

**İZOPROTERENOL HİDROKLORÜR İÇİNDE İZOPROPİLAMİN HİDROKLORÜR
TAYİNİ, ANALİTİK METOT GELİŞTİRİLMESİ VE VALİDASYONU**

SELİN SALMAN

**Kimya Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi
Danışman: Prof. Dr. Ayça KARASAKAL**

2023

T.C.
TEKİRDAĞ NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



İZOPROTERENOL HİDROKLORÜR İÇİNDE İZOPROPİLAMİN HİDROKLORÜR
TAYİNİ, ANALİTİK METOT GELİŞTİRİLMESİ VE VALİDASYONU

SELİN SALMAN

ORCID: 0000-0002-1286-0097

KİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Danışman: Prof. Dr. Ayça KARASAKAL

TEMMUZ 2023
Her hakkı saklıdır.

ÖZET

İZOPROTERENOL HİDROKLORÜR İÇİNDE İZOPROPİLAMİN HİDROKLORÜR TAYİNİ, ANALİTİK METOT GELİŞTİRİLMESİ VE VALIDASYONU

Selin SALMAN

Kimya Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Ayça KARASAKAL

İzoproterenol hidroklorür; kan damarlarını genişleten, β_1 ve β_2 reseptörleri uyaran sentetik bir katekolamindir. İzopropilamin, izoproterenol hidroklorür ilaç etken maddesinin sentezinde kullanılan başlangıç maddelerinden biri olup, son üründe miktarı Uluslararası İlaç Uyum Konseyi (ICH)'ne göre %0.15'i geçmemesi gerektiğinden, kantifikasyonu analitik metot ile kontrol edilir. Bu çalışmada izopropilamin safsızlığı yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC-UV) sistemi kullanılarak ve kolon öncesi türevlendirme yapılarak tayin edilmiştir. Yöntemde türevlendirme ajanı olarak 1-naftil izotiyosiyanat kullanılmış, oluşan 1-izopropil-3-(naftalen-1-il)tiyoüre molekülü 230 nm dalga boyunda izlenmiştir. Numunedeki analitik ayırım Phenomenex Luna Phenyl-Hexyl kolon (4,6 mm x 250 mm; 5.0 μm), %0.1 o-fosforik asit ve 70:20:10 oranında asetonitril, metanol ve su karıştırılmış mobil faz sistemi kullanılarak sağlanmıştır. Metot validasyonu çalışmaları ICH Q2(R1) kılavuzuna göre yapılmıştır. Validasyon parametrelerinden seçicilikte; türevlendirilmiş izopropilamin molekülünün oluşturduğu pikin izoproterenol hidroklorür maddesinin pikinden ve diğer safsızlıkların piklerinden ayrıldığı ve spektral olarak saf olduğu gözlemlenmiştir. Türevlendirilmiş izopropilamin molekülünün stabilitesinin 10 saat olduğu bulunmuştur. Gözlenebilirlik sınırı (LOD) 0.0021 $\mu\text{g/mL}$ ve alt tayin sınırı (LOQ) 0.0071 $\mu\text{g/mL}$ olarak hesaplanmıştır. Yöntemin hızlı, sağlam, seçici, tekrar edilebilir ve düşük derişimlerde de izopropilamin tayinine olanak sağlayan bir çalışma olduğu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: İzoproterenol hidroklorür, İzopropilamin, HPLC, Türevlendirme

ABSTRACT

DETERMINATION OF ISOPROPYLAMINE HYDROCHLORIDE IN ISOPROTERENOL HYDROCHLORIDE, DEVELOPMENT AND VALIDATION OF ANALYTICAL METHOD

Selin SALMAN

Department of Chemistry

MSc. Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Ayça KARASAKAL

Isoproterenol hydrochloride; is a synthetic catecholamine that dilates blood vessels and stimulates β_1 and β_2 receptors. Isopropylamine is one of the starting materials used in the synthesis of isoproterenol hydrochloride active pharmaceutical ingredient, and its quantification is controlled by analytical method, since its amount in the final product should not exceed 0.15% according to the The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). In this study, determination of isopropylamine impurity was performed by high performance liquid chromatography system and pre-column derivatization. In the method, 1-naphthyl isothiocyanate was used as the derivatizing agent and the resulting 1-isopropyl-3-(naphthalen-1-yl)thiourea molecule was monitored at a wavelength of 230 nm. Analytical separation in the sample was made using a Phenomenex Luna Phenyl-Hexyl column (4.6 mm x 250 mm; 5.0 μm), 0.1% o-phosphoric acid and a 70:20:10 ratio acetonitrile, methanol and water mixed mobile phase system. Method validation studies were performed according to the ICH Q2(R1) guideline. Specificity from validation parameters; it was observed that the peak formed by the derivatized isopropylamine molecule was separated from the peak of the isoproterenol hydrochloride substance and the peaks of other impurities and was spectrally pure. The stability of the derivatized isopropylamine molecule was determined as 10 hours. The limit of detection (LOD) was calculated as 0.0021 $\mu\text{g/mL}$ and the limit of quantification (LOQ) as 0.0071 $\mu\text{g/mL}$. It has been observed that the method is fast, robust, selective, reproducible and allows the determination of isopropylamine at low concentrations.

Keywords: Isoproterenol hydrochloride, Isopropilamine, HPLC, Derivatization

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ÇİZELGELER DİZİNİ	v
SİMGELER DİZİNİ	vii
KISALTMALAR DİZİNİ	viii
TEŞEKKÜR	9
1. GİRİŞ	10
1.1 Literatür Özeti	11
1.2 İzoproterenol Hidroklorür, İzopropilamin ve 1-Naftil izotiyosiyanat Hakkında Genel Bilgiler.....	14
1.2.1 İzoproterenol hidroklorür.....	14
1.2.2 İzopropilamin.....	14
1.2.3 1-Naftil izotiyosiyanat	14
1.3 Kromatografi.....	15
1.3.1 Sıvı Kromatografi	16
1.3.2 Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC).....	16
1.4 Türevlendirme.....	18
1.4.1 Kolon Öncesi Türevlendirme.....	19
1.4.2 Kolon Sonrası Türevlendirme.....	20
1.4.3 Türevlendirme Reaktif Seçimi.....	20
1.5 Çalışmanın Amacı.....	22
2. MATERYAL VE YÖNTEM	23
2.1 Tez Çalışmasında Kullanılan Cihazlar.....	23
2.2 Tez Çalışmasında Çalışılan Kolonlar.....	23
2.3 Tez Çalışmasında Kullanılan Kimyasallar.....	23
2.4 Tez Çalışmasında Kullanılan Sertifikalı Standartlar ve İlaç Etken Maddeleri	23
2.5 Tez Çalışmasında Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	24
2.5.1 Optimize Edilen Metotta Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması.....	24
2.5.2 Seçicilik Parametresi Çalışmalarında Kullanılan Çözeltiler.....	25
2.5.3 Doğrusallık Parametresi Çalışmalarında Kullanılan Çözeltiler.....	26
2.5.4 Belirleme ve Nicelik Sınırı Çalışmalarında Kullanılan Çözeltiler	27
2.5.5 Doğruluk Parametresi Çalışmalarında Kullanılan Çözeltiler	27
2.5.6 Kesinlik Parametresi Çalışmalarında Kullanılan Çözeltiler	28

2.6 İzoproterenol hidroklorür İçinde İzopropilamin Tayini Yöntemi.....	28
2.7 Yöntem Validasyonu ve Validasyon Parametreleri	29
2.7.1 Seçicilik.....	29
2.7.2 Doğrusallık.....	29
2.7.3 Çalışma Aralığı	30
2.7.4 Belirleme ve Nicelik Sınırı	30
2.7.5 Doğruluk	30
2.7.6 Kesinlik	30
2.7.7 Sağlamlık	31
2.7.8 Numune ve Standart Çözeltileri Stabilesi.....	31
3. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE BULGULAR.....	32
3.1 Seçicilik.....	32
3.2 Doğrusallık.....	33
3.3 Çalışma Aralığı	34
3.4 Belirleme ve Nicelik Sınırı	35
3.5 Doğruluk	37
3.6 Kesinlik	38
3.6.1 Sistem Kesinliği	38
3.6.2 Yöntem Kesinliği	38
3.6.3 Laboratuvarlar Arası Kesinlik.....	39
3.7 Sağlamlık	40
3.8 Numune ve Standart Çözeltileri Stabilesi.....	41
4. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	43
KAYNAKLAR.....	45

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. İzoproterenol hidroklorür'ün molekül formülü, kimyasal formülü ve molekül ağırlığı.....	14
Çizelge 1.2. İzopropilamin'in molekül formülü, kimyasal formülü ve molekül ağırlığı	14
Çizelge 1.3. 1-Naftil izotiyosiyanat'ın molekül formülü, kimyasal formülü ve molekül ağırlığı	14
Çizelge 1.4. İzopropilamin ve 1-Naftil izotiyosiyanat arasında gerçekleşen türevlendirme tepkimesi.....	15
Çizelge 1.5. Fonksiyonel gruplar ve türevlendirme reaktifleri.....	21
Çizelge 2.1. Tez kapsamında kullanılan cihazlar	23
Çizelge 2.2. Tez kapsamında çalışılan kolonlar	23
Çizelge 2.3. Tez kapsamında çalışılan kimyasallar	23
Çizelge 2.4. Tez kapsamında çalışılan standartlar.....	24
Çizelge 2.5. İzoproterenol hidroklorür içinde izopropilamin tayini yöntemi gradient programı	29
Çizelge 3.1. İzoproterenol hidroklorür içinde izopropilamin tayini için seçicilik sonuçları	32
Çizelge 3.2. İzoproterenol hidroklorür içinde izopropilamin tayini için doğrusalılık sonuçları	34
Çizelge 3.3. İzoproterenol hidroklorür içinde izopropilamin tayini için çalışma aralığı sonuçları	35
Çizelge 3.4. Spesifikasyon limitinde safsızlıkların sinyal-gürültü oranı sonuçları	36
Çizelge 3.5. LOQ alan sonucu.....	36
Çizelge 3.6. LOD ve LOQ sonuçları (% ve çözelti konsantrasyonları olarak)	36
Çizelge 3.7. İzopropilamin için doğruluk çalışması sonuçları	38
Çizelge 3.8. İzopropilamin için sistem kesinliği çalışması sonuçları.....	38
Çizelge 3.9. İzopropilamin için yöntem kesinliği çalışması sonuçları	39
Çizelge 3.10. İzopropilamin için laboratuvarlar arası kesinlik çalışması sonuçları	40
Çizelge 3.11. İzopropilamin için sağlamlık çalışması sonuçları	41
Çizelge 3.12. İzopropilamin için standart çözeltisi stabilite çalışması sonuçları	41
Çizelge 3.13. İzopropilamin için safsızlık ilaveli numune çözeltisi stabilite çalışması sonuçları	41

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Sıvı Kromatografisi (HPLC) Cihazının Temel Bölümleri	17
Şekil 3.1. Blank çözeltisi kromatogramı	32
Şekil 3.2. Standart çözeltisi kromatogramı.....	33
Şekil 3.3. Safsızlık karışımı çözeltisi kromatogramı.....	33
Şekil 3.4. İzopropilamin Doğrusallık grafiği.....	34
Şekil 3.5. LOQ çözeltisi kromatogramı.....	36
Şekil 3.6. LOD çözeltisi kromatogramı.....	37



SİMGELER DİZİNİ

°C	Santigrat derece
%	Yüzde



KISALTMALAR DİZİNİ

AU	Absorbans birimi
LOQ	Alt Tayin Sınırı
pKa	Asidik İyonlaşma Sabiti
RSD	Bağıl Standart Sapma
DNA	Deoksiribonükleik Asit
GC	Gaz Kromatografisi
LOD	Gözlenebilme Sınırı
pH	Hidrojen İyonu Derişiminin Eksi Logaritması
UV	Morötesi ışınım
RNA	Ribonükleik Asit
LC	Sıvı Kromatografisi
SS	Standart Sapma
SFC	Süperkritik Akışkan Kromatografi
ICH	Uluslararası İlaç Uyum Konseyi
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans sürecim boyunca her zaman yanımda olan, motive eden, hoşgörü ve güleryüzünü hiçbir zaman esirgemeyen saygıdeğer hocam Prof. Dr. Ayça KARASAKAL'a,

Çalışkanlığı, zekası, ekibine duyduğu güven ve verdiği destek ile ilk günümden beri hayranlık ve saygı duyduğum, yüksek lisansım boyunca her zaman destek olan çok değerli müdürüm Doç. Dr. Esen BELLUR ATİCİ'ye,

İlaç ARGE'si alanında ülkemizin önde gelen değerlerinden olan ve çalışmanı olmakla gurur duyduğum, yüksek lisans eğitimimi ve tez çalışmamı maddi ve manevi olarak destekleyen şirketim DEVA Holding A.Ş'ye,

Tez çalışmam sürecime olan katkıları, anlayış ve destekleri için müdür yardımcılarım Yücel YAZAR ve Çağan AĞTAŞ'a, şefim Nurten RIDVANOĞLU'ya,

İlaç sektörüne girmem ve ARGE çalışmanı olup yüksek lisans yapabilmem için bir kapıyı aralamak dahil olmak üzere hayatımın en önemli anlarında hep yanımda olan biricik dostum Çağla AYDIN'a,

Tez çalışmam boyunca yanımda olan, üstün gayret ve sabır gösteren sevgili arkadaşlarım Ömer Adil KORKMAZ ve Melike Ceren MİSER'e,

Hayattaki en büyük şansım ve her zaman her koşulda destekçim, en kıymetli varlıklarım olan babam İsmail GÜN, annem Seyhan GÜN, ağabeyim Sezin GÜN, yengem Yeliz GÜN ve tabii ki yeğenlerim Ömer GÜN ve Zeynep GÜN'e,

Hayatıma anlam katan, her koşulda yanımda olan yol arkadaşım, sevgili eşim Burak SALMAN'a sonsuz teşekkür ederim.

Selin SALMAN

Biyomühendis

1. GİRİŞ

İzoproterenol β_1 ve β_2 reseptörleri uyaran sentetik bir katekolamin olup sistemik adlandırılması 4-[1-hydroxy-2-(propan-2-ylamino)ethyl]benzene-1,2-diol; hydrochloride şeklindedir ve 247.72 g molekül ağırlığına sahiptir. Adrenalin insan vücudunda doğal yolla sentezlenen birincil bir katekolamindir. Yapı olarakrenaline benzeyen izoproterenol, adrenalinin uyardığı α reseptörlerine etki etmez. İzoproterenol kan damarlarını genişletir yani vazodilatör etkidedir. Ağız yolu ile alınamaz çünkü barsaklarda inaktif duruma geçer. Kalp hızını arttırmak ve pulmoner vasküler rezistansı azaltmak için kullanılır Solunum yoluyla alındığında astım hastalarının tedavisinde bronş düz kaslarının açılarak solunumun yollarının genişlemesini sağlar. Türlü nedenlerle kalp kasının beslenememesi yani iskemik kalp hastalığı durumu yaşayan hastalarda kullanılmamalıdır (Göncü, 2010).

1990 yılında Uluslararası İlaç Uyum Konseyi (ICH) Amerika Birleşik Devletleri, Avrupa Birliği ve Japonya'daki ilaç otoriteleri tarafından kurulmuştur. Kuruluş amacı rehberler yayınlamak üretilen ilaçların etkili, güvenilir ve yüksek kalitede olduğunun güvencesini verebilmek adına dünya çapında ilaç ayarlamalarının uyumlaştırılmasıdır. Günümüzde tüm dünyada ilaç ayarlamalarını yayınlayan, düzenleyen ve yönlendiren en temel kuruluştur.

Yeni ilaç maddelerindeki safsızlıklar ICH'e göre "Yeni ilaç maddesi olarak tanımlanan kimyasal madde dışında, yeni ilaç maddesinin içinde yer alan herhangi bir bileşen" şeklinde belirlenmiştir (ICH Q3A(R2), 2006). Yeni ilaç ürünlerindeki safsızlıklar için ise "Yeni ilaç ürünü içinde yer alan ilaç maddesi ve yardımcı madde dışında kalan herhangi bir bileşen" olarak belirlenmiştir (ICH Q3B(R2), 2006). İlaçların hastalara zarar verebilecek nitelikte safsızlıklar içermemesi, üretim aşamasından ambalajlanma ve depolanma aşamalarına kadar güvenilirliği hususunda garanti verilebilmesi gereklidir. Safsızlıkların tespit edilip ortadan kaldırılması hem ilacın kalitesini hem de güvenliğini ilgilendirir. İlaçlarda bilinmeyen safsızlıkların tanımlanması ve karakterizasyonu; genotoksik, teratojenik, karsinojenik safsızlıkların kontrol edilmesi; birincil ambalaj malzemelerinden veya stabilite sürecinde depolama şartlarından ortaya çıkabilecek safsızlıkların kontrol edilmesi; elementel safsızlıklar ve nitrozamin safsızlıkları konusunda ileri seviyede analitik çalışmalar yapılması gerekmektedir.

Genetik mutasyonları indükleyen ve bir anlamda kanserojen olarak kabul edilen safsızlıklara genotoksik safsızlıklar denir. Aminler, sülfonatlar, alkil halojenürler, epoksitler, hidrazin ve esterler gibi fonksiyonel grup barındıran moleküllerin ilaçlar söz konusuysa genotoksik olduğu bilinir (Özcan, 2019). Genotoksik bileşikler DNA ile direkt ya da dolaylı biçimde etkileşime girerler. DNA bazlarının arasına girerek sarmalın gerilmesine ve DNA polimerazın hatalı şekilde fazladan nükleotid eklemesine neden olabilirler. Safsızlıkların birçoğunun alt kümesinde genotoksisite potansiyeli olması klinik gönüllüler ve hastalar açısından ek bir güvenlik endişesi anlamına gelir. Bu nedenle ilaç sektörü otoriteleri genotoksik safsızlıkların sınırlandırılması ile ilgili yükümlülüklerle sahiptir. Genel anlamda etkin madde ile reaksiyona giren maddeler ve genotoksisite açısından uyarı veren maddeler değerlendirilmelidir. Son üründe potansiyel genotoksik kalıntılara sebep olmayan alternatif kimyasallar varsa onlar tercih edilmelidir. Eğer alternatif sentez yolları veya formülasyonlar ya da farklı başlangıç maddeleri dahil olmak üzere uygulanabilir bir alternatif yoksa bunun gerekçesi sunulmalıdır. Neticede kaçınılmaz bir genotoksik safsızlık varsa teknik çabalar bu safsızlığın içeriğini azaltmak yönünde olmalıdır. Son üründe güvenlik gereksinimleriyle uyumlu ya da makul seviyede uygulanabilir olduğu kadar düşük seviyede olmalıdır. Reaktiflerin kimyasal stabilitesine ilişkin veriler de bu değerlendirmeye dahildir. Bu kalıntıların tespiti en gelişmiş analitik yöntemlerle yapılmalıdır (Kushwaha, 2010).

İzopropilamin, izoproterenol hidroklorür ilaç etken maddesinin sentezine katılan başlangıç maddelerinden biridir. ICH'e göre ilaç etken maddesi içindeki genotoksik olmayan safsızlık miktarı %0.15'i geçmemelidir. Dolayısıyla etken madde içeriğinde izopropilaminin kantitatif analizinin gerçekleştirilmesi önemli bir rol oynamaktadır.

1.1 Literatür Özeti

Çeşitli aminler ve asetillenmiş türevleri hücrenin normal ve neoplastik büyümesinde, RNA'nın transkripsiyonunda ve translasyonunda ve protein sentezinde rol oynar. Bu sebeple ilaç maddelerinde kontrol edilmeleri gerekmektedir. Literatüre bakıldığında UV spektrofotometresi, gaz kromatografisi, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ve başka türevlendirme yöntemleri kullanılarak gıdalarda ve ilaç maddelerinde amin tayininin yapıldığı çalışmalar olduğu görülmüştür. Metoprolol süksinat içinde izopropilamin içeriğinin belirlenmesi için iyon kromatografisi yönteminin geliştirildiği bir çalışma mevcuttur. İzopropilamin metoprolol süksinat sentezindeki başlangıç materyallerindedir. Çalışma valide edilerek basit, hassas, spesifik ve doğrusal olduğu ortaya konmuştur (More vd., 2019)

Sıçan beyninden elde edilen aspartat, glutamat, serin, glutamin, glisin ve gama aminobütirik asit bileşikleri için HPLC cihazında terz faz kullanarak kantitatif tayin için geliştirilmiş hassas, basit, seçici ve tekrarlanabilir bir çalışma yapılmıştır. Yöntem aminoasitlerden feniltiyokarbamil türevlerinin oluşumuna dayanmaktadır. Sıçan beyinde bulunan diğer amino asitler ile çalışmada kullanılanlar arasında girişim gözlemlenmemiştir. Her bir amino asit için 0.5-20 nmol aralığında oluşturulan standart eğrilerinde iyi bir doğrusallık elde edilmiştir. Aynı gün ve farklı günlerde yapılan analizlerde varyasyon katsayısının en yüksek konsantrasyon limitinde %0.4 en düşük konsantrasyon limitinde ise %11 olduğu tespit edilmiştir. Sıçan beyinlerinin bütün halinde -70°C'de saklanıyor olması çalışılan 6 amino asitin de konsantrasyonlarının etkilenmemesi için önem taşır (Gunawan vd, 1990)

Bir başka çalışmada mikrodializ vasıtasıyla sıçan beyinlerinin çeşitli bölgelerinden alınan beyin omurilik sıvısı numunelerinde gama aminobütirik asit, serotonin, glutamat ve noradrenalin nörotransmitterleri ve melatonin hormonu tayini için bir HPLC yöntemi geliştirilmiştir. Bu çalışma floresan dedektör ve ters faz C₁₈ kolon ile gerçekleştirilmiştir. Gama aminobütirik asit ve glutamatın beraber tayini için 2,3-naftalindikarboksialdehit siyanür iyonu varlığında kolon öncesi türevlendirme yapılmış, izokratik yıkama ile ayrılan türevler 420 nm uyarılma ile 480 nm emisyon dalga boylarında floresan dedektör vasıtasıyla tespit edilmişlerdir. Yöntemin validasyonu yapılmış, Doğrusallık, belirleme ve nicelik sınırı, kesinlik ve geri kazanım gibi parametreler ile değerlendirilmiştir (Yetgin, 2014).

Kolon sonrası türevlendirme yöntemiyle HPLC cihazında yapılmış bir çalışma örneği olarak Karaman ili semt pazarlarında açıkta satılan fındık, fıstık, badem gibi ürünler ile küflü peynir ve marketlerden temin edilen ekmeklerde 7 gün boyunca sürdürülen çalışmada aflatoksin B1, B2, G1, G2 seviyeleri belirlenmiştir. 4 mevsim boyunca numuneler alınmış ve her numuneden 2 paralel kontrol edilmiştir. C₁₈ kolon, floresans dedektör ve kolon sonrası türevlendirme (Coring cell) ile yürütülen yöntemde 45 numunede yapılan 90 ölçüm sonucunda kırmızı biber hariç kuru gıdalarda limitlerin altında sonuçlar elde edilirken, dört mevsim boyunca kırmızı biber numunelerinde bulunnan aflatoksin B1'in insan sağlığını tehlikeye atabilecek düzeyde olduğu ortaya konmuştur (Karapınar, 2013).

Hazır gıda sektöründe lezzet artırıcı olarak çok yaygın biçimde kullanılan monosodyum glutamat miktarının gıdalar içerisindeki tayininde kolon öncesi türevlendirme yöntemi ile HPLC cihazında gerçekleştirilmiş bir çalışma mevcuttur. Bu çalışmada ultraviyole

/ foto diyot dizisi, evaporatif ışık saçılım dedektörü ve floresans olmak üzere üç farklı dedektör kullanılmıştır. Bunlardan ultraviyole/foto diyot dizisi ve floresans yöntemlerinde kolon öncesi türevlendirme ortofitaldialdehit ve dansil klorür reaktifleri ile yapılmıştır (Soyseven, 2018).

Yine dansil klorür reaktifi ile yapılan bir başka türevlendirme çalışmasında nateglinid maddesinin basit, hassas ve güvenilir biçimde analizi için bir spektrofotometrik yöntem geliştirilmiştir. Türevlendirme tepkimesinin en uygun koşullarının pH 11.0'de 40°C sıcaklıkta belirteç/nateglinid mol oranı 16 olduğu ve 10 dakika içerisinde gerçekleştiği saptanmıştır. Geliştirilen yöntem ile tabletlerdeki nateglinid miktar tayini uygulanarak elde edilen sonuçlar farmakope yöntemiyle elde edilen sonuçlar ile karşılaştırıldığında %95 oranında ortalamalar ve standart sapmalar açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır (Özçelik, 2015).

Bir başka çalışmada histamin, tiramin ve kadaverin gibi biyojen aminlerin metanol-su ortamında asetilaseton reaktifi ile kolon öncesi türevlendirilerek HPLC yöntemiyle tayini gerçekleştirilmiştir. Oluşturulan türevlerin ters faz kromatografisinde ayrımı gerçekleştirildikten sonra UV görünür bölge spektrofotometresi ile numuneler analiz edilmişlerdir. Potansiyel toksisiteleri açısından pek çok gıdada bulunan biyojen aminlerin tespiti oldukça önemlidir. Gıdaların kompleks yapıları bu tespiti zorlaştırmaktadır. Söz konusu çalışmada farklı elma suyu numunelerindeki biyojen aminler tayin edilmiştir (Akmeşe, 2015).

Şarap numunelerinde feniletilamin, putresin, agmatin, histamin, kadaverin ve tiramin gibi maddeler florenil-metil kloroformat reaktifi ile türevlendirilerek ve oktadesil silika Hypersil kolonu kullanılarak HPLC'de tayin edildiği bir çalışma da mevcuttur (Bauzaa vd., 1995)

Kahve numunelerinde tiramin, histamin, kadaverin, putresin, spermin, serotonin ve spermidin maddelerinin dansil klorür reaktifi ile türevlendirilerek HPLC'de tayin edildiği bir çalışma yapılmıştır. Kromasil C₁₈ kolonunun kullanıldığı, mobil fazın gradient elüsyon olarak yapıldığı çalışmada akış hızı 1 mL / dk olarak ayarlanmıştır (Casal vd., 2002).

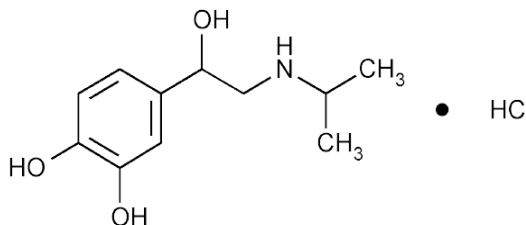
Histaminin izlenebilirliği su ürünlerinde gıda güvenliği kontrolleri açısından dünya çapında öneme sahiptir. Resmi ve özel kurumlarca balık ve balık ürünlerinde histamin miktarlarının kontrol edilmesi ve izlenmesi için hızlı sonuç veren test kitlerinin yanı sıra hassas sonuçlar verebilen güvenilir analiz yöntemlerinin varlığı da önem taşımaktadır. Su

ürünlerinde histaminin tayin edilebilmesi için HPLC cihazında yapılan, floresans ve diode array dedektör vasıtasıyla verilerin elde edildiği yöntemler karşılaştırılmıştır. Bu yöntemlerde o-fitaldialdehit ve benzoil klorür reaktifleri ile türevlendirme yapılmıştır (Demirkıran, 2013).

1.2 İzoproterenol Hidroklorür, İzopropilamin ve 1-Naftil izotiyosiyanat Hakkında Genel Bilgiler


1.2.1 İzoproterenol hidroklorür

Çizelge 1.1. İzoproterenol hidroklorür'ün molekül formülü, kimyasal formülü ve molekül ağırlığı

Özellik	Değer
Molekül formülü	
Kimyasal formülü	$C_{11}H_{18}ClNO_3$
Molekül ağırlığı	247,72 g/mol

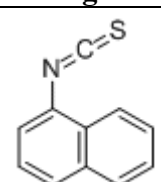
1.2.2 İzopropilamin

Çizelge 1.2. İzopropilamin'in molekül formülü, kimyasal formülü ve molekül ağırlığı

Özellik	Değer
Molekül formülü	
Kimyasal formülü	C_3H_9N
Molekül ağırlığı	59,11 g/mol

1.2.3 1-Naftil izotiyosiyanat

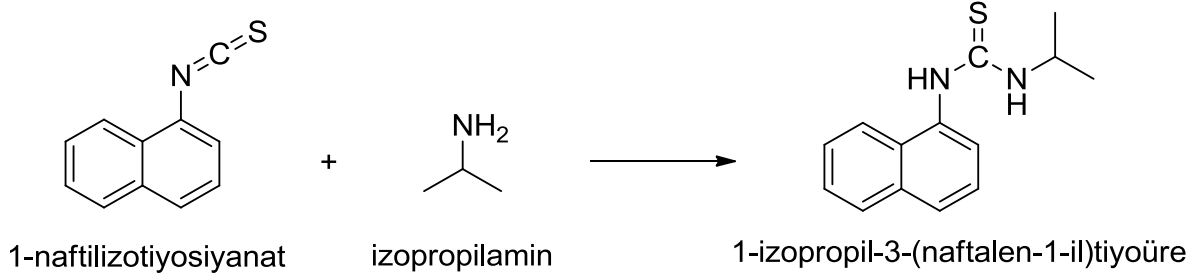
Çizelge 1.3. 1-Naftil izotiyosiyanat'ın molekül formülü, kimyasal formülü ve molekül ağırlığı

Özellik	Değer
Molekül formülü	
Kimyasal formülü	$C_{11}H_7NS$
Molekül ağırlığı	185,24 g/mol

- **İzopropilamin ve 1-Naftil izotiyosiyanat Arasında Gerçekleşen Türevlendirme**

Tepkimesi:

Çizelge 1.4. İzopropilamin ve 1-Naftil izotiyosiyanat arasında gerçekleşen türevlendirme tepkimesi



1.3 Kromatografi

Kromatografi karışımların ayırımında çok yaygın olarak kullanılan bir laboratuvar yöntemidir. 1903 yılında Rus botanikçi Mikhail Semyonovich Tswett tarafından bulunan bu yöntem ilk olarak bitki pigmentlerinin ayırımında uygulanmıştır. Mikhail Semyonovich Tswett kullandığı kolonda farklı renklerde bantlar oluşmasından dolayı Yunanca chroma “renk”, graphein “yazı” anlamına geldiğinden yönteme kromatografi adını koymuştur. Bu yöntemle hem kantitatif hem de kalitatif analizler gerçekleştirmek mümkündür. Zamanla kromatografi alanında yeni ve daha karmaşık ayırımların yapılmasına imkan sağlayan yöntemler geliştirilmiştir.

Tüm kromatografik yöntemlerde numune sıvı, gaz veya süperkritik bir akışkan şeklinde bir mobil fazda çözülerek mobil faz ile karışmayan bir sabit faz içinden geçmeye zorlanır. Bu sabit faz bir düzlem ya da bir kolonda sabitleştirilmiş olabilir. Sabit fazın kuvvetli şekilde tuttuğu bileşenler oldukça yavaş hareket ederler. Sabit fazın zayıf şekilde tuttuğu bileşenler ise oldukça hızlı hareket ederler. Bileşenlerin hareket hızındaki bu fark sonucunda da numunelerin kantitatif ve kalitatif açıdan ayrımı yapılabilen ayrı bölgeler ya da bantlar biçiminde analizi yapılmış olur.

Genel olarak kromatografik yöntemler kolon kromatografi ve düzlemsel kromatografi olarak ikiye ayrılır. Kolon kromatografisinde sabit faz ince bir kolonda yer alır ve yüksek basınç vasıtasıyla mobil faz sabit fazdan geçmeye zorlanır. Düzlemsel kromatografide sabit faz bir plakada ya da bir kağıdın gözeneklerinde tutulur. Burada mobil faz yer çekimi veya kapiler etkisiyle geçer.

Kolon kromatografisi sıvı kromatografi (LC), gaz kromatografi (GC) ve süperkritik akışkan kromatografi (SFC) olarak üçe ayrılır. Tez çalışmasında sıvı kromatografisi yöntemi kullanılmıştır (Kuandykova, 2020).

1.3.1 Sıvı Kromatografi

Sıvı kromatografi numunede bakılmak istenen bileşenin polaritesine ve kolon ile etkileşimine dayanan, kolonda karmaşık sıvı karışımlarını bileşenlerine ayırma yöntemidir. Karışımdaki bileşenlerin kolonda ayrılması mobil faz ile olan yakınlıklarına bağlıdır. Bileşenlerin farklı polaritelere sahip olma durumu belirli polaritedeki mobil fazın kolondan geçirilirken bileşenlerin bir kısmının diğerlerine göre daha çabuk kolonu terk etmesi ile sonuçlanır. Aynı bileşene ait moleküller çoğunlukla grup olarak hareket ettiğinden bileşenler kolonda ayrı bantlara ayrılırlar. Bu bileşenler farklı renklerde ise ait oldukları bantlar görülebilir. Aksi durumda yüksek performanslı sıvı kromatografide (HPLC) olduğu şekilde piklerin varlığını belirlemek için diğer enstrümantal analiz tekniklerinden faydalanılır (Makowski, 2017).

Normal Faz Kromatografisi: Normal faz kromatografisinde sabit faz polardır, mobil faz ise apolardır. Sabit faz dolgu maddesi olarak alümina ve silikajelin üzeri; fonksiyonel grup olan $-NO_2$, $-CN$, ya da $-NH_2$ ile kaplanır ve polar özellik eklenir. Mobil faz olarak kloroform, hegzan gibi çözücü ya da çözücü sistemleri tercih edilir. Bu yöntem yüksek polar özelliğe sahip maddelerin ayrımında kullanılır. Polar bileşikler kolonda daha çok tutunduğundan için daha uzun sürede çıkar (Ahuja ve Alsante, 2004).

Ters Faz Kromatografisi: Ters faz kromatografisinde kolon apolardır, mobil faz ise polardır. Bu kromatografide; apolar maddelerin, iyonik yapıları maddelerin ve zayıf polar maddelerin ayrımı gerçekleşir. Kovalent bağlı polar olmayan genellikle alkil grubu ya da fenil grubu kolon dolgu maddesi olan silika jel üzerine bağlanır. Bu bağlanmadan sonra kolonun kararlılığının artması adına silika üzerinde bulunan serbest silanol grupları kapatılır. Bu sayede kolon polaritesinde azalma sağlanır (Skoog vd., 2017). Tez çalışmasında ters faz kromatografisi yöntemi kullanılmıştır.

1.3.2 Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC)

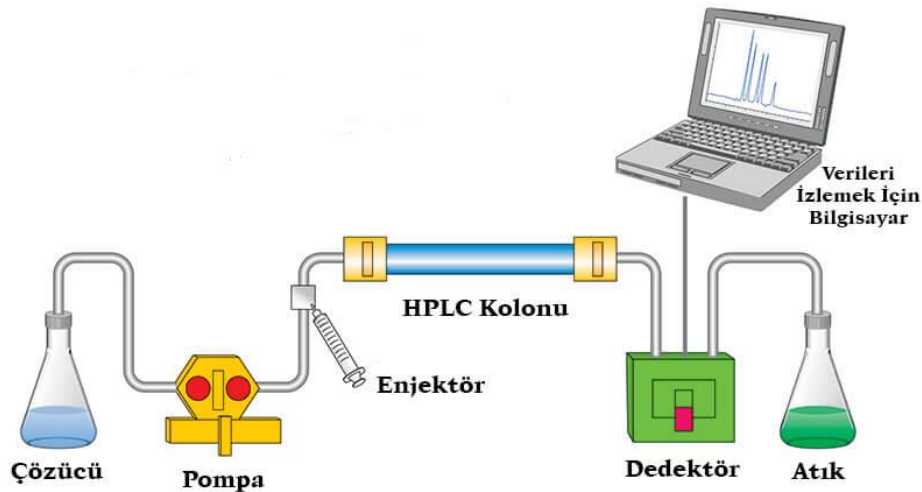
Ayrırmanın yüksek hızla gerçekleştiği sıvı kromatografi sistemi yüksek performanslı sıvı kromatografisidir (HPLC). Kullanışlı bir yöntem olma nedenleri hassas olması, kantitatif

analizlere uygulanmasında kolaylık ve sıcaklığa karşı duyarlı olan bileşenlerin ve büyük yapılı moleküllerin ayrımını gerçekleştirebilmesidir. Örneğin proteinler, aminoasitler, biyojenik aminler, steroidler, karbonhidratlar, pestisitler, anorganik bileşikler, antibiyotikler ve metal-organik bileşiklerde kullanılabilir.

HPLC’de mobil faz sıvı kolon ise çok küçük boyutta katı taneciklerden meydana gelir. Uygun bir akışın sağlanması için sıvıya belli bir basınç uygulanır.

Sıvı kromatografisi sabit fazın türüne göre ya da ayırma mekanizmasına göre dağılma kromatografisi, iyon değişimi kromatografisi, afinite kromatografisi, adsorpsiyon kromatografisi, kiral kromatografisi ve boyut ayırıcı kromatografisi olarak sınıflandırılır (Skoog vd., 2017).

- **HPLC Cihazı:** HPLC cihazı bileşenleri mobil faz, pompa, enjektör, kolon, dedektör ve veri toplama merkezi olarak tanımlanabilir. Yüksek basınç vasıtasıyla kolona gönderilen mobil fazın kolon içerisine enjektör ile gönderilen numunelerin kolon ile etkileşimleri neticesinde UV dedektöre ulaşması ve UV dedektörün numunelerin absorbans değerleri oranında elektrik sinyallerini verilere çevirmesi cihazın çalışma prensibi olarak özetlenebilir. Çalışma prensibinin şematik gösterimi Şekil 1.1’de yer almaktadır (Talay, 2022).



Şekil 1.1. Sıvı Kromatografisi (HPLC) Cihazının Temel Bölümleri (<https://www.bilimvetekno.com/hpcl-nedir-nasil-yapilir> adresinden 27.04.2023 tarihinde alınmıştır)

HPLC cihazına verilen çözücünün içinde çözünmüş olan gazın ortadan kaldırılması gerekmektedir. Aksi takdirde oluşabilecek bir gaz kabarcığı sistemde anlık basınç değişimi ve analizde gürültü oluşmasına neden olabilir. Sistemde mevcut olan degazörler bu riski ortadan kaldırır (Moldoveanu ve David, 2013).

Mobil fazın sistemde belirlenen akış hızında akabilmesi bunun yanı sıra gradient sistemlerde belirli periyotlarda valfler vasıtasıyla iki ya da daha fazla kanaldan akmasını pompalar sağlar (Skoog vd., 2017).

Numuneyi kolona ulaşmadan mobil faza enjektörler enjekte eder. Otomatik olarak fazla sayıdaki numuneyi cihazın kendisi enjekte edebilir, eski sistemlerde analistin kendisinin manuel olarak enjekte etmesi söz konusudur (Kazakevich ve Lobrutto, 2007).

Mobil faz içeriği ve oranlarını değiştirerek ayırıcılık, alıkonma zamanı gibi ana parametrelerin belirlenmesi mümkün olmaktadır. HPLC cihazının kısımlarında ya da kolon içeriğinde olası bir kontaminasyondan oluşabilecek tıkanıklıkların önüne geçebilmek için analiz öncesi süzme işlemi yapılır. Polarlık, viskozite ve pH mobil fazın belirlenmesinde elüsyon ve seçicilik gücüne etki eden özellikler olarak göz önünde bulundurulurlar (Aghari vd., 2013). Ayrıca mobil fazın kolon, numuneler, dedektör ve sistem kompartımanları ile uyumu, çözünmüş gaz oranı, refraktif indeksi, toksisitesi, buhar basıncı, diğer mobil fazlar ile karışabilir olması, kaynama noktası, aşındırıcı olmaması gibi özellikleri de dikkate alınır.

Kolonlar HPLC sistemindeki numunelerin istenen şekilde ayrımı yapılabilmesinde kritik bir görevi olan materyalleri içerdiğinden en önemli kısımlardır. Çoğunlukla paslanmaz çelikten üretilirler. Partikül çapları 0.9-10 µm arasında değişebilen materyaller içeren kolonların çapları ise Ayrımı gerçekleştirilen numunelerin tespiti ve elektrik sinyallerinin okunabilir verilere çevrilmesinde dedektörler görev alır. Analiz edilmek istenen numuneye göre farklı dedektörler tercih edilir. UV dedektörleri, refraktif indeks dedektörleri, floresan dedektörleri, elektrokimyasal dedektörler, dansite dedektörleri, kütle spektrometresi dedektörleri, iletkenlik dedektörleri gibi dedektörler HPLC sistemlerinde sıklıkla tercih edilmektedir (Kumar vd., 2015).

1.4 Türevlendirme

Türevlendirme kimyada kullanılan, analizi yapılan bileşiğin benzer yapıya sahip bir türeve dönüştürüldüğü bir analiz yöntemidir. Numunenin analizine eklenmiş bir adım olarak,

bileşimin stabilitesini arttırarak sonuçların daha sağlam olmasını sağladığında, tekrarlanabilirliği geliştirdiğinde ve matris girişimlerini azalttığında kabul edilir. Çoğu bileşimin optimum bir kromofor, florofor, elektrofor eksikliği ya da beklenen numune konsantrasyonlarında algılamak adına düşük bir iyonizasyon etkinliğine sahip olması gerekir (Poole, 2013).

Reaktif fonksiyonel grupları olan bileşiklerde basit kimyasal reaksiyonlar kolay bir şekilde kimyasal tespiti için gereken yapıyı değiştirerek ya da dedektör yanıtındaki girişimin en az olduğu kromatogramdaki bir bölgeye hareket ettirerek matris girişimini en aza indirmeye yardımcı olur. Bir ya da birden fazla fonksiyonel grubun farklı polarite ikamesiyle hatta kısmen karmaşık bir yapıya dönüştürülmesi reaktifin ayırma özelliklerini değiştirir.

Türevlendirme tepkimeleri kolon öncesi ya da kolon sonrası olarak yapılabilir. Bazı durumlarda türevlendirme tepkimesi numunelerin geri kazanımını arttırmak, hedeflenen bileşiklerde yöntem seçiciliğini arttırmak ya da izolasyon prosedüründe olan şartlara karşı kararlılıklarını sağlamak adına bir izolasyon prosedürünün başlangıcına yakın gerçekleştirilir.

Türevlendirme sayesinde zayıf tespit edilebilir bileşiklerin tespit edilebilirlikleri çoğunlukla GC seviyesine kadar geliştirilebilir. Türevlendirme tepkimesi ayrı bir temizleme prosedürü olarak da görülebilir.

Sıvı kromatografide iki ana türevlendirme çeşidi mevcuttur; kolon öncesi türevlendirme ve kolon sonrası türevlendirme şeklindedir.

1.4.1 Kolon Öncesi Türevlendirme

Kromatografik enjeksiyon öncesi gerçekleşen türevlendirme kolon öncesi türevlendirmedir. Bitki bileşikleri, amino asitler, ilaçlar, metaller ve başka bileşikleri kolon öncesi türevlendirme ile analiz etmek mümkündür (Andea ve Brown, 1997).

Reaksiyon koşullarının serbestçe belirlenebilmesi, reaksiyonun yavaş olabilmesi, saflaştırma ve işlem basamağı olarak görev alabilmesi, numunenin kromatografik özelliklerini daha iyi hale getirmesi, daha az ekipman ve tepkime sınırlandırmalarının olması açısından avantajlıdır.

Reaksiyonun kantitatif olması gerekliliği, uzun bir tepkime süresinin sonucu olarak yan ürün oluşabilmesi, türevlendirme işleminden sonra ortaya çıkan numune türleri arasında

benzerliğin artması ve dolaylı yoldan kromatografik seçiciliği azaltması, kirletici maddelerin adsorpsiyon yoluyla girmesi ve numune kaybına sebep olması dezavantajlarıdır. Tez çalışmasında kolon öncesi türevlendirme yöntemi kullanılmıştır

1.4.2 Kolon Sonrası Türevlendirme

Kolon sonrası türevlendirmede reaktif kolon akıntısına eklenir, çoğunlukla derişimi yüksek olan reaktifler tercih edilir. Çünkü bu reaktifler seyreltme etkisini en aza indirir.

Reaksiyonun kantitatif olma gerekliliğinin olmaması, oldukça spesifik tespit sistemleri kurularak bağışıklık tahlilleri gibi analizlerin yapılabilmesi, türevlendirme öncesi ek dedektör eklenebilmesi, ayırmanın tespit öncesi gerçekleşmesinden özdeş reaksiyon ürünlerinin analiz edebilme imkanının olması bu türevlendirme çeşidinin avantajlarıdır.

Reaksiyonun olasılıkları sınırlayan mobil fazda yapılması gerekliliği, tüm çok hızlı reaksiyonlarda bant genişlemesi olması, türevlendirici maddenin kendisinin tespit edilmemesi gerekliliği, kolon öncesi türevlendirme şekillerine göre daha az hassasiyette olması, analiz zamanının uzun olması ve karmaşık donanım ve işlem gerektiriyor olması ise bu türevlendirme çeşidinin dezavantajlarıdır (Meyer, 2010).

Çoğunlukla kolon sonrası türevlendirme numuneyi ayırdıktan sonra tespitinden önce bir reaksiyon dedektörü aracılığıyla gerçekleştirilir. Reaksiyon sistemi içinde numunenin dağılımı dikkate alınarak reaksiyon dedektörü tasarlanır. Bu tasarımda genellikle hızlı (<1 dk), yavaş (1-5 dk) ve daha yavaş (5-30 dk) reaksiyon oranları için açık kılcal, yatak ve bölümlenmiş reaktörleri tercih edilir (Poole ve Poole, 1993).

1.4.3 Türevlendirme Reaktif Seçimi

HPLC yöntemi için türevlendirme yapılırken tespiti arttırmak için ilk olarak hangi tespit türünün en iyi olduğu belirlenmelidir. Kolon öncesi ya da kolon sonrası türevlendirme konusunda seçim yapmak gerekir. Çizelge 1.5'te görüldüğü üzere pek çok bileşik türevlendirilebilir.

Çizelge 1.5. Fonksiyonel gruplar ve türevlendirme reaktifleri (Kuandykova, 2020)

Fonksiyonel Grup	Kromofor ^a	Florofor ^b
Karboksilik asitler, Yağ asitleri, Fosfonik asitler	PNBDİ DNBDİ PBPB	BrMaC BrMnC
Alkoller	DNBC Dabsil-Cl NİC-1	
Aldehitler, Ketonlar	PNBA DNBA	Dansil hidrazin
Aminler 1° 1° ve 2°	DNBC SNPA SDNPA	Floresamin OPA NBD-Cl NBD-F Dansil-Cl
Aminler 1° ve 2°	Dabsil-Cl NİC-1	
Amino asitler (peptitler)	SBOA SDOBA Dabsil-Cl	Floresamin OPA NBD-Cl NBD-F Dansil-Cl
İzosiyanatlar	PNBPA DNBPA	
Fenoller	DNBC Dabsil-Cl NİC-1	NBD-Cl NBD-F Dansil-Cl
Tiyoller	Dabsil-Cl	NBD-Cl NBD-F OPA

^aKromofor kısaltmaları: Dabsil-Cl, 4-dimetilaminazobenzen-4-sulfinil; DNBA, 3,5-dinitrobenziloksiamin hidroklorür; NİC-1, 1-naftilizosiyanat; PBPB, *p*-bromofenasil bromür; PNBA, *p*-nitrobenziloksiamin hidroklorür; PNBDİ, *p*-nitrobenzil-N,N'-diizopropilözüre; PNBPA, *p*-nitrobenzil-*N-n*-propilamin hidroklorür; SNPA, *N*-süksinimidil-*p*-nitrofenilasetat; DNBC, 3,5-dinitrobenzil klorür. ^bFlorofor kısaltmaları: NBD-Cl, 7-kloro-4-nitrobenzo-2-oksa-1,3-diazol; NBD-F, 7-floro-4-nitrobenzo-2-oksa-1,3-diazol; Floresamin, 4-fenilsprio (furan-2 (3H), 1'-ftalan-3,3-dion); OPA, *o*-ftalaldehit; DansilCl, 5-metilaminonaftalen-1-sülfonil klorür; BrMnC, 4-bromometil-7-metoksikumarin; BrMaC, 4-bromometil-7-asetoksikumarin

Türevlendirme reaktifinin sabit olması, uygun şartlar altında numune ile türevlendirme reaktifi arasında tepkime olması, türevlendirme neticesinde oluşan yan ürünlerin ve türevlendirme reaktifinin numuneden ayrılabilmesi, mümkün olduğunca reaktiflerin toksik olmaması, prosesin otomasyona elverişli olması hususları türevlendirme reaktiflerini belirlerken göz önünde bulundurulmalıdır (Wainer, 1985).

Bir türevlendirme reaktifinde iki ana kısım olduğu söylenebilir. Bunlardan ilki kimyasal tepkimenin oranı, kapsamı ve seçiciliğini belirleyen fonksiyonel gruptur. Diğer ise

türevine uygun olarak bir dedektör yanıtı oluşturan ve kolon öncesi türevlendirmelerde numunelerin ayırma ve izolasyon özelliklerini değiştiren yapısal kısımdır (Kuandykova, 2020).

Sıvı kromatografide türevlendirme reaktifleri tespit türüne göre UV-görünür alan tespiti için reaktifler, elektrokimyasal yöntem ile tespit için reaktifler, floresans ve kemilüminesans tespiti için reaktifler, diastereomerler için reaktifler ve kütle spektroskopik yöntem ile tespit için reaktifler olarak ayrılır. Tez çalışmasında UV görünür alan tespiti için türevlendirme reaktifi olarak 1-naftil izotiyosiyanat kullanılmıştır.

Çoğu çözücünün 210 nm'den küçük dalga boylarında güçlü biçimde absorbe olmasından dolayı 240 nm'den büyük dalga boylarında tespiti gerçekleşen türevleri meydana getiren reaktifler daha çok tercih edilir. Renkli türevler meydana getiren çoğu reaktif UV bölgesinde yüksek oranda molar absorpsiyona sahip olup görünür algılaması daha az rastlanırdır. Aynı zamanda çoğu organik bileşik görünür bölgede şeffaftır ve görünür algılanabilirlik yüksek matris yükü olan numunelerde daha yüksek seçicilik anlamına gelir (Kuandykova, 2020).

1.5 Çalışmanın Amacı

İzoproterenol hidroklorür ilaç etken maddesinin genotoksik safsızlığı olan izopropilaminin 1-naftil izotiyosiyanat ile türevlendirme tepkimesi sonucu oluşan 1-izopropil-3-(naftalen-1-il)tiyoüre bileşiğinin HPLC-UV sisteminde kantitatif olarak tayin edilmesi için özgün bir yöntem geliştirilmesi ve valide edilmesi amaçlanmıştır.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1 Tez Çalışmasında Kullanılan Cihazlar

Çizelge 2.1. Tez kapsamında kullanılan cihazlar

Cihazlar	Marka
Hassas terazi	Sartorius ME 235S
pH-metre	Mettler Toledo
Manyetik karıştırıcı	Heidolph MR 3001 K
HPLC	Shimadzu LC 2030 C Plus
Saf su cihazı	Milli Q-Millipore
Ultrasonik su banyosu	Elma-transsonic digital

2.2 Tez Çalışmasında Çalışılan Kolonlar

Çizelge 2.2. Tez kapsamında çalışılan kolonlar

Kolon Türü	Uzunluğu (mm)	İç Çapı (mm)	Partikül Çapı (µm)	Firma
Luna Phenyl-Hexyl	250	4.6	5.0	Phenomenex
Zorbax SB-Phenyl	250	4.6	5.0	Agilent
Hypersil BDS C ₁₈	250	4.6	3.0	Thermo Scientific
Symmetry C ₁₈	150	4.6	5.0	Waters

2.3 Tez Çalışmasında Kullanılan Kimyasallar

Çizelge 2.3. Tez kapsamında çalışılan kimyasallar

Kimyasal Madde	Firma
Asetonitril gradient grade	J.T Baker
o-Fosforik asit (%85), Metanol HPLC kalitede	Scharlau
1-Naftil izotiyosiyanat (%98)	J.T Baker
Sodyum bikarbonat	Sigma-Aldrich
	Supelco

2.4 Tez Çalışmasında Kullanılan Sertifikalı Standartlar ve İlaç Etken Maddeleri

İzoproterenol hidroklorür ilaç etken maddesi Deva Holding A.Ş API Ar-Ge sentez laboratuvarında veya ticari olarak Deva Holding A.Ş'de sentezlenen serilerden elde edilmiştir.

Analitik yöntem geliştirme ve validasyon çalışmalarında kullanılacak izoproterenol hidroklorür standartı ile bu ilaç etken maddelerin safsızlık standartlarının bir kısmı Deva Holding A.Ş API Ar-Ge sentez laboratuvarında sentezlenmiştir. Bir kısmı da tedarikçi

firmalardan temin edilmiştir. Her iki durumda da tüm maddeler, Deva Holding A.Ş API Ar-Ge analitik laboratuvarında standardize edilmiştir.

Çizelge 2.4. Tez kapsamında çalışılan standartlar

Standartın adı	Sistemik Adı	Firma
İzopropilamin	Propan-2-amine	Acros Organics
İzoproterenon	1-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-(isopropylamino)ethanone	DEVA
Hidrojenasyon safsızlığı	4-(2-(isopropylamino)ethyl)benzene-1,2-diol hydrochloride	DEVA
4-Asetilkatekol	1-(3,4-dihydroxyphenyl)ethanone	DEVA
4-(Kloroasetil)katekol	2-chloro-1-(3,4-dihydroxyphenyl)ethanone	DEVA

2.5 Tez Çalışmasında Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

2.5.1 Optimize Edilen Metotta Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

- **Mobil Faz A Çözeltilisinin Hazırlanması:** 1.0 mL o-fosforik asit (85%) 1000 mL saf suda çözülmüştür, karıştırılmış ve 0.45µ' luk filtreden filtre edilmiştir.
- **Mobil Faz B Çözeltilisinin Hazırlanması:** 70:20:10 oranında asetonitril, metanol ve su karışımı hazırlanmıştır.
- **Çözücü Hazırlanması:** 2.5 g 1-naftil izotiyosiyanat 500 mL 80:20 oranında hazırlanmış asetonitril ve su karışımında çözülmüştür.
- **Sistem Uygunluk Çözeltilisinin Hazırlanması:** Sistem uygunluk çözeltisi olarak standart çözeltisi kullanılmıştır.
- **Blank Çözeltilisinin Hazırlanması:** 100.0 mg sodyum bikarbonat 100.0 mL'lik balon jöjeye tartılıp bir miktar çözücü eklenerek, ultrasonik banyoda 40 dk çözülmüş ve hacmine çözücü ile tamamlanmıştır.

- **Standart Çözeltisinin Hazırlanması:** 12.4 mg izopropilamin standardı (20.0 mg izopropilamin hidroklorüre eşdeğer) 100.0 mL'lik balon jolye tartılmış, çözücü ile çözümlenerek hacmine tamamlanmıştır. Bu çözeltiden 2.5 mL alınarak 20.0 mL'ye çözücü ile seyreltilmiştir. Bu çözeltiden 1.0 mL alınarak 100.0 mL'ye çözücü ile seyreltilmiştir ($C_{\text{izopropilamin hidroklorür}}=0.25 \mu\text{g/mL}$). Standart çözeltisi hazırlandıktan sonra enjeksiyon öncesi yaklaşık 1 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir..
- **Numune Çözeltisinin Hazırlanması:** 50.0 mg izoproterenol hidroklorür numunesi ve 100.0 mg sodyum bikarbonat 100.0 mL balon jolye tartılmış ve 60.0 mL çözücü eklenerek 40 dakika boyunca ultrasonda tutulmuş ve hacmine çözücü ile tamamlanmıştır ($C_{\text{izoproterenol hidroklorür}}=0.5 \text{ mg/mL}$). Numune çözeltisi hazırlandıktan sonra enjeksiyon öncesi yaklaşık 1 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir.

2.5.2 Seçicilik Parametresi Çalışmalarında Kullanılan Çözeltiler

- **İzoproterenon Stok Çözeltilerinin Hazırlanması:** 12.9 mg izoproterenon standardı (15.18 mg izoproterenon hidroklorüre eşdeğer) 10.0 mL'lik balon jolye tartılmış, çözücü ile çözümlenmiş ve hacmine tamamlanmıştır. Bu çözeltiden 1.0 mL alınarak 10.0 mL'ye çözücü ile seyreltilmiştir.
- **Hidrojenasyon Safsızlığı Stok Çözeltilerinin Hazırlanması:** 25.9 mg hidrojenasyon safsızlık standardı 10.0 mL'lik balon jolye tartılmış, çözücü ile çözümlenmiş ve hacmine tamamlanmıştır. Bu çözeltiden 1.0 mL alınarak 10.0 mL'ye çözücü ile seyreltilmiştir.
- **4-Asetilkatekol Safsızlığı Stok Çözeltilerinin Hazırlanması:** 15.3 mg 4-asetilkatekol safsızlık standardı 10.0 mL'lik balon jolye tartılmış, çözücü ile çözümlenmiş ve hacmine tamamlanmıştır. Bu çözeltiden 1.0 mL alınarak 10.0 mL'ye çözücü ile seyreltilmiştir.
- **4-(Kloroasetil)katekol Safsızlığı Stok Çözeltilerinin Hazırlanması:** 15.2 mg 4-(kloroasetil)katekol safsızlık standardı 10.0 mL'lik balon jolye tartılmış, çözücü ile çözümlenmiş ve hacmine tamamlanmıştır. Bu çözeltiden 1.0 mL alınarak 10.0 mL'ye çözücü ile seyreltilmiştir.

- **Spesifikasyon Limitinde Safsızlık Karışımı Çözeltisinin Hazırlanması:** 100.0 mL'lik balon jöjeye izoproterenon, hidrojenasyon safsızlığı, 4-asetilkatekol ve 4-(kloroasetil)katekol safsızlık stok çözeltilerinden 1.0 mL alınarak hacmine çözücü ile tamamlanmıştır.
- **Standart Çözeltinin Hazırlanması:** Bölüm 2.5.1'de standart çözeltisi hazırlığı verilmiştir.
- **Numune Çözeltisinin Hazırlanması:** Bölüm 2.5.1'de numune çözeltisi hazırlığı verilmiştir.
- **İzopropilamin Stok Çözeltisinin Hazırlanması:** 15.3 mg izopropilamin standardı 10.0 mL'lik balon jöjeye tartılmış, çözücü ile çözülmüş ve hacmine çözücü ile tamamlanmıştır. Bu çözetiden 0.5 mL alınarak 50.0 mL'ye çözücü ile seyreltilmiştir.
- **Spesifikasyon Limitinde İzopropilamin İlaveli Numune Çözeltisinin Hazırlanması:** 50.0 mg izoproterenol hidroklorür numunesi ve 100.0 mg sodyum bikarbonat 100.0 mL'lik balon jöjeye tartılmış ve bir miktar çözücü ile ultrasonik banyoda 40 dakikada çözülmüştür. Üzerine izopropilamin stok çözeltisinden 1.0 mL eklenmiş ve hacmine çözücü ile tamamlanmıştır.

2.5.3 Doğrusallık Parametresi Çalışmalarında Kullanılan Çözeltiler

- **İzopropilamin Stok Çözeltisinin Hazırlanması:** 15.3 mg izopropilamin standardı 10.0 mL'lik balon jöjeye tartılmış, çözücü ile çözülmüş ve hacmine çözücü ile tamamlanmıştır. Bu çözetiden 0.5 mL alınarak 50.0 mL'ye çözücü ile seyreltilmiştir.
- **Seviye-1 (LOQ) Doğrusallık Çözeltisinin Hazırlanması:** 0.575 mL seviye-4 (%100) çözeltisi 20.0 mL'lik balon jöjeye alınmış ve hacmine çözücü ile tamamlanmıştır ($C_{\text{İzopropylamin HCl}}=0.0071 \mu\text{g/mL}$).
- **Seviye-2 (%50) Doğrusallık Çözeltisinin Hazırlanması:** 0.5 mL izopropilamin stok çözeltisi 100.0 mL'lik balon jöjeye alınmış, hacmine çözücü ile tamamlanmıştır ($C_{\text{İzopropilamin HCl}}=0.1236 \mu\text{g/mL}$).

- **Seviye-3 (%75) Doğrusallık Çözeltisinin Hazırlanması:** 0.75 mL izopropilamin stok çözeltisi 100.0 mL'lik balon jøjeye alınmış, hacmine çözücü ile tamamlanmıştır ($C_{\text{İzopropilamin HCl}}=0.1853 \mu\text{g/mL}$).
- **Seviye-4 (%100) Doğrusallık Çözeltisinin Hazırlanması:** 1.0 mL izopropilamin stok çözeltisi 10.0 mL'lik balon jøjeye alınmış, hacmine çözücü ile tamamlanmıştır ($C_{\text{İzopropilamin HCl}}=0.2471 \mu\text{g/mL}$).
- **Seviye-5 (%125) Doğrusallık Çözeltisinin Hazırlanması:** 1.25 mL izopropilamin stok çözeltisi 10.0 mL'lik balon jøjeye alınmış, hacmine çözücü ile tamamlanmıştır ($C_{\text{İzopropilamine HCl}}=0.3089 \mu\text{g/mL}$).
- **Seviye-6 (%150) Doğrusallık Çözeltisinin Hazırlanması:** 1.50 mL izopropilamin stok çözeltisi 10.0 mL'lik balon jøjeye alınmış, hacmine çözücü ile tamamlanmıştır ($C_{\text{İzopropilamin HCl}}=0.3707 \mu\text{g/mL}$).

2.5.4 Belirleme ve Nicelik Sınırı Çalışmalarında Kullanılan Çözeltiler

- **Spesifikasyon Limitinde İzopropilamin Çözeltisinin Hazırlanması:** Bölüm 2.5.3'te spesifikasyon limitinde izopropilamin çözeltisi hazırlığı verilmiştir.
- **LOQ Çözeltisinin Hazırlanması:** Bölüm 2.5.3'te LOQ çözeltisi hazırlığı verilmiştir.
- **LOD Çözeltisinin Hazırlanması:** 3.0 mL LOQ çözeltisi 10.0 mL'lik balon jøjeye aktarılmış ve çözücü ile hacmine tamamlanmıştır.

2.5.5 Doğruluk Parametresi Çalışmalarında Kullanılan Çözeltiler

- **Numune Çözeltisinin Hazırlanması:** Bölüm 2.5.1'de numune çözeltisi hazırlığı verilmiştir.
- **İzopropilamin Stok Çözeltisinin Hazırlanması:** 15.3 mg izopropilamin standardı 10.0 mL'lik balon jøjeye tartılmış, çözücü ile çözülmüş ve hacmine çözücü ile tamamlanmıştır. Bu çözetiden 0.5 mL alınarak 50.0 mL' ye çözücü ile seyreltilmiştir.

- **Doğruluk Numune Çözeltisi 1 (%50 seviyesi) Hazırlanması:** 50.0 mg izoproterenol hidroklorür numunesi 100.0 mL'lik balon jøjeye tartılmış, üzerine 100.0 mg sodyum bikarbonat ilave edilmiştir. Bir miktar çözcü ile ultrasonik banyoda 40 dakika bekletilmiş, üzerine 0.5 mL izopropilamin stok çözeltisi eklenmiş ve hacmine çözücü ile tamamlanmıştır.
- **Doğruluk Numune Çözeltisi 2 (%100 seviyesi) Hazırlanması:** 50.0 mg izoproterenol hidroklorür numunesi 100.0 mL'lik balon jøjeye tartılmış, üzerine 100.0 mg sodyum bikarbonat ilave edilmiştir. Bir miktar çözcü ile ultrasonik banyoda 40 dakika bekletilmiş, üzerine 1.0 mL izopropilamin stok çözeltisi eklenmiş ve hacmine çözücü ile tamamlanmıştır.
- **Doğruluk Numune Çözeltisi 3 (%120 seviyesi) Hazırlanması:** 50.0 mg izoproterenol hidroklorür numunesi 100.0 mL'lik balon jøjeye tartılmış, üzerine 100.0 mg sodyum bikarbonat ilave edilmiştir. Bir miktar çözcü ile ultrasonik banyoda 40 dakika bekletilmiş, üzerine 1.2 mL izopropilamin stok çözeltisi eklenmiş ve hacmine çözücü ile tamamlanmıştır.

2.5.6 Kesinlik Parametresi Çalışmalarında Kullanılan Çözeltiler

- **Sistem Kesinliği Parametresi Çalışmalarında Kullanılan Çözeltiler**
 1. Standart Çözeltinin Hazırlanması: Bölüm 2.5.1'de standart çözeltisi hazırlığı verilmiştir.
- **Metot Kesinliği Parametresi Çalışmalarında Kullanılan Çözeltiler**
 1. Spesifikasyon Limitinde Safsızlık Eklenmiş Numune Çözeltisi Hazırlanması: Bölüm 2.5.2'de spesifikasyon limitinde safsızlık eklenmiş numune çözeltisi hazırlığı verilmiştir.

2.6 İzoproterenol hidroklorür İçinde İzopropilamin Tayini Yöntemi

İzoproterenol hidroklorür içinde izopropilamin tayini yöntemi Shimadzu LC- 2030 C Plus cihazında yapılmış ve LabSolution sürüm 6.108 ile kaydedilmiştir. Sabit faz olarak, Phenomenex Luna Phenyl-Hexyl kolon (4,6 mm x 250 mm; 5.0 µm) kullanılmıştır. Numune ve kolon sıcaklığı sırasıyla 5 °C ve 25 °C; dalga boyu 230 nm, 10,0 µL enjeksiyon hacmi,

akış hızı 1.0 mL/dk olarak saptanmıştır. Mobil faz A için 1.0 mL o-fosforik asitin (85%) 1000 mL saf suda çözülmesiyle elde edilen karışım, mobil faz B için ise 70:20:10 oranında hazırlanan asetonitril, metanol ve su karışımı kullanılmıştır. Analiz süresi 55 dakika olan bir gradient sistemi düzenlenmiştir. Gradient programı çizelge 2.5'te yer almaktadır.

Çizelge 2.5. İzoproterenol hidroklorür içinde izopropilamin tayini yöntemi gradient programı

Zaman, dk	Hareketli faz A, %	Hareketli faz B, %
0	60	40
8	60	40
28	50	50
32	20	80
38	20	80
39	10	90
45	10	90
47	60	40
55	60	40

2.7 Yöntem Validasyonu ve Validasyon Parametreleri

Optimize edilen yöntem için validasyon çalışmaları ICH Q2(R1) kılavuzu rehber alınarak yapılmıştır. Yöntemin geçerliliğinin kontrolü için seçicilik, doğrusalılık, çalışma aralığı, belirleme ve nicelik sınırı, doğruluk, kesinlik, sağlamlık, numune ve standart çözeltileri stabilitesi parametreleri kontrol edilmiştir.

2.7.1 Seçicilik

Yöntemin seçiciliğinde sistem uygunluk parametreleri sağlanıyor olmalıdır. İzopropilamine piki kromatografik olarak ayırım göstermelidir. İzopropilamin pikinin alıkonma zamanında çözücüden pik gelmemelidir. İzopropilamin piki spektral olarak saf olmalıdır yani pik saflık endeksi saflık eşiğinden büyük olmalıdır.

2.7.2 Doğrusallık

Dedektörün analizi yapılan numunenin derişimine verdiği yanıtın doğru orantılı olarak artması ve çizilen grafikte noktaların çizgi üzerinde ya da yakınında yer alması doğrusallıktır. Doğrusallığı veren parametreler eğim, kesişim noktası, korelasyon katsayısı ve artık kareler toplamı şeklindedir. Bu parametreler ölçülen değere karşı analizi yapılan numune derişiminin regresyon analizleri ile hesaplanır ve $y = mx + n$ denkleminde yerine yazılır.

Çalışmada korelasyon kat sayısı 0.99'dan az olmamalı, eğim raporlanmalı ve kesim noktası % 100 derişime karşılık gelen alanın % 5'inden fazla olmamalıdır. Karelerin farkı toplamı (RSS) raporlandırılır.

2.7.3 Çalışma Aralığı

Kalibrasyon eğrisinde belirlenebilen en düşük derişimden doğrusallıktan saptığı derişime kadar olan derişim aralığı çalışma aralığıdır. Kabul kriteri gereği minimum seviyede alanların bağıl standart sapması (RSD) %10.0'dan fazla olmamalı, maksimum seviyede alanların bağıl standart sapması %5.0'den fazla olmamalıdır.

2.7.4 Belirleme ve Nicelik Sınırı

LOQ, doğrusallık sınırları içinde kalmayan ya da analitin kabul edilebilir bir kesinlik ve doğruluk seviyesiyle ölçülebildiği en düşük doğrusallık derişimini oluşturan düzeydir. Doğrudan deneylerden ya da hesaplama aracılığıyla bulunabilir. LOD, analitin görüldüğü; fakat nicel limitler içerisinde olmadığı en düşük derişimdir. Doğrudan deneylerden ya da hesaplama aracılığıyla bulunabilir.

Kabul kriteri gereği LOQ tüm safsızlıklar için raporlama seviyesinden büyük olmamalıdır ve LOQ derişiminde 6 tekrarlı enjeksiyon için alanların %RSD 10 ve altında olmalıdır. LOD derişiminde sinyal-gürültü oranı 3 ve üzerinde olmalıyken LOQ derişiminde ise sinyal-gürültü oranı 10 ve üzerinde olmalıdır.

2.7.5 Doğruluk

Analitik bir yöntem için doğruluk belirli sayıda birbirinden bağımsız ölçümün gerçek değere yakınlığının hesaplanmasıdır. Ortama eklenen numunenin analiz edilen ortamdaki denli geri kazanılabileceğini ortaya koyar. Bu çalışmanın kabul kriteri gereği her bir geri kazanım %90.0 – %110.0 arasında olmalıdır.

2.7.6 Kesinlik

Aynı şartlarda ve aynı yöntemle ortaya konulan sonuçların sırayla elde edilen ölçümleri arasındaki yakınlıktır. Yani ölçümlerin tekrarlanabilirliğini ortaya koymak için kullanılır. Homojen ve özgün bir numune kullanılarak tekrarlanan ölçümler vasıtasıyla basit bir şekilde bulunabilir. Tez çalışması kapsamında sistem kesinliği, yöntem kesinliği ve laboratuvarlar arası kesinlik çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

2.7.7 Sağlamlık

Sağlamlık alışması yapılırken yöntem parametrelerinde küçük, planlı ve mhım değişiklikler meydana getirilir ve bu değişikliklere karşı yöntemin hassasiyeti ölçülür. Bunun sonucunda analiz sonucunu değiştirebilecek etkiler ve yöntemin en ideal koşulları ortaya konulur. Kabul kriteri gereği izopropilamin ve safsızlık pikleri kromatografik olarak ayırım göstermelidir.

2.7.8 Numune ve Standart zeltileri Stabilitesi

Numune ve standartların kararlılığının belirli bir süre korunabilir olması doğru, tekrarlanabilir ve güvenilir sonuçlara ulaşmak açısından gereklidir. Geliştirilmiş olan yöntemle farklı zaman aralıklarında yapılan kararlılık çalışmaları ortaya konulmalıdır. Kabul kriteri gereği standart çözeltisi için başlangıç ve farklı zaman dilimlerindeki pik alan farkları %5.0'den fazla olmamalı ve numune çözeltisi için: başlangıç ve farklı zaman dilimlerindeki pik alan farkları %10.0'dan fazla olmamalıdır.

3. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE BULGULAR

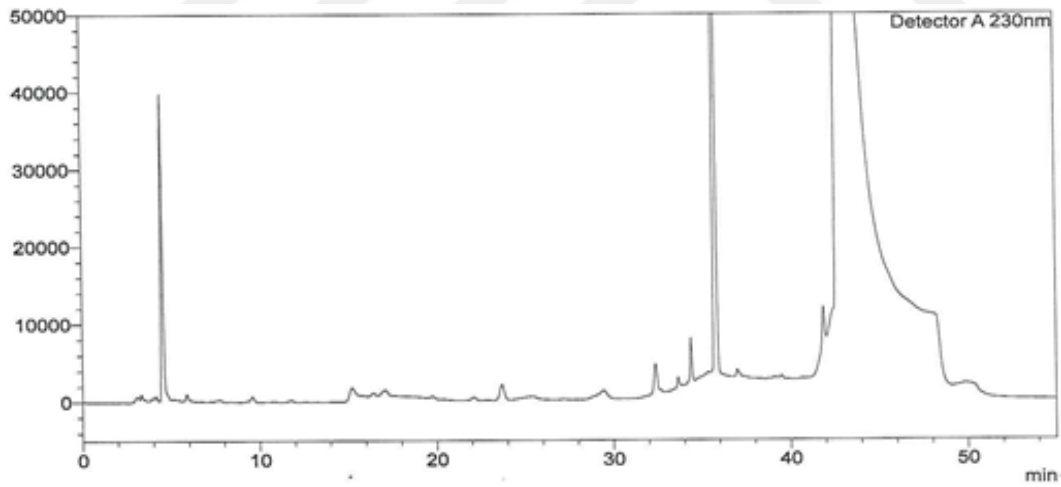
3.1 Seçicilik

Çalışmada yöntemin seçiciliği için blank çözeltisi, standart çözeltisi, numune çözeltisi, spesifikasyon limitinde izopropilamin ilaveli numune çözeltisi ve spesifikasyon limitinde safsızlık karışımı çözeltisi verilmiştir.

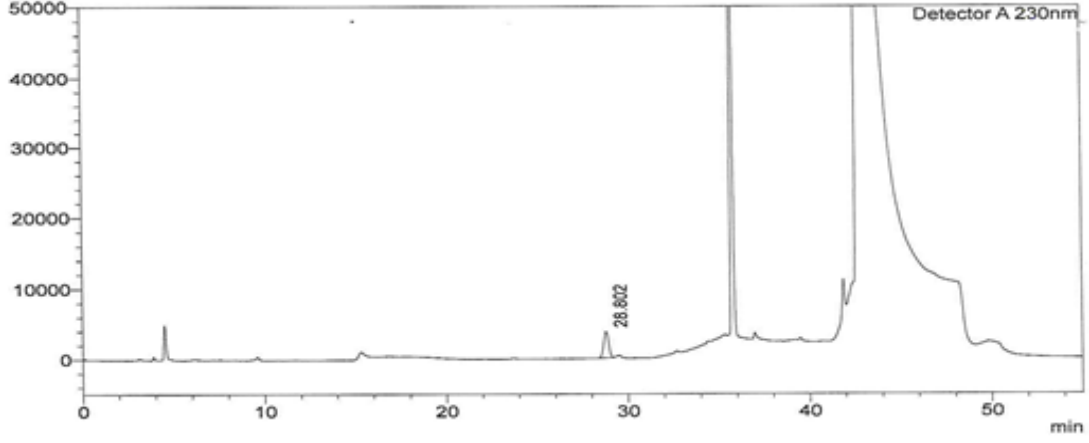
Çalışma sonucunda izopropilamin pikinin alıkonma zamanında çözücüde pik gözlenmemiştir. İzopropilamin piki safsızlık piklerinden ayrılmıştır. İzopropilamin piki spektral olarak saftır. Şekil X, Y ve Z'deki kromatogramlara göre yöntem seçicidir.

Çizelge 3.1. İzoproterenol hidroklorür içinde izopropilamin tayini için seçicilik sonuçları

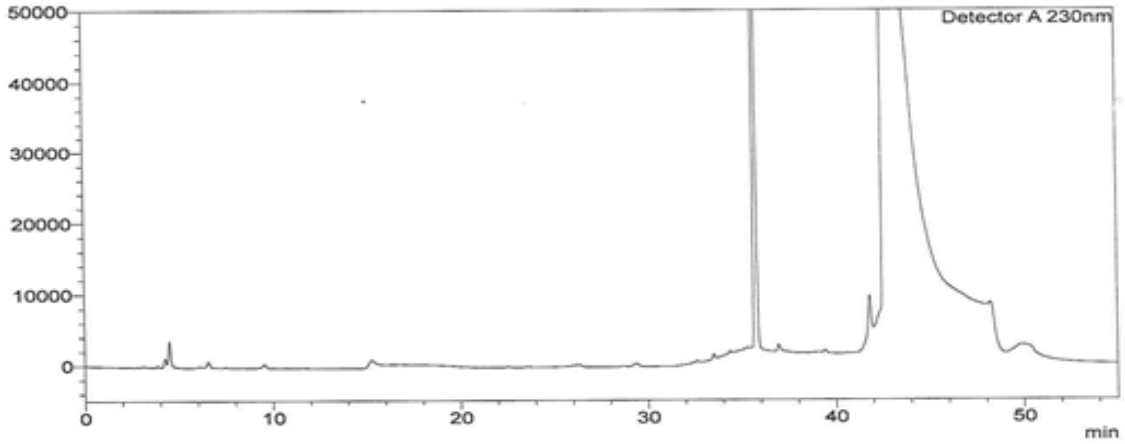
Safsızlıklar	Alıkonma zamanı, dk	Safılık endeksi	Safılık eşiği
İzopropilamin	~28.7	1.000000	0.999946
İzoproterenon	-	-	-
Hidrojenasyon safsızlığı	-	-	-
4-Asetil katekol	-	-	-
4-(Kloroasetil) katekol	-	-	-



Şekil 3.1. Blank çözeltisi kromatogramı



Şekil 3.2.Standart çözeltisi kromatogramı



Şekil 3.3.Safsızlık karışımı çözeltisi kromatogramı

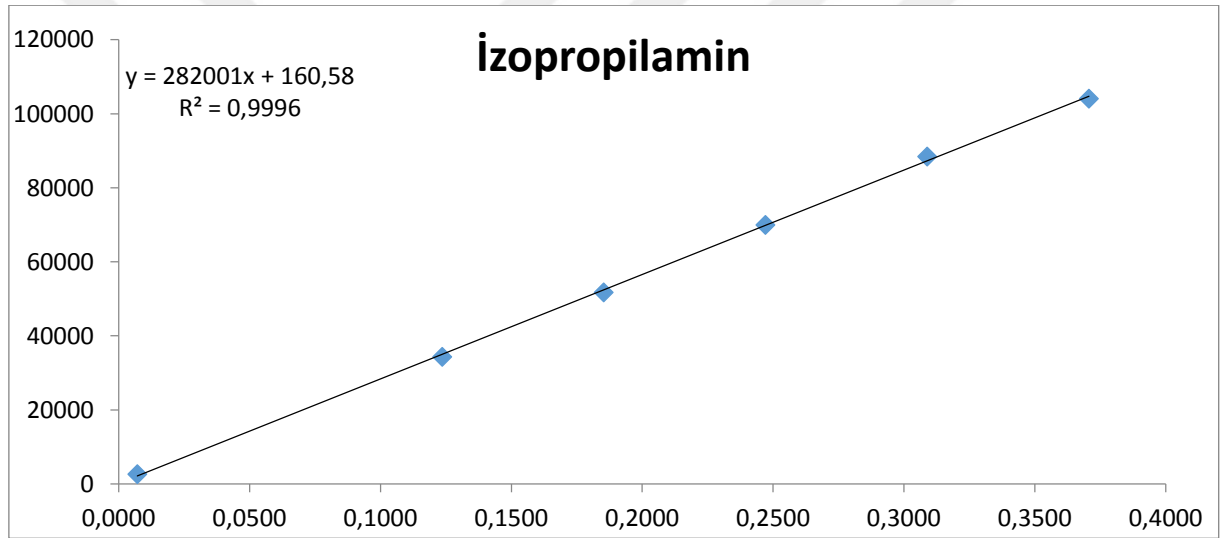
3.2 Doğrusallık

Çalışmada yöntemin doğrusallığı için LOQ çözeltisi ile spesifikasyon limitinin %50, %75, %100, %125 ve %150 seviyelerine karşılık gelen derişimlerdeki izopropilamin çözeltisinden enjeksiyonlar yapılmıştır. Her bir standart çözeltiden 3 kez enjeksiyon, minimum (LOQ) ve maksimum (%150'lik) seviyelerde 6 kez enjeksiyon yapılmıştır.

Çalışma sonucunda izopropilamin hidroklorür derişimi ile dedektör yanıtı arasında doğrusal bir ilişki olduğu görülmüştür. Doğrusallık için Microsoft Excel programı kullanılarak her derişime karşılık ortalama pik alanı ve kalibrasyon eğrisi çizilmiştir, korelasyon katsayısı hesaplanmıştır.

Çizelge 3.2. İzoproterenol hidroklorür içinde izopropilamin tayini için doğrusallık sonuçları

Seviyeler	Teorik konsantrasyon (µg/ml)	Alanlar (AU)	Hesaplanan alanlar (AU)	Farkların karesi
1 (LOQ)	0.0071	2670	2163	257049
2 (50%)	0.1236	34366	35016	422500
3 (75%)	0.1853	51780	52416	404496
4 (100%)	0.2471	70002	69843	25281
5 (125%)	0.3089	88473	87271	1444804
6 (150%)	0.3707	104115	104699	341056
RSS				2895186
Korelasyon katsayısı				0.9998
Eğim				282001
y-kesim noktası				161
y-kesim noktasıx100 % seviyedeki alan				0.2



Şekil 3.4. İzopropilamin Doğrusallık grafiği

3.3 Çalışma Aralığı

Doğrusallık çalışmasındaki minimum ve maksimum derişimdeki alanlar kullanılmıştır.

Çizelge 3.3. İzoproterenol hidroklorür içinde izopropilamin tayini için çalışma aralığı sonuçları

		Enjeksiyonlar	İzopropilamin alanı
Min. derişim alanları		1	2608
		2	2754
		3	2630
		4	2677
		5	2681
		Ortalama	2670
		SS	56
		%RSD	2.10
Maks. derişim alanları		1	104831
		2	104606
		3	104039
		4	103756
		5	103344
		Ortalama	104115
		SS	609
		%RSD	0.58

3.4 Belirleme ve Nicelik Sınırı

Çalışmada spesifikasyon limitinde izopropilamin çözeltisi 5 kez enjekte edilmiş ve sinyal-gürültü oranları hesaplanmıştır. Sinyal-gürültü oranı sonuçlarına göre, belirleme (LOD) ve nicelik (LOQ) sınırları hesaplanmıştır. LOD ve LOQ çözeltileri 3'er kez enjekte edilmiştir.

Hesaplama

$$LOD = \frac{3}{SN} \times C$$

(3.1)

$$LOQ = \frac{10}{SN} \times C$$

(3.2)

SN: Sinyal-Gürültü oranı, C: Standart çözeltilerdeki konsantrasyonlar (µg/mL)

Çizelge 3.4. Spesifikasyon limitinde safsızlıkların sinyal-gürültü oranı sonuçları

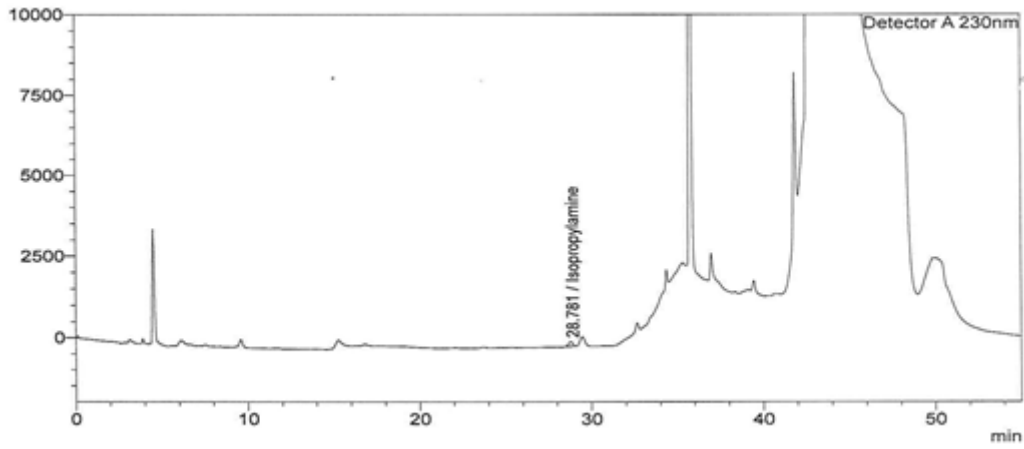
Safsızlıklar	Konsantrasyonlar, µg/mL	Sinyal-gürültü oranları
İzopropilamin	0.2471	349

Çizelge 3.5. LOQ alan sonucu

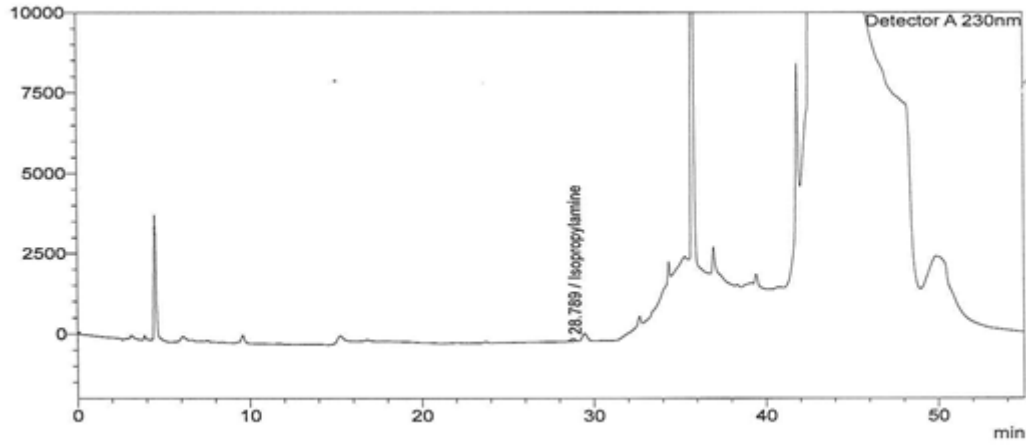
Enjeksiyonlar	İzopropilamin
1	2608
2	2754
3	2630
4	2677
5	2681
Ortalama	2670
SS	56
%RSD	2.10

Çizelge 3.6. LOD ve LOQ sonuçları (% ve çözelti konsantrasyonları olarak)

Safsızlıklar	LOD		LOQ		S/N	
	µg/ml	%	µg/ml	%	LOD	LOQ
İzopropilamin	0.0021	0.0004	0.0071	0.0014	6	11



Şekil 3.5. LOQ çözeltisi kromatogramı



Şekil 3.6.LOD çözeltisi kromatogramı

3.5 Doğruluk

Çalışmada yöntemin doğruluğu için spesifikasyon limitinde izopropilamin standart çözeltisi 5 kez enjekte edilmiştir. İki paralel numune çözeltisi enjekte edilmiştir. Spesifikasyon limitinin %50'sine, %100'üne ve %120'sine karşılık gelen derişimlerde numuneye izopropilamin eklenmiştir. Her seviyede 3'er numune hazırlanmış ve her biri 1 kez enjekte edilmiştir. Numune LOQ seviyesinde izopropilamin içerdiğinden dolayı bu seviyede geri kazanım çalışması yapılmamıştır. Doğruluk çalışmasında elde edilen sonuçlar kabul kriterlerine uygun bulunmuştur.

Hesaplama

$$\text{Teorik miktar (\%)} = C_{\text{spk}} \times \frac{D}{W_{\text{test}}} \times 100 + \text{numunedeki miktar} \quad (3.3)$$

C_{spk} : Eklenen safsızlık konsantrasyonu (mg/mL), D: Seyreltme, W_{test} : Numune tartımı (mg)

Çizelge 3.7. İzopropilamin için doğruluk çalışması sonuçları

Numune	Derişim (µg/ml)	Numune alanı (mV)	Numune ağırlığı (mg)	Teorik (%)	Deneysel (%)	Geri kazanım (%)
1 (50%)	0.1236	39473	50.0	0.0257	0.0263	102.3
		39610	50.1	0.0257	0.0263	102.3
		39850	50.2	0.0256	0.0264	103.1
2 (100%)	0.2471	76310	50.0	0.0504	0.0508	100.8
		76235	50.1	0.0503	0.0506	100.6
		76302	50.3	0.0501	0.0505	100.8
3 (120%)	0.2965	91529	50.1	0.0602	0.0608	101.0
		91467	50.0	0.0603	0.0608	100.8
		91382	49.9	0.0604	0.0609	100.8
Standart derişimi (µg/mL)						0.2471
Standart alanı						74298
Numunedeki miktar (%)						TE/ND

3.6 Kesinlik

3.6.1 Sistem Kesinliği

Çalışmada sistemin kesinliği için standart çözeltisi 5 defa enjekte edilmiştir. Kabul kriteri gereği standart çözeltisinin 5 enjeksiyonundan elde edilen izopropilamin pik alanları arasındaki % RSD en fazla 5.0 olmalıdır. Sistem kesinliği çalışmasında elde edilen sonuçlar kabul kriterlerine uygun bulunmuştur.

Çizelge 3.8. İzopropilamin için sistem kesinliği çalışması sonuçları

Enjeksiyon No	Numune Alanı
1	71186
2	71128
3	70963
4	70897
5	70575
Ortalama	70950
SD	240
RSD%	0.34

3.6.2 Yöntem Kesinliği

Çalışmada yöntemin kesinliği için spesifikasyon limitinde izopropilamin eklenmiş 6 numune analiz edilmiştir. Kabul kriteri gereği her bir geri kazanım %90.0 – %110.0 arasında olmalıdır. Geri kazanım sonuçlarının arasındaki RSD ≤ % 10.0 olmalıdır. % 95 güven aralığı

hesaplanır. Yöntem kesinliği çalışmasında elde edilen sonuçlar kabul kriterlerine uygun bulunmuştur.

Çizelge 3.9. İzopropilamin için yöntem kesinliği çalışması sonuçları

Numune	Numune alanı	Seyreltme	Numune ağırlığı (mg)	Teorik (%)	Deneysel (%)	Geri kazanım (%)
1	72347	100	49.9	0.0505	0.0505	100.0
2	71968		50.1	0.0503	0.0500	99.4
3	72127		50.0	0.0504	0.0502	99.6
4	72430		50.3	0.0501	0.0501	100.0
5	71067		49.8	0.0506	0.0497	98.2
6	70339		50.2	0.0502	0.0488	97.2
Ortalama						99.1
SD						1.1
RSD%						1.1
% 95 Güven aralığı						97.9 – 100.3
Standart derişimi (µg/mL)						0.2471
Numunedeki miktar (%)						0.001

3.6.3 Laboratuvarlar Arası Kesinlik

Laboratuvarlar arası değişimlerin analiz yöntemi üzerine olan etkisini görmek amacıyla, aynı yöntemin farklı laboratuvarlarda, farklı kolon kullanılarak, farklı günde, farklı bir cihazda, farklı bir kişi tarafından yapıldığı kesinlik çalışmasına tekrar üretilebilirlik denir. Kabul kriteri gereği her bir geri kazanım %90.0 – %110.0 arasında olmalıdır. Her çalışma için geri kazanım sonuçlarının arasındaki RSD ≤ % 10.0 olmalıdır. Geri kazanım sonuç ortalamaları arasındaki fark 10.0'dan fazla olmamalıdır. % 95 güven aralığı hesaplanır. Laboratuvarlar arası kesinlik çalışmasında elde edilen sonuçlar kabul kriterlerine uygun bulunmuştur.

Çizelge 3.10. İzopropilamin için laboratuvarlar arası kesinlik çalışması sonuçları

1.Çalışma						
Numune	Numune alanı	Seyreltme	Numune ağırlığı (mg)	Teorik (%)	Deneyisel (%)	Geri kazanım (%)
1	72347	100	49.9	0.0505	0.0505	100.0
2	71968		50.1	0.0503	0.0500	99.4
3	72127		50.0	0.0504	0.0502	99.6
4	72430		50.3	0.0501	0.0501	100.0
5	71067		49.8	0.0506	0.0497	98.2
6	70339		50.2	0.0502	0.0488	97.2
Ortalama						99.1
SD						1.1
RSD%						1.1
% 95 Güven aralığı						97.9 – 100.3
Standart derişimi (µg/mL)						0.2471
Numunedeki miktar (%)						0.001
2.çalışma						
1	94419	100	50.1	0.0592	0.0581	98.1
2	95526		50.0	0.0593	0.0589	99.3
3	96880		50.2	0.0591	0.0595	100.7
4	98167		50.1	0.0592	0.0604	102.0
5	99536		49.9	0.0594	0.0615	103.5
6	99254		49.8	0.0596	0.0615	103.2
Ortalama						101.1
SD						2.2
RSD%						2.2
% 95 Güven aralığı						98.8 – 103.4
Standart derişimi (µg/mL)						0.2617
Numunedeki miktar (%)						0.007
Ortalama sonuçlar arasındaki fark						2.0

3.7 Sağlamlık

Bu çalışmada sağlamlık parametresinde incelenen değişiklikler; mobil faz akış hızının değişimi, kolon sıcaklığı değişimi ve mobil faz A derişimidir. Mobil faz akış hızı ± 0.1 mL/dk olacak şekilde değiştirilmiştir. Kolon sıcaklığı $\pm 3^\circ\text{C}$ olacak şekilde değiştirilmiştir. Mobil faz A derişimi ± 0.01 olarak değiştirilmiştir. Çalışmada yöntemin sağlamlığı için sisteme çözücü (blank) çözeltisi, standart çözeltisi ve spesifikasyon limitinde safsızlık eklenmiş numune çözeltisi enjekte edilmiştir. Sağlamlık çalışmalarına göre yöntemin parametrelerdeki küçük değişimlerden etkilenmediği görülmüştür.

Çizelge 3.11. İzopropilamin için sağlamlık çalışması sonuçları

ŞARTLAR	RT	RSD%	Simetri Faktörü	Teorik plaka sayısı
Normal Şartlar	28.9	0.22	1.011	50088
Kolon akışı: 1.1 mL/dk	27.0	0.44	1.007	45424
Kolon akışı: 0.9 ml/dk	31.0	0.62	1.014	55170
Kolon sıcaklığı: 22 °C	29.8	0.26	1.006	51288
Kolon sıcaklığı: 28 °C	28.1	0.62	1.015	49260
Mobil faz A: 1.1 mL/L'de H ₃ PO ₄	27.9	0.20	1.020	320977
Mobil faz A: 0.9 mL/L'de H ₃ PO ₄	27.7	0.58	1.019	316251

3.8 Numune ve Standart Çözeltileri Stabilitesi

Çizelge 3.12. İzopropilamin için standart çözeltisi stabilite çalışması sonuçları

Zaman	Standart	
	Alanlar	Fark (%)
Başlangıç	73207	UY/NA
2. Saat	73870	0.9
4. Saat	73751	0.7
6. Saat	73936	1.0
8. Saat	73853	0.9
10. Saat	73931	1.0
12. Saat	73936	1.0
14. Saat	73994	1.1
16. Saat	74089	1.2
18. Saat	74225	1.4
20. Saat	74179	1.3
22. Saat	74152	1.3
24. Saat	74212	1.4
26. Saat	74249	1.4
28. Saat	74212	1.4
30. Saat	74119	1.2
32. Saat	74167	1.3
34. Saat	74086	1.2
36. Saat	74354	1.6
38. Saat	74353	1.6
40. Saat	74396	1.6
42. Saat	74402	1.6
44. Saat	74431	1.7
46. Saat	74325	1.5
48. Saat	74435	1.7

Çizelge 3.13. İzopropilamin için safsızlık ilaveli numune çözeltisi stabilite çalışması sonuçları

Zaman	Numune	
	İzopropilamin alanı	Fark (%)

Zaman	Numune	
	İzopropilamin alanı	Fark (%)
Başlangıç	77548	UY/NA
2. Saat	78315	1.0
4. Saat	79256	2.2
6. Saat	80311	3.6
8. Saat	81819	5.5
10. Saat	83869	8.2
12. Saat	86836	12.0
14. Saat	91525	18.0
16. Saat	97735	26.0
18. Saat	105180	35.6
20. Saat	113968	47.0
22. Saat	123521	59.3
24. Saat	134356	73.3
26. Saat	145475	87.6
28. Saat	156399	101.7
30. Saat	168049	116.7
32. Saat	179296	131.2
34. Saat	190459	145.6
36. Saat	202229	160.8
38. Saat	214329	176.4
40. Saat	226333	191.9
42. Saat	239425	208.7
44. Saat	252707	225.9
46. Saat	265069	241.8
48. Saat	277256	257.5

Çalışmada numune ve standart stabilitesi için standart ve safsızlık ilaveli numune çözeltileri hazırlanmış ve farklı zaman dilimlerinde 48 saat boyunca analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre standart çözeltilisinin 48 saat; numune çözeltilisinin ise 10 saat dayanıklı olduğu gözlemlenmiştir.

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yöntem geliştirilmesi safhasında piklerin birbirinden ayrımı ve pik şekillerinin iyileştirilmesi adına farklı kolonlar, farklı hareketli fazlar, kolon ve numune bölmesi sıcaklıkları, enjeksiyon hacmi, akış hızı ve dalga boyları da denenmiştir. Geliştirilen yöntem ICH yönergelerine göre valide edilmiştir.

İzopropilamin safsızlığı, 1-naftilizotiyosiyanat ile türevlendirilirken; optimum reaksiyon süresinin belirlenmesi amacıyla farklı sürelerde çözelti ortamından numune alınarak, HPLC cihazına enjeksiyon yapılmıştır. Bu kapsamda standart çözeltisi hazırlanmış olup, oda sıcaklığında türevlendirilmeye bırakılmıştır. Başlangıç zamanından itibaren her 20 dakikada bir HPLC cihazına enjeksiyon verilerek, 1-izopropil-3-(naftalen-1-il)tiyoüre piki'nin alanı kontrol edilmiştir. 60.dakikaya kadar pik alanının arttığı, 100. dakikaya kadar da değişmediği gözlemlenmiştir. Optimum reaksiyon süresi 60 dakika olarak belirlenmiştir.

İzopropilamin türevlendirildikten sonra oluşan yapı apolar yapıya sahip olduğundan ters faz kromatografisi çalışılmıştır. Bu kromatografi türünde kolon apolar özelliktedir ve ayırım kolon yüzeyinde gerçekleşir. Kolon boyunca çözünen maddenin ilerlemesini sağlayan mobil faz ise polar özelliktedir. Benzer benzeri çeker kuralına göre bir madde ne kadar apolarsa kolona ilgisi çoktur ve kolona daha çok tutunacağından farklı polar yapıdaki diğer moleküllerden ayrılır. Bu sebeple yöntem geliştirirken kullanılan çözücülerin, kolonların ve mobil fazların ve ilaç etken maddelerinin polarite özellikleri bilinmelidir. Geliştirdiğimiz yöntemler, kalite kontrol laboratuvarlarında rutin analizlerde kullanılacağından hızlı, doğru ve kesin olması önem taşımaktadır.

Yöntem geliştirilmeden önce ilk olarak uygun çözücü seçimi yapılır. Bu amaçla orta polarlıkta ve düşük viskozite de asetonitril, metanol gibi organik çözücüler ve bunların farklı oranlarda su ile karışmış çözücü sistemleri denenmiştir. Çözücü seçiminde hem izoproterenolün, hem izopropilamin safsızlığının ve aynı zamanda türevlendirme ajanının homojen bir çözelti oluşturduğu optimum çözücü sistemi tercih edilmiştir.

Moleküllerin daha iyi ayırım gösterebilmesi için, yüksek hidrofobik kolon kullanımı daha uygundur. Bu bağlamda farklı analitik kolonlar denenmiş, seçiciliğin ve pik simetrisinin en uygun olduğu kolon seçilmiştir. Metod geliştirme aşamasında en uygun ayırım ve pik şekli Luna phenyl-hexyl kolonda gözlemlenmiştir.

Mobil faz seçerken; maddenin pKa değeri göz önünde bulunmuş hareketli faz pH'ı hesaplanmıştır. Bunun için tampon çözeltiler kullanılmış veya elüsyon programında organik miktarıyla oynanmıştır. Yöntem geliştirme sürecinde en iyi ayırımın ve pik şeklinin elde edildiği o-fosforik asidin sulu çözeltisi ile asetonitril, metanol ve su karışımı en uygun mobil fazlar olarak belirlenmiştir.

Çalışma derişimi belirlenirken spesifikasyon limitinde farklı derişimlerde safsızlık ilaveli numune çözeltileri hazırlanmıştır. Bu çözeltilerdeki türevlendirilmiş izopropilamin moleküllerinin sinyal / gürültü oranları hesaplanmıştır. İhmal limitinin (% 0.05) sinyal / gürültü oranının, LOQ derişimindeki sinyal / gürültü oranından HPLC sistemlerinde bu oran 10 olarak kabul edilmektedir.) büyük olması beklenir. Bu kriterler göz önünde bulundurulduğunda en uygun numune derişimi 0.5 mg/mL olarak görülmüştür ve enjeksiyon hacmi 10 mL olarak belirlenmiştir.

Çalışma dalga boyu için yapılan 200-400 nm aralığındaki UV taraması sonucunda; en yüksek absorpsiyon 230 nm dalga boyunda gözlenmiştir.

İlaç üretimi yüksek teknoloji, zaman ve maliyet gerektiren hassas bir süreçtir. Hastaların ilaçlara hızlı ve daha düşük maliyetlerde ulaşabilmesi büyük önem taşımaktadır. Bu bağlamda jenerik ilaç üretimi alanında iyileştirme ve geliştirme çalışmalarının hız kazanmasının, toplum sağlığı, ekonomisi ve hayat kalitesinin artmasında payı büyüktür. Üretilen ilaçların istenilen niteliğe uygun olmasının kontrolü iyi geliştirilmiş, hassas, sağlam, tekrarlanabilir ve hızlı analitik metotlar ile sağlanır. Tez çalışması kapsamında ele alınan izopropilamin safsızlığının tayini için geliştirilen ve valide edilen metodun bu gereklilikleri karşıladığı görülmektedir.

KAYNAKLAR

- Aghari, V., Bajpai, M., Nanda, S. (2013), Essential Concepts of Mobile Phase Selection for Reversed Phase HPLC, *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 6(5):459–64.
- Ahuja, S., Alsante, K. (2004), *Handbook of Isolation and Characterization of Impurities in Pharmaceuticals* (s. 231-248), San Diego, Londra: Separation Science and Technology, Vol. V Academic Press ISBN: 0-12-044982-X.
- Akmeşe, B. (2015), *Biyojen Aminlerin Yüksek Basınç Sıvı Kromatografisi İle Ayırımı Ve Uv-Görünür Spektrofotometrik Tayinleri*, Samsun: Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Ana Bilim Dalı Doktora Tezi.
- Andea, W., Brown, WP.(1997), *HPLC and CE Principles and Practice* (s.100-102), San Diego: Academic Press.
- Başçı, N., Temizer, A., Bozkurt, A., Isımer, A., (1998), Optimization of Mobile Phase in the Separation of β -blockers by HPLC, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 18(4–5):745– 50.
- Bauzaa, T., Blake, A., Dumasb, F., Cabanis, JC. (1994), Determination of Biogenic Amines and Their Precursor Amino Acids in Wines of the Vallée du Rhône by Highperformance Liquid Chromatography with Precolumn Derivatization and Fluorimetric Detection, *Journal Chromatography A*, 707, 373-379.
- Casal, S., Oliveira MBPP., Ferreira, MA. (2002), Determination of biogenic amines in coffee by an optimized liquid chromatographic method, *Liquid Chromatography & Related Technologies*, 25, 2535–2549.
- Demirkıran, D. (2013), *Balık Ve Balık Ürünlerinde Histamin Düzeylerinin Tespiti İçin O-Fitaldialdehit Ve Benzoil Klorür Türevlendirmesi Kullanılan Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi Metotlarının Karşılaştırılması*, Ankara: Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Ana Bilim Dalı Doktora Tezi.
- Göncü, E. (2010), *Isoproterenol ile Miyokart İnfarktüsü Oluşturulmuş Ratlarda L-argininin Lipit, Lipoprotein ve Malondialdehid Düzeylerine Etkisinin İncelenmesi*, Edirne: T.C. Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi.
- Gunawan, S., Walton, NY., Treiman, DM. (1990), High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Selected Amino Acids in Rat Brain by Precolumn Derivatization with Phenylisothiocyanate, *Journal Chromatography A*, (503):177-187.
- International Conference on Harmonization (ICH) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology (2006). Genova. Q3A(R2).
- International Conference on Harmonization (ICH) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology (2006). Genova. Q3B(R2).
- Karapınar, HS. (2013), *Bazı Gıdaların Aflatoksin İçeriğinin Hplc Metodu İle Tayini*, Karaman: Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi.

- Kazakevich, Y., Lobrutto, R. (2007), *HPLC for Pharmaceutical Scientists*, Hoboken: John Wiley & Sons, 1st edition.
- Kuandykova, KG. (2020), *Bazı Aminoasitlerin Schiff Bazı İle Türevlendirilerek HPLC İle Tayin*, Ankara: Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi.
- Kumar, V., Bharadwaj, R., Gupta, G., Kumar, S., (2015), An Overview on HPLC Method Development, Optimization and Validation Process for Drug Analysis, *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 2(2):30–40.
- Kushwaha, P. (2010), Genotoxic Impurities in Pharmaceuticals, *Pharmainfo.net*, Vol. 8 Issue 2.
- Makowski, GS. (2017), *Advances in Clinical Chemistry*, Londra: Elsevier 79,153-198.
- Meyer, VR. (2010), *Practical High- Performance Liquid Chromatography*, New Jersey: WilleyBlackwell.
- Moldoveanu, S., David, V. (2013), *Essentials in Modern HPLC Separations*, New York: Elsevier.
- More, R., Gosar, A., Shaikh, T., Joglekar, A. (2019), Ion Chromatography Method For Determination of Isopropylamine Content In Metoprolol Succinate, *Journal of Biomedical and Pharmaceutical Research*, 2279-0594.
- Özcan, S. (2019), *Çeşitli Sıvı Kromatografisi Yöntemleri İle İvakaftorun Tayini Ve Bozunma Ürünlerinin Karakterizasyonu*, Eskişehir: Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Anabilim Dalı Doktora Tezi.
- Özçelik, NO. (2015), *Nateglinidin Farmasötik Preparatlarda Spektrofluorimetrik Miktar Tayini*, İstanbul: İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Tezi.
- Poole, CF. (2013), *Liquid Chromatography* (Chapter 2. Derivatization in Liquid Chromatography), Michigan: Elsevier.
- Poole, CF., Poole, SK. (1993), *Chromatography Today*, Amsterdam: Elsevier
- Regis Chromatography Catalog/Guide 1993*
- Skoog, DA., Holler, FJ., Crouch, SR. (2017), *Principal of Instrumental Analysis* (s. 695-782) New York: Sunder College Publisher, 7th Edition.
- Skoog, DA., Holler, FJ., Crouch, SR. (2013), *Enstrümantal Analiz İlkeleri*, Ankara: Bilim Yayınevi, 6. Baskı.
- Soyseven, M. (2018), *Gıda Katkı Maddesi Olarak Kullanılan Monosodyum Glutamatın Çeşitli Gıda Maddelerinin İçindeki Miktarının Tayini*, Eskişehir: Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Ana Bilim Dalı Doktora Tezi.
- Talay, Ç. (2022), *Metronidazol, Mikonazol Ve Lidokain'in Farmasötik Preparattan Aynı Anda Analizi İçin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Yönteminin*

Geliştirilmesi, Ankara: T.C Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Programı Yüksek Lisans Tezi.

Wainer, IW. (1985), *Liquid Chromatography in Pharmaceutical Development*, Springfield: Aster Publishing.

Yetgin, Ö. (2014), *Nörotransmitterlerin Tayini İçin Hplc'de Metot Geliştirilmesi Ve Metot Validasyonu*, Bolu: Abant İzzet Baysal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Bölümü Analitik Kimya Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Tezi.

