



**YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

Paras., Kafein ve Prop. İp. Tab. Hglo İle An. Fak. Tas. İle Opt.

Yüksek Lisans Tezi

SEMHA ERAL

**YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PARASETAMOL, KAFEİN VE PROPİFENAZON İÇEREN**  
**TABLETLERİN HPLC İLE ANALİZİNİN FAKTÖRİYEL**  
**TASARIM İLE OPTİMİZASYONU**

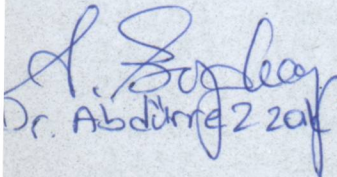
513

Kimyager B. Semah ERAL

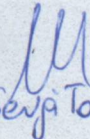
FBE Kimya Anabilim Dalı Analitik Kimya Programında  
Hazırlanan

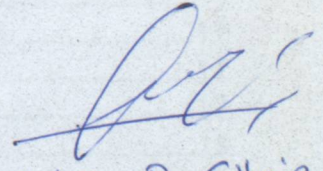
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Tez Danışmanı:** Yrd.Doç.Dr Güzin ALPDOĞAN

  
Dr. Abdülkerem Zorlu

İSTANBUL, 2007

  
Yrd. Doç. Dr. Sevgi Toker Ulu

  
Yrd. Doç. Dr. Güzin  
Alpdoğan

# İÇİNDEKİLER

Sayfa

KISALTMA LİSTESİ.....	iii
ŞEKİL LİSTESİ.....	iv
ÇİZELGE LİSTESİ.....	v
ÖNSÖZ.....	vi
ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BÖLÜM.....	2
2.1 Faktöriyel Tasarım Ve Optimizasyon.....	2
2.2 Faktöriyel Tasarım İle İlgili Bazı Çalışmalar.....	3
2.3 Validasyon.....	6
2.3.1 Validasyonun Tanımı ve Önemi.....	6
2.3.2 İlaç Endüstrisinde Validasyon Çeşitleri.....	6
2.4 Analitik Yöntem Validasyonu.....	7
2.4.1 Analitik Yöntem Validasyonunda Amaç.....	7
2.4.2 Dikkat Edilmesi Gereken Noktalar.....	7
2.4.3 Analitik Yöntem Validasyonunda Kapsam.....	8
2.4.4 Analitik Yöntem Validasyon Aşamaları.....	9
2.4.5 Analitik Yöntem Validasyon Parametreleri.....	10
2.4.5.1 Seçicilik/Spesifiklik.....	11
2.4.5.1.1 UV Dedektörü HPLC Uygulamaları.....	12
2.4.5.2 Kesinlik.....	12
2.4.5.2.1 Tekrarlanabilirlik.....	12
2.4.5.2.1.1 Laboratuvar İçi Tekrarlanabilirlik.....	13
2.4.5.2.1.2 Laboratuvarlar Arası Tekrarlanabilirlik.....	13
2.4.5.2.2 UV Dedektörü Kullanan HPLC Uygulamaları.....	14
2.4.5.2.2.1 Analizler Arası Tekrarlanabilirlik.....	14
2.4.5.2.4.2 Laboratuvar İçi Tekrarlanabilirlik.....	14
2.4.5.3 Doğruluk Ve % Geri Kazanım.....	15
2.4.5.3.1 UV Dedektörü Kullanan HPLC Uygulamaları.....	16
2.4.5.4 Doğrusallık.....	16
2.4.5.4.1 UV Dedektörü Kullanan HPLC Uygulamaları.....	16
2.4.5.5 Çalışma Aralığı.....	17
2.4.5.6 Miktar Tayini Limiti Ve Tanıma Limiti.....	17
2.4.5.6.1 Miktar Tayini Limiti.....	17
2.4.5.6.2 Tanıma Limiti.....	17
2.4.5.6.3 UV Dedektörü Kullanan HPLC Uygulamaları.....	18
2.4.5.6.3.1 Tanıma Limiti(LOD) Uygulaması.....	18
2.4.5.6.3.2 Miktar Tayini Limiti (LOQ) Uygulaması.....	18
2.4.5.7 Güvenilirlik.....	19

2.4.5.7.1	UV Dedektörü Kullanan HPLC Uygulamaları.....	19
2.4.5.8	Tutarlılık.....	20
2.4.5.8.1.	UV Dedektörü Kullanan HPLC Uygulamaları.....	20
2.6.6.	Validasyon İle İlgili Bazı Örnekler.....	20
2.7.	İlaç Preperatlarındaki Etken Maddeler Ve Özellikleri.....	22
2.7.1	Parasetamol.....	22
2.7.2	Kafein.....	23
2.7.3	Propifenazon.....	24
3.	DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	24
3.1	Kullanılan Kimyasallar.....	24
3.2	Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması.....	25
3.3	Kullanılan Cihazlar.....	25
3.4	Yöntemler.....	26
3.4.1	Parasetamol, Kafein Ve Propifenazon İçeren Tabletlerin HPLC İle Ayrılması.....	26
3.4.2	Faktöriyel Tasarım.....	26
3.4.3	Validasyon.....	26
3.4.3.1	Doğrusallık.....	26
3.4.3.2	% Geri Kazanım.....	26
3.4.3.3	Gün İçi Ve Günler Arası Tekrarlanabilirlik.....	27
4.	SONUÇLAR.....	27
4.1	HPLC İle Ayırma Koşulları.....	27
4.2	Faktöriyel Tasarım Uygulamaları.....	28
4.3	Validasyon Uygulamaları.....	33
4.3.1	Doğrusallık.....	33
4.3.2	% Geri Kazanım.....	37
4.3.3	Gün İçi Ve Günler Arası Tekrarlanabilirlik .....	38
	KAYNAKLAR.....	45
	ÖZGEÇMİŞ.....	46

## KISALTMA LİSTESİ

<b>CZE</b>	Kapiler Bölge Elektroforez
<b>HPLC</b>	Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
<b>LC</b>	Sıvı Kromatografisi
<b>MS</b>	Kütle Spektroskopisi

Şekil 2.5.6.1.	Keskinlik-konsantrasyon eğrisi.....	19
Şekil 4.1.1	Optimum koşullarda elde edilen kromatogram.....	28
Şekil 4.2.1	Tahmin edilen çözünürlük değerlerine karşı artıklar.....	31
Şekil 4.2.2	$\hat{R}^*_{ort}$ - pH değerleri grafiği.....	32
Şekil 4.2.3.	$\hat{R}^*_{ort}$ - Akış hızı değerleri grafiği.....	32
Şekil 4.2.4.	$\hat{R}^*_{ort}$ - MeOH değerleri (ml) grafiği.....	33
Şekil 4.3.1.1.	Parasetamol'ün doğrusallık grafiği .....	35
Şekil 4.3.1.2	Kafein'in doğrusallık grafiği.....	36
Şekil 4.3.1.3	Propifenazon'un doğrusallık grafiği.....	36

## ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.2.1	Faktöriyel tasarım ile ilgili bazı çalışmalar.....	4
Çizelge 2.4.5.1.	İlaç analizinde yöntemlere göre değişen parametreler.....	11
Çizelge 2.4.5.2.1	Analit konsantrasyonuna bağlı olarak kesinlik değerleri.....	13
Çizelge 2.4.5.3.1	Geri kazanım verileri.....	15
Çizelge 4.2.1	Varyans analizi.....	28
Çizelge 4.2.2	2 <sup>3</sup> Faktöriyel tasarımında etkilerin işaretleri.....	29
Çizelge 4.2.3	Deneysel Veriler.....	30
Çizelge 4.3.1.1	Parasetamol'ün doğrusallık değerleri.....	34
Çizelge 4.3.1.2.	Kafein'nin doğrusallık değerleri.....	34
Çizelge 4.3.1.3.	Propifenazon'nun doğrusallık değerleri.....	35
Çizelge 4.3.2.1.	İlaç preparatındaki etken maddelerin % geri kazanım değerleri.....	37
Çizelge 4.3.3.1	Gün içi tekrarlanabilirlik değerleri.....	39
Çizelge 4.3.3.2	Günler arası tekrarlanabilirlik değerleri.....	40

## ÖZET

Bu tezde parasetamol, kafein ve propifenazonu içeren tabletlerin HPLC yöntemiyle analizi için deneysel tasarım optimizasyonu ve validasyon gerçekleştirilmiştir.

Deneysel tasarım optimizasyonunda incelenen etkenler pH, akış hızı ve metanol oranıdır. Bu etkenlerin ve aralarındaki etkileşimlerin HPLC kromatogramındaki piklerin ayırma gücü üzerindeki etkileri araştırıldı. Bunun için üç tekrarlı  $2^3$  faktöriyel tasarımı kullanıldı.

Her etken için iki seviye seçilmiştir. Bu seviyeler pH için 2,8 ve 3,2; akış hızı için ; 0,8 ve 1,5  $\text{mL}^{-1}$  ; metanol oranı için 250mL /1000mL ve 355mL/1000 mL 'dir.

Toplam 24 deney yapıldı. Deneylerin sırası rasgele belirlendi. Etkilerin düşük değerleri için “-” , yüksek değerleri için “+” işareti kullanıldı.

İncelenen etkilerin ve kendi aralarındaki etkileşimin ayırma gücü üzerindeki etkilerini değerlendirmek için Varyans Analizi (ANOVA) kullanıldı ve sonuç olarak incelenen tüm etkenler ve etkileşimlerin ayırma gücü üzerinde etkili olduğu, ancak bu etkenler arasında akış hızının en etkili olduğu bulundu. İkinci etkili parametre ise hareketli fazdaki metanol oranı, en az etkili olan ise pH oldu.

Validasyon çalışmalarında ise ilaç preparatında parasetamol, kafein ve propifenazon için % geri kazanım oranları sırasıyla % 101,07; 97,00; 100,60 olarak hesaplandı.

Aynı gün içinde yapılan bağıl standart sapma değerleri sırasıyla %  $1,61 \pm 0,42$  ; %  $1,12 \pm 0,28$  ; %  $1,69 \pm 0,73$  farklı günlerde yapılan analizler sonucunda elde edilen bağıl standart sapma değerleri sırasıyla %  $0,56 \pm 0,07$  ; %  $3,84 \pm 0,93$  ; %  $1,68 \pm 0,15$  olarak bulundu.

Analiz çözültisindeki etken madde konsantrasyonlarının % 50 – 150 sine karşılık gelen konsantrasyonlarda yapılan ölçümlerden elde edilen sonuçlardan hesaplanan korelasyon katsayısı üç etken madde için yukarıdaki sırasıyla 0,9986;0,9979;0,9985 dir.

**Anahtar Kelimeler:** Faktöriyel Tasarım, Optimizasyon, Validasyon

## ABSTRACT

In the present work, experimental design was used in tablets that, including paracetamol, caffeine and propiphenazone by using HPLC method and this method validated.

Investigated factors which are, pH, flow rate and methanol ratio in mobile phase in optimisation of experimental design.

This factors and interactions between factors were researched on effect of resolution, peaks in chromatogram.  $2^3$  factorial design was used for it.

Two level were chose for each factor. This levels are 2,8 and 3,2 for pH, 0,8 and 1,5mldak<sup>-1</sup> for flow rate, 250mL / 1000 mL and 355mL / 1000 mL for methanol ratio.

24 experiments were done totally. Order of experiments were determinated at random. Low level of factors were showed as (-), high level were showed as (+).

ANOVA applied investigated factors and interaction between factors of effect on resolution. The results showed that all factors have effect on resolution. But between thr factors, flow rate is more effective others. Methanol ratio is more less effective than flow rate . pH is less effective on resolution.

On validation works, averages recoveries of paracetamol, caffeine and propiphenazone were found to be 101,07 % ; 97,00 % ; 100,60 %

Relative standart deviation (RSD) values of within day analyses were in range of %  $1,61 \pm 0,42$  ; %  $1,12 \pm 0,28$ ; %  $1,69 \pm 0,73$  for paracetamol, caffeine and propiphenazone, respectively. Meanwhile relative standart deviation values of day-to-day analyses were found to be %  $0,56 \pm 0,07$ ; %  $3,84 \pm 0,93$ ; %  $1,68 \pm 0,15$  for paracetamol, caffeine and propiphenazone, respectively.

The main materials of concentration were prepared in solvent of analyses equivalent of 50% -150 % concentration in range , correlation coefficients calculated 0,9986;0,9979;0,9985 for paracetamol, caffeine and propiphenazone, respectively.

**Keywords:** Factorial Design, Optimization, Validation.

## 1.GİRİŞ

Faktöriyel tasarım yöntemi, genellikle üretim süreci veriminin ve ürün kalitesinin artırılması, ürün girdilerinin ürün üzerindeki etkilerinin belirlenmesi ile ilintili bir istatistik yaklaşım olarak kullanılmaktadır.

Analitik kimyada ise analizi etkileyen faktörlerin kendi başına ve karşılıklı etkileşimlerinin sonuç üzerindeki etkilerinin '2<sup>k</sup> Faktöriyel Tasarım' yöntemi kullanılarak belirlenmesi, kabul gören önemli bir uygulama olmuştur. Yöntemin avantajı, deneysel veri tabanını oluşturan tüm faktörlerin iki düzeyli kabul edilmesi; alt ve üst sınır olarak belirlenmiş iki sayısal büyüklükle ya da niteliksel büyüklükle 'var' – 'yok', 'düşük'-'yüksek' vs. olarak değerlendirilmelerine olanak tanınmasıdır. Metot sonuca etkisi yüksek olan faktörleri ve kombinasyonlarını belirlediği gibi, incelenen faktörlerin dışındaki diğer faktörlerin etkisini vurgulayan bir hata terimi de vermektedir. Bu metotla incelenen ana faktör sayısı 'k' ve problemin de iki düzeyli olması durumunda, toplam deney sayısı hassasiyeti daha da artırılabilir.

İlaç endüstrisinde kalite kontrolde genellikle kullanılan HPLC analizlerinde deneysel koşulların daha iyi bir ayırma sağlamak üzere optimize edilmesinde faktöriyel tasarımdan yararlanılabilir.

Bu tez çalışmasının konusu parasetamol, kafein ve propifenazon içeren tabletlerin HPLC yöntemi ile analizinin faktöriyel tasarım ile optimize edilmesidir. Bunun için ayırma gücüne etki eden faktörlerin etkileri araştırılmış, ayırma gücü ve etkiler arasındaki ilişkiyi veren bir model verilmiş ve ayırma gücünü arttırmak için koşullar belirlenmiştir.

Henüz diğer endüstri alanlarında zorunlu olmayan validasyon işlemleri, ilaç endüstrisinde üretim ve kontrolde kullanılan temel işlemlerin ve makinelerin sistematik olarak gözden geçirilmesi, önerilen ve kontrol yöntemleri kullanıldığında tekrarlanabilir sonuçlar alınması ve istenen kalitenin sağlanacağından emin olunması için zorunlu olarak yapılmaktadır. Buna bağlı olarak validasyon işlemlerinin çeşitli türleri bulunmaktadır. Bunlardan biri de yöntem validasyonudur.

Tezin ikinci bölümünde, ilk bölümünde optimize edilmiş olan HPLC yöntemine analitik yöntem validasyonu uygulanmıştır.

## 2.GENEL BÖLÜM

### 2.1 Faktöriyel Tasarım Ve Optimizasyon

Bir deneyden elde edilen sonuçları etkileyen herhangi bir deneysel koşul faktör olarak adlandırılır. Bir deneyde ilgili faktör, çözeltinin muhafaza edildiği koşullardır; araştırmacı tarafından değiştirilebildiği için de kontrol edilebilen faktör olarak isimlendirilir. Bir varilin farklı kısımlarından alınan tuz örneklerinin saflık açısından kontrol edilmesinde ise ilgili faktör, varilin tuz alınan bölümüdür ve rasgele seçilmiştir. Bu nedenle de bu faktör, kontrol edilemeyen faktör olarak isimlendirilir. Mümkün olan değerler sayısal bir şekilde düzenlenemediği için bu faktörlerin her ikisine de **nitel faktörler** adı verilir. Mümkün değerleri sayısal olarak düzenlenebilen (örn. sıcaklık) faktörlere **nicel faktörler** adı verilir. Bir faktörün aldığı farklı değerlere ise farklı seviyeler denir.

Açıkça bir deneyden doğru bir sonuç elde edilmek isteniyorsa, sonucu etkileyecek birçok faktör belirlenmeli ve eğer mümkünse kontrol edilmelidir. Faktöriyel tasarım terimi genellikle şu seviyeleri tanımlamak için kullanılır.( J.C ve J.N Miller., (2004))

1. Deney sonuçlarını etkileyebilecek faktörlerin belirlenmesi
2. Kontrol edilemeyen faktörlerin etkisini en aza indirebilecek şekilde deneyin tasarlanması
3. Mevcut değişik faktörlerin etkisini ayırt edebilmek için istatistiksel analiz yapılması

Analitik teknikler çoğu zaman maddelerin çok küçük miktarlarının analiziyle ilgilendiklerinden, cevabın bağlı olduğu faktör seviyelerinin, genellikle elde edilen cevabı maksimize edecek bir şekilde seçilmesi önemlidir. Bu en uygun faktör seviyesinin belirlendiği sürece **optimizasyon** adı verilir. İlk basamak, hangi faktörlerin ve bunların arasındaki hangi etkileşimlerin önemli derecede cevabı etkilediğinin belirlenmesidir. Bu belirleme, her bir faktörün genellikle düşük ve yüksek olarak bilinen iki seviyede bulunduğu faktöriyel bir deney yaparak gerçekleştirilir. Nicel değişkenlerin söz konusu olduğu bir durumda düşük ve yüksek terimleri bilinen anlamları ile kullanılırlar. Seviyelerin isabetli bir şekilde seçimini, prensip olarak araştırmacının bilgisi ve deneyimi ve kullanılan sistemin kısıtlamaları belirler; Örneğin çözücü eğer su ise ancak 0-100 C° arasında bir sıcaklık aralığı kullanılabilir. Nitel bir değişken için düşük ve yüksek terimleri ise farklı şart çiftini temsil eder; Örneğin bir katalizörün ortamda bulunması veya bulunmaması, mekanik veya magnetik karıştırma, analiz edilen örneğin toz veya granül olması vs. örneğin üç faktörlü : (A,B,C ) bir deneye

bakıldığında aşağıdaki bitişik tabloda da belirtildiği gibi faktör seviyelerinin  $2 \times 2 \times 2 = 8$  adet mümkün kombinasyonları görülmektedir. Bu sütunda uygun bir küçük harfin bulunması faktörün yüksek seviyede olduğunu, bulunmaması ise faktörün düşük seviyede olduğunu gösterir. 1 sayısı faktörlerin aynı seviyede bulunduğunu gösterir.

Kombinasyon	A	B	C	Cevap
1	-	-	-	Y <sub>1</sub>
a	+	-	-	Y <sub>2</sub>
b	-	+	-	Y <sub>3</sub>
c	-	-	+	Y <sub>4</sub>
bc	-	+	+	Y <sub>5</sub>
ac	+	-	+	Y <sub>6</sub>
ab	+	+	-	Y <sub>7</sub>
abc	+	+	+	Y <sub>8</sub>

Faktöriyel tasarımda faktörlerin etkisinin ve etkileşmenin hesaplanmasında belirli bir yöntem uygulanır.

## 2.2 Faktöriyel Tasarım İle İlgili Bazı Çalışmalar

Faktöriyel tasarım ile ilgili yapılan literatür araştırmasında faktöriyel tasarım denemelerinin faktör sayısı ve etkisine göre çeşitli şekillerde uygulama alanları olduğu görülmüştür.

Full faktöriyel tasarım (ANOVA , Yates v.b. )

Fraksiyonel faktöriyel tasarım (Plackett Burman v.b.)

Sinyal yüzey tasarımları

A) Merkez kompozit tasarımları

B) Box Behnken tasarımları

D - optimal tasarımları gibi faktöriyel tasarımlardır.

Çizelge 2.1 de faktöriyel tasarım uygulanarak yapılmış çalışmalar görülmektedir.

Çizelge2.2.1 Faktöriyel tasarım ile ilgili bazı çalışmalar

ANALİZ EDİLEN MADDE	YÖNTEM	DENEYSEL TASARIM	ÖRNEK	KAYNAK
Nikotinic Asit	İyon Kromatografisi	3 seviyeli Faktöriyel Tasarım	Domuz Eti	G .Saccani, E. Tanzi, S.Mallazi 2004
Çeşitli Organik Çözücü Bileşenleri	HPLC	2 seviyeli Faktöriyel Tasarım		Vicki Morris, Jeff Hughes, 2003
Penisilin G,Benzatin, Prokain	HPLC	2 Seviyeli ANOVA Yöntemi	İlaç	Alizeno Ghassempour, Saied S. Qeed 2003
Lipozomlar	HPLC	3 Seviyeli Box Behnken Tasarımı		Gry Stenrud, Sverre A, 1999
Amfoterin B	HPLC	2 <sup>5</sup> X 3 Seviyeli	Sulu Ortam	C.T. Hung, F.C. Lam, D.G. Perrier 1987
Biojenik aminler	HPLC	Faktöriyel Tasarım	Şarap	Natavidad Garcia-Villar, Javier Saurina 2006
Farmasötikler	HPLC	Faktöriyel Tasarım		Jian-Ge Chen, Kelly Glancy 2001
Lineer alkali benzenler	GC/MS	Faktöriyel Tasarım	Deterjan	Jose C. Pentoado, Ray E.Burns 2006
NikardipinHCL – Aljinat Jel		2 <sup>3</sup> Seviyeli	İlaç	Sevgi Takka, Ömer H. Ocak, Füsün Acartürk 1998
Benzoik asit, Vanilin	Kolorimetri	Faktöriyel Tasarım	İlaç	S.Ray,A.T. Riga,K.S. Alexander 2002
Siprofloksasin-PLGA		2 <sup>4</sup> Full Faktöriyel Tasarım	İlaç	Kathleen Dillen, Jo Vandervoot 2004
Tetrasilin	Kapiler Zone Elektroforez	Faktöriyel Tasarım	İlaç	Monica Cecilia Vargas Mamani, Jime Amaya Farfan 2006
Ginsenoidler	HPLC	Merkez kompozit tasarım	Asya ve Amerikan Ginsengi	Yong Guo Li, Hong Liu, Y.Vander Heyden 2005
Herbisid		Sinyal Yüzey Tasarım	Su	C. Gonzales Barreino, M.Lores R. Cela 2000
Aminoasit	HPLC	2 Seviyeli		H.A. Hansen, ve C. Emborg 1992
Hormonal steroid	RP- HPLC	Faktöriyel Tasarım		Ji Quing Wei, Xian-Teng Zhou 1991
Aspirin ve Salisilik asit	HPLC	Plackett Burman Faktöriyel Tasarım	İlaç	M.Mulholland P.J. Naish 1988
9- nitrokomptotesin	Kolorimetri	Full Faktöriyel Tasarım ANOVA	İlaç	M.Erfan, S. Dadashzadeh 2006
Bazı polimerler	FTIR	3 <sup>2</sup> Seviyeli Sinyal Yüzey Tasarım	İlaç	Praveen Sher, Ganesh Ingavle 2006
Lipozomlar	UV	Faktöriyel Tasarım	Deri	Manesh Padamwar 2006

Lipozomal speroksit dismutaz	ELİZA	2 <sup>(5-2)</sup> Seviyeli Tasarım	Deri	Edith Braun ,Andreas Wagner 2005
Antiemetikler	Klinik Testler	2 <sup>6</sup> Seviyeli Faktöriyel Tasarım	İlaç	Christian C. Apfel,Kari Kortilla 2003
Tesaglitasar	LC/MS	Faktöriyel Tasarım	Plazma	Henrik Svenberg Susanne Bergh 2003
İlaçlar		SinyalYüzey Tasarım		A.M. Dean W.I Notz 2002
Parasetamol	Sprey Kurutma	Merkez Kompozit Tasarım		A.Billion, G. Cassanas 2000
Su- yağ		Faktöriyel Tasarım	Hidrofilik ilaç	S. Bjerregaard, I. Söderberg 1999
Beta durdurucular	Kapiler elektroforez	3 <sup>(4-1)</sup> Seviyeli 2 <sup>(3-1)</sup> Seviyeli		M.G. Vargas, Y.Van Heyder 1999
Çoklu komponent ve koruyucu lipozomlar	Spektrofotometre	2 Seviyeli 6 Faktörlü	C vitamini	Yannis L. Loukas 1998
Teofelin		3 <sup>3</sup> Seviyeli Full Faktöriyel Tasarım	Sodyum aljinat	M.C. Gohel, G.K. Jani 1998
Kimyasal ve biyolojik ürünler		Fraksiyonel Tasarım D-Optimal Tasarım		Lennart Erikson, Erik Johansson 1996
PLGA		2 <sup>3</sup> Seviyeli	Salbutamol sülfat	Nevin Çelebi, Nurhan Erden 1996
Nerokoruyucu peptidler	HPLC	Faktöriyel Tasarım	Nöral ağlar	Klara Novotna, Jan Havlis 2005
Bazı çeşit tabletler		2 seviyeli Fraksiyonel Faktöriyel Fasarım	İlaç	Gopi.M. Vakatesh, Jo Ann N. Coleman 1999
Metil hidroksi benzoat,propil hidroksi benzoat, Klrofeniraminmaleat, fenilefrin HCL	İyon değiştirme RP- HPLC	Faktöriyel Tasarım	şurup	Jacques O.D.Beer, Catherine V. Vanderbroucke 1995
Kodein fosfat, psedeuefedrin HCL, Klorfeniraminmaleat	HPLC	Full Faktöriyel Tasarım	İlaç	Ruby Ragonese,Mary Mulholland 2007
İbuprofen,kodein fosfat,	Kapiler elektroforez	Faktöriyel Tasarım	İlaç	Karin Persson-Stubberud,Ove Aström 1999
Triadimenol	RP- HPLC	2 Seviyeli Faktöriyel Tasarım	İlaç	E.Hund,Y.Vander Heyden, 2000

## 2.3.Validasyon

### 2.3.1 Validasyonun Tanımı, Önemi

Validasyon, ürün kalitesine etki edebilecek tüm imkan ve operasyonların önceden belirlenmiş spesifikasyonları sağlayacak şekilde işlendiğini garanti altına almak amacıyla yürütülen çalışmalardır.

Her zaman aynı kalitede ve aynı şartlarda üretim yaparak, tüm üretilen ürünlerin kalitesinin aynı olmasını sağlamaktır.( Sönmezer T. ,(2003))

Validasyon;

- -GMP kuralları için yapılması gerekir.
- Kaliteyi güvence altına alır, değişkenliği en aza indirger.
- İyi kontrol edilmiş, güvenilir prosesler oluşmasını sağlar. Çünkü kimyasal sonuçlardan elde edilen bilgiler güvenilir olmalıdır.
- Ekipman ve prosesler hakkında daha iyi bilgi sahibi olunmasını sağlar.
- Bozuk çıkan malın imhası, yeniden işlem görmesi, yeniden numune alınması, ekstradan analiz yapılması gibi olaylardan dolayı maliyeti azaltır.
- Verimliliği artırır.
- Organizasyon içindeki birimlerde koordinasyon, iletişim ve bilgi akışını artırır.

Validasyonun temel işlemleri yapılan işi tanımlamaktır. Tanımlanan işlemi kanıtlamak ve bu kanıtlanan bulguları tekrarlayıp, sonuçları yorumlamaktır. Validasyon işlemi tüm ürünlerin kalite kontrollerine uygulanabilir. Ülkemizde validasyon işlemi genellikle ilaç sektöründe geniş uygulama alanı bulmaktadır.

### 2.3.2 İlaç Endüstrisinde Validasyon Çeşitleri(Schauwechwer P. Frei R. W., (1977))

- Temizlik yöntemleri validasyonu
- Analitik yöntem validasyonu
- Makine/ Ekipman validasyonu
- Proses validasyonu

**Temizlik işleri validasyonu**, imalat alanında bulunan tüm imalatla ilgili ekipmanların temizlenmesinde uygulanacak olan validasyon işlemleridir.

**Analitik yöntem validasyonu**, analitik prosedürün kalitatif ve kantitatif olarak doğru sonuçlar verdiğini belirleyen çalışmalardır.

**Ekipman validasyonu**, ekipmanın doğru bir şekilde çalışıp çalışmadığını, fonksiyonlarını doğru bir şekilde yerine getirip getirmediğini gözlemlemek amacıyla yapılan çalışmalardır.

**İlaç proses validasyonu**, spesifik olarak bir ürünün araştırma kademesinden final ürün haline gelene kadar geçen sürede yapılan validasyondur.

## 2.4. Analitik Yöntem Validasyonu

### 2.4.1 Amaç

Analitik yöntem validasyonu tasarlanmış analitik yöntemin kabul edilebilirliğini kanıtlamak ve analitik prosedürün kantitatif ve kalitatif olarak doğru sonuçlar verdiğini belirleyen sonuçları elde etmektir. Kısaca analiz yönteminde kullanılacak olan parametreleri ve yapılacak işlemleri tanımlar.( Gülhan S. ,(1999))

### 2.4.2 Dikkat Edilmesi Gereken Noktalar

Yöntem validasyonu hazırlanırken;( Snyder L. R. Ve Kirkland J. J. ,(1979)

- a. Yöntem validasyonu, rutin çalışmalarda kullanılan örnek, reaktif veya standartların laboratuardaki deneyimlerini göstermesi,
- b. Kullanılan reaktifler ve standartlar, bileşenin saflığı ve doğruluğu için kontrol edilmesi,
- c. Bir validasyon planı hazırlanması ve adım adım hangi aşamaların yapılacağı belirtilmesi,
- d. Özel bir yöntemin validasyonu; örnekler yada bilinmeyen örnek ile aynı özellik gösteren standartlarla laboratuvar deneylerinde çalışılması, hazırlık ve yürütme, validasyon protokolünü izlemesi,
- e. Bir yöntemin validasyonu, analizin gerektirdiği koşullardan ayrılmaması, sapmaması yeni bir analitik yöntemin validasyonu ve geliştirilmesi bu süreç içinde tekrarlanabilir olabilmesi,

f. Her validasyon çalışması sırasında yöntem anahtar parametreleri belirlenmesi ve sonra gelen bütün validasyon adımlarında bu parametreler kullanılması, her defasında tekrarlanan çalışmaları minimuma indirmek ve yöntem koşullarının sağlandıktan sonra bir sonraki çalışmalara geçilmesi gerekliliği saptanmıştır.

g. Yukarıdaki koşullarla birlikte validasyon kriterlerinin belirlenmesi gerekliliği de doğmuştur.

Bu kriterler;

1. Etken madde(ler)
2. Matriks (katkı maddeleri)
3. Yöntemin kalitatif veya kantitatif olması
4. Tanıma ve miktar limitleri
5. Çalışma aralığı
6. Kesinlik ve tekrarlanabilirlik özellikleri
7. Ekipman tipi ve konum

### 2.4.3 Analitik Yöntem Validasyonunda Kapsam

Analitik Yöntem Validasyonu, yöntemin belirlenen amaç için uygun olduğunu göstermelidir.

Validasyon;

- Yöntemin kapsamını,
  - Farmakopide kayıtlı olan yöntemleri,
- Farmasötik alanda bu yöntemler 3 grupta toplanır;

1. **etken madde analiz yöntemi:** hammadde veya bitmiş ürün içindeki koruyucu maddeler dahil aktif maddenin tayininde kullanılan yöntemlerdir.

2. **safsızlık yöntemi:** hammaddedeki safsızlıkları veya bitmiş ürünlerdeki parçalanma ürünlerini tayin etmeye yarayan yöntemlerdir.

3. **bitmiş ürün analiz yöntemi:** performans özelliklerini tayin için kullanılan yöntemlerdir.

- Yöntemin performans özelliklerini içermelidir.
- Yöntemin kabul edilebilir limitlerini içeren bir plan izlemelidir.
- Disolüsyon ve içerik düzgünlüğü testlerini içermelidir.
- Farklı tiplerde donanım ve yöntemin yürütüleceği yerin farklı koşullarda olduğunu belirtmelidir. Örneğin; yöntem sadece bir özel aletle ve sadece bir özel laboratuarda

yürütülürse, satıcıların ve müşterilerin farklı bir alet kullanması ve farklı bir laboratuarda validasyonu yapmaması gerekirdi. Böylece deneyler çok kısıtlandırılmış olurdu.

Yöntemin performans özellikleri tasarlanmış yöntemin kullanımına göre olmalıdır. Örneğin; yöntem kalitatif ise ekipmanın tüm dinamik alanını kapsayan yöntemin, doğrusallığının kontrolüne ve validasyonuna gerek olmadığı görülmüştür. Eğer validasyon verileri uygun gözüküyorsa ya yöntemin kendisi, ya donanımı, ya analiz tekniği ya da kabul edilebilir limitleri değiştirilmelidir. Sonuçta yöntem gelişimi ve validasyonu tekrarlanabilen bir yöntemdir. Örneğin; kantitatif ölçümlerde iki pik arasındaki ayırma gücü 2,5 yada daha fazla olmalıdır. Eğer daha az ise Sıvı Kromatografisindeki mobil faz bileşimleri için daha fazla optimizasyona gerek duyulur.

Validasyonda tatmin edici sonuçlar iyi performans sağlayan ekipmanlarla sağlanabilir. Bir aletin, yöntemin validasyonunda kullanılmasından önce, aletin performansı, genel özellikleri belli olan standartlar kullanılarak doğrulanmalıdır. Yönteme ait kritik özellikleri için özel bakım ve ilgi gösterilmelidir. Validasyon parametrelerinde kullanılan materyal; Örneğin belirteç ve referanslar, düzen ve temizliği için kontrol edilmelidir.

#### 2.4.4 Analitik Yöntem Validasyon Aşamaları

Analitik yöntem validasyonunda kimyasal ölçümlerden elde edilen verilerin doğruluğunu kanıtlayan delillerin sağlanması için adımların teker teker gerçekleştirilmesi gerekir.( Huber L., (2001),)

1. İlk olarak bir validasyon protokolü seçilir.
2. Uygulama ve amaç belirlenir, yöntemin kapsamı ve onun validasyon kriterleri belirlenir. Bu validasyon kriterleri önceden dikkat edilmesi gereken noktalar bölümünde belirtilen bileşenler, matriksler, analizin kalitatif yada kantitatif oluşu, tanıma ve miktar limitleri, çalışma aralığı, kesinlik ve doğruluk, donanım tipi ve analiz ortamıdır.
3. Validasyon deneyleri belirlenir.
4. Yöntem parametreleri ve kabul edilebilir limitler belirlenir.
5. Standart ve belirteç gibi materyaller belirlenir.
6. Yöntem parametreleri ve/veya kabul edilebilir kriterleri ayarlanır ve artık validasyon deneyleri uygulanmalıdır.
7. Revalidasyon kriterleri belirlenir ve gerekiyorsa yöntem yeniden valide edilir.

8. Analitik kalite kontrol denetimleri yöntemin rutini için belirlenir ve /veya sistem uygunluk testlerinin sıklığı ve tipi belirlenir.

9. Validasyon deneyleri raporlandırılır

#### 2.4.5. Analitik Yöntem Validasyon Parametreleri

Validasyon deneylerinin sırası hakkında resmi bir yönerge yoktur ve en uygun sıra yöntemin kendi özelliğine bağlıdır. Yöntem validasyonu için parametreler, ulusların farklı kuruluşlarında, uluslararası komitelerde ve literatürde belirtilerle tanımlanmıştır. Maalesef bazı tanımlar farklı organizasyonlar arasında farklı şekildedir. Farmasötik uygulamalar için *International Conferance on Harmonization* ve bazı organizasyonlar tarafından belirlenen aşağıda sırası ile belirtilmiştir. (Huber L., (2001))

1. Seçicilik (spesifiklik)
2. Doğrusallık
3. Çalışma aralığı
4. Doğruluk ve geri kazanabilirlik
5. Kesinlik (tekrarlanabilirlik)
  - Laboratuar içi tekrarlanabilirlik
  - Laboratuarlar arası tekrarlanabilirlik
6. Tutarlılık
7. Tanıma limiti (LOD)
8. Miktar tayini limiti (LOQ)
9. Güvenilirlik

İlaç analizinde genel olarak 3 yöntem kullanılır;

1. Hammadde veya bitmiş ürün içindeki koruyucular dahil aktif maddenin tayininde kullanılan yöntemler,
2. Hammadde ki safsızlıkları veya bitmiş ürünlerdeki parçalanma ürünlerini tayin etmeye yarayan yöntemler,
3. Ürünün performans özelliklerinin tayini için kullanılan yöntemler,

Bu 3 yöntemin amacına göre valide edilecek parametreler de farklılık göstermektedir. Çizelge 2.4.5.1. de bu yönteme göre değişen parametreler gösterilmektedir.

Çizelge 2.4.5.1. İlaç analizinde yöntemlere göre değişen parametreler (Gülhan S. ,(1999))

Parametreler	1.yöntem	2.yöntem		3.yöntem
		kantitatif tayin testi	limit	
Seçicilik	+	+	+	-
Doğrusallık	+	+	-	+
Çalışma aralığı	+	+	*	*
Doğruluk ve geri kazanım	+	+	-	*
Kesinlik	+	+	*	+
Tutarlılık	+	+	+	+
Tanım limiti	+	+	+	*
Miktar tayini limiti	+	+	+	*
Güvenirlilik	+	+	+	+

(\*): Spesifik testlere bağlı olarak gerekirse yapılır.

#### 2.4.5.1 Seçicilik/Spesifiklik

Spesifiklik, genellikle bir tek analit için üretilen yönteme karşılıktır. Seçicilik ise birbirinden ayırt edilen ya da edilemeyen kimyasal içerikler için kullanılmıştır. Kısacası; katkı maddeleri, değişik interferanslar varlığında analitin doğru olarak ölçebilen seçiciliğini tanımlar. Likit kromatografisinde seçicilik optimum ayırma ve kolon koşullarının seçimiyle elde edilmiştir. Seçiciliğin üstünlüğü kullanılan analiz yönteminde sadece o etken maddeye özgün ve spesifik olduğunu ifade etmesidir. Bizim yöntemimiz sadece etken maddeyi ölçebilmeli ve diğerleri ile reaksiyon vermemelidir. Burada amaç, ilacın içindeki yardımcı maddeler ile etken maddenin ve bilinen bozunma ürünleri veya safsızlıkların birbirinden ayrı bir şekilde tanımlanabilir olmasıdır. Bunun için özellikle LC 'de uygun kolon ve kromatografi koşulları, örneğin; mobil faz bileşimi, kolon sıcaklığı ve dedektör dalga boyu seçilmelidir.

#### 2.4.5.1.1 UV Dedektörü Kullanan HPLC Uygulamaları (Gülhan S. ,(1999))

Seçicilik uygulamaları minimum 5 ayrı bileşen ile denenmiş olması gerektiği saptanmıştır.

- Normal çalışma konsantrasyonu ve bunun iki katı konsantrasyonda plasebo ve madde çözeltileri hazırlanmış,
- Ve UV spektrometrede, 200- 400 nm arasında okunmuş,
- Plasebonun, etken maddenin maksimum absorbans gösterdiği alanlarda girişim yapıp yapmadığı tespit edilmiştir.

#### 2.4.5.2 Kesinlik

Bir yöntemin kesinliği birkaç kez enjeksiyon yapıldığında sonuçların birbirine uygunluk derecesidir. Yani homojen bir karışımdan, kısa aralıklarla birden fazla numune alındığında elde edilen sonuçların birbiriyle uyumlu olmasıdır. Bir yöntemin kesinliği genellikle test sonuçlarının RSD(bağıl standart sapma) 'si ile ölçülmüştür.

Bu standart sapmalar 3 kategoride toplanmıştır. (Snyder L. R. Ve Kirkland J. J. ,(1979)):

1. Tekrarlanabilirlik
2. Laboratuvar içi tekrarlanabilirlik
3. Laboratuvarlar arası tekrarlanabilirlik

#### 2.4.5.2.1 Tekrarlanabilirlik

Bir analistin laboratuvarında bir ekipman ile kısa zamanda analizi gerçekleştirdiğinde elde edilen sonuç tutarlılığıdır. En azından 5 yada 6 saptama, 3 farklı matriks, 2 yada 3 farklı konsantrasyon ile analiz gerçekleştirilmiş ve % RSD hesaplanmıştır. Kesinlik için kabul edilebilir kriter, yapılan bir çok tip analizin türüne bağlıdır. Farmasötik analizlerde kalite kontrolde % 2 RSD kolayca başarılıdır. Oysa biyolojik numunelerde duyarlılık konsantrasyon limitlerinde yaklaşık %15, ve diğer konsantrasyon düzeylerinde %10' dur. Çevresel ve gıda numunelerinde kesinlik matrikse, analit konsantrasyonuna ve analiz tekniklerine bağlıdır. RSD%2 ile % 20 arasında değişmektedir.( Snyder L. R. Ve Kirkland J. J. ,(1979))

Çizelge 2.4.5.2.1 Analit konsantrasyonuna bağlı olarak kesinlik değerleri: (Huber L., (2001))

(The AOAC Manuel for the Peer Verified Methods Program)

Analit %	Analit oranı	Birim	RSD %
100	1	100%	1,3
10	10 <sup>-1</sup>	10%	2,8
1	10 <sup>-2</sup>	1%	2,7
0,1	10 <sup>-3</sup>	0,1%	3,7
0,01	10 <sup>-4</sup>	100 ppm	5,3
0,001	10 <sup>-5</sup>	10 ppm	7,3
0,0001	10 <sup>-6</sup>	1 ppm	11
0,00001	10 <sup>-7</sup>	100 ppb	15
0,000001	10 <sup>-8</sup>	10 ppb	21
0,0000001	10 <sup>-9</sup>	1 ppb	30

#### 2.4.5.2.1.1 Laboratuvar içi tekrarlanabilirlik

Laboratuvar içi tekrarlanabilirlik, haftalar boyunca *aynı laboratuvar*da yapılan bir yöntemin karşılaştırılması ile belirlenmiştir. Aynı laboratuvarda farklı analistlerle, farklı cihazlarla, farklı standartlar, farklı kolonlar kullanılarak veya bunların kombinasyonları yapılarak aynı analiz farklı günlerde yapılmıştır.

Bir yöntemin laboratuvar içi tekrarlanabilirliği farklı operatörler, farklı firmalar, farklı aletler, farklı standartlar, farklı belirteçler ya da bunların farklı kombinasyonları ile elde edilen sonuçlarda uyumsuzluk gösterebilmiştir. Laboratuvar içi tekrarlanabilirlik validasyonunun amacı; analiz sona erdiğinde aynı laboratuvarda, yöntemin aynı sonuçları doğrulamış olmasıdır.

#### 2.4.5.2.1.2 Laboratuvarlar arası tekrarlanabilirlik

Laboratuvarlar arası tekrarlanabilirlik, farklı laboratuvarlardan elde edilen kesinlik sonuçlarını göstermektedir. Amacı farklı laboratuvarlardan elde edilecek sonuçları sağlayacak yöntemleri doğrulamaktır. Bir analitik yöntemin laboratuvarlar arası tekrarlanabilirliği farklı

laboratuarlarda farklı analistlerle ve farklı işlevsel, çevresel şartlar altında ama aynı belirli yöntem parametreleri ile analiz edilerek belirlenmiştir. Eğer yöntem farklı laboratuarlarda kullanılacaksa validasyonu önemlidir. Bir yöntemin laboratuvarlar arası tekrarlanabilirliğini etkileyen faktörler:

- Oda içindeki sıcaklık ve nem farklılıkları,
- Farklı tecrübe ve farklı gayretteki analistler,
- Farklı özellikteki donanım. Mesela HPLC deki alıkonma hacmi,
- Malzeme ve aletlerdeki koşulların varyasyonları, mesela HPLC' deki mobil faz karışımı, pH, akış oranı...,
- Farklı şirketlerin kolonları,
- Çözücüler, belirteçler ve farklı kalitedeki aletler olarak belirlenmiştir.

#### **2.4.5.2.3 UV Dedektörü Kullanan HPLC Uygulamaları(Gülhan S. ,(1999))**

##### **2.5.2.3.1.1 Analizler arası tekrarlanabilirlik**

- Bir homojen karışım hazırlanır. Kısa süre sonra bu homojen karışımdan numuneler alınarak 6 ayrı analiz yapılır.(analizlerde standarda karşı 2 ayrı ölçüm yapılır.)
- Analizlerin sonuçları değerlendirilir.(6 analiz sonuçları için RSD maksimum %2 olmalıdır.)

##### **2.5.2.3.1.2 Laboratuvar içi tekrarlanabilirlik**

- Aynı laboratuvarda güvenilir sonuçlar alınabilmesi için yapılır. Aynı numune uzun zaman aralıklarında, en az 1 hafta sonra farklı kişi tarafından farklı aletlerle, farklı lot no' lu reaktif vb. kullanılarak analizler tekrarlanır.

### 2.4.5.3 Doğruluk ve % Geri kazanım

Doğruluk, yöntem ile elde edilen test sonuçlarının gerçek değerde uygunluğunun bir ölçüsüdür. Doğruluk değerlendirilmesi birçok yolla elde edilebilir(Huber L., (2001)):

I. Referans yöntemi ile numune yönteminin karşılaştırılması bir yoldur. Bu yaklaşımda referans yönteminin belirsizliği bilinmektedir.

II. Doğruluk, konsantrasyonları bilinen bir numunenin analizi ile tayin edilebilir. Mesela bir sertifikalı numune ve ölçülmüş doğru değer kıyaslanır.

% geri kazanım bulunan sonuçların gerçek değere yakınlığının ölçülmesidir. % geri kazanım olarak ifade edilir. Elimizde sertifikalı örnek bulunmuyorsa boş numune matriksine konsantrasyonu bilinen hacimde ve ağırlıkta analit eklenir. Sonra matriksten, analitin ekstraksiyonu sonucu elde edilen analitin standart çözeltilere göre geri kazanımları hesaplanır. Bu sayede plaseboya ilave edilen etken maddenin tam olarak geri kazanıp kazanılmadığı anlaşılır. Elde edilen geri kazanım değerleri %100 ± 3 limitleri içinde olmalıdır. Ama analit konsantrasyonu çok düşük olduğu zaman bu sınır genişler. Çizelge 2.4.5.3.1.2de *AOAC Manuel for the Peer Verified Methods Program*(Huber L., (2001)) nın hazırlamış olduğu sınırlar gösterilmiştir. Beklenen geri geri kazanım numune matriksine bağlıdır, işleme konulan örneğe ve analit konsantrasyonuna bağlıdır. Bu doğruluk değerlendirilmesi numune preparatın etkinliğini ölçer.

Çizelge 2.4.5.3.1. Geri kazanım verileri (Huber L., (2001))

Aktif bileşenler (%)	Analit oranı	Birim	Limit aralığı (%)
100	1	100%	98-102
>=10	10 <sup>-1</sup>	10%	98-102
>=1	10 <sup>-2</sup>	1%	97-103
>=0,1	10 <sup>-3</sup>	0,1%	95-105
0,01	10 <sup>-4</sup>	100ppm	90-107
0,001	10 <sup>-5</sup>	10 ppm	80-110
0,0001	10 <sup>-6</sup>	1 ppm	80-110
0,00001	10 <sup>-7</sup>	100 ppb	80-110
0,000001	10 <sup>-8</sup>	10 ppb	60-115
0,0000001	10 <sup>-9</sup>	1 ppb	40-120

#### 2.4.5.3.1 UV Dedektörü Kullanan HPLC uygulamaları (Huber L., (2001))

- Formüldeki inaktif maddeleri taşıyan plasebo çözeltisi hazırlanır.
- Etken maddeye ait çözelti hazırlanır.
- Daha sonra bu çözeltiden(% 50, 80, 100, 120 ve150) etken maddeye eşdeğer miktarda madde alınır, plaseboyla karıştırılır.
- Plaseboya ve numuneye normal analiz işlemi uygulanır.(analizler 3'er defa tekrarlanır)
- Çıkan sonuçlardan koyulan miktar ve % geri kazanım değerleri hesaplanır.
- Direkt UV analizlerinde ise standarda karşı hazırlanan çözeltilerin absorbansları okunur.
- Geri kazanım miktarı analiz edilecek madde/ bileşenler oranına göre değişir.

#### 2.4.5.4 Doğrusallık(Huber L., (2001))

Doğrusallık, yöntemin verilen bir alanda örnek içindeki analitin konsantrasyonu ile orantılı, iyi tanımlanmış matematiksel dönüşüm ya da doğrudan ortaya çıkma yeteneği olarak belirlenmiştir. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltiler cihaza verilerek yöntemin doğrusal olup olmadığı tespit edilmiştir. En az 5 farklı konsantrasyonda çözeltiler hazırlanmış bu çözeltilerin konsantrasyonları aktif maddenin %25 -150 aralığında olması, kullanılan standart çözeltiler, matriksli ve matriksiz olarak hazırlanarak her iki durumda da doğrusallık araştırılması gerektiği belirlenmiştir. Lineer regresyondan hesaplanan korelasyon katsayısı değeri doğrusallık hakkında bilgi edinmemizi sağlamıştır. Bu değer 0,997 büyük eşit olmalıdır. (Huber L., (2001))

#### 2.4.5.4.1 UV Dedektörü Kullanan HPLC uygulamaları(Gülhan S. ,(1999))

- Etken maddenin belli bir çalışma aralığına göre % 50, %80, % 100, %120 ve % 150 konsantrasyonlarında 5 ayrı çözelti hazırlanır. Numuneler iki şekilde hazırlanabilir:
  - 1- stok solusyonu seyreltilerek,
  - 2- belli bir karışımdan farklı tartımlar alarak hazırlanır.
- Sonra bu 5 ayrı konsantrasyondaki numunelerin her birinden 5 ayrı ölçüm yapılır.
- HPLC ' ye enjekte edilir ve pikleri veya sonuçları değerlendirilir.

- 5 ayrı konsantrasyona karşılık gelen 5 ayrı ölçüm sonuçları kullanılarak standart eğri çizilir. Veriler bir doğru üzerinde olmalıdır.

Eğriye ait aşağıdaki parametreler hesaplanır.

- Korelasyon katsayısı
- Regrasyon eğimi
- Bakiye(gözlenen sinyal-hesaplanan sinyal) karelerinin toplamı bulunur.

#### **2.4.5.5 Çalışma aralığı**

Bir analitik yöntemin çalışma aralığı; kesinlik, doğruluk ve doğrusallık belirlenirken üst ve alt aralıklarıdır. Çalışma aralığı analitik yöntem ile elde edilen test sonuçlarına benzer birimlerle ifade edilir. Örneğin analiz konsantrasyonu yöntemin çalışma aralıklarını belirler. (Huber L., (2001))

ICH ' ye göre analiz konsantrasyonu (Gülhan S. ,(1999)):

Kimyasal analizlerde : %80-%120

Safsızlık analizlerinde: %50-%120 olmalıdır.

#### **2.4.5.6 Miktar tayini limiti ve tanıma limiti**

##### **2.4.5.6.1 Miktar tayin limiti(limit of quantitation)**

Bir maddenin %95 güvenirlilik sınırı içinde tayin edilebilen minimum miktarı olarak tanımlanmıştır. Yani bu miktar analiz koşullarına, kabul edilebilir kesinlik ve doğruluk değerlerine sahip tayin edilebilecek en düşük konsantrasyondaki madde miktarıdır denilebilir. Bu parametre özellikle hammadde veya bitmiş ürünlerdeki safsızlık, parçalanma ürünü gibi düşük miktardaki maddelerin analizinde önem taşımaktadır. Kromatografi de ise kesin ölçüm veren minimum enjeksiyon miktarı olduğu belirlenmiştir. Kromatografide tipik olarak zemin gürültüsünden 10 - 20 kere daha yüksek bir pik gerektirdiği belirlenmiştir. (Gülhan S. ,(1999))

##### **2.5.6.2 Tanıma limiti**

Saptanan fakat miktarının ölçülmesinin gereksiz olduğu numunedeki etken maddenin %95 ya da % 99 güvenirlilik sınırı içinde teşhis edilebildiği minimum miktarı olarak tanımlanmıştır.

Genellikle bu seviyelerde güvenilir, kantitatif sonuçlar elde edilemediği görülmüştür. Kromatografi de 2 ya da 3 katı olması gerektiği saptanmıştır (Gülhan S. ,(1999)).

#### **2.4.5.6.3 UV Dedektörü Kullanan HPLC uygulamaları (Gülhan S. ,(1999))**

##### **2.4.5.6.3.1 Tanıma limiti (LOD) uygulaması:**

- Bilinen konsantrasyonlarda bir numune hazırlanır.
- Bu numune belli oranlarda seyreltilerek hazırlanan blanke karşı teşhis edilebildiği minimum miktar belirlenir. HPLC 'deki gürültü sinyalinin 3 katı pik yeterlidir.

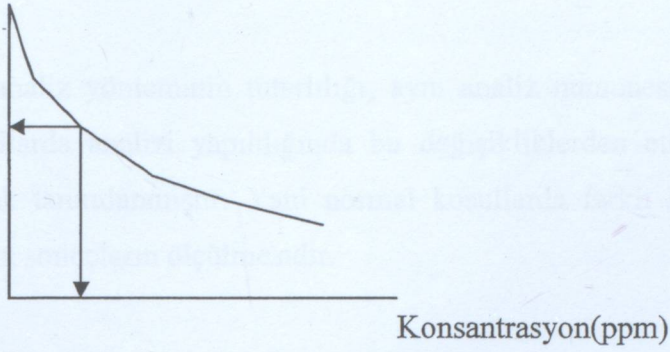
##### **2.4.5.6.3.2 Miktar tayin limiti(LOQ) uygulaması:**

- Analiz yönteminin miktar tayin limitini hesaplamak için birçok blank, örnek ile analiz yapılır.
- Sonra bunların % RSD' si hesaplanır. Bulunan standart sapma 10 ile çarpılır. Bu değer genelde minimum kantitatif tayin limitidir.
- Miktar tayin limiti, tanıma limitinin yaklaşık 3 katı HPLC de elde edilen gürültü pikinin 10-20 katıdır.

Ya da;

- Etken madde eklenmiş matriks örneği hazırlanır.
- Seyreltilir ve 6 kere enjekte edilir.
- Her konsantrasyon için %RSD (kesinlik) hesaplanır.
- Kesinlik - konsantrasyon eğrisi çizilir.(şekil 2.5.6.1)
- Beklenen kesinlik değeri miktar limitine eşdeğerdir.

Kesinlik(%RSD)



Şekil 2.5.6.1. Kesinlik-konsantrasyon eğrisi

#### 2.4.5.7 Güvenilirlik

Güvenilirlik testleri, yöntemde ufak değişiklikler yapıldığı zaman sonuçların yine de uygun olduğunu göstermek için yapılmıştır. Örneğin sıvı kromatografisinde akış hızı, dedektör dalga boyu veya mobil faz bileşiminin gerçek değerinden toleranslar ölçüsünde sapması sonucu analizlerin bu saptamalardan ne kadar etkilenip etkilenmediğini tespit edilmiştir. Kromatografik parametrelerde güvenilirlik belirlenmesi için akış hızı, kolon sıcaklığı, enjeksiyon hacmi, dedektör dalga boyu ya da mobil faz bileşimi yani çalışma aralığının içindeki değişken veya değişkenlerin kantitatif etkisi belirlenmiştir. Eğer parametrenin etkisi önceden belirlenmiş tolerans içinde ise parametre, yöntemin güvenilirlik aralığında olduğu saptanmıştır. Bu etkilerle karşılaşıldığı zaman yöntemin yeniden validasyonunun gerekliliğinin olup olmadığı belirlenmiştir. ICH dokümanlarına göre ilaç geliştirme aşamaları sırasında yöntem üzerinde güvenilirlik değerlendirilmesinin düşünülmesi tavsiye edilmiştir. Fakat onaylı bir uygulamanın parçası olarak Analitik Yöntem Validasyonu parametre çalışmalarında gerekliliği olmadığı görülmüştür.

##### 2.4.5.7.1 UV Dedektörü Kullanan HPLC uygulamaları(Gülhan S. ,(1999))

HPLC kolonunda, mobil fazda veya akış hızında değişiklik yapıldığı zaman sonuçlarda da değişiklik olmamalıdır.

### 2.4.5.8 Tutarlılık

Bir analiz yönteminin tutarlılığı, aynı analiz numunesinin uzun zaman aralıklarında farklı koşullarda analizi yapıldığında bu değişikliklerden etkilenip etkilenmemesinin bir ölçüsü olarak tanımlanmıştır. Yani normal koşullarda farklı kişiler veya farklı laboratuarda elde edilen sonuçların ölçülmesidir.

#### 2.4.5.8.1 UV Dedektörü Kullanan HPLC uygulamaları(Gülhan S. ,(1999))

- Homojen bir karışım alınır.
- Bu karışımında ayrı ayrı numuneler alınarak farklı laboratuarlarda, farklı günlerde farklı kişiler tarafından, farklı aletlerle analiz yapılır.

### 2.5. Validasyon İle İlgili Bazı Örnekler

Literatür araştırmasında çeşitli endüstrilerde uygulanan çok sayıda validasyon çalışmalarına rastlanmıştır. Bu tezde son yıllarda ilaç, besin ve biyokimya alanında uygulanan bazı validasyon çalışmalarından örnekler verilmiştir.

Migren ağularına karşı etkisi bilinen rizatriptan benzoatın kantitatif tayini için RP-HPLC metodu geliştirilmiş ve en iyi ayırma gücünün analit içindeki degradasyon ürünlerinin verdiği görülmüştür. Mobil faz olarak asetonitril ve metanol kullanılmış ve yöntem valide edilmiştir.(M.K. Srinivasu v.d. 2006 )

Cossia V. Garcia ve arkadaşları RP-LC kullanarak rabeprazol sodyum içeren tabletlerin analizi için yöntem geliştirmiş ve validasyon çalışmalarını yapmışlardır.(Cossia V. Garcia v.d. 2006)

Saç telindeki kokain, anhidroekgonin metilester, ekgonin metilesterin analizleri yapılmış, doğruluk ve kesinlik parametreleri ile validasyon sonuçları hesaplanmıştır.( Emmanuelle Cognard v.d.2006)

Stephen G. Gozo ve arkadaşları CXCL5 geni üzerinde araştırma yapmışlardır. Bu çalışmada çapraz validasyon yöntemi kullanmışlardır. (Stephen G. Gozo v.d. 2006)

[Zn di tio karbamat,2,6-di-tert-butil-para-kresol (BHT) oktalat difenilamin antioksidan sülfür, pentilfenol ve tetrakis(metilen (3,5-di-tert-butil-4-hidroksihidro sinamat)) metan]' ı kompleks yüzey matriksi içinde, elastomerik durduruculardan ayırmak için yöntem geliştirilmiş ve valide edilmiştir.( Stephen K. Gozo v.d. 2006 )

Reneta P.ve arkadaşları pantprozol'ün enfeksiyonlar üzerindeki etkilerinin incelenmesinde aynı ve farklı günlerde yapılan çalışmalarda proses validasyonunu gerçekleştirmişlerdir. (Reneta P. v.d. 2006)

Paraskevas D. Tzanavaras ve arkadaşları besin örneklerindeki kafeinin miktar tayini için HPLC metodu geliştirmişlerdir. Bu çalışmalarda doğrusallık, LOD ve LOQ, kesinlik, seçicilik ve sağlamlık parametreleri incelenerek valide edilmiştir.(Paraskevas D. Tzanavaras v.d. 2007)

Beyaz, kırmızı ve gül şarabı içinde alüminyumun tayini HPLC ve AAS kullanılarak yapılmış ve Al 'nin en fazla beyaz şarap içinde olduğu bulunmuştur.( Mary T. Kelly v.d.2006)

Antihipertansif etkisi bilinen epsortan içeren ilaçların katı faz ekstraksiyon-RP-HPLC metoduyla analizler gerçekleştirilmiş ve bunu insan plazmasındaki kardiyovasküler etkilerinin validasyonunda kullanmışlardır. Bu metot oluşturulurken faktöriyel tasarım yönteminden yararlanılmıştır. (N.Ferriros v.d. 2006)

Kinürenik asitin voltametrik olarak idrar içindeki tayini için analizler yapılmış ve validasyon işlemlerinde tekrarlanabilirlik, seçicilik, doğrusallık ve çalışma aralığı, LOD, doğruluk, kesinlik ve analit stabilitesi parametrelerine bakılmıştır. Laboratuar arası kesinlik için full faktöriyel tasarım yöntemi geliştirilmiştir. .( Sandra Furlanetto v.d. 1998)

## 2.6.İncelenen Preparatın Etken Maddeleri

### 2.6.1 Parasetamol

**Kimyasal formülü:**  $C_8H_9NO_2$  C: %63.56; H: % 6.00; N: %9.27; O: % 21.17.( Wikipedia, (2007))

**Moleküler ağırlığı:** 151.17 g/ mol

**Bio yararlanma:** % 100

**Metabolizma:** Karaciğer

**Yarı ömrü:** 1- 4 saat

**Atılımı:** Böbrek

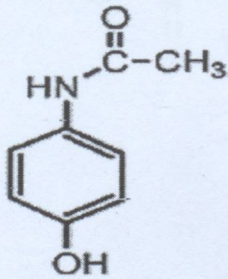
**Erime aralığı:** 169-170.5 C°

**LD<sub>50</sub> (mg/ kg):** 338

**$\lambda_{max}$ :** 250 nm

**$d_{4}^{21}$ :** 1.263 g/ cm<sup>3</sup>

**Çözünürlüğü:** Etanolde ve sıcak suda çözünür. ( Wikipedia, (2007))



Ağrı kesici ve ateş düşürücü etkiye sahip bir ilaç etken maddesidir. Parasetamol ağızdan alındığında sindirim sistemde hızla emilir. İlaç alındıktan 30- 60 dakika sonra maksimum plazma konsantrasyonuna ulaşır.

Parasetamol bütün dokulara hızla yayılır. Plazma proteinlerine bağlanması zayıftır. Plazma yarı ömrü 1- 4 saattir. İdrarla, parasetamolün %1-3 ' ü değişmemiş olarak atılır.% 80 ' i ise biyolojik olarak glukuronid veya sülfat bileşikleri olarak atılır. Analjezik etkisi yeni nesil analjeziklere göre hafif kalmış olsa da sindirim sistemde yan etkisinin hemen hemen olmaması, güvenilirliği ve de gebelerde kullanılabilmesi parasetamol ün her zaman ön planda kalmasını ve klasik bir analjezik olmasını sağlar.( Wikipedia, (2007))

## 2.6.2 Kafein

**Kimyasal formülü:**  $C_8H_{10}N_4O_2$  C : %49.4 ; H:% 5.19; N: %28.85 ; O: %16.48 .( Wikipedia, (2007))

**Moleküler ağırlığı:** 194.19 g/ mol

**Erime noktası:** 238 C°

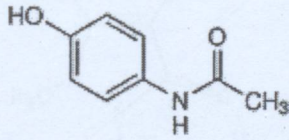
**Süblimleşme noktası:** 178 C°( 1 mm basınç altında 160 -165 C° de hızlı süblimleşme gerçekleşir.)

**LD<sub>50</sub> (mg/ kg):** Fare, hamster, sıçan ve tavşanlarda

(dişiler) ; 127, 230, 355, 246 ( erkekler); 137 ,249, 247, 224

**d<sub>4</sub><sup>18</sup>:** 1.23 g/ cm<sup>3</sup>

**Çözünürlüğü:** Suda çözünür. ( Wikipedia, (2007))



Tein, matein ve guaranin olarak da bilinir. Bir alkolioid olan kafein doğal olarak çay, kahve, guaranada bulunur. Kafeinin karakteristik, yoğun acı bir tadı vardır. Kola gibi bazı gazlı, içeceklere tat vermesi için eklenmektedir.

Temel farmakolojik özellikleri;

- Merkezi sinir sisteminde uyaran
- Solunum sistemi uyarıcısı
- Kalp atış hızı uyarıcısı
- Hafif diüretik etki

Sürekli kafein kullanımı, farmakolojik toleransa ve yokluk sendromuna neden olur.

( Wikipedia, (2007))

### 2.6.3 Propifenazon

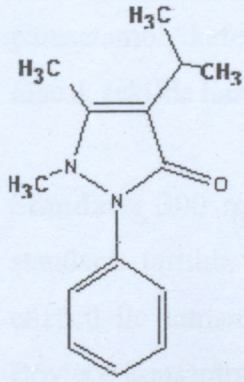
**Kimyasal formülü:**  $C_{14}H_{18}N_2O$  C:%73.01 ;H:% 7.88; N:%12.17;O:%6.95 .( Wikipedia, (2007))

**Moleküler ağırlığı:** 230.30 g/ mol

**Erime noktası:**103 C°

**Çözünürlük:** Alkolde ve eterde kolayca çözünür. Suda 16,5 C° de 0.24 g/ mol çözünürlüğe sahiptir.

Analjezik, antipiretik ve antiflojistik olarak kullanılır.



## 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

### 3.1 Kullanılan Kimyasallar

Panalgin tablet tozu ( 10 tablet tozu)

Parasetamol standartı (USP 28 )

Kafein standartı (USP 26)

Propifenazon standartı (USP 26)

Sodyum asetat (Merck)

Asetik asit (Merck)

NaOH (Merck)

MeOH (Merck) (HPLC saflıkta)

CH<sub>3</sub>COOH (Merck)

### 3.2 Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

**pH 2.8 tampon çözeltisi:** 4 g sodyum asetat tartıldı. Bir miktar su ile çözülür. 0.1 N sodyum hidroksit ve 0.1 N asetik asit ile pH ayarı yapılarak 1 L ye tamamlandı.

**pH 3.2 tampon çözeltisi:** 4g sodyum asetat tartıldı. Bir miktar su ile çözülür. 0.1 N sodyum hidroksit ve 0.1 N asetik asit ile pH ayarı yapılarak 1L ye tamamlandı.

**Örnek:** 10 tablet tartıldı.(ort tab. ağırlığı 625 mg) Toz haline getirilerek 50 mL' ye 95: 5 oranında metanol:asetik asit içeren çözücü ile tamamlandı. İncelenen tablet içindeki parasetamol, kafein ve propifenazon konsantrasyonları sırasıyla 1.2 ; 0,12 ; 0,60 mg/mL olacak şekilde hazırlandı.

**Standart:** 300 mg parasetamol standardı, 30 mg kafein standardı, 150 mg propifenazon standardı tartıldı. 100 mL ye yukarıda belirtilen 95:5 oranında metanol:asetik asit içeren çözücü ile tamamlandı. Bu çözeltiden 20 mL çekilerek 50 mL ye çözücü ile seyreltildi. Böylece konsantrasyonları örnek konsantrasyonu ile aynı olacak şekilde sırasıyla 1.2 ; 0,12 ; 0,60 mg/mL konsantrasyonlu çözeltiler hazırlanmış oldu.

### 3.3 Kullanılan Cihazlar

HPLC ( Agilent1100 serisi)

C<sub>18</sub> Hypersil Gold ( 5µm, 250 x 4.6 mm I.D. ) kolonu ( Shimadsu )

Quartenary pomp (Agilent 1100 Series) (G1311 A, DE409263313 )

VWD Dedektör (Agilent 1100 Series) (G 1314 A, JP33323315 )

Dual Loop enjektör, Auto sampler PS, (Agilent 1100 Series) (G 1313 A, DE 33224958 )

pH metre(Mettler Toledo)

Magnetik karıştırıcı(MettlerToledo)

### 3.4 Yöntemler

#### 3.4.1 Parasetamol, Kafein Ve Propifenazonun HPLC İle Ayrılması

Üç etken maddeden oluşan tabletin içindeki parasetamol, kafein ve propifenazonun tayini için dalga boyu, akış hızı, pH ve hareketli faz oranı gibi optimum koşullar araştırılmıştır. Bulunan uygun koşullar bölüm 4.1’de sonuçlar kısmında belirtilmiştir.

#### 3.4.2 Faktoriyel Tasarım

pH, (A), akış hızı (B), metanol oranının (C) ayırma gücü (R ) üzerindeki etkilerini araştırmak amacıyla üç tekrarlı  $2^3$  faktoriyel tasarımı kullanılmıştır. Her etken için iki seviye seçilmiştir. Bu seviyeler pH için 2.8 ve 3.2; akış hızı için 0.8 ve 1.5 mL.dak<sup>-1</sup>; metanol oranı için 250mL / 1000 mL ve 355mL / 1000 mL dir. Toplam 24 deney yapılmıştır. Deneylerin sırası rasgele belirlenmiştir. Etkenlerin düşük değerleri için “-” , yüksek seviyeleri “+” işareti ile gösterilmiştir. Tanımlanan bu değerlere ait sonuçlar bölüm 4.2 ‘de belirtilmiştir.

#### 3.4.3 Validasyon

##### 3.4.3.1 Doğrusallık

İncelenen tabletteki parasetamol, kafein ve propifenazonun içeriğinin %50, % 80, %100, % 120 ve %150 sine karşılık olan 5 farklı test çözeltisinden üçer tane hazırlandı. Bu çözeltilerin her birinin HPLC ile analizi yapıldı. Doğrusallık sonuçlarının pik alanları, % RSD ve standart sapması hesaplanarak grafiksel değerlendirilmesi yapıldı. Hesaplamalar ve grafikler bölüm 4.3.1’ de verilmiştir.

##### 3.4.3.2 %Geri Kazanım

Bölüm 3.4.3.1’ de belirtildiği gibi geri kazanım ve doğruluk değerleri, tablet içeriğinde bulunan etken maddelerin konsantrasyonunun %50 si ile % 150 si aralığında 5 farklı konsantrasyonu hazırlandı. Bu çözeltilerin HPLC ile analizi yapılarak her bir çözeltiden enjeksiyon sonucu elde

edilen değerlerin standart sapması, ortalama % geri kazanım değerleri ve % RSD si hesaplandı. Sonuçlar bölüm 4.3.2' de verilmiştir.

### 3.4.3.3 Gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik

Bölüm 3.4.3.1' de belirtildiği gibi tablet içindeki etken maddeleri içeriğinin %50, %80, %100, %120 ve %150 sine karşılık olan beş farklı konsantrasyonda test zeltisi hazırlandı. Bu zeltilerin HPLC ile analizi yapıldı. Sonuçlar gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik değerleri % geri kazanım, standart sapma ve % bağlı standart sapma olarak hesaplandı. Sonuçlar bölüm 4.3.3.' de verilmiştir.

## 4. SONUÇLAR

### 4.1 HPLC ile Ayırma Koşulları

HPLC ile miktar tayini için optimum koşulların belirlenmesi ile bölüm 3.4.1 'de belirtildiği gibi çalışılmış ve aşağıdaki uygun koşullar bulunmuştur. Şekil 4.1.1 de parasetamol, kafein ve propifenazon karışımına ait kromatogram görülmektedir. Parasetamol, kafein ve propifenazonun alıkonma zamanları sırası ile 2,37 ; 3,01 ; 12,30 dur.

**Mobil faz** : Su : MeOH : CH<sub>3</sub>COOH (615 : 355 : 50)

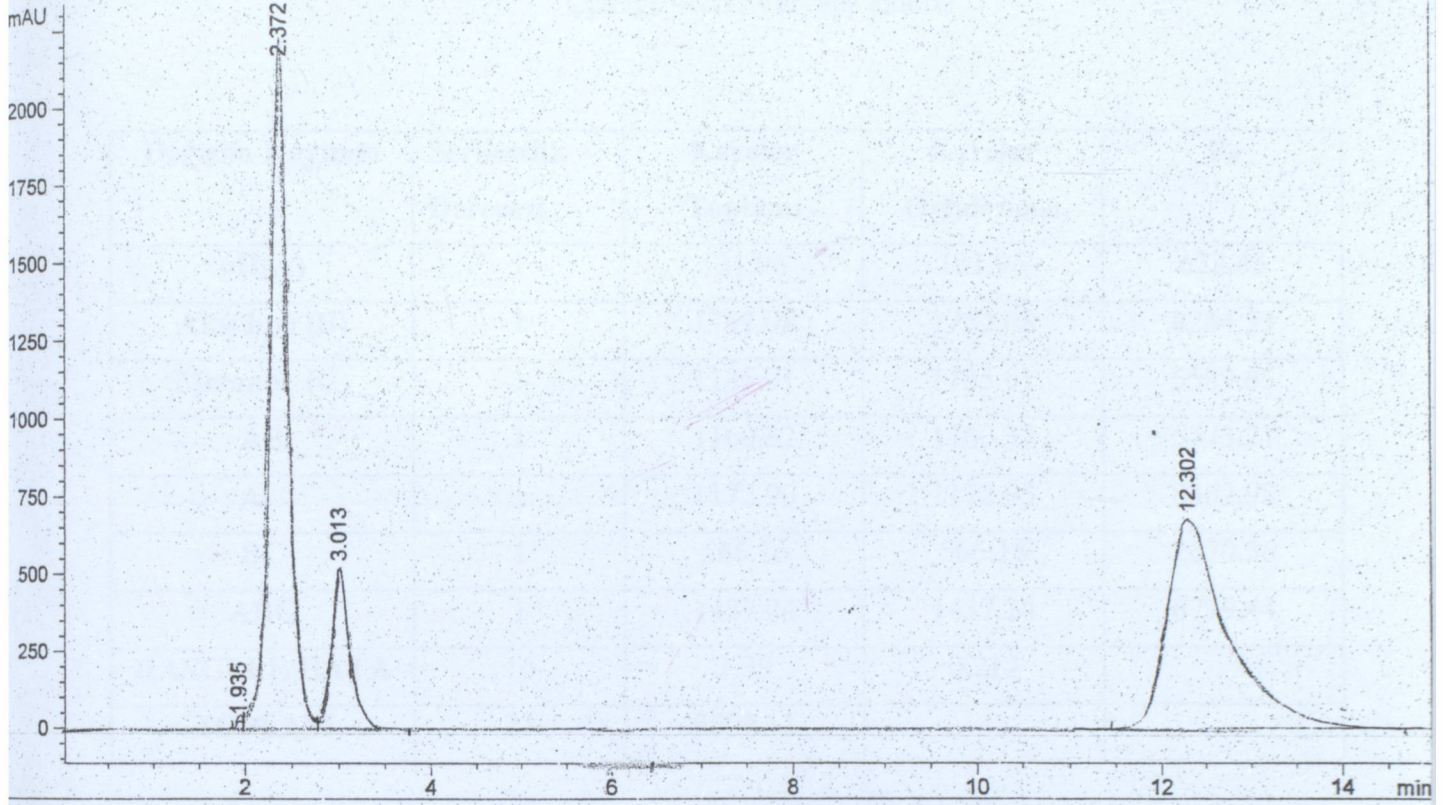
**Kolon** : C<sub>18</sub> Hypersil Gold ( 5µm, 250 x 4.6 mm I.D. ) kolonu ( Shimadzu )

**Akış hızı** : 1,5 mldak<sup>-1</sup>

**Dalga boyu** : 270 nm

**Enjeksiyon hacmi** : 30 µl

**Kolon sıcaklığı** : Oda sıcaklığı



Şekil 4.1.1. Optimum koşullarda elde edilmiş kromatogram

#### 4.2 Faktöriyel Tasarım Uygulanması

Faktöriyel tasarıma ait bölüm de belirtildiği gibi yapılan çalışmalar sonunda deney koşulları ve ayırma gücü değerleri çizelge 4.2.3. de verilmiştir.

Etkenlerin ve etkileşim etkilerinin ayırma gücü üzerindeki etkilerini değerlendirmek için varyans analizi (Analysis of Variance ANOVA) yöntemi uygulanmıştır. Sonuçlar çizelge 4.2.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.2.1. Varyans analizi

Değişim Kaynağı	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F <sub>0</sub>
pH(A)	1	131.96	131.96	622.43
Akış hızı (B)	1	1752.08	1752.08	8264.53
Metanol (C)	1	1185.01	1185.01	5589.65
AB	1	1160.32	1160.32	5473.21
AC	1	1172.95	1172.95	8362.98
BC	1	566.16	566.16	2670.56
ABC	1	1437.24	1437.24	6779.44
RASGELE HATA	16	3.39	0.212	
TOPLAM	23	8009.11		

% 5 anlam seviyesinde kritik tablo değeri  $^{0.05}F_{1,16} = 4.49$  dur. Etkenler ve etkileşimler için bulunan F<sub>0</sub> değerleri kritik tablo değerinden büyük olduğundan tüm etkenler ve etkileşimler ayırma gücü üzerinde etkilidir.

2<sup>3</sup> faktöriyel tasarımda etkileri hesaplamak için kullanılan cebirsel işaretler Çizelge 4.2.2 'de verilmiştir.

Çizelge 4.2.2 . 2<sup>3</sup> Faktöriyel tasarımında etkilerin işaretleri

FAKTÖRİYEL ETKİ							
1	-	-	+	-	+	+	-
2	+	-	-	-	-	+	+
3	-	+	-	-	+	-	+
4	+	+	+	-	-	-	-
5	-	-	+	+	-	-	+
6	+	-	-	+	+	-	-
7	-	+	-	+	-	+	-
8	+	+	+	+	+	+	+

Ayırma gücünü (R\*) tahmin etmek için bulunan regresyon modeli aşağıda verilmiştir.

$$\hat{R}^* = R^* = 42.43 - 2.345 x_1 - 8.544 x_2 - 7.0265 x_3 + 6.953 x_1x_2 + 8.595 x_1x_3 + 4.814 x_2x_3 - 7.738 x_1x_2x_3$$

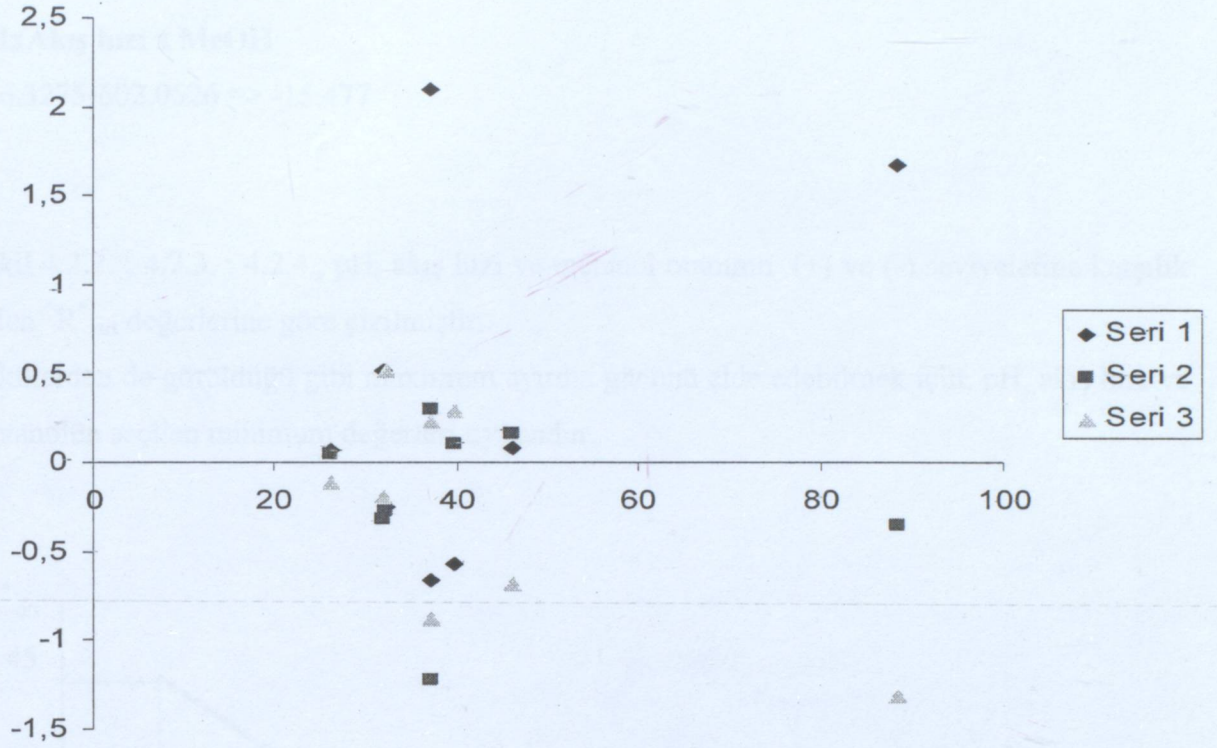
Bu modeldeki kodlanmış (+1, -1)  $x_1, x_2$  ve  $x_3$  değişkenleri sırasıyla A, B, ve C etkenlerini,  $x_1x_2$  terimi AB etkileşimini,  $x_1x_3$  terimi AC etkileşimini,  $x_2x_3$  terimi BC etkileşimini ve  $x_1x_2x_3$  terimi de ABC etkileşimini göstermektedir.

Modelin uygunluğunu göstermek için deneyde bulunan ayırma gücü değerinden, ( $R^*$ ), modelden bulunan ayırma gücü, ( $\hat{R}^*$ ) çıkarılacak artık  $e_0$  değerleri bulundu. Bu değerler çizelge 4.2.3'de gösterilmektedir.

Şekil 4.2.1' de artıkların sıfır artık değeri etrafında rasgele dağıldığı görüldüğünden modelin uygun olduğu ve varılan sonuçların verilen anlam seviyesinde güvenilir olduğu sonucuna varılmıştır.

Çizelge 4.2.3. Deneysel veriler

	pH	Akış Hızı	MeOH	$R_{(1-2)}$	$R_{(2-3)}$	$R^*$	$\hat{R}^*$	$e_0$
1	-	-	-	4	22.53	90.12	88.4455	1.6745
				3.94	22.36	88.0984		-0.3471
				3.93	22.17	87.1281		-1.3174
2	-	+	-	2.24	14.33	32.0992	32.3475	-0.2483
				2.22	14.45	32.079		-0.2685
				2.27	14.48	32.8696		0.5221
3	-	-	+	2.15	15.17	32.6155	32.0985	0.5170
				2.14	14.85	31.779		-0.3195
				2.12	15.05	31.906		-0.1925
4	+	+	-	5.33	7.37	39.2821	39.8495	-0.5674
				5.4	7.4	39.96		0.1105
				5.39	7.48	40.1372		0.2897
5	-	+	+	1.98	13.27	26.2746	26.2085	0.0661
				1.98	13.26	26.2548		0.0463
				1.97	13.25	26.1025		-0.1060
6	+	-	-	4.75	8.27	39.2825	37.1835	2.0990
				4.72	7.62	35.9664		-1.2171
				4.74	7.66	36.3084		-0.8751
7	+	-	+	2.49	18.51	46.0899	46.1685	0.0786
				2.5	18.53	46.325		0.1570
				2.5	18.44	46.100		-0.6850
8	+	+	+	2.28	16.26	37.0728	37.1385	-0.6570
				2.28	16.42	37.4376		0.2991
				2.27	16.26	36.9102		0.2283



Şekil 4.2.1. Tahmin edilen ayırma gücü değerlerine karşı artıklar

Etken ve etkileşim etkileri aşağıda verilmiştir.

**pH**

$$1018.3798 - 537.3277 = +481.0521 \Rightarrow -56.2756 / 12 = -4.6896$$

**Akış hızı**

$$1752.08 - 611.7202 + 406.6596 = -205.06 = -17.088$$

**MeOH**

$$1185.005 \Rightarrow -593.5089 + 424.8709 = -169.638 = -14.053$$

**pHx Akış hızı**

$$+ 592.6279 - 425.7519 = +166.879 \Rightarrow +13.906$$

**pHx MeOH**

$$+ 612.3292 - 406.0506 \Rightarrow +17.19$$

**Akış hızı x MeOH**

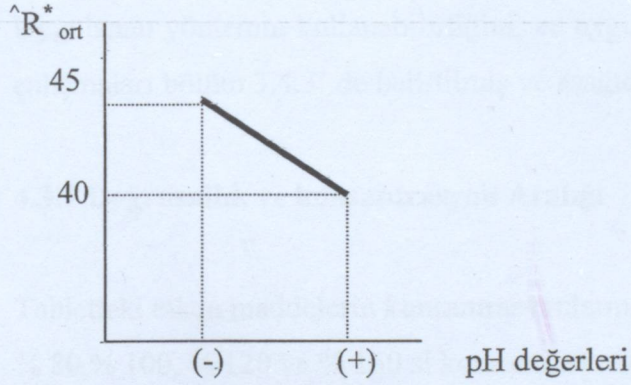
$$+ 566.9563 - 451.4235 \Rightarrow + 9.628$$

**pH x Akış hızı x MeOH**

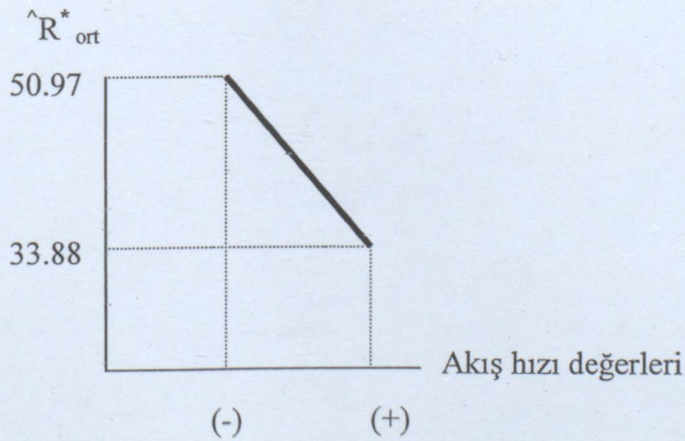
$$416.3275 - 602.0526 \Rightarrow -15.477$$

Şekil 4.2.2. ; 4.2.3. ; 4.2.4., pH, akış hızı ve metanol oranının (+) ve (-) seviyelerine karşılık gelen  $\hat{R}^*_{ort}$  değerlerine göre çizilmiştir.

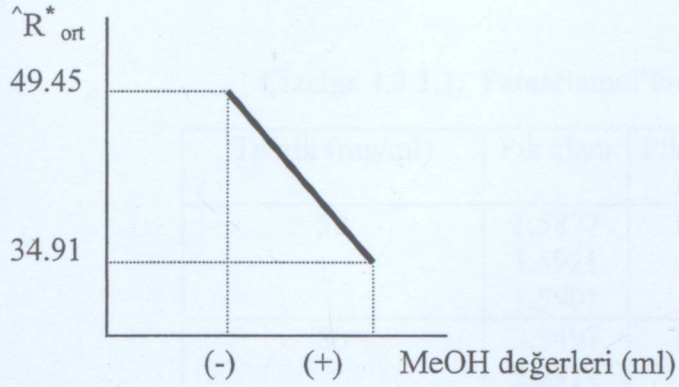
Şekillerden de görüldüğü gibi maximum ayırma gücünü elde edebilmek için, pH, akış hızı ve metanolün seçilen minimum değerleri uygundur.



Şekil 4.2.2.  $\hat{R}^*_{ort}$  - pH değerleri grafiği



Şekil 4.2.3.  $\hat{R}^*_{ort}$  - Akış hızı değerleri grafiği



Şekil 4.2.4.  $\hat{R}^*_{ort}$  -MeOH değerleri (ml) grafiği

### 4.3.Validasyon Uygulamaları

Uygulanan yöntemin kullanılabilirliğini, ve uygulanabilirliğini ölçmek için yapılan validasyon çalışmaları bölüm 3.4.3' de belirtilmiş ve aşağıdaki koşullar uygulanmıştır.

#### 4.3.1 Doğrusallık ve konsantrasyon Aralığı

Tabletteki etken maddelerin konsantrasyonlarının bölüm 3.4.3.1' de belirtildiği gibi %50, % 80,% 100, % 120 ve % 150 si konsantrasyonlarında test çözeltileri hazırlandı ve her bir çözeltilerden üç enjeksiyon yapıldı. Sonuçların ortalaması alınarak grafik değerleri elde edildi. Çizelge 4.3.1.1. ; 4.3.1.2. ; 4.3.1.3'de sırasıyla parasetamol, kafein ve propifenazona ait sonuçlar ve grafikler verilmiştir.

Çizelge 4.3.1.1. Parasetamol'ün doğrusallık değerleri

Teorik (mg/ml)	Pik alanı	Pik alanı ort	Standart sapma	%RSD
50	1.5877 1.5921 1.5901	1.60	0.02	1.39
80	2.3497 2.2814 2.1966	2.28	0.08	3.37
100	2.7691 2.7262 2.7555	2.75	0.02	0.80
120	3.1092 3.0584 3.2047	3.12	0.07	2.39
150	3.7902 3.7055 3.6699	3.70	0.07	1.95
Ort standart sapma	%0.05			
ORT RSD	%1.98			

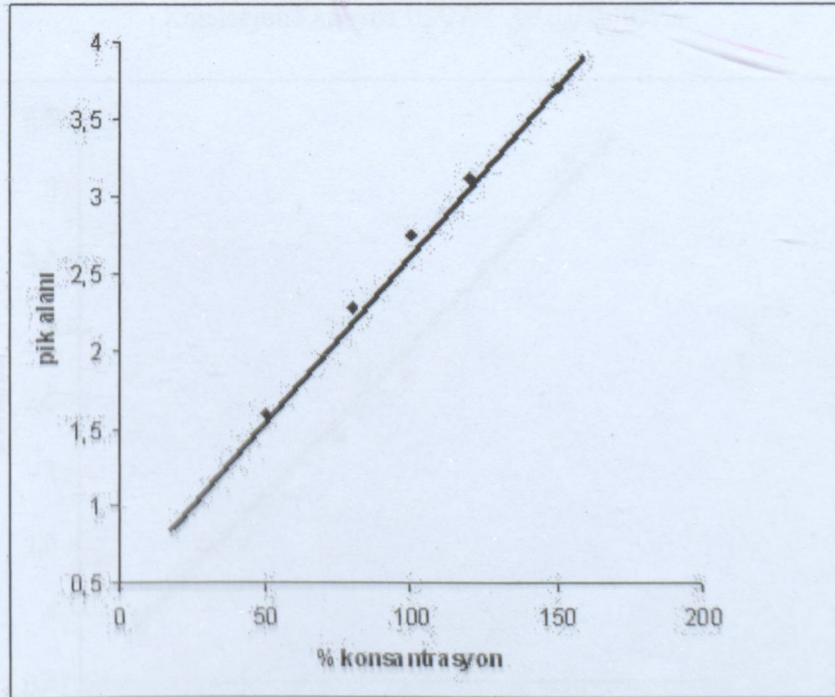
Çizelge 4.3.1.2. Kafein'nin doğrusallık değerleri

Teorik (mg/ml)	Pik alanı	Pik alanı ort	Standart sapma	%RSD
50	1.5001 1.5010 1.5063	1.50	0.03	2.00
80	2.1966 2.2991 2.1802	2.23	0.06	2.90
100	2.6747 2.6383 2.7438	2.69	0.05	1.99
120	3.3633 3.4360 3.1413	3.31	0.15	4.63
150	4.2212 4.2200 4.2299	4.20	0.05	1.31
Ort standart sapma	%0.07			
ORT RSD	%2,57			

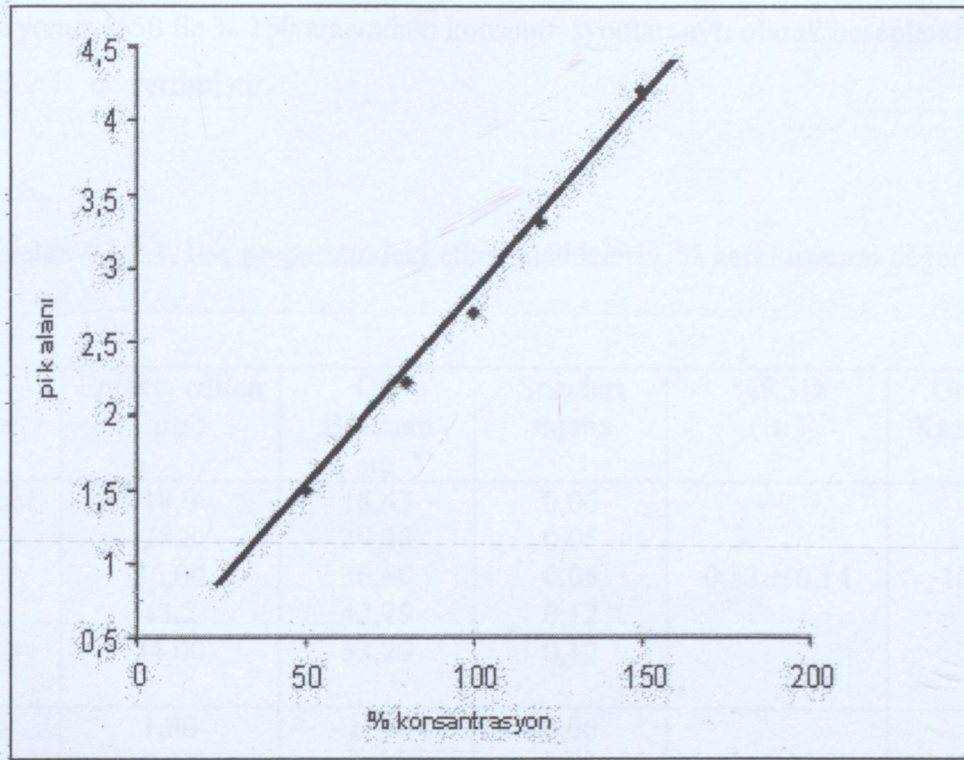
Çizelge 4.3.1.3. Propifenazon'nun doğrusallık değerleri

Teorik (mg/ml)	Pik alanı	Pik alanı ort	Standart sapma	%RSD
50	3.4155 3.5895 3.5901	3.50	0.03	0.73
80	5.5362 5.2091 5.1806	5.31	0.20	3.72
100	6.6409 6.9243 6.3611	6.64	0.28	4.24
120	8.4294 8.2989 7.9844	8.24	0.23	2.78
150	10.4855 10.4001 10.3657	10.40	0.05	0.45
Ort standart sapma	%0.16			
ORT RSD	%2.50			

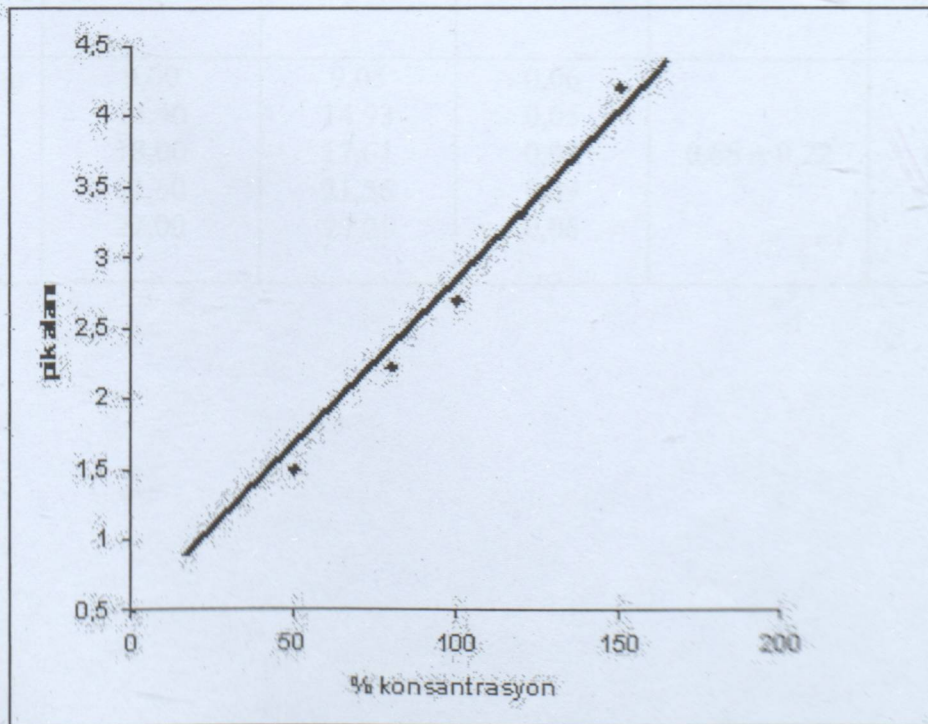
Aşağıdaki grafikler parasetamol, kafein ve propifenazon için hesaplanan doğrusallığı göstermektedir



Şekil 4.3.1.1. Parasetamol'ün doğrusallık grafiği  
Korelasyon Katsayısı: 0,9986  $y = 0,02 + 0,0599x$



Şekil 4.3.2. Kafein'in doğrusallık grafiği  
Korelasyon Katsayısı: 0,9979  $y = 0,07x + 0,590$



Şekil 4.3.3. Propifenazon'un doğrusallık grafiği  
Korelasyon Katsayısı: 0,9985  $y = 0,03 + 0,02$

### 4.3.2. % Geri Kazanım

Parasetamol, kafein ve propifenazonun % geri kazanım değerlerini hesaplamak için bölüm 3.4.3.2 de anlatıldığı gibi çalışıldı. Her bir etken madde için değerler tablet içindeki konsantrasyonun %50 ile % 150 arasındaki konsantrasyonları ayrı olarak hesaplandı. Sonuçlar çizelge 4.3.2.1 de verilmiştir.

Çizelge 4.3.2.1. İlaç preparatındaki etken maddelerin % geri kazanım değerleri

Etken maddeler	Enjekte edilen ( µg )	Ort Bulunan ( µg )	Standart sapma	%RSD ( ± )	Ort Geri Kazanım%
Parasetamol	18,0	18,43	0,06	0,33 ± 0,14	101,07
	28,8	29,38	0,05		
	36,00	36,60	0,05		
	43,2	42,79	0,12		
	54,00	53,29	0,12		
Kafein	1,80	1,74	0,06	8,05 ± 0,58	97,00
	2,88	2,72	0,05		
	3,60	3,42	0,05		
	4,32	4,28	0,12		
	5,40	5,39	0,10		
Propifenazon	9,00	9,05	0,06	0,66 ± 0,22	100,60
	14,40	14,93	0,05		
	18,00	17,61	0,09		
	21,60	21,56	0,09		
	27,00	27,30	0,06		

### 4.3.3. Gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik

Parasetamol, kafein ve propifenazonun tablet içindeki konsantrasyonlarının bölüm 3.4.3.3 de belirtildiği gibi %50 ve %150 konsantrasyon aralığında 5 farklı test çözeltisi hazırlandı. Her bir çözelti üç kez çalışıldı. Bulunan değerlerin% ortalama geri kazanım, standart sapma ve bağıl standart sapma değerleri hesaplandı. % Ortalama geri kazanım değerleri% 98.00 ile % 100.00 aralığında bulundu. Gün içi değerleri için parasetamol, kafein ve propifenazonun sırasıyla % bağıl standart sapmaları  $1,61 \pm 0,42$  ;  $1,12 \pm 0,28$  ;  $1,69 \pm 0,73$  olarak bulundu. Sonuçlar çizelge 4.3.3.1 ' de verilmiştir

2 hafta içinde 3 farklı günde yapılan analizler sonucunda elde edilen bağıl standart-sapma değerleri parasetamol, kafein ve propifenazonun sırasıyla  $0,56 \pm 0,07$  ;  $3,84 \pm 0,93$  ;  $1,68 \pm 0,15$  olarak bulundu. Sonuçlar çizelge 4.3.3.2' de verilmiştir

Çizelge 4.3.3.1. Etken maddelerin gün içi tekrarlanabilirlik değerleri

Etken maddeler	Enjekte edilen (µg)	Bulunan (µg)	Ort Bulunan (µg)	Standart Sapma	Ort %RSD	%Geri Kazanım
Parasetamol	18,0	18,14 17,88	17,95	0,17	0,95	99,73
Kafein	1,8	17,82 1,79 1,80 1,77	1,79	0,02	1,12	99,34
Propifenazon	9,00	9,02 8,78 8,75	8,85	0,15	1,69	98,33
Parasetamol	28,8	28,80 28,46 27,90	28,39	0,45	1,61	99,49
Kafein	2,88	2,89 2,85 2,84	2,86	0,03	1,05	99,30
Propifenazon	14,40	14,43 14,22 14,22	14,29	0,12	0,84	99,25
Parasetamol	36,0	36,00 35,66 35,90	35,85	0,17	0,47	99,59
Kafein	3,6	3,57 3,59 3,58	3,58	0,01	0,28	99,43
Propifenazon	18,00	17,93 17,76 17,67	17,79	0,13	0,73	98,81
Parasetamol	43,2	43,26 42,90 43,10	43,09	0,18	0,42	99,73
Kafein	4,32	4,29 4,30 4,34	4,31	0,03	0,70	99,80
Propifenazon	21,6	21,60 21,55 21,27	21,47	0,18	0,84	99,41
Parasetamol	54,0	54,38 53,91 53,64	53,99	0,37	0,69	99,96
Kafein	5,40	5,39 5,36 5,37	5,37	0,02	0,37	99,53
Propifenazon	27,00	27,76 27,16 26,99	27,30	0,40	1,47	100,25

Çizelge 4.3.3.2. Etken maddelerin günler arası tekrarlanabilirlik değerleri

Etken maddeler	Enjekte edilen ( µg )	Bulunan ( µg )	Ort Bulunan ( µg )	Standart sapma	Ort %RSD	%Geri Kazanım
Parasetamol	18,0	17,88 17,75	17,86	0,10	0,56	99,24
Kafein	1,8	17,95 1,89 1,81	1,82	0,07	3,84	101,05
Propifenazon	9,00	1,76 8,99 8,87 8,69	8,95	0,15	1,68	99,49
Parasetamol	28,8	28,72 28,55	28,65	0,09	0,31	99,49
Kafein	2,88	28,68 2,99 2,87	2,92	0,06	2,05	101,27
Propifenazon	14,40	2,90 14,51 14,40 14,38	14,43	0,07	0,48	100,20
Parasetamol	36,0	36,04 36,11	36,02	0,10	0,28	100,07
Kafein	3,6	35,91 3,67 3,72	3,65	0,08	2,19	101,33
Propifenazon	18,00	3,56 17,81 17,70 17,59	17,73	0,11	0,62	98,48
Parasetamol	43,2	43,26 43,31	43,23	0,10	0,23	100,07
Kafein	4,32	43,12 4,36 4,31	4,32	0,04	0,93	100,03
Propifenazon	21,6	4,28 21,55 21,52 21,67	21,58	0,08	0,37	99,90
Parasetamol	54,0	53,57 53,52	53,54	0,04	0,07	99,15
Kafein	5,40	53,49 5,35 5,30	5,39	0,08	1,48	99,88
Propifenazon	27,00	5,45 26,76 26,69 26,74	26,73	0,04	0,15	99,00

**KAYNAKLAR**

Apfel, Christian C., Kortilla, Kari (2003) "An international multicenter protocol to assess the single and combined benefits of antiemetics interventions in a controlled clinical trial of 2x2x2x2x2 factorial design(IMPACT)" *Controlled Clinical Trials*, 24, 6, 736-751

Barreino, C. Gonzales., Lores , M., Cela,R. (2000) "Optimisation of alaclor solid-phase microextraction from water samples using experimental design" *Journal of Chromatography A*, 896, 1-2, 373-379

Beer, Jacques O.D., Vanderbroucke, Catherine V. (1995) " Half-fraction and full fraction designs versus central composite design for retention modelling in RP-Ion pair LC" *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*,14, 5, 525-541

Bjerregaard, S., Söderberg, I. (1999) "Formulation and evaluation of release and swelling mechanism of a water-in-oil emulsion using factorial design" *International Journal of Pharmaceutics*, 193, 1, 1-11

Billion, A., Cassanas, G. (2000) "Development of spray-dried acetamionphen microparticles using experimental designs" *International Journal of Pharmaceutics*, 203, 1-2, 159-168

Braun , Edith ., Wagner, Andreas (2005) " Experimental design for in vitro skin penetration study of liposomal superoxide dismutase" *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 40, 5, 1187-1197

Budavari, S. "Merck Indeks" , (1989)

Chen, Jian-Ge., Glancy, Kelly. (2001) "Investigation of pharmaceutical HPLC assay bias using experimental design" *Journal of Chromatography A*, 917, 1-2, 63-73

Cognard, E., Bouchonnet, S., Staub, C.(2006) "Validation of gas chromatography- Ion trap tandem mass spectrometry for simultaneous analyse of cocaine and its metablites in saliva" *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41, 3, 925-934

Çelebi, Nevin., Erden, Nurhan ( 1996) "The preparation and evulation of salbutamol sulphate containing poly(lactic acid-co-glycolic acid) micropheres with factorial design-based studies" *International Journal of Pharmaceutics*, 136, 1-2, 89-100

Dean, A.M., Notz, W.I (2002) "A bound for efficiency in multiple response designs" *Journal of Statistical Planning and Inference*, 106, 1-2, 235-24

Dillen, K., Vandervoot, J., (2004) "Factorial design phsicochemical characterizartion and activity of ciprofloxacin-PLGA nanoparticles" *International Journal of Pharmaceutics*, 275, 1-2, 171-184

Erfan, M., Dadashzadeh, S. (2007) " Encapsulation of 9-nitrocamptothecin, a novel anticancer drug, in biodegradable nanoparticles: Factorial design, characterization and release kinetics" *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* , 66, 1, 34-41

Erikson, Lennart ., Johansson, Erik.(1996) "Multivariate design and modelling in QSAR" *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 34,1,1-19

Ferreiros, N., Iriarte, G., Alanso, R.M.(2006) "Validation of a solid phase extraction-high performance liquid chromatographic method for the determination of eprosartan in human plasma" *Journal of Chromatography A* 1119, 1-2, 309-314

Furlanetto, S., Tonini, C.(1998) "Set-up validation of an adsorptive stripping voltammetric method for kynurenic acid determination in human plasma" *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 18, 1-2, 67-73

Garcia, C., Paim, C. (2006) "Development and validation of a dissolution test for rabeprazole sodium in coated tablets." *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41, 3, 833-837

García-Villar, Natavidad., Saurina, Javier. ( 2006) " HPLC determination of biogenic amines in wines with an experimental design optimization procedure" *Analitica Chimica Acta* 575, 1, 97-105

Ghassempour, A., . Qeed, Saied S. (2005)"Determination of ternary mixtures of penicillin G, benzathine and procaine by liquid chromatography and factorial design" *Talanta*, 65, 4, 1038-1044

Gohel, M.C., Jani, G.K. (1998) " Application of classical experimental design for the development of theophylline micropheres" *Journal of Controlled Release*, 45, 3, 265-271

Gozo, S., Xiao, B.(2007) "Development and validation HPLC methods for the determination of potential extractables from elastomeric stoppers in the presence of a complex surfactant vehicle used in the preparation of parenteral drug products" *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 43, 2, 558-565

Gülhan S. ,(1999), "Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Validasyon Konulu Seminer"  
Hansen, H.A. , Emborg, C. (1992) "Experimental design in the development and characteriation of a HPLC method for aminoacids" *Journal of Chromatography A*, 626, 2, 171-180

Huber L., (2001), "Validation Of Analytical Methods Review And Strategy" , "Advanstar Communication For Publication In LC/GC International"

Hund, E., Heyden, Y.Vander (2000) "Robustness testing of a RP-HPLC assay: comparison of fractional and asymmetrical factorial design" *Journal of Chromatography A*, 874, 2, 167-185

Hung, C.T. , Lam, F.C., Perrier, D.G. (1988) "A stability study of amphotericin B in aqueous media using factorian design" *International Journal of Pharmaceutics*, 44, 1-3, 117-123

J.C ve J.N Miller., (2004) ,"Analitik Kimyacılar İçin İstatistik" . Çeviri Levent Bat ve Ahmet Uyanık 19 Mayıs Üniversitesi

Kelly, M.T., Blaise, A.(2006) " Validation and evaluation of a HPLC method for the determination of alumina in wine" *Journal of Chromatography A* 1134, 1-2, 74-80

Li, Yong Guo., Liu, Hong., Heyden, Y.Vander. (2005) "Robustness test on the USP XXVI HPLC assay for ginsenosides in Asian ginseng using an experimental design" *Analitica Chimica Acta* 536, 1-2, 29-38

Loukas, Yannis L. (1998) "Experimental studies for screening the factors that influence the effectiveness of new multicomponent and protective liposomes" *Analitica Chimica Acta* 361, 3, 241-251

Mamani, Monica Cecilia Vargas., Farfan, Jime Amaya., (2006) "Simultaneous determination of tetracyclines in pharmaceuticals by CZE using experimental design" *Talanta*, 70, 2, 236-243

Morris, V., Hughes, J. (2003) "Spherical coordinate representations of solvent composition for liquid chromatography method development using experimental design" *Journal of Chromatography A*, 1008, I, 43-56

Mulholland, M., Naish, P.J. (1989) "Experimental design for the ruggedness testing of HPLC methodology" *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 5, 3, 263-270

Novotna, Klara., Havlis, Jan (2005) "Optimization of HPLC separation of neuroprotective peptides" *Journal of Chromatography A*, 1096, 1-2, 50-57

Padamwar, Manesh. (2006) "Development of vitamin loaded liposomal formulation using factorial design approach: Drug deposition and stability" *International Journal of Pharmaceutics*, 320, 1-2, 37-44

Pentoado, Jose C., Burns, Ray E. (2006) "Factorial design optimization of solid phase microextraction conditions for GC/MS analysis of LABs in detergents" *Analitica Chimica Acta* 562, 2, 152-157

Persson-Stubberud, Karin., Aström, Ove (1999) "Separation of ibuprofen, codeine phosphate, their degradation products and impurities by capillary electrophoresis" *Journal of Chromatography A*, 798, 1-2, 307-314

Raffin, R.P, Jornada, D.S. (2006) "Sodium pantprozole-loaded enteric microparticles prepared by spray drying: Effect of the scale of production and process validation" *International Journal of Pharmaceutics* 324, 1, 10-18

Ragonese, Ruby., Mulholland, Mary (2007) "Full and fractionated experimental designs for robustness testing in the HPLC analysis of codeine phosphate, pseudoephedrine HCL and chlorpheniraminemaleate in a pharmaceutical preparation" *Journal of Chromatography A*, 870, 1-2, 45-51

Roy, S., Riga, A.T., Alexander, K.S. (2002) "Experimental design aids the development of a differential scanning calorimetry standard test procedure for pharmaceuticals" *Thermo Chimica Acta*, 392-393, 399-404

Saccani, G., Tanzi, E., Mallazi, S. (2005) "Determination of niacin in fresh and dry cured pork products by ion chromatography; experimental design approach for the optimization of nicotinic acid separation" *Food Chemistry* 92, 2, 373-379

Schauwechwer P. Frei R. W., (1977), "Chromatography LC Magazine 14"

Sher, Praveen., Ingavle, Ganesh (2007) "Low density porous carrier drug adsorption and release by response surface methodology using different solvents" *International Journal of Pharmaceutics*, 331, 1, 72-83

Snyder L. R. Ve Kirkland J. J., (1979), "Introduction to Modern LC"

Sönmezer T., (2003), "İlaç Ve Validasyon Konulu Seminer" YÜ Kimya Bölümü

Srinivasu, M.K., Rao, B.M., Devi, M.L. (2006) "Development and validation of a specific stability indicating HPLC method for rizaptizan benzoate" *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41, 4, 1146-1151

Stenrud, Gry., A., Sverre (1999) "Formulation and characterization of primaquine loaded liposomes prepared by a pH gradient using experimental design" 198, 2, 213-228

Svenberg, Henrik., Bergh, Susanne (2003) "Factorial design for the development of automated solid-phase extraction in 96-well format for determination of tetraglitazar, in plasma, by LC/MS" *Journal of Chromatography B*, 787, 2, 231-241

Takka, Sevgi., Ocak, Ömer H., Acartürk, Füsün. (1998) "Formulation and investigation of nicarpidine HCL-alginate gel beads with factorial design-based studies" *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 6, 3, 241-246

Tazanavaras. Paraskevas, D., Themelis, D.G. (2007) "Development and validation of a high-throughput HPLC assay for the determination of caffeine in food samples using a monolithic column"

*Analitica Chimica Acta* 581, 1, 89-94

Vakatesh, Gopi.M., Ann, Jo., Coleman, N. (1999) "Fractional factorial design for optimizing experimental conditions for Hiestand's Indices of tableting performance" *Powder Technology*, 97, 2, 151-159

Vargas, M.G., Heyder, Y. Van (1999) "Rapid development of the enantiomeric separation of blockers by capillary electrophoresis using an experimental design approach" *Journal of Chromatography A*, 855, 2, 681-693

Wikipedia, [www.wikipedia.com](http://www.wikipedia.com) (2007)

Wei, Ji Quing., Zhou, Xian-Teng (1991) "Computer aided optimisation of the experimental conditions for the isocratic RP-HPLC separation of hormonal steroids" *Journal of Chromatography A*, 552, 103-111



