

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

**PARASETAMOLÜN PARENTERAL ÇÖZELTİDE STABİLİTE
GÖSTERGELİ MİKTAR TAYİNİ İÇİN YÜKSEK
PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ YÖNTEMİ
GELİŞTİRİLMESİ VE VALİDASYONU**

Nagehan TUĞ

**Analitik Kimya Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ANKARA
2022**

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

**PARASETAMOLÜN PARENTERAL ÇÖZELTİDE STABİLİTE
GÖSTERGELİ MİKTAR TAYİNİ İÇİN YÜKSEK
PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ YÖNTEMİ
GELİŞTİRİLMESİ VE VALİDASYONU**

Nagehan TUĞ

**Analitik Kimya Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Emirhan NEMUTLU**

**ANKARA
2022**

ONAY SAYFASI

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.

Tezim 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 6 ay ertelenmiştir. (2)

o Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir.

.../.../...

Nagehan TUĞ

“*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, Prof. Dr. Emirhan Nemutlu danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığımı beyan ederim.

Nagehan TUĞ

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım sırasında bilimsel katkılarını ve vaktini esirgemediği bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren danışmanım Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Emirhan NEMUTLU'ya,

Tez çalışmamda desteğini esirgemeyen Prof. Dr. Nuran ÖZALTIN' a ve değerli bilgiler için tüm öğretim üyelerine saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

Eğitimim için beni cesaretlendiren ve desteğini eksik etmeyen eşim MERT' e, canım KÜÇÜK ve TUĞ ailelerime; ailem kadar kıymetli dostlarıma sevgilerimi ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarımda katkılarından dolayı TURKTIPSAN Sağlık Turizm Eğitim ve Ticaret A.Ş' ye ve değerli çalışma arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Nagehan TUĞ
ANKARA, 2022

ÖZET

Tuğ N., Parasetamolün Parenteral Çözeltide Stabilite Göstergeli Miktar Tayini İçin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yöntemi Geliştirilmesi ve Validasyonu, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2022. Parasetamol etken maddesinin içeren yarı geçirgen primer torba ve geçirgen olmayan primer flakon ambalajda bulunan parenteral solüsyonun miktar tayini stabilite göstergeli bir YPSK yöntemi geliştirilerek ve validasyon parametreleri değerlendirilerek analitik validasyonu tamamlanmıştır. Sıvı dozajda parasetamolün analizleri, ters faz kromatografi prensibine dayalı olarak 12.5 mM potasyum dihidrojen fosfat ve 10.33 mM dipotasyum hidrojen fosfat tartılıp 1000 ml saf su ile hazırlanan çözelti (pH:6.9) ve metanol (95:5, h/h) karıştırılarak oluşturulan hareketli faz, C18 4.6 x 50 mm 2.7 µm kolon, 30 °C kolon sıcaklığı, 15 °C oto örnekleyici sıcaklığı, 1.0 ml/dk akış hızı, 254nm dalga boyu ve 10 µl enjeksiyon hacmi ile gerçekleştirilmiştir. Bu koşullar altında alıkonma zamanı 4.dk'dır ve toplam analiz süresi 7 dk'dır. Yöntem, Uluslararası Uyumlaştırma Konferansı (ICH) yönergelerine göre doğrulanmış ve seçicilik çalışması için gerçekleştirilen zorlanmış bozundurma çalışmaları (oksidasyon, ışık, asit, baz ve sıcaklık) neticesinde gerçekleştirilen yöntemin parasetamol için yüksek seçiciliğe sahip olduğu belirlenmiştir. Yöntem 0.625-5.000 µg/mL derişim aralığında doğrusal bulunmuştur. Geri kazanım çalışmaları ise aynı derişim aralığında ve doğrusallığın çalışıldığı her noktada gerçekleştirilmiş ve %100.01 ve %101.91 aralığında bulunmuştur. Stabilite çalışmaları sonucunda parasetamol standart çözeltilerinin ve numune çözeltilerinin 30 gün boyunca oda sıcaklığında, 4 °C ve 15 °C sıcaklıkta kararlı olduğu belirlenmiştir. Gün içi ve günler arası yapılan doğruluk ve kesinlik çalışmalarında bulunan BSS % 0.75' ten ve BH %0.02 'den az olduğu ve yöntemin rutin analizler için uygun olduğu görülmüştür. Validasyon parametrelerinin değerlendirilmesine göre bu çalışmada geliştirilen yöntem, seçici, kesin, doğru, duyarlı ve tekrarlanabiliridir.

Anahtar kelimeler: Parasetamol, miktar tayini, stabilite göstergeli, YPSK-DAD, analitik yöntem validasyonu

ABSTRACT

Tuğ N., Development and Validation of High Performance Liquid Chromatography Stability Indicating Method for Determination of Paracetamol in Parenteral Solution, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences, Department of Analytical Chemistry, Master Thesis, Ankara, 2022. The analytical validation of the parenteral solution in the semi-permeable primary bag and the non-permeable primary vial packaging containing the active ingredient Paracetamol was completed by developing a stability indicating HPLC method and evaluating the validation parameters. Analysis of paracetamol in liquid dosage, based on the principle of reversed phase chromatography, 12.5 mM potassium dihydrogen phosphate and 10.33 mM dipotassium hydrogen phosphate were weighed and the mobile phase formed by mixing the solution prepared with 1000 ml of distilled water (pH:6.9) and methanol (95:5, v/v), C18 4.6 x 50 mm, 2.7 μ m column, 30 °C column temperature, 15 °C autosampler temperature, 1.0 ml/min flow rate, 254 nm wavelength and 10 μ l injection volume. Under these conditions, the retention time is 4 min and the total analysis time is 7 min. The method was validated according to the guidelines of the International Conference on Harmonization (ICH), and it was determined that the method, which was carried out as a result of forced degradation studies (oxidation, light, acid, base and temperature) carried out for the selectivity study, has high selectivity for paracetamol. The method was found to be linear in the concentration range of 0.625-5,000 μ g/mL. Recovery studies were carried out in the same concentration range and at every point where linearity was studied, and it was found in the range of 100.01% and 101.91%. As a result of stability studies, it was determined that paracetamol standard solutions and sample solutions were stable at room temperature, 4 °C and 15 °C for 30 days. In intraday and interday accuracy and precision studies, RSD was less than 0.75% and RE was less than 0.02%, and the method was found to be suitable for routine analyses. According to the evaluation of the validation parameters, the method developed in this study is selective, precise, accurate, sensitive and reproducible.

Keywords: Paracetamol, assay, stability indicating, HPLC-DAD, analytical method validation

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	xiii
ŞEKİLLER	xv
TABLolar	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Parasetamol	3
2.1.1. Parasetamol (Asetaminofen)'ün Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	4
2.1.2. Parasetamol (Asetaminofen)'ün Farmakolojik Özellikleri	4
2.1.3. Parasetamol İlaç Formları	7
2.1.4. Parasetamol Yan Etkileri ve İlaç Etkileşimleri	8
2.2. Parasetamol Analiz Yöntemleri	9
2.3. Validasyon	13
2.4. Validasyon Parametreleri	15
2.4.1. Sistem Uygunluk	15
2.4.2. Seçicilik	16
2.4.3. Kesinlik	16
2.4.4. Doğrusallık	17
2.4.5. Alt Tayin Sınırı (LOQ)	18
2.4.6. Gözlenebilme Sınırı (LOD)	18
2.4.7. Doğruluk (Geri Kazanım)	18
2.4.8. Sağlamlık	19
2.4.9. Çözelti Stabilitesi	19
2.5. Kromatografi	19
2.6. Sıvı Kromatografisi	20

2.6.1. Cihaz	21
2.6.2. Pompa Sistemleri	21
2.6.3. Enjektörler	21
2.6.4. Sabit Fazlar	21
2.6.5. Hareketli Fazlar	23
2.6.6. Dedektörler	24
2.7. Kromatografide Temel Kavramlar	24
2.7.1. Alıkonma Zamanı	24
2.7.2. Teorik Tabaka Yüksekliği ve Teorik Tabaka Sayısı	24
2.7.3. Kapasite Faktörü	26
2.7.4. Seçicilik	26
2.7.5. Ayırıcılık	26
2.7.6. Pik Simetrisi	27
3. GEREÇ ve YÖNTEM	28
3.1. Kullanılan Kimyasallar Maddeler	28
3.2. Kullanılan Cihazlar	28
3.3. Kullanılan Cam Malzemeler	28
3.4. Kullanılan Farmasötik Preperatlar	29
3.5. Kullanılan Standart	29
3.6. Kullanılan Analitik Yöntem	29
3.7. Çözeltilerin Tanımlanması ve Hazırlanması	30
3.7.1. Genel Çözeltiler	30
3.7.2. Seçicilik Çalışmasında Kullanılan Çözeltiler	31
3.7.3. Gün Işığı Bozundurma Çalışmasında Kullanılan Çözeltiler	31
3.7.4. Termal Bozundurma Çalışmasında Kullanılan Çözeltiler	32
3.7.5. Asit Bozundurma Çalışmasında Kullanılan Çözeltiler	32
3.7.6. Baz Bozundurma Çalışmasında Kullanılan Çözeltiler	33
3.7.7. Hidrojen Peroksit Bozundurma Çalışmasında Kullanılan Çözeltiler	33
3.7.8. Hidrojen Peroksit ve Termal Bozundurma Çalışmasında Kullanılan Çözeltiler	34
3.7.9. Doğrusallık Parametresinde Kullanılan Çözeltiler	34
3.7.10. Doğruluk Parametresinde Kullanılan Çözeltiler	35

3.8. Validasyon Parametrelerinin Çalışılması	36
3.8.1. Sistem Uygunluk	36
3.8.2. Seçicilik	36
3.8.3. Kesinlik	37
3.8.4. Doğrusallık	38
3.8.5. Çalışma Aralığı	38
3.8.6. Alt Tayin Sınırı (LOQ)	38
3.8.7. Gözlenebilme Sınırı (LOD)	38
3.8.8. Doğruluk (Geri Kazanım)	38
3.8.9. Sağlamlık	39
3.8.10. Çözelti Stabilitesi	39
4. BULGULAR	40
4.1. Sistem Uygunluk	40
4.2. Seçicilik	40
4.2.1. Gün Işığı Bozundurma Çalışmaları	41
4.2.2. Termal Bozundurma Çalışmaları	44
4.2.3. Asit Bozundurma Çalışmaları	44
4.2.4. Baz Bozundurma Çalışmaları	47
4.2.5. Hidrojen Peroksit Bozundurma Çalışmaları	47
4.2.6. Hidrojen Peroksit ve Termal Bozundurma Çalışmaları	55
4.3. Kesinlik	58
4.4. Doğrusallık	59
4.5. Alt Tayin Sınırı Bulguları	59
4.6. Gözlenebilme Sınırı	60
4.7. Doğruluk (Geri Kazanım)	60
4.8. Sağlamlık	62
4.9. Çözelti Stabilitesi	64
5. TARTIŞMA	65
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	68
7. KAYNAKLAR	69
8. EKLER	
EK 1. İstatistiksel Katsayıların Hesaplanması	

EK 2. Orjinallik Ekran Çıktısı

EK 3. Dijital Makbuz

9. ÖZGEÇMİŞ

SİMGELER ve KISALTMALAR

%	Yüzde
°C	Celsius
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
ANOVA	Analysis of variance, Varyans analizi
AŞ	Anonim şirketi
BH	RE, Bağlı hata
Bkz.	Bakınız
BSS	RSD, Bağlı standart sapma
CL	Güvenlik limiti
C_{parasetamol}	Parasetamolün derişimi
CRS	Chemical reference substance, Kimyasal referans madde
DAD	Diode-array detector, Foto diyot dizisi dedektörü
dk	Dakika
EP	European Phamakopeia, Avrupa Farmakopesi
FIA	Akış enjeksiyon analizi
g	Gram
h/h	Hacim/Hacim oranı I.V. İntervenöz, damar içi
ICH	International Conference on Harmonisation
k'	Kapasite faktörü
LOQ	Miktar tayini limiti
M	Molar
mg	Miligram
ml	Mililitre
N	Teorik plaka sayısı
NAPQI	N-acetyl-p-benzoquinone imine
nm	Nanometre
NY	Nylon
PTFE	Teflon
R	Rezolüsyon
r²	Determinasyon katsayısı

RC	Rejenere Selüloz
RT	Alıkonma zamanı
S/N	Signal/Noise, Sinyal/Gürültü
SS	Standart sapma
Tf	Kuyruklanma faktörü
UPSK	Ultra yüksek performanslı sıvı kromatografisi
USP	United States Pharmacopeia
UV	Ultraviyole
VB.	Ve bunun gibi
WELAC	Western European Laboratory Accreditation Cooperation
X	Ortalama
YPSK	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa	
2.1.	N-(4-Hidroksifenil) asetamid yapısı.	4
2.2.	Kromatografi sınıflandırılması.	20
2.3.	Alıkonma zamanı.	26
2.4.	Simetrik pik.	27
4.1.	Karşılaştırmalı seçicilik kromatogramları.	42
4.2.	Gün ışığı bozundurma çalışması karşılaştırma kromatogramları.	43
4.3.	Termal bozundurma çalışması karşılaştırma kromatogramları.	45
4.4.	Asit (1M HCl ile) bozundurma çalışması karşılaştırma kromatogramları.	46
4.5.	Baz (1M NaOH ile) bozundurma çalışması karşılaştırma kromatogramları.	48
4.6.	10 µl hidrojen peroksit ile bozundurma çalışması karşılaştırma kromatogramları.	49
4.7.	25 µl hidrojen peroksit ile bozundurma çalışması karşılaştırma kromatogramları.	51
4.8.	50 µl hidrojen peroksit ile bozundurma çalışması karşılaştırma kromatogramları.	52
4.9.	250 µl hidrojen peroksit ile bozundurma çalışması karşılaştırma kromatogramları.	53
4.10.	500 µl hidrojen peroksit ile bozundurma çalışması karşılaştırma kromatogramları.	54
4.11.	250 µl hidrojen peroksit ve termal bozundurma çalışmasının karşılaştırma kromatogramları.	56
4.12.	500 µl hidrojen peroksit ve termal bozundurma çalışmasının karşılaştırma kromatogramları.	57

TABLOLAR

Tablo	Sayfa
2.1. Kaynaklara ait özet tablo.	13
2.2. ICH ve USP kılavuzlarının miktar tayini parametre karşılaştırılması.	14
2.3. Sistem uygunluk kabul kriterleri.	16
3.1. Çalışılan doğrusalılık derişimi.	34
3.2. Maruz kalma zamanları.	37
3.3. Sağlamlık parametresi çalışma koşulları.	39
4.1. Sistem uygunluk sonuçları.	40
4.2. Gün ışığı bozundurma sonuçları.	41
4.3. Termal bozundurma sonuçları.	44
4.4. Asit (1M HCl ile) bozundurma sonuçları.	44
4.5. Baz (1M NaOH ile) bozundurma sonuçları.	47
4.6. 10 µl hidrojen peroksit ile bozundurma sonuçları.	47
4.7. 25 µl hidrojen peroksit ile bozundurma sonuçları.	50
4.8. 50 µl hidrojen peroksit ile bozundurma sonuçları.	50
4.9. 250 µl hidrojen peroksit ile bozundurma sonuçları.	50
4.10. 500 µl hidrojen peroksit ile bozundurma sonuçları.	50
4.11. 250 µl hidrojen peroksit ve termal etki ile bozundurma sonuçları.	55
4.12. 500 µl hidrojen peroksit ve termal etki ile bozundurma sonuçları.	55
4.13. Filtre etkisi sonuçları.	55
4.14. Tekrarlanabilirlik sonuçları.	58
4.15. Tutarlılık sonuçları.	59
4.16. Doğrusallık sonuçlarının istatistiksel verileri.	59
4.17. LOQ sonuçları.	60
4.18. LOD sonuçları.	60
4.19. Doğruluk verilerinin gün içi ve günler arası değerlendirme sonuçları.	61
4.20. Dalga boyu değişimi sağlamlık sonuçları.	62
4.21. Akış hızı değişimi sağlamlık sonuçları.	62
4.22. Kolon sıcaklığı değişimi sağlamlık sonuçları.	63
4.23. pH değeri değişimi sağlamlık sonuçları.	63
4.24. Hareketli faz oranı değişimi sağlamlık sonuçları.	63

4.25.	Standart çözeltilisinin stabilite sonuçları.	64
4.26.	Torba numunesi çözeltilisinin stabilite sonuçları.	64
4.27.	Flakon numunesi çözeltilisinin stabilite sonuçları.	64

1. GİRİŞ

Bu tez çalışmasının konusu parasetamolün aynı birim formüle sahip torba ve flakon ambalajlı parenteral solüsyondan yüksek performanslı sıvı kromatografisi (YPSK) ile analizi için stabilite göstergeli bir yöntemin geliştirilmesi ve valide edilmesidir.

Farmasötik bitmiş ürün üreticileri, ürünün üretim aşamalarında ve raf ömrü boyunca kalitesinin güvenilirliğini ispatlayacak, validasyonu gerçekleştirilmiş analitik yöntem kullanmaları zorunludur. Geliştirilen yöntemler, sektörün referans olarak kullandığı farmakope, kılavuzlar doğrultusunda verifikasyonu yapılmalı ve işletme içi yöntemler ise tam validasyon çalışmaları ile geçerli kılınmalıdır. “Analitik yöntem validasyonu, analitik yöntemin hedeflenen kullanım için uygunluğunun ispatlanmasıdır (1).

Stabilite göstergeli yöntem, ilaç aktif maddesini doğru ve kesin bir şekilde bozunma ürünlerinden, üretim safsızlıklarından, varsa yardımcı maddelerden veya diğer olası safsızlıklardan arınmış bir şekilde tayin etmektedir. Analitik yöntem zaman içinde farmasötik üründe oluşan değişiklikleri izleyebilecek yetenekte olmalıdır. Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) stabilite çalışmalarında kullanılan tüm miktar tayini yöntemlerinin stabilite göstergeli olmasını tavsiye etmektedir. Analitik yöntem zaman içinde farmasötik üründe oluşan değişiklikleri izleyebilecek yetenekte olmalıdır. Stabilite çalışmaları sırasında üründe meydana gelecek değişiklikleri izlemek için kullanılacak stabilite göstergeli yöntemler ürünün güvenliğini, etkinliğini ve kalitesini garanti etmektedir (2).

Stabilite göstergeli bir yöntem, bozunma ürünleri, proses safsızlıkları, yardımcı maddeleri veya diğer potansiyel safsızlıklardan etkilenmeden aktif içerikleri doğru bir şekilde tayin eden analitik bir yöntem olarak tanımlanır. Önemli bozunma maddelerini doğru bir şekilde nicelendiren bir yöntem, stabilite göstergesi olarak da kabul edilebilir. Stabilite göstergeli YPSK yöntemi geliştirmeye yönelik proaktif bir yaklaşım, yöntem geliştirme sürecinde kullanılan temel bozunma örnekleriyle erken aşamalarında zorunlu bozunmayı içermelidir (3).

Validasyon çalışmalarının kabul edilebilirliği için elde edilen analiz sonuçlarının validasyon parametrelerinin kabul kriterlerinin sağlandığı gösterir istatistiksel çalışmalar ile ispatlamak gerekmektedir.

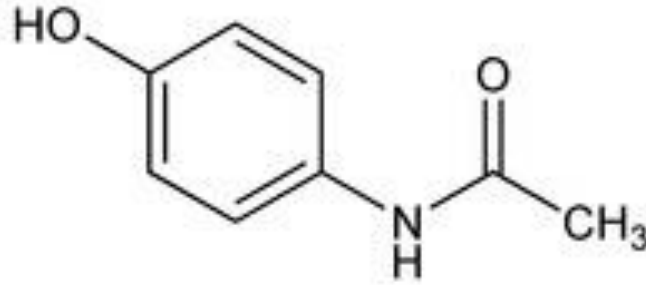
Bu çalışmada, parasetamol (asetaminofen) farmasötik formlar için tekrarlanabilir, tutarlı, güvenilir ve rutin olarak uygulanabilen bir stabilite göstergeli YPSK ile miktar tayini yöntemi geliştirilmesi ve validasyonu amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Parasetamol

Parasetamol (asetaminofen), hafif ila orta şiddette ağrı durumları için standart ateş düşürücü ve analjezik etkisini açıkça ortaya koyan zengin deneyime sahip, tüm ilaçlar arasında en yaygın kullanılan ilaçlardan biridir. İlk olarak 1893'te von Mering tarafından klinik olarak kullanılan parasetamol, 1950'de Amerika Birleşik Devletleri'nde ve 1956'da Avustralya'da ticari olarak ortaya çıkmadı. 1960'larda ve 1970'lerde, reçetesiz analjeziklerin toksisitesi hakkında artan endişeler dile getirildi, ancak normal kullanımda parasetamol tutarlı bir güvenlik profili sergiledi. Örnek güvenlik kaydı, 1966'da büyük bir aşırı dozun ciddi ve bazen ölümcül karaciğer hasarı ile komplike hale gelebileceğinin keşfiyle gölgelendi. Neyse ki, N-asetilsistein ile erken tedavi karaciğer toksisitesini önler. Pediatrik analjezik seçiminde bir dönüm noktası, aspirinin Reye sendromuyla bağlantılı olduğu 1980'lerde geldi. Sonuç olarak, parasetamol, Reye sendromu insidansında bir azalma ile çocuklar için temel analjezik ve ateş düşürücü olmuştur. Günümüzde parasetamol, çocuklar, hamile kadınlar, yaşlılar, osteoartriti olanlar, basit baş ağrıları olanlar ve inflamatuvar olmayan kas-iskelet sistemi rahatsızlıkları olanlar dahil olmak üzere çeşitli hastalarda ağrı yönetimi ve ateş düşürücü için ilk seçenektir. Doğru kullanımda parasetamol nadiren yan etkilere neden olur. Geniş bir tolere edilebilirliği vardır ve aspirine duyarlı astım hastaları ve gastrointestinal komplikasyon riski taşıyan kişiler gibi nonsteroid antiinflamatuvar ilaçların kontrendike olduğu hastaların tedavisinde özellikle değerlidir. Gelecekte, siklooksijenaz enzimlerinin daha iyi anlaşılmasıyla parasetamolün etki mekanizması hakkında daha iyi bir fikir elde edilebilir. Bu arada, parasetamol, potansiyel bir antioksidan aktivite yoluyla aterosklerozun önlenmesi gibi diğer terapötik alanlarda uygulamalar bulabilir. Özetle, parasetamolün ilk klinik kullanımının üzerinden bir asırdan fazla zaman geçmesine rağmen, ateş ve ağrı şikayeti olan erişkin ve çocuklarda ilk tercih edilen tedavi olmaya devam etmektedir (4).

2.1.1. Parasetamol (Asetaminofen)'ün Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri



Şekil 2.1. N-(4-Hidroksifenil) asetamid yapısı.

Kapalı Formülü: $C_8H_9NO_2$

Molekül Ağırlığı: 151.17 g/mol

Erime Noktası: 168-172 °C

Görünüşü: Beyaz neredeyse beyaz kristal toz

Çözünürlüğü: Suda az çözünür, etanolde serbestçe çözünür (% 96), metilen klorürde çok az çözünür (5).

2.1.2. Parasetamol (Asetaminofen)'ün Farmakolojik Özellikleri

Terapötik dozlarda parasetamol güvenli bir analjeziktir, ancak aşırı dozda ciddi karaciğer nekrozuna neden olabilir. Oral uygulamayı takiben gastrointestinal sistemden hızla emilir, sistemik biyoyararlanımı doza bağımlıdır ve %70 ile %90 arasında değişir. Oral absorpsiyon hızı ağırlıklı olarak mide boşalma hızına bağlıdır, gıda, propantelin, petidin ve diamorfin tarafından geciktirilirken metoklopramid ile artar. Parasetamol ayrıca rektumdan iyi emilir. Çoğu doku ve sıvıda hızlı ve eşit bir şekilde dağılır ve yaklaşık 0,9 L/kg dağılım hacmine sahiptir. İlacın %10 ile %20'si kırmızı kan hücrelerine bağlanır. Parasetamol geniş ölçüde metabolize edilir (ağırlıklı olarak karaciğerde) ve başlıca metabolitleri sülfat ve glukuronid konjugatlarıdır. İlacın küçük bir fraksiyonu, indirgenmiş glutatyon ile inaktive edilen ve sistein ve merkapturik asit konjugatları olarak idrarla atılan oldukça reaktif bir alkilleyici metabolite dönüştürülür. Yüksek dozlarda parasetamol (aşırı dozlar), glutatyonun tükenmesi ve aşırı reaktif metabolitin hayati hücre bileşenlerine bağlanmasının bir sonucu olarak akut hepatik nekroza neden olur. Bu hasar, metionin ve N-asetilsistein gibi sülfhidril bileşiklerinin erken uygulanmasıyla önlenir. Sağlıklı deneklerde

terapötik dozun %85 %95'i 24 saat içinde idrarla atılır ve sırasıyla yaklaşık %4.55, 30.4 ve 4'ü değişmemiş parasetamol ve bunun glukuronid, sülfat, merkapturik asit ve sistein konjugatları olarak görünür. Bu tür deneklerde plazma yarı ömrü 1.9 ila 2.5 saat arasında ve toplam vücut klerensi 4.5 ila 5.5 ml/kg/dk arasında değişmektedir. Yaşın, antikonvülzan alan hastalarda kısalan plazma yarı ömrü üzerinde çok az etkisi vardır. Plazma yarı ömrü, hafif kronik karaciğer hastalığı olan hastalarda genellikle normaldir, ancak dekompanse karaciğer hastalığı olanlarda uzar (6).

Parasetamolün (asetaminofen) avantajı, oral, intravenöz veya rektal yollardan uygulanabilmesidir. Son bahsedilen, aktif maddenin yavaş ve düzensiz emiliminde oral yoldan farklıdır. Terapötik derişimlerde parasetamolün farmakokinetiği doğrusaldır; yani dozdan bağımsızdır ve tekrarlanan uygulama ile sabittir. Parasetamolün etkinliği, çok çeşitli akut veya kronik ağrılı sendromlarda gösterilmiştir. Erişkinlerde optimum birim doz 1 g' dır. Maksimum günlük dozaj, genellikle 6 saatten fazla olan analjezik aktivitedeki düşüşle tutarlı olarak 4 g' dır. Efervesan tabletlerde, ilaç emilimi ve etki başlangıcı geleneksel tabletlere göre daha hızlıdır. Bununla birlikte, parasetamolün serum derişimleri ile analjezik veya antipiretik etkisi arasında doğrudan bir ilişki yoktur. Parasetamol, yaşlı kişilerde veya kronik böbrek yetmezliği olan hastalarda opiat olmayan analjeziktir ve klirens azaltılsa bile bu tür kişilerde genellikle dozun azaltılması gerekli değildir. Kronik, iyi huylu karaciğer hastalıkları olan hastalarda parasetamolün biyoyararlanımı bozulmasa da ajan karaciğer yetmezliği olanlarda kontrendikedir. Hamilelik ve emzirme döneminde kullanılabilir. Plazma proteinlerine bağlanan çok düşük düzeyde parasetamol, hepatik metabolizması ile birlikte, özellikle glukuronid veya sülfat konjugasyonu yoluyla, parasetamol ile özellikle de antivitamin K ile düşük ilaç etkileşimi riski değerlendirilir. Geleneksel bir nonsteroidal anti- inflamatuvar ilaç, parasetamol analjezik etkiyi artırır veya daha düşük dozlarda kullanılmasına izin verir. Yaşın parasetamolün farmakokinetiği üzerindeki etkisi ve fitillerin nispeten düzensiz biyoyararlanımı nedeniyle çocuklarda ideal parasetamol dozunu tanımlamak daha zordur. Toplam 60 mg/kg/gün' e kadar 4 saatte bir 15 mg/kg' lık bir oral doz, istenen analjezik veya antipiretik etkiyi elde etmek için genellikle yeterlidir (7).

Parasetamol, benzeri diğer analjezik ilaçlardan farklı olarak hipotalamus ve omurilik gibi peroksidlerden fakir ortamda prostaglandin sentezini inhibe edebilir;

antipiretik ve analjezik etkilerinin, sırasıyla, hipotalamus ve omurilik arka ventralde prostaglandin sentez ve saliverilmesini inhibe etmesi ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür. Periferdeki iltihabi dokular gibi peroksit açısından zengin ortamda, siklooksijenazı inhibe edememesi antienflamatuvar etkisinin olmamasını açıklayabilir.

Parasetamolün solunum, kardiyovasküler sistem ve asit-baz dengesi üzerinde belirgin bir etkisi yoktur. Midede irritasyon yapmaz. Protrombin sentezini pek etkilemez. Plazma proteinlerine fazla bağlanmaz. Aspirinin aksine oral antikoagülanlarla belirgin bir etkileşme göstermez. Aspirinden farklı olarak ürik asit itrahını etkilemez ve ürikozürük ilaçların etkinliğini azaltmaz.

Parasetamolü sıvı farmasötik şekiller içinde vermek mümkündür. Bundan dolayı, parasetamol özellikle bebek ve çocuklar için hazırlanan eliksir, süspansiyon vb. şekillerdeki sıvı analjezik müstahzarların yapımında kullanılır.

Parasetamol yemek sırasında veya yemekten sonra alınırsa, biyoyararlanımı belirgin şekilde azalır; onun için aç karnına alınması tercih edilir. Parasetamol oral dozuna eşit dozlarda rektal yoldan da verilebilir. Parasetamol kronik kullanılış halinde fenasetine oranla daha az toksik gibi gözükmekte ise de akut toksisitesi fenasetininkinden daha ciddidir. Bu ilaç aşırı dozda alındığında, öldürücü akut karaciğer nekrozu yaptığı bilinen az saydaki ilaçlardan biridir. Hepatotoksik etkenin, parasetamolün karaciğerde oluşan N-oksidasyon ürünü olan N-hidroksil türevi ve ilacın fenolik hidroksilinin oksitlenmesi ile oluşan N-asetil-p benzokinonimin olduğu sanılmaktadır. Akut intoksikasyon sırasında ilk 24 saat zarfında bulantı, kusma ve karın ağrısı gibi belirtiler oluşur. Sarılık ve diğer karaciğer yetmezliği belirtileri 2-3 gün sonra ortaya çıkmaya başlarlar. Bunlarla birlikte hepatik ensefalopati ve akut böbrek yetmezliği oluşabilir. Bir defada 10 g veya daha yüksek miktarlarda vücuda girdiğinde belirgin akut karaciğer nekrozu sıklıkla oluşur. Bir defada 20 g' ın üstünde alınmışsa ölümle sonuçlanma olasılığı artar. Günde 5-8 g dozunda birkaç hafta alınması ile de karaciğer nekrozu ve ona bağlı ölüm yapabilir. 0-6 yaş

grubundaki çocuklar parasetamolün hepatotoksik etkisine dayanıklıdır. Tedavisi için destekleyici önlemler yanında karaciğer hücrelerinde glutatyon ve sistein düzeyini yükselten sülfidril grubu donörü (glutatyon prekürörü) ilaçlar (N-asetil sistein, L-metiyonin ve sisteamin gibi) uygulanır. N-asetilsistein, parasetamol zehirlenmesinin tedavisinde en tercih edilen ilaçtır. İlk 8-10 saat içinde i.v. infüzyonla uygulanırsa yeterli derecede etkilidir. İlacın alınışından itibaren 16 saat geçmiße yararlı olma ihtimali çok azdır. Buna rağmen 24 saate kadar verilmesini tavsiye edenler vardır. N-asetil sistein antidot olarak oral yoldan da verilir. İntravenöz olarak 20 saat boyunca toplam 300 mg/kg dozunda uygulanır. Oral yoldan başlangıçta 140 mg/kg yükleme dozunda verildikten sonra 4 saatte bir 17 kez 70 mg/kg uygulanır ve böylece tedavi 72 saatte tamamlanır. Oral uygulamanın i.v. uygulama kadar etkili olduğu bulunmuştur ve tedaviye geç (10 saatten sonra) başlanan olgularda i.v. uygulamadan daha üstün olabilir.

Parasetamol, fenasetin'in metaboliti olmasına rağmen methemoglobinemi ve hemolitik anemi nadiren oluşturur. Uzun süre kullanıldığında analjezik nefropati riskini artırır, yılda 366 tablet (0.5 g'lık) veya daha fazla kullananlarda riskin 2.1 kez arttığı kestirilmiş ve bir incelemede son dönem böbrek hastalığı olgularının %8-10'unun kronik parasetamol kullanımı ile ilgili olduğu bildirilmiştir. Parasetamol seyrek olarak ciltte ürtiker ve diğer alerjik döküntülere neden olabilir, nadiren larenks ödemi ve bronkospazm yapabilir (8).

2.1.3. Parasetamol İlaç Formları

Parasetamol etken maddesi içeren Tabletler, Kapletler, Kapsüller, Gelkapslar/Geltabletler, Uzatılmış Salımlı Tabletler, Çiğnenebilir Tabletler, Oral solüsyon/süspansiyon, Oral Şurup, İksir, Suppozituar ve İnfüzyonluk Çözeltiler bulunmaktadır (9,10).

2.1.4. Parasetamol Yan Etkileri ve İlaç Etkileşimleri

Klinik olarak anlamlı birkaç ilaç etkileşimi belgelenmiştir. Enzim indükleyen ilaçlar tarafından parasetamol metaboliti NAPQI' den aşırı doz alınmasını takiben olası hepatotoksisite potansiyeli vardır. Gözlemsel çalışmalar ve sağlıklı gönüllülerdeki farklılıklar nedeniyle, warfarin ile olası etkileşiminin antikoagülan etkilerini artırma potansiyeli konusunda önemli tartışmalar vardır. Aksi takdirde, insanlarda terapötik dozlarda parasetamol ile ciddi advers ilaç etkileşimleri doğrulanmamıştır. Parasetamolün absorpsiyonu mide boşalmasına çok bağlı olduğundan, mide boşalmasını değiştiren diğer ilaçlar farmakokinetiğini değiştirebilir; ancak bu ciddi olumsuz etkilere neden olmaz. Hayvan deneyleri, birçok bileşiğin parasetamol hepatotoksisitesini değiştirebildiğini gösterse de bunların terapötik dozlarda önemli olması olası değildir (11).

Terapötik dozlarda güvenli olduğu düşünülmeyle birlikte, son zamanlarda aşırı doz veya yanlışlıkla uygulama sonucu oluşan hepatotoksisite insidansı artmaktadır. Parasetamol doz aşımı tedavisinde bağırsak dekontaminasyonu, N-asetilsistein antidot uygulaması ve eliminasyonun artırılması kullanılır (12-15).

Parasetamol (asetaminofen) çocuklarda ateşi düşürmek için yaygın olarak kullanılmaktadır (16, 17). Çeşitli akut, aralıklı ve kronik ağrı durumlarında analjezik olarak uzun süredir kullanılmaktadır ve çoklu uygulama biçimleri dahil olmak üzere olumlu bir terapötik profil ile bu ilaç, her yaştaki çocuklarda kullanım için önerilen ilk analjeziktir (18, 19). Ayrıca; ateş ve enfeksiyonların neden olduğu daha ciddi sonuçları önlemek için hamilelik sırasında Parasetamol ilacının önemi kabul edilmiştir (20).

Oral ve rektal uygulamada biyoyararlanımdaki büyük farklılıklar sebebiyle tedavinin başlamasını ve süresini etkileyebilir (21). Parasetamol, pediatrik hastalarda ağrı veya inflamasyon belirtilerine neden olmadan hızlı i.v. infüzyon olarak uygulanabilir. Sonuçlar, hastalar ve sağlık profesyonelleri için hareketsizlik süresini azaltarak daha uygun maliyetli ağrı kontrolüne katkıda bulunabilir (22). Bu çalışmalar neticesinde ağrının hemen giderilmesi gerektiğinde veya oral veya rektal uygulamanın mümkün olmadığı durumlarda tercih edilir.

2.2. Parasetamol Analiz Yöntemleri

Parasetamolün nicel ve nitel analizleri için çok sayıda analitik yöntem bulunmaktadır. Tek etken maddeli ve kombine ürünlerin analizleri için YPSK ve ultra yüksek performanslı sıvı kromatografisi (UPSK), UV-spektrofotometresi, iyon kromatografisi ve akış enjeksiyon analizi (FIA) bu çalışmalara örnek gösterilebilir. Aynı yöntem ile farklı farmasötik preparatların analizleri de gerçekleştirilmektedir.

Aminu ve ark. basit, ekonomik, hızlı, güvenilir ve kararlılığı gösteren bir yüksek performanslı sıvı kromatografisi (YPSK) yöntemi geliştirilmiş ve valide edilmiştir. Çözücü iletim ünitesi (LC-20AD), ultraviyole-görünür (UV-vis) dedektör, gaz giderici ile donatılmış bir Shimadzu cihazı kullanılmıştır. Veri toplama ve işleme, bir masaüstü bilgisayar sisteminde kurulu LabSolutions yazılımı tarafından gerçekleştirilmiştir.

Katı dozajda parasetamol ve kafeinin eşzamanlı tayini formu kullanılmıştır. Kromatografik ayırmalar, Waters Symmetry C18 kolon (5 µm, 4.6 × 150 mm) ile, hareketli faz olarak metanol ve su (40:60, h/h) karışımı kullanılarak, 0.8 mL/dk akış hızıyla izokratik elüsyon modu altında gerçekleştirilmiş ve ultraviyole (UV) dedektör dalga boyu 264 nm'ye ayarlanmıştır. Kolon için fırın sıcaklığı 35 °C'ye ayarlanmış ve muhafaza edilmiştir. Yöntem, Uluslararası Uyumlaştırma Konferansı (ICH) yönergelerine göre doğrulanmış ve 15-300 µg/mL parasetamol ve 2.5-50 µg/mL kafein derişim aralıklarında parasetamol ve kafein için sırasıyla 1 ve 0.9999 korelasyon katsayısı ile mükemmel doğrusallık göstermiştir. Alıkonma süresi (t_R) parasetamol ve kafein için sırasıyla 2.6 ± 0.001 ve 3.5 ± 0.002 dakika olarak bulunmuştur. Analitlerin asidik ve alkali hidroliz gibi çeşitli stres koşullarının yanı sıra oksidatif, fotolitik ve ısı bozunmalarına maruz bırakılmasıyla kapsamlı stres bozunması çalışmaları yürütülmüştür. Yöntemin, alıkonma sürelerinde herhangi bir değişiklik olmaksızın analit piklerinin bozunma ürünlerinden etkili bir şekilde ayırdığı görülmüştür. Parasetamol ve kafein için tüm geri kazanımların bağıl standart sapma (BSS) değerleri %1,3'ten az olduğu ve yöntemin rutin analizler için uygun olduğu görülmüştür (23).

Atay ve ark., bu ülkede analjezik ateş düşürücü amaçlarla yaygın olarak kullanılan aspirin ve parasetamol içeren tabletlerin kantitatif analizini çeşitli analitik yöntemler kullanılarak gerçekleştirmiştir. Farklı seri numaralarına sahip ticari farmasötik preparatlar Ankara'daki yerel eczanelerden satın alınmıştır. Bu

kombinasyon için iki farklı spektrofotometrik ve bir yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (YPSK) yöntemi önerilmiştir. Spektrofotometrik çalışmalarda Shimadzu UV 160-A model kayıt spektrofotometresi kullanılmıştır. YPSK çalışmalarında Shimadzu LC-6A pompa, SPD-6AV dedektör, SCL-6A sistem kontrolörü ve CR3-A integratör kullanılmıştır. Kullanılan çözücüler ve kimyasallar reaktif sınıfıdır. Ayrım için Hypersil BDS C18 (250 x 4 mm, 5 µm) analitik kolonu ve hareketli faz olarak su-metanol-glasiyal asetik asit (960:280:30) kullanılmıştır. Absorbans oranı, Vierordt ve YPSK yöntemleri için bağıl standart sapmalar aspirin için sırasıyla %0.89, %1.1 ve %1.1 ve parasetamol için %1.24, %1.39, %0.84 olarak bulunmuştur. Üç yöntemin kesinliği, Student't ve Fisher F testleri kullanılarak karşılaştırılmıştır. Absorbans oranı ve Vierordt yöntemleri, YPSK yönteminden önemli ölçüde farklı değildir ve üç yöntemin karşılaştırılabilir kesinliği bulunmaktadır. Üç yöntemin tümü, kabul edilebilir korelasyon katsayıları ile doğrusal bir ilişki göstermiştir (24).

Perez ve ark. UV tespiti kullanılarak baskılama olmaksızın parasetamol ve salisilik asidin eşzamanlı tespiti için bir iyon kromatografi (IC) prosedürü önerilmiştir. Yöntem, farmasötiklerde parasetamolün belirlenmesine uygulanmıştır ve ayrıca toplam asetilsalisilik asidin salisilik asit olarak miktarının belirlenmesine izin verir. Anyonik bastırılmamış IC'nin kullanılması, bastırılmış IC'nin gerçekleştiremediği parasetamol gibi çok zayıf asitlerin ayrılmasına izin verir. Eluent olarak; asit türlerinin protondan arındırılması için uygun bir pH'a sahip olması gerektiğinden, zayıf asitleri iyonize etme kabiliyeti nedeniyle LiOH olmuştur. Bu çalışma, fotometrik algılama kullanarak parasetamolün ayrılması ve tayini için yeni, basit, hızlı ve yüksek derecede hassas bastırılmamış IC yöntemini bildirmektedir. Yüksek pH değerinde hidrolize edilmesi, her iki aktif maddenin de sıklıkla bulunduğu analjezik farmasötiklerde parasetamolün doğrudan belirlenmesini sağlar. Aynı şekilde, asetilsalisilik asidin toplam içeriğinin salisilik asit olarak eş zamanlı belirlenmesinde mümkün olduğu görülmüştür. Önerilen prosedüre göre parasetamol ve salisilik asidin ayrılması gibi iyi bir ayırıcılık göstermiştir. Duyarlılık dikkat çekicidir ve tespit limitleri yaklaşık 0.06-0.12 mg/ml olarak belirtilmiştir. Her iki analit için %97-101 arasında geri kazanımlar raporlandırılmıştır (25).

Nguyen ve ark. Parasetamol, ibuprofen ve ilgili safsızlığın eş zamanlı tespiti için bir ters fazlı UPSK yöntemi geliştirilmiştir. Kullanılan UPSK kolonu BEH C18 (2.1 x 100 mm, 1.7 µm) ve hareketli faz, gradyan modunda metanol ve 0.01% trietilamin sulu çözeltisinden oluşmaktadır. UV dedektör dalga boyu, parasetamol için UV 230 nm ye ayarlanırken safsızlık ve ibuprofen için 254 nm ayarlanmıştır. Kalibrasyon eğrilerinin tümü, parasetamol için 50 – 600 µg/ml, ibuprofen için 50-600 µg/ml ve safsızlık için 0.05-0.5 µg/ml konsantrasyon aralıklarında doğrusaldır ($r^2 > 0.999$). Kesinlik BSS'leri parasetamol, ibuprofen için $< \%2$ ve safsızlık için $< \%2,5$ şeklindedir. İbuprofen safsızlığının LOD ve LOQ'su sırasıyla 0.03 µg/ml ve 0.05 µg/ml olarak tespit edilirken bu üç bileşiğin geri kazanımı $\%98-102$ aralığındadır. Önerilen RP -UPSK yöntemi basit, zaman kazandıran (bir çalışma için < 10 dakika), ancak oldukça kesin ve doğru olduğunu ve bu nedenle parasetamol, ibuprofen ve farmasötik dozaj formlarında ibuprofenin safsızlığının rutin değerlendirmesine uygulanabilir olduğunu göstermektedir (26).

More ve ark. farmasötik dozaj formunda parasetamol, klorzoksazon ve nimesulid'in eş zamanlı tayini için basit, kesin ve doğru bir ters fazlı sıvı kromatografik yöntem geliştirilmiştir. Kromatografik ayırma, bir Thermo Hypersil GOLD C18 kolonu (4.6 x 250 mm, 5 µm) üzerinde gerçekleştirilmiş, su ve asetonitrilden (55 : 45 h/h) oluşan hareketli faz kullanılmıştır. Akış hızı 1.2 ml/dk olarak ayarlanmış ve 275 nm'de çalışma gerçekleştirilmiştir. Parasetamol, klorzoksazon ve nimesulid için alıkonma süresi (t_R) sırasıyla 2.69 ± 0.02 , 4.61 ± 0.01 ve 9.55 ± 0.02 dakika olarak bulunmuştur. Önerilen yöntemin doğrulaması, doğrusallık, kesinlik, sağlamlık, saptama sınırı, nicelik sınırı, özgüllük ve doğruluk için gerçekleştirilmiştir. Doğrusal dinamik aralıklar, parasetamol için 32.5–65.0 µg/ ml, klorzoksazon için 37.5–75.0 µg/ml ve nimesulid için 10.0–20.0 µg/ml olduğu görülmektedir. Geliştirilen yöntem, farmasötik dozaj formundaki ilaçların rutin kalite kontrol analizleri için önerilmektedir (27).

Fathi ve ark. çalışmalarında, tablet, kapsül ve efervesan dozaj formlarındaki ürünler ile oral biyoyararlanımını karşılaştırmayı amaçlamışlardır. Sağlıklı gönüllüleri çalışmalarına dahil ederek her bir dozaj formu, aktif madde olarak 500 mg asetaminofen kullanmışlardır. Doz alındıktan sonra 0,5, 1, 2, 4 ve 8 saatlik aralıklarla kan örnekleri alınarak asetaminofen kan seviyeleri YPSK-DAD yöntemi kullanılarak

ölçülmüştür. İç standart (IS) olarak asetofenon kullanılmıştır. C18 kolonu (4.6 mm x 25 mm), UV detektörü (dalga boyu 240 nm) ve hareketli faz (20/80) oranında asetonitril: suda %0.1 asetik asit karışımından oluşmaktadır. 20 µl enjeksiyon hacmi ile analizler gerçekleştirilmiştir. Kan örneklerinde maksimum asetaminofen derişimleri ilacı aldıktan 1 saat sonra ölçülmüştür (kapsül, tablet ve efervesan alan gruplarda sırasıyla 6.61±3.19 µg/ml, 11.29±3.94 µg/ml ve 15.25±2.54 µg/ml). Üç gruptan farmakokinetik veri analizi ve modellemesi, asetaminofenin yarı ömrünün tablet grubunda 140.72 dakika, kapsülde 140.29 dakika ve efervesanda 132.08 dakika olduğunu göstermiştir. Kan seviyeleri eğrisinin altında kalan alan sırasıyla tablet, kapsül ve efervesan gruplarında 47.04, 40.62 ve 53.11 µg.dk/ml olarak bulunmuştur. farmakokinetik parametrelerinde istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar, çalışma yerine efervesan tabletler ve kapsül dozaj formları ile karşılaştırdığımızda kaydedilmiştir (p<0.05). Sonuçlara göre, efervesan formun, tablet ve kapsül formlarına göre daha hızlı ilaç etkinliğinin elde edilmesi için ağrı ve ateş durumlarında verilmesi önerilmektedir (28).

Knochen ve ark. farmasötik dozaj formlarında parasetamol tayini için bir akış enjeksiyon yöntemi önermiştir. Yöntem, parasetamolün sodyum nitrit ile nitrasyonuna dayanır ve reaksiyon ürününün absorpsiyonu alkali ortamda 430 nm'de ölçülür. Parasetamol tayini için kullanılan diğer kolorimetrik yöntemlerin aksine, bu yöntem ısı kullanımını gerektirmeyen yöntemdir ve bu yöntem ile çeşitli çalışma parametrelerinin etkisi incelenmiştir. Yöntem parasetamolün oral çözeltilerde ve tabletlerde tek başına veya kafeinle birlikte tayinine uygulanmıştır. FIA sistemi çok kanallı bir peristaltik pompa ve yardımcı peristaltik pompadan oluşmaktadır. Tygon ve Viton boru sistemi, altı portlu enjesiyon valf ve Hellma dedektörden oluşan UV-240 UV görünür bölge kayıt spektrofotometresi kullanılmıştır. Test çözeltileri 240 mg/L iken çalışılan doğrusallık derişim aralığı 0-480 mg/L şeklindedir (29).

Ahmed, farmasötik formülasyonlarda ve çevresel su örneklerinde parasetamol tayini için basit, kesin, hızlı ve doğru bir ters fazlı yüksek performanslı sıvı kromatografi yöntemi geliştirilmiştir. Kromatografik yöntem, 1.5 ml/dk bir akış hızında hareketli faz olarak asetonitril: tampon pH3.0 (40:60 h/h) karışımı kullanılarak Supelco L1 (C18) ters faz kolonu (25 cm x 4.6 mm, 5µm) üzerinde gerçekleştirilmiştir. Dedeksiyon, ortam sıcaklığında 243nm'de gerçekleştirilmiş ve alıkonma süresi 2.2

dakika olarak bulunmuştur. Kalibrasyon eğrisi, 10 ile 100 µg/ml 'lik bir derişim aralığında doğrusal ($r= 0.999$); gözlenebilme sınırı (LOD) ve alt tayin sınırı (LOQ) sırasıyla 3 µg/ml ve 9 µg/ml 'dir. Yöntem, doğrusallığı, kesinliği ve doğruluğu açısından valide edilmiştir. Önerilen yöntem, parasetamolün saf formda, farmasötik formülasyonlarda ve çevresel su örneklerinde tayini için başarıyla uygulanmıştır (30).

Bu çalışmalar Tablo 2.1'de özetlenmiştir.

Tablo 2.1. Kaynaklara ait özet tablo.

Yöntem	Analit	LOD	Aralık	Örnek	Referans
YPSK	Parasetamol Kafein	0.01 µg/ml 0.02 µg/ml	15-300µg/ml 2.5-50 µg/ml	Tablet	23
UV YPSK	Aspirin Parasetamol	Veri bulunmamaktadır	2-50µg/ml 2-50µg/ml	Tablet	24
İyon Kromatografi	Parasetamol Salisilik Asit	0.06 mg/ml 0.12 mg/ml	0.5-7 mg/ml 0.5-12 mg/ml	Efervesan Kapsül Tablet	25
UPSK	Parasetamol İbuprofen ve Safsızlık	0.03 µg/ml	50-600 µg/ml 50-600 µg/ml	Tablet	26
YPSK	Parasetamol Klorzoksazon Nimesulid	1.08-3.28 µg/ml 1.43-4.34 µg/ml 0.30-0.42 µg/ml	32.5-65 µg/ml 37.5-75 µg/ml 10-20 µg/ml	Tablet	27
YPSK	Parasetamol	Veri bulunmamaktadır.	5-40 µg/ml	Tablet Kapsül Efervesan	28
Akış Enjeksiyonu Spektrofotometresi	Parasetamol	Veri bulunmamaktadır	0-400 mg/L	Tablet Oral solüsyon Tablet Şurup Damla Fital	29
YPSK	Parasetamol	3 µg/ml	10-100 µg/ml	Endüstriyel atık su	30

2.3. Validasyon

Validasyon, kılavuzlar doğrultusunda belirlenmiş spesifikasyonları sağlayacak şekilde kişi ve zamandan bağımsız yaşam döngüsü boyunca geçerliliğini korumak için değerlendirilen parametreleri kapsamaktadır. Her zaman aynı kalitede ve aynı şartlarda üretim yaparak, tüm üretilen ürünlerin kalitesinin aynı olmasını sağlamaktır.

Analitik yöntem validasyonu, kimyasal değerlendirmeyi gerçekleştirmek için temel gereklilik olup bir analitik test sisteminin amaçlanan amacına uygun olduğunu analitik veriler ile desteklenerek geçerli kılınması için tasarlanmış çok sayıda değerlendirmenin gerçekleştirildiği prosedürdür.

Ticari ilaç maddelerinin ve ürünlerinin (kimyasal ve biyolojik/biyoteknolojik) salınım ve stabilitesi için kullanılan yeni veya revize edilmiş analitik prosedürler için geçerli olan *ICH Guideline Q2(R2) on Validation of Analytical Procedures* kılavuzunda yer alan metodoloji, analitik prosedürün tasarlandığı ana performans özelliğine göre gruplandırılmıştır. *United States Pharmacopeia* (31), bitmiş farmasötik ürünlerdeki bulk ilaç maddelerinin veya aktif bileşenlerin (koruyucular dahil) ana bileşenlerinin miktar tayini için analitik prosedürlerin kategori I, bitmiş farmasötik ürünlerdeki bulk ilaç maddelerindeki safsızlıkların veya bozunma bileşiklerinin belirlenmesi için analitik prosedürleri nicel analizleri ve limit testlerini içerdiğinden dolayı kategori II olarak sınıflandırır. ICH ve USP kılavuzu miktar tayini çalışmasında çalışılmasını değerlendirdiği parametreler Tablo 2.2.'de özetlenmiştir.

Tablo 2.2. ICH ve USP kılavuzlarının miktar tayini parametre karşılaştırılması.

Analitik Prosedür Tipi Karakteristik (1)	ICH	USP	
	Miktar Tayini	Kategori I	Kategori II
Doğruluk (3)	+	+	+
Kesinlik (3)			
Tekrarlanabilirlik	+	+	+
Ara kesinlik	+(4)	+	+
Spesifiklik (2)	+	+	+
Dedeksiyon Limiti	-	-	-
Tayin Limiti	-	-	+
Doğrusallık	+	+	+
Aralık	+	+	+

- bu özelliğin normal olarak değerlendirilmediğini belirtir

+ bu özelliğin normal olarak değerlendirildiğini belirtir

(1) Fizikokimyasal özellikler için belirli analitik prosedürler söz konusu olduğunda, bazı performans özellikleri, teknolojinin doğal gerekçesi veya yeterliliği ile ikame edilebilir.

(2) Doğruluk ve kesinliğin ayrı ayrı değerlendirilmesine alternatif olarak birleşik bir yaklaşım kullanılabilir

(3) bir analitik prosedürün spesifik olmaması, bir veya daha fazla destekleyici analitik prosedürle telafi edilebilir.

(4) Tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik, tek bir deney seti olarak gerçekleştirilebilir.

İlgili prosesle ilgili safsızlıklardan veya matris bileşenlerinden herhangi bir müdahale, yani prosesle ilgili safsızlıklar ve matris bileşenleri, doz-tepki eğrisinin özelliklerini önemli ölçüde etkilemez. Stabilitate göstergeli miktar tayini, potansteki bir değişikliği ve/veya doz-yanıt eğrisinin şeklindeki bir değişikliği tespit etme yeteneğine sahiptir ve zorla bozulmuş numuneler (anlamalı termal, fotostabilite veya oksidatif strese maruz kalan numuneler) kullanılarak teyit edilir (32).

Stabilitateyi gösteren bir yöntem, tanımlanmış saklama koşulları altında etkin maddenin ve ilaç ürününün ilgili özelliklerinde zamanla meydana gelen değişiklikleri tespit edebilen valide edilmiş bir nicel analitik prosedürdür. Stabilitateyi gösteren bir tayin yöntemi, aktif bileşen(ler)i diğer bileşenlerden etkilenmeden doğru bir şekilde ölçer ve bozunma ürünlerini/girişimleri saptamak ve ölçmek için yeterince hassastır. Stabilitateyi gösteren bir yöntem geliştirmek için, zorlamalı bozunma ve fotostabilite çalışması şeklinde stres testi, safsızlıkların ve bozunma ürünlerinin tanımlanıp karakterize edilebilmesi için erken bir aşamada yapılmalıdır. Stabilitate gösteren tayin analitik yöntemler, uzun vadeli stabilite çalışması trendinin doğruluğunu sağlamak için ayırt edici ve doğrulanmış olmalıdır (33).

Bir ilaç maddesinin veya bir ilaç ürününün zorla bozunması, genellikle, stabilitateyi gösteren bir kromatografik yöntem geliştirilirken yöntem seçiciliğini göstermek için gerçekleştirilir. Zorla bozunma, farklı ısı, nem, ışık, asit, baz veya oksitleyici kombinasyonları kullanılarak gerçekleştirilebilir (33).

2.4. Validasyon Parametreleri

2.4.1. Sistem Uygunluk

Sistem Uygunluk parametresi validasyon çalışmasında ilk değerlendirilen parametresi olup kabul kriterleri sağlanmadığı takdirde analizlere başlanılmamaktadır.

Kullanılan ekipmanın çeşitli bileşenlerin kalifikasyonu olmalı ve testi veya tayini yapmak için gereken performansı sağlayabilmelidir. Sistem uygunluk testleri, yöntemin ayrılmaz bir parçasını temsil eder ve kromatografik sistemin yeterli performansını sağlamak için kullanılır. Kapasite faktörü, rezolüsyon, bağıl alıkonma ve kuyruklanma faktörü genellikle kolon performansının değerlendirilmesinde kullanılan parametrelerdir (34).

Center for Drug Evaluation and Research (35) pik özelliklerine ilişkin kabul kriterlerini aşağıdaki şekilde tanımlamıştır.

Tablo 2.3. Sistem uygunluk kabul kriterleri.

Kriter	Kabul Limiti
Kapasite Faktörü	$k': >2$
% Bağıl Standart Sapma	$n \geq 5 \Rightarrow \%BSS \leq \%1$
Rezölüsyon	$R \geq 2$
Kuyruklanma Faktörü	$Tf \leq 2$
Teorik Plaka Sayısı	$N \geq 2000$

2.4.2. Seçicilik

ICH seçicilik parametresini, yöntemin mevcut olması beklenen bileşenlerin varlığında analiti kesin olarak analiz edebilme yeteneğidir ve tipik olarak bunlar, safsızlıkları, bozunma maddelerini, matrisi vb. içerebilir şekilde tanımlarken; *Western European Laboratory Accreditation Cooperation*, bir yöntemin seçiciliği, karışımdaki diğer bileşenlerin müdahalesi olmaksızın karmaşık bir karışımdaki belirli analit (ler)i ne ölçüde belirleyebildiğini ifade eder. Bir analit veya analit grubu için tamamen seçici olan bir yöntemin spesifik olduğu söylenir ifadesi ile tanımlar (36).

Filtre Etkisi

Optimum kromatografi koşullarında kullanılan enjektör filtresinin değişmesinin etkisinin incelenmesi rutin analizlerde analistin alternatif kullanımını geçerli kılmaktır.

2.4.3. Kesinlik

Bir yöntemin kesinliği sonuçların birbirine uygunluk derecesidir. Bir yöntemin kesinliği tekrarlanabilirlik, ara kesinlik ve tutarlılık ile değerlendirilir.

Tekrarlanabilirlik (Enjeksiyon Tekrarlanabilirliği)

Tekrarlanabilirlik, aynı çalışma koşulları altında kısa bir zaman aralığında ölçüm serilerinin tayin sonuçlarının yakınlığını yansıtır. Bir kromatografik yöntem için, tekrarlanabilirlik, %100 test onayıyla hazırlanan tek numune çözeltisinin en az altı tekrarlı enjeksiyonu gerçekleştirilerek değerlendirilebilir (37).

Bu çalışmada %100 derişimdeki standart (2.5 ppm) çözeltisinin enjeksiyon tekrarlanabilirliği incelenmiştir.

Ara Kesinlik

Ara kesinlik, farklı günler, farklı analistler ve farklı ekipman gibi laboratuvar içi varyasyonları yansıtır. Ara kesinlik testi, analitik yöntemine göre her biri toplam altı numune hazırlayan iki farklı analistten oluşabilir. Analist, testlerini ayrı cihaz ve ekipmanlar kullanarak farklı günlerde yürütür (37).

Tutarlılık

Tutarlılık, analitik test numuneleri arasındaki kesinliği yansıtır. Her test analitik yöntemine göre toplam altı numune hazırlığı hazırlayabilir. Sonuçlar, çeşitli testler arasında istatistiksel denklığı sağlamak için değerlendirilir. Ara kesinliğe uygulananlara benzer kabul kriterleri, tutarlılık için de geçerlidir (37).

2.4.4. Doğrusallık

Doğrusallık, yöntemin belirli bir aralıktaki analit derişimiyle doğru orantılı olan test sonuçlarını ortaya çıkarma yeteneğidir. Doğrusallık verilerinin kabul edilebilirliği, genellikle, dedektör cevabına karşı derişim grafiği için doğrusal regresyon eğrisinin korelasyon katsayısı ve kesim noktası incelenerek değerlendirilir (38).

Bir analitik yöntemin çalışma aralığı; kesinlik, doğruluk ve doğrusallık belirlenirken üst ve alt aralıklarıdır. Çalışma aralığı içinde, yöntemin analitin derişimiyle orantılı sonuçlar verdiği doğrusal bir yanıt aralığı olabilir (39).

2.4.5. Alt Tayin Sınırı (LOQ)

Genellikle, analitik yöntemin çalışma aralığını belirlemek için çalışmanın bir parçası olarak gerçekleştirilir ve alt tayin sınırını kalibrasyon aralığının en düşük standart derişimine sabitlemek yaygın bir uygulamadır (39).

Yöntemin LOQ değeri sinyal gürültü oranının (S/N) 10 olduğu değer olarak belirlenmiştir.

2.4.6. Gözlenebilme Sınırı (LOD)

Gözlenebilme sınırı, saptanabilen en küçük analit miktarıdır. Bu parametre, yöntemin altında çalışmayacağı seviyeyi belirlediğinden limit testlerinin kullanımında önemlidir.

YPSK yöntemleri için LOD hesaplamının birkaç yolu vardır. En yaygın yaklaşım, LOD olarak 3:1'lik bir sinyal-gürültü oranı tercih edilir (33). Yöntemin LOD değeri sinyal gürültü oranının (S/N) 3 olduğu değer olarak belirlenmiştir.

2.4.7. Doğruluk (Geri Kazanım)

Bir analitik yöntemin doğruluğu, elde edilen test sonuçlarının gerçek (teorik) değere olan yakınlığıdır. Doğruluk geri kazanım olarak adlandırılır.

Her seviye (derişim) üç ila altı tekrar ile analiz edilir. Bilinen bir derişime sahip izlenebilir malzemeler kullanılarak, ideal olarak gerçek numunelere yakın bir matrisle test edilmelidirler. Test edilen çözeltiler, kalibrasyon için analiz edilenlerden farklı olmalıdır. Azalan uygunluk sırasına göre belirtilen aşağıdaki malzemeler önerilir (40):

Numuneye yakın referans sertifikalı malzemeler: derişim, akredite bir laboratuvar tarafından doğru bir şekilde belirlenmiştir. Ancak pahalı bir malzemedir.

Spike numune: Bilinen miktarda analit ile kör bir numune güçlendirilir. Bu durumda doğruluk geri kazanım olarak belirlenir.

Standart Çözeltiler: Sonuçlar matris etkisini içermediğinden önerilmez.

Referans güvenilir bir yöntem kullanılarak analiz edilen gerçek numuneler: yalnızca standartlar mevcut değilse uygulanabilir.

2.4.8. Sağlamlık

Bir analitik yöntemin sağlamlığı, sistem şartlarında yapılan küçük fakat önemli değişimlerden etkilenmeden kaldığının ölçüsüdür ve yöntemin normal şartlarda kullanıldığı sürece güvenilir olduğunun göstergesidir. Sağlamlık, yöntem performansının kontrol edilebilir faktörlerdeki değişikliklerden etkilenmeden kalmasıdır (41).

2.4.9. Çözelti Stabilitesi

Stabilite, bir numunenin belirli koşullar altında birkaç kez depolamadan sonra fizikokimyasal özelliklerini ve özellikle analitin derişimini koruma yeteneği olarak tanımlanır. Stabilite testleri, numune hazırlama ve analiz arasında izin verilen maksimum süreyi tahmin etmek için önemlidir (40).

2.5. Kromatografi

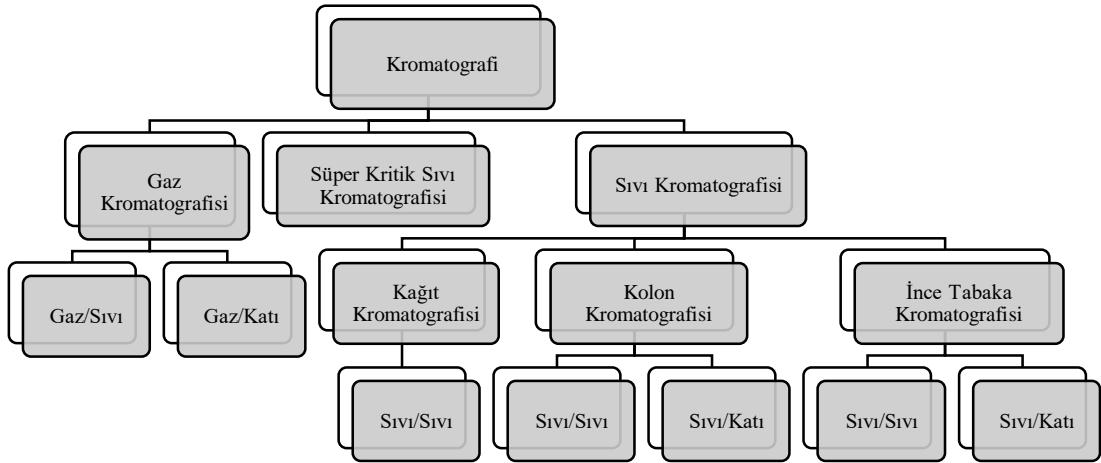
Kromatografi birbirine fiziksel ve kimyasal özellikleri bakımından benzeyen maddelerin, karışımların, birbirinden ayrılmasını, tanınmasını ve tayinini sağlayan, birçok yöntemi kapsayan yöntemlerin genel adıdır. Bütün kromatografik ayırmalarda numune gaz, sıvı veya bir süperkritik akışkanı olan hareketli faz ile taşınır. Bu hareketli faz bir kolonda veya bir katı yüzeyde sabitleştirilmiş kendisi ile karışmayan bir durgun faz içinden geçmeye zorlanır. Bu iki faz numune bileşenlerinin hareketli ve durgun fazlarda farklı oranlarda dağılacağı şekilde seçilir. Durgun faz tarafından kuvvetli tutulan numune bileşenleri, hareketli fazın akışıyla çok yavaş hareket ederler. Buna karşılık, durgun faz tarafından zayıfça tutulan bileşenler hızlı hareket ederler. Bu hareket hızlarının farklılığı sonucu, numune bileşenleri birbirinden kalitatif ve/veya kantitatif olarak analizlenebilen farklı bantlar veya bölgeler şeklinde ayrılırlar.

Kromatografik yöntemler iki şekilde sınıflandırılabilir. Birincisinde hareketli ve durgun fazların fiziksel olarak nasıl temas ettirildikleri esas alınır. Kolon kromatografide, durgun faz ince bir kolonda tutulur ve hareketli faz basınç altında bu durgun faz arasından geçmeye zorlanır. Düzlemsel kromatografide, durgun faz düz bir plaka üzerine veya bir kağıdın gözenekleri arasına tutturulur ve bu durumda hareketli faz durgun faz arasından kapiler etkisiyle veya yer çekimi etkisiyle hareket eder.

Ancak her iki tür kromatografinin dayandığı dengeler aynıdır ve kolon kromatografisi için geliştirilmiş kuramlar düzlemsel kromatografiye de kolaylıkla uyarlanabilir

Kromatografinin daha temel bir sınıflandırılması kullanılan durgun ve hareketli fazların tipleri ve fazlar arasında madde aktarımı sağlayan dengelerin cinslerine göre yapılır (42). Sınıflandırma Şekil 2.2’de yer almaktadır (43).

Sıvı kromatografisi düzlemsel yüzeylere ve kolonlara uygulanabilen bir kromatografi türüdür. Ayırma mekanizmasına göre sıvı kromatografisi; Adsorpsiyon, Dağılıma, İyon çifti oluşumu, İyon değiştirme, Moleküler eleme ve Afinite kromatografisi olarak sınıflandırılır.



Şekil 2.2. Kromatografi sınıflandırılması.

2.6. Sıvı Kromatografisi

Sıvı kromatografisi (LC), hareketli fazın bir kolonda bulunan sabit bir fazdan süzülen bir sıvı olduğu, karışmayan iki faz arasındaki türlerin dağılımındaki farklılığa dayanan bir kromatografik ayırma yöntemidir (44).

Cihaz modülleri, pompa sistemleri, enjektörler, sabit fazlar, dedektörler ve hareketli fazlar Avrupa Farmakopesinde aşağıdaki gibi tanımlanmıştır.

2.6.1. Cihaz

Cihaz, pompalama sistemi, enjektör, kromatografik kolon (bir kolon sıcaklık kontrolörü kullanılabilir), dedektör ve veri toplama sisteminden (veya bir entegratör veya bir çizelge kaydediciden) oluşur. Hareketli faz, bir veya birkaç rezervuardan sağlanır ve kolondan geçerek dedektöre ulaşır.

2.6.2. Pompa Sistemleri

Hareketli fazı sabit bir akış hızında iletme için sıvı kromatografi pompalama sistemleri gereklidir. Basınç dalgalanmaları en aza indirilmelidir. Borular ve bağlantılar, pompalama sisteminin geliştirdiği basınçlara dayanabilmektedir. sıvı kromatografi pompaları, sıkışan hava kabarcıkları sisteminin "havasını boşaltmak" için bir olanağa sahip olabilir.

Mikroişlemci kontrollü sistemler, tanımlanmış bir programa göre sabit (izokratik elüsyon) veya değişken bileşimli (gradyan elüsyon) bir hareketli fazı doğru bir şekilde sunabilir. Gradyanlı elüsyon durumunda, birkaç rezervuardan solvent(ler) sağlayan pompa sistemleri mevcuttur ve solvent karışımı, pompanın/pompaların düşük veya yüksek basınçlı tarafında gerçekleştirilebilir.

2.6.3. Enjektörler

Numune çözeltisi, yüksek basınçta çalışabilen bir enjeksiyon sistemi kullanılarak kolonun başına veya yakınında akan hareketli faza verilir. Manuel olarak veya bir otomatik örnekleyici tarafından çalıştırılan sabit döngülü ve değişken hacimli cihazlar kullanılır. Döngülerin manuel olarak kısmen doldurulması, enjeksiyon hacmi hassasiyetinin daha düşük olmasına neden olabilir.

2.6.4. Sabit Fazlar

Aşağıdakiler de dahil olmak üzere, sıvı kromatografide kullanılan birçok sabit faz türü vardır:

- Ayırmanın adsorpsiyon ve/veya kütle dağılımındaki farklılıklara dayandığı normal faz kromatografisinde kullanılan silika, alümina veya gözenekli grafit,

- Ayırmanın ayrılacak iyonlar ile hareketli fazdakiler arasındaki rekabete dayandığı iyon değişim kromatografisinde kullanılan asit veya bazik gruplara sahip reçineler veya polimerler,

- Boyut dışlama kromatografisinde kullanılan, ayırmanın moleküllerin hacimleri arasındaki farklılıklara dayalı olduğu, sterik dışlamaya karşılık gelen gözenekli silika veya polimerler,

- Polimerlerden, silikadan veya gözenekli grafitten hazırlanan, ters fazlı sıvı kromatografide kullanılan, ayırmanın esas olarak moleküllerin hareketli faz ile sabit faz arasındaki bölünmesine dayandığı çeşitli kimyasal olarak değiştirilmiş destekler,

- Kimyasal olarak değiştirilmiş özel sabit fazlar, örn. enantiyomerlerin ayrılması için selüloz veya amiloz türevleri, proteinler veya peptitler, siklodekstrinler vb. (kiral kromatografi).

Çoğu ayırma, sabit faz olarak kimyasal olarak değiştirilmiş silika ve hareketli faz olarak polar çözücüler kullanan bölme mekanizmalarına dayanır. Desteğin yüzeyi, örn. silikanın silanol grupları, desteğin yüzeyinde değişen sayıda aktif bölgeyi kapsayan kovalent olarak bağlı silil türevleri üretmek için çeşitli silan reaktifleri ile reaksiyona girer. Sabit fazın doğası, kromatografik sistemin ayırma özelliklerini belirlemek için önemli bir parametredir. Yaygın olarak kullanılan bağlı fazlar aşağıda gösterilmiştir:

oktil = Si-[CH ₂] ₇ -CH ₃	C ₈
oktadesil = Si-[CH ₂] ₁₇ -CH ₃	C ₁₈
fenil = Si-[CH ₂] _n -C ₆ H ₅	C ₆ H ₅
siyanopropil = Si-[CH ₂] ₃ -CN	CN
aminopropil = Si-[CH ₂] ₃ -NH ₂	NH ₂
diol = Si-[CH ₂] ₃ -O-CH(OH)-CH ₂ -OH	

Üretici tarafından aksi belirtilmedikçe, silika bazlı ters fazlı kolonların, 2.0 ila 8.0 aralığında görünen bir pH'a sahip hareketli fazlarda stabil olduğu kabul edilir. Gözenekli grafit veya stiren-divinilbenzen kopolimeri gibi polimerik malzeme parçacıkları içeren kolonlar, daha geniş bir pH aralığında stabildir.

Modifiye edilmemiş silika, gözenekli grafit veya polar kimyasal olarak modifiye edilmiş silika ile normal faz kromatografisi kullanılarak analiz, örn. siyanopropil veya diol, belirli durumlarda polar olmayan hareketli fazlı sabit faz uygulanabilir.

Analitik ayırmalar için en yaygın olarak kullanılan sabit fazların partikül boyutu 3 µm ile 10 µm arasında değişir. Parçacıklar, değişen gözenekliliğe ve spesifik yüzey alanına sahip küresel veya düzensiz olabilir. Bu parametreler, belirli bir sabit fazın kromatografik davranışına katkıda bulunur. Ters fazlar olması durumunda, sabit fazın doğası, bağlanmanın boyutu ve sabit fazın artık silanol gruplarının durumu ek belirleyici faktörlerdir. Artan silanol grupları mevcut olduğunda, özellikle bazik maddelerde piklerin kuyruklanması meydana gelebilir.

Analitik kromatografi için, monografta aksi belirtilmedikçe paslanmaz çelikten yapılmış, değişen uzunluk ve iç çapta (Ø) kolonlar kullanılır. Bir analiz sırasında hareketli fazın ve kolonun sıcaklığı sabit tutulmalıdır. Çoğu ayırma oda sıcaklığında gerçekleştirilir, ancak daha yüksek verim sağlamak için kolonlar ısıtılabilir. Sabit faz bozulması veya hareketli fazın bileşiminde meydana gelen değişiklikler nedeniyle kolonların 60 °C'nin üzerinde ısıtılmaması önerilir.

2.6.5. Hareketli Fazlar

Normal fazlı kromatografi için daha az polar çözücüler kullanılır. Hareketli fazda suyun varlığı, tekrarlanabilir sonuçlar elde etmek için sıkı bir şekilde kontrol edilmelidir. Ters fazlı sıvı kromatografide, organik değiştiriciler içeren veya içermeyen sulu hareketli fazlar kullanılır.

Hareketli fazın bileşenleri genellikle 0.45 µm'den büyük partikülleri uzaklaştırmak için filtrelendir. Çok bileşenli hareketli fazlar, tek tek bileşenlerin gerekli hacimleri (kütleler belirtilmedikçe) ölçülerek ve ardından karıştırılarak hazırlanır. Alternatif olarak, çözücüler, karıştırmanın istenen orana göre gerçekleştirildiği orantı valfleri tarafından kontrol edilen ayrı pompalar tarafından verilebilir.

Dedektör hücresinde gaz kabarcıklarının oluşmasını önlemek için, solventlerin normal olarak, helyum, sonikasyon veya on-line membran/vakum modülleri kullanılarak pompalamadan önce gazı giderilir. Kullanılan çözücüler ve diğer bileşenler uygun kalitede olacaktır. pH'nın ayarlanması gerekirse, karışım değil,

hareketli fazın sadece sulu bileşeni kullanılarak gerçekleştirilir. Tampon çözeltiler kullanılıyorsa, kromatografinin tamamlanmasından sonra tuzların kristalleşmesini önlemek için sistemin bir su ve hareketli fazın organik değiştiricisi (% 5 h/h) karışımı ile yeterli durulama yapılır. Hareketli fazlar diğer bileşenleri içerebilir, örn. iyon çifti kromatografisi için bir karşı iyon veya bir aşiral sabit faz kullanan kromatografi için bir kiral seçici.

2.6.6. Dedektörler

Diyot dizisi dedektörleri dahil olmak üzere ultraviyole/görünür (UV/Vis) spektrofotometreler, en yaygın kullanılan dedektörlerdir. Floresans spektrofotometreler, diferansiyel refraktometreler, elektrokimyasal dedektörler, kütle spektrometreleri, ışık saçılım dedektörleri, radyoaktivite dedektörleri veya diğer özel dedektörler de kullanılabilir.

2.7. Kromatografide Temel Kavramlar

2.7.1. Alıkonma Zamanı

Numune enjeksiyonundan sonra, analit pikinin dedektöre ulaşması için geçen zamana alıkonma zamanı denir ve t_R sembolü ile gösterilir. Kolonda tutunmayan maddenin dedektöre ulaşması için geçen zamana ölü zaman (t_0) denir. Tutulmayan türün kolonda göç hızı, hareketli faz moleküllerinin ortalama hareket hızına eşittir.

2.7.2. Teorik Tabaka Yüksekliği ve Teorik Tabaka Sayısı

Kromatografik kolon verimliliğinin kantitatif bir ölçüsü olarak genellikle birbiri ile ilgili iki terim kullanılmaktadır: (1) teorik tabaka yüksekliği, H ve (2) teorik tabaka sayısı, N.

Bu iki terim arasında Eşitlik 2.1'de yer aldığı gibi bağlantı bulunmaktadır.

$$N = L/H \quad (2.1)$$

Bu eşitlikte L, kolon dolgununun uzunluğudur. Kromatografik kolonun verimliliği tabaka sayısı arttıkça ve tabaka yüksekliği azaldıkça artar. Kolon tipi, durgun ve hareketli fazların cinslerine bağlı olarak kolon verimliliklerinde büyük farklılıklar vardır. Tabaka sayısı cinsinden kolon verimi, birkaç yüz ile yüzbinler

arasında değişir; tabaka yüksekliği ise santimetrenin onda birleri ile binde birleri veya daha da düşük değerler arasında değişir.

Bir Gauss pikinin genişliği, ölçülerin standart sapması (σ) veya varyansı (σ^2) ile doğrudan ilgilidir. Kromatografik bantlar genellikle Gauss tipi olduğu kabul edildiğinden, bir kolonun verimliliği kolonun birim uzunluğu başına varyans cinsinden tanımlamak uygun olmaktadır. Bu durumda tabaka yüksekliği

$$H = \sigma^2 / L \quad (2.2)$$

şeklinde verilir.

Kolon etkinliği, pik genişliği ile ilgilidir. Etkinliği yüksek olan kolonlar, dar pikler verirler ve bu kolonlarla maddeleri ayırmak daha kolaydır. Başarılı bir kromatografinin asıl amacı verimli bir ayırım ve dar bir kromatografik bant elde etmektir. Kolon etkinliğinin ölçüsü kolonun eşdeğer teorik tabaka sayısı (N)'dir ve aşağıdaki eşitlikle verilir;

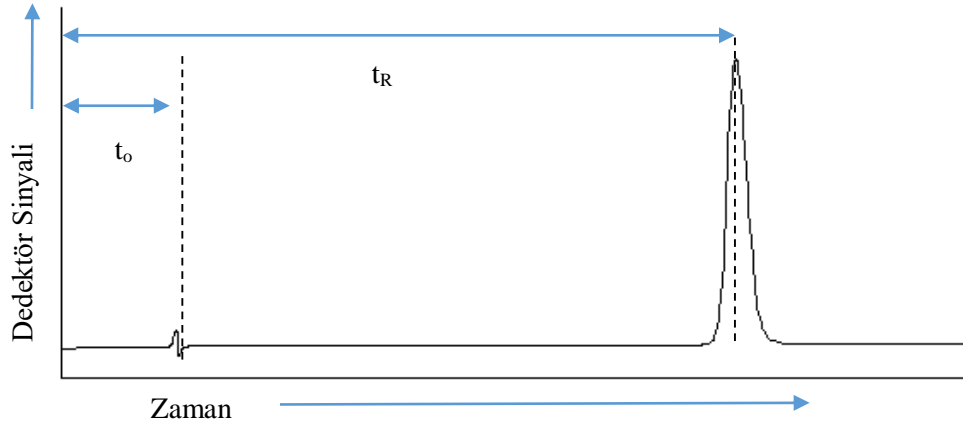
$$N = 16 \times (t_R / w)^2 \quad (2.3)$$

Bu eşitlikte w , elüsyon pik yüksekliğinin % 10'undaki pik taban genişliğidir.

Kolon etkinliği eşdeğer teorik tabaka yüksekliği (H) ile de gösterilebilir ve kolon uzunluğunun (L) teorik tabak sayısına (N) bölünmesiyle hesaplanır (Eşitlik 2.4).

$$H = L/N \quad (2.4)$$

Etkinlik; kolon uzunluğunun, partikül boyutunun ve akış hızının bir fonksiyonudur. Bu parametrelerin değişimi kolonun basıncını da etkiler. Bunun yanında kolon uzunluğu ve akış hızının değişimi alıkonma zamanını da değiştirir.



Şekil 2.3. Alıkonma zamanı.

2.7.3. Kapasite Faktörü

Kapasite faktörü her maddenin kendine özgüdür ve bir karışımı oluşturan bileşikleri seçici olarak ayıran kromatografik sistemin seçiminde göz önünde tutulan en önemli parametredir. Uygun bir hareketli faz-sabit faz çifti seçildiğinde belirli bir karışımdaki her bir bileşen için farklı kapasite faktörü değerleri elde edilir. Genellikle hareketli faz bileşimi değiştirilerek kapasite faktörü ayarlanır. Akış hızı değişikliklerinde, alıkonma zamanı değişir fakat kapasite faktörü sabit kalır (45).

$$k' = (t_R - t_0) / t_0 \quad (2.5)$$

2.7.4. Seçicilik

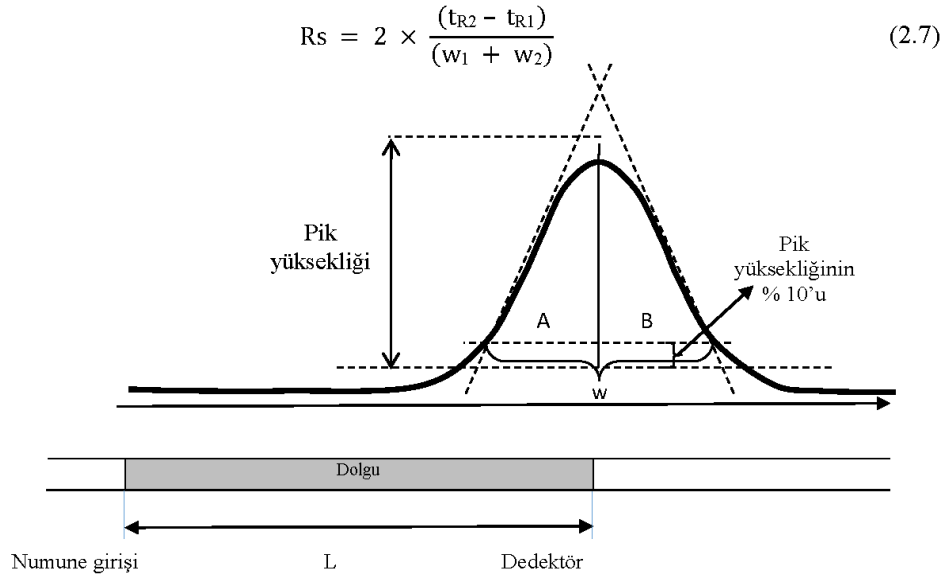
İki maddeye ait kapasite faktörü oranı seçicilik (α) veya ayırım faktörü olarak adlandırılır ve aşağıdaki eşitlikle verilir.

$$\alpha = k'_2 / k'_1 = (t_{R2} - t_0) / (t_{R1} - t_0) \quad (2.6)$$

Bu eşitlikte, k'_1 kısa alıkonma zamanlı maddenin, k'_2 ise daha uzun alıkonma zamanlı maddenin kapasite faktörü olarak tanımlanmıştır. Seçicilik, esas olarak sabit faz özelliklerine bağlıdır ancak hareketli faz bileşimi de seçiciliği etkiler.

2.7.5. Ayırıcılık

Kromatografik işlemlerde kolon etkinliği ve çözücü etkinliğinin ortak etkisi ayırıcılık (R_s) kavramıyla ifade edilir. Ayırıcılık genel olarak aşağıdaki eşitlikle verilmektedir:



Şekil 2.4. Simetrik pik.

Ayırıcılık kontrolü:

Ayırıcılığın; kapasite faktörü (k'), seçicilik (α) ve kolon etkinliği (N) terimleriyle ilişkisi aşağıdaki eşitlikle ifade edilebilir.

$$R = \frac{1}{4} \times \left[\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right] \times \left[\frac{k'}{k' + 1} \right] \times \sqrt{N} \quad (2.8)$$

2.7.6. Pik Simetrisi

Analitin hareketli fazdaki denge derişimi (C_m) sabit fazdaki denge derişimine (C_s) karşı grafiğe geçirildiğinde bir dizi izoterm elde edilir. İdeal durumlarda $K=C_s/C_m$ sabit olduğu için kromatografik bant bütün derişimlerde aynı hızda hareket eder ve simetrik (gauss) bir elüsyon piki elde edilir (Şekil 2.4).

Pik simetrisinin belirlenmesinde kullanılan pik asimetri (A_s) oranı aşağıdaki eşitlik yardımıyla hesaplanır.

$$A_s = B / A \quad (2.9)$$

B ve A uzunlukları Şekil 2.4'de tanımlanmıştır. İyi bir ayırma işleminde, pik asimetri oranının 1.00 ile 1.25 arasında olması istenir (46).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasallar Maddeler

- Potasyum Dihidrojen Fosfat (KH_2PO_4) (Scharlau)
- Dipotasyum Dihidrojen Fosfat (K_2HPO_4) (Merck)
- Metanol (MeOH) (Scharlau)
- Sodyum Hidroksit (NaOH) (Merck)
- Hidroklorik Asit (HCL) (Merck)
- Hidrojen Peroksit (H_2O_2) (Merck)
- Sistein Hidroklorür Monohidrat (Merck)
- Disodyum Hidrojen Fosfat Dihidrat (Merck)
- Sistin (Sigma Aldrich)
- Mannitol (Sigma Aldrich)

3.2. Kullanılan Cihazlar

- YPSK (Shimadzu, Prominence-i LC-2030C)
- Hassas Terazi (Mettler Toledo ME204)
- pH Metre (Mettler Toledo)
- Etüv (Nüve)
- Soğuk Kabin (Frigo Block)
- Ultrasonik Banyo (Faithfull 22L Ultrasonic)
- Karıştırıcı (MTOPS)

3.3. Kullanılan Cam Malzemeler

- Beher
- Balon joje
- Vial
- Pipet

3.4. Kullanılan Farmasötik Preperatlar

Bu analitik çalışmada Turktipsan AŞ.'ye ait müstahzarlar kullanılmıştır. Dolaset 10 mg/ml I.V. İnfüzyonluk Çözelti, flakon ve Parasetamol IV İnfüzyon İçin Çözelti, torba firma bünyesinde Ar-Ge Merkezi çalışmalarına ait stoklardan temin edilmiştir.

3.5. Kullanılan Standart

EP (European Pharmacopeia) Referans Standardı, Parasetamol CRS (Paracetamol Chemical Reference Substance).

3.6. Kullanılan Analitik Yöntem

Yöntemin optimizasyonu gerçekleştirilirken parasetamolün pKa değeri: 9.38 olması, kuvvetli baz yapısı nedeniyle pH'ı 6.94 olan hareketli faz A'da değişiklik yapılmamıştır.

0.6 ml/dk akış hızı ile başlayan analiz denemelerinde akış hızı 0.8 ml/dk, 1.0 ml/dk, 1.2 ml/dk 1.4 ml/dk olacak şekilde arttırılmıştır. Parasetamol pikine ait alıkonma zamanı beklenen şekilde azalmış fakat alan küçükmüş ve teorik plaka sayısı düşmüştür. Optimum akış hızı olarak 1.0 ml/dk seçilmiştir.

Organik oranının optimizasyonu çalışmaları %35-%5 aralığında gerçekleştirilmiş olup akış hızı denemeleri ile paralel sonuçlar elde edilmiştir. Organik oranı %5 olacak şekilde yöntem sistem uygunluk parametreleri göz önünde tutularak optimize edilmiştir.

Ayrıca bozunma ürünlerinin parasetamol pikinin öncesinde oluşması sebebiyle pik saflık indeks değerinin korunması gerektiği değerlendirilmiş ve yaklaşık dakika 4, parasetamol için alıkonma zamanı uygun kabul edilmiştir.

Çalışmanın gerçekleştirildiği yöntem şartları aşağıda sunulmuştur.

Cihaz	: YPSK, Ters faz kromatografi
Dedektör	: Diode Array Dedektör
Kolon	: Infinitylab Poroshell 120 EC-C18 4.6 x 50 mm 2.7 µm
Kolon Sıcaklığı	: 30°C
Akış hızı	: 1.0 ml/dk
Dalga boyu	: 254 nm
Enjeksiyon hacmi	: 10 µl
Analiz süresi	: 7 dk
Oto örnekleme sıcaklığı	: 15°C
İzokritik Sistem	: Hareketli faz A: Hareketli faz B (%95:%5)

3.7. Çözeltilerin Tanımlanması ve Hazırlanması

3.7.1. Genel Çözeltiler

Hareketli Faz A: 1.7 g (12.5 mM) potasyum dihidrojen fosfat ve 1.8 g (10.33 mM) dipotasyum hidrojen fosfat tartılıp 1000 ml saf su içerisinde çözülmüştür. Elde edilen hareketli faz süzölmüş ve degaze edilmiştir.

Hareketli Faz B: %100 metanol.

Seyreltme çözeltisi/Çözücü: 150 ml metanol ve 850 ml saf su karıştırılıp degaze edilerek hazırlanmıştır.

Parasetamol Standart çözeltisi: 50 ml'lik balon jøjeye 12.5 mg Parasetamol standardı tartılmıştır. Çözücü ile çözümlenerek hacmine tamamlanmıştır. Bu çözeltiden 100 ml'lik balon jøjeye 1 ml alınıp çözücü ile çözümlenerek hacmine tamamlanmıştır ($C_{\text{parasetamol}}: 2.5 \mu\text{g/ml}$).

Numune çözeltisi: Darası alınmış 50 ml'lik balon jøjeye 1.25 ml numune hassas bir şekilde tartılarak çözücü ile çözümlenerek hacmine tamamlanmıştır. Bu çözeltiden 100 ml'lik balon jøjeye 1 ml alınıp çözücü ile çözümlenerek hacmine tamamlanmıştır ($C_{\text{parasetamol}}: 2.5 \mu\text{g/ml}$).

1 M Sodyum Hidroksit Çözeltisi: 4 g Sodyum hidroksit 100 ml'lik balon jøjeye tartılarak bir miktar saf su ile çözülmüş ve hacmine tamamlanarak karıştırılmıştır.

1 M Hidroklorik Asit Çözeltisi: 100 ml'lik balon jöje içerisine yaklaşık 25 ml saf su koyulmuş, üzerine 8.2117 ml (9.85404g) %37 Hidroklorik Asit çözeltisi eklenerek karıştırılmıştır. Hacmine saf su ile tamamlanarak karıştırılmıştır.

Stok Plasebo Çözeltisi: 100 ml' lik balon joje içerisine plasebodan 1 ml alınarak hacmine çözücü ile tamamlanmıştır.

Stok Standart Çözeltisi: 12.5 mg parasetamol standardı 50 ml' lik balon joje içerisine alınarak çözücü eklenmiş çözüldükten sonra hacmine çözücü ile tamamlanmıştır.

Stok Numune Çözeltisi: 1.25 ml numuneden 100 ml' lik balon jojeye tartılarak hacmine çözücü ile tamamlanmıştır.

3.7.2. Seçicilik Çalışmasında Kullanılan Çözeltiler

Mannitol Çözeltisi: 3850 mg mannitol 100 ml' lik balon jojeye tartılarak çözücü ile çözülmüş hacmine tamamlanmıştır. Son derişimi 9.63 µg/ml olacak şekilde seyreltme yapılmıştır.

Sistein Hidroklorür Monohidrat Çözeltisi: 25 mg sistein hidroklorür monohidrat 100 ml' lik balon jojeye tartılarak çözücü ile çözülmüş hacmine tamamlanmıştır. Son derişimi 0.0625 µg/ml olacak şekilde seyreltme yapılmıştır.

Sistin Çözeltisi: 3.591 mg sistin 100 ml' lik balon jojeye tartılarak çözücü ile çözülmüş hacmine tamamlanmıştır. Son derişimi 0.009 µg/ml olacak şekilde seyreltme yapılmıştır.

Disodyum Fosfat Dihidrat Çözeltisi: 13 mg disodyum fosfat dihidrat 100 ml' lik balon jojeye tartılarak çözücü ile çözülmüş hacmine tamamlanmıştır. Son derişimi 0.0325 µg/ml olacak şekilde seyreltme yapılmıştır.

3.7.3. Gün Işığı Bozundurma Çalışmasında Kullanılan Çözeltiler

Gün ışığı bozundurma çalışması için çözeltiler aşağıda anlatıldığı gibi hazırlanmıştır. Tüm vialler hava almayacak ve gün ışığına maruz kalacak şekilde bekletilmiştir.

Plasebo bozundurma çalışması için Stok Plasebo Çözeltisinden 25' lik ml balon jojeye 250 µl eklenmiş, hacmine çözücü ile tamamlanmış ve karıştırılmıştır. Filtre edilerek viallenmiştir.

Standart bozundurma çalışması için Stok Standart Çözeltisinden 25 ml' lik balon jojeye 250 µl eklenmiş, hacmine çözücü ile tamamlanmış ve karıştırılmıştır. Filtre edilerek viallenmiştir.

Numune bozundurma çalışması için Stok Numune Çözeltilerinden 25 ml' lik balon jøjeye 250 µl eklenmiş, hacmine çözücü ile tamamlanmış ve karıştırılmıştır. Filtre edilerek viallenmiştir.

3.7.4. Termal Bozundurma Çalışmasında Kullanılan Çözeltiler

Termal bozundurma çalışması için çözeltiler aşağıda anlatıldığı gibi hazırlanmıştır. Tüm balon jøjeler 80°C sıcaklıkta olan etüv içerisinde ağzı kapalı olarak yerleştirilmiştir. Enjeksiyon zamanı geldiğinde oda sıcaklığına gelmesi sağlanıp filtre edilerek viallenmiş ve sisteme verilmiştir.

Plasebo bozundurma çalışması için Stok Plasebo Çözeltilerinden 25 ml' lik balon jøjeye 250 µl eklenmiş, hacmine çözücü ile tamamlanmış ve karıştırılmıştır.

Standart bozundurma çalışması için Stok Standart Çözeltilerinden 25 ml' lik balon jøjeye 250 µl eklenmiş, hacmine çözücü ile tamamlanmış ve karıştırılmıştır.

Toz Standart bozundurma çalışması için ham madde kapalı cam petriye koyularak etüve yerleştirilmiş, enjeksiyon zamanı geldiğinde 50 ml'lik balon jøjeye 12.5 mg Parasetamol standardı tartılmıştır. Çözücü ile çözümlenerek hacmine tamamlanmıştır. Bu çözeltiden 100 ml'lik balon jøjeye 1 ml alınıp çözücü ile çözümlenerek hacmine tamamlanmıştır.

Numune bozundurma çalışması için Stok Numune Çözeltilerinden 25 ml' lik balon jøjeye 250 µl eklenmiş, hacmine çözücü ile tamamlanmış ve karıştırılmıştır.

3.7.5. Asit Bozundurma Çalışmasında Kullanılan Çözeltiler

Asit bozundurma çalışması için çözeltiler aşağıda anlatıldığı gibi hazırlanmıştır.

Plasebo bozundurma çalışması için 25 ml' lik balon jøjeye, 250 µl Stok Plasebo Çözeltisi ve 250 µl 1 M Hidroklorik Asit Çözeltisi eklenmiş ve karıştırılmıştır.

Standart bozundurma çalışması için 25 ml' lik balon jøjeye, 250 µl Stok Standart Çözeltisi ve 250 µl 1 M Hidroklorik Asit Çözeltisi eklenmiş ve karıştırılmıştır.

Numune bozundurma çalışması için 25 ml' lik balon jøjeye, 250 µl Stok Numune Çözeltisi ve 250 µl 1 M Hidroklorik Asit Çözeltisi eklenmiş ve karıştırılmıştır.

Bozundurma saati tamamlandığında karışımın üzerine 250 µl 1 M Sodyum Hidroksit Çözeltisi eklenerek karıştırılmış, hacmine çözücü ile tamamlanmış ve karıştırılmıştır. Filtre edilerek viallenmiştir.

3.7.6. Baz Bozundurma Çalışmasında Kullanılan Çözeltiler

Bazik bozundurma çalışması için çözeltiler aşağıda anlatıldığı gibi hazırlanmıştır.

Plasebo bozundurma çalışması için 25 ml' lik balon jojeye, 250 µl Stok Plasebo Çözeltisi ve 250 µl 1 M Sodyum Hidroksit Çözeltisi eklenmiş ve karıştırılmıştır.

Standart bozundurma çalışması için 25 ml' lik balon jojeye, 250 µl Stok Standart Çözeltisi ve 250 µl 1 M Sodyum Hidroksit Çözeltisi eklenmiş ve karıştırılmıştır.

Numune bozundurma çalışması için 25 ml' lik balon jojeye, 250 µl Stok Numune Çözeltisi ve 250 µl 1 M Sodyum Hidroksit Çözeltisi eklenmiş ve karıştırılmıştır.

Bozundurma saati tamamlandığında karışımın üzerine 250 µl 1 M Hidroklorik Asit Çözeltisi eklenerek karıştırılmış, hacmine çözücü ile tamamlanmış ve karıştırılmıştır. Filtre edilerek viallenmiştir.

3.7.7. Hidrojen Peroksit Bozundurma Çalışmasında Kullanılan Çözeltiler

Hidrojen Peroksit bozundurma çalışması için çözeltiler aşağıda anlatıldığı gibi hazırlanmıştır. Bozundurma saati tamamlandığında karışım hacmine çözücü ile tamamlanmış ve karıştırılmıştır. Filtre edilerek viallenmiştir.

Plasebo bozundurma çalışması için farklı 25 ml' lik balon jojelere, 250 µl Stok Plasebo Çözeltisi ve sırasıyla 10 µl, 25 µl, 50 µl, 250 µl, 500 µl %30'luk Hidrojen Peroksit Çözeltisi eklenmiş ve karıştırılmıştır.

Standart bozundurma çalışması farklı 25 ml' lik balon jojelere, 250 µl Stok Standart Çözeltisi ve sırasıyla 10 µl, 25 µl, 50 µl, 250 µl, 500 µl %30'luk Hidrojen Peroksit Çözeltisi eklenmiş ve karıştırılmıştır.

Numune bozundurma çalışması için farklı 25' lik ml balon jodelere, 250 µl Stok Numune Çözeltisi ve sırasıyla 10 µl, 25 µl, 50 µl, 250 µl, 500 µl %30'luk Hidrojen Peroksit Çözeltisi eklenmiş ve karıştırılmıştır.

3.7.8. Hidrojen Peroksit ve Termal Bozundurma Çalışmasında Kullanılan Çözeltiler

Hidrojen Peroksit bozundurma çalışması için çözeltiler aşağıda anlatıldığı gibi hazırlanmıştır. 80 °C etüvler içerisinde ağzı kapalı bir şekilde bekletilmiştir.

Plasebo bozundurma çalışması için farklı 25 ml' lik balon jodelere, 250 µl Stok Plasebo Çözeltisi ve sırasıyla 250 µl ve 500 µl %30'luk Hidrojen Peroksit Çözeltisi eklenmiş ve karıştırılmıştır.

Standart bozundurma çalışması farklı 25 ml' lik balon jodelere, 250 µl Stok Standart Çözeltisi ve sırasıyla 250 µl ve 500 µl %30'luk Hidrojen Peroksit Çözeltisi eklenmiş ve karıştırılmıştır.

Numune bozundurma çalışması için farklı 25 ml' lik balon jodelere, 250 µl Stok Numune Çözeltisi ve sırasıyla 250 µl ve 500 µl %30'luk Hidrojen Peroksit Çözeltisi eklenmiş ve karıştırılmıştır.

Bozundurma saati tamamlandığında karışım hacmine çözücü ile tamamlanmış ve karıştırılmıştır. Filtre edilerek viallenmiştir.

3.7.9. Doğrusallık Parametresinde Kullanılan Çözeltiler

Doğrusallık parametresinde kullanılan çözeltiler Stok Standart Çözeltisi kullanılarak 3.1. tablosunda derişimi belirtilen 7 farklı noktadaki çözeltilerin hazırlanışı aşağıda belirtilmiştir.

Tablo 3.1. Çalışılan doğrusallık derişimi.

Teorik Derişim %	Teorik Derişim µg /ml
25	0.625
50	1.250
80	2.000
100	2.500
120	3.000
150	3.750
200	5.000

% 25'lik doğrusallık çözeltisi: 100 ml'lik bir balon jojeye stok standart çözeltisinden 0.25 ml pipetlenir ve hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlanarak karıştırılır.

% 50'lik doğrusallık çözeltisi: 100 ml'lik bir balon jojeye stok standart çözeltisinden 0.50 ml pipetlenir ve hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlanarak karıştırılır.

% 80'lik doğrusallık çözeltisi: 100 ml'lik bir balon jojeye stok standart çözeltisinden 0.80 ml pipetlenir ve hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlanarak karıştırılır.

% 100'lik doğrusallık çözeltisi: 100 ml'lik bir balon jojeye stok standart çözeltisinden 1.00 ml pipetlenir ve hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlanarak karıştırılır.

% 120'lik doğrusallık çözeltisi: 100 ml'lik bir balon jojeye stok standart çözeltisinden 1.20 ml pipetlenir ve hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlanarak karıştırılır.

% 150'lik doğrusallık çözeltisi: 100 ml'lik bir balon jojeye stok standart çözeltisinden 1.50 ml pipetlenir ve hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlanarak karıştırılır.

% 200'lik doğrusallık çözeltisi: 100 ml'lik bir balon jojeye stok standart çözeltisinden 2.00 ml pipetlenir ve hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlanarak karıştırılır.

3.7.10. Doğruluk Parametresinde Kullanılan Çözeltiler

Doğruluk parametresinde kullanılan çözeltiler stok standart çözeltisi kullanılarak 3.1. tablosunda derişimi belirtilen 7 farklı noktadaki çözeltilerin hazırlanışı aşağıda belirtilmiştir.

% 25'lik doğruluk çözeltisi: 100 ml'lik bir balon jojeye stok standart çözeltisinden 0.25 ml ve plasebodan 1.0 ml pipetlenir, hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlanarak karıştırılmıştır.

% 50'lik doğruluk çözeltisi: 100 ml'lik bir balon jojeye stok standart çözeltisinden 0.5 ml ve plasebodan 1.0 ml pipetlenir, hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlanarak karıştırılmıştır.

% 80'lik doğruluk çözeltisi: 100 ml'lik bir balon jöjeye stok standart çözeltisinden 0.8 ml ve plasebodan 1.0 ml pipetlenir, seyreltme çözeltisi ile tamamlanarak karıştırılmıştır.

% 100'lik doğruluk çözeltisi: 100 ml'lik bir balon jöjeye stok standart çözeltisinden 1.0 ml ve plasebodan 1.0 ml pipetlenir, hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlanarak karıştırılmıştır.

% 120'lik doğruluk çözeltisi: 100 ml'lik bir balon jöjeye stok standart çözeltisinden 1.2 ml ve plasebodan 1.0 ml pipetlenir, hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlanarak karıştırılmıştır.

% 150'lik doğruluk çözeltisi: 100 ml'lik bir balon jöjeye stok standart çözeltisinden 1.5 ml ve plasebodan 1.0 ml pipetlenir, hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlanarak karıştırılır.

% 200'lik doğruluk çözeltisi: 100 ml'lik bir balon jöjeye stok standart çözeltisinden 2.0 ml ve plasebodan 1.0 ml pipetlenir, hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlanarak karıştırılır.

3.8. Validasyon Parametrelerinin Çalışılması

3.8.1. Sistem Uygunluk

Bu çalışmada standart çözeltisine ilişkin birinci ve ikinci gün enjeksiyonları arasındaki benzerlik, alıkonma zamanı, kuyruklanma faktörü, teorik plaka sayısı, pik saflık indeks değeri ve kapasite faktörü raporlandırılmıştır. Kapasite faktörü hesaplanması için sisteme metanol enjeksiyonu verilmiş ve metanolün alıkonma zamanı ile standart enjeksiyonlarına ait piklerin kapasite faktörleri hesaplanmıştır.

3.8.2. Seçicilik

3.7.1. genel çözücüler başlığında anlatılan, çözücü, hareketli faz, boş enjeksiyon, standart, numune çözeltileri ve bitmiş ürünü oluşturan tüm maddeler numune derişiminde ve plasebo çözeltisi sisteme enjekte edilmiştir.

Stabilite göstergeli yöntemi doğrultusunda gün ışığı, termal, asit, baz, hidrojen peroksit ve hidrojen peroksit ile termal etkiler bozundurma çalışmaları kapsamında

incelenmiş ve çözeltiler Tablo 3.2.'de belirtilen saatler kapsamında enjeksiyon verilmiştir.

Filtre Etkisi

Validasyona ait çalışmalar gerçekleştirilirken ana enjeksiyon filtresi olarak 0.45 μ Nylon kullanılmıştır. Sisteme enjekte edilen çözeltilerde filtre etkisini incelemek için 0.45 μ RC, 0.20 μ RC, 0.20 μ Nylon, 0.20 μ PTFE ve 0.45 PTFE filtreleri kullanılmıştır.

Tablo 3.2. Maruz kalma zamanları.

Gün Işığı	Termal	Asit	Baz	Hidrojen Peroksit					Hidrojen Peroksit ve Termal	
				10 μ l	25 μ l	50 μ l	250 μ l	500 μ l	250 μ l	500 μ l
Saat										
5.5	8	7	10.25	0.5	0.5	0.5	2	2	7	7
9.5	11.25	12	25.5	1	1	1	3	3	8	8
13.5	25.93	25	57	4.5	5		16	16	31	31
18	35	36		9					32	32
36	58.83			24						
	95.25									

3.8.3. Kesinlik

Tekrarlanabilirlik (Enjeksiyon Tekrarlanabilirliği)

Bu çalışmada %100 derişimdeki standart (2.5 ppm) çözeltilerinin enjeksiyon tekrarlanabilirliği incelenmiştir. Standart enjeksiyonu sisteme peş peşe 6 kez enjekte edilmiştir.

Ara Kesinlik

Bu çalışmada torba ve flakon ürünlerinden hazırlanan 6 farklı numune çözeltileri sisteme ikişer kez farklı analist tarafından hazırlanarak sisteme enjekte edilmiştir.

Tutarlılık

Bu parametre için birinci ve ikinci gün 6 farklı numune çözeltileri olarak hazırlanan torba ve flakon numunelerinin sonuçları T-testi istatistiksel çalışması ile değerlendirilmiştir.

3.8.4. Doğrusallık

Stok standart çözelti ile hazırlanan doğrusallık çözeltilerinin her biri sisteme 3 kez verilmiş ve dedektör cevabına karşı derişim grafiği çizilmiştir. Bu çalışma 6 paralel çalışma olarak gerçekleştirilmiştir.

3.8.5. Çalışma Aralığı

Paralel derişim ile hazırlanan doğrusallık ve doğruluk çalışmasında elde edilen alt ve üst derişimler çalışma aralığı olarak raporlandırılmıştır.

3.8.6. Alt Tayin Sınırı (LOQ)

Yöntemin doğrusallık çalışmasına bağlı olarak çalışılan en düşük derişim olan değer LOQ değerı sinyal gürültü oranının (S/N) 10 olduğu değer olarak belirlenmiştir.

3.8.7. Gözlenebilme Sınırı (LOD)

Yöntemin doğrusallık çalışmasına bağlı olarak çalışılan en düşük derişim olan değer LOQ değerine karşılık gelen %25 derişimdeki çözeltiden 3.3 ml çözelti 10 ml' lik balonjojeye alınarak hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlanmıştır. Sisteme 3 kez ardı ardına enjekte edilmiştir.

3.8.8. Doğruluk (Geri Kazanım)

Doğruluk parametresi için stok standart çözeltilerinin plasebo üzerine eklenerek %25, %50, %80, %100, %120, %150 ve %200' lik çözeltiler hazırlanmıştır. Doğruluk çalışması için her bir derişimden 3 doğruluk çözeltisi hazırlanıp her biri sisteme 3 kez enjekte edilmiş ve parametre 3 paralel şekilde tekrarlanmıştır. Günler içi ve günler arası olarak gerçekleştirilen çalışmada aynı kişi, aynı cihazda farklı günde çözeltiler hazırlanarak gerçekleştirilmiştir. Parasetamol için bulunan analiz sonuçlarının gerçek değerden sapması tanımlanan doğrusallık standart çözeltilerine karşı % geri kazanımları açısından incelenmiştir. Doğrusallık analizinde bulunan regresyon doğru denklemi ile doğruluk enjeksiyonlarından elde edilen alan değerleriyle derişim değerlerine ulaşılarak geri kazanım hesaplanmıştır.

3.8.9. Sağlamlık

Bu çalışmada sistem şartları olarak dalga boyu, akış hızı, kolon fırını sıcaklığı, hareketli faz pH değeri ve organik faz oranı değişiklikleri yapılarak sağlamlık parametresi değerlendirilmiştir. Standart ve numune çözeltileri hazırlanarak bu şartlarda sisteme enjeksiyon verilmiştir. Sağlamlık çalışması yapılan değişiklikler 3.2. tablosunda sunulmuştur.

Tablo 3.3. Sağlamlık parametresi çalışma koşulları.

Değişim	Çalışma Koşulları		
	Optimum	Azalan	Artan
Dalga boyu	254 nm	252 nm	256 nm
Akış hızı	1.0 ml/dk	0.95 ml/dk	1.05 ml/dk
Kolon fırını sıcaklık	30 °C	28 °C	32 °C
Hareketli faz pH	6.942	6.842	7.042
Hareketli faz organik oranı	%5	%4	%6

3.8.10. Çözelti Stabilitesi

Standart ve Numune çözeltileri oda sıcaklığında, oto örnekleyici sıcaklığında (15 °C) ve 4 °C sıcaklıkta 30 gün bekletilerek periyodik olarak çözelti stabilitesi incelenmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Sistem Uygunluk

Standart çözeltilerin 1. ve 2. gün çalışmaları ile elde edilen sonuçlar incelendiğinde %BSS, teorik plaka sayısı, kuyruklanma faktörü, pik saflık indeks değeri, metanol enjeksiyonuna ait alıkonma zamanı 0.659 dk ile hesaplanan kapasite faktörü ve iki standarda ilişkin benzerliğin %99.61 ile sistemin uygun olduğunu göstermektedir.

Tablo 4.1. Sistem uygunluk sonuçları.

	Enjeksiyon Sayısı	RT	Alan	Teorik Plaka Sayısı	Kuyruklanma Faktörü	Pik Saflık İndeks Değeri	Kapasite Faktörü
Sistem Uygunluğu (1.gün)	1	3.900	77586	4148	1.112	0.999999	4.92
	2	3.912	77835	4177	1.115	0.999999	4.94
	3	3.913	77610	4223	1.112	0.999999	4.94
	4	3.893	77510	4172	1.111	1.000000	4.91
	5	3.901	77280	4172	1.109	0.999999	4.92
	6	3.895	77523	4145	1.109	0.999999	4.91
	Ortalama	3.90	77557	4173	1.111	1.000	4.922
	SS	0.008	179	28.0	0.002	0.000	0.013
	%BSS	0.22	0.23	0.67	0.20	0.00	0.26
Sistem Kesinliği (2.gün)	1	3.790	78624	4002	1.123	0.999998	4.75
	2	3.781	79013	3920	1.130	0.999996	4.74
	3	3.782	78950	3958	1.130	0.999999	4.74
	4	3.787	79394	3928	1.131	1.000000	4.75
	5	3.778	79127	3951	1.132	0.999999	4.73
	6	3.769	79416	3927	1.142	0.999997	4.72
	Ortalama	3.781	79087	3948	1.131	1.000	4.738
	SS	0.007	298	30.5	0.006	0.000	0.011
	%BSS	0.19	0.38	0.77	0.54	0.00	0.24

4.2. Seçicilik

Seçicilik çalışmalarının enjeksiyonları sonucu elde edilen kromatogramlar karşılaştırılmak üzere tek kromatogramda Şekil 4.1.'de sunulmuştur. Parasetamol pikinin alıkonma zamanında girişim bulunmamaktadır.

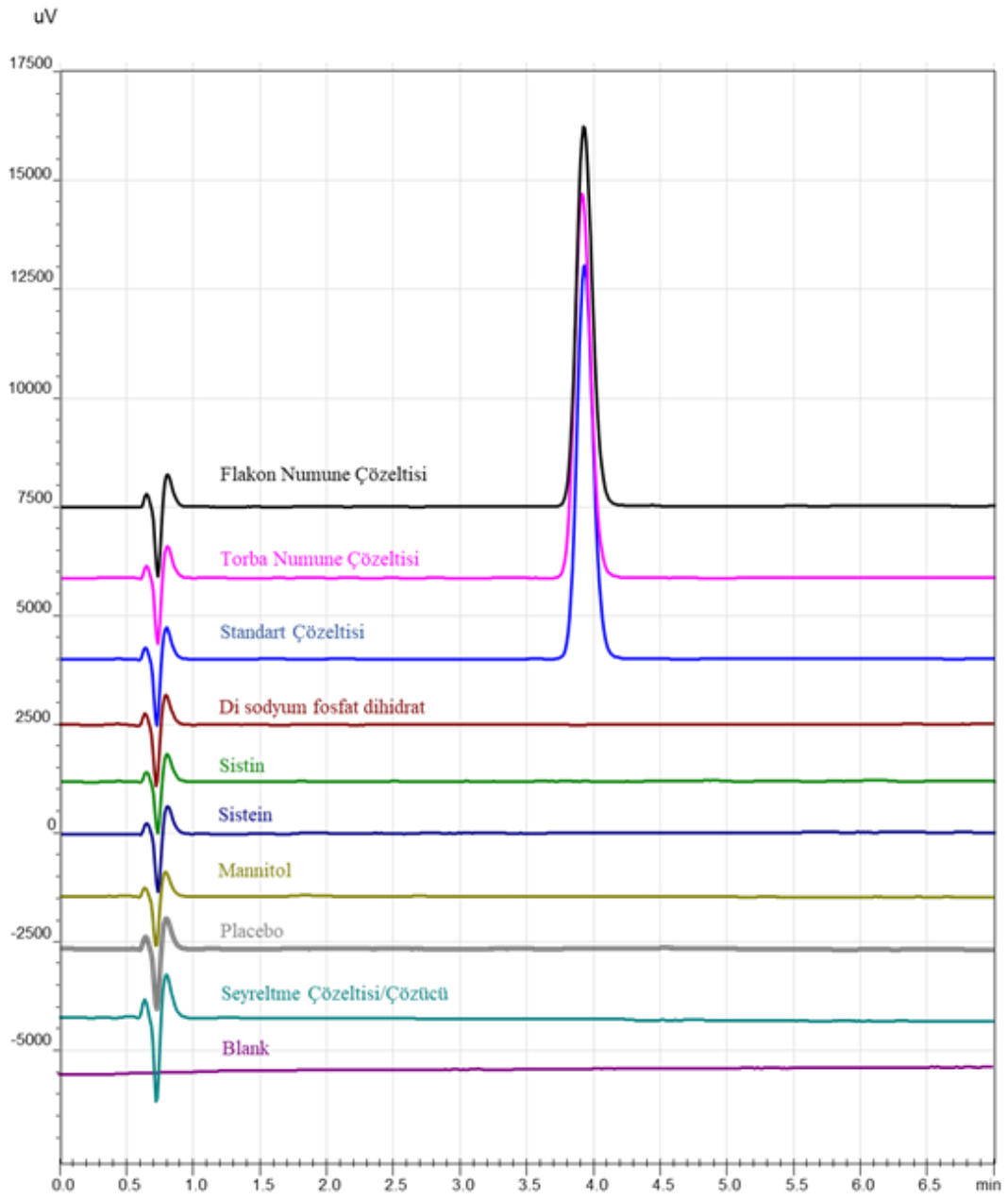
Stabilite göstergeli yöntem olduğunu kanıtlamak için gün ışığı, termal, asit, baz, hidrojen peroksit, hidrojen peroksit-termal bozundurma çalışmaları, plasebo, standart ve numune çözeltilerine çalışması yapılarak elde edilen enjeksiyon sonuçları ile bozunma yüzdeleri değerlendirilmiş ve etken maddenin pik saflık indeks değeri tablolar halinde sunulmaktadır. Seçicilik çalışmasına ait gerçekleştirilen tüm bozundurma çalışmaları sonunda parasetamol pikinin saflık indeks değeri kabul kriterinin içerisinde bulunmaktadır.

4.2.1. Gün Işığı Bozundurma Çalışmaları

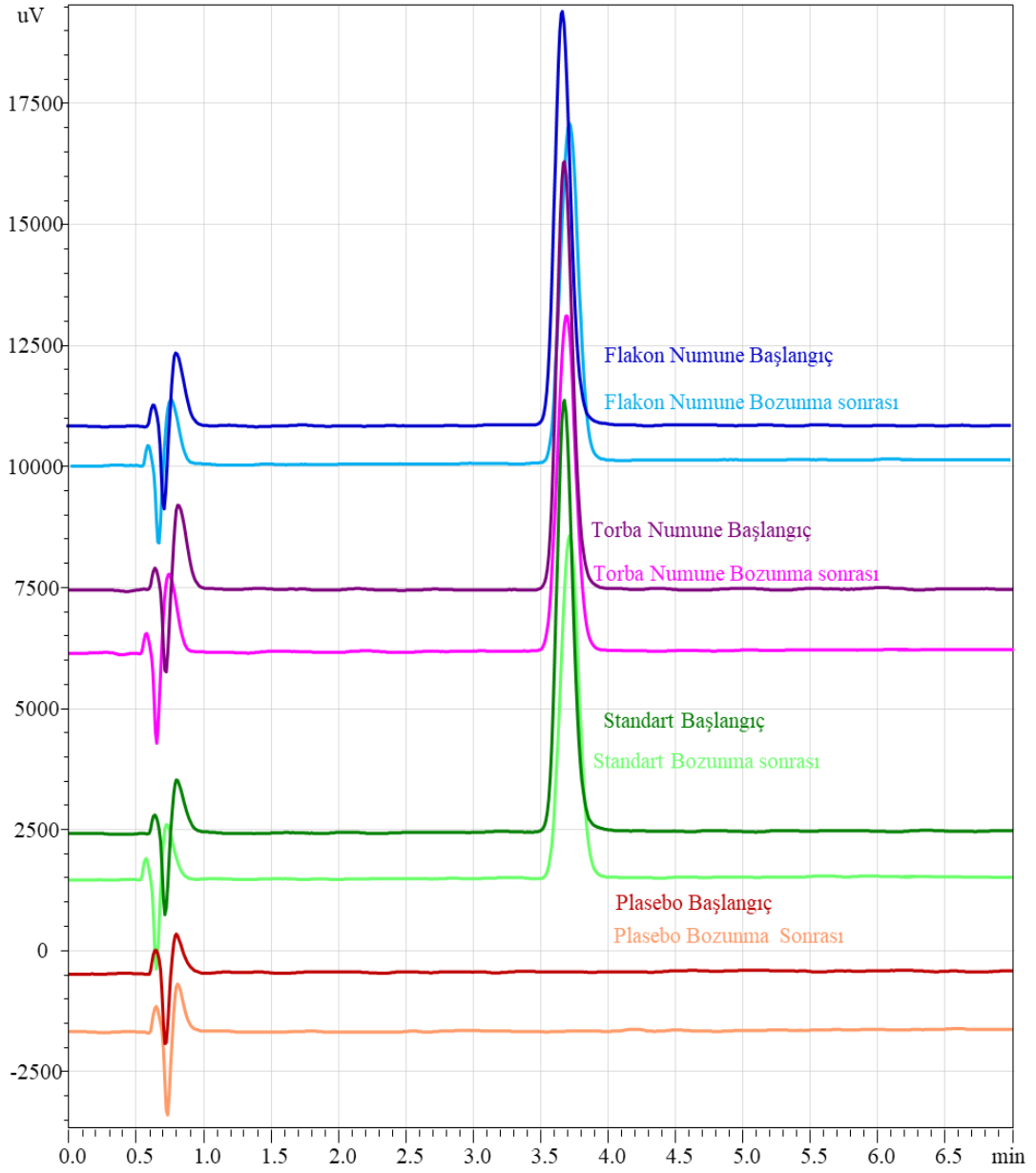
Gün Işığı bozundurma çalışması için çözeltiler bölüm 3.8.1.1. anlatıldığı gibi hazırlanmış olup enjeksiyon sonrası elde edilen veriler Tablo 4.2. de sunulmaktadır. Flakon numunesi 36 saat gün ışığına maruz kaldığında %2 değişim kabul kriterini karşılamamıştır. Gün ışığı bozundurma çalışmasında elde edilen başlangıç ve son enjeksiyonların karşılaştırılmış kromatogramları Şekil 4.2. 'de sunulmuştur.

Tablo 4.2. Gün ışığı bozundurma sonuçları.

Gün Işığına Maruz Kalma Zamanları Saat	Standart Çözeltisi		Torba Numunesi		Flakon Numunesi	
	Pik Saflık İndeks Değeri	% Fark	Pik Saflık İndeks Değeri	% Fark	Pik Saflık İndeks Değeri	% Fark
Başlangıç	0.999998	-	0.999997	-	0.999996	-
5.5	0.999984	-0.01	0.999996	-0.26	0.999997	0.88
9.5	1.000000	-0.32	0.999998	-0.10	0.999996	1.54
13.5	1.000000	0.99	0.999995	0.27	0.999998	0.99
18	0.999996	-1.04	1.000000	-0.65	0.999975	1.57
36	0.999956	-0.83	0.999992	-0.95	0.999949	4.53



Şekil 4.1. Karşılaştırmalı seçicilik kromatogramları.



Şekil 4.2. Gün ışığı bozundurma çalışması karşılaştırma kromatogramları.

4.2.2. Termal Bozundurma Çalışmaları

Termal bozundurma çalışması için çözeltiler bölüm 3.8.1.2. anlatıldığı gibi hazırlanmış olup enjeksiyon sonrası elde edilen veriler Tablo 4.3’ de sunulmaktadır. 35 saatin sonunda torba numunesi ve 95 saatin sonunda flakon numunesi fark yüzdeleri limit dışına çıkmıştır. Termal bozundurma çalışmasında elde edilen başlangıç ve son enjeksiyonların karşılaştırılmış kromatogramları Şekil 4.3. ‘de sunulmuştur.

Tablo 4.3. Termal bozundurma sonuçları.

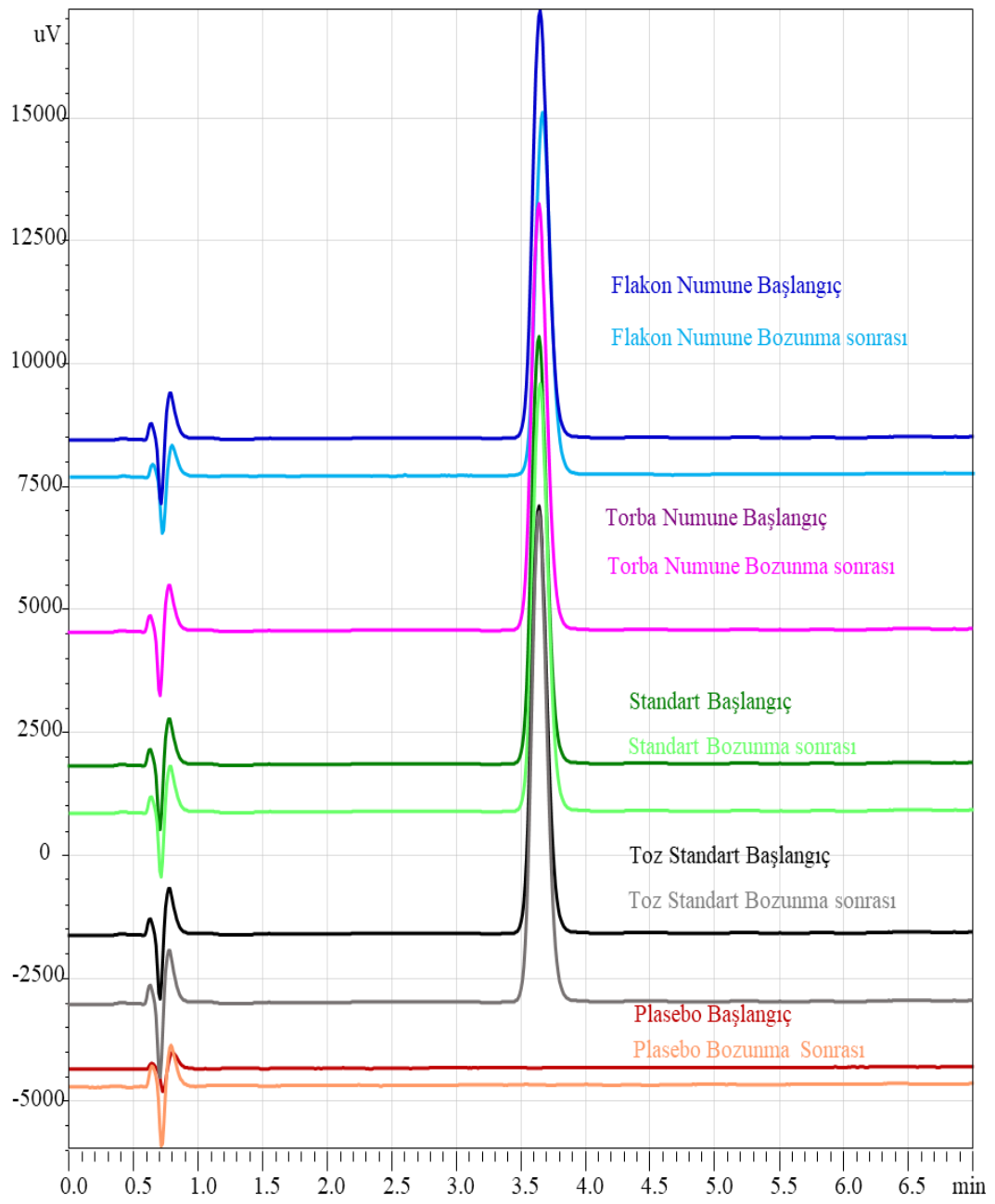
Bekletme Zamanları	Standart Çözeltisi		Torba Numunesi		Flakon Numunesi		Toz Standart Çözeltisi	
	Pik Safılık İndeks Değeri	% Fark	Pik Safılık İndeks Değeri	% Fark	Pik Safılık İndeks Değeri	% Fark	Pik Safılık İndeks Değeri	% Fark
Normal	0.999978	-	0.999970	-	1.000000	-	0.999978	-
8	1.000000	0.68	1.000000	-0.05	0.999974	0.38	0.999996	-0.87
11.25	0.999994	0.97	0.999995	0.19	0.999997	0.24	1.000000	-1.74
25.93	0.999978	0.38	0.999973	-1.12	1.000000	-1.29	0.999997	1.80
35	1.000000	1.65	0.999968	-1.39	0.999980	-2.35	1.000000	0.86
58.83	0.999970	0.23	0.999930	-1.53	0.999935	-4.43	0.999935	1.38
95.25	0.999971	-1.05	0.999941	-1.28	1.000000	-8.00	0.999983	4.94

4.2.3. Asit Bozundurma Çalışmaları

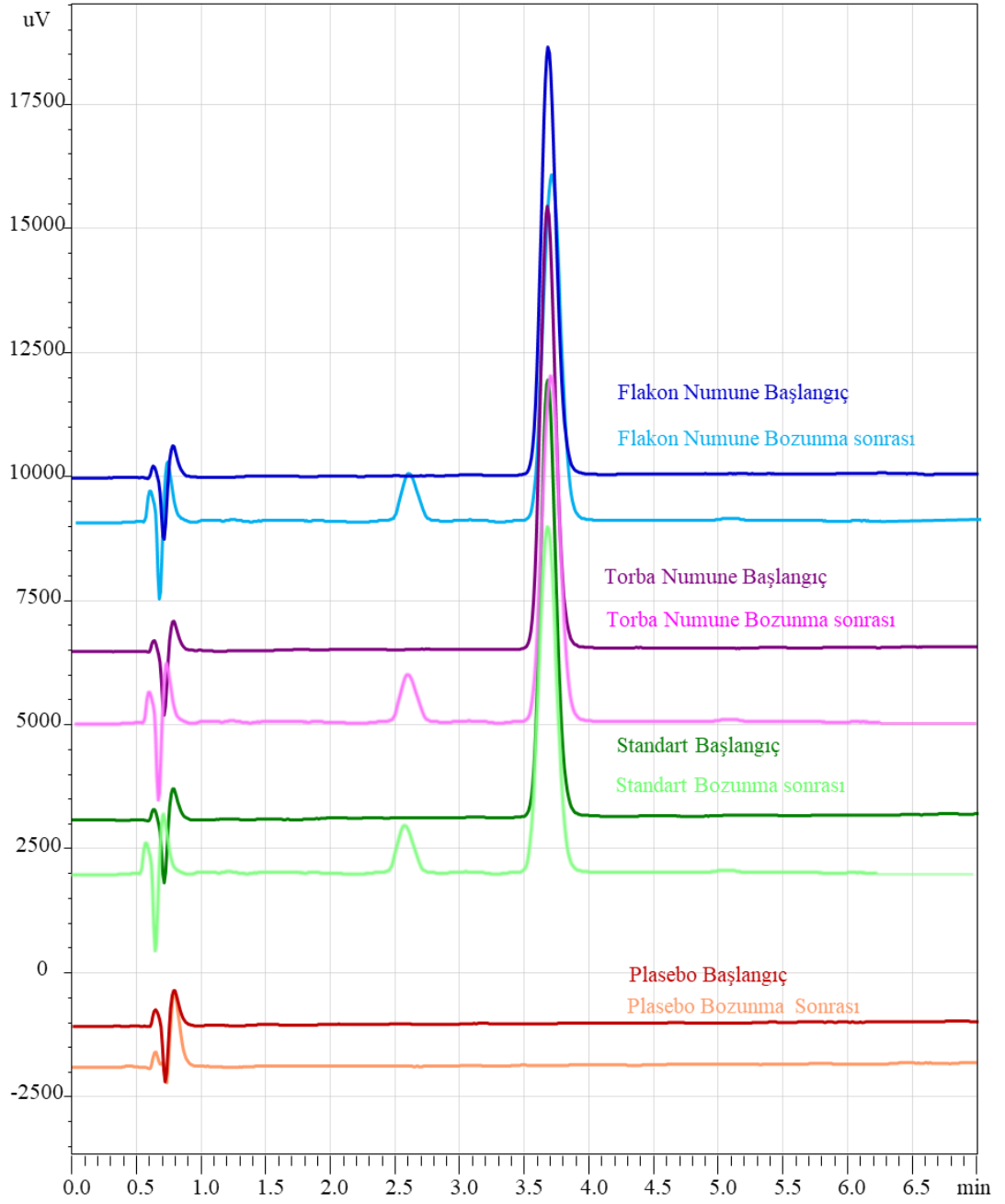
Asit bozundurma çalışması için çözeltiler bölüm 3.8.1.3. anlatıldığı gibi hazırlanmış olup enjeksiyon sonrası elde edilen veriler Tablo 4.4’ de sunulmaktadır. Asit ile bozunma 25. saatin sonunda başlarken 36. saatin sonunda hem standart hem de numunelerde % fark %2 ‘nin üzerinde görülmüştür. Asit bozundurma çalışmasında elde edilen başlangıç ve son enjeksiyonların karşılaştırılmış kromatogramları Şekil 4.4. ‘de sunulmuştur.

Tablo 4.4. Asit (1M HCl ile) bozundurma sonuçları.

Bekletme Zamanları	Standart Çözeltisi		Torba Numunesi		Flakon Numunesi	
	Pik Safılık İndeks Değeri	% Fark	Pik Safılık İndeks Değeri	% Fark	Pik Safılık İndeks Değeri	% Fark
Başlangıç	0.999998	-	0.999997	-	0.999996	-
7	1.000000	1.31	0.999998	0.71	1.000000	1.21
12	1.000000	-0.72	0.999985	-1.03	1.000000	-0.32
25	0.999998	-1.91	1.000000	-0.38	0.999999	-2.25
36	0.999999	-3.90	0.999980	-4.62	1.000000	-5.21



Şekil 4.3. Termal bozundurma çalışması karşılaştırma kromatogramları.



Şekil 4.4. Asit (1M HCl ile) bozundurma çalışması karşılaştırma kromatogramları.

4.2.4. Baz Bozundurma Çalışmaları

Baz bozundurma çalışması için çözeltiler bölüm 3.8.1.4. anlatıldığı gibi hazırlanmış olup enjeksiyon sonrası elde edilen veriler Tablo 4.5.' de sunulmaktadır. Sodyum hidroksit ile gerçekleştirilen bozunma çalışmasında 10 saatlik hızlı bir zamanın sonunda bozunma gözlemlenmiştir. Baz bozundurma çalışmasında elde edilen başlangıç ve son enjeksiyonların karşılaştırılmış kromatogramları Şekil 4.5. 'de sunulmuştur.

Tablo 4.5. Baz (1M NaOH ile) bozundurma sonuçları.

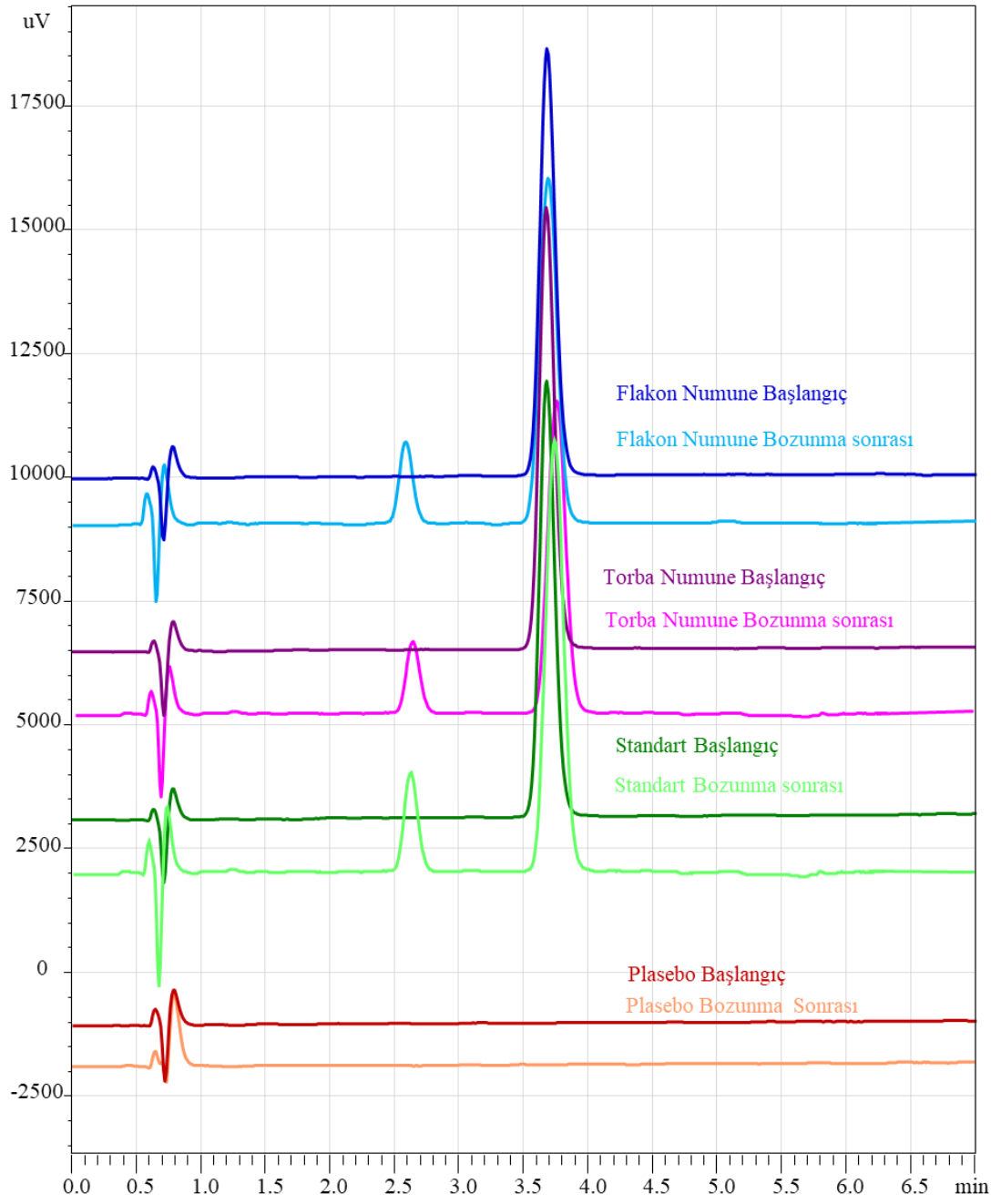
Bekletme Zamanları Saat	Standart Çözeltisi		Torba Numunesi		Flakon Numunesi	
	Pik Safılık İndeks Değeri	% Fark	Pik Safılık İndeks Değeri	% Fark	Pik Safılık İndeks Değeri	% Fark
Normal	0.999978	-	0.999970	-	1.000000	-
10.25	0.999980	-8.22	1.000000	-11.56	0.999981	-3.02
25.5	0.999994	-8.79	0.999917	-7.85	0.999998	-5.85
57	0.999942	-24.01	1.000000	-17.88	0.999994	-20.29

4.2.5. Hidrojen Peroksit Bozundurma Çalışmaları

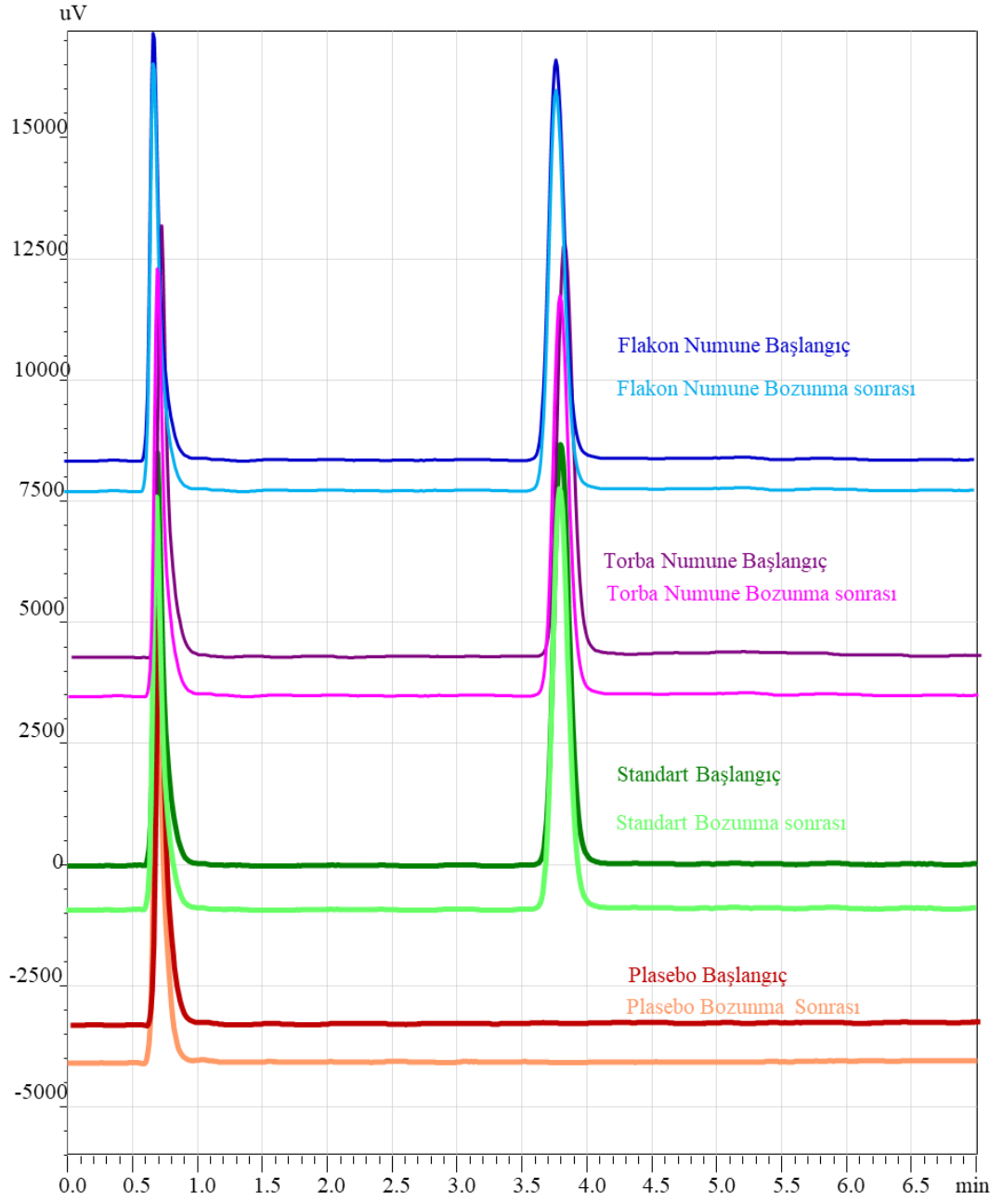
Hidrojen Peroksit bozundurma çalışması için çözeltiler bölüm 3.8.1.5. anlatıldığı gibi hazırlanmış olup enjeksiyon sonrası elde edilen veriler Tablo 4.6., 4.7., 4.8., 4.9., 4.10.'de sunulmuştur. 10 µl, 25 µl, 50 µl, 250 µl ve 500 µl %30'luk hidrojen peroksit eklenmesi ile bekletilen çözeltiler bozunmamıştır. Hidrojen peroksit bozundurma çalışmasında elde edilen başlangıç ve son enjeksiyonların karşılaştırılmış kromatogramları Şekil 4.6, 4.7., 4.8., 4.9. ve 4.10. 'da sunulmuştur.

Tablo 4.6. 10 µl hidrojen peroksit ile bozundurma sonuçları.

Bekletme Zamanları Saat	Standart Çözeltisi		Torba Numunesi		Flakon Numunesi	
	Pik Safılık İndeks Değeri	% Fark	Pik Safılık İndeks Değeri	% Fark	Pik Safılık İndeks Değeri	% Fark
Normal	0.999998	-	0.999997	-	0.999996	-
Başlangıç	0.999998	-1.08	0.999969	-1.68	1.000000	-0.62
0.5	0.999997	-0.27	1.000000	-1.75	0.999996	-0.25
1	0.999998	-0.28	0.999998	-1.87	0.999998	-0.39
4.5	0.999997	-0.68	0.999998	-1.78	0.999986	0.62
9	0.999998	-0.12	0.999999	-1.92	1.000000	-0.62
24	1.000000	-0.71	0.999992	-1.77	1.000000	-1.11



Şekil 4.5. Baz (1M NaOH ile) bozundurma çalışması karşılaştırma kromatogramları.



Şekil 4.6. 10 µl hidrojen peroksit ile bozundurma çalışması karşılaştırma kromatogramları.

Tablo 4.7. 25 µl hidrojen peroksit ile bozundurma sonuçları.

Bekletme Zamanları Saat	Standart Çözeltisi		Torba Numunesi		Flakon Numunesi	
	Pik Saflık İndeks Değeri	% Fark	Pik Saflık İndeks Değeri	% Fark	Pik Saflık İndeks Değeri	% Fark
Normal	0.999978	-	0.999970	-	1.000000	-
Başlangıç	0.999992	-0.76	0.999999	-0.20	0.999999	0.24
0.5	0.999999	-0.43	1.000000	-0.39	0.999995	0.18
1	0.999996	-0.49	0.999999	-0.36	0.999997	0.08
5	0.999995	-0.42	0.999968	-0.51	1.000000	-0.29

Tablo 4.8. 50 µl hidrojen peroksit ile bozundurma sonuçları.

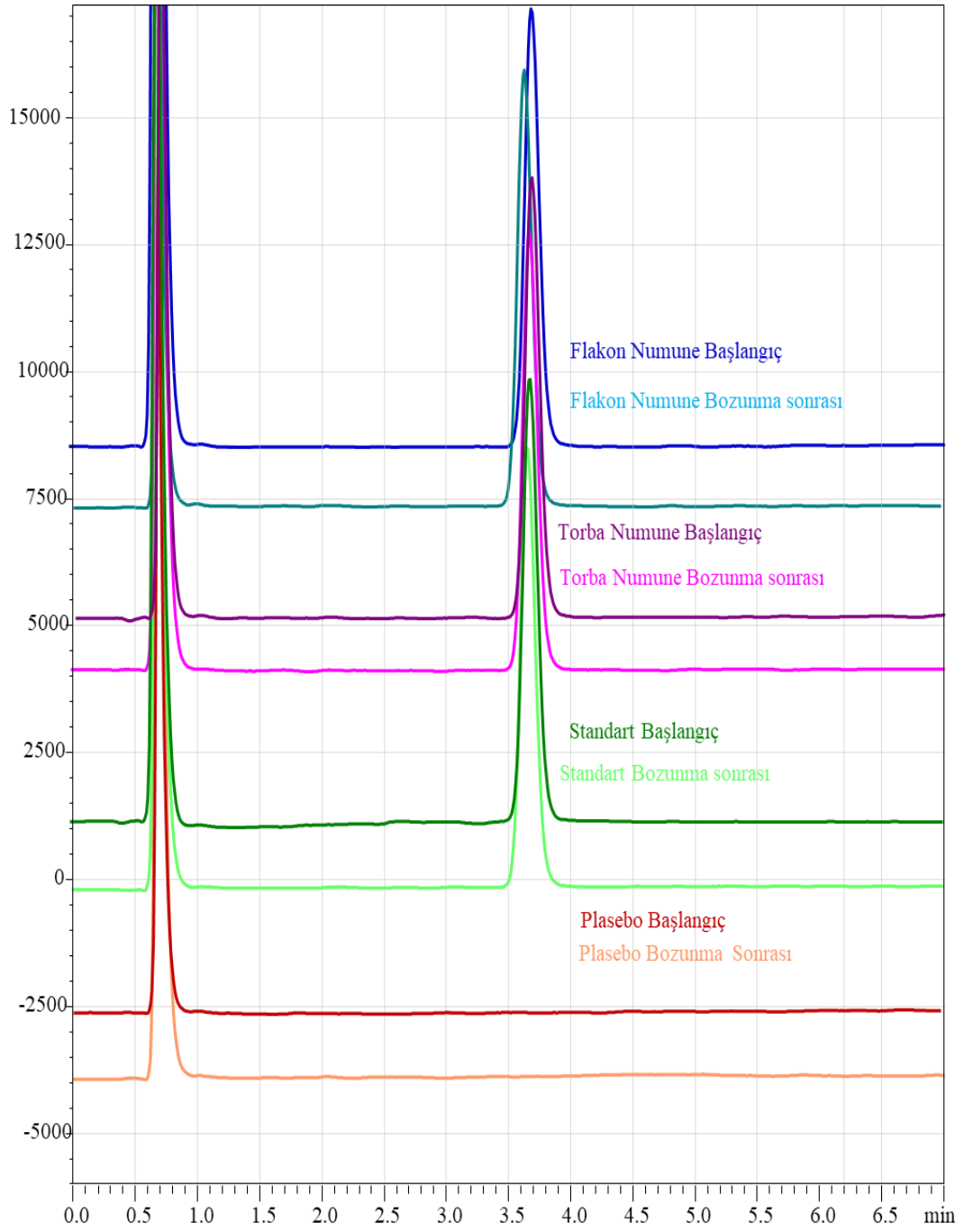
Bekletme Zamanları Saat	Standart Çözeltisi		Torba Numunesi		Flakon Numunesi	
	Pik Saflık İndeks Değeri	% Fark	Pik Saflık İndeks Değeri	% Fark	Pik Saflık İndeks Değeri	% Fark
Normal	0.999978	-	0.999970	-	1.000000	-
Başlangıç	0.999998	-0.70	0.999995	-1.40	1.000000	0.76
0.5	1.000000	-0.71	1.000000	-1.26	0.999999	0.63
1	1.000000	-0.69	0.999999	-1.37	1.000000	0.62

Tablo 4.9. 250 µl hidrojen peroksit ile bozundurma sonuçları.

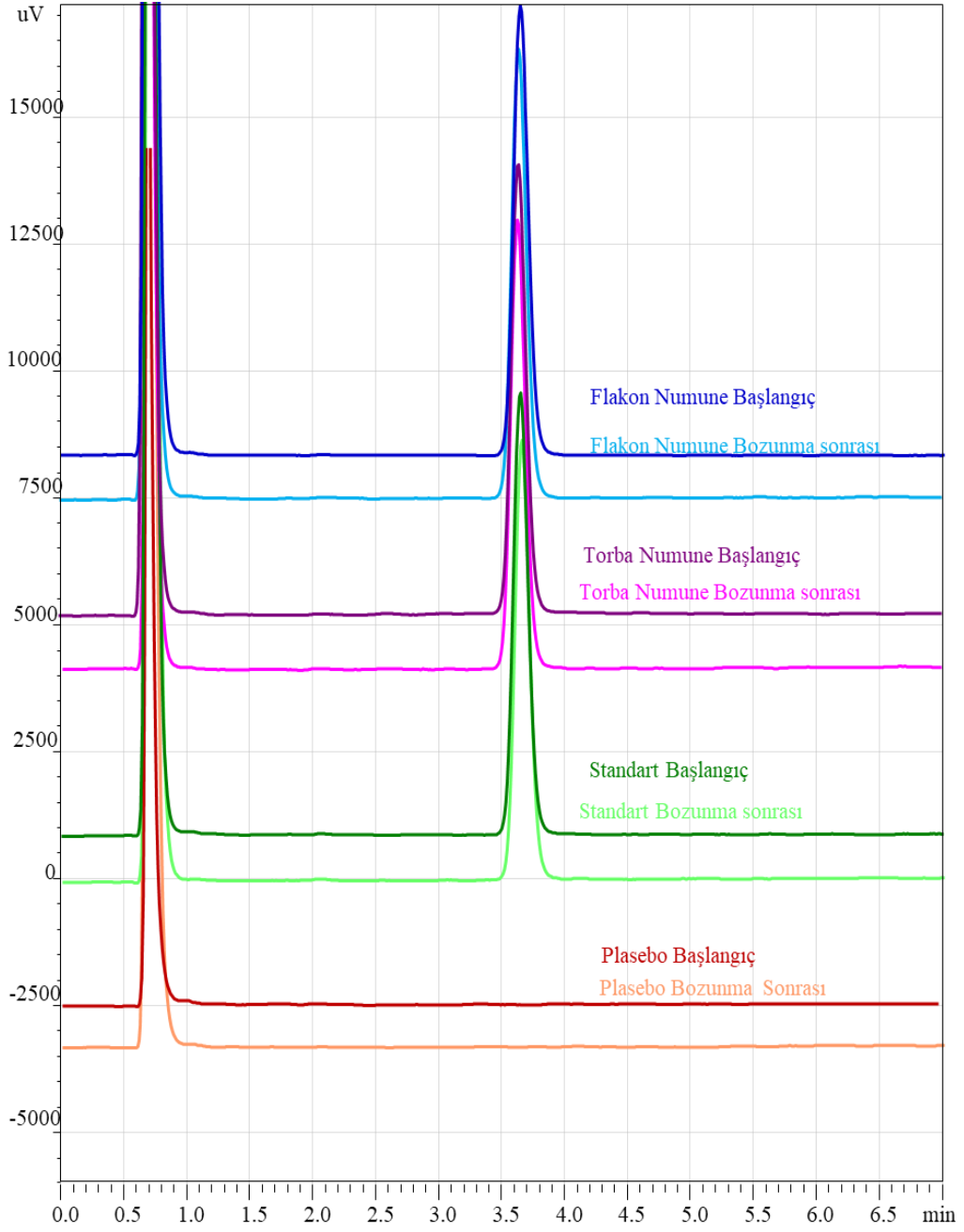
Bekletme Zamanları Saat	Standart Çözeltisi		Torba Numunesi		Flakon Numunesi	
	Pik Saflık İndeks Değeri	% Fark	Pik Saflık İndeks Değeri	% Fark	Pik Saflık İndeks Değeri	% Fark
Normal	0.999978	-	0.999970	-	1.000000	-
Başlangıç	1.000000	-0.94	0.999995	-0.87	0.999993	-0.94
2	1.000000	-0.48	1.000000	-0.51	1.000000	-1.03
3	1.000000	-0.78	0.999995	-0.78	0.999997	-1.14
16	0.999979	-1.40	0.999975	-0.59	0.999958	-1.01

Tablo 4.10. 500 µl hidrojen peroksit ile bozundurma sonuçları.

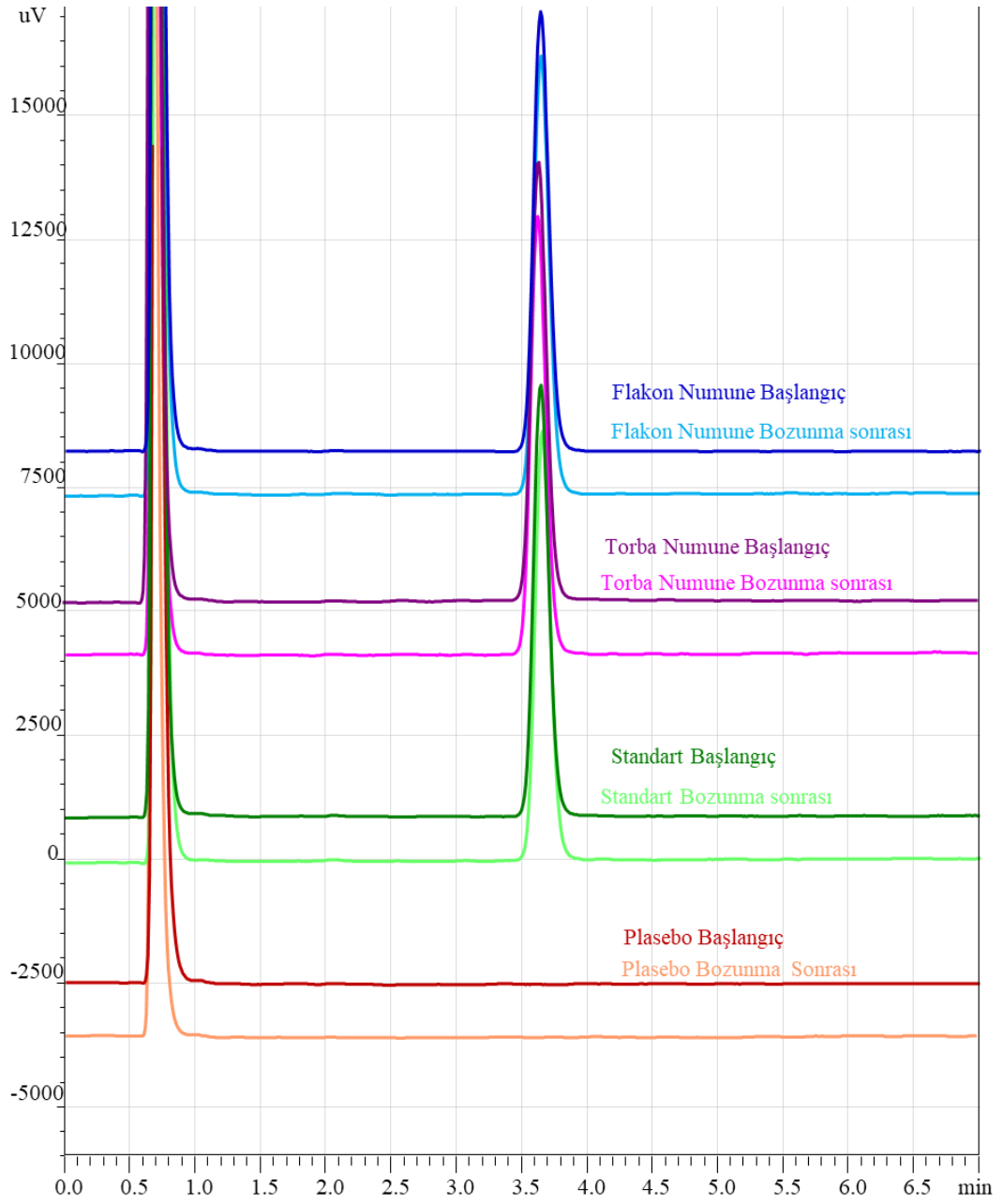
Bekletme Zamanları Saat	Standart Çözeltisi		Torba Numunesi		Flakon Numunesi	
	Pik Saflık İndeks Değeri	% Fark	Pik Saflık İndeks Değeri	% Fark	Pik Saflık İndeks Değeri	% Fark
Normal	0.999978	-	0.999970	-	1.000000	-
Başlangıç	0.999999	1.55	0.999999	-0.66	0.999996	-0.82
2	1.000000	1.88	1.000000	-0.03	0.999998	-1.12
3	0.999997	1.63	1.000000	-0.10	1.000000	-0.61
16	0.999984	1.29	0.999997	-1.01	0.999990	-1.30



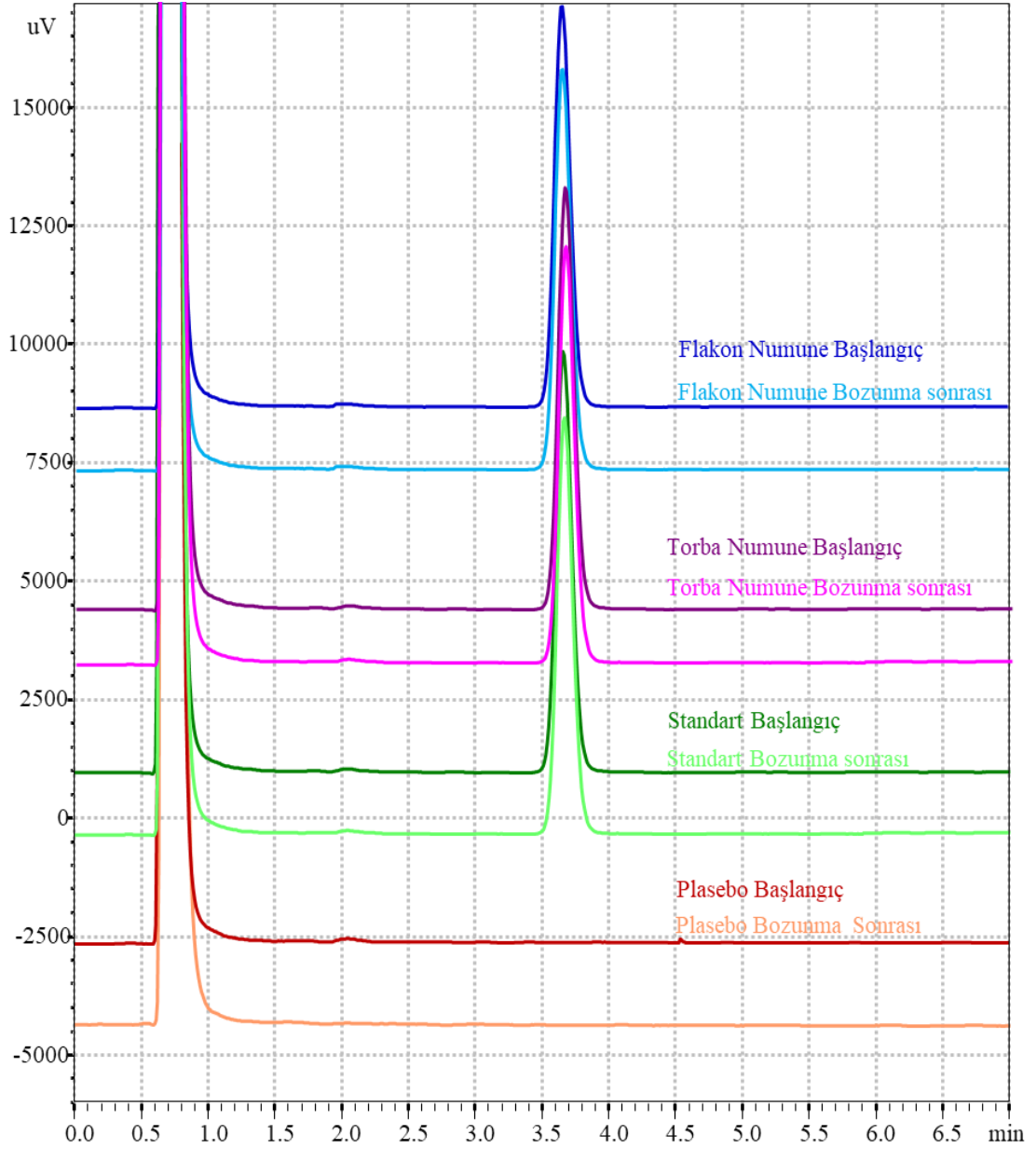
Şekil 4.7. 25 µl hidrojen peroksit ile bozundurma çalışması karşılaştırma kromatogramları.



Şekil 4.8. 50 µl hidrojen peroksit ile bozundurma çalışması karşılaştırma kromatogramları.



Şekil 4.9. 250 µl hidrojen peroksit ile bozundurma çalışması karşılaştırma kromatogramları.



Şekil 4.10. 500 µl hidrojen peroksit ile bozundurma çalışması karşılaştırma kromatogramları.

4.2.6. Hidrojen Peroksit ve Termal Bozundurma Çalışmaları

Hidrojen Peroksit ve termal bozundurma çalışması için çözeltiler bölüm 3.8.1.6. anlatıldığı gibi hazırlanmış olup enjeksiyon sonrası elde edilen veriler Tablo 4.11., 4.12.'de sunulmuştur. Oksidasyon etkisi ile sıcaklığın uygulanması sonucu çözeltiler direk bozunmaya başlamış ve hidrojen peroksit miktarın fazlalaştırılması bozunmayı daha da hızlandırmıştır. Filtre etkisini incelemek için hazırlanan çözeltilere ilişkin sonuçlar Tablo 4.13.'de sunulmuştur.

Tablo 4.11. 250 µl hidrojen peroksit ve termal etki ile bozundurma sonuçları.

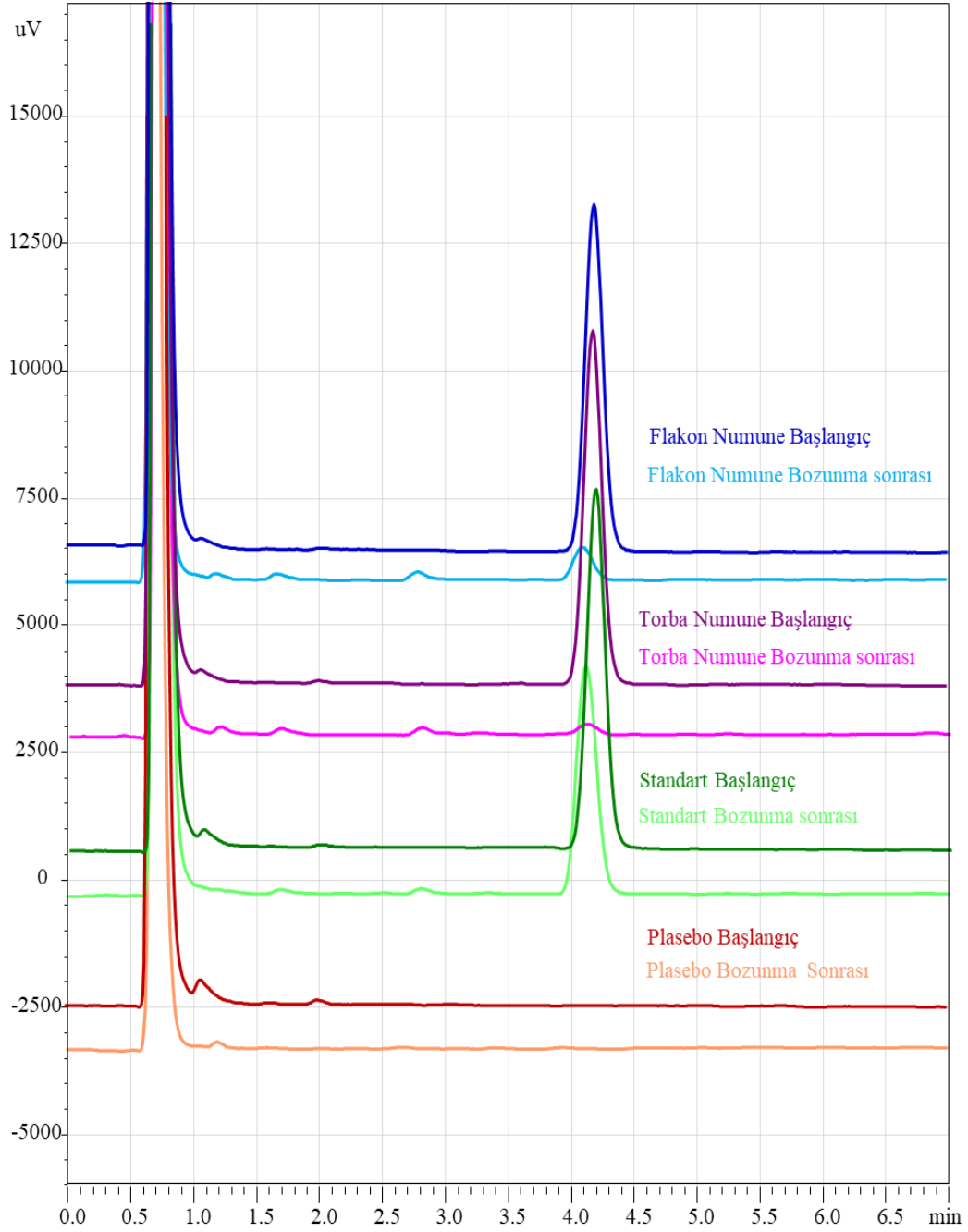
Bekletme Zamanları Saat	Standart Çözeltisi		Torba Numunesi		Flakon Numunesi	
	Pik Safılık İndeks Değeri	% Fark	Pik Safılık İndeks Değeri	% Fark	Pik Safılık İndeks Değeri	% Fark
Normal	0.999978	0.00	0.999970	0.00	1.000000	0.00
Başlangıç	0.999999	-2.14	0.999962	-5.32	0.999961	-5.10
7	0.999999	-4.16	0.999978	-21.55	0.999963	-12.30
8	0.999997	-3.82	1.000000	-21.71	0.999982	-12.18
31	0.999973	-32.98	Hesaplanamamıştır	-97.47	0.999580	-90.72
32	0.999855	-33.00	Hesaplanamamıştır	-97.22	0.999088	-90.35

Tablo 4.12. 500 µl hidrojen peroksit ve termal etki ile bozundurma sonuçları.

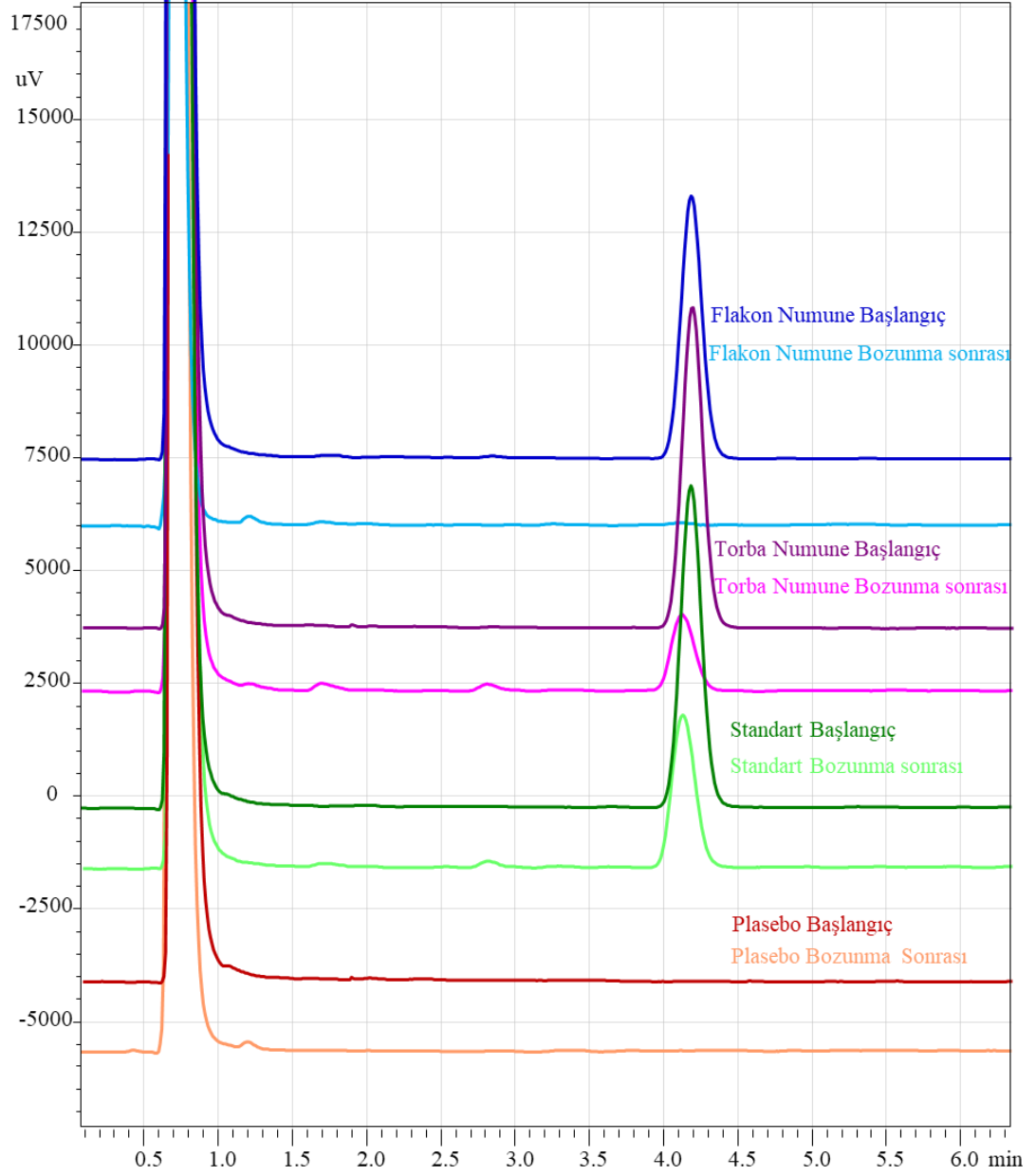
Bekletme Zamanları Saat	Standart Çözeltisi		Torba Numunesi		Flakon Numunesi	
	Pik Safılık İndeks Değeri	% Fark	Pik Safılık İndeks Değeri	% Fark	Pik Safılık İndeks Değeri	% Fark
Normal	0.999978	0.00	0.999970	0.00	1.000000	0.00
Başlangıç	0.999954	-2.88	0.999996	-4.42	0.999969	-19.12
7	0.999994	-27.22	0.999969	-8.83	0.999933	-35.71
8	0.999995	-27.21	0.999961	-8.51	0.999946	-35.29
31	0.999935	-50.15	0.999955	-75.28	Hesaplanamamıştır	-99.44
32	0.999855	-49.74	0.999271	-75.44	Hesaplanamamıştır	-99.36

Tablo 4.13. Filtre etkisi sonuçları.

FİLTRE	Miktar Tayini (mg/ml)		%Fark	
	Torba	Flakon	Torba	Flakon
0.45 NY	10.05	9.92	-	-
0.45 RC	10.00	9.84	-0.54	-0.84
0.20 RC	9.97	9.88	-0.83	-0.39
0.20 NY	10.05	9.87	-0.05	-0.54
0.20 PTFE	9.97	9.96	-0.84	0.44
0.45 PTFE	9.95	9.89	-1.02	-0.33



Şekil 4.11. 250 µl hidrojen peroksit ve termal bozundurma çalışmasının karşılaştırma kromatogramları.



Şekil 4.12. 500 µl hidrojen peroksit ve termal bozundurma çalışmasının karşılaştırma kromatogramları.

4.3. Kesinlik

Kesinlik çalışmasında enjeksiyon tekrarlanabilirliği verileri sistem uygunluk bulgularında yer alan Tablo 4.1. incelendiğinde %BSS, teorik plaka sayısı, kuyruklanma faktörü pik saflık indeksi değeri raporlandırılmıştır. kabul kriterleri içerisinde bulunmuştur.

Numune enjeksiyonlarına ait alan verileri ile raporlandırılan tekrarlanabilirlik verileri (Bkz. Tablo 4.14.) %95 güvenlik sınırları içerisinde incelenmiş ve bağlı standart sapma değerleri rapolandırılmıştır.

Numune enjeksiyonlarına ait 1. ve 2. gün miktar tayini sonuçları istatistiksel olarak T-testine tabi tutulmuştur (Bkz. Tablo 4.15.).

Tablo 4.14. Tekrarlanabilirlik sonuçları.

	Numune Sayısı	Alan		Numune Sayısı	Alan
Torba Numuneleri	1	76437	Flakon Numuneleri	1	75041
		76261			74978
	2	75907		2	75479
		76297			75452
	3	76123		3	75490
		76199			75407
	4	76500		4	75432
		76354			75548
	5	76396		5	75266
		76493			75511
	6	76619		6	75388
		76624			75558
	Ortalama	76350.83		Ortalama	75379.17
	SS	209.195		SS	190.015
	%BSS	0.274		%BSS	0.252
	%95 Güvenilirlik üst limiti	76570.36		%95 Güvenilirlik üst limiti	75578.57
	%95 Güvenilirlik alt limiti	76131.30		%95 Güvenilirlik alt limiti	75179.77
	%95 CL	76350.83±219.5		%95 CL	75379.17±199.4

Tablo 4.15. Tutarlılık sonuçları.

Torba Numuneleri (mg/ml)		Flakon Numuneleri (mg/ml)	
I. Gün	II. Gün	I. Gün	II. Gün
10.09	10.12	9.91	10.00
10.06	10.15	9.90	10.00
10.02	10.00	9.97	9.89
10.07	10.04	9.97	9.92
10.05	10.00	9.97	9.91
10.06	9.96	9.96	9.92
10.10	10.03	9.96	9.87
10.08	10.05	9.98	9.86
10.08	10.05	9.94	9.88
10.09	10.01	9.97	9.90
10.11	10.10	9.96	9.98
10.11	10.13	9.98	9.98
T.TESTİ >0.05			
0.23		0.062	

4.4. Doğrusallık

Bu parametrenin çalışılmasında stok standart çözeltisi kullanılarak 3.1. tablosunda derişimleri belirtilen 7 farklı noktadaki çözeltiler ile 6 tekrarlı kalibrasyon çalışması hazırlanarak elde edilen sonuçların excellde Anova testi ile elde edilen istatistiksel veriler 4.16. tablosunda sunulmuştur.

Tablo 4.16. Doğrusallık sonuçlarının istatistiksel verileri.

Kalibrasyon	Eğim	Kesişim	r ²	P (eğim)	P (kesişim)	F değeri
1	29875.16±483.84	1034.17±1465.09	0.99869	2.11x10 ⁻⁸	0.51	2.11x10 ⁻⁸
2	29471.62±292.94	-1569.51 ±880.17	0.99951	1.84x10 ⁻⁹	0.13	1.84x10 ⁻⁹
3	29896.90±189.80	-85.12±570.26	0.9998	1.96x10 ⁻¹⁰	0.89	1.96x10 ⁻¹⁰
4	29809.76±162.93	23.12±489.56	0.99985	9.26x10 ⁻¹¹	0.96	9.26x10 ⁻¹¹
5	30267.19±165.38	26.06±493.01	0.99985	9.24x10 ⁻¹¹	0.96	9.24x10 ⁻¹¹
6	30034.05±164.59	18.13±486.80	0.99985	9.38x10 ⁻¹¹	0.97	9.38x10 ⁻¹¹

4.5. Alt Tayin Sınırı Bulguları

Doğrusallık parametresi çalışıldığında S/N değerinin yaklaşık 10 olduğu değere inilerek çalışılmış olup edilen değer 4.17 tablosunda sunulmuştur. Bu değer doğrusallık alt derişim değeridir.

Tablo 4.17. LOQ sonuçları.

% Derişim	S/N
25	9.25
	9.65
	9.72

4.6. Gözlenebilme Sınırı

Dedeksiyon limiti için hazırlanan çözeltilerin kromatogramları değerlendirilmiş ve bulunan S/N sonuçları Tablo 4.18. 'da sunulmuştur.

Tablo 4.18. LOD sonuçları.

% Derişim	S/N
8.25	2.95
	2.90
	2.87

4.7. Doğruluk (Geri Kazanım)

Parasetamol için bulunan analiz sonuçlarının gerçek değerden sapması tanımlanan doğrusallık standart çözeltilerine karşı % geri kazanımları açısından incelenmiştir. Doğrusallık analizinde bulunan regresyon doğru denklemi ile doğruluk enjeksiyonlarından elde edilen alan değerleriyle derişim değerlerine ulaşarak geri kazanım hesaplanmıştır. 3 paralel çalışılan doğruluk noktaları gün içi ve günler arası veriler geri kazanım yüzdesinin %98-102 arasında kaldığını ve bağıl standart sapma değerinin %2 küçük olduğunu kanıtlamıştır.

Tablo 4.19. Doğruluk verilerinin gün içi ve günler arası değerlendirme sonuçları.

GÜN İÇİ % Geri Kazanım		GÜNLER ARASI % Geri Kazanım
% 25	101.78	101.91
	101.99	101.23
	101.96	101.00
	x 101.91	x 101.38
	SS 0.11	SS 0.47
	BH 0.02	BH 0.01
	% BSS 0.11	% BSS 0.47
% 50	100.74	100.60
	100.36	100.05
	100.71	99.36
	x 100.60	x 100.01
	SS 0.21	SS 0.62
	BH 0.01	BH 0.00
	% BSS 0.21	% BSS 0.62
% 80	100.48	100.57
	100.48	100.29
	100.74	101.06
	x 100.57	x 100.64
	SS 0.15	SS 0.39
	BH 0.01	BH 0.01
	% BSS 0.15	% BSS 0.39
% 100	100.58	101.14
	101.80	101.15
	101.04	100.79
	x 101.14	x 101.03
	SS 0.62	SS 0.21
	BH 0.01	BH 0.01
	% BSS 0.61	% BSS 0.21
% 120	101.89	101.85
	101.75	101.17
	101.92	101.50
	x 101.85	x 101.51
	SS 0.09	SS 0.34
	BH 0.02	BH 0.02
	% BSS 0.09	% BSS 0.34
% 150	101.48	101.37
	101.38	100.83
	101.24	100.63
	x 101.37	x 100.94
	SS 0.12	SS 0.38
	BH 0.01	BH 0.01
	% BSS 0.12	% BSS 0.38
% 200	100.57	100.55
	100.22	100.48
	100.87	101.83
	x 100.55	x 100.96
	SS 0.33	SS 0.76
	BH 0.01	BH 0.01
	% BSS 0.32	% BSS 0.75

4.8. Sağlamlık

Bu çalışmada sistem şartları olarak dalga boyu, akış hızı, kolon firını sıcaklığı, hareketli faz pH değeri ve organik faz oranı değişiklikleri yapılarak incelenen sağlamlık parametrelerine ait sonuçlar Tablo 4.20., 4.21., 4.22. 4.23., ve 4.24., 'de sunulmaktadır. İlgili tablolarda yer alan veriler incelendiğinde bağıl standart sapmanın %2 değerinden küçük olduğu görülmektedir. Yöntem için yapılan küçük değişiklikler kritik değildir.

Tablo 4.20. Dalga boyu değişimi sağlamlık sonuçları.

	252 nm		256 nm	
	RT	Alan	RT	Alan
	4.315	81760	4.315	68553
	4.322	81930	4.322	68655
	4.330	81732	4.330	68509
	4.345	82248	4.345	68939
	4.357	82434	4.357	68885
	4.359	82056	4.359	68539
Ortalama	4.3	82026.7	4.3	68680.0
SS	0.0	276.8	0.0	187.1
%BSS	0.4	0.3	0.4	0.3

Tablo 4.21. Akış hızı değişimi sağlamlık sonuçları.

	0.95 ml/dk		1.05 ml/dk	
	RT	Alan	RT	Alan
	3.886	83115	3.530	75201
	3.883	83381	3.520	75196
	3.890	83401	3.524	75358
	3.890	83386	3.524	75308
	3.892	83408	3.527	75267
	3.887	83311	3.526	75309
Ortalama	3.9	83333.7	3.5	75273.2
SS	0.0	112.6	0.0	64.6
%BSS	0.1	0.1	0.1	0.1

Tablo 4.22. Kolon sıcaklığı değişimi sağlamlık sonuçları.

	28 °C		32 °C	
	RT	Alan	RT	Alan
	4.632	75793	4.187	75626
	4.632	75560	4.183	75668
	4.637	75357	4.187	75352
	4.639	75513	4.189	75781
	4.644	75226	4.193	75742
	4.646	75309	4.197	75361
Ortalama	4.638	75459.7	4.2	75588.3
SS	0.01	205.8	0.0	187.6
%BSS	0.13	0.3	0.1	0.2

Tablo 4.23. pH değeri değişimi sağlamlık sonuçları.

	pH 6.848		pH 7.042	
	RT	Alan	RT	Alan
	4.086	75800	4.065	75992
	4.139	75546	4.133	75619
	4.143	75461	4.216	75492
	4.143	75852	4.237	75791
	4.137	75445	4.237	75637
	4.134	75955	4.233	75797
Ortalama	4.130	75676.5	4.2	75721.3
SS	0.02	219.4	0.1	175.5
%BSS	0.53	0.3	1.7	0.2

Tablo 4.24. Hareketli faz oranı değişimi sağlamlık sonuçları.

	Hareketli Faz A:B (%94:%6)		Hareketli Faz A:B (%96:%4)	
	RT	Alan	RT	Alan
	3.865	75944	5.145	75089
	3.869	75868	5.135	75188
	3.872	76010	5.142	74890
	3.871	75840	5.145	75334
	3.873	75978	5.144	75498
	3.875	76211	5.149	74816
Ortalama	3.871	75975.2	5.1	75135.8
SS	0.0	132.3	0.0	260.0
%BSS	0.1	0.2	0.1	0.3

4.9. Çözelti Stabilitesi

Standart ve Numune çözeltileri oda sıcaklığında, oto örnekleyici sıcaklığında (15 °C) ve 4 °C sıcaklıkta 30 gün boyunca hava almayacak şekilde bekletilerek elde edilen sonuçlar tablo 4.25., 4.26. ve 4.27.'de sunulmuştur. Geliştirilen yöntem bitmiş ürün analizleri esnasında kullanılan çözeltilerin 30 gün boyunca belirtilen şartlarda stabil olduğunu göstermiştir.

Tablo 4.25. Standart çözeltisinin stabilite sonuçları.

Stabilite Zamanları	15 °C		4 °C		Oda Şartlarında	
	Alan	% Fark	Alan	% Fark	Alan	% Fark
Başlangıç	75660	0.00	75660	0.00	75660	0.00
72 saat	75921	0.34	75687	0.04	75961	0.40
168 saat	75832	0.23	75677	0.02	75603	-0.08
408 saat	75307	-0.47	75150	-0.67	74689	-1.28
720 saat	75383	-0.37	74959	-0.93	74959	-0.93

Tablo 4.26. Torba numunesi çözeltisinin stabilite sonuçları.

Stabilite Zamanları	15 °C			4 °C			Oda Şartlarında		
	Alan	Miktar Tayini (mg/ml)	% Fark	Alan	Miktar Tayini (mg/ml)	% Fark	Alan	Miktar Tayini (mg/ml)	% Fark
Başlangıç	77195	10.31	0.00	77195	10.31	0.00	77195	10.31	0.00
72 saat	77688	10.37	0.64	77906	10.40	0.92	77585	10.36	0.51
168 saat	77542	10.35	0.45	77788	10.39	0.77	77338	10.33	0.19
408 saat	77240	10.31	0.06	77269	10.32	0.10	76965	10.28	-0.30
720 saat	77310	10.32	0.15	77393	10.33	0.26	76047	10.15	-1.49

Tablo 4.27. Flakon numunesi çözeltisinin stabilite sonuçları.

Stabilite Zamanları	15 °C			4 °C			Oda Şartlarında		
	Alan	Miktar Tayini (mg/ml)	% Fark	Alan	Miktar Tayini (mg/ml)	% Fark	Alan	Miktar Tayini (mg/ml)	% Fark
Başlangıç	76148	10.17	0.00	76148	10.17	0.00	76148	10.17	0.00
72 saat	75821	10.12	-0.43	76471	10.21	0.42	76381	10.20	0.31
168 saat	75829	10.13	-0.42	76304	10.19	0.20	76024	10.15	-0.16
408 saat	75846	10.13	-0.40	76058	10.15	-0.12	75307	10.05	-1.10
720 saat	74817	9.99	-1.75	74817	9.99	-1.75	76047	10.15	-0.13

5. TARTIŞMA

Parasetamol etken maddesinin farklı farmasötik preparatlarda kullanımının olması ve kullanıcıların yaş aralığının geniş olması ayrıca hamile ve emzirme dönemindeki kadınlar tarafından da kullanılmasının güvenilir görülmesi bitmiş ürünlerin analizlerin bir o kadar hassas yöntemler ile gerçekleştirilmesini gerektirmektedir.

Etken maddenin hangi şartlar altında miktar tayinin etkilendiğini bilmek, saklama şartlarını belirlemek, bitmiş ürün üretim süreçlerini tasarlamak, ambalajını seçmek ve raf ömrü belirlemede stabilite testlerini takip etmek için stabilite göstergeli yöntem kullanmak gereklidir.

Parasetamol pikinin alıkonma zamanında matriksten kaynaklı girişim bulunmaması yöntemin seçici olduğunu kanıtlarken zorlandırılmış bozunma çalışmalarında (gün ışığı, termal, asit, baz, hidrojen peroksit ve hidrojen peroksit-termal) korunan pik saflık indeks değeri bu yöntemin stabilite göstergeli yöntem olduğunu kanıtlamıştır. Bozundurma çalışmalarında parasetamolün etki-zaman sonuçlar incelendiğinde baz ve asit etkisi göz arda edilemez veri sağlarken; oksidasyon etkisine termal etkinin eklenmesi ile elde edilen sonuçlar daha fazladır. Zorlandırılmış koşulların etkileri; *Termal+oksidasyon > baz > asit > gün ışığı ≈ oksidasyon ≈ termal* şeklinde özetlenebilir.

Kesinlik verileri incelendiğinde; enjeksiyon tekrarlanabilirliği alıkonma zamanlarına ve alanlara ait bağıl standart sapma sırasıyla %0.22 ve %0.23 bulunmuştur. Tekrarlanabilirlik verileri her iki ambalaj formu için % 95 güven aralığı sağlarken torba ve flakon için bağıl standart sapma sırasıyla % 0.274 ve % 0.252 olarak raporlandırılmıştır. İki ayrı günde iki farklı analist tarafından hazırlanan torba ve flakon numunelerine (n=6) ait istatistiksel değerlendirmelerin sonuçlarının 0.05'den büyük (0.23 ve 0.062) bulunması yani anlamlı bir farkın çıkmaması. yöntemin kesinliği destekleyen veridir.

Analize başlayabilmenin ön değerlendirmesi olan sistem uygunluk parametresi için hazırlanan standart çözeltisi 1. ve 2. gün çalışmaları ile elde edilen sonuçlar incelendiğinde %BSS, teorik plaka sayısı, kuyruklanma faktörü, pik saflık indeks değeri ve metanol enjeksiyonunun alıkonma zamanı ile hesaplanan kapasite faktörü

raporlandırılmış ve kabul kriterleri içerisinde bulunduğu tespit edilmiştir. Ayrıca iki standarda ilişkin benzerliğin %99.61 ile sistemin uygun olduğunu göstermektedir.

Parasetamol derişiminin pik alanına oranının grafiğe geçirilmesi sonucu elde edilen kalibrasyon eğrilerin 0.625-5.0 µg/ ml çalışma aralığında doğrusal olduğu; grafik yöntemi ve istatistiksel olarak saptanmıştır. Grafik yönteminde standart çözeltilerin olması gereken derişimlerine karşı kalibrasyon denkleminde bulunan derişimleri grafiğe geçirilmiş ve sonuçta bir doğru elde edilmesi ile doğrusallık test edilmiştir.

Tanımlayıcılık katsayıları (r^2) çizilen altı doğrusallık çalışması için sırasıyla 0.99869, 0.99951, 0.9998, 0.99985, 0.99985 ve 0.99985 bulunmuştur. Bu değerler, çizilen kalibrasyon eğrilerinin bir doğru olduğunu göstermektedir. Ayrıca doğrusallıktan ayrılışın ve korrelasyon katsayılarının önem kontrolü yapılarak doğrusallıktan ayrılışlarının önemsiz olduğu ve korrelasyon katsayılarının önemli bir değer olduğu istatistiksel olarak saptanmıştır.

Miktar tayini limiti (LOQ) kalibrasyon eğrisindeki en düşük derişim değeri olarak çalışılmış (0.625 µg/ml) ve bu derişime ait enjeksiyonlara ait S/N oranı yaklaşık 10 olarak tespit edilmiştir. Dedeksiyon limiti bulunan S/N değeri yaklaşık 3 olduğu derişim ise 0.206 µg/ ml'dir.

Doğrusallık regresyon doğru denklemi ile doğruluk enjeksiyonlarından elde edilen alan değerleriyle derişim değerlerine ulaşarak hesaplanan geri kazanım sonuçları %98-102 arasındadır ve bağıl standart sapma değerinin % 2 küçüktür. 7 ayrı noktada paralel çalışılan doğrusallık ve doğruluk derişimlerinin minimum ve maksimum değeri 0.625-5.0 µg/ ml çalışmanın aralığını vermektedir.

Analiz sırasında yöntemi oluşturan parametrelerin değişikliği ile analiz sonucuna etki edebilecek dalga boyu, akış hızı, kolon fırını sıcaklığı, hareketli faz pH değeri ve organik faz oranında yapılan küçük değişiklikler kritik olmaması yöntem sağlamlığını göstermiştir.

Filtre derişiminin etkisi incelemek üzere kullanılan 0.45 NY, 0.45 RC, 0.20 RC, 0.20 NY, 0.20 PTFE, 0.45 PTFE filtrelele ait analiz sonuçları anlamlı bir farka sebep olmadığından rutin analizlerde enjeksiyon verilen her çözelti bu filtrelerin bir tanesi ile hazırlanabileceği belirlenmiştir.

Parasetamol standart çözeltilisinin (2.50 µg/ ml) çözelti stabilitesi çalışması yapılmıştır. Bunun için oda sıcaklığında, oto örnekleyici sıcaklığında ve buzdolabında saklanan çözeltilerinin 30 gün boyunca enjeksiyonları verilmiştir. Bu süre içinde enjeksiyonların alanlarında anlamlı bir azalma gözlenmemiştir. Böylece standart çözeltilisinin en az 30 gün boyunca stabil olduğu gözlenilmiştir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

İlaç endüstrisinde test yönteminin validasyonunu gerçekleştirmek için seçim, çalışmanın amacına ve düzenlenmiş analitik laboratuvarlarda geçerli uyumluluk kılavuzlarına dayanmalıdır. Belirli bir analiz yöntemi için en değerli olduğu düşünülen bilgileri elde etmek için bir test yöntemi doğrulama çalışması dikkatlice tasarlanmalıdır. İlgili hedef, analizin bütünlüğünü sağlamak ve böylece genel performans kalitesini iyileştirmektir.

YPSK, ilgili maddenin matrisler ile girişiminin engellenmesi için hareketli fazın yeni kombinasyonları ve kullanılan kolon çeşitliğini sebebiyle tercih edilen yöntemlerin başında gelmektedir. DAD dedektörü, tek dalga boyu dedektörlerine göre biraz daha az hassas olmasına rağmen pikin tanımlaması ve pik saflığının izlenmesi için yararlı olduğundan stabilite göstergeli yöntem çalışması için gereklidir.

Parasetamol, tek etki düşünüldüğünde asit, baz, termal olarak etkilenirken, çoklu etki düşünüldüğünde oksidasyon ve termal şartlardan oldukça etkilenmektedir. Sıvı preparat üreticilerinin bu etkileri göz önüne aldıklarında üretim proseslerine ait adımları belirlerken su içerisindeki oksijen miktarını, pH aralığının kaç olacağını ve sterilizasyon gerekli ise hangi şartlarda yapılacağını dikkate alarak farmasötik gelişim çalışmalarında etkin maddenin miktar tayinin girişim olmadan belirlenmesi çok önemlidir. Ayrıca; üretim prosesi kadar primer ve sekonder ambalaj seçimin ürünün raf ömrünü belirlemede etkili olduğu bilinmektedir. Geliştirilen yöntemin seçici olması ve farklı primer ambalaj içeren farmasötik ürünlere uygulanabilirliğini gösterilmiş olması yöntemin uygulanabilirliğini saptamıştır.

Tez çalışmasında elde edilen sonuçlar göstermiştir ki belirlenen kromatografik şartlarda yapılan analiz parasetamol tayini için hızlı, seçici, güvenilir, doğru ve tutarlıdır. Zorlanmış bozunma çalışmaları yöntemin kararlılığını gösterme gücünü kanıtlamıştır. Ayrıca geliştirilen yöntemin hızlı ve ilaç endüstrisinde yaygın olarak kullanılan YPSK cihazının analizde kullanılması geliştirilen yöntemin rutin analizlerde kullanılabileceği öngörülmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Harmonised Tripartite Guideline: Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R2). 2022.
2. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. Guidance for Industry: Analytical Procedures and Methods Validation. 2015.
3. Alsante KM, Andob A, Brown R, Ensing J, Hatajik T, Kongd W, Tsudab Y. The role of degradant profiling in active pharmaceutical ingredients and drug products. *Advanced drug delivery reviews*. 2007;59:29-37.
4. Prescott LF. Paracetamol: past, present, and future. *Am J Ther*. 2000;7(2):143-7.
5. European Pharmacopeia. 10th edition. Strasbourg: Council of Europe; 2019. Volume II, Paracetamol; 3481-3483.
6. Forrest JA, Clements JA, Prescott LF. Clinical pharmacokinetics of paracetamol. *Clinical Pharmacokinetics*. 1982;7(2):93-107.
7. Bannwarth B, Péhourcq F. Pharmacologic basis for using paracetamol: pharmacokinetic and pharmacodynamic issues, *Drugs*, 2003;63(2):5-13.
8. Kayaalp SO, Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. 10. Baskı. Ankara. Hacettepe-Taş; 2002.
9. Acetaminophen. 2022. https://www.rxlist.com/consumer_acetaminophen_tylenol/drugs-condition.htm
10. Ruhsath ürünler listesi. 2022. <https://www.titck.gov.tr>.
11. Toes MJ, Jones AL, Prescott L. Drug interactions with paracetamol. *Am J Ther*. 2005;12(1):56-66.
12. Hazai E, Monostory K, Bakos A, Zacher G, Vereczkey L. About paracetamol again. *Orvosi hetilap*. 2001; 142(7):345-9.
13. Hameleers-Snijders P, Hogeveen M, Smeitink JA, Kramers C, Draaisma JM. Risk of acute hepatic insufficiency in children due to chronic accidental overdose of paracetamol (acetaminophen). *Ned Tijdschr Geneeskd*. 2007; 151(16):897-900.
14. Bourdeaux C, Bewley J. Death from paracetamol overdose despite appropriate treatment with N-acetylcysteine. *Emerg Med J*. 2007 24(5):e31.
15. Schiødt FV, Ott P, Christensen E, Bondesen S. The value of plasma acetaminophen half-life in antidote-treated acetaminophen overdosage. *Clin Pharmacol Ther*. 2002;71(4):221-5.
16. Das Kumar S, Subudhi M. A study on chronicity and treatment response of functional abdominal pain in 5 to 15 years of children, in relation to size and location of primary mesenteric lymphadenitis in a tertiary care centre. *Original Research Article*. 2019; 6(12): 602-605.

17. Meremikwu MM, Oyo-Ita A. Paracetamol versus placebo or physical methods for treating fever in children (Review). *Cochrane Database Syst Rev.* 2002;2.
18. Moore RA, Derry S, Wiffen PJ, Straube S, Aldington DJ. Overview review: Comparative efficacy of oral ibuprofen and paracetamol (acetaminophen) across acute and chronic pain conditions. *Eur J Pain.* 2015;19(9):1213-23.
19. Tan E, Braithwaite I, McKinlay CJD, Dalziel SR. Comparison of acetaminophen (paracetamol) with ibuprofen for treatment of fever or pain in children younger than 2 years a systematic review and meta-analysis. *JAMA Netw Open.* 2020;3(10):e2022398.
20. Bremer L, Goletzke J, Wiessner C, Pagenkemper M, Gehbauer C, Becher H et al. Paracetamol medication during pregnancy: insights on intake frequencies, dosages and effects on hematopoietic stem cell populations in cord blood from a longitudinal prospective pregnancy cohort. *EBioMedicine.* 2017; 26: 146–151.
21. Sharma CV, Mehta V, Paracetamol: mechanisms and updates. *Continuing Education in Anaesthesia Critical Care & Pain.* 2014; 14(4):153-158.
22. Eliassen A, Otnes S, Matz M, Aunsholt L, Mathiasen R. Safety of rapid intravenous paracetamol infusion in paediatric patients. *Curr Res Pharmacol Drug Discov.* 2021; 3:100077.
23. Aminu N, Chan SY, Khan NH, Farhan AB, Umar MN, Toh SM. A simple stability-indicating hplc method for simultaneous analysis of paracetamol and caffeine and its application to determinations in fixed-dose combination tablet dosage form. *Acta Chromatographica.* 2019;31(2): 85–91.
24. Atay O, Dinçol F. Quantitative Determination of Aspirin and Paracetamol in Tablets. *J.Pharm.Sci.* 1995; 20(1):13-19.
25. Pérez JL, Bello MA. Determination of paracetamol in dosage forms by non-suppressed ion chromatography. *Talanta.* 1999 ;48(5):1199-202.
26. Nguyen NVT, Tran TNT, Nguyen MQ, Nguyen TK. Rapid and simultaneous determination of paracetamol, ibuprofen and related impurity of ibuprofen by UPLC/DAD. *Pharm Sci Asia* 2018; 45 (4): 213-220.
27. More SJ, Tandulwadkar SS, Nikam AR, Rathore AS, Sathiyarayanan L, Mahadik KR. Application of HPLC for the Simultaneous Determination of Paracetamol, Chlorzoxazone, and Nimesulide in Pharmaceutical Dosage Form. *International Scholarly Research Network.* 2012; 2528954
28. Fathi M, Kazemi S, Zahedi F, Shiran MR, Moghadamnia AA. Comparison of oral bioavailability of acetaminophen tablets, capsules and effervescent dosage forms in healthy volunteers. *Curr. Issues Pharm. Med. Sci.* 2018;31 (1):5-9.
29. Knochen M, Giglio J, Reis BF. Flow-injection spectrophotometric determination of paracetamol in tablets and oral solutions. *J Pharm Biomed Anal.* 2003;33(2):191-7.
30. Ahmed NR. HPLC Method for Determination of Paracetamol in Pharmaceutical Formulations and Environmental Water Samples. *Chemical Science Transactions.* 2019;8(2):237-243.

31. United States Pharmacopeia. 44 edition. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention; 2020. Validation of Compendial Procedures
32. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Harmonised Tripartite Guideline: Analytical Procedure Development Q14. 2022.
33. Dong M.W., Ahuja S. editör. Handbook of pharmaceutical analysis by hplc. United Kingdom; Elsevier Academic Press; 2005.
34. European Pharmacopeia. 10th edition. Strasbourg: Council of Europe; 2019. 2.2.46., Chromatographic Separation Techniques; 80-87.
35. Reviewer Guidance: Validation of Chromatographic Methods, Food and Drug Administration (FDA) Center for Drug Evaluation and Research (CDER). United States. 1994
36. Vessman J. Selectivity or specificity? Validation of analytical methods from the perspective of an analytical chemist in the pharmaceutical industry. *J Pharm Biomed Anal.* 1996;14:867-869.
37. Tiwari G, Tiwari R. Bioanalytical method validation: An updated review. *Pharm Methods.* 2010;1(1):25-38.
38. Shabir GA. 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 Conference on Harmonization. *J Chromatogr A.* 2003;987(1-2):57-66.
39. Boque R, Maroto A, Riu J, R, us FX. Validation of analytical methods. *Grassas y aceites.* 2002; 53(1): 128-143.
40. Peris-Vicente J, Esteve-Romero J, Carda-Broch S, Anderson JL, Berthod A, Pino V, Stalcup A. Analytical Separation Science. Validation of analytical methods based on chromatographic techniques: An Overview. Wiley VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. 2015.
41. Verch T, Campa C, Chéry CC, Frenkel R, Graul T, Jaya N ve ark. Analytical quality by design, life cycle management, and method control. *AAPS J.* 2022;24(1):34.
42. D.A. Skoog, Holler, F.J., Nieman, T.A., , Principles of instrumental analysis. Çeviri Editörleri; Kılıç, E., Köseoğlu, F., Yılmaz, H., I., 5 ed., Bilim Yayıncılık Ltd. Şti.; Ankara; 2000.
43. I. Baraem, S.S. Nielsen. Basic Principles of chromatography. Boston; Springer; MA; 2010
44. European Pharmacopeia. 10th edition. Strasbourg: Council of Europe; 2019. Volume II, Liquid Chromatography; 49-50.
45. P.C. Sadek. Troubleshooting HPLC systems. John Wiley & Sons; Inc; 2000.
46. T. Hanai, HPLC: a practical guide. Royal Society of Chemistry; Cambridge; 1999.

8. EKLER

EK 1. İstatistiksel Katsayıların Hesaplanması

Bağıl standart sapma (BSS) hesaplanması

$$BSS = \frac{\text{Standart sapma}}{\text{Ortalama}} \times 100$$

Bağıl hata (BH) hesaplanması

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

Standart hata (SH) hesaplanması

$$SH = \frac{\text{Standart sapma}}{\sqrt{n}}$$

n: Ölçüm sayısı

% Geri kazanım hesaplanması

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

EK 2. Orjinallik Ekran Çıktısı

Yüksek Lisans Tez

ORIGINALITY REPORT

19%

SIMILARITY INDEX

18%

INTERNET SOURCES

2%

PUBLICATIONS

8%

STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1	acikbilim.yok.gov.tr Internet Source	5%
2	dspace.gazi.edu.tr Internet Source	3%
3	Submitted to Inonu University Student Paper	3%
4	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 Internet Source	1%
5	polen.itu.edu.tr Internet Source	1%
6	nek.istanbul.edu.tr:4444 Internet Source	1%
7	Submitted to TechKnowledge Turkey Student Paper	<1%
8	acikerisim.harran.edu.tr:8080 Internet Source	<1%
9	acikerisim.pau.edu.tr Internet Source	<1%

EK 3. Dijital Makbuz



Digital Receipt

This receipt acknowledges that Turnitin received your paper. Below you will find the receipt information regarding your submission.

The first page of your submissions is displayed below.

Submission author: Nagehan Tuğ
Assignment title: Nagehan Tez-pre defence
Submission title: Yüksek Lisans Tez
File name: Nagehan_Tez.docx
File size: 1.56M
Page count: 93
Word count: 15,918
Character count: 106,123
Submission date: 20-Sep-2022 09:00AM (UTC+0300)
Submission ID: 1904328389



9. ÖZGEÇMİŞ