

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**



**GIDA TAKVİYESİ TABLETLERİNDE BULUNAN GLUKOZAMİN ETKEN
MADDESİNİN YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ (HPLC)
YÖNTEMİ İLE TAYİNİ İÇİN METOT OPTİMİZASYONU VE VALİDASYONU**

Ayşegül SEMİZ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS

TEMMUZ 2018

ANTALYA

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**



**GIDA TAKVİYESİ TABLETLERİNDE BULUNAN GLUKOZAMİN ETKEN
MADDESİNİN YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ (HPLC)
YÖNTEMİ İLE TAYİNİ İÇİN METOT OPTİMİZASYONU VE VALİDASYONU**

Ayşegül SEMİZ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEMMUZ 2018

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**GIDA TAKVİYESİ TABLETLERİNDE BULUNAN GLUKOZAMİN ETKEN
MADDESİNİN YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOGRAFİSİ (HPLC)
YÖNTEMİ İLE TAYİNİ İÇİN METOT OPTİMİZASYONU VE VALİDASYONU**

Ayşegül SEMİZ

KİMYA

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS

**(Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon
Birimi tarafından FYL-2016-1659 nolu proje ile desteklenmiştir.)**

TEMMUZ 2018

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**GIDA TAKVİYESİ TABLETLERİNDE BULUNAN GLUKOZAMİN ETKEN
MADDESİNİN YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ (HPLC)
YÖNTEMİ İLE TAYİNİ İÇİN METOT OPTİMİZASYONU VE VALİDASYONU**

Ayşegül SEMİZ
KİMYA
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez 13/07/2018 tarihinde jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Sibel TUNÇ (Danışman)



Prof. Dr. Erol AYRANCI



Doç. Dr. Ebru ÇUBUK DEMİRALAY



ÖZET

GIDA TAKVİYESİ TABLETLERİNDE BULUNAN GLUKOZAMİN ETKEN MADDESİNİN YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ (HPLC) YÖNTEMİ İLE TAYİNİ İÇİN METOT OPTİMİZASYONU VE VALİDASYONU

Ayşegül SEMİZ

Yüksek Lisans / Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Sibel TUNÇ

Temmuz 2018; 39 sayfa

Bu çalışma, gıda takviyesi tabletlerinde bulunan glukozamin etken maddesinin yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) cihazı ile metot optimizasyonunu ve validasyonunu kapsamaktadır. Glukozaminin gıda takviyesi tabletlerinden tespiti, Agilent marka 1100 model HPLC cihazı ile diyot dizi (array) dedektörü (DAD) kullanılarak sağlanmıştır. Sabit faz olarak Prodigy™ C18 (5 µm partikül büyüklüğünde, 150 mm uzunluğunda ve 3,2 mm iç çapında) ters faz sıvı kromatografi kolonu seçilmiştir. Gıda takviyesi tabletlerindeki glukozamin tespitinde referans standart madde olarak glukozamin sülfat kullanılmış ve Fmoc-OSu ile türevlendirme işlemi yapılmıştır.

Glukozamin etken maddesinin metot optimizasyon çalışmalarında hareketli fazın belirlenmesi için farklı hareketli faz bileşimleri denenmiş ve asetonitril (ACN):H₂O karışımı (50:50) (pH 4'e trifloroasetik asit (TFA) ile ayarlanmıştır) uygun hareketli faz olarak bulunmuştur. DAD dedektörü ile farklı dalga boylarında çalışmalar yapılmış ve glukozaminin maksimum absorplama yaptığı dalga boyu 206 nm olarak belirlenmiştir. Band genişliği (bw) için optimum değer 4 olarak seçilmiştir. Hareketli faz akış hızı belirlenirken Van Deemter eğrisinden yararlanılmış ve optimum akış hızı 0,6 mL/dk olarak tespit edilmiştir. Optimum kolon sıcaklık değeri 35 °C olarak saptanmış ve optimum enjeksiyon hacmi 5 µL seçilmiştir. Tespit limiti (LOD) ve kantitatif tayin limiti (LOQ) değerleri sırasıyla 0,014 mg/L ve 0,046 mg/L olarak hesaplanmıştır. Kesinliği belirlemek için, gün içi ve günler arası çalışmalar yapılmış ve yüzde bağıl standart sapma (%RSD) değerleri hesaplanmıştır. Gerçeklik parametresi için gıda takviyesi tabletlerine belirli derişimlerde glukozamin maddesi ilave edilerek çalışmalar yapılmış ve %85,15-%116,88 aralığında %geri kazanım değerleri elde edilmiştir. Seçicilik parametresi için, deneylerde kullanılan gıda takviyesi tablet numunesinden farklı formülasyona sahip gıda takviyesi tableti kullanılmıştır. Kararlılık testleri için kontrol numuneleri hazırlanmış ve oda sıcaklığında 5 gün boyunca farklı günlerde kısa dönem kararlılıkları karşılaştırılmıştır. Glukozamin etken maddesi için yapılan optimizasyon ve validasyon çalışmaları sonuçları değerlendirildiğinde, sistemin sağlam ve uygulanabilir olduğu görülmüştür.

ANAHTAR KELİMELELER: Glukozamin Sülfat, Türevlendirme, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi, Gıda Takviyesi Tableti

JÜRİ: Prof. Dr. Sibel TUNÇ

Prof. Dr. Erol AYRANCI

Doç. Dr. Ebru ÇUBUK DEMİRALAY



ABSTRACT

METHOD OPTIMIZATION AND VALIDATION FOR THE DETERMINATION OF GLUCOSAMINE ACTIVE INGREDIENT IN FOOD SUPPLEMENT TABLETS BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC) METHOD

Ayşegül SEMİZ

MSc. Thesis in Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Sibel TUNÇ

July 2018; 39 pages

This study involves the method optimization and validation of the glucosamine agent contained in dietary supplement tablets with a high-performance liquid chromatography (HPLC) device. Detection of glucosamine from dietary supplement tablets was performed using an Agilent brand 1100 model HPLC device with diode array detector (DAD). Prodigy™ C18 (150 mm length, with a particle size of 5 µm and an inner diameter of 3.2 mm) the reversed phase liquid chromatography column was used as a stationary phase. Glucosamine sulphate was used as a reference standard substance for detecting glucosamine in the dietary supplement tablets and derivatization process was realized with Fmoc-OSu.

In order to determine the mobile phase in the method optimization studies of the glucosamine agent, different mobile phase compositions were tested and the acetonitrile (ACN):H₂O mixture (50:50) (pH adjusted to 4 with trifluoroacetic acid (TFA)) was selected as the appropriate mobile phase. Studies were carried out with the DAD dedector at different wavelengths, and the wavelength at which glucosamine performed a maximum absorbance was obtained at 206 nm. The optimum value for band width (bw) was selected as 4. Van Deemter equation was used for determining the flow rate of the mobile phase and the optimum flow rate was found to be 0,6 mL/min. The optimum column temperature value was assigned as 35 °C and the optimum injection volume was selected as 5 µL. The values of the limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) were calculated as 0,014 mg/L and 0,046 mg/L, respectively. For determination of precision, intra-day and inter-day studies were carried out and percent relative standard deviation (%RSD) values were calculated. Glucosamine agent was added to the dietary supplement tablets at certain concentrations for the trueness parameter and %recovery values were obtained between 85,15% and 116,88%. For selectivity parameter, studies were carried out with a dietary supplement tablets with a different formulations than the dietary supplement tablet samples used in the experiments. For stability tests, control samples were prepared and their short-term stability values were compared at room temperature on different days for 5 days. When the results of optimization and validation studies for the glucosamine agent were evaluated, it was seen that the system was steady and applicable.

KEYWORDS: Derivatization, Dietary Supplements Tablet, Glucosamine Sulphate, High Performance Liquid Chromatography

COMMITTEE: Prof. Dr. Sibel TUNÇ

Prof. Dr. Erol AYRANCI

Assoc. Prof. Dr. Ebru ÇUBUK DEMİRALAY



ÖNSÖZ

Glukozamin (2-amino-2-deoksi-D-glukoz), bir amino monosakkarit olup bağ dokularında ve mide mukoza zarlarında bulunan doğal bir bileşendir. Bunun yanı sıra, glukozamin içeren gıda takviyesi tabletlerinin oral yolla alınmasıyla vücuttaki glukozamin eksikliği giderilebilmektedir.

Glukozamin etken maddesi içerikli gıda takviyesi tabletlerinde glukozamin tayini için literatürde kullanılan metotların dışında bir metot geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu tez çalışmasında, standart referans madde olarak glukozamin sülfatın yer aldığı gıda takviyesi tabletlerinden glukozamin maddesinin tayini için DAD dedektörüne sahip yüksek performanslı sıvı kromatografisi cihazı kullanılarak yeni bir metot geliştirilmiş ve bu metodun validasyon işlemleri yapılmıştır. Bir analizin pratikliği ve maliyeti, laboratuvar çalışmaları açısından çok önemlidir. Bir metot oluşturulurken, metodun laboratuvar bünyesinde kolaylıkla uygulanabilir olması durumu da göz önünde bulundurulmalıdır. Yapılan literatür araştırmalarına göre; glukozamin tespitinde kromatografik ayırma yöntemlerinden yararlanıldığı görülmektedir. Sıvı kromatografisi-kütle spektrometri (LC-MS) ile yapılan tayinlerin yüksek maliyetli olması ve ekstra ekstraksiyon adımları içermesi sebebiyle glukozamin tespitinde dezavantaj oluşturmaktadır. Gaz kromatografisi (GC) yöntemleri yüksek hassasiyete ve seçiciliğe sahiptir, fakat işlemleri çok zaman alıcıdır ve yüksek analiz maliyeti gerektirir. Literatürde yapılan çalışmalarda glukozamin tayini için kullanılan ekipman maliyetlerinin genellikle yüksek olması ve numune hazırlama aşamalarının uzun zaman alması nedeniyle geliştirilen bu metot farmasötik alanda arge ve üretim yapan firmalar ile rutin analiz tekniği olarak çalışmalarına dahil edecek gıda kontrol laboratuvarları için oldukça faydalı olacaktır.

Tez çalışması, Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne "Gıda takviyesi tabletlerinde bulunan glukozamin etken maddesinin yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi ile tayini için metot optimizasyonu ve validasyonu" başlığı ile sunulmuş ve aynı birim tarafından FYL-2016-1659 nolu proje ile desteklenmiştir.

Tez çalışmam boyunca beni yönlendiren ve desteğini esirgemeyen, bilgisi, deneyimleri ve hoşgörüsü ile her konuda bana yol gösteren danışman hocam Sayın Prof. Dr. Sibel TUNÇ'a (Akdeniz Üniversitesi, Fen Fakültesi) ve tezimde gerekli olan HPLC cihazının kullanımına izin veren Prof. Dr. Erol AYRANCI'ya (Akdeniz Üniversitesi, Fen Fakültesi), aynı zamanda Prof. Dr. Osman DUMAN'a (Akdeniz Üniversitesi, Fen Fakültesi), Dr. Tülin GÜRKAN POLAT'a, Arş. Gör. Bahar KANCI BOZOĞLAN'a ve tez çalışmam süresince bana inanan, destekleyen ve moral veren aileme ve arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ	v
İÇİNDEKİLER	vi
AKADEMİK BEYAN	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Eklem Hastalığı	1
1.2. Glukozamin ve Özellikleri	2
1.3. Glukozaminin Klinik Kullanımı.....	3
1.4. Glukozamin İçin Analiz Yöntemleri	5
1.5. Metot Validasyonu	6
1.6. Çalışmanın Amacı	6
2. KAYNAK TARAMASI.....	7
3. MATERYAL VE METOT	9
3.1. Materyal	9
3.2. Metot	10
3.2.1. Kullanılan standart madde ve türevlendirme çözeltilerinin hazırlanması	10
3.2.1.1. Glukozamin ana stok ve ara stok standart çözeltilerinin hazırlanması	10
3.2.1.2. Fmoc-OSu çözeltilisinin hazırlanması	10
3.2.1.3. Glukozamin standardının ve glukozamin içerikli numunelerin türevlendirilmesi	11
3.2.2. Metot optimizasyon çalışmaları	11
3.2.2.1. Hareketli faz bileşiminin belirlenmesi	11
3.2.2.2. Glukozaminin UV spektrumu	12
3.2.2.3. Band genişliğinin belirlenmesi	13
3.2.2.4. Akış hızının belirlenmesi	13
3.2.2.5. Kolon sıcaklığının belirlenmesi	13

3.2.2.6. Enjeksiyon hacminin belirlenmesi.....	13
3.2.3. Metot validasyonu çalışmaları	13
3.2.3.1. Doğrusallık parametresinin belirlenmesi	13
3.2.3.2. LOD ve LOQ değerlerinin belirlenmesi	13
3.2.3.3. Kesinlik parametresinin belirlenmesi	14
3.2.3.4. Gerçeklik parametresinin belirlenmesi	14
3.2.3.5. Seçicilik parametresinin belirlenmesi	14
3.2.3.6. Kararlılık parametresinin belirlenmesi	14
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	15
4.1. Hareketli Faz Bileşiminin Belirlenmesi	15
4.2. Optimum Metot Parametreleri.....	20
4.2.1. Dalga boyunun belirlenmesi.....	20
4.2.2. Optimum band genişliğinin belirlenmesi	21
4.2.3. Optimum akış hızının belirlenmesi	22
4.2.4. Optimum kolon sıcaklığının belirlenmesi	24
4.2.5. Optimum enjeksiyon hacminin belirlenmesi.....	27
4.3. Metot Validasyon Parametrelerinin Belirlenmesi	27
4.3.1. Doğrusallık	27
4.3.2. LOD ve LOQ değerlerinin hesaplanması	28
4.3.3. Kesinlik	29
4.3.3.1. Tekrar edilebilirlik	29
4.3.3.2. Tekrar üretilebilirlik.....	31
4.3.4. Gerçeklik	32
4.3.5. Seçicilik.....	32
4.3.6. Kararlılık	33
5. SONUÇLAR	35
6. KAYNAKLAR	36
ÖZGEÇMİŞ	

AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Gıda Takviyesi Tabletlerinde Bulunan Glukozamin Etken Maddesinin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Yöntemi İle Tayini İçin Metot Optimizasyonu Ve Validasyonu” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

13/07/2018

Ayşegül SEMİZ

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

%	: Yüzde
⁰ C	: Santigrat derece cinsinden sıcaklık birimi
bw	: Band genişliği
C18	: Karbon 18
C ₆ H ₁₃ NO ₅	: Glukozamin
CH ₃ COOH	: Asetik asit
cm	: Santimetre
dk	: Dakika
g	: Gram
H	: Plaka yüksekliği
H ₂ O	: Su
HCl	: Hidroklorik asit
L	: Litre
m	: Kalibrasyon doğrusunun eğimi
MeOH	: Metanol
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mm	: Milimetre
mM	: Milimolar
N	: Teorik plaka sayısı
n	: Çalışılan standart sayısı
nm	: Nanometre
pH	: H ⁺ iyonunun eksi logaritması
ppm	: Milyonda bir

R^2	: Korelasyon katsayısı
t_r	: Alıkonma zamanı
v/v	: Hacim/hacim
w_b	: Taban pik genişliği
y_{den}	: Deneyisel elde edilen pik alanı
y_{teo}	: Kalibrasyon denkleminde hesaplanan pik alanı
μ	: Mikro
μL	: Mikrolitre
μm	: Mikrometre, mikron

Kısaltmalar

ACN	: Asetonitril
DAD	: Diyot dizi (array) dedektörü
DMOAD	: Hastalık düzenleyici osteoartrit ilacı
FLD	: Floresans dedektör
Fmoc-Cl	: N-(9-florenilmetoksikarboniloksi)klorür
Fmoc-OSu	: N-(9-florenilmetoksikarboniloksi)süksinimid
GC	: Gaz kromatografisi
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
LC	: Sıvı kromatografisi
LOD	: Tespit limiti
LOQ	: Kantitatif tayin limiti
MS	: Kütle spektroskopisi
MSM	: Metilsülfonilmetan
ODS	: Oktadesilsilan
OPA	: Ortoftaldialdehit
PITC	: Fenilizotiyosiyanat

RID	: Refraktif indeks dedektörü
RSD	: Bağlı standart sapma
SAMe	: S-adenozil-L-metionin
TEA	: Trietilamin
TFA	: Trifloroasetik asit
UV	: Ultraviyole
3D	: Üç boyutlu



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Sağlıklı ve osteoartritli diz eklemleri.....	1
Şekil 1.2. Glukozamin ve türevleri	3
Şekil 1.3. Glukozamin ve türevlerinin potansiyel biyolojik aktiviteleri.....	5
Şekil 3.1. Agilent marka Cary 100 model UV-Vis cihazı	9
Şekil 3.2. Çalışmalarda kullanılan Agilent marka 1100 model HPLC cihazı	10
Şekil 3.3. Fmoc-OSu kimyasal yapısı.....	11
Şekil 3.4. Türevlendirilmemiş glukozaminin UV spektrumu.....	12
Şekil 3.5. Türevlendirilmiş glukozaminin UV spektrumu.....	12
Şekil 4.1. 1 nolu hareketli faz bileşimine ait HPLC kromatogramı.....	15
Şekil 4.2. 2 nolu hareketli faz bileşimine ait HPLC kromatogramı.....	16
Şekil 4.3. 3 nolu hareketli faz bileşimine ait HPLC kromatogramı.....	16
Şekil 4.4. 4 nolu hareketli faz bileşimine ait HPLC kromatogramı.....	17
Şekil 4.5. 5 nolu hareketli faz bileşimine ait HPLC kromatogramı.....	17
Şekil 4.6. 6 nolu hareketli faz bileşimine ait HPLC kromatogramı.....	18
Şekil 4.7. 7 nolu hareketli faz bileşimine ait HPLC kromatogramı.....	18
Şekil 4.8. 8 nolu hareketli faz bileşimine ait HPLC kromatogramı.....	19
Şekil 4.9. 9 nolu hareketli faz bileşimine ait HPLC kromatogramı.....	19
Şekil 4.10. Glukozamin için 206 nm, 256 nm ve 265 nm dalga boylarında kaydedilen kromatogramlar	20
Şekil 4.11. Glukozamin için 206 nm, 256 nm ve 265 nm dalga boylarında kaydedilen üç boyutlu kromatogramlar	21
Şekil 4.12. Glukozamin için farklı band genişliklerinde elde edilen kromatogramların karşılaştırılması	22
Şekil 4.13. Akış hızı optimizasyonu çalışmaları için elde edilen Van Deemter eğrisi.....	23
Şekil 4.14. 25 °C kolon sıcaklığında kaydedilen HPLC kromatogramı	24
Şekil 4.15. 30 °C kolon sıcaklığında kaydedilen HPLC kromatogramı	24
Şekil 4.16. 35 °C kolon sıcaklığında kaydedilen HPLC kromatogramı	25
Şekil 4.17. 40 °C kolon sıcaklığında kaydedilen HPLC kromatogramı	25
Şekil 4.18. 45 °C kolon sıcaklığında kaydedilen HPLC kromatogramı	26
Şekil 4.19. Farklı enjeksiyon hacimlerinde elde edilen glukozamin kromatogramları	27
Şekil 4.20. Glukozamin analizinde kullanılan kalibrasyon doğrusu	28

ÇİZELGELER DİZİNİ

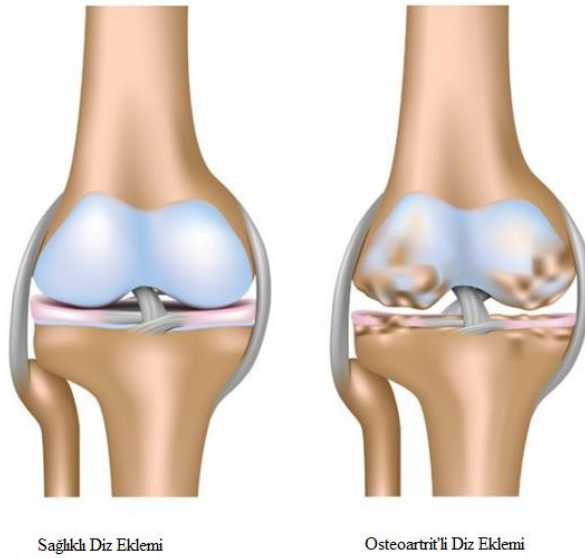
Çizelge 4.1. Farklı akış hızları için elde edilen teorik plaka sayıları ve plaka yükseklikleri.....	23
Çizelge 4.2. Kolon sıcaklığının optimizasyonunda kullanılan sıcaklık değerlerinin karşılaştırılması	26
Çizelge 4.3. Tekrar edilebilirlik çalışması sonuçları	30
Çizelge 4.4. Tekrar edilebilirlik için elde edilen HorRat değerlerinin karşılaştırılması.	30
Çizelge 4.5. Tekrar üretilebilirlik çalışması sonuçları.	31
Çizelge 4.6. Tekrar üretilebilirlik için elde edilen HorRat değerlerinin karşılaştırılması ...	31
Çizelge 4.7. Geri kazanım çalışması sonuçları	32
Çizelge 4.8. Seçicilik testi sonuçları	33
Çizelge 4.9. Kararlılık testi sonuçları.	33

1. GİRİŞ

1.1. Eklem Hastalığı

Eklemler, kemikleri birbirine bağlayan, kas ve iskelet sisteminde hareketi kolaylaştıran yapılardır. Eklemler insan vücudunun sürekli hareket eden kısımlarını oluşturduğu için zaman içerisinde hasar görmeye oldukça duyarlıdırlar. “Artrit” olarak bilinen eklemlerdeki rahatsızlık, “iltihaplı eklem hastalığı” veya “kireçlenme” şeklinde tanımlanmaktadır. Kireçlenme olarak bilinen osteoartrit, eklemlerde yapısal bozulmaya yol açmaktadır ve özellikle 50 yaş üstü bireylerde sıklıkla sakatlığa neden olmaktadır (<https://www.medicalpark.com.tr/kireclenme-mi-iltihapli-eklem-hastaligi-mi/hg-1586>).

Osteoartrit, yaygın olarak bilinen adıyla kireçlenme, eklemlerde kıkırdak dokunun yapısında bozulma, incelme, aşınma ve tahribat şeklinde ortaya çıkan ve en sık görülen eklem hastalığıdır (Pujalte vd. 1980; Nakamura 2011). Çoğunlukla diz, kalça, el bileği ve omurgada görülmektedir. En çok diz eklemlerinde etkisini gösteren hastalık genellikle ağrıya, sertliğe, hareket kısıtlılığına ve şekil bozukluğuna neden olmaktadır (Felson ve Zhang 1998). Şekil 1.1’de sağlıklı ve osteoartritli diz eklemlerinin genel bir görüntüsü yer almaktadır.



Şekil 1.1. Sağlıklı ve osteoartritli diz eklemleri (<https://www.practicalpainmanagement.com/patient/conditions/osteoarthritis/knee-osteoarthritis/knee-osteoarthritis-diagnosis>)

Osteoartrit, dünya çapında bir halk sağlığı problemidir. Osteoartrit, ağırlıklı olarak yaşlı bireylerde görülmektedir (Murray ve Lopez 1997). Batı Avrupa'da dizde osteoartrit yaygınlığı erkeklerde %18-25, Hollanda'da kadınlarda %24-40 ve İspanya'da %28-34 olarak tahmin edilmektedir. Ayrıca, Avrupa Birliği'nde osteoartrit olan 100 milyon kişinin bulunduğu öne sürülmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde ise osteoartrit problemi 2001'de 69,9 milyon kişide görülmüştür (Reginster vd. 2007). 2005 yılında Türkiye'de yapılan bir çalışmada ise 50 yaş üstü osteoartrit yaygınlığı kadınlarda %22,5 ve erkeklerde %8 olmak üzere ortalama %14,8 olarak bulunmuştur

(Bodur 2011). 2020 yılına kadar gelişmiş ülkelerde 65 yaş ve üzeri bireylerin osteoartrit hastalığına yakalanma sıklığının %71 düzeyine çıkacağı öngörülmektedir (Murray ve Lopez 1997).

Osteoartritin, obeziteye bağlı osteoartrit, mekanik orijinli osteoartrit ve yaşa bağlı osteoartrit olmak üzere farklı fenotipleri tanımlanmıştır (Conaghan 2013). Osteoartritin önlenmesi için ağrıyı azaltma ve hastaların işlevsel yeteneklerini geliştirmeye yönelik çeşitli tedavi yöntemleri kullanılmaktadır. Bu amaçla farmakolojik, farmakolojik olmayan (fizyoterapi, meslek terapisi, kilo verme ve egzersiz), alternatif terapi (homeopati, akupunktur ve fitoterapötik ilaçlar) ve cerrahi gibi yöntemlerden yararlanılmaktadır (Juniora ve Inaciob 2013). Diğer bir önleyici yöntem ise, doğal olarak elde edilen ya da kimyasal olarak sentezlenen takviye edici gıdalardır. Bu takviye edici gıdaların içerisinde, ağrıyı azaltma potansiyeli olan farklı formülasyonda glukozamin yer almaktadır (Runkel ve Cupp, 1999; Felson vd. 2000).

Geçtiğimiz on yılda, glukozamin kullanımında önemli bir artış olmuştur. Glukozamin "tamamlayıcı ajanlar", "hastalık düzenleyici ajanlar" veya "hastalık düzenleyici osteoartrit ilaçları" (DMOAD'ler) olarak adlandırılan bir gıda takviyesi grubunun üyesidir. Bunlar, hayvan kıkırdagından veya yengeç kabuklarından yapılmışlardır. Diz ağrısını gidermek, eklemi oluşturan hücreleri onarmak ve hasar görmüş kıkırdagi yeniden canlandırmak için piyasaya sürülmüşlerdir. DMOAD'ler Amerika Birleşik Devletleri'nde en çok satışı yapılan takviye edici gıdalar arasındadır (Sherman vd. 2012).

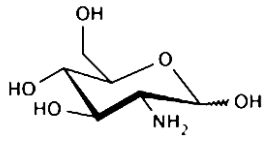
1.2. Glukozamin ve Özellikleri

Glukozamin (2-amino-2-deoksi-D-glukoz); vücutta yoğun olarak kıkırdakta, bağ dokularında ve mide mukoza zarlarında bulunan doğal bir amino monosakkarittir (Largo vd. 2003; Pearle vd. 2005). Amino şekerlerinin temel yapı taşı olması sebebiyle hücre duvarının ve interstisyel proteinlerin önemli bir bileşenidir. Glukozamin, insan hücrelerinde yaygın olan iki heksosamin şekerinden biridir. Yapısal olarak glukozamin, modifiye edilmiş glikoz olup, ikinci karbonu (C-2) üzerinde bulunan -OH grubunun yerini bir -NH₃ grubunun almasıyla oluşmuştur (Kelly 1998).

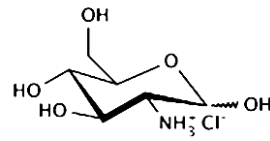
Glukozamin; glukoprotein, glukozaminoglikan ve hiyalüronat sentezi için ihtiyaç duyulan sinovial sıvının, ligamentlerin ve diğer eklemlerin yapılarında bulunmaktadır (Felson vd. 2000; Richy vd. 2003; Towheed vd. 2005). Ayrıca, eklemlerde kayganlaştırıcı veya koruyucu maddeler olarak işlev gören mükün veya mukus salgılarının sentezine de yardımcı olmaktadır (Hamerman 1989). Osteoartritli bireylerde bölgesel eksikliği gidermek üzere substrat olarak glukozaminin görev yaptığı düşünülmektedir (Pavelka vd. 2002). Yapılan laboratuvar çalışmaları ve hayvansal deneyler sonucunda glukozaminin iltihap önleyici etkisinin olduğu ve eklem ve kıkırdak lezyonlarının iyileşmesinde yarar sağladığı bilinmektedir (McCarty 1994; Bassler vd. 1998).

Glukozamin; sülfat, hidroklorür ve N-asetil-glukozamin gibi pek çok formda bulunabilir (Şekil 1.2). Her üç formda glukozamin suda çözünür. Nötr ve fizyolojik pH'da, glukozaminde bulunan amino grubu protonlanır ve böylece pozitif bir yük

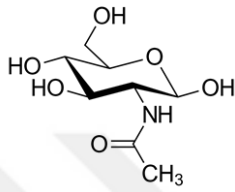
oluşur. Glukozaminin tuz formları, yükü nötralize etmek için negatif anyonlar içermektedir (Towheed vd. 2005).



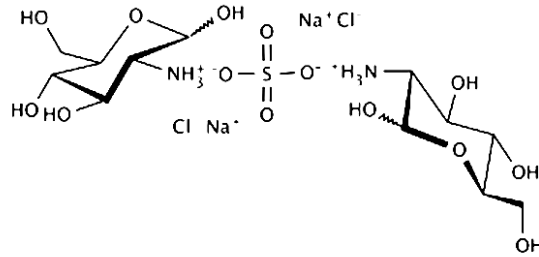
Glukozamin



Glukozamin hidroklorür



N-asetil-glukozamin



Glukozamin sülfat

Şekil 1.2. Glukozamin ve türevleri (Rovati vd. 2012)

Glukozaminin eksikliğinde, eklem kıkırdağında bozulma ve deformasyona bağlı olarak eklem ağrıları ile eklem çevresindeki hareketlilikte azalma gözlenmektedir (Towheed vd. 2005). Bu gibi durumlarda besin kaynağı olarak hayvan kıkırdakları ve kabuklu deniz hayvanlarının kabukları kullanılmaktadır. Glukozamin, oral yolla alındıktan sonra yaklaşık %90 oranında absorbe olur ve hızla eklem kıkırdağına katılır (Setnikar vd. 1993).

Glukozaminin sülfat tuzu formu, osteoartritli hastalarda keratan sülfatın alt ünitesinin yarısını oluşturmaktadır. Glukozamin içerikli ürünlerin kullanıldığı çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre; glukozamin sülfat formülasyonu osteoartritik ağrıyı azaltırken, diğer formülasyonlar ise azaltmamaktadır. ‘Dona’ adı verilen özgün bir ticari glukozamin sülfat ürününün kullanıldığı çalışmaların bulguları, diğer formülasyonlardan farklı olarak bu formülasyonun osteoartrit ağrıyı azalttığını göstermektedir (Towheed vd. 2005). Çin’de yapılan bir başka çalışmada; glukozamin hidroklorürün, glukozamin sülfatla eşit düzeyde etkin olduğunu rapor etmiştir (Qiu vd. 2005).

1.3. Glukozaminin Klinik Kullanımı

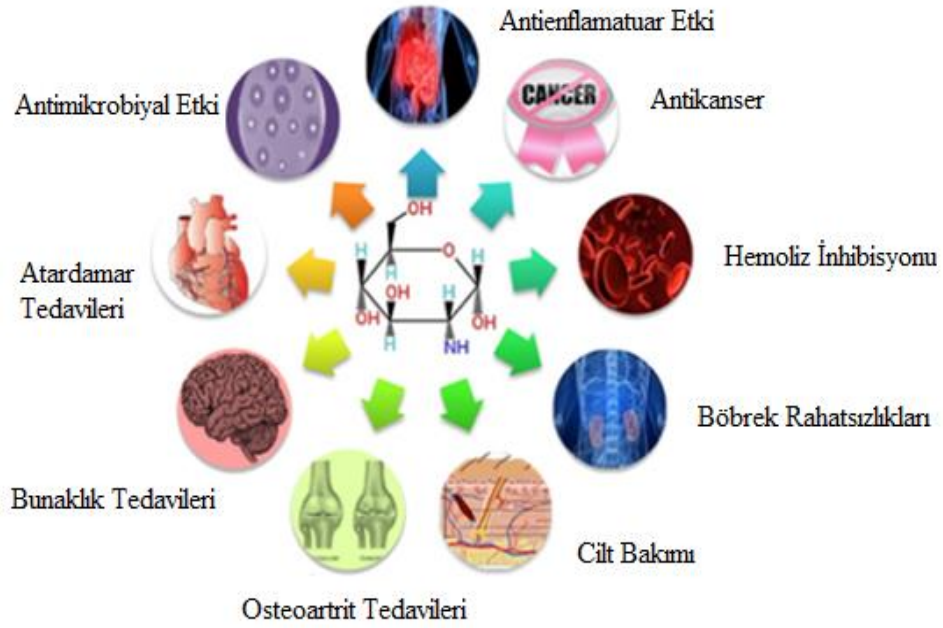
Glukozamin, Gıda ve İlaç İdaresi tarafından takviye edici gıda olarak kabul edilmektedir. Glukozaminin eklem ve kıkırdak için tıbbi amaçlı kullanımı Asya ve Avrupa’da 40 yılı aşkın süredir devam etmekte olup, son 20 yılda kazandığı popülerlikle glukozamin başta Amerika Birleşik Devletleri olmak üzere birçok ülkede yaygın olarak kullanılmaktadır (Vangsness vd. 2009).

2007'den önce yapılan en önemli zihinsel ve bedensel kontrollü çalışmaların ikisi Avrupa'da yapılmış ve bu çalışmalarda glukozamin sülfat formülasyonu kullanılmıştır (Reginster vd. 2001; Pavelka vd. 2002). Bu ilaç, birçok Avrupa ülkesinde reçeteli ilaç olarak satılmıştır. Bununla birlikte 1994 tarihli Gıda Katkısı Sağlık ve Eğitim Yasası, Amerika Birleşik Devletleri'ndeki ve diğer ülkelerdeki gıda takviyeleri piyasasındaki çeşitli belgelenmemiş glukozamin tuzlarını (örneğin hidroklorür), türevlerini (örneğin N-asetil-glukozamin) ve diğer çeşitli dozajlardaki formlarını onaylamıştır (Persiani 2005).

Bazı çalışmalar glukozaminin iyileştirme belirtilerinin, daha önce yapılan zihinsel ve bedensel kontrollü çalışmalardan daha etkili olduğunu ve osteoartrözde eklem daralmasının ilerleme hızını azaltabileceğini göstermiştir. Yapılan klinik denemeler, glukozamin sülfatın günde bir kere 1500 mg çözünür toz formunda kullanılmasının yeterli olduğunu ortaya koymuştur (Reginster vd. 2001; Pavelka vd. 2002; Altman vd. 2006; Rezende ve Gomes 2009).

Glukozaminin klinik olarak geniş alanda kullanımı mevcuttur. Eklemlerdeki kıkırdak yapısını oluşturma ve kayganlaştırıcı özelliği sayesinde spor ve atletizm faaliyetlerinde kullanımı büyük ilgi görmektedir (Blockyz vd. 2010). Glukozaminin demir iyonları ile güçlü şelatlanma etkisi sayesinde antioksidan aktiviteye sahip olduğu görülmüştür (Ronge vd. 2006).

Yapılan araştırmalar, kanser tedavilerinde glukozamin kullanımının ölüm oranının %25'ten %13'e azalmasında etkili olduğunu göstermektedir (Pohlig vd. 2016). Deneysel çalışmalar, glukozaminin kolesterol miktarını azalttığını ve kardiyovasküler hastalıklara karşı olumlu bir etkisinin olduğunu göstermiştir. Ayrıca, sinir sistemi problemleri, böbrek rahatsızlıkları, migren, cilt yaralanmaları gibi geniş kapsamlı hastalıkların tedavisinde glukozaminin yarar sağladığı öne sürülmektedir. (Russell ve McCarty 2000; Dalirfardouei vd. 2016). Şekil 1.3'te glukozamin ve türevlerinin potansiyel biyolojik aktivitelerine yer verilmektedir.



Şekil 1.3. Glukozamin ve türevlerinin potansiyel biyolojik aktiviteleri (Dalirfardouei vd. 2016)

1.4. Glukozamin İçin Analiz Yöntemleri

Glukozamin tespitine yönelik yapılan literatür tarama sonuçlarına göre; El-Saharty ve Bary (2002), glukozamin sülfatı ve bunun polimerik formu olan kitosanı HPLC- refraktif indeks dedektörü (RID) cihazında amino bazlı sabit faz içeren kolon kullanarak tespit etmiştir. Appuhn vd. (2004), toprak ve kök hidrolizatlarında bulunan glukozamini OPA (ortofitaldialdehit) ile türevlendirmiş ve HPLC-FLD cihazı ile analiz etmiştir. Shao vd. (2004), glukozamin hidroklorür tespitini türevlendirme işlemi yapmaksızın amino bazlı sabit faz içeren kolon kullanarak HPLC’de yapmıştır. Zhou vd. (2004), gıda takviyesi tabletlerinde yer alan glukozamin hidroklorürü UV dedektörü bulunan HPLC cihazında analiz etmiştir. Zhang vd. (2006), insan plazmasındaki glukozamin sülfatı HPLC-FLD cihazı ile tespit etmiştir. Tekko vd. (2006), glukozaminin insan vücuduna deri yoluyla geçişini incelemek için bir metot geliştirmiştir. Uygulanan metotta glukozamin hidroklorür, PITC (fenilizotiyosiyanat) türevlendirme ajanı kullanılarak diyot dizi (array) dedektörü (DAD) ile tespit edilmiştir. Lopez-Cervantes vd. (2007) yapmış oldukları çalışmada, glukozaminin kitindeki miktarını HPLC-UV cihazı ile analiz etmiştir. Magana vd. (2014), türevlendirme işlemi olmaksızın HPLC cihazı ile gıda takviyesi tabletlerinde glukozamin tayinini gerçekleştirmiştir. Pesek vd. (2015) çalışmalarında, glukozamin tayinini sıvı kromatografisi-kütle spektrometri (LC-MS) ile yapmıştır. Çalışılan glukozamin örnekleri karides kabuklarından veya glukozamin tabletlerinden ekstrakte edilmiştir. Yapılan literatür çalışmalarında, gıda takviyesi tabletlerinde, glukozamin sülfat formülasyonuna sahip referans standart maddenin kullanımına az rastlanmaktadır.

Bu tez çalışmasında, HPLC cihazı ile DAD dedektörünün ve referans standart madde olarak glukozamin sülfatın yer aldığı gıda takviyesi tabletlerinin kullanıldığı,

pratik ve ekonomik bir metot geliştirilmiştir. Daha sonra, metot validasyonu işlemleri gerçekleştirilmiştir.

1.5. Metot Validasyonu

Metot validasyonu; kullanılan metodun amaca uygunluğunun belirlenmesi için yapılan ölçümlerdir. Metot validasyonu; doğrusallık, tespit limiti (LOD), kantitatif tayin limiti (LOQ), kesinlik, gerçeklik, seçicilik ve kararlılık parametreleri ile çalışmalar yapılarak gerçekleştirilmektedir. Bu tez çalışmasında, oluşturulan yeni metodun güvenilirliği validasyon parametreleri kullanılarak sağlanmıştır.

1.6. Çalışmanın Amacı

DAD dedektörüne sahip HPLC cihazı ile gıda takviyesi tabletlerinde bulunan glukozamin sülfat etken maddesinin tespitine yönelik analizi için kısa analiz süresine sahip ve pratik yeni bir metot geliştirmek ve bu metodun validasyonunu gerçekleştirmektir.

2. KAYNAK TARAMASI

El-Saharty ve Bary (2002), glukozamin sülfatı ve bunun polimerik bir formu olan kitosanı refraktif indeks dedektörü (RID) olan HPLC’de tespit etmiştir. Bu çalışmada, hareketli faz olarak ACN:H₂O:CH₃COOH (50:50:0.02 v/v/v, pH:4,0) karışımı ve sabit faz olarak amino bazlı kolon kullanılmıştır. Kalibrasyon doğrusu, 20-1000 µg/mL derişim aralığında doğrusal, korelasyon katsayısı (R^2) $\geq 0,99$ bulunmuştur. Kesinlik çalışmasında RSD %3’ten düşük hesaplanmıştır.

Aghazadeh-Habashi vd. (2002), HPLC cihazı ile 254 nm dalga boyunda UV dedektörü kullanarak sıçan plazmasında glukozamin hidroklorür tespiti yapmıştır. Plazma, asetonitril (ACN) ile ekstraksiyon adımından sonra 1-naftil izotiyosiyanat kullanılarak türevlendirme işlemine tabi tutulmuştur. Sabit faz olarak C18 kolonu kullanılmıştır. Optimum hareketli faz olarak ACN:H₂O:CH₃COOH:TEA (4,5:95,5:0,1:0,05 v/v/v) bileşimi ve optimum hareketli faz akış hızı olarak 0,9 mL/dk belirlenmiştir. 1,25-400 µg/mL derişim aralığında doğrusal olduğu bulunmuştur. Metotta LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0,63 µg/mL ve 1,25 µg/mL olarak hesaplanmıştır.

Zhou vd. (2004), gıda takviyesi tabletlerinde glukozamin hidroklorür tespiti için ultraviyole (UV) dedektörünün kullanıldığı HPLC cihazı ile metot geliştirmiş ve validasyon işlemlerini yapmıştır. Metotta seçicilik ve spesifiklik çalışmaları için iki farklı matriks seçilmiştir. Kararlılık testi için numuneler en az 5 gün oda sıcaklığında bekletilmiş ve numunelerin dayanıklı olduğu gözlenmiştir. Kalibrasyon doğrusu 2,0-150,0 µg/mL derişim aralığında çalışılmış ve korelasyon katsayısı $>0,9999$ bulunmuştur. Metotta LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0,3 µg/mL ve 1 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Geri kazanım değerleri %93,5-%102,8 aralığında bulunmuştur. Tekrar üretilebilirlik çalışması 7 farklı günde yapılmış ve RSD %0,9’den küçük olarak tespit edilmiştir.

Shao vd. (2004), glukozamin hidroklorür tespitinde türevlendirme işlemi yapmaksızın amino bazlı sabit faz içeren kolon (150,0 mm x 4,6 mm, 5 µm) kullanarak 195 nm dalga boyunda HPLC-DAD cihazı ile metot geliştirmiş ve validasyon çalışmalarını yapmıştır. Optimum hareketli faz olarak ACN-fosfat tamponu (75:25, v/v, pH 7,50) ve optimum akış hızı olarak 1,5 mL/dk belirlenmiştir. Doğrusal çalışma aralığı 1,88-5,62 mg/mL ve korelasyon katsayısı 0,9998 olarak bulunmuştur. Metotta LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0,037 mg/mL, 0,149 mg/mL olarak tespit edilmiştir. Doğruluk çalışmaları %98,9-%100,5 aralığında, kesinlik RSD değeri %1,1 olarak hesaplanmıştır. Numune ve standart çözeltilerin 1 hafta boyunca dayanıklı olduğu gözlenmiştir.

Appuhn vd. (2004), toprak ve kök hidrolizatlarındaki glukozamin tespitinde türevlendirme ajanı olarak OPA’yı kullanmış ve yüksek performans sıvı kromatografi (HPLC-FLD) cihazı ile glukozamini tayin etmiştir.

Zhang vd. (2006), insan plazmasındaki glukozamin sülfatı, floresans dedektörü bulunan yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC-FLD) cihazı ile tespit etmiştir. Plazma, asetonitril (ACN) ile ekstraksiyon adımından sonra Fmoc-Cl kullanılarak türevlendirme işlemine tabi tutulmuştur. Sabit faz için C18 (150,0 mm x 4,6 mm, 5 µm)

kolonu seçilmiştir. Optimum hareketli faz olarak Su-ACN karışımının ve optimum akış hızı olarak 1 mL/dk'nın olduğu belirlenmiştir. Kalibrasyon doğrusu, 0,1-10 µg/mL aralığında çalışılmış ve korelasyon katsayısı 0,9996 bulunmuştur. Metotta LOD değeri 15 ng/mL olarak saptanmış ve tekrar edilebilirlik %RSD≤6,28, tekrar üretilebilirlik %RSD:7,41 olarak rapor edilmiştir. Doğruluk çalışmaları %95,20-%104,92 aralığında hesaplanmıştır. Ekstraksiyon geri kazanımlarının %90,4'ün üzerinde olduğu görülmüştür.

Tekko vd. (2006) yaptıkları çalışmada, glukozaminin insan vücuduna deri yoluyla geçişini incelemek amacıyla bir metot geliştirmiştir. Glukozamin hidroklorür tespitinde PITC türevlendirme ajanı olarak kullanılmıştır. Glukozaminin türevlendirme işlemi 80°C'de 30 dakikada gerçekleştirilmiş ve 245 nm dalga boyunda DAD dedektörü ile tespiti sağlanmıştır. Optimum hareketli faz olarak metanol-su-buzlu asetik asit (10:89,96:0,04 v/v/v, pH:3,5) bileşimi ve optimum hareketli faz akış hızı 1 mL/dk olarak belirlenmiştir. Metotta, kolon sıcaklığı 30 °C'ye ayarlanmıştır. Kesinlik çalışmalarında %RSD<12 olarak hesaplanmıştır.

Lopez-Cervantes vd. (2007), karides kabuklarından ekstrakte edilerek elde edilen kitindeki glukozamin miktarını analiz etmiştir. Glukozaminin, 264 nm dalga boyunda UV dedektörü ile HPLC cihazında tespiti sağlanmıştır. Hareketli faz olarak; A, 30 mM amonyum fosfat (pH:6,5)-metanol (15:85 v/v), B, metanol-su (15:85 v/v) ve C, ACN-su (90:10 v/v) kullanılmıştır. Optimum kolon sıcaklığı 38 °C ve optimum hareketli faz akış hızı 1,2 mL/dk olarak belirlenmiştir. Türevlendirme ajanı Fmoc-Cl seçilmiştir. Kesinlik çalışmalarında %RSD değeri 5,8 ve geri kazanım değeri %92,7 olarak hesaplanmıştır. Metotta LOD değeri 2 µg/mL olarak hesaplanmıştır.

Magana vd. (2014) yaptıkları çalışmada, türevlendirme işlemi olmaksızın DAD bulunan HPLC cihazı ile gıda takviyesi tabletlerinden glukozamini tespit etmişlerdir. Sabit faz olarak C18 (250,0 mm x 4,6 mm, 5µm) kolonu kullanılmıştır. Optimum hareketli faz olarak sodyum perklorat (50,0 nM, pH:6,5)-ACN (99:1 v/v) ve optimum hareketli faz akış hızı olarak 0,8 mL/dk belirlenmiştir. Çalışılan metotta kalibrasyon doğrusu korelasyon katsayısı 0,9998 bulunmuştur. Kesinlik çalışmalarında %RSD değeri <1 olarak hesaplanmıştır.

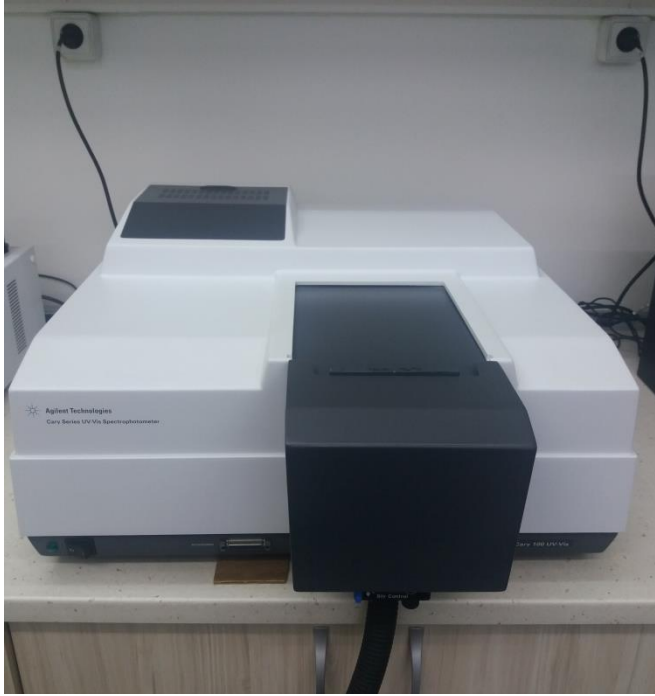
Pesek vd. (2015), glukozamin tespitini ve ayrılmasını sıvı kromatografi-kütle spektrometri (LC-MS) cihazı ile yapmıştır. Cihaz koşullarında optimum enjeksiyon hacmi 1µL ve hareketli faz akış hızı 0,4 mL/dk olarak belirlenmiştir. Çalışılan glukozamin örnekleri karides kabuklarından veya glukozamin tabletlerinden ekstrakte edilmiştir. Kalibrasyon doğrusu, 6,0-30,0 mg/L aralığında çalışılmıştır ve korelasyon katsayısı 0,9945 bulunmuştur.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Glukozamin tayini için referans standart madde EDQM marka glukozamin sülfat, çözücü olarak Merck marka HPLC saflıkta su, hareketli faz bileşimi için Merck marka trifloroasetik asit (TFA) ve asetronitril (ACN), türevlendirme ajanı olarak Sigma-Aldrich marka N-(9-florenilmetoksikarboniloksi)süksinimid (Fmoc-OSu) ve trietilamin (TEA) kullanılmıştır.

Deneyisel çalışmalarda, çözelti ön hazırlık işlemlerinde Hanna marka manyetik karıştırıcı, IsoLab marka ultrasonik banyo ve vortex, pH ayarlamak için Mettler Toledo marka pH metre, tartım işlemlerinde Mettler Toledo marka analitik terazi kullanılmıştır. Glukozaminin UV spektrumunu Şekil 3.1’de yer alan Agilent marka Cary 100 model UV-Vis cihazı ile ölçülmüştür. Glukozaminin kromatografik ayrılması Agilent marka 1100 model HPLC cihazı ve Prodigy™ C18 (5 µm partikül büyüklüğünde, 150 mm uzunluğunda x 3,2 mm iç çapında) ters faz sıvı kromatografi kolonu ile sağlanmıştır. HPLC sistemi üzerinde, G1311A model pompa, G1313A ALS model oto örnekleyici, G1379A model gaz giderici, G1316A model termostatl kolon kompartmanı ve G1315B model diyot dizi (array) dedektörü mevcuttur. Çalışmalarda kullanılan HPLC cihazı Şekil 3.2’de yer almaktadır.



Şekil 3.1. Agilent marka Cary 100 model UV-Vis cihazı



Şekil 3.2. Çalışmalarda kullanılan Agilent marka 1100 model HPLC cihazı

3.2. Metot

3.2.1. Kullanılan standart madde ve türevlendirme çözeltilerinin hazırlanması

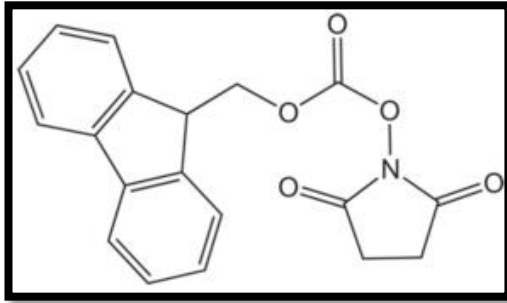
3.2.1.1. Glukozamin ana stok ve ara stok standart çözeltilerinin hazırlanması

Glukozamin sülfat standardı kullanılarak 1000 mg/L'lik ana stok çözelti hazırlamak için Mettler Toledo marka analitik terazide 0,0001 g hassasiyetle uygun miktarda glukozamin sülfat tartılmış ve 10 mL'lik balon jojeye aktarılmıştır. Bir miktar su ile glukozamin sülfat çözüldükten sonra çözeltinin toplam hacmi 10 mL'ye su ile tamamlanmıştır. 1000 mg/L'lik glukozamin sülfat ana stok standart çözeltisinden 2,5 mL alınarak 5 mL'lik balon jojeye aktarılmış ve üzerine 31,3 µL TEA ilave edildikten sonra 5mL'ye su ile tamamlanarak 500 mg/L'lik glukozamin ara stok standart çözeltisi hazırlanmıştır.

3.2.1.2. Fmoc-OSu çözeltisinin hazırlanması

Glukozamin molekülü, kromofor grup içermemesi sebebiyle düşük dalga boylarında UV absorpsiyonu yapmaktadır. HPLC cihazında glukozamin analiz metodunun hassasiyetini ve seçiciliğini artırmak için türevlendirmeye ihtiyaç duyulmaktadır. Türevlendirme ajanı olan Fmoc-OSu'dan (Şekil 3.3), 50 mg tartılmış ve

10 mL'lik balon jojeye aktarılmıştır. Daha sonra; madde asetonitrilde çözülmüş ve 10 mL'ye ACN ile tamamlanarak Fmoc-OSu çözeltisi hazırlanmıştır.



Şekil 3.3. Fmoc-OSu kimyasal yapısı

3.2.1.3. Glukozamin standardının ve glukozamin içerikli numunelerin türevlendirilmesi

Tüm çalışmada, glukozamin standardı ve glukozamin içerikli numuneler türevlendirildikten sonra kalibrasyon ve analiz işlemlerinde kullanılmıştır. Glukozamin tayin edilecek gıda takviyesi tabletleri 100 mL'lik balon jodede suda çözülerek 750 µL TEA ile nötralizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan çözelti 0,45 µm'lik filtreden geçirilmiştir. Türevlendirme için filtre edilmiş numune miktarına ve glukozamin sülfat ara stok standart çözelti miktarına karşılık olarak 1:3 oranında türevlendirme çözeltisi eklenerek 50 °C'de 30 dk'da türevlendirme işlemi tamamlanmıştır. Benzer türevlendirme işlemleri glukozamin standardı için de yapılmıştır.

3.2.2. Metot optimizasyon çalışmaları

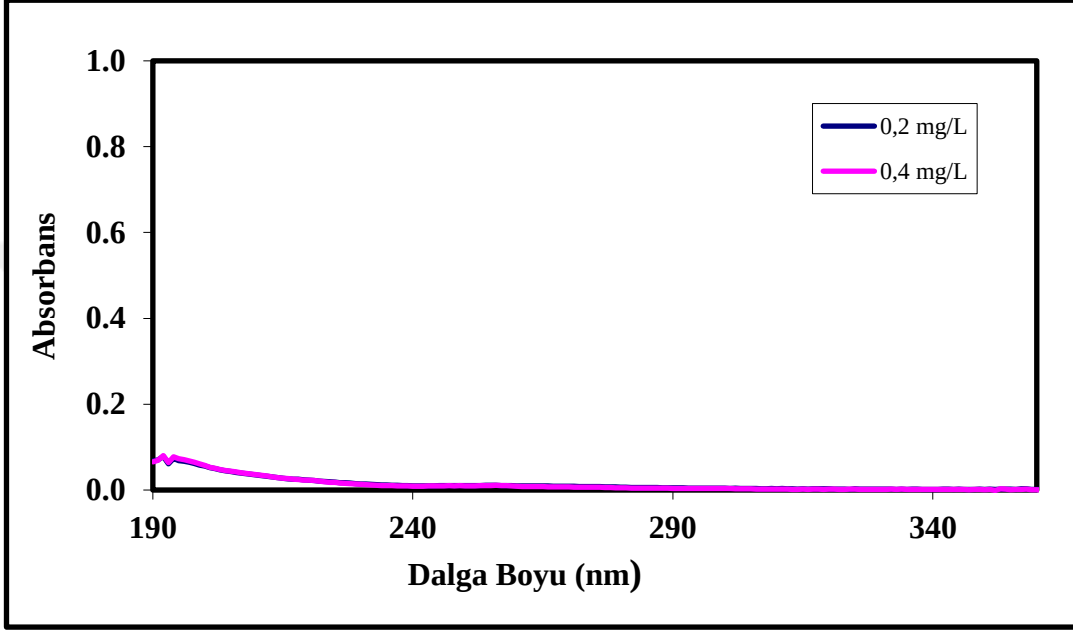
Glukozamin sülfat içerikli gıda takviyesi tabletlerinde glukozamin tayini için seçiciliği yüksek, pratik ve ekonomik bir metot geliştirebilmesi için HPLC cihazında metot optimizasyonu çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

3.2.2.1. Hareketli faz bileşiminin belirlenmesi

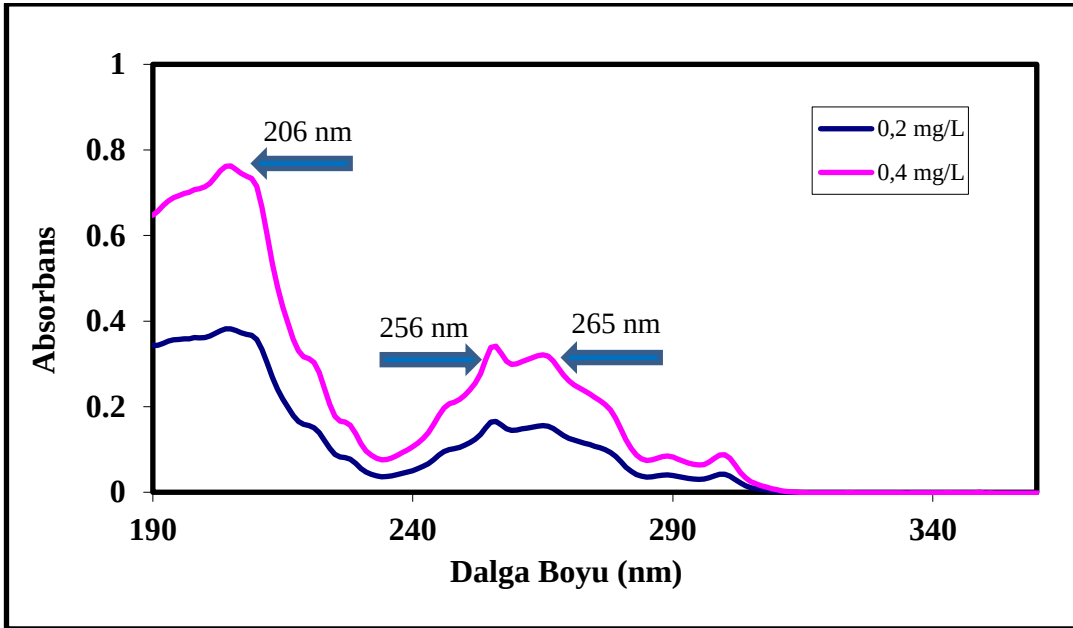
Kromatografik çalışmalarda hareketli faz bileşiminin pH değerine bağlılığı oldukça önemlidir. Hareketli faz bileşiminin pH değeri 5,5'in altına düştüğü zaman amino gruplarındaki güçlü etkileşimler nedeniyle pik kuyruklanmalarının azaldığı ve pik şekillerinde düzelme sağladığı bilgisi literatürde yer almaktadır (Berthod ve Garcia-Alvarez-Coque 2000). Çalışılan hareketli faz bileşimleri sırasıyla şunlardır; hareketli faz sistem 1: MeOH:H₂O (10:90) (pH 4'e asetik asit ile ayarlanmıştır), sistem 2: MeOH:H₂O (80:20) (pH 4'e asetik asit ile ayarlanmıştır), sistem 3: ACN:H₂O (10:90) (pH 4'e asetik asit ile ayarlanmıştır), sistem 4: ACN:H₂O (50:50) (pH 4'e asetik asit ile ayarlanmıştır), sistem 5: ACN:H₂O (10:90) (pH 4'e TFA ile ayarlanmıştır), sistem 6: ACN:H₂O (20:80) (pH 4'e TFA ile ayarlanmıştır), sistem 7: ACN:H₂O (50:50) (pH 4'e TFA ile ayarlanmıştır), sistem 8: ACN:H₂O (60:40) (pH 4'e TFA ile ayarlanmıştır) ve sistem 9: ACN:H₂O (70:30) (pH 4'e TFA ile ayarlanmıştır).

3.2.2.2. Glukozaminin UV spektrumu

Türevlendirilmiş glukozaminin absorpsiyon dalga boyunun belirlenmesi amacı ile 0,2 mg/L ve 0,4 mg/L olmak üzere iki farklı derişimde glukozamin standart çözeltisi hazırlanmış ve türevlendirilmiştir. Türevlendirilmemiş ve türevlendirilmiş glukozamin standart çözeltilerinin 190-390 nm aralığında UV spektrumu alınmıştır. Türevlendirilmemiş glukozamin için elde edilen UV spektrumu Şekil 3.4'te ve türevlendirilmiş glukozamin için elde edilen UV spektrumu Şekil 3.5'te verilmiştir.



Şekil 3.4. Türevlendirilmemiş glukozaminin UV spektrumu



Şekil 3.5. Türevlendirilmiş glukozaminin UV spektrumu

Şekil 3.5'te bulunan UV spektrumlarına bakıldığında türevlendirilmiş glukozamin standardının 3 farklı dalga boyunda absorpsiyon verdiği görülmektedir.

3.2.2.3. Band genişliğinin belirlenmesi

Çalışmada band genişliği olarak 4, 6, 8 ve 10 değerleri denenmiştir.

3.2.2.4. Akış hızının belirlenmesi

Optimum hareketli faz akış hızını belirlemek için 0,1 mL/dk, 0,2 mL/dk, 0,4 mL/dk, 0,6 mL/dk, 0,8 mL/dk ve 1 mL/dk olmak üzere 6 farklı akış hızı denemesi yapılmıştır. Van Deemter eğrisinden yararlanılarak optimum akış hızı belirlenmiştir.

3.2.2.5. Kolon sıcaklığının belirlenmesi

Optimum kolon sıcaklığını belirlemek amacıyla 25 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C ve 45 °C olmak üzere 5 farklı kolon sıcaklığı test edilmiştir. Pik kuyruklanma faktörü ve teorik plaka sayısı değerleri göz önüne alınarak optimum kolon sıcaklığı belirlenmiştir.

3.2.2.6. Enjeksiyon hacminin belirlenmesi

Enjeksiyon hacmini belirlemek için 1 µL, 2,5 µL, 5 µL, 10 µL, 20 µL ve 30 µL olmak üzere 6 farklı enjeksiyon hacim denemesi yapılmıştır. Pik kuyruklanma faktörü göz önüne alınarak optimum enjeksiyon hacmi tespit edilmiştir.

3.2.3. Metot validasyonu çalışmaları

Gıda takviyesi tabletlerinde glukozamin tespiti için metot optimizasyonu çalışmaları ile birlikte metot validasyonu yapmak için doğrusalılık, tespit limiti (LOD), kantitatif tayin limiti (LOQ), kesinlik, gerçeklik, seçicilik ve kararlılık parametrelerinin çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

3.2.3.1. Doğrusallık parametresinin belirlenmesi

Glukozaminin doğrusallık parametresinin belirlenmesi için 0,05 mg/L, 0,1 mg/L, 0,25 mg/L, 0,5 mg/L, 1 mg/L ve 2,5 mg/L olmak üzere 6 farklı derişimde 3 kez tekrar edilerek analiz yapılmıştır. Elde edilen pik alanı değerlerine karşı derişim verilerinin grafiğe geçirilmesiyle kalibrasyon doğrusu oluşturulmuştur.

3.2.3.2. LOD ve LOQ değerlerinin belirlenmesi

Tespit limiti (LOD), metodun laboratuvar koşullarında örnekteki varlığını tespit edebildiği, ancak kesin miktarını ölçemediği en düşük analit derişimi olarak tanımlanır. Kantitatif tayin limiti (LOQ), miktarsal olarak tespit edilebilen en düşük analit derişimi olarak ifade edilmektedir (Açar vd. 2013; Magnusson ve Örnemark 2014). Geliştirilen metot için LOD ve LOQ değerleri, kalibrasyon doğrusundan yararlanılarak hesaplanmıştır.

3.2.3.3. Kesinlik parametresinin belirlenmesi

Kesinliği belirlemek için, gün içi ve günler arası çalışmalar yapılmıştır. Tekrar edilebilirlik için ölçümler aynı gün içerisinde 5 kez çalışılmış ve tekrar üretilebilirlik ölçümleri 5 farklı günde gerçekleştirilmiştir.

3.2.3.4. Gerçeklik parametresinin belirlenmesi

Gerçeklik tespiti için gıda takviyesi tabletlerine düşük, orta ve yüksek seviyede olmak üzere 3 farklı derişimde (düşük=0,1 mg/L; orta=0,5 mg/L ve yüksek=2,5 mg/L) standart ilavesi yapılmış ve 6 tekrarlı olarak çalışılmıştır. Gerçeklik parametresi, %geri kazanım miktarı ile değerlendirilmiştir. %Geri kazanım miktarı, Eşitlik 3.2 ile hesaplanmıştır.

$$\% \text{Geri Kazanım Miktarı} = (C_2/C_1) \times 100 \quad (3.2)$$

C₁, Bilinen ya da standart çalışma sonucunda ilave edilen derişim

C₂, Çalışma sonucunda bulunan derişim

3.2.3.5. Seçicilik parametresinin belirlenmesi

Seçicilik için çalışmada kullanılan tablet formundaki gıda takviyesi numunesinden farklı formülasyona sahip gıda takviyesi tableti seçilmiş ve çalışma gerçekleştirilmiştir.

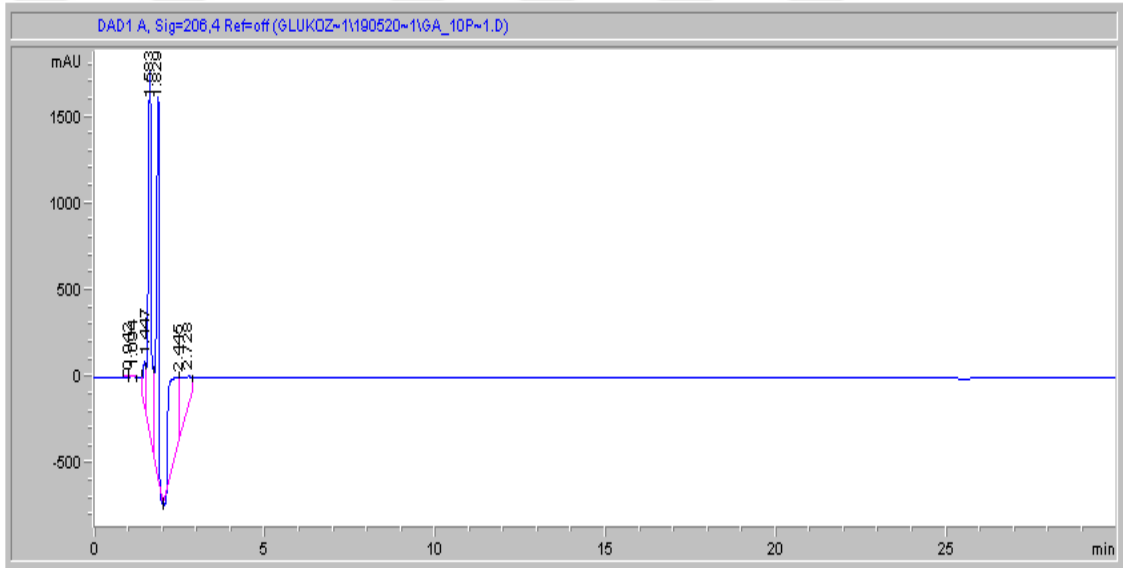
3.2.3.6. Kararlılık parametresinin belirlenmesi

Kararlılık testleri için kontrol numuneleri hazırlanmış ve oda sıcaklığında 1, 2, 3, 4 ve 5 gün boyunca bekletildikten sonra farklı günlerde kısa dönem kararlılıkları karşılaştırılmıştır.

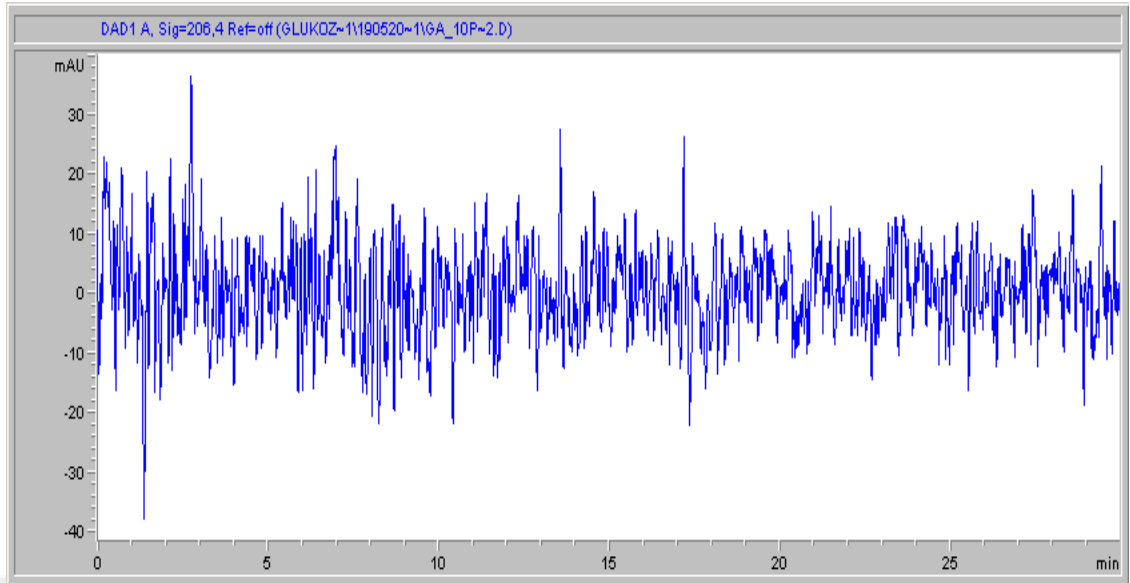
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Hareketli Faz Bileşiminin Belirlenmesi

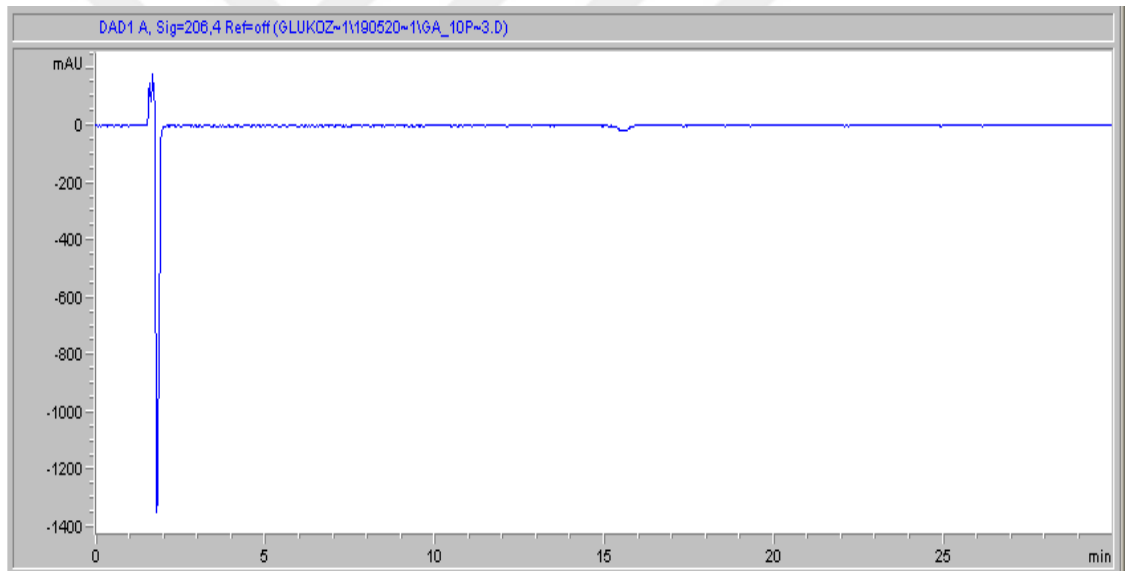
Gıda takviyesi tabletlerinde glukozamin tespitine yönelik hareketli faz bileşiminin belirlenmesi için birbirinden farklı hareketli faz bileşimleri ile çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Çalışılan hareketli faz bileşimleri sırasıyla; hareketli faz sistem 1: MeOH:H₂O (10:90) (pH 4'e asetik asit ile ayarlanmıştır), sistem 2: MeOH:H₂O (80:20) (pH 4'e asetik asit ile ayarlanmıştır), sistem 3: ACN:H₂O (10:90) (pH 4'e asetik asit ile ayarlanmıştır), sistem 4: ACN:H₂O (50:50) (pH 4'e asetik asit ile ayarlanmıştır), sistem 5: ACN:H₂O (10:90) (pH 4'e TFA ile ayarlanmıştır), sistem 6: ACN:H₂O (20:80) (pH 4'e TFA ile ayarlanmıştır), sistem 7: ACN:H₂O (50:50) (pH 4'e TFA ile ayarlanmıştır), sistem 8: ACN:H₂O (60:40) (pH 4'e TFA ile ayarlanmıştır) ve sistem 9: ACN:H₂O (70:30) (pH 4'e TFA ile ayarlanmıştır). 9 adet hareketli faz sistemine ait HPLC kromatogramları sırasıyla Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5, Şekil 4.6, Şekil 4.7, Şekil 4.8 ve Şekil 4.9'da gösterilmektedir.



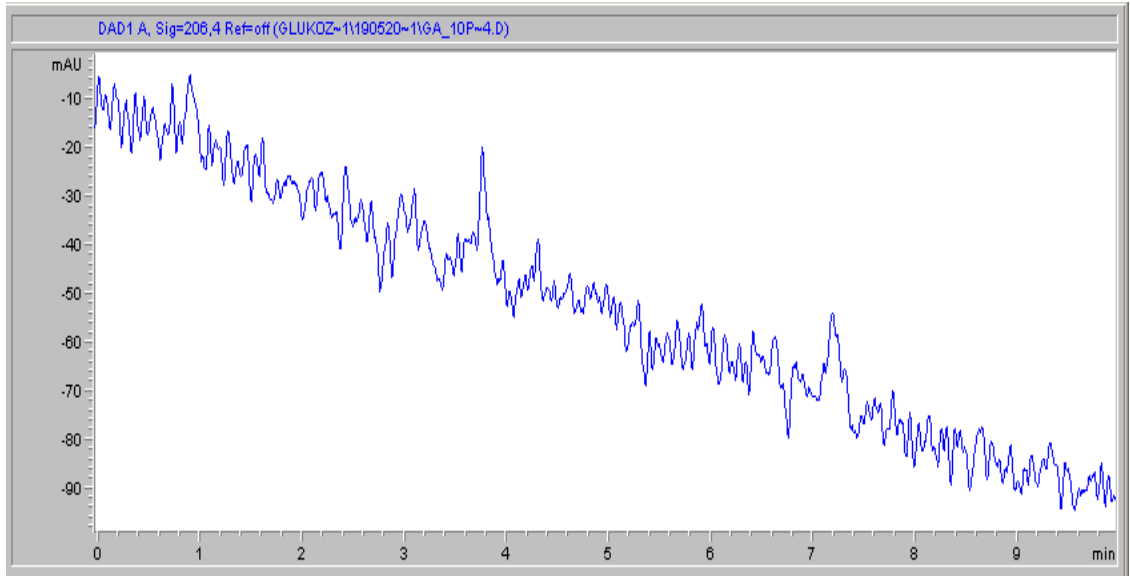
Şekil 4.1. 1 nolu hareketli faz bileşimine ait HPLC kromatogramı



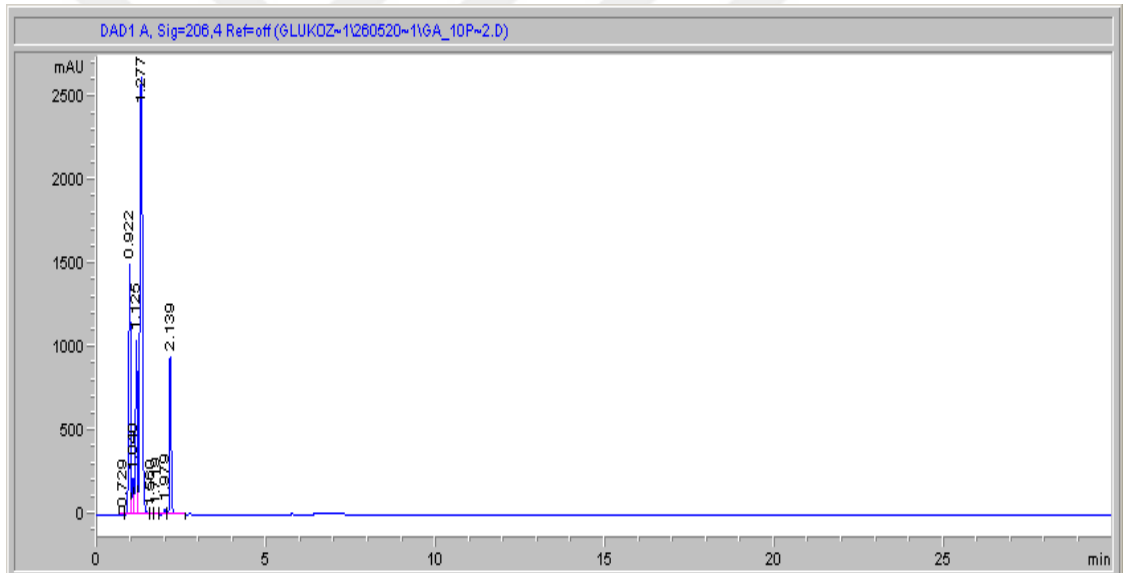
şekil 4.2. 2 nolu hareketli faz bileşimine ait HPLC kromatogramı



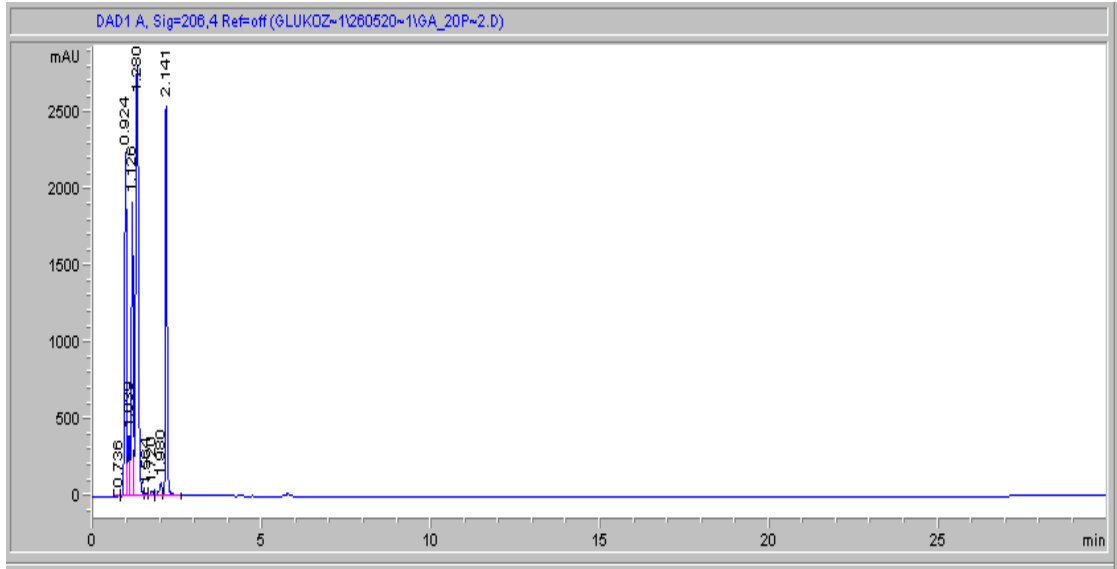
şekil 4.3. 3 nolu hareketli faz bileşimine ait HPLC kromatogramı



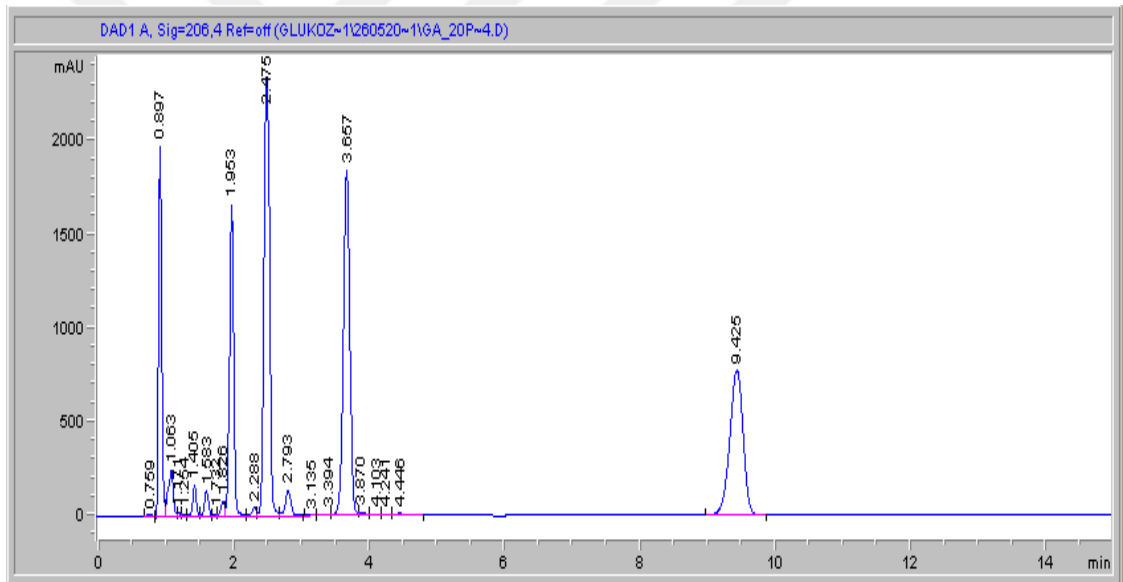
şekil 4.4. 4 nolu hareketli faz bileşimine ait HPLC kromatogramı



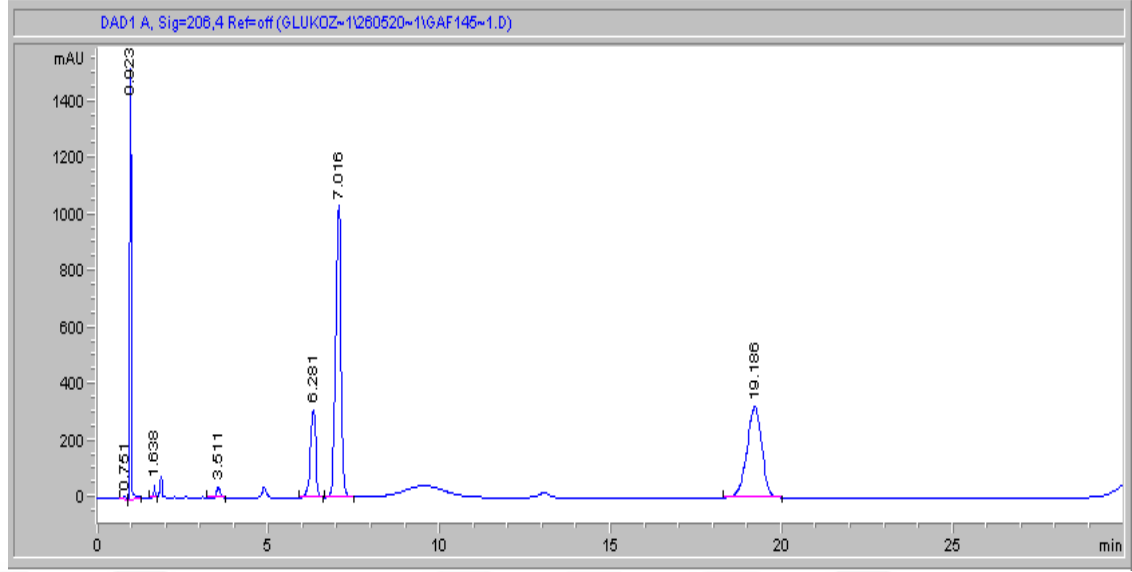
şekil 4.5. 5 nolu hareketli faz bileşimine ait HPLC kromatogramı



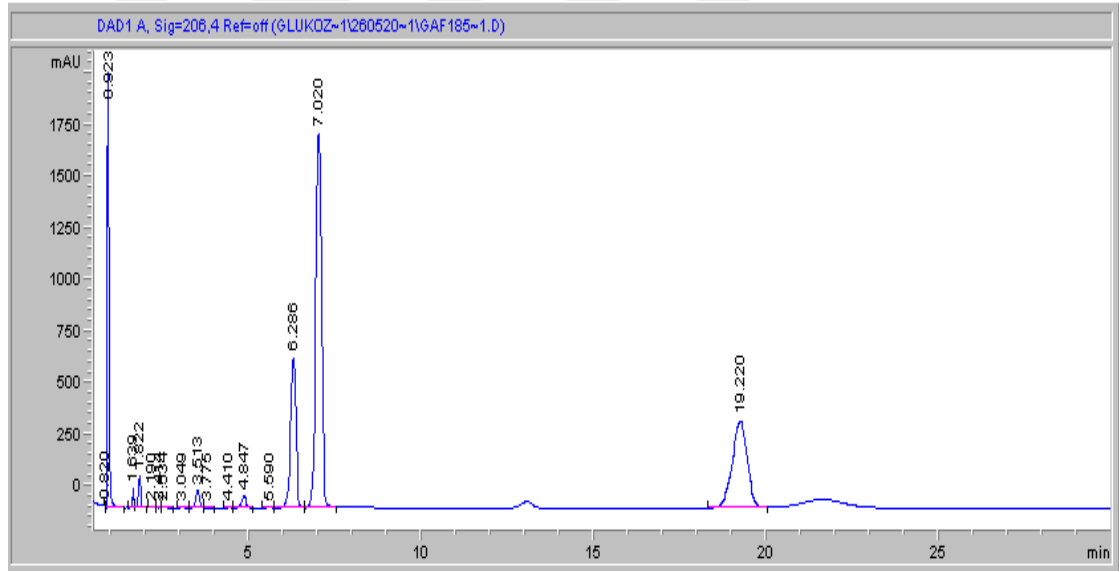
Şekil 4.6. 6 nolu hareketli faz bileşimine ait HPLC kromatogramı



Şekil 4.7. 7 nolu hareketli faz bileşimine ait HPLC kromatogramı



Şekil 4.8. 8 nolu hareketli faz bileşimine ait HPLC kromatogramı



Şekil 4.9. 9 nolu hareketli faz bileşimine ait HPLC kromatogramı

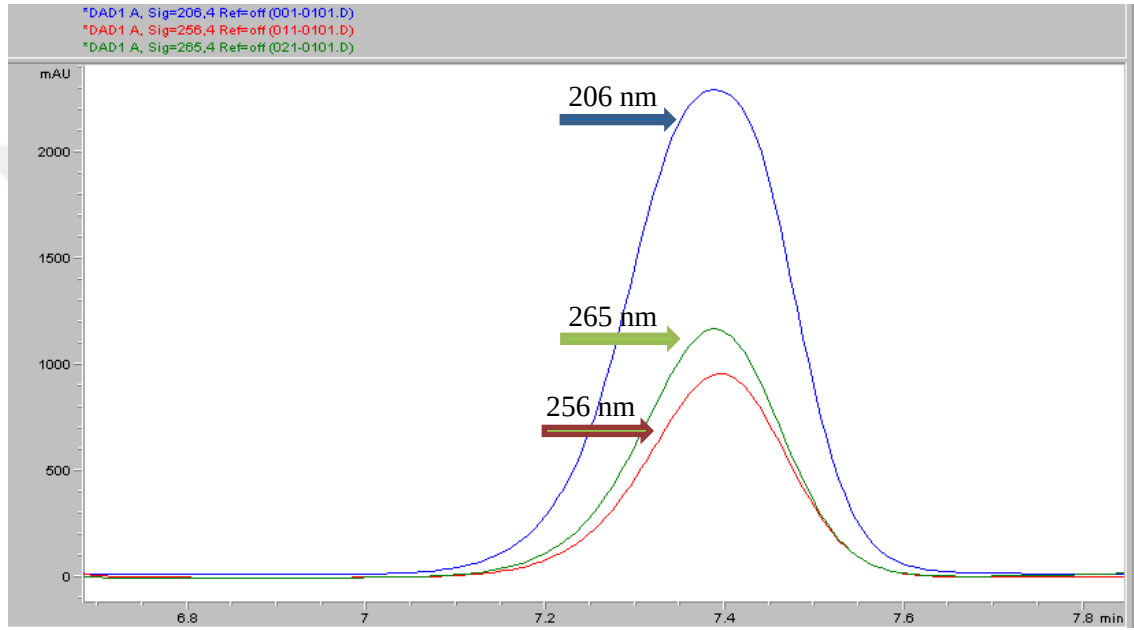
Optimum hareketli fazın belirlenmesi için yapılan çalışmalar sonucunda 1, 2, 3 ve 4 nolu sistemlerde glukozamin piki tespit edilememiştir (Bkz. Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3 ve Şekil 4.4). 2 ve 4 nolu hareketli faz sistemlerinde sabit bir temel hat çizgisi elde edilememiştir. 5 ve 6 nolu sistemlerde pikler birbirine çok yakın olduğu iyi bir pik ayrımı yapılamamıştır (Bkz. Şekil 4.5 ve Şekil 4.6). 7 nolu sistemde glukozamin piki 9,426 dakikada tespit edilmiştir. 8 ve 9 nolu sistemlerde glukozamin piki 19,186 ve 19,220 dakikada saptanmış, fakat 7 nolu sisteme göre alıkonma sürelerinin daha uzun olduğu görülmüştür. (Bkz. Şekil 4.7, Şekil 4.8 ve Şekil 4.9). Sonuç olarak analiz süresi kısa, pik şekli düzgün ve pik şiddeti yüksek olduğu için 7 nolu sistem, ACN:H₂O (50:50) (pH 4'e TFA ile ayarlanmıştır), optimum hareketli faz bileşimi olarak

belirlenmiştir. Hareketli faz sistemlerinin tamamı, 206 nm dalga boyunda analiz edilmiştir.

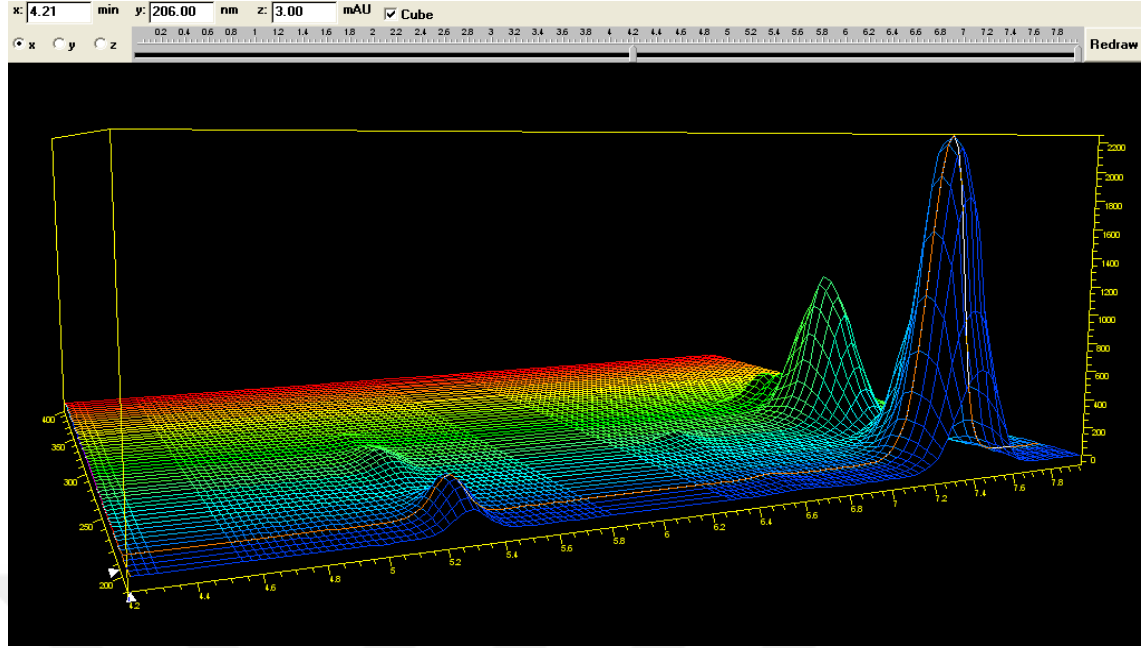
4.2. Optimum Metot Parametreleri

4.2.1. Dalga boyunun belirlenmesi

Glukozamin tayini için dedektör olarak diyot array dedektör (DAD) kullanılmıştır. Optimum dalga boyunun belirlenmesinde 206 nm, 256 nm ve 265 nm olmak üzere üç farklı dalga boyunda çalışmalar yapılmıştır. Kromatogramların karşılaştırılması Şekil 4.10'da ve Şekil 4.11'de yer almaktadır.



Şekil 4.10. Glukozamin için 206 nm, 256 nm ve 265 nm dalga boylarında kaydedilen kromatogramlar



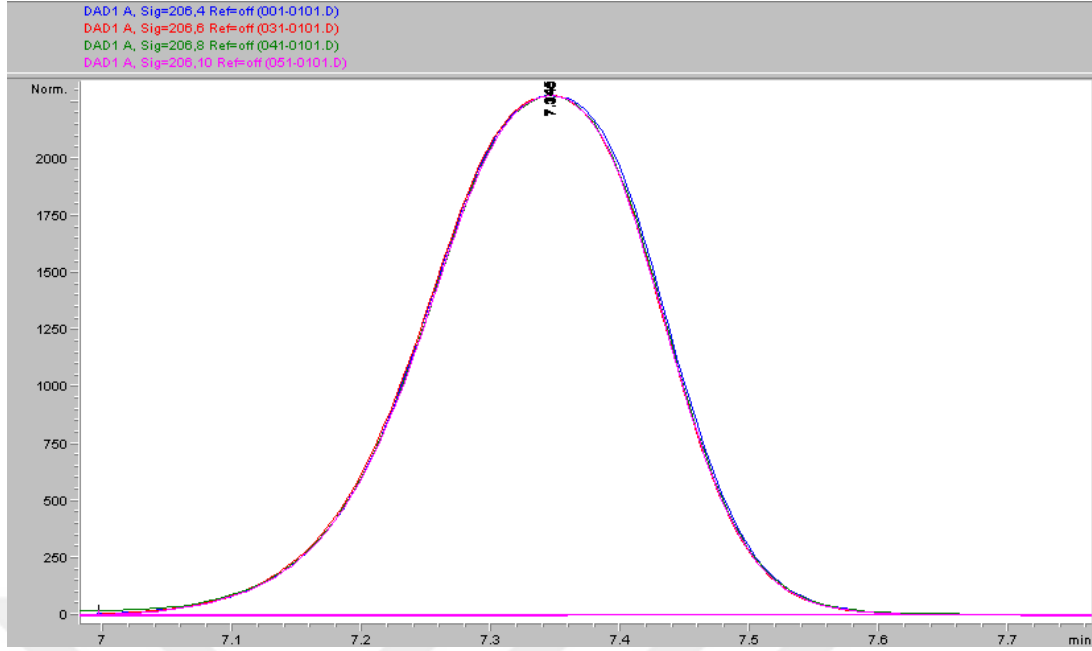
Şekil 4.11. Glukozamin için 206 nm, 256 nm ve 265 nm dalga boylarında kaydedilen üç boyutlu kromatogramlar

Şekil 4.10'da ve Şekil 4.11'de görüldüğü gibi çalışılan dalga boylarının kromatogramları karşılaştırıldığında, glukozaminin maksimum absorplama yaptığı dalga boyu 206 nm'dir.

Glukozamin tespitine yönelik yapılan literatür çalışmalarında glukozaminin farklı dalga boyları ile tayin edildiği gözlenmiştir. Zhou vd. (2004), gıda takviyesi tabletlerinde glukozamin hidroklorür tayinini 265 nm dalga boyu ile HPLC-UV cihazını kullanarak tespit etmiştir. Zhang vd. (2006), insan plazmasındaki glukozamin sülfatı HPLC-FLD cihazında 263 nm dalga boyunda analiz etmiştir. Tekko vd. (2006), HPLC-DAD cihazı ile glukozaminin insan vücuduna deri yoluyla geçişini 245 nm dalga boyunda incelemiştir. Lopez-Cervantes vd. (2007), glukozaminin kitindeki miktarını HPLC-UV cihazında 264 nm dalga boyunda tayin etmiştir. Shao vd. (2004) ve Magana vd. (2014), glukozamin tayinini türevlendirme yapmadan HPLC-DAD cihazını kullanarak sırasıyla 195 nm ve 193 nm dalga boylarında gerçekleştirmişlerdir.

4.2.2. Optimum band genişliğinin belirlenmesi

Glukozamin tayini için yapılan çalışmalarda band genişliği (bw) olarak 4, 6, 8 ve 10 değerleri denenmiştir. Elde edilen kromatogramlar Şekil 4.12'de gösterilmektedir.



Şekil 4.12. Glukozamin için farklı band genişliklerinde elde edilen kromatogramların karşılaştırılması

Şekil 4.12’de görüldüğü gibi, 206 nm dalga boyunda glukozamin için kromatogramlar arasında herhangi bir fark gözlenmediği için band genişliği 4 nm olarak belirlenmiştir.

4.2.3. Optimum akış hızının belirlenmesi

Gıda takviyesi tabletlerinde glukozamin tespitinde optimum hareketli faz akış hızının belirlenmesi için 0,1 mL/dk, 0,2 mL/dk, 0,4 mL/dk, 0,6 mL/dk, 0,8 mL/dk ve 1 mL/dk olmak üzere 6 farklı akış hızı denenmiştir.

Plaka yüksekliği (H), Eşitlik 4.1 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$H = \frac{L}{N} \quad (4.1)$$

H, plaka yüksekliği

L, kullanılan kolonun uzunluğu

N, teorik plaka sayısı

Teorik plaka sayısı (N), Eşitlik 4.2 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$N = 16 \left(\frac{t_r}{W_b} \right)^2 \quad (4.2)$$

t_r , alıkonma zamanı

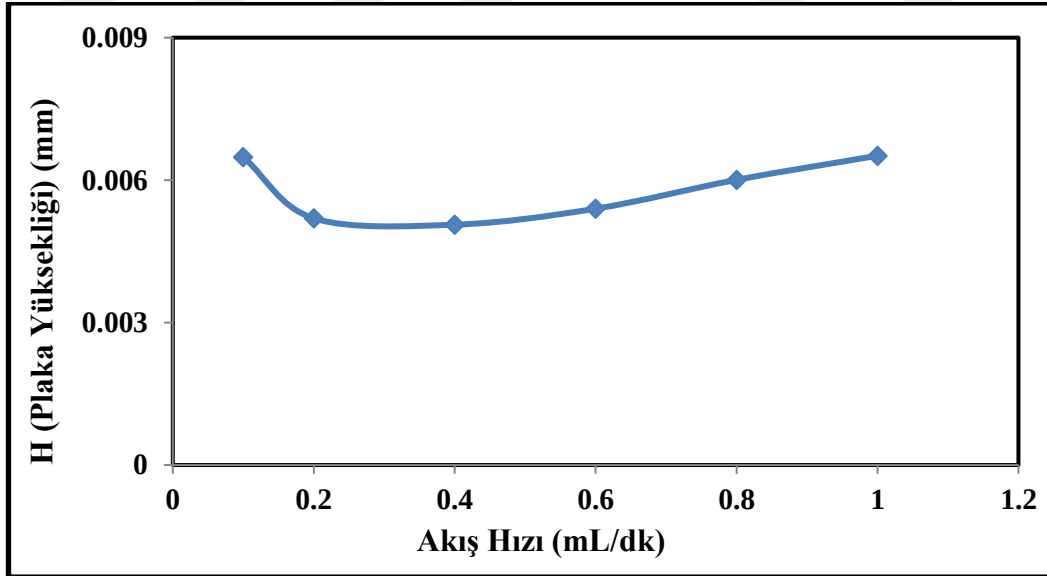
W_b , pik taban genişliği

N, teorik plaka sayısı

Plaka yükseklikleri (H), kolon uzunluğun farklı akış hızlarındaki teorik plaka sayılarına bölünmesi ile hesaplanmıştır. Akış hızlarına karşılık gelen teorik plaka sayıları ve plaka yükseklikleri Çizelge 4.1'de verilmektedir. Akış hızına karşı plaka yüksekliği verileri ile Van Deemter eğrisi oluşturulmuştur (Şekil 4.13). Şekil 4.13'teki Van Deemter grafiğinin minimum noktasına karşılık gelen akış hızı, optimum akış hızı olarak belirlenmektedir.

Çizelge 4.1. Farklı akış hızları için elde edilen teorik plaka sayıları ve plaka yükseklikleri

Akış hızı (mL/dk)	N (Teorik plaka sayısı) (10 ⁴)	H (Plaka yüksekliği) (mm) (10 ⁻³)
0,1	2,313	6,486
0,2	2,887	5,196
0,4	2,964	5,061
0,6	2,779	5,398
0,8	2,498	6,006
1,0	2,303	6,514



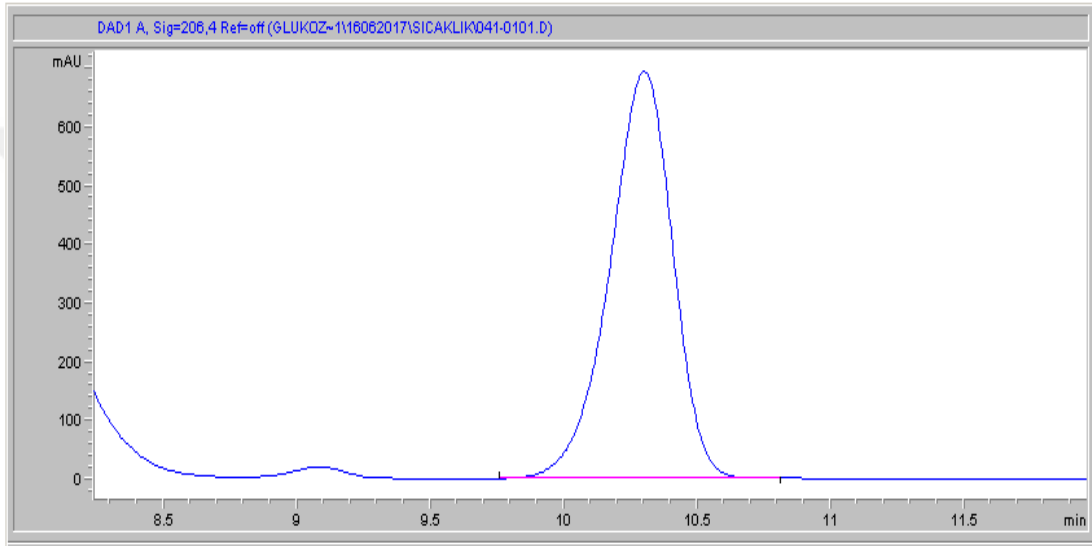
Şekil 4.13. Akış hızı optimizasyonu çalışmaları için elde edilen Van Deemter eğrisi

Şekil 4.13'teki eğriye bakıldığında optimum akış hızı, 0,4 mL/dk'dır. 0,4 mL/dk akış hızında glukozaminin alıkonma zamanı 0,6 mL/dk'da gözlenen alıkonma zamanına göre daha uzundur. 0,4 mL/dk ile 0,6 mL/dk akış hızlarında elde edilen plaka yükseklikleri ve teorik plaka sayıları karşılaştırıldığında birbirine çok yakın değerler

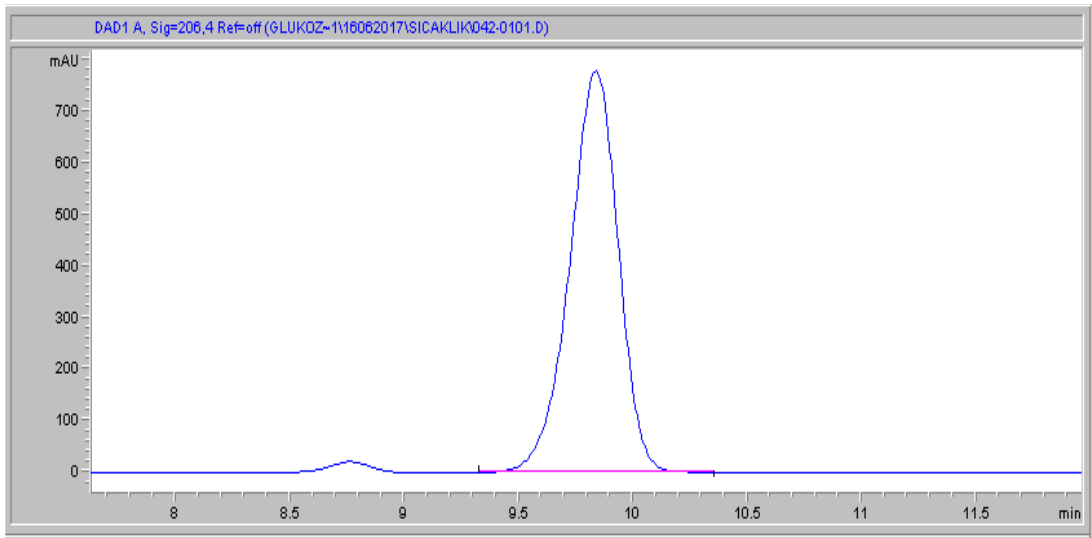
bulunmuştur (Çizelge 4.1). Geliştirilen yeni metotta analiz süresinin kısa olması amaçlandığından hareketli faz akış hızı 0,6 mL/dk olarak belirlenmiştir.

4.2.4. Optimum kolon sıcaklığının belirlenmesi

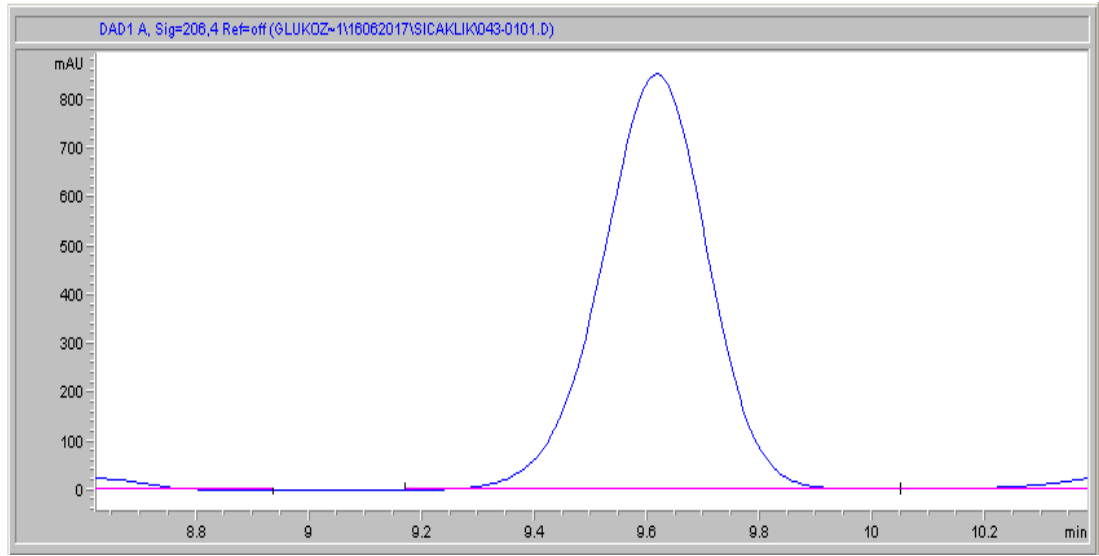
Gıda takviyesi tabletlerinde glukozamin tespitinde optimum kolon sıcaklığını belirlemek için 25 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C ve 45 °C olmak üzere 5 farklı kolon sıcaklığında analiz gerçekleştirilmiştir. Farklı kolon sıcaklıklarında elde edilen kromatogramlar sırasıyla Şekil 4.14, Şekil 4.15, Şekil 4.16, Şekil 4.17 ve Şekil 4.18’de yer almaktadır. Bu sıcaklıklar için elde edilen pik alanı, USP kuyruklanma faktörü ve teorik plaka sayısı (N) değerleri Çizelge 4.2’de verilmektedir.



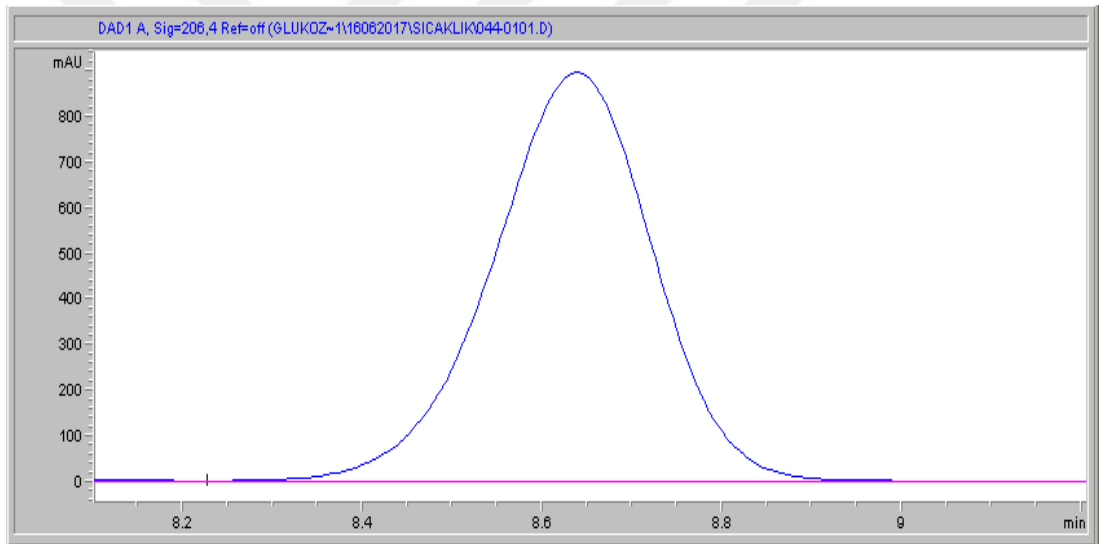
Şekil 4.14. 25 °C kolon sıcaklığında kaydedilen HPLC kromatogramı



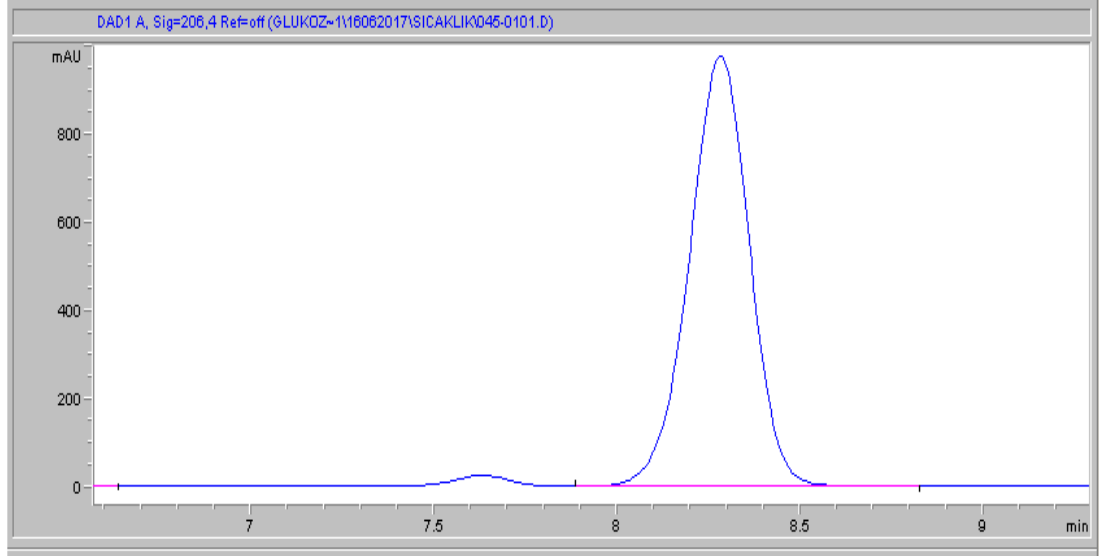
Şekil 4.15. 30 °C kolon sıcaklığında kaydedilen HPLC kromatogramı



şekil 4.16. 35 °C kolon sıcaklığında kaydedilen HPLC kromatogramı



şekil 4.17. 40 °C kolon sıcaklığında kaydedilen HPLC kromatogramı



Şekil 4.18. 45 °C kolon sıcaklığında kaydedilen HPLC kromatogramı

Çizelge 4.2. Kolon sıcaklığının optimizasyonunda kullanılan sıcaklık değerlerinin karşılaştırılması

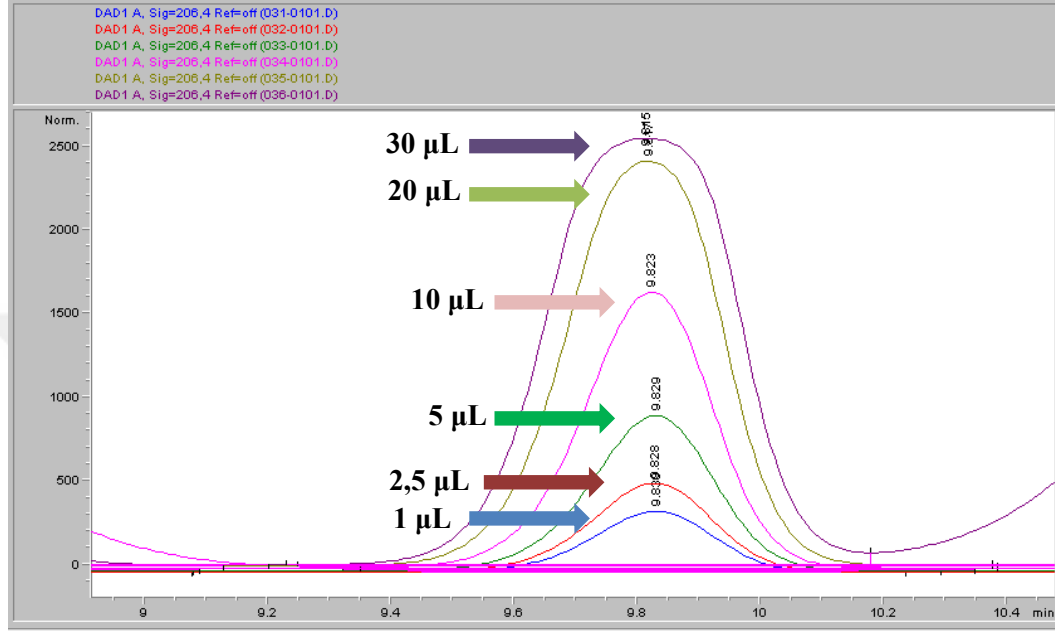
Sıcaklık (°C)	Pik alanı	USP kuyruklanma faktörü	Teorik plaka sayısı (N) (10 ⁴)
25	11392,5	1,192	2,639
30	11506,6	1,148	3,020
35	11356,1	1,073	3,514
40	11289,9	1,108	3,215
45	11212,7	1,162	3,463

Çizelge 4.2'de görüldüğü gibi pik USP kuyruklanma faktörünün en az olduğu ve teorik plaka sayısının en fazla olduğu 35 °C optimum kolon sıcaklığı olarak belirlenmiştir.

Glukozamin tespitinde literatür tarama sonuçlarına göre çalışmalarda kullanılan kolon sıcaklıklarının genellikle 30 °C olarak belirlendiği gözlenmektedir. Appuhn vd. (2004), toprak ve kök hidrolizatlarında glukozaminin tespitini 35 °C kolon sıcaklığı ile yapmıştır. Zhang vd. (2006), glukozamin sülfat ve Shao vd. (2004), glukozamin hidroklorür tayinini 30 °C'lik kolon sıcaklığında gerçekleştirmişlerdir. Başka bir çalışmada Tekko vd. (2006), glukozaminin insan vücuduna deri yoluyla geçişini 30 °C'lik kolon sıcaklığında incelemişlerdir. Lopez-Cervantes vd. (2007), kitindeki glukozamin miktarını 38 °C'lik kolon sıcaklığında yapmıştır. Elde edilen literatür taraması verilerine göre tespit edilen kolon sıcaklığının uyumlu olduğu ortaya çıkmıştır.

4.2.5. Optimum enjeksiyon hacminin belirlenmesi

Glukozamin tespitinde enjeksiyon hacminin belirlenmesi için 1 µL, 2,5 µL, 5 µL, 10 µL, 20 µL ve 30 µL olmak üzere 6 farklı hacim denemesi gerçekleştirilmiştir. Farklı enjeksiyon hacimlerinin kullanılmasıyla elde edilen kromatogramlar Şekil 4.19'da yer almaktadır.



Şekil 4.19. Farklı enjeksiyon hacimlerinde elde edilen glukozamin kromatogramları

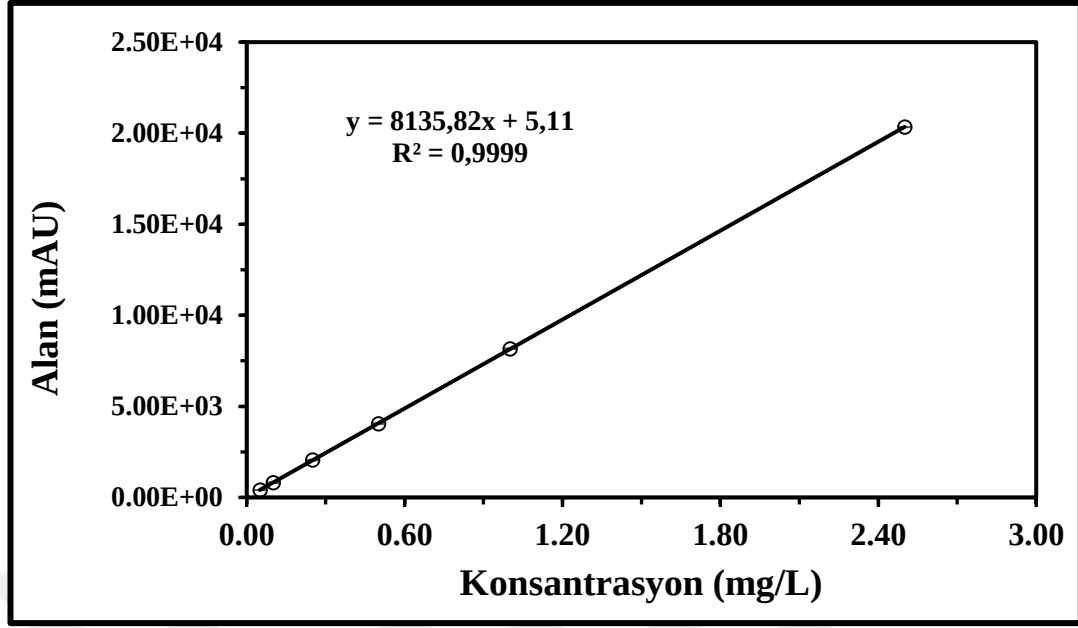
Şekil 4.19'daki kromatogramlarda görüldüğü gibi, enjeksiyon hacimlerinin artması ile piklerde bozulmalar meydana geldiği için optimum enjeksiyon hacmi 5 µL seçilmiştir.

4.3. Metot Validasyon Parametrelerinin Belirlenmesi

Metot validasyonu; doğrusalılık, tespit limiti (LOD), kantitatif tayin limiti (LOQ), kesinlik, gerçeklik, seçicilik ve kararlılık parametreleri ile çalışmalar yapılarak gerçekleştirilmiştir.

4.3.1. Doğrusallık

Glukozaminin doğrusalılık parametresinin belirlenmesi için 0,05 mg/L, 0,10 mg/L, 0,25 mg/L, 0,50 mg/L, 1,00 mg/L, 2,50 mg/L olmak üzere 6 farklı glukozamin derişiminde 3 kez tekrar edilerek ölçümler gerçekleştirilmiştir. Elde edilen pik alan verilerine karşı derişim değerleri ile oluşturulan kalibrasyon doğrusu Şekil 4.20'te gösterilmektedir.



Şekil 4.20. Glukozamin analizinde kullanılan kalibrasyon doğrusu

4.3.2. LOD ve LOQ değerlerinin hesaplanması

Optimize edilen metodun LOD ve LOQ değerlerinin hesaplanmasında kalibrasyon doğrusu denkleminde yararlanılmıştır. Öncelikle kalibrasyon denkleminde çalışılan derişimlere karşılık gelen y_{teo} değerleri hesaplanmıştır. Daha sonra, hesaplanan y_{teo} değerleri Eşitlik 4.3'te yerine yazılarak standart sapma değeri 37,49 olarak bulunmuştur. Eşitlik 4.4 ve Eşitlik 4.5 kullanılarak LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0,014 mg/L ve 0,046 mg/L olarak elde edilmiştir.

$$\text{Standart Sapma (SD)} = \sqrt{\frac{\sum (y_{den} - y_{teo})^2}{n-2}} \quad (4.3)$$

$$\text{LOD} = \frac{3 \times \text{SD}}{m} \quad (4.4)$$

$$\text{LOQ} = \frac{10 \times \text{SD}}{m} \quad (4.5)$$

y_{den} , deneysel elde edilen pik alanı

y_{teo} , kalibrasyon denkleminde hesaplanan pik alanı

n , çalışılan standart sayısı

m , kalibrasyon doğrusunun eğimi

Glukozamin tespitine yönelik geliştirilen metotta elde edilen LOD ve LOQ değerleri literatür sonuçları ile karşılaştırıldığında; Aghazadeh-Habashi vd. (2002), glukozamin hidroklorür tespitinde LOD ve LOQ değerlerini sırasıyla 0,63 µg/mL ve 1,25 µg/mL olarak saptamıştır. Zhou vd. (2004), gıda takviyesi tabletlerinde glukozamin

hidroklorür tespitinde LOD ve LOQ değerlerini 0,3 µg/mL ve 1,0 µg/mL bulmuştur. Shao vd. (2004), glukozamin hidroklorür tespitini türevlendirme işlemi yapmaksızın amino bazlı sabit faz kolon kullanarak gerçekleştirmiş ve LOD ve LOQ değerlerini sırasıyla 0,037 mg/mL ve 0,149 mg/mL olarak tespit etmiştir. Zhang vd. (2006), glukozamin sülfat tespitinde LOD ve LOQ değerlerini, 15 ng/mL ve 100 ng/mL bulmuştur. Tekko vd. (2006), glukozaminin insan vücuduna deri yoluyla geçişini incelemek için yaptıkları çalışmada LOD ve LOQ değerlerini sırasıyla 0,3 µg/mL ve 1,0 µg/mL olarak saptamıştır. Lopez-Cervantes vd. (2007), kitindeki glukozamin miktarı tayininde LOD değerini 2 µg/mL olarak belirlemiştir. Geliştirilen bu yeni metotta, Çizelge 4.4'te görüldüğü gibi glukozaminin LOD ve LOQ değerlerinin sırasıyla 0,014 mg/L ve 0,046 mg/L olarak tespit edilmiştir. Geliştirilen metodun LOD ve LOQ değerlerinin, literatürde yer alan çalışmalarda elde edilen LOD ve LOQ değerlerinden daha düşük olduğu sonucuna varılmıştır.

4.3.3. Kesinlik

Kesinlik, geliştirilen metodun tekrarlanabilirliğinin bir ölçüsüdür ve çalışmalarda elde edilen sonuçların aynı şartlar altında birbirine yakınlığını göstermektedir. Elde edilen sonuçlardaki bağıl standart sapmanın küçük olması, metodun kesinliğinin yüksek olduğunun bir göstergesidir (NMKL 2009). Kesinlik parametresinin uygunluğu, HorRat (Horwitz) kuralına göre kıyaslanabilmektedir. HorRat, birçok kimyasal analiz yöntemleri için geçerli olup, çalışılan metotların kabul edilebilirliğini gösteren bir performans parametresidir (Horwitz ve Albert 2006). HorRat değeri Eşitlik 4.6 ve Eşitlik 4.7 kullanılarak hesaplanmaktadır.

$$RSD_{\text{öngörülen}} = 2^{(1-0,5\log C)} \quad (4.6)$$

$$\text{HorRat} = \frac{\%RSD_{\text{elde edilen}}}{\%RSD_{\text{öngörülen}}} \quad (4.7)$$

Burada, C derişimi ifade etmektedir.

4.3.3.1. Tekrar edilebilirlik

Tekrar edilebilirlik, aynı gün içerisinde, aynı metot ile gıda takviyesi tabletlerine belirlenen düşük (0,1 mg/L), orta (0,5 mg/L) ve yüksek (2,5 mg/L) derişim seviyelerinde standart madde ilavesi yapılarak çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.3'te yer almaktadır.

Çizelge 4.3. Tekrar edilebilirlik çalışması sonuçları

Tekrar sayısı	Düşük glukozamin derişimi (0,1 mg/L)	Tekrar sayısı	Orta glukozamin derişimi (0,5 mg/L)	Tekrar sayısı	Yüksek glukozamin derişimi (2,5 mg/L)
1	0,138	1	0,514	1	2,452
2	0,140	2	0,513	2	2,454
3	0,136	3	0,512	3	2,470
4	0,134	4	0,522	4	2,579
5	0,133	5	0,531	5	2,437
Ortalama	0,136	Ortalama	0,518	Ortalama	2,478
Standart Sapma	0,003	Standart Sapma	0,008	Standart Sapma	0,057
RSDr	0,022	RSDr	0,015	RSDr	0,023
%RSD	2,244	%RSD	1,540	%RSD	2,317

Çizelge 4.3'e göre her bir derişim için elde edilen %RSD değerleri ile Eşitlik 4.6 ve Eşitlik 4.7 kullanılarak hesaplama yapılmış ve HorRat değerleri ile sonuçların uygunluğu kontrol edilmiştir. Elde edilen HorRat değerleri Çizelge 4.4'te gösterilmektedir.

Çizelge 4.4. Tekrar edilebilirlik için elde edilen HorRat değerlerinin karşılaştırılması.

Glukozamin derişimi	%RSD _{elde edilen}	%RSD _{öngörülen}	HorRat
Düşük glukozamin derişimi (0,1 mg/L)	2,244	5,656	0,397
Orta glukozamin derişimi (0,5 mg/L)	1,540	4,438	0,347
Yüksek glukozamin derişimi (2,5 mg/L)	2,317	3,482	0,665

Çizelge 4.4'te görüldüğü gibi her bir derişim için ayrı hesaplanan HorRat değeri ≤ 2 olduğu için sonuçların uygunluğu tespit edilmiştir (NMKL 2009).

4.3.3.2. Tekrar üretilebilirlik

Tekrar üretilebilirlik için farklı günlerde, aynı metot ile gıda takviyesi tabletlerine, düşük, orta ve yüksek seviyede olmak üzere 3 farklı derişimde standart madde ilavesi yapılarak çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.5'te yer almaktadır.

Çizelge 4.5. Tekrar üretilebilirlik çalışması sonuçları.

Çalışılan gün	Düşük glukozamin derişimi (0,1 mg/L)	Çalışılan gün	Orta glukozamin derişimi (0,5 mg/L)	Çalışılan gün	Yüksek glukozamin derişimi (2,5 mg/L)
1.Gün	0,123	1.Gün	0,559	1.Gün	2,489
2.Gün	0,122	2.Gün	0,568	2.Gün	2,466
3.Gün	0,121	3.Gün	0,558	3.Gün	2,452
4.Gün	0,118	4.Gün	0,583	4.Gün	2,452
5.Gün	0,122	5.Gün	0,577	5.Gün	2,445
Ortalama	0,121	Ortalama	0,569	Ortalama	2,461
Standart sapma	0,002	Standart sapma	0,011	Standart sapma	0,018
RSDr	0,016	RSDr	0,019	RSDr	0,007
%RSD	1,626	%RSD	1,892	%RSD	0,721

Çizelge 4.5'deki her bir derişim için elde edilen %RSD değerleri ile Eşitlik 4.6 ve Eşitlik 4.7 kullanılarak hesaplama yapılmış ve HorRat değerleri ile sonuçların uygunluğu kontrol edilmiştir. Elde edilen HorRat değerleri Çizelge 4.6'da gösterilmektedir.

Çizelge 4.6. Tekrar üretilebilirlik için elde edilen HorRat değerlerinin karşılaştırılması

Glukozamin derişimi	%RSD _{elde edilen}	%RSD _{öngörülen}	HorRat
Düşük glukozamin derişimi (0,1 mg/L)	1,626	5,656	0,288
Orta glukozamin derişimi (0,5 mg/L)	1,892	4,438	0,426
Yüksek glukozamin derişimi (2,5 mg/L)	0,721	3,482	0,207

Çizelge 4.6'da görüldüğü gibi her bir derişim için ayrı hesaplanan HorRat değeri ≤ 2 olduğu için sonuçların uygunluğu tespit edilmiştir (NMKL 2009).

4.3.4. Gerçeklik

Gerçeklik parametresi, çalışılan numuneye en az iki farklı derişim standart madde ilavesi yapılarak en az beş tekrarlı geri kazanım çalışmaları ile gerçekleştirilir (Pihlström 2011).

Bu çalışmada, gerçeklik tespiti için gıda takviyesi tabletlerine düşük (0,1 mg/L), orta (0,5 mg/L) ve yüksek (2,5 mg/L) seviyede olmak üzere 3 farklı derişimde standart glukozamin ilavesi yapılmış ve 6 tekrarlı olacak şekilde %geri kazanım çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.7'de yer almaktadır.

Çizelge 4.7. Geri kazanım çalışması sonuçları

Tekrar sayısı	İlave edilen düşük glukozamin derişimi (0,1 mg/L)		Tekrar sayısı	İlave edilen orta glukozamin derişimi (0,5 mg/L)		Tekrar sayısı	İlave edilen yüksek glukozamin derişimi (2,5 mg/L)	
	Bulunan glukozamin derişimi (mg/L)	%Geri kazanım		Bulunan glukozamin derişimi (mg/L)	%Geri kazanım		Bulunan glukozamin derişim (mg/L)	%Geri kazanım
1	0,117	116,88	1	0,426	85,15	1	2,346	93,83
2	0,119	118,86	2	0,466	93,21	2	2,408	96,33
3	0,113	112,94	3	0,470	93,98	3	2,370	94,81
4	0,116	116,21	4	0,451	90,12	4	2,449	97,94
5	0,111	110,82	5	0,453	90,57	5	2,354	94,14
6	0,112	112,13	6	0,456	91,25	6	2,427	97,07
	ort	114,64		ort	90,71		ort	95,69
	sd	3,133		sd	3,112		sd	1,673
	sd/ $\sqrt{n}$	0,013		sd/ $\sqrt{n}$	0,013		sd/ $\sqrt{n}$	0,007
	RSDr	0,027		RSDr	0,034		RSDr	0,017
	%RSD	2,733		%RSD	3,431		%RSD	1,748

Çizelge 4.7'ye göre, çalışılan gıda takviyesi tabletlerinin %geri kazanım değerleri %80,0-%120,0 aralığında olduğu için uygun bulunmuştur (Magnusson ve Örnemark 2014).

4.3.5. Seçicilik

Seçicilik, analitik metodun analiti örnekte bulunan diğer maddelerden ayırt etme yeteneği olarak tarif edilebilir. Seçicilik için, kullanılan gıda takviyesi tabletinden farklı formülasyona sahip gıda takviyesi tableti seçilmiş ve 0,5 mg/L ve 1 mg/L derişiminde standart glukozamin maddesi ilave edilmiştir. Çalışmalar sonucu, hesaplanan %geri kazanım değerleri ve pik alanları kıyaslanmıştır. Sonuçlar Çizelge 4.8'de gösterilmektedir.

Çizelge 4.8. Seçicilik testi sonuçları

Parametre	Numune 1	Numune 2
Pik alanı	7681,85	7639,33
Derişim (mg/L)	0,9440	0,9388
İlave edilen 0,5 mg/L		
Pik alanı	12078,8	11354,4
Derişim (mg/L)	1,4844	1,3954
%Geri kazanım	108,08	91,32
İlave edilen 1 mg/L		
Pik alanı	14170	14116
Derişim (mg/L)	1,7414	1,7348
%Geri Kazanım	79,74	79,60

Çizelge 4.8'de görüldüğü gibi, çalışılan her iki farklı formülasyona sahip kontrol numunesinin pik alanlarında önemli bir değişim gözlenmemiştir. Geliştirilen metodun numunedeki diğer maddelerden etkilenmediği %geri kazanım sonuçları ile ortaya konmuştur.

4.3.6. Kararlılık

Kararlılık için çalışılan numune oda sıcaklığında 1, 2, 3, 4 ve 5 gün boyunca bekletildikten sonra farklı günlerdeki kararlılık testleri yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.9'da yer almaktadır.

Çizelge 4.9. Kararlılık testi sonuçları.

Çalışılan gün	Derişim (mg/L)	Pik alanı
1. Gün	1,022	8317,50
2. Gün	1,024	8329,72
3. Gün	1,011	8230,01
4. Gün	1,002	8155,85
5. Gün	1,000	8140,14
Ortalama		8234,644
Standart sapma		88,128
%RSD		1,070

Çizelge 4.9'da görüldüğü gibi numunenin oda sıcaklığında 5 farklı günde yapılan çalışmaları sonucu pik alanlarında hemen hemen hiçbir değişim gözlenmemiştir. %RSD değerinin çok düşük olması, glukozaminin 5 gün boyunca kararlı olduğunu göstermektedir.



5. SONUÇLAR

Bu yüksek lisans tez çalışmasında, gıda takviyesi tabletlerinde glukozamin etken maddesinin analizi, yüksek performanslı sıvı kromatografisi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonucunda elde edilen sonuçlar aşağıda yer almaktadır.

- Optimum hareketli faz bileşimi olarak ACN:H₂O (50:50) (pH 4'e TFA ile ayarlanmıştır) bileşimi hareketli faz olarak belirlenmiştir.
- Glukozamin analizi için dedektör olarak DAD kullanılmıştır. Glukozaminin maksimum absorbans verdiği optimum dalga boyu 206 nm olarak tespit edilmiştir.
- Band genişliği (bw) değeri 4 nm seçilmiştir.
- Optimum hareketli faz akış hızı 0,6 mL/dk olarak, optimum kolon sıcaklığı 35 °C olarak ve optimum enjeksiyon hacmi 5 µL olarak belirlenmiştir.
- Doğrusallık parametresinin belirlenmesi için 0,05 mg/L ile 2,5 mg/L derişim aralığında glukozamin kalibrasyon doğrusu oluşturulmuş ve bu doğrunun korelasyon katsayısı 0,9999 olarak bulunmuştur.
- Glukozamin analizinde tespit limiti (LOD) ve kantitatif tayin limiti (LOQ) değerleri sırasıyla 0,014 mg/L ve 0,046 mg/L olarak hesaplanmıştır.
- Kesinliği belirlemek amacıyla tekrar edilebilirlik ve tekrar üretilebilirlik çalışmaları yapılmış ve %RSD değerleri hesaplanmıştır. Hesaplanan sonuçlar HorRat $\leq$ 2 olduğu için metodun uygun olduğu anlaşılmıştır.
- Gerçeklik çalışması sonucunda %geri kazanım değerleri %85,15-%116,88 aralığında saptanmıştır.
- Seçicilik için çalışmada kullanılan gıda takviyesi tableti numunesinden farklı formülasyona sahip gıda takviyesi tableti ile çalışma yapılmıştır. Metodun numunedeki diğer maddelerden etkilenmediği %geri kazanım sonuçları ile ortaya konulmuştur.
- Kararlılık testleri için oda sıcaklığında 5 gün boyunca farklı günlerde numunelerin kısa dönem kararlılıkları karşılaştırılmıştır. %RSD değeri 1,070 olarak hesaplanmıştır.
- Glukozamin için yapılan optimizasyon ve validasyon çalışmaları sonuçları değerlendirildiğinde sistemin sağlam ve uygulanabilir olduğu görülmüştür.

6. KAYNAKLAR

- Açar, Ç.Ö., Kırış, S., Diler, F. ve Avcı, A. 2013. Pestisit analizleri için metot validasyonu ve ölçüm belirsizliği hesaplanması açıklamalı uygulama rehberi. T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Ulusal Gıda Referans Laboratuvarı, 52 s.
- Aghazadeh-Habashi, A., Sattari, S., Pasutto, F. and Jamali, F. 2002. High performance liquid chromatographic determination of glucosamine in rat plasma. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2: 176-180.
- Altman, R.D., Abramson, S., Bruyere, O., Clegg, D., Herrero-Beaumont, G., Maheu, E., Moskowitz, R., Pavelka, K. and Reginster, J.Y. 2006. Commentary: osteoarthritis of the knee and glucosamine. *Osteoarthritis Cartilage*, 14: 963-966.
- Anonim 1: <https://www.medicalpark.com.tr/kireclenme-mi-iltihapli-eklem-hastaligi-mi/hg-1586> [Son erişim tarihi: 06.04.2018]
- Anonim 2: <https://www.practicalpainmanagement.com/patient/conditions/osteoarthritis/knee-osteoarthritis/knee-osteoarthritis-diagnosis> [Son erişim tarihi: 06.04.2018]
- Appuhn, A., Joergensen, R.G., Raubuch, M., Scheller, E. and Wilke B. 2004. The automated determination of glucosamine, galactosamine, muramic acid and mannosamine in soil and root hydrolysates by HPLC. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 167: 17-21.
- Bassleer, C., Rovati, L. and Franchimont, P. 1998. Stimulation of proteoglycan production by glucosamine sulfate in chondrocyte isolated from human osteoarthritic cartilage in vitro. *Osteoarthritis Cartilage*, 6: 427-434.
- Berthod, A. and Garcia-Alvarez-Coque, C. 2000. Micellar Liquid Chromatography. Chromatic Science Series, Marcel Dekker Inc., New York, p. 198.
- Blocky, J. A., Oegemaz, T. R., Sandy, J. D. and Plaas, A. 2010. The effects of oral glucosamine on joint health: is a change in research approach needed. *Osteoarthritis and Cartilage*, 18: 5-11.
- Bodur, H. 2011. Dünyada ve Türkiye’de osteoartrite güncel bakış; Epidemiyoloji ve sosyoekonomik boyut. *Turkish Journal of Geriatrics*, 14: 7-14.
- Conaghan, P.G. 2013. Osteoarthritis in 2012: parallel evolution of OA phenotypes and therapies. *Nature Reviews Rheumatology*, 9: 68-70.
- Dalirfardouei, R., Karimi, G. and Jamialahmadi, K. 2016. Molecular mechanisms and biomedical applications of glucosamine as a potential multifunctional therapeutic agent. *Life Sciences*, 152: 21-29.
- El-Saharty, Y.S. and Bary, A.A. 2002. High-performance liquid chromatographic determination of nutraceuticals, glucosamine sulphate and chitosan, in raw materials and dosage forms. *Analytica Chimica Acta*, 462: 125-131.
- Felson, D. T. and Zhang, Y. 1998. An update on the epidemiology of knee and hip osteoarthritis with a view to prevention. *Arthritis and Rheumatism*, 41: 1343-1355.

- Felson, D.T., Lawrence, R.C., Hochberg, M.C., Alindon, T., Dieppe, P.A., Minor, M.A., Blair, S.N., Berman, B.M., Fries, J.F., Weinberger, M., Lorig, K.R., Jacobs, J.J. and Goldberg, V. 2000. Osteoarthritis: New Insights. Part 2: Treatment Approaches. *Annals of Internal Medicine*, 9: 726-737.
- Hamerman, D. 1989. The biology of osteoarthritis. *The New England Journal of Medicine*, 320: 1322-1330.
- Horwitz, W. and Albert, R. 2006. The horwitz ratio (HorRat): A useful index of method performance with respect to precision. *Journal of AOAC International*, 4: 1095-1109.
- Juniora, O.V.L. and Inaciob, A.M. 2013. Use of glucosamine and chondroitin to treat osteoarthritis: a review of the literature. *Revista Brasileira de Ortopedia*, 48: 300-306.
- Kelly, G.K. 1998. The role of glucosamine sulfate and chondroitin sulfates in the treatment of degenerative joint disease. *Alternative Medicine Review*, 3: 27-39.
- Largo, R., Alvarez-Soria, M.A. and Diez-Ortego, I. 2003. Glucosamine inhibits IL-1 β -induced NF κ B activation in human osteoarthritic chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*, 11: 290-298.
- Lopez-Cervantes, J., Sanchez-Machado, D.I. and Delgado-Rosas, K.E. 2007. Quantitation of glucosamine from shrimp waste using HPLC. *Journal of Chromatographic Science*, 45: 195-199.
- Magana, A.A., Wrobel, K., Escobosa, A.R.C. and Wrobel, K. 2014. Fast determination of glucosamine in pharmaceutical formulations by high performance liquid chromatography without pre-column derivatization. *Ciencias Médicas*, 24 (NE-2): 16-22.
- Magnusson, B. and Örnemark, U. 2014. Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, ISBN 978-91-87461-59-0.
- McCarty, M. 1994. The neglect of glucosamine as treatment for osteoarthritis. A personal perspective. *Medical Hypotheses*, 42: 323-327.
- Murray, C.J. and Lopez, A.D. 1997. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990–2020. *Global Burden of Disease Study*, 349: 1498-1504.
- Nakamura, H., 2011. Application of glucosamine on human disease – Osteoarthritis. *Carbohydrate Polymers*, 84: 835-839.
- NMKL, 2009. Validation of chemical analytical methods, Procedure No.4.
- Pavelka, K., Gatterova, J., Olejarova, M., Machacek, S., Giacobelli, G. and Rovati, L.C. 2002. Glucosamine sulfate use and delay of progression of knee osteoarthritis: a 3-year, randomized, placebo-controlled, double-blind study. *Archives of Internal Medicine*, 162: 2113-2123.
- Pearle, A., Warren, R. and Rodeo, S. 2005. Basic science of articular cartilage and osteoarthritis. *Clinics in Sports Medicine*, 24: 1-12.

- Persiani, S., Roda, E., Rovati, L.C., Locatelli, M., Giacobelli, G.P. and Roda, A. 2005. Glucosamine oral bioavailability and plasma pharmacokinetics after increasing doses of crystalline glucosamine sulfate in man. *Osteoarthritis Cartilage*, 13: 1041-1049.
- Pesek, J., Matyska, M., Jimena, A., Juan, J., Jo, A. and Berioso, B. 2015. Analysis of glucosamine using aqueous normal phase chromatography. *LWT-Food Science and Technology*, 65: 777-782.
- Pihlström, T. 2011. Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed. SANCO, 12495. p. 39.
- Pohlig, F., Ulrich, J., Lenze, U., Mühlhofer, H. M. L., Harrasser, N., Suren, C., Schauwecker, J., Mayer-Kuckuk, P. and von Eisenhart-Rothe, R. 2016. Glucosamine sulfate suppresses the expression of matrix metalloproteinase-3 in osteosarcoma cells in vitro. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16: 313.
- Pujalte, J.M., Llavore, E.P. and Ylescupidez, F.R. 1980. Double blind clinical evaluation of oral glucosamine sulphate in the basic treatment of osteoarthritis. *Current Medical Research and Opinion*, 7: 110-114.
- Qiu, G.X., Weng, X.S., Zhang, K., Zhou, Y.X., Lou, S.Q., Wang, Y.P., Li, W., Zhang, H. and Liu, Y. 2005. A multi-central, randomized, controlled clinical trial of glucosamine hydrochloride/sulfate in the treatment of knee osteoarthritis. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 85: 3067-3070.
- Reginster, J.Y., Bruyere, O. and Neuprez, A. 2007. Current role of glucosamine in the treatment of osteoarthritis. *Rheumatology*, 46: 731-735.
- Reginster, J.Y., Deroisy, R. and Rovati, L.C. 2001. Long-term effects of glucosamine sulphate on osteoarthritis progression: a randomised, placebo-controlled clinical trial. *The Lancet*, 357: 251-256.
- Rezende, M.U. and Gomes, R.G. 2009. Tratamento medicamentoso da osteoartrose do joelho. *Revista Brasileira de Ortopedia*, 44: 14-19.
- Richy, F., Bruyere, O., Ethgen, O., Cucherat, M., Henrotin, Y. and Reginster, J.Y. 2003. Structural and symptomatic efficacy of glucosamine and chondroitin in knee osteoarthritis: a comprehensive meta-analysis. *Archives of Internal Medicine*, 13: 1514-1522.
- Ronge, X., Song, L., Zhanyong, G., Huahua, Y., Cuiping, L., Xia, J., Jinhua, F. and Pengcheng, L. 2006. The antioxidant activity of glucosamine hydrochloride in vitro. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 14: 1706-1709.
- Rovati, L.C., Girolami, F. and Persiani, S. 2012. Crystalline glucosamine sulfate in the management of knee osteoarthritis: efficacy, safety, and pharmacokinetic properties. *Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease*, 4: 167-180.
- Runkel, D.R. and Cupp, M.J. 1999. Glucosamine sulfate use in osteoarthritis. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 56: 267-269.
- Russell, A.L. and McCarty, M.F. 2000. Glucosamine for migraine prophylaxis. *Medical Hypotheses*, 55: 195-198.

- Setnikar, I., Palumbo, R., Canali, S. and Zanolo, G. 1993. Pharmacokinetics of glucosamine in man. *Rzneimittelforschung*, 43: 1109-1113.
- Shao, Y., Alluri, R., Mummert, M., Koetter, U. and Lech, S. 2004. A stability-indicating HPLC method for the determination of glucosamine in pharmaceutical formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 35: 625-631.
- Sherman, A.L., Ojeda-Correal, G. and Mena, J. 2012. Use of glucosamine and chondroitin in persons with osteoarthritis. *American Academy of Physical Medicine and Rehabilitation*, 4: 110-116.
- Tekko, I.A., Bonner, M.C. and Williams, A.C. 2006. An optimized reverse-phase high performance liquid chromatographic method for evaluating percutaneous absorption of glucosamine hydrochloride *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41: 385-392.
- Towheed, T.E., Maxwell, L., Anastassiades, T.P., Shea, B., Houpt, J., Robinson, V., Hochberg, M.C. and Wells, G. 2005. Glucosamine therapy for treating osteoarthritis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 18:CD002946.
- Vangsness, C.T., Spiker W. and Erickson J. 2009. A review of evidence-based medicine for glucosamine and chondroitin sulfate use in knee osteoarthritis. *Journal of Arthroscopic and Related Surgery*, 25: 86-94.
- Zhang, L., Liu, W.S., Han, B.Q., Peng, Y.F. and Wang, D.F. 2006. Antitumor activities of Dglucosamine and its derivatives. *Journal of Zhejiang University Science B*, 7: 608-614.
- Zhou, J.Z., Waszkuc, T. and Mohammed, F. 2004. Single laboratory validation of a method for determination of glucosamine in raw materials and dietary supplements containing glucosamine sulfate and/or glucosamine hydrochloride by high-performance liquid chromatography with FMOC-Su derivatization. *Journal of AOAC International*, 87: 1083-1092.

ÖZGEÇMİŞ

AYŞEGÜL SEMİZ
aysegul_semiz@yahoo.com



ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2014-2018	Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Antalya
Lisans	Selçuk Üniversitesi
2006-2011	Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Konya

MESLEKİ VE İDARİ GÖREVLER

Kimyager	Makro Tarım İnş. Tur. Paz. San. Tic. Ltd. Şti. - Antalya
2016-Devam Ediyor	
Kimyager	Kare Tarım Kimya İth. İhr. İnş. Elek. Mak. San. Tic. Ltd. Şti. - Antalya
2015-2016	
Kimyager	Naturmed İlaç, Kimya ve Kozmetik Ltd. Şti / Akdeniz Üniversitesi - Teknokent - Antalya
2014-2015	
Kimyager	Proanaliz Gıda ve Tarımsal Analiz Laboratuvarı - Antalya
2012-2014	
Kimyager	MMT Toprak Analiz Laboratuvarı - Konya
2011 - 2012	