

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

**METRONİDAZOL, MİKONAZOL VE LİDOKAİN'İN
FARMASÖTİK PREPARATTAN AYNI ANDA ANALİZİ İÇİN
YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ (HPLC)
YÖNTEMİNİN GELİŞTİRİLMESİ**

Uzm. Kim. ÇAĞRI TALAY

**Analitik Kimya Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ANKARA
2022**

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

**METRONİDAZOL, MİKONAZOL VE LİDOKAİN'İN
FARMASÖTİK PREPARATTAN AYNI ANDA ANALİZİ İÇİN
YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ (HPLC)
YÖNTEMİNİN GELİŞTİRİLMESİ**

Uzm. Kim. ÇAĞRI TALAY

**Analitik Kimya Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Ayşegül DOĞAN**

**ANKARA
2022**

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
METRONİDAZOL, MİKONAZOL VE LİDOKAİN' İN FARMASÖTİK PREPARATTAN AYNI
ANDA ANALİZİ İÇİN YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ (HPLC)
YÖNTEMİNİN GELİŞTİRİLMESİ
Öğrenci: Çağrı Talay
Danışman: Doç. Dr. Ayşegül Doğan

Bu tez çalışması 03.06.2022 tarihinde jürimiz tarafından "Analitik Kimya Programı"nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: *Prof. Dr. Nursabah E. Başcı Akduman*
Hacettepe Üniversitesi

Tez Danışmanı: *Doç. Dr. Ayşegül Doğan*
Hacettepe Üniversitesi

Üye: *Prof. Dr. Sedef Kır*
Hacettepe Üniversitesi

Üye: *Prof. Dr. İncilay Süslü*
Hacettepe Üniversitesi

Üye: *Prof. Dr. İ. Murat Palabıyık*
Ankara Üniversitesi

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

27 Haziran 2022

Prof. Dr. Müge YEMİŞCİ ÖZKAN
Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan “**Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge**” kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- o Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- o Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 0 ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- o Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir.

...../...../.....

Uzm. Kim. Çağrı TALAY

1 “Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

- (1) *Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.*
- (2) *Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.*
- (3) *Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, tezin yapıldığı kurum tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü veya fakültenin uygun görüşü üzerine üniversite yönetim kurulu tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir. Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir*

** Tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.*

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Doç. Dr. Ayşegül DOĞAN danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Uzm. Kim. Çağrı TALAY

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasında beni her zaman destekleyen, süreç içerisinde bilgi, deneyim, yardım ve tavsiyeleri ile yol gösteren, danışmanım Doç. Dr. Ayşegül DOĞAN'a,

Tüm yaşamım boyunca ve her koşulda bana destek veren, sevgisini ve varlığını her daim hissettiğim annem Ismahan Talay'a, babam Aziz Ahmet Talay'a, kardeşim Çağla Talay'a,

Tanıştığımız günden bu yana desteklerini esirgmeden sabır gösteren hem iyi hem kötü zamanlarda yanımda olan değerli eşim Gonca Talay'a,

Destek ve yardımları ile önemli katkıları sunan Drogosan İlaçları Ar-Ge personeline,

Etkin ve yardımcı maddelerin sağlanması, analitik cihaz, ekipman ve tez çalışmasında kullanılan yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) cihazının her daim kullanıma açılmasını sağlayan başta Drogosan İlaçları San. ve Tic. A.Ş olmak üzere, Drogosan İlaçları Fabrika-Ar-Ge Direktörü Mustafa Arısoy'a, Drogosan İlaçları Ar-Ge Müdür Mehtap Saydam'a, Drogosan İlaçları Ar-Ge Analitik Birim Yöneticisi Yasemin Dolaksız'a, sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

ÖZET

Talay, Ç. Metronidazol, Mikonazol Ve Lidokain'in Farmasötik Preparattan Aynı Anda Analizi İçin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Yönteminin Geliştirilmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2022. Bu tez kapsamında, *Candida albicans*'in oluşturduğu kandidal vulvovajinit, *Gardnerella vaginalis* ve anaerob bakterilerin oluşturduğu bakteriyel vajinoz ve *Trichomonas vaginalis*'in oluşturduğu trikomonal vajinit ile karma vajinal enfeksiyonların tedavisinde kullanılan Metronidazol, Mikonazol ve Lidokain etken maddelerini içeren farmasötik preparattan aynı anda analizi için yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile analiz yöntemi geliştirme ve validasyonu çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Analiz yönteminde, sabit faz olarak, ACE C18 250 x 4.6 mm 5 µm kolon tercih edilmiş olup, hareketli faz olarak tercih edilen 35 mM amonyum asetat ve metanol gradient sistemi ile 1.3 mL/dk akış hızında analitler elue edilmiştir. Ultraviyole detektörde 230 nm dalga boyunda gerçekleştirilen çalışmada Metronidazol, Lidokain, Mikonazol alıkonma zamanları sırasıyla 3.3 dk, 12.1 dk ve 17.3 dk'dır. Geliştirilen yöntemler ICH Q2(R1) analitik yöntem validasyon parametreleri baz alınarak gerçekleştirilmiş olup, kararlılık, özgünlük, doğrusallık, doğruluk, geri kazanım, gözlenebilme sınırı (LOD), tayin alt sınırı (LOQ), kesinlik, tekrarlanabilirlik, sağlamlık, tutarlılık parametreleri esas alınmıştır. Doğrusallık aralıkları, Metronidazol için 75 µg/mL – 1125 µg/mL, Lidokain HCl için 10 µg/mL – 150 µg/mL, Mikonazol nitrat için 20 µg/mL – 300 µg/mL olarak bulunmuştur. Gözlenebilme sınırları, Metronidazol için 0.39 µg/mL, Lidokain HCl için 1.72 µg/mL, Mikonazol nitrat için 0.82 µg/mL ölçülürken, alt tayin sınırı, Metronidazol için 1.17 µg/mL, Lidokain HCl için 5.21 µg/mL, Mikonazol nitrat için 2.47 µg/mL olarak tespit edilmiştir. Geliştirilen yöntemin validasyon çalışmaları sonuçları neticesinde, doğru, kesin, özgün, duyarlı, tutarlı ve sağlam olduğu ispatlanmıştır. Valide edilen yöntem ile piyasadan temin edilen, her üç etken maddeyi içeren farmasötik preparat analiz edilmiş ve birim dozda olması gereken etken madde miktarının güvenilirliği kanıtlanmıştır.

Anahtar Kelimeler Metronidazol, Mikonazol, Lidokain, HPLC, Vajinal tablet

ABSTRACT

Talay, Ç. Development of High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Method For Simultaneous Analysis Of Metronidazole, Miconazole and Lidocaine Mixture from Pharmaceutical Preparation, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences, Analytical Chemistry Program, Master Thesis, Ankara, 2022. In this thesis, high performance liquid chromatography (HPLC) for simultaneous analysis of the pharmaceutical product containing Metronidazole, Miconazole and Lidocaine active ingredients used in the treatment of candidal vulvovaginitis caused by *Candida albicans*, bacterial vaginosis caused by *Gardnerella vaginalis* and anaerobic bacteria, and trichomonal vaginitis caused by *Trichomonas vaginalis* and mixed vaginal infections, method development and validation studies were carried out with. In the analysis method, ACE C18 250 x 4.6-5 μ m column was preferred as the stationary phase, and the analytes were eluted with the 35 mM Ammonium Acetate and Methanol gradient system preferred as the mobile phase at a flow rate of 1.3mL/min. In the study 230 nm wavelength was carried out at with the ultraviolet detector. Metronidazole, Lidocaine, Miconazole, retention times are 3.3 min, 12.1 min and 17.3 min, respectively. The developed methods were based on ICH Q2 (R1) analytical method validation parameters, which are stability, specificity, linearity, accuracy, recovery, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), precision, repeatability, robustness, ruggedness parameters. Linearity ranges for all three substances were found as 75 μ g/mL – 1125 μ g/mL for Metronidazole, 10 μ g/mL – 150 μ g/mL for Lidocaine HCl, 20 μ g/mL – 300 μ g/mL for Miconazole nitrate. Limit of detection (LOD) were calculated as 0.39 μ g/mL for Metronidazole, 1.72 μ g/mL for Lidocaine HCl, 0.82 μ g/mL for Miconazole nitrate, while the limit of quantification (LOQ) was detected that 1.17 μ g/mL for Metronidazole, 5.21 μ g/mL for Lidocaine HCl, and 2.47 μ g/mL for Miconazole nitrate. As a result of the validation studies for developed method, it has been found to be accurate, precise, original, sensitive, consistent and robust. With the validated method, the pharmaceutical product containing all three active substances obtained from the market was analyzed and the reliability of the amount of active substance required in a unit dose was proven.

Key Words: Metronidazole, Miconazole, Lidocaine, HPLC, Vaginal tablet

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xiv
TABLolar	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Nitroimidazol Türevi Antibakteriyeller	3
2.2. Yüzey MikoZ Tedavisinde Kullanılan Antifungallar	4
2.3. Amid Türevi Lokal Anestezik İlaçlar	5
2.4. Tez Kapsamında İncelenecek Etkin Maddeler	6
2.4.1. Metronidazol'ün Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	7
2.4.2. Mikanazol'ün Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	9
2.4.3. Lidokain'in Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	10
2.5. Metranidazol, Lidokain ve Mikanazol Kombinasyonun Kontrendikasyonları	13
2.6. Kromatografik Sınıflandırma	13
2.6.1. Adsorbsiyon Kromatografisi	15
2.6.2. Dağılma Kromatografisi	15
2.6.3. İyon Çifti Kromatografisi	16
2.6.4. İyon Değişirme Kromatografisi	17
2.6.5. Eleme Kromatografisi	18
2.6.6. Afinite Kromatografisi	18
2.7. Kromatografik Çalışmalarda Temel Parametreler	19
2.7.1. Alıkonma Zamanı	19
2.7.2. Kapasite Faktörü	19
2.7.3. Seçicilik	20

2.7.4. Teorik Tabaka Sayısı	20
2.7.5. Ayırıcılık	21
2.7.6. Pik Simetrisi	22
2.7.7. Hareketli Faz Bileşiminin Ayırma Etkisi	23
2.8. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)	24
2.8.1. Pompa ve Degazör	25
2.8.2. Enjektörler	25
2.8.3. Hareketli Faz	25
2.8.4. Kolonlar	26
2.8.5. Dedektörler	26
2.8.6. Veri Toplama, İşleme ve Kontrol	27
3. GEREÇ VE YÖNTEM	28
3.1. Çalışmada Kullanılan Gereçler	28
3.1.1. Cihazlar	28
3.1.2. Kimyasallar	28
3.1.3. Cam ve Sarf Malzemeler	29
3.1.4. Kullanılan İstatiksel Yöntemler ve Yazılımlar	29
3.1.5. Analizi Yapılan Farmasötik Preparat	30
3.2. Deney için Gerekli Hazırlıklar	30
3.2.1. Etkin Madde Saflığı	30
3.2.2. Çözelti Hazırlama	30
3.2.3. Farmasötik Preparatın Analize Hazırlanması	31
3.2.4. Plasebo Hazırlığı	31
3.2.5. Malzemelerin Temizliği	32
3.3. HPLC Analiz Yönteminin Geliştirilmesi	32
3.3.1. Analizinin Yapılışı ve Kromatografik Koşulların Saptanması	32
3.3.2. Analizinin Yönteminin Validasyon Çalışması	33
3.3.3. Analiz Yönteminin Farmasötik Preparatta Uygulanması	37
3.3.4. Sistem Uygunluk Testleri	38
4. BULGULAR	39
4.1. Metranidazol, Lidokian ve Mikonazol için Dalga Boyu Taraması	39
4.2. HPLC Sistem Optimizasyonu	40

4.2.1. Sabit Faz	40
4.2.2. Hareketli Fazların ve Gradient Sistemin Belirlenmesi	42
4.2.3. Hareketli Faz A'nın pH'sının Belirlenmesi	48
4.2.4. Akış Hızının Belirlenmesi	48
4.2.5. Enjeksiyon Hacminin Belirlenmesi	49
4.3. HPLC Yöntem Validasyonu	51
4.3.1. Analitik Çözeltilerin Kararlılığı	51
4.3.2. Özgünlük	52
4.3.3. Kalibrasyon Eğrileri ve Doğrusallık Aralıkları	57
4.3.4. Doğruluk ve Geri Kazanım	62
4.3.5. Gözlenebilme Sınırı ve Tayin Alt Sınırı (LOD ve LOQ)	64
4.3.6. Kesinlik ve Tekrarlanabilirlik	65
4.3.7. Sağlamlık ve Tutarlılık	67
4.4. HPLC ile Farmasötik Preparatın Analizi	69
4.5. Sistem Uygunluk Testleri	69
5. TARTIŞMA	70
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	75
7. KAYNAKLAR	77
8. EKLER	
EK 1. Korrelasyon Katsayısı ve Doğrusallıktan Ayrılış Önem Kontrolü	
EK 2. İstatistiksel Katsayıların Hesaplanması	
EK-3. t – Testi	
EK-4. Wilcoxon Eşleştirilmiş İki Örnek Testi	
EK-5. Kruskal Wallis Varyans Analizi	
EK 6- Sertifikalar	
EK-7. Turnitin Ekran Görüntüsü	
EK-8: Dijital Makbuz	
9. ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR

ACN	Asetonitril
BH	Bağıl Hata
BSS	Bağıl Standart Sapma
C₂H₇NO₂	Amonyum Asetat
CNS	Central Nervous System, Merkezi Sinir Sistemi
CVS	Cardiovascular System, Kardiyovasküler sistem
DAD	Dizi diyot detektör
dk	Dakika
GA	Güven aralığı
H	Eşdeğer teorik tabaka yüksekliği
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
IR	İnfrared
k'	Kapasite faktörü
Lidokain	Ld
LOD	Gözlenebilme sınırı
LOQ	Tayin alt sınırı
M	Molar
MeOH	Metanol
Metronidazol	Mt
mg	Miligram
Mikonazol	Mk
mL	Mililitre
mM	Milimolar
N	Teorik tabaka sayısı
ng	Nanogram
P	Pik simetri oranı
r	Korelasyon katsayısı

R²	Tanımlayıcılık katsayısı
Rs	Ayırıcılık
S / G	Sinyal / Gürültü
SH	Standart Hata
SS	Standart Sapma
t_R	Alıkonma zamanı
UV	Ultraviyole (Morötesi)
UV/GB	Ultraviyole/Görünür Bölge
V₀	Ölü hacim
α	Seçicilik
μL	Mikro litre

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Mt'nin molekül yapısı	7
2.2. Mk'nin molekül yapısı	9
2.3. Ld'nin molekül yapısı	10
2.4. Eleme yöntemi ile yüksek ve düşük molekül ağırlığına sahip moleküllerin ayrılmasının şematik gösterimi.	18
2.5. Kapasite faktörü hesabında kullanılan değişkenlerin gösterimi.	20
2.6. Alıkonma zamanı ve pik genişliği şematik gösterimi.	21
2.7. Pik simetri oranı şematik gösterimi.	23
2.8. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) cihazının temel bölümleri.	24
4.1. Standart çözeltisi absorpsiyon spektrumları.	39
4.2. Optimum dalga boyu tespiti.	40
4.3. C ₈ ve C ₁₈ sabit fazlarının Mt, Ld HCl, Mk nitrat sistem uygunluk parametreleri üzerindeki etkisi grafiği.	41
4.4. Hareketli faz A derişiminin, Mt, Ld, Mk nitrat sistem uygunluk parametreleri üzerindeki etkisi.	43
4.5. Hareketli faz oranlarının Mt piki sistem uygunluk parametreleri üzerindeki etkisi (t=0 ile t=7.dk için).	44
4.6. Pik simetrisi üzerinde asetonitril ve metanol etkisi.	45
4.7. Hareketli faz B % oranının Ld piki sistem uygunluk parametreleri üzerindeki etkisi (t=7 ile t=20.dk için).	46
4.8. Hareketli faz B % oranının Mk nitrat piki sistem uygunluk parametreleri üzerindeki etkisi (t=20 ile t=25.dk için).	47
4.9. Hareketli faz A pH'sının sistem uygunluk parametreleri üzerindeki etkisi.	48
4.10. Akış hızının sistem uygunluk parametreleri üzerindeki etkisi.	49
4.11. Enjeksiyon hacminin sistem uygunluk parametreleri üzerindeki etkisi.	50
4.12. Standart çözeltisi kromatogramı.	53
4.13. Seyreltme çözeltisi kromatogramı.	53
4.14. Plasebo çözeltisi kromatogramı.	54
4.15. Farmasötik preparat çözeltisi kromatogramı.	54
4.16. Mt plasebo çözeltisi kromatogramı.	55
4.17. Mk nitrat plasebo çözeltisi kromatogramı.	55
4.18. Ld HCl plasebo plasebo çözeltisi kromatogramı.	56

4.19.	Mt (a), Ld HCl (b), Mk nitrat (c) piklerinin saflıklarının gösterimi.	57
4.20.	Mt kalibrasyon eğrisi (75 µg/mL – 1125 µg/mL).	58
4.21.	Ld HCl kalibrasyon eğrisi (10 µg/mL – 150 µg/mL).	58
4.22.	Mk Nitrat kalibrasyon eğrisi (20 µg/mL – 300 µg/mL).	59
4.23.	Mt, Ld HCl, Mk nitrat doğrusallık kontrol grafikleri.	60
4.24.	LOD (a) ve LOQ (b) derişimlerinde hazırlanan standart çözeltileri kromatogramları çözeltileri.	64

TABLOLAR

Tablo	Sayfa
3.1. Plasebo yardımcı madde miktarları.	31
3.2. Sistem uygunluk limitleri (84, 85)	38
4.1. C ₈ ve C ₁₈ sabit fazların maddelerin sistem uygunluk özellikleri üzerindeki etkisi	41
4.2. Hareketli faz A derişiminin etkisi	42
4.3. Hareketli faz % oranlarının belirlenmesi (İlk 7 dk için).	44
4.4. Hareketli faz % oranlarının belirlenmesi (7 dk ile 20. dk arası için).	45
4.5. Hareketli faz % oranlarının belirlenmesi (20 dk ile 25. dk arası için).	46
4.6. Gradient sistemi deneme çalışmaları sonrası belirlenen zaman bağı % hareketli faz oranları.	47
4.7. Filtre türü seçimi	51
4.8. Filtre içi uyum kontrolü.	51
4.9. Analitik çözeltilerin kararlılık çalışması sonuçları.	52
4.10. Mt'nin doğrusallık ve kalibrasyon önemi kontrolü.	61
4.11. Ld HCl'in doğrusallık ve kalibrasyon önemi kontrolü.	61
4.12. Mk Nitrat'ın doğrusallık ve kalibrasyon önemi kontrolü.	61
4.13. Analiz yöntemi doğrusallık grafiğı üzerinden elde edilen veriler.	62
4.14. Mt doğruluk ve geri kazanım sonuçları.	62
4.15. Ld HCl doğruluk ve geri kazanım sonuçları.	63
4.16. Mk Nitrat doğruluk ve geri kazanım sonuçları.	63
4.17. Duyarlılık testi sonuçları.	65
4.18. Analiz yöntemin tekrarlanabilirlik sonuçları.	65
4.19. Analiz yöntemin ara kesinlik sonuçları.	66
4.20. Analiz yöntemi sağlamlık çalışması sonuçları.	67
4.21. Tutarlılık testi sonuçları.	68
4.22. Exagyn® tablet etken maddelerin miktar tayini sonuçları.	69
4.23. Sistem uygunluk testi sonuçları.	69
6.1. Analitlerin alıkonma zamanları.	75

1. GİRİŞ

Metronidazol (Mt), Mikonazol (Mk) ve Lidokain (Ld), *Candida albicans*'in oluşturduğu kandidal vulvovajinit, *Gardnerella vaginalis* ve anaerob bakterilerin oluşturduğu bakteriyel vajinoz ve *Trichomonas vaginalis*'in oluşturduğu trikomonal vajinit ile karma vajinal enfeksiyonların tedavisinde kullanılır (1). Mt yapı olarak nitroimidazol türevidir. Bilinen diğer nitroimidazol türevi dar spektrumlu antibiyotikler (ornidazol ve tinidazol) gibi, anaeroblar, protozonlar ve bazı helmitlere karşı etkilidirler. Abse, yumuşak doku enfeksiyonları, oral ve dental enfeksiyonlarda da Mt kullanılabilir. *Clostridium Diffivile*'in oluşturduğu psödomembranöz enterokolitte için ilk tercihtir. Ek olarak, tek başına veya betalaktam antibiyotiklerle kombine edilerek jinekolojik operasyonlar ve apendektomi profilaksisinde tercih edilebilir (2). Mk, fenetil imidazol türevi olan azol gurubu bir bileşiktir. Gram pozitif bakterilere karşı endike geniş spektrumlu azol antifungaldır. Oral ve vajinal enfeksiyonlarda sıklıkla kullanılırken, mukozal maya enfeksiyonları tedavilerinde de tercih edilir. İntravenöz uygulaması olmasa da krem, jel ve tablet ticari ürünleri mevcuttur (3). Ld, pek çok çeşitli tıbbi prosedürler için güçlü ve güvenli bir lokal anestetiktir. İlk olarak, 60 yıl öncesinde piyasaya sürülmesine rağmen halen, mukozal, kas içi, rektal, transdermal ve vajinal uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (4, 5)

Mt'ün yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile tabletten (6), süspansiyondan (7), idrardan (8), sıçan midesinde (9) ve UV spektrofotometrisi ile de tabletten analizleri mevcuttur (10).

Mk 'ünde Mt'de olduğu gibi çeşitli farmasötik formlardan HPLC ile tek başına ve diğer etken maddeler ile kombine şekilde analizleri mevcuttur. Vajinal fitillerden (11), kremden (12), toz numunelerinden (13), topikal kullanım sonucu biyoyararlanım tespiti için (14) analizleri olduğu gibi, UV spektrofotometrisi ile tabletten analizi de literatürde bulunmaktadır (15) .

Ld'in HPLC yöntemi ile jelden (16), insan serumundan (17), kas içi uygulama için hazırlanmış parenteral farmasötik preparattan (18), enjeksiyonluk çözelti içeriğinden (19), lokal anestetik kremden (20) analizleri mevcuttur. Ayrıca merhemden ultraviyole (UV) spektrofotometrisi ile analizi de vardır (21).

Mt ve Mk 'ün birlikte aynı anda ters faz HPLC yöntemi ile vajinal ovülden analizi mevcuttur (22). Mk ve Ld'nin de HPLC ile aynı anda oral jel formdaki farmasötik preparattan analizleri mevcuttur (23).

Mt, Mk ve Ld etkin maddelerinin, tek başına veya ikişerli kombine halde analizleri bulunurken, üçünün yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile aynı anda analizi kaynaklarda bulunmamaktadır. Bu sebeple, bu tez çalışması kapsamında: her üç etkin maddenin, yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile aynı anda analizi için kromatografik koşullar optimize edilerek, farmasötik preparattan analizine olanak sağlayan HPLC yöntemi geliştirilecektir. Geliştirilen analiz yöntemi, rutin analiz için uygunluk ve güvenilirliğinin kanıtlanması amacıyla valide edilecektir. Bu tez çalışması çerçevesinde, geliştirilen ve valide edilen yöntemin farmasötik preparata da uygulanabilirliği test edilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Nitroimidazol Türevi Antibakteriyeller

1955'te Paris'teki Rhone-Poulenc araştırma çalışanları tarafından, Streptomyces türünden izole edilen bir antibiyotik kompleksinin trikomonasidal azomisin içerdiğinde bulunan 2-nitroimidazol olarak tanımlanmış olan bu molekül grubunun, sentezlenmesi ve akabinde aktivitesinin test edilmesi çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Daha aktif antiprotozoal nitroimidazol türevi olduğu keşfedilen 5-nitroimidazol üzerine etkinlik testleri gerçekleştirilmiştir (24, 25). Bu çalışmaların ardından, 5-nitroimidazol'un 150 farklı türevinin yer aldığı moleküller arasından en öne çıkanının, nitroimidazol türevi olan, Mt olduğu tespit edilmiştir (26).

Nitroimidazoller anaeroblar ve protozoonlara endike antibiyotiklerdir ve etkilerini intrasellüler kimyasal reaksiyona girerek gösterirler. Antibakteriyel etkili etkin maddeler günümüzde oldukça sık olarak bakteri enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılmaktadır (27).

Mt, dünya çapında anaerobik enfeksiyonların tedavisinde temel olarak kullanılan ve Dünya Sağlık Örgütü tarafından "temel ilaçlar" kategorisinde yer alan bir 5-nitroimidazol ilacıdır (28). 1959'da özel olarak, o zamanlar tedavisi çok zor olan mikroaerofilik parazit *Trichomonas Vaginalis*'in neden olduğu genital sistem enfeksiyonu olan *Trichomoniasis* tedavisi için geliştirilmiştir (29).

Mt etkisinin birbirini takip eden üç adımdan oluştuğuna inanılmaktadır (30):

- İlacın hedef hücrelere girişi,
- İndirgeme işlemi ile aktivasyonu,
- İndirgenmiş ürün üzerinde toksik etki

5 nitroimidazolün nitro grubunun indirgenmesi, DNA ile etkileşerek duyarlı bakterileri öldüren toksik türevlerin oluşumuyla sonuçlanır. Anaerobik organizmalarda Mt'nin indirgenmesi büyük olasılıkla tek elektronlu bir adımda gerçekleşir ve ilk önce bir serbest radikal anyon oluşumuna yol açtığı varsayılır (30, 31).

2.2. Yüzey Mikoz Tedavisinde Kullanılan Antifungallar

Mantarların hastalığa sebep olduğu bakterilerden çok daha önce bilim insanları tarafından tespit edilmiş ve kayıtlara hastalığa sebep olan ilk organizma olarak geçmiştir. 1665’lerde oral *Candida Albicans* enfeksiyonu belirtisi olan pamukçuğun sebep olduğu hastalık veri kayıtları da, mantarların sebep olduğu hastalıkların tespitinde ne kadar eski bilimsel çalışmalar olduğunu göstermektedir (32).

Antifungal ilaçlar iki temel grup halinde incelenirler (33):

- Subkutan ve sistemik mikoz tedavisinde kullanılanlar
 - Örnekler:
 - Amfoterisin B
 - Kaspofungin
 - Flukonazol
 - Ketokonazol
- Yüzeysel mikoz tedavisinde kullanılanlar
 - Örnekler:
 - Butokonazol
 - **Mikonazol**
 - Terkonazol
 - Nistatin
 - Ekonazol

Sentetik bir imidazol antifungal olan ve yüzeysel mikotik enfeksiyon tedavisinde kullanılan ilaç gurubunda yer alan Mk’nın topik uygulamaları mevcut olup, yüksek toksisite sebebiyle nadiren parenteral uygulamaları mevcuttur (33, 34). Ayrıca *Candida Albicans* ve non-albicans *Candida*’lar üzerinde geniş spekturuma sahiptir (34).

Mk topikal ve intravajinal olarak kullanılan imadazol yapılı antifungal bir ilaçtır. İmidazol grubu diğer antifungal ilaçlar klotrimazol, ekonazol, fentikonazol, izokonazol, ketokonazol, solkonazol ve tiakonazol’dür. Sayılan tüm bu ilaçlar gibi Mk ’nın antifungal spektrumu da geniştir. Başlıca endikasyonu vajinal kandidiyazis ve dermatofit enfeksiyonlarıdır. Ayrıca, ağız ve bağırsaktaki enfeksiyonların tedavisi için

oral yoldan da kullanılabilir. Diğer azol yapılı antifungal ilaçlar gibi, Mk de mantar hücre membranı üzerinde etki gösterir (35).

Mk intravajinal olarak uygulandığında sistemik olarak çok az absorbe olur. *Vulvovajinal Kandidiyazis* tedavisi için 6 gün uygulandıktan sonra, ortalama serum doruk derişimi 4.2 ng/mL olarak ölçülmüştür. Proteinlere bağlanma oranı %91-93 kadardır. Esas olarak karaciğerde metabolize edilir. Absorbe olan Mk idrar ve feçesle atılır (35, 36).

2.3. Amid Türevi Lokal Anestezik İlaçlar

Lokal anestezikler (LA'ler), uygulandıkları bölgedeki ağrı hissini bloke eden ilaçlardır. LA'ler, sinir liflerinin sodyum kanallarını geri dönüşümlü olarak bloke ederek etki eder, böylece sinir uyarılarının iletimini engeller. Ağrı duyusunu taşıyan sinir lifleri en küçük çapa sahiptir ve LA'lar tarafından ilk bloke edilenlerdir. Etki süresine ve kullanılan LA'nın dozuna bağlı olarak motor fonksiyon kaybı ve dokunma ve basınç hissi takip eder. LA'lar lokal anestezi sağlamak için deri/deri altı dokulara veya bölgesel anestezi sağlamak için epidural/subaraknoid boşluğa infiltre edilebilir (örneğin, spinal anestezi, epidural anestezi, vb.). Bazı LA'lar (Ld, prilokain, tetrakain) topikal uygulamada etkilidir ve minör invaziv prosedürlerden (venponksiyon, mesane kateterizasyonu, endoskopi/laringoskopi) önce kullanılır. Amid grubu (Ld, prilokain, mepivakain, vb.) daha güvenlidir ve bu nedenle klinik uygulamada daha yaygın olarak kullanılır. Ester grubu (prokain, tetrakain) alerjik reaksiyonlara veya sistemik toksisiteye neden olma riski daha yüksektir ve bu nedenle amid grubu ilaçlara alerjisi olduğu bilinen hastalar için ayrılmıştır. Bir kan damarına aşırı dozda veya yanlışlıkla LA enjeksiyonu, esas olarak CNS'yi (kulak çınlaması, nöbetler, vb.) ve CVS'yi (bradikardi, aritmiler, vb.) etkileyen sistemik toksisiteye neden olabilir (37, 38).

Lokal anesteziklerin ideal özellikleri (38, 39):

- Dokuları tahriş etmez ve kalıcı hasara yol açmaz.
- Düşük sistemik toksisite
- İster dokuya enjekte edilsin, ister lokal olarak deriye veya mukoz membranlara uygulansın, etkilidir
- Hızlı anestezi başlangıcı ve kısa etki süresi

Lokal anesteziklerin sınıfları (37, 39)

- Amit Tipi
 - Uzun Etki: Bupivakain, levo-Bupivakain, Etidokain, Ropivakain, Dibukain
 - Kısa Etki: **Lidokain**, Mepivakain, Prilokain
- Ester Tipi
 - Uzun Etki: Tetrakain
 - Orta Vadeli Etki: Kokain
 - Kısa Etki: Prokain, Kloroprokain, Benzokain, Betambenm Proparakain
- Diğer
 - Pramoksin (Pramokain), Diklonin, Oksetakain

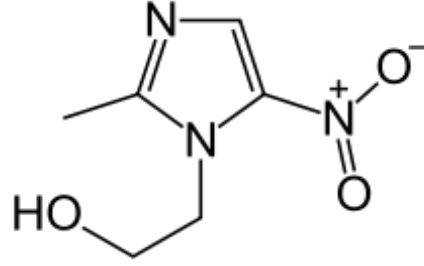
Ld yaygın olarak kullanılan bir lokal anesteziktir. Lokal anestezik etkisi için kullanılmak üzere merhem, jel, sprey veya oral çözeltileri ile lokal anesteziye özel enjektabl preparatları vardır. Oral (ağıza topikal olarak), parenteral veya perkütan yoldan uygulanır. Oral verilmesini takiben hemen hemen bütünüyle absorbe olur, fakat karaciğerde yoğun bir ilk geçiş metabolizmasına uğrar ve bu nedenle sistemik biyoyararlanımı sadece %35 düzeylerinde kalır. Sistemik etki için oral yoldan kullanılmamasına rağmen, ağızda topikal uygulama için hazırlanmış konsantre oral çözeltilerinin bir bölümünün sistemik absorpsiyonu mümkündür. Karaciğerde kapsamlı bir şekilde iki aktif bileşiğe metabolize olur. Bunlardan biri Ld kadar güçlü aktivite gösteren monoetilglisineksilidid, diğeri ise Ld'nin ancak %25'i kadar aktivite gösteren glisineksilidid'tir. Sağlıklı bireylerdeki başlangıç yarı ömrü 7-30 dk, terminal yarı ömrü ise 1.5-2 saattir. Mukoz membranlara topikal olarak uygulandığında etkisi 1-2 dk içinde başlar ve 30-60 dk kadar devam eder (42).

2.4. Tez Kapsamında İncelenecek Etkin Maddeler

Bu tez kapsamında, bir antibakteriyel ve antiprotozoal olan Mt, antifungal olan Mk ve lokal antestetik olan Ld, farmasötik preparatlardan birarada analizleri için yöntem geliştirilmesi amacıyla incelenecektir.

2.4.1. Metronidazol'ün Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri (43, 44)

Mt beyazdan açık sarıya değişen renkte kristal yapıda toz veya kristaller halinde bulunur. İngiliz Farmakopesi (BP)'ne göre, su, alkol, aseton ve metilen klorürde hafifçe çözünür; eterde çok hafif çözünür. Amerikan Farmakopesi (USP)'ye göre enjektabl çözeltisinin pH'sı 4.5 ile 7.0 arasında değişir. log P değeri -0.02'dir (45).



Şekil 2.1. Mt'nin molekül yapısı

Molekül formülü $C_6H_9N_3O_3$, 2-(2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-yl)ethanol (Şekil 2.1), molekül ağırlığı 171.15g/mol ve erime noktası 159 - 163 °C olan Mt molekülünün yapısı Şekil 2.1.'de gösterilmiştir.

Farmakolojisi (45, 46)

Mt sentetik antibakteriyel ve antiprotozoal bir ilaçtır. Kimyasal yapısı bakımından nitroimidazol sınıfına girer. *Trichomonas Vaginalis*, *Amebiyazis* ve *Jiardiyazis* gibi protozoalara karşı etkilidir. Anaerobik bakteriyel enfeksiyonlara karşı mevcut en etkin ilaçlardan biridir. Crohn hastalığı, antibiyotikle ilişkili diyare ve rosacea tedavisinde de kullanılır. Mt'nin oral, parenteral ve topikal formülasyonları vardır. Günde tek doz kullanılmasına olanak veren gecikmeli salıveren oral farmasötik formları bulunmaktadır.

Farmakodinamik ve Farmakokinetik Özellikleri (46, 47)

Mt amebisit, bakterisit ve trikomonosit etki gösterir. Noniyonize halde anaerobik organizmalar ve hücreler tarafından hızla alınır. Anaerobik bakteriler üzerindeki selektif etkinliği bu mikroorganizmaların Mt'i hücre içinde aktif forma dönüştürme yeteneklerinden kaynaklanır. Bu mekanizma için gerekli elektron transport transfer proteinleri sadece anaerobik bakterilerde bulunurlar. İndirgenen Mt

DNA'nın sarmal yapısını bozar. Böylece bakterilerdeki nükleik asit sentezini inhibe ederek ölümlerine neden olur. Hem çoğalmakta olan hem de çoğalması durmuş bakterilere karşı eşit derecede etkinlik gösterir.

Etki mekanizmasının niteliği, molekül ağırlığının düşük olması ve serum proteinlerine sınırlı ölçüde bağlanması nedeniyle bakterisit etkinliği oldukça güçlüdür.

Yaygın bulunan aeroblara karşı etkili olmamasına rağmen, aerob *Gardnerella (Haemophilus) Vaginalis*'e karşı etkili bulunmuştur. Etkili olduğu protozalar arasında *Entamoeba Histolytica*, *Giardia Lamblia* ve *Trichomonas Vaginalis* sayılabilir.

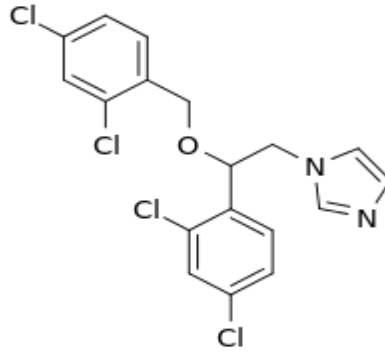
Mt oral, intravenöz (IV) ve topikal yoldan uygulanır. Oral yoldan absorpsiyonu mükemmeldir. Biyoyararlanımı yaklaşık %90'dur. Besinler absorpsiyon hızını yavaşlatabilir, fakat absorpsiyon kapsamını etkilemez. İntravajinal olarak uygulandığında sistemik absorpsiyonu çok azdır; bu yolla verildiğinde serumdaki doruk derişimleri oral yoldan verilen 500 mg'ının oluşturduğu serum doruk derişiminin %2'sinden azdır. Mt IV ve oral yoldan verildiğinde vücut dokularına ve sıvılarına geniş ölçüde dağılır. Safra, salya, plöral ve peritoniyal sıvılar, vajinal ve seminal sıvılar ile beyin-omurilik sıvısına dağılır. Sağlıklı gönüllülere aç karnına 250 mg, 500 mg ve 2 g dozunda verildiğinde, 1-3 saat sonra serum doruk derişimleri sırasıyla 4.6-6.5 µg/mL, 11.5-13 µg/mL ve 30-45 µg/mL olarak belirlenmiştir. Mt plasentayı aşar ve anne sütüne geçer.

Mt'ün önemli bir bölümü (%30-60'ı) karaciğerde metabolize olur. Metabolizması hidroksilasyon, oksidasyon ve glukuronik asit ile konjugasyon şeklinde gerçekleşir. Ana metaboliti 2-hidroksimetil Mt belli ölçüde antibakteriyel ve antiprotozoal aktivite gösterir. Verilen dozunun 24 saat içinde yaklaşık %20'si idrarla ve %3'ü feçesle elimine olur. 5 günün sonunda idrarla atılan miktarı %77'ye, feçesle atılan miktarı ise %14'e çıkar. Gerek değişmemiş ilaç, gerekse metabolitleri idrar ve feçesle elimine edilirler. Geriatrik hastalarda üriner atılımı azalabilir. Mt hemodiyalizle uzaklaştırılabilir, fakat peritoniyal diyaliz tek başına etkili olmaz. Mt metabolizması sırasında oluşan suda çözünür pigmentler nedeniyle idrarı kırmızı-kahverengine boyayabilir. Ortalama eliminasyon yarı ömrü kabaca 8 saattir.

İntravajinal olarak uygulandığında sistemik absorpsiyonu çok azdır; bu yolla verildiğinde serumdaki doruk derişimleri oral yoldan verilen 500 mg'ının oluşturduğu serum doruk derişiminin %2'sinden azdır.

2.4.2. Mikanazol'un Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri (48, 49)

Mk beyaz veya beyaza yakın renkte, hemen hemen kokusuz, kristalize bir tozdur. Molekül yapısı Şekil 2.2'de gösterildiği gibidir. İngiliz farmakopesi (BP)'ye göre çözünürlükleri: Su ve eterde çok az çözünür; alkolde hafifçe çözünür; metil alkolde serbestçe çözünür. Log P değeri 6.1'dir (51).



Şekil 2.2. Mk'nin molekül yapısı

Farmakolojisi

Mk topikal ve intravajinal olarak kullanılan imadazol yapılı antifungal bir ilaçtır. İmidazol grubu diğer antifungal ilaçlar klotrimazol, ekonazol, fentikonazol, izokonazol, ketokonazol, solkonazol ve tiakonazol'dür. Sayılan tüm bu ilaçlar gibi Mk 'ün antifungal spektrumu da geniştir. Başlıca endikasyonu vajinal kandidiyazis ve dermatofit enfeksiyonlarıdır. Ayrıca, ağız ve bağırsaktaki enfeksiyonların tedavisi için oral yoldan da kullanılabilir. Diğer azol yapılı antifungal ilaçlar gibi, Mk'da mantar hücre membranı üzerinde etki gösterir (35).

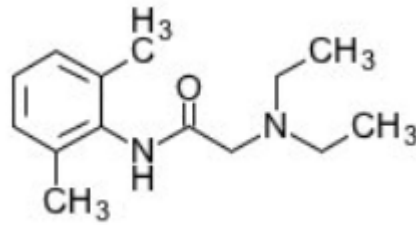
Farmakodinamik ve Farmakokinetik Özellikleri

Mk intravajinal olarak uygulandığında sistemik olarak çok az absorbe olur. *Vulvovajinal Kandidiyazis* tedavisi için 6 gün uygulandıktan sonra, ortalama serum doruk derişimi 4.2 ng/mL olarak ölçülmüştür. Proteinlere bağlanma oranı %91-93

kadardır. Esas olarak karaciğerde metabolize edilir. Absorbe olan Mk idrar ve feçesle atılır (35, 36).

2.4.3. Lidokain'in Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri (52)

Ld beyaz renkli kokusuz kristal bir tozdur. Erime sıcaklığı 68.5 °C olan molekül (Şekil 2.3), Avrupa Farmakopesi'ne göre suda çok çözünür, alkol ve kloroformda serbestçe çözünür, eterde pratik olarak çözünmez. %0.5'lik sulu çözeltisinin pH değeri 4.0-5.5 olarak ölçülmektedir. Amerikan Farmakopesi'ne göre enjektabl ve topikal çözeltilerinin pH'sı 5.0-7.0 olmalıdır. Log P değeri 2.84'tür (53).



Şekil 2.3. Ld'nin molekül yapısı

Farmakolojisi (4, 51 , 52, 53)

Ld antiaritmik ve lokal anestetik olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Ld antiaritmik ilaç sınıfında yer alırken, parenteral yoldan etkin bir akut ventrikuüler aritmilere karşı en önce kullanılan etkin maddelerdendir. Migren, hıçkırık, baş ağrısı ve kanser ağrıları içinde kullanılan bir etkin maddedir. Lokal anesteziye özel enjektabl preparatları da oldukça yaygındır.

Farmakodinamik ve Farmakokinetik Özellikleri (1, 4, 42, 54, 55)

Ld'nin antiaritmik etkileri miyokard hücre membranında bulunan "hızlı" kanallardan sodyumun hücre içine girişini inhibe etmesine dayanır; böylece repolarizasyon sonrası dinlenme periyodu uzar. Ld otomatisiteyi inhibe eder ve SA düğümde otomatisiteyi süprese etmediği derişimlerde His -Purkinje sisteminde efektif refrakter periyodu ve aksiyon potansiyelinin süresini kısaltır. İlaç yeniden giriş mekanizmalarını inhibe ederek ventriküllerdeki spontan depolarizasyonları süprese eder ve öncelikli olarak iskemik doku üzerinde etkili olur. Ld refrakter periyodu

kısaltır; bu bakımdan refrakter periyodu uzatan prokainamidden farklıdır. Ld vagolitik etki yapmaz.

Ld miyokard hücrelerinde sodyuma karşı geçirgenliği nasıl etkiliyorsa, diğer lokal anestezipler gibi hücre membranında sinirsel uyarıların oluşum ve iletimini de inhibe eder. Uyarılabilen membranlardaki uyarı iletimini geçirgenlikteki geçici artışı önleyerek bloke ederler. Lokal anestezipler voltaja duyarlı sodyum kanallarının intraselüler bölümüne içten doğrudan bağlanırlar. Yaptıkları bloğun derecesi sinirin nasıl uyarıldığına ve dinlenim membran potansiyeline bağlıdır. Lokal anestezipler sodyum kanallarına sadece yüklü formda olduklarında ve sodyum kanalları açık olduğu zaman bağlanabilirler. Lokal anestezipler molekülleri bu koşullarda daha güçlü bağlanırlar ve böylece sodyum kanalını stabilize ederler. pKa değerindeki farklılıklar, yağdaki çözünürlük derecesi ve molekül büyüklüğü farklı lokal anesteziplerin sodyum kanallarına bağlanmasını etkiler. Genelde küçük sinir lifleri lokal anesteziplere karşı büyük sinir liflerine göre daha duyarlıdır. Bununla birlikte, miyelinli lifler aynı çaptaki miyelinsiz liflere kıyasla daha erken bloke olurlar. Otonom lifler, küçük miyelinsiz C lifler (ağrı iletiminden sorumlu) ve küçük miyelinsiz A-delta lifler (ağrı ve sıcaklık duyusunun iletiminden sorumlu), büyük miyelinli A-gama, A-beta veya A-alfa liflerden (dokunma, basınç, kas ve postüral uyarıların iletiminden sorumlu) önce bloke olurlar. Küçük duyuşal liflerin daha önce bloke olmasının nedeni, sinirsel uyarıların kısa mesafelerde daha kolay bloke olması ve aksiyon potansiyellerinin lokal anesteziplerin daha fazla bağlanmasına imkan verecek şekilde daha uzun olmasıdır. Klinik olarak sinirsel işlevin kaybı sırasıyla ağrı, sıcaklık, dokunma, propriosepsiyon ve sonunda iskelet kas tonusunun kaybı şeklinde ortaya çıkar.

Ld'nin sistemik absorpsiyonu santral sinir sistemi ve kardiyovasküler sistemde etkilere yol açabilir. Terapötik dozlarda ulaşılan kan derişimlerinde, kalpteki iletim, eksitabilite, refrakterlik ve periferik vasküler dirençte değişiklikler olabileceği bildirilmiştir. Toksik kan derişimleri, ölümcül olabilen AV blok, ventriküler aritmi ve kalp durması ile sonuçlanan kardiyak iletim ve eksitabilite depresyonuna yol açar. Ayrıca, miyokard kontraktilesi deprese olur ve periferik vazodilatasyon meydana gelir; bu, kalp debisinin ve arteriyel kan basıncının düşmesine yol açar.

Santral sinir sistemi stimülasyonu genellikle konvülziyonlara varan huzursuzluk, titreme ve ürpermelerle belirgindir. Bunları en sonunda solunumun durması ile sonuçlanan depresyon ve koma izler. Bununla birlikte, lokal anestezipler medulla ve yüksek merkezlerde esas olarak depresan etki gösterirler ve depresyon durumu önceki eksitator dönem görülmeksizin de gelişebilir.

Ld oral (ağıza topikal olarak), parenteral veya perkütan yoldan uygulanır. Oral verilmesini takiben hemen hemen bütünüyle absorbe olur, fakat karaciğerde yoğun bir ilk geçiş metabolizmasına uğrar ve bu nedenle sistemik biyoyararlanımı sadece %35 düzeylerinde kalır. Ld sistemik etki için oral yoldan kullanılmamasına rağmen, ağızda topikal uygulama için hazırlanmış konsantre oral çözeltilerinin bir bölümünün sistemik absorpsiyonu mümkündür. İntravenöz (IV) enjeksiyondan sonra ilaç iki faza ayrılır. Erken faz, Ld 'in çok fazla kanlanan dokulara dağıldığı fazdır. İkinci, yavaş faz esnasında ilaç yağ dokusu ve iskelet kaslarına dağılır. Kalp yetmezliği olan hastalarda ilacın dağılımı azalabilir. IV yoldan verilen dozların etkisi derhal başlarken, intramusküler (IM) olarak verilen bir dozun etkisinin başlaması 5-15 dk sonra olur. IV bir dozun etki süresi 10-20 dk ve IM bir dozun etki süresi ise 60-90 dk kadardır. Ancak, IM dozun etki süresi büyük oranda hepatik fonksiyona bağlıdır. Ld karaciğerde kapsamlı bir şekilde iki aktif bileşiğe metabolize olur. Bunlardan biri Ld kadar güçlü aktivite gösteren monoetilglisineksilidid, diğeri ise Ld'nin ancak %25'i kadar aktivite gösteren glisineksilidid'tir. Konjestif kalp yetmezliği, karaciğer yetmezliği ve miyokard infarktüsü gibi durumlar hepatik kan akımını azaltır ve Ld klirensini düşürebilirler. Ld'nin sağlıklı bireylerdeki başlangıç yarı ömrü 7-30 dk, terminal yarı ömrü ise 1.5-2 saattir. Kalp yetmezliği, üremi veya siroz sorunu olan hastalarda terminal yarı ömrü sırasıyla 115, 77 ve 296 dk'ya kadar uzayabilir. Ld subkütan enjeksiyondan sonra dolaşıma sadece çok küçük miktarlarda girer. Ancak tekrarlanan dozlar halinde uygulanması Ld ve metabolitlerinin kümülatif olarak birikmesine neden olabilir. Bu durumda kanda saptanabilir derişim düzeylerine ulaşabilir. Parenteral yoldan uygulanan Ld 'in etki süresi, veriliş yolu ve kullanılan ilaç miktarına bağlı olarak 1-3 saat arasında değişir. Ld çözeltisine 1:200.000 ile 1:100.000 adrenalin eklenmesi, ilacın vasküler absorpsiyonunu yavaşlatır ve etkisinin uzamasını sağlar. Mukoz membranlara topikal olarak uygulandığında etkisi 1-2 dk içinde başlar ve 30-60 dk kadar devam eder.

2.5. Metranidazol, Lidokain ve Mikanazol Kombinasyonun Kontrendikasyonları¹

Mt, Mk ve Ld karışımını içeren intravajinal uygulanan preparatları,

- İçeriğinde bulunan etkin maddelerin herhangi birine veya bunların türevlerine karşı alerjiniz var ise,
- Hamileliğinizin ilk 3 aylık döneminde iseniz,
- Porfiri hastalığınız (kan sistemi ile ilgili kalıtsal, metabolik bir bozukluk) var ise,
- Epilepsi (sara) hastası iseniz,
- Ciddi karaciğer fonksiyon bozukluğunuz var ise

kullanmayınız.

2.6. Kromatografik Sınıflandırma (57, 58)

Kromatografi kelime anlamı olarak renk yazılımı olup Grekçe renk, yazmak anlamına gelen Chromatus, Graphein kelimelerinin birleşmesinden oluşmuştur. Kimyasal bileşimlerin ayrılması tanınması ve miktarlarının tayin edilmesi amacıyla kullanılan kromatografi, yaygın olarak kullanılan bir analitik yöntemdir. Analizler, nitel ve nicel olarak analitlerin hareketli faz içerisinde, sabit fazdan geçme hızlarına göre değişmesi prensibine dayanır.

İlk olarak 1892’de Reed kolon yardımı ile analitlerin ayrılabilceğini söylemiş, akabinde Tsweett klorofili pigmentlerine 1906 yılında ayırmıştır. Sabit faz olarak CaCO₃ kullanılmış olup, ilk kez katı-sıvı kromatografisi kullanılmıştır. 1938 yılında Izmailov tarafından ince tabaka kromatografi keşfedilmiş, 1950’de Stahl tarafından pratikte kullanım prosedürü tanımlanmıştır. 1941 yılında sıvı-sıvı kromatografisinde yaşanan gelişmelerin ardından, Martin-James gaz-sıvı kromatografisi çalışmaları ile Nobel ödülüne (1952) layık görülmüştür. 1967 yılında, Huber ve Hulsman öncülüğünde, kolon teknolojisi, yüksek performans gösteren pompa sistemlerinin

¹ Kontrendikasyon: hastaya vereceği zarar nedeniyle belirli bir tıbbi tedaviyi almama nedeni olarak hizmet eden bir durumdur. Belirli bir tedaviyi kullanmak için bir neden olan endikasyonun tersidir.

geliştirilmesi, daha duyarlı dedektörlerin kullanılması gibi gelişmeler ile modern yüksek performanslı sıvı kromatografi yöntemlerinin temelleri atılmıştır.

Kromatografik Yöntemler Sınıflandırılması:

Faz tiplerine, uygulama biçimlerine ve ayrılmanın dayandığı yöneme göre sınıflandırmak mümkündür.

Uygulama biçimlerine göre kromatografi yöntemleri

- Kolon
- Düzlemsel
- Gaz
- Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC, High Performance Liquid Chromatography)
- Elektrokromatografi

Faz tiplerine göre kromatografi yöntemleri

- Sıvı
 - Sıvı-katı
 - Sıvı-sıvı
- Gaz
 - Gaz-katı
 - Gaz-sıvı
- Süperkritik akışkan

Ayırma mekanizmalarına göre Kromatografi yöntemleri

- Adsorbsiyon
- Partisyon
- İyon değiştirme
- İyon çifti
- Moleküler eleme
- Affinite

Kromatografi çeşitli moleküllerin sabit faz içeriğinde bulunan moleküller ile çeşitli etkileşimlerine dayanarak ayırma prensibine dayanır. Bu etkileşimler genel olarak, büyüklükleri, ağırlıkları, şekilleri, elektriksel yükleri, adsorbsiyonları gibi

temel ayırt edici özellikleridir. Bu etkileşimi sağlamak moleküllerin sabit faz ile sürekli bir etkileşim halinde olması amacıyla bir hareketli faz vardır. Kromatografinin temel işlemlerinden olan elüsyon işlemi ile sabit fazın bulunduğu kolondan sürekli taze hareketli faz geçirilir ve ayrılması amaçlanan molekül bileşiminin sabit faz ile oluşturduğu etkileşimden faydalanarak ayrılması sağlanır.

2.6.1. Adsorbsiyon Kromatografisi

Sıvı-katı veya gaz-katı olarak ayrılan adsorbsiyon kromatografisi, temelini sıvı veya gaz hareketli faz içerisindeki moleküllerin, katı sabit faz yüzeyinde adsorplanma miktarına dayanmaktadır. Sabit fazlarda kullanılan adsorban maddeler, polar ve apolar moleküllerin ayrılması amacıyla yine polar veya apolar olarak seçilebilirler. Temel olarak polar moleküller polar sabit faz yüzeylerinde, apolar moleküllerde apolar sabit faz yüzeylerinde adsorplanacaktır. Moleküllerin sabit faz yüzeyinde tutunma gücü moleküldeki fonksiyonel grup türüne ve miktarına göre değişim gösterebilmektedir.

2.6.2. Dağılma Kromatografisi

Dağılma kromatografisi temel olarak herhangi bir etkileşime sebep olmayan destek malzemesine sabitlenmiş, sıvı sabit faz ile sıvı hareketli faz arasındaki maddelerin dağılmalarına dayanarak ayırma yöntemidir. Maddeler sabit ve hareketli faz arasında dağılma katsayıları, ayırmanın performansını belirler. Sabit faz tarafından daha fazla tutunan moleküllerin ortalama ilerleme (göç) hızları daha düşük iken, daha az tutunan moleküllerin ortalama göç hızları daha büyüktür (59).

Dağılma kromatografisi temel olarak sabit faz polarite farkları baz alındığında iki farklı şekilde incelenmektedir: Normal ve Ters faz kromatografisi

Normal faz sıvı kromatografisi

Normal faz, sabit fazın polar ve hareketli fazın apolar olduğu dağılma kromatografisidir. Bir karışımdaki daha yüksek polariteye sahip analitler, kolonda daha düşük polariteye sahip analitlerden daha fazla tutunurlar. Bu yöntem, analitlerin polar sabit fazda (genellikle silika veya alümina) desorpsiyonuna veya adsorpsiyonuna dayanır. Polar analitler sabit fazda, silanol grupları arasındaki güçlü etkileşim

nedeniyle, kolonda daha yavaş hareket eder. Bu nedenle, en düşük polariteye sahip molekül ilk olarak kolondan ayrılır (60).

Normal fazda ki temel etkileşim kuvvetleri hidrojen bağları (polar) ve dipol-dipol etkileşimleridir (61).

Bu yöntemin en önemli dezavantajı, polar yüzeylerin numune bileşenleri ile kolayca kontamine olabilmesidir. Bu dezavantaj, silanol gruplarına, siyano ve amino fonksiyonel grupların eklenmesiyle azaltılır (60).

Ters faz sıvı kromatografisi

Ters faz, sabit fazın apolar, hareketli fazın ise polar (asetonitril, metanol, su gibi) olduğu dağılma kromatografisidir. Çoğunlukla oktadesil (C18) grupları, sabit faz olarak kullanılır. Apolar analitler hidrofobik C18 grupları ile daha güçlü etkileşime girdiğinden, ilk olarak polar analitler kolondan ayrılır. Normal fazdan farklı olarak, polar bileşiklerin önce ayrılmasından dolayı bu tipe ters faz sıvı kromatografisi denir. Ters fazda etkili kuvvetler çoğunlukla hidrofobik etkileşimlerdir (62, 63).

Bu yöntem, çok sayıda organik bileşiği ayırma kabiliyetinden dolayı en yaygın kromatografik yöntemdir. HPLC analizlerinin %90'ından fazlasında kullanılmaktadır (63). Bu tez çalışmasında kullanılan HPLC tipi de ters fazlı sıvı kromatografisidir.

2.6.3. İyon Çifti Kromatografisi (65, 66, 67)

İyon çifti kromatografisi, iyonik türlerin ayrılması ve tayini için kullanılan bir tür dağılma kromatografisidir. Temel olarak hareketli faz metanol, asetonitril gibi organik çözücüler içerirken, ayrıca sulu tampon ve analit ile karşıt iyon içeren sulu çözeltiler de içerebilir (58). Karşıt iyonlar temel olarak analit ile birleşerek, sabit faz üzerinde etkileşimi arttırmaları. Bu şekilde polar analitin kolon içeriğinde daha fazla tutunması sağlanır.

Bu yöntemde, analitin pKa değerine göre çözelti içerisindeki iyon miktarı artıp azalacağından, hareketli fazın pH'sının kontrol edilmesi oldukça önemlidir. Analitin kuvvetli asit olması veya kuvvetli temel olması durumunda uygulanan iyon bastırma tekniği temelini bu prensipten almaktadır. pH değerinin çok düşük (<2) veya çok

yüksek (>8) olması durumunda kolon içerisinde aşındırıcı veya sabit faz fonksiyonel grupları üzerinde yıkıcı etkileri olabilmektedir.

Hareketli faza eklenecek karşıt iyon tekniği, 3 temel prensiple ayırma gerçekleştirilebilir.

1. İyon çifti oluşturup sabit faz üzerindeki etkileşimi değiştirerek,
2. Eklenen iyonun analit ile sabit faz etkileşiminde yarışarak,
3. Sabit faz üzerindeki fonksiyonel grupların üzerlerini kapatarak

İyon çifti oluşumunda etkili faktörler:

- İyon
 - Tipi ve etkileşme derecesi,
 - Boyutu,
 - Derişimi,
- Ortamın pH'sı,
- Hareketli fazdaki organik çözücü
 - Tipi
 - Miktarı,
- Analiz ortamının sıcaklığı
- Sabit fazın karşı iyonla kaplanma miktarı.

Sabit faz üzerindeki silanol gruplarının yeterli miktarda kaplanması, pik simetrisi üzerinde oldukça etkilidir. Kaşıt iyon derişimi alıkonma zamanı ve kapasite faktörünü değiştirirken seçicilik üzerinde belirgin bir etki göstermez. Etkin bir iyon çifti kromatografisi uygulaması için, hareketli faz pH değeri hem analitin hem de karşıt iyonun en fazla iyonlaştığı değerde tutulmalıdır (65).

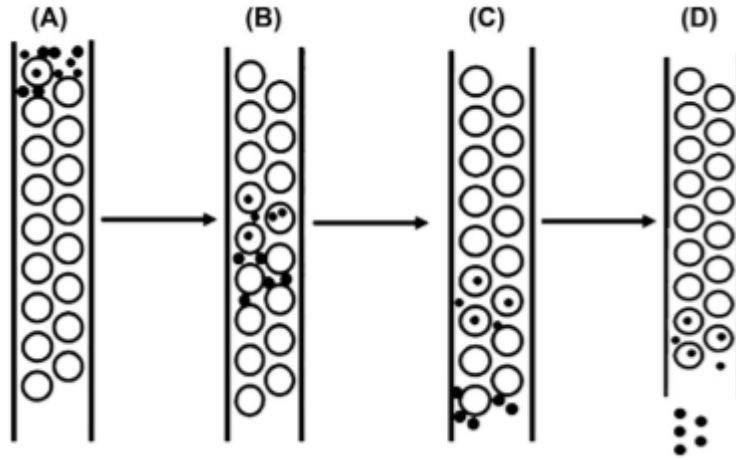
2.6.4. İyon Değişirme Kromatografisi

Sabit fazda bulunan iyonlar ile hareketli fazdaki iyonların yer değiştirmesi prensibine dayanan bu kromatografi çeşidinde, hareketli fazın pH'sı ve iyonik gücü, organik çözücü oranından, daha yüksek bir şekilde, alıkonma süresine etki eder. Dolgu maddelerinde yer alan silikaya bağlı fonksiyonel gruplar temel olarak iyon değiştirici

molekülleri içerirler. Sabit faz materyali içersinde yer alan, iyon değiştirici ile analit arasındaki bağın kuvveti ayırma performansını birebir etkilemektedir (58, 68).

2.6.5. Eleme Kromatografisi

Molekül ağırlığı birbirinden farklı analitleri birbirinden ayırmak için kullanılan bu kromatografi yönteminde, sabit fazdaki dolgu maddesinin gözenek (por) büyüklüğü ve analit bileşiminde bulunan moleküllerin büyüklüğü ayırmada temel etkindir (şekil 2.4). Analit içersindeki büyük moleküller dolgu maddesi üzerindeki gözenekler ile etkileşime giremeyerek hareketli faz ile birlikte hızla kolonu terk ederken, küçük moleküllerin etkileşimi ile ayırma işlemi gerçekteşirilir. Difüze olan küçük moleküllerin hızları oranında ayırma işlemi performansı belirlenir. Orta büyüklükteki moleküller küçük moleküllere nazaran daha az difüze olacakları için küçük moleküllere nazaran daha hızlı kolonu terk edeceklerdir. Bu yöntem ile molekül ağırlıkları ve kolon içersinde geçirdikleri zaman temel alınarak, ilgili molekülün ağırlığını tespit etmek mümkündür.



şekil 2.4. Eleme yöntemi ile yüksek ve düşük molekül ağırlığına sahip moleküllerin ayrılmasının şematik gösterimi (68)

2.6.6. Afinite Kromatografisi

Sabit fazda bulunan, üzerinde ligant bağlı jel bileşimi ile genellikle protein molekülleri ayırımında kullanılan bir ayırma tekniği olan afinite kromatografisinde, hareketli fazın pH'sı veya bileşimi değiştirilerek analit (protein) elüsyonu sağlanır.

Bu yöntem biyoafinite, immunoafinite, DNA afinitesi, lektin afinitesi, boronat afinitesi, biyomimetik afinite ve metal iyonu afinitesi gibi çeşitli alt dallara ayrılmakta olup, protein, enzim, karbonhidrat, vitamin gibi pek çok molekülün ayrılmasında, antijen ve antikor saflaştırılmasında faydalanılmaktadır (69).

2.7. Kromatografik Çalışmalarda Temel Parametreler (72, 73, 58)

2.7.1. Alıkonma Zamanı

Analitin enjeksiyonu ile detektöre ulaşma zamanı arasındaki fark alıkonma zamanı olarak geçmektedir (t_R). Bazı kaynaklar alıkonma zamanı yerine (veya her ikisi de) alıkonma hacmi (V_R)'de kullanılmaktadır. Alıkonma hacmi akış hızı (F) ile alıkonma zamanının çarpımına eşit olup, analitin kolondan geçmesi için gerekli hareketli faz miktarını gösterir ve Formül 2.1 'de olduğu şekilde hesaplanır.

$$V_R = t_R \cdot F \quad (2.1)$$

Alıkonma hacmi, dağılım katsayısı olan K ile Formül 2.2.'de görüleceği üzere direkt olarak ilgilidir.

$$V_R = V_M + K \cdot V_S \quad (2.2)$$

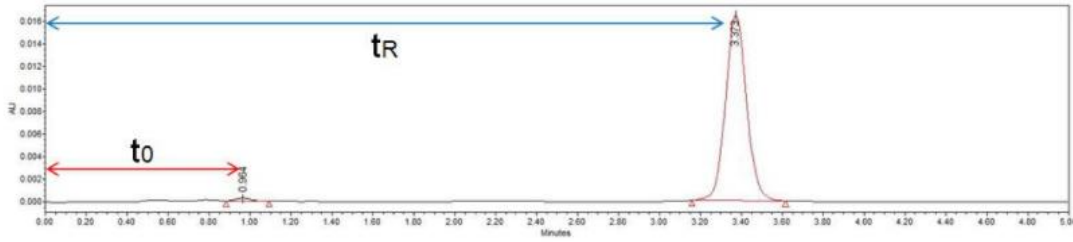
V_M : Hareketli faz hacmi

V_S : Sabit faz hacmi

Alıkonma zamanı temel olarak, kolon özellikleri ve sıcaklığı, hareketli fazın bileşimi, sabit fazın tipi ve özelliği, analit/hareketli/sabit faz arasındaki etkileşim mekanizması ile kontrol altına alınabilir.

2.7.2. Kapasite Faktörü

Kapasite faktörü (k') analitin kolon içerisindeki geçirdiği vaktin ölçülmesi amacıyla kullanılan bir ölçümdür. Analitin yapısı, sabit faz ve hareketli fazın türü kapasite faktörü üzerinde önemli etkileri mevcuttur.



Şekil 2.5. Kapasite faktörü hesabında kullanılan değişkenlerin gösterimi (72)

$$k' = (t_R - t_0) / t_0 \quad (2.3)$$

t_0 = Ölü hacim pikinin detektöre ulaştığı zaman

t_R = Analit pikinin detektöre ulaştığı zaman

İdeal kapasite faktörü (Formül 2.3.'de) 1-10 arasında olduğu kabul edilir. Daha küçük olması kolonda geçirilen vaktin kısa, daha büyük olması kolonda geçirilen vaktin uzun olduğunu göstermektedir. Ayrıca, Amerikan farmakopesinde kapasite faktörü >1.5 olarak önerilmektedir (73).

2.7.3. Seçicilik

Analitlerin kapasite faktör oranları olarak tanımlanan seçicilik (ayırım) faktörü Formül 2.4'de gösterilmiştir.

$$\alpha = k'_2 / k'_1 = (t_{R2} - t_0) / (t_{R1} - t_0) \quad (2.4)$$

Deneysel çalışmalarda pratik olarak ta gözlenmesi ve kontrol edilmesi gereken bu parametre, sabit faz ve hareketli faz özelliklerine bağlı olarak değişmektedir. Genel olarak 1'den büyük olması beklenir (70).

2.7.4. Teorik Tabaka Sayısı

Teorik tabaka sayısı aynı özelliğe sahip farklı kolonların etkinliklerinin karşılaştırılmasında kullanılabilir. Etkinliği analiz sonucu oluşan pik genişliği ile gözlemleyebilirken, dar pik elde edilen kolonların daha etkin, geniş (yayvan) piklerin elde edildiği kolonların etkinliğinin düşük olduğu söylenebilir. Kolonun zaman içinde yıpranma/performansını izleyebilmenin en önemli parametrelerinden bir tanesidir.

Teorik tabaka sayısı, kolon uzunluğu, partikül büyüklüğü, akış hızına bağlı olup Formül 2.5’de gösterildiği gibidir.

$$N = 16. (t_R/W_t)^2 \text{ veya } N = 5.54. (t_R/W_{1/2})^2 \quad (2.5)$$

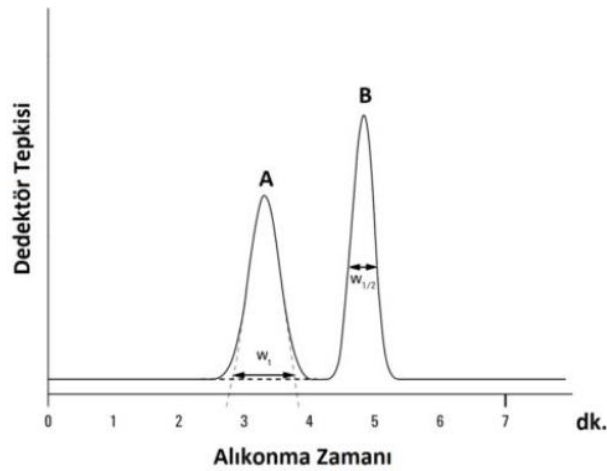
N: Teorik tabaka sayısı

t_R : Alıkonma zamanı

W_t : Pik genişliği

$W_{1/2}$: Yarı yükseklikte pik genişliği

Teorik tabaka sayısının yüksek olması, daha dar pikler elde edilmesini bu durumda ayırıcılığın artmasına sebep olacaktır. Hareketli faz tipinden ve akış hızından etkilenir. Formülden de görüleceği üzere analitin alıkonma zamanı da teorik tabaka sayısını yani etkinliği birebir etkilemektedir. Bu durumda seçiciliği yüksek kolonlar ile çalışmak, etkinlik açısından da önemlidir.



Şekil 2.6. Alıkonma zamanı ve pik genişliği şematik gösterimi (72)

2.7.5. Ayırıcılık

Kolon ve çözücü etkinliğine birebir bağlı olup Formül 2.6.’da yer aldığı şekilde hesaplanmaktadır.

$$R = 2x (t_{R2} - t_{R1}) / (w_1 + w_2) \quad (2.6)$$

Kapasite faktörü, seçicilik, teorik tabaka sayısı ile ilişkisini gösteren Formül 2.7’de yer aldığı gibidir.

$$R = (1/4) [(\alpha-1) / \alpha] [k' / (k'+1)] N^{1/2} \quad (2.7)$$

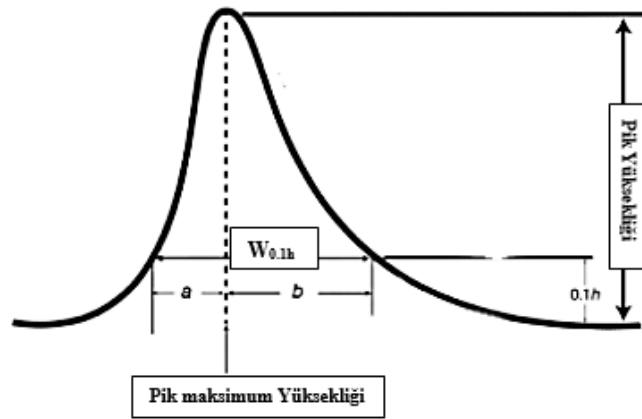
Genel olarak $R \geq 1.5$ ideal olarak kabul edilmekte olup, ayırıcılığın, seçicilik arttıkça yükselmesi beklenir. Teorik tabaka sayısında görülen değişiklikler ayırıcılık üzerinde daha az bir etki gösterir (ayırıcılığın teorik tabaka sayısının karekökünün bir fonksiyonu olmasından dolayı). Kapasite faktörü yükseldikçe $k' / (k'+1)$ değeri birbirine yaklaştığından ayırıcılık üzerindeki etkisi gittikçe azalır, 0 olduğunda herhangi bir ayırıcılıktan bahsedilemez.

2.7.6. Pik Simetrisi

Analitlerin hareketli fazdaki ve sabit fazdaki derişimlerinin denge halinin grafiksel gösterimi ile bağlantılı olan pik simetrisi, eğer doğrusal bir grafikten söz etmemiz durumunda eğim ile dağılma katsayısı bulmak mümkündür. Eğer iç bükey bir doğru elde etmemiz durumunda analitlerin sabit faz ile etkileşiminin, hareketli faz ile olan etkileşimden daha az olduğu söylenebilir. Bu durumun pik önünde yer alan kuyruklanma ile gözlenebilir ve derişimin arttırılması durumunda alıkonma zamanının artışı gözlenecektir. Eğer dış bükey bir grafik elde ediliyorsa, analit sabit faz etkileşimi katmanlar halinde gerçekleşiyor olup, pik üzerinde kuyruklanma olarak kendini gösterecektir. Kuyruklanmanın sonucu olarak analit derişimi arttırıldığı zaman alıkonma zamanı da azalacaktır.

Bu sebepledir ki, analiz yöntemlerindeki pik simetrisi önemli bir parametre olarak takip edilmekte, geliştirme aşamalarında uygun sabit ve hareketli faz türlerinin seçiminde belirleyici bir özellik olarak kabul edilmektedir (65).

Aşağıdaki şematik gösterimde ve Formül 2.8'de pik simetri hesaplaması ve hesaplamada kullanılan değişkenler açık bir şekilde gösterilmiştir.



2

Şekil 2.7. Pik simetri oranı şematik gösterimi

$$P = \frac{a}{b} \quad (2.8)$$

P: Pik Simetri oranı

$W_{0.1h}$: Pik yükselişinin 10'da 1'indeki genişlik

$0.1h$: Pik yükselişinin 10'da 1'i

a : Pik maksimum yüksekliği ile temel çizginin kesişim noktasının solunda kalan genişlik

b : Pik maksimum yüksekliği ile temel çizginin kesişim noktasının sağında kalan genişlik

2.7.7. Hareketli Faz Bileşiminin Ayırma Etkisi

Kromatografik yöntemlerde hareketli faz seçimi analiz yöntemi için oldukça önemli olan birçok faktörü etkileyebilir. Bunlardan başlıca olanları: kapasite faktörü, ayırıcılık, pik simetrisi, alıkonma zamanıdır. Bu faktörler analiz yönteminin özgün ve seçici olmasında doğrudan ilişkilidir. Ters faz sıvı kromatografisinde genel olarak su ve sudan görece daha az polar olan asetonitril, metanol gibi hareketli fazlar kullanılır. Hareketli faz olarak seçilen su içerisine uygun pH'ı ayarlamak amaçlı tampon sistemleri de eklenebilir. Tampon derişiminde yapılacak değişiklikler, analit piklerinin sistem uygunluk parametreleri üstünde etkisi olabilir. Çok sayıda analitin olduğu ters faz sıvı kromatografisi yöntemlerinde gradient programları ile de etkili bir ayırım

² Pik maksimum yükseliği, pikin en üst noktası ile temel çizgi (base line) arasındaki yükseklik iken, Pik yüksekliği ise pikin iki tarafından çizilen doğrunun, pikin en üst noktasına olan uzaklığıdır.

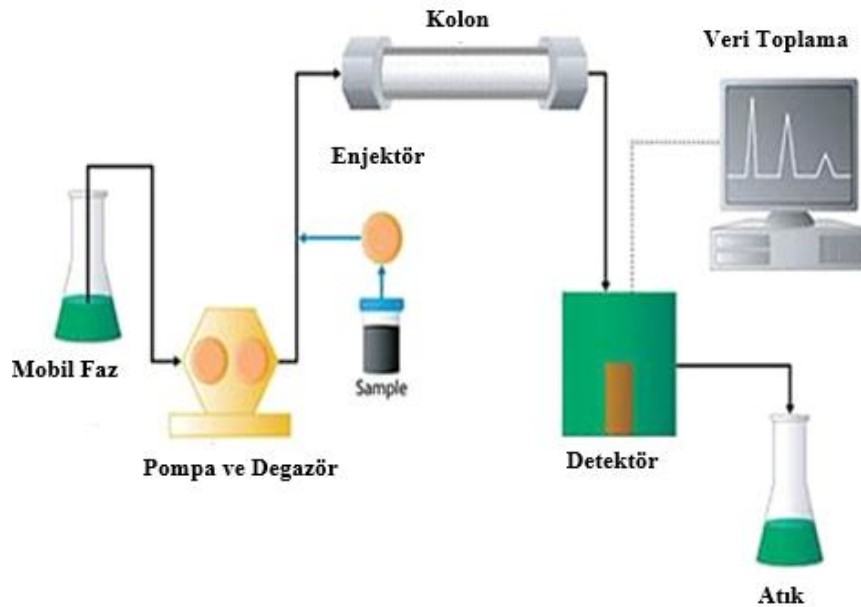
Pik genişlikleri (a , b) belirlerken maksimum yükseklik üzerinden, 10'da 1 oranında yükseklik belirlenirken pik yükseliği üzerinden gerçekleştirilir (90)

sağlanabilmekte, daha iyi pik şekilleri elde edilebilmektedir olup, bu tez kapsamında da bu yöntemden faydalanılmıştır.

2.8. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

HPLC cihazı, degazör, pompa, enjektör, kolon, detektör ve veri toplama merkezlerinden ana bölümlerinden oluşmaktadır.

Çalışma prensibi, yüksek basınç altında hareketli fazların kolona gönderilmesi, kolon içerisine enjektör vasıtasıyla gönderilen analitlerin, sabit faz ile etkileşimleri orantısıyla (yüksek etkileşim, yüksek alıkonma zamanı) UV detektöre ulaşması, UV detektörlerin analitlerin absorbans değerleri ile orantılı bir şekilde elektriksel sinyalleri verilere dönüştürmesine dayanır. Sistemin çalışma prensibini basit bir şekilde gösteren şematik gösterim Şekil 2.9'daki gibidir. Yüksek basınç temel sebepleri arasında, kolon çaplarının ve içerisinde yer alan sabit faz materyali partikül çaplarının küçük³ olması sebebiyledir.



Şekil 2.8. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) cihazının temel bölümleri

³ Daha düşük partikül büyüklüğüne sahip sabit faz materyali ile, daha seçici analiz yöntemleri geliştirmek mümkündür (91).

2.8.1. Pompa ve Degazör

Sistemi kullanmadan önce her zaman hareketli fazın gazı alınmalıdır. HPLC sisteminin kendisindeki degazör akan hareketli fazdan çözünmüş gazı ortadan kaldırır. Küçük bir gaz kabarcığı sistemde ani basınç değişikliklerine sebep olacağı gibi, analide fazlardan gürültüye sebep olabilir (62).

Pompalar hareketli fazın sistem içerisinde belirlenen akış hızında akmasını sağlar ayrıca gradient sistemlerde belirli zaman periyotlarında valfler aracılığıyla 2 veya daha fazla hareketli fazın 2 veya daha fazla kanaldan akmasında da görev alırlar (58)

2.8.2. Enjektörler

Enjektörler, analit karışımını kolona ulaşmadan hareketli faza enjekte etmekle görevlidir. Otomatik versiyonları ile fazlaca numuneyi cihaz kendisi enjekte edebildiği gibi eski modellerde analistin kendisinin enjekte edebildiği sistemlerde mevcuttur (63).

2.8.3. Hareketli Faz

Hareketli faz oranları ve içeriği ile alıkonma zamanı, ayırıcılık gibi ana parametreleri ayarlayabilmek mümkündür. HPLC sistem bölümlerinde veya sabit faz içeriğinde olası herhangi bir kontaminasyon kaynaklı tıkanmaya mahal vermemek amacıyla, analiz öncesi süzme⁴ işlemi gerçekleştirilir.

Hareketli fazın seçiminde belirleyici temel özellikler (74):

- Elüsyon ve seçicilik gücü
 - pH
 - Viskozite
 - Polarlık
- Sabit faz, analitler, detektör ve sistem kompartmanları ile geçimliliği
- Saflık derecesi (çözünmüş gaz oranı)
- Buhar basıncı

⁴ Genellikle 0.45µm veya daha düşük membran filtelerden

- Refraktif index
- Kaynama noktası
- Toksisite
- Diğer hareketli fazlar ile karışabilir olması
- Aşındırıcı olmaması

2.8.4. Kolonlar

Bir HPLC sisteminin en önemli parçası olan kolonlar, analitlerin istenen ayrımına kavuşmasında kritik rol oynayan sabit faz materyallerini içerirler. Genel olarak paslanmaz çelikten yapılırlar (64, 76). Kolon içerisindeki sabit faz materyali partikül çapları 0.9-10 µm arasında değişkenlik gösterirken, kolon çapları HPLC sistemleri için 1-10mm aralığında değişkenlik gösterebilmektedir. Ters faz ve normal faz kolonları sabit faz içerisindeki materyallerin apolar ve polar olmasına göre değişkenlik gösterirler. Normal fazda genel olarak -OH gurubu içeren sabit fazlar, ter fazda ise genel olarak yüksek apolarlığa sahip hidrokarbon (örn.-C₁₈H₃₅) grupları yer alır.

2.8.5. Dedektörler

Ayrımı sağlanan analitlerin tespit edilmesi ve elektriksel sinyallerin okunabilir verilere dönüştürülmesinde rol oynar (76). HPLC sistemlerinin önemli bölümlerinden olan detektörler incelenecek olan analitin ayırt edici özelliklerine göre değişiklik gösterebilirler.

HPLC ve entegre sistemlerde kullanılan en yaygın detektörler (76):

- Ultraviyole detektörleri (UV) (fotometrik)
- Floresan detektörleri
- Kırılma indisi detektörleri (refraktif index)
- Kütle spektrometresi detektörleri
- Elektrokimyasal detektörler
- İletkenlik detektörleri
- Dansite detektörleri

Bu tez kapsamında kullanılan HPLC sistemi detektörü Ultraviyole (fotometrik) detektör olup, analitlerin 230 nm dalga boyunda absorbe ettiği ışık miktarı prensibi üzerinden veri oluşturmuştur. Ultraviyole detektör çeşidi olan dizi diyot dedektör (DAD) tercih edilmiştir. DAD detektörlerin en önemli avantajlarından biri 190-400 nm arasında tek seferde analiz yapılmasına imkân sunması ve bu şekilde analiz yöntemi için en uygun dalga boyunun seçilmesine imkân vermesidir. Bir başka avantajı da farklı dalga boylarında elde edilen kromatogramların karşılaştırılması ve pik saflığının tespit edilmesidir. Spekturumları tespit edilen pikler için nicel analiz gerçekleştirilebilir, sistem üzerinden oluşturulacak kütüphane ile bütün piklerin tanımlanması ve sonraki çalışmalarda piklerin doğrulanması sağlanabilir (77).

2.8.6. Veri Toplama, İşleme ve Kontrol

HPLC sistemlerinin hareketli faz bileşimi, sıcaklık, enjeksiyon hacmi gibi cihaz parametrelerini kontrol edebilmesi için, bilgisayar tabanlı bir veri sistemine ihtiyaç vardır. Bu sistem, detektörden aldığı elektronik sinyal verilerini işleyerek kromatografik pik olarak bilgisayarda kayıt eder. Sonrasında bu veriler üzerinden işlem yapabilme, test sonuçlarını değerlendirme gibi temel fonksiyonlar gerçekleştirilebilmektedir (63).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışmada Kullanılan Gereçler

3.1.1. Cihazlar

HPLC sistemi	Agilent 1100
<ul style="list-style-type: none"> • Pompa • Oto örnekleyici • UV Dedektör • Yazılım 	<ul style="list-style-type: none"> • Agilent G1311 A • Agilent G1313 A • Agilent G1314 A • ChemStation
UV-GB Spektrofotometresi	Agilent 8453
pH metre	Mettler Toledo / MP 220
Hassas terazi	Mettler Toledo/XS204 S
	Mettler Toledo/XSE105 DualRange
	Mettler Toledo/AB204-S
Ultrasonik banyo	Advantage Lab / AL 04-12
	Everest Ultrasonic/Cleanex 2001
Santrifüj	Nüve NF400
Vorteks karıştırıcı	Heidolph REAX top
Saf su sistemi	Milli-Q Advantage A-10
Buzdolabı	Liebherr/MKv 3913-21E-001
Manyetik karıştırıcı	Heidolph/MR Hei-Tech
	Heidolph/ MR 3001

3.1.2. Kimyasallar

Metronidazol	$C_6H_9N_3O_3$, DrogSan
Mikonazol nitrat	$C_{18}H_{14}C_{14}N_2O$, DrogSan
Lidokain HCl	$C_{14}H_{22}N_2O$, DrogSan
Metanol	CH_3OH , Panreac
Amonyum asetat	$C_2H_7NO_2$, Merck
Su	H_2O , Ultra saf su

3.1.3. Cam ve Sarf Malzemeler

Kolon	ACE C18 250 x 4.6 mm 5 μ m
Filtre/şırınga	PTFE 0.45 μ m hidrofobik, Merck Millipore Millex-FH şırınga ucu filtesi
Vial	Cam, 1 mL
Küvet	1x1x3 cm, kuvarz
Balon joje	10, 20 ve 100 mL'lik
Spatül	Metal
Tartım kabı	Plastik
Mezürler	250 ve 500 mL'lik

3.1.4. Kullanılan İstatiksel Yöntemler ve Yazılımlar

Ms office xp excel

Mann-Whitney U Testi

Kruskal wallis varyans analizi

Wilcoxon eşleştirilmiş iki örnek testi

Korrelasyon katsayısı

Doğrusallıktan ayrılış önem kontrolü

t-testi

Doğrusallıktan ayrılış önem kontrolü

İstatistiksel katsayıların hesaplanması

%Bağıl hata hesaplanması

Standart hata hesaplanması

%Geri kazanım hesaplanması

Evren ortalaması güven aralığının hesaplanması

Bağıl standart sapma

Ms office xp word

Cambridge chemdraw programı (cambridge, abd)

3.1.5. Analizi Yapılan Farmasötik Preparat

Exagyn[®] vajinal tablet (Helba İlaç, İstanbul/ Türkiye, Seri no: 485) ürünüdür.

3.2. Deney için Gerekli Hazırlıklar

3.2.1. Etkin Madde Saflığı

Etkin maddeler Drogsan İlaçları San. ve Tic. A.Ş. Firması'ndan temin edilmiş olup, Ek 6'da analiz sertifikaları sunulmuştur.

- Metronidazol Seri no: RMTZP20171
- Mikonazol nitrat Seri no: 2900/11/14
- Lidokain HCl Seri no: LHAH028081314

3.2.2. Çözelti Hazırlama⁵

Hareketli Faz A (0.035M amonyum asetat) çözeltisi: 1000mL'lik balon jöjeye 500mL saf su alınır. Üzerine 2.75g Amonyum Asetat eklenir. Saf su ile hacmine tamamlanır. 0.45 µ membran filtreden süzülür.

Hareketli Faz B: Metanol

Seyreltme Çözeltisi: Hareketli faz A ve hareketli faz B'nin 2/3 oranında karışımından oluşmaktadır.

Mt Stok Çözeltisi (7500 µg/mL): 75 mg Mt 10 mL'lik balon jöjeye tartılır. Üzerine 5 mL seyreltme çözeltisi eklenir 10 dk ultrasonik banyoda tutulur. Ardından, seyreltme çözeltisi ile hacmine tamamlanır.

Ld Stok Çözeltisi (865 µg/mL Ld = 1000 µg/mL Ld HCl): 17.3 mg Ld (20 mg Ld HCl'e eşdeğer) 20 mL'lik balon jöjeye tartılır. Üzerine 10 mL seyreltme çözeltisi eklenir 10 dk ultrasonik banyoda tutulur. Ardından, seyreltme çözeltisi ile hacmine tamamlanır.

Mk Stok Çözeltisi (2000 µg/mL): 20 mg Mk Nitrat 10 mL'lik balon jöjeye tartılır. Üzerine 5 mL seyreltme çözeltisi eklenir 10 dk ultrasonik banyoda tutulur. Ardından, seyreltme çözeltisi ile hacmine tamamlanır.

⁵ Analiz yönteminde kullanılan bütün çözeltiler hergün taze olarak hazırlanır

Standart Çözelti (750 µg/mL Mt, 86.5 µg/mL Ld =100 µg/mL Ld HCl, 200 µg/mL Mk Nitrat): 2 mL Mt stok çözeltisinden, 2 mL Ld stok çözeltisinden, 2 mL Mk Nitrate stok çözeltisinden 20 mL'lik balon jøjeye alınır. Seyreltme çözeltisi ile hacmine tamamlanır. 0.45 µm PTFE filtreden süzülür⁶.

3.2.3. Farmasötik Preparatın Analize Hazırlanması

10 tablet alınır, öğütücüde öğütülür. Bu karışımdan tek doz miktarı kadar tartım (2000 mg) alınarak 100 mL'lik balon jøjeye alınır, üzerine 50 mL seyreltme çözeltisi eklenir ve 30 dk ultrasonik banyoda tutulur ve ardından seyreltme çözeltisi ile hacmine tamamlanır. Bu çözeltiden 2 mL alınarak 20 mL'lik balon jøjeye aktarılır ve seyreltme çözeltisi ile hacmine tamamlanır. 0.45 µm PTFE filtreden süzülür (750 µg/mL Mt, 100 µg/mL Ld HCl, 200 µg/mL Mk nitrat).

3.2.4. Plasebo Hazırlığı

Vajinal tablet ürününde bulunan yardımcı maddeler Exagyn kısa ürün bilgisi dokümanında yer alan yardımcı maddeler, Tablo 3.1'deki oranlarda eklenmiş ve porselen havanda karıştırılmışlardır (1). Toplam oran %100 olacak şekilde ayarlama yapılmıştır. Vajinal tabletlerde kullanılan yardımcı madde oranları yaklaşık olarak seçilmiş olup Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA, Food and Drug Administration) tarafından yayınlanan liste üzerinden belirlenmiştir (78).

Tablo 3.1. Plasebo yardımcı madde miktarları.

Yardımcı Maddeler	% Oranlar
Mikrokristalin selüloz	33
Magnezyum alüminyum silikat	8
Sodyum nişasta glikolat	2
Mannitol/krospovidon/polivinil Asetat	43
Mısır nişastası	4
Kolloidal anhidrit silika	4
Magnezyum stearat	2

⁶Analiz yöntemi geliştirme çalışmalarında, kullanılan HPLC cihazının bütün bölümlerinin (pompa, valf sistemi, detektör, örnekleme ünitesi) operasyonel (OQ, *operational qualification*) ve performans kalibrasyonları (PQ, *performance qualification*) USP <1058> kalifikasyon monografisi doğrultusunda yapıldığından, ekipman kaynaklı belirsizlik kaynakları elimine edilmiş ve iç standart kullanılmamıştır.

Mt Plasebo Hazırlığı: Tablo 3.1’de yer alan % oranlar temel alınarak, farmasötik preparattaki⁷ Ld HCl ve Mk nitrat ilavesi yapılmıştır.

Ld HCl Plasebo Hazırlığı: Tablo 3.1’de yer alan % oranlar temel alınarak, farmasötik preparattaki Mt ve Mk ilavesi yapılmıştır.

Mk Nitrat Plasebo Hazırlığı: Tablo 3.1’de yer alan % oranlar temel alınarak, farmasötik preparattaki Ld HCl ve Mt ilavesi yapılmıştır.

3.2.5. Malzemelerin Temizliği

Bütün cam malzemeler ultra saf su ile yıkandıktan sonra, %96’lık etanol ile yıkanmışlardır. HPLC vialleri her numune çözeltisi için sıfır kullanılmış olup, kullanıldıktan sonra atılmıştır. HPLC sisteminde kullanılan kolon, çalışma sonunda sistemden 30 dk HPLC kalitesinde %95-%5 su-metanol ve 30 dk %60-%40 su-metanol geçirilerek (akış hızı: 1 mL/dk) temizlenmiştir.

3.3. HPLC Analiz Yönteminin Geliştirilmesi

3.3.1. Analizinin Yapılışı ve Kromatografik Koşulların Saptanması

HPLC yöntemin optimum parametrelerin tespit edilmesi amacıyla, dalga boyu taraması, sabit faz belirlenmesi, hareketli faz bileşiminde yer alan organik çözücü ve kullanılacak tampon çözelti miktarının/içerdiği tuz miktarının/ pH’nın tespit edilmesi, akış hızının, enjeksiyon hacminin ve son olarak uygulanacak gradient programın tespit edilmesi, çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Her üç etken madde için ortak bir dalga boyunda çalışmanın yapılması amacıyla optimizasyon çalışması da gerçekleştirilmiştir. Ters faz sıvı kromatografi yöntemi kullanılmıştır. HPLC analizlerinde sıklıkla tercih edilmesi ve analitlerin polarite (LogP) farklılıkları göz önüne alınarak, oktodesil (ODS) analitik kolon (marka/özellik: ACE C18 250 x 4.6 mm, 5µm) olarak tercih edilmiştir. Analiz oda sıcaklığında (22-25°C)

⁷ Farmasötik preparat Exagyn® Tablet olup, bir tablet ağırlığı ~2000 mg’dır. Bu miktar baz alındığında bir tablette yer alan etken madde miktarları ~ 1050 mg (100 mg Lidokain, 750 mg Metronidazol, 200 mg Mikonazol Nitrat) olduğundan dolayı, yardımcı maddelerin toplam miktarı ~950 mg’dır. Her bir plasebo hazırlığı bu miktar üzerinden hesaplanmış olup etken madde ilaveleri de bu miktar üzerinden ayarlanmıştır.

gerçekleştirilmiş olup, hareketli faz olarak, 0.035M amonyum asetat çözeltisi (Hareketli faz A) ve metanol (Hareketli faz B) tercih edilmiştir. Akış hızı 1.3 mL/dk olarak belirlenmiş olup, toplam analiz süresi 25 dk ile son haline getirilmiştir.

Analizi başlangıcında, Tablo 4.6.'da yer alan gradient sistemi ve akış hızı temel alınarak, sistemden 3 tekrarlı olarak (75 dk) seyreltme çözeltisi enjete edilmiştir. 3. Kez verilen seyreltme çözeltisi enjeksiyonu sonrasında gürültünün düşürüldüğü, kromatogramın stabil olduğu gözlenmiştir. Olası istenmeyen gürültü ve kromatogram görüntüsü gözlenmesi durumunda ilave seyreltme çözeltisi analizi gerçekleştirilmiştir. Seyreltme çözeltisi analizlerinde ölü hacim değeri de belirlenmiştir (79).

Hareketli faz gradient profilinin belirlenmesi amacıyla, her üç analitin alıkonma zamanları için farklı tampon ve organik faz oranları ile denemeler yapılmıştır. Ayrıca tampon çözelti derişiminin belirlenmesi amacıyla, 25 mM, 35 mM, 45 mM düzeyleri kontrol edilmiştir. Tampon çözelti pH aralığı 3.0, 4.0, 5.0, akış hızı için 1.0, 1.3, 1.5 mL/dk çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Analiz çalışmalarında kullanılan seyreltme çözeltisi bölüm 3.2.2'de anlatılmıştır. Kullanılan detektör UV/GB'dir. Bütün analizlerin gerçekleştirilmesi sonrası, kolon temiz bırakıldığından emin olunduktan sonra çalışma sonlandırılmıştır.

3.3.2. Analizin Yönteminin Validasyon Çalışması

Kararlılık

Bölüm 3.2.2'de anlatılan standart çözelti kararlılığını belirlemek için buzdolabı (2 °C -8 °C) koşullarında ve oda sıcaklığı (22 °C -25 °C) koşullarında bekletilmiş olup, 24., 48. saatlerde taze, 5 tekrarlı olarak hazırlanan standart çözeltilerin pik alanlarının istatistiksel yöntemlerle ile kıyaslanarak gerçekleştirilmiştir.

Özgünlük

Yöntemin her üç analit içinde özgün olduğu, bölüm 3.2.4'de hazırlığı anlatılan, plasebo numuneleri, seyreltme çözeltisi (kör çözelti), standart çözeltisi, bölüm 3.2.3'de ki şekilde hazırlanan farmasötik preparat çözeltisi kromatogramları karşılaştırılarak ispat edilmiştir.

Doğrusallık ve Aralık

Analitik yöntemin doğrusallığı, derişim ile test ölçümlerinden alınan yanıt arasındaki ilişki ile kontrol edilir. Analiz yöntemleri için doğrusallık çalışması, hedef derişimin %80 ila %120'si olan en az beş derişim seviyesinde standartlar hazırlanarak gerçekleştirilmesi önerilir (80). Regresyon hesaplaması ile korelasyonun derecesi ölçülür. Korelasyon katsayısı, y eksenini kesim noktası, eğim gibi veriler grafik üzerinden çıkarılır. Genel olarak analiz yönteminin, 0,999'dan yüksek korelasyon katsayısına sahip olması, regresyon çizgisi verilerinin kabul edilebilirliği için bir kanıt olarak kabul edilir (82, 83).

Bu tez çalışmasında, doğrusallık 6 farklı noktadan, bölüm 3.2.2. kısmında yer alan standart çözelti derişim miktarının, %10'u ile %150'si derişimlerde hazırlanmıştır. Her bir analit için doğrusallık aralığını saptamak amacıyla aşağıdaki şekilde artan derişime sahip çözeltiler hazırlanmıştır. Bu çözeltilerin derişimlerine karşı alan değerleri yardımı ile hazırlanan grafiklerden hesaplanan regresyon denklemleri ve korelasyon katsayıları vasıtasıyla doğrusallık istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Mt Standart Stok Çözeltisi: 150 mg Mt Standardı 20 mL'lik balon jöjeye tartılır. Üzerine 10 mL seyreltme çözeltisi eklenir 10 dk ultrasonik banyoda tutulur. Ardından, seyreltme çözeltisi ile hacmine tamamlanır (7500 µg/mL Mt)

Ld Standart Stok Çözeltisi: 17.3 mg Ld standardı (20mg Ld HCl'e eşdeğer) 20 mL'lik balon jöjeye tartılır. Üzerine 10 mL seyreltme çözeltisi eklenir 10 dk ultrasonik banyoda tutulur. Ardından, seyreltme çözeltisi ile hacmine tamamlanır (865 µg/mL Ld = 1000 µg/mL Ld HCl)

Mk Nitrat Standart Stok Çözeltisi: 40 mg Mk Nitrat Standardı 20 mL'lik balon jöjeye tartılır. Üzerine 10 mL seyreltme çözeltisi eklenir, 10 dk ultrasonik banyoda tutulur. Ardından, seyreltme çözeltisi ile hacmine tamamlanır. (2000 µg/mL Mk Nitrat).

Çözelti 1: (%10) 1 mL Mt Standart Stok çözeltisinden, 1 mL Ld Standart Stok çözeltisinden, 1 mL Mk Nitrat Standart Stok çözeltisinden 100 mL'lik balon jojeye alınır. Seyreltme çözeltisi ile hacmine tamamlanır. 0.45 µ PTFE filtreden süzülür (75 µg/mL Mt, 8.65 µg/mL Ld = 10 µg/mL Ld HCl, 20 µg/mL Mk Nitrat)

Çözelti 2: (%50) 1 mL Mt Standart Stok çözeltisinden, 1 mL Ld standart Stok çözeltisinden, 1 mL Mk Nitrat Standart Stok çözeltisinden 20 mL'lik balon jojeye alınır. Seyreltme çözeltisi ile hacmine tamamlanır. 0.45 µ PTFE filtreden süzülür (375 µg/mL Mt, 43.3 µg/mL Ld = 50 µg/mL Ld HCl, 100 µg/mL Mk Nitrat).

Çözelti 3: (%75) 1.5 mL Mt Standart Stok çözeltisinden, 1.5 mL Ld Standart Stok çözeltisinden, 1.5 mL Mk Nitrat Standart Stok çözeltisinden 20 mL'lik balon jojeye alınır. Seyreltme çözeltisi ile hacmine tamamlanır. 0.45 µ PTFE filtreden süzülür (562.5 µg/mL Mt, 64.9 µg/mL Ld = 75 µg/mL Ld HCl, 150 µg/mL Mk Nitrat).

Çözelti 4: (%100) 2 mL Mt Standart Stok çözeltisinden, 2 mL Ld Standart Stok çözeltisinden, 2 mL Mk Nitrat Standart Stok çözeltisinden 20 mL'lik balon jojeye alınır. Seyreltme çözeltisi ile hacmine tamamlanır. 0.45 µ PTFE filtreden süzülür (750 µg/mL Mt, 86.5 µg/mL Ld = 100 µg/mL Ld HCl, 200 µg/mL Mk Nitrat).

Çözelti 5: (%125) 2.5 mL Mt Standart Stok çözeltisinden, 2.5 mL Ld Standart Stok çözeltisinden, 2.5 mL Mk Nitrat Standart Stok çözeltisinden 20 mL'lik balon jojeye alınır. Seyreltme çözeltisi ile hacmine tamamlanır. 0.45 µ PTFE filtreden süzülür (937.5 µg/mL Mt, 108.1 µg/mL Ld = 125 µg/mL Ld HCl, 250 µg/mL Mk Nitrat).

Çözelti 6: (%150) 3 mL Mt Standart Stok çözeltisinden, 3 mL Ld Standart Stok çözeltisinden, 3 mL Mk Nitrat Standart Stok çözeltisinden 20 mL'lik balon jojeye alınır. Seyreltme çözeltisi ile hacmine tamamlanır. 0.45 µ PTFE filtreden süzülür (1125 µg/mL Mt, 129.8 µg/mL Ld = 150 µg/mL Ld HCl, 300 µg/mL Mk Nitrat).

Doğruluk ve Geri Kazanım

Test sonuçlarının gerçek değerlerle uyum ve geri kazanım kontrolü için Uluslararası Uyum Konseyinin de (ICH, *International Council of Harmonization*) önerdiği bir yöntem (*geri elde, recovery*) olan, plasebo üzerine doğruluk çözeltileri hazırlığı kısmında anlatıldığı şekilde, 3 farklı derişimde etken madde ilavesi ile hazırlanan çözeltilerin, 3 tekrarlı olarak hazırlanması ve analiz edilmesi yöntemi uygulanmıştır. Hazırlanan doğruluk çözeltileri, 3.2.2'de anlatılan standart ve farmasötik preparat çözelti içeriklerindeki etken madde derişimlerinin %50-%150 arasındadır. (100% = 750 µg/mL Mt, 100 µg/mL Ld HCl, 200 µg/mL Mk)

Doğruluk çözeltilerinin hazırlığı aşağıda yer aldığı gibidir.

Çözelti 1 (%50): 190 mg plasebo, 75 mg Mt, 8.65 mg Ld (10mg Ld HCl'e eşdeğer), 20 mg Mk Nitrat 200 mL'lik balon jöjeye tartılır, üzerine 100 mL seyreltme çözeltisi eklenir 15 dk ultrasonik banyoda bekletilir. Seyreltme çözeltisi ile hacmine tamamlanır. 0.45 µ PTFE filtreden süzülür. (375 µg/mL Mt, 43.3 µg/mL Ld = 50 µg/mL Ld HCl, 100 µg/mL Mk Nitrat %50)

Çözelti 2 (%100): 95 mg plasebo, 75 mg Mt, 8.65 mg Ld (10mg Ld HCl'e eşdeğer), 20 mg Mk Nitrat 100 mL'lik balon jöjeye tartılır, üzerine 50 mL seyreltme çözeltisi eklenir 15 dk ultrasonik banyoda bekletilir. Seyreltme çözeltisi ile hacmine tamamlanır. 0.45 µ PTFE filtreden süzülür. (750 µg/mL Mt, 86.5 µg/mL Ld = 100 µg/mL Ld HCl, 200 µg/mL Mk Nitrat %100).

Çözelti 3 (%150): 95 mg plasebo, 112.5 mg Mt, 13 mg Ld (15 mg Ld HCl'e eşdeğer), 30 mg Mk Nitrat 100 mL'lik balon jöjeye tartılır, üzerine 50mL seyreltme çözeltisi eklenir 15 dk ultrasonik banyoda bekletilir. Seyreltme çözeltisi ile hacmine tamamlanır. 0.45 µ PTFE filtreden süzülür. (1125 µg/mL Mt, 130 µg/mL Ld = 150 µg/mL Ld HCl, 300 µg/mL Mk Nitrat %150).

Kesinlik ve Tekrarlanabilirlik

Analiz yönteminin kesinliği, tekrarlanabilirlik ve ara-kesinlik olarak elde edilmiştir. Doğruluk çalışmasında hazırlanan %100 derişime sahip çözelti 10 paralel

çözelti hazırlanmış ve iki farklı günde ikişer kez analiz edilmiştir. Gün içi sonuçlar üzerinden hesaplanan BSS değeri ile yöntemin tekrarlanabilirliği, günler arası sonuçları BSS değeri hesaplaması üzerinden yöntemin ara kesinliği ispat edilmiştir.

Gözlenebilme Sınırı ve Tayin Alt Sınırı (LOD ve LOQ)

Analiz yönteminin duyarlılığı, LOD (gözlenebilme sınırı) ve LOQ (tayin alt sınırı) belirlenmesi ile gerçekleştirilmiştir.

Bu amaçla Uluslararası uyum konseyinin (ICH, *International Council of Harmonization*) önerdiği hesaplama yöntemi olan, doğrusalık grafiğinin *ss* (*standart sapması*) ve eğimi, *S*, ile hesaplanan Formül 3.1. ve Formül 3.2.'den faydalanılmıştır (80). Formül üzerinden hesaplanan derişimlerde hazırlanan çözeltiler için enjeksiyon verilmiş ve hem LOD hem de LOQ düzeyinde sinyal olduğu gösterilmiştir.

$$\text{LOD} = \frac{3.3 \times ss}{S} \quad (3.1)$$

$$\text{LOQ} = \frac{10 \times ss}{S} \quad (3.2)$$

Sağlamlık ve Tutarlılık

Analiz yönteminin sağlam olduğunun ispatı amacıyla sistematik bir çalışma gerçekleştirilmiş olup, değişiklik yapılacak parametreler, akış hızı, dalga boyu ve hareketli faz özellikleri olarak seçilmiştir. Bu parametreler üzerinden gerçekleştirilen küçük değişikliklerin sistem uygunluk parametreleri üzerindeki etkileri incelenmiştir. Tutarlılık, 2 farklı analistin, 6 paralel hazırladığı %100 doğruluk numunesi çözeltisinin, 2 farklı cihazda analiz edilmesinin etkisi incelenerek kontrol edilmiştir.

3.3.3. Analiz Yönteminin Farmasötik Preparatta Uygulanması

Bu analiz yöntemi, Türkiye piyasasındaki tek bir muadili bulunan Exagyn ® vajinal tablet ürününe uygulanmıştır. Test çözeltisi 3.2.3'de anlatıldığı gibi, 6 kez art arda hazırlanmış ve analiz sonuçlarının BSS ve güven aralıkları tespit edilmiştir. Farmasötik preparatta yer alan Mt, Ld HCl ve Mk Nitrat miktarları, bölüm 3.2.2'de yer alan standart çözeltisi vasıtasıyla hesaplanmıştır. Standart çözeltisi art arda 2 kez

hazırlanmış ve her iki çözeltide HPLC sisteminde 5'er kez analiz edilmiştir. Ortalaması alınan her iki standart çözeltinin de kendi içlerindeki⁸ ve karşılıklı⁹ uyumu kontrol edilmiştir.

3.3.4. Sistem Uygunluk Testleri

Analiz yöntemi için sistem uygunluk testleri, Tablo 3.3'de yer alan, hem Amerikan hem de Türk farmakopesinde yer alan limitler/yönlendirmeler ışığında kontrol edilmiştir.

Tablo 3.2. Sistem uygunluk limitleri (84, 85)

Parametre	Limit
Kapasite Faktörü	$k' > 1.5$
Ayırıcılık	$R_s > 1.5$
Teorik Tabaka Sayısı	$N > 2000$
Alıkonma zamanı %BSS	$\%BSS \leq \%1$ (Min. 5 tekrar)
Pik Simetri Oranı	$P \leq 1.5$
Pik Alanı Tekrarlanabilirlik %BSS	$\%BSS \leq \%1$ (Min. 5 tekrar)

k' : Kapasite faktörü, R_s : Ayırıcılık, N : Teorik tabaka sayısı, t_R : Alıkonma zamanı, P : Pik simetri oranı

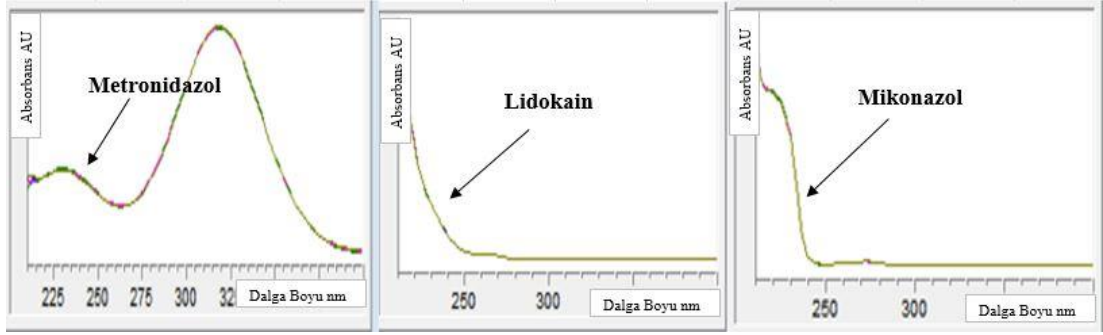
⁸ %BSS < %1.0

⁹ Alan ortalamaları %99-%101 Aralığında olmalıdır.

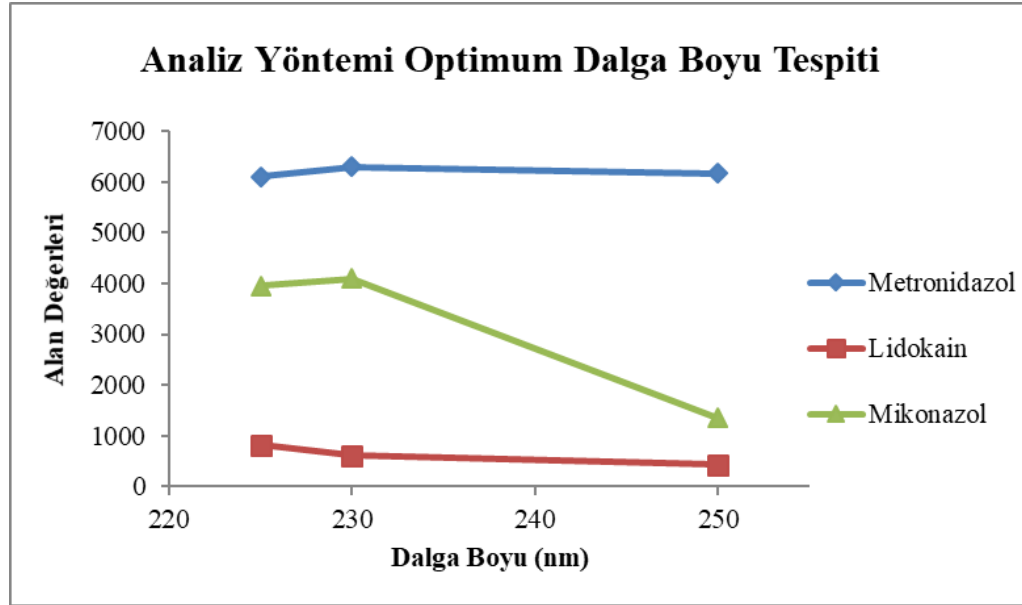
4. BULGULAR

4.1. Metranidazol, Lidokian ve Mikonazol için Dalga Boyu Taraması

3.2.2. bölümünde belirtilen standart çözelti üzerinden gerçekleştirilen dalga boyu taramasında her üç maddenin de 225-235 nm dalga boyu aralığında absorptans verdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.1). Her üç maddenin de optimum absorptans verdikleri dalga boyları tespiti amacıyla 225 nm, 230 nm ve 235 nm analizler gerçekleştirilmiş olup Şekil 4.2'den de görüleceği üzere 230 nm dalga boyunun optimum olduğuna karar verilmiştir.



Şekil 4.1. Standart çözeltisi absorpsiyon spektrumları.



Şekil 4.2. Optimum dalga boyu tespiti. Kromatografik koşullar: Gradient sistemi 4.2.2’de anlatıldığı gibi olup, HF A: 35mM amonyum asetat, HF B: metanol, akış hızı: 1.3mL/dk.

4.2. HPLC Sistem Optimizasyonu

Mt, Ld, Mk nitrat analitlerinin aynı anda test edilmesi için optimum kromatografik şartların tespit edilmesi amacıyla aşağıdaki parametrelerde değişiklik yapılmış ve sonuçlar incelenmiştir.

- Sabit faz
- Hareketli fazların ve gradient sisteminin belirlenmesi
 - Hareketli faz A tampon çözelti derişiminin belirlenmesi
 - Hareketli faz A pH’nın belirlenmesi
 - Hareketli faz B (organik çözücü) türü ve gradient sisteminin % oranlarının belirlenmesi
- Akış hızı
- Enjeksiyon hacmi

4.2.1. Sabit Faz

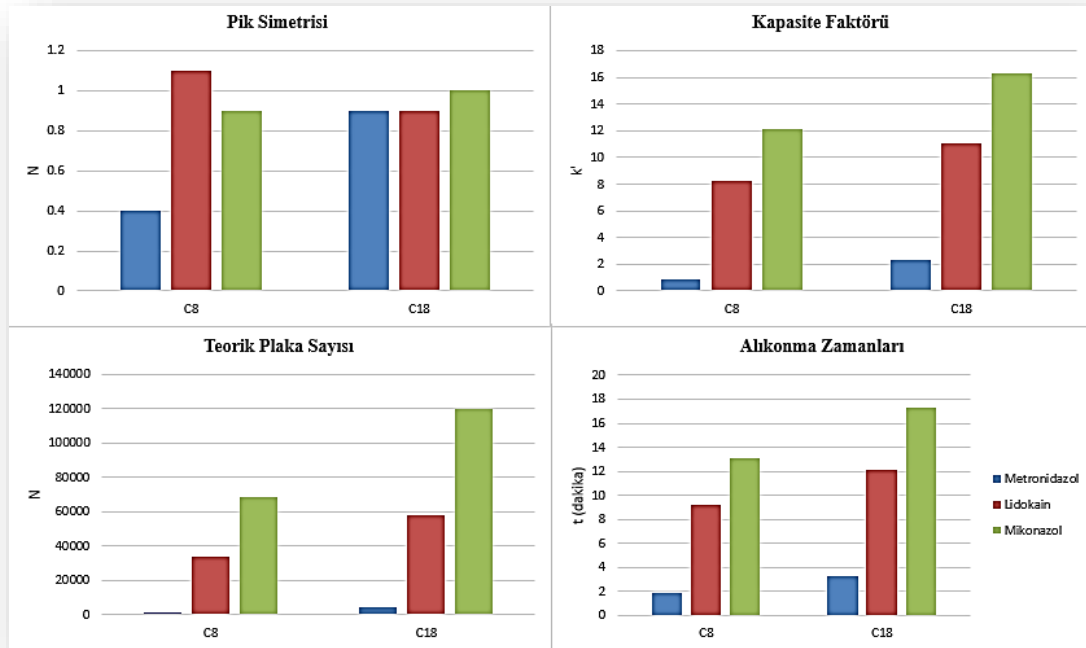
Her bir analitin HPLC analiz yöntemlerinde, C₈ ve C₁₈ sabit fazları kullanılmıştır (8, 18, 20, 86).

C₈ ve C₁₈ sabit faz denemeleri sonucunda, maddelerin alıkonma zamanı, kapasite faktörü, teorik tabaka sayısı parametreleri üzerinden incelenmiş (Tablo 4.1 ve Şekil 4.3) ve bu tez çalışması kapsamında kullanılacak sabit faz olarak, sistem uygunluk özellikleri daha iyi olan, ACE C18 250 x 4.6 mm 5 µm kullanılmasına karar verilmiştir.

Tablo 4.1. C₈ ve C₁₈ sabit fazların maddelerin sistem uygunluk özellikleri üzerindeki etkisi

Kolon	Mt				Ld				Mk			
	t _R (dk)	P	k'	N	t _R (dk)	P	k'	N	t _R (dk)	P	k'	N
C ₈	2.1	0.6	0.9	1444	9.2	1.1	8.2	33856	13.1	0.9	12.1	68644
C ₁₈	3.3	0.9	2.3	4340	12.1	0.9	11.1	58245	17.3	1.0	16.3	120298

t_R=Alıkonma zamanı, P: Pik Simetri oranı, k': Kapasite faktörü, N: Teorik tabaka sayısı



Şekil 4.3. C₈ ve C₁₈ sabit fazlarının Mt, Ld HCl, Mk nitrat sistem uygunluk parametreleri üzerindeki etkisi grafiği. Kromatografik koşullar: Gradient sistemi 4.2.2'de anlatıldığı gibi olup, HF A: 35 mM amonyum asetat, HF B: metanol, akış hızı: 1.3mL/dk.

4.2.2. Hareketli Fazların ve Gradient Sistemin Belirlenmesi

Hareketli fazların belirlenmesi için yapılan çalışmada hareketli faz A çözeltisinin tampon tuzu iyon derişimi, tampon çözelti pH'ı organik çözücü türü ve gradient sistemdeki hareketli faz % oranları ve akış hızı değışikliklerinin, sistem uygunluk parametreleri üzerindeki etkisi incelenmiştir.

Hareketli Faz A Tampon Çözelti Derişiminin Belirlenmesi

Hareketli fazda kullanılan tampon çözelti derişiminin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen çalışmalarda, 25mM, 35mM ve 45mM amonyum asetat çözeltileri hazırlanmış ve tampon çözeltiler olası HPLC sisteminde tıkanıklığa yol açmaması amacıyla 0.45 µm membran filtrelerden süzölmüştür. Deneme çalışmalarında pik simetrisi ve teorik tabaka sayısı üzerinde durulmuştur (Tablo 4.2., Şekil 4.4.).

- 25 mM hazırlanan hareketli faz A kullanıldığındaki etken maddelerin pik genişliği 35 mM ve 45 mM nazaran daha yüksek çıkmıştır. Bu durumun teorik tabaka sayısı (N) değeri üzerinde negatif etki yaratmıştır.
- 45 mM Ld HCl pik simetrisi açısından en kötü performansı göstermesi ve HPLC sisteminde tuz birikiminin 45 mM'larda daha fazla olması, zamanla sistemde tıkanma, korezyon gibi teknik problemlere yol açabileceği şüphesi ile 35 mM amonyum asetat çözeltisi ile hareketli faz A ile çalışılmasına karar verilmiştir.

Tablo 4.2. Hareketli faz A derişiminin etkisi

Hareketli Faz A Derişimi	Mt		Ld HCl		Mk Nitrat	
	P	N	P	N	P	N
25 mM	0.8	3500	0.8	40125	0.7	98348
35 mM	1	4522	0.9	58327	1.1	110296
45 mM	0.9	5112	1.3	39578	0.8	100986

P: Pik simetri oranı, N: Teorik tabaka sayısı



Şekil 4.4. Hareketli faz A derişiminin, Mt, Ld, Mk nitrat sistem uygunluk parametreleri üzerindeki etkisi. Kromatografik koşullar: Gradient sistemi 4.2.2’de anlatıldığı gibi olup, HF A: 35 mM amonyum asetat, HF B: metanol, akış hızı: 1.3mL/dk.

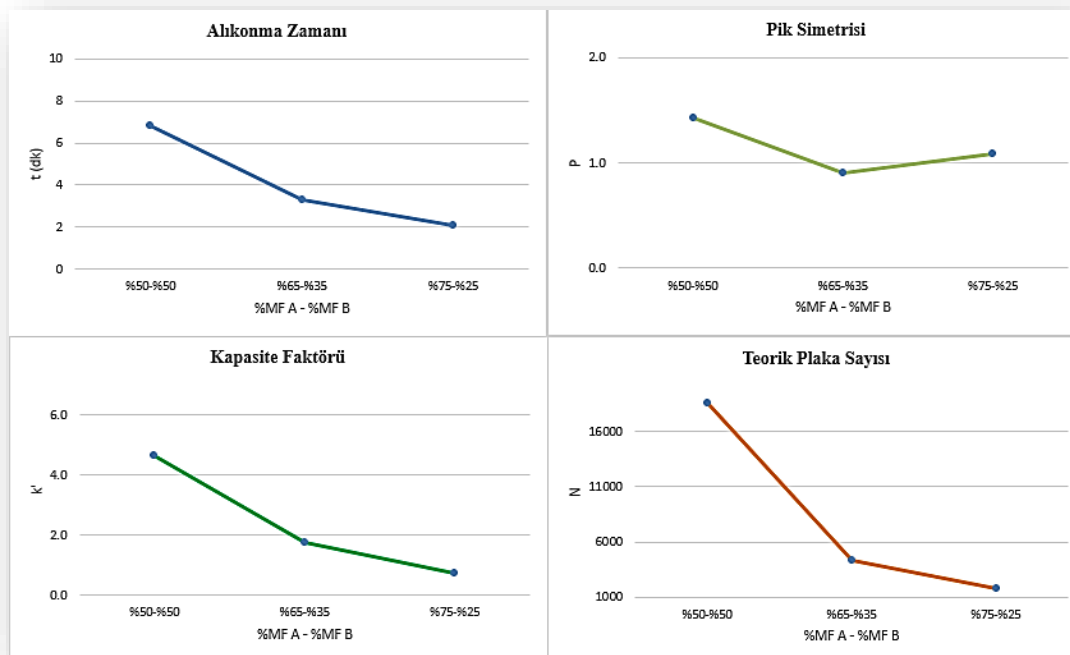
Organik Çözücü Türü ve Gradient Sisteminin % Oranlarının Belirlenmesi

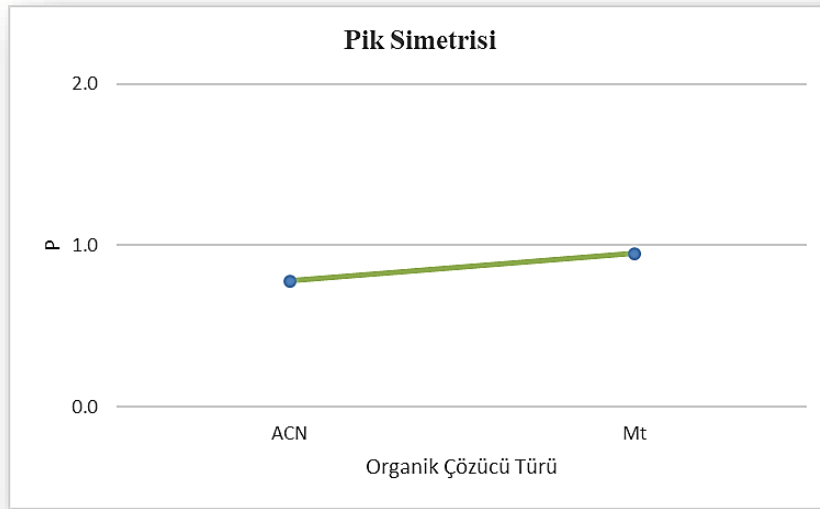
Organik çözücü miktarının belirlenmesi ve gradient sisteminin % hareketli faz oranlarının tespit edilmesi amacıyla sisteme 10 µL 3.2.2’de anlatılan standart çözelti enjeksiyonu gerçekleştirilmiş ve polaritesi en yüksek olan Mt pikinin alıkonma zamanı, kapasite faktörü, pik simetrisi ve teorik tabaka sayısı özellikleri incelenmiştir (Tablo 4.3.). Hareketli faz oranlarının 7.dk ya kadar hareketli faz A: %65, hareketli faz b %35 olması halinde, Mt pikinin, alıkonma zamanı ve pik simetri oranı açısından, optimum olacağı tespit edilmiştir. Bu aşamada organik çözücü türü olarak, asetonitril ve metanol kullanılmış olup Mt pik simetrisi açısından metanolün daha uygun olduğu gözlenmiş ve hareketli faz B olarak kullanılmasına karar verilmiştir (Tablo 4.3., Şekil 4.5.).

Tablo 4.3. Hareketli faz % oranlarının belirlenmesi (İlk 7 dk için).

t=0 ile t=7.dk arası %HF A - %HF B Oranları	Mt Sistem Uygunluk Parametreleri			
	<i>t</i>	<i>P</i>	<i>k'</i>	<i>N</i>
%50-%50	6.8	1.4	4.7	18496
%65-%35	3.3	0.9	1.8	4356
%75-%25	2.1	1.1	0.8	1764

t_R =Alıkonma zamanı, *P*: Pik aymetrisi oranı *k'*: Kapasite faktörü, *N*: Teorik tabaka sayısı,

**Şekil 4.5.** Hareketli faz oranlarının Mt piki sistem uygunluk parametreleri üzerindeki etkisi (t=0 ile t=7.dk için).

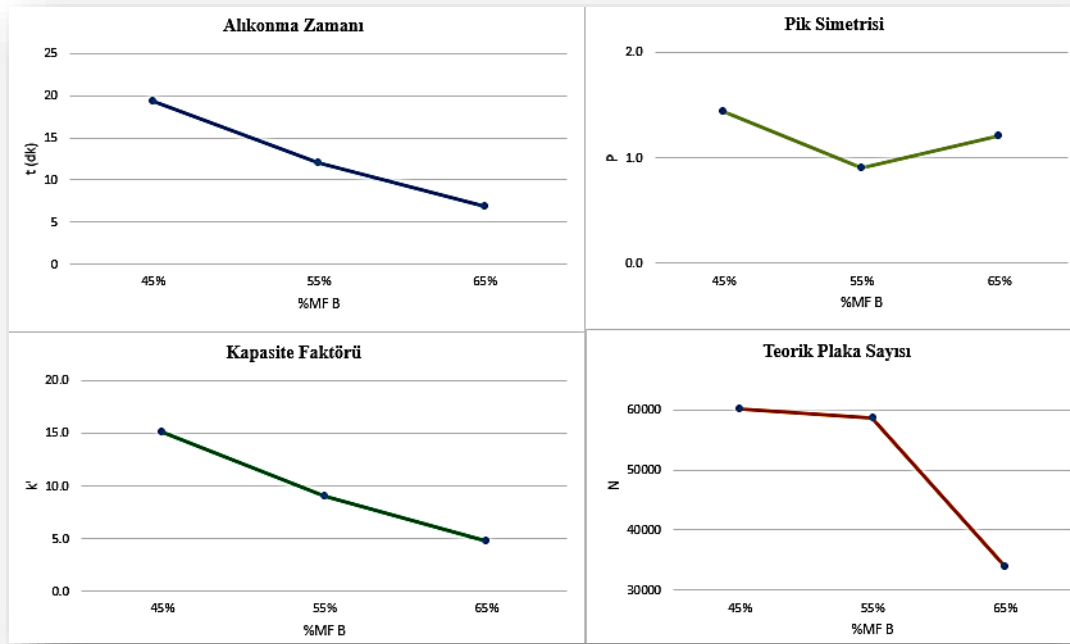


Şekil 4.6. Pik simetrisi üzerinde asetonitril ve metanol etkisi.

Mt için optimum sistem uygunluk parametreleri belirlendikten sonra, polaritesi Mt'den düşük olan Ld maddesi için uygun sistem uygunluk parametreleri elde etmek amaçlı farklı hareketli faz oranları denenmiştir. İlk olarak t=0 ile 5. dk arasında uygulanan %65-%35 oranı ile devam ettirilen analiz sonrası Ld pikinin alıkonma zamanının çok uzaması pik genişliğinin artışına (=teorik tabaka sayısında düşüş) sebep olmuştur. Bu sebeple organik çözücü (Hareketli Faz B) miktarında artış denemeleri yapılmış olup %45, %55 ve %65 organik çözücü oranları ile yapılan çalışmalarda, Ld pikinin, alıkonma zamanı, pik simetrisi ve teorik tabaka sayısı kontrol edilmiştir (Tablo 4.4., Şekil 4.7.).

Tablo 4.4. Hareketli faz % oranlarının belirlenmesi (7 dk ile 20. dk arası için).

t=7.dk ile t=20.dk arası %HF B Oranı	Ld Sistem Uygunluk Parametreleri			
	t	P	k'	N
%45	19.4	1.4	15.2	60218
%55	12.1	0.9	9.1	58564
%65	6.9	1.2	4.8	33856

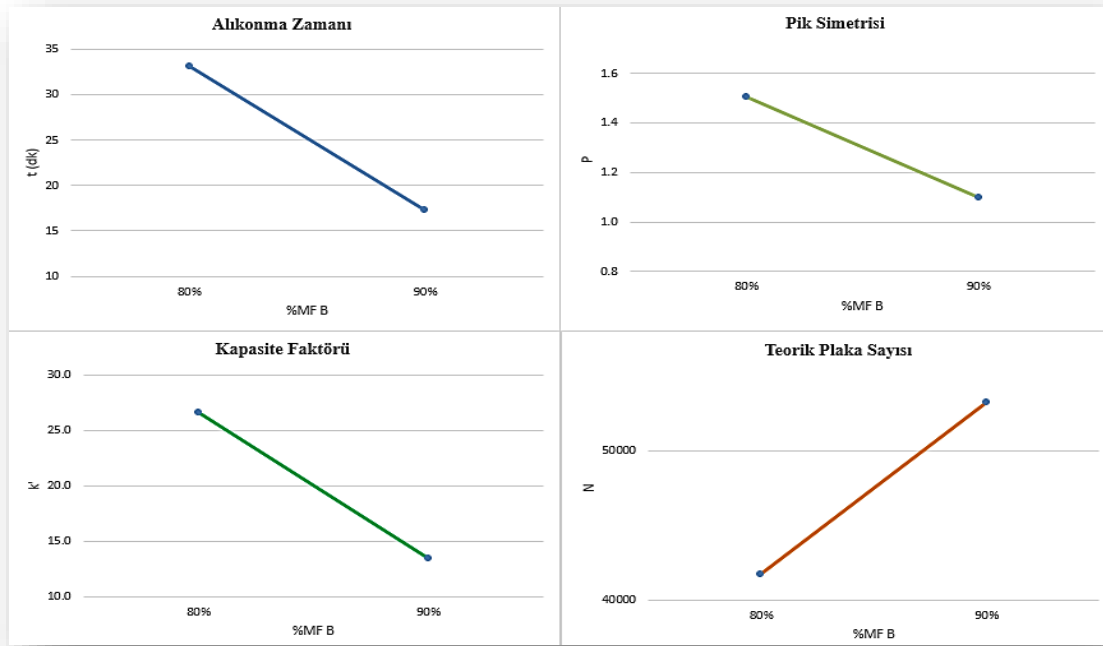


Şekil 4.7. Hareketli faz B % oranının Ld piki sistem uygunluk parametreleri üzerindeki etkisi (t=7 ile t=20.dk için).

Ld ve Mt piklerin alıkonma zamanlarının belirlenmesi sonrasında, en düşük polariteye sahip, sabit faz (C₁₈) ile en yüksek etkileşimde olacak, Mk nitrat maddesi için, sistem uygunluk parametreleri optimum olacak şekilde organik çözelti (HF B) oranı yükseltilerek deneme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. 20.dk sonrasında MF B %55 ile akışa devam ettirilmiş olsa da Mk nitrat pikinin alıkonma süresinin çok uzaması (~30. dk) nedeniyle, HF B oranları %80, %90 ve %100 olarak gerçekleştirilmiş, fakat %100 metanol ile yapılan çalışma, kromatogram zemin çizgisi üzerinde yüksek gürültüye sebep olması sebebiyle gerçekleştirilmemiştir.

Tablo 4.5. Hareketli faz % oranlarının belirlenmesi (20 dk ile 25. dk arası için).

t=7.dk ile t=20.dk arası %HF B Oranı	Mk Piki Sistem Uygunluk Parametreleri			
	t	P	k'	N
%80	19.4	1.4	15.2	60218
%90	12.1	0.9	9.1	58564



Şekil 4.8. Hareketli faz B % oranının Mk nitrat piki sistem uygunluk parametreleri üzerindeki etkisi (t=20 ile t=25.dk için).

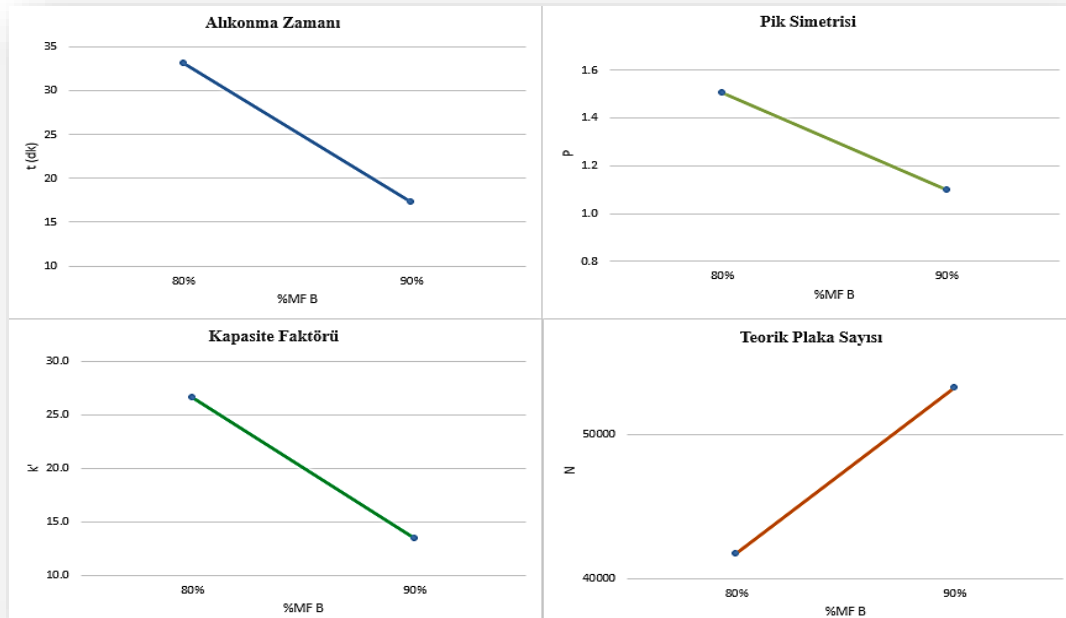
Her üç madde için en uygun hareketli faz oranları belirlendikten sonra, gradient sisteminde ani geçişlerden kaynaklanabilecek problemlerden (*gürültü, ani basınç değişimi, ... gibi*) kaynaklı her bir geçiş aralığı yavaş tutulmuştur. Bu ara geçişler ve son ayarlamalar ile birlikte gradient sistemi zamana bağlı hareketli faz oranlar tablosu aşağıda yer aldığı gibidir (Tablo 4.6.). 21. dk ile 25.dk bir sonraki enjeksiyon için başlangıç % hareketli faz oranları ile sistemi şartlandırma için eklenmiştir.

Tablo 4.6. Gradient sistemi deneme çalışmaları sonrası belirlenen zaman bağlı % hareketli faz oranları.

Zaman (dk)	% Hareketli Faz A	% Hareketli Faz B
0.00	65	35
3.00	65	35
5.00	45	55
12.00	10	90
21.00	10	90
21.10	65	35
25.00	65	35

4.2.3. Hareketli Faz A'nın pH'sının Belirlenmesi

Hareketli faz A tampon çözelti derişiminin belirlenmesi sonrasında farklı pH'larda tampon çözeltiler hazırlanmış olup, pH 3.0, pH 4.0 ve pH 5.0 aralığında deneme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. 35 mM tampon çözelti pH'ı ~4 gelirken, pH 3.0'e ayarlama asetik asit ile pH 5.0'e 0.1 N sodyum hidroksit ile gerçekleştirilmiştir. Deneme çalışmalarında her 3 analit için alıkonma zamanı, pik simetri oranı ve kapasite faktörü incelemeleri yapılmış olup, her üç analitinde pKa değerinin 5.0'den büyük olması sebebiyle belirleyici bir fark gözlenmemiş olup, pH değeri 4.0 olarak seçilmiştir. Herhangi bir pH ayarlama yapılmasına gerek kalmadığından, hareketli faz A hazırlığı basit tutulmuştur.

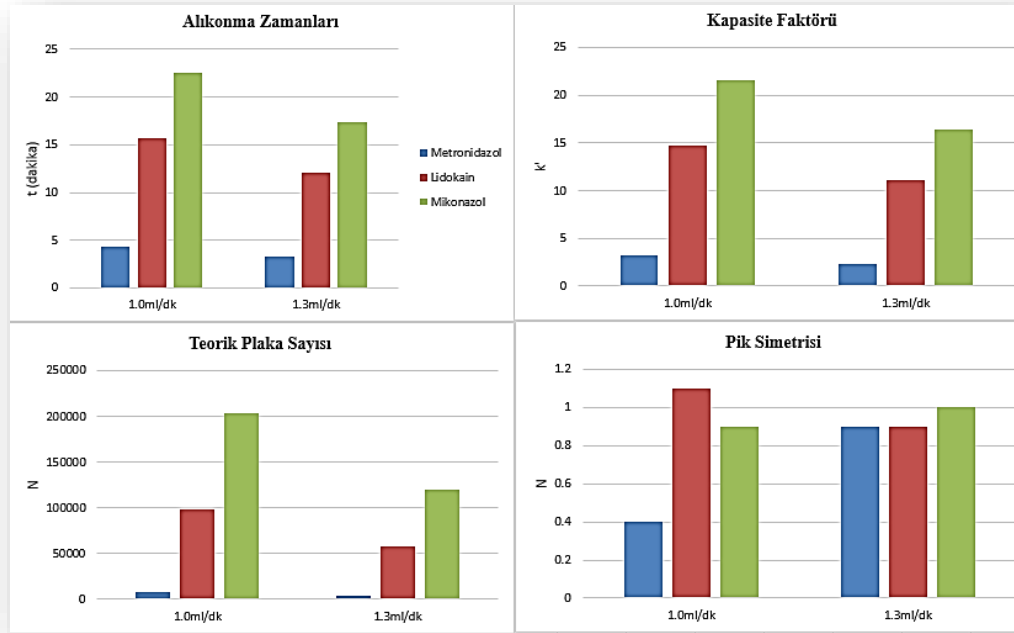


Şekil 4.9. Hareketli faz A pH'sının sistem uygunluk parametreleri üzerindeki etkisi. Kromatografik koşullar: Gradient sistemi 4.2.2'de anlatıldığı gibi olup, HF A: 35 mM amonyum asetat, HF B: metanol, akış hızı: 1.3 mL/dk.

4.2.4. Akış Hızının Belirlenmesi

Akış hızının belirlenmesinde, 1.0 mL/dk, 1.3 mL/dk ve 1.6 mL/dk olmak üzere 3 farklı değişiklik ile analiz gerçekleştirilmiş olup 1.6 mL/dk hızında sistem basıncının yüksek olması (>200 bar) sebebiyle, akış hızı ile çalışmalar tamamlanamamıştır.

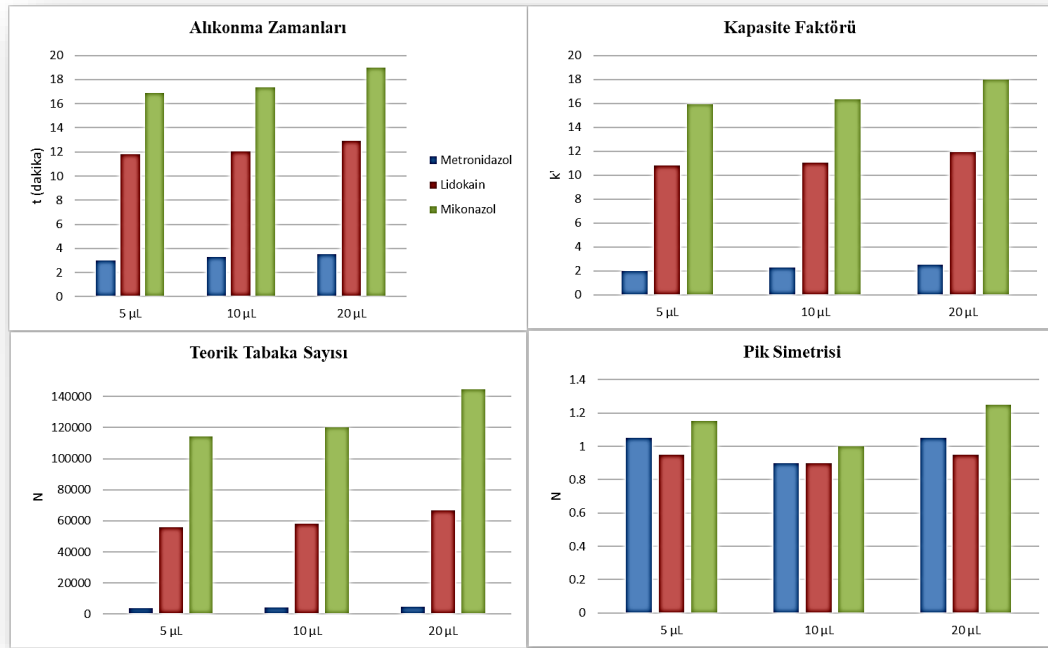
Çalışmaların gerçekleştirildiği 1.0 ve 1.3 mL/dk hızları, her 3 analit için alıkonma zamanı, pik simetri oranı, kapasite faktörü ve teorik tabaka sayısı üzerinden değerlendirilmiştir (Şekil 4.10). 1.0 mL/dk akış hızında alıkonma zamanlarının uzun olması, pik simetri oranlarındaki bozulma sebebiyle, 1.3 mL/dk akış hızı optimum olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.10. Akış hızının sistem uygunluk parametreleri üzerindeki etkisi.
Kromatografik koşullar: Gradient sistemi 4.2.2’de anlatıldığı gibi olup,
HF A: 35 mM amonyum asetat, HF B: metanol, akış hızı: 1.3 mL/dk.

4.2.5. Enjeksiyon Hacminin Belirlenmesi

3 farklı (5 μ L, 10 μ L, 20 μ L) enjeksiyon hacmi denemelerinde, enjeksiyon hacminin belirlenmesi için, pik simetri oranı, pik alan değerleri ve teorik tabaka sayısı baz alınmıştır. 5 μ L ile en iyi pik simetri oranı elde edilirken, Ld alan değerinin düşük olması ve HPLC sistemi için minimum enjeksiyon hacminde çalışmanın riskli olabileceği sebebiyle tercih edilmemiştir. 3.2.3’de ve 3.2.2’de anlatılan farmasötik preparat ve standart çözelti içerisinde yer alan Mt derişiminin yüksek olması analit pikinin üstünde kırılmaya (overload), pik simetri oranının negatif etkilenmesine sebep olduğu gerekçesiyle, 20 μ L enjeksiyon hacmi tercih edilmemiştir.



Şekil 4.11. Enjeksiyon hacminin sistem uygunluk parametreleri üzerindeki etkisi. Kromatografik koşullar: Gradient sistemi 4.2.2’de anlatıldığı gibi olup, HF A: 35 mM amonyum asetat, HF B: metanol, akış hızı: 1.3 mL/dk.

4.2.6. Filtre Seçimi

Analiz yönteminde kullanılacak bütün çözeltilerin süzülmesin de kullanılacak filtre türü seçimi amacıyla Bölüm 3.2.2 ve Bölüm 3.2.3’de yer alan farmasötik preparat ve standart çözeltileri ayrı ayrı 0.45 µm PTFE (PoliTetraFloroEtilen) ve 0.45 µm PVDF (PoliViniliDeFlorit) filtrelerden süzülmuş, santrifüje edilen çözeltilerin pik alanları ile kıyaslama yöntemi esas alınarak karşılaştırılmıştır (Tablo 4.7). PTFE filtrenin en uygun seçim olduğuna karar verilen çalışma, 1’er mL porsiyonlar halinde 5 kez art arda PTFE filtreden süzülen analiz numunelerinin, ayrı ayrı enjeksiyonları sisteme verilerek gerçekleştirilmiştir (Tablo 4.8). Bütün istatistiksel katsayıların hesaplanması Ek 6’da gösterildiği gibidir.

Tablo 4.7. Filtre türü seçimi

Filtre Türü	Santrifüjlenen ve Filtre Edilen Farmasötik Preparat Çözeltisi (Bölüm 3.2.3) Alan Değerleri Uyum Kontrolü								
	<i>Mt</i>			<i>Ld HCl</i>			<i>Mk Nitrat</i>		
	Santrifüj	PTFE	PVDF	Santrifüj	PTFE	PVDF	Santrifüj	PTFE	PVDF
1.Enj.	6467.3	6469.0	6332.5	606.1	598.9	598.5	3218.2	3276.5	3212.0
2.Enj.	6452.2	6446.0	6336.2	607.0	609.1	598.7	3219.4	3265.8	3220.8
3.Enj.	6447.6	6487.1	6353.4	606.0	601.1	590.7	3218.8	3279.1	3205.2
4.Enj.	6459.8	6483.9	6371.9	601.2	602.9	590.5	3238.7	3251.0	3213.6
5.Enj.	6456.8	6472.2	6333.2	605.7	601.4	591.0	3222.3	3279.5	3218.1
Ort.	6456.8	6471.7	6345.4	605.2	602.7	593.9	3223.5	3270.4	3214.0
SS	6	13	14	2	3	4	7	10	5
%BSS	0.1	0.3	0.3	0.4	0.6	0.7	0.3	0.4	0.2
%Uyum	-	100	102	-	100	102	-	99	100

Enj: Enjeksiyon

Tablo 4.8. Filtre içi uyum kontrolü.

Vial no	PTFE filtreden art arda geçirilerek 5 adet 1'er mL süzülerek hazırlanan Standart Çözelti (Bölüm 3.2.2) Alan Değerleri Uyum Kontrolü		
	<i>Mt</i>	<i>Ld HCl</i>	<i>Mk</i>
	Alan	Alan	Alan
1.Vial	6010.8	585.6	3032.0
2.Vial	6017.6	582.0	3027.6
3.Vial	6018.2	584.3	3026.6
4.Vial	6016.6	582.6	3025.8
5.Vial	6020.5	584.3	3027.0
Ortalama	6016.74	583.76	3027.80
SS	3.23	1.30	2.18
%BSS	0.06	0.25	0.08

4.3. HPLC Yöntem Validasyonu

4.3.1. Analitik Çözeltilerin Kararlılığı

Mt, Ld HCl, Mk nitrat çözeltilerinin kararlılığı 3.3.2.1'de belirtilen şartlarda bekletilen numunelerin analizlerinin gerçekleştirilmesi ve taze hazırlanmış 3.2.2'de belirtilen standart çözelti sonuçlarının karşılaştırılması vasıtasıyla gerçekleştirilmiştir. Her üç analit üzerinden yapılan test sonuçları neticesinde hem oda sıcaklığında hem de buzdolabı sıcaklığında (2-8 °C) bekletilen numunelerin 48 saat'e kadar, sonuçların Friedman iki yönlü varyans analizine göre gerçekleştirilen hesaplamalar sonucunda, kararlı olduğu tespit edilmiştir. ($p < 0.05$, Tablo 4.9).

Tablo 4.9. Analitik çözeltilerin kararlılık çalışması sonuçları.

Zaman (Saat)	Mt		Ld HCl		Mk Nitrat	
	<i>Oda Sıcaklığı</i> (22-25 °C)	<i>Buzdolabı</i> (2-8 °C)	<i>Oda Sıcaklığı</i> (22-25 °C)	<i>Buzdolabı</i> (2-8 °C)	<i>Oda Sıcaklığı</i> (22-25 °C)	<i>Buzdolabı</i> (2-8 °C)
	%	%	%	%	%	%
0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
12	99.5	100.2	99.7	100.1	100.6	99.6
24	99.1	99.4	99.4	99.3	99.4	99.8
48	99.4	99.7	99.0	99.6	99.9	99.2

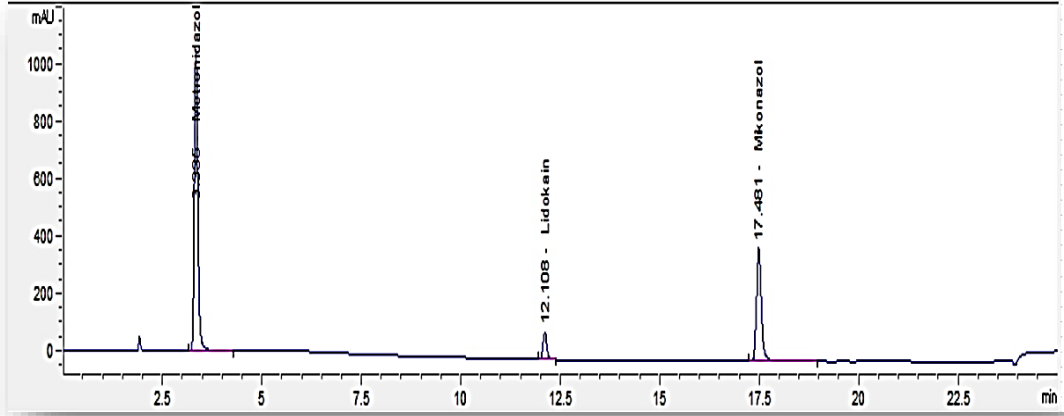
%: başlangıç zaman noktası ile ilgili zaman noktası alan değerleri üzerinden hesaplanmıştır.

4.3.2. Özgünlük

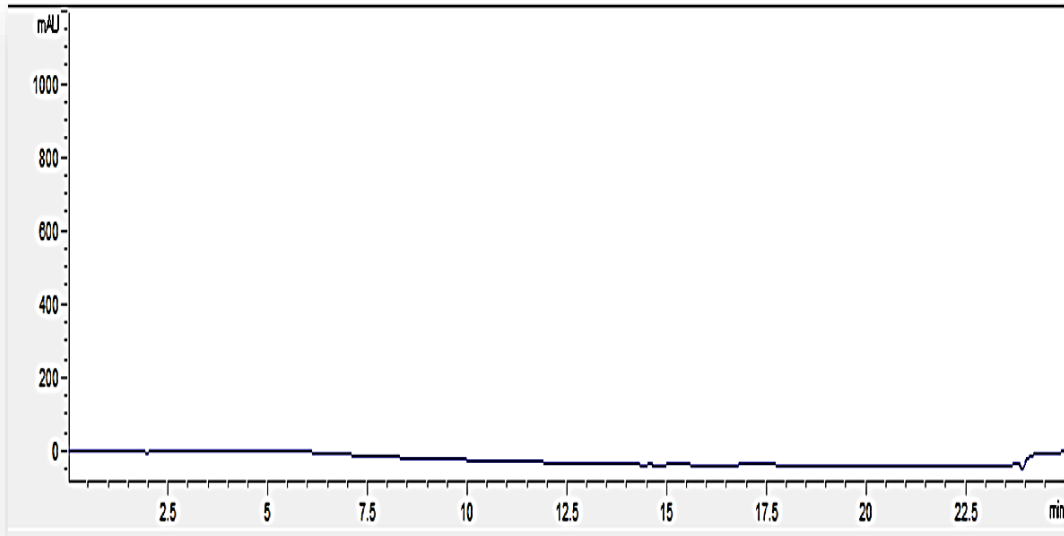
Yöntemin özgünlüğü 3.3.2.2’de anlatılan çözeltilerinin kromatogramları karşılaştırılmıştır. Şekil 4.11. – Şekil 4. 17. ‘den görüleceği üzere plasebo, seyreltme çözeltilerinin analit pikleri üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı, ayrı ayrı hazırlanan plasebo çözeltileri ile ilgili analitlerin olası istenmeyen piklerinin de¹⁰ ana pikler ile girişim yapmayacağı saptanmıştır. Ayrıca her üç pik içinde saflık kontrolü¹¹ HPLC sistemi (ChemStation yazılımı) üzerinden Şekil 4.19 da gösterilmiştir.

¹⁰ Mt, Ld, Mk Nitrat’ın olası ilgili bileşiklerinden ve/veya degradasyon kaynaklı pikler

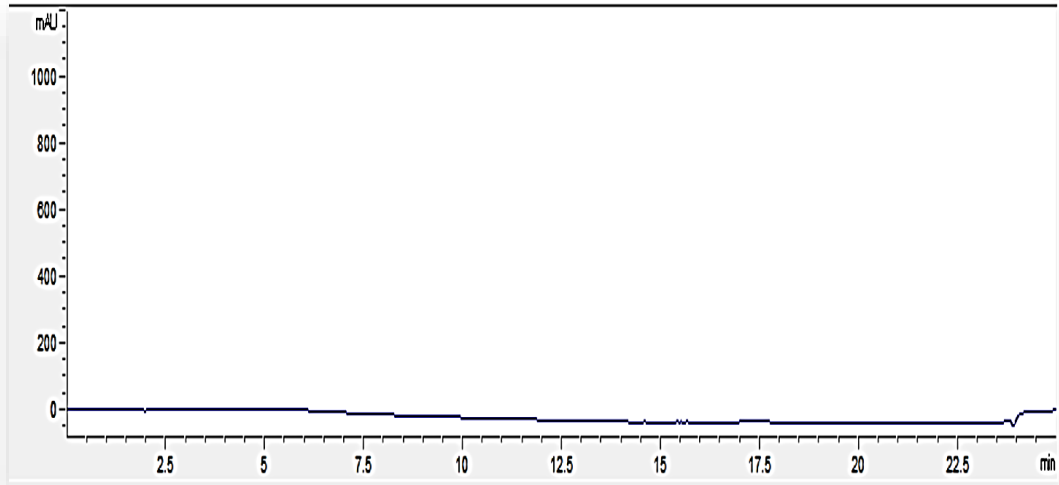
¹¹ Pik saflık değerinin 0.990 olan eşik değerinden büyük olması spektrumların birebir aynı olduğu, herhangi bir girişimin söz konusu olmadığı anlamına gelmektedir.



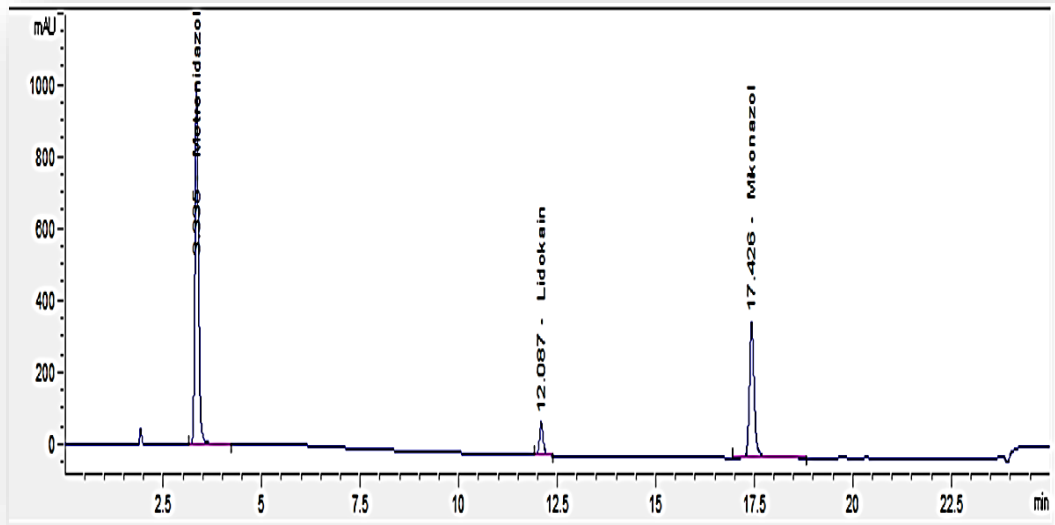
Şekil 4.12. Standart çözeltisi kromatogramı. Kromatografik koşullar: Gradient sistemi 4.2.2’de anlatıldığı gibi olup, HF A: 35 mM amonyum asetat, HF B: metanol, akış hızı: 1.3 mL/dk, enjeksiyon hacmi: 10 μ L, Mt 750 μ g/ml, Ld HCl 100 μ g/ml, Mk nitrat 200 μ g/ml.



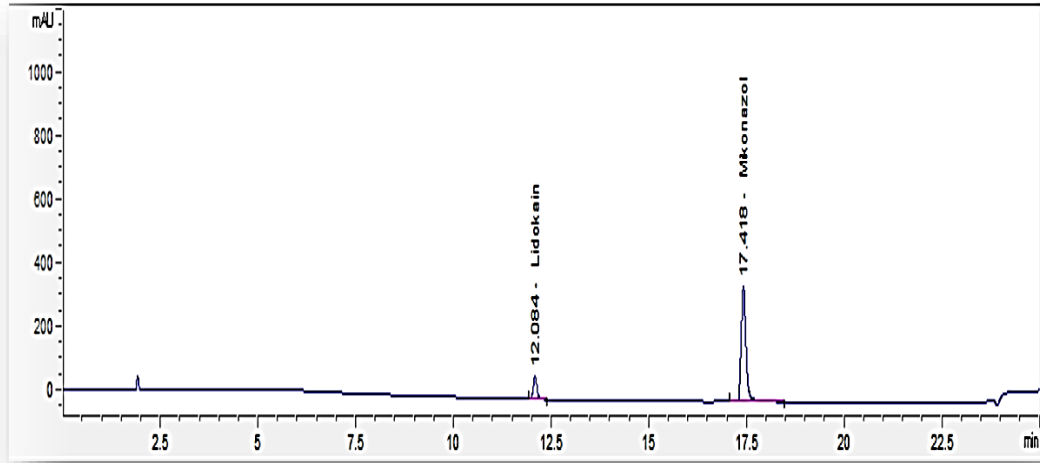
Şekil 4.13. Seyreltme çözeltisi kromatogramı. Kromatografik koşullar: Gradient sistemi 4.2.2’de anlatıldığı gibi olup, HF A: 35 mM amonyum asetat, HF B: metanol, akış hızı: 1.3 mL/dk.



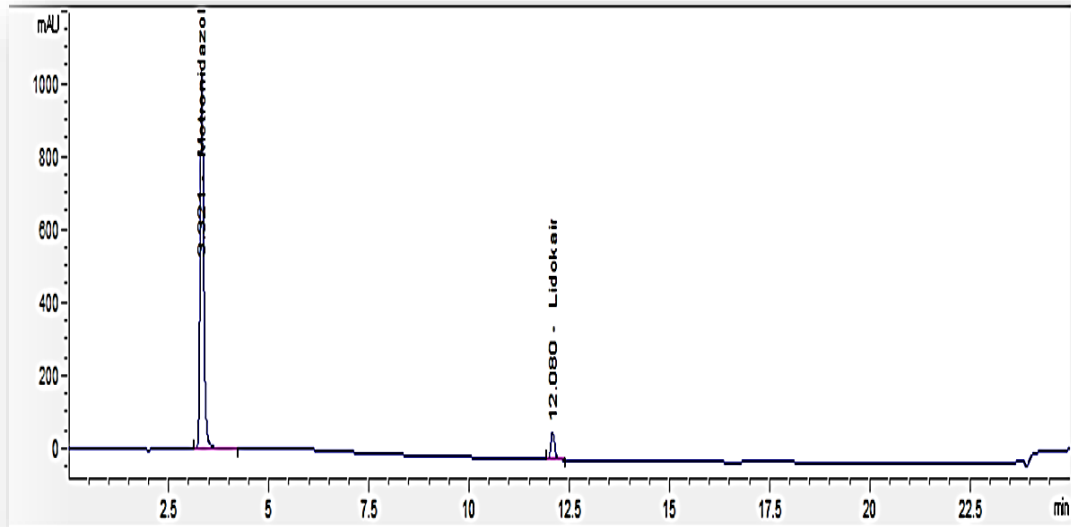
Şekil 4.14. Plasebo çözeltisi kromatogramı. Kromatografik koşullar: Gradient sistemi 4.2.2’de anlatıldığı gibi olup, HF A: 35 mM amonyum asetat, HF B: metanol, akış hızı: 1.3 mL/dk.



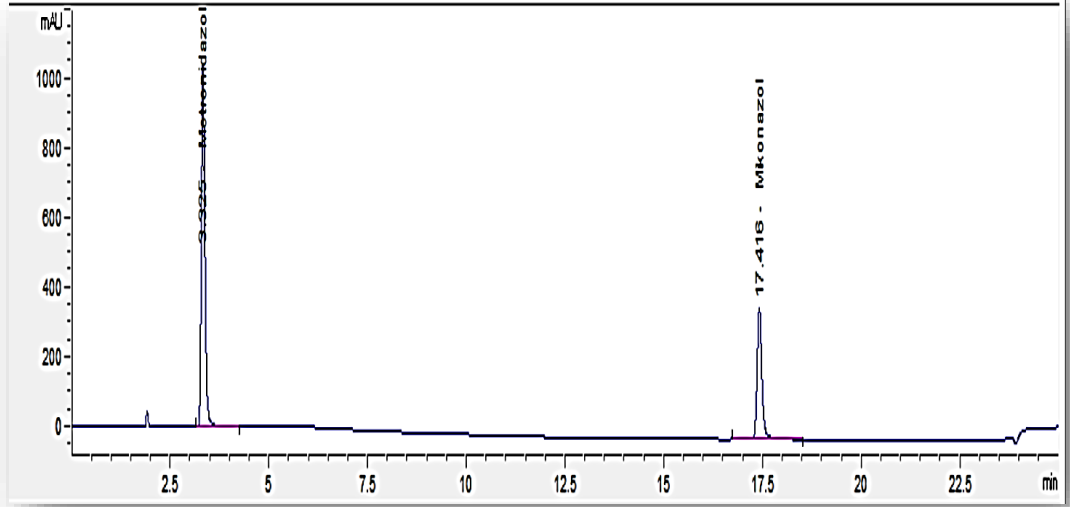
Şekil 4.15. Farmasötik preparat çözeltisi kromatogramı. Kromatografik koşullar: Gradient sistemi 4.2.2’de anlatıldığı gibi olup, HF A: 35 mM amonyum asetat, HF B: metanol, akış hızı: 1.3 mL/dk, enjeksiyon hacmi: 10 µL, Mt 750 µg/ml, Ld HCl 100 µg/ml, Mk nitrat 200 µg/ml.



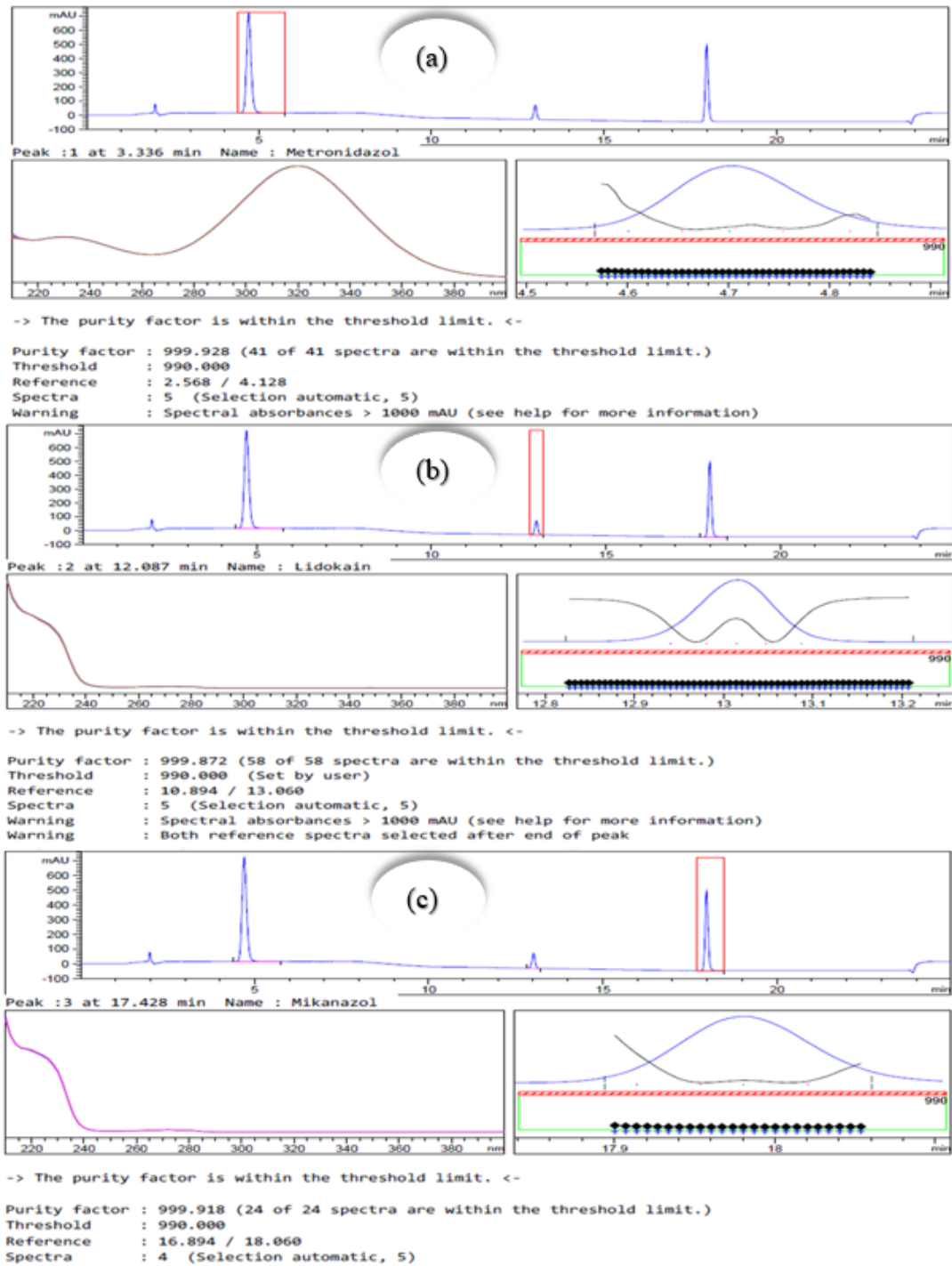
Şekil 4.16. Mt plasebo çözeltisi kromatogramı. Kromatografik koşullar: Gradient sistemi 4.2.2’de anlatıldığı gibi olup, HF A: 35 mM amonyum asetat, HF B: metanol, akış hızı: 1.3 mL/dk, enjeksiyon hacmi: 10 μ L, Ld HCl 100 μ g/ml, Mk nitrat 200 μ g/ml.



Şekil 4.17. Mk nitrat plasebo çözeltisi kromatogramı. Kromatografik koşullar: Gradient sistemi 4.2.2’de anlatıldığı gibi olup, HF A: 35 mM amonyum asetat, HF B: metanol, akış hızı: 1.3 mL/dk, enjeksiyon hacmi: 10 μ L, Mt 750 μ g/ml, Ld HCl 100 μ g/ml.



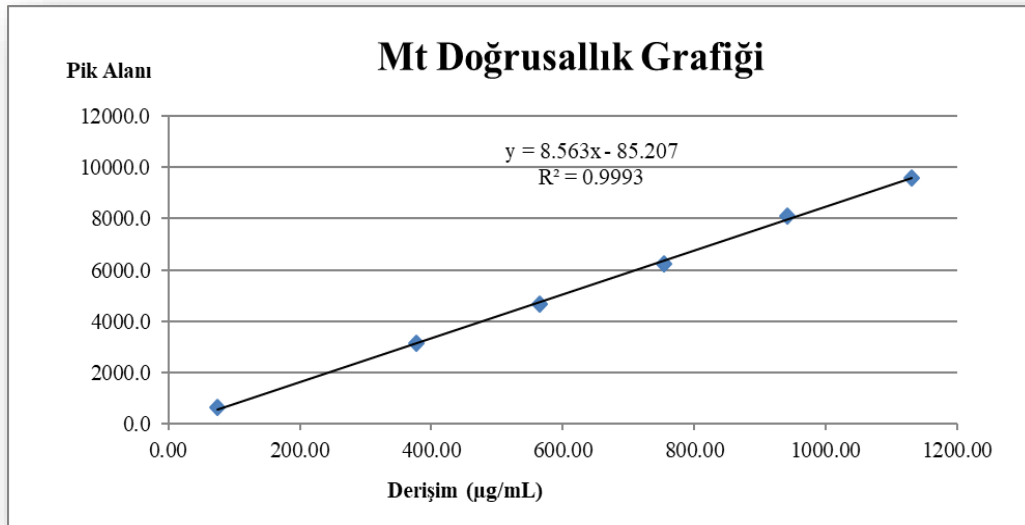
Şekil 4.18. Ld HCl plasebo plasebo çözeltisi kromatogramı. Kromatografik koşullar: Gradient sistemi 4.2.2’de anlatıldığı gibi olup, HF A: 35 mM amonyum asetat, HF B: metanol, akış hızı: 1.3 mL/dk, enjeksiyon hacmi: 10 µL, Mt 750 µg/ml, Mk nitrat 200 µg/mL.



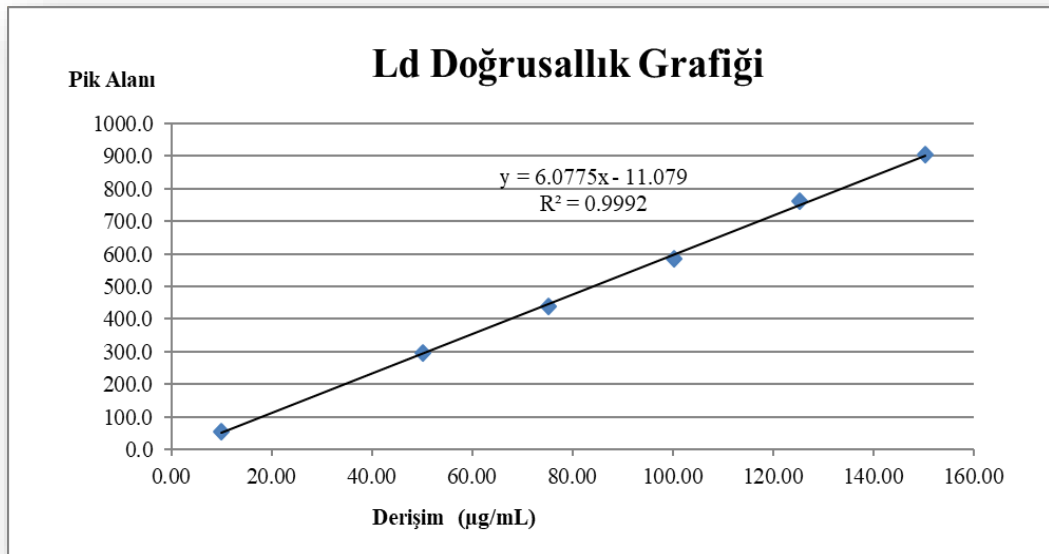
Şekil 4.19. Mt (a), Ld HCl (b), Mk nitrat (c) piklerinin saflıklarının gösterimi.

4.3.3. Kalibrasyon Eğrileri ve Doğrusallık Aralıkları

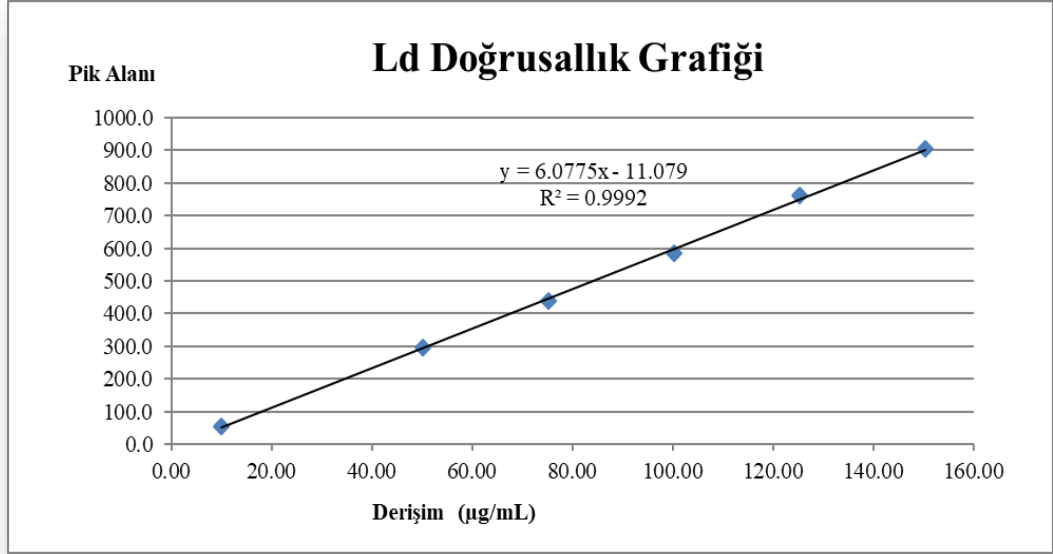
Mt, Ld HCl, Mk nitrat pik alanlarının, derişime karşı çizilen grafiklerinde, 3.2.2'de anlatılan standart derişiminin %10 ile %150'si aralığında doğrusal kalibrasyon eğrileri elde edildiği gösterilmiştir (Şekil 4.18.- Şekil 4.20.).



Şekil 4.20. Mt kalibrasyon eğrisi (75 µg/mL – 1125 µg/mL).

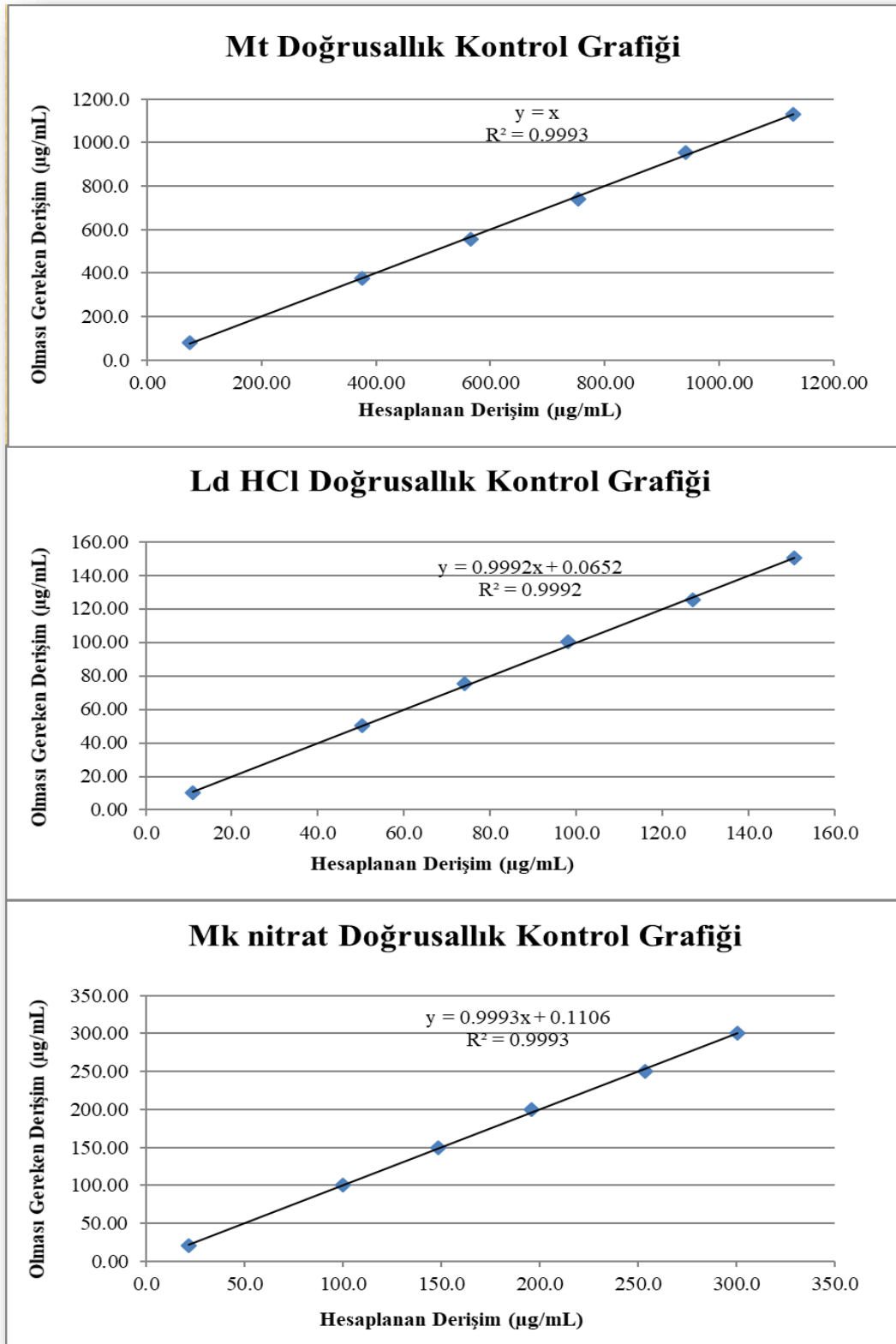


Şekil 4.21. Ld HCl kalibrasyon eğrisi (10 µg/mL – 150 µg/mL).



Şekil 4.22. Mk Nitrat kalibrasyon eğrisi (20 µg/mL – 300 µg/mL).

Mt, Ld HCl, Mk nitrat eğrileri üzerinden yapılan istatistiksel (Ek 1) hesaplamalar neticesinde, doğrusallıktan sapmanın önemli olmadığı ve kalibrasyon katsayılarının rastlantı olmadığı ispat edilmiştir (Tablo 4.10.- Tablo 4.13.). İlaveten Şekil 4.22’de her bir analit için doğrusallık kontrol grafikleri çizilmiştir.



Şekil 4.23. Mt, Ld HCl, Mk nitrat doğrusallık kontrol grafikleri.

Tablo 4.10. Mt'nin doğrusallık ve kalibrasyon önemi kontrolü.

Korelasyon Katsayısı için Önem Kontrolü*						
n	r	S _r	t _{Hesap}	t _{Teorik}		
6	0.9993	0.9968	53.4	2.78		
t _{Hesap} >t _{Teorik} (p<0.05) Korelasyon katsayısı tesadüfi değildir.						
Doğrusallıktan Sapma için Önem Kontrolü*						
RKT	YOAKT	RAKT	RAKO	RKO	F _H	F _T
54116763	54156508	39746	9936	54116762	5446	4.53
F _{Hesap} >F _{Teorik} (p<0.05) Pik alanı ile derişim arasında doğrudan bir ilişki mevcuttur.						

*Ek 1: Korrelasyon Katsayısı ve Doğrusallıktan Ayrılış Önem Kontrolü

Tablo 4.11. Ld HCl'in doğrusallık ve kalibrasyon önemi kontrolü.

Korelasyon Katsayısı için Önem Kontrolü*						
n	r	S _r	t _{Hesap}	t _{Teorik}		
6	0.9992	9.61	72.3	2.78		
t _{Hesap} >t _{Teorik} (p<0.05) Korelasyon katsayısı tesadüfi değildir.						
Doğrusallıktan Sapma için Önem Kontrolü*						
RKT	YOAKT	RAKT	RAKO	RKO	F _H	F _T
54116763	54156508	39746	9936	54116762	5446	4.53
F _{Hesap} >F _{Teorik} (p<0.05) Pik alanı ile derişim arasında doğrudan bir ilişki mevcuttur.						

*Ek 1: Korrelasyon Katsayısı ve Doğrusallıktan Ayrılış Önem Kontrolü

Tablo 4.12. Mk Nitrat'ın doğrusallık ve kalibrasyon önemi kontrolü.

Korelasyon Katsayısı için Önem Kontrolü*						
n	r	S _r	t _{Hesap}	t _{Teorik}		
6	0.9993	0.9968	53.4	2.78		
t _{Hesap} >t _{Teorik} (p<0.05) Korelasyon katsayısı tesadüfi değildir.						
Doğrusallıktan Sapma için Önem Kontrolü*						
RKT	YOAKT	RAKT	RAKO	RKO	F _H	F _T
54116763	54156508	39746	9936	54116762	5446	4.53
F _{Hesap} >F _{Teorik} (p<0.05) Pik alanı ile derişim arasında doğrudan bir ilişki mevcuttur.						

*Ek 1: Korrelasyon Katsayısı ve Doğrusallıktan Ayrılış Önem Kontrolü

Tablo 4.13. Analiz yöntemi doğrusallık grafiği üzerinden elde edilen veriler.

	Mt	Ld HCl	Mk Nitrat
Denklem	$y = 8.563x - 85.207$	$y = 6.0775x - 11.07$	$y = 15.825x - 32.362$
Eğimin Standart Hatası	0.7379	0.0841	0.2019
Kesişimin Standart Hatası	1.006	3.166	39.127
Korelasyon katsayısı (r)	0.9996	0.9996	0.9997
Tanımlayıcılık katsayısı (R²)	0.9993	0.9992	0.9993
Doğrusallık aralığı (µg/mL)	75.00 – 1125.00	10.00 – 150.00	20.00 – 300.00
Gözlenebilirme sınırı (LOD) (µg/mL)	0.39	1.72	0.82
Tayin alt sınırı (LOQ) (µg/mL)	1.17	5.21	2.47

*Ek 1: Korrelasyon Katsayısı ve Doğrusallıktan Ayrılış Önem Kontrolü

4.3.4. Doğruluk ve Geri Kazanım

Analiz yönteminin doğruluk çalışmaları, Mt için en düşük, 375 µg/mL, en yüksek 1500 µg/mL derişimlerinde, Ld HCl için en düşük 50 µg/mL, en yüksek 150 µg/mL, Mk nitrat için en düşük 100 µg/mL, en yüksek 300 µg/mL çalışılmış ve bu derişim düzeylerin analiz yönteminin doğru olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.14 - Tablo 4.16). Doğruluk ve geri kazanım çalışmasında yararlanılan istatistiksel hesaplamalar Ek 2.'de verilmiştir.

Tablo 4.14. Mt doğruluk ve geri kazanım sonuçları.

Mt Derişimi	Geri Kazanım (µg/mL)	Bağlı Hata
%50 (375 µg/mL)	377.02	0.54
	377.04	0.55
	376.21	0.32
\bar{X} (Ortalama)	376.76 ± 0.22	
SS (Standart Sapma)	0.39	
% BSS (%Bağlı Standart Sapma)	0.10	
%100 (750 µg/mL)	747.70	0.31
	751.99	0.53
	755.01	0.26
\bar{X} (Ortalama)	751.56 ± 1.73	
SS (Standart Sapma)	3.00	
% BSS (%Bağlı Standart Sapma)	0.40	
%150 (1125 µg/mL)	1122.22	0.62
	1129.14	0.35
	1127.36	0.26
\bar{X} (Ortalama)	1126.24 ± 1.69	
SS (Standart Sapma)	2.93	
% BSS (%Bağlı Standart Sapma)	0.26	

\bar{X} : Ortalama±standart hata, SS: Standart sapma; BSS: Bağlı standart sapma (Bkz. Ek -2)

Tablo 4.15. Ld HCl doğruluk ve geri kazanım sonuçları.

Ld HCl Derişimi	Geri Kazanım ($\mu\text{g/mL}$)	Bağıl Hata
%50 (50 $\mu\text{g/mL}$)	49.82	0.36
	50.73	1.46
	49.98	0.05
\bar{X} (Ortalama)	50.18 \pm 0.23	
SS (Standart Sapma)	0.40	
% BSS (%Bağıl Standart Sapma)	0.79	
%100 (100 $\mu\text{g/mL}$)	99.15	0.85
	100.91	0.91
	101.40	1.40
\bar{X} (Ortalama)	100.49 \pm 0.56	
SS (Standart Sapma)	0.96	
% BSS (%Bağıl Standart Sapma)	0.96	
%150 (150 $\mu\text{g/mL}$)	152.93	1.96
	148.76	0.83
	149.47	0.36
\bar{X} (Ortalama)	150.39 \pm 1.05	
SS (Standart Sapma)	1.82	
% BSS (%Bağıl Standart Sapma)	1.21	

\bar{X} : Ortalama \pm standart hata, SS: Standart sapma; BSS: Bağıl standart sapma (Bkz. Ek -2)

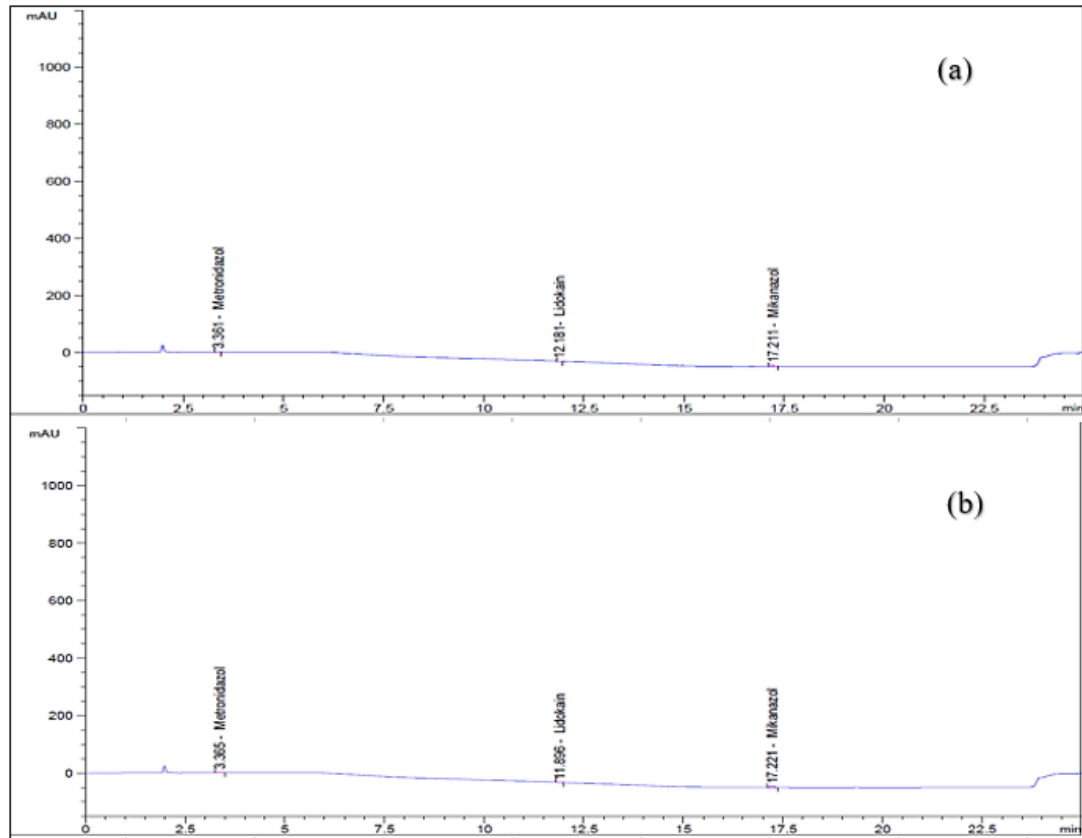
Tablo 4.16. Mk Nitrat doğruluk ve geri kazanım sonuçları.

Mk Nitrat Derişimi	Geri Kazanım ($\mu\text{g/mL}$)	Bağıl Hata
%50 (100 $\mu\text{g/mL}$)	101.41	1.41
	101.64	1.64
	101.31	1.31
\bar{X} (Ortalama)	101.45 \pm 0.08	
SS (Standart Sapma)	0.14	
% BSS (%Bağıl Standart Sapma)	0.13	
%100 (200 $\mu\text{g/mL}$)	200.54	0.54
	199.80	0.20
	199.90	0.10
\bar{X} (Ortalama)	200.08 \pm 0.19	
SS (Standart Sapma)	0.33	
% BSS (%Bağıl Standart Sapma)	0.17	
%150 (300 $\mu\text{g/mL}$)	300.82	0.27
	299.69	0.10
	299.86	0.05
\bar{X} (Ortalama)	300.12 \pm 0.29	
SS (Standart Sapma)	0.50	
% BSS (%Bağıl Standart Sapma)	0.17	

\bar{X} : Ortalama \pm standart hata, SS: Standart sapma; BSS: Bağıl standart sapma (Bkz. Ek -2)

4.3.5. Gözlenebilme Sınırı ve Tayin Alt Sınırı (LOD ve LOQ)

Analiz yönteminin duyarlılığı, gözlenebilme sınırı (LOD) ve tayin alt sınırı (LOQ) verileri üzerinden belirlenmiştir ve Tablo 4.13’de sunulmuştur. Şekil 4.23’de Tablo 4.13’de gösterilen ve Bölüm 3.3.2.6.’da hesaplama yöntemi verilen, derişim düzeylerindeki kromatogramı verilmiştir¹². LOQ değerinin %BSS ve %BH değerleri hesaplatılmıştır (n=6).



Şekil 4.24. LOD (a) ve LOQ (b) derişimlerinde hazırlanan standart çözeltisi kromatogramları çözeltisi. Kromatografik koşullar: Gradient sistemi 4.2.2’de anlatıldığı gibi olup, HF A: 35 mM amonyum asetat, HF B: metanol, akış hızı: 1.3 mL/dk, LOD (a): Mt 0.39 µg/ml, Ld HCl 1.72 µg/ml, Mk nitrat 0.82 µg/ml, LOQ (b): Mt 1.17 µg/ml, Ld HCl 5.21 µg/ml, Mk nitrat 2.47 µg/ml.

¹² S/G oranı ölçülememiştir.

Tablo 4.17. Duyarlılık testi sonuçları.

	LOD ($\mu\text{g/mL}$)	LOQ ($\mu\text{g/mL}$)	%BSS*	%BH*
Mt	0.39	1.18	0.51	0.84
Ld HCl	1.72	5.25	0.62	0.81
Mk nitrat	0.82	2.47	0.35	0.17

*LOQ değerleri ait hesaplamalardır.

4.3.6. Kesinlik ve Tekrarlanabilirlik

Analiz yönteminin gün içi/ günler arası kesin ve tekrarlanabilir olduğu, sonuçların istatistiksel olarak değerlendirmesi sonucu ispat edilmiştir (Tablo 4.18, Tablo 4.19)

Tablo 4.18. Analiz yöntemin tekrarlanabilirlik sonuçları.

Numune no	Mt ($\mu\text{g/mL}$)	Ld HCl ($\mu\text{g/mL}$)	Mk nitrat ($\mu\text{g/mL}$)
1	740.9	100.6	196.4
2	729.0	97.9	196.9
3	731.5	99.4	200.0
4	732.0	97.5	201.2
5	732.2	98.0	196.9
6	733.0	98.7	193.4
7	733.6	98.6	197.8
8	733.9	99.6	192.1
9	735.4	98.3	196.6
10	735.7	99.3	198.6
\bar{X}	733.71 ± 1.24	98.79 ± 0.36	196.98 ± 1.05
SS	3.04	0.89	2.58
% BSS	0.41	0.90	1.31

\bar{X} : Ortalama \pm standart hata, SS: Standart sapma; BSS: Bağıl standart sapma (Bkz. Ek -2).

Tablo 4.19. Analiz yöntemin ara kesinlik sonuçları.

		Geri Kazanım Derişimleri ($\mu\text{g/mL}$) Sonuçları		
	Numune No	Mt ($\mu\text{g/mL}$)	Ld HCl ($\mu\text{g/mL}$)	Mk ($\mu\text{g/mL}$)
1. Gün Hazırlanan numuneler	1	740.9	100.6	196.4
	2	729.0	97.9	196.9
	3	731.5	99.4	200.0
	4	732.0	97.5	201.2
	5	732.2	98.0	196.9
	6	733.0	98.7	193.4
	7	733.6	98.6	197.8
	8	733.9	99.6	192.1
	9	735.4	98.3	196.6
	10	735.7	99.3	198.6
2. Gün Hazırlanan numuneler	1	736.1	97.8	195.1
	2	739.3	98.3	198.1
	3	741.5	99.7	197.3
	4	742.0	99.8	195.5
	5	742.3	98.6	197.5
	6	743.0	99.7	194.7
	7	745.0	100.9	193.6
	8	745.3	100.8	196.5
	9	746.5	100.9	198.1
	10	749.2	100.8	199.8
\bar{X}		738.36 ± 2.38	99.26 ± 0.46	196.79 ± 0.93
SS		5.85	1.13	2.28
% BSS		0.79	1.14	1.16

\bar{X} : Ortalama \pm standart hata, SS: Standart sapma; BSS: Bağlı standart sapma (Bkz. Ek -2)

4.3.7. Sağlamlık ve Tutarlılık

Analiz yönteminde yapılan parametre değişiklikleri sonucunda, sonuçların ne kadar etkilendiği araştırılmıştır. Akış hızı, dalga boyu ve hareketli faz üzerinden yapılan değişikliklerinin geliştirilen yöntemde elde edilen sonuçlar üzerinde büyük bir etkisi olmadığından kaynaklı, yöntemin sağlam olduğu kanıtlanmıştır (Tablo 4.20).

Tutarlılık, 2 farklı analistin, 6 kez art arda hazırladığı %100 doğruluk numunesi çözeltisinin, 2 farklı cihazda analiz sonuçlarının karşılaştırılması ile kanıtlanmıştır (Tablo 4.21).

Tablo 4.20. Analiz yöntemi sağlamlık çalışması sonuçları.

Değişiklikler	Mt			Ld HCl			Mk		
	% Miktar	% BSS	t _{Hesap}	% Miktar	% BSS	t _{Hesap}	% Miktar	% BSS	t _{Hesap}
Belirlenen Optimum Yöntem	100.06 ±0.06	0.15	-	100.06±0.02	0.15	-	100.06 ±0.04	0.15	-
Akış Hızı 1.2mL/dk	100.04 ±0.02	0.06	0.40	99.15 ±0.44	1.09	0.06	99.22 ±0.55	1.37	0.13
Akış Hızı 1.4mL/dk	100.16 ±0.09	0.21	0.24	101.04±0.62	1.49	0.10	100.33 ±0.24	0.58	0.15
Dalga Boyu 225nm	100.04 ±0.04	0.10	0.42	99.40 ±0.32	0.80	0.08	100.16 ±0.16	0.39	0.35
Dalga Boyu 235nm	99.99 ±0.02	0.04	0.18	100.02±0.05	0.13	0.39	99.82 ±0.13	0.32	0.15
Hareketli Faz + %2.0	99.96 ±0.04	0.10	0.21	100.28±0.15	0.37	0.20	99.94 ±0.37	0.90	0.39
Hareketli Faz - %2.0	100.19 ±0.09	0.21	0.20	99.94 ±0.13	0.32	0.31	99.67 ±0.14	0.35	0.05

BSS: % Bağıl Standart Sapma. (Bkz. Ek-2)

Veriler tek tek belirlenen analiz yöntemi sonuçları ile t-testi uygulanmıştır. ($t_{\text{tablo}} = 2.776 > t_{\text{hesap}}$ ($p > 0.05$) (Bkz. Ek-3)

Tablo 4.21. Tutarlılık testi sonuçları.

Mt Derişimi	1. Analist		2. Analist	
	Sonuç (µg/mL)	Sonuç (%)	Sonuç (µg/mL)	Sonuç (%)
750 µg/mL	732.5	97.7	758.6	101.1
	752.5	100.3	754.4	100.6
	750.5	100.1	754.7	100.6
	748.8	99.8	753.2	100.4
	730.7	97.4	754.1	100.5
	730.9	97.5	750.7	100.1
\bar{X} (Ortalama)	741.0 ± 4.3	98.8 ± 0.6	754.3 ± 1.0	100.6 ± 0.1
SS (Standart Sapma)	10.6	1.4	2.6	0.3
% BSS (%Bağıl Standart Sapma)	1.4	1.4	0.3	0.3
$t_H = 3.0 > t_T = 2.0, p > 0.05$				
Ld HCl Derişimi	Sonuç (µg/mL)	Sonuç (%)	Sonuç (µg/mL)	Sonuç (%)
100 µg/mL	98.8	98.8	101.5	101.5
	99.7	99.7	100.9	100.9
	99.7	99.7	101.3	101.3
	100.0	100.0	101.2	101.2
	98.8	98.8	99.1	99.1
	97.5	97.5	97.7	97.7
\bar{X} (Ortalama)	99.1 ± 0.4	99.1 ± 0.4	100.3 ± 0.6	100.3 ± 0.6
SS (Standart Sapma)	0.9	0.9	1.5	1.5
% BSS (%Bağıl Standart Sapma)	0.9	0.9	1.5	1.5
$t_H = 3.2 > t_T = 2.0, p > 0.05$				
Mk Nitrat Derişimi	Sonuç (µg/mL)	Sonuç (%)	Sonuç (µg/mL)	Sonuç (%)
200 µg/mL	199.7	99.9	200.0	100.0
	200.9	100.5	199.4	99.7
	200.1	100.1	199.3	99.7
	200.5	100.3	200.3	100.2
	199.7	99.9	198.4	99.2
	199.9	100.0	199.7	99.9
\bar{X} (Ortalama)	200.1 ± 0.2	100.1 ± 0.1	199.5 ± 0.3	99.8 ± 0.3
SS (Standart Sapma)	0.5	0.2	0.7	0.3
% BSS (%Bağıl Standart Sapma)	0.2	0.2	0.3	0.3
$t_H = 2.1 > t_T = 2.0, p > 0.05$				

BSS: % Bağıl Standart Sapma. (Bkz. Ek-2)

Veriler tek tek belirlenen analiz yöntemi sonuçları ile t-testi uygulanmıştır (Bkz. Ek-3).

4.4. HPLC ile Farmasötik Preparatın Analizi

Farmasötik preparat çözeltisinin analizi sonucunda elde edilen veriler aşağıda yer aldığı gibidir.

Tablo 4.22. Exagyn® tablet etken maddelerin miktar tayini sonuçları.

Numune No	Mt 750 µg/mL	Ld HCl 100 µg/mL	Mk Nitrat 200 µg/mL
1	748.8	100.0	200.5
2	740.7	98.8	198.2
3	740.9	99.5	196.7
4	758.6	100.5	201.0
5	754.4	100.9	199.4
6	754.7	101.3	199.3
\bar{X}	749.7 ±2.8	100.2 ±0.3	199.2 ±0.6
SS	6.9	0.9	1.4
%BSS	0.9	0.9	0.7

\bar{X} : Ortalama±standart hata, SS: Standart sapma; BSS: Bağıl standart sapma (Bkz. Ek -2)

4.5. Sistem Uygunluk Testleri

Sistem uygunluk çalışması, farmasötik preparat çözeltisinin analizleri esnasında gerçekleştirilmiş olup, 6 tekrarlı analiz sonuçları neticesinde elde edilen parametrelerin kabul limitlerini (Tablo 3.4) sağladığı tespit edilmiştir. Test sonuçları Tablo 4.23’de gösterilmiş olup, ayırıcılık Mt - Ld, Ld - Mk pikleri arasında kontrol edilmiştir.

Tablo 4.23. Sistem uygunluk testi sonuçları.

Parametreler	Sistem Uygunluk Test Sonuçları		
	Mt	Ld HCl	Mk Nitrat
k'	1.8	9.0	13.3
R _s	11.9		17.5
N	4399.4	57710.6	53206.9
t _R %BSS	0.2	0.2	0.6
P	0.8	0.8	1.1
Pik alanı	0.1	0.0	0.1
Tekrarlanabilirlik %BSS			

k': Kapasite faktörü, R_s: Ayırıcılık, N: Teorik tabaka sayısı, t_R: Alınma zamanı, P: Pik simetri oranı

5. TARTIŞMA

Analiz yöntemin geliştirilmesi ve validasyonu çalışmalarında kullanılan çözeltilerin derişim oranları, her 3 etken maddenin famasötik üründe ki miktarları¹³ baz alınarak gerçekleştirilmiştir.

HPLC yönteminde ters faz sıvı kromatografisi tercih edilmiştir. Bu sıvı kromatografisinde sabit faz olarak apolar maddeler kullanılırken, analitlerin polar/apolarlığı ve sabit faz ile oluşturduğu hidrofobik etkileşimleri temel alınmıştır. Analitlerin molekül şekillerinden (Bkz.Şekil 2.1., Şekil 2.3) de görüleceği üzere en polar olan Mt alıkonma zamanı en düşük iken, sırasıyla apolarlıkların arttığı Ld ve Mk maddelerinin alıkonma zamanları en yüksek olarak elde edilmiştir.

Ters faz sıvı kromatografisinde kolon seçimi, alıkonma zamanları, kapasite faktörü, pik simetrisi, teorik tabaka sayısı gibi temel sistem uygunluk parametrelerini etkilemektedir. C₈ ve C₁₈ temelli sabit faz içeren kolonlar üzerinden yapılan çalışma sonucunda, özellikle alıkonma zamanı en düşük olan Mt için en uygun kapasite faktörünün (<1.5) ve teorik tabaka (<2000) sayısının C₁₈ kolon ile sağlandığı görülmüştür.

Gradient sistemi ters faz kromatografisinde genel olarak 2 (veya daha fazla) farklı polariteye sahip hareketli fazın analiz sisteminde aynı anda kullanılması ile gerçekleştirilir. Genel olarak hareketli fazlardan bir tanesi su bazlı tampon çözeltiler olurken diğer fazda metanol, asetonitril gibi polaritesi görece daha düşük organik çözücülerdir.

Bu tez kapsamında geliştirilen analiz yönteminde gradient sisteminin tercih edilme sebepleri:

- 3 farklı polariteye (Mt log P: -0.02, Ld HCl log P: 2.84, Mk nitrat log P: 5.96) sahip analitlerin, tek bir hareketli faz (isokritik) ile analiz edilmesi durumunda alıkonma zamanları arasındaki fark,

¹³ Exagyn[®], birim dozda, Lidokain HCl: 100mg, Mikonazol Nitrat: 200mg, Metronidazol: 750mg içermektedir.

- İsokritik yöntemde, alıkonma zamanı en yüksek olan analitin için pik genişlemesi ve akabinde teorik tabaka sayısı/pik simetrisi gibi temel parametrelerin bozulması,
- Alıkonma zamanlarının uzaması ile analiz maliyetinin ve analiz süresinin de uzaması.

Gradient sistemi belirlenirken sistematik bir yöntem seçilmiş sırasıyla alıkonma zamanları en düşükten en yükseğe (*Alıkonma Zamanı: $Mt < Ld < Mk$*) doğru her bir analit için ayrı ayrı hareketli faz bileşenleri belirlenmiştir.

Hareketli faz A için optimum tampon çözelti derişimine ve pH değerine, analit piklerinin sistem uygunluk kriterleri üzerindeki etkileri incelenerek karar verilmiştir. Ayrıca alıkonma zamanı üzerinde önemli bir etkisi gözlenmediğinden, hareketli faz A için ayrıca pH ayarlamasının gerekli olmadığı tespit edilmiş, yöntemin bu şekilde uygulanabilirliği, hazırlık süresi gibi önemli koşullarıda iyileştirilmiştir.

Organik çözücü türünün seçiminde tercih edilen HPLC ters faz kromatografi yöntemlerin sıklıkla kullanılan asetonitril ve metanol deneme çalışmaları için seçilmiş olup Mt analitinin pik simetrisi açısından en uygun olanının metanol olduğu görülmüştür.

Akış hızı seçiminde piklerin sistem uygunluk parametreleri baz alınmış fakat öncelikli olarak alıkonma zamanları, pik simetrisi ve sistem basıncı üzerinde durulmuştur. 1.6 mL/dk akışta sistem basıncının yüksek gelmesi sebebiyle çalışma gerçekleştirilememiş olup, 1.3 mL/dk akış hızında en uygun kromatografik koşullar sağlanmıştır.

Famasötik preparat çözeltisi içeriğinde yer alan Mt derişiminin yüksek oluşu, enjeksiyon hacmi konusunda sınırlayıcı etki yaratmıştır. Bu sebeple 20 μL enjeksiyon hacmi piklerin üzerlerinde kırılmaya sebep olması, fazla yükleme göstergesi olarak kabul edilip sadece 5 μL ve 10 μL enjeksiyon hacimlerinde çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Ayrıca 15 μL enjeksiyon hacminde tekrarlı verilen farmasötik preparat çözeltisi için herhangi bir kırılma/fazla yükleme (overload) olup olmadığı kontrol edilmiştir.

Santrifüjleme işleminin ayrı bir hazırlık süreci getireceği, enjektörlere alınan analiz çözeltilerinin uygun (0.45 μm) filtreler vasıtasıyla süzülmesinin kolaylığı

sebebiyle filtre seçimi için çalışmalar gerçekleştirilmiş olup PTFE filtresinin analiz yöntemindeki çözeltileri süzmek için kullanılabilceği, santrifüleme işlemi ile hazırlanan numune çözeltilerinin pik alanları ile % uyumu kontrolü neticesinde, tespit edilmiştir.

Validasyon çalışmalarına öncelikli olarak kullanılacak olan çözeltilerin kararlılığı ile başlanmış olup 48 saat süresinde oda koşullarında kararlı olduğu tespit edilmiştir. Analiz ve numune hazırlama süreleri bu kapsamda değerlendirilmiştir. (Bkz. Tablo 4.9.). Numune hazırlama ve bekletme işlemleri aydınlık ortamda gerçekleştirilmiştir.

Analiz yönteminin özgünlüğü çalışmasında, standart çözelti (Bölüm 3.2.2), farmasötik preparat çözeltisi (Bölüm 3.2.3), her bir analit için hazırlanan plasebolar, seyreltme çözeltisi (kör çözelti) kromatogramları karşılaştırılmıştır (Bkz. Şekil 4.11.- Şekil 4.17.). Bu şekilde analit piklerinin seyreltme çözeltisi veya plasebo içerisinde yer alan herhangi bir yardımcı madde ile girişim yapmadığı gözlenmiştir.

Doğrusallık her üç analit içinde sağlanmış olup, çizilen kalibrasyon eğrileri (Bkz. Şekil 4.18.- Şekil 4.20.) ile belirlenen korelasyon katsayısı ve doğrusallıktan ayrılış önem kontrolleri (Tablo 4.10.-Tablo 4.13.) için gerçekleştirilen istatistiksel hesaplar ile gösterilmiştir. Her üç analit için, T testi ile hesaplanan korelasyon katsayılarının tesadüfi olmadığı ($t_{\text{Hesap}} > t_{\text{Teorik}}$ ($p < 0.05$)), F testi ile pik alanları ve derişimler arasında doğrudan bir ilişki olduğu gösterilmiştir ($F_{\text{Hesap}} > F_{\text{Teorik}}$ ($p < 0.05$)). Korelasyon katsayıları Mt, Ld HCl, Mk nitrat için sırasıyla, 0.9993, 0.9992, 0.9993'tür.

Analiz yönteminin doğruluğu ve geri kazanımı, 3 analitin 3 farklı derişiminde 3'er kez hazırlanması ile gerçekleştirilmiş olup, test sonuçlarında geri kazanım ve doğruluk miktarları istatistiksel olarak hesaplanmıştır. Her bir hazırlık, teorik miktarları tespit edilen yardımcı maddeler ile hazırlanan plasebo (Bölüm 3.2.4) bileşimi üzerine eklenen 3 farklı derişimindeki analitler ile gerçekleştirilmiştir. Test sonuçları sonucu elde edilen % bağıl hata değerlerinin (Bkz. Tablo 4.14., Tablo 4.16.) kabul kriterlerini (< 2.0) sağlaması sebebiyle yöntemin doğruluğu kanıtlanmıştır (86, 87).

Gözlenebilirlik alt sınırı ve alt tayin sınırı çalışmaları, doğrusallık grafikleri üzerinden hesaplanmış olup (Bkz. Şekil 4.18., Şekil 4.19. ve Şekil 4.20), tayin alt sınırı, Mt: 1.17 $\mu\text{g/mL}$, Ld HCl: 5.21 $\mu\text{g/mL}$, Mk nitrat: 2.47 $\mu\text{g/mL}$ olarak bulunmuştur.

Gözlenebilirlik sınırı da Mt: 0.39 µg/mL, Ld HCl: 1.72 µg/mL, Mk nitrat:0.82 µg/mL olduğu belirlenmiştir (Bkz. Tablo 4.13.). Hesaplama ile gerçekleştirilen LOQ derişim düzeyi için %BSS ve %BH değerleri hesaplanmış (Bkz. Tablo 4.17.) ve yöntemin biyoanalitik yöntem klavuzlarında geçen %20 limitinin altında olmasından dolayı, doğru ve kesin olduğu gösterilmiştir (89).

Kesinlik ve tekrarlanabilirlik çalışmaları bir arada gerçekleştirilmiş. Gün içinde ve farklı bir günde hazırlanan 10'ar adet farmasötik preparat çözeltisi sonuçlarının %BSS değerlerinin %2'den küçük olması ile analiz yönteminin tekrarlanabilirliği gösterilirken (Bkz. Tablo 4.18.), analiz yönteminin kesinliği (Bkz. Tablo 4.19.)'de farklı günlerde analizi gerçekleştirilen 10'ar adet numune sonuçlarının %BSS değerinin %2'den küçük olması ile kanıtlanmıştır (88).

Yöntemin sağlamlığı akış hızı, dalga boyu, hareketli faz % miktarı parametrelerinde gerçekleştirilen küçük değişiklikler sonrası gerçekleştirilen analiz sonuçlarının istatistiksel olarak karşılaştırılması ile gerçekleştirilmiştir (Tablo 4.20.). Optimize edilen yöntem ile elde edilen sonuçlar ile kıyaslanan değişiklik sonrası elde edilen sonuçların t_{Hesap} değerleri hesaplanmıştır. Yöntemin sağlamlığı, sonuçlar arasındaki farkın anlamlı olmadığı gerekçesiyle ispatlanmıştır. Tutarlılık çalışması 2 farklı analistin gerçekleştirdiği analiz sonuçlarının yine istatistiksel olarak karşılaştırılması ile gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar arasındaki farkın anlamlı olmadığı $t_{\text{Hesap}} > t_{\text{teorik}}$, $p < 0.05$ (Bkz. Tablo 4.21) olarak elde edilen değerler sonucu gösterilmiş ve yöntemin tutarlı olduğu belirlenmiştir.

Analiz yöntemin farmasötik tablet ürünü için gerçekleştirilmesi sonucunda, elde edilen verilerin teorik etken madde miktarı ile uyumlu olduğu, bütün analitler için sistem uygunluk parametreleri ($k' > 1.5$, $R_s > 2.0$, $N > 2000$, $t_R \%BSS < \%1.0$, *Pik alanı* *Tekrarlanabilirlik* $\%BSS < \%2.0$) kabul kriterlerini (Bkz. Tablo 3.4.) sağladığı, Tablo 4.23'deki sonuçlar üzerinden gösterilmiştir (84, 85).

İlaç sektöründe yer alan analiz laboratuvarlarında kısa süre içerisinde sonuç veren valide edilmiş yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. HPLC yöntemi ile etken madde miktar tayini analizleri sıklıkla tercih edilen yöntemlerin başında yer almaktadır. Bu tez kapsamında incelenen Mt, Ld HCl ve Mk nitrat etken maddelerinin tekli ve iki analiz çalışmaları literatürde rastlanırken her üçünün birden tek seferde analizine yönelik

çalışmaya rastlanmamıştır (6-23). Her üç etken maddenin yer aldığı tek vajinal tablet olan, Exagyn ® T.C. Sağlık Bakanlığı tarafından ruhsatlı bir ürün olup, tedavide sıklıkla kullanılan bir ilaçtır. Validasyon çalışmaları kapsamında kullanılan standartlar DrogSan İlaçları tarafından sağlanmış olup, sertifikaları Ek 6'da yer almaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez kapsamında farmasötik preparattan Mt, Ld HCl, Mk nitrat etken maddelerinin miktar tayini analiz yönteminin geliştirilmesi, valide edilmesi ve farmasötik preparattan ilgili maddelerin analiz edilmesine yönelik çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

Analizde sabit faz olarak C18 250 x 4.6 mm 5µm (Marka: ACE), dalga boyu olarak 230 nm, akış hızı olarak 1.3 mL/dk, enjeksiyon hacmi olarak 10 µL, kolon sıcaklığı olarak 22-25°C seçilmiştir. Akış sistematığında gradient sistem kullanılmış olup hareketli faz A olarak 35 mM amonyum asetat çözeltisi, hareketli faz B olarak da metanol kullanılmıştır. Gradient akış sistemi Tablo 4.6'da, alıkonma zamanları Tablo 6.1'de gösterilmiştir.

Tablo 6.1. Analitlerin alıkonma zamanları.

Analit	Rt (dk)
Mt	3.3
Ld	12.1
Mk	17.5

Optimizasyon çalışmaları sonunda valide edilen yöntemde, kararlılık, özgünlük, doğrusalık, doğruluk, geri kazanım, kesinlik, tekrarlanabilirlik, gözlenebilirlik sınırı, alt tayin sınırı, sağlamlık, tutarlılık parametreleri üzerinden gerçekleştirilen çalışmalarda kabul kriterleri sağlanmıştır. Validasyonu gerçekleştirilen analiz yöntemi Exagyn® ilaç ürünü için gerçekleştirilmiş ve sonuçların kısa ürün bilgisinde yer alan etken madde miktarları ile uyumlu olduğu, art arda 6 kez hazırlığı yapılan numune üzerinden gerçekleştirilen test sonuçları istatistiksel olarak da tekrarlanabilir olduğu gösterilmiştir (Bkz. Tablo 4.22).

Bu yöntemin Mt, Ld HCl, Mk nitrat'ın birlikte yer aldığı ilaç ürünlerinin, bir seferde her üç etken maddenin de analiz edilmesi amacıyla kullanılabilmesi, bu anlamda literatüre katkı sunacağı düşünülmektedir. Yöntemin özellikle tablet formunda yer alan ilaç ürünleri için doğrudan uygulanabiliyor olması, 3 farklı analit için alıkonma zamanlarının oldukça kısa olması, analiz maliyetlerini düşüreceği görüldüğünden bu yöntemin farmasötik preparatların kalite kontrolü amacıyla

kullanılması önerilmektedir. Bu açıdan özellikle ilaç endüstrisinde benzer (jenerik, muadil) ilaçların geliştirilmesi/analiz edilmesi çalışmalarında faydalı olması beklenmektedir.

Analiz yöntemi, Mt, Ld HCL, Mk nitrat analitlerini tek tek veya kombine şekilde içeren, farklı farmasötik preparatlardan, analizlerinde yol açıcı olacağı düşünülmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. HELBA İlaç İç ve Dış San Tic. Ltd. Şti. EXAGYN® Vajinal tablet kısa ürün bilgisi (KÜB) [Internet]. 2012 [Erişim Tarihi 10 Nisan 2021]. p. 1–10. Erişim adresi: <https://pdf.ilacprospektusu.com/2677-exagyn-vajinal-tablet-kub.pdf>
2. Davis JL, Papich MG. Antimicrobial Therapy. Second Edi. Equine Infectious Diseases: Second Edition. Elsevier Inc.; 2013. 571–584 p.
3. Gaba M, Mohan C. Development of drugs based on imidazole and benzimidazole bioactive heterocycles: Recent advances and future directions. Vol. 25, Medicinal Chemistry Research. Springer US; 2016. 173–210 p.
4. Martell B, Kushner H, Richardson E, Mize A, Mayer P. Pharmacokinetics of Lidocaine and Its Metabolites Following Vaginal Administration of Lidocaine Gel to Healthy Female Subjects. Clin Pharmacol Drug Dev. 2017;6(1):27–35.
5. Zhu Z, Zhai Y, Zhang N, Leng D, Ding P. The development of polycarbophil as a bioadhesive material in pharmacy. Asian J Pharm Sci. 2013;8(4):218–27.
6. Elkhoudary MM, Abdel Salam RA, Hadad GM. Development and optimization of hplc analysis of metronidazole, diloxanide, spiramycin and cliquinol in pharmaceutical dosage forms using experimental design. J Chromatogr Sci. 2016;54(10):1701–12.
7. Saeed-Ul-Hassan, Hussain S, Ansari MT. Quantitation of metronidazole in pharmaceutical suspension using high performance liquid chromatographic method. Pak J Zool. 2011;43(5):909–14.
8. Afify K, Abdelsalam R, Hadad G. HPLC determination of Metronidazole in pure form, pharmaceutical dosage form and spiked urine. Rec Pharm Biomed Sci. 2018;2(2):46–51.
9. Kubodera M, Tokumura T, MacHida Y. Determination of metronidazole in a rat stomach by HPLC for obtaining basic data of the eradication therapy of Helicobacter pylori. J Pharm Anal. 2012;2(5):378–81.
10. Naveed S, Qamar F. Simple UV Spectrophotometric Assay of Metronidazole. OALib. 2014;01(06):1–4.
11. Henedak HM, Salama I, Mostafa S, El-Sadek M. HPLC and chemometric methods for the simultaneous determination of miconazole nitrate and nystatin. J Chromatogr Sci. 2012;50(10):855–61.
12. Bhosale S, Educational M. RP-HPLC method for simultaneous estimation of hydrocortisone acetate and miconazole nitrate in a cream RP-HPLC Method for Simultaneous Estimation of Hydrocortisone Acetate and Miconazole Nitrate in a Cream Formulation. Inven Rapid Pharm Anal Qual Assur. 2014;2014(3):1–4.
13. Kane SN, Mishra A, Dutta AK. Development of high performance liquid chromatography method for miconazole analysis in powder sample. J Phys Conf Ser. 2016;755(1).

14. Tenjarla S, Puranajoti P, Kasina R, Mandal T. Preparation, characterization, and evaluation of miconazole- cyclodextrin complexes for improved oral and topical delivery. *J Pharm Sci.* 1998;87(4):425–9.
15. Cavrini V, Di Pietra AM, Gatti R. Analysis of miconazole and econazole in pharmaceutical formulations by derivative UV spectroscopy and liquid chromatography (HPLC). *J Pharm Biomed Anal.* 1989;7(12):1535–43.
16. Ricci E, Bentley MVLB, Maldonado Marchetti J. HPLC assay of lidocaine in in vitro dissolution test of the poloxamer 407 gels. *Rev Bras Ciencias Farm J Pharm Sci.* 2002;38(1):107–11.
17. Al Nebaihi HM, Primrose M, Green JS, Brocks DR. A High-Performance liquid chromatography assay method for the determination of lidocaine in human serum. *Pharmaceutics.* 2017;9(4):1–8.
18. Al-Salman HNK, Al-Jadaan SAN, Alnuaim M, Hassan H. Estimation of Lidocaine-HCl in Pharmaceutical drugs by HPLC-UV System. *Am J PharmTech Res.* 2017;7(1)(January):1–11.
19. Smith FM, Nuessle NO. Hplc method for determination of lidocaine in admixture with dextrose injection. *Anal Lett.* 1981;14(8):567–75.
20. Narendra MG, Sharesh JW. Development And Validation Of HPLC Method For Simultaneous Determination Of Lidocaine And Prilocaine In Topical Formulation. *Asian J Pharm Clin Res.* 2017;10(10).
21. Kumar BK, Rajan VST, Begum NT. Analytical Method Development and Validation of Lidocaine in Ointment Formulation By U . V Spectrophotometric Method. *Int J Pharm Pharm Sci.* 2012;4(2):2–6.
22. Akay C, Özkan SA, Şentürk Z, Cevheroğlu A. Simultaneous determination of metronidazole and miconazole in pharmaceutical dosage forms by RP-HPLC. *Farmaco.* 2002;57(11):953–7.
23. Belal TS, Haggag RS. Gradient HPLC-DAD stability indicating determination of miconazole nitrate and lidocaine hydrochloride in their combined oral gel dosage form. *J Chromatogr Sci.* 2012;50(5):401–9.
24. Maeda, K., Osato, T., and Umezawa H. A new antibiotic azomycin. *J Antibiot (Tokyo).* 1953;(6A):182.
25. Nakamura S. Structure of azomycin, a new antibiotic. *Pharm Bull.* 1955;(3):379.
26. Cosar, C., and Julou L. Activity of 1-(21-hydroxyethyl)-2- methyl-5-nitroimidazole (8823 RP) against experimental *Trichomonas vaginalis* infection. *Ann Inst Pasteur (Paris).* 1959;(96):238–41.
27. Sağlıkoğlu G. Nitroimidazol Türevi Antibakteriyel Etkili İlaç Aktif maddelerinin Dozaj Formlarından Modifiye ve Modifiye Edilmiş Elektrotlarda Voltametrik Teknikler ile Kantitatif Analizi [Yüksek Lisans tezi]. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi; 2011.
28. Leitsch D. A review on metronidazole: An old warhorse in antimicrobial chemotherapy. *Parasitology.* 2019;146(9):1167–78.

29. Cosar C, Julou L. The activity of 1-(2-hydroxyethyl)-2-methyl-5-nitroimidazole (R. P. 8823) against experimental *trichomonas vaginalis* infections. In: Annales d'Institut Pasteur. 1959. p. 238–41.
30. Edwards D. Mechanisms of selective toxicity of metronidazole and other nitroimidazole drugs. Br J Vener Dis. 1980;(56):285–90.
31. Muller M. Action of clinically utilized 5-nitroimidazoles on microorganisms. Scand J Infect Dis Suppl. 1981;(26):31–41.
32. D'Arey P., Scott EM. Antifungal agents. Prog Durg Res. 1978;(22):93.
33. Richard HD, Mycek JM. Antifungal İlaçlar. In: Richard HA, Champe C. Pamela, editors. Lippincott's Illustrated Reviews. 3rd ed. 2016. p. 403–13.
34. Fan S, Liu X, Liang Y. Miconazole Nitrate Vaginal Suppository 1,200 mg versus Oral Fluconazole 150 mg in Treating Severe Vulvovaginal Candidiasis. Gynecol Obstet Invest. 2015;80(2):113–8.
35. Rubin JE, Crowe SE. Azole Antifungal Drugs: Old and New. Ann Intern Med. 1988;109(3):177–9.
36. Park NH, Shin KH, Kang MK. Antifungal and Antiviral Agents. Seventh Ed. Pharmacology and Therapeutics for Dentistry: Seventh Edition. Elsevier; 2017. 488–503 p.
37. Becker DE, Reed KL. Local anesthetics: review of pharmacological considerations. Anesth Prog. 2012;59(2):90–102.
38. Goth A. Prensip ve Kavramlar. Tibbi Farmakoloji. 1971;27:410.
39. Suzuki S, Koköfer A, Gerner P. Local Anesthetics. Pharmacol Physiol Anesth Found Clin Appl. 2013;291–308.
40. Konukman S. Diş Hekimliğinde Anestezi. İstanbul: Ahmet Sait Matbaası; 1975. 52–53 p.
41. Koveleskie J. Amide local anesthetics. 5-Minute Anesth Consult. 2012;(Md).
42. Tetzlaff JE. The pharmacology of local anesthetics. Anesth Clin North Am. 2000;18(2):217.
43. Medicine USNL of. Metronidazole [Internet]. ChemIDplus. [Erişim Tarihi: 10 Mart 2021]. Erişim Adresi: <https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/sid/0000443481>
44. Bucklin MH, Groth CM, Henriksen B. Metronidazole. Encycl Toxicol Third Ed. 2014;3:330–1.
45. PubChem National Library of Medicine. Metronidazole [Internet]. [Erişim Tarihi: 10 Mart 2021]. Erişim Adresi: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Metronidazole>
46. Williams CS, Woodcock KR. Do Ethanol and Metronidazole Interact to Produce a Disulfiram-Like Reaction? Ann Pharmacother. 2000;34(June 1999):255–7.
47. Sydney M.D, Finegold M. Pharmacology and Mode of Action of Metronidazole. Ann Intern Med. 1980;93(4):585–7.

48. Lamp KC, Freeman CD, Klutman NE, Lacy MK. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the nitroimidazole antimicrobials. *Clin Pharmacokinet.* 1999;36(5):353–73.
49. Miconazole [Internet]. U.S. National Library of Medicine. [Erişim Tarihi: 10 Mart 2021]. Erişim Adresi: <https://druginfo.nlm.nih.gov/drugportal/name/miconazole>
50. Miconazole. In: *European Pharmacopoeia (Ph Eur) 10th Edition.* 2021.
51. PubChem National Library of Medicine. Miconazole [Internet]. [Erişim Tarihi: 10 Mart 2021]. Erişim Adresi: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Miconazole#section=Solubility>
52. Lidocaine. In: *European Pharmacopoeia (Ph Eur) 10th Edition.* 2021.
53. PubChem National Library of Medicine. Lidocaine [Internet]. [Erişim Tarihi: 10 Mart 2021]. Erişim Adresi: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Lidocaine#section=Vapor-Pressure>
54. Maizels M, B Scott, Cohen W. Intranasal lidocaine for treatment of migraine. *JAMA.* 1996;276:319–21.
55. Dunst M, Margolin K, Horak D. Lidocaine for severe hiccups. *N Engl J Med.* 1993;329:890–1.
56. Jacox A, Carr D, Payne R. New clinical-practice guidelines for the management of pain in patients with cancer. *N Engl J Med.* 1994;330:651–5.
57. Emekdaş G, Güngör S, Gün H, Kocabeyoğlu Ö. Kromatografik Yöntemler. *Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Derg.* 1990;1:108–18.
58. Skoog D, Holler FJ, Neiman TA. *Enstrümantal Analiz İlkeleri (1bs.).* Ankara: Bilim Yayıncılık; 1998.
59. Hamilton R., Sewell P. *Introduction To High Performance Liquid Chromatography (2 bs.).* London: Chapman and Hall.;
60. Sneha RL. A review on chromatography with high performance liquid chromatography (HPLC) and its functions. *RRJPA.* 2015;4:1–15.
61. Mcpolin O. *An Introduction to HPLC for Pharmaceutical Analysis.* UK: Mourn Training Services; 2009.
62. Moldoveanu S, David V. *Essentials in Modern HPLC Separations.* New York: Elsevier; 2013.
63. Kazakevich Y, Lobrutto R. *HPLC for Pharmaceutical Scientists.* 1st ed. John Wiley & Sons: Hoboken; 2007.
64. Basci N, Temizer A, Bozkurt A, Isimer A. Optimization of mobile phase in the separation of β -blockers by HPLC. *J Pharm Biomed Anal.* 1998;18(4–5):745–50.
65. Krstulovic AM, Brown PR. *Reversed-Phase High- Performance Liquid Chromatography.* New York: John Wiley and Sons.; 1982.

66. Stahlberg J. Ion Chromatography : Mechanisms. *Encycl Sep Sci.* 2000;c:676–84.
67. Snyder LR, Glajch JL, Kirkland JJ. *Practical HPLC Method Development.* New York: John Wiley and Sons.; 1988.
68. Giridhar G, Manepalli RKNR, Apparao G. *Size-Exclusion Chromatography. Vol. 3, Thermal and Rheological Measurement Techniques for Nanomaterials Characterization.* Elsevier Inc.; 2017. 51–65 p.
69. Hage DS. *Handbook of Affinity Chromatography.* Hage DS, Cazes J, editors. CRC Pres; 2006. 856 p.
70. Ravisankar P, Anusha S, Supriya K, Kumar UA. Fundamental chromatographic parameters. *Int J Pharm Sci Rev Res.* 2019;55(April):46–50.
71. Ito Y, Rolet MC, Thiebaut D, Rosset R. Fundamental chromatographic parameters in countercurrent chromatography: Influence of the volume of stationary phase and the flow-rate. *J Liq Chromatogr.* 1992;15(15–16):2883–908.
72. Çakan O. Sıvı Kromatografi Sisteminde Önemli Parametreler [Internet]. 2017. [Erişim Tarihi: 10 Mart 2021]. Erişim Adresi: <https://labakademi.com/sivi-kromatografi-sisteminde-onemli-parametreler/>
73. Shabir G. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: understanding the differences and similarities between validation requirements of the us food and drug administration, the us pharmacopeia and the international conf. *J Chromatogr.* 2003;987:57–66.
74. Agrahari V, Bajpai M, Nanda S. Essential concepts of mobile phase selection for Reversed phase HPLC. *Res J Pharm Technol.* 2013;6(5):459–64.
75. World Health Organization. *High Performance Liquid Chromatography. in The International Pharmacopoeia.* Geneva; 2016.
76. Kumar V, Bharadwaj R, Gupta G, Kumar S. An overview on HPLC method development, optimization and validation process for drug analysis. *Pharm Chem J.* 2015;2(2):30–40.
77. Harris D. *Quantitative Chemical Analysis.* New York: W. H. Freeman and Company; 2007.
78. FDA. Inactive Ingredient Search for Approved Drug Products [Internet]. 2021. [Erişim Tarihi: 10 Mart 2021]. Erişim Adresi: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/iig/index.cfm>
79. Rimmer C, Simmons C, Drosey J. The measurement and meaning of void volumes in reversed-phase liquid chromatography. *J Pharm Biomed Anal.* 2002;24(5–6):755–67.
80. EMEA International Conference on Harmonisation. *ICH Topic Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology.* 2014;2(June 1995):1070–2.
81. *Validation of Compendial Procedures.* United States Pharmacopoeial Convention:Rockville. 2016.

82. Kazusaki M, Ueda S, Takeuchi N, Ohgami Y. Validation of analytical procedures by high-performance liquid chromatography for pharmaceutical analysis. *Chromatogr.* 2012;33:65–73.
83. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Reviewer Guidance Validation of Chromatographic Methods [Internet]. 1994. [Erişim Tarihi: 10 Mart 2021]. p. 21–6. Erişim Adresi: <https://www.fda.gov/media/75643/download>
84. The United State Pharmacopeia (USP). <1225> Validation of Compendial Procedures. In 2017.
85. Türk Famakopesi. Türkiye: T.C. Sağlık Bakanlığı. Ankara; 2017.
86. Wael Abu Dayyih, Noor Al Saadi, Mohmad Hamad, Eyad Mallah, Khalid Matalka TA. Development and validation of HPLC method for some azoles in pharmaceutical preparation. *Int J Pharm Sci Res.* 2013;3(10):3686.
87. Green J. A practical guide to analytical method validation. *Anal Chem.* 1996;68:305A-309A.
88. Ermer J. Validation in pharmaceutical analysis. Part I: An integrated approach. *J Pharm Biomed Anal.* 2001;24(5–6):755–67.
89. Booth BP, Simon WC. Analytical method validation. *New Drug Dev Regul Paradig Clin Pharmacol Biopharm.* 2016;(May):138–59.
90. Papai Z, Pap TL. Analysis of peak asymmetry in chromatography. *J Chromatogr A.* 2002;953(1–2):31–8.
91. Khater S, West C, Lesellier E. Characterization of five chemistries and three particle sizes of stationary phases used in supercritical fluid chromatography. *J Chromatogr A* [Internet]. 2013;1319:148–59. [Erişim Tarihi: 10 Mart 2021]. Erişim Adresi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2013.10.037>

8. EKLER

EK 1. Korrelasyon Katsayısı ve Doğrusallıktan Ayrılış Önem Kontrolü

Bulunan korrelasyon katsayısının önemli bir katsayı mı yoksa tesadüfe bağlı bir katsayı mı olduğu test edilmiştir.

Testin yapımında işlemler:

- Ho: Korrelasyon katsayısı tesadüfe bağlı bir değerdir ($r = 0$).
- Test istatistiğinin hesaplanması:

$$T = \frac{r}{Sr}$$

$$Sr = \left[\frac{1-r^2}{n-2} \right] \text{ (Korrelasyon katsayısının standart hatası)}$$

- Yanılma olasılığı olarak $\alpha = 0.05$ seçilmiştir.
- Serbestlik derecesi = $n - 2$
- $\alpha = 0.05$ düzeyinde ve 4. Madde de bulunan serbestlik derecesinde tablo t değerine bakılır.
- Karşılaştırma: Hesapla bulunan t değeri tablo t değerinden büyükse H0 hipotezi reddedilir, küçükse kabul edilir.
- Karar: Korrelasyon katsayısı önemli bir değerdir, tesadüfen bulunmuş bir değer değildir ($t =$ Hesapla bulunan değer, $p < 0.05$) veya korrelasyon katsayısı önemli bir değer değildir, tesadüfen bulunmuş bir değerdir ($t =$ Hesapla bulunan değer, $p > 0.05$).

Doğrusallıktan Ayrılış Önem Kontrolü

1. Kareler toplamları bulunur:

a) Regresyon Kareler Toplamı (RKT):

$$RKT = \frac{\left[\Sigma xy - \frac{(\Sigma x)(\Sigma y)}{n} \right]^2}{\Sigma x^2 - \frac{(\Sigma x)^2}{n}}$$

b) Y Ortalamadan Ayrılış Kareler Toplamı (YOAKT):

$$YOAKT = \Sigma y^2 - \frac{(\Sigma y)^2}{n}$$

c) Regresyondan Ayrılış Kareler Toplamı \Rightarrow RAKT = YOAKT - RKT

2. Serbestlik dereceleri bulunur:

a) Regresyon Serbestlik Derecesi (RSD) = 1

b) Y Ortalamadan Ayrılış Serbestlik Derecesi \Rightarrow YOASD = n-1

c) Regresyondan Ayrılış Serbestlik Derecesi \Rightarrow RASD = YOASD

RSD

3. Kareler ortalamaları bulunur:

a) Regresyon Kareler Ortalaması \Rightarrow RKT / RSD

b) Regresyondan Ayrılış Kareler Ortalaması \Rightarrow RAKO = RAKT / RASD

4. H_0 = Değişim ile detektör cevabı arasındaki ilişki doğrusal değildir.

5. Yanılma olasılığı $\alpha = 0.05$ seçilmiştir.

6. $F = RKO / RAKO$

7. $p = 0.05$ düzeyinde RSD ve RASD serbestlik derecelerindeki tablo F değerleri bulunur.

8. Karşılaştırma: Hesapla bulunan F değeri tablo F değerinden büyükse H_0 hipotezi reddedilir, küçükse kabul edilir.

9. Karar: Derişim ile detektör cevabı arasındaki ilişki doğrusaldır ($F =$ Hesapla bulunan, $p < 0.05$) veya doğrusal değildir ($F =$ Hesapla bulunan, $p > 0.05$).

Kesişimin sıfırdan ayrılışının önem kontrolü

$$S_{yx} = \frac{\Sigma y^2 - (\Sigma x)^2 / n}{n - 1} \left[\frac{(1 - r)^2 (n-1)}{n - 2} \right]^{1/2}$$

$$S_{H(a)} = (S_{yx})^2 \left[\left(\frac{1}{n} \right) + \bar{x} / (\Sigma x^2 - (\Sigma x)^2 / n) \right]$$

$H_0 =$ Kesişim değeri (a) sıfıra eşittir.

Yanılma olasılığı $p = 0.05$ seçilmiştir.

$$t_H = a / S_{H(a)}$$

$\alpha = 0.05$ düzeyinde t_T değerleri bulunur.

Karşılaştırma: Hesapla bulunan t değeri tablo t değerinden büyükse H_0 hipotezi reddedilir, küçükse kabul edilir.

Karar: Kesişim değeri sıfıra eşittir ($t_H =$ Hesapla bulunan, $p > 0.05$) veya Kesişim değeri sıfırdan farklıdır ($t_H =$ Hesapla bulunan, $p < 0.05$).

EK 2. İstatistiksel Katsayıların Hesaplanması

Bağıl Standart Sapma Hesaplanması

$$\text{Bağıl Standart Sapma (BSS)} = \frac{SS}{\bar{X}} \times 100$$

SS: Standart Sapma

\bar{X} : Aritmetik ortalama

% Bağıl Hata Hesaplanması

$$\% \text{ Bağıl Hata (\%BH)} = \frac{|\text{Olması gereken miktar} - \text{Bulunan miktar}|}{\text{Olması gereken miktar}} \times 100$$

Standart Hata Hesaplanması

$$\text{Standart Hata (SH)} = \frac{SS}{\sqrt{n}}$$

SS: Standart sapma

n: Ölçüm sayısı

%Geri Kazanım Hesaplanması

$$\% \text{ Geri Kazanım} = \frac{\text{Bulunan miktar}}{\text{Olması gereken miktar}} \times 100$$

Evren Ortalaması Güven Aralığının Hesaplanması

$$\mu = \bar{X} \pm S_{\bar{X}} t \quad \text{veya} \quad \bar{X} - S_{\bar{X}} < \mu < \bar{X} + S_{\bar{X}}$$

μ : Evren ortalaması

\bar{X} : Örneklem ortalaması

$S_{\bar{X}}$: Standart hata

t : Seçilen yanılma düzeyi (α) ve n-1 serbestlik derecesindeki t tablosundaki değer.

EK- 3. t – Testi

İki ortalama arasında fark olup olmadığını test eder.

$$s^2 = [(n_1-1) s_1^2 + (n_2-1) s_2^2] / (n_1 + n_2 -2)$$

$$t = (\bar{x}_1 - \bar{x}_2) / s \sqrt{(1/n_1 + 1/n_2)}$$

n_1 : 1.yöntemin ölçüm sayısı n_2 : 2.yöntemin ölçüm sayısı

s_1 : 1. yöntemin standart sapması s_2 : 2.yöntemin standart sapması

\bar{x}_1 : 1. yöntemin ortalaması \bar{x}_2 : 2.yöntemin ortalaması

Serbestlik derecesi= $n_1 + n_2 -2$

1. H_0 = İki ortalama arasında fark yoktur.

2. $\alpha=0.05$ yanılma düzeyinde ve $n_1 + n_2 -2$ serbestlik derecesindeki tablo t değerine bakılır.

3. Karşılaştırma: Hesapla bulunan t değeri tablo t değerinden büyükse H_0 hipotezi reddedilir, küçükse kabul edilir.

4. Karar:

a) Ortalamalar arasında fark yoktur (t = Hesaplanan değer, $p > 0.05$).

b) Ortalamalar arasında fark vardır (t = Hesaplanan değer, $p < 0.05$).

EK-4. Wilcoxon Eşleştirilmiş İki Örnek Testi

Aynı örneklerin değişik iki durumdaki ölçüm sonuçları arasında fark olup olmadığının belirlenmesinde $n < 25$ ise uygulanan önemlilik testidir.

H_0 = İki yöntemle elde edilen sonuçlar arasında fark yoktur.

$\alpha = 0,05$ yanılma düzeyi seçilmiştir.

Test istatistiğinin hesaplanması:

İki yöntemden elde edilen sonuçlar iki sütun şeklinde yanyana yazılır. Sağda yeni bir sütuna satırlar arasındaki farklar +/- işaretleriyle birlikte yazılır. Ardından farklar küçükten büyüğe doğru sıralanır ve sıra no. verilir. Sıra no.ların önüne farklardaki +/- işaretleri yazılır. + ve - işaretli sıra no. grupları arasında işareti sayıca fazla olan grup toplanır. Elde edilen değer, hesaplama bulunan T değeridir (T_H).

Ölçüm sayısı (n) serbestlik derecesindeki tablo T değerine bakılır.

Karar:

a) $T_H > T_t$ ise iki yöntemle elde edilen sonuçlar arasında fark yoktur ($T_H =$ Hesaplanan T değeri, $p < 0,05$)

b) $T_H < T_t$ ise iki yöntemle elde edilen sonuçlar arasında fark vardır ($T_H =$ Hesaplanan T değeri, $p > 0,05$)

EK-5. Kruskal Wallis Varyans Analizi

Test varsayımları uygun olmadığı durumda, ikiden fazla değişkenin olduğu gruplar arasında herhangi bir farkın olup olmadığı kontrollerinde kullanılırlar.

İstatistiksel Hesap (KW)

$$KW = \frac{12}{n(n+1)} \left[\sum_{j=1}^k \frac{T_j^2}{n_j} \right] - k(n+1)$$

T_j : j. gruptaki değerlerin sıra numaraları toplamı (her bir grup için);

n_j : j. gruptaki örnek miktarı (her bir grup için);

k : Grup miktarı;

n : Toplam deney miktarı.

H_0 = İki yöntemle elde edilen sonuçlar arasında fark yoktur.

$\alpha=0,05$ yanılma düzeyi için (grup sayısı – 1) serbestlik derecesindeki tablo değerine (KW_T) bakılır.


Sonucun belirlenmesi:

$KW_T > KW$ ise H_0 hipotezi kabul edilir.

$KW > KW_T$ ise H_0 hipotezi reddedilir

EK 6- Sertifikalar

Metronidazol Etkin Maddesi Analiz Sertifikası



UNICHEM
LABORATORIES LTD.

Plot No. 99, M.I.D.C., DhataV, Roha, Dist. Raigad - 402 116. (India)
Phone : ++91-2194-263561, 62, 49
Fax : ++91-2194-263545

Certificate of Analysis

Product : METRONIDAZOLE Ph. Eur.
Batch No. : RMTZP20171
Mfg. Date : MAY 2012
Exp. Date : APRIL 2017

A. R. No. : 04000046011
Release Date : 14/06/12
Batch Qty : 500.00 Kg

Sr. No.	Test	Specification	Results
01	Characters		
	i) Appearance	A white or yellowish crystalline powder.	White crystalline powder
	ii) Solubility	Slightly soluble in water, in acetone, in alcohol and in methylene chloride.	Slightly soluble in water, in acetone, in alcohol and in methylene chloride.
02.	Identification		
	C) By IR	Spectrum of sample should be concordant with the spectrum obtained from working standard.	Spectrum of sample is concordant with the spectrum obtained from working standard.
03.	Appearance of Solution	The solution is not more opalescent than Reference Suspension II and not more intensely coloured than reference solution GY ₆ .	The solution is not more opalescent than Reference Suspension II and not more intensely coloured than reference solution GY ₆ .
04.	Related Substances by HPLC(%w/w)		
	i) Impurity A	Not More than 0.1%	0.02%
	ii) Any Individual unknown impurity	Not More than 0.05%	Not detected
	iii) Total impurities	Not more than 0.2%	0.02%
05.	Heavy metals	Not more than 20 ppm	Less than 20 ppm.
06.	Loss on drying (%w/w)	Not more than 0.5%	0.13%
07.	Sulphated ash (%w/w)	Not more than 0.1%	0.04%
08.	Assay by potentiometry (%w/w) (On dried basis)	Between 99.0% and 101.0%.	99.2%
ADDITIONAL TEST AS PER CUSTOMER REQUIREMENT			
A	Particle size by Malvern (Dry method)	100% < 20 micron	100% < 9.37 micron.

Remarks: - The above product Complies to the prescribed standards of quality with respect to above tests as per Ph. Eur. specification. (Specification No. CQA/APIS/MTZ04/05)

Prepared by: _____
Date: 15/06/12

Approved by: _____
Date: 15/06/12

COA ISSUED TO SELECTCHEMIE, GERMANY ON 15/06/12

UNICHEM - A TRUSTED NAME IN PHARMACEUTICALS

RQA/F/007/01



UNICHEM
LABORATORIES LTD.

Plot No. 99, M.I.D.C., Dhataw, Roha, Dist. Raigad - 402 116. (India)
Phone : ++91-2194-263561, 62, 49
Fax : ++91-2194-263545

Certificate of Analysis

Product : METRONIDAZOLE Ph. Eur.
Batch No. : RMTZP20171
Mfg. Date : MAY 2012
Exp. Date : APRIL 2017
A. R. No. : 04000046011
Release Date : 14/06/12
Batch Qty : 500.00 Kg

Sr. No.	Test	Specification	Results
01	Characters		
	i) Appearance	A white or yellowish crystalline powder.	White crystalline powder
	ii) Solubility	Slightly soluble in water, in acetone, in alcohol and in methylene chloride.	Slightly soluble in water, in acetone, in alcohol and in methylene chloride.
02.	Identification		
	C) By IR	Spectrum of sample should be concordant with the spectrum obtained from working standard.	Spectrum of sample is concordant with the spectrum obtained from working standard.
03.	Appearance of Solution	The solution is not more opalescent than Reference Suspension II and not more intensely coloured than reference solution GY ₆ .	The solution is not more opalescent than Reference Suspension II and not more intensely coloured than reference solution GY ₆ .
04.	Related Substances by HPLC(%w/w)		
	i) Impurity A	Not More than 0.1%	0.02%
	ii) Any Individual unknown impurity	Not More than 0.05%	Not detected
	iii) Total impurities	Not more than 0.2%	0.02%
05.	Heavy metals	Not more than 20 ppm	Less than 20 ppm.
06.	Loss on drying (%w/w)	Not more than 0.5%	0.13%
07.	Sulphated ash (%w/w)	Not more than 0.1%	0.04%
08.	Assay by potentiometry (%w/w) (On dried basis)	Between 99.0% and 101.0%.	99.2%
ADDITIONAL TEST AS PER CUSTOMER REQUIREMENT			
A	Particle size by Malvern (Dry method)	100% < 20 micron	100% < 9.37 micron.

Remarks: - The above product Complies to the prescribed standards of quality with respect to above tests as per Ph. Eur. specification. (Specification No. CQA/APIS/MTZ04/05)

Prepared by:

Approved by:

Date:

15/06/12

Date:

15/06/12

COA ISSUED TO SELECTCHEMIE, GERMANY ON 15/06/12

UNICHEM - A TRUSTED NAME IN PHARMACEUTICALS

RQA/F/007/0:

Mikonazol Nitrat Etkin Maddesi Analiz Sertifikasi

A member of Infa Group



Revision 2900-02

Page 1/2

MICONAZOLE NITRATE				
Batch N°:	2900/11/14	ANALYSIS CERTIFICATE N° 141520	Date:	04/09/2014
Kg:	432.00	Formula: C ₁₈ H ₁₄ Cl ₄ N ₂ O.HNO ₃	M.W.:	479.10
Man. date:	17/06/2014	Retest date: Jun/2019	Complies with:	Ph.Eur.-BP-USP
Solubility: <i>freely soluble in dimethylsulfoxide; soluble in dimethylformamide; sparingly soluble in methanol; slightly soluble in ethanol, chloroform and propylene glycol; very slightly soluble in water and isopropanol; practically insoluble in ether.</i>				
TESTS	SPECIFICATIONS	RESULTS		
DESCRIPTION	white or almost white crystalline powder	complies		
IDENTIFICATION	(1): IR spectrum (2): UV spectrum (3): melting point: 178°-184°C	complies complies 183°-184°C		
LOSS ON DRYING	not more than 0.5%	0.11%		
SULPHATED ASH	not more than 0.1%	0.01%		
HEAVY METALS	not more than 10 ppm	complies		
APPEARANCE OF SOLUTION	clear and not more intensely coloured than reference solution Y ₇	complies		
OPTICAL ROTATION	- 0.10° to + 0.10°	- 0.01°		
ASSAY	99.0% to 101.0% with reference to the dried substance (pot.)	100.4%		
RESIDUAL SOLVENTS	(1): methanol not more than 1000 ppm (2): acetone not more than 1000 ppm (3): toluene not more than 890 ppm (4): sum of all solvents not more than 1000 ppm	< LOQ < LOQ < LOQ complies		
<i>This material has been prepared following the current Good Manufacturing Practice (cGMP).</i>				

Q.C. Manager

Q.A. Manager

Qualified Person

08/09/2014

05/08/14

05/09/14

Sifavitor srl
Sede Legale / Registered Office
Largo Guido Donegani, 2 - 20121 Milan (Italy)
T: +39 02 777281 | F: +39 02 77728349

Stabilimento / Plant
Via Livelli, 1 - 26852 Casaleto Lodigiano Iraz, Mairano (Lodi), (Italy)
T: +39 0371 739901 | F: +39 0371 73108
sifavitor@infagroup.com | www.infagroup.com

A member of Infa Group



Revision 2900-02

Page 2/2

MICONAZOLE NITRATE				
Batch N°:	2900/11/14	ANALYSIS CERTIFICATE N° 141520	Date:	04/09/2014
Kg:	432.00	Formula: C ₁₈ H ₁₄ Cl ₄ N ₂ O.HNO ₃	M.W.:	479.10
Man. date:	17/06/2014	Retest date: Jun/2019	Complies with:	Ph.Eur.-BP-USP
Solubility: <i>freely soluble in dimethylsulfoxide; soluble in dimethylformamide; sparingly soluble in methanol; slightly soluble in ethanol, chloroform and propylene glycol; very slightly soluble in water and isopropanol; practically insoluble in ether.</i>				
TESTS	SPECIFICATIONS	RESULTS		
RELATED SUBSTANCES (HPLC)	(1): impurity 6 (2,4-dichlorobenzylchloride) not more than 30 ppm (2): impurity 1 not more than 0.05% (3): sum of impurities 2 and 10 not more than 0.05% (4): sum of impurities 3 and 9 not more than 0.05% (5): impurity 4 not more than 0.05% (6): sum of impurities 7 and 8 not more than 0.05% (7): any other impurity not more than 0.05% (8): sum of all impurities not more than 0.5% NOTE: impurities 2/10, 3/9, 7/8 coelute	< LOQ < LOQ < LOQ 0.01% < LOQ 0.03% RRT 0.29: 0.03% RRT 1.38: 0.01% RRT 1.45: 0.02% 0.10%		
ADDITIONAL TEST				
PARTICLE SIZE	d90 not more than 20 micrometers	19 micrometers		
<i>This material has been prepared following the current Good Manufacturing Practice (cGMP).</i>				

Q.C. Manager

Q.A. Manager

.. Qualified Person

08/09/2014

Sifavitor srl
Sede Legale / Registered Office
Largo Guido Donegani, 2 - 20121 Milan (Italy)
T: +39 02 777281 | F: +39 02 77728349

Stabilimento / Plant
Via Livelli, 1 - 26852 Casaleto Lodigiano Iraz. Mairano (Lodi), (Italy)
T: +39 0371 739901 | F: +39 0371 73108
sifavitor@infagroup.com | www.infagroup.com

Lidokain HCl Etkin Maddesi Analiz Sertifikası

APEX HEALTHCARE LIMITED

Plot No.: 4710 – G.I.D.C., Ankleshwar-393 002,Gujarat.(India)

QUALITY CONTROL DEPARTMENT CERTIFICATE OF ANALYSIS

Name of the Product: - LIDOCAINE HYDROCHLORIDE EP					
Batch No.	: LHAH028081314	Date of Receipt	: 29.08.2013	A. R. No.	: FPLHAH0281314
Mfg. Date	: AUG.2013	Sampled Qty.	: 3 x 15 gm	A. R. Date	: 30.08.2013
Exp. Date	: JUL.2018	Pack Size	: -	Qty. Released	: 500.00 Kgs.
Batch Size	: 500.20 Kgs.	Drug Lic. No.	: G/25/1642 dt. 27.07.2012		

TESTS	SPECIFICATIONS	RESULTS
Description	A white or almost white, crystalline powder.	White, crystalline powder.
Solubility	Very soluble in water; Freely soluble in ethanol (96 %)	Complies
Identification	A) Melting Point : Between 74° to 78° C	75° to 77° C
	B) To Comply IR test.	Complies
	D) It gives reaction (a) of chlorides(2.3.1)	Complies
Appearance of solution	5.0 % w/v solution in carbon dioxide-free water is clear & colourless	Clear and colourless.
Related Substances (by HPLC)	Impurity-A: 0.01 %	0.0054 %
	Single unknown impurity: 0.10 %	0.0615 %
	Total Impurity: 0.5 %	0.0864 %
pH	Between 4.0 to 5.5	5.12
Heavy Metals	Not more than 5 ppm	Complies
Sulphated Ash	Not more than 0.1 % w/w	0.044 % w/w
Water	Between 5.5 and 7.0 % w/w	6.42 % w/w
Assay	NLT 99.0 % and NMT 101.0 % of C ₁₄ H ₂₂ N ₂ O.HCL on dried basis.	99.49 % w/w

Opinion: The sample referred to above Complies with respects to above tests and prescribed standard EP 7.8 specification.
The sample referred to above is of STANDARD quality as defined in the Drugs and Cosmetic Act and the Rules there under.

Analysed By:

Date: 30.08.2013

Checked By:

Date: 30.08.2013

Approved By:

Date: 30.08.2013

APEX HEALTHCARE LIMITED

Plot No.: 4710 – G.I.D.C., Ankleshwar-393 002,Gujarat.(India)

QUALITY CONTROL DEPARTMENT CERTIFICATE OF ANALYSIS

Name of the Product: - LIDOCAINE HYDROCHLORIDE EP					
Batch No.	: LHAH028081314	Date of Receipt	: 29.08.2013	A. R. No.	: FPLHAH0281314
Mfg. Date	: AUG.2013	Sampled Qty.	: 3 x 15 gm	A. R. Date	: 30.08.2013
Exp. Date	: JUL.2018	Pack Size	: -	Qty. Released	: 500.00 Kgs.
Batch Size	: 500.20 Kgs.	Drug Lic. No.	: G/25/1642 dt. 27.07.2012		

TESTS	SPECIFICATIONS	RESULTS
Description	A white or almost white, crystalline powder.	White, crystalline powder.
Solubility	Very soluble in water; Freely soluble in ethanol (96 %)	Complies
Identification	A) Melting Point : Between 74 ^o to 78 ^o C	75 ^o to 77 ^o C
	B) To Comply IR test.	Complies
	D) It gives reaction (a) of chlorides(2.3.1)	Complies
Appearance of solution	5.0 % w/v solution in carbon dioxide-free water is clear & colourless	Clear and colourless.
Related Substances (by HPLC)	Impurity-A: 0.01 %	0.0054 %
	Single unknown impurity: 0.10 %	0.0615 %
	Total Impurity: 0.5 %	0.0864 %
pH	Between 4.0 to 5.5	5.12
Heavy Metals	Not more than 5 ppm	Complies
Sulphated Ash	Not more than 0.1 % w/w	0.044 % w/w
Water	Between 5.5 and 7.0 % w/w	6.42 % w/w
Assay	NLT 99.0 % and NMT 101.0 % of C ₁₄ H ₂₂ N ₂ O.HCL on dried basis.	99.49 % w/w

Opinion: The sample referred to above **Complies** with respects to above tests and prescribed standard EP 7.8 specification.
The sample referred to above is of **STANDARD** quality as defined in the Drugs and Cosmetic Act and the Rules there under.

Analysed By: _____

Date: 30.08.2013

Checked By: _____

Date: 30.08.2013

Approved By: _____


Date: 30.08.2013

EK-7. Turnitin Ekran Görüntüsü

Turnitin Orijinallik Raporu	
İşleme İkonu: 25-Haz-2022 15:47 +03	
NUMARA: 1064144595	
Kelime Sayısı: 20527	
Gönderildi: 1	
Metronidazol, Mikonazol ve Lidokain' in farmasötik preparattan aynı anda analizi için yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yönteminin geliştirilmesi Çağrı Talay tarafından	
	2% match (07-Nis-2022 tarihli internet)
http://nek.istanbul.edu.tr:4444/ekos/TEZ/48532.pdf	
2% match (12-May-2022 tarihli internet)	
http://nek.istanbul.edu.tr:4444/ekos/TEZ/44903.pdf	
2% match (25-Eki-2021 tarihli internet)	
http://openaccess.hacettepe.edu.tr:8080/xmlui/bitstream/handle/11655/25319/10417937.pdf?isAllowed=y&sequence=1	
2% match (07-Şub-2022 tarihli internet)	
https://dspace.gazi.edu.tr/bitstream/handle/20.500.12602/214078/?isAllowed=y&sequence=1	
1% match (06-Eyl-2018 tarihli öğrenci ödevleri)	
Submitted to Hacettepe University on 2018-09-06	
< 1% match (05-May-2022 tarihli internet)	
http://nek.istanbul.edu.tr:4444/ekos/TEZ/51167.pdf	
< 1% match (09-May-2022 tarihli internet)	
http://nek.istanbul.edu.tr:4444/ekos/TEZ/53193.pdf	
< 1% match (24-May-2022 tarihli internet)	
https://ackbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20.500.12812/492022/yokAcikBilim_10100899.pdf?isAllowed=y&sequence=-1	
< 1% match (14-Nis-2022 tarihli internet)	
https://ackbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20.500.12812/145886/yokAcikBilim_10170223.pdf?isAllowed=y&sequence=-1	
< 1% match (10-Şub-2022 tarihli internet)	
https://ackbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20.500.12812/494810/yokAcikBilim_9002629.pdf?isAllowed=y&sequence=-1	
< 1% match (10-Oca-2022 tarihli internet)	
https://ackbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20.500.12812/146532/yokAcikBilim_10146684.pdf?isAllowed=y&sequence=-1	
< 1% match (06-Oca-2022 tarihli internet)	
https://ackbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20.500.12812/602427/yokAcikBilim_10044409.pdf?sequence=-1	
< 1% match (13-Mar-2022 tarihli internet)	
https://ackbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20.500.12812/491466/yokAcikBilim_10160867.pdf?isAllowed=y&sequence=-1	
< 1% match (24-May-2022 tarihli internet)	
https://ackbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20.500.12812/494163/yokAcikBilim_326599.pdf?isAllowed=y&sequence=-1	
< 1% match (10-Şub-2022 tarihli internet)	
https://ackbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20.500.12812/494176/yokAcikBilim_325610.pdf?isAllowed=y&sequence=-1	
< 1% match (15-Haz-2022 tarihli internet)	
https://ackbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20.500.12812/488663/yokAcikBilim_10299370.pdf?isAllowed=y&sequence=-1	
< 1% match (17-Şub-2022 tarihli internet)	
https://ackbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20.500.12812/54988/yokAcikBilim_462161.pdf?isAllowed=y&sequence=-1	
< 1% match (23-Şub-2022 tarihli internet)	
https://ackbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20.500.12812/76816/yokAcikBilim_148100.pdf?sequence=-1	
< 1% match (23-May-2022 tarihli internet)	
https://ackbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20.500.12812/162999/yokAcikBilim_431367.pdf?isAllowed=y&sequence=-1	
< 1% match (14-Nis-2022 tarihli internet)	
https://ackbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20.500.12812/143961/yokAcikBilim_10189551.pdf?isAllowed=y&sequence=-1	
< 1% match (15-Haz-2022 tarihli internet)	
https://ackbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20.500.12812/477557/yokAcikBilim_428179.pdf?isAllowed=y&sequence=-1	
< 1% match (10-Şub-2022 tarihli internet)	
https://ackbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20.500.12812/491474/yokAcikBilim_10134852.pdf?isAllowed=y&sequence=-1	
< 1% match (24-Şub-2022 tarihli internet)	
https://ackbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20.500.12812/627217/yokAcikBilim_10101551.pdf?isAllowed=y&sequence=-1	
< 1% match (17-Nis-2022 tarihli internet)	
https://ackbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20.500.12812/289379/yokAcikBilim_10034968.pdf?isAllowed=y&sequence=-1	

Benzerlik Endeksi		Kaynağa göre Benzerlik	
Benzerlik Endeksi		İnternet Sources:	%17
%18		Yayımlar:	%1
		Öğrenci Ödevleri:	%5

EK-8: Turnitin Dijital Makbuz



Dijital Makbuz

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Çağrı Talay
Ödev başlığı: Çağrı Talay Tez
Gönderi Başlığı: Metronidazol, Mikonazol ve Lidokain' in farmasötik preparatt...
Dosya adı: a_r_Talay_Hacettepe_Analitık_Tez_Tez_s_nav_sonras_2.pdf
Dosya boyutu: 3.63M
Sayfa sayısı: 115
Kelime sayısı: 20,527
Karakter sayısı: 118,978
Gönderim Tarihi: 28-Haz-2022 03:38ÖS (UTC+0300)
Gönderim Numarası: 1864144595

TEZ
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

METRONİDAZOL, MİKONAZOL VE LİDOKAİNİN
KARIŞIMININ FARMASÖTİK PREPARATTA AYNI ANDA
ANALİZİ İÇİN YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI
KROMATOGRAFİSİ (HPLC) YÖNTEMİNİN GELİŞTİRİLMESİ

Doç. Dr. Çağrı TALAY

Ana Bilim Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANKARA
2022

Copyright 2022 Turnitin. Tüm hakları saklıdır.

9. ÖZGEÇMİŞ