

**PARASETAMOL İÇEREN KOMBİNE FARMASÖTİK  
PREPARATLARIN UPLC YÖNTEMİ İLE KANTİTATİF  
ANALİZİ**

**Faysal SELİMOĞLU**

**Analitik Kimya Anabilim Dalı**

**Tez Danışmanı**

**Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU**

**İkinci Tez Danışmanı**

**Prof. Dr. Erdal DİNÇ**

**Doktora Tezi - 2013**

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

**PARASETAMOL İÇEREN KOMBİNE FARMASÖTİK  
PREPARATLARIN UPLC YÖNTEMİ İLE KANTİTATİF  
ANALİZİ**

**Faysal SELİMOĞLU**

**Analitik Kimya Anabilim Dalı  
Doktora Tezi**

**Tez Danışmanı  
Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU**

**İkinci Tez Danışmanı  
Prof. Dr. Erdal DİNÇ**

**ERZURUM  
2013**

T.C.  
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI

PARASETAMOL İÇEREN KOMBİNE FARMASÖTİK  
PREPARATLARIN UPLC YÖNTEMİ İLE KANTİTATİF ANALİZİ

Tez Savunma Tarihi : 02.08.2013

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Mehmet TÜFEKÇİ

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Erdal DİNÇ

Jüri Üyesi : Doç. Dr Bilal YILMAZ

Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr Fehmi ODABAŞOĞLU

Onay

Bu çalışma yukarıdaki jüri tarafından **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

  
Prof. Dr. Yavuz Selim SAĞLAM  
Enstitü Müdürü

Doktora Tezi  
ERZURUM - 2013

# İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR .....	V
ÖZET .....	VI
ABSTRACT.....	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	X
TABLolar DİZİNİ.....	XVI
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	6
2.1 Parasetamol.....	6
2.1.1 Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri.....	6
2.1.2 Farmakolojik Özellikleri:.....	7
2.2 Kafein.....	9
2.2.1 Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri.....	9
2.2.2 Farmakolojik özellikleri:.....	10
2.3 Askorbik Asit.....	13
2.3.1 Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri.....	13
2.3.2 Farmakolojik Özellikleri:.....	14
2.4 Aspirin .....	15
2.4.1 Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri.....	15
2.4.2 Farmakolojik Özellikleri.....	16
2.5 Parasetamol İçeren Karışımların Analizinde Kullanılan Analitik Yöntemleri .....	18
2.5.1 Parasetamol İçeren Karışımların Analizinde Kullanılan HPLC Yöntemleri.....	18
2.5.2 Parasetamol İçeren Karışımların Analizinde Kullanılan HPLC-MS Yöntemleri..	23
2.5.3 Parasetamol İçeren Karışımların Analizinde Kullanılan Kapiler Elektroforez Yöntemleri.....	29
2.5.4 Parasetamol İçeren Karışımların Analizinde Kullanılan Kemometrik Yöntemler	33
2.5.5 Parasetamol İçeren Karışımların Analizinde Kullanılan Spektrofotometrik Yöntemler.....	38
2.5.6 Parasetamol İçeren Karışımların Analizinde Kullanılan Titrimetrik Yöntemler... 41	

2.6 Kafein İçeren Karışımların Analizinde Kullanılan Analitik Yöntemler.....	42
2.6.1 Kafein İçeren Karışımların Analizinde Kullanılan HPLC Yöntemleri. ....	42
2.6.2 Kafein içeren karışımların Analizinde Kullanılan HPLC-MS Yöntemleri. ....	48
2.6.3 Kafein içeren karışımların Analizinde Kullanılan Kapilarelektroforez Yöntemleri.....	51
2.6.4 Kafein İçeren Karışımların Analizinde Kullanılan Kemometrik Yöntemler.....	55
2.6.5 Kafein İçeren Karışımların Analizinde Kullanılan Spektrofotometrik Yöntemler.	60
2.7 Aspirin İçeren Karışımların Analizinde Kullanılan Analitik Yöntemler.....	64
2.7.1 Aspirin İçeren Karışımların Analizinde Kullanılan HPLC Yöntemleri. ....	64
2.7.2 Aspirin İçeren Karışımların Analizinde Kullanılan HPLC-MS Yöntemleri. ....	69
2.7.3 Aspirin İçeren Karışımların Analizinde Kullanılan Kapilarelektroforez Yöntemleri. ....	73
2.7.4 Aspirin İçeren Karışımların Analizinde Kullanılan Kemometrik Yöntemleri.....	78
2.7.5 Aspirin İçeren Karışımların Analizinde Kullanılan Spektrofotometrik Yöntemler.....	84
<b>3. MATERYAL VE METOT.....</b>	<b>89</b>
3.7 Kromatografik Yöntem.....	89
3.8 Kromatografi'nin Sınıflandırılması .....	89
3.9 Kemometri .....	91
3.9.1 Çok Değişkenli Kalibrasyon Algoritmaları. (Multivariate calibration algorithms)	94
3.9.1.1 Klasik En Küçük Kareler Yöntemi. (Classical Least Squares (K- matris) method).....	94
3.9.1.2 Ters En Küçük Kareler (P-Matris) Yöntemi. ( Inverse Least Squares method). 95	
3.9.2 Temel Bileşen Regresyon Yöntemi (Principal Component Regression, PCR) .....	96
3.9.2.1 Kısmi En Küçük Kareler Yöntemi (Partial Least Squares Regression Method) 98	
3.9.2.2 Kalibrasyon (Konsantrasyon) Setinin Tasarımı.....	100
3.10 Çapraz Validasyon İşlemi (Cross-Validation Procedure).....	101
3.11 Kemometrik Kalibrasyon Yöntemlerinin Uygulamaları .....	102
3.11.1 Kemometrik yöntemlerin uygulama alanları .....	102
3.11.2 Çoklu Bileşen Analizi (Multicomponent Analysis).....	102

3.12 Organik Bileşiklerin Kantitatif Analizi.....	107
3.12.1 Farmasötik Analizdeki Uygulamalar .....	107
3.13 Gereçler.....	107
3.13.1 Kullanılan Cihaz ve Gereçler.....	107
3.13.2 Kullanılan Bilgisayar Yazılımları .....	108
3.13.3 Kullanılan Kimyasal Maddeler .....	108
3.14 Analiz Edilen Bileşiklerin Ticari Preparatları.....	108
3.14.1 AFEBRYL® Efervesan Tablet Smb Technology S.A. Belçika Galepharma:....	108
3.14.2 THOMAPYRİN® Tablet, BOehringer INgelheim Phara GmbH ve Co/ KG: ...	109
3.15 Askorbik Asit Parasetamol ve Aspirin Karışımına ait Ortam şartları.....	109
3.15.1.1 Standart Çözeltiler .....	109
3.15.1.2 UPLC Yönteminde Uygulanan Kromatografik Şartlar .....	109
3.16 Parasetamol, Kafein ve Askorbik Asit Karışımına Ait Ortam Şartları.....	110
3.16.1.1 Standart Çözeltiler .....	110
3.16.1.2 Klasik UPLC Yönteminde Uygulanan Kromatografik Şartlar .....	111
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>112</b>
4.1 Klasik UPLC Yöntemiyle AA, PAR ve ASP Karışımının Analizi .....	113
4.1.1 Klasik UPLC Yöntemi.....	113
4.1.1.1 Klasik UPLC Yönteminde Doğrusal Regresyon Analizi ve Kalibrasyon .....	113
4.1.1.2 Klasik UPLC Yönteminin Validasyonu.....	117
4.1.1.3 Klasik UPLC Yönteminin Farmasötik Preparatlara Uygulaması .....	141
4.1.2 UPLC-Kemometrik Yöntemlerinin AA-PAR-ASP Karışımının Analizine Uygulanması. ....	143
4.1.2.1 UPLC-PCR ve UPLC-PLS Kalibrasyonları .....	144
4.1.2.2 UPLC-PCR Kalibrasyon Denklemleri :.....	147
4.1.2.3 UPLC-PLS Kalibrasyon Denklemleri : .....	147
4.1.2.4 UPLC-PCR ve UPLC-PLS Yöntemlerinin Validasyonu.....	151
4.1.2.5 UPLC-PLS ve UPLC-PCR Yöntemlerinin Farmasötik Preparatlara Uygulanması.....	155
4.2 Klasik UPLC Yöntemiyle PAR, KAF, ASP Karışımının Analizi .....	157
4.2.1 Klasik UPLC Yöntemi.....	157
4.2.1.1 Doğrusal Regresyon Analizi ve Kalibrasyon.....	157

4.2.1.2 Klasik UPLC Yönteminin Validasyonu .....	162
4.2.1.3 Klasik UPLC Yönteminin Farmasötik Preparatlara Uygulaması .....	186
4.2.2 UPLC-Kemometrik Yöntemlerinin PAR-KAF-ASP Karışımının Analizine Uygulanması .....	189
4.2.2.1 UPLC-PCR ve UPLC-PLS Kalibrasyonları .....	189
4.2.2.2 UPLC-PCR Kalibrasyon Denklemleri : .....	192
4.2.2.3 UPLC-PLS Kalibrasyon Denklemleri : .....	192
4.2.2.4 UPLC-PCR ve UPLC-PLS Yöntemlerinin Validasyonu.....	196
4.2.2.5 UPLC-PLS ve UPLC-PCR Yöntemlerinin Farmasötik Preparatlara Uygulanması .....	200
<b>5. TARTIŞMA .....</b>	<b>202</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>216</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>217</b>
<b>EKLER .....</b>	<b>240</b>
<b>EK-1. ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>240</b>
<b>EK-2. ETİK KURUL ONAY FORMU .....</b>	<b>241</b>

## TEŞEKKÜR

Anlayışı, ve hanımefendiliği ile akademik sürecimin ilerlemesinde çok büyük pay sahibi kişilerden olan değerli hocam Erzincan Üniversitesi Eczacılık Fakültesi dekanı Sayın Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU Hanımefendiye, en samimi duygularıyla teşekkürlerimi bildirir saygılarımı sunarım. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Ana bilim dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr Erdal DİNÇ Bey'e akademik eğitimim süresince sağladığı eşsiz katkıdan ve şahsımız ile alakalı olarak gösterdiği fedakarlıktan ötürü ömür boyu sürecek saygı, minnet ve şükranlarımı sunarım.

Annem Dürdane SELİMOĞLU'na ve Babam Necati SELİMOĞLU'na bu süreçte olan cefakârane katkılarından ötürü şükranlarımı sunarım. Yine bu süreçte fedakar katkılarından ötürü Erzurum Atatürk Üniversitesi öğretim Üyelerinden Prof. Dr Sn İsmail CEYLAN Bey'e, Prof.Dr Recep ORBAK Bey'e ve Yard.Doç.Dr Zeynep CEYLAN Hanım'a, teşekkürlerimi sunarım.

Kıymetli Eşim Hatice SELİMOĞLU Hanımefendi'ye ve kızım Zeynep Reyyan'a ve kardeşim Veysel SELİMOĞLU'na bana gösterdiği anlayış ve destekten ötürü en içten sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Arkadaşlarım, Sn Engin DALGIÇ Bey'e, Sn Mehmet Emin EKEMEN Bey'e, Cihangir SÖNMEZ Bey'e, Doç.Dr Sn İlkey ŞİŞMAN Bey'e, Serkan ZOROĞLU Bey'e Fatih Cem OĞUZ Bey'e ve son olarak Emekli Albay Sn Mustafa Musa AKSU Bey'e teşekkürlerimi borç bilirim.

Faysal SELİMOĞLU



## ÖZET

### Parasetamol İçeren Kombine Farmasötik Preparatların UPLC Yöntemi İle Kantitatif Analizi

**Amaç:** Bu doktora tez kapsamında, parasetamol (PAR) içeren, askorbik asit (AA), kafein (KAF) ve aspirin (ASP)'nin de bulunduğu, dörtlü kombine farmasötik preparatların kantitatif analizi için, yeni bir UPLC yönteminin geliştirilip valide edilmesi amaçlanmıştır.

**Materyal ve Metot:** AA-PAR-ASP ve PAR-KAF-ASP karışımlarını içeren kombine farmasötik preparatlarda bu adı geçen maddelerin daha iyi ayrılıp analiz edilebilmeleri için mobil faz sistemi, pH, akış hızı, kolon sıcaklığı gibi UPLC yöntem şartları optimize edildi.

**Bulgular:** Çalışmada, mobil faz olarak asetonilril ve 0.1 M CH<sub>3</sub>COOH (25:75, *h/h*), akış hızı 0.3 ml/dk, kolon sıcaklığı 35 °C ve 245 nm dalga boyu ile 280 nm dalga boyu aralığında  $\Delta\lambda=5\text{nm}$ 'lik intervaller ile alınan 8 farklı dalga boyu çalışma parametreleri kullanılarak farmasötik preparatlar içerisinde aktif bileşenlerin iyi bir ayırımla birlikte analizleri gerçekleştirildi. Belirlenen en optimal kromatografik şartlar altında, klasik UPLC, UPLC-PCR ve UPLC-PLS yöntemleri ile iki ayrı ticari farmasötik preparatın kantitatif analizleri gerçekleştirildi. AA-PAR-ASP ve PAR-KAF-ASP kombinasyonlarını içeren sentetik karışımların gün içi-günler arası analizleri ve standart ekleme teknikleri kullanılarak geliştirilen klasik UPLC, UPLC-PCR ve UPLC-PLS yöntemleri valide edildi.

**Sonuç:** Sonuç olarak klasik UPLC, UPLC-PCR ve UPLC-PLS yöntemleri, AA-PAR-ASP ve PAR-KAF-ASP karışımlarından oluşan iki değişik dozaj formunun eş zamanlı kantitatif analizine başarı ile uygulandı. Geliştirilen klasik UPLC ve UPLC-Kemometrik kalibrasyonlarının örneklerde seçilen aktif bileşenlerin analizi için başarılı bir sonuç verdiği belirlendi.

**Anahtar Kelimeler:** Kantitatif analiz, UPLC yöntemi, Parasetamol-Askorbik asit-Aspirin karışımı; Parasetamol-Kafein-Aspirin karışımı; Farmasötik Preparat, Kemometri, Klasik-UPLC, UPLC-PCR, UPLC-PLS

## ABSTRACT

### Quantitative Analysis of Combined Pharmaceutical Preparations Containin Paracetamol by UPLC Method

**Aim:** In this PhD. thesis, It is aimed to develop and validate a quantitative UPLC method for quaternary combined pharmaceutical preparation including parasetamol (PAR) and also ascorbic acid (AA), cafeine (CAF) and aspirine (ASP)

**Material and Method:** UPLC parameters as mobil phase system, flow rate, Ph and column temperature were optimized in order to seperate and analyze the combined pharmaceutical dosage forms including AA-PAR-ASP and PAR-KAF-ASP mixtures..

**Results:** In the study, active compounds of pharmaceutical preparation were simultaneously analyzed with good separation by using acetonitrile and 0.1 M CH<sub>3</sub>COOH (25:75, v/v) as mobile phase, 0.3 mL/min flow rate, 35 °C column temperature and  $\Delta\lambda=5\text{nm}$  of intervals obtained from 8 different wavelength between 245 - 280 nm. Under the optimum chromatographic conditions, two different commercial pharmaceutical preparations were quantitatively analyzed by classical UPLC, UPLC-PCR and UPLC-PLS methods. Developed classical UPLC, UPLC-PCR and UPLC-PLS methods were validated by using standard addition method and analyzing intra-day and inter-day measurements of synthetic mixtures of AA-PAR-ASP and PAR-KAF-ASP combinations.

**Conclusion:** As a result of these, classical UPLC, UPLC-PCR and UPLC-PLS methods were succesfully applied onto simultaneous determination of two different dosage forms containing AA-PAR-ASP and PAR-KAF-ASP mixture. It is determined that developed classical UPLC and UPLC-Chemometric calibrations succeed in analysis of active compounds of selected samples

**Key Words:** Quantitative Analysis, UPLC method, Paracetamol-Ascorbic acid-Aspirin mixture; Paracetamol-Cafeine-Aspirin mixture; Pharmaceutical Preparation, Chemometry, Classical-UPLC, UPLC-PCR, UPLC-PLS

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b><i>a</i></b>	: Skala Faktörü
<b>ASA</b>	: Asetil Salisilik Asit
<b>ASP</b>	: Aspirin
<b>BH</b>	: % Bağlı Hata
<b>BH</b>	: Bağlı Hata
<b>BSS</b>	: % Bağlı Standart Sapma
<b>BSS</b>	: Bağlı Standart Sapma
<b>CE-MS</b>	: Kapiller Elektroforez- Kütle Spektroskopisi
<b>CLS</b>	: Classical Least Squares
<b>CWT</b>	: Continuous Wavelet Transform
<b>DS<sup>1</sup></b>	: Birinci Türev Spektrofotometri
<b>DWT</b>	: Discrete Wavelet Transform
<b>EMR</b>	: Elektromagnetik Radyasyon
<b>F-hes</b>	: Hesaplanan F Değeri
<b>F-tab</b>	: F-Tablo Değeri
<b>GC-MS</b>	: Gaz Kromatografisi- Kütle Spektroskopisi
<b>GK</b>	: Geri Kazanım
<b>GK</b>	: % Geri Kazanım
<b>HAAR-SDD</b>	: Haar Sürekli Dalgacık Dönüşümü Yöntemi
<b>HCT</b>	: Hidroklorotiazid
<b>HPLC</b>	: High Performance Liquid Chromatography (Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi)
<b>HPLC-MS</b>	: High Performace Liquid Chromatography-Mass Spectromery
<b>HPLC-NMR</b>	: High Performace Liquid Chromatography-Nuclear Magnetic Resonance
<b>ILS</b>	: Inverse Least Squares Method
<b>IR</b>	: İnfrared
<b>IS</b>	: İnternal Standard (İç Standart)
<b>KAF</b>	: Kafein
<b><math>\lambda</math></b>	: Dalga Boyu
<b>LC-MS</b>	: Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektroskopisi
<b>LOD</b>	: Dedeksiyon Limiti (Limit Of Dedection)
<b>LOQ</b>	: Miktar Tayin Alt Limiti (Limit Of Quantification)
<b><math>\mu\text{g}</math></b>	: Mikro Gram
<b>m</b>	: Regresyon Denkleminin Eğimi
<b>mL</b>	: Mili Litre
<b>n</b>	: Regresyon Denkleminin Kesim Noktası
<b>PAR</b>	: Parasetamol
<b>PCR</b>	: Principal Component Regression Method
<b>PDA</b>	: Photodiod Array Dedektör
<b>PLS</b>	: Partial Least Squares Regression Method

<b>PRESS</b>	: Prediction Error Sum Of Squares
<b>r</b>	: Regresyon Denkleminin Korelasyon Katsayısı
<b>SEC</b>	: Kalibrasyon Eğrisi Standart Hata
<b>SEP</b>	: Standart Error of Prediction
<b>SH</b>	: Standart Hata
<b>SS</b>	: Standart Sapma
<b>UPLC</b>	: Ultra Performans Sıvı Kromatografisi (Ultra Performance Liquid Chromatography)
<b>UPLC-PCR</b>	: Ultra Performance Liquid Chromatography-Principal Component Regression Method
<b>UPLC-PLS</b>	: Ultra Performance Liquid Chromatography-Partial Least Squares Regression Method
<b>UV</b>	: Ultra Viyole
<b>UV/ VIS</b>	: Ultra Viyolet/Visible
<b><math>\bar{X}</math></b>	: Aritmetik Ortalama

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1 Parasetamolün açık formülü <sup>5</sup> .....	6
Şekil 2.2 Parasetamolün su içerisindeki absorpsiyon spektrumu .....	7
Şekil 2.3 Kafein'in açık formülü .....	9
Şekil 2.4 Kafeinin su içerisindeki absorpsiyon spektrumu.....	10
Şekil 2.5 Askorbik asit'in açık formülü.....	13
Şekil 2.6 Askorbik asitin asetonitiril içerisindeki absorpsiyon spektrumu .....	14
Şekil 2.7 Aspirin'in açık formülü .....	15
Şekil 2.8 Aspirinin de iyonize su içindeki UV absorpsiyon spektrumu .....	16
Şekil 3.1 UPLC sisteminin basit şeması .....	91
Şekil 3.2 Kemometrinin farklı disiplinler ile ilişkileri .....	93
Şekil 3.3 PLS2 kalibrasyonu .....	99
Şekil 4.1 Derişim set No. 4'e karşılık gelen 20 µg/ml a) Askorbik asit (AA), b) Parasetamol (PAR), c) Aspirin (ASP) bileşikleri ve d) IS Kafein (KAF) için sekiz farklı dalga boyunda dedeksiyon ile kaydedilen kromatogramları...	113
Şekil 4.2 Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniği ile uygulanmasında AA/IS karşı konsantrasyon grafiği ( $\lambda_{245} \rightarrow C_{AA} = 5.75 \mu\text{g/ml}$ ) .....	129
Şekil 4.3 Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniği ile uygulanmasında AA/IS karşı konsantrasyon grafiği ( $\lambda_{250} \rightarrow C_{AA} = 6.29 \mu\text{g/ml}$ ) .....	129
Şekil 4.4 Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniği ile uygulanmasında AA/IS karşı konsantrasyon grafiği ( $\lambda_{255} \rightarrow C_{AA} = -6.25 \mu\text{g/ml}$ ).....	130
Şekil 4.5 Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniği ile uygulanmasında AA/IS karşı konsantrasyon grafiği ( $\lambda_{260} \rightarrow C_{AA} = -5.72 \mu\text{g/ml}$ ).....	130

<b>Şekil 4.6</b> Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniği ile uygulanmasında AA/IS karşı konsantrasyon grafiği ( $\lambda_{265} \rightarrow C_{AA} = 5.76 \mu\text{g/ml}$ ) .....	131
<b>Şekil 4.7</b> Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniği ile uygulanmasında AA/IS karşı konsantrasyon grafiği ( $\lambda_{270} \rightarrow C_{AA} = 6.00 \mu\text{g/ml}$ ) .....	131
<b>Şekil 4.8</b> Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniği ile uygulanmasında AA/IS karşı konsantrasyon grafiği ( $\lambda_{275} \rightarrow C_{AA} = 5.70 \mu\text{g/ml}$ ) .....	132
<b>Şekil 4.9</b> Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniği ile uygulanmasında AA/IS karşı konsantrasyon grafiği ( $\lambda_{280} \rightarrow C_{AA} = 5.72 \mu\text{g/ml}$ ) .....	132
<b>Şekil 4.10</b> Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniği ile uygulanmasında PAR/IS karşı konsantrasyon grafiği ( $\lambda_{245} \rightarrow C_{PAR} = -4.034 \mu\text{g/ml}$ ) .....	133
<b>Şekil 4.11</b> Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniği ile uygulanmasında PAR/IS karşı konsantrasyon grafiği ( $\lambda_{250} \rightarrow C_{PAR} = -4.15 \mu\text{g/ml}$ ) .....	133
<b>Şekil 4.12</b> Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniği ile uygulanmasında PAR/IS karşı konsantrasyon grafiği ( $\lambda_{255} \rightarrow C_{PAR} = -4.20 \mu\text{g/ml}$ ) .....	134
<b>Şekil 4.13</b> Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniği ile uygulanmasında PAR/IS karşı konsantrasyon grafiği ( $\lambda_{260} \rightarrow C_{PAR} = -4.23 \mu\text{g/ml}$ ) .....	134
<b>Şekil 4.14</b> Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniği ile uygulanmasında PAR/IS karşı konsantrasyon grafiği ( $\lambda_{265} \rightarrow C_{PAR} = -4.18 \mu\text{g/ml}$ ) .....	135
<b>Şekil 4.15</b> Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniği ile uygulanmasında PAR/IS karşı konsantrasyon grafiği ( $\lambda_{270} \rightarrow C_{PAR} = -4.04 \mu\text{g/ml}$ ) .....	135
<b>Şekil 4.16</b> Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniği ile uygulanmasında PAR/IS karşı konsantrasyon grafiği ( $\lambda_{275} \rightarrow C_{PAR} = -3.86 \mu\text{g/ml}$ ) .....	136
<b>Şekil 4.17</b> Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniği ile uygulanmasında PAR/IS karşı konsantrasyon grafiği ( $\lambda_{280} \rightarrow C_{PAR} = -4.10 \mu\text{g/ml}$ ) .....	136

<b>Şekil 4.18</b> Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniği ile uygulanmasında ASP/IS karşı konsantrasyon grafiği ( $\lambda_{245} \rightarrow C_{ASP} = -6.28 \mu\text{g/ml}$ ).....	137
<b>Şekil 4.19</b> Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniği ile uygulanmasında ASP/IS karşı konsantrasyon grafiği ( $\lambda_{250} \rightarrow C_{ASP} = -6.28 \mu\text{g/ml}$ ).....	137
<b>Şekil 4.20</b> Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniği ile uygulanmasında ASP/IS karşı konsantrasyon grafiği ( $\lambda_{255} \rightarrow C_{ASP} = -6.27 \mu\text{g/ml}$ ) .....	138
<b>Şekil 4.21</b> Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniği ile uygulanmasında ASP/IS karşı konsantrasyon grafiği ( $\lambda_{260} \rightarrow C_{ASP} = -6.23 \mu\text{g/ml}$ ).....	138
<b>Şekil 4.22</b> Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniği ile uygulanmasında ASP/IS karşı konsantrasyon grafiği ( $\lambda_{265} \rightarrow C_{ASP} = -6.26 \mu\text{g/ml}$ ) .....	139
<b>Şekil 4.23</b> Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniği ile uygulanmasında ASP/IS karşı konsantrasyon grafiği ( $\lambda_{270} \rightarrow C_{ASP} = -6.27 \mu\text{g/ml}$ ) .....	139
<b>Şekil 4.24</b> Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniği ile uygulanmasında ASP/IS karşı konsantrasyon grafiği ( $\lambda_{275} \rightarrow C_{ASP} = -6.22 \mu\text{g/ml}$ ) .....	140
<b>Şekil 4.25</b> Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniği ile uygulanmasında ASP/IS karşı konsantrasyon grafiği ( $\lambda_{280} \rightarrow C_{ASP} = -5.85 \mu\text{g/ml}$ ) .....	140
<b>Şekil 4.26</b> Klasik UPLC yönteminin farmasötik preparatlara uygulanmasıyla kalibrasyon basamağında elde edilen UPLC kromatogramları. ....	141
<b>Şekil 4.27</b> 20 $\mu\text{g/ml}$ AA, PAR, ASP bileşikleri ile IS KAF için çoklu kromatogram .	145
<b>Şekil 4.28</b> AA İçin UPLC-PLS Kalibrasyonu İçin Faktör Seçim Eğrisi.....	148
<b>Şekil 4.29</b> AA İçin UPLC-PCR Kalibrasyonu İçin Faktör Seçim Eğrisi .....	148
<b>Şekil 4.30</b> PAR İçin UPLC-PLS Kalibrasyonu İçin Faktör Seçim Eğrisi.....	149
<b>Şekil 4.31</b> PAR İçin UPLC-PCR Kalibrasyonu İçin Faktör Seçim Eğrisi .....	149
<b>Şekil 4.32</b> ASP İçin UPLC-PLS Kalibrasyonu İçin Faktör Seçim Eğrisi .....	150
<b>Şekil 4.33</b> ASP İçin UPLC-PCR Kalibrasyonu İçin Faktör Seçim Eğrisi.....	150

- Şekil 4.34** Kalibrasyon basamağındaki tablet çözeltilerinin kromatografik UPLC şartlarda 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275 ve 280 nm dalga boylarındaki dedeksiyon ile elde edilen kromatogramları..... 155
- Şekil 4.35** Derişim set No. 4'e karşılık gelen 20 µg/ml a) Parasetamol (PAR), b) Kafein (KAF) c) Aspirin bileşikleri (ASP) ve d) IS Askorbik asit (AA) için sekiz farklı dalga boyunda dedeksiyon ile kaydedilen kromatogramların dizisi 158
- Şekil 4.36** Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniğı ile uygulanmasında PAR/IS karşı konsantrasyon grafiğı (  $\lambda_{245} \rightarrow C_{PAR} = 4.13 \mu\text{g/ml}$  ) ..... 174
- Şekil 4.37** Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniğı ile uygulanmasında PAR/IS karşı konsantrasyon grafiğı (  $\lambda_{250} \rightarrow C_{PAR} = 4.17 \mu\text{g/ml}$  ) ..... 174
- Şekil 4.38** Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniğı ile uygulanmasında PAR/IS karşı konsantrasyon grafiğı (  $\lambda_{255} \rightarrow C_{PAR} = 3.88 \mu\text{g/ml}$  ) ..... 175
- Şekil 4.39** Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniğı ile uygulanmasında PAR/IS karşı konsantrasyon grafiğı (  $\lambda_{260} \rightarrow C_{PAR} = 3.97 \mu\text{g/ml}$  )..... 175
- Şekil 4.40** Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniğı ile uygulanmasında PAR/IS karşı konsantrasyon grafiğı (  $\lambda_{265} \rightarrow C_{PAR} = 4.14 \mu\text{g/ml}$  ) ..... 176
- Şekil 4.41** Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniğı ile uygulanmasında PAR/IS karşı konsantrasyon grafiğı (  $\lambda_{270} \rightarrow C_{PAR} = 4.06 \mu\text{g/ml}$  )..... 176
- Şekil 4.42** Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniğı ile uygulanmasında PAR/IS karşı konsantrasyon grafiğı (  $\lambda_{275} \rightarrow C_{PAR} = 4.05 \mu\text{g/ml}$  ) ..... 177
- Şekil 4.43** Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniğı ile uygulanmasında PAR/IS karşı konsantrasyon grafiğı (  $\lambda_{280} \rightarrow C_{PAR} = 4.02 \mu\text{g/ml}$  ) ..... 177
- Şekil 4.44** Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniğı ile uygulanmasında KAF/IS karşı konsantrasyon grafiğı (  $\lambda_{245} \rightarrow C_{KAF} = 1.0 \mu\text{g/ml}$  ) ..... 178



<b>Şekil 4.45</b> Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniği ile uygulanmasında KAF/IS karşı konsantrasyon grafiği ( $\lambda_{250} \rightarrow C_{KAF} = 0.96 \mu\text{g/ml}$ ).....	178
<b>Şekil 4.46</b> Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniği ile uygulanmasında KAF/IS karşı konsantrasyon grafiği ( $\lambda_{255} \rightarrow C_{KAF} = 1.05 \mu\text{g/ml}$ ).....	179
<b>Şekil 4.47</b> Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniği ile uygulanmasında KAF/IS karşı konsantrasyon grafiği ( $\lambda_{260} \rightarrow C_{KAF} = 0.95 \mu\text{g/ml}$ ).....	179
<b>Şekil 4.48</b> Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniği ile uygulanmasında KAF/IS karşı konsantrasyon grafiği ( $\lambda_{265} \rightarrow C_{KAF} = 0.99 \mu\text{g/ml}$ ).....	180
<b>Şekil 4.49</b> Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniği ile uygulanmasında KAF/IS karşı konsantrasyon grafiği ( $\lambda_{270} \rightarrow C_{KAF} = 0.96 \mu\text{g/ml}$ ).....	180
<b>Şekil 4.50</b> Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniği ile uygulanmasında KAF/IS karşı konsantrasyon grafiği ( $\lambda_{275} \rightarrow C_{KAF} = 0.97 \mu\text{g/ml}$ ).....	181
<b>Şekil 4.51</b> Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniği ile uygulanmasında KAF/IS karşı konsantrasyon grafiği ( $\lambda_{280} \rightarrow C_{KAF} = 0.99 \mu\text{g/ml}$ ).....	181
<b>Şekil 4.52</b> Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniği ile uygulanmasında ASP/IS karşı konsantrasyon grafiği ( $\lambda_{245} \rightarrow C_{ASP} = 5.25 \mu\text{g/ml}$ ).....	182
<b>Şekil 4.53</b> Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniği ile uygulanmasında ASP/IS karşı konsantrasyon grafiği ( $\lambda_{250} \rightarrow C_{ASP} = 5.22 \mu\text{g/ml}$ ).....	182
<b>Şekil 4.54</b> Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniği ile uygulanmasında ASP/IS karşı konsantrasyon grafiği ( $\lambda_{255} \rightarrow C_{ASP} = 2.24 \mu\text{g/ml}$ ).....	183
<b>Şekil 4.55</b> Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniği ile uygulanmasında ASP/IS karşı konsantrasyon grafiği ( $\lambda_{260} \rightarrow C_{ASP} = 4.91 \mu\text{g/ml}$ ).....	183
<b>Şekil 4.56</b> Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniği ile uygulanmasında ASP/IS karşı konsantrasyon grafiği ( $\lambda_{265} \rightarrow C_{ASP} = 5.19 \mu\text{g/ml}$ ) .....	184

<b>Şekil 4.57</b> Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniği ile uygulanmasında ASP/IS karşı konsantrasyon grafiği ( $\lambda_{270} \rightarrow C_{ASP} = 5.22 \mu\text{g/ml}$ ) .....	184
<b>Şekil 4.58</b> Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniği ile uygulanmasında ASP/IS karşı konsantrasyon grafiği ( $\lambda_{275} \rightarrow C_{ASP} = 4.92 \mu\text{g/ml}$ ) .....	185
<b>Şekil 4.59</b> Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniği ile uygulanmasında ASP/IS karşı konsantrasyon grafiği ( $\lambda_{280} \rightarrow C_{ASP} = 5.27 \mu\text{g/ml}$ ) .....	185
<b>Şekil 4.60</b> Klasik UPLC yönteminin farmasötik preparatlara uygulanmasında, bir tablete karşılık gelen kalibrasyon basamağındaki kromatografik UPLC şartlarına ait kromatogram dizisi.....	187
<b>Şekil 4.61</b> 20 $\mu\text{g/ml}$ a)AA, b) PAR, c)ASP bileşikleri ile d) IS için çoklu üç boyutlu kromatogram .....	190
<b>Şekil 4.62</b> PAR İçin UPLC-PLS Kalibrasyonu İçin Faktör Seçim Eğrisi.....	193
<b>Şekil 4.63</b> ASP İçin UPLC-PCR Kalibrasyonu İçin Faktör Seçim Eğrisi.....	193
<b>Şekil 4.64</b> CAF İçin UPLC-PCR Kalibrasyonu İçin Faktör Seçim Eğrisi .....	194
<b>Şekil 4.65</b> CAF İçin UPLC-PCR Kalibrasyonu İçin Faktör Seçim Eğrisi .....	194
<b>Şekil 4.66</b> ASP İçin UPLC-PCR Kalibrasyonu İçin Faktör Seçim Eğrisi.....	195
<b>Şekil 4.67</b> ASP İçin UPLC-PLS Kalibrasyonu İçin Faktör Seçim Eğrisi .....	195
<b>Şekil 4.68</b> Kalibrasyon basamağındaki tablet çözeltilerinin kromatografik UPLC şartlarda 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275 ve 280 nm dalga boylarındaki kromatogram serileri.....	200

## TABLULAR DİZİNİ

<u>Tablo No</u>	<u>Sayfa No</u>
<b>Tablo 4.1</b> Konsantrasyon seti ve ilaç ile IS pik alanlarına karşılık gelen kromatografik data seti.....	115
<b>Tablo 4.2</b> Doğrusal regresyon analizi ve istatistiksel sonuçlar .....	116
<b>Tablo 4.3</b> Klasik UPLC yönteminin AA, PAR ve ASP yapay karışımının analizinde AA için elde edilen % geri kazanım sonuçları .....	118
<b>Tablo 4.4</b> Klasik UPLC yönteminin AA, PAR ve ASP yapay karışımının analizinde PAR için elde edilen % geri kazanım sonuçları.....	119
<b>Tablo 4.5</b> Klasik UPLC yönteminin AA, PAR ve ASP yapay karışımının analizinde ASP için elde edilen % geri kazanım sonuçları .....	120
<b>Tablo 4.6</b> Klasik UPLC yönteminin uygulanmasına AA için gün içi analiz sonuçları	122
<b>Tablo 4.7</b> Klasik UPLC yönteminin uygulanmasına PAR için gün içi analiz sonuçları .....	123
<b>Tablo 4.8</b> Klasik UPLC yönteminin uygulanmasına ASP için gün için analiz sonuçları.....	124
<b>Tablo 4.9</b> Klasik UPLC yönteminin uygulanmasına AA için günler arası analiz sonuçları .....	125
<b>Tablo 4.10</b> Klasik UPLC yönteminin uygulanmasına PAR için günler arası analiz sonuçları.....	126
<b>Tablo 4.11</b> Klasik UPLC yönteminin uygulanmasına ASP için günler arası analiz sonuçları.....	127
<b>Tablo 4.12</b> Tabletlerin içerisinde hesaplanan AA, PAR ve ASP miktarları .....	142
<b>Tablo 4.13</b> Derişim Seti ve Kromatografik Analit/IS Oranlarına Karşılık Gelen Veriler.....	146

<b>Tablo 4.14</b> UPLC-PLS ve UPLC-PCR kalibrasyon yöntemlerinin karışım analizine uygulanmasıyla elde edilen geri kazanım sonuçları .....	152
<b>Tablo 4.15</b> UPLC-PLS ve UPLC-PCR Yöntemiyle Gün İçi Kesinlik ve Doğruluk İçin Analiz Sonuçları.....	153
<b>Tablo 4.16</b> UPLC-PLS ve UPLC-PCR Yöntemiyle Günler Arası Kesinlik ve Doğruluk İçin Analiz Sonuçları .....	154
<b>Tablo 4.17</b> UPLC-PLS ve UPCR Yöntemlerinden elde edilen miktar tayini sonuçları.....	156
<b>Tablo 4.18</b> Konsantrasyon seti ve ilaç ile IS pik alanlarına karşılık gelen kromatografik data seti .....	160
<b>Tablo 4.19</b> Doğrusal regresyon analizi ve istatistiksel sonuçları .....	161
<b>Tablo 4.20</b> Klasik UPLC yönteminin PAR,CAF ve ASP yapay karışımının analizinde PAR için elde edilen % geri kazanım sonuçları ....	163
<b>Tablo 4.21</b> Klasik UPLC yönteminin PAR,KAF ve ASP yapay karışımının analizinde KAF için elde edilen % geri kazanım sonuçları .....	164
<b>Tablo 4.22</b> Klasik UPLC yönteminin PAR,KAF ve ASP yapay karışımının analizinde ASP için elde edilen % geri kazanım sonuçları.....	165
<b>Tablo 4.23</b> Klasik UPLC yönteminin uygulanmasına PAR için gün içi analiz sonuçları.....	167
<b>Tablo 4.24</b> Klasik UPLC yönteminin uygulanmasına KAF için gün içi analiz sonuçları .....	168
<b>Tablo 4.25</b> Klasik UPLC yönteminin uygulanmasına ASP için gün içi analiz sonuçları .....	169
<b>Tablo 4.26</b> Klasik UPLC yönteminin uygulanmasına PAR için günler arası analiz sonuçları.....	170

<b>Tablo 4.27</b> Klasik UPLC yönteminin uygulanmasına KAF için günler arası analiz sonuçları .....	171
<b>Tablo 4.28</b> Klasik UPLC yönteminin uygulanmasına ASP için günler arası analiz sonuçları .....	172
<b>Tablo 4.29</b> Tabletlerin içerisinde hesaplanan PAR, KAF ve ASP miktarları .....	188
<b>Tablo 4.30</b> Derişim Seti ve Kromatografik Analit/IS Oranlarına Karşılık Gelen Veriler.....	191
<b>Tablo 4.31</b> UPLC-PLS ve UPLC-PCR kalibrasyon yöntemlerinin karışım analizine uygulanmasıyla elde edilen geri kazanım sonuçları .....	197
<b>Tablo 4.32</b> UPLC-PLS ve UPLC-PCR Yöntemiyle Gün İçi Kesinlik ve Doğruluk İçin Analiz Sonuçları.....	198
<b>Tablo 4.33</b> UPLC-PLS ve UPLC-PCR Yöntemiyle Günler Arası Kesinlik ve Doğruluk İçin Analiz Sonuçları .....	199
<b>Tablo 4.34</b> UPLC-PLS ve UPCR Yöntemlerinin Ticari Farmasötik Preparatlara Uygulanmasıyla Elde Edilen Miktar Tayini Sonuçları .....	201
<b>Tablo 5.1</b> AA için kalibrasyon grafikleri ile standart ekleme grafiklerinin eğimlerine karşılaştırmalı tablo.....	206
<b>Tablo 5.2</b> PAR için kalibrasyon grafikleri ile standart ekleme grafiklerinin eğimlerine karşılaştırmalı tablo.....	206
<b>Tablo 5.3</b> ASP için kalibrasyon grafikleri ile standart ekleme grafiklerinin eğimlerine karşılaştırmalı tablo.....	206
<b>Tablo 5.4</b> PAR için kalibrasyon grafikleri ile standart ekleme grafiklerinin eğimlerine karşılaştırmalı tablo.....	211
<b>Tablo 5.5</b> KAF için kalibrasyon grafikleri ile standart ekleme grafiklerinin eğimlerine karşılaştırmalı tablo.....	211

<b>Tablo 5.6</b> ASP için kalibrasyon grafikleri ile standart ekleme grafiklerinin eğimlerine karşılaştırmalı tablo.....	212
<b>Tablo 5.7</b> Askorbik asit, parasetamol ve aspirin analizleri için geliştirilen yöntemler ile literatür yöntemlerinin karşılaştırılmasına ait sonuçlar .....	214
<b>Tablo 5.8</b> Parasetamol, kafein ve aspirin analizleri için geliştirilen yöntemler ile literatür yöntemlerinin karşılaştırılmasına ait sonuçlar .....	214
<b>Tablo 5.9</b> Tablet içesirindeki (Thomapryn) parasetamol, kafein ve aspirin'in analizinden elde edilen sonuçlar ile literatür sonuçlarının karşılaştırılmasına ait sonuçlar .....	215

# 1. GİRİŞ

Günümüzde artan dünya nüfusu ile birlikte, aşırı sanayileşme ve tüketimin sonuçları olarak hiper çevre kirliliği, gıda tüketimi, çeşidi değişen ve tedavisi güç olan hastalık türlerini ortaya koymaktadır. Bu bağlamda çeşidi değişen hastalıkların tedavisinde kullanılan tek aktif bileşenli preparatlara insanların bağışıklık kazanması nedeniyle, ilaçların farmakolojik etkinliğinin azalması dolayısıyla iki veya daha fazla etkin madde içeren kombine preparatlar, daha düşük yan etki ve yüksek farmakolojik aktivite sağlamak amacıyla dünya ve Türkiye ilaç piyasasında tek etkin madde içeren farmasötik preparatların yerine üretilmektedir.

İlaç piyasasında kombine preparatların artışına paralel olarak bu farmasötik ticari ürünlerin kalite kontrol ve rutin analizleride zorlaşmaktadır. İlaç endüstrisi ve araştırmalarda (klinik araştırmalar vb) kombine preparatların analizi için klasik popüler teknik olan yüksek performanslı sıvı kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) kullanılmaktadır. Çoğu zaman kombine preparatlardaki aktif bileşiklerin yakın kimyasal ve fiziksel özelliğe sahip olmaları ile birlikte yardımcı maddelerin girişimleri nedeniyle istenen kromatografik ayrımları ya yapılamamakta yada gereğinden fazla analiz süresi ve reaktif tüketiminin sonucunda ayırım gerçekleştirilmektedir ki bu analizin maliyetini arttırmaktadır.

Son zamanlarda mikro işlemci ve bilgisayar yazılımlarının gelişimi ile birlikte kolon teknolojisindeki gelişmeler iki veya daha fazla aktif madde içeren farmasötik preparatların kalite kontrol ve rutin analiz işlemlerinde, daha az analiz süresine ihtiyaç duyan ve yüksek ayırma gücüne sahip kromatografik tekniklerin geliştirilmesine yol açmıştır. Bu çerçevede analitik cihaz üreten bir çok firma aşırı yüksek performanslı sıvı kromatografisi cihazlarını bileşenleri ile birlikte piyasaya sürmüşlerdir.

Şimdilerde ise kompleks analitik problemlerin çözümünde aşırı yüksek performanslı sıvı kromatografi (Ultra High Performance Liquid Chromatography→UHPLC yada Ultra Performance Liquid Chromatography →UPLC) adı verilen yöntem uygulanmaktadır. UPLC teknolojisinde 1000 Bar'ın üzerinde basınç üretebilen pompa sistemleri, amaca göre en küçük 5 cm uzunluğunda, normal kolonlara göre daha küçük çaplı ve daha küçük tanecik boyutuna sahip kolonlar kullanılmaktadır. Bu yeni UPLC yöntemi ilaç analizi ve klinik çalışmalardan çevre analizlerine kadar bir çok alanda yüksek ayırma gücü ve hızlı analiz sağlaması nedeniyle artan bir kullanım trendine girmiştir. Dolayısıyla başta akademik çalışmalarda, ilaç araştırma ve geliştirme laboratuvarları olmak üzere araştırmacılar yardımcı maddelerin etkisinin olduğu kompleks kombine farmasötik preparatların analizi için bu yeni UPLC tekniğini avantajları nedeni ile klasik HPLC yerine kullanmayı tercih etmektedirler. Bilindiği gibi klasik HPLC yönteminin uygulamalarında analiz edilen bileşiklerin elektronik geçişleri sağlayacak kromofor gruplarının, elektrokimyasal olarak indirgenebilen veya yükseltgenebilen fonksiyonel gruplarının ve floresans-fosforesans özelliği taşıyan yapılarının varlığına göre ultraviyole (UV) veya photodiod array dedektör (PDA), elektrokimyasal ve floresans dedektörler kullanılmaktadır. Aynı şekilde yüksek ayırma ve kısa analiz süresi gibi avantajlara sahip UPLC uygulamalarında da benzer dedektör sistemleri kullanılabilir. İhtiyaç duyulması halinde, numune matriksinin analiz üzerine etki ettiği ve girişimin olduğu kompleks karışımların analizinde çizgili teknikler (Hyphanted Techniques) olarak adlandırılan yüksek performanslı sıvı kromatografisi-kütle spektrometri (High Performace Liquid Chromatography-Mass spectrometry→HPLC-MS), Yüksek performanslı sıvı kromatografisi-Nüleer magnetik rezonans (High Performace Liquid Chromatography-Nuclear Magnetic Resonance→HPLC-NMR) gibi kombine teknikler analiz işlemlerinde kullanılmaktadır.



Benzer şekilde klasik HPLC'den daha etkin ve düşük analiz maliyeti gibi avantaja sahip UPLC tekniğinde ihtiyaç halinde UPLC-MS ve UPLC-NMR gibi kombine yöntemler halinde analiz işlemlerindeki uygulamaları literatürlerde ortaya konmaktadır. Açıkça ifade etmek gerekirse analiz işlemlerinde düşük analiz maliyeti ile birlikte hızlı, kolay, duyarlı, seçici, güvenilir ve kolay uygulanabilir bir analitik yöntemin geliştirilmesi ve uygulanması analitik kimyanın temel problemidir. Bu kapsamda klasik HPLC analiz işlemlerindeki dezavantajlarını elimine etmek ve yukarıda sayılan analitik problemlerin çözümü için son derece uygun yöntemlerden birisinin UPLC yönteminin olduğu son uygulamalar ile açıkça ortaya konmaktadır. Dolayısıyla "Parasetamol İçeren Kombine Farmasötik Preparatların UPLC Yöntemi İle Kantitatif Analizi" başlıklı çalışmamızda analiz işlemlerinde UPLC yönteminin kullanımını amaç edinmiştir.

Kromatografik analiz işlemlerinde özellikle UV yada PDA dedektör sisteminin kullanımı sırasında birden fazla etkin madde içeren farmasötik ticari preparatların analizinde bütün bileşikler için tek bir dalga boyunda kromatografik analizini yapmak bir çok dezavantajı beraberinde getirmektedir. Bu problemi aşabilmek için her bir bileşiğin analizi için uygun bir dalga boyu seçmek gerekir yada dalga boylarının set içerisinde bütün kromatogramlara ait kromatografik alanların kullanıldığı kromatografi-kemometri kalibrasyon teknikleri kullanmak gerekir.

Türkiye ilaç piyasasında parasetamol ve parasetamol ile diğer aktif bileşikleri, birlikte içeren çok sayıda ticari farmasötik preparat bulunmaktadır. Bu ticari preparatların tablet, efervesan tablet, şurup ve poşet granül şekillerinde ticari formları ilaç piyasasında hastaların tedavisi için piyasaya sürülmüştür. Bilindiği gibi kombine preparatların kalite kontrol ve rutin analizleri ilaç endüstrisi ve araştırmalar açısından önemlidir.

Kombine farmasötik preparatların sabit tablet yardımcı maddeleri ile birlikte iki veya daha fazla bileşik içermesi durumudna bileşiklerin girişim yapan spektrumlar vermesi, kromatografik bir yöntemin kullanımını zorunlu hale getirmektedir. Oysa pahalı komponentler içeren kromatografik yöntemlerde, analiz edilen bileşiklerin yakın fiziksel ve kimyasal özellikleri nedeniyle ayırma işlemi, şartların optimizasyonu gibi zaman alıcı ve bıktırıcı işlemler gerektirebilir. Ayrıca parasetamol içeren kombine preparatların analizi için önerilen klasik HPLC yöntemleri, uzun analiz süreleri ve geleneksel işlemler içermesi nedeniyle yeni, hızlı, kolay, ucuz ve güvenilir kromatografik yöntemlerin geliştirilmesi gerekliliği doğmaktadır.

Bu doktora tezi kapsamında, parasetamol içeren AA-PAR-ASP ve PAR-KAF-ASP gibi kombine farmasötik preparatlardaki etkin maddelerin miktar tayinlerine, ticari farmasötik preparatların kalite kontrol çalışmalarına ve rutin analizlerine yönelik yeni kromatografik (UPLC) ve kromatografik-kemometrik (UPLC-Kemometrik) kombine yöntemlerin geliştirilmesi ve valide edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaca ulaşabilmek için parasetamol içeren kombine farmasötik preparatlardaki aktif bileşiklerin optimal kromatografik ayırımı ve tayini için mümkün olan kısa analiz sürelerindeki en iyi kromatografik tayin şartlarının araştırılması yapıldı. Optimal kromatografik şartların belirlenmesinden ve validasyonu işlemlerinden sonra farmasötik preparatlarda miktar tayinleri yapılarak geliştirilen klasik UPLC ve UPLC-Kemometrik kalibrasyon yöntemlerinin uygulanabilirliği gösterildi.

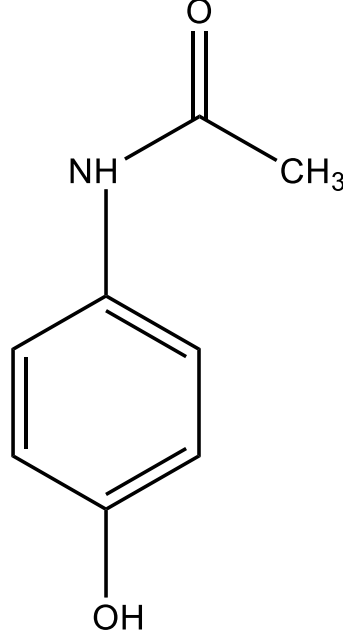
Bu doktora tez çalışması kapsamında, klasik UPLC yöntemiyle AA-PAR-ASP ve PAR- KAF- ASP kombinasyonları için 8 farklı dalga boyunda (245, 250, 255, 260, 265, 270, 275 ve 280 nm) tek dalga boyundaki ölçümlere dayanan kalibrasyonlar ile aktif bileşiklerin miktarları tayin edildi.

UPLC-Kemometrik kalibrasyonların uygulamalarında ise PCR ve PLS algoritmaları doğrudan 8 dalga boyunda elde edilen kromatografik alan verilerine uygulanarak UPLC-PCR ve UPLC-PLS kalibrasyonları elde edildi ve validasyonları gerçekleştirildi. Tez kapsamında geliştirilen yeni analitik yöntemlerin hızlı, kolay, hassas, güvenilir ve ucuz olmaları, parasetamol içeren preparatların analizinde ilaç endüstrisi analiz laboratuvarlarında ve AR-GE çalışmalarında tercih edilerek yaygın bir şekilde kullanılabilceği sonucuna varılmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 Parasetamol

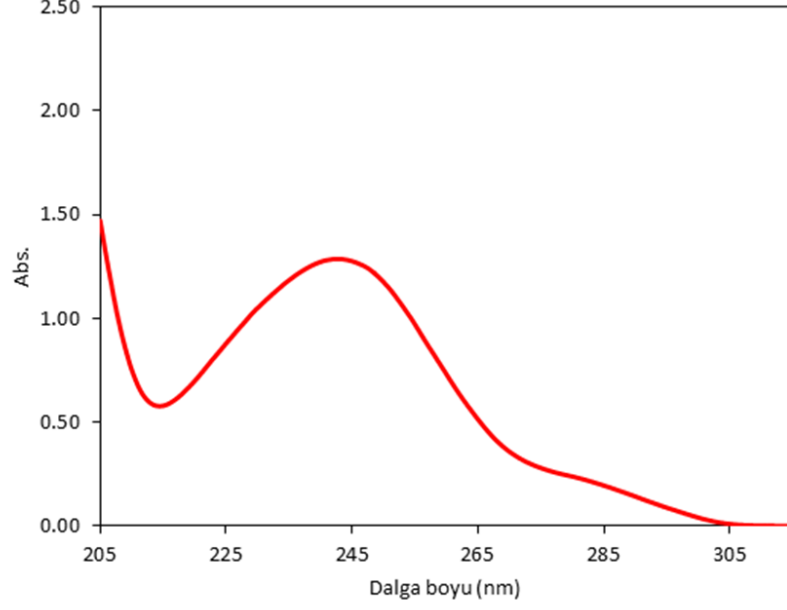
#### 2.1.1 Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri



Şekil 2.1 Parasetamolün kimyasal formülü<sup>1</sup>

- **Molekül Formülü:** C<sub>8</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>2</sub>
- **Molekül ağırlığı:** 151,17 g/mol
- **Açık formülü:** N-(4hikroksifenil)etanamid, ya da asetaminofen
- **Erime Noktası:** 169 °C
- **Kaynama Noktası<sup>2</sup>:** 500 °C
- **Yoğunluğu:** 1.263 gr/cm<sup>3</sup>

Parasetamol, beyaz, kokusuz, kristalize bir tozdur. Acı bir tadı vardır. Suda sınırlı ölçüde çözünür; 1 kısım asetaminofen 20 kısım kaynar su,10 kısım alkol,13 kısım aseton, 40 kısım gliserol, 9 kısım propilen glikol, 50 kısım kloroform ve 10 kısım metilalkolde çözünür<sup>3</sup>. Eter ve metilen klorürdeki çözünürlüğü çok azdır. Benzende çözünmez. Doymuş sulu çözeltisi kararlı yapıdadır ama kararlılığı asit şartlarında azalır.<sup>3</sup>



**Şekil 2.2** Parasetamolün su içerisindeki absorpsiyon spektrumu

### 2.1.2 Farmakolojik Özellikleri:

Parasetamol (N-asetil-p-aminofenol veya p-asetaminofenol) non-steroidal anti-inflamatuar bir ilaçtır. Ağrı eşiğini yükseltmek yoluyla analjezik, hipotalamustaki termoregulasyon merkezi üzerindeki etkisi yolu ile de antipatik bir etki gösterir.<sup>4</sup> Yaygın bir şekilde ağrı kesici ve ateş düşürücü olarak kullanılan Parasetamol uygun olmayan saklama koşullarında 4-aminofenol ve asetik aside dönüşmektedir.<sup>4</sup> 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 dak içinde maksimuma erişir. Absorpsiyonu besinler tarafından azaltılır. İlk dozdan sonra analjezik etkisi 3-4 saat kadar devam eder.

Parasetamolun büyük kısmı karaciğerde glukuronik asitle ve sulfatla konjuge edilir ve böbreklerden bu şekilde ıtrah edilir. Mutat dozda eliminasyon yarılanma ömrü 2.4 saattir, non-lineer eliminasyon kinetiği göstermesi nedeniyle aşırı dozda 7.3 saate kadar çıkabilir.<sup>5</sup>

Parasetamolun solunum, kardiyovaskuler sistem ve asit-baz dengesi üzerinde belirgin bir etkisi yoktur. Midede irritasyon yapmaz. Protrombin sentezini pek etkilemez. Plazma proteinlerine fazla başlanmaz. Aspirinin aksine oral antikoagulanlarla belirgin bir etkileme göstermez.

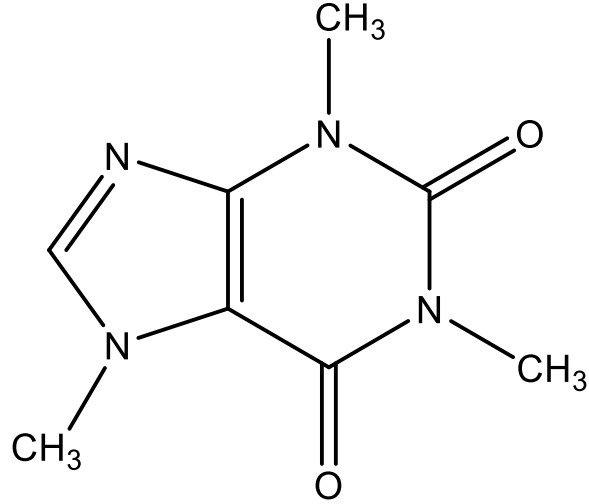
Aspirinden farklı olarak ürik asit ıtrahını etkilemez ve urikozurik ilaçların etkinliğini azaltmaz. Parasetamolu sıvı farmasötik şekiller içinde vermek mümkündür. Bundan dolayı, parasetamol özellikle bebek ve çocuklar için hazırlanan eliksir, suspansiyon vb. şekillerdeki sıvı analjezik etkili müstahzarların yapımında kullanılır.

Parasetamol oral yoldan 500-1000 mg dozda verilir. Gerekirse bu doz 4-6 saatte bir tekrarlanır. Günlük maksimum dozu genellikle 4 g olarak kabul edilir. Bazı kaynaklarda 3 g hatta 2.6 g olarak belirtilmiştir. Böbrek yetmezliği olanlarda ve alkoliklerde bu doz azaltılmalıdır. Yukarıda belirtilen dozda 5-10 günden fazla kullanılması tavsiye edilmez.

Çocuklarda, hepatoksisite potansiyeli daha düşük olduğu için kg başına verilen doz daha yüksektir; bir defada 10 mg/kg dozunda verilir 6-12 yaşlar arasında bir defalık dozun 20-30 mg/kg çıkartılabileceği bildirilmiştir<sup>6</sup>. Parasetamol, yemek arasında veya yemekten sonra alınırsa, biyoyararlanım belirgin şekilde azalır; onun için aç karnına alınması tercih edilir. Parasetamol oral dozuna eşit dozlarda rektal yoldan da verilebilir.<sup>6</sup>

## 2.2 Kafein

### 2.2.1 Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri

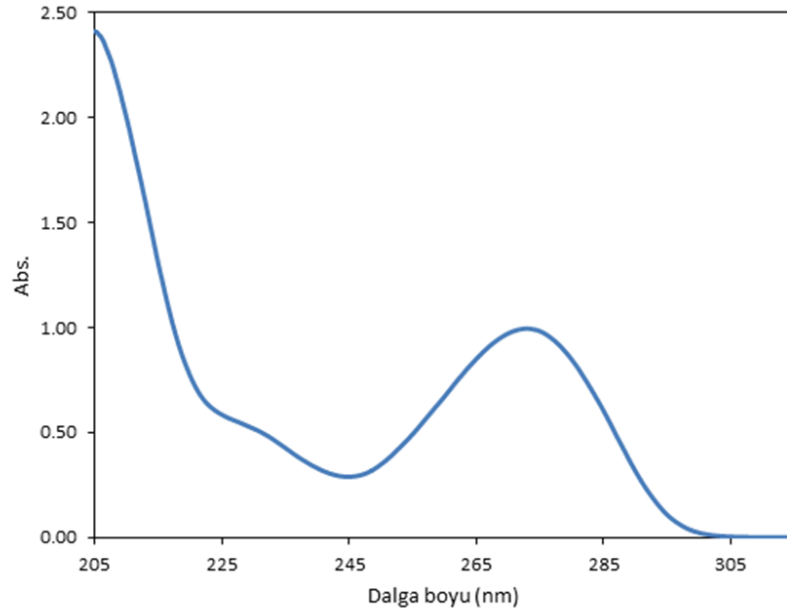


Şekil 2.3 Kafein'in kimyasal formülü

- **Molekül Formülü:** C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>
- **Moleküler Ağırlık:** 194.19 g/mol
- **Açık Formülü:** 1,3,7-trimethyl-1H-purine-2,6(3H,7H)-dione, 3,7-dihidro-1,3,7-trimethyl-1H-purine-2,6-dione
- **Erime Noktası:** 178 °C
- **Kaynama Noktası:** 238 °C
- **Yoğunluğu:** 1.2 g/cm<sup>3</sup>

KAF'in kimyasal adı 3,7-Dihidro-1,3,7-trimetil 9 1H-purin-2,6-dion veya 1,3,7-Trimetilksantin'dir. KAF'in diğer adları (sinonimleri) şunlardır: Coffeine, Oxopurine, Thein, Guanine, Methyltheobromine, No-Doz.<sup>7</sup> KAF beyaz kristalize toz şeklinde bulunur. Süblimleşebilen KAF soğutulunca heksagonal kristaller şeklinde yoğunlaşır. Katı KAF'a 5 mm uzaklıktan 1 mm Hg vakum uygulanınca 160-165°C'de hızlı süblimleşme sağlanır.<sup>7</sup>

Hazır kahveden KAF süblimleştirilerek KAF'sız kahve hazırlanır ve aynı zamanda KAF da elde edilmiş olur. KAF'ın %1'lik sulu çözeltisinde pH 6.9'tur. KAF'ın 1 g'ı 46 mL suda, 5.5 ml 80°C suda, 1.5 ml kaynar suda, 66 ml etanolde, 22 mL 60°C alkolde, 50 mL asetonda, 5.5 mL kloroformda, 530 mL eterde, 100 mL benzende, 22 mL kaynar benzende çözünür. KAF'ın ayrışma sabiti  $pK = 0,11 \pm 0,05$  'tir.<sup>8</sup>



**Şekil 2.4** Kafeinin su içerisindeki absorpsiyon spektrumu

### 2.2.2 Farmakolojik özellikleri:

KAF oral yolla 200-400 mg dozda alındığında psikostimulan etki gösterir. Uyanıklığı ve dikkati artırır, yorgunluğu azaltır, amfetaminlerin aksine bellek fonksiyonları üzerinde etkisi yoktur. KAF genelde bağımlılık oluşturmaz. Ancak günde 15-20 fincan kahve içenlerde bağımlılık görülmeye başlanır. 100-200 mg dozda oral alındığında benzodiazepinlerin anksiyolitik etkisini azaltırken, yüksek dozlarda alındığında anksiyete oluşturabilir. KAF analeptik amaçla sodyum benzoat kompleksi veya sitrat tuzu halinde intramüsküler veya subkutan olarak kullanılırken, prematüre apnesi görülen yeni doğanlarda intravenöz veya nazogastrik sondayla kullanılır.<sup>9</sup>



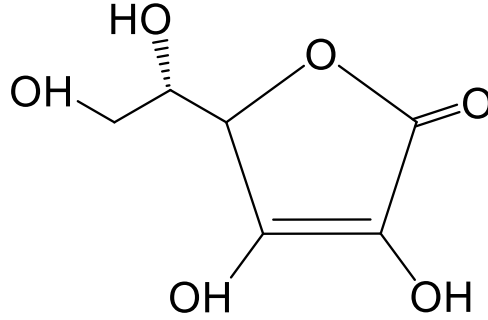
KAF'ın santral sinir sistemi uyarıcısı ve hafif diüretik etkili olduğunu, astım, uyuşukluk, yorgunluk, yenidoğan apnesi ve postdural gerilim tipi baş ağrısında endike olduğunu belirtmiştir. KAF'ın klinikte prematüre apnesi görülen yenidoğanlarda oral ve parenteral yoldan solunum stimülanı olarak kullanıldığını ve verildikten sonraki 24 saat içinde apne episodlarının frekansını %30-50 oranında azalttığını bildirmektedir.<sup>10</sup> KAF bu endikasyonda günde bir kez verilebilme kolaylığı, oral absorpsiyonunun güvenilirliği ve terapötik penceresinin geniş olmasıyla teofiline tercih edilir. KAF migren veya baş ağrısına karşı kullanılmak üzere çoğu zaman analjeziklerle veya ergot alkaloidleri ile kombine edilir. Ayrıca uyuşukluk ve yorgunluk hallerine karşı da kullanılan bir ilaçtır. KAF santral sinir sistemini her düzeyde stimüle eden hafif bir uyarıcıdır; kalp ve kardiyovasküler sistemi de stimüle eder. KAF medüller solunum merkezini uyardığı gibi, bronş düz kasında da gevşeme meydana getirir. KAF istemli kasları ve gastrik asit salgılanmasını uyarır; böbrek kan akımını artırır ve hafif diüretik etki gösterir.<sup>11</sup>

KAF gastrointestinal kanaldan tam olarak absorbe olur. Oral olarak alınmasını takiben plazma doruk konsantrasyon düzeylerine 50-75 dakika içinde ulaşılır. KAF tüm vücut sıvılarına hızla dağılır; kan-beyin engeli ile plasenta engelini hemen hızla aşar. Anne sütüne geçer. Yaklaşık % 17'si plazma proteinlerine bağlanır. KAF kısmen karaciğerde metabolize olur; gerek değişmemiş ilaç olarak gerekse metabolitleri halinde idrarla atılır. Plazma yarı ömrü yetişkinlerde 3-4 saattir. Ancak KAF'ı annelerinden alan yeni doğanlarda plazma yarı ömrü çok daha uzun olup 80 saat kadardır. KAF'ın yan etkilerinin büyük bir bölümü farmakolojik etkilerinin şiddetlenmiş olarak ortaya çıkmasından kaynaklanır. KAF terapötik veya toksik olmayan doz düzeylerinde titreme, sinüs taşikardisi ve dikkatte artma meydana getirir.<sup>12</sup> Diğer yan etkileri arasında diyare, heyecan hali, çarpıntılar, uykusuzluk, baş ağrısı ve kas seyirmeleri sayılabilir. Aşırı doz durumunda, KAF önemli ölçüde bulantı/kusma ve anksiyete yapabilir.

Aşırı dozda KAF alınması kardiyak aritmiler, nöbetler (konvülsiyonlar) ve deliryum meydana getirebilir. KAF hafif bir diüretiktir. Poliüriye neden olabilir. 1992 yılında KAF yoksunluk sendromu kesin olarak tanımlanmıştır. Birkaç hafta boyunca KAF tüketen veya ilaç olarak alan hastalarda KAF kesildiğinde letarji, anksiyete, baş dönmesi veya baş ağrısı da dahil dikkate değer fiziksel ve psikiyatrik belirtiler gözlenir. KAF anksiyete hastalığı ve/veya panik hastalığı olan hastalarda bu olguların şiddetlenmesine yol açabileceği için dikkatle kullanılmalıdır. KAF, gebelikte ve emzirme süresince, tam olarak kesilmese bile dikkatle kullanılmalıdır. KAF süt içine az da olsa geçer ve bu yenidoğanda birikime yol açabilir. Süt veren annenin yüksek miktarda KAF alması bebeğin uyuma güçlüğü çekmesine ve hiperaktif olmasına neden olur. Bu nedenle süt veren anneler KAF içeren içecekleri sınırlı ölçüde kullanmalıdırlar. Hamilelik sırasında KAF alındığında, fetusta aritmi geliştiği bildirilmiştir. KAF, FDA'nın hamilelik kategorisinde C kategorisine giren bir ilaçtır.<sup>13</sup>

## 2.3 Askorbik Asit.

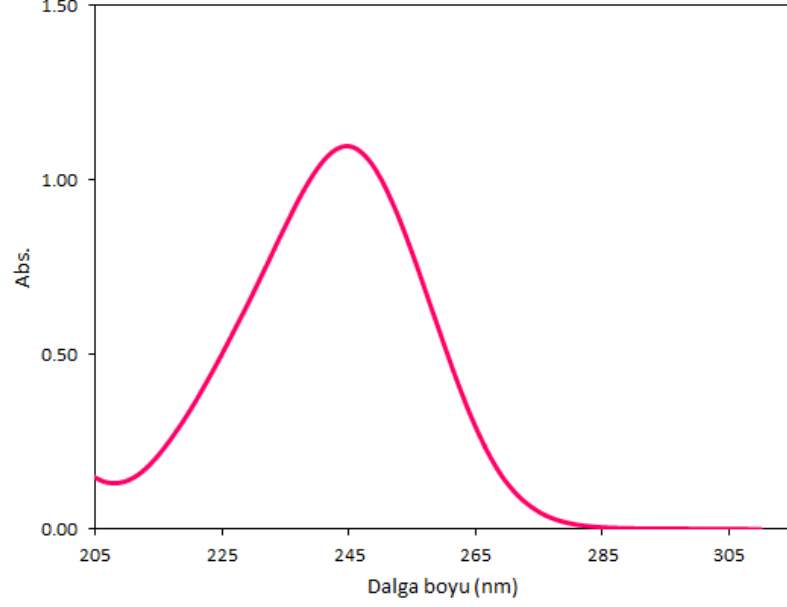
### 2.3.1 Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri



Şekil 2.5 Askorbik asit'in kimyasal formülü

- **Molekül Formülü:** C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub>
- **Molekül Ağırlığı:** 176,12 g/mol
- **Açık formülü:** Vitamin C, 3-Keto-L gulofuranolaktone; 3-Oxo-L-gulofuranolaktone
- **Erime Noktası:** 189 °C
- **Bozulma Noktası:** 192 °C
- **Yoğunluğu:** 1.65 g/cm<sup>3</sup>

Erime noktası 189 °C ve molekül ağırlığı 176,12 g/mol, renksiz kristallerden oluşan C vitamini, bir antiskorbüt faktörüdür. Hem indirgen gücü olan hem de asidik özellik veren bir dienol grup ihtiva eder. Askorbik asit (indirgenmiş formu) Askorbik asit (oksidlenmiş formu) suda, metanol ve etanolde kolay çözünür. Benzen, eter, petrol eter, kloroform ve yağda çözünmez. C vitamini (Askorbikasit) vitaminler arasında en dayanıksız olanıdır.<sup>14</sup>



**Şekil 2.6** Askorbik asitin asetoniltiril içerisindeki absorpsiyon spektrumu

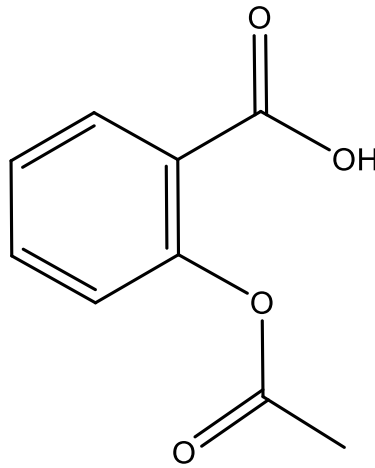
### 2.3.2 Farmakolojik Özellikleri:

Askorbik asit kollajen yapımı ve doku onarımı için gerekli bir vitamindir. Geri dönüşebilir bir şekilde dehidroaskorbik aside okside olur. Her iki formu da oksidasyon-reduksiyon reaksiyonları ile ilgilidir. C vitamini tirozin, karbonhidratlar, noradrenalin, histamin, fenilalanin ve demir metabolizması ile ilişkilidir. Lipid, protein ve karnitin sentezi vücudun enfeksiyona karşı dirençli olmasının sağlanması; serotoninin hidrosilasyonu; kan damarlarının bütünlük ve işlevselliğinin korunması ve hücre solunum askorbikasite gereksinim duyulan diğer durumlardır. Mevsimsel epidemik influenza olan 39 ayakta tedavi edilen hastada Asetilsalisilik Asit +C vitaminin antipiretik, analjezik ve antiinflamatuvar etkisi araştırılmıştır. Günde iki kere uygulanan 500 mg Asetilsalisilik Asit + 300 mg C vitamini ile tedavi edilen tüm hastalarda hızlı tam bir iyileşme sağlamıştır. Sadece 6 kişi yan etki bildiriminde bulunmuştur. Askorbik asit, aktif transportla emilir. Emilim miktarı gastrointestinal hastalık durumlarında ve yüksek dozlarda verildiğinde azalır. Askorbikasit vücutta geniş ölçüde dağılır; en fazla depolandığı yer bez dokulardır. Plasentayı aşar ve anne sütüne geçer<sup>15</sup>.

Askorbik asidin büyük bolumu geri dönüşebilir şekilde dehidroaskorbik asite dönüşür. Geri kalan idrarla elimine edilen askorbikasit-2-sulfat ve okzalik asit gibi inaktif metabolitlerine metabolize edilir. Askorbik asitin fazlası idrarla değişmeden atılır. Askorbikasitin farmakokinetiği 200 mg dozlarında lineerdir.<sup>15</sup>

## 2.4 Aspirin

### 2.4.1 Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri

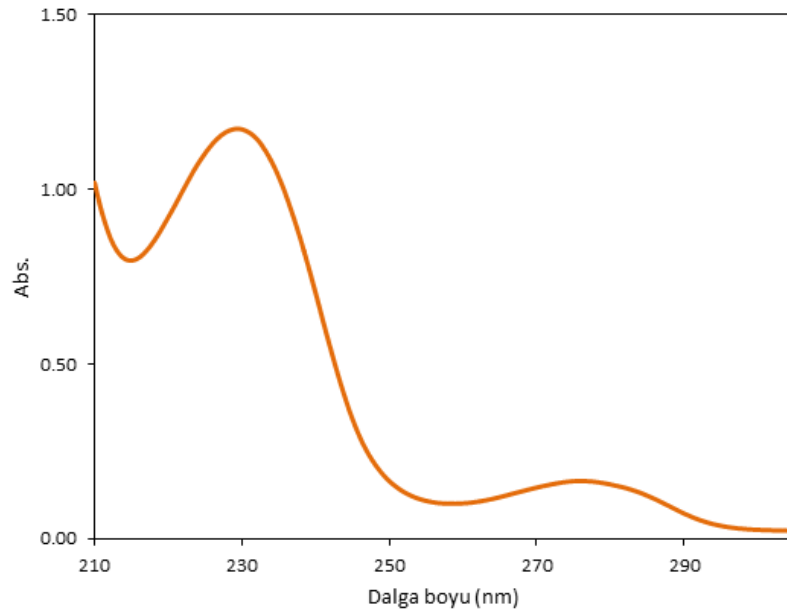


Şekil 2.7 Aspirin'in kimyasal formülü

- **Molekül Formülü:** C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub>
- **Molekül Ağırlığı:** 180,16 g/mol
- **Açık formülü:** 2-asetiloksibenzoik asit, 2-asetoksibenzoik asid, asetilsalisilat, asetilsalisilik asit, O-asetilsalisilik asit
- **Erime Noktası:** 136 °C
- **Kaynama Noktası:** 140 °C
- **Yoğunluğu:** 1.40 g/cm<sup>3</sup>

Bütün ilaçlar arasında, aspirin hiç tartışmasız en yaygın olanıdır. Aspirin asetilsalisilik asitin herkesçe bilinen yaygın adıdır; bu asit ilk olarak 1853'te bir bitkiden elde edilmiştir.<sup>15</sup> 1895'te Alman araştırmacılar, bugünkü aspirin yapımının esası olan kimyasal sentezi başardılar.

Aspirin asit beyaz, kokusuz, hafif ekşi, acı bir tozdur. Sodyum karbonat içinde erir. Suda kolay erimez. Bağırsaklarda ya da alkali bir ortamda parçalanırsa salisilik ve asetik asitlere ayrışır. 135 °C erir, tortu bırakmadan yanar. İnce iğnecikler halinde kristallenir.<sup>15</sup> Dünya aspirin yılda binlerce ton olarak tüketildiği belirtilmektedir



Şekil 2.8 Aspirinin de iyonize su içindeki UV absorpsiyon spektrumu

#### 2.4.2 Farmakolojik Özellikleri

Aspirin, 1971'de John R. Vane bu ilacın siklo-oksijenaz (COX) enzimini ve dolayısıyla prostaglandin sentezini baskıladığını gösterene kadar, yaklaşık elli yıl boyunca etki mekanizması bilinmeden kullanılmış. Bu buluş Vane'e, 1982 Nobel Tıp Ödülünü kazandırmıştır. Bu arada aspirinle benzer özellikler taşıyan başka ilaçlar da geliştirilmiştir<sup>15</sup>.

Bunlar, nonsteroidal anti-inflamatuar ilaçlar (NSAİ'ler) yâni, steroid olmayan iltihap önleyici ilaçlar olarak anılmaktadır. Bu ilaçların tümü Vane'in belirttiği gibi COX sınıfı enzimleri baskılayarak çalışmaktadır ve enzimin, COX-1 ve COX-2 olmak üzere iki türü vardır. Asetilsalisilik asit prostoglandin sentezindeki siklooksijenaz enzimini geri dönüşümsüz olarak inhibe etmektedir<sup>16</sup>.

Prostaglandinler arasındaki dinamik denge trombositler ve damar endotel hücreleri arasındaki etkileşimin düzenlenmesinde yer alan önemli mekanizmalardan biridir<sup>16</sup>. Vasküler endotelyumda üretilen prostasiklin (PGI<sub>2</sub>) vazodilatör ve trombosit agregasyonunu azaltıcı etkilere sahiptir. Trombositlerde sentezlenen tromboksan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) ise vazokonstriksiyon ve agregasyona yol açar. Vasküler endotelyum hasarında PGI<sub>2</sub> sentezi aksar ve TXA<sub>2</sub> fazlalaşır.

Asetilsalisilikasit tarafından inhibe edilen bu enzimi trombositlerin, tekrar sentez edememeleri nedeniyle, ömürlerinin geri kalan kısmında (7-10 gün) TXA<sub>2</sub> sentezleyemezler ve agregasyon özelliklerini kaybederler<sup>16</sup>. Asetilsalisilik asit düşük dozlarda alındığında trombositlerin siklooksijenaz enzimini irreversible bir şekilde inhibe ederek trombositlerin agregasyonunu önlemek suretiyle, antitrombotik-antiagregan etki gösterir<sup>17</sup>.

Ancak trombositlerin damar çeperine yapışmalarını engelleyemez. Asetilsalisilik asidin mide mukozası üzerindeki tahriş edici etkisinin azaltılması amacıyla tabletler bağırsakta çözünecek şekilde enterik kaplanmışır. İlaç karaciğer ve plazmada hidrolize uğrar. Alınımından 1-2 saat sonra ilacın ancak %25'i hidrolize edilmeden kalır. Salisilik asidin yarılanma ömrü 6 saattir. Tromboembolitik hastalıkların profilaksi ve tedavisinde doz 1-3 mg/kg'dır. Erişkinlerde genellikle günde bir ya da gün aşırı bir tablet kullanılır<sup>17</sup>.

Doktor tarafından başka şekilde kullanılmadığı takdirde, stoke profilaksisinde ve geçici iskemik ataklarda günde 1-3 defa 1'er tablet, reinfaktüs profilaksisi ve non-stabil anjina pektoriste günde 1-3 defa 1'er tablet, risk altındaki hastalarda koroner trombozun önlenmesinde gün aşırı 1-2 defa 1'er tablet ve postoperatif (by-pass ve shunt) tromboz profilaksisinde günde 1 tablet kullanılır<sup>18</sup>.

## **2.5 Parasetamol İçeren Karışımların Analizinde Kullanılan Analitik**

### **Yöntemleri**

#### **2.5.1 Parasetamol İçeren Karışımların Analizinde Kullanılan HPLC**

##### **Yöntemleri**

Aqel W ve arkadaşları<sup>19</sup>, anti-sinir ajanı pridostigmin bromür (PB;3-dimetilaminokarboniloksi-N-metil pyridinyum bromür)'ün, aneljezik ilaçlar olan asetaminofen, asetilsalisilik asit'in ve uyarıcı kafein (3,7-dihidro-1,3,7-trimetil-1 H-purin-2,6-dion) 'un sıçan plazma ve idrarında ayırtırmak ve miktarını belirlemek amacıyla HPLC yöntemini geliştirmişlerdir. C18 ters faz kolonu, 280 nm dalga boyu, % 15-85 asetonytril-su'dan oluşan mobil fazı, gradient elüsyon (ph 3.0),1 ile 1.5 ml/dk arası değişen akışı hızı ve 14 dakikalık çalışma süresinden oluşan çalışma parametreleri kullanmışlardır. Alıkonma zamanlarının 8.8 ile 11.5 dk arasında değiştiği; miktar tayin limiti değerlerinin 100 ile 200 ng/ml arasında ve tayin limit değerlerinin ise 150-200 ng/ml arasında olduğu tespit edilmiştir. Pridostigmin bromür, asetaminofen, asetilsalisilik asit ve kafein'in ortalama geri kazanım değerleri katkılı plazma için sırası ile % 70-99-5, %73-79-8, %88-69-3 ve %83-97-8, idrar için ise % 69-18-5, %74-58-7, %85-99-8 ve %83-29-3 olarak bulunmuştur. Pik alanları ve konsantrasyon arası ilişkinin 100-1000 ng/ml arasında doğrusal olduğu belirlenmiştir.



A. Esteban ve arkadaşları<sup>20</sup> parasetamol ve dört temel metabolitinin (glukuronid, sülfat, sistein ve mercapturate kanjugatları) fare plazması örnekleri içerisinde ayrıştırılması için bir ters-faz iyon-çifti-HPLC yöntemi kullanmışlardır. Kolon olarak bir ODS tip kolon, mobil faz olarak ise metanolün organik çözücü olarak kullanıldığı 0.01 M tetrabutilamonyum klorür ve 0.01 M tris karışımının fosforik asitle pH'sı 5.0'e ayarlanmış olan sulu tampon çözeltisi kullanılmıştır. Gradient elüsyonu %30 metanolla başlatılmıştır. 0.5 dk gecikme ile metanol konsantrasyonu 7.5 dk içinde doğrusal olarak %75'e çıkarılmıştır. Kolon 1 dakika gecikme ile başlangıç şartlarına döndürülmüştür. Teofilin metanolla hazırlanmış çözeltisi fare plazmasına eklenerek, santrifüj edilmiş ve hemen kromatografik sisteme enjekte edilmiştir.

E. Pufal ve arkadaşları<sup>21</sup> serum örnekleri için sürekli kullanılan bir katı-faz ekstraksiyon yöntemini geliştirerek, parasetamolün kan, idrar, beyin-omurilik sıvısı, eklem sıvısı, vitreous humor gibi vücut sıvılarında ve doku örneklerinde kalitatif ve kantitatif olarak tayini için uygulamışlardır. Kullandıkları yöntem basit olmasına karşın çok iyi sonuçlar vermiştir. Vücut sıvıları, internal standart olarak kullanılan fenasetin ve fosfat tamponu (pH=6.8) ile karıştırılmıştır. Ardından asetonitril kullanılarak plazma proteinleri çöktürülmüştür. Güçlü bir santrifüjden sonra süpernatant şartları önceden ayarlanmış bir Bakerbond C18-katı faz ekstraksiyon (SPE) kolonuna aktarılmıştır. Ön yıkama basamağı olmaksızın metanolla yapılan elüsyon en yüksek geri kazanım oranlarını göstermiştir. Ekstraktlar, HPLC sistemi ile beraber, fotometrik ve immünokimyasal yöntemi kapsayan ultraviyole ölçüm ile incelenmiştir.

Martin J ve arkadaşları<sup>22</sup>, kanalizasyon atığı ve yüzey sularında 13 adet farmasötik ve farmasötik metabolitlerinin bileşenin analizi için basit bir yöntem sunmuşlardır. Farmasötik bileşenler Phenomenex Strata X'in sabit faz olarak kullanıldığı bir kapsamlı bir katı-faz ekstraksiyon prosedürü kullanılarak ekstrakte edilmiştir.

Ekstraktlar dört ayrı ters fazı HPLC–ESI-MS/MS yöntemi ile kantitatif analizi yapılmış ve (13C-fenasetin) internal standardına karşı miktarları belirlenmiştir. Geri kazanım ve sulfametoksazol (%120, 50 ng/l), acetil-sulfametoksazol (%56, 50 ng/l), trimetoprim (%123, 10 ng/l), eritromisin (%73, 10 ng/l), parasetamol (%75, 50 ng/l), ibuprofen (%117, 20 ng/l), klofibrik asit (%83, 50 ng/l), mefenamik asit (%24, 50 ng/l), diklofenak (%62, 20 ng/l), propranolol (%45, 10 ng/l), dextropropoksifen (%63, 20 ng/l) ve tamoksifen (%42, 10 ng/l) için (LOD) teşhis limitlerinin tümünü kabul edilebilir değerlerde bulmuşlardır. Lofepamin'in (%4) olan geri kazanımı görüntüleme programında kullanmak için çok düşük olarak bulunmuştur.

Ghada M ve arkadaşları<sup>23</sup> parasetamol, dantrolene, cetirizine ve pseudoephedrine'i ayıran ve miktar tespitini doğru yapılabilecek kendi içinde stabil bir RP-HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Yöntem, bu dört analitin kalite kontrol laboratuvarlarındaki stabilite çalışmalarının geliştirilmesi amacıyla, başarılı bir şekilde valide edilmiştir. Bu yöntemin stabilite gösterme yeteneği bu dört analitin bozulan tüm piklerinin yeterli ayrımıyla sergilenmiştir. Ters-faz HS C18 analitik kolonu (250mmX4.6 mm i.d, 5m partikül büyüklüğü) ile birlikte gradient mobil faz sistemi olarak (A) pH'sı 4.2 olan 50 mmol/l sodyum dihidrojen fosfat, 5 mmol/l heptan sulfonik asit sodyum tuzu, ve (B) asetonitril kullanmışlardır. Miktar tayini 214 nm de UV dedektör kullanılarak elde edilen pik alanlarına bağlı olarak yapılmıştır.

Kelly A ve arkadaşları<sup>24</sup> tarafından geliştirilen yöntem biyolojik sıvılardaki ilaç metabolitlerinin hızlı tayin ve karakterizasyon kabiliyetleri, sıklıkla yüksek kalitedeki kromatografik ayırım ve hassas yüksek çözünürlüklü kütle spektroskopisine dayanmaktadır. Burada monolit kolon olarak adlandırılan yüksek verimli iki LC/MS yaklaşımının performansı ve sub-2m parçacıklı UPLC kolonu insan metabolitlerinden idrar içindeki asetaminofenin teşhisi ve tanımlanması amacıyla karşılaştırılmıştır.

UPLC sistemi monolitik kolona yöntemine göre yaklaşık üç kat daha hassastır ve üç kat daha fazla metaboliti ölçebilmiştir.

Murat Kartal<sup>25</sup>, parasetamol, kafein ve kodein fosfatın tayini için kesin, basit, tekrarlanabilir ve hassas bir yöntem geliştirip ve valide etmiştir. Parasetamol, kafein ve kodein fosfatın ayrılmaları, 1.0 ml/dk akış hızındaki izokratik elüsyon içeren bir Bond C8 kolon kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Mobil faz bileşimi 420/20/30/30 (*h/h/h/h*) oranlarındaki 0.1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, metanol, asetronitril ve izopropil alkoldür, spektrofotometrik ölçümler 215 nm'de gerçekleştirilmiştir. Parasetamol, kafein ve kodein fosfat'ın teşhisinin doğrusal aralığı sırasıyla 0.400 ve 1500 g/ml; 0.075 ve 90 g/ml; 0.300 ve 30 g/ml olarak belirlenmiştir.

A.P. Dewani ve arkadaşları<sup>26</sup>, fenilefrin, paraetamol, kafein ve kloroneframinin bulk ve tablet dozaj formalarının eş zamanlı analizi için basit, sipesifik RP-HPLC-DAD yöntemi geliştirip, valide etmişlerdir. Değişken konsantrasyonlarda sunulan dört bileşen, analiz prosesini zorlaştıran değişken kromatografik davranışlar göstermiştir. Bu çalışmada, mobil faz olarak hacimce 16: 22: 62 (*h/h/h*) oranlarında asetronitril, metanol ve 10 Mm fosfat tamponu içeren (tampon çözeltisi orto-fosforik asit ile pH 2.5 ± 0.02'e ayarlanmıştır) ters faz C18 kolon (150 mm; 4.5 mm i.d., partikül büyüklüğü 5 mm) kullanılmıştır. Akış hızı 1.0 ml/dk'dır, elüentler 280 nm'de gözlemlenmiştir. Ortalama alıkonma zamanları fenilefrin, parasetamol, kafein ve klorofeniramin için sırasıyla 1.8, 3.1, 5.2 ve 10.9 dk olarak bulunmuştur.

Silabat<sup>TM</sup> Endonezyada PT Bernofarm Pharmaceutical Industry, Surabaya, tarafından reçetesiz satışı yönelik olarak üretilmiş tablet formundaki soğuk algınlığı ilacıdır. Bir silabat tablet 25 mg fenilpropanolamin HCl (PPA), 30 mg kafein (CAF), 500 mg parasetamol (PAR), 25mg gliserilgilyakolat (GGL) ve 2mg klorfeniramine maleate (CTM) içermektedir.

Silabat tabletin analizi PAR'ın diğer komponentlere nazaran bağıl konsantrasyonunun yüksek olması sebebiyle çok daha karmaşıktır. Gunawan Indrayanto ve arkadaşları<sup>27</sup>, PPA, CAF, PAR, GGL ve CTM'nin Silabat içerisindeki eş zamanlı analizi için HPLC-DAD yöntemini geliştirip valide etmişlerdir.

Irena Baranowska ve arkadaşları<sup>28</sup>, sotalol (SOT), metoprolol (MET) ve a-hidroksi-metoprolol metabolit (MET-H), parasetamol (PAR), parasetamol glukuronit (PAR-G) ve parasetamol sülfat (PAR-S)'in insan idrarındaki analizi için bir HPLC yöntemi tanımlamışlardır. Analizler ters-faz gradient elüsyonlu LiChroCart Purospher C18 kolon (125 mmX3 mm, 5 mm partiküllü) ve spektrofotometrik, florometrik detektör kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analiz edilen bileşiklerden elde edilen pikler 15 dk'dan az sürede ve iyi çözünürlükte elde edilmiştir. İnsan idrarındaki (matriks olarak) kalibrasyon eğrilerinin doğrusallık aralığı, 3.25–45 mg/ml (SOT), 0.75–40 mg/ml (MET), 0.6–40 mg/ml (MET-H), 4.6–60 mg/ml (PAR-G), 4.95–50 mg/ml (PAR-S), 1.95–45 mg/ml (PAR) olarak bulunmuştur.

L.S. Jensen ve arkadaşları<sup>29</sup>, ters fazlı HPLC ve spektrofotometrik ölçüm sisteminden oluşan bir analiz sistemini geliştirmişlerdir. Çalışmada 100 µl plazma ve 50 µl idrar, ters faz C18 kolon, 254 nm dalga boyu, pH'sı fosforik asit ile 3.7'ye ayarlanmış, potasyum dihidrojen orto-fosfat (0.1M)-isopropanol-tetrahidrofuran, (THF) bileşenlerinden (100:1.5:0.1) (h/h/h) oluşan mobil faz kullanılmıştır. Yöntem idrar içindeki parasetamol, PG ve PS'in için 0.4-200 M, plazma içindeki parasetamol, PG ve PS için ise 100-20,000 M aralığındaki konsantrasyon değerlerinde hassasasiyet ve doğrusallık göstermiştir. Bu yöntem, sağlıklı deneklerin 1000 mg parasetamol'ü oral yoldan almalarının ardından, alınan parmak ucu kanı ve idrar örneklerinden elde edilen numunelerin içinde parasetamol ve iki metabolitinin konsantrasyonunu ölçmek amacıyla kullanılmıştır.

## 2.5.2 Parasetamol İçeren Karışımların Analizinde Kullanılan HPLC-MS

### Yöntemleri

Asetaminofen, fenilefrin ve klorofeniramin nezle tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır. Bu bileşiklerin miktar tayinlerinde pekçok problem vardır. A. Marı'n ve arkadaşları<sup>30</sup> bu bileşenlerin kapsül ve saşe gibi safsızlık ve ekşiپیyenlerini içeren farmasötik formülasyonlarda eş zamanlı analizi için bir HPLC yöntemi geliştirerek valide etmişlerdir. Yöntemin seçiciliği, fenilefrin yerine fenilpropanolamin hidroklorür kullanılarak test edilmiştir. Nihai kromatografik şartların gradient elüsyonları, A: pH 6,0'da 40 mM fosfat tamponu ve B: asetonitrildir. t=0 anında mobil faz %92 A ve %8 B oranında iken, süreç doğrusal bir seyirle 8 dakika içinde %75 A ve %25 B orana doğru seyrelmiştir, t=8 itibariyle oran 5 dakika içinde %30 A ve % 70 B olarak değişmiş, t=15 olduğunda ise ortam bir dakika içinde başlangıç şartları olan %92 A ve %8 B halini almıştır. Süreç başlangıçtan bitime 20 dakika sürmüştür. UV ölçümleri fenilefrin ve klorofeniramin hassasiyeti, diğer karakteristik dalga boylarına göre daha yüksek olduğu ve minör bileşenlerin ölçümü 215 nm dalga boyunda, asetaminofen ise 280 nm dalga boyunda yapılmıştır.

Natalie J Thatcher ve arkadaşları<sup>31</sup> insan hepatik mikrozomal inkübasyonları içindeki parasetamol'e konjüge glutatyonun ölçümüne dayalı iyon seçici özelliğe sahip microbore sıvı kromatografisi-pozitif iyon elektrosprey kütle spektrometri yöntemini geliştirmişlerdir. Glutation konjugatı bir döttere analog, internal standart olarak kullanılmak üzere sentezlenmiş ve ekstraksiyon Oasis katı faz ekstraksiyon kolonu ile gerçekleştirilmiştir. Glutation konjugatı için miktar tayin limiti (LOQ) 10 ng / inkübasyon ve bu konsantrasyondaki yöntem içi varyasyon katsayısı % 6.8 olarak bulunmuştur.

Matt Barfield ve arkadaşları tarafından<sup>32</sup>, 15 litre köpek kanından küçük hacimler halinde hazırlanan kuru kan örnekleri içinde bulunan asetaminofenin, biyoanalitik kantitatif miktar tayini için ters faz HPLC-MS/MS yöntemi geliştirmiş ve valide edilmişlerdir. Örnekler analiz için metanolle ekstrakte edilmiştir. Ölçüm pozitif iyon Turbospray<sup>TM</sup> iyonlaştırıcı ile birleşik reaksiyon seçici MS ile yapılmıştır. Analitik konsantrasyon aralığı 0.1-50 µg/ml olarak belirlenmiştir. Gün için kesinlik ve hata değerleri %15'in altında olduğu tespit edilmiştir. Asetaminofenin DBS stoğu içinde oda sıcaklığında 10 güne kadar stabil kaldığı belirlenmiştir. Yöntem, verilerin DBS örneklerinden elde edildiği toksikokinetik çalışmaya uygulanmış, aydınlatma amacıyla HPLC-MS/MS şartlarında dublike kan örnekleri kullanılarak yapılan (1:1 oranında su ile seyreltilmiş) çalışmada elde edilen sonuçların, fizyolojik olarak kıyaslanabilir olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışma, deney hayvanlarından alınan kanın hacmi azaltılırken DBS'den ekstrakte edilen ilaçların miktar analizinden çok yüksek kalitede TK verisi elde edilebileceğini göstermiştir, ayrıca ilaç endüstrisinde halı hazırda yapılan uygulamaların onda biri maliyette olduğu tespit edilmiştir. Bu güvenlik risk değerlendirmesi çalışması desteğinde, TK çalışmalarına dönük DBS analizleri ile alakalı olarak bildirilmiş ilk çalışmadır. Bu ve benzeri çalışmaların başarısı, DBS teknolojisini evvelden başarılı bir biyoanalitik validasyon göstermiş olan tüm yeni oral, küçük molekülü ilaç adaylarını farmakokinetik (PK)/TK değerlendirme çalışmaları için önerilen analitik yaklaşım teknolojisi olarak uygulama amacına yöneltmiştir.

Markus Godejohanna ve arkadaşları<sup>33</sup>, 500 MHz'de LC-SPE-NMR-MS hyphenation sistemini, insan idrarı içinde düşük konsantrasyondaki parasetamol metabolitinin yapısal izahını yapabilmek için kullanmışlardır. SPE kartuşlarında metabolitin kütle ölçümünden elde edilen tek ya da çoklu pikler geleneksel LC-NMR yöntemi üzerinde NMR ölçümünün hassaslık ve kalitesini artırmak için kullanılmıştır.

Başlangıçtaki NMR incelemesi için dötero asetonitril kullanarak NMR akış probu ile SPE kartuşundan metabolitin elüsyonunun ardından, fraksiyon azot gazı ile NMR prob başlığı üzerinden örnek püskürtülerek geri kazanılmıştır. Geri kazanılan fraksiyon üzerinde, bilinmeyen metabolit hakkında kesin kütle bilgisi veren yüksek çözünürlüklü FT-ICR-MS ölçümleri yapılmıştır.

Buna ek olarak, bilinmeyen metabolitin yapısının aydınlatılması için kriyostatik mikro NMR prob başlığı kullanılarak NMR ölçüm hassasiyetini 5 kat artırılıp, iki boyutlu deneyler yapabilir hale gelmesi sağlanmıştır. MS ve NMR kombinasyonundan elde edilen sonuçlar yapının net bir şekilde 3-methoksi parasetamolün eter glukuronit olduğunu anlamamıza imkân sağlamıştır.

Hewavitharana ve arkadaşları<sup>34</sup> parasetamol ve iki temel metabolitin miktar tayini için seçici bir LC-MS/MS yöntemini geliştirmişlerdir. MS ölçümleri metabolitlerin az miktardaki numunelerde bile seçici ve hassas olarak teşhis, tayin edilmelerine imkan sağladığı gözlemlenmiştir. Asetonitril ve formik asit içeren su karışımının izokratik elüsyon olarak kullanıldığı elektrospray-MS'li sistem her üç analitin ve internal standart olan 3-asetamidofenol'ün ayırımının ve miktar tayininin çok hassas yapılmasına yol açmıştır. Parasetamol, parasetamol sülfat ve parasetamol glukuronit kolon üzerindeki teşhis limitleri sırasıyla 2.4, 1.2 ve 1.2 pmol olarak bulunmuştur. Yöntem parasetamol ve metabolitlerinin fare idrarındaki miktarının belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır. Yöntemin oldukça özgün, hassas olduğu, ilgili analitleri ölçmek amacıyla diğer hayvanlarında biyolojik sıvılarının ölçümü için kolaylıkla adapte edilebilir olduğu belirtilmiştir.

C. Celma ve arkadaşları<sup>35</sup> parasetamol ve klorofeniraminin insan plazmasında miktar tayini için bir analitik yöntem geliştirilmiş, valide edilmiş ve faz 1 aşamasındaki klinik bir testten elde edilen örnekler üzerinde uygulamışlardır.

Uygulanan analitik yöntem, parasetamol ve klorfeniraminin dietil eter ile ekstraksiyonunun ardından, 2-asetamidofenol'ün internal standart olarak kullanıldığı bir LC-MS-MS yöntemi ile her iki ilacın tayininden ibaret olduğu belirtilmiştir. Yöntemin gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerlerinin iyi olduğu ve plazmadaki tayin limitlerinin parasetamol için 0.5 µg/ml ve klorfeniramin için 0.2 ng/ml olduğu belirtilmiştir.

Çalışma aralığı konsantrasyonları parasetamol için 0.5-25 µg/ml ve klorfeniramin için 0.2-50 ng/ml olarak bulunmuştur. Yöntem, 24 gönüllünün katıldığı klinik bir çalışmadan elde edilen 1200'ü aşkın örneğin analizi için kullanılmıştır.

İlk kez, tek basamaklı çökelmeden sonra direkt kullanılan yüksek duyarlılıkta ve basit LC-MS/MS sistemini, internal standart olarak difenhidramin kullanıldığı insan plazmasındaki parasetamol, pseudoefedrin, dekstrofan ve klorfenilaminin, eş zamanlı determinasyonu için Hong-gang Lou ve arkadaşları<sup>36</sup> tarafından geliştirip valide etmiştir. Analitler ve IS, mobil faz olarak 0.30 ml/dk akış hızlı ve hacimce %0.3 (*h/h*) asetik asit, metanol içeren bir YMC-ODS-AQ C18 Kolonu (100mm×2.0mm, 3m) ve bir gradiyent programı kullanılarak ayrılmışlardır. Araştırma pozitif iyon modlu elektrosprey ionizatörü, birleşik üçlenmiş kuadrupol kütle spektrometresi ile gerçekleştirilmiştir. Yöntemin validasyonu yapılmış, ayrıca bileşenler için doğrusal konsantrasyon aralığı sırasıyla PA için 10–5000 ng/ml, PE için 2–1000 ng/ml, DT için 0.05–25 ng/ml, ve CP için 0.1–50 ng/ml'dir olarak tespit edilmiştir. Kalite kontrol örneklerinden elde edilen doğrulamalar tüm analitler için %-8.37 ile % 3.13 sınırları arasında ve gün içi ve günler arası hassasiyeti tüm analitler için sırasıyla %11.54 ve %14.35 den daha az olduğu belirlenmiştir.



Validasyonu yapılmış olan bu yöntem iki peryotlu ve rastgele çaprazlanan bioeşdeğerlilik çalışması olarak 325 mg parasetamol, 30 mg pseudo efedrin hidroklorid, 15 mg dekstometorfan hidrobromid ve 2 mg klorfenamin malat içeren multicomponent formülün 20 sağlıklı Çinli gönüllüye başarıyla uygulanmasıyla gerçekleştirilmiştir.

Hao Li ve arkadaşları<sup>37</sup>, insan plazmasında parasetamol, kafein, pseudo efedrin, klorfeniramin ve kloperastin eşzamanlı miktar tayini için LC-MS/MS yöntemini geliştirmiş ve valide etmişlerdir. Sıvı-sıvı ekstraksiyonu sonrası numuneler hazırlandıktan sonra, analitler ve internal standart, içinde mobil faz olarak akış zamanı 2.6 dakika olan formik asit:10Mm amonyum asetat:metanol (1:40:60, *h/h/h*) içeren Venusil Mp-C18 kolon (50mm×4.6mm, 5m)'nun kullanıldığı ters fazlı HPLC vasıtasıyla analiz edilmiştir. Araştırma çoklu reaksiyon gösterim modunda olan pozitif iyonlaştırıcıli electrospray kütle spektrometrisi ile gerçekleştirilmiştir. Yöntem parasetamol 5.0–2000 mg/ml; kafein 10–4000 mg/ml; pseudoefedrin 0.25–100 mg/ml; klorfeniramine 0.05–20 mg/ml; kloperastine 0.10–40 mg/ml konsantrasyonlarında doğrusal olduğu belirlenmiştir. Gün içi ve günler arası duyarlılığı (bağıl standart sapma), tüm değerler için  $\leq$  % 11.3, doğruluğu (bağıl hata) ise  $\pm$  % 0.5 olarak tespit edilmiştir. 5 analitten oluşan kombinasyonunun farmakokinetik bir çalışması olan bu yöntem kombinasyonu oral yolla almış olan sağlıklı Çinli gönüllülere başarıyla uygulanmıştır.

Qin-you ve arkadaşları<sup>38</sup> insan plazması ve idrarında bulunan parasetamol (APAP) ve glukronit konjugatınının (PG) eşzamanlı tayini için, HPLC ile birleşik kütle spektrometresi (HPLC-MS/MS) yöntemi geliştirmişlerdir. Plazma numuneleri asetonitril ve propilen glikol (90:10, *h/h*) çözeltisi ile çökteltilmiş ve idrar numuneleri analitleri ekstraktların izokratik elüsyon ile birlikte C18 üzerine enjekte edilmesini takiben, analitleri biyolojik matriksten izole etmek için kullanılan mobil faz ile seyreltilmiştir.

Araştırma multiple reaction monitoring (MRM) modda positive electrospray iyonizasyon (ESI+) kullanılarak, triple quadrupole tandem kütle spektrometresi ile yapılmıştır. Yöntem APAP için sırasıyla, plazmada 10–30,000 ng/ml ve idrarda 100–6000 ng/ml; PG için plazmada 10–15,000 ng/ml ve idrarda 200–60,000 ng/ml konsantrasyon aralıklarında valide edilmiştir. APAP ve PG için gün içi ve günler arası hassasiyeti %15 ten az, doğruluğu, plazma ve idrarda %85-115 arasında olduğu belirlenmiştir.

Plazma ve idrarda sırasıyla APAP için ortalama geri kazanım değerleri APAP için %93.1, %89.1 ve %93.7, PG için ise 93.7% ve 92.3% olarak tespit edilmiştir. APAP ve PG'nin insan plazma ve idrarındaki doğrusallık, geri kazanım ve kararlılık değerlerinin validasyonu yapılmış, yöntemin basit, güçlü ve verimli olduğu gösterilmiştir.

Hana Raouf ve arkadaşları<sup>39</sup>, yasa dışı ilaç yapımını belirlemek ve bunlar karşısındaki yasal önlemleri desteklemek amacı ile ilaç metabolitlerinin sulu çözeltilerinde fotodegradasyon yolu ile TiO<sub>2</sub>/UV kullanılarak öngörü ve sentezler gerçekleştirmişlerdir. Parasetamol ve kokain metabolizması örnek bileşikler olarak kullanılmış, (LC–MS/MS) ile gözlemlenmiş ve ESI–MS/MS ile direkt analizi yapılmıştır. Deneyler simüle edilmiş ilaç numunelerinin metabolik yollarının etkin olduğu ve yaşayan organizma ya da hepatosit mikrozomal preparatlarda gözlemlenebilen ürünlerin oluşumuna yol açtığını ıspatlamışlardır. TiO<sub>2</sub> nanotozu genellikle, çevreyi korumak amacıyla istenmeyen artıkların tamamen bozunması için kullanılmaktadır. Sonuçlar, TiO<sub>2</sub>/UV oksitatif sistemin daha ileri çalışmalarda etkili ve canlı içi çalışmalarda önemli metabolitler elde etmede, tamamlayıcı bir yaklaşım olabileceğini gösterilmiştir.

Benzer yöntemi kullanan araştırmalar, toksikolojistlere e.g den türetilen yeni yeni tanınmaya başlanmış, bilinç arttırıcı (dizayn edici ilaçlar) ve ev yapımı, reçetesiz maddelerin hazırlanmasından elde edilmiş metabolitler hakkında hayati bilgiler elde etmelerine yardımcı olabildiğini göstermiştir.

### **2.5.3 Parasetamol İçeren Karışımların Analizinde Kullanılan Kapiler**

#### **Elektroforez Yöntemleri**

Gang Chen ve arkadaşları<sup>40</sup>, asetaminofenin hidralizatında p-aminofenol ve asetaminofen'in eşzamanlı belirlenmesi için kapiler elektroforez ve elektrokimyasal yola (CE-ED) dayalı bir yöntem geliştirilmişlerdir. Optimum şartları sağlamak amacıyla, kullanılan tamponun konsantrasyonu ve asiditesi, voltaj ayrılması, enjeksiyon zamanı, çalışma potansiyeli gibi pekçok önemli faktörün etkisi için araştırılmıştır. Çalışma elektrodu çalışma potansiyeli +0.80 V olan 300 m karbon disk elektrodu olarak belirlenmiştir (SCE'ye karşı). Her iki analitte 25 mM fosfat tamponunda (pH 6.5) ayrılma voltajı 18 kV olan 50 cm uzunluğundaki eriyik kapiler silika'da 6 dakika içinde çok iyi ayrılmaktadır. Asetaminofenin 0.5 M HCl içinde ve farklı sıcaklıklardaki hidrolizinin oran sabitleri, asetaminofenin konsantrasyon değişikliklerinin gözlenmesiyle bulunmuştur. 70, 80, 90 ve 100 derecelerde asetaminofenin hidrolizine ait oran sabitleri sırasıyla  $5.027 \times 10^{-3}$ ,  $8.522 \times 10^{-3}$ ,  $18.60 \times 10^{-3}$  ve  $32.76 \times 10^{-3}/dk$  olarak bulunmuştur. Asetaminofen hidrolizinin aktivasyon enerjisi literatürlerdeki ile uyumlu olarak 68.13 kJ/mol olarak hesaplanmıştır. Orphenadrine sitratein'in, parasetamol varlığında tablet formülasyonlarındaki tayininin araştırılması için, validasyonu yapılmış bir kapiller elektroforez yöntemi geliştirilmiştir. Yöntem pH'sı 7.7 olan 20 mM MOPS tampon içinde çözülmüş hareketli 30mM pentane sulfonate sodium tamponunu kullanılmıştır. Numuneler hidrodinamik örnek enjeksiyon modu kullanılarak (25 mbar, for 25 s), 30°C da ki sabit sıcaklıkta 25 kV'lık pozitif polaritede enjekte edilmiştir.

Dana N. ve arkadaşları<sup>41</sup>, orfenadrin sitrat numunelerini tek ya da parasetamol ile karıştırılarak, kendi belirledikleri yada önerilen indirgeme şartlarında elektroforez kullanılarak incelemiştir. Yöntem spesifik, lineer ( $r^2= 0.994$ ), 0.02 mg/ml LOQ değeri ilede doğru, ve sağlam bulunmuştur. Önerilen yöntem uygun ticari tabletler içindeki orfenadrin sitratın, etiket başına yüzdesinin ölçülmesinde başarıyla uygulanmıştır.

Stefan Heitmeier ve arkadaşları<sup>42</sup>, parasetamol ve ana metabolitlerinin idrar ve serumdaki miktarlarının tespiti için kapiller elektroforez (CE) yöntemini kullanmışlardır. Yüksek etkinliğinden dolayı CE yöntemi, ilaçların kompleks matris içinde direk olarak analizine imkan sağladığı gözlemlenmiştir. Yaptıkları bu çalışmada, parasetamolden kaynaklı olarak ortaya çıkan pik bölünmeleri araştırılmış, bu bölünmeleri baskılayan yeni yöntemler geliştirmişlerdir. Parasetamolün temel metabolitleri olan parasetamol glukuronit ve parasetamol sülfat aynen parasetamol sisteinat ve parasetamol merkapturate gibi oksidasyon arbasamaklarının metabolitleri olarak idrar içinde diode-array dedektörlü CE ve elektrospray-kütle spektrometri yöntemlerinin eş zamanlı kullanılması sureti ile tespit edilmiştir. Tüm analiz yöntemleri valide edilmiştir. Yöntemlerin kullanılabilirliği, sağlıklı gönüllülerin ve kanser tedavisi gören çocukların idrar ve serum örneklerine uygulanarak gösterilmiştir.

Frank Bohnenstengel ve arkadaşları<sup>43</sup>, insandaki b-glukuronidas aktivitesinin tespiti için parasetamol glukuronidini probe olarak kullanan kapiller elektroforez yöntemi geliştirmişlerdir. Yöntem 0.25 mM (38 ng/ml)'lik tespit limiti ve 1 Mm (151 ng/ml)'lik kantitatif ölçüm limiti ile yüksek hassasiyet, doğruluk ve duyarlılığa sahip olduğu tespit edilmiştir. Yöntemin farklı karaciğer ve böbrek homejenatında enzim kinetiği çalışmaları için uygun olduğu gösterilmiştir. Çalışmada elde edilen veriler parasetamol ve parasetamol glukuronitin, insan b-glukuronidas enzimi tarafından parçalandığından dolayı açığa çıktığını göstermiştir.

Geliştirilen CE yöntemi, sadece insan b-glukuronid aktivitesini ölçmek için değil, parasetamol glukuronoidin, parasetamole deglukuronidasyonla olan katkısının araştırılması açısından uygulanabilir olduğunu göstermişlerdir.

S. Azhagvuel ve arkadaşları<sup>44</sup>, tabletlerdeki cetirizine dihidroklorürün (CTZ), parasetamolün (PAR) ve fenilproparolamin hidroklorürün eş zamanlı ayrıştırılması ve tespiti için basit, selektif ve ucuz kapiller alan elektroforez yöntemi geliştirmişlerdir. Tüm analitleri ayırtmak için, 10 Mm sodyum tetraborat elektrolit çözeltisi (BGE, pH:9.0) background olarak kullanılmıştır. Ayrıştırmada toplam uzunluğu 76 cm olan (efektif uzunluk 64,5 cm) kaplamasız ve kaynaşmış silika kılcalı kullanılmıştır. Tüm analitler, uygulanan 20 kV'lik voltaj ile 10 dk içinde tamamen ayrıştırılmış ve UV dedektörü ile 195 nm dalga boyunda analiz edilmiştir. İbuprofen, internal standart (IS) olarak kullanılmıştır. Yöntemin doğrulanmasında, doğrusallık, kesinlik, hassasiyet, tarama limiti (LOD) ve ölçüm limiti (LOQ) açısından değerlendirme yapılmıştır. CTZ, PARA, PPA (test edilen alan) için kalibrasyon eğrilerinin doğrusallığı sırasıyla 2''C50 gml/ml ( $r^2=0.9982$ ), 10'' C1000 gml/ml ( $r^2=0.9986$ ) olarak tespit edilmiştir. Önerilen yöntem, tabletlerdeki aktif içerikleri belirlemek için kullanılmıştır ve düzeltme il'si %1.56'lik göreceli standart deviasyonla birlikte il % 98.60 olarak bulunmuştur. CTZ, PARA ve PPA'nın LOQ'su sırasıyla 2.0, 2.0 ve 4.0 g/ml olarak bulunmuştur. Farmasötik tabletler içinde ekşiipiyen varlığına bağlı olarak aykırı bir yoğunlaşmanın olmadığı gösterilmiştir. Bu nedenle önerilen yöntem, tablet dozaj formlarındaki aktif içeriğin benzer analizlerinde basit ve kullanımı uygun bulunmuştur.

Maria-Elisa ve arkadaşları<sup>45</sup> kodein ve parasetamolün nicel tespiti için kapiller alan elektroforezi yönteminin optimizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Kritik parametrelerin (konsantrasyon, ph, voltaj ve tamponlama) çözünürlük, analiz zamanı ve verimlilik üzerine etkileri değerlendirilmiştir.

Optimum seperasyon şartları, 20 mM/Ph 6.8 olan fosfat tamponu ve 15 Kv değerinde voltaj kullanarak sağlanmıştır. Optimize edilen prosedür, 3 dk'dan az süren bir ayrıştırma ile kodein ve parasetamolü kolayca tespit edilmesini sağlamıştır. Kalibrasyon eğrileri kodein ve parasetamol için sırasıyla 13.5 LODs ve 340 ng/ml ölçüleri kullanılarak hazırlanmıştır. Geliştirilen bu yöntem, farmasötik formülasyonlardaki kodein ve parasetamolü belirlemek ve belirtilen içerikteki miktarların tespiti için kullanılmıştır.

Annette Kunkel ve arkadaşları<sup>46</sup>, biyolojik örneklerin analizinde ilgi çeken yöntem haline gelmiş olan kapiller elektroforez yöntemi geliştirmişlerdir. Geliştirilen yöntem vasıtasıyla insan plazmasındaki farmasötikler, örneklerde herhangi bir ön işlem gerektirmeksizin, kaplanmamış ve kaynaşmış silika kapilleri üzerinde kolayca tespit edilmiştir. Gün içi ve arası hassasiyet değerlerini, pH= 10 olan sodyum dodesil sulfat içerikli borate tamponu ve asetonitril'in ara geçişte çalkalama reaktifi olarak kullanıldığı ortamda sırasıyla, % 1-2 R.S.D. (n=20) ve %2-3 R.S.D. olarak, tespit etmişlerdir.

Deniz Emre ve arkadaşları<sup>47</sup>, parasetamol (PAR), kafein (KAF) ve propifenazom (PRO) 'nun üçlü kombinasyonunu içeren farmasötik preparatları analiz etmek için yeni bir elektrokinetik misel-kapiller esaslara dayalı kromatografik yöntem geliştirmişlerdir. En iyi sonuçları, 30 mM sodyumdesilsülfat içeren 20 mM pH 9.0 borate tamponu background elektroliti olarak kullandıklarında elde etmişlerdir. Diflunisal internal standart için kullanılmıştır. Ayrıştırma, kaynaşmış silika kapillere (50 m internal çap ve 44 cm total uzunluk, 35.5 cm efektif uzunluk) 25 °C'da 50 mbar basınç ve 29 kV potansiyel altında, 3 s hidrodinamik enjeksiyon basıncı ile uygulanmıştır. Bu şartlarda, yer değiştirme zamanları, PAR için 5.174 dakika, CAF için 5.513 dakika, D'IF için 7.195 dakika ve PRO için 9.366 dakika olarak bulunmuştur. Bu yöntem için doğrusal aralıklar PAR ve KAF için 2-200 g/ml , PRO için 3-200 g/ml olarak tanımlanmıştır.

Tarama limitleri PAR ve KAF için 0.6 g/ml, PRO için 0.8 g/ml olarak tespit edilmiştir. Türkiye’de farklı ilaç firmaları tarafından üretilen üç farmasötik preparat, geliştirilen yöntem ve literatürde rapor diğer yöntemle olan zero-crossing spectrophotometrik yöntem ile analiz edilmiştir. İstatistiksel olarak önemli fark bulunmadığı tespit edilmiştir.

#### **2.5.4 Parasetamol İçeren Karışımların Analizinde Kullanılan Kemometrik Yöntemler**

Erdal Dinç ve arkadaşları<sup>48</sup> parasetamol (PAR), asetylsalisilik asit (ASP) ve kafein (KAF)’in tablet ve üçlü karışımlarındaki ayrışması zor spektrumlara sahip kantitatif multiresülasyonları, “ratio spectra first derivative-zero crossing ve ratio spectra-continuous wavelet transform-zero crossing (ratio spectra CWT-zero crossing)” olarak adlandırılan dalgacık dönüşüm yöntemlerini kullanarak analiz etmişlerdir.

Bu çalışmada, ratio spectra derivative-zero crossing ve ratio spectra CWT-zero crossing yöntemleri, oran spektrumlarının dönüştürülmüş sinyallerini ve oran spektrumunun sıfırla çakışan noktalarının  $dA/d\lambda$  ve CWT genliklerini ölçerek elde edilen kalibrasyon grafiklerini kullanma üzerine kurulmuştur. PLS kalibrasyon yöntemi diğer yöntemler ile kıyaslamak amacıyla benzer özellik ve içerikteki başka karışımların içeriğini tahmin etmek için kullanılmış ve iyi uyum sağladığı görülmüştür.

Erdal Dinç ve arkadaşları<sup>49</sup>, metamizol, asetaminofen ve kafein içeren üçlü karışımların her hangi bir ön ayırım yapmadan, spektrofotometrik ve multikomponent analizini yapmak amacı ile ters en küçük kareler tekniği (ILS) ve faktör tabanlı (temel komponent analizi (PCA) tekniklerini kullanarak yeni yöntemler tasarlamışlardır. Bu kemometrik tekniklerde, absorbans değerlerinin ölçümleri, 0,1 M HCl içinde bulunan ve aktif gradientleri içeren üçlü karışımların zero-order spektrumlarına tekabül eden, 225-285 nm sınırları içinde 5 nm aralıklarla içinde 13 dalga boyu kullanılarak yapılmıştır.

Konsantrasyon dataları ile absorbans data setlerini kullanan her iki teknik için hazırlanmış olan kalibrasyonlar, metamizol, asetaminofen ve kafein'in üçlü karışımları içindeki bilinmeyen konsantrasyonlarını öngörmek amacıyla kullanılmıştır. Numerik değerlerin hesaplanması için 'MAPLE V' yazılımı, kullanılmıştır. ILS ve PCA tekniklerinin her ikisi için ortalama geri kazanım ve relatif standart dönüşüm türevleri sırasıyla sırasıyla kafein için "%99.8, 1.68, 99.9 ve %1.66", metamizol için "%99.8, 1.84, 100.4 ve %2.85", asetaminofen için ise "%99.7, 1.04, %99.6 ve 1.34" olarak bulunmuştur. Sonuçlar yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemleri ile karşılaştırılmış ve başarılı bir şekilde Türkiye'de pazarlanan farmasötik formasyonlara uygulanmıştır.

Erdal Dinç<sup>50</sup>, spektrumlarında sık girişim yapan kafein (KAF), parasetamol (PAR), metamizol (MET) üçlü karışımının multiresülasyonları için çok değişkenli spektral kalibrasyon yöntemleri olan, üçlü doğrusal regresyon-kalibrasyonu yöntemi (TLRC) ve çoklu doğrusal "regression" kalibrasyon (MLRC) yöntemlerini geliştirilmişlerdir. Geliştirilen bu yöntemler kullanılarak KAF/PAR/MET'ten oluşan üçlü karışım sistemi için kalibrasyon algoritması çok net açıklanmış, tanımlanmıştır. Üç bileşenin çeşitli sentetik karışımları vasıtasıyla, TLRC ve MLRC yöntemlerinin geçerliliği teyit edilmiş, iki farklı gerçek ticari tablet formülasyonuna uygulanmıştır. Veri işlemleri MAPLE V EXCEL ve SPSS 10.0 yazılımları ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçları literatürdeki diğer yöntemlerle kıyasladıklarında, başarılı olduğunu gözlemlemişlerdir.

Erdal Dinç<sup>51</sup>, parasetamol, propinefazom, kafein ve tiamin dördlüsünü içeren karışımların kantitatif çözünürlüğü, kademeli dalgacık transform (FWT) ile temel bileşen regressionu, kısmi en küçük kareler (PLS) ve suni neural ağ (ANN) yöntemleri aynı anda kullanılarak gerçekleştirilmiştir.



22 tane çözelti karışımından oluşan kalibrasyon seti 210.0-312.3 nm lik spektral aralıkta kaydedilmiş ve kademeli dalgacık domeyinine transfer edilerek FWT kullanılarak yöntemlerin uygulaması gerçekleştirilmiştir. FWT-PCR, FWT-PLS ve FWT-ANN kemometrik kalibrasyonları, FWT metodu ve kalibrasyon setinden gelen datalardan sağlanan katsayılar arasındaki ilişkiler kullanılarak hesaplanmıştır. Geliştirilen yöntemler başarılı sonuçları içeren bileşenlerin sentetik karışımlarının analiz sonuçlarına uygulayabilmek için harici bir validasyon gerçekleştirilmiştir. Modeller sonuçta ticari farmasötik fomülasyonların içinde bulunan ilaçların doğrulanması için kullanılmıştır.

Erdal Dinç<sup>52</sup>, mefenamik asit (MEF) ve parasetamol (PAR) kombinasyonlarının aynı anda tayini için dört yeni yöntem tanımlamıştır. İlk yöntem; spektrum türev oranı yönteminde, analitik sinyaller her iki ilacın standart spektrumunu 0.1M NaOH:metanol (1:9)'de iki ye bölerek elde edilen oran spektrumların ilk türev spektrumuna ait dalga boylarının her birine ait maksimum ve minimum değerlerine karşılık gelen analitik sinyalleri ölçmüştür.

Klasik en küçük kareler, ters en küçük kareler ve temel komponent gerilimi "regression" (PCR) dizileri gibi kemometrik tekniklerde çalışma örnekleri her iki ilacın 0.1 M NaOH:methanol (1:9) içinde hazırlanmış olan değişik oranlardaki karışımlarını içeren çözeltilerini kullanarak rastgele hazırlanmıştır.

Absorbans dataları 235-355nm arası elde edilen absorpsiyon spektrumlarındaki 13 noktada yapılan ölçümler ile elde edilmiştir. Kemometrik kalibrasyonlar yapılandırılırken absorbans dataları ve MEF ile PAR'ın örneklerdeki miktarının tahmini için hazırlanmış çalışma setleri kullanılmıştır. Üçüncü kemometrik yöntem, PCR, kovaryans matrisi "the covariance matrix" yeni koordinatları içeren matris ve baz vektörleri "basis vectors" ve matris için hesaplanan absorbans dataları ile çakıştığı tespit edilmiştir. Elde edilen kalibrasyonlar karışımdaki ilaçları tanımlamada kullanılmıştır.

Tüm yöntemlerdeki doğrusallık aralığı MEF için 2–10 g/ml, PAR için ise 4–20 g/ml olarak bulunmuştur. Mean Recovery değerleri tatmin edici bulunmuştur (%99). Prosedürün her hangi bir ayırma basamağına gerek duymadığı bildirilmiştir. Bu yöntemler farmasötik formülasyona, tablete başarıyla uygulanmıştır sonuçlar birbirleriyle kıyaslanmıştır.

Erdal Dinç<sup>53</sup>, klorfenoksiamin hidroklorit (KP) ve kafein (KAF)'in kombine karışımları içinde eş zamanlı tayini için üç yeni yöntem geliştirmiştir. İlk yöntem olan spektrum türev oranı yönteminde, analitik sinyaller iki ilacın her birinin 0.1 M HCl çözeltisi içinde hazırlanmış hallerinin ayırıcı olarak kullanılmasıyla elde edilen oran spektrumunun ilk türev spektrumundaki maksimum ve minimum değerler ile çakışan dalga boylarından elde edilmiştir.

Diğer iki kemometrik teknik olan klasik en küçük kareler (CLS) ve ters en küçük kareler (ILS) yöntemleri için konsantrasyon data matrisleri her iki ilacın 0.1 m HCl içindeki sentetik çözeltileri kullanılarak hazırlanmıştır. Konsantrasyon data matrisine karşılık gelen absorbans data matrisi, kendi “zero-order” spektrumu içindeki 225-285 nm dalga boyu aralığında 5 nm aralıkla seçilmiş 13 dalga boyunda yapılan absorbans ölçümlerinden elde edilmiştir, kalibrasyon yada regression verileri, konsantrasyonu bilinmeyen CP ve CAF çözeltilerinin tahmini için kullanılan konsantrasyon ve absorpsiyon data matrislerinden elde edilmiştir.

Kemometrik verilerin numerik dataları MAPLE V yazılımı kullanılarak hesaplanmıştır. Prosedür her hangi bir ayırım basamağı gerektirmemektedir. Yöntemlerin doğruluk ve kesinliği, başlıktaki ilaçların sentetik karışımlarının analizi ve validasyonu ile yapılmıştır. Bu yöntemlerin farmasötik formülasyona ve şeker kaplı tabletlere uygulanmış sonuçlar ise birbiri içinde kıyaslanmıştır.

Erdal Dinç<sup>54</sup>, tablet içindeki hidroklorotiazide ve pironolakton'un eş zamanlı spektrometrik tayinini, klasik en küçük kareler (CLS), ters en küçük kareler (ILS) temel komponent regresyonu (PCR) ve kısmi kareler yöntemleri ile yapmıştır. Bu kemometrik analiz yöntemleri, numunelerin ön hazırlık işlemine tabi tutulmasını gerektirmemektedir. İlaçların her ikisini içeren 25 adet numuneden oluşan çalışma seti karışım dizaynına göre 2/20 mg/ml lik konsantrasyon aralığında hazırlanmıştır.

Çok değişkenli kalibrasyonlar çalışma setlerini kullanılarak 220 den 290 nm aralığındaki 15 noktanın zero-order ve ilk türev absorbanlarının ölçümü ile elde edilmiştir. Çok değişkenli yöntemlerin validasyonu, hidroklorotiazid ve spironolakton sentetik karışımlarının analizi ile gerçekleştirilmiştir. Sentetik karışımlar ve tabletler üzerinde elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak one-way ANOVA testi ile kıyaslanmıştır. Kemometrik analiz metotları hidroklorotiazid ve spironolakton'nun tablet formülasyonundaki eş zamanlı analizi için uygulanmış ve tatmin edici sonuçlar alınmıştır.

E. Dinç ve arkadaşları<sup>55</sup>, klasik en küçük kareler (CLS) ve temel komponent regresyon (PCR) yöntemleri ile asetaminofen ve kafeinin içeren tabletlerde, kimyasal bir ön ayırım kullanmaksızın eş zamanlı analizi tasarlamışlardır. Kemometrik kalibrasyonlar her iki ilacın 0.1 M HCl içerisinde hazırlanmış çözeltilerinin 215-285 nm dalga boyları arasında kalan bölgede seçilen 15 dalga boyundan elde edilen absorban verileri kullanılarak hazırlanmıştır. Elde edilen kemometrik kalibrasyonlar, aset aminofen ve kafeinin karışımlarının kantitatif analizinde kullanılmıştır. Nümerik hesaplamalar MAPLE V yazılımı ile yapılmıştır. Bu tekniklerin sentetik karışımlara uygulanmasıyla CLS ve PCR teknikleri içindeki ortalama geri kazanım ve relatif standart sapma değerleri sırasıyla asetaminofen için %99.5 ve 1.29, 99.7 ve 1.00 kafein için % 99.9 and 1.92, 100.0 and 1.178 olarak belirlenmiştir. Sonuçlar referans HPLC yöntemiyle karşılaştırılmıştır ve farmasötik preparatlara da uygulanmıştır.

### 2.5.5 Parasetamol İçeren Karışımların Analizinde Kullanılan Spektrofotometrik Yöntemler.

Erdal Dinç<sup>56</sup>, çift bölümlü oran spektrumu türevi “The double divisor–ratio spectra derivative” ve spektra-zero oran spektrumu yöntemleri askorbik asit, asetil salisilik asit ve parasetamol içeren efervesan tabletlerin analizi için herhangi bir kimyasal ayırım prosedürü olmadan uygulanmıştır.

Her iki yöntemin kullanımında kalibrasyon grafiği 8-28 mg/ml aralığında üç karışımın her biri için doğrusal olduğu belirlenmiştir. Sonuçların karşılaştırılması iki yöntem ile yapılmıştır ve her iki yöntemde de çok iyi sonuçlar elde edilmiştir.

Erdal Dinç ve arkadaşları<sup>57</sup>, metamizol, parasetamol ve kafein’in üçlü karışımının ön ayırmsız eş zamanlı analizi için yeni bir spektroskopik yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntem metamizol, parasetamol ve kafein üçlü karışımının içindeki bileşenden ikisinin standart spektrumu ile üçlü karışımın absorpsiyon spektrumunu bölerek elde edilen oran spektrum türevinin kullanılmasına dayandığı belirtilmiştir. Bu üç bileşenin konsantrasyonu kendi karışımları içinde, seçilen maksimum ya da minimum dalga boyu genişliğinin ölçülmesiyle elde edilen kalibrasyon grafiklerinin sırasıyla kullanılması ile belirlenmiştir. Prosedürün matematiksel açıklaması şekillendirilmiştir. Bu yöntem metamizol, kafein ve parasetamol içeren tabletlerin tahlili için uygulanmıştır. Geliştirilen yöntem alternatif spektrometrik yöntemler ile karşılaştırılmıştır.

4-aminophenol (4AP) parasetamolün ilk degradasyon ürünüdür, Avrupa ve Amerika kodekslerinde ilaç hammaddesi olarak kullanımı 50 ppm ya da % 0,005 a/a olarak, Almanya’da ise manuel yolla yapılan kolorimetrik limit testi sınırlandırılmıştır. Tablet monografları için 4AP limiti 1000 ppm yada 0.1 a/a ya çıkarılmıştır, buda daha otomatik HPLC ölçümlerinin daha az hassas olacağı gösterilmiştir.

M.S. Bloomfield<sup>58</sup>, yaptığı çalışmada, düşük ilaç hammaddesi spesifikasyonlarını uygulanmıştır (50 ppm, 500-mg parasetamol içeren tablette 25 mg 4AP'ye karşılık gelen oran). Bu çok düşük konsantrasyon seviyesinde matriks arafazı sebebiyle HPLC kodeks ölçümleri uygun olmadığı için kullanılamamıştır. Bu çalışmada, hassas kesin degradantın kantitatif ölçüm için çok düşük olan konsantrasyonundan dolayı otomatik ölçüm tekniği olan flow injection tekniğini sunmuşlardır. İlacın çözelti ya da 4AP içeren tablet ekstraktı taşıyıcı solvent akıntısına enjekte edilerek nitro prusiyat sodyum ile karıştırıldığında spektrofotometrik olarak 710 nm de ölçülebilen mavi bir türev oluşturmaktadır. Sürecin başından sonuna standart HPLC ekipmanları kullanılmıştır. Prosedür tamamen kantitatif ve çok değişkenli deneysel tasarım modelleri için hassas ve sağlamdır. Yöntem tamamen valide edilmiştir ve 0,01 mg/ml sınırının altında doğrusal olduğu belirlenmiştir.

M. Blanco ve arkadaşları<sup>59</sup>, farmasötik endüstrinin ilgisi dahilinde pekçok fiziksel ve kimyasal parametre NIR spektroskopisi ile tanımlanmıştır, ayrıca amacımız için NIR spektroskopisinin bilinen ticari yöntemler karşısında ivedi ve etkin bir teknik olup olmayacağını değerlendirmesini amaçlamıştır. Bu bağlamda, aşağıda belirtilen iki basamakta 1 gr parasetamol içeren tabletler incelenmiştir. İncelenen başlıklar, 1 API standartlarında belirlenmiş olan başlangıç granül oluşturması ve ortalama partikül büyüklüğü ile partikül büyüklüğünün dağılımının saptanması, 2 üretilen tabletlerin, API içeriği ve sıkıştırma basıncı ile gibi özellikleri incelenmesini kapsamaktadır. Buradaki en önemli amaç İlaç üretimindeki prosesin kritik niteliklerinin bitiş ürünün kalitesine etkilerini açığa çıkarmaktır. Sonuçlara bağlı olarak, bitiş ürünü için API kurallarını tanımlayan bir kalite kontrol metodu geliştirilmiş ve validasyonu yapılmıştır.

Fawzi A ve arkadaşları<sup>60</sup>, aspirin, parasetamol ve salisilik asitin üçlü kombinasyonunun analizi için bir türev spektrofotometresi yöntemi geliştirmiştir.

Yöntem birinci ve ikinci türevleri 'zero crossing' dalga boyunda alınan spektrumlarına dayanır. Oran spektrumu, karışımın absorpsiyon spektrumunun saf numunelerden birisinin spektrumuna bölünmesiyle elde edilmiştir. Diğer komponentlerin konsantrasyonu, kendi kalibrasyon eğrilerinden sırasıyla tanımlanmıştır. Tanımlanan yöntem sentetik karışımlara ve farmasötik dozajlara uygulanmıştır.

Altair B. Moreira ve arkadaşları<sup>61</sup>, asetaminofenin katı haldeki doğal floresans özelliğini sunmuşlardır. Kullanılan yöntem asetaminofenin hızlı ve basit bir şekilde farmasötik preparatlarda direk analizine imkân tanımıştır. Floresans ölçümler  $\lambda_{ex} = 333$  nm;  $\lambda_{em} = 382$  nm de toz haldeki numunelere uygulanmıştır. Etkin madde laktoz, maize nişasta, poly(vinylpyrrolidone), talk ve stearic asit içerisinde seyreltilmiştir. PA formülasyonuna diğer içeriklerin etkileri tartışılmıştır. Floresans intensitesinin doğrusallığı PA'nın 100-400 mg aralığındaki derişimine bağlı olduğu görülmüştür. Analitik frekans  $200 \text{ h}^{-1}$ 'dir. Belirleme ve miktar tain limitleri farklı içeriklerin porsiyonları için sırasıyla 13.0–16.7 ve 43.1–55.7 mg olarak ölçülmüştür. Yöntem bütün farmasötik preparatlara uygulanmış ve bağıl standart sapma %BSS değerlerinin  $\% < 2.7$  ( $n = 20$ ) olduğu bulunmuştur. Sonuçlar İngiliz farmakopesi verileri ile karşılaştırılmış ve  $\%95$  güven aralığında istatistiksel bir fark bulunmadığı gözlenmiştir.

J.Hanaee<sup>78</sup>, asetaminofen ve kodeinin eş zamanlı analizi için birinci türev UV spektrofotometre yöntemi kullanılmıştır. Asetaminofen ve kodein'in analizleri ilk türev absorbanslarının sırasıyla 263.4 nm ve 251.2 nm'de ölçülmesiyle elde edilmiştir. Asetaminofen ve kodein konsantrasyonları birbirleriyle arafaz yapmayacak şekilde hesaplanmıştır. Yöntem basit, hızlı ve aynı zamanda doğru ve kesin sonuçlar sağlamıştır.

N. Erk ve arkadaşları<sup>62</sup>, parasetamol ve metokarbamol'un kombine farmasötik tabletlerdeki miktar tayini için oran spektrum türevi spektrometresi ve HPLC yöntemlerini uyguladıkları çalışmaları sunmuşlardır.

Spektrofotometrik ölçümler bileşenlerden birinin standart spektrumu ile ikili karışımın spektrumunun bölünmesinden elde edilen oran spektrumunun ilk türev spektrumunu kullanma esasına dayanmaktadır.

1. türev genlikleri parasetamol ve metokarbamol ölçümleri için sırasıyla 243 ve 230.3 nm. olarak belirlenmiştir. İkili karışımdaki kalibrasyon grafikleri parasetamol için 2-30 mg/ml ve metokarbamol 2-36 mg/ml konsantrasyonları için belirlenmiştir. Kantifikasyon limitlerinin PAR ve MET için sırasıyla 0.573 mg/ml ve 1.717 mg/ml olduğu durum için; PAR ve MET'in ölçüm değeri ise PAR için 0.097 and MET için ise 0.079 olarak belirlenmiştir. HPLC prosedürü için analizler mobil faz olarak metanol-su (60:40, *h/h*) karışımının kullanıldığı ters fazlı bir HPLC kolon içerisinde 274 nm dalga boyunda yapılan ölçümler ile gerçekleştirilmiştir. PAR ve MET için doğrusal aralık sırasıyla 2-300 ve 1.5-375 mg/ml olarak saptanmıştır. Ölçüm ve miktar belirleme değerleri PAR için 0.42 ve 1.4 mg/ml, MET için 0.36 ve 1.2 mg/ml olarak tespit edilmiştir. %0.52'den daha az ölçülen relatif standart sapma değeri her iki yönteminde, anlamlı sonuçlar verdiğini ve tekrarlanabilir olduğunu göstermektedir. Tasarlanan yöntem ilaçların ticari tabletlerine başarıyla uygulanmıştır.

#### **2.5.6 Parasetamol İçeren Karışımların Analizinde Kullanılan Titrimetrik Yöntemler.**

G. Burgot ve arkadaşları<sup>63</sup>. Asetaminofen'in farmasötik formülasyondaki saf 275 mg hali için hassas doğru ve güvenilir bir termometrik titrasyon yöntemi tanımlanmıştır. Titrasyon sodyum hidroksitin sulu çözeltisi ile gerçekleştirilmiştir. Eksipiyenlerin (nişasta, talk, laktöz) doğruluk ve kesinliğe hiç bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir.

## **2.6 Kafein İçeren Karışımların Analizinde Kullanılan Analitik Yöntemler.**

### **2.6.1 Kafein İçeren Karışımların Analizinde Kullanılan HPLC Yöntemleri.**

Erdal Dinç<sup>64</sup>, tablet formundaki parasetamol ve kafein, iki spektrofotometrik yöntem ve yüksek basınçlı sıvı kromatografi yöntemiyle aynı anda analiz etmiştir. Analitik sinyallerin kullanıldığı radyo dalga verilerinde, ilk ölçümlerde kafein için 267.9 nm ve 291.0 nm, parasetamol için 237.0 nm ve 251.8 nm dalga boylarında absorbanans ölçmüştür. Kafein için 4-40 mg/ml ve parasetamol için 8-48 mg/ml oranlarında kalibrasyon eğrileri hazırlanmıştır. Vierordt yönteminde, A 1 1 (%1, 1cm) değerleri parasetamol için 292.9 nm ve 273.0 nm de ölçülmüştür. Matlab yazılımı yardımıyla her ilacın miktarı hesaplanmış ve A 1 1 (%1, 1cm) değerleri için matris hazırlanmıştır. Bu spektrofotometrik metodlardan elde edilen sonuçlar, HPLC metodunun sonuçlarıyla karşılaştırılmıştır.

Aqel W ve arkadaşları<sup>65</sup>, bir anti-sinir ajanı olan pyridostgmine bromide (PB;3-dimethylaminocarbonyloxy-N-methyl pyridinium bromide)'in, analjezik ilaçlar olan asetaminofen ve asetilsalisilik asitin ve uyarıcı kafeinin (3,7-dihydro-1,3,7-trimethyl-1 H-purine-2,6-dione) rat plazma ve idrarında ayrılması ve ölçümü için bir yöntem geliştirilmişlerdir.

Bileşikler C18 Sep-PakR kartuşları kullanılarak ekstrakte edilmiş, daha sonra ters faz C18 kolonu ile yüksek performanslı sıvı kromatografisi vasıtasıyla analiz edilmiş ve 280 nm'de UV ile tespit edilmişlerdir. Bileşikler su (pH 3.0) içinde % 1-85 asetonitril gradyanı kullanılarak 1 ve 1.5 ml/min arasındaki akış hızında değişen 14 dakikalık bir süre içinde ayrılmıştır. Bekleme süreleri 8.8 ile 11.5 dakika arasında değişmektedir. Kantitasyon sınırları, 150-200 ng/ml iken tespit sınırları 100 ve 200 ng/ml arasında değişmektedir.



5 örneğin spike işlemi yapılmış ve ortalama yüzdeleri pridostigmin bromid, asetaminofen, asetilsalisilik asid ve kafein için sırasıyla % 70.99.5, 73.79.8, 88.69.3, 83.97.8, ve üre için ise % 69.18.5, 74.58.7, 85.99.8, 83.29.3 olarak bulunmuştur. Pik alanlarının arasındaki ilişki ve konsantrasyonları 100 ve 1000 ng/ml arasındaki aralıkta doğrusal olduğu ve çıkan kromotogramlar endojen plazma veya idrar bileşimlerinde hiçbir aykırı pik göstermemiştir. Bu yöntem sıçanlarda oral uygulamanın ardından bu bileşiklerin analiz edilmesi için kullanılmıştır.

Kahve, uluslararası ticarete yüksek kalitede olması istenen önemli bir ham maddedir. Yüksek miktarda örnek analiz edilmesine rağmen, hızlı ve güvenilir bilgi veren yeni analiz teknikleri gereklidir. Bu nedenle, C.W. Huck ve arkadaşları<sup>84</sup> kavrulmuş kahvedeki sert yeşil çekirdekleri arabic ve robusta olarak ayırdıktan sonra, 3 temel alkaloid olan KAF, TBR ve TBH'yi ölçen, NIRS'ye dayanan yeni bir analiz yöntemi geliştirmişlerdir. Bu geçerli metod, en çok kullanılan UV dedektörle LC, MS yöntemi ile karşılaştırılmıştır. Yöntemde, bir stasyonere faz olarak 20 dakika süreyle uygulanan poröz silika ile karşılaştırıldığında, yüksek dayanıklılıkta olan 18 non poröz silika, 2,5 dakika içinde 3 alkaloidin analiz edilmesine imkan vermiştir. İdeal LC yöntemi sadece bir EIS arayüzü vasıtasıyla bağlamak; KAF, TBR ve TBF'yi kendi karakteristik gramantasyonu ile CID kullanarak tanımlanmasına izin vermemiştir. UV dedeksiyonu ile karşılaştırılan yüzde 6, daha fazla bulunan 3 analitin miktarını ölçmeye yardımcı olduğu belirtilmiştir. Onaylanmış LC-UV yöntemi, NIRC sistemin kalibrasyonu için seçilen bir referans yöntemidir. 83 adet sıvı kahve ekstraktının rastgele analizi kafein ve tbrnin S.E.E için 0.34, 0.40 g/100 g, S.E.P için ise 0.10 g/100 g değerlerini 0.10 ve 4.13 g/100g konsantrasyon skalası aralığında, 0.86 ve 0.85 katsayıları ile neticelenen sonucu vermiştir. LC ile kıyaslandığında NIRS-yönteminin dedeksiyon limiti, 0.244-0.6ng/100g olan LC'ye kıyasla 0.05g/100g olarak bulunmuştur.

Bu nedenle, odak noktasına, kafein ve teobromin'in NIRS analizi konulmuştur. Bununla beraber, NIRS, LC ye kahve üretim endüstrisinde ciddi bir alternatif sunduğu belirtilmiştir.

Marie-Sophie Caubet<sup>66</sup>, kafeinin ve onun idrardaki metabolitlerinin 14 tanesinin selektif ve hızlı analizi için yeni bir RP-HPLC methodu ve ekstraksiyon prosedürü geliştirmiştir. Analitler katı faz ekstraksiyonla izole edilip ve Eclipse XDB kolonu üzerinde ayrılması gerçekleştirilmiştir. Geri kazanımlar % 83 ve % 99 arasında değiştiği görülmüştür. Kromatografik yöntemin hassasiyet, doğrusallık ve kesinliği gerekli sınırlar içinde bulunmuştur. Bu prosedür kullanılarak, kafein metabolik oranları; nispeten sigara alışkanlıkları olan ve kontraseptif kullanan karakteristik CYP1A2 aktiviteleri olan 20 örnekte tespit edilmiştir. Bu method CYP1A2 aktivitesinin indüksiyonu ve inhibisyonuna dikkat çekmek açısından faydalı olabileceği tespit edilmiştir.

Günümüzde, çay demindeki kafein içeriğinin analizi için sıklıkla kullanılan HPLC methodunda kolon üzerinde örneklerin direk uygulanması tercih edilmektedir. Bu uygulama kolonun etkinliğini düşürür ve ömrünü kısaltır. J. Pura Naik ve arkadaşları<sup>67</sup> modifiye edilmiş bu metotla, müdahil olan çay pigmentlerini, örneğin Sep-Pak C18 kartuşunun içinden geçirilmesiyle etkili bir şekilde uzaklaştırmışlardır.

Daha sonra, içerisinde mobil faz olarak asetonitril ve su (20:80 *h/h*) kullanılan sistemi, ters faz i-Bondapak C18 kolonu üzerine enjeksiyonunu gerçekleştirerek, pik çözünürlüğünü ya da kafein tayininin doğruluğunu etkilemeden analiz süresini azaltmışlardır. Bu yöntemle siyah çay, kafeinsiz çay ve kafeinsiz instant çayın deminin içindeki çözülebilir kafein içeriği doğru bir şekilde tahmin edilebilmiştir. Bundan dolayı, bu metod siyah çay ve ürünlerinin hızlı rutin analizi için uygun olduğu görülmüştür.

Daniel Perrone ve arkadaşları<sup>68</sup>, kahvedeki kafein, trigonelin, nikotinik asit ve sukrozun eşzamanlı analizi için hızlı bir sıvı kromatografi-kütle spektrometri metodu geliştirerek validasyonunu yapmışlardır. Söz konusu metot, sıcak suyla ekstraksiyon, bazik kurşun asetat ile arıtma, membran filtrasyonu ve kolon olarak 5 nm'lik Spherisorb S5 ODS2'nin ve elüsyon olarak da akış hızı 0,2 mL/dakika olan % 0,3'lük sulu formik asit/metanol karışımının kullanıldığı, kromatografik ayırma basamaklarından oluştuğu belirtilmiştir.

Elektrosprey iyonlaştırma kaynağının negatif modda çalıştırılmasıyla sukroz iyonları ve pozitif modda çalıştırılmasıyla da kafein, trigonelin ve nikotinik asit iyonları elde edilmiştir. Yeşil ve kavrulmuş kahve ekstraktlarının kalibrasyon eğrileri  $r^2 > 0,999$  olacak şekilde doğrusal elde edilmiştir. Kavrulmuş kahvedeki geri kazanım kafein için % 93,0-105,1, trigonelin için % 85,2-116,2, from nikotinik asit için % 89,6-113,5 ve sukroz için ise % 94,1-109,7 olarak tespit edilmiştir. Matriksteki bütün analitler için oldukça iyi tekrarlanabilirlikler (RSD < 5%) bulunmuştur. Sinyal:gürültü oranınının 3:1 değerinde olduğu göz önünde tutularak tayin limitinin (LOD) kafein, trigonelin, nikotinik asit ve sukroz için sırasıyla 11,9, 36,4, 18,5 ve 5,0 ng/ml olduğu bulunmuştur. 11 ayrı kahve örneğinden (yeşil, kavrulmuş ve çabuk kahve) elde edilen sonuçların literatürle uyum halinde olduğu görülmüştür. Söz konusu metodun marketlerde bulunan birçok kahve çeşidinin rutin analizi için hızlı ve güvenilir alternatif bir metot olduğu açıkça görülmüştür.

X. Xu ve arkadaşları<sup>69</sup>, aspirin-kafein-butalbital (karışım 1) ve asetaminofen-kafein-butalbital (karışım 2) karışımlarının analizi için poröz olmayan ODS kolonları kullanılarak HPLC prosedürleri geliştirmişlerdir.

Karışım 1'in ayrılması ve belirlenme işlemi akış hızı 1,5 mL/dakika olan ve 50 mM fosfat tamponu ile pH'ı 3,0'a ayarlanmış 98:2 *h/h*'lik asetonitrilin hareketli faz olarak kullanıldığı bir 3,0 nm'lik poröz olmayan silika ODS kolonunda oda sıcaklığında ve 220 nm dedeksiyon dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. Metot, aspirin-kafein-butalbital için sırasıyla 325-6500, 40-800 ve 50-1000 ng/ml aralıklarında doğrusallık göstermiştir. Gün içi ve günler arası RSD değerleri ise aspirin için % 0,19-1,72 ve % 1,30-1,49, kafein için % 0,08-1,17 ve % 0,06-1,09 ve butalbital için % 0,09-1,55 ve % 0,07-2,10 bulunmuştur. Gün içi ve günler arası doğruluk değerleri ise aspirin için % 0,70-1,27 ve % 0,20-1,13, kafein için % 0,05-0,06 ve % 0,004-0,09 ve butalbital için % 0,02-0,09 ve % 0,02-0,05 bulunmuştur. Aspirin, kafein ve butalbital için tayin limitleri (sinyal/gürültü: 3) ise sırasıyla 5, 5 ve 10 ng/ml olarak bulunmuştur. Karışım 2'in ayrılması ve belirlenme işlemi akış hızı 2 mL/dakika olan ve 50 mM fosfat tamponu ile pH'ı 2,5'e ayarlanmış 97:3 *h/h*'lik metanolün hareketli faz olarak kullanıldığı bir 3,0 mm'lik poröz olmayan silika ODS kolonunda oda sıcaklığında ve 220 nm dedeksiyon dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. Metot, asetaminofen-kafein-butalbital için sırasıyla 650-6500, 100-800 ve 125-1000 ng/ml aralıklarında doğrusallık göstermiştir. Gün içi ve günler arası RSD değerleri ise asetaminofen için % 0,06-2,64 ve % 2,18-4,19, kafein için % 2,24-4,76 and % 4,09-4,12 ve butalbital için % % 1,65-3,94 ve % 3,33-3,40 bulundu. Gün içi ve günler arası doğruluk değerleri ise asetaminofen için % 1,13-2,86 ve % 0,08-0,10, kafein için % 1,12-4,62 ve % 0,04-2,75 ve butalbital için % 0,34-3,48 ve % 0,02-2,30 bulundu. Asetaminofen, kafein ve butalbital için tayin limitleri (sinyal/gürültü: 3) ise sırasıyla 20, 20 ve 35 ng/ml olarak bulunmuştur.

Günümüzde sulu kakao ekstraktlarındaki kafein ve teobromin miktarlarının analizi, HPLC metodunun kolondaki ekstraktlara doğrudan uygulanması şeklinde gerçekleştirilmektedir.

Oysa bu uygulama, kolon verimini ve ömrünü azaltmaktadır. Ayrıca maddelerin girişim yapması ve düşük taban çizgisi çözünürlüğünden dolayı bu metotla olması gereken değerlerden daha büyük değerler elde edilmektedir. J. Pura Naik<sup>70</sup> buna karşın, iyileştirilmiş HPLC metodunda kullanılan Sep-pak C18 kartuşu sayesinde girişim yapan kakao pigmentleri etkin bir şekilde gidermeyi başarmıştır. Bu işlemin akabinde C18 ters-faz kolonuna yapılan asetonitril ve su (20:80) enjeksiyonu (hareketli faz), hem pik hem de taban çizgisi çözünürlüğünü değiştirmeden analiz süresini kısaltılmıştır. Sonuç itibariyle, kakao ve kakao içeren ürünlerin hem hızlı hem de rutin analizi için bu metodun uygun olduğu tespit edilmiştir.

K. A. Georga<sup>71</sup> kafein ve kafeinin sekiz ana metabolitinin (xanthine (XA), 7-methylxanthine (7-MX), 3-methylxanthine (3-MX), 1-methylxanthine (1-MX), isocaffeine (IC), theobromine (TB), paraxanthine (PA) ve theophylline (TP))'in aynı anda tespit edilebilmesini sağlayan çeşitli doğrusal eğimli elüsyonun kullanıldığı iyileştirilmiş bir HPLC-fotodiyot metodunu kullanmıştır. Ayırma metodu, kan serumu ve idrardan katı faz ekstraksiyonuna ve hareketli faz optimizasyonuna dayanmaktadır. Elüsyon sistemi ise 0,05 M amonyum asetat (pH=7) ve 30 dakikalık bir periyotta hacim oranı 90:10 *h/h*'den 40:60 *h/h*'ye değiştirilen metanolden oluşturulmuştur.

Metabolitlerin tespiti, 270 nm'de 2 ng tayin limitinde çalışan fotodiyot dedektörle gerçekleştirilmiş. Lamotrigine bir iç standart olarak kullanılmıştır. Her gün 8 kez olmak üzere 8 gün boyunca istatistiksel değişim metodu ile oldukça iyi düzeylerde doğruluk ve kesinlik değerleri elde edilmiştir. Merck C8 400 mg and Oasis HLB kartuşları kullanılarak kan serumu ve idrardan yüksek ekstraksiyon ger kazanımları elde edilmiştir. Ayırma, içerisinde octylsilica bulunan 10 mm, 250 x 4.6 mm boyutlarındaki analitik bir kolonda oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir.

Huafu Wang<sup>72</sup> aydaki kateşinler, kafein ve gallik asit analizi için izokratik elüsyon sistemi ile basit bir yüksek performanslı sıvı kromatografisi geliştirmiştir. Ayırma sistemi; C18 ters faz sütunu, metanol/su/orto-fosforik asidin bir izokratik elüsyon sistemi ve UV dedektöründen oluşmaktadır. Bu metod yeşil çay içindeki kateşinlerin tekrarlanabilir ve doğru sonuçlarla hızlı ve rutin analizi için uygun olduğu görülmüştür. Ayrıca; bu metod bütün çay ve çay ürünlerine uygulanabilir ve tespit etmek için çok düşük konsantrasyonlarda olduğu kabul edilen (+)-kateşinin ve yeşil çay için ısı işleminin (tedavisi) için bir ölçü olarak kabul edilen (y)-gallokateşin galletin tespiti için özellikle uygun olduğu tespit edilmiştir.

### **2.6.2 Kafein içeren karışımların Analizinde Kullanılan HPLC-MS**

#### **Yöntemleri.**

Marie-Sophie Caubet ve arkadaşları<sup>73</sup> , atmosferik basınç elektrosprey kaynağı ve kütle spektrometresini, sıvı kromatografisi ile birleştirerek idrardaki işaretlenmiş kafein ve ondört farklı metabolitinin analizi için geliştirmişlerdir. Devamında sigara alışkanlığına sahip ve oral kontraseptif yolla kafein alan kişilerden oluşan, 20 sağlıklı kontrol grubunda, kafein alım şeklinin yüzdesi çıkarılarak, farklı karakteristik CYP1A2 aktivitesine bağlı işaretli kafein oranları belirlenmiştir. Spesifik diyetten sonra bile ortadan kaldırılması çok zor olan kafein metabolitlerinin, metabolik oranlarının hesaplanması için işaretlenmiş kafein kullanımına dikkat edilmesi gerekir. Seçici ve yüksek hassasiyetli kütle spektrometresi tespiti için, deneklerden sadece 3 saatlik aralıklarla idrar numuneleri toplanmıştır. Karakteristik gruplar arasında karşılaştırılmalar, işaretli kafeinin metabolit oranları, CYP1A2 aktivitesindeki değişikliklere duyarlı markırlar olduğunu göstermiştir.

Ghada M ve arkadaşları<sup>74</sup> basit ve hızlı dönüşüm-yüksek faz-performanslı sıvı kromatografi prosedürü ile birleştirilmiş bir fotodiyot dizi dedektörü uygulaması (RP-HPLC-DAD), çeşitli gıda ve içecek uygulamalarında yaygın bir şekilde kullanılan doğal antioksidanlardan olan, büyük kateşinler, proantosiyandin (procyanidinB2) ve caffeinin 25 maddelerini içeren iki popüler bitki türü “Camellia sinensis L” ve üzüm çekirdek özütlerinin, farklı doğal karmaşık varyantlarının analizi için geliştirmişlerdir. Tüm birleşiklerin ayrılması bir isocraticelution sistemi kullanılarak 12 dakika içinde başarmışlardır. Mükemmel doğruluk tüm standart kalibrasyon eğrileri için gözlenmiş ve kolerasyon katsayıları 0.9997 üzerinde olduğu görülmüştür. Pek çok analiz edilmiş bileşik için tespit sınırları 2.80103 ve 2.51102 mg/ml; kantitatif sınırları 9.30103 ve 8.36102 mg/ml arasında dağıldığı görülmüştür. Geliştirilen bu metodun doğru ve hassas olduğu bulunmuş ve iyi bilinen doğal antioksidanlarda temel bileşenlerin rutin analizinde hızlı bir şekilde uygulanmıştır.

Hao Li ve arkadaşları<sup>75</sup> sıvı kromatografisi ve tandem kütle spektrometresine dayandırılan hızlı ve hassas bir metot geliştirerek, insan kanındaki Parasetamol, Kafein, Psedoferin, Klorofenilamin ve Kloperastin’in eş zamanlı miktar tayini gerçekleştirmişlerdir. Örnekler sıvı bir şekilde hazırlandıktan sonra; sıvı ekstrakt, analitler ve standartlar 2,6 dk yürütme zamanında hareketli faz olarak metanol, 10 mM amonyum asetatve formik asit kullanılarak venusul MP-CLF kolonunda HPLC ters faz yoluyla analiz edilmiştir. Belirleme çoklu reaksiyon izleme modundaki elektrosprey pozitif ion kütle spektrometrisi ile yürütülmüştür. Bu metodda tüm analitlerin konsantrasyonları şu ekilde sabitlenmiştir; parasetamol 5.0.2000; kafein 10.4000; psedofedrin 0.25.100; klorfeniramine 0.05.20; kloperastine 0.10.40. Çalışmada sabah ve akşam duyarlılığına göre SD:%11.3 ve SE:%5 olarak tespit edilmiştir.

Bu çalışmada Çinli sağlıklı gönüllülerde 5 analitin oral doz kombinasyon uygulaması sonrasında farmakokinetiklerinin belirlenmesi başarı ile gerçekleştirilmiştir.

Piero R ve arkadaşları<sup>76</sup> atmosferik basıçta çalışan kimyasal iyonizasyon kütle spektroskopisi (LC-APCI-MS) ve ters faz sıvı kromatografisi sıvı-sıvı ekstraksiyon tabanlı yeni bir yöntem geliştirmek için birleştirmişlerdir. Bu yeni metod Florida, Biscayne Bay yakın kıyı ekosisteminden alınan yüzey suyu örneklerinde kafein kalıntısını belirlemede kullanılmıştır. Böyle bir yöntemi geliştirmedeki mantık insan kaynaklı atık kontaminasyonlarının potansiyel çözelti fazındaki izlerinden biri olan metabolize olmayan kafeinin kullanımını değerlendirmek olacaktır. Pronlanmış moleküler iyonlar (M+H<sup>+</sup>) için seçilen iyon görüntüleme (SIM) ile (APCI-MS)'ye kombine edilmiş HPLC kullanılarak 1 litre ekstrakte ve kondense su örneklerinden 500Al hacimde elde edilen tuz ve temiz su örneklerinde bu yöntem ile 4.0 Ng/l ye kadar düşük seviyede kafeini belirlenebilmiştir.

Miami nehrinin önemli kollarından birinden ve Biscayne Bay'ın farklı bölgelerinden alınan örnekler analiz edilmiş ve kafeinin bulunduğu tespit edilmiştir. Bu alanlar önceden fecal koliform bakteri kontaminasyon ile suyun kalite kriterinin sürekli aşıldığı bilindiği için seçilmiştir. Pozitif bulgulara sahip örneklerdeki kafein konsantrasyonu genel olarak 41 Ng/L ve bu miktardan daha düşük seviyede olduğu belirlenmiş. Bununla birlikte Miami nehri ve Biscayne Bay alanlarından toplanan örnekler arasında göze çarpan farklılıklar varlığı kaydedilmiştir.



### 2.6.3 Kafein içeren karışımların Analizinde Kullanılan Kapilerektoforez Yöntemleri.

Çay dünyadaki en popüler içeceklerden biridir. Çay içerisindeki maddeler ile ilgili Özellikle de kateşinler için pek çok veri mevcuttur ve son zamanlarda da artmaktadır. Hideki Horie ve Arkadaşları<sup>77</sup> HPLC ve HPCE analitik metodlarını kullanarak analiz edilen çay maddelerinin raporlarını derlemişlerdir.

Hideki Horie ve arkadaşları<sup>78</sup> yeşil çayın niteliksel olarak önemli bileşenleri (theanine, kafein, askorbik asit, (2)-epikateşin, (2)-epigallocatechin, (2)-epikateşin gallat ve (2)-epigallocatechin gallat) kapiler elektroforez kullanılarak eş zamanlı olarak analiz etmişlerdir. Sodyum dodesilsülfat'ın 50 mM'ını içeren borat tamponu (80 mM, pH 8.4) hareketli faz olarak kullanılmıştır. Oolong çayı, siyah çay ve yeşil çay ekstraları bu metot kullanılarak analiz edilmiştir. Farklı zamanlarda toplanan ve tek sürgünde farklı pozisyonlardan yaprak örnekleri alınan yeşil çaylar da bu metot kullanılarak ölçülmüştür. Bu metot sonuçlara göre, bileşenlerin analizi için önemli ölçüde zaman ve iş gücü tasarrufu yaptığını ve taze çay yapraklarının karakterizasyonu ile çayların (özellikle yeşil çayın) kalite tahmini için oldukça faydalı olduğunu göstermiştir.

N. Maeso ve arkadaşları<sup>79</sup> çekilmiş veya filtrelenmiş kahve ile ilgili yaptıkları bir pyroglutamat ön çalışması ile bazı liyofilize kahvelerin 10 kat daha artmış olduğunu göstermişlerdir. Pyroglutamatın kayda değer sayıda zihinsel aktiviteyi artırıcı etkileri olduğunu vurguladıkları çalışmada, aynı zamanda kahvenin geleneksel olarak kafein ile ilişkilendirilen etkileri ile ilgili olabileceğini göstermişlerdir. Pyroglutamate hafıza ve öğrenmeyi geliştirerek, ratlarda anti-anksiyete etkilerinin var olduğunu ortaya koymuşlardır. Bu nedenle, kahvedeki kafein ve pyroglutamatın birarada belirlenmesi için kapiler elektroforez tabanlı yöntemi geliştirerek valide etmişlerdir.

Ayırma işlemlerinde, 130mM SDS ile pH'sı 9.5 'olan 50 mM borat tamponu ile Meck şartları kullanılmıştır. 10 kv potansiyel uygulanmış ve 200 nm'de ölçüm yapılmıştır. Süreçte piyasadan temin edilen 10 adet çözünür kahve ürünü ölçülmüş, kafein ve pyroglutamat düzeyleri karşılaştırılmıştır. Kafeinli olsun ya da olmasın yüksek piroglutamathlı bu kahvelerin sedatif/stimulan özellikleri, kavramayı artırıcı etkileri farede test edilmiştir.

Kafein ve analoglarının belirlenmesi çeşitli analizler için önemlidir ve gıdadan klinik örneklerle kadar değişen aralıkta matris çeşitlerinde yapılır. Ters-faz HPLC birçok laboratuvarında standart analiz protokolü haline gelmişken, kapiler elektroforezin yüksek ayırma verimliliği ve daha kısa ayrılma zamanı avantajları vardır. Bu kapsamda, Yeping Zhao ve arkadaşları<sup>80</sup> kafein ve metabolitlerinin (theobromine paraxanthine, teofilin ve 1,3,7-trimethyluric asit) misel kapiler elektroforez (MECC) ayırımı misel faz olarak sodyum dodesil sülfat (SDS) kullanılarak araştırmışlardır.

PH'n etkisi, misel konsantrasyonu, tampon konsantrasyonu, iyonik kuvvet, tampon tuzları, uygulanan gerilim ve enjeksiyon zamanı; ilaçta, yiyecekte ve vücut sıvılarında kafeinin ve dört analogunun tayini için optimum şartların bulunması için çalışılmıştır. Örnekler, tatminkar bir çözünürlük ve tekrarlanabilirlik ile direkt enjeksiyon kullanılarak analiz edilebilir bulunmuştur.

Tuulia Hyötyläinen ve arkadaşları<sup>81</sup>, biyolojik sıvılar ve ilaçlarda, amfetamine, morphine, heroin (acetomorphine), kodeine (methyilmorphine) ve kafein'in simultane belirlenmesi ve hızlı görüntülenmesi için güvenilir bir metot araştırması yapmışlardır. CZE ve MEKC 200 ve 220 nm ile, insan serumu ve urinde analitlerde keşfedilmiştir. Yeterli seperasyon CZE li öncül çalışmalarda elde edilemediği için, ileriki gelişmeler MEKC metodu üzerine odaklanılmıştır.

Sodium lauryl sulfate (pH 10.5) içeren Glycine buffer MEKC ayrıştırılması için kullanılmıştır. Analitler ve karboksilik asit marker tamamlayıcıları olarak, kısa kapiller metod ile 2 dk dan az sürede görüntülenebilir olduğu gösterilmiştir. Çalışılan dalga boyunda absorbe olan markerlar ve endojen tamamlayıcılar tek seferde yeterince ayrıştırılabilmektedir. Bileşenlerin migrasyon süreleri sırasıyla kafein, morfin, eroin, kodein ve amfetamine de artırılabilir. Separasyonun tekrarlanabilirliği iki karboksilik asit ile, analitlerin migrasyonunu belirlemede marker bileşenleri gibi kullanılarak test edilmiştir. Migrasyon için relatif standart deviasyon yüzde 1 indeksinden daha az olduğu görülmüştür.

Qian-Li Zhang<sup>82</sup>, teofilin ve kafeinin hassas bir şekilde belirlenmesi ve hızlıca ayrılması için elektrokimyasal deteksiyon ile entegre, poly(dimetiloksan) (PDMS) mikrokanalitik elektroforez sunmuşlardır. Metanol'ün, katkı maddesi olarak kullanılmasıyla pik şekli ve çözülmesi özellikle geliştirilmiştir.

Analit, 10%'luk (*h/h*) metanol içeren (pH 9.2) 5.0mM borat çözeltisinin akışkan tamponunda sadece 40 s'de iyice ayrılmıştır. Sırasıyla kafein ve teofilin için linear aralık 6M'dan 0,6mM'a kadar olduğu görülmüş ve deteksiyon limiti 4m' olarak belirlenmiştir. Önerilen metot rat serumu ve idrarında kafein ve teofilini tespit etmek için başarıyla uygulanmıştır.

J.P. Aucampa ve arkadaşları<sup>83</sup>, beş çay kateşini olan tianin, kafein, galik asit ve askorbik asidin eş zamanlı analizi için, miselli elektrokinetik kapiler kromatografi metodu geliştirmişlerdir. Kateşinler 2- epikateşin, 1-kateşin, 2-epigalokateşin, 2-epikateşin galat ve 2-epigalokateşingalat' tır. P-Nitrofenol her referansa ve standarta uygulanmıştır. Bütün bileşimler 13 dakikada, 57cm lik silikasız kolon ile ayrıştırılmıştır.

Kolon verilerinin 200nm de absorbans değerlerine bakılmıştır. Bu method, taze çay yaprakları ve çay liköründeki bileşiklerin ölçülmesinde kullanılmıştır. Bütün analitler için bulguların aralığı 1mg/ml ile 20mg/ml arasında olduğu görölmüştür.

Deniz Emre ve arkadaşları<sup>84</sup>, PAR, KAF ve PRO nun üçlü kombinasyonunu içeren farmatik preparasyonların analiz edilmesi için yeni bir micellar elektrokinetik kapiler kromatografik metot geliştirmişlerdir. En iyi sonuçlar elektrolit bekraund olarak 20 mM pH 9.0 borat tamponu içeren 30 mM sodyum dodesil sülfat kullanılarak elde edilmiştir. DIF, IS olarak kullanılmıştır. Ayrım Fused silika kapiler borusunda (50 internal diametre, 44 cm toplam uzunluk, 35.5 cm efektif genişlik) 25 °C'da , üç saniyelik 50mbar basınç altında ve 29 kV potansiyel fark altındaki hidrodinamik enjeksiyon ile gerçekleştirilmiştir. Belirleyici dalga boyu 200 nm olarak tespit edilmiştir. Bu koşullar altında migrasyon süreleri par için 5,174, kaf için 5,513, dıf için 7.195, pro için 9.366 dakika olarak tespit edilmiştir. Metot için Linearite aralığı par ve kaf için 2.200 gmL<sup>-1</sup>, pro için 3.200 gmL<sup>-1</sup>. olarak belirlenmiştir. Belirleme limitleri par ve kaf için 0,6, kaf, pro için 0,8 bulunmuştur. Onaylanmış çalışmaya göre, geliştirilen metotun kesin, güvenli, hassas, spesifik, sağlam ve kuvvetli olduğu ispatlanmıştır. Türkiye' de farklı firmalarca üretilen Farmatik preparasyonlar, geliştirilen metot ile analiz edilmiştir. Aynı preparatlardan biri literatürdeki gibi the derivative ratio spectro zero-crossing spektrofotometrik methodla analiz edilmiştir. İstatistiksel anlamlı fark bulunmamıştır.

#### 2.6.4 Kafein İçeren Karışımların Analizinde Kullanılan Kemometrik Yöntemler.

Erdal Dinç<sup>85</sup> kafein ve parasetamolün tablet formülasyonundaki simültane analizi için, iki spektrometrik metot ve HPLC metodu tasarlamıştır. Oran spektrumu metodu, kafein için 267.9 ve 291.0 nm, parasetamol için 237.0 ve 251.8 nm’de ölçülerek elde edilen analitik sinyallerin ilk türev metodu spektrumunda kullanılması üzerine kurulmuştur. Kalibrasyon grafikleri kafein için 4-40 mg:ml, parasetamol için ise 8-48 mg:ml lik çalışma konsantrasyonlarında hazırlanmıştır. Vierordt metodunda parasetamol’ün değeri  $A \propto c \cdot l$  (1%, 1 cm) dir ve kafeinin determinasyonu zero-order spektrumu içinde 242.9 ve 273.0 nm’de gerçekleştirilmiştir. Matrixi için  $A \propto c \cdot l$  (1%, 1 cm) değeri yazılmıştır ve her iki ilacın miktarlarının ortalamaları matlab yazılımı ile hesaplanmıştır. Spektrofotometrik metot ile elde edilen sonuçlar HPLC metodu ile elde edilenler ile karşılaştırılmıştır.

Erdal Dinç<sup>86</sup>, kafein, parasetamol ve metamizol’ün üçlü karışımlarının spektrumlarının güçlü girişim yaptığı ortamda, karışımın multirezölüsyonu için çok değişkenli spektral kalibrasyon metotları olan tri-linear regresyon-kalibrasyon (TLRC) ve çoklu-doğrusal regresyon kalibrasyon (MLRC) olarak adlandırılan metotları, geliştirilmiştir. Kalibrasyon algoritmaları KAF/PAR/MET den oluşan üçlü komponent sistemi için tanımlanmıştır. Üç bileşenin değişik sentetik karışımlarını kullanarak TLRC ve MLRC metotlarının validasyonu sağlamış ve ismi geçen komponentleri içeren gerçek ticari tablet karışımlarına uygulamıştır. TLRC ve MLRC metotları hızlı, uygulaması kolay, ucuz ve güçlü araçlardır, ayrıca üçlü yahut daha fazla komponent içeren sistemlerin çoklu çözünürlüğü içinde basit bir matematiksel içeriğe sahiptir. Tüm datalar MAPLE V, EXCEL ve SPSS 10.0 yazılımlarıyla türetilmiştir. Metotlar literatürdeki diğer metotlar ile kıyaslanmıştır.

David C. Grant ve arkadaşları<sup>87</sup> kafein ve riboflavin, nikotin amid, piridoxin vitaminlerinin çeşitli enerji içeceklerindeki analizinde yeni bir yaklaşımda bulunmuşlardır. Hızlı küçük-moleküllü analiz yaklaşımı olan bu metot MALDİ-TOMFS başarılı bir şekilde kullanılmıştır. Beş ana Maltın matrisi test edilmiştir.  $\alpha$  siyano-4-hidroksinamik asit yüksek şeker içerikli enerji içecekleri için daha uygun bulunmuştur. Yaklaşık 500:1 mol oranında CTAB matrix ön süpresörü olarak kullanılmıştır. CC.ESI.MS tarafından karşılaştırma amacıyla aynı analizlerle UV saptaması ile enerji içeceklerindeki miktarları belirlenmiştir. Kantitatif olarak 4 analizin kalibrasyon eğrileri göstermiştir ki, işaretlenmiş sürfaktan-mediated metot geleneksel MALDI. TOF. MS ile kıyaslanarak kullanıldığında, korelasyon katsayıları 0,989 (nikotin amid), 0,991(pridoksin), 0,983(kafein) ve 0,987(riboflavin) olduğu ortaya çıkmıştır. Ayrıca yüzey aktif MALDİ.TOF-M sonuçlarının, LC sisteminden elde edilenler ile kıyaslanabileceği gözlemlenmiştir.

M.R. Khoshayand<sup>88</sup>, farmasotiklerdeki parasetamol, ibuprofen ve kafeinin UV spektrofotometri kullanarak, kemometrik yaklaşımla eş zamanlı determinasyonu için basit bir alternatif yol rapor etmiştir. Parasetamolun ibuprofen ve kafeinin spektrumları, yatay aralık içinde çeşitli konsantrasyonlarda kaydedilmiş ve metanol içinde 1nm lik aralıkla 200 ve 400 nm dalga boyu aralığında kalibrasyonu için kullanılmıştır. Kısmi en küçük kareler (PLS), genetik algoritması PLS ile birleştirilmiş (GA-PLS) ve temel bileşen-yapay nöral ağ (PC\_ANN) metodu, verinin kemometrik analizi için kullanılmış ve kemometrik prosedürlerin parametreleri için uygun hale getirilmiştir. Bu kemometrik metotların analitik performansları bağıl tahmin hataları ve % geri kazanım değerleriyle nitelendirilerek birbirleriyle kıyaslanmıştır. GA-PLS genetik algoritması kullanarak tahmin kapasite kaybı olmadığından ve PLS kalibrasyonundaki dalaboyu seçiminden ötürü diğer uygulanan çok değişkenli metotlara karşı üstünlük gösterdiği bildirilmiştir.

Her ne kadar bileşenler önemli ölçüde spektral bir örtüşme gösterebilirler de, bunlar hiçbir ön ayırım adımı gerektirmeyen eşzamanlı ve süratli bir şekilde saptanmışlardır. Bu üç metot da farmasötik formülasyona, kapsüle geri dönüşüm sonuçlarında da belirtildiği gibi ekşiyanlardan gelen herhangi bir tesir olmadığı görülmüştür. Bu önerilen metotlar basit ve hızlıdır ve alternatif analiz araçları olarak ilaçların kalitelerinin kontrol edilmesinde kolaylıkla kullanılabilir olduğu ortaya konulmuştur.

Erdal Dinç ve arkadaşları<sup>89</sup> ilaçların bileşimlerinde bulunan klorfenoksamin hidroklorid (CP) ve kafeinin eş zamanlı determinasyonu için üç yeni metot tanımlamışlardır. İlk metotta 0.1 M HCl içeren ortamda, bileşenlerden her birinin spektrumlarını kendi içinde ortak bölen olarak kullanmak suretiyle elde edilen oran spektrumunun, ilk türevinde (yan ürün), iki ilaç için de maksimum ya da minimumlara karşılık gelen dalga boylarında elde edilen analitik sinyaller, ikincil türev spektrofotometrisi kullanılarak ölçülmüştür. Diğer iki metot olan klasik en küçük kareler (CLS) ve ters en küçük kareler (ILS) metodunda konsantrasyon data matrisleri ilaçların 0.1 M HCl içeren ortamda sentetik karışımlarını kullanılarak hazırlanmıştır. Konsantrasyon data matrisine karşılık gelen absorban data matrisi, 225-285 nm aralığında  $\Delta\lambda=5\text{nm}$  intervallerle alınan 13 dalga boyunun absorbanların zero-order spektrumlarının ölçülmesiyle elde edilmiştir. Kalibrasyon ve regresyon karışımlarında CP ve CAFin bilinmeyen konsantrasyonlarının tahmini için absorban data matrisi ve konsantrasyon data matrisi kullanılmıştır. Rakamsal değerler kemometrik metotla MAPLE V yazılım kullanılarak hesaplanmıştır. Prosedürler hiçbir ön ayırma adımı gerektirmemektedir. Metotların doğruluğu ve kesinliği ilaçların sentetik karışımların analizinin yapılmasıyla doğrulanmıştır. Bu üç metot da bir farmasötik formülasyon ve şeker kaplı tabletlere başarıyla uygulanmış ve sonuçlar birbiriyle karşılaştırılmıştır.

Erdal Dinç ve arkadaşları<sup>90</sup>, ön bir ayırım olmaksızın metamizol asetaminofen ve kafein içeren üçlü bir karışımın çok bileşenli spektrofotometrik analizi için, ters en küçük kareler (ILS) ve faktöre dayalı temel bileşen analizi (PCA) tekniklerini önermişlerdir. Bu kemometrik tekniklerde, absorbans değerlerinin ölçümleri zero-order spektrumunda 0.1 M HCl de bu aktif içeriklerin farklı üçlü karışımlarının spektral dağılım aralığı 225 den 285'e 5 nm intervallerle 13 dalga boyunda gerçekleştirilmiştir.

Absorbans verileri ve konsantrasyon matris veri setleri kullanan her iki tekniğin de hazırlanan kalibrasyonları ternari (üçlü) karışımlarında metamizol asetaminofen ve kafeinin bilinmeyen konsantrasyonlarının tahminini yapmakta kullanılmıştır. Rakamsal hesaplamalar için "MAPLE V" yazılımı kullanılmıştır. ILS ve PCA teknikleri için ortalama iyileşme ve rölatif standart sapma sırasıyla birinci ve ikinci teknikler için kafeinde %99.8 ve 1.68, %99.9 ve 1.66, metamizol için %99.8 ve 1.84, %100.4 ve 2.85 ve asetaminofen için %99.7 ve 1.04, %99.6 ve 1.34 olarak bulunmuştur. Bu teknikler Türkiye'de pazarlanan iki farmakotik formulasyona başarıyla uygulanmış ve sonuçlar yeni bir yüksek performanslı likit kromatografi metoduyla karşılaştırılmıştır.

Erdal Dinç ve arkadaşları<sup>91</sup>, metamizol, acetaminophen, ve kafinden oluşan üçlü karışımların spektrofotometrik multikomponent analizleri için her hangi bir ön ayırtmaya ihtiyaç duymayan ters en küçük kareler (ILS) ve faktöre dayalı PCA tekniklerini tasarlayarak önermiştir. Bu kimyasal ölçüm tekniğinde, 0.1 M HCl içinde üç farklı karışımdan oluşan aktif içeriklerin zero-order spektrumlarının absorbans değerleri, 225 ile 285 nm dalga boyu aralığı içerisinde bulunan 0.5 intervallik aralıklarla belirlenmiş 13 dalga boyunun ölçülmesiyle elde edilmiştir. Bütün tekniklerin kalibrasyonları, bilinmeyen üçlü karışım konsantrelerinde metamizol, asetaminofen ve kafeinin yoğunluklarını tahmin etmek için absorbans data ve konsantre matris veri seti kullanılarak düzenlenmiştir. Sayısal hesaplamalar için MAPLE V yazılımı kullanılmıştır.



ILS ce PCA teknikleri için geri dönüşüm ve standart sapma değerleri sırasıyla, kafein için 99.8, % 1.68, 99.9 ile 1.66%, metamizol için 99.8, 1.84%, 100.4 ile 2.85% asitominofen için 99.7, 1.04 %, 99.6 ve 1.34% olarak tespit edilmiştir. Methodlar Türkiye 'de satılan iki farmasötik formüllerde başarıyla uygulanmış ve sonuçlar yüksek performanslı likit kromatografi methoduyla karşılaştırılmıştır.

Erdal Dinç ve arkadaşları<sup>92</sup>, tablet formundaki kafein ve parasetamolun simultane analizleri için iki ayrı spektrofotometrik metot ile yüksek performans sıvı kromatografi tekniği önermektedirler. Spektrum oranlarından türetilmiş methotun verileri, kafein için 267.9 ve 291.0 nm ve parasetamol için 237.0 ve 251.8 nm ölçülerek elde edilen analitik sinyallerden elde edilmiştir. Kalibrasyon grafikleri kafein için 4-40mg:ml aralığında, parasetamol için 8-48 aralığında hazırlanmıştır. Vierordt's methodunda , A 1 1 (1%, 1 cm) parasetamol ve kafein değerleri sıfır dereceli spektrum içinde 242.9 ve 273.0 nm olarak belirlenmiştir. A 1 1 (1%, 1 cm) için matris değerleri yazılmıştır ve bütün ilaçların miktarları, Matlab yazılım programı kullanılarak hesaplanmıştır. Bu spektrofotometrik methodlarla elde edilen sonuçlar HPLC methodunun sonuçları ile karşılaştırılmıştır.

Erdal Dinç ve arkadaşları<sup>93</sup>, zero- crossing tekniğinin kullanıldığı, sürekli dalgacık analizi üzerine kurulu bir teknik geliştirmişlerdir. Geliştirilen bu tekniği kafein ve propifenazom'un, karışımının çalışma aralığındaki çakışan sinyalleri varlığında, yüksek çözünürlük elde etmek için uygulamışlardır. Dalga ailelerinin optimizasyonları bu karışım için tamamlanmıştır. De-noise prosedürü 4-seviye Haar süreksiz dalga dönüşümü kullanılarak gerçekleştirilmiştir ve sonuçlanan de-noise sinyalleri sürekli Mexican ve Haar dönüşüm metotları ile araştırılmıştır. Sonuç olarak, zero-crossing tekniği, Ca ve Pr içeren farklı karışımların bileşiminin analiziyle test edilen sinyallere dönüştürülmüş ve yapılandırılmış kalibrasyonlara uygulanmıştır.

Bütün hesaplamalar EXCEL ce Matlab 6.5 yazılımı kullanılarak yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar kullanılan metotun karışım analizleri için esnek ve uygulanabilir olduğunu göstermiştir.

### **2.6.5 Kafein İçeren Karışımların Analizinde Kullanılan Spektrofotometrik Yöntemler.**

Carla Isabel Rodrigues ve arkadaşları<sup>94</sup>, geliştirdikleri katı faz ekstraksiyon metodu ile koyu kahve örneklerinde bulunan 7 organik asitin (asetik, sitrik, formik, malik, pirüvik, kuinik ve süksinik) incelenmesinde kullanmıştır. Kahve içeriğinde bulunan kafein ise diğerlerinden farklı olarak UV/HPLC (RP/UV-HPLC) de ters faz metodu kullanılarak belirlenmiştir. Kullanılan metot bütün analitler için iyi bir hassasiyet ve linearite göstermiştir. bir uygulamada, robusta ve arabica türlerinden alınan 20 kahve örneği test edilmiştir. Koyu kahve numuneleri ISO 6668 standartlarında hazırlanmıştır. Sensör analizi için numunelerin yeşil kahve-örneklerinin hazırlanmış ve sonuçlar diğer kahve örneklerinden oluşturulan bir tablodan elde edilen sensör değerleriyle karşılaştırılmıştır. Robusta kahvesinin yüksek dozda kafein içerdiği gösterilmiştir. Toplam asit içeriği, coğrafi bölgesindeki yeşil kahve ve diğer kahve tipleriyle belirlenerek çeşitlendirilmiştir. Her kahve örneğinde sıcak ortamda son asidik özelliği analiz edilmiştir.

Suresh C. Ve arkadaşları<sup>95</sup>, eski çalışmaların devamı olarak, temelinde Vierordt metodu ilavesi olan, meklozin hidroklorid, pridoksin hidroklorit ve kafein in üçlü karışımı incelemiştir. Çözücü olarak 0.01M metanolik sodyum kullanılarak, karışım çözeltilerinin absorbanları, 230, 273 ve 307 nm olarak kaydedilmiş. Eş zamanlı denklemlerle üç çözeltisinde konsantrasyonu belirlenmiştir.

Ali Reza Khanchi ve arkadaşları<sup>96</sup>, theobromin ve kafein miktarını belirlemek için, basit, hızlı ve ekonomik bir spektrofotometrik yöntem olarak kullanmışlardır. Komponentler arasındaki sıkı girişim sebebiyle suni sinirsel bir ağ metodu kullanılmıştır. 230-300 nm aralığında 1 nm lik intervaller ile spektral çalışma yapılmıştır. Girdi ve çıktı katmanları arasında doğrusal aktarım işlevi görevini yapam yapay sinir ağı yöntemi, (5-5-3) dört çeşit İran çayı örneğinde metilksantin konsantrasyonunun belirlenmesi amacı ile uygulanmıştır. Model PLS modeli metodu ile karşılaştırılmış, standart metod olarak HPLC tekniği kullanılmıştır.

Ahmed Ashour<sup>97</sup>, bu çalışmada farmasötik preparat ile laboratuarda hazırlanan karışımlardaki parasetamol ve kafeinin eş zamanlı analizi için iki spektrofotometrik analiz yöntemi geliştirmiştir. PCT ve KAF'ın basit spektrofotometrik analizleri, spektral örtüşmeleri nedeniyle pek mümkün olmamasına karşın, bu çalışmada önerilen methodlar olan, sürekli dalga dönüşümü CWT ve türetilmiş dönüşüm (Savitsky-Golay Filters) metotları her bir KAF ve PCT'nin kantitatif yoldan belirlenmesi için kullanılmıştır. Birçok dalga boyu serisi denenmiştir. Coif1 ve Sym2'in optimum şartlarda en iyi sonucu verdiği bulunmuştur. Spektra oranının dönüşen sinyalleri bütün komponentlerin kalibrasyon kıvrımlarını işaretlemek için kullanılmıştır. Kalibrasyon validasyonunun öngörülebilirliği, kullanılan bu metotların bütün ilaçların çeşitli sentetik karışımlarında uygulanabilirliği ile kendini ispatlamaktadır. Önerilen methodlar farmasötik preparasyonlardaki KAF ve PCT tahmini için kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak HPLC methodu bir referans ile karşılaştırılmış, elde edilen sonuçlar ve referans method sonuçları arasında önemli bir fark bulunmamıştır. Önerilen methodun basit, hızlı, ucuz ve hassas olması nedeniyle kalite kontrol laboratuvarlarında her iki ilaç karışımının günlük ve rutin analizlerinde kullanılmasını önermişlerdir.

Carola F ve arkadaşları<sup>98</sup>, Phenilpropanolamine Hydrochloride, kafein ve Diazepam tablet formülasyonunun determinasyonu için hızlı, güvenilir ve spesifik UV spektrofotometrik metot, geliştirmişlerdir. Bu metod sıvı kromatografi ile karşılaştırılarak doğrulanmış ve ilaçların kantitatif analizi için kullanılmıştır. Yukarıda adı geçen I,II,III bileşikleri için kullanılan metotun lineerlik aralığı sırasıyla 0.36–0.88, 0.012–0.028 ve 0.036–0.084 mg/ml olarak tespit edilmiştir. HPLC korrelasyon katsayıları  $r^2=0.997$ ,  $r^2_{II}=0.999$ ,  $r^2_{III}=0.999$  ve spektrofotometrik katsayılar  $r^2_{I}=0.998$ ,  $r^2_{II}=0.996$ ,  $r^2_{III}=0.999$  olarak bulunmuştur. LC ve UV metodları mükemmel bir hassasiyet ve doğruluk gösterdiği görülmüştür.

Hassaslık değerleri LC 0.2–0.9 ve UV 0.15–0.72 CV değerleri arasında belirlenmiştir. Başka bir deyişle sırasıyla LV ve UV için 0.1–1.8 ve 0.32–1.11 CV değerleri arasında kesinlik değerleri elde edilmiştir. Her iki metod için geri kazanımlar %98.04 dolaylarında hesaplanmıştır. UV ve HPLC metodları farklı orjinli tabletlerde I, II ve III içeriği belirlemek için başarıyla kullanılmıştır.

D.K. Singh ve arkadaşları<sup>99</sup>, teofilin ve kafeinin farmasötik formülasyonlardaki tayini için spektrofotometrik ölçümle bağlantı yeni bir saflaştırma metodu tanımlamışlardır. Metod asetik asit varlığında sodyum metaperidat ile teofilin ve kafeinin oksidasyonu takip eden MBTH'ın maksimum 630 nm de mavi renkte ışımaya yapan bir ürün oluşturma yöntemine dayanmaktadır. Tanımlanan bu yöntem ile tabletlerdeki kafein ve teofilin kantitatif yoldan tespiti için uygulanmıştır.

Elde edilen sonuçlar İngiliz Farmakopesi (BP) yöntemi ile elde edilen sonuçlarla karşılaştırılabilir sonuçlar ortaya konmuştur. Yaygın kullanılan katkı maddesi olan ekspiyenler önerilen yöntemde farmasötik preparatlarla karışmadığı tespit edilmiştir.

E. Luque-Pe'rez<sup>100</sup>, kahve ve çay örneklerinde kafein' in belirlenmesi için temelinde sıvı membranlarla desteklenme olan, bir akım sistemi geliştirmiştir. Numune hem katı hem de bulamaç halinde analiz edilebildiği söylenmiştir. Numune katı ise direkt olarak membran ünitesine yerleştirilmiş, numune bulamaç halinde ise sürekli membran ünitesine basınçla verilmiştir.

Her iki durumda da, kafein örneklerden salınarak asidik bir alıcı akımı olan PTFE'n-undecane:hexyl eter membrana geçmiştir. Bu akım spektrofotometrik detektöre giderek ve kafeinin 274nm de absorbansının ölçülmesini sağlamıştır. Bu metod, 0,5 ile 15 g ly1 arasında lineer özellik gösterdiği tespit edilmiş, standart sapma verisi ise %3,7 olarak hesaplanmıştır.

E. Dinç<sup>101</sup> klasik en küçük kareler (CLS) ve temel komponent regresyon (PCR) tekniklerini, her hanig bir ön kimyasal ayırma prosedürü kullanılmaksızın asetaminofen ve kafein içeren tabletlerin eş zamanlı analiz için önermiştir. Kemometrik kalibrasyonlar her iki ilacın 0.1 M HCl karışımı içinde hazırlamıştır.

Elde edilen veriler 215–285 nm dalga boyu aralığındaki 15 değerde ölçülerek elde edilmiştir. Elde edilen kemometrik kalibrasyon yöntemleri asetiminofen ve kafein numunelerinin analizi için kullanılmıştır. Sayısal hesaplamalar MAPLEV yazılımı ile yapılmıştır. Sentetik karışımlara iki teknik uygulanarak standart sapma ve ortalama verimleri CLS ve PCR tekniklerinde sırasıyla kafein için %99.9, %1.92, %100.0 ve %1.178, asetominofen için %99.5, %1.29, %99.7 ve %1.00 olarak bulunmuştur. Elde edilen bulgular, daha önce denenmiş referans bir HPLC metodu ile karşılaştırılmıştır. Geliştirilen her iki, metod iki ilacın farmasötik tablet formülasyonunda başarıyla uygulanmıştır.

## 2.7 Aspirin İçeren Karışımların Analizinde Kullanılan Analitik Yöntemler

### 2.7.1 Aspirin İçeren Karışımların Analizinde Kullanılan HPLC Yöntemleri.

Aqel ve arkadaşları<sup>102</sup>, sinir ilacı olan pyridostgmine bromür (PB;3-dimethylaminocarbonyloxy-N-methyl pyridinium bromide) ve ağrı kesici ilaçlar olan asetaminofen, asetilsalisilik asit ve uyarıcı olan kafeinin (3,7-dihydro-1,3,7-trimethyl-1-H-purine-2,6-dione) fare plazması ve idrarındaki ayrımı ve miktar taini için metot geliştirmiştir.

Bileşikleri ayırımında C18 Sep-PakR kartuşları kullanılmış ve daha sonra ters faz C18 kolonlu ile yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile analiz edilmiş ve 280 nm'de ise UV ölçümü yapılmıştır. Bileşikler (pH 3.0) olan % 15-85 asetonitril su karışımından müteşekkil gradiyente 1 ile 1.5 ml / dakika akış hızı ile 14 dakikalık bir süre içinde ayrılmıştır. Alıkonma süreleri 8.8 ile 11.5 dk arasında değişmektedir.

Kantitasyon sınırları 150-200 ng / ml iken tespit limitleri, 100 ve 200 ng / ml arasında değişmekte olduğu bildirilmiştir. Beş örnekten pridostigmin bromür için, asetaminofen, asetilsalisilik asit ve kafein'in kanplazması ve idrar için ölçülmüş ortalama geri kazanım değeri plazma için 70.99.5, 73.79.8, 88.69.3, 83.97.8, ve idrar için 69.18.5, 74.58.7, 85.99.8, 83.29.3 olarak tespit edilmiştir. 100 ve 1000 ng/ml arasındaki konsantrasyon değerlerinde pik alanları ve konsantrasyon arasındaki ilişki doğrusaldır. Endojen plazma veya idrar bileşiminden elde edilen sonuçta kromatogramlarının hiçbirinde girişim yapan bir pike rastlanmamıştır. Bu yöntemde maddeler sıçanlara oral yolla verilmiştir.

K Kranthi<sup>103</sup>, pekçok meyve ve sebze de yaygın olarak bulunan c vitamininin indirgenmiş ve okside formları, askorbik asit (AA) ve dehidroaskorbik asit (DHA) greyfruit içinde stabil kalmasını sağlayan faktörlerin optimizasyonu ve validasyonu amacıyla yeni özgün bir çalışma yapmıştır.

Optimize edilmiş olan metot diğer meyve ve sebzelerdeki AA DHA'nın miktar taini için kullanılmıştır. Stabilizasyon ve validasyon için yapılan çalışmalar greyfurt suyundan AA'yı 1, 3 ve 5 g/100 mL oranında karıştırılan metafosforik asit (MPA) ve trikloro asetik asit kullanarak yapılan ekstraksiyon ile elde edilmiştir.

Greyfurttan 1, 3 and 5 g/100 mL MPA kullanılarak yapılan ekstraksiyonda AA seviyeleri stabil iken (TCA) kullanarak yapılan ekstraksiyonda elde edilen örnekler 48 saat içinde bozulma göstermişlerdir. Çalışılan üç indirgen ajan arasından, tris (2-karboksi etil) fosfin hidroklorür (TCEP) DHA'yı verimli bir şekilde dönüştürmüştür ve 2.5 mmol / L konsantrasyonundaki (TCEP) içinde örnekler 48 saat boyunca stabil kalmıştır. Düşük pH DHA'nın TCEP kullanılarak tamamen dönüştürülmesi ditiyotretol'e nazaran daha çok tercih edilir olduğu gözlemlenmiştir.

Çeşitli meyve ve sebze arasında yapılan incelemede en yüksek seviyede AA 260.1 mg/100 g değeri ile guavada ve en yüksek DHA ise 58.6 mg/100 g ile maydanozda gözlenmiştir. Optimizasyonu yapılmış olan mevcut yöntem, meyve ve sebzelerde iki gün süreyle oda sıcaklığında AA ve DHA'nın bozunmasını önlemiştir.

Dini ve arkadaşları<sup>104</sup>, serbest asetilsalisilik asit, serbest salisilik asit, ve serbest salisilik asit artı salisilik asitin, alkali hidrolizi sonrası gıdalardaki tain ve teşhisi için floresans ölçümüyle birleştirilmiş duyarlı ve hassas bir HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Asetilsalisilik asit postkolon hidrolizi, sonrası salisilik asite çevrilerek saptanmıştır. Metotla birlikte Serbest asetilsalisilik asit ve salisilik asit geri kazanımı %95-98 olarak tespit edilmiş, asetilsalisilik asit katkılı gıdalar için ise salisilik asit geri kazanımı %95 olduğu gözlemlenmiştir. Taze gıdalar için tespit limiti tüm örnekler için 0,02, kurutulmuş gıdalar için ise 0,2 mg/kg olarak tespit edilmiştir. Önceden gıdalardan yüksek miktarda salisilat olduğu düşünülmekteydi, ancak araştırması yapılan 30 gıdanın hiç birinde asetil salisilik asit bulunamamıştır.

Free-plus-bound salisilikasit ve serbest salisilik asit içeriği sebzelerde 0'dan 1 mg/kg'a meyvelerde ise 3 den 28 mg/kg'a kadar değişmektedir. Böylece gıdalarda çok az miktarda salisilik asitin olduğu asetil salisilik asit'in ise bulunmadığı tespit edilmiştir. Günde besinlerden alınan asetilsalisilik asit miktarı sıfırdır, salisilik asit oranı ise 0-5 mg / gün olduğu düşünölmektedir.

Vitamin c vücutta merkezi rol oynamaktadır öyleki, vücuttaki en önemli işlevlerinden birisi bir antioksidan olmasıdır. Üslendiği bu görevin yorumlanması açısından hassas ölçümlerin yapılması önemlidir. Ancak, reaktif doğası ve özellikle biyolojik örneklerde istikrarsızlık göstermesi değerlendirmesini zorlaştırmaktadır. Anette Karlsen ve arkadaşları<sup>105</sup> plasmadaki ve toplamlamdaki askorbikasidin tespitini yapmak için yüksek verimli bir kromatografik metot yanında monlitik bir kolon ve UV ölçümü kullanmıştır.

Yöntem validasyon çalışması sırasında mükemmel analitik duyarlılık, özgüllük, kesinlik, geri kazanım ve doğrusallık göstermiştir. Yöntem, çeşitli klinik araştırmalar sırasında askorbik asit ve toplam askorbik asit değerlendirilmesi için kullanılmıştır.

J.T. Franeta<sup>106</sup>, tabletlerdeki asetilsalisilik asit, parasetamol, kafein ve fenbarbitalin eşzamanlı analizi için çözücü pompası olarak Bio Rad 18 01, enjektör olarak Rheodine 71 25 ve dedektör olarak ise Bio Rad 18 01 UV/Vis dedektörünün kullanıldığı bir HPLC metodunu anlatmıştır. Ayırma Bio SiL HL C18, 5 mm, 250 x 4,6 mm'lik bir kolonda yapılmıştır. Hareketli faz olarak, akış hızı 2,0 ml min-1 olan ve fosforik asitle pH'ı 2,5'e ayarlanmış asetonitril/su (25:75 v/v) karışımı kullanılmıştır. UV dedektörü ile ölçüm 207 nm'de yapılmıştır. Salisilik asitin seviyesini belirlemek aynı şartlar altında mümkündür. Kromatografik parametrelerden olan alıkonma zamanları, kapasite faktörü, pik asimetrisi, seçicilik faktörü ve çözünürlük faktörü gibi kromatografik parametrelerin tanımlanması yapılmıştır.



Validasyon parametreleri olan, doğrusallık ( $r/0,998$ ), gün içi kesinlik (RSD: 0,36/1,89%), günler arası kesinlik (RSD: 0,58/2,18%), hassasiyet (LOD:  $9 \times 10^{-5}$ -  $1,7 \times 10^{-4}$  mg ml<sup>-1</sup> ve LOQ:  $2,5 \times 10^{-4}$  -  $5,6 \times 10^{-4}$  mg ml<sup>-1</sup>), doğruluk (geri kazanmalar: % 98,35- 99,14) ve tekrarlanabilirlik (geri kazanma değerleri: asetilsalisilik asit için % 98,74- 102,08, parasetamol için % 99,93- 102,11, kafein için % 98,25 - 102,12 ve fenbarbital için % 98,15 – 102,3 RSD: % 1,21- 1,85 değerlerinin tümü tatmin edici düzeyde bulunmuştur. Önerilen HPLC metodu, Malophenum tabletlerindeki asetilsalisilik asit, parasetamol, kafein ve fenbarbitalin belirlenmesinde kullanılmıştır. RSD değerleri % 0,99–1,21 aralığında bulunmuştur. Geliştirilen söz konusu HPLC metodu oldukça hızlı ve hassas olduğu için bu ilaçların rutin analizlerinde kullanımı uygun olduğu bildirilmiştir.

Altun ve arkadaşları<sup>107</sup>, asetilsalisilik asit, kafein ve kodein fosfat tayini için doğru, basit, tekrarlanabilir ve duyarlı bir yöntem geliştirilmiş ve valide etmişlerdir. Asetilsalisilik asit, kafein ve kodein fosfat akış hızı 1.0 ml ile izokratik elüsyon ile bir mBondapack C8 sütunu kullanılarak ayrılmıştır. İzopropil alkol, asetonitril, su ve o-fosforik asitten oluşan hareketli fazın bileşimi hacimce 125:125:250:0.5 (*h/h*) dir. Örneklerin tespiti için 215 nm'de fotodiyot array dedektör kullanılmıştır. Asetilsalisilik asit, kafein ve kodein fosfat için doğrusal algılama aralığı sırasıyla 0.40 ve 1000, 0.25 ve 250, ve 0.48 ve 96 mg olarak tespit edilmiştir. Metotun asetilsalisilik asit, kafein ve kodein fosfat için ortaya koyduğu doğrusallık, analiz aralığı, seçicilik, sistem performans parametreleri, hassasiyet, doğruluk ve sağlamlık değerleri kabul edilebilir değerlerde olduğu gösterilmiştir.

Chinmoy Ghosh ve arkadaşları<sup>108</sup>, aspirinin (ASA) ve salisilik asit (SA) insan plazmasındaki eşzamanlı ölçümü için hızlı ve hassas sıvı kromatografisi yöntemi ile birleşik UV yöntemi geliştiririp ve tamamen valide etmişlerdir.

ASA, SA, ve internal standart olarak kullanılan Benzoik asit (BA), perklorik asitin kullanıldığı protein çöktürme metodu ile ekstrakte edilmiştir. Girişim piklerini ayırmak amacıyla içinde ikili modlu bir izokratik elüsyon sistemi bulunan bir ACQUITY marka C18 kolonu üç dakikalık analiz süresi boyunca kullanılmıştır. Doğrusallık aralığının 15 ila 6000 Ng.mL<sup>-1</sup> olduğu tespit edilmiştir. ASA ve SA için gün içi ve günler arası %CV değerleri %15 ve stabilite örneklerinin karşılaştırma örnekleri ile birlikte yüzde değişimi %10 olarak tespit edilmiştir. ASA'nın SA'ya in vitro dönüşüm çalışılmış ve (<% 10)'un altında tutmak amacıyla kontrol edilmiştir. Bu yöntem, yayımlanan diğer metotlara nazaran UV ölçümlerinde daha hassas olduğu gibi duyarlılığı ve verimliliği bakımından diğer LC-MS = MS yöntemlerine göre daha iyi olarak adlandırılmıştır. Bu yöntem 81 mg enterik kaplanmış aspirin tabletlerin tek doz biyoeşdeğerlik (BE) ministrasyon çalışmalarına başarılı şekilde uygulanmıştır.

G. Santoni<sup>109</sup>, aspirin, propifenazon ve kodein fosfatın analjezik tablet formülasyonundaki eş zamanlı analizi için ters-fazlı yüksek performans sıvı kromatografi yöntemi geliştirilmiştir. Önerilen yöntem, salisilik asitin düşük miktarlardaki oranlarında belirlenmesi için uygundur. İzokratik Elüsyon % 1.4 asetik asit ve, mM tetrametil-amonyum bromit hacimce metanol-su (45:55) karışımından ibarettir, ayırım için iki adet C-8 kolon kullanılmıştır.

I.M. Jalal<sup>100</sup>, dekstropropoksifen napsilat, kafein, aspirin ve salisilik asitin determinasyonu için uzun bir gaz kromatografisi ve spektrofotometri yöntemi içeren resmi kompendiyum metot kullanmıştır. Bildirilen analitik şema burada, aynı anda tüm bu bileşenler için hızlı, duyarlı ve istikrarlı bir ters-fazlı HPLC analizini göstermektedir. Toplam elüsyon zamanı 10 dakikadır. Yöntemin doğruluğu ticari ürünler üzerinde test edilmiştir. Yöntem salisilik asitin en düşük konsantrasyonlardaki düzeyini bile kolaylıkla algılayabilmektedir.

Jasmonik asit (JA) ve salisilik asit (SA) bitki büyüme ve gelişmesinde etkili bitkisel hormonlardır. Son çalışmalar JA ve SA'nın arasında patogenetik atak ve biotik strese neden olan karşılıklı ve karmaşık sinyalleşme mekanizmaları varlığını göstermiştir. Özellikle glikozitlerin depo yadada inaktive bileşikler olduğu düşünülmektedir, ancak bunların katkı aglikon miktarının açıklanmasına katkısı göz önüne alınmalıdır.

Bu, SA'nın isochorismate sentez mekanizmasının varlığı nedeniyle, SA biyosentetik başlangıç ürünleri olan fenilalanin, benzoik asit ve sinnamik asit'in endojen miktarını ölçmek için önemlidir. Hideyuki Matsuura ve arkadaşları<sup>101</sup> bu amaçla kullandıkları metotta, döteryumla işaretlenmiş ürünleri internal standart olarak kullanmışlardır.

Yaptıkları bu çalışmanın JA, SA, endojenleri ve ilgili bileşiklerin eş zamanlı analizi ile ilgili elde edilmiş olan ilk belge olduğunu bildirmişlerdir. Tütün bitkisinde biriken JA, SA, endojenleri ve ilgili bileşiklerinin ölçülmesi geliştirilen bu yeni yöntemin pratikliğini ispatladığını bildirmişlerdir. JA, SA ve ilgili bileşiklerin birikme durumunun, TMV enfeksiyonunun her iki durumu ve abiyotik stres durumunda olduğu görülmüştür.

### **2.7.2 Aspirin İçeren Karışımların Analizinde Kullanılan HPLC-MS**

#### **Yöntemleri.**

Diyet salisilatları siklooksigenaz-2'yi inhibe eder ve bu sebepten asprine benzer antienflamatuar özelliklere sahip olabilmektedirler. Asprine duyarlı kişiler ayrıca asetilsiz salisilatlarada tahammülsüz olabilirler ve düşük miktardaki salisilat diyeti faydalarına olabilir. Michael J. Scotter<sup>102</sup> meyveleri, dondurulmuş ve taze sebzeleri, değişik ot türlerini, çiçek ve soğanlarını, içkileri ve pek çok çeşit toplamda 76 adet gıda hammaddesini <sup>13</sup>C karboksil SA'yı internal standart olarak kullanmak suretiyle gaz kromatografisi ve kütle spektrometresi kullanılarak analizini gerçekleştirmişlerdir.

Örneklerin 37 tanesi tespit edilebilir oranda SA içermektedir, kurutulmuş otlarda bulunan maksimum oran en fazla 28.6 mg / kg olarak tespit edilmiştir. Bunun yanında örneklerden sadece köri sosu, tespit edilebilir oran olan 0.34 mg / kg 'da ASA içermekte olduğu görülmüştür. SA ve ASA'nın her ikisinde ölçüm limitleri matris tabanlı ve 0,008 ila 0.23 mg / kg sınırları arasında olduğu bildirilmiştir. Sonuçlar önceki datalarla uyum göstermemektedir, besin ve içecekler için daha geniş bir analiz aralığına ihtiyaç duyulduğunun altı çizilmesi gerektiğini rapor etmişlerdir.

Srinivasa Rao ve arkadaşları<sup>103</sup>, pravastatin ve aspirinin insan plazmasındaki eş zamanlı miktar tespiti için validasyonu tam olarak yapılmış hızlı hassas bir LC-MS/MS test yöntemi geliştirmiştir. Furosemid internalstandard olarak kullanılmıştır. Analitler ve internal standart metil tertiarybutyl eter kullanarak insan plazmasından sıvı-sıvı ekstraksiyonu tekniği ile elde edilmiştir. Seçilen örnekler 0.8mL/min 'lik akış hızına sahip 5m amonyum asetat tamponu ve asetonitrilden oluşan (20:80, *h/h*) mobil fazın kullanıldığı Zorbax SB-C18 kolon kullanılarak kromatografiye edilmiştir.

Elde edilen kalibrasyon eğrisi ( $rZ=0.99$ ) aspirin için 20.07-2012.00 ng/ml, pravastatin için 0.50-600.29 ng/ml aralığında olduğu görülmüştür. Metodun validasyonu FDA yüzdesi olarak yapılmıştır, sonuçlar kabul kriterleri ile örtüşmektedir. Çalışma zamanının 2.0 dakika olması hasebiyle günde 400'den fazla insan plazması örneği ile çalışılması mümkün olmuştur. Metot klinik çalışmalar için kabul edilebilir bulunmuştur.

L. Nova ve arkadaşları<sup>105</sup>, askorbik asit (AA)'tin biyolojik sistemlerdeki potansiyel rolü genişçe simüle etmiştir. Çok sayıda bilim dalının bu bileşik üzerine ilgisi artmıştır. Askorbik asitin determinasyonu gıda, klinik çalışmalar, bitki ya da farmasötik analizler gibi çok sahayı ilgilendirmektedir. Son birkaç yıl içinde, AA ve oksidasyon ürünü olan dehidroaskorbik asit (DHA) determinasyonu için farklı analitik tekniklere dayalı birçok yöntem geliştirilmiştir.

Bu yorum HPLC kullanılarak yapılan her bir yaklaşımın farklılıkları, amaçları, avantaj ile dezavantajlarına açıklık getirmeyi amaçlamaktadır. Burada ayrıştırma mekanizması ve algılama tekniği açısından bakılarak AA ve DHA'nın HPLC ile determinasyonu tartışılmıştır. Bu analitlerin kararlılığı güvenilir bir metot validasyonu elde etme için anahtar konumdadır, bu yüzden bu konuda tartışmaya dahil edilmiştir.

Daha önce bildirildiği üzere, yaşlı insan lens proteinlerinden izole edilen sarı kromoforların benzerliği kromatografik bu metotta elde edilen dataları desteklemektedir. Rongzhu Cheng ve arkadaşları<sup>106</sup>, erken brunescant katarakt lens proteinleri ve kalf lens proteinleri in vitro yoldan askorbile etmiştir. Makalede bu proteyin popülasyonları içerisindeki modifiye amino asitlerin, yeni geliştirilmiş iki boyutlu LC-MS haritalama tekniği ile destekli kütle spektrometresi kullanılarak elde edilen yeni deliller ile desteklenmektedir.

Nolmal insan lenslerinden toplanmış olan suda çözünen proteyinlerinler, erken dönem brunescant katarakt lensleri ve 4 hafta süresince 20 mM askorbikasitle muamele edilmiş yahut edilmemiş kalf lensleri argon gazı altında proteolitik enzimler kullanılarak modifiye enzimlerin açığa çıkarılması için sindirilmiştir. Sindirilmiş proteyinlerin aliquots eşitliğine göre 2.0 gr'ı sise-exclusion kromatografisine Bio-jel P-2 kolonu vasıtasıyla yönlendirilmiş ve 330 nm de ana absorpsiyon piklerinin determinasyonu yapılmıştır. Örnekler 150-106 arası respons faktörler olan pikler ile birlikte tekrar incelenmiş ve MS/MS'e kardeş iyonların modifikasyonunu aydınlatmak amacıyla analiz için yönlendirilmiştir.

Askorbile edilerek sindirilmiş kalf lens proteyinleri ile yapılmış benzer bir analiz, sırasıyla 81, 70 ve 67 kütle değerlerini vermiştir içlerinden 100 değeri katarakt lens proteyinlerinin aydınlatılmasında yardımcı olmuştur.

Ana türlerden toplamda 40 tanesi LC-MS/MS de analiz edilmiştir bunlardan 36 tanesi aydınlatıcı olacak gibi gözükmektedir. Askorbikasit ile inkübe edilmeyen kalf lens proteyinleri çok benzer kütle değerleri göstermiştir. Ancak respons faktör değerleri her bir modifikasyon için 100 den 1000'e düşmüştür. Bu datalar bağlı olarak ana modifiye amino asitlerin erken aşamalarda var olduğunu görülmektedir, brunescient indian katarakt lens proteyinlerinin, askorbikasit modifikasyonu sonucu olarak arttığını gözlemlenmiştir ve muhtemelen bu proteyinler ileri glukasyon bitiş ürünleridir.

Eikozonoidler çeşitli biyolojik tekniklerde önemli rol oynarlar ve spesifik hastalıklar için biomarker olarak kullanılabilirler. Bu nedenle, Dhanonjoy D ve arkadaşları<sup>107</sup> insan plazmasındaki 32 metaboliti ve araşidonik asiti ölçmek için son derece seçici, hassas ve sağlam-liquid chromatography birimine bitişik kütle spektrometrisi metodunu geliştirmişlerdir. Örnek hazırlama, insan plasmasında mevcut olan arafaz kaynağının etkin bir şekilde ortadan kaldırıldığı katı faz ekstraksiyonunu içermektedir.

Kromograik ayırım, mobil faz olarak asetonitril ve 0,5mM amonyum format tamponunun kullanıldığı Luna C8 kolon vasıtasıyla gradient şartları altında gerçekleştirilmiştir. Araştırma arafazı negatif iyon modunda olan elektrospray iyonizasyon ünitesi ile donatılmış kütle spektrometresi ile yapılmıştır. Matriks metodun yeniden oluşumu ve güvenilirliğini etkilememiştir. Bütün analitler araştırılan konsantrasyon aralığında ( $r>0,997$ ) iyi doğrusallık göstermiştir. Analitlerin valide edilmiş kantitasyonlarının alt sınırı sınırı 10 ile 400 pg/ml arasında değişmektedir. Tüm eikozonoidlerin gün içi ve günler arası konsantrasyon limit üstü duyarlılığı (RDS%) %16,8 dir ve doğruluk değerleri ise %108,2-88,1 aralığında değişmektedir. Bu metot eikozonoid ve aspirinin sağlıklı objelerdeki eikozonoid plazma seviyelerinin evaluasyon etkilerine ait basal plazma düzeylerinin belirlenmesi için uygun bulunmuştur.

Jose Feroll ve arkadaşları<sup>108</sup> bu çalışma dehidroaskorbik asit (DHAA) ve askorbik asit(AA)'in biber, domates, portakal ve limondaki eş zamanlı taini için kullanılan seçici reaksiyon izleme modunda, üçlü quadropol ile birleşik kütle spektrometresi ve sıvı kromatografisi (LC-MS\MS) metotlarını tanımlamışlardır. ESI ve MS\MS'nin AA için negatif iyon modu geçişleri m/z 173\143 ve m/z 173\71, DHAA için ise m/z 175\87 ve m/z 175\115 kullanılmıştır. Tüm doğrulama parametreleri her iki bileşik için kabul sınırları içinde olduğu bulunmuştur. Farklı matriks etkileri, başka sebzeler ile yapılan çalışmalarda da gözlemlenmiştir. Standart ekleme yaklaşımı kullanılarak miktar ölçümü yapılmıştır. Tasarlanan matod DHAA ve AA nın eşzamanlı taini için her hangi ilave türevlendirme ya da gereksiz oksidasyon \redüksiyon basamağına ihtiyaç duymamaksızın uygun olduğu görülmüştür. Bu yöntemin başlıca sırasıyla avantajları sadeliği (küçük örnek hazırlama),hız (toplam analiz süresi 5 dk) ve mükemmel hassasiyeti AA ve DHA için (saptama limitleri (Lods) 13 ve 11 ng /mL) olan çok düşük değerleridir.

### **2.7.3 Aspirin İçeren Karışımların Analizinde Kullanılan Kapilarelektroforez Yöntemleri.**

Yajun Tang ve arkadaşları<sup>109</sup> tarafından askorbik asit ve sorbik asitin ultraviyole ile kapiller zone elektroforezinde hızlı tespitini sağlayan bir metot geliştirilmiştir. Elektrolitlerin arka planı, dalga boyu, eklenme zamanı, uygulanan voltaj tartışılmıştır. Askorbik asit ve sorbik asit 80 mmol L<sup>-1</sup> borik asit–5 mmol L<sup>-1</sup>boraks (pH = 8.0) 5 saniye içinde 270 nm dalga boyunda birbirinden ayrılmıştır. Optimum koşullar altında bu metottaki norm değerleri askorbik asit için 2.54–352.00 mg L<sup>-1</sup>, sorbik asit için 1.08–336.39 mg L<sup>-1</sup> olarak belirlenmiştir. Tespit edilen değerler askorbik asit için 1.70 mg L<sup>-1</sup>,sorbik asit için 0.54 mg L<sup>-1</sup> olarak belirlenmiştir. Meyve sularındaki diğer organik asitlerin tespit edilmesinde etkili olmadığı görülmüştür. Bu metot meyve sularındaki askorbik asit ve sorbik asitin tespit edilmesinde çok kullanışlı ve basit bir özelliğe sahiptir.

Marcelo M ve arkadaşları<sup>110</sup>, bu çalışmada, paralel faktör analizi (PARAFAC) ve Parsiyel Least Square(PLS) kullanılan ultraviyole spektrofotometre (210-300 nm) ile Asetilsalisilik asit (ASA) karışımları ve askorbik asit(AA) üzerinde çalışmışlardır. Bu çalışmada iki analitikte de PH oranı 1.0 dan 5.5 e ve konsantrasyon oranı  $1.010^{-5}$  den  $1.010^{-4}$  mol l<sup>-1</sup> e yükselmiştir. PARAFAC spektrum ters evrimi, iki asit için P Ka tahmini ve salisilik asitin ASA içeriğindeki varlığını göstermek için kullanılmıştır.

Tahmin edilen ilk PKa ASA ve AA da 3.41 ve 4.10'a eşitti. Farklı PH daki PLS de ve N-Way PLS çeşitli değerlerdeki kalibrasyon modelleri kullanılarak ASA ve AA nın farmakotikal örneklerinin ayrıntılı tespiti yapılmıştır. En iyi model N-Way PLS-2 ve PLS2 nin PH 1.1 değerinde elde edilmiştir. ASA ve AA örneklerinin sonuçlarının eş zamanlı değerlendirilmesi üreticiler tarafından belirlenen değerler kullanılarak yapılmıştır. İyileşme %97.6 ve 103.6 arasında bulunmuştur. Fakat bu modeller ASA içeriğindeki SA örneğinin belirlenmesinde başarısız olduğu belirtilmiştir. Bundan dolayı SA nın bulunduğu yeni PLS-PH1 modeli düşünüldü ve başarılı bir şekilde uygulanmıştır.

Steen Honore ve arkadaşları<sup>111</sup>, asetilsalisilik asit ve üç metaboliti olan salisilik asit, salisilürük asit ve gentizik asitin ayrılmasını, sulu olmayan tersine çevrilmiş elektrostatik akımlı kapiller elektrofrez sisteminde göstermiştir.

Elektrofrezde metanol ve asetonitril içeren çözücü karışımları kullanılmış ve farklı elektrolitler araştırılmıştır. Akım polikatyon ve hexadimethrine bromid ilave edilerek ters çevrilmiştir. Bu nedenle negatif akım kullanılmıştır. Bu sistem 4 analitikte hızlı ve etkili bir ayrılma sağladığı görülmüştür. Ayrılma metodları asetilsalisilik asit ve ana metabolitlerinin plazma ve idrarda tahlilleri yapılarak değerlendirilmiştir. İdrar ve diğer tüm içerik miktarı yaklaşık 1 ml plazmada 5mg ve 1 ml idrarda 25 mg olarak hesaplanmıştır.



Lin Ling ve arkadaşları<sup>112</sup>, voltaj ayrımı, tampon pH ve konsantrasyon arıştırıcı kapiler türü veya yükleme koşulları gibi çeşitli parametrelerin etkisini analiz ederek kapiller bölge elektroforez'i askorbik ve isoaskorbik asitlerin kararlılığına uygulamıştır. Her iki analit de 5dk içinde yeterli düzeyde belirlenebilmiştir. Önerilen metot da 20cmX25cm i.d kaplanmış tüp, 0.1 M fosfat tamponu pH 5.0, 8kV gerilim ayrımı ve 265 nm'de yapılan ışık emisyonu tespiti kullanılmıştır. Çizgisel kalibre eğrileri 0-1 aralığında, 0.5-1 arasında algılanma limitiyle elde edilmiştir. Bu metot limon ve portakalın yanı sıra portakalda olduğu gibi, piyasada satılan farmakolojik formülasyonlardaki askorbik asitin miktar ve niteliğinin belirlenmesinde çok hızlı, basit ve pratik olduğunu göstermiştir.

Xuemei Sun ve arkadaşları<sup>113</sup>, yeni bir tür ev yapımı karbon fiber mikrodisk demeti-bağı elektrodu kullanılarak, elektrokimyasal tesbit (ECD)'le birleştirilmiş CE'ye dayalı, hapatositi (karaciğer gözesi) olan sıçanlarda askorbik asitin doğrudan belirlenmesi amacıyla yeni bir method tanımlamıştır. Sıçana ait hapatositin iç çapı 25m olan eriyik slika kapilere enjekte edilmiş ve hücre hidroliz solüsyonu olarak kullanılan %0.1 SDS ile çözünmüştür. Sonrasındaki şartlar AA'nın tebiti için uygun hale getirilmiştir.

Kullanılan akışkan tampon,  $1.83 \times 10^{-2}$  mol/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4^{-1}$ .  $7.0 \times 10^{-3}$  mol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (pH 7.8) konsantrasyonda; ayrılma gerilimi 20.0kV, deteksiyon potansiyeli, 0.80 V olarak görülmüştür (doygun kalomel electrot (SCE) e karşı). Metodun konsantrasyona bağlı deteksiyonunun limiti  $1.7 \times 10^{-6}$  mol/l'dür, sinyal gürültü (S/N) oranı 3 ve kütlesi 3.0 mol olarak belirlenmiştir. Doğrusal dinamik dağılım aralığı 5.0 kV lik enjeksiyon gerilimi ve 10 s.lik enjeksiyon zamanı için 0.9962 luk korelasyon katsayısıyla  $5.0 \times 10^{-6}$  dan  $5.0 \times 10^{-4}$  mol/l olarak, bağıl standart sapma migrasyon zamanı için %0.85 ve maksimum akım için 1.8 olarak belirlenmiştir.

Bu metod sıçan hepatositinde AA belirlenmesine başarıyla uygulandı. İyileşme oranı %91 ile %97 arasındaydı ve tek bir sıçanın hepatositinde AA i nin oranı 28 ile 63 mol arasında dağılım gösterdiği belirtilmiştir.

Asetilsalisilik asit (Aspirin) salisilik asit (salicylate) ve salislürük asidi dahil diğer bileşiklere hızlıca metabolize edildiği bilinmektedir. Salisilat ve onun metabolitlerini kontrol etmek toksoloji, farmakoloji ve biomedikalın ilgi alanıdır. Sandra Zauggve arkadaşları<sup>114</sup>, alkaline aköz tamponu, lazer etkili fluoresein (LIF) deteksiyonu ve solute olmayan tooth poling veya türevlendirme özellikleri gösteren üç kapiler elektroforez keşfetmiştir.

Buna bağlı olarak ürindeki salistat ve jantizikin bulunduğunu teşhis eden kompetatif bağlayıcı, elektrokinetik kapiler temelli immünolojik testler geliştirilmiştir. Ancak, bununla birlikte iki bileşiğin farklılaşması yönündeki bulgular tartışmalıdır. Uygun ultraviole eksitasyonu ile çoğu salistat bağlantılı bileşikler ışığa yayar, böylece doğrudan ürin enjeksiyonu ile CE ve LIF deteksiyonu salistat, jantizik ve salislürük asitin determinasyonuna izin vermiştir. 325 nm ile bir HeCd lazer kullanımı üç bileşiğin hepsinin dışarıdan müdahale olmadan denetlenmesini sağlamıştır. 257 nm sıklığı ikiye katlanmış Ar iyon lazerden eksitasyon kullanımıyla jantizik asitle birlikte migrasyonu olan bir endojenöz üriner bleşiğin natif flüor ışınması gözlenmiştir.

Ancak dalga boylarındaki çözünük, kararlı flor ışınma deteksiyonu ile iki madde de ayırt edilmiştir. Dahası bu teknik literatür verilerine kıyasla diğer salistat ve salikür asidin glukoronid bağlayıcıları çeşitli piklerin farzedilen görevine izin verir. Bütün bu üç CE-LIF teknikleri, toksolojik hasta ürünlerine uygulanmış ve ürünler 500 mg asetilsalisilik asit alınımından sonra toplanmıştır. CE sonuçları uygun olarak ticari flöür ışınma polarizasyon immünolojik testten ve geleneksel fotometrik tahlilden elde edilenlerle karşılaştırılmıştır.

Yoko Goto ve arkadaşları<sup>115</sup>, bir aspirin metaboliti olan salisilik asitin bir dizi diode algılayıcı içeren CZE kullanılarak insan serumunda saptanmasına dönük bir metodu tanımlamışlardır. İnsan serumundaki salisilik asitin CZE analizi ile ayrıştırılmasının tekrarlanabilirliği, miktarının belirlenebilmesi ve gün içi ile günler arasında katsayıların belirlenmesi açısından uygundur. Gönüllülerin serumunda CZE ve floresans polarizasyon immünoanaliz ile yapılan saptamalarda yüksek uyum elde edilmesine rağmen eski değerler yeni elde edilen değerlerden bir miktar daha yüksektir. Salisilik asitin standart analiz metodlarıyla aşırı çatışan sonuçlar yoktur. CZE metodu hastalarda SA'nın monitörize edilmesinde basit ve verimli bir metot olabildiği vurgulanmıştır.

Peng Hea ve arkadaşları<sup>116</sup>, burada bir farenin peritonel mast hücresinde, karbon fiber mikrodisk elektrot kümesi içinde elektrokimyasal algılayıcı içeren kapiller elektroforez yöntemiyle askorbik asit tespit edilmesinden bahsedilmiştir. CE-ED sistemi ve tek hücre enjeksiyon sistemi operasyonu daha verimli ve pratik hale getirmek için yeniden düzenlenmiştir. Deneyde kapilleri sallantıdan korumak için kullanılan kendinden tutuculu köpük, elektroferogramın taban seviyesinin stabilitesini korumuştur. Hücre 5 sn süreyle % 0,1 lik sds kullanılarak ayrıca çözünme voltaj olan 2 kV voltajla tamamen çözülmüştür. Kantitatif analizler kalibrasyon eğrileri kullanılarak yapılmıştır ve bir tek farenin peritonel mast hücresinde 2,4 – 7,1 mol arasında askorbik asit olduğu sonucuna varılmıştır.

Angelo Zinellu ve arkadaşları<sup>117</sup>, bu makalede insan plasmasındaki askorbik ve ürik asitlerin eşzamanlı determinasyonu için yeni, hızlı yer konusunda bağımsız bir elektroforez metot önermişlerdir. Konsantrasyon ve akışkan borate tamponu, tüp sıcaklık derecesi ve örnek tedavisi, ayrıştırma, migrasyon zamanları, düzeltilmiş pik bölgeleri ve etkinlik gibi analitik parametrelerin etkisini araştırdılar.

Metafosforik asit protein çöktürücü olarak kullanıldığında, bir 60.2-cm $\phi$  G75-m kapsız silika kapiler ve 100mmol/L sodyum borate tamponu (pH= 8), kullanarak 4 dakikadan az bir zamanda iyi bir ayrılma sağlamıştır. Bu şartlar sırasıyla askorbat ve ürat için göç zamanlarına (CV 0.35 and 0.34%) ve pik alanlarına (CV 3.2 ve 3.1%) iyi bir tekrarlanabilirlik sağlamıştır. Deteksiyon AA için 254nm ve UA için 292 nm ile uygulandığında her iki analit için deteksiyon limiti 0.5mg/L idi. Mevcut metodu 32 normal denekteki plasma ürat ve askorbatı ölçerek ve geçerliği kabul edilmiş kapiler elektroforez analizle karşılaştırılmış ve elde edilen veriler The Passing ve Bablok regresyonu yoluyla analiz edilmiştir.

#### **2.7.4 Aspirin İçeren Karışımların Analizinde Kullanılan Kemometrik Yöntemleri.**

I. Stanimirova ve arkadaşları<sup>118</sup>, farklı ülkelerin ilaç firmaları tarafından üretilen, asetilsalisilik asit (aspirin) örneklerindeki oranlardan elde edilen 14 izotopik oranı ya içeren data setlerinin incelenmesini gerçekleştirmişlerdir. Veri analizinin amacı, sonuçların coğrafi kökeni ya da numunelerin farklı üretim süreçleri gibi diğer özellikleri ile bağlantılı olup olmadığını araştırmaktır. Kullanılan veri analiz yöntemleri temel bileşenler analizi (PCA), sağlam temel bileşen analizi (RPCA), projeksiyon izleme (PP) ve çoklu faktör analizi (MFA) idi. Sonuçlar Hindistan'dan gelen bazı örnekler dışında, coğrafi kökene bağlı olmadığı yönündedir. Ayrıca, benzer örneklerin kümelerini oluşturan bazı ilaç şirketlerine ait örneklerin arasında, bazı ortak özelliklerin olduğu görülmektedir. MFA aracılığıyla yapılan işlemler, değişken seçimini kolaylaştırmış ve değişkenlerin sayısının bilgi kaybı olmadan beşe indirilebilir olduğunu göstermiştir.

Erdal Dinç ve Arkadaşları<sup>119</sup>, efervesan tabletlerde girişim yapan spektrumların varlığında, askorbik asit (AA) ve asetilsalisilik asitin (ASA) eşzamanlı determinasyonunun spektrofotometrik yöntem kullanılarak belirlenmesi için, sürekli dalgacık dönüşümü (SDD), türev spektrofotometri (DS) kısmi en küçük kareler (PLS) metotlarını kullandılar. Ayrıca geliştirilen bu metod ilave herhangi bir kimyasal ön arıtmaya ihtiyaç duymamaktadır.

AA ve ASA için CWT ve DS kalibrasyon denklemleri, sırasıyla dalga boyları karşısında sürekli dalgacık katsayıları ve birinci türev absorbans değerleri elde edilerek sıfır geçiş noktalarına göre CWT ve DS genlikleri ölçülmüştür. PLS kalibrasyonu, konsantrasyon seti ve onun 210-310 nm aralığındaki 220'den 305 nm'ye kadar olan 850 noktadan oluşan tam veri absorbansı kullanılarak yapılmıştır.

Bu üç yöntem, yukarıda ilaçların sentetik karışımları analiz edilerek test edilmiştir ve bu ilaçların 2 ticari farmasötik preparatını içeren gerçek numunelere uygulanmıştır. Karşılaştırmalı bir çalışmada, üç analitik yöntemlerden elde edilen deneysel sonuçlar kullanılarak gerçekleştirilmiştir ve doğru ve kesin sonuçlar elde edilmiştir.

Getu Kahsay ve Arkadaşları<sup>120</sup>, klopidogrel ve asetil salisilik asit ve ilgili maddelerin kombine oral formülasyonlarının eşzamanlı belirlenmesi için UV saptamalı ters faz sıvı kromatografik yöntem geliştirilmiş ve doğrulanmıştır.

Luna C18 kolonunda (150 mm x 4.6 mm, 3 m) 1 mL / dk akış hızında elüsyon gradyanı ve 35 °C kolon sıcaklığı kullanılarak iyi ayırma sağlanmıştır. UV saptaması 220 nm'de gerçekleştirildi. Doğrulama ICH kurallarına göre yapıldı.

Yöntem, özgü, duyarlı (sırasıyla klopidogrel ve asetil salisilik asit için, LOQ = 0.975 g / mL ve 0.0384 g / mL), Klopidogrel için LOQ den 325 g / mL den ve asetil salisilik asit için LOQ 650 g/mL den konsantrasyon aralığında doğrusal, kesin (ara kesinlik için RSD değerleri < % 1) ve ortalama recovery değerleri sırasıyla klopidogrel için 100.7% ve asetilsalisilik asit için % 100.2 ile hassas çıktığı kanıtlanmıştır.

Ayrıca, solüsyon kararlılık ve sağlamlık yöntemi incelenmiştir. Yöntem, klopidogrel ve asetilsalisilik asitin safsızlıklarının tatmin edici ayırma verir ve bu nedenle aktif bir tahlil olmasının yanında ilgili maddenin ölçülmesi için uygundur.

Alaa El-Gindy ve Arkadaşları<sup>149</sup>. Siproheptadin hidroklorür (CP), tiamin hidroklorür (B1), riboflavin-5-fosfat sodyum dihidrat (B2), nikotinamid (B3), piridoksin hidroklorür (B6) ve sorbik asitin eşzamanlı belirlenmesi için üç yöntem sunulmuştur. Kromatografik yöntem, ters-fazlı RP 18 kolon üzerinde yüksek performanslı bir sıvı kromatografik (HPLC) ayırmaya bağlıdır.

Elüsyon, % 0.1 metanolik heksan sülfonik asit sodyum tuzu (çözücü A) ve belirgin bir pH değerine ayarlanmış 2.7 (çözücü B) % 0.1 heksan sülfonik asit sodyum tuzu ihtiva eden 0.01 M fosfat tamponu ile gerçekleştirilmiştir. Gradient HPLC sırasıyla, çözücü A:B için, çözücü oranı 20:80 dan 70:30 (9 dak üzerinde) sonra 80:20 (11 dak üzerinde) ile kullanılmıştır. Kantitasyonu pik alanına göre 220 ve 288 nm'de UV saptaması ile sağlandı. Uygulanan diğer iki kemometrik yöntemleri ise temel bileşen regresyon (PCR) ve kısmi en küçük kareler (PLS) idi. Bu yaklaşımlar, 100 dalgaboylarında  $\lambda = 0,4$  nm süresinde 250-290 nm aralığındaki emme solüsyonlarının UV emme spektrumlarındaki bilgiler kullanılarak karışımdaki her ilaca başarılı bir şekilde uygulanmıştır. Kemometrik yöntemler herhangi bir ayırma adımı gerektirmez. Üç yöntem başarılı bir şekilde farmasötik formülasyona uygulanmış ve sonuçlar birbirleriyle karşılaştırılmıştır.

Jordi ve arkadaşları<sup>150</sup>. Yakın kızılötesi kimyasal görüntülemeyi, farmasötik yapının analitik ihtiyaçlarını ve geleneksel NIR ile pek çok alanda çok yönlü bağlantıları olmasından dolayı, farmasötik araştırmalarda gittikçe artan bir ilgi kaynağı olduğunu belirtmişlerdir. Hiperspektral görüntülemenin kullanıldığı örneklerin direkt analiz yöntemlerinde, tekniğin NIR spektrumunu sağlayan görüntünün elde edilmesinde ve ilaveten görüntünün her bir pikselinde bir örnekten çok sayıda bilgi elde edilmesini sağlamaktadır. Farmasötik araştırmaların ilgisine odaklanıldığında birkaç araştırma kemometrik algoritmanın ortaya çıkardığı bilginin işlevsel olmayışını bildirmektedir. (örn. Bir örnekteki komponentin kararlılığının miktarı). Bu araştırmada, farklı ticari firmalara ait asetilsalisilik asit tabletlerin Multivariate Curve Resolution-Alternating Least Squares (MCR-ALS) niceliksel metoduna göre önerilmiş önceden herhalgi bir kalibrasyon yapılmamış modelde hiperspektral görüntüleme yapılmıştır.

Bu amaçla yüksek derişiklik genişliğinde aktif farmasötik bileşen (ASA) %82 ile % 12 arasında üreticiye bağılı olarak değışmektedir. MCR-ALS asetilsalisilik asitin konsantrasyon haritasını belirlememize imkan tanımıştır, bunun yanında ASA nın sonuç analizinde de tabletlerdeki konsantrasyon dağılımını histogram olarak belirlenmiştir. Sonuçta tabletler farklı olmasına rağmen ASA dağılımının iyi olduğu onaylanmıştır. Ayrıca, belirli konsantrasyondaki miktarlar nominal ASA miktarında iyi bir uyum sağladığı görterdi. Bunun önemi, sonuçların kalitesi MCR-ALS ile birlikte NIR-CI tekniğinin kaliteli sonuçlarının faydasını göstermetedir.

Alberto Navalo'n ve arkadaşları<sup>151</sup>. Florasan spektrumunun 300 – 500 nm olduğu ve uyarma dalgaboyunun 290nm olduğu bir sistemde Naproksen, salisilik asit ve asetilsalisilik asitin bulunduğu üç komponentin karışımlarını ortaya çıkarmaya çalışmışlardır. Konvasiyonel metotlardaki öncü ayırma olmadan direkt ayırma izin vermeyecek şekilde bu bileşiklerin uyarma emisyon spektrumunu fazlaca aşılmıştır.

Buradaki amaç, tüm spektrum çok değişkenli kalibrasyon metodu ve kısmi en küçük kareler (PLS) metodunu kullanılarak bu kimyasalların ayırımına dönük bir metot önermektir. Deneysel kalibrasyon matrisi 18 örnekten yapıldı. Konsantrasyon 0.1 ve 1.0 mg ml<sup>-1</sup> naproxen, 0.5 ve 5.0 mg ml<sup>-1</sup> salisilik asid ve 2.0 ile 12.0 mg ml<sup>-1</sup> asetylsalik asid içermektedir. Çapraz değerlendirme metodu faktörleri numaralandırmak için kullanıldı. Uygun metodun doğruluğunu kontrol için optimize edilmiş model, PLS-1, bu komponentlere uygulanmıştır. Farmasötik ve insan serum örneklerine ve farklı miktarlarda herbir kimyasalla bilhassa uygulanmıştır.

A. Ruiz Medina<sup>152</sup>. Kafein (KAF), asetilsalisilik asit (ASA) ve parasetamol (PAR)'ün farmasotik preparatlardaki eş zamanlı determinasyonu için flow-through multisensor'den türetilen kısmi en küçük kareler (PLS) yöntemiyle katı destekli analitlerin UV deteksiyonu ve rentensiyon integrasyonuna dayalı basit hızlı bir analitik prosedür tasarlanmıştır.

Diode-array spektrofotometri spektrumunu sabitlemek için akışkan hücrede diod array spektrofotometrisi, C18 bağlı boncuk paketleri bulunan akış hücresinde alıkonulan analitlerin 240–350 nm'de spektrumlarını ölçmek için kullanılmıştır. Taşıyıcı faz olarak pH'sı 1 olan 0.5% HClO<sub>4</sub> kullanılmıştır, ilave reaktif veya çeşitlendirme işlemi gerekmez, aktif mikroalan salınım ajanı olarak metanol kullanılmıştır.

Ayrıca multisensörlerden ölçüm alanında doğrusal veriler elde edilmiştir. Karşı gelen analitlerin spektrumları, analize uygun spektrumları çok değişkenli prosedür için çok değişkenli dataların elde edilmesi için kullanılmıştır. Değişik reaksiyon zamanlarında PLS metodunun uygulamalarıyla elde edilmiş istatistiksel parametreler analiz edilmiştir. Gerçek ve sentetik örneklerin analizi ile doğru tam ve kesin sonuçlar elde edilmiştir.



Xue-Zhu Liua<sup>153</sup>, sequential-injection (SI) tekniğinin tarifini yaparak, birleşik tabletlerdeki aspirinin, phenacetin ve kafeinin eş zamanlı tespiti için, ilacı çözme üzerine çalışan otomatik bir otomatik sistem tanımlamıştır. Kısmi en küçük kare kalibrasyon tekniği kullanarak üç komponentin eş zamanlı olarak belirlenmesi için damarda çözünecek 300 ml lik solüsyon enjektöre düz yaylı bir sistemle çekildi. Dedöktöre bağlantısı bulunan eşit 10 ar ml aspire edilen solüsyonlar örnek kullanılan çözücü solüsyonu azaltmak için kalan çözücü solüsyonu tutan spiral taşıyıcılardan geri çekildi. Eşit miktar örnek spektrofotometrik dedektörde durduruldu ve 220 ile 310 nm de tarandı. 15 örnek bir saat boyunca 3 kez işlem gördü ve toplamda 45 ölçüm yapıldı.

Rosa Lucia Simencio ve arkadaşları<sup>154</sup>. deneysel olarak termogravimetrik değişim şartlarında, örneğin ısıtma oranında ya da basit hareketin farmasötik analizlerde herhangi bir değişimi elemine edecek kadar etkili olmadığını göstermişlerdir. Farmasötik formülasyonlarda ilaç aktivasyonlarını belirlemek için yapılan kemometrik yaklaşımlara olan motivasyonu sağlamaktadır. Çoklu lineer regresyonun mikrokristallin selüloz kullanılarak yapılması, noneffervesan olan simule edilmiş askorbik asitin SPA nın tepitinin sıcaklıkla kullanılarak yapılması içindir. Karşılaştırma olarak, diğer mutivaryans kalibrasyon metotları MLR GA tarafından seçilmiş sıcaklık ve tüm sıcaklıkların seçildiği PLS kullanıldı. MLR SPA beklenen AA konsantrasyonunda beklenen en iyi öngörüü sağladı. MLR ile SPA arasında idiyometrik titrasyonun t test %95 güven aralığında anlamlı değişiklik bulunmadı.

### **2.7.5 Aspirin İçeren Karışımların Analizinde Kullanılan Spektrofotometrik Yöntemler.**

Erdal Din ve arkadaşları<sup>155</sup>. Tabletler ve parasetamol (PAR), asetilsalisilik asit(ASP) ve kafein(CAF) in üçlü karışımının kantitatif multirezolüsyonunun, 2 grafiksel dönüşüm metodu olan ilk derive sıfır geçiş oran spektrumu ve sürekli dalgacık dönüşümü sıfır geçiş oran spektrumu metodlarıyla güçlü bir şekilde örtüştüğü gösterildi. Bu çalışmada ilk türev (DA) sıfır geçiş oran spektrumu ve sürekli dalgacık dönüşümü (CWT) sıfır geçiş oran spektrumu metodları, oran spektrumunun dönüşüm sinyallerinin kullanımına dayanmakta ve kalibrasyon grafikleri ise sıfır geçiş puanına karşılık gelen DA ve CWT oran spektrumu genişliklerinin ölçülmesiyle elde edilmiştir. Karşılaştırma amacıyla, aktif komponentleri aynı olan karışımın içeriğini tahmin etmek için PLS kalibrasyon yöntemi kullanıldı. Elde edilen kalibrasyon, sentetik karışımlar ve standart ekleme tekniğı kullanılarak test edildi.

Ticari farmasötik bir preperatta PAR, ASP ve CAF ın eşzamanlı saptamasında uygulandı. Elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak HPLC kalibrasyon yöntemi ile karşılaştırılmış ve iyi bir uyum göstermiştir.

Periasamy Umapathi<sup>156</sup>. Araştırma türev spektrofotometri ile tablet preperatlardaki atenolol, nifedipin, aspirin ve dipiridamol un miktarını tartışmıştır. Kombine preperatlardaki Atenolol ve nifedipin oranları, 0.1 N hidroklorik asit solusyonlarının ikinci düzen türev spektrumları kullanılarak hesaplanmaktadır. Aspirin ve dipiridamol, 0.1 N HCl ve 0.1 N NaOH içinde eşit mol ilaç solüsyonlarına ait oranlar, tarama ile elde edilen ikinci türev fark spektrumları kullanılarak hesaplandı. Yöntem, saf ilaç karışımları ile birlikte ticari preparatlar için de uygulanmış, kesin ve tekrar edilebilir olduğu saptanmıştır.

Yöntem, atenolol, nifedipin, aspirin ve dipiridamol için teşhis aralığını %2.5 te sınırlamış ve sırasıyla 1.53, 0.72, 1.30 ve 1.46 mg/ml olduğunu ortaya koymuştur.

Antonio Ruiz-Medina ve arkadaşları<sup>157</sup>. Sağlam bir destek üzerine emilen türlerinin absorpsiyonunun doğrudan ölçüldüğü katı faz spektrofotometri tekniğini ve akış enjeksiyon analizini salisilik asit tayini için uygulanmıştır. Asetil salisilik asit, uygun yoğunluktaki bir hücreye yerleştirilen Sephadex QAE A-25 rezinin 297nm deki intrinsik emiliminin izlenmesi ile belirlenmiştir. Önerilen yöntem, karşılık gelen çözelti fazlı yöntem ile karşılaştırıldığında duyarlılığı artırmaktadır ve seçiciliği 30 kat ve daha fazladır. Önerilen sensör, enjekte örnek hacmi değiştirilerek çeşitli kalibrasyonlarda çalışmayı sağlar. Böylece, 1 ila 20 ve 2-40 mg/ml dan doğrusal dinamik aralıkta, 0.064 ve 0.135 ml<sup>-1</sup> olduğu tespit limitleri ile, sırasıyla, 1000 ve 300 ml kullanılarak elde edilebilir. Sırasıyla bağıl standart sapmalar %0.52, 0.38 ve örneklem frekansları da 18 ve 25 h<sup>-1</sup> bulundu. Algılayıcı asetilsalisilik asidin hidroliz öncesi hali olan salisilik asidin indirekt olarak belirlenmesini de sağlar.

Asetilsalisilik asit için, doğrusal dinamik aralık 5-120 mg ml<sup>-1</sup> ve örneklem frekansı 25 h<sup>-1</sup> (örnek hacmi 300 ml) elde edilmiştir. Önerilen sensör, farmasötik preparatlarda her iki analitin belirlenmesi ile başarı ile uygulanmıştır.

P. Ortega Barrales ve arkadaşları<sup>158</sup>. Katı-faz spektrofotometresi (SPS) tekniğini, demir(II) ferrozin şelatın formasyonu ardından redükte olan demir(III) iyonu etkisiyle oluşan askorbik asidin spektrofotometrik belirlenmesinde kullandılar. Dextran tip anyon değişim jeli ve paketlenmiş 1 mm lik hücrede absorbe edilen jele emdirilen şelat 567 ve 800 nm de direk olarak ölçülmüştür. Örneğin 100 ml si kullanılarak görünür molar absorplama 2,1107 l mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> dir ve 5±90 ng ml<sup>-1</sup> aralığında askorbik asidin belirlenmesine izin verir. Saptama sınırı askorbik asidin 50 ng ml<sup>-1</sup> luk bir konsantrasyon için 0.91 ng ml<sup>-1</sup> ve MSB% 0.91 dir (n.10)'dir.

Önerilen yöntem, askorbik asidin herhangi bir prekonsantrasyonu olmadan son derece duyarlı ve seçici belirlenmesine izin vermektedir ayrıca meyve suları, ilaç, idrar ve konservatif sıvılardaki askorbik asidin belirlenmesinde tatmin edici bir şekilde uygulanmıştır.

Julio cesar ve arkadaşları<sup>159</sup>. bu çalışmalarında asetil salisilik asit, parasetamol kafeinin farmasötik formülasyonlardaki determinasyonu için solid-faz moleküler floresans ve ikinci dereceden değişken kalibrasyon tekniklerini kullanmışlardır. Bu method bilinmeyen karışımlarda, bileşenlerin spektral girişim yaptığı karışımlarda bile uygulanabilir. Paralel faktör analizi PARAFAC model gelişimi için kullanılmıştır, bu yolun etkinliği de ANOVA (çoklu varyans analizi) ile gösteriştir. % 10 un altındaki hatalar dış geçerlilik kümesi kullanılarak bütün bileşiklerde elde edilmiştir. Yeni prosedürün düşük maliyet, örnek hazırlama gerektirmemesi, floresan spektrofotometre ile hızlı ve kolay analizi, atık oluşturmaması gibi yararları referans metotlarında yer almamaktadır.

Bu metodu yararları daha çekici kılmakta, bileşiklerin doğru ve çoğaltılabilir bir şekilde eş zamanlı belirlenebilmesine izin vermektedir.

Zenon Kokot<sup>160</sup>. Aspirinin ve 'zero crossing' ikincil-türev uv spektrofotometri yöntemi ile formüle edilen geç salınlı tablet formülasyonlu aspirin içindeki salisilik asitin eş zamanlı analizi için hızlı, kolay analiz yöntemi geliştirmiştir. Aspirin ve salisilik asitin sıfırinci dereceden absorpsiyon spektrumu ve ikincil türev spektrumu asetonitril-formik asit sulandırıcı solüsyonunda kaydedilmiştir. Methodun güvenilirliği 5 tablet formülasyonlarında (aynı partinin her bir 20 tabletinde) ASA ve SA nın belirlenmesiyle, tanımlanan methodla, yüksek performanslı sıvı kromatografik methodla gösterilmiştir ve sonuçlar görüş birliğindedir.

Altair ve Ark<sup>161</sup>. Kısmi en küçük kare algoritmasının değişkenini olan PLS-1'i farmasötik formüllerdeki asetilsalisilikasit ve kafeinin katı-faz spectrofluorimetric yöntem kullanılarak belirlenmesi için kullanmıştır. Kullanılan bu method, sık örtüşen spektral bantların etkin bir şekilde çözülmesine imkân sağlayarak, analitlerin eş zamanlı ölçümüne izin vermektedir. Analiz öncesi numune hazırlanması gerekmemektedir. Kalibrasyon seti 50-170 mg g<sup>-1</sup> ASA ve 5-20 mg g<sup>-1</sup> CF den oluşan toplamda 83 örnekten oluşmaktadır. 25 örnekten oluşan diğer set harici doğrulama için kullanılmıştır. Öngörülen deney konsantrasyonlardaki görüş doğrudur( r= 0.987 ve 0.974 ASA ve CF modelleri için). Bütün modellerin öngörü performansı; değişkenlik katsayısı, göreceli öngörü tayini, oran hata aralığına göre değerlendirilmiştir. Nihai PLS1 modelleri farmasötik formüllerdeki ASA ve CF nin belirlenmesi için kullanılmıştır.

Airton Vicente ve arkadaşları<sup>162</sup>. Akışkan enjeksiyon sistemi ile spektrofotometrik aptama, farmasötik formüller içinde L-askorbik asit in saptanmasında tavsiye edilmektedir.

Bu sistemde içinde polyester rezin sütun içeren, sabitleyici (FeOH)<sub>3</sub> dedektörden önce eklenmektedir. 510 nm de görüntülenen Fe(II)-1,10- phenanthroline kompleksini üretebilmek için Fe (III)-1,10 phenanthroline kompleksi L-askorbik asit ile azaltılmıştır. Uygun analitik şartlarda, kalibrasyon denkleminin doğrusallığı ilave miktarda L-askorbik asit için 5.0106 ile 6.0105 aralığındadır. Saptanma limiti 5.0107 M'dir ve geri kazanımlar 98.5-102.0% olarak elde edilmektedir. Farmasötik formüllerin ortak yardımcı maddelerinden ve diğer asetil salisilik asit, kafein ve tiamin gibi aktif maddelerden hiçbir engel gözlenmemiştir.

Erdal Dinç<sup>163</sup>. double divisor-oran spektrum türevi (double divisor –ratio spectra derivative) ve spectra-zero crossing methodlarını, her hangi bir kimyasal ayırma işlemi uygulanmadan askorbik asit, asetilsalisilik asit ve parasetamol içeren efervesan tabletlerin analizlerinde uygulanmıştır. Her iki methodta 3 bileşik için kalibrasyon grafikleri 8-28mg ml<sup>-1</sup> aralığında doğrusaldır. Her iki methodla elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında her ikisinde çok iyi sonuçları verdiği görülmektedir.

### 3. MATERYAL VE METOT

#### 3.7 Kromatografik Yöntem

Kromatografi, bir karışımda bulunan maddelerin, biri sabit diğeri hareketli faz olmak üzere birbirleriyle karışmayan iki fazlı bir sistemde ayrılması ve saflaştırılması yöntemidir. Çeşitli maddelerin hareketli faz yardımıyla, sabit faz üzerinde, değişik hızlarla hareket etmeleri veya sürüklenmeleri esasına dayanır.

#### 3.8 Kromatografi'nin Sınıflandırılması

##### A. Ayrılma Mekanizmalarına Göre

1. Adsorpsiyon Kromatografisi
2. Partisyon Kromatografisi
3. İyon değıştirme Kromatografisi
4. Jel filtrasyon (Moleküler eleme) Kromatografisi
5. İyon çifti Kromatografisi
6. Afinite Kromatografisi

##### B. Uygulama Biçimine Göre

1. Düzlemsel kromatografi
2. Kağıt Kromatografisi
3. İnce tabaka kromatografisi (TLC)
4. Kolon Kromatografisi
5. Gaz kromatografisi (GC)
6. Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC)

HPLC tekniğı son teknolojik ve mikroişlemci gelişmelerin sayesinde daha yüksek basınç ve yeni kolon sistemleri ile UPLC şeklinde kullanılmaktadır.

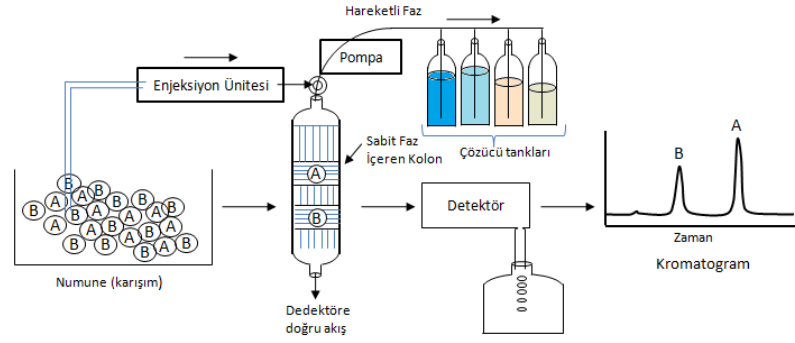
Kromatografik çalışmalarda Aşırı Basınçlı Sıvı Kromatografisi (Ultra High-Performance Liquid Chromatography-UPLC) UPLC’inde fizikokimyasal özelliklerine göre ayrılan moleküller; UV “photo diode array” (PDA) ve floresans dedektör sistemi kullanılarak analiz gerçekleştirilir.

UPLC yöntemi çok çeşitli alanlarda uygulanabilir. Bunlardan en yaygın olanları; farmakokinetik çalışmalar, proteomiks/metabolomiks ve ilaç geliştirme çalışmalarıdır. UPLC yaygın olarak farmasötiklerin farmakokinetik çalışmalarında kullanılır ve bu bakımdan biyolojik analizler açısından çok sıklıkla kullanılır. Bu çalışmalar, örnek olarak bir farmasötik maddenin hepatik kan akımından ve organlardan ne kadar sürede ayrıldığı bilgisini verir. Ayrıca kısa analiz süresi ile büyük bir sağlar.

UPLC bir ayırma yöntemidir. Bu yöntem sayesinde kompleks bir karışımdaki bileşenleri birbirinden ayırır. Şöyle ki, her kompleks bir karışım içindeki kimyasal ve fiziksel özellikleri farklı olan bileşiklerin hareketli ve sabit faz ile etkileşmeleri birbirinden farklı olduğu için kromatografik ayırım sağlanır. UPLC yöntemi ile bir analizin özeti Şekil 3.2.1’ de gösterilmiştir. Bu karışımda A ve B maddesi X çözücüsünde çözünmüştür. Örnek numune UPLC cihazına enjekte edildiğinde, pompa vasıtasıyla hareketli faz kolon boyunca taşınır ve bölmelere ayrılır. Hareketli faz örnekteki bileşenleri kolon boyunca hareket ettirir. Numunedeki A ve B bileşikleri sütunun içinden geçerek hareket eder. Kolon içerisinde A sabit fazla B’ dan daha fazla etkileşim halindedir. Böylece A kolonda B’ den daha uzun süre tutulur. Sonuç itibarıyla B, kolondan A’ den önce ortaya çıkar ve B’ nin tutulma zamanı A’ den daha kısadır.

Kolondan çıkan maddeler detektörler (algılayıcılar) vasıtasıyla kaydediciye kromatogram olarak aktarılırlar (Şekil 3.1). Detektör tepkilerinin zamana göre kaydı sonucu bir kromatogram oluşur.





**Şekil 3.1** UPLC sisteminin basit şeması

UPLC sisteminde kullanılan dedektör sayesinde ayrılan bileşikler dedekte edilerek kromatogram olarak kayıt edilirler. Günümüzün artan nüfusuyla beraber, tükenen kaynaklar ve aşırı gelişen teknolojileri çevre kirliliğinden sağlığa kadar bir çok alanda kompleks bir hal alan analiz işlemleri için UPLC sisteminin kullanımı zorunlu hale gelmiştir. Bu UPLC teknolojisiyle analiz süresi kısaltılmış ve yüksek kromatografik ayırım sağlanmıştır.

### 3.9 Kemometri

Günümüzde bilgisayar, yazılım, istatistik ve uygulamalı matematik alanlarındaki gelişmeler, kimya alanında, özellikle de analitik kimya da kompleks sistemlerin çözümü için kemometri adı verilen yeni bir disiplinin doğuşuna neden olmuştur. Bu gelişmeler, analitik kimya ve komşu branşlardaki araştırmacılara, analitik problemlerin çözümünde yeni olanaklar sağlayan çok boyutlu ve çok değişkenli parametrelerin kullanıldığı kemometrik yöntemlerle yeni çalışma alanları doğurmuştur. Kemometri, istatistik ve matematik ile birlikte bilgisayar kullanarak kimyasal verilerin işlenmesini kapsayan bir kimya disiplini.

Kemometri, kimyasal analizlerde, kimyasal verilerden gerçek bilginin ekstraksiyonunu veya saklı bilgilerin açığa çıkarılmasına olanak tanıyan güçlü bir araçtır. Kemometrinin temel uygulama alanlarından biri analitik kimyadır.

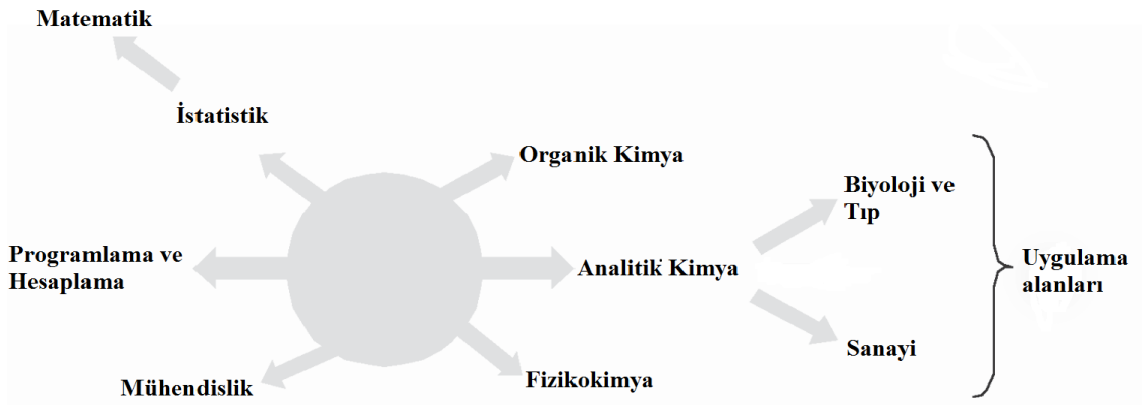
Kemometri kelime olarak, 1970'li yıllarda istatistik ve matematiksel yöntemler ile birlikte bilgisayar ve yazılımların kullanıldığı kimyadaki uygulamaları için sözü edilmeye başlanmıştır. Kemometri kavramı, 1972 yılında İsveçli Svante Wold ve Amerikalı Bruce R. Kowalski tarafından ileri sürüldü ve 1974 yılında uluslararası kemometri derneği tarafından bu disiplinin ilk resmi açıklaması yapıldı. İzleyen yıllarda, dünyada, ulusal ve uluslararası kemometri konferanslarının da organize edildiği gözlenmektedir. Bugün analitik kimyada kemometri disiplininin tanımı, konuları ve çözüm getirdiği problemler için artan yoğunlukta ve çok sayıda kitabının yayınlandığı görülmektedir<sup>15-17</sup>. Bu disiplinin ortaya atıldığı günden itibaren kemometrik yöntemler ve uygulamaları ile ilgili derleme makaleler ve öğretici ders notları yayınlanmıştır<sup>14-16</sup>. Bu kemometrik yöntemlere rağbet edilmesi, kimya ve de analitik kimyada kompleks numunelerin analizinde hızlı, doğru, kesin ve güvenilir sonuçlara ulaşmak için esnek ve çok yönlü çözümler sunmasına bağlanabilir. Yapılan bilimsel çalışmaların sonucu yayınlanan makaleler göstermiştir ki son 15 yıl içinde analitik problemlerin çözümü için gelişmiş analitik cihazlardan elde edilen çok değişkenli ve çok boyutlu ölçüm verilerinin işlenmesi için kemometrik yöntemlerin en büyük kullanıcısı analitik kimyacılarıdır. Kemometri içerik olarak, tanımlayıcı ve açıklayıcı istatistik (descriptive and inference statistics), sinyal işleme (signal processing), deneysel tasarım (experimental design), modelleme (modeling), kalibrasyon (calibration), optimizasyon (optimization), yapı tanıma (pattern recognition), sınıflandırma (classification), yapay akıl yöntemleri (Artificial intelligence methods), resim işleme (image processing), bilgi ve sistem kuramı (information and system theory) gibi kavram ve uygulamaları kemometrinin konularını oluşturmaktadır.

Kemometri disiplininde temel olarak üzerinde vurgu yapılan istatistik-matematik yöntemler üzerindedir. Rastgele (düzensiz) veriler, sırasıyla istatistiğin tanımlayıcı ve açıklayıcı yöntemleriyle karakterize ve test edilirler.

Analitik verilerin işlenmesinde, istatistik ve uygulamalı matematik kemometrinin temel araçlarıdır. Sinyallerin işlenmesi, düzleştirme (smoothing), filtreleme (filtering), türev ve integrasyon için kullanılan algoritmalar vasıtasıyla gerçekleştirilir. Fourier ve dalgacık dönüşümü gibi yöntemler sinyal işlemek için kullanılan yöntemlerdir<sup>16,19</sup>.

Yüksek verimli deneysel çalışmalar, deneysel tasarım ve kantitatif değerlendirme yöntemlerine dayanır. Deneysel tasarım ve kantitatif değerlendirmeler matematiksel modeller veya tasarımlar vasıtasıyla başarılabilir. Deneysel tasarım ve optimizasyon konusunda çok sayıda teknik bilgi notu ve kitap istatistikçiler tarafından yazılmıştır. Bu konuda ilk analitik uygulamalı kitaplardan biri Cornell tarafından yazılmıştır<sup>10</sup>. Doğrusal olmayan kompleks sistemlerde kalitatif ve kantitatif analizlerde yapay zeka yöntemleri olarak yapay sinir ağları yöntemleri, kemometrik çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır.

Kemometrik yöntemlerin en büyük kullanıcısı analitik kimyacılar olmakla birlikte, laboratuvar ve analiz çalışması yapan komşu branşlarda da kullanıldığı yayınlanan eğitici notlardan ve yayınlanan bilimsel makalelerden gözlenmektedir. Kemometrinin farklı disiplinler ile ilişkileri Şekil 3.2’de sunulmaktadır<sup>20</sup>



Şekil 3.2 Kemometrinin farklı disiplinler ile ilişkileri

Yukarıdaki şemadan da (şekil 2) görüldüğü gibi kemometrik çalışmalarda, analitik kimyacıların ve diğer ilgili disiplinlerin ihtiyaçları ölçüsünde uygulamalı matematik ve istatistik bilgisine sahip olmaları gerektirdiği açıktır. Burada programlama ve hesaplama çok önemlidir. Kemometrik uygulamaların çoğu kompleks hesaplamalar içermektedir. Bu hesaplamaları elle veya basit hesap makineleriyle gerçekleştirmek mümkün olmadığı için bilgisayar programlarına ihtiyaç vardır. Kemometrik hesaplamalarda genellikle Excel, Matlab ve diğer paket programlar kullanılmaktadır.

Kemometri; analitik kimya, adli tıp, biyoloji, gıda kimyası, çevre kimyası, arkeoloji gibi alanlarda kullanılmaktadır. Fizikokimyacılar ve madde bilimciler, sinyal işleme ve çok değişkenli verilerin analizinde kemometrik yöntemleri uyguladıkları görülmektedir. Organik kimyacılar ve farmasötik kimyacılar, reaksiyon koşullarının optimizasyonunda deneysel tasarım ve ilaç tasarımında yapı etki ilişkisi çalışmalarında kemometrinin araçlarını kullanmaktadırlar.

### **3.9.1 Çok Değişkenli Kalibrasyon Algoritmaları. (Multivariate calibration algorithms)**

#### **3.9.1.1 Klasik En Küçük Kareler Yöntemi. (Classical Least Squares (K-matris) method)**

Klasik en küçük kareler kalibrasyon yöntemi, spektrofotometrik veya diğer analitik cihazlardan elde edilen ölçüm verilerinden oluşan lineer denklem sistemlerine, Beer–Lambert yasasına uygulanmasıdır. Burada açıklamalar spektrofotometrik çalışmalar için yapılmaktadır.  $A = K \times C$  (Lambert-Beer yasasına göre)'dir. Bu denklem lineer denklem sistemleri ile ifade edilecek olursa;

$$\begin{aligned}A_1 &= K_{11}C_1 + K_{12}C_2 + \dots\dots\dots K_{1c}C_c \\A_2 &= K_{21}C_1 + K_{22}C_2 + \dots\dots\dots K_{2c}C_c \\A_3 &= K_{31}C_1 + K_{32}C_2 + \dots\dots\dots K_{3c}C_c \\&\dots\dots\dots \\A_w &= K_{w1}C_1 + K_{w2}C_2 + \dots\dots\dots K_{wc}C_c\end{aligned}$$



Bu yöntemin basit algoritması:

$$C_{k \times q} = P_{k \times p} A_{p \times q}$$

$$P = (C_{k \times q} A^T (C_{k \times q} A^T (A_{p \times q} A_{q \times p}^T)^{-1})^{-1}$$

$$C_{sample} = P_{k \times p} A_{p \times q}$$

a) Yöntemin avantajları; i) numune için ölçülen absorbans değerleri, formülde yerine konduğu zaman doğrudan konsantrasyonu hesaplamak mümkündür, bu da hesaplamalarda zaman kaybını ortadan kaldırmaktadır, ii) analiz edilen bileşiklerin bilinmesi şartıyla bu kalibrasyon modeli çok kompleks karışımların analizine olanak tanır, b) Yöntemin dezavantajları; i) kalibrasyon için kullanılan dalga boyunun seçimi zor ve zaman alıcı olabilir, ii) dalga boylarının sayısı kalibrasyon numunelerinin sayısı ile sınırlanan modeller kullanılır, iii) genellikle çok sayıda numune kullanılması doğru bir kalibrasyon için gereklidir.

Çünkü katsayı matrisinin hesaplanmasında matris determinant değerinin “0” çıkması sonsuz çözüm gerektirmesi nedeniyle sakınca doğurur, bunu aşmak için de kalibrasyon setindeki seri sayısını artırmak gerekir, iv) kalibrasyon numunelerinin hazırlanması ve bir ön kalibrasyon vasıtasıyla ölçüm son derece zor ve sıkıntılıdır.

### **3.9.2 Temel Bileşen Regresyon Yöntemi (Principal Component Regression, PCR)**

Kemometrik kalibrasyon yöntemlerinden birisi olan temel bileşen regresyon yöntemi, konsantrasyon seti için ölçülen absorbans verilerinin dekompozisyonu ile birbirine dik (ortogonal) doğrular elde edilmesi esasına dayanır. Bu elde edilen doğrular kurulacak kalibrasyonun koordinat sistemidir. Burada açıklanan PCR algoritması martens ve Naes (1984) tarafından verilen şemaya göre açıklanmaktadır. PCR kalibrasyonu kurulmasındaki basamaklar aşağıdaki biçimdedir. Analiz edilecek maddenin konsantrasyon ve absorbans verilerinin varyans-kovaryansı bulunur.

Varyans-kovaryans saçılma matriksinin öz vektörleri ve öz değerleri hesaplanır. Seçilen öz değere (eigenvalue) karşılık gelen öz vektör (eigen vector) kalibrasyonun lineer bileşenidir.

PCR algoritmasında genel lineer regresyon denklemi aşağıdaki biçimde yazılabilir:

$$C = a + b \cdot A$$

Burada C analiz edilecek maddenin konsantrasyonudur, a sabit sayı, b ise temel bileşenlerin ve C-loading matriksinin (q) çarpımından elde edilir:

$$b = P \cdot q$$

Burada P öz vektörlerin matriksidir. öz vektörler kolon matriksi en uygun öz değere (faktöre) ya da öz değerlere (faktörlere) karşılık gelmektedir.

Burada q vektörü C-loadings olarak adlandırılır ve T (sayı matriksi) üzerinden C'nin regresyonu ile tayin edilir:

$$q = D \cdot T^T \cdot Y_0$$

Burada D diagonal matriks olup herbir öz değer tersine eşittir. sayı matriksi aşağıdaki eşitlikten elde edilebilir

$$t_1 = A_0 \cdot P_1$$

Ortalanmış absorbans ve konsantrasyon,  $A_0$  ve  $C_0$  ile gösterilebilir. Burada a sabiti genel lineer regresyon denklemi kullanılarak aşağıdaki eşitlikten hesaplanabilir :

$$a_0 = C_0 - A^T \cdot b$$

Her bir aşamada elde edilen değerler 16 no'lu denklemde yerine konarak numunede bilinmeyen konsantrasyonu hesaplanabilir. Her bir aşamada elde edilen değerler 16 no'lu denklemde yerine konarak numunede bilinmeyen konsantrasyonu hesaplanabilir.

a) Yöntemin avantajları; i) dalga boyu seçimi gerektirmez, genellikle bütün spektral alan ya da bu spektral alanın geniş bir bölgesi kullanılabilir, ii) çok bileşen analiz için kullanılabilir, iii) PCR data işlemleri için ve kalibrasyondaki katsayılarının hesaplanmasında ILS regresyon işleminin kullanılmasına olanak tanır. iv) analiz edilecek bileşenlerin bilinmesi şartıyla çok kompleks karışımlar için kullanılabilir, v) bazen orijinal kalibrasyon karışımlarında bulunan fakat numunede bulunmayan bileşenli numunelerin miktar tayininde kullanılabilir, vi) kalibrasyon için ölçülen absorbansların dekompozisyon işleminden sonra uygun öz vektörlere karşılık seçilen öz değerlerin deneysel ortamdaki ve ölçüm aletlerinden gelen gürültünün eliminasyonuna olanak tanır.

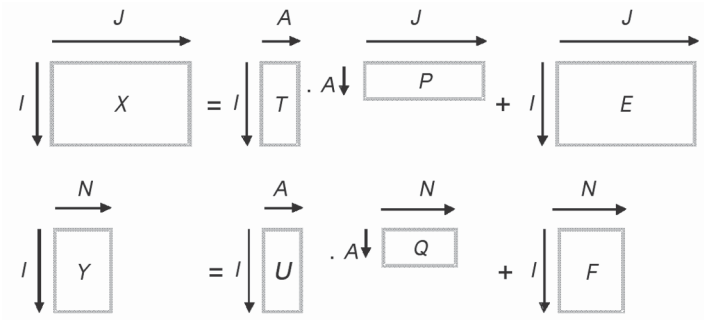
b) Yöntemin dezavantajları; i) hesaplamalar klasik yöntemlere göre daha yavaştır, ii) yöntemin optimizasyonu temel kalibrasyon komponentlerinin bazılarının bilinmesini gerektirir (anlaşılması ve yorumlanması çok kompleks modeller için), iii) kalibrasyon için temel alınan vektörler analiz edilecek bileşenlere karşılık gelmeyebilir, iv) genellikle çok sayıda kalibrasyon numunesinin kullanılması doğru bir kalibrasyon için gereklidir, v) kalibrasyon numunelerinin hazırlanması bileşenlerin konsantrasyonları ile doğrusallıktan uzaklaşmaları nedeniyle zordur.

### **3.9.2.1 Kısmi En Küçük Kareler Yöntemi (Partial Least Squares Regression Method)**

Kemometrik kalibrasyonlardan en yagın ve popüler olanı PLS yön- temidir. PLS yönteminde kalibrasyonun kurulması için kullanılan PLS algoritmalarına göre, ortogonalize edilmiş PLS algoritması (orthogonal-ized PLS algorithm) ve ortogonalize olmayan PLS algoritması (non-orthog- onalized PLS algorithm) gibi şekilleri vardır. ortogonalize PLS ve ortogonalize olmayan PLS algoritması arasındaki temel fark X den faktörlerin çıkarılmasındadır.



PLS kalibrasyonunun PLS1 ve PLS2 şeklinde iki tipi söz konusudur. PLS1 de bir bileşik model içerisinde iken; PLS2 de bütün bileşikler modele dahil edilmektedir. Wold ve martens tarafından verilen PLS algoritması en genel olanlardandır. PLS kalibrasyonu, sayı vektörleri vasıtasıyla X-ve Y-blokları arasındaki ilişkiye dayanır. PLS algoritmasına göre sıfır etrafında merkezleştirilmiş X-değişkeninin matrisi ve sıfır etrafında merkezleştirilmiş Y-değişkeninin parçalanması aşağıdaki biçimde verilir.



**Şekil 3.3** PLS2 kalibrasyonu

$$\begin{aligned}
 X &= T P^T + E \\
 Y &= U Q^T + F \\
 Y &= X B + F \\
 B &= W (P^T W)^{-1} Q^T
 \end{aligned}$$

Burada X= bağımlı değişken (örneğin absorbans verileri), Y = bağımsız değişken (örneğin konsantrasyon), T = X için sayı matrisi, U= Y için sayı matrisi, P = X için yük matrisi Q= Y için yük matrisi, E = X-kalıntı matrisi, F=Y-kalıntı matrisi, W= max(kovaryans( E, F))

PCR algoritmasında olduğu gibi bu katsayılar (B) linear regresyon denkleminde yerine konursa analiz edilecek numunenin absorbans değerleri bu eşitlikte yerine yazılarak hesaplanır.

a) Yöntemin avantajları; i) PLS kalibrasyon işlemi CLS ve ILS hesap tekniklerini kapsamaktadır, ii) tek aşamalı bir dekompozisyon ve regresyon işlemi gerektirir, kalibrasyonda kullanılan öz vektörler analiz edilen bileşenler ile en geniş ortak spektral değişimin olduğu bölgede doğrudan ilişkilidir, iii) kalibrasyonlar genellikle kalibrasyon setinin bilinmeyen numunelerden beklenen değişik konsantrasyonlarını yansıtması daha fazla güvenilirlik sağlayacaktır, iv) yalnızca analiz edilecek bileşenlerin bilinmesi şartıyla kompleks karışımlar için kullanılabilir, v) bazı durumlarda orijinal kalibrasyon karışımlarında bulunan fakat numunede olmayan bileşenli numunelerin miktar tayininde kullanılabilir,

vi) bu tekniklerin hepsi spektral kantitatif analiz için uygulanırken literatürdeki sebepler genellikle PLS'nin tahmin gücünün yüksek olduğunu göstermektedir. Birçok durumda PLS metodları PCR'den daha iyi sonuçlar verir.

b) Yöntemin dezavantajları; i) PLS hesaplamaları klasik metodlar- dan daha yavaştır, ii) PLS modellerin anlaşılması ve yorumlanması zor olup son derece soyuttur, iii) genellikle çok sayıda numune için doğru bir kalibrasyon gereklidir, iv) kalibrasyon numunelerinin hazırlanması bileşenlerin konsantrasyonları ile doğrusallıktan uzaklaşmaları nedeniyle zordur.

### **3.9.2.2 Kalibrasyon (Konsantrasyon) Setinin Tasarımı**

Kemometrik (CLS, ILS, PCR, PLS) kalibrasyonlar için kalibrasyon seti ya rastgele (randomly) yada analizi yapılacak numunede yer alan maddelerin konsantrasyonlarını içerecek şekilde kalibrasyon (konsantrasyon) setinin tasarımı yapılır. Simetrik kalibrasyon setinin planlamasında analiz edilecek maddelerin konsantrasyonları, kalibrasyon setinin içinde ana kümenin permütasyonları şeklinde alt kümeler oluşturmalıdır.

Kemometrik çalışmalarda rastgele kalibrasyon setinin hazırlanmasından ziyade, analiz edilecek maddelerin konsantrasyonlarına göre simetrik bir kalibrasyon setinin hazırlanması, elde edilecek sonuçların doğruluğu ve hataların minimize edilmesi açısından tercih edilecek bir durumdur. Çalışmalarda konsantrasyon (derişim) seti hazırlamasında, çeşitli tasarım Şekilleri verilmekle birlikte rastgele hazırlanan konsantrasyon setleride kullanılmaktadır.

### **3.10 Çapraz Validasyon İşlemi (Cross-Validation Procedure)**

Kemometrik kalibrasyonların validasyonu için kalibrasyonu ve tayin basamaklarında kalibrasyonun standart hatası (standard error of calibration → SEC) ve tayinin (tahminin) standart hatası (standard error of prediction →SEP) gibi parametreler kullanılmaktadır. SEC ve SEP değerlerinin minimum yapan kalibrasyon koşulları ve F-istatistiği kullanılır. Kalibrasyon performanslarını değerlendirmek için, kemometrik kalibrasyonların SEC ve SEP değerleri yanında, bilinen ve tahmin edilen konsantrasyon değerlerinin lineer regresyon analizi yapılarak, korelasyon katsayısı (r), doğrunun eğim (m) ve kesim (n) değerleri kullanılır<sup>16-17</sup>. PCR ve PLS kalibrasyonlarının kurulmasında faktör seçimi için çapraz validasyon işlemi (cross-validation procedure) kullanılır. Bunun için karaların tahmin (tayin) hatalarının toplamı (prediction error sum of squares → PRESS) hesaplanır. optimal faktör sayısını bulmak için ner- ilen kriterler minimum PRESS değeri ve F-istatistidir<sup>16-17</sup>.

### **3.11 Kemometrik Kalibrasyon Yöntemlerinin Uygulamaları**

#### **3.11.1 Kemometrik yöntemlerin uygulama alanları**

Analitik kimyadaki miktar tayini çalışmalarında, kemometrik kalibrasyon yöntemleri yada çok değişkenli kalibrasyon yöntemleri IR spektrofotometre, UV-görünür alan spektrofotometre, spektroflorimetre, potansiyometre, elektrokimyasal analizör, kütle spektrometre, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ve kapiler elektroforez gibi analitik cihazlardan elde edilen analitik veriler uygulanmaktadır. Analitik kimyanın prensip ve yöntemleri çok değişik komşu disiplin tarafından kullanılmaktadır. Bu da analitik kimyanın biyoloji, tıp, ziraat, gıda ve eczacılık gibi alanlarda geniş bir uygulama alanı olduğunu göstermektedir.

Analitik çalışmalarda kemometrik yöntemlerin uygulamaları inorganik analiz, organik analiz, ilaç analizi, klinik ve biyolojik numunelerin analizi, gıda ve su analizleri, çevre analizleri ve stabilite tayinleri, çözünme hızı testleri şeklinde özetlenebilir.

#### **3.11.2 Çoklu Bileşen Analizi (Multicomponent Analysis)**

Son yıllarda, çoklu bileşen analizi, analitik kimyacılar için en önemli konulardan birisi oldu. Bu bağlamda, aynı anda miktar tayinlerinin klinik kimyası, ilaç analizi, kirlilik kontrolü vb. gibi değişik disiplinler ile ilgili aktif bileşikleri içeren karışımların kantitatif analizi için oldukça kullanışlı olduğu kanıtlanmıştır. Çok değişkenli kalibrasyonların absorbans sinyallerine uygulanmasıyla çok bileşen analizlerinden elde edilen sonuçların doğruluğu, yöntem ve kullanılan analitik sinyallere bağlıdır<sup>21</sup>. Çoklu bileşen analizi için kombine farmasötik preparatlardaki aktif bileşiklerin miktar tayinlerine kemometrik kalibrasyon yöntemlerinin uygulaması, bu alanda uğraşan araştırmacılar için ilgi odağı olmuştur.

Örneğin üç farklı kombine farmasötik preparatta asetilsalisilik asit (ASA), asetaminofen (ASE) ve kafeini (KAF) hiç bir ayırma işlemi yapmaksızın ve aynı anda kantitatif analizleri spektrofotometrik çoklu doğrusal regresyon ve PLS kalibrasyonlarıyla gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada kalibrasyonu kurulmasında ASA, ASE ve KAF içeren konsantrasyon matrisi, sırasıyla 4-12 µg/ml, 2.0-10 µg/ml ve 0.9-6.0 µg/ml konsantrasyon aralığında hazırlanmıştır. Çalışmada son derece başarılı sonuçlar elde edilmiştir<sup>21</sup>. İki veya daha fazla aktif bileşiği içeren karışımlarda, çoklu bileşen analizinde kemometrik kalibrasyon ya da çok değişkenli kalibrasyon yöntemleri, doğrudan absorban sinyallerine uygulandığı gibi türev absorban sinyallerine de uygulanabilir. PLS kalibrasyon yönteminin türev yöntemiyle kombine kullanımıyla üç bileşenli bir karışım için iki farklı deneysel tasarım test edilmiş ve sonuçlar tartışılmıştır. Bu kombine yöntem, ırmak sularındaki bileşiklerin tayinine uygulanmıştır<sup>22</sup>. Normal spektrofotometrik absorban ve türev sinyalleri kullanımına dayanan iki kemometrik yöntemin (çoklu doğrusal regresyon→MULTI3 ve PLS2) performansı, asetilsalisilik asit–kafein–kodein ve asetaminofen–kafein–kodein içeren üçlü karışımların analizleri için test edilmiştir ve yöntemler farmasötik preparatlara uygulanmıştır<sup>23</sup>. Kemometrik kalibrasyon yöntemleriyle bazı veteriner preparatlarının analizi için normal ve türev absorban spektrumları kullanılmıştır. Türev tekniği ile PLS yöntemin kombine kullanımının anlamlı avantajlar sağladığı belirtilmektedir<sup>24</sup>. Bu sonuç, zemin çizgisi etkisinin ilişkili olduğu ölçüm hataları olarak karakterize edilen ve hata kovaryans matrislerindeki kovaryans işlemiyle indirgenmesi ve türevin filtre etkisinin bazı etkili gürültüyü kısmen gideren öngörüsüyle açıklanabilir. Bu yaklaşım bir dereceye kadar başarılı olurken, türevin filtre etkisi, hata kovaryans matrisinin az da olsa işlemler ile diagonalize olabilmeleri nedeniyle optimal değerlerin elde edildiği düşünülebilir.

Dört kemometrik kalibrasyon tekniği (CLS, ILS, PCR ve PLS) bir farmasötik preparattaki amilorid ve hidroklorotiyazitin, absorpsiyon ve birinci türev spektrofotometrik tayinlerine uygulanmıştır<sup>25</sup>. Farklı farmasötik preparatlarda, krom (tris) pikolinat [Cr(pic)3] 'ın hızlı, doğrudan ölçümü için bir Fourier transform (FT-IR) spektrofotometrik yöntem geliştirilmiştir. Bu çalışmada, Lambert-Beer yasası ve iki kemometrik kalibrasyon (PLS ve PCR) verilerin işlenmesinde kullanılmışlardır<sup>26</sup>. Ticari farmasötik preparatta teofilin anhidrit, guafenesin, difenhidr- amin hidroklorür, metilparaben, propilparaben, sodyum benzoatın miktar tayinleri için PLS1 ve PCR kalibrasyonları uygulanmıştır. Kalibrasyon yöntemleri, 220-270 nm spektral dalga boyu aralığında  $\Delta\lambda = 0.4$  nm aralıklar ile ölçülen absorbans değerleri kullanılarak hesaplanan PLS1 ve PCR kalibrasyonları ile yapay ve ticari preparattaki 6 aktif bileşiğın kantitatif analizi yapılmıştır. Kemometrik sonuçlar, geliştirilen HPLC yöntemiyle elde edilen sonuçlar ile karşılaştırılmıştır<sup>27</sup>. Çok kanallı deteksiyonlu spektrofotometrik verilerin analizine uygulanan, çok değişkenli kalibrasyon kullanarak idrarda iki fluorokinolin (siprofloksasin ve ofloksasin) ve iki nonsteroid antiinflamatuvar ilacın (diklofenak ve mefenamik asit) kantitatif analizi gerçekleştiriliyor. Yöntemin esası fluorimetrik sinyallerin birinci ve ikinci türeve verilerinin kullanımına dayanmaktadır<sup>28</sup>. Mebeverin HCl (mB) ve sülprid (SU) kombinasyonundaki bu etken maddelerin analizi için iki yöntem kullanılıyor. Bu yöntemlerden birincisi, spektrum oranları türev yöntemi, ikincisi klasik en küçük kareler (CLS) kalibrasyon yöntemidir. Kemometrik yöntemde iki aktif bileşiği içeren bir konsantrasyon seti 0.1 M HCl içerisinde hazırlanıyor. Konsantrasyon seti için 200-300 nm dalga boyu aralığında, absorpsiyon spektrumları çizdirilmektedir.

Konsantrasyon seti verileri ve 200-300 nm aralığında, ölçülen absorbanslar arasındaki elde edilen lineer denklemler sisteminden oluşan kalibrasyon karışımlardaki mB ve SU bileşiklerinin tayini için kullanılmıştır<sup>29</sup>.

İkili karışımdaki parasetamol (PAR) ve diklofenak (DIK) miktar tayinleri için herhangi bir ayırma işlemi yapmaksızın PLS1 yöntemi uygulanmıştır. Kemometrik kalibrasyon yöntemiyle üç farklı tablet preparatında PAR ve DIK kantitatif analizi başarıyla gerçekleştirilmiştir. Karşılaştırma için HPLC yöntemi kullanılmıştır<sup>30</sup>. Farmasötik numunelerdeki Fe(II) ve Fe(III) tayinleri için 1,10-fenan-trolin and tiyosiyanat karışımı kullanılarak spektral olarak PC-ANN, PCR ve PLS kalibrasyon yöntemleri geliştirmişlerdir. PC-ANN ve PLS ile elde edilen sonuçların kesinliği kısmen PCR nin sonuçlarınınkinden daha iyi olduğu bulunmuştur<sup>31</sup>. Bir farmasötik formülasyondaki atenolol, amilorid ve klortalidonun miktar tayinleri için üç yöntem geliştiriliyor. Bu yöntemler, HPLC, PCR ve PLS-1 dir. Kromatografik ayırım, ters faz C<sub>18</sub> kolon kullanılarak, asetonitril, 5 mm heptansülfonik asitinin sodyum tuzundan (20:80, *h/h*, pH=4.4) oluşan hareketli faz ile gerçekleştirilmiştir. Bu etken maddelerin analizi için 240-290 nm dalga boyu aralığında  $\Delta\lambda= 0.2$  nm aralıklar ile ölçülen absorbans değerlerinin ölçümüne dayanan, PCR ve PLS1 kemometrik yöntemleri uygulanmıştır<sup>32</sup>. Perfenazin (PER), amitriptilin HCl (AmI) ve imipramin HCl (ImP) içeren ikili ve üçlü tabletlerde içerik tek düzeliği ve çözünme testleri için çifte bölücü-spektrum oranları türev spektrumu (ÇBSOT) ve PLS yöntemleri geliştirilmiştir. ÇBSOT yönteminin sonuçlar PLS yöntemiyle elde edilen sonuçlar ile istatistik olarak karşılaştırılmıştır<sup>33</sup>. Maltol (mAL), etil maltol (EmA), vanilin (VAN) ve etil vanilin (EVA) maddeleri, gıda katkı maddeleridir. Bu maddelerin absorpsiyon spektrumlarının girişim yapması nedeniyle bir ön ayırma işlemi yapmaksızın karışımlardan onların klasik yöntemlerle tek tek miktar tayinleri oldukça zordur. Kemometrik yöntemler bu gıda katkı maddelerinin hiç bir ayırma işlemi yapmaksızın kantitatif analizlerine uygulanmıştır. Bu mAL, EmA, VAN ve EVA bileşiklerin değişik derişimlerde içeren işlem setinin 200-350 nm de absorpsiyonlarından oluşan absobans veriler dizisi kullanılmıştır.

CLS, PCR, PLS ve yapay sinir ağıları (artificial neural networks →ANNs) gibi yedi farklı kemometrik yöntem hesaplanmıştır. Bu kemometrik yöntemler, dört bileşiği içeren karışımların analiziyle test edilmiştir ve ticari gıda numunelerine başarıyla uygulanmıştır<sup>34</sup>. Farklı kemometrik yöntemler (CLS, PCR, PLS1) UV spektral veriler (oD) ve birinci türevleri (1D), amilorid hidroklorür, atenolol hidroklorotiyazid ve timol maleatın karışımlarını içeren numunelerinin aynı anda analizi için uygulanmıştır. Yöntemlerin performansları ANOVA testleri vasıtasıyla karşılaştırılmıştır. oD-PCR, oD-PLS1, 1D-PLS ve 1D-PLS1, tekrar edilebilir ve istatistiksel olarak benzer sonuçlar verdikleri ortaya konmuştur. Yöntemler valide edildikten sonra gerçek numunelere (ticari tablet preparatlarına) uygulanmıştır<sup>35</sup>. İkili karışımdaki atenolol (ATE) ve klortalidonun (KTD) miktar tayinleri, UV spektrum verilerinin kullanımına dayanan PLS1 yöntemiyle başarılmıştır. PLS1 kalibrasyonları ATE için 255-300 nm dalga boyu aralığında ve KTD için 253-268 nm dalga boyu aralığında absorbans ölçümleri kullanılarak oluşturulmuştur. Yapay karışımlarda, geri kazanım değerleri ATE ve KTD için sırasıyla 100.3±%1.0 ve 100.7±% 0.7 olarak bulunmuştur. Daha sonra yöntem ATE ve CTD içeren tablet preparatlarının tek dizelik ve çözünme testlerine uygulanmıştır<sup>36</sup>. Saf ve dozaj formlarda glafenin kantitatif analizi için spektrofotometrik kararlılık gösterme yöntemleri geliştirilmiştir. Bu çalışmada, spektrum oranları türev ve kemometrik yöntemler kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Yukarıdaki çalışmaların dışında CLS, ILS, PCR ve PLS kemometrik kalibrasyon yöntemlerinin, çeşitli analitik cihazlardan elde edilen verilerin kullanımına dayalı olarak, organik bileşiklerin analizinde, gıda analizinde, çevre analizindeki uygulamalarına ait özgün çalışmalar, aşağıdaki alt başlıklar ve karşılık gelen çizelgelerde sunulmaktadır.



### **3.12 Organik Bileşiklerin Kantitatif Analizi**

#### **3.12.1 Farmasötik Analizdeki Uygulamalar**

Farmasötik preparatlar, sabit matriks bileşimi ile nisbeten yüksek seviyede bir, iki veya daha fazla aktif bileşiği içeren ticari formülasyonlardır. Farmasötik preparatların kantitatif analizinde CLS, ILS, PCR ve PLS kalibrasyon yöntemleri artan yoğunlukta kullanılmaktadır. Yardımcı maddelerin varlığında girişim yapan bileşikleri içeren kombine farmasötik preparatların analizi, hiç bir ayırma işlemi yapmaksızın, klasik analitik yöntemlerle mümkün değil iken kemometrik yöntemlerle çözümü son derece basit bir işlemdir. Bu nedenle kemometrik yöntemler, farmasötik numunelerin analizi için potansiyel araçlardır. Kemometrik yöntemler, farmasötiklerin kararlılık (stability) ve bozunma ürünlerinin miktar tayinlerinde de kullanılmaktadır. Bazı çalışmalarda iki veya daha fazla etkin maddeyi içeren tabletlerin çözünme hızı tayinlerinde kemometrik yöntemlerin başarıyla uygulandığı gözlenmiştir.

### **3.13 Gereçler**

#### **3.13.1 Kullanılan Cihaz ve Gereçler**

- Waters Acquity Series UPLC H Class Sistemi (Waters Corporation 34 Maple Street Milford, MA 01757 USA) (PDA sistemi ile birlikte).
- Waters BEH<sup>®</sup> C18 (2.1 x 50 mm, 1.7  $\mu$ ) UPLC Kolonu.
- Empower UPLC Software programı.
- Waters Vial
- Spektrofotometre (UV/ VIS): Shimadzu UV- 1601
- Spektrofotometre (IR): Jasco FT/IR 420
- Kuvartz küvet
- Hassas terazi: Shimadzu Libror AEG-220
- Manyetik karıştırıcı: Ikamak RH Jonke & Kunkel IKA (Labortechnik)
- Magnet
- Pipet (1-10 mL)
- Sartorius Minisart membran filtre (Gözenek çapı = 0,45  $\mu$ m)

- Balon joje (25-250 mL)
- Beher

### **3.13.2 Kullanılan Bilgisayar Yazılımları**

- Microsoft Excel
- Microsoft Word
- E-power software (Waters, USA)
- Matlab 7.0 software

### **3.13.3 Kullanılan Kimyasal Maddeler**

- Metanol (Merck)
- Asetik asit (Merck)
- Aseto Nitril (Merck)
- Kafein (KAF)
- Parasetamol (PAR)
- Asetik asit (AA)
- Asprin (ASP)
- Distile su

## **3.14 Analiz Edilen Bileşiklerin Ticari Preparatları**

### **3.14.1 AFEBRYL<sup>®</sup> Efervesan Tablet Smb Technology S.A. Belçika**

#### **Galepharma:**

- Parasetamol 200 mg
- Asetilsalisilik asit 300 mg
- Askorbik asit 300 mg
- Sitrik asit 678 mg
- Polividon 8 mg
- Laktoz 94 mg
- Sorbitol 83 mg
- Sodyum hidrojen karbonat 1.170 mg
- Sodyum sakkarin 15 mg
- Limon tuzu esansı 15 mg

### 3.14.2 THOMAPYRİN® Tablet, BOehringer INgelheim Phara GmbH ve Co/

#### KG:

- ASP:..... 250 mg
- PAR:..... 200 mg
- KAF .....50 mg/tablet
- Mısır Nişastası,
- Laktoz,
- Stearik Asit,
- Arıtılmış Su

### 3.15 Askorbik Asit Parasetamol ve Aspirin Karışımına ait Ortam şartları

#### 3.15.1.1 Standart Çözeltiler

1. Stok çözeltiler: 20 µg/ml AA, PAR, ASP ve KAF çözeltileri 0.1 M CH<sub>3</sub>COOH ve metanol (75:25, *h/h*) içerisinde hazırlandı.
2. İnternal standart olarak 20 µg /ml AA, PAR ve ASP bileşiklerini içeren 5.0-30.0 µg/ml konsantrasyon aralığındaki 6 adet kalibrasyon set çözeltisi 0.1 M CH<sub>3</sub>COOH ve metanol (75:25, *h/h*) içerisinde hazırlandı.
3. İnternal standart olarak 20 mg/ml AA, PAR ve ASP bileşiklerini içeren 5.0-30.0 µg/ml AA, PAR ve ASP için 5.0-30 µg/ml çalışma aralıkları içinde bu üç bileşiği içeren 19 değişik konsantrasyonlarda validasyon set çözeltisi 0.1 M CH<sub>3</sub>COOH ve metanol (75:25, *h/h*) içerisinde hazırlandı.
4. KAF varlığında gün içi ve günler arası analiz çözeltileri 10, 20 ve 30 µg/ml olarak üç farklı konsantrasyon ile üçer tekrar olmak üzere 0.1 M CH<sub>3</sub>COOH ve CH<sub>3</sub>OH (75:25, *h/h*) içerisinde hazırlandı.

#### 3.15.1.2 UPLC Yönteminde Uygulanan Kromatografik Şartlar

Karışımlardaki AA, PAR ve ASP analizi için UPLC yönteminin geliştirilmesinde optimal kromatografik şartların bulunması amacıyla çeşitli hareketli faz sistemleri, akış hızı, dalga boyu seçimi, enjeksiyon hacmi gibi parametreler test edildi. AA, PAR ve ASP bileşiklerinin ayırımı ve tayini için aşağıda verilen kromatografik şartların uygun olduğu bulundu:

- 1. Hareketli Faz:** 0.1 M asetik asit ve metanol (75:25 *h/h*) karışımıyla oluşan çözücü sistemi
- 2. Kolon Cinsi:** Acquiting UPLC™ BEH fenil kolonu (100 mm x 1.0 mm, i.d., 1.7 µm) kullanıldı.
- 3. Kolon Sıcaklığı:** Kolon sisteminde maddelerin ayırımı 35°C'de gerçekleştirildi.
- 4. Basınç:** Kolondan çözelti akışı sırasında kolon basıncı ortalama 467 bar civarındadır.
- 5. Akış Hızı:** Deneyde akış hızı 0,35 ml/dak. Olacak şekilde ayarlandı.
- 6. Enjeksiyon hacmi:** Analiz süresinde her bir vial'den 3,5 µl alınacak şekilde enjeksiyon hacmi ayarlandı.
- 7. Dalga Boyu:** Parasetamol ve Aspirin ve Askorbik Asit analizi için dalga boyları 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275 ve 280 nm olarak seçildi.
- 8. Çözücü:** 0.1 M CH<sub>3</sub>COOH ve metanol (75:25, *h/h*) sisteminden oluşan karışım çözeltisi

### 3.16 Parasetamol, Kafein ve Askorbik Asit Karışımına Ait Ortam Şartları

#### 3.16.1.1 Standart Çözeltiler

1. Stok çözeltiler: 20 µg/ml PAR, KAF, ASP ve AA çözeltileri 0.1 M CH<sub>3</sub>COOH ve metanol (75:25, *h/h*) içerisinde hazırlandı.
2. İnternal standart olarak 20 mg/ml PAR, KAF ve ASP bileşiklerini içeren 5.0-30.0 µg/ml konsantrasyon aralığındaki 6 adet kalibrasyon set çözeltisi 0.1 M CH<sub>3</sub>COOH ve metanol (75:25, *h/h*) içerisinde hazırlandı.
3. İnternal standart olarak 20 µg/ml PAR, KAF ve ASP bileşiklerini içeren 5.0-30.0 µg/ml PAR, KAF ve ASP için 5.0-30.0 µg/ml çalışma aralıkları içinde bu üç bileşiği içeren 19 değişik konsantrasyonlarda validasyonu set çözeltisi 0.1 M CH<sub>3</sub>COOH ve metanol (75:25, *h/h*) içerisinde hazırlandı.
4. AA varlığında gün içi ve günler arası analiz çözeltileri 10, 20 ve 30 µg/ml olarak üç farklı konsantrasyon ile üçer tekrar olmak üzere 0.1 M CH<sub>3</sub>COOH ve metanol (75:25, *h/h*) içerisinde hazırlandı.

### 3.16.1.2 Klasik UPLC Yönteminde Uygulanan Kromatografik Şartlar

Karışımlardaki PAR, KAF ve ASP analizi için UPLC yönteminin geliştirilmesinde optimal kromatografik şartların bulunması için hareketli faz sistemleri, akış hızı, dalga boyu seçimi, enjeksiyon hacmi gibi parametreler test edildi. PAR, KAF ve ASP bileşiklerinin ayırımı ve tayini için aşağıda verilen kromatografik şartların uygun olduğu bulundu.

1. **Hareketli Faz:** 0.1 M asetik asit ve metanol (75:25 *h/h*) karışımıyla oluşan çözücü sistemi.
2. **Kolon Cinsi:** Acquiting UPLC™ BEH fenil kolonu (100mm x 1.0 mm, i.d., 1.7 µm) kullanıldı.
3. **Kolon Sıcaklığı:** Kolon sisteminde maddelerin ayırımı 35 °C'de gerçekleştirildi.
4. **Basınç:** Kolondan çözelti akışı sırasında kolon basıncı ortalama 467 bar civarındadır.
5. **Akış Hızı:** Deneyde akış hızı 0,35 ml/dak. Olacak şekilde ayarlandı.
6. **Enjeksiyon Hacmi:** Analiz süresinde her bir vial'den 3,5 µl alınacak şekilde enjeksiyon hacmi ayarlandı.
7. **Dalga Boyu:** Parasetamol, Kafein ve Aspirinin analizi için dalga boyları 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275 ve 280 nm olarak seçildi.
8. **Çözücü:** 0.1 M CH<sub>3</sub>COOH ve metanol (75:25, *h/h*) sisteminden oluşan karışım çözeltisi

## 4. BULGULAR

Ayırma yöntemlerinden biri olan, aşırı yüksek basınçlı sıvı kromatografisinin bir karışım'ın analizine uygulanmasındaki temel esas, bileşenlerin biri sabit (stasyoner) ve diğeri hareketli (mobil) olan iki faz arasındaki dağılım dengelerinin farklılığı esasından faydalanarak ayrılmayı sağlayan bir yöntem olmasıdır. Aşırı yüksek basınçlı sıvı kromatografisinde ayrışmaya tabi tutulacak olan karışım, iç çeperinde sabit faz dolgu materyali bulunan kolon sisteminden, değişik çözücü sistemlerinin özel bir pompa yardımıyla uygulanan aşırı yüksek basınç eşliğinde kolon sisteminden geçirilmesi sağlanır.

Enjeksiyon sistemiyle hareketli faz içine enjekte edilen numunede bulunan maddeler kolon sisteminde sabit ve hareketli fazlarla etkileşimleri farklı olduğundan kolon içinde farklı hızlarla hareket ederler.

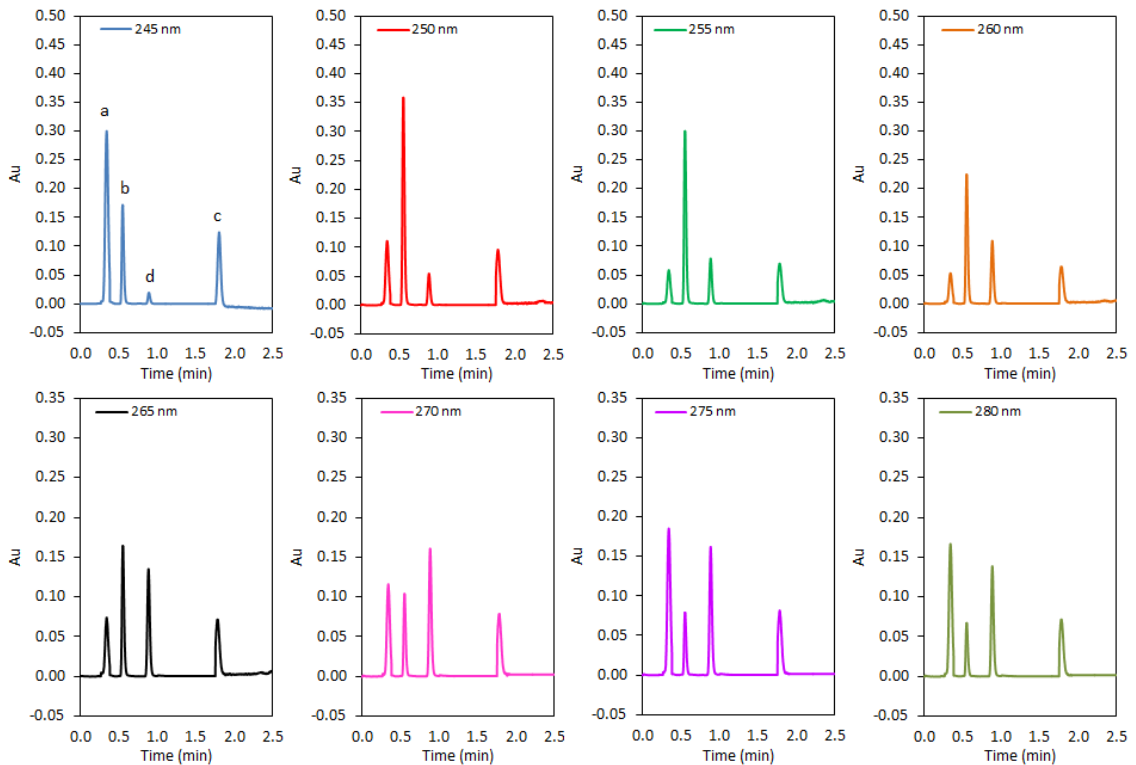
Sonuçta maddelerin tutulma zamanları farklı olduğu için, kolonu terk etme sıralarına göre dedektör sisteminde tespit edilerek, bilgisayarda kullanılan yazılım yardımıyla elde edilen veriler kromatogram olarak kaydedilirler. Kullanılan bu UPLC yöntemi aşırı yüksek basınç ve daha küçük tanecik çaplı, boyutu çok daha küçük yeni nesil kolon teknolojisine dayanan bir ayırma yöntemidir.

## 4.1 Klasik UPLC Yöntemiyle AA, PAR ve ASP Karışımının Analizi

### 4.1.1 Klasik UPLC Yöntemi

#### 4.1.1.1 Klasik UPLC Yönteminde Doğrusal Regresyon Analizi ve Kalibrasyon

Bu doktora tez çalışmasında klasik UPLC yönteminin geliştirilmesinde, 15.0 µg/ml sabit konsantrasyonda internal standart (IS, kafein) eklenerek AA, PAR ve ASP için 5.0-30 µg/ml doğrusal çalışma aralığında hazırlanan 6 adet standart çözeltiyi içeren “konsantrasyon (derişim) seti adı verilen” kalibrasyon setinin 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275 ve 280 nm’de photodiode array (PDA) dedektörü kullanılarak kromatogramlar çizdirildi. Elde edilen bu kromatogramlarda AA, PAR ve ASP ile IS için kolonda tutulma süreleri sırasıyla ortalama 0.364, 0.552 ve 1.802 ile 0.892 dakika olarak gözlemlendi. (Şekil 4.1)



**Şekil 4.1** Derişim set No. 4’e karşılık gelen 20 µg/ml a) Askorbik asit (AA), b) Parasetamol (PAR), c) Aspirin (ASP) bileşikleri ve d) IS Kafein (KAF) için sekiz farklı dalga boyunda dedeksiyon ile kaydedilen kromatogramları.

Kromatografik analizde AA, PAR ve ASP'in standart çözeltilerden hazırlanan konsantrasyon seti için 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275 ve 280 nm dalga boylarında dedeksiyonu yapılan kromatogramlardan, integrasyonla bulunan alanlar EM-Power UPLC programı yardımıyla hesaplandı. Klasik UPLC analiz yönteminin uygulamasında seçilen herbir dalga boyu için AA/IS, PAR/IS ve ASP/IS oranları Tablo 4.1'de sunuldu. Kromatogramların AA/IS, PAR/IS ve ASP/IS alanlarının oranları, konsantrasyona karşı grafiğe geçirilerek bir doğru denklemi elde edildi. UPLC alanları ile konsantrasyonlar arasındaki doğrusal regresyon analizi ve buna bağlı istatistiksel sonuçları, analizi gerçekleştirilen herbir bileşik için Tablo 4.2'de sunulmuştur.



**Tablo 4.1** Konsantrasyon seti ve ilaç ile IS pik alanlarına karşılık gelen kromatografik data seti

			<b>AA , Zaman (dakika) = 0.364</b>								
AA	PAR ( $\mu$ /mL)	ASP	<b>Alan/IS</b>								
			245	250	255	260	265	270	275	280	
FK1	5	5	0.9200	0.8578	0.4978	0.2518	0.1433	0.1148	0.0703	0.0531	
FK2	10	10	1.8391	1.6024	0.9743	0.5160	0.3163	0.2215	0.1502	0.1170	
FK3	15	15	2.9509	2.3393	1.4106	0.8141	0.4947	0.3243	0.2438	0.1851	
FK4	20	20	3.8138	3.1051	1.8874	1.0889	0.6702	0.4321	0.3083	0.2515	
FK5	25	25	4.8878	3.7972	2.3663	1.3609	0.8440	0.5374	0.3962	0.3167	
FK6	30	30	5.8096	4.5465	2.8266	1.6172	0.9971	0.6399	0.4952	0.3831	
			<b>PAR, Zaman (dakika) = 0.552</b>								
AA	PAR ( $\mu$ /mL)	ASP	<b>Alan/IS</b>								
			245	250	255	260	265	270	275	280	
FK1	5	5	1.8347	1.4921	0.8726	0.4780	0.2478	0.1551	0.1028	0.1107	
FK2	10	10	3.6531	2.8634	1.6246	0.8859	0.4750	0.2809	0.2141	0.2119	
FK3	15	15	5.4177	4.3632	2.5425	1.3154	0.7028	0.4072	0.3092	0.3079	
FK4	20	20	7.1124	5.7065	3.2537	1.7290	0.9199	0.5367	0.4099	0.4054	
FK5	25	25	9.1119	7.1848	3.9771	2.1111	1.1529	0.6648	0.5110	0.5090	
FK6	30	30	10.8775	8.5212	4.7780	2.5495	1.3961	0.8043	0.6389	0.6193	
			<b>ASP, Zaman (dakika) =1.802</b>								
AA	PAR ( $\mu$ /mL)	ASP	<b>Alan/IS</b>								
			245	250	255	260	265	270	275	280	
FK1	5	5	0.2297	0.1060	0.0497	0.0328	0.0315	0.0372	0.0312	0.0280	
FK2	10	10	0.4363	0.1970	0.0944	0.0627	0.0579	0.0626	0.0550	0.0563	
FK3	15	15	0.6417	0.3032	0.1335	0.0917	0.0825	0.0867	0.0840	0.0897	
FK4	20	20	0.8467	0.3890	0.1760	0.1195	0.1073	0.1103	0.1077	0.1126	
FK5	25	25	1.0322	0.4875	0.2243	0.1487	0.1333	0.1371	0.1337	0.1470	
FK6	30	30	1.2748	0.5854	0.2666	0.1804	0.1603	0.1614	0.1607	0.1763	

**Tablo 4.2** Doğrusal regresyon analizi ve istatistiksel sonuçlar

<b>AA , t (sn)= 0.364</b>								
$\lambda$ (nm)	m	n	r	SE(m)	SE(n)	SE(r)	LOD	LOQ
245	0.1969	-0.0755	0.9996	2.72E-03	5.09E-02	5.68E-02	1.8988	6.3292
250	0.1474	0.1287	0.9999	8.15E-04	1.59E-02	1.71E-02	0.7915	2.6384
255	0.0931	0.0308	0.9999	5.54E-04	1.08E-02	1.16E-02	0.8507	2.8358
260	0.0551	-0.0222	0.9998	5.66E-04	1.10E-02	1.18E-02	1.4703	4.9010
265	0.0344	-0.0251	0.9997	3.88E-04	7.56E-03	8.12E-03	1.6123	5.3743
270	0.0210	0.0103	1.0000	6.91E-05	1.34E-03	1.44E-03	0.4698	1.5659
275	0.0166	-0.0130	0.9982	5.01E-04	4.66E-03	1.05E-02	2.0620	6.8734
280	0.0132	-0.0138	1.0000	4.45E-05	8.66E-04	9.30E-04	0.4808	1.6025
<b>PAR, t (sn)= 0.552</b>								
$\lambda$ (nm)	m	n	r	SE(m)	SE(n)	SE(r)	LOD	LOQ
245	0.3616	0.0060	0.9998	3.56E-03	6.94E-02	7.45E-02	1.4100	4.7001
250	0.2826	0.0766	0.9999	2.04E-03	3.97E-02	4.27E-02	1.0332	3.4441
255	0.1560	0.1118	0.9994	2.69E-03	5.24E-02	5.63E-02	2.4707	8.2356
260	0.0826	0.0669	0.9999	6.30E-04	1.23E-02	1.32E-02	1.0917	3.6388
265	0.0457	0.0165	0.9999	3.65E-04	7.10E-03	7.63E-03	1.1429	3.8098
270	0.0259	0.0222	0.9999	2.19E-04	4.26E-03	4.58E-03	1.2102	4.0341
275	0.0210	-0.0029	0.9990	4.62E-04	6.99E-03	9.66E-03	2.4490	8.1632
280	0.0202	0.0076	0.9997	2.39E-04	4.65E-03	5.00E-03	1.6940	5.6467
<b>ASP, t (sn)= 1.802</b>								
$\lambda$ (n)	m	n	r	SE(m)	SE(n)	SE(r)	LOD	LOQ
245	0.0412	0.0217	0.9995	6.25E-04	1.22E-02	1.31E-02	2.1675	7.2249
250	0.0192	0.0093	0.9998	2.04E-04	3.97E-03	4.27E-03	1.5232	5.0774
255	0.0087	0.0057	0.9997	1.14E-04	1.52E-03	2.38E-03	1.2903	4.3010
260	0.0059	0.0036	0.9998	5.20E-05	1.01E-03	1.09E-03	1.2709	4.2364
265	0.0051	0.0062	0.9999	3.04E-05	5.92E-04	6.36E-04	0.8545	2.8485
270	0.0050	0.0125	0.9999	3.92E-05	7.63E-04	8.20E-04	1.1309	3.7697
275	0.0052	0.0046	0.9997	5.87E-05	1.14E-03	1.23E-03	1.6211	5.4036
280	0.0059	-0.0020	0.9992	1.19E-04	2.32E-03	2.49E-03	2.8815	9.6049

#### 4.1.1.2 Klasik UPLC Yönteminin Validasyonu

Bu doktora tez kapsamında geliştirilen UPLC yönteminin validasyonu için 0.1M CH<sub>3</sub>COOH ve metanol (75:25, *h/h*) içerisinde AA, PAR ve ASP için 5.0-30 µg/ml doğrusal çalışma aralığı içinde farklı konsantrasyonlarda 19 adet yapay karışım çözeltisinden oluşan bir validasyon seti hazırlandı. Bu validasyon setinin hazırlanmasında her bir karışım çözeltisine 20 µg/ml sabit konsantrasyonda IS stok çözeltisinden ilave edildi. Bu validasyon seti kullanılarak klasik UPLC yönteminin kesinlik ve doğruluğu test yapıldı. Geri kazanım değerleri ASP için % 98.5-101.8 aralığında, PAR için % 99.0-102.0 ve AA için % 98.8-102.0 aralığında bulundu.

Bu geri kazanım çalışmalarının sonuçları Tablo 4.3, Tablo 4.4 ve Tablo 4.5’de sunulmuştur. Bağlı standart sapma değerleri ASP için % 2.22-3.32 aralığında, PAR için % 2.15-3.16 ve AA için % 2.16-2.60 aralığında hesaplandı. Geri kazanım çalışmasında UPLC yönteminin yapay karışımlara uygulanması ile elde edilen sonuçlar AA için Tablo 6’da, PAR için Tablo 7’de ve ASP için Tablo 8’de sunulmaktadır.

**Tablo 4.3** Klasik UPLC yönteminin AA, PAR ve ASP yapay karışımının analizinde AA için elde edilen % geri kazanım sonuçları

Karışım No:	İlave edilen (µg/ml)			AA, Bulunan (µg/ml)									AA, Geri kazanım (%)								
	AA	PAR	ASP	AA	PAR	ASP	AA	PAR	ASP	AA	PAR	ASP	AA	PAR	ASP						
1	5	10	15	5.09	4.96	4.89	5.08	4.75	5.01	5.18	4.90	101.9	99.2	97.8	101.6	95.0	100.1	103.6	98.0		
2	10	10	15	10.47	9.59	9.69	10.45	10.35	9.71	10.49	9.52	104.7	95.9	96.9	104.5	103.5	97.1	104.9	95.2		
3	15	10	15	14.94	14.74	15.02	15.08	14.98	15.03	15.06	14.40	99.6	98.3	100.1	100.5	99.9	100.2	100.4	96.0		
4	20	10	15	19.74	19.30	19.79	20.90	21.08	20.94	20.05	19.05	98.7	96.5	98.9	104.5	105.4	104.7	100.2	95.3		
5	25	10	15	24.93	25.00	24.80	25.25	25.99	26.01	26.28	25.17	99.7	100.0	99.2	101.0	103.9	104.0	105.1	100.7		
6	30	10	15	31.37	29.70	31.05	30.80	30.10	31.12	30.81	30.40	104.6	99.0	103.5	102.7	100.3	103.7	102.7	101.3		
7	15	5	15	15.39	15.03	15.00	15.14	15.16	14.92	15.20	14.59	102.6	100.2	100.0	100.9	101.1	99.5	101.3	97.3		
8	15	10	15	15.87	14.75	15.03	14.94	14.89	14.87	14.90	15.21	105.8	98.3	100.2	99.6	99.3	99.2	99.3	101.4		
9	15	15	15	14.64	15.15	14.27	14.94	15.43	15.24	15.86	14.92	97.6	101.0	95.1	99.6	102.8	101.6	105.7	99.5		
10	15	20	15	15.10	14.98	15.40	14.82	14.89	14.97	15.98	15.15	100.6	99.9	102.6	98.8	99.3	99.8	106.5	101.0		
11	15	25	15	14.99	14.97	14.58	15.57	14.73	15.65	14.98	14.62	99.9	99.8	97.2	103.8	98.2	104.3	99.9	97.5		
12	15	30	15	15.34	15.08	14.91	14.42	15.04	15.24	15.19	15.71	102.3	100.5	99.4	96.1	100.3	101.6	101.2	104.7		
13	15	10	5	15.58	14.31	15.35	14.98	15.14	15.22	15.08	14.95	103.8	95.4	102.3	99.8	100.9	101.5	100.5	99.7		
14	15	10	10	15.63	15.06	14.26	15.10	15.28	15.18	15.14	14.34	104.2	100.4	95.1	100.6	101.8	101.2	100.9	95.6		
15	15	10	15	15.22	14.38	14.94	14.78	15.62	15.04	15.66	14.45	101.5	95.9	99.6	98.5	104.1	100.2	104.4	96.3		
16	15	10	20	15.52	14.84	15.01	15.73	15.08	15.13	14.99	15.03	103.5	98.9	100.1	104.9	100.5	100.9	99.9	100.2		
17	15	10	25	15.28	15.08	14.55	14.99	15.10	14.66	14.93	14.97	101.9	100.5	97.0	99.9	100.7	97.7	99.5	99.8		
18	15	10	30	15.40	15.69	14.85	15.27	15.26	15.03	15.03	15.08	102.7	104.6	99.0	101.8	101.7	100.2	100.2	100.5		
19	15	10	15	14.96	14.53	14.55	15.08	15.75	15.56	15.17	14.64	99.7	96.8	97.0	100.5	105.0	103.8	101.1	97.6		
												$\bar{X}$	=	101.9	99.0	99.0	101.0	101.3	101.1	102.0	98.8
												SS	=	2.27	2.24	2.33	2.27	2.53	2.18	2.33	2.57
												BSS	=	2.22	2.26	2.36	2.24	2.50	2.16	2.28	2.60
												$\bar{X}$ = Aritmetik ortalama, SS= Standart sapma, BSS= Bağıl standart sapma									

**Tablo 4.4** Klasik UPLC yönteminin AA, PAR ve ASP yapay karışımının analizinde PAR için elde edilen % geri kazanım sonuçları

Karışım No:	İlave edilen (µg/ml)			PAR, Bulunan (µg/ml)								PAR Geri kazanım (%)							
	AA	PAR	ASP	245	250	255	260	265	270	275	280	245	250	255	260	265	270	275	280
1	5	10	15	10.40	10.23	10.10	10.40	9.90	10.11	10.27	9.89	104.0	102.3	101.0	104.0	101.0	101.1	102.7	98.9
2	10	10	15	10.39	10.24	10.02	10.30	10.34	10.19	10.27	10.08	103.9	102.4	100.2	103.0	96.7	101.9	102.7	100.8
3	15	10	15	10.26	10.37	9.78	10.00	10.01	10.08	10.19	10.34	102.6	103.7	97.8	100.0	99.9	100.8	101.9	103.4
4	20	10	15	10.46	9.82	9.49	10.27	10.06	10.07	10.10	10.00	104.6	98.2	94.9	102.7	99.4	100.7	101.0	100.0
5	25	10	15	10.22	9.67	9.80	9.72	10.30	10.07	10.41	10.18	102.2	96.7	98.0	97.2	97.1	100.7	104.1	101.8
6	30	10	15	10.36	9.52	9.94	9.95	10.10	9.99	10.17	9.78	103.6	95.2	99.4	99.5	99.0	99.9	101.7	97.8
7	15	5	15	5.21	4.72	5.06	5.11	5.39	5.01	4.96	5.38	104.2	94.4	101.1	102.2	92.7	100.1	99.2	107.5
8	15	10	15	10.64	9.61	9.48	9.89	9.91	9.70	10.47	10.00	106.4	96.1	94.8	98.9	100.9	97.0	104.7	100.0
9	15	15	15	15.17	15.31	15.29	15.77	14.93	14.30	15.16	14.88	101.1	102.0	101.9	105.1	100.4	95.3	101.1	99.2
10	15	20	15	19.64	19.80	20.48	19.99	20.03	19.95	20.08	19.38	98.2	99.0	102.4	99.9	99.9	99.7	100.4	96.9
11	15	25	15	24.06	25.26	25.52	25.36	24.69	24.97	24.15	24.40	96.2	101.0	102.1	101.4	101.3	99.9	96.6	97.6
12	15	30	15	29.74	28.82	30.16	31.26	29.45	28.88	28.87	29.26	99.1	96.1	100.5	104.2	101.9	96.3	96.2	97.5
13	15	10	5	10.34	10.16	9.92	9.95	10.10	10.01	10.31	9.53	103.4	101.6	99.2	99.5	99.0	100.1	103.1	95.3
14	15	10	10	10.19	10.11	9.77	10.06	9.94	9.91	10.33	9.92	101.9	101.1	97.7	100.6	100.6	99.1	103.3	99.2
15	15	10	15	10.27	10.02	10.08	10.04	9.83	9.96	9.90	10.21	102.7	100.2	100.8	100.4	101.7	99.6	99.0	102.1
16	15	10	20	10.12	9.60	9.54	10.64	10.15	9.94	10.39	10.16	101.2	96.0	95.4	106.4	98.5	99.4	103.9	101.6
17	15	10	25	10.16	9.69	9.78	10.22	9.95	9.80	10.42	9.47	101.6	96.9	97.8	102.2	100.5	98.0	104.2	94.7
18	15	10	30	10.13	9.97	9.78	10.28	10.13	10.15	10.12	9.54	101.3	99.7	97.8	102.8	98.7	101.5	101.2	95.4
19	15	10	15	10.05	9.82	10.19	9.82	10.05	9.88	10.45	10.16	100.5	98.2	101.9	98.2	99.5	98.8	104.5	101.6

$\bar{X}$  = 102.0 99.0 99.2 101.5 99.4 99.5 101.7 99.6  
SS = 2.40 2.83 2.44 2.46 2.14 1.75 2.50 3.15  
BSS = 2.35 2.86 2.46 2.42 2.15 1.76 2.46 3.16  
 $\bar{X}$  = Aritmetik ortalama, SS= Standart sapma, BSS= Bağıl standart sapma

**Tablo 4.5** Klasik UPLC yönteminin AA, PAR ve ASP yapay karışımının analizinde ASP için elde edilen % geri kazanım sonuçları

Karışım No:	İlave edilen (µg/ml)			ASP, Bulunan (µg/ml)									ASP, Geri kazanım (%)								
	AA	PAR	ASP	AA	PAR	ASP	AA	PAR	ASP	AA	PAR	ASP	AA	PAR	ASP						
1	5	10	15	15.55	14.17	15.19	15.35	14.93	14.96	14.57	14.61	103.6	94.5	101.3	102.3	99.6	99.7	97.1	97.4		
2	10	10	15	14.96	14.99	15.88	15.27	14.83	15.79	14.64	15.15	99.8	99.9	105.9	101.8	98.8	105.3	97.6	101.0		
3	15	10	15	14.83	14.96	15.70	15.53	14.69	15.25	15.09	14.70	98.9	100.1	106.5	103.4	97.4	101.7	100.4	97.6		
4	20	10	15	15.04	14.91	15.04	15.18	14.75	15.07	14.70	15.02	100.3	99.4	100.3	101.2	98.3	100.5	98.0	100.2		
5	25	10	15	15.16	14.70	14.70	15.00	15.05	14.18	15.92	15.32	101.0	98.0	98.0	100.0	100.3	94.5	106.1	102.1		
6	30	10	15	15.41	14.94	15.01	14.45	14.92	14.76	15.12	14.34	102.7	99.6	100.1	96.3	99.5	98.4	100.8	95.6		
7	15	5	15	15.43	14.87	15.27	15.56	14.71	15.38	15.12	14.99	102.9	99.2	101.8	103.7	98.1	102.5	100.8	99.9		
8	15	10	15	15.02	14.98	15.15	15.24	14.09	14.95	15.05	14.29	100.1	99.9	101.0	101.6	93.9	99.7	100.4	95.3		
9	15	15	15	15.34	15.17	15.64	14.68	14.88	15.37	15.31	15.08	102.3	101.1	104.3	97.9	99.2	102.5	102.0	100.5		
10	15	20	15	15.01	14.40	14.91	15.72	14.91	15.31	15.17	15.17	100.1	96.0	99.4	104.8	99.4	102.0	101.1	101.1		
11	15	25	15	15.09	14.38	15.92	15.16	15.03	15.15	15.03	14.90	100.6	95.9	106.1	101.1	100.2	101.0	100.2	99.3		
12	15	30	15	15.17	15.11	15.55	14.77	14.75	15.20	14.96	14.87	101.1	100.7	103.7	98.4	98.3	101.4	99.7	99.1		
13	15	10	5	5.50	4.70	5.07	5.25	5.07	5.07	5.10	5.08	110.0	94.0	101.4	104.9	101.4	101.3	102.0	101.5		
14	15	10	10	10.20	10.28	10.38	10.60	9.43	10.24	9.96	9.52	102.0	102.8	103.8	106.0	94.3	102.4	99.6	95.2		
15	15	10	15	15.39	15.03	14.65	15.27	15.40	15.87	15.00	15.17	102.6	100.2	97.6	101.8	102.7	105.8	100.0	101.1		
16	15	10	20	19.60	19.22	20.23	20.82	20.29	21.24	21.05	19.24	98.0	96.1	101.1	104.1	101.4	106.2	105.3	96.2		
17	15	10	25	25.00	24.35	23.82	25.35	25.04	24.79	25.27	24.10	100.0	97.4	95.3	101.4	100.2	99.2	101.1	96.4		
18	15	10	30	29.59	28.64	28.41	31.01	30.35	29.67	31.40	30.38	98.6	95.5	94.7	103.4	101.2	98.9	104.7	101.3		
19	15	10	15	15.36	15.17	15.27	15.06	14.95	15.24	14.99	14.78	102.4	101.2	101.8	100.4	99.6	101.6	100.0	98.6		
												$\bar{X}$	=	101.4	98.5	101.3	101.8	99.1	101.3	100.9	98.9
												SS	=	2.60	2.53	3.36	2.52	2.20	2.75	2.39	2.34
												BSS	=	2.56	2.57	3.32	2.47	2.22	2.71	2.37	2.36
												$\bar{X}$	=	Aritmetik ortalama, SS= Standart sapma, BSS= Bağıl standart sapma							

Diğer bir validasyon işlemi olarak klasik UPLC yönteminin doğruluk ve kesinliğini değerlendirmek için gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk çalışmalarında, doğrusal çalışma aralığının içinde olacak şekilde üç farklı konsantrasyonda (AA, PAR ve ASP) için 10.0, 20 ve 30 µg/ml olarak her derişim için 3 farklı çözelti olmak üzere, aynı gün içinde ve günler arasında hazırlanan çözeltiler kullanılarak gerçekleştirildi. Gün içi elde edilen sonuçlar AA için Tablo 4.6'de, PAR için Tablo 4.7'de ve Tablo 4.8'da gösterilmiştir. Aynı şekilde ve günler arası elde edilen sonuçlar AA için Tablo 4.9'de, PAR için Tablo 4.10'de ve Tablo 4.11'da gösterilmiştir.

**Tablo 4.6** Klasik UPLC yönteminin uygulanmasına AA için gün içi analiz sonuçları

İlave edilen (µg/ml)			AA Bulunan (µg/ml)							
AA	PAR	ASP	245	250	255	260	265	270	275	280
10	10	10	9.70	10.25	10.12	9.85	10.14	9.74	9.88	10.01
20	20	20	19.64	20.40	19.93	20.18	20.24	20.58	20.27	20.12
30	30	30	31.19	31.09	30.40	30.61	30.49	30.77	30.20	29.82
			AA Geri kazanım (%)							
			245	250	255	260	265	270	275	280
			97.0	102.5	101.2	98.5	101.4	97.4	98.8	100.1
			98.2	102.0	99.6	100.9	101.2	102.9	101.4	100.6
			104.0	103.6	101.3	102.0	101.6	102.6	100.7	99.4
			AA SS							
			245	250	255	260	265	270	275	280
			0.194	0.215	0.205	0.277	0.143	0.306	0.074	0.181
			0.179	0.441	0.199	0.586	0.505	0.630	0.232	0.404
			0.682	0.434	0.650	0.388	0.823	0.103	0.308	0.291
			AA BSS (%)							
			245	250	255	260	265	270	275	280
			1.997	2.093	2.030	2.813	1.405	3.140	0.745	1.810
			0.911	2.164	0.998	2.902	2.493	3.063	1.143	2.009
			2.186	1.396	2.139	1.269	2.699	0.336	1.020	0.977
			AA Bağıl Hata (%)							
			245	250	255	260	265	270	275	280
			-2.996	2.532	1.194	-1.535	1.420	-2.632	-1.222	0.148
			-1.780	1.986	-0.359	0.924	1.206	2.888	1.363	0.577
			3.977	3.641	1.349	2.035	1.628	2.563	0.682	-0.584

SS =Standart sapma, BSS = % Bağıl standart sapma

$$\% \text{ BH} = \left( \frac{\text{ilave edilen} - \text{Bulunan}}{\text{ilave edilen}} \right) \times 100 = \% \text{ Bağıl hata}$$



**Tablo 4.7** Klasik UPLC yönteminin uygulanmasına PAR için gün içi analiz sonuçları

İlave edilen (µg/ml)			PAR							
AA	PAR	ASP	Bulunan (µg/ml)							
			245	250	255	260	265	270	275	280
10	10	10	10.26	9.78	9.85	9.88	10.06	9.97	10.23	10.08
20	20	20	19.42	19.63	19.63	19.73	19.46	19.75	19.42	19.46
30	30	30	28.94	29.71	29.86	29.63	28.73	29.58	29.50	28.95
			PAR							
			Geri Kazanım (%)							
			245	250	255	260	265	270	275	280
			102.6	97.8	98.5	98.8	100.6	99.7	102.3	100.8
			97.1	98.1	98.1	98.6	97.3	98.7	97.1	97.3
			96.5	99.0	99.5	98.8	95.8	98.6	98.3	96.5
			PAR							
			SS							
			245	250	255	260	265	270	275	280
			0.080	0.206	0.228	0.182	0.141	0.106	0.103	0.072
			0.240	0.227	0.245	0.383	0.150	0.321	0.221	0.129
			0.313	0.436	0.331	0.309	0.412	0.336	0.709	0.339
			PAR							
			BSS (%)							
			245	250	255	260	265	270	275	280
			0.777	2.110	2.312	1.842	1.404	1.062	1.009	0.711
			1.235	1.157	1.248	1.944	0.769	1.628	1.136	0.660
			1.083	1.467	1.109	1.041	1.432	1.135	2.403	1.170
			PAR							
			BH (%)							
			245	250	255	260	265	270	275	280
			2.620	-2.201	-1.461	-1.191	0.614	-0.343	2.336	0.755
			-2.881	-1.863	-1.855	-1.374	-2.695	-1.261	-2.900	-2.694
			-3.546	-0.950	-0.467	-1.232	-4.223	-1.406	-1.667	-3.513

SS =Standart sapma, BSS = % Bağlı standart sapma

$$\% BH = \left( \frac{\text{İlave edilen} - \text{Bulunan}}{\text{İlave edilen}} \right) \times 100 = \% \text{ Bağlı hata}$$

**Tablo 4.8** Klasik UPLC yönteminin uygulanmasına ASP için gün içi analiz sonuçları

İlave edilen (µg/ml)			ASP Bulunan (µg/ml)							
AA	PAR	ASP	245	250	255	260	265	270	275	280
10	10	10	10.37	10.28	10.52	10.34	10.32	10.16	10.20	10.10
20	20	20	20.35	19.74	19.30	20.02	19.68	20.28	20.21	19.72
30	30	30	29.57	30.12	28.25	30.24	30.51	29.33	30.24	29.27
			ASP Geri Kazanım(%)							
			245	250	255	260	265	270	275	280
			103.7	102.8	105.2	103.4	103.2	101.6	102.0	101.0
			101.7	98.7	96.5	100.1	98.4	101.4	101.1	98.6
			98.6	100.4	94.2	100.8	101.7	97.8	100.8	97.6
			ASP SS							
			245	250	255	260	265	270	275	280
			0.091	0.161	0.113	0.085	0.108	0.113	0.201	0.126
			0.596	0.505	0.198	0.288	0.578	0.118	0.419	0.825
			0.345	0.304	0.177	0.523	0.817	0.816	0.194	0.608
			ASP BSS (%)							
			245	250	255	260	265	270	275	280
			0.879	1.566	1.072	0.823	1.046	1.114	1.965	1.243
			2.928	2.557	1.028	1.438	2.936	0.582	2.071	4.186
			1.166	1.010	0.625	1.731	2.677	2.783	0.642	2.078
			ASP BH (%)							
			245	250	255	260	265	270	275	280
			3.683	2.781	5.169	3.361	3.164	1.573	2.032	1.003
			1.729	-1.306	-3.493	0.121	-1.624	1.405	1.071	-1.406
			-1.422	0.394	-5.834	0.788	1.692	-2.243	0.809	-2.417

SS =Standart sapma, BSS = % Bağıl standart sapma

$$\% BH = \left( \frac{\text{İlave edilen} - \text{Bulunan}}{\text{İlave edilen}} \right) \times 100 = \% \text{ Bağıl hata}$$

**Tablo 4.9** Klasik UPLC yönteminin uygulanmasına AA için günler arası analiz sonuçları

İlave edilen (µg/ml)			AA Bulunan (µg/ml)							
AA	PAR	ASP	245	250	255	260	265	270	275	280
10	10	10	9.84	10.19	9.86	9.90	10.12	10.14	10.16	9.83
20	20	20	20.27	19.58	20.33	20.32	20.47	20.52	20.22	20.49
30	30	30	30.64	30.54	29.56	30.02	30.49	30.74	30.70	30.89
			AA Geri Kazanım (%)							
			245	250	255	260	265	270	275	280
			98.4	101.9	98.6	99.0	101.2	101.4	101.6	98.3
			101.4	97.9	101.6	101.6	102.3	102.6	101.1	102.4
			102.1	101.8	98.5	100.1	101.6	102.5	102.3	103.0
			AA SS							
			245	250	255	260	265	270	275	280
			0.166	0.196	0.132	0.171	0.145	0.220	0.207	0.153
			0.312	0.302	0.328	0.070	0.753	0.448	0.407	0.618
			0.538	0.814	0.558	0.321	0.727	0.557	0.744	0.518
			AA BSS(%)							
			245	250	255	260	265	270	275	280
			1.684	1.927	1.337	1.729	1.438	2.175	2.039	1.551
			1.538	1.540	1.613	0.346	3.679	2.185	2.011	3.019
			1.757	2.667	1.886	1.069	2.383	1.811	2.423	1.677
			AA BH (%)							
			245	250	255	260	265	270	275	280
			-1.580	1.866	-1.409	-1.016	1.179	1.383	1.605	-1.664
			1.358	-2.099	1.638	1.586	2.328	2.621	1.115	2.428
			2.149	1.811	-1.450	0.064	1.645	2.463	2.322	2.954

SS =Standart sapma, BSS = % Bağlı standart sapma

$$\% \text{ BH} = \left( \frac{\text{İlave edilen} - \text{Bulunan}}{\text{İlave edilen}} \right) \times 100 = \% \text{ Bağlı hata}$$

**Tablo 4.10** Klasik UPLC yönteminin uygulanmasına PAR için günler arası analiz sonuçları

İlave edilen (µg/ml)			PAR							
AA	PAR	ASP	Bulunan (µg/ml)							
			245	250	255	260	265	270	275	280
10	10	10	10.26	9.77	9.95	9.90	10.15	9.89	10.30	10.19
20	20	20	20.36	19.81	19.68	19.86	19.54	19.60	19.32	19.41
30	30	30	30.47	29.64	29.43	29.32	28.98	29.21	30.61	29.52
			PAR							
			Geri Kazanım							
			245	250	255	260	265	270	275	280
			102.6	97.7	99.5	99.0	101.5	98.9	103.0	101.9
			101.8	99.1	98.4	99.3	97.7	98.0	96.6	97.0
			101.6	98.8	98.1	97.7	96.6	97.4	102.0	98.4
			PAR							
			SS							
			245	250	255	260	265	270	275	280
			0.214	0.158	0.170	0.073	0.218	0.142	0.142	0.130
			0.175	0.572	0.230	0.306	0.192	0.419	0.143	0.289
			0.543	0.413	0.319	0.133	0.486	0.187	0.787	0.608
			PAR							
			BSS (%)							
			245	250	255	260	265	270	275	280
			2.082	1.622	1.713	0.733	2.149	1.435	1.375	1.272
			0.858	2.885	1.171	1.541	0.981	2.138	0.737	1.489
			1.781	1.394	1.084	0.454	1.677	0.641	2.571	2.060
			PAR							
			GK (%)							
			245	250	255	260	265	270	275	280
			2.637	-2.329	-0.530	-0.958	1.534	-1.077	2.964	1.913
			1.787	-0.934	-1.581	-0.712	-2.299	-1.978	-3.377	-2.952
			1.573	-1.209	-1.910	-2.256	-3.384	-2.632	2.024	-1.589

SS =Standart sapma, BSS = % Bağıl standart sapma

$$\% \text{ BH} = \left( \frac{\text{İlave edilen} - \text{Bulunan}}{\text{İlave edilen}} \right) \times 100 = \% \text{ Bağıl hata}$$

**Tablo 4.11** Klasik UPLC yönteminin uygulanmasına ASP için günler arası analiz sonuçları

İlave edilen (µg/ml)			ASP Bulunan (µg/ml)							
AA	PAR	ASP	245	250	255	260	265	270	275	280
10	10	10	9.84	10.22	10.15	10.19	9.86	10.36	10.20	10.37
20	20	20	20.41	20.39	20.21	20.19	20.33	20.13	20.36	20.43
30	30	30	29.97	30.36	29.49	30.50	30.52	30.39	30.61	30.39
			ASP Geri Kazanım							
			245	250	255	260	265	270	275	280
			98.4	102.2	101.5	101.9	98.6	103.6	102.0	103.7
			102.0	102.0	101.0	101.0	101.7	100.7	101.8	102.2
			99.9	101.2	98.3	101.7	101.7	101.3	102.0	101.3
			ASP SS							
			245	250	255	260	265	270	275	280
			0.204	0.110	0.236	0.196	0.210	0.112	0.149	0.370
			0.643	0.542	0.320	0.338	0.580	0.339	0.175	0.589
			0.296	0.406	0.757	0.566	0.608	0.729	0.537	0.479
			ASP BSS (%)							
			245	250	255	260	265	270	275	280
			2.071	1.081	2.323	1.920	2.127	1.080	1.461	3.565
			3.151	2.658	1.583	1.674	2.850	1.686	0.860	2.881
			0.988	1.336	2.566	1.856	1.994	2.398	1.755	1.577
			ASP GK (%)							
			245	250	255	260	265	270	275	280
			-1.587	2.173	1.535	1.949	-1.415	3.586	2.031	3.706
			2.045	1.973	1.034	0.968	1.669	0.672	1.816	2.166
			-0.108	1.210	-1.701	1.652	1.722	1.302	2.045	1.316

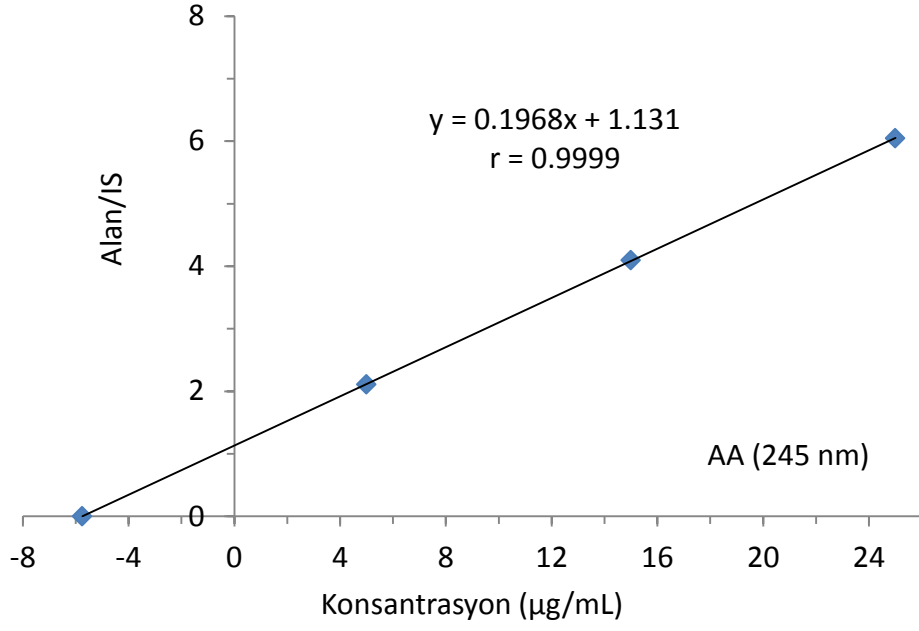
SS =Standart sapma, BSS = % Bağlı standart sapma

% BH =  $\left(\frac{\text{ilave edilen}-\text{Bulunan}}{\text{ilave edilen}}\right) \times 100 = \% \text{ Bağlı hata}$

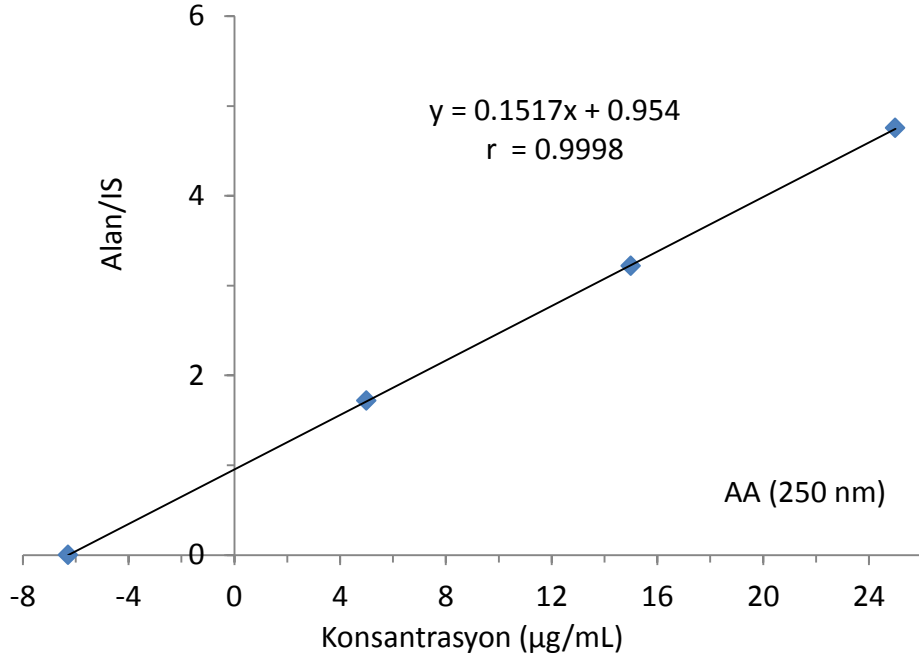
UPLC yöntemini ticari farmasötik preparat analizine uygulamadan önce AA, PAR ve ASP içeren farmasötik preparatlarda, tablet yardımcı maddelerinin “eksipiyenlerin” analiz üzerinde bir etkisinin olup olmadığı araştırıldı. Bunun için de standart ilavesi tekniği kullanıldı.

Farmasötik preparatlardaki bir tablete karşılık gelen içerik 100 mL metanol çözeltisi içinde hazırlandı. Bu preparat çözeltisinden gerekli seyreltmeler yapılarak, preparatın üzerindeki etiket miktarlarına göre sırasıyla yaklaşık 6.00 µg/ml AA, 4.00 µg/ml PAR ve 6.00 µg/ml ASP 'e karşılık gelen numune içeriğinin üzerine 5.00, 15.00 ve 25.00 µg/ml AA, PAR ve ASP olacak şekilde stok çözeltilerden standart ilavesi yapıldı. AFEBRYL<sup>®</sup> tablet'e uygulanan bu işlem neticesinde elde edilen analiz sonucunda preparattan gelen AA, PAR ve ASP miktarları doğrusal regresyon analizi ile konsantrasyon eksenini (x kesenini) kestiği eksi kesim noktalarından tayin edildi. Bu denemeler üç farklı konsantrasyon seviyesinde üç tekrar yapılarak gerçekleştirildi.

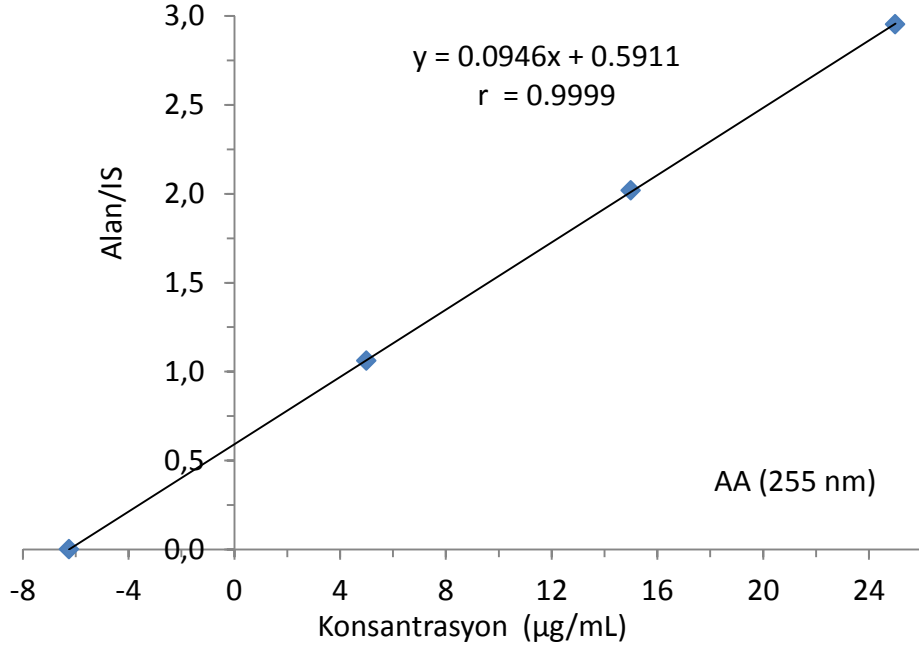
Klasik UPLC yönteminin tabletlere eklenen numunelere uygulamasında 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275, 280 nm dalga boylarında kromatografik dedeksiyonu AA için 245 nm'de 5,75 µg/ml, 250 nm'de 6,29 µg/ml 255 nm'de 6,25 µg/ml 260 nme'de 5,72 µg/ml, 265 nm'de 5,75 µg/ml 270 nm'de 6,00 µg/ml 275 nm'de 5,72 µg/ml, PAR için 245 nm'de 4,03 µg/ml, 250 ml'de 4,15 µg/ml 255 nm'de 4,20 µg/ml 260 nm'de 4,23 µg/ml, 265 nm'de 4,18 µg/ml 270 nm'de 4,04 µg/ml 275 nm'de 3,87 µg/ml ve 280 nm'de 4,10 µg/ml ve ASP için 245 nm'de 6,28 µg/ml, 250nm'de 6,27 µg/ml 255 nm'de 6,27 µg/ml 260 nm'de 6,23 µg/ml, 265 nm'de 6,26 µg/ml 270 nm'de 6,27 µg/ml 275 nm'de 6,22 µg/ml ve 280 nm'de 5,85 µg/ml olarak elde edildi.



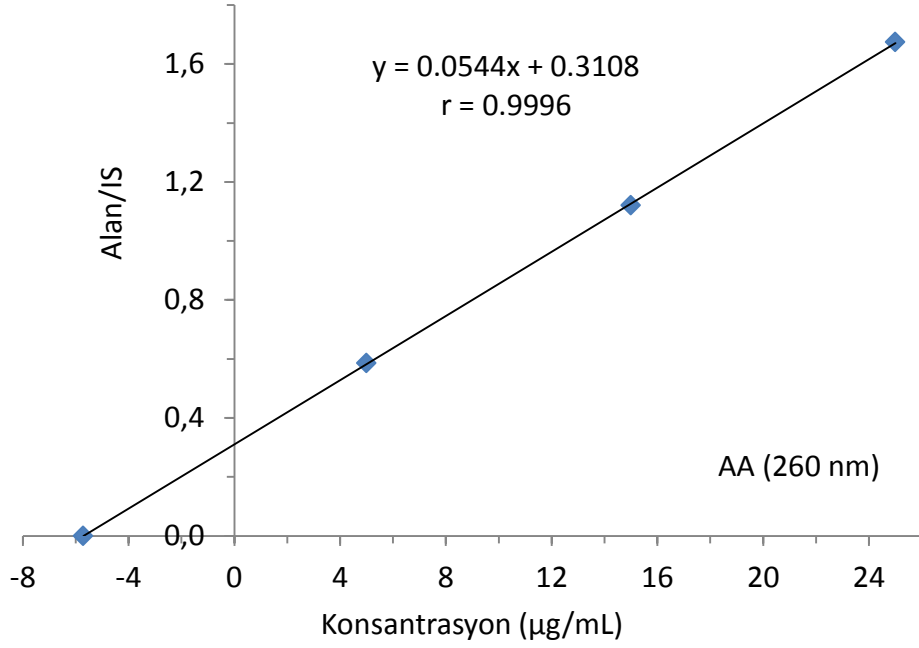
**Şekil 4.2** Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniği ile uygulanmasında AA/IS karşı konsantrasyon grafiği ( $\lambda_{245} \rightarrow C_{AA} = 5.75 \mu\text{g/ml}$ )



**Şekil 4.3** Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniği ile uygulanmasında AA/IS karşı konsantrasyon grafiği ( $\lambda_{250} \rightarrow C_{AA} = 6.29 \mu\text{g/ml}$ )

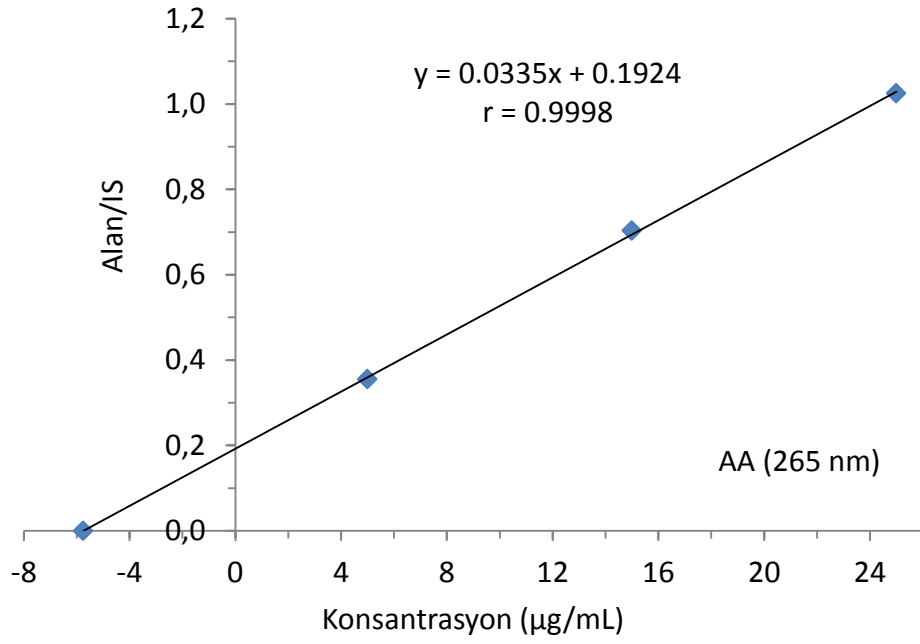


Şekil 4.4 Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniği ile uygulanmasında AA/IS karşı konsantrasyon grafiği ( $\lambda_{255} \rightarrow C_{AA} = -6.25 \mu\text{g/ml}$ )

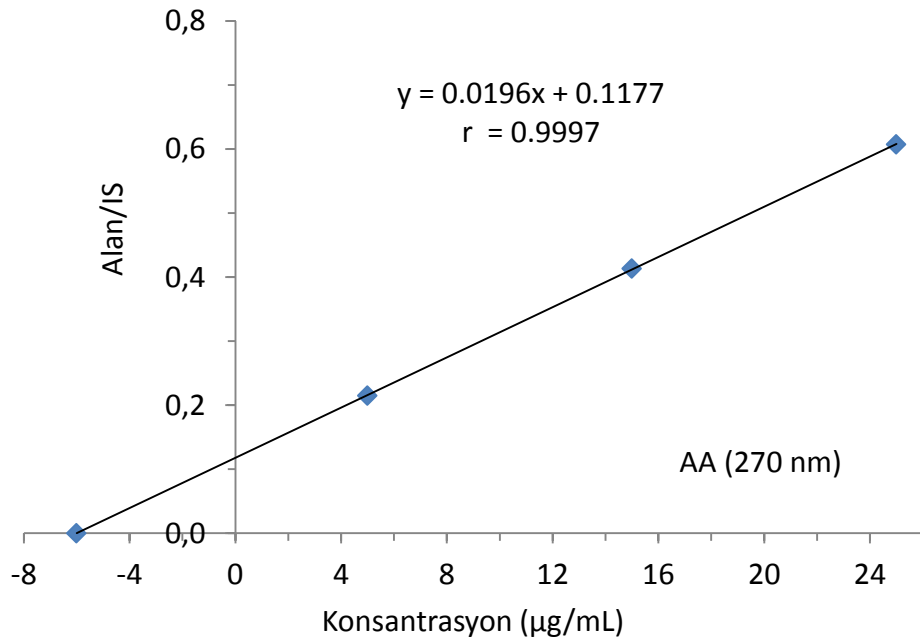


Şekil 4.5 Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniği ile uygulanmasında AA/IS karşı konsantrasyon grafiği ( $\lambda_{260} \rightarrow C_{AA} = -5.72 \mu\text{g/ml}$ )

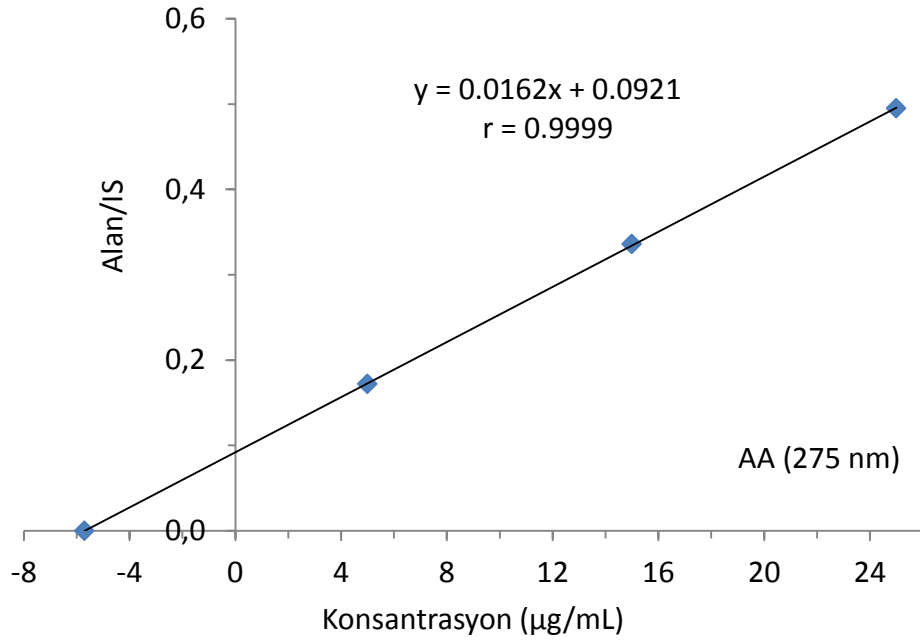




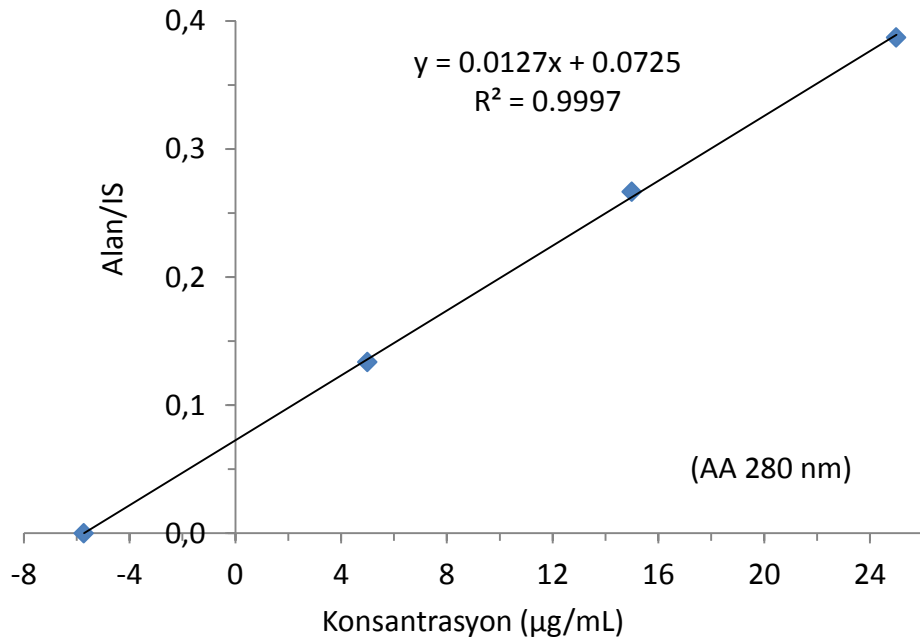
**Şekil 4.6** Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniği ile uygulanmasında AA/IS karşı konsantrasyon grafiği ( $\lambda_{265} \rightarrow C_{AA} = 5.76 \mu\text{g/ml}$ )



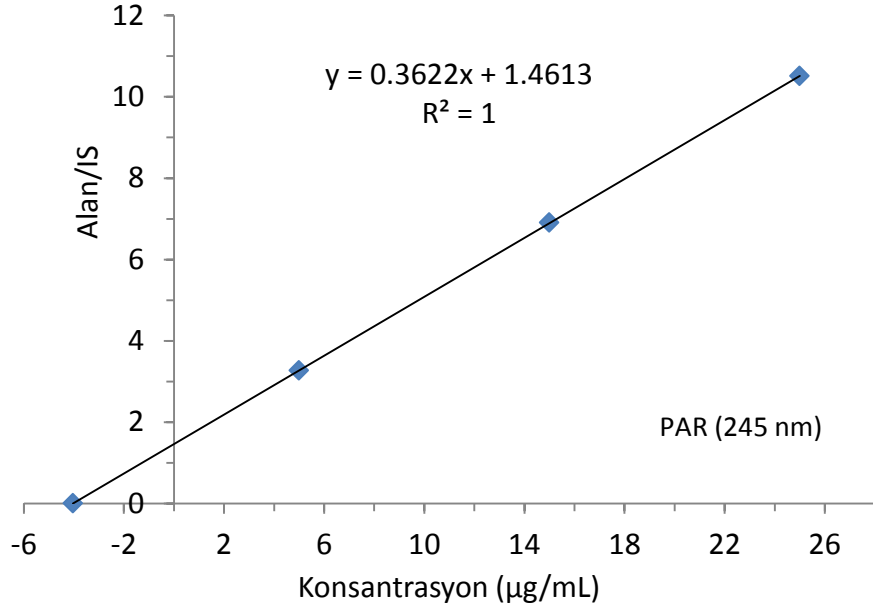
**Şekil 4.7** Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniği ile uygulanmasında AA/IS karşı konsantrasyon grafiği ( $\lambda_{270} \rightarrow C_{AA} = 6.00 \mu\text{g/ml}$ )



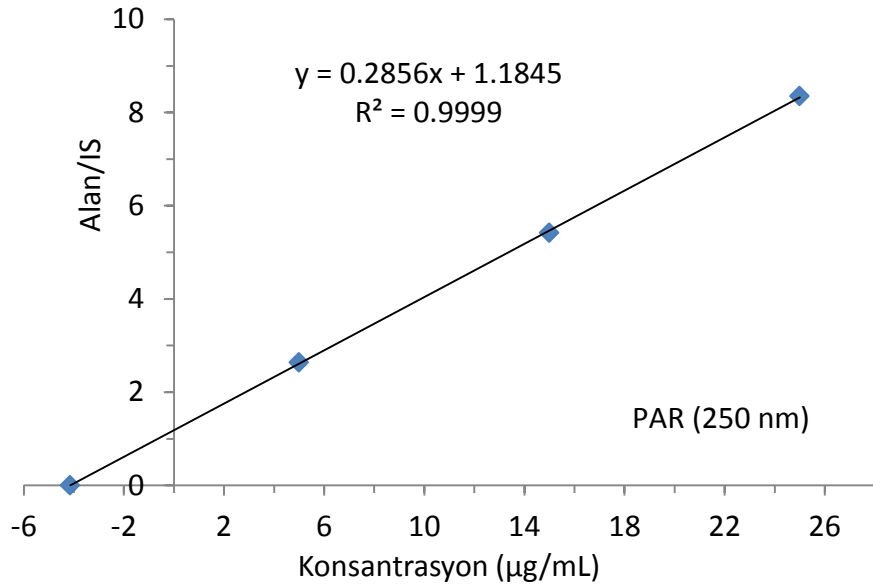
**Şekil 4.8** Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniği ile uygulanmasında AA/IS karşı konsantrasyon grafiği ( $\lambda_{275} \rightarrow C_{AA} = 5.70 \mu\text{g/ml}$ )



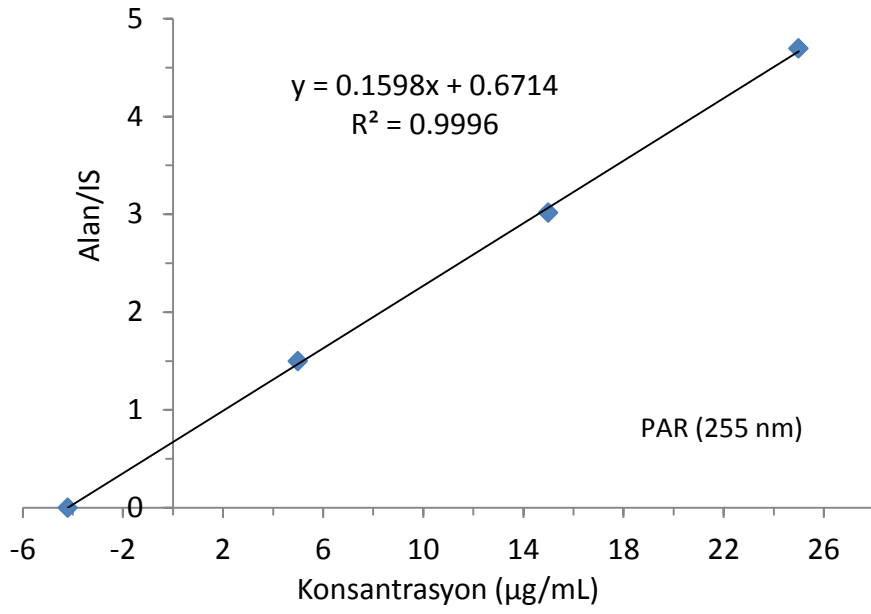
**Şekil 4.9** Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniği ile uygulanmasında AA/IS karşı konsantrasyon grafiği ( $\lambda_{280} \rightarrow C_{AA} = 5.72 \mu\text{g/ml}$ )



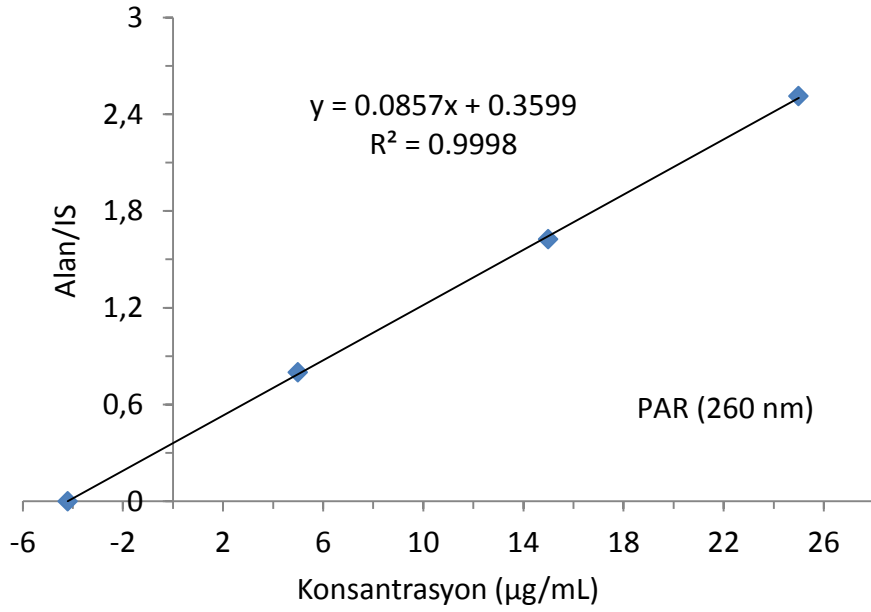
**Şekil 4.10** Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniği ile uygulanmasında PAR/IS karşı konsantrasyon grafiği ( $\lambda_{245} \rightarrow C_{PAR} = -4.034 \mu\text{g/ml}$ )



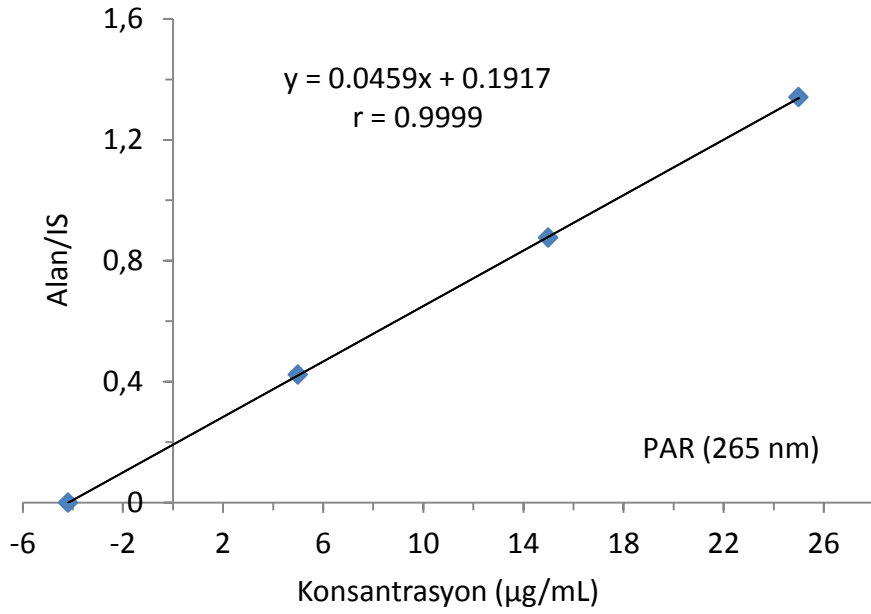
**Şekil 4.11** Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniği ile uygulanmasında PAR/IS karşı konsantrasyon grafiği ( $\lambda_{250} \rightarrow C_{PAR} = -4.15 \mu\text{g/ml}$ )



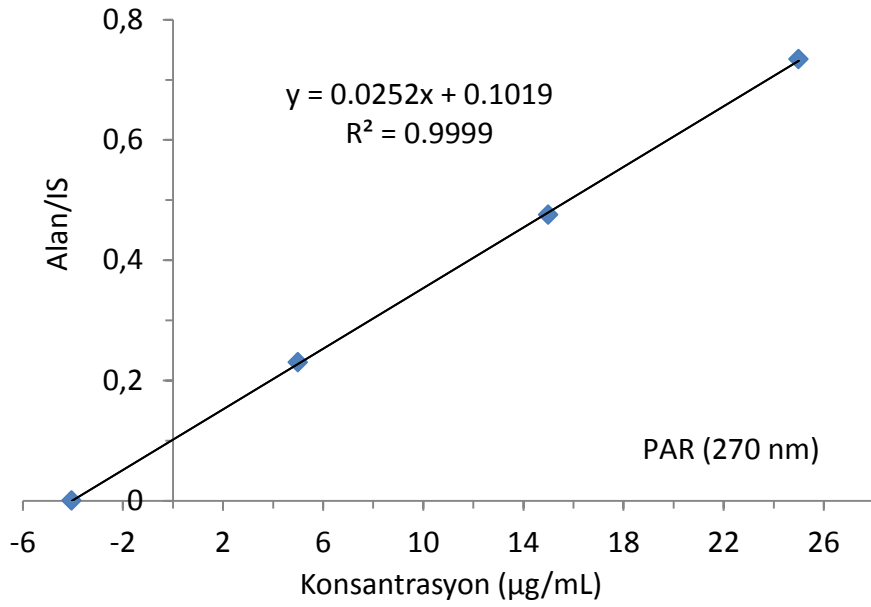
Şekil 4.12 Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniği ile uygulanmasında PAR/IS karşı konsantrasyon grafiği ( $\lambda_{255} \rightarrow C_{PAR} = -4.20 \mu\text{g/ml}$ )



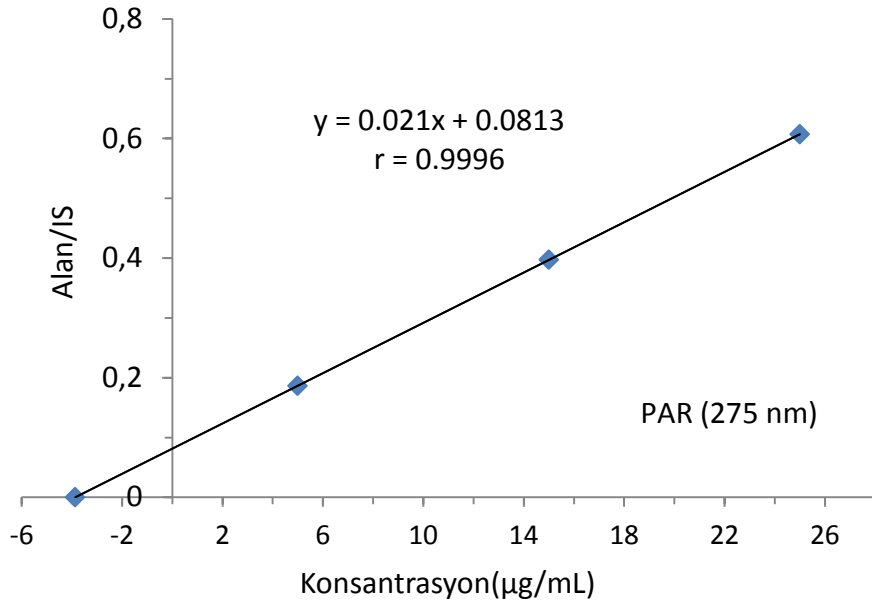
Şekil 4.13 Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniği ile uygulanmasında PAR/IS karşı konsantrasyon grafiği ( $\lambda_{260} \rightarrow C_{PAR} = -4.23 \mu\text{g/ml}$ )



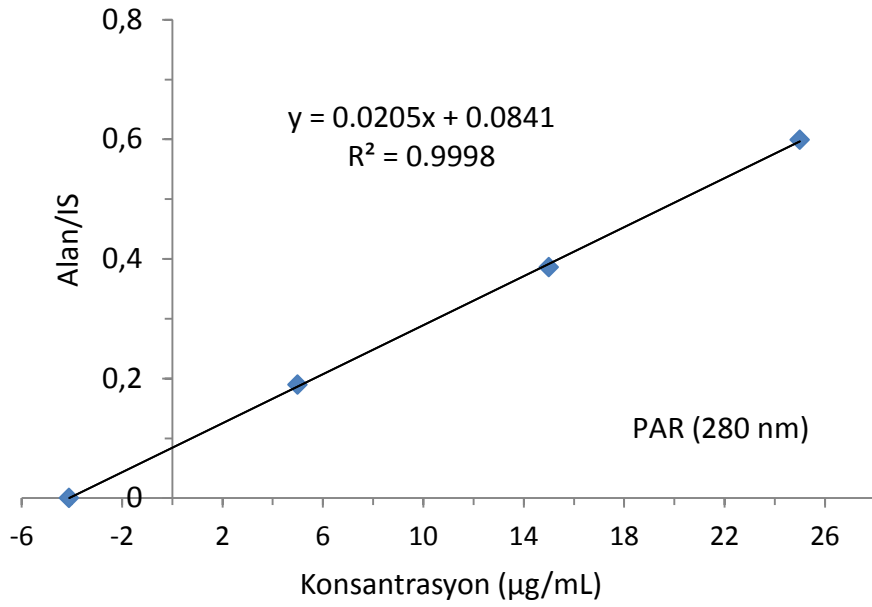
**Şekil 4.14** Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniği ile uygulanmasında PAR/IS karşı konsantrasyon grafiği ( $\lambda_{265} \rightarrow C_{PAR} = -4.18 \mu\text{g/ml}$ )



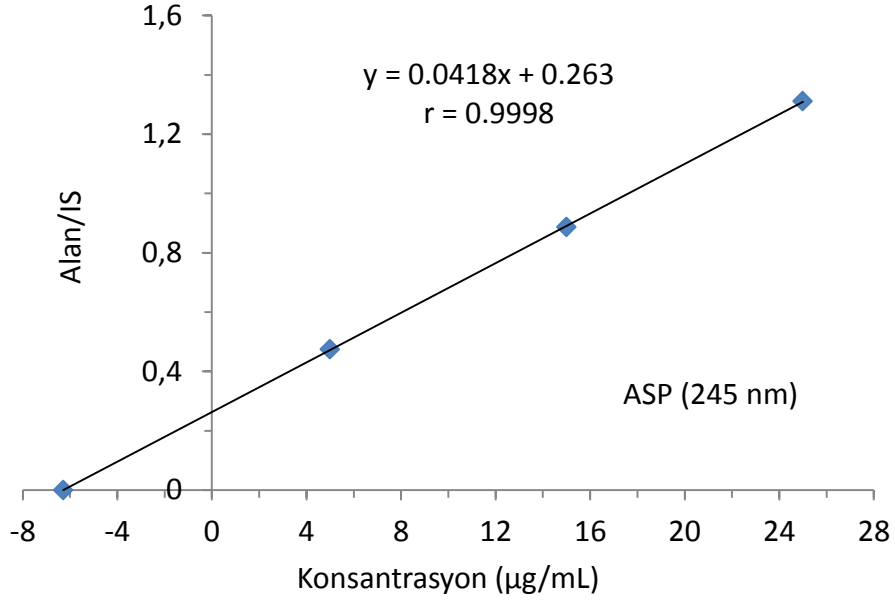
**Şekil 4.15** Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniği ile uygulanmasında PAR/IS karşı konsantrasyon grafiği ( $\lambda_{270} \rightarrow C_{PAR} = -4.04 \mu\text{g/ml}$ )



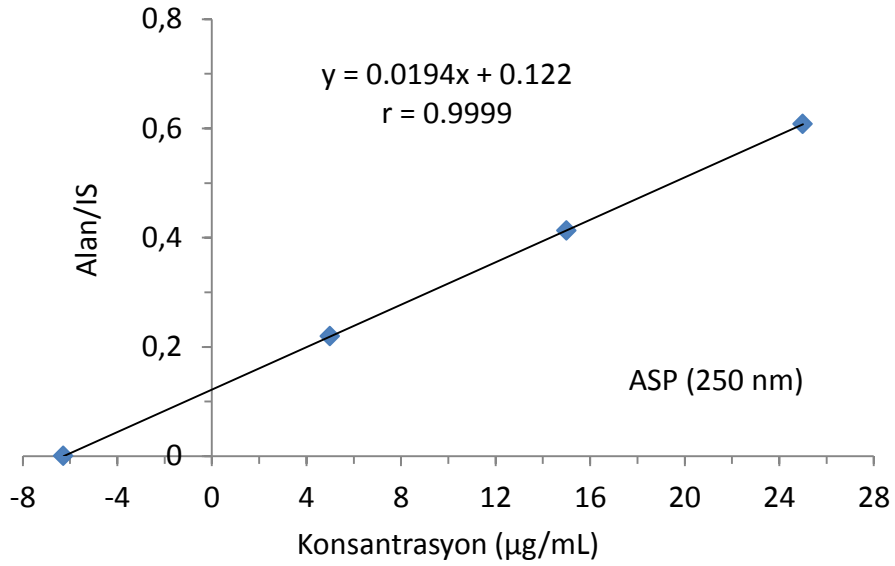
**Şekil 4.16** Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniği ile uygulanmasında PAR/IS karşı konsantrasyon grafiği ( $\lambda_{275} \rightarrow C_{\text{PAR}} = -3.86 \mu\text{g}/\text{ml}$ )



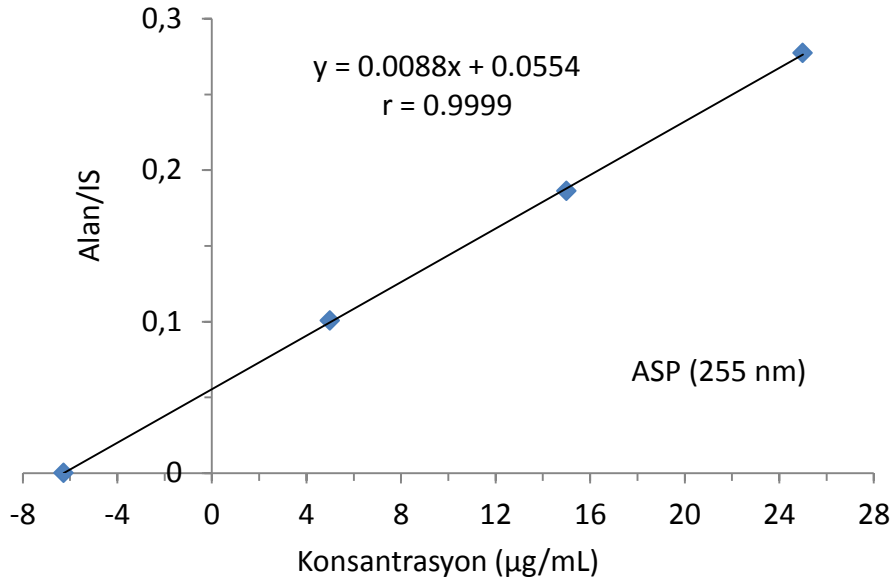
**Şekil 4.17** Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniği ile uygulanmasında PAR/IS karşı konsantrasyon grafiği ( $\lambda_{280} \rightarrow C_{\text{PAR}} = -4.10 \mu\text{g}/\text{ml}$ )



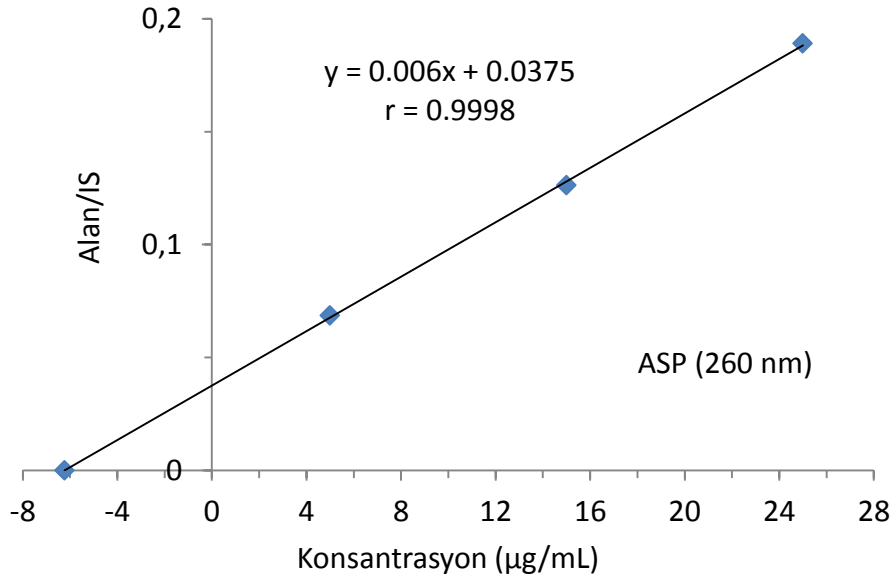
**Şekil 4.18** Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniği ile uygulanmasında ASP/IS karşı konsantrasyon grafiği ( $\lambda_{245} \rightarrow C_{\text{ASP}} = -6.28 \mu\text{g/ml}$ )



**Şekil 4.19** Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniği ile uygulanmasında ASP/IS karşı konsantrasyon grafiği ( $\lambda_{250} \rightarrow C_{\text{ASP}} = -6.28 \mu\text{g/ml}$ )

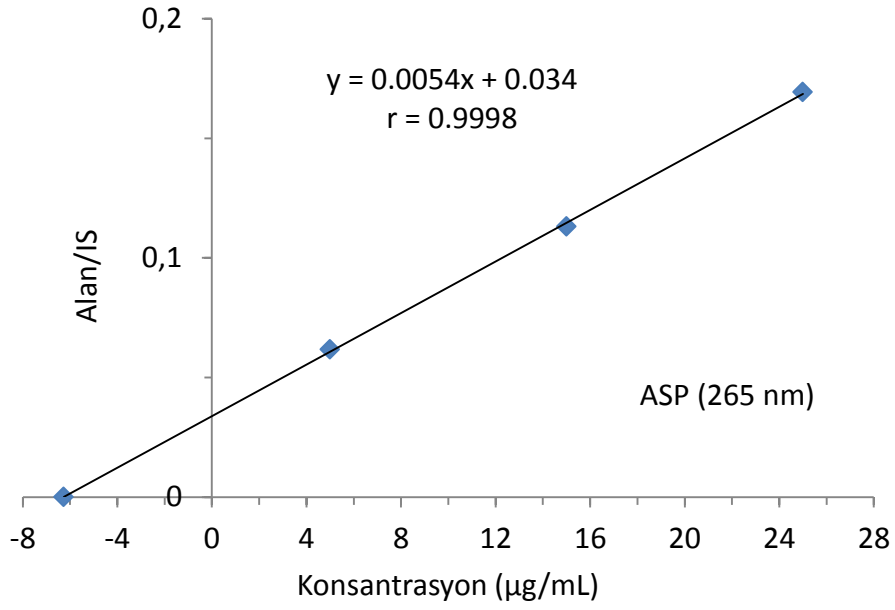


**Şekil 4.20** Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniği ile uygulanmasında ASP/IS karşı konsantrasyon grafiği ( $\lambda_{255} \rightarrow C_{ASP} = -6.27 \mu\text{g/ml}$ )

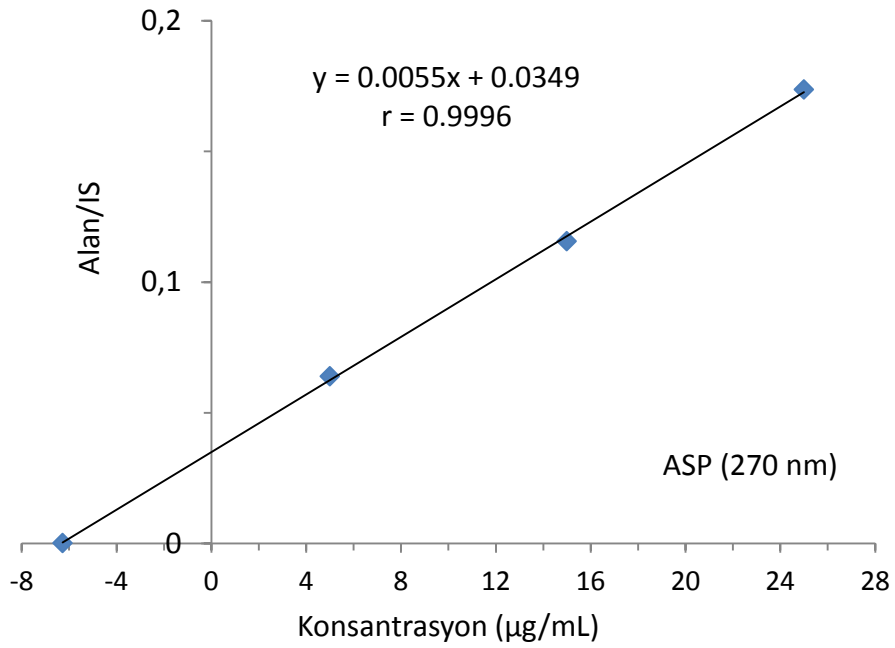


**Şekil 4.21** Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniği ile uygulanmasında ASP/IS karşı konsantrasyon grafiği ( $\lambda_{260} \rightarrow C_{ASP} = -6.23 \mu\text{g/ml}$ )

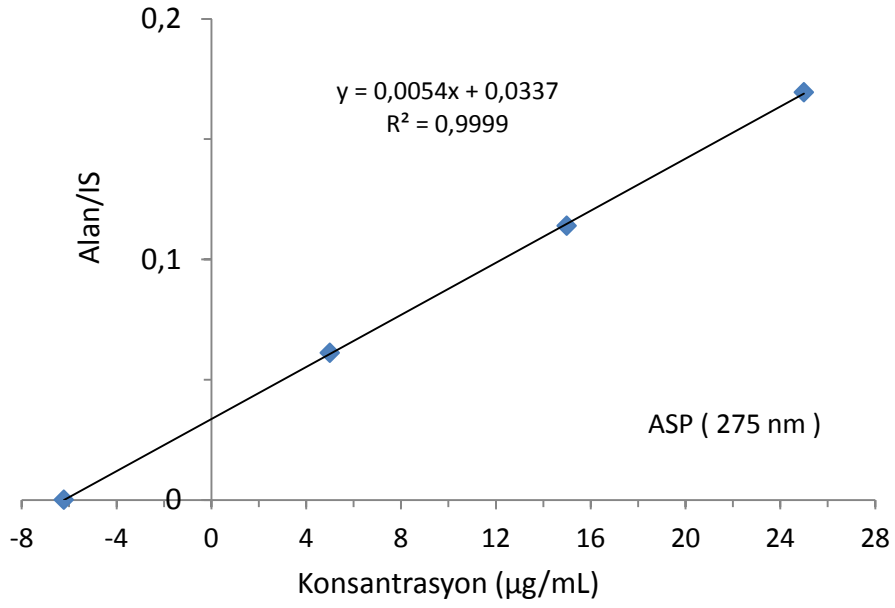




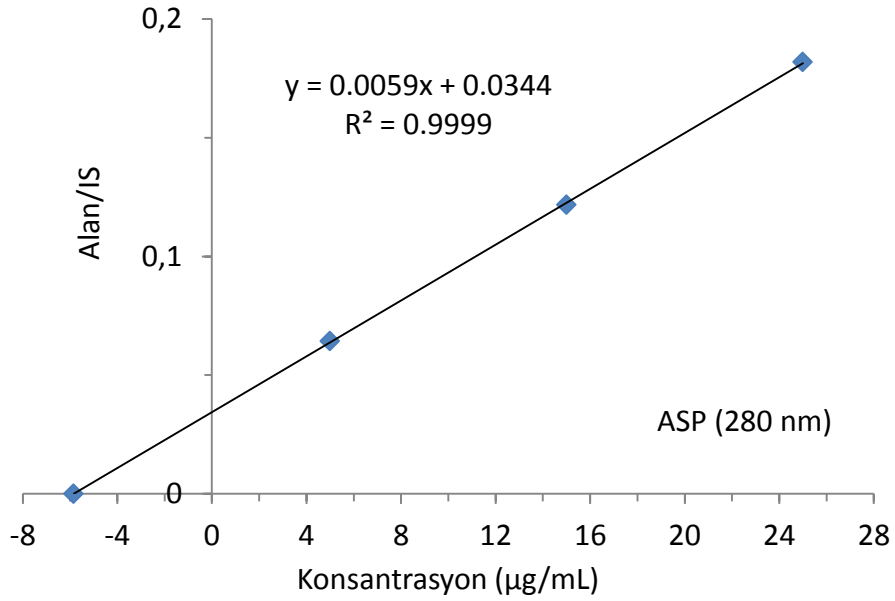
**Şekil 4.22** Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniği ile uygulanmasında ASP/IS karşı konsantrasyon grafiği ( $\lambda_{265} \rightarrow C_{\text{ASP}} = -6.26 \mu\text{g/ml}$ )



**Şekil 4.23** Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniği ile uygulanmasında ASP/IS karşı konsantrasyon grafiği ( $\lambda_{270} \rightarrow C_{\text{ASP}} = -6.27 \mu\text{g/ml}$ )



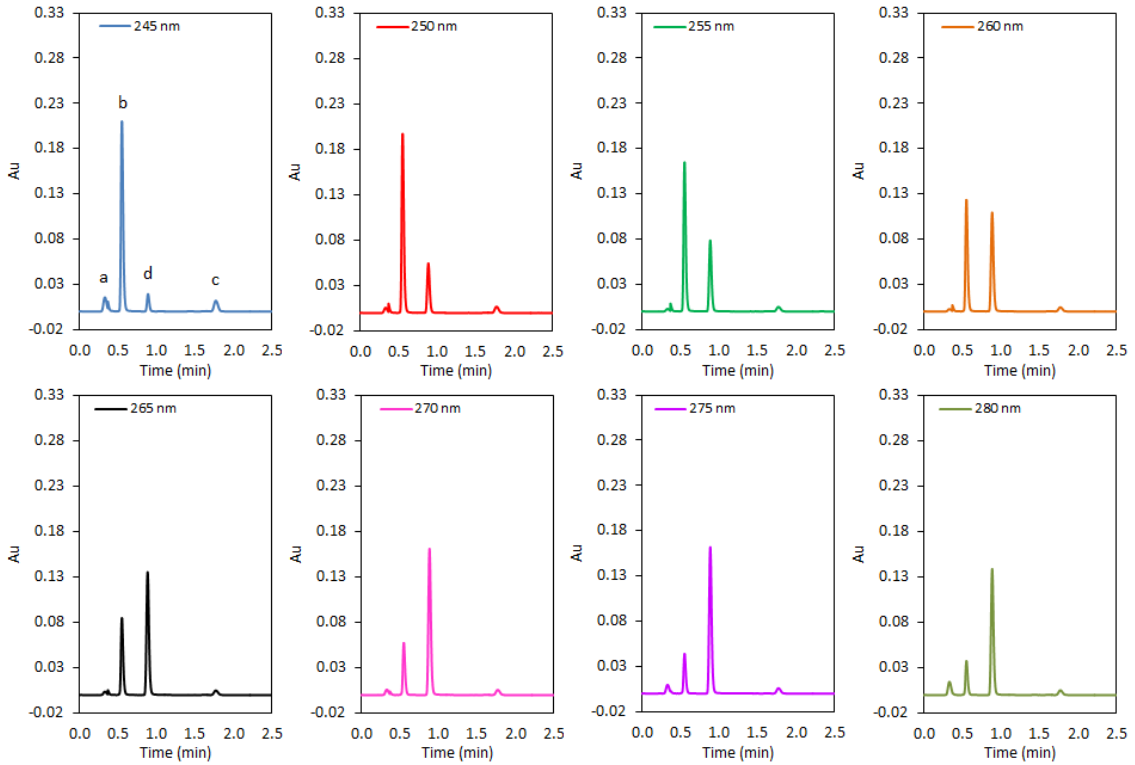
**Şekil 4.24** Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniği ile uygulanmasında ASP/IS karşı konsantrasyon grafiği ( $\lambda_{275} \rightarrow C_{ASP} = -6.22 \mu\text{g/ml}$ )



**Şekil 4.25** Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniği ile uygulanmasında ASP/IS karşı konsantrasyon grafiği ( $\lambda_{280} \rightarrow C_{ASP} = -5.85 \mu\text{g/ml}$ )

#### 4.1.1.3 Klasik UPLC Yönteminin Farmasötik Preparatlara Uygulaması

Çalışmada klasik UPLC yönteminin farmasötik preparatlara uygulanmasında, 20 adet AFEBRYL<sup>®</sup> tablet doğru bir şekilde tartıldı ve havanda iyice toz edildikten sonra bir tablete karşılık gelen tablet miktarı 100 mL’lik balonjode metanol içerisinde çözüldü. Balonjoje içeriği mekanik karıştırıcı ile 35 dakika karıştırıldı ve membran filtre (Sartorius Minisart  $\phi = 0,45 \mu\text{m}$ ) yardımı ile süzüldü. Hazırlanan tablet çözeltileri 2 mL’lik “vial” lere konularak kalibrasyon basamağındaki kromatografik UPLC şartlarda kromatogramları çizdirildi. Kromatogramlardan AA/IS, PAR/IS, ve ASP/IS oranları hesaplanarak bölüm 4.1.2.2’de elde edilen kalibrasyon grafiklerinde yerine konarak tabletlerin içerisindeki AA, PAR ve ASP miktarları hesaplandı Tablo 4.12. Elde edilen kromatogram Şekil 4.26 de sunulmuştur.



Şekil 4.26 Klasik UPLC yönteminin farmasötik preparatlara uygulanmasıyla kalibrasyon basamağındaki elde edilen UPLC kromatogramları.

**Tablo 4.12** Tabletlerin içerisinde hesaplanan AA, PAR ve ASP miktarları

No.	AA, t (sn)= 0.364								PAR, t (sn)= 0.552								ASP, t (sn)= 1.802							
	mg/tablet								mg/tablet								mg/tablet							
	245	250	255	260	265	270	275	280	245	250	255	260	265	270	275	280	245	250	255	260	265	270	275	280
1	313.5	312.8	312.3	306.0	291.7	310.8	307.5	303.6	204.1	192.8	190.7	206.0	209.0	205.5	206.5	206.1	315.6	301.8	288.6	312.3	303.5	314.7	305.3	284.9
2	304.8	315.7	301.0	288.9	301.3	305.1	298.3	285.7	207.0	199.9	190.0	211.0	196.2	210.7	204.1	205.9	307.3	302.5	312.6	313.2	285.1	306.9	309.5	288.6
3	301.0	306.8	288.6	305.7	300.5	286.2	307.2	301.4	205.4	199.6	200.5	201.5	203.7	201.9	192.7	209.8	312.0	286.2	301.1	299.4	309.7	302.9	317.8	302.8
4	306.4	298.8	307.5	303.3	303.0	301.1	302.5	306.3	204.2	207.1	201.8	202.2	203.5	198.1	206.9	192.3	307.4	316.1	303.4	301.7	316.2	307.3	302.8	303.0
5	294.5	307.1	297.9	302.5	305.9	306.4	311.3	301.7	192.7	191.2	199.8	202.1	203.6	193.6	209.0	209.3	307.0	309.0	301.8	296.3	301.7	283.2	302.3	283.7
6	310.2	279.7	310.7	308.4	313.6	303.3	301.5	305.5	207.4	195.7	202.9	205.6	205.8	205.0	206.0	200.7	308.7	310.5	314.4	299.9	300.6	316.5	305.7	310.1
7	281.0	304.3	303.2	302.6	289.8	300.9	288.2	309.0	203.6	196.3	195.3	205.3	195.4	203.7	203.8	193.7	285.7	308.2	300.5	310.6	307.0	302.1	301.7	297.4
8	309.3	306.8	304.0	310.8	306.1	313.0	299.4	302.6	210.8	193.2	199.0	191.5	208.0	204.8	204.2	205.8	307.5	308.3	307.8	299.6	300.3	305.5	284.8	289.5
9	304.4	299.3	298.8	301.2	301.4	313.6	305.7	301.9	203.9	198.3	195.4	202.2	209.2	201.6	202.4	203.8	309.3	300.5	301.6	317.9	290.8	285.6	299.3	304.4
<b>Mean</b>	302.8	303.5	302.7	303.3	301.5	304.5	302.4	302.0	204.4	197.1	197.3	203.0	203.8	202.7	204.0	203.1	306.7	304.8	303.5	305.7	301.7	302.8	303.2	296.0
<b>SS</b>	9.88	10.47	7.26	6.22	7.27	8.38	6.77	6.62	4.95	4.82	4.69	5.27	5.06	4.85	4.65	6.30	8.38	8.51	7.62	7.80	9.38	11.49	8.81	9.60
<b>RSS</b>	3.26	3.45	2.40	2.05	2.41	2.75	2.24	2.19	2.42	2.44	2.38	2.59	2.49	2.39	2.28	3.10	2.73	2.79	2.51	2.55	3.11	3.79	2.91	3.24

#### 4.1.2 UPLC-Kemometrik Yöntemlerinin AA-PAR-ASP Karışımının

##### Analizine Uygulanması.

Klasik UPLC yönteminin sonuçlarını karşılaştırmak amacıyla, UPLC-Kemometrik yöntemler olarak, UPLC-Temel Bileşen Regresyon (UPLC-Principal Component Regression, UPLC-PCR) ve UPLC-Kısmi En Küçük Kareler (UPLC-Partial Least Squares, UPLC-PLS) yöntemleri Çizelge 4.1'de AA, PAR ve ASP bileşikleri için hazırlanan konsantrasyon seti  $C_{6 \times 3}$  ve ölçülen-hesaplanan  $(Alan/IS)_{6 \times 8}$  veri setine uygulanarak, UPLC-PCR ve UPLC-PLS kalibrasyonları hesaplandı. Bu UPLC-PCR ve UPLC-PLS yöntemleri klasik UPLC yönteminin uygulamasındaki kromatografik ayırma ve tayin şartlarındaki verilerin çok bileşenli kullanımın dayanmaktadır.

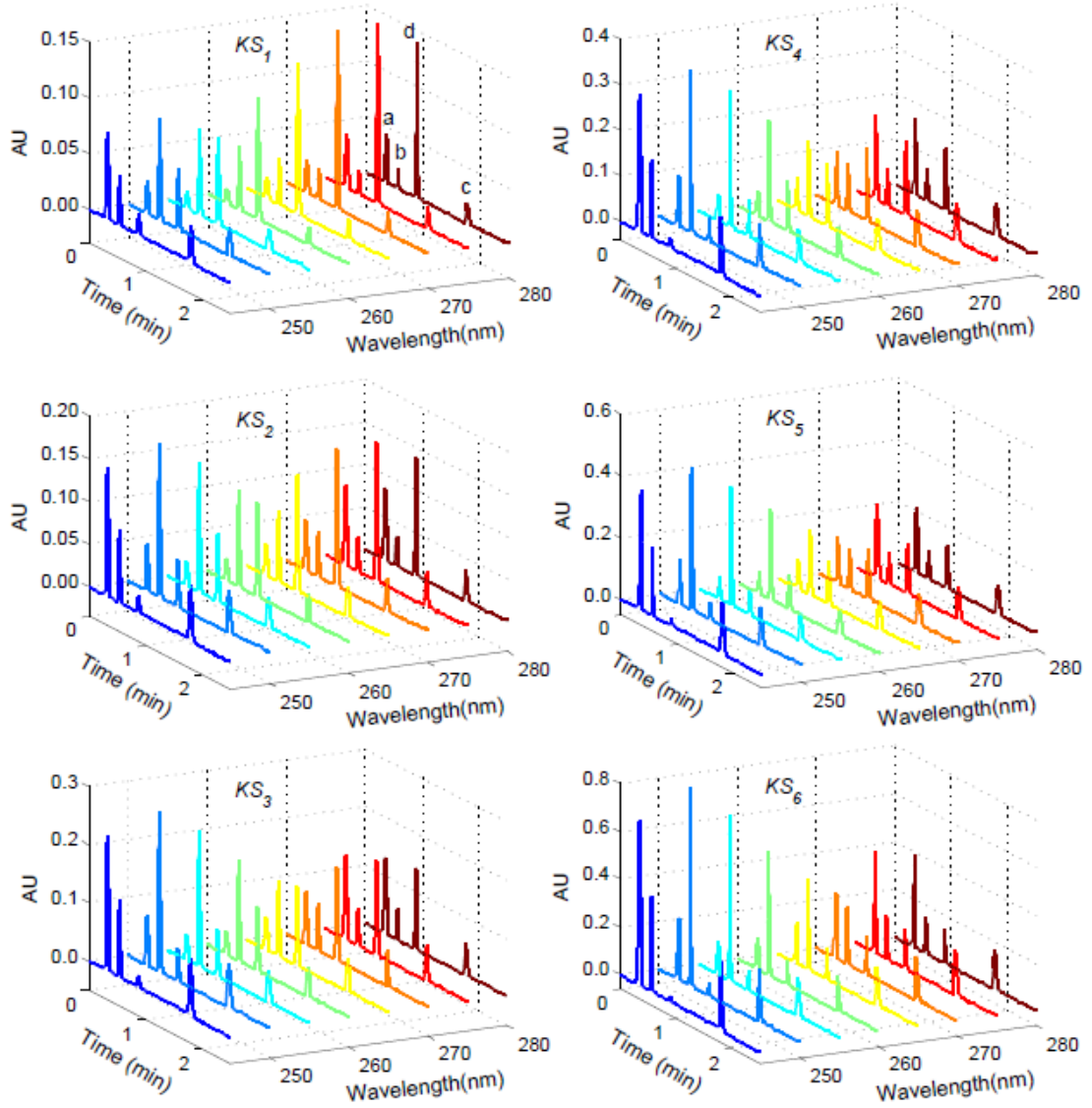
Kromatografik analizlerden olan aşırı yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (Ultra Performance Liquid Chromatography, UPLC) ile analiz edilecek olan bir karışımda gerçekleşecek olan ayrılma, karışım içerisindeki bileşenlerin bir kısmının sabit (stasyoner), diğerinin ise hareketli (mobil) olan iki ayrı faz sistemi arasındaki dağılımlara ait dengelerin farklı olması esasına göre gerçekleşmektedir.

Aşırı yüksek basınçlı sıvı kromatografisi sisteminde kullanılan ve iç çeperinde sabit faz dolgu materyali bulunan kolon sisteminden değişik çözücü sistemleri, pompa yardımıyla aşırı yüksek basınç eşliğinde geçirilir. Enjeksiyon sistemiyle hareketli faz içine enjekte edilen numunede bulunan maddeler, kolon sisteminde sabit ve hareketli fazlarla etkileşimleri farklı olduğundan, kolon içinde farklı hızlarla hareket ederler. Analiz edilen maddeler, tutulma zamanları farklı olduğu için kolonu terk etme sıralarına göre dedektör sisteminde yakalanarak, alınan sinyaller vasıtasıyla kromatogram olarak kaydedilir. Çok değişkenli kemometrik kalibrasyon algoritmalarının uygulamaları, analizin kesinliği ve doğruluğu üzerine etkisi yanında kromatografik dedeksiyonda dalga boyu seçiminide ortadan kaldırmaktadır .

Bu çalışmada parasetamol (PAR), asetilsalisilik asit (ASP) ve askorbik Asit (AA) içeren farmasötik preparatın kantitatif analizi için UPLC-PCR ve UPLC-PLS yöntemleri geliştirildi.

#### **4.1.2.1 UPLC-PCR ve UPLC-PLS Kalibrasyonları**

UPLC-PCR ve UPLC-PLS Kalibrasyonları UPLC-PLS ve UPLC-PCR kalibrasyonlarının hazırlanması için 5-30 µg/ml konsantrasyon aralığında AA, PAR ve ASP ile sabit konsantrasyonda internal standart olarak kafein içeren 6 farklı çözeltilerden oluşan bir konsantrasyon seti hazırlandı Çizelge 4.13. Bu hazırlanann konsantrasyon setinin UPLC cihazı ile “photo diode array” (PDA) kullanılarak 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275 ve 280 nm dalga boylarındaki dedeksiyonla kromatogramları çizdirildi Şekil 4.27. Elde edilen bu kromatogramlarda AA, PAR ve ASP ile IS için kolonda tutulma süreleri sırasıyla ortalama 0.364, 0.552 ve 1.802 ile 0.892 dakika olarak gözlemlendi.



**Şekil 4.27** 20 µg/ml a)AA, b) PAR, c)ASP bileşikleri ile d) IS KAF için çoklu ve üç boyutlu kromatogram

Konsantrasyon setinine karşılık gelen 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275 ve 280 nm dalga boylarındaki dedeksiyon ile elde edilen kromatogramlardan hesaplanan AA/IS, PAR/IS ve ASP/IS oranları için Tablo 4.13’deki sonuçlara ulaşıldı. Bu işlemde sonra PLS ve PCR algoritmaları konsantrasyon seti ile AA/IS, PAR/IS ve ASP/IS oran değerlerine uygulanarak UPLC-PLS ve UPLC-PCR kalibrasyonları elde edildi.

**Tablo 4.13** Derişim Seti ve Kromatografik Analit/IS Oranlarına Karşılık Gelen Veriler.

Derişim Set No	AA, Alı Konma Zamanı (dakika) = 0.364										
	AA	PAR	ASP	Alan/IS							
	(µ/mL)			245	250	255	260	265	270	275	280
1	5	5	5	0.9200	0.8578	0.4978	0.2518	0.1433	0.1148	0.0703	0.0531
2	10	10	10	1.8391	1.6024	0.9743	0.5160	0.3163	0.2215	0.1502	0.1170
3	15	15	15	2.9509	2.3393	1.4106	0.8141	0.4947	0.3243	0.2438	0.1851
4	20	20	20	3.8138	3.1051	1.8874	1.0889	0.6702	0.4321	0.3083	0.2515
5	25	25	25	4.8878	3.7972	2.3663	1.3609	0.8440	0.5374	0.3962	0.3167
6	30	30	30	5.8096	4.5465	2.8266	1.6172	0.9971	0.6399	0.4952	0.3831
Derişim Set No	PAR, Alı Konma Zamanı (dakika) = 0.552										
				Alan/IS							
				245	250	255	260	265	270	275	280
1	5	5	5	1.8347	1.4921	0.8726	0.4780	0.2478	0.1551	0.1028	0.1107
2	10	10	10	3.6531	2.8634	1.6246	0.8859	0.4750	0.2809	0.2141	0.2119
3	15	15	15	5.4177	4.3632	2.5425	1.3154	0.7028	0.4072	0.3092	0.3079
4	20	20	20	7.1124	5.7065	3.2537	1.7290	0.9199	0.5367	0.4099	0.4054
5	25	25	25	9.1119	7.1848	3.9771	2.1111	1.1529	0.6648	0.5110	0.5090
6	30	30	30	10.8775	8.5212	4.7780	2.5495	1.3961	0.8043	0.6389	0.6193
Derişim Set No	ASP, Alı Konma Zamanı (dakika) =1.802										
				Alan/IS							
				245	250	255	260	265	270	275	280
1	5	5	5	0.2297	0.1060	0.0497	0.0328	0.0315	0.0372	0.0312	0.0280
2	10	10	10	0.4363	0.1970	0.0944	0.0627	0.0579	0.0626	0.0550	0.0563
3	15	15	15	0.6417	0.3032	0.1335	0.0917	0.0825	0.0867	0.0840	0.0897
4	20	20	20	0.8467	0.3890	0.1760	0.1195	0.1073	0.1103	0.1077	0.1126
5	25	25	25	1.0322	0.4875	0.2243	0.1487	0.1333	0.1371	0.1337	0.1470
6	30	30	30	1.2748	0.5854	0.2666	0.1804	0.1603	0.1614	0.1607	0.1763



UPLC-PCR kalibrasyonu, Tablo 4.13’de verilen derişim seti için ölçülen ve hesaplanan AA/IS, PAR/IS, ve ASP/IS alanlarının oranlarından oluşan veri setine PCR algoritmasının uygulanmasıyla elde edilen PULC-PCR kalibrasyon denklemlerinin sırasıyla AA, PAR ve ASP için sunuldu.

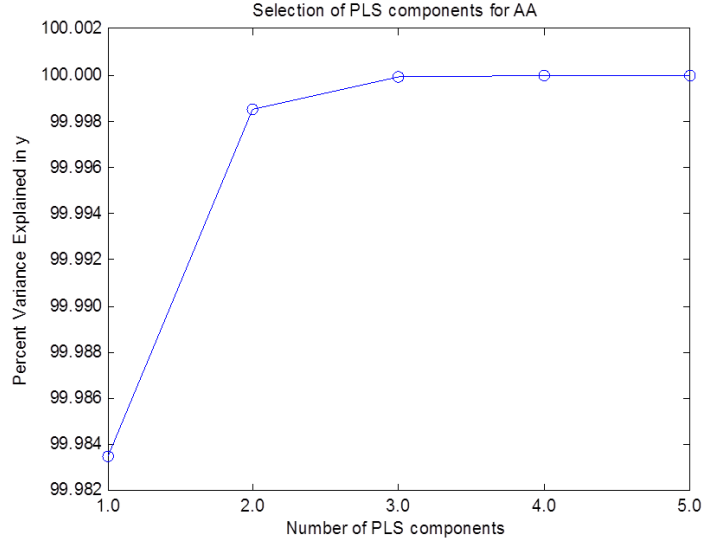
#### 4.1.2.2 UPLC-PCR Kalibrasyon Denklemleri :

- $C_{AA} = -0.4489 + 0.8233A_{245} + 3.7149A_{250} + 2.2196A_{255} + 0.8558A_{260} + 0.6162A_{265} + 0.4761A_{270} + 0.1065A_{275} + 0.2612A_{280}$
- $C_{PAR} = 0.2854A + 1.0543A_{245} + 1.2767A_{250} + 1.0788A_{255} + 0.7984A_{260} + 0.2651A_{265} + 0.2026A_{270} + 0.17992A_{275} + 0.1243A_{280}$
- $C_{ASP} = 0.5483 + 5.6514A_{245} + 25.7312A_{250} + 10.8491A_{255} + 4.422A_{260} + 4.1591A_{265} + 6.5604A_{270} + 6.3344A_{275} + 11.2965A_{280}$

#### 4.1.2.3 UPLC-PLS Kalibrasyon Denklemleri :

- $C_{AA} = 0.4531 + 0.8067A_{245} + 3.6332A_{250} + 2.4992A_{255} + 0.6844A_{260} + 0.5137A_{265} + 0.4920A_{270} + 0.2184A_{275} + 0.2653A_{280}$
- $C_{PAR} = 0.2854 + 1.0543A_{245} + 1.2767A_{250} + 1.0788A_{255} + 0.7984A_{260} + 0.2651A_{265} + 0.2026A_{270} + 0.17992A_{275} + 0.1243A_{280}$
- $C_{ASP} = 0.6029 + 4.4361A_{245} + 25.2150A_{250} + 16.8868A_{255} + 5.1484A_{260} + 5.9158A_{265} + 9.2010A_{270} + 6.0256A_{275} + 8.4289A_{280}$

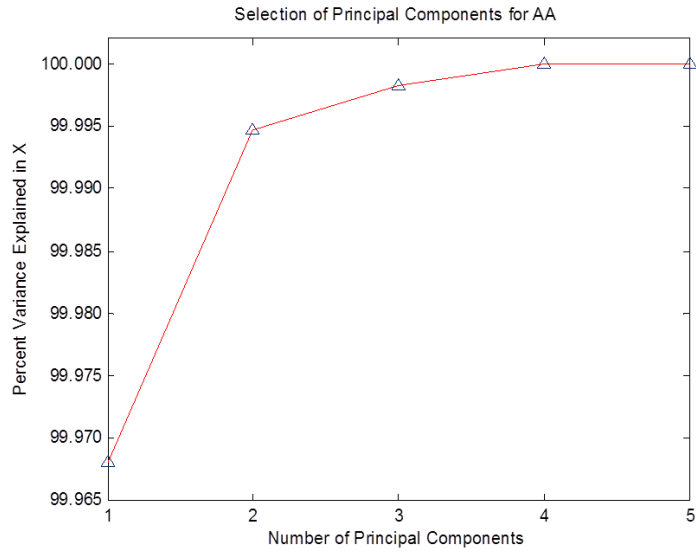
UPLC-PLS ve UPLC-PCR kalibrasyonlarında faktör seçiminde 2 faktör kullanımının uygun olacağı bulunmuştur. UPLC-PLS kalibrasyonlarında AA, PAR ve ASP için sırasıyla SEC = 0.0331, SEP = 0.2495 ve PRESS = 0.0066; SEC = 0.0924, SEP = 0.1381 ve PRESS = 0.0512; SEC = 0.1279, SEP = 0.2681, PRESS = 0.0982 olarak bulunmuştur (Şekil 4.2.24-29). UPLC-PCR kalibrasyonlarında AA, PAR ve ASP için sırasıyla SEC = 0.0381, SEP = 0.2895 ve PRESS = 0.0087; SEC = 0.0924, SEP = 0.1381, PRESS = 0.0512; SEC = 0.1395, SEP = 0.2602, PRESS = 0.1677 olarak elde edilmiştir Şekil 4.28-33.



**Şekil 4.28** AA İçin UPLC-PLS Kalibrasyonu İçin Faktör Seçim Eğrisi

**UPLC-PLS AA:** Factor =2, SEC =0.0331, SEP =0.2495, PRESS =0.00656

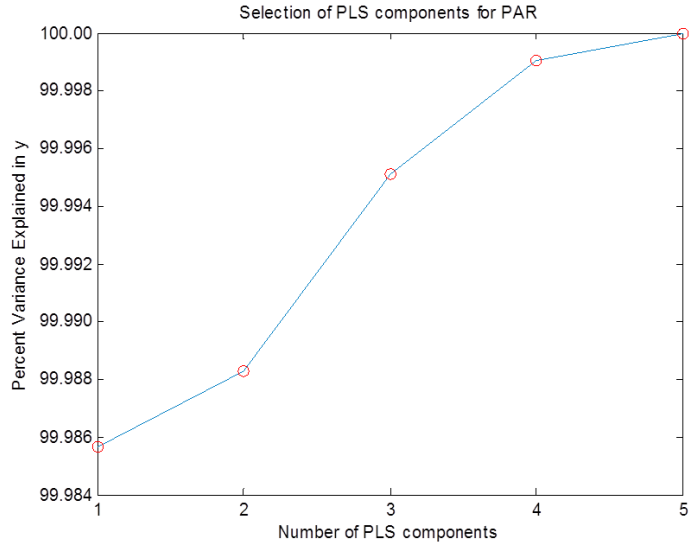
$$C_{AA} = -0.4531 + 0.8067A_{245} + 3.6332A_{250} + 2.4992A_{255} + 0.6844A_{260} + 0.5137A_{265} + 0.4920A_{270} + 0.2184A_{275} + 0.2653A_{280}$$



**Şekil 4.29** AA İçin UPLC-PCR Kalibrasyonu İçin Faktör Seçim Eğrisi

**UPLC-PCR AA:** Factor =2, SEC =0.0381, SEP =0.2895, PRESS =0.0087

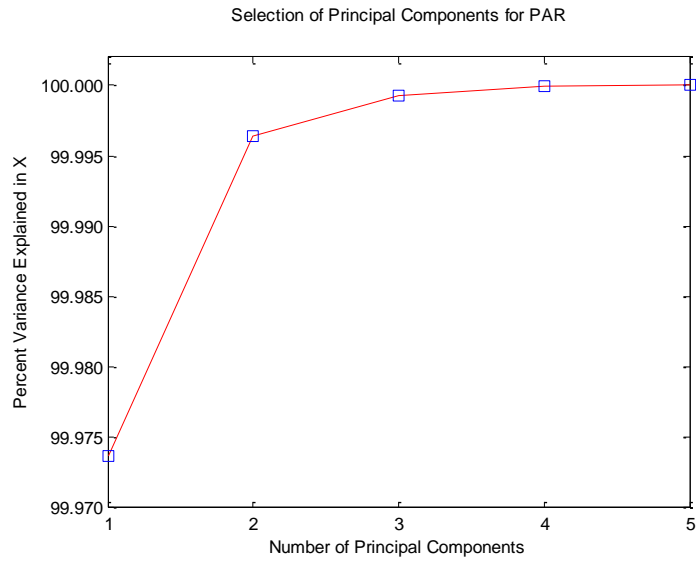
$$C_{AA} = -0.4489 + 0.8233A_{245} + 3.71497A_{250} + 2.2196A_{255} + 0.8558A_{260} + 0.6162A_{265} + 0.4761A_{270} + 0.1065A_{275} + 0.2612A_{280}$$



**Şekil 4.30** PAR İçin UPLC-PLS Kalibrasyonu İçin Faktör Seçim Eğrisi

**UPLC-PLS PAR:** Factor =2, SEC= 0.0924, SEP= 0.1381, PRESS = 0.0512

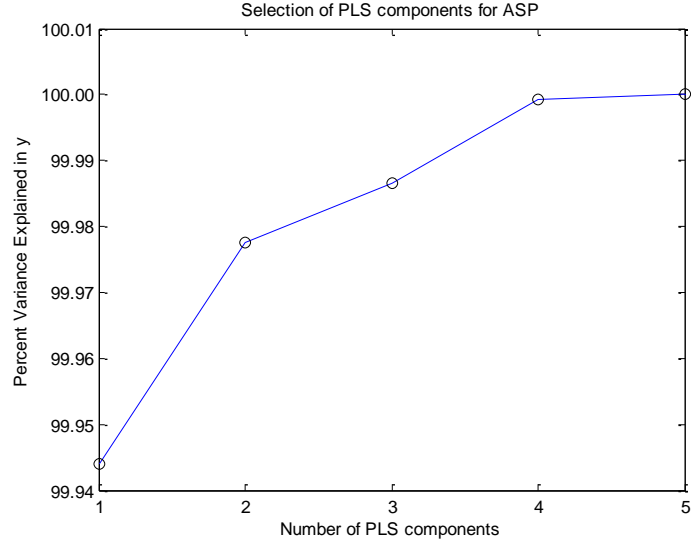
$$C_{PAR} = -0.2854 A_{245} + 1.0543 A_{250} + 1.2767 A_{255} + 1.0788 A_{260} + 0.7984 A_{265} + 0.2651 + 0.2026 A_{270} + 0.17992 A_{275} + 0.12432 A_{280}$$



**Şekil 4.31** PAR İçin UPLC-PCR Kalibrasyonu İçin Faktör Seçim Eğrisi

**UPLC-PCR PAR:** Factor =2, SEC= 0.0924, SEP= 0.1381, PRESS = 0.0512

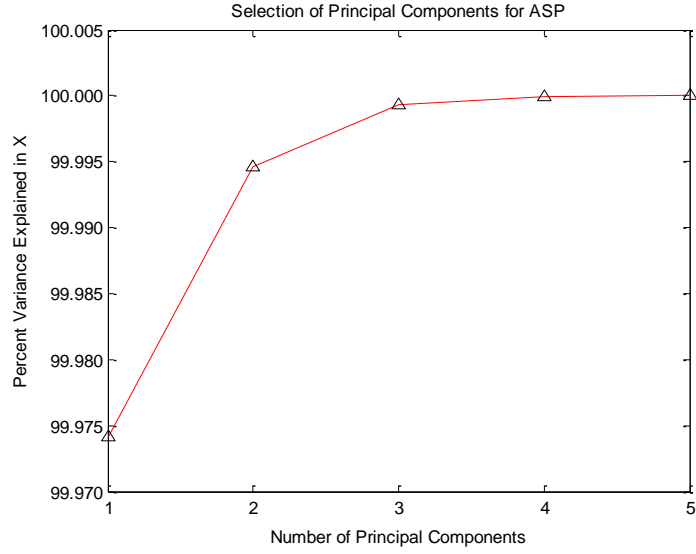
$$C_{PAR} = -0.2854 A_{245} + 1.0543 A_{250} + 1.2767 A_{255} + 1.0788 A_{260} + 0.7984 A_{265} + 0.2651 + 0.2026 A_{270} + 0.17992 A_{275} + 0.12432 A_{280}$$



**Şekil 4.32** ASP İçin UPLC-PLS Kalibrasyonu İçin Faktör Seçim Eğrisi

**UPLC-PLS ASP:** Factor =2, SEC= 0.1279, SEP= 0.2681, PRESS = 0.0982

$$C_{ASP}=0.6029+4.4361A_{245}+25.2150A_{250}+16.8868A_{255}+5.1484A_{260}+5.9158A_{265}+9.2010A_{270}+6.0256A_{275}+8.4289A_{280}$$



**Şekil 4.33** ASP İçin UPLC-PCR Kalibrasyonu İçin Faktör Seçim Eğrisi

**UPLC-PCR ASP:** Factor =2, SEC= 0.1395, SEP= 0.2602, PRESS = 0.1677

$$C_{ASP}=0.5483+5.6514A_{245}+25.7312A_{250}+10.8491A_{255}+4.4228A_{260}+4.1591A_{265}+6.5604A_{270}+6.3344A_{275}+11.2965A_{280}$$

#### 4.1.2.4 UPLC-PCR ve UPLC-PLS Yöntemlerinin Validasyonu

Bu doktora tez kapsamında geliştirilen UPLC yönteminin validasyonu için 0.1M CH<sub>3</sub>COOH ve metanol (75:25, *h/h*) içerisinde ASP, PAR ve AA için 5.0-30 µg/ml doğrusal çalışma aralığı içinde farklı konsantrasyonlarda 19 adet yapay karışım çözeltisinden oluşan bir validasyon seti hazırlandı. Bu validasyon setinin hazırlanmasında herbir karışım çözeltisine 20 µg/ml sabit konsantrasyonda IS stok çözeltisinden ilave edildi. Bu validasyon seti kullanılarak UPLC-PLS ve UPLC-PCR yöntemlerinin kesinlik ve doğruluğu test yapıldı.

Geri kazanım değerleri UPLC-PLS ile AA için % 99.8, PAR için % 100.2 ve ASP için % 100.5 ve UPLC-PCR ile AA için % 100.9, PAR için % 101.0 ve ASP için % 100.9 olarak bulundu Tablo 4.14. Bağıl standart sapma değerleri UPLC-PLS ile AA için % 0.77, PAR için % 0.86 ve ASP için % 0.99 ve UPLC-PCR ile AA için % 0.94, PAR için % 1.30 ve ASP için % 1.23 olarak sonuçlar elde edildi Tablo 4.14

**Tablo 4.14** UPLC-PLS ve UPLC-PCR kalibrasyon yöntemlerinin karışım analizine uygulanmasıyla elde edilen geri kazanım sonuçları

Karışım No.	İlave edilen ( $\mu\text{g/ml}$ )			Bulunan ( $\mu\text{g/ml}$ )						Geri Kazanım (%)					
				AA		PAR		ASP		AA		PAR		ASP	
	AA	PAR	ASP	UPLC-PLS	UPLC-PCR	UPLC-PLS	UPLC-PCR	UPLC-PLS	UPLC-PCR	UPLC-PLS	UPLC-PCR	UPLC-PLS	UPLC-PCR	UPLC-PLS	UPLC-PCR
1	5	10	15	4.98	4.98	10.03	10.15	15.19	15.20	99.7	99.6	100.3	101.5	101.3	101.3
2	10	10	15	9.82	9.81	10.26	10.27	15.00	15.00	98.2	98.1	102.6	102.7	100.0	100.0
3	15	10	15	14.97	14.97	10.11	10.14	14.94	14.94	99.8	99.8	101.1	101.4	99.6	99.8
4	20	10	15	20.09	20.10	9.98	10.08	14.96	14.96	100.4	100.5	99.8	100.8	99.7	99.7
5	25	10	15	25.01	25.01	9.98	10.03	14.86	14.88	100.0	100.1	99.8	100.3	99.0	99.2
6	30	10	15	30.63	30.65	10.02	9.97	15.04	15.06	102.1	102.2	100.2	99.7	100.2	100.4
7	15	5	15	15.09	15.09	5.09	5.10	15.09	15.09	100.6	100.6	101.9	102.1	100.6	100.6
8	15	10	15	14.90	14.90	10.17	10.31	15.04	15.04	99.3	99.3	101.7	103.1	100.3	100.3
9	15	15	15	15.04	15.03	15.25	15.24	15.26	15.24	100.2	100.2	101.7	101.6	101.7	101.6
10	15	20	15	15.18	15.18	19.95	19.97	15.02	15.02	101.2	101.2	99.8	99.9	100.1	100.1
11	15	25	15	14.97	14.97	25.13	25.17	15.24	15.24	99.8	99.8	100.5	100.7	101.6	101.6
12	15	30	15	15.07	15.08	29.91	29.85	15.08	15.08	100.5	100.5	99.7	99.5	100.5	100.6
13	15	10	5	15.34	15.35	10.12	10.19	5.09	5.09	102.3	102.3	101.2	101.9	101.8	101.8
14	15	10	10	15.59	15.60	10.09	10.09	10.28	10.26	103.9	104.0	100.9	100.9	102.8	102.6
15	15	10	15	14.78	14.77	10.06	10.13	15.07	15.11	98.5	98.5	100.6	101.3	100.5	100.7
16	15	10	20	15.00	15.00	9.92	9.93	19.62	19.58	100.0	100.0	99.2	99.3	98.1	97.9
17	15	10	25	15.20	15.21	9.98	9.95	24.98	25.06	101.3	101.4	99.8	99.5	99.9	100.2
18	15	10	30	15.33	15.34	9.99	10.00	29.06	29.12	102.2	102.3	99.9	100.0	96.9	97.1
19	15	10	15	14.87	14.87	9.96	10.02	15.20	15.20	99.1	99.1	99.6	100.2	101.3	101.3
								$\bar{X}$		100.5	100.5	100.5	100.9	100.3	100.4
								SS		1.42	1.45	0.94	1.11	1.37	1.33
								BSS		1.42	1.44	0.94	1.10	1.36	1.32

**Tablo 4.15** UPLC-PLS ve UPLC-PCR Yöntemiyle Gün İçi Kesinlik ve Doğruluk İçin Analiz Sonuçları

İlave edilen ( $\mu\text{g/ml}$ )			Bulunan ( $\mu\text{g/ml}$ )					
AA	PAR	ASP	AA		PAR		ASP	
			PLS	PCR	PLS	PCR	PLS	PCR
10	10	10	10.11	10.11	10.06	10.07	10.31	10.30
20	20	20	19.96	19.96	19.55	19.54	19.89	19.92
30	30	30	30.90	30.91	29.42	29.39	29.57	29.65
			Geri Kazanım (%)					
			AA		PAR		ASP	
			PLS	PCR	PLS	PCR	PLS	PCR
			101.1	101.1	100.6	100.7	103.1	103.0
			99.8	99.8	97.8	97.7	99.4	99.6
			103.0	103.0	98.1	98.0	98.6	98.8
			SS					
			AA		PAR		ASP	
			PLS	PCR	PLS	PCR	PLS	PCR
			0.172	0.175	0.094	0.090	0.085	0.092
			0.352	0.358	0.140	0.148	0.208	0.202
			0.288	0.280	0.217	0.216	0.119	0.162
			BSS (%)					
			AA		PAR		ASP	
			PLS	PCR	PLS	PCR	PLS	PCR
			1.701	1.727	0.925	1.047	0.828	0.895
			1.761	1.793	0.900	0.950	1.047	1.016
			0.932	0.904	0.603	0.646	0.402	0.545
			BH (%)					
			AA		PAR		ASP	
			PLS	PCR	PLS	PCR	PLS	PCR
			1.123	1.121	0.571	0.727	3.091	3.001
			-0.209	-0.196	-2.232	-2.286	-0.564	-0.385
			2.996	3.034	-1.933	-2.024	-1.446	-1.170

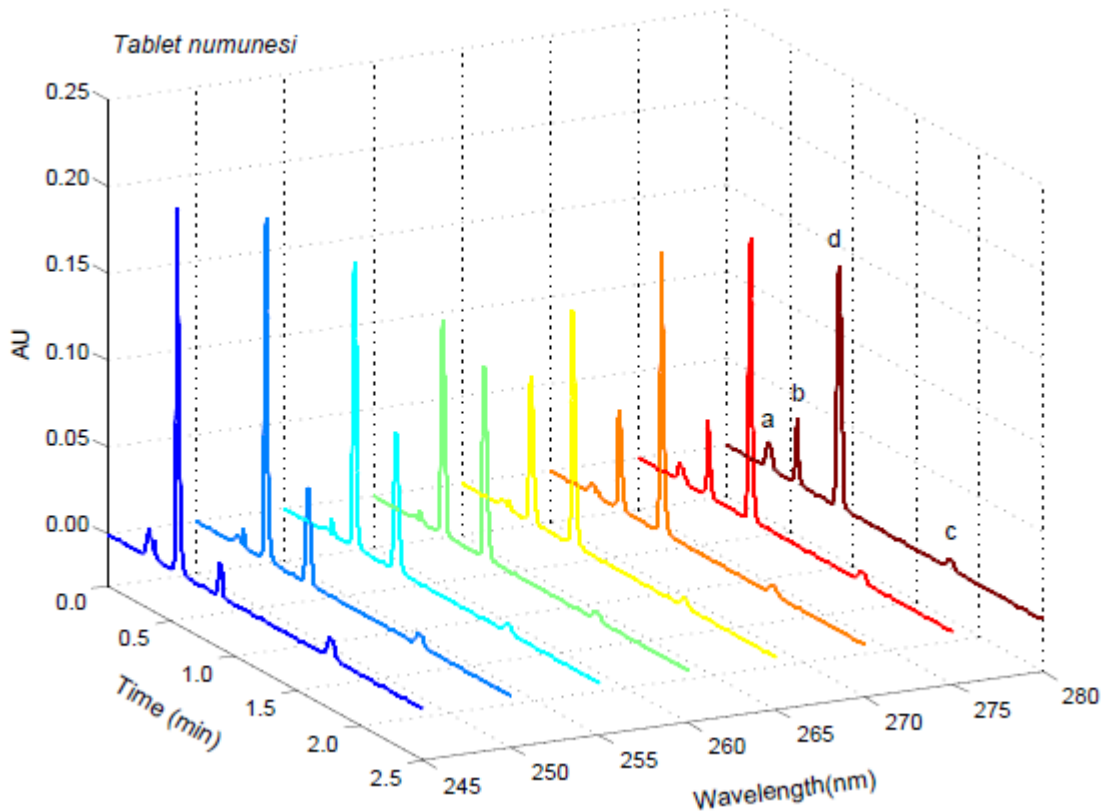
**Tablo 4.16** UPLC-PLS ve UPLC-PCR Yöntemiyle Günler Arası Kesinlik ve Doğruluk İçin Analiz Sonuçları

İlave edilen ( $\mu\text{g/ml}$ )			Bulunan ( $\mu\text{g/ml}$ )					
			AA		PAR		ASP	
AA	PAR	ASP	PLS	PCR	PLS	PCR	PLS	PCR
10	10	10	10.00	10.01	10.00	10.02	10.16	10.22
20	20	20	20.18	20.18	20.00	20.02	20.13	20.14
30	30	30	30.09	30.09	29.89	29.94	30.19	30.36
			Geri Kazanım (%)					
			AA		PAR		ASP	
			PLS	PCR	PLS	PCR	PLS	PCR
			100.0	100.1	100.0	100.2	101.6	102.2
			100.9	100.9	100.0	100.1	100.7	100.7
			100.3	100.3	99.6	99.8	100.6	101.2
			SS					
			AA		PAR		ASP	
			PLS	PCR	PLS	PCR	PLS	PCR
			0.128	0.131	0.093	0.105	0.094	0.110
			0.262	0.268	0.180	0.190	0.255	0.355
			0.539	0.542	0.180	0.193	0.210	0.406
			BSS (%)					
			AA		PAR		ASP	
			PLS	PCR	PLS	PCR	PLS	PCR
			1.282	1.308	0.925	1.047	0.925	1.081
			1.298	1.329	0.900	0.950	1.267	1.764
			1.792	1.802	0.603	0.646	0.697	1.336
			BH(%)					
			AA		PAR		ASP	
			PLS	PCR	PLS	PCR	PLS	PCR
			0.046	0.081	0.035	0.161	1.602	2.173
			0.900	0.881	-0.020	0.110	0.666	0.702
			0.292	0.300	-0.376	-0.206	0.627	1.210



#### 4.1.2.5 UPLC-PLS ve UPLC-PCR Yöntemlerinin Farmasötik Preparatlara Uygulanması

Çalışmada UPLC-PLS ve UPLC-PCR yöntemlerinin farmasötik preparatlara uygulanmasında, 20 adet AFEBRYL® tablet doğru bir şekilde tartıldı ve havanda iyice toz edildikten sonra bir tablete karşılık gelen tablet miktarı 100 mL'lik balonjode metanol içerisinde çözüldü. Balonjoje içeriği mekanik karıştırıcı ile 35 dakika karıştırıldı ve membran filtre (Sartorius Minisart  $\phi=0,45 \mu\text{m}$ ) yardımı ile süzüldü. Hazırlanan tablet çözeltileri 2 mL'lik "vial" lere konularak kalibrasyon basamağındaki kromatografik UPLC şartlarda 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275 ve 280 nm dalga boylarındaki dedeksiyon ile Şekil 4.34'de ki kromatogramlar alındı.



**Şekil 4.34** Kalibrasyon basamağındaki tablet çözeltilerinin kromatografik UPLC şartlarda 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275 ve 280 nm dalga boylarındaki dedeksiyon ile elde edilen kromatogramları.

Elde edilen kromatogramlardan AA/IS, PAR/IS ve ASP/IS oranları hesaplanıp, UPLC-PLS ve UPLC PCR kalibrasyon denklemlerinde yerine konarak tabletlerin içerisindeki AA, PAR ve ASP miktarları hesaplandı. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.17’de sunulmaktadır.

**Tablo 4.17** UPLC-PLS ve UPCR Yöntemlerinden elde edilen miktar tayini sonuçları

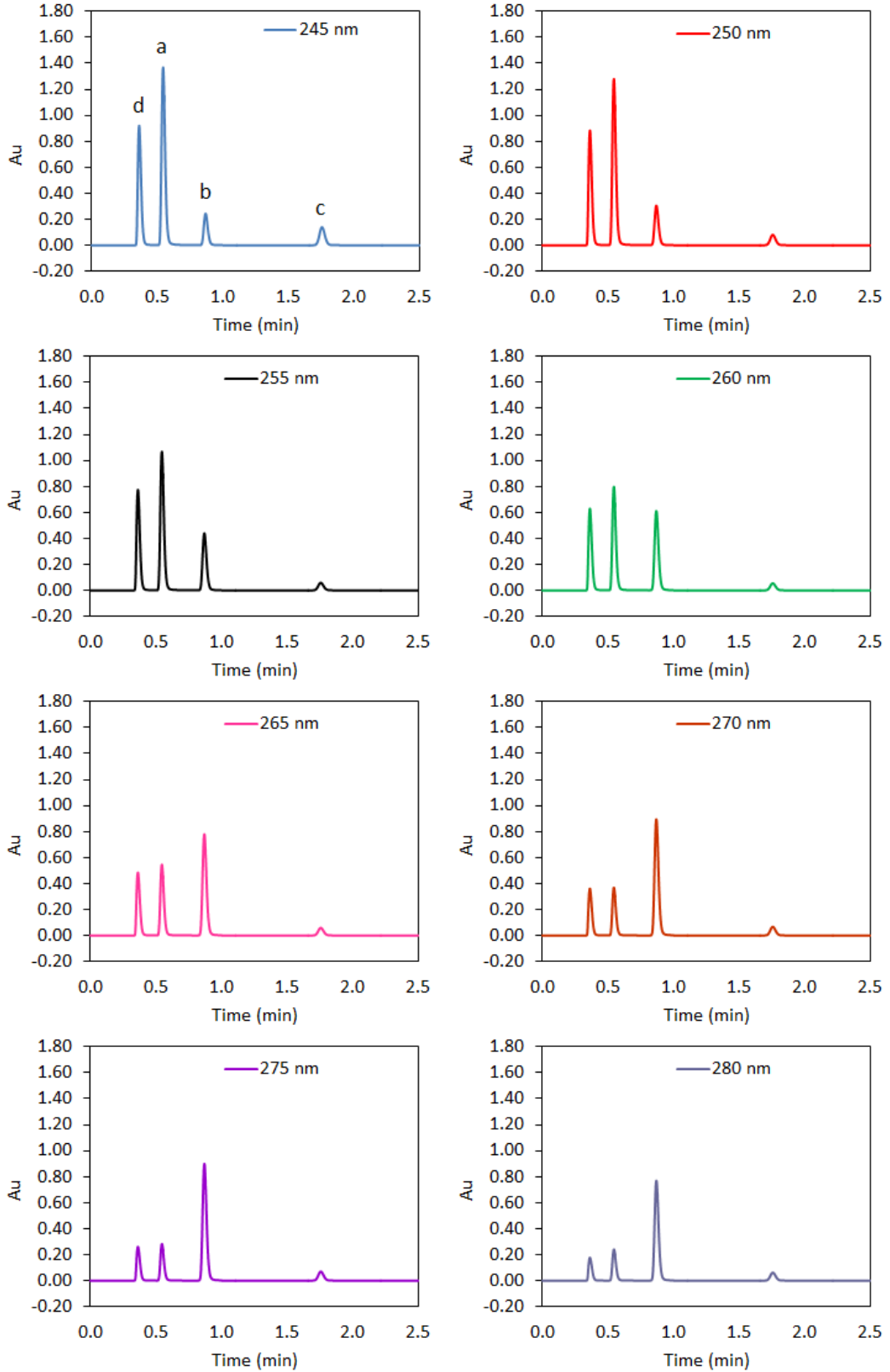
No.	mg/tablet					
	AA		PAR		ASP	
	PLS	PCR	PLS	PCR	PLS	PCR
1	303.8	303.9	198.8	198.8	302.1	302.7
2	303.7	303.8	202.9	202.9	303.1	303.4
3	303.1	303.9	202.2	202.3	302.2	303.3
4	302.3	302.5	204.7	204.8	302.6	303.0
5	302.7	302.9	196.6	196.3	306.1	306.6
6	304.2	304.0	202.2	202.3	300.1	301.2
7	302.5	302.5	199.8	199.7	304.4	304.6
8	306.3	306.9	199.4	199.5	302.6	302.5
9	300.2	300.2	200.4	200.5	302.5	303.0
$\bar{X}$	303.2	303.4	200.8	200.8	302.9	303.4
SS	1.65	1.78	2.47	2.56	1.65	1.50
BSS	0.54	0.59	1.23	1.27	0.54	0.50

## **4.2 Klasik UPLC Yöntemiyle PAR, KAF, ASP Karışımının Analizi**

### **4.2.1 Klasik UPLC Yöntemi**

#### **4.2.1.1 Doğrusal Regresyon Analizi ve Kalibrasyon.**

UPLC yönteminin geliştirilmesinde 15 µg/ml sabit konsantrasyonda internal standart olarak (IS AA) eklenerek PAR, KAF ve ASP için 5.0-30 µg/ml doğrusal çalışma aralığında hazırlanan 6 adet standart çözeltileri içeren konsantrasyon (derişim) seti olarak adlandırılan kalibrasyon setinin 245, 250, 255, 260, 265, 270 ve 280 nm'de photodiode array (PDA) dedektörü kullanılarak aşağıdaki kromatogram çizdirildi. Elde edilen kromatogramlarda PAR, KAF ve ASP ile IS için kolonda tutulma süreleri sırasıyla ortalma 0.552, 0.892, 1.802 sn olarak gözlemlendi. Şekil 4.35



**Şekil 4.35** Derişim set No. 4'e karşılık gelen 20 µg/ml a) Parasetamol (PAR), b) Kafein (KAF) c) Aspirin bileşikleri (ASP) ve d) IS Askorbik asit (AA) için sekiz farklı dalga boyunda dedeksiyon ile kaydedilen kromatogramların dizisi

Kromatografik analizde PAR, KAF ve ASP'nin standart çözeltilerinden hazırlanan konsantrasyon seti için 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275, 280 nm dalga boylarında dedeksiyonu yapılan kromatogramların integrasyonla bulunanlar EM-Power UPLC programı yardımıyla hesaplandı. Klasik UPLC analiz yönteminin uygulamasında seçilen her bir dalga boyu için PAR/IS, KAF/IS ve ASP/IS oranları Tablo 4.18'de sunuldu

**Tablo 4.18** Konsantrasyon seti ve ilaç ile IS pik alanlarına karşılık gelen kromatografik data seti

Karışım No:	PAR	CAF ( $\mu$ /mL)	ASP	PAR, Zaman (dakika) = 0.552								
				Alan/IS								
				245	250	255	260	265	270	275	280	
1	4	4	6	0.3155	0.3063	0.2897	0.2635	0.2317	0.2076	0.2194	0.2729	
2	12	12	14	0.9405	0.9115	0.8642	0.7884	0.7686	0.6236	0.6577	0.8218	
3	20	20	22	1.6164	1.5696	1.4855	1.3567	0.9249	1.0692	1.1277	1.4078	
4	28	28	30	2.2974	2.2307	2.1096	1.9261	1.6865	1.5136	1.5940	2.0001	
5	32	32	38	2.5769	2.5045	2.3736	2.2156	1.9109	1.7155	1.8100	2.2660	

Karışım No:	PAR	CAF ( $\mu$ /mL)	ASP	KAF, Zaman (dakika) = 0.892								
				Alan/IS								
				245	250	255	260	265	270	275	280	
1	4	4	4	0.0644	0.0846	0.1388	0.2373	0.3898	0.5986	0.8302	1.0457	
2	12	12	12	0.1859	0.2424	0.3996	0.6805	1.1229	1.7214	2.3914	3.0039	
3	20	20	20	0.3186	0.4156	0.6824	1.1651	1.9150	2.9387	4.0700	5.1155	
4	28	28	28	0.4477	0.5848	0.9575	1.6353	2.6850	4.1153	5.7123	7.1996	
5	32	32	32	0.5052	0.6595	1.0838	1.8488	3.0395	4.6531	6.4578	8.1367	

Karışım No:	PAR	CAF ( $\mu$ /mL)	ASP	ASP, Zaman (dakika) = 1.802								
				Alan/IS								
				245	250	255	260	265	270	275	280	
1	4	4	6	0.0680	0.0395	0.0322	0.0348	0.0509	0.0767	0.1085	0.1462	
2	12	12	14	0.1468	0.0894	0.0751	0.0844	0.1121	0.1687	0.2361	0.3258	
3	20	20	22	0.2355	0.1435	0.1166	0.1305	0.1840	0.2653	0.3915	0.5056	
4	28	28	30	0.3224	0.1928	0.1596	0.1803	0.2415	0.3733	0.5381	0.6977	
5	32	32	38	0.3969	0.2357	0.1935	0.2212	0.3064	0.4652	0.6728	0.8727	

Kromatogramların PAR/IS, KAF/IS ve ASP/IS alanlarının oranlarının konsantrasyona karşı grafiğe geçirilerek doğru denklemi elde edildi. UPLC alanları ile konsantrasyonlar arasındaki doğal regresyon analizi ve istatistiksel sonuçları analiz edilecek her bir bileşik için Tablo 4.19 sunulmuştur.

**Tablo 4.19** Doğrusal regresyon analizi ve istatistiksel sonuçları

<b>PAR, t (sn)= 0.552</b>								
$\lambda$ (nm)	m	n	r	SE(m)	SE(n)	SE(r)	LOD	LOQ
245	0.0818	-0.0212	0.9998	0.0010	0.0103	0.0236	0.9228	3.0759
250	0.0795	-0.0220	0.9998	0.0010	0.0130	0.0227	1.2014	4.0045
255	0.0753	-0.0210	0.9998	0.0009	0.0122	0.0196	1.1953	3.9845
260	0.0689	-0.0215	0.9998	0.0007	0.0108	0.0167	1.1570	3.8565
265	0.0605	-0.0190	0.9999	0.0005	0.0092	0.0121	1.1167	3.7222
270	0.0543	-0.0163	0.9999	0.0004	0.0081	0.0101	1.0975	3.6583
275	0.0572	-0.0168	0.9999	0.0004	0.0090	0.0099	1.1569	3.856
280	0.0718	-0.0244	0.9999	0.0006	0.0105	0.0142	1.0720	3.5733
<b>CAF, t (sn)=0.892</b>								
$\lambda$ (nm)	m	n	r	SE(m)	SE(n)	SE(r)	LOD	LOQ
245	0.0159	-0.0009	0.9998	0.0002	0.0025	0.0036	1.1391	3.7969
250	0.0207	-0.0010	0.9998	0.0002	0.0032	0.0050	1.1272	3.7575
255	0.0340	-0.0009	0.9999	0.0003	0.0043	0.0066	0.9224	3.0747
260	0.0581	-0.0018	0.9999	0.0005	0.0059	0.0125	0.7458	2.4859
265	0.0954	-0.0009	0.9999	0.0008	0.0169	0.0178	1.3055	4.3516
270	0.1460	0.0018	0.9999	0.0013	0.0178	0.0293	0.8982	2.9939
275	0.2026	0.0016	0.9999	0.0017	0.0267	0.0386	0.9686	3.2287
280	0.2555	-0.0049	0.9999	0.0020	0.0228	0.0514	0.6572	2.1907
<b>ASP, t (sn)= 1.802</b>								
$\lambda$ (nm)	m	n	r	SE(m)	SE(n)	SE(r)	LOD	LOQ
245	0.0104	0.0047	0.9996	0.0002	0.0023	0.0044	1.4807	4.9358
250	0.0062	0.0039	0.9992	0.0001	0.0014	0.0035	1.5626	5.2088
255	0.0051	0.0035	0.9992	0.0001	0.0011	0.0030	1.4246	4.7485
260	0.0059	0.0014	0.9995	0.0001	0.0015	0.0027	1.7344	5.7812
265	0.0080	0.0029	0.9996	0.0001	0.0021	0.0035	1.7714	5.9046
270	0.0123	-0.0001	0.9996	0.0002	0.0033	0.0048	1.8007	6.0024
275	0.0179	-0.0040	0.9996	0.0003	0.0045	0.0077	1.6871	5.6238
280	0.0228	0.0077	0.9999	0.0002	0.0038	0.0043	1.1162	3.7207

#### 4.2.1.2 Klasik UPLC Yönteminin Validasyonu

Geliştirilen yöntemin validasyonu için “UPLC” 0.1M CH<sub>3</sub>COOH ve metanol (75:25 *h/h*) içerisinde PAR, KAF ve ASP için 4.0-38 µg/ml doğrusal çalışma aralığı içinde farklı konsantrasyonlarda 19 adet yapay karışım çözeltisinden oluşan bir validasyonu seti hazırlandı. Bu validasyon setinin hazırlanmasında her bir karışım çözeltisine 15 µg/ml sabit konsantrasyonda IS stok çözeltisi ilave edildi.

Bu validasyonu seti kullanılarak klasik UPLC yönteminin kesinlik ve doğruluğu test yapıldı. Geri kazanım değerleri PAR için % 98.1-99.5 aralığında, KAF için % 100-101.9 arasında ve ASP için % 99-99.4 aralığında bulunmuştur.

Bu geri kazanım çalışmalarının sonuçları Tablo 4.20, Tablo 4.21, Tablo 4.22’de sunulmuştur. Standart sapma değerleri ise PAR için %1.9-2.65 aralığında, KAF için % 2.49-2.97 aralığında, ASP için %1.19-1.96 aralığında hesaplandı. Geri kazanım çalışmasında UPLC yönteminin yapay karışımlara uygulanması ile elde edilen sonuçlar PAR için Tablo 4.20, KAF için Tablo 4.21, ASP için Tablo 4.22’de sunulmaktadır.



**Tablo 4.20** Klasik UPLC yönteminin PAR,CAF ve ASP yapay karışımının analizinde PAR için elde edilen % geri kazanım sonuçları

Karışım No:	İlave edilen (µg/ml)			PAR, Bulunan (µg/ml)								PAR, Geri kazanım (%)								
	PAR	KAF	ASP	245	250	255	260	265	270	275	280	245	250	255	260	265	270	275	280	
1	4	7	35	4.04	3.99	3.90	3.89	4.07	4.07	4.09	4.14	101.0	99.7	97.6	97.3	101.9	101.8	102.3	103.5	
2	12	7	35	12.36	12.41	11.46	11.83	12.12	12.32	12.43	12.48	103.0	103.4	95.5	98.6	101.0	102.6	103.5	104.0	
3	20	7	35	19.80	19.79	19.78	19.76	19.48	20.14	19.81	19.79	99.0	99.0	98.9	98.8	97.4	100.7	99.1	99.0	
4	28	7	35	28.05	27.90	26.90	29.20	28.47	27.62	28.35	27.86	100.2	99.6	96.1	104.3	101.7	98.6	101.2	99.5	
5	32	7	35	33.01	32.98	33.01	32.93	32.94	32.93	32.89	32.89	103.2	103.0	103.2	102.9	102.9	102.9	102.8	102.8	
6	28	4	35	27.76	27.75	27.72	27.67	27.64	27.64	27.64	27.61	99.2	99.1	99.0	98.8	98.7	98.7	98.7	98.6	
7	28	12	35	28.26	28.23	28.20	28.13	28.10	28.06	28.07	28.03	100.9	100.8	100.7	100.5	100.4	100.2	100.3	100.1	
8	28	20	35	27.26	27.27	27.32	27.35	27.42	27.49	27.54	27.54	97.4	97.4	97.6	97.7	97.9	98.2	98.4	98.4	
9	28	28	35	27.22	27.28	26.37	27.12	27.67	28.03	28.27	28.38	97.2	97.4	94.2	96.9	98.8	100.1	101.0	101.4	
10	28	32	35	26.46	27.98	28.38	26.66	27.23	27.65	27.89	28.02	94.5	99.9	101.3	95.2	97.2	98.8	99.6	100.1	
11	28	7	6	27.83	27.79	27.79	27.76	27.74	27.80	27.75	27.73	99.4	99.2	99.2	99.1	99.1	99.3	99.1	99.0	
12	28	7	14	28.13	27.77	27.63	26.45	26.58	26.69	26.74	26.79	100.5	99.2	98.7	94.5	94.9	95.3	95.5	95.7	
13	28	7	22	26.78	27.48	28.04	27.22	26.92	27.23	27.38	27.47	95.7	98.1	100.1	97.2	96.2	97.2	97.8	98.1	
14	28	7	30	27.42	27.52	27.88	26.73	26.66	26.74	26.81	26.78	97.9	98.3	99.6	95.5	95.2	95.5	95.7	95.6	
15	28	7	38	27.50	26.99	27.22	27.41	26.64	26.71	26.73	26.69	98.2	96.4	97.2	97.9	95.1	95.4	95.5	95.3	
16	28	7	35	27.45	27.47	27.65	27.88	27.90	28.06	28.07	28.08	98.0	98.1	98.8	99.6	99.7	100.2	100.3	100.3	
												$\bar{X}$	99.1	99.3	98.6	98.4	98.6	99.1	99.4	99.5
												SS	2.37	1.88	2.25	2.61	2.53	2.40	2.48	2.62
												BSS	2.39	1.90	2.29	2.65	2.56	2.42	2.50	2.63

$\bar{X}$ = Aritmetik ortalama, SS= Standart sapma, BSS= Bağıl standart sapma

**Tablo 4.21** Klasik UPLC yönteminin PAR,KAF ve ASP yapay karışımının analizinde KAF için elde edilen % geri kazanım sonuçları

Karışım No:	İlave edilen (µg/ml)			KAF Bulunan (µg/ml)								KAF, Geri kazanım (%)								
	PAR	KAF	ASP	245	250	255	260	265	270	275	280	245	250	255	260	265	270	275	280	
1	4	7	35	7.06	7.09	7.11	7.14	7.15	7.15	7.17	7.18	99.1	98.7	98.4	98.1	97.9	97.9	97.7	97.5	
2	12	7	35	6.62	6.66	6.70	6.76	6.83	6.89	6.96	7.01	105.7	105.1	104.4	103.5	102.5	101.5	100.6	99.8	
3	20	7	35	7.02	7.05	7.07	7.10	7.06	6.93	7.14	7.15	99.8	99.3	98.9	98.6	99.1	101.0	98.0	98.0	
4	28	7	35	7.00	7.03	7.06	7.09	6.96	7.04	7.13	7.15	100.0	99.6	99.2	98.8	100.6	99.4	98.2	97.9	
5	32	7	35	6.91	6.92	6.96	6.97	6.98	6.97	6.97	6.98	101.3	101.1	100.6	100.5	100.3	100.5	100.4	100.2	
6	28	4	35	3.99	4.02	4.06	4.08	4.08	4.07	4.08	4.09	100.3	99.5	98.6	98.0	98.1	98.3	98.1	97.8	
7	28	12	35	12.27	12.30	12.33	12.34	12.36	12.36	12.35	12.36	97.8	97.5	97.3	97.2	97.1	97.1	97.1	97.1	
8	28	20	35	19.58	19.61	19.65	19.69	19.73	19.79	19.81	19.84	102.2	102.0	101.8	101.6	101.4	101.1	100.9	100.8	
9	28	28	35	27.19	27.25	27.35	27.43	27.38	27.17	27.07	27.55	103.0	102.7	102.4	102.1	102.3	103.1	103.4	101.6	
10	28	32	35	30.95	31.04	31.13	31.15	30.78	30.19	29.88	30.76	103.4	103.1	102.8	102.7	104.0	106.0	107.1	104.0	
11	28	7	6	6.80	6.80	6.83	6.86	6.86	6.85	6.87	6.88	102.9	102.9	102.5	102.0	102.1	102.1	101.9	101.8	
12	28	7	14	6.56	6.58	6.59	6.63	6.65	6.66	6.69	6.71	106.7	106.3	106.2	105.6	105.3	105.1	104.6	104.3	
13	28	7	22	6.79	6.82	6.86	6.91	6.96	7.01	7.05	7.09	103.1	102.6	102.1	101.3	100.6	99.9	99.3	98.8	
14	28	7	30	7.11	7.14	7.16	7.19	7.21	7.23	7.25	7.26	98.4	98.0	97.7	97.3	97.0	96.8	96.6	96.4	
15	28	7	38	6.89	6.91	6.92	6.94	6.95	6.96	6.98	6.98	101.6	101.3	101.2	100.8	100.7	100.6	100.3	100.3	
16	28	7	35	6.63	6.64	6.67	6.70	6.72	6.74	6.76	6.78	105.6	105.4	105.0	104.5	104.2	103.8	103.6	103.3	
												$\bar{X}$	101.9	101.6	101.2	100.8	100.8	100.9	100.5	100.0
												SS	2.63	2.67	2.68	2.59	2.51	2.71	2.99	2.52
												BSS	2.59	2.63	2.65	2.57	2.49	2.68	2.97	2.52

$\bar{X}$ =Aritmetik ortalama, SS= Standart sapma, BSS= Bağlı standart sapma

**Tablo 4.22** Klasik UPLC yönteminin PAR,KAF ve ASP yapay karışımının analizinde ASP için elde edilen % geri kazanım sonuçları

Karışım No:	İlave edilen (µg/ml)			ASP Bulunan (µg/ml)								ASP, Geri kazanım (%)								
	PAR	KAF	ASP	245	250	255	260	265	270	275	280	245	250	255	260	265	270	275	280	
1	4	7	35	34.40	34.19	34.28	34.31	34.73	34.83	36.46	34.64	98.3	99.4	100.3	100.1	101.2	100.3	104.7	95.0	
2	12	7	35	35.01	35.10	35.48	35.51	34.47	34.79	34.95	35.19	100.0	100.3	101.1	100.1	97.1	100.9	100.5	100.7	
3	20	7	35	35.18	34.94	35.33	34.99	35.67	35.02	35.55	35.42	100.5	99.3	101.1	99.0	101.9	98.2	101.5	99.6	
4	28	7	35	34.34	34.08	34.13	34.23	34.76	34.93	34.84	34.82	98.1	99.3	100.1	100.3	101.6	100.5	99.8	100.0	
5	32	7	35	34.83	34.50	34.80	34.58	34.95	34.97	34.84	34.77	99.5	99.1	100.9	99.4	101.1	100.1	99.6	99.8	
6	28	4	35	34.44	34.16	34.46	34.17	34.43	34.62	34.40	34.45	98.4	99.2	100.9	99.1	100.8	100.5	99.4	100.1	
7	28	12	35	35.26	34.92	35.27	34.98	35.35	35.28	35.20	35.24	100.7	99.0	101.0	99.2	101.1	99.8	99.8	100.1	
8	28	20	35	34.16	34.00	34.04	34.10	34.71	34.78	34.67	34.64	97.6	99.5	100.1	100.2	101.8	100.2	99.7	99.9	
9	28	28	35	34.14	34.18	34.52	34.51	35.67	35.92	35.00	35.15	97.5	100.1	101.0	100.0	103.4	100.7	97.4	100.5	
10	28	32	35	34.68	34.80	35.13	35.19	36.39	35.06	35.08	34.86	99.1	100.4	100.9	100.2	103.4	96.4	100.1	99.4	
11	28	7	6	5.89	5.95	6.14	5.97	6.02	5.95	6.02	5.93	98.2	101.0	103.1	97.4	100.9	98.7	101.2	98.5	
12	28	7	14	13.94	13.35	13.26	13.68	14.20	14.26	14.44	14.02	99.5	95.8	99.3	103.2	103.8	100.4	101.2	97.1	
13	28	7	22	21.99	21.81	21.95	22.05	22.69	23.01	23.08	22.97	100.0	99.2	100.7	100.4	102.9	101.4	100.3	99.5	
14	28	7	30	30.81	30.67	31.81	30.54	31.25	31.37	32.29	30.38	102.7	99.6	103.7	96.0	102.3	100.4	102.9	94.1	
15	28	7	38	38.01	38.15	37.91	39.46	38.64	38.55	38.58	38.54	100.0	100.4	99.4	104.1	97.9	99.8	100.1	99.9	
16	28	7	35	35.06	34.18	35.00	35.45	35.71	35.86	35.74	35.78	100.2	97.5	102.4	101.3	100.7	100.4	99.7	100.1	
												$\bar{X}$	99.4	99.3	101.0	100.0	101.4	99.9	100.5	99.0
												SS	1.36	1.23	1.20	1.91	1.82	1.23	1.63	1.94
												BSS	1.37	1.24	1.19	1.91	1.79	1.23	1.62	1.96

$\bar{X}$ =Aritmetik ortalama, SS= Standart sapma, BSS= Bağıl standart sapma

Diğer bir validasyon işlemi olarak klasik UPLC yönteminin doğruluk ve kesinliğini değerlendirmek için gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk çalışmalarında doğrusal çalışma aralığının içinde olacak şekilde üç farklı konsantrasyonda PAR, ve KAF için 8.0, 20.0 ve 30.0 µg/ml, ASP için ise 10.0, 20 ve 30 µg/ml olarak her derişim için 3 farklı çözelti olmak üzere aynı gün içinde ve günler arasında hazırlanan çözeltiler kullanılarak gerçekleştirildi. Gün içi elde edilen sonuçlar PAR için Tablo 4.23.'da, KAF için Tablo 4.24.'de ve ASP için ise Tablo 4.25.'de gösterilmiştir. Aynı şekilde ve günler arası elde edilen sonuçlar PAR için Tablo 4.26'da, KAF için Tablo 4.27'de ASP için ise Tablo 4.28'de gösterilmiştir.

**Tablo 4.23** Klasik UPLC yönteminin uygulanmasına PAR için gün içi analiz sonuçları

			PAR							
İlave Edilen (µg/ml)			Bulunan (µg/ml)							
PAR	KAF	ASP	245	250	255	260	265	270	275	280
8	8	10	7.78	7.82	7.86	7.91	7.97	8.02	8.06	8.11
20	20	20	20.08	20.12	20.17	20.22	20.30	20.38	20.41	20.44
30	30	30	30.37	30.53	30.44	30.59	30.72	30.79	30.79	30.78
			PAR							
			Geri kazanım (%)							
			245	250	255	260	265	270	275	280
			97.3	97.8	98.2	98.9	99.6	100.3	100.7	101.3
			100.4	100.6	100.9	101.1	101.5	101.9	102.1	102.2
			101.2	101.8	101.5	102.0	102.4	102.6	102.6	102.6
			PAR							
			SS							
			245	250	255	260	265	270	275	280
			0.007	0.006	0.006	0.005	0.006	0.009	0.007	0.012
			0.169	0.146	0.104	0.055	0.015	0.035	0.065	0.081
			0.546	0.343	0.553	0.260	0.089	0.039	0.099	0.139
			PAR							
			BSS (%)							
			245	250	255	260	265	270	275	280
			0.09	0.08	0.08	0.07	0.08	0.11	0.09	0.15
			0.84	0.73	0.51	0.27	0.07	0.17	0.32	0.40
			1.80	1.12	1.82	0.85	0.29	0.13	0.32	0.45
			PAR							
			Bağlı Hata (%)							
			245	250	255	260	265	270	275	280
			-2.69	-2.19	-1.80	-1.11	-0.36	0.26	0.71	1.33
			0.42	0.58	0.86	1.12	1.50	1.88	2.07	2.18
			1.23	1.75	1.47	1.98	2.39	2.64	2.65	2.59

SS =Standart sapma, BSS = % Bağlı standart sapma

$$\% \text{ BH} = \left( \frac{\text{ilave edilen} - \text{Bulunan}}{\text{ilave edilen}} \right) \times 100 = \% \text{ Bağlı hata}$$

**Tablo 4.24** Klasik UPLC yönteminin uygulanmasına KAF için gün içi analiz sonuçları

İlave edilen (µg/ml)			KAF							
PAR	KAF	ASP	Bulunan(µg/ml)							
			245	250	255	260	265	270	275	280
8	8	10	7.70	7.60	7.64	7.70	7.76	7.83	7.88	7.93
20	20	24	19.56	19.58	19.63	19.68	19.75	19.81	19.86	19.90
30	30	30	30.75	31.17	29.87	30.80	30.10	30.76	31.14	29.87
			KAF							
			Geri Kazanım(%)							
			245	250	255	260	265	270	275	280
			96.2	94.9	95.4	96.2	97.0	97.8	98.5	99.1
			97.8	97.9	98.2	98.4	98.8	99.1	99.3	99.5
			102.5	103.9	99.6	102.7	100.3	102.5	103.8	99.6
			KAF							
			SS							
			245	250	255	260	265	270	275	280
			0.146	0.050	0.070	0.067	0.087	0.150	0.145	0.141
			0.094	0.087	0.070	0.047	0.027	0.018	0.020	0.041
			1.048	0.581	0.712	0.794	0.375	0.840	0.853	0.876
			KAF							
			BSS (%)							
			245	250	255	260	265	270	275	280
			1.891	0.652	0.912	0.873	1.117	1.919	1.834	1.777
			0.479	0.445	0.359	0.241	0.136	0.092	0.103	0.208
			3.408	1.865	2.384	2.578	1.247	2.730	2.738	2.933
			KAF							
			Bağıl Hata (%)							
			245	250	255	260	265	270	275	280
			-3.804	-5.062	-4.556	-3.806	-2.983	-2.151	-1.457	-0.877
			-2.222	-2.121	-1.838	-1.604	-1.245	-0.940	-0.692	-0.514
			2.505	3.900	-0.428	2.671	0.337	2.533	3.809	-0.424

SS =Standart sapma, BSS = % Bağıl standart sapma

$$\% BH = \left( \frac{\text{ilave edilen} - \text{Bulunan}}{\text{ilave edilen}} \right) \times 100 = \% \text{ Bağıl hata}$$

**Tablo 4.25** Klasik UPLC yönteminin uygulanmasına ASP için gün içi analiz sonuçları

			ASP							
İlave edilen (µg/ml)			Bulunan (µg/ml)							
PAR	KAF	ASP	245	250	255	260	265	270	275	280
8	8	10	9.97	9.92	9.86	10.19	10.10	10.09	10.29	10.01
20	20	24	23.73	24.46	24.45	24.47	24.46	23.48	23.95	23.68
30	30	30	29.99	29.79	29.95	29.85	30.38	30.15	30.42	30.35
			ASP							
			Geri Kazanım (%)							
			245	250	255	260	265	270	275	280
			99.7	99.2	98.6	101.9	101.0	100.9	102.9	100.1
			98.9	101.9	101.9	102.0	101.9	97.8	99.8	98.7
			100.0	99.3	99.8	99.5	101.3	100.5	101.4	101.2
			ASP							
			SS							
			245	250	255	260	265	270	275	280
			2.376	0.483	0.338	0.535	0.453	0.107	0.305	0.277
			1.176	0.610	0.614	0.663	1.412	0.502	1.968	0.901
			0.672	0.406	0.556	0.302	0.491	0.613	0.866	0.993
			ASP							
			BSS (%)							
			245	250	255	260	265	270	275	280
			2.384	0.487	0.343	0.525	0.449	0.106	0.296	0.277
			1.189	0.598	0.602	0.650	1.386	0.513	1.972	0.914
			0.672	0.408	0.557	0.304	0.484	0.610	0.854	0.981

SS =Standart sapma, BSS = % Bağıl standart sapma

$$\% BH = \left( \frac{\text{ilave edilen} - \text{Bulunan}}{\text{ilave edilen}} \right) \times 100 = \% \text{ Bağıl hata}$$

**Tablo 4.26** Klasik UPLC yönteminin uygulanmasına PAR için günler arası analiz sonuçları

İlave edilen (µg/ml)			PAR							
PAR	KAF	ASP	Bulunan(µg/ml)							
			245	250	255	260	265	270	275	280
8	8	10	8.02	8.01	8.00	7.97	7.94	7.98	7.99	7.97
20	20	24	19.16	19.29	19.49	19.69	19.87	20.02	20.09	20.11
30	30	30	30.75	31.17	29.87	30.80	30.10	30.76	31.14	29.87
			PAR							
			Geri kazanım (%)							
			245	250	255	260	265	270	275	280
			100.2	100.1	100.0	99.6	99.2	99.8	99.8	99.6
			95.8	96.4	97.5	98.5	99.4	100.1	100.4	100.6
			102.5	103.9	99.6	102.7	100.3	102.5	103.8	99.6
			PAR							
			SS							
			245	250	255	260	265	270	275	280
			0.094	0.004	0.004	0.001	0.039	0.064	0.089	0.134
			0.021	0.021	0.015	0.016	0.028	0.030	0.025	0.045
			1.048	0.581	0.712	0.794	0.375	0.840	0.853	0.876
			PAR							
			BSS (%)							
			245	250	255	260	265	270	275	280
			1.178	0.047	0.048	0.018	0.495	0.804	1.116	1.685
			0.108	0.106	0.076	0.083	0.143	0.150	0.127	0.224
			3.408	1.865	2.384	2.578	1.247	2.730	2.738	2.933
			PAR							
			Bağıl Hata (%)							
			245	250	255	260	265	270	275	280
			0.248	0.069	0.009	-0.375	-0.811	-0.203	-0.177	-0.392
			-4.217	-3.559	-2.545	-1.533	-0.630	0.118	0.448	0.571
			2.505	3.900	-0.428	2.671	0.337	2.533	3.809	-0.424

SS =Standart sapma, BSS = % Bağıl standart sapma

$$\% \text{ BH} = \left( \frac{\text{İlave edilen} - \text{Bulunan}}{\text{İlave edilen}} \right) \times 100 = \% \text{ Bağıl hata}$$



**Tablo 4.27** Klasik UPLC yönteminin uygulanmasına KAF için günler arası analiz sonuçları

İlave edilen (µg/ml)			KAF							
PAR	KAF	ASP	Bulunan (µg/ml)							
			245	250	255	260	265	270	275	280
8	8	10	7.56	7.60	7.64	7.70	7.76	7.83	7.88	7.93
20	20	24	19.56	19.58	19.63	19.68	19.75	19.81	19.86	19.90
30	30	30	29.81	29.82	29.85	29.83	29.83	29.75	29.74	29.82
			KAF							
			Geri kazanım (%)							
			245	250	255	260	265	270	275	280
			94.6	94.9	95.4	96.2	97.0	97.8	98.5	99.1
			97.8	97.9	98.2	98.4	98.8	99.1	99.3	99.5
			99.4	99.4	99.5	99.4	99.4	99.2	99.1	99.4
			KAF							
			SS							
			245	250	255	260	265	270	275	280
			0.006	0.004	0.006	0.005	0.007	0.012	0.012	0.011
			0.094	0.087	0.070	0.047	0.027	0.018	0.020	0.041
			0.219	0.203	0.178	0.155	0.166	0.258	0.247	0.117
			KAF							
			BSS (%)							
			245	250	255	260	265	270	275	280
			0.078	0.052	0.073	0.070	0.089	0.154	0.147	0.142
			0.479	0.445	0.359	0.241	0.136	0.092	0.103	0.208
			0.733	0.681	0.596	0.520	0.556	0.866	0.830	0.392
			KAF							
			Bağıl Hata (%)							
			245	250	255	260	265	270	275	280
			-5.446	-5.062	-4.556	-3.806	-2.983	-2.151	-1.457	-0.877
			-2.222	-2.121	-1.838	-1.604	-1.245	-0.940	-0.692	-0.514
			-0.635	-0.612	-0.508	-0.582	-0.553	-0.842	-0.869	-0.602

SS =Standart sapma, BSS = % Bağıl standart sapma

$$\% \text{ BH} = \left( \frac{\text{İlave edilen} - \text{Bulunan}}{\text{İlave edilen}} \right) \times 100 = \% \text{ Bağıl hata}$$

**Tablo 4.28** Klasik UPLC yönteminin uygulanmasına ASP için günler arası analiz sonuçları

İlave edilen (µg/ml)			ASP							
PAR	KAF	ASP	Bulunan (µg/ml)							
			245	250	255	260	265	270	275	280
8	8	10	10.24	10.00	9.92	10.20	10.12	10.18	10.15	10.19
20	20	24	23.97	23.87	23.98	24.06	23.86	24.15	24.24	24.12
30	30	30	30.75	31.17	29.87	30.80	30.10	30.76	31.14	29.87
			ASP							
			Geri Kazanım							
			245	250	255	260	265	270	275	280
			102.4	100.0	99.2	102.0	101.2	101.8	101.5	101.9
			99.9	99.4	99.9	100.2	99.4	100.6	101.0	100.5
			102.5	103.9	99.6	102.7	100.3	102.5	103.8	99.6
			ASP							
			SS							
			245	250	255	260	265	270	275	280
			0.012	0.009	0.025	0.014	0.254	0.113	0.122	0.169
			0.015	0.019	0.025	0.015	0.026	0.038	0.029	0.063
			1.048	0.581	0.712	0.794	0.375	0.840	0.853	0.876
			ASP							
			BSS (%)							
			245	250	255	260	265	270	275	280
			0.121	0.092	0.251	0.141	2.511	1.112	1.199	1.654
			0.061	0.079	0.103	0.060	0.108	0.159	0.118	0.260
			3.408	1.865	2.384	2.578	1.247	2.730	2.738	2.933
			ASP							
			Bağlı Hata (%)							
			245	250	255	260	265	270	275	280
			2.402	-0.026	-0.841	1.966	1.234	1.783	1.477	1.928
			-0.119	-0.555	-0.077	0.235	-0.573	0.635	1.017	0.505
			2.505	3.900	-0.428	2.671	0.337	2.533	3.809	-0.424

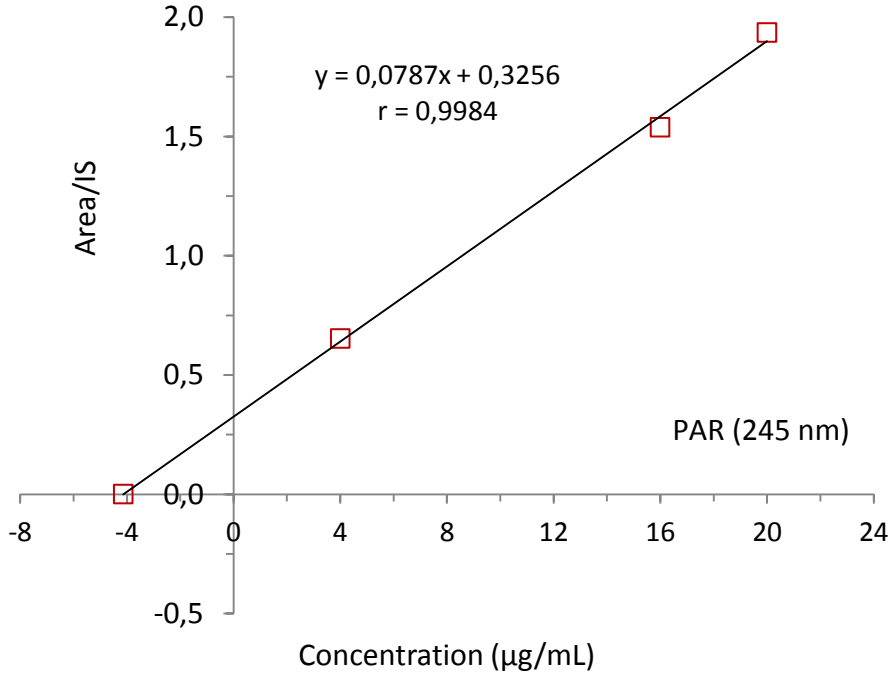
SS =Standart sapma, BSS = % Bağlı standart sapma

% BH =  $\left(\frac{\text{ilave edilen}-\text{Bulunan}}{\text{ilave edilen}}\right) \times 100 = \% \text{ Bağlı hata}$

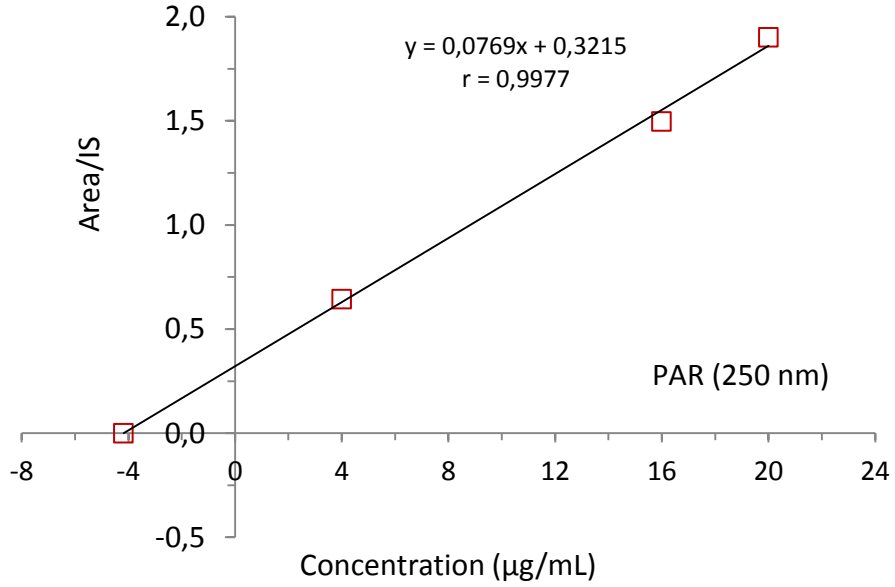
UPLC yöntemini ticari farmasötik preparat analizine uygulamadan önce PAR, KAF ve ASP içeren farmasötik preparatlarda, tablet yardımcı maddelerin analiz üzerinde bir etkisinin olup olmadığı araştırıldı.

Bunun içinde standart ilavesi tekniği kullanıldı. Bunun için de standart ilavesi tekniği kullanıldı. Farmasötik preparatlardaki bir tablete karşılık gelen içeriğin 100 mL metanol içinde çözeltisi hazırlandı. Bu preparat çözeltisinden gerekli seyreltmeler yapılarak, preparatın üzerindeki etiket miktarlarına göre sırasıyla yaklaşık 6.00 µg/ml PAR, 4.00 µg/ml KAF ve 6.00 µg/ml ASP 'e karşılık gelen numune içeriğinin üzerine 5.00, 15.00 ve 25.00 µg/ml PAR, KAF ve ASP olacak şekilde stok çözeltilerden standart ilavesi yapıldı. Bu işlem THOMAPYRİN<sup>®</sup> Tablet'e uygulandı. Analiz sonucunda preparattan gelen PAR KAF, ve ASP miktarları doğrusal regresyon analizi ile konsantrasyon eksenini (x kesenini) eksi kesim noktalarından tayin edildi. Bu denemeler üç farklı konsantrasyon seviyesinde üç tekrar yapılarak gerçekleştirildi.

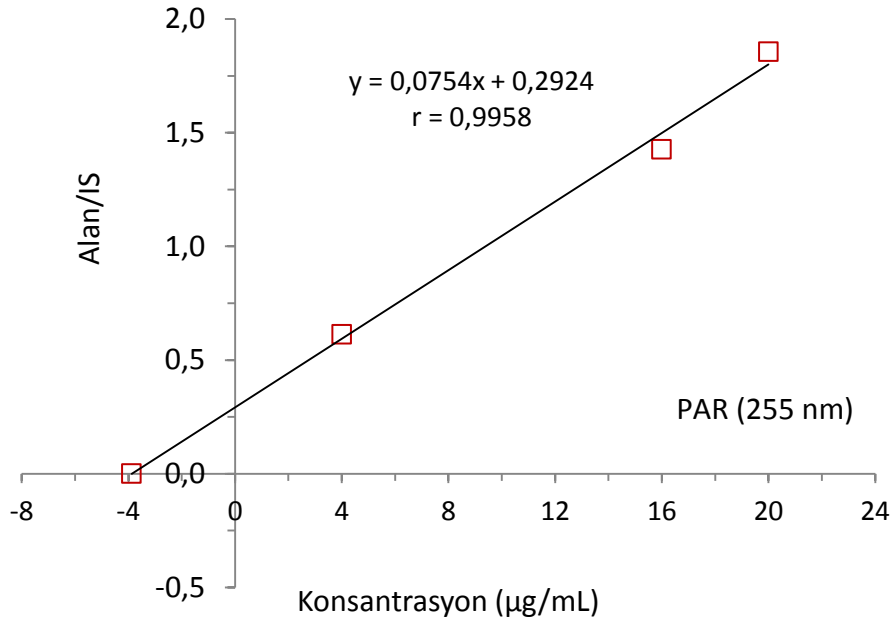
Klasik UPLC yönteminin tabletlere eklenen numunelere uygulamasında 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275, 280 nm dalga boylarında kromatografik dedeksiyonu PAR için 245 nm'de 4.13 µg/ml, 250 nm'de 4.17 µg/ml, 255 nm'de 3.88 µg/ml, 260 nm'de 3.97 µg/ml, 265 nm'de 4.14 µg/ml, 270 nm'de 4.06 µg/ml, 275 nm'de 4.05 µg/ml, 280 nm'de 4.02 KAF için 245 nm'de 1.0 µg/ml, 250 nm'de 5.22 µg/ml, 255 nm'de 5.24 µg/ml, 260 nm'de 4.91 µg/ml, 265 nm'de 5.19 µg/ml 270 nm'de 5.22 µg/ml, 275 nm'de 4.92 µg/ml ve 280 nm'de 5.27 µg/ml ve ASP için 245 nm'de 5.25 µg/ml, 250nm'de 5.22 µg/ml, 255 nm'de 5.24 µg/ml, 260 nm'de 4.91 µg/ml, 265 nm'de 5.19 µg/ml, 270 nm'de 5.22 µg/ml, 275 nm'de 4.92 µg/ml ve 280 nm'de 5.27 µg/ml olarak elde edildi.



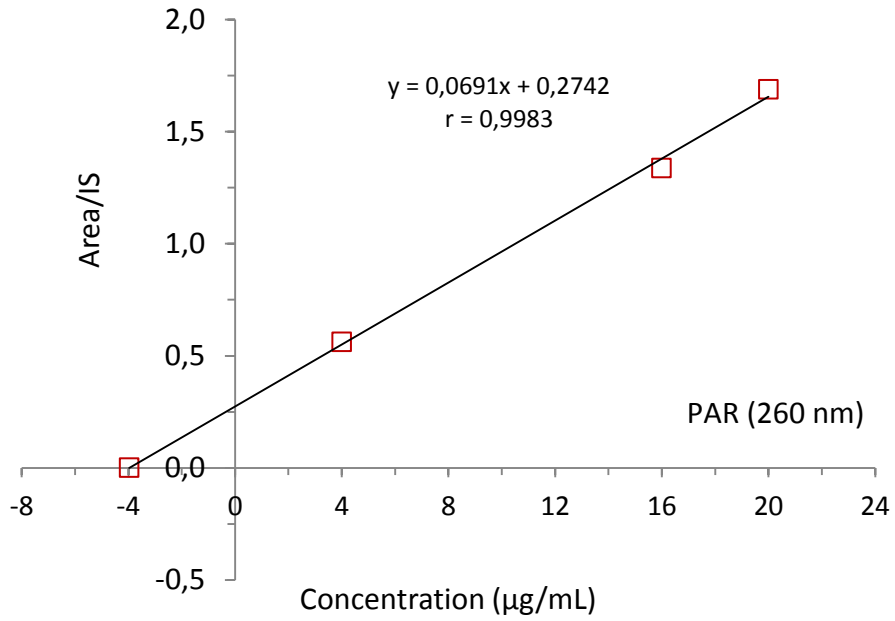
**Şekil 4.36** Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniği ile uygulanmasında PAR/IS karşı konsantrasyon grafiği ( $\lambda_{245} \rightarrow C_{\text{PAR}} = 4.13 \mu\text{g/ml}$ )



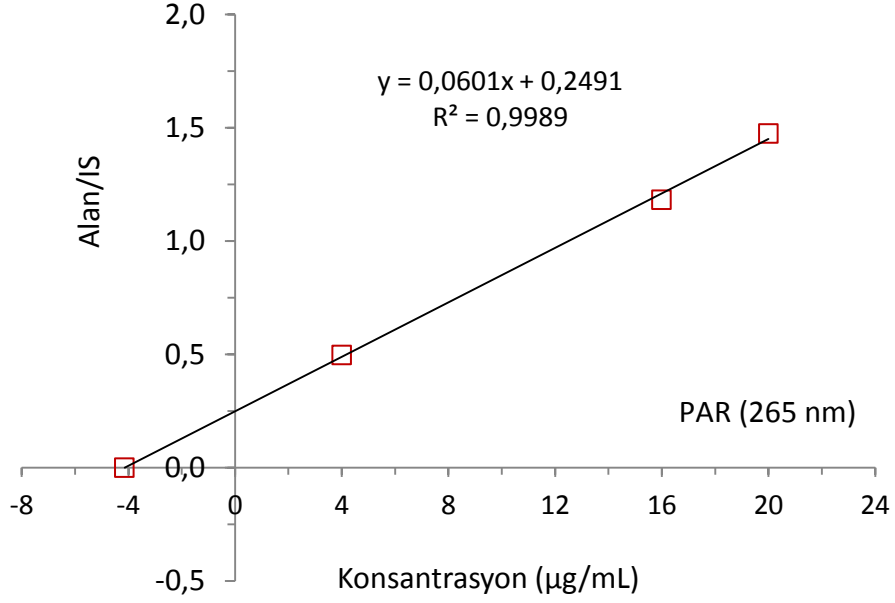
**Şekil 4.37** Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniği ile uygulanmasında PAR/IS karşı konsantrasyon grafiği ( $\lambda_{250} \rightarrow C_{\text{PAR}} = 4.17 \mu\text{g/ml}$ )



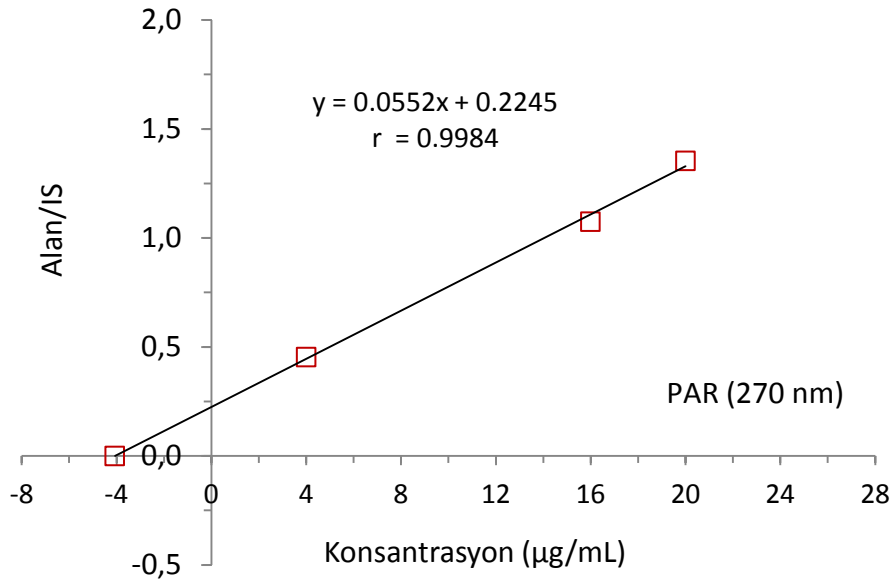
**Şekil 4.38** Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniği ile uygulanmasında PAR/IS karşı konsantrasyon grafiği ( $\lambda_{255} \rightarrow C_{\text{PAR}} = 3.88 \mu\text{g/ml}$ )



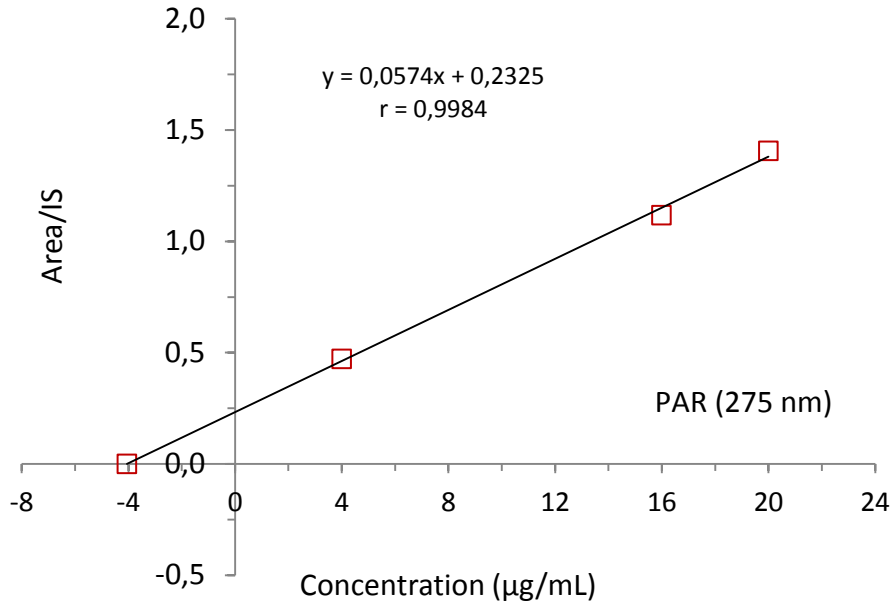
**Şekil 4.39** Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniği ile uygulanmasında PAR/IS karşı konsantrasyon grafiği ( $\lambda_{260} \rightarrow C_{\text{PAR}} = 3.97 \mu\text{g/ml}$ )



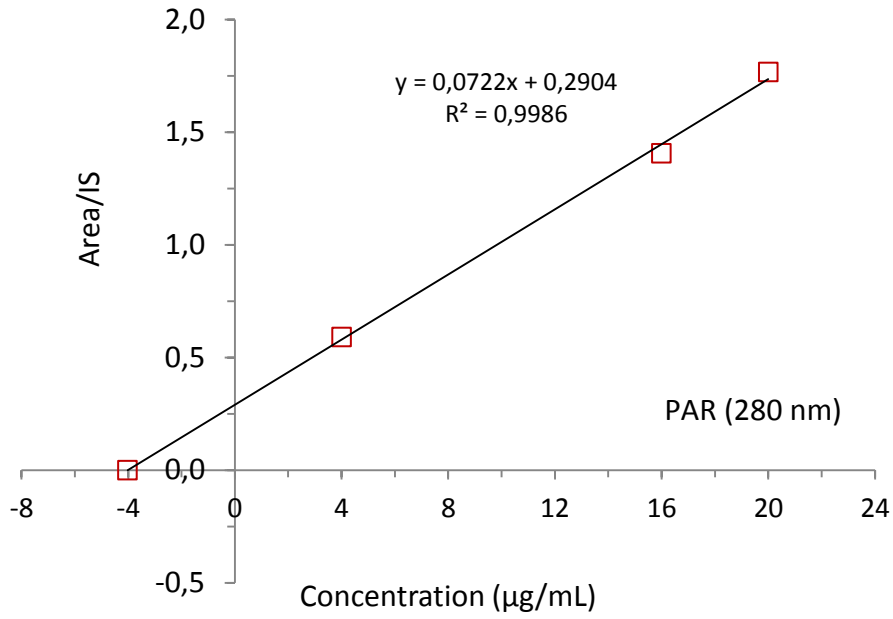
**Şekil 4.40** Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniği ile uygulanmasında PAR/IS karşı konsantrasyon grafiği ( $\lambda_{265} \rightarrow C_{PAR} = 4.14 \mu\text{g/ml}$ )



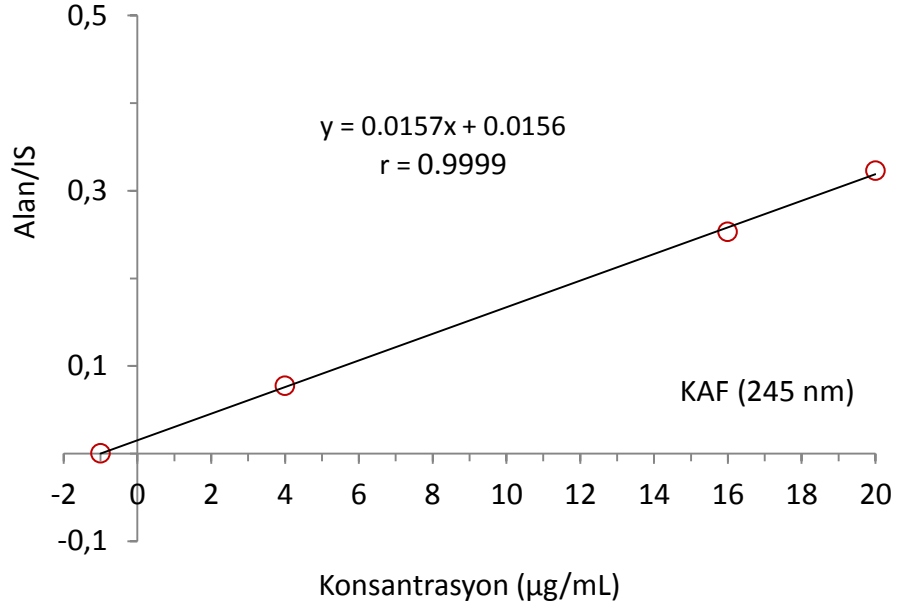
**Şekil 4.41** Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniği ile uygulanmasında PAR/IS karşı konsantrasyon grafiği ( $\lambda_{270} \rightarrow C_{PAR} = 4.06 \mu\text{g/ml}$ )



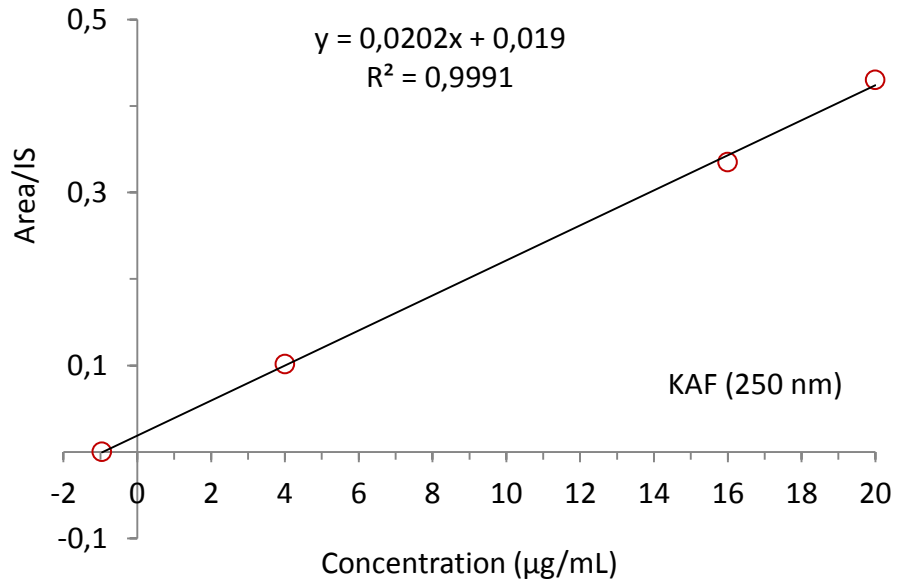
**Şekil 4.42** Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniği ile uygulanmasında PAR/IS karşı konsantrasyon grafiği ( $\lambda_{275} \rightarrow C_{PAR} = 4.05 \mu\text{g/ml}$ )



**Şekil 4.43** Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniği ile uygulanmasında PAR/IS karşı konsantrasyon grafiği ( $\lambda_{280} \rightarrow C_{PAR} = 4.02 \mu\text{g/ml}$ )

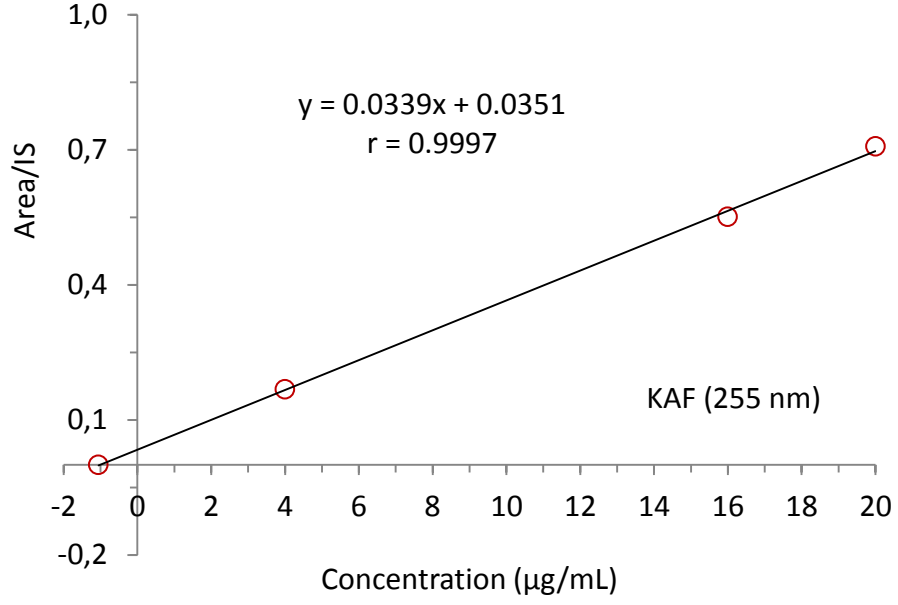


**Şekil 4.44** Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniği ile uygulanmasında KAF/IS karşı konsantrasyon grafiği ( $\lambda_{245} \rightarrow C_{\text{KAF}} = 1.0 \mu\text{g/ml}$ )

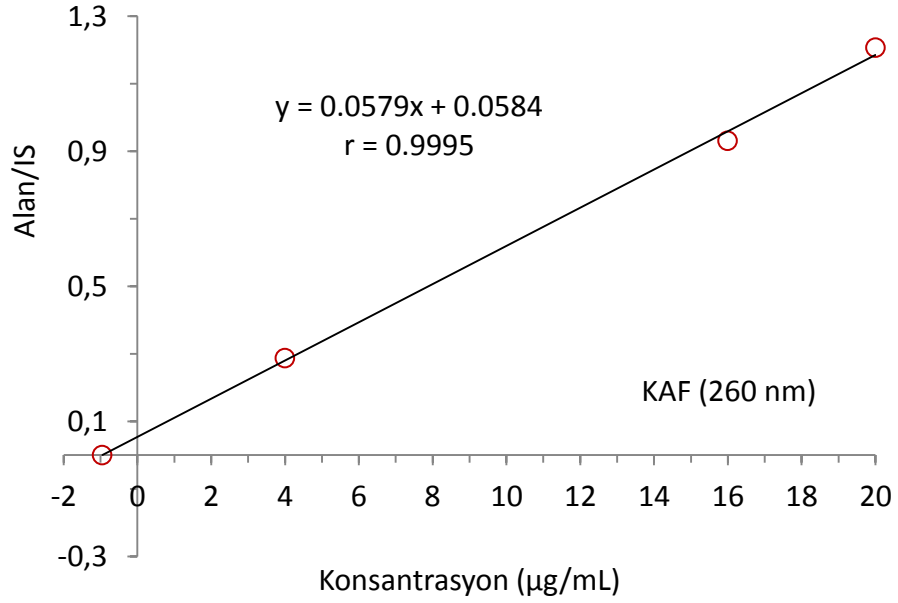


**Şekil 4.45** Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniği ile uygulanmasında KAF/IS karşı konsantrasyon grafiği ( $\lambda_{250} \rightarrow C_{\text{KAF}} = 0.96 \mu\text{g/ml}$ )

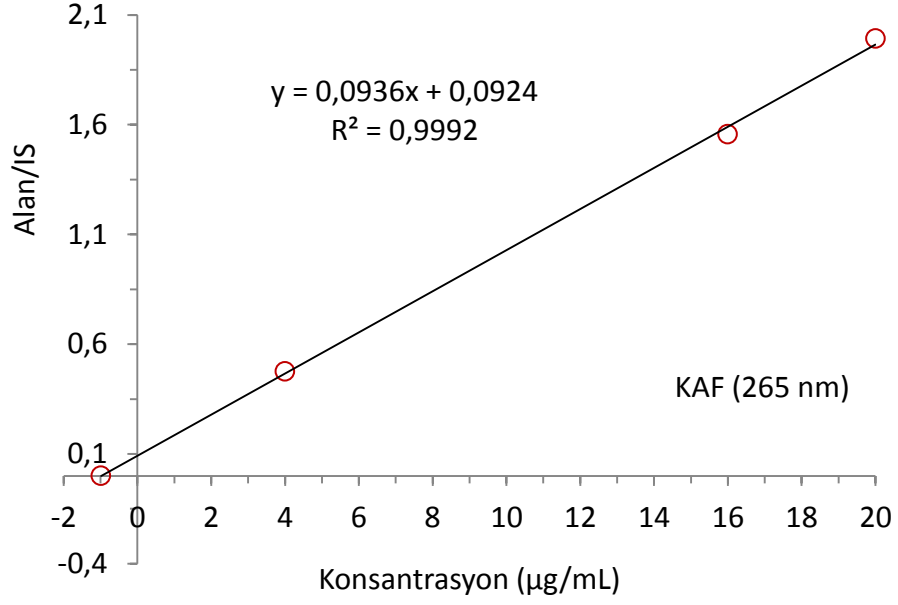




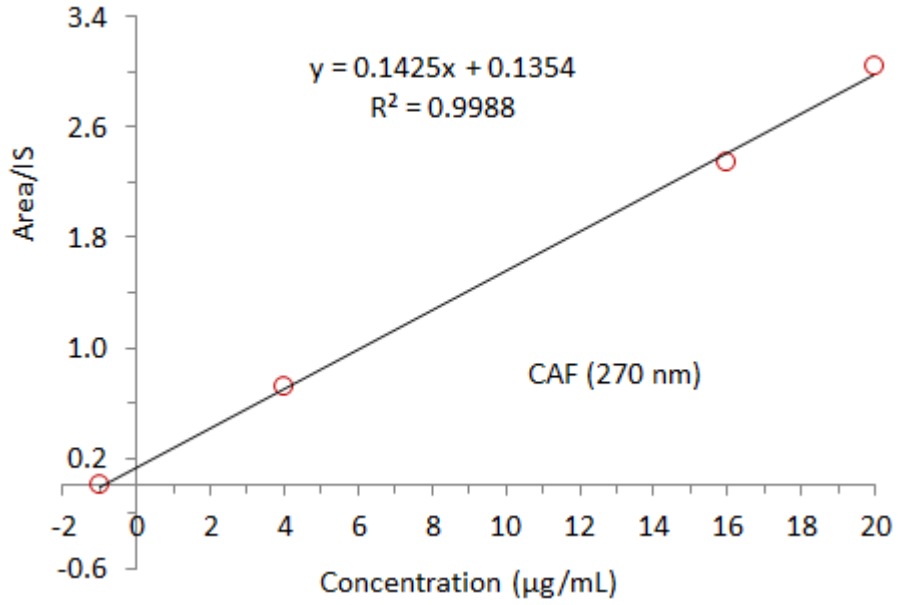
**Şekil 4.46** Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniği ile uygulanmasında KAF/IS karşı konsantrasyon grafiği ( $\lambda_{255} \rightarrow C_{\text{KAF}} = 1.05 \mu\text{g/ml}$ )



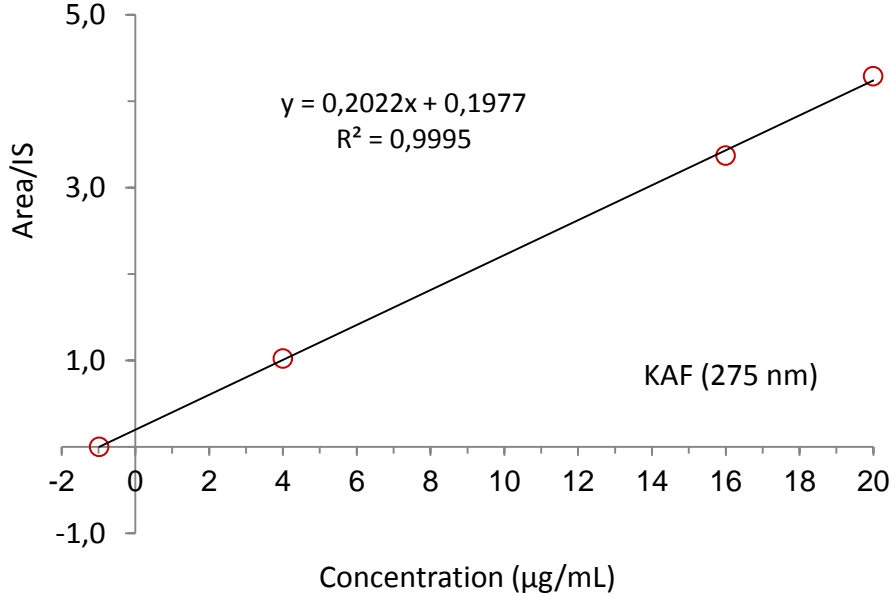
**Şekil 4.47** Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniği ile uygulanmasında KAF/IS karşı konsantrasyon grafiği ( $\lambda_{260} \rightarrow C_{\text{KAF}} = 0.95 \mu\text{g/ml}$ )



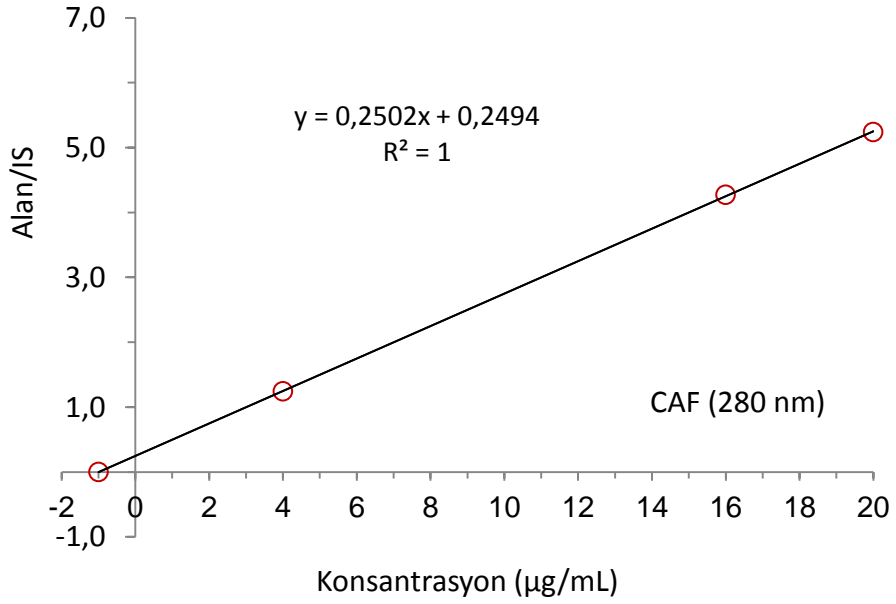
**Şekil 4.48** Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniği ile uygulanmasında KAF/IS karşı konsantrasyon grafiği ( $\lambda_{265} \rightarrow C_{\text{KAF}} = 0.99 \mu\text{g/ml}$ )



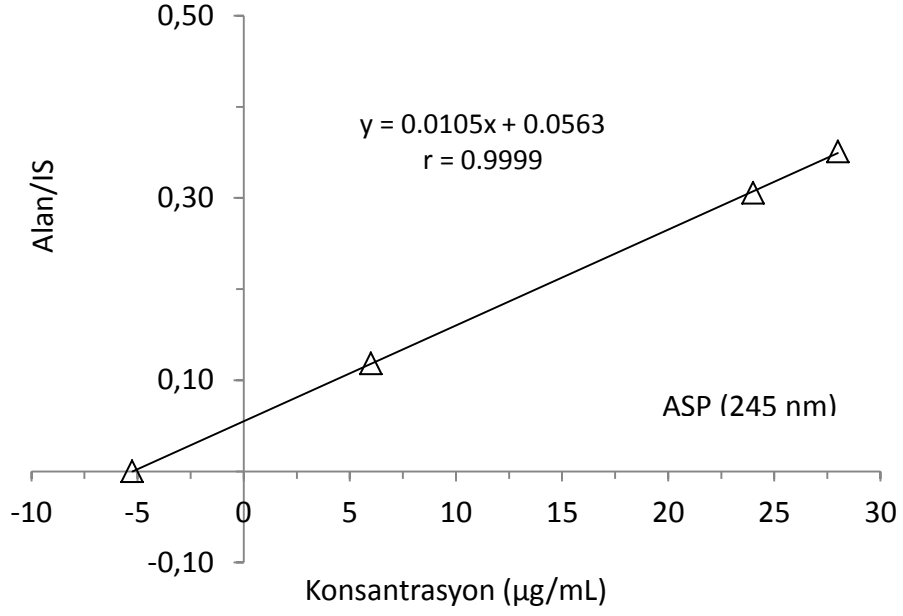
**Şekil 4.49** Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniği ile uygulanmasında KAF/IS karşı konsantrasyon grafiği ( $\lambda_{270} \rightarrow C_{\text{KAF}} = 0.96 \mu\text{g/ml}$ )



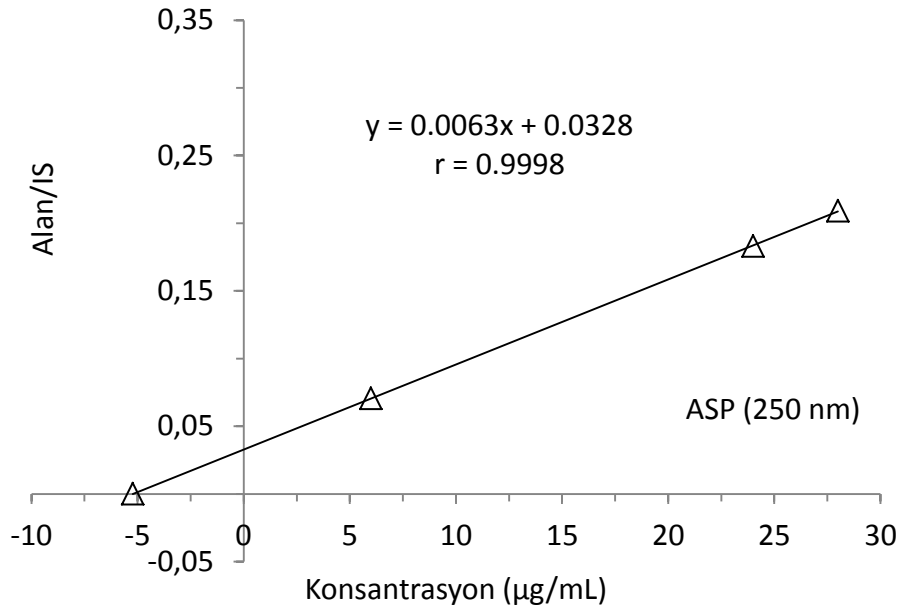
**Şekil 4.50** Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniği ile uygulanmasında KAF/IS karşı konsantrasyon grafiği ( $\lambda_{275} \rightarrow C_{\text{KAF}} = 0.97 \mu\text{g/ml}$ )



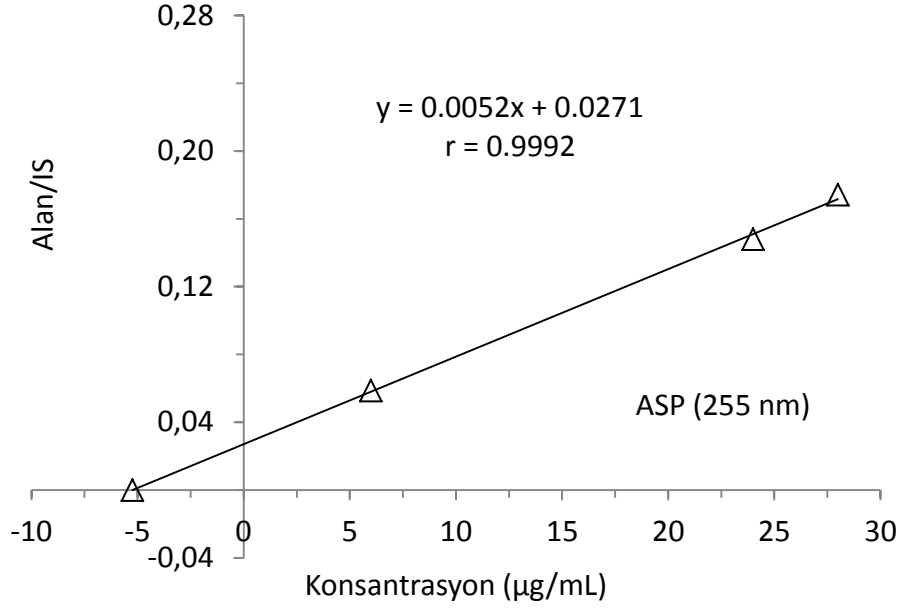
**Şekil 4.51** Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniği ile uygulanmasında KAF/IS karşı konsantrasyon grafiği ( $\lambda_{280} \rightarrow C_{\text{KAF}} = 0.99 \mu\text{g/ml}$ )



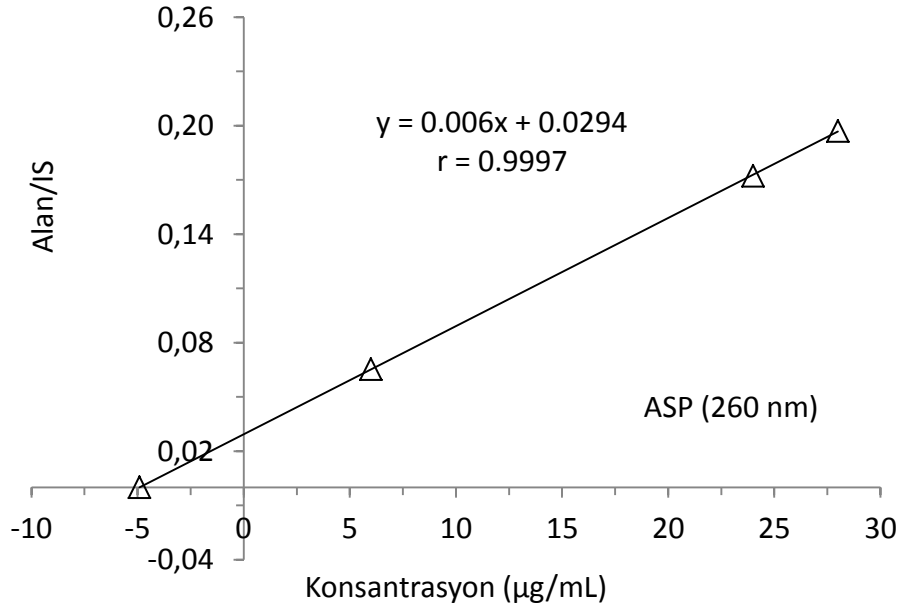
**Şekil 4.52** Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniği ile uygulanmasında ASP/IS karşı konsantrasyon grafiği ( $\lambda_{245} \rightarrow C_{ASP} = 5.25 \mu\text{g/ml}$ )



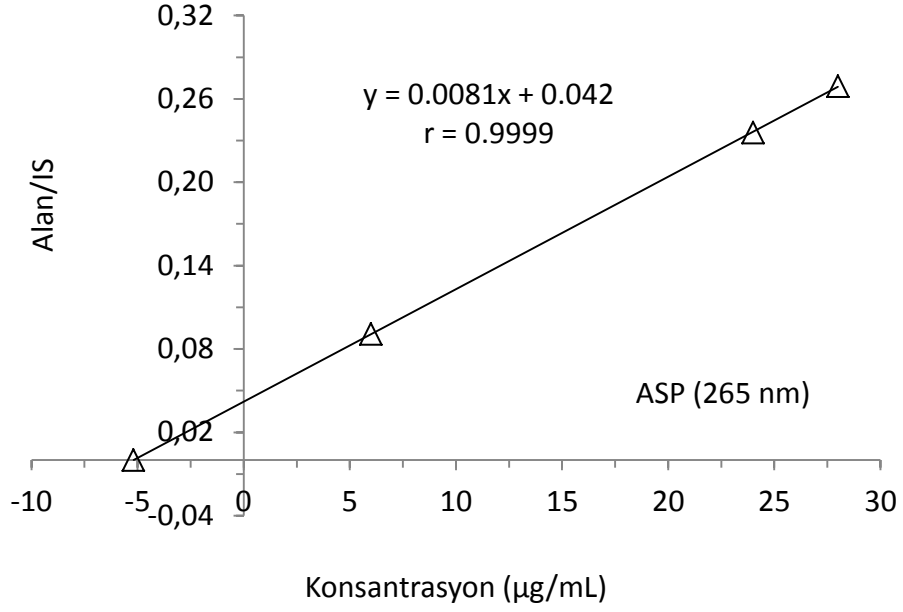
**Şekil 4.53** Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniği ile uygulanmasında ASP/IS karşı konsantrasyon grafiği ( $\lambda_{250} \rightarrow C_{ASP} = 5.22 \mu\text{g/ml}$ )



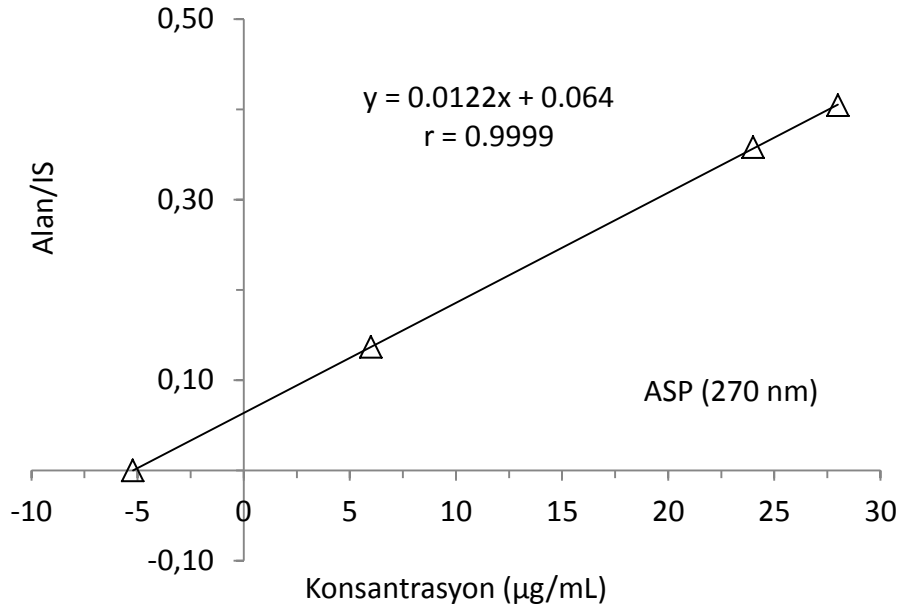
**Şekil 4.54** Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniği ile uygulanmasında ASP/IS karşı konsantrasyon grafiği ( $\lambda_{255} \rightarrow C_{ASP} = 2.24 \mu\text{g/ml}$ )



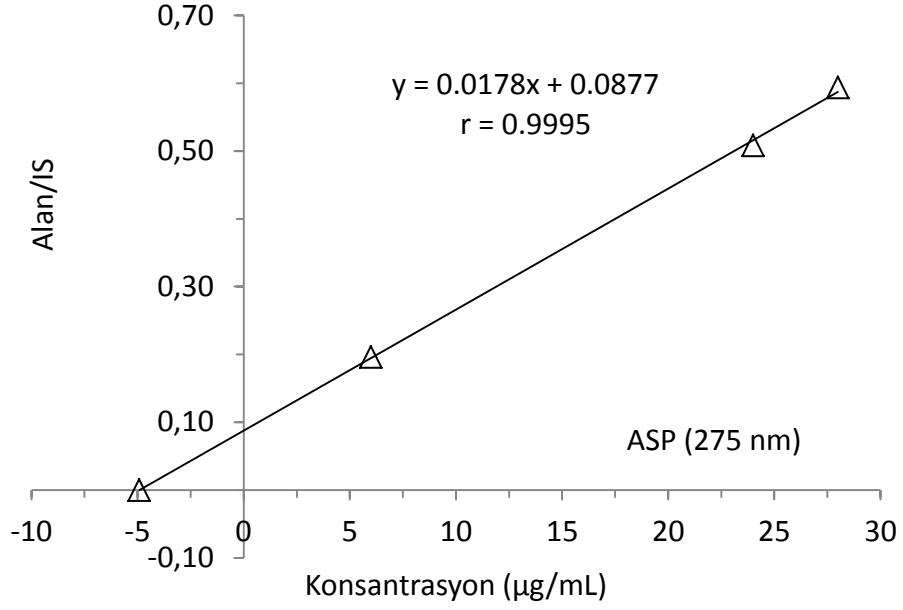
**Şekil 4.55** Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniği ile uygulanmasında ASP/IS karşı konsantrasyon grafiği ( $\lambda_{260} \rightarrow C_{ASP} = 4.91 \mu\text{g/ml}$ )



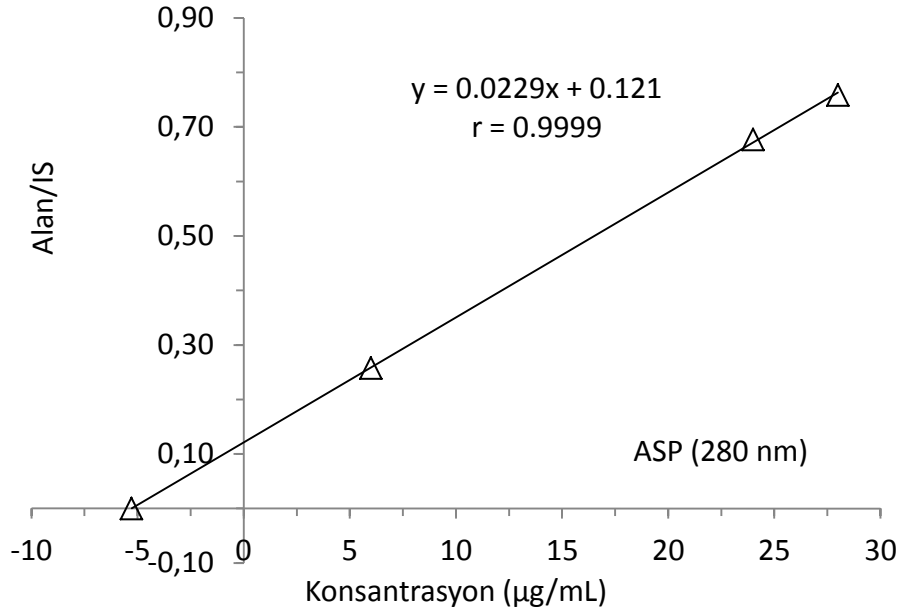
**Şekil 4.56** Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniği ile uygulanmasında ASP/IS karşı konsantrasyon grafiği ( $\lambda_{265} \rightarrow C_{\text{ASP}} = 5.19 \mu\text{g/ml}$ )



**Şekil 4.57** Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniği ile uygulanmasında ASP/IS karşı konsantrasyon grafiği ( $\lambda_{270} \rightarrow C_{\text{ASP}} = 5.22 \mu\text{g/ml}$ )



**Şekil 4.58** Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniği ile uygulanmasında ASP/IS karşı konsantrasyon grafiği ( $\lambda_{275} \rightarrow C_{ASP} = 4.92 \mu\text{g/ml}$ )



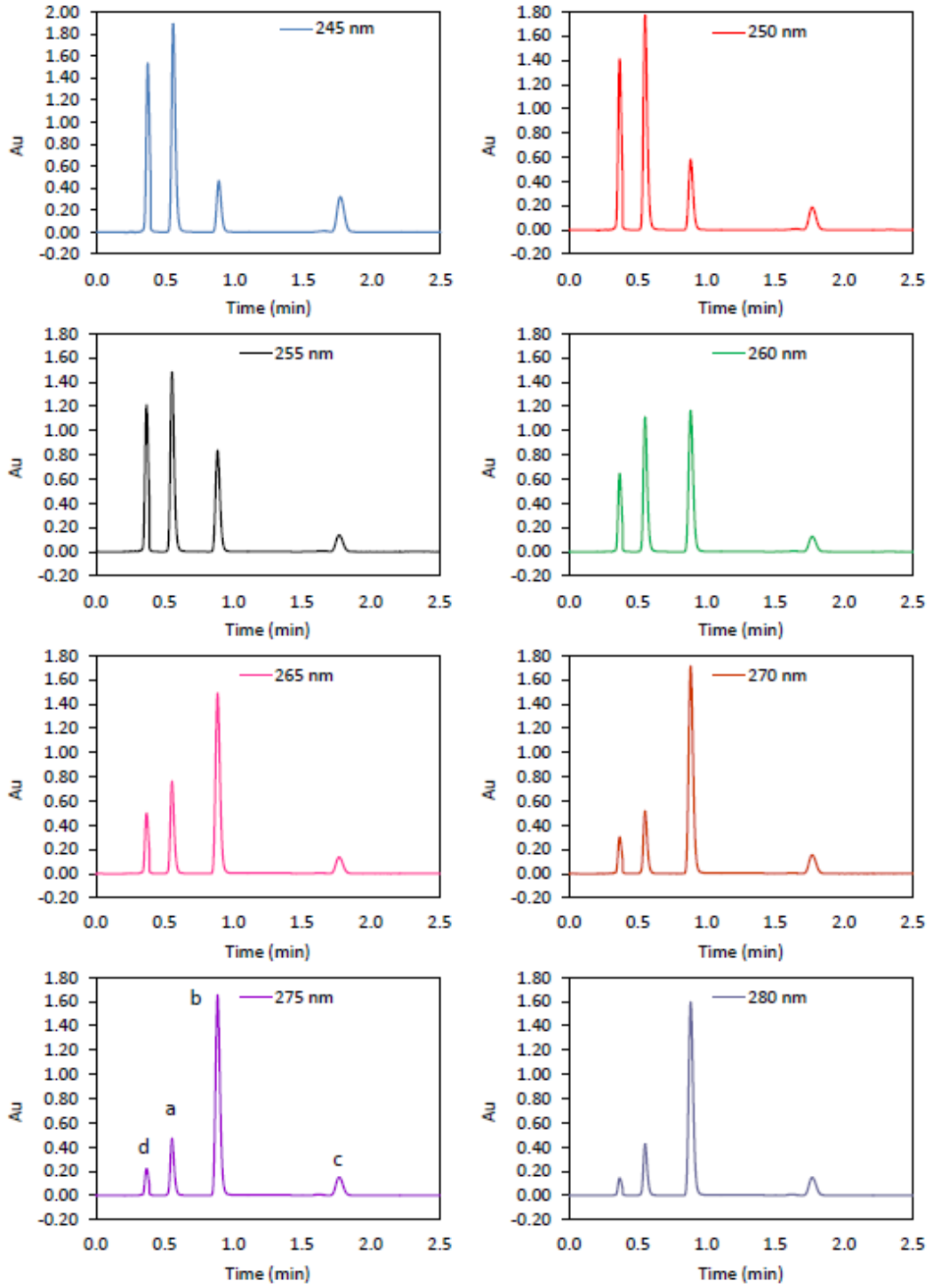
**Şekil 4.59** Klasik UPLC yönteminin standart ilavesi tekniği ile uygulanmasında ASP/IS karşı konsantrasyon grafiği ( $\lambda_{280} \rightarrow C_{ASP} = 5.27 \mu\text{g/ml}$ )

#### 4.2.1.3 Klasik UPLC Yönteminin Farmasötik Preparatlara Uygulaması

Çalışmada klasik UPLC yönteminin farmasötik preparatlara uygulanmasında, 20 adet THOMAPYRİN<sup>®</sup> tablet doğru bir şekilde tartıldı ve havanda iyice toz edildikten sonra bir tablete karşılık gelen tablet miktarı 100 mL'lik balonjojede metanol içerisinde çözüldü. Balonjoje içeriği mekanik karıştırıcı ile 35 dakika karıştırıldı ve membran filtre (Sartorius Minisart  $\phi = 0,45 \mu\text{m}$ ) yardımı ile süzüldü. Hazırlanan tablet çözeltileri 2 mL'lik "vial" lere konularak kalibrasyon basamağındaki kromatografik UPLC şartlarda Şekil 4.60'daki kromatogramları çizdirildi.

Kromatogramlardan PAR/IS, KAF/IS, ve ASP/IS oranları hesaplanarak Çizelge 4.36-59'de numaraları ile elde edilen kalibrasyon grafiklerinde yerine konarak tabletlerin içerisindeki PAR, KAF ve ASP miktarları hesaplandı Tablo 4.29





**Şekil 4.60** Klasik UPLC yönteminin farmasötik preparatlara uygulanmasında, bir tablete karşılık gelen kalibrasyon basamağındaki kromatografik UPLC şartlarına ait kromatogram dizisi.

**Tablo 4.29** Tabletlerin içerisinde hesaplanan PAR, KAF ve ASP miktarları

No.	PAR, t (sn)= 0.552								CAF, t (sn) =0.892								ASP, t (sn)= 1.802							
	245	250	255	260	265	270	275	280	245	250	255	260	265	270	275	280	245	250	255	260	265	270	275	280
1	201.05	201.60	202.22	203.21	204.93	198.76	199.76	204.01	50.28	50.63	49.95	50.43	50.43	50.29	50.35	53.36	250.3	250.8	251.9	250.8	256.7	253.8	250.4	248.2
2	199.99	200.83	201.90	204.26	198.00	199.92	200.18	200.62	50.15	50.59	49.72	49.96	50.57	49.97	50.30	49.99	258.3	259.3	250.8	249.5	266.5	253.0	250.1	249.3
3	201.93	202.81	203.29	204.17	205.73	207.67	208.51	199.87	49.43	47.77	49.05	48.64	49.15	49.52	50.11	50.16	245.7	244.4	246.7	244.4	252.7	251.1	248.5	255.6
4	200.24	200.80	201.21	201.69	202.60	204.46	204.99	204.84	49.69	49.76	50.35	50.59	51.00	50.03	50.22	51.92	247.7	248.0	246.5	248.3	256.3	255.1	254.6	247.4
5	194.06	194.88	195.25	201.58	200.32	201.74	202.37	202.99	48.89	49.94	49.81	49.24	49.69	47.38	47.88	48.11	251.6	251.4	251.1	253.8	256.8	254.3	251.5	251.5
6	195.22	196.15	196.70	203.54	205.32	199.09	207.66	208.20	46.84	49.93	50.76	50.35	49.84	48.56	48.99	49.40	253.3	250.6	250.3	253.8	261.1	253.5	252.8	249.3
7	202.03	202.96	203.60	200.00	201.22	202.95	204.16	199.24	46.50	47.02	47.12	47.57	48.10	48.51	49.01	49.19	249.3	248.1	248.6	250.4	258.0	249.9	261.3	251.1
8	203.52	204.17	195.26	196.10	197.77	199.56	200.57	200.41	47.66	50.29	48.31	48.52	49.06	49.37	49.64	50.35	260.7	259.1	256.1	250.1	270.8	252.7	253.9	254.0
9	198.36	199.58	201.03	195.07	197.39	199.98	201.41	202.02	49.43	49.69	50.41	49.75	50.50	49.88	49.79	51.85	248.2	248.7	250.7	247.9	254.9	247.2	251.1	250.0
$\bar{X}$	199.6	200.4	200.1	201.1	201.5	201.6	203.3	202.5	48.8	49.5	49.5	49.4	49.8	49.3	49.6	50.5	251.7	251.2	250.3	249.9	259.3	252.3	252.7	250.7
<b>SS</b>	3.18	3.11	3.37	3.41	3.35	2.98	3.24	2.88	1.41	1.26	1.16	1.03	0.92	0.95	0.82	1.62	4.99	5.00	2.89	2.92	5.84	2.50	3.76	2.68
<b>BSS</b>	1.59	1.55	1.68	1.69	1.66	1.48	1.59	1.42	2.90	2.54	2.34	2.09	1.85	1.93	1.66	3.21	1.98	1.99	1.16	1.17	2.25	0.99	1.49	1.07

#### **4.2.2 UPLC-Kemometrik Yöntemlerinin PAR-KAF-ASP Karışımının Analizine Uygulanması.**

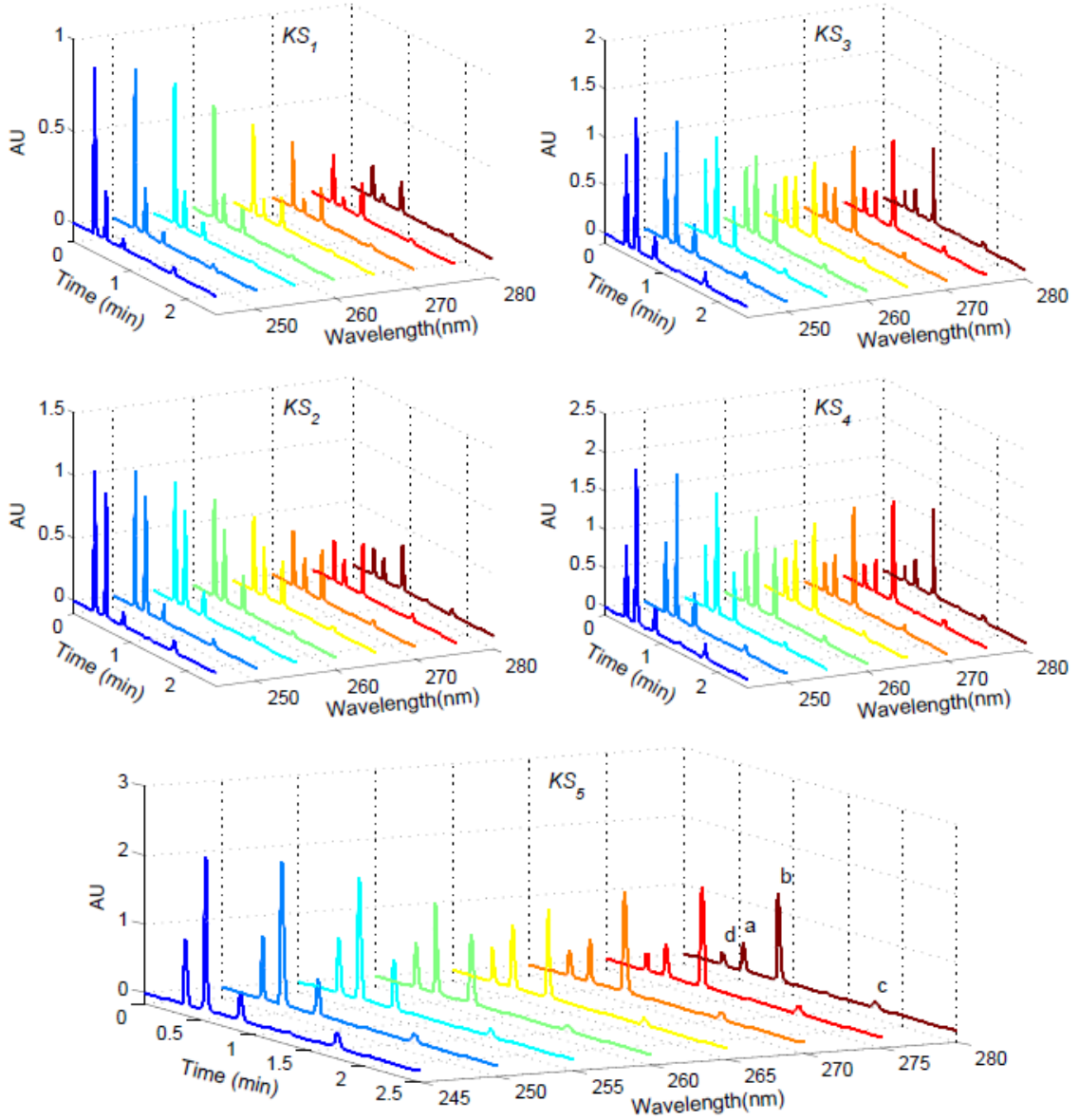
Klasik UPLC yönteminin sonuçlarını karşılaştırmak amacıyla UPLC-Kemometrik yöntemler olarak UPLC-Temel Bileşen Regresyon (UPLC-Principal Component Regression, UPLC-PCR) ve UPLC-Kısmi En Küçük Kareler (UPLC-Partial Least Squares, UPLC-PLS) yöntemleri Tablo 4.18’de PAR, KAF ve ASP bileşikleri için hazırlanan konsantrasyon seti C6x3 ve ölçülen-hesaplanan (Alan/IS)6X8 veri setine uygulanarak UPLC-PCR ve UPLC-PLS kalibrasyonları hesaplandı.

Bu UPLC-PCR ve UPLC-PLS yöntemleri klasik UPLC yönteminin uygulamasındaki kromatografik ayırma ve tayin şartlarındaki verilerin çok bileşenli kullanımın dayanmaktadır. Bu çalışmada parasetamol (PAR), asetilsalisilik asit (ASP) ve askorbik Asit (AA) içeren farmasötik preparatın kantitatif analizi için UPLC-PCR ve UPLC-PLS yöntemleri geliştirildi.

##### **4.2.2.1 UPLC-PCR ve UPLC-PLS Kalibrasyonları**

UPLC-PCR ve UPLC-PLS Kalibrasyonları UPLC-PLS ve UPLC-PCR kalibrasyonlarının hazırlanması için 5-30 µg/ml konsantrasyon aralığında PAR, KAF ve ASP ile sabit konsantrasyonda internal standart olarak askorbik asit içeren 5 farklı çözeltiden oluşan bir konsantrasyon seti hazırlandı Tablo 4.30

Bu hazırlanan konsantrasyon setinin UPLC cihazı ile “photo diode array” (PDA) kullanılarak 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275 ve 280 nm dalga boylarındaki dedeksiyonla kromatogramları çizdirildi Şekil 4.61 Elde edilen bu kromatogramlarda PAR, KAF ve ASP, ve ile IS için kolonda tutulma süreleri sırasıyla ortalama 0.552 0.892 ve 1.802 dakika olarak gözlemlendi.



**Şekil 4.61** 20 µg/ml a)AA, b) PAR, c)ASP bileşikleri ile d) IS için çoklu üç boyutlu kromatogram

Konsantrasyon setinine karşılık gelen 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275 ve 280 nm dalga boylarındaki dedeksiyon ile elde edilen kromatogramlardan hesaplanan PAR/IS, KAF/IS ve ASP/IS oranları için Tablo 4.30'deki sonuçlara ulaşıldı. Bu işlemde sonra PLS ve PCR algoritmaları konsantrasyon seti ile AA/IS, PAR/IS ve ASP/IS oran değerlerine uygulanarak UPLC-PLS ve UPLC-PCR kalibrasyonları elde edildi.

**Tablo 4.30** Derişim Seti ve Kromatografik Analit/IS Oranlarına Karşılık Gelen Veriler

Derişim Set No:	PAR	CAF	ASP	PAR, Alı Konma Zamanı t(dakika) 0.552							
				Alan/IS							
	( $\mu$ /mL)			245	250	255	260	265	270	275	280
1	4	4	6	0.3155	0.3063	0.2897	0.2635	0.2317	0.2076	0.2194	0.2729
2	12	12	14	0.9405	0.9115	0.8642	0.7884	0.7686	0.6236	0.6577	0.8218
3	20	20	22	1.6164	1.5696	1.4855	1.3567	0.9249	1.0692	1.1277	1.4078
4	28	28	30	2.2974	2.2307	2.1096	1.9261	1.6865	1.5136	1.5940	2.0001
5	32	32	38	2.5769	2.5045	2.3736	2.2156	1.9109	1.7155	1.8100	2.2660
Derişim Set No:	KAF, Alı Konma Zamanı t(dakika) =0.892										
	Alan/IS										
				245	250	255	260	265	270	275	280
1	FK1	4	4	0.0644	0.0846	0.1388	0.2373	0.3898	0.5986	0.8302	1.0457
2	FK2	12	12	0.1859	0.2424	0.3996	0.6805	1.1229	1.7214	2.3914	3.0039
3	FK3	20	20	0.3186	0.4156	0.6824	1.1651	1.9150	2.9387	4.0700	5.1155
4	FK4	28	28	0.4477	0.5848	0.9575	1.6353	2.6850	4.1153	5.7123	7.1996
5	FK5	32	32	0.5052	0.6595	1.0838	1.8488	3.0395	4.6531	6.4578	8.1367
Derişim Set No:	ASP, Alı Konma Zamanı t(dakika) = 1.802										
	Alan/IS										
				245	250	255	260	265	270	275	280
1	4	4	6	0.0680	0.0395	0.0322	0.0348	0.0509	0.0767	0.1085	0.1462
2	12	12	14	0.1468	0.0894	0.0751	0.0844	0.1121	0.1687	0.2361	0.3258
3	20	20	22	0.2355	0.1435	0.1166	0.1305	0.1840	0.2653	0.3915	0.5056
4	28	28	30	0.3224	0.1928	0.1596	0.1803	0.2415	0.3733	0.5381	0.6977
5	32	32	38	0.3969	0.2357	0.1935	0.2212	0.3064	0.4652	0.6728	0.8727

UPLC-PCR kalibrasyonu, Tablo 4.30’da verilen derişim seti için ölçülen ve hesaplanan PAR/IS, KAF/IS, ve ASP/IS alanlarının oranlarından oluşan veri setine PCR algoritmasının uygulanmasıyla elde edilen UPLC-PCR kalibrasyon denklemlerinin sırasıyla PAR, KAF ve ASP için sunuldu.

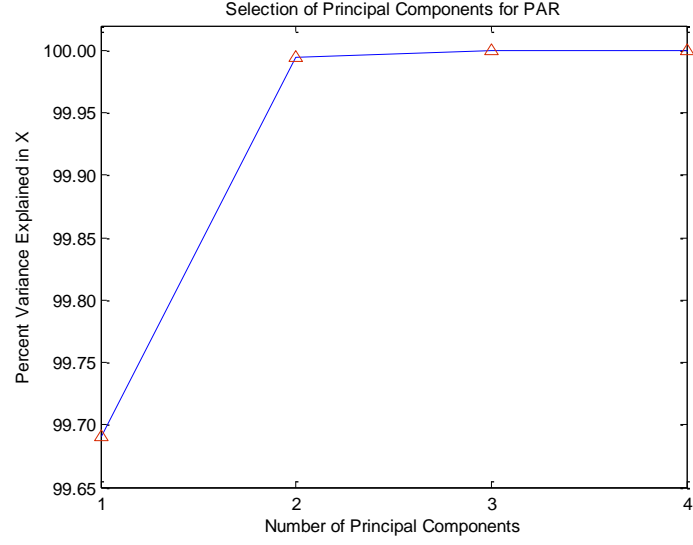
#### 4.2.2.2 UPLC-PCR Kalibrasyon Denklemleri :

- $C_{PAR} = 0.3398 + 2.1268A_{245} + 2.0673A_{250} + 1.9575A_{255} + 1.8188A_{260} + 1.5395A_{265} + 1.4112A_{270} + 1.4878A_{275} + 1.8662A_{280}$
- $C_{KAF} = -0.1256 - 8.0011A_{245} - 14.9425A_{250} + 2.1838A_{255} - 16.2109A_{260} + 16.841A_{265} - 2.9030A_{270} + 22.04673A_{275} - 13.0955A_{280}$
- $C_{ASP} = -0.1721 + 8.2546A_{245} + 4.9086A_{250} + 4.0309A_{255} + 4.6402A_{260} + 6.3406A_{265} + 9.7229A_{270} + 14.1684A_{275} + 18.0699A_{280}$

#### 4.2.2.3 UPLC-PLS Kalibrasyon Denklemleri :

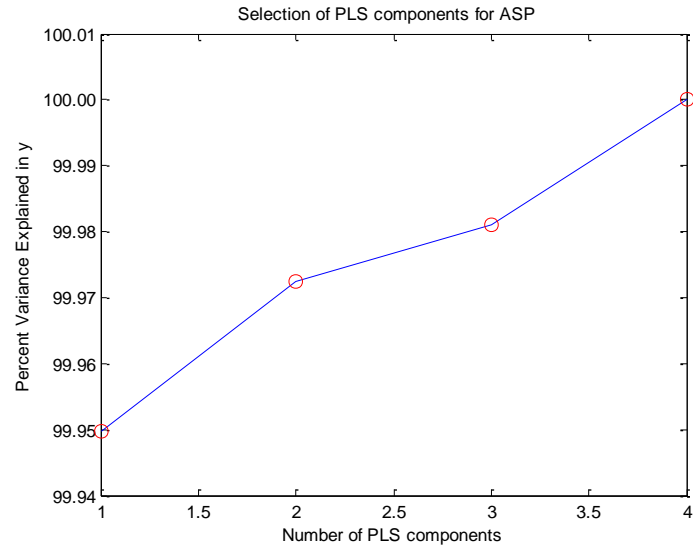
- $C_{PAR} = 0.3219 + 2.2839A_{245} + 2.2201A_{250} + 2.1151A_{255} + 2.0011A_{260} + 2.2057A_{265} + 2.1582A_{270} + 1.6540A_{275} + 2.0313A_{280}$
- $C_{KAF} = 0.3219 + 2.2839A_{245} + 2.2201A_{250} + 2.1151A_{255} + 2.0011A_{260} + 0.2057A_{265} + 1.5558A_{270} + 1.6540A_{275} + 2.0313A_{280}$
- $C_{ASP} = -0.4694 - 10.3541A_{245} - 0.9658A_{250} - 0.6645A_{255} + 7.7140A_{260} + 28.2674A_{265} + 0.1125A_{270} - 14.6825A_{275} + 48.5231A_{280}$

UPLC-PLS ve UPLC-PCR kalibrasyonlarında faktör seçiminde 2 faktör kullanımının uygun olacağı bulunmuştur. UPLC-PLS kalibrasyonlarında PAR KAF, ve ASP için sırasıyla SEC = 0.1702, SEP = 0.5009 ve PRESS = 0.14489; SEC= 0.1100, SEP = 1.3581 ve PRESS = 0.0606; SEC = 0.0750, SEP = 0.4401, PRESS = 0.0281 olarak bulunmuştur (Şekil 4.2.24-29). UPLC-PCR kalibrasyonlarında PAR, KAF ve ASP için sırasıyla SEC = 0.2302, SEP = 0.512 Ve PRESS = 0.2650; SEC= 0.1524, SEP = 0.4442, PRESS = 0.1162; SEC = 0.1983, SEP = 0.4451, PRESS = 0.1976 olarak elde edilmiştir (Şekil 4.62-67).



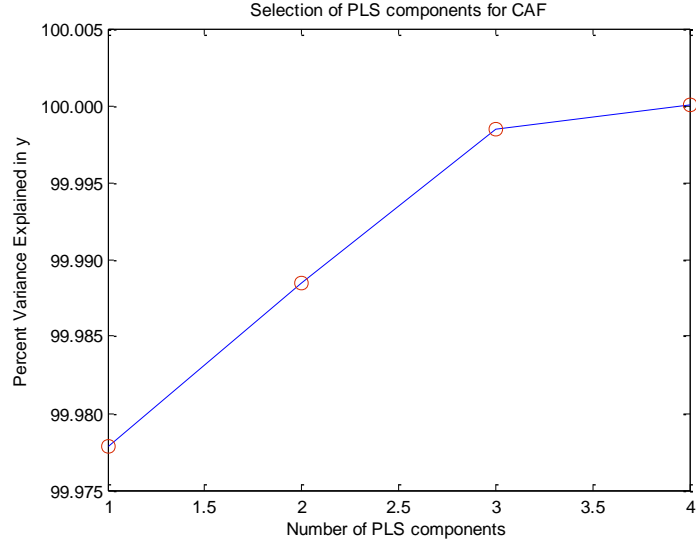
**Şekil 4.62** PAR İçin UPLC-PLS Kalibrasyonu İçin Faktör Seçim Eğrisi

**UPLC-PLS PAR:** Factor = 2.0, SEC = 0.2302, SEP = 0.512, PRESS = 0.2650,  
 $C_{PAR} = 0.3398 + 2.1268A_{245} + 2.0673A_{250} + 1.9575A_{255} + 1.8188A_{260} + 1.5395A_{265} + 1.4112A_{270} + 1.4878A_{275} + 1.8662A_{280}$



**Şekil 4.63** ASP İçin UPLC-PCR Kalibrasyonu İçin Faktör Seçim Eğrisi

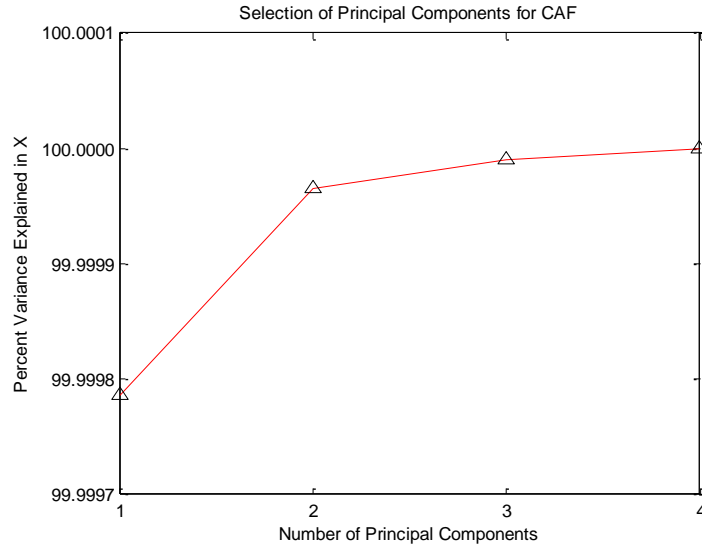
**UPLC-PLS PAR:** Factor = 2.0, SEC = 0.1702, SEP = 0.5009, PRESS = 0.14489,  
 $C_{PAR} = 0.3219 + 2.2839A_{245} + 2.2201A_{250} + 2.1151A_{255} + 2.0011A_{260} + 0.2057A_{265} + 1.5582A_{270} + 1.6540A_{275} + 2.0313A_{280}$



**Şekil 4.64** CAF İçin UPLC-PCR Kalibrasyonu İçin Faktör Seçim Eğrisi

**UPLC-PCR CAF:** Factor = 1.0 SEC = 0.1524, SEP = 0.4442, PRESS = 0.1162

$$C_{CAF} = -0.1256 - 8.0011A_{245} - 14.9425A_{250} + 2.1838A_{255} - 16.2109A_{260} + 16.841A_{265} - 2.9030A_{270} + 22.04673A_{275} - 13.0955A_{280}$$

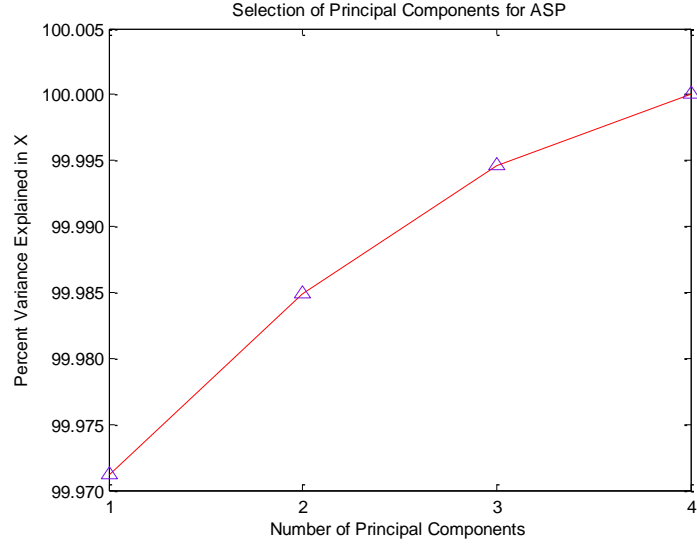


**Şekil 4.65** CAF İçin UPLC-PCR Kalibrasyonu İçin Faktör Seçim Eğrisi

**UPLC-PLS CAF:** Factor = 2.0 SEC = 0.1100, SEP = 1.3581, PRESS = 0.0606

$$C_{CAF} = 0.3219 + 2.2839A_{245} + 2.2201A_{250} + 2.1151A_{255} + 2.0011A_{260} + 0.2057A_{265} + 1.5582A_{270} + 1.6540A_{275} + 2.0313A_{280}$$

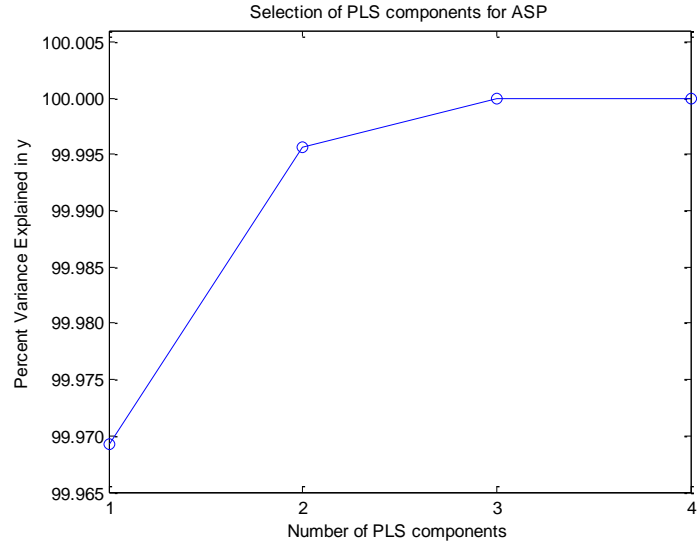




**Şekil 4.66** ASP İçin UPLC-PCR Kalibrasyonu İçin Faktör Seçim Eğrisi

**UPLC-PCR ASP:** Factor = 1.0 SEC = 0.1983, SEP = 0.4451, PRESS = 0.1976

$$C_{ASP} = -0.1721 + 8.2546A_{245} + 4.9086A_{250} + 4.0309A_{255} + 4.6402A_{260} + 6.3406A_{265} + 9.7229A_{270} + 14.1684A_{275} + 18.0699A_{280}$$



**Şekil 4.67** ASP İçin UPLC-PLS Kalibrasyonu İçin Faktör Seçim Eğrisi

**UPLC-PLS ASP:** Factor = 2.0 SEC = 0.0750, SEP = 0.4401, PRESS = 0.0281

$$C_{ASP} = -0.4694 - 10.3541A_{245} - 0.9658A_{250} - 0.6645A_{255} + 7.7140A_{260} + 28.2674A_{265} + 0.1125A_{270} - 14.6825A_{275} + 48.5231A_{280}$$

#### 4.2.2.4 UPLC-PCR ve UPLC-PLS Yöntemlerinin Validasyonu

Bu doktora tez kapsamında geliştirilen UPLC yönteminin validasyonu için 0.1M CH<sub>3</sub>COOH ve metanol (75:25, *h/h*) içerisinde PAR, KAF ve ASP için 5.0-30 µg/ml doğrusal çalışma aralığı içinde farklı konsantrasyonlarda 19 adet yapay karışım çözeltisinden oluşan bir validasyon seti hazırlandı.

Bu validasyon setinin hazırlanmasında herbir karışım çözeltisine 15.0 µg/ml sabit konsantrasyonda IS “AA” stok çözeltisinden ilave edildi. Bu validasyon seti kullanılarak UPLC-PLS ve UPLC-PCR yöntemlerinin kesinlik ve doğruluğu test yapıldı.

Geri kazanım değerleri UPLC-PLS ile PAR için % 99.7 KAF için % 99.4 ve ASP için % 100.1 ve UPLC-PCR ile PAR için % 99.3, KAF için % 99.6 ve ASP için % 100.3 olarak bulundu. Bağıl standart sapma değerleri UPLC-PLS ile PAR için % 0.97, KAF için % 1.64 ve ASP için % 0.61 ve UPLC-PCR ile PAR için % 1.27, KAF için % 1.27 ve ASP için % 0.87 olarak sonuçlar edildi edildi Tablo 4.31.

**Tablo 4.31** UPLC-PLS ve UPLC-PCR kalibrasyon yöntemlerinin karışım analizine uygulanmasıyla elde edilen geri kazanım sonuçları

Karışım No	Bulunan ( $\mu\text{g/ml}$ )									Geri Kazanım (%)					
	Konulan ( $\mu\text{g/ml}$ )			PAR		KAF		ASP		PAR		KAF		ASP	
	PAR	KAF	ASP	UPLC-PCR	UPLC-PLS	UPLC-PCR	UPLC-PLS	UPLC-PCR	UPLC-PLS	UPLC-PCR	UPLC-PLS	UPLC-PCR	UPLC-PLS	UPLC-PCR	UPLC-PLS
1	4.0	7.0	35.0	4.03	4.06	7.07	7.05	35.07	34.59	100.8	101.5	101.0	100.7	100.2	98.8
2	12.0	7.0	35.0	12.17	12.21	6.96	6.99	35.04	35.12	101.5	101.7	99.4	99.9	100.1	100.3
3	20.0	7.0	35.0	19.81	19.83	7.05	7.00	35.36	35.25	99.0	99.2	100.7	100.0	101.0	100.7
4	28.0	7.0	35.0	27.93	28.05	7.01	6.89	34.84	34.83	99.8	100.2	100.2	98.4	99.5	99.5
5	32.0	7.0	35.0	32.42	32.00	6.98	6.97	34.81	34.78	101.3	100.0	99.7	99.6	99.5	99.4
6	28.0	4.0	35.0	27.67	27.73	4.06	4.03	34.63	34.94	98.8	99.0	101.4	100.8	99.0	99.8
7	28.0	12.0	35.0	28.13	28.19	12.06	12.04	35.22	35.27	100.5	100.7	100.5	100.4	100.6	100.8
8	28.0	20.0	35.0	27.35	27.82	19.81	19.90	34.58	34.79	97.7	99.4	99.1	99.5	98.8	99.4
9	28.0	28.0	35.0	27.40	27.48	27.83	27.65	35.08	35.30	97.8	98.1	99.4	98.8	100.2	100.9
10	28.0	32.0	35.0	27.51	27.55	31.43	31.66	35.01	35.19	98.3	98.4	98.2	98.9	100.0	100.5
11	28.0	7.0	6.0	27.75	27.82	6.89	6.99	5.97	5.98	99.1	99.3	98.4	99.8	99.4	99.7
12	28.0	7.0	14.0	27.27	27.98	6.89	6.67	14.10	13.95	97.4	99.9	98.5	95.3	100.7	99.6
13	28.0	7.0	22.0	27.94	27.84	7.05	7.03	22.32	22.15	99.8	99.4	100.7	100.4	101.5	100.7
14	28.0	7.0	30.0	27.98	27.92	7.05	7.11	30.50	30.03	99.9	99.7	100.7	101.5	101.7	100.1
15	28.0	7.0	38.0	27.56	27.79	6.98	6.99	38.51	38.15	98.4	99.3	99.7	99.8	101.3	100.4
16	28.0	7.0	35.0	27.72	27.88	6.76	6.73	35.23	35.15	99.0	99.6	96.6	96.2	100.7	100.4
									$\bar{X}$	99.3	99.7	99.6	99.4	100.3	100.1
									SS	1.26	0.97	1.27	1.63	0.88	0.61
									BSS	1.27	0.97	1.27	1.64	0.87	0.61

**Tablo 4.32** UPLC-PLS ve UPLC-PCR Yöntemiyle Gün İçi Kesinlik ve Doğruluk İçin Analiz Sonuçları

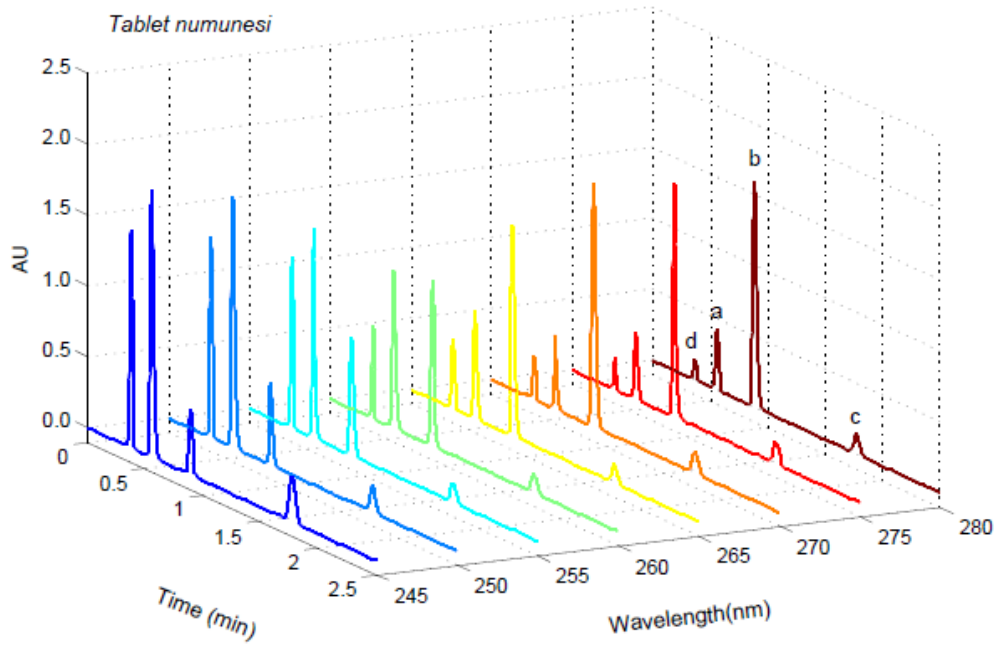
Konulan ( $\mu\text{g/ml}$ )			Bulunan ( $\mu\text{g/ml}$ )					
			PAR		KAF		ASP	
PAR	KAF	ASP	PCR	PLS	PCR	PLS	PCR	PLS
8	8	10	7.94	7.98	7.88	7.89	10.10	9.97
20	20	20	20.22	20.25	19.86	19.89	20.40	20.35
30	30	30	30.35	30.35	29.78	29.70	30.27	30.36
			Geri kazanım (%)					
			PAR		KAF		ASP	
			PCR	PLS	PCR	PLS	PCR	PLS
			99.2	99.8	98.5	98.6	101.0	99.7
			101.1	101.2	99.3	99.4	85.0	84.8
			101.2	101.2	99.3	99.0	100.9	101.2
			SS					
			PAR		KAF		ASP	
			PCR	PLS	PCR	PLS	PCR	PLS
			0.013	0.015	0.010	0.033	0.032	0.029
			0.062	0.103	0.022	0.029	0.450	0.368
			0.300	0.191	0.179	0.480	0.192	0.315
			BSS (%)					
			PAR		KAF		ASP	
			PCR	PLS	PCR	PLS	PCR	PLS
			0.17	0.18	0.13	0.41	0.32	0.29
			0.31	0.51	0.11	0.14	2.21	1.81
			0.99	0.63	0.60	1.61	0.63	1.04
			BH (%)					
			PAR		KAF		ASP	
			-0.790	-0.233	-1.461	-1.431	0.951	-0.265
			1.105	1.231	-0.722	-0.567	1.975	1.771
			1.155	1.163	-0.719	-0.998	0.910	1.195

**Tablo 4.33** UPLC-PLS ve UPLC-PCR Yöntemiyle Günler Arası Kesinlik ve Doğruluk İçin Analiz Sonuçları

Konulan ( $\mu\text{g/ml}$ )			Bulunan ( $\mu\text{g/ml}$ )					
			PAR		KAF		ASP	
PAR	KAF	ASP	PCR	PLS	PCR	PLS	PCR	PLS
8	8	10	8.01	8.03	7.89	7.94	10.17	10.19
20	20	24	19.78	19.87	19.86	19.90	24.12	24.05
30	30	30	30.30	30.27	29.84	29.69	30.27	30.46
			Geri Kazanım (%)					
			PAR		KAF		ASP	
			PCR	PLS	PCR	PLS	PCR	PLS
			100.1	100.4	98.7	99.3	101.7	101.9
			98.9	99.4	99.3	99.5	100.5	100.2
			101.0	100.9	99.5	99.0	100.9	101.5
			SS					
			PAR		KAF		ASP	
			PCR	PLS	PCR	PLS	PCR	PLS
			0.019	0.018	0.006	0.044	0.100	0.202
			0.105	0.090	0.022	0.049	0.038	0.066
			0.245	0.217	0.063	0.478	0.332	0.454
			BSS (%)					
			PAR		KAF		ASP	
			PCR	PLS	PCR	PLS	PCR	PLS
			0.232	0.220	0.079	0.553	0.988	1.980
			0.529	0.452	0.108	0.244	0.156	0.276
			0.809	0.717	0.210	1.608	1.097	1.490
			BH (%)					
			PAR		KAF		ASP	
			PCR	PLS	PCR	PLS	PCR	PLS
			0.085	0.406	-1.347	-0.703	1.723	1.866
			-1.113	-0.648	-0.722	-0.487	0.488	0.189
			1.006	0.916	-0.545	-1.018	0.898	1.524

#### 4.2.2.5 UPLC-PLS ve UPLC-PCR Yöntemlerinin Farmasötik Preparatlara Uygulanması

Çalışmada UPLC-PLS ve UPLC-PCR yöntemlerinin farmasötik preparatlara uygulanmasında, 20 adet THOMAPYRİN, tablet doğru bir şekilde tartıldı ve havanda iyice toz edildikten sonra bir tablete karşılık gelen tablet miktarı 100 mL'lik balonjojede metanol içerisinde çözüldü. Balonjoje içeriği mekanik karıştırıcı ile 35 dakika karıştırıldı ve membran filtre (Sartorius Minisart  $\phi=0,45 \mu\text{m}$ ) yardımı ile süzüldü. Hazırlanan tablet çözeltileri 2 mL'lik "vial" lere konularak kalibrasyon basamağındaki kromatografik UPLC şartlarda 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275 ve 280 nm dalga boylarındaki dedeksiyon ile kromatogramları alındı.



**Şekil 4.68** Kalibrasyon basamağındaki tablet çözeltilerinin kromatografik UPLC şartlarda 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275 ve 280 nm dalga boylarındaki kromatogram serileri.

Elde edilen kromatogramlardan hesaplanan PAR/IS, KAF/IS ve ASP/IS oranları hesaplanarak UPLC-PLS ve UPLC PCR kalibrasyon denklemlerinde yerine konarak tabletlerin içerisindeki PAR, KAF ve ASP miktarları hesaplandı. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.34’da sunulmaktadır.

**Tablo 4.34** UPLC-PLS ve UPCR Yöntemlerinin Ticari Farmasötik Preparatlara Uygulanmasıyla Elde Edilen Miktar Tayini Sonuçları

No.	mg/tablet					
	PAR		KAF		ASP	
	UPLC-PCR	UPLC-PLS	UPLC-PCR	UPLC-PLS	UPLC-PCR	UPLC-PLS
1	201.6	202.3	50.2	49.4	250.2	249.4
2	200.9	201.1	50.1	50.0	251.9	251.9
3	203.3	203.9	50.0	49.3	251.4	257.5
4	202.0	202.5	50.3	49.6	250.6	247.5
5	198.0	198.7	48.1	49.8	252.1	252.8
6	200.0	201.0	49.2	49.8	251.8	250.8
7	201.8	202.2	48.9	49.3	253.5	250.2
8	200.0	200.3	49.9	49.7	255.3	256.8
9	199.3	199.6	50.3	49.9	249.9	250.9
$\bar{X}$	200.8	201.3	49.7	49.6	251.9	252.0
SS	1.60	1.63	0.76	0.25	1.69	3.30
BSS	0.80	0.81	1.52	0.50	0.67	1.31

## 5. TARTIŞMA

Bu doktora tezinin konusu “Parasetamol İçeren Kombine Farmasötik Preparatların UPLC Yöntemi İle Kantitatif Analizi” olarak seçilmiştir. Bu doktora tez çalışmasının temel amacı, parasetamol içeren kombine farmasötik preparatlardaki aktif bileşiklerin miktar tainleri için yeni, hızlı, kolay ve güvenilir kromatografik yöntemlerin geliştirilmesidir. Ayrıca tez çalışması kapsamında, yeni geliştirilecek klasik kromatografik yöntemlerin kemometrik kalibrasyon yöntemleriyle kombine kullanımına dayalı olarak, parasetamol içeren kombine ticari farmasötik dozaj formlarının kantitatif analizlerinin gerçekleştirilmesi hedeflenmiştir.

Bu kapsamda, yeni geliştirilen klasik UPLC ve UPLC-Kemometrik kalibrasyon tekniklerinin analitik validasyonları gerçekleştirilerek parasetamol içeren karışımların analizine başarıyla uygulamaları yapılmıştır. Karışım analizlerinde klasik HPLC yöntemi analiz edilecek maddelerin fiziksel ve kimyasal yapılarının yakın olması dolayısıyla ayırma kapasitesi her zaman beklenildiği gibi iyi sonuçlar vermediği gibi, analiz süresinin uzun olması aşırı miktarda reaktif harcanmasına neden olduğu için analiz maliyetinide arttırmaktadır.

Son zamanlarda klasik HPLC yönteminin dezavantajlarını elimine etmek için aşırı yüksek basınca dayanabilen yeni, daha kısa, daha küçük çaplı ve daha küçük tanecik boyutlu kolon teknolojisi geliştirilerek, ayırma kapasitesi yüksek olan Aşırı Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (UPLC) yöntemi geliştirilmiştir.

Dolayısıyla doktora tezi çalışması kapsamında yeni kolon teknolojisine dayanan UPLC yöntemiyle parasetamol içeren farmasötik karışımların analizleri optimal bir kromatografik ayırma kapasitesi ile 2.5 dakika gibi kısa bir analiz süresinde gerçekleştirildi.



Buna ilaveten geliştirilen klasik UPLC yönteminin analiz işlemlerinde kullanılmasıyla birlikte bu yöntemin kesinlik ve doğruluğunu arttırmak amacıyla, UPLC-PCR ve UPLC-PLS kombine yöntemleri parasetamol içeren üçlü karışımların analizlerine başarıyla uygulandı.

Tez çalışması kapsamında, askorbikasıit-parasetamol-aspirin (AA-PAR -ASP) ve parasetamol-kafein-aspirin (PAR-KAF-ASP) karışımlarını içeren iki farklı kombine farmasötik ticari preparat olan AFEBRYL<sup>®</sup> Efervesan Tablet ve THOMAPRYN<sup>®</sup> Tabletın kantitatif analizine, klasik UPLC ve UPLC-PCR ve UPLC-PLS yöntemleri uygulanmıştır. PAR-AA-ASP ve PAR-KAF-ASP karışımlardaki bileşiklerin ayırımı ve tayini için UPLC yöntemiyle ayırma ve analizleri için farklı kolonlarla farklı, kolon sıcaklıklarında, değişik pH'larda optimal kromatografik şartların saptanması amacıyla çeşitli hareketli faz sistemleri, akış hızı, dalga boyu seçimi, enjeksiyon hacmi gibi parametreler test edildi.

Bu test işleminde hareketli faz olarak 0.1 M asetik asit ve metanol (75:25 *h/h*) karışımıyla oluşan çözücü sistemi, kolon olarak Acquiting UPLCTM BEH fenil kolonu (100mm x 1.0 mm, i.d., 1.7 µm) kullanıldı, kolon sıcaklığı: 35 °C' sıcaklık, akış hızı 0,35 ml/dak, enjeksiyon hacmi 3,5 µl, çalışma dalga boyları 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275 ve 280 nm olarak bulundu. Yukarıda açıklanan optimal kromatografik şartlar altında klasik UPLC yöntemiyle Afebryl<sup>®</sup> Efervesan Tabletteki AA, PAR ve ASP bileşiklerinin analizi için internal standart (KAF) varlığında bileşiklerin standart çözeltilerinin sekiz farklı dalga boyunda 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275 ve 280 nm'deki DAT "PDA" dedeksiyonu ile kromatogramlar elde edildi (Şekil 4.1).

Karışımdaki AA, PAR ve ASP için ayrı ayrı her bir dalga boyunda elde edilen kromatogramlar konsantrasyona karşı grafiğe geçirildi, lineer regresyon analizi ile doğru denklemleri ve karşılık gelen istatistiksel veriler hesaplandı (Tablo 4.2).

Klasik UPLC uygulamasında (Tablo 4.2)'den de görüldüğü gibi lineer regresyon analizi hesaplamalarından elde edilen korelasyon katsayıları yöntemin 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275 ve 280 nm çalışma dalga boyları için 5-30 µg/ml derişim aralığında doğrusal olduğunu göstermiştir. Aynı çizelge üzerinde klasik UPLC yönteminin sekiz farklı dalga boyunda AA, PAR, ASP, için sırasıyla LOD ve LOQ değerleri hesaplanarak sunulmuştur. Bu sonuçlar karışımdaki AA, PAR ve ASP'nin kromatografik ayırımı ve tainleri için uygun olduğu görülmektedir. Klasik UPLC yönteminin analitik validasyonu için geri kazanım çalışmaları, gün içi ve günler arası çalışmalar ile standart ekleme yöntemleri uygulandı.

Geri kazanım çalışmaları AA, PAR, ASP içeren 19 farklı konsantrasyonda yapay karışımlar hazırlandı, bu karışımların yukarıda belirlenen kromatografik koşullarda UPLC kromatogramları alınarak kalibrasyon grafiklerinde yerine konarak miktarları hesaplandı. Konulan-bulunan üzerinden % geri kazanım değerleri, standart sapmaları ve bağıl standart sapmaları hesaplandı. Sırasıyla AA, PAR ve ASP için sonuçlar Tablo 4.3, Tablo 4.4 ve Tablo 4.5 de sunuldu. Sonuçlar gösterdiği klasik UPLC yönteminin yapay karışımların analizine uygulanmasında son derece başarılı sonuçlar elde edildi. Geliştirilen klasik UPLC yönteminin gün içi ve günler arası analiz çalışmalarındaki uygulamalarında 20.0 µg/ml IS varlığında , AA, PAR ve ASP için 10 µg/ml, 20 µg/ml ve 30 µg/ml olmak üzere üç farklı derişimde her bir konsantrasyon için n=6 tekrarlı denemeler yapıldı. Gün içi ve günler arası çalışmalarda % geri kazanım, standart sapma, bağıl standart sapma ve bağıl hatalar hesaplandı.

Bu gün içi ve günler arası deneysel çalışmalar için klasik UPLC yöntemi sonuçları AA, PAR ve ASP için sırasıyla gün içi Tablo 4.6, Tablo 4.7, Tablo 4.8, günler arası Tablo 4.9, Tablo 4.10, Tablo 4.11 sunuldu.

Bu sonuçlar yöntemlerin kesinliği ve doğruluğu hakkında başarılı sonuçlar verdiğini ve yöntemlerin ticari preparatlara başarıyla uygulanabileceğini göstermiştir. Ayrıca klasik UPLC yöntemi ile Afebryl® Efervesan Tabletlerdeki AA, PAR ve ASP'nin analizi üzerine farmasötik tablet yardımcı maddelerinin etkilerinin olup olmadığını değerlendirmek için standart ekleme tekniği uygulandı bu uygulamada Afebryl® Efervesan Tablet'in etiketinde 300 mg ASP, 200 mg PAR ve 300 mg AA/tablet olduğu belirtilen ticari numunelerde gerekli seyretmeler yapıldığında yaklaşık 6.0 µg/ml AA, 4.0 µg/ml PAR ve 6.0 µg/ml ASP olacak şekilde olduğu durumlarda üzerine 20.0 µg/ml IS varlığında AA, PAR ve ASP için üç farklı derişimde sırasıyla 5 µg/ml, 15 µg/ml ve 25 µg/ml eklemeler yapıldı.

Her bir konsantrasyon için n=3 deneysel tekrarlar yapıldı. Eklenen konsantrasyonlar, 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275 ve 280 nm'de AA/IS, PAR/IS ve ASP/IS kromatogram oranlarına karşı grafiğe geçirildiğinde AA, PAR ve ASP için sırasıyla sekiz farklı dalga boyunda elde edilen doğru denklemlerinin veya çizilen grafiklerin kesim noktalarından tablet numuneleri içerisindeki miktarlar hesaplandı. Klasik UPLC yönteminin uygulamasında standart ekleme tekniği ile elde edilen grafikler AA için Şekil 4.2-9, PAR 4.10-17, ve ASP için 4.18-25 de sunuldu.

AA için 245 nm'de 5,75 µg/ml, 250 nm'de 6,29 µg/ml, 255 nm'de 6,25 µg/ml, 260 nm'de 5,72 µg/ml, 265 nm'de 5,75 µg/ml, 270 nm'de 6,00 µg/ml, 275 nm'de 5,72 µg/ml, PAR için 245 nm'de 4,03 µg/ml, 250 nm'de 4,15 µg/ml, 255 nm'de 4,20 µg/ml, 260 nm'de 4,23 µg/ml, 265 nm'de 4,18 µg/ml, 270 nm'de 4,04 µg/ml, 275 nm'de 3,87 µg/ml ve 280 nm'de 4,10 µg/ml ve ASP için 245 nm'de 6,28 µg/ml, 250 nm'de 6,27 µg/ml, 255 nm'de 6,27 µg/ml, 260 nm'de 6,23 µg/ml, 265 nm'de 6,26 µg/ml, 270 nm'de 6,27 µg/ml, 275 nm'de 6,22 µg/ml ve 280 nm'de 5,85 µg/ml olarak elde edildi.

Standart ekleme tekniğindeki AA, PAR ve ASP için sırasıyla 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275 ve 280 nm’de ki kalibrasyon grafikleri, aynı dalga boylarında elde edilen klasik UPLS kalibrasyon grafiklerinin eğimleri ile karşılaştırıldığında eğimlerin birbirine son derece yakın olduğu görülmektedir.

**Tablo 5.1** AA için kalibrasyon grafikleri ile standart ekleme grafiklerinin eğimlerine karşılaştırmalı tablo

$\lambda_M$	Kalibrasyon Denklemi m	Standart Ekleme Grafiği m
245	0.1969	0.1968
250	0.1474	0.1517
255	0.0931	0.0946
260	0.0551	0.0544
265	0.0344	0.0335
270	0.0210	0.0196
275	0.0166	0.0162
280	0.0132	0.0127

**Tablo 5.2** PAR için kalibrasyon grafikleri ile standart ekleme grafiklerinin eğimlerine karşılaştırmalı tablo

$\lambda_M$	Kalibrasyon Denklemi m	Standart Ekleme Grafiği m
245	0.3616	0.3622
250	0.2826	0.2856
255	0.1560	0.1598
260	0.0826	0.0857
265	0.0457	0.0459
270	0.0259	0.0252
275	0.0210	0.0210
280	0.0202	0.0205

**Tablo 5.3** ASP için kalibrasyon grafikleri ile standart ekleme grafiklerinin eğimlerine karşılaştırmalı tablo

$\lambda_M$	Kalibrasyon Denklemi m	Standart Ekleme Grafiği m
245	0.0412	0.0418
250	0.0192	0.0194
255	0.0087	0.0088
260	0.0059	0.0060
265	0.0051	0.0054
270	0.0050	0.0055
275	0.0052	0.0054
280	0.0059	0.0059

Tablo 5.1, Tablo 5.2 ve Tablo 5.3'den de görüldüğü üzere farmasötik tablet yardımcı maddelerinin klasik UPLC yöntemiyle AA, PAR ve ASP analizi üzerinde her hangi bir etkisi yoktur.

UPLC-Kemometrik yöntemlerin AA-PAR-ASP ve PAR-ASP-KAF karışımlarının analizine uygulanmasında iki farklı PCR ve PLS kalibrasyon algoritması kullanıldı. Bu PCR ve PLS kalibrasyon algoritmalarının UPLC yöntemiyle kombine kullanılması UPLC-PCR ve UPLC-PLS algoritmalarının AA-PAR-ASP karışımlarına uygulanmasında analiz edilen AA, PAR ve ASP bileşiklerinin kalibrasyon konsantrasyonlarına karşı 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275 ve 280 nm dalga boylarında elde edilen AA/IS, PAR/IS ve ASP/IS değerleri kullanılarak PCR ve PLS kalibrasyonları hesaplandı. Hesaplanan PCR ve PLS kalibrasyon denklemleri AA-PAR-ASP için sırasıyla bölüm 4.1.3.2'de UPLC-PCR, 4.1.3.3'de UPLC-PCL, denklemleri sunulmuştur. PCR ve PLS kalibrasyonlarında optimal faktör sayısını belirlemek için çapraz validasyonu işlemi uygulandı. PCR ve PLS kalibrasyonlarını elde edilmesinde ilk iki faktörün uygun olduğu saptandı.

UPLC-PCR ve UPLC-PLS yöntemlerinin analitik validasyonunda gün içi ve günler arası çalışmalarında AA, PAR ve ASP için 10 µg/ml, 20 µg/ml, 30 µg/ml olmak üzere üç farklı konsantrasyonlarda deneyler gerçekleştirildi. Gün içi ve günler arası denemelerden 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275 ve 280 nm dalga boylarında elde edilen AA/IS, PAR/IS ve ASP/IS kromatografi UPLC alanları, UPLC-PCR ve UPLC-PLS kalibrasyon denklemlerinde yerine konarak, UPLC-PCR ve UPLC-PLS yöntemlerinin validasyonu işleminde geri kazanım çalışmaları yapılarak AA-PAR-ASP karışımlarındaki bileşiklerin miktarlarının kantitatif tahminleri yapıldı. Sonuçlar % geri kazanım, standart sapma (SS) ve % bağıl standart sapma (BSS) olarak sırasıyla AA, PAR ve ASP için hesaplandı.

Hesaplanan sonuçlar Tablo 4.14’de verildi. % geri kazanım çalışmalarındaki SS ve BSS değerleri klasik UPLC yöntemlerinden elde edilen sapmalardan daha küçük olduğu gözlemlendi. AA, PAR ve ASP için sırasıyla 10 µg/ml, 20 µg/ml, 30 µg/ml konsantrasyon değerlerine karşılık hesaplanan sonuçlardan % geri kazanım, SS ve BSS değerleri hesaplandı ve sonuçlar Tablo 4.15 ve Tablo 4.16’de verildi. Gün içi ve günlerarası çalışmalarda denemeler n=6 tekrarlı olarak gerçekleştirildi. UPLC-PCR ve UPLC-PLS yöntemiyle bulunan sonuçlar kesinlik ve doğruluk açısından klasik UPLC yöntemine göre daha başarılı olduğu gözlemlendi.

Bu doktora tez çalışması kapsamında, AA-PAR-ASP karışımını içeren farmasötik preparatların analizi için geliştirilen klasik UPLC, UPLC-PCR ve UPLC-PLS yöntemlerinin analitik validasyonu işleminden sonra yöntemler parasetamol içeren ticari farmasötik preparatın analizine uygulandı. Sonuçlar Tablo 4.2’de sırasıyla AA, PAR ve ASP için sunulmuştur.

Elde edilen sonuçlar çizelge Tablo 4.2’de görüldüğü gibi etiket değerleriyle uyumlu olduğu UPLC-PCR ve UPLC-PLS yöntemlerinin sonuçlarının klasik UPLC’ye göre daha küçük ve BSS değerlerinin var olduğu belirlendi. Dolayısıyla tez kapsamında geliştirilen klasik UPLC, UPLC-PCR ve UPLC-PLS yöntemleri AA-PAR-ASP karışımını içeren kombine preparatların kalite kontrol ve rutin analizlerinde uygulanabileceği bu tez kapsamında ortaya konulmuştur.

Yukarıda açıklanan optimal kromatografik şartlar altında klasik UPLC yöntemiyle THOMAPYRİN® tabletteki PAR-KAF-ASP bileşiklerinin analizi için internal standart (AA) varlığında bileşiklerin standart çözeltilerinin sekiz farklı dalga boyunda 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275 ve 280 nm’deki DAT “PDA” dedeksiyonu ile kromatogramlar elde edildi (Şekil 4.35).

Karışımındaki PAR-KAF-ASP için ayrı ayrı her bir dalga boyunda elde edilen kromatogramlar konsantrasyona karşı grafiğe geçirildi, lineer regresyon analizi ile doğru denklemleri ve karşılık gelen istatistiksel veriler hesaplandı (Tablo 4.19).Klasik UPLC uygulamasında (Tablo 4.19)'den de görüldüğü gibi lineer regeresyon analizi hesaplamalarından elde edilen korelasyon katsayıları yöntemin 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275 ve 280 nm çalışma dalga boyları için 4.0-38 µg/ml derişim aralığında doğrusal olduğunu göstermiştir. Aynı çizelge üzerinde klasik UPLC yönteminin sekiz farklı dalga boyunda PAR-KAF-ASP için sırasıyla LOD ve LOQ değerleri hesaplanarak sunulmuştur. Bu sonuçlar karışımındaki PAR-KAF-ASP'nın kromatografik ayırımı ve tainleri için uygun olduğu görülmektedir.

Klasik UPLC yönteminin analitik validasyonu için geri kazanım çalışmaları, gün içi ve günler arası çalışmalar ile standart ekleme yöntemleri uygulandı. Geri kazanım çalışmalarında PAR-KAF-ASP içeren 19 farklı konsantrasyonda yapay karışımlar hazırlandı, bu karışımların yukarıda belirlenen kromatografik koşullarda UPLC kromatogramları alınarak kalibrasyon grafiklerinde yerine konarak miktarları hesaplandı. Konulan-bulunan üzerinden % geri kazanım değerleri, standart sapmaları ve bağıl standart sapmaları hesaplandı. Sırasıyla PAR-KAF-ASP için sonuçlar Tablo 4.20, Tablo 4.21 ve Tablo 4.22 de sunuldu.

Sonuçlar gösterdi ki klasik UPLC yönteminin yapay karışımların analizine uygulanmasında son derece başarılı sonuçlar elde edildi. Geliştirilen klasik UPLC yönteminin gün içi ve günler arası analiz çalışmalarındaki uygulamalarında 15.0 µg/ml IS varlığında, PAR-KAF-ASP için PAR, ve KAF için 8.0, 20.0 ve 30.0 µg/ml ASP 10.0, 20 ve 30 µg/ml olmak üzere üç farklı derişimde her bir konsantrasyon için n=6 tekrarlı denemeler yapıldı. Gün içi ve günler arası çalışmalarda % geri kazanım, standart sapma, bağıl standart sapma ve bağıl hatalar hesaplandı.

Bu gün içi ve günler arası deneysel çalışmalar için klasik UPLC yöntemi sonuçları PAR-KAF-ASP için sırasıyla gün içi Tablo 4.23, Tablo 4.24, Tablo 4.25, günler arası Tablo 4.26, Tablo 4.27, Tablo 4.28 sunuldu. Bu sonuçlar yöntemlerin kesinliği ve doğruluğu hakkında başarılı sonuçlar verdiğini ve yöntemlerin ticari preparatlara başarıyla uygulanabileceğini göstermiştir.

Ayrıca klasik UPLC yöntemi ile Thomapyrin® tabletlerdeki PAR-KAF-ASP'nin analizi üzerine farmasötik tablet yardımcı maddelerinin etkilerinin olup olmadığını değerlendirmek için standart ekleme tekniği uygulandı bu uygulamada Thomapyrin® Tablet'in etiketinde 250.0 mg ASP, 200.0 mg PAR ve 50.0 mg KAF/tablet olduğu belirtilen ticari numunelerde gerekli seyretmeler yapıldığında yaklaşık 1.0 µg/ml PAR, 4.0 µg/ml KAF ve 5.0 µg/ml ASP olacak şekilde olduğu durumlarda üzerine 15.0 µg/ml IS varlığında PAR, KAF ve ASP için üç farklı derişimde sırasıyla 4 µg/ml, 16 µg/ml ve 28 µg/ml eklemeler yapıldı.

Her bir konsantrasyon için n=3 deneysel tekrarlar yapıldı. Eklenen konsantrasyonlar, 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275 ve 280 nm'de PAR/IS, KAF/IS ve ASP/IS kromatogram oranlarına karşı grafiğe geçirildiğinde PAR-KAF-ASP için sırasıyla sekiz farklı dalga boyunda elde edilen doğru denklemlerinin veya çizilen grafiklerin kesim noktalarından tablet numuneleri içerisindeki miktarlar hesaplandı. Klasik UPLC yönteminin uygulamasında standart ekleme tekniği ile elde edilen grafikler PAR için Şekil 4.36 -43, KAF için 4.44 -51, ve ASP için 4.52-58 de sunuldu.

PAR için 245 nm'de 4.13 µg/ml, 250 nm'de 4.17 µg/ml, 255 nm'de 3.88 µg/ml, 260 nm'de 3.97 µg/ml, 265 nm'de 4.14 µg/ml, 270 nm'de 4.06 µg/ml, 275 nm'de 4.05 µg/ml, 280 nm'de 4.02.



KAF için 245 nm'de 1.0 µg/ml, 250 ml'de 5.22 µg/ml, 255 nm'de 5.24 µg/ml, 260 nm'de 4.91 µg/ml, 265 nm'de 5.19 µg/ml, 270 nm'de 5.22 µg/ml, 275 nm'de 4.92 µg/ml ve 280 nm'de 5.27 µg/ml ve ASP için 245 nm'de 5.25 µg/ml, 250nm'de 5.22 µg/ml, 255 nm'de 5.24 µg/ml, 260 nm'de 4.91 µg/ml, 265 nm'de 5.19 µg/ml, 270 nm'de 5.22 µg/ml, 275 nm'de 4.92 µg/ml ve 280 nm'de 5.27 µg/ml olarak elde edildi.

Standart ekleme tekniğindeki PAR, KAF ve ASP için sırasıyla 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275 ve 280 nm'de ki kalibrasyon grafikleri, aynı dalga boylarında elde edilen klasik UPLS kalibrasyon grafiklerinin eğimleri ile karşılaştırıldığında eğimlerin birbirine son derece yakın olduğu görülmektedir.

**Tablo 5.4** PAR için kalibrasyon grafikleri ile standart ekleme grafiklerinin eğimlerine karşılaştırmalı tablo

$\lambda_M$	Kalibrasyon Denklemi m	Standart Ekleme Grafiği m
245	0.0818	0.0787
250	0.0795	0.0769
255	0.0753	0.0754
260	0.0689	0.0691
265	0.0605	0.0601
270	0.0543	0.0552
275	0.0572	0.0574
280	0.0718	0.0722

**Tablo 5.5** KAF için kalibrasyon grafikleri ile standart ekleme grafiklerinin eğimlerine karşılaştırmalı tablo

$\lambda_M$	Kalibrasyon Denklemi m	Standart Ekleme Grafiği m
245	0.0159	0.0157
250	0.0207	0.0202
255	0.0340	0.0339
260	0.0581	0.0579
265	0.0954	0.0936
270	0.1460	0.1425
275	0.2026	0.2022
280	0.2555	0.2502

**Tablo 5.6** ASP için kalibrasyon grafikleri ile standart ekleme grafiklerinin eğimlerine karşılaştırmalı tablo

$\lambda_M$	Kalibrasyon Denklemi m	Standart Ekleme Grafiği m
245	0.0104	0.0105
250	0.0062	0.0063
255	0.0051	0.0052
260	0.0059	0.0060
265	0.0080	0.0081
270	0.0123	0.0122
275	0.0179	0.0178
280	0.0228	0.0229

Tablo 5.4, Tablo 5.5 ve Tablo 5.6'den de görüldüğü üzere farmasötik tablet yardımcı maddelerinin klasik UPLC yöntemiyle PAR, KAF ve ASP analizi üzerinde herhangi bir etkisi yoktur.

UPLC-Kemometrik yöntemlerin PAR-KAF-ASP karşılaşımlarının analizine uygulanmasında iki farklı PCR ve PLS kalibrasyon algoritması kullanıldı. Bu PCR ve PLS kalibrasyon algoritmalarının UPLC yöntemiyle kombine kullanılması UPLC-PCR ve UPLC-PLS algoritmalarının PAR-KAF-ASP karışımlarına uygulanmasında analiz edilen PAR, KAF ve ASP bileşiklerinin kalibrasyon konsantrasyonlarına karşı, 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275 ve 280 nm dalga boylarında elde edilen PAR/IS, KAF/IS ve ASP/IS değerleri kullanılarak PCR ve PLS kalibrasyonları hesaplandı. Hesaplanan PCR ve PLS kalibrasyon denklemleri PAR-KAF-ASP için sırasıyla bölüm 4.2.3.2'de UPLC-PCR, 4.2.3.3'de UPLC-PCL, denklemleri sunulmuştur. PCR ve PLS kalibrasyonlarında optimal faktör sayısını belirlemek için çapraz validasyonu işlemi uygulandı. PCR ve PLS kalibrasyonlarını elde edilmesinde ilk iki faktörün uygun olduğu saptandı.

UPLC-PCR ve UPLC-PLS yöntemlerinin analitik validasyonunda gün içi ve günler arası çalışmalarında PAR, KAF ve ASP için 8 µg/ml, 20 µg/ml, 30 µg/ml olmak üzere üç farklı konsantrasyonlarda deneyler gerçekleştirildi.

Gün içi ve günler arası denemelerden 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275 ve 280 nm dalga boylarında elde edilen PAR/IS, KAF/IS ve ASP/IS kromatografi UPLC alanları, UPLC-PCR ve UPLC-PLS kalibrasyon denklemlerinde yerine konarak, UPLC-PCR ve UPLC-PLS yöntemlerinin validasyonu işleminde geri kazanım çalışmaları yapılarak AA-PAR-ASP karışımlarındaki bileşiklerin miktarlarının kantitatif tahminleri yapıldı.

Sonuçlar % geri kazanım, standart sapma (SS) ve % bağıl standart sapma (BSS) olarak sırasıyla PAR, KAF ve ASP için hesaplandı. Hesaplanan sonuçlar Tablo 4.19'de verildi. % geri kazanım çalışmalarındaki SS ve BSS değerleri klasik UPLC yöntemlerinden elde edilen saptamalardan daha küçük olduğu gözlemlendi. PAR, KAF ve ASP için sırasıyla 12µg/ml, 20 µg/ml, 35 µg/ml konsantrasyon değerlerine karşılık hesaplanan sonuçlardan % geri kazanım, SS ve BSS değerleri hesaplandı ve sonuçlar PAR, KAF ve ASP için Tablo 4.18, numaralı çizelgede verildi.

Gün içi ve günlerarası çalışmalarda denemeler n=6 tekrarlı olarak gerçekleştirildi. UPLC-PCR ve UPLC-PLS yöntemiyle bulunan sonuçlar kesinlik ve doğruluk açısından klasik UPLC yöntemine göre daha başarılı olduğu gözlemlendi. Bu doktora tez çalışması kapsamında, PAR, KAF ve ASP karışımını içeren farmasötik preparatların analizi için geliştirilen klasik UPLC, UPLC-PCR ve UPLC-PLS yöntemlerinin analitik validasyonu işleminden sonra yöntemler parasetamol içeren ticari farmasötik preparatın analizine uygulandı. Sonuçlar Tablo 4.31'de sırasıyla PAR, KAF ve ASP için sunulmuştur. Elde edilen sonuçlar çizelge Tablo 4.31'de görüldüğü gibi etiket değerleriyle uyumlu olduğu UPLC-PCR ve UPLC-PLS yöntemlerinin sonuçlarının klasik UPLC'ye göre daha küçük ve BSS değerlerinin var olduğu belirlendi.

Dolayısıyla tez kapsamında geliştirilen klasik UPLC, UPLC-PCR ve UPLC-PLS yöntemleri PAR, KAF ve ASP karışımını içeren kombine preparatların kalite kontrol ve rutin analizlerinde uygulanabileceği bu tez kapsamında ortaya konulmuştur.

Doktora tezi kapsamında geliştirilen yeni yöntemlerin sonuçları literatür yöntemi ile karşılaştırıldı<sup>145</sup>. Bu karşılaştırma işleminde AA, PAR, ASP karışımı için sonuçlar tablo 5.7 sunuldu. Sonuçlar analiz süresi açısından bakıldığında doktora tezi kapsamında geliştirilen yöntemlerin daha avantajlı olduğunu göstermektedir. Dolayısıyla tez kapsamında geliştirilen yöntemler analiz süresinin daha kısa olması nedeniyle ekonomiktir.

**Tablo 5.7** Askorbik asit, parasetamol ve aspirin analizleri için geliştirilen yöntemler ile literatür yöntemlerinin karşılaştırılmasına ait sonuçlar

Parametreler	Klasik UPLC 245-280 nm			UPLC-PLS			UPLC-PCR			Literatür Metot (HPLC)		
	AA	PAR	ASP	AA	PAR	ASP	AA	PAR	ASP	AA	PAR	ASP
Analiz Süresi/Dak	0,364	0,552	1,802	0,364	0,552	1,802	0,364	0,552	1,802	1,9	2,7	6,6

Tez kapsamında analiz edilen PAR, KAF, ASP karışımı için diğer bir karşılaştırma işlemide tablo 5.8 de verildi. Geliştirilen yöntemlerin karışım analizlerine uygulanmasıyla elde edilen sonuçlar analiz süresi ve % geri kazanım açısından literatür yöntemi ile karşılaştırıldığında daha kısa analiz süresinde karşılaştırılabilir geri kazanım sonuçları verdiği görülmektedir<sup>146</sup>.

**Tablo 5.8** Parasetamol, kafein ve aspirin analizleri için geliştirilen yöntemler ile literatür yöntemlerinin karşılaştırılmasına ait sonuçlar

Parametreler	Klasik UPLC 245-280 nm			UPLC-PLS			UPLC-PCR			Literatür Metot(HPLC)		
	PAR	KAF	ASP	PAR	KAF	ASP	PAR	KAF	ASP	PAR	KAF	ASP
Analiz Süresi/Dk	0.552	0.892	1,802	0.552	0.892	1,802	0.552	0.892	1,802	9,9	4,86	7,78
% G.K	99.5	100	99,4	99,7	99,4	100,1	99,3	99,6	100,3	98,35	99,15	98,50

Tablet analizi bakımından 200 mg PAR, 50 mg KAF ve 200 mg ASP türlerini içeren (Thomapryn ) tablet ile literatürde incelemesi yapılmış olan ve 250 mg PAR, 50 mg KAF ve 250 mg ASP türlerini içeren Malophenum karışımı için elde edilen sonuçlar tablo 5.9 de görülmektedir<sup>146</sup>. Bu karşılaştırma sonuçları göstermektedirki, geliştirilen yöntemler analiz süresi bakımından literatür yöntemine göre daha avantajlıdır.

**Tablo 5.9** Tablet içerisindeki (Thomapryn) parasetamol, kafein ve aspirin'in analizinden elde edilen sonuçlar ile literatür sonuçlarının karşılaştırılmasına ait sonuçlar

Parametreler	Klasik UPLC 245-280 nm			UPLC-PLS			UPLC-PCR			Literatür Metot (HPLC)		
	PAR	KAF	ASP	PAR	KAF	ASP	PAR	KAF	ASP	PAR	KAF	ASP
<b>Analiz Süresi/Dak</b>	0.552	0.892	1,802	0.552	0.892	1,802	0.552	0.892	1,802	9,9	4,86	7,78
<b>Tablet Miktarları</b>	199,60	50,50	250,70	201,3	49,6	252,0	200,8	49,7	251,9	246,83	49,59	244,93

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu doktora tez çalışması kapsamı içerisinde AA, PAR, ASP ve PAR, KAF, ASP karışımlarını içeren kombine farmasötik preparatlardaki aktif bileşiklerin miktar tayinleri için klasik UPLC ve kemometrik UPLC-PCR ve UPLC-PLC yöntemleri geliştirildi.

Bu yöntemlerin uygulamasından elde edilen sonuçlar, geliştirilen yöntemlerin kolay, hızlı, güvenilir ve ekonomik olduğunu göstermektedir. UPLC yöntemi klasik HPLC yöntemi ile karşılaştırıldığında dah hızlı analiz süresi ile ayırma kapasitesinin yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Dolayısıyla klasik UPLC yönteminin bu özelliği doktora tez çalışmasındaki AA, PAR, ASP ve PAR, KAF, ASP karışımlarının analizinde uygulanmıştır.

Karışımlarda analiz edilen maddelerin farklı dalga boylarında maksimum absorpsiyon vermeleri klasik kromatografik analizlerde, dalga boyu seçimini gerektirmesine rağmen UPLC-PCR ve UPLC-PLS kalibrasyon yöntemleri belli bir dalga boyu aralığında uygulandığı için maddelerin dedeksiyonu için spesifik dalga boyu seçimini gerektirmemiştir. Bu kemometrik kalibrasyonların klasik “single” kalibrasyonlara olan üstünlüğüdür.

Geliştirilen yöntemler, geri kazanım gün için ve günler arası analiz ile standart ekleme yöntemleri kullanılarak valide edilmiştir. Arkasından geliştirilen ve valide edilen klasik UPLC ile UPLC-PCR ve UPLC-PLS yöntemleri AA, PAR, ASP ve PAR, KAF, ASP karışımlarını içeren multi komponentli farmasötik preparatların kalite ve rutin analizlerinde başarıyla uygulandı. Doktora tezi kapsamında geliştirilen ve valide edilen klasik UPLC ile UPLC-PCR ve UPLC-PLS yöntemleri sonraki AR-GE çalışmaları ve ilaç endüstrisinde standart yöntemler olarak kullanılabilirlerdir.

## KAYNAKLAR

1. Tuzun C. Aromatik bileşikler, *Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi yayınlar*. 1975,117. 1975 161.
2. International Safety Programme on Chemical Safety ICSC: 1330  
<http://www.inchem.org/documents/icsc/icsc/eics1330.htm> 07.08.2013
3. El-Obeid HA, Al-Badr AA. Acetaminophen. *Analytical profiles of drug substances*, 1974, 3: 1-109.
4. Bosch ME. Sanchez AJR. Rojas FS. Ojeda CB. Determination of Paracetamol:Historical Evolution. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2006; 42:291-321.
5. Mohamed FA, Abdullah MA, Shammed SM. Selective Spectrophotometric Determination of p-Aminophenol and Acetaminophen. *Talanta* , 44 1997, 61-68.
6. Beaver WT, Mc Million D, *Journal of. Clinical. Pharmacol*, 1980, 2. 215-223.
7. Kayaalp O. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, 7. baskı, 2. cilt, 1995.
8. Merck Research Laboratories, *The Merck Index. XII. Baskı, Whitehouse Station, N.J.*, 1996, 9, 268, 1351.
9. Bilgin AA, Şafak C. *Farmasötik Kimya*. Cilt 1, Irmak Matbaası, Ankara, 2000, 360
10. Becker A.B, Simons K.J., Gillespie C.A., The bronchodilator effects and pharmacokinetics of caffeine in asthma. *N. Engl. J.Med*, 1984, 310: 743
11. Becker AB, Simons KJ, Gillespie CA. The bronchodilator effects ant pharmacokinetics of caffeine in asthma. *N. English Journal of Medicine*. 1984, 310: 743.
12. Choi A, Laurito C.E., Cunningham F.E., Pharmacologic management of postdural puncture headache. *Ann. Pharmacother*, 1996, 30: 831.

13. Roberts LS, Marrow JD. Analgesic-Antipyretic and antiinflammatory agents and drugs employed in the treatment of gout. *The pharmacological basis of therapeutics*. 10 2001; 687-703.
14. Needs CJ, Brooks PM. Clinical pharmacokinetics of the salicylates. *Clinical Pharmacokinetics*; 10, 1985: 164-77.
15. Gosselin RE, Smith RP, Hodge HC, Braddock JE. Salicylate. In: Tracy TM (Eds). *Clinical Toxicology of Commercial Products*, 5, 1984; 368-75.
16. Patrono C., Collier B., Dalen JE., FitzGerald GA., Fuster V., Gent M, Hirsh J., Roth G., Platelet-active drugs : the relationships among dose, effectiveness, and side effects. *Chest*; 2001. 119: 39-63,.
17. Gum PA., Kottke-Marchant K., Poggio ED., Gurm H., Welsh PA., Brooks L., Sapp SK., Topol EJ., Profile and prevalence of aspirin resistance in patients with cardiovascular disease. *Am J Cardiol*; 2001 88: 230-235.
18. TC Milli Savunma Bakanlığı, İlaç Fabrikası Komutanlığı  
[http://www.msb.gov.tr/Birimler/ILACFB/ilaclar/orpirin\\_ec\\_film\\_tablet\\_100mg.html](http://www.msb.gov.tr/Birimler/ILACFB/ilaclar/orpirin_ec_film_tablet_100mg.html)  
ml 11.09.2013
19. Aqel W, Abu-Qare, Mohamed, Abou-Donia. A validated hplc method for the determination of pyridostigmine bromide, acetaminophen, acetylsalicylic acid and caffeine in rat plasma and urine. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (2001) 26:939–947
20. Esteban, Graells M, Satorre j, Pérez-Mateo M, Determination of paracetamol and its four major metabolites in mouse plasma by reversed-phase ion-pair high-performance liquid Chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 1992 573:121–126



21. Pufal E, Sykutera M, Rochholz G, Schütz H. W, Sliwka K, Kaatsch H. Determination of paracetamol (acetaminophen) in different body fluids and organ samples after solid-phase extraction using hplc and an immunological method. *Fresenius J Anal Chem* 1999 367:596–599
22. Martin J. Hilton, Kevin V. Thomas. Determination of selected human pharmaceutical compounds in effluent and surface water samples by high-performance liquid chromatography–electrospray tandem mass Spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1015 (2003) 129–141
23. Ghada M. Hadada Samy Emarab, Waleed M.M. Mahmouda. 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* 79 (2009) 1360–1367
24. Kelly A. Johnson, Robert Plumb. Investigating the human metabolism of acetaminophen using uplc and exact mass of a-tof ms. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 39 (2005) 805–810
25. Murat Kartal. Lc method for the analysis of paracetamol, caffeine and codeine phosphate in pharmaceutical preparations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 26 (2001) 857–864
26. A.P. Dewani, B.B. Barik, V.D. Chipade, R.L. Bakal, A.V. Chandewar, S.K. Kanungo. Rp-hplc-dad method for the determination of phenylephrine, paracetamol, caffeine and chlorpheniramine in bulk and marketed formulation. *Arabian Journal of Chemistry* 11 March 2012; 18 July 2012

27. Gunawan Indrayanto, Ariani Sunartob Yenita Adriani. Simultaneous assay of phenylpropanolamine hydrochloride, caffeine, paracetamol, glycerylguaiacolate and chlorpheniramine maleate in silabat tm tablet using hplc with diode array detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 13 (1995) 1555-1559
28. Irena Baranowska, Andrzej Wilczek. Simultaneous rp-hplc determination of sotalol, metoprolol, a-hydroxymetoprolol, paracetamol and its glucuronide and sulfate metabolites in human urine. *The Japan Society for Analytical Chemistry*. 25 2009 44-100
29. L.S. Jensen, J. Valentine, R.W. Milne, A.M. Evans. The quantification of paracetamol, paracetamol glucuronide and paracetamol sulphate in plasma and urine using a single high-performance liquid chromatography assay. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 34 (2004) 585–593
30. Mari'n, E. Garcı, A. Garcı, Barbas C. Validation of a hplc quantification of acetaminophen, phenylephrine and chlorpheniramine in pharmaceutical formulations: capsules and sachets. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 29 (2002) 701–714
31. Natalie J Thatcher and Stephan Murray. Analysis of glutathione conjugate of paracetamol in human liver microsomal fraction by liquid chromatography mass spectrometry. *Biomedical Chromatography Biomed. Chromatogr.* 15: 374–378 (2001)
32. Matt Barfield, Neil Spooner, Rakesh Lad, Simon Parry, Susan Fowles. Application of dried blood spots combined with hplc-ms/ms for the quantification of acetaminophen in toxicokinetic studies. *Journal of Chromatography B*, 870 (2008) 32–37

33. Markus Godejohanna, Li-Hong Tsenga, Ulrich Braumanna, Jens Fuchserb, Manfred Spraula characterization of a paracetamol metabolite using on-line lc-spe-nmr-ms and a cryogenic nmr probe. *Journal Of Chromatography A*, 1058 (2004) 191–196
34. Hewavitharana, S. Lee, P.A. Dawson, D. Markovich, P.N. Shaw development of an hplc–ms/ms method for the selective determination of paracetamol metabolites in mouse urine. *Analytical Biochemistry* 374 (2008) 106–111
35. C. Celma, J.A. Allue', J. Prunonosa, C. Peraire, R. Obach. Simultaneous determination of paracetamol and chlorpheniramine in human plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 870 (2000) 77–86
36. Hong-gang Lou, Hong Yuan, Zou-rong Ruan, Bo Jiang. Simultaneous determination of paracetamol, pseudoephedrine, dextrophan and chlorpheniramine in human plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 878 (2010) 682–688
37. Hao Li, Chao Zhang, Jiang Wang, Yao Jianga, J. Paul Fawcettb, Jingkai Gua. Simultaneous quantitation of paracetamol, caffeine, pseudoephedrine, chlorpheniramine and cloperastine in human plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 51 (2010) 716–722
38. Qin-you Tana, Rong-hua Zhua, Huan-de Li, Feng Wang, Miao Yana, Li-bo Daia. Simultaneous quantitative determination of paracetamol and its glucuronide conjugate in human plasma and urine by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry: application to a clinical pharmacokinetic study. *Journal of Chromatography B*, 893– 894 (2012) 162– 167

39. Hana Raouf Przemyslaw Mielczarek, Katarzyna A. Michalow, Mieczyslaw Rekas, Jerzy Silberring. Synthesis of metabolites of paracetamol and cocaine via photooxidation on tio<sub>2</sub> catalyzed by uv light. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* (2012)
40. Gang Chen Jiannong Ye, Huimin Bao, Pengyuan Yang. Determination of the rate constants and activation energy of acetaminophen hydrolysis by capillary electrophoresis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 29 (2002) 843–850
41. Dana N. Haj-Ali, Imad I. Hamdan. Development of a capillary electrophoresis method for the determination of orphenadrine citrate in tablets in the presence of paracetamol. *Saudi Pharmaceutical Journal* (2010) 18, 233–237
42. Stefan Heitmeier, Gottfried Blaschke. Direct determination of paracetamol and its metabolites in urine and serum by capillary electrophoresis with ultraviolet and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography B*, 721 (1999) 93–108
43. Frank Bohnenstengel, Heyo K. Kroemer, Bernhard Sperker. In vitro cleavage of paracetamol glucuronide by human liver and kidney b-glucuronidase: determination of paracetamol by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B*, 721 (1999) 295–299
44. S. Azhagvuel, 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* 43 (2007) 873–878.

45. Maria-Elisa Capella-Peiró, Devasish Bose, Manuel Font Rubert c, Josep Esteve-Romero c. Optimization of a capillary zone electrophoresis method by using a central composite factorial design for the determination of codeine and paracetamol in pharmaceuticals. *Journal of Chromatography B*, 839 (2006) 95–101
46. Annette Kunkel, Stefan Giinter, Hermann Witzig. Quantitation of acetaminophen and salicylic acid in plasma using capillary electrophoresis without sample pretreatment improvement of precision. *Journal of Chromatography A*, 768 (1997) 125-133
47. Deniz Emre, Nuran Özaltn. Simultaneous determination of paracetamol, caffeine and propyphenazone in ternary mixtures by micellar electrokinetic capillary chromatography *Journal of Chromatography B*, 847 (2007) 126–132
48. Erdal Dinç , Abdil Ozdemir , Dumitru Baleanu. An application of derivative and continuous wavelet transforms to the overlapping ratio spectra for the quantitative multiresolution of a ternary mixture of paracetamol, acetylsalicylic acid and caffeine in tablets. *Talanta* 65 (2005) 36–47
49. Erdal Dinç, Dumitru Baleanu Feyyaz Onur Spectrophotometric multicomponent analysis of a mixture of metamizol, acetaminophen and caffeine in pharmaceutical formulations by two chemometric techniques. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 26 (2001) 949–957
50. Erdal Dinç. Linear regression analysis and its application to the multivariate spectral calibrations for the multiresolution of a ternary mixture of caffeine, paracetamol and metamizol in tablets. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 33 (2003) 605/615

51. Erdal Dinç, Dumitru Baleanu, Giuseppina Ioele, Michele De Luca, Gaetano Ragnob. Multivariate analysis of paracetamol, propiphenazone, caffeine and thiamine in quaternary mixtures by pcr, pls and ann calibrations applied on wavelet transform data. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 48 (2008) 1471–1475
52. Erdal Dinç, Cem Yücesoy, Feyyaz 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* 28 (2002) 1091–1100
53. Erdal Dinç, İ. Murat Palabıyık, Özgür Üstündağ, Filiz Yurtsever, Feyyaz Onur. Simultaneous spectrophotometric determination of chlorphenoxamine hydrochloride and caffeine in a pharmaceutical preparation using first derivative of the ratio spectra and chemometric methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 28 (2002) 591–600
54. Erdal Dinç, Özgür Üstündağ. Spectrophotometric quantitative resolution of hydrochlorothiazide and pironolactone in tablets by chemometric analysis methods. *Farmaco* 58 (2003) 1151/1161
55. E. Dinç, D. Baleanu. Two new spectrophotometric approaches to the multicomponent analysis of the acetaminophen and caffeine in tablets by classical least-squares and principal component regression techniques. *Farmaco* 57 (2002) 33–37
56. Erdal Dinç. The spectrophotometric multicomponent analysis of a ternary mixture of ascorbic acid, acetylsalicylic acid and paracetamol by the double divisor-ratio spectra derivative and ratio spectra-zero crossing methods. *Talanta* 48 (1999) 1145–1157

57. Erdal Dinç, Feyyaz Onur. Application of a new spectrophotometric method for the analysis of a ternary mixture containing metamizol, paracetamol and caffeine in tablets. *Analytica Chimica Acta* 359 (1998) 93±106
58. M.S. Bloomfield. A sensitive and rapid assay for 4-aminophenol in paracetamol drug and tablet formulation, by flow injection analysis with spectrophotometric detection *Talanta* 580 (2002) 1301/1310
59. M. Blanco, R. Cueva-Mestanza, A. Peguero. Controlling individual steps in the production process of paracetamol tablets by use of nir spectroscopy *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 51 (2010) 797–804
60. Fawzi A. El-Yazbi, Hassan H. Hammudb, Sulaf A. Assi. A derivative-ratio spectrophotometric method for the determination of ternary mixture of aspirin, paracetamol and salicylic acid. *Spectrochimica Acta Part A* 68 (2007) 275–278
61. Altair B. Moreira, Hueder P.M. Oliveira, Teresa D.Z. Atvars, Iara L.T. Dias, Graciliano O. Neto, Elias A.G. Zagatto, Lauro T. Kubota. Direct determination of paracetamol in powdered pharmaceutical samples by fluorescence spectroscopy *Analytica Chimica Acta* 539 (2005) 257–261
62. J.Hanaee simultaneous determination of acetaminophen and codeine in pharmaceutical preparations by derivative spectrophotometry. *Pharmaceutics Acta Helvetiae* 72 (1997) 239-241
63. N. Erk, Y. Özkan, E. Banoğlu, S.A. Özkan, Z. Şentürk. Simultaneous determination of paracetamol and methocarbamol in tablets by ratio spectra derivative spectrophotometry and lc. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 24 (2001) 469–475
64. G. Burgot, F. A&ret, J.-L. Burgot determination of acetaminophen by thermometric titrimetry. *Analytica Chimica Acta* 343 (1997) 125-1 28

65. Erdal Dinç. A comparative study of the ratio spectra derivative spectrophotometry, vierordt's method and high-performance liquid chromatography applied to the simultaneous analysis of caffeine and paracetamol in tablets. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 21 (1999) 723–730
66. Aqel W. Abu-Qare. Mohamed b. Abou-donia a validated hplc method for the determination of pyridostigmine bromide, acetaminophen, acetylsalicylic acid and caffeine in rat plasma and urine. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 26 (2001) 939–947
67. C.W. Huck., W. Guggenbichler, G.K. Bonn. Analysis of caffeine, theobromine and theophylline in coffee by near infrared spectroscopy (nirs) compared to high-performance liquid chromatography (hplc) coupled to mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 538 (2005) 195–203
68. Marie-Sophie Caubet, Walid Elbast, Marie-Claude Dubuc, Jean-Louis brazier analysis of urinary caffeine metabolites by hplc-dad: the use of metabolic ratios to assess cyp1a2 enzyme activity. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 27 (2002) 261–270
69. J. Pura Naik, S. Nagalakshmi. Determination of caffeine in tea products by an improved high-performance liquid chromatography method. *J. Agric. Food Chem.* 1997, 45, 3973-3975
70. Daniel Perrone, Carmen Marino Donangelo, Adriana Farah. Fast simultaneous analysis of caffeine, trigonelline, nicotinic acid and sucrose in coffee by liquid chromatography–mass spectrometry. *Food Chemistry* 110 (2008) 1030–1035



71. X. Xu, J. T. Stewart. Hplc methods for aspirin-caffeinebutalbital and acetaminophencaffeine-butalbital mixtures in tablet dosage forms using non-porous octadecylsilane columns. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol*, 23(5), 769–779 (2000)
72. J. Pura Naik. Improved high-performance liquid chromatography method to determine theobromine and caffeine in cocoa and cocoa products. *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, 3579-3583
73. K. A. Georga, V. F. Samanidou, I. N. Papadoyannis. Improved micro-method for the hplc analysis of caffeine and its demethylated metabolites in human biological fluids after spe. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.* 23(10), 1523–1537 (2000)
74. Huafu Wang, Keith Helliwell, Xiaoqing You. Isocratic elution system for the determination of catechins, caffeine and gallic acid in green tea using hplc. *Food Chemistry* 68 (2000) 115±121
75. Marie-Sophie Caubet, Blandine Comteb, Jean-Louis Brazier. Determination of urinary 13c-caffeine metabolites by liquid chromatography–mass spectrometry: the use of metabolic ratios to assess cyp1a2 activity. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 34 (2004) 379–389
76. Ghada M.Hadad, RandaA.AbdelSalam, RababM.Soliman, MostafaK. Mesbah rapid and simultaneous determination of antioxidant markersand caffeine in commercial teasand dietary supplement tsbyhplc-dad. *Talanta* 101(2012)38–44
77. Hao Li, Chao Zhanga, Jiang Wanga, Yao Jianga, J. Paul Fawcettb, Jingkai Gua. Simultaneous quantitation of paracetamol, caffeine, pseudoephedrine, chlorpheniramine and cloperastine in human plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 51 (2010) 716–722

78. Piero R. Gardinalia, Xu Zhao. Trace determination of caffeine in surface water samples by liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization–mass spectrometry (lc–apci–ms). *Environment International* 28 (2002) 521–528
79. Hideki Horie, Katsunori Kohata. Analysis of tea components by high-performance liquid chromatography and high-performance capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 881 (2000) 425–438
80. Hideki Horie, Katsunori Kohata. Application of capillary electrophoresis to tea quality estimation. *Journal of Chromatography A*, 802 (1998) 219–223
81. N. Maeso, C. del Castillo, L. Cornejo, M. Garc'ia-Acicollar, L.F. Alguacil, C. Barbas. Capillary electrophoresis for caffeine and pyroglutamate determination in coffees study of the in vivo effect on learning and locomotor activity in mice. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41 (2006) 1095–1100
82. Yeping Zhao, Craig E. Lunte\*. Determination of caffeine and its metabolites by micellar electrokinetic capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B*, 688 (1997) 265-274
83. Tuulia Hyötyläinen, Heli Sirén, Marja-Liisa Riekkola. Determination of morphine analogues, caffeine and amphetamine in biological fluids by capillary electrophoresis with the marker technique. *Journal of Chromatography A* 735, 1–2, 31 May 1996, Pages 439–447
84. Qian-Li Zhang, Hong-Zhen Lian, Wei-Han Wang, Hong-Yuan Chen. Separation of caffeine and theophylline in poly (dimethylsiloxane) microchannel electrophoresis with electrochemical detection. *Journal of Chromatography A*, 1098 (2005) 172–176

85. J.P. Aucampa, Y. Harab, Z. Apostolides. Simultaneous analysis of tea catechins, caffeine, gallic acid, theanine and ascorbic acid by micellar electrokinetic capillary Chromatography. *Journal of Chromatography A*, 876 (2000) 235–242
86. Deniz Emre, Nuran Özaltın. Simultaneous determination of paracetamol, caffeine and propyphenazone in ternary mixtures by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Journal of Chromatography B*, 847 (2007) 126–132
87. Erdal Dinç. A comparative study of the ratio spectra derivative spectrophotometry, vierordt's method and high-performance liquid chromatography applied to the simultaneous analysis of caffeine and paracetamol in tablets. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 21 (1999) 723–730
88. Erdal Dinç. Linear regression analysis and its application to the multivariate spectral calibrations for the multiresolution of a ternary mixture of caffeine, paracetamol and metamizol in tablets. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 33 (2003) 605/615
89. David C. Grant Robert J. Helleur simultaneous analysis of vitamins and caffeine in energy drinks by surfactant mediated matrix assisted laser desorption/ionization 5. Kafein spektrofotometri çalışmaları. *Analytical Bioanal Chemistry* (2008) 391:2811–2818
90. M.R. Khoshayand H. Abdollahi M. Shariatpanahi A. Saadatfard, A. Mohammadi. Simultaneous spectrophotometric determination of paracetamol, ibuprofen and caffeine in pharmaceuticals by chemometric methods *Spectrochimica Acta Part A* 70 (2008) 491–499

91. Erdal Dinç, I. M. Palabıyık, Ö. Üstündağ, F. Yurtsever, F. Onur. Simultaneous spectrophotometric determination of chlorphenoxamine hydrochloride and caffeine in a pharmaceutical preparation using first derivative of the ratio spectra and chemometric methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 28 (2002) 591–600
92. Erdal Dinç. Dumitru Baleanu, Feyyaz Onur. Spectrophotometric multicomponent analysis of a mixture of metamizol, acetaminophen and caffeine in pharmaceutical formulations by two chemometric techniques. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 26 (2001) 949–957
93. Erdal Dinç, Dumitru Baleanu, Feyyaz Onur. Spectrophotometric multicomponent analysis of a mixture of metamizol, acetaminophen and caffeine in pharmaceutical formulations by two chemometric techniques. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 26 (2001) 949–957
94. Erdal Dinç. A comparative study of the ratio spectra derivative spectrophotometry, vierordt's method and high-performance liquid chromatography applied to the simultaneous analysis of caffeine and paracetamol in tablets. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 21 (1999) 723–730
95. Erdal Dinç, Dumitru Baleanu, HassanY. Aboul-Enein. Wavelet analysis for the multicomponent determination in a binary mixture of caffeine and propyphenazone in tablets. *IL Farmaco* 59 (2004) 335–342
96. Carla Isabel Rodriguesa, Liliana Marta, Rodrigo Maia, Marco Miranda, Miguel Ribeirinho, Cristina Ma' guaş. Application of solid-phase extraction to brewed coffee caffeine and organic acid determination by uv/hplc. *Journal of Food Composition and Analysis* 20 (2007) 440–448

97. Suresh C. Sharma, Satish C. Sharma, 1, R.C. Saxena, Santosh K. Talwar. Simultaneous spectrophotometric analysis of a ternary mixture of pharmaceuticals assay for meclozine hydrochloride, pyridoxine hydrochloride and caffeine. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 7, 1989, 3, Pages 321–327
98. Ali Reza Khanchi, Mohamad Khayatzadeh Mahani, Majid Hajihosseini, Mohamad Ghanadi Maragheh, Marzieh Chalooosi, Farhad Bani. Simultaneous spectrophotometric determination of caffeine and theobromine in iranian tea by artificial neural networks and its comparison with pls. *Food Chemistry* 103 (2007) 1062–1068
99. Ahmed Ashour, Maha A. Hegazy, Mohamed Abdel-Kawy, Mohammad B. ElZeiny. Simultaneous spectrophotometric determination of overlapping spectra of paracetamol and caffeine in laboratory prepared mixtures and pharmaceutical preparations using continuous wavelet and derivative transform. *Journal of Saudi Chemical Society* (2012)
100. Carola F. Ferreyra, Cristina S. Ortiz. Simultaneous spectrophotometric determination of phenilpropanolamine hcl, caffeine and diazepam in tablets. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 29 (2002) 811–818
101. D.K. Singh, Archana Sahu. Spectrophotometric determination of caveine and theophylline in pure alkaloids and its application in pharmaceutical formulations. *Analytical Biochemistry* 349 (2006) 176–180
102. E. Luque-Pe´rez, A. R´ios, M. Valca´rcel, L.-G. Danielsson, F. Ingman. Spectrophotometric flow injection determination of caffeine in solid and slurry coffee and tea samples using supported liquid membranes. *Laboratory Automation and Information Management* 34 99. 131–142

103. E. Dinç, D. Baleanu. Two new spectrophotometric approaches to the multicomponent analysis of the acetaminophen and caffeine in tablets by classical least-squares and principal component regression techniques. *Il Farmaco* 57 (2002) 33–37
104. Aqel W. Abu-Qare, Mohamed B. Abou-Donia. A validated hplc method for the determination of pyridostigmine bromide, acetaminophen, acetylsalicylic acid and caffeine in rat plasma and urine. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 26 (2001) 939–947
105. Kranthi K. Chebrolu, G.K. Jayaprakasha, Kil Sun Yoo, John L. Jifon, Bhimanagouda S. Patil. An improved sample preparation method for quantification of ascorbic acid and dehydroascorbic acid by hplc lwt. *Food Science and Technology* 47 (2012) 443-449
106. Dini P. Venema, Peter C. H. Hollman, Karin P. L. T. M. Janssen, Martijn B. Katan. Determination of acetylsalicylic acid and salicylic acid in foods, using hplc with fluorescence detection. *J. Agric. Food chem.* 1996, 44, 1762-1767
107. Anette Karlsen, Rune Blomhoff, Thomas E. Gundersen. High-throughput analysis of vitamin c in human plasma with the use of hplc with monolithic column and uv-detection. *Journal of Chromatography B*, 824 (2005) 132–138
108. J.T. Franeta, D. Agbaba, S. Eric, S. Pavkov, M. Aleksic, S. Vladimirov. Hplc assay of acetylsalicylic acid, paracetamol, caffeine and phenobarbital in tablets. *Il Farmaco* 57 (2002) 709/713
109. M.L. Altun, T. Ceyhan, M. Kartal, T. Atay, N. Özdemir, S. .Cevheroğlu. Lc method for the analysis of acetylsalicylic acid, caffeine and codeine phosphate in pharmaceutical preparations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 25 (2001) 93–101

110. Chinmoy Ghosh, Anita Upadhayay, Ajay Singh, Saumya Bahadur, Priya Jain, Bhaswat S. Chakraborty. Simultaneous determination of aspirin and its metabolite from human plasma by uplc-uv detection: application to pharmacokinetic study. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 34: 2011 2326–2338,
111. G. Santoni, L. Fabbri, P. Gratteri, G. Renzi, S. Pinzauti. Simultaneous determination of aspirin, codeine phosphate and propyphenazone in tablets by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *International Journal of Pharmaceutics* 80, 1992 1–3, 25, 263–266
112. I.M. Jalal. Simultaneous determination of dextropropoxyphene napsylate, caffeine, aspirin and salicylic acid in pharmaceutical preparations by reversed-phase hplc. 31, 1984, 11, 1015–1017
113. Hideyuki Matsuura, Arata Aoi, Chizuru Satou, Mino Nakaya, Chikara Masuta, Kensuke Nabeta. Simultaneous uplc ms/ms analysis of endogenous jasmonic acid, salicylic acid, and their related compounds. *Plant Growth Regul* (2009) 57:293–301
114. Michael J. Scotter, Dominic P.T. Roberts, Lesley A. Wilson, Frances A.C. Howard b, June Davis b, Nicholas Mansell. Free salicylic acid and acetyl salicylic acid content of foods using gas chromatography–mass spectrometry. *Food Chemistry* 105 (2007) 273–279
115. Srinivasa Rao Polagani, Nages wara Rao Pilli, Venkates warlu Gandu. High performance liquid chromatography mass spectrometric method for the simultaneous quantification of pravastatin and aspirinin human plasma: pharmacokinetic application. *Journal of Pharmaceutical Analysis* 2012;2(3):206–213

116. L. Novačková, P. Solich, D. Solichová. Hplc methods for simultaneous determination of ascorbic and dehydroascorbic acids. *Trends in Analytical Chemistry*, 27 2008,. 10,
117. Rongzhu Cheng, Qi Feng 1, Beryl J. Ortwerth. Lc-ms display of the total modified amino acids in cataract lens proteins and in lens proteins glycosylated by ascorbic acid in vitro. *Biochimica et Biophysica Acta* 1762 (2006) 533–543
118. Dhananjay D. Shinde, Kwon-Bok Kima, Kyung-Suk Oha, Nagi Abdalla, Kwang-Hyeon Liu, Soo Kyung Bae, Ji-Hong Shon, Ho-Sook Kim, Dong-Hyun Kim, Jae Gook Shin. Lc–ms/ms for the simultaneous analysis of arachidonic acid and 32 related metabolites in human plasma: basal plasma concentrations and aspirin-induced changes of eicosanoids. *Journal of Chromatography B*, 911 (2012) 113–121
119. José Fenoll, Alicia Martínez, Pilar Hellín, Pilar Flores. Simultaneous determination of ascorbic and dehydroascorbic acids in vegetables and fruits by liquid chromatography with tandem-mass spectrometry. *Food Chemistry* 127 (2011) 340–344
120. Yajun Tang, Mingjia Wu. A quick method for the simultaneous determination of ascorbic acid and sorbic acid in fruit juices by capillary zone electrophoresis. *Talanta* 65 (2005) 794–798
121. Marcelo M. Sena, Julio Cesar B. Fernandes, Laércio Rover Jr., Ronei J. Poppi, Lauro T. Kubota. Application of two- and three-way chemometric methods in the study of acetylsalicylic acid and ascorbic acid mixtures using ultraviolet spectrophotometry. *Analytica Chimica Acta* 409 (2000) 159–170



122. Steen Honore' Hansen, Maj Elgin Jensen, Inga Bjørnsdottir. Assay of acetylsalicylic acid and three of its metabolites in human plasma and urine using non-aqueous capillary electrophoresis with reversed electroosmotic flow. *Fl Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 17 (1998) 1155–1160
123. B. Lin Ling, W.R.G. Baeyens, P. Van Ackerb, C. Dewaele. Determination of ascorbic acid and isoascorbic acid by capillary zone electrophoresis: application to fruit juices and to a pharmaceutical formulation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 10, 1992, 10–12, , 717–721
124. Xuemei Sun, Yan Niu, Sai Bi, Shusheng Zhang. Determination of ascorbic acid in individual rat hepatocyte by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Journal of Chromatography B*, 870 (2008) 46–50
125. Sandra Zaugga, Xin Zhangb, Jonathan Sweedlerb, Wolfgang Thormanna. Determination of salicylate, gentisic acid and salicyluric acid in human urine by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*, 752 (2001) 17–31
126. Yoko Goto, Kazutaka Makino, Yasufumi Kataoka, Hideki Shuto, Ryozo Oishi. Determination of salicylic acid in human serum with capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography B*, 706 (1998) 329–335
127. Peng Hea, Yan Niub, Zhen-hua Meia, Jun-fang Baoa, Xue-mei Suna. Measurement of ascorbic acid in single rat peritoneal mast cells using capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Journal of Chromatography B*, 878 (2010) 1093–1097
128. Angelo Zinellu,<sup>1</sup> Ciriaco Carru,<sup>1</sup> Salvatore Sotgia, Luca Deiana. Optimization of ascorbic and uric acid separation in human plasma by free zone capillary electrophoresis ultraviolet detection. *Analytical Biochemistry* 330 (2004) 298–305

129. Stanimirova, M. Daszykowski, E. Van Gyseghem, F.F. Bensaid, M. Lees, J. Smeyers-Verbeke, D.L. Massart, Y. Vander Heyden. Chemometrical exploration of an isotopic ratio data set of acetylsalicylic acid. *Analytica Chimica Acta* 552 (2005) 1–12
130. Erdal Dinç, Abdil Ozdemir, Dumitru Baleanu. Comparative study of the continuous wavelet transform, derivative and partial least squares methods applied to the overlapping spectra for the simultaneous quantitative resolution of ascorbic acid and acetylsalicylic acid in effervescent tablets. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 37 (2005) 569–575
131. Getu Kahsay, Ann Van Schepdael, Erwin Adams. Development and validation of a liquid chromatographic method for purity control of clopidogrel–acetylsalicylic acid in combined oral dosage forms. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 61 (2012) 271–276
132. Alaa El-Gindy, Fawzy El-Yazby, Ahmed Mostafa, Moustafa M. Maher. Hplc and chemometric methods for the simultaneous determination of cyproheptadine hydrochloride, multivitamins, and sorbic acid. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 35 (2004) 703–713
133. Jordi Cruz, Manel Bautista, Jose Manuel Amigo, Marcel Blanco. Nir-chemical imaging study of acetylsalicylic acid in commercial tablets. *Talanta* 80 (2009) 473–478
134. Alberto Navalo'n, Rosario Blanc, Monsalud del Olmo, Jose' Luis Vilchez. Simultaneous determination of naproxen, salicylic acid and acetylsalicylic acid by spectrofluorimetry using partial least-squares (pls) multivariate calibration. *Talanta* 48 (1999) 469–475

135. Ruiz Medina, M.L. Fernandez de Co'rdova, A. Molina-Diaz. Simultaneous determination of paracetamol, caffeine and acetylsalicylic acid by means of a fi ultraviolet pls multioptosensing device. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 21 (1999) 983–992
136. Xue-Zhu Liu, Shu-Sheng Liu, Jin-Feng Wub, Zhao-Lun Fanga. Simultaneous monitoring of aspirin, phenacetin and caffeine in compound aspirin tablets using a sequential injection drug-dissolution testing system with partial least squares calibration. *Analytica Chimica Acta* 392 (1999) 273±281
137. Rosa Lucia Simencio Otero 1, Roberto Kawakami Harrop Galvão, Mário César Ugulino Araújo, Éder Tadeu Gomes Cavalheiro. Thermogravimetric determination of l-ascorbic acid in non-effervescent formulations using multiple linear regression with temperature selection by the successive projections algorithm. *Thermochimica Acta* 2011, 526. 200– 204.
138. Erdal Dinc, Abdil Ozdemir, Dumitru Baleanu an application of derivative and continuous wavelet transforms to the overlapping ratio spectra for the quantitative multiresolution of a ternary mixture of paracetamol, acetylsalicylic acid and caffeine in tablets. *Talanta* 2005, 65. 36–47.
139. Periasamy Umapathi. Determination of atenolol, nifedipine, aspirin and dipyridamole in tablet preparations by second-order derivative spectrophometry. *International Journal of Pharmaceutics* 1994, 108: 11–19.
140. Antonio Ruiz-Medina, Maria L. Ferna'ndez-de Co'rdova, Pilar Ortega-Barrales, Antonio Molina-Di'az. Flow-through uv spectrophotometric sensor for determination of (acetyl)salicylic acid in pharmaceutical preparations. *International Journal of Pharmaceutics* 2001, 216. 95–104.

141. P. Ortega Barrales, M.L. Fernández de Córdoba, A. Molina Díaz Indirect determination of ascorbic acid by solid-phase spectrophotometry. *Analytica Chimica Acta* 1998, 360. 143-152.
142. Julio Cesar L. Alves, Ronei J. Poppi. Simultaneous determination of acetylsalicylic acid, paracetamol and caffeine using solid-phase molecular fluorescence and parallel factor analysis. *Analytica Chimica Acta* 2009, 64: 212–216.
143. Zenon Kokot, Kinga Burda. Simultaneous determination of salicylic acid and acetylsalicylic acid in aspirin delayed-release tablet formulations by second-derivative uv spectrophotometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 1998, 18: 871–875
144. Altair B. Moreira, Iara L.T. Dias, Graciliano O. Neto, Elias A.G. Zagatto, M'arcia M.C. Ferreira, Lauro T. Kubota. Solid-phase spectrofluorimetric determination of acetylsalicylic acid and caffeine in pharmaceutical preparations using partial least-squares multivariate calibration. *Talanta* 2005, 67, 65–69.
145. Airton Vicente Pereira, Orlando Fatibello-Filho. Spectrophotometric flow injection determination of l-ascorbic acid with a packed reactor containing ferric hydroxide. *Talanta* 1998, 47: 11–18
146. Erdal Dinç. The spectrophotometric multicomponent analysis of a ternary mixture of ascorbic acid, acetylsalicylic acid and paracetamol by the double divisor-ratio spectra derivative and ratio spectra-zero crossing methods. *Talanta* 1999, 48. 1145–1157.

147. Erdal Dinç. Chemometric approach to simultaneous chromatographic determination of paracetamol and chlorzoxazone in tablets and spiked human plasma. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 2006, 29: 1803–1822.
148. Cemal Akay, Bülent Gümüşel, Tuncer Değim, Senol Tartılmış, S. Cevheroğlu. Simultaneous determination of acetaminophen, acetylsalicylic acid and ascorbic acid in tablet form using HPLC. *Drug Metabolism and Drug Interactions* 1999, 15,-2-3.
149. J.T. Franeta, D. Agbaba, S. Eric, S. Pavkov, M. Aleksic, S. Vladimirov. HPLC assay of acetylsalicylic acid, paracetamol, caffeine and phenobarbital in tablets. *II Farmaco* 2002. 57, 709-713.

## EKLER

### EK-1. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler
<p><b>Adı Soyadı:</b> Faysal SELİMOĞLU <b>Doğum tarihi:</b> 07.07.1976 <b>Doğum yeri:</b> Erzurum - Merkez <b>Medeni hali:</b> Evli <b>Uyruğu:</b> T.C. <b>Adres:</b> Gazi Cad. Tunahan Evleri Bizim Ülker Sitesi 6 M Blok Kat 12 NO:45 5. Etap Eryaman/Etimesgut ANKARA <b>Tel:</b> 0312 283 22 41 <b>GSM:</b> 0530 645 84 97 <b>E-mail:</b> faysalselimoglu@gmail.com, fselimoglu@tppd.gov.tr</p>
Eğitim
<p><b>Lise:</b> Erzurum Anadolu Lisesi <b>Lisans:</b> Atatürk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi <b>Yüksek lisans:</b> Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı (2002–2005) <b>Doktora:</b> Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı (2005–2013)</p>
Yabancı Dil Bilgisi
<p>İngilizce: İyi derecede</p>
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar
İlgi Alanları ve Hobiler

## EK-2. ETİK KURUL ONAY FORMU

### “2010.4.1/19“ SAĞLIK BİLİMLERİ ETİK KURUL KARARI 23.09.2010

4.1/19 - Enstitümüz **Analitik Kimya** Anabilim Dalı **Doktora** öğrencisi **Faysal SELİMOĞLU** 'nun “ **Parasetamol İçeren Kombine Farmasötik Preparatların UPLC Yöntemi İle Kantitatif Analizi** ” tez konusu görüşüldü;  
İlgilinin tez konusunun etik değerlere uygun olduğu mevcudun oybirliği ile karar verildi.



Prof. Dr. Türkan PASİNLİOĞLU  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurul Başkanı

Başkan Yardımcısı  
Prof. Dr. Funda BAYINDIR  
(Katılmadı)

ÜYE  
Prof. Dr. İsmail CEYLAN

ÜYE  
(Katılmadı)  
Prof. Dr. Mustafa ATASEVER

ÜYE  
Prof. Dr. H.İnci GÜL

ÜYE  
(Katılmadı)  
Prof. Dr. Zekeriya AKTÜRK

ÜYE  
Doç. Dr. Hakan ÜSLU

ÜYE  
Doç. Dr. Abdulkadir YILDIRIM

ÜYE  
Yrd. Doç. Dr. İlhan ŞEN (Raportör)