



TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**GUAFENESİN İÇEREN FARMASÖTİK ŞURUP  
PREPARATLARININ OPTİMİZASYON TEKNİKLERİ  
KULLANARAK AŞIRI YÜKSEK BASINÇLI SIVI  
KROMATOĞRAFİSİ İLE  
KANTİTATİF ANALİZİ**

Ghazal ROUHANI

ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI  
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN  
Prof. Dr. Erdal DİNÇ

ANKARA  
2017

TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**GUAFENESİN İÇEREN FARMASÖTİKŞURUP  
PREPARATLARININ OPTİMİZASYON TEKNİKLERİ  
KULLANARAK AŞIRI YÜKSEK BASINÇLI SIVI  
KROMATOĞRAFİSİ İLE  
KANTİTATİF ANALİZİ**

Ghazal ROUHANI

ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI  
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN  
Prof. Dr. Erdal DİNÇ

ANKARA

2017

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü ne,

Yüksek Lisans/ Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Guaifenesin içeren farmasötik şurup preparatlarının optimizasyon teknikleri kullanarak aşırı yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile kantitatif analizi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır.Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir.Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler , yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Ghazal Rouhani

Tarih: 13.06.2017

İmza:

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Analitik Kimya Doktora Programı

Çerçevesinde yürütölmüş olan bu çalışma, aşğıdaki jüri tarafından  
Doktora **Tezi** Olarak OY BİRLİĞİ/OY ÇOKLUĞU ile Kabul/ret edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 06 / 07 / 2017

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

Üniversitesi

Jüri Başkanı

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

Üniversitesi

Raportör

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

Üniversitesi

Üye

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

Üniversitesi

Üye

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

Üniversitesi

Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Sağlık Bilimleri  
Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## İÇİNDEKİLER

|                                                                                                                        |          |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| Etik Beyan .....                                                                                                       | ii       |
| Kabul ve Onay Sayfası .....                                                                                            | iii      |
| İçindekiler .....                                                                                                      | iv       |
| Önsöz .....                                                                                                            | ix       |
| Simgeler ve Kısaltmalar.....                                                                                           | x        |
| Şekiller .....                                                                                                         | xi       |
| Çizelgeler .....                                                                                                       | ii       |
| <b>1.GİRİŞ</b> .....                                                                                                   | <b>1</b> |
| 1.1. Guafenesin .....                                                                                                  | 5        |
| 1.1.1. Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri .....                                                                          | 5        |
| 1.1.2. Farmakolojik Özellikleri .....                                                                                  | 7        |
| 1.2. Efedrin Hidroklorür .....                                                                                         | 9        |
| 1.2.1. Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri .....                                                                          | 9        |
| 1.2.2. Farmakolojik Özellikleri .....                                                                                  | 11       |
| 1.3. Psödoefedrin Hidroklorür .....                                                                                    | 14       |
| 1.3.1. Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri.....                                                                           | 14       |
| 1.3.2. Farmakolojik Özellikler.....                                                                                    | 16       |
| 1.4. Guafenesin ve Efedrin ve Psödoefedrin Analizlerinde Kullanılan Analitik Yöntemler İçin Literatür Araştırması..... | 19       |
| 1.4.1. Guafenesin İçin Uygulanam Analiz Yöntemleri.....                                                                | 19       |
| 1.4.1.1. HPLC Yöntemi.....                                                                                             | 19       |
| 1.4.2. Efedrin İçin Uygulanan Yöntemler.....                                                                           | 25       |

|          |                                                           |    |
|----------|-----------------------------------------------------------|----|
| 1.4.2.1. | HPLC Yötemi.....                                          | 25 |
| 1.4.3.   | Psödoefedrin İçin Uygulanam Analiz Yöntemleri.....        | 29 |
| 1.4.3.1. | HPLC Yöntemi.....                                         | 29 |
| 1.5.     | Kromatografi Yöntemleri ve Teorik Esaslar.....            | 40 |
| 1.6.     | Kromatografinin Sınıflandırması.....                      | 42 |
| 1.6.1.   | Ayırma Mekanizmalarına Göre.....                          | 42 |
| 1.6.2.   | Faz tiplerine Göre.....                                   | 46 |
| 1.6.2.1. | Sıvı kromatografisi.....                                  | 46 |
| 1.6.2.2. | Gaz kromatografisi.....                                   | 46 |
| 1.6.3.   | Uygulama Biçimlerine Göre.....                            | 47 |
| 1.7.     | Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC).....           | 48 |
| 1.8.     | Cihaz şeması.....                                         | 50 |
| 1.9.     | Normal faz kromatografisi ve Ters faz kromatografisi..... | 51 |
| 1.9.1.   | Normal faz kromatografisi.....                            | 51 |
| 1.9.2.   | Ters faz kromatografisi.....                              | 51 |
| 1.10.    | Dedektör.....                                             | 53 |
| 1.10.1.  | (UV) Görünür bölge(UV/Vis) Dedektörü.....                 | 53 |
| 1.10.2.  | Fotodiyod (Photodiode Array-PDA) Dedektörü.....           | 54 |
| 1.10.3.  | Floresan ( Fluorescence) Dedektörü.....                   | 57 |
| 1.10.4.  | İletkenlik (Conductivity) Dedektörü.....                  | 58 |
| 1.10.5   | Refraktif İndeks ( Refractive Index) Dedektörü.....       | 59 |
| 1.10.6   | Elektrokimyasal (Electrochemical) Dedektörü.....          | 59 |
| 1.10.7   | Kütle Spektrometrisi Dedektörü.....                       | 60 |
| 1.11.    | Sistem Uygunluk Parametreleri.....                        | 60 |
| 1.11.1.  | Teorik Tabaka (Plaka) Sayısı (N).....                     | 61 |
| 1.11.2.  | Kuyruklanma Faktörü (T) ve Asimetri Faktörü (As).....     | 62 |
| 1.11.3.  | Kapasite Faktörü (k).....                                 | 63 |
| 1.11.4.  | Seçicilik Faktörü.....                                    | 64 |

|         |                                                          |    |
|---------|----------------------------------------------------------|----|
| 1.11.5. | Ayrırma Faktörü.....                                     | 64 |
| 1.12.   | Van Deemter denklemi.....                                | 66 |
| 1.13.   | Analitik Yöntem Geçerliliği (Validasyon).....            | 68 |
| 1.13.1. | Özgünlük.....                                            | 69 |
| 1.13.2. | Doğrusallık.....                                         | 70 |
| 1.13.3. | Kesinlik.....                                            | 70 |
| 1.13.4. | Doğruluk.....                                            | 70 |
| 1.13.5. | Günler (Ölçümler) arası kesinlik.....                    | 71 |
| 1.13.6. | Yakalama Sınırı.....                                     | 71 |
| 1.13.7. | Tayin sınırı.....                                        | 72 |
| 1.13.8. | Tutarlılık ve Sağlamlık(Robustness).....                 | 72 |
| 1.14.   | Deneyisel Uzay Kavramı.....                              | 74 |
| 1.15.   | Cevap Yüzey Kavramı.....                                 | 77 |
| 1.16.   | Matematiksel Modelleme Kavramı.....                      | 79 |
| 1.17.   | Modelleme.....                                           | 80 |
| 1.18.   | Denklemlerin Sistemi.....                                | 81 |
| 1.19.   | İki Seviyeli Tam Faktöriyel Tasarım.....                 | 83 |
| 1.20.   | Çizelge Şeklinde Bir Çalışmanın Sunulması.....           | 85 |
| 1.21.   | Deney Sonuçlarının Sunumu.....                           | 87 |
| 1.22.   | Katsayıların Hesaplanması.....                           | 88 |
| 1.23.   | Çalışmanın Açıklaması.....                               | 89 |
| 1.24.   | İki Seviyeli iki faktörlü Tam faktöriyel Tasarımlar..... | 92 |
| 1.25.   | Üç Seviyeli Tasarımlar (Cevap Yüzey tasarımları).....    | 92 |
| 1.26.   | Kromatografik Cevap Fonksiyonu (ICRF).....               | 94 |

|                                                                                             |                |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| <b>2. GEREÇ VE YÖNTEM.....</b>                                                              | <b>97</b>      |
| 2.1. Aşırı Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (UPLC).....                                 | 97             |
| 2.2. Kullanılan Cihaz.....                                                                  | 98             |
| 2.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....                                                      | 99             |
| 2.4. Analizi Edilen Bileşikler İçeren Ticari Preparatlar.....                               | 99             |
| <br><b>3. BULGULAR.....</b>                                                                 | <br><b>100</b> |
| 3.1. Guafenesin - Efedrin Karışımının UPLC Yöntem ile Kantitatif Analizi.....               | 101            |
| 3.1.1. UPLC Yönteminin geliştirmesinde kemometrik optimizasyon.....                         | 101            |
| 3.1.2. Optimal Koşullar UPLC Yöntemi ile GUA- EFE Kombinasyonunun<br>Kalitatif Analizi..... | 109            |
| 3.1.2.1 Optimal Kromatografik Koşullar.....                                                 | 109            |
| 3.1.2.2 Doğrusal Regresyon Denklemine Hesaplanması.....                                     | 110            |
| 3.1.2.3 UPLC Analitik Yöntem Validasyonu.....                                               | 113            |
| 3.2. UPLC Analizinde Sistem Uygunluk Parametreleri.....                                     | 118            |
| 3.3. UPLC Yönteminin Farmasötik Preparatlara Uygulaması.....                                | 120            |
| 3.4. Guafenesin - Psödoefedrin Karışımının UPLC Yöntem ile Kantitatif<br>Analizi.....       | 122            |
| 3.5. UPLC Yönteminin geliştirmesinde kemometrik Optimizasyonu.....                          | 122            |
| 3.6. Optimal Koşullar UPLC Yöntemi ile GUA- PS Kombinasyonunun<br>Kalitatif Analizi .....   | 131            |
| 3.7. Optimal Kromatografik Koşullar .....                                                   | 131            |
| 3.8. Doğrusal Regresyon Denklemine Hesaplanması.....                                        | 132            |
| 3.9. UPLC Analitik Yöntem Validasyonu .....                                                 | 135            |
| 3.10. UPLC Analizinde Sistem Uygunluk Parametreleri.....                                    | 140            |
| 3.11. UPLC Yönteminin Farmasötik Preparatlara Uygulaması.....                               | 142            |

|                                  |            |
|----------------------------------|------------|
| <b>4. TARTIşMA.....</b>          | <b>145</b> |
| <b>5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b> | <b>150</b> |
| <b>ÖZET.....</b>                 | <b>152</b> |
| <b>SUMMARY.....</b>              | <b>153</b> |
| <b>KAYNAKLAR.....</b>            | <b>154</b> |
| <b>ÖZGEMİş.....</b>              | <b>161</b> |



## ÖNSÖZ

Bu doktora tez çalışmasında Guafenesin ve Efedrin hidrokolorür ve Psödoefedrin içeren farmasotik preparatların kantitatif analizi hiçbir ayırma işlemi uygulanmadan sinyal işleme ve çok değişkenli kalibrasyon yöntemleri geliştirerek gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma kapsamında geliştirilen numerik hesaplama dayanan kemometrik kalibrasyon ve grafik işlemlere dayanan kemometrik sinyal işleme yöntemlerinin sonuçları, sıvı kromatografisi yöntemi ile yapılmıştır. Geliştirilen analitik yöntemlerin Guafenesin ve Efedrin hidrokolorid ve Psödoefedrin bileşiklerini içeren farmasotik preparatların kalite kontrol ve rutin analizlerine uygulanabileceği, yöntemlerin analitik validasyonu yaparak analiz sonuçlarıyla ortaya konmuştur. Bu tez kapsamında çalışma, amacına ulaşılmıştır. Ayrıca, bu doktora tezinin sonuçları Guafenesin ve Efedrin hidrokolorid ve Psödoefedrin analiziyle ilgili olarak ilaç endüstrisinde kullanılabilecektir.

Doktora tezindeki konu seçimi, çalışmalarımın planlanması, yürütülmesi ile sonuçlandırılmasında yakın ilgi ve desteğini esirgemeyen, bilgi ve deneyimlerini aktaran danışman hocam Prof. Dr. Erdal Dinç'e teşekkür eder, sonsuz saygılarımı sunarım.

Doktora programı ders döneminde teorik bilgilerini ve deneyimlerini esirgemeyen Anabilim Dalımız Hocalarına sonsuz teşekkür eder ve saygılarımı sunarım.

Hayatım boyunca ve tezim sırasında desteklerini üzerimden eksik etmeyen Aileme; tezim esnasındaki destekleri için sevgili Ümit Güniken ve Ceren Ertekin'e teşekkür ederim.

## SİMGELER VE KISALTMALAR

|                      |                                                                                                        |
|----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| BSS                  | % Bağlı standart sapma                                                                                 |
| SS                   | Standart Sapma                                                                                         |
| SH                   | Standart hata                                                                                          |
| Kar. No              | Karışım numarası                                                                                       |
| LOD                  | (Limit of Detection) Saptama limiti                                                                    |
| LOQ                  | (Limit of Quantification) Nicelik sınırı                                                               |
| r                    | Korelasyon katsayısı                                                                                   |
| RP - UPLC<br>(AYBSK) | Aşırı Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi<br>(Reversed- Phase Ultra Performace Liquid chromatography) |
| $\bar{x}$            | Ortalama                                                                                               |
| GUA                  | Guafenesin                                                                                             |
| EFE                  | Efedrin Hidroklorür                                                                                    |
| PS                   | Psödoefedrin                                                                                           |
| n                    | Regresyon denkleminin eğimi                                                                            |
| SH (m)               | Eğimin standart hatası                                                                                 |
| SH (n)               | Kesim noktasının standart hatası                                                                       |
| SH (r)               | Korelasyon Katsayısının standart hatası                                                                |

## ŞEKİLLER

|             |                                                                                                                                                         |    |
|-------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 1.1.  | Guafenesin formülü                                                                                                                                      | 5  |
| Şekil 1.2.  | Guafenesin bileşiğinin(20 µg/mL) MeOH ve 0.05 M HCl içerisindeki UV spektrumu.                                                                          | 6  |
| Şekil 1.3.  | Efedrin Hidroklorür formülü                                                                                                                             | 9  |
| Şekil 1.4.  | MeOH ve 0.05 M HCL içerisindeki 20Mg/mL efedrin hidroklorürün UV Spektrum                                                                               | 10 |
| Şekil 1.5.  | Psödoefedrin Hidroklorür formülü                                                                                                                        | 14 |
| Şekil 1.6.  | MeOH ve 0.05 M HCl içerisinde 20µg/mL Psödoefedrinin UV spektrumu                                                                                       | 15 |
| Şekil 1.7.  | Bir Kromatogram Örneği                                                                                                                                  | 41 |
| Şekil 1.8.  | UPLC sistemi ve cihaz şeması                                                                                                                            | 49 |
| Şekil 1.9.  | Elektromanyetik spektrum                                                                                                                                | 55 |
| Şekil 1.10. | Fotodiyod (Photodiode Array-PDA) Dedektörü                                                                                                              | 55 |
| Şekil 1.11. | Foto Diyod Çalışma Prensibi                                                                                                                             | 56 |
| Şekil 1.12. | Asimetri Faktörleri                                                                                                                                     | 62 |
| Şekil 1.13. | Kromatograma ait genel değişimler ve birimler                                                                                                           | 63 |
| Şekil 1.14. | Ayırma Faktörü                                                                                                                                          | 65 |
| Şekil 1.15. | Van Deemter denklemi                                                                                                                                    | 67 |
| Şekil 1.16. | Faktörün alt seviyesi -1 ile üst seviyesi +1 ile gösterilir. Faktörün değişim alanı düşük ve yüksek seviyeler arasını kapsayan bütün değerlerden oluşur | 74 |
| Şekil 1.17. | Her faktör ölçülü ve yönlendirilmiş bir eksenle temsil edilir bu faktörlerin eksenleri kendi aralarında birbirine diktir                                | 75 |
| Şekil 1.18. | Deneysel uzayda faktörlerin seviyeleri deneysel noktalar ile tarif edilir                                                                               | 76 |
| Şekil 1.19. | Deneysel noktalar bir araştırmacı tarafından tanımlanan inceleme alanında düzenlenir                                                                    | 76 |

|                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |     |
|--------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Şekil 1.20.</b> | Çalışma alanının noktaları ile ilgili cevaplar cevap yüzeyini oluşturur                                                                                                                                                                                                                                                | 78  |
| <b>Şekil 1.21.</b> | Uygulanan model birinci dereceden olduğu zaman deneysel noktaların en iyi olduğu bölgeler (yerler) çalışma alanının doruklarıdır.                                                                                                                                                                                      | 84  |
| <b>Şekil 1.22.</b> | Etkin ürün verimi üzerine NaCl ve sıcaklığın etkileri.                                                                                                                                                                                                                                                                 | 90  |
| <b>Şekil 1.23.</b> | Ürünün verimi üzerine NaCl konsantrasyonu ve sıcaklığın etkilerini gösteren izocevap eğrileri.                                                                                                                                                                                                                         | 91  |
| <b>Şekil 1.24.</b> | İki faktör için tam faktör için tam faktöriyel 32 tasarım.                                                                                                                                                                                                                                                             | 93  |
| <b>Şekil 1.25.</b> | $\theta$ için gerekli parametreler                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 96  |
| <b>Şekil 3.1.</b>  | Tam faktöryel tasarıma karşılık gelen 27 adet örneğin UPLC Kromatogramları                                                                                                                                                                                                                                             | 106 |
| <b>Şekil 3.2.</b>  | Yüzey grafikleri ve ilgili plotlar, yüzey grafiği hakkında, akış hızı düşük seviyede yüksek ICRF ve yüksek seviyede 0.10 M H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (a), düşük seviyede akış hızı ve sıcaklık için yüksek ICRF (b) düşük seviyede sıcaklık ve yüksek seviyede 0.10 M H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> için ICRF(c) | 108 |
| <b>Şekil 3.3.</b>  | GUA (a) ve EFE (b) bileşikleri için kalibrasyon numunelerine (CS number) optimal kromatografik şartın uygulanması ile elde edilen kromatogramlar                                                                                                                                                                       | 112 |
| <b>Şekil 3.4.</b>  | GUA (a) ve EFE (b) bileşikleri için ticari şurup preparatın numunelerine optimal kromatografik şartın uygulanması ile elde edilen kromatogramlar .                                                                                                                                                                     | 120 |
| <b>Şekil 3.5.</b>  | 3 <sup>3</sup> tam faktöryel tasarıma karşılık gelen 27 adet örneklerin UPLC Kromatogramları                                                                                                                                                                                                                           | 128 |
| <b>Şekil 3.6.</b>  | Yüzey grafikleri ve ilgili plotlar, Yüzey grafiği hakkında , düşük seviyede akış hızı ve 0.1 M H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> yüksek ICRF (a) , Yüksek seviyede akış hızı ve sıcaklık için yüksek ICRF (b) düşük seviyede sıcaklık ve 0.1 M H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> için ICRF(c) .                              | 129 |
| <b>Şekil 3.7.</b>  | GUA (a) ve PS (b) bileşikleri için kalibrasyon numunelerine (CS number) optimal kromatografik şartın uygulanması ile elde edilen kromatogramlar                                                                                                                                                                        | 134 |
| <b>Şekil 3.8.</b>  | GUA (a) ve PS (b) bileşikleri için ticari şurup preparatın numunelerine optimal kromatografik şartın uygulanması ile elde edilen kromatogramlar                                                                                                                                                                        | 143 |

## ÇİZELGELER

|                      |                                                                                                         |     |
|----------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Çizelge 1.1.</b>  | Deney çizelgesi (genel birimlerde)                                                                      | 85  |
| <b>Çizelge 1.2.</b>  | Deneyisel tasarım (kodlanmış birimlerle)                                                                | 86  |
| <b>Çizelge 1.3.</b>  | Deneyisel tasarım ve deneyisel sonuçlar                                                                 | 87  |
| <b>Çizelge 1.4.</b>  | Deneyisel tasarım ve deneyisel sonuçlar                                                                 | 89  |
| <b>Çizelge 1.5.</b>  | Etkilerin çizelgesi                                                                                     | 90  |
| <b>Çizelge 3.1.</b>  | Araştırılan faktörlerin deneyisel aralıkları                                                            | 102 |
| <b>Çizelge 3.2.</b>  | Üç faktörlü ve üç-seviyeli tam faktöryel tasarım ile ICRF değerleri                                     | 105 |
| <b>Çizelge 3.3.</b>  | İkinci dereceden polinom kuadratik modelin parametreleri için istatistiksel t ve P testleri             | 107 |
| <b>Çizelge 3.4.</b>  | GUA ve EFE için doğrusal regresyon analizi ve istatistiksel Sonuçlar                                    | 111 |
| <b>Çizelge 3.5.</b>  | RP-UPLC yönteminin GUA- EFE ikili yapay karışımlarına uygulanmasıyla elde edilen geri kazanım sonuçları | 114 |
| <b>Çizelge 3.6.</b>  | Gün içi ve günler arası numuneler için deney sonuçları                                                  | 115 |
| <b>Çizelge 3.7.</b>  | Standart ekleme tekniği kullanılarak elde edilen % geri kazanım Sonuçları                               | 117 |
| <b>Çizelge 3.8.</b>  | Sistem uygunluk parametreleri                                                                           | 119 |
| <b>Çizelge 3.9.</b>  | RP-UPLC yöntemiyle şurup numunelerinin analiz sonuçları                                                 | 121 |
| <b>Çizelge 3.10.</b> | Araştırılan faktörlerin deneyisel aralıkları                                                            | 123 |
| <b>Çizelge 3.11.</b> | Üç faktörlü üç-seviyeli tam faktöryel tasarım ve ICRF ile tahmin değerleri                              | 127 |
| <b>Çizelge 3.12.</b> | İkinci dereceden polinom kuadratik modelin parametreleri istatistiksel t ve P testleri                  | 130 |
| <b>Çizelge 3.13.</b> | GUA ve PS için doğrusal regresyon analizi ve istatistiksel sonuçlar                                     | 133 |
| <b>Çizelge 3.14.</b> | RP-UPLC yönteminin GUA- PS ikili yapay karışımlarına uygulanmasıyla elde edilen geri kazanım sonuçları  | 136 |

|                      |                                                                          |     |
|----------------------|--------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Çizelge 3.15.</b> | Gün içi ve günler arası numuneler için deney sonuçları                   | 137 |
| <b>Çizelge 3.16.</b> | Standart ekleme teknigi kullanılarak elde edilen % geri kazanım sonuçlar | 139 |
| <b>Çizelge 3.17.</b> | Sistem uygunluk parametreleri                                            | 141 |
| <b>Çizelge 3.18.</b> | RP-UPLC yöntemiyle şurup numunelerinin analiz sonuçları                  | 144 |



## 1. GİRİŞ

Analitik kimyada kalitatif ve kantitatif analiz işlemleri analitik cihazlardan elde edilen spektrum, kromatogram, voltamogram, elektroferogram gibi formatlardaki sinyallerin değerlendirilmesiyle gerçekleştirilmektedir. Analitik analiz yöntemlerinin geliştirilmesi de bu sinyallerin kullanımına dayanmaktadır. Dolayısıyla, analiz işlemlerinde enstrumentasyon son derece önemlidir.

Gıda, çevre analizlerinde olduğu gibi, ilaç aktif maddelerinin biyolojik sıvılardan ve ticari preparatlardan kantitatif ve kalitatif analizleri için Uv-Vis spektrofotometri, infrared spektrofotometri, voltametri (veya plorografi), kapiler elektroforez, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (veya aşırı basınçlı sıvı kromatografisi), gaz kromatografisi ve bu yöntemlerin kombine şekli olan yüksek basınçlı sıvı kromatografisi – kütle spektrometri (Liquid chromatography -mass spectrometry → LC-MS), gaz kromatografisi – kütle spektrometri (Gas chromatography - mass spectrometry → GC-MS) ve kapiler elektroforez – kütle spektrometri (chapillary elechtophoresis - mass spectrometry → CE- MS) yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden, özellikle Uv-Vis spektrofotometry ile analiz edilen bileşiklerin spektrumlarının girişim yapması veya numune matriksinin analitlerin spektrumları ile çakışan spektral bandlar vermesi nedeniyle analiz işlemler çoğu zaman başarılı değildir.

Elektrokimyasal yöntemler ile yükseltgenen – indirgenen fonksiyonel grup içermeyen ilaç bileşiklerinin analizi mümkün değildir. Dolayısıyla, ilaç analizi için elektrokimyasal yöntemler standart bir yöntem değildir. Diğer taraftan kapiler elektroforez yönteminde yüksek ayırım gücüne rağmen, analiz koşullarının belirlenmesi çok zor ve zaman alıcı olmasıyla birlikte tekraredilebilirlik problemleri nedeniyle ilaç analizde geleneksel kullanılan bir yöntem olamamıştır.

Günümüzde, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (High performance liquid chromatography → HPLC) veya aşırı yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (Ultra-performance liquid chromatography → UPLC) yöntemi ilaç analizlerinde yaygın olarak kullanılan standart bir yöntemdir. Ancak, bu HPLC veya UPLC yönteminin uygulanmasında da optimal kromatografik şartların uzun deneysel çalışmaları gerektiği bir gerçektir. Bazı durumlarda, HPLC veya UPLC yöntemiyle analiz edilen bileşiklerin kromatografik istenildiği gibi olmayabilir veya zayıf kromatografik ayırım olabilir. Bu durumda bileşiklerin istenen kromatografik ayırımını gerçekleştirmek için uzun deneysel çalışmalar ve aşırı reaktif tüketimi ile insan gücü gerekmektedir. Kromatografik çalışmaların çoğu göstermiştir ki; analizlerde, deneysel şartların ;hareketli faz, akış hızı, kolon sıcaklığı, hareketli faz içerisindeki inorganik ve organik maddelerin yüzdelерinin ve diğer parametrelerin kemometrik optimizasyonu kısa zaman aralığında iyi bir pik ayırımı için gerekli olabilir.

Analitik kimyada, genel bir strateji olarak tek değişkenin optimizasyonu kullanılmaktadır. Bu geleneksel optimizasyon yaklaşımında, örneğin kromatografik yöntem geliştirilmesinde sabit akış hızı ve sabit kolon sıcaklığında mobil faz içerisindeki tampon yüzdesinin değiştirilmesi ve uygun tampon yüzdesinin belirlenmesi şeklindedir. Sırasıyla, akış hızı ve kolon sıcaklığı içinde yukardaki gibi tek değişken optimizasyon yaklaşımı uygulanabilir.

Ancak, optimize edilmeye çalışılan faktörler arasında ki bir etkileşim kromatografik ayırımı etkiliyorsa, bu durumda tek değişken optimizasyon tekniği, deneysel koşulların belirlenmesinde yanlışlığa karara sebep olacaktır. Tek değişken optimizasyon yaklaşımının elimine etmek için çok faktörlü ve faktör etkileşimlerinin de dikkate alan kemometrik deneysel tasarım ve optimizasyon metodolojisini kullanmak son derece isabetli olacaktır. Bir kromatografik analiz işleminde kemometrik optimizasyon tekniği ile deneysel uzay içerisinde ki matematiksel model ve çözümü sayesinde kısa zaman aralığında yüksek veya istenen kromatografik ayırım sağlamak mümkün olacaktır. Dolayısıyla, bu doktora tezi çalışmasındaki söz konusu ilaçların kromatografik analizlerinde kemometrik optimizasyon tekniği ile deneysel koşulların belirlenmesine dayanan UPLC yönteminin geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Bu doktora tez çalışmasında GUA-EFE ve GUA- PS şurup kombinasyonlarını içeren iki farklı farmasötik preparatın analizi tez konusu olarak seçildi. Bu doktora tez çalışmasının ana amacı, GUA-EFE ve GUA- PS karışımlarının kantitatif analizleri için çok değişkenli optimizasyon stratejisine dayanan yeni UPLC yöntemlerinin geliştirilmesidir. Bu hedefin gerçekleştirilmesi için UPLC analizlerinde kısa zaman aralığında iyi bir kromatografik ayırım için  $3^3$  tam faktöriyel tasarımlar ve cevap faktör olarak ise kromatografik yüzey cevap değişkeni kullanılmıştır. Bu sayede kısa zaman aralığı ve iyi kromatografik ayırım arasındaki dengeye dayanan optimal kromatografik koşullar bulundu.

Yöntemlerin kemometrik optimizasyon işlemlerinden sonra, UPLC yöntemlerinin validasyonu için GUA-EFE ve GUA-PS karışımının içeren bağımsız test çözeltileri analizi, gün içi ve günler arası analiz çalışmaları ve standart ekleme teknikleri kullanıldı ve yöntemleri valide edici sonuçlara ulaşıldı. Validasyon işleminden sonra yöntemler GUA-EFE ve GUA-PS kombinasyonlarını içeren ticari şurup preparatların analizlerine başarıyla uygulandı.

Özellikle GUA, EFE ve PS bileşikleri pek çok kombine farmasötik preparat içerisinde yer almaktadır. Bu bakımdan geliştirilen UPLC yöntemleri ilgili etkin maddeleri formülasyon öncesi ve formülasyon sonrası analizlerinde de kullanılabilecek olmasından dolayı da önemlidir.

Türkiye ilaç piyasasında GUA içeren çok sayıda farmasötik preparat bulunmaktadır. Ancak, doktora tez çalışmasının konusu olarak GUA-EFE ve GUA-PS kombinasyonlarını içeren şurup formülasyonlarının kantitatif analizleri için kemometrik optimizasyon metodolojisi ile yeni UPLC yöntemlerinin geliştirilmesi olarak seçildi.

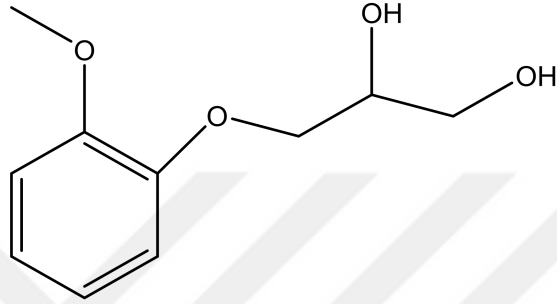
Doktora tezi kapsamında GUA-EFE ve GUA-PS karışımlarını ve bu karışımları içeren şurup preparatlarının analizleri ve kalite kontrolleri için optimize ve valide edilmiş iki farklı UPLC yöntemi geliştirildi. Bu yöntemler son derece ekonomik ve güvenilir yöntemlerdir. Ayrıca, yeni geliştirilen UPLC yöntemleri, ilgili ilaç preparatlarının analizleri bakımından AR-GE ve ilaç endüstrisinde de kullanılabilecek olması, doktora çalışmanın önemini daha da artırmaktadır.



## 1.1. Guafenesin

### 1.1.1. Kimyasal ve Fiziksel Özellikler

Guafenesin 'in kimyasal formülü şekil 1.1 'de sunulmuştur.



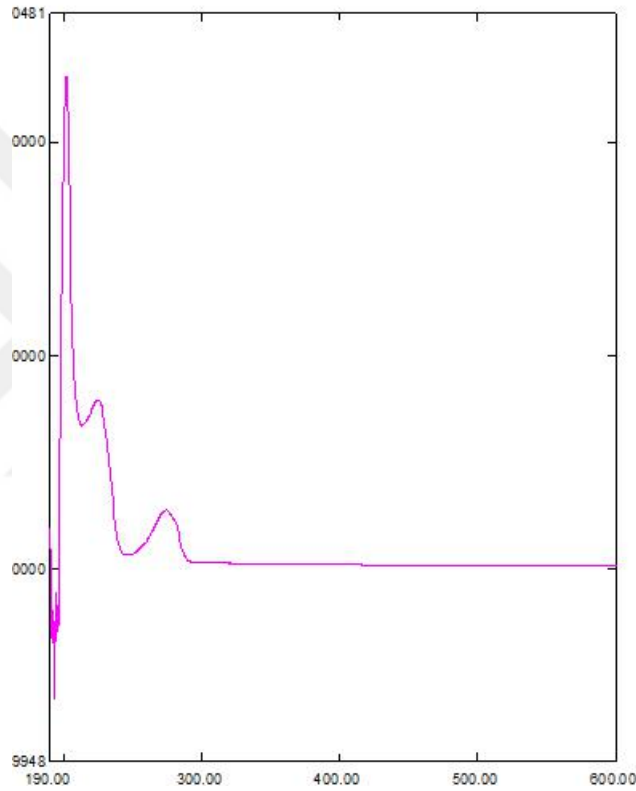
Şekil 1.1. Guafenesin formulu

Guafenesin 'in kimyasal özellikleri aşağıda sunulmaktadır.

|                 |                                                |
|-----------------|------------------------------------------------|
| Molekül Formülü | C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub> |
| Mol ağırlığı    | 198.216 g/mol                                  |
| CAS No          | 93-14-1                                        |
| Açık formülü    | (RS)-3- (2-methoxyphenoxy) propane-1,2-diol    |
| Erime noktası   | 77- 81 °C                                      |

## Fiziksel Özellikleri:

Guafenesin in fiziksel özellikleri ile ilgili olarak beyaz renkte bir toz olduğu, Pratik olarak suda çözülmediği ve Metanol gibi çözeltilerde çözünürlüğü (Michael M. Crowley, 2003) raporlanmıştır. GUA ilaç etkin maddesinin MeOH ve 0.05 M HCl içerisindeki absorpsiyon spektrumu şekil 1.2 de sunulmaktadır.



**Şekil 1.2.** Guafenesin bileşiğinin (20 µg/mL) MeOH ve 0.05 M HCl karışımı (50:50,V/V) içerisindeki UV spektrumu.

### 1.1.2. Farmakolojik özellikler

Guaifenesin, ilaç olarak çok yaygın bir şekilde kullanılmaktadır ve balgam söktürücü ilaç olarak reçetelendirilmektedir. Ancak, etki mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır ve mevcut bilgi sınırlıdır. Ekspektoranlar, solunum yolu salgılanmasını arttırarak, öksürük hafifletmek için kullanılır. Dolayısıyla, solunum viskozitesinin azaltılması ile öksürük daha etkin hale getirilir. Söktürücü öksürük ilaçları alanında, klinik veriler nadirdir. Ayrıca, öksürük ve mukus üretimi veya atımı için objektif tahmini sağlayan karmaşıklık nedeniyle araştırma zordur. Solunum mukus üretimi sağlıklı kişilerde nispeten düşük olduğundan, bu alandaki araştırmalar için başka bir engel, mukus numune toplama zorluğudur.

Guaifenesin, yaygın olarak kullanılan ağız balgam söktürücü ilaç, 1952 yılında, Amerikan gıda ve İlaç İdaresi tarafından onaylanmıştır. İlaçlarda etken madde olarak kullanılan guaifenesin, soğuk algınlığında ve hafif solunum yolu enfeksiyonlarında öksürük tedavisi için kullanılır. Ancak, guaifenesin klinikal kullanımları iyi belgelenmiş değildir ve klinik çalışmaların sonuçları tartışmalıdır. Robinson ve ark. guaifenesin, üst solunum yolu enfeksiyonu nedeniyle öksürük sıklığı ve şiddeti iyileştirilmesi için plaseboya üstün olduğunu bildirdiler.

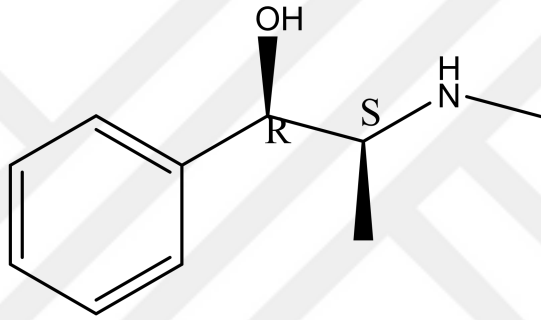
Bunun aksine, Kuhn ve ark. tarafından yapılan araştırmalara göre, bu durumda, guaifenesin tedavisinden herhangi bir yarar bulunmamaktadır. Thomson et al. kronik bronşit hastalarda, öksürük üzerinde, ilacın hiçbir etkisi olmadığını bildirdi.

Ancak, Parvez ve arkadaşları tarafından daha yeni bir çalışmada, Kronik obstrüktif akciğer hastalığı olan hastalarda, guaifenesin-plasebo karşılaştırılmasında, öksürük ortalama yoğunluğu daha büyük bir azalma ile sonuçlanması gösterilmiştir. Benzer konuda raporlar, diğer balgam söktürücü maddeler için bulunabilir (yani bromheksin, asetilsistein). Ekspektoranlar aksiyon mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır. En azından bir kısım için, ekspektoranlar aksiyonu, mide mukozasının uyarılması ile başlatılan bir vagus reflaksdan yararlanarak aracılık eder. Bu mekanizma, 19. yüzyılda önerilmiştir ve balgam söktürücü olarak kullanılan ipecacuaula, yüksek dozlarda verildiğinde kusmaya neden olması gözlemlere dayalıdır. Bu hipotezi doğrulamak için farklı hayvan modellerinde yapılan deneylerde bazı ampirik veriler vardır. Perry ve Boyd çalışmalarında, ipecacuanha, yüksek dozlarda midede solunum çıkış yol sıvısı artırılmasına neden olması gösterilmiştir. İntravenöz yolu uygulaması ile karşılaştığında, mide tüpü yoluyla, solunum yolu çıkış sıvısının daha hızlı bir etkisini üreterek, amonyum klorür tavşanlarda uygulanmıştır.

## 1.2. Efedrin Hidroklorür

### 1.2.1. Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri

Efedrin Hidroklorürün kimyasak formülü şekil 1.3 de sunulmaktadır.



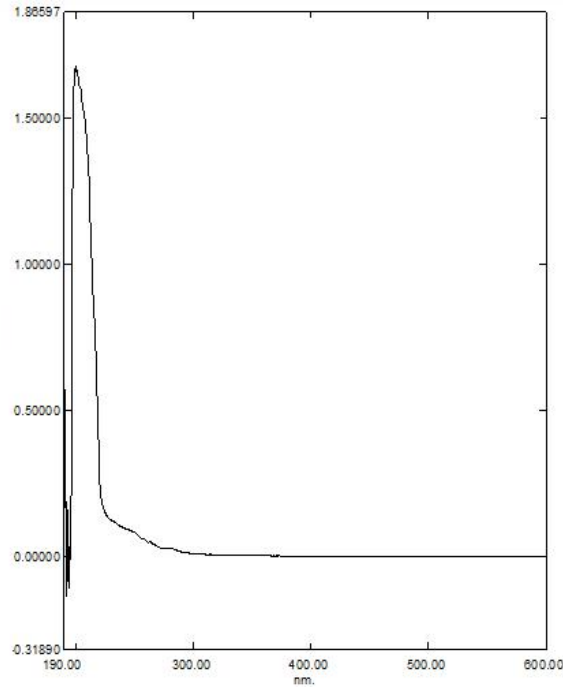
**Şekil 1.3.** Efedrin Hidroklorür formülü

FEF'nin kimyasal özellikleri aşağıda sunulmaktadır.

|                  |                                               |
|------------------|-----------------------------------------------|
| Molekül Formül   | C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> NO            |
| Molekül ağırlığı | 165.23                                        |
| Açık formülü     | rel-(R,S)-2-(methylamino)-1-phenylpropan-1-ol |
| Erime noktası    | 86°C                                          |
| CAS No           | 299-42-3                                      |
| PKa              | 10.3 (25 °C)                                  |

### Fiziksel Özellikleri:

FEF Kristal halinde parçacık yapısındadır. Metanol ve kloroform ve eter gibi çözeltiler içinde çözülür. Kokusuz bir etken maddedir. 218 ° C° sıcaklıkta, suda, alkol içinde, eter ya da kloroform da çözünür. Efedrin hidroklorürün MeOH ve 0.05 M HCl içerisindeki UV absorpsiyon spektrum şekil 1.4 de sunulmaktadır.



**Şekil 1.4.** MeOH ve 0.05 M HCl karışımı (50:50 V/V) içerisinde 20µg/mL efedrin hidroklorürün UV spektrumu.

### 1.2.2. EFE Farmakolojik Özellikler

EFE spinal anestezi sırasında düşük kan basıncı önlemek için kullanılan bir ilaçtır. Ayrıca, astım ve narkolepsi için kullanılmaktadır. Fakat, tercih edilen tedavi değildir. Bu ağızdan, damar veya kas içine enjeksiyonla alınabilir. Başlangıçta, intravenöz kullanımı ile hızlıdır. Ama bir kas içine enjeksiyon 20 dakika sürebilir, ağız yoluyla etkisini göstermek için 1 saat sürebilir. Enjeksiyon yoluyla verildiğinde, yaklaşık bir saat sürer ve ağız yoluyla alındığında, dört saate kadar sürebilir. Yaygın görülen yan etkiler, uyku sorunları, anksiyete, baş ağrısı, halüsinasyonlar, yüksek kan basıncı, kalp hızı, iştah kaybı ve idrar yetersizliği sayılabilir. Ciddi yan etkileri felç, kalp krizi ve mide bulantısıdır. Emzirme sırasında kullanılması önerilmez. Efedrin  $\alpha$  ve  $\beta$  adrenerjik reseptörler üzerinde açarak çalışır. Efedrin ilk 1885 yılında izole edilmiştir. Efedrin genel bir ilaç olarak kullanılabilir. Gelişmekte olan dünyada toptan maliyeti yaklaşık 0.69 doz başına 1,35 USD etmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde, çok pahalı değildir. Normal olarak Ephedra Çeşidi bitkilerde bulunabilir. Efedrin içeren diyet takviyeleri Amerika Birleşik Devletleri'nde yasadışıdır. Geleneksel Çin tıbbında kullanılması bir istisnadır. Efedrin, mide bulantısını azaltır. Kafein ve teofilin gibi metilksantinler, kilo kaybı bakımından, efedrin ile sinerjistik bir etkisi vardır. Bu başka ürünlerin yaratılmasına ve pazarlamasına yol açmıştır (Astrup ve ark, 1995).

EFE: Norepinefrinin doku depolarını serbest bırakır ve böylece bir alfa ve beta-adrenerjik stimülasyon üretir; Epinefrinden daha uzun etkili ve daha az güçlüdür(Astrup ve ark, 1995).

GUA:Gastrik mukozayı tahriş ederek ve solunum yolu sekresyonlarını uyararak balgam söktürücü olarak hareket eder, böylece solunum sıvısı hacimlerini artırır ve mukus viskozitesini düşürür(Sams RA ve ark,1984).

EFE ve GUA kombinasyonu için etiketli endikasyonlar astım hastalığında gösterilmektedir. Astım için (hırıltılı solunum, göğüs sıkışması, nefes darlığı) hafif derecede semptomların geçici olarak hafifletilmesi ve balgamın (mukus) gevşetilmesi, kalın bronşiyal salgılar, bronşiyal tüplerin boşaltılması ve öksürüklerin daha verimli hale getirilmesini sağlar (Gamal M ve ark , 1997).

EFE ve GUA Kombinasyonu İçin İlaç Etkileşimleri:

Alkalinize Ajanlar: Alfa / Beta-Agonistlerin serum konsantrasyonunu artırabilir.

Alfa 1-Blokerleri: Alfa / Beta-Agonistlerin vazokonstriksiyon etkisini azaltabilir. Benzer şekilde Alfa /  $\beta$ -Agonistler Alpha1-Bloker vazodilatasyonunu antagonize edebilir.

Atropin (Sistemik): Efedrinin (Sistemik) terapötik etkisini artırabilir.

EFE/ GUA kullanım nedeni:

Soğuk algınlığı, grip veya saman nezlesi nedeniyle öksürük, boğaz ve hava yolu tahrişlerini rahatlatır. Efedrin / guaifenez, dekonjestan ve ekspektoran kombinasyonudur. Kan damarlarını daraltarak, burun kanallarındaki şişmeyi azaltarak ve hava yolunda mukusu inceltip gevşeterek çalışır. Bu, daha kolay nefes almanızı sağlar ve öksürükleri daha verimli hale getirir (Shuhua Deng ve ark, 2016).

EFE / GUA kullanılmadığı nedenler:

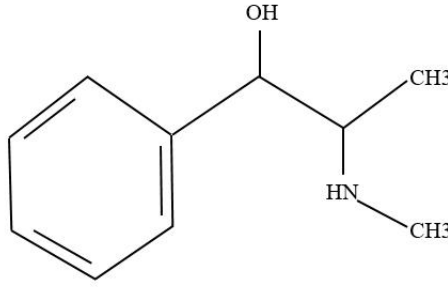
Efedrin / Guaifenesin içerisindeki herhangi bir maddeye alerji olduğunda, Şiddetli yüksek tansiyon, hızlı kalp atışlar veya diğer ciddi kalp problemlerinde(rneğin, kalp damar hastalığı), Son 14 gün içinde furazolidon veya bir monoamin oksidaz (MAO) inhibitörü (rneğin fenelzin) kullanıldığında, bu kombinasyon kullanımı tavsiye edilmemektedir (Brandon C ve ark, 2006).



### 1.3. Psödoefedrin Hidroklorür

#### 1.3.1. Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri

Psödoefedrin Hidroklorürün formülü şekil 1.5' de sunulmuştur.

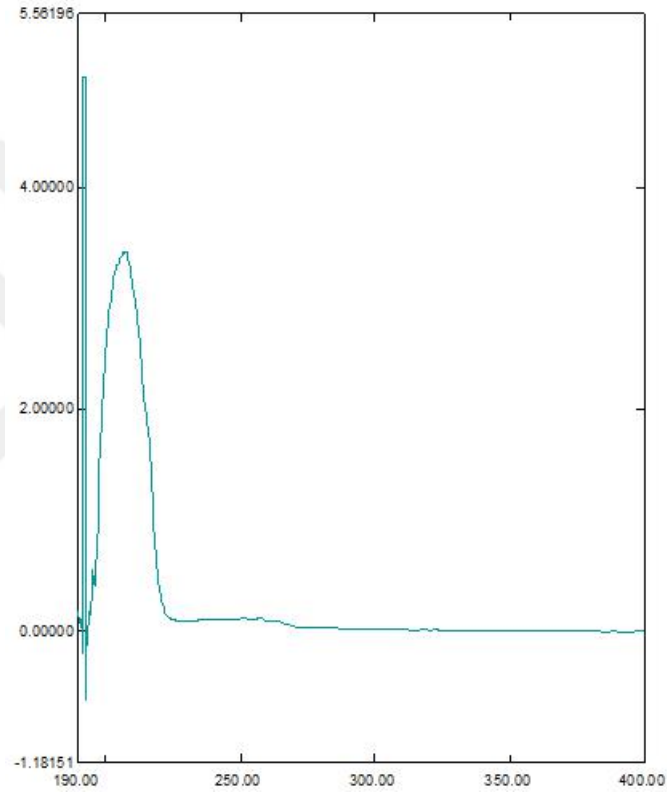


Şekil 1.5. Psödoefedrin Hidroklorür Formülü

|                  |                                          |
|------------------|------------------------------------------|
| Molekül Formülü  | C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> NO       |
| Molekül ağırlığı | 165.23                                   |
| Açık formülü     | (S, S)-2-methylamino-1-phenylpropan-1-ol |
| Erime noktası    | 86°C                                     |
| CAS No           | 90-82-4                                  |
| Pka              | 5-11 (10.5°C)                            |

### Fiziksel Özellikleri:

Psödoefedrin, beyaz renkli kristalize bir tozudur. Alkol, eter veya suda çözülür. Psödoefedrinin MeOH ve 0.05 M HCl içerisindeki UV absorpsiyon spectrum şekil 1.6 da sunulmaktadır.



**Şekil 1.6.** MeOH ve 0.05 M HCl karışımı (50:50 V/V) içerisinde 20µg/mL Psödoefedrinin UV spektrumu.

### 1.3.2. Farmakolojik Özellikler

Psödoefedrin bir uyarıcıdır, ama burun mukozaların küçültmesi için belirlendiğine göre, bir dekonjestan olarak kullanılır. Genellikle soğuk algınlığı veya alerji ile ilişkili doku hiperemi, ödem ve burun tıkanıklığı azaltır. Diğer positive etkiler, sinüs salgılarının drenaj artırması ve tıkalı östaki borusu açılmasını içermektedir. Bu etkin madde vazokonstriksiyon aksiyon ve yüksek tansiyona neden olabilir, bu nedenle bir yan etki olarak tanınmaktadır. Bir araştırmaya göre, psödoefedrin öksürük ilacı (öksürüğün baskılanması) olarak etkinliğini gösterebilir. Psödoefedrin tedavisi ile ilişkili yaygın advers ilaç reaksiyonları (ADR), merkezi sinir sistemi stimülasyonu, uykusuzluk, sinirlilik, heyecanlanma, baş dönmesi ve anksiyete sayılabilir. Nadiren, psödoefedrin tedavi midriyazis, halüsinasyonlar, aritmi, hipertansiyon, nöbetler ve iskemik kolit ile ilişkili olabilir; psödoefedrin, narkotik dahil diğer ilaçlar ile kombine olarak, paranoyak psikoz vakalarının tedavisinde de bir rol oynayabilir. Ayrıca, psödoefedrin, diğer simpatomimetik maddeler arasında, felç oluşumu ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Endou ve ark,2003).

Psödoefedrin, diabetes mellitus, kardiyovasküler hastalık, şiddetli veya kontrolsüz hipertansiyon, ciddi koroner arter hastalığı, prostat hipertrofisi, hipertiroidizm, kapalı açılı glokom hastalarında veya hamile kadınlar tarafından kontrendikedir. Eşlik eden veya yeni (önceki ondört gün) monoamin oksidaz inhibitör kullanımı, hipertansif krizler'de dahil olmak üzere, hipertansif reaksiyonlara neden olabilir. Metildopa, mekamilamin, reserpin ve veratrum alkaloidler antihipertansif etkileri, sempatomimetikler ile azaltılabilir. Beta-adrenerjik antagonistleri, sempatomimetikler ile etkileşmeye girebilir (B. ABaldwina ve ark, 1998)

Psödoefedrin, direkt ve indirekt semptomimetik aktiviteye sahiptir ve etkili bir üst solunum yolları dekonjestanıdır. Psödoefedrin, sistolik kan basıncının yükseltilmesinde ve taşikardi yaratılmasında efedrinden önemli oranda daha az etkilidir ve merkezi sinir sisteminin uyarılmasında da etkisi daha düşüktür. Guaifenesin, ekspektoran bir etkiye sahiptir. Bu etkinin bronşiyal salgının hacmini ve su muhtevasını artırarak salya viskozitesini azaltmak ve böylece salyanın ekspektorasyonunu sağlamak olduğu düşünülmektedir ( Keri Wellington ve ark,2001).

Psödoefedrin karaciğerde N-demetilasyon yoluyla aktif bir metabolit olan norpsödoefedrine kısmen metabolize olmaktadır. Psödoefedrin ve metaboliti idrar ile atılır, dozun %55 ile 75'i herhangi bir değişikliğe uğramadan atılır. İdrar asitlendiğinde psödoefedrinin idrar ile dışarı atılma hızı artar. Bunun tersine idrar pH'ı arttıkça idrar ile dışarı atılma hızı azalır. Guaifenesin hem oksidasyon, hem de demetilasyona uğrar. Sağlıklı yetişkin gönüllülerde, 60mg psödoefedrinin verilmesi yaklaşık 2 saat sonra (Tmax) yaklaşık 180 ng/ml'lik bir pik plazma konsantrasyonu (Cmax) yaratmıştır. Plazma yarılanma ömrü yaklaşık 5.5 saattir (idrar pH'ı 5.0 ile 7.0 arasında kalır). Psödoefedrinin plazma yarılanma ömrü idrarın asitleşmesiyle önemli ölçüde azalır ve alkalinizasyon ile artar. Sağlıklı yetişkin gönüllülerde 600mg guaifenesin verildikten sonra Cmax yaklaşık 1.4 µg/ml, Tmax ise ilacın verilmesinden itibaren 15 dakikadır. Guaifenesinin plazma yarılanma ömrü yaklaşık 1 saattir ve 8 saat sonra kanda görülmez ( Stanley, N ve ark, 1996).

Psödoefedrin, 4 saat süren dekonjestan etkisine 30 dakika içinde ulaşır. Guaifenesin ekspektoran etkisini 24 saat içerisinde gösterir. Psödoefedrin ve guaifenesin uzun süreden beri istenmeyen etkiler görülmeden yaygın bir şekilde kullanılmaktaysa da, bunların gebelik sırasında kullanımları ile ilgili spesifik veriler bulunmamaktadır. Bundan dolayı, gebe kadının bu ilaçtan sağlayacağı yarar ile ilacın gelişmekte olan fetusa olabilecek tehlikeli etkileri dengelemek şartıyla kullanımına karar verilmelidir. Psödoefedrin anne sütüne az miktarda geçer, fakat bunun emzirilen bebeklerdeki etki derecesi bilinmemektedir. Ağız yoluyla tek doz psödoefedrin verilen annenin sütüyle 24 saat içinde bunun %0.5 - 0.7'si atılacağı tahmin edilmektedir. Guaifenesin, bebek üzerinde hiçbir etkisi olmadığı tahmin edilen küçük miktarlarda anne sütünde atılmaktadır.



## **1.4. Guafenesin ve Efedrin ve Psödoefedrin Analizlerinde Kullanılan Analitik**

### **Yöntemler İçin Literatür Araştırması**

#### **1.4.1. Guafenesin İçin Uygulanan Yöntemler**

##### **1.4.1.1. HPLC Yöntem**

Dinç ve ark.,2005 bir öksürük şurupta, Guafenesin ve Dekstrometorfan'ın eş zamanlı tayini için yeni HPLC yöntemi geliştirilmiştir ve bu yöntemi, florimetrik dedektör ile birlikte uygulamışlardır. Diğer maddeler arasında, aktif bileşenlerin ayrılması ve değerlendirilmesi için geliştirilen yöntem, basit, doğru ve hızlı numune hazırlama adımları içerir. Dalgaboyu bölgesinde floresan karaktere sahip olan Amilorid (AM), iç standart olarak kullanılmıştır. İki ilaç için iyi bir kromatografik ayırım, bir Waters Symmetry C18 kolonunda ® 5 µm 4.6 x 250 mm ve mobil faz olarak Fosfat tampon maddesi ve Metil alkol ve Asetonitril de yapılmıştır. Elüsyon, floresan dedektör ile 277 ve 588 nm uyarma ve emisyon dalga boylarında izlenmiştir. Tarif edilen koşullar altında, elde edilen kalibrasyon grafikleri, Dekstrometorfan ve Guaifenesin için, 0.05-0.2 ve 1.2-2.4 mg/ ML konsantrasyon aralığı üzerinde doğrusaldır ve regresyon katsayıları 0.999 dan fazla idi. Validasyon çalışması, yeni analitik yöntemin seçicilik, doğrusallık, kesinlik, doğruluk ve hassasiyet de dahil olmak üzere temel kriterlere uygun olduğunu kanıtlamak amacıyla, ICH kurallarını yerine getirmek için tespit edilmiştir ( Dinç ve ark., 2005)

Hatami ve ark. , 2011 yapılan bir çalışmada, bir basit, hızlı ve etkili bir yöntem, dağıtıcı sıvı-sıvı mikroekstraksiyon (DLLME), yüksek performanslı sıvı kromatografisi-floresan dedektörü ile birlikte, insan idrar örneklerinde, guafenesin şurup formülasyonunun bir oral doz uygulamasından sonra, guafenesin enantiomerlerinin belirlenmesi için geliştirmişlerdir. İdrar numuneleri, 0.0 - 2.0 , 2.0 - 4.0 ve 4.0 - 6.0 saat zaman aralıklarında toplanmıştır ve derişim ve iki enantiyomerin oranı tespit edilmiştir. İdrarda, R-(–) S-(+) enantiyomer konsantrasyon oranı, 0.66, 2 saat ve 6 saat 2.23, R/S enantiyomerde zamanla bir artış göstermiştir. Mikroekstraksiyonu bir işlem için, ekstraksiyon Solvent karışımı (Diklorometan, 100 uL) ve dağıtıcı bir çözücü (THF, 1 ml), bulanık bir çözelti oluşması için, 5.0 mL seyreltilmiş idrar örneği içine hızla enjekte edildi ve CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> halinde enantiyomerler elde edilmiş. HPLC enantioselektif koşulların optimizasyonu sonrası, ekstraksiyon hacmi ve türü ve dağıtıcı çözücüler, ekstraksiyon süresi, sıcaklık, pH ve tuz etkisi gibi en önemli parametreler, dağıtıcı sıvı-sıvı mikroekstraksiyon işlemi için optimize edilmiştir. Optimum ekstraksiyon koşulları altında, hedef analitler için 10- 2000 ng / ml konsantrasyon aralığında, yöntem de, kalibrasyon eğrisi doğrusaldır. Her iki enantiyomer için LOD 3.00 ng / ml olduğu tespit edilmiştir (Hatami ve ark. , 2011).

Dinç ve ark. , 2015 ticari bir öksürük şurupta, potasyum guaiacolsulfonate (PGS), guaifenesin (GUA), difenhidramin HCl (DIP) ve carbepentane sitrat (SYR), aynı anda değerlendirilmek için yeni ultra-performanslı sıvı kromatografik (UPLC) yöntemi geliştirmişlerdir. PGS, GUA, DIP ve ARAÇ, dört bileşikler için kromatografik ayırma, Asetonitril ve 0.1 M HCl oluşan bir hareketli faz (50: 50, hac / hac) kullanarak, bir BEH fenil sütun üzerinde (100 × 2.1 mm, 1.7 mikron i.d.) gerçekleştirdi. Bununla birlikte, kromatografik analizi için optimize koşulları, 0.38 ml / dak akış hızı, 30° C kolon sıcaklığı, 220 nm fotodiyot dedektör ile 1.2 uL enjeksiyon hacmi bulundular. Kalibrasyon eğrileri, 10–98 µg/mL konsantrasyon aralığında PGS için, 5–80 µg/mL aralıkta GUA için, 5–25 µg/mL aralığında DIP ve CAR için, pik alanı üzerinde analit konsantrasyon regresyonu ile hesaplanmıştır. Yöntem validasyon sonrası, önerilen UPLC yaklaşım, PGS, GUA, DIP ve ek bileşikler içeren ticari şurup formülasyonu analizi için başarılı bir şekilde uygulandı ( Dinç ve ark. , 2015) .

Grosa ve ark. ,2006 guaifenesin (GUA), metil p-hidroksibenzoat (MHB) ve propil p-hidroksibenzoat (PHB) üçlü bir karışım içeren ticari bir öksürük şurubu dozaj formülasyonları için yüksek performanslı sıvı kromatografi işlemi gösteren bir stabilite geliştirmişlerdir. Kromatografik koşulları gösteren stabil bir yöntem, GUA, MHB, PHB ayrılmasını sağlamak için seçilmiştir. Kantitatif ve izokratik ayrılma, 17 dakika içinde, bir eter-bağlı fenil durağan faz ile 150 mm kolonu üzerinde elde edilmiştir. Analitlerin saptanması 254 ve 276 nm' de yapılmıştır. Mobile faz Fosfat tampon : A (pH 3.0, 10 mM) ve Asetonitril 'den :B 25/75 (v/v) oluşmuştur. 95–285 ve 4–12 aralıklarda, GUA–MHB–PHB karışımı için yöntem iyi doğrusallık göstermiştir. Korelasyon katsayılarının karesi 0.999' dan büyüktür. İnterday R.S.D. sırasıyla GUA, MHB, ve PHP için, 1.17, 1.14 ve 0.91% idi. Gerçekten ortalama geri kazanım, hedef deney konsantrasyonunun 100% 'de , 100.3, 100.5 idi ve 0.8, 0.7 bağıl standart sapma ile 100.7% ve sırasıyla, laboratuvarında hazırlanan örneklerden , GUA ve MHB ve PHB için % 0.4 olmuştur. Yöntemin uygulanabilirliği, ticari dozaj form analizi için değerlendirilmiştir (Grosa ve ark. , 2006) .

Muhammad ve ark. ,2007 bir çalışmada, hızlı bir Eşli-iyon yüksek basınçlı sıvı kromatografik yöntem, Guaifenesin, Fenilpropanolamin hidroklorür, sodyum benzoat ve kodein fosfat dörtlü karışım içeren öksürük bir şurupta geliştirmişlerdir. Heptan Sülfonik Asit, mobil faz olarak kullanılmıştır. Sabit bir dalga boyu dedektörü ( $\lambda = 254$  nm) ve  $\mu$ -Bondapak fenil kolonu kullanılmıştır. Tüm aktif bileşenler için toplam analiz süresi 22 dakika olmuştur Naseem (Muhammad ve ark. , 2007).

Thresiana ve ark. ,2005 öksürük ve tablet ve şurupta, basit ve hızlı bir gaz kromatografi (GC) yöntem, Asetaminofen, Fenilpropanolamin Hidroklorür, Guaifenesin, Psödoefedrin Hidroklorür, Kafein, Klorfeniramin Maleat ve Dekstrometorfan Hidrobromür, kombinasyonu aynı anda tespit için geliştirmişlerdir. Alkali Etil Asetat ile analit ekstraksiyondan sonra, 2 uL özü, bir CBP1-M25-025 silika kılcal sütun ile (film kalınlığı 0.25 um, 0.22 mm x 25 m) donatılmış bir gaz kromatografa enjekte edilmiştir (50 bölme oranı: 1). Kolon sıcaklığı, 5 dakika boyunca 150° C'de tutulmuştur ve 3°C / dakikada 175 ° C' ye ve 10 ° C / dk'da 270 ° C'ye yükseltildi. Alev iyonizasyon detektörü ve enjektörün sıcaklıkları, 300 ° C'de muhafaza edilmiştir. GC yöntemi, ucuz, hızlı, doğru ve hassas bir yöntemdir ve ilaç şirketlerinin kalite kontrol laboratuvarlarında tablet ve şurup analizi için kullanılabilir (Thresiana ve ark. , 2005).

Abdelkawy ve ark. , 2011 üç basit ve güvenilir yöntem, Ambroksol HCI (A) ve Guaifenesin (G), A'nın oksidative parçacıklarının (AD) varlığında ve gayakol(GD) ve G safsızlık, üçlü karışımın tespiti için geliştirmişlerdir. A, AD, G ve GD dört bileşenin ayrılması için ilk yöntem, izokratik bir HPLC yöntemi olarak, C18 kolonu üzerinde, su: metanol (80: 20, hac / hac, % 1 trietilamin, pH 2.9) oranda kullanarak, 1.5 mL / dakikalık bir akış hızı ve 220nm' de UV tespiti ile uygulandı. A ve G için, doğrusal bir ilişki, 5-80 µg/ml ve 10-150 µg/ml aralığında, elde edilmiştir. İkinci metot, bir ince tabaka Kromatografisi-Spectrodensitometric yöntemi olarak, silika jel 60F 254 plakalar üzerinde, Kloroform: Metanol: Etil Asetat: Asetik Asit (70: 8: 12:10, hacim olarak) bir mobil faz oluşturan, ayrılması için kullanılmıştır. Ayrılmış bölgelerin densitometrik değerlendirilmesi, 270 nm' de yapıldı. Kalibrasyon grafikleri için regresyon analizi, sırasıyla, A ve G için, 1-7 µg/ band ve 2-10 µg/band aralığında, iyi bir korelasyon göstermiştir. Üçüncü yöntem, PCR (Ana bileşen regresyon) ve PLS (kısmı en küçük kareler yöntemleri içeren çok değişkenli spektrofotometrik kalibrasyon yöntem, dört bileşenden A, AD, G, ve GD belirlenmesi için kullanılmıştır (Abdelkawy ve ark. , 2011).

Reddy ve ark. , 2011 bir kararlılık belirten gradyan ters faz sıvı kromatografik (RP-LC) yöntem, farmasötik formülasyonlarda, guaifenesin ile ilgili maddelerin kantitatif analizi için geliştirmişlerdir. Guaifenesin ve yabancı maddeler için temel ayırım, bir Water Symmetry C18 (150 mm × 4.6 mm) 5 µm kolon ve gradyan elüsyon yöntemi kullanarak başarıldı. Sırasıyla, A mobil faz 90 :10 v/v oranda, 0.02 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 3.2) ve metanol ve B mobil faz 10:90 v/v oranda, 0.02 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 3.2) ve Metanol içermektedir. Hareketli fazın akış hızı, 273 nm' de saptama dalga boyu ve bir 25 ° C kolon sıcaklığı ile 0.8 ml / dak olmuştur. Gelişmiş yöntem özgüllük, doğrusallık, algılama ve ölçümü, doğruluk, kesinlik ve sağlamlık sınırı ile ilgili belirli kurallara göre doğrulandı (Reddy ve ark. , 2011).

Bhattacharyya ve ark., 2013 yapılan bir çalışmada, kabul, yayın, istikrar veya farmakokinetik çalışmayı dikkate almadan, güvenilir ve doğru veri oluşturmak için, geliştirilmiş ve istikrarlı bir yöntem elde ettiler. UV spektrom da, 200 nm ile 400 nm ve 273 aralığı, Emilimi için maksimum dalga boyu olarak seçilmiştir. Konsantrasyona bağlı absorbans lineer regresyon, 0.991 bir regresyon katsayısı (R<sup>2</sup>) ile  $y = 0.0155x - 0.0136$  eşitliği elde etti. Yüksek oranda geri kazanım değeri, formülasyonda bulunan ilave maddelerin hiçbir girişimi olmadığını gösterilmektedir. Stabilite çalışması, büyük oranda değişiklikleri, sadece bir ilacın UV ışığı, oksitleme, asitik hidroliz ve bazik hidroliz ile etkileşmesi halde gözlenmiştir. Böylece, bu yöntem, farmasötik formülasyonda guaifenesin belirlemek için kullanışlıdır. Bir basit, hassas ve stabilite gösteren UV spektrofotometrik yöntem, hazırlanan hacim ve katı dozaj formu (tablet) de, Guaifenesin kantitatif tayini için geliştirilmiştir. Yöntem hızlı ve ekonomik bir yöntemdir ve aynı zamanda belirlenen aralık için hızlı ve hassas bir yöntemdir. Stabilite çalışması, geniş bir PH aralığı boyunca, hidroliz için, sıcaklık, oksidasyon, fotoliz ve duyarlılık etkisini içermektedir (Bhattacharyya ve ark., 2013).

Lopes ve ark. , 2012 desonid, sorbik asit, metilparaben, propil galat ayrıştırma ve aynı anda tayini için yeni ters fazlı sıvı kromatografik yöntem uygulandı ve desonid'in hidrofilik bir kremdeki ürün bozunması, deneysel tasarım, çözünürlük kayıp fonksiyonları ve kemometri yöntemleri ile geliştirmişlerdir. Bu yöntemi kullanarak, tarama aşaması ve tam faktöriyel tasarımı içeren bir strateji, en etkili kromatografik değişkenleri (pH ve organik çözücü içeriği) ortaya çıkarmıştır. Arka teğet çözünürlük fonksiyonu, optimizasyon kaybı fonksiyonu olarak benimsenmiştir. Bu değişkenler, merkezi bir kompozit tasarım kullanılarak daha da optimize edilmiştir. Çok değişkenli eğri çözünürlüğü ve kısmi en küçük kareler regresyonu, kromatografik çalışma süresini optimize etmek için test edilmiştir. Ancak, Kesinlik açısından üstün olduğu ortaya çıkardı ve toplam çalıştırma süresi 3 kat daha düşük (yaklaşık 8 dak) bir yöntemin geçerliliğine izin verdi. Desonid formülasyonu için optimum ayırma koşullarının tahmininde, deney tasarım ve kemometri modelleri, zaman ve kaynakların etkin bir şekilde kullanılmasını sağladı. Ortaya çıkan yöntemin mevcut ICH yönergelerine göre doğrulaması, seçiciliğini, doğrusallığını, doğruluğunu ve doğruluğunu teyit edildi (Lopes ve ark. , 2012).

Yehia ve ark., 2015 üç gelişmiş kemometrik spektrofotometrik yöntemleri; Konsantrasyon Kalıntıları Artırılmış Klasik En Küçük Kareler (CRACLS), Çok Değişkenli Eğri Çözünürlüğü - Değişen En Küçük Kareler (MCR-ALS) ve Temel Bileşen Analizi-Yapay Sinir Ağlarını (PCA-ANN) geliştirmiş ve doğrulamıştır ve PLS kalibrasyonu ile değerlendirmişlerdir. Önerilen yöntemlerin analitik performansı, yüzde geri kazanımlar, kalibrasyonun kök ortalama karesi hatası ve tahmini standart hata ile tanımlanmıştır. Dört çok değişkenli kalibrasyon yöntemi, herhangi bir ön ayırma basamağı olmadan doğrudan kullanılabilir ve farmasötik formülasyon analizi için başarıyla uygulanabilir ve hiçbir yardımcı maddenin müdahalesi gözlenmez (Yehia ve ark., 2015).

## 1.4.2. Efedrin İçin Uygulanan Yöntemler

### 1.4.2.1. HPLC Yöntem

İmamoglu ve ark, 2013 guafenesin ve Efedrin Hidroklorür ikili karışımı içeren Farmasötik formülasyonları için yeni basit ve seçici tayin metodu yayınlamışlardır. Bu yöntem için Fosfat tampion – Metanol kombinasyonu (60: 40, h = h) izokratik mobil faz olarak seçilmiş ve GUA ve EFE kombinasyonun eş zamanlı analizi için geliştirilmiş bu sıvı koromatografi için PH 3'e ayarlandı. Bu yöntem için konsantrasyon aralığı GUA için 30-100 µg/ mL ve EFE için 15-50 µg/mL gözlenmiştir. 212 nm' de yapılan tespitleri için toplam çalışma süresi en az 10 dakikadır. Bu çalışmada, geliştirilmiş RP-HPLC yöntemi, sıvı-sıvı ektre etmeden, insan plazma ve şurub dozaj form numunelerinde farmasötik preparatlara başarı ile uygulandı ve bu yöntemin istatistiksel karşılaştırması, farmasötik preparatlar ve insan plazma örneğinde gerçekleştirilmiştir ( İmamoglu ve ark, 2013).

Matthijs ve ark., 2006 bir çalışmada, hızlı tarama ve çeşitli optimizasyon adımlarını içeren bir stratejiyi, farmasötik bağların kiral moleküllerinin ayrılması için polar organik çözücü kromatografisiyle (POSC), dört polisakarit esaslı sabit faz kullanarak önerdiler ve normal fazda (NPLC) ve süperkritik sıvı kromatografisinde (SFC) daha önce bildirilen stratejilerle karşılaştırdılar. Burada, optimizasyon, deneysel alanı verimli bir şekilde haritalamak için deneysel tasarımın kullanımına dayanır (Matthijs ve ark., 2006).

Stanaszek ve ark., 2004 Saçta, metamedioksametamin (MDA), metilendioksimetamfetamin (MDMA) ve metilendioksietilamfetamin (MDEA) amfetamin, efedrin (EP), metakainon (MTC), parametoksiampetamin (PMA), metamfetamin (MA) belirlemek için bir analitik prosedürü optimize, valide ve geliştirmeyi değerlendirdiler. Hedef maddeler, alkalın (İM NaOH) sindiriminden sonra 1-klorobütan ile ekstrakte edildi ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi-atmosferik basınçlı kimyasal iyonizasyon kütle spektrometresi (LC-APCI-MS) ile temsil edildi. Kılcal gerilim, korona akımı, kurutma gazı sıcaklığı ve akış hızı, buharlaştırıcı sıcaklığı ve nebulizör gazı basıncı gibi APCI-MS parametreleri akış enjeksiyon analizinin uygulanması ile optimize edilmiştir. Kantitasyon, çalışılan ilaçların protonlanmış moleküler iyonlarının seçilen iyon izlemesi kullanılarak yapıldı ve bunların döteryumlu analogları dahili standartlar olarak kullanıldı. Algılama limitleri MA, MDA, MDMA ve MDEA için 0.05 ng / mg; EP ve AMP için 0.10 ng / mg; Ve MTC ve PMA için 0.20 ng / mg idi. Tüm ilaçlar 0 ila 20 ng / mg arasında doğrusal tepki görüldü. Yöntem, detoksifikasyon ve metadon tedavisi alan hastalardan elde edilen 93 orijinal sa örneğinde amfetaminlerin belirlenmesinde uygulanmış ve 0.17-17.28 ng / mg (EP), 0.52-2.08 ng / mg (MTC), 0.15-62.52 (AMP), 0.10-16.52 ng / mg (MA), 0.10-0.88 ng / mg (MDMA) ve 0.10-0.16 ng / mg (MDEA) elde edilmiştir. MDA ve PMA hiç tespit edilmedi (Stanaszek ve ark. , 2004) .

Orsi ve ark ., 2006 nafazolin, oksimetazolin, ksilometazolin ve efedrin'in ters fazlı HPLC kullanılarak kronolojik özümelerde belirlenmesi için basit, hızlı ve doğru bir yöntem geliştirdiler. Bu araştırmada, sabit faz olarak polibutadien ile kaplanmış alümin, Asetonitril-sulu 10-3 M NaOH (10: 90) başlangıç mobil fazı olarak, 25 dakika iinde% 10 ila% 80 asetonitril içeren bir lineer gradyan ve 224 nm'de saptama kullanılmıştır. Sadece numune hazırlığı, su ile seyreltilmesidir. Metodun doğrusallığı ve doğruluğu değerlendirildi. Çeşitli formülasyonlar için elde edilen deney sonuçları beyan edilen miktarlarla uyumluydu (Orsi ve ark ., 2006) .

Bagheri ve ark., 2008 idrar numunelerinde efedrin tayini için hassas bir yöntem olarak HPLC ve UV tespiti ile birlikte sıvı-sıvı mikro ekstraksiyon (LLLME) kullanmıştır. Efedrin önce 3.5 mL idrar örneğinden (pH 12) tolüen / benzen mikrofilm (50:50) içine ekstrakte edildiler. Daha sonra analit, organik fazda süspansiyon haline getirilmiş asidik bir mikrodrops solüsyonu (pH 2) içinde geri ekstrakte edildi. Ekstrakt daha sonra doğrudan HPLC sistemine enjekte edildi. 137 zenginleştirme faktörü iyi örnek temizleme ile birlikte optimize edilmiş koşullar altında elde edildi. Kalibrasyon eğrisi 0,01-50 mg / L aralığında doğrusallık gösterdi, regresyon katsayısı 0,998'e karşılık geldi. 3 ve 10'luk bir S / N'ye dayanan LOD'lar ve LOQ'ler sırasıyla 5 ve 10 µg / L idi. Metod, sonunda 5 mg'lık tek ilacın oral yoldan verilmesinden sonra idrar örneğinde efedrin tayini için uygulanmıştır (Bagheri ve ark., 2008).

K. Lemr ve ark., 2006 yapılan bir çalışmada, farklı parametrelerin etkisini (Mobil faz kompozisyonu - pH, organik solvent, tuz niteliği ve konsantrasyonu, akış oranı, enjekte edilen miktar ve sıcaklık) farmakolojik açıdan üç önemli bileşiğin enantiyomerik ayrılması üzerine, B-siklodekstrin sabit faz kullanılarak incelediler. Bu parametrelerin etkisinin değerlendirilmesi, optik saflık tespiti için şartın optimize edilmesine izin verir. Rasemik karışımın ayrılması için aşağıdaki deney koşulları seçildi: Sabit faz - ChiraDex, 5 µm; Sütun - LiChroCart 250 x 4 mm I.D. ; Mobil faz - 500 mmol trietilamin / 1 su içinde H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile, PH = 3.5, akış hızı - 0.8 mL / dak; Algılama - 206 nm'de UV absorpsiyonu; sıcaklık. Küçük (% 1) enantiyomerin büyük bir miktarın üzerinde ayrılması ,akış hızı 0.2 mL / dak ve termostatlı kolon (Metamfetamin ve selegilin için 20 ° C, efedrin için 5 ° C) kullanarak geliştirildi (K. Lemr ve ark., 2006).

Boberić-Borojević ve ark., 1999 efedrin hidroklorür, teofilin, papaverin hidroklorür ve hidroksijin hidroklorür içeren ithal antiasmatik tabletlerin kalitesini kontrol edilmişlerdir. Analiz metodunun amacı, analiz için ayırım, tanımlanma ve tüm bileşiklerin miktarını aynı anda ölçmektir. Programlanabilir bir dalga boyu dedektörüne bağlı ticari olarak paketlenmiş bir Nucleosil C<sub>18</sub> kolonu kullanarak bir RP-LC sistemi uygulandı. Analiz, su içindeki asetonitril konsantrasyonunun artması ile gradyan programında gerçekleştirildi. Burada Mobil fazın pH'nın etkisi belirlenmiştir. (Boberić-Borojević ve ark., 1999).

HX ve ark., 1991 yapılan bir çalışmada, HPLC'de mobil faz kompozisyonunu optimize etmek için Powell metodu başarıyla uygulanmışlardır. KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> çözeltisi metanol mobil faz sistemi, efedrin ve psödoefedrin'in Powell yöntemi ile ayrılması için optimize ettiler. Mobil fazın optimize bileşimi: 0.01 mol / L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> -MeOH = 94: 6 (V / V) olarak bulundu. Powell yöntemi kullanarak, tablolar ve şekiller gerçekleştirildi ve 0.95 pik ayırma fonksiyonuna ulaşıldı (HX ve ark., 1991).

### 1.4.3. Psödoefedrin İçin Uygulanam Analiz Yöntemleri

#### 1.4.3.1. HPLC Yöntem

Carnevale ve ark., 2008 Yapılan bir çalışmada, bir grup parabenler ile birlikte (butil metil,V-VIII) ,Asetaminofen (I), Guaifenesin (II), Psödoefedrin Hidroklorür (III), ve Folkodin (IV), öksürük karışımı için, geliştirilen bir yüksek performans sıvı kromatografisi bir yöntemi, iyon eşleştirme ajan asit oktansülfonik içeren metanol-su-asetik asit bir hareketli faz ile (45:55:2) birlikte ve kimyasal olarak bağlanmış oktadesilsilan hareketsiz faz kullanılarak kanıtlandılar. Aktif bileşenler için destekleme hacimleri, sırasıyla, I-IV bileşikler için, 3.8 mL, 5.4 mL, 9.4 mL, 15.6 ml idi. Parabenler için düzeltilmiş alıkonma hacimleri, [Metil (V) için 5.4 ml, etil(VI) için 9.6 ml, propil (VII) için 18.5 ml, ve butil (VIII) için 37.9 ml] esterlenmesi alkollerin zincir uzunluğuna sahip bir üstel bir ilişki göstermiştir. Aktif bileşenler ve labratuarda hazırlanan numunelerden parabenler için ortalama geri kazanım, sırasıyla, 1.7, 0.3, 1.5, 0.3, 0.3, 3.3, 0.7, ve I-VIII için % 2.7, standart sapmaları ile teorinin% 100'ü idi (Carnevale ve ark., 2008).

Shervington ve ark., 1996 yapılan bir çalışmada, birçok bileşenli bir farmasötik üründe aktif bileşenlerin aynı anda belirlenmesini bildirdiler. Bir şurupta, Psödoefedrin HCl (I), Guaifenesin (II) ve Dekstrometorfan HBr (III) karışımının HPLC ile eşzamalı analizi için izokratik ters fazlı bir kromatografik yöntem geliştirildi. Kolon, oktadesilsilan 5-mikron sabit faz' dan oluşmuştur. Hareketli faz, 45% (v/v) sulu metanol ve tampon olarak amonyum format (pH 4.3) 'tan oluşmuştur. Sırasıyla, (I), (II) ve (III) için tutunma zamanı, 4.50, 7.30 ve 17.60 dakika olarak saptanmıştır ( Shervington ve ark., 1996).

Rahul ve ark., 2011 iki tekrarlanabilir, basit, doğru, hassas, önceden her hangi bir ayırmaya ihtiyacı olmayan ve ekonomik yöntem, Guaifenesin ve Psödoefedrin Hidroklorürün aynı anda, tablet dozaj formunda, eş zamanlı olarak tayini için geliştirmişlerdir. Birinci yöntem simültane denklem yöntemi: bu yöntemde, sırasıyla, Guaifenesin ve Psödoefedrin Hidroklorür absorbansı ölçmek için 272 nm ve 257 nm seçildi. İkinci yöntem, 272 nm ve 265.50 nm' de (ISO-emme noktası olarak) absorbans ölçümüne dayalı bir Q-değeri analizidir. Guaifenesin ve Psödoefedrin Hidroklorür, maksimum dalga boyu olarak 272nm ve 257 nm 'de ve 265,50 nm isoabsorptive noktada, 30-150 µg/mL ve 300-1500 µg/mL konsantrasyon aralığında doğrusallık gösterdi. Geri kazanım aralığı, simültane denklem metodu halinde, Guaifenesin için >98.50% ve Psödoefedrin Hidroklorür için > 98.90%, ve önerilen yöntemin doğruluğunu teyit etmek için, Q-analiz metodu halinde, Guaifenesin için > 98,24% ve Psödoefedrin Hidroklorür için > 98.09% , saptanmaktadır. (Rahul ve ark., 2011).

Riahi ve ark., 2011 yapılan bir çalışmada, farklı kemometrik yöntemlerin doğruluğunu, UV spektrumları ve birinci dereceden türev spektrumları üzerinde uygulandığında, karşılaştırdılar. Ana bileşen regresyon (PCR) ve bir bağımlı değişken ile kısmi en küçük kareler (PLS1) ve iki bağımlı değişken (PLS2), Psödoefedrin (PDP) ve Guaifenesin (GFN) içeren bir farmasötik formülün spektral veriler üzerinde uygulanmıştır. Burada örtüşen spektrumların derivate derecesi, herhangi bir kimyasal ön işlem kullanmadan, iki bileşenli karışımların analizi için çok değişkenli yöntemler ile değerlendirilmiştir. Kemometri modelleri validasyon veri setleri üzerinde test edilmiştir ve son olarak, ilaç analizi için uygulanmıştır. Gerçek örneklerin analizinde, önemli avantajları, türev spektrumların kalibrasyon modelleri kullanıldığı zaman bulundular. Önerilen yöntem, ön ayırılma işlemlerine ihtiyacı olmayan basit ve hızlı bir yöntemdir ve özellikle kalite kontrol laboratuvarlarında, bu bileşiklerin analizi için kolay bir şekilde kullanılabilir ( Riahi ve ark., 2011).

Vignaduzzo ve ark., 2012 bromheksin, Klorfeniramin, Parasetamol ve Psödoefedrin, eş zamanlı tayini için, tablet ve ya şuruplarda basit ve etkili bir sıvı kromatografik yöntem geliştirdiler. Analitlerin ayrılması, 10 dakika içinde, ( PH=4 ) Trietilamin-Fosforik Asit tampon ve Metanolu, izokratik mobil faz olarak kullanıldığında, 1.0 mL min<sup>-1</sup> akış hızı ile siyano kolonunda (5 µm parçacık büyüklüğü) yapıldı. Analitler 215 nm'de tespit edilmiştir. İstatistiksel deneysel tasarımlar ve grafik gösterimi, uygun dalgaboyu seçmek için ve mobil faz bileşimi optimize etmek ve yöntem sağlamlığı değerlendirilmesi için kullanıldı. Kalibrasyon için doğrusallık (R> 0.99, n = 21), ilgili aralıklarda (formülasyonlarda, analitlerin beklenen konsantrasyonlarının 130% kadar), yöntem doğruluğu (<% 2.0), tekrarlanabilirlik (RSD <% 2.0) ve orta hassasiyet doğrulanmıştır. Ek olarak, özgüllük ( fotodiyot dedektör ile pik saflığı > 0,9997) ve yöntem sağlamlığı değerlendirilmiştir ve sistem uygunluk parametreleri belirlenmiştir. Değerlendirilen metot, çeşitli ticari tabletin rutin analizleri ve tatmin edici analit geri kazanımı ve RSD (bağıl standart sapma) değerleri gösteren soğuk algınlığa karşı şurup farmasötik preparatlar için kullanılmıştır (Vignaduzzo ve ark., 2012).

Rostami ve ark., 2015 bir çalışmada, manyetik nanopartikül Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> üzerinde immobilize olan Psödoefedrin vanadyum kompleksi [VO (Psödoefedrin ile birlikte) @MNPs], elemental analiz teknikleri ve UV-vis, SEM, XRD, TGA, EDX, FT-IR, AGFM ile hazırlanmış ve tanımlanmışlardır. VO (psödoefedrin) @MNPs, oda sıcaklığında, çözücü içermeyen koşullar altında, 8-25% enantiyomerik aşırılıkları ile iyi verimlerde, Karbonil bileşiklerinin cyanosilylationını katalize etmek için bulundu. Katalizör aktivitesi ve enantioselektiflikte az kayıp ile 15 kat kadar geri kazanılmıştır (Rostami ve ark., 2015).

Hadad ve ark. , 2009 parasetamol, Dantrolen, Setirizin ve Psödoefedrin, dörtlü karışımın tayini için bir stabilite gösteren ters fazlı yüksek-performanslı sıvı kromatografisi geliştirdiler. Yöntem, kalite kontrol (QC) laboratuvarlarında, dört analitin stabilite çalışmaları amacıyla değerlendirilmiştir. Yöntem, stabilite özelliği, bu dört analitin tüm degradan piklerden yeterli ayrılması ile gösterilmiştir. Mobil faz sistemi, (A) 50 mmol L<sup>-1</sup>, sodyum dihidrojen fosfat, 5 mmol, L-1 heptan sülfonik asit sodyum tuzu, pH 4.2 ve (B) Asetonitril 'dan oluşmuştur ve bu yöntemde, ters fazlı HS C<sub>18</sub> analitik kolon (250 mm x 4.6 mm iç çaplı, 5 µm partikül boyutu) kullanılmıştır. Kantitasyon, pik alanına dayanılarak, 214 nm'de UV tespiti ile elde edilmiştir ve başarılı bir şekilde farmasötik formülasyonlar ve iki-bileşenli kombinasyonları içeren laboratuvar hazırlanmış karışımlar analizi için uygulanmıştır (Hadad ve ark. , 2009).

Fang Feng ve ark. , 2016 bir hassas, basit ve son derece seçici sıvı kromatografisi / tandem kütle spektrometrisi (LC / MS / MS) yöntem, insan plazmasında, Psödoefedrin ve Setirizin belirlenmesi için geliştirdiler ve değerlendirdiler. Bu yöntemde, prosedür olarak sadece tek adımlı bir protein çökmesi olduğuna göre, minimum örnek hazırlama en önemli avantaj sayılır. İki ilaç , bir C<sub>8</sub> kolonu üzerinde ayrılmıştır ve pozitif elektrosprey iyonizasyon (ESI) kullanılarak (LC / MS / MS) ile analiz edilmiştir. Bu yöntem için tutunma zamanı 12.0 dak idi ve psödoefedrin için 1.0–800 ng/ml aralığında bir kalibrasyon eğrisi ve setirizin için 1.0–400 ng/ml aralıkta kalibrasyon eğrisi değerlendirilmiştir. İki ilaç miktarının alt sınırı, sırasıyla, 1.0 ng / ml olmuştur. Hassasiyet % 9,7 az idi. Burada tarif edilen yöntem , Psödoefedrin Hidroklorür tablet ve Setirizin Dihidrokloridin farklı dozları sağlıklı Çinli gönüllülerde, Farmakokinetik karakterleri ortaya çıkarmak için kullanılmıştır ve standart bir yemek etkisi, kombinasyon tabletin emilim miktarı ve oranı üzerinde değerlendirilmiştir (Fang Feng ve ark. , 2016) .

Andrighetto ve ark., 2014 yapay ve gerçek ayrımları arasındaki mükemmel uyumluluk görüldüğünde, in-siliko iki boyutlu yüksek performanslı sıvı kromatografisi (2D-HPLC), metamfetamin örneklerin ayrımları için tarif ettiler. Model bileşiklerinin hedeflenen analiz için, önemli ölçüde azaltılmış yöntem geliştirme süresi ile tamamlanmıştır. Bu ayırma işlemi, mobil faz olarak Metanol ve asetonitril kullanıldığında ve C<sub>18</sub> kolonda yapılmıştır. Bu yöntem geliştirme protokolü, kimyasal olarak benzer kimyasal bileşiklerin ayrılmasını optimize ederken, optimum deneysel şartları tanımlamak için enjekte hataları ortadan kaldırma nedeniyle çok önemlidir. Sadece dört enjeksiyonundan sonra, 2D-HPLC boyutları için gradyan profili, 9.7 dakika içinde Diastereomer bazal çözünürlük (Efedrin ve Psödoefedrin) sağlanması simülasyonları yoluyla optimize edilebilir. Diastereomerin türüne bağlı olarak, potansiyel sentetik yolu kategorize edilebilir (Andrighetto ve ark., 2014).

Xiaochen Gu ve ark., 2009 H<sub>1</sub>-Antihistaminik akrivastin ve dekonjestan Psödoefedrin Hidroklorür tayini için yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) kullandılar. Her iki bileşik 214 nm dalga boyunda saptandı. Mobil faz etkisi ve dalga boyu belirlenmesi değerlendirilip, optimize edilmiştir. Bu yöntem, ticari preparat Semprex®-D kapsüllerin çeşitli örneklerinin değerlendirmesi için kullanıldı. Bu yöntem, rutin kalite kontrol analizleri için doğru, hızlı ve seçici bulunmuştur (Xiaochen Gu ve ark., 2009).

Wang ve ark., 2005 yapılan bir çalışmada, 5-(4,6-dichloro-s-triazin-2-ylamino) floresan ile derive edildikten sonra, Efedrin (E) ve Psödoefedrinin (PE) analizi için lazer kaynaklı floresan dedektör ile bir misel elektrokinetik kromatografi yöntemi geliştirdiler. Optimum türetme şartları, 0.05 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> / NaHCO<sub>3</sub> (pH 9.5), reaksiyon süresi 45 ° C'de 30 dakika, E ve PE göre, DTAF mol oranı, 20: 1 arasındadır. Temel ayırım, 8 dakikada ve tampon olarak, 20 mM borat + 20 mM SDS +% 15 Asetonitril (hac / hac) (pH =9.8) ve 20 kV uygulanan voltaj ile yapılmıştır. Pik yüksekliği ve analitlerin konsantrasyon (2.5–50 ng mL<sup>-1</sup>) arasındaki doğrusallık ilişkiler, (Korelasyon katsayıları: E için 0, 9906 ve PE için 0, 9941) elde edilmiştir. Sırasıyla, E ve PE için tespit limitleri,  $3.85 \times 10^{-4}$  ve  $1.41 \times 10^{-4}$  ng mL<sup>-1</sup> saptanmıştır. Önerilen yöntem, en az 10<sup>3</sup> kat saptama sınırı açısından, diğer kromatografik alternatifleri aşmıştır. Yöntem, Efedra bitkilerinde, iki Alkaloid analizi için uygulanmıştır (Wang ve ark., 2005).

Sun ve ark., 2005 psödoefedrin Sülfat (PES) ve Loratadin (LOR) ikili karışım içeren bir farmasötik formülasyonda (tablet) , yüksek performanslı sıvı kromatografisi-elektrosprey iyonizasyon kütle spektrometri yöntemini (LC-MS), insan plazmasında, LOR ve PES' nin aynı anda tespiti için geliştirdiler. Sırasıyla, LOR ve PES için Diazepam (DP) ve Phenylpropanolamine ( PPA) , iç standart olarak kullanılmıştır. Analitler, sıvı / sıvı ekstraksiyon etil eter kullanılarak, insan plazmasının alkali halinden ekstere edilmiştirler. Kromatografik ayırma, ODS kolon üzerinde, 0.2 ml/min akış hızı ile gerçekleştirilmiştir. Toplam kromatografik çalışma süresi 10.5 min, tutunma zamanı, sırasıyla LOR ve DP için, 7.1 min ve 6.2 min ve PES ve PPA için 2.2 min saptanmıştır. LOR and PES için, LOQ, 10 pg/ml ve 50 pg/ml değerlendirilmiştir. Bu yöntem kendi amacı için hasas ve doğrudur (Sun ve ark., 2005).

Aşçi ve ark., 2010 şurup hazırlanmasında ibuprofen, psödoefedrin hidroklorür, klorfeniramin maleat ve nipajenin RP-HPLC kromatografik koşullarını optimize etmek için  $2^{5-1}$  fraksiyonel faktöriyel tasarım uyguladılar. Bileşenlerin belirlenmesini etkileyen tüm faktörler ve bunların etkileşimlerini araştırmışlardır. Üç basamaklı gradyan profili için pH, akış hızı ve solvent oranları iki seviye içerisinde araştırılacak faktörler olarak kabul edilmiştir. Çözüm, analitik tepki olarak seçilmiştir. Kalitatif sınırı (10 s / m) sırasıyla ibuprofen, psödoefedrin hidroklorür, klorfeniramin maleat ve nipajen için 0.9, 1.0, 0.4 ve 0.12 µg / mL olarak bulunmuştu (Aşçi ve ark., 2010) .

Wahba ve ark., 2014 birleşik tabletlerinde askorbik asit, psödoefedrin hidroklorür ve ibuprofen'in aynı anda tespiti için doğru, basit, hassas ve seçici bir misel sıvı kromatografi yöntemi geliştirdiler. Ayırma, ortam sıcaklığında, 260 nm'de UV tespiti ile bir ODS C18 (150 x 4.6 mm id) paslanmaz çelik sütun kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 0.02 M fosforik aside 30 mM sodyum dodesil sülfat,% 8 1-propanol,% 0.3 tri-etilamin'den oluşan ve pH 3'e ayarlanan bir mobil faz, 1 mL / dak'lık bir akış hızında kullanılmıştır. Kalibrasyon eğrileri sırasıyla askorbik asit, psödoefedrin hidroklorür ve ibuprofen için 1.5-18.0, 1.0-10.0 ve 3.0-30.0 µg / mL konsantrasyon aralıkları boyunca düz çizgiseldi. Anılan ilaçların saptama limitleri (LOD) sırasıyla 1.0, 0.05 ve 2.2 µg / mL idi ve miktar sınırları (LOQ) sırasıyla 1.4, 1.2 ve 3.2 µg / mL idi. Elde edilen sonuçlar, karşılaştırma yöntemiyle elde edilenlerle iyi uyum içindedir. Ayrıca, içerik tayin için ilgili yöntem uygulanmıştır (Wahba ve ark., 2014).

Aşçı ve ark., 2011 tabletlerde parasetamol (PAR), psödoefedrin hidroklorür (PSE) ve dekstrometorfan hidrobromidin (DEX) eşzamanlı olarak bulunması için, diyot dizilimi algılama (DAD) ile yüksek performanslı katı madde kromatografisini (HPLC) kullanan yeni bir yöntem geliştirdiler ve doğruladılar. Bu bileşiklerin spektrokromatogramları, ciddi örtüşen spektrokromatogram verdi. Bu, tek değişkenli kalibrasyonun kullanılmasını imkansız hale getirdi. Bu nedenle, HPLC-DAD tarafından kaydedilen üç yönlü verileri analiz etmek için PLS ve PCR kullanılmıştır. Bu çok değişkenli kalibrasyon yöntemleri, PAR, PSE ve DEX'in sentetik karışımlarını analiz ederek test etti. Geri kazanımlar sırasıyla% 96.1-100.2 ve% 97.1-100.4 arasında değişirken, sırasıyla PLS ve PCR için% 0.5-6.7 ve% 0.8-7.0 aralığında tahminin göreceli hatası (REP) elde etti. Bu yöntemler, üç ilacı içeren gerçek örneklerle de uygulanmış ve sırasıyla PLS ve PCR için% 99.0-106.0 ve% 99.6-106.3 aralığında geri kazanımlar elde edilmiştir. PLS ve PCR ile elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak klasik HPLC yöntemiyle elde edilen sonuçlarla karşılaştırılmıştır. Çok değişkenli kalibrasyon yöntemleri ve klasik yöntem ile elde edilen sonuçların ortalamaları ve ortalamaları arasında anlamlı fark bulunmadığı bulunmuştur. HPLC-çok değişkenli kalibrasyon yöntemleri, klasik HPLC yöntemine göre birkaç avantaja sahiptir. Bu avantajlar, basit bir mobil fazın kullanılması ve analiz süresinin kısaltılmasıdır. Ayrıca, bu yöntemler iç standart ve gradient elüsyon gerektirmez (Aşçı ve ark., 2011).

Likar ve ark., 2005 yapılan bir çalışmada, derhal salım için 10 mg setirizin dihidroklorür (setirizin HC1) ve uzun süreli salınım için 240 mg psödoefedrin hidroklorür (psödoefedrin HC1) içeren günde bir kez kombine edilen tablet için bir çözünme testi yürürlüğe girdiler ve mevcut ICH ve FDA yönergelerine göre doğruladılar. Setirizin HC1 tabletin dış tabakasında bulunurken selüloz asetat ve polietilen glikolün yarı geçirgen bir membranı, psödoefedrin HC1'nin tablet çekirdekten salınım hızını kontrol eder. 50 dev / dak'da dönen kürekler, çözünme ortamı olarak 1000 ml havasız su ve kantitatif olarak ters faz HPLC'nin kullanıldığı USP aparatı 2'yi kullanan çözünme metodunun sağlam, ayırtedici ve devredilebilir olduğu gösterildi. Bu test koşulları, tabletin setirizin HC1 bölümünün fizyolojik olarak ilgili pH 1.1-7.5 aralığında sulu ortamda hızla çözündüğünü ve psödoefedrin HC1'in uzun süreli salım profilinin çözünme koşullarından bağımsız olduğunu gösterdikten sonra seçildi. (Yani, aparat, pH ve ajitasyon) (Likar ve ark., 2005).

Culzoni ve ark., 2007 farmasötik numunelerde, diyagram dizisi algılama özelliğine sahip bir pH gradyan akış enjeksiyon analiz (FIA) sistemi ile üretilen doğrusal olmayan ikinci dereceden veriler kullanılarak Loratadin (LOR) ve psödoefedrin sülfat (PES) tespit ettiler. Her iki analitin tayini, her bir ilaç türünün asit-baz ve spektral özellikleri arasındaki farklara dayanarak gerçekleştirildi. Kalitatif ve kantitatif ölçen araçlar kullanarak doğrusal olmayanlıklar tespit edildi. Doğrusal olmayanlığın bir sonucu olarak, son zamanlarda bildirilen bir algoritma, artık bilinearizasyon (ANN / RBL) izleyen yapay sinir ağlarının daha tatmin edici sonuçlar verdiğini gösterdi. Beklenmedik bileşenleri (farmasötik preparatlarda bulunan olağan ekşiyanlar) içeren bir doğrulama setini analiz ederken,% 99.7 (LOR) ve% 95.6 (PES) iyileşmeler elde edildi. Metodun dört replikasyonda uygulanmasıyla elde edilen ortalama değer, HPLC'ye dayalı bir referans yöntemle elde edilen değerle karşılaştırıldı (fark anlamlı değil;  $p > 0.05$ ) (Culzoni ve ark., 2007).

Njaria ve ark., 2016 Kenya'da yaygın olarak satılan öksürük-soğuk şuruplarda bromheksin, guaifenezin, ambroksol, salbutamol / terbutalin, psödoefedrin, triprolidin ve klorfeniramin maleat'ın aynı anda tespiti için basit, hızlı, izokratik ve çok yönlü bir sıvı kromatografi yöntemi geliştirilmişlerdir. Ayrılma, 40 ° C'de muhafaza edilen bir Gemini® NX C18 kolonu (250 x 4.6 mm, 5 µm) ve bir asetronitril-0.25 M sodyum heksan-sülfonat-0.2 M amonyum asetat ve pH 3.0-sudan (35: 4:10:51,% v / v / v / v) 1.0 mL dk-1'de teslim edildi. Taşıyıcılar 254 nm'de UV deteksiyonuyla izlendi. Doğrulama sırasında yöntem doğrusallık, hassaslık, hassaslık, doğruluk ve sağlamlık için Uluslararası Uyumlaştırma Komitesi'nin kabul kriterlerini karşıladı. Geliştirilen sıvı kromatografik yöntem, Kenya Nairobi Şehri İlçesinden elde edilen dokuz ticari numunenin analizinde uygulanmıştır. Ekstraksiyon prosedürleri örneklerin analizi sırasında uygulanmadı, böylece analiz süresini önemli ölçüde kısalttı (Njaria ve ark., 2016).

Hadad ve ark., 2011 farmasötik tablet formülasyonlarında kafein, parasetamol, psödoefedrin, aspirin, dekstrometorfan ve klorfeniramin'in aynı anda tespiti için yeni, basit, hızlı ve duyarlı bir sıvı kromatografik yöntem geliştirildi ve konvansiyonel C18 ve monolitik silis C18 kolonlarında gerçekleştirdiler. Kromatografik ayırıştırma, 50: 50 hacim / hacim, 40: 50'lik bir oranda 10 mM NaH<sub>2</sub>P0<sub>4</sub>, 3 mM heptan sülfonik asit sodyum tuzu,% 0.1 trietilamin, pH 2.5 (hidroklorik asit ile ayarlanmış) içeren bir tampon ve bir metanol karışımı kullanılarak gerçekleştirildi. Sırasıyla konvansiyonel C18 ve monolitik silis C18 kolonları için hacimce 60 µg / v'dir. Kantitatif pik alanına dayalı olarak 214 nm'de UV algılamasıyla elde edilmiştir. Niceleme pik alanına dayalı olarak 214 nm'de UV algılamasıyla elde edilmiştir. Önerilen yöntem onaylanmış ve bu çok bileşenli kombinasyonları içeren farmasötik formülasyonların ve laboratuarda hazırlanan karışımların analizi için başarıyla uygulanmıştır (Hadad ve ark., 2011).

Jing ve ark., 2012 ephedra otundaki efedrin ve psödoefedrin tayini için bir kılcal elektroforez / ışık yayan diyot (LED) indüklenen floresan dedektör sistemi tasarlanmış ve yapmışlardır. Efedrin ve psödoefedrin'in spektral ve kimyasal özelliklerine göre cihazın ana parçaları aşağıdaki gibi seçildi: ışık kaynağı olarak mavi bir LED, emisyon ışığı için BP 470 filtre ve BP 530 filtre dahil olmak üzere iki bant geçiren filtre kullanıldı ve flüoresanı kullandı ve fotomültiför tüpü (PMT) algılama elemanı olarak kullanıldı. Tampon konsantrasyonu ve ayırma voltajı optimize edildi. Etiket probu olarak floresein izotiyosiyanat (FITC) seçildi ve çalışma tamponu olarak 10 mmol / L Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> (pH 9.3) + 16 mmol / L SDS kullanıldı. Optimum koşullar altında, 12 kV ayırma voltajı altında ephedra otundaki iki bileşiğin temel ayrımı gerçekleştirildi. Yöntem, korelasyon katsayısı 0.99'dan fazla olan iki bileşik için 0.25-10 mg / L konsantrasyon aralığında iyi doğrusallık gösterdi. Efedrin ve psödoefedrin için saptama limitleri (S / N = 3) sırasıyla 0.38 µg / L ve 0.29 µg / L idi. Efedrin ve psödoefedrin için intra-day RSD'ler sırasıyla% 2.0 ve% 2.2 ve RSD süreleri sırasıyla% 5.4 ve% 5.1 idi. Yöntem, ephedralı bitkilerin analizinde ephedrin için% 94 ve psödoefedrin için% 107'lik geri kazanımlar ile başarıyla kullanılmıştır (Jing ve ark., 2012).

## 1.5. Kromatografik Yöntemler ve Teorik Esasları

Kromatografi, ilk kez 1903 yılında Rus Botanikçi Michael Tsvett tarafından bitki pigmentlerini ayırma amacıyla kullanılmıştır. Bu deney de cam kolon içerisine doldurulan  $\text{CaCO}_3$  içersinden, bitkilerden izole ettiği bitki pigment ekstraktlarını geçirdiğinde, klorofil ve ksantofil gibi birçok bitki pigmentine ait renk ayrımlarını gözlemlemiştir. Tsvett, buna dayanarak yöntemin renk ayırımının ölçülmesi anlamına gelen Yunanca da "chroma" renk ve yazma anlamına gelen "graphein" birleşimi olan kromatografi adını vermiştir (J.F.K.Huber ve ark,1971) .

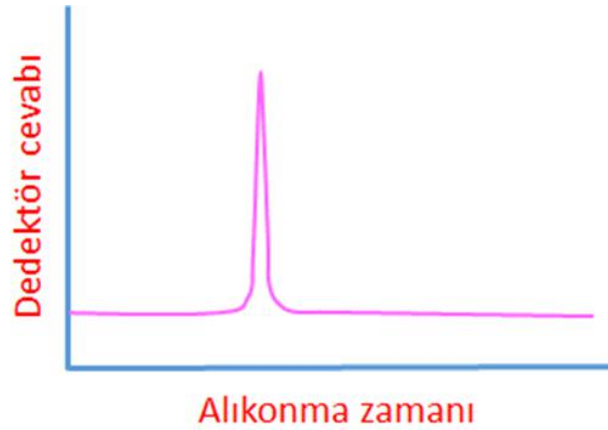
Kromatografi, analizi yapılan bir numunedeki bileşiklerin ayırımına dayanan bir yöntemdir. Kromatografik yöntemler ile kalitatif ve kantitatif analizler gerçekleştirilebilir. Bu yöntemde ayırımın esası, analiz edilen numune de bulunan bileşiklerin sabit faza (stationary phase) ve hareketli faza ( mobil phase) olan kimyasal ve fiziksel etkilerinin farklılığına dayanır (FrançoiseBressoll ve ark,1969).

Hareketli faz, numunedeki bileşikleri sabit faz (kolon) boyunca sürükleyen değişik fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip çözeltilerdir. Kromatografik analizlerde ve ayırım işleminde, özellikle sıvı kromatografisinde kullanılacak hareketli fazın seçiminde, analizi yapılan numunedeki maddelerin kimyasal ve fiziksel yapısı, kullanılacak sabit faz ve dedektör önemlidir ( RogerCauson , 1997).

Sabit faz (stationary phase), hareketli faz içerisinde sürüklenerek gelen numune içerisindeki bileşiklerin fiziksel ve kimyasal etkileşime girdikleri ve bu nedenle kısmen alıkonuldukları faz denir. Kromatografik metodolojiye göre farklı boyutlarda olan materyallerden imal edilen ve kromatografik kolon adı verilen sabit fazlar ayırma işlemlerinde kullanılmaktadır.

Numune içerisindeki bileşiklerin, hareketli faz içerisinde yer alan bileşikler ve sabit faz ait dolgu maddesiyle etkileşimlerinin farklılığı nedeniyle kolon içerisinde farklı sürelerde alıkonulur ve tutulurlar. Bu nedenle bileşikler birbirinden ayrılmış olarak kolonu farklı sürelerde terk ederler.

Bu kolonu farklı zamanlar da terk eden bileşikler detektöre ulaştığında alıkonma zamanına (x-eksenine) karşı dedektör cevabına (y-eksenine) çizilerek kromatogram adı verilen grafik elde edilir (Şekil 1.7).



**Şekil 1.7.** Bir kromatogram örneği

## 1.6. Kromatografi 'nin Sınıflandırılması

Kromatografik yöntemler: 1- Ayrılma mekanizmalarına göre, 2- Uygulama biçimine göre ve 3- Faz tiplerine göre olmak üzere sınıflandırılmaktadır.

### 1.6.1. Ayrılma Mekanizmalarına Göre:

#### (A) Adsorpsiyon kromatografisi:

Adsorpsiyon, bir karışımda bulunan sıvı veya gaz halindeki maddelerin katı faz üzerine tutunmasıdır. Adsorpsiyon kromatografisi ise örnek bileşenlerinin dolgu maddesinin yüzeyinde farklı olarak tutunmaları sonucu meydana gelen bir ayırma işlemidir. Adsorpsiyon kromatografisinde; maddeler katı olan sabit faz ile sıvı veya gaz olan hareketli faz arasında etkileşir ( Howard A.Chase ve ark, 1994) .

Faz tiplerine göre adsorpsiyon kromatografisi:

- 1) sıvı-katı
- 2) gaz-katık

Sabit faz: Durgun veya hareketsiz fazdır. Hareketli faz : Sabit faz üzerinde hareket ederek numune bileşenlerinin ayrılmasını sağlayan fazdır

Sabit faz özellikleri:

- Ayrılması gereken maddeleri parçalamamalı
- Ayrılması beklenen maddeler ile kimyasal reaksiyon vermemeli
- Adsorpsiyon kapasitesi yüksek olmalı
- Adsorpladıkları maddeleri kolaylıkla geri vermeli

## **B) Partisyon (Dağılma) kromatografisi:**

Maddeler sıvı olan sabit faz ile sıvı veya gaz olan hareketli faz arasında dağılır. Birbiriyle karışmayan iki sıvıdan, yani iki fazdan oluşan bir faz sistemi içine konulan madde bu sıvılardaki çözünürlüğüne bağlı olarak iki faz arasında dağılır ve dengeye ulaşır. Böyle bir sistemde maddelerin dağılması sabit olup dağılma katsayısı ile ifade edilir ve  $K_d$  ile gösterilir. Böylece  $K_c$  değerleri birbirinden farklı olan maddeler kromatografik sistem içersinde farklı hızlarda ilerleyerek birbirlerinden ayrılırlar. Bölüşüm oranı veya bölüşüm katsayısı olarak da adlandırılır ve  $K_c$  ile sembolize edilir.

$$K_c = \frac{C_s}{C_M} \quad (1)$$

Burada  $C_s$  örneğini sabit fazdaki,  $C_M$  ise mobil fazdaki molar konsantrasyonunu simgelemektedir. İdealde,  $K$  geniş bir örnek konsantrasyon aralığında sabittir. Bu nedenle  $C_s$  ve  $C_M$  doğru orantılıdır ve yukarıdaki eşitliğin geçerli olduğu kromatografiye düzlemsel kromatografi denir. Doğrusal kromatografinin, simetrik Gauss tipi pikler vermesi ve alıkonma zamanlarının enjekte edilen analit miktarından bağımsız olması gibi özellikleri vardır.

Faz tiplerine göre partisyon kromatografisi:

- 1) sıvı – sıvı
- 2) sıvı - gaz

### C) İyon değiştirme kromatografisi

Çözeltideki iyonların, ters yüklü destek katısı iyonlarına olan ilgisine dayalı bir ayırmadır. Durgun faz zayıf ya da kuvvetli, katyon ya da anyon değiştirici bir reçinedir. Reçinenin sabit yükü (-) ise buna ‘katyon değiştirici reçine’, (+) ise de ‘anyon değiştirici reçine’ adı verilir. Analiz sırasında reçinenin tamamen iyonlaşmış durumda olması gerekmektedir. Hareketli faz genellikle tamponlanmış: istenen iyonların oluşmasına neden olan belli bir pH değerinde sulu çözeltilidir ve yükü katının sabit yükünün tersi olan ‘zıt iyonu’ içerir. Yükü, hareketli fazın zıt iyonları ile aynı olan iyonik yapıdaki örnek bileşenleri katıya bağlanmak için zıt iyonlarla yarışır. Zıt iyonu yerinden ederek katıya kuvvetle bağlanan –uygun yükte- bileşenler kolonda uzun süre kalırken, katıya zayıfça bağlanan, uygun yükte olmayan veya yüksüz olan bileşenler kolonu çabuk terk eder. İyon değiştirme kromatografisi, kullanılan iyon değiştiricinin anyon veya katyon aktarmasına göre sırasıyla anyon değiştirme kromatografisi veya katyon değiştirme kromatografisi olarak adlandırılır (Alan Williams ve ark, 2001).

İyon değiştirme kromatografisi, kullanılan iyon değiştiricinin anyon veya katyon aktarmasına göre sırasıyla anyon değiştirme kromatografisi veya katyon değiştirme kromatografisi olarak adlandırılır. Cl ve I karışımının nitrat bağlanmış anyon değiştirici  $\text{RNO}_3$  ile bileşenlerine ayrılmasında geçerli dengeler aşağıdaki biçimdedir:



#### **D) Jel filtrasyon (Moleküler eleme) kromatografisi:**

Karışımındaki moleküllerin moleköl büyüklüklerinde göre ayrılması esasına analizlenecek maddelere ait moleküller boyutlarına göre ayrılmaktadır. Bu işlem için çok değişik por çapları içeren dolgu maddesiyle doldurulmuş kolonlar kullanılmaktadır. Böylece değişik çaplardaki porlar birer elek gibi davranarak maddeleri boyut (çaplarına) göre alıkoymaktadır ( Lewis M.Siege ve ark,1966).

#### **E) İyon Çifti Kromatografisi:**

Bu teknik, özellikle iyonlaşabilen asidik veya bazik maddelerin ayrılmasında kullanılır. Hareketli faza ilave edilen iyon çifti reaktif sabit faz tarafından adsorplanır ve iyonize olmuş maddeler bu iyon çiftleri ile iyonik etkileşime girerek birbirinden ayrılır.

#### **F) Afinite kromatografisi**

Afinite kromatografisi, antijen ve antikor, enzim ve substrat veya reseptör ve ligand arasındaki gibi oldukça spesifik bir etkileşime dayalı biyokimyasal karışımların ayrılması için bir yöntemdir. Bir karışımındaki biyolojik moleküllerin moleküler özelliklerden istifade ederek saflaştırılması için kullanılan bir tür kromatografik laboratuvar tekniğidir. Enzimler ve diğer proteinler gibi biyolojik makromoleküller, birkaç farklı bağ ve etkileşim vasıtasıyla yüksek özgünlükle diğer moleküllerle etkileşime girer.

Hidrojen bağlanması, iyonik etkileşim, disülfür köprüleri, hidrofobik etkileşim ve daha fazlasını içeren bu tür etkileşimler. Afinite kromatografisinin yüksek seçiciliği, arzu edilen molekülün durağan faz ile etkileşime girmesine ve kolonda sıkıştınlarak etkileşime girmeyecek ve ilk önce elüe edilecek istenmeyen materyalden ayrılmasıyla meydana gelir.

### **1.6.2. Faz Tiplerine Göre:**

#### **1.6.2.1. Sıvı kromatografisi**

- Sıvı-Katı kromatografisi
- Sıvı-Sıvı kromatografisi

#### **1.6.2.2. Gaz kromatografisi**

- Gaz-Katı kromatografisi
- Gaz-Sıvı kromatografisi

### **1.6.3. Uygulama Biçimine Göre:**

- Kağıt kromatografisi
- İnce tabaka kromatografisi (TLC)
- Kolon kromatografisi
- Gaz kromatografisi (GC)

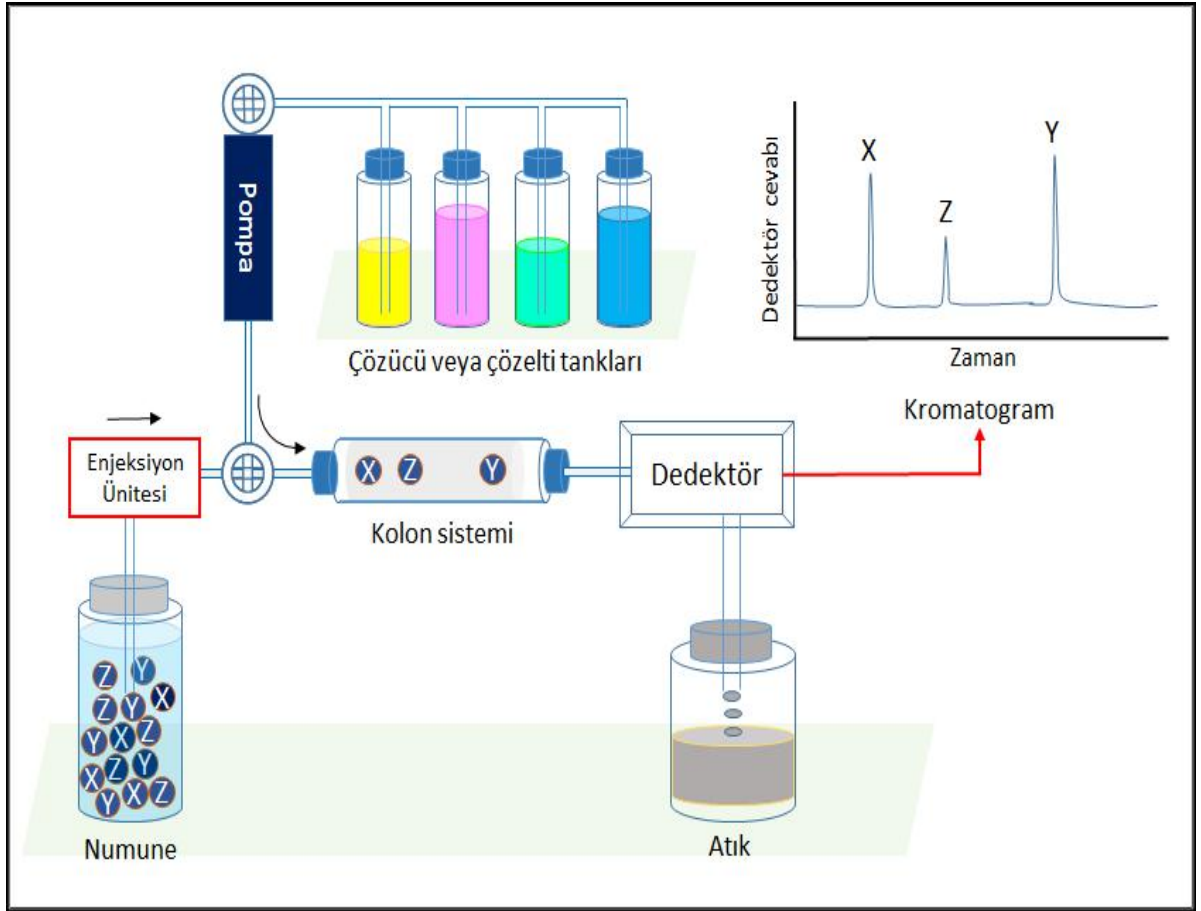


## 1.7. Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC)

HPLC tekniği son teknolojik ve mikro işlemci gelişmelerin sayesinde daha yüksek basınç ve yeni kolon sistemleri ile UPLC şeklinde kullanılmaktadır. Kromatografik çalışmalarda Aşırı Basınçlı Sıvı Kromatografisi (Ultra High-Performance Liquid Chromatography-UPLC) UPLC’de fizikokimyasal özelliklerine göre ayrılan moleküller; UV “photo diode array” (PDA) ve floresans dedektör sistemi kullanılarak analiz edilir.

UPLC yöntemi çok çeşitli alanlarda uygulanabilir. Bunlardan en yaygın olanları; farmakokinetik çalışmalar, proteomiks/metabolomiks ve ilaç geliştirme çalışmalarıdır. UPLC yaygın olarak farmasötiklerin farmakokinetik çalışmalarında kullanılır ve bu bakımdan biyolojik analizler açısından çok sıklıkla kullanılır. UPLC bir ayırma yöntemidir. Bu yöntem sayesinde kompleks bir karışımdaki bileşenleri birbirinden ayırır. Şöyle ki, her kompleks bir karışım içindeki kimyasal ve fiziksel özellikleri farklı olan bileşiklerin hareketli ve sabit faz ile etkileşimleri birbirinden farklı olduğu için kromatografik ayırım sağlanır. UPLC cihaz şeması ve yöntem ile bir analiz işlemi Şekil 1.8.’ de gösterilmiştir. Bu karışımda x , y ve z maddesi X çözücüsünde çözünmüştür. Örnek numune UPLC cihazına enjekte edildiğinde, pompa vasıtasıyla hareketli faz kolon boyunca taşınır ve bölmelere ayrılır. Hareketli faz örnekteki bileşenleri kolon boyunca hareket ettirir. Numunedeki x , y ve z bileşikleri sütunun içinden geçerek hareket eder.

Kolon içerisinde y ve z sabit fazla x den daha fazla etkileşim halindedir. Böylece y ve z kolonda x den daha uzun süre tutulur. Sonuç itibarıyla x, kolondan y ve z' den önce ortaya çıkar ve x' nın tutulma zamanı y ve z' den daha kısadır. Kolondan çıkan maddeler detektörler (algılayıcılar) vasıtasıyla kaydediciye kromatogram olarak aktarılırlar (Şekil 1.8.). Detektör tepkilerinin zamana göre kaydı sonucu bir kromatogram oluşur.



Şekil 1.8. UPLC sistemi ve cihaz şeması

### 1.8. Cihaz şeması:

- 1- Pompa
- 2- Otomatik enjeksiyon sistemi
- 2- Kolon
- 4- Dedektör
- 5- Kadedici şeklinde özetlenebilir.

Analiz süresince kullanılan mobil fazın içeriğinde gerçekleşen değişim ve mobil fazı oluşturan çözügenlerin karıştırılma prensibine göre HPLC sistem türleri genel olarak 3 farklı kategoride gruplandırılmaktadır. Bu kategorilerin temel hali olan izokratik sistemde analiz süresince mobil fazın içeriği değişmezken diğer sistemlerde değişim gerçekleşmektedir.

**İzokratik Sistem:** Mobil faz içeriğinin veya oranının analizi süresince değişmediği sisteme izokratik sistem denilir.

**Gradient Sistem:** Mobil faz içeriğinin veya oranının analiz süresince değiştiği sisteme gradient sistem denilir.

## **1.9. Normal faz kromatografi ve Ters faz kromatografi**

### **1.9.1. Normal faz kromatografi**

Sabit faz polar (Silikajel-Polimer ve üzerine bağlanmış  $-\text{CN}$ ,  $-\text{NO}_2$  veya  $\text{NH}_2$  dolgu maddeleri) maddelerden ve mobil faz non-polar yada düşük polariteye sahip ( Etiler, Kloroform, Hekzan vb. çözücüler ve karışımları) maddelerden oluşmaktadır. Düşük polariteye sahip analit kolondan ilk çıkar. Benzer özelliklere sahip maddelerin birbiri içinde dağılma özelliği yüksek olduğu için düşük polariteye sahip analit mobil fazda çok iyi çözünür ve kolondan ilk önce çıkar. Ayrıca yine aynı özellik sebebiyle apolar analit polar sabit fazla az etkileştiğinden dolayı kolonda kısa süre tutunabilir. Alıkonma zamanını kısaltmak için mobil fazın polaritesi azaltılır. Alıkonma zamanını arttırmak için mobil fazın polaritesi artırılır.

### **1.9.2. Ters faz kromatografi:**

Sabit faz apolar ( Silikajel-Polimer ve üzerine bağlanmış  $\text{C}_{18}$ , oktil veya fenil grupları, metil, etil ve  $-\text{NH}_2$  gruplu dolgu maddeleri) maddeler ve mobilfaz polar (Metanol, Asetonitril, Tetrahidrofuran gibi güçlü organik çözücülerin zayıf çözücü olan sulu veya tamponlanmış, pH ayarı yapılmış karışımları) maddelerden oluşmaktadır.

Yüksek polariteye sahip analit kolondan ilk çıkar. Benzer özelliklere sahip maddelerin birbiri içinde dağılma özelliği olduğu için yüksek polariteye sahip analit mobil fazda çok iyi çözünür ve kolondan ilk önce çıkar. Ayrıca yine aynı özellik sebebiyle polar analit apolar sabit fazla az etkileştiğinden dolayı kolonda kısa süre tutunabilir. Alıkonma zamanını kısaltmak için mobil fazın polaritesi azaltılır. Alıkonma zamanını arttırmak için mobil fazın polaritesi artırılır. Genel olarak, normal Faz Kromatografide, düşük polariteye sahip mobil fazda alıkonma zamanları uzun, polaritesi arttırılmış mobil fazda alıkonma zamanları kısadır. Ters Faz Kromatografide, yüksek polariteye sahip mobil fazda alıkonma zamanları uzun, polaritesi azaltılmış mobil fazda alıkonma zamanları kısadır.

## 1.10. Dedektör

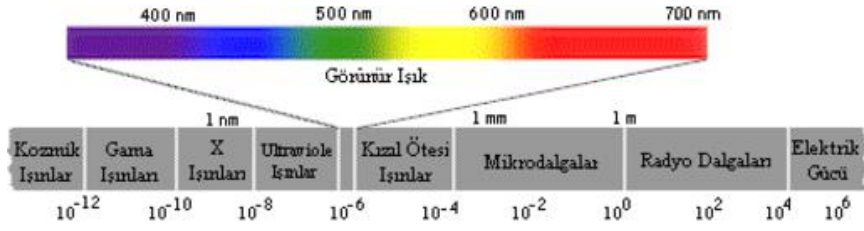
Dedektör HPLC donanımında 5 temel bileşenden birisidir. HPLC cihazında kullanılan dedektör çeşitleri aşağıda açıklanmaktadır.

### 1.10.1. UV/Görünür Bölge (UV/Vis) Dedektörü

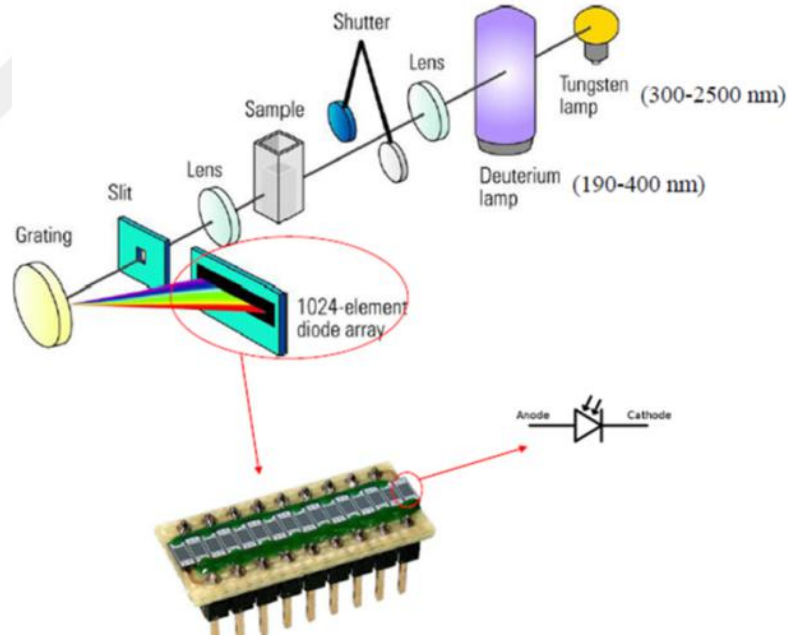
Lambert-Beer kanununa göre zamana karşı absorbans ölçülür. Genellikle tek veya en fazla iki farklı dalga boyunda eş zamanlı ölçüm yapılabilmektedir. Ekonomik olması ve geniş uygulama alanına sahip olması nedeniyle en sık kullanılan dedektördür. Diğer dedektörlerin sahip oldukları uygulanabilirlik kısıtlamaları nedeniyle, uygulanabilen madde grubu sayısı bakımından en iyi performansa sahiptir, ayrıca bakım ve kullanımının kolay olması da tercih nedenlerindendir. UV absorpsiyon dedektörleri 180 ile 350 nm dalgaboyu arasındaki ışığı absorbe eden maddeler için kullanılırlar. Ortaklanmamış elektron çiftine sahip olanlar ve çift bağ yapmış olan maddeler gibi çoğu madde bu dalga boyları arasındaki ışığı absorblarlar. UV dedektör sensörü 1µL ile arasında kapasiteye sahiptir. UV ışığı bu gözden geçip bir foto-elektrik göze düşecek şekilde ayarlanır. Fotoselden çıkan yanıt modifiye bir amplifikatöre ordanda bir kayıt aleti ile data sistemine kaydedilir.

### 1.10.2. Fotodiyod (Photodiode Array-PDA) Dedektörü

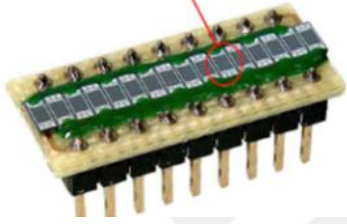
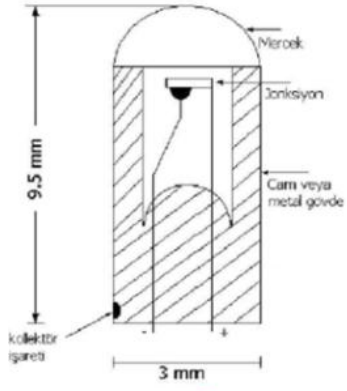
Diyot dedektörleri (ayrıca bir DAD dedektörü veya daha spesifik olarak HPLC PDA dedektörü olarak anılır), moleküler karışımlardan veya kromatografik olarak ayrılmış örneklerden spektral profiller elde etmek için kullanılır. Bir akış hücresi, statik solüsyon veya katı madde içerisindeki molekülleri analiz etmek için kullanılmış olsunlar, ultra hızlı, düşük gürültülü spektrum analizi sağlar; rezolüsyon, belirli bir dalga boyu aralığında dağıtılan diyot sayısına göre değerlendirilir. Bir HPLC foto diyot dizisi dedektörü, molekül ağırlığı, hidrofobiklik (ters faz) veya iyonik yük ile ayırıştırma aygıtlarının eluatlarına birleştirilir ve böylece onları HPLC için önemli hale getirir. Belli HPLC PDA dedektörleri, 190 nm'lik UV'den 1 mikron'a kadar Yakın IR'ye kadar tüm spektrumu idare ederken, diğerleri özellikle çözünürlük ve çoğullama açısından en üst düzeyde esneklik sağlamak için 2048 öğeye kadar UV, görsel veya yakın IR'yi hedef alır. Bu makineler 190 Hz'e kadar yüksek örnekleme hızları sağlar ve gürültüyü sınırlamak için sensörlerin termo elektrik (Peltier) sıcaklık kontrolü sağlar. HPLC foto diyot dizisi dedektörü dedektörleri, bileşen tanımlama ve çoklu spektral görüntüler için spektral kütüphaneler kullanarak spektrumları işleme için programlanabilirlik sunar. Fotodiyot ışığı, çalışma moduna bağlı olarak, akım veya gerilime dönüştürebilen bir foto dedektördür. Yeterli kitenik enerjiye sahip bir ışık fotonu fotodiyot yüzeyine çarptığında bir elektronu uyararak serbest bir elektron ve boş bir orbital oluşumuna neden olmaktadır. Birleşme yüzeyine ışık gelince, bu ışığın verdiği enerji ile kovalan bağların kıran P bölgesi elektronları, gerilim kaynağının pozitif kutbunun çekme etkisi nedeniyle N bölgesine ve oradan da N bölgesi serbest elektronları ile birlikte kaynağa doğru akmaya başlar. Diğer taraftan, kaynağın negatif kutbundan kopan elektronlar, diyodun P bölgesine doğru akar. Böylelikle gelen ışığın şiddetiyle orantılı olarak oluşan akım elektronik çeviricilerde çevrilerek absorbans şiddeti olarak kromatogramda gösterilir( Paul D ve ark, 2000).



Şekil 1.9. Elektromanyetik Spektrum



Şekil 1.10. Fotodiyod (Photodiode Array-PDA) Dedektörü



**Şekil 1.11.** Foto Diyod Çalışma Prensibi

### 1.10.3. Floresans ( Fluorescence) Dedektörü

Floresan dedektörler, muhtemelen mevcut modern HPLC bulucuları arasında en duyarlı olanlardır. Akış hücresinde tek bir analit molekülünün varlığını bile tespit etmek mümkündür. Tipik olarak, flüoresan duyarlılığı güçlü UV emici malzemeler için UV detektöründen 10-1000 kat daha fazladır. Floresan dedektörler diğerleri arasında çok spesifik ve seçici optik dedektörlerdir.

Bu, normalde numunelerde spesifik flüoresan türlerinin ölçülmesinde bir avantaj olarak kullanılır. Spesifik fonksiyonel gruplara sahip olan bileşikler daha kısa dalga boyu enerjisi ile uyarıldığında ve flüoresan denilen yüksek dalga boylu radyasyon yayarlar. Genellikle, emisyon uyarıya dik açı ile ölçülür. Tüm bileşiklerin yaklaşık% 15'i doğal olarak flüoresanı haizdir. Özellikle aromatik bileşenlerde konjuge pi elektronların varlığı en yoğun flüoresan aktivitesini verir. Ayrıca, karbonil gruplarına sahip alifatik ve alisiklik bileşikler ve yüksek oranda eşlenik çift bağ içeren bileşikler flüoresan, ancak genellikle daha düşük bir dereceye kadar. Çoğu ikame edilmemiş aromatik hidrokarbonlar, halka sayısı, yoğunlaşma dereceleri ve yapısal katılıklarıyla birlikte artan kuantum verimiyle fluoreserleşirler. Flüoresan yoğunluğu hem uyarma hem de emisyon dalga boyuna bağlıdır, diğerlerinin emisyonunu bastırırken bazı bileşenlerin seçici olarak tespit edilmesine izin verir. Herhangi bir bileşenin algılanması, seçilen dalga boyuna bağlıdır ve eğer bir bileşen 280 ve 340 nm'de algılanabilirse, bir diğeri kaçırılacaktır. Modern dedektörlerin çoğu uyarı ve emisyon dalga boyunun hızlı bir şekilde değiştirilmesine izin verir, bu da karışımdaki tüm bileşenleri algılama imkanı sunar. Örneğin, çok önemli polinükleer aromatik kromotogramda, uyarma ve emisyon dalga boyları ilk 6 bileşen için sırasıyla 280 ve 340 nm idi ve daha sonra 305 ve 430 nm

değerlerine değiştirildi; Son değerler, bileşiklerin hassas algılanmasına izin vermek için en iyi uzlaşmayı temsil eder ( Sreemant bas ve ark, 2007).

#### **1.10.4. İletkenlik (Conductivity) Dedektörü**

Katharometer olarak da bilinen termal iletkenlik dedektörü (TCD), gaz kromatografisinde yaygın olarak kullanılan bir yığınsal özellik dedektörü ve kimyasala özgü bir dedektördür. Bu dedektör, kolon atığının termal iletkenliğinde meydana gelen değişiklikleri algılar ve referans bir taşıyıcı gaz akışıyla karşılaştırır. Çoğu bileşik, helyumun veya hidrojenin ortak taşıyıcı gazlarınınkinden daha düşük bir termal iletkenliğe sahip olduğundan, bir analit kolondan akıtıldığında, atık su iletkenliği azaltılır ve saptanabilir bir sinyal üretilir. TCD, sıcaklık kontrollü bir hücrede elektrikle ısıtılan bir filamentten oluşur. Normal koşullar altında filamentten dedektör gövdesine sabit bir ısı akışı vardır. Bir analit elute edildiğinde ve kolon atığının ısı iletkenliği azaltıldığında, filament ısınır ve direnci değiştirir. Bu direnç değişikliği genellikle ölçülebilir bir gerilim değişikliği üreten bir Wheatstone köprüsü devresi tarafından algılanır. Kolon atığı, dirençlerden birinin üzerine akarken, referans akışı dört direnç devresindeki bir ikinci direnç üzerindedir.

#### **1.10.5. Refraktif İndeks ( Refractive Index) Dedektörü**

Refraktif indeks (RI) detektörü HPLC'de tek evrensel detektördür. Algılama ilkesi, akış hücresi içinden geçen kolon atığının refraktif indeksindeki değişimin ölçülmesini içerir. Numune ve mobil faz arasındaki RI farkı ne kadar büyük olursa dengesizlik o kadar büyük olur. Böylece, numune ile hareketli faz arasındaki RI'daki yüksek fark için duyarlılık daha yüksek olacaktır. Öte yandan, karmaşık karışımlarda, numune komponentleri geniş bir refraktif indeks değerlerini kapsayabilir ve bazıları da mobil fazınkiyle yakından eşleşebilir ve detektör için görünmez olur. RI dedektörü saf bir diferansiyel enstrümandır ve eluent bileşimindeki değişiklikler dedektörün yeniden dengelenmesini gerektirir. Bu faktör, ayırma işlemini gerçekleştirmek için analiz sırasında mobil faz kompozisyonunun değiştirildiği gradiyent elüsyonunu gerektiren analizlerde RI detektör uygulamasını ciddi ölçüde sınırlamaktadır. RI dedektörlerinin iki temel türü bugün piyasada. Her ikisi de, numune içeren tarafın numune içermeyen referans tarafıyla sürekli olarak karşılaştırıldığı iki yollu bir hücrenin kullanılmasını gerektirir ( K. Carlsson ve ark, 1991).

#### **1.10.6. Elektrokimyasal (Electrochemical) Dedektör**

Elektrokimyasal dedektör, aynı zamanda popüler bir sıvı kromatografik detektördür. Bazı bileşikler için ek seçicilik ve duyarlılık nedeniyle kromatograf ile değerlendirilmelidir. Bu dedektör, analitin uygun bir elektrotta oksidasyon / indirgeme

reaksiyonundan kaynaklanan akım ölçümlerine dayanır. Akım seviyesi doğrudan analit konsantrasyonu ile orantılı olduğu için, bu dedektör niceleme için kullanılabilir ( Aylin Aytaç ve ark, 2011).

#### **1.10.7. Kütle Spektrometri Detektörü**

Kütle detektörü, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile karbonhidrat ve lipid analizleri için RI saptamasına alternatif olarak araştırılmıştır. Enstrüman çoğu RI dedektöründen daha duyarlı bulundu ve gradyan ayırıştırma işlemi de gerçekleştirilebildiğinden ortaya çıkan kromatogramlar iyileştirilmiş çözünürlük gösterdi.

#### **1.11. Sistem Uygunluk Parametreleri**

Kromatografik yöntemlerin bir parçasıdır. SUT yöntemin kabul edilebilir doğruluk ve kesinlikte olduğunu belirtir. Gerekli işlem ve hesaplamalar yöntem geliştirilmesi ve validasyon işlemlerinin tamamlanmasından sonra veya işlemler sırasında yapılır.

### 1.11.1. Teorik Tabaka (Plaka) Sayısı (N)

Kolonun en önemli parametresidir. Kolondan çıkan pikin sivri ve dar olması ve piklerin birbirlerinden iyi ayrılması ile ilgilidir. N'nin sayısal değeri, analizi yapılan maddenin cinsine bağlı olduğu gibi, deney koşullarına örneğin, akış hızı, sıcaklık, kolon kalitesi, dolumun tek biçimliliği gibi çeşitli faktörlere de bağlıdır (Da-WeiWang ve ark , 2009) .

$$N = 16 \left( \frac{t_R}{w} \right)^2 \quad (2)$$

Tavsiye edilen değer  $N > 2000$  dir.

$t_R$  =Maddenin alıkonma zamanı

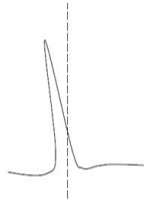
$W$  = Elde edilen pikin taban genişliği

### 1.11.2. Kuyruklanma Faktörü (T) ve Asimetri Faktörü (As):

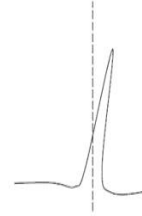
Bu faktör pikin simetrik olması ile ilgilidir. Çalışmalarda daima simetrik pikler seçilmelidir. Simetrik olmayan piklerden

1. Doğru olmayan tabaka sayısı ve ayırım gücü sonuçları,
2. Kararlı olmayan miktar tayinleri,
3. Gözlemlenemeyen pik kuyruklanmaları,
4. Alıkonmanın tekrarlanabilirliğinin düşük olması gibi sorunlarla karşılaşılır.

Pik asimetrisi (As) taban yüksekliğinin %10'u civarında, kuyruklanma faktörü (T) de %5'i civarında ölçülür. Bu durumlarla karşılaşmamak için As'nin 0,95-1,2 arasında; T'nin de  $T < 2$  olması istenir.



(öne yönelmek)



(Kuyruklanma)

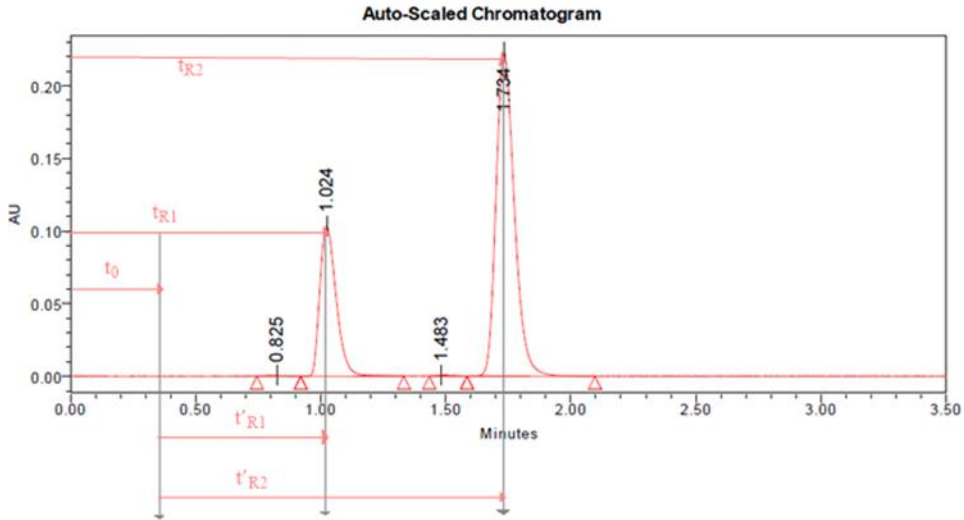
$$\text{Asimetri Faktörleri} = \frac{B}{A}$$

**Şekil 1.12.** Asimetri Faktörleri

### 1.11.3. Kapasite Faktörü (k):

Alıkonna faktörü de denir ve  $k$  ile sembolize edilir. Kolonda çözünen örneğin göç hızını açıklamada sıkça kullanılan önemli bir terimdir. Kapasite faktörünün sayasal değeri 1' den çok küçük olursa elüsyon çok hızlı olacağından alıkoma zamanının tayini zorlaşır. Tersî durumda, kapasite faktörünün 20-30'dan büyük olması durumundaysa elüsyon zamanı aşırı uzun olur. İdealde, kromatografik analizler kapasite faktörünün  $2 \leq k' \leq 10$  olduğu durumlarda gerçekleştirilir.

Kromatogram



Şekil 1.13. Kromatograma ait genel değişimler ve birimler

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (3)$$

#### 1.11.4. Seçicilik Faktörü

Relatif alıkonma (relative retention) olarakta adlandırılır ve  $\alpha$  ile sembolize edilir. Sistemin birbirini takip eden 2 maddeyi ayırma gücünün bir göstergesi olup, kapasite faktörlerinin oranıdır. Mobil ve sabit fazın özelliklerinden ve sıcaklıktan etkilenir.

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \quad (4)$$

#### 1.11.5. Ayırma Faktörü:

Ayırma faktörü (Resolution Factor) R ile sembolize edilir. Birbirini takip eden iki adet bileşene ait piklerin birbirinden ayrımlarının başarısını (oranını) gösterir. Takip eden piklere ait maksimallar arası mesafenin iki pik'e ait genişliklerin (birimi dakika) toplamına bölünmesiyle hesaplanır.

$$R = \frac{[2(t_{R2} - t_{R1})]}{w_1 + w_2} \quad (5)$$

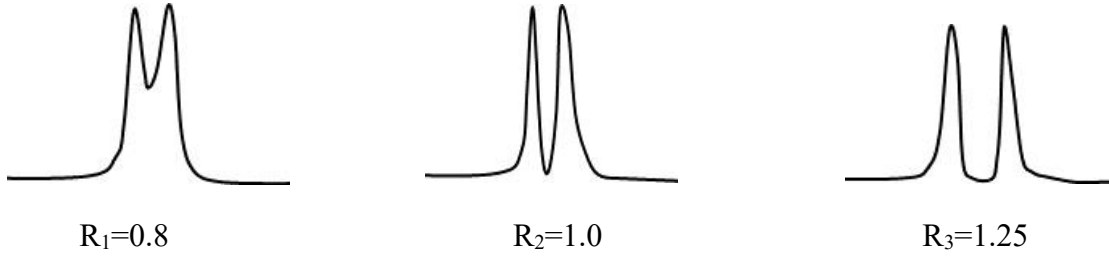
$t_1$  : 1. Maddenin alıkonma zamanı

$t_2$  : 2. Maddenin alıkonma zamanı

$w_1$ : 1. Maddenin taban genişliği

$w_2$ : 2. Maddenin taban genişliği

Takip eden pikler için iyi bir çözünürlükten bahsedebilmek için hesaplanan R değerinin 1-1.5 civarında olması istenir.



**Şekil 1.14.** Ayırma gücüne göre kromatogramlar

### 1.12. Van Deemter denklemi

Kromatografide Van Deemter denklemi, bir ayırmanın fiziksel, kinetik ve termodinamik özelliklerini göz önüne alarak bir ayırma kolonunun birim uzunluğundaki varyansı doğrusal mobil faz hızı ile ilişkilendirir. Bu özellikler sütun içerisindeki yolları, difüzyonu (eksenel ve uzunlamasına) ve sabit ve hareketli fazlar arasındaki kütle transfer kinetiğini içerir. Sıvı kromatografisinde hareketli faz hızı, çıkış hızı, yani ml / saniyedeki akış oranının 'kolon-çıkış akış yolunun kesit alanına oranı olarak alınır. Paketlenmiş bir sütun için, kolon çıkış akış yolunun kesit alanı genellikle kolonun kesit alanının 0,6 katı olarak alınır. Alternatif olarak, doğrusal hız, sütun uzunluğunun ölü zamana oranı olarak alınabilir. Mobil faz bir gaz ise, basınç düzeltilmesi uygulanmalıdır. Kolonun birim uzunluğu başına varyans, kolon uzunluğunun kolon verimliliğine teorik plakalar içindeki oranı olarak alınır. Van Deemter denklemi, birim sütun uzunluğu başına minimum varyansın olacağı ve dolayısıyla maksimum bir etkinliğin olacağı konusunda bir optimum hız olduğunu öngören hiperbolik bir işlevdir. Van Deemter denklemi, hız teorisinin kromatografi elüsyon işlemine ilk uygulamanın sonucudur ( Walter L ve ark, 1961).

Van Deemter denklemi, bir kromatografik kolonun çözünürlüğünü (HETP, teorik bir plakaya eşdeğer yükseklik) aşağıdaki gibi pik genişlemeye neden olan çeşitli akış ve kinetik parametrelere ilişkilendirir:

$$HETP = A + B + ( C_8+C_m) . u \quad (6)$$

HETP = kuramsal bir plakaya eşit yükseklik, kolonun çözülme gücü ölçüsü [m]

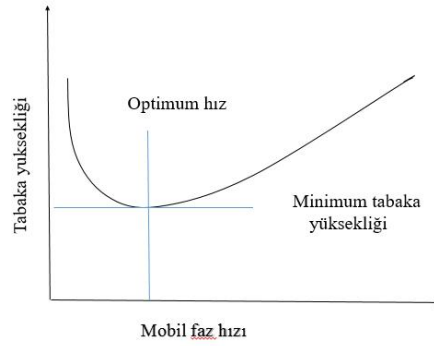
A = İdeal olmayan bir paketleme yoluyla kanalizasyon ile ilgili Eddy-difüzyon parametresi [m]

B = Salınma parçacıklarının uzunlamasına yöndeki difüzyon katsayısı, dağılım ile sonuçlanır [ $\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ ]

C = Analitin seyyar ve durağan faz arasındaki kütle transfer katsayısı direnci [s]

U = Doğrusal Hız [ $\text{m s}^{-1}$ ]

Mobil fazın ortalama doğrusal hızı ile plaka yüksekliği:



Şekil 1.15 . Mobil faz akış hızına karşı teorik tabaka yüksekliği

Bu gibi çizimler, optimum hareketli faz akış oranının belirlenmesinde önemli miktarda kullanılmaktadır.

Van Deemter denkleminin formu, HETP'nin belirli bir akış hızında minimum bir değere ulaşacağı şekildedir. Bu akış hızında, pratikte elüsyon süresinin pratik olmayacağı düşünülse de, kolonun çözülme gücü en üst düzeye çıkar. Van Deemter denklemini hızla ilişkili olarak farklılaştırmak, elde edilen ifadeyi sıfıra eşit ayarlamak ve optimum hız için çözmek aşağıdaki hususları ortaya çıkarır:

$$u = \frac{L}{t_M} \quad (7)$$

L: kolon uzunluğu

$t_M$  : Alıkonma süresi(retention time)

### 1.13. Analitik Yöntem Geçerliliği (Validasyonu)

Kromatografik yöntemler için validasyon deneylerine ait, belirlenmiş bir parametre önceliği veya sıralaması mevcut değildir, dolayısıyla optimum sıralama daha çok kullanılan metoda göre oluşturulmaktadır. Ancak literatürde benzer konuda atıf almakta

olan makalelere göre, bir sıvı kromatografik metod için, aşağıdaki tablodaki sıralamanın uygun olabileceği ve sıkça kullanılmakta olduğu bildirilmiştir.

### 1.13.1.Özgünlük

Özgünlük, mevcut olması beklenen bileşenlerin varlığında analiteyi açıkça değerlendirebilme yeteneğidir. Tipik olarak bunlar, yabancı maddeler, parçacıklar, matris vb. içerebilir. Bireysel analitik prosedürün özgüllüğünün olmaması, diğer destekleyici analitik prosedür (ler) tarafından telafi edilebilir ( NOTE FOR GUIDANCE ON VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES:TEXT AND METHODOLOGY, June 1995 CPMP/ICH/381/95 ).

Bu tanım aşağıdaki sonuçları içerir:

Tanımlama: bir analitin kimliğini sağlamak.

Saflık Testleri: Gerçekleştirilen tüm analitik prosedürleri ,Bir analitin yabancı madde içeriğinin doğru bir şekilde ifade edilmesine izin verir.

Deney (içerik veya etki): Kesin bir sonuç sağlamak için bir numunedeki analitin içeriği hakkında doğru bir açıklama yapılmasına olanak tanır.

### **1.13.2. Doğrusallık**

Bir analitik prosedürün doğrusallığı, numunedeki analit konsantrasyonu ile doğru orantılı olan test sonuçlarını elde etme yeteneğidir (belirli bir aralıkta) (NOTE FOR GUIDANCE ON VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: TEXT AND METHODOLOGY, June 1995 CPMP/ICH/381/95 ).

### **1.13.3. Kesinlik**

Test için ve kirliliklerin nicel tayinine yönelik testlerin geçerliliği, hassaslığın araştırılmasını içerir (NOTE FOR GUIDANCE ON VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: TEXT AND METHODOLOGY, June 1995 CPMP/ICH/381/95 ).

#### **1.13.4. Doğruluk**

Kör örnek çözeltisine 3 farklı konsantrasyonda analit eklenir (spiking). Gerçek değerler kullanarak valide edilecek HPLC metodu ile elde edilen sonuçların sapması hesaplanır.

#### **1.13.5. Günler (ölçümler) arası kesinlik**

Standart farklı konsantrasyonlarda 15 gün boyunca enjekte edilir. Bu işlem 3 farklı operatör tarafından aynı partiden 3 farklı analitik kolon kullanarak gerçekleştirilir. Miktarların kesinliği ölçülür.

#### **1.13.6. Yakalama Sınırı**

Yakalama sınırı ( limit of detection → LOD) bir numunede ölçülebilen değil, algılanabilen bir analitin en düşük konsantrasyonu olarak tanımlanır. Bir analitin belirli

bir değerin üstünde veya altında olup olmadığını belirleyen bir sınır testidir. Belirtilen bir sinyal / gürültü oranına, genellikle 3: 1'e konsantrasyon olarak ifade edilir.

#### 1.13.7. Tayin Sınırı

Tayin sınırı ( quantitation limit → LOQ), numunedeki bir analitin, metodun belirtilen operasyonel şartları altında kabul edilebilir hassasiyet ve hassaslıkla saptanabilen en düşük konsantrasyonu olarak tanımlanır.

Bazen, LOQ'yu saptamak için 10: 1'lik bir sinyal / gürültü oranı kullanılır. Bu sinyal-gürültü oranı iyi bir kuraldır, ancak LOQ'nun belirlenmesinin konsantrasyon ile gerekli hassasiyet ve doğruluk arasında bir uzlaşma olduğu unutulmamalıdır. Yani, LOQ konsantrasyon seviyesi düştükçe hassasiyet artar.

### 1.13.8. Esneklik (Ruggedness) ve Sağlamlık (Robustness)

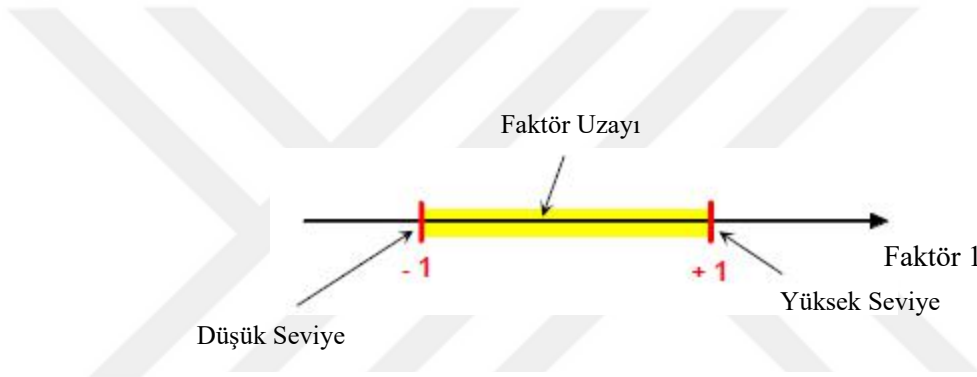
Esneklik (Ruggedness), farklı örnekler gibi çeşitli koşullar altında aynı numunelerin analizi ile elde edilen test sonuçlarının tekrarlanabilirlik derecesi olarak tanımlanır. Örnek olarak :

- Laboratuvarlar;
- Aletler;
- Reaktif partileri;
- Geçen deney süreleri;
- Deney sıcaklıkları; ve
- Gün.

Geleneksel olarak sağlamlık (Robustness), en katı şekilde bir doğrulama parametresi olarak düşünülmemiştir, çünkü yöntem genellikle en azından kısmen optimize edildiğinde yöntem geliştirme sırasında araştırılır. Bu bağlamda düşünüldüğünde, yöntemi etkileyen parametreler seçicilik veya optimizasyon amaçları için manipüle edildiğinde kolaylıkla tanımlanabildiğinden gelişme sürecindeki sağlamlığın değerlendirilmesi mantıklı olur. Resmi yöntem doğrulama sürecinin başlamasından önce ya da başında sağlamlığı değerlendirmek "şu an bana para ödeyebilirsiniz" ya da daha sonra ödeyebilirsiniz kategorisine girer.

#### 1.14. Deneysel Uzay Kavramı

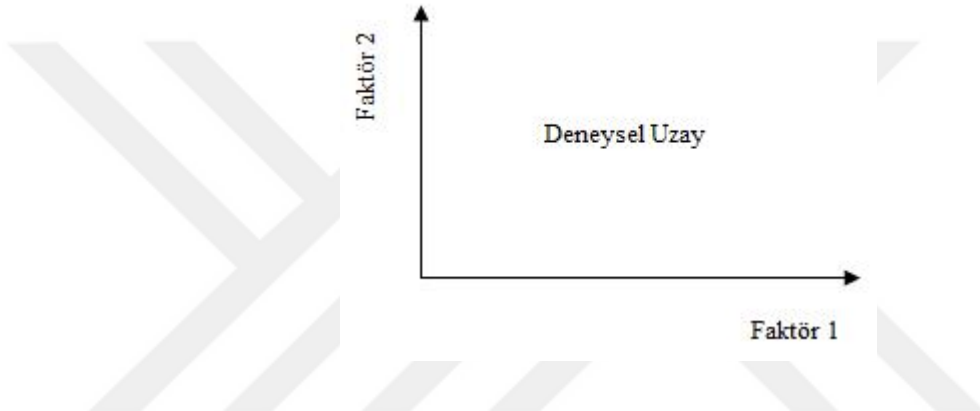
Bir araştımayı gerçekleştiren araştırmacı her deneyi ölçen bir değişkenle ilgilenir. Bu değişken (büyüklük) cevap olarak adlandırılır. Bu cevabın değeri bir çok değişkene bağlıdır. Deneysel tasarım ve optimizasyon terminolojisinde, değişken terimi yerine faktör kelimesi kullanılır. Bu cevap değişkeni, bir veya bir çok faktöre bağlı olacaktır. Bir faktör ölçülü bir eksen ile temsil edilebilir (şekil 1.16).



**şekil 1.16.** Faktörün alt seviyesi -1 ile st seviyesi +1 ile gösterilir. Faktörün değişim alanı düşük ve yüksek seviyeler arasını kapsayan bütün değerlerden oluşur.

Düşük seviye ve yüksek seviye arasındaki faktörü kapsayabilen bütün faktrlerin hepsi faktörün değişim alanı veya basit olarak faktör alanı olarak adlandırılır. Sonra her zaman düşük seviye -1 ile yüksek seviye +1 ile gösterilir.

Eğer ikinci bir faktör varsa o da ölçülü ve yönlendirilmiş bir eksen ile temsil edilebilir. Birinci faktörde olduğu gibi ikinci faktörün de düşük seviyesi, yüksek seviyesi ve onun değişim alanı aynı şekilde tarif edilir. İkinci eksen birinci eksene dik olarak düzenlenmiştir. Böylece iki boyutlu öklidyen “euclidean” uzayı olarak tarif edilen koordinat sistemi elde edilir. Bu uzay, deneysel uzay (alan) olarak adlandırılır (Şekil 1.17)



**Şekil 1.17.** Her faktör ölçülü ve yönlendirilmiş bir eksenle temsil edilir. Bu faktörlerin eksenleri kendi aralarında birbirine diktir.

Faktör 1'in seviyesi  $x_1$  ve faktör 2'nin seviyesi  $x_2$ , deneysel uzayın bir noktasının koordinatları gibi dikkate alınır (Şekil 1.17). Öyleyse verilen deney eksenleri bu sistem içinde bir noktayla temsil edilebilir. Ayrıca deneylerin bir planı veri noktalarının kümesiyle temsil edilebilir.



76

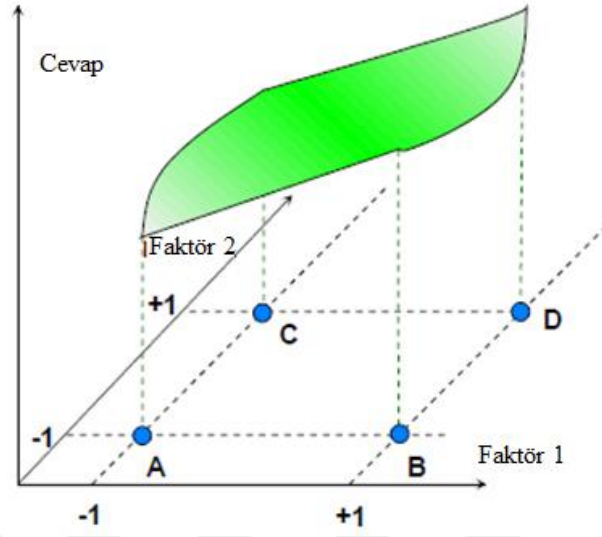
Daha önce yapılan tanımlar sürekli değişkenlere de uygulanabilir. Fakat değişkenlerin diğer çeşitleri de mevcuttur.

### 1.15. Cevap Yüzeyi Kavramı

Deneyisel tasarım ve optimizasyon metodolojisinde,  $X_i$  seviyeleri deneyisel bir noktanın koordinatları ile temsil edilir ve  $y$  değeri bu noktadaki cevabın değeridir. Bu nokta, deneyisel uzaya dik olan bir eksen ile tanımlanır ve cevapla ilişkilidir. Deneyisel tasarım ve cevabın geometrik sunumu deneyisel uzaydan ziyade birden fazla boyuta sahip olan bir uzay gerektirir. İki faktörlü bir deneyisel tasarım üç boyutlu bir uzayı kullanır. Şöyleki, cevap için bir boyut, iki faktör için de iki boyut kullanılır.

Çalışma alanının tüm noktalarının bir dizisi cevap yüzeyi adı verilen bir yüzey üzerinde lokalize olan cevapların tamamıdır (Şekil 1.20).

Deneyisel noktaların sayısı ve konumu deneyisel tasarımın temelini oluşturmaktadır. Deneylerin sayısının sınırlandırılması ise cevap yüzeyinin en iyi doğrulukla elde edilmek isteniyor olmasıdır.



**Şekil 1.20.** Çalışma alanının noktaları ile ilgili cevaplar cevap yüzeyini oluşturur.

Deneyisel tasarımın noktalarında ölçülen bazı cevaplar, yüzey cevabının denkleminin hesaplanmasına olanak tanır.

### 1.16. Matematiksel Modelleme Kavramı

Önce, faktörlerin cevabı ile ilgili bir matematiksel fonksiyon seçilir. Örneğin ikinci dereceden polinomiyal bir fonksiyon aşağıdaki gibi sunulabilir.

$$y = b_0 + \sum b_i x_i + \sum b_{ij} x_i x_j + \dots + \sum b_{ii} x_i^2 + b_{ij\dots z} x_i x_j \dots x_z \quad (8)$$

Bu denklemden  $y$ , cevap veya ilgili büyüklüktür. Bu  $y$  değeri deney esnasında ölçülür ve belirli bir doğruluk ile elde edilir.  $x_i$ , bir deneyi gerçekleştirmek için araştırmacı tarafından bir  $i$  faktörü ile ilgili seviyeyi temsil eder. Bu değer tamamen bilinen bir değerdir. Aynı şekilde bu seviyenin hatasız bir şekilde tayin edildiği kabul edilir.  $b_0$ ,  $b_i$ ,  $b_{ij}$ ,  $b_{ii}$  bunlar katsayılarıdır. Önceden kabul edilen matematiksel modelin katsayılarıdır. Bunların değeri bilinmez ve deney sonuçlarından hareketle değerleri hesaplanır.

Bir tasarım ve optimizasyon işleminde faktörler ile cevabı modellemenin faydası, deneyleri yapmak zorunda kalmadan çalışmanın bütün cevaplarını hesaplayabilmektir.

### 1.17. Modelleme

Yukarıda açıklanan modele iki ekleme yapmak gerekir. Bunlardan birincisi uyum eksikliğidir. Bu ifadenin anlamı, incelenen olaya etki eden gerçek modelin daha önce önerilen bir modelden farklı olduğu gerçeğini yansıtmasıdır. Bu iki model arasında bir fark vardır. Bu fark uyum eksikliğidir. İkinci ekleme, cevabın rastgele yapısının dikkate alınmasıdır. Gerçekte aynı deneysel noktada cevabın birçok kez ölçülmesinde tamamıyla aynı sonuçlar elde edilememektedir. Sonuçlar bir değere etrafında saçılır. Bu saçılmalar deneysel hatalar olarak adlandırılır.

Bu iki gözlenen fark yani uyum eksikliği ve deneysel hata, çoğu zaman  $e$  ile ifade edilen model hatası içerisinde birleştirilir.

$$y = b_0 + \sum b_i x_i + \sum b_{ij} x_i x_j + \dots + \sum b_{ii} x_i^2 + b_{ij\dots z} x_i x_j \dots x_z + e \quad (9)$$

### 1.18. Denklemlerin Sistemi

Her bir deneysel nokta, bir cevap değerininde elde edilmesine imkan tanır. Bu cevap, katsayılarının bilinmediğı ancak tayin edilmesi gereken bir polinom ile modellenir.

Deneysel tasarımının sonunda p bilinmeyenli n sayıda denklem sistemi elde edilir. Burada n deney sayısı, p modeldeki katsayıları gösterir. Bu sistem matris notasyonunda basit bir biçimde aşağıdaki gibi yazılır;

$$y = x_b + e \quad (10)$$

y cevap vektörü, x ise tasarımı ve ön modeli için seçilen deneysel noktalara bağlı matris, b katsayıların vektörü, e ise hataların vektörüdür.

Bu sistem denklem sayısından daha çok bilinmeyen sayısına sahiptir. Yani n denklem sayısı iken p+n kadar bilinmeyen söz konusudur. Bu denlem sistemini çözmek için en küçük karelere dayanan regresyon yöntemi kullanılır. Böylece katsayıların değerlendirilmesi yapılır. Bu hesabın sonucu;

$$b = (x'x)^{-1} x'y \quad (11)$$

$x'$  matrisi  $x$ 'in traspozudur. Birçok yazılım bu hesaplamayı gerçekleştirmede kullanılabilir ve katsayıların değerleri doğrudan bulunur. Aşağıdaki iki matris deneysel tasarım teorisine sürekli olarak katılır;

bilgi matrisi  $x'x$

saçılma matrisi  $(x'x)^{-1}$

Daha önce klasik deneysel tasarımlardaki notasyon ve özellikleri şimdi uygulayabiliriz.

### 1.19. İki Seviyeli Tam Faktöriyel Tasarım

Bu planlar (tasarımlar) her bir faktör için iki seviye ile sınırlıdır. Seviyelerin bütün kombinasyonları deney sırasında gerçekleştirilir. Bu tasarımlar sürekli değişkenler ve ayrık değişkenler için birbirinin yerine kullanılabilir.

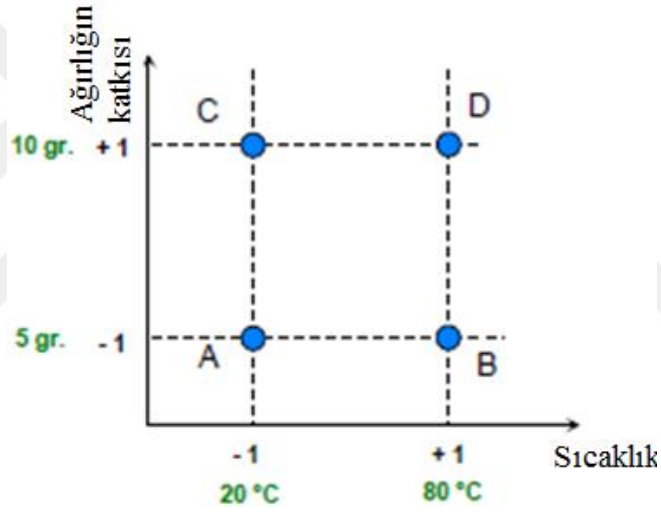
#### İki Faktörlü Tasarım

Bu tasarımlar her faktör için iki seviye ile sınırlıdır. Seviyelerin bütün kombinasyonları deney esnasında gerçekleştirilir. Yukarıda da ifade edildiği gibi bu tasarımlar, sürekli değişkenler ve kesikli ayrışık değişkenler için birbirlerinin yerine kullanılabilirler.

İki faktörlü tasarımlar için çalışma alanı bir karedir. Örneğin Şekil 1.21’de iki seviyeli bir tasarım sunulmaktadır. Uygulanan matematiksel model her faktöre göre birinci dereceden bir modeldir.

Bu denklemde  $y$  cevap,  $x_1$  ve  $x_2$  faktörler,  $b_0$  çalışma alanının merkezindeki cevabın değeri,  $b_1$  faktör 1'in etkisi (yada temel etkisi),  $b_2$  faktör 2'nin etkisi (yada temel etkisi),  $b_{12}$  faktör 1 ve 2'ler arasındaki etkileşim ve "e" ise model hatasını göstermektedir.

Deney noktalarının en iyi bölgeleri, çalışma alanının doruklarında yer aldığı görülmektedir.



**Şekil 1.21.** Uygulanan model birinci dereceden olduğu zaman deneysel noktaların en iyi olduğu bölgeler (yerler) çalışma alanının doruklarıdır.

### 1.20. Çizelge Şeklinde Bir Çalışmanın Sunulması

Geometrik sunumlar, son derece uygun ve kullanışlıdır. Ancak faktör sayısı 3'ten fazla olduğu durumlarda kullanışlı değildir. Çok boyutlu uzay için çizelge şeklindeki bir sunum kabul edilebilir. Geometrik ve çizelge şeklindeki iki sunum arasındaki ilişkiyi göstermek için Şekil 1.21'de iki seviyeli iki faktörlü bir tasarımın çizelgesinin oluşturulması sunulmaktadır. Bu çizelge iki kolondan oluşmaktadır. Bu kolonlardan birincisi deneyi tanımlamakta, ikincisi ve üçüncüsü deney noktalarının koordinatlarını göstermektedir. Birinci deney incelenen iki faktörün 20 °C (yada kodlama ile -1) ve 5 gram (yada kodlama ile -1) ile düşük seviyeleridir. Bu birinci deney Şekil 2.14'teki A noktasına karşılık gelir. Deney 2 ise birinci faktör 80 °C (yada kodlama ile +1) yüksek seviye ve ikinci faktör 5 gram (yada kodlama ile -1) düşük seviyedir. İkinci deney B noktasına karşılık gelir. Eğer alışılmış fiziksel birimler ile oluşturuluyor ise (Çizelge 1.1) bu çizelgeye deney çizelgesi adı verilir ve eğer kodlamasında birimler kullanılıyorsa (Çizelge 1.2) deneysel tasarım adı verilir. Bu durumda, çizelgenin en altında alışılmış fiziksel birimlerde her faktör için kodlanmış birimlerin anlamı hatırlatılır.

**Çizelge 1.1.** Deney çizelgesi (genel birimlerde)

| Deney No | Sıcaklık (1) (°C) | Ağırlık (2) (gr) |
|----------|-------------------|------------------|
| 1 (A)    | 20                | 5                |
| 2 (B)    | 80                | 5                |
| 3 (C)    | 20                | 10               |
| 4 (D)    | 80                | 10               |

Kodlanmış birimleri kullanan sunum, alışılmış fiziksel birimleri kullanan sunumdan daha geneldir. Bu kodlanmış çizelge aşağıdaki biçimdedir.

**Çizelge 1.2.** Deneysel tasarım (kodlanmış birimlerle)

| Deney No  | Faktör 1 | Faktör 2 |
|-----------|----------|----------|
| 1 (A)     | -1       | -1       |
| 2 (B)     | +1       | -1       |
| 3 (C)     | -1       | +1       |
| 4 (D)     | +1       | +1       |
| Seviye -1 | 20       | 5 gr     |
| Seviye +1 | 80       | 10 gr    |

Geometrik sunumlar ve Çizelge ile sunumlar birbirine eşdeğerdir. Çizelgeler (yada matrisler), faktörlerin sayısı ne olursa olsun yani deneysel uzayın boyutlarının sayısı ne olursa olsun kullanılabilme avantajı sunarlar.

Deneysel tasarımların sonuçlarını iyi yorumlayabilmek için bir sunumdan diğerine geçişi iyi bilmek faydalıdır.

### 1.21. Deney Sonuçlarının Sunumu

Her deneyde araştırmacı, seçilen cevabı ölçer. Örneğin, birinci deneyin cevabı  $y_1$ 'dir. İkinci deneyin cevabı  $y_2$  ve böyle devam eder. Bu cevaplar her deneyin karşısında gösterilir ve sonuç sütununda toplanır (Çizelge 1.3).

**Çizelge 1.3.** Deneysel tasarım ve deneysel sonuçlar

| Deney No  | Faktör 1 | Faktör 2 | Cevap |
|-----------|----------|----------|-------|
| 1         | -1       | -1       | $y_1$ |
| 2         | +1       | -1       | $y_2$ |
| 3         | -1       | +1       | $y_3$ |
| 4         | +1       | +1       | $y_4$ |
| Seviye -1 | 20       | 5 gr     |       |
| Seviye +1 | 80       | 10 gr    |       |

## 1.22. Katsayıların Hesaplanması

Dört noktalı bir deney dört denklem gerektirir.

Bu sistemin çözümü katsayıların değerlerini verir.

Katsayıların bilinmesi ile tahminler yapabilen regresyon modeli yazılabilir.

### 1.23. Çalışmanın Açıklanması

Üretimin verimliliğini artırmak isteyen bir üretici, doğal bitkilerden hareket ederek bir ilaç hazırlamakta ve aktif bileşiğin ekstraksiyon verimini artırmaya çalışmaktadır. Ekstraksiyon konsantrasyonu 50 g/L olan NaCl varlığında ve 70 °C sıcaklıkta gerçekleştirilir. Çalışmada, normal çalışmalar civarında seviyelerde bu iki faktörün incelenmesine karar verilir.

Faktör 1: 40 ve 50 g arasında NaCl konsantrasyonu

Faktör 2: 60 ve 80 °C arasında sıcaklık

Çalışmada, cevap faktörü, fabrikada üretilen ürünün kalitesidir. Üretici 2<sup>2</sup> olan bir faktöriyel tasarım gerçekleştirir. Bu tasarım Çizelge 1.4’te verilmektedir.

**Çizelge 1.4.** Deneysel tasarım ve deneysel sonuçlar

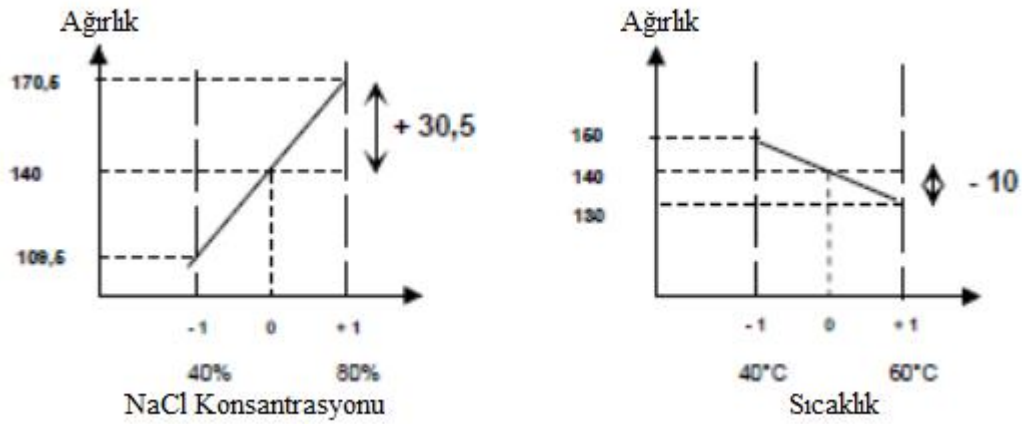
| Deney No  | Faktör 1 | Faktör 2 | Cevap (gram) |
|-----------|----------|----------|--------------|
| 1         | -1       | -1       | y= 115       |
| 2         | 1        | -1       | y= 185       |
| 3         | -1       | 1        | y= 104       |
| 4         | 1        | 1        | y= 156       |
| Seviye -1 | 40       | 60       |              |
| Seviye +1 | 60       | 80       |              |

Hesaplar, 4 nolu denklem kullanılarak gerçekleştirilir.

**Çizelge 1.5.** Etkilerin çizelgesi

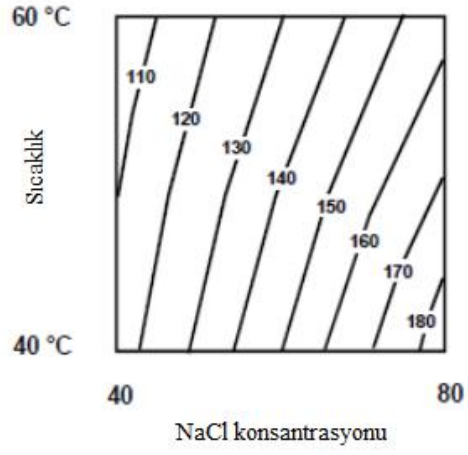
|                     |        |
|---------------------|--------|
| Ortalama            | 140 g  |
| Faktör 1'in etkisi  | 30.5 g |
| Faktör 2'nin etkisi | -10 g  |
| Etkileşim           | -4.5 g |

Bu deneyin yorumunda, konsantrasyonun etkisi, NaCl de 10 gramlık bir değişim için 30.5 gramdır (Şekil 1.22). Böylece NaCl'nin konsantrasyonunu artırarak üretim arttırılabilir. Sıcaklığın etkisi, sıcaklıktaki 10 °C'lık bir değişim için -10 dur. Bunun sonucu şudur ki üretimi arttırmak için sıcaklığı düşürmek gerekir.



**Şekil 1.22.** Etkin ürün verimi üzerine NaCl ve sıcaklığın etkileri.

Sonuçların genel görünümünü elde etmek için çalışma alanındaki izoverimlilik eğrileri çizilir (Şekil 1.23).



**Şekil 1.23.** Ürünün verimi üzerine NaCl konsantrasyonu ve sıcaklığın etkilerini gösteren izocevap eğrileri.

#### 1.24. İki Seviyeli k Faktörlü Faktöriyel Tasarımlar

Faktörlerin sayısı arttırılabilir. Deneysel uzay, faktörlerin boyutları kadardır ve matematiksel model 2 numaralı bağıntıya karşılık gelir.

İki seviyeli k faktörü kapsayan bir tasarım  $2^k$  ile gösterilir.

k, faktörlerin sayısını gösterir

2 ise faktörün seviyesini gösterir

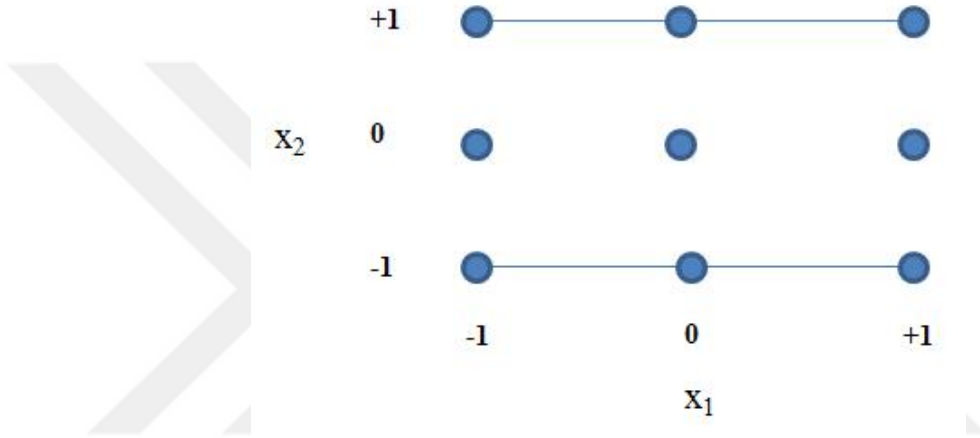
Bu notasyon aynı zamanda gerçekleştirilecek deneyin sayısını da belirtmektedir. Bu sayı son derece önemlidir. 2 seviyeli bir tasarımda 7 faktörlü bir deney için  $2^7$  olduğundan 128 deney gerçekleştirmek gerekir. Deney sayısını düşürmek için kesirli faktöriyel tasarımlar kullanmak gerekir.

#### 1.25. Üç Seviyeli Tasarımlar: Cevap Yüzey Tasarımları

Cevaplar ve faktörler arasındaki ilişkiyi kantitatif olarak açıklayabilmek için aşağıda mekanik (fizikokimyasal) yada deneysel modeller örneğin polinomial modelleri kullanacağız.

Bu matematiksel modeller hem doğrusal ve hem kavisli cevap yüzeyleri tanımlamak için eşit olmalıdır. Eğer faktör seviyeleri en az üç seviyede olursa, kavisli bağımlılık modellenabilir.

Üç seviyeli faktöriyel tasarımlar “cevap yüzey tasarımlar”ı olarak bilinir. Tam faktöriyel üç seviyeli tasarımlar, iki seviyeli tasarımlarda olduğu gibi formalize edilebilir, örneğin bir  $3^k$  tasarımı, üç faktör seviyeli k faktörlü bir tasarım anlamına gelir. Şekil 1.24’de bir  $3^2$  tasarımına örnek verilmektedir.



**Şekil 1.24.** İki faktör için tam faktör için tam faktöriyel  $3^2$  tasarım.

Tam faktöriyel üç seviyeli tasarımların, parametrelerin değerlendirilmesindeki istatistiksel özellikleri iki seviyeli tasarımlarınkinden daha az tercih edilmesine rağmen, bu tam faktöriyel üç seviyeli tasarımlar bazen iki, bazen de üç faktörü araştırmak için kullanılmaktadır. Aynı sorun iki faktörlü tasarımlarda da olabilir. Örneğin, deneylerin sayısının fazla olmasıdır. Bu tasarımların dezavantajları çok önemli olan “merkezi bileşenli tasarım” ve “Box-Behnken” tasarımı olarak adlandırılan optimal tasarımların geliştirilmesine neden olmuştur.

### 1.26. Kromatografik Cevap fonksiyonu (ICRF)

Analitik performansın önemli ölçütlerine duyarlı bir kromatografik yanıt fonksiyonu incelenmiştir: Seçicilik, doğruluk, kesin = açık ve ayırma işlemini gerçekleştirmek için gereken süre. Bu fonksiyon, bilinmeyen çözünen karışımlara uygulanabilir ve fonksiyonun kromatogramdaki sayısal değerini değerlendirmek için çaba göstermek gerekiyor. Yüksek performanslı sıvı kromatografisinde iyi ayırmalar ile aynı anda minimum elüsyon süreleri veren elüsyon kuvvetlerinde iyi tanımlanmış optima gösterir. Beklenen performansı karakterize eden daha önce herhangi bir kromatografik bilgi yok bir sistemin gerekli olması gerekir. Bir sistemin beklenen performansını karakterize eden daha önce herhangi bir kromatografik bilgi gerekli değildir. Bu işlevi, açıklayan mekanik bir model olmadan kullanmak mümkündür.

Eğer deneysel değişkenleri tanımlanırsa, analitik kimyadaki optimizasyon yöntemleri büyük fayda sağlıyor. Bununla birlikte, optimum değerler her zaman benzersiz bir şekilde kurulabilir değildir ve laboratuvarlar arasında aktarılabilir değildir, ayrıca bireysel deneysel kurulumlar ve zamanlar arasında da yoktur. Prensip olarak bu, çoğu analitik prosedür için geçerli olduğuna rağmen, mobil fazın küçük değişiklikleriyle elde edilebilen seçicilik aralığı ve sabit fazın özünürlüğü ve yüzey kimyası gibi sütun parametrelerinin bazen yetersiz tekrarlanabilirliği nedeniyle, Özellikle yüksek performanslı sıvı kromatografisinde sınır bozucudur. Uygulamada bu, her zaman daha önce yayınlanmış bir prosedürün uygulanması rutin bir laboratuvarda denenmeye

çalışıldığında, ayırma işlemini en verimli şekilde etkileyen deneysel değişkenlerin optimize edilmesine ihtiyaç duyulmasına neden olur.

Son birkaç yıldır analitik kimyasal problemlere uygulanan çok boyutlu optimizasyonda kaydedilen ilerlemelere rağmen, halen az sayıda uzman bir alandır, Analitik kimyanın çoğunluğu, Geleneksel fakat güvenilir tek faktörlü-zamanlı yöntemlere dayanarak, Kantitatif olarak ayırma niteliğini karakterize etme girişimleri kromatografinin kendisi kadar eski olmasına rağmen, 1975'e kadar, Morgan ve Deming'in pik ayrımı kavramını genelleştirdiği zaman, bir karışımdaki tüm bileşenlerin aynı miktarda ayrılmasının nicel olarak tanımlandığı anlaşılmadı.

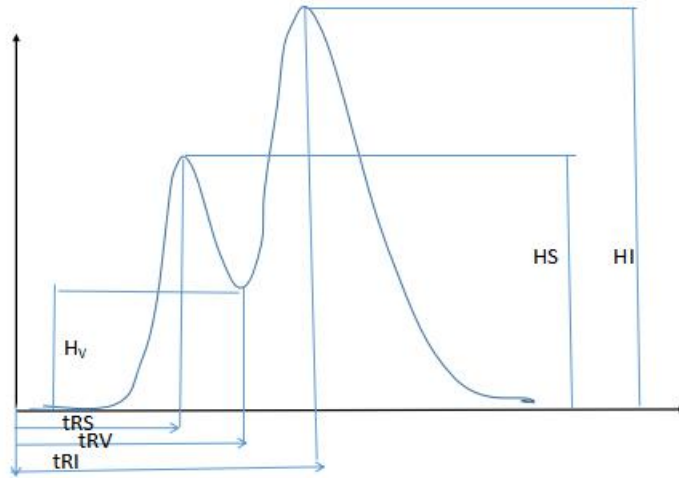
Deneysel yöntemde, kromatografik optimizasyon yaklaşımı için, analizi yapılacak bileşiklerin kromatogramında, kısa runtime ile verimli kromatografik pik ayrışası sağlamak için deneysel tasarım ve optimizasyon çalışmasında, yeni geliştirilmiş kromatografik fonksiyonu (ICRF) kullanılmaktadır. ICRF aşağıdaki denkleme göre hesaplandı:

$$ICRF = \left( a \left( 1 - \frac{\sum_{i=1}^{n-1} \theta_{s,i}}{N-1} \right) + 1 \right) \left( 1 + \left( \frac{t_f}{t_{opt}} \right) \right)^b \left( 1 + \frac{\sum w_i}{N} \right)^c \quad (25)$$

Burada, N tahmin edilen zirve noktalarıyla sayısını temsil eder,  $t_f$  son pik elüsyon süreci,  $t_{opt}$  seçilen optimal elüsyon süreci, a denklemin katsayısı, başlangıçta zirve genişliğini tekabül eder.  $\theta_{s,i}$  pik örtüşme fonksiyonu ve çözünürlük kriteri aşağıdaki denkleme göre tanımlanmıştır:

$$\theta_{S,l} = \frac{H_V[t_{R,l}-t_{R,S}]}{[t_{R,V}-t_{R,S}](H_l-H_S)H_S(t_{R,l}-t_{R,S})} \quad (26)$$

$H_S$  ve  $H_l$  piklerin yüksekliğidir,  $H_V$  vadi yüksekliği,  $t_{R,S}$  ve  $t_{R,L}$  piklerin tutunma süresi,  $t_{R,V}$  zaman konumudur. Çizelge 1.4' de  $3^3$  tam faktöryel tasarımlar dikkate alınarak, tasarım durumuna göre 27 adet çalışma örneklerinin kromatogramları kaydedildi. Kromatogramlar şekil 1.17 ve 1.18 ve 1.19 da gösterilmiştir. ICRF sayısal değerleri, (26) denkleminde hesaplandı.  $\theta$  için gerekli parametreler şekil 1.25 'de sunuldu.



**Şekil 1.25.**  $\theta$  için gerekli parametreler

## 2. GEREÇ VE YÖNTEM

### 2.1. Aşırı Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (UPLC)

Klasik yüksek basınçlı sıvı kromatografisinin (High performance liquid chromatography (HPLC)) yeni bir versiyon olan aşırı yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (Ultra performance Liquid chromatography (UPLC)), bir karışım içerisindeki bileşenlerin biri sabit (stasyonere) ve diğeri hareketli (mobil) olan iki faz arasındaki dağılım dengelerinin farklılığına dayalı bir ayırma yöntemidir. Aşırı yüksek basınçlı sıvı kromatografisinde iç çeperi sabit fazı dolgu materyali bulunan kolon sisteminden değişik çözücü sistemleri, pompa yardımıyla çok yüksek bir basınçla kolon sisteminden geçirilir. Enjeksiyon sistemiyle hareketli faz içine edilen numunede bulunan maddeler kolon sisteminde sabit ve hareketli fazlarla etkileşimleri farklı olduğundan kolon içinde farklı hızlarda hareket ederler ve analiz edilen kolon içinde farklı hızlarda hareket ederler ve analiz edilen maddelerin tutulma zamanları farklı olduğu için kolonu terk etme sıralarına göre dedektör sisteminde yakalanarak kromatogram olarak kaydedilir. Aslında yöntemin esası klasik YBSK yönteminde olduğu gibidir. UPLC yönteminde klasik YBSK yönteminden farklı olarak daha yüksek basınç ve daha kısa kolonların kullanılmasıyla daha az zamanda analiz işleminin gerçekleştirilmesi amaçlanmaktadır.

## 2.2. Kullanılan Cihaz

- Water Acquity Series UPLC sistemi (water corporation 34 Maple street Milford, MA 01757 USA) (PDA sistemi birlikte)
- Waters BEH® C<sub>18</sub> (2.1\* 50 mm, 1.7 µ) UPLC kolonu
- Empower UPLC software programı
- Vial
- Kuvartz küvet
- Hassas terazı
- Pipet (1-10 ml)
- Sartorius Minisart membrane filter ( çapı= 0.2 µm)
- Balon joje (25-250 ml)
- Beher

### 2.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Methanol (Merck)
- Acetonitrile (Merck)
- H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (0.1M) (Merck )
- Psedöefedrin (Glaxo Smith Kline İlaçları San.Ve Tic.A.Ş)
- Efedrin (Mustafa Nevzat İlaç Sanayi A.Ş.)
- Guafenesin (Mustafa Nevzat İlaç Sanayi A.Ş.)

### 2.4. Analizi Edilen Bileşikleri İçeren Ticari Preparatlar

| No. | Ticari Formülasyon           | Etiket Değerleri             | İlaç Firma                                    |
|-----|------------------------------|------------------------------|-----------------------------------------------|
| 1   | SUDAFED <sup>®</sup> (Şurup) | 100 mg GUA + 30 mg PS/ 5ml   | Amgen İlaç Tic. Ltd.<br>Şti                   |
| 2   | BROKSIN <sup>®</sup> (Şurup) | 100 mg GUA + 6,66 mg EF/ 5ml | Abdi İbrahim İlaç<br>Sanayi ve Ticaret<br>A.Ş |

### 3. BULGULAR

Bu doktora tez çalışmasında GUA-EFE ve GUA-PS kombinasyonlarını içeren ticari farmöstik preparatlardaki aktif bileşiklerin kalite kontrol ve rutin analizlerine yönelik ters- faz aşırı yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (reversed- phase ultra-performance liquid kromatografi > RP- UPLC) yöntemleri geliştirildi. Bu kromatografik yöntemlerin geliştirilmesinde optimal kromatografik deneysel koşulların belirlenmesinde kemometrik optimizasyon metodolojileri kullanıldı.

### 3.1. Guafenesin - Efedrin Karışımının UPLC Yöntem ile Kantitatif Analizi

Guafenesin – Efedrin kombinasyonunu içeren ticari şurup formülasyonunun kantitatif analizi için yeni bir UPLC yöntemi geliştirildi. Deneysel kromatografik şartların saptanmasında tam faktöriyel üç seviyeli bir tasarım modeli kullanarak gerçekleştirildi.

#### 3.1.1. UPLC Yönteminin geliştirmesinde kemometrik Optimizasyon

Bir ticari şurup formülasyonundaki GUA ve EFE bileşiklerinin UPLC yöntem ile analiz edilebilmesi için deneysel tasarım ve optimizasyon tekniği ile bileşiklerin kromatografik ayrımı üzerine etki eden faktörlerin optimal değerleri matematiksel model ile hesaplandı.

Kemometrik optimizasyon işleminde önce bileşiklerin ayrımı üzerine etki edebilecek farklı kolon sıcaklığı, değişik akış hızları, hareketli faz içerisindeki organik ve inorganik solvent sistemlerinin değişik % bileşimleri test edildi. Çalışmalarımızda, hareketli faz akış hızı ( $X_1$ ), hareketli faz içerisindeki 0.1 M  $H_3PO_4$  yüzdesi (%) ( $X_2$ ) ve kolon sıcaklığı ( $X_3$ ) faktörleri kromatografik ayırım üzerine etki eden faktörler olarak seçildi. Bu faktörler üzerinde yapılan ön çalışmalardan faktörlerin seviyeleri belirlendi ve sonuçları çizelge 3.1’de sunuldu.

Deneyisel tasarım ve optimizasyon çalışmalarında üç farklı seviye; düşük (-1) , orta (0) ve yüksek (+) olarak saptandı. Akış hızı ( $X_1$ ) ; 0.16 (-) , 0.26 (0) ve 0.36 (+) mL/dak olarak, 0.15 M  $H_3PO_4$  ( $X_2$ ) ; 30 (-), 50 (0) ve 70 (+) olarak ve kolon sıcaklığı ( $X_3$ ) ; 30 (-), 45(0) ve 60 (+)°C olarak belirlendi.

**Çizelge 3.1.** Araştırılan faktörlerin deneyisel aralıkları

|                                      | Akış Hızı (mL/dak) | 0.10 M $H_3PO_4$ (%) | Sıcaklık (°C) |
|--------------------------------------|--------------------|----------------------|---------------|
| Seviye                               | $X_1$              | $X_2$                | $X_3$         |
| -1                                   | 0.16               | 30                   | 30            |
| 0                                    | 0.26               | 50                   | 45            |
| 1                                    | 0.36               | 70                   | 60            |
| Düşük (-1), Orta (0) and Yüksek (+1) |                    |                      |               |

Optimizasyon çalışmalarındaki seçilen faktörler ve seviyelerine göre,  $3^3$  tam faktöriyel tasarım modeli için hazırlanan tasarımı matrisi çizelge 3.2 de sunulmaktadır. Bu çizelge 3.2 deki tasarım matrisinden de görüldüğü gibi 27 değişik koşulda enjeksiyonla kromatogramları çizdirildi ve bilgisayar hafızasına kaydedildi. Bu 27 değişik koşulda çizdirilen tasarım matrisinin kromatogramları şekil 1.16 da sunuldu.

Tasarım matrisinin kromatogramları, şekil 3.1 den de görüldüğü gibi 0.0 - 3.0 dakika arasında değişen kromatogramlardır. Bu kromatogramlar hafızadan çağrılarak, cevap fonksiyon, bölümünde açıklanan teorik esaslara göre ICRF değerler hesaplandı ve ölçülen koşullara göre çizelge 3.2 de yerine yazıldı. Kromatografik faktörler, (akış hızı ( $X_1$ ), 0.15 M  $H_3PO_4$  %( $X_2$ ) ve kolon sıcaklığı ( $X_3$ )°C) ile faktör etkileşimleri ve ICRF arasında regresyon analizi yapılarak ikinci dereceden polinomial kuadratik model hesaplandı. Bu modelde de faktörler  $X_1$ ,  $X_2$  ve  $X_3$  bağımsız değişkenler ve ICRF bağımlı değişken olarak model de yer aldı. Tasarım matrisi ve ICRF için bulunan model aşağıda sunuldu.

$$Y = 0.928 + 0.050X_1 - 1.185X_2 + 0.415X_3 - 0.069X_{12} + 1.239X_{22} + 0.148X_{32} - 0.107X_1X_2 - 0.049X_1X_3 - 0.640X_2X_3 \quad (27)$$

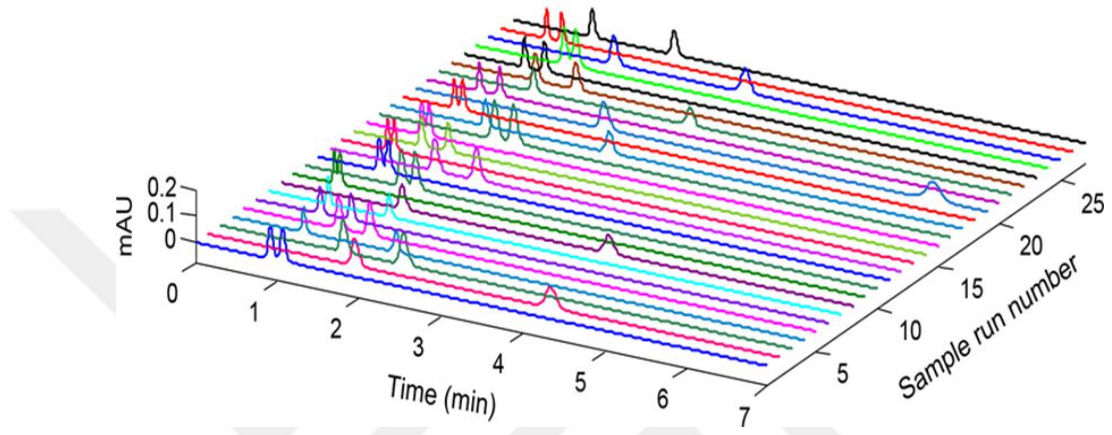
Bu denklemde  $X_1, X_2$  ve  $X_3$  faktörleri sırasıyla, akış hızı ( mL/ dak), 0.1 M  $H_3PO_4$  (%) ve sıcaklık ( $^{\circ}C$ ) olup, faktörlerin karesi,  $X_1X_2$ ,  $X_1X_3$  ve  $X_2X_3$  ise faktör etkileşimlerine karşılık gelmektedir.

GUA-EFE kombinasyonu içeren ticari şurup formülasyonunun analizi için geliştirilen UPLC yöntemi için regresyon analizi ile hesaplanan eşitlik 27 deki ikinci dereceden polinomiyal kuadratik model parametrelerinin ( katsayılarının) anlamlı olup olmadığı hususunu görebilmek için istatistiksel testler yapıldı. İstatistiksel analiz sonuçları çizelge 3.3 de sunuldu. Test sonuçlarından model katsayılarının tablo değerinden daha büyük t- değerleri ve p- hesaplanan  $p = 0.05$  olduğu için anlamlı olduğu gözlemlendi.

Faktör etkileşimlerini görmek için üç boyutlu yüzey – cevap grafikleri ile eş yükseltli eğrileri çizdirildi. Şekil 3.2. a-c den yüzey- cevap grafikleri ve eş yükseltli eğrileri görülebilir. Şekil 3.2 a da kromatografik cevaba karşı akış hızı 0.1 M  $H_3PO_4$  için yüzey- cevap ve eş yükseltli eğrileride; düşük akış hızı ve 0.1 M  $H_3PO_4$  'ün yüksek % aralığında yüksek kromatografik cevap elde edildi. Şekil 3.2 b de ise yüksek kromatografik cevaplar kısmen düşük akış hızında ve yüksek sıcaklıklarda elde edildiği görülmektedir. Şekil 3.2 c deki üç boyutlu cevap- yüzey grafikleri ile eş yükseltli eğrileri, yüksek sıcaklık ve yüksek % 0.1M  $H_3PO_4$  değerlerinde yüksek kromatografik cevap değerleri gözlenmiştir. optimizasyon işlemlerimizde kromatografik cevap ile ifade edilen ICRF değerleridir. Şekil a-c deki yüzey grafikleri ve eş yükseltli eğrileri , kromatografik cevap üzerine kuvvetli faktör etkileşimlerinin olduğunu göstermektedir.

**Çizelge3.2.** Üç faktörlü ve üç-seviyeli tam faktöryel tasarım ile ICRF değerleri

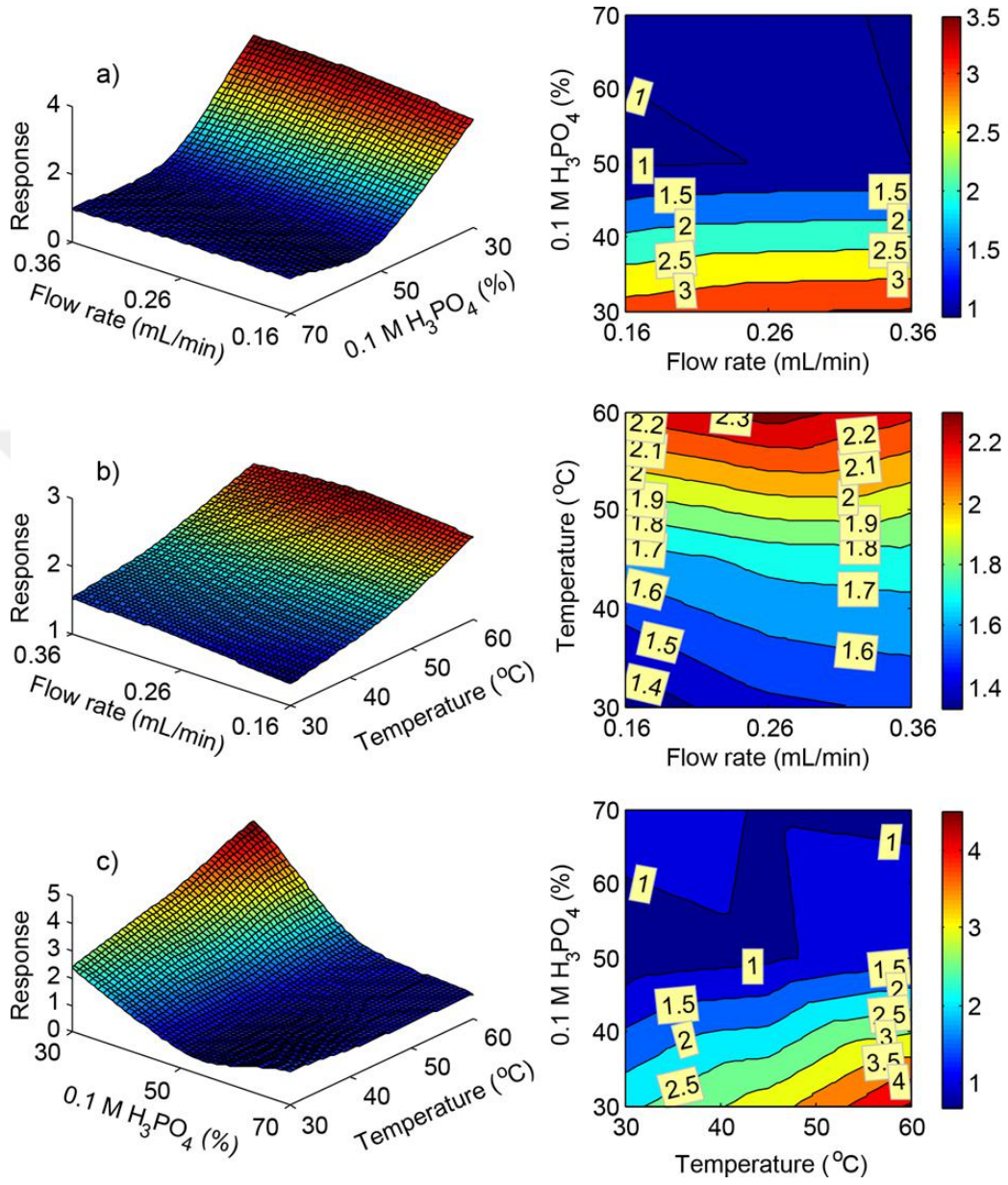
| No. | Akış hızı      | 0.1 M<br>H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (%) | Sıcaklık       | ICRF    |        |
|-----|----------------|---------------------------------------------|----------------|---------|--------|
|     | X <sub>1</sub> | X <sub>2</sub>                              | X <sub>3</sub> | Ölçülen | Tahmin |
| 1   | -1             | -1                                          | -1             | 2.1335  | 2.1699 |
| 2   | 0              | -1                                          | -1             | 2.4267  | 2.4455 |
| 3   | 1              | -1                                          | -1             | 2.5762  | 2.5823 |
| 4   | -1             | 0                                           | -1             | 0.5991  | 0.4930 |
| 5   | 0              | 0                                           | -1             | 0.7092  | 0.6614 |
| 6   | 1              | 0                                           | -1             | 0.7503  | 0.6910 |
| 7   | -1             | 1                                           | -1             | 1.2526  | 1.2950 |
| 8   | 0              | 1                                           | -1             | 1.2950  | 1.3561 |
| 9   | 1              | 1                                           | -1             | 1.2302  | 1.2786 |
| 10  | -1             | -1                                          | 0              | 3.0773  | 3.1255 |
| 11  | 0              | -1                                          | 0              | 3.2662  | 3.3521 |
| 12  | 1              | -1                                          | 0              | 3.4513  | 3.4400 |
| 13  | -1             | 0                                           | 0              | 0.8492  | 0.8084 |
| 14  | 0              | 0                                           | 0              | 0.9393  | 0.9278 |
| 15  | 1              | 0                                           | 0              | 0.9210  | 0.9085 |
| 16  | -1             | 1                                           | 0              | 0.9875  | 0.9701 |
| 17  | 0              | 1                                           | 0              | 0.9917  | 0.9823 |
| 18  | 1              | 1                                           | 0              | 0.8870  | 0.8558 |
| 19  | -1             | -1                                          | 1              | 4.4050  | 4.3779 |
| 20  | 0              | -1                                          | 1              | 4.7337  | 4.5555 |
| 21  | 1              | -1                                          | 1              | 4.5733  | 4.5944 |
| 22  | -1             | 0                                           | 1              | 1.3370  | 1.4205 |
| 23  | 0              | 0                                           | 1              | 1.3882  | 1.4909 |
| 24  | 1              | 0                                           | 1              | 1.3310  | 1.4226 |
| 25  | -1             | 1                                           | 1              | 0.9612  | 0.9420 |
| 26  | 0              | 1                                           | 1              | 0.9268  | 0.9052 |
| 27  | 1              | 1                                           | 1              | 0.7826  | 0.7297 |



**Şekil 3.1.**  $3^3$  tam faktöryel tasarıma karşılık gelen 27 adet örneklerin UPLC kromatogramları

**Çizelge 3.3.** İkinci dereceden polinom kuadratik modelin parametreleri için istatistiksel t ve P testleri

|                 | Katsayı | T- değeri | P-değeri |
|-----------------|---------|-----------|----------|
| Kesim noktası   | 0.9278  | 23.49     | 0.00     |
| $x_1$           | 0.0500  | 2.74      | 0.01     |
| $x_2$           | -1.1849 | -64.80    | 0.00     |
| $x_3$           | 0.4148  | 22.68     | 0.00     |
| $x_1^2$         | -0.0693 | -2.19     | 0.04     |
| $x_2^2$         | 1.2394  | 39.13     | 0.00     |
| $x_3^2$         | 0.1484  | 4.68      | 0.00     |
| $x_1 \cdot x_2$ | -0.1072 | -4.79     | 0.00     |
| $x_1 \cdot x_3$ | -0.0490 | -2.19     | 0.04     |
| $x_2 \cdot x_3$ | -0.6402 | -28.59    | 0.00     |



**Şekil 3.2.** Yüzey grafikleri ve ilgili plotlar, yüzey grafiği hakkında, akış hızı düşük seviyede yüksek ICRF ve yüksek seviyede 0.10 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (a), düşük seviyede akış hızı ve sıcaklık için yüksek ICRF (b) düşük seviyede sıcaklık ve yüksek seviyede 0.10 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> için ICRF(c)

### **3.1.2. Optimal Koşullar UPLC Yöntemi İle GUA- EFE Kombinasyonunun Kalitatif Analizi**

Kemometrik optimizasyon tekniği ile saptanan optimal kromatografik şartlarda UPLC yöntemi ticari şurup formülasyonundeki GUA ve EFE analizlerine uygulandı.

#### **3.1.2.1. Optimal Kromatografik Koşullar**

GUA-EFE karışımının UPLC yöntemiyle analiz işlemleri için Waters UPLC BEH C<sub>18</sub> (50 mm \* 2.1mm i.d, 1.7 µm) kolonu seçildi. Yapılan denemelerde 1.0 µL enjeksiyon hacminin uygun olduğu ve kromatogramların çizilmesinde dedeksiyon dalga boyu olarak 215 nm belirlendi.

Kemometrik optimizasyon metodolojisi ile bulunan optimal faktör değerleri:

Akış hızı: 0.36 mL/dak

Kolon sıcaklığı: 60° C

Hareketli faz bileşimindeki 0.1 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> miktarı: % 56

### 3.1.2.2. Doğrusal Regresyon Denkleminin Hesaplanması

UPLC yönteminde kalibrasyon için 6.0-96.0 µg/mL konsantrasyon aralığında GUA ve 4.0-64.0 µg/mL konsantrasyon aralığında EFE karışımını içeren 25 adet çözelti hazırlandı. Bu kalibrasyon çözeltilerinin GUA için 215.0 nm’de ve EFE için 215.0 nm’de PDA dedeksiyonu ile UPLC kromatogramları kaydı yapılarak bilgisayar hafızasına alındı. Bu UPLC kromatogramlarından GUA ve EFE için sırasıyla alıkonma zamanları 1.754 dakika ve 1.043 dakika olarak rapor edildi. Kromatografik analizde GUA ve EFE bileşiklerinin kromatogramlarından integrasyonla bulunan doğru denklemi elde edildi. Doğrusal regresyon analizi ve istatistiksel sonuçlar Çizelge 3.4 de sunulmuştur.

**Çizelge3.4.** GUA ve EFE için doğrusal regresyon analizi ve istatistiksel sonuçlar

| Parametreler | EFE                   | GUA                   |
|--------------|-----------------------|-----------------------|
| m            | $1.32 \times 10^{-1}$ | $2.41 \times 10^{-1}$ |
| n            | $4.12 \times 10^{-2}$ | $4.95 \times 10^{-3}$ |
| r            | 0.9998                | 0.9999                |
| SD (m)       | $5.8 \times 10^{-4}$  | $7.61 \times 10^{-4}$ |
| SD (n)       | $1.92 \times 10^{-2}$ | $3.77 \times 10^{-2}$ |
| SD ( r )     | $9.14 \times 10^{-4}$ | $6.60 \times 10^{-4}$ |
| LOD          | 0.43                  | 0.47                  |
| LOQ          | 1.45                  | 1.57                  |

m = Regresyon denkleminin egimi,

n = Regresyon denkleminin kesim noktası,

r = Regresyon denkleminin korelasyon katsayısı,

SH (m) = Egimin standart hatası,

SH (n) = kesim noktasının standart hatası,

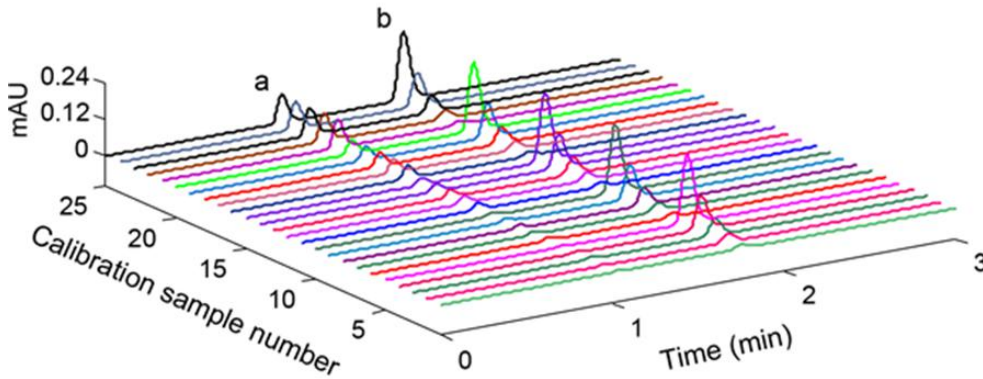
SH (r) = Korelasyon katsayısının standart hatası,

LOD (g/mL) = Yakalama Sınırı,

LOQ (g/mL) = Tayin sınırı,

Kalibrasyon set çözeltilerindeki GUA ve EFE analizi için UPLC yönteminin geliştirilmesinde deneysel tasarım ve optimizasyon yönteminden faydalanılarak bulunan optimal kromatografik şartlara göre çizdirilen kalibrasyon numunelerine ait kromatogramlar Şekil 3.3 de gösterildi.

Kalibrasyon setinde GUA ve EFE bileşiklerini içeren çözeltilerin kromatogramlarının verileri UPLC-H-Class Empower2 programı vasıtasıyla Microsoft Excell olarak transferi gerçekleştirildi. Sonra Matlab 7.0 programında “m-file” yazılımı kullanılarak GUA için 215 nm’de EFE için 215nm’de pik alanları ile konsantrasyon arasındaki matematiksel ilişkiye dayalı doğrusal regesyon analizi ile doğrunun eğimi, kesimi, korelasyon katsayıları ve istatistiksel sonuçları hesaplandı ve Çizelge 3.4’ da sunuldu.



**Şekil 3.3.** GUA (a) ve EFE (b) bileşikleri için kalibrasyon numunelerine (CS number) optimal kromatografik şartın uygulanması ile elde edilen kromatogramlar

### 3.1.2.3. UPLC Analitik Yöntem Validasyonu

Bu doktora tez çalışmasında kemometrik optimizasyon tekniği ile geliştirilen UPLC yönteminin analitik validasyonu için metanol içerisinde GUA için 6.0-96.0 µg/mL ve EFE için 4.0-64.0 µg/mL çalışma aralığında farklı konsantrasyonlar içeren 11 adet karışım çözeltisini içeren validasyon seti hazırlandı. UPLC yönteminin kesinlik ve doğruluğunu test etmek için bu validasyon setindeki kullanıldı. Geri kazanım değerleri GUA için % 99.2, EFE için % 101.1 olarak bulundu. Bağlı standart sapma değerleri GUA için % 2.210 ve EFE için % 2.27 olarak bulundu. Validasyon set çözeltilerinin analizi için optimize edilen UPLC yönteminin validasyon setine uygulanması ile elde edilen sonuçlar Çizelge 3.5 da verildi.

Deneysel tasarım ve optimizasyon metodolojisiyle geliştirilen UPLC yönteminin kesinliği ve doğruluğunu çek etmek için diğer bir validasyon işlemi olarak gün içi ve günler arası ölçümler için GUA için üç farklı konsantrasyonda (10.0, 40.0 ve 70.0 µg/mL) ve EFE için üç farklı konsantrasyonda (20.0, 40.0 ve 60.0 µg/mL) Çizelge 3.6'de gösterildiği biçimde çözeltiler hazırlandı. Gün içi ve günler arası numunelerin aynı gün 1'er saat aralıklar ile ve günler arasında birbirini izleyen 6 günde olmak üzere 3'er tekrarlı kromatogramları alınarak yapılan alan okumaları kullanılarak analiz edildi. Analiz sonuçları yüzde geri kazanım (%), bağlı standart sapma (%) ve bağlı standart hata (%) Çizelge 3.6'da sunuldu.

**Çizelge 3.5.** RP-UPLC yönteminin GUA- EFE ikili yapay karışımlarına uygulanmasıyla elde edilen geri kazanım sonuçları

| No.             | Konulan<br>( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) |      | Bulunan<br>( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) |           | Geri kazanım<br>(%) |       |
|-----------------|------------------------------------------|------|----------------------------------------|-----------|---------------------|-------|
|                 | EFE                                      | GUA  | EFE                                    | GUA       | EFE                 | GUA   |
| M <sub>1</sub>  | 4                                        | 90.0 | 4.2                                    | 88.8      | 104.6               | 98.7  |
| M <sub>2</sub>  | 8                                        | 90.0 | 7.8                                    | 88.2      | 98.1                | 98.0  |
| M <sub>3</sub>  | 16                                       | 90.0 | 16.0                                   | 90.1      | 100.1               | 100.1 |
| M <sub>4</sub>  | 32                                       | 90.0 | 32.1                                   | 89.6      | 100.4               | 99.5  |
| M <sub>5</sub>  | 64                                       | 90.0 | 64.1                                   | 89.3      | 100.2               | 99.2  |
| M <sub>6</sub>  | 6                                        | 6    | 6.2                                    | 6.3       | 103.7               | 104.3 |
| M <sub>7</sub>  | 6                                        | 12   | 6.0                                    | 11.5      | 100.3               | 96.2  |
| M <sub>8</sub>  | 6                                        | 24   | 6.1                                    | 23.2      | 101.8               | 96.8  |
| M <sub>9</sub>  | 6                                        | 48   | 6.2                                    | 47.9      | 103.4               | 99.7  |
| M <sub>10</sub> | 6                                        | 96   | 5.9                                    | 95.0      | 98.0                | 99.0  |
| M <sub>11</sub> | 6                                        | 90   | 5.9                                    | 95.0      | 98.0                | 105.6 |
|                 |                                          |      |                                        | $\bar{x}$ | 101.1               | 99.2  |
|                 |                                          |      |                                        | SD        | 2.27                | 2.21  |
|                 |                                          |      |                                        | RSD       | 2.25                | 2.23  |

No = Karışım numarası ,

$\bar{x}$  = Ortalama ,

SS = Standart Sapma,

BSS = % Bağlı Standart Sapma,

**Çizelge 3.6.** Gün içi ve günler arası numuneler için deney sonuçları

|           | Konulan<br>(µg/µL) |     | Bulunan<br>(µg/µL) |       | Geri kazanım<br>(%) |      | BSS<br>(%) |      | BH<br>(%) |       |
|-----------|--------------------|-----|--------------------|-------|---------------------|------|------------|------|-----------|-------|
|           | EFE                | GUA | EFE                | GUA   | EFE                 | GUA  | EFE        | GUA  | EFE       | GUA   |
| Gün içi   | 20                 | 10  | 20.08              | 10.00 | 100.4               | 100  | 0.66       | 0.88 | 0.41      | 0.04  |
|           | 40                 | 40  | 40.15              | 39.72 | 100.4               | 99.3 | 0.27       | 0.21 | 0.38      | -0.70 |
|           | 60                 | 70  | 59.91              | 68.48 | 99.9                | 97.8 | 0.57       | 0.4  | -0.15     | -2.18 |
| Gün arası | 20                 | 10  | 19.56              | 9.76  | 97.8                | 97.6 | 1.32       | 1.19 | -2.18     | -2.4  |
|           | 40                 | 40  | 40.06              | 39.68 | 100.2               | 99.2 | 0.86       | 0.55 | 0.15      | -0.81 |
|           | 60                 | 70  | 59.95              | 68.55 | 99.9                | 97.9 | 0.66       | 0.42 | -0.09     | -2.07 |

BSS = % Bağıl Standart Sapma

BH = % Bağıl hata

Kemometrik optimizasyon ile bulunan kromatografik koşullarda GUA ve EFE bileşiklerini içeren ticari şurup preparatın yardımcı maddelerin aktif bileşiklerin analizi üzerine etkisini değerlendirmek için standart ekleme tekniği uygulandı. Bu deneysel işlemde mL'sinde 100 mg GUA ve 6.66 mg EFE içeren ticari preparat için 1 mL alınarak 10 mL'lik balon jojeye transfer edildi ve hacim metanol ile tamamlandı. Üç farklı konsantrasyon için bu çözeltilerden 2.mL'lik kısım 10 mL'lik balon jojeye aktarıldı ve numune içeriğinin üzerine 6.0, 12.0 ve 16.0 µg/mL GUA ve 8.0, 30.0 ve 40.0µg/mL EFE olacak şekilde stok çözeltilerden ilave edilerek standart eklemeli çözeltiler hazırlandı. Bu çözeltilerin kemometrik optimizasyon koşullarında GUA için 215.0 nm'de ve EFE için 215.0 nm'de PDA dedeksiyon ile kromatogramlar elde edildi. Bu kromatogramlardan okunan pik alanları kalibrasyon denklemlerinde yerine konularak numune içeriğindeki GUA ve EFE içerikleri hesaplandı. Standart eklemeli numuneleri içeren çözeltilerin analiz sonuçları Çizelge 3.7'de gösterildi.

Standart eklemeli çözeltilerden bulunan toplam GUA ve EFE miktarlarından formülasyon ilavesi çıkarılarak eklenen GUA ve EFE miktarları hesaplandı. Buna göre ilave edilen standart miktarlar için GUA ve EFE için bulunan ortalama % geri kazanım ve bağıl standart sapma değerleri hesaplanarak sunuldu (Çizelge 3.7). Bu standart eklemeli deneylerde üç farklı konsantrasyon seviyesi için üç tekrar yapılarak ortalama sonuçlara ulaşıldı.

**Çizelge 3.7.** Standart ekleme teknigi kullanılarak elde edilen % geri kazanım Sonuçları

|             | Konulan<br>(µg/µL) |     | Bulunan<br>(µg/µL) |      | Geri kazanım<br>(%) |       | BSS (%) |      |
|-------------|--------------------|-----|--------------------|------|---------------------|-------|---------|------|
|             | EFE                | GUA | EFE                | GUA  | EFE                 | GUA   | EFE     | GUA  |
| Formulasyon | 20                 | 20  | 20.8               | 20.2 | 103.8               | 101.0 | 0.41    | 0.21 |
| Formulasyon | 40                 | 40  | 43.0               | 41.9 | 107.4               | 104.8 | 1.73    | 1.56 |
| Formulasyon | 60                 | 60  | 61.0               | 61.0 | 101.7               | 101.7 | 0.37    | 1.32 |

BSS= % Bağlı Standart Sapma

### 3.2. UPLC Analizinde Sistem Uygunluk Parametreleri

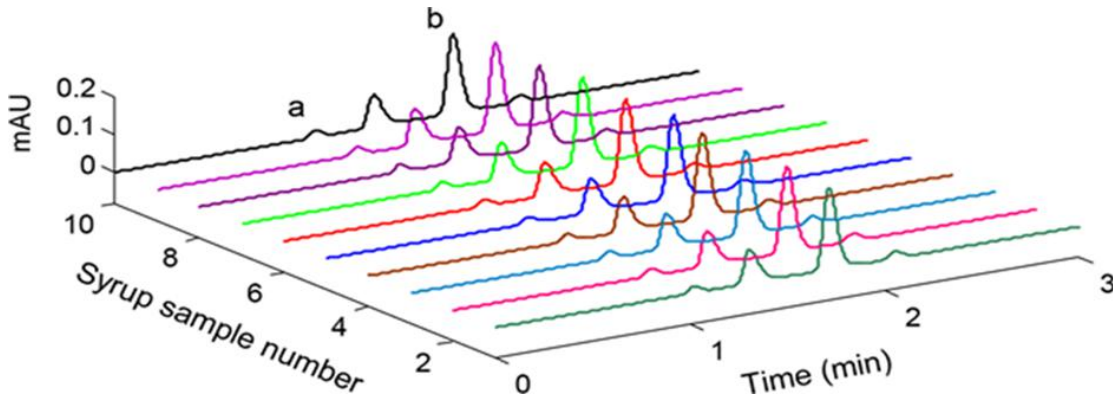
Analiz işlemlerinde kromatografik sistemin, dedeksiyon duyarlılığı, ayırma faktörü, seçicilik, teorik tabaka sayısı, kuyruklanma faktörü gibi parametrelerin sayısal değerlerine dayalı olarak doğrulanması kromatografik analizin gereklerindendir. Bu doktora tez çalışmasında seçicilik, rezolüsyon, pik asimetri, kuyruklanma faktörü ve teorik tabaka sayısı parametrelerinin GUA ve EFE bileşiklerini içeren bir numunenin UPLC kromatogramında hesaplanan değerleri Çizelge 3.8’de listelendi. GUA ve EFE karışımının UPLC yöntemiyle analizinde bu değerlerin istenen limitler içerisinde olduğu gözlemlendi.

**Çizelge 3.8.** Sistem uygunluk parametreleri

|                | Kapasite faktörü | Seçicilik | Resolüsyon | Kuyruklanma | Simetri faktörü | Teorik tabaka sayısı |
|----------------|------------------|-----------|------------|-------------|-----------------|----------------------|
| EF             | 20.78            | -         | -          | 1.41        | 1.41            | 1190                 |
| GUA            | 35.88            | 1.73      | 5.66       | 1.27        | 1.27            | 2728                 |
| Referans değer | >2               | >1        | >2         | <2          | <2              | >2000                |

### 3.3. UPLC Yönteminin Farmasötik Preparatlara Uygulaması

Optimize edilen UPLC yönteminin ticari oftalmik preparatlara uygulanmasında, 1 mL BROKSİN 50 mL'lik balonjojeye aktarıldıktan sonra hacmi metanolle tamamlandı. Balonjojede hazırlanan stok karışım manyetik karıştırıcı ile 35 dakika karıştırıldı ve membran filtre (Sartorius Minisart  $\phi=0,20\ \mu\text{m}$ )'den süzüldü. Bu stok çözeltiden 4.5 mL alınıp 10 mL'lik balon jojeye aktarıldıktan sonra hacmi metanolle tamamlandı. Hazırlanan çözeltileri “vial” lere konuldu ve optimal kromatografik şartlardaki kromatogramları elde edildi. GUA ve EFE kromatogramlarından hesaplanarak elde edilen kalibrasyon grafikleri ile göz damlası numunesinin içerisindeki GUA ve EFE miktarları hesaplandı. Elde edilen kromatogram Şekil 3.4’de sunulmuştur.



**Şekil 3.4.** GUA (a) ve EFE (b) bileşikleri için ticari şurup preparatın numunesine optimal kromatografik şartın uygulanması ile elde edilen kromatogramlar .

Yukarıda açıklanan kromatografik analiz işlemi BROKSİN® ticari şurup preparatına uygulanmıştır. BROKSİN® ticari şurup sonuçları Çizelge 3.9’da sunuldu.

**Çizelge 3.9.** RP-UPLC yöntemiyle şurup numunelerinin analiz sonuçları (100 mg GUA + 6.66 mg EF/5ml )

| No.  | mg/mL |       |
|------|-------|-------|
| No.  | EFE   | GUA   |
| 1    | 6.1   | 91.3  |
| 2    | 6.0   | 94.6  |
| 3    | 5.8   | 92.5  |
| 4    | 6.0   | 93.5  |
| 5    | 5.8   | 94.4  |
| 6    | 6.0   | 93.6  |
| 7    | 6.1   | 93.0  |
| 8    | 5.7   | 92.1  |
| 9    | 5.9   | 94.1  |
| 10   | 5.8   | 88.5  |
| Mean | 5.93  | 92.76 |
| SS   | 0.14  | 1.81  |
| BSS  | 2.39  | 1.96  |

$\bar{x}$  = Aritmetik Ortalama

SS = Standart Sapma

BSS= % Bağıl Standart Sapma

### 3.4. Guafenesin - Psödoefedrin Karışımının UPLC Yöntem ile Kantitatif Analizi

Guafenesin – Psödoefedrin kombinasyonunu içeren ticari şurup formülasyonunun kantitatif analizi için yeni bir UPLC yöntemi geliştirildi. Deneysel kromatografik şartların saptanmasında tam faktöriyel üç seviyeli bir tasarım modeli kullanarak gerçekleştirildi.

### 3.5. UPLC Yönteminin geliştirmesinde kemometrik Optimizasyonu

Bir ticari şurup formülasyonundaki GUA ve PS bileşiklerinin UPLC yöntem ile analiz edilebilmesi için deneysel tasarım ve optimizasyon tekniği ile bileşiklerin kromatografik ayrımı üzerine etki eden faktörlerin optimal değerleri matematiksel model ile hesaplandı.

Kemometrik optimizasyon işleminde önce bileşiklerin ayrımı üzerine etki edebilecek farklı kolon sıcaklığı, değişik akış hızları, hareketli faz içerisindeki organik ve inorganik solvent sistemlerinin değişik % bileşimleri test edildi. Çalışmalarımızda, hareketli faz akış hızı (  $X_1$  ), hareketli faz içerisindeki 0.1 M  $H_3PO_4$  yüzdesi (%) (  $X_2$  ) ve kolon sıcaklığı (  $X_3$  ) faktörleri kromatografik ayırım üzerine etki eden faktörler olarak seçildi. Bu faktörler üzerinde yapılan ön çalışmalardan faktörlerin seviyeleri belirlendi ve sonuçları çizelge 3.10’de sunuldu.

**Çizelge 3.10.** Araştırılan faktörlerin deneysel aralıkları

|      | Flow rate      | 0.10 M<br>H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (%) | Temp           |
|------|----------------|----------------------------------------------|----------------|
| Düzy | X <sub>1</sub> | X <sub>2</sub>                               | X <sub>3</sub> |
| -1   | 0.18           | 30                                           | 32             |
| 0    | 0.28           | 50                                           | 45             |
| 1    | 0.38           | 70                                           | 58             |

Düşük (-1), Orta (0) and Yüksek (+1)

Deneyisel tasarım ve optimizasyon çalışmalarında üç farklı seviye; düşük (-1) , orta (0) ve yüksek (+) olarak saptandı. Akış hızı ( $X_1$ ) ; 0.16 (-) , 0.26 (0) ve 0.36 (+) mL/dak olarak, 0.15 M  $H_3PO_4$  ( $X_2$ ) ; 30 (-), 50 (0) ve 70 (+) olarak ve kolon sıcaklığı ( $X_3$ ) ; 30 (-), 60 (0) ve 60 (+)°C olarak belirlendi.

Optimizasyon çalışmalarındaki seçilen faktörler ve seviyelerine göre,  $3^3$  tam faktöriyel tasarım modeli için hazırlanan tasarımı matrisi çizelge 3.11 'de sunulmaktadır. Bu çizelge 3.10 'deki tasarım matrisinden de görüldüğü gibi 27 değişik koşulda enjeksiyonla kromatogramları çizdirildi ve bilgisayar hafızasına kaydedildi. Bu 27 değişik koşulda çizdirilen tasarım matrisinin kromatogramları şekil 1.28 de sunuldu.

Tasarım matrisinin kromatogramları, şekil 3.5 den de görüldüğü gibi 0.0 - 5.0 dakika arasında değişen kromatogramlardır. Bu kromatogramlar hafızadan çağrılarak, cevap fonksiyon, bölümünde açıklanan teorik esaslara göre ICRF değerler hesaplandı ve ölçülen koşullara göre çizelge 3.11' de yerine yazıldı. Kromatografik faktörler, (akış hızı ( $X_1$ ), 0.1 M  $H_3PO_4$  %( $X_2$ ) ve kolon sıcaklığı ( $X_3$ )°C) ile faktör etkileşimleri ve ICRF arasında regresyon analizi yapılarak ikinci dereceden polinomial kuadratik model hesaplandı. Bu modelde de faktörler  $X_1$ ,  $X_2$  ve  $X_3$  bağımsız değişkenler ve ICRF bağımlı değişken olarak model de yer aldı. Tasarım matrisi ve ICRF için bulunan model aşağıda sunuldu.

$$Y = 0.9278 + 0.05 x_1 - 1.1849 x_2 + 0.4148 x_3 - 0.0693 x_{12} + 1.2394 x_{22} + 0.1484 x_{32} - 0.1072 x_1 x_2 - 0.0490 x_1 x_3 - 0.6402 x_2 x_3$$

Bu denklemde  $X_1, X_2$  ve  $X_3$  faktörleri sırasıyla, akış hızı ( mL/ dak), 0.1 M  $H_3PO_4$  (%) ve sıcaklık ( $^{\circ}C$ ) olup, faktörlerin karesi,  $X_1X_2$ ,  $X_1X_3$  ve  $X_2X_3$  ise faktör etkileşimlerine karşılık gelmektedir.

GUA-EFE kombinasyonu içeren ticari şurup formulasyonunun analizi için geliştirilen UPLC yöntemi için regresyon analizi ile hesaplananeşitlik 27 deki ikinci dereceden polinomiyal kuadratik model parametrelerinin ( katsayılarının) anlamlı olup olmadığı hususunu görebilmek için istatistiksel testler yapıldı. İstatistiksel analiz sonuçları çizelge 3.12 'de sunuldu. Test sonuçlarından model katsayılarının tablo değerinden daha büyük t- değerleri ve p- hesaplanan < p = 0.05 olduğu için anlamlı olduğu gözlemlendi.

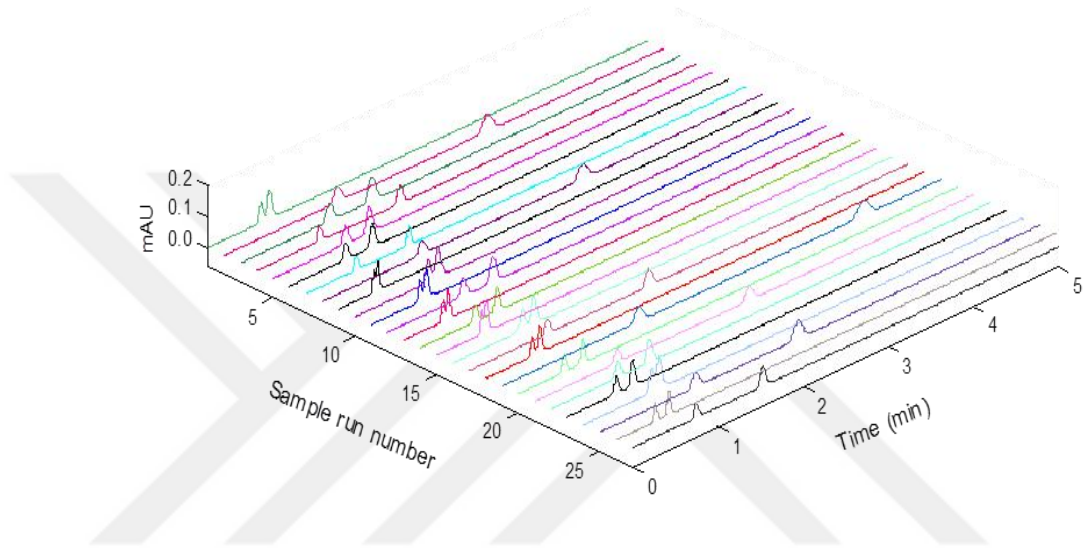
Faktör etkileşimlerini görmek için üç boyutlu yüzey – cevap grafikleri ile eş yükselti eğrileri çizdirildi. Şekil 3.6 a-c den yüzey- cevap grafikleri ve eş yükselti eğrileri görülebilir. Şekil 3.6 a da kromatografik cevaba karşı akış hızı 0.1 M  $H_3PO_4$  için yüzey- cevap ve eş yükselti eğrileride ; düşük akış hızı ve 0.1 M  $H_3PO_4$  'ün yüksek % aralığında yüksek kromatografik cevap elde edildi. Şekil 3.6 b de ise yüksek kromatografik cevaplar kısmen yüksek akış hızında ve yüksek sıcaklıklarda elde edildiği görülmektedir. Şekil 3.6 c deki üç boyutlu cevap- yüzey grafikleri ile eş yükselti eğrileri, düşük sıcaklık ve düşük % 0.1M  $H_3PO_4$  değerlerinde yüksek kromatografik cevap değerleri gözlenmiştir. Optimizasyon işlemlerimizde kromatografik cevap ile ifade edilen ICRF değerleridir.

Şekil a-c deki yüzey grafikleri ve eş yükselti eğrileri, kromatografik cevap üzerine kuvvetli faktör etkileşimlerinin olduğunu göstermektedir.

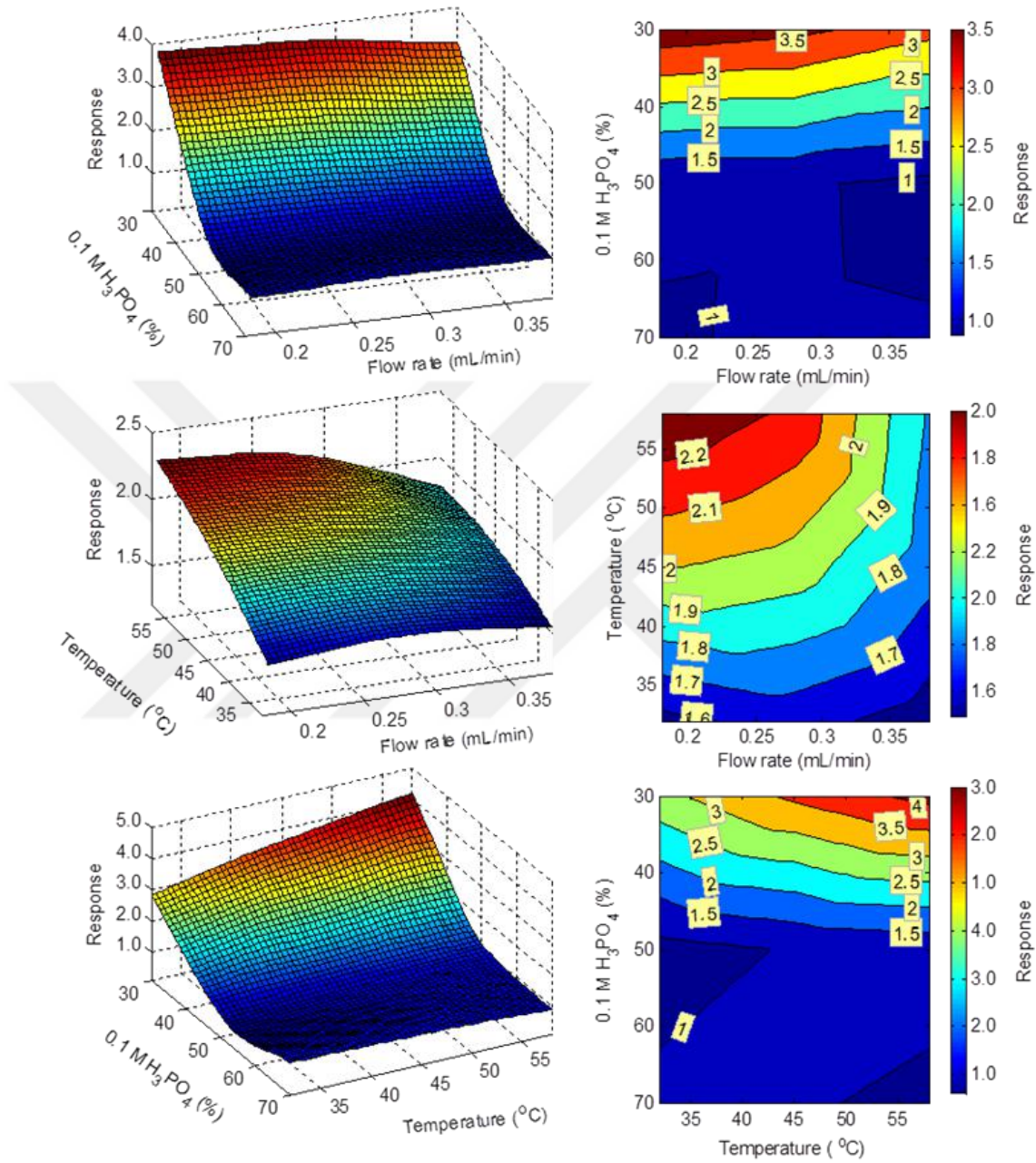
Kemometrik optimizasyon ile ticari şurup formülasyonundan GUA ve PS bileşiklerinin UPLC yöntemiyle kantitatif analizleri için kolon sıcaklığının 60° C, akış hızının 0.38 mL/ dak ve hareketli faz bileşimindeki 0.1 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> oranı % 56.3 saptandı.

**Çizelge 3.11.** Üç faktörlü üç-seviyeli tam faktöryel tasarım ve ICRF ile tahmin değerleri

| No. | Akış hızı<br>(mL/min)<br>X <sub>1</sub> | 0.10 M H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub><br>(%)<br>X <sub>2</sub> | Sıcaklık<br>(°C)<br>X <sub>3</sub> |
|-----|-----------------------------------------|----------------------------------------------------------------|------------------------------------|
| 1   | -1                                      | -1                                                             | -1                                 |
| 2   | 0                                       | -1                                                             | -1                                 |
| 3   | 1                                       | -1                                                             | -1                                 |
| 4   | -1                                      | 0                                                              | -1                                 |
| 5   | 0                                       | 0                                                              | -1                                 |
| 6   | 1                                       | 0                                                              | -1                                 |
| 7   | -1                                      | 1                                                              | -1                                 |
| 8   | 0                                       | 1                                                              | -1                                 |
| 9   | 1                                       | 1                                                              | -1                                 |
| 10  | -1                                      | -1                                                             | 0                                  |
| 11  | 0                                       | -1                                                             | 0                                  |
| 12  | 1                                       | -1                                                             | 0                                  |
| 13  | -1                                      | 0                                                              | 0                                  |
| 14  | 0                                       | 0                                                              | 0                                  |
| 15  | 1                                       | 0                                                              | 0                                  |
| 16  | -1                                      | 1                                                              | 0                                  |
| 17  | 0                                       | 1                                                              | 0                                  |
| 18  | 1                                       | 1                                                              | 0                                  |
| 19  | -1                                      | -1                                                             | 1                                  |
| 20  | 0                                       | -1                                                             | 1                                  |
| 21  | 1                                       | -1                                                             | 1                                  |
| 22  | -1                                      | 0                                                              | 1                                  |
| 23  | 0                                       | 0                                                              | 1                                  |
| 24  | 1                                       | 0                                                              | 1                                  |
| 25  | -1                                      | 1                                                              | 1                                  |
| 26  | 0                                       | 1                                                              | 1                                  |
| 27  | 1                                       | 1                                                              | 1                                  |



**Şekil 3.5.**  $3^3$  tam faktöryel tasarıma karşılık gelen 27 adet örneklerin UPLC kromatogramları



**Şekil 3.6.** Yüzey grafikleri ve ilgili plotlar, Yüzey grafiği hakkında , düşük seviyede akış hızı ve 0.1 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> yüksek ICRF (a) , Yüksek seviyede akış hızı ve sıcaklık için yüksek ICRF (b) düşük seviyede sıcaklık ve 0.1 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> için ICRF(c) .

**Çizelge 3.12.** İkinci dereceden polinom kuadratik modelin parametreleri için istatistiksel t ve P testleri

|                 | katsayı | t -değeri | P-değeri |
|-----------------|---------|-----------|----------|
| Kesim noktası   | 1.1200  | 31.2      | 0.000    |
| $x_1$           | -0.1322 | -7.9      | 0.000    |
| $x_2$           | -1.2610 | -75.8     | 0.000    |
| $x_3$           | 0.2488  | 15.0      | 0.000    |
| $x_1^2$         | -0.1016 | -3.5      | 0.002    |
| $x_2^2$         | 1.2724  | 44.2      | 0.000    |
| $x_3^2$         | -0.0651 | -2.3      | 0.037    |
| $x_1 \cdot x_2$ | 0.1881  | 9.2       | 0.000    |
| $x_1 \cdot x_3$ | -0.1188 | -5.8      | 0.000    |
| $x_2 \cdot x_3$ | -0.3820 | -18.7     | 0.000    |

### **3.6. Optimal Koşullar UPLC Yöntemi İle GUA- PS Kombinasyonunun Kalitatif**

#### **Analizi**

Kemometrik optimizasyon tekniği ile saptanan optimal kromatografik şartlarda UPLC yöntemi ticari şurup formülasyonundeki GUA ve EFE analizlerine uygulandı.

### **3.7. Optimal Kromatografik Koşullar**

GUA-PSkarışımının UPLC yöntemiyle analiz işlemleri için Waters UPLC BEH C<sub>18</sub> (50 mm \* 2.1mm i.d, 1.7 µm) kolonu seçildi. Yapılan denemelerde 1.0 µL enjeksiyon hacminin uygun olduğu ve kromatogramların çizilmesinde dedeksiyon dalga boyu olarak 215 nm belirlendi.

Kemometrik optimizasyon methodology ile bulunan optimal faktör değerleri:

Akış hızı: 0.38 mL/dak

Kolon sıcaklığı: 60° C

Hareketli faz bileşimindeki 0.1 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> miktarı: % 56

### 3.8. Doğrusal Regresyon Denkleminin Hesaplanması

UPLC yönteminde kalibrasyon için 5.0-80.0 µg/mL konsantrasyon aralığında GUA ve 10.0-90.0 µg/mL konsantrasyon aralığında PS karışımını içeren 25 adet çözelti hazırlandı. Bu kalibrasyon çözeltilerinin GUA için 215.0 nm’de ve PS için 215.0 nm’de PDA dedeksiyonu ile UPLC kromatogramları kaydı yapılarak bilgisayar hafızasına alındı. Bu UPLC kromatogramlarından GUA ve PS için sırasıyla alıkonma zamanları 1.03 dakika ve 1.90 dakika olarak rapor edildi. Kromatografik analizde GUA ve PS bileşiklerinin kromatogramlarından integrasyonla bulunan doğru denklemi elde edildi. Doğrusal regresyon analizi ve istatistiksel sonuçlar Çizelge 3.13’de sunulmuştur.

**Çizelge 3.13.** GUA ve PS için doğrusal regresyon analizi ve istatistiksel sonuçlar

| Parametreler   | PS       | GUA      |
|----------------|----------|----------|
| $\lambda$ (nm) |          |          |
| m              | 0.1182   | 0.1973   |
| n              | -0.0304  | 0.0929   |
| r              | 0.9990   | 0.9996   |
| SD (m)         | 1.08E-03 | 1.10E-03 |
| SD (n)         | 6.19E-02 | 4.54E-02 |
| SD ( r )       | 1.90E-03 | 1.16E-03 |
| LOD            | 1.57     | 0.69     |
| LOQ            | 5.23     | 2.30     |

m = Regresyon denkleminin egimi,

n = Regresyon denkleminin kesim noktası,

r = Regresyon denkleminin korelasyon katsayısı,

SH (m) = Egimin standart hatası,

SH (n) = kesim noktasının standart hatası,

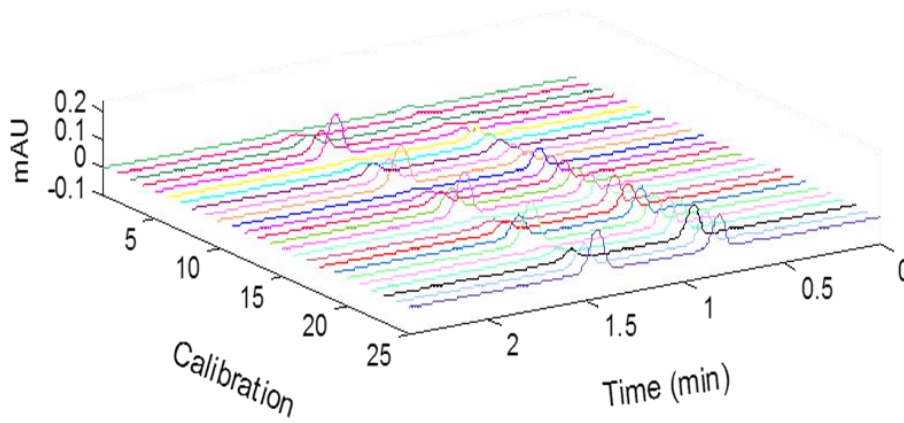
SH (r) = Korelasyon katsayısının standart hatası,

LOD (g/mL) = Yakalama sınırı,

LOQ (g/mL) = Tayin sınırı,

Kalibrasyon set çözeltilerindeki GUA ve PS analizi için UPLC yönteminin geliştirilmesinde deneysel tasarım ve optimizasyon yönteminden faydalanılarak bulunan optimal kromatografik şartlara göre çizdirilen kalibrasyon numunelerine ait kromatogramlar Şekil 3.7’de gösterildi.

Kalibrasyon setinde GUA ve PS bileşiklerini içeren çözeltilerin kromatogramlarının verileri UPLC-H-Class Empower 2 programı vasıtasıyla Microsoft Excell olarak transferi gerçekleştirildi. Sonra Matlab 7.0 programında “m-file” yazılımı kullanılarak GUA için 215 nm’de PS için 215nm’de pik alanları ile konsantrasyon arasındaki matematiksel ilişkiye dayalı doğrusal regresyon analizi ile doğrunun eğimi, kesimi, korelasyon katsayıları ve istatistiksel sonuçları hesaplandı ve Çizelge 3.13’ da sunuldu.



**Şekil 3.7.** GUA (a) ve PS (b) bileşikleri için kalibrasyon numunelerine (CS number) optimal kromatografik şartın uygulanması ile elde edilen kromatogramlar

### 3.9. UPLC Analitik Yöntem Validasyonu

Bu doktora tez çalışmasında kemometrik optimiizasyon tekniği ile geliştirilen UPLC yönteminin analitik validasyonu için metanol içerisinde GUA için 5.0-80.0 µg/mL ve PS için 10.0 - 90.0 µg/mL çalışma aralığında farklı konsantrasyonlar içeren 11 adet karışım çözeltisini içeren validasyon seti hazırlandı. UPLC yönteminin kesinlik ve doğruluğunu test etmek için bu validasyon setindeki kullanıldı. Geri kazanım değerleri GUA için % 97.8 , PS için % 99.5 olarak bulundu. Bağıl standart sapma değerleri GUA için % 1.42 ve PS için % 2.42 olarak bulundu. Validasyon set çözeltilerinin analizi için optimize edilen UPLC yönteminin validasyon setine uygulanması ile elde edilen sonuçlar Çizelge 3.14' da verildi.

Deneyssel tasarım ve optimizasyon metodolojisiyle geliştirilen UPLC yönteminin kesinliği ve doğruluğunu çek etmek için diğer bir validasyon işlemi olarak gün içi ve günler arası ölçümler için GUA için üç farklı konsantrasyonda (20.0, 40.0 ve 60.0µg/mL) ve PS için üç farklı konsantrasyonda (30.0, 50.0 ve 70.0 µg/mL) Çizelge 3.15'de gösterildiği biçimde çözeltiler hazırlandı. Gün içi ve günler arası numunelerin aynı gün 1'er saat aralıklar ile ve günler arasında birbirini izleyen 6 günde olmak üzere 3'er tekrarlı kromatogramları alınarak yapılan alan okumaları kullanılarak analiz edildi. Analiz sonuçları yüzde geri kazanım (%), bağıl standart sapma (%) ve bağıl standart hata (%) Çizelge 3.14'da sunuldu.

**Çizelge 3.14.** RP-UPLC yönteminin GUA- PS ikili yapay karışımlarına uygulanmasıyla elde edilen geri kazanım sonuçları

| No.             | Konulan<br>( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) |      | Bulunan<br>( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) |          | Geri kazanım<br>(%) |       |
|-----------------|------------------------------------------|------|----------------------------------------|----------|---------------------|-------|
|                 | PS                                       | GUA  | PS                                     | GUA      | PS                  | GUA   |
| M <sub>1</sub>  | 10                                       | 60.0 | 10.4                                   | 60.3     | 103.9               | 100.5 |
| M <sub>2</sub>  | 30                                       | 60.0 | 30.2                                   | 59.5     | 100.7               | 99.1  |
| M <sub>3</sub>  | 50                                       | 60.0 | 48.8                                   | 59.1     | 97.6                | 98.6  |
| M <sub>4</sub>  | 70                                       | 60.0 | 68.7                                   | 58.8     | 98.2                | 97.9  |
| M <sub>5</sub>  | 90                                       | 60.0 | 89.7                                   | 58.9     | 99.7                | 98.2  |
| M <sub>6</sub>  | 18                                       | 5    | 4.8                                    | 6.3      | 102.9               | 96.3  |
| M <sub>7</sub>  | 18                                       | 10   | 9.7                                    | 11.5     | 100.1               | 97.4  |
| M <sub>8</sub>  | 18                                       | 20   | 19.1                                   | 23.2     | 97.4                | 95.7  |
| M <sub>9</sub>  | 18                                       | 40   | 38.7                                   | 47.9     | 96.6                | 96.6  |
| M <sub>10</sub> | 18                                       | 80   | 78.2                                   | 95.0     | 98.2                | 97.8  |
| M <sub>11</sub> | 18                                       | 60   | 57.9                                   | 95.0     | 98.1                | 96.5  |
|                 |                                          |      |                                        | Ortalama | 99.5                | 97.8  |
|                 |                                          |      |                                        | SS       | 2.42                | 1.42  |
|                 |                                          |      |                                        | BSS      | 2.43                | 1.45  |

No = Karışım Numarası

$\bar{X}$  = Ortalama

SS = Standart Sapma

BSS = % Bağıl Standart Sapma

**Çizelge 3.15.** Gün içi ve günler arası numuneler için deney sonuçları

|           | konulan<br>(µg/µL) |     | Bulunan<br>(µg/µL) |       | Gerikazanım<br>(%) |       | BSS % |      | BH %  |       |
|-----------|--------------------|-----|--------------------|-------|--------------------|-------|-------|------|-------|-------|
|           | PS                 | GUA | PS                 | GUA   | PS                 | GUA   | PS    | GUA  | PS    | GUA   |
| Gün içi   | 30                 | 20  | 29.84              | 19.81 | 99.48              | 99.04 | 1.69  | 2.99 | -0.52 | -0.96 |
|           | 50                 | 40  | 48.59              | 39.11 | 97.18              | 97.77 | 0.18  | 1.64 | -2.82 | -2.23 |
|           | 70                 | 60  | 68.36              | 57.92 | 97.65              | 96.53 | 1.43  | 0.87 | -2.35 | -3.47 |
| Gün arası | 30                 | 20  | 31.00              | 19.82 | 103.33             | 99.08 | 4.54  | 2.44 | 3.33  | -0.92 |
|           | 50                 | 40  | 49.20              | 38.95 | 98.39              | 97.39 | 0.73  | 0.96 | -1.61 | -2.61 |
|           | 70                 | 60  | 66.15              | 57.79 | 94.50              | 96.31 | 1.01  | 1.19 | -5.50 | -3.69 |

SS = Standart Sapma

BSS = % Bağlı Standart Sapma

BH%= Bağlı hata

Kemometrik optimizasyon ile bulunan kromatografik koşullarda GUA ve PS bileşiklerini içeren ticari şurup preparatın yardımcı maddelerin aktif bileşiklerin analizi üzerine etkisini değerlendirmek için standart ekleme tekniği uygulandı. Bu deneysel işlemde mL'inde 100 mg GUA ve 30 mg PS içeren ticari preparat için 1 mL alınarak 10 mL'lik balon jojeye transfer edildi ve hacim metanol ile tamamlandı. Üç farklı konsantrasyon için bu çözeltilerden 2.mL'lik kısım 10 mL'lik balon jojeye aktarıldı ve numune içeriğinin üzerine 20.0, 40.0 ve 60 .0 µg/mL GUA ve 20.0, 40.0 ve 60.0µg/mL PS olacak şekilde stok çözeltilerden ilave edilerek standart eklemeli çözeltiler hazırlandı. Bu çözeltilerin kemometrik optimizasyon koşullarında GUA için 215.0 nm'de ve PS için 215.0 nm'de PDA dedeksiyon ile kromatogramlar elde edildi. Bu kromatogramlardan okunan pik alanları kalibrasyon denklemlerinde yerine konularak numune içeriğindeki GUA ve PS içerikleri hesaplandı. Standart eklemeli numuneleri içeren çözeltilerin analiz sonuçları Çizelge 3.16'de gösterildi.

Standart ekleme çözeltilerden bulunan toplam GUA ve PS miktarlarından formülasyon ilavesi çıkarılarak eklenen GUA ve PS miktarları hesaplandı. Buna göre ilave edilen standart miktalar için GUA ve PS için bulunan ortalama % geri kazanım ve bağıl standart sapma değerleri hesaplanarak sunuldu (Çizelge 3.17). Bu standart eklemeli deneylerde üç farklı konsantrasyon seviyesi için üç tekrar yapılarak ortalama sonuçlara ulaşıldı.

**Çizelge 3.16.** Standart ekleme teknigi kullanılarak elde edilen % geri kazanım sonuçlar

|             | Konulan |     | Bulunan<br>(µg/µL) |       | Geri kazanım<br>(%) |       | BSS % |      |
|-------------|---------|-----|--------------------|-------|---------------------|-------|-------|------|
|             | PS      | GUA | PS                 | GUA   | PS                  | GUA   | PS    | GUA  |
| Formulasyon | 20      | 10  | 19.66              | 10.04 | 98.3                | 100.4 | 0.73  | 0.19 |
| Formulasyon | 40      | 20  | 39.10              | 19.95 | 97.8                | 99.7  | 0.61  | 0.87 |
| Formulasyon | 60      | 40  | 62.66              | 40.79 | 104.4               | 102.0 | 0.37  | 0.66 |

BSS = % Bagıl Standart Sapma

### 3.10 UPLC Analizinde Sistem Uygunluk Parametreleri

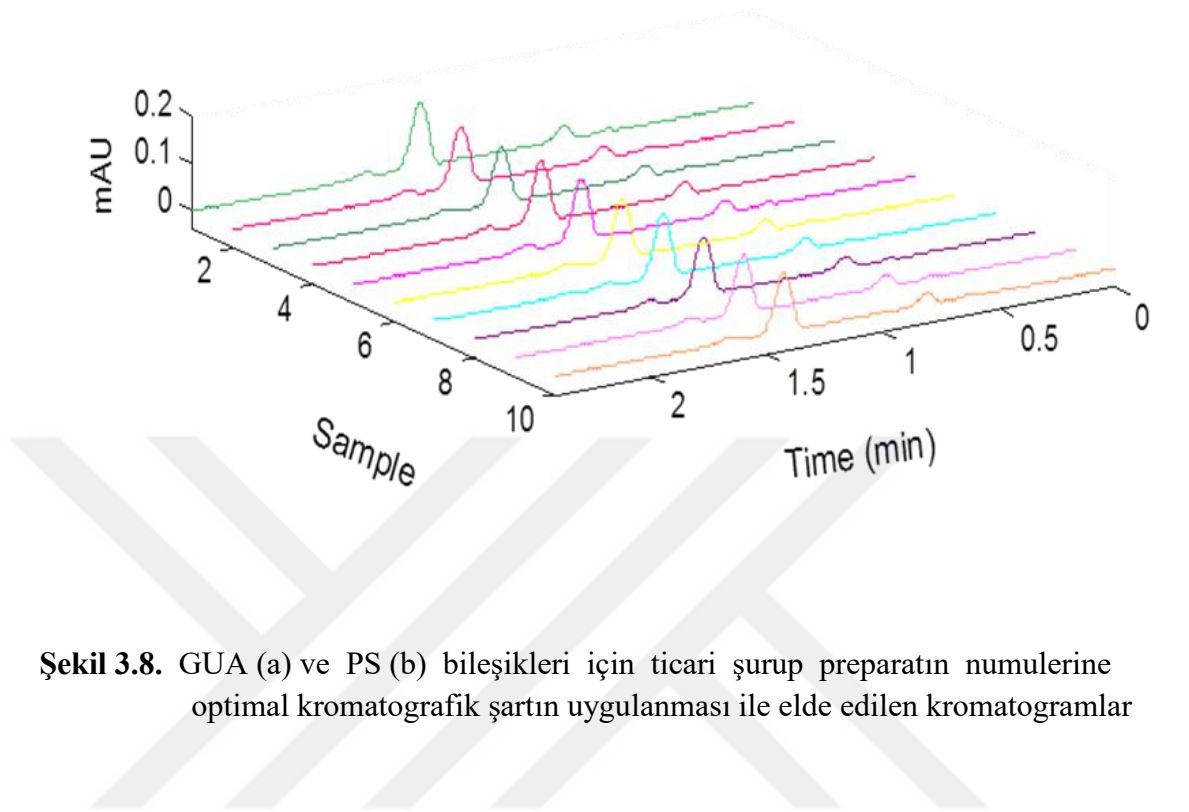
Analiz işlemlerinde kromatografik sistemin, dedeksiyon duyarlılığı, ayırma faktörü, seçicilik, teorik tabaka sayısı, kuyruklanma faktörü gibi parametrelerin sayısal değerlerine dayalı olarak doğrulanması kromatografik analizin gereklerindendir. Bu doktora tez çalışmasında seçicilik, rezolüsyon, pik asimetri, kuyruklanma faktörü ve teorik tabaka sayısı parametrelerinin GUA ve PS bileşiklerini içeren bir numunenin UPLC kromatogramında hesaplanan değerleri Çizelge 3.18’de listelendi. GUA ve PS karışımının UPLC yöntemiyle analizinde bu değerlerin istenen limitler içerisinde olduğu gözlemlendi.

**Çizelge 3.17.** system uygunluk parametreleri

|                | Kapasite faktörü | Seçicilik | Resolüsyon | Kuyruklanma | Simetri faktörü | Teorik tabaka sayısı |
|----------------|------------------|-----------|------------|-------------|-----------------|----------------------|
| PS             | 15.58            | -         | -          | 1.28        | 1.28            | 762                  |
| GUA            | 28.02            | 1.80      | 4.71       | 1.20        | 1.20            | 1802                 |
| Referans değer | >2               | >1        | >2         | <2          | <2              | >2000                |

### 3.11. UPLC Yönteminin Farmasötik Preparatlara Uygulaması

Optimize edilen UPLC yönteminin ticari preparatlara uygulanmasında, 1 mL BROKSİN 50 mL'lik balonjojeye aktarıldıktan sonra hacmi metanolle tamamlandı. Balonjojede hazırlanan stok karışım manyetik karıştırıcı ile 35 dakika karıştırıldı ve membran filtre (Sartorius Minisart  $\phi=0,20\ \mu\text{m}$ )'den süzüldü. Bu stok çözeltiden 3.4 mL alınıp 10 mL'lik balon jojeye aktarıldıktan sonra hacmi metanolle tamamlandı. Hazırlanan göz damlası çözeltileri “vial” lere konuldu ve optimal kromatografik şartlardaki kromatogramları elde edildi. GUA ve PS kromatogramlarından hesaplanarak elde edilen kalibrasyon grafikleri ile numunesinin içerisindeki GUA ve PS miktarları hesaplandı. Elde edilen kromatogram Şekil 3.8'de sunulmuştur.



**Şekil 3.8.** GUA (a) ve PS (b) bileşikleri için ticari şurup preparatın numulerine optimal kromatografik şartın uygulanması ile elde edilen kromatogramlar

Yukarıda açıklanan kromatografik analiz işlemi SUDAFED<sup>®</sup> ticari şurup preparatına uygulanmıştır. SUDAFED<sup>®</sup> ticari şurup sonuçları Çizelge 3.18 'da sunuldu.

**Çizelge 3.18.** RP-UPLC yöntemiyle şurup numunelerinin analiz sonuçları (100mg GUA + 30mg PS / 5ml)

| No.      | mg/5 mL |        |
|----------|---------|--------|
|          | PS      | GUA    |
| 1.0      | 30.98   | 104.22 |
| 2.0      | 30.39   | 101.42 |
| 3.0      | 30.49   | 101.27 |
| 4.0      | 31.50   | 105.23 |
| 5.0      | 30.30   | 103.34 |
| 6.0      | 30.60   | 104.18 |
| 7.0      | 29.92   | 102.48 |
| 8.0      | 30.71   | 100.89 |
| 9.0      | 31.24   | 102.81 |
| 10.0     | 30.91   | 102.81 |
| Ortalama | 30.70   | 102.87 |
| SS       | 0.47    | 1.42   |
| BSS      | 1.52    | 1.38   |

$\bar{x}$  = Ortalama

SS = Standart Sapma

BSS = % Bagıl Standart Sapma

#### 4. TARTIŞMA

Bu doktora tez çalışmasında GUA-EFE ve GUA-PS kombinasyonlarını içeren iki farklı ticari şurup formülasyondaki aktif bileşiklerin miktar tayinleri için yeni ters faz aşırı yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (reversed-phase ultra performance liquid chromatography → RP-UPLC ) yöntemlerinin gelişmesi amaçlanmıştır.

Genellikle , analitik kimyada yeni yöntem geliştirilmesinde deneysel şartların optimizasyonu için analitik cevap üzerine etki eden faktörlerden birisi optimize ediliyen diğerleri sabit tutulur. Bu tek değişkenli optimizasyon tekniğidir. Cevap üzerine birden fazla faktörün etkisi ile faktörler arasında etkileşmenin etkisi var ise, tek değişkenli optimizasyon tekniği ile doğru optimal deneysel şartları saptamak mümkün olmayabilir veya tamamen yanlış şartların uygulanmasına sebep olabilir.

Bu nedenle, çalışmalarımızda GUA-EFE ve GUA-PS karışımlarının kantitatif analizleri için tek değişkenli optimizasyon tekniği yerine yeni UPLC yöntemlerinin geliştirilmesinde en uygun kromatografik deneysel şartların belirlenmesinde kemometrik çok faktörlü optimizasyon metodolojisi kullanıldı. Bu çok faktörlü yada çok değişkenli optimizasyon tekniği sayesinde tek değişkenli optimizasyon tekniği ile belirlenecek hatalı kromatografik deneysel şartların yol açacağı istenmeyen analiz sonuçları durumunda önceden kalmış oldu.

Doktora tezi kapsamında GUA-EFE ve GUA-PS kombinasyonlarını analizleri ile ilgili olarak yapılan literatür araştırmalarından, iki bileşenli ticari şurup preparatlarındaki aktif bileşiklerin miktar tayinlerine UPLC yöntemlerinin veya kemometrik optimizasyona dayalı UPLC yönlerinin uygulanmadığı saptandı. Bu literatür araştırması sonuçlarından sonra doktora tez kombine ticari preparatların analizleri için yeni optimize edilmiş RP-UPLC yöntemlerinin geliştirilmesi ve valide edilmesi, literatüre göre yeni analitik yöntem oldu.

Ayrıca , GUA-EFE ve GUA-PS karışımlarının analizlerinde kullanılabilecek hazır yeni RP-UPLC yöntemlerinin olması, araştırma ve AR-GE labratuvarları ile ilaç endüstrisi içinde alternatif analitik yöntemler olacaktır.

Çalışmalarımızda iki farklı ticari şurup preparatının analizinde kullanmak üzere iki farklı RP-UPLC yöntemi gerçekleştirdi.

GUA-EFE kombinasyonunun kantitasyonu için üç seviyeli üç faktörlü tam faktöriyel tasarım kullanıldı. Yapılan ön çalışmalarda, kolon sıcaklığı ( $X_1$ ), akış hızı ( $X_2$ ) ve hareketli fazdaki % 0.1 M gibi faktörlerin cevap faktörü( improved chromatographic response function→ ICRF) üzerine etkili olduğunu belirledik ve çizelge 3.3' de olduğu gibi aralıklarını saptadık. Yöntem optimizasyonunda  $3^3$  tam faktöriyel tasarımı matrisine karşılık gelen 3.2 'de gösterildiği gibi 27 farklı kromatogram üzerinden ICRF değerleri hesaplandı.

Model fonksiyon (2 dereceden kuadratik denklem hesaplandı ve bundan faydalanılarak optimal kromatografik şartlar bulundu. GUA-EFE analizinde kromatografik optimizasyon yaklaşımı ile optimal kromatografik deneysel koşullar, kolon sıcaklığı 36.4 °C , akış hızı 0.29 mL/ dakika ve hareketli faz bileşimindeki 0.1 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> yüzdesi 56.9 olarak bulundu. Faktör etkileşimleri görmek için yüzey farklılıkları ve eş yükselti eğriler çizdirildi ve çizelge 3.2' de sunuldu. Şekillerdeki yüzey grafikleri ve eş yükselti eğrileri faktörler arasında şiddetli etkileşim olduğu göstermektedir.

RP-UPLC yöntemin geliştirilmesinde kemometrik optimizasyon tekniği ile belirlenen optimizasyon koşullarında GUA-EFE analizi, sırasıyla 6-36 Mg/ ml ve 4.64 Mg/ ml çalışma aralığında GUA ve EFE için gerçekleştirildi. Geliştirilen RP-UPLC yöntemi, validasyon parametreleri ve sistem uygunluk parametreleri açısından valide edildi. Sonuçlar Çizelge 3.2, Çizelge 3.3 ve çizelge 3.4' de sunuldu.

Geliştirilen RP-UPLC yönteminin kemometrik optimizasyonu kısa zaman aralığında kromatografik alkıloma ve yüksek elüsyonla GUA ve EFE analizlerinin yapılması olarak verdi. Bu RP-UPLC yöntem literatüre yöntemlere göre daha hızlı , daha ekonomik, daha doğru ve daha güvenilir olduğu, bu doktora tez çalışmasıyla ortaya konulmuştur. Bileşenlerin kromatografik analizi 215 dalga boyundaki dedeksiyonla gerçekleştirildi.

GUA-PS karşımını içeren ticari şurup preparatının analizinde geliştirilecek RP-UPLC yönteminin kemometrik optimizasyonunda  $3^3$  tam faktöriyel tasarım modeli uygulandı. Kromatografik cevap faktörü (improved chromatografik response function→ICRF) zerine etkili olan faktörlerin belirlenmesi çalışmasında öncelik karışımın analizlerinde olduğu gibi kolon sıcaklığı ( $X_1$ ) , akış hızı ( $x_2$ ) ve haleketli faz içeriğinde 0.1 M  $H_3PO_4$  nın yüzdesinin etkili olduğunu deneysel olarak gözlendi.

Seçilen bu faktörlerin seviyeleri ve karşılık gelen faktör aralıkları izelge 3.11 sunuldu. Bu izelgedeki faktör seviyeleri ve aralıklarından hareket ederek 3 faktörlü 3 seviyeli olan  $3^3$  tasarım matrisi hazırlandı. Bu tasarım matrisinde 27 farklı deneysel koşulda elde edilen şekil.3.1 'deki kromatogramlar kullanılarak ICRF değerleri hesaplandı. Faktörler ve cevaplar arasındaki matematiksel ilişkiden 2 dereceden kudratik fonksiyon elde edildi .

Bu model fonksiyon üzerinde en kısa alkıloma zaman aralığında maksimum kromatografik ayırım sağlayan optimal kromatografik deneysel şartlar tayin edildi. Ayrıca faktörler ve faktör etkileşimlerinin ICRF (cevap)zerine etkilerini görmek için yüzey grafikleri ve eş yükselti eğrileri çizdirildi (şekil 3.2). Bu yüzey grafikleri ve eş yükseltli eğrileri kuvvetli faktör etkileşimlerinin cevap üzerine etkilerini göstermektedir.

Dolayısıyla, seçilen faktörlerin optimizasyon işleminde kullanılması son derece isabetli olduğu görülmektedir. optimize edilen kromatografik deneysel koşullarda GUA-PS kombinasyonu içeren ticari şurup preparatının kantitatif analizi, sırasıyla 5-80 Mg/mL ve 10-90 Mg/mL doğrusal çalışma aralığında GUA ve PS için gerçekleştirildi. Bu doktora tezi kapsamında GUA-PS için geliştirilen RP-UPLC yöntemin, hazırlanan yapay karışımlarının analizi, gün içi ve günler arası numunelerin analizleri ile standart ekleme numunelerinin analizleri ile analitik validasyonu gerçekleştirildi. Yöntem validasyonu ile ilgili analitik sonuçlar sunuldu.

Bu doktora tez çalışması kapsamında geliştirilen RP-UPLC yöntemi GUA-PS karışımının analizi, bileşenlerin kısa zaman aralığında yüksek ayırma gücü ile ayrılmasına imkan sağladı. GUA-PS kombinasyonunun analizi için yeni geliştirilen RP-UPLC yöntemi literatür yöntemleri ile karşılaştırıldığının avantajları, daha hızlı, daha kolay, daha kesin, daha doğru ve daha güvenilir sonuçlar verdiği doktora tezimin içeriğinden görülmektedir.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu doktora tez araştırmasının temel hedefi GUA-EFE ve GUA-PS kombinasyonlarını içeren ticari şurup formülasyonlarının kantitatif analizleri ve kalite kontrolleri için kemometrik optimizasyona dayanan yeni RP-UPLC yöntemlerinin geliştirmesidir. Bu hedef doğrultusunda  $3^3$  faktöriyel tasarım kullanarak GUA-EFE ve GUA-PS karışımlarının analizi için iki farklı RP-UPLC yöntemi geliştirildi.

GUA-EFE kombinasyonun analizi, kolon sıcaklığı  $36.4^{\circ}\text{C}$ , akış hızı  $0.29\text{ mL/dakika}$  ve hareketli faz bileşimindeki  $0.1\text{M H}_3\text{PO}_4$  yüzdesi  $56.9$  olduğu şartlarda  $215\text{nm}$  dalga boyu dedeksiyonla  $3$  dakikalık alkıloma süresinde gerçekleştirildi.

GUA-EFE karışımının içeren ticari farmöstik preparat içerisindeki aktif bileşiklerin miktar tayinleri, kolon sıcaklığı  $51.6^{\circ}\text{C}$  de, akış hızı  $0.24\text{ mL/dakika}$  ve hareketli fazdaki  $0.1\text{ M H}_3\text{PO}_4$  yüzdesi  $62$  olan kromatografik koşullarda  $215\text{ nm}$  de ölçülen kromatografik kayıt işlemeyle  $2.5$  dakikalık alkıloma süresinde yapıldı.

Bu doktora tez çalışmasının sonucunda GUA-EFE ve GUA-PS karışımlarını içeren ticari şuruplardaki aktif bileşiklerin kantitasyonu için optimize ve valide edilen RP-UPLC yöntemleri kalite kontrol ve rutin analiz işlemleri için AR-GE laboratuvarlarında ve ilaç endustrisinde yeni alternatif yöntemler olarak kullanılacaktır.

Literatürlerde olmayan yeni RP-UPLC yöntemleri geliştirildiği için bu çalışma özgündü. Doktora tez çalışması GUA,EFE ve PS bileşiklerinin daha sonraki analiz çalışmalarına temel kaynak oluşturacaktır.



## ÖZET

### **Guaifenesin İçeren Farmasötik Şurup Preparatlarının Optimizasyon Teknikleri Kullanarak Aşırı Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi İle Kantitatif Analizi**

Efedrin (EPH) ve guaifenesin (GUA) içeren bir ticari şurup formülasyonunun kantitatif analizi için yeni bir ultra performans sıvı kromatografisi (UPLC) yöntemi geliştirildi. Bu yöntemin geliştirilmesinde, deneysel kromatografik koşullar, akış hızı, kolon sıcaklığı ve mobil faz için % 0.1 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> , kemometrik stratejiyi kullanılarak , optimize edilmiştir. Bu faktörler için , 3<sup>3</sup> tam faktöriyel tasarım uygulandığında, optimum kromatografik koşullar, 0,29 mL / dakika akış hızı, 36.4 ° C kolon sıcaklığı ve mobil faz için 0.1 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> %56.9 olarak elde edildi . Bu koşullar uygulandığında , verimli pik ayırımı 3 dakika içinde saptandı. EPH ve GUA için kalibrasyon eğrileri , 4-64 ve 6-96 µg / mL çalışma aralığında , 215 nm'de tespit edilen pik alanları kullanarak elde edildi. EPH ve GUA için 4-64 ve 6-96 µg / mL çalışma aralığında, 215 nm'de kromatogramları kayıt ve kalibrasyon eğrisi tespit edildi. Optimize edilmiş UPLC yöntemin performansı ve geçerliliği, bağımsız ikili karışımları, gün içi ve günler arası örnekleri ve EPH ve GUA maddeler içeren standart ilave çözeltileri analiz edilerek tahmin edilmiştir. Önerilen yöntem , seçilen ticari şurup preparatın Kantitatif tespit ve rutin analiz için umut verici bir yaklaşımdır. Guaifenesin (GUA) ve psödoefedrin hidrokloridin (PS) içeren bir ticari şurup preparatın analizinde, yeni bir ultra-performans sıvı kromatografisi (UPLC) geliştirmek için bir kemometrik optimizasyon yaklaşımı geliştirildi. Bu yöntemde , en uygun çalışma koşullarını bulmak için üç faktörlü, üç kademeli, tam faktöriyel tasarım uygulanmıştır.

Kromatografik faktörler (akış hızı, sıcaklık ve mobil fazdaki 0.1 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> yüzdesi) Kromatografik yanıtı etkilemektedir. Ardından, analiz edilen bileşiklerin kısa çalışma süresi içinde uygun bir şekilde elüsyonunu sağlayan etkili kromatografik çalışma koşulları, kemometrik yöntem optimizasyonu kullanılarak değerlendirildi. Optimal deney koşullarına göre , GUA ve PS'nin kromatografik ayrılması , Waters UPLC BEH C18 (50 mm x 2.1 mm yani, 1.7 um) kolonu kullanılarak gerçekleştirildi. Analiz edilen örneklerin kromatogramları, PDA dedektör ile 215 nm'de saptandı. Kalibrasyon eğrileri, GUA için 5.0-80.0 µg / mL ve PS için 10.0-90.0 µg / mL konsantrasyon aralığında doğrusal olarak bulundu. Ticari bir şurup preparatı için GUA ve PS konsantrasyonu, optimize edilmiş ve geliştirilmiş UPLC yöntemi ile belirlendi.

**Anahtar kelimeler :** Efedrin, Guafenesin, Optimizasyon, Psödoefedrin, RP-UPLC yöntemi, Şurup Formülasyon

## SUMMARY

### **A New UPLC Approach For The Quantitation Of Ephedrine And Guaifenesin In a Syrup Formulation Using Multivariate Optimization Strategy**

A new ultra performance liquid chromatography (UPLC) method with photodiode array detection was developed for the quantitative analysis of a commercial syrup formulation containing ephedrine (EPH) and guaifenesin (GUA). In the development of UPLC method, experimental chromatographic conditions, flow rate, column temperature, and percentage of 0.1 M  $\text{H}_3\text{PO}_4$  in mobile phase, were optimized using chemometric multivariate strategy. From the application of a  $3^3$  full factorial design, the optimal chromatographic conditions were obtained as the flow rate of 0.29 mL/min, column temperature of 36.4° C, and 56.9% of 0.1 M  $\text{H}_3\text{PO}_4$  in the mobile phase. The optimal conditions gave us a good chromatographic separation of the analyzed drugs with short analysis run time within 3 min. Calibration curves for EPH and GUA in the linear working range of 4–64 and 6–96  $\mu\text{g/mL}$ , respectively, were obtained using peak areas detected at 215 nm. Performance and validity of the optimized UPLC method were estimated by analyzing independent binary mixtures, inter-day and intra - day samples, and standard addition solutions containing EPH and GUA substances. It was concluded that the proposed method was a promising approach for the quantitative determination and routine analysis of a commercial syrup formulation of the titled substances. A chemometric optimization approach for developing a new ultra-performance liquid chromatography (UPLC) was explored for the quantification of guaifenesin (GUA) and pseudoephedrine hydrochloride (PS) in a syrup preparation.

A three-factor three-level full factorial design was implement in finding optimal operational conditions of chromatographic factors (flow rate, temperature and 0.1 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> percentage in mobile phase) effecting chromatographic response. Then, effective chromatographic operational conditions providing adequate elution of analyzed compounds within short runtime were assessed by using the chemometric method optimization. Under optimal experimental conditions, chromatographic separation of GUA and PS was performed using a Waters UPLC BEH C18 (50 mm x 2.1 mm i.e., 1.7 µm) column. Chromatograms of analyzed samples were monitored with the PDA detection at 215 nm. Calibration curves were found to be linear in the concentration range of 5.0-80.0 µg/mL for GUA and 10.0-90.0 µg/mL for PS. The concentration of GUA and PS in a commercial syrup preparation was determined by the optimized and developed UPLC method.

**Keywords:** Ephedrine, Guaifenesin, Optimization, Pseudoephedrine, Quantification, RP-UPLC method, Syrup dosage form

## KAYNAKLAR

TURAK F, GÜZEL R, DİNÇ E (2016). A New UPLC Approach for the Simultaneous Quantitative Estimation of Four Compounds in a Cough Syrup Formulation. *J Chromatogr Sci*, **54**: 28-35.

DİNC E, ÜSTÜNDAĞ Ö, ÖZDEMİR A & BALEANU D (2005). A New application of Chemometric Techniques to HPLC Data for The Similtaneous analysis of a Two-Component Mixture. *Journal of Liquid Chromatography & Related technologies*, 28:2179=2194.

HATAMIA M, KARIMNI E, FARHADI KH (2011). Determination dried blood spot using an ionic liquid based dispersive liquid– Liquid microextraction coupled with HPLC. *Journal of Pharmaceutical and biomedical analysis*, **85**: 283–287.

GROSA G, DEL GROSSO E, RUSSO R, ALLEGRONE G (2006) . Simultaneous, stability indicating, HPLC-DAD determination of guaifenesin and methyl and propyl-parabens in cough syrup. *J Pharm Biomed Anal*. **41**:798-803.

ÖZDEMİR, A., AKSOY, H., DİNÇ, E., BALEANU, D., DERMİŞ, S. (2006) Determination of guaifenesin and dextromethorphan in a cough syrup by HPLC with fluorometric detection. *Revue Roumaine de Chimie*, **51**: 117-122.

DİNÇ E, ERTEKİN Z, ROUHANİ Gh (2015).“ A new RP-UPLC method for simultaneous quantitative estimation of bisoprolol hemifumarate and hydrochlorothiazide in tablets using experimental design and optimization”, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* , ISSN: 1082-6076 (Print) 1520-572X (Online) Journal homepage: <http://www.tandfonline.com/loi/ljlc20>.

ÖZDEMİR A, AKSOY H, DİNÇ E, BĂLEANU D, DERMİŞ S(2006). Determination of Guaifenesin and Dextromethorphan in a cough syrup by HPLC with Fluorometric Detection. *Revue Roumaine de Chimie*, **51**:117–122.

PINGILI REDDY S, K. BABU S, KUMAR N, Y.V.V. SASI SEKHAR (2011). Development and validation of stability indicating the RP-HPLC method for the estimation of related compounds of guaifenesin in pharmaceutical dosage forms. *Pharmaceutical Methods*, **2** :229–234.

HARSONO TH ; YUWONO M; INDRAYANTO G (2005). Simultaneous determination of some active ingredients in cough and cold preparations by gas chromatography, and method validation. *Journal of AOAC International*, **88**: 1060-3271.

ABDELKAWY M, METWALY F, EL RAGHY N, HEGAZY M AND FAYEK N (2011). Simultaneous determination of Ambroxol Hydrochloride and Guaifenesin by HPLC, TLC-Spectrodensitometric and multivariate calibration methods in pure form and in Cough Cold Formulations. *Journal of Chromatography & Separation Techniques*, 2:3 <http://dx.doi.org/10.4172/2157-7064.1000112>.

REDDY SP, BABU KS, KUMAR N, SEKHAR YV (2011). Development and validation of stability indicating the RP-HPLC method for the estimation of related compounds of guaifenesin in pharmaceutical dosage forms. *J Pharm Methods*, **2(4)**:229-34.

I BHATTACHARY YA, BHATTACHARYYA S.P, KYAL C, CHOUDHURY P, DHAKAL B, DR GHOSH SK (2013). Estimation and validation of stability indicating UV spectrophotometric method for the determination of guaifenesin in presence of its degradant products. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, Vol 5, ISSN- 0975-1491.

IMAMOGLU ES AND KUCUK TUNCA A (2013). Simultaneous determination of guaifenesin and ephedrine HCL binary mixture in syrup dosage forms and human plasma by using RP-HPLC-dad. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, **37**:1039–1051.

ORSI D DE, L. GAGLIARDI, CAVAZZUTTI G, MEDIATI M.C & TONELLI D (2006). Simultaneous Determination of Ephedrine and 2-Imidazolines in Pharmaceutical Formulations by Reversed-Phase HPLC. *Journal of Liquid Chromatography*, Volume 18, Issue 16.

BAGHERI H, KHALILIAN F, ENAYATI AHANGAR L (2008). Liquid–liquid–liquid microextraction followed by HPLC with UV detection for quantitation of ephedrine in urine. *Journal of Separation Science*, Volume 31, Issue 18, Pages 3212–3217.

SHERVINGTON L. A (1996). A Quantitative Simultaneous High Performance Liquid Chromatographic Determination of Pseudoephedrine HCl, Guaifenesin and Dextromethorphan HBr. *Journal Analytical Letters*, Volume 30, 1997 - Issue 5, 927-944

LAKSHMI NARASIMHA RAOA K, KRISHNAIAHA CH, SUDHEER BABUA K, PADMAJA REDDYA K (2014). Development and validation of a stability-indicating LC method for simultaneous determination of related compounds of guaifenesin, terbutaline sulfate and ambroxol HCl in cough syrup formulation. *Journal of Saudi Chemical Society*, **18**: 593–600.

YEHIA ALI M , HEBA M. MOHAMED (2016). Chemometrics resolution and quantification power evaluation: Application on pharmaceutical quaternary mixture of paracetamol, Guaifenesin, Phenylephrine and p-aminophenol. *J Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, Volume 152, Pages 491–500.

AKSU DÖNMEZ Ö, AŞCI B, BOZOĞAN A, SUNGUR S (2011). Simultaneous determination of potassium guaiacolsulfonate, guaifenesin, diphenhydramine HCl and carbetapentane citrate in syrups by using HPLC-DAD coupled with partial least squares multivariate calibration. *Talanta*, Volume **83**: 1601–1605.

RAHUL S, HEMENDRA KUMAR S, VINOD S, SHRUTI T, NILESH J (2011). Spectrophotometric Determination of Guaifenesin and Pseudoephedrine Hydrochloride in Tablet Dosage Form. *IJRPS*, 1(3): 41-49.

RIAHİ S, GANJALI M, ALIPOUR A, LARIJANI B, NOROUZI P (2011). Quantitative Analysis of Pseudoephedrine in Formulation by Potentiometric Membrane Sensor; Computational Investigation. *Int. J. Electrochem. Sci.*, 4 (2009) 1262 – 1276.

SILVANA E, VIGNADUZZO & TEODORO S, KAUFMAN (2012). Development and validation of a HPLC method for the simultaneous determination of bromhexine, chlorpheniramine, paracetamol, and pseudoephedrine in their combined cold medicine formulations. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, ISSN: 1082-6076 (Print) 1520-572X (Online) Journal homepage: <http://www.tandfonline.com/loi/ljlc20>.

HADAD GM1, EMARA S, MAHMOUD WM (2009). Development and validation of a stability-indicating RP-HPLC method for the determination of paracetamol with dantrolene or/and cetirizine and pseudoephedrine in two pharmaceutical dosage forms. *J pub med*, **79** (5):1360-7.

ANDRIGHETTO, LUKE M. STEVENSON, G. PEARSON P, JAMES HENDERSON, LUKE C. CONLAN NR, XAVIER A (2014). DryLab® optimised two-dimensional high performance liquid chromatography for differentiation of ephedrine and pseudoephedrine based methamphetamine samples. *J forensic science international*, Vol 244, 302-305.

- X Gu (2009). Simultaneous Analysis of the H1-Antihistamine Acrivastine and the Decongestant Pseudoephedrine Hydrochloride by High-Performance Liquid Chromatography. *J Pharm Biomed Anal*, 37 (4), 663-667.
- WAHBA M. E. K (2014). Simultaneous Determination of Ascorbic Acid, Pseudoephedrine Hydrochloride and Ibuprofen in their Combined Tablets Using Micellar Liquid Chromatography. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, Volume 38, 2015 - Issue 1, 54-61.
- MEREDITH L. W , STEWART J.T (2000). HPLC determination of guaifenesin with selected medications on underivatized silica with an aqueous-organic mobile phase. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **23**: 909–916.
- THOMAS H. E , DAVID L. M, DEEPA A. KHAMBE,GARY A. THOMPSON, STEVEN H. HOKE II (2007), Simultaneous determination of dextromethorphan, dextrophan, and guaifenesin in human plasma using semi-automated liquid/liquid extraction and gradient liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **43**: 586–600.
- Maged H.M , Dwight D. S (2004), Determination of guaifenesin in human serum by capillary gas chromatography and electron capture detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **35**: 801–806.
- ALEXANDER A.B, , AIDAR T. GUBAIDULLIN, ZEMFIRA A.B, DMITRY B. KRIVOLAPOV, ALEXANDER V. PASHAGIN, IGORA. LITVINOV (2009), Absolute configuration and crystal packing for three chiral drugs prone to spontaneous resolution: Guaifenesin, methocarbamol and mephensin. *Journal of Molecular Structure*, **28**: 377–382.
- ALAA EL-G (2005), HPLC and chemometric assisted spectrophotometric methods for simultaneous determination of diprophylline, phenobarbitone and papaverine hydrochloride. *Il Farmaco*, **60**: 745–753.

- Langel Ch , Grossmann C , Morbidelli M, Morari M, Mazzotti M (2009), Implementation of an automated on-line high-performance liquid chromatography monitoring system for 'cycle to cycle' control of simulated moving beds. *Journal of Chromatography A*, **1216**: 8806–8815.
- ROJAS F. S , OJEDA C. B (2009). Recent development in derivative ultraviolet/visible absorption spectrophotometry. *Analytica Chimica Acta*, **635**: 22–44.
- MEREDITH L.W, STEWART J.T (2000). HPLC determination of guaifenesin with selected medications on underivatized silica with an aqueous-organic mobile phase. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **23**: 909–916.
- EHAB F. ELKADY (2010). Simultaneous determination of diclofenac potassium and methocarbamol in ternary mixture with guaifenesin by reversed phase liquid chromatography. *Pharmaceutical Chemistry Department, Faculty of Pharmacy, Cairo University, Kasr El-Aini St., Cairo 11562, Egypt. Talanta* , **82**:1604–1607.
- STEPHEN BENNETT, M.D., NATHAN HOFFMAN, M.D., MONGA M, M.D. (2004). Ephedrine and Guaifenesin-Induced Nephrolithiasis. *THE JOURNAL OF ALTERNATIVE AND COMPLEMENTARY MEDICINE*, Volume 10, 967–969.
- GALLI V , BARBAS C (2004). High-performance liquid chromatographic analysis of dextromethorphan, guaifenesin and benzoate in a cough syrup for stability testing. *Journal of Chromatography A*, **1048**: 207–211.
- CHEN K.K, KAO C.H (1926). Ephedrine and Pseudoephedrine, their Isolation, Constitution, Isomerism, Properties, Derivatives and Synthesis. (With a Bibliography). *The Journal of the American Pharmaceutical Association, Volume 15, Issue 8*, 625-639.
- GUOYI MA, SUPRIYA A. BAVADEK AR, YOLANDE M.D, SHILPA G.L, Nagmani R, Brian T. Schaneberg, Ikhlās A.K, Dennis R.F (2007). Pharmacological Effects of Ephedrine Alkaloids on Human  $\alpha_1$ - and  $\alpha_2$ -Adrenergic Receptor Subtypes. *THE JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS*, **0022-3565/07/3221**-214–221.

MARK W. WATSON, PETER W. C. Simplex Algorithm for the optimization of gradient elution high-performance liquid chromatography. *Publication Date: September 1979, Anal. Chem., 1979, 51 :1835–1842.*

Jančić-Stojanović B , Rakića T, Kostića N, Vemić A , Malenovića A, Ivanović D, Medenica M (2011). Advancement in optimization tactic achieved by newly developed chromatographic response function: Application to LC separation of raloxifene and its impurities, *Talanta* , Volume 85, Issue 3, 1453–1460.

WALTON R , DOVEY S, HARVEY E , FREEMANTE N, Computer support for determining drug dose: systematic review and meta-analysis, *ICRF General Practice Research Group, University of Oxford, Department of Public Health and Primary Care, Institute of Health Sciences, Oxford OX3 7LF.*

## ÖZGEÇMİŞ

### I- Bireysel Bilgiler

|                             |                  |
|-----------------------------|------------------|
| Adı                         | Ghazal           |
| Soyadı                      | Rouhani          |
| Doğum yeri ve tarihi        | İran- 18.09.1991 |
| Uyruğu                      | İran             |
| Medeni durum                | Bekar            |
| İletişim adresi ve telefonu | İran-Tabriz      |

### II-Eğitimi

|               |                              |
|---------------|------------------------------|
| Lisans        | İran- Tabriz Üniversitesi    |
| Yüksek lisans | İran- Tabriz Üniversitesi    |
| Doktora       | Türkiye- Ankara Üniversitesi |

### III- Bilimsel İlgili Alanarı

1. (Synthesis of a New Aza Crown ethers (23-Crown-7) and (21-Crown-7). American Journal of Scientific Research ISSN 1450-223X Issue 47 (2012), pp. 105-109. © Euro Journals Publishing, Inc. (2012).
2. Erdal Dinç, Zehra Ceren Ertekin ,Ghazal Rouhani,“ A new RP-UPLC method for simultaneous quantitative estimation of Bisoprolol Hemifumarate and Hydrochlorothiazide in tablets using experimental design and optimization” Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies.(2015).

3. Ghazal Rouhani, Z.Ceren Ertekin, Erdal Dinç, "The simultaneous determination of a binary pharmaceutical mixture in a SUDAFED preparation by UPLC after adopting an optimized set of instrumental parameters from a multivariate procedure" Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies. (2017).
4. Ghazal Rouhani, Z.Ceren Ertekin, Erdal Dinç, "A chemometric optimization approach to developing a new ultra-performance liquid chromatography for the quantification of Guaifenesin and Pseudoephedrine hydrochloride in a syrup preparation". (Under Revision)

### **Conferences**

1. 17<sup>th</sup> Iranian Seminar of Organic Chemistry (University of Mazandaran, Babolsar, Iran, 13-15 October 2010) (Synthesis of some New Azacrown ethers as New Receptors) S. Bavili Tabrizi, Gh.Ruhani.
2. 2<sup>nd</sup> International Conference on new trend in Chemometrics and applications (October 25-28 ,2013, Ankara, Turkey, Faculty of Pharmacy)(Application of the Chemometric Calibration Method to the Multi-Wavelength UPLC Data for the Quantitative Resolution and In Vitro Dissolution Testing of Antiretroviral in a Tablet Dosage Form) ErdalDinç, Nurten Özdemir, M.GünseliTilkan, GhazalRouhani, Eda Büker.
3. 3<sup>rd</sup> Turkish Conference on new trend in Analytical Chemistry (May 15-18,2014 , Tokat, Turkey, Faculty of Chemistry)( A New RP-UPLC Method for Simultaneous Quantitative Estimation of Bisoprolol Hemifumarate and Hydrochlorothiazide in Tablets Using Experimental Design and Optimization) Erdal Dinç, Zehra Ceren Ertekin & Ghazal Rouhani.
4. 3<sup>rd</sup> International Conference on new trend in Chemometrics and applications (May 25-28, 2016, Antalya, Turkey, Faculty of Pharmacy) (Reversed –phase ultra – performance liquid chromatographic approach for the simultaneous quantitative analysis of Ephedrine and Guaifenesin in a syrup formulation using chemometric optimization technique) Erdal Dinç, Ghazal Rouhani and Z.Ceren Ertekin.

5. Ivek 3<sup>rd</sup> International Convention of Pharmaceuticals and Pharmacies (April 26-29, 2017, Istanbul, Turkey, Wow Istanbul Hotel & Convention Center)(A chemometric optimization approach to developing a new ultra-performance liquid chromatography for the quantification of guaifenesin and pseudoephedrine hydrochloride in a syrup preparation) Ghazal Rouhani, Z.Ceren Ertekin, Erdal Dinç.

