

T.C.  
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İLAÇ ETKEN MADDELERİNİN DENEYSEL TASARIM  
KULLANILARAK YÜKSEK BASINÇLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ  
İLE ANALİZİ

**Gizem YARKADAŞ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimya Anabilim Dalı

Analitik Kimya Programı

Danışman

Doç. Dr. Özlem AKSU DÖNMEZ

Mayıs, 2019

**T.C.**  
**YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**İLAÇ ETKEN MADDELERİNİN DENEYSEL TASARIM KULLANILARAK  
YÜKSEK BASINÇLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ İLE ANALİZİ**

Gizem YARKADAŞ tarafından hazırlanan tez çalışması 29.05.2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Anabilim Dalı **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Özlem AKSU DÖNMEZ

Yıldız Teknik Üniversitesi

Danışman

**Jüri Üyeleri**

Doç. Dr. Özlem AKSU DÖNMEZ, Danışman

Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Bürge AŞÇI, Üye

Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Gönül KUNT KANDEMİR, Üye

Yeni Yüzyıl Üniversitesi

Danışmanım Doç. Dr. Özlem AKSU DÖNMEZ sorumluluğunda tarafımca hazırlanan İlaç Etken Maddelerinin Deneysel Tasarım Kullanılarak Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ile Analizi başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve kaynakçada eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Gizem YARKADAŞ

*Aileme  
ve  
Yalçın ÖNER'e*



## TEŐEKKÜR

---

Bitirme tezimin her aŐamasından bilgi ve deneyimleriyle katkılarda bulunan değerli tez danışmanım Doç. Dr. Özlem AKSU DÖNMEZ' e, katkı ve yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Bürge AŐCI ve Doç. Dr. Őule DİNÇ ZOR'a, yine bu süreçte desteğini ve yardımlarını esirgemeyen Yalçın ÖNER' e teŐekkürü bir borç bilirim.

Mayıs, 2019

Gizem YARKADAŞ



# İÇİNDEKİLER

---

SİMGE LİSTESİ.....	VIII
KISALTMA LİSTESİ .....	IX
ŞEKİL LİSTESİ.....	XI
TABLO LİSTESİ.....	XII
ÖZET .....	XIV
ABSTRACT.....	XVII
1 Giriş.....	1
1.1 Literatür Özeti .....	1
1.2 Tezin Amacı .....	2
1.3 Hipotez.....	3
2 Genel Bilgiler .....	4
2.1 İlaç Etken Maddeleri.....	4
2.2 Deneysel Tasarım.....	38
2.3 Validasyon.....	68
3 Deneysel Bölüm.....	83
3.1 Kullanılan Kimyasallar .....	83
3.2 Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması.....	83
3.3 Kullanılan Cihazlar .....	84
3.4 Yöntem .....	85
3.5 Validasyon.....	86
4 Sonuçlar ve Öneriler .....	88
4.1 Metot Geliştirme ve Optimizasyon.....	88
4.2 Validasyon.....	97

4.3 Tartışma.....	108
Kaynakça.....	111



## SİMGE LİSTESİ

---

k	Faktör sayısı
x	Faktör
N	Deney sayısı
$\alpha$	Farklı tasarımlardaki seviye
X	Tasarım noktalarının matrisi
T	Transpoze
$^{\circ}\text{C}$	Santigrad derece



## KISALTMA LİSTESİ

---

AA-DLLME	Alkol Destekli Dispersif Sıvı-Sıvı Mikroekstraksiyonu
ANOVA	Analysis of Variance
CE	Kapiler Elektroforez
CL	Kemilüminesans
DSC-FTIR	Diferansiyel Tarama Kalorimetrisi-Fourier Dönüşümlü Infrared
EI	Elektron İmpakt İyonlaştırma
ELSD	Evaporatif Işık Saçılması Dedektörü
EMA	Eurepoean Medicines Agency
ESI	Elektrosprey İyonizasyon
ESI-MS	Elektrosprey İyonlaştırmalı Kütle Spektrometresi
ETA-AAS	Elektrotermal Atomlaştırmalı Atomik Absorpsiyon Spektrofotometrisi
FIA	Akış Enjeksiyon Analizi
FI-CE	Akış Enjeksiyonlu Kapiler Elektroforez
FID	Akış Enjeksiyon Online Diyaliz
FLD	Floresans Dedektör
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
GC	Gaz Kromatografisi
GC-AED	Atomik Emisyon Dedektörlü Gaz Kromatografisi
GC-ECD	Elektrokimyasal Dedeksiyonlu Gaz Kromatografisi
GC-FIA	Gaz Kromatografisi-Akış Enjeksiyon Analizi
GC -FID	Alev İyonizasyon Dedektörlü Gaz Kromatografisi
GC-HPLC	Gaz Kromatografisi- Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
GC-MS	Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi
GC-MS/MS	Gaz Kromatografisi-Tandem Kütle Spektrometrisi
GC-SIM-MS	Gaz Kromatografisi-Seçici İyon Görüntüleme-Kütle Spektroskopisi
HILIC	Hidrofilik İnteraksiyon Sıvı Kromatografisi
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
HPTLC	Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi
HPLC-DAD	Fotodiyot Dizili Dedektörlü Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
HPLC-UV	UV Dedektörlü Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

IC	İyon Kromatografisi
ICH	Uluslararası Harmonizasyon Konferansı
IIC	İyon İnteraksiyon Kromatografisi
IMS	İyon Mobilite Spektrometri
IPC	İyon Çifti Kromatografisi
LC	Sıvı Kromatografisi
LC-FLD	Floresans Dedektörlü Sıvı Kromatografisi
LE	Sıvı Ekstraksiyonu
LLE	Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu
LLME	Sıvı-Sıvı Mikroekstraksiyonu
MA-DE	Mikrodalga Destekli Türevleme-Ekstraksiyon
MEEKC	Mikroemülsiyon Elektrokinetik Kromatografisi
MEKC	Misel Elektrokinetik Kromatografisi
MELC	Mikroemülsiyon Likit Kromatografisi
MLC	Misel Sıvı Kromatografisi
MS	Kütle Spektrometrisi
MS/MS	Tandem Kütle Spektrometrisi
MSC	Çoklu Enjektör Kromatografisi
NQR	Çekirdek Kuadropol Rezonans
RR-RP-HPLC	Hızlı Rezolüsyonlu Ters Faz Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
SBSE	Stir-Bar Sorptif Ekstraksiyonu
SFE	Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu
SFE-MAE	Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu- Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon
SPE	Katı Faz Ekstraksiyonu
SPE-SFE	Katı Faz Ekstraksiyonu- Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu
SPME	Katı Faz Mikroekstraksiyonu
TLC	İnce Tabaka Kromatografisi
TNIR	Transmisyon Yakın Kızılötesi Spektroskopisi
UHPLC	Ultra Hızlı Sıvı Kromatografisi
USP	United States Pharmacopoeia
UV	Ultraviyole
UV-DAD	Ultraviyole- Fotodiyot Dizili Dedektör
XRF	X-ışınları Floresans Spektroskopisi

## ŞEKİL LİSTESİ

---

<b>Şekil 2.1</b> Tam faktöriyel tasarım .....	40
<b>Şekil 2.2</b> Tam faktöriyel, kısmi faktöriyel ve birleşik tasarım noktalarının gösterilmesi .....	48
<b>Şekil 2.3</b> Deneysel tasarımın uygulanması. ....	55
<b>Şekil 4.1</b> Etkili olan faktörler ve faktörlerin birbirleri ile olan etkileşimleri için Pareto grafiği .....	93
<b>Şekil 4.2</b> Ana faktörlerin rezolüsyon üzerindeki etkileri .....	93
<b>Şekil 4.3</b> Tahmini R değerleri ve deneysel R değerleri arasındaki ölçü grafiği .....	94
<b>Şekil 4.4</b> Box-Behnken tasarımı ile elde edilen cevap yüzey grafikleri .....	95
<b>Şekil 4.5</b> Fenilefrin hidroklorür, guaifenesin, pirilamin maleat ve parasetamolün HPLC ile elde edilen kromatogramı.....	97
<b>Şekil 4.6</b> Fenilefrin için doğrusallık grafiği .....	98
<b>Şekil 4.7</b> Guaifenesin için doğrusallık grafiği .....	99
<b>Şekil 4.8</b> Pirilamin maleat için doğrusallık grafiği .....	100
<b>Şekil 4.9</b> Parasetamol için doğrusallık grafiği.....	102

## TABLO LİSTESİ

<b>Tablo 2.1</b> Fenilefrin hidroklorürün HPLC ile analizleri .....	5
<b>Tablo 2.2</b> Fenilefrin hidroklorürün diğer yöntemlerle analizleri .....	7
<b>Tablo 2.3</b> Guaifenesinin HPLC ile analizleri .....	10
<b>Tablo 2.4</b> Guaifenesinin diğer yöntemlerle analizleri .....	14
<b>Tablo 2.5</b> Pirilamin maleatın HPLC ile analizleri.....	17
<b>Tablo 2.6</b> Pirilamin maleatın diğer yöntemlerle analizleri .....	18
<b>Tablo 2.7</b> Parasetamolün HPLC ile analizleri.....	20
<b>Tablo 2.8</b> Parasetamolün diğer yöntemlerle analizleri.....	24
<b>Tablo 2.9</b> Fenilefrin hidroklorür, guaifenesin, pirilamin maleat ve parasetamolün ikili ve üçlü bir arada tayin yöntemleri.....	32
<b>Tablo 2.10</b> 3 faktör için faktöriyel tasarım .....	41
<b>Tablo 2.11</b> $2^{(6-2)}$ 16 deney için fraksiyonlu faktöriyel tasarım.....	43
<b>Tablo 2.12</b> Plackett-Burman tasarımı için üreticiler .....	45
<b>Tablo 2.13</b> 11 faktör için Plackett-Burman tasarımı .....	45
<b>Tablo 2.14</b> 3 faktör için merkezi kompozit tasarım.....	49
<b>Tablo 2.15</b> 3 faktör için Box-Behnken tasarımı .....	51
<b>Tablo 2.16</b> 3 faktör için Doehlert tasarımı.....	52
<b>Tablo 2.17</b> İlaç örneklerinin ve çeşitli örneklerin analizinde HPLC ile uygulanan deneysel tasarım yöntemleri .....	56
<b>Tablo 2.18</b> Analitik yöntemlerin kategorilerine göre gerekli validasyon parametreleri.....	72
<b>Tablo 3.1</b> İncelenen faktörler ve seviyeleri .....	85
<b>Tablo 4.1</b> Box-Behnken tasarımı ve belirtilen şartlarda elde edilen ayırma gücü değerleri.....	89
<b>Tablo 4.2</b> Regresyon analizi sonuçları.....	91
<b>Tablo 4.3</b> ANOVA testi sonuçları.....	92
<b>Tablo 4.4</b> Faktörlerin kodlu ve gerçek optimum değerleri .....	96
<b>Tablo 4.5</b> Fenilefrin hidroklorür ölçü eğrisine ait pik alanları değerleri.....	98
<b>Tablo 4.6</b> Fenilefrin hidroklorür ölçü eğrisine ait regresyon analizi sonuçları.....	98
<b>Tablo 4.7</b> Guaifenesin ölçü eğrisine ait pik alanları değerleri.....	99
<b>Tablo 4.8</b> Guaifenesin ölçü eğrisine ait regresyon analizi sonuçları .....	99

<b>Tablo 4.9</b> Pirilamin maleat ölçü eğrisine ait pik alanları değerleri.....	100
<b>Tablo 4.10</b> Pirilamin maleat ölçü eğrisine ait regresyon analizi sonuçları.....	100
<b>Tablo 4.11</b> Parasetamol ölçü eğrisine ait pik alanları değerleri.....	101
<b>Tablo 4.12</b> Parasetamol ölçü eğrisine ait regresyon analizi sonuçları.....	102
<b>Tablo 4.13</b> Gün içi tekrarlanabilirlik sonuçları.....	103
<b>Tablo 4.14</b> Günler arası tekrarlanabilirlik sonuçları .....	104
<b>Tablo 4.15</b> % Geri kazanım sonuçları.....	105
<b>Tablo 4.16</b> Tanıma ve hesaplanabilirlik limiti sonuçları.....	106
<b>Tablo 4.17</b> Örnek analizi sonuçları.....	107



## İlaç Etken Maddelerinin Deneysel Tasarım Kullanılarak Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi ile Analizi

Gizem YARKADAŞ

Kimya Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Özlem AKSU DÖNMEZ

Bu çalışmada soğuk algınlığı preparatlarında etken madde olarak kullanılan fenilefrin hidroklorür, guaifenesin, pirilamin maleat ve parasetamolün bir arada tayini için gradient HPLC yöntemi geliştirildi. Deneysel tasarım yöntemlerinden 4 faktörlü, 3 seviyeli Box-Behnken tasarımı kullanılarak yöntemin optimizasyonu yapıldı. pH, akış hızı ile gradient 1 ve gradient 2'deki asetonitril : fosfat tamponu hareketli faz sisteminin % fosfat tamponu miktarları olmak üzere 4 faktör belirlendi. Seviyeler pH için 2,5 - 3,0 - 3,5; akış hızı için 0,8 - 1,0 - 1,2 mL/dak, gradient 1 için 85 - 90 - 95, gradient 2 için ise 70 - 75 - 80 % fosfat tamponu olarak belirlendi. Faktörlerin düşük seviyeleri için (-1), orta seviyeleri için (0) ve yüksek seviyeleri için (+1) kodları kullanıldı ve toplam 27 deney yapıldı. İncelenen faktörlerin HPLC kromatogramındaki piklerin ayırma gücü üzerine bireysel ve birbirleri ile olan etkileşimlerinin etkileri incelendi. Optimizasyon tasarımı ile elde edilen verilere regresyon analizi yapıldı. Sonuçların doğruluğunu test etmek için ANOVA yapıldı. Elde edilen sonuçlardan iki gradient basamağında fosfat tamponu oranının ve bunların ikili etkileşimlerinin ayırma gücü üzerinde etkili olduğu görüldü. Ayırma gücüne ait matematiksel bir model regresyon sonuçları kullanılarak elde edildi. Bu modelden teorik ayırma gücü değerleri bulundu. Teorik

ayırma gücü değerleri ile deneysel ayırma gücü değerleri arasındaki ilişki incelenerek modelin uygunluğu test edildi ve bulunan korelasyon katsayısına göre (0,9820) modelin uygun olduğuna karar verildi.

Elde edilen modele göre kromatografik şartlar; hareketli fazın pH'ı 3,5; gradient 1 için %95 fosfat tamponu; gradient 2 için %80 fosfat tamponu ve akış hızı 0,8 mL/dak olarak belirlendi. Belirlenen optimum şartlarda parasetamol için 250 nm, diğer etken maddeler için ise 220 nm'de spektrofotometrik dedektör kullanılarak kromatogramlar kaydedildi.

Geliştirilen yöntem doğrusalık, tekrarlanabilirlik, doğruluk (% geri kazanım), tanıma - hesaplanabilirlik limiti (LOD-LOQ) parametreleri incelenerek valide edildi. Doğrusalık için yapılan çalışmalarda regresyon katsayıları ( $R^2$ ) fenilefrin hidroklorür, guaifenesin, pirilamin maleat ve parasetamol için sırasıyla 0,9997; 0,9998; 0,9998 ve 0,9999 olarak bulundu. Gün içi tekrarlanabilirlik testlerinde %RSD değerleri fenilefrin hidroklorür için 0,99 - 1,94; guaifenesin için 0,25 - 1,89; pirilamin maleat için 0,66 - 1,92 ve parasetamol için 0,18 - 0,66 aralığında; günler arası tekrarlanabilirlik testlerinde ise %RSD değerleri fenilefrin hidroklorür için 1,38 - 1,92; guaifenesin için 0,33 - 1,06; pirilamin maleat için 1,29 - 1,82 ve parasetamol için 0,89- 1,98 aralığında bulundu. Doğruluk için, incelenen maddeleri içeren örnek çözeltisi içine 3 farklı konsantrasyonda fenilefrin hidroklorür, guaifenesin, pirilamin maleat ve parasetamol ilave edilerek analiz yapıldı. Fenilefrin hidroklorür için %99,20 - %101,53; guaifenesin için %103,13 - %104,30; pirilamin maleat için %98,72 - %99,42 ve parasetamol için %101,60 - %102,80 aralığında geri kazanım değerleri elde edildi. Fenilefrin hidroklorür, guaifenesin pirilamin maleat ve parasetamol için sırası ile tanıma limiti; 0,42; 0,25; 0,34; 0,32  $\mu\text{g/mL}$ , hesaplanabilirlik limiti; 1,41; 0,83; 1,14; 1,07  $\mu\text{g/mL}$  olarak hesaplandı.

Fenilefrin hidroklorür, guaifenesin, pirilamin maleat ve parasetamolün bir arada analizi için geliştirilen HPLC yöntemi Peditus adlı şurup preparatına başarıyla uygulandı. Fenilefrin hidroklorür için %98,33; guaifenesin için %101,70; pirilamin maleat için %98,66 ve parasetamol için %102,15 geri kazanım değerleri elde edildi.

**Anahtar Kelimeler:** Parasetamol, guaifenesin, fenilefrin hidroklorür, pirilamin maleat, deneysel tasarım, HPLC



---

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



# High Pressure Liquid Chromatography Analysis of Drug Active Ingredients Using Experimental Design

Gizem YARKADAŞ

Department of Chemistry

MSc. Thesis

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Özlem AKSU DÖNMEZ

In this study, a gradient HPLC method was developed for simultaneous analysis of phenylephrine hydrochloride, guaifenesin, pyrilamine maleate and paracetamol used as active ingredient in cough-cold syrup preparations. The experimental design method was used to optimize the method using 3 levels 4 factors Box-Behnken design. pH, flow rate, % phosphate buffer ratio in mobile phase system were selected as factors. The levels were determined as pH 2.5 – 3.0 – 3.5, flow rate 0.8 – 1.0 – 1.2, gradient 1 85% – 90% – 95%, gradient 2 70% – 75% – 80%. The codes; (-1), for low levels, (0) for intermediate and (+1) for high levels of the factors were used. 27 experimental runs were randomly carried out. Effects of these factors and the interactions between them on resolution between peaks in HPLC chromatogram were analyzed. Regression analysis was performed on data obtained by the optimization design. ANOVA was performed to test reliability of the results. In studies, it was determined that mobile phase ratio for gradient 1, gradient 2 and quadratic contribution of mobile phase ratio can influence the resolution significantly. A mathematical model related to resolution was obtained using regression results. According to the data obtained from regression results, a model was created with respect to the resolution. Theoretical resolution values

were obtained from the model. The relationship between these values and the experimental values has been examined to test the suitability of the model. Correlation coefficient was found 0.9820 and the model was determined to be appropriate.

According the model chromatographic conditions were found as pH 3.5; flow rate 0.8 mL min<sup>-1</sup>, gradient 1 95% phosphate buffer and gradient 2 80% phosphate buffer.

The chromatograms were recorded by using spectrophotometric detector at 250 nm for paracetamol and 220 nm for other active substances at the optimum conditions.

Analytical method validation was made by the examination of linearity, repeatability, accuracy (recovery %), limit of quantification, limit of detection parameters. In studies for linearity, the regression coefficients (R<sup>2</sup>) for phenylephrine hydrochloride, guaiphenesin pyriline maleate and paracetamol were found 0.9997; 0.9998; 0.9998 and 0.9999 respectively.

The RSD% values of the intra-day repeatability analysis were found in the range of 0.99 – 1.94 for phenylephrine hydrochloride; 0.25 – 1.89 for guaiphenesin; 0.66 – 1.92 for pyriline maleate; 0.18 – 0.66 for paracetamol and inter-day repeatability analysis were found in the range of 1.38 – 1.92 for phenylephrine hydrochloride; 0.33 – 1.06 for guaiphenesin; 1.29 – 1.82 for pyriline maleate and 0.89 – 1.98 for paracetamol. In order to calculate accuracy, analyses were performed by the addition of 3 different concentrations of pyriline maleate, guaiphenesin, phenylephrine hydrochloride and paracetamol into the examined samples which contain the substances.

The recovery percentage values were obtained in the range of 99.20% – 101.53% for phenylephrine hydrochloride; 103.13% – 104.30% for guaifenesin; 98.72% – 99.42% for pyriline maleate and 101.60% – 102.80% for paracetamol. Limit of detection values were calculated for phenylephrine hydrochloride, guaifenesin, pyriline maleate and paracetamol as 0.42; 0.25; 0.34; 0.32 µg/mL and the limit of quantification values were calculated for phenylephrine hydrochloride, guaifenesin, pyriline maleate and paracetamol as 1.41; 0.83; 1.14; 1.07 µg/mL.

The developed HPLC method for the simultaneous determination of phenylephrine hydrochloride, guaiphenesin, pyrilamine maleate and paracetamol was applied to Peditus syrup preparations, successfully. The recovery percentage values were obtained respectively 98.33% for phenylephrine hydrochloride; 101.70% for guaiphenesin, 98.66% for pyrilamine maleate and 102.15% for paracetamol.

**Keywords:** Paracetamol, guaiphenesin, phenylephrine hydrochloride, pyrilamine maleate, experimental design, HPLC



### 1.1. Literatür Özeti

Çoklu ilaç karışımlarının hızlı, duyarlı, seçici ve güvenilir yöntemlerle analizi hem insan sağlığı açısından hem de ilaç kalite kontrol işlemlerinin doğru ve pratik olarak uygulanabilirliği açısından oldukça önemli bir yere sahiptir. Dolayısıyla ilaç endüstrisinde performansı yüksek güçlü analitik yöntemlerin geliştirilmesi her zaman bir ihtiyaç oluşturmaktadır.

HPLC yöntemi günümüzde, birden fazla etken maddenin ve çeşitli katkı maddelerinin (boya, tatlandırıcı, koruyucu gibi) bulunduğu ilaç preparatlarının analizinde en çok tercih edilen yöntemler arasındadır. Bu yöntemin üstünlükleri arasında, yüksek performansı, karışımları ön işleme tabi tutmadan ayırma ve tayin edebilme gücü, hızı ve oldukça iyi duyarlılığa sahip olması sayılabilir.

Bu çalışmada bebek ve çocukların soğuk algınlığı tedavisinde kullanılan "Peditus" adlı şurup, fenilefrin hidroklorür, guaifenesin, pirilamin maleat, parasetamol ve çeşitli katkı maddeleri içermektedir. İlaç içeriğini oluşturan bu etken maddelerin ayrı ayrı tek başlarına ya da diğer maddelerle birlikte analizine yönelik HPLC başta olmak üzere birçok yöntem literatürde bulunmaktadır. İlaç preparatlarında dekonjestan olarak kullanılan fenilefrin hidroklorür, HPLC [2 - 17], spektrofotometri [27 - 38], elektroforez [23 - 44] ve elektroanalitik [39 - 41] olmak üzere birçok yöntemle analiz edilmiştir. Literatür araştırmasında, balgam söktürücü etkisiyle bilinen guaifenesin tayini için ağırlıklı olarak HPLC ve spektrofotometrenin kullanıldığı çeşitli yayınlara rastlanmıştır [43 - 73]. Antihistaminik etki gösteren pirilamin maleat ile ilgili çalışmalar ise oldukça kısıtlı olup kromatografik [98 - 101] ve spektrofotometrik [106 - 108] birkaç yayın bulunmaktadır. Parasetamol, birçok ilaç preparatında analjezik olarak sıklıkla kullanılan ve uzun yıllardan beri çeşitli örneklerde analizi yapılan bir ilaç maddesidir. Son yıllarda yapılan parasetamol analizlerinde HPLC [110 - 150] başta

olmak üzere elektroanalitik [236 – 239] ve spektrofotometrik [202 – 230] pek çok yöntem kullanılmıştır. Ayrıca çalışılan maddelerin, HPLC başta olmak üzere çeşitli yöntemlerle, ikili ve çoklu kombinasyonlar halinde ve başka ilaç etken maddeleri ile bir arada miktar tayinleri yapılmıştır [278 – 317]. Ancak 4 etken maddenin bir arada tayin edildiği herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Yöntem geliştirme ve optimizasyonda deneysel tasarım yöntemleri son yıllarda sıklıkla kullanılmaktadır. Bir deneysel çalışmada doğru ve güvenilir sonuçların eldesi için, o deneyin performansını etkileyecek parametrelerin belirlenmesi ve kontrolü oldukça önemlidir. Çalışılan deneysel yöntemde, deney sonuçlarını etkileyebilecek herhangi bir deneysel parametre faktör olarak adlandırılır. Etkili faktörlerin tespiti sonrası bu faktörlerin en uygun değerleri ile yapılan bir çalışma ise cevap sinyalini büyütürken maddelerin çok küçük miktarlarının bile analizine olanak sağlamaktadır. Klasik yöntemlerle optimizasyonda, bir faktörün değerini değiştirme, diğerlerini ise sabit tutma yöntemi ile faktörlerin optimum değerleri belirlenmektedir. Ancak fazla sayıda faktör incelendiğinde çok sayıda deney yapılması gerekmekte ve bu da hem zaman alıcı hem de maliyetli olmaktadır. Optimizasyonda deneysel tasarım yöntemleri kullanıldığında ise deney sayısı ve buna bağlı olarak harcanan süre ve maliyet azalmaktadır. Ayrıca faktörlerin birbirlerinden bağımsız etkilerinin yanında, birbirleri ile olan etkileşimleri ve bu etkileşimlerin deney sonuçlarına olan etkisinin de incelenebilmesi bu yöntemlerin diğer üstünlüklerindedir. Böylelikle deneysel tasarım yöntemleri ile optimizasyonla, klasik yöntemlere göre daha güvenilir sonuçlar elde edilmektedir. İlaç ve biyolojik örneklerinin HPLC ile analizinde deneysel tasarım yöntemleri sıklıkla kullanılmış ve deney koşullarının optimizasyonu güvenilir bir şekilde yapılmıştır [358 – 467].

## **1.2. Tezin Amacı**

Bu tezde fenilefrin hidroklorür, guaifenesin, pirilamin maleat ve parasetamolün bir arada analizine yönelik HPLC yönteminin geliştirilmesi, deneysel tasarım kullanılarak optimum ayırma koşullarının belirlenmesi, geliştirilen yöntemin validasyonu ve bu etken maddeleri içeren ilaç formülasyonlarına uygulanması amaçlanmıştır.

### **1.3. Hipotez**

Fenilefrin hidroklorür, guaifenesin, pirilamin maleat ve parasetamolün bir arada analizi için geliştirilecek HPLC yönteminin farklı matriks içeren ilaç karışımlarına ve çeşitli biyolojik örneklerle kolaylıkla uygulanabileceği düşünülmektedir. Ayrıca deneysel tasarım kullanılarak optimum kromatografik koşulların belirlenmesi sayesinde geliştirilen yöntemin, daha az sayıda enjeksiyon ve daha az çözücü sarfiyatı ile klasik optimizasyona göre daha kısa, daha ucuz ve daha çevreci olması beklenmektedir. Bunların yanında deneysel tasarım ile deneyi etkileyen bütün faktörlerin bireysel ve birbirleriyle etkileşimi ve deney sonucuna tüm bunların etkisi incelediğinden klasik optimizasyona göre daha doğru sonuçlar elde edileceği öngörülmektedir.

Bu tez çalışmasında deneysel tasarım kullanılarak geliştirilmesi ve validasyonu amaçlanan HPLC yönteminin, ilaç kalite kontrol laboratuvarlarında incelenen etken maddelerin rutin analizlerine yönelik güvenilir bir yöntem olarak önerilebileceği ve böylelikle bilim ve ilaç sanayine katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.

## 2.1. İlaç Etken Maddeleri

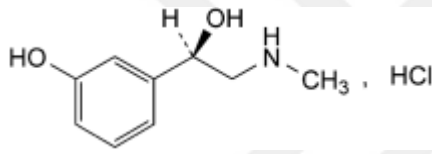
### 2.1.1. Fenilefrin Hidroklorür

(European Pharmacopoeia, 01/2008:0632)

#### 2.1.1.1. Özellikleri

Kapalı formülü:  $C_9H_{14}ClNO_2$

Yapısal formülü:



Kimyasal Adı:

1. Benzenmetanol,-[1-(metilamino)etil]-, hidroklorür [R-(R\*,S\*)], tuzu
2. (1R)-1-(3-Hidroksifenil)-2-(Metilamino)Etanol hidroklorür

Molekül ağırlığı: 203,7 g/mol

Renk ve görünüşü: Beyaz kristal toz.

Erime noktası: 143°C

Çözünürlüğü: Suda ve alkolde serbestçe çözünür.

#### 2.1.1.2. Farmakolojik Etkisi

Fenilefrin; oral solüsyonlar, burun spreyleri ve göz damlalarında kullanılmakta olan bir dekonjestandır [1]. Kan damarlarını büzerek kan basıncını yükseltici, gözbebeklerini genişletici, burun konjestiyonunu hafifletici etkilere sahip adrenerjik bir ilaçtır.

Midriyazis ve hipertansiyon gibi yan etkileri bulunur. Ayrıca çeşitli göz rahatsızlıklarında ve göz incelemesi esnasında midriyatik olarak damla formunda kullanılmaktadır. Mao inhibitörleri ile birlikte kullanılmamalıdır.

### 2.1.1.3. Miktar Tayini Yöntemleri

Fenilefrin güncel birçok farmasötik formülasyonda yaygın olarak kullanılan bir etken maddedir. Bu sebeple uzun yıllardan beri gerek tek başına, gerekse ikili ve üçlü birçok kombinasyon içinde analizi yapılmıştır. Fenilefrin hidroklorürün HPLC ile yapılan analizleri Tablo 2.1'de, diğer yöntemlerle yapılan analizleri ise Tablo 2.2'de verilmiştir.

**Tablo 2.1** Fenilefrin hidroklorürün HPLC ile analizleri

Örnek	Diğer madde	Kolon	Hareketli Faz	Dedektör	Kaynak
İnsan kan plazması	-	-	-	Floresans	[2]
İnsan kan serumu	-	-	-	Floresans	[3]
İlaç örnekleri	Dekstrometorfan, difenhidramin, fenilpropanolamin, psödoefedrin	-	-	-	[4]
İlaç örnekleri	Bromheksin HCl, klorfeniramin maleat, kodein fosfat, dekstrometorfan HBr, difenhidramin HCl, efedrin HCl, papaverin HCl	Ultrasphere Spherical CN (250 mm x 4,6 mm, 5 µm)	Su:asetonitril: etanol (38:60:2)	İndirekt kondüktometrik	[5]
İnsan kan plazması	Fenilefrin türevleri	ODS	-	Elektrokimyasal	[6]
İnsan kan serumu	Orsiprenalin	C18 (250 mm x 4,6 mm ve 50mm x 4,6 mm)	Metanol:50 mM pH 3,2 fosfat tamponu (10:90)	Kulometrik	[7]
Nazal solüsyonlar	Glutarik asit, benzil alkol	-	-	UV	[8]



**Tablo 2.1** Fenilefrin hidroklorürün HPLC ile analizleri (devamı)

İlaç örnekleri	Klorfeniramin maleat	C18(200 mm x 4,6 mm, 5 µm)	Metanol: pH 7,2 fosfat tamponu (70:30)	UV	[9]
İlaç örnekleri	Klorfeniramin maleat, metskopolamin nitrat	Phenomenex CN 5-µm (250 mm x4,6 mm)	Asetonitril: su (70:30)	UV	[10]
İnsan göz sıvısı	Tropikamid	Lichrospher 100 CN (250 mm x 4 mm, 5 µm)	0,01M oktan sülfonik asit : asetonitril (65:35)	UV	[11]
İlaç örnekleri	Klorfeniramin, fenilpropanolamin , psödoefedrin	C18	0,15 M SDS - %6 pentanol	UV	[12]
İlaç örnekleri	Dekstrometorfan HBr, klorfeniramin maleat, metil paraben, propil paraben, sodyum benzoat, efedrin HCl, benzoik asit	ODS	Asetonitril: pH 2,7 fosfat tamponu (40:60)	UV	[13]
İlaç örnekleri	Klorfeniramin maleat, metskopolamin	Novapak silika kolon (7,5 cm)	Metanol: 1-pentansülfonik asit sodyum tuzu (%0,5) (93:7)	UV	[14]
İlaç örnekleri	Dekstrometorfan HBr, karbinoksamin maleat	C18	Asetonitril, sodyum perklorat	UV	[15]
İnsan kan plazması	-	Pentaflorofenilpropil silika kolon (50 mm x 4 mm, 3 µm)	Metanol: 10mM amonyum asetat (90:10)	MS/MS	[16]
İnsan kan plazması	-	BEH HILIC	10 mM pH 3,5 amonyum format tamponu : asetonitril (10:90)	MS/MS	[17]

**Tablo 2.1** Fenilefrin hidroklorürün HPLC ile analizleri (devamı)

İlaç örnekleri	Parasetamol, kafein, setirizin dihidroklorür, nimesulid	Kinetex-C18 (4,6 mm, 150 mm, 5 mm)	10 mM pH 3,3 fosfat tamponu : asetonitril	DAD	[18]
İlaç örnekleri	Ambroksol hidroklorür, levosetirizin hidroklorür, parasetamol	Nucleosil C18 (250 mm × 4,6 mm × 5 µm)	Metanol: sodyum fosfat (65: 35 )	UV	[19]
İlaç örnekleri	Klorfeniramin maleat, parasetamol	Phenomenex Luna CN 100A(250× 4,6 mm×5 µm)	pH 6,2 fosfat tamponu : asetonitril (70:30)	UV	[20]
İlaç örnekleri	Setirizin hidroklorür	C18 (220 mm × 4,6 mm, 10 µm)	Metanol: asetonitril: disodyum hidrojen fosfat (80:4:19)	UV	[21]
İlaç örnekleri	Klorfeniramin maleat, ibuprofen	Inertsil ODS C18	Metanol : % 0,1' lik trietillamin (55:45)	UV	[22]
İlaç örnekleri	Ketorolak trometamin	Zorbax eclipse plus C8 (4,6 mm × 250 mm, 5 µm)	0,05 M o-fosforik asit : asetonitril (50:50)	DAD	[23]
İlaç örnekleri	Siklopentolat hidroklorür	Waters Spherisorb ODS2 C18 (5 µm)	% 0,1heptan-1-sülfonik asit tuzu : metanol (80:20)	UV	[24]

**Tablo 2.2** Fenilefrin hidroklorürün diğer yöntemlerle analizleri

Örnek	Diğer Maddeler	Analiz Yöntemi	Kaynak
İlaç örnekleri	-	FIA-Kemilüminesans	[25]
İlaç örnekleri	-	FIA-SPE-Spektrofotometri	[26]
İlaç örnekleri	-	SIA-Spektrofotometri	[27]

**Tablo 2.2** Fenilefrin hidroklorürün diğer yöntemlerle analizleri (devamı)

İlaç örnekleri	-	Potansiyometri	[28]
İlaç örnekleri	Lignokain HCl	HPTLC	[29]
İlaç örnekleri	Dekstrometorfan, difenhidramin	Kapiler Elektforez	[30]
İlaç örnekleri	Nafazolin, difenhidramin	Kapiler Elektforez	[31]
İlaç örnekleri	Prednizolon, nafazolin	MEKC	[32]
İlaç preparatları ve biyolojik sıvılar	-	Kemilüminesans	[33]
İlaç örnekleri	Efedrin	Spektrofotometri	[34]
İlaç örnekleri	Karbinoksamin maleat	Spektrofotometri	[35]
Nazal solüsyonlar	Klorfeniramin maleat	Spektrofotometri	[36]
İlaç örnekleri	Orfenadrin sitrat	Spektrofotometri	[37]
Nazal solüsyonlar	-	Spektrofotometri	[38]
Nazal solüsyonlar	Trimazolin	Spektrofotometri	[39]
Oftalmik solüsyonlar	Tropikamid	Spektrofotometri	[40]
İlaç örnekleri	-	Spektrofotometri-FIA	[41]
Oftalmik solüsyonlar	Kloramfenikol, antipirin, metil paraben, timerosal (tiyomersal)	Spektrofotometri-kemometri	[42]
Nazal solüsyonlar	Difenhidramin, nafazolin, metil paraben	Spektrofotometri-kemometri	[43]
İlaç örnekleri	Klorfeniramin maleat	Spektrofotometri-kemometri, HPLC-UV	[44]

**Tablo 2.2** Fenilefrin hidroklorürün diğer yöntemlerle analizleri (devamı)

İlaç örnekleri	Guaifenesin	Spektroflorometri	[45]
İnsan idrar örneği	-	Voltametri	[46]
İlaç örnekleri	Klorprotiksen	Voltametri	[47]
İlaç örnekleri	-	Voltametri	[48]
İlaç örnekleri	Ketorolak trometamin	Spektrofotometri-kemometri	[49]
İlaç örnekleri	Ketorolak trometamin, klorfeniramin maleat	HPTLC	[50]
İlaç örnekleri	Klorfeniramin maleat, parasetamol, kafein	HPTLC	[51]
İlaç örnekleri	İbuprofen	Elektroforez	[52]

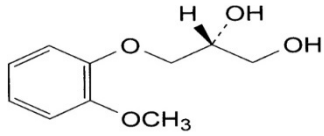
## 2.1.2. Guaifenesin

### 2.1.2.1. Özellikleri

(European Pharmacopoeia, 04/2018:0615)

Kapalı formülü:  $C_{10}H_{14}O_4$

Yapısal formülü:



Kimyasal Adı: (2RS)-3-(2-Metoksifenoksi)propan-1,2-diol.

Molekül ağırlığı: 198,2 g/mol

Renk ve görünüş: Beyaz kristalize toz.

Erime noktası: 79°C - 83°C.

Çözünürlüğü: Suda kısmen çözünür, alkolde çözünür.

### 2.1.2.2. Farmakolojik Etkisi

Guaifenesin, gayakolun gliserolle yaptığı esterdir. Bronş salgısını, bezler üzerindeki direkt etkisi ile stimüle eder. Guaifenesin kronik bronşit, öksürük, bronşektazi ve diğer hastalıklar için kullanılan bir balgam söktürücüdür. Ekspektoran ilaçlar, genellikle ağız yolundan sistemik olarak uygulanan ve solunum yollarında birikmiş balgamı sulandırıp yapışkanlığını azaltmak suretiyle öksürükle dışarı atılmasını kolaylaştıran ilaçlardır.

Yüksek dozda alındığında kusma, bulantı, diyare, baş ağrısı, sancılı idrara çıkma, sinirlilik, uyuyamama, deri döküntüsü gibi etkileri görülebilir [53].

### 2.1.2.3. Miktar Tayini Yöntemleri

Guaifenesin ile yapılan çalışmalar arasında ağırlıklı olarak kromatografik ve spektrofotometrik yöntemler bulunmaktadır. Guaifenesin etken maddesinin HPLC ile yapılan analizleri Tablo 2.3'te, diğer yöntemlerle yapılan analizleri ise Tablo 2.4'te verilmiştir.

**Tablo 2.3** Guaifenesinin HPLC ile analizleri

Örnek	Diğer madde	Kolon	Hareketli Faz	Dedektör	Kaynak
İlaç örnekleri	Efedrin hidroklorür	C18	Fosfat tamponu : metanol (60:40)	DAD	[54]
İnsan kan plazması	-	C18	Metanol : su (60:40)	UV	[55]
İlaç örnekleri	Benzonat, difenhidramin hidroklorür, fenilefrin hidroklorür	C18	Fosfat tampon :asetonitril : trietilamin (49:50:1)	UV	[56]
İlaç örnekleri	Terbutalin sülfat, ambroksol hidroklorür	C18	Fosfat tamponu, asetonitril, metanol	UV	[57]
İlaç örnekleri	Ambroksol hidroklorür, teofilin	C18	Fosfat tamponu: metanol: asetonitril:trietilamin (63,5:27,5:9:0,25)	UV	[58]

**Tablo 2.3** Guaifenesinin HPLC ile analizleri (devamı)

İnsan kan serumu	-	C18	Metanol, fosfat tamponu	UV	[59]
İlaç örnekleri	Ambroksol, salbutamol	C8	Disodyum hidrojen fosfat, metanol	UV	[60]
İlaç örnekleri	Metokarbamol, diklofenak potasyum, ibuprofen	C18	Monopotasyum fosfat, asetonitril, metanol	UV	[61]
İlaç örnekleri	Metokarbamol	Fenil	Ortofosforik asit, asetonitril (80:20)	Floresans	[62]
İlaç örnekleri	Ambroksol hidroklorür, salbutamol sülfat	C8	Potasyum dihidrojen fosfat, metanol (58:42)	UV	[63]
İlaç örnekleri	Sodyum benzoat	CN	Asetonitril : su (20:80)	UV	[64]
İlaç örnekleri	Bromheksin hidroklorür, terbutalin sülfat	C18	Fosfat tamponu :asetonitril (80:20) ve (60:40)	UV	[65]
İlaç örnekleri	Fenilefrin hidroklorür , ambroksol hidroklorür, levosetirizin	C8	Fosfat tamponu, metanol, asetonitril	UV	[66]
İlaç örnekleri	Psödoefedrin, feniramin, pirilamin, dekstrometorfan, klorfeniramin	C18	Metanol :dihidrojen fosfat (45:55)	UV	[67]
İlaç örnekleri	Metil paraben, propil paraben	Fenil	Tampon çözelti : asetonitril (25:75)	DAD	[68]
İlaç örnekleri	Dekstrometorfan	C18	Fosfat tamponu : asetonitril : metanol (62:23:15)	Floresans	[69]
İlaç örnekleri	Psödoefedrin, dekstrometorfan, kodein	Silika	Fosfat tamponu : asetonitril (60:40)	UV	[70]

**Tablo 2.3** Guaifenesinin HPLC ile analizleri (devamı)

İlaç örnekleri	Asetaminofen, romisoval, buletin, kafein, dekstrometorfan hidrojen bromür, klorfeniramin maleat, etoksibenzamid, metilefedrin - noskapin HCl	ODS	Fosfat tampon :asetonitril (85:15)	UV	[71]
İlaç örnekleri	Psödoefedrin HCl, dekstrometorfan HBr	ODS	Metanol : amonyum fosfat tamponu (45: 55)	-	[72]
İlaç örnekleri	Fenilpropanol HCl, dekstrometorfan HBr, sodyum benzoat	C18	-	UV	[73]
İnsan kan plazması	Psödoefedrin	C8	Sodyum heptan sülfonat : asetonitril (70:30)	UV	[74]
İlaç örnekleri	Teofilin	-	Sodyum dihidrojen fosfat:metanol: asetonitril (8:2:1)	UV	[75]
Köpek kan plazması	-	ODS	Metanol: asetonitril: fosfat tamponu (11:11:78)	UV	[76]
İnsan kan plazması	-	C18	Su : metanol : asetik asit (60:40 :1.5)	UV	[77]
İnsan kan plazması	Ketorolak enantiyomer	Polisakkarit bazlı kiral kolon	Hekzan:izopropanol: trifloroasetik asit (85:15:0,05)	UV	[78]
İlaç örnekleri	Fenilefrin HCl, parasetamol, efedrin HCl, doksilamin sukkinat,dekstrometorfan HBr	C18	Çeşitli pH değerlerinde tampon çözeltiler	UV	[79]
İlaç örnekleri	Fenilefrin, parasetamol	Monolitik kolon	-	-	[80]
İlaç örnekleri	-	C18	Su : metanol : glasiyel asetik asit (60:40:1,5)	UV	[81]

**Tablo 2.3** Guaifenesinin HPLC ile analizleri (devamı)

İlaç örnekleri	Ambroksol, loratidin	Kromasil C8 (250 × 4,6 mm, 5 µm)	% 0,1' lik ortofosforik asit : asetonytril (60:40)	UV	[82]
İlaç örnekleri	Psödoefedrin HCl	Hidrosorb RP-C18 250 mm × 4,6 mm, 5 µm	Metanol: su (50:50)	UV	[83]
İlaç örnekleri	Bromheksin, ambroksol, salbutamol/terbutalin, psödoefedrin, triprolidin, klorfeniramin maleat	Gemini® NX C18 (250 × 4,6 mm, 5 µm)	Asetonytril : 0,25 M sodyum hekzasülfonat : 0,2 M amonyum asetat : pH 3,0 su (35:4:10:51)	UV	[84]
İlaç örnekleri	Salbütamol sülfat, amroksol hidroklorür	Inertsil C8-3 (250 × 4,6 mm, 5 µm)	pH 3,0 sodyum dihidrojen fosfat tampon : asetonytril : metanol (65:10:25)	UV	[85]
İlaç örnekleri	Terbutalin sülfat	Phenomenex Luna C18 (4,6x250 mm 5µm)	Metanol : amonyum format tamponu (45:55)	UV	[86]
İlaç örnekleri	Metokarbamol ve aspirin	C18	pH 3,2 seyreltik asetik asit : asetonytril (79:21)	UV	[87]
İlaç örnekleri	Pentoksiverin sitrat	CAPCELL PAK C18 MG S-5	Asetonytril : trietilamin fosforik asit tamponu (pH 2,6±0,05)(33:67)	UV	[88]
İlaç örnekleri	Teofilin, difenhidramin	C18-1 (250 x 4,6 mm, 5 µm)	Metanol : su (1:1) pH 3,0)	UV	[89]



**Tablo 2.4** Guaifenesinin diğer yöntemlerle analizleri

<b>Örnek</b>	<b>Diğer Maddeler</b>	<b>Analiz Yöntemi</b>	<b>Kaynak</b>
İlaç örnekleri	Fenilefrin hidroklorür	Spektrofluorometri	[90]
İlaç örnekleri	Teofilin	Spektrofotometri Voltametri	[91]
İlaç örnekleri	Teofilin, ambroksol hidroklorür	Spektrofotometri	[92]
İnsan idrar numunesi	-	Voltametri	[93]
İlaç örnekleri	Difenhidramin hidroklorür, benzonat, fenilefrin hidroklorür ,	Spektrofotometri	[94]
İlaç örnekleri	Difenhidramin, psödoefedrin, parasetamol	Spektrofotometri	[95]
İlaç örnekleri	Difenhidramin hidroklorür, benzonat, fenilefrin hidroklorür	Kemometri Spektrofotometri	[96]
İlaç örnekleri	İbuprofen, metokarbamol, parasetamol, diklofenak	Kemometri	[97]
Gerçek numuler	Teofilin	Voltametri	[98]
İlaç örnekleri	Psödofenilefrin hidroklorür, gayakol	TLC	[99]
İlaç örnekleri	Psödoefedrin, klorfeniramin maleat	Kemometri Spektrofotometri	[100]
İlaç örnekleri	Ambroksol, levosalbutamol sülfat	Spektrofotometri	[101]
İlaç örnekleri	Teofilin	Spektrofotometri	[102]
İlaç örnekleri	Psödoefedrin	Kemometri Spektrofotometri	[103]
İnsan kan serumu	-	Voltametri	[104]
İlaç örnekleri	Teofilin	Kemometri	[105]
İlaç örnekleri	Diprofilin, metil paraben, propil paraben	Kemometri Spektrofotometri	[106]

**Tablo 2.4** Guaifenesinin diğer yöntemlerle analizleri (devamı)

İlaç örnekleri	Salbutamol	Spektroflorimetri	[107]
İlaç örnekleri	Salbutamol sülfat, metil paraben, propil paraben	Spektrofotometri Kemometri	[108]
İlaç örnekleri	-	Voltametri	[109]
İnsan kan serumu	-	GC-ECD	[110]
İlaç örnekleri	Klorfeniramin maleat, noskapin hidroklorür, klorfeniramin maleat	Spektrofotometri	[111]
İlaç örnekleri	Dekstrometorfan	Spektrofotometri	[112]
İlaç örnekleri	Fenilefrin hidroklorür	Spektroflorimetrik	[113]
Çeşitli örnekler	Teofilin	Voltametrik	[114]
Egzersiz atları için kan serumu örneği	-	UV	[115]
Elektrokimyasal sensör	Oksomemazin hidroklorür, parasetamol	Elektrokimyasal	[116]
İlaç örnekleri	Salbutamol sülfat, dekstrometorfan HBr, gayakol	HPTLC	[117]
İlaç örnekleri	Teofilin, gayakol	HPTLC	[118]

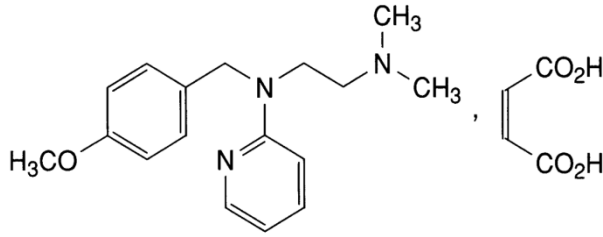
### 2.1.3. Pirilamin (Mepiramin) Maleat

#### 2.1.3.1. Özellikleri

(European Pharmacopoeia, 01/2017:0278)

Kapalı formülü: C<sub>21</sub>H<sub>27</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>

Yapısal formülü:



Kimyasal Adı:

N-(4-Metoksibenzil)-N',N'-dimetil-N-(piridin-2-yl)etan-1,2-diamin(2Z)-büt-2-enedioat

Molekül ağırlığı: 401,5 g/mol

Görünüş ve renk: Beyaz ya da hafifçe sarı, kristalize toz.

Erime noktası: 99°C -103°C.

Çözünürlüğü: Suda çok, alkolde oldukça iyi çözünür.

#### 2.1.3.2. Farmakolojik Etkisi

Pirilamin maleat; yan etkileri çok az olan, kronik veya dönemsel rinit, doğal maddelere ve yiyecek maddelerine karşı gelişen konjunktivit ve benzeri alerjik reaksiyonların giderilmesinde kullanılan H<sub>1</sub> reseptör antagonisti bir antihistaminiktir [128]. Aşırı duyarlılık reaksiyonlarının ve kaşıntılı deri rahatsızlıklarının semptomlarının giderilmesinde kullanılır. Soğukalgınlığı ve öksürüğün semptomatik tedavisi için bileşik preparatların yaygın bileşenidir.

#### 2.1.3.3. Miktar Tayini Yöntemleri

Pirilamin maleat üzerine yapılmış çalışmalar oldukça kısıtlı sayıda olup kromatografik ve spektrofotometrik birkaç yayına rastlanmıştır. Pirilamin maleatın HPLC ile yapılan analizleri Tablo 2.5'te, diğer yöntemlerle yapılan analizleri ise Tablo 2.6'da verilmiştir.

**Tablo 2.5** Pirilamin maleatın HPLC ile analizleri

Örnek	Diğer madde	Kolon	Yöntem	Hareketli Faz	Dedektör	Kaynak
İlaç örnekleri	Dekstrometorfan HBr, sodyum benzoat	C18	HPLC	Asetonitril: 0,1M pH 2,5 dihidrojen fosfat tamponu (29:71 )	UV	[119]
İlaç örnekleri	Asetaminofen, fenilefrin hidroklorür, kodein fosfat	C18	HPLC	Alginik asit, 0,01 N HCl	UV	[120]
İlaç örnekleri	Metilkopolamin nitrat, fenilpropanol hidroklorür, feniramin maleat	ODS	HPLC	2,85 x 10 <sup>-3</sup> M etilendiamin sülfat tamponu : pH' ı 7,44' e ayarlanmış 1 M amonyum hidroksit (1:1)	UV	[121]
Balgam söktürücü	Kodein fosfat, guaifenesin, feniramin maleat, fenilpropanolamin hidroklorür	Siyano	HPLC	%13 metanol içeren su içindeki 0,05 M potasyum dihidrojen fosfat çözeltisi	UV	[122]
İlaç örnekleri	Asetaminofen, pamabrom	C18	HPLC	Metanol : asitlendirilmiş su (pH 1,8) (27:73)	UV	[123]
İlaç örnekleri	Dekspantenol, lidokain hidroklorür	Inertsil ODS-3V, 250 x 4,6 mm (5 µm)	HPLC	0,01 M Amonyum asetat : metanol	UV	[124]
İlaç örnekleri	-	Hypersil BDS C8 (250 X 4,6 mm, 5 mm)	HPLC	Metanol : 0,018M pH 3,0 fosfat tamponu (pH 3,0) (9:41)	DAD	[125]

**Tablo 2.6** Pirilamin maleatın diğer yöntemlerle analizleri

Örnek	Diğer Maddeler	Analiz Yöntemi	Kaynak
Aerosol sprey	Metanol, fenol, benzokain	GC	[126]
İlaç örnekleri	Fenilpropanolamin hidroklorür, kafein, klorfeniramin maleat, fenilefrin hidroklorür	GC	[127]
Mikrobiyal biyotransformasyon örnekleri	Pirilaminin N-oksidi	Voltametri, HPLC-ECD	[128]
İlaç örnekleri	Lidokain HCl, dekspantenol	Kemometri-spektrofotometri	[129]
İlaç örnekleri	-	Spektrofotometri	[130]
İlaç örnekleri	-	Spektrofotometri	[131]
İlaç örnekleri	-	Spektrofotometri	[132]

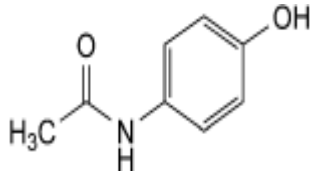
#### 2.1.4. Parasetamol (Asetaminofen)

##### 2.1.4.1. Özellikleri

(European Pharmacopoeia, 04/2018:0049)

Kapalı formülü: C<sub>8</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>2</sub>

Yapısal formülü:



Kimyasal Adı: N-(4-Hidroksifenil)asetamid, ya da asetaminofen

Molekül ağırlığı: 151,2 g/mol

Görünüş ve renk: Beyaz veya beyazımsı kristalize toz.

Erime noktası: 168°C-172°C

Çözünürlüğü: Suda kısmen, alkolde serbestçe, metilen klorürde ise çok az çözünür.

#### **2.1.4.2. Farmakolojik Etkisi**

Bir anilin türevi olan parasetamol (asetaminofen), antiinflamatuvar etkisi göstermeyen, analjezik ve antipiretik olma özellikleri sayesinde ciddi ağrıların semptomatik tedavisinde kullanılan bir maddedir [133].

Doymuş sulu çözeltisi kararlı yapıdadır ancak kararlılığı asit şartlarında azalır. Ağrı kontrol yöntemlerinin başında analjeziklerin kullanımı gelir. Analjezikler toplumda antibiyotiklerle birlikte en sık kullanılan ilaçların başında gelmektedir. Parasetamol (asetaminofen) kömür katranı analjeziği diye adlandırılan fenasetinin aktif metabolitidir. Asetaminofen, N-asetil-p-aminofenol, APAP isimleriyle de bilinir. Bir grup ağrı kesici ve ateş düşürücü etkiye sahip ilacın da etken maddesidir. Ağrı eşliğini yükseltmek yoluyla analjezik, hipotalamustaki termo-regulasyon merkezi üzerindeki etkisi yolu ile de antipatik bir etki gösterir. Yaygın bir şekilde ağrı kesici ve ateş düşürücü olarak kullanılan parasetamol uygun olmayan saklama koşullarında 4-aminofenol ve asetik aside dönüşmektedir. Parasetamol benzeri diğer analjezik ilaçlardan farklı olarak hipotalamus ve omurilik gibi peroksitlerden az olan ortamda prostaglandin sentezini inhibe edebilir ve etkisi erken başlar; plazma düzeyi 30-60 dakika içinde maksimuma erişir. Absorpsiyonu besinler tarafından azaltılır. İlk dozdan sonra analjezik etkisi 3-4 saat kadar devam eder. Asetaminofen aspirininkine, yaklaşık olarak eşit derecede analjezik etki yapar. Antipiretik etkisinde onunkine yakın güçtedir; fakat aspirinden farklı olarak, antiinflamatuvar etkinliği oldukça düşüktür ve bu tür etkinlik gerektiren 6 indikasyonlarda kullanılmaz. Ancak antiinflamatuvar ilaçların analjezik etkisini artırmak için onlarla birlikte kullanılabilir.

#### **2.1.4.3. Miktar Tayini Yöntemleri**

Parasetamol, çok uzun yıllardır birçok analjezik ve antipiretik ilaç preparatında kullanılmakta olan bir etken maddedir. Üzerinde yapılmış binlerce çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalar incelendiğinde ise kromatografik, elektroanalitik ve spektroskopik çalışmaların öne çıktığı gözlenmektedir. Parasetamolün HPLC ile yapılan son yıllardaki analizleri Tablo 2.7'de, diğer yöntemlerle yapılan analizleri ise Tablo 2.8'de verilmiştir.

**Tablo 2.7** Parasetamolün HPLC ile analizleri

Örnek	Diğer madde	Kolon	Hareketli Faz	Dedektör	Kaynak
İlaç örnekleri	Fenilefrin hidroklorür, guaifenesin, klorfeniramin maleat, bromheksin hidroklorür	Phenomenex RPC18 (5 µm × 250 mm × 4,6 mm)	Metanol : asetonyril : 10 mM pH 3,0 fosfat tamponu (27,5:22,5:50)	UV	[134]
İlaç örnekleri	Salisilamid, feniltoloksamin	C8	pH 2,7 fosfat tamponu, metanol, asetonyril	UV	[135]
İlaç örnekleri	Kafein, kodein fosfat	C8	0,01 M potasyum dihidrojen fosfat: metanol: asetonyril:izopropil alkol (420:20:30:30)	UV	[136]
İlaç örnekleri	Fenprobamat	RP18-5	Metanol:su:formik asit (120:80:1)	UV	[137]
İnsan idrar örneği	-	C18	Su:asetonyril (100:20)	Floresans	[138]
İlaç örnekleri	Asetilsalisilik asit, kafein, kodein, piridoksin, tiamin	C18	Asetonyril:su (75:25)	UV	[139]
İlaç örnekleri	4-aminofenol, 4-kloro asetanilid	PGC	Asetonyril: 0,05M pH 5,5 fosfat tamponu (80:20)	UV	[140]
İlaç örnekleri	Asetilsalisilik asit, kafein, fenobarbital	C18	Asetonyril : su (25:75)	UV	[141]
İlaç örnekleri	Kafein, klorfeniramin maleat	Siyano	Tetrahidrofurana: Asetonyril: iyon çifti çözeltisi (87:13:14)	UV	[142]
Domuz mikrosomal örnekleri	Fenasetin	C18	%0,05' lik pH 3,0 Fosforik asit çözeltisi, metanol	UV	[143]
İlaç örnekleri	Kafein	RP <sub>18</sub>	Metanol:su (40:60)	UV	[144]
İlaç formülasyonu	Dekstrometorfan hidrobromür, psödoefedrin HCl	Siyano	İyon çifti çözeltisi : metanol : asetonyril (25:57:18)	UV	[145]
İnsan kan serumu	Kafein, bütalbital	C18	pH 2,41 monobazik potasyum fosfat: asetonyril (95:5)	UV	[146]

**Tablo 2.7** Parasetamolün HPLC ile analizleri (devamı)

İnsan kan plazması	Dekstropropoksifen	Amino	Asetonitril: %0,4' lük glasiyal asetik asitin sulu çözeltisi	MS/MS	[147]
İnsan idrar örneği	İmipenem ve 9 farklı etken madde	RP18	Metanol, asetonitril, %0,05 trifloroasetik asit çözeltisi	DAD ve floresans	[148]
İlaç preparatları	Parasetamolün türevleri	C18	pH 3,9 potasyum dihidrojen fosfat tamponu, asetonitril	DAD	[149]
İlaç örnekleri	Kafein, klorfeniramin maleat	C18	Metanol : potasyum fosfat (15:55)	UV	[150]
İlaç örnekleri	Klorzoksazon ve safsızlık olarak bulunan diğer benzer maddeler	C18	Su:metanol:glasiyel asetik asit (60:40:2)	UV-VIS	[151]
İnsan kan plazması	Tramadol	Siyano	%0,5' lik formik asit içeren 10 mM amonyum asetat tamponu : metanol (40:60)	ESI-MS	[152]
Homeopatik formülasyonlar	Naproksen, ketoprofen, ibuprofen, diklofenak, piroksikam, nimesulid	C18	Asetonitril:asetik asit çözeltisi	UV-ESI-MS	[153]
İlaç örnekleri	Aseklofenak, klorzoksazon	C18	Asetonitril: pH 6 o-fosforik asit tamponu	UV	[154]
İnsan kan plazması	Kafein	C18	%0,2'lik formik asit:metanol (60:40)	ESI-MS	[155]
Klasik tabletler ve mikroküre formülasyonlar	Aseklofenak	C18	pH 2,5 fosfat tamponu: metanol (20:80)	UV	[156]
İnsan kan plazması	Amantadin HCl, kafein, klorfeniramin maleat	C18	Metanol: %0,5'lik formik asit içeren su (20:80)	ESI-MS-MS	[157]
İlaç örnekleri	Etodolak	C18	%0,05'lik ortofosforik asit:asetonitril (50:50)	UV	[158]
İlaç örnekleri	Tramadol HCl	C18	pH 6,3 fosfat tamponu : asetonitril (90:10)	UV	[159]



**Tablo 2.7** Parasetamolün HPLC ile analizleri (devamı)

İlaç örnekleri	Askorbik asit, klorfeniramin maleat	C18	Asetonitril, %0,05'lik trifloroasetik asit çözeltisi	DAD	[160]
İlaç örnekleri	Dantrolen, setrizin, psödoefedrin	C18	Sodyum dihidrojen fosfat, pH 4,2 heptan sülfanik asit, asetonitril	UV	[161]
İnsan idrar örneği	Sotatol ve 21 farklı etken madde	-	Asetonitril, metanol, %0,05'lik trifloroasetik asit çözeltisi	DAD	[162]
İlaç örnekleri	Kafein, asetilsalisilik asit	C18	Asetonitril:50 mM pH 3,0 fosfat tamponu (14:86)	UV	[163]
İlaç örnekleri	Tramadol HCl, domperidon	C18	Metanol: pH 4,0 fosfat tamponu (40:60)	UV	[164]
İlaç örnekleri	Tizanidin, diklofenak	C18	Amonyum karbonat çözeltisi:metanol (60:40)	UV	[165]
İlaç örnekleri	Askorbik asit	C18	0,1 M pH 6,5 fosfat tamponu: metanol (91:9)	Amperometrik	[166]
İlaç örnekleri	Metil, etil ve propil p-hidroksibenzoat	RP8	Tetrahidrofuran: Asetonitril:su (13:21:36)	UV-DAD	[167]
Pediyatrik çalışmalar	N-asetil-p-benzokinonimin	C18	Su: metanol: formik asit (70:30:0,15)	UV	[168]
İlaç örnekleri	İbuprofen, klorzoksazon, metokarbamol, ketoprofen diklofenak sodyum, lidokain	C18	Asetonitril: pH 5.0 fosfat tamponu (60:40)	UV	[169]
İlaç örnekleri	İbuprofen	C18	50 mM pH 7,5 fosfat tamponu, metanol	UV	[170]
İnsan kan plazması	Orfanadrin sitrat	C18	pH' ı 2,6' ya ayarlanmış asetonitril : saf su karışımı (50 : 50)	UV	[171]
İnsan kan plazması	Naproksen, ibuprofen	C18	1,8mM pH 2,8 fosforoik asit : asetonitril (1:1)	UV	[172]
İlaç örnekleri	Kafein	C18	Saf sudaki %21,69' luk asetonitril	DAD	[173]

**Tablo 2.7** Parasetamolün HPLC ile analizleri (devamı)

İlaç örnekleri	Kafein, asetilsalisilik asit	C18	Asetonitril : 0,01 M pH 4,05 fosfat tamponu (10 : 90)	UV	[174]
İlaç örnekleri	Kafein, ibuprofen	C18	%20 ile %100 arasında değişen 40 mM pH 7,0 fosfat tamponundaki asetonitril	DAD	[175]
İlaç örnekleri	Tramadol hidroklorür	C18 (250 ×4,6mm, 5µm)	10 mM pH 3,0 potasyum dihidrojen ortofosfat tamponu : asetonitril (60:40)	UV	[176]
Fare plazması	-	C18 5 µm, 150 × 4,6 mm	Su : metanol (75:25)	PDA	[177]
İlaç örnekleri	Fenilefrin hidroklorür, triprolidin hidroklorür	Prontosil C18 (250 x 4,6mm, 5µm)	Asetonitril : 0,1M potasyum dihidrojen fosfat tamponu (52:48)	UV	[178]
İlaç örnekleri	Kafein	Waters Symmetry® C18 (5 µm, 4,6 × 150 mm)	Metanol : su (40:60)	UV	[179]
İlaç örnekleri	İbuprofen	Phenomenex C18 (250 mm , 4,6 mm, 5 µm)	50 mM pH 7,5 fosfat tamponu : metanol	UV	[180]
İlaç örnekleri	Aseklofenak, , diklofenak, para-aminofenol	C18 (100 × 2,1 mm, 1,7µm)	Asetonitril : fosfat tamponu (50:50)	UV	[181]
İlaç örnekleri	Pamabrom	Phenomenex C8	0,05 M Sodyum dihidrojen fosfat tamponu : metanol : asetonitril (85:10:5)	UV	[182]
İnsan kan serumu	Setrizin HCl	Lichrosorb® C18	Asetonitril: tampon: sülfürik asit (45:55:0,3)	UV	[183]
İlaç örnekleri	Serratiopeptidaz, aseklofenak	C18 (4,6× 150 mm x 5 µm)	Su : metanol (50:50)	UV	[184]

**Tablo 2.7** Parasetamolün HPLC ile analizleri (devamı)

İlaç örnekleri	Hiyosin N-butil bromür	C18 (25 cm × 4,6 mm, 5 µm)	Su: metanol (50:50) Trifloroasetik asit ile pH '1 3,9' a ayarlanmış	UV	[185]
----------------	------------------------	-------------------------------------	---	----	-------

**Tablo 2.8** Parasetamolün diğer yöntemlerle analizleri

Örnek	Diğer Maddeler	Analiz Yöntemi	Kaynak
İlaç örnekleri ve oral solüsyonlar	Kafein	FIA-HPLC	[186]
İlaç örnekleri	-	FIA, SIA, nitrosolama reaksiyonu, UV	[187]
İlaç örnekleri	-	FIA, amperometri	[188]
İlaç örnekleri	-	FIA, kemilüminesans	[189]
İlaç örnekleri	-	FIA, amperimetri	[190]
İlaç örnekleri	Psödoefedrin HCl, dekstrometorfan HBr, klorfeniramin hidroj en maleat	FIA, Kapiler elektroforez-UV	[191]
İlaç örnekleri	Askorbik asit	FIA, amperometri	[192]
İlaç örnekleri	-	FIA, amperometri	[193]
İlaç örnekleri	Kafein	FIA, amperometri	[194]
İlaç örnekleri	-	SIA-UV	[195]
İlaç örnekleri	-	SIA-florometri	[196]
Klinik örnekler	Askorbik asit, ürik asit	SIA-voltametri	[197]
İlaç örnekleri	-	SIA	[198]
Kanalizasyon örneği	Endokrin bozucu moleküller ve diğer ilaç etken maddeleri	GC-MS	[199]

Ekstra kuvvetli analjezik tabletler	Kafein	HPTLC	[200]
İlaç örnekleri	Diklofenak sodyum	HPTLC	[201]
İlaç örnekleri	Kafein	HPTLC-UV	[202]
İlaç örnekleri	Diklofenak potasyum, famotidin	HPTLC	[203]
İlaç örnekleri	Propifenazon, kafein	PPEC, HPTLC	[204]
İlaç örnekleri	Famotidin, ibuprofen	HPTLC	[205]
Antienflamatuvar tabletler	Kafein, salisilik asit	SIC (İki Kolonlu)-UV	[206]
İlaç örnekleri	Asetilsalisilik asit, kafein	Kapiler elektrokromatografi	[207]
İlaç örnekleri ve biyolojik örnekler	-	Kapiler elektroforez-kemilüminesans	[208]
Supozituvar formülasyonlar	-	MELC	[209]
İlaç örnekleri	Kafein, propifenazon	Kapiler elektrokromatografi-UV	[210]
İlaç örnekleri	Setrizin dihidroklorür, fenilpropanolamin HCl	Kapiler elektroforez-UV	[211]
İlaç örnekleri	4-aminofenol	MEKC	[212]
İlaç örnekleri	p-Aminofenol	Kapiler elektroforez-amperometri	[213]
İnsan idrar örneği	Siprofloksasin, diklofenak sodyum	Kapiler elektroforez	[214]
İlaç örnekleri	İbuprofen, amantadin HCl, aminopirin, diklofenak sodyum kodein fosfat	Kapiler elektroforez-elektromanyetik indüksiyon	[215]
İlaç örnekleri	Kafein, asetilsalisilik asit	SIC-UV	[216]
İlaç örnekleri	Kloroksazon	Kemometri	[217]

**Tablo 2.8** Parasetamolün diğer yöntemlerle analizleri (devamı)

ilaç örnekleri	Asetilsalisilik asit	Kemometri-FTIR- raman spektroskopisi	[218]
ilaç örnekleri	p-Aminofenil	Kemometri	[219]
İkili ve üçlü ilaç karışımları	Mefnamik asit, asetilsalisilik asit, askorbik asit	Kemometri- spektrofotometri	[220]
ilaç örnekleri	Diklofenak	Kemometri-UV	[221]
Üçlü ilaç karışımları (tablet)	Kafein, asetilsalisilik asit	Kemometri	[222]
ilaç örnekleri ve insan kan plazması	Kloroksazon	Kemometri-HPLC	[223]
ilaç örnekleri	Kafein	Kemometri- spektrofotometri	[224]
İnsan idrar örneği	Hidroklorotiyazid	Kemometri-HPLC	[225]
ilaç örnekleri	Propifenazon, kafein	Kemometri-UV	[226]
ilaç örnekleri	Drotaverin HCl, kafein, metrodinazol, diloksanit furoat	Kemometri-HPLC-UV	[227]
ilaç örnekleri	-	Kemometri-IR-FTIR- raman spektroskopisi	[228]
ilaç örnekleri	Psödoefedrin HCl, dekstrometorfan HBr	Kemometri-HPLC-DAD	[229]
ilaç örnekleri	Kodein fosfat, mısır nişastası	Kemometri -TGA	[230]
ilaç örnekleri	Kloroksazon	Kemometri- spektrofotometri	[231]
ilaç örnekleri	p-Aminofenol	Kemometri- spektrofotometri	[232]
ilaç örnekleri	Kloroksazin, kafein, salisilik asit	Kemometri-HPLC	[233]
ilaç ve insan idrar örnekleri	Dekstrometorfan, fenilefrin	Kemometri	[234]
ilaç örnekleri	-	Raman spektroskopisi- kemometri	[235]

**Tablo 2.8** Parasetamolün diğer yöntemlerle analizleri (devamı)

İlaç örnekleri	-	Raman spektroskopisi-kemometri	[236]
İlaç örnekleri	-	Spektrofotometri-alkali hidroliz	[237]
Etanolik ve parenteral solüsyonlar	Propasetamol HCl	Spektrofotometri	[238]
İlaç örnekleri	Askorbik asit	Spektrofotometrik sensör	[239]
İlaç örnekleri	-	Spektrofotometrik sensör	[240]
İlaç örnekleri	Propifenazon, kafein	Spektrofotometri-HPLC	[241]
Kan serumu	-	Spektrofotometri	[242]
İlaç örnekleri	Mefnamik asit	Spektrofotometri-kemometri	[243]
İlaç örnekleri	Kafein	Spektrofotometrik sensör	[244]
İlaç örnekleri	Asetilsalisilik asit, kafein	Spektrofotometrik sensör	[245]
İlaç örnekleri	-	Spektroflorimetri	[246]
İlaç örnekleri	p-Aminofenol	Spektrofotometri	[247]
İlaç örnekleri	Asetilsalisilik asit, kafein	Spektrofotometri	[248]
İlaç örnekleri	-	Spektrofotometri	[249]
İlaç örnekleri	p-Aminofenol	Spektrofotometri	[250]
İlaç örnekleri ve insan kan serumu	Salisilamid	Spektrofotometri	[251]
Toz karışımlar	Difenhidramin HCl	Spektrofotometri(NIR)	[252]
Toz karışımlar	Amantadin HCl	Spektrofotometri(NIR)	[253]

**Tablo 2.8** Parasetamolün diğ er yöntemlerle analizleri (devamı)

İlaç örnekleri	Askorbik asit, dekstrometorfan HBr, kafein, klorfeniraminaleat	Spektrofotometri(NIR)	[254]
İlaç örnekleri	Drotaverin HCl	Spektrofotometri-Spektrodensitometri	[255]
İlaç örnekleri	Drotaverin HCl, kafein	Spektrofotometri-TLC	[256]
İlaç örnekleri	İpuprofen, kafein	Spektrofotometri-Kemometri	[257]
İlaç örnekleri	Aspirin, kafein, klorfenamin	Spektrofotometri-Kemometri	[258]
İlaç örnekleri	-	Spektrofotometri(NIR)	[259]
İlaç örnekleri	Drotaverin HCl	Spektrofotometri	[260]
İlaç örnekleri	-	Spektrofotometri-Alkali Hidroliz	[261]
İlaç örnekleri ve biyolojik örnekler	-	Spektrofotometri	[262]
İlaç örnekleri	-	Spektrofotometri	[263]
İlaç örnekleri	Orpenadrin sitrat	Spektrofotometri	[264]
İlaç örnekleri	Aspirin, kafein	Spektrofotometri	[265]
İlaç örnekleri	-	Türbidimetri	[266]
İlaç örnekleri ve insan kan plazması	Askorbik asit	Amperometri-FTIR	[267]
İlaç preparatları ve nehirlerden alınmış su örnekleri	-	Biyomimetik sensör-FIA-amperometri	[268]
Tıbbi inhalasyon ürünleri	Noradrenalin	Biyosensör (Hematoksilin)-voltametri	[269]
Biyolojik ve bitkisel örnekler	-	Biyosensör (polifenol oksidaz/ polipirol matriksi)-voltametri	[270]

**Tablo 2.8** Parasetamolün diğ er yöntemlerle analizleri (devamı)

İlaç örnekleri	Dopamin	Elektroanalitik yöntemler	[271]
Gerçek örnekler	-	Elektrokataliz	[272]
İlaç örnekleri ve insan kan serumu	-	Elektrokataliz	[273]
İlaç örnekleri	Fenasetin, p-aminofenol	Elektrokataliz	[274]
İlaç örnekleri	-	Potansiyometri	[275]
İlaç örnekleri	p-Aminofenol	Voltametri	[276]
İlaç ve insan idrar örnekleri	-	Voltametri	[277]
İnsan kan plazması	-	Voltametri	[278]
İlaç örnekleri	-	Voltametri	[279]
İlaç örnekleri	Kafein	Voltametri	[280]
İlaç örnekleri	Dipiron	Voltametri	[281]
Çeşitli örnekler	-	Voltametri	[282]
Çeşitli örnekler	N-asetilsistein	Voltametri	[283]
Çeşitli örnekler	Norepinefrin, folik asit	Voltametri	[284]
İlaç örnekleri ve insan kan serumu	Askorbik asit, izonizid	Voltametri	[285]
İlaç örnekleri ve biyolojik örnekler	Mefenamik asit	Voltametri	[286]
Çeşitli örnekler	Askorbik asit	Voltametri	[287]
Çeşitli örnekler	Askorbik asit, kodein	Voltametri	[288]



**Tablo 2.8** Parasetamolün diğ er yöntemlerle analizleri (devamı)

Üçlü karışımlar	Askorbik asit, kodein	Voltametri-Kronoamperometri	[289]
İlaç örnekleri ve biyolojik sıvılar	-	Voltametri	[290]
İnsan kan serumu ve idrar örneği	Aspirin, kafein	Voltametri-EIS-CC	[291]
İlaç örnekleri ve biyolojik sıvılar	Tramadol	Voltametri-EIS-CC	[292]
İnsan kan serumu	Dopamin ve askorbik asit varlığında	Çeşitli elektrokimyasal yöntemler	[293]
Vücut sıvıları	Ürik asit varlığında	Voltametri	[294]
Çeşitli örnekler	Askorbik asit, triptofan	Voltametri	[295]
Çeşitli örnekler	3-Aminofenol	Voltametri	[296]
İlaç örnekleri	Askorbik asit	Voltametri	[297]
Çeşitli örnekler	Tiramin,dopamin ve askorbik asit varlığında	Voltametri	[298]
Çeşitli örnekler	Epinefrin	Voltametri	[299]
İlaç örnekleri ve insan kan serumu	Dopamin	Voltametri	[300]
İnsan idrar örnekleri	Penisilin	Voltametri	[301]
İnsan idrar örnekleri	Kafein	Voltametri	[302]
İlaç örnekleri	p-Aminofenol	Voltametri	[303]
Kan serumu ve insan idrar örnekleri	L-Dopa	Voltametri-Kronoamperometri	[304]
Çeşitli örnekler	Kaptopril, triptofan	Voltametri	[305]
İlaç örnekleri	-	Voltametri	[306]

**Tablo 2.8** Parasetamolün diğer yöntemlerle analizleri (devamı)

İnsan idrar örnekleri	Dopamin	Voltametri	[307]
Işığa duyarlı polimerler	-	Voltametri	[308]
Amorf karışımlar	Sitrik asit anhidrat	NMR	[309]
TiO <sub>2</sub> nanopartiküller	-	Fotokatalitik	[310]

#### **2.1.5. Fenilefrin Hidroklorür, Guiafenesin, Pirilamin Maleat ve Parasetamol' ün İkili ve Üçlü Kombinasyonlar Halinde Tayin Yöntemleri**

Fenilefrin hidroklorür, guaifenesin, pirilamin maleat ve parasetamol ikili ve üçlü kombinasyonlar halinde ve kromatografik ve spektrofotometrik yöntemlerle tayin edilmiştir. Yapılan araştırmalar sonucunda hiçbir dördü bir arada tayin yöntemine rastlanmamıştır. Bu dört etken maddenin ikili ve üçlü kombinasyonları halindeki tayinleri Tablo 2.9'da verilmiştir

**Tablo 2.9** Fenilefrin hidroklorür, guaifenesin, pirilamin maleat ve parasetamolün ikili ve üçlü bir arada tayin yöntemleri

Örnek	Diğer madde	Kolon	Yöntem	Hareketli Faz	Dedektör	Kaynak
İlaç örnekleri	Fenilefrin hidroklorür, guaifenesin, fenilpropanolamin HCl	-	HPLC	-	-	[311]
İlaç örnekleri	Fenilefrin hidroklorür, guaifenesin, fenilpropanolamin HCl, sodyum benzoat	-	HPLC	-	-	[312]
İlaç örnekleri	Guaifenesin, fenilefrin hidroklorür, klorfeniramin maleat	C8	HPLC	Sodyum heptan sülfonat, asetonyitril	UV	[313]
İlaç örnekleri	Fenilefrin hidroklorür, guaifenesin, ambroksol HCl, lovesetirizin dihidroklorür	C8	HPLC	Fosfat tamponu, metanol, asetonyitril	UV	[314]
İlaç örnekleri	Fenilefrin hidroklorür, guaifenesin ambroksol HCl, salbutamol	C8	HPLC	Metanol: asetonyitril (50:50), pH 3,0 fosfat tamponu	UV	[315]
İlaç örnekleri	Fenilefrin hidroklorür, guaifenesin, dekstrometorfan HBr, sodyum benzoat, klorfeniramin maleat, butilparaben	ODS	HPLC- spektromet ri- kemometri	Asetonyitril: pH 2,7 potasyum dihidrojen fosfat tamponu	UV	[316]
İlaç örnekleri	Fenilefrin hidroklorür, pirilamin maleat, salisilamit, fenilpropanolamin HCl, kafein, klorfeniramin maleat	-	GC	-	Alev İyonizasyon	[317]

**Tablo 2.9** Fenilefrin hidroklorür, guaifenesin, pirilamin maleat ve parasetamolün ikili ve üçlü bir arada tayin yöntemleri (devamı)

İlaç örnekleri	Guaifenesin, pirilamin maleat, psödoefedrin, klorfeniramin, dekstrometorfan, feniramin	C18	HPLC	Metanol: pH 3,0 dihidrojen fosfat tamponu	UV	[318]
İlaç örnekleri	Parasetamol, fenilefrin hidroklorür, kafein, askorbik asit	RP18	HPLC	-	-	[319]
İlaç örnekleri	Parasetamol, fenilefrin hidroklorür, klorfeniramin maleat	RP8	HPLC	Fosfat tamponu, asetonitril	UV	[320]
İlaç örnekleri	Parasetamol, fenilefrin hidroklorür, klorfeniramin maleat	HS PEG	HPLC	pH 7,0 fosfat tamponu: asetonitril	UV	[321]
İlaç örnekleri	Parasetamol, fenilefrin hidroklorür, klorfeniramin maleat	Siyano	HPLC	Fosforik asit, asetonitril	UV	[322]
İlaç örnekleri	Parasetamol, fenilefrin hidroklorür, klorfeniramin maleat, dekstrometorfan HBr	C18	HPLC	Asetonitril, sodyum perklorat (pH 3,0)	UV	[323]
İlaç örnekleri	Parasetamol, fenilefrin hidroklorür, klorfeniramin maleat, dekstrometorfan HBr	C18	HPLC	Metanol:su (95:5), pH 5,0 (ortofosforik asit)	UV	[324]
İlaç örnekleri	Parasetamol, fenilefrin hidroklorür, karboksamid	C18	HPLC	Metanol: potasyum monobazik fosfat	UV	[325]
İlaç örnekleri	Parasetamol, fenilefrin hidroklorür, askorbik asit, aspartam, sukroz	RP18	HPLC	Sodyum oktan-1-sülfonat (pH 2,0 H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> : asetonitril	UV-Floresans	[326]

**Tablo 2.9** Fenilefrin hidroklorür, guaifenesin, pirilamin maleat ve parasetamolün ikili ve üçlü bir arada tayin yöntemleri (devamı)

İlaç örnekleri	Parasetamol, fenilefrin hidroklorür, klorfeniramin maleat, oksolamin sitrat	Siyano	HPLC	pH 4,0 fosfat tamponu : asetonyitril	DAD	[327]
İlaç örnekleri	Parasetamol, fenilefrin hidroklorür, kafein, askorbik asit	C18	HPLC	Asetonyitril: pH 6,5 fosfat tamponu	UV	[328]
İlaç örnekleri	Parasetamol, fenilefrin hidroklorür, loratidin	-	HPLC	Metanol: asetonyitril:su: Tetrahidrofuran	-	[329]
İlaç örnekleri	Parasetamol, fenilefrin HCl, klorfeniramin maleat, dekstrometorfan HBr	-	Kapiler elektroforez	-	-	[330]
İlaç örnekleri	Parasetamol varlığında, fenilefrin hidroklorür	-	Spektroflorimetri	-	Floresans	[331]
İlaç örnekleri	Parasetamol varlığında, fenilefrin hidroklorür, oksatomid	-	Spektrofotometrik	-	Floresans	[332]
İlaç örnekleri	Parasetamol, fenilefrin hidroklorür, klorfenilamin maleat	-	Spektrofotometri-	-	UV	[333]
İlaç örnekleri	Parasetamol, fenilefrin hidroklorür, klorfeniramin maleat	-	Spektrofotometri-kemometri	-	UV	[334]

**Tablo 2.9** Fenilefrin hidroklorür, guaifenesin, pirilamin maleat ve parasetamolün ikili ve üçlü bir arada tayin yöntemleri (devamı)

İlaç örnekleri	Parasetamol, fenilefrin hidroklorür, asetilsalisilik asit, feniramin maleat, difenhidramin, prometazin, kinin sülfat, kafein, kodein fosfat	C18	UHPLC	pH 4,0 amonyum asetat tamponu, metanol	DAD	[335]
İlaç örnekleri	Parasetamol, guaifenesin, tiamin nitrat, kafein, riboflavin, psödoefedrin HCl, askorbik asit, etanzamid, dl-metilefedrin HCl, dihidrokodein fosfat, ibuprofen, noskapin, karbinoksamin maleat, bromheksin HCl	-	CD-MEEKC	Pentan: 1-butanol: 2-propanol: sodyum dodesil sülfat: sodyum tetraborat	-	[336]
İlaç örnekleri	Parasetamol, guaifenesin, fenilpropanolamin HCl, psödoefedrin HCl, kafein, klorfeniramin maleat, dekstrometorfan HBr	Silika	GC	-	Alev İyonizasyon	[337]
İlaç örnekleri	Parasetamol, guaifenesin, dekstrometorfan HBr	C18	HPLC	Metanol:su (45:55), pH 4,2 formik asit-amonyum format tamponu	-	[338]
İlaç örnekleri	Parasetamol, guaifenesin, psödoefedrin, folkodin, paraben	C18	HPLC	Metanol: su: asetik asit	-	[339]
İlaç örnekleri	Parasetamol, guaifenesin, sodyum benzoat, oksomemazin, ve bozunma ürünleri	-	HPLC	-	-	[340]

**Tablo 2.9** Fenilefrin hidroklorür, guaifenesin, pirilamin maleat ve parasetamolün ikili ve üçlü bir arada tayin yöntemleri (devamı)

İlaç örnekleri	Parasetamol, guaifenesin, bromural, buletin, kafein, klorfeniramin maleat, dekstrameterfan HBr, etoksibenzamid, metilefedrin HCl, noskapin HCl	C18	HPLC	%0,1 o-Fosfat Asidi:asetonitril (85:15) (pH 2,7), %0,2'lik trietilamin, %2'lik Tetrahidrofuran	UV	[341]
İlaç örnekleri	Parasetamol, guaifenesin, p-aminofenol, kafein, klorfeniramin maleat	C18	HPLC	Asetonitril: sodyum heptil sülfonat: potasyum dihidrojen fosfat: trietilamin, pH3,0 fosforik asit	UV	[342]
İnsan kan plazması	Parasetamol, guaifenesin	C18	HPLC-MS/MS	Metanol:su:formik asit	MS	[343]
İlaç örnekleri	Parasetamol, guaifenesin, kafein, etenzamid, potasyum gayakol sülfonat	-	Kapiler elektroforez	pH 11,0 fosfat tamponu, sodyum dodesil sülfat	UV	[344]
İlaç örnekleri	Parasetamol, guaifenesin, bromfeniramin, klorsiklizin, klorfeniramin, difenhidramin, doksilamin, flunarizin, hidroksizin prometazin, terfenadin, tripelenamin, tripirolidin, kafein, piridoksin	C18	LC	Setiltrimetilamonyum bromür, fosfat ve sitrat tamponları	UV	[345]
İlaç örnekleri	Parasetamol, guaifenesin, kafein, benzoik asit, metil paraben, propil paraben	C18	LC	1-Butanol:su (1:99), sodyum dodesil sülfat, trikloroasetik asit (%0,1'lik)	UV	[346]
İlaç örnekleri	Parasetamol, guaifenesin, p-aminofenol, kafein, klorfeniramin maleat	-	Spektrofotometri	-	-	[347]

**Tablo 2.9** Fenilefrin hidroklorür, guaifenesin, pirilamin maleat ve parasetamolün ikili ve üçlü bir arada tayin yöntemleri (devamı)

İlaç örnekleri	Parasetamol, guaifenesin, p-aminofenol, kafein, klorfeniramin maleat	-	Spektrofotometri	-	-	[348]
İlaç örnekleri	Parasetamol, guaifenesin, asetilsalisilik asit, kafein, psödoefedrin HCl	-	X-Ray difraksiyonu	-	-	[349]
İlaç örnekleri	Guaifenesin, metil paraben, propil paraben, parasetamol, kafein, benzoik asit	Kromasil C18	LC	1-Butanol: su (1:99), sodyum dodesil sülfat, trikloroasetik asit (%0,1'lik)	UV	[350]
İlaç örnekleri	Fenilefrin hidroklorür, parasetamol, guaifenesin, klorfeniramin maleat, bromhekzin hidroklorür	RPC18 (5 µm × 250 mm × 4,6 mm)	HPLC	Metanol : asetonitril : 10 mM pH 3,0 fosfat tamponu (27,5:22,5:50)	UV	[126]



## 2.2. Deneysel Tasarım [351 - 357]

### 2.2.1. Deneysel Tasarımın Tanımı ve Önemi

Günümüzde analistler, daha başarılı sonuçlar elde etmek için yapılan deneyleri sistematik olarak tasarlamayı bir ihtiyaç olarak görmeye başlamış, bu tasarlama ihtiyacı için de istatistiksel ve kemometrik yöntemlere başvurmuşlardır.

Yapılan deneyden elde edilen sonuçları etkileyen herhangi bir koşul, faktör olarak adlandırılır. Faktörler, kontrol edilebilen ve kontrol edilemeyen olmak üzere ikiye ayrılır. Örneğin; bir çözeltinin saklama şartı araştırmacı tarafından değiştirilebilir, bu sebeple bu faktör kontrol edilebilirken, rastgele örnekleme içeren bir faktör, araştırmacı tarafından kontrol edilemeyen bir faktördür. Sayısal bir değer verilemeyen bu tür faktörler nitel faktörler olarak adlandırılırlar. Sıcaklık, konsantrasyon, pH gibi faktörler ise sayısal bir değere sahip olduklarından nicel faktörler olarak adlandırılırlar. Bir faktörün aldığı farklı değerler ise seviye olarak ifade edilir.

Deneysel tasarım, deney koşullarını etkileyecek faktörlerin seviyelerinin sistematik bir şekilde değiştirilmesi ile ölçülen cevaptaki değişimin gözlenmesi ve yorumlanması amacıyla kullanılan istatistiksel bir tekniktir.

Bir araştırmadan doğru sonuçlar elde edebilmek için bu araştırmanın sonuçlarını etkileyebilecek faktörler belirlenmeli ve bu faktörler kontrol edilmelidir. Analitik teknikler maddelerin çok küçük miktarlarının analizi ile ilgilendiğinden, cevabın bağlı olduğu faktörlerin sayısal değerleri, elde edilecek cevabın en üst değerde olmasını sağlayacak şekilde seçilmelidir. Bu değerlere de optimum değerler denir.

Klasik yöntemlerle faktörlerin optimum değerleri, diğer faktörlerin değerleri sabit tutulurken incelenmek istenen faktörün değerinin değiştirilmesi yoluyla belirlenmektedir. Bu durumda, çok sayıda faktörün incelenmesi için çok fazla deney yapılması gerekmekte, dolayısıyla da tüm bu işlemler hem zaman hem de maliyet açısından yük getirmektedir. Deneysel tasarım, faktörleri optimum değerlere ayarlamak için deneme yanılma veya her seferinde bir faktörün incelenmesi yerine bilimsel bir yöntem kullanılmasına olanak sağlamaktadır. Bu sayede araştırmanın kritik parametrelerini olması gereken optimum seviyelere ayarlama imkanı doğmaktadır. Deneysel tasarım ile klasik yöntemle göre çok daha az deney yapılarak hem daha kısa sürede sonuca ulaşabilmek mümkün olmakta ve

dolayısıyla maliyet de azalmaktadır. Deneysel tasarımın en önemli avantajı, klasik yöntemlerde faktörlerin yalnızca tek başlarına yarattıkları etki incelenebilirken; deneysel tasarımda faktörlerin hem kendi başlarına yarattıkları etkinin hem de bu faktörlerin birbirleri ile etkileşimlerinin ve bu etkileşimlerin deney sonuçlarına olan etkisinin incelenebilmesidir. Bu sayede daha güvenilir sonuçlar elde edilmektedir.

Deneysel tasarım; tarama, optimizasyon ve modelleme olmak üzere 3 aşamadan oluşur:

**1.Tarama:** Tarama tasarımı, bir araştırmanın başında, deneysel çalışmanın sonucunu etkileyen ana faktörleri belirleme ve tepkideki değişimleri her bir faktörü değiştirerek araştırmak istediğinde uygulanır. Etkileşme etkilerinden ziyade anlamlı ana etkileri tanımlama özelliği nedeniyle, tarama tasarımları çok sayıda faktörleri içeren tasarımları analiz etmek için daha sıklıkla kullanılır. Tarama tasarımı ile kritik faktörlerin tanımlanması bir sonraki basamak olan optimizasyon süreçleri için oldukça yararlıdır.

**2.Optimizasyon:** Tarama tasarımından sonra, yaygın olan yaklaşım optimizasyonun yapılmasıdır. Tarama tasarımları ile belirlenmiş olan önemli faktörlerin optimum değerlerinin tespit edilebilmesi için yapılır. Bu tasarım, deneyi gerçekleştiren kişiye faktörlerin etkisi hakkında detaylı bilgi verir ve en iyi tepkiyi beraberinde getiren faktörler kombinasyonunu belirler. Daha basit ifade ile tasarım tüm olası faktör kombinasyonları için tepki değerlerini kestirerek optimal deney noktasının bulunmasına yardım eder. Tepki yüzeyi modellemesi (RSM) önemli faktörlerin arasındaki etkileşimi ve hatta ikincil dereceki etkilerin tahmin edilmesi ve dolayısıyla araştırılan tepki yüzeyinin biçimi hakkında bir fikir verir. Bu bakımdan RSM istenen sonucu elde etmek için faktörlerin optimize değerlerini belirlemek için kullanılır.

**3.Modelleme:** Tarama tasarımı ile belirlenen ve optimizasyon sonucu ile optimum değerleri tespit edilen faktörlerin etkisi matematiksel bir model ile ifade edilir. Böylece deneysel olarak bulunan sonuçların yanı sıra, teorik hesaplamalar kullanılarak tahmini sonuçlar elde edilmiş olur. Deneysel olarak elde edilen sonuçların, teorik hesaplamalar kullanılarak elde edilen tahmini sonuçlarla uyumlu olması beklenir.

### 2.2.2. Tarama Tasarımları

Tarama, deneysel tasarımın en önemli basamaklarından biridir. Analitik metotların optimizasyonu çok çeşitli faktörlerden etkilenebilmektedir. Bu nedenle bu metotlar

üzerinde hangi faktörlerin etkili olduğunu belirlemek ve optimizasyon için etkili olan bu faktörlerin sayısını üç ya da dörde indirerek faktör sayısını azaltmak oldukça önemlidir.

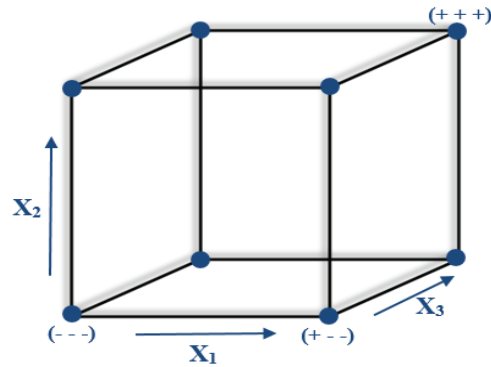
Tarama tasarımlarında az sayıda seviye ile tüm faktörler sistematik olarak aynı anda değiştirilerek bu değişimlerin deney sonuçları üzerine etkisi incelenir. Her bir faktörün etkisi için sayısal değerler elde edilir. Bu değerlerden elde edilen sonuçlar doğrultusunda deney sonuçlarına gerçekten etki eden ana faktörler belirlenir.

Tarama aşamasında en çok Faktöriyel Tasarım ve Plackett-Burman tasarımları kullanılır.

### 2.2.2.1. Tam Faktöriyel Tasarım

Şekil 2.1' de gösterilen, köşeleri de dahil olmak üzere tüm küp olarak araştırma yapılan ilk tasarım tam faktöriyel tasarımdır. Buna ek olarak, bazı yinelenen merkez-nokta deneyleri yapılır. Şekil 2.2, bunları küpün ortasındaki bir kar tanesi olarak göstermektedir. Faktörler iki seviyede araştırılır, bu yüzden k faktörleri için  $2^k$  tasarım işlemine gerek duyulur. Bu tip tasarım normalde doğrusal model veya etkileşim modeli ile birlikte tarama için kullanılır.

Faktör sayısının sınırlı olduğu durumlarda oldukça kullanışlı bir yöntemdir. Tipik bir deneysel tasarım çalışmasında kaç tane ilgili faktör olduğuna ve her faktör için kaç seviyede çalışılacağına karar vermek önemlidir. Bu tasarımda N faktörü, K ise seviyeyi temsil ve deney sayısı  $K^N$  formülü ile hesaplanır.



Şekil 2.1 Tam faktöriyel tasarım

İlk adım olarak her faktör için çalışma aralığı belirlenir. Örneğin, alevli AAS cihazı ile yapılan cam seramikte yer alan Titanyum tayininde, Titanyum sinyali üzerine Sodyum, Alüminyum, Magnezyum ve Silisyum sinyallerinin etkisi incelendiğinde her element için kabul edilebilir düşük ve yüksek seviyeler ppm cinsinden belirlenir. Ya da bir bir kimyasal

reaksiyon sıcaklık ve pH değerlerine bağı olarak değişiyorsa pH için 3 ve 5, sıcaklık için 40°C - 60°C gibi seviyeler seçilebilir.

İkinci adım olarak dizayn seçilir. 3 faktörlü 2 seviyeli tam faktöriyel tasarım örneği Tablo 2.10' da verilmiştir. Burada seviye sayısı 2 (-1 ve +1 olarak kodlanır) faktör sayısı ise 3' tür. 3 faktör için deney sayısı  $K^N$  formülünden hesaplanarak deney sayısı 8 olarak belirlenmiştir.

**Tablo 2.10** 3 Faktör için tam faktöriyel tasarım

Deney sayısı	Faktörler			Cevap
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	
1	-	-	-	y <sub>1</sub>
2	+	-	-	y <sub>2</sub>
3	-	+	-	y <sub>3</sub>
4	+	+	-	y <sub>4</sub>
5	-	-	+	y <sub>5</sub>
6	+	-	+	y <sub>6</sub>
7	-	+	+	y <sub>7</sub>
8	+	+	+	y <sub>8</sub>

Üçüncü adım olarak ölçülen cevap seçilir. Bu aşamada pik alanı, sinyal yüksekliği gibi kolay ölçülebilen bir cevap elde etmek önemlidir.

Dördüncü adım olarak kodlanmış değerler yerine faktörlerin gerçek değerleri yerleştirilerek deneysel çalışma gerçekleştirilir. Faktörlerin etkisini belirlemek için aşağıda verilen doğrusal denklemdeki b katsayıları hesaplanır.

$$y=bX$$

Burada b katsayısı;

$$b=(X'X)^{-1}X'y$$

Elde edilen cevap ve faktörlerin etkileşimini içeren matematiksel bir model oluşturulur. Genellikle kullanılan lineer model aşağıdaki gibidir.

$$\hat{y}= b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + \dots + b_{N-1}X_{N-1} + b_{NX_N} + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 + \dots + b_{(N-1)N}X_{N-1}X_N$$

Burada  $\hat{y}$  , tahmini cevap,  $b_0$ , ortalama deneysel cevap,  $b_1 - b_N$  , metodun performansını etkileyen ve ana etken olarak adlandırılan, göz önünde tutulan faktörlerin tahmini etkilerini ifade eden katsayılar olarak sembolize edilir.  $b_{12}$ ' den  $b_{(N-1)N}$ ' e kadar olan katsayılar ise faktörlerin birbirleriyle etkileşimlerini ifade eder. Böylelikle deneysel tasarım faktörlerin birbirleriyle olan etkileşimi ve bu etkileşimlerden hangisinin önemli olduğu hakkında bilgi verir.

#### 2.2.2.2. Azaltılmış Faktöriyel Tasarım

Faktör sayısının fazla olduğu deneysel çalışmalar için azaltılmış faktöriyel tasarımlardan yararlanır. Örneğin bir kromatografi çalışması için sonuç üzerinde örnek çözeltisinin hazırlanması (numune tartımı, sıcaklık, seyreltme hacmi, çalkalama süresi santrifüj süresi gibi) kromatografik ayırma aşaması (pH, sıcaklık, çözücü bileşimi, akış hızı, tampon çözeltisinin konsantrasyonu, analiz süresi, enjeksiyon hacmi, dalga boyu ve benzeri) gibi bir çok faktör etkili olabilir.

Faktör sayısı artıkça aynı oranda deney sayısı da arttığı için faktörler arasındaki ikili, üçlü ve daha yüksek etkileşimler çok önemli olmayabilir. Bu durumda; örneğin 6 faktörlü bir çalışma için 64'ten daha az sayıda deney yaparak faktörlerin etkileri incelenebilir. Gereğinden daha fazla olan deney sayısı tam faktöriyel tasarımın 1/2'si 32 deney, 1/4'ü 16 deney, 1/8'i 8 deney olacak şekilde azaltılabilir. En çok kullanılan azaltılmış faktöriyel tasarım şekli fraksiyonel faktöriyel ve Plackett-Burman tasarımıdır.

### 2.2.2.2.1. Fraksiyonel Faktöriyel Tasarım

Fraksiyonel bir tasarım tüm olası köşelerin üzerinde durmak yerine tam faktöriyel tasarımın iki işleminin yalnızca bir fraksiyonunu seçerek tasarım işlemleri sayısını azaltır. Şekil 2.2' de verilen örnekten de görüleceği üzere olası sekiz noktanın yalnızca dördü araştırılmaktadır. Fraksiyonel faktöriyel tasarımlardan genellikle tarama ve sağlamlık testlerinde yararlanır.

Bu tasarımda deney sayısı  $K^{N-P}$  formülünden hesaplanır. Deney sayısı P sayısı kadar bir azalma gösterir ve P sayısı her zaman faktör sayısı olan N'den daha küçük olmalıdır. Örneğin P=1 için tasarım yarı fraksiyonlu tasarım adını alır.

Deneysel tasarımda genellikle 2 seviye kullanılır (K=2). Deney sayısı ( $2^{N-P}$ ) faktör sayısından (N) büyük olmalıdır. Örneğin 6 faktör için, P=2 alındığında  $2^{(6-2)}$  formülüne göre 16 adet deney yapılması gerekmektedir.  $2^{(6-2)}$  fraksiyonel faktöriyel tasarım Tablo 2.11'de gösterilmiştir. Burada ilk 4 kolon  $x_1, x_2, x_3$  ve  $x_4$  faktörleridir. Eklenen diğer iki kolon (p=2)  $x_2, x_3, x_4$  ve  $x_1, x_3, x_4$  faktörlerinin birleştirilmesiyle oluşturulan  $x_5$  ve  $x_6$  faktörleridir.

**Tablo 2.11**  $2^{(6-2)}$  16 deney için fraksiyonlu faktöriyel tasarım

No	$x_1$	$x_2$	$x_3$	$x_4$	$x_5 (x_2 x_3 x_4)$	$x_6 (x_1 x_3 x_4)$
1	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	+	+	+
3	-	-	+	-	+	+
4	-	-	+	+	-	-
5	-	+	-	-	+	-
6	-	+	-	+	-	+
7	-	+	+	-	-	+

8	-	+	+	+	+	-
---	---	---	---	---	---	---



**Tablo 2.11**  $2^{(6-2)}$  16 deney için fraksiyonlu faktöriyel tasarım (devamı)

9	+	-	-	-	-	+
10	+	-	-	+	+	-
11	+	-	+	-	+	-
12	+	-	+	+	-	+
13	+	+	-	-	+	+
14	+	+	-	+	-	-
15	+	+	+	-	-	-
16	+	+	+	+	+	+

Fraksiyonel faktöriyel tasarımda deney sayısı azaltıldığından bazı faktörler arası etkileşimler incelenemez. Bu durumda belirlenen amaca göre tam faktöriyel veya fraksiyonel faktöriyel tasarım kullanılmalıdır. Fraksiyonel faktöriyel tasarımın birçok avantajı olmakla beraber aşağıdaki şekilde bazı dezavantajları da bulunmaktadır:

1. Deneysel tasarımda iki seviye kullanıldığından parabolik terimler incelenememektedir.
2. Tekrar edilen deneyler yer almadığı için hata hesabı yapılamamaktadır.
3. Deneysel tasarım sadece iki ve katları şeklindedir.

#### **2.2.2.2.2. Plackett-Burman Tasarımı**

Tam faktöriyel ve fraksiyonel faktöriyel tasarım yöntemlerinin uygulanması çok sayıda faktörün etkisi incelenmek istendiğinde zorlaşmaktadır. Sadece faktörlerin birbirlerinden bağımsız etkileri incelenmek istendiğinde, yani faktörler arasındaki etkileşimlerin önemli olmadığı durumlarda Plackett-Burman tasarımından yararlanılabilir. Bu tasarım için deney sayısı, faktör sayısı ve üreticiler Tablo 2.12'de gösterilmiştir.



Bu tasarımda sadece doğrusal modeller oluşturulabilir. Dolayısıyla ikili faktör etkileşimleri hakkında kestirimde bulunulamaz. Birçok faktör arasından, sonuç üzerinde en yüksek etkisi olabilecek faktör sayısının az olabileceğinin öngörülebildiği durumlarda elverişli bir yöntemdir. Bu tasarımda, faktör sayısından bir fazlası kadar deneme yapılarak faktörü sayısı düşürülebilir.

**Tablo 2.12** Plackett-Burman tasarımı için üreticiler

Deney sayısı	Faktörler	Üretici
8	7	+ + + - + - -
12	11	+ + - + + + - - - + -
16	15	+ + + + - + - + + - - + - - -
20	19	+ + - + + + + - + - + - - - - + + -
24	23	+ + + + + - + - + + - - + + - - + - + - - - -

11 faktör ve 12 deneyi içeren Plackett-Burman tasarımı Tablo 2.13'te gösterilmektedir.

**Tablo 2.13** 11 Faktör için Plackett-Burman tasarımı

DENEYLER	FAKTÖRLER										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+
3	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-
4	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
5	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+
6	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+
7	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-
8	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-
9	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-
10	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+
11	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-
12	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+

Bu tasarımın aşağıdaki şekilde bazı özellikleri vardır:

- Birinci satır aynı seviyeye sahiptir (-1 veya +1).
- İkinci satır üretici satırdır. Tablo 2.12'deki üreticilerden birisi kullanılır. Faktör sayısı her zaman tek sayı ve deney sayısı faktör sayısından bir fazladır.
- İkinci satırın yana kaydırılması ile üçüncü satır elde edilir (Tablo 2.13).
- Bütün faktörler için yüksek ve düşük seviye sayısı aynıdır. Bu da kolonların birbirinden bağımsız olduğunu göstermektedir.
- Plackett-Burman tasarımda deney sayısı faktör sayısından bir fazladır. 11 faktör için 12 deney yapılmalıdır. Ancak gerçekte 10 faktör mevcut ise 11. faktörün seçimi için sonuç üzerinde herhangi bir etkisi olmayan bir faktörden yararlanılır. Bu faktör "dummy faktör" olarak adlandırılmaktadır. Tasarım tablosuna kesim noktası ( $b_0$ ) ilave edildiğinde kare matris elde edilir. Bu durumda b katsayıları aşağıdaki gibi hesaplanabilir:

$$b = D^{-1}y$$

Tasarım tablosunda kodlanmış değerler kullanıldığında b katsayıları her bir kolon ölçülen değerlerle ( $y$ ) çarpıldıktan sonra deney sayısına bölünerek de hesap yapılabilir.

$$b_j = \sum_{i=1}^N X_{ij} y_i \frac{1}{N}$$

### 2.2.3. Optimizasyon Tasarımları

Tarama tasarımları, iki seviye ile her bir faktörün etkilerini genel olarak inceler. Tekrarlanan deney sayısını ve parabolik etkilerini incelemeyi. Bazı durumlarda faktörler arasındaki etkileşimleri incelemek mümkün olmadığından bu tasarımlar ile önemli faktörler belirlendikten sonra optimizasyon yapılır. Optimizasyon yapılmasının iki amacı vardır. Bunlardan birincisi, deneysel sonuç üzerinde etkisi olan faktörlerin optimum değerlerini belirlemektir. Örneğin, kromatografik bir ayırma işleminde ayırma gücü üzerinde etkisi olan faktörlerin optimizasyonu gibi. İkincisi ise, her bir faktörün sonuç üzerinden etkisini ortaya koyan matematiksel modelin oluşturulmasıdır. Örneğin, bir

ürünün FTIR spektrumu ölçülerek ürünün özelliği ve dolayısıyla üretim prosesi arasında ilişki kurulmasına ihtiyaç duyulabilir.

Optimizasyon tasarımlarında sadece, tarama tasarımı ile bulunan etkili faktörlerin deney sonuçları üzerine olan etkileri incelenir. Daha fazla sayıda seviye ile çalışılır, tekrarlanan deney sayısı, faktörler arasındaki etkileşimler ve parabolik etkiler hesaplanır.

En yaygın kullanılan optimizasyon tasarımları; merkezi kompozit tasarım, Box-Behnken tasarımı, Doehlert tasarımı ve D-optimal tasarımıdır.

### **2.2.3.1. Merkezi Kompozit Tasarım**

Bu tasarımlar tam karesel bir model oluşturulabilirler. Özellikle faktör eleme aşamasında 2k veya 2k-p faktöriyel tasarımları kullanılması halinde, faktöriyel tasarımda bulunmayan bazı denemelerin yapılması sayesinde ekonomik olarak tamamlanabilirler. Çünkü bu tasarımlar temelde, iki seviyeli tam/kısmi faktöriyel tasarım, eksen noktaları ve ilave merkez noktalarından oluşur. Daha önce yapılmış olan iki seviyeli bir tam/kısmi faktöriyel tasarımın yanıt yüzeyi grafiğinde düzlemsellikten ziyade dağ şeklini andıran eğimlilik görülmesi halinde (eğimliliğin görülebilmesi için tasarıma birkaç merkez noktası eklenmiş olmalıdır), bu eğimliliğin daha iyi tahmini için mevcut faktöriyel tasarıma eksen noktaları ve ilave merkez noktaları eklenerek merkezi birleşik tasarıma dönüştürülebilir. Bu tasarımda bulunan eksen noktaları, faktör seviyelerinin alt ve üst limitlerinin dışında noktalar olabildiği için bu noktalarda yapılan denemelerin kabul edilemez değerler oluşturulabileceği göz önünde bulundurulmalıdır.

Bu durumda, eksen noktalarının tasarım merkezine uzaklığı olan  $\alpha$  değeri değiştirilerek çözüm bulunabilir. Bu tasarımın çevresel sınırlı (CCC), ortogonal (CCO) ve yüzey merkezli (CCF) tipleri bulunmaktadır.

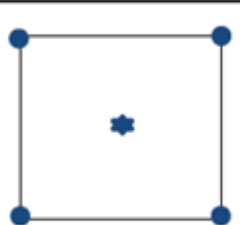
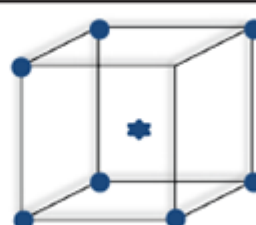
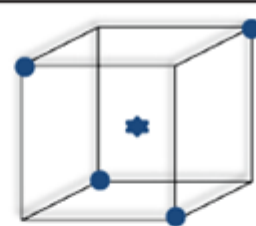
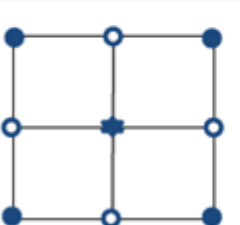
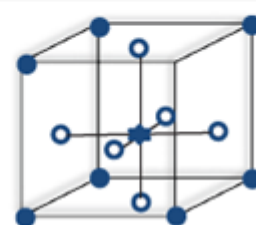
Şekil 2.2' de tam faktöriyel, kısmi faktöriyel ve birleşik tasarım noktaları gösterilmiştir. Her bir nokta, bir denemeyi temsil etmektedir. Şekillerin ortasındaki kar taneciği, deneysel hatanın araştırılması için yapılan tekrarlanmış merkez noktasını göstermektedir. Şekilden de görülebilceği gibi, istatistiksel eleme amaçlı olarak da kullanılan tam faktöriyel tasarımda sadece köşe noktaları ve her zaman olmamakla birlikte merkez noktasında denemeler yapılmaktadır. Sadece eleme amaçlı olarak kullanılan ikinci satırdaki kısmi faktöriyel tasarımda ise, tam faktöriyelden daha az köşe noktası ve merkez noktası vardır. Ancak

optimizasyon amacıyla kullanılan birleşik tasarımda ise, tam faktöriyeldeki tasarım noktalarına ek olarak, içi boş yuvarlaklarla gösterilen eksen noktaları da bulunmaktadır.

Merkezi kompozit tasarımda deney sayısı aşağıdaki formüle göre belirlenir:

$$\text{Deney sayısı} = 2^k + 2k + 1 \quad (k: \text{faktör sayısı})$$

Formüldeki  $2^k$  tam faktöriyel veya fraksiyonlu faktöriyel tasarımdaki deney sayılarını,  $2k$  star tasarım deney sayısını ve 1 ise orta seviyedeki deney sayısını gösterir.  $2^k$ 'daki seviyeler (-1) ve (+1),  $2k$ 'dakiler  $\pm\alpha$ , 1'deki ise (0) dır.  $\alpha$  değeri dairesel ve ortogonal tasarıma göre farklı seviyeler alır.  $\alpha$ ; dairesel tasarımda  $\pm\sqrt{2^k}$ , ortogonal tasarımda ise  $\pm\sqrt{k}$  formülüne göre hesaplanır.

Tasarım tipi	2 adet faktör	3 adet faktör	3'ten fazla faktör (>3)
Tam faktöriyel tasarım			Hiperküp
Kısmi faktöriyel tasarım			Hiperkübün dengeli bir bölümü
Merkezi birleşik tasarım			Hiperküp + eksen noktaları

**Şekil 2.2** Tam faktöriyel, kısmi faktöriyel ve birleşik tasarım noktalarının gösterilmesi

3 faktör için merkezi kompozit tasarım örneği Tablo 2.14'de verilmiştir.

**Tablo 2.14** 3 Faktör için merkezi kompozit tasarım

Deney sayısı	Faktörler		
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>
1	0	0	0
2	-1	0	0
3	+1	0	0
4	0	-1	0
5	0	+1	-1
6	0	0	+1
7	0	0	-0,5
8	-0,5	-0,5	-0,5
9	-0,5	+0,5	-0,5
10	0,5	+0,5	-0,5
11	0,5	-0,5	0,5
12	-0,5	-0,5	0,5
13	-0,5	+0,5	0,5
14	0,5	+0,5	0,5
15	0,5	-0,5	0,5

### 2.2.3.2. Box-Behnken Tasarımı

Box-Behnken tasarımı merkezi kompozit tasarımının aksine tam/kısmi faktöriyel tasarım içermeyen üç ya da daha fazla seviyeye sahip tasarımlardır ve üç ya da daha fazla faktöre sahip problemlere uygulanabilir. Faktöriyel veya ekstremum noktaları yoktur ve bu tasarım  $[2k(k-1) + nc]$  sayıda noktadan oluşur. Bu denklemde k faktör sayısını, nc merkezi deneme sayısını belirtmektedir.

Box-Behnken tasarımında tüm tasarım noktaları, bir küpün veya hiperkübün kenarlarının ortasında bulunur ve bu noktaların hepsi bir kürenin yüzeyine yerleştirilmiştir. Bu tasarımlarda 1. ve 2. dereceden model katsayılarının etkili bir biçimde kestirimi sağlanabilir.

Ancak bu tasarımın kullanılabilmesi için en azından üç faktörün nicel olması gerekmektedir. Aynı sayıda faktörün yer aldığı durumlarda, merkezi kompozit tasarımına göre daha az nokta içerdiğinden daha ekonomiktir. Box-Benkhen tasarımı, optimum değerler faktör aralığı ortasında olduğu bilinen, ikiden daha fazla faktörün bulunduğu sistemler için önerilir. Fakat içinde faktöriyel tasarım bulundurmadığı için ardışık sıralı denemeler için uygun olmadığı, yani yapılmış bir faktöriyel tasarımdaki denemelerle birleştirilemeyeceği göz önünde bulundurulmalıdır. Bu tasarımda merkezi kompozit tasarımında olduğu gibi eksen noktaları bulunmadığı için faktör seviyelerinin alt ve üst limitlerinin dışına çıkılması gibi bir durum söz konusu değildir. Ayrıca bu tasarımda, tüm faktörlerin aynı anda düşük (-) ve aynı anda yüksek (+) olduğu denemeler bulunmaz. Üç faktörlü Box-Behnken tasarımı için 15 adet ve dört faktörlü tasarımı ise 27 adet deneme yapılması gerekir.

3 faktör için Box-Behnken tasarımı örneği Tablo 2.15'te verilmiştir.

**Tablo 2.15** 3 Faktör için Box-Behnken tasarımı

Deney sayısı	Faktörler		
	A	B	C
1	-1	-1	0
2	+1	-1	0
3	-1	+1	0
4	+1	+1	0
5	-1	0	-1
6	+1	0	-1
7	-1	0	+1
8	+1	0	+1
9	0	-1	-1
10	0	+1	-1
11	0	-1	+1
12	0	+1	+1
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0

### 2.2.3.3. Doehlert Tasarımı

Doehlert tasarımı, başka faktör aralıklarına geçebilme ve faktör aralıklarını genişletebilme gibi özelliklere sahip olan karesel modeller oluşturabilen bir tasarımdır. Merkezi kompozit ve Box-Behnken tasarımları gibi döndürülebilir değildir. Bu tasarımda tüm ana faktör

etkileri, birinci dereceden etkileşimler ve karesel etkiler birbirine karıştırılmadan öngörülebilir. Farklı faktörler için farklı tahmin değerleri verebilir. Böylece, önemli faktörler için daha fazla seviyelerde ölçüm gerçekleştirilebilir.

Merkezi kompozit tasarımlarıyla benzer özelliklere sahiptir. Geometrik olarak, hiper-üçgenler içeren iç içe geçmiş çok yüzlü şekillerdir. Bu tasarım verilen faktör boşluğunu mümkün olduğunca düzgün olarak doldurmaya çalışır. Faktör sayısının  $k$  olduğu, merkez noktası içermeyen durumda Doehlert tasarımı  $k^2 + k + nc$  noktadan oluşur. Bu tasarımlara mutlaka 3 – 4 adet merkez noktası eklenmesi tavsiye edilmektedir.

3 faktör için Doehlert tasarımı örneği Tablo 2.16'da verilmiştir.

**Tablo 2.16** 3 Faktör için Doehlert tasarımı

Deney sayısı	Faktörler		
	A	B	C
1	0	0	0
2	1	0	0
3	0,5	0,866	0
4	0,5	0,289	0,817
5	-1	0	0
6	-0,5	-0,866	0
7	-0,5	-0,289	-0,817
8	0,5	0,866	0
9	0,5	0,289	-0,817
10	-0,5	0,866	0
11	0	0,577	-0,817
12	-0,5	0,289	0,817
13	0	-0,577	0,817



#### **2.2.3.4. D-Optimal Tasarım**

D-optimal tasarımda faktör seviyelerinin oluşturduğu deneysel bölge düzenli hiper-üçgen şeklinde değil, düzensiz çok yüzlü şeklindedir. Klasik tasarımların uygulanmasının mümkün olmadığı, faktör seviyelerinde çeşitli kısıtlamalar olduğu, dolayısıyla düzensiz şekilli deneysel bölgenin olduğu (örneğin; çözücü bileşimi ve çözünen konsantrasyonlarının kombinasyonlarının uygun olmaması gibi), nitel faktörlerin fazla olduğu ve ikiden fazla seviyelerinin olduğu durumlarda tercih edilebilir.

Bu tasarımın avantajı deney sayısının araştırmacı tarafından belirlenebilir olmasıdır. Bu sayı modeldeki etkilerin katsayılarını hesaplamak için minimum olmalıdır. D-optimal çözüm, toplam sayıdan tasarım noktalarını seçerek, "Noktaların optimal dağılımı nedir?" sorusunu cevaplar. Bu,  $X^T X$  determinantının maksimize edilmesiyle gösterilebilir ( $X$ , tasarım noktalarının matrisi,  $T$ , transpoze). Minimum bir tasarım analiz edildiğinde, sistem hakkındaki bilginin netleştirilebilmesi için aynı prensiple daha fazla nokta eklenebilir.

#### **2.2.3.5. Karışım Tasarımları**

Karışım tasarımları, optimizasyonu yapılacak olan deneydeki sonuçlara etki eden ana faktörlerin toplamı sabit bir sayı ile sınırlandırıldığında kullanılır. Örneğin kromatografik bir ayırma yönteminde mobil faz çözeltisinin bileşenlerinin toplamının %100 olması gerekmektedir. Mobil fazın asetonitril, metanol ve su gibi üç organik çözücünden olduğu bir durumda, mobil faz bileşeninde yer alan çözeltilerin ağırlık ya da hacimce oranlarının toplamı 100'e eşit olmalıdır. Bu tür çalışmalar için karışım tasarımları kullanılabilir ve bu tasarımlarda bir bileşen sabit tutulurken diğer ikisi seçilir.

Karesel ve kübik modeller oluşturulabilir, hiperüçgen ağırlık merkezi (centroid), hiper-üçgen kafes (lattice) ve uç köşe noktaları (extreme vertices) şeklinde tasarım türleri bulunmaktadır.

#### **2.2.4. Varyans Analizi (ANOVA)**

Varyans analizi, ikiden fazla popülasyonun ortalamaları arasında anlamlı bir fark olup olmadığını, eğer anlamlı bir fark var ise hangi spesifik popülasyon ortalamasının diğerlerinden farklı olduğunu bulmak için kullanılan istatistiksel bir işlemdir. İki grubun ortalamaları arasındaki farkın anlamlı olup olmadığı t testi kullanılarak da incelenebilir.

Eğer ikiden fazla grubun ortalamaları karşılaştırılacak ise F Testi, diğer bir isimle Varyans Analizi (ANOVA, Analysis Of Variance) uygulanır.

Deneysel tasarım yöntemlerinde de ANOVA'nın avantajlarından yararlanır. ANOVA tarama tasarımlarında ve optimizasyonda farklı amaçlarla kullanılabilir. Tarama tasarımlarında, faktörlerin etkileri sayısal olarak hesaplanır. Bu sayısal değerler ANOVA ile incelenerek değerlerin anlamlı olup olmadığı yani faktörün deney sonucu üzerinde etkisi olup olmadığı belirlenir. Optimizasyonda ise ANOVA ile, modelleme sonucu elde edilen teorik sonuçlarla, deneysel sonuçlar arasında anlamlı bir fark olup olmadığı belirlenir. Böylelikle oluşturulan modelin güvenilirliği test edilir. İki den fazla grubun ortalamaları arasında anlamlı bir farklılık olup olmadığını test eden F testinin hipotezi aşağıdaki gibidir.

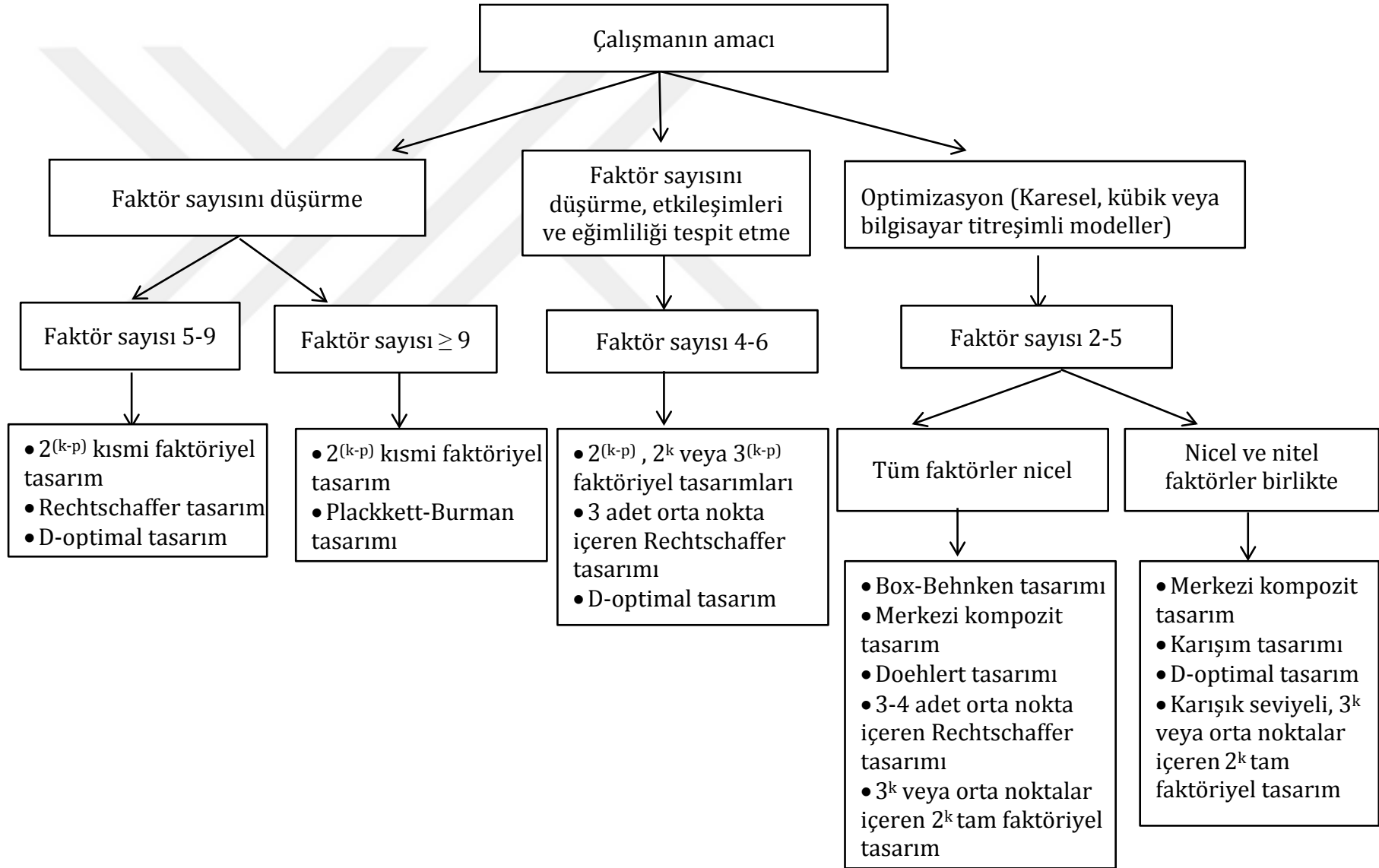
$H_0 : \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \dots = \mu_N$  yani ortalamalar arasında fark yoktur.

$H_A$  : Ortalamalardan en az ikisi arasında anlamlı fark vardır.

### **2.2.5. Deneysel Tasarımın Analitik Kimyada Uygulamaları**

Analitik kimyada çeşitli yöntemlerle yapılan analizlerde analiz sonuçları üzerinde etkisi olan faktörlerin ve bu faktörlerin optimum değerlerinin belirlenebilmesi amacı ile deneysel tasarımdan yararlanılmaktadır. Çalışmanın amacına göre sözü edilen deneysel tasarım yöntemlerini uygulama planı Şekil 2.3'de gösterilmiştir. İlaç endüstrisinde deneysel tasarıma en çok başvuru yapılan yöntemler kromatografik yöntemler ve elektroforez yöntemidir. Tablo 2.17'de deneysel tasarımın ilaç örnekleri ve çeşitli biyolojik örneklerin analizinde HPLC ile uygulamaları ve bu çalışmalarda kullanılan deneysel tasarım yöntemleri verilmiştir.

Ayrıca deneysel tasarım, geliştirilen analitik yöntemlerin geçerliliğini kontrol etmek amacı ile yapılan validasyon çalışmalarında tutarlılık parametresinin incelenmesinde de kullanılmaktadır.



**Şekil 2.3** Deneysel tasarımın uygulanması

**Tablo 2.17** İlaç örneklerinin ve çeşitli biyolojik örneklerin analizinde HPLC ile uygulanan deneysel tasarım yöntemleri

Örnek	Analitler	Analiz Yöntemi	Deneysel Tasarım	Faktörler	Kaynak
Çeşitli örnekler	Malonil-koenzim-A	HPLC	Plackett-Burman, merkezi kompozit	pH, Magnezyum ve tampon konsantrasyonu, reaksiyon sıcaklığı, zaman	[358]
Atık sular ve yüzey suları	Nitrit, nitrat ve fenilendiamin izomerleri	İyon etkileşimi sıvı kromatografisi	Merkezi kompozit-PLS (kısmi en küçük kareler)	Amonyum tuzunun alkil zinciri uzunluğu, konsantrasyonu ve akış hızı	[359]
Çeşitli örnekler	Poli(stirendivinilbenzen) üzerindeki tetrasiklin	LC	Yarı fraksiyonel faktöriyel	Çeşitli parametreler	[360]
İlaç örnekleri	Metil ve propil p-hidroksi benzoat, fenilefrin hidroklorür, klorfeniramin maleat	İyon çifti sıvı kromatografisi	Merkezi kompozit	Metanol konsantrasyonu, sodyum dioktilsülfosüksinat ve dimetiloktilamin konsantrasyonu, pH	[361]
Çeşitli örnekler	Tetrasiklin hidroklorür	HPLC	Plackett-Burman, fraksiyonel faktöriyel	Çeşitli parametreler	[362]
Çeşitli örnekler	Simazin, atrazin	GC-HPLC	Simpleks metodu	Elüent karışımının polarlığı, enjeksiyon miktarı	[363]
Kazein	Riboflavin	HPLC	Faktöriyel	Çeşitli parametreler	[364]
Çeşitli örnekler	Simazin, atrazin	İyon etkileşimi sıvı kromatografisi	Fraksiyonel	İyon-etkileşim ajanının zincir uzunluğu ve konsantrasyonu, mobil fazın pH'ı, akış hızı, organik değiştirici konsantrasyonu	[365]
İlaç örnekleri	Stereoizomerik safsızlıklar	HPLC	Fraksiyonel faktöriyel	Siklodesktrin konsantrasyonu, sabit faz, tampon pH'ı, tampon/organik değiştirici oranı, akış hızı, kolon sıcaklığı	[366]

**Tablo 2.17** İlaç örneklerinin ve çeşitli biyolojik örneklerin analizinde HPLC ile uygulanan deneysel tasarım yöntemleri (devamı)

Bitki örnekleri	Karboksilik asitler	HPLC	Faktöriyel	İyon değiştirici, pH, organik çözücü varlığı ya da yokluğu, tampon konsantrasyonu	[367]
Deniz suyu	Nitrat, fosfat	İyon kromatografisi	Fraksiyonel faktöriyel	Çeşitli parametreler	[368]
İlaç örnekleri	B-1, B-2-fosfat, B-3, B-6, C vitaminleri (sakarın ve E110 varlığında)	İyon çifti sıvı kromatografisi	Draper-Lin kompozit	Metanol yüzdesi, heksansülfonat ve trietanolamin konsantrasyonu, pH	[369]
Sirke	Organik asitler	İyon değişim kromatografisi	Faktöriyel	Elüent pH'ı, kolon sıcaklığı, mobil faz akış hızı	[370]
Çeşitli örnekler	Pestisitler	İyon etkileşimi sıvı kromatografisi	ANN (Yapay sinir ağı)	Mobil faz pH'ı, iyon etkileşim ajanının alkil zinciri uzunluğu, organik faz konsantrasyonu, iyon etkileşim ajanı konsantrasyonu, akış hızı	[371]
Yeni ve geri kazanılmış poliolefin örnekleri	Irganox 1076,	SFE, HPLC	Tam faktöriyel	Basınç, sıcaklık, süre, organik çözücü yüzdesi	[372]
İlaç örnekleri	Kodein fosfat, psödöfenilefrin hidroklorür, klorfeniramin maleat	HPLC	Tam ve faktöriyel	Dalga boyu, mobil faz pH'ı, iyon çifti ajanı konsantrasyonu	[373]
Çeşitli örnekler	Fenolik yan ürünler	HPLC	Merkezi kompozit	Başlangıç izokratik elüsyonu, gradient çalışma süresi	[374]
İlaç örnekleri	Kaptopril	HPLC	Box-Behnken	Çeşitli parametreler	[375]

**Tablo 2.17** İlaç örneklerinin ve çeşitli biyolojik örneklerin analizinde HPLC ile uygulanan deneysel tasarım yöntemleri (devamı)

Çeşitli örnekler	Troleandomisin	LC	Tam faktöriyel	Mobil faz pH'ı, kolon sıcaklığı, organik çözücü konsantrasyonu	[376]
Soya fasulyesi	İzoflavonoidler	HPLC	Merkezi kompozit	Hidroklorür konsantrasyonu, sıcaklık, hidroliz süresi	[377]
Çeşitli örnekler	H 314/27, H 314/26, H 314/21, H 299/87, DKP	HPLC-UV	Faktöriyel, merkezi kompozit	Mobil fazdaki asetonitril miktarı, fosfat tamponu konsantrasyonu, mobil fazdaki oktan sülfonat konsantrasyonu	[378]
Şarap örnekleri	Biyojenik aminler	LC	Doehlert	Çeşitli parametreler	[379]
Antifungal ilaç preparatı	Pneumocandin B0	HPLC	Plackett-Burman	Kolon sıcaklığı, akış hızı, dalgaboyu, enjeksiyon hacmi, mobil faz bileşimi, kolon çeşitliliği	[380]
Bergamot Portakalı Suyu	Flavonoidler	HPLC	D-optimal	Ekstraksiyon süresi, sıcaklık, çözücüler	[381]
İlaç örnekleri	İmatinib mesilat ve safsızlıkları	HPLC	2 <sup>4</sup> faktöriyel	Mobil fazdaki metanol ve trietilamin içeriği, mobil fazın pH'ı, kolon sıcaklığı	[382]
Kan plazması (insan)	5 Tane 1,4-Dihidropiridin	LLE, HPLC-DAD	Faktöriyel, merkezi kompozit	Sodyum hidroksit konsantrasyonu, organik çözücü hacmi, karıştırma süresi	[383]
Kahve, çay ve idrar örnekleri	Metilksantinler	HPLC-UV	Tam faktöriyel	Akış hızı, mobil faz bileşimi	[384]
Humanin türevleri	Nörokoruyucu peptitler	İyon çifti kromatografisi	Tam faktöriyel, fraksiyonel faktöriyel, ANN (yapay sinir ağı)	Mobil fazın bileşimi, mobil fazın pH'ı, kolon sıcaklığı	[385]

**Tablo 2.17** İlaç örneklerinin ve çeşitli biyolojik örneklerin analizinde HPLC ile uygulanan deneysel tasarım yöntemleri (devamı)

Kan plazması örneği (insanlarda)	Prostaglandin E-2	LC-MS	Merkezi kompozit	Çeşitli parametreler	[386]
Çeşitli örnekler	Heterosiklik aromatik aminler	SPE, HPLC-UV/DAD	Faktöriyel-Doehlert	Absorpsiyon süresi, ıslanma süresi, desorpsiyon süresi	[387]
İlaç örnekleri	Pramipeksol	HPLC-UV	Merkezi kompozit, 2 <sup>3</sup> faktöriyel	Asetonitril yüzdesi, akış hızı, pH	[388]
Kan plazması örneği (insan)	Valsartan	SPE, HPLC-UV-Floresans	Fraksiyonel faktöriyel, merkezi kompozit	Akış hızı, kolon sıcaklığı, mobil faz pH'ı, mobil fazdaki TFA yüzdesi, mobil fazın başlangıç bileşimi, gradient elüsyondaki ACN basamakları	[389]
Şarap örnekleri	Biyojenik aminler	İyon çifti sıvı kromatografisi	Faktöriyel	Asetonitril ve SHS konsantrasyonu	[390]
İlaç örnekleri	Valdekoksib ve bozunma ürünleri	HPLC	2 <sup>3</sup> tam faktöriyel(validasyon)	Çeşitli parametreler	[391]
İlaç örnekleri	Liklokain, proparakain, bupivakain, oksibuprokain	HPLC-UV	Tam faktöriyel, merkezi kompozit	Mobil faz bileşimi, pH akış hızı	[392]
İlaç örnekleri	Atorvastatin ve safsızlıkları	RR-RP-HPLC	Tam faktöriyel, merkezi kompozit	Gradient elüsyon sırasında organik faz miktarı, organik fazdaki Tetrahidrofuran içeriği, gradient süresi(dayanıklılık testi için)	[393]
Doğal kontamine sular	EPA-polisiklik aromatik hidrokarbonlar	HPLC-Floresans	Doehlert	Toplam hekzan hacmi, ekstraksiyon basamaklarının sayısı ve süresi	[394]
İlaç örnekleri	Lerkanidipin	LC-UV	Faktöriyel	Asetonitril miktarı, mobil faz pH'ı	[395]

**Tablo 2.17** İlaç örneklerinin ve çeşitli biyolojik örneklerin analizinde HPLC ile uygulanan deneysel tasarım yöntemleri (devamı)

Su örnekleri	Metakrat	HPLC	Ortogonal, merkezi kompozit	Ekstraksiyon çözücü ve disperse edici çözücü hacmi, tuz etkisi, örnek hacmi, ekstraksiyon süresi	[396]
Caropa guianensis ağacı tohumu yağı	Terranortriterpenoidler	HPLC	Merkezi kompozit	Çeşitli parametreler	[397]
Çeşitli örnekler	Yunakonitin	HPLC	Box-Behnken	Asetonitril, perklorik asit, trietilamin içeriği, kolon sıcaklığı	[398]
İdrar ve kan plazması örnekleri (insan)	Mikofenolik asit, mikofenolik asit glukuronit	SPE, HPLC	Fraksiyonel faktöriyel, merkezi kompozit	Çeşitli parametreler	[399]
İlaç örnekleri	7 tane 2-arilimidazolin türevi	HPLC	Tam faktöriyel	Sıcaklık, pH, mobil faz bileşimi	[400]
İlaç örnekleri	İbuprofen, psödoefedrin hidroklorür, klorfeniramin maleat, nipajen	HPLC	Fraksiyonel faktöriyel	pH, akış hızı, 3 basamaklı gradient elüsyon için çözücü oranı	[401]
Bal	Flavonoid belirteçleri	SPE, LC	Merkezi kompozit	Maksimum yükleme kapasitesi, Taşıyıcı gaz hacmi	[402]
İlaç örnekleri	Karbamazepin ve safsızlıkları	LC	Merkezi kompozit, fraksiyonel faktöriyel	Kolon sıcaklığı, organik çözücü yüzdesi, asetat tamponu konsantrasyonu, sulu fazın pH'ı	[403]
İlaç örnekleri	Nimopidin ve safsızlıkları	HPLC	Tam faktöriyel	Organik çözücü türü ve konsantrasyonu, kolon sıcaklığı, akış hızı, pH	[404]
İdrar ve kan plazması örnekleri	Mikofenolik asit, glukuronit	HPLC	Fraksiyonel faktöriyel	Sulu fazın pH'ı, asetonitril yüzdesi, kolon sıcaklığı, akış hızı	[405]



**Tablo 2.17** İlaç örneklerinin ve çeşitli biyolojik örneklerin analizinde HPLC ile uygulanan deneysel tasarım yöntemleri (devamı)

Çocuk mamaları	Florokinolon kalıntıları	LC-FLD	Fraksiyonel faktöriyel, merkezi kompozit	Çözücü bileşimi, sıcaklık, basınç, aşama sayısı	[406]
Kompleks karışımlar	Polisiklik aromatik hidrokarbonlar	HPLC	Tam faktöriyel	Akış hızı, kolon sıcaklığı, mobil faz gradienti	[407]
İlaç örnekleri	Sertralin ve kiral olmayan safsızlıkları	HPLC	Faktöriyel	Kolon sıcaklığı, tampon pH'ı, tampon konsantrasyonu	[408]
Kompleks biyolojik örnekler	Kolesteril esterler	HPLC	Fraksiyonel faktöriyel, ANN-GA	Mobil fazdaki organik bileşen, kolon sıcaklığı, akış hızı	[409]
İlaç örnekleri	Rivastigmin hidrojen tartarat	LC	Deneysel tasarım	Asetonitril yüzdesi, akış hızı, sıcaklık	[410]
İlaç örnekleri	Non-steroidal antiinflamatuar ilaçlar	HPLC	Fraksiyonel, MRA (çok değişkenli regresyon analizi)	Çeşitli parametreler	[411]
İlaç örnekleri	İbuprofen, psödofenilefrin hidroklorür, klorfeniramin maleat, nipajen	HPLC	2 <sup>(5-1)</sup> fraksiyonel faktöriyel	pH, akış hızı, çözücü oranları	[412]
İlaç örnekleri	Aliskiren, hidroklorotiazid	HPLC-DAD	Plackett-Burman, 2 <sup>3</sup> tam faktöriyel	Akış hızı, tampon konsantrasyonu, pH, organik çözücüdeki asetonitril yüzdesi, sıcaklık	[413]
İlaç örnekleri	Kaptopril	HPLC-ECD	Merkezi kompozit	Mobil faz pH'ı, mobil faz konsantrasyonu, asetonitril konsantrasyonu	[414]
Kan serumu örnekleri	Klorpromazin, trifluoperazin	SBSE, HPLC-UV	2 <sup>5</sup> yarı fraksiyonel faktöriyel, Box-Behnken	Örnek hacmi, ekstraksiyon süresi, sıcaklık, karıştırma hızı, ekstraksiyon basamağındaki pH	[415]

**Tablo 2.17** İlaç örneklerinin ve çeşitli biyolojik örneklerin analizinde HPLC ile uygulanan deneysel tasarım yöntemleri (devamı)

Su örnekleri	N-metilkarbamat	LLME, HPLC	Plackett-Burman, merkezi kompozit	Ekstraksiyon ve dispersiyon çözücülerinin hacmi, iyonik güç, pH, ekstraksiyon süresi, santifüj süresi	[416]
Toprak örnekleri	Ariloksifenoksi propiyonik herbisitler	LC-UV	Faktöriyel	2-propanol yüzdesi, tampon pH'ı, kolon sıcaklığı	[417]
Biyolojik örnekler	Propil tiourasil	HPLC-UV	Yarı faktöriyel fraksiyonel, merkezi kompozit	pH, sıcaklık, ekstraksiyon süresi, karşıt iyon konsantrasyonu, organik çözücü yüzdesi	[418]
Kozmetik ürünler ve çevresel su örnekleri	Ftalat esterleri	USAEME-SFO, HPLC-DAD	Faktöriyel, Box-Behnken	Ekstraksiyon çözücü hacmi, tuz etkisi, ekstraksiyon ve santrifüj süresi	[419]
İlaç örnekleri	Sitalopram enantiyomerleri	HPLC-UV	2 <sup>3</sup> Tam faktöriyel, Box-Behnken	Organik çözücü yüzdesi, akış hızı, sıcaklık	[420]
Kan plazma örnekleri (insanlarda)	İmanitib ve metaboliti	HPLC	D-optimal	Mobil faz bileşimi, tampon pH'ı	[421]
Sebzeler	İyonoforik ve sentetik bakterisidallar	UPLC-MS/MS	Tam faktöriyel, fraksiyonel faktöriyel, Plackett-Burman	Ekstraksiyon, elüsyon ve enjeksiyon çözücüleri, santrifüj süresi, farklı heksan hacimleriyle yapılan sıvı-sıvı ekstraksiyonlar, farklı oranlardaki yıkama çözeltileri, santrifüjleme hacimleri, dondurarak kurutma etkisi	[422]
Çevresel su örnekleri	Polisiklik aromatik hidrokarbonlar	AA-DLLME, HPLC	Faktöriyel, merkezi kompozit	Ekstraksiyon da ve dispersiyonda kullanılan çözücülerin türü ve hacmi, tuz miktarı, karıştırma süresi	[423]
Ev tozu	Polisiklik aromatik hidrokarbonlar	HPLC-UV-DAD	Deneysel tasarım ve yanıt yüzey metodolojisi	Ekstraksiyon, elüent ve dispersiyon çözücülerinin hacmi	[424]

**Tablo 2.17** İlaç örneklerinin ve çeşitli biyolojik örneklerin analizinde HPLC ile uygulanan deneysel tasarım yöntemleri (devamı)

Bitki örneği	Oksindol alkaloidler	HPLC	2 <sup>3</sup> tam faktöriyel, merkezi kompozit	Tampon, pH, kolon sıcaklığı	[425]
Bitki örneği	Aporfin alkaloidler	HPLC-UV	Tam faktöriyel	Mobil faz pH'ı, metanolün başlangıç oranı	[426]
İdrar örnekleri	Organik UV filtreleri	DLLME, HPLC-DAD	2 <sup>(6-2)</sup> fraksiyonel faktöriyel	Dispersiyon ve ekstraksiyon çözücülerinin türü ve hacmi, örnek pH'ı, tuz konsantrasyonu	[427]
İlaç örnekleri	Amoksisilin trihidrat	HPLC	Box-Behnken	Mobil faz bileşimi, akış hızı, pH	[428]
İlaç örnekleri	Sitalopram ve safsızlıkları	HPLC	PSLR-MLP-ANN	Tampon pH'ı, akış hızı, kolon sıcaklığı	[429]
Kan plazması örneği	Lenalidomid	LC-MS/MS	3 <sup>2</sup> faktöriyel, Box-Behnken	Mobil faz bileşimi, akış hızı, pH	[430]
Biyolojik matrisler	Glutasyon	LC-ESI-MS	Doehlert	Mobil faz akış hızı, sulu çözeltide asetonitrilin yüzde hacmi	[431]
İlaç örnekleri	Levulinik asid (LEA) loril alkol	HPLC	Box-Behnken	Mobil faz oranı, pH	[432]
İlaç örnekleri	Glipizid	HPLC	Merkezi kompozit	Sıcaklık, mobil faz	[433]
İlaç örnekleri	Nistatin	HPLC	Box-Behnken	Mobil faz, pH	[434]
Okaliptüs	Fenolik bileşikler	MAE, LC	Box-Behnken	Çözücü, zaman	[435]

**Tablo 2.17** İlaç örneklerinin ve çeşitli biyolojik örneklerin analizinde HPLC ile uygulanan deneysel tasarım yöntemleri (devamı)

İnsan kan plazması	Ezetimib	HPLC	Box-Behnken	Mobil faz oranı, atık faktörü	[436]
İlaç örnekleri	Ofloksin, nimorazol	RP-HPLC	Merkezi kompozit	Mobil fazdaki tetrahidrofuran oranı, akış hızı, tampon çözelti	[437]
İlaç örnekleri	Beta blokerler	RP-HPLC	Merkezi kompozit	Dalga boyu	[438]
İlaç örnekleri	Metoprolol ( $\beta$ 1-bloker)	LC-MS/MS	Faktöriyel	UV yoğunluk, çözünmüş organik madde	[439]
İlaç örnekleri	Eberkonazol nitrat	HPLC	3 <sup>3</sup> fraksiyonel faktöriyel	Mobil faz bileşimi, pH	[440]
İlaç örnekleri	Fenoverin	HPLC	(2 <sup>7-3</sup> ) fraksiyonel faktöriyel (tarama), 3 <sup>3</sup> Box-Behnken (optimizasyon)	Mobil faz bileşimi, sıcaklık, çözünmüş organik madde	[441]
İlaç örnekleri	Dabigatran eteksilat ve ilgili safsızlıklar	HPLC	3 <sup>3</sup> fraksiyonel faktöriyel, merkezi kompozit	Mobil faz akış hızı, pH, sıcaklık	[442]
İnsan kan plazması	Fluoksetin	LC-MS	3 <sup>3</sup> Box-Behnken	Mobil faz akış hızı, pH, çözünmüş organik madde	[443]
Bitki örneği	Coptis Chinensis	HPLC	Plackett-Burman, Box-Behnken	pH, sıcaklık, organik faz yüzdesi	[444]

**Tablo 2.17** İlaç örneklerinin ve çeşitli biyolojik örneklerin analizinde HPLC ile uygulanan deneysel tasarım yöntemleri (devamı)

Protein	-	UHPLC-UV, UHPLC-MS	Plackett-Burman, Box-Behnken	Denatüre hacim, alkilasyon süresi ve sıcaklığı, enzimatik sindirim sıcaklığı ve süresi, mobil faz ve gradient oranı	[445]
İlaç örnekleri	Terazosin	LC-MS	Deney tasarımı	Gradient süresi, sıcaklık, üçlü elüent bileşimi	[446]
Hidrojel	Triamsinolon asetonid	UPLC	Merkezi kompozit	Sıcaklık, akış hızı, mobil fazdaki metanol bileşimi	[447]
İlaç örnekleri	Vilazodon HCl	UPLC	3 <sup>3</sup> Box-Behnken	Tampon çözeltinin pH' ı, akış hızı, mobil fazdaki metanol bileşimi	[448]
İlaç örnekleri	Tamoksifen sitrat	HPLC	Box-Behnken	Tampon çözeltinin pH' ı, mobil faz oranı, fırın sıcaklığı	[449]
İlaç örnekleri	Esomeprazol, omeprazol	HPLC-UPLC	2 seviyeli fraksiyonel faktöriyel	Tampon çözeltinin pH' ı, kolon sıcaklığı, mobil faz A ve B' deki Asetonitril yüzdesi	[450]
Çeşitli örnekler	$\beta$ -agonist, benzoik asit, nükleositler	HILIC	(PLS), merkezi kompozit tasarım	Mobil fazdaki asetonitril yüzdesi, sulu fazın pH' ı, mobil fazdaki tuz konsantrasyonu	[451]
İlaç örnekleri	Bilastin ve degradasyon safsızlıkları	HILIC	Box-Behnken, fraksiyonel faktöriyel	Mobil fazdaki asetonitril yüzdesi, sulu fazın pH' ı, sulu fazdaki amonyum asetat konsantrasyonu	[452]
İlaç örnekleri	Siyanidin-3-O-glukozit	RP-HPLC	Box-Behnken	Mobil faz oranı, akış hızı, dalga boyu değişimi, kolon sıcaklığı	[453]
İlaç örnekleri	Gliklazid & metformin HCl	HPLC	Fraksiyonel faktöriyel	Mobil faz oranı, akış hızı, mobil fazın pH değişimi, kolon sıcaklığı	[454]
İlaç örnekleri	Olanzapin	HILIC	Rechtschaffen	Mobil fazın sulu faz oranı, kolon sıcaklığı, doğrusal gradient süresi	[455]

**Tablo 2.17** İlaç örneklerinin ve çeşitli biyolojik örneklerin analizinde HPLC ile uygulanan deneysel tasarım yöntemleri (devamı)

Çeşitli örnekler	Biyoaktif bileşenler	SPE-HPLC-UV/ELSD	Plackett-Burman, Box-Behnken	Mobil fazın akış oranı, kolon sıcaklığı, evaporatör sıcaklığı, gaz akış hızı	[456]
Çeşitli örnekler	GNE1 ve ilgili izomerleri	2D-HPLC	Merkezi kompozit	Mobil fazın organik faz yüzdesi, mobil faz A' nın formik asit yüzdesi, loop hacmi	[457]
Çeşitli örnekler	Avanafil ve dapoksetin	HPLC	Box-Behnken	Mobil fazın asetonitril yüzdesi, pH, mobil fazın akış oranı, kolon sıcaklığı	[458]
Fare plazması	Nevirapin	HPLC	Box-Behnken	Mobil fazın yüzde oranı, pH, mobil fazın akış oranı, ekstraksiyon süresi, santrifüj hızı	[459]
İlaç örnekleri	Metilparaben sodyum, propilparaben sodyum, hidrokortizon feksofenadin HCl, ibuprofen ve pioglitazon	RP-HPLC	Fraksiyonel faktöriyel	Gradient süresi, tampon çözeltisinin pH' ı	[460]
Çeşitli örnekler	BEL097, BEL174, BEL169	HPLC	Merkezi kompozit	Kolon sıcaklığı, mobil fazın trifloroasetik asit ve n-hekzan yüzdesi	[461]
İlaç örnekleri	Dabigatran eteksilatmesilat ve safsızlıkları	RP-HPLC	Box-Behnken	Gradient programın başlangıç Asetonitril yüzdesi, gradient süresi	[462]
İlaç örnekleri	Sumatriptan ve naproksen	UHPLC-MS	Fraksiyonel faktöriyel	Mobil fazın akış oranı, sıcaklık, gradient süresi	[463]
İlaç örnekleri	Amlodipin	UHPLC	Design space (Dry Lab® models)	Gradient süresi, sıcaklık, pH	[464]

**Tablo 2.17** İlaç örneklerinin ve çeşitli biyolojik örneklerin analizinde HPLC ile uygulanan deneysel tasarım yöntemleri (devamı)

İlaç örnekleri	İmatinib mesilat	UPLC	Box-Behnken	Gradient süresi, sıcaklık, pH, mobil fazın akış oranı, dalgaboyu	[465]
İlaç örnekleri	Dekstrometorfan HBr ve degradasyon ürünleri	UHPLC	Merkezi kompozit, Box-Behnken	Mobil fazın akış oranı, sıcaklık, pH	[466]
İlaç örnekleri	İyoheksol ve safsızlıkları	HILIC	Plackett-Burman, Box-Behnken	Mobil fazın asetonitril yüzdesi, sulu fazın pH' ı, sulu fazın amonyum asetat konsantrasyonu	[467]

## 2.3. Validasyon [468 - 471]

### 2.3.1. Validasyonun Tanımı ve Önemi

Validasyon, ürün kalitesine etki edebilecek tüm işlemlerin önceden belirlenmiş olan spesifikasyonları sağlayacak şekilde işlendiğini, amacına uygunluğunu, kalitesini, çalışılabilirliğini ve geçerliliğini güvence altına almak amacıyla yürütülen çalışmalardır. Hedef her zaman aynı kalite ve aynı şartlar altında üretimi gerçekleştirerek, bu bağlamda üretilen tüm ürünlerin aynı kalitede olmasını sağlamak ve doğru uygulanmış ve düzgün dokümante edilmiş deneysel çalışmalarla uygulanması istenilen amaç için analitik prosedürün uygun olduğunu kanıtlamaktır.

Validasyon işlemlerinin GMP kuralları içinde yapılması gerekmektedir. Validasyon, değişiklikleri en aza indirger, kaliteyi güvence altına alır, kontrolü sağlanmış, güvenilir proseslerle çalışılmasını sağlar, ekipman ve prosesler hakkında bilgi sahibi olunmasını, hatalı malın imhası, yeniden işlem görmesi, yeniden örneklenmesi, analizlerin tekrarlanması gibi olaylardan kaynaklı maliyeti azaltır, verimliliği artırır ve organizasyon içindeki birimlerle koordinasyon, iletişim ve bilgi akışını sağlar.

Valide edilmiş yöntemle çalışıldığında yapılan işlemin kesin, doğru, seçici, tutarlı, geçerli ve güvenilir olduğu garanti edilmiş olur.

- Geçerli olma durumu, geçerlik anlamına gelmektedir.
- Bir kavramın, bir yargının, mantık veya anlamı ve değeri bakımından onaylanabilir olmasıdır.
- Tüm endüstriyel sistemler için, sistemlerin eksiksiz bir şekilde çalıştığının garanti altına alındığı ve hedeflenen kalite anlayışının istenilen yönde olduğunu garanti altına alan ve ortaya koyan çalışmalar bütünüdür.

Validasyon işlemi tüm ürünlerin kalite kontrollerine uygulanabilir. Ülkemizde validasyon işlemi genellikle ilaç sektöründe geniş uygulama alanı bulmaktadır.



### 2.3.2. Endüstride Validasyon Çeşitleri

Endüstride yapılan validasyonlar 4 ana başlık altında toplanır.

**Temizlik işleri validasyonu**, imalat alanında bulunan tüm imalatla ilgili ekipmanların temizlenmesi amacı ile yapılan çalışmalardır.

**Analitik yöntem validasyonu**, analitik bir metodun kalitatif ve kantitatif olarak doğru sonuç verdiğini belirlemek için bir takım değişkenlere göre yapılan test ve ölçme işlemleridir. Çeşitli alanlarda verilen pek çok karar, yapılan ölçümlerin sonucuna dayanılarak verilir. Doğru karar verebilmek için analitik ölçüm sonucunun doğru ve tekrarlanabilir olması gerekir.

Analitik yöntemler aşağıdaki şekilde sınıflandırılabilir;

- Bitmiş ürün ve hammaddelerin etkin madde miktar tayini ve safsızlık tayini yöntemleri
- Bitmiş ürünlerin koruyucu madde miktar tayini yöntemleri
- Limit testi yöntemleri
- Çözünme hızı tayin yöntemleri
- Stabilitate çalışmalarında kullanılan analitik yöntemler
- Farmakopelerde belirtilen bitmiş ürün, etkin madde veya yardımcı maddelere yönelik analitik yöntemler.

**Ekipman validasyonu**, ekipmanın doğru bir şekilde çalışıp çalışmadığını, fonksiyonlarını doğru bir şekilde yerine getirip getirmediğini gözlemlemek amacı ile yapılan çalışmalardır. Ekipman üreticileri,

- İyi laboratuvar uygulamaları (GLP),
- İyi imalat teknikleri (GMP) ve/veya
- ISO 9000 gibi standartlara göre valide edilmiş bir ortamda geliştirmek ve üretmekle sorumludurlar.

**Proses validasyonu**, spesifik olarak bir ürüne ait prosesin tasarım adımından başlayıp ticari boyut seri imalat aşamasına kadar, bir prosesin devamlı olarak kaliteli bir ürünü oluşturma kapasitesinin bilimsel kanıtını sunan verilerin toplanması ve değerlendirilmesidir.

### **2.3.3. Analitik Yöntem Validasyonu**

#### **2.3.3.1. Amaç**

Analitik yöntem validasyonu, tasarlanmış analitik yöntemin kabul edilebilirliğini kanıtlamak ve analitik prosedürün kantitatif ve kalitatif olarak doğru sonuçlar verdiğini belirlemek amacıyla yapılır. Analitik yöntem validasyonu şu durumlarda yapılır;

- Standart bir yöntem bir laboratuvarında ilk defa uygulanacağı zaman,
- Bir analiz için yeni metot geliştirildiği zaman,
- Kullanılmakta olan metotta değişiklik yapıldığı zaman,
- Geçerliliği belirlenmiş bir metot başka bir laboratuvarında / başka bir kişi tarafından / farklı bir cihazla kullanılacağı zaman,
- Metodun performansında zamanla bir değişme olduğu anlaşıldığında yapılır.

#### **2.3.3.2. Analitik Yöntem Validasyon Parametreleri**

Yöntem validasyonu için parametreler uluslararası komitelerce, ulusların farklı kuruluşları tarafından ve literatürde tanımlanmıştır. Fakat bazı tanımlar kurumlara göre farklılık gösterebilir. Validasyon parametrelerinin deney sırası hakkında resmi bir yönerge yoktur. Uluslararası kabul edilen çeşitli validasyon kriterleri mevcuttur. ISO/IEC, ICH, US, EPA, FDA, USP, cMP gibi kurumlar tarafından belirlenmiş kriterler kullanılmaktadır.

USP'ye göre validasyon parametreleri şu şekilde sınıflandırılabilir: Seçicilik, doğrusalılık, çalışma aralığı, doğruluk, kesinlik, tanıma limiti, hesaplanabilirlik limiti, sağlamlık ve kararlılık.

ICH'e göre validasyon parametreleri şu şekilde sınıflandırılabilir: Seçicilik, doğrusalılık, çalışma aralığı, doğruluk, kesinlik, tanıma limiti, hesaplanabilirlik limiti, stabilite.

Yöntemin özelliğine göre en uygun sıra oluşturulur. En çok kabul gören validasyon parametreleri ve sırası aşağıda verilmiştir.

1. Seçicilik / Spesifiklik
2. Sistem uygunluk
3. Tanıma limiti (LOD)
4. Hesaplanabilirlik limiti (LOQ)
5. Raporlama seviyesi
6. Doğrusallık
7. Çalışma aralığı
8. Kesinlik
  - Sistem kesinliği
  - Tekrarlanabilirlik
  - Laboratuvar içi kesinlik
  - Laboratuvarlar arası kesinlik
9. Doğruluk ve geri kazanılabilirlik
10. Sağlamlık
11. Tutarlılık
12. Stabilitate

Yöntem validasyonu için gerekli parametreler analizin amacına göre de farklılık gösterir. Analizler genel olarak 3 amaçla yapılır.

1. Hammadde veya bitmiş ürün içindeki aktif maddenin tayini
2. Hammadedeki safsızlıkların veya bitmiş ürünlerdeki parçalanma ürünlerinin tayini
3. Ürünün performans özelliklerinin tayini

Analitik yöntemlerin kategorilerine göre kullanılan validasyon parametreleri Tablo 2.18'de gösterilmiştir.

**Tablo 2.18** Analitik yöntemlerin kategorilerine göre gerekli validasyon parametreleri

Performans Parametreleri	Kategori I	Kategori II		Kategori III	Kategori IV
		Kantitatif	Limit test		
Doğruluk	+	+	*	+	-
Kesinlik	+	+	-	+	-
Spesifiklik	+	+	+	+	+
Raporlama seviyesi	-	+	+	*	-
Tespit limiti	-	-	+	*	-
Hesaplanabilirlik limiti	-	+	-	*	-
Doğrusallık	+	+	-	+	-
Uygulama aralığı	+	+	*	+	-
Sağlamlık	+	+	*	+	-

\*Spesifik testin yapısına bağlı olarak gerekli olabilir.

+ Genel uygulamada yapılmalıdır

- Genel uygulamada gerekmez

**Kategori I:** Etkin madde ve bitmiş üründeki etkin maddenin (koruyucular dahil) belirlenmesi için kullanılan analitik yöntemler.

**Kategori II:** Etkin maddedeki ve bitmiş üründeki ilgili maddeler/bozunma ürünlerinin belirlenmesi için kullanılan analitik yöntemler. Bu tür yöntemler kantitatif miktar tayini ve limit testlerini içerirler.

**Kategori III:** Performans karakteristikleri tayini için kullanılan analitik yöntemler (örneğin; çözünme testi, ilaç salımı gibi).

**Kategori IV:** Tanıma testleri.

### **2.3.3.2.1. Seçicilik/Spesifiklik**

Spesifiklik, genellikle bir tek analit için üretilen yönteme karşılıktır. Seçicilik ise birbirinden ayırt edilen ya da edilemeyen kimyasal içerikler için kullanılmıştır. Kısacası; girişim yapan maddeler varlığında analitin doğru olarak  lebilirliğini ifade eder. Likit kromatografisinde seçicilik, optimum ayırma ve kolon koşullarının seçimiyle elde edilmiştir. Seçiciliğin  st nl ğ , kullanılan analiz yönteminde sadece o etken maddeye  zg n ve spesifik olduğunu ifade etmesidir. Seçilen yöntem sadece etken maddeyi  lebilmeli ve diğerleri ile reaksiyon vermemelidir.

### **2.3.3.2.2. Sistem Uygunluk**

Sistem uygunluk testleri, analitik yöntemlerin doğru ve kesin sonuçlar vermesine katkıda bulunan spesifik testlerdir. Bu testlerin prosedürleri, ekipmana, uygulanan test prosedürlerine ve analiz edilecek maddeye bağlı olarak hazırlanmalı ve değerlendirilmelidir. Eğer analitik yöntemde sistem uygunluk çözeltisi hazırlığı varsa yönteme göre hazırlanan sistem uygunluk çözeltisi enjekte edilir. Eğer yok ise standart çözeltisi enjeksiyonunun belirtilen kabul kriterine uygunluğu kontrol edilir. Analitik yönteme spesifik olduğu için genel bir kabul kriteri yoktur, validasyon çalışmasında belirlenir.

### **2.3.3.2.3. Doğrusallık**

Analitik yöntemin doğrusallığı, belirlenen aralıkta elde edilen test sonuçlarının test içindeki ilgili madde ve/veya etkin madde konsantrasyonu ile doğru orantıya sahip olması, iyi tanımlanmış matematiksel dönüşüm ya da doğrudan ortaya çıkma yeteneği olarak belirlenmiştir.

Aktif maddenin %25 - %150 aralığında olacak şekilde en az 5 farklı konsantrasyonda  zelteleri hazırlanır ve sisteme verilir. Konsantrasyonla cihaz cevabı arasında grafik çizilerek regresyon analizi yapılır. Hesaplanan korelasyon katsayısı değeri doğrusallık hakkında bilgi sağlar. Bu değer 0,997'den büyük veya eşit olmalıdır.

#### **2.3.3.2.4. Çalışma Aralığı**

Bir analitik yöntemin çalışma aralığı; kesinlik, doğruluk ve doğrusallık belirlenirken üst ve alt aralıklarıdır. Örneğin analiz konsantrasyonu yöntemin çalışma aralıklarını belirler. ICH'e göre analiz konsantrasyonu kimyasal analizler için %80 - %120 aralığında, safsızlık analizleri için %50 - %120 aralığında olmalıdır.

#### **2.3.3.2.5. Doğruluk**

Doğruluk, yöntem ile elde edilen test sonuçlarının gerçek değerle uygunluğunun bir ölçüsüdür. Doğruluk değerlendirilmesi birçok yolla elde edilebilir:

- Referans yöntemi ile örnek yönteminin karşılaştırılması yapılabilir. Bu yaklaşımda referans yönteminin belirsizliği bilinmektedir.
- Konsantrasyonları bilinen bir örneğin analizi ile tayin edilebilir. Bir sertifikalı örnek ve ölçülmüş doğru değer kıyaslanır.

% geri kazanım bulunan sonuçların gerçek değere yakınlığının ölçülmesidir. Elimizde sertifikalı örnek bulunmuyorsa boş deneme çözeltisine konsantrasyonu bilinen hacimde ve ağırlıkta analit eklenir. Sonra matriksten, analitin ekstraksiyonu sonucu elde edilen analitin standart çözeltilere göre % geri kazanımları hesaplanır. Bu sayede boş deneme çözeltisine ilave edilen etken maddenin tam olarak geri kazanıp kazanılmadığı anlaşılır. Elde edilen geri kazanım değerleri  $100 \pm 3$  limitleri içinde olmalıdır. Ama analit konsantrasyonu çok düşük olduğu zaman bu sınır genişler. Beklenen geri kazanım örnek matriksine ve analit konsantrasyonuna bağlıdır.

#### **2.3.3.2.6. Kesinlik**

Bir yöntemin kesinliği birkaç kez ölçüm yapıldığında sonuçların birbirine uygunluk derecesidir. Yani homojen bir karışımdan, birden fazla örnek alındığında elde edilen sonuçların birbiriyle uyumlu olmasıdır. Bir yöntemin kesinliği genellikle test sonuçlarının %RSD (bağıl standart sapma) değeri ile ölçülür. Kesinlik için kabul edilebilirlik sınırı yapılan analizin türüne bağlıdır. İlaç analizlerinde kabul edilebilirlik sınırı %2'nin altında iken, çevre ve gıda analizlerinde matrikse, analit

konsantrasyonuna ve analiz tekniklerine bağlı olarak %2 ile %20 arasında değişmektedir.

Bir analitik prosedürün kesinliği aynı homojen örnekten çoklu numune hazırlayarak yapılan ölçümlerin birbirlerine olan uyumu ya da yakınlığıdır (saçınım derecesi olarak da ifade edilebilir). Kesinlik homojen ve güvenilir numuneler üzerinden araştırılmalıdır.

Bir analitik prosedürün kesinliği ardışık ölçümlerin değişimi, standart sapması ve varyasyon katsayısı olarak da ifade edilebilir.

Bir analitik prosedürün kesinliği dört parametre ile incelenir:

- 1) Sistem kesinliği
- 2) Tekrarlanabilirlik
- 3) Laboratuvar içi kesinlik
- 4) Laboratuvarlar arası kesinlik

Her bir parametre için standart sapma (SD), varyasyon katsayısı (RSD) ve güven aralığı hesapları yapılmalıdır.

Analiz sonuçlarının birbirine çok yakın olması, doğru sonuçlar elde edildiği anlamına gelmez. Sonuçlar birbirlerine çok yakın olmasına rağmen gerçek değerden uzak olabilir.

Tekrarlanabilirlik ise sonuçların kalitesini arttırır ve güvenilirliğinin bir ölçüsünü verir.

**Sistem kesinliği:** Valide edilecek analitik test yöntemi ile kısa zaman içinde yapılan ölçümler sırasında oluşan sistemden kaynaklanan varyasyonların ölçüsüdür. Cihaz enjeksiyon kesinliği ya da enjeksiyon tekrarlanabilirliği diye de adlandırılabilir. Aynı homojen numuneden yapılan ardışık ölçümler analitik sistemin uygulanacak olan metot için ne kadar hassas ve ne kadar doğru sonuçlar verdiğini gösterir.

**Tekrarlanabilirlik (Gün içi tekrarlanabilirlik):** Sistem kesinliğine ek olarak numune hazırlığından gelecek hata ve değişimlerin de (tartım, seyreltme, ekstraksiyon gibi) hesaba katılarak kısa zaman aralığında yapılan ölçümlerin birbirine yakınlığını ifade eder. 2 ya da 3 farklı konsantrasyonda aynı standartlar

kullanılarak hazırlanan çözeltiler, aynı gün içerisinde, aynı cihazlarla, aynı analist tarafından 3 ya da 4 kez analiz edilir ve %RSD hesaplanır.

Güvenilir numuneler elde etmek için bir tek numuneyi çok defa enjekte etmek yerine, birçok numuneyi analiz etmek çok daha uygundur. Bu şekilde analitik yöntem rutin analizlerde kullanılmış gibi sonuçlar verebilir. ICH tekrarlanabilirlik çalışması için iki farklı yöntem tavsiye etmiştir:

1) Üç farklı konsantrasyonda numunelerle her seviyeden üçer adet numune hazırlanır.

2) Test çözeltilisinin %100 seviyesinde minimum 6 numune hazırlanır.

**Laboratuvar içi kesinlik (Günler arası tekrarlanabilirlik):** Analitik prosedürün aynı laboratuvar içinde oluşabilecek rastgele değişimlerden ne kadar etkilendiğini gösterir.

Bu değişimler:

- Farklı analist,
- Farklı kolon seri numaralı kolon,
- Aynı numunenin farklı günde çalışılması,
- Farklı cihaz
- Farklı seri nolu ürün olabilir.

Bu değişimlerin hepsinin tek tek denenmesi gerekmez. FDA laboratuvar içi kesinlik parametresi için minimum iki farklı günde iki farklı analist çalışmasını tavsiye eder. Tekrarlanabilirlik çalışmasında olduğu gibi analitik prosedürün belirttiği şekilde altı farklı numune hazırlanır ve analiz edilir.

Sonuçların ve sonuçlar arası %RSD'nin limitler içinde olması beklenir. Bunun yanında yapılan değişiklikler sonrası elde edilen sonuçlarla tekrarlanabilirlik analizi sonucu elde edilen sonuçlar arasında da bir uyum olması beklenir.

Analitik yöntemin farklı laboratuvarlarda uygulanmasından elde edilecek sonuçların laboratuvarlar arası farklılıklardan ne kadar etkilendiğinin ölçüsüdür. Aynı şirket içindeki farklı laboratuvarlar için bu çalışma laboratuvar içi kesinlik çalışmasına yakın bir anlam ifade eder.



Laboratuvarlar arası farklılıklar:

Analist tecrübe ve bilgi farkı

Cihaz farkı

Reaktif farkı gibi farklılıklar olabilir.

ICH'e göre bu parametrenin başvuru dosyalarında bulunmasına gerek yoktur. Laboratuvarlar arası kesinlik çalışması metodun standardizasyonu için yapılmalıdır.

**Laboratuvarlar arası kesinlik:** Laboratuvarlar arası kesinlik çalışması, analitik yöntemin ürettiği analitik sonuçların laboratuvarlar arası farklılıktan ne derece etkilendiğinin araştırılması, analitik yöntemin farklı laboratuvarlarda da kabul edilebilir sonuçlar ürettiğinin kanıtlanmasıdır.

Farklı laboratuvarlarda, farklı analistlerle ve farklı işlevsel, çevresel şartlar altında ama aynı yöntem ile analiz tekrarlanır. Eğer yöntem farklı laboratuvarlarda kullanılacaksa bu validasyon parametresi önemlidir. Bir yöntemin laboratuvarlar arası tekrarlanabilirliğini, oda içindeki sıcaklık ve nem farklılıkları, farklı tecrübe ve farklı gayretteki analistler, farklı özellikteki donanım, malzeme ve aletlerdeki koşulların varyasyonları, farklı şirketlerin kolonları, çözücüler, belirteçler ve farklı kalitedeki aletler etkiler.

ICH Q2R1 kılavuzunda bu parametrenin yöntemi standardize etmek amaçlı çalışılması gerektiği bu sebeple de otoriteye sunulacak dosyada yer almasına gerek olmadığı belirtilir. Yöntemin geliştirildiği laboratuvardan bir başka laboratuvara transfer edilmesi sırasında uygulanır.

#### **2.3.3.2.7. Tutarlılık**

Bir analiz yönteminin tutarlılığı, aynı analiz örneğinin uzun zaman aralıklarında farklı koşullarda analizi yapıldığında bu değişikliklerden etkilenip etkilenmemesinin bir ölçüsü olarak tanımlanmıştır. Yani normal koşullarda farklı kişiler veya farklı laboratuvarlarda elde edilen sonuçların ölçülmesidir.

Bunun için çalışmanın;

- Aynı laboratuvarlarda farklı analizciler tarafından,
- Aynı laboratuvarlarda farklı cihazlar tarafından,
- Farklı laboratuvarlarda gerçekleştirilmesi,
- Reaktif ve çözücülerin markalarının değiştirilmesi,
- Aynı marka ve modele sahip yeni bir kolon kullanarak tekrarlanması gereklidir.

Tutarlılık; orta kesinlikle de benzeşmektedir. %RSD ile ifade edilir. ICH (Uluslararası uyum konferansı) bunu yapılması kesin olarak zorunlu işlemler grubuna dahil etmemiştir.

#### **2.3.3.2.8. Stabilite**

Belirli bir matriks içindeki bir analitin, amaçlanan saklama ısısında, dondurma veya çözme dönemlerinin etkisinde, oda ısısında veya diğer çevresel faktörlerin etkisindeki stabilitesidir. Zorunlu bir validasyon parametresi olmamakla beraber yapılması tavsiye edilir. Tekrar edilebilir ve güvenilir sonuçlar elde edebilmek için numunelerin, standart maddelerin ve kullanılan çözücülerin uygun bir süre (örneğin 1 gün, 1 hafta, 1 ay veya ne kadar süreye ihtiyaç duyuluyorsa o kadar süre) stabilitesini koruması gereklidir.

Stok solüsyonların ve numunenin kararlılığının da belirlenmesi gerekir. Bir çözücü içindeki analitin kararlılığı, saklama koşulları, maddenin kimyasal özellikleri, matriks ve kap sistemine bağlıdır. Kararlılık deneylerindeki koşullar, gerçek numune hazırlama ve analizi sırasında karşılaşılabilecek muhtemel durumları yansıtmalıdır. İstenine saklama süresinin tamamlanmasından sonra kararlılık, cihaz tepkisinin taze hazırlanmış solüsyonların tepkisi ile karşılaştırılarak test edilmelidir.

Stabilite çeşitleri şu şekildedir;

- Donma ve erime stabilitesi: Analit stabilitesi üç donma ve erime turlarından sonra belirlenmelidir. Analit ayarlanmış depolama sıcaklığında stabil değilse, stabilite örneği üç donma ve erime turu boyunca -70 derecede dondurulmalıdır.

- Kısa dönem stabilitesi: 2 ile 24 saat arasında oda sıcaklığındaki analitin stabilitesidir.
- Uzun dönem stabilitesi: Uzun dönem bir stabilite değerlendirmesinde depolama zamanı, son örneğin analiz tarihi ile ilk örneğin toplanma tarihi arasındaki zamanı aşmalıdır.
- Stok çözeltisinin stabilitesi: Stok çözelti ve internal standardın stabilitesi en az 6 saatlik oda sıcaklığında değerlendirilmelidir. Stok çözeltiler, uygun periyotlarda dondurulur ya da buzdolabında tutulursa, stabilite belgelenmelidir.
- Hazırlama sonrası stabilite: Otomatik örnekleyici içindeki bekleme zamanının içeren işlenmiş örneklerin stabilitesi belirlenmelidir.

### **2.3.3.2.9. Tanıma Limiti ve Hesaplanabilirlik Limiti**

#### **2.3.3.2.9.1. Tanıma Limiti (LOD)**

Bir maddenin %95 ya da %99 güvenilirlik sınırı içinde teşhis edilebildiği minimum miktarı olarak tanımlanmıştır. Genellikle bu seviyelerde güvenilir kantitatif sonuçlar elde edilemez. Test kromatogramında elde edilen sinyalin gürültüye oranının en az 3 olması gerekir.

#### **2.3.3.2.9.2. Hesaplanabilirlik Limiti (LOQ)**

Bir maddenin %95 ya da %99 güvenilirlik sınırı içinde tayin edilebilen minimum miktarı olarak tanımlanır. Bu miktar analiz koşullarında, kabul edilebilir kesinlik ve doğruluk değerlerine sahip tayin edilebilecek en düşük konsantrasyondaki madde miktarıdır. Bu parametre özellikle hammadde veya bitmiş ürünlerdeki safsızlık, parçalanma ürünü gibi düşük miktardaki maddelerin analizinde önem taşımaktadır.

Örnekteki bileşenin doğru ve güvenilir şekilde hesaplanabilen en düşük konsantrasyondur. Düşük konsantrasyonlarda bilinen safsızlıklar ve etkin madde içeren çözeltiler hazırlanarak enjekte edilir ve sinyal / gürültü oranı  $\geq 10$  olan çözelti konsantrasyonu hesaplanabilirlik seviyesi olarak belirlenir.

Test kromatogramında elde edilen sinyalin gürültüye oranının en az 10 olması gerekir.

Hesaplanabilirlik limiti, raporlama seviyesinden küçük veya eşit olmalıdır.

#### **2.3.3.2.10. Raporlama Seviyesi**

Ürünün günlük alım dozu ve ICH Guideline baz alınarak her bir safsızlık için raporlama seviyesi (reporting threshold) hesaplanır. Raporlama seviyesinin üstünde olan safsızlıklar ilgili analitik yöntemle göre test edilip raporlanır.

#### **2.3.3.2.11. Sağlamlık**

Bir analitik yöntemin sağlamlığı, yöntem parametrelerinin bilinerek yapılan küçük değişimlerden etkilenmeden kaldığının ölçüsüdür ve analitik yöntemin normal kullanıldığı sürede güvenilirliğinin göstergesidir. Sağlamlık çalışmasında yöntemin hassas olduğu noktalar tespit edildiğinde bunlar analitik yöntemde kullanıcıya uyarı olarak belirtilmelidir.

- Yöntemin stabilitesi
- Çözelti stabilitesi
- Hareketli faz stabilitesi

**Yöntemin stabilitesi:** Analitik yöntemin özelliğine göre aşağıda verilen parametrelerden yöntem için kritik olduğu düşünülenler çalışılmalıdır ve parametrelerdeki değişiklik oranları yöntemde rutin çalışma sırasında meydana gelebilecek olası küçük sapmaları yansıtacak miktarda olmalıdır.

Standart çözeltisi, test çözeltisi ve eğer yöntemde varsa sistem uygunluk çözeltisi, önce yöntemle göre çalışılır daha sonra aşağıda verilen değişikliklerden uygun olanlar doğrultusunda yöntemde değişiklikler yapılarak çalışılır, sistem uygunluk parametreleri ve test çözeltisi sonucundaki değişikliklerin kabul kriterlerine uygunluğuna bakılır.

Safsızlık tayininde eğer bilinen safsızlıklar varsa spike edilmiş test çözeltisi ile analiz edilir.

Likit kromatografisi için önerilen değişiklikler aşağıdaki şekildedir:

- Kolon tipi
- Kolon sıcaklığı
- Hareketli faz çözeltilsinin pH' ı
- Akış hızı
- Hareketli faz tampon/organik faz oranı
- Hareketli fazın tampon çözeltili konsantrasyonu
- İyon çifti ajanı gibi tampon çözeltiliye ilave edilen maddelerin konsantrasyonu
- Test çözeltili hazırlığında kullanılan çözücünün pH'ı veya konsantrasyonu

Gaz kromatografisi için önerilen değişiklikler aşağıdaki şekildedir:

- Akış hızı
- Isıtma programı
- Split oranı
- Kolon tipi
- Kolon sıcaklığı
- Enjektör sıcaklığı
- Dedektör sıcaklığı
- Test çözeltili hazırlığında kullanılan çözücü pH'ı veya konsantrasyonu

Spektrofotometrik analizler için önerilen değişiklikler aşağıdaki şekildedir:

- Test çözeltili hazırlığında kullanılan çözücü pH'ı veya konsantrasyonu
- Sıcaklık
- Dalga boyu doğruluğu

**Çözeltili stabilitesi:** Analizi yapılacak maddenin stabil olarak analiz şartlarında bekletilme süresi saptanmalıdır. Seçilecek bekletilme süresi analize özgüdür. Eğer etkin madde bu süre ve saklama şartlarında bozulacak olursa bu şartlar limitlendirilir ve yöntemde belirtilir. Standart ve test çözeltileri yönleme göre hazırlanarak protokolde belirlenen sıcaklıkta yine protokolde belirlenen süre

boyunca bekletilip belli sürelerde analiz edilir, en az 6 data toplanması tavsiye edilir. Uçucu safsızlık ve safsızlık tayini için bilinen safsızlıkların stabilitesini görmek amacıyla safsızlıkların limit oranında ilave edildiği test çözeltisinin de takibi yapılır.

**Hareketli faz çözeltisinin stabilitesi:** Bu parametre hareketli fazın stabil kaldığı süreyi saptamak amacı ile çalışılır ve tespit edilen süre analitik yöntemde belirtilerek kullanım süresi limitlendirilir.

Yönteme göre hazırlanan standart ve test çözeltileri, aynı hareketli faz çözeltisi ile protokolde belirlenen periyotlarda analiz edilir. Çözelti stabilitesine bağlı olarak ya aynı standart ve test çözeltisi ile ya da yeni hazırlananlar ile analizler yapılır.

Safsızlık tayini için bilinen safsızlıkların limit oranında ilave edildiği test çözeltileri analiz edilir.

### 3.1. Kullanılan Kimyasallar

Parasetamol, guaifenesin, fenilefrin hidroklorür ve pirilamin maleat standartları çeşitli ilaç firmalarından temin edilmiştir. Dipotasyum hidrojen fosfat, dihidrojen potasyum fosfat (Merck), fosforik asit, asetik asit, amonyum asetat (Merck) ve metanol HPLC saflıktadır. Çalışmalar süresince ultra saf su kullanılmıştır.

### 3.2. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

**Parasetamol çözeltisinin hazırlanması (1000µg/mL):** 0,1 gram parasetamol etken maddesi tartıldı ve 100 mL'lik balon jøjeye aktarıldı. Üzerine bir miktar saf su ilave edilerek çözünmesi sağlandı ve aynı çözücü ile hacmine tamamlandı.

**Guaifenesin çözeltisinin hazırlanması (1000µg/mL):** 0,1 gram guaifenesin etken maddesi tartıldı ve 100 mL'lik balon jøjeye aktarıldı. Üzerine bir miktar saf su ilave edilerek çözünmesi sağlandı ve aynı çözücü ile hacmine tamamlandı.

**Fenilefrin hidroklorür-1 çözeltisinin hazırlanması (1000µg/mL):** 0,1 gram fenilefrin hidroklorür etken maddesi tartıldı ve 100 mL'lik balon jøjeye aktarıldı. Üzerine bir miktar saf su ilave edilerek çözünmesi sağlandı ve aynı çözücü ile hacmine tamamlandı.

**Fenilefrin hidroklorür-2 çözeltisinin hazırlanması (500µg/mL):** Fenilefrin hidroklorür-1 çözeltisinin 50 mL'si 100 mL'lik balon jøjeye aktarıldı. Saf su ile hacmine tamamlandı.

**Pirilamin maleat-1 çözeltisinin hazırlanması (1000µg/mL):** 0,1 gram pirilamin maleat etken maddesi tartıldı ve 100 mL'lik balon jøjeye aktarıldı. Üzerine bir miktar saf su ilave edilerek çözünmesi sağlandı ve aynı çözücü ile hacmine tamamlandı.

**Pirilamin maleat-2 çözeltisinin hazırlanması (250µg/mL):** Pirilamin maleat-1 çözeltisinin 25 mL'si 100 mL'lik balon jöjeye aktarıldı. Saf su ile hacmine tamamlandı.

**pH 2,5 tampon çözeltisinin hazırlanması:** 0,025M ortofosforik asit çözeltisi ile 0,025M sodyum dihidrojen fosfat çözeltisi karıştırıldı ve çözeltinin pH' ı pH-metre ile 2,5'a ayarlandı.

**pH 3,0 tampon çözeltisinin hazırlanması:** 0,025M ortofosforik asit çözeltisi ile 0,025M sodyum dihidrojen fosfat çözeltisi karıştırıldı ve çözeltinin pH' ı pH-metre ile 3,0'e ayarlandı.

**pH 3,5 tampon çözeltisinin hazırlanması:** 0,025M ortofosforik asit çözeltisi ile 0,025M sodyum dihidrojen fosfat çözeltisi karıştırıldı ve çözeltinin pH' ı pH-metre ile 3,5'a ayarlandı.

**0.025 M Dihidrojen potasyum fosfat çözeltisinin hazırlanması:** 3,4 gram dihidrojen potasyum fosfat tartılıp bir miktar su ile çözüldü. 1000 mL'lik balon jöjede hacmine tamamlandı.

### **3.3. Kullanılan Cihazlar**

Kullanılan HPLC sistemi: LC-20 AT pompa, SPD-20A DAD dedektör, 7725 (20 µL) enjeksiyon ve bilgisayar sisteminden oluşan Shimadzu yüksek performanslı sıvı kromatografi cihazıdır. Ayrım Inertsil ODS-3V C18 kolon (4,6 mmx 150 mm, 5 µm) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analiz yapılırken kullanılan diğer cihazlar aşağıda belirtilmiştir:

- 620 InoLab pH-metre ve cam elektrodu
- Chiltern magnetik karıştırıcı
- Sartorius analitik terazi (0,1 mg'a kadar duyarlı)
- Anzak ultrasonik banyo
- Hamilton enjektör.



### 3.4. Yöntem

Fenilefrin hidroklorür, guaifenesin, pirilamin maleat ve parasetamolün HPLC ile bir arada analizinde optimum koşulların bulunması için faktörlerin ve bu faktörlerin birbirleri ile olan etkileşimlerinin ayırma gücü üzerindeki etkisi incelendi. Çalışmada 4 faktörlü 3 seviyeli Box-Behnken tasarımı kullanıldı. Tasarım için seçilen faktörler ve seviyeleri Tablo 3.1’de verilmiştir. Optimizasyon için öncelikle parasetamol ve guaifenesinin 1000µg/mL’lik çözeltilerinden parasetamol için 2,4 mL, guaifenesin için 1 mL, fenilefrin hidroklorürün 1000 µg/mL’lik çözeltisinden 0,1 mL ve 250 µg/mL’lik pirilamin maleat-2 çözeltisinden 0,5 mL alınıp 10 ml’lik balon jode su ile hacmine tamamlanarak sentetik bir karışım hazırlandı. Bu karışım hazırlanırken Peditus adlı şurup preparatı içindeki ilaç oranları göz önünde tutuldu. Elde edilen sentetik karışımın hazırlanan tasarıma göre 220 nm’de 27 kez kromatogramı alındı ve her bir kromatogramdaki, tüm ardışık piklere ait ayırma gücü değerleri tek tek hesaplandı. Hesaplanan değerlere regresyon analizi yapıldı. Sonuçlar doğrultusunda model oluşturuldu. Oluşturulan model kullanılarak faktörlerin optimum değerleri hesaplandı. Modelin güvenilirliğini test etmek için ANOVA yapıldı. Sonuçlar bölüm 4.1.1’den itibaren verilmiştir.

**Tablo 3.1** İncelenen faktörler ve seviyeleri

<b>Faktör</b>	<b>Düşük (-1)</b>	<b>Orta (0)</b>	<b>Yüksek (+1)</b>
pH (A)	2,5	3,0	3,5
Akış Hızı (mL/dak) (B)	0,8	1,0	1,2
Gradient 1’de fosfat tamponu oranı (%) (C)	85	90	95
Gradient 2’de fosfat tamponu oranı (%) (D)	70	75	80

## 3.5. Validasyon

### 3.5.1. Doğrusallık

Parasetamol, guaifenesin, pirilamin maleat ve fenilefrin hidroklorürün konsantrasyonları ile pik alanları arasındaki ilişkiyi incelemek amacı ile 10 mL'lik balon jöje içerisine 1000 µg/mL parasetamol çözeltisinden 0,6 - 3,0 mL, 1000 µg/mL guaifenesin çözeltisinden 0,2 - 1,8 mL, 250 µg/mL pirilamin maleat çözeltisinden 0,3 - 1,1 mL ve 500 µg/mL fenilefrin hidroklorür çözeltisinden 0,1 - 0,5 mL alındıktan sonra hacmine tamamlandı. Hazırlanan çözeltiler C18 kolonda 0,8 mL/dak akış hızında, pH 3,5 fosfat tamponu ( $H_3PO_4/H_2PO_4^{2-}$ )/asetonitril hareketli fazı ile 0-4 dakikada (95:5), 4-12 dakikada (80:20) gradient elüsyon tekniği kullanılarak kromatografiye edildi. Fenilefrin hidroklorür, guaifenesin, pirilamin maleatın 220 nm'de, parasetamolün 250 nm'de kromatogramları alınarak pik alanları hesaplandı. Pik alanları ile konsantrasyon arasında ölçü eğrileri çizilerek regresyon analizi yapıldı. Sonuçlar bölüm 4.2.1'de verilmiştir.

### 3.5.2. Gün İçi ve Günler Arası Tekrarlanabilirlik

Parasetamol, guaifenesin, pirilamin maleat ve fenilefrin hidroklorür için gün içi ve günler arası tekrarlanabilirliği incelemek amacı ile doğrusal alan içinde olacak şekilde 3 ayrı konsantrasyon seçildi. Seçilen konsantrasyondaki çözeltileri hazırlamak amacı ile 1000 µg/mL'lik parasetamol, 1000 µg/mL'lik guaifenesin, 250 µg/mL'lik pirilamin maleat ve 500 µg/mL'lik fenilefrin hidroklorür çözeltilerinden 10 mL'lik balon jöjeye sırası ile I. seviye için 0,6 mL, 0,2 mL, 0,3 mL, 0,1 mL; II. seviye için 1,8 mL, 1,0 mL, 0,7 mL, 0,3 mL; III. seviye için 3,0 mL, 1,8 mL, 1,1 mL ve 0,5 mL alınarak hacmine tamamlandı. Gün içi tekrarlanabilirlik için aynı gün içerisinde her karışımdan 3'er kez, günler arası tekrarlanabilirlik için 4 farklı günde karışımların birer kez kromatogramları bölüm 3.5.1'de belirtilen şartlarda alındı ve pik alanları hesaplandı. İlgili ölçü eğrisi yardımı ile konsantrasyonları bulundu. Ortalama, % geri kazanım ve bağıl standart sapmaları hesaplandı. Sonuçlar bölüm 4.2.2 'de verilmiştir.

### 3.5.3. Geri Kazanım

10 ml'lik balon jöje içine; fenilefrin hidroklorür, guaifenesin, pirilamin maleat ve parasetamol maddelerini içeren, 5 mL alınıp 50 mL'ye seyreltilmiş örnek çözeltisinden (Peditus şurup) 0,1 mL konuldu. Üzerine 1000 µg/mL'lik parasetamol, 1000 µg/mL'lik guaifenesin, 250 µg/mL'lik pirilamin maleat ve 500 µg/mL'lik fenilefrin hidroklorür çözeltilerinden 10 mL'lik balon jöjeye sırası ile I. seviye için 0,4 mL, 0,1 mL, 0,25 mL, 0,1 mL; II. seviye için 1,6 mL, 0,9 mL, 0,65 mL, 0,3 mL; III. seviye için 2,7 mL, 1,7 mL, 1,05 mL, 0,45 mL alınarak hacmine tamamlandı. Hazırlanan çözeltilerin bölüm 3.5.1'de belirtilen şartlarda kromatogramı alınarak pik alanları hesaplandı. İlgili ölçü eğrisi yardımı ile konsantrasyonları bulundu. % geri kazanım değeri hesaplandı, sonuçlar bölüm 4.2.3'te verilmiştir.

### 3.5.4. Tanıma ve Hesaplanabilirlik Limiti (LOD, LOQ)

Tanıma ve hesaplanabilirlik limitinin hesaplanması için boş deneme çözeltisinin 10 mL'si analiz şartları altında kolondan geçirildi. Her bir maddeye ait pikin alıkonma zamanındaki pik alanı ölçüldü, bu işlem 10 kez tekrar edildikten sonra ortalama değeri hesaplandı. Boş deneme çözeltisinin her bir maddenin alıkonma zamanındaki pik alanlarının standart sapmasının, tanıma sınırı için 3 katına, tayin sınırı için 10 katına karşılık gelen madde konsantrasyonu saptandı. Sonuçlar bölüm 4.2.4'de verilmiştir.

### 3.5.5. Örnek analizi

5 mL'sinde 5 mg fenilefrin hidroklorür, 50 mg guaifenesin, 6,25 mg pirilamin maleat ve 120 mg parasetamol içeren "Peditus®" adlı şurup örneğinin 5 mL'si 50 mL'lik balon jöjeye aktarıldı ve saf su ile hacmine tamamlandı. Bu çözeltiden 1 mL alınıp 10 mL'lik balon jöjeye aktarıldı ve saf su ile hacmine tamamlandı. Hazırlanan çözeltilerin bölüm 3.5.1'de belirtilen şartlarda kromatogramı alınarak pik alanları hesaplandı. İlgili ölçü eğrisi yardımı ile şurup örnekleri içindeki miktarları bulundu. Elde edilen sonuçlar bölüm 4.2.5'te verilmiştir.

#### 4.1. Metot Geliştirme ve Optimizasyon

Parasetamol, guaifenesin, fenilefrin hidroklorür ve pirilamin maleatın bir arada HPLC ile analizi için literatür çalışmaları göz önünde tutularak çeşitli hareketli faz sistemleri denendi. İzokratik şartlarda piklerin ayrılmadığı gözlemlendi. Yapılan ön çalışmalar sonunda pH 3 civarı fosfat ( $H_3PO_4/H_2PO_4^{2-}$ ) : asetonitril hareketli faz sisteminde 220 nm dalga boyunda 2 seviyeli gradient elüsyon ile 4 maddeye ait pikin ayrılabilceği sonucuna varıldı. Geliştirilen yöntemin Peditus adlı ilaç preparatına uygulanması amaçlandığından etken maddelerin ayrılma koşulları ve preparattaki katkı maddelerinin etkisi belirlenen yaklaşık şartlarda incelendi. Koruyucu olarak kullanılan metil paraben ve propil parabenin ve renklendirici olarak kullanılan tartrazinin bu koşullarda analize etkisi olmadığı görüldü. Ancak tatlandırıcı olarak kullanılan sodyum siklamat ve sakkarinin 220 nm dalga boyunda parasetamol ile aynı zamanda pik verdiği gözlemlendi. Bunun sonucunda ilaç preparatında parasetamol tayini için iki tatlandırıcının absorpsiyonunun olmadığı 250 nm dalga boyunda analiz edilmesine karar verildi. Yapılan bu ön çalışmalar doğrultusunda en uygun kromatografik şartların belirlenmesi amacıyla Box-Behnken tasarımı uygulandı.

##### 4.1.1. Box-Behnken Tasarımı

Faktörlerin optimum değerlerini belirlemek, faktör ve etkileşimlerinin etkilerini incelemek amacıyla bölüm 3.4 de anlatıldığı şekilde çalışıldı. 3 seviyeli 4 faktörlü Box-Behnken tasarımı ve belirtilen şartlarda elde edilen ayırma gücü (R; rezolüsyon) değerleri Tablo 4.1'de görülmektedir.

**Tablo 4.1** Box-Behnken tasarımı ve belirtilen şartlarda elde edilen ayırma gücü değerleri

Deney No	pH (A)	Akış Hızı (mL/dak) (B)	Gradient 1 Fosfat Tamponu Oranı (%)	Gradient 2 Fosfat Tamponu Oranı (%)	*Rezolüsyon (R <sub>12</sub> X R <sub>23</sub> X R <sub>34</sub> )
1	2,5	1,2	90	75	1,32
2	3,0	0,8	95	75	652,56
3	3,0	0,8	90	70	0,64
4	3,0	1,0	90	75	1,18
5	3,5	1,2	90	75	1,12
6	3,0	1,0	95	80	739,86
7	3,0	1,2	95	75	331,88
8	2,5	1,0	90	70	1,02
9	3,5	1,0	85	75	1,19
10	2,5	1,0	85	75	1,44
11	3,0	1,2	90	80	1,32
12	3,0	1,2	90	70	1,01
13	3,5	0,8	90	75	0,99
14	3,0	1,0	85	70	1,11
15	2,5	1,0	95	75	174,25
16	3,0	1,2	85	75	1,14
17	3,0	1,0	95	70	265,81
18	3,0	1,0	90	75	1,14
19	3,0	1,0	85	80	1,34
20	3,5	0,8	90	75	1,07
21	3,0	0,8	90	80	1,98
22	3,5	1,0	90	70	0,89
23	3,5	1,0	90	80	1,98
24	3,0	1,0	90	75	1,32
25	2,5	1,0	90	80	1,98
26	3,0	0,8	85	75	81,62
27	3,5	1,0	95	75	527,60

\* Rezolüsyon; (R<sub>12</sub>X R<sub>23</sub>X R<sub>34</sub>) ün çarpım değeridir. R<sub>12</sub> fenilefrin hidroklörür ve pirilamin maleata, R<sub>23</sub> pirilamin maleat ve parasetamol; R<sub>34</sub> parasetamol ve guaifenesine ait pikler arasındaki ayırma gücü değerleridir.

#### 4.1.2. Veri Değerlendirme

Box-Behnken tasarımı uygulanarak elde edilen ayırma gücü değerlerine regresyon analizi yapıldı. Her bir faktörün kendi başına olan etkisi ve birbirleri ile olan etkileşimlerine ait etki değerleri Tablo 4.2'de, ANOVA sonuçları ise Tablo 4.3'te verilmiştir. Hesaplanan değerler doğrultusunda C ve D faktörleri ile CD ve CC etkileşimlerinin analiz sonuçları üzerinde anlamlı bir şekilde etkili olduğu belirlenmiştir. A ve B faktörlerinin rezolüsyona etkileri ise seçilen seviyelerine bağlı olarak daha azdır.

Elde edilen ikinci dereceden modelin yeterliliği, ANOVA testinde bulunan F ve p değerleri ile test edilmiştir. 30,72 olarak bulunan F değeri ve 0,05'ten küçük p değerleri, ikinci dereceden modelin istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermektedir. Çünkü hesaplanan F değeri, %5 güvenilirlik seviyesinde, tablo F değerinden ( $F_{0.05, 14, 12} = 2,64$ ) daha büyük olarak bulunmuştur. Modelin uygunluğu,  $R^2$ ; determinasyon katsayısı (0,9729) ve ayarlı  $R^2$  (0,9412) değerleri ile anlaşılabilir. Ayarlı  $R^2$  değeri, toplam değişimin %94,12'sinin model tarafından açıklanabileceğini göstermektedir. Ayarlı  $R^2$ ,  $R^2$ 'den biraz daha küçüktür. Regresyon modelinde birçok terimin eklenmesi durumunda ayarlı  $R^2$ ,  $R^2$ 'den daha az olabilir. Bu çalışmada, ayarlı  $R^2$ , deney verilerinin modele uygun olduğunu kanıtlayan  $R^2 \geq 0,80$ 'den büyük olduğundan sonucun kabul edilebilir sınırlar dahilinde olduğunu, yani modelin uygun olduğunu söyleyebiliriz [472].

Bu sonuçlar doğrultusunda elde edilen Pareto grafiği Şekil 4.1'de, faktörlerin etkileri ise Şekil 4.2'de bir kez de görsel olarak verilmiştir. Pareto grafiğinden de ayırma gücü üzerindeki etkili faktörlerin C ve D faktörleri olduğu, etkili etkileşimlerin ise CC ve CD'ye ait olduğu görülmektedir. C ve D faktörleri ile beraber CC etkileşiminin artan değeri ayırma gücünü artırırken, CD etkileşiminin artan değerleri ile ayırma gücü azalmaktadır.

**Tablo 4.2** Regresyon analizi sonuçları

<b>Faktör</b>	<b>Etki</b>	<b>Regresyon Katsayısı</b>
<b>A</b>	19,8845	9,94225
<b>B</b>	-13,328	-6,66375
<b>C</b>	419,597	209,7985
<b>D</b>	56,4802	28,2401
<b>AA</b>	-15,284	-7,6421
<b>AB</b>	-0,0585	-0,02925
<b>AC</b>	60,122	30,061
<b>AD</b>	0,04	0,02
<b>BB</b>	9,42725	4,713625
<b>BC</b>	-39,972	-19,986
<b>BD</b>	-0,51	-0,255
<b>CC</b>	419,584	209,792
<b>CD</b>	167,383	83,6915
<b>DD</b>	6,03725	3,018625

**Tablo 4.3** ANOVA testi sonuçları

<b>Faktör</b>	<b>Kareler Toplamı</b>	<b>S.d</b>	<b>Kareler Ortalaması</b>	<b>Fdeğeri</b>	<b>Pdeğeri</b>
Model	866788,3	14	61913,45	30,72	0,0000*
A	1186,18	1	1186,18	0,59	0,4578
B	532,87	1	532,87	0,26	0,6165
C	528185	1	528185	262,05	0,0000*
D	9570,03	1	9570,03	4,75	0,0500*
AA	311,48	1	311,48	0,15	0,7011
AB	0,00	1	0,00	0,00	0,9990
AC	3614,65	1	3614,65	1,79	0,2053
AD	0,00	1	0,00	0,00	0,9993
BB	118,50	1	118,50	0,06	0,8125
BC	1597,76	1	1597,76	0,79	0,3908
BD	0,26	1	0,26	0,00	0,9911
CC	234734	1	234734	116,46	0,0000*
CD	28016,90	1	28016,90	13,90	0,0029*
DD	48,60	1	48,60	0,02	0,8792
Hata	24186,7	12	2015,56		
Toplam	890975	26			

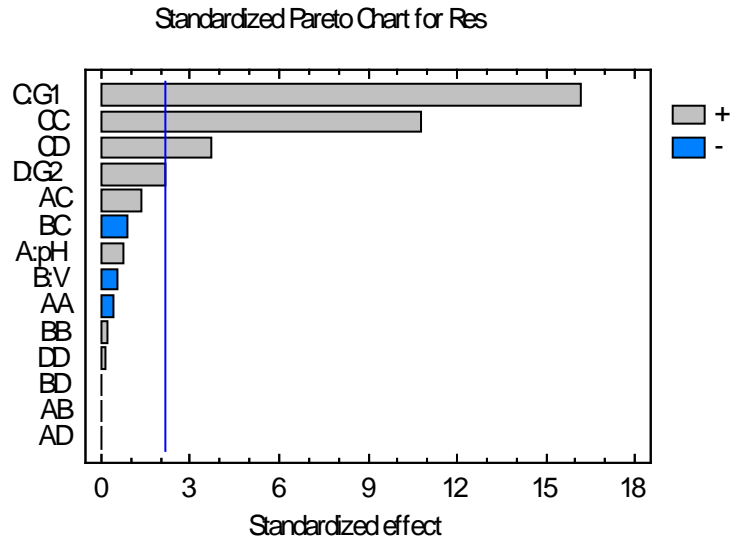
KT: Kareler Toplamı; KO: Kareler Ortalaması; Fdeğeri:  $KT/KO_{hata}$ ;

P-değeri: olasılık seviyesi; S.d.: Serbestlik derecesi.

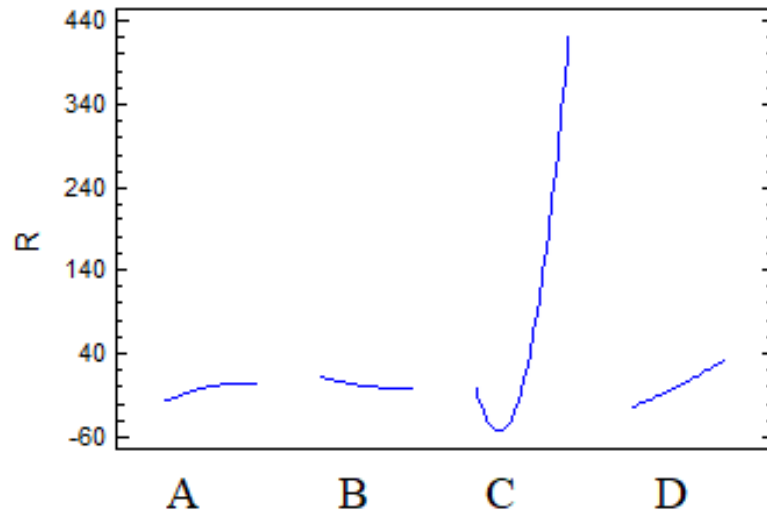
$R^2 = 0,9729$ , Ayarlı  $R^2 = 0,9412$ .

\*Anlamlılık seviyesi  $\alpha = 0,05$ .





Şekil 4.1 Faktörler ve faktörlerin birbirleri ile olan etkileşimleri için Pareto grafiği



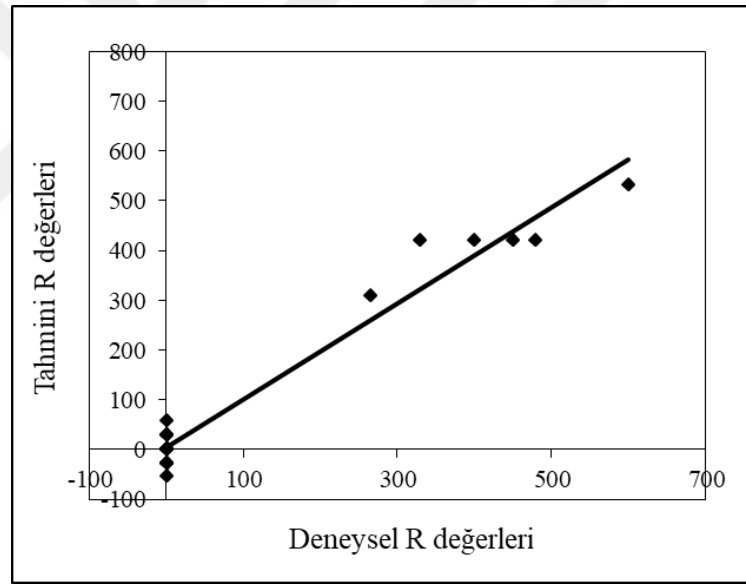
Şekil 4.2 Ana faktörlerin rezolüsyon üzerindeki etkileri

#### 4.1.3. Modelleme

Varyans analizi sonuçlarına göre Tablo 4.2'deki katsayılar bulunmuş ve ayırma gücü ile incelenen faktörler arasındaki ilişki aşağıdaki ikinci dereceden model ile gösterilmiştir.

$$\hat{y} = 1,213 + 9,94225A - 6,66375B + 209,798C + 28,2401D - 7,64212A^2 - 0,02925AB + 30,061AC + 0,02AD + 4,71363B^2 - 19,986BC - 0,255BD + 209,792C^2 + 83,6912CD + 3,01863D^2$$

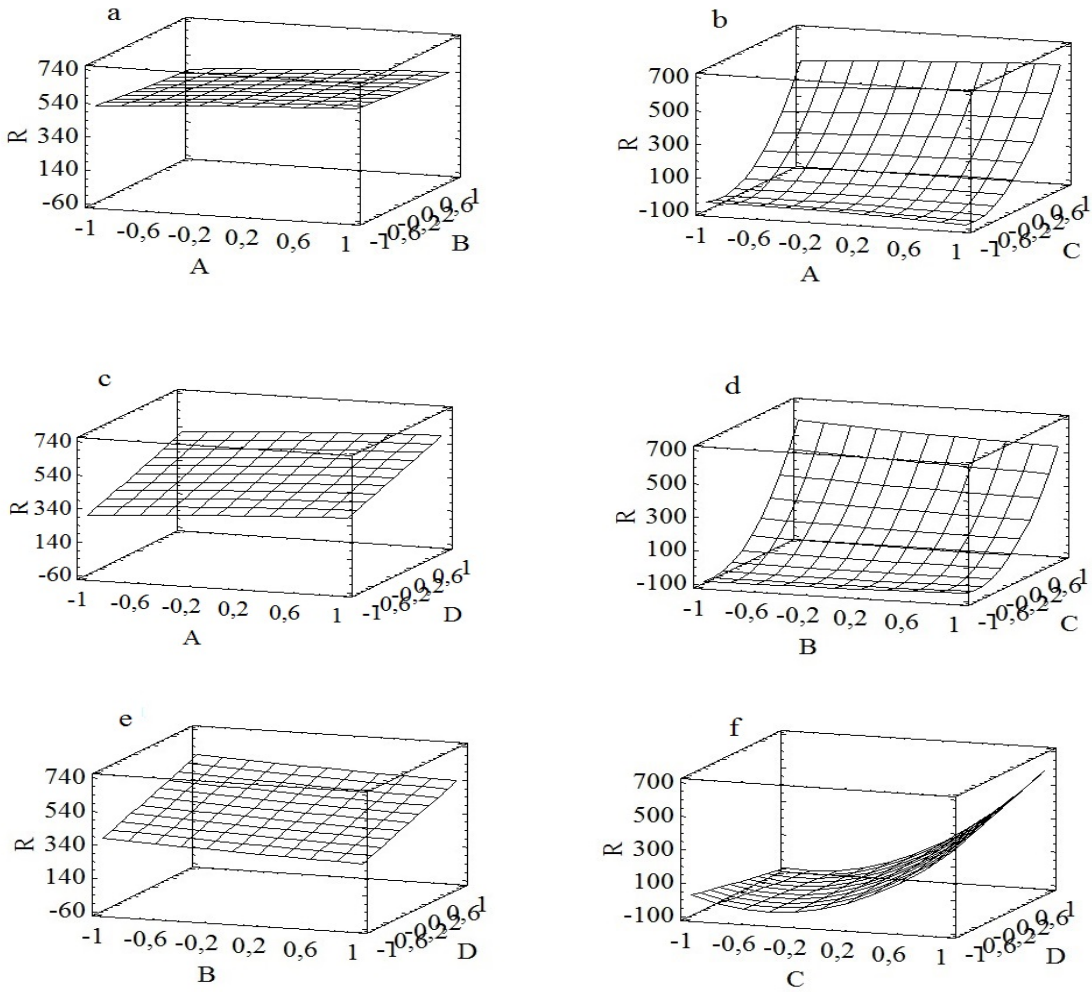
Bu ikinci dereceden modelin uygunluğunu göstermek için, model ile tahmin edilen ve deneysel olarak elde edilen ayırma gücü değerlerinin arasında korelasyon testi yapıldı. Şekil 4.3'te görüldüğü gibi, korelasyon katsayısının yüksek değeri ( $R = 0,9820$ ), yukarıda belirtilen parametreler arasında iyi bir ilişki olduğunu göstermektedir.



**Şekil 4.3** Tahmini R değerleri ve deneysel R değerleri arasındaki korelasyon

İncelenen faktörlerin ayırma gücü üzerindeki değişimlerini gösteren cevap yüzeyi grafikleri Şekil 4.4'te görülmektedir. Bu grafiklerden fosfat tamponunun pH değeri (A) ve mobil fazın akış hızının (B) incelenen seviyelerinde ayırma gücü üzerinde önemli bir etkiye sahip olmadıkları anlaşılırken, fosfat tampon yüzdelerinin (C, D) değişmesi ile ayırma gücünün etkilendiği görülmektedir. Özellikle, Şekil 4.4 (f)'deki doğrusal olmayan ilişki C ile D arasında önemli bir etkileşim olduğunu

göstermiştir. Ayrıca bu grafikten de C ve D faktörlerinin artan değerleri ile yüksek ayırma gücü elde edildiği gözlenmektedir.



**Şekil 4.4** Box-Behnken tasarımı ile elde edilen cevap yüzeyi grafikleri

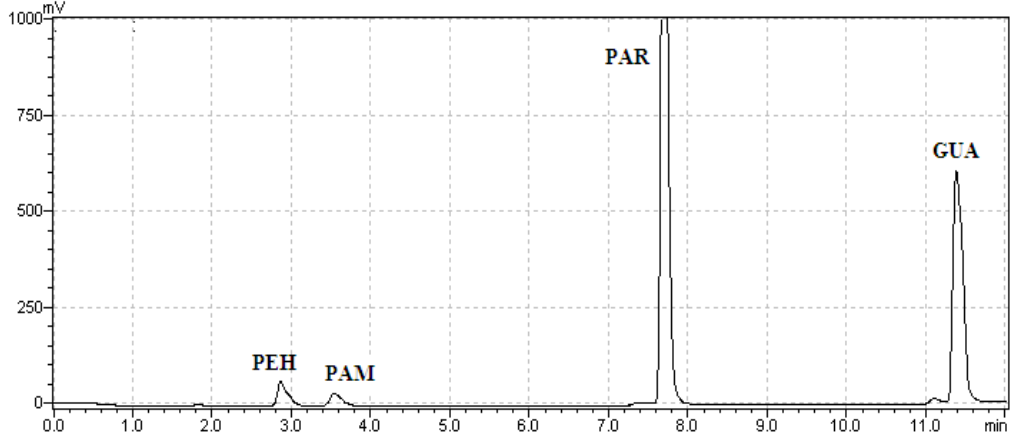
- a) pH (A) ve akış hızı (B),
  - b) pH (A) ve gradient 1 için fosfat tamponu yüzdesi (C),
  - c) pH (A) ve gradient 2 için fosfat tamponu yüzdesi (D),
  - d) akış hızı (B) ve gradient 1 için fosfat tamponu yüzdesi (C),
  - e) akış hızı (B) ve gradient 2 için fosfat tampon yüzdesi (D),
  - f) gradient 1 için fosfat tampon yüzdesi (C) ve gradient 2 için fosfat tampon yüzdesi (D)
- (diğer değişkenler kendi optimum seviyelerinde tutulmuştur).

Rezolüsyon değerini maksimum yapacak optimum faktör seviyelerini belirlemek için, elde edilen model kullanılmış ve Tablo 4.4' te verilen kodlu ve gerçek değerleri verilen optimum şartlar bulunmuştur.

**Tablo 4.4** Faktörlerin kodlu ve gerçek optimum değerleri

<b>Faktör</b>	<b>Düşük</b>	<b>Yüksek</b>	<b>Optimum değer (kodlu)</b>	<b>Optimum değer (gerçek)</b>
pH (A)	-1,0	1,0	1,0	3,5
Akış hızı (mL/dak)(B)	-1,0	1,0	-1,0	0,8
Gradient 1'de fosfat tamponu oranı (%) (C)	-1,0	1,0	0,991315	95
Gradient 2'de fosfat tamponu oranı (%) (D)	-1,0	1,0	0,971497	80

Bu kodlanmış optimum değerler modelde yerine koyulduğunda maksimum ayırma gücü değeri 583,964 olmaktadır. Kodlanmış değerlerden gerçek değerlerin hesaplanması ile faktörlerin optimum değerleri; pH için 3,5, akış hızı için 0,8 mL/dak, Gradient 1'de fosfat tamponu oranı %95 ve Gradient 2'de fosfat tamponu oranı %80 olarak belirlenmiştir. Belirlenen optimum şartlar altında elde edilen kromatogram Şekil 4.5'te gösterilmiştir.



**Şekil 4.5** Parasetamol (PAR), guaifenesin (GUA), fenilefrin hidroklorür (PEH) ve pirilamin maleat (PAM) içeren sentetik karışımın optimum şartlar altında elde edilen HPLC kromatogramı (PEH; 10 µg/mL, PAM; 12,5 µg/mL, PAR; 240 µg/mL, and GUA; 100 µg/mL)

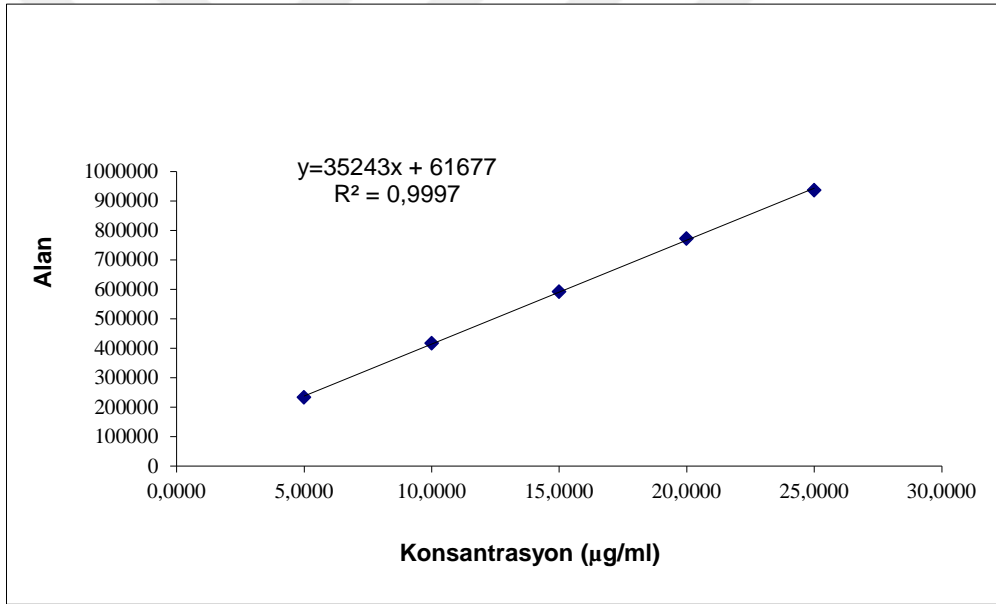
## 4.2. Validasyon

### 4.2.1. Doğrusallık

HPLC ile karışım ve örnek analizinde kullanılmak üzere bölüm 3.5.1’de anlatıldığı şekilde yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen ölçü eğrilerine ait pik alanları ile standart sapma değerleri ve regresyon analizi parametreleri sırasıyla fenilefrin hidroklorür için Tablo 4.5 ve Tablo 4.6’da, guaifenesin için Tablo 4.7 ve Tablo 4.8’de, pirilamin maleat için Tablo 4.9 ve 4.10’da, parasetamol için 4.11 ve 4.12’de verilmiştir. Elde edilen doğru denklemleri ve ilgili grafikler fenilefrin hidroklorür, guaifenesin, pirilamin maleat ve parasetamol için sırasıyla Şekil 4.6, 4.7, 4.8 ve 4.9’da gösterilmiştir.

**Tablo 4.5** Fenilefrin hidroklorür ölçü eğrisine ait pik alanları değerleri

No	C (µg/mL)	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	A <sub>4</sub>	A(ort)	s	% RSD
1	5	237328	235220	232088	228304	233235	3929,5	1,68
2	10	421928	416208	420918	409434	417122	5699,4	1,37
3	15	590772	587388	592248	598172	592145	4503,7	0,76
4	20	780017	766894	761684	781449	772511	9746,8	1,26
5	25	935343	921101	935316	954734	936623	13811,7	1,47



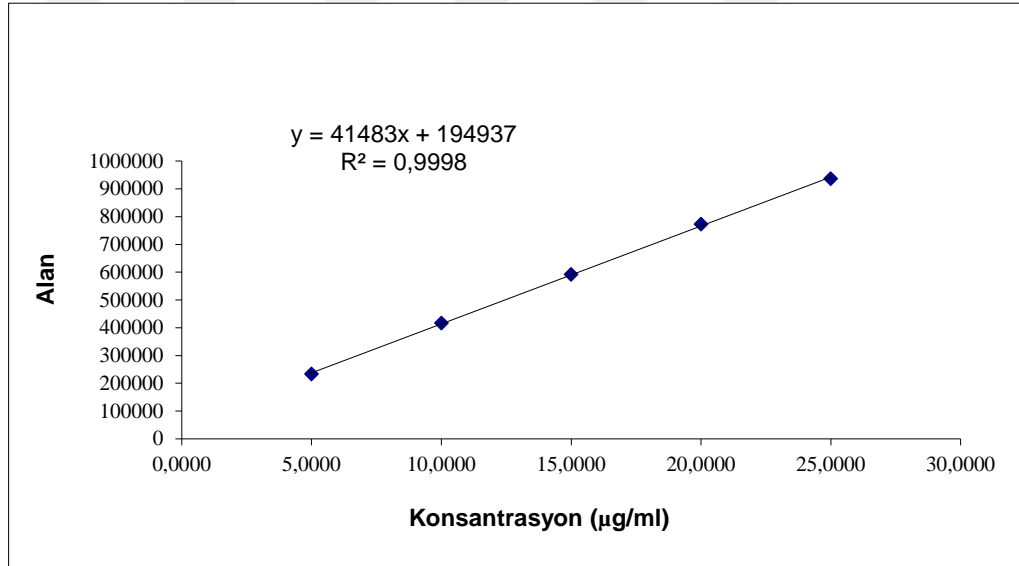
**Şekil 4.6** Fenilefrin hidroklorür için doğrusallık grafiği

**Tablo 4.6** Fenilefrin hidroklorür ölçü eğrisine ait regresyon analizi sonuçları

A	B	R <sup>2</sup>	Sa	Sb
61677	35243	0,9997	6633	399

**Tablo 4.7** Guaifenesin ölçü eğrisine ait pik alanları değerleri

No	C (µg/mL)	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	A <sub>4</sub>	A(ort)	s	% RSD
1	20	1024514	1061313	1043061	1022716	1037901	18115,8	1,75
2	60	2704149	2722387	2680236	2654452	2690306	29483	1,10
3	100	4302136	4358997	4348840	4317139	4331778	26614,1	0,61
4	140	5908614	5892291	5927607	6083392	5952976	88133,6	1,48
5	180	7520607	7725592	7835529	7730776	7703126	131799,1	1,71



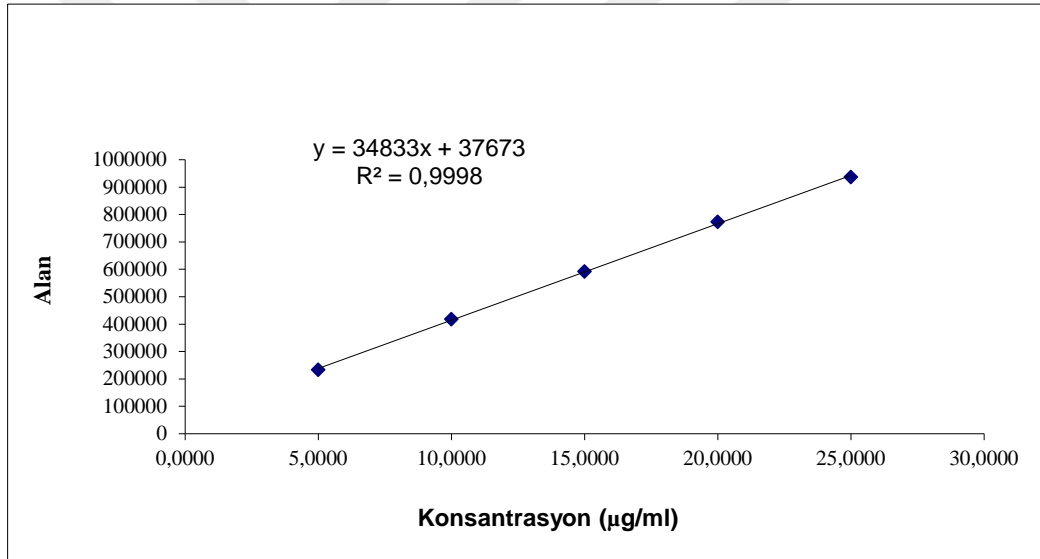
**Şekil 4.7** Guaifenesin için doğrusallık grafiği

**Tablo 4.8** Guaifenesin ölçü eğrisine ait regresyon analizi sonuçları

A	B	R <sup>2</sup>	Sa	Sb
194937	41483	0,9998	29287	255

**Tablo 4.9** Pirilamin maleat ölçü eğrisine ait pik alanları değerleri

No	C (µg/mL)	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	A <sub>4</sub>	A(ort)	s	% RSD
1	7,5	294761	290038	300124	291017	293985	4570,8	1,55
2	12,5	479377	479699	478638	476450	478541	1463,1	0,31
3	17,5	661373	652750	634917	642776	647954	11544,8	1,78
4	22,5	847934	814625	805740	825142	823360	18200,9	2,2
5	27,5	989537	974772	1005872	999403	992396	13533,7	1,36



**Şekil 4.8** Pirilamin maleat için doğrusallık grafiği

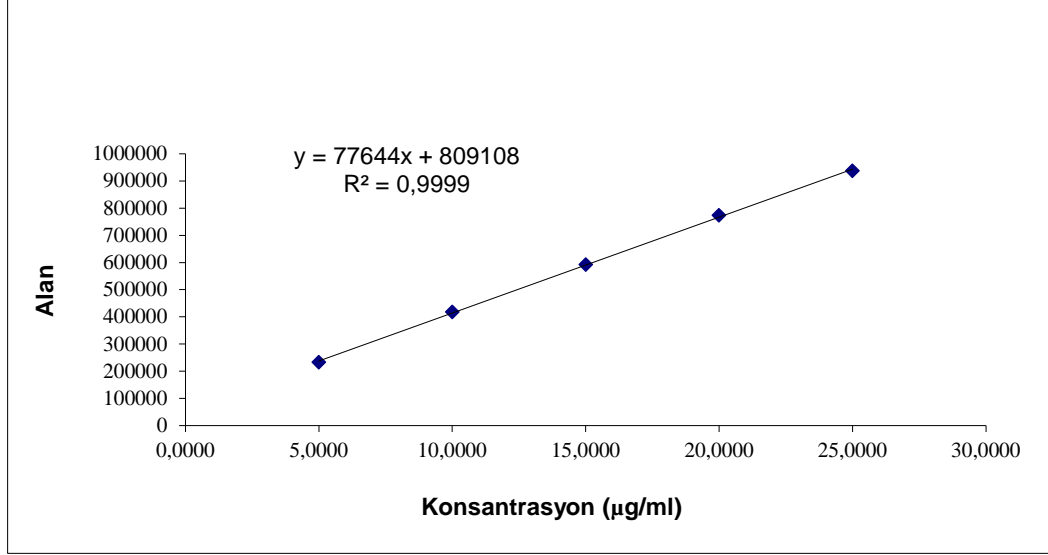
**Tablo 4.10** Pirilamin maleat ölçü eğrisine ait regresyon analizi sonuçları

A	B	R <sup>2</sup>	Sa	Sb
37673	34833	0,9998	5468	290



**Tablo 4.11** Parasetamol ölçü eğrisine ait pik alanları değerleri

No	C (µg/mL)	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	A <sub>4</sub>	A(ort)	s	% RSD
1	60	5402518	5434594	5509922	5613114	5490037	93589,3	1,70
2	120	10153563	10251732	10124826	10025147	10138817	93244,9	0,92
3	180	14977856	15003116	14506692	14567092	14763689	263243	1,78
4	240	19337929	19317313	19383867	19398343	19359363	38068	0,20
5	300	24233480	24250379	24283371	23924089	24172830	167116,4	0,69



**Şekil 4.9** Parasetamol için doğrusallık grafiği

**Tablo 4.12** Parasetamol ölçü eğrisine ait regresyon analizi sonuçları

A	B	R <sup>2</sup>	Sa	Sb
809108	77644	0,9999	58819	296

#### 4.2.2. Gün İçi ve Günler Arası Tekrarlanabilirlik

Bölüm 3.5.2’de anlatıldığı şekilde, fenilefrin hidroklorür, guaifenesin, pirilamin maleat ve parasetamolün bir arada analizi için geliştirilen yöntemin tekrarlanabilirlik çalışmalarından elde edilen değerler, gün içi tekrarlanabilirlik için Tablo 4.13’te, günler arası tekrarlanabilirlik için Tablo 4.14’ te verilmiştir.

**Tablo 4.13** Gün içi tekrarlanabilirlik

	<b>Fenilefrin hidroklorür</b> ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )			<b>Guaifenesin</b> ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )			<b>Pirilamin Maleat</b> ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )			<b>Parasetamol</b> ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )		
	5	15	25	20	100	180	7,5	17,5	27,5	60	180	300
<b>1</b>	5,04	14,62	24,90	19,28	99,13	183,23	7,56	17,41	27,70	55,97	174,55	306,68
<b>2</b>	5,04	14,57	24,95	19,13	98,92	181,93	7,68	17,66	27,26	56,00	176,84	307,79
<b>3</b>	5,13	14,19	24,10	18,59	99,41	182,29	7,62	18,08	27,74	55,81	175,98	307,87
<b>X(ort)</b>	5,07	14,46	24,65	19,00	99,15	182,48	7,62	17,72	27,57	55,93	175,79	307,44
<b>s</b>	0,05	0,24	0,48	0,36	0,25	0,67	0,05	0,34	0,27	0,10	1,16	0,66
<b>%RSD</b>	0,99	1,66	1,94	1,89	0,25	0,37	0,66	1,92	0,98	0,18	0,66	0,21
<b>% Geri kazanım</b>	101,40	96,40	98,60	95,00	99,15	101,38	101,60	101,26	100,25	93,21	97,66	102,48

**Tablo 4.14** Günler arası tekrarlanabilirlik

	<b>Fenilefrin hidroklorür(µg/mL)</b>			<b>Guaifenesin (µg/mL)</b>			<b>Pirilamin Maleat(µg/ml)</b>			<b>Parasetamol (µg/mL)</b>		
	5	15	25	20	100	180	7,5	17,5	27,5	60	180	300
<b>1. gün</b>	5,07	15,22	24,19	19,97	99,15	182,48	7,62	17,99	27,21	55,93	179,96	301,83
<b>2. gün</b>	5,26	14,67	24,34	19,63	99,63	181,93	7,83	17,72	26,54	57,00	175,27	307,49
<b>3. gün</b>	5,23	15,33	24,88	19,67	99,41	180,38	7,81	17,22	27,57	55,18	176,84	307,49
<b>4. gün</b>	5,30	15,07	24,79	20,06	99,92	182,90	7,70	17,60	27,06	57,70	182,19	306,68
<b>X(ort)</b>	5,22	15,07	24,55	19,83	99,53	181,92	7,74	17,63	27,10	56,45	178,56	305,87
<b>s</b>	0,10	0,29	0,34	0,21	0,33	1,10	0,10	0,32	0,43	1,12	3,10	2,72
<b>%RSD</b>	1,92	1,92	1,38	1,06	0,33	0,60	1,29	1,82	1,59	1,98	1,74	0,89
<b>% Geri kazanım</b>	104,40	100,47	98,20	99,15	99,53	101,07	103,20	100,74	98,55	94,08	99,20	101,96

#### 4.2.3. Geri Kazanım

Bölüm 3.5.3'te anlatıldığı şekilde, fenilefrin hidroklorür, guaifenesin, pirilamin maleat ve parasetamolün bir arada analizine yönelik geliştirilen yöntemin doğruluğunu test etmek için yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen değerler Tablo 4.15'te verilmiştir.

**Tablo 4.15 % Geri kazanım**

	<b>Örnekten gelen</b>	<b>Konulan</b>	<b>Bulunan</b>	<b>%Geri kazanım</b>
<b>Fenilefrin hidroklorür</b> <b>µg/mL</b>	1	5	5,96	99,20
		15	16,23	101,53
		22,5	23,52	100,08
<b>Guaifenesin</b> <b>µg/mL</b>	10	10	20,43	104,30
		90	102,82	103,13
		170	185,39	103,17
<b>Pirilamin maleat</b> <b>µg/mL</b>	1,25	6,25	7,42	98,72
		16,25	17,66	100,98
		26,25	27,22	98,93
<b>Parasetamol</b> <b>µg/mL</b>	24	40	64,64	101,60
		160	188,48	102,80
		270	298,39	101,63

#### 4.2.4. Tanıma ve Hesaplanabilirlik Limitinin Belirlenmesi (LOD, LOQ)

Fenilefrin hidroklorür, guaifenesin, pirilamin maleat ve parasetamolün analizi için geliştirilen yöntemin tanıma ve hesaplanabilirlik sınırlarının belirlenmesi için bölüm 3.5.4'te anlatıldığı şekilde yapılan çalışmalar sonucunda Tablo 4.16'daki değerler elde edilmiştir.

**Tablo 4.16** Tanıma ve hesaplanabilirlik sınırları

$\mu\text{g/mL}$	Fenileferin HCL	Guaifenesin	Pirilamin maleat	Parasetamol
<b>LOD</b>	0,42	0,25	0,34	0,32
<b>LOQ</b>	1,41	0,83	1,14	1,07

#### 4.2.5. Örnek Analizi

Fenilefrin hidroklorür, guaifenesin, pirilamin maleat ve parasetamol içeren şurup örneğinin analizi için bölüm 3.5.5' te anlatıldığı şekilde yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen sonuçlar Tablo 4.17' de verilmiştir.

**Tablo 4.17** Örnek analizi sonuçları

Örnek	Fenilefrin hidroklorür (mg/mL)	%R	Guaifenesin (mg/mL)	%R	Pirilamin maleat (mg/mL)	%R	Parasetamol (mg/mL)	%R
1	0,97	97,00	10,22	102,20	1,22	97,60	24,87	103,62
2	0,98	98,00	10,29	102,90	1,23	98,40	24,72	103,00
3	0,97	97,00	10,27	102,70	1,24	99,20	24,64	102,66
4	0,98	98,00	10,25	102,50	1,21	96,80	24,43	101,79
5	1,00	101,00	10,06	100,60	1,27	101,60	24,55	102,29
6	0,99	99,00	9,93	99,30	1,23	98,40	23,89	99,54
<b>X ort</b>	0,98	98,33	10,17	101,70	1,23	98,66	24,52	102,15
<b>s</b>	0,01		0,14		0,02		0,34	
<b>%RSD</b>	1,02		1,38		1,62		1,39	
<b>Güven aralığı</b>	0,97 - 0,99		10,02 - 10,32		1,21 - 1,25		24,16 - 24,88	
$t = 2,571$								

### 4.3. Tartışma

İlaç endüstrisinde uluslararası kalite standartlarına uygunluk ve bu amaçla yapılan sıkı denetimler ilaç karışımlarının analizi için doğru, kesin, hızlı ve seçici yöntemler geliştirme zorunluluğunu oluşturmuştur. HPLC, ilaç AR-GE merkezlerinin en çok tercih ettiği analitik cihazlar arasında olup yeni kromatografik yöntemler geliştirmek ve rutin analizlerde uygulamak önemli bir görev haline gelmiştir.

Bu çalışmada fenilefrin hidroklorür, guaifenesin, pirilamin maleat ve parasetamol içeren şurup preparatının analizi için HPLC yöntemi geliştirilmiştir. Yapılan ön çalışmalar sonucunda yaklaşık kromatografik ayırma şartları için, fosfat ( $H_3PO_4/H_2PO_4^{2-}$ ) tamponu ve asetonitril hareketli faz sistemi ile 2 aşamalı gradient elüsyonun uygun olduğuna karar verilmiştir. Box-Behnken deneysel tasarımı kullanılarak kromatografik ayırma üzerine, hareketli fazın oranı, pH, akış hızı etkisi ve optimum koşullar belirlenmiştir. Geliştirilen yöntem ile çalışılan maddelerin bir arada analizi 220 nm' de fenilefrin hidroklorür, guaifenesin, pirilamin maleat ve 250 nm' de parasetamol olmak üzere gradient elüsyon tekniğiyle 12 dakikada gerçekleştirilmiştir.

Çalışılan yöntemin geçerliliğini kontrol etmek amacıyla yapılan validasyon çalışmalarında doğruluk, tekrarlanabilirlik, doğruluk, tanıma ve hesaplanabilirlik limiti, (LOD-LOQ) parametreleri incelenmiştir.

Doğrusallık parametresi için yapılan çalışmalarda, her bir maddenin ölçü eğrilerinin konsantrasyon aralığı, maddelerin örnek içindeki miktarları gözönünde tutularak hazırlanmıştır. 0,9997 - 0,9999 aralığında bulunan regresyon katsayılarının kabul edilebilir olduğu görülmüştür.

Tekrarlanabilirlik çalışmalarında, her bir maddenin 3 farklı konsantrasyonunu içeren sentetik karışımlar hazırlanmış ve her karışım aynı gün içinde ve farklı günlerde belirlenen optimum kromatografik koşullarda analiz edilmiştir. Elde edilen %RSD değerleri %2' nin altında bulunmuştur.

Geliştirilen yöntemin doğruluğu için yapılan çalışmalarda, şurup örnekleri üzerine 3 farklı konsantrasyonda maddelerin bilinen miktarları ilave edilmiştir. Hesaplanan % geri kazanım değerlerinin kabul edilir sınırlar içinde (%95 - %105)



olduğu görülmüştür.

Çalışılan yöntem piyasada bulunan “Peditus” adlı şurup preparatına uygulanmıştır. Örnek analizlerinden elde edilen sonuçlara göre 1,02 – 1,62 aralığında % RSD değerleri ile %98,33 – %102,15 aralığında geri kazanım değerleri bulunmuştur.

Yapılan bu çalışmalar kapsamında önerilen HPLC yönteminin geçerliliği test edilerek uygun olduğu görülmüş olup, kalite kontrol laboratuvarlarındaki rutin analizlerde güvenilir bir yöntem olarak kullanılacağı ve benzer içerikteki farklı örnek analizlerinde de kaynak oluşturacağı düşünülmektedir.



- [1] Pubchem, 2005, Phenylephrine Hydrochloride, [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/phenylephrine\\_hydrochloride#section=Top](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/phenylephrine_hydrochloride#section=Top), 20.11.2005
- [2] D.S. Chien and R.D. Schoenwald, "Fluorometric Determination of Phenylephrine Hydrochloride by Liquid Chromatography in Human Plasma", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 74, no. 5, pp. 562-564, 1985.
- [3] M. Yamaguchi, H. Monji, I. Aoki and T. Yashiki, "High-performance liquid chromatographic determination of phenylephrine in human serum using column switching with fluorescence detection", *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, vol. 661, no. 1, pp. 93-99, 1994.
- [4] I. Caraballo, M. Fernández-Arévalo, M. A. Holgado, J. Alvarez-Fuentes and A. M. Rabasco, "Simultaneous HPLC Determination of some Drugs Commonly Used in Cold Medications: Dextromethorphan, Dephenhydramine, Phenylephrine, Phenylpropanolamine and Pseudoephedrine", *Drug Development and Industrial Pharmacy*, vol. 21, no. 5, pp. 605-613, 1995.
- [5] I. W. Lau and C. S. Mok, "High performance liquid chromatographic determination of active ingredients in cough-cold syrups with indirect conductometric detection", *Journal of Chromatography A*, vol. 693, no. 1, pp. 45-54, 1995.
- [6] K. Gumbhir and W. D. Mason, "High-performance liquid chromatographic determination of phenylephrine and its conjugates in human plasma using solid-phase extraction and electrochemical detection", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 14, no. 5, pp. 623-630, 1996.
- [7] V. Vuma and I. Kanfer, "High-performance liquid chromatographic determination of phenylephrine in human serum with coulometric detection", *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, vol. 678 no. 2, pp. 245-252, 1996.
- [8] T. D. Wilson, M. D. Forde, and A. V. R. Crain, "Simultaneous Liquid Chromatographic Determination of Glutaric Acid, Phenylephrine, and Benzyl Alcohol in a Prototype Nasal Spray with Application to Di- and Tricarboxylic Acids", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 74, no. 3, pp. 312-315, 1985.
- [9] N. Erk, M. Kartal, "Simultaneous High Performance Liquid Chromatographic and Derivative Ratio Spectra Spectrophotometry Determination of Chlorpheniramine maleate and Phenylephrine hydrochloride", *II Farmaco*, vol. 53, no. 8-9, pp. 617-622, 1998.
- [10] M. E. S. Metwally, "Chromatographic separation and analysis of chlorpheniramine maleate, methscopolamine nitrate and phenylephrine

- hydrochloride in sustained release capsules”, *Chromatographia*, vol. 50, no. 1-2, pp. 113-117, 1999.
- [11] M. J. Galmier, A. M. Frasey, S. Meski, E. Beyssac, J. Petit, J. M. Aiache, and C. Lartigue, “High-performance liquid chromatographic determination of phenylephrine and tropicamide in human aqueous humor” *Biomedical Chromatography*, vol. 14, no. 3, pp. 202–204, 2000.
- [12] M. Gil-Agusti, L. Monferrer-Pons, M. C. Garcia-Alvarez-Coque and J. Esteve-Romero, "Determination of active ingredients in cough-cold preparations by micellarliquid chromatography", *Talanta*, vol. 54, no. 4, pp. 621-630, 2001.
- [13] A. El-Gindy, S. Emara, M. K. Mesbah, and G. M. Hadad, “Liquid chromatography and chemometric-assisted spectrophotometric methods for the analysis of two multicomponent mixtures containing cough suppressant drugs”, *Journal of AOAC International*, vol. 88, no.4, pp. 1069-1080, 2005
- [14] U. R. Cieri, “Determination of Phenylephrine Hydrochloride, Chlorpheniramine Maleate, and Methscopolamine Nitrate in Tablets or Capsules by Liquid Chromatography with Two UV Absorbance Detectors in Series”, *Journal of AOAC International*, vol. 89, no. 1, pp. 53-57, 2006
- [15] I. M. Palabiyik, and F. Onur, “Simultaneous spectrophotometric and liquid chromatographic determination of dextromethorphan hydrobromide, phenylephrine hydrochloride, and carbinoxamine maleate in pharmaceutical preparations”, *Journal of Analytical Chemistry*, vol. 67, no. 1, pp. 56-63, 2012.
- [16] P. Ptacek, J. Klima and J. Macek, “Development and validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of phenylephrine in human plasma and its application to a pharmacokinetic study”, *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, vol. 858, no. 1-2, pp. 263-268, 2007.
- [17] S. Feng, Q. Zhao, J. Jiang and P. Hu, “Determination of phenylephrine in human plasma using ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry”, *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, vol. 915, pp. 28-32, 2013.
- [18] A. P. Dewani, S. M. Dabhade, R. L. Bakal, C. K. Gadewar, A. V. Chandewar and S. Patra, “Development and validation of a novel RP-HPLC method for simultaneous determination of paracetamol, phenylephrine hydrochloride, caffeine, cetirizine and nimesulide in tablet formulation”, *Arabian Journal of Chemistry*, vol. 8, no. 4, pp. 591–598, 2015.
- [19] K. Patel Devangi, J. Vyas Amit, M. N. Noolvi, B. Patel Ashok and K. Patel Nilesh, “Estimation of four drugs: Ambroxol hydrochloride, Levocetirizine hydrochloride, Phenylephrine hydrochloride and Paracetamol by RP-HPLC in tablet dosage form”, *International Journal of Pharmaceutical Chemistry and Analysis*, vol. 5, no. 1, pp. 31-38, 2018

- [20] S. Naveed, K. Usmanghani, F. Qamar and S. Khan "A RP-HPLC Method for Simultaneous estimation of Chlorpheniramine Maleate, Paracetamol and Phenylephrine Hydrochloride in Bulk", RADS Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, vol. 6, no. 1, 2018
- [21] T. Tonde, H. Ramesh, S. Bhandarkar, T. S. Bobade and S. M. Hiradeve "Simultaneous estimation of Cetrizine hydrochloride and Phenylephrine hydrochloride in tablet dosage form by RP-HPLC", International Journal of Biomedical and Advance Research, vol. 8, no. 12, pp. 465-472, 2017.
- [22] V. B. Baviskar, S. T. Donda, S. S. Patil, P. K. Deshmukh and P. O. Patil, "Development and validation of determination for chlorpheniramine maleate, phenylephrine hydrochloride and ibuprofen in bulk and pharmaceutical formulation by RP-HPLC method", Indian Drugs, vol. 52, no. 11, pp. 35-40, 2015.
- [23] T. S. Belal, D. S. El-Kafrawy, M. S. Mahrous, M. M. Abdel-Khalek and A. H. Abo-Gharam, "Validated spectrophotometric and chromatographic methods for simultaneous determination of ketorolac tromethamine and phenylephrine hydrochloride", Annales Pharmaceutiques Françaises, vol. 74, no. 4, pp. 267-282, 2016.
- [24] M. R. Rezk, A. S. Fayed, H. M. Marzouk, and S. S. Abbas, "Chromatographic Determination of Cyclopentolate Hydrochloride and Phenylephrine Hydrochloride in the Presence of Their Potential Degradation Products", Journal of AOAC International, vol. 100, no. 2, pp. 434-444, 2017.
- [25] Y. F. Mestre, L. L. Zamora and J. M. Calatayud, "Determination of phenylephrine hydrochloride by flow injection analysis with chemiluminescence detection", Journal of AOAC International, vol. 84, no. 1, pp. 13-18, 2011.
- [26] M. Knochen, J. Giglio and B. F. Reis, "Flow-injection spectrophotometric determination of paracetamol in tablets and oral solutions", Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, vol. 33, no. 2, pp. 191-197, 2003.
- [27] N. W. Beyene, P. Kotzian, K. Schachl, H. Alemu, E. Turkusic, A. Copra, H. Moderegger, I. Svancara, K. Vytras and K. Kalcher, "Biosensors based on manganese dioxide-modified carbon substrates: retrospections, further improvements and applications", Talanta, vol. 64, no. 5, pp. 1151-1159, 2004.
- [28] M. Giahi, M. Mirzaei and G. V. Lahijani, "Potentiometric PVC membrane sensor for the determination of phenylephrine hydrochloride in some pharmaceutical products", Journal of the Iranian Chemical Society, vol. 7, no. 2, pp. 333-338, 2010.
- [29] P. V. Devarajan, M. H. Adani and A. S. Gandhi, AS, "Simultaneous determination of lignocaine hydrochloride and phenylephrine hydrochloride by HPTLC", Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, vol. 22, no. 4, pp. 685-690, 2000.

- [30] M. R. Gomez, R. A. Olsina, L. D. Martinez and M. F. Silva, "Simultaneous determination of dextromethorphan, diphenhydramine and phenylephrine in expectorant and decongestant syrups by capillary electrophoresis", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 30, no. 3, pp. 791-799, 2002.
- [31] A. F. Marchesini, M. R. Williner, V. E. Mantovani, J. C. Robles and H. C. Goicoechea, "Simultaneous determination of naphazoline, diphenhydramine and phenylephrine in nasal solutions by capillary electrophoresis", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 31, no.1, pp. 39-46, 2003.
- [32] J. M. L. Gallego and J. P. Arroyo, "Determination of prednisolone, naphazoline, and phenylephrine in local pharmaceutical preparations by micellar electrokinetic chromatography", *Journal of Separation Science*, vol. 6, no. 9-10, pp. 947-952, 2003.
- [33] H. A. J. Al Lawati, M. Al-Azwani, G. B. Varma, F. E. O. Suliman and K. A. Shalabi "Analysis of phenylephrine hydrochloride in pharmaceutical formulations and biological fluids using 2,2'-bipyridyl)ruthenium(II)-peroxydisulphate chemiluminescence system in a two-chip microdevice", *Analytical Methods*, vol. 3, no. 11, pp. 2585-2592, 2011.
- [34] B. Gala, A. Gomez-Hens, D. Perez-bendito, "Individual and simultaneous determination of ephedrine and phenylephrine by use of kinetic methodology", *Journal of Analytical Chemistry*, vol. 349, no. 12, pp. 824-828, 1994.
- [35] I. Shoukrallah, I, "Determination of Phenylephrine Hydrochloride and Carbinoxamine Maleate in Capsules and Diphenhydramine", *ACTA Pharmaceutica Jugoslavica*, vol. 41, no. 2, pp. 107-115, 1991.
- [36] N. Erk, "Quantitative analysis of chlorpheniramine maleate and phenylephrine hydrochloride in nasal drops by differential-derivative spectrophotometric, zero-crossing first derivative UV spectrophotometric and absorbance ratio methods", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 23, no. 6 pp. 1023-1031, 2000.
- [37] S. A. Shama, "Spectrophotometric determination of Phenylephrine hydrochloride and orphenadrine citrate in pure and in dosage forms", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 30, no. 4, pp. 1385-1392, 2002.
- [38] I. Savic, G. Nikolic and V. Bankovic-Macedonian, "Development and validation of spectrophotometric method for phenylephrine hydrochloride estimation in nasal drops formulations", *Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, vol. 27, no. 2, pp. 149-156, 2008.
- [39] I. Savic, G. Nikolic and V. Bankovic-Macedonian, "The simultaneous spectrophotometric determination of trimazolin and phenylephrine hydrochloride in nasal preparations", *Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly*, vol. 14, no. 4, pp. 261-264, 2008.

- [40] S. Sardana and R. C. Mashru, "Simultaneous determination of phenylephrine hydrochloride and tropicamide in ophthalmic dosage form with three rapid derivative spectrophotometric methods", *Journal of the Chilean Chemical Society*, vol. 55, no. 4, pp. 515-518, 2010.
- [41] J. R. C. Rocha, C. X. Galhardo, M. Auxiliadora, E. Natividade and J. C. Masini, "Spectrophotometric Determination of Phenylephrine Hydrochloride in Pharmaceuticals by Flow Injection Analysis Exploiting the Reaction with Potassium Ferricyanide and 4-Aminoantipyrine", *Journal of AOAC International*, vol. 85, no. 4, pp. 875-878, 2002.
- [42] M. S. Collado, V. E. Mantovani, H. C. Goicoechea and A. C. Olivieri, "Simultaneous spectrophotometric-multivariate calibration determination of several components of ophthalmic solutions: phenylephrine, chloramphenicol, antipyrine, methylparaben and thimerosal", *Talanta*, vol. 52, no. 5, pp. 909-920, 2000.
- [43] H. C. Goicoechea and A. C. Olivieri "Chemometric assisted simultaneous spectrophotometric determination of four-component nasal solutions with a reduced number of calibration samples", *Analytica Chimica ACTA*, vol. 453, no. 2, pp. 289-300, 2002.
- [44] N. H. Al-Shaalan, "Determination of phenylephrine hydrochloride and chlorpheniramine maleate in binary mixture using chemometric-assisted spectrophotometric and high-performance liquid chromatographic-UV methods", *Journal of Saudi Chemical Society*, vol. 14, no. 1, pp. 15-21, 2010.
- [45] L. D. Yao, Y. W. Tang, W. P. Zeng and Z. F. Huang "An Electrochemical Sensor for Phenylephrine Based on Molecular Imprinting", *Analytical Sciences*, vol. 25, no. 9, pp. 1089-1093, 2009.
- [46] J. C. Perlado, A. Zapardiel, E. Bermejo, J. A. Perez, and L. Hernandez, "Determination of phenylephrine with a modified carbon paste electrode", *Analytica Chimica ACTA*, vol. 305, no. 1-33, pp. 83-90, 1995.
- [47] F. Huang, G. Jin, Y. Liu and J. Kong, "Sensitive determination of phenylephrine and chlorprothixene at poly(4-aminobenzene sulfonic acid) modified glassy carbon electrode" *Talanta*, vol. 74, no. 5, pp. 1435-1441, 2008.
- [48] H. M. Maher, M. M. Alshehri and M. Al-taweel Shorog "Derivative emission spectrofluorimetry for the simultaneous determination of guaifenesin and phenylephrine hydrochloride in pharmaceutical tablets", *Luminescence*, vol. 30, no. 3, pp. 330-336, 2014.
- [49] H. M. Elfatry, M. M. Mabrouk, S. F. Hammad, F. R. Mansour, A. H. Kamal and S. Alahmad, "Development and Validation of Chemometric-Assisted Spectrophotometric Methods for Simultaneous Determination of Phenylephrine Hydrochloride and Ketorolac Tromethamine in Binary Combinations", *Journal of AOAC International*, vol. 99, no. 5, pp. 1247-1251, 2016.

- [50] F. A. El Yazbi, E. M. Hassan, E. F. Khamis, M. A. A. Ragab and M. M. A. Hamdy, "HPTLC analysis of ternary mixture containing ketorolac tromethamine, phenylephrine hydrochloride, and chlorpheniramine maleate", *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, vol. 39, no. 19-20, pp. 869-876, 2016.
- [51] M. A. A. Ragab, F. A. El Yazbi, E. M. Hassan, E. F. Khamis and M. M. A. Hamdy, "Stability Studies of Over the Counter Quaternary Mixture Containing Phenylephrine Hydrochloride, Chlorpheniramine Maleate, Paracetamol and Caffeine Using Different Chromatographic Methods", *Analytical Chemistry Letters*, vol. 8, no. 3, pp. 331-347, 2018.
- [52] M. A. A. Ragab, H. M. Abdel-Hay, M. Ahmed, M. Hytham and S. M. Mohyeldin, "Application of Capillary Zone Electrophoresis Coupled with a Diode Array Detector (CZE-DAD) for Simultaneous Analysis of Ibuprofen and Phenylephrine", *Journal of AOAC International*, vol. 102, no. 29, pp. 473-479, 2019.
- [53] British Pharmacopeia, Her Majesty's stationary Office: London; 2009.
- [54] E. Imamoglu and A. K. Tunca, "Simultaneous Determination of Guaifenesin and Ephedrine HCl Binary Mixture in Syrup Dosage Forms and Human Plasma by Using RP-HPLC-DAD", *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, vol. 37, no. 7, pp. 1039-1051, 2014.
- [55] H. Patil, S. Sonawane and P. Gide, "Determination of Guaifenesin from Spiked Human Plasma Using RP-HPLC with UV Detection", *Journal of Analytical Chemistry*, vol. 69, no. 4, pp. 390-394, 2014.
- [56] S. M. Kishk, I. Salama, S. Mostafa and M. El-Sadek, "Stability Indicating Chromatographic Method For The Determination of Benzonatate Diphenhydramine, Guaifenesin and Phenylephrine", *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, vol. 37, no. 5, pp. 726-747, 2014.
- [57] K. L. N. Rao, C. Krishnaiah, K. S. Babu and K. P. Reddy, "Development and validation of a stability-indicating LC method for simultaneous determination of related compounds of guaifenesin, terbutaline sulfate and ambroxol HCl in cough syrup formulation", *Journal of Saudi Chemical Society*, vol. 18, no. 5, pp. 593-600, 2014.
- [58] N. S. Abdelwahab, "Determination of Ambroxol Hydrochloride, Guaifenesin, and Theophylline in Ternary Mixtures and in the Presence of Excipients in Different Pharmaceutical Dosage Forms", *Journal of Aoac International*, vol. 95, no. 6, pp. 1629-1638, 2012.
- [59] S. Emara, M. Kamal, G. Hadad, H. ZaaZaa and M. A. Kawi, "Back- flush Column Switching Technique For On-line Sample Cleanup and Enrichment to Determine Guaifenesin in Human Serum", *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, vol. 35, no. 1, pp. 15-27, 2012.
- [60] N. Dubey, S. Sahu and G. N. Singh, "Development of HPLC method for simultaneous estimation of ambroxol, guaifenesin and salbutamol in single

- dose form”, Indian Journal of Chemistry Section B-Organic Chemistry Including Medicinal Chemistry, vol. 51, no. 11, pp. 1633-1636, 2012.
- [61] N. W. Ali, M. A. Hegazy, M. Abdelkawy and E. A. Abdelaleem, “Simultaneous Determination of Methocarbamol and Its Related Substance (Guaifenesin) in Two Ternary Mixtures with Ibuprofen and Diclofenac Potassium by HPTLC Spectrodensitometric Method”, Journal of Planar Chromatography-Modern TLC, vol. 25, pp. 150-155, 2012.
- [62] M. I. Walsh, F. Belal, N. El-Enany, M. Eid and R. N. El-Shaheny, “Stability Indicating HPLC Method With Fluorescence Detection For Determination of Methocarbamol in Tablets Application to Therapeutic Drug Monitoring”, Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, vol. 35, no. 14, pp. 2021-2041, 2012.
- [63] M. Maithani, S. Sahu, A. K. Chaudhary and R. Singh, “Development and Validation of a Novel RP-HPLC Method For Simultaneous Determination of Salbutamol Sulfate, Guaifenesin and Ambroxol Hydrochloride in Tablet Formulation”, Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, vol. 35 no. 9, pp. 1156-1170, 2012.
- [64] G. A. Shabir, “Determination of Guaiphenesin and Sodium Benzoate in Liquifruta Garlic Cough Medicine by High Performance Liquid Chromatography”, Journal of Analytical Chemistry, vol. 66, pp. 963-968, 2011.
- [65] A. Porel, S. Haty and A. Kundu, “Stability-indicating HPLC Method for Simultaneous Determination of Terbutaline Sulphate, Bromhexine Hydrochloride and Guaifenesin”, Indian Journal of Pharmaceutical Science, vol. 73, no. 1, pp. 46-56, 2011.
- [66] S. Joshi, C. Bhatia, C. S. Bal and M. S. M. Rawat, “A validated HPLC method for simultaneous determination of four active components in counter cough formulation”, Journal of the Indian Chemical Society, vol. 87, pp. 1425-1429, 2010.
- [67] M. R. Louhaichi, S. Jebali, M. H. Loueslati, N. Adhoum and L. Monser, “Simultaneous determination of pseudoephedrine, pheniramine, guaifenesin, pyrilamine, chlorpheniramine and dextromethorphan in cough and cold medicines by high performance liquid chromatography”, Talanta, vol. 78, no. 3, pp. 991-997, 2009.
- [68] G. Grosa, E. Del Grosso, R. Russo and G. Allegrone, “Simultaneous, stability indicating, HPLC-DAD determination of guaifenesin and methyl and propylparabens in cough syrup”, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, vol. 41, no. 3, pp. 798-803, 2006.
- [69] A. Ozdemir, H. Aksoy, E. Dinc, D. Baleanu and S. Dermis, “Determination of guaifenesin and dextromethorphan in a cough syrup by HPLC with fluorometric detection”, Revue Roumaine De Chimie, vol. 51, no. 2, pp. 117-122, 2006.



- [70] M. L. Wilcox and J. T. Stewart, "HPLC determination of guaifenesin with selected medications on underivatized silica with an aqueous-organic mobile phase", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 23, no. 5, pp. 909-916, 2000.
- [71] Y. P. Chen, P. Wang, C. Y. Shaw, and B. L. Chang, "Simultaneous determination of complex cold medicine formulations by HPLC", *Journal of Food and Drug Analysis*, vol. 7, no. 1, pp. 13-22, 1999.
- [72] L. A. Shervington, "A quantitative simultaneous high performance liquid chromatographic determination of pseudoephedrine HCl, guaifenesin and dextromethorphan HBr", *Analytical Letters*, vol. 30, no. 5, pp. 927-944, 1997.
- [73] T. D. Wilson, W. G. Jump, W. C. Neumann and T. San Martin, "Validation of Improved Methods for HPLC Determination of Phenylpropanolamine, Dextromethorphan, Guaifenesin and Sodium benzoate in a Cough-Cold Formulations", *Journal of Chromatography*, vol. 641, no. 2, pp. 241-248, 1993.
- [74] V. Pade and S. Stavchansky, "HPLC Determination of Pseudoephedrine in Plasma in the Presence of Guaifenesin", *Analytical Letters*, vol. 26, no. 5, pp. 867-873, 1993.
- [75] M. H. Abdelhay, M. S. Eldin and M. A. Abuirjeie, "Simultaneous Determination of Theophylline and Guaiphenesin by 3RD-Derivative Ultraviolet Spectrophotometry and High-Performance Liquid-Chromatography", *Analyst*, vol. 117, no. 2, pp. 157-160, 1992.
- [76] R. M. Gudipati, J. E. Wallace and S. A. Stavchansky, "High-Performance Liquid-Chromatography Determination of Guaifenesin in Dog Plasma", *Analytical Letters*, vol. 24, no. 2, pp. 265-274, 1991.
- [77] G. A. Thompson, G. Solomon, H. H. Albrecht, D. P. Reitberg and E. Guenin, "Guaifenesin Pharmacokinetics Following Single-Dose Oral Administration in Children Aged 2 to 17 Years", *The Journal of Clinical Pharmacology*, vol. 56, no. 7, pp. 894-901, 2016.
- [78] H. M. Maher, S. M. Al-Taweel, M. M. Alshehri, N. Z. Alzoman, "Novel Stereoselective High-Performance Liquid Chromatographic Method for Simultaneous Determination of Guaifenesin and Ketorolac Enantiomers in Human Plasma", *Chirality*, vol. 26, no. 10, pp. 629-639, 2014.
- [79] A. M. Yehia and H. M. Essam, "Development and validation of a generic high-performance liquid chromatography for the simultaneous separation and determination of six cough ingredients: Robustness study on core-shell particles", *Journal of Separation Science*, vol. 39, no. 17, pp. 3357-3367, 2016.
- [80] A. M. Yehia and H. M. Mohamed, "Green approach using monolithic column for simultaneous determination of coformulated drugs", *Journal of Separation Science*, vol. 39, no. 11, pp. 2114-2122, 2016.

- [81] C. Lewis, A. Ray, T. Bristow, and S. Wren, "Determining the suitability of mass spectrometry for understanding the dissolution processes involved with pharmaceutical tablets", *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, vol. 29, no. 12, pp. 1107–1114, 2015.
- [82] G. Sailaja and B. H. Babu "A Validated High Performance Liquid Chromatography Method for the Simultaneous Analysis of Guaifenesin, Ambroxol and Loratidine in Bulk and Liquid Dosage Form", *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, vol. 5, no. 12, pp. 61-66, 2015
- [83] N. S. Abdelwahab and E. A. Abdelaleem, "Stability indicating RP-HPLC method for simultaneous determination of guaifenesin and pseudoephedrine hydrochloride in the presence of syrup excipients", *Arabian Journal of Chemistry*, vol. 10, no. 2, pp. 2896–2901, 2017.
- [84] P. M. Njaria K. O. Abuga F. N. Kamau and H. K. Chepkwony, "A Versatile HPLC Method for the Simultaneous Determination of Bromhexine, Guaifenesin, Ambroxol, Salbutamol/Terbutaline, Pseudoephedrine, Triprolidine, and Chlorpheniramine Maleate in Cough–Cold Syrups", *Chromatographia*, vol. 79, no. 21-22, pp. 1507-1514, 2016.
- [85] P. Thangavelu A. C. Grace and J. Murugesan, "Analytical Method Development and Validation for the Simultaneous Estimation of Salbutamol Sulphate, Guaifenesin and Ambroxol Hydrochloride by RP-HPLC Method in Commercial Oral Liquid Dosage Form", *International Journal of Pharmaceutical Sciences And Research Projected Impact Factor*, vol. 27 no. 0.59, pp. 260-265, 2017.
- [86] K Praneet, K. N. K. Reddy and P. Swetha, "Simultaneous estimation and method validation of Terbutaline sulfate and Guaifenesin in liquid dosage form by RP-HPLC", *Indian Journal of Research in Pharmacy and Biotechnology*, vol. 5, no. 1, pp. 36-40, 2017.
- [87] F. A. El-Yazbi, O. A. Amin, E. I. El-Kimary, E. F. Khamis and S. E. Younis, "Simultaneous Determination of Methocarbamol and Aspirin in Presence of their Pharmacopeial Related Substances in Combined", *Drug Development and Industrial Pharmacy*, vol. 1, no. 22, 2018.
- [88] L. I. Xiaoling, L. I. U. Min, L. I. Meifang, L. J. Yulan and T. Wang, "Study on Determination Method for Dissolution of Pentoxifyverine Citrate and Guaifenesin Tablets", *China Pharmacy*, vol. 28, no. 12, pp. 1702-1706, 2017.
- [89] H. Y. Hayun and M. O. Puspasari, "Development of a high performance liquid chromatography method for simultaneous analysis of theophylline, guaifenesin and diphenhydramine in an elixir", *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, vol. 16, no. 10, 2017.
- [90] H. M. Maher, M. M. Alshehri and S. M. Al-Taweel, "Derivative Emission Spectrofluorimetry for the Simultaneous Determination of Guaifenesin and Phenylephrine hydrochloride in pharmaceutical tablets", *Luminescence*, vol. 30, pp. 330- 336, 2015.

- [91] S. Guney and F. C. Cebeci, "Selective Electrochemical Sensor for Theophylline Based on an Electrode Modified with Imprinted Sol-gel Film Immobilized on Carbon Nanoparticle Layer", *Sensors and Actuators B-chemical*, vol. 208, pp. 307-314, 2015.
- [92] M. M. Abdelrahman and N. S. Abdelwahab, "Superior Spectrophotometric Method for Determination of a Ternary Mixture with Overlapping Spectra". *Analytical Methods*, vol. 6, no. 2, pp. 509-514, 2014.
- [93] T. Jos, L. Lonappan, Z. Rasheed, A. E. Vikraman and K. G. Kumarz, "Voltammetric Determination of Guaifenesin on a MWCNT Modified Pt Electrode", *Ecs Electrochemistry Letters*, vol. 3, no. 12, pp. B23-B25, 2014.
- [94] H. W. Darwish, F. H. Metwally and A. E. Bayoumi, "Simultaneous Spectrophotometric Determination of Diphenhydramine, Benzonatate, Guaifenesin and Phenylephrine in Their Quaternary Mixture Using Partial Least Squares with and without Genetic Algorithm as a Powerful Variable Selection Procedure", *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, vol. 9, no. 4, pp. 1359-1372, 2014.
- [95] R. Hajian, E. S. Kamaei, "Simultaneous Determination of Paracetamol, Pseudoephedrine and Diphenhydramine in Cold Medicines Using Net Analyte Signal Concept", *Journal of The Indian Chemical Society*, vol. 91, pp. 2133-2141, 2014.
- [96] H. W. Darwish, F. H. Metwally, A. El Bayoumi and A. A. Ashour, "Artificial Neural Networks and Concentration Residual Augmented Classical Least Squares for the Simultaneous Determination of Diphenhydramine, Benzonatate, Guaifenesin and Phenylephrine in their Quaternary Mixture", *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, vol. 13, pp. 2083-2090, 2014.
- [97] M. A. A. Ragab, M. A. Korany, K. Michail, A. E. Issa, H. M. Daabees and D. S. Elkafrawy, "Discrete Fourier Transform Convolved Densitometric Peak Responses for the Determination of Methacarbamol in Different Pharmaceutical Mixtures in the Presence of its Degradation Product", *Journal of Liquid Chromatography Related Technologies*, vol. 37, no. 14, pp. 1999-2020, 2014.
- [98] M. B. Gholivand and M. Khodadadian, "Simultaneous Voltammetric Determination of Theophylline and Guaifenesin Using a Multiwalled Carbon Nanotube-Ionic Liquid Modified Glassy Carbon Electrode", *Electroanalysis*, vol. 26, no. 9, pp. 1975-1983, 2014.
- [99] N. S. Abdelwahab and E. A. Abdelaleem, "TLC Densitometric Determination of Guaifenesin, Pseudoephedrine Hydrochloride and Guaifenesin Related Substance (Guaicol)", *Journal of Planar Chromatography - modern TLC*, vol. 26, no. 1, pp. 73-77, 2013.
- [100] R. Hajian and A. Karamian, "The Use of Net Analyte Signal Aspect in Univariate Calibration for Simultaneous determination of Guaifenesin, Pseudoephedrine and Chlorpheniramine in Cough Syrup Formulations", *Current Pharmaceutical Analysis*, vol. 8, no. 1, pp. 93-100, 2012.

- [101] G. Gagandeep, N. K. Karan, G. S. Sarma and A. Thakkar, "Journal of the Chilean Chemical Society", vol. 57, no. 4, pp. 1436-1441, 2012.
- [102] R. Hajian, N. Shams and Z. Davarpanah, "E-Journal of Chemistry, Combination of First Derivative Spectrophotometry and H-Point Standard Addition Method for Simultaneous Determination of Guaifenesin and Theophylline in Cough Syrup", E-Journal of Chemistry, vol. 8, no. 3, pp. 966-976, 2011.
- [103] S. Riahi, F. Hadiloo, S. M. R. Milani, N. Davarkhah, M. R. Ganjali, P. Norouzi and P. Seyfi, "A New Technique for Spectrophotometric Determination of Pseudoephedrine and Guaifenesin in Syrup and Synthetic Mixture", Drug Testing and Analysis, vol. 3, no. 5, pp. 319-324, 2011.
- [104] M. B. Gholivand, A. Azadbakht and A. Pashabadi, "An Electrochemical Sensor Based on Carbon Nanotube Bimetallic Au-Pt Inorganic-Organic Nanofiber Hybrid Nanocomposite Electrode Applied for Detection of Guaifenesin", Electroanalysis, vol. 23, no. 12, pp. 2771-2779, 2011.
- [105] V. Zare-Shahabadi, M. Shamsipur, B. Hemmatenejad and M. Akhond, "Simultaneous Determination of Guaifenesin and Theophylline by Chemometrics Methods", Analytical Letters, vol. 43, no. 4, pp. 687-700, 2010.
- [106] G. M. Hadad, A. El-Gindy and W. M. M. Mahmoud, "New Validated Liquid Chromatographic and Chemometrics-Assisted UV Spectroscopic Methods for the Determination of Two Multicomponent Cough Mixtures in Syrup", Journal of AOAC International, vol. 91, no. 1, pp. 39-51, 2008.
- [107] K. M. Emara, H. M. Abdel-Wadood and M. F. Bakr, "Utility of Certain Spectrofluorimetric Methods for Analysis of Two Pharmaceutical Binary Mixtures", Bulletin of Pharmaceutical Sciences, vol. 31, pp. 183-195, 2008.
- [108] A. El-Gindy, S. Emara and H. Shaaban, "Development and validation of chemometrics-assisted spectrophotometric and liquid chromatographic methods for the simultaneous determination of two multicomponent mixtures containing bronchodilator drugs", Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, vol. 43, no. 3, pp. 973-982, 2007.
- [109] I. Tapsoba, J. E. Belgaied and K. Boujlel, "Voltammetric Assay of Guaifenesin in Pharmaceutical Formulation", Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, vol. 38, no.1, pp. 162-165, 2005.
- [110] M. H. M. Sharaf and D. D. Stiff, "Determination of Guaifenesin in Human Serum by Capillary Gas Chromatography and Electron Capture Detection", Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, vol. 35, no. 4, pp. 801-806, 2004.
- [111] N. B. Pappano, Y. C. De Micalizzi, N. B. Debattista and F. H. Ferretti, "Rapid and Accurate Determination of Chlorpheniramine Maleate, Noscapiene Hydrochloride and Guaiphenesin in Binary Mixtures by Derivative Spectrophotometry", Talanta, vol. 44, no. 4, pp. 633-639, 1997.

- [112] A. R. Lee, and T. M. Hu, "Determination of Guaifenesin in Anti-Tussive Pharmaceutical Preparation Containing Dextromethorphan by First Derivative and 2nd-Derivative Ultraviolet Spectrophotometry", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 12, no. 6, pp. 747-752, 1994.
- [113] H. M. Maher, M. M. Alshehri and M. S. Al-taweel, "Derivative emission spectrofluorimetry for the simultaneous determination of guaifenesin and phenylephrine hydrochloride in pharmaceutical tablets", *Luminescence*, vol. 30, no. 3, pp. 330-336, 2014.
- [114] M. B. Gholivand and M. Khodadadian, "Simultaneous Voltammetric Determination of Theophylline and Guaifenesin Using a Multiwalled Carbon Nanotube-Ionic Liquid Modified Glassy Carbon Electrode", *Electroanalysis*, vol. 26, no. 9, pp. 1975-1983, 2014.
- [115] H. K. Knych, S. D. Stanley, D. Benson and R. M. Arthur, "Pharmacokinetics of guaifenesin following administration of multiple doses to exercised Thoroughbred horses", *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, vol. 39, no. 4, pp. 416-419, 2016.
- [116] M. A. Mohammed, A. K. Attia and H. M. Elwy, "Electrochemical Sensor Based on Multiwalled Carbon Nanotube, Alizarine Red S and Chitosan for Simultaneous Determination of Oxememazine Hydrochloride, Paracetamol and Guaifenesin", *Electroanalysis*, vol. 29, no. 2, pp. 506-513, 2016.
- [117] I. A. Naguib, E. A. Abdelaleem, S. A. Farag and H. E. Zaazaa, "Simultaneous Determination of Guaifenesin, Salbutamol Sulfate or Dextromethorphan HBr and Guaifenesin Impurity (Guaicol) by HPTLC Method", *Analytical Chemistry Letters*, vol. 7, no. 2, pp. 142-152, 2017.
- [118] E. A. Abdelaleem, I. A. Naguib, S. A. Farag, and H. E. Zaazaa, H. E. "Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography and High-Performance Thin-layer Liquid Chromatography Methods for Simultaneous Determination of Theophylline, Guaifenesin and Guaifenesin Impurity (Guaicol) in Their Bulk Powders and in Dosage Form", *Journal of Chromatographic Science*, vol. 56, no. 9, pp. 846-852, 2018.
- [119] M. R. Louhaichi, S. Jebali, M. H. Loueslati, N. Adhoum and L. Monser, "Simultaneous determination of pseudoephedrine, pheniramine, guaifenesin, pyrilamine, chlorpheniramine and dextromethorphan in cough and cold medicines by high performance liquid chromatography", *Talanta*, vol. 78, no. 3, pp. 991-997, 2009.
- [120] F. De Fabrizio, "Spectrophotometric Determination of Acetaminophen, Phenylephrine Hydrochloride, Codeine Phosphate, and Pyrilamine Maleate in Tablets or Powder", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 57, no. 4, pp. 644-645, 1968.
- [121] D. R. Heidemann, "High-pressure liquid chromatographic determination of methscopolamine nitrate, phenylpropanolamine hydrochloride, pyrilamine maleate, and pheniramine maleate in tablets", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 70, no. 7, pp. 820-822, 1981.

- [122] V. Das Gupta and A. G. Ghanekar, "Quantitative Determinations of Codeine Phosphate, Guaifenesin, Pheniramine Maleate, Phenylpropanolamine Hydrochloride, and Pylamine Maleate in an Expectorant by High-Pressure Liquid Chromatography", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 66, no. 6, pp. 895–897, 1977.
- [123] A. Saleem, S. Anwar, T. Hussain, R. Ahmad, G. Mustafa and M. Ashfaq, "Simultaneous Determination of Acetaminophen, Pamabrom and Pylamine Maleate in Pharmaceutical Formulations Using Stability Indicating HPLC Assay Method", *Journal of the Mexican Chemical Society*, vol. 59, no. 2, 2015.
- [124] A. Doganay, B. Koxsel, S. O. Gundogdu and Y. Capan, "Simultaneous Determination of Dexpanthenol, Lidocaine Hydrochloride, Mepyramine Maleate and their Related Substances by a RP-HPLC Method in Topical Dosage Forms", *Journal of Chromatographic Science*, vol. 56, no. 10, p. 903-911, 2018.
- [125] B. Kapalavavi, Y. Yang, R. Marple and C. Gamsky, "Separation and analysis of pharmaceuticals in cold drugs using green chromatography", *Separation and Purification Technology*, vol. 158, pp. 308–312, 2016.
- [126] F. De Fabrizio, "GLC Analysis of Menthol, Phenol, Benzocaine, and Pylamine Maleate in Aerosol Spray Lotion", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 70, no. 10, pp. 1151–1152, 1981.
- [127] F. De Fabrizio, "Simultaneous GLC analysis of salicylamide, phenylpropanolamine hydrochloride, caffeine, chlorpheniramine maleate, phenylephrine hydrochloride, and pylamine maleate in capsule preparations", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 69, no. 7, pp. 854–855, 1980.
- [128] S. M. Billedeau, C. L. Holder and T. A. Getek, "High-performance liquid chromatography of the antihistamine pylamine and its N-oxide using electrochemical detection", *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, vol. 534, pp. 151–159, 1990.
- [129] O. Aksu, A. Bozdogan and G. Kunt, "Simultaneous Determination of Mepyramine Maleate, Lidocaine Hydrochloride, and Dexpanthenol in Pharmaceutical Preparations by Partial Least-Squares Multivariate Calibration", *Analytical Letters*, vol. 39, no. 4, pp. 751-761, 2006.
- [130] V. Annapurna, G. Jyothi, V. Nagalakshmi, and B. B. V. Sailaja, "Spectrophotometric Methods for the Assay of Pylamine Maleate Using Chromogenic Reagents", *E-Journal of Chemistry*, vol. 7, no. 4, pp. 1507–1513, 2010.
- [131] M. S. Raghu and K. Basavaiah, K, "Two charge-transfer complexation reactions for spectrophotometric determination of pheniramine maleate using  $\pi$ -acceptors", *Journal of Scientific & Industrial Research*, vol. 70, no. 10, pp. 851-858, 2011.

- [132] M. S. Raghu, K. Basavaiah, P. J. Ramesh, S. A. M. Abdulrahman and K. B. Vinay "Development and validation of a uv-spectrophotometric method for the determination of pheniramine maleate and its stability studies", *Journal of Applied Spectroscopy*, vol. 79, no. 1, pp. 131–138, 2012.
- [133] S. Dhillon, "Tramadol/paracetamol fixed-dose combination: a review of its use in the management of moderate to severe pain", *Clinical Drug Investigation*, vol. 30, no. 10, pp. 711-738, 2010.
- [134] P. R. Bhamre and S. J. Rajput, "Development of HPLC and Chemometric Assisted Spectrophotometric Methods for the Simultaneous Determination of Five Active Ingredients in Cough and Cold Tablets and Their Application to Dissolution Study", *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, vol. 8, no. 1, 2016.
- [135] J. V. Aukunuru, U. B. Kompella, and G. V. Betageri, "Simultaneous high performance liquid chromatographic analysis of acetaminophen, salicylamide, phenyltoloxamine, and related products", *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, vol. 23, no. 4, pp. 565-578, 2000
- [136] M. Kartal, "LC method for the analysis of paracetamol, caffeine and codeine phosphate in pharmaceutical preparations", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 26, no. 5-6, pp. 857-864, 2001.
- [137] M. L. Altun and N. Erk, "The rapid quantitative analysis of phenprobamate and acetaminophen by RP-LC and compensation technique", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 25, no. 1, pp. 85-92 , 2001.
- [138] J. Meyer and U. Karst, "Determination of paracetamol (acetaminophen) by HPLC with post-column enzymatic derivatization and fluorescence detection", *Chromatographia*, vol. 54, no. 3-4, pp. 163-167, 2001.
- [139] N. Ramos-Martos, F. Aguirre-Gomez, A. Molinz-Diaz and L. F. Capitan-Vallvey, "Application of Liquid Chromatography to the Simultaneous Determination of Acetylsalicylic Acid, Caffeine, Codeine, Paracetamol, Pyridoxine, and Thiamine in Pharmaceutical Preparations", *Journal of AOAC International*, vol. 84, no.3, pp. 676-683, 2001.
- [140] L. Monser and F. Darghouth, "Simultaneous LC determination of paracetamol and related compounds in pharmaceutical formulations using a carbon-based column". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 27, no. 6, pp. 851–860, 2002.
- [141] J. T. Franeta, D. Agbaba, S. Eric, S. Pavkov, M. Aleksic and S. Vladimirov, "HPLC assay of acetylsalicylic acid, paracetamol, caffeine and phenobarbital in tablets", *Il Farmaco*, vol. 57, no.9, pp. 709–713, 2002.
- [142] M. L. Qi, P. Wang, Y. X. Leng, J. L. Gu and R. N. Fu, "Simple HPLC method for simultaneous determination of acetaminophen, caffeine and chlorpheniramine maleate in tablet formulations", *Chromatographia*, vol. 56, no. 5-6, pp. 295-298, 2002.

- [143] S. K. Cox, T. Hamner and J. Bartges, "Determination of Acetaminophen and Phenacetin in Porcine Microsomal Samples", *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, vol. 26, no. 6, pp. 925-935, 2003.
- [144] M. Prodan, E. Gere-Paszti, O. Farkas and E. Forgacs, "Validation and simultaneous determination of paracetamol and caffeine in pharmaceutical formulations by RP-HPLC", *Chemia Analityczna*, vol. 48, no. 6, pp. 901-907, 2003.
- [145] M. L. Qi, P. Wang, L. Zhou, J. L. Gu and R. N. Fu, "Simultaneous determination of acetaminophen, dextromethorphen hydrobromide and pseudoephedrine hydrochloride in a new drug formulation for cold treatment by HPLC", *Chromatographia*, vol. 57, no. 3-4, pp. 139-142, 2003.
- [146] C. Pistos and J. T. Stewart, "Assay for the simultaneous determination of acetaminophen-caffeine-butalbital in human serum using a monolithic column", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 36, no. 4, pp. 737-741, 2004.
- [147] O. Q. P. Yin, S. S. L. Lam and M. S. S. Chow, "Simultaneous determination of paracetamol and dextropropoxyphene in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry: application to clinical bioequivalence studies", *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, vol. 19, no. 6, pp. 767-774, 2005.
- [148] L. Baranowska, P. Markowski and J. Baranowski, "Simultaneous determination of 11 drugs belonging to four different groups in human urine samples by reversed-phase high-performance liquid chromatography method", *Analytica Chimica Acta*, vol. 570, no. 1, pp. 46-58, 2006.
- [149] R. Nageswara Rao and A. Narasaraju, "Rapid Separation and Determination of Process-Related Substances of Paracetamol Using Reversed-Phase HPLC with Photo Diode Array as a Detector", *Analytical Sciences*, vol. 22, no. 2, pp. 287-292, 2006.
- [150] S. F. Sun, G. R. Liu and Y. H. Wang, "Simultaneous Determination of Acetaminophen, Caffeine, and Chlorphenamine Maleate in Paracetamol and Chlorphenamine Maleate Granules", *Chromatographia*, vol. 64, no. 11-12, pp. 719-724, 2006.
- [151] M. S. Ali, S. Rafiuddin, M. Ghorri and A. R. Kahtri, "Simultaneous Determination of Paracetamol, Chlorzoxazone and Related Impurities 4-Aminophenol, 4-Chloroacetanilide, and *p*-Chlorophenol in Pharmaceutical Preparations by High-Performance Liquid Chromatography", *Journal of AOAC International*, vol. 90, no. 1, pp. 82-93, 2007.
- [152] T. Zhu, L. Ding, L. Yang and A. Wen, "Simultaneous Determination of Tramadol and Acetaminophen in Human Plasma by LC-ESI-MS Chromatographia", vol. 66, no. 3-4, pp. 171-178, 2007.
- [153] A. Panusa, G. Multari, G. Incarnato and L. Gagliardi, "High-performance liquid chromatography analysis of anti-inflammatory pharmaceuticals with ultraviolet and electrospray-mass spectrometry detection in suspected



- counterfeit homeopathic medicinal products”, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 43, no. 4, pp. 1221–1227, 2007.
- [154] K. A. Shaikh and A. B. Devkhile, “Simultaneous Determination of Aceclofenac, Paracetamol and Chlorzoxazone by RP-HPLC in Pharmaceutical Dosage Form”, *Journal of Chromatographic Science*, vol. 46, no. 7, pp. 649–652, 2008.
- [155] A. Wang, J. Sun, H. J. Feng, S. Gao and Z. G. He, “Simultaneous Determination of Paracetamol and Caffeine in Human Plasma by LC-ESI-MS”, *Chromatographia*, vol. 67, no. 3-4, pp. 281-285, 2008.
- [156] S. Jamil, S. Talegaonkar, R. K. Khar and K. Kohli, “Development and Validation of a Stability-Indicating LC Method for Simultaneous Analysis of Aceclofenac and Paracetamol in Conventional Tablets and in Microsphere Formulations”, *Chromatographia*, vol. 68, no. 7-8, pp. 557-565, 2008.
- [157] S. Feng, Y. Tian, Z. Zhang, J. Zhang, M. Huang and Y. Chen, “Rapid Simultaneous Determination of Paracetamol, Amantadine Hydrochloride, Caffeine and Chlorpheniramine Maleate in Human Plasma by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry”, *Arzneimittelforschung*, vol. 59, no. 2, pp. 86–95, 2011.
- [158] V. G. Dongre, S. B. Shah, G. S. Bayes, M. Phadke and V. K. Jadhav, “Simultaneous Determination of Etodolac and Acetaminophen in Tablet Dosage Form by RP-LC”, *Chromatographia*, vol. 69, no. 9-10, pp. 1019-1023, 2009.
- [159] T. Belal, T. Awad and R. Clark, “Determination of Paracetamol and Tramadol Hydrochloride in Pharmaceutical Mixture Using HPLC and GC-MS”, *Journal of Chromatographic Science*, vol. 47, no. 10, pp. 849–854, 2009.
- [160] S. Y. Garmonov and I. A. Salakhov, “Quantitative hplc determination of antigrippin drug components”, *Pharmaceutical Chemistry Journal*, vol. 43, no. 11, pp. 637-640, 2009.
- [161] G. M. Hadad, S. Emara and W. M. M. Mahmoud, “Development and validation of a stability-indicating RP-HPLC method for the determination of paracetamol with dantrolene or/and cetirizine and pseudoephedrine in two pharmaceutical dosage forms”, *Talanta*, vol. 79, no. 5, pp. 1360–1367, 2009.
- [162] I. Baranowska and A. Wilczek, “Simultaneous RP-HPLC Determination of Sotalol, Metoprolol,  $\alpha$ -Hydroxymetoprolol, Paracetamol and Its Glucuronide and Sulfate Metabolites in Human Urine”. *Analytical Sciences*, vol. 25, no. 6, pp. 769–772, 2009.
- [163] H. A. A. Hashem, “Chromatographic Application on Calixarene Bonded Stationary Phases: A Stability Indicating Method for Simultaneous Determination of Paracetamol, Caffeine and Acetylsalicylic Acid in Excedrin Tablets”, *Chromatographia*, vol. 71, no. 1-2, pp. 31-35, 2010.
- [164] D. Jain, R. N. Kachave and R. N. Bhadane, “Simultaneous Estimation Of Tramadol Hydrochloride, Paracetamol and Domperidone by RP-HPLC in

- Tablet Formulation”, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, vol. 33, no. 6, pp. 786–792, 2010.
- [165] F. A. Siddiqui, M. S. Arayne, N. Sultana and F. Qureshi, “Development and Validation of Stability-Indicating HPLC Method for the Simultaneous Determination of Paracetamol, Tizanidine, and Diclofenac in Pharmaceuticals and Human Serum”, *Journal of AOAC International*, vol. 94, no. 1, pp. 150-158, 2011.
- [166] A. Sarakbi, Z. Aydogmus, T. Sidali, G. Gokce and J. M. Kauffmann, “Simultaneous Determination of Acetaminophen (Paracetamol) and Ascorbic Acid in Pharmaceutical Formulations by LC Coupled to a Screen Printed Carbon Based Amperometric Detector”, *Electroanalysis*, vol. 23, no. 1, pp. 29–36, 2010.
- [167] G. A. Shabir and S. A. Arain, “Determination of Paracetamol, Methyl Parahydroxybenzoate, Ethyl Parahydroxybenzoate and Propyl Parahydroxybenzoate in Medicinal Suspension and Tablets by RPLC/UV-DAD”, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, vol. 34, no. 9, pp. 719–729, 2011.
- [168] C. Flores-Pérez, J. L. Chávez-Pacheco, B. Ramírez-Mendiola, R. Alemón-Medina, R. García-Álvarez, H. Juárez-Olguín and J. Flores-Pérez, “A reliable method of liquid chromatography for the quantification of acetaminophen and identification of its toxic metabolite N-acetyl-p-benzoquinoneimine for application in pediatric studies”, *Biomedical Chromatography*, vol. 25, no. 7, pp. 760–766, 2010.
- [169] M. E. El-Kommos, N. A. Mohamed and A. F. A. Hakiem, “Selective Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography for The simultaneous Determination of Some Pharmaceutical Binary Mixtures Containing Nsaids”, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, vol. 35, no. 15, pp. 2188-2202, 2012.
- [170] T. Borahan, T. Unutkan, A. Şahin, and S. Bakırdere, “A rapid and sensitive Reversed Phase-HPLC method for simultaneous determination of ibuprofen and paracetamol in drug samples and their behaviors in simulated gastric conditions”, *Journal of Separation Science*, vol. 42, no.3, pp. 678-683, 2018.
- [171] M. S. Arayne, N. Sultana and F. A. Siddiqui, “Simultaneous Determination of Paracetamol and Orphenadrine Citrate in Dosage Formulations and in Human Serum by RP-HPLC”, *Journal of the Chinese Chemical Society*, vol. 56, no. 1, pp. 169–174, 2009.
- [172] M. Filist, L. Szlaska, M. Kaza and T. Pawiński, “Validated HPLC-UV method for determination of naproxen in human plasma with proven selectivity against ibuprofen and paracetamol”, *Biomedical Chromatography*, vol. 30, no. 6, pp. 953–961, 2015.
- [173] M. Topkafa, H. F. Ayyildiz, F. N. Memon and H. Kara, “New potential humic acid stationary phase toward drug components: Development of a chemometric-assisted RP-HPLC method for the determination of

- paracetamol and caffeine in tablet formulations”, *Journal of Separation Science*, vol. 39, no. 13, pp. 2451–2458, 2016.
- [174] D. Šatínský, I. Neto, P. Solich, H. Sklenářová, M. Conceição, B. S. M. Montenegro and A. N. Araújo, “Sequential injection chromatographic determination of paracetamol, caffeine, and acetylsalicylic acid in pharmaceutical tablets”, *Journal of Separation Science*, vol. 27, no. 7-8, pp. 529–536, 2004.
- [175] R. R. Cunha, S. C. Chaves, M. M. A. Ribeiro, L. M. F. C. Torres, R. A. A. Muñoz, W. T. P. D. Santos and E. M. Richter, “Simultaneous determination of caffeine, paracetamol, and ibuprofen in pharmaceutical formulations by high-performance liquid chromatography with UV detection and by capillary electrophoresis with conductivity detection”, *Journal of Separation Science*, vol. 38, no. 10, pp. 1657–1662, 2015.
- [176] S. P. Thomas and A. Poomali, “Development and Validation of RP-HPLC Method for Simultaneous Estimation of Paracetamol and Tramadol Hydrochloride”, *Indian Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 3, no. 4, pp. 169-172, 2016.
- [177] A. M. Dominguez-Ramirez, F. J. Lopez-Munoz, J. R. Medina, M. Hurtado, G. A. Angeles, A. D. Pineda and L. A. Moreno-Rocha, “HPLC-PDA Method for the Quantification of Paracetamol in Plasma: Application to PK/PD Studies with Arthritic Rats”, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, vol. 9, no. 5, pp. 233-239, 2017.
- [178] A. Shukla, V. Jain and S. Boddu, “Method Development and Validation of RP-HPLC Method for Simultaneous Estimation of Paracetamol, Phenylephrine Hydrochloride and Triprolidine Hydrochloride in Bulk and Combined Tablets Dosage Forms”, *World Journal of Pharmaceutical Research*, vol. 6, no. 9, pp. 483-492, 2017.
- [179] N. Aminu, S. Y. Chan, N. H. Khan, A. B. Farhan, M. N. Umar and S. M. Toh, “A simple stability-indicating HPLC method for simultaneous analysis of paracetamol and caffeine and its application to determinations in fixed-dose combination tablet dosage form”, *Acta Chromatographica*, pp. 1–7, 2018.
- [180] T. Borahan, T. Unutkan, A. Şahin and S. Bakırdere, “A rapid and sensitive Reversed Phase-HPLC method for simultaneous determination of ibuprofen and paracetamol in drug samples and their behaviors in simulated gastric conditions”, *Journal of Separation Science*, vol. 42, no. 3, pp. 678-683, 2018.
- [181] H. Khan, M. Ali, A. Ahuja and J. Ali, “Validated HPLC-UV Method for Simultaneous Determination of Some Anti-Inflammatory and Analgesic Drugs”, *Asian J. Pharm. Ana.*, vol. 6, no. 3, pp. 183-187, 2016.
- [182] E. A. Abdelaleem, I. A. Naguib, E. S. Hassan and N. W. Ali, “HPTLC and RP-HPLC methods for simultaneous determination of Paracetamol and Pamabrom in presence of their potential impurities”, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 114, pp. 22–27, 2015.

- [183] N. Hasan, M. Chaiharn, U. A. Toor, Z. A. Mirani, G. Sajjad, N. Sher and F. A. Siddiqui, "Development, Validation and Application of RP-HPLC Method: Simultaneous Determination of Antihistamine and Preservatives with Paracetamol in Liquid Formulations and Human Serum", *The Open Medicinal Chemistry Journal*, vol. 10, no. 1, pp. 33–43, 2016.
- [184] U. N. Kumar, A. Aftoze, C. Pradeepti, K. Shailendra, K. K. Naik, M. Sharma, P. Swati, T. Sunil and S. Sameer, "Development and Validation of a New Chromatographic Method for the Simultaneous Estimation of Serratiopeptidase, Aceclofenac and Paracetamol by RP-HPLC", *Pharmaceutical Analytical Chemistry: Open Access*, vol. 03, no. 02, 2017.
- [185] N. W. Ali, M. Gamal and M. Abdelkawy, "Simultaneous determination of hyoscine N-butyl bromide and paracetamol in their binary mixture by RP-HPLC method", *Arabian Journal of Chemistry*, vol. 10, S1868–S1874, 2017.
- [186] M. Knochen, J. Giglio and B. F. Reis, "Flow-injection spectrophotometric determination of paracetamol in tablets and oral solutions", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 33, no. 2, pp. 191–197, 2003.
- [187] R. Burakham, S. Duangthong, L. Patimapornlert, N. Lenghor, S. Kasiwad, L. Srivichai and K. Grupdan, "Flow-Injection and Sequential-Injection Determinations of Paracetamol in Pharmaceutical Preparations Using Nitrosation Reaction", *Analytical Sciences*, vol. 20, no. 5, pp. 837–840, 2004.
- [188] V. A. Pedrosa, D. Lowinsohn and M. Bertotti, "FIA Determination of Paracetamol in Pharmaceutical Drugs by Using Gold Electrodes Modified with a 3-Mercaptopropionic Acid Monolayer", *Electroanalysis*, vol. 18, no. 9, pp. 931–934, 2006.
- [189] W. Ruengsitagoon, S. Liawruangrath and A. Townshend, "Flow injection chemiluminescence determination of paracetamol", *Talanta*, vol. 69, no. 4, pp. 976–983, 2006.
- [190] F. S. Felix, C. M. A. Brett and L. Angnes, "Carbon film resistor electrode for amperometric determination of acetaminophen in pharmaceutical formulations", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 43, no. 5, pp. 1622–1627, 2007.
- [191] X. Liu, L. Liu, H. Chen and X. Chen, "Separation and determination of four active components in medicinal preparations by flow injection-capillary electrophoresis", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 43, no. 5, pp. 1700–1705, 2007.
- [192] W. Torres Pio dos Santos, E. G. Nascimento de Almeida, H. E. Alves Ferreira, D. T. Gimenes and E. M. Richter, "Simultaneous Flow Injection Analysis of Paracetamol and Ascorbic Acid with Multiple Pulse Amperometric Detection", *Electroanalysis*, vol. 20, no. 17, pp. 1878–1883, 2008.
- [193] Z. M. Xu, Q. Yue, Z. J. Zhuang and D. Xiao, "Flow injection amperometric determination of acetaminophen at a gold nanoparticle modified carbon paste electrode", *Microchimica ACTA*, vol. 164, no. 3-4, pp. 387-393, 2009.

- [194] W. C. Silva, P. F. Pereira, M. C. Marra, D. T. Gimenes, R. R. Cunha, R. A. B. da Silva and E. M. Richter, "A Simple Strategy for Simultaneous Determination of Paracetamol and Caffeine Using Flow Injection Analysis with Multiple Pulse Amperometric Detection", *Electroanalysis*, vol. 23, no. 12, pp. 2764–2770, 2011.
- [195] J. F. Van Staden and M. Tsanwani, "Determination of paracetamol in pharmaceutical formulations using a sequential injection system", *Talanta*, vol. 58, no. 6, pp. 1095–1101, 2002.
- [196] E. J. Llorent-Martínez, D. Šatínský, P. Solich, P. Ortega-Barrales and A. Molina-Díaz, "Fluorimetric SIA optosensing in pharmaceutical analysis: Determination of paracetamol. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 45, no. 2, pp. 318–321, 2007.
- [197] A. Gutes, D. Calvo, F. Cespedes and M. Del Valle, "Automatic sequential injection analysis electronic tongue with integrated reference electrode for the determination of ascorbic acid, uric acid and paracetamol", *Microchimica ACTA*, vol. 157, no. 1-2, pp. 1-6, 2007.
- [198] M. Shalash, A. Salhin, B. Saad and I. A. Rahman, "Simple Flow Injection Spectrophotometric Determination of Acetaminophen in Pharmaceutical Formulations Using 1,2-Naphyhoquinone-4-Sulphonate as Chemical Derivatization Chromogenic Reagent", *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, vol. 36, no. 1, pp. 155-166, 2012.
- [199] Y. Yu and L. Wu, "Analysis of endocrine disrupting compounds, pharmaceuticals and personal care products in sewage sludge by gas chromatography–mass spectrometry", *Talanta*, vol. 89, pp. 258–263, 2012.
- [200] J. V. Aukunuru, U. B. Kompella and G. V. Betageri, "Simultaneous High Performance Liquid Chromatographic Analysis of Acetaminophen, Salicylamide, Phenyltoloxamine and Related Products", *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, vol. 23, no.4, pp. 565–578, 2000.
- [201] V. V. Dighe, R. T. Sane, S. N. Menon, H. N. Tambe, S. Pillai and V. N. Gokarn, "Simultaneous determination of diclofenac sodium and paracetamol in a pharmaceutical preparation and in bulk drug powder by high-performance thin-layer chromatography", *JPC-Journal of Planar Chromatography-Modern TLC*, vol. 19, no. 112, pp. 443-448, 2006.
- [202] F. Sponar, A. C. Mot and C. Sarbu, "Quantitative Evaluation of Paracetamol and Caffeine from Pharmaceutical Preparations Using Image Analysis and RP-TLC", *Chromatographia*, vol. 69, no. 1-2, pp. 151-155, 2009.
- [203] L. D. Khatal, A. Y. Kamble, M. V. Mahadik and S. R. Dhaneshwar, "Validated HPTLC Method for Simultaneous Quantitation of Paracetamol, Diclofenac Potassium, and Famotidine in Tablet Formulation", *Journal of AOAC International*, vol. 93, no. 3, pp. 765-770, 2010.
- [204] A. Haka-Grysinska, P. Slazak, G. Zareba, W. Markowski, A. Klimek-Turek, T. H. Dzido, "Simultaneous determination of acetaminophen, propyphenazone and caffeine in cefalgin preparation by pressurized planar

- electrochromatography and high-performance thin-layer chromatography”, *Analytical Methods*, vol. 4, no. 4, pp. 973-982, 2012.
- [205] N. Dubey, R. Siddiqu and D. K. Jain, “Simultaneous Determination of Paracetamol, Phenylephrine Hydrochloride and Loratadine”, *Asian Journal of Chemistry*, vol. 24, no. 11, pp. 5409-5410, 2012.
- [206] P. Chocholouš, D. Šatínský, H. Sklenářová and P. Solich, “Two-column Sequential Injection Chromatography—New approach for fast and effective analysis and its comparison with gradient elution chromatography”, *Analytica Chimica Acta*, vol. 668, no. 1, pp. 61-66, 2010.
- [207] V. Pucci, R. Mandrioli, M. A. Raggi and S. Fanali, “Reversed-phase capillary electrochromatography for the simultaneous determination of acetylsalicylic acid, paracetamol, and caffeine in analgesic tablets”, *Electrophoresis*, vol. 25, no. 45, pp. 615-621, 2004.
- [208] S. Zhao, W. Bai, H. Yuan and D Xiao, “Detection of paracetamol by capillary electrophoresis with chemiluminescence detection”, *Analytica Chimica Acta*, vol. 559, no. 2, pp. 195-199, 2006.
- [209] E. McEvoy, S. Donegan, J. Power and K. Altria, “Optimisation and validation of a rapid and efficient microemulsion liquid chromatographic (MELC) method for the determination of paracetamol (acetaminophen) content in a suppository formulation”, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 44, no. 1, pp. 137-143, 2007.
- [210] D. Emre and N. Özaltın, “Simultaneous determination of paracetamol, caffeine and propyphenazone in ternary mixtures by micellar electrokinetic capillary chromatography”, *Journal of Chromatography B*, vol. 847, no. 2, pp. 126-132, 2007.
- [211] S. Azhagvuel and R. Sekar, “Method development and validation for the simultaneous determination of cetirizine dihydrochloride, paracetamol, and phenylpropanolamine hydrochloride in tablets by capillary zone electrophoresis”, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 43, no. 3, pp. 873-878, 2007.
- [212] T. Nemeth, P. Jankovics, J. Nemeth-Palotas and H. Kozegi-Szalai, “Determination of paracetamol and its main impurity 4-aminophenol in analgesic preparations by micellar electrokinetic chromatography”, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 47, no. 4-5, pp. 746-749, 2008.
- [213] Q. Chu, L. M. Jiang, X. H. An and J. N. Ye, “Rapid determination of acetaminophen and p-aminophenol in pharmaceutical formulations using miniaturized capillary electrophoresis with amperometric detection”, *Analytica Chimica ACTA*, vol. 606, no. 2, pp. 246-251, 2008.
- [214] A. R. Solangi, S. Q. Memon, A. Mallah, N. Memon, M. Y. Khuhawar and M. I. Bhangar, “Development and implication of a capillary electrophoresis methodology for ciprofloxacin, paracetamol and diclofenac sodium in pharmaceutical formulations and simultaneously in human urine samples”,

Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences, vol. 24, no. 4, pp. 539-544, 2011.

- [215] X. J. Yang, J. Feng, Z. G. Chen, R. F. Liao and X. C. Li, "Determination of Six Analgesics by CE with an Improved Electromagnetic Induction Detector", *Chromatographia*, vol. 75, no. 1-2, pp. 71-76, 2012.
- [216] D. Satinsky, I. Neto, P. Solich, H. Sklenarova, M. Conceicao, B. S. M. Montenegro and A. N. Araujo, "Sequential injection chromatographic determination of paracetamol, caffeine, and acetylsalicylic acid in pharmaceutical tablets", *Journal of Separation Science*, vol. 27, no. 7-8, pp. 529-536, 2004.
- [217] L. Y. Ding, C. Q. Yang, W. H. Zhan, H. Y. Wu and K. M. Zheng, "Determination of chlorzoxazone and paracetamol in co-chlorzoxazone tablet by multi-wavelength linear regression method", *Spectroscopy and Spectral Analysis*, vol. 20, no. 3, pp. 423-424, 2000.
- [218] R. Szostak and S. Mazurek, "Quantitative determination of acetylsalicylic acid and acetaminophen in tablets by FT-Raman spectroscopy", *Analyst*, vol. 127, no. 1, pp. 144-148, 2002.
- [219] A. Safavi and Q. Moradlou, "Simultaneous Kinetic Determination of Paracetamol and p-Aminophenol by Using H-Point Standard Addition Method", *Analytical Letters*, vol. 37, no. 11, pp. 2337-2349, 2004.
- [220] A. Afkhami and M. Bahram, "Mean centering of ratio spectra as a new spectrophotometric method for the analysis of binary and ternary mixtures", *Talanta*, vol. 66, no. 3, pp. 712-720, 2005.
- [221] P. M. Castellano, S. E. Vignaduzzo, R. M. Maggio and T. S. Kaufman, "Application of a chemometric method for simultaneous determination of acetaminophen and diclofenac in content-uniformity and drug-dissolution studies", *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 382, no. 7, pp. 1711-1714, 2005.
- [222] E. Dinc and A. Ozdemir, "Mathematical Algorithms Applied to the Multi-linear Regression Functions for the Multicomponent Determination of Pharmaceutical Dosage Form Containing Three-component Mixtures", *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, vol. 53, no. 8, pp. 899-906, 2005.
- [223] E. Dinc, G. Kokdil and F. Onur, "Derivative ratio spectra-zero crossing spectrophotometry and LC method applied to the quantitative determination of paracetamol, propyphenazone and caffeine in ternary mixtures", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 26, no. 5-6, pp. 769-778, 2001.
- [224] A. B. Moreira, I. L. T. Dias, G. O. Neto, E. A. G. Zagatto and L. T. Kubota, "Simultaneous Spectrofluorimetric Determination of Paracetamol and Caffeine in Pharmaceutical Preparations in Solid-Phase Using Partial Least Squares Multivariate Calibration", *Analytical Letters*, vol. 39, no. 2, pp. 349-360, 2006.

- [225] E. A. Suchara and E. Carasek, "Use of Addition Calibration Technique for Determination of Acetaminophen and Hydrochlorothiazide in Human Urine by High-Performance Liquid Chromatography", *Journal of Chromatographic Science*, vol. 46, no. 9, pp. 804-808, 2008.
- [226] M. De Luca, F. Oliverio, G. Ioele and G. Ragno, "Multivariate calibration techniques applied to derivative spectroscopy data for the analysis of pharmaceutical mixtures", *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, vol. 96, no. 1, pp. 14-21, 2009.
- [227] A. El-Gindy, S. Emara and H. Shaaban, "Validation and Application of Chemometrics-Assisted Spectrophotometry and Liquid Chromatography for Simultaneous Determination of Two Ternary Mixtures Containing Drotaverine Hydrochloride", *Journal of AOAC International*, vol. 93, no. 2, pp. 536-548, 2010.
- [228] L. Komsta, H. Czarnik-Matusiewicz, R. Szostak, A. Gumieniczek, R. Pietras, R. Skibinski and T. Inglot, "Chemometric Detection of Acetaminophen in Pharmaceuticals by Infrared Spectroscopy Combined with Pattern Recognition Techniques: Comparison of Attenuated Total Reflectance-FTIR and Raman Spectroscopy", *Journal of AOAC International*, vol. 94, no. 3, pp. 743-749, 2011.
- [229] B. Asci, O. A. Donmez, A. Bozdogan, S. Sungur, "Simultaneous determination of paracetamol, pseudoephedrine hydrochloride and Dextromethorphan hydribromide in tablets using multivariate calibration methods coupled with HPLC-DAD", *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, vol. 34, no. 16, pp. 1686-1698, 2011.
- [230] M. Khanmohammadi, M. Soleimani, F. Morovvat, A. B. Garmarudi, M. Khalafbeigi and K. Ghasemi, "Simultaneous determination of paracetamol and codeine phosphate in tablets by TGA and chemometrics", *Thermochimica ACTA*, vol. 530, pp. 128-132, 2012.
- [231] L. Sratthaphut and C. Phechkrajang, "Genetic Algorithms-Based Approach for Wavelength Selection in Spectrophotometric Determination of Paracetamol and Chlorzoxazone in Tablet Preparation by Partial Least-Squares", *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, vol. 46, no. 1, pp. 59-65, 2012.
- [232] S. Yousefinejad and B. Hemmateenejad, "Simultaneous spectrophotometric determination of paracetamol and para-aminophenol in pharmaceutical dosage forms using two novel multivariate standard addition methods based on net analyte signal and rank annihilation factor analysis", *Drug Testing and Analysis*, vol. 4, no. 6, pp. 507-514, 2012.
- [233] J. K. Mbinze, P. Lebrun, B. Debrus, A. Dispas, N. Kalenda, J. M. T. Mbay, T. Schofield, B. Boulanger, E. Rozet, P. Hubert and R. D. Marini, "Application of an innovative design space optimization strategy to the development of liquid chromatographic methods to combat potentially counterfeit nonsteroidal anti-inflammatory drugs", *Journal of Chromatography A*, vol. 1263, pp. 113-124, 2012.



- [234] M. Shariati-Rad, M. Irandoust, N. Amin and M. Shamsipur, "Solving matrix effect, spectral interferences and nonlinearity by generalized standard addition method coupled with radial basis functions-partial least squares: Application to simultaneous determination of drugs in urine", *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, vol. 120, pp. 77–83, 2013.
- [235] M. Fransson, J. Johansson, A. Sparén and O. Svensson, "Comparison of multivariate methods for quantitative determination with transmission Raman spectroscopy in pharmaceutical formulations", *Journal of Chemometrics*, vol. 24, no. 11-12, pp. 674–680, 2010.
- [236] V. G. Borio, R. Vinha, R. A. Nicolau, H. P. M. De Oliveira, C. J. De Lima, L. Silveira, "Quantitative Evaluation of Acetaminophen in Oral Solutions by Dispersive Raman Spectroscopy for Quality Control", *Spectroscopy-An International Journal*, vol. 27, no. 4, pp. 215-228, 2012.
- [237] M. Ramil Criado, S. Pombo da Torre, I. Rodríguez Pereiro and R. Cela Torrijos, "Optimization of a microwave-assisted derivatization–extraction procedure for the determination of chlorophenols in ash samples", *Journal of Chromatography A*, vol. 1024, no. 1-2, pp. 155–163, 2004.
- [238] V. Rodenas, "Simultaneous determination of propacetamol and paracetamol by derivative spectrophotometry", *Talanta*, vol. 52, no. 3, pp. 517–523, 2000.
- [239] A. Ruiz-Medina, M. Fernández-de Córdoba, M. Ayora-Cañada, M. Pascual-Reguera and A. Molina-Díaz, "A flow-through solid phase UV spectrophotometric biparameter sensor for the sequential determination of ascorbic acid and paracetamol", *Analytica Chimica Acta*, vol. 404, no. 1, pp. 131–139, 2000.
- [240] M. J. Ayora Cañada, M. I. Pascual Reguera, A. Ruiz Medina, M. L. Fernández de Córdoba and A. Molina Díaz, "Fast determination of paracetamol by using a very simple photometric flow-through sensing device", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 22, no. 1, pp. 59–66, 2000.
- [241] E. Dinç, G. Kökdil and F. Onur, "Derivative ratio spectra–zero crossing spectrophotometry and LC method applied to the quantitative determination of paracetamol, propyphenazone and caffeine in ternary mixtures", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 26, no. 5-6, pp. 769–778, 2001.
- [242] J. T. Afshari and T. Z. Liu, "Rapid spectrophotometric method for the quantitation of acetaminophen in serum", *Analytica Chimica Acta*, vol. 443, no. 1, pp. 165–169, 2001.
- [243] E. Dinç, C. Yücesoy and F. Onur, "Simultaneous spectrophotometric determination of mefenamic acid and paracetamol in a pharmaceutical preparation using ratio spectra derivative spectrophotometry and chemometric methods", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 28, no. 6, pp. 1091–1100, 2002.

- [244] P. Ortega-Barrales, R. Padilla-Weigand and A. Molina-Diaz, A, "Simultaneous Determination of Paracetamol and Caffeine by Flow Injection-Solid Phase Spectrometry Using C18 Silica Gel as a Sensing Support", *Analytical Sciences*, vol. 18, no. 11, pp. 1241–1246, 2002.
- [245] A. D. Vidal, J. F. G. Reyes, P. O. Barrales and A. M. Diaz, "UV Spectrophotometric Flow-Through Multiparameter Sensor For the Simultaneous Determination of Acetaminophen, Acetylsalicylic Acid and Caffeine", *Analytical Letters*, vol. 35, no. 15, pp. 2433–2447, 2002.
- [246] M. Delosaoliva, R. Olsina and A. Masi, "Selective spectrofluorimetric method for paracetamol determination through coumarinic compound formation", *Talanta*, vol. 66, no. 1, pp. 229–235, 2005.
- [247] H. Filik, M. Hayvali and E. Kilic, "Sequential spectrophotometric determination of paracetamol and p-aminophenol with 2,2'-(1,4-phenylenedivinylene) bis-8-hydroxyquinoline as a novel coupling reagent after microwave assisted hydrolysis", *Analytica Chimica Acta*, vol. 535, no. 1-2, pp. 177–182, 2005.
- [248] E. Dinc and A. Ozdemir, "Mathematical Algorithms Applied to the Multilinear Regression Functions for the Multicomponent Determination of Pharmaceutical Dosage Form Containing Three-component Mixtures", *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, vol. 53, no. 8, pp. 899–906, 2005.
- [249] D. T. B. Burns, N. Tungkananuruk, S. Kasemsumran and K. Tungkananuruk, "Derivative Spectrophotometric Determination of Acetaminophen by the Formation of  $[\text{Fe}(\text{II})-(2, 2'\text{-bipyridyl})_3]^{2+}$ ", *Chemia Analityczna*, vol. 50, no. 2, pp. 475-479, 2005.
- [250] S. D. Cekic, H. Filik and R. Apak, "Simultaneous Spectrophotometric Determination of Paracetamol and p-Aminophenol in Pharmaceutical Products with Tiron Using Dissolved Oxygen as Oxidant", *Journal of Analytical Chemistry*, vol. 60, no. 11, pp. 1019-1023, 2005.
- [251] A. R. Zarei, A. Afkhami and N. Sarlak, "Simultaneous Spectrophotometric Determination of Paracetamol and Salicylamide in Human Serum and Pharmaceutical Formulations by a differential Kinetic Method", *Journal of AOAC International*, vol. 88, no. 6, pp. 1695-1701, 2005.
- [252] Y. Dou, Y. Sun, Y. Ren, P. Ju and Y. Ren, "Simultaneous non-destructive determination of two components of combined paracetamol and amantadine hydrochloride in tablets and powder by NIR spectroscopy and artificial neural networks", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 37, no. 3, pp. 543–549, 2005.
- [253] Y. Dou, Y. Sun and Y. Ren, "Artificial neural network for simultaneous determination of two components of compound paracetamol and diphenhydramine hydrochloride powder on NIR spectroscopy", *Analytica Chimica Acta*, vol. 528, no. 1, pp. 55–61, 2005.
- [254] M. Blanco and M. Alcalá, "Simultaneous quantitation of five active principles in a pharmaceutical preparation: Development and validation of a near

- infrared spectroscopic method”, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 27, no. 2-3, pp. 280–286, 2006.
- [255] H. E. Abdellatef, M. M. Ayad, S. M. Soliman and N. F. Youssef, “Spectrophotometric and spectrodensitometric determination of paracetamol and drotaverine HCl in combination”, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 66, no. 4-5, pp. 1147–1151, 2007.
- [256] F. H. Metwally, Y. S. El-Saharty, M. Refaat and S. Z. El-Khateeb, “Application of Derivative, Derivative Ratio and Multivariate Spectral Analysis and Thin-Layer Chromatography-Densitometry for Determination of a Ternary Mixture Containing Drotaverine Hydrochloride, Caffeine and Paracetamol”, *Journal of AOAC International*, vol. 90, no. 2, pp. 391-404, 2007.
- [257] M. R. Khoshayand, H. Abdollahi, M. Shariatpanahi, A. Saadatfard and A. Mohammadi, “Simultaneous spectrophotometric determination of paracetamol, ibuprofen and caffeine in pharmaceuticals by chemometric methods”, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 70, no. 3, pp. 491–499, 2008.
- [258] A. C. Moț, F. Soponar, A. Medvedovici and C. Sârbu, “Simultaneous Spectrophotometric Determination of Aspirin, Paracetamol, Caffeine, and Chlorphenamine from Pharmaceutical Formulations Using Multivariate Regression Methods”, *Analytical Letters*, vol. 43, no. 5, pp. 804–813, 2010.
- [259] E. Ziémons, J. Mantanus, P. Lebrun, E. Rozet, B. Evrard and P. Hubert, “Acetaminophen determination in low-dose pharmaceutical syrup by NIR spectroscopy”, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 53, no. 3, pp. 510–516, 2010.
- [260] S. Mahaparale, R. S. Telekone, R. P. Raut, S. S. Damle and P. V. Kasture, “Simultaneous Spectrophotometric Determination of Drotaverine Hydrochloride and Paracetamol in Tablet”, *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 72, no. 1, pp. 133-136, 2010.
- [261] R. Sequinel, J. L. Rufino, H. R. Pezza and L. Pezza, “Spectrophotometric Determination of Paracetamol in Pharmaceuticals Using Microwave-Assisted Hydrolysis and a Micellar Medium”, *Latin American Journal of Pharmacy*, vol. 30, no. 7, pp. 1330-1335, 2011.
- [262] Y. Y. Zhan, Y. Zhang, Q. M. Li and X. Z. Du, “Selective spectrophotometric determination of paracetamol with sodium nitroprusside in pharmaceutical and biological samples”, *Journal of Analytical Chemistry*, vol. 66, no. 2, pp. 215-220, 2011.
- [263] L. Li, Y. X. Lu, Y. P. Ding, Y. Cheng, W. C. Xu and F. F. Zhang, “Determination of Paracetamol Based on its Quenching Effect on the Photoluminescence of CdTe Fluorescence Probes”, *Journal of Fluorescence*, vol. 22, no. 2, pp. 591-596, 2012.

- [264] L. Nejem, S. Antakli and H. Bagdashe, "Spectrophotometric Determination of Paracetamol and Orphenadrine Citrate in Tablet", *Asian Journal of Chemistry*, vol. 25, no. 2, pp. 1079-1082, 2013.
- [265] R. Hajian and A. Soltaninezhad, "The Spectrophotometric Multicomponent Analysis of a Ternary Mixture of Paracetamol, Aspirin, and Caffeine by the Double Divisor-Ratio Spectra Derivative Method", *Journal of Spectroscopy*, vol. 2013, pp. 1-7, 2013.
- [266] A. S. Amin and M. Y. El-Maamly, "A Turbidimetric Determination of Paracetamol in Pharmaceutical Formulations", *Quimica Analitica*, vol. 20, no. 4, pp. 275-279, 2002.
- [267] S. S. Nair, S. A. John and T. Sagara, "Simultaneous determination of paracetamol and ascorbic acid using tetraoctylammonium bromide capped gold nanoparticles immobilized on 1,6-hexanedithiol modified Au electrode", *Electrochimica Acta*, vol. 54, no. 27, pp. 6837-6843, 2009.
- [268] M. C. Q. Oliveira, M. R. V. Lanza, A. A. Tanaka and M. D. P. T. Sotomayor, "Flow injection analysis of paracetamol using a biomimetic sensor as a sensitive and selective amperometric detector", *Analytical Methods*, vol. 2, no. 5, pp. 507-512, 2010.
- [269] N. Nasirizadeh and H. R. Zare, "Differential pulse voltammetric simultaneous determination of noradrenalin and acetaminophen using a hematoxylin biosensor", *Talanta*, vol. 80, no. 2, pp. 656-663, 2009.
- [270] G. Rounaghi and R. M. Kakhki, "Preparation and electrochemical application of a new biosensor based on plant tissue/polypyrrole for determination of acetaminophen", *Bulletin of Materials Science*, vol. 35, no. 5, pp. 811-816, 2012.
- [271] S. A. Kumar, C. F. Tang and S. M. Chen, "Electroanalytical determination of acetaminophen using nano-TiO<sub>2</sub>/polymer coated electrode in the presence of dopamine", *Talanta*, vol. 76, no. 5, pp. 997-1005, 2008.
- [272] Y. Umasankar, B. Unnikrishnan, S. M. Chen and T. W. Ting, "Effective Determination of Acetaminophen Present in Pharmaceutical Drug Using Functionalized Multi-Walled Carbon Nanotube Film", *International Journal of Electrochemical Science*, vol. 7, no. 1, pp. 484-498, 2012.
- [273] Z. D. Chang, N. S. Gao, Y. J. Li and X. W. He, "Preparation of ferrocene immobilized metal-organic-framework modified electrode for the determination of acetaminophen", *Analytical Methods*, vol. 4, no. 12, pp. 4037-4041, 2012.
- [274] H. S. Yin, X. M. Meng, Z. N. Xu, L. J. Chen and S. Y. Ai, "Electrochemical behavior of phenacetin on CdSe microspheres modified glassy carbon electrode and its simultaneous determination with paracetamol and 4-aminophenol", *Analytical Methods*, vol. 4, no. 5, pp. 1445-1451, 2012.
- [275] N. Pejić, L. Kolar-Anić, S. Anić and D. Stanisavljev, "Determination of paracetamol in pure and pharmaceutical dosage forms by pulse

- perturbation technique”, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 41, no. 2, pp. 610–615, 2006.
- [276] A. Safavi, N. Maleki and O. Moradlou, “A Selective and Sensitive Method for Simultaneous Determination of Traces of Paracetamol and p-Aminophenol in Pharmaceuticals Using Carbon Ionic Liquid Electrode”, *Electroanalysis*, vol. 20, no. 19, pp. 2158–2162, 2008.
- [277] X. D. ShangGuan, H. F. Zhang and J. B. Zheng, “Electrochemical behavior and differential pulse voltammetric determination of paracetamol at a carbon ionic liquid electrode”, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 391, no. 3, pp. 1049-1055, 2008.
- [278] B. Saraswathamma, I. Grzybowska, C. Orlewska, J. Radecki, W. Dehaen, K. G. Kumar and H. Radecka, “Electroactive Dipyrromethene-Cu(II) Monolayers Deposited onto Gold Electrodes for Voltammetric Determination of Paracetamol”, *Electroanalysis*, vol. 20, no. 21, pp. 2317–2323, 2008.
- [279] R. T. Kachoosangi, G. G. Wildgoose and R. G. Compton, “Sensitive adsorptive stripping voltammetric determination of paracetamol at multiwalled carbon nanotube modified basal plane pyrolytic graphite electrode”, *Analytica Chimica Acta*, vol. 618, no. 1, pp. 54–60, 2008.
- [280] B. C. Lourenção, R. A. Medeiros, R. C. Rocha-Filho, L. H. Mazo and O. Fatibello-Filho, “Simultaneous voltammetric determination of paracetamol and caffeine in pharmaceutical formulations using a boron-doped diamond electrode”, *Talanta*, vol. 78, no. 3, pp. 748–752, 2009.
- [281] M. Teixeira, L. Marcolino-Junior, O. Fatibello-Filho, F. Moraes and R. Nunes, “Determination of Analgesics (Dipyrone and Acetaminophen) in Pharmaceutical Preparations by Cyclic Voltammetry at a Copper(II) Hexacyanoferrate(III) Modified Carbon Paste Electrode”, *Current Analytical Chemistry*, vol. 5, no. 4, pp. 303–310, 2009.
- [282] X. Kang, J. Wang, H. Wu, J. Liu, I. A. Aksay and Y. Lin, “A graphene-based electrochemical sensor for sensitive detection of paracetamol”, *Talanta*, vol. 81, no. 3, pp. 754–759, 2010.
- [283] H. Beitollahi, J. B. Raof and R. Hosseinzadeh, “Fabrication of a nanostructure-based electrochemical sensor for simultaneous determination of N-acetylcysteine and acetaminophen”, *Talanta*, vol. 85, no. 4, pp. 2128–2134, 2011.
- [284] M. Mazloun-Ardakani, M. A. Sheikh-Mohseni, B. F. Mirjalili and L. Zamani, “Simultaneous determination of captopril, acetaminophen and tryptophan at a modified electrode based on carbon nanotubes”, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, vol. 686, pp. 12–18, 2012.
- [285] S. Shahrokhian and E. Asadian, “Simultaneous voltammetric determination of ascorbic acid, acetaminophen and isoniazid using thionine immobilized multi-walled carbon nanotube modified carbon paste electrode”, *Electrochimica Acta*, vol. 55, no. 3, pp. 666–672, 2010.

- [286] A. Babaei, M. Afrasiabi and M. Babazadeh, "A Glassy Carbon Electrode Modified with Multiwalled Carbon Nanotube/Chitosan Composite as a New Sensor for Simultaneous Determination of Acetaminophen and Mefenamic Acid in Pharmaceutical Preparations and Biological Samples" *Electroanalysis*, vol. 22, no. 15, pp. 1743–1749, 2010.
- [287] P. Kalimuthu and S. Abraham John, "Selective Electrochemical Determination of Paracetamol Using Nanostructured Film of Functionalized Thiadiazole Modified Electrode", *Electroanalysis*, vol. 22, no. 3, pp. 303–309, 2010.
- [288] M. H. Pournaghi-Azar, S. Kheradmandi and A. Saadatirad, "Simultaneous voltammetry of paracetamol, ascorbic acid, and codeine on a palladium-plated aluminum electrode: oxidation pathway and kinetics", *Journal of Solid State Electrochemistry*, vol. 14, no. 9, pp. 1689-1695, 2010.
- [289] M. H. Pournaghi-Azar and A. Saadatirad, "Simultaneous Determination of Paracetamol, Ascorbic Acid and Codeine by Differential Pulse Voltammetry on the Aluminum Electrode Modified by Thin Layer of Palladium", *Electroanalysis*, vol. 22, no. 14, pp. 1592-1598, 2010.
- [290] A. B. Moghaddam, A. Mohammadi, S. Mohammadi, D. Rayeji, R. Dinarvand, M. Baghi and R. B. Walker, "The determination of acetaminophen using a carbon nanotube:graphite-based electrode", *Microchimica ACTA*, vol. 171, no. 3-4, pp. 377-384, 2010.
- [291] B. J. Sanghavi and A. K. Srivastava, "Simultaneous voltammetric determination of acetaminophen, aspirin and caffeine using an in situ surfactant-modified multiwalled carbon nanotube paste electrode", *Electrochimica Acta*, vol. 55, no. 28, pp. 8638–8648, 2010.
- [292] B. J. Sanghavi and A. K. Srivastava, "Simultaneous voltammetric determination of acetaminophen and tramadol using Dowex50wx2 and gold nanoparticles modified glassy carbon paste electrode", *Analytica Chimica Acta*, vol. 706, no. 2, pp. 246–254, 2011.
- [293] R. Manjunatha, D. H. Nagaraju, G. S. Suresh, J. S. Melo, S. F. D'Souza and T. V. Venkatesha, "Electrochemical detection of acetaminophen on the functionalized MWCNTs modified electrode using layer-by-layer technique", *Electrochimica Acta*, vol. 56, no. 19, pp. 6619–6627, 2011.
- [294] A. Ozcan, Y. Sahin, "A novel approach for the determination of paracetamol based on the reduction of N-acetyl- p -benzoquinoneimine formed on the electrochemically treated pencil graphite electrode", *Analytica Chimica Acta*, vol. 685, no. 1, pp. 9–14, 2011.
- [295] A. A. Ensafi, H. Karimi-Maleh and S. Mallakpour, "Simultaneous Determination of Ascorbic Acid, Acetaminophen, and Tryptophan by Square Wave Voltammetry Using N-(3,4-Dihydroxyphenethyl)-3,5-Dinitrobenzamide-Modified Carbon Nanotubes Paste Electrode", *Electroanalysis*, vol. 24, no. 3, pp. 666–675, 2012.

- [296] I. Noviandri and R. Rakhmana, "Carbon Paste Electrode Modified with Carbon Nanotubes and Poly(3-Aminophenol) for Voltammetric Determination of Paracetamol", *International Journal of Electrochemical Science*, vol. 7, no. 5, pp. 4479-4487, 2012.
- [297] P. R. Dalmasso, M. L. Pedano and G. A. Rivas, "Electrochemical determination of ascorbic acid and paracetamol in pharmaceutical formulations using a glassy carbon electrode modified with multi-wall carbon nanotubes dispersed in polyhistidine", *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 173, pp. 732-736, 2012.
- [298] J. B. Raoof, R. Ojani, M. Baghayeri and M. Amiri-Aref, "Application of a glassy carbon electrode modified with functionalized multi-walled carbon nanotubes as a sensor device for simultaneous determination of acetaminophen and tyramine", *Analytical Methods* vol. 4, no. 6, pp. 1579-1587, 2012.
- [299] M. Mazloum-Ardakani, M. A. Sheikh-Mohseni, M. Abdollahi-Alibeik and A. Benvidi, "Electrochemical sensor for simultaneous determination of norepinephrine, paracetamol and folic acid by a nanostructured mesoporous material", *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 171-172, pp. 380-386, 2012.
- [300] G. P. Keeley, N. McEvoy, H. Nolan, S. Kumar, E. Rezvani, M. Holzinger, S. Cosnier and G. S. Duesberg, "Simultaneous electrochemical determination of dopamine and paracetamol based on thin pyrolytic carbon films", *Analytical Methods*, vol. 4, no. 7, pp. 2048-2053, 2012.
- [301] L. Švorc, J. Sochr, P. Tomčík, M. Rievaj and D. Bustin, "Simultaneous determination of paracetamol and penicillin V by square-wave voltammetry at a bare boron-doped diamond electrode", *Electrochimica Acta*, vol. 68, pp. 227-234, 2012.
- [302] X. C. Lu, K. J. Huang, Z. W. Wu, S. F. Huang and C. X. Xu, "Simultaneous Determination of Acetaminophen and Caffeine Based on Graphene Oxide/Cerium Hexacyanoferrate Modified Glassy Carbon Electrode", *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, vol. 40, no. 3, pp. 452-456, 2012.
- [303] A. L. Liu, K. Wang, W. Chen, F. Gao, Y. S. Cai, X. H. Lin, Y. Z. Chen and X. H. Xia, "Simultaneous and sensitive voltammetric determination of acetaminophen and its degradation product for pharmaceutical quality control and pharmacokinetic research by using ultrathin poly (calconcarboxylic acid) film modified glassy carbon electrode", *Electrochimica Acta*, vol. 63, pp. 161-168, 2012.
- [304] A. Babaei, M. Babazadeh and M. Afrasiabi, "A Sensitive Simultaneous Determination of L-Dopa and Acetaminophen on a Glassy Carbon Electrode Modified with a Film of SWCNT-CHIT-IL Nanocomposite", *Sensor Letters*, vol. 10, no. 3-4, pp. 993-999, 2012.
- [305] M. Mazloum-Ardakani, N. Rajabzadeh, A. Dehghani-Firouzabadi, M. A. Sheikh-Mohseni, A. Benvidi, H. Naeimi, M. Akbari and A. Karshenas, "Carbon nanoparticles and a new derivative of hydroquinone for modification of a

- carbon paste electrode for simultaneous determination of epinephrine and acetaminophen”, *Analytical Methods*, vol. 4, no. 7, pp. 2127-2133, 2012.
- [306] T. R. Saciloto, P. Cervini and É. T. Gomes Cavalheiro, “New Screen Printed Electrode Based on Graphite and Polyurethane Composite for the Determination of Acetaminophen”, *Analytical Letters*, vol. 46, no. 2, pp. 312–322, 2013.
- [307] P. Chandra, N. X. Son, H. B. Noh, R. N. Goyal and Y. B. Shim, “Investigation on the downregulation of dopamine by acetaminophen administration based on their simultaneous determination in urine”, *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 39, no. 1, pp. 139–144, 2013.
- [308] X. Wang, J. Luo, C. Yi and X. Liu, “Paracetamol Sensor Based on Molecular Imprinting by Photosensitive Polymers”, *Electroanalysis*, vol. 25, no. 8, pp. 1907–1916, 2013.
- [309] S. Schantz, P. Hoppu and A. M. Juppo, “A Solid-State NMR Study of Phase Structure, Molecular Interactions, and Mobility in Blends of Citric Acid and Paracetamol”, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 98, no. 5, pp. 1862–1870, 2009.
- [310] N. Jallouli, K. Elghniji, H. Trabelsi and M. Ksibi, “Photocatalytic degradation of paracetamol on TiO<sub>2</sub> nanoparticles and TiO<sub>2</sub>/cellulosic fiber under UV and sunlight irradiation”, *Arabian Journal of Chemistry*, vol. 10, pp. 3640–3645, 2017.
- [311] G. W. Schieffer and D. E. Hughes, “Simultaneous Stability-Indicating Determination of Phenylephrine Hydrochloride, Phenylpropanolamine Hydrochloride, and Guaifenesin in Dosage Forms by Reversed-Phase Paired-Ion High-Performance Liquid Chromatography”, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 72, no. 1, pp. 55–59, 1983.
- [312] G. W. Schieffer, W. O. Smith, G. S. Lubey and D. G. Newby, “Determination of the Structure of a Synthetic Impurity in Guaifenesin: Modification of a High-Performance Liquid Chromatographic Method for Phenylephrine Hydrochloride, Phenylpropanolamine Hydrochloride, Guaifenesin, and Sodium Benzoate in Dosage Forms”, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 73, no. 12, pp. 1856–1858, 1984.
- [313] S. M. Amer, S. S. Abbas, M. A. Shehata and N. M. Ali, “Simultaneous determination of phenylephrine hydrochloride, guaifenesin, and chlorpheniramine maleate in cough syrup by gradient liquid chromatography”, *Journal of AOAC International*, vol. 91, no. 2, pp. 276-284, 2008.
- [314] S. Joshi, C. Bhatia, C. S. Bal, M. S. M. Rawat, “A validated HPLC method for simultaneous determination of four active components in counter cough formulation”, *Journal of the Indian Chemical Society*, vol. 87, no. 11, pp. 1425-1429, 2010.
- [315] S. Joshi, C. Bhatia, C. S. Bal, M. S. M. Rawat, “Simultaneous analysis of phenylephrine hydrochloride, guaifenesin, ambroxol hydrochloride, and



- salbutamol (as salbutamol sulphate) by use of a validated high-performance liquid chromatographic method”, *ACTA Chromatographica*, vol. 23, no. 1, pp. 109-119, 2011.
- [316] A. El-Gindy, S. Emara and A. Mostafa, “Application and validation of chemometrics-assisted spectrophotometry and liquid chromatography for the simultaneous determination of six-component pharmaceuticals”, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 41, no. 2, pp. 421-430, 2006.
- [317] F. De Fabrizio, “Simultaneous GLC analysis of salicylamide, phenylpropanolamine hydrochloride, caffeine, chlorpheniramine maleate, phenylephrine hydrochloride, and pyrilamine maleate in capsule preparations”, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 69, no. 7, pp. 854-855, 1980.
- [318] M. R. Louhaichi, S. Jebali, M. H. Loueslati, N. Adhoum and L. Monser, , “Simultaneous determination of pseudoephedrine, pheniramine, guaifenesin, pyrilamine, chlorpheniramine and dextromethorphan in cough and cold medicines by high performance liquid chromatography”, *Talanta*, vol. 78, no. 3, pp. 991-997, 2009.
- [319] I. Muszalska, M. Zajac, K. Czajkowski and M. Nogowska, “Simultaneous determination of paracetamol, caffeine, ascorbic acid and phenylephrine hydrochloride in pharmaceutical formulations by HPLC”, *Chemia Analityczna*, vol. 45, no. 6, pp. 825-833, 2000.
- [320] A. Marín, E. García, A. García and C. Barbas, “Validation of a HPLC quantification of acetaminophen, phenylephrine and chlorpheniramine in pharmaceutical formulations: capsules and sachets”, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 29, no. 4, pp. 701-714, 2002.
- [321] A. García, F. Rupérez, A. Marín, A. de la Maza and C. Barbas, “Poly(ethyleneglycol) column for the determination of acetaminophen, phenylephrine and chlorpheniramine in pharmaceutical formulations”, *Journal of Chromatography B*, vol. 785, no. 2, pp. 237-243, 2003.
- [322] B. Olmo, A. García, A. Marín and C. Barbas, “New approaches with two cyano columns to the separation of acetaminophen, phenylephrine, chlorpheniramine and related compounds”, *Journal of Chromatography B*, vol. 817, no. 2, pp. 159-165, 2005.
- [323] I. M. Palabiyik and F. Onur, “The Simultaneous Determination of Phenylephrine Hydrochloride, Paracetamol, Chlorpheniramine Maleate and Dextromethorphan Hydrobromide in Pharmaceutical Preparations”, *Chromatographia*, vol. 66, no. 1, pp. 93-96, 2007.
- [324] R. Heydari, “A New HPLC Method for the Simultaneous Determination of Acetaminophen, Phenylephrine, Dextromethorphan and Chlorpheniramine in Pharmaceutical Formulations”, *Analytical Letters*, vol. 41, no. 6, pp. 965-976, 2008.

- [325] C. de A. Bastos and M. A. L. de Oliveira, "Quantitative determination of acetaminophen, phenylephrine and carbinoxamine in tablets by high-performance liquid chromatography", *Química Nova*, vol. 32, no. 7, pp. 1951–1955, 2009.
- [326] M. Dousa and P. Gibala, "Fast HPLC Method Using Ion-Pair and Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography for Determination of Phenylephrine in Pharmaceutical Formulations", *Journal of AOAC International*, vol. 93, no. 5, pp. 1436-1442, 2010.
- [327] O. Pirol, M. Sukuroglu and T. Ozden, "Simultaneous Determination of Paracetamol, Phenylephrine Hydrochloride, Oxolamine Citrate and Chlorpheniramine Maleate by HPLC in Pharmaceutical Dosage Forms", *E-Journal of Chemistry*, vol. 8, no. 3, pp. 1275–1279, 2011.
- [328] P. Koblova, H. Sklenarova, I. Brabcova and P. Solich, "Development and validation of a rapid HPLC method for the determination of ascorbic acid, phenylephrine, paracetamol and caffeine using a monolithic column", *Analytical Methods*, vol. 4, no. 6, pp. 1588-1591, 2012.
- [329] N. Dubey, S. Sahu and G N. Singh, "Development of HPLC method for simultaneous estimation of ambroxol, guaifenesin and salbutamol in single dose form", *Indian Journal of Chemistry Section B-Organic Chemistry Including Medicinal Chemistry*, vol. 51, no. 11, pp. 1633-1636, 2012.
- [330] I. M. Palabiyik and F. Onur, "Multivariate Optimization and Validation of a Capillary Electrophoresis Method for the Simultaneous Determination of Dextromethorphan Hydrobromur, Phenylephrine Hydrochloride, Paracetamol and Chlorpheniramine Maleate in a Pharmaceutical Preparation Using Response Surface Methodology", *Analytical Sciences*, vol. 26, no. 8, pp. 853–859, 2010.
- [331] J. A. Arancibia, A. J. Nepote, G. M. Escandar and A. C. Olivieri, "Spectrofluorimetric determination of phenylephrine in the presence of a large excess of paracetamol", *Analytica Chimica Acta*, vol. 419, no. 2, pp. 159–168, 2000.
- [332] A. J. Nepote and A. C. Olivieri, "Simultaneous spectrofluorometric determination of oxatomide and phenylephrine in the presence of a large excess of paracetamol", *Analytica Chimica Acta*, vol. 439, no. 1, pp. 87–94, 2001.
- [333] A. Samadi-Maybodi and S. K. Hassani Nejad-Darzi, "Simultaneous determination of paracetamol, phenylephrine hydrochloride and chlorpheniramine maleate in pharmaceutical preparations using multivariate calibration 1", *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 75, no. 4, pp. 1270–1274, 2010.
- [334] M. R. Khoshayand, H. Abdollahi, A. Ghaffari, M. Shariatpanahi, H. Farzanegan, "Simultaneous spectrophotometric determination of paracetamol, phenylephrine and chlorpheniramine in pharmaceuticals using chemometric approaches", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 18, no. 4, pp. 292-297, 2010.

- [335] E. Deconinck, P. Y. Sacré, S. Baudewyns, P. Courselle and J. De Beer, "A fast ultra high pressure liquid chromatographic method for qualification and quantification of pharmaceutical combination preparations containing paracetamol, acetyl salicylic acid and/or antihistaminics", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 56, no. 2, pp. 200–209, 2011.
- [336] H. Okamoto, T. Nakajima, Y. Ito, T. Aketo, K. Shimada and S. Yamato, "Simultaneous determination of ingredients in a cold medicine by cyclodextrin-modified microemulsion electrokinetic chromatography", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 37, no. 3, pp. 517–528, 2005.
- [337] T. Harsono, M. Yuwono and G. Indrayanto, "Simultaneous Determination of Some Active Ingredients in Cough and Cold Preparations by Gas Chromatography, and Method Validation", *Journal of AOAC International*, vol. 88, no. 4, pp. 1093-1098, 2005.
- [338] W. O. McSharry and I. V. E. Savage, "Simultaneous High-pressure Liquid Chromatographic Determination of Acetaminophen, Guaifenesin, and Dextromethorphan Hydrobromide in Cough Syrup", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 69, no. 2, pp. 212–214, 1980.
- [339] L. Carnevale, "Simultaneous Determination of Acetaminophen, Guaifenesin, Pseudoephedrine, Pholcodine, and Paraben Preservatives in Cough Mixture by High-Performance Liquid Chromatography", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 72, no. 2, pp. 196–198, 1983.
- [340] I. I. Hewala, "Stability - Indicating Hplc Assay for Paracetamol, Guaiphenesin, Sodium Benzoate and Oxomemazine in Cough Syrup", *Analytical Letters*, vol. 27, no. 1, pp. 71–93, 1994.
- [341] Y. P. Chen, P. Wang, C. Y. Shaw and B. L. Chang, "Simultaneous Determination of Complex Cold Medicine Formulations by HPLC," *Journal of Food and Drug Analysis*, vol. 7, no. 1, pp. 13-22, 1999.
- [342] L. Q. Zhang, X. H. Wu, Y. Lu and X. Wang, "Simultaneous determination of five components including acetaminophen by reversed-phase high performance liquid chromatography", *Journal of Wuhan University of Technology-Materials Science Edition*, vol. 19, no. 1, pp. 34-35, 2004.
- [343] X. Chen, J. Huang, Z. Kong and D. Zhong, "Sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of paracetamol and guaifenesin in human plasma", *Journal of Chromatography B*, vol. 817, no. 2, pp. 263–269, 2005.
- [344] M. Yururi, H. Nakanishi, K. Taniguchi and B. Kagaku, "Simultaneous Analysis of Ingredients of Anti-Cold Preparations Using Capillary Electrophoresis", vol. 43, no. 7, pp. 575-580, 1994.
- [345] C. Martínez-Algaba, J. M. Bermúdez-Saldaña, R. M. Villanueva-Camañas, S. Sagrado and M. J. Medina-Hernández, "Analysis of pharmaceutical preparations containing antihistamine drugs by micellar liquid

- chromatography”, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 40, no. 2, pp. 312–321, 2006.
- [346] A. U. Kulikov and A. G. Verushkin, “Simultaneous Determination of Paracetamol, Caffeine, Guaifenesin and Preservatives in Syrups by Micellar LC”, *Chromatographia*, vol. 67, no. 5-6, pp. 347-355, 2008.
- [347] L. Q. Zhang, X. Tang and X. L. Zhu, “The Simultaneous Determination of Five Components Including Acetaminophen by Ridge Regression Spectrophotometry”, *Journal of Wuhan University of Technology-Materials, Science Edition*, vol. 16, no. 2, pp. 79-82, 2001.
- [348] L. Q. Zhang, X. H. Wu, X. Tang, X. L. Zhu and W. T. Su, “Research into simultaneous spectrophotometric determination of components in cough syrup by principal component regression method”, *Spectroscopy and Spectral Analysis*, vol. 22, no. 3, pp. 427-429, 2002.
- [349] T. Grygar, O. Frybort, P. Bezdicka and T. Pekarek, “Quantitative Analysis of Antipyretics and Analgesics in Solid Dosage Forms by Powder X-Ray Diffraction”, *Chemia Analityczna*, vol. 53, no. 2, pp. 187-200, 2008.
- [350] A. El-Gindy, S. Emara and A. Mostafa, “Application and validation of chemometrics-assisted spectrophotometry and liquid chromatography for the simultaneous determination of six-component pharmaceuticals”, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 41, pp. 421-430, 2006.
- [351] C. Demir, II. Kemometri yaz okulu ders notları, İzmir İleri Teknoloji Enstitüsü, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, İzmir, 2009.
- [352] B. Hibbert, “Experimental design in chromatography: a tutorial review”, *Journal of Chromatography B*, vol. 910, pp. 2-13, 2012.
- [353] P. Araujo and R. Brereton, “Experimental design I. Screening”, *Trends In Analytical Chemistry*, vol. 15, no. 1, 1996.
- [354] F. Triefenbach “Design of Experiments : The D-Optimal Approach and Its Implementation As a Computer Algorithm”, Umea University, 2008.
- [355] B. P. Kumar and S. K. Karimulla, “Solid lipid nanoparticles – a brief review”, *Int J Adv Pharm*, vol. 2, pp. 35 -55, 2012.
- [356] K. H. Esbense, D. Guyo, F. Westad and L. P. Houmoller, “Multivariate data analysis in practice: An intrduction to multivariate data analysis and experimental design”, Aalborg University, Denmark. pp. 361 – 479, 2002.
- [357] L. Eriksson, E. Johansson, N. Kettaneh-Wold, C. Wikstrom and S. Wol, “Desing of experiments: Principles and applications”, MKS Umetrics AB, Sweden, pp. 7 – 386, 2008.
- [358] B. M. J. De Spiegeleer, K. Sintobin and J. Desmet, “High performance liquid chromatography stability study of malonyl-coenzyme A, using statistical experimental designs”, *Biomed Chromatography*, vol. 3, no. 5 pp. 213-216, 1989.

- [359] E. Marengo, M. C. Gennaro and C. Abrigo, "Experimental-design and partial least-squares for optimization of reversed-phase ion-interaction liquid-chromatographic separation of nitrite, nitrate, and phenylenediamine isomers", *Analytical Chemistry*, 64(17)1885-1893, 1992.
- [360] J. O. Debeer and J. Hoogmartens, "Experimental-design on liquid-chromatographic parameters in the analysis of tetracycline on poly(styrene divinylbenzene)", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 11, no. 11-12, pp. 1239-1250, 1993.
- [361] J. O. Debeer, C. V. Vandenbroucke and D. Massart, "Experimental-design for the rapid selection of separation conditions for methyl and propyl parahydroxybenzoate, phenylephrine hydrochloride and chlorphenamine maleate by ion-pair liquid-chromatography ", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 12, no. 11, pp. 1379-1396, 1994.
- [362] Y. Vanderheyden, K. Luypaert, C. Hartmann, D. L. Massart, J. Hoogmartens and J. Debeer, "Ruggedness tests on the high-performance liquid-chromatography assay of the united-states-pharmacopeia-xxii for tetracycline hydrochloride - a comparison of experimental-designs and statistical interpretations", *Analytica Chimica ACTA*, vol. 312, no. 3, pp. 245-252, 1995.
- [363] F. Rouberty and J. Fournier, "Modeling of gc and hplc separations of simazin and atrazin by experimental-design methodology", *Chromatographia*, vol. 41, no. 9-10, pp. 553-560, 1995.
- [364] A. K. Hewavitharana, "Method for the extraction of riboflavin for high-performance liquid chromatography and application to casein", *Analyst*, vol. 121, no. 11, pp. 1671-1676, 1996.
- [365] E. Marengo, M. C. Gennaro and C. Abrigo, "Investigation by experimental design and regression models of the effect of five experimental factors on ion-interaction high-performance liquid chromatographic retention", *Analytica Chimica ACTA*, vol. 321, no. 2-3, pp. 225-236, 1996.
- [366] L. M. Osborne and T. W. Miyakawa, "Use of experimental design in the optimization of hplc methodology for the separation of stereoisomer", *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, vol. 20, no. 4, pp. 501-509, 1997.
- [367] C. F. Harrington, D. J. Roberts and G. Nickless, "Optimization of a reversed-phase high performance liquid chromatography separation using an ion-pair reagent for the determination of carboxylic acids in plant materials", *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, vol. 20, no. 11, pp. 1773-1787, 1997.
- [368] I. Dahllof, O. Svensson and C. Torstensson, "Optimising the determination of nitrate and phosphate in sea water with ion chromatography using experimental design", *Journal of Chromatography A*, vol. 771, no. 1-2, pp. 163-168, 1997.

- [369] C. Nsengiyumva, J. O. DeBeer, W. VandeWauw, A. J. Vlietinck and F. Parmentier, "An experimental design approach to selecting the optimum liquid chromatographic conditions for the determination of vitamins B-1, B-2-phosphate, B-3, B-6 and C in effervescent tablets containing saccharin and sunset yellow FCF", *Chromatographia*, vol. 44, pp. 634-644, 1997.
- [370] S. Furlanetto, C. Tognini, R. Carpenedo, E. La Porta and S. Pinzauti, "Set-up and validation of an adsorptive stripping voltammetric method for kynurenic acid determination in human urine", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 18, no. 1-2", pp. 67-73, 1998.
- [371] E. Marengo, M. C. Gennaro and S. Angelino, "Neural network and experimental design to investigate the effect of five factors in ion-interaction high-performance liquid chromatography", *Journal of Chromatography A*, vol. 799, no. 1-2, pp. 47-55, 1998.
- [372] J. Salafranca, J. Cacho and C. Nerin, "Supercritical fluid extraction (SFE) optimization by full-factorial design for the determination of Irganox 1076, Irgafos 168 and Chimassorb 81 in virgin and recycled polyolefins", *HRC-Journal of High Resolution Chromatography*, vol. 22, no. 10, pp. 553-558, 1999.
- [373] R. Ragonese, M. Macka, J. Hughes and P. Petocz, "The use of the Box-Behnken experimental design in the optimisation and robustness testing of a capillary electrophoresis method for the analysis of ethambutol hydrochloride in a pharmaceutical formulation", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 27, no. 6, pp. 995-1007, 2002.
- [374] B. Motamed, J. L. Bohm, D. Hennequin, H. Texier, R. Mosrati and D. Barillier, "Development of an HPLC method for the determination of phenolic by-products: optimisation of the separation by means of the experimental designs methodology", *Analysis*, vol. 28, no. 7, pp. 592-599, 2000.
- [375] T. Mirza, H. S. I. Tan, "Determination of captopril in pharmaceutical tablets by anion-exchange HPLC using indirect photometric detection; a study in systematic method development", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 25, no. 1, pp. 39-52, 2001.
- [376] H. K. Chepkwony, E. Roets and J. Hoogmartens, "Liquid chromatography of troleandomycin", *Journal of Chromatography*, vol. 914, no. 1-2), pp. 53-58, 2001.
- [377] M. Careri, L. Elviri and A. Mangia, "Validation of a high-performance liquid chromatographic method for determination of isoflavonoids in soybeans. Study of the extraction procedure by experimental design", *Chromatographia*, vol. 54, no. 1-2, pp. 45-50, 2001.
- [378] V. Harang, A. Karlsson and M. Josefson, "Liquid chromatography method development and optimization by statistical experimental design and chromatogram simulation", *Chromatographia*, vol. 54, no. 11-12, pp. 703-709, 2001.

- [379] R. Romero, J. A. Jonsson, D. Gazquez, M. G. Bagur and M. Sanchez-Vinas, "Multivariate optimization of supported liquid membrane extraction of biogenic amines from wine samples prior to liquid chromatography determination as dabsyl derivatives", *Journal of Separation Science*, vol. 25, no. 9, pp. 584-592, 2002.
- [380] R. B. Waters and A. Dovletoglou, "Evaluating HPLC assay robustness with experimental design", *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, vol. 26, no. 18, pp. 2975-2985, 2003.
- [381] M. L. Calabro, V. Galtieri, P. Cutroneo, S. Tommasini, P. Ficarra and R. Ficarra, "Study of the extraction procedure by experimental design and validation of a LC method for determination of flavonoids in Citrus bergamia juice", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 35, no. 2, pp. 349-363, 2004.
- [382] M. Medenica, B. Jancic, D. Ivanovic and A. Malenovic, "Experimental design in reversed-phase high-performance liquid chromatographic analysis of imatinib mesylate and its impurity", *Journal of Chromatography A*, vol. 1031, no. 1-2, pp. 243-248, 2004.
- [383] A. B. Baranda, N. Etxebarria, R. M. Jimenez and R. M. Alonso, "Development of a liquid-liquid extraction procedure for five 1,4-dihydropyridines calcium channel antagonists from human plasma using experimental design", *Talanta*, vol. 67, no. 5, pp. 933-941, 2005.
- [384] N. M. De Aragdo, M. C. C. Veloso, M. S. Bispo, S. L. C. Ferreira and J. B. de Andrade, "Multivariate optimisation of the experimental conditions for determination of three methylxanthines by reversed-phase high-performance liquid chromatography", *Talanta*, vol. 67, no. 5, pp. 1007-1013, 2005.
- [385] K. Novotna, J. Havlis and J. Havel, "Optimisation of high performance liquid chromatography separation of neuroprotective peptides - Fractional experimental designs combined with artificial neural networks", *Journal of Chromatography A*, vol. 1096, no. 1-2, pp. 50-57, 2005.
- [386] P. Araujo, F. Couillard, E. Leirnes, K. Ask, A. Bokevoll and L. Froyland, "Experimental design considerations in quantification experiments by using the internal standard technique: Cholesterol determination by gas chromatography as a case study", *Journal of Chromatography A*, vol. 1121, no. 1, pp. 99-105, 2006.
- [387] L. Cardenes, A. Martin-Calero, J. H. Ayala, V. Gonzalez and A. M. Afonso, AM., "Experimental design optimization of solid-phase microextraction conditions for the determination of heterocyclic aromatic amines by high-performance liquid chromatography", *Analytical Letters*, vol. 39, no. 2, pp. 405-423, 2006.
- [388] G. Srinubabu, K. Jaganbabu, B. Sudharani, K. Venugopal, G. Girizasankar and J. V. L. N. S. Rao, "Development and validation of a LC method for the determination of pramipexole using an experimental design", *Chromatographia*, vol. 64, no. 1-2, pp. 95-100, 2006.

- [389] G. Iriarte, N. Ferreiros, I. Ibarondo, R. M. Alonso, M. I. Maguregi, L. Gonzalez and R. N. Jimenez, "Optimization via experimental design of an SPE-HPLC-UV-fluorescence method for the determination of valsartan and its metabolite in human plasma samples", *Journal of Separation Science*, vol. 29, no. 15, pp. 2265-2283, 2006.
- [390] L. Hlabangana, S. Hernandez-Cassou and J. Saurina, "Determination of biogenic amines in wines by ion-pair liquid chromatography and post-column derivatization with 1,2-naphthoquinone-4-sulphonate", *Journal of Chromatography A*, vol. 1130, no. 1, pp. 130-136, 2006.
- [391] I. Savic, G. Nikolic and V. Bankovic, "Development and validation of spectrophotometric method for phenylephrine hydrochloride estimation in nasal drops formulations", *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, vol. 27, no. 2, pp. 149-156, 2008.
- [392] A. Dincel, N. E. Basci, "An experimental design approach to selecting the optimum LC conditions for the determination of local anaesthetics", *Chromatographia*, vol. 66, no. 1, pp. 81-85, 2007.
- [393] R. Petkovska, C. Cornett and A. Dimitrovska, "Development and validation of rapid resolution RP-HPLC method for simultaneous determination of atorvastatin and related compounds by use of chemometrics", *Analytical Letters*, vol. 41, no. 6, pp. 992-1009, 2008.
- [394] D. M. Brum, R. J. Cassella and A. D. P. Netto, "Multivariate optimization of a liquid-liquid extraction of the EPA-PAHs from natural contaminated waters prior to determination by liquid chromatography with fluorescence detection", *Talanta*, vol. 74, no. 5, pp. 1392-1399, 2008.
- [395] I. Popovic, D. Ivanovic, M. Medenica, A. Malenovic and B. Jancic-Stojanovic, "LC determination of lercanidipine and its impurities using DryLab software and experimental design procedures", *Chromatographia*, vol. 67, no. 5-6, pp. 449-454, 2008.
- [396] J. Xia, B. R. Xiang and W. Zhang, "Determination of metacrate in water samples using dispersive liquid-liquid microextraction and HPLC with the aid of response surface methodology and experimental design", *Analytica Chimica ACTA*, vol. 625, no. 1, pp. 28-34, 2008.
- [397] M. R. R. Tappin, M. J. Nakamura, A. C. Siani and L. Lucchetti, "Development of an HPLC method for the determination of tetranortriterpenoids in *Carapa guianensis* seed oil by experimental design", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 48, no. 4, pp. 1090-1095, 2008.
- [398] J. Z. Song, C. F. Qiao, S. L. Li, Q. B. Han and H. X. Xu, "Purity determination of yunaconitine reference standard using HPLC with experimental design and response surface optimization", *Journal of Separation Science*, vol. 31, no. 22, pp. 3809-3816, 2008.
- [399] L. Zivanovic, A. Licanski, M. Zecevic, B. Jovic and M. Kostic, "Application of experimental design in optimization of solid phase extraction of mycophenolic acid and mycophenolic acid glucuronide from human urine



- and plasma and SPE-RP-HPLC method validation”, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 47, no. 3, pp. 575-585, 2008.
- [400] K. Vucicevic, G. Popovic, K. Nikolic, I. Vovk and D. Agbaba, “An Experimental Design Approach to Selecting the Optimum HPLC Conditions for the Determination of 2-Arylimidazoline Derivatives”, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, vol. 32, no. 5, pp. 656-667, 2009.
- [401] B. Asci, O. A. Donmez, A. Bozdogan, S. Sungur, “Determination of Ibuprofen, Pseudoephedrine HCl, Chlorpheniramine Maleate and Nipagen by Liquid Chromatography and Fractional Factorial Design”, *Innovations in Chemical Biology*, pp. 285-290, 2009.
- [402] M. R. Hadjmohammadi, S. Nazari and K. Kamel, “Determination of Flavonoid Markers in Honey with SPE and LC using Experimental Design”, *Chromatographia*, vol. 69, no. 11-12, pp. 1291-1297, 2009.
- [403] P. Dzodic, L. Zivanovic, A. Protic, M. Zecevic and B. Jovic, “Chemometrically Assisted Development and Validation of LC for Simultaneous Determination of Carbamazepine and Its Impurities Iminostilbene and Iminodibenzyl in Solid Dosage Form”, *Chromatographia*, vol. 70, no. 9-10, pp. 1343-1351, 2009.
- [404] P. Barmapalexis, F. I. Kanaze and E. Georgarakis, “Developing and optimizing a validated isocratic reversed-phase high-performance liquid chromatography separation of nimodipine and impurities in tablets using experimental design methodology”, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 49, no. 5, pp. 1192-1202, 2009.
- [405] L. Zivanovic, A. Protic, M. Zecevic, B. Jovic and M. Kostic, “Chemometrically Assisted Development and Validation of LC for Simultaneous Determination of Carbamazepine and Its Impurities Iminostilbene and Iminodibenzyl in Solid Dosage Form”, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 50, no. 4, pp. 640-648, 2009.
- [406] E. Rodriguez, F. N. Villoslada, M. C. Moreno-Bondi and M. D. Marazuela, “Optimization of a pressurized liquid extraction method by experimental design methodologies for the determination of fluoroquinolone residues in infant foods by liquid chromatography”, *Journal of Chromatography A*, vol. 1217, no. 5, pp. 605-613, 2010.
- [407] A. Andrade-Eiroa, P. Dievart and P. Dagaut, “Improved optimization of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) mixtures resolution in reversed-phase high performance liquid chromatography by using factorial design and response surface methodology”, *Talanta*, vol. 81, no. 1-2, pp. 265-274, 2010.
- [408] A. Ferrarini, A. L. Huidobro, F. Pellati and C. Barbas, “Development and validation of a HPLC method for the determination of sertraline and three non-chiral related impurities”, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 53, no. 2, pp. 122-129, 2010.

- [409] M. A. Jansen, J. Kiwata, J. Arceo, K. F. Faull, G. Hanrahan, and E. Porter, "Evolving neural network optimization of cholesteryl ester separation by reversed-phase HPLC", *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 397, no. 6, pp. 2367-2374, 2010
- [410] M. H. Semreen and H. Y. Aboul-Enein, "Experimental design strategies in LC method development and in robustness testing for reversible cholinesterase inhibitor rivastigmine in pharmaceutical formulation" *Journal of Liquid chromatography & Related Technologies*, vol. 33, no. 2, pp. 191-201, 2010.
- [411] P. Iuliani, G. Carlucci and A. Marrone, "Investigation of the HPLC response of NSAIDs by fractional experimental design and multivariate regression analysis. Response optimization and new retention parameters", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 51, no. 1, pp. 46-55, 2010.
- [412] B. Asci, O. A. Donmez, A. Bozdogan and S. Sungur, "Experimental design of reversed-phase high performance liquid chromatographic conditions for simultaneous determination of ibuprofen, pseudoephedrine hydrochloride, chlorpheniramine maleate, and nipagen", *Journal of Analytical Chemistry*, vol. 65, no. 7, pp. 743-748, 2010.
- [413] M. D. Sangoi, M. Wrasse-Sangoi, P R. de Oliveira, V. Todeschini and C. M. B. Rolim, "Rapid simultaneous determination of aliskiren and hydrochlorothiazide from their pharmaceutical formulations by monolithic silica hplc column employing experimental designs", *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, vol. 34, no. 17, pp. 1976-1996, 2011.
- [414] S. M. Khamanga and R. B. Walker, "The use of experimental design in the development of an HPLC-ECD method for the analysis of captopril", *Talanta*, vol. 83, no. 3, pp. 1037-1049, 2011.
- [415] S. Bazhdanzadeh, Z. Talebpour, N. Adib and H. Y. Aboul-Enein, "A simple and reliable stir bar sorptive extraction-liquid chromatography procedure for the determination of chlorpromazine and trifluoperazine in human serum using experimental design methodology", *Journal of Separation Science* vol. 34, no. 1, pp. 90-97, 2011.
- [416] S. Khodadoust and M. Hadjmohammadi, "Determination of N-methylcarbamate insecticides in water samples using dispersive liquid-liquid microextraction and HPLC with the aid of experimental design and desirability function", *Analytica Chimica ACTA*, vol. 699, no. 1, pp. 113-119, 2011.
- [417] V. Guillen-Casla, J. Magro-Moral, N. Rosales-Conrado, L. V. Perez-Arribas, M. E. Leon-Gonzalez and L. M. Polo-Diez, "Direct chiral liquid chromatography determination of aryloxyphenoxypropionic herbicides in soil: deconvolution tools for peak processing", *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 400, no. 10, pp. 3547-3560, 2011.
- [418] H. Ebrahimzadeh, A. A. Asgharinezhad, H. Abedi and F. Kamarei, "Optimization of carrier-mediated three-phase hollow fiber microextraction

- combined with HPLC-UV for determination of propylthiouracil in biological samples”, *Talanta*, vol. 85, no. 2, pp. 1043–1049, 2011.
- [419] F. Kamarei, H. Ebrahimzadeh and Y. Yamini, “Optimization of ultrasound-assisted emulsification microextraction with solidification of floating organic droplet followed by high performance liquid chromatography for the analysis of phthalate esters in cosmetic and environmental water samples”, *Microchemical Journal*, vol. 99, no. 1, pp. 26-33, 2011.
- [420] M. H. Semreen and H. Y. Aboul-Enein, “Enantioselective Separation and Determination of Citalopram Enantiomers in Pharmaceutical Dosage Form and Bulk Drug Using Experimental Design Approach on Chiralcel (R) OC as a Chiral Stationary Phase”, *ACTA Chromatographica*, vol. 23, no. 3, pp. 389-401, 2011.
- [421] A. A. Golabchifar, M. R. Rouini, B. Shafaghi, S. Rezaee, A. Foroumadi and M. R. Khoshayand, “Optimization of the simultaneous determination of imatinib and its major metabolite, CGP74588, in human plasma by a rapid HPLC method using D-optimal experimental design”, *Talanta*, vol. 85, no. 5, pp. 2320-2329, 2011.
- [422] N. Broekaert, C. Van Peteghem, E. Daeseleire, D. Sticker and C. Van Poucke, “Development and validation of an UPLC-MS/MS method for the determination of ionophoric and synthetic coccidiostats in vegetables”, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 401, no. 10, pp. 3335-3344, 2011.
- [423] M. H. Fatemi, M. R. Hadjmohammadi, P. Shakeri and P. Biparva, “Extraction optimization of polycyclic aromatic hydrocarbons by alcoholic-assisted dispersive liquid-liquid microextraction and their determination by HPLC”, *Journal of Separation Science*, vol. 35, no. 1, pp. 86-92, 2012.
- [424] O. D. Christopoulou, V. A. Sakkas and T. A. Albanis, “Development and application of chemometric-assisted dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of suspected fragrance allergens in water samples”, *Journal of Separation Science*, vol. 35, no. 24, pp. 3554-3560, 2012.
- [425] G. Bertol, L. Franco and B. H. de Oliveira, “HPLC Analysis of Oxindole Alkaloids in *Uncaria Tomentosa*: Sample Preparation and Analysis Optimisation by Factorial Design”, *Phytochemical Analysis*, vol. 23, no. 2, pp. 143-151, 2012.
- [426] M. H. Rafamantanana, B. Debrus, G. E. Raelison, E. Rozet, P. Lebrun, S. Uverg-Ratsimamanga, P. Hubert and J. Quetin-Leclercq, “Application of design of experiments and design space methodology for the HPLC-UV separation optimization of aporphine alkaloids from leaves of *Spirospermum penduliflorum* Thouars”, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 62, pp. 23-32, 2012.
- [427] M. Vosough, N. R. Mojdehi and A. Salemi, “Chemometrics assisted dispersive liquid-liquid microextraction for quantification of seven UV filters in urine

- samples by HPLC-DAD”, *Journal of Separation Science*, vol. 35, no. 24, pp. 3575-3585, 2012.
- [428] S. Beg, K. Kohli, S. Swain and M. S. Hasnain, “Development and validation of RP-HPLC method for quantitation of amoxicillin trihydrate in bulk and pharmaceutical formulations using Box-Behnken experimental design”, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, vol. 35, no. 1-4, pp. 393-406, 2012.
- [429] S. Tadic, K. Nikolic and D. Agbaba, “Development and Optimization of an HPLC Analysis of Citalopram and Its Four Nonchiral Impurities Using Experimental Design Methodology”, *Journal of AOAC International*, vol. 95, no. 3, pp. 733-743, 2012.
- [430] M. S. Hasnain, S. Rao, M. K., Singh, N. Vig, A. Gupta, A. Ansari, P. Sen, P. Joshi and A. S. Ansari, “Development and validation of LC-MS/MS method for the quantitation of lenalidomide in human plasma using Box-Behnken experimental design”, *Analyst*, vol. 1388, no. 5, pp. 1581-1588, 2013.
- [431] G. A. Zachariadis and E. Rosenberg, “Use of modified Doehlert-type experimental design in optimization of a hybrid electrospray ionization ion trap time-of-flight mass spectrometry technique for glutathione determination”, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, vol. 27, no. 3, pp. 489-499, 2013.
- [432] S. M. Taghizahed, A. Moghimi-Ardakani, F. Mohamadnia, “A statistical experimental design approach to evaluate the influence of various penetration enhancers on transdermal drug delivery of buprenorphine” *Journal of Advanced Research*, vol. 6, no. 2, pp. 155-162, 2015.
- [433] R. Dash, H. Mohammed, T. Humaira and D. Ramash, “Design, optimization and evaluation of glipizide solid self-nanoemulsifying drug delivery for enhanced solubility and dissolution” *Saudi Pharmaceutical Journal*, vol. 23, no. 5, pp. 528-540, 2015.
- [434] F. Shokraneha, R. Asghariana, A. Abdollahpoura, M. Raminb A. Montaseric and A. Mahboubid, “A Novel High Performance Liquid Chromatographic Method for Determination of Nystatin in Pharmaceutical Formulations by Box-Behnken Statistical Experiment Design”, *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, vol. 14, pp. 43-49, 2015.
- [435] D. Bhuyan, V. Quan A. Chalmers, C. Bowyer and J. Scarlett, “Microwave-assisted extraction of *Eucalyptus robusta* leaf for the optimal yield of total phenolic compounds”, *Industrial Crops and Products* vol. 69, pp. 290-299, 2015.
- [436] R. Dash, M. Habibuddin, T. Humaira and A. Patel, “Application of Quality by Design for the Optimization of an HPLC Method to Determine Ezetimibe in a Supersaturable Self-Nanoemulsifying Formulation”, *Journal of Liquid Chromatography Related Technologies*, vol. 38, no. 8, pp. 874-885, 2015.

- [437] P. Giriraj and T. Sivakkumar, "A Rapid-Chemometrics Assisted RP-HPLC Method with PDA Detection for the Simultaneous Estimation of Ofloxacin and Nimorazole in Pharmaceutical Formulation", *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, vol. 38, no. 8, pp. 904-910, 2015.
- [438] E. Hameed, R. Salam and G. Hadad, "Chemometric-assisted spectrophotometric methods and high performance liquid chromatography for simultaneous determination of seven beta-blockers in their pharmaceutical products: A comparative study", *Spectrochimica Acta Part A-Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 141, pp. 278-286, 2015.
- [439] S. Nam, Y. Yoon, D. Choi and K. Zoh, "Degradation characteristics of metoprolol during UV/chlorination reaction and a factorial design optimization", *Journal of Hazardous Materials*, vol. 285, pp. 453-463, 2015.
- [440] M. V. Krishna, R. N. Dash, B. J. Reddy, P. Venugopal, P. Sandeep and G. Madhavi, "Quality by Design (QbD) approach to develop HPLC method for beclomethasone dipropionate: application to hydrolytic, thermal, oxidative and photolytic degradation kinetics", *Journal of Saudi Chemical Society*, vol. 20, pp. 313-322, 2016.
- [441] S. Saroj, V. Jairaj and R. Rathod, "Applying green analytical chemistry for development and validation of RP-HPLC stability indicating assay method for estimation of fenoverine in bulk and dosage form using quality by design approach", *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, vol. 40, no. 7, pp. 340-352, 2017.
- [442] H. R. Bapatu, R. K. Maram, W. H. Cho and V. B. R. Pasagadugula, "QbD approach method development for estimation of dabigatran etexilate along with its impurities and identification of degradants in capsule dosage form", *American Journal of Analytical Chemistry*, vol. 7, pp. 494-524, 2016.
- [443] M. S. Hasnain, S. Siddiqui, S. Rao, P. Mohanty, T. J. Ara and S. Beg, "QbD-Driven development and validation of a bioanalytical LC-MS method for quantification of fluoxetine in human plasma", *Journal of Chromatographic Science*, vol. 54, no. 5, pp. 736-743, 2016.
- [444] S. Dai, B. Xu, Y. Zhang, J. Li, F. Sun, X. Shi and Y. Qiao, "Establishment and reliability evaluation of the design space for HPLC analysis of six alkaloids in *Coptis chinensis* (Huanglian) using Bayesian approach", *Chinese Journal of Natural Medicines*, vol. 14, no. 9, pp. 697-708, 2016.
- [445] J. Kochling, W. Wu, Y. Hua, Q. Guan and J. Castaneda-Merced, "A platform analytical quality by design (AQbD) approach for multiple UHPLC-UV and UHPLC MS methods development for protein analysis", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 125, pp. 130-139, 2016.
- [446] R. Kormány, I. Molnár and J. Fekete, "Renewal of an old European Pharmacopoeia method for Terazosin using modeling with mass spectrometric peaktracking", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 135, pp. 8-15, 2017.

- [447] A. Oliva, C. Monzón, A. Santoveina, J. B. Farina and M. Llabrés, "Development of an ultra high performance liquid chromatography method for determining triamcinolone acetonide in hydrogels using the design of experiments/design space strategy in combination with process capability index", *Journal of Separation Science*, vol. 39, no. 14, pp. 2689-2701, 2016.
- [448] S. S. Panda, B. V. V. R. Kumar, S. Beg, S. K. Sahu and S. Muni, "Development and validation of a stability-indicating liquid chromatographic method for estimating vilazodone hydrochloride in pharmaceutical dosage form using quality by design", *Journal of Chromatographic Science*, vol. 54, no. 10, pp. 1713-1722, 2016.
- [449] P. S. Sandhu, S. Beg, O. P. Katare and B. Singh, "QbD-Driven development and validation of a HPLC method for estimation of tamoxifen citrate with improved performance", *Journal of Chromatographic Science*, vol. 54, no. 8, pp. 1373-1384, 2016.
- [450] D. Åsberg, M. Nilsson, S. Olsson, J. Samuelsson, O. Svensson, S. Klick, J. Ennis, P. Butterworth, D. Watt, S. Iliadou, A. Karlsson, J. T. Walker, K. Arnot, N. Ealer, K. Hernqvist, K. Svensson, A. Grinell, P. Quist, A. Karlsson and T. Fornstedt, "A quality control method enhancement concept – continual improvement of regulatory approved QC methods", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 129, pp. 273-281, 2016.
- [451] M. Taraji, P. R. Haddad, R. I. J. Amos, M. Talebi, R. Szucs, J. W. Dolan and C. A. Pohl, "Rapid method development in hydrophilic interaction liquid chromatography for pharmaceutical analysis using a combination of quantitative structure-Retention relationships and design of experiments", *Analytical Chemistry*, vol. 89, no. 3, pp. 1870-1878, 2017.
- [452] J. Terzić, I. Popović, A. Stajić, A. Tumpa, B. Jancić -Stojanović, "Application of Analytical Quality by Design concept for bilastine and its degradation impurities determination by hydrophilic interaction liquid chromatographic method", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 125, pp. 385-393, 2016.
- [453] D. Thakur, A. Jain, G. Ghoshal, U. S. Shivhare and O. P. Katare, "RP-HPLC method development using analytical QbD approach for estimation of cyanidin-3-O-glucoside in natural biopolymer based microcapsules and tablet dosage form", *Journal of Pharmaceutical Investigation*, vol. 47, no. 5, pp. 413-427, 2017.
- [454] D. Thakur, A. Kaur and S. Sharma, "Application of QbD based approach in method development of RP-HPLC for simultaneous estimation of antidiabetic drugs in pharmaceutical dosage form", *Journal of Pharmaceutical Investigation*, vol. 47, no. 3, pp. 229-239, 2017.
- [455] A. Tumpa, A. Stajić, B. Jancić -Stojanović and M. Medenica, "Quality by Design in the development of hydrophilic interaction liquid chromatography method with gradient elution for the analysis of olanzapine", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 134, pp. 18-26, 2017.

- [456] L. Wang and H. Qu, "Development and optimization of SPE-HPLC-UV/ELSD for simultaneous determination of nine bioactive components in Shenqi Fuzheng Injection based on Quality by Design principles", *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 408, no. 8, pp. 2133-2145, 2016.
- [457] S. H. Yang, J. Wang and K. Zhang, "Validation of a two-Dimensional liquid chromatography method for quality control testing of pharmaceutical materials", *Journal of Chromatography A*, vol. 1492, pp. 89-97, 2017.
- [458] M. N. Patel and C. S. Kothari, "Multivariate approaches for simultaneous determination of avanafil and dapoxetine by UV chemometrics and HPLC-QbD in binary mixtures and pharmaceutical product", *Journal of AOAC International*, vol. 99, no. 3, pp. 649-663, 2016.
- [459] S. Beg, V. Chaudhary, G. Sharma, B. Garg, S. S. Panda and B. Singh, "QbD-oriented development and validation of a bioanalytical method for nevirapine with enhanced liquid-liquid extraction and chromatographic separation", *Biomedical Chromatography*, vol. 30, no. 6, pp. 818-828, 2016.
- [460] H. I. Mokhtar, R. A. Abdel-Salam and G. M. Hadad, "Design space calculation by Insilico robustness simulation with modeling error propagation in QbD framework of RP-HPLC method development", *Chromatographia*, vol. 78, no. 7-8, pp. 457-466, 2015.
- [461] I. Nistor, P. Lebrun, A. Ceccato, F. Lecomte, I. Slama, R. Oprean, E. Badarau, F. Dufour, K. S. S. Dossou, M. Fillet, J. Liégeois, P. Hubert and E. Rozet, "Implementation of a design space approach for enantiomeric separations in polar organic solvent chromatography", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 74, pp. 273-283, 2013.
- [462] J. Pantović, A. Malenović, A. Vemić, N. Kostić and M. Medenica, "Development of liquid chromatographic method for the analysis of dabigatran etexilate mesilate and its ten impurities supported by quality-by-design methodology", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 111, pp. 7-13, 2015.
- [463] P. N. Patel, V. S. Karakam, G. Samanthula and S. Ragampeta, "Quality-by-design-based ultra high performance liquid chromatography related substances method development by establishing the proficient design space for sumatriptan and naproxen combination", *Journal of Separation Science*, vol. 38, no. 19, pp. 3354-3362, 2015.
- [464] N. Rácz, R. Kormány, J. Fekete and I. Molnár, "Establishing column batch repeatability according to Quality by Design (QbD) principles using modeling software", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 108, pp. 1-10, 2015.
- [465] Z. Ren, X. Zhang, H. Wang and X. Jin, "Using an innovative quality-by-design approach for the development of a stability-indicating UPLC/Q-TOF-ESI-MS/MS method for stressed degradation products of imatinib mesylate", *Royal Society of Chemistry*, vol. 6, pp. 13050-13062, 2016.

- [466] C. Boussès, L. Ferey, E. Vedrines and K. Gaudin, "Using an innovative combination of quality-by-design and green analytical chemistry approaches for the development of a stability indicating UHPLC method in pharmaceutical products", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 115, pp. 114–122, 2015.
- [467] M. Jovanović, T. Rakić, A. Tumpa and B. Jančić Stojanović, "Quality by Design approach in the development of hydrophilic interaction liquid chromatographic method for the analysis of iohexol and its impurities", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 110, pp. 42-48, 2015.
- [468] ICH Guidelines, Analytical Procedure Development and Revision of Q2(R1), Validation of Analytical Procedures:Text and Methodology, <https://ich.org>,
- [469] USP 40-NF35, General Information/USP Chapter <1225> Validation of Compendial Procedures, <https://hcm.usp.org>
- [470] ICH Guidelines, Q2A, Validation of Analytical Procedures (March 1995) and Q2B Validation of Analytical Procedures (May, 1997), <https://ich.org>.
- [471] EMEA, The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, <https://emea.mobi>, 1998.
- [472] T. Lundstedt, E. Seifert, L. Abramo, B. Thelin, A. Nystrom, J. Pettersen and R. Bergman, "Experimental design and optimization", *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, vol. 42, no. 1-2, pp. 3-40, 1998.