr. Üyesi Ekim
GÜMELER
Kurul Üyesi

Dr. Öğr. Üyesi Beren
KARAOSMANOĞLU
Kurul Üyesi

EK-2: Tez Çalışması Orijinallik Raporu

TEZİN TAM BAŞLIĞI: BAZI ANTİVİRAL İLAÇLARIN FARMASÖTİK DOZAJ ŞEKİLLERİNDEN VE PLAZMADAN SIVI KROMATOĞRAFISI İLE NİCEL ANALİZLERİ
 ÖĞRENCİNİN ADI SOYADI: MEHMET EMRE ÖZDEMİRHAN
 DOSYANIN TOPLAM SAYFA SAYISI: 122

ORIGINALITY REPORT

9%	8%	3%	3%
SIMILARITY INDEX	INTERNET SOURCES	PUBLICATIONS	STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1	acikbilim.yok.gov.tr Internet Source	3%
2	openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 Internet Source	3%
3	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 Internet Source	1%
4	openaccess.hacettepe.edu.tr Internet Source	1%
5	Mehmet Emre Özdemirhan, Gürkan Özen, Emirhan Nemitlu. "An RP-HPLC Method for the Simultaneous Analysis of Selected Antiviral Drugs", Chromatographia, 2025 Publication	1%

Exclude quotes On

Exclude matches < 1%

Exclude bibliography On

EK-3: Tez Çalışması Orijinlilik Raporu - Dijital Makbuz**Digital Receipt**

This receipt acknowledges that Turnitin received your paper. Below you will find the receipt information regarding your submission.

The first page of your submissions is displayed below.

Submission author: **Emre Özdemirhan**
Assignment title: **Emre Tez draft**
Submission title: **emre final**
File name: **ME_DoktoraTez0313.docx**
File size: **2.7M**
Page count: **121**
Word count: **25,114**
Character count: **168,373**
Submission date: **13-Mar-2025 10:10PM (UTC+0300)**
Submission ID: **2429458476**



9. ÖZGEÇMİŞ