

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

**H<sub>2</sub> RESEPTÖR ANTAGONİSTLERİNİN YEŞİL HPLC AYIRIMI  
İÇİN KEMOMETRİK OPTİMİZASYON YAKLAŞIMI VE  
FAMOTİDİN İÇEREN FARMASÖTİK PREPARATLARA  
UYGULANMASI**

**Kim. Müh. Nazife Egeşen HALICI**

**Analitik Kimya Programı  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ANKARA**

**2022**



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

**H<sub>2</sub> RESEPTÖR ANTAGONİSTLERİNİN YEŞİL HPLC AYIRIMI  
İÇİN KEMOMETRİK OPTİMİZASYON YAKLAŞIMI VE  
FAMOTİDİN İÇEREN FARMASÖTİK PREPARATLARA  
UYGULANMASI**

**Kim. Müh. Nazife Egeşen HALICI**

**Analitik Kimya Programı**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI**

**Prof. Dr. Nursabah Elif BAŞCI AKDUMAN**

**ANKARA**

**2022**

**ONAY SAYFASI**  
**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**H<sub>2</sub> Reseptör Antagonistlerinin Yeşil HPLC Ayırımı için Kemometrik  
Optimizasyon Yaklaşımı ve Famotidin İçeren Farmasötik Preparatlara  
Uygulanması**

**Öğrenci: Kim. Müh. Nazife Egeşen HALICI**

**Danışman: Prof. Dr. Nursabah Elif BAŞCI AKDUMAN**

Bu tez çalışması 26.08.2022 tarihinde jürimiz tarafından “Analitik Kimya Programı”nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

**Jüri Başkanı: Prof. Dr. Emirhan Nemetlu**  
**(Hacettepe Üniversitesi)**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Nursabah E. Başcı Akduman**  
**(Hacettepe Üniversitesi)**

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

**Üye: Doç. Dr. Ayşegül Doğan**  
**(Hacettepe Üniversitesi)**

**Üye: Doç. Dr. Engin Koçak**  
**(Sağlık Bilimleri Üniversitesi)**

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

Prof. Dr. Müge YEMİŞCİ ÖZKAN

**Enstitü Müdürü**

## YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

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

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

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

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir.
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 6 ay ertelenmiştir.
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir.

26.08.2022

Nazife Egeşen HALICI

<sup>1</sup> “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.

\*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. Nursabah Elif BAŞCI AKDUMAN danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

**26.08.2022**

**Nazife Egeşen HALICI**

## TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim boyunca yardım ve desteklerini esirgemeyen, bilgi ve tecrübeleri ile çalışmalarımın yön veren danışman hocam Sayın Prof. Dr. Nursabah Elif Başcı Akduman'a, göstermiş olduğu ilgi ve samimiyet için teşekkürlerimi sunarım.

Teorik ve pratik derslerde verdikleri değerli bilgiler için Analitik Kimya Anabilim Dalının saygıdeğer hocalarına, bilgi ve birikimime sağladıkları katkılardan ötürü teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarımın sırasında verdikleri destek ve katkıları ile yanımda olan Doç. Dr. Ayşegül Doğan ve Dr. Cemil Can Eylem'e teşekkür ederim.

Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne tezime ilgili projenin kabulünden sonuçlanmasına kadar ki tüm süreçte sağladıkları imkanlardan ve desteklerinden dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Her zaman ve her koşulda yanımda olan sevgili annem Evşen ve sevgili babam İrfan'a, bugünlere gelmemi sağladıkları ve tüm hayatım boyunca desteklerini asla esirgemedikleri için teşekkürlerimi sunarım.

Mezun olduktan sonra bünyesine dahil olduğum ve her konuda yardımlarını esirgemeyen İLKO ARGEM ailesine teşekkürlerimi sunarım.

Tez yazım sürecinde desteğini ve ilgisini esirgemeyen sevgili dostlarım Burak, Melek, Hande ve Tolga'ya teşekkür ederim.

## ÖZET

**HALICI, N. E., H<sub>2</sub> Reseptör Antagonistlerinin Yeşil HPLC Ayırımı için Kemometrik Optimizasyon Yaklaşımı ve Famotidin İçeren Farmasötik Preparatlara Uygulanması, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2022.** Özellikle gastroözofageal reflü hastalığında ya da mide asitliğinin bozulduğu durumların tedavisinde H<sub>2</sub> reseptör antagonistleri sıklıkla tercih edilir. Bu tezde, kemometrik optimizasyon yaklaşımıyla, H<sub>2</sub> reseptör antagonistlerinden famotidin, nizatidin, ranitidin ve simetidin etken maddelerinin aynı anda analiz edilebileceği bir HPLC yöntemi yeşil analitik kimya ilkeleri benimsenerek geliştirilmiştir. Analiz yöntemini optimize etmek için kromatografik parametreler (akış hızı, kolon sıcaklığı, hareketli fazdaki etanol oranı, tampon derişimi) incelenmiştir. Geliştirilen bu yeşil HPLC yönteminin sistem uygunluk testleri, özgünlük, duyarlılık, doğrusallık, doğruluk, kesinlik, geri kazanım, kararlılık, sağlamlık ve tutarlılık parametreleri farmasötik preparattan famotidin analizi için valide edilmiştir. Doğrusallık aralığı 1,5-75 µg/mL, gözlenebilme sınırı (LOD) 0,5 µg/mL ve alt tayin sınırı (LOQ) 1,5 µg/mL olarak bulunmuştur. Famotidin tablet USP monografında belirtilen yöntemin de validasyonu yine aynı parametrelerin incelenmesiyle gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemin doğrusallık aralığı 5,0-500 µg/mL, gözlenebilme sınırı (LOD) 2,0 µg/mL ve alt tayin sınırı (LOQ) 5,0 µg/mL olarak bulunmuştur. İki yöntemin de duyarlı, kesin, doğru, özgün, sağlam ve tutarlı olduğunu göstermiştir. Valide edilen bu iki yöntem famotidin içeren farmasötik preparatın analizine başarılı bir şekilde uygulanmıştır. Sonuçlar karşılaştırılarak aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Geliştirilen yöntemin USP monografında belirtilen yöntemden daha duyarlı olduğu aynı zamanda çevre ve insan sağlığına verilecek hasarın da minimum olduğu gözlemlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Yeşil kromatografi, yüksek performanslı sıvı kromatografisi, farmasötik analiz, H<sub>2</sub> reseptör antagonistleri, famotidin, ranitidin, nizatidin, simetidin, etanol, kemometri



## ABSTRACT

**HALICI, N. E., Chemometric Approach for Green HPLC Separation of H<sub>2</sub> Receptor Antagonists and Application to the Analysis of Famotidine Containing Pharmaceuticals, Hacettepe University Graduate School Health Sciences Department of Analytical Chemistry Master of Science Thesis, Ankara, 2022.** H<sub>2</sub>

receptor antagonists are often preferred in gastroesophageal reflux disease or in the treatment of gastric acidity disorders. In this thesis, an HPLC method for simultaneous analysis of H<sub>2</sub> receptor antagonists, famotidine, nizatidine, ranitidine and cimetidine active ingredients was developed by implementing green analytical chemistry principles and chemometric approach. Chromatographic parameters such as ethanol ratio, buffer concentration, flow rate of mobile phase and column temperature were optimized the analysis method. System compatibility tests, specificity, sensitivity, linearity, accuracy, precision, recovery, stability, robustness and consistency parameters of this green HPLC method were validated for the analysis of famotidine from the pharmaceutical preparation. The linearity range was 1,5-75 µg/mL, the limit of detection (LOD) was 0,5 µg/mL, and the limit of quantification (LOQ) was 1,5 µg/mL. Afterwards, the validation of the method specified in the Famotidine tablet USP monograph was carried out by examining the same parameters. The linearity range of this method was 5,0-500 µg/mL, the limit of detection (LOD) was 2,0 µg/mL, and the limit of quantification (LOQ) was 5,0 µg/mL. Cimetidine was chosen as the internal standard (IS) in both methods and validation results showed that the methods were sensitive, precise, accurate, specific, robust and consistent. These two validated methods were successfully applied to the analysis of the famotidine-containing pharmaceutical preparation. By comparing the results, no statistically significant difference was found between them. It has been observed that the developed method is more sensitive than the method specified in the USP monograph, and at the same time, the damage to the environment and human health is minimal.

**Keywords:** Green chromatography, high performance liquid chromatography, pharmaceutical analysis, H<sub>2</sub> receptor antagonists, famotidine, nizatidine, ranitidine, cimetidine, ethanol, chemometry

**İÇİNDEKİLER**

<b>ONAY SAYFASI</b>	<b>iii</b>
<b>YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI</b>	<b>iv</b>
<b>ETİK BEYAN</b>	<b>v</b>
<b>TEŞEKKÜR</b>	<b>vi</b>
<b>ÖZET</b>	<b>vii</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>viii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b>	<b>ix</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR</b>	<b>xiii</b>
<b>TABLolar</b>	<b>xiv</b>
<b>ŞEKİLLER</b>	<b>xiv</b>
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	<b>5</b>
2.1. Gastroözofageal Reflü Hastalığı	<b>5</b>
2.2. Histamin	<b>6</b>
2.3. H <sub>2</sub> reseptör Antagonisleri	<b>7</b>
2.3.1. Famotidin	<b>7</b>
2.3.2. Nizatidin	<b>10</b>
2.3.3. Ranitidin	<b>13</b>
2.3.4. Simetidin	<b>16</b>
2.4. H <sub>2</sub> reseptör Antagonistlerinin Literatürdeki Analiz Yöntemleri	<b>19</b>
2.5. Yeşil Kimya	<b>22</b>
2.6. Yeşil Analitik Kimya	<b>23</b>
2.6.1. Yeşil Analitik Kimyanın Tarihçesi	<b>23</b>
2.6.2. Yeşil Analitik Kimya İlkeleri	<b>26</b>
2.6.3. İlaç Sektöründe Yeşil Analitik Kimya	<b>27</b>
2.7. Kromatografik Yöntemler	<b>28</b>
2.7.1. Kromatografinin Temel Parametreleri	<b>29</b>
2.7.2. Kromatografik Yöntemlerin Sınıflandırılması	<b>32</b>
2.8. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)	<b>36</b>
2.8.1. Hareketli Faz Rezervuarları	<b>37</b>

2.8.2. Transfer Hattı	38
2.8.3. Pompa Sistemi	38
2.8.4. Numune Enjeksiyon Haznesi	40
2.8.5. Kolon ve Kolon Fırını	41
2.8.6. Dedektör Çeşitleri	43
2.9. Kemometrik Optimizasyon	45
2.9.1. İsteklilik Fonksiyonu	46
2.10. Yöntem Validasyonu	47
2.10.1. Sistem Uygunluğu	50
2.10.2. Seçicilik / Spesifiklik	50
2.10.3. Doğrusallık ve Aralık	52
2.10.4. Gözlenebilme Sınırı / Alt Tayin Sınırı	53
2.10.5. Kesinlik	54
2.10.6. Doğruluk	55
2.10.7. Sağlamlık	55
<b>3. GEREÇLER VE YÖNTEM</b>	<b>58</b>
3.1. Cihaz ve ekipmanlar.	58
3.2. Kimyasal Maddeler ve Kolonlar	58
3.3. Çözeltilerin Hazırlanması	59
3.3.1. Hareketli Fazların Hazırlanması	59
3.3.2. Çözücülerin Hazırlanması	61
3.4. Stok ve Çalışma Standartlarının Hazırlanması	61
3.5. Farmasötik Preperatların Hazırlanması	63
3.6. Plasebo Çözeltisinin Hazırlanması	63
3.7. Yöntem Geliştirme ve Optimizasyon Tasarımı	63
3.7.1. Yöntem Geliştirme	63
3.7.2. Optimizasyon Tasarımı	64
3.8. Kromatografik Koşullar	66
3.8.1 Famotidinin Farmasötik Preperatlardan Analizi için Geliştirilen Yeşil Kromatografik Yöntem	66
3.8.2. Famotidinin Farmasötik Preperatlardan Analizi için Kullanılan USP Metodu	67

<b>4. BULGULAR</b>	<b>68</b>
4.1. Analiz Yönteminin Geliştirilmesi	68
4.1.1. Yöntem Seçimi	68
4.1.2. İç Standart Seçimi	75
4.2. Famotidinin Farmasötik Preparatlardan Analizi İçin Yeşil Kromatografi ile Yöntem Validasyonu	76
4.2.1. Sistem Uygunluk Testleri	76
4.2.2. Seçicilik	78
4.2.3. Kalibrasyon Eğrileri ve Doğrusallık Aralıkları	80
4.2.4. Gözlenebilme Sınırı ve Alt Tayin Sınırı (LOD ve LOQ)	81
4.2.5. Doğruluk ve Kesinlik	81
4.2.6. Tekrarlanabilirlik	83
4.2.7. Tutarlılık	83
4.2.8. Kararlılık	84
4.2.9. Sağlamlık	85
4.2.10. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması	86
4.3. Famotidinin Farmasötik Preparatlardan Analizi İçin USP Monografi ile Yöntem Validasyonu	<b>87</b>
4.3.1. Sistem Uygunluk Testleri	87
4.3.2. Seçicilik	88
4.3.3. Kalibrasyon Eğrisi ve Doğrusallık Aralığı	90
4.3.4. Gözlenebilme Sınırı ve Alt Tayin Sınırı (LOD ve LOQ)	91
4.3.5. Doğruluk ve Kesinlik	91
4.3.6. Tekrarlanabilirlik	93
4.3.7. Tutarlılık	93
4.3.8. Kararlılık	94
4.3.9. Sağlamlık	95
4.3.10. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması	96
4.4. Yöntemlerin Karşılaştırılması	97
<b>5. TARTIŞMA</b>	<b>99</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	<b>112</b>
<b>7. KAYNAKLAR</b>	<b>114</b>

<b>8. EKLER</b>	<b>126</b>
<b>EK-1:</b> Tez Çalışması Orijinallik Raporu	
<b>EK-2:</b> Turnitin Dijital Makbuz	
<b>EK-3:</b> Tez İçinde Kullanılan İstatistiksel Katsayıların Hesaplanması	
<b>EK-4:</b> T-Testi - Eşit Olmayan Varyanslar Varsayarak İki Örneklem	
<b>EK-5:</b> Farklı Veri Setleri için Mann-Whitney U Testi	
<b>9. ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>133</b>

**SİMGELER VE KISALTMALAR**

BHATA	Bağıl hata
BSS	Bağıl Standart Sapma
CE	Kapiler Elektroforez
D	Küresel İsteklilik
$d_i$	İsteklilik değeri
EP	Avrupa Farmakopesi
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FMT	Famotidin
GÖRH	Gastroözofageal Reflü Hastalığı
GC	Gaz kromatografisi
HPLC	Yüksel performanslı sıvı kromatografisi
ICH	Uluslararası Harmonizasyon Konferansı
ISTD	İç standart
$k'$	Kapasite faktörü
LOD	Gözlenebilme sınırı
LOQ	Alt tayin sınırı
N	Teorik plaka sayısı
NZT	Nizatidin
PAO	Pik asimetri oranı
PPI	Proton Pompa İnhibitörleri
$R_s$	Ayırıcılık
RNT	Ranitidin
RP-HPLC	Ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi
SMT	Simetidin
$t_m$	Ölü hacim
$t_R$	Alıkonma zamanı
USP	Amerikan Farmakopesi
$D_{tr}$	

## TABLOLAR

### Tablo

2.1. Famotidinin fiziksel ve kimyasal özellikleri.	8
2.2. Nizatidinin fiziksel ve kimyasal özellikleri.	11
2.3. Ranitidinin fiziksel ve kimyasal özellikleri.	14
2.4. Simetidinin fiziksel ve kimyasal özellikleri.	17
2.5. Yeşil analitik kimya kavramlarının ve daha yeşil metodolojilerin geliştirilmesindeki bazı kilometre taşları.	25
2.6. ICH Yönergelerine göre farklı analizlerde dikkat edilmesi gereken validasyon parametreleri.	49
2.7. USP'ye göre farklı analizlerde dikkat edilmesi gereken validasyon parametreleri.	50
2.8. Doğrusallık çalışmaları için önerilen validasyon aralıkları.	53
3.1. Kısmi faktöriyel tasarım planına göre belirlenen deneysel koşullar.	65
3.2. Seçilmiş faktörler ve tam faktöriyel tasarımdaki seviyeler.	66
4.1. İki seviyeli kısmi faktöriyel tasarımdaki her bir koşula ait cevap değişkeni olan alıkonma sürelerinin istekliliği ( $D_{tr}$ ), ayıricılıkların istekliliği ( $D_R$ ) ve alıkonma sürelerinin istekliliği + ayıricılıkların istekliliği.	70
4.2. Cevap değişkenleri için önerilen modellere ait ANOVA testi sonuçları.	72
4.3. Cevap değişkenleri için önerilen modellere ait uyum istatistiği testi sonuçları.	72
4.4. Design Expert programı tarafından üç cevap değişkeni için sunulan modellere ait önerilen matematiksel eşitliklerdeki katsayılar.	73
4.5. Optimum koşullarda elde edilen famotidin pikine ait sistem uygunluk parametreleri.	76
4.6. Optimum koşullarda elde edilen simetidin pikine ait sistem uygunluk parametreleri.	77
4.7. Optimum koşullarda elde edilen ranitidin pikine ait sistem uygunluk parametreleri.	77
4.8. Optimum koşullarda elde edilen nizatidin pikine ait sistem uygunluk parametreleri.	78

- 4.9.** Optimize koşullarda elde edilen piklere ait ortalama sistem uygunluk parametreleri. 78
- 4.10.** Geliştirilen yeşil HPLC metodunda tabletten famotidin analizi için elde edilen kalibrasyon doğrusunun özellikleri. 80
- 4.11.** Geliştirilen yeşil HPLC metodunda gözlenebilme ve alt tayin sınırı (LOD ve LOQ) sonuçları. 81
- 4.12.** Geliştirilen yeşil HPLC metodunda famotidin analizine ait gün içi ve günler arası analiz sonuçları. 82
- 4.13.** Geliştirilen yöntemin enjeksiyon ve yöntem tekrarlanabilirliği bulguları. 83
- 4.14.** Geliştirilen yeşil kromatografik yöntemin tutarlılık bulguları. 84
- 4.15.** Yeşil kromatografik yönteme ait kararlılık bulguları. 85
- 4.16.** Sağlıklik bulguları. 85
- 4.17.** Yeşil kromatografik yöntem ile sentetik tablet analizine ait geri kazanım değerleri. 86
- 4.18.** Famotidin Tablet USP monografında belirtilen yöntem ile elde edilen piklere ait kromatografik parametreler. 87
- 4.19.** Famotidin Tablet USP monografında bildirilen yöntem ile tabletten famotidin analizi için elde edilen kalibrasyon doğrusunun özellikleri. 90
- 4.20.** Famotidin Tablet USP monografında belirtilen yöntemde gözlenebilme ve alt tayin sınırı (LOD ve LOQ) sonuçları. 91
- 4.21.** Famotidin tablet USP monografında belirtilen yöntemle famotidin analizine ait gün içi ve günler arası analiz sonuçları. 92
- 4.22.** Famotidin tablet USP monografında belirtilen yöntemin enjeksiyon ve yöntem tekrarlanabilirliği bulguları. 93
- 4.23.** Famotidin tablet USP monografında belirtilen yöntemin tutarlılık bulguları. 94
- 4.24.** Famotidin Tablet USP monografındaki yönteme ait kararlılık bulguları. 95
- 4.25.** Famotidin Tablet USP monografındaki metodun sağlıklik bulguları. 96
- 4.26.** Famotidin tablet USP monografında belirtilen yöntem ile sentetik tablet analizine ait geri kazanım değerleri. 97
- 4.27.** Geliştirilen yeşil kromatografik yöntemin ve USP monografında belirtilen yöntemin famotidin içeren farmasötik preparatta analiz sonuçlarının karşılaştırılması 98



## ŞEKİLLER

### Şekil

2.1. Sağlıklı ve reflü hastası kişilerin temsili mide görselleri.	5
2.2. Histaminin kimyasal yapısı.	6
2.3. Famotidinin kimyasal yapısı.	8
2.4. Nizatidinin kimyasal yapısı.	11
2.5. Ranitidinin kimyasal yapısı.	14
2.6. Simetidinin kimyasal yapısı.	16
2.7. Yeşil Analitik Yöntemler hakkında bilimsel literatürün gelişimi.	24
2.8. Yeşil analitik kimya açısından analitik prosedürlerin önemli bileşenleri.	27
2.9. Tek bileşenli bir numune için örnek kromatogram.	29
2.10. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisinin şematik gösterimi.	37
2.11. HPLC kolonunun şematik gösterimi.	41
2.12. Validasyon parametreleri.	48
2.13. Nitro-bileşiklerinin HPLC ile farklı hareketli faz oranları kullanılarak miktar tayini analizleri.	52
4.1. Famotidin, simetidin, ranitidin ve nizatidin etken maddelerinin eş zamanlı olarak minimum sürede ayırımlarının ( $R_s > 2$ ) sağlanması amacıyla en yüksek isteklilik değerine sahip faktör değerleri.	74
4.2. Optimize koşullarda etken maddelerin ayırımına ait örnek kromatogram.	75
4.3. Geliştirilen yeşil HPLC yönteminde elde edilen kromatogramlar.	79
4.4. Geliştirilen yeşil HPLC yöntemi ile tabletten famotidin analizi için elde edilen kalibrasyon eğrisi.	81
4.5. Famotidin Tablet USP monografında belirtilen yöntem kullanılarak elde edilen kromatogramlar.	89
4.6. Famotidin Tablet USP monografında bildirilen yöntemle tabletten famotidin analizi için elde edilen kalibrasyon eğrisi.	91

## 1. GİRİŞ

Gastroözofageal reflü hastalığı, kısaca GÖRH, dünyada her yaştan ve her gelir düzeyinden insanda oldukça sık görülen bir rahatsızlıktır. Özellikle çocukların yaşam kalitesini önemli ölçüde bozan ve sağlıklarını ciddi şekilde tehdit eden hastalıklardan biridir. Pediatri ve Pediatrik Cerrahi Bilim Merkezi'nde 2008'den 2019'a kadar, 69'u (%51,0) bebek olmak üzere yaşları 6 ay ile 12 arasında değişen 134 hasta hastaneye kaldırılmıştır. Bu çocuklardan 107'sinde (%79,8) denenen alternatif tedavi şekilleri yetersiz kaldığından ameliyat zorunluluğu doğmuştur (1). Aslında; mide ekşimesi, ağız kokusu, hıçkırık, reflü sebebiyle mideden geri gelen sıvının ağıza ulaşması ve dışarı çıkması gibi klasik ve kontrol altında tutulabilen belirtileri vardır. Ancak GÖRH boğazda gıcık hissi, ses kısıklığı, kronik öksürük gibi tipik olmayan belirtilerle de ortaya çıkabilmektedir. Eroviz olmayan reflü hastalığı, yani reflüye ait semptomların bulunduğu ancak endoskopik olarak bir hasarın tespit edilmediği rahatsızlık, GÖRH'nın en yaygın fenotipidir (2). Bu durumda da hastalığın teşhisi geciktiğinden verdiği hasar artmaktadır. Aynı zamanda GÖRH'nın, akciğer nakli sonrası laringeal rahatsızlıklar, sinüzit, kronik öksürük, astım, KOAH, idiyopatik pulmoner fibroz, kistik fibroz ve bronşiyolit obliterans dahil olmak üzere bir dizi solunum yolu hastalığına neden olduğu veya bu hastalıkların ciddiyetine katkıda bulunduğu bildirilmektedir (3). Özellikle bronşektazili hastalarda GÖRH, artan sağlık hizmeti kullanımı ve tıbbi maliyetlerle ilişkilendirilmektedir (4).

Histamin vücutta bulunan bir azot bileşiğidir ve farklı organlardaki yumuşak kasları uyararak kasılmalarını sağlamaktadır. Bu etkiler, düşük derişimlerde mepiramin veya ilgili ilaçlarla bastırılabilir. Bu mepiramine duyarlı histamin tepkilerinde yer alan farmakolojik reseptörler, H<sub>1</sub> reseptörleri olarak tanımlanmıştır. Bununla birlikte histamin midede asit salgısını da uyarmakla görevlidir. Kalp atış hızını arttırmakta ve rahim kasılmalarını engellemektedir. Bu eylemler, geleneksel antihistaminikler tarafından antagonize edilemez ve H<sub>2</sub> reseptörleri olarak tanımlanan histamin reseptörlerinin uyarılmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (5). Histamin tip 2 yani H<sub>2</sub> reseptör antagonistleri, dünyada en yaygın şekilde reçete edilen farmakolojik ajan sınıfındadır. H<sub>2</sub> reseptör antagonistlerinin asit-peptik

bozukluklar için reçetesiz satılan ilaçlar olarak pazarlanması bile önerilmiştir. Daha sonrasında zaten yaygın kullanıma sahip olan bu ilaçlara bir de insanların kontrolsüz erişime sahip olmasının sorun yaratabileceği düşünüldüğünden bu karardan vazgeçilmiştir (6).

Antiasitler uzun süredir mide yanması reflü semptomlarını gidermek için kullanılmaktadır. Yüksek ve sık dozlarda verildiğinde asitle ilişkili bu hastalıkların daha hafif formlarında etkili olmaktadır (7). 1900'lü yılların ilk çeyreğinde, asit salgısının üç ana uyarıcısı gastrin, asetilkolin ve histamin olarak kabul edilmiştir. Bu gelişmeden yaklaşık 50 yıl sonra 1972'de insan çalışmalarıyla doğrulanan ilk histamin-2 (H<sub>2</sub>) reseptör antagonisti olan Buriamid, Birleşik Krallık'ta James Black ve meslektaşları tarafından keşfedilmiştir. Bu keşfi 1976 yılında piyasaya çıkan Simetidin izlemiştir (8, 9). Ranitidin ve Famotidin gibi diğer moleküller 1980'lerin başında sürece dahil olmuştur (7).

Famotidin, nizatidin, ranitidin ve simetidin de içinde bulunduğu H<sub>2</sub> reseptör antagonistleri mide paryetal hücresinde histaminin etkisini bloke ederek bu hücrelerdeki asit salınımını azaltan moleküllerdir. Bu ilaçlar dispepsi tedavisinde kullanılır (10). Aynı zamanda peptik ülser hastalığı ve GÖRH tedavisinde baskın bir rol oynamaktadırlar. H<sub>2</sub> reseptör antagonistleri oldukça seçici moleküller olup H<sub>1</sub> reseptörlerini etkilememektedirler. Bu sayede H<sub>1</sub> reseptör antagonistleri grubundaki ilaçlar gibi kulak, burun ve boğaz bölgesinde etkileri yoktur. Aynı zamanda antikolinerjik ajanlar değildir. Yani, sinir sistemi üzerinde herhangi bir yan etkileri bulunmamaktadır. H<sub>2</sub> reseptör antagonistlerinden de önce yine midedeki asit salgısını azaltma amacıyla kullanılan proton pompa inhibitörlerinden (PPI) hangi grubun daha etkili olduğu hala tıp dünyasında devam eden bir düşünce ayrılığına sebep olmaktadır. Bu düşünce ayrılığından bağımsız olarak konuya bakıldığında, bu iki grubun sıralı gelişiminin; *Helicobacter pylori* enfeksiyonunun keşfi ile morbidite ve mortalitede belirgin azalma ile peptik ülser hastalığının tedavisine de ışık tutmaktadır (11).

İlaç firmaları için analitik kimya olmazsa olmaz bir yapı taşıdır. Bilindiği üzere analitik kimya; bir dizi yöntemden oluşan, bilimin her alanında yararlı olan, maddenin ve/veya numunenin bileşimi ve yapısı hakkında bilgi edinme ve işleme

bilimidir. Özellikle farmasötik preparatlardaki ilaç etken maddelerinin dozları insan sağlığı için hayati önem taşıdığından tayin edilmesi gerekmektedir. Bu amaç doğrultusunda genellikle yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) veya gaz kromatografisi (GC) gibi kromatografik yöntemler tercih edilmektedir (12).

Kromatografik yöntemler her ne kadar hızlı, etkili ve çok tercih edilen yöntemler olsa da, aslında çevreye çok da duyarlı olmadıkları yeteri kadar dikkat çekmeyen bir konudur. Bu noktada devreye yeşil kimya kavramı girmektedir. Yeşil kimya sadece kromatografik yöntemlere değil kimyanın her alanında uygulanabilmekte ve uygulanması gerekmektedir. Yeşil kimyanın amacı, ürünlerin sentez, analiz ve diğer aşamalarında kullanılan çevreye zararlı kimyasalların ortadan kaldırılması, kaldırılamıyorsa kullanımının minimum seviyede olacak şekilde azaltılması ya da çevreye daha duyarlı olanlarla değiştirilmesiyle hem insan sağlığına hem de çevreye verilen zararı azaltmaktır. Kimyasalların insan sağlığına ve ekolojiye etkileri hakkında mevcut kapsamlı verilerin kullanılmasıyla, belirli bir sentez veya proseste hangi kimyasalların kullanılmasının daha uygun olacağı konusunda bilinçli seçimler yapılarak yeşil kimyaya küçük de olsa bir adım atılmalıdır. Basitçe ifade etmek gerekirse, yeşil kimya, insan sağlığına ve/veya çevreye zararlı hammaddelerin, ürünlerin, yan ürünlerin, çözücülerin, reaktiflerin vb. kullanımını veya oluşumunu azaltan ya da ortadan kaldıran kimya tekniklerinin ve metodolojilerinin kullanılmasıdır (13).

Famotidin, nizatidin, ranitidin ve simetidin analizi ile ilgili olarak genellikle floresans detektörü ile yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC-Floresans) (14, 15), ultraviyole detektörlü yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC-UV) (16-23), kapiller elektroforez (CE) (24, 25), yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi (HPTLC) (26) ve gaz kromatografisi (GC) (27) yöntemlerine rastlanmaktadır. Aynı zamanda ebrotidin, roksatidin ve lafutidin gibi diğer H<sub>2</sub> reseptör antagonistlerinin de benzer yöntemlerle analiz edildiği kaynaklar mevcuttur (28-36). Bu analiz yöntemleri etken maddelerin birlikte analiz edildiği yöntemler olabildiği gibi tek etken madde üzerine yoğunlaşmış insan plazması ya da farmasötik preparatlardan analiz çalışmaları olabilmektedir.

H<sub>2</sub> reseptör antagonistlerin analizlerine ilişkin yayınların sayısı her ne kadar yüksek olsa da bu yöntemlerin çevreye ve insan sağlığına özellikle birincil kullanıcı olan analizcinin sağlığına duyarlılık konusuna dikkat çekilmediği görülmektedir. Bu tezde, bu boşluğu doldurmak amacıyla; klasik kromatografi yöntemlerinin hareketli fazlarında kullanılan toksik çözücülerin yeşil olanlarıyla yer değiştirilmesi sayesinde analiz performansı yitirmeden yeşil kromatografiye geçilmesi için toksik olmayan etanolün hareketli faz organik düzenleyici olarak kullanılması, böylece famotidin, nizatidin, ranitidin ve simetidin etken maddelerinin yeşil yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile eş zamanlı ayırımı yöntemi geliştirilmesi amaçlanmıştır. Yöntem geliştirme sürecinde en optimum kromatografik koşulları belirlemek amacıyla minimum analiz sayısı ile optimizasyon yeteneğine sahip dolayısıyla zaman ve enerji kazanımı sağlayarak yeşil kimya ilkeleriyle örtüşen kemometrik optimizasyon tekniği kullanılmıştır.

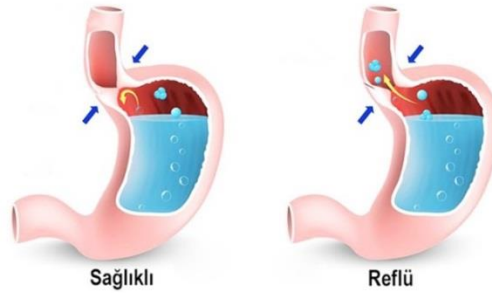
Geliştirilen yöntemin, famotidin etken maddesinin farmasötik preparatlardan analizi için simetidin iç standart olacak şekilde valide edilmesi planlanmıştır. Validasyon parametreleri (özgünlük, doğruluk, kesinlik, geri kazanım, duyarlılık, kararlılık, sağlamlık, tutarlılık) farmasötik preparattan famotidin analizi için değerlendirilerek geçerliliklerinin kanıtlanması amaçlanmıştır. Aynı zamanda Amerika Farmakopesi'nde (USP) famotidin tablet monografında miktar tayini analizi için belirtilen yöntemin de, validasyon parametreleri aynı olacak şekilde, valide edilmesi planlanmıştır. Valide edilen bu iki yöntemin famotidin içeren farmasötik preparatların analizine uygulanması ve sonuçların karşılaştırılması amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Gastroözofageal Reflü Hastalığı

Yemek yedikten sonra yenilen yemeğinin bir kısmının mide öz suyu ile birlikte ağıza geri gelmesi sağlıklı bebeklerde, çocuklarda ve gençlerde görülebilen normal bir süreçtir. Gastroözofageal reflü (GÖR) en çok bebeklerde görülmektedir ve her on bebekten dördünde etkilidir. Gastroözofageal reflü hastalığı ise (GÖRH) ciddi medikal tedavi gerektirmektedir (37).

Gastroözofageal reflü hastalığı özellikle batı dünyasında oldukça yaygın bir hastalıktır, ancak hastaların çok az bir kısmında endoskopik anormallikler olduğu için genellikle geç teşhis edilmekte ve tedavisinde geç kalınmaktadır (38). Hafif vakalarda çoğunlukla; mide ekşimesi, ağız kokusu, hıçkırık, reflü sebebiyle mideden geri gelen sıvının ağıza ulaşması ve dışarı çıkması gibi belirtileri vardır ve kontrol altında tutulabilmektedir. Sağlıklı ve reflü hastalığı olan kişilerin temsili mide görselleri Şekil 2.1’de verilmiştir.



**Şekil 2.1.** Sağlıklı ve reflü hastası kişilerin temsili mide görselleri.

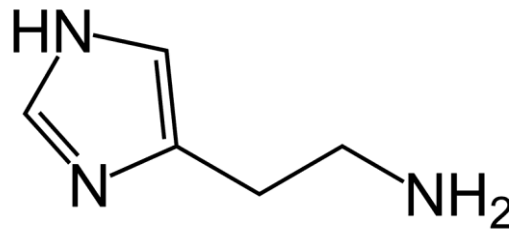
GÖRH'li bireyler Endoskopik-negatif reflü hastalığı (ENRH) olanlar, Eroziv Özofajiti olanlar ve Barrett Özofagusu olanlar olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır (39). Eroziv olmayan reflü hastalığında ise, endoskopik bir hasar tespit edilememekle birlikte reflüye ait semptomların bulunduğu GÖRH'nin en yaygın fenotipidir (2).

GÖRH ve benzeri mide asit salgısındaki anormallikler nedeniyle meydana gelen hastalıklarda, ciddi boyutlarda ameliyat gerektiren hastalık türleri hariç, tedavi

yöntemi olarak genellikle proton pompası inhibitörleri veya H<sub>2</sub> reseptör antagonistleri tercih edilmektedir. Proton pompası inhibitörü (PPI) veya H<sub>2</sub> reseptör antagonistleri ile iyileşme sonrası yüksek tekrarlama oranı nedeniyle, GÖRH genellikle uzun süreli idame tedavisine ihtiyaç duymaktadır. Ağır GÖRH vakaları için proton pompası inhibitörleri daha çok tercih edilmektedir. Bununla birlikte, H<sub>2</sub> reseptör antagonistleri, daha hafif GÖRH hastaları için yeterlidir. Son dönemde, günde iki kez PPI verilmesine rağmen gece asit salgısında azalmanın olmadığı vakalar tespit edilmiştir. H<sub>2</sub> reseptör antagonistlerinin, gece asit atılımını engellemek için PPI'den daha güçlü olduğuna dair çalışmalar devam etmektedir (40).

## 2.2. Histamin

Histamin ilk olarak 20. yüzyılın başlarında izole edilmiş ve karakterize edilmiştir. Temelde vücutta bulunan bir azot bileşiğidir (Şekil 2.2). Farklı organlardaki yumuşak kasları uyararak kasılmalarını sağlamakla görevli olan histaminin; makrofajlar, dendritik hücreler (DC'ler), T lenfositleri, B lenfositleri ve endotel hücreleri dahil olmak üzere bağışıklık tepkisi ve hematopoezin düzenlenmesinde yer alan hücrelerin sayısız işlevinde rol almaktadır ve bu hücreler histamin reseptörlerini ifade etmektedirler (41).



Şekil 2.2. Histaminin kimyasal yapısı.

Histamin reseptörlerinin ikiye ayrıldığı düşüncesi bilim dünyasında uzunca bir süre kabul görse de son dönemde üçüncü ve dördüncü tür reseptörler keşfedilmiştir.

**Tip-1 histaminik reseptör (H<sub>1</sub> reseptörü):** Tüm vücutta yaygın olarak bulunmasına karşın en önemli buldukları bölgeler damar endoteli ve damar duvarlarıdır. Bu reseptörler alerji gibi immün yanıt veya yangısal olaylarda mast hücrelerinden ve nötrofillerden salgılanan histaminlerin bağlandığı başlıca reseptörlerdir. Bu

reseptörlerin etkinliğine en güzel örnek alerjik reaksiyonlardır. H1 tipi antihistaminikler (veya antialerjikler) alerjik tepkilere ve taşıt tutmalarına karşı kullanılırlar ve esasta yatıştırıcılardır (örneğin klorfeniramin) (42).

**Tip-2 histaminik reseptör (H<sub>2</sub> reseptörü):** Bu tip reseptörlerin başlıca bulunduğu yerler mide mukozasına ait paryetal hücrelerdir. Histaminin bu reseptörlere bağlanması sonucu gastrik asit ve buna bağlı pepsin enzimi salınımı artarak mide faaliyetleri artırılır. H<sub>2</sub> reseptör antagonistleri (örneğin famotidin, nizatidin, ranitidin, simetidin.) bu asit ve enzim salgılanmasının azaltılması amacıyla kullanılır (9).

**Tip-3 histaminik reseptör (H<sub>3</sub> reseptörü):** Bu reseptörler yapılan çalışmalar sonucu beyinde bulunmuştur. H<sub>3</sub> reseptör antagonistlerinin merkezi sinir sistemi hastalıkları için kullanımı konusunda araştırmalar devam etmekte ve klinik çalışmalar yapılmaktadır (43).

### 2.3. H<sub>2</sub> reseptör Antagonisleri

Mide asidi salgısının anlaşılmasında ve asit-peptik bozuklukların tedavisindeki son kilometre taşları arasında H<sub>2</sub> reseptörlerinin keşfi ve antagonistlerinin geliştirilmesi, paryetal hücrelerin tanımlanması ve proton pompası inhibitörlerinin geliştirilmesi ve duodenal ülserin başlıca nedeni olarak *Helicobacter pylori*'nin belirlenmesi yer almaktadır (44).

H<sub>2</sub> reseptör antagonistlerinin, parietal hücrelerin bazolateral membranındaki H<sub>2</sub> reseptörlerine geri dönüşümlü bağlanma için histamin ile rekabet ettiği ve bu şekilde asit üretimini engelleyebildiği kanıtlanmıştır. Bu ilaçlar ile PPI'nin hangisinin daha etkili olduğu hala tartışılan bir konudur. Ancak H<sub>2</sub> reseptör antagonistlerinin 24 saatlik gastrik asit salgılanmasını %70'den fazla baskılayabildikleri kanıtlanmış bir gerçektir (26).

#### 2.3.1. Famotidin

- **Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri**

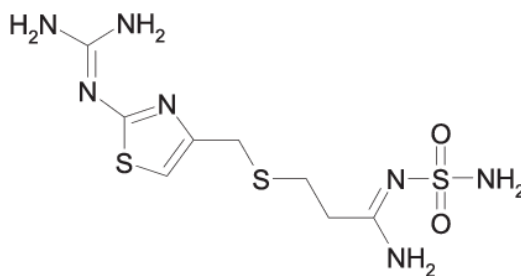
Famotidin, gastrik asit salgılanmayı inhibe etmek için çalışan bir H<sub>2</sub> reseptör antagonistidir. Yetişkinlerde ve çocuklarda mide ülseri ve gastroözofageal reflü



hastalığı (GÖRH) gibi asit salgılanmasıyla ilgili gastrointestinal durumlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Diğer H<sub>2</sub> reseptör antagonistleriyle karşılaştırıldığında, famotidin, bu reseptöre karşı yüksek seçicilik göstermektedir.

Famotidin'in, çeşitli tezgah üstü ve etiket dışı kullanımları da mevcuttur. Oral formülasyonları daha yaygın olarak kullanılırken, ilacın intravenöz solüsyonu hastane ortamlarında kullanılabilir.

Famotidin C<sub>8</sub>H<sub>15</sub>N<sub>7</sub>O<sub>2</sub>S<sub>3</sub> molekül formülüne ve 3-[[2-(diaminomethylidene amino)-1,3-thiazol-4-yl]methylsulfanyl]-N'-sulfamoyl propanimidamide kimyasal yapısına sahiptir (Şekil 2.3).



**Şekil 2.3.** Famotidin'in kimyasal yapısı.

Famotidin'in CAS numarası 76824-35-6'dır ve fiziksel ve kimyasal özellikleri Tablo 2.1'de verilmiştir (45).

**Tablo 2.1.** Famotidin'in fiziksel ve kimyasal özellikleri.

Özellik	Değer
Molekül Ağırlığı	337,45 g/mol
Erime Noktası	163,5 °C
Çözünürlük	20°C'de sudaki çözünürlüğü 1000 mg/L'dir.
LogP	-0,64
pK <sub>a</sub> (En güçlü Asidik)	9,29
pK <sub>a</sub> (En güçlü Bazik)	8,38

- **Farmakodinamik Özellikleri**

Oral uygulamadan (5 ve 40 mg) sonra, famotidin, doza bağlı bir şekilde bazal ve uyarılmış gastrik asit salgılanmayı inhibe etmektedir. Maksimum etki, aynı zamanda en büyük yanıt tekdüzeliğini veren 40 mg dozla elde edilmektedir. En yüksek aktiviteye ilk üç saat içinde ulaşmakta, etki 10, 12 saat sürmektedir.

Famotidinin intravenöz uygulaması benzer bir salgı önleyici profile sahiptir, intravenöz dozlar oral dozlardan iki kat daha güçlüdür, bu bulgu oral famotidinin ortalama yüzde 45 biyoyararlanımı ile tutarlıdır. Tek bir 40 mg'lık oral doz, gece bazal salgılanmayı yüzde 85'i aşan bir oranda inhibe eder. Deneysel bir öğüne verilen ortalama salgı tepkisi, 40 mg'lık bir dozdan üç saat sonra yüzde 85 ve 40 mg'lık bir dozdan sekiz saat sonra yüzde 30 oranında inhibe edilir (46).

- **Farmakokinetik Özellikleri**

**Emilim:** Oral uygulamayı takiben famotidin emilimi doza bağımlıdır. Oral biyoyararlanım %40-50 arasında değişir ve  $C_{maks}$ 'a dozlamadan 1-4 saat sonra ulaşılır. Biyoyararlanım, gıda alımı ile hafifçe artabilir ve antasitler tarafından azaltılabilirken, klinik bir önemi yoktur.

**Dağılım:** Kararlı durum dağılım hacmi 1,0 ila 1,3 L/kg arasındadır. Famotidin anne sütünde bulunur; ancak diğer  $H_2$  reseptör antagonistlerine kıyasla anne sütünde en düşük düzeylerde bulunur. Famotidinin proteine bağlanması yaklaşık %15 ila 22'dir.

**Metabolizma:** Famotidin minimum ilk geçiş metabolizmasına uğrar. İlacın yaklaşık %25-30'u hepatik metabolizma yoluyla elimine edilir. İnsanlarda tanımlanan tek metabolit S-oksittir.

**Eliminasyon:** Eliminasyon yarı ömrü yaklaşık 2-4 saat arasındadır. Böbrek fonksiyonu azalmış hastalarda yarı ömrün doğrusal olmayan bir şekilde artması beklenir. Uygulanan toplam famotidin dozunun yaklaşık %65-70'i böbrekle eliminasyona uğrar ve dozun %30-35'i metabolizma ile atılır. İntravenöz uygulamayı takiben, ilacın yaklaşık %70'i değişmemiş bir ilaç olarak idrarla atılır (47).

- **Yan Etkileri**

Aşağıda listelenen yan etkiler, yaklaşık 2500 hastada yapılan yerel ve uluslararası klinik deneyler sırasında rapor edilmiştir. Kontrollü klinik çalışmalarda famotidin ile tedavi gören hastaların baş ağrısı (4,7 %), baş dönmesi (1,3 %), kabızlık (1,2 %) ve ishal (1,7 %) gibi yan etkilerin meydana geldiği raporlanmış ancak bu yan etkilerin plasebo grubuyla benzerlik gösterdiği anlaşılmıştır. Yorgunluk, aritmi, çarpıntı, kusma, bulantı, ağız kuruluğu, tat bozukluğu ve uyku hali gibi diğer advers reaksiyonlar, klinik çalışmalarda veya ilaç piyasaya sürüldüğünden beri seyrek olarak bildirilmiştir.

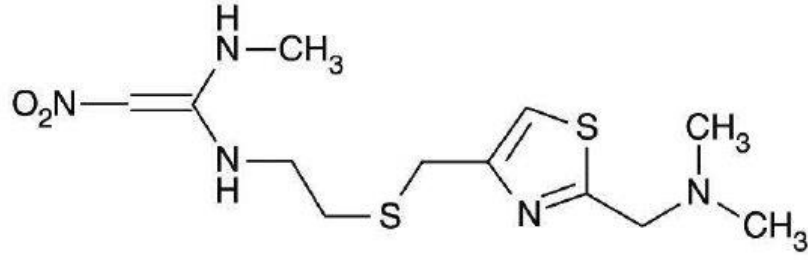
GÖRH semptomları (kusma ve huzursuzluk gibi) olan 1 yaşından küçük 35 pediyatrik hastada yapılan bir klinik çalışmada, famotidin alan 5 hastada ilaç kesildiğinde düzelen ajitasyon gözlenmiştir (48).

### 2.3.2. Nizatidin

- **Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri**

Nizatidin, mide ve bağırsak ülserlerini tedavi etmek ve iyileştikten sonra geri gelmelerini önlemek için kullanılır. Bu ilaç ayrıca belirli mide ve boğaz (yemek borusu) problemlerini (eroziv özofajit, gastroözofageal reflü hastalığı-GERD gibi) tedavi etmek için kullanılır. Midenizin yaptığı asit miktarını azaltarak çalışır. Geçmeyen öksürük, mide ağrısı, mide ekşimesi ve yutma güçlüğü gibi semptomları giderir. Nizatidin, H<sub>2</sub> blokerleri olarak bilinen bir ilaç sınıfına aittir.

C<sub>12</sub>H<sub>21</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>S<sub>2</sub> molekül formülüne ve (E)-1-N'-[2-[[2-[(dimethylamino)methyl]-1,3-thiazol-4-yl]methylsulfanyl]ethyl]-1-N-methyl-2-nitroethene-1,1-diamine kimyasal yapısına sahiptir (Şekil 2.4).



**Şekil 2.4.** Nizatidinin kimyasal yapısı.

Nizatidin'in CAS numarası 76963-41-2'dir ve fiziksel ve kimyasal özellikleri Tablo 2.2'de verilmiştir (49).

**Tablo 2.2.** Nizatidinin fiziksel ve kimyasal özellikleri.

Özellik	Değer
Molekül Ağırlığı	331,5 g/mol
Erime Noktası	130-132 °C
Çözünürlük	Suda az, metanolde çok çözünmektedir.
LogP	1,1
pK <sub>a</sub> (En güçlü Asidik)	2,1
pK <sub>a</sub> (En güçlü Bazik)	6,8

- **Farmakodinamik Özellikleri**

Hayvan çalışmalarında, nizatidinin, H<sub>2</sub> reseptör bölgelerinde yarışmacı bir histamin inhibitörü olduğunu göstermiştir. *In vitro* ve *in vivo* olarak, bazal gastrik asit salgılanmayı inhibe etmede ve metakolin ve tetragastrin tarafından indüklenende simetidinden ağırlık bazında daha aktiftir.

Sağlıklı deneklerde, nizatidin 30, 100 ve 300 mg'ın tek oral akşam dozları, gece gastrik asit salgılanmasını sırasıyla %57, %73 ve %90 oranında inhibe etmiştir. Nizatidin 150 veya 300 mg'ın sağlıklı deneklerde pentagastrine ve kafein ile uyarılan asit salgısını inhibe etmede simetidin 300 mg'dan önemli ölçüde daha güçlü olduğu (p<0,05), ancak pentagastrin ile uyarılan asit salgılanmasına karşı 150 mg ranitidin'den daha az etkili olduğu gösterilmiştir. İlk kanıtlara göre pepsin çıktısı, tekrarlayan nizatidin uygulamasından çok az etkilenmiş gibi görünmektedir. Sağlıklı

gönüllülerde ve duodenum ülseri hastalarında serum gastrin derişimleri, oral nizatidin uygulamasıyla önemli ölçüde değişmez. Nizatidin, hormon işlevini veya doğurganlığı etkilemiyor gibi görünmektedir ve simetidin aksine hayvanlarda veya insanlarda herhangi bir antiandrojenik etkiye sahip değildir. Çalışmalar, nizatidin diğer ilaçların hepatik metabolizmasını etkilemediğini göstermektedir (50).

- **Farmakokinetik Özellikleri**

**Emilim:** Oral uygulamayı takiben famotidin emilimi doza bağımlıdır. Oral biyoyararlanım %40-50 arasında değişir ve  $C_{maks}$ 'a dozlamadan 1-4 saat sonra ulaşılır. Biyoyararlanım, gıda alımı ile hafifçe artabilir ve antasitler tarafından azaltılabilirken, klinik bir önemi yoktur.

**Dağılım:** Dağılım hacmi 0,8-1,5 L/kg'dır. Nizatidin kısa yarılanma ömrü ve hızlı klerensi nedeniyle, yatmadan önce günde bir kez 300 mg veya günde iki kez 150 mg alan normal böbrek fonksiyonu olan kişilerde ilacın birikmesi beklenmez. Nizatidin, önerilen doz aralığının üzerinde doz orantılılığı sergiler.

**Metabolizma:** Oral dozun %7'sinden azı, idrarla atılan başlıca metabolit olan bir  $H_2$  reseptör antagonisti olan  $N_2$ -monodlar-metilnizatidin olarak karaciğerde metabolize edilir. Diğer muhtemel metabolitler,  $N_2$ -oksit (dozun %5'inden azı) ve S-oksittir (dozun %6'sından azı).

**Eliminasyon:** Eliminasyon yarı ömrü yaklaşık 1 ila 2 saattir. Oral nizatidin dozunun %90'ından fazlası 12 saat içinde idrarla atılır. Oral dozun yaklaşık %60'ı değişmemiş ilaç olarak atılır. Böbrek klerensi yaklaşık 500 mL/dk'dır ve bu, aktif tübüler salgılama ile atılımı gösterir. Uygulanan dozun %6'dan azı dışkıyla atılır.

Orta veya şiddetli böbrek yetmezliği, yarı ömrü önemli ölçüde uzatır ve nizatidin klerensini azaltır. Fonksiyonel olarak anefrik olan bireylerde yarılanma ömrü 3.5-11 saat arasındadır ve plazma klerensi 7 ila 14 L/saattir. Klinik olarak belirgin böbrek yetmezliği olan kişilerde ilacın birikmesini önlemek için, Axid (nizatidin) dozlarının miktarı ve/veya sıklığı, disfonksiyonun ciddiyeti ile orantılı olarak azaltılmalıdır (51).

- **Yan etkileri**

Dünya çapında, değişen sürelerdeki çalışmalarda 6000'den fazla hasta kontrollü nizatidin klinik deneylerine katılmıştır. Amerika Birleşik Devletleri ve Kanada'daki plasebo kontrollü çalışmalar yapılmış olup, bu çalışmalar, nizatidin verilen 2600'den fazla hastayı ve plasebo verilen 1700'den fazla hastayı kapsamaktadır. Bu plasebo kontrollü çalışmalarda advers olaylar arasında anemi (%0,2'ye karşı %0) ve ürtiker (%0,5'e karşı %0,1) nizatidin grubunda önemli ölçüde daha yaygın gözlemlenmiştir. Bu çalışmalarda baş ağrısı, ateş, ishal, kusma, kabızlık, baş dönmesi, anksiyete, yorgunluk, aritmi, çarpıntı ve uyku hali gibi diğer advers reaksiyonlar da bildirilmiş ancak nizatidinle ilişkisi kanıtlanmamıştır.

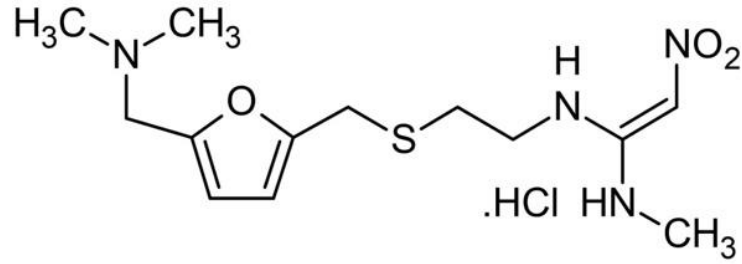
Klinik farmakoloji çalışmaları, kontrollü klinik deneyler ve ürünün piyasada olduğu süre boyunca bildirilen diğer yan etkiler arasında karaciğer enzim testlerinde yükselme, hepatit, sarılık, tersine çevrilebilen zihinsel karışıklık, libido eksikliği, iktidarsızlık, terleme, aşırı duyarlılık, ateş ve mide bulantısı yer almaktadır. Bu yan etkiler ilacı kullanan hastalar arasında sıklıkla gözlemlenmemekle birlikte klinik çalışmalarda plasebo grubunda da aynı yan etkilerin gözlemlenmesi sonucu nizatidinle ilişkileri kesin olarak kanıtlanmış değildir (52).

### 2.3.3. Ranitidin

- **Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri**

Ranitidin, asit-peptik hastalık ve mide ekşimesi tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir histamin tip 2 reseptör antagonistidir.

(E)-1-N'-[2-[[5-[(dimethylamino)methyl]furan-2-yl]methylsulfanyl]ethyl]-1-N-methyl-2-nitroethene-1,1-diamine kimyasal yapısına ve  $C_{13}H_{23}ClN_4O_3S$  HCl molekül formülüne sahiptir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Ranitidinin kimyasal yapısı.

Ranitidin'in CAS numarası 82530-72-1'dir ve fiziksel ve kimyasal özellikleri Tablo 2.3'de verilmiştir (53).

**Tablo 2.3.** Ranitidinin fiziksel ve kimyasal özellikleri.

Özellik	Değer
Molekül Ağırlığı	314,4 g/mol
Erime Noktası	134 °C
Kaynama Noktası	437,1 ± 45,0°C
Çözünürlük	Suda çözünebilir (0,0795 mg/mL)
LogP	0,2
pK <sub>a</sub>	8,2 ve 2,7

- **Farmakodinamik Özellikleri**

Ranitidinin, gastrik asit salınımında son ortak yola aracılık ediyor gibi görünen histamin H<sub>2</sub> reseptörlerini spesifik olarak antagonize ettiğini *in vitro* çalışmalar göstermiştir.

Normal gönüllülerde ve peptik ülser hastalığı olan hastalarda, günde 150 mg veya sabah ve akşam olarak bölünmüş dozda günde 300 mg ranitidin, 24 saatte düşük intragastrik pH-metri okumalarının sayısını ve ağırlıklı olarak gece asit salgılanmasını baskılanması yoluyla 24 saatlik entegre hidrojen iyonu aktivitesini azaltmaktadır (54).

Ranitidin ayrıca, azalan mide asiditesi ile bağlantılı olarak pepsin aktivitesinin azalmasına neden olan pepsin çıkışını da baskılamaktadır. Peptik ülser hastalığının ranitidin tedavisi sırasında elde edilen asit ve pepsin inhibisyonu modeli,

kritik hastalarda yüksek doz intravenöz rejimler tarafından üretilen sürekli aklorhidri sırasında kolonizasyon meydana gelebilmesine rağmen, midenin mikrobiyal kolonizasyonunu kolaylaştırmıyor gibi görünmektedir.

Bazı çalışmalar, ranitidin tedavisinin serum gastrin derişiminde bir artış ve/veya yemekle uyarılan gastrin salınımında bir artış ile ilişkili olduğunu ileri sürmektedir. Ranitidin kesildiğinde yükselmiş serum gastrin derişimleri tedavi öncesi seviyelere dönmektedir (55-59).

Ranitidin, bir imidazol çekirdeğinden ziyade bir furana sahip olduğundan, sitokrom P450'ye sadece zayıf bir şekilde bağlanır ve sonuç olarak karaciğer tarafından ilaç metabolizması üzerinde minimum etkiye sahiptir (60).

- **Farmakokinetik Özellikleri**

**Emilim:** Ranitidin Tabletler, 150 mg'lık bir dozdan yaklaşık 3 saat sonra meydana gelen ortalama 440-545 µg/mL aralıkta bir intravenöz (iv) enjeksiyona kıyasla, oral uygulamadan sonra %50 oranında emilmektedir. Emilim, gıda veya antasitlerin uygulanmasıyla önemli ölçüde etkilenmemektedir.

**Dağılım:** Dağılım hacmi yaklaşık 1,4 L/kg'dır. Serum protein bağlanması ortalama %15'tir.

**Metabolizma:** İnsanlarda, idrardaki başlıca metabolit N-oksittir; ancak bu, dozun <%4'ü kadardır. Diğer metabolitler S-oksit (%1) ve desmetil ranitidindir (%1). Uygulanan dozun geri kalanı dışkıda bulunur. Karaciğer fonksiyon bozukluğu (kompanse siroz) olan hastalarda yapılan çalışmalar, Ranitidin'in yarı ömründe, dağılımında, klerensinde ve biyoyararlanımda minör fakat klinik olarak önemsiz değişiklikler olduğunu göstermektedir.

**Eliminasyon:** Başlıca atılım yolu idrardır ve oral yoldan verilen dozun yaklaşık %30'u 24 saat içinde değişmemiş ilaç olarak idrarda toplanır. Böbrek klerensi yaklaşık 410 mL/dk olup, aktif tübüler atılımı gösterir. Eliminasyon yarı ömrü yaklaşık 3 saattir. 50 mg Ranitidin intravenöz olarak uygulanan klinik olarak anlamlı böbrek fonksiyon bozukluğu (kreatinin klerensi 25-35 mL/dk. arasında) olan dört hastada ortalama plazma yarılanma ömrü 4,8 saat, Ranitidin klerensi 29 mL/dk. ve



dağılım hacmi 1,76 L/kg olarak bulunmuştur. Genel olarak, bu parametrelerin kreatinin klirensi ile orantılı olarak değiştiği görülmektedir (61).

- **Yan Etkileri**

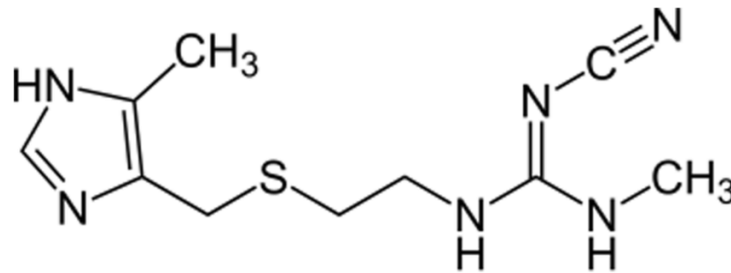
Ranitidin'in yaygın yan etkileri arasında baş ağrısı, ishal ve mide bulantısı bulunmaktadır. Bu yan etkiler hafif ve geçicidir. Nadir, ciddi yan etkileri arasında karaciğer yetmezliği, akut porfiri ve pnömonili hastalarda akut porfiri atakları yer almaktadır (62).

#### 2.3.4. Simetidin

- **Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri**

Simetidin, geniş klinik uygulaması olan ilk histamin H<sub>2</sub> reseptör antagonistidir. Biyolojik sıvılarda bir dizi yüksek basınçlı sıvı kromatografik yöntemle ölçülebilen zayıf bir baz ve suda çözünürlüğü yüksek bir bileşiktir.

Simetidin de aynı Ranitidin gibi, asit-peptik hastalık ve mide ekşimesi tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir histamin tip 2 reseptör antagonistidir. 1-cyano-2-methyl-3-[2-[(5-methyl-1H-imidazol-4-yl)methylsulfanyl]ethyl] guanidine kimyasal yapısına ve C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>N<sub>6</sub>S molekül formülüne sahiptir (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Simetidin'in kimyasal yapısı.

Simetidin'in CAS numarası 51481-61-9'dir ve fiziksel ve kimyasal özellikleri Tablo 2.4'de verilmiştir (63).

**Tablo 2.4.** Simetidin'in fiziksel ve kimyasal özellikleri.

Özellik	Değer
Molekül Ağırlığı	252,34 g/mol
Erime Noktası	142 °C
Çözünürlük	25 °C'de sudaki çözünürlüğü 9380 mg/L'dir.
LogP	0,40
LogS	-1,35
pK <sub>a</sub>	6,8

- **Farmakodinamik Özellikleri**

Simetidin bazal ve gece gastrik asit salgılanmasını ve gastrik hacim, asitlik ve gıda, kafein, insülin, betazol veya pentagastrin dahil olmak üzere uyarılara yanıt olarak salınan gastrik asit miktarında bir azaltmaya yardımcı olmaktadır. Mide veya duodenum ülseri, gastroözofageal reflü hastalığı ve patolojik hipersekretuar durumlar gibi gastrointestinal bozuklukları tedavi etmek için kullanılmaktadır. Simetidin, hepatic CYP450 enzim sisteminin birçok izoenzimini inhibe etmektedir. Simetidin'in nitrat indirgeyen organizmalar gibi mide bakteri florasında bir artışı sağlamak gibi etkileri de bulunmaktadır (63).

- **Farmakokinetik Özellikleri**

Simetidin, gastrik parietal hücrenin bazolateral membranında bulunan bir H<sub>2</sub> reseptörüne bağlanarak histamin etkilerini bloke etmektedir. Bu yarışmalı inhibisyon, gastrik asit sekresyonunun azalmasına ve gastrik hacim ve asitliğin azalmasına neden olmaktadır (64).

**Emilim:** Gastrointestinal sistemdeki kesintili absorpsiyonun bir sonucu olarak, simetidin'in oral uygulamasından sonra genellikle iki doruk plazma derişimi gözlenmektedir. Sağlıklı hastalarda simetidin'in mutlak biyoyararlanımı yaklaşık %60'tır; bununla birlikte, peptik ülser hastalığı olan hastalarda biyoyararlanım %70 kadar yükselebilmektedir. Genel olarak, peptik ülser hastalığı olan hastalarda biyoyararlanım oranları çok daha değişkenlik göstermektedir.

**Dağılım:** Simetidin, tüm dokularda yaygın olarak dağılmaktadır. Kan-beyin engelini geçebilmekte ve merkezi sinir sisteminde, baş ağrısı, baş dönmesi ve uyuklama gibi etkiler yaratabilmektedir. Simetidin'in dağılım hacmi yetişkinlerde 0,8 L/kg ve çocuklarda 1,2-2,1 L/kg aralığındadır (65).

**Metabolizma:** Simetidin'in birincil metaboliti simetidin sülfoksittir ve toplam eliminasyonun tahmini %10-15'ini temsil etmektedir. Araştırmacılar ayrıca, toplam eliminasyonun sadece %4'ünü temsil eden imidazol halkası üzerinde hidroksillenmiş bir metil grubuna sahip küçük bir simetidin metaboliti tanımlamışlardır. Hem sitokrom P450 enzimleri hem de flavin içeren monooksijenazlar, hangi spesifik enzimlerin dahil olduğu belirsiz olmasına rağmen, simetidin metabolizmasında rol oynamaktadır. Simetidin iyi bilinen bir enzim inhibitörüdür ve birlikte uygulanan bazı ilaçların metabolizmasını bozabilmektedir.

**Eliminasyon:** Simetidin esas olarak idrarla atılmaktadır. Örneğin, intravenöz uygulamasından sonra, ana ilacın çoğunluğu (%58-77) idrarda değişmeden atılmıştır. Simetidin'in yarı ömrünün yaklaşık 2 saat olduğu tahmin edilmektedir (63).

- **Yan Etkileri**

Ranitidin, famotidin ve nizatidin dahil olmak üzere diğer H<sub>2</sub> reseptör blokörleri ile klinik olarak ilaç etkileşimleri gözlenmemektedir. Simetidin, mide içeriğinin pH'ını yükseltir. Bu artan pH, çözünmesi için daha düşük bir pH gerektiren ilaçların emiliminin azalmasına veya midede asit inaktivasyonu ile azalan emilim ile ilaçların emiliminin artmasına neden olabilmektedir (66).

Baş ağrısı, baş dönmesi, uyuşukluk veya ishal simetidin kullanımından sonra genellikle görülen yan etkilerdendir. İlacın kullanımı esnasında; zihinsel/ruh hali değişiklikleri (ajitasyon, kafa karışıklığı, depresyon, halüsinasyonlar gibi), idrar yapma zorluğu, kas/eklem ağrısı, erkeklerde meme şişmesi/ağrısı, cinsel yetenekte azalma (bu ilacın çok yüksek dozları ile), kolay morarma/kanama, enfeksiyon belirtileri (ateş, inatçı boğaz ağrısı, öksürük, nefes almada güçlük), hızlı/yavaş/düzensiz kalp atışı, olağandışı yorgunluk, kalıcı mide bulantısı/kusma, şiddetli mide/karın ağrısı, koyu renkli idrar, sararma gözler/cilt, böbrek sorunları

belirtileri gibi ciddi yan etkiler çok nadir olsa da gözlenmiştir. Bu gibi durumlarda ilaç acilen bırakılmalı ve doktor kontrolüne gidilmelidir (67).

#### 2.4. H<sub>2</sub> reseptör Antagonistlerinin Literatürdeki Analiz Yöntemleri

Çakar ve diğ., (14) nizatidinin insan plazmasından ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile tayini için yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntemde Floresans detektörü tercih edilmiş olup 461 nm (uyartı) ve 517 nm (emisyon) dalga boylarında çalışılmıştır. Çalışmada 5 µm partikül boyutlu C18 (150 mm x 4,6 mm i.ç.) kolon kullanılmış olup hareketli faz olarak metanol: su (55.45, h/h) karışımı seçilmiştir. Akış hızı 1,2 mL/dk. olarak ayarlanmıştır. Geliştirilen yöntemde 50 – 2000 µg/mL derişim aralığında doğrusal cevap elde edilmiştir.

Ulu ve diğ., (15) ranitidinin insan plazmasından ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile tayini için yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntemde Floresans detektörü tercih edilmiş olup 458 nm (uyartı) ve 521 nm (emisyon) dalga boylarında çalışılmıştır. Çalışmada 5 µm partikül boyutlu C18 (150 mm x 4,6 mm i.ç.) kolon kullanılmış olup hareketli faz olarak metanol: su (60.40, h/h) karışımı seçilmiştir. Akış hızı 1,2 mL/dk. olarak ayarlanmıştır. Geliştirilen yöntemde 50 – 2000 µg/mL derişim aralığında doğrusal cevap elde edilmiştir. Ranitidin ve lisinopril etken maddeleri için alıkonma zamanları sırasıyla 3,24 ve 2,25 dakika olarak bulunmuştur.

Arayne ve diğ., (16) metformin, simetidin, famotidin ve ranitidin etken maddelerinin eş zamanlı olarak hem farmasötik preparatlardan hem de insan plazmasından ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile tayini için yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntemde UV detektörü kullanılmış olup 229 nm dalga boyunda çalışılmıştır. 5 µm partikül boyutlu C18 (250 mm x 4,6 mm i.ç.) kolon tercih edilmiş olup hareketli faz olarak pH'sı 3,0 olacak şekilde fosforik asitle ayarlanmış metanol: su: trietilamin (20.80.0,5, h/h/h) karışımı seçilmiştir. Akış hızı 1,0 mL/dk. olarak ayarlanmıştır. Geliştirilen bu yöntem tüm validasyon parametrelerini sağlamıştır. Simetidin, famotidin ve ranitidin için alıkonma zamanları sırasıyla 4,76, 6,81 ve 8,12 dakika olarak bulunmuştur. Tüm etken maddeler için 5,0 – 25,0 µg/mL derişim aralığında doğrusal cevap elde edilmiştir.

Ashiru ve diğ., (17) simetidin, ranitidin, famotidin ve nizatidin etken maddelerinin eş zamanlı olarak idrardan ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile tayini için yöntem geliştirmişlerdir. Daha sonra geliştirilen bu yöntem ranitidin ve metabolitlerinin analizinde kullanılmıştır. Bu yöntemde UV detektörü tercih edilmiş olup tüm etken maddelerin analizi için 230 nm, ranitidin ve metabolitlerinin analizinde 320 nm dalga boyunda çalışılmıştır. Çalışmada 5 µm partikül boyutlu SCX (250 mm x 4,6 mm i.ç.) kolon kullanılmış olup hareketli faz olarak pH'sı 5,0 olacak şekilde glasiyel asetik asitle ayarlanmış asetonitril:0,1 M sodyum asetat tamponu (20.80, h/h) karışımı seçilmiştir. Akış hızı 2,0 mL/dk. olarak ayarlanmıştır. Famotidin, simetidin, ranitidin ve nizatidin için alıkonma zamanları sırasıyla 5,1, 5,6, 9,5 ve 9,9 dakika olarak bulunmuştur. Tüm etken maddeler için 500 µg/mL derişime kadar doğrusal cevap elde edilmiştir.

Assali ve diğ., (18) indomethasin, parasetamol ve famotidin etken maddelerinin eş zamanlı olarak farmasötik preparattan ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile tayini için yöntem geliştirmişlerdir ve validasyon çalışmaları yürütmüşlerdir. Bu yöntemde UV detektörü tercih edilmiş olup tüm etken maddelerin analizi için 275 nm dalga boyunda çalışılmıştır. Çalışmada 5 µm partikül boyutlu C18 (250 mm x 4,6 mm i.ç.) kolon kullanılmış olup hareketli faz olarak pH'sı 5,0 olacak şekilde ayarlanmış asetonitril: sodyum asetat tamponu (60.40, h/h) karışımı seçilmiştir. Akış hızı 1,4 mL/dk. olarak ayarlanmıştır. Famotidin, parasetamol ve indomethasin etken maddeleri için alıkonma süreleri 3,22, 3,62 ve 7,75 dakika olarak bulunmuştur. Tüm etken maddeler için 0,01 – 0,1 µg/mL derişim aralığında doğrusal cevap elde edilmiştir.

Zarghi ve diğ., (22) famotidinin insan plazmasından ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile tayini için yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntemde UV detektörü tercih edilmiş 267 nm dalga boyunda çalışılmıştır. Çalışmada monolitik kolon (RP-18e, 100 mm x 4,6 mm i.ç.) kullanılmış olup hareketli faz olarak pH'sı 6,5 olacak şekilde ayarlanmış 0,03M disodyum hidrojen fosfat tamponu: asetonitril (93.7, h/h) karışımı seçilmiştir. Akış hızı 1,5 mL/dk. olarak ayarlanmıştır. Famotidin ve ranitidin için alıkonma zamanları sırasıyla 3,3 ve 4,3 dakika olarak bulunmuştur. Yöntemde gözlenebilme sınırı 5 µg/mL olarak

bulunmuştur. Tüm etken maddeler için 20 - 400 µg/mL derişim aralığında doğrusal cevap elde edilmiştir.

Zendelovska ve diğ., (23) ranitidin ve simetidin etken maddelerinin eş zamanlı olarak insan plazmasından ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile tayini için yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntemde UV detektörü tercih edilmiş, 230 nm dalga boyunda çalışılmıştır. 5 µm partikül boyutlu *RP-Select B* (250 mm x 4,6 mm i.ç.) kolon kullanılmış olup hareketli faz olarak %0,2 (h) trietilamin, %85,8 (h) pH'sı 6,8 olacak şekilde ayarlanmış 0,04 mol/L potasyum dihidrojen fosfat tamponu ve %14 (h) asetonitril karışımı seçilmiştir. Akış hızı 1,0 mL/dk olarak ayarlanmıştır. Yöntemde famotidin iç standart olarak kullanılmıştır. Famotidin, ranitidin ve simetidin için alıkonma zamanları 5,2, 7,8 ve 8,9 dakika olarak bulunmuştur. Toplam analiz süresi ise 11 dakikadır. Ranitidin ve simetidin için sırasıyla 50 – 1000 ve 50 – 2000 µg/mL derişim aralığında doğrusal cevap elde edilmiştir.

Nevado ve diğ., (24) simetidin, ranitidin, roksatidin, nizatidin ve famotidin etken maddelerinin eş zamanlı olarak idrardan susuz kapiller elektroforez ve ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile tayini için yöntem geliştirmişlerdir. Daha sonrasında geliştirilen bu iki yöntemi valide edip performans karşılaştırması yapmışlardır. HPLC yönteminde 5 µm partikül boyutlu C18 (150 mm x 4,6 mm i.ç.) kolon kullanılmış olup hareketli faz olarak pH'sı 7,5 olacak şekilde ayarlanmış asetonitril:20 mM fosfat tamponu (20.80, h/h) karışımı seçilmiştir. Akış hızı 1,0 mL/dk olarak ayarlanmıştır. Famotidin, simetidin, nizatidin ve ranitidin için alıkonma zamanları sırasıyla 2,9, 3,2, 3,9 ve 4,8 dakika olarak bulunmuştur.

Wu ve diğ., (25) simetidin, ranitidin, famotidin ve nizatidin etken maddelerinin eş zamanlı olarak kapiller elektroforez ile tayini için yöntem geliştirmişlerdir. Analiz pH3,5 100 mM fosfat tamponunda, 20 kV akım uygulanarak gerçekleştirilmiştir ve 214 nm dalga boyunda çalışılmıştır. Çalışmada kaplanmamış silika kapiller (30 cm x 50 µm i.ç.) kolon kullanılmıştır. Geliştirilen yöntem tüm validasyon parametrelerini sağlamaktadır ve tüm etken maddeler için limitlere uygun ayırım gerçekleştirilmiştir.

Ahmed ve diğ., (26) famotidin, nizatidin ve ranitidin etken maddelerinin eş zamanlı olarak farmasötik preparatlardan stabilite göstergeli yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi ile tayini için yöntem geliştirmişlerdir. Bu çalışmada TLC tarayıcısı detektör olarak kullanılmış, ranitidin ve nizatidin için 320 nm, famotidin için 280 nm dalga boyunda çalışılmıştır. Camag 100 µL numune enjektörü kullanılarak 4 mm bant genişliğinde numune belirlenmiştir. Silika jel ile kaplanmış alüminyum tabaka (10 cm x 10 cm, 250 µm kalınlık) numune uygulayıcısı olarak kullanılmıştır. Uygulama hızı 0,1 mL/s ve bantlar arası boşluk yaklaşık 4 mm olacak şekilde çalışmalar yapılmıştır. Hareketli faz olarak; ranitidin için asetonitril: asetat tamponu (pH 5,8 olacak şekilde ayarlanmış) (60.40, h/h), nizatidin için (70.30, h/h) ve famotidin için asetonitril: 5M amonyum hidroksit tamponu (80.20, h/h) tercih edilmiştir. Yöntemde gözlenebilme sınırı ve alt tayin sınırı sırasıyla 5.47-9.37 ve 16.30-31.26 µg/bant olarak bulunmuştur.

## 2.5. Yeşil Kimya

Yeşil kimyanın temel amacı proseslerin sentez ve diğer aşamalarında kullanılan kimyasal miktarının azaltılması ya da bu kimyasalların çevreye daha duyarlı olanlarla değiştirilmesiyle hem insan sağlığına hem de çevreye verilen zararı azaltmaktır (68). Özellikle son yıllarda yeşil kimyaya, diğer isimleriyle; Çevreye Duyarlı Kimya, Temiz Kimya, Atom Ekonomisi ve Tasarımına Göre İyi Huyulu Kimya, artan ilgiyle birlikte etkili, verimli ve çevreye daha duyarlı birçok yenilikçi adım atılmıştır. Bu adımlar, yeni sentezler ve süreçlerin yanı sıra, yeni analiz yöntemleri ve tayin yöntemleri olarak literatürde kendine yer bulmuştur (69).

Çevreye zararsız olmayan hiçbir şey olmamakla birlikte, insan sağlığı ve çevre için daha zararlı olduğu bilinen maddeler de bulunmaktadır. Kimyasalların insan sağlığına ve ekolojiye etkileri hakkında mevcut kapsamlı verilerin kullanılmasıyla, belirli bir sentez veya proste hangi kimyasalların kullanılmasının daha uygun olacağı konusunda bilinçli seçimler yapılarak yeşil kimyaya küçük de olsa bir adım atılmalıdır. Basitçe ifade etmek gerekirse, yeşil kimya, insan sağlığına ve/veya çevreye zararlı hammaddelerin, ürünlerin, yan ürünlerin, çözücülerin, reaktiflerin vb. kullanımını veya oluşumunu azaltan ya da ortadan kaldıran kimya tekniklerinin ve metodolojilerinin kullanılmasıdır.

Kimyasal atıkların arıtılması ve tehlikeli atıkların güvenli hale getirilmesi, hava, su ve topraktaki kontaminasyonu tespit etmek için yeni izleme ve analitik araçların geliştirilmesi, maruziyeti en aza indirmek için yeni işleme prosedürleri ve muhafaza teknolojileri her ne kadar risklerin azaltılmasında övgüye değer çabalar olsa da (70-79), yeşil kimya dahilinde değil, kirletici ve atık kontrolüne yönelik yaklaşımlardır. Yeşil kimyada atıkların azaltılması son çare olarak tercih edilmektedir. Öncelikle atık sayılabilecek tehlikeli maddelerin kimyasal tasarım, üretim, analiz, kullanım ve bertaraf dahil olmak üzere süreçten tamamen çıkarılmasına yönelik çalışılmaktadır. Kısaca yeşil kimya proaktiftir (80).

## 2.6. Yeşil Analitik Kimya

Analitik kimyanın, kimyanın analize ve geliştirmeye ayrılmış bölümü olduğunu düşünmek gibi, yeşil analitik kimya da tüm yeşil kimya fikrinin bir parçası olarak düşünülmelidir. Bununla birlikte, analitik kimyanın aslında kimyanın yalnızca basit bir bölümü olduğu düşünülmemelidir. Atomlar, moleküller ve kimyasal yapılar arasındaki farkları araştırmaktan oluşan analitik bir bakış açısıyla gözlemlenen tüm kimya, analitik kimyadır. Periyodik tablonun elementleri arasındaki bağlantıları göz önünde bulundurmanın veya fonksiyonel grupların varlığından molekülleri değerlendirmenin ötesinde, görünüşte benzer olan atomlar ve moleküller arasındaki farklılıklara odaklanır. Bu nedenle analitik çalışmaları yeşillendirmek için net bir yönlendirme sağlayabilmek amacıyla Yeşil Analitik Kimya'nın sahip olması gereken birçok özelliği vardır (81).

### 2.6.1. Yeşil Analitik Kimyanın Tarihçesi

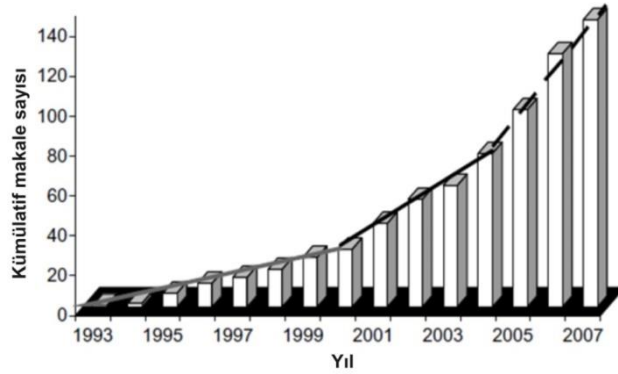
Yeşil analitik kimyanın çıkışı 1987'de Paris'te *Euroanalysis VI* sırasında Malissa, analitik kimyadaki paradigmalardaki değişiklikler hakkındaki fikirlerini sunmasıyla başlamıştır. Tarihte kimyanın kapsadığı farklı aşamalara dayanan bu tez, yirminci yüzyılın sonunda empoze edilen ekolojik paradigma kavramını içermektedir. Bu fikirler, 1985'te ABD'de yayınlanan Pimentel raporunun (82), kimyanın Dünya'nın sağlığı üzerindeki etkisi hakkındaki sonuçlarıyla uyumlu bulunmuştur. On yıl sonra, Birleşik Krallık'taki "*Royal Society of Chemistry*"nin "*The Analyst*" dergisi, Çevresel Analitik Kimya konusunu, analitik uygulamaların



çevresel yan etkilerini de dikkate alan, analitik kimyaya bütünleşik bir yaklaşımda analitik uygulamaların bir modeli olarak önerilmiştir (83).

Yeşil kimya ile ilgili ilk teori ve fikirler, analitik laboratuvarlarında geliştirilmiştir. Analitik topluluğu kullanılan yöntemlerin çevreye duyarlı olmasına, çözücü ve reaktif tüketimini azaltarak analitik yöntemleri geliştirme fikri teorik gelişmelerden önce gelse de, yeşil analitik kimya yöntemlerinin ilk tanımları 1995 yılında ortaya çıkmıştır. Bununla birlikte, bu yeni fikirlerin ışığında, hem numune ön işleme hem de ölçüm yöntemlerindeki önceki gelişmeler, analitik kimyaya yeni entegre yaklaşıma dahil edilmiştir (83).

Yeşil analitik kimya ile ilgili bilimsel referanslar son yıllarda önemli ölçüde artmıştır. Bu konudaki literatürün 1990'lardan bu yana katlanarak büyüdüğünü ve yirminci yüzyılın sonunda ve bu yeni yüzyılda bilimsel literatür üretim oranında iki açık değişiklik tespit edilebileceğini göstermektedir (Şekil 2.7). Yeşil analitik kimya yöntemlerine ilişkin yayın oranındaki bu artış, bilim camiasının faaliyetlerinin çevresel etkisi hakkında artan endişesiyle ilgilidir (83).



**Şekil 2.7.** Yeşil Analitik Yöntemler hakkında bilimsel literatürün gelişimi (83).

Dünya'daki her gelişme sürecinde olduğu gibi yeşil analitik kimyanın yaygınlaşmaya başlamasında rol oynayan birden fazla kilometre taşı bulunmaktadır. Yeşil kimya anlayışının ortaya atılmasından akış enjeksiyon analizine, süper kritik sıvı tüketmesinden ultra performanslı sıvı kromatografisinin (UPLC) geliştirilmesine kadar bu yapı taşları birbiri üstüne konmuş ve yöntemlerin yeşilleştirilmesi için yeni yöntemlerin önünü açmaya devam etmiştir. Yeşil analitik kimyanın geliştirilmesinde rol alan bazı kilometre taşları Tablo 2.5'te özetlenmiştir.

**Tablo 2.5.** Yeşil analitik kimya kavramlarının ve daha yeşil metodolojilerin geliştirilmesindeki bazı kilometre taşları (84-91).

<b>Yıllar</b>	<b>Gelişmeler</b>	<b>Etkileri</b>
1975	Numune hazırlığında mikrodalga enerjisinin kullanılması	Numune hazırlığında harcanan çözelti miktarının azaltılması (84)
1976	Akış enjeksiyon analizinin (FIA) ve sıvı kromatografisi için paslanmaz çelikten kapiler hatların geliştirilmesi.	Analiz yöntemlerinin hızlanması ve kolaylaşması (85)
1980'ler	Süper kritik sıvı tüketmesi yönteminin geliştirilmesi	Organik çözücülerin kullanımının azaltılması ve katı numunelerden analit tüketmesinin kolaylaştırılması (86)
1989	Katı faz mikrotüketme yönteminin geliştirilmesi	Harcanan çözücü miktarının azaltılması, yüksek tüketme verimi ve otomasyona uyumluluk (87)
1996	Basınçlı sıvı tüketme yönteminin geliştirilmesi	Yüksek sıcaklık ve basınç sayesinde yüksek çözünürlüğün elde edilmesi (88)
1996	Sıvı faz mikrotüketme (LPME) ve sıvı-sıvı-sıvı mikrotüketme (LLLME) yöntemlerinin geliştirilmesi	Kullanılan organik çözücü miktarının azaltılması (89)
2000'ler	Ultra performanslı sıvı kromatografisinin (UPLC) geliştirilmesi	Yöntem sürelerinin kısılması, harcanan hareketli faz miktarının azalması (90)
2002	Kütle Spektroskopisinde (MS) Elektrosprey iyonizasyonunun geliştirilmesi	Sistemin özellikle proteinler gibi makropartiküller üzerine uygulanabilirliğinin artırılması (91)

### 2.6.2. Yeşil Analitik Kimya İlkeleri

Yeşil analitik kimya kavramı, sürdürülebilir kalkınma ilkelerinin yayılması ve bunların hem kimyasal tesislerde hem de laboratuvarlarda uygulanmasıyla giderek daha çok ilgi görmeye başlamıştır.

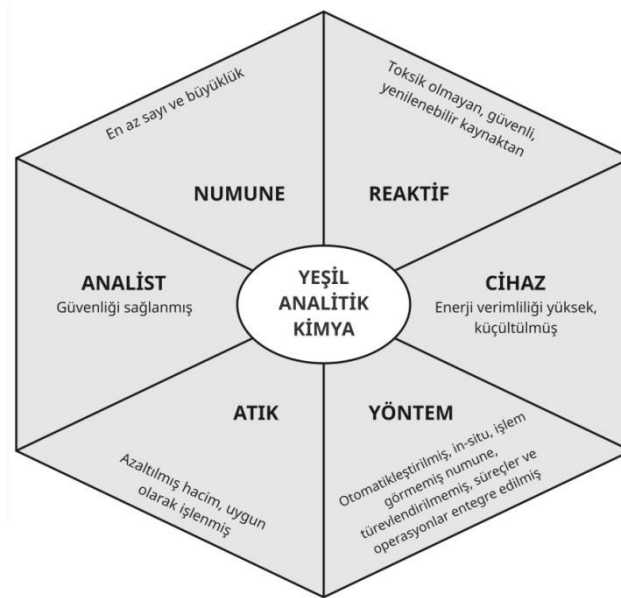
Genel öncüllerden yola çıkarak, kimyagerler ve üretim mühendisleri için, faaliyetlerini çevreye zararsız hale getirmek veya zararlılıklarını en aza indirmek amacıyla kılavuz olması gereken daha ayrıntılı bir dizi ilke geliştirilmiştir. Amerikan Kimya Derneği'nin ana sayfasında da yer alan, 1998'de önerilen yeşil analitik kimyanın 12 ilkesi günümüzde de hala önem görmekte ve sektörde çalışanlar için kılavuz görevi görmektedir (92).

Yeşil analitik kimyanın bu 12 temel ilkesi Galuszka ve arkadaşları (2013) tarafından da aşağıdaki maddelerle özetlenmiştir (93);

- Numune muamelesinden kaçınmak için doğrudan analitik teknikler uygulanmalıdır.
- Minimum örneklem büyüklüğü ve minimum örnek sayısı hedeflenmelidir.
- Yerinde ölçümler yapılmalıdır. Gereksiz yapılan analizler yalnızca enerji harcamakla kalmaz aynı zamanda analiz sonucunda oluşan atık miktarını da arttırmaktadır.
- Analitik süreçlerin ve işlemlerin entegrasyonu, enerji tasarrufu sağlamakta ve reaktiflerin kullanımını azaltmaktadır. Örneğin kombine kromatografik yöntemler analiz süresini kısaltarak enerji tasarrufuna katkıda bulunmaktadır.
- Otomatik ve minyatür yöntemler seçilmelidir.
- Türevlendirmeden kaçınılmalıdır.
- Büyük hacimli analitik atık oluşumundan kaçınılmalı ve analitik atıkların uygun yönetimi sağlanmalıdır. Mikroçip teknolojisinin analitik cihazlara entegre edilmesiyle küçük hacimlerde çalışma olanağı sunulmaktadır.

- Çoklu analit veya çok parametrelı yöntemler, bir seferde bir analit kullanan yöntemlere göre tercih edilmelidir. Bu sayede hem harcanan kimyasallardan hem de enerjiden tasarruf edilebilmektedir.
- Enerji kullanımını en aza indirilmelidir.
- Yenilenebilir kaynaktan elde edilen reaktifler tercih edilmelidir.
- Toksik reaktifler elimine edilmeli veya değiştirilmelidir.

Bu 12 temel ilke numune, reaktif, cihaz, yöntem, atık ve kullanıcı olarak 6 temel bileşende özetlenebilmektedir. Yeşil analitik kimya açısından analitik prosedürlerin bu önemli bileşenleri açıklamalarıyla birlikte Şekil 2.8'de özetlenmiştir.



**Şekil 2.8.** Yeşil analitik kimya açısından analitik prosedürlerin önemli bileşenleri (84).

### 2.6.3. İlaç Sektöründe Yeşil Analitik Kimya

Farmasötik ve kozmetik analizlerinde, kalite kontrol laboratuvarlarında rutin analizler, saflık ve potens çalışmaları, miktar tayini, çözünme analizleri, saf kimyasalların ve farklı dozaj formlarının bozunma çalışmaları için titrimetrik, kromatografik, spektrofotometrik, kolorimetrik, spektroflorimetrik ve elektro-analitik gibi çeşitli analitik yöntemler tercih edilmektedir. Yeşil analitik kimya ilkelerini

uygulamak için, bahsedilen bu analitik yöntemlerin; numune alma, numune ön işleme ve ölçüm ile çözücüler ve reaktifler, aparat, atık yönetimi ve veri işleme kapsamındaki her adımı mükemmel bir olanak sağlamaktadır. Bu kapsamda, 12 ilkeyi de uygulayarak analitik metodolojilerin çevresel etkisini azaltmak için; tehlikeli çözücülerin kullanımının kısıtlanması, kromatografik ayırma işlemlerinin tek hatta birleştirilmesi ve/veya sürelerinin kısaltılması, atık ürünlerin uygun yönetimi ve analitik cihazların minyatürleştirilmesi gibi çeşitli yaklaşımlar uygulanmıştır (94).

Genel olarak, ilaç sektöründe de oldukça tercih edilen, doğrudan analitik yöntemlerin çevreci olma olasılığı daha yüksektir ve yeşil analitik kimya yaklaşımında daha çok tercih edilmektedir. Bu yöntemler, numune muamelesi veya atık üretimi olmayan yakın kızılötesi (NIR), orta kızıl ötesi (MIR), Raman, bazı ultraviyole (UV) ve elektroanalitik gibi doğrudan yöntemlerdir. Numune hazırlama ve ön işlem gerektiren diğer yöntemler, yeşil analitik kimya kavramlarına mümkün olduğunca bağlı kalmak için metodolojilerine çeşitli çözümler ve modifikasyonlar uygulamalıdır (95).

## **2.7. Kromatografik Yöntemler**

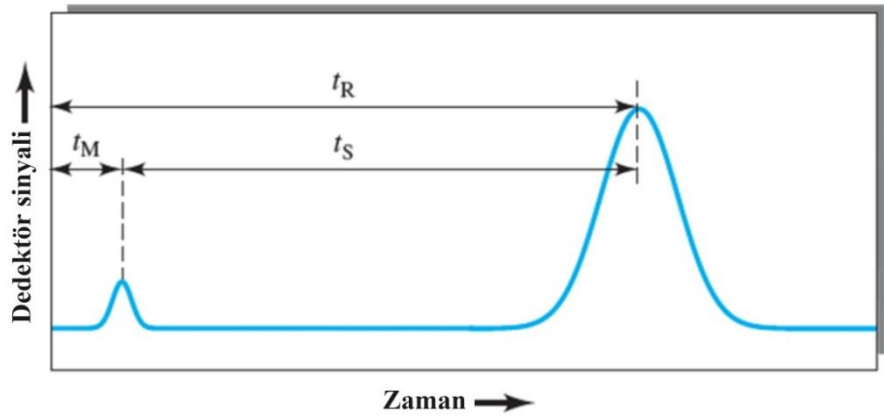
Kromatografi, bir karışımda bulunan maddelerin, biri sabit diğeri hareketli faz olmak üzere birbirleriyle karışmayan iki fazlı bir sistemde ayrılması, tanımlanması ve saflaştırılması yöntemlerinin genel adıdır. Çeşitli maddelerin hareketli faz yardımıyla, sabit faz üzerinden, değişik hızlarla hareket etmeleri veya sürüklenmeleri esasına dayanmaktadır.

Kromatografik yöntemleri sınıflandırmak için birden fazla parametre bulunmaktadır. Örneğin, sabit faz, ya küçük parçacık biçiminde katı, gözenekli, yüzey aktif bir malzeme ya da katı bir destek ya da kolon duvarı üzerine kaplanmış ince bir sıvı filmidir. Hareketli faz ise bir gaz veya sıvıdır. Bir gaz kullanılıyorsa, işlem gaz kromatografisi olarak adlandırılmakta; hareketli faz, ince tabaka çeşidi de dahil olmak üzere sıvı ise işlem sıvı kromatografisi olarak adlandırılmaktadır (96).

### 2.7.1. Kromatografinin Temel Parametreleri

- **Alıkonma Zamanı**

Tek bir bileşen içeren numune için örnek bir kromatogram Şekil 2.9'da verilmiştir. Numune enjeksiyonundan sonra gelen ilk pik için, pik süresi ölü hacim alıkonma zamanı olarak adlandırılır ve  $t_m$  ile gösterilir. Numunedeki veya hareketli fazdaki kolon tarafından tutulmayan bileşenden kaynaklanan bu pik, hareketli fazın ortalama göç hızını verir. Analit piklerinin tanınmasında ve cihazın ölü hacminin belirlenmesinde önemli rol oynar. Eğer numunede veya hareketli fazda böyle bir bileşen yoksa diğer piklerin tanınmasına yardımcı olmak ortama sonradan eklenebilir. İlk pikten sonra gelen pik bir analit türüne aittir. Numunenin enjeksiyonu ile bu pikin detektöre ulaşması için geçen süreye alıkonma zamanı denir ve  $t_R$  simgesiyle gösterilir.



Şekil 2.9. Tek bileşenli bir numune için örnek kromatogram.

- **Analitin Göç Hızı, Kapasite Faktörü**

Kapasite faktörü,  $k'$ , çözünen maddelerin kolonda göç hızlarını tanımlamakta sıklıkla tercih edilen önemli bir parametredir. Bir çözünen madde için kapasite faktörü çok büyükse ayırım gecikeceğinden analiz yönteminin süresi uzar. Bununla birlikte kapasite faktörü birden çok küçük olursa ayırım çok hızlı gerçekleşeceğinden alıkonma zamanının belirlenmesi zorlaşacaktır. Bu nedenlerden dolayı ideal bir kapasite faktörü değerinin 1 ila 5 arasında olması gerekmektedir. Kapasite faktörü kullanılan metoda, kolonun içerisindeki sabit fazın cinsine, hareketli faz bileşimi gibi

parametrelere bağlıdır. Bu sayede aslında kapasite faktörü hareketli faz ve sabit faz bileşimlerinin değiştirilmesiyle ayarlanabilir. Her maddenin kendine özgü bir kapasite faktör değeri vardır. Kapasite faktörü 2.1’de verilen eşitlik ile ifade edilmektedir.

$$k' = \frac{(t_R - t_m)}{t_m} \dots \dots \dots (2.1)$$

- **Ayırıcılık**

Kromatografide asıl amacın karışım içerisindeki maddelerin birbirinden ayrılması olduğu düşünülecek olursa bu maddelerin birbirinden ne kadar ayrıldığını gösteren temel parametre ayırıcılıktır ( $R_s$ ). Kısaca, kolonun iki analiti birbirinden ayırabilme yeteneğinin nicel ölçüsüdür ve Eşitlik 2.2 ile ifade edilmektedir.

$$R_s = \frac{2[(t_R)_B - (t_R)_A]}{(W_A - W_B)} \dots \dots \dots (2.2)$$

$(t_R)_A, (t_R)_B$ : A ve B maddelerinin alıkonma zamanları

$W_A, W_B$ : A ve B için zemin pik genişlikleri

ICH kurallarına göre iki pikin birbirinden yeteri kadar ayrılması için ayırıcılık faktörü minimum 2,0 olmalıdır. Bu parametre 1.5’tan ne kadar büyük olursa pikler de birbirinden o kadar uzaklaşacaktır. Ayırıcılığı etkileyen üç ana faktör bulunmaktadır. Bunlar seçicilik ( $\alpha$ ), teorik tabaka sayısı ( $N$ ) ve kapasite faktörüdür ( $k'$ ). Bu üç ana faktör kullanılarak elde edilen eşitlik 2.3’te verilmiştir.

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \left[ \frac{(\alpha - 1)}{\alpha} \right] \left[ \frac{k'}{(1 + k')} \right] \dots \dots \dots (2.3)$$

Seçicilik ve kapasite faktörü arttıkça ayırıcılık artar (Eşitlik 2.2). Burada dikkat edilmesi gereken konu seçiciliğin her zaman 1’den büyük olması gerektiğidir. Bir diğer konu ise  $k'$  değerinin çok fazla artması eşitlikteki etkisini azaltmakla birlikte alıkonma zamanı da çok artacağından geliştirilen yöntem verimli olmayacaktır. Bu nedenle ayırıcılık için optimum kapasite faktörü değeri 1-10 arasında olmalıdır.

- **Seçicilik Faktörü**

Bir karışımdaki analitlerin kapasite faktörlerinin oranı seçicilik olarak adlandırılır. Bu katsayısı; bir kolonun söz konusu maddeleri ne kadar iyi ayıracağıının bir ölçüsüdür. Karışımda bulunan ve bir kolonda ayrılması istenen A ve B maddeleri için seçicilik faktörü  $\alpha$ , Eşitlik 2.4’de verilen biçimde ifade edilmektedir.

$$\alpha = \frac{K_B}{K_A} \dots \dots \dots (2.4)$$

$K_A$ : Kolonda daha zayıf tutunduğu için alıkonma zamanı daha düşük olan A maddesi için dağılma katsayısı,

$K_B$ : Kolonda daha kuvvetli tutunduğu için alıkonma zamanı daha yüksek olan B maddesi için dağılma katsayısını ifade etmektedir.

Deneysel olarak ise, elde edilen kromatogramdan seçicilik katsayısını belirlemek için 2.5’te verilen eşitlik kullanılmaktadır.

$$\alpha = \frac{[(t_R)_B - t_m]}{[(t_R)_A - t_m]} \dots \dots \dots (2.5)$$

$(t_R)_A$ = Kolonda daha zayıf tutunan bileşiğin alıkonma zamanı

$(t_R)_B$  = Kolonda daha kuvvetli tutunan bileşiğin alıkonma zamanı

- **Kolon Verimliliği**

Kolon verimliliğini belirtmek amacıyla kullanılan iki temel kavram vardır. Bunlar; teorik tabaka yüksekliği (H) ve teorik tabaka sayısıdır (N). Bu iki kavram her başarılı kromatogramda elde edilen dar ve sivri pikleri ifade etmektedir. Bir kolonda tabaka yüksekliğinin azalması ve tabaka sayısının artmasıyla etkinlik artmaktadır. Bu iki terim arasındaki bağlantı Eşitlik 2.6 ile ifade edilmektedir.

$$N = \frac{L}{H} \dots \dots \dots (2.6)$$

L: Kolon dolgusunun uzunluğu



Kolon dolgu maddesinin tanecik büyüklüğü, kolon çapı, kolon tipi, kolon uzunluğu, hareketli ve sabit fazların uyumu ve bileşimi kolon verimliliği üzerinde etkili parametrelerdir. ICH kurallarına göre özellikle validasyon sırasında kullanılan kolonun teorik tabaka sayısının minimum 2000 olması gerekmektedir. Teorik tabaka sayısı ve teorik tabaka yüksekliği, kaynaklarda ve kromatografik cihaz üreticileri tarafından, kolon performansının bir ölçümü olarak kullanılmaktadır.

Kromatografik çalışmalarda esas amaç bir karışımın bileşenlerini olabilecek en kısa sürede ve en net şekilde ayırmaktır. Bu doğrultuda geliştirilen metodun bahsedilen parametreler de göz önünde bulundurulacak şekilde optimize edilmesi gerekmektedir. Bant genişlemesini azaltmak, pik şekil bozukluklarının önüne geçmek, yüksek teorik tabaka sayısı ve düşük teorik tabaka yüksekliği elde etmek, etkili ve net pik ayrımları sağlamak yapılan bu çalışmaların odak noktasıdır.

### **2.7.2. Kromatografik Yöntemlerin Sınıflandırılması**

Kromatografik yöntemlerin sınıflandırılmasında üç farklı yöntem tercih edilmektedir. Bunlar;

1. Ayrılma mekanizmalarına göre;
  - a. Adsorpsiyon kromatografisi
  - b. Dağılma (partisyon) kromatografisi
  - c. Jel filtrasyon (moleküler eleme) kromatografisi
  - d. İyon değiştirme kromatografisi
  - e. İyon çifti kromatografisi
  - f. Afinite kromatografisi
2. Uygulama biçimine göre;
  - a. Düzlemsel Kromatografi (Kağıt kromatografisi, İnce tabaka kromatografisi)
  - b. Kolon kromatografisi (Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi, Süper kritik akışkan kromatografisi, Gaz kromatografisi gibi)
3. Faz tiplerine göre;
 

Sıvı kromatografisi

  - a. Sıvı - katı kromatografisi

b. Sıvı - sıvı kromatografisi

Gaz kromatografisi

a. Gaz - katı kromatografisi

b. Gaz - sıvı kromatografisi (97)

### **Ayrılma Mekanizmalarına Göre Sınıflandırma**

- **Adsorpsiyon Kromatografisi**

Adsorpsiyon kromatografisi etkili ve basit bir ayırma yöntemidir. İzomerler, hidrokarbonlar, hormonlar ve antibiyotikler bu yöntemle kolayca ayrılabilir. Yöntemin temel çalışma prensibi ayrılacak maddelerin sabit faza olan afinitelerine yani adsorpsiyon derecelerine dayanmaktadır. Hareketli faz, gözenekli bir katı veya çok ince toz olan sabit fazdan geçer. Madde sabit faz tarafından ne kadar çok adsorbe edilirse, o kadar yavaş hareket eder.

Bu yöntemin dezavantajları arasında, sabit fazın ayrılacak maddeleri parçalaması sonucu aranan maddeler yerine başka maddelerin bulunması, sabit fazın ayrılan maddelerle kimyasal olarak reaksiyona girmesi ve uygun sabit faz ve çözücü bulunmasının zorluğu yer almaktadır (98).

- **Dağılma Kromatografisi:**

Bu yöntemin temel prensibi, maddelerin bağlı çözünürlüklerine yani dağılım katsayılarına dayanmaktadır. Sabit faz, inert bir katı destek üzerinde kaplanmış bir sıvıdır. Sıvı veya gaz halinde olabilen hareketli faz, sabit fazın kapsadığı destek malzemesinin üzerinden hareket eder. Analitlerin ayrılması bu hareketli ve sabit faz arasındaki çözünme oranına bağlıdır. Sabit fazda daha fazla çözünen daha yavaş hareket ederken, hareketli fazda daha fazla çözünen daha hızlı hareket eder (99).

Dağılma kromatografi işlemleri sabit fazın veya destek malzemesinin türüne göre kağıt, ince tabaka ve gaz kromatografileri şeklinde uygulanır. Bu kromatografi tekniği küçük moleküllerin, özellikle amino asit, karbohidrat ve yağ asitlerinin ayrılması ve belirlenmesinde etkin bir şekilde kullanılır.

- **Jel Filtrasyon (Moleküler Eleme) Kromatografisi**

Bu yöntemin temel prensibi, maddelerin molekül büyüklüklerindeki farklılığa dayanmaktadır. Ağsı yapılı polimer materyalde, maddeler molekül büyüklüklerine bağlı olarak, ağsı yapıya girme derecelerine göre birbirinden ayrılırlar. Küçük moleküller tanecikler arasındaki boşluklara girebildiklerinden ilerlemeleri gecikirken, büyük moleküller bu boşluklara giremez ve kolayca ilerlerler. Genellikle proteinler gibi büyük moleküllerin ayrılmasında, maddelerin molekül büyüklüklerinin tayin edilmesinde kullanılırlar.

- **İyon Değişirme Kromatografisi**

Bu yöntemin temel prensibi, bir katının temas ettiği çözeltideki diğer iyonlarla dengesine bağlı olarak iyon yapısını değiştirme özelliğine dayanmaktadır. Sulu bir çözeltideki yüklü bir iyon, bir iyon değiştiricisi ile temas ettiğinde, iyon değiştiricisinin fonksiyonel grubunun yükü ile iyon yükü arasında bir etkileşim olur. Sulu çözeltideki iyonlar, durağan fazda benzer yüklü iyonlarla değiştirilir ve kolona bağlanır. Bağlanmamış iyonlar kolonu önce terk eder. İyon değiştiricisindeki tanecikler sabit fazı oluştururken, içinden geçirilen çözücü hareketli fazı oluşturur. Bu amaçla kullanılan iyon değiştirici katı maddeler, çözelti ortamında hiç çözünmeyen, büyük moleküllü doğal ve yapay maddelerdir. İnorganik ve organik maddeler olarak ikiye ayrılır. Hem inorganik hem de organik iyon değiştiricilerde, temas ettikleri çözeltideki iyonlarla değiştirilebilecek birçok iyon bulunur. En çok kullanılan inorganik iyon değiştiriciler zeloit denilen silikat yapılardır ( $\text{Na}_2$ ,  $\text{Al}_2$ ,  $\text{Si}_4$ ,  $\text{O}_{12}$ ). Organik iyon değiştiriciler ise anyon ve katyon değiştirici reçineler olarak ikiye ayrılır. Sabit yük negatif ise katyon değiştirici, sabit yük pozitif ise anyon değiştirici reçine olarak adlandırılır.

- **İyon Çifti Kromatografisi**

Bu yöntemde ayırma işlemi, hareketli faza ilave edilen iyon çifti reaktiflerinin numunedeki maddelerin iyonik grupları ile eşdeğer miktarlarının karşılıklı yer değiştirmesi temeline dayanır. Kullanılan iyon değiştiricisi anyon aktarıyorsa “Anyon Değişirme Kromatografisi”, katyon aktarıyor ise “Katyon Değişirme

Kromatografisi” olarak adlandırılır. İyon çifti kromatografisi özellikle iyonlaşabilen asidik veya bazik maddelerin ayrılmasında kullanılır. Bu yöntemde dikkat edilmesi gereken husus; iyon eşleştirme ajanlarının numunedeki elektrik yükünün zıttı olması gerektiğidir. Aksi takdirde iyonlar çiftlenemeyeceğinden, aynı zamanda aynı yüke sahip iyonlar birbirini iteceğinden, ayırım gerçekleşemeyecektir. Gerekli tampon çözeltilerini hazırlamak bu yöntemde kolaydır. Aynı zamanda sonuçlar yüksek oranda tekrarlanabilir, pik şekli düzgündür ve ayırma süresi kısadır.

İyon çifti kromatografisi ve iyon değiştirme kromatografisi benzer prensiplere dayansa da aralarında temel farklılıklar bulunmaktadır. En temel farklılık, iyon çifti kromatografisinde numunedeki iyonlar eşleştirilip iyon çifti olarak ayrılabilirken, iyon değişim kromatografisinde doğrudan iyonlar ayrılabilir.

- **Afinite Kromatografisi**

Bu yöntemde, kolonunun dolgu maddesine, spesifik protein ile kompleks yapabilen bir ligand bağlanır. Ligand ile kompleks yapan spesifik protein, katı desteğe bağlanarak kolonda tutulurken; serbest proteinler kolonu terk ederler. Daha sonra, bağlı protein pH değişikliği veya ligand ilavesiyle kolondan ayrılırlar. Enzim, hormon vb. spesifik proteinlerin saflaştırılmasında kullanıldığından klasik ilaç laboratuvarlarında tercih edilen yöntemlerden biri değildir (100).

### **Uygulama Biçimine Göre Sınıflandırma**

Bu sınıflandırma altında düzlemsel kromatografi ve kolon kromatografisi olmak üzere iki ana başlık bulunmaktadır.

Düzlemsel kromatografiye kağıt kromatografisi ve ince tabaka kromatografisi dahil edilmektedir. Kağıt kromatografisi yönteminde, özel üretilmiş kağıt destek ve bu kağıdın gözeneklerine yerleşen su ise sabit fazı oluşturur. Hareketli faz ise ayrılması amaçlanan analite uygun bir çözücüdür. Bir yürütme tankı içerisinde, kağıdın üzerine numune karışımı eklenir ve analitlerin hareketli faz yardımı ile bir köşeden diğer köşeye hareket etmesi gözlemlenir. Çözücü, kağıt üzerinde kapiler etki ile ilerlerken karışımdaki maddeler de özelliklerine göre ayırım gösterir. İnce tabaka kromatografisinde ise, ayırma işlemi cam, alüminyum veya plastik bir yüzey üzerine

kaplanmış bir adsorban tabaka ile gerçekleşir. Adsorblayıcı tabakanın seçiminde ayrılması istenen maddelerin asidik veya bazik karakterli olmasına dikkat edilmelidir (99).

Kolon kromatografisi daha iyi ayırım sağlamaları, otomasyona uygun olmaları, çok farklı molekül gruplarıyla uyumlu olmaları ve kalitatif ve kantitatif analiz olanağı sunmaları nedeniyle ilaç analiz laboratuvarlarında en çok tercih edilen sistemlerdir. Özellikle yüksek tekrarlanabilirlik özelliklerinden dolayı devamlı analiz yapılan kalite kontrol laboratuvarlarının vazgeçilmezleri konumundadırlar.

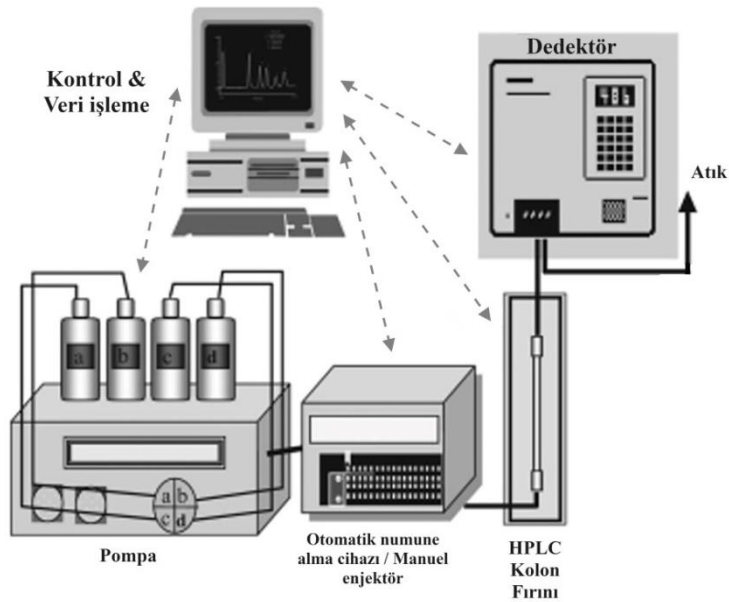
### **Sıvı Kromatografisi**

Sıvı kromatografisinin ana ve diğer yöntemlere karşı en avantajlı özelliklerini vurgulayan birden çok adı vardır. Bunlar; Yüksek Hız Sıvı Kromatografisi (HSLC), Yüksek Verimli Sıvı Kromatografisi (HELIC) ve Yüksek Basıncılı veya Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi'dir (HPLC) (101). Bu isimlerden de anlaşılacağı üzere HPLC sistemleri diğer ayırma tekniklerine göre, özellikle kalite kontrol laboratuvarları gibi devamlı analiz yapılan yerlerde, daha hızlı ve daha verimli olduğu için sıklıkla tercih edilmektedir. Sıvı kromatografisinin diğer yöntemlere göre sağladığı en büyük avantajlardan biri ise hiç şüphesiz birkaç farklı mekanizmasının olmasıdır. Bu mekanizmalar sayesinde Sıvı Kromatografisi kullanılarak iyonik bileşiklerden polimer ya da proteinler gibi büyük moleküllerin analizine kadar yüksek çeşitlilikte numune türleri için ayırım gerçekleştirilebilmektedir. Sıvı Kromatografisinin bahsi geçen bu mekanizmaları kromatografik sistemlerin ayrılma mekanizmalarına göre sınıflandırıldıkları başlıklardır.

### **2.8. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)**

Yüksek performanslı ya da yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) bir sıvıda çözülmüş bileşenlerin, bir kolonun içerisinde, genellikle katı bir destek maddesine bağlanmış sabit bir faz ile değişik etkileşimlere girmesi ve kolon içinde değişik hızlarla hareket etmeleri sonucu, farklı zamanlarda bileşenlerin kolonu terk ederek birbirinden ayrılması temeline dayanır.

Bir HPLC cihazı, temel olarak hareketli faz rezervuarı, transfer hattı, yüksek basınçlı pompa, numune enjeksiyon haznesi, kolon, kolon fırını, dedektör ve veri toplama ekipmanlarına sahiptir (Şekil 2.10). Kolon aslında ayırımın gerçekleştiği en önemli kısım olmasına rağmen, genellikle en küçük parçadır. Kolon fırınında sıcaklık kontrollü ayırmalar için bir termostat bulunmaktadır. Birden fazla hareketli faz ile çalışmak ve bu çözeltilerin cihazda ayrı hatlara bağlanarak istenilen zamanlarda ve istenilen oranlarda karıştırılmasını sağlamak amacıyla sistemde bir karıştırıcı ve kontrolör de mevcut bulunur. Veri alımı ve tüm sistemin kontrolü günümüzde bilgisayarlar kullanılarak yapılmaktadır (96).



Şekil 2.10. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisinin şematik gösterimi (102).

### 2.8.1. Hareketli Faz Rezervuarları

Hareketli faz rezervuarı olarak herhangi bir temiz kap kullanılabilir. Genellikle hareketli faz ile herhangi bir etkileşime girmemesi için 0,5 ile 2,0 litre kapasiteli cam materyal tercih edilmektedir. Ancak RNA, protein ve elektrokimyasal analizleri için, cam hareketli faza eser miktarda iyon süzebilmesinden dolayı analize müdahale edebileceğinden, plastik rezervuarlar tercih edilir. Hareketli fazı cihaza dağıtan boru hatlarının girişine izin veren, ancak toz gibi dışarıdan gelebilecek kirliliklerin girişine izin vermeyen, hareketli fazın buharlaşmasını azaltan ve şişenin basınçlandırılmasına izin veren bir kapağı bulunmaktadır.

Son yıllarda, iyon kromatografi (IC) uygulamaları için hareketli fazın manuel olarak hazırlanmasına alternatif olarak hareketli faz üreteçleri tanıtılmıştır. Hareketli faz üretimi, ticari olarak satılan bir hareketli faz üreteci kartuşu ve deiyonize su kaynağı kullanarak otomatik olarak yüksek saflıkta IC sistemine uygun hareketli faz üretmektedir. Filtreleme ve çözünmüş gazlardan arındırma adımlarını içeren manuel hareketli faz hazırlama işleminin ortadan kaldırılması, artan hareketli faz tutarlılığı ve saflığı, geliştirilmiş yöntem tekrarlanabilirliği ve artan zaman verimliliği sağlamaktadır (103).

### **2.8.2. Transfer Hattı**

Hareketli fazın rezervuarlardan kolona taşınması ve daha sonra kolondan çıkan numune ve hareketli faz karışımının detektöre ulaştırılması süreçlerinde transfer hatları kullanılmaktadır (101). HPLC sistemlerindeki bu transfer hatlarının hareketli faz ile etkileşime geçmeyen bir materyalden yapılmış olması, yüksek basınçlara dayanıklı olması ve çalışılan akış hızlarıyla uyumlu iç yarıçapa sahip olması önemlidir.

Kullanılan tüm hareketli fazların cihaza verilmeden önce filtrelenmesi ve içerisinde çözünmüş olarak bulunan oksijenden arındırılması önemli bir husustur. Günümüzde küçük gaz kabarcıklarını gidermek ve çözünmüş havayı azaltmak amacıyla HPLC sistemine eklemeler yapılmaktadır. Bu ekleme hareketli fazın manuel olarak gazdan arındırılması ihtiyacını ortadan kaldırmaktadır. Kullanım sırasında hareketli fazda oluşabilecek partikülleri veya çökeltileri gidermek için genellikle hareketli faz giriş hattının sonuna ek bir filtre yerleştirilmesi önerilmektedir (103). Oluşan bu partiküller ve çökeltiler özellikle döngü enjektörü ile kolon arasında kullanılan çok dar boru tesisatını tıkamakta, aynı zamanda pompa contalarının ömrünü kısaltmakta ve valf sorunlarına neden olmaktadır.

### **2.8.3. Pompa Sistemi**

Uygun pompalama sistemlerinin keşfedilmesi, modern sıvı kromatografi sistemlerinin geliştirilmesinde ana faktörlerden biri olmuştur ve pompa sistemin kritik derecede önemli bir parçasıdır. Yüksek basınç pompasının amacı kolona

hareketli fazın kesin, doğru, tekrarlanabilir, sabit ve dalgalanmadan akışını sağlamaktır. Normal bir HPLC sistemi 30-400 bar arasındaki basınçlarda çalışabilmektedir (101).

Günümüzde kullanımda olan üç ana HPLC pompası sınıfı vardır. Bunlar; sabit basınçlı pompalar, şırınga bazlı veya deplasmanlı pompalar ve sabit akışlı pompalardır. Akış hızında meydana gelebilecek herhangi bir dalgalanma tekrarlanamayan alıkonma sürelerine, başarılı bir ayırıcılığın sağlanamamasına neden olmaktadır. Bu nedenle pompa seçimi çok önemlidir. Sabit basınç pompalarında, sıcaklık dalgalanmaları veya bileşim değişikliklerinden dolayı hareketli fazda meydana gelen viskozite farklılıkları, ya da kolon dolgu maddesinin çökmesi veya şişmesinden dolayı sistem geçirgenliğinin etkilenmesi gibi durumların sebep olduğu basınç dalgalanmaları telafi edilmekte ve akış hızı hep sabit kalmaktadır. Akış hızındaki dalgalanma minimum olmasına rağmen sabit basınç pompaları gradiyent hareketli faz dağıtımına kolayca uyarlanamayacaklarından günümüzde fazla tercih edilmemektedirler. Şırınga bazlı pompalar ise eski sistem olmalarından dolayı otomasyona uygun değildir ve artık neredeyse hiç kullanılmamaktadırlar. Bu nedenle, sabit akışlı pompalar açık ara en yaygın sınıftır (103).

Günümüzde mevcut olan ticari yüksek basınç pompalarının çoğu, basit bir pistonlu pompa etrafında tasarlanmıştır. Motorun dönme enerjisi, pistonun karşılıklı hareketine aktarılır. Hareketli faz, çift kontrol valfi yardımıyla oluşan basınç farkı ile akışında dalgalanma olmadan kolona aktarılır.

Birçok ayırma izokratik olarak yani analiz süresi boyunca hareketli faz bileşimi değiştirilmeden yapılabilir. Daha karmaşık ayrımlar için gradiyent sistemler tercih edilir. En yaygın tercih edilen gradiyent sistem, ayırma boyunca hareketli faz oranı değiştirilerek gerçekleştirilir. Bunu yaparken, alıkonma süresi kısa olan bileşikler iyi ayrılmış halde kalırken, daha yüksek oranda kolonda tutulan bileşikler daha hızlı ayrıştırılır. Gradyent sistemler, kısaca bir ayırma sırasında hareketli faz gücünün programlanması veya değiştirilmesidir (102).

Son yıllarda, 6000 - 15000 psi yani 400 - 1000 bar arasında değişen basınçlarda çalışabilen ultra yüksek performanslı sıvı kromatografisi (UHPLC) sistemleri yaygınlaşmaya başlamıştır. Bu gibi yüksek basınçlarla uğraşırken ek sistem tasarımı



bir gereklilik haline gelir, ama temel çalışma ilkeleri aslında standart HPLC sistemiyle aynıdır. Artan sistem basıncı sayesinde, analiz süreleri kısalmakta ve harcanan hareketli faz miktarı azalmaktadır. Bu nedenle de UHPLC sistemleri günümüzde belirli uygulamaları keşfetmek için kullanışlı sistemler haline gelmiştir (103).

#### **2.8.4. Numune Enjeksiyon Haznesi**

HPLC sisteminin kesinliğindeki en önemli faktör numune enjeksiyonunun tekrarlanabilirliğidir. Cihazın her seferinde istenen kadar numune çekip kolona vermesi ve her tekrarda hatasız, eksiksiz çalışması HPLC sistemlerinin temel yapı taşlarından biridir. Bu doğrultuda numune enjektörü olarak da bilinen numune yerleştirme cihazları kullanılır. Buradaki önemli husus, numunenin enjeksiyonu sırasında hareketli faz akışında ve bu akıştan kaynaklanan iç basınçta dalgalanma yaratmayacak bir sistemin kullanılmasıdır (103).

Şırınga enjektörler, döngü valfli enjektörleri ve şırınga döngüsü enjektörleri gibi değişik numune yerleştirme cihaz türleri bulunmaktadır. Bu türlerinin her birinin avantaj ve dezavantajları olduğundan yapılan analizin amacına göre en uygun sistemin tercih edilmesi önemlidir. Örneğin şırınga enjektörlerde; doğrudan kolona şırınga ile enjeksiyon, en yüksek ayırma verimliliği sağlamaktadır ancak böyle bir sistemin sürekliliği yoktur. Döngü valfli enjeksiyonlar ise; yüksek derecede tekrarlanabilirlik ile çok çeşitli numune hacimlerini enjekte etme yeteneğine, çözelti akışını durdurmadan yüksek basınçlarda enjekte etme yeteneğine ve otomatik numune alma ile kullanım için otomasyon olasılığına sahiptir. Ancak bunların da yüksek bir çözünen hacmine ihtiyaç duymaları en büyük dezavantajlarıdır. En yaygın olarak kullanılan numune enjeksiyon yöntemi, yalnızca bir valf değiştirilerek hareketli faz akış yolunun içine ve dışına yerleştirilebilen bir numune döngüsüne dayanmaktadır (101).

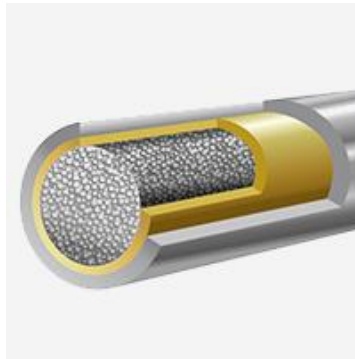
Kalite kontrol laboratuvarları gibi devamlı analizin yapıldığı yerler için en önemli parametrelerden biri ise enjeksiyon sisteminin otomasyona uyumlu olmasıdır. Yaygın olarak otomatik numune alıcılar olarak da adlandırılan otomatik enjektörlerin kullanımı, yalnızca enjeksiyonun tekrarlanabilirliğini iyileştirmekle kalmaz, aynı

zamanda sürekli ve çok sayıda örneğin işlenmesine olanak tanır. Bu sistemlerde numuneler, genellikle termal olarak hassas numunelerin analizine de olanak verecek şekilde sıcaklık kontrolü de yapılabilen numune raflarında saklanan şişelerde bulunur. Önceden programlanmış bir numune hacmi, belirtilen konumdan alınır ve kolona iletilir (103).

### 2.8.5. Kolon ve Kolon Fırını

Kolon HPLC sisteminin en önemli parçalarından birisidir, çünkü numunenin içerisindeki analitlerin ayrıldığı kısımdır. Yüksek basınçlara dayanması amacıyla genellikle paslanmaz çelikten yapılmış bu kolonlar çoğunlukla 5-30 santim boylarındadır ve 4-10 mm iç çapa sahiptirler. Kolon içerisindeki parçacıkların boyutu genellikle 3, 5 ve 10  $\mu\text{m}$ 'dir. Bir HPLC kolonu şematik olarak Şekil 2.11'de gösterilmiştir. Daha farklı sistemler için küçük, yüksek basınçlara daha dayanıklı, verimi daha yüksek ve minimum hareketli faz tüketimi sağlayan farklı kolon tasarımları da bulunmaktadır (103).

Kolon içerisindeki partiküller çoğunlukla silika temellidir. Bu mikron boyutundaki silika taneciklerine farklı uzunluklarda karbon zincirleri ya da farklı fonksiyonel gruplar bağlanabilmektedir. Bu sayede farklı özelliklere sahip kolonlar elde edilir. Örneğin silika taneciklerine bağlanmış 18 karbona sahip bir zincir ile  $\text{C}_{18}$  kolonlar elde edilir.  $\text{C}_{18}$  kolonlar ters faz sıvı kromatografisi için sıklıkla tercih edilen bir türdür. CN fonksiyonel grubunun bağlı olduğu silika tanecikleri ise hem normal hem de ters faz sıvı kromatografisinde tercih edilebilmektedirler (104).



Şekil 2.11. HPLC kolonunun şematik gösterimi.

Son yıllarda silika jellere değişik fonksiyonel grupların bağlanmaya başlaması ile analiz yelpazesi oldukça gelişmiştir. Bağlanan fonksiyonel gruplara örnek olarak p-toluensulfonilamid (105), 2-aminotiazol (106), p-dimetilaminobenzaldehid (107), 4-aminometilpiridin (108), ksenolorange (109), merkapto grupları (110), 2,3-dihidroksibenzaldehid (111), diaminobenzidin (112), gallik asit (113), alizarin violet (114), difenilkarbazon (115), trietilentetramin (116), tiyosalisilik asit (117), makrosiklik (118), aminotiyoamidoantrakinon (119) verilebilir.

Kolon kullanımı sırasında dikkat edilmesi gereken parametrelerden ilki kullanılan kolonun paketleme malzemesine göre hareketli faz seçimidir. Örneğin silika temelli kolonlar genellikle sadece 2 ile 7 arasındaki pH'larla uyumludur. Kolonun bakımı, kullanımı ve sınırlamaları ile ilgili olarak üretici talimatlarını okumak önemlidir (120). Dikkat edilmesi gereken bir diğer konu ise yıkama çözeltileridir. Kolonun işi bittiğinde uygun yıkama çözeltisiyle yıkanmalı ve nakliye çözeltisiyle kapatılmalıdır.

Paketleme malzemesinin kimyasal sınırlamalarına ek olarak; kolonlar, numunelerden ve çözücülerden gelen safsızlıkların dolgu taneciği yüzeyine geri dönüşü olmayan adsorpsiyonu ile kolayca bozunmaktadır. Bu nedenle, çok daha pahalı olan analitik kolonun bütünlüğünü korumak için genellikle bir koruma kolonu kullanılması tavsiye edilmektedir. Burada akılda bulundurulması gereken konu enjektörden sonra cihaza eklenen her bir bileşenin ayırma verimi düşürdüğüdür. Bu nedenle, hat içi eklentilerin akıllıca kullanılması gerekmektedir (103).

Sıvı kromatografisinde kolon sıcaklığının kontrolü önemli bir parametredir. Sıcaklığın alıkonma süreleri ve tekrarlanabilirlik üzerindeki etkisi, özellikle ters faz ve iyon değiştirme kromatografileri kullanıldığında oldukça önemlidir. Sıcaklık kromatografik yöntemden alınacak cevabı etkileyebileceği gibi kimyasal olarak bağlı sabit fazları yani sistemi de etkileyebilmektedir. Sıcaklık değişimlerine duyarlı olan sabit fazlar tercih edildiğinde bu kontrolün yapılmaması kolon yapısında önemli sorunlara neden olabilmektedir (102). Günümüzde kolon fırınında sıcaklık kontrolü yapılması amacıyla otomasyon sistemler kullanılmaktadır.

### 2.8.6. Dedektör Çeşitleri

Kolon çıkışına bağlanan bir detektör ile analitin veya hareketli fazın bazı fiziksel veya kimyasal özellikleri elektrik sinyaline dönüştürülür ve bu elektrik sinyali kolonda ayrılan maddeleri takip edilebilir hale getirir. Detektörden alınan bu cevap analitin mevcudiyeti ve miktarı ile değişmektedir. HPLC detektörleri, toplu özelliklere veya analitin bazı özelliklerine yanıt veren detektörler olarak sınıflandırılmaktadır (121). Bir HPLC detektörünün olmazsa olmaz özellikleri arasında, yüksek hassasiyet, iyi stabilite, doğrusallık, kısa tepki süresi, güvenilirlik, dayanıklılık, kullanım kolaylığı ve düşük ölü hacim yer almaktadır (103).

- **UV/VIS Absorpsiyon Detektörü**

Analiz edilecek maddenin UV/VIS absorpsiyonu varsa sıklıkla tercih edilen, hızlı, güvenilir ve kullanımı kolay bir detektördür. UV/VIS detektörlerinde, hareketli faz, UV/VIS veya spektrofotometrenin radyasyon ışınının bulunduğu küçük hacimli bir akış hücresinden geçirilir. UV absorpsiyonu olan bir analit akış hücresinden geçerken, derişimle orantılı bir sinyal üretilir. Tipik bir HPLC-UV sisteminde kullanılan dalga boyu aralığı, hem UV'yi hem de görünür spektrumun alt kısmını kapsayan 200 - 400 nm aralığındadır.

Bu detektörde dikkat edilmesi gereken husus analitik yöntemde kullanılan hareketli faz bileşenlerinin ışını çok az ya da hiç absorplamayacak şekilde seçilmesidir. Buna UV kesme denir. UV kesme, çözücünün ışığı (UV veya görünür) absorpladığı dalga boyu olarak tanımlanır. O bölgede ölçüm yapmaktan kaçınılmalıdır. Farklı çözücülerin farklı UV kesme değerleri vardır. Analize başlanmadan önce bu değer kontrol edilmeli ve olabildiğince uzak bir dalga boyunda çalışılmalıdır (122). Örneğin HPLC analizlerinde sıklıkla tercih edilen çözücülerden asetonitril ve metanolün UV kesme değerleri sırasıyla 190 ve 205 nm'dir.

- **Floresans Detektörü**

Bazı maddeler yüksek enerji seviyesine ulaşmak için ışığı bir dalga boyunda emer ve sonra orijinal enerji seviyesine dönmek için başka bir dalga boyunda floresans adı verilen ışığı yayar. Floresans dedektörleri belli bir dalga boyunda ışığı

absorpladıktan sonra başka bir dalga boyunda ışın yayan yani orijinal enerji seviyesine dönmeye çalışan maddelerin yaydığı ışık şiddetini ölçmektedir. Detektörün çalışma prensibi, hareketli faz ve içerisinde ayrılmış şekilde bulunan analitlerin üzerine monokromatik ışın gönderilmesi ve bu ışının bileşikler tarafından absorbe edildikten sonra başka bir dalga boyunda ışınla emisyonuna dayanır.

Floresans detektörleri genellikle yüksek hassasiyet ve seçiciliğe sahiptir. Bu nedenle ortalama derişimi 100 ppm'den az yani eser miktarda bulunan maddelerin analizlerinde sıklıkla tercih edilirler.

Bu detektörün en büyük dezavantajı orijinal olarak floresan (doğal floresan) yayan çok fazla bileşik olmamasıdır. Bu gibi durumlarda numune hazırlık aşamasına bir floresan reaktifi ile türevlendirme basamağı eklenmek durumundadır. Bu sayede amino asitler vb. maddelerin yüksek hassasiyetli ölçümü mümkün kılınır (103).

- **Elektrokimyasal Detektör**

Elektrokimyasal detektörler, kolonda ayrılan analitlerin oksidasyonu veya indirgenmesiyle ilişkili akımı ölçmektedir. Madde elektrokimyasal hücreden geçerken bir tepkime, böylece akım oluşur. Gözlenen bu akım maddenin derişimiyle orantılıdır. Elektrokimyasal detektörler, yüksek hassasiyet, yüksek seçicilik ve geniş lineer aralık avantajlarına sahiptir. Elektroaktif bileşiklerin çoğu, katekoller, kininler ve aril aminler gibi, aromatik halkaya sahiptir (123).

- **İletkenlik Detektörü**

İletkenlik detektörleri iyonik bileşenlerin tayininde tercih edilen detektörlerdir. İki inert elektrot yardımıyla kolondan çıkan hareketli faz ve içerisindeki analitlerin iletkenliği ölçülür. Bu detektörde reaktiflerin dikkatli seçimi ve derişimlerinin kontrolü oldukça önemlidir (103).

- **Kırılma İndis Detektörü**

Bu detektörün çalışma prensibi, kolondan çıkan ve analit içeren kolon eluenti ile yalnızca hareketli faz içeren bir referans akışı arasındaki RI farkını izler. Bu detektörler, HPLC'deki evrensel detektörlere en yakın olanlardır çünkü RI'si hareketli

fazından farklı olduğu sürece herhangi bir çözünen tespit edilebilir. Ne yazık ki, RI tespiti bir takım önemli dezavantajlarla sınırlıdır. RI saptamanın duyarlılığı, HPLC tarafından yaygın olarak analiz edilen birçok maddenin mutlak kırılma indekslerindeki küçük farklılıklar nedeniyle zayıftır. RI tespiti hem sıcaklık hem de basınç değişikliklerine duyarlıdır ve sonuç olarak detektörün katı sıcaklık kontrolü ve darbesiz akış zorunludur. RI bir toplu özellik detektörü olduğundan, analit derişiminin yanı sıra hareketli faz bileşimindeki değişikliklere karşı da hassastır ve gradiyent elüsyonuna uygun değildir.

## 2.9. Kemometrik Optimizasyon

HPLC’de, özellikle birden çok etken maddenin kombine analiz edilmesi için yapılan yöntem geliştirme çalışmaları sırasında optimizasyon sıklıkla karşımıza çıkan bir kavramdır. Özellikle yeşil kromatografi prensiplerini benimsemiş bir çalışmada harcanan kimyasal miktarını azaltmak, zamandan ve enerjiden tasarruf etmek yani kısaca çevreye verilen zararı en aza indirmek amacıyla kısa sürede birden çok deney tasarımı denemek için kemometrik optimizasyon tercih edilmektedir (124). Kemometri, kromatografi laboratuvarında, yöntemlerin geliştirilmesini hızlandırmak, kromatografik verileri daha iyi kullanmak ve kromatografik süreci açıklamak gibi çeşitli hedeflere ulaşmak için kullanılabilir (125).

Kemometrinin farklı yaklaşımları arasında en dik çıkış yolu, kısıtlı optimizasyon prosedürü, Pareto-optimalite, fayda fonksiyonu, Derringer’in isteklilik fonksiyonu yer almaktadır. En dik çıkış yolu, yalnızca tüm yanıt modelleri doğrusal olduğunda kullanılabilir. Kısıtlı optimizasyon prosedürü, tüm yanıt modelleri doğrusal olmadığında veya doğrusal ve doğrusal olmayan yanıtların bir karışımı olduğunda kullanılabilir. Ancak bu yöntem, diğer tüm yanıtları uygun kısıtlamalara hedefleyerek yalnızca bir yanıtı optimize eder. Doğrusal ve doğrusal olmayan yanıtların bir karışımı olduğunda veya tüm yanıt modelleri doğrusal veya doğrusal olmayan olduğunda, Pareto-optimalite, fayda fonksiyonu veya Derringer’in isteklilik fonksiyonu kullanılabilir. Pareto-optimalite yöntemi temel olarak Pareto optimal bölgesini grafiksel yollarla tanımlayabilir, ancak belirli bir Pareto optimum noktasını seçmek için bazı ek kriterler veya bir uzman tavsiyesi gerektirir (126). Pareto-optimal yöntem ve Derringer yaklaşımının kendi avantajları vardır ve hangi

yöntemin kullanılacağına ilişkin karar, soruna ve kromatografik uzmanlığın mevcudiyetine bağlı olmaktadır (127).

Optimum koşulları belirlemek için, her adımda tek değişkenin değiştirildiği klasik yöntem, özellikle çok sayıda değişkenin deney koşullarını etkilediği ve deneylerin yorucu, sıkıcı ve zaman alıcı hale geldiği durumlarda çok fazla deneysel işlem gerektirebilmektedir. Deney tasarımı uygulamasının temel amacı, girdi ve çıktı değişkenleri arasındaki korelasyonu ifade etmektir (128). Deney tasarım uygulaması istatistiksel bir teknik değildir, analistin daha iyi ve verimli optimizasyon süreci yapmasına öncülük eden bir yöntemdir.

Deney tasarım uygulaması, özellikle birden fazla değişken aynı anda düşünüldüğünde, optimizasyonun ayrılmaz bir parçası haline gelmektedir. Her bir değişkenin etkisi, deney tasarımının diğer değişkenlere de bağlı olduğu deney koşulları için vazgeçilmezdir. Deney tasarımı optimizasyonu ile hem deney sonucunu etkileyen faktörlerin optimum değerleri bulunur hem de her bir faktörün sonuca etkisini gösteren matematiksel model oluşturulur.

### 2.9.1. İsteklilik Fonksiyonu

Optimizasyon, eleme yoluyla bulunan önemli faktörlerin optimum değerlerinin belirlenmesi işlemidir. Kromatografik optimizasyon adımlarında ortaya çıkan zorlayıcı durum, istenen kromatografik parametre kombinasyonunu veren koşulların seçimidir. Bu, çoklu yanıt değişkenlerinin eş zamanlı optimizasyonunu gerektiren bir durumdur. Değişkenlerin birbiri üstündeki etkisi ise artırıcı veya azaltıcı yönde olabilmektedir (124).

İsteklilik fonksiyonunun ilkesi, tüm yanıtların “isteklilik fonksiyonu” olarak tanımlanan tek bir fonksiyonda toplanmasını içermektedir. Farklı birim ve ölçeklerdeki yanıtların birlikte değerlendirilebilmesi, yanıtların tek bir fonksiyona dönüştürülebilmesi, nitel ve nicel yanıtların kullanılabilmesi bu yöntemin avantajları arasındadır. Derringer ve Suich tarafından geliştirilen isteklilik fonksiyonu, her bir yanıt değişkenini sayısal bir değere dönüştürür (129). İsteklilik değeri  $0 \leq d_i \leq 1$  aralığındadır. İlk tepkilerin değerleri optimal aralığa yaklaştığında, karşılık gelen isteklilik değeri  $d_i$  artar, optimal değerler  $d_i = 1$ 'e dönüştürülür. Ardından tüm

bireysel isteklilik değerlerinin geometrik ortalaması alınarak, küresel isteklilik (D) hesaplanır. Küresel isteklilik D, 0-1 aralığında bir değer alır ve özellikler daha fazla istekli olduğunda, D'nin değeri artar. Bu şekilde farklı birimlerdeki farklı değişkenler ortak bir şekilde değerlendirilmiş olur.

İstenilirlik fonksiyonu yaklaşımının diğer yaklaşımlara göre en önemli avantajı, aynı anda birden fazla maksimizasyonuna ve/veya minimizasyonuna izin vermesidir. Ek olarak, bu yaklaşım, kişinin her bir yanıtın önemine ilişkin uzman/analist bilgilerinin öznel bir şekilde dahil edilmesini sağlamaktadır (130, 131).

## 2.10. Yöntem Validasyonu

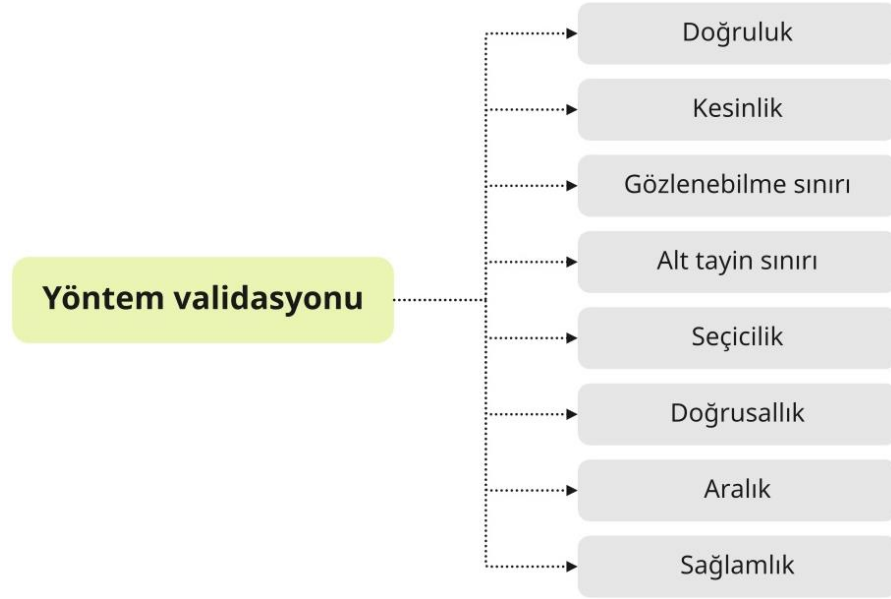
Yöntem geliştirme aşaması bir analitik yöntemin belki de en önemli aşamalarından biridir. Bir yöntem ne kadar iyi geliştirildiyse analiz zamanı ve maliyeti azalmış, metodun kesinliği ve doğruluğu da bir o kadar artmış olmaktadır. Yöntem geliştirme çalışmaları tamamlandıktan sonra sıra metodun validasyonuna gelmektedir. Yöntem validasyonu, geliştirilmiş bu yeni metodun evrensellik kazanabilmesini ve herkes tarafından uygulanabilmesini sağlamaktadır. Bu nedenle özellikle analitik yöntemlerde mutlaka yapılması gereken çok önemli bir çalışmadır (132).

Bazı durumlarda; örneğin geliştirilmiş bir yöntemde değişiklikler yapıldığında ya da yeni parametre çalışma aralığının dışında olduğunda yeniden validasyon yapılması gereklidir. Safsızlıkların miktar tayini yöntemleri söz konusu olduğunda, yöntemin seçiciliği açısından yetersiz yapan yeni bir safsızlık bulunursa, bunun modifikasyona ve yeniden valide edilmesine ihtiyacı vardır. Ekipman veya kimyasal kalitedeki değişikliklerin de yöntem üzerinde kritik etkileri olabilmektedir. Dolayısıyla, bu tür herhangi bir değişikliğin yeniden valide edilmesi gerekmektedir (133).

İlaç ve ilaç hammaddesi analizlerinde validasyonlar ICH ya da USP kılavuzlarına uyacak şekilde yapılmalıdır (134, 135). Temel olarak validasyon parametreleri sekiz ana başlıkta toplanmaktadır. Bunlar; sistem uygunluk, seçicilik, doğrusallık, kesinlik, doğruluk, LOD, LOQ ve dayanıklılık / sağlamlıktır (Bkz. Şekil 2.12). Geliştirilen metodun bütün bu parametrelerde sağlaması gereken limitler vardır. Bu limitler



temel olarak parametreler için sağlandığı zaman yöntem doğrulanmış olur ve herkes tarafından kullanılabilir hale gelmektedir.



**Şekil 2.12.** Validasyon parametreleri.

Bu iki yönetmelikte ortak validasyon parametreleri olmasına karşın hangi analizde hangi parametrelerin önemli olduğu değişkenlik gösterebilmektedir. Analiz amacına göre kullanılması gereken validasyon parametreleri de değişkenlik gösterebilmektedir. Nitelik analizleri, miktar tayini analizleri ve safsızlıkların belirlenmesinde kullanılan analizlere göre değişen validasyon parametreleri ICH kılavuzu için Tablo 2.6’da, USP kılavuzu için Tablo 2.7’de özetlenmektedir (134, 135).

**Tablo 2.6.** ICH Yönergelerine göre farklı analizlerde dikkat edilmesi gereken validasyon parametreleri.

Karakteristikler	Nitelik	Safsızlık Testleri		Miktar Tayini
		Kantitatif	Limit Testleri	
<b>Doğruluk</b>	-	+	-	+
<b>Kesinlik</b>	-	+	-	+
<b>Tekrarlanabilirlik</b>	-	+	-	+
<b>Ara Kesinlik</b>	-	+	-	+
<b>Spesifiklik</b>	+	+	+	+
<b>Gözlenebilme Sınırı</b>	-	-	+	-
<b>Alt Tayin Sınırı</b>	-	+	-	-
<b>Doğrusallık</b>	-	+	-	+
<b>Aralık</b>	-	+	-	+

+: Parametrenin değerlendirilmesi gerektiğini belirtmektedir.

-: Parametrenin değerlendirilmesine gerek olmadığını belirtmektedir.

Amerikan Farmakopisi (USP) ise bu yöntemleri dört kategoride toplamıştır ve ICH kılavuzu gibi farklı çeşit yöntemlerin validasyonu için farklı parametrelerin önemli olduğuna karar vermiştir. Bu kategoriler;

Kategori I: Bitmiş ürünlerin, sentez sırasında kullanılan ara ürünlerin veya etken maddelerin miktar tayini analizlerinde kullanılan analitik yöntemlerdir.

Kategori II: sentez sırasında kullanılan ara ürünlerdeki veya bitmiş ürünlerdeki safsızlıkların belirlenmesinde kullanılan analitik yöntemlerdir.

Kategori III: Ürünün performans karakteristiklerinin belirlenmesinde (dissolüsyon, dağılma testleri...) kullanılan analitik yöntemlerdir.

Kategori IV: Nitelik belirleme testleridir.

**Tablo 2.7.** USP'ye göre farklı analizlerde dikkat edilmesi gereken validasyon parametreleri.

Karakteristikler	Kategori I	Kategori II		Kategori III	Kategori IV
		Kantitatif	Limit Testleri		
<b>Doğruluk</b>	+	+	*	*	
<b>Kesinlik</b>	+	+		+	
<b>Spesifiklik</b>	+	+	+	*	+
<b>Gözlenebilme Sınırı</b>			+	*	
<b>Alt Tayin Sınırı</b>		+		*	
<b>Doğrusallık</b>	+	+		*	
<b>Aralık</b>	+	+	*	*	
<b>Sağlamlık</b>	+	+		+	

+: Parametrenin değerlendirilmesi gerektiğini belirtmektedir.

\*: Testin durumuna göre parametrenin değerlendirilmesine gerek olup olmayacağına karar verilebilir anlamına gelmektedir.

### 2.10.1. Sistem Uygunluğu

Analize başlamadan önce referans standardı ile analiz sisteminin performansını belirlemek için yapılan çalışmalara sistem uygunluk testleri denir. Bu amaçla kromatografik sistemlerde ayırıcılık ( $R_s$ ), teorik tabaka sayısı ( $N$ ), enjeksiyon tekrarlanabilirliği ve pik asimetri oranı (PAO) parametreleri incelenir (135).

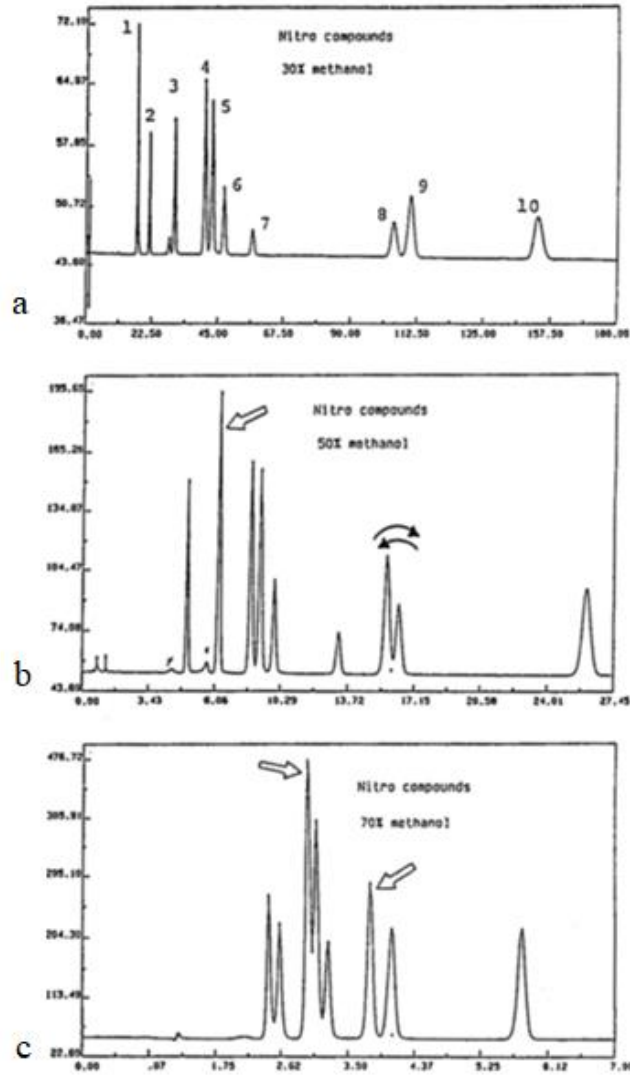
### 2.10.2. Seçicilik / Spesifiklik

ICH Kılavuzlarında “Seçicilik” diğer kaynaklarda “Spesifiklik” olarak geçen bu parametre yapılan bütün validasyonlarda kritik bir konuma sahiptir (136). Spesifiklik, hem analitin hem de numunenin (matris) özellikleri dikkate alınarak, yöntem geliştirmenin başlangıcından itibaren dikkate alınmalıdır. Analitin seçici tayini, uygun numune hazırlama, ayırma ve/veya saptama ile sağlanabilir. Seçici bir saptama için, analitin benzersiz özellikleri, örneğin spektral özellikler (seçici UV dalga boyu, floresan), seçici reaksiyonlar (sensörler) veya moleküler tanıma (antikorlar, reseptörler) kullanılmaktadır.

Herhangi bir amaç için kullanılan herhangi bir yöntemde yeterli bir seçicilik/spesifiklik sağlanmaması diğer parametreleri anlamsız kılmaktadır. Bu nedenle sıkı bir şekilde incelenmesi gereken bir parametredir. Seçicilik, seçicilik faktörü denilen karışımdaki analitlerin kapasite faktörlerinin oranı kullanılarak incelenir.

Özellikle ilaç üretiminde bitmiş bir ürüne uygunluk verebilmek adına; dissolüsyon, dağılma, etken ve safsızlıkların miktar tayini gibi bir dizi analiz yapılmaktadır. Bu nedenle, ilaç analizlerinde kullanılan bu yöntemlerin performansları birbirlerini destekleyerek ortak bir seçicilik seviyesine gelmelidir (137). Örneğin insan plazmasından LC-MS sistemi kullanılarak yapılan bir ilaç etken maddesi analizinin seçiciliğiyle, titrasyon yöntemi kullanılarak yapılan bir miktar tayini analizinin seçiciliği aynı değildir. LC-MS çok hassas bir sistem olduğundan kan plazması matriksinden gelen her maddeyi ayırırken, yani seçiciliği yüksek bir sistemken, titrasyonda bitmiş ürünün içindeki yardımcı maddelerden girişim olup olmayacağı bilinemeyeceğinden spesifik bir sistem değildir.

Analiz yöntemindeki küçük değişiklikler metodun seçiciliği üzerinde büyük etkilere sahip olabilmektedir. Klasik bir ters faz sıvı kromatografisi metodunda hareketli faz oranının seçicilik üzerindeki etkisi Şekil 2.13'te görülmektedir. Ayrımın en iyi gerçekleştiği koşul, %30 metanol/su karışımı, bu yöntem için en optimum koşuldur.



**Şekil 2.13.** Nitro-bileşiklerinin HPLC ile farklı hareketli faz oranları kullanılarak miktar tayini analizleri. (a) %30 metanol/su, (b) %50 metanol/su, (c) %70 metanol/su (137).

### 2.10.3. Doğrusallık ve Aralık

Doğrusallık, yöntemin belirli bir aralıktaki analit derişimiyle doğru orantılı olan test sonuçlarını ortaya çıkarma yeteneğidir. Uygulamada doğrusallık çalışması, amaçlanan analitik yonteme uygun olacak şekilde tasarlanmalıdır (Tablo 2.8). Doğrusallık verilerinin kabul edilebilirliği genellikle, derişime karşı sinyal grafiğı için doğrusal regresyon eğrisinin korelasyon katsayısı ve y-kesişiminin incelenmesiyle değerlendirilir. Genellikle, korelasyon katsayısı 0,999 olması

verilerin regresyon eğrisine kabul edilebilir bir şekilde uyduğunun kanıtı olarak kabul edilir. y-kesişim noktası, hedef düzeyde analit için elde edilen yanıtın yüzde birkaçından az olmalıdır.

**Tablo 2.8.** Doğrusallık çalışmaları için önerilen validasyon aralıkları (138).

<b>Analiz Kategorisi</b>	<b>Aralık (%)</b>	<b>Önerilen Validasyon Aralığı (%)</b>
<b>Serbest bırakma için test spesifikasyonları</b>	95-105	80-120
<b>Kontrol için test spesifikasyonu</b>	90-110	80-120
<b>İçerik tekdüzelik testi</b>	75-125	70-130
<b>Bir stabilite çalışmasında bir koruyucunun analizi</b>	50-110	40-120
<b>Stabilite çalışmasında bir bozunma safsızlığının belirlenmesi</b>	0-10	0-20

Aralık ise, yöntemin doğrusallığının geçerli olduğu analitin alt ve üst derişim seviyeleri aralığıdır. Aynı yöntem kullanılarak yapılan kesinlik, doğruluk ve doğrusallık analizleriyle belirlenmektedir. Aralık normalde, yöntemle elde edilen test sonuçlarıyla aynı birimlerde ifade edilir. ICH kılavuzunda, farklı analiz çeşitleri için minimum aralıklar belirtilmiş olup en az beş derişim seviyesi ihtiva edilmek durumundadır. Bir safsızlık testi için minimum aralık, her bir safsızlığın raporlama seviyesinden spesifikasyonun %120'sine kadardır (Toksik veya daha güçlü safsızlıklar için aralık, kontrol edilen seviye ile orantılı olmalıdır). İçerik tekdüzelik testi için minimum aralık, testin veya hedef derişimin %70 ile %130'u ve çözünme testi için belirlenen test aralığının  $\pm 20$ 'sidir.

#### **2.10.4. Gözlenebilme Sınırı / Alt Tayin Sınırı**

Gözlenebilme sınırı ve alt tayin sınırı diye ayrılan bu iki parametre özünde doğrusallık parametresinin alt başlıklarıdır. ICH Q2 Klavuzuna göre de zaten hesaplanmasında kalibrasyon eğrisi kullanılması en ideal yöntemdir ve 2.7 ve 2.8'deki denklemler kullanılarak hesaplanmaktadır (139).

$$\text{Alt Tayin Sınırı (LOQ)} = \frac{10\sigma}{b} \dots \dots \dots (2.7)$$

$$\text{Gözlenebilme Sınırı (LOD)} = \frac{3.3\sigma}{b} \dots \dots \dots (2.8)$$

$\sigma$ =standart sapma, b = regresyon eğrisinin eğimi

LOD ve LOQ parametrelerinin hesaplanması için pratik bir yöntem olarak S/G (sinyal / gürültü) oranı da kullanılabilir. Bu oranın 3:1 olması LOD'yi ifade ederken, 10:1 olması LOQ'yu ifade etmektedir. Günümüzde kullanılan HPLC cihazlarında bu hesap otomatik olarak yapılabilmektedir.

Gözlenebilme sınırı; numunede tanımlanabilen ancak doğru değer olarak değerlendirilemeyen en minimal analit ölçüsüdür. Örneğin klasik bir ters faz sıvı kromatografisi yöntemi kullanılıyorsa bahsi geçen analit içindeki herhangi bir maddenin analit içinde var olduğunu kanıtlayacak kadar yüksek ancak miktarı hesaplanamayacak (analiz yönteminin aralığının dışında kaldığından) kadar da küçük bir pik elde edilmesidir (135).

Alt tayin sınırı ise; numunede tanımlanabilen ve doğru bir şekilde miktarı belirlenebilen en minimal analit ölçüsüdür. Örneğin, klasik bir ters faz sıvı kromatografisi yöntemi kullanılıyorsa bahsi geçen analit içindeki herhangi bir maddenin analit var olduğunu kanıtlayacak ve miktarını belirleyecek boyutta bir pik elde edilmesidir (135).

### 2.10.5. Kesinlik

Analitik bir metodun kesinliği, aynı homojen numunenin öngörülen koşullar altında birden fazla örneklenmesinden elde edilen bir dizi ölçüm arasındaki yakınlığını, yani dağılım derecesini ifade etmektedir. Kesinliğin; tekrarlanabilirlik, ara kesinlik ve yeniden üretilebilirlik olmak üzere üç düzeyi bulunmaktadır. Kontrol parametreleri olarak standart sapma, bağıl standart sapma (varyasyon katsayısı) ve güven aralığı her kesinlik düzeyi için hesaplanmalıdır.

Tekrarlanabilirlik, aynı çalışma koşulları altında kısa bir zaman aralığında analitik değişkenliği ifade etmektedir. Belirtilen aralığı kapsayan en az dokuz

numune veya %100 test derişiminde altı numune hazırlanarak bu numunelerin cevapları karşılaştırılmaktadır. Bu karşılaştırma sonunda kontrol parametreleri limitler içerisinde giriyorsa metodun tekrarlanabilirliği kanıtlanmış olmaktadır.

Ara kesinlik, prosedürün amaçlanan kullanımına göre, örneğin farklı günler, farklı analistler veya farklı ekipman (örneğin, HPLC metodu kullanılıyorsa aynı özelliklere sahip başka bir kolon kullanılabilir ya da analiz farklı bir HPLC cihazında tekrar edilebilir) gibi laboratuvarlardaki ek rastgele etkilerin etkisini gözlemlemeye yarayan bir parametredir. Ara kesinlik analiz sonuçları ile tekrarlanabilirlik sonuçları birbiri ile uyumlu çıkıyorsa metodun ara kesinliği kanıtlanmış olmaktadır.

Yeniden üretilebilirlik, yani laboratuvarlar arasındaki kesinlik (işbirliği veya laboratuvarlar arası çalışmalar), devamlı yapılması gerekli değildir, ancak analitik prosedürlerin standardizasyonu için dikkate alınabilecek parametrelerden biridir (140).

#### **2.10.6. Doğruluk**

Analitik yöntem kullanılarak yapılan analizler sonucunda elde edilen ortalama test sonuçlarının analitin gerçek değerine olan yakınlığı doğruluk parametresinin tanımıdır. Bilinen derişimde analit eklenerek hazırlanan çözeltilerin tekrarlanan analizleri sonucunda tespit edilir. Belirlenen aralıkta en az üç derişim seçilmeli ve beş ölçüm yapılmalıdır. Kontrol parametresi olarak bağıl hata kullanılmaktadır. LOQ seviyesinde doğruluk %20'den fazla sapmamalıdır. Pratik olarak hesaplanan ortalama değer teorik yani gerçek değer  $\pm 2\%$ 'si olmalıdır. Ortalama değer gerçek değerden sapma oranı da doğruluk ölçütü olarak kabul edilir (135).

#### **2.10.7. Sağlamlık**

Farklı otoritelerin bu parametre konusunda yaptığı farklı tanımlar bulunmaktadır. Örneğin, ICH Q2A'ya göre; analitik bir prosedürün dayanıklılığı, yöntem parametrelerindeki küçük, ancak kasıtlı değişikliklerden etkilenmeme kapasitesinin bir ölçüsüdür ve normal kullanım sırasında güvenilirliğinin bir göstergesini sağlamaktadır. FDA ise, dayanıklılık için ICH tanımını kullanmakta ve dayanıklılık



için yapılan çalışmalardan elde edilen verilerin, genellikle sunulmasa da yöntem doğrulamasının bir parçası olarak dahil edilmesinin tavsiye edildiğini belirtmektedir.

USP'de dayanıklılığın tanımı, ICH kılavuzlarında verilene benzemektedir. Ancak dayanıklılıktan ayrı olarak, sağlamlık adı verilen başka bir parametre tanımlanmıştır. Sağlamlık; bir analitik yöntemin sağlamlığı, farklı laboratuvarlar, farklı analistler, farklı cihazlar, farklı günler vb. gibi çeşitli koşullar altında aynı numunelerin analiziyle elde edilen test sonuçlarının tekrarlanabilirlik derecesi olarak tanımlanmaktadır. Sağlamlık özetle analitik yöntemin operasyonel ve çevresel değişkenlerinin test sonuçları üzerinde etkisinin olmaması şeklinde ifade edilebilmektedir (136).

Analitik prosedürlerin sağlamlığı genellikle hepsinden daha az fark edilse de en önemli validasyon parametrelerinden biridir. Günümüzde özellikle farmasötik analizde bu parametreye daha fazla dikkat edilmektedir. Temel olarak, dayanıklılık testi, bir yöntemin tipik bir laboratuvar ortamında ve kabul edilebilir varyasyonlarla etkili bir şekilde performans gösterme yeteneğini değerlendirmek anlamına gelmektedir.

Sağlamlığın değerlendirilmesi için, cihaz ayarları gibi kullanılan analitik ekipmanla doğrudan bağlantılı olan yöntem parametreleri değiştirilmektedir. Bu nedenle, bu parametreler dahili parametreler olarak adlandırılmaktadır. Sağlamlık değerlendirmesi, laboratuvarlar vb. gibi değişken parametreleri içermektedir. Bu nedenle, bu parametreler harici parametreler olarak tanımlanmaktadır (141, 142).

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi sistemlerinde kasıtlı değişikliklerin yapılabileceği dayanıklılık parametreleri aşağıdaki gibidir;

- Kolon tipi (üretici, sabit faz partisi)
- Kolon sıcaklığı
- Hareketli faz pH'sı
- Akış hızı
- Tampon derişimi (iyonik kuvvet)
- Hareketli faz bileşimi (organik çözücü yüzdesi)
- Gradyent eğimi

- Enjeksiyon hacmi
- Numune hazırlama (çözeltilerin pH'sı, reaktif derişimleri vb.)

### 3. GEREÇLER VE YÖNTEM

#### 3.1. Cihaz ve ekipmanlar.

HPLC	Shimadzu, LC-20 HPLC Sistemi
Gradient Pompa	Shimadzu, LC-20AT
Auto-Sampler	Shimadzu, SIL-20AC
Kolon Fırını	Shimadzu, CTO-20AC
PDA Dedektörü	Shimadzu, SPD-M20A
Ultrasonik Banyo	ISOLAB, Banyo – Ultrasonik – 3 lt.
Manyetik Karıştırıcı	DLAB, MS-H340-S4
pH Metre	Mettler Toledo, S220-K Sevencompact
Buzdolabı	Vestel, SC25001
Mikropipet	ISOLAB
Mezür (25 – 100- 1000 mL)	ISOLAB
Spatül	ISOLAB
Balon Joje (10 – 100 mL)	ISOLAB

#### 3.2. Kimyasal Maddeler ve Kolonlar

##### Kimyasal Maddeler:

Potasyum Dihidrojen Fosfat	Sigma Aldrich
Sodyum Asetat Trihidrat	Sigma Aldrich
Trietilamin	Sigma Aldrich
Glasiyel Asetik Asit	Sigma Aldrich
Etanol (HPLC Grade)	Sigma Aldrich
Metanol (HPLC Grade)	Sigma Aldrich
Simetidin	USP
Famotidin	USP
Nizatidin	USP
Ranitidin	USP
Mikrokristalin Selüloz	İlko İlaç
Hidroksipropilmetilselüloz	İlko İlaç

Talk	İlko İlaç
Prejelatinize Nişasta	İlko İlaç
Magnezyum Stearat	İlko İlaç
Titanyum Dioksit	İlko İlaç
Laktoz Monohidrat	İlko İlaç

### **Kolonlar:**

ACE 5 C8 (150 mm x 4,6 mm i.ç), 5µm partikül boyutu

ACE 5 C18 (250 mm x 4,6 mm i.ç), 5µm partikül boyutu

ACE 5 C18 (150 mm x 4,6 mm i.ç), 5µm partikül boyutu

Inertsil ODS-4V (150 mm x 4,6 mm i.ç), 5µm partikül boyutu

### **3.3. Çözeltilerin Hazırlanması**

#### **3.3.1. Hareketli Fazların Hazırlanması**

Çalışmanın hem yeşil kromatografiye uyması hem de gerekli kromatografik ayrımın sağlanması için potasyum dihidrojen fosfat tamponu tercih edilmiştir. Bu doğrultuda metodunun optimizasyonu sürecinde 10, 30 ve 50 mM'lık tampon çözeltileri hazırlanmıştır. Bu tamponların hazırlanışları aşağıdaki gibidir;

**10 mM Potasyum Dihidrojen Fosfat Tamponu:** Tuz olarak potasyum dihidrojen fosfat kullanılmıştır. 1,36 g potasyum dihidrojen fosfat tartılarak 1000 mL'lik balon jojeye aktarılmıştır. Manyetik karıştırıcı yardımıyla tuzun suda çözünmesi sağlanmıştır. Balık balon jodeden çıkarıldıktan sonra, çözeltinin hacmi su ile 1000 mL'ye tamamlanmıştır. İçerisindeki partiküllerin uzaklaştırılması için süzgeç kağıdı (0,45 µ, 47 mm) ile süzölmüş ve daha sonra çözünmeyen gazların uzaklaştırılması için 15 dakika ultrasonik banyoda bekletilmiştir.

**30 mM Potasyum Dihidrojen Fosfat Tamponu:** Tuz olarak potasyum dihidrojen fosfat kullanılmıştır. 4,08 g potasyum dihidrojen fosfat tartılarak 1000 mL'lik balon jojeye aktarılmıştır. Manyetik karıştırıcı yardımıyla tuzun suda çözünmesi sağlanmıştır. Balık balon jodeden çıkarıldıktan sonra, çözeltinin hacmi su

ile 1000 mL'ye tamamlanmıştır. İçerisindeki partiküllerin uzaklaştırılması için süzgeç kağıdı (0,45  $\mu$ , 47 mm) ile süzölmüş ve daha sonra çözönmeyen gazların uzaklaştırılması için 15 dakika ultrasonik banyoda bekletilmiştir.

**50 mM Potasyum Dihidrojen Fosfat Tamponu:** Tuz olarak potasyum dihidrojen fosfat kullanılmıştır. 6,80 g potasyum dihidrojen fosfat tartılarak 1000 mL'lik balon jøjeye aktarılmıştır. Manyetik karıştırıcı yardımıyla tuzun suda çözönmesi sağlanmıştır. Balık balon jøjeden çıkarıldıktan sonra, çözeltinin hacmi su ile 1000 mL'ye tamamlanmıştır. İçerisindeki partiküllerin uzaklaştırılması için süzgeç kağıdı (0,45  $\mu$ , 47 mm) ile süzölmüş ve daha sonra çözönmeyen gazların uzaklaştırılması için 15 dakika ultrasonik banyoda bekletilmiştir.

**50 mM pH 6.0 Potasyum Dihidrojen Fosfat Tamponu:** Tuz olarak potasyum dihidrojen fosfat kullanılmıştır. 6,80 g potasyum dihidrojen fosfat tartılarak 1000 mL'lik balon jøjeye aktarılmış ve üzerine 750 mL ultra saf su eklenmiştir. Manyetik karıştırıcı yardımıyla tuzun suda çözönmesi sağlanmıştır. Tuz tamamen çözöndükten sonra 1 M potasyum hidroksit çözeltisi ile pH 6,0 olacak şekilde ayarlanmıştır. Balık balon jøjeden çıkarıldıktan sonra, çözeltinin hacmi su ile 1000 mL'ye tamamlanmıştır. İçerisindeki partiküllerin uzaklaştırılması için süzgeç kağıdı (0,45  $\mu$ , 47 mm) ile süzölmüş ve daha sonra çözönmeyen gazların uzaklaştırılması için 15 dakika ultrasonik banyoda bekletilmiştir.

**100 mM Sodyum Asetat Trihidrat Tamponu:** Tuz olarak sodyum asetat trihidrat kullanılmıştır. 13,60 g sodyum asetat trihidrat tartılarak 1000 mL'lik balon jøjeye ve üzerine 750 mL ultra saf su eklenmiştir. Manyetik karıştırıcı yardımıyla suda çözönmesi sağlanmıştır. Tuz tamamen çözöndükten sonra mikropipet yardımıyla 1 mL trietilamin eklenmiş, sonrasında glasiyel asetik asit ile pH 6,0 olacak şekilde ayarlanmıştır. Balık balon jøjeden çıkarıldıktan sonra, çözeltinin hacmi su ile 1000 mL'ye tamamlanmıştır. İçerisindeki partiküllerin uzaklaştırılması için süzgeç kağıdı (0,45  $\mu$ , 47 mm) ile süzölmüş ve daha sonra çözönmeyen gazların uzaklaştırılması için 15 dakika ultrasonik banyoda bekletilmiştir.

### 3.3.2. Çözücülerin Hazırlanması

Famotidin validasyonu hem geliştirilen yeşil kromatografi metoduyla hem de Famotidin Tablet USP monografında bulunan yöntemle yapıldığından iki yöntem için iki farklı çözücü kullanılmıştır.

**Yeşil Kromatografi Çözücüsü:** 30 mM'lık potasyum dihidrojen fosfat tamponu Bölüm 3.1.1'de anlatıldığı şekilde hazırlanmıştır. Bu tampondan 980 mL alınarak üzerine 20 mL etanol eklenmiş, manyetik karıştırıcıda 10 dakika daha karıştırılmıştır. Çözünmeyen gazların uzaklaştırılması için 30 dakika ultrasonik banyoda bekletilmiştir.

**USP Çözücüsü:** 50 mM pH 6.0'lık potasyum dihidrojen fosfat tamponu Bölüm 3.1.1'de anlatıldığı şekilde hazırlanmıştır.

### 3.4. Stok ve Çalışma Standartlarının Hazırlanması

- **Famotidin stok çözeltisinin hazırlanması (0,1 mg/mL)**

Famotidin çalışma standardından 10 mg tartılarak 100 mL'lik balon jøjeye alınmıştır. Üzerine 25 mL metanol eklenerek 10 dakika boyunca ultrasonik banyoda tutulmuş ve çözünmesi sağlanmıştır. Daha sonra hacmine yine metanolle tamamlanmıştır.

- **Famotidin çalışma standardının hazırlanması (0,01 mg/mL)**

Hazırlanan Famotidin stok çözeltisinden 1 mL alınarak 10 mL'lik balon jøjede hacmine numune çözücüsü ile seyreltilmiştir. Hazırlanan bu çözelti HPLC vialine alınmıştır.

- **Nizatidin stok çözeltisinin hazırlanması (0,1 mg/mL)**

Nizatidin çalışma standardından 10 mg tartılarak 100 mL'lik balon jøjeye alınmıştır. Üzerine 25 mL metanol eklenerek 10 dakika boyunca ultrasonik banyoda tutulmuş ve çözünmesi sağlanmıştır. Daha sonra hacmine yine metanolle tamamlanmıştır.

- **Nizatidin çalışma standardının hazırlanması (0,01 mg/mL)**

Hazırlanan Nizatidin stok çözeltisinden 1 mL alınarak 10 mL'lik balon jojede hacmine numune çözücüsü ile seyreltilmiştir. Hazırlanan bu çözelti HPLC vialine alınmıştır.

- **Ranitidin stok çözeltisinin hazırlanması (0,1 mg/mL)**

Ranitidin çalışma standardından 10 mg tartılarak 100 mL'lik balon jojeye alınmıştır. Üzerine 25 mL metanol eklenerek 10 dakika boyunca ultrasonik banyoda tutulmuş ve çözünmesi sağlanmıştır. Daha sonra hacmine yine metanolle tamamlanmıştır.

- **Ranitidin çalışma standardının hazırlanması (0,01 mg/mL)**

Hazırlanan Ranitidin stok çözeltisinden 1 mL alınarak 10 mL'lik balon jojede hacmine numune çözücüsü ile seyreltilmiştir. Hazırlanan bu çözelti HPLC vialine alınmıştır.

- **Simetidin stok çözeltisinin hazırlanması (0,1 mg/mL)**

Simetidin çalışma standardından 10 mg tartılarak 100 mL'lik balon jojeye alınmıştır. Üzerine 25 mL metanol eklenerek 10 dakika boyunca ultrasonik banyoda tutulmuş ve çözünmesi sağlanmıştır. Daha sonra hacmine yine metanolle tamamlanmıştır.

- **Simetidin çalışma standardının hazırlanması (0,01 mg/mL)**

Hazırlanan simetidin stok çözeltisinden 1 mL alınarak 10 mL'lik balon jojede hacmine yeşil ile seyreltilmiştir. Hazırlanan bu çözelti HPLC vialine alınmıştır.

- **Karışım çözeltisinin hazırlanması**

Yöntem optimizasyonu sırasında kromatografik ayrımın sağlanıp sağlanmadığını kontrol etmek amacıyla tüm etken maddeleri içeren bir karışım enjeksiyonundan yararlanılmıştır. Bu doğrultuda her etken madde için hazırlanan stok çözeltilerinden 1 mL alınarak 10 mL'lik balon jojede hacmine 3.3.2'de anlatılan yeşil kromatografi

çözücüsü ile seyreltilmiştir. ( $C_{RNT}=0,01$  mg/mL,  $C_{SMT}=0,01$  mg/mL,  $C_{FMT}=0,01$  mg/mL,  $C_{NNT}=0,01$  mg/mL) Hazırlanan bu çözelti HPLC vialine alınmıştır.

- **İç standart (Simetidin) çözeltisinin hazırlanması (0,2 µg/mL)**

Hazırlanan simetidin stok çözeltisinden 20 µL alınarak 10 mL'lik balon jode hacmine bölüm 3.3.2'de anlatılan yeşil kromatografi çözücüsü ile seyreltilmiştir. Hazırlanan bu çözelti HPLC vialine alınmıştır.

### 3.5. Farmasötik Preparatların Hazırlanması

**Duovel 40 mg Film Kaplı Tablet (Famotidin):** Altı adet 40 mg Famotidin içeren tabletler havan yardımıyla toz haline getirildikten sonra, 1 tablete eşdeğer miktarı tartılarak 200 mL'lik balon jeye alınmıştır. Üzerine 50 mL metanol eklenerek 20 dakika ultrasonik banyoda çözünmesi sağlanmıştır. Hacmine metanol ile tamamlandıktan sonra hazırlanan bu çözeltiden 0.50 mL 10 mL'lik balon jeye alınmış ve numune çözücüsü ile hacmine seyreltilmiştir ( $C_{FMT} = 0,01$  mg/mL). Hazırlanan bu çözelti HPLC vialine alınmıştır.

### 3.6. Plasebo Çözeltisinin Hazırlanması

**Duovel Film Kaplı Tablet Plasebosu:** Famotidin Tablet içeriği kısa ürün bilgisinden öğrenilmiştir (143). Bu doğrultuda gerekli yardımcı maddeler tartılarak karıştırılmıştır. Bir tablet içeriğine uyacak şekilde 320 mg karışım 200 mL'lik balon jeye tartılmıştır. Üzerine 50 mL metanol eklenerek 20 dakika ultrasonik banyoda çözünmesi sağlanmıştır. Hacmine metanol ile tamamlandıktan sonra hazırlanan bu çözeltiden 0,05 mL 10 mL'lik balon jeye alınmış ve numune çözücüsü ile hacmine seyreltilmiştir. Hazırlanan bu çözelti HPLC vialine alınmıştır.

### 3.7. Yöntem Geliştirme ve Optimizasyon Tasarımı

#### 3.7.1. Yöntem Geliştirme

Yöntem geliştirme çalışmaları sırasında öncelikle kromatografik ayırma önem verilmeden farklı kolon boyları ve hareketli faz olarak farklı oranlardaki etanol:su (20.80, 10.90, h/h) karışımları kullanılarak HPLC sistemine enjeksiyonlar yapılmış



ve etken madde piklerinin alıkonma zamanlarının yaklaşık kaçınıcı dakika olduğu kaydedilmiştir. Çalışmalar sonrasında; kolon boyu uzadıkça ve partikül boyutu küçüldükçe ayırıcılığın arttığı gözlemlenmiştir. Ancak yine bu koşullarda etken maddelerin alıkonma zamanlarının da artması sonucu analiz süresi fazla uzayacağından hem ayırıcılığın limitlere uygun olduğu hem de analiz süresinin fazla uzun olmadığı optimum kolon olarak 150 mm x 4,6 mm i.ç 5 µm partikül boyutlu kolonla devam edilme kararı alınmıştır. Son olarak farklı derişimlerde hazırlanan tampon çözeltisi ile farklı oranlarda etanol karışımı hareketli faz olarak kullanılmış hem sistem uygunluk parametrelerinde uygunluğun artacağı görülmüş hem de kromatografik ayırımın iyileşeceği anlaşılmıştır. Ayrıca, 70 dakikalık analiz süresi boyunca etken maddelerden gelen herhangi bir safsızlık gözlemlenmemiştir. Bu sebeple optimizasyon çalışmasına potasyum dihidrojen fosfat tamponu ile devam edilmesine karar verilmiştir.

### 3.7.2. Optimizasyon Tasarımı

Ön çalışmalar temel alınarak famotidin, nizatidin, ranitidin ve simetidin etken maddelerinin kromatografik olarak ayırımlarında kullanılacak optimum koşulları belirlemek için deneysel tasarım planı oluşturulmuştur. Kemometrik olarak yapılan deneysel tasarım planlamalarında faktör sayısı arttıkça deney sayısı artmakta, buna bağılı olarak sonuçları değerlendirilmesinde kullanılan cevap yüzey alanı grafiğı karmaşık bir hale gelmektedir. Bu sebeple famotidin, nizatidin, ranitidin ve simetidin etken maddelerin kromatografik ayırımlarına etki eden ana faktörleri bulmak ve deney sayısını azaltmak için iki seviyeli tam faktöriyel tasarım planı; 2<sup>4</sup> yani 16 deney ve buna ilave olarak 5 orta koşul olmak üzere toplamda 21 deney olacak şekilde oluşturulmuştur. Tam faktöriyel tasarımda kromatografik ayırımı etkilediğı belirlenen faktörler tampon derişimi, etanol (%) miktarı, kolon sıcaklığı ve akış hızıdır (Tablo 3.1, Tablo 3.2). Faktörlerin kromatografik ayırma olan etkisinin incelenmesinde cevap değışkenleri kromatografik performansın değerlendirilmesinde kullanılan ayırıcılık ( $R_s > 2$ ) ve etken maddelere ait alıkonma zamanları olarak belirlenmiştir. Aynı zamanda kapasite faktörü, teorik tabaka sayısı ve simetri faktörü gibi sistem uygunluk parametreleri de takip edilmiştir.

**Tablo 3.1.** Kısmi faktoriyel tasarım planına göre belirlenen deneysel koşullar.

Deney No.	Faktör 1	Faktör 2	Faktör 3	Faktör 4
	Tampon Derişimi (mM)	Etanol (%)	Akış hızı (mL/dakika)	Kolon Sıcaklığı (°C)
1	-1	-1	1	1
2	0	0	0	0
3	-1	1	1	1
4	-1	-1	1	-1
5	0	0	0	0
6	0	0	0	0
7	1	1	-1	-1
8	-1	1	1	-1
9	1	1	1	-1
10	-1	-1	-1	-1
11	1	-1	-1	-1
12	-1	-1	-1	1
13	1	1	-1	1
14	1	-1	-1	1
15	1	-1	1	1
16	0	0	0	0
17	1	-1	1	-1
18	-1	1	-1	1
19	1	1	1	1
20	-1	1	-1	-1
21	0	0	0	0

**Tablo 3.2.** Seçilmiş faktörler ve tam faktöriyel tasarımdaki seviyeler.

Faktörler	Seviyeler		
	-1	0	1
Tampon Derişimi (mM)	10	30	50
Etanol (%)	2	6	10
Akış Hızı (mL/dakika)	0,70	0,85	1,00
Kolon Sıcaklığı (°C)	25	32,5	40

### 3.8. Kromatografik Koşullar

#### 3.8.1. Famotidinin Farmasötik Preparatlardan Analizi için Geliştirilen Yeşil Kromatografik Yöntem

Yöntem optimizasyon çalışmalarından sonra karar verilen cihaz parametreleri aşağıdaki gibidir;

<b>Kullanılacak Cihaz</b>	: HPLC/PDA
<b>Kolon</b>	: ACE 5 C18 (150 x 4,6 i.d., 5 µm partikül boyutu)
<b>Kolon Sıcaklığı</b>	: 40°C
<b>Hareketli Faz Akış Hızı</b>	: 1,0 mL/dakika
<b>Enjeksiyon hacmi</b>	: 2 µL
<b>Dedektör Dalga Boyu</b>	: 230 nm
<b>Hareketli Faz Bileşimi</b>	: 10 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> tamponu: Etanol (98.2, h/h)
<b>Enjeksiyon Süresi</b>	: 15 dakika
<b>Numune Sıcaklığı</b>	: Oda sıcaklığı

### 3.8.2. Famotidinin Farmasötik Preperatlardan Analizi için Kullanılan USP Metodu

<b>Kullanılacak Cihaz</b>	: HPLC/PDA
<b>Kolon</b>	: ACE 5 C18 (150 x 4,6 i.d., 5 µm partikül boyutu)
<b>Kolon Sıcaklığı</b>	: 40 °C
<b>Akış hızı</b>	: 1,4 mL/dakika
<b>Dedektör Dalga Boyu</b>	: 275 nm
<b>Enjeksiyon hacmi</b>	: 50 µL
<b>Hareketli Faz Bileşimi</b>	: 10 mM Asetat tamponu: Asetonitril (93.7, h/h)
<b>Enjeksiyon Süresi</b>	: 15 dakika
<b>Numune Sıcaklığı</b>	: Oda sıcaklığı

## 4. BULGULAR

Bu tez çalışmasında, famotidin, nizatidin, ranitidin ve simetidin etken maddelerinin, HPLC ile analizi için koşullar optimize edildikten sonra iç standart olarak simetidin kullanılarak farmasötik preparatlardan famotidin tayini için validasyon çalışmalarına geçilmiştir.

Hem yeşil kromatografi kurallarına ve prensiplerine uygun olarak geliştirilen yeni metodun hem de tüm dünyada aktif olarak kullanılan ama çevreye duyarlı olmayan USP metodunun validasyonları yapılmıştır. Bu iki yöntem etkinlik ve çevreye duyarlılık bakımından karşılaştırılmıştır.

### 4.1. Analiz Yönteminin Geliştirilmesi

#### 4.1.1. Yöntem Seçimi

Çalışmada kullanılacak olan famotidin, nizatidin, ranitidin ve simetidin etken maddelerin öncelikle fiziksel ve kimyasal özellikleri incelenmiş sonrasında her etken madde için USP monograflarında belirtilen yöntemler karşılaştırılmıştır. Bu sayede dalga boyu, kolon sıcaklığı gibi kromatografik koşullar belirlenerek bir çalışma aralığı seçilmiştir. Belirlenen çalışma aralığında kemometrik optimizasyon çalışması yapılmasına karar verilmiştir. Bu sayede en verimli yeşil kromatografik yöntemin geliştirileceği öngörülmüştür.

Yeşil kromatografik yöntemde kullanılacak kolonun belirlenmesi adına da çalışmalar yapılmıştır. Bu doğrultuda farklı özelliklere sahip kolonlar kullanılarak karışım çözeltisinden enjeksiyonlar verilmiştir. En yüksek ayırıcılık sağlanırken enjeksiyon zamanının da fazla olmamasına dikkat edilmiştir. C18 kolonlarda iyi ayırıcılık sağlandığı gözlemlenmiştir. 3 µm çapında dolgu maddesi olan kolonlarda hem basıncın fazla yükseldiği hem de enjeksiyon süresinin arttığı belirlenmiştir. Benzer şekilde aynı sorun 250 mm kolonlarla da yaşanmıştır. Bu nedenle çalışmalara 5 µm C18 150 x 4,6 mm kolonla devam edilmesine karar verilmiştir.

- **Kromatografik Yöntem Koşullarının Optimizasyonu**

Faktörlerin kromatografik ayırma olan etkisinin incelenmesinde cevap değişkenleri kromatografik performansın değerlendirilmesinde kullanılan ayırıcılık ( $R_s > 2$ ) ve etken maddelere ait alıkonma zamanları olarak belirlenmiştir. Mümkün olan en kısa analiz süresinde maksimum ayırıcılık ( $R_s > 2$ ) elde etmek için iki seviyeli tam faktöriyel tasarım ile Tablo 3.9'da verilen koşullarda analizler gerçekleştirilmiştir. Faktörlerin seviye değerleri ön deneylere göre belirlenmiştir. Sonuçlar cevap değişkeni olarak dört etken maddenin alıkonma zamanları (famotidin, nizatidin, ranitidin, simetidin) ve etken maddeler arasındaki ayırıcılık (famotidin-simetidin, simetidin-nizatidin, nizatidin-ranitidin) verileri kullanılarak değerlendirilmiştir. Buna göre toplamda 7 tane cevap değişkeni kullanılmıştır.

Birden fazla cevap değişkeni (alıkonma zamanı ve ayırıcılıklar) olması ve bu cevap değişkenlerinin farklı skalalara sahip olmaları nedeniyle her bir faktörün ayrı ayrı değerlendirilmesi çok zordur. Bu zorlukların üstesinden gelmek için, tüm sonuçlar aynı anda toplam isteklilik fonksiyonu ile değerlendirilmiştir. Bu fonksiyon, farklı cevap değişkenlerinden (alıkonma zamanı, dtr; ayırıcılık, dR) elde edilen değerlerinin birleştirilebilmesi için cevapların her bir kriter için boyutsuz bir isteklilik ölçeğine dönüştürülmesine dayanmaktadır (131, 144, 145). İsteklilik fonksiyonunun ölçeği, tamamen istenmeyen bir yanıt için  $d = 0$  arasında, tamamen istenen bir yanıt için  $d = 1$  arasında değişir, bunun üzerinde daha fazla iyileştirmenin hiçbir önemi yoktur. Cevapların aynı anda değerlendirilebilmesi için toplam isteklilik fonksiyonu uygulanmıştır. Buna göre, geometrik ortalama yoluyla farklı cevap değişkenleri için elde edilen isteklilik değerleri birleştirilerek toplam isteklilik değeri ( $D_{\text{toplam}}$ ) hesaplanmıştır (Eşitlik 4.1).

$$D = (d_1^{w_1} \times d_2^{w_2} \times \dots \times d_n^{w_n})^{1/(w_1 + w_2 + \dots + w_n)} \dots \dots \dots (4.1)$$

Denklemdaki  $d_i$ , her deneyin bireysel yanıtının dönüştürülmesinden elde edilen her yanıtın bireysel istenilirlik fonksiyonu  $w$  yanıtın ağırlığı ve  $n$  yanıt sayısıdır. Famotidin, nizatidin, ranitidin ve simetidin etken maddelerinin alıkonma zamanlarına ait toplam isteklilik fonksiyonun hesaplanması için bu etken maddelere ait toplam 4 alıkonma zamanı, etken maddelerin ayırıcılıklarına ait toplam isteklilik fonksiyonun

hesaplanması içinse bu etken maddelere ait toplam 3 ayırıcılık değeri kullanılarak hesaplamalar gerçekleştirilmiştir.

Deneylerden etken maddelere ait elde edilen alıkonma süreleri ve ayırıcılıklar, maksimum ayırıcılık ve minimum alıkonma süresini elde etmek için bir isteklilik fonksiyonuna dönüştürülmüştür. Bu çalışmada isteklilik fonksiyonunun ölçeği  $d = 0,1$  ile  $1$  arasında değişmektedir. Birçok deney için toplam isteklilik fonksiyonunun sıfır olarak hesaplanmasına bağlı olarak  $d = 0$  ile  $1$  arasında isteklilik fonksiyonunun uygulanması geçersiz modellerin ortaya çıkmasına neden olmuştur. Bu nedenle isteklilik fonksiyonunun  $d = 0,1$  ile  $1$  arasında değişen ölçeği kullanılmıştır. Etken maddelerin cevap değişkenleri olan alıkonma süreleri ve ayırıcılıkları için ağırlık  $1$  ( $w=1$ ) olarak belirlenmiştir. Bu değerlere göre, 4 etken maddeye ait dört alıkonma zamanı ile famotidin-simetidin, simetidin-nizatidin, nizatidin-ranitidin etken maddeleri arasındaki 3 ayırıcılık değeri kullanılarak alıkonma sürelerinin istekliliği ( $D_{tr}$ ), ayırıcılıkların istekliliği ( $D_R$ ) ve alıkonma sürelerinin istekliliği + ayırıcılıkların istekliliği ( $D_{toplam}$ ) hesaplanmıştır (Tablo 4.1).

**Tablo 4.1.** İki seviyeli kısmi faktöriyel tasarımdaki her bir koşula ait cevap değişkeni olan alıkonma sürelerinin istekliliği ( $D_{tr}$ ), ayırıcılıkların istekliliği ( $D_R$ ) ve alıkonma sürelerinin istekliliği + ayırıcılıkların istekliliği.

	1.Faktör	2.Faktör	3.Faktör	4.Faktör	Cevap 1	Cevap 2	Cevap 3
Analiz Sırası	A:Tampon Derişimi (mM)	B:Etanol (%)	C:Akış hızı (mL/dk.)	D:Kolon Sıcaklığı (°C)	$D_{tr}$	$D_R$	$D_{toplam}$
1	10	2	1,00	40	0,564	0,992	0,748
2*	30	6	0,85	32,5	0,965	0,193	0,432
3	10	10	1,00	40	1,000	0,162	0,402
4	10	2	1,00	25	0,424	0,792	0,579
5*	30	6	0,85	32,5	0,956	0,198	0,436
6*	30	6	0,85	32,5	0,942	0,244	0,479
7	50	10	0,70	25	0,992	0,100	0,315
8	10	10	1,00	25	1,000	0,176	0,419
9	50	10	1,00	25	1,000	0,150	0,388
10	10	2	0,70	25	0,166	0,804	0,365
11	50	2	0,70	25	0,247	0,215	0,231
12	10	2	0,70	40	0,256	0,958	0,496

**Tablo 4.1.** İki seviyeli kısmi faktöriyel tasarımdaki her bir koşula ait cevap değişkeni olan alıkonma sürelerinin istekliliği ( $D_{tr}$ ), ayırıcılıkların istekliliği ( $D_R$ ) ve alıkonma sürelerinin istekliliği + ayırıcılıkların istekliliği (devam).

<b>13</b>	<b>50</b>	<b>10</b>	<b>0,70</b>	<b>40</b>	<b>1,000</b>	<b>0,100</b>	<b>0,316</b>
<b>14</b>	50	2	0,70	40	0,395	0,215	0,292
<b>15</b>	50	2	1,00	40	0,109	0,737	0,283
<b>16*</b>	30	6	0,85	32,5	0,950	0,227	0,464
<b>17</b>	50	2	1,00	25	0,582	0,215	0,354
<b>18</b>	10	10	0,70	40	0,996	0,178	0,422
<b>19</b>	50	10	1,00	40	1,000	0,139	0,373
<b>20</b>	10	10	0,70	25	0,988	0,197	0,441
<b>21*</b>	30	6	0,85	32,5	0,950	0,183	0,417

\*Merkez noktalar

Her bir analiz için cevap değişkenlerine ait hesaplanan sonuçlar “*Design Expert*” programına aktarılmış ve sonuçlar istatistiksel testler ile değerlendirilmiştir. “*Design Expert*” programı tarafından sağlanan “*Box-Cox*” grafiği aracılığıyla cevap değişkenlerine uygulanacak matematiksel dönüşüm belirlenmiştir. Sonrasında program tarafından her bir cevap değişkenine ait önerilen modeller ANOVA testi ve uyum istatistikleri ile değerlendirilmiş ve önerilen modellerin geçerlilikleri sınanmıştır. Program tarafından sağlanan tanı araçları ile cevap değişkenlerinde aykırı değer olup olmadığı kontrol edilmiş ve aykırı olan değerler dışlanmıştır. Cevap değişkenlerine ait modellerin ANOVA testi ve uyum istatistik sonuçları Tablo 4.2 ve 4.3’te verilmiştir. Modellere ait p değerinin 0,05’ten küçük olması ve modele ait uyum eksikliği noktasının ise 0,05’ten büyük olması anlamlılık kriteri olarak kabul edilmiştir. Program tarafından uyum eksikliğinin anlamsız olması modelin geçerliliğini doğrulamak için kullanılan bir kriterdir ve modeldeki uyum eksikliğinin saf hataya göre önemli olmadığını gösterir. Tasarımdaki cevap değişkenleri için önerilen modellere ait doğrusal regresyon katsayıları böyle bir karmaşık tasarım için hayli yüksek bir korelasyonda bulunmuştur. Bu sonuçlara göre cevap değişkenleri için önerilen modeller istatistiksel olarak geçerli ve anlamlıdır.



**Tablo 4.2.** Cevap değişkenleri için önerilen modellere ait ANOVA testi sonuçları.

	<b>Kareler Toplamı</b>	<b>df</b>	<b>Ortalama Kare</b>	<b>F-değeri</b>	<b>p-değeri</b>	
<b>Model (D<sub>tr</sub>)</b>	0,5764	7	0,0823	7182,50	1,1x10 <sup>-17</sup>	anlamlı
<b>UE (D<sub>tr</sub>)</b>	0,0000	6	6,786x10 <sup>-6</sup>	0,3672	0,8685	anlamsız
<b>Model (D<sub>R</sub>)</b>	1,7100	3	0,5685	121,89	3,1x10 <sup>-11</sup>	anlamlı
<b>UE (D<sub>R</sub>)</b>	0,0640	12	0,0053	2,01	0,2617	anlamsız
<b>Model(D<sub>toplam</sub>)</b>	0,2097	7	0,0300	11,96	0,0001	anlamlı
<b>UE (D<sub>toplam</sub>)</b>	0,0275	8	0,0034	5,36	0,0612	anlamsız

**Tablo 4.3.** Cevap değişkenleri için önerilen modellere ait uyum istatistiği testi sonuçları.

	<b>D<sub>tr</sub></b>	<b>D<sub>R</sub></b>	<b>D<sub>toplam</sub></b>		<b>D<sub>tr</sub></b>	<b>D<sub>R</sub></b>	<b>D<sub>toplam</sub></b>
<b>SS</b>	0,0034	0,0683	0,0501	<b>R<sup>2</sup></b>	0,9998	0,9581	0,8746
<b>Ortalama</b>	0,8724	-0,6155	0,4120	<b>Düzeltilmiş R<sup>2</sup></b>	0,9997	0,9502	0,8015
<b>C.V. %</b>	0,3881	11,10	12,15	<b>Tahmini R<sup>2</sup></b>	0,9992	0,9381	0,5245

SS: Standart sapma. C.V: % Varyasyon Katsayısı

Deneysel veriler, faktörler veya bağımsız değişkenler ile (tampon derişimi, akış hızı, kolon sıcaklığı ve %etanol) cevap veya bağımlı değişken (D<sub>tr</sub>, D<sub>R</sub>, D<sub>toplam</sub>) arasındaki ilişki matematiksel olarak açıklanabilir. Matematiksel eşitliklere ait katsayılar aşağıdaki örnek model ile açıklanabilir.

$$y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{11}X_{12} + b_{22}X_{22} + b_{33}X_{33} + b_{12}X_{1X_2} + b_{13}X_{1X_3} + b_{23}X_{2X_3}$$

y (Cevap): Deney sonucunda elde edilen değerler, b<sub>0</sub>: kesişim veya ortalama, b<sub>1</sub>X<sub>1</sub> + b<sub>2</sub>X<sub>2</sub> + b<sub>3</sub>X<sub>3</sub>: üç faktörün her birine ait doğrusal terimler, b<sub>11</sub>X<sub>12</sub> + b<sub>22</sub>X<sub>22</sub> + b<sub>33</sub>X<sub>33</sub>: üç faktörün her birine ait kuadratik terimler, b<sub>12</sub>X<sub>1X\_2</sub> + b<sub>13</sub>X<sub>1X\_3</sub> + b<sub>23</sub>X<sub>2X\_3</sub>: faktörler arasındaki etkileşimlerdir.

Bu bağlamda faktörler açısından “*Design Expert*” programı tarafından üç cevap değişkeni için sunulan modellere ait önerilen matematiksel eşitlikler aşağıda

verilmiştir. Önemsiz olan faktörler modelden çıkarılmıştır. Elde edilen katsayılar Tablo 4.4'te verilmiştir.

$$D_{tr} = -0,690589 + 0,003640 \text{ Tampon Derişimi} + 0,167520 \text{ Etanol} + 1,00354 \text{ Akış hızı} + 0,008472 \text{ Kolon Sıcaklığı} - 0,000361 \text{ Tampon Derişimi} * \text{Etanol} - 0,099335 \text{ Etanol} * \text{Akış hızı} - 0,000834 \text{ Etanol} * \text{Kolon Sıcaklığı}$$

$$D_R = +0,282458 - 0,018273 \text{ Tampon Derişimi} - 0,100987 \text{ Etanol} + 0,001403 \text{ Tampon Derişimi} * \text{Etanol}$$

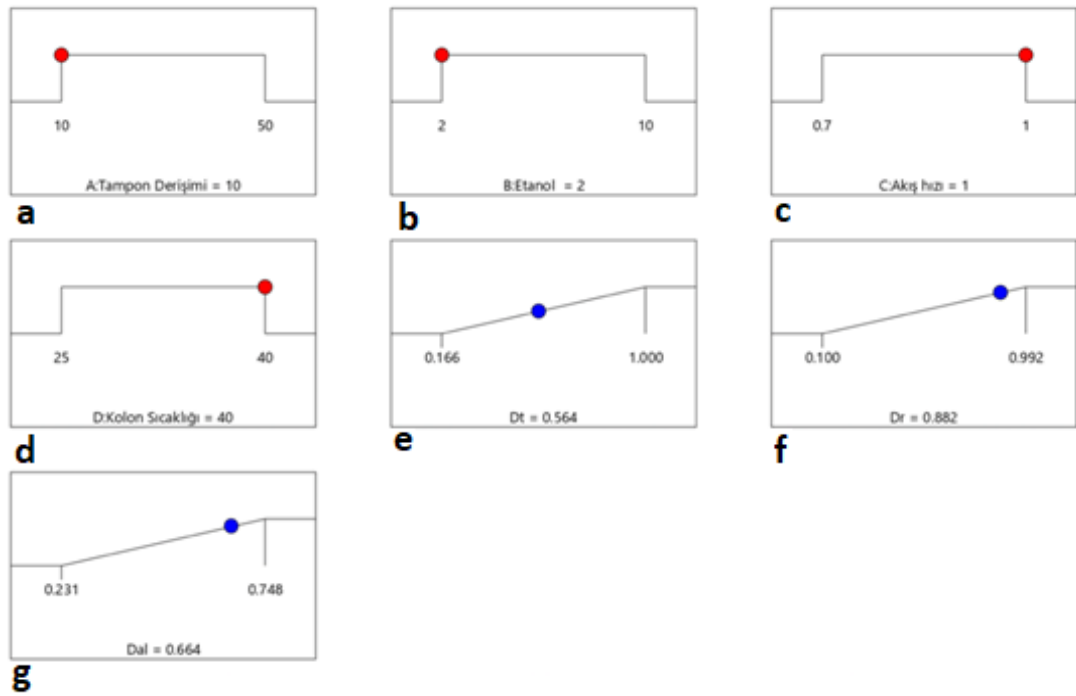
$$D_{toplam} = -0,356258 + 0,009490 \text{ Tampon Derişimi} + 0,091314 \text{ Etanol} + 1,18895 \text{ Akış hızı} - 0,001734 \text{ Tampon Derişimi} * \text{Etanol} - 0,020081 \text{ Tampon Derişimi} * \text{Akış hızı} - 0,132738 \text{ Etanol} * \text{Akış hızı} + 0,002716 \text{ Tampon Derişimi} * \text{Etanol} * \text{Akış hızı}$$

**Tablo 4.4.** Design Expert programı tarafından üç cevap değişkeni için sunulan modellere ait önerilen matematiksel eşitliklerdeki katsayılar.

Katsayı	Değer ( $D_{tr}$ )	Değer ( $D_R$ )	Değer ( $D_{toplam}$ )
$b_0$	-0,6906	0,2824	-0,3562
$b_1$	0,0036	-0,0183	0,0095
$b_2$	0,1675	-0,1010	0,09131
$b_3$	1,0035	-	1,1890
$b_4$	0,0085	-	-
$b_{12}$	-0,0004	0,0014	-0,0017
$b_{13}$	-	-	-0,0201
$b_{23}$	-0,0993	-	-0,1327
$b_{24}$	-0,0008	-	-
$b_{123}$	-	-	0,0027

\* Önemsiz faktörler modelden çıkarılmıştır.

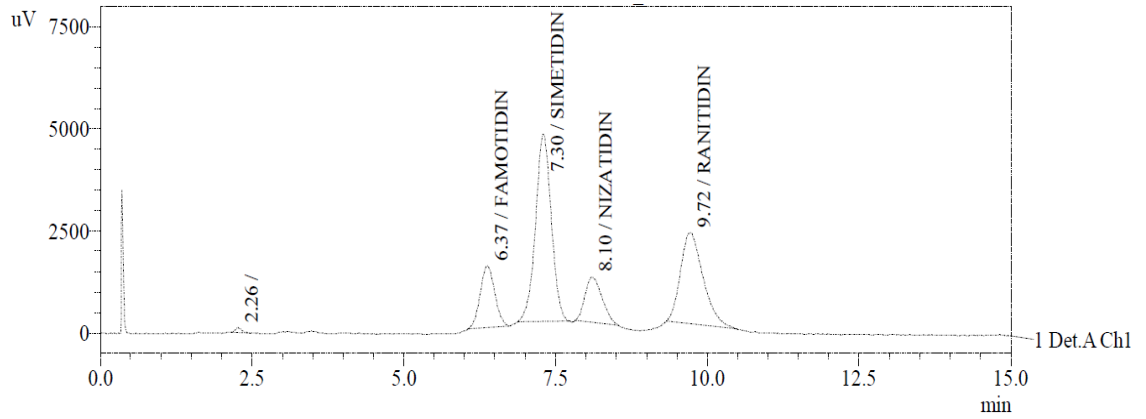
Bu sonuçlara göre Design Expert programı tarafından cevap değişkenlerinin maksimum isteklilik değerlerine bağlı olarak ( $D_{tr}$ ,  $D_R$ ,  $D_{toplaml}$ ) minimum sürede etken maddeler için iyi bir ayırım ( $R_s > 2$ ) sağlanması amacıyla önerilen faktör değerleri Şekil 4.1'de sunulmuştur. Buna göre famotidin, nizatidin, ranitidin ve simetidin etken maddelerinin eş zamanlı olarak minimum sürede ayırımları ( $R_s > 2$ ) için belirlenen optimum koşullar sırasıyla; 10 mM  $KH_2PO_4$  tamponu, Tampon: etanol (98.2, h/h) hareketli faz oranı, 1 mL/dk akış hızı ve 40 °C kolon sıcaklığıdır.



**Şekil 4.1.** Famotidin, simetidin, ranitidin ve nizatidin etken maddelerinin eş zamanlı olarak minimum sürede ayırımlarının ( $R_s > 2$ ) sağlanması amacıyla en yüksek isteklilik değerine sahip faktör değerleri; a: Tampon derişimi, 10 mM, b: etanol oranı, %2, c: akış hızı, 1,0 mL/dk, d: kolon sıcaklığı, 40°C, e:  $d_t$ , alıkonma sürelerinin istekliliği, 0,564, f:  $D_r$ , ayırıcılıkların istekliliği, 0,882, g:  $D_{al}$ , toplam isteklilik, 0,664

İki seviyeli tam faktöriyel tasarım ile isteklilik fonksiyonuna bağlı bir kriter kullanılarak optimize edilen koşullarda elde edilen kromatogram Şekil 4.2'de verilmiştir. Buna göre famotidin, nizatidin, simetidin ve ranitidin etken maddeleri

izokratik elüsyon modunda 10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  tamponu : etanol (98.2, h/h) hareketli fazı, 1 mL/dk akış hızı ve 40 °C kolon sıcaklığı ile kromatografik olarak ayrılmıştır.



**Şekil 4.2.** Optimize koşullarda etken maddelerin ayırımına ait örnek kromatogram. Hareketli faz: 10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  tamponu:etanol (98.2, h/h), akış hızı 1,0 mL/dk, Kolon: C18 150 x 4.6 mm 5  $\mu\text{m}$ , 40 °C.

#### 4.1.2. İç Standart Seçimi

Famotidinin HPLC yöntemiyle tayininde kullanılacak iç standart seçimi için optimizasyon çalışmasında famotidinden kromatografik olarak tamamen ayrılmış olan diğer  $\text{H}_2$  reseptör antagonistleri, simetidin, nizatidin ve ranitidinden alıkonma zamanı 7,30 dakika olan simetidin seçilmiştir.

Geliştirilen yeşil kromatografik yöntemde 230 nm dalga boyunda en fazla cevabı veren etken madde simetidindir. Diğer etken maddelere göre daha net ve düzgün bir pik vermesi simetidinin iç standart olarak tercih edilme sebepleridir. Hem simetidin etken maddesinden çok fazla harcamamak için hem de 0,2  $\mu\text{g/mL}$  konsantrasyonunda sistem uygunluk parametrelerine uygun pik verdiği için iç standart konsantrasyonu olarak 0,2  $\mu\text{g/mL}$  seçilmiştir.

## 4.2. Famotidinin Farmasötik Preperatlardan Analizi İçin Yeşil Kromatografi ile Yöntem Validasyonu

### 4.2.1. Sistem Uygunluk Testleri

Sistem uygunluk parametrelerin değerlendirilmesi amacıyla optimum koşullarda, 10,0 µg/mL ilaç etken maddelerini içeren karışımın analizi gerçekleştirilmiş ve bağıl hata değerleri hesaplanmıştır (Bkz. Tablo 4.5 – Tablo 4.9, n=6). Elde edilen kromatogramda, sistem uygunluk (kapasite faktörü,  $k' > 2,0$ ; pik asimetri oranı,  $PAO < 1,5$ ; teorik tabaka sayısı,  $N > 2000$ ) parametreleri açısından değerlendirildiğinde kabul edilen kritik değerleri sağladığı görülmüştür.

**Tablo 4.5.** Optimum koşullarda elde edilen famotidin pikine ait sistem uygunluk parametreleri (n=6).

	<b>Akionma zamanı (dk)</b>	<b>Kapasite Faktörü</b>	<b>Pik Asimetri Oranı</b>	<b>Teorik Tabaka Sayısı</b>	<b>Ayrırlık</b>
<b>Famotidin</b>	6,37	1,82	1,07	3187	16
	6,37	1,80	1,06	3192	16
	6,39	1,83	1,07	3185	16
	6,31	1,84	1,05	3176	16
	6,38	1,80	1,05	3198	16
	6,37	1,81	1,07	3183	16
<b>ORT</b>	6,37	1,82	1,06	3186,83	16
<b>SS</b>	0,03	0,02	0,01	6,91	0,03
<b>BSS</b>	0,40	0,82	0,84	0,22	0,19

SS: Standart sapma. BSS: % Bağıl standart sapma

**Tablo 4.6.** Optimum koşullarda elde edilen simetidin pikine ait sistem uygunluk parametreleri (n=6).

	<b>Alıkonma zamanı (dk)</b>	<b>Kapasite Faktörü</b>	<b>Pik Asimetri Oranı</b>	<b>Teorik Tabaka Sayısı</b>	<b>Ayırıcılık</b>
<b>Simetidin</b>	7,29	2,23	1,02	3754	2
	7,27	2,24	1,01	3751	2
	7,32	2,22	1,03	3762	2
	7,31	2,2	1,01	3767	2
	7,28	2,25	1,02	3750	2
	7,29	2,21	1,01	3749	2
<b>ORT</b>	7,29	2,23	1,02	3755,50	2
<b>SS</b>	0,02	0,02	0,01	6,70	0,01
<b>BSS</b>	0,23	0,77	0,73	0,18	0,68

SS: Standart sapma. BSS: % Bağıl standart sapma

**Tablo 4.7.** Optimum koşullarda elde edilen ranitidin pikine ait sistem uygunluk parametreleri (n=6).

	<b>Alıkonma zamanı (dk)</b>	<b>Kapasite Faktörü</b>	<b>Pik Asimetri Oranı</b>	<b>Teorik Tabaka Sayısı</b>	<b>Ayırıcılık</b>
<b>Ranitidin</b>	9,72	3,30	1,34	3276	2
	9,75	3,31	1,32	3270	2
	9,74	3,34	1,31	3279	2
	9,70	3,28	1,31	3281	2
	9,71	3,29	1,32	3274	2
	9,71	3,30	1,32	3268	2
<b>ORT</b>	9,72	3,30	1,32	3274,67	2
<b>SS</b>	0,02	0,02	0,01	4,61	0,02
<b>BSS</b>	0,18	0,57	0,76	0,14	0,66

SS: Standart sapma. BSS: % Bağıl standart sapma

**Tablo 4.8.** Optimum koşullarda elde edilen nizatidin pikine ait sistem uygunluk parametreleri (n=6).

	<b>Alıkonma zamanı (dak)</b>	<b>Kapasite Faktörü</b>	<b>Pik Asimetri Oranı</b>	<b>Teorik Tabaka Sayısı</b>	<b>Ayırıcılık</b>
<b>Nizatidin</b>	8,10	2,59	1,32	3576	3
	8,13	2,57	1,32	3568	3
	8,09	2,58	1,31	3579	3
	8,08	2,61	1,30	3581	3
	8,11	2,61	1,31	3577	3
	8,10	2,58	1,33	3572	3
<b>ORT</b>	8,10	2,59	1,32	3575,50	3
<b>SS</b>	0,02	0,02	0,01	4,35	0,01
<b>BSS</b>	0,19	0,59	0,73	0,12	0,39

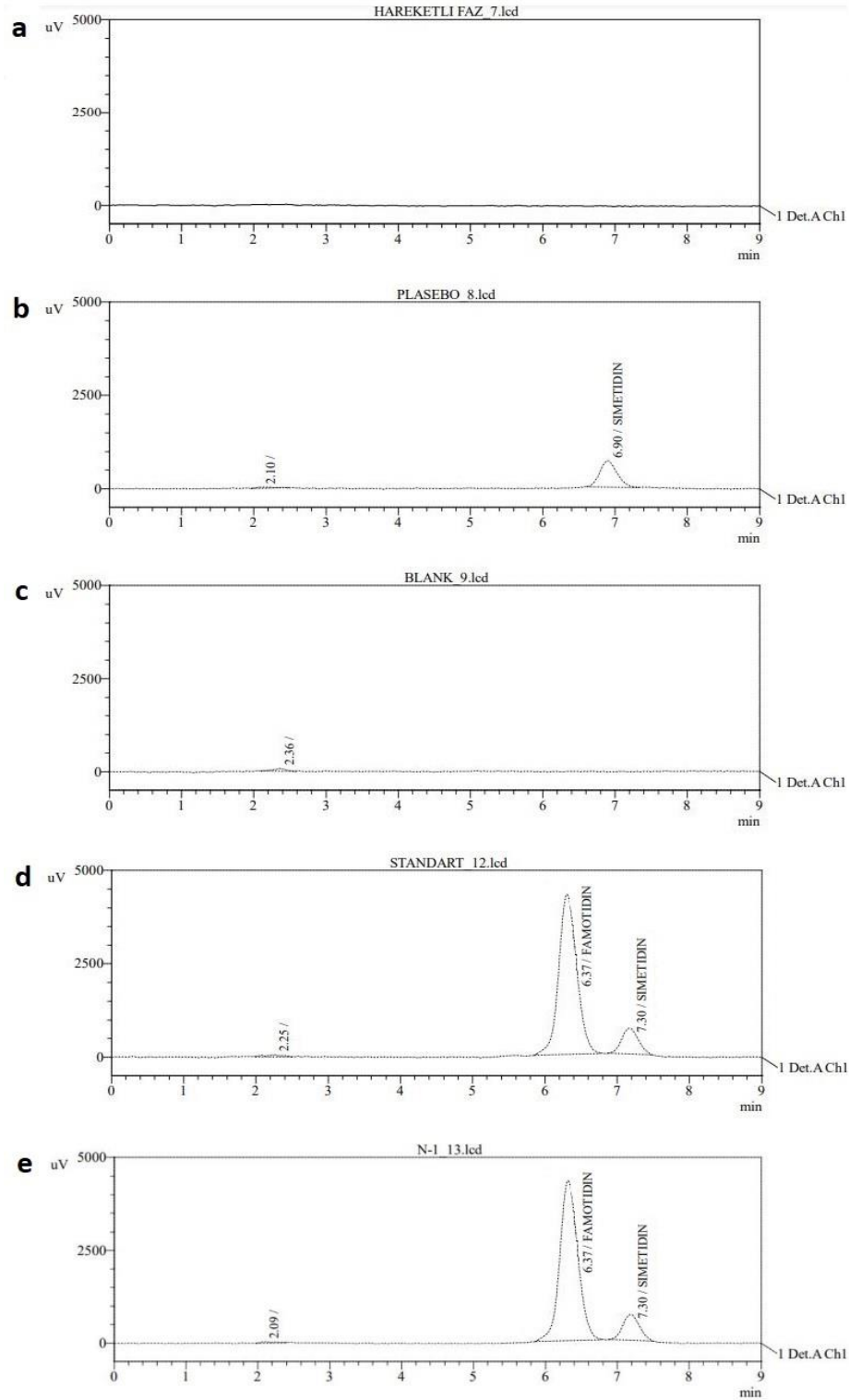
SS: Standart sapma. BSS: % Bağıl standart sapma

**Tablo 4.9.** Optimize koşullarda elde edilen piklere ait ortalama sistem uygunluk parametreleri.

	<b>Alıkonma zamanı (dak)</b>	<b>Kapasite Faktörü</b>	<b>Pik Asimetri Oranı</b>	<b>Teorik Tabaka Sayısı</b>	<b>Ayırıcılık</b>
<b>Famotidin</b>	6,37	1,82	1,06	3187	16
<b>Ranitidin</b>	9,72	3,30	1,32	3275	2
<b>Simetidin</b>	7,29	2,23	1,02	3756	2
<b>Nazitidin</b>	8,10	2,59	1,32	3576	3

#### 4.2.2. Seçicilik

Seçicilik çalışması için, famotidin ilaç etken maddesini içeren ticari olarak satılan tabletin içeriğinde yer alan yardımcı maddeleri içeren çözeltiler hazırlanmış (plasebo) ve optimize edilen yöntem ile analizleri gerçekleştirilmiştir. Her bir etken maddeye, plasebo çözeltisine, hareketli faza ve ilaç etken maddesini içeren karışım çözeltisine ait elde edilen kromatogramlar Şekil 4.3'te verilmiştir.



**Şekil 4.3.** Geliştirilen yeşil HPLC yönteminde elde edilen kromatogramlar: (a) Hareketli faz, (b) 0,2 µg/mL ISTD içeren tablet plasebosu, (c) çözücü, (d) 8 µg/mL'lik famotidin ve 0,2 µg/mL'lik ISTD içeren standart çözeltisi, (e) 8 µg/mL'lik famotidin ve 0,2 µg/mL'lik ISTD içeren farmasötik preparat çözeltisi.



### 4.2.3. Kalibrasyon Eğrileri ve Doğrusallık Aralıkları

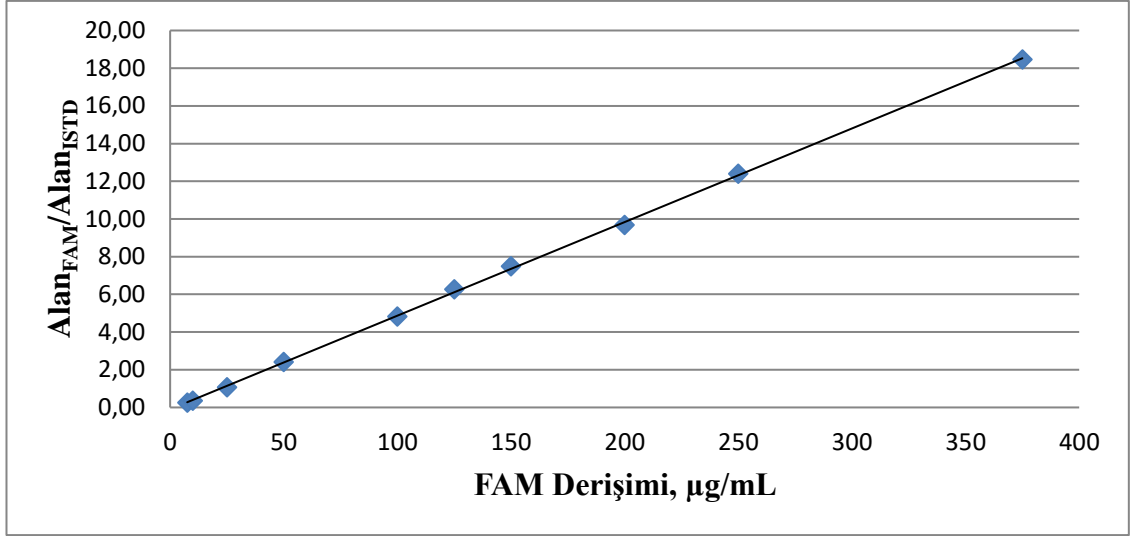
Doğrusallık çalışması famotidin ve ISTD (simetidin) içeren karışım ile yapılmıştır. Bu sebeple, famotidinin 0,5 - 175 µg/mL aralığında kalibrasyon çözeltileri hazırlanarak, doğrusallık aralığı belirlenmeye çalışılmıştır. Bu kalibrasyon çözeltilerine 0,2 µg/mL derişimde olacak şekilde ISTD eklenmiştir.

Famotidin içeren çözeltilerin doğrusallık aralığı 1,5 - 75 µg/mL olarak bulunmuştur. Doğrusallık aralığı, regresyon denklemi ve korelasyon katsayısı değerleri Tablo 4.5'te verilmiştir. Doğrusallık aralığının 1,5 - 75 µg/mL aralığında bulunması nedeniyle çalışmanın devamında bu aralıkta kalibrasyon çözeltileri kullanılmıştır. Elde edilen kalibrasyon grafiği Şekil 4.4'te ve bu kalibrasyon doğrusunun özellikleri Tablo 4.10'da verilmiştir.

**Tablo 4.10.** Geliştirilen yeşil HPLC metodunda tablettten famotidin analizi için elde edilen kalibrasyon doğrusunun özellikleri.

	<b>Famotidin</b>
<b>Regresyon denklemi</b>	$y = 0,0497 x - 0,0967$
<b>Eğimin standart hatası</b>	0,0003
<b>Kesişimin standart hatası</b>	0,0512
<b>Korelasyon katsayısı (r)</b>	0,9998
<b>Tanımlayıcılık katsayısı (R<sup>2</sup>)</b>	0,9997
<b>Doğrusallık aralığı (µg / mL)</b>	1,5 – 75,0
<b>Gözlenebilme sınırı (µg / mL)</b>	0,5
<b>Alt tayin sınırı (µg / mL)</b>	1,5

\* $y=ax + b$ ; x: µg / mL biriminde derişim, y: pik alan oranı, a: eğim, b:kesişim



**Şekil 4.4.** Geliştirilen yeşil HPLC yöntemi ile tabletten famotidin analizi için elde edilen kalibrasyon eğrisi.

#### 4.2.4. Gözlenebilme Sınırı ve Alt Tayin Sınırı (LOD ve LOQ)

Duyarlılık çalışması için famotidin ve ISTD içeren karışım geliştirilen analitik yöntem ile analiz edilmiştir. Hesaplanan alt tayin sınırı ve gözlenebilme sınırı değerleri Tablo 4.11’de verilmiştir.

**Tablo 4.11.** Geliştirilen yeşil HPLC metodunda gözlenebilme ve alt tayin sınırı (LOD ve LOQ) sonuçları.

	<b>Gözlenebilme Sınırı (LOD)</b>	<b>Alt Tayin Sınırı (LOQ)</b>
<b>Famotidin</b>	0,5 µg/mL (S/N değeri= 3,52±0,09, n=6)	1,5 µg/mL (S/N değeri= 10,33±0,07, n=6)

#### 4.2.5. Doğruluk ve Kesinlik

Doğruluk ve kesinlik çalışması, gün içi ve günler arası olmak üzere famotidin ve ISTD içeren 3 farklı derişimdeki çözeltilerinin (8,0, 22,5 ve 69,0 µg/mL) analiz edilmesiyle yapılmıştır (n=6). Gün içi ve günler arası bağıl hata değerleri sırasıyla % 0,09 – 1,76 ve 0,14 – 1,74 aralığında, bağıl standart sapma değerleri ise küçükten büyüğe her bir derişim için sırasıyla, 1,22 – 0,64 – 0,39 ve 0,64 – 1,23 – 0,85 olarak hesaplanmıştır (Tablo 4.12).

**Tablo 4.12.** Geliştirilen yeşil HPLC metodunda famotidin analizine ait gün içi ve günler arası analiz sonuçları (n=6).

Famotidin Derişimi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Günler Arası		Gün İçi	
	Bulunan miktar ( $\mu\text{g/mL}$ )	Bağlı hata ( % )	Bulunan miktar ( $\mu\text{g/mL}$ )	Bağlı hata ( % )
8,0	7,99	-0,14	7,92	-1,00
	8,06	0,81	7,96	-0,55
	7,95	-0,66	7,90	-1,20
	8,09	1,15	8,14	1,69
	8,05	0,65	8,14	1,76
	8,08	0,95	8,06	0,79
	$\bar{X}$	8,04		8,02
SS	0,05		0,10	
BSS (%)	0,64		1,22	
22,5	22,89	1,74	22,59	0,38
	22,19	-1,39	22,52	0,09
	22,18	-1,44	22,16	-1,51
	22,19	-1,38	22,43	-0,29
	22,66	0,70	22,34	-0,70
	22,53	0,14	22,53	0,13
$\bar{X}$	22,44		22,43	
SS	0,28		0,14	
BSS (%)	1,23		0,64	
69,0	69,57	0,83	69,53	0,76
	69,20	0,28	69,75	1,09
	68,53	-0,68	69,43	0,62
	67,83	-1,70	69,60	0,87
	69,14	0,21	69,19	0,28
	69,33	0,48	68,93	-0,11
$\bar{X}$	68,93		69,40	
SS	0,59		0,27	
BSS (%)	0,85		0,39	

$\bar{X}$  : Ortalama. SS: Standart sapma. BSS: % Bağlı standart sapma

#### 4.2.6. Tekrarlanabilirlik

Yöntem tekrarlanabilirliğinin incelenmesi için 10 µg/mL famotidin içeren standart çözeltisinden 10 farklı numune hazırlanarak analiz edilmiştir. Enjeksiyon tekrarlanabilirliğinin incelenmesinde ise 10 µg/mL famotidin içeren tek bir standart çözeltisinden 10 tekrarlı analiz gerçekleştirilmiştir. Enjeksiyon ve yöntem tekrarlanabilirliğine bağlı standart sapma değerleri, sırasıyla 0,97 ve 0,48 olarak hesaplanmıştır (Tablo 4.13).

**Tablo 4.13.** Geliştirilen yöntemin enjeksiyon ve yöntem tekrarlanabilirliği bulguları (n=10).

Eklenen Famotidin derişimi (µg / mL)	Bulunan Famotidin (µg / mL)	
	Enjeksiyon Tekrarlanabilirliği	Yöntem Tekrarlanabilirliği
10	9,97	10,08
	10,01	9,98
	10,01	9,95
	10,05	10,09
	9,96	10,08
	9,98	10,06
	10,03	10,03
	9,70	10,04
	10,04	10,09
	10,01	9,99
$\bar{X}$	9,98	10,04
SS	0,10	0,05
BSS (%)	0,97	0,48
GA	9,98 ± 0,0598	10,04 ± 0,0299

$\bar{X}$  : Ortalama, SS: Standart sapma, BSS : % Bağlı standart sapma, (%95 güven aralığında)

#### 4.2.7. Tutarlılık

Tutarlılık çalışması için 22,5 µg/mL'lik famotidin içeren karışım hazırlanmış ve geliştirilen analitik yöntem ile analiz edilmiştir. Bu çalışmada iki farklı analizcinin etkisi incelenmiştir. Farklı iki analizcinin verilerini karşılaştırmak için Mann-Whitney U Testi tercih edilmiş ve tutarlılık bulguları Tablo 4.14'te verilmiştir.

**Tablo 4.14.** Geliştirilen yeşil kromatografik yöntemin tutarlılık bulguları (n = 6).

<b>Famotidin</b>				
<b>Eklenen Derişim (µg/mL)</b>	<b>1. Analizci</b>		<b>2. Analizci</b>	
	<b>Bulunan Derişim (µg/mL)</b>	<b>Geri Kazanım (%)</b>	<b>Bulunan Derişim (µg/mL)</b>	<b>Geri Kazanım (%)</b>
<b>22,5</b>	22,57	100,31	22,61	100,47
	22,45	99,78	22,53	100,14
	22,42	99,64	22,17	98,55
	22,53	100,12	22,46	99,83
	22,41	99,59	22,36	99,36
	22,50	100,01	22,56	100,28
$\bar{X}$	22,48	99,91	22,45	99,77
<b>SS</b>	0,06	0,26	0,15	0,65
<b>BSS (%)</b>	0,26	0,26	0,65	0,65
Farklı iki analizci bulguları için Mann-Whitney U Testi: $U_{\text{Hesap}} = > U_{\text{Tablo}}, p > 0.05$				

$\bar{X}$  : Ortalama ± standart hata, SS: Standart sapma, BSS: % Bağlı standart sapma

Hesaplamalar sonucunda  $U_{\text{hesap}}$  17 olarak bulunmuştur. Mann - Whitney U testi tabloları incelendiğinde  $U_{\text{tablo}}$  değerinin 7 olduğu görülmüştür.  $U_{\text{hesap}}$  değeri  $U_{\text{tablo}}$  değerinden büyük olduğundan veri setleri arasında kayda değer bir fark olmadığı söylenebilmektedir.

#### 4.2.8. Kararlılık

Famotidinin kısa dönem ve uzun dönem kararlılığının saptaması için famotidin ve ISTD içeren çözeltiler, aydınlık, karanlık ve + 4 °C'de 8, 24 ve 48 saat bekletilmiştir. Uzun dönem kararlılık testi ise derin dondurucuda (-20 °C) 1 ay bekletilerek yapılmıştır. Belirtilen saklama koşullarında bekletilen stok çözeltilerden hazırlanan 22,5 µg/mL famotidin 0,2 µg/mL ISTD derişimindeki çalışma standartları analiz edilmiştir (n = 3). Standart derişimleri taze hazırlanmış çalışma standartlarının derişimleri ile karşılaştırılarak kalan miktarlar hesaplanmıştır (Tablo 4.15).

**Tablo 4.15.** Yeşil kromatografik yöntemle ait kararlılık bulguları (22,5 µg/mL, n=3)

<b>Famotidin</b>				
<b>Süre (saat)</b>	<b>Aydınlık</b>	<b>Karanlık</b>	<b>Soğuk (+ 4 °C)</b>	<b>Uzun Dönem (1 Ay)</b>
	<b>% Kalan</b>	<b>% Kalan</b>	<b>% Kalan</b>	<b>% Ort. Kalan</b>
<b>0</b>	100,00	100,00	100,00	99,39±0,50
<b>8</b>	99,71	99,51	99,83	
<b>24</b>	99,52	99,98	99,43	
<b>48</b>	99,39	99,39	100,56	

#### 4.2.9. Sağlamlık

Sağlamlık çalışması için 22,5 µg/mL'lik famotidin ve 0,2 µg/mL'lik ISTD içeren karışım hazırlanmış ve geliştirilen analitik yöntem ile analiz edilmiştir. Sağlamlık testi için geliştirilen yeşil analitik yöntemdeki kromatografik parametrelerde yapılan ufak değişikliklerin etkisi incelenmiştir. Bunun için çalışılan dalga boyu, akış hızı ve kolon sıcaklığı, tampon derişimi ve hareketli fazdaki etanol parametreleri değiştirilmiştir. t-testi ile yapılan istatistiksel değerlendirmede en küçük p değeri 0,238 olarak hesaplanmıştır (Tablo 4.16).

**Tablo 4.16.** Sağlamlık bulguları (Eklenen 22,5 µg/mL Famotidin, n = 6).

	<b>Famotidin</b>		
	<b>Bulunan (µg/mL)</b>	<b>BSS (%)</b>	<b>p</b>
<b>Optimum koşullarda</b>	22,45	0,08	-
<b>Etanol Oranı %1.7</b>	22,48	0,19	0,2572
<b>Etanol Oranı %2.3</b>	22,51	0,21	0,2379
<b>Tampon Derişimi 29 mM</b>	22,45	0,15	0,7766
<b>Tampon Derişimi 31 mM</b>	22,48	0,25	0,4706

BSS: % Bağıl standart sapma, p: hesaplanan p değeri

**Tablo 4.16.** Sağlık bulguları (Eklenen 22,5 µg/mL Famotidin, n = 6) (devam).

<b>Dalga boyu 228 nm</b>	22,46	0,52	0,9761
<b>Dalga boyu 232 nm</b>	22,49	0,34	0,4311
<b>Akış Hızı 0.95 mL/dk</b>	22,48	0,50	0,6290
<b>Akış Hızı 1.05 mL/dk</b>	22,48	0,22	0,3583
<b>Kolon Sıcaklığı 38°C</b>	22,45	0,23	0,8168
<b>Kolon Sıcaklığı 42°C</b>	22,47	0,16	0,5330

BSS: % Bağlı standart sapma, p: hesaplanan p değeri

#### 4.2.10. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması

Famotidin etken maddesi içeren tabletler piyasadan temin edilmiş, DUOVEL® tablet kullanılmıştır. Famotidin içeren farmasötik preparatların her birine ait 6 farklı çözelti hazırlandıktan (Bkz. Bölüm 3.8.1) sonra geliştirilen yeşil analitik yöntem ile analiz edilmiştir. Analizler sonrasında kalibrasyon eğrisi kullanılarak derişim değerleri bulunmuştur (Bkz. Tablo 4.17).

**Tablo 4.17.** Yeşil kromatografik yöntem ile sentetik tablet analizine ait geri kazanım değerleri (n=6).

<b>Famotidin</b>		
<b>Farmasötik Preparattaki Etiket Değeri (mg)</b>	<b>Bulunan Miktar (mg)</b>	<b>% Geri Kazanım</b>
<b>40</b>	39,34	98,34
	39,42	98,54
	39,50	98,76
	39,48	98,71
	39,87	99,68
	39,87	99,68
	$\bar{X}$	39,58
<b>SS</b>	0,21	0,53
<b>BSS (%)</b>	0,54	0,54

$\bar{X}$  : Ortalama. SS: Standart sapma. BSS: % Bağlı standart sapma

### 4.3. Famotidinin Farmasötik Preparatlardan Analizi İçin USP Monografi ile Yöntem Validasyonu

Tezin bu kısmında, Famotidin USP Monografından alınan metodun validasyonu yapılmıştır. Daha sonrasında geliştirilen yeşil kromatografik yöntem ile farmasötik preparatlardaki sonuçları karşılaştırılmıştır.

#### 4.3.1. Sistem Uygunluk Testleri

Sistem uygunluk parametrelerin değerlendirilmesi amacıyla USP tarafından belirtilen koşullarda, 100,0 µg/mL famotidin içeren çözeltinin analizi gerçekleştirilmiş, sistem uygunluk parametreleri hesaplanmıştır (Tablo 4.18, n=6). Elde edilen kromatogramda, kapasite faktörü,  $k' > 2,0$ , pik asimetri oranı,  $PAO < 1,5$ ; teorik tabaka sayısı,  $N > 2000$  olarak bulunmuştur.

**Tablo 4.18.** Famotidin Tablet USP monografında belirtilen yöntem ile elde edilen piklere ait kromatografik parametreler.

	<b>Ahkonma zamanı (dk)</b>	<b>Kapasite Faktörü</b>	<b>Pik Asimetri Oranı</b>	<b>Teorik Tabaka Sayısı</b>	<b>Ayırıcılık</b>
<b>Famotidin</b>	8,49	2,06	1,14	3286	15
	8,47	2,07	1,13	3280	15
	8,50	2,04	1,13	3291	15
	8,48	2,04	1,12	3278	15
	8,47	2,07	1,15	3289	15
	8,51	2,05	1,13	3296	15
<b>ORT</b>	8,49	2,06	1,13	3287	15
<b>SS</b>	0,01	0,01	0,01	6,21	0,05
<b>BSS</b>	0,18	0,61	0,83	0,19	0,34

SS: Standart sapma, BSS: % Bağıl standart sapma

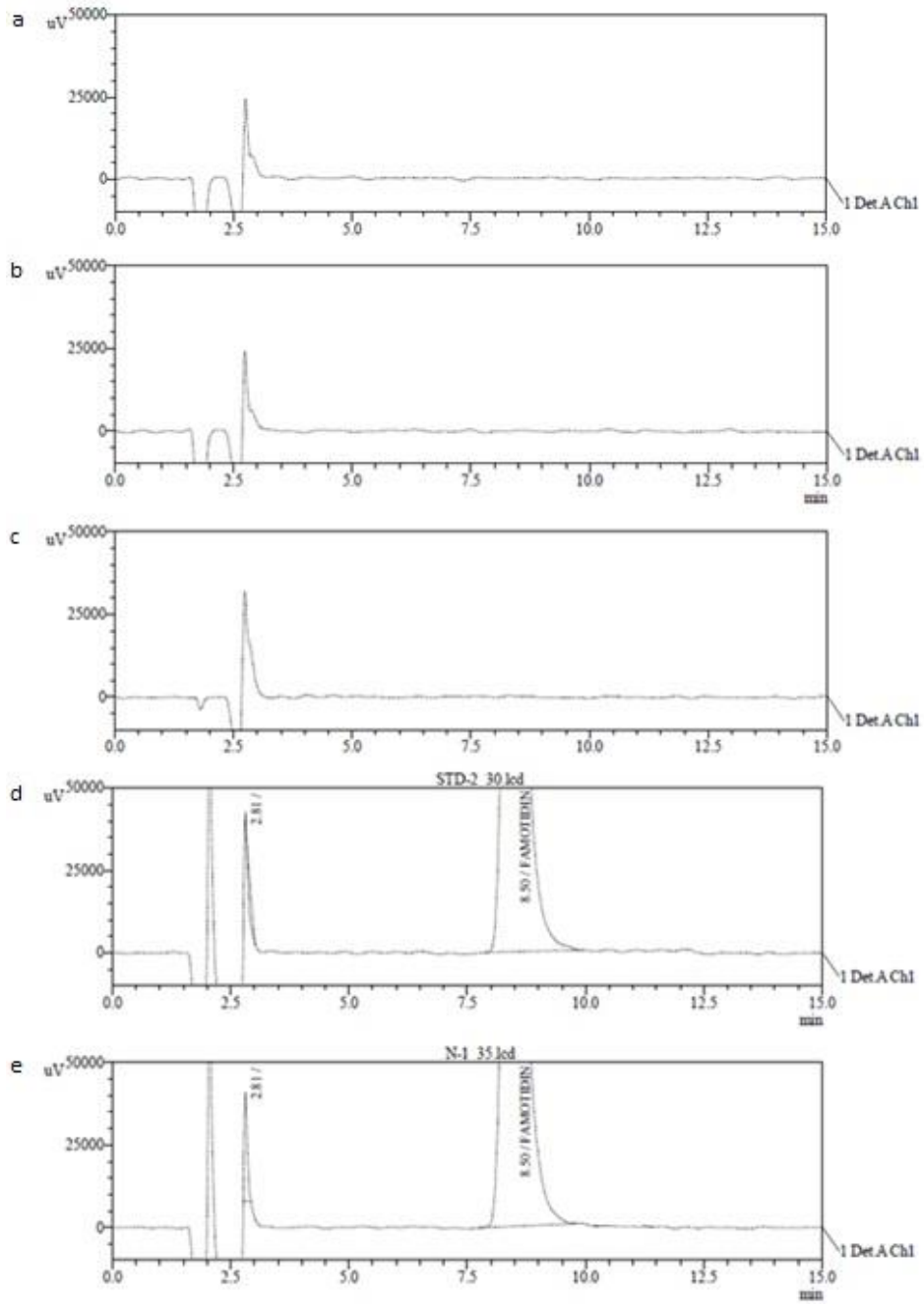
Sistem uygunluk parametrelerinin alt ve üst sınır değerlerine bakıldığında famotidin etken maddesine ait kapasite faktörü değerinin 1,5'tan büyük olduğu, pik asimetri oranının 1,5'tan küçük olduğu, ayırıcılık değerinin 2,0'den büyük olduğu ve teorik tabaka sayısının 2000'den büyük olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar



doğrultusunda USP Famotidin Tablet monografındaki metodun sistem uygunluk parametrelerine uygun olduğunu göstermektedir.

#### **4.3.2. Seçicilik**

Seçicilik çalışması için, famotidin ilaç etken maddesini içeren ticari olarak satılan tabletin içeriğinde yer alan yardımcı maddeleri içeren çözeltiler hazırlanmış (plasebo) ve USP Famotidin Tablet monografında yazan yöntem ile analizleri gerçekleştirilmiştir. Famotidin standart çözeltisine, plasebo çözeltisine, hareketli faza, çözücüye ve famotidin içeren farmasötik preperat çözeltisine ait elde edilen kromatogramlar Şekil 4.5'te görülmektedir.



**Şekil 4.5.** Famotidin Tablet USP monografında belirtilen yöntem kullanılarak elde edilen kromatogramlar; (a) Hareketli faz, (b) Çözücü, (c) Duovel tablet plasebo çözeltisi, (d) 100,0 µg/mL'lik famotidin içeren standart çözeltisi, (e) 100,0 µg/mL'lik famotidin içeren farmasötik preparat çözeltisi

### 4.3.3. Kalibrasyon Eğrisi ve Doğrusallık Aralığı

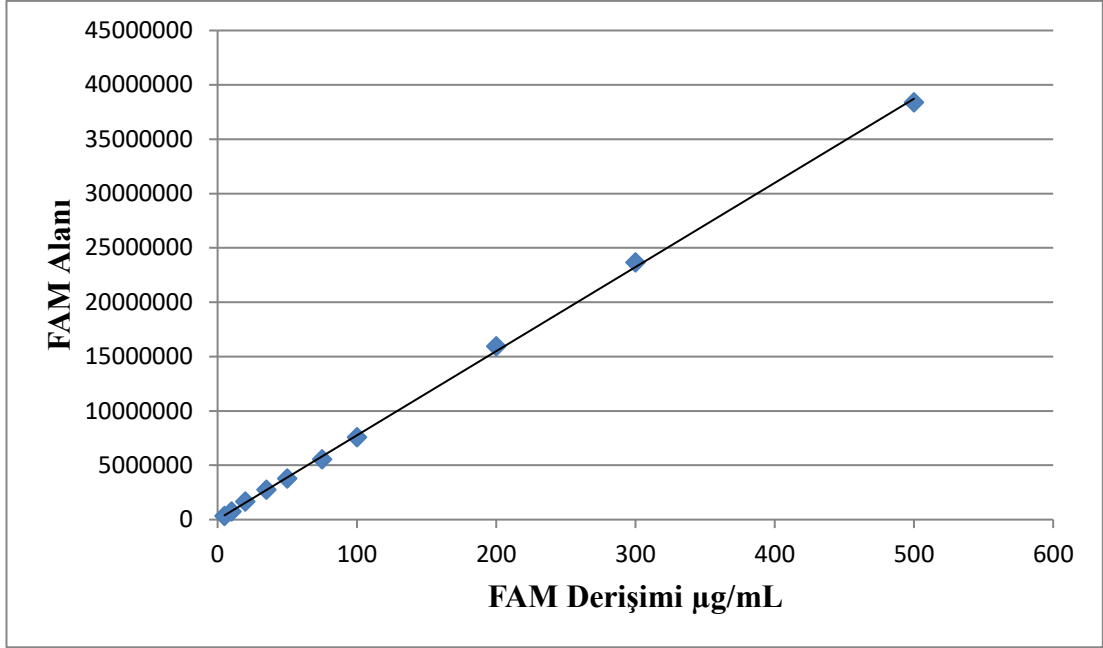
Doğrusallık çalışması famotidin içeren standart çözeltisi ile yapılmıştır. Bu sebeple, famotidin 0,5 - 1000 µg/mL aralığında kalibrasyon çözeltileri hazırlanarak, doğrusallık aralığı belirlenmeye çalışılmıştır.

Famotidin içeren çözeltinin doğrusallık aralığı 5,0 - 500 µg/mL olarak bulunmuştur. Doğrusallık aralığı, regresyon denklemi ve korelasyon katsayısı değerleri Tablo 4.18’de verilmiştir. Doğrusallık aralığının 5,0 - 500 µg/mL aralığında bulunması nedeniyle çalışmanın devamında bu aralıkta kalibrasyon çözeltileri kullanılmıştır. Elde edilen kalibrasyon grafiği Şekil 4.6’da ve bu kalibrasyon doğrusunun özellikleri Tablo 4.19’da verilmiştir.

**Tablo 4.19.** Famotidin Tablet USP monografında bildirilen yöntem ile tabletten famotidin analizi için elde edilen kalibrasyon doğrusunun özellikleri.

	<b>Famotidin</b>
<b>Regresyon denklemi</b>	$y = 77422,08 x + 7367,53$
<b>Eğimin standart hatası</b>	566,04
<b>Kesişimin standart hatası</b>	113189,38
<b>Korelasyon katsayısı (r)</b>	0,9998
<b>Tanımlayıcılık katsayısı (R<sup>2</sup>)</b>	0,9996
<b>Doğrusallık aralığı (µg / mL)</b>	5,0 – 500
<b>Gözlenebilme sınırı (µg / mL)</b>	2,0
<b>Alt tayin sınırı (µg / mL)</b>	5,0

\* $y=ax + b$ ; x: µg/mL biriminde derişim, y: pik alanı, a: eğim, b:kesişim



**Şekil 4.6.** Famotidin Tablet USP monografında bildirilen yöntemle tabletten famotidin analizi için elde edilen kalibrasyon eğrisi.

#### 4.3.4. Gözlenebilme Sınırı ve Alt Tayin Sınırı (LOD ve LOQ)

Duyarlılık çalışması için ilaç etken maddelerini içeren karışım geliştirilen analitik yöntem ile analiz edilmiştir. Hesaplanan alt tayin sınırı ve gözlenebilme sınırı değerleri Tablo 4.20’de verilmiştir.

**Tablo 4.20.** Famotidin Tablet USP monografında belirtilen yöntemde gözlenebilme ve alt tayin sınırı (LOD ve LOQ) sonuçları.

	<b>Gözlenebilme Sınırı (LOD)</b>	<b>Alt Tayin Sınırı (LOQ)</b>
<b>Famotidin</b>	2,0 µg/mL (S/N değeri= 6,44±0,15, n=6)	5,0 µg/mL (S/N değeri= 14,22±0,10, n=6)

#### 4.3.5. Doğruluk ve Kesinlik

Doğruluk ve kesinlik çalışması ise gün içi ve günler arası olmak üzere famotidin içeren 3 farklı derişimdeki karışım çözeltilerinin (8,0, 87,5 ve 460 µg/mL) 6 tekrarlı olarak analiz edilmesiyle yapılmıştır. Gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik çalışmasına ait sonuçlar ve bağıl hata değerleri Tablo 4.21’de verilmiştir.

**Tablo 4.21.** Famotidin tablet USP monografında belirtilen yöntemle famotidin analizine ait gün içi ve günler arası analiz sonuçları (n=6).

Famotidin derişimi (µg/mL)	Günler Arası		Gün İçi	
	Bulunan miktar (µg/mL)	Bağlı hata ( % )	Bulunan miktar (µg/mL)	Bağlı hata ( % )
8,0	7,99	-0,11	7,94	-0,75
	7,93	-0,84	7,99	-0,13
	7,94	-0,69	8,03	0,43
	7,97	-0,37	7,97	-0,32
	7,96	-0,46	7,93	-0,85
	8,00	0,01	8,04	0,47
	$\bar{X}$	7,97		7,98
SS	0,02		0,04	
BSS (%)	0,30		0,52	
87,5	87,58	0,10	87,40	-0,12
	87,42	-0,09	87,59	0,10
	87,50	0,00	87,35	-0,17
	87,52	0,03	87,42	-0,09
	87,56	0,07	87,61	0,12
	87,35	-0,17	87,36	-0,16
$\bar{X}$	87,49		87,45	
SS	0,08		0,10	
BSS (%)	0,09		0,12	
460,0	460,99	0,22	461,37	0,30
	461,72	0,37	458,46	-0,33
	462,10	0,46	458,78	-0,27
	458,56	-0,31	458,51	-0,32
	459,57	-0,09	459,01	-0,21
	458,70	-0,28	460,96	0,21
$\bar{X}$	460,27		459,52	
SS	1,40		1,19	
BSS (%)	0,30		0,26	

$\bar{X}$  : Ortalama  $\pm$  standart hata, SS: Standart sapma, BSS: % Bağlı standart sapma

#### 4.3.6. Tekrarlanabilirlik

Yöntem tekrarlanabilirliğinin incelenmesi için 87,5 µg/mL famotidin içeren standart çözeltisinden 10 farklı numune hazırlanarak analiz edilmiştir. Enjeksiyon tekrarlanabilirliğinin incelenmesinde ise 87,5 µg/mL famotidin içeren tek bir standart çözeltisinden 10 tekrarlı analiz gerçekleştirilmiştir. Enjeksiyon ve yöntem tekrarlanabilirliğine bağlı standart sapma değerleri, sırasıyla 0,23 ve 0,10 olarak hesaplanmıştır. Enjeksiyon ve yöntem tekrarlanabilirliğine ait sonuçlar ve bağlı standart sapma değerleri Tablo 4.22’de verilmiştir.

**Tablo 4.22.** Famotidin tablet USP monografında belirtilen yöntemin enjeksiyon ve yöntem tekrarlanabilirliği bulguları (n=10).

Eklenen Famotidin derişimi (µg / mL)	Bulunan Famotidin (µg / mL)	
	Enjeksiyon Tekrarlanabilirliği	Yöntem Tekrarlanabilirliği
<b>87,50</b>	87,15	87,61
	87,51	87,42
	87,22	87,41
	87,40	87,63
	87,67	87,45
	87,59	87,59
	87,47	87,57
	87,37	87,58
	87,75	87,60
	87,16	87,38
$\bar{X}$	87,50	87,53
SS	0,20	0,08
BSS (%)	0,23	0,10
GA	87,50 ± 0,14	87,53 ± 0,06

$\bar{X}$  : Ortalama, SS: Standart sapma, BSS : % Bağlı standart sapma, (%95 güven aralığında)

#### 4.3.7. Tutarlılık

Tutarlılık çalışması için 87,5 µg/mL’lik famotidin içeren çözelti hazırlanmış ve Famotidin USP monografında belirtilen yöntem ile analiz edilmiştir. Bu çalışmada

iki farklı analizcinin etkisi incelenmiştir. Farklı iki analizcinin bulgularılarını karşılaştırmak için Mann-Whitney U Testi tercih edilmiştir (Tablo 4.23).

**Tablo 4.23.** Famotidin tablet USP monografında belirtilen yöntemin tutarlılık bulguları (n = 6).

<b>Famotidin</b>				
<b>Eklenen Derişim (µg/mL)</b>	<b>1. Analizci</b>		<b>2. Analizci</b>	
	<b>Bulunan Derişim (µg/mL)</b>	<b>Geri Kazanım (%)</b>	<b>Bulunan Derişim (µg/mL)</b>	<b>Geri Kazanım (%)</b>
<b>87,50</b>	86,81	99,21	87,71	100,24
	87,67	100,20	87,32	99,79
	87,76	100,30	87,49	99,99
	86,87	99,27	87,12	99,57
	87,04	99,47	87,79	100,34
	87,74	100,27	88,08	100,66
$\bar{X}$	87,31	99,79	87,59	100,10
<b>SS</b>	0,42	0,48	0,32	0,36
<b>BSS (%)</b>	0,48	0,48	0,36	0,36
Farklı iki analizci bulguları için Mann-Whitney U Testi: $U_{\text{Hesap}} = > U_{\text{Tablo}}, p > 0.05$				

$\bar{X}$  : Ortalama, SS: Standart sapma, BSS: % Bağlı standart sapma

Hesaplamalar sonucunda  $U_{\text{hesap}}$  11 olarak bulunmuştur. Mann - Whitney U testi tabloları incelendiğinde  $U_{\text{tablo}}$  değerinin 7 olduğu görülmüştür.  $U_{\text{hesap}}$  değeri  $U_{\text{tablo}}$  değerinden büyük olduğundan veri setleri arasında kayda değer bir fark olmadığı söylenebilmektedir.

#### 4.3.8. Kararlılık

Famotidin çözeltisinin kısa dönem ve uzun dönem kararlılığının saptaması için çözeltiler, aydınlık, karanlık ve + 4 °C'de 8, 24 ve 48 saat bekletilmiştir. Uzun dönem kararlılık testi ise derin dondurucuda (-20 °C) 1 ay bekletilerek yapılmıştır. Belirtilen saklama koşullarında bekletilen stok çözeltilerden hazırlanan 22,5 µg/mL derişimindeki çalışma standartları analiz edilmiştir (n = 3). Standart derişimleri taze

hazırlanmış çalışma standartlarının derişimleri ile karşılaştırılarak kalan miktarlar hesaplanmış, sonuçlar Tablo 4.24'te sunulmuştur.

**Tablo 4.24.** Famotidin Tablet USP monografındaki yönteme ait kararlılık bulguları (22,5 µg/mL, n=3).

<b>Famotidin</b>				
<b>Süre (saat)</b>	<b>Aydınlık</b>	<b>Karanlık</b>	<b>Soğuk (+ 4 °C)</b>	<b>Uzun Dönem (1 Ay)</b>
	<b>% Kalan</b>	<b>% Kalan</b>	<b>% Kalan</b>	<b>% Ort. Kalan</b>
<b>0</b>	100,00	100,00	100,00	99,38±0,02
<b>8</b>	99,58	99,91	99,96	
<b>24</b>	99,42	100,15	99,71	
<b>48</b>	99,22	99,87	99,64	

#### 4.3.9. Sağlamlık

Sağlamlık çalışması için 87,50 µg/mL derişiminde Famotidin içeren çözeltiler hazırlanmış ve famotidin tablet USP monografında belirtilen analitik yöntem ile analiz edilmiştir. Sağlamlık testi için USP monografında belirtilen analitik yöntemdeki kromatografik parametrelerde yapılan ufak değişikliklerin etkisi incelenmiştir. Bunun için çalışılan dalga boyu, akış hızı ve kolon sıcaklığı, tampon derişimi ve hareketli fazdaki asetonitril parametreleri değiştirilmiştir (Tablo 4.25).

USP monografında belirtilen analitik yöntemde dalga boyu, akış hızı ve kolon sıcaklığı, tampon derişimi ve hareketli fazdaki asetonitril parametrelerinde yapılan ufak değişiklikler ile yapılan analizde karışıma eklenen ilaç etken maddelerinin derişimleri ile standart analizler sonucunda bulunan ortalama derişim arasında istatistiksel bir fark gözlemlenmemiştir (t-test, p<0,05).



**Tablo 4.25.** Famotidin Tablet USP monografındaki metodun sağlamlık bulguları (Eklenen 87,5 µg / mL Famotidin, n = 6).

	<b>Famotidin</b>		
	<b>Bulunan (µg / mL)</b>	<b>BSS (%)</b>	<b>p</b>
<b>Optimum koşullarda</b>	87,48	0,05	-
<b>Asetonitril Oranı %91</b>	87,47	0,03	0,5379
<b>Asetonitril Oranı %95</b>	87,43	0,04	0,1046
<b>Tampon Derişimi 9 mM</b>	87,42	0,07	0,1953
<b>Tampon Derişimi 11 mM</b>	87,42	0,05	0,1575
<b>Dalga boyu 273 nm</b>	87,43	0,07	0,1736
<b>Dalga boyu 277 nm</b>	87,50	0,05	0,4766
<b>Akış Hızı 1.3 mL/dk</b>	87,53	0,05	0,1408
<b>Akış Hızı 1.5 mL/dk</b>	87,46	0,07	0,3432
<b>Kolon Sıcaklığı 38°C</b>	87,56	0,06	0,1062
<b>Kolon Sıcaklığı 42°C</b>	87,53	0,03	0,1033

BSS: % Bağlı standart sapma, p: hesaplanan p değeri

#### **4.3.10. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması**

Famotidin içeren tabletler piyasadan temin edilmiş, DUOVEL® tablet kullanılmıştır. Famotidin içeren farmasötik preparatların her birine ait 6 farklı çözelti hazırlandıktan sonra Famotidin tablet USP monografında belirtilen analitik yöntem ile analiz edilmiştir. Analizler sonrasında her bir maddeye ait alan değerleri kalibrasyon grafiğinde yerine konularak maddelere ait derişim değerleri hesaplanmıştır (Tablo 4.26).

**Tablo 4.26.** Famotidin tablet USP monografında belirtilen yöntem ile sentetik tablet analizine ait geri kazanım değerleri (n=6).

<b>Famotidin</b>		
<b>Farmasötik Preparattaki Etiket Değeri (mg)</b>	<b>Bulunan Miktar (mg)</b>	<b>% Geri Kazanım</b>
<b>40</b>	39,68	99,21
	39,43	98,56
	39,48	98,69
	39,31	98,28
	39,40	98,49
	39,81	99,53
$\bar{X}$	39,52	98,80
<b>SS</b>	0,17	0,43
<b>BSS (%)</b>	0,44	0,44

$\bar{X}$  : Ortalama. SS: Standart sapma. BSS: % Bağıl standart sapma

#### 4.4. Yöntemlerin Karşılaştırılması

Piyasadan temin edilmiş olan famotidin içeren DUOVEL® tabletlere hem geliştirilen yeşil kromatografik yöntem ile hem de Famotidin Tablet USP Monografında belirtilen yöntem ile miktar tayini analizleri yapılmıştır. Yapılan analizlerin sonuçları Bölüm 4.2.10 ve Bölüm 4.3.10'da verilmiştir. Elde edilen analiz sonuçlarını istatistiksel olarak karşılaştırmak adına geri elde verilerine hem t-test ( $p < 0,05$ ) hem de Mann-Whitney U test çalışmaları yapılmıştır. Elde edilen tüm veriler Tablo 4.27'de sunulmaktadır.

Yapılan istatistiksel analizler sonucunda  $U_{hesap}$  13 olarak bulunmuştur. Mann - Whitney U testi tabloları incelendiğinde  $U_{tablo}$  değerinin 7 olduğu görülmüştür.  $U_{hesap}$  değeri  $U_{tablo}$  değerinden büyük olduğundan veri setleri arasında kayda değer bir fark olmadığı söylenebilmektedir. Aynı zamanda t-test analizi sonuçlarında da p değeri 0,59 olarak bulunduğu için veri setleri arasında kayda değer bir fark olmadığı tekrar kanıtlanmıştır.

**Tablo 4.27.** Geliştirilen yeşil kromatografik yöntemin ve USP monografında belirtilen yöntemin famotidin içeren farmasötik preparatta analiz sonuçlarının karşılaştırılması

<b>Famotidin</b>		
<b>Farmasötik Preparattaki Etiket Değeri (mg)</b>	<b>Yeşil Kromatografik Yöntem Analiz Sonuçları (Bulunan Miktar, mg)</b>	<b>USP Monografında Belirtilen Yöntem Analiz Sonuçları (Bulunan Miktar, mg)</b>
<b>40</b>	39,34	39,68
	39,42	39,43
	39,50	39,48
	39,48	39,31
	39,87	39,40
	39,87	39,81
	$\bar{X}$	39,58
<b>SS</b>	0,21	0,17
<b>BSS (%)</b>	0,54	0,44
Farklı iki analiz bulguları için Mann-Whitney U Testi: $U_{\text{Hesap}} = > U_{\text{Tablo}}, p > 0,05$		
t-test, $p > 0,05$		

## 5. TARTIŞMA

Literatür incelendiğinde famotidin, nizatidin, ranitidin ve simetidin etken maddelerinin ortak bir yöntemle analizi ile ilgili çalışmalara oldukça az rastlanmıştır. Bu çalışmalar aynı zamanda; içerisinde asetonitril, metanol gibi çevreye zararlı organik çözücüler ve yoğun asitlerle pH ayarlaması yapılan tamponlar içermektedir. Yöntem süreleri uzun ve çözelti hazırlama süreçleri zahmetlidir. Yani kısaca çevre ve insan sağlığı dikkate alınmadan geliştirilmiş, etkinliği düşük yöntemlere rastlanmıştır. Bu çalışmada bu dört etken maddenin eş zamanlı olarak analizi için çevreye duyarlı, yeşil kromatografik prensipler de benimsenerek, etkin ve güvenli bir analitik yöntem geliştirilmiştir. Bu amaçla farklı kromatografik koşullar denenerek yöntemin optimizasyonu sağlanmıştır. Geliştirilen yöntem daha sonra famotidinin farmasötik preparattan analizi için valide edilmiştir. Validasyon ve sistem uygunluk parametreleri değerlendirilerek famotidin içeren farmasötik preparatın analizine uygulanmıştır. Aynı zamanda Famotidin Tablet USP monografında belirtilen yöntemin validasyonu da gerçekleştirilmiştir. Bu yöntem de validasyon ve sistem uygunluk parametreleri değerlendirilerek famotidin içeren farmasötik preparatın analizine uygulanmıştır.

Famotidin, nizatidin, ranitidin ve simetidin etken maddelerinin yeşil kromatografik yöntem ile analizi için en uygun kromatografik koşulların belirlenmesinde; tampon derişimi, hareketli fazdaki organik çözücü oranı, kolon sıcaklığı ve akış hızının etken maddelerin kromatografik davranışı üzerindeki etkileri incelenmiştir. Etken maddelerin davranışlarını belirlemek için alıkonma zamanı ( $t_R$ ), simetri faktörü, teorik plaka sayısı ( $N$ ), ayırıcılık ( $R_s$ ) ve kapasite faktörü ( $k'$ ) gibi bazı sistem uygunluk parametreleri takip edilmiştir. Sonuç olarak takip edilen sistem uygunluk parametrelerinin, pik ayırıcılığının ( $R_s$ )  $> 1,5$ , pik simetri oranının  $\leq 2,0$ , teorik tabaka sayısının ( $N$ )  $> 2000$  ve kapasite faktörünün ( $k'$ )  $> 2,0$  limitlerine uygun olmasına dikkat edilmiştir.

Kromatografik koşulların belirlenmesi için en uygun yöntemin kemometrik optimizasyon olduğu düşünülmüştür. Bu doğrultuda etken maddelerin kromatografik olarak ayırımlarında kullanılacak optimum koşulları belirlemek için deneysel tasarım

planı oluşturulmuştur. İsteklilik fonksiyonu ile famotidin, nizatidin, ranitidin ve simetidin etken maddelerinin kromatografik ayırımı toplam 21 deneyden oluşan iki seviyeli kısmi faktöriyel tasarım ile gerçekleştirilmiştir. 4 etken maddenin ayırımı için yapılan yöntem geliştirme çalışması az sayıda deney ile gerçekleştirilmiştir. Analitik yöntem geliştirme basamağında geleneksel yaklaşımın aksine yüzlerce deney yerine sadece 21 deney ile optimize koşulların belirlenmesi, rutin analizlerde deneysel tasarım planlamasının kullanımının önemini göstermektedir. Çalışma kapsamında, kemometrik deneysel tasarım planlamasının kullanılması ile zamandan ve maliyetten tasarruf sağlanmış, harcanan sarf malzemeler ve kimyasallar asgari seviyeye indirilerek çevreye verilen zarar minimum düzeyde tutulmuştur. Bu çalışma yeşil kimyanın gereklilikleri açısından az sayıda deney ile çevreye verilen zararı ve analistin maruz kalacağı riski en aza indirmesi bakımından önem arz etmektedir. Bu yaklaşımın sanayide veya analiz laboratuvarlarında oluşan tonlarca atığın asgari seviyeye indirilmesi için diğer rutin analizlerde kullanımını teşvik edecek önemli bir kaynak olması beklenmektedir.

Famotidinin farmasötik preparattan analizi için geliştirilen yeşil kromatografik yöntemde iç standart olarak ranitidin ve simetidin etken maddeleri denenmiştir. Alıkonma zamanları incelendiğinde alıkonma zamanı famotidine en yakın olan etken maddenin simetidin olduğu görülmüştür. Yöntemin toplam süresini kısaltmak ve bu sayede harcanan hareketli faz ve enerjiyi minimuma indirmek amacıyla alıkonma zamanı famotidine en yakın olan simetidin iç standart olarak seçilmiştir.

Geliştirilen yöntem sistem uygunluk testleri, özgünlük, duyarlılık, doğrusallık, doğruluk, kesinlik, geri kazanım, kararlılık, sağlamlık ve tutarlılık parametreleri araştırılarak valide edilmiştir.

Geliştirilen analiz yönteminin sistem uygunluğu; enjeksiyon tekrarlanabilirliği, ayırıcılık ( $R_s$ ), teorik tabaka sayısı (N) ve simetri faktörü parametrelerine göre değerlendirilmiştir. Test için standart çözeltinin on tekrarlı enjeksiyonu sonucunda elde edilen veriler kullanılmış ve elde edilen değerler incelendiğinde sınır değerler içinde olduğu görülmüştür (Bkz. Tablo 4.5 – Tablo 4.9).

### **Famotidinin farmasötik preparattan analizi için geliştirilen yeşil kromatografik yöntem validasyonu:**

Famotidin, nizatidin, ranitidin ve simetidin etken maddelerinin eş zamanlı analizi için geliştirilen yöntem famotidinin farmasötik preparattan analizi için valide edilmiştir. Bu doğrultuda öncelikle bir iç standart (ISTD) seçilmesi gerekmiştir. Yöntemin toplam süresini kısaltmak ve bu sayede harcanan hareketli faz ve enerjiyi minimuma indirmek amacıyla alikonma zamanı famotidine en yakın olan simetidin iç standart olarak seçilmiştir. Aynı zamanda geliştirilen yeşil analitik yöntemde dalga boyu olarak seçilen 230 nm'de en düzgün ve yüksek piki simetidin vermektedir. Bu da iç standart olarak seçilme sebeplerinden birisidir.

Yöntemin ilk önce sistem uygunluk parametrelerini sağlayıp sağlamadığı kontrol edilmiştir. 6 tekrarlı tüm etken maddeleri içeren (10,0 µg/mL) karışım enjeksiyonunda, sistem uygunluk parametrelerinin (kapasite faktörü, ayırıcılık, pik asimetri oranı, teorik tabaka sayısı) alt ve üst sınır değerlerine bakıldığında her bir ilaç etken maddesine ait kapasite faktörü değerinin 2,0'den büyük olduğu, pik asimetri oranınının 1.5'tan küçük olduğu, ayırıcılık değerlerinin 2,0'den büyük olduğu ve teorik tabaka sayısının ise 2000'den büyük olduğu görülmüştür. Aynı zamanda yapılan bu 6 enjeksiyonda alikonma zamanı, kapasite faktörü, pik asimetri oranı, teorik tabaka sayısı ve ayırıcılık değerlerinin bağıl standart sapma değerleri sırasıyla famotidin için 0,40, 0,82, 0,84, 0,22, 0,19, nizatidin için 0,19, 0,59, 0,73, 0,12, 0,39, ranitidin için 0,18, 0,57, 0,76, 0,14, 0,66 ve simetidin için 0,23, 0,77, 0,73, 0,18, 0,68'dir. Bağıl standart sapma değerleri 2,0'dan düşük olduğundan verilerin tekrarlanabilir olduğu kanıtlanmıştır.

Famotidinin farmasötik preparattan analizi için valide edilen bu yöntemde önemli olan bir diğer sistem uygunluk parametresi ise iç standart olarak seçilen simetidin ile famotidin arasındaki ayırıcılıktır. Bu değer de 2,0'den büyük olduğundan geliştirilen yöntemin sistem uygunluk parametrelerini sağladığı söylenebilmektedir.

Yöntemin seçiciliğini (özgünlüğünü) gözlemlemek için hareketli faz, çözücü, DUOVEL® tablet plasebosu, tüm etken maddeleri içeren karışım çözeltisi (10,0 µg/mL), numune ve standart (famotidin 87,5 µg/mL, ISTD 0,2 µg/mL) çözeltileri

analiz edilmiş ve elde edilen kromatogramlar incelenerek çözelti kaynaklı safsızlık veya başka bir sebeple herhangi bir girişim olmadığı gözlenmiştir (Bkz. Şekil 4.2 Şekil 4.3). Kromatogramlardan elde edilen sonuçlar göz önüne alındığında geliştirilen yeşil analitik yöntem seçicidir.

Yöntemin doğrusallığını belirlemek adına, 0,5 – 175 µg/mL aralığında farklı derişimlerde hazırlanan famotidin çözeltisinin cevap olarak vermiş olduğu pik alanlarının ISTD (0,2 µg/mL) pik alanına oranı grafiğe geçirilmiştir. Bu çalışma sonucunda yöntemin doğrusallık aralığı olarak 1,5 – 75 µg/mL belirlenmiştir. Yöntemin doğrusallığının kontrol grafiği çizilmiştir (Bkz. Şekil 4.4) ve elde edilen kalibrasyon eğrisinin tanımlayıcılık katsayısının 0,9997 olarak bulunması yani bire yakın çıkması yöntemin doğrusal olduğunu göstermiştir (Bkz. Tablo 4.10).

LOD ve LOQ değerleri S/G oranının 3 ve 10 olmasına göre seçilmiştir. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0,5 µg/mL ve 1,5 µg/mL bulunmuştur. LOD ve LOQ değerlerinin S/G oranları ise yine sırasıyla 3,52 ve 10,33 olarak belirlenmiştir. Bu değerler famotidinin farmasötik preparattan analizi için geliştirilen yeşil HPLC yönteminin yeteri kadar duyarlı olduğunu göstermektedir (Bkz. Tablo 4.11).

Yöntemin gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk çalışmaları çizilen kalibrasyon eğrisi üzerinden 3 farklı derişimdeki (8,0, 22,5, 69,0 µg/mL) bağımsız numunelerin tekrarlı (n=6) analizleri ile yapılmıştır. Geliştirilen yöntemin gün içi ve günler arası analizleri sonucunda elde edilen bağıl hata değerleri sırasıyla %0,09 – 1,76 ve 0,14 – 1,74 arasında bulunmuştur. Bağıl hata değerlerinin %2'nin altında bulunmuş olması ilaç etken maddelerinin eş zamanlı analizleri için geliştirilen yeşil analitik yöntemin yüksek doğrulukta olduğunu göstermektedir. Ayrıca yöntemin gün içi ve günler arası analizleri sonucunda elde edilen bağıl standart sapma değerleri küçükten büyüğe her bir derişim için sırasıyla, 1,22 – 0,64 – 0,39 ve 0,64 – 1,23 – 0,85 olarak bulunmuştur. (Bkz. Tablo 4.12). BSS değerleri ise yöntemin kesinliğinin bir ölçütüdür. Bu 3 farklı derişimde gün içi ve günler arası yapılan analizler sonucunda elde edilen maksimum bağıl standart sapma değerinin %2 den küçük olması geliştirilen yeşil analitik metodun kesin olduğunu göstermektedir. Kesinliğin (BSS) ve doğruluğun (BH) %2'den fazla olmaması gerekmektedir (135). Bu verilere göre değerlendirme yapıldığında, gün içi ve günler arası sonuçlarının

kesinliğinin yüksek ve yöntemin doğru ve tekrarlanabilir olduğu sonucuna varılmıştır.

Geliştirilen yöntemin enjeksiyon ve yöntem tekrarlanabilirliğini belirlemek amacıyla 10 µg/mL derişimde famotidin ve 0,2 µg/mL derişimde ISTD içerecek şekilde hazırlanan çözeltilerin 10'ar tekrarlı enjeksiyonu yapılmıştır. Enjeksiyon ve yöntem tekrarlanabilirliği için yapılan bu 10 ardışık enjeksiyondan elde edilen bağıl standart sapma değerleri sırasıyla %0,97 ve %0,48 olarak bulunmuştur (Bkz. Tablo 4.13). Bağıl standart sapma değerlerinin %2'nin altında olması geliştirilen yeşil analitik yöntemin tekrarlanabilir olduğunu göstermektedir.

Tutarlılık çalışması; geri kazanım, bağıl ve mutlak geri kazanım olarak tek derişimde (22,5 µg/mL) iki farklı analizci tarafından yapılmıştır. Mutlak geri kazanım, tüm analiz yönteminin sonucunda plasebo çözeltilisine eklenen maddelerin ne kadarının bulunduğunu belirlemek için yapılır. Analiz sonuçlarına göre; mutlak geri kazanım birinci ve ikinci analizci tarafından sırasıyla, %99,59 – 100,31 ve %99,36 – 100,47 değerleri arasında bulunmuştur (Bkz. Tablo 4.14). İki analizci arasında karışıma eklenen ilaç etken maddelerinin derişimleri ve bulunan ortalama derişim arasında istatistiksel olarak bir fark olup olmadığını belirlemek adına Mann – Whitney U testi tercih edilmiştir. Bu doğrultuda yapılan hesaplamalar sonucunda  $U_{hesap}$  17 olarak bulunmuştur. Mann - Whitney U testi tabloları incelendiğinde  $U_{tablo}$  değerinin 7 olduğu görülmüştür.  $U_{hesap}$  değeri  $U_{tablo}$  değerinden büyük olduğundan veri setleri arasında kayda değer bir fark olmadığı söylenebilmektedir. Elde edilen sonuçlar geliştirilen yeşil analitik yöntemin tutarlı olduğunu göstermektedir.

Etken maddelerin kısa dönem ve uzun dönem kararlılığının saptanması için 22,5 µg/mL famotidin ve 0,2 µg/mL ISTD içeren çözeltiler, 8, 24 ve 48 saat boyunca aydınlık ve karanlık ortamda oda sıcaklığında ve ayrıca +4°C'de bekletilmiştir. Uzun dönem kararlılık testi ise derin dondurucuda (-20 °C) 1 ay bekletilerek yapılmıştır. Belirtilen saklama koşullarında bekletilen çalışma standartları bekleme süresi dolduktan sonra analiz edilmiştir (n = 3). Standartlar taze hazırlanmış olup, çalışma standartlarının derişimleri ile karşılaştırılarak kalan miktarlar hesaplanmıştır (Bkz. Tablo 4.15). FDA tarafından yayınlanan validasyon kılavuzunda, kararlılık çalışmalarında, farmasötik preparatlarda %2'ye kadar meydana gelebilecek



değişimler kabul edilmektedir (135). Famotidin ve ISTD içeren standart çözeltilerinin 48 saat boyunca aydınlık ve karanlık ortamda oda sıcaklığında bekletildiğinde hesaplanan geri elde değerleri iki ortam için de %99,39 olarak bulunmuştur. Bu veriler ışığında oda sıcaklığında aydınlıkta ve karanlıkta 48 saat boyunca bekletilen standart çözeltilerinin stabil olduğu gözlemlenmiştir. Aynı zamanda famotidin ve ISTD içeren standart çözeltilerinin yine 48 saat boyunca soğukta (+4°C) bekletildiğinde hesaplanan geri elde değeri %100,56 olarak bulunmuştur. Çözeltinin soğukta da stabil olduğu belirlenmiştir. Ayrıca uzun dönem stabilite çalışmasında, 1 ay süreyle -20°C bekletilmiş olan standart çözeltilerinde %0,61'lik bir değişim gözlenmiştir ve bu değişim kabul edilebilir sınırlar içerisinde olduğundan çözeltilerin kararlı olduğu sonucuna varılmıştır. Buna göre famotidin ve ISTD uzun dönem ve kısa dönemde kararlı bulunmuştur.

Sağlamlık çalışmaları için deneyde oluşabilecek ana parametrelerdeki küçük değişimlerin sonuçlar üzerindeki etkisi incelenmektedir. Bunun için çalışılan dalga boyu, akış hızı, kolon sıcaklığı, tampon derişimi ve hareketli fazdaki etanol oranı parametreleri değiştirilmiştir. Çalışma 6 tekrarlı yapılmıştır. Elde edilen t-test değerleri (Bkz. Tablo 4.16) verilmiştir. Çalışmada 22,5 µg/mL'lik famotidin ve 0,2 µg/mL'lik ISTD içeren karışım hazırlanmış ve geliştirilen analitik yöntem ile analiz edilmiştir. Analiz sonuçları t-testi kullanılarak istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. T-testi sonuçlarında en yüksek 0,9761 ve en düşük 0,2379 değerleri elde edilmiştir. Tüm bu veriler değerlendirildiğinde yöntemin sağlamlık çalışması için meydana gelen küçük değişikliklerden etkilenmesinin önemsiz olduğu sonucuna varılmıştır. Böylece geliştirilen yöntemin sağlam olduğu kanıtlanmıştır.

Geliştirilen bu yöntemin validasyon sonrasında farmasötik preparatlara uygulanması denenmiştir. Bu amaçla piyasadan temin edilen ve famotidin içeren DUOVEL® tablet kullanılmıştır. 6 farklı çözelti hazırlandıktan sonra geliştirilen yeşil analitik yöntem ile analiz edilmiştir. Analizler sonrasında her bir maddeye ait alan değerleri kalibrasyon grafiğinde yerine konularak maddelere ait ortalama derişim değerleri bulunmuştur. Yapılan analizler sonucunda tablet numunelerinde bulunan miktar ortalama 39,58 mg olarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar DUOVEL® tablet ürünün etiketinde belirtilen doz ile uyumlu çıkmaktadır. Aynı zamanda

hazırlanan çözeltilerden elde edilen bağıl standart sapma değeri bulunan miktar ve % geri kazanım değerlerinin ikisi de %0,54 olarak bulunmuştur (Bkz. Tablo 4.17). Bağıl standart sapma değerlerinde herhangi bir sapma olmaması ve sonuçların ürünün etiket değeriyle uyumlu çıkması nedeniyle yöntemin farmasötik preparatlara uygulanabilir olduğu kanıtlanmıştır.

**Famotidinin farmasötik preparattan analizi için Famotidin Tablet USP monografında belirtilen analitik yöntemin validasyonu:**

Yöntemin ilk önce sistem uygunluk parametrelerini sağlayıp sağlamadığı kontrol edilmiştir. 6 tekrarlı famotidin içeren çözelti (100 µg/mL'lik) enjeksiyonunda, bu sistem uygunluk parametrelerinin (kapasite faktörü, ayırıcılık, pik asimetri oranı, teorik tabaka sayısı) alt ve üst sınır değerlerine bakıldığında famotidin pikine ait kapasite faktörü değerinin 2,0'den büyük olduğu, pik asimetri oranınının 1.5'tan küçük olduğu, ayırıcılık değerlerinin 2,0'den büyük olduğu ve teorik tabaka sayısının ise 2000'den büyük olduğu görülmüştür. Aynı zamanda yapılan bu 6 enjeksiyonda alıkonma zamanı, kapasite faktörü, pik asimetri oranı, teorik tabaka sayısı ve ayırıcılık değerlerinin bağıl standart sapma değerleri sırasıyla 0,18, 0,61, 0,83, 0,19, 0,34'tür. Bağıl standart sapma değerleri 2,0'dan düşük olduğundan verilerin tekrarlanabilir olduğu kanıtlanmıştır.

Yöntemin seçiciliğini (özgünlüğünü) gözlemek için hareketli faz, çözücü, DUOVEL® tablet plasebosu, numune ve standart (famotidin 100,0 µg/mL) çözeltileri analiz edilmiş ve elde edilen kromatogramlar incelenerek çözelti kaynaklı safsızlık veya başka bir sebeple herhangi bir girişim olmadığı gözlenmiştir (Bkz. Şekil 4.5). Kromatogramlardan elde edilen sonuçlar göz önüne alındığında Famotidin Tablet USP Monografi'nda belirtilen yöntem seçicidir.

Yöntemin doğrusallığını belirlemek adına, 0,5 – 1000 µg/mL aralığında farklı derişimlerde hazırlanan famotidin çözeltilerinin cevap olarak vermiş olduğu pik alanları grafiğe geçirilmiştir. Bu çalışma sonucunda yöntemin doğrusallık aralığı olarak 5,0 - 500 µg/mL belirlenmiştir. Yöntemin doğrusallığının kontrol grafiği çizilmiştir (Bkz. Şekil 4.6) ve elde edilen kalibrasyon eğrisinin tanımlayıcılık

katsayısının 0,9996 olarak bulunması yani bire yakın çıkması yöntemin doğrusal olduğunu göstermiştir (Bkz. Tablo 4.19).

LOD ve LOQ değerleri S/G oranının 3 ve 10 olmasına göre seçilmiştir. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 2,0 µg/mL ve 5,0 µg/mL bulunmuştur. LOD ve LOQ değerlerinin S/G oranları ise yine sırasıyla 6,44 ve 14,22 olarak belirlenmiştir. Bu değerler famotidinin farmasötik preparattan analizi için USP Monografi'nda belirtilen yönteminin yeteri kadar duyarlı olduğunu göstermektedir (Bkz. Tablo 4.20).

Yöntemin gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk çalışmaları çizilen kalibrasyon eğrisi üzerinden 3 farklı derişimdeki (8,0, 87,5, 460,0 µg/mL) bağımsız numunelerin tekrarlı (n=6) analizleri ile yapılmıştır. Geliştirilen yöntemin gün içi ve günler arası analizleri sonucunda elde edilen bağıl hata değerleri sırasıyla %0,09 – 0,85 ve %0,01 – 0,84 arasında bulunmuştur. Bağıl hata değerlerinin %2'nin altında bulunmuş olması famotidin tablet USP Monografi'nda belirtilen analitik yöntemin yüksek doğrulukta olduğunu göstermektedir. Ayrıca yöntemin gün içi ve günler arası analizleri sonucunda elde edilen bağıl standart sapma değerleri küçükten büyüğe her bir derişim için sırasıyla, %0,52 – 0,12 – 0,26 ve %0,30 – 0,09 – 0,30 olarak bulunmuştur. (Bkz. Tablo 4.21). BSS değerleri ise yöntemin kesinliğinin bir ölçütüdür. Bu 3 farklı derişimde gün içi ve günler arası yapılan analizler sonucunda elde edilen maksimum bağıl standart sapma değerinin %2 den küçük olması famotidin tablet USP Monografi'nda belirtilen analitik metodun kesin olduğunu göstermektedir. Kesinliğin (BSS) ve doğruluğun (BH) %2'den fazla olmaması gerekmektedir (135). Bu verilere göre değerlendirme yapıldığında, gün içi ve günler arası sonuçlarının kesinliğinin yüksek ve yöntemin doğru ve tekrarlanabilir olduğu sonucuna varılmıştır.

Famotidin tablet USP Monografi'nda belirtilen yöntemin enjeksiyon ve yöntem tekrarlanabilirliğini belirlemek amacıyla 87,5 µg/mL derişimde famotidin içerecek şekilde hazırlanan çözeltinin 10'ar tekrarlı enjeksiyonu yapılmıştır. Enjeksiyon ve yöntem tekrarlanabilirliği için yapılan bu 10 ardışık enjeksiyondan elde edilen bağıl standart sapma değerleri sırasıyla %0,23 ve %0,10 olarak bulunmuştur (Bkz. Tablo

4.22). Bağıl standart sapma değerlerinin %2'nin altında olması famotidin tablet USP Monografi'nda belirtilen analitik yöntemin tekrarlanabilir olduğunu göstermektedir.

Tutarlılık çalışması; geri kazanım, bağıl ve mutlak geri kazanım olarak tek derişimde (87,5 µg/mL) iki farklı analizci tarafından yapılmıştır. Mutlak geri kazanım, tüm analiz yönteminin sonucunda plasebo çözeltisine eklenen maddelerin ne kadarının bulunduğunu belirlemek için yapılır. Analiz sonuçlarına göre; mutlak geri kazanım birinci ve ikinci analizci tarafından sırasıyla, %99,21 – 100,30 ve %99,79 – 100,66 değerleri arasında bulunmuştur (Bkz. Tablo 4.23). İki analizci arasında karışıma eklenen ilaç etken maddelerinin derişimleri ve bulunan ortalama derişim arasında istatistiksel olarak bir fark olup olmadığını belirlemek adına Mann – Whitney U testi tercih edilmiştir. Bu doğrultuda yapılan hesaplamalar sonucunda  $U_{hesap}$  11 olarak bulunmuştur. Mann - Whitney U testi tabloları incelendiğinde  $U_{tablo}$  değerinin 7 olduğu görülmüştür.  $U_{hesap}$  değeri  $U_{tablo}$  değerinden büyük olduğundan veri setleri arasında kayda değer bir fark olmadığı söylenebilmektedir. Elde edilen sonuçlar famotidin tablet USP Monografi'nda belirtilen analitik yöntemin tutarlı olduğunu göstermektedir.

Etken maddelerin kısa dönem ve uzun dönem kararlılığının saptanması için 22,5 µg/mL famotidin içeren çözeltiler, 8, 24 ve 48 saat boyunca aydınlık ve karanlık ortamda oda sıcaklığında ve ayrıca +4°C'de bekletilmiştir. Uzun dönem kararlılık testi ise derin dondurucuda (-20 °C) 1 ay bekletilerek yapılmıştır. Belirtilen saklama koşullarında bekletilen çalışma standartları bekleme süresi dolduktan sonra analiz edilmiştir (n = 3). Standartlar taze hazırlanmış olup, çalışma standartlarının derişimleri ile karşılaştırılarak kalan miktarlar hesaplanmıştır (Bkz. Tablo 4.24). FDA tarafından yayınlanan validasyon kılavuzunda, kararlılık çalışmalarında, farmasötik preparatlarda %2'ye kadar meydana gelebilecek derişimler kabul edilmektedir (135). Famotidin içeren standart çözeltilerinin 48 saat boyunca aydınlık ve karanlık ortamda oda sıcaklığında bekletildiğinde hesaplanan geri elde değerleri sırasıyla %99,22 ve %99,87 olarak bulunmuştur. Bu veriler ışığında oda sıcaklığında aydınlıkta ve karanlıkta 48 saat boyunca bekletilen standart çözeltilerinin stabil olduğu gözlemlenmiştir. Aynı zamanda famotidin içeren standart çözeltilerinin yine 48 saat boyunca soğukta (+4°C) bekletildiğinde hesaplanan geri elde değeri %99,64

olarak bulunmuştur. Çözeltinin soğukta da stabil olduğu belirlenmiştir. Ayrıca uzun dönem stabilite çalışmasında, 1 ay süreyle -20°C bekletilmiş olan standart çözeltilerinde %0,62'lik bir değişim gözlenmiştir ve bu değişim kabul edilebilir sınırlar içerisinde olduğundan çözeltilerin kararlı olduğu sonucuna varılmıştır. Buna göre famotidin uzun dönem ve kısa dönemde kararlı bulunmuştur.

Sağlamlık çalışmaları için deneyde oluşabilecek ana parametrelerdeki küçük değişimlerin sonuçlar üzerindeki etkisi incelenmektedir. Bunun için çalışılan dalga boyu, akış hızı, kolon sıcaklığı, tampon derişimi ve hareketli fazdaki etanol oranı parametreleri değiştirilmiştir. Çalışma 6 tekrarlı yapılmıştır. Elde edilen t-test değerleri (Bkz. Tablo 4.25) verilmiştir. Çalışmada 22,5 µg/mL'lik famotidin içeren çözeltiler hazırlanmış ve famotidin tablet USP Monografi'nda belirtilen analitik yöntem ile analiz edilmiştir. Analiz sonuçları t-testi kullanılarak istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. T-testi sonuçlarında en yüksek 0,54 ve en düşük 0,10 değerleri elde edilmiştir. Tüm bu veriler değerlendirildiğinde yöntemin sağlamlık çalışması için meydana gelen küçük değişikliklerden etkilenmesinin önemsiz olduğu sonucuna varılmıştır. Böylece famotidin tablet USP Monografi'nda belirtilen yöntemin sağlam olduğu kanıtlanmıştır.

Famotidin tablet USP Monografi'nda belirtilen yöntemin validasyon sonrasında farmasötik preparatlara uygulanması denenmiştir. Bu amaçla piyasadan temin edilen ve famotidin içeren DUOVEL® tablet kullanılmıştır. 6 farklı çözelti hazırlandıktan sonra famotidin tablet USP Monografi'nda belirtilen yeşil analitik yöntem ile analiz edilmiştir. Analizler sonrasında her bir maddeye ait alan değerleri kalibrasyon grafiğinde yerine konularak maddelere ait ortalama derişim değerleri bulunmuştur. Yapılan analizler sonucunda tablet numunelerinde bulunan miktar ortalama 39,52 mg olarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar DUOVEL® tablet ürünün etiketinde belirtilen doz ile uyumlu çıkmaktadır. Aynı zamanda hazırlanan çözeltilerden elde edilen bağıl standart sapma değeri bulunan miktar ve % geri kazanım değerlerinin ikisi de %0,44 olarak bulunmuştur (Bkz. Tablo 4.26). Bağıl standart sapma değerlerinde herhangi bir sapma olmaması ve sonuçların ürünün etiket değeriyle uyumlu çıkması nedeniyle yöntemin farmasötik preparatlara uygulanabilir olduğu kanıtlanmıştır.

## Yöntemlerin Karşılaştırılması

Geliştirilen yeşil kromatografik yöntem ile Famotidin Tablet USP monografında belirtilen yöntem istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Bu amaç doğrultusunda famotidin içeren tablet formundaki piyasada satışta bulunan DUOVEL® Tabletın miktar tayini analizi iki yöntemle de yapılmıştır. Elde edilen verilerle hem Mann-Whitney U testi hem de t-test çalışmaları yürütülmüştür. Mann-Whitney U testi için yapılan istatistiksel analizler sonucunda  $U_{hesap}$  13 olarak bulunmuştur. Testin U tabloları incelendiğinde  $U_{tablo}$  değerinin 7 olduğu görülmüştür.  $U_{hesap}$  değeri  $U_{tablo}$  değerinden büyük olduğundan veri setleri arasında kayda değer bir fark olmadığı söylenebilmektedir. Aynı zamanda t-test analizi sonuçlarında da  $t_{hesap}$  değeri 0,59 olarak bulunduğundan veri setleri arasında kayda değer bir fark olmadığı tekrar kanıtlanmıştır. Analiz sonuçları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmamasının yanı sıra, çevreye zararlı olacak hareketli faz karışımı içeren USP metodunun aksine, geliştirilen yeşil kromatografik yöntemin, insan ve çevre sağlığını tehdit etmediğinden, üstün olduğu düşünülmüştür.

Geliştirilen yeşil analitik yöntem performansı kromatografik olarak incelenmiştir. Yöntemin 15 dakikada famotidin, nizatidin, ranitidin ve simetidin etken maddelerini tüm sistem uygunluk parametrelerini de sağlayarak eş zamanlı olarak analiz edebildiği görülmüştür. Famotidinin farmasötik preparattan analizinde ise yöntem süresinin 9 dakikaya kısaltılabileceği tespit edilmiştir. Bu yöntemde famotidin için LOQ değerinin 1,5 µg/mL olarak bulunması yöntemin oldukça duyarlı olduğunu göstermektedir. Aynı zamanda validasyon sırasında yapılan tüm analizlerde BSS ve BH değerlerinin oldukça düşük bulunması yöntemin kesinliğini ve tutarlılığını vurgulayacak niteliktedir.

Famotidin Tablet USP monografında belirtilen yöntemin enjeksiyon süresinin, sadece famotidinin farmasötik preparattan analizi için 15 dakika olması, geliştirilen yeşil kromatografik yöntem ile karşılaştırıldığında uzun bir süredir. Belirtilen yöntemin, hareketli fazında bulunan trietilamin ve glasiyel asetik asit ile hazırlanmış sodyum asetat trihidrat tamponu ve organik çözücü olarak yüksek miktarda kullanılan asetonitril içermesi sebebiyle, öncelikle analizci sağlığı olmakla birlikte çevre ve insan sağlığına önem verilmeden geliştirildiği aşıkardır. Enjeksiyon süresi

boyunca harcanan, toksik solventler ve kimyasallar içeren hareketli faz karışımı yüzünden çevreye verilen hasar gün geçtikçe artmaktadır. Her enjeksiyonda bu fazladan harcanan zaman kümülatif olarak harcanan elektrik ve insan gücünü de beraberinde getirmektedir. Özellikle olabildiğince hızlı ve çok analiz yapılan kalite kontrol laboratuvarlarında fazladan harcanan zaman doğrudan maliyeti etkileyeceğinden birden fazla ürünün eş zamanlı olarak analiz edilebileceği, kısa, etkin, hızlı ve duyarlı yöntemlerin önemi büyüktür. Burada famotidin, nizatidin, ranitidin ve simetidin etken maddeleri için devreye aynı zamanda insan ve çevre sağlığını tehdit etmeyen geliştirilen yeşil kromatografik yöntem girmektedir.

Validasyon çalışmaları sırasında USP monografında belirtilen yöntemin LOQ değeri 5,0 µg/mL olarak belirlenmiştir. Bu değer de geliştirilen yöntemin LOQ değerinden (1,5 µg/mL) yüksektir. Geliştirilen yöntemin USP yönteminden daha duyarlı olduğu söylenebilir. Aynı zamanda çevreye ve analiste zarar vermeden, zamandan ve maliyetten tasarruf sağlanarak harcanan sarf maddeleri ve kimyasalları minimum düzeyde tutarak analizin gerçekleştirilebilir olması geliştirilen bu yöntem için büyük bir avantajdır.

Literatür verileri incelendiğinde famotidin, nizatidin, ranitidin ve simetidin etken maddeleri için hem ayrı ayrı hem de eş zamanlı analizlerine yönelik birden çok yayın bulunmuştur. Bu yayınlar incelendiğinde dikkat çeken ilk nokta yapılan çalışmaların hiçbirinin yeşil kromatografi temellerine dayanmadığı olmuştur. Hem pik şekillerini düzeltmek hem de ayrımı iyileştirmek adına yöntemlerde oldukça toksik kimyasalların kullanıldığı görülmüştür. Her ne kadar bazı yöntemlerde alıkonma süreleri ve buna bağlı olarak toplam enjeksiyon süresi kısa olsa da (15, 22, 24) yüksek oranda metanol ve asetonitril içeren yöntemler olmaları çevre ve insan sağlığı açısından duyarsız geliştirildiklerinin kanıtı niteliğindedir. Aynı zamanda literatür yöntemlerinde bulunan ve fazladan eklenen her bir toksik kimyasalın harcanan cam ve sarf malzeme, ekstra kişisel koruyucu donanım ihtiyacı ve atık bedeli vb. gibi maliyet arttırıcı etkileri bulunmaktadır. Literatürdeki çalışmaların çoğunda doğrusallık aralığı (en düşük değer 5,0 µg/mL olmakla birlikte genelde 50 µg/mL ve üstü) geliştirilen yeşil kromatografik yöntemde (1,5 µg/mL) elde edilenden fazladır. Bu da insan ve çevre sağlığını tehdit etmemesi ve çevreye verilen zararın azaltılması

için geliştirilen yeşil kromatografik yöntemin aynı zamanda da oldukça duyarlı olduğunu kanıtlar niteliktedir.



## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez kapsamında dünyada her yaştan ve her gelir düzeyinden insanda oldukça sık görülen bir rahatsızlık olan Gastroözofageal reflü hastalığı, kısaca GÖRH, tedavisinde kullanılan H<sub>2</sub> reseptör antagonistlerinden famotidin, nizatidin, ranitidin ve simetidin etken maddelerinin kombine bir şekilde analiz edilebileceği, aynı zamanda çevreye duyarlı olan yeşil HPLC yöntemi geliştirilmiştir. Optimizasyon çalışmalarının ardından validasyon çalışmaları da yapılmıştır.

Famotidin, nizatidin, ranitidin ve simetidin etken maddelerinin kombine olarak analiz edilmesi için geliştirilen yeşil HPLC yönteminin parametreleri; 10 mM Potasyum Dihidrojen Fosfat Tamponu, hareketli faz oranı tampon:etanol (98:2 v:v), 150 x 4,6 mm C18 kolon, kolon sıcaklığı 40°C, akış hızı 1,0 mL/dk. ve 230 nm dalga boyunda olacak şekilde ayarlanmıştır. Hepsinin eş zamanlı analiz edilmesi durumunda toplam enjeksiyon süresi 15 dakikadır.

Seçilen kromatografik koşullarda famotidin, nizatidin, ranitidin ve simetidin etken maddelerinin alıkonma zamanları sırasıyla 6,37, 8,10, 9,72 ve 7,29 dakika, kapasite faktörleri yine sırasıyla 1,82, 2,59, 3,30 ve 2,23 olarak bulunmuştur. Etken maddeler arasındaki ayırıcılık; famotidin-simetidin, simetidin-nizatidin ve nizatidin-ranitidin olacak şekilde sırasıyla 2, 3 ve 2 olarak bulunmuştur. Teorik tabaka sayıları 2000'in üstündedir ve simetri faktörleri 2.0'nin altındadır. Bu sonuçlar doğrultusunda geliştirilen yeşil HPLC yönteminin tüm parametreleri sağladığı ve bahsi geçen bu dört etken maddenin etkili bir şekilde analizinin yapılabileceği görülmektedir.

Geliştirilen yöntemin validasyonu farmasötik preperattan famotidin tayini için değerlendirilmiştir. Bunlara göre analit çözeltilerinin seçicilik, doğruluk, kesinlik, geri kazanım, duyarlılık, kararlılık, sağlamlık ve tutarlılık validasyon parametreleri değerlendirilmiştir. Bütün validasyon parametrelerinin kabul edilebilir sınırlar içinde olduğu tespit edilmiştir

Valide edilen yöntem Türkiye ilaç piyasasında satılan Duovel® isimli farmasötik tablet preparata uygulanmıştır. Sonuçlar yine bu çalışma kapsamında validasyonu yapılan Famotidin Tablet USP monografında belirtilen yöntemle karşılaştırılmış ve

aralarında anlamlı fark bulunmamıştır. Bahsi geçen Famotidin Tablet USP monografında belirtilen yöntemin, yoğun asitli ve organik çözücülü hareketli faz ve çözücü içerdiği, dolayısıyla çevreye duyarlı olmadığı görülmektedir. Aynı zamanda LOQ değeri 5,0 µg/mL olarak belirlenmiştir. Bu değer de geliştirilen yöntemin LOQ değerinden (1,5 µg/mL) yüksektir. Geliştirilen yöntemin USP yönteminden daha duyarlı olduğu söylenebilir. Aynı zamanda çevreye ve analiste zarar vermeden, zamandan ve maliyetten tasarruf sağlanarak harcanan sarf maddeleri ve kimyasalları minimum düzeyde tutarak analizin gerçekleştirilebilir olması geliştirilen bu yöntem için büyük bir avantajdır.

Literatürde famotidin, nizatidin, ranitidin ve simetidin etken maddelerinin kombine olarak analiz edilebileceği yöntemler bulunmasına rağmen, herhangi bir yeşil kromatografik yönteme rastlanmamıştır. Bu nedenle bu dört etken maddenin kombine olarak yeşil HPLC yöntemiyle tayini için ilk çalışma olarak kaynaklara geçecek bu tezin, literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Geliştirilen ve valide edilen yeşil HPLC yöntemi famotidinin farmasötik preperattan analizi için USP tarafından ve diğer kaynaklardan bildirilmiş çevre ve insan sağlığına duyarlı olmayan HPLC yöntemlerine bir alternatif olarak sunulabilir. Bununla birlikte toksik etki yaratabilecek organik çözücüler yerine etanol kullanılması, çevreye ve analist sağlığına verilen zararın minimuma indirilmesi, analiz süresinin kısa olmasıyla zamandan ve harcanan çözücülerden tasarruf edilmesi, analisti yormayacak zahmetli numune ve çözücü hazırlama yöntemleri içermemesi, 4 etken maddenin aynı anda analiz edilebilmesi yöntemi çekici kılmaktadır. Geliştirilen yöntemin ilaç endüstrisinde özellikle çok hızlı ve seri analizlerin yapıldığı kalite kontrol laboratuvarlarında aynı zamanda Ar-Ge çalışmalarında da faydalı olabileceği düşünülmüştür.

## 7. KAYNAKLAR

1. Akhparov NN, Boranbayeva R, Suleimanova SB, Temirkhanova M. Current issues of gastro-oesophageal reflux disease surgical treatment in children. *Afr J Paediatr Surg.* 2021;18(3):127-32.
2. Fass R, Boeckxstaens GE, El-Serag H, Rosen R, Sifrim D, Vaezi MF. Gastro-oesophageal reflux disease. *Nat Rev Dis Primers.* 2021;7(1):55.
3. McDonnell MJ, Hunt EB, Ward C, Pearson JP, O'Toole D, Laffey JG, et al. Current therapies for gastro-oesophageal reflux in the setting of chronic lung disease: state of the art review. *ERJ Open Res.* 2020;6(4).
4. Yoon JH, Kim SH, Ryu J, Chung SJ, Kim Y, Yoon CK, et al. Gastro-oesophageal reflux disease increases healthcare use and medical costs in patients with bronchiectasis: a Korean nationwide population-based study. *Therap Adv Gastroenterol.* 2021;14:17562848211062801.
5. Konturek SJ. Antagonism of Histamine H<sub>2</sub>-Receptors and Gastric Secretion. *Scandinavian Journal of Gastroenterology.* 2020;8(8):687-9.
6. Solomon SD, Wolff S, Jarboe LA, Wolfe MM, Lee RT. Effects of histamine type 2-receptor antagonists cimetidine and famotidine on left ventricular systolic function in chronic congestive heart failure. *Am J Cardiol.* 1993;72(15):1163-6.
7. Ganellin JFaCR, editor. *Analogue-based Drug Discovery (2006)2006.*
8. Mohammad Shahid TT, Farrukh Sobia, Shagufta Moin, Mashiatullah Siddiqui, Rahat Ali Khan. Histamine, Histamine Receptors, and their Role in Immunomodulation: An Updated Systematic Review *The Open Immunology Journal.* 2009;2:9-41.
9. Black JW, Duncan WA, Durant CJ, Ganellin CR, Parsons EM. Definition and antagonism of histamine H<sub>2</sub> -receptors. *Nature.* 1972;236(5347):385-90.
10. Group CS. Double blind comparative study of omeprazole and ranitidine in patients with uodenal or gastric ulcer: a multicentre trial. 1990.
11. Shim YK, Kim N. The Effect of H<sub>2</sub> Receptor Antagonist in Acid Inhibition and Its Clinical Efficacy. *Korean J Gastroenterol.* 2017;70(1):4-12.
12. Smith RV. Analytical pharmaceutical chemistry--bridging disciplines and interests. *Am J Pharm Educ.* 1977;41(3):298-9.
13. Sheldon RA, Brady D. Green Chemistry, Biocatalysis, and the Chemical Industry of the Future. *ChemSusChem.* 2022;15(9):e202102628.

14. Cakar MB, Ulu ST. HPLC fluorescence method for the determination of nizatidine in human plasma and its application to pharmacokinetic study. *Luminescence*. 2014;29(4):357-61.
15. Ulu ST, Tuncel M. A sensitive and rapid determination of ranitidine in human plasma by HPLC with fluorescence detection and its application for a pharmacokinetic study. *J Chromatogr Sci*. 2012;50(4):301-6.
16. Arayne MS, Sultana N, Zuberi MH, Siddiqui FA. Simultaneous determination of metformin, cimetidine, famotidine, and ranitidine in human serum and dosage formulations using HPLC with UV detection. *J Chromatogr Sci*. 2010;48(9):721-5.
17. Ashiru DA, Patel R, Basit AW. Simple and universal HPLC-UV method to determine cimetidine, ranitidine, famotidine and nizatidine in urine: application to the analysis of ranitidine and its metabolites in human volunteers. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2007;860(2):235-40.
18. Assali M, Abualhasan M, Zohud N, Ghazal N. RP-HPLC Method Development and Validation of Synthesized Codrug in Combination with Indomethacin, Paracetamol, and Famotidine. *Int J Anal Chem*. 2020;2020:1894907.
19. Kokoletsi MX, Kafkala S, Tsiaganis M. A novel gradient HPLC method for simultaneous determination of ranitidine, methylparaben and propylparaben in oral liquid pharmaceutical formulation. *J Pharm Biomed Anal*. 2005;38(4):763-7.
20. Lin QS. [Simultaneous determination of cimetidine and ranitidine by HPLC]. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao*. 1986;8(4):291-6.
21. Tracqui A, Kintz P, Mangin P, Lugnier AA, Chaumont AJ. A new rapid HPLC assay for the simultaneous determination of two histamine H<sub>2</sub>-receptor antagonists, cimetidine and ranitidine, in human plasma. *J Toxicol Clin Exp*. 1988;8(6):387-94.
22. Zarghi A, Shafaati A, Foroutan SM, Khoddam A. Development of a rapid HPLC method for determination of famotidine in human plasma using a monolithic column. *J Pharm Biomed Anal*. 2005;39(3-4):677-80.
23. Zendelovska D, Stafilov T. Development of an HPLC method for the determination of ranitidine and cimetidine in human plasma following SPE. *J Pharm Biomed Anal*. 2003;33(2):165-73.
24. Berzas Nevado JJ, Castaneda Penalvo G, Rodriguez Dorado RM, Rodriguez Robledo V. Comparative validations of non-aqueous capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography methods for the simultaneous determination of histamine H<sub>2</sub> receptor antagonists in human urine. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2013;921-922:56-63.

25. Shou-Mei Wu Y-HH, Hsin-Lung Wu, Su-Hwei Chen, Hwang-Shang Ko. Simultaneous determination of cimetidine, famotidine, nizatidine, and ranitidine in tablets by capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis*. 2001;22:2758-62.
26. Ahmed S, Elshaboury SR, Mohamed NA, Farrag S. Development of a Validated Comparative Stability-Indicating Assay Method for Some H<sub>2</sub>-Receptor Antagonists. *J Chromatogr Sci*. 2017;55(8):818-31.
27. Alshehri YM, Alghamdi TS, Aldawsari FS. HS-SPME-GC-MS as an alternative method for NDMA analysis in ranitidine products. *J Pharm Biomed Anal*. 2020;191:113582.
28. Burrows JL, Jolley KW, Sullivan DJ. Determination of roxatidine in human plasma, urine and milk by capillary gas chromatography using nitrogen-selective detection. *J Chromatogr*. 1988;432:199-208.
29. Hassan S, Iqbal S, Zaheer E, Hassan A, Hamid S, Ali M, et al. Development and validation of RP-HPLC method for simultaneous determination of cefpodoxime proxetil and H<sub>2</sub> receptor antagonists in pharmaceutical dosage forms. *Pak J Pharm Sci*. 2019;32(2 (Supplementary)):839-44.
30. Rozman E, Galceran MT, Albet C. Determination of ebrotidine and its metabolites in human urine by reversed-phase ion-pair high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 1997;688(1):107-15.
31. Rozman E, Galceran MT, Anglada L, Albet C. Investigation of the metabolism of ebrotidine in human urine by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Drug Metab Dispos*. 1995;23(9):976-81.
32. Ryu JH, Choi SJ, Lee HW, Choi SK, Lee KT. Quantification of roxatidine in human plasma by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry: application to a bioequivalence study. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2008;876(1):143-7.
33. Sentellas S, Puignou L, Galceran MT. Determination of ebrotidine and its metabolites by micellar electrokinetic capillary chromatography. *J Chromatogr A*. 2002;976(1-2):221-7.
34. Shin BS, Choi JW, Balthasar JP, Hong DK, Kim JJ, Yoo SD. Determination of roxatidine in human plasma by liquid chromatography/electrospray mass spectrometry and application to a clinical pharmacokinetic study. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2007;21(3):329-35.
35. Wang Y, Chen X, Li Q, Zhong D. Characterization of metabolites of a novel histamine H<sub>2</sub>-receptor antagonist, lafutidine, in human liver microsomes by liquid chromatography coupled with ion trap mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2008;22(12):1843-52.

36. Wu L, Zhang Z, Tian Y, Li W, Xu F, Chen Y, et al. Determination of lafutidine in human plasma by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry: application to a bioequivalence study. *J Mass Spectrom.* 2005;40(12):1637-43.
37. *Gord. Nurs Stand.* 2015;29(25):18.
38. Assirati FS, Hashimoto CL, Dib RA, Fontes LH, Navarro-Rodriguez T. High definition endoscopy and "narrow band imaging" in the diagnosis of gastroesophageal reflux disease. *Arq Bras Cir Dig.* 2014;27(1):59-65.
39. Tack J, Fass R. Review article: approaches to endoscopic-negative reflux disease: part of the GERD spectrum or a unique acid-related disorder? *Aliment Pharmacol Ther.* 2004;19 Suppl 1:28-34.
40. Kurosawa S. [Maintenance therapy of mild form of GERD by H2 receptor antagonists]. *Nihon Rinsho.* 2000;58(9):1859-64.
41. Jutel M, Akdis M, Akdis CA. Histamine, histamine receptors and their role in immune pathology. *Clin Exp Allergy.* 2009;39(12):1786-800.
42. Serra-Grabulosa JM, Grau C, Escera C, Sanchez-Turet M. The H1-receptor antagonist dextro-chlorpheniramine impairs selective auditory attention in the absence of subjective awareness of this impairment. *J Clin Psychopharmacol.* 2001;21(6):599-602.
43. Lazewska D, Kiec-Kononowicz K. Progress in the development of histamine H3 receptor antagonists/inverse agonists: a patent review (2013-2017). *Expert Opin Ther Pat.* 2018;28(3):175-96.
44. Schubert ML, Peura DA. Control of gastric acid secretion in health and disease. *Gastroenterology.* 2008;134(7):1842-60.
45. PubChem. Compound Summary\_Famotidine [Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Famotidine#section=Information-Sources>].
46. N. CA. Pharmacodynamics of Famotidine in Humans. *The American Journal of Medicine.* 1986;81:3-7.
47. Drugbank. Famotidine [Available from: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00927>].
48. RxList. PEPCID(FAMOTIDINE) SIDE EFFECTS DRUG CENTER [Available from: <https://www.rxlist.com/pepcid-side-effects-drug-center.htm#overview>].

49. PubChem. Compound Summary\_Nizatidine [Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Nizatidine>.
50. Price A, H., Brogden, R., N. Nizatidine A Preliminary Review of its Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Properties, and its Therapeutic Use in Peptic Ulcer Disease. *Drug Evaluation*1988. p. 521-39.
51. Drugbank. Nizatidine [Available from: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00585>.
52. RxList. AXID (NIZATIDINE) SIDE EFFECTS DRUG CENTER [Available from: <https://www.rxlist.com/axid-drug.htm#description>.
53. PubChem. Compound Summary\_Ranitidine [Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ranitidine>.
54. R Arcidiacono VB, G M Bonomo, M Bottari, L Buscarini, E Camarri, G Celle, M Coltorti, S Di Matteo, G Dobrilla, et al. Comparison between ranitidine 150 mg b.d. and ranitidine 300 mg nocte in the treatment of duodenal ulcer. *International Journal of Clinical Pharmacy*. 1986.
55. Mohammed R, Holden RJ, Hearn JB, McKibben BM, Buchanan KD, Crean GP. Effects of eight weeks' continuous treatment with oral ranitidine and cimetidine on gastric acid secretion, pepsin secretion, and fasting serum gastrin. *Gut*. 1983;24(1):61-6.
56. O'Sullivan G, Sear JW, Bullingham RE, Carrie LE. The effect of magnesium trisilicate mixture, metoclopramide and ranitidine on gastric pH, volume and serum gastrin. *Anaesthesia*. 1985;40(3):246-53.
57. Ohsawa T, Hirata W, Higuchi S. Effects of three H<sub>2</sub>-receptor antagonists (cimetidine, famotidine, ranitidine) on serum gastrin level. *Int J Clin Pharmacol Res*. 2002;22(2):29-35.
58. Thompson A, Kirdeikis P, Jamali F, Tavernini M, Zuk L, Marriage B, et al. Effect of nizatidine and ranitidine on 24 hour intragastric pH, pepsin, prostaglandin E<sub>2</sub> and serum gastrin concentrations in healthy volunteers. *J Gastroenterol Hepatol*. 1995;10(5):546-54.
59. Yamaji Y, Omata T, Abe T, Yoshida A, Ueki S, Aita H, et al. Effects of successive doses of nizatidine, cimetidine and ranitidine on serum gastrin level and gastric acid secretion. *Arzneimittelforschung*. 1991;41(9):954-7.
60. Susan M. Grant HDLaRNB. Ranitidine An Updated Review of its Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Properties and Therapeutic Use in Peptic Ulcer Disease and Other Allied Diseases. *Drug Evaluation*1989. p. 801-70.

61. Drugbank. Ranitidine [Available from: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00863>].
62. RxList. ACID REDUCER (RANITIDINE) ORAL [Available from: <https://www.rxlist.com/fdb/drugs/153190/acid-reducer-ranitidine-oral-drug.htm>].
63. Drugbank. Cimetidine [Available from: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00501>].
64. Somogyi A, Gugler, R.,. Clinical Pharmacokinetics of Cimetidine. *Clinical Pharmacokinetics*. 1983;8:463-95.
65. Cimetidine Hydrochloride. In: Florey K, editor. *Analytical Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology*. 131984.
66. Medicine NLo. Cimetidine [Available from: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK544255/#:~:text=Mechanism%20of%20Action,-Understanding%20the%20physiology&text=The%20H2%2Dreceptor%20antagonist%20cimetidine,secretion%20of%20the%20intrinsic%20factor](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK544255/#:~:text=Mechanism%20of%20Action,-Understanding%20the%20physiology&text=The%20H2%2Dreceptor%20antagonist%20cimetidine,secretion%20of%20the%20intrinsic%20factor))).
67. RxList. CONSUMER\_CIMETIDINE\_TAGAMET [Available from: [https://www.rxlist.com/consumer\\_cimetidine\\_tagamet/drugs-condition.htm](https://www.rxlist.com/consumer_cimetidine_tagamet/drugs-condition.htm)].
68. Anastas PT. Green Chemistry and the Role of Analytical Methodology Development. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. 1999;29(3):167-75.
69. Trost BM. *The Atom Economy - A Search for Synthetic Efficiency*. 1991.
70. Barbosa MAG, Capela R, Rodolfo J, Fonseca E, Montes R, Andre A, et al. Linking chemical exposure to lipid homeostasis: A municipal waste water treatment plant influent is obesogenic for zebrafish larvae. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2019;182:109406.
71. Bixler JN, Cone MT, Hokr BH, Mason JD, Figueroa E, Fry ES, et al. Ultrasensitive detection of waste products in water using fluorescence emission cavity-enhanced spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(20):7208-11.
72. Faingol'd ZL. [Biophysico-chemical purification of highly concentrated waste water from antibiotic-producing plant]. *Antibiot Khimioter*. 1991;36(10):13-5.
73. Halperin W, Landrigan PJ, Altman R, Iaci AW, Morse DL, Needham LL. Chemical fire at toxic waste disposal plant: epidemiologic study of exposure to smoke and fumes. *J Med Soc N J*. 1981;78(9):591-4.
74. Himmelsbach M, Buchberger W, Klampfl CW. Determination of antidepressants in surface and waste water samples by capillary electrophoresis with



electrospray ionization mass spectrometric detection after preconcentration using off-line solid-phase extraction. *Electrophoresis*. 2006;27(5-6):1220-6.

75. Lund V, Fonahn W, Pettersen JE, Caugant DA, Ask E, Nysaeter A. Detection of *Legionella* by cultivation and quantitative real-time polymerase chain reaction in biological waste water treatment plants in Norway. *J Water Health*. 2014;12(3):543-54.

76. Mangano V, Gervasi T, Rotondo A, De Pasquale P, Dugo G, Macri F, et al. Protein hydrolysates from anchovy waste: purification and chemical characterization. *Nat Prod Res*. 2021;35(3):399-406.

77. Trubnikova LI, Trubnikova NI. [Integral toxicity of aqueous extract of slime from biological purification of waste waters from petroleum chemical enterprises]. *Gig Sanit*. 2002(4):51-3.

78. Wolff S. Problems and prospects in the utilization of cytogenetics to estimate exposure at toxic chemical waste dumps. *Environ Health Perspect*. 1983;48:25-7.

79. You Y, Hilpert M, Ward MJ. Detection of a common and persistent tet(L)-carrying plasmid in chicken-waste-impacted farm soil. *Appl Environ Microbiol*. 2012;78(9):3203-13.

80. Kira J. M. Matus JBZ, Evan Beach. A Proactive Approach to Toxic Chemicals: Moving Green Chemistry Beyond Alternatives in the "Safe Chemicals Act of 2010". *Environmental Science Technologies*. 2010;44:6022-3.

81. Handbook of Green Analytical Chemistry. Miguel De La Guardia SG, editor 2012.

82. Moore GB. George Claude Pimentel - A. Biographical Memoir. National Academy of Sciences. 2007.

83. Armenta S, Garrigues S, de la Guardia M. Green Analytical Chemistry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2008;27(6):497-511.

84. Adel Abu-Samra JSM, and S. R. Koirtyohann. Wet Ashing of Some Biological Samples In a Microwave Oven. *Analytical Chemistry*. 1975;47(8):1475-7.

85. P. Maclaurin KNAaPJW. Flow Injection Analysis. In: Kowalski FMaBR, editor. *Process Analytical Chemistry* 1995. p. 159-82.

86. M.D Luque de Castro MMJ-C. Where is Supercritical Fluid Extraction Going? *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2000;19(4):223-8.

87. B. Denis Page GL. Application of solid-phase microextraction to the headspace gas chromatographic analysis of semi-volatile organochlorine

contaminants in aqueous matrices. *Journal of Chromatography A*. 1997;757(1-2):173-82.

88. N. A. Klyuev AAS, V. S. Soifer and E. S. Brodskii. A Method of Flow Solvent Extraction from Solid Substances. *Journal of Analytical Chemistry*. 2003;58:629-30.

89. H Liu PKD. Analytical chemistry in a drop. Solvent extraction in a microdrop. *Analytical Chemistry*. 1996;68(11):1817-21.

90. Jaromir Ruzicka EHH. Retro-review of flow-injection analysis. *Trends in Analytical Chemistry*. 2008;21(5):390-3.

91. The Nobel Prize in Chemistry 2002 [Available from: <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2002/popular-information/>].

92. Paul t. Anastas JCW. *Green chemistry: theory and practice*: Oxford (England); New York: Oxford University Press; 1998.

93. Gałuszka A, Migaszewski Z, Namieśnik J. The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2013;50:78-84.

94. Mohamed HM. Green, environment-friendly, analytical tools give insights in pharmaceuticals and cosmetics analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2015;66:176-92.

95. C. Bendicho IL, F. Pena-Pereira, V. Romero. Green chemistry in analytical atomic spectrometry: a review. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 2012(11):98-106.

96. Meyer VR. *Practical High-Performance Liquid Chromatography*. Fifth ed: Wiley; 2010.

97. Kromatografi [Available from: [http://docs.neu.edu.tr/staff/serdar.susever/13%20kolonkromatografisi\\_99.pdf](http://docs.neu.edu.tr/staff/serdar.susever/13%20kolonkromatografisi_99.pdf)].

98. Bresler SE. [Physicochemical basis of the principle of obtaining viral vaccines using adsorption chromatography]. *Tr Inst Im Pastera*. 1976;47:13-9.

99. Douglas A. Skoog FJH, Stanley R. Crouch. *Principles of Instrumental Analysis*. Sixth ed2000.

100. Hage D. S. AJA, Li R., Matsuda R., Papastavros E., Pfaunmiller E., Sobansky M., Zheng X., Chapter 1-Affinity Chromatography. In: Fanali S. HPR, Poole C. F., Schoenmakers P., Lloyd D., editor. *Liquid Chromatography Applications*: Elsevier; 2013. p. 1-23.

101. Hamilton R. J. SPA. Introduction To High Performance Liquid Chromatography. Second ed. USA1982.
102. S. L. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) in the Pharmaceutical Analysis. In: S. GC, editor. Pharmaceutical Sciences Encyclopedia2010.
103. LaCourse ME, LaCourse WR. General instrumentation in HPLC \*. Liquid Chromatography2017. p. 417-29.
104. Staniak M, Wojciak M, Sowa I, Tyszczyk-Rotko K, Strzemski M, Dresler S, et al. Silica-Based Monolithic Columns as a Tool in HPLC-An Overview of Application in Analysis of Active Compounds in Biological Samples. *Molecules*. 2020;25(14).
105. Turova N. Y. TEP, Kessler V. G., Yanovskaya M. I. The Chemistry of Metal Alkoxides. Massachusetts: Kluwer Academic Publishers; 2002.
106. A. N. Organic and Inorganic Nanostructures. Illustrated edition ed. London: Artech House Publishers; 2005.
107. S. K. Silan türevli işlevsel gruplar kullanılarak metal-polimer malzemelerinin sentezi ve uygulamalarının araştırılması. Malatya: İnönü Üniversitesi; 2001.
108. A. G. Kil-polimer sol-jel hibrit materyallerinin sentezi ve fizikokimyasal özelliklerinin incelenmesi. Malatya: İnönü Üniversitesi; 1998.
109. Arkles B. KRE, Othmer D. E. Encyclopedia of Chemical Technology. New York1982.
110. Schmidt H. SB. In Better Ceramics Through Chemistry. Materials Research Society. 1986;15:739-50.
111. Hoffmann F. CM, Morell J., Fröba M. Silica-Based Mesoporous Organic-Inorganic Hybrid Materials. *Angewandte Chemie International Edition*. 2006;45:3216-51.
112. Kırhık M. MMT, Shahriari M. R. A Spectroscopic Study of the Effects of Various Solvents and Sol-Gel Hosts on the Chemical and Photochemical Properties of Thionin and Nile Blue A. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*. 1997;10:153-63.
113. Vervoort N. GP, Baron G. V., Desmet G. A correlation for the pressure drop in monolithic silica columns. *Analytical Chemistry*. 2003;75:843-50.
114. Florian B. CM, Brun A. Optical alignment of organic dopants in a solid gel matrix: dispersed and grafted rhodamine b molecules. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*. 1997;9:33-9.


115. Filho N. L. D. CL, Carmoa D. R., Rosa A. H. Preparation of a Silica Gel Modified with 2-amino-1, 3, 4-thiadiazole for Adsorption of Metal Ions and Electroanalytical Application. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2006;17:473-81.
116. Niknam K. JA, Tajaddod M., Deris A. Synthesis of 2-amino-4, 6-diarylnicotinonitriles using silica-bound n-propyl triethylenetetramine sulfamic acid as a recyclable solid acid catalyst. *Chinese Journal of Catalysis*. 2012;33:8:1312-7.
117. Kron J. SSA. Functional coatings on glass using ormoecer systems. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*. 1994;2:189-92.
118. Pal D. CK, Sen S., Sen S. K. The synthesis, characterization and sintering of sol-gel derived cordierite ceramics for electronic applications. *Materials In Medicine Journal*. 1996;31:3995-4005.
119. Kardys Y. A. BDJ, Mousa S. A. Amino-functionalized silica nanoparticles: in vitro evaluation for targeted delivery and therapy of pancreatic cancer. *Journal of Nanotechnology*. 2013;768724:1-8.
120. E. K. Care, Maintenance and Troubleshooting of HPLC Columns - Columns and Consumables: Agilent; 2008 [Available from: <https://www.agilent.com/cs/library/slidepresentation/Public/Care%20Maintenance%20and%20HPLC%20Column%20Troubleshooting.pdf>].
121. M. S. HPLC DETECTORS: A BRIEF REVIEW. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*. 2010;12:1130-50.
122. L. SR. UV-VIS Absorption Detectors for HPLC. In: W. SRP, editor. *Liquid Chromatography Detectors*. 33. First ed: Elsevier; 1983. p. 64.
123. Situmorang M. LMTB, Witzeman K., Heineman W. R. Liquid Chromatography with Electrochemical Detection (LC-EC): An Experiment Using 4-Aminophenol. *Journal of Chemical Education*. 1998;75(8):1035.
124. Doğan A. TM. Optimization of liquid chromatographic separation of pharmaceuticals within green analytical chemistry framework. *Microchemical Journal*. 2020;152.
125. Sivakumar T. MR, Muralidharan C., Valliappan K. Multi-criteria decision making approach and experimental design as chemometric tools to optimize HPLC separation of domperidone and pantoprazole. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2007;43:1842-8.
126. Hadjmohammadi M. R. SF. Multi-criteria decision making in micellar liquid chromatographic separation of chlorophenols. *Journal of Separation Science*. 2004;27(12):997-1004.

127. Bigus P. NJ, Tobiszewski M. Implementation of multicriteria decision analysis in design of experiment for dispersive liquid-liquid microextraction optimization for chlorophenols determination. *Journal of Chromatography A*. 2018.
128. B. HD. Experimental design in chromatography: A tutorial review. *Journal of Chromatography B*. 2012;910:2-13.
129. Derringer G. SR. Simultaneous Optimization of Several Response Variables. *Journal of Quality Technology*. 1980;12(4):214-9.
130. Bezerra M. A. FSLC, Novaes C. G., Santos A. M. P., Valasques G. S., Cerqueira U. M. F. M., Alves J. P. S. Simultaneous optimization of multiple responses and its application in Analytical Chemistry – A review. *Talanta*. 2019;194:941-59.
131. Candiotti LV, De Zan, M. M., Cámara, M. S., & Goicoechea, H. C. Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development. *Talanta*. 2014;124:123-38.
132. Ravisankar P. NCN, Pravallika D., Sri D. N. A Review on Step-by-Step Analytical Method Validation. *Journal of Pharmacy*. 2015;5(10):7-19.
133. V. PH. HPLC Method Validation for Pharmaceuticals: A Review. *International Journal of Universal Pharmacy and Bio Sciences*. 2013;4.
134. EMEA. ICH Topic Q 2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. 1995.
135. Research CfDEa, (CDER). Food and Drug Administration Technical Review Guide: Validation of Chromatographic Methods. Rockville, MD.1993.
136. Method Validation in Pharmaceutical Analysis. Ermer J. MJH, editor. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2005.
137. Zhu E. Merken MPA, E. Porqueras, E. Roets, J. Hoogmartens. Evaluation of LC methods for the separation of phenoxymethylpenicillin and its related substances. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1998;6:39-45.
138. A. SG. 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. *Journal of Chromatography A*. 2003;987:57-66.
139. Bhadra S, Das SC, Roy S, Arefeen S, Rouf ASS. Development and Validation of RP-HPLC Method for Quantitative Estimation of Vinpocetine in Pure and Pharmaceutical Dosage Forms. *Chromatography Research International*. 2011;2011:1-7.

140. M. GJ. A Practical Guide to Analytical Method Validation. Analytical Chemistry News and Features. 1996:305-9.
141. Leeuwen J. A. BLMC, Vandeginste B. G. M., Kateman G., Schoenmakers P. J., Mulholland M. RES, an expert system for the set-up and interpretation of a ruggedness test in HPLC method validation: Part 2: The ruggedness expert system. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems. 1991;11(1):37-55.
142. Heyden Y. V. QF, Massart L. Ruggedness testing of chromatographic methods: selection of factors and levels. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 1998;18(1-2):43-56.
143. Rehberi İ. Duovel 40 mg Film Tablet - Kısa Ürün Bilgisi [Available from: <https://cdn.ilacrehberi.com/duovel-40-mg-film-tablet-8c4c-kub.pdf>].
144. Gotti R, Furlanetto, S., Andrisano, V., Cavrini, V., & Pinzauti, S. . Design of experiments for capillary electrophoretic enantioresolution of salbutamol using dermatan sulfate. Journal of Chromatography A. 2000;875((1-2)):411-22.
145. Medenica M, Jancic, B., Ivanovic, D., & Malenovic, A. Experimental design in reversed-phase high-performance liquid chromatographic analysis of imatinib mesylate and its impurity. Journal of Chromatography A. 2004;1031((1-2)):243-8.

## 8. EKLER

### EK-1: Dijital Makbuz



## Dijital Makbuz

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

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen:	Nazife Egeşen Halıcı
Ödev başlığı:	H2 RESEPTÖR ANTAGONİSTLERİNİN YEŞİL HPLC AYIRIMI İÇİN ...
Gönderi Başlığı:	H2 RESEPTÖR ANTAGONİSTLERİNİN YEŞİL HPLC AYIRIMI İÇİN ...
Dosya adı:	Ege_en_Hal_c_Y_ksek_Lisans_Tezi_2022_D_zeltilmi_R2.pdf
Dosya boyutu:	1.65M
Sayfa sayısı:	148
Kelime sayısı:	32,398
Karakter sayısı:	215,491
Gönderim Tarihi:	20-Eyl-2022 10:47ÖÖ (UTC+0300)
Gönderim Numarası:	1904373497

T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

H<sub>2</sub> RESEPTÖR ANTAGONİSTLERİNİN YEŞİL HPLC AYIRIMI  
İÇİN KROMATİK OPTİMİZASYON YAKLAŞIMI VE  
FAMOTİDİN İÇEREN FARMASÖTİK PREPARATLARA  
UYGULANMASI

Klas. Mik. Saad. Egeşen HALICI

Analitik Kimya Programı  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANKARA  
2022

Copyright 2022 Turnitin. Tüm hakları saklıdır.

## EK-2: Orijinallik Raporu Örneği

Turnitin Orijinallik Raporu					
İşleme konu: 20-Eyl-2022 10:52 +03 NUMARA: 1904373497 Kelime Sayısı: 32398 Gönderildi: 1	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Benzerlik Endeksi</th> <th>Kaynağına göre Benzerlik</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><b>%18</b></td> <td>           İnternet Sources: %18            Yayınlar: %1            Öğrenci Ödevleri: %5         </td> </tr> </tbody> </table>	Benzerlik Endeksi	Kaynağına göre Benzerlik	<b>%18</b>	İnternet Sources: %18 Yayınlar: %1 Öğrenci Ödevleri: %5
Benzerlik Endeksi	Kaynağına göre Benzerlik				
<b>%18</b>	İnternet Sources: %18 Yayınlar: %1 Öğrenci Ödevleri: %5				
<b>H2 RESEPTÖR ANTAGONİSTLERİNİN YEŞİL HPLC AYIRIMI İÇİN KEMOMETRİK OPTİMİZASYON YAKLAŞIMI VE FAMOTİDİN İÇEREN FARMASÖTİK PREPARATLARA UYGULANMASI</b> Nazife Egeşen Halıcı tarafından	5% match (05-May-2022 tarihli internet) <a href="http://nek.istanbul.edu.tr:4444/ekos/TEZ/51167.pdf">http://nek.istanbul.edu.tr:4444/ekos/TEZ/51167.pdf</a>				
	2% match (16-Mar-2022 tarihli internet) <a href="http://openaccess.hacettepe.edu.tr:8080/xmlui/bitstream/handle/11655/25918/10236783.pdf?isAllowed=y&amp;sequence=1">http://openaccess.hacettepe.edu.tr:8080/xmlui/bitstream/handle/11655/25918/10236783.pdf?isAllowed=y&amp;sequence=1</a>				
	1% match (07-Nis-2022 tarihli internet) <a href="http://nek.istanbul.edu.tr:4444/ekos/TEZ/48532.pdf">http://nek.istanbul.edu.tr:4444/ekos/TEZ/48532.pdf</a>				
	1% match (24-May-2022 tarihli internet) <a href="https://acikbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20.500.12812/492022/yokAcikBilim_10100899.pdf?isAllowed=y&amp;sequence=-1">https://acikbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20.500.12812/492022/yokAcikBilim_10100899.pdf?isAllowed=y&amp;sequence=-1</a>				
	1% match (13-Nis-2022 tarihli internet) <a href="http://www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080/xmlui/bitstream/handle/11655/25851/10267999.pdf?isAllowed=y&amp;sequence=1">http://www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080/xmlui/bitstream/handle/11655/25851/10267999.pdf?isAllowed=y&amp;sequence=1</a>				
	< 1% match (12-May-2022 tarihli internet) <a href="http://nek.istanbul.edu.tr:4444/ekos/TEZ/44903.pdf">http://nek.istanbul.edu.tr:4444/ekos/TEZ/44903.pdf</a>				
	< 1% match (08-Nis-2022 tarihli internet) <a href="http://nek.istanbul.edu.tr:4444/ekos/TEZ/ET002641.pdf">http://nek.istanbul.edu.tr:4444/ekos/TEZ/ET002641.pdf</a>				
	< 1% match (24-May-2022 tarihli internet) <a href="https://acikbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20.500.12812/494163/yokAcikBilim_326599.pdf?isAllowed=y&amp;sequence=-1">https://acikbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20.500.12812/494163/yokAcikBilim_326599.pdf?isAllowed=y&amp;sequence=-1</a>				
	< 1% match (14-Nis-2022 tarihli internet) <a href="https://acikbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20.500.12812/149166/yokAcikBilim_10067625.pdf?isAllowed=y&amp;sequence=-1">https://acikbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20.500.12812/149166/yokAcikBilim_10067625.pdf?isAllowed=y&amp;sequence=-1</a>				
	< 1% match (12-Oca-2022 tarihli internet) <a href="https://acikbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20.500.12812/437501/yokAcikBilim_10324366.pdf?isAllowed=y&amp;sequence=-1">https://acikbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20.500.12812/437501/yokAcikBilim_10324366.pdf?isAllowed=y&amp;sequence=-1</a>				
	< 1% match (10-Şub-2022 tarihli internet) <a href="https://acikbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20.500.12812/494176/yokAcikBilim_325610.pdf?isAllowed=y&amp;sequence=-1">https://acikbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20.500.12812/494176/yokAcikBilim_325610.pdf?isAllowed=y&amp;sequence=-1</a>				
	< 1% match (23-May-2022 tarihli internet) <a href="https://acikbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20.500.12812/134115/yokAcikBilim_10063093.pdf?isAllowed=y&amp;sequence=-1">https://acikbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20.500.12812/134115/yokAcikBilim_10063093.pdf?isAllowed=y&amp;sequence=-1</a>				



**Ek-3: Tez İçinde Kullanılan İstatistiksel Katsayıların Hesaplanması**

$$\text{Standart Hata} = \frac{SS}{\sqrt{\text{ölçüm sayısı}}} \times 100$$

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

SS: Standart Sapma

X: Aritmetik Ortalama

$$\text{Bağlı Hata (BHATA)} = \frac{\text{Olması gereken miktar} - \text{Bulunan miktar}}{\text{Olması gereken miktar}} \times 100$$

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

#### EK-4: T-Testi - Eşit Olmayan Varyanslar Varsayarak İki Örnekleme

İki veri seti arasında anlamlı bir fark olup olmadığını belirlemek için kullanılan yöntemlerden biri t-testi'dir.

- Öncelikle standart hata aşağıdaki denklem yardımıyla belirlenir;

$$\text{Standart Hata (SH)} = \sqrt{\left[\left(\frac{SS_1}{n_1}\right) + \left(\frac{SS_2}{n_2}\right)\right]}$$

SS<sub>1</sub>: Birinci veri setinin standart sapması

n<sub>1</sub>: Birinci veri setindeki örnek sayısı

SS<sub>2</sub>: İkinci veri setinin standart sapması

n<sub>2</sub>: İkinci veri setindeki örnek sayısı

- Ardından serbestlik derecesi (SD) aşağıdaki denklem yardımıyla belirlenir;

$$\text{Serbestlik Derecesi (SD)} = n_1 + n_2 - 2$$

- t<sub>hesap</sub> değeri aşağıdaki denklem yardımıyla belirlenir;

$$t_{\text{hesap}} = \frac{[(x_1 - x_2) - d]}{SH}$$

x<sub>1</sub>: Birinci veri setinin ortalaması

x<sub>2</sub>: İkinci veri setinin ortalaması

d: Popülasyon ortalamaları arasındaki varsayımsal fark

SH: Standart hata

**P-değeri:** Test istatistiği kadar uç bir örnek istatistiği gözlemlene olasıdır. Test istatistiği bir t-puanı olduğundan, yukarıda hesaplanan serbestlik derecelerine sahip olan t-puanı ile ilişkili olasılığı değerlendirmek için t Dağılım Hesaplayıcısını kullanılmaktadır.

**Hipotezler belirtilir.** İlk adım, boş hipotezi ve alternatif bir hipotez belirtmektir.

**Boş Hipotez:**  $\mu_1 - \mu_2 = 0$

**Alternatif Hipotez:**  $\mu_1 - \mu_2 \neq 0$

Bu hipotezlerin iki uçlu bir test oluşturduğuna dikkat edilmelidir. Örnek ortalamalar arasındaki fark çok büyükse veya çok küçükse boş hipotez reddedilecektir.

**Eğer;**

- $t_{\text{hesap}} > t_{\text{tablo}}$ ,  $p < \alpha = 0,05$ , durumunda boş hipotez reddedilecektir.
- $t_{\text{hesap}} < t_{\text{tablo}}$ ,  $p > \alpha = 0,05$ , durumunda boş hipotez kabul edilecektir.

### EK-5: Farklı Veri Setleri için Mann-Whitney U Testi

İki veri seti arasında anlamlı bir fark olup olmadığını belirlemek için kullanılan yöntemlerden biri Mann-Whitney U Testi'dir.

- Eldeki iki örneklem gözden geçirilir ve daha küçük görünen örneklem baz örneklem olarak seçilir. Buna Örneklem 1 adı verilir ve diğer örneklem ise Örneklem 2 olarak adlandırılır.
- Örneklem 2'deki her bir veri tek başına alınır. Örneklem 1'de bulunan veriler bu veri değeri ile karşılaştırılır. Her daha büyük değere 1 puan ve her aynı değere 1/2 puan vererek, toplam puan sayısı kaydedilir. Bu işlem bütün Örneklem 2 elemanları için yapılır ve her eleman için toplam puan bulunur.
- Bu her eleman için puanların tüm elemanlar için toplamı U istatistiği değeri olur.
- Tüm gözlemleri bir araya alarak bir sıralama düzeni elde edilir. Aşağıdaki formüller yardımıyla  $U_{\text{istatistik}}$  değeri hesaplanır;

$$U_1 = R_1 - \frac{n_1(n_1 + 1)}{2}$$

$$U_2 = R_2 - \frac{n_2(n_2 + 1)}{2}$$

$R_1$ : Örneklem 1'deki sıralama numaralarının toplamı

$R_2$ : Örneklem 2'deki sıralama numaralarının toplamı

$n_1$ : Örneklem 1'deki toplam gözlem sayısı

$n_2$ : Örneklem 2'deki toplam gözlem sayısı

$U_1$ : Örneklem 1 için hesaplanan  $U_{\text{hesap}}$  değeri

$U_2$ : Örneklem 2 için hesaplanan  $U_{\text{hesap}}$  değeri

Bulunan  $U_1$  ve  $U_2$  değerlerinden küçük olanı (hazırlanmış olan U-istatistiği anlamlılık tablosundaki  $U_{\text{tablo}}$  değeriyle karşılaştırılır.

**Eğer;**

- $U_{\text{hesap}} > U_{\text{tablo}}$ , durumunda veri setleri arasında istatistiksel bir fark olmadığı kabul edilir.
- $U_{\text{hesap}} < U_{\text{tablo}}$ , durumunda veri setleri arasında istatistiksel bir fark olduğu kabul edilir.

## 9. ÖZGEÇMİŞ