



**ERDOSTEİN ETKİN MADDESİNİN HPLC İLE
FARMASÖTİK PREPARATLARDA MİKTAR TAYİNİ
VE ATIK SULARDAN KİTOSAN/PVA İLE
GİDERİLMESİ**

Muhammet Sefa YARALI
Analitik Kimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı
Prof.Dr. Alptuğ Atila

Yüksek Lisans Tezi-2024



SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Graduate School of Health Sciences

**ERDOSTEİN ETKİN MADDESİNİN HPLC İLE
FARMASÖTİK PREPARATLARDA MİKTAR TAYİNİ VE
ATIK SULARDAN KİTOSAN/PVA İLE GİDERİLMESİ**

Muhammet Sefa YARALI

**Analitik Kimya Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

**Tez Danışmanı
Prof.Dr. Alptuğ ATILA
İkinci Danışman
Öğr.Gör.Dr. Mehmet Semih BİNGÖL**

**ERZURUM
2024**

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	I
TEŞEKKÜR	IV
ÖZET	V
ABSTRACT	VI
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	VII
TABLolar DİZİNİ	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ	IX
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. ErdosteİN	3
2.1.1. ErdosteİN Kimyasal Yapısı.....	4
2.2. ErdosteİN İle Gerçekleştirilen Çalışmalar	4
2.3. Atık Sularda İlaçların Giderimi.....	8
2.3.1. İlaç Giderimi Üzerine Yapılan Çalışmalar.....	9
2.4. Spektroskopik Yöntemler.....	10
2.4.1. Elektromanyetik Spektrum.....	13
2.4.2. UV Görünür Bölge Spektroskopisi	16
2.4.3. Lambert-Beer Kanunundan Sapmalar.....	18
2.5. Cihaz	19
2.5.1. Tek-Işınlı Cihazlar	19
2.5.2. Çift-Işınlı Cihazlar	19
2.6. Türev Spektrofotometrisi Yöntemi	21
2.7. Kromatografik Yöntemler.....	25
2.7.1.Kromatografik Yöntemlerin Sınıflandırılması	26
2.7.2. Kromatografide Temel Kavramlar	32
2.8. Analitik Yöntem Geliştirme ve Validasyon	35

2.8.1 Doğrusallık ve Ölçüm Aralığı.....	35
2.8.2 Doğruluk	35
2.8.3. Sağlamlık	36
2.8.4. Kesinlik	37
2.8.5. Teşhis (LOD) ve Tayin Sınırı (LOQ).....	37
2.8.6. Seçicilik ve Duyarlılık.....	38
2.8.7. Ölçüm Belirsizliği	38
3. MATERYAL VE METOT.....	39
3.1. Kimyasal Maddeler ve Malzemeler	39
3.2. Kullanılan Cihazlar	39
3.3. HPLC Yöntem Şartları.....	39
3.3.1. HPLC Yöntem Geçerlilik Testleri	40
3.3.1.1. Doğrusallık ve Çalışma Aralığı.....	40
3.3.1.2. Doğruluk/Kesinlik ve Geri Kazanım.....	40
3.3.1.3. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Miktar Tayin Alt Sınırı (LOQ).....	41
3.3.1.4. Kapsül Çözeltilerin Hazırlanması	41
3.3.1.5. Stres Testi.....	41
3.4. Adsorpsiyon Çalışması	41
3.4.1. Adsorbentin (Kitosan /Polivinil Alkol) Hazırlanması.....	41
3.4.2. Adsorbentin Karakterizasyonu.....	42
3.4.3. Adsorpsiyon Çalışması.....	42
4. BULGULAR.....	43
4.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC) Yöntemi Geliştirme	43
4.2. HPLC Yöntem Geçerlilik Testleri	43
4.2.1. Doğrusal Aralık ve Kalibrasyon Eğrisi	43
4.2.2. Kararlılık (Stabilite)	44
4.2.3. Doğruluk/Kesinlik.....	45

4.2.4. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Miktar Tayin Alt Sınırı (LOQ).....	46
4.2.5. Analitik Geri Kazanım	46
4.2.6. Stres Çalışmaları	47
4.3. Adsorpsiyon Çalışmaları.....	47
5. TARTIŞMA.....	50
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	54
KAYNAKLAR	55
EKLER	61
EK-1. Etik Bildirim ve İntihal Beyan Formu.....	61
EK-2. Etik Kurul Onay Formu.....	62
EK-3. Tez Adı Değişikliği Bildirim Formu	63

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi, fikir ve tecrübelerinden faydalandığım, sabırla yolumu aydınlatan, çok sevdiğim, örnek aldığım saygıdeğer danışman hocam Sayın Prof.Dr. Alptuğ Atila'ya en derin saygı ve şükranlarımı sunarım.

Tez çalışmamın her aşamasında değerli katkıları, görüş ve önerileriyle her türlü yardım ve desteğini gösteren ortak danışman hocam Sayın Öğr.Gör.Dr. Mehmet Semih Bingöl'e tezime yapmış oldukları katkılardan dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Bununla birlikte cihaz çalışmalarında her türlü desteğini gösteren Sayın Öğr.Gör.Dr. Hasan CAN'a sonsuz şükranlarımı sunarım. Son olarak her daim yanımda olan desteğini hiç eksik etmeyen eşime sevgi ve şükranlarımı sunarım.

Muhammet Sefa Yaralı

ÖZET

Erdosteine Etkin Maddesinin HPLC İle Farmasötik Preparatlarda Miktar Tayini ve Atık Sulardan Kitosan/PVA İle Giderilmesi

Amaç: Bu çalışmada, erdosteine standart çalışma çözeltilerinde ve kapsüllerde miktar tayini için HPLC yöntemlerinin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca atık sulardaki erdosteine'in giderimi için kitosan/pva adsorbentleri kullanılarak zamana bağlı olarak adsorplanma miktarları, geliştirilen HPLC yöntemi ile belirlenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot: Bu çalışmada geliştirilen HPLC yönteminde C18 (Zorbax;150 x 4.6 mm, 5 µm) kolonu, metanol-su (0.01 M Asetik asit)(65:35, V:V)'dan oluşan hareketli faz, 0.4 mL /dk akış hızı, 235 nm dalga boyu ve 5 µL enjeksiyon hacminden oluşan çalışma parametreleri kullanıldı. Bu parametreler belirlenirken öncelikle literatürdeki veriler incelendi ve böylelikle en uygun parametreler tayin edildi. Yönteminin 0.1-25 µg/mL derişim aralığında doğrusal olduğu belirlendi. Stok çözeltiden 0.1, 0.5, 1, 5, 10 ve 25 µg/mL derişimlerinde bir seri standart erdosteine çözeltisi hazırlandı ve HPLC'de kromatogramları alındı. Atık sulardan erdosteine giderimi için adsorbent olarak kitosan/pva kullanıldı. Buna göre adsorpsiyon işlemi zaman bağlı olarak 5, 10, 20, 40 ve 80 dk gerçekleştirildi. Sonrasında elde edilen çözeltilerde ki erdosteine miktarı HPLC ile belirlendi.

Bulgular: Her bir çözeltinin derişimine karşı erdosteine pik alanını grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi elde edildi. Kalibrasyon eğrisinin regrasyon analizinden, regrasyon doğrusunun denklemi $y = 14.33x + 0.6505$; erdosteine etkin maddesi için korelasyon katsayısı (r) 0,9997 olarak belirlendi. Yöntemin LOD değeri 0.03 ve LOQ değeri 0.01 olarak belirlenmiştir. Gün içi doğruluk ve kesinlik çalışmalarında %BH ve %BSS sırasıyla % 6.5 ve %0.387 olduğu belirlendi. Geçerlilik testleri yapılan yöntemin erdosteine içeren Erdostin kapsül uygulaması ile geri kazanım değerleri %99.8 olduğu bulunmuştur. Adsorpsiyon işleminde ise 5-80 dk'larında sırasıyla 5.67, 11.47, 32.22, 76.25 ve 76.8 yüzde erdosteine giderimi sağlanmıştır. Buna göre 80 dk sonunda 76.8 ile en yüksek adsorplanma yüzdesine ulaşılmıştır.

Sonuç: HPLC ile gerçekleştirilen çalışmalarda erdosteine etkin maddesinin farmasötik preparatlarda miktar tayini başarılı bir şekilde yapıldı ve bu yöntemler geliştirilip geçerlilik testleri yapıldı. Hassas, duyarlı, seçici, doğru ve kesin olduğu validasyon çalışmalarıyla gösterildiğinden dolayı yöntemlerin farmasötik preparatlarda kalite kontrol amaçlı çalışmalarda başarıyla uygulanabilir olduğu sonucuna varıldı. Ayrıca bu yöntemin adsorpsiyon sonrası miktar tayinin de kullanılabildiği belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Adsorpsiyon, Erdosteine, farmasötik preparat, HPLC Kitosan/PVA

ABSTRACT

Quantity Determination of Erdosteine Active Ingredient in Pharmaceutical Preparations with HPLC and Removal from Wastewater with Chitosan/PVA

Aim: In this study, it was aimed to develop HPLC methods for the determination of erdosteine in standard working solutions and tablets. In addition, it was aimed to determine adsorption rates depending on time by using chitosan/pva adsorbents for the removal of erdosteine in wastewater by the developed HPLC method.

Materials and Methods: In the HPLC method developed in this study, the C18 (Zorbax; 150 x 4.6 mm, 5 μ m) column uses a mobile phase consisting of methanol-water (0.01 M Acetic acid)(65:35, V:V). Operating parameters consisting of a flow rate of 0.4 mL/min, a wavelength of 235 nm and an injection volume of 5 μ L were used. While determining these parameters, firstly the data in the literature were examined and thus the most appropriate parameters were determined. It was determined that the method was linear in the concentration range of 0.1-25 μ g/mL. A series of standard erdosteine solutions were prepared from the stock solution at concentrations of 0.1, 0.5, 1, 5, 10 and 25 μ g/mL and their chromatograms were taken on HPLC. Chitosan/pva were used as adsorbents for Erdosteine removal from wastewater. Accordingly, the adsorption process was carried out for 5, 10, 20, 40 and 80 min depending on the time. Afterwards, the amount of erdosteine in the obtained solutions was determined by HPLC.

Results: A calibration curve was obtained by plotting the erdosteine peak area against the concentration of each solution. From the regression analysis of the calibration curve, the equation of the regression line is $y = 14.33x + 0.6505$; The correlation coefficient (r) for the active substance erdosteine was determined as 0.9995. The LOD value of the method is determined as 0,03 and the LOQ value is 0.01. Intraday accuracy and precision studies, %BH and %BSS were determined to be 6.5% and 0.387%, respectively. The recovery values of the method, for which validity tests were performed, were found to be 99.8% with the application of Erdostin capsules containing erdosteine. In the adsorption process, 5.67, 11.47, 32.22, 76.25 and 76.8 percent erdosteine removal was achieved in 5-80 minutes, respectively. Accordingly, the highest adsorption percentage was reached at 76.8 at the end of 80 minutes.

Conclusion: In studies carried out with HPLC, the quantification of the active substance erdosteine in commercial preparations was successfully carried out, and these methods were developed and validity tested. It was concluded that the methods can be successfully applied in studies for quality control purposes in pharmaceutical preparations, since validation studies have shown that the methods are sensitive, sensitive, selective, accurate and precise. It has also been determined that this method can be used for post-adsorption quantification.

Key Word: Adsorption, chitosan/PVA, erdosteine, HPLC, pharmaceutical preparation.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

BH	: Bağıl hata
BSS	: Bağıl standart sapma
Erd	: Erdosteın
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
KOAH	: Kronik obstrüktif akciğer hastalığı
LOD	: Teşhis alt limiti
LOQ	: Tayin alt limiti
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre
mm	: Milimetre
nm	: Nanometre
UV	: Ultraviyole

TABLULAR DİZİNİ

<u>Tablo No</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1. Bir foton ve örnek arasındaki enerji alışverişini içeren spektroskopik tekniklere örnekler	15
Tablo 3.1. HPLC yöntem şartları	40
Tablo 4.1. Erdosteine kalibrasyon eğrisinin istatistiksel analiz değerleri.....	44
Tablo 4.2. Erdosteine'in HPLC yöntemi ile belirlenen kararlılık (stabilite) değerleri	45
Tablo 4.3. HPLC çalışmalarında erdosteine'in gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri.....	45
Tablo 4.4. HPLC yönteminin tablet çözeltilerinin analiz sonuçları.....	47
Tablo 4.5. Erdosteine'in stres şartlarında bozulma oranları	47
Tablo 4.6. Zamana bağlı erdosteine'in adsorplanma değerleri	48

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. Erdosteın'ın kimyasal yapısı.	4
Şekil 2.2. Elektromanyetik radyasyon düzlemi.	12
Şekil 2.3. Elektromanyetik spektrum.	14
Şekil 2.4. Bir fotonun bir atom veya molekül tarafından emilmesini ve yayılmasını gösteren basitleştirilmiş enerji diyagramı	15
Şekil 2.5. Birbirinden tamamen farklı ancak benzer renkte iki bileşiğin absorpsiyon spektrumları.	21
Şekil 2.6. UV türevi sıfır dereceli türev spektrumunun bir temsili	24
Şekil 2.7. Sıfır, birinci ve ikinci dereceden türev spektrumu	25
Şekil 2.8. Kolon kromatografisi	27
Şekil 2.9. İyon değiştirici kromatografisi	28
Şekil 4.1. Erdosteın'ın 5 µg/mL derişimde HPLC kromatogramı.....	43
Şekil 4.2. Erdosteın için HPLC yöntemi ile kullanılarak elde edilen kalibrasyon eğrisi	44
Şekil 4.3. Erdostin Kapsülün 25 µg/mL derişimindeki HPLC kromatogramı	46
Şekil 4.4. Adsorpsiyon sonrası zamana bağlı HPLC kromatogramı.	48
Şekil 4.5. Adsorbentin (Kitosan/PVA) FTIR analizi.....	49

1. GİRİŞ

Mukolitik ajanlar mukusun (balgamin) inceltilmesine ve akciğerlerden daha kolay atılmasına yardımcı olan ilaçlardır. Genellikle solunum yolu hastalıklarının tedavisinde kullanılırlar (Balsamo ve ark., 2010). Mukolitik ajanlar, mukusun içindeki viskoz bağları parçalayarak balgamin daha sıvı hale gelmesini sağlarlar. Bu, hava yollarının tıkanıklığını azaltır ve balgamin daha kolay atılmasına yardımcı olur. Mukolitik ajanlar genellikle kronik bronşit, KOAH, sinüzit ve diğer solunum yolu enfeksiyonları gibi durumların tedavisinde kullanılır (Decramer & Janssens, 2010). Ayrıca, kistik fibrozis gibi mukusun aşırı üretildiği genetik hastalıkların tedavisinde de etkilidirler. Örnek olarak kullanılan mukolitik Ajanlar: Asetilsistein, Erdostein, Guaifenesin, Bromheksin, Ambroksol (Hillas ve ark., 2013)

Erdostein, mukolitik (balmumu söktürücü) bir ilaç olarak keşfedilmiştir. İlk olarak 1980'lerde İtalyan ilaç şirketi Edmond Pharma tarafından sentezlenmiştir. Erdostein'in kimyasal yapısı N-asetil-L-sistein'dir. Kimyasal formülü $C_8H_{11}O_4N_1S_2$ 'dir. Erdostein, sistein amino asidine benzeyen bir yapıya sahiptir ve mukolitik etkisini bu yapı üzerinden gösterir (Hillas ve ark., 2013). Mukolitik etkisi, mukusun içindeki disülfid bağlarını parçalayarak mukusun daha sıvı hale gelmesini sağlar. Bu, hava yollarının tıkanıklığını azaltır ve balgamin daha kolay atılmasını sağlar. Erdostein, diğer mukolitik ajanlara kıyasla birçok avantaj sunabilir (Moretti, 2007). Erdostein'in tercih edilme nedenlerinden bazıları: Erdostein, antioksidan özelliklere sahiptir. Serbest radikalleri nötralize ederek hücresel hasarı azaltabilir. Bu özellik, akciğerlerdeki inflamasyonu ve oksidatif stresi azaltarak hastalığın ilerlemesini yavaşlatabilir. Bununla birlikte erdostein'in anti-enflamatuar özellikleri vardır (Cazzola ve ark., 2010). Bu, akciğerlerdeki inflamasyonu azaltabilir ve hava yollarının açılmasına yardımcı olabilir. Erdostein genellikle iyi tolere edilir ve yan etkileri diğer mukolitik ajanlara kıyasla daha azdır. Erdostein, genellikle

diğer ilaçlarla etkileşime girme riski düşüktür ve çoğu hasta için güvenlidir (Dal Negro & Visconti, 2016).

Erdostein'in etkinliği ve güvenliği üzerine bir dizi klinik çalışma yürütüldü. Bu çalışmalar, ilacın mukolitik özelliklerini ve solunum yolu hastalıklarının tedavisindeki potansiyelini gösterdi. Erdostein, birçok ülkede solunum yolu hastalıklarının tedavisi için onaylanmıştır.

Bu çalışmada, erdostein etkin maddesinin farmosötik preparatlarda miktar tayini için yeni bir yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi geliştirilip geçerlilik testlerinin yapılması amaçlanmaktadır. Bu HPLC yöntemi ile erdostein içeren farmosötik preparatlarda erdosteinin miktar tayini yapılmıştır.

Atık sulardaki ilaçların çevreye zararlarını azaltmak için uygulanan birçok yöntem vardır. Bunlardan en etkili olan adsorpsiyon işleminde, adsorbentler kullanılarak sulardaki atık ilaçların giderimi sağlanmaktadır. Ayrıca bu çalışmada atık sulardaki erdostein'in giderimi için kitosan/PVA adsorbentleri de kullanılmıştır. Adsorpsiyon sonrası erdostein miktarı geliştirilen ve valide edilen HPLC yöntemi kullanılarak belirlenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Erdosteın

Mukolitik, mukusun (balgamin) inceltılması ve solunum yollarındaki mukusun daha rahat bir şekilde temizlenmesine yardımcı olan bir tür ilaç veya maddeyi ifade eder. Mukus, solunum yollarında normal olarak bulunan, balgam olarak adlandırılan bir salgıdır. Mukolitikler, bu mukusu incelterek, akışkan hale getirir ve böylece solunum yollarındaki tıkanıklıkların giderilmesine yardımcı olur (Dechant ve Noble, 1996).

Mukolitik ilaçlar genellikle solunum yolu enfeksiyonları, kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAHA), astım ve diğer solunum yolu hastalıklarının tedavisinde kullanılır. İlacın etkisi, mukusun kimyasal yapısını değiştirerek veya doğrudan mukusu incelterek sağlanır (King & Rubin, 2002). Bu, hastanın daha kolay nefes almasına ve balgamin daha etkili bir şekilde temizlenmesine yardımcı olabilir (Poole ve ark., 2012). Erdosteın, bir mukolitik ajan olarak sınıflandırılan bir etkin maddedir. Erdosteın, özellikle solunum yolu hastalıklarının tedavisinde kullanılır (Marchioni ve ark., 1990).

Erdosteın'ın bazı temel özellikleri şunlar olabilir:

1. Mukolitik Etki: Erdosteın, mukusun kimyasal yapısını değiştirerek mukusun daha akışkan hale gelmesine ve bu sayede solunum yollarındaki mukusun daha etkili bir şekilde temizlenmesine yardımcı olabilir (Moretti, 2007).

2. Antioksidan Özellikler: Erdosteın'ın antioksidan özellikleri de bulunmaktadır. Antioksidanlar, vücuttaki oksidatif stresle mücadele ederek hücreleri koruma potansiyeline sahiptir (Braga ve ark., 2000).

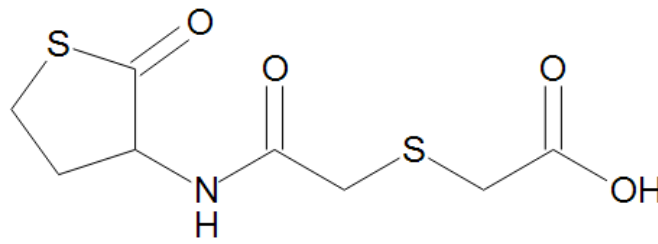
3. Solunum Yolu Hastalıkları: Erdosteın, genellikle kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAHA), kronik bronşit ve diğer solunum yolu enfeksiyonları gibi durumların tedavisinde kullanılır (Cazzola ve ark., 2020).

Erdostein akut ve kronik bronşit tedavisinde mukolitik olarak önerilmektedir. Erdostein, sisteinin yeni bir tiyol türevidir. Asetilsistein ile benzer mukolitik ve balgam söktürücü etkiye sahiptir. Serbest radikaller üzerinde azaltıcı bir etki in vitro olarak da gösterilebilir. Bu mukolitikler, muhtemelen mukoproteinlerin disülfid köprülerini azaltan ve onları sıvılaştıran tiyol gruplarına sahiptir. Bu nedenle mukolitik etki, mukoproteinlerin azaltılmış viskozitesine ve yapışkanlığına dayanır (Cazzola ve ark., 2010).

2.1.1. Erdostein Kimyasal Yapısı

Son zamanlarda, kronik solunum yolu hastalıklarında yaygın olarak kullanılan bir mukolitik olan erdosteinin [N-(karboksimetiltiyoasetil)-homosistein tiyolaktin] lakton halkasında bir tiyol grubuna sahiptir ve iki kükürt atomunun varlığıyla karakterize edilen bir ön ilaç molekülüdür (Moretti & Marchioni, 2007).

Doğal bir amino asit olan homosisteinin bir formu olan Erdostein, bu amino asidin Ntiolaktinik şeklidir. Acı, beyaz mikro kristalli ve toz görünümündedir. Kimyasal kapalı formülü $C_8H_{11}O_4N_1S_2$ 'dir. Kimyasal yapısı Şekil 2.1'de verilmiştir. Moleküler ağırlığı da 249.30'tir (Dechant & Noble, 1996).



Şekil 2.1. Erdostein'in kimyasal yapısı.

2.2. Erdostein İle Gerçekleştirilen Çalışmalar

Liu ve Ark. Erdostein içeren farmasötik preparatlarda erdostein ve safsızlıklarının tayin edilmesi için bir HPLC yöntemi geliştirmişler. Bu amaçla kromatografik ayırmada sabit faz olarak ters faz C18 kolon (250 mm × 4.6 mm id, 5 µm) kullanmışlardır.

254 nm’de çalışmışlardır. Hareketli faz olarak 1,0 mL/dakika akış hızında asetonitril-0,01 mol/l sitrik asit çözeltisi (v:v/13:87) kullanmışlardır. Burada var olan iki ana safsızlık, oksidatif bozunma ile elde edildikten sonra ODS kolon ile birbirinden ayrılmış sonrasında yarı preparatif HPLC ile bu maddeler toplanmıştır. Bu toplanan elüantlar çeşitli spektroskopik yöntemlerle belirlenmiştir. Erdosteinin üretim işleminde yeni bir safsızlık olan erdostein etil ester ($\{2\text{-okso-2-}[(2\text{-oksotetrahidro-3-tiyofenil) amino] etil\}$ sülfanil) tespit edilmiştir. Üretim esnasında solvent olarak etanol kullanıldığında başka bir safsızlığın, bir erdostein oksit olan ($\{2\text{-okso-2-}[(2\text{-oksotetrahidro-3-tiyofenil)amino]etil\}$ sülfanil) asetik asit tespit edilmiştir. Yaptıkları bu çalışmada erdostein için iki ana safsızlık izole edilmiş ve tanımlamışlardır (Liu ve ark., 2022).

Khalil ve ark. farmasötik preparatlarda ERD’in tayini için 4 ayrı kimyasal ile ERD’yi reaksiyona sokarak basit, hassas, ekonomik ve çevre dostu spektrofotometrik ve spektroflorimetrik yöntemler geliştirmişlerdir. Birinci yöntemde, güçlü oksitleyici ajan olan potasyum permanganat ERD’ye eklenmiştir. ERD’nin üzerine potasyum permanganat ilave edildikten sonra 600 nm dalga boyunda ölçüm almışlardır. İkinci yöntemde başka bir oksitleyici madde olan serik amonyum sülfat kullanmışlardır; serik amonyum sülfat 320 nm’de ölçüldüğünü belirlemişlerdir. Benzer şekilde, üçüncü yöntem’de serik amonyum sülfat kullanmışlardır. ERD, Seryum (III) iyonları ile reaksiyona girdikten sonra sırasıyla $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ 255/355 nm dalga boylarında tayinler yapılmıştır. Dördüncü yöntem’de ise akriflavine ERD’ne eklenerek doğal floresansında bir azalma sağlamışlardır. Bu yöntemlerin ERD analizi yapılırken kalibrasyon eğrisi 10–100 $\mu\text{g/mL}$ aralığında çizilmiştir. LOD değeri 0.179 belirlemişlerdir (Khalil ve ark., 2023).

Önal ve Tekkeli, plazmada erdostein için HPLC-FL kullanarak yeni bir analitik yöntem geliştirmişlerdir. Erdostein’in, 4-bromometil-7-metoksi kumarin (BrMmC) ve

dibenzo-18 reaksiyon katalizörü olarak kullanılarak türevlenmesi sağlanmıştır. Erdosteine için, eksitasyon dalga boyu 325 nm ve emisyon dalga boyu 390 nm olduğunu floresans dedektör ile tespit edilmiştir. Ters faz C18 (150x4.6 mm'lik, 3 µm) kolon sabit faz olarak kullanılmışlardır. Hareketli faz olarak Metanol:asetonitril:su (30:30:40,v:v:v), 0.5 mL/dk akış hızında kromatografik ayırım sağlanmıştır. Kalibrasyon eğrisi 0,2–3,0 µg/mL aralığında, tespit limitini 0.015 µg/mL ve tayin limitini 0.05 µg/mL olarak bulmuşlardır. Ortalama geri kazanımı %87.33 ve bağıl standart sapmanın %4.4'ten az olduğu hesaplanmıştır (Onal ve Kepekci Tekkeli, 2020).

Kim ve Ark. insan plazmasında erdosteine tayini için HPLC-UV (220 nm) yöntemi geliştirmişlerdir. Plazmadan erdosteini ekstrakte etmek için %6.25 trikloroasetik asit ile deproteinasyon yapmışlardır. Karışım santrifüj edildikten sonra süpernatant kısmı CAPCELL PACK C18 (4.6 x 250 mm) kolonu kullanılarak ERD'den ayrılmıştır. Hareketli faz olarak fosfat-heptan sülfonat:asetonitrilden (5:95, v:v) (pH 2.0) oluşan tampon sistem kullanılmıştır. Citalone bir iç standart olarak kullanılmışlardır. Kalibrasyon eğrisi 0.999 korelasyon katsayısıyla 0.5–8 µg/mL derişimlerde doğrusal bulmuşlardır. LOQ değerini 0.5 µg/mL olarak bulmuşlardır (Kim ve ark., 2010).

Moustafa ve ark. ERD'nin asit ile bozundurulması sonucu oluşan bozunma ürünlerinin tespiti için dört farklı yöntem geliştirmişlerdir. İlk yöntemde, spektrumların 229 nm'de ve 10–70 µg/mL derişim aralığında birinci türev spektroskopisini kullanmışlardır. Ortalama geri kazanım 100.43 ± 0.977 bulmuşlardır. İkinci yöntem, 10–70 µg/mL derişim aralığında 227.4 ve 255 nm'de birinci türev spektrofotometrisine kullanarak geliştirmişlerdir. Ortalama geri kazanım, 227.4 ve 255 nm'de sırasıyla 99.65 ± 1.122 ve 100.02 ± 1.306 bulmuşlardır. Üçüncü yöntem, asit bozunma ürünlerinin varlığında erdosteine TLC'sinin kantitatif dansitometrik olarak kullanılmışlardır. Hareketli faz olarak metanol-kloroform-amonyak (7:3:0.01/v:v:v) kullanmışlardır. TLC

kromatogramlarını 235 nm'de taramışlardır. Bu yöntem ile erdosteini 2.4–5.6 µg/spot derişim aralığında ve ortalama geri kazanım yüzdesi %100.03 ± 1.015 bulmuşlardır. Dördüncü yöntemde ise erdosteinin asit bozunma ürünlerinin varlığında eşzamanlı olarak erdosteinin belirlenmesinde HPLC kullanılarak belirlemişlerdir. Hareketli faz su-metanolden (65:35/v:v) oluşmuştur. Erdosteinin kalibrasyon eğrisi, 10–80 µg/mL derişim aralığında doğrusallık göstermiş; ortalama geri kazanım yüzdesi %99.90 ± 1.207 bulmuşlardır (Moustafa ve ark., 2014).

Yaman ve Atila farmasötik preparatlarda erdostein tayini için hızlı, hassas, spesifik ultra performanslı sıvı kromatografisi-tandem kütle spektrometrik (UPLC-MS-MS) yöntemi geliştirmişlerdir. Kromatografik ayırımı C18 UPLC kolonu, 95A, 2.1 x 50 mm, 1.8 µm kullanılarak asetonitril (25:75/h:h) ile kombinasyon halinde %0,1 formik asit ile gerçekleştirmişlerdir. Akış hızı 0.15 mL/dk ve analiz süresi olarak 2.0 dk belirlemişlerdir. Kolon sıcaklığı 40°C ve enjeksiyon hacmi 5 µL'dir. Geliştirilen yöntemin Erdostein içeren kapsül formülasyonunun analizinde başarıyla uygulanmasını ve yöntemin rutin kalite kontrol analizleri için kullanılabileceğini göstermişlerdir (Yaman ve Atila, 2021).

Dhoka ve Ark. farmasötik preparatlarda Sefiksim Trihidrat ve Erdostein kombine farmasötik Dozaj Formlarında bunların belirlenmesi için basit, doğru, hassas ve hızlı, yüksek performanslı, ince tabaka kromatografik bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntemde sabit faz olarak silika jel ile önceden kaplanmış olan TLC alüminyum plakalar kullanmışlardır. Hareketli faz olarak Etil Asetat: Aseton: Metanol: Su (7.5:2.5:2.5:1.5/v:v:v:v) kullanmışlardır. Dansitometrik analizi 235 nm'de gerçekleştirmişlerdir. Sefiksim Trihidrat için geri kazanım yüzdesi 99.47-101.85, Erdostein için ise 98.99-101.51 olarak belirlenmiştir. Yöntemin gün içi ve günler arası tekrarlanabilir olduğu % bağıl standart sapma (RSD) ile hesaplanmıştır. Kesinlik ve doğruluğu sırasıyla 11.14 ng/bant ve 15.63

ng/bant olacak şekilde hesaplanmıştır. Yöntem, kombine kapsül dozaj formunun analizinde başarıyla uygulandığını bildirmişlerdir (Dhoka ve ark., 2013).

Monharo ve Ark. PDA detektörlü UPLC ile farmasötik preparatlarda sefiksim ve erdosteinin tayini, miktarının belirlenmesi için spesifik ve yeni bir yöntem geliştirmişlerdir. Geliştirmiş oldukları yöntemde, hareketli faz olarak metanol:su (%65:35, v/v) ve altı dakikalık analiz süresiyle Sunfire C18 analitik kolonu kullanılarak yapmışlardır. Hareketli fazın kolondan akışı 1.0 mL/dak ve numune hacmi 10 µL belirlemişlerdir. Saptama, foto diyot dizisi detektöründe 254 nm'de gerçekleştirilmiştir. Sefiksim için 20.0 ng/mL-200.0 ng/mL ve Erdostein için 30 ng/mL-300.0 ng/mL doğrusal aralığında incelenmiştir. Erdostein için korelasyon katsayısı (r^2) 1.000 olarak bulunmuşlardır. Sefiksim ve erdostein için LOQ değerleri sırasıyla 20 ng/mL ve 30 ng/mL bulunmuşlardır. Sefiksim ve erdostein için LOD değerleri sırasıyla 1.0 ng/mL ve 1.5 ng/mL bulunmuşlardır (Mohanrao ve ark., 2020).

2.3. Atık Sularda İlaçların Giderimi

Gelişen endüstri ve artan nüfus ile birlikte çevreye zararları atıklarda artmaktadır. Bunların atık sular ile birlikte çevreye salınması çevre ve insan sağlığı açısından önemli zararları vardır. Bu sebeple bunların verdiği zararları azaltmak için bazı çalışmalar yapılmaktadır. Atık sulardaki kirlilikleri gidermek için flokulasyon/koagülasyon, adsorpsiyon ve kimyasal oksidasyon gibi çeşitli fiziksel/kimyasal metotlarla, biyolojik arıtma gibi birçok yöntem vardır. Bunlardan en ekonomik ve etkilisi adsorpsiyon yöntemidir.

Farmasötik ürünler günlük yaşamımızda kullandığımız hastalıkların iyileşmesine ve yaşamın kolaylaştırmasına için kullanılmaktadır. Artan talepler nedeniyle ilaç fabrikaları hastaneler ve evlerden drenaj yoluyla çevreye çok kolay bir şekilde salınabilir. Çevre suları yoluyla toprak, bitki, hayvanlar ve insan sağlığını etkilemektedir. Farmösötik

ürünlerin çevre sularından arıtılması da büyük önem arz etmektedir. Bu nedenle bunların giderimi üzerine birçok çalışma yapılmıştır.

2.3.1. İlaç Giderimi Üzerine Yapılan Çalışmalar

Show ve ark. atık öncül demirhindi (TCAB) tohumundan türetilen ham biyokömürün (TRB) ve kimyasal olarak aktifleştirilmiş biyokömürün emici gücü sayesinde, sulu ortamda farmasötik mikro kirletici ibuprofen'i ortadan kaldırmak için incelemiştirler. TRB ve TCAB için maksimum uzaklaştırma yüzdesi, 3 saatlik temas süresi boyunca sırasıyla 40°C'de %72.29 ve 35 °C sıcaklıkta %95.44 bulmuşlardır (Show ve ark., 2020).

Bello ve ark. H₃PO₄ ile hindistan cevizi kabuğu (ACH) aktive edip ibuprofen'i (IBP) sulu çözeltiden adsorplanmasını incelemiştirler. Buna göre ACH'nin, IBP'nin sulu çözeltilerden uzaklaştırılmasında diğer adsorbanlara uygun bir alternatif olduğu tavsiye etmişlerdir (Bello ve ark., 2020).

Olszwoy ve ark. polipirol (PPy) ve politiyofen (PTh) adsorbentlerini kullanarak antibiyotik ilaçların insan plazmasından giderimi üzerine çalışmışlardır. Bu araştırmalarda polipirol lifleri için daha iyi bir adsorpsiyon kapasitesi elde etmişler ve dolayısıyla insan plazmasından yapılan ölçümlerde polipirol liflerini kullanmışlardır (Olszwoy ve ark., 2011).

Elbalkiny ve ark. hayvanlarda kullanılan antibiyotik olan sefalosporinlerin atık sulardan giderimi üzerine çalışmışlardır. Adsorpsiyon kinetiği ve izotermi de incelenmiştir ve deneysel sonuçlar, adsorpsiyon işleminin yalancı ikinci dereceden kinetik modeli ve Freundlich izotermini takip ettiğini belirlemişlerdir (Elbalkiny ve ark., 2019).

Zhang ve ark. kitosan/Fe₃O₄ kompozit parçacıklarının yüzeyine kopolimerizasyon aşılansak çekirdek fırça topolojisine sahip bir dizi manyetik kompozit adsorban

hazırlamışlar ve daha sonra iki farmasötik maddenin (diklofenak sodyum ve tetrasiklin hidroklorür) sudan uzaklaştırılması için uygulamışlardır. Farklı pH'larda tekli ve ikili çözünen çözeltilerden adsorpsiyon kapasiteleri, birlikte mevcut tuzların etkileri, desorpsiyon ve yeniden kullanılabilirlik dahil olmak üzere adsorpsiyon performansı değerlendirmesi sonucu uygun maliyetli bir adsorban olduğunu göstermişlerdir (Zhang ve ark., 2016).

2.4. Spektroskopik Yöntemler

Dünya ışığın gözlerimizdeki reseptörler ile etkileşimi sonucu görünür (Harvey, 2010). Daha sonra çevremizdeki nesnelere yansıtılır (veya bunlar aracılığıyla iletilir). Emilmeyen ışık gözümüze ulaşır (Hoppe ve ark., 2012). Çevremizin moleküler yapısına ilişkin bilgiyi de yanında taşır. Nesnelere her baktığımızda spektroskopik analiz gerçekleştiririz. Gözümüzde ışığı yansıtan, ileten, dağıtan ve soğuran bir ışık kaynağı, bir cisim ve dalga boyuna bağlı bir detektör bulunmaktadır (Ito ve ark., 2010). Spektroskopik çalışmalar için kullanılan cihaza spektrometre denir ve maddenin belirli bir özelliğinin dalga boyuna, frekansına veya radyasyon enerjisine karşı grafiğine spektrum adı verilir (Pelton ve McLean, 2000).

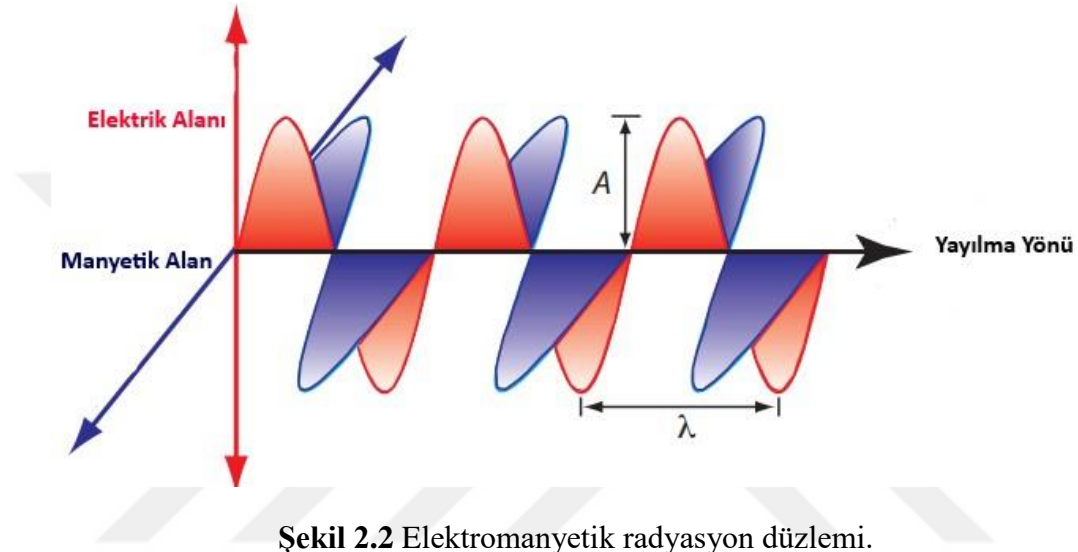
Spektroskopik yöntemler, makro ölçekli fiziksel olayların altında yatan karmaşık süreçlerin çoğunu aydınlatabilmektedir. Son yıllarda, artan çözünürlük ve hassasiyet sayesinde, nano ölçekteki ve altındaki dinamikler aşırı doğrulukla izlenebilmektedir (Baeten ve Dardenne, 2002). Malzemenin hassas ışık-madde etkileşimlerinden yararlanarak bilgi aktarmak, bir dizi uygulamaya ve temel fizik üzerine birçok çalışmaya yol açmıştır. Spektroskopik çalışmaların önemli bir alanı, parçacıkların ve moleküllerin titreşim hareketlerini incelemeyi içerir. Bunlar nano ölçekli dünyanın ilginç temel özelliklerini aydınlatmak için kullanılmıştır (Dardenne ve ark., 2000). Malzemelerin tanımlanmasına yönelik spektroskopi çalışmaları, sanat dünyası ve çevresel çalışmalar

dahil olmak üzere çok çeşitli alanlara dokunmuştur. Nano ölçekte üretilen cihazlar teknolojik gelişmelerde ön plana çıktıkça, bu ölçekteki davranışların tam bir tanımını geliştirmek giderek daha önemli hale gelmektedir. Amaç, yalnızca spektroskopik tekniklerin uygulama alanını genişletmek değil, aynı zamanda bunları kontrol ve endüstriyel laboratuvarlarda doğal olarak kullanmak ve tamamen doğrulanmış spektroskopik yöntemler geliştirmek olmalıdır (Li ve ark., 2000).

Spektrometrik teknikler, farklı frekansların etkileşimini ölçmek için kullanılır. Elektromanyetik radyasyonun bileşenleri ve maddenin bileşenleri birbirleri ile etkileşime girerler. Elektromanyetik radyasyonlar madde ile belirli enerji seviyelerinde etkileşime girer. Madde tarafından radyasyonlar emilir ve numunede bulunan analit bir enerji durumundan başka bir enerji durumuna geçer (Lee ve ark., 2017). Madde ve/veya madde ışıkla etkileşime girdiğinde, madde ve/veya maddeye değil, onun hayaletine bakmak mümkündür. Bunun yerine, ışığın madde ve/veya maddenin farklı serbestlik dereceleri ile etkileşimini gözlemleriz. Spektrofotometride, elektromanyetik radyasyonun madde ile etkileşiminden sonra ya absorpsiyonunu ya da emisyonunu ölçeriz. Spektrofotometri, Elektromanyetik radyasyonun farklı frekans bileşenlerinin madde ile nasıl etkileşime girdiğini anlamak için nasıl kullanabileceğimizi anlamak için kullanılır (Kumirska ve ark., 2010).

Elektromanyetik radyasyonun tam doğası, 20. yüzyılın ilk çeyreğinde kuantum mekaniğinin gelişiminden bu yana belirsizliğini korumuştur. Bununla birlikte, dalga ve parçacık davranışının çift modelleri, elektromanyetik radyasyon için kullanışlı bir tanım sağlar (Abdulhalim ve ark., 2008). Elektromanyetik radyasyon, uzay boyunca lineer bir yol boyunca ve sabit bir hızda yayılan salınımlı elektrik ve manyetik alanlardan oluşur. Bir vakumda elektromanyetik radyasyonun hızı (c), $2.997\ 92 \times 10^8$ m/s olan ışık hızında seyahat eder. Elektromanyetik radyasyon, bir vakum dışında başka bir ortamdan

geçtiğinde, hızı v , bir vakumda ışık hızından daha azdır. v ve c arasındaki fark (%0.1'den az) yeterince küçüktür, böylece üç önemli rakam için ışık hızı, 3.00×10^8 m/s, çoğu amaç için yeterince doğrudur. Elektrik ve manyetik alanlardaki salınımlar birbirine dik ve dalganın yayılma yönüne dik olarak gerçekleşir. Şekil 2.2, bir tek salınımlı elektrik alanı ve bir tek salınımlı manyetik alan içeren düzlem polarize elektromanyetik radyasyonun bir örneğini gösterir (Ball, 1994).



Şekil 2.2 Elektromanyetik radyasyon düzlemi.

Bir elektromanyetik dalganın hızı, genliği, frekansı, faz açısı, polarizasyonu ve yayılma yönü de dahil olmak üzere çeşitli temel özelliklere sahiptir. Örneğin, yayılan dalga boyunca herhangi bir noktada salınan elektrik alanının denklemini aşağıdaki gibidir:

$$A_t = A_e - \sin(2\pi vt + \Phi)$$

Burada A_t , t zamanındaki elektrik alanının büyüklüğüdür, A_e , elektrik alanının maksimum genliğidir, v dalganın frekansıdır (birim zaman başına elektrik alanındaki salınım sayısı) ve Φ bir faz açısıdır. Manyetik alan için aynı denklem şu şekildedir:

$$A_t = A_m - \sin(2\pi vt + \Phi)$$

Burada A_m manyetik alanın maksimum genliğidir. Diğer özelliklerde elektromanyetik radyasyonun dalga davranışını karakterize etmek için faydalıdır. Dalga boyu λ , ardışık maksimumlar arasındaki mesafe olarak tanımlanır. Ultraviyole ve görünür elektromanyetik radyasyon için dalga boyu genellikle nanometre ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$)

cinsinden ifade edilir ve kızılötesi radyasyon için mikron ($1 \mu\text{m} = 10^{-6} \text{ m}$) cinsinden verilir. Dalga boyu ile frekans arasındaki ilişki aşağıdaki gibidir (Ball, 1994):

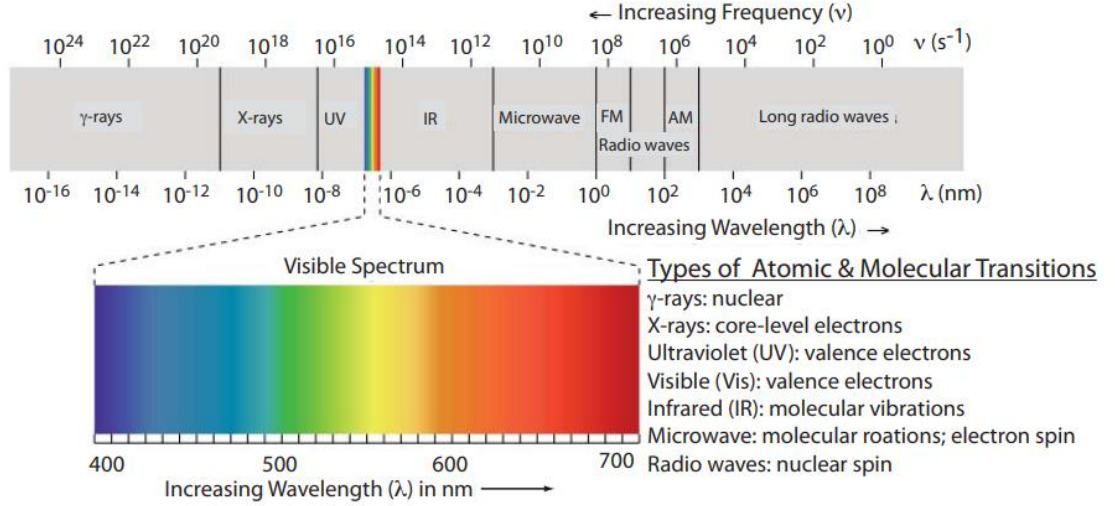
$$\lambda = \frac{c}{\nu}$$

Bir başka kullanışlı birim, dalga boyunun tersi olan dalga sayısı $\tilde{\nu}$ 'dur.

$$\tilde{\nu} = \frac{1}{\lambda}$$

2.4.1. Elektromanyetik Spektrum

Elektromanyetik spektrumun (EMS) kesin bir alt veya üst sınırı yoktur ve 10^{-14} m dalga boyuna sahip ikincil kozmik ışıklardan 10^8 m dalga boyuna sahip uzun AC devrelerine kadar uzanan radyasyonu temsil eder. EMS genellikle kozmik radyasyon, X radyasyonu (X ışınları), ultraviyole radyasyon (UVR), görünür spektrum (VIS) radyasyonu, kızılötesi (IR) radyasyon, mikrodalga (MW) radyasyon ve radyo frekansı (RF) radyasyonu olarak ayrılır (Şekil 2.3). Aynı faza sahip bir ışık dalgasında iki nokta arasındaki mesafe dalga boyunu λ tanımlar. Dalga boyunun ölçü birimi 10^{-9} m 'ye eşit olan nanometredir (nm). Geçmişte dalga boyunu belirtmek için kullanılan Angstrom (A), mikron (μm) ve milimikron (mm) gibi birimler nanometreye dönüştürülecektir. Dönüştürme amacıyla, $10 \text{ A} = 1 \text{ nm}$ 'ye, $1 \text{ mm} = 10^3 \text{ nm}$ 'ye ve $1 \text{ mikron} (\mu\text{m}) = 10^3 \text{ nm}$ 'e eşittir. Elektromanyetik spektrumun bölgeleri arasındaki sınırlar katı değildir ve spektral bölgeler arasında örtüşme mümkündür (Norgard ve Best, 2017).

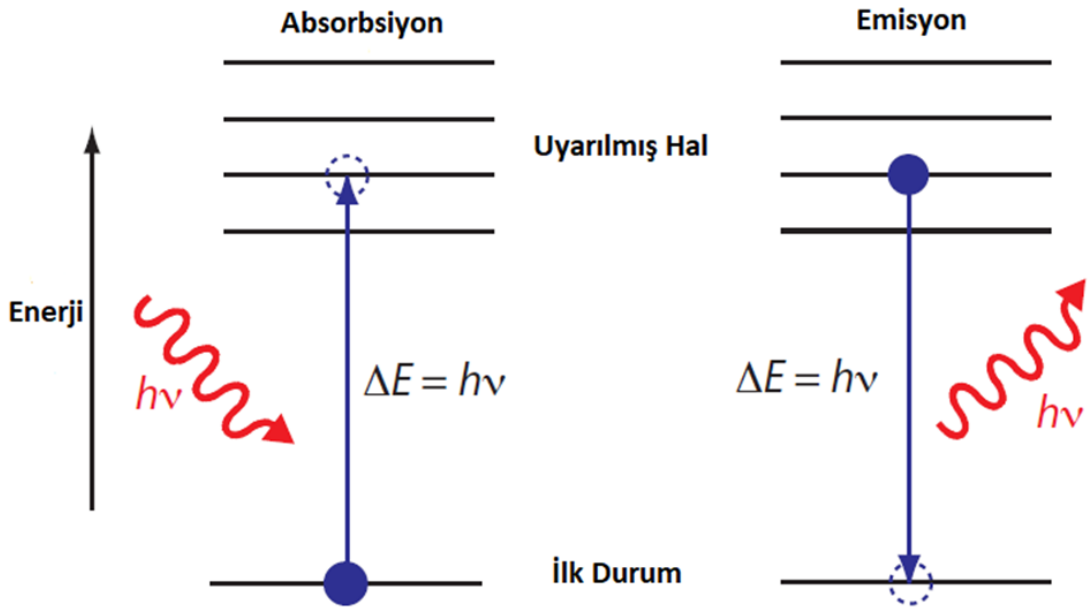


Şekil 2.3. Elektromanyetik spektrum

Spektroskopik ölçüm ancak fotonun numuneyle etkileşiminin bu karakteristik özelliklerden bir veya daha fazlasında bir değişikliğe yol açması durumunda mümkündür. Spektroskopiye iki sınıfta incelenebilir. İlkinde foton ve örnek arasında enerji transferi söz konusudur. Tablo 2.1'de farklı örneklerin listesi verilmiştir. Uyarılmış durumdaki molekül veya atom tarafından foton emilir (Şekil 2.4). Geçişin türü fotonun enerjisine bağlıdır. Örneğin, Şekil 2.3'teki elektromanyetik spektrum, görünür ışıktaki bir fotonun soğurulmasının, atomun veya molekülün değerlik elektronlarından birini daha yüksek bir enerji seviyesine yükselttiğini göstermektedir. Diğerinde bir molekül kızılötesi radyasyonu emdiğinde kimyasal bağlarından birinin titreşim enerjisinde bir değişiklik olur (Wyszecki ve Stiles, 2000).

Tablo 2.1. Bir foton ve örnek arasındaki enerji alışverişini içeren spektroskopik tekniklere örnekler

Enerji Transfer Çeşidi	Elektromanyetik Spektrum Bölgesi	Spektroskopik Teknik
Absorpsiyon	γ ray	Mossbauer Spektroskopi
	X ray	X-Ray spektroskopi
	UV/Vis	UV/Vis spektroskopi
	IR	İnfrared spektroskopi
		Raman spektroskopi
		Mikrodalga
	Radyodalga	Elektron spin rezonans spektroskopi
Emisyon	UV/Vis	Atomik emisyon spektroskopi
Fotoluminesans	X-ray	X-Ray Florosans
	UV/Vis	Florosans Spektroskopi
		Atomik Florosans Spektroskopi
Kemilimunesans	UV/Vis	Kemilüminesans Spektroskopi



Şekil 2.4. Bir fotonun bir atom veya molekül tarafından emilmesini ve yayılmasını gösteren basitleştirilmiş enerji diyagramı

2.4.2. UV Görünür Bölge Spektroskopisi

UV-Vis spektroskopisi, onlarca yıldır kültürel miras malzemelerinin incelenmesinde invazif olmayan bir yöntem olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Özellikle 1980'lerde kullanılmaya başlanan, kısa sürede yüzlerce yansıma spektrumunun yerinde elde edilmesini sağlayarak sanatçı malzemelerinin tanımlanmasına katkıda bulunmaktadır. UV-Vis spektroskopisi, moleküllerin oluşumunda rol oynayan atomların en dış elektronlarının uyarılmasıyla ilgilidir. UV-Vis bölgesindeki ölçümler genellikle geçirgenlik, yansıma ve fotolüminesans (floresans ve fosforesans) modlarında gerçekleştirilir. Geçirgenlik ve yansıma ölçümlerinin bir referans malzemeye karşı kaydedilmesi gerekirken, fotolüminesans edinimleri mutlak ölçümler olarak kabul edilebilir (Simonian ve Smith, 2006):

$$E = hc / \lambda$$

h =Planck sabiti

c= ışık hızı

E= dalga boyu

UV-VIS spektroskopisi ışığın soğurulması olgusuna dayanarak çalışır ve soğurulan ışık miktarı bir örnek çözeltide bulunan analit miktarı ile doğru orantılıdır. Analit konsantrasyonu arttıkça, ışığın emilimi de doğrusal olarak artarken, ışığın iletimi üstel olarak azalır. UV-VIS bölgesinde, radyasyonun emilimi atomlar, moleküller, iyonlar veya kompleksler gibi emici türlerin elektronik konfigürasyonuna bağlıdır. Bir elektronik enerji seviyesi çeşitli titreşimsel enerji seviyelerinden oluşurken, tek bir titreşimsel enerji seviyesi çeşitli dönme enerji seviyelerinden oluşur. Bir foton bir molekülle etkileşime girdiğinde, foton tarafından sağlanan enerji bu seviyelerdeki enerji farkıyla eşleşirse, elektronik enerji seviyelerinde bir geçişe neden olabilir. Spektrumu elde etmek için analit tarafından absorbe edilen radyasyon miktarı ölçülür ve EMR'nin

dalga boyuna karşı grafiğe geçirilir. Bu nedenle, tipik bir UV-VIS spektrumu, dalga boyu veya frekansa karşı absorpsiyon yoğunluğunun bir grafiğidir (Diffey, 2002).

Ultraviyole (UV) bölgesi, elektromanyetik spektrumun yaklaşık 10-380 nm aralığını kapsar. Görünür (Vis) bölge 380-750 nm spektral aralığı kapsar. UV-Vis spektroskopisi, moleküllerin oluşumunda rol oynayan atomların en dıştaki elektronlarının uyarılmasıyla ilgilidir ve bu nedenle sıklıkla “elektronik spektroskopi” olarak anılır. UV-Vis bölgesindeki ölçümler genellikle geçirgenlik, yansıma ve fotoluminesans (floresan ve fosforesans) modlarında gerçekleştirilir (Shinde ve ark., 2020).

Bir yüzeye çarpan ultraviyole ve görünür radyasyon madde ile farklı şekillerde etkileşime girebilir: iletilebilir, dağınık bir şekilde iletilebilir, yansıtılabilir, emilebilir ve fotoluminesans (floresan) olarak yayılabilir. Gelen radyasyonun frekansı, iki enerji seviyesi arasındaki geçişin enerji farkına karşılık geliyorsa, bu spesifik frekans malzeme tarafından emilir ve bu, elektronik yoğunluğun dağılımında bir değişiklik yaratan bir rezonans uyarımına neden olur. Bu etki Bohr modeliyle temsil edilebilir (O'Connor, 1955):

$$\Delta E = E_2 - E_1 = h\nu \rightarrow h\nu = hc \tilde{\nu} = hc/\lambda$$

Burada E1 ve E2 sırasıyla başlangıç ve son enerjilerdir; h = Planck sabiti ($6,62 \times 10^{-34}$ Js); c = boşluktaki ışık hızı ($2,99 \times 10^8$ m/s); ν = frekans; λ = dalga boyu; $\tilde{\nu}$ = dalga sayısı.

Bu olay, örneğin elektronik spektroskopi durumunda, tek bir atomun en dış yörüngelerindeki elektronik yoğunluğun dağılımında bir değişikliğe veya moleküler yörüngelerde dolu seviyelerden boş seviyelere elektronik bir geçişe neden olur. Bohr ilişkisi bu nedenle atomik veya moleküler elektronik enerji seviyelerini gelen radyasyonun frekansına bağlar. Genel olarak madde, gelen radyasyonun bir kısmını

emdiğinde ve daha yüksek enerji seviyelerine uyarıldığında, madde kararlı değildir ve başlangıçtaki dengesine geri döner (Demchenko, 2013).

2.4.3. Lambert-Beer Kanunundan Sapmalar

Belirli bir dalga boyundaki ışığı emen moleküllerin sayısı ne kadar fazla olursa, ışık absorpsiyonunun kapsamı da o kadar büyük olur ve absorpsiyon spektrumundaki tepe yoğunluğu da o kadar yüksek olur. Radyasyonu emen yalnızca birkaç molekül varsa, toplam enerji emilimi daha az olur ve dolayısıyla daha düşük yoğunluk zirvesi gözlemlenir. Bu, gelen ışının emilen kısmının yolundaki soğurucu moleküllerin sayısı ile orantılı olduğunu belirten Beer-Lambert Yasasının temelini oluşturur. Radyasyon bir çözültiden geçtiğinde, emilen veya iletilen ışık miktarı, çözünen maddenin moleküller derişiminin üstel bir fonksiyonudur ve aynı zamanda numune boyunca radyasyon yolunun uzunluğunun da bir fonksiyonudur (Mäntelev ve Deniz, 2017).

$$\log \frac{I_0}{I} = \epsilon cl$$

Burada I_0 = Gelen ışığın yoğunluğu (veya bir referans hücresinden geçen ışık yoğunluğu)

I = ışığın yoğunluğu

c = maddenin derişimi (mol l^{-1})

l = yol uzunluğu (cm)

ϵ = ışık molar soğurma kapasitesi veya molar sönme katsayısı.

Bu bir sabittir ve belirli bir dalga boyunda belirli bir çözücü içindeki belirli bir emici türün (molekül veya iyon) bir özelliğidir. ϵ sayısal olarak birim uzunluktaki ($l = 1$) bir hücredeki birim molar derişimli ($c = 1$) bir çözültinin absorbansına eşittir ve birimi $\text{litre.mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

I/I_0 oranı geçirgenlik T olarak bilinir ve ters I_0/I oranının logaritması absorbans A olarak bilinir.

$$\log \frac{I}{I_0} = -\log T = \epsilon cl$$

$$\log I_0/I = A = \epsilon cl$$

$$A = \epsilon cl$$

Bir spektrumun soğurma özelliklerini sunmak için, tepe noktalarının konumları λ_{\max} (nm cinsinden) değerleri olarak rapor edilir ve soğurma gücü parantez içinde ifade edilir (Langhals ve ark., 2000).

2.5. Cihaz

Fotometri, bir çözültideki madde miktarının çözültiden geçen veya çözültinin tuttuğu ışık miktarından faydalanılarak ölçülmesidir. Spektrofotometri ise seçilmiş dalga boylarındaki ışığın şiddetinin ölçümüdür. Bu amaçla kullanılan cihazlara da spektrofotometre denir. Yaygın olarak kullanılan 2 tip spektrofotometre vardır.

2.5.1. Tek-Işınlı Cihazlar

Bu tip spektrofotometrelerde analiz için tek ışın demeti ve/veya kuvvet kullanılır (Şekil 3.8). Tek ışınlı UV-VIS spektrofotometresinde, kuvetten tek bir ışık demeti geçer. Spektrofotometre, referans ve/veya standart çözültinin kuvete konulmasıyla kalibre edilir ve ardından elde edilen absorban değerleri, çözücü ve hücre tarafından üretilen etkileri gidermek için numune ölçümlerinden çıkarılır. Bu tip spektrofotometre 190-1100 nm dalga boyu aralığındaki uygulamalar için uygundur. Nükleik asit, proteinler ve bir dizi organik molekül dahil olmak üzere çeşitli numune türleri genellikle bu bölgede analiz edilir. Elektromanyetik spektrumun görünür bölgesi ise 340 ila 750 nm arasındadır ve bu bölge renkli numunelerin analizi için uygundur (Zweig ve Sherma, 1977).

2.5.2. Çift-Işınlı Cihazlar

Bu tip spektrofotometrelerde analiz için iki ışın demeti ve/veya kuvvet kullanılır. Işık kaynağından gelen ışık demeti, mekanik kısıyıcı yardımıyla örnek ve referans demetine ayrılır. Referans ışınının rolü ışık enerjisinin yoğunluğunu izlemek iken, örnek ışını

örnekten gelen ışığın emilimini gösterir. Örnek ve referans ışınının oranı olan gözlenen absorpsiyon değeri, monokromatöre girmeden önce yeniden birleştirilir. Bu düzenleme, referans ve numune ışınlarını eşit şekilde etkileyen lamba yoğunluğundaki kayma, elektronik ve mekanik dalgalanmalar nedeniyle ışık referans ve numune ışınının etkilerini telafi eder. Çift ışınlı UV-VIS spektrofotometreleri, tek ışınlılara kıyasla biraz daha karmaşık olmasına rağmen, yine de aşağıdaki gibi bazı avantajlara sahiptir:

1. Örnek ve referans aynı anda çalışır. Her dalga boyunda sıfırı ayarlamaya veya boşluğu numune ile değiştirmeye gerek yoktur.

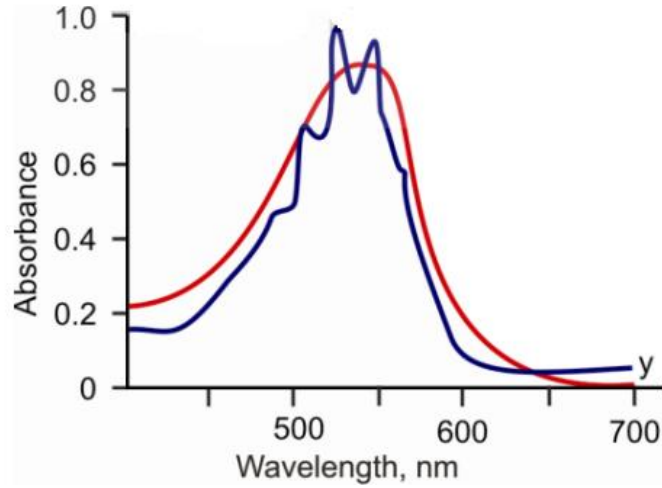
2. Referans ve numunenin güçlerinin oranı sürekli olarak elde edilir.

3. Tarama hızı geniş bir dalga boyu aralığında hızlıdır ve elektrik sinyallerini kaydetmek için dijital okuma cihazı kullanılır (Purbaningtiar ve ark., 2020).

a. Kalitatif Analiz

Analitin kalitatif analizi açısından UV-VIS spektrometresi oldukça faydalıdır. Ancak moleküllerin yapısal detaylarının belirlenmesi bağlamında ikincil öneme sahiptir. Buradan elde edilen bilgilerin diğer spektroskopik yöntemlerden elde edilen bilgilerle desteklenmesi gerekir. UV-VIS absorpsiyon spektroskopisi, UV görünür radyasyonu absorbe eden bileşikler karakterize etmek için kullanılabilir. Tanımlama, bilinmeyen bileşik ve/veya analitin absorpsiyon spektrumlarının bilinen bileşiklerin spektrumlarıyla karşılaştırılmasıyla yapılır.

UV-görünür spektrumdaki ince yapının eksikliği, molekülün kesin olarak tanımlanmasına izin vermese de bazen spektrumun doğası, benzer renge sahip iki molekülü ayırt etmede oldukça yararlı olabilir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Birbirinden tamamen farklı ancak benzer renkte iki bileşiğin absorpsiyon spektrumları

b. Kantitatif Analiz

UV-VIS spektrometri muhtemelen çeşitli alanlardaki niceliksel belirlemeler için mevcut en kullanışlı araçtır. Bunun nedeni çok yönlülüğü, doğruluğu ve hassasiyetidir. Birçok organik, inorganik ve biyokimyasal türün düşük derişimlerde doğru bir şekilde doğrudan belirlenmesi için kullanılabilir; yani 10^{-4} ila 10^{-5} veya daha düşük. Bunlara ek olarak tayinin yapılabilmesinin kolaylığı ve makul seçiciliği, onu kantitatif tespitler için tercih edilen bir yöntem haline getirmektedir. Bu tekniğin bir diğer önemli özelliği UV-VIS bölgesinde absorbe olmayan analitin kantitatif tayini için de kullanılabilmesidir. UV-VIS bölgesinde absorbe olan bir ürün veren bir reaktifle reaksiyona girmeleri sağlanarak elde edilir (Purbaningias ve ark., 2020; Zweig ve Sherma, 1977).

2.6. Türev Spektrofotometrisi Yöntemi

Türev spektroskopisi, seçiciliği genişletmek için en az karmaşık tekniktir ve spektrumların belirlenmesidir. Bu etkinlik, sonuçların ve engellerin ortadan kaldırılmasına olanak tanır ve incelemenin seçiciliğinin artırılmasını sağlar. Sıradan spektrumların birinci, ikinci veya daha yüksek alt spektrumlara değiştirilmesini içerir. Tipik spektrumlar D_0 spektrumları veya kritik sıfır dereceli olarak bilinir. Sıradan alım

aralığına temel sıfır isteği veya D_0 spektrumu adı verilir. Türev Spektroskopisi: Floresans spektrometresi ve UV-Görünür absorpsiyonda esas olarak spektrumları ayıran prosedürdür (Karpinska, 2012). Mantık biliminde kullanılan yardımcı teknikler şunlardır:

- Niceliksel inceleme
- Fantom ayırma
- Hayali hedef iyileştirme

Nicel inceleme: Hedefin başlangıcını veya kaplama bantlarının ayrılmasını yapılandırır. Türev spektroskopisi, önemsiz temel asimilasyonunu revize eder ve çok bileşenli analizi kolaylaştırır. Genellikle sentetik maddeler için katkısız malzemeler ve ölçüm yapılarının parçaları olarak yaygın şekilde kullanılır (Purbaningias ve ark., 2020).

Fantom ayırma: UV radyasyonunu özümseyen bu tür karışımları tasvir eder. Ayırt edici kanıt, bilinen karışımların alıkonma aralığı ve spektrumlarının karşılaştırılması ile tamamlanır (Koba ve ark., 2008a).

Hayali hedef iyileştirme: Grupların sıklığının ve sayısının değerlendirilmesi, önemli grupları kapsayarak belirlenir.

Türev spektroskopisinin tahmin stratejileri: Bir parça karışımının sıfır talep aralığı, farklılaşma yoluyla herhangi bir talebin yardımcı aralığına giden yolu gösterir. Üç strateji vardır (Davidson ve ark., 1997):

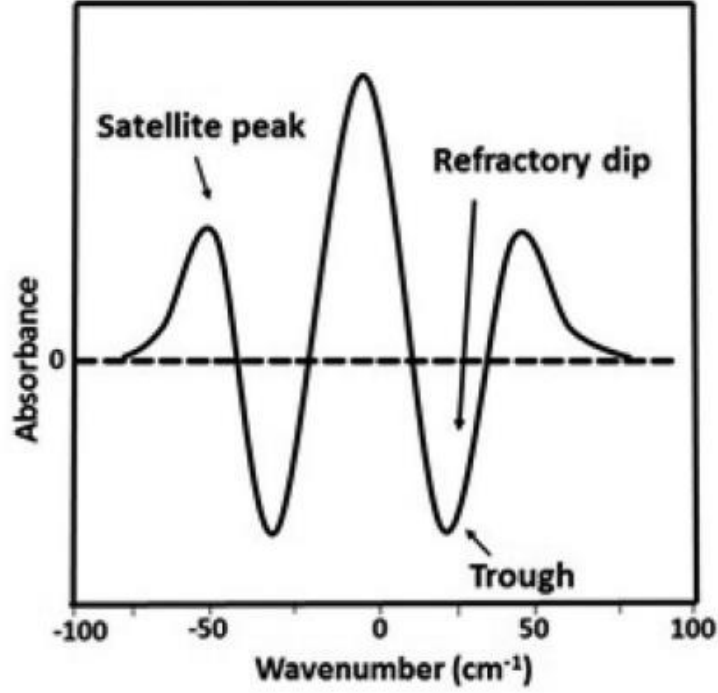
1. Sayısal tahmin
2. Grafik tahmini
3. Sıfır kesişme prosedürü

Sayısal tahmin: Bu teknik, belirli bir dalga boyunda ikincil değeri değerlendirerek ikincil niteliklerin yapıldığı bir dizi yeri kullanır.

Grafik tahmin: Kâğıt üzerinde ikincil spektrumları hesaplamak için kullanılan varsayımsal tekniktir.

Sıfır kesişim prosedürü: Bu strateji, ikincil kesişimlerin sıfır çizgisini işaret ettiği belirli frekanstaki yardımcı spektrumları tahmin eder. Sıfır kesişim prosedürü ile bir parçanın empedansı diğer parçanın güvencesi altında bertaraf edilir (Willard ve ark., 1988).

Türev spektrumlar kantitatif incelemede, alt spektrumlar, kaplama gruplarını belirlemek için spektrumlar arasında bir ayırım geliştirir. Savitzky-Golay adı verilen bilgisayarlı hesaplama stratejisine genellikle ikincil spektrumların elde edilmesinde dikkat çekici bir şekilde değinilmektedir. Yaygın strateji, absorbans aralığının frekansa göre ilerleme hızının çizilmesini içerir. Yardımcı spektrumlar çeşitli deneme yöntemleriyle elde edilebilir; aralığın dikkatli bir şekilde veya otomatik tutarlı bir yapıda kaydedilip kaydedilmediğine bakılmaksızın ayırma matematiksel olarak mümkün olmalıdır. Aralığın tutarlı bir oranda incelenmesi durumunda, aralığın zaman tamamlayıcısı tamamlanarak veya frekans ayarı yapılarak sabit alt spektrumlar kaydedilebilir. Frekans dengesi cihazı, bir ışık emisyonunun frekansta küçük bir değişiklikle (1-2 nm) kontrast oluşturduğu ve iki okuma arasındaki farkın kaydedildiği alt spektrumları kaydetmek için kullanılır; otomatik teknik genellikle ikincil kıvrımları elde etmek için kullanılır. Kantitatif olarak ikinci veya dördüncü istek ikincil kıvrımlar için, uzun dalga üst uydunun veya kısa dalga üst uydunun üst boyları tahmin edilir. Yardımcı spektrumların sorun düzeyi, uydu zirvelerinin varlığıyla birlikte artar. İkinci yardımcı spektrum, iki keskin tepe noktasının ve bir kutunun varlığıyla ele alınır. Çözücülerin üst kısımlar üzerinde şaşırtıcı bir etkisi vardır. Çözücünün uç noktasına bağlı olarak, tepe noktaları ve kutu ya daha sınırlı ya da daha uzun frekansa doğru hareket eder (Upstone, 2000) (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. UV türevi sıfır dereceli türev spektrumunun bir temsili

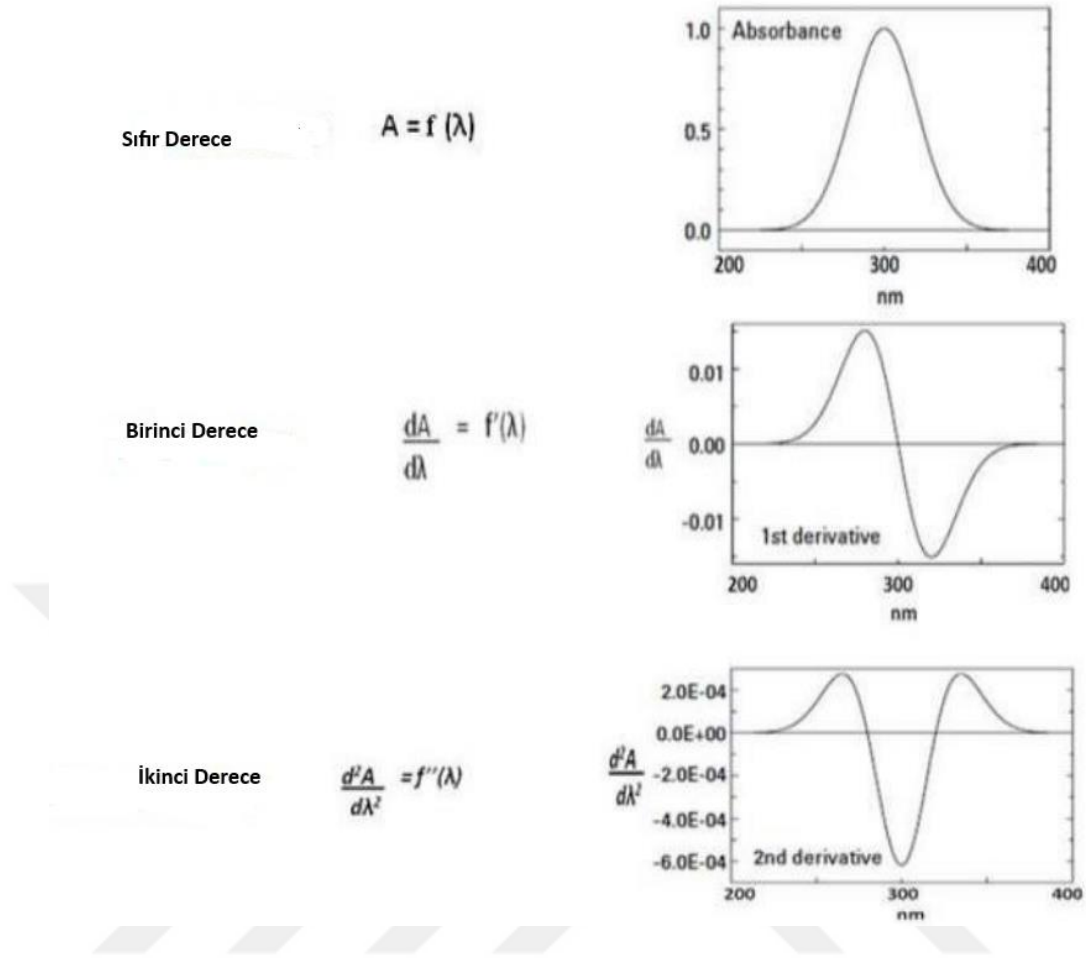
Bu D_0 aralığında örneğin sıfırinci istek, tipik asimilasyon spektrumunun ögesidir. Sıfırinci istekten itibaren 1., 2., 3. ve 4. istek alt spektrumları doğrudan elde edilebilir. Yardımcı yapılar tarafından düzenlenen artış, güvencenin duyarlılığını artırır.

Birinci dereceden türev spektrumu: Sıfır istek aralığının bir kez türetilmesiyle elde edilir. Frekans ile absorbansın dalga boyuna karşı ilerlemesinin, absorbansın frekans ile ilerleme hızının grafiğidir.

İkinci dereceden türev spektrumu: Sıfır istek aralığının iki kez türetilmesiyle elde edilir. Bu, dalga boyuna karşı alım aralığının gel-git grafiğidir.

Üçüncü dereceden türev spektrumu: İkinci istek aralığı üçüncü istek yardımcı aralığı, benzersiz bükülmeye göre dağılım kapasitesini gösterir.

Dördüncü dereceden türev spektrumu: İkinci isteğin aralığı yeniden düzenlenmiştir ve taşta yerleştirilmemiş dördüncü yan sınırlı gruplar tarafından birinci banttı daha keskinleştirilmiş bir odak tepesine sahiptir (Purbaningias ve ark., 2020).



Şekil 2.7. Sıfır, birinci ve ikinci dereceden türev spektrumu

2.7. Kromatografik Yöntemler

Kromatografi, karışım halindeki moleküllerin yüzeye veya katı içerisine uygulanması ve akışkanın kararlı fazının, hareketli bir faz yardımıyla hareket ederken birbirinden ayrılması prensibine dayanmaktadır (Coskun, 2016). Bu ayırım işlemi etkili olan faktörler arasında adsorpsiyon (sıvı-katı), bölünme (sıvı-katı) ile ilgili moleküler özellikler ve molekül ağırlıkları arasındaki afinite veya farklılıklar yer almaktadır (Cuatrecasas ve ark., 1968). Bu farklılıklar nedeniyle karışımın bazı bileşenleri sabit fazda daha uzun süre kalarak kromatografi sisteminde yavaş hareket ederken, bazıları ise hızla hareketli faza geçerek sistemi daha hızlı terk eder (Koba ve ark., 2008b).

2.7.1.Kromatografik Yöntemlerin Sınıflandırılması

Karışımın içerdiği sabit faz, hareketli faz ve maddeler arasındaki etkileşimin türü, moleküllerin birbirinden ayrılmasında etkili olan temel bileşenlerdir. Parçalamaya dayalı kromatografi yöntemleri, amino asitler, karbonhidratlar ve yağ asitleri gibi küçük moleküllerin ayrılmasında ve tanımlanmasında oldukça etkilidir. Farklı elementler, nükleik asitler, proteinler, alkoller, amino asit, karbonhidrat, sıvı, gaz vs. belirlenmesinde farklı kromatografik yöntemler kullanılmaktadır. Bu amaçla çeşitli kromatografi yöntemleri geliştirilmiştir.

Kromatografi türleri

- Kolon kromatografisi
- İyon değişirme kromatografisi
- Jel geçirgenliği (moleküler elek) kromatografisi
- Afinite kromatografisi
- Kağıt kromatografisi
- İnce tabaka kromatografisi
- Gaz kromatografisi
- Boya ligand kromatografisi
- Hidrofobik etkileşim kromatografisi
- Psödoafinite kromatografisi
- Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC)

Kolon Kromatografisi

Proteinler boyut, şekil, net yük, kullanılan sabit faz ve bağlanma kapasitesi gibi farklı karakteristik özelliklere sahip olduğundan, bu karakteristik bileşenlerin her biri

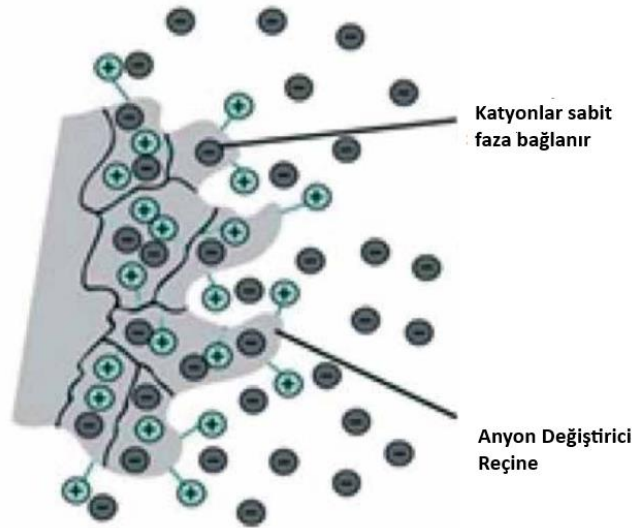
kromatografik yöntemler kullanılarak saflaştırılabilir. Kolon kromatografisi, bir sıvı içinde çözülmüş bir karışımdan tek bir kimyasal bileşiği ayırmak için kullanılan bir tekniktir. Bileşikler kolon boyunca farklı hızlarda hareket ettikçe, bileşiklerin adsorbana diferansiyel adsorpsiyonuna dayalı olarak maddeleri ayırır ve bu da fraksiyonlara ayrılmalarını sağlar. Bu teknik, gelecekteki deneylerde kullanılacak malzemeleri saflaştırmak için küçük ölçekte olduğu kadar büyük ölçekte de kullanılabilir. Bu yöntem bir tür adsorpsiyon kromatografisi tekniğidir (Şekil 2.8). Kolon Kromatografisi Prensipli Ayrılması gereken karışımla birlikte hareketli faz kolonun üst kısmından verildiğinde, karışımın tek tek bileşenlerinin hareketi farklı hızlarda olur. Sabit faza daha düşük adsorpsiyon ve afiniteye sahip bileşenler, sabit faza daha yüksek adsorpsiyon ve afiniteye sahip olanlara kıyasla daha hızlı hareket eder. Hızlı hareket eden bileşenler ilk önce uzaklaştırılırken yavaş hareket eden bileşenler en son elüe edilir. Çözünen moleküllerin kolona adsorpsiyonu tersinir bir şekilde gerçekleşir (Das ve Dasgupta, 1998).



Şekil 2.8. Kolon kromatografisi

İyon Değişirme Kromatografisi

İyon Değişirme Kromatografisi (IEC), iyonize olabilen moleküllerin yük özelliklerindeki farklılıklar temelinde ayrılmasını sağlar. Büyük örnek işleme kapasitesi, geniş uygulanabilirliği (özellikle proteinler ve enzimler için), makul maliyeti, güçlü çözme kabiliyeti ve ölçek büyütme ve otomasyon kolaylığı, tüm sıvı kromatografi (LC) teknikleri arasında en çok yönlü ve yaygın kullanılanlardan biri haline gelmesine yol açmıştır (Karlsson ve Ryden, 1998). Pozitif yüklü iyon değişim matrislerine anyon, negatif yüklü gruplarla bağlanan matrislere katyon değişim matrisleri olarak tanımlanırlar (Şekil 2.9) (Biosciences, 2002).



Şekil 2.9. İyon değişirici kromatografisi

Jel Geçirgenliği (moleküler elek) Kromatografisi

Jel geçirgenlik kromatografisi, sabit fazın bir kromatografik kolona dikkatlice paketlenmiş ve bir hareketli faz tarafından şişirilmiş gözenekli çapraz bağlı bir jel olduğu özel bir sıvı kromatografi işlemidir. Kromatografik nedenlerden dolayı jel genellikle mümkün olan en küçük çapa ve dar bir boyut dağılımına sahip küresel boncuklardan oluşur. Alıkoyma mekanizması nedenleriyle, gözeneklerin boyutu çözeltide ayrıştırılacak

makromoleküllerin boyutuyla aynı büyüklük sırasına sahip olmalıdır. Bu nedenle, modern geleneksel Sıvı Kromatografisinin (HPLC) aksine, çapı 10 µm'den çok daha küçük olan jel boncukların kullanılması genellikle mümkün değildir (Determann, 2012).

Afinite Kromatografisi

Afinite kromatografisi, karmaşık karışımlardan belirli bir molekülün veya bir grup molekülün saflaştırılması için en çeşitli ve güçlü kromatografik yöntemlerden biridir. Enzim ve substrat, reseptör ve ligand veya antikor ve antijen arasındaki etkileşimler gibi iki molekül arasındaki oldukça spesifik biyolojik etkileşimlere dayanır. Tipik olarak tersine çevrilebilir olan bu etkileşimler, hedef molekül hareketli fazdayken sabit bir faz oluşturmak için afinite ligandı olarak adlandırılan etkileşen molekülden birinin katı bir matris üzerine yerleştirilmesiyle saflaştırma için kullanılır (Wilchek & Chaiken, 2000). Başarılı bir afinite saflaştırması, uygun bir afinite ligandının ve saflaştırma prosedürünün seçilmesine yardımcı olmak için hedef molekül ile ligand arasındaki etkileşimlerin doğası hakkında belirli bir derecede bilgi ve anlayış gerektirir. Afinite saflaştırmasının artan popülaritesiyle birlikte, afinite matrislerine bağlanmış yaygın olarak kullanılan ligandların çoğu artık ticari olarak mevcuttur ve kullanıma hazırdır (Firer, 2001).

Kâğıt Kromatografisi

Kâğıt kromatografisi, sabit faz ve hareketli fazdaki (çözücü) diferansiyel çözünürlüğe dayalı olarak bileşiklerin ayrılması için kullanılan bir tekniktir. Kağıt kromatografisi ile amino asit ayrımında, çözücü kağıt boyunca hareket eder ve amino asitleri de beraberinde taşır. Amino asitler kağıt üzerinde diferansiyel çözünürlüğe göre ayrılır (Stoddard ve ark., 2007).

İnce Tabaka Kromatografisi

İnce tabaka kromatografisi bir “katı-sıvı adsorpsiyon” kromatografisidir. Bu yöntemde sabit faz, cam plakalar üzerine kaplanmış katı bir adsorban maddedir. Adsorban malzeme olarak tüm katı maddeler kullanılır. Kolon kromatografisinde (alümina, silika jel, selüloz) kullanılabilir. Bu yöntemde hareketli faz, sabit faz boyunca yukarıya doğru hareket eder. Çözücü, kılcal etki yoluyla çözücüye batırılmış ince plaka üzerinde yukarı doğru hareket eder. Bu işlem sırasında plakanın alt kısmına önceden damlatılan karışımı da farklı akış hızlarında pipet yardımıyla yukarıya doğru sürer. Böylece analitlerin ayrılması sağlanır (Sherma ve Fried, 2003).

Gaz Kromatografisi

Bu yöntemde sabit faz, cihaza yerleştirilen ve inert bir katının yüzeyine adsorbe edilen bir sıvı sabit fazı içeren bir sütundur. Gaz kromatografisi bir “gaz-sıvı” kromatografisidir. Ayrımlar gaz kromatografisi ile, bir karışım dar bir bant olarak enjekte edildikten sonra küçük çaplı bir tüpte (kolon) tutulan hareketli bir gaz fazı ile sabit bir sıvı fazı arasındaki bir dizi bölme ile elde edilir. Daha sonra bir dedektör, ayrılmış bileşenleri taşıyan kolondan çıkarken gaz akışının bileşimini izler ve elde edilen sinyaller veri toplama için girdi sağlar. Gaz kromatografisi, kaynama noktaları sıfırdan 700 K'nin üzerine kadar olan bileşikler içeren veya birkaç mmHg buhar basıncı verecek şekilde ayrılmadan yeterince ısıtılabilen karışımların analizine uygulanabilir. Uçuculuğu artırmak için türevlendirme bu aralığı genişletir. Numune boyutu pg kadar küçük olabilir, ancak analitik uygulamaların aksine preparatif uygulamalarda onlarca gram işlenebilir.

Gaz kromatografisi artık başta petrokimya üretimi olmak üzere birçok endüstride ve çevre, gıda kirleticileri, ilaç kalıntıları ve adli analizlerde araştırma, geliştirme ve kalite kontrolün temelini oluşturan standart bir analitik yöntemdir.

Boya Ligand Kromatografisi

Boya-ligandlar, spesifik afinite kromatografisi için doğal muadillerine önemli alternatiflerden biri olarak kabul edilmiştir. Boya-ligandları, bazı durumlarda oldukça spesifik bir şekilde çoğu protein türünü bağlayabilmektedir. Ticari olarak temin edilebilirler, ucuzdurlar ve özellikle hidroksil grupları taşıyan matrisler üzerinde kolayca immobilize edilebilirler. Boyaların hepsi doğada sentetik olmasına rağmen, yine de afinite ligandları olarak sınıflandırılırlar çünkü bu proteinler için substratların, kofaktörlerin veya bağlayıcı ajanların yapısını taklit eden birçok proteinin aktif bölgeleri ile etkileşime girerler. Reaktif boyalar olarak bilinen bir dizi tekstil boyası, protein saflaştırma için kullanılmıştır. Bu reaktif boyaların çoğu, reaktif bir gruba (genellikle mono- veya diklorotriazin halkası) bağlı bir kromofordan (azo boyalar, antrakinon veya fathalosiyanın) oluşur. Boya ligandı ve proteinler arasındaki etkileşim elektrostatik, hidrofobik, hidrojen bağının karmaşık kombinasyonu ile olabilir. Boya afinite sistemlerinde destekleyici matrisin seçimi ilk önemli husustur. Boya moleküllerinin destek matrisi üzerine immobilizasyonu için genellikle birkaç ara adımın takip edildiği çeşitli yöntemler vardır. Başarılı bir ayırma için hem adsorpsiyon hem de elüsyon adımları dikkatlice optimize edilmeli/tasarlanmalıdır. Boya afinite sistemleri, küresel sorbentler şeklinde veya afinite membranları olarak protein ayırmada kullanılmıştır (Scopes, 1984).

Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi (HIC)

Bu yöntemde afinite kromatografisinde ligand bağlanması için kolon malzemesi olarak hazırlanan adsorbanlar kullanılır. HIC tekniği, kromatografi matrisine bağlı yan zincirler arasındaki hidrofobik etkileşimlere dayanmaktadır (Mahn ve Asenjo, 2005).

Psödoafinite Kromatografisi

Antrakinin boyaları ve azo boyaları gibi bazı bileşikler, özellikle dehidrojenazlara, kinazlara, transferazlara ve redüktazlara olan afinitelerinden dolayı ligand olarak kullanılabilir. Bu tür kromatografinin en çok bilinen türü immobilize metal afinite kromatografisidir (Porath, 1992).

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

HPLC sıvı kromatografisinin sadece bir türüdür, yani hareketli faz bir sıvıdır. Ters fazın anlamı, hareketli fazın nispeten polar olması ve sabit fazın nispeten polar olmamasıdır. Böylece polar olmayan bileşikler polar bileşiklere göre daha fazla tutulur (yani daha uzun alıkonma sürelerine sahip olur). Normal faz HPLC'de hareketli faz nispeten polar değildir ve sabit faz nispeten polardır. Diğer daha genel HPLC türleri arasında bölme, adsorpsiyon, iyon değiştirme, boyut dışlama ve ince tabaka kromatografisi yer alır. HPLC yönteminin amacı, ana ilacı, herhangi bir reaksiyon safsızlığını, mevcut tüm sentetik ara ürünleri ve herhangi bir bozucu maddeyi ayırmak ve miktarını belirlemektir. HPLC artık analitik kimyadaki en güçlü araçlardan biridir. Bir sıvı içinde çözülebilen herhangi bir numunede bulunan bileşikleri ayırma, tanımlama ve miktarını belirleme yeteneğine sahiptir. HPLC, ilaç ürünlerinin hem kantitatif hem de kalitatif analizi için yaygın olarak kullanılan ve ilaç ürünü stabilitesinin belirlenmesinde kullanılan en doğru analitik yöntemdir (Harvey, 2010).

2.7.2. Kromatografide Temel Kavramlar

1. Ayırım Gücü (Rezulusyon RS)

HPLC'de en önemli şey optimum çözünürlüğün minimum sürede elde edilmesidir. İki tepe noktası arasında 1,5 veya daha büyük bir çözünürlük değeri, numune bileşenlerinin, her bir tepe noktasının alanı veya yüksekliğinin doğru bir şekilde ölçülebileceği bir dereceye kadar iyi (taban çizgisi) ayrılmasını sağlayacaktır.

Her bir tepe noktasının tabanındaki genişlik, gösterildiği gibi tepe noktasının her iki tarafındaki bükülme noktalarına çizilen teğetler tarafından kesilen tepe tabanı bölümüdür. Çözünürlük arttıkça ayırım için gereken sürenin de arttığına dikkat edilmelidir. Bir kromatografi olarak, zorlu ayırlara yönelik arzunuzu zaman ve malzeme arzusuyla dengelemeniz gerekecektir (Scientific, 2014).

2. Alıkonma (Retansiyon)

Alıkonma faktörü, analitin kolon üzerinde tutulma süresinin, tutulmayan bileşiğin tutulma süresine oranına eşittir. Tutulmayan bileşiğin sabit faza afinitesi yoktur ve 'bekletme süresi' veya 'ölü zaman' olarak da bilinen t_0 zamanında solvent cephesi ile elüsyona uğrar.

$$K = \frac{(t_R - t_0)}{t_0}$$

t_0 'ı belirlemek için Enjeksiyon solventi detektörden geçerken absorbans veya kırılma indeksindeki farklılıklar nedeniyle görülen taban çizgisi bozulmasındaki süre

Tutma faktörü, küçük akış hızı değişiklikleri ve sütun boyutları dahil olmak üzere bazı önemli değişken faktörlerden bağımsızdır. Bu nedenle, farklı HPLC sistemleri kullanılarak elde edilen kromatografik piklerin tutulmasını karşılaştırırken faydalı bir parametredir (Scientific, 2014).

3. Seçicilik

Seçicilik (veya ayırım) faktörü (α), kromatografik sistemin numune bileşenleri arasında 'kimyasal olarak' ayırım yapabilme yeteneğidir. Genellikle söz konusu iki pikin tutma (kapasite) faktörlerinin (k) oranı olarak ölçülür ve iki pikin tepe noktaları arasındaki mesafe olarak görselleştirilebilir.

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t_{R2} - t_0}{t_{R1} - t_0}$$

Yüksek α değerleri, iyi ayırım gücünü ve her pikin APEX'i arasında iyi bir ayırımı gösterir. Ancak alfa değeri doğrudan çözünürlüğün göstergesi değildir. Tanım gereği seçicilik her zaman birden büyüktür; α bire eşit olduğunda iki tepe birlikte elüte olur (yani tutma faktörü değerleri aynıdır). Seçicilik değeri ne kadar büyük olursa, iki pikin tepe noktaları o kadar birbirinden uzaklaşır.

Bir ayırımının seçiciliği analitin, hareketli ve sabit fazların kimyasına bağlı olduğundan, bir HPLC ayırımının seçiciliğini değiştirmek veya optimize etmek amacıyla bu faktörlerin tümü değiştirilebilir (Scientific, 2014).

4.Verimlilik

Kromatografik bir pikin verimliliği, analit bandının HPLC sistemi ve kolonu boyunca ilerlerken dağılımının bir ölçüsüdür. İdeal bir dünyada, kromatografik tepe noktaları kalem inceliğinde çizgiler olacaktır, ancak dağılma etkilerinden dolayı tepe noktaları tanıdık 'Guassian' şeklini alır.

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

Plaka numarası (N), HPLC kolonundaki kolon performansını yansıtan tepe dağılımının bir ölçüsüdür. Verimlilik, kolon verimliliğini kolonun Teorik Plakalara bölündüğü fraksiyonel damıtma işlemine benzeten Martyn ve Syng'e'nin benzetmesinden türetilmiştir.

Her plaka, numune bileşenlerinin kolondaki sabit ve hareketli faz arasında bir dengeye ulaştığı mesafedir. Bu nedenle, bir sütunda ne kadar çok teorik plaka mevcut olursa, o kadar fazla dengeleme mümkün olur ve ayırım kalitesi de o kadar iyi olur (Scientific, 2014).

5. Faktörlerin Birbiri ile İlişkisi

Bir ayırımının üç bileşeni; hız, ayırım gücü ve alıkonma veya kapasite faktörü birbiri ile ilişkilidir; bu yüzden herhangi birinin iyileştirilmesi diğerlerini etkiler. Bir ayırım işleminde optimizasyon, en etkin ayırma ulaşana kadar her bir parametrenin basamaklı incelenmesi ile sağlanır. Ayırım gücü, ayırımı iyileştirecek veya birleştirecek üç faktörün fonksiyonudur (Scientific, 2014):

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

2.8. Analitik Yöntem Geliştirme ve Validasyon

2.8.1 Doğrusallık ve Ölçüm Aralığı

Bir test prosedürünün doğrusallığı, numunedeki analitin derişimiyle doğrudan orantılı sonuçlar üretme yeteneğidir (belirli bir aralık dahilinde). Aralık, yazılı yöntem kullanılarak kesinlik, doğruluk ve doğrusallıkla belirlenen analitin üst ve alt seviyeleri arasındaki aralıktır. ICH yönergeleri belirli minimum belirlenmiş aralıklarla birlikte minimum beş derişim seviyesini belirtir. Test için belirlenen minimum aralık teorik aktif içeriğinin %80-120'sidir. Doğrusallık verilerinin kabul edilebilirliği genellikle tepkiye karşı derişim grafiği için doğrusal regresyon çizgisinin korelasyon katsayısı ve y-kesişim noktası incelenerek değerlendirilir. Regresyon katsayısı (r^2) genellikle verilerin regresyon çizgisine kabul edilebilir uyumunun kanıtı olarak kabul edilir. Yüzde bağıl standart sapma (RSD), kesişim ve eğim hesaplanmalıdır (Shabir, 2004).

2.8.2 Doğruluk

Bir yöntemin, analite yönelik doğru sayısal yanıtı vermesi durumunda doğru olduğu söylenir. Yöntem, söz konusu malzemenin spesifikasyonuna uygun olup olmadığını belirleyebilmelidir (örneğin, mevcut maddenin tam miktarını sağlayabilmelidir). Ancak mevcut miktar tam olarak bilinmediğinden doğruluğu tahmin

etmek için bir test yöntemi kullanılır. Ayrıca, birkaç tekrarlı testin sonuçlarının hepsinin aynı cevabı vermesi nadirdir, dolayısıyla ortalama veya ortalama değer, doğru cevabın tahmini olarak alınır.

Bazı analistler, hatayla ifade edilen kesinlik konusunda daha pratik bir tutum benimsiyor. Mutlak hata, analitin gözlemlenen ve beklenen derişimleri arasındaki farktır. Yüzde doğruluk, beklenen ve gözlemlenen derişimler arasındaki yüzde farkı cinsinden tanımlanabilir.

Yüzde doğruluk, kalibrasyon eğrisinin alt ucunda daha düşük olma eğilimindedir. Doğruluk terimi genellikle nicel yöntemlere uygulanır ancak limit testleri gibi yöntemlere de uygulanabilir. Doğruluk genellikle standart malzemenin bilinen bir miktarının çeşitli koşullar altında ölçülmesiyle belirlenir, ancak diğer bileşenlerin analitik yöntemle müdahale etmemesini sağlamak için tercihen formülasyonda, dökme malzemede veya ara üründe ölçülür. Analiz yöntemleri için, katkılı numuneler hedef derişiminin %50-150'si aralığında üç seviyede üç kopya halinde hazırlanır. Daha sonra geri kazanım yüzdesi hesaplanmalıdır (Guideline, 1994).

2.8.3. Sağlamlık

Sağlamlık, analitik bir yöntemin, yöntem parametrelerindeki küçük ama kasıtlı değişikliklerden etkilenmeden kalma kapasitesini ölçer. Aynı zamanda normal kullanım sırasında analitik yöntemin güvenilirliğine dair bazı göstergeler sağlar. Araştırılması gereken parametreler, hareketli fazdaki veya gradyan rampasındaki organik içeriğin yüzdesi; hareketli fazın pH'ı; tampon derişimi; sıcaklık; ve enjeksiyon hacmi. Bu parametreler, faktöriyel deneyin bir parçası olarak aynı anda veya aynı anda bir faktör olarak değerlendirilebilir. Değiştirilmiş parametreler kullanıldığında temsili safsızlıklar

içeren bir numune için elde edilen kromatografi, hedef parametreler kullanılarak elde edilen kromatografiyle karşılaştırılmalıdır (Shabir, 2003).

2.8.4. Kesinlik

Kesinlik bir analitin tüm ölçümlerinin birbirine çok yakın olması gerektiği anlamına gelir. Tüm kantitatif sonuçlar yüksek hassasiyette olmalıdır; test sisteminde $\pm\%2$ 'den fazla değişiklik olmamalıdır. Yararlı bir kriter, sistemin belirsizliğinin bir göstergesi olan bağıl standart sapma (RSD) veya varyasyon katsayısıdır.

ICH'ye göre hassasiyet, tekrarlanabilirlik ve ara hassasiyet olmak üzere iki farklı seviyede gerçekleştirilmelidir. Tekrarlanabilirlik, laboratuvardaki bir operatörün aynı ekipman ve reaktifleri kullanarak aynı yöntemi farklı zamanlarda kullanarak aynı malzeme grubu için aynı sonucu elde etmesinin ne kadar kolay olduğunun bir göstergesidir. Prosedürün belirtilen aralığını kapsayan en az dokuz tespitten (örneğin, her biri üç seviye, üç tekrar) veya testin veya hedef derişiminin %100'ünde en az altı tespitten belirlenmelidir.

Orta düzeyde kesinlik, farklı günler, analistler ve ekipman gibi farklılıklardan kaynaklanır. Ara kesinliğin belirlenmesinde, bireysel değişkenlerin etkilerinin (varsa) izlenebilmesi için deneysel tasarım kullanılmalıdır. Bir tahlil yönteminin kesinlik kriterleri, cihaz hassasiyetinin ve tahlil içi kesinliğin (RSD) $\leq\%2$ olmasıdır (G. Shabir, 2004).

2.8.5. Teşhis (LOD) ve Tayin Sınırı (LOQ)

Teşhis sınırı (LOD), bir numunedeki analitin ölçülmeyen, tespit edilebilen en düşük derişimi olarak tanımlanır. Genellikle belirli bir sinyal:gürültü oranındaki derişim olarak ifade edilir. Kantitasyon sınırı (LOQ), bir numunedeki analitin belirtilen çalışma koşulları altında kabul edilebilir hassasiyet ve doğrulukla belirlenebilen en düşük derişimi

olarak tanımlanır. ICH, 10:1'lik bir sinyal: gürültü oranı önermektedir. LOD ve LOQ ayrıca yanıtın standart sapmasına (SS) ve aşağıdaki formüllere göre LOD'ye yaklaşan seviyelerde kalibrasyon eğrilerinin eğimine (SD) dayalı olarak da hesaplanabilir.

Yanıtın standart sapması, boşluğun standart sapmasına, regresyon çizgisinin kalan standart sapmasına veya regresyon çizgilerinin y kesişimlerinin standart sapmasına bağlı olarak belirlenebilir. LOD ve LOQ'yu belirlemek için kullanılan yöntem belgelenmeli ve desteklenmeli ve seviyeyi doğrulamak için uygun sayıda numune limite analiz edilmelidir (Shabir, 2004).

2.8.6. Seçicilik ve Duyarlılık

Yöntemin seçiciliği; analiti örnekte varlığı tespit edilmiş ve analitle girişim yapabilen diğer bileşenlerden ayırt etmesidir. Seçicilik yeterli düzeyde değilse, yöntemin doğruluğu, kesinliği ve doğrusallığı hakkında bir şüphe uyanır (Shabir, 2003).

2.8.7. Ölçüm Belirsizliği

Ölçülen miktar ile ilişkili olarak karşılaşılabilecek değerler dağılımını ifade eder. Ölçüm belirsizliği, gerçekte, her ölçüm sonucu ile birlikte yer alması gereken bir parametredir. Testin güven düzeyini gösterir. Testi kullananlara ölçümün kalitesi hakkında bilgi verir, sonucun gerçek değeri ne ölçüde yansıttığını gösterir. Laboratuvarlar, kendi koşullarında tüm belirsizlik kaynaklarını sistematik olarak inceleyip, belirsizlik değerlerini ölçüm sonucu ile birlikte rapor etmelidir (Guideline, 1994).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Kimyasal Maddeler ve Malzemeler

Metanol (honeywell)

Acetik asit (merck)

Ultrasaf su

Otomatik Pipet (10-100 μ l, 100-1000 μ l)

Erdostin (Sandoz Novartis)

Chitosan (Merck)

Polivinil alkol (Merck)

3.2. Kullanılan Cihazlar

Etüv (Mettler)

Terazi (Shimadzu)

Vorteks Karıştırıcı (Heidolph)

Ultrasonik Banyo (Isolab)

HPLC Sistemi

Agilent 1220 HPLC.

3.3. HPLC Yöntem Şartları

Erdostein için HPLC çalışmasında uygulanan kromatografik yöntem şartları Tablo 3.1’de verilmiştir.

Tablo 3.1. HPLC yöntem şartları

Yöntem Şartları	Erdosteine
Kolon	C18 kolon (Zorbax;150 x 4.6 mm, 5 µm)
Dedektör	UV Dedektör
Hareketli Faz	Metanol-Su(0.01 M Asetik asit)(65:35, V:V)
Akış Hızı (mL/dk)	0.4
Dalga Boyu (nm)	235
Elüsyon	İzokratik
Kolon Sıcaklığı (°C)	40
Enjeksiyon hacmi (µL)	5

3.3.1. HPLC Yöntem Geçerlilik Testleri

Bu çalışmada analizlerde kullanılan geçerlilik testleri, ICH Q2B (The International Conference on Harmonization) rehberine uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

3.3.1.1. Doğrusallık ve Çalışma Aralığı

Bu çalışmada kalibrasyon eğrisi elde edilebilmek için 0.1-25 µg/mL derişimlerdeki standart çözeltilerin HPLC'den kromotogramları alınmıştır. Bu kromotogramlar da bulunan piklerin alanlarına karşılık gelen derişimlere göre kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Kalibrasyon eğrisi yardımıyla doğru denklemi ve korelasyon eğrisi elde edilmiştir.

3.3.1.2. Doğruluk/Kesinlik ve Geri Kazanım

Doğruluk ve kesinlik çalışmaları yapılırken kalibrasyon eğrisi içerisine düşecek şekilde üç farklı derişimde kalite kontrol numueleri belirlendi. Kesinlik ve doğruluk çalışmaları gün içi ve günler arası olacak şekilde yapılmıştır. Erdosteine standart çalışma çözeltilerin derişimleri 0.25, 8 ve 24 µg/mL olacak şekilde hazırlanmıştır. Herbir kalite kontrol numunesi 6 defa analizleri yapıldıktan sonra kesinlik % bağıl standart sapma, doğruluk % bağıl hata ile verildi.

Doğruluk [%BH: (bulunan-eklenen/eklenen) x 100], kesinlik [% BSS: (SS/ortalama değer) x 100] ile hesaplanmıştır.

Farmasötik preparatlar için analitik geri kazanım, standart ekleme yöntemine göre yapıldı.

3.3.1.3. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Miktar Tayin Alt Sınırı (LOQ)

HPLC yönteminde, kromatogramlarda sinyal/gürültü oranının 0,03 olduğu derişim gözlenebilme sınırı (LOD), 0.1 olduğu derişim ise miktar tayin alt sınırı (LOQ) olarak belirlendi.

3.3.1.4. Kapsül Çözeltilerin Hazırlanması

Erdosteine etkin maddesini içeren farmasetik preparat Erdostin 300 mg eczaneden temin edildi. Erdostin kapsül açılarak içersindeki toz alınarak tartıldı. Metanol içersinde 100 µg/mL derişimde stok çözelti hazırlandıktan sonra 25 µg/mL erdosteine çözeltisi hazırlandı. Sonrasında HPLC cihazında miktar tayini yapıldı.

3.3.1.5. Stres Testi

Erdosteinein stabilitesini araştırmak amacıyla farklı şartlar altında stres çalışmaları yapıldı. Erdosteine asidik (0.1 M HCl), bazik (0.1 M NaOH) ve oksitleyici (0.1 M H₂O₂) ortamlarda 2 saat bekletildikten sonra validasyonu yapılmış olan HPLC’de analizler yapıldı.

3.4. Adsorpsiyon Çalışması

3.4.1. Adsorbentin (Kitosan /Polivinil Alkol) Hazırlanması

Kitosan %2’lik asetik asit çözeltisinde tamamen çözündürüldü. PVA, 90°C’de damıtılmış su ile karıştırılarak tamamen çözüldü ve kitosan çözeltisine eklendi. Bu son çözelti 3 saat karıştırıldı. Çözelti -80 °C’de 3 saat donduruldu ve liyofilize edildi. Elde edilen köpük benzeri adsorbentleri, adsorpsiyon deneyleri için küçük parçalar halinde kesildi.

3.4.2. Adsorbentin Karakterizasyonu

Hazırlanan adsorbent öncelikle kimyasal yapıları ve bağları anlamak için Bruker VERTEX 70v model FT-IR (Fourier transform kızılötesi spektrometre) kullanılarak 4000–400 cm^{-1} aralığında analiz edildi.

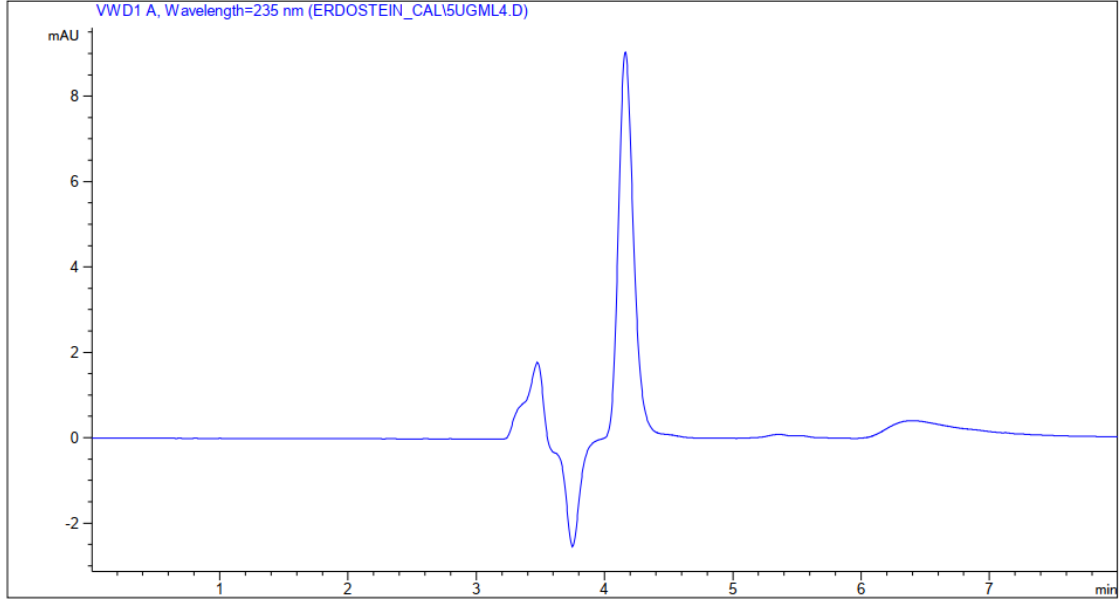
3.4.3. Adsorpsiyon Çalışması

Adsorpsiyon deneyleri zamana bağlı olarak erdosteine giderim miktarını belirlemek için yapılmıştır. Buna göre 50 mg adsorbent 10 mL hacminde 40 $\mu\text{g/mL}$ erdosteine çözeltisine katılmıştır ve 5, 10, 20, 40, 80 dk'lar boyunca çalkalayıcıda (250 rpm) adsorpsiyon deneyleri gerçekleştirilmiştir. Sonrasında çözeltiler 6000 rpm'de santrifüj edilmiş ve üstte kalan çözelti alınarak HPLC cihazı ile yeni geliştirilmiş yöntem ile analiz edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC) Yöntemi Geliştirme

Erdostein'in 100 µg/mL derişimde metanol içerisinde hazırlanan stok çözeltisi analiz yapıłana kadar -20°C'de kadar bekletilmiştir. Bu çalışmada hareketli faz olarak Metanol-Su(0.01 M Asetik asit) (65:35, V:V) kullanılmıştır. Ayrıca en iyi ayırım C18 kolon (Zorbax;150 x 4.6 mm, 5 µm) kullanıldı. Stok çözeltiden 0.1, 0.5, 1, 5, 10 ve 25 µg/mL derişimlerinde standart çalışma çözeltileri hazırlandı. Elde edilen kromotogram şekil 4.1'de verilmiştir. Bu standart çözeltilerinin HPLC'de 235 nm dalga boyunda kromatogramları alındı.

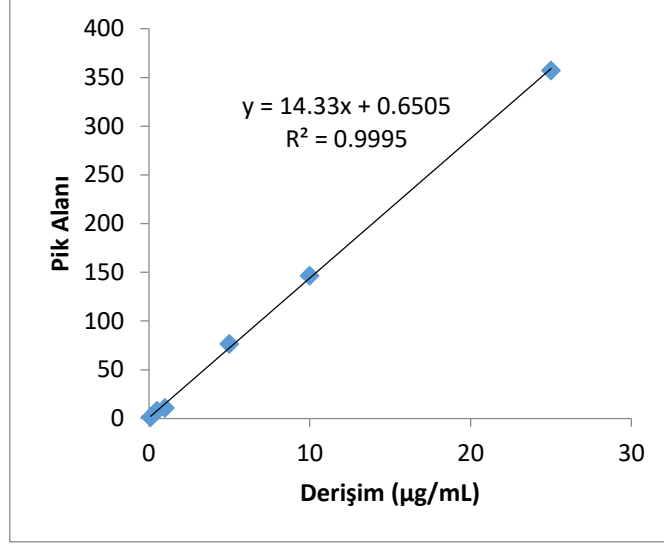


Şekil 4.1. Erdostein'in 5 µg/mL derişimde HPLC kromatogramı

4.2. HPLC Yöntem Geçerlilik Testleri

4.2.1. Doğrusal Aralık ve Kalibrasyon Eğrisi

Kalibrasyon eğrisi elde edilebilmek için 0.1-25 µg/mL (0.1, 0.5, 1, 5, 10 ve 25 µg/mL) derişimlerdeki standart erdostein çözeltilerinin HPLC'de kromotogramları alınmıştır. Bu kromotogramlar da bulunan piklerin alanlarına karşılık gelen derişimlere göre kalibrasyon eğrisi çizilmiştir.



Şekil 4.2. Erdosteine için HPLC yöntemi ile kullanılarak elde edilen kalibrasyon eğrisi

Kalibrasyon eğrisinin istatistiksel analiz sonuçları Tablo 4.1’de verildi.

Tablo 4.1. Erdosteine kalibrasyon eğrisinin istatistiksel analiz değerleri

Enstrümental Sistem	HPLC
Dalga Boyu (λ: nm)	235
Doğrusal Aralık (µg/mL)	0.1–25
Regrasyon Doğrusu Denklemi	$y = 14.33x + 0.6505$
Korelasyon katsayısı (r)	0.9997

4.2.2. Kararlılık (Stabilite)

Erdosteine standart çözeltilerinin çalışma süresince kararlı (stabil) kaldığı süreyi belirlemek amacıyla kararlılık çalışması gerçekleştirildi. Bunun için erdosteinein 7.5 ve 22 µg/mL derişimde hazırlanan çözeltileri oda sıcaklığı, +4 ve -20 °C’de 24 ve 48 saat süreyle bekletildi. Bu süreler sonunda çözeltilerin yayma şiddetleri ölçüldü ve elde edilen değerler standart çözeltilerin hemen okunan değerleri ile kıyaslanarak sonuçlar yüzde geri kazanım ile Tablo 4.2’de verildi.

Tablo 4.2. Erdosteine'in HPLC yöntemi ile belirlenen kararlılık (stabilite) değerleri

Eklenen ($\mu\text{g/mL}$)	Oda	Oda	Oda	+4°C	+4°C	+4°C	-20° C	-20°C	-20°C
	sıcaklığı (0.saat)	sıcaklığı (24.saat)	sıcaklığı (72.saat)	(0.saat)	(24.saat)	(72.saat)	(0.saat)	(24.saat)	(72.saat)
7.5	8.44	8.20	7.14	7.76	8.07	7.64	8.0	8.04	7.68
22	23.43	23.90	23.38	23.56	23.93	23.10	22.64	23.09	22.50

4.2.3. Doğruluk/Kesinlik

HPLC yönteminin gün içi ve günler arası kesinlik hassas tekrarlanabilirliği belirlenmiştir ve bu değerler Tablo 4.3'te verilmiştir.

Tablo 4.3. HPLC çalışmalarında erdosteine'in gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri

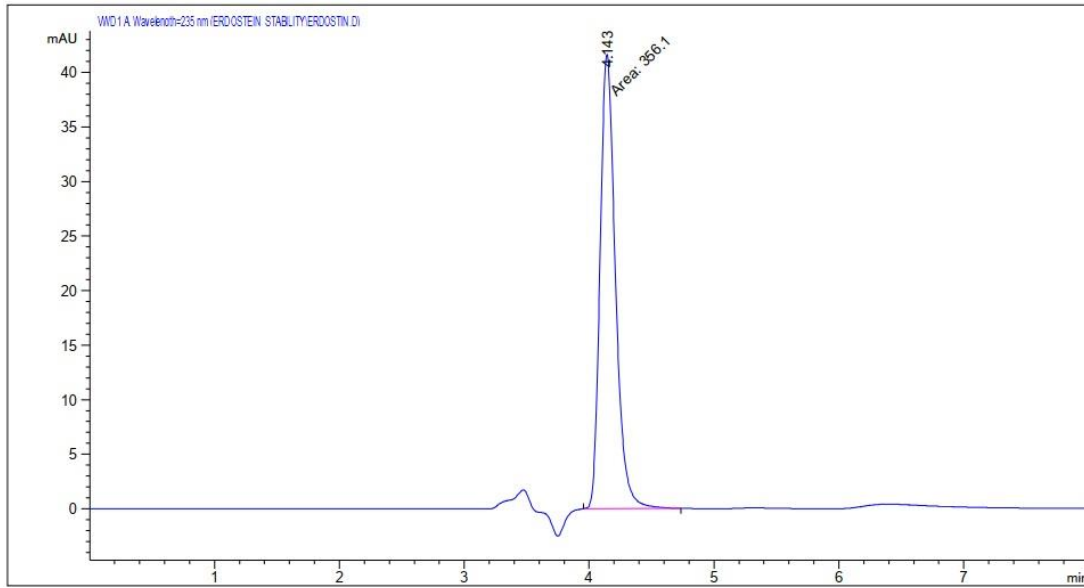
Eklenen ($\mu\text{g/mL}$)	Bulunan ($\mu\text{g/ml}$)	Gün içi			Eklenen ($\mu\text{g/mL}$)	Günler Arası		
		X \pm SS ($\mu\text{g/mL}$)	% BSS	% BH		X \pm SS ($\mu\text{g/mL}$)	% BSS	% BH
0.25	0.27	0.27 \pm 0.003	1.113	8	0.27	0.271 \pm 0.013	4.79	8.4
	0.27							
	0.27							
	0.27							
	0.27							
	0.27							
8	8.51	8.52 \pm 0.033	0.387	6.5	8.54	8.51 \pm 0.044	0.517	6.375
	8.53							
	8.57							
	8.54							
	8.49							
	8.48							
24	24.28	24.27 \pm 0.023	0.094	1.11	24.35	24.35 \pm 0.053	0.217	1.458
	24.28							
	24.24							
	24.30							
	24.26							
	24.25							

4.2.4. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Miktar Tayin Alt Sınırı (LOQ)

HPLC yönteminde, kromatogramlarda sinyal/gürültü oranının 0.03 olduğu derişim gözlenebilme sınırı (LOD), 0.1 olduğu derişim ise miktar tayin alt sınırı (LOQ) olarak belirlendi.

4.2.5. Analitik Geri Kazanım

Erdostein için HPLC geliştirilen yöntemin uygulanabilir olduğunu görmek için ticari olarak piyasada mevcut olan Erdostin(300mg) eczanelerden temin edildi. Bu ilaç 25 µg/mL derişimlerde çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerin HPLC yöntemiyle kromatogramları alındı, pik alanları okundu, pik alan oranları belirlendi. Sonuçlar % geri kazanım değerleriyle verildi. Farmasötik preparatlardan elde edilen spektrumlar Şekil 4.3'de ve analiz sonuçları Tablo 4.3 'de verildi.



Şekil 4.3. Erdostin kapsülün 25 µg/mL derişimindeki HPLC kromatogramı

Tablo 4.4. HPLC yönteminin tablet çözeltilerinin analiz sonuçları

Ticari Preparat	Eklenen ($\mu\text{g/mL}$)	Bulunan ($\mu\text{g/mL}$)+SS	Geri Kazanım (%)
Erdostin (300mg)	25	24.95 \pm 0.35	99.8

SS: Standart Sapma

4.2.6. Stres Çalışmaları

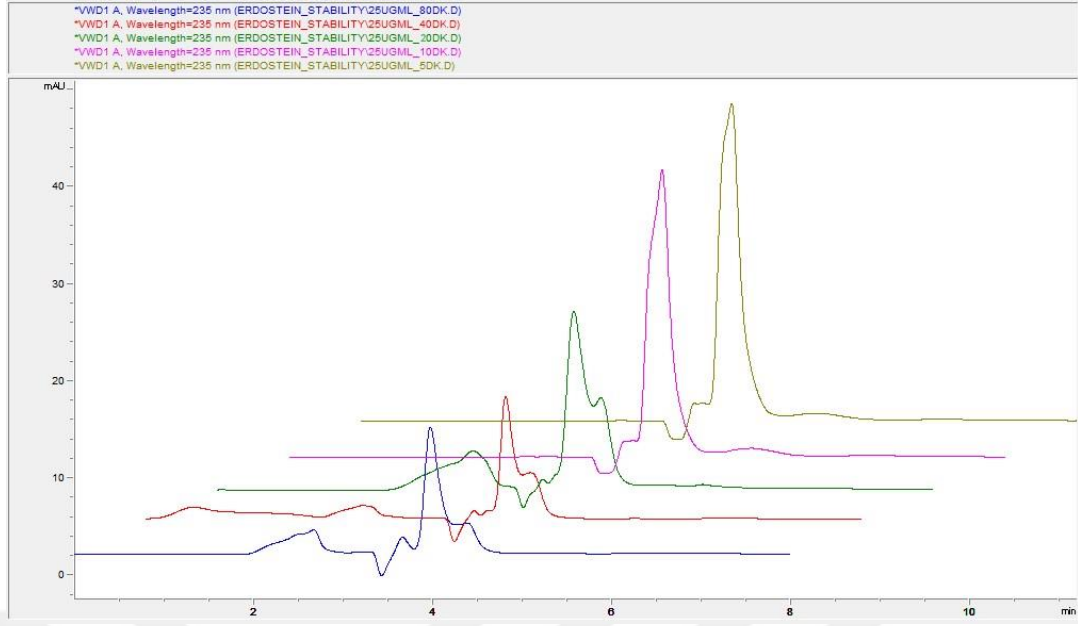
Sulu, asit, baz ve oksidasyon ortamlarında erdostein'in bozulma oranları hesaplandı. Buna göre Sulu ortamda hiç bozulmazken, asit baz ve oksidasyon ortamlarında önemli derecede bozulmuştur. Sulu ortamda %0.24, asitli ortamda %92.04, bazlı ortamda %99.73 ve oksidasyon ortamda %48.15 oranında bozulma görülmüştür.

Tablo 4.5. Erdostein'in stres şartlarında bozulma oranları

Stres Şartları	Eklenen Erdostein ($\mu\text{g/mL}$)	Zaman (saat)	Bulunan Erdostein ($\mu\text{g/mL}$)	Bozulma (%)
Su	200	2	200.4	0.24
Asit Hidrolizi	200	2	15.91	92.04
Baz Hidrolizi	200	2	0.54	99.73
Oksidasyon	200	2	103.7	48.15

4.3. Adsorpsiyon Çalışmaları

Daha önce hazırlanmış Kitosan/PVA adsorbentleri 5, 10, 20, 40 ve 80 dk boyunca 40 $\mu\text{g/ml}$ erdostein çözeltisinde çalkalayıcıda bekletilerek adsorpsiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Adsorpsiyon sonrası zamana bağlı HPLC kromotogramı Şekil 4.4'te ve çözeltide kalan Erdostein yüzdeleri de Tablo 4.4'te verilmiştir.



Şekil 4.4. Adsorpsiyon sonrası zamana bağlı HPLC kromotogramı.

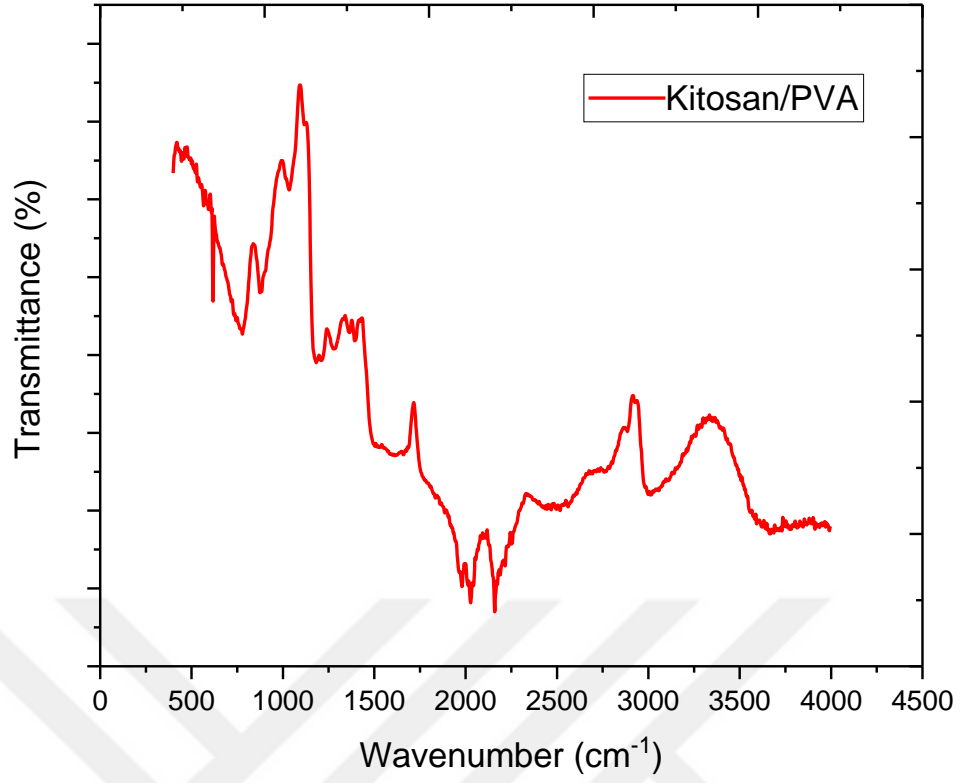
Tablo 4.6. Zamana bağlı erdosteinin adsorplanma değerleri

Zaman (dk)	Eklenen Erdosteinein (µg/mL)	Bulunan Erdosteinein (µg/mL)	Adsorplanma Miktarı (%)
5	40	37.73	5.67
10	40	35.41	11.47
20	40	27.11	32.22
40	40	9.50	76.25
80	40	9.28	76.8

4.5. Adsorbentin FTIR Analizi

Adsorbentin kimyasal yapılarının doğrulanması için FTIR analizi yapılmıştır.

Kitosan/PVA adsorbentinin FTIR analizi Şekil 4.5'te verilmiştir.



Şekil 4.5. Adsorbentin (Kitosan/PVA) FTIR analizi

5. TARTIŞMA

Analitik kimya, bir madde örneğinin kimyasal ve yapısal bileşimi hakkında niteliksel ve niceliksel bilgi sağlayan bilim dalıdır. Alaşımli çeliklerdeki yüksek derişimlerinden, biyolojik dokudaki milyarda bir oranındaki ilaç seviyelerine kadar farklı numuneler analistler tarafından değerlendirilir. Bu alan, incelenen türün ölçülmüş bir fiziksel özelliğinin kullanılabilir bir sinyale dönüştürülmesi üzerine kurulmuştur. Tarihsel gelişimine göre genel olarak klasik ve enstrümantal olmak üzere iki kategoriye ayrılır. Genel strateji, numuneyi doğru bir şekilde hazırlamak, belirli bir analiz yöntemi geliştirmek ve sonuçları istatistiksel değerlendirmeyi de içerebilecek anlamlı bir formatta raporlamaktır.

Bir analist, kendisine sunulan temel teknolojik problem bağlamında ölçümleri tasarlayabilmeli, gerçekleştirebilmeli ve yorumlayabilmelidir. Uygun kimyasal prosedürlerin seçimi ve kullanımı geniş bir kimya bilgisi gerektirirken, çeşitli enstrümanlara aşinalık ve bunları kullanma yeteneği de esastır. Son olarak analistler, elde ettikleri sonuçların anlamını ve güvenilirliğini ölçebilmelerini sağlamak için deneysel verilerin istatistiksel olarak işlenmesine ilişkin sağlam bir bilgiye sahip olmalıdır. Bir inceleme, numunenin bir veya daha fazla bileşeninin tanımlanmasıyla sınırlı olduğunda, buna niteliksel analiz denir; belirli bir türün ne kadarının mevcut olduğunu belirlemeye yönelik bir inceleme ise niceliksel bir analiz oluşturur. Bazen bir molekül veya kristalli bileşikteki atomların uzaysal düzenine ilişkin bilgiye ihtiyaç duyulabilir. Belirli organik fonksiyonel grupların varlığının ve konumunun doğrulanması istenebilir. Bu tür incelemeler yapısal analiz olarak nitelendirilbilmektedir. Niteliksel veya niceliksel analize konu olan herhangi bir tür, analitler olarak tanımlanır. Niteliksel ve niceliksel analizde kullanılan teknikler ve yöntemler arasında pek çok ortak nokta vardır. Her iki durumda, fiziksel ve kimyasal 'şartlandırma' yoluyla analiz için bir numune hazırlanır ve ardından analite ilişkin bazı özelliklerin ölçümü yapılır. Niteliksel bir analiz için, olumlu

ve olumsuz sonuçların doğru perspektifte görülebilmesi için duyarlılık sınırı bilinen bir testin uygulanabilmesi yeterlidir. Ancak niceliksel bir analiz yapıldığında ölçüm ile analit arasındaki ilişkinin katı ve ölçülebilir bir orantıya uyması gerekir. Bu sayede numunedeki analit miktarı ölçülebilir. Bu orantıyı korumak için, ölçüm yapılacak bir numunenin hazırlanmasında kullanılan tüm reaksiyonların kontrollü, tekrarlanabilir olması ve ölçüm koşullarının tüm benzer ölçümler için sabit kalması genellikle esastır. Kantitatif analizde kullanılan yöntemlerin dikkatli kalibrasyonuda önemlidir. Kimyasal analizin bu yönleri analistin önemli bir görevidir.

Bu çalışmada bir mukolotik ajan olan Erdosteine etkin maddesinin farmasötik preparatlarda miktar tayini için iyi bir literatür araştırması sonrasında HPLC cihazında kullanılmak üzere yeni bir analitik yöntem geliştirilerek geçerlilik testlerinin (validasyonlarının) yapılması amaçlandı. Ayrıca erdosteine etkin maddesinin atık sularda kirliliğini azaltması için bir adsorbent yardımıyla adsorpsiyon işlemi gerçekleştirilmiş ve bu yeni geliştirilen HPLC yöntemi ile çözeltideki adsorplanma oranları bulunmuştur.

Kromatografi, sabit faz üzerine tutunmuş birbirine benzer maddelerin hareketli faz vasıtasıyla ayrılmasıdır. Hareketli faz sıvı, gaz veya bir süperkritik akışkan olabilirken, sabit faz katı, jel veya katı üzerine emdirilmiş sıvı olabilir. Araştırılan analitlerin özellikleri ve mevcut analitlerin miktarı ışığında seçilmelidir. Yanlış bir seçim başarılı bir analizin yapılmasını engelleyebilir. HPLC yöntemi ilaç analizlerinde en fazla kullanılan analitik yöntemdir. HPLC nin hassasiyetinin yüksek olması hem farmasötik preparatlarda hem de biyolojik ortamlarda yapılan analizlerde çok büyük bir avantaj sağlamaktadır.

Yapılan bu çalışmada geliştirilen HPLC yönteminde C18 (Zorbax;150 x 4.6 mm, 5 µm) kolonu, metanol-su (0.01 M Asetik asit) (65:35, V:V)'dan oluşan hareketli faz, 0.4 mL/dk akış hızı, 235 nm dalga boyu ve 5 µL enjeksiyon hacminden oluşan çalışma parametreleri kullanıldı. Bu parametreler belirlenirken öncelikle literatürdeki veriler incelendi ve böylelikle en uygun parametreler tayin edildi. Bu yöntemin 0.1-25 µg/mL

derişim aralığında doğrusal olduğu belirlendi. Stok çözeltilerden 0.1, 0.5, 1, 5, 10 ve 25 µg/mL derişimlerinde standart erdostein çözeltileri hazırlandı ve HPLC’de kromatogramları alındı. Her bir çözeltilerin derişimine karşı erdostein pik alanını grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi elde edildi. Kalibrasyon eğrisinin regresyon analizinden, regresyon doğrusunun denklemi $y = 14.33x + 0.6505$; erdostein etkin maddesi için korelasyon katsayısı (r) 0.9997 olarak belirlendi. Bertolini ve arkadaşları, Erdostein için HPLC’de yeni bir metod geliştirmişler ve korelasyon katsayısını (R) 0.9996 bulmuşlardır (Bertolini ve ark. 2018). Literatürden görüldüğü üzere bu çalışmada yakın korelasyon katsayısı bulunmuştur. Yöntemin LOD değeri 0.03 ve LOQ değeri 0.01 olarak belirlenmiştir. Liu ve arkadaşları HPLC’de erdostein için yeni bir metod geliştirmişler ve LOD ve LOQ değerlerini sırasıyla 3 ve 10 bulmuşlardır (Liu ve ark. 2022). Yine benzer bir çalışmada Dhoka ve arkadaşları erdostein için HPLC’de LOD ve LOQ değerlerini sırasıyla 5.29 ve 11.14 bulmuşlardır (Dhoka ve ark. 2013). Bu sonuçlardan anlaşıldığı üzere LOD ve LOQ değerleri bu çalışmada daha hassas olduğu görülmüştür. Gün içi, doğruluk ve kesinlik çalışmalarında %BH ve %BSS sırasıyla % 6.5 ve %0.387 olduğu; günler arası ise %6.375 ve %0.517 belirlendi. Geçerlilik testleri yapılan yöntemin erdostein içeren Erdostin kapsüllerde uygulaması ile geri kazanım değerleri %99.8 olduğu bulunmuştur.

Geliştirilip, geçerlilik testleri yapılan yöntemlerin kesinlik ve doğruluğunun iyi olduğu, geri kazanım değerlerinin yüksek olduğu bundan dolayı da yöntemlerin rutin kalite kontrol laboratuvarlarında rahatlıkla kullanılabilmesi söylenebilir.

İlaçların atık sulara karışıp doğaya salınması çevre sağlığı açısından önemli bir sorundur. Bu sebeple kitosan/pva adsorbentleri kullanılarak çözeltilerdeki erdostein adsorplanma miktarı bulunmuştur. Buna göre zamana bağlı olarak 5,10,20,40 ve 80 dk sürelerinde adsorpsiyon işlemi gerçekleştirilmiş ve bu süreler sonunda elde edilen her bir çözelti satrifüj işlemi sonrası HPLC ile çözelti içerisinde kalan erdostein miktarları tayin

edilmiştir. Buna göre 5-80 dk arasında sırasıyla 5.67, 11.47, 32.22, 76.25 ve 76.8 yüzde erdostein giderimi sağlanmıştır. En yüksek adsorplanma 80 dk sonunda %76.8 ile elde edilmiştir.

Kitosanda ve PVA'da sırasıyla 3307 cm^{-1} ve 3309 cm^{-1} 'deki pikler $-\text{OH}$ gruplarını, 2912 ve 2917 cm^{-1} 'deki pikler ise $-\text{NH}_2$ titreşimlerini gösterir. 1436 cm^{-1} bantların görünümü CH_2 bükülmesini ve CH_3 simetrik deformasyonlarını doğrular. 1068 cm^{-1} ve 1080 cm^{-1} 'deki bantlar C–O gerilmesine karşılık gelir. Literatürle karşılaştırıldığında bu çalışmada FTIR analizi ile Kitosan ve PVA varlığı doğrulanmıştır (Bingöl, 2022).



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, erdostein etkin maddesinin standart çözeltilerde ve farmasötik preparatlarda miktar tayini için literatürdeki yöntemlere alternatif olacak yeni bir HPLC yöntemi geliştirilip geçerlilik testleri yapıldı. Ayrıca atık sularda kitosan/pva adsorbenti kullanılarak zamana bağlı erdostein giderimi çalışması yapıldı. Elde edilen çözeltiler geliştirilen bu HPLC yöntemi ile miktar tayini yapıldı.

Geliştirilen bu yöntemler hassas, duyarlı, seçici, doğru ve kesin olduğu geçerlilik testleri ile gösterildiğinden dolayı yöntemlerin farmasötik preparatlarda erdostein miktar tayini için uygulanabilir olduğu sonucuna varıldı. Ayrıca adsorpsiyon sonrası elde edilen çözeltilerde uygulanabildiği görünen bu yöntemin bundan sonraki çalışmalara da yol gösterici ve uygulanabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Abdulhalim, I., Zourob, M., Lakhtakia, A. (2008). Surface plasmon resonance for biosensing: a mini-review. *Electromagnetics*, 28(3), 214-242.
- Baeten, V., ve Dardenne, P. (2002). Spectroscopy: Developments in instrumentation and analysis. *Grasas y aceites*, 53(1), 45-63.
- Ball, D. W. (1994). The Baseline: Properties of Light Waves. *Spectroscopy-Eugene*, 9(5), 24-25.
- Bello, O. S., Moshood, M. A., Ewetumo, B. A., Afolabi, I. C. (2020). Ibuprofen removal using coconut husk activated Biomass. *Chemical Data Collections*, 29, 100533.
- Bertolini, T., Vicentini, L., Boschetti, S., Gatti, R. (2018). A novel ultra-high performance liquid chromatography method for the determination of erdosteine, related impurities and degradation products in new effervescent tablets. *Chromatographia*, 81(12), 1661-1672.
- Bingöl, M.S. (2022). Effects of Prepared Gadolinium Oxide-Doped Chitosan/PVA Hydrogels on Congo Red Removal in Water. *Water Air Soil Pollut*, 233, 410.
- Biosciences, A. (2002). Ion Exchange chromatography, Principles and methods, Amercham Pharmacia. *Biotech SE*, 751.
- Braga, P. C., Dal Sasso, M., Zuccotti, T. (2000). Assessment of the antioxidant activity of the SH metabolite I of erdosteine on human neutrophil oxidative bursts. *Arzneimittelforschung*, 50(08), 739-746.
- Cazzola, M., Floriani, I., Page, C. P. (2010). The therapeutic efficacy of erdosteine in the treatment of chronic obstructive bronchitis: a meta-analysis of individual patient data. *Pulmonary pharmacology & therapeutics*, 23(2), 135-144.
- Cazzola, M., Page, C., Rogliani, P., Calzetta, L., Matera, M. G. (2020). Multifaceted beneficial effects of erdosteine: more than a mucolytic agent. *Drugs*, 80, 1799-1809.
- Coskun, O. (2016). Separation techniques: chromatography. *Northern clinics of Istanbul*, 3(2), 156.
- Cuatrecasas, P., Wilchek, M., Anfinsen, C. B. (1968). Selective enzyme purification by affinity chromatography. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 61(2), 636-643.
- Dardenne, P., Sinnaeve, G., Baeten, V. (2000). Multivariate calibration and chemometrics for near infrared spectroscopy: which method? *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 8(4), 229-237.

- Das, M., ve Dasgupta, D. (1998). Pseudo-affinity column chromatography based rapid purification procedure for T7 RNA polymerase. *Preparative biochemistry & biotechnology*, 28(4), 339-348.
- Davidson, A. G., Beckett, A. H., Stenlake, J. B. (1997). *Practical Pharmaceutical Chemistry*. CBS publishers and distributors, New Delhi.
- Dechant, K. L., ve Noble, S. (1996). Erdosteine. *Drugs*, 52(6), 875-881.
- Demchenko, A. P. (2013). *Ultraviolet spectroscopy of proteins*. Springer Science & Business Media.
- Determann, H. (2012). *Gel chromatography gel filtration· gel permeation· molecular sieves: A laboratory handbook*. Springer Science & Business Media.
- Dhoka, M. V, Gawande, V. T., Joshi, P. P. (2013). Validated HPTLC Method for Determination of Cefixime Trihydrate and Erdosteine in Bulk and combined Pharmaceutical Dosage Form. *Eurasian J Anal Chem*, 8(3), 99-106.
- Diffey, B. L. (2002). Sources and measurement of ultraviolet radiation. *Methods*, 28(1), 4-13.
- Elbalkiny, H. T., Yehia, A. M., Riad, S. M., Elsaharty, Y. S. (2019). Removal and tracing of cephalosporins in industrial wastewater by SPE-HPLC: optimization of adsorption kinetics on mesoporous silica nanoparticles. *Journal of Analytical Science and Technology*, 10, 1-12.
- Firer, M. A. (2001). Efficient elution of functional proteins in affinity chromatography. *Journal of biochemical and biophysical methods*, 49(1-3), 433-442.
- Gerberding, S. J., ve Byers, C. H. (1998). Preparative ion-exchange chromatography of proteins from dairy whey. *Journal of Chromatography A*, 808(1-2), 141-151.
- Guideline, T. (1994). Q2A Text on Validation of Analytical Procedures. *Fed. Regist*, 60.
- Harvey, D. (2010). *Analytical Chemistry 2.0*. LibreTexts.
- Hoppe, W., Lohmann, W., Markl, H., Ziegler, H. (2012). *Biophysics*. Springer Science & Business Media.
- Ito, M., Suzuki, T., Yada, S., Nakagami, H., Teramoto, H., Yonemochi, E., Terada, K. (2010). Development of a method for nondestructive NIR transmittance spectroscopic analysis of acetaminophen and caffeine anhydrate in intact bilayer tablets. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 53(3), 396-402.
- Karlsson, E., ve Ryden, L. (1998). JOHN BREWER. *Protein Purification: Principles, High-Resolution Methods, and Applications*, 145.

- Karpinska, J. (2012). Basic principles and analytical application of derivative spectrophotometry. *Macro to nano spectroscopy, book edited by Jamal Uddin*, 253-256.
- Khalil, H. A., El-Kimary, E. I., El-Yazbi, A. F., Belal, T. S. (2023). Multiple green spectroscopic methods for erdosteine determination in bulk and dosage form with extensive greenness evaluation. *Scientific Reports*, 13(1), 18216.
- Kim, S. T., Park, J.-S., Tae Kim, H., Kim, C.-K. (2010). Simple determination of erdosteine in human plasma using high performance liquid chromatography. *Journal of liquid chromatography & related technologies*, 33(13), 1319-1327.
- King, M., ve Rubin, B. K. (2002). Pharmacological approaches to discovery and development of new mucolytic agents. *Advanced drug delivery reviews*, 54(11), 1475-1490.
- Koba, M., Koba, K., Przyborowski, L. (2008a). Application of UV-derivative spectrophotometry for determination of some bisphosphonates drugs in pharmaceutical formulations. *Acta Pol Pharm*, 65(3), 289-294.
- Koba, M., Koba, K., Przyborowski, L. (2008b). Application of UV-derivative spectrophotometry for determination of some bisphosphonates drugs in pharmaceutical formulations. *Acta Pol Pharm*, 65(3), 289-294.
- Kumirska, J., Czerwicka, M., Kaczyński, Z., Bychowska, A., Brzozowski, K., Thöming, J., Stepnowski, P. (2010). Application of spectroscopic methods for structural analysis of chitin and chitosan. *Marine drugs*, 8(5), 1567-1636.
- Langhals, H., Abbt-Braun, G., Frimmel, F. H. (2000). Association of Humic Substances: Verification of Lambert-Beer Law. *Acta hydrochimica et hydrobiologica*, 28(6), 329-332.
- Lee, K. J., Elgrishi, N., Kandemir, B., Dempsey, J. L. (2017). Electrochemical and spectroscopic methods for evaluating molecular electrocatalysts. *Nature Reviews Chemistry*, 1(5), 0039.
- Li, H., Van De Voort, F. R., Ismail, A. A., Cox, R. (2000). Determination of peroxide value by Fourier transform near-infrared spectroscopy. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 77(2), 137-142.
- Liu, H., Xiong, X., Wang, J., Pei, K., Zhong, Z., Zhou, Z., Cheng, Q. (2022). Determination, Isolation, and Identification of Related Impurities in Erdosteine Bulk Drug. *Journal of AOAC International*, 105(3), 696-702.
- Mahn, A., ve Asenjo, J. A. (2005). Prediction of protein retention in hydrophobic interaction chromatography. *Biotechnology advances*, 23(5), 359-368.

- Mäntele, W., ve Deniz, E. (2017). UV–VIS absorption spectroscopy: Lambert-Beer reloaded. İçinde *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* (C. 173, ss. 965-968). Elsevier.
- Marchioni, C. F., Moretti, M., Muratori, M., Casadei, M. C., Guerzoni, P., Scuri, R., Fregnan, G. B. (1990). Effects of erdosteine on sputum biochemical and rheologic properties: pharmacokinetics in chronic obstructive lung disease. *Lung*, 168, 285-293.
- Mohanrao, T., Reddy, C. B., Babu, P. S. (2020). A New Investigational Method For Quantification And Validation Of Analytical Method For Cefixime And Erdosteine By Uplc With Photo Diode Array Detector In Bulk And Formulation. Application To The Estimation Of Product Traces. *Indian Drugs*, 57(11).
- Moretti, M. (2007). Pharmacology and clinical efficacy of erdosteine in chronic obstructive pulmonary disease. *Expert review of respiratory medicine*, 1(3), 307-316.
- Moretti, M., ve Marchioni, C. F. (2007). An overview of erdosteine antioxidant activity in experimental research. *Pharmacological Research*, 55(4), 249-254. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.phrs.2006.12.006>
- Moustafa, N. M., Badawey, A. M., Lamie, N. T., Abd El-Aleem, A. E.-A. B. (2014). Stability-indicating methods for the determination of erdosteine in the presence of its acid degradation products. *Journal of AOAC International*, 97(1), 86-93.
- Norgard, J., ve Best, G. L. (2017). The electromagnetic spectrum. *National Association of Broadcasters Engineering Handbook*:
- O'Connor, R. T. (1955). Ultraviolet absorption spectroscopy. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 32, 616-624.
- Olszowy, P., Szultka, M., Nowaczyk, J., Buszewski, B. (2011). A new way of solid-phase microextraction fibers preparation for selected antibiotic drug determination by HPLC–MS. *Journal of Chromatography B*, 879(25), 2542-2548.
- Onal, C., ve Kepekci Tekkeli, S. E. (2020). Ultrafast liquid chromatographic analysis of erdosteine in human plasma based on fluorimetric detection and precolumn derivatization with 4-bromomethyl-7-methoxycoumarin: Application to pharmacokinetic studies. *Luminescence*, 35(5), 748-753.
- Pelton, J. T., ve McLean, L. R. (2000). Spectroscopic methods for analysis of protein secondary structure. *Analytical biochemistry*, 277(2), 167-176.
- Poole, P., Black, P. N., Cates, C. J. (2012). Mucolytic agents for chronic bronchitis or chronic obstructive pulmonary disease. *Cochrane Database of systematic reviews*, 8.

- Porath, J. (1992). Immobilized metal ion affinity chromatography. *Protein expression and purification*, 3(4), 263-281.
- Porath, J. (1997). From gel filtration to adsorptive size exclusion. *Journal of protein chemistry*, 16, 463-468.
- Purbaningtyas, T. E., Larasati, M., Kurniawati, P., Wiyantoko, B. (2020). The performance study of a single and double beam UV-Vis spectrophotometer on nitrite determination in groundwater. *AIP Conference Proceedings*, 2229(1).
- Scientific, C. (2014). The theory of HPLC. Chromatographic parameters. *e-Learning for the Analytical Chemistry Community, LC/GC, Chromacademy*, 1-21.
- Scopes, R. K. (1984). Use of differential dye-ligand chromatography with affinity elution for enzyme purification: 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate aldolase from *Zymomonas mobilis*. *Analytical biochemistry*, 136(2), 525-529.
- Shabir, G. (2004). HPLC method development and validation for pharmaceutical analysis. *Pharmaceutical Technology Europe*, 16(3).
- Shabir, G. A. (2003). Validation of HPLC methods for pharmaceutical analysis: Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopoeia and the International Conference on Harmonization. *J. Chromatogr. A*, 987(1-2), 57-66.
- Sherma, J., ve Fried, B. (2003). *Handbook of thin-layer chromatography*. CRC press.
- Shinde, G., Godage, R. K., Jadhav, R. S., Manoj, B., Aniket, B. (2020). A Review on Advances in UV Spectroscopy. *Research Journal of Science and Technology*, 12(1), 47-51.
- Show, S., Karmakar, B., Halder, G. (2020). Sorptive uptake of anti-inflammatory drug ibuprofen by waste biomass-derived biochar: experimental and statistical analysis. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1-19.
- Simonian, M. H., ve Smith, J. A. (2006). Spectrophotometric and colorimetric determination of protein concentration. *Current protocols in molecular biology*, 76(1), 10-11.
- Stoddard, J. M., Nguyen, L., Mata-Chavez, H., Nguyen, K. (2007). TLC plates as a convenient platform for solvent-free reactions. *Chemical communications*, 12, 1240-1241.
- Upstone, S. L. (2000). Ultraviolet/visible light absorption spectrophotometry in clinical chemistry. *Encyclopedia of analytical chemistry*, 1699-1714.
- Wilchek, M., ve Chaiken, I. (2000). An overview of affinity chromatography. *Affinity Chromatography: Methods and Protocols*, 1-6.

- Willard, H. H., Merritt Jr, L. L., Dean, J. A., Settle Jr, F. A. (1988). *Instrumental methods of analysis*.
- Wyszecki, G., ve Stiles, W. S. (2000). *Color science: concepts and methods, quantitative data and formulae* (C. 40). John wiley & sons.
- Yaman, M. E., ve Atila, A. (2021). A rapid and sensitive UPLC–MS/MS method for quantification of erdosteine as bulk drug and in capsules as dosage forms. *Maced Pharm Bull*, 67(2), 23-31.
- Zhang, S., Dong, Y., Yang, Z., Yang, W., Wu, J., Dong, C. (2016). Adsorption of pharmaceuticals on chitosan-based magnetic composite particles with core-brush topology. *Chemical Engineering Journal*, 304, 325-334.
- Zweig, G., ve Sherma, J. (1977). *Spectroscopic Methods of Analysis* (C. 9). Elsevier.



EKLER

EK-1. Etik Bildirim ve İntihal Beyan Formu



SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Graduate School of Health Sciences

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU¹

Öğrencinin Adı ve Soyadı	Muhammet Sefa Yaralı
Öğrencinin Numarası	
Ana Bilim Dalı	Analitik Kimya
Öğrencinin Kayıtlı Olduğu Program Türü	Yüksek Lisans

Yukarıda bilgileri verilen tezin intihal tespit yazılımıyla (Turnitin) yapılan tarama sonucunda elde edilen benzerlik oranları aşağıdaki gibidir. Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi hâlde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz.

Bölümler	Benzerlik Oranı	Maksimum Benzerlik Oranları
I. Giriş	% 2	% 15
II. Genel Bilgiler	% 13	% 35
III. Materyal ve Metod	% 26	% 35
IV. Bulgular	% 12	% 15
V. Tartışma	% 17	% 20

Not: Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının %5'den büyük olmaması gerekir.

EK-2. Etik Kurul Onay Formu



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
Eczacılık Fakültesi Dekanlığı
Birim Etik Kurulu

Sayı : 93722986.12/1
Konu: Birim Etik Kurul Kararı

11/05/2018

Sayın Doç. Dr. Alptuğ ATILA

İlgi: 08.05.2018 tarih ve 1800142115 sayılı dilekçeniz.


Fakültemiz Birim Etik Kurulunun 11.05.2018 tarihinde almış olduğu 04 numaralı karar ile danışmanı olduğunuz yüksek lisans öğrencisi Sefa YARALI'nın "Erdostein Etkin Maddesinin Farmasötik Preparatlarda Analitik Yöntemlerle Miktar Tayini" başlıklı çalışma etik kurulunuz tarafından kabul edilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

Karar-04- Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Alptuğ ATILA'nın danışmanı olduğu yüksek lisans öğrencisi Sefa YARALI'nın Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı Laboratuvarında yürüteceği "Erdostein Etkin Maddesinin Farmasötik Preparatlarda Analitik Yöntemlerle Miktar Tayini" başlıklı çalışma ile ilgili 08.05.2018 tarih ve 1800142115 sayılı yazı ile ekleri görüşülmüştür.

Yapılan görüşmelerden sonra; söz konusu çalışmanın yürütülmesinin etik kurallara uygun olduğu mevcut oybirliği ile kabul edilmiştir.

EK-3. Tez Adı Değişikliği Bildirim Formu

	SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ Graduate School of Health Sciences
TEZ ADI DEĞİŞİKLİĞİ BİLDİRİM FORMU	
Öğrencinin Adı ve Soyadı	Muhammet Sefa YARALI
Ana Bilim Dalı	Analitik Kimya
Öğrencinin Kayıtlı Olduğu Program Türü	Yüksek Lisans
Analitik Kimya Ana Bilim Dalı Başkanlığına	
Danışmanlığımı yürüttüğüm ve yukarıda bilgileri yazılı olan ana bilim dalımız öğrencisinin tez adı aşağıda belirtilen şekilde değiştirilmiştir. Bilgilerinize arz ederim. 04.07.2024	
Değişiklik Türü	Tez adı değişikliği ☒
Tezin Eski Adı	Erdosteine Etkin Maddesinin Farmasötik Preparatlarda Analitik Yöntemlerle Miktar Tayini
Tezin Yeni Adı	Erdosteine Etkin Maddesinin HPLC ile Farmasötik Preparatlarda Miktar Tayini ve Atık Sulardan Kitosan/PVA ile Giderilmesi
Tezin İngilizce Adı	Quantity Determination of Erdosteine Active Ingredient in Pharmaceutical Preparations by HPLC and Removal from Wastewater with Chitosan/PVA
Değişikliğin Gerekeceği	Teze Atık Sularda Erdosteine Giderim Yöntemi Eklenmiştir