



**KREM FORMÜLASYONUNDAKİ FARMASÖTİK ÜRÜNLERDE ETKEN
MADDE, SAFSIZLIK VE YAĞ ASİTİ ESTERLERİNİN YÜKSEK
BASINÇLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ İLE EŞZAMANLI TAYİNİ**

Mehmet ÇALIKOĞLU

**DOKTORA TEZİ
ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

EYLÜL 2019

Mehmet ÇALIKOĞLU tarafından hazırlanan “KREM FORMÜLASYONUNDAKİ FARMASÖTİK ÜRÜNLERDE ETKEN MADDE, SAFSIZLIK VE YAĞ ASİTİ ESTERLERİNİN YÜKSEK BASINÇLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ İLE EŞZAMANLI TAYİNİ” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Gazi Üniversitesi Analitik Kimya Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. Aysel BERKKAN

Analitik Kimya Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

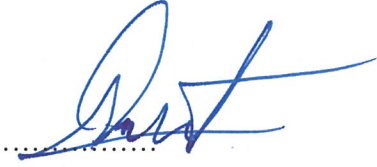
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum.....



Başkan : Prof. Dr. Nusret ERTAŞ

Analitik Kimya Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum.....



Üye : Prof. Dr. Gonca ÇAKMAK

Toksikoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

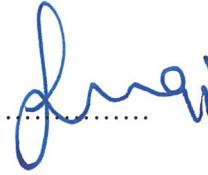
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum.....



Üye : Prof. Dr. Bengi USLU

Analitik Kimya Anabilim Dalı, Ankara Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum.....



Üye : Doç. Dr. Emirhan NEMUTLU

Analitik Kimya Anabilim Dalı, Hacettepe Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum.....



Tez Savunma Tarihi: 11/Eylül/2019

Jüri üyeleri tarafından DOKTORA tezi olarak uygun görülmüş olan bu tez Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mustafa ASLAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dökümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Mehmet ÇALIKOĞLU

11.09.2019

KREM FORMÜLASYONUNDAKİ FARMASÖTİK ÜRÜNLERDE ETKEN MADDE,
SAFSIZLIK VE YAĞ ASİTİ ESTERLERİNİN YÜKSEK BASINÇLI SIVI
KROMATOĞRAFİSİ İLE EŞZAMANLI TAYİNİ
(Doktora Tezi)

Mehmet ÇALIKOĞLU

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Eylül 2019

ÖZET

Farmasötik kalite kontrol laboratuvarlarında yarı-katı ürünler için hızlı, duyarlı ve güvenilir test metotlarına ihtiyaç duyulması, bu çalışmanın ana amacını oluşturmuştur. Bu sebeple etken madde (etofenamat, benzil nikotinat), koruyucu (benzil alkol), safsızlık (flufenamik asit, dekarboksil, dietilenglikol diflufenamat, flufenamik asit bütilester, benzaldehit) ve yağ asidi esterleri (etofenamat miristat, etofenamat palmitat, etofenamat stearat) için eş zamanlı kantitatif tayin imkanı sağlayan yöntem geliştirilmiştir. 10 mM sodyum asetat/metanol çözeltisi hareketli faz olarak gradient akış programında kullanılarak 11 analit tayin edilmiştir. HPLC cihazında sabit faz olarak C8 Hypersil 125 mm x 4,6 mm 5µm analitik kolonu kullanılmıştır. Kolon sıcaklığı 40 °C, akış hızı 2,0 mL/dakika ve enjeksiyon hacmi 10 µL'dir. Numuneler için çözücü olarak metanol kullanılmıştır. Dalga boyu t= 0 için 258 nm'ye ayarlanmış ve gradient elüsyonun 9,1 ci dakikasında 286 nm'ye değiştirilmiştir. Her bir enjeksiyon için kromatografik süre 15 dakikadır. ICH Q2 (R1) rehberi referans alınarak seçicilik, doğrusalılık, kesinlik, doğruluk, teşhis limiti ve tayin alt limiti parametreleri hesaplanarak analitik yöntem valide edilmiş ve ticari numuneler için yöntemin uygunluğu istatistiksel olarak ispatlanmıştır. Yöntem kesinliği için bağıl standart sapma sonuçları %0,24 - 2,02 arasında olup analitlere ait ortalama geri kazanım sonuçları %91,5 – 102,6 arasında tespit edilmiştir. Tüm validasyon sonuçları değerlendirildiğinde; hızlı, seçici, kesinliği ve duyarlılığı yüksek bir tayin yöntemi geliştirilmiştir. Geliştirilen yöntem, etofenamat, benzil alkol ve benzil nikotinat içeren krem formülasyonundaki farmasötik preparatların rutin kalite kontrol analizlerinde kolay, hızlı, seçici ve duyarlı bir yöntemdir.

Bilim Kodu : 1004
Anahtar Kelimeler : Etofenamat, Benzil nikotinat, Safsızlık, HPLC, Validasyon
Sayfa Adedi : 103
Danışman : Doç. Dr. Aysel BERKKAN

SIMULTANEOUS DETERMINATION OF ACTIVE SUBSTANCE, IMPURITY AND
FATTY ACID ESTERS IN CREAM FORMULATION PHARMACEUTICAL
PRODUCTS BY HIGH PRESSURE LIQUID CHROMATOGRAPHY

(Ph. D. Thesis)

Mehmet ÇALIKOĞLU

GAZİ UNIVERSITY
INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

September 2019

ABSTRACT

The purpose of this study is the necessity for rapid, sensitive, and reliable test methods for semi-solid products in pharmaceutical quality control laboratories. Therefore, a method was developed for simultaneous determination of active substance (etofenamate, benzyl nicotinate), preservative (benzyl alcohol), impurity (flufenamic acid, decarboxy, diethyleneglycol diflufenamate, flufenamic acid butylester, benzaldehyde) and fatty acid esters (etofenamate myristate, etofenamate palmitate, etofenamate stearate). 11 analytes were determined by using 10 mM sodium acetate/methanol as mobile phase with gradient flow system. C8 Hypersil 125 mm x 4,6 mm 5µm analytical column was used as stationary phase in HPLC device. The column temperature was 40 °C, flow rate was 2.0 mL/minute and injection volume was 10µL. Methanol was used as solvent for samples. The wavelength was set at 258 nm for t= 0 and changed to 286 nm at the 9.1th min of gradient elution. Run time for each injection is 15 minutes. Selectivity, linearity, precision, accuracy, detection limit, quantitation limit parameters were calculated and analytical method was validated with reference to ICH Q2 (R1) guideline. The suitability of method for commercial samples was proved statistically. Relative standard deviation results are between 0,24 – 2,02% for method precision and average recovery results for analytes are between 91,5 – 102,6%. Based on obtained validation results; a rapid, selective, precise and sensitive determination method was generated. The developed method is simple, rapid and sensitive for routine quality control analysis of pharmaceutical products in cream formulation which contains etofenamate, benzyl alcohol and benzyl nicotinate.

Science Code	: 1004
Key Words	: Etofenamate, Benzyl nicotinate, Impurity, HPLC, Validation
Page Number	: 103
Advisor	: Assoc. Prof. Dr. Aysel BERKKAN

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca değerli katkılarıyla beni yönlendiren ve kıymetli tecrübelerinden faydalandığım danışmanım Doç. Dr. Aysel BERKKAN'a ve manevi destekleriyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan çok değerli eşim Nurcihan ÇALIKOĞLU ve annem Azime ÇALIKOĞLU'na çok teşekkür ederim.

Varlığını tüm kalbimle hissettiğim ve kendisine layık bir evlat olmaya çalıştığım rahmetli babam Engin ÇALIKOĞLU'na teşekkürü bir borç bilirim.



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Non-steroid Anti-inflamatuvar İlaçlar	3
2.1.1. Etofenamat ve farmakolojik özellikleri.....	3
2.1.2. Benzil nikotinat ve farmakolojik özellikleri	5
2.1.3. Benzil alkol, flufenamik asit, flufenamik asit bütilester, benzaldehit, etofenamat miristat, etofenamat palmitat ve etofenamat stearat kimyasal ve farmakolojik özellikleri	5
2.2. Toksisite	8
2.3. Topikal Preparatlar	9
2.4. Kromatografi	13
2.4.1. Ayrılma mekanizmalarına göre kromatografi.....	14
2.4.2. Hareketli faz tipine göre kromatografi.....	17
2.4.3. Uygulama biçimine göre kromatografi	18
2.5. Analitik Yöntem Validasyonu	31
2.6. İstatistiksel Testler.....	33
2.7. Etofenamat, Benzil Nikotinat, Benzil Alkol, Benzaldehit, Flufenamik Asit Tayini	34
3. YÖNTEM.....	41

	Sayfa
3.1. Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar	41
3.2. Hareketli Faz, Plasebo ve Standart Analit Çözeltilerinin Hazırlanması.....	41
3.2.1. Tampon, asit ve baz çözeltileri	41
3.2.2. Plasebo	42
3.2.3. Standart analit çözeltileri	42
3.3. Etken Madde, Koruyucu, Safsızlık ve Yağ Asitlerinin UV-Görünür Bölge Spektrumları.....	43
3.4. Etken Madde, Koruyucu, Safsızlık ve Yağ Asitlerinin Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografi (HPLC) ile Analizinde Hareketli Faz Seçimi ve Gradient Akış Programı.....	55
4. BULGULAR	59
5. ANALİTİK YÖNTEM VALİDASYONU	67
5.1. Seçicilik	67
5.2. Teşhis Limiti (LOD) ve Tayin Alt Limiti (LOQ).....	68
5.3. Doğrusallık	73
5.4. Kesinlik.....	78
5.4.1. Cihaz kesinliği.....	78
5.4.2. Yöntem kesinliği	82
5.4.3. Ara kesinlik	82
5.5. Doğruluk.....	88
5.6. Ticari Numune Analizi	89
6. TARTIŞMA ve SONUÇ	91
KAYNAKLAR	95
ÖZGEÇMİŞ	103

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Türkiye’de etofenamat içeren preparatlar.....	4
Çizelge 2.2. Hodge ve Sterner skalasına göre toksisitenin değerlendirilmesi	9
Çizelge 2.3. Hareketli faz olarak kullanılan bazı çözücüler ve özellikleri	21
Çizelge 3.1. HPLC gradient akış programı	55
Çizelge 3.2. Etofenamat miristat, etofenamat palmitat ve etofenamat stearat’a ait kromatogramların pik alanları	56
Çizelge 3.3. HPLC gradient akış ve gradient dalga boyu programı	57
Çizelge 5.1. Numune matrisinde bulunması beklenen bileşenlerin alıkonma zamanları.	67
Çizelge 5.2. Teşhis limiti ve tayin alt limiti.....	69
Çizelge 5.3. Etofenamat doğrusal derişim aralığı.....	73
Çizelge 5.4. Benzil alkol doğrusal derişim aralığı.....	74
Çizelge 5.5. Benzil nikotinat doğrusal derişim aralığı.....	74
Çizelge 5.6. Etofenamat miristat doğrusal derişim aralığı.....	74
Çizelge 5.7. Etofenamat palmitat doğrusal derişim aralığı.....	75
Çizelge 5.8. Etofenamat stearat doğrusal derişim aralığı	75
Çizelge 5.9. Benzaldehit doğrusal derişim aralığı	75
Çizelge 5.10. Flufenamik asit doğrusal derişim aralığı	76
Çizelge 5.11. Dekarboksil doğrusal derişim aralığı.....	76
Çizelge 5.12. Dietilenglikol diflufenamat doğrusal derişim aralığı.....	76
Çizelge 5.13. Flufenamik asit butilester doğrusal derişim aralığı	77
Çizelge 5.14. Doğrusal aralık.....	77
Çizelge 5.15. Etofenamat (1,2 mg/mL) için cihaz kesinliği	78
Çizelge 5.16. Benzil alkol (0,18 mg/mL) için cihaz kesinliği	78
Çizelge 5.17. Benzil nikotinat (0,12 mg/mL) için cihaz kesinliği	79
Çizelge 5.18. Etofenamat miristat (0,012 mg/mL) için cihaz kesinliği	79

Çizelge	Sayfa
Çizelge 5.19. Etofenamat palmitat (0,012 mg/mL) için cihaz kesinliği	79
Çizelge 5.20. Etofenamat stearat (0,012 mg/mL) için cihaz kesinliği	80
Çizelge 5.21. Benzaldehit (0,0018 mg/mL) için cihaz kesinliği.....	80
Çizelge 5.22. Flufenamik asit (0,012 mg/mL) için cihaz kesinliği.....	80
Çizelge 5.23. Dekarboksil (0,012 mg/mL) için cihaz kesinliği	81
Çizelge 5.24. Dietilenglikol diflufenamat (0,012 mg/mL) için cihaz kesinliği	81
Çizelge 5.25. Flufenamik asit butilester (0,012 mg/mL) için cihaz kesinliği.....	81
Çizelge 5.26. Yöntem kesinliği.....	82
Çizelge 5.27. Etofenamat için ara kesinlik	83
Çizelge 5.28. Benzil alkol için ara kesinlik	83
Çizelge 5.29. Benzil nikotinat için ara kesinlik	84
Çizelge 5.30. Etofenamat miristat için ara kesinlik	84
Çizelge 5.31. Etofenamat palmitat için ara kesinlik	85
Çizelge 5.32. Etofenamat stearat için ara kesinlik	85
Çizelge 5.33. Benzaldehit için ara kesinlik.....	86
Çizelge 5.34. Flufenamik asit için ara kesinlik.....	86
Çizelge 5.35. Dekarboksil için ara kesinlik	87
Çizelge 5.36. Dietilenglikol diflufenamat için ara kesinlik	87
Çizelge 5.37. Flufenamik asit butilester için ara kesinlik.....	88
Çizelge 5.38. Geri kazanım sonuçları	89
Çizelge 5.39. Ticari numunelerdeki etken madde, safızlık ve yağ asidi esteri miktarları	89
Çizelge 5.40. Formülasyon miktarına göre istatistiksel değerlendirme.....	90

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Etofenamat kimyasal formülü.....	4
Şekil 2.2. Benzil nikotinat kimyasal formülü	5
Şekil 2.3. Benzil alkol kimyasal formülü.....	5
Şekil 2.4. Flufenamik asit kimyasal formülü	6
Şekil 2.5. Flufenamik asit bütilester kimyasal formülü	6
Şekil 2.6. Benzaldehit kimyasal formülü.....	6
Şekil 2.7. Etofenamat miristat kimyasal formülü	7
Şekil 2.8. Etofenamat palmitat kimyasal formülü	7
Şekil 2.9. Etofenamat stearat kimyasal formülü	7
Şekil 2.10. Derinin anatomik yapısı	9
Şekil 2.11. HPLC cihazının şematik gösterimi	20
Şekil 2.12. HPLC kolonu	24
Şekil 2.13. HPLC’de normal faz (a) ve ters faz (b) kolonda polar ve apolar bileşiklerin akışı	26
Şekil 3.1.a. Etofenamat (0,024 mg/mL) UV-görünür bölge spektrumu	44
Şekil 3.1.b. Benzil nikotinat (0,12 mg/mL) UV- görünür bölge spektrumu	44
Şekil 3.1.c. Benzil alkol (0,18 mg/mL) UV- görünür bölge spektrumu	44
Şekil 3.1.d. Etofenamat miristat (0,012 mg/mL) UV- görünür bölge spektrumu.....	44
Şekil 3.1.e. Etofenamat palmitat (0,012 mg/mL) UV- görünür bölge spektrumu	44
Şekil 3.1.f. Etofenamat stearat (0,012 mg/mL) UV- görünür bölge spektrumu.....	44
Şekil 3.1.g. Benzaldehit (0,0018 mg/mL) UV- görünür bölge spektrumu	50
Şekil 3.1.h. Flufenamik asit (0,012 mg/mL) UV- görünür bölge spektrumu	51
Şekil 3.1.i. Dekarboksil (0,012 mg/mL) UV- görünür bölge spektrumu	52
Şekil 3.1.j. Dietilenglikol diflufenamat (0,012 mg/mL) UV-görünür bölge spektrumu	53
Şekil 3.1.k. Flufenamik asit bütilester (0,012 mg/mL) UV- görünür bölge spektrumu .	44

Şekil	Sayfa
Şekil 3.2. Gradient akışta 258 ve 286 nm dalga boylarında etofenamat miristat, etofenamat palmitat ve etofenamat stearat standartlarına ait karşılaştırılmış kromatogramlar.....	56
Şekil 4.1. 10 mM CH ₃ COONa (pH 7,4) ve metanol (hareketli faz) kromatogramı	59
Şekil 4.2. Metanol kromatogramı	60
Şekil 4.3. Plasebo kromatogramı	60
Şekil 4.4. Etofenamat (1,2 mg/mL) kromatogramı (t _R : 7,647 dak)	60
Şekil 4.5. Benzil alkol (0,18 mg/mL) kromatogramı (t _R : 3,366 dak)	61
Şekil 4.6. Benzil nikotinat (0,12 mg/mL) kromatogramı (t _R : 5,703 dak)	61
Şekil 4.7. Etofenamat miristat (0,012 mg/mL) kromatogramı (t _R : 9,794 dak)	61
Şekil 4.8. Etofenamat palmitat (0,012 mg/mL) kromatogramı (t _R : 10,417 dak)	62
Şekil 4.9. Etofenamat stearat (0,012 mg/mL) kromatogramı (t _R : 11,270 dak).....	62
Şekil 4.10. Benzaldehit (0,0018 mg/mL) kromatogramı (t _R : 3,951dak).....	62
Şekil 4.11. Flufenamik asit (0,012 mg/mL) kromatogramı (t _R : 4,823 dak).....	63
Şekil 4.12. Dekarboksil (0,012 mg/mL) kromatogramı (t _R : 7,379 dak)	63
Şekil 4.13. Dietilenglikol diflufenamat (0,012 mg/mL) kromatogramı (t _R : 8,816 dak) .	63
Şekil 4.14. Flufenamik asit butilester (0,012 mg/mL) kromatogramı (t _R : 8,609 dak)...	64
Şekil 4.15. Etofenamat, benzil nikotinat, benzil alkol, etofenamat miristat, etofenamat palmitat, etofenamat stearat, benzaldehit, flufenamik asit, dekarboksil, dietilen glikol diflufenamat ve flufenamik asit bütilestere ait karşılaştırılmış kromatogram	64
Şekil 4.16. Etofenamat, benzil nikotinat, benzil alkol, etofenamat miristat, etofenamat palmitat, etofenamat stearat, benzaldehit, flufenamik asit, dekarboksil, dietilen glikol diflufenamat ve flufenamik asit bütilester karışımına ait kromatogram	65
Şekil 4.17. Sentetik numune çözeltisine ait kromatogram.....	66
Şekil 5.1. Etofenamat kromatogramı	69
Şekil 5.2. Benzil alkol kromatogramı	70
Şekil 5.3. Benzil nikotinat kromatogramı	70
Şekil 5.4. Etofenamat miristat kromatogramı	70

Şekil	Sayfa
Şekil 5.5. Etofenamat palmitat kromatogramı	71
Şekil 5.6. Etofenamat stearat kromatogramı	71
Şekil 5.7. Benzaldehit kromatogramı.....	71
Şekil 5.8. Flufenamik asit kromatogramı.....	72
Şekil 5.9. Dekarboksil kromatogramı	72
Şekil 5.10. Dietilenglikol diflufenamat kromatogramı	72
Şekil 5.11. Flufenamik asit butilester kromatogramı.....	73



SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler

Açıklamalar

%	Yüzde
y/s	Yağ /su
s/y	Su /yağ
g	Gram
mg	Milligram
ng	Nanogram
mL	Mililitre
μL	Mikrolitre
L	Litre
°C	Derece Celcius
cm	Santimetre
mm	Milimetre
μm	Mikrometre
nm	nanometre
M	Molar
mM	Milimolar
μM	Mikromolar
nM	Nanomolar
Å	Angstrom
dk	Dakika
K _d	Dağılma katsayısı
eV	Elektrovolt
rpm	Dakikadaki devir sayısı
R	Ayrışma
R _f	Alıkonma faktörü
t _R	Alıkonma zamanı
Rt _R	Bağıl alıkonma zamanı
R ²	Bakiye kareler toplamı
r	Korelasyon katsayısı

Kısaltmalar

Açıklamalar

CCD	Charge Coupled Device (Yük eşleşmiş düzenekli dedektör)
-----	--

Kısaltmalar**Açıklamalar**

CID	Charge Injection Device (Yük Enjeksiyon Düzenekli Dedektör)
CTD	Charge Transfer Device (Yük Aktarım Dedektörü)
DAD	Diode Array Detector (Fotodiyot Dizisi Dedektör)
FDA	Food and Drug Administration (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Yüksek performanslı sıvı kromatografisi)
HPTLC	High Performance Thin Layer Chromatography (Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi)
ICH	International Conference on Harmonisation (Uluslararası Harmonizasyon Topluluğu)
LOD	Limit of Detection (Teşhis Limiti)
LOQ	Limit of Quantitation (Tayin Alt Limiti)
NSAİİ	Non-steroid anti-inflamatuvar ilaçlar
QbD	Quality by Design (Tasarımla Kalite)
RP	Reversed Phase (Ters faz)
İTK	Thin Layer Chromatography (İnce Tabaka Kromatografisi)
UV	Ultraviyole (Mor ötesi)
VIS	Visible Part (Görünür bölge)
ESI	Electrospray Ionization (Elektrosprey İyonizasyon)
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization (Atmosferik Basınç Kimyasal İyonizasyon)
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry (Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği)
WHO	World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)
EMA	European Medicines Agency (Avrupa İlaç Ajansı)

1. GİRİŞ

Farmasötik formlar için gerçekleştirilmesi gereken testler ve bu testlere ait kabul kriterlerinin listelendiği dokümanlara spesifikasyon denir. Spesifikasyonlar, düzenleyici otoriteler tarafından onaylanan kritik kalite standartlarıdır ve ilaçların planlanan kullanımlarına uygunluğunu belirlemek için gerekli kriterleri ortaya koyar [1].

Safsızlık kavramı; başlangıç maddesi, ortamdaki maddeler ya da yan reaksiyonlar sonucu ortaya çıkan ve orijinal ilaçla bir arada bulunabilen herhangi bir madde olarak tanımlanmaktadır. Bir başka deyişle safsızlık, etken maddenin ya da bir ilacın saflığını etkileyen herhangi bir madde olarak ifade edilir. Farmasötik kalite kontrol laboratuvarlarının ana hedeflerinden biri, terapötik kullanım için yüksek kalitede ilaç üretimine katkı sağlamaktır. Bu nedenle bir ilaç ya da etken maddenin kalitesini belirlemenin en iyi şekli, onun saflığını belirlemektir [2].

ICH Q6A spesifikasyonlar rehberinde, etken madde miktar tayini ve safsızlık testlerinin tüm farmasötik ürünler için uygulanabilir olduğu açıkça belirtilmiştir. Bununla birlikte etken madde ve safsızlıkların aynı HPLC yöntemiyle eşzamanlı tayin edilmesi önemli bir avantaj olup, kullanılan analitik yöntemin stabilite göstergeli olduğunu ortaya koymaktadır [1].

Farmasötik formlarda etken madde, safsızlık ve yağ asiti esterlerinin eşzamanlı tayini analiz süresi ve maliyet açısından da avantaj sağlamaktadır. Fakat, farmasötik preparatlarda etken madde yanında formülasyondaki koruyucu ve safsızlıkların miktarları düşük olduğundan, HPLC ile tek dalga boyunda eş zamanlı olarak etken madde ve safsızlıkların tayinleri duyarlık açısından zordur.

Kremler dış fazı su olan, yağ/su (y/s) emülsiyon tipindeki preparatlardır [3, 4]. Bu tip emülsiyonların dış fazı su bazlı olduğundan, mantar ve bakteri üreme riskine karşı koruyucu olarak antiseptik içermesi gerekebilir [5]. Sıvağlar yarı katı preparatların taşıyıcı kısmıdır ve su ya da yağ bazlı olabilirler.

Bu çalışmada yarı katı topikal krem formülasyonundaki non-steroid anti-inflamatuvar ilaçlardaki (NSAİİ) etofenamat ve benzil nikotinat etken maddeleri, koruyucu olarak

kullanılan benzil alkol, safsızlıklar (benzaldehit, dekarboksil, dietilenglikoldiflufenamat, flufenamik asit bütilester, flufenamik asit) ve yağ asitlerinin (etofenamat miristat, etofenamat palmitat, etofenamat stearat) farmasötik kalite kontrol laboratuvarlarında hızlı, kolay uygulanabilen, doğru ve güvenilir tayin yöntemlerinden biri olan HPLC ile eşzamanlı analizi için yöntem geliştirilmiş ve geliştirilen yöntem için ICH Q2 (R1) rehberinde belirtilen analitik validasyon parametreleri (seçicilik, teşhis limiti (LOD), tayin alt limiti (LOQ), doğrusallık, aralık, kesinlik, cihaz kesinliği (enjeksiyon tekrarlanabilirliği), yöntem kesinliği, ara kesinlik ve doğruluk uygulanmıştır. Yöntem, kısa sürede (15 dk.) onbir molekülün (etofenamat, benzil nikotinat, benzil alkol, etofenamat miristat, etofenamat palmitat, etofenamat stearat, benzaldehit, flufenamik asit, dekarboksi, dietilenglikoldiflufenamat, flufenamik asit bütilester) aynı kromatografik sistemde ayrılmasına ve eşzamanlı olarak tayinine imkân sağlamaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Non-steroid Anti-inflamatuvar İlaçlar

Non-steroid anti-inflamatuvar ilaçlar (NSAİİ) analjezik, antipiretik, ve antiinflamatuvar özelliklere sahiptir. İnflamatuvar reaksiyona bağlı olarak gelişen ağrı, dokularda ağrı mediyatörlerince (bradikinin ve prostaglandin) oluşturulmaktadır [6]. NSAİİ dokularda araşidonik asitten prostaglandinlerin ve diğer bazı eikozanoidlerin oluşmasını sağlayan siklooksijenaz enzimlerini (COX-1 ve COX-2) inhibe ederek etki gösterirler [7]. Prostaglandin vücudun her organ ve sisteminde bulunan, hem normal hem de patolojik fonksiyonlara katılan bir kimyasal mediyatördür [6]. Opioid olmayan analjezikler, hiperaljezik bileşeni baskı altına alarak ağrı kesici etki gösterirler [8]. NSAİİ'nin büyük bir bölümü zayıf asidiktir ve pKa'ları 3-5 aralığındadır, mide ve bağırsak mukozasından iyi emilir ve plazma proteinlerine %95'ten daha yüksek oranda bağlanırlar. Genellikle albümine bağlanarak taşındıklarından dağılım hacimleri plazma hacmine yakın değerdedir. NSAİİ karaciğerde oksidasyon ve konjugasyon ile inaktif metabolitlerine dönüşür ve idrarla atılırlar. Hastalık durumlarında metabolizma anormalleşebilir ve normal dozda dahi vücutta birikim olabilir [9].

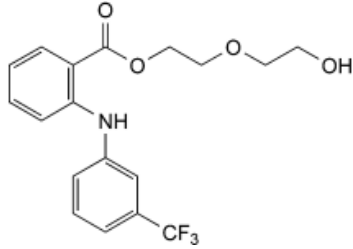
NSAİİ kimyasal yapılarına göre dokuz gruba ayrılırlar:

- Salisilatlar (aspirin ve sodyum salisilatlar)
- Para-aminofenol türevleri (parasetamol)
- Pirazolon türevi ilaçlar (aminopirin, propifenazon, dipiroin, fenilbutazon)
- Profenler (ibuprofen, naproksen, fenbufen, tiaprofenik asit, ketoprofen)
- Fenilasetik asit türevleri (diklofenak sodyum, nabumeton)
- İndolasetik asit türevleri (indometasin, tolmetin, ketorolak trometamin, sulindak)
- Fenamik asit türevleri (mefenamik asit, flufenamik asit, etofenamat)
- Oksikamlar (piroksikam, tenoksikam)
- Diğerleri (prokuazon, azopropazon, metotrimeprazin) [8]

2.1.1. Etofenamat ve farmakolojik özellikleri

Etofenamat molekülünün (Şekil 2.1.) kimyasal adı 2-(2-hidroksiyetoksi)etil 2-[[3-(triflorometil)fenil]amino]benzoat olup, kapalı formülü $C_{18}H_{18}F_3NO_4$ (369,4 g/mol)'dür.

Pratikte suda çözünmez, %96'lık etanol ve etil asetatta çözünür [10]. LogP değeri 4,86'dır [11].



Şekil 2.1. Etofenamat kimyasal formülü

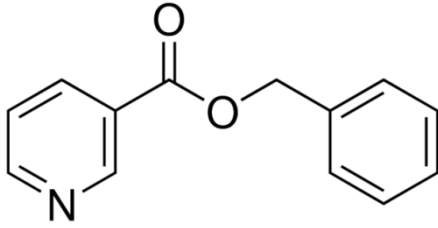
Etofenamat, fenamik asit türevi steroid olmayan anti-romatik ilaç grubundadır. Anti-inflamasyon (iltihap giderici) ve analjezik (ağrı kesici) özelliklere sahiptir. Etofenamat, siklooksijenaz ve lipooksijenaz enzimlerini birlikte inhibe ederek hem prostaglandin hem de lökotrien sentezini engelleyerek etki gösterir. Türkiye'de etofenamat içeren preparatlar Çizelge 2.1'de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Türkiye'de etofenamat içeren preparatlar [12]

Farmasötik Form	İçerik	Firma
Thermoflex 50 g Krem	1 g krem içinde 100 mg etofenamat, 10 mg benzil nikotinat, 15 mg benzil alkol bulunur.	Santa Farma İlaç Sanayi A.Ş.
Thermo-rheumon 100 mg 50 g Krem	1 g kremi içinde 100 mg etofenamat, 10 mg benzil nikotinat, 15 mg Benzil alkol bulunur.	Meda Pharmaceuticals İlaç Pazarlama Ticaret Ltd. Şirketi
Thermodoline 50 g Krem	1 g krem içinde 100 mg etofenamat, 10 mg benzil nikotinat, 15 mg benzil alkol bulunur.	Tripharma İlaç Sanayi ve Tic. A.Ş.
Thermove 50 g Krem	1 g krem içinde 100 mg etofenamat, 10 mg benzil nikotinat, 15 mg benzil alkol bulunur.	Yeni Recordati İlaç ve Hammaddeleri Sanayi ve Tic. A.Ş.
Thermo-efemat Krem	1 g krem içinde 100 mg etofenamat, 10 mg benzil nikotinat bulunur.	Deva Holding A.Ş.
Restafen Plus Krem 50 g	1 g krem içinde 100 mg etofenamat, 10 mg benzil nikotinat bulunur.	Vem İlaç Sanayi
Ther-meram Krem	1 g krem içinde 100 mg etofenamat, 10 mg benzil nikotinat bulunur.	Berksam İlaç Ticaret A.Ş.
Thermo Etox 50 g Krem	1 g krem içinde 100 mg Etofenamat bulunur	Triozer İlaç Kim. Koz. Sağ. ve San. Tic. Ltd. Şti.

2.1.2. Benzil nikotinat ve farmakolojik özellikleri

Benzil nikotinat molekülünün (Şekil 2.2.) kimyasal adı benzil piridin-3-karboksilat (nikotinik asit benzil ester) olup, kapalı formülü $C_{13}H_{11}NO_2$ (213,2 g/mol)'dür. LogP (oktanol/su) değeri 2,4'tür. Suda çok az çözünür. Asetonda, diklorometanda, %96'lık etanolde ve kloroformda çözünür [13].

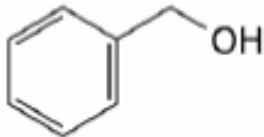


Şekil 2.2. Benzil nikotinat kimyasal formülü

Benzil nikotinat, kronik romatizma hastalarında hiperemi ve sıcaklık duyumuna neden olarak, ısı ile yapılan fizik tedaviye etkin bir destek sağlar. Benzil nikotinat ciltten hızla emilir ve enzimatik hidroliz yoluyla nikotinik asit açığa çıkar. Böylece cilt oksijenasyonunun sonucu olarak, lokal kan akış hızı artar [14, 15].

2.1.3. Benzil alkol, flufenamik asit, flufenamik asit bütilester, benzaldehit, etofenamat miristat, etofenamat palmitat ve etofenamat stearat kimyasal ve farmakolojik özellikleri

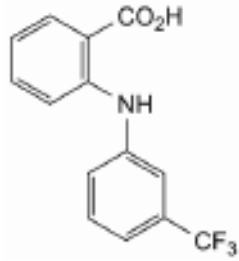
Benzil alkol molekülün (Şekil 2.3.) diğer kimyasal adı fenilmetanol olup, kapalı formülü C_7H_8O (108,1 g/mol)'dur. Suda çözünür. %96'lık etanol ve esansiyel yağlar ile karışım oluşturur [10]. Mikrobiyolojik üreme riskine karşı krem formülasyonundaki preparatlarda koruyucu olarak görev yapmaktadır [5].



Şekil 2.3. Benzil alkol kimyasal formülü

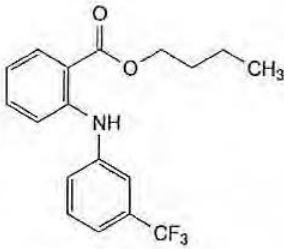
Flufenamik asit molekülünün (Şekil 2.4.) kimyasal adı 2-[[3-(triflorometil)fenil]amino] benzoik asittir [10]. Kapalı formülü $C_{14}H_{10}F_3NO_2$ (281,2 g/mol)'dür [16]. Etofenamatın

hidrolizi sonucu flufenamik asit açığa çıkmaktadır [17]. Letal doz 50 (oral-sıçan) değeri 249 mg/kg'dır [18]. Hodge ve Sterner skalasına göre orta derecede toksik sınıfta yer almaktadır.



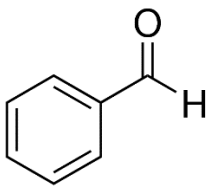
Şekil 2.4. Flufenamik asit kimyasal formülü

Flufenamik asit bütilester molekülünün (Şekil 2.5.) kimyasal adı bütül 2-[[3-(triflorometil)fenil]amino] benzoattır [10]. Kapalı formülü $C_{18}H_{18}F_3NO_2$ (337,3 g/mol)'dur [19]. Antralinik asit türevi, anti-inflamatuvar özelliğe sahip bir bileşiktir [20]. Letal doz 50 (oral-sıçan) değeri 510 mg/kg'dır [21]. Hodge ve Sterner skalasına göre az toksik sınıfta yer almaktadır.



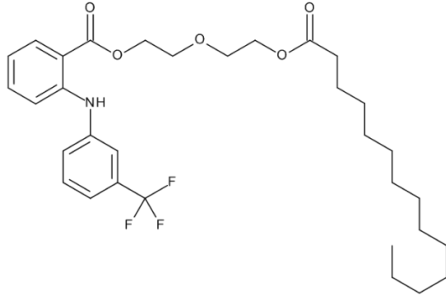
Şekil 2.5. Flufenamik asit bütilester kimyasal formülü

Benzaldehit (Şekil 2.6.) aromatik aldehytler arasında yer alır. Kapalı formülü C_7H_6O (106,1 g/mol)'dur [22]. Benzil alkol molekülünün oksidasyon ürünü olarak açığa çıkmaktadır [23]. Letal doz 50 (oral-sıçan) değeri 1300 mg/kg'dır [24]. Hodge ve Sterner skalasına göre az toksik sınıfta yer almaktadır.



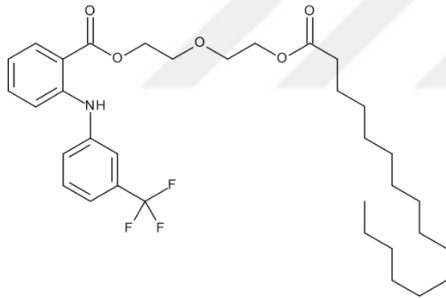
Şekil 2.6. Benzaldehit kimyasal formülü

Etofenamat miristat molekülünün (Şekil 2.7.) kimyasal adı 2-(2-tetradekanoyiloksietoksi)etil 2-[3-(triflorometil)anilin] benzoattır. Kapalı formülü $C_{32}H_{44}F_3NO_5$ (579,7g/mol)'dur [25]. Sıvı safsızlığıdır.



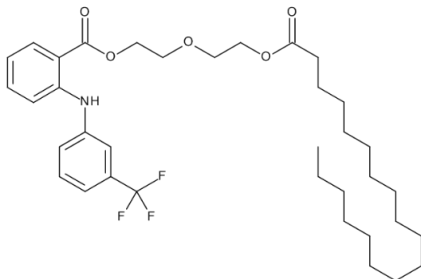
Şekil 2.7. Etofenamat miristat kimyasal formülü

Etöfenamat palmitat molekülünün (Şekil 2.8.) kimyasal adı 2-(2-hekzadekanoyiloksietoksi) etil 2-[3-(triflorometil)anilin] benzoattır. Kapalı formülü $C_{34}H_{48}F_3NO_5$ (607,7g/mol)'dur [26]. Sıvı safsızlığıdır.



Şekil 2.8. Etofenamat palmitat kimyasal formülü

Etöfenamat stearat molekülünün (Şekil 2.9.) kimyasal adı 2-(2-oktadekanoyiloksietoksi)etil 2-[3-(triflorometil)anilin] benzoattır. Kapalı formülü $C_{36}H_{52}F_3NO_5$ (635,8 g/mol)'dur [27]. Sıvı safsızlığıdır.



Şekil 2.9. Etofenamat stearat kimyasal formülü

2.2. Toksisite

Farmakolojide, bir ilacın canlı bir organizma üzerinde oluşturduğu tüm zararlı etkilere toksisite denir. Bir maddenin toksisitesinin incelenmesi, tüm araştırmanın başlangıcını oluşturur. Zira, farmasötik etki ile toksikolojik etki birbirleri ile çeşitli noktalarda ilişkili olup, toksikolojik etki, farmakolojik etkiye neden olan miktara artırılması sonucunda görülen bir reaksiyondur [28].

Toksisite değerlendirmesi bir ilacın, rezorbsiyon ve eliminasyon nitelikleri ile birlikte etki mekanizması hakkında bilgi verir. Bununla birlikte bir ilacın, ilaç olarak kabul görüp görmeyeceği hakkındaki kararı da etkiler. Ayrıca toksisite tayini, tedavi amacıyla uygulanacak dozun belirlenmesinde büyük önem taşır [29].

Akut toksisite, belirli koşullarda bir defa verilmekle ölüme neden olan ilaç miktarının tespitidir. Akut toksisite iki şekilde ölçülür

1. Letal Doz 50 (LD50): Akut toksisitede en çok kullanılan ölçüdür. Belirli koşullar altında, bir grupta yer alan canlı hayvanlarının %50'sinin ölümüne sebep olan doz miktarıdır. Birimi mg/kg dır.
2. En küçük öldürücü doz: Bir hayvanı öldürebilen en düşük ilaç miktarıdır [30, 31].

Deney hayvanları yoluyla elde edilen LD50 verilerine göre, kimyasal maddelerin toksisite seviyelerini göstermekte kullanılan en yaygın skala Hodge ve Sterner skalasıdır. Bir maddenin LD50 değeri ne kadar düşükse, toksisitesi o kadar büyüktür [32].

Topikal tedavide ilaçlar deriye doğrudan uygulanır ve deriden emilerek terapötik etki gösterirler [37]. İlaç etken maddelerinin deriden emilimi pasif difüzyon ile epidermisten, kıl foliküllerinden ve ter bezi kanallarından gerçekleşir [38]. Etken maddenin yapısı, taşıyıcı ve ilacın uygulandığı bölgenin özellikleri deriden emilimin düzeyini etkiler [37]. Özellikle yağlar ve yağda çözünen maddelerin deriden geçişleri çok daha kolay olduğundan topikal ilaçların etkinliği açısından oldukça önemlidir [39].

Topikal tedavinin amacı, sistemik yolla verilebilecek ilaçlarda genel yan etki ve komplikasyonlardan kaçınmak, sistemik yolla sağlanamayan lokal etkileri sağlamak, ilacın uygulama alanında çok daha yüksek derişimde bulunmasını sağlamak ve hedefe doğrudan etki etmektir. Düşük maliyet, olumlu psikolojik etki ve uygulama kolaylığı topikal tedavinin avantajlarıdır [37, 40]. Dozaj miktarını ayarlama zorluğu, elin ulaşamayacağı alanlar için uygulama zorluğu, uygulamanın kirletici ve zaman alıcı olması, allerjik kontakt dermatit, irritasyon ve az sayıda da olsa olumsuz psikolojik etki oluşturabilmesi topikal tedavinin dezavantajlarıdır [37].

Topikal tedavide ilaçlar fiziksel, kimyasal veya her iki yolla etkili olurlar ve kurutma, nemlendirme, ısıtma, soğutma gibi amaçlarla kullanılabilirler. Vehikül ya da baz adı verilen, yalnızca fiziksel etki gösterenler aynı zamanda taşıyıcı olarak da kullanılabilirler. [40].

Antibiyotikler, antiseptikler, antihistaminikler, antimikotikler, antiviraller, ektoparazitler, kortikosteroidler, analjezik ve antiinflamatuvarlar gibi çok geniş alanda topikal tedavide kullanılan ilaçlar mevcuttur. Lezyonların tipine ve hastalığın dönemine göre ilaçlar sıvı, yarı katı, katı ve bunların ara şekillerinde hazırlanır. Farmasötik formülasyonlarına göre topikal preparatlar üç (3) ana gruba ayrılır [5]:

- Sıvı preparatlar (solüsyon, süspansiyon, emülsiyon, sıvı yağlar ve linimentler)
- Yarı-katı topikal preparatlar (krem, pomat-merhem, pat)
- Katı topikal preparatlar (pudra)

Kremler, pomatlar (merhemler) ve patlar deriye uygulanan başlıca yarı-katı preparatlardır. Yarı katı preparatlar dışarıdan uygulanan kuvvetin etkisiyle şekil değişikliğine uğrarlar ve uygulandıkları yüzeyde film halinde yayılırlar [41]. Sıvı preparatlara en yakın tarafta

kremler, katılara en yakın tarafta patlar, bunların arasında ise pomatlar yer alır [5]. Patlar uygulandıkları cilt yüzeyinde emilene ya da temizlenene kadar yapışarak kalırlar. Bu adhesif nitelik, formülasyonun reolojik özelliği ile ilişkilidir [42].

Kremler dış fazı su olan (yağ/su) emülsiyon tipindeki preparatlardır [3, 4]. Bu tip emülsiyonların dış fazı su bazlı olduğundan, mantar ve bakteri üreme riskine karşı koruyucu olarak antiseptik içermesi gerekebilir [5]. Preparatın pH'sı belirleyici olmamakla beraber, deri pH'sına yakın, hafif asidiktir [4]. Yağ oranı yüksek olan kremler pomatlar ve kremler arasında yer alırlar. Yağ oranı arttıkça serinletici etki azalır, nemlendirici etki artar. Kremler opak, yumuşak kıvamlı, yağsız görünümlü, kolay buharlaşan, kolay sürülen ve yıkama ile deriden uzaklaştırılabilen preparatlardır [5]. Merhemlere kıyasla yağ oranları düşüktür [43]. Cilde sürüldüklerinde sıvı kısmı buharlaşarak serinletici bir etki yaratır. Kozmetik amaçla, cildi temizlemek için yüz ve ellerde pomatlara kıyasla daha çok tercih edilirler [5].

Pomatlar (merhemler) dış fazı yağ olan su/yag (s/y) emülsiyon tipinde koyu kıvamlı, kremlere kıyasla daha zor sürülen, lezyon yüzeyini kapatıp buharlaşmaya imkan vermeyen, sabun ve deterjan kullanmadan yıkanması mümkün olmayan preparatlardır. Nemlendirici ve koruyucu özellikleri vardır [5]. Dış fazın yağ olması nedeniyle, mantar ve bakteri üreme tehlikesi bulunmamaktadır. Bu nedenle koruyucu madde içermesi gerekmez. Sürüldükleri bölgede uzun süre kalırlar ancak pratik olarak emilmezler, deri gözeneklerini tıkamazlar. Buna karşılık oklüzyon yaptıkları için aktif madde emilimini arttırırlar [3-5, 43].

Patlar katıya yakın kıvamlı yarı katı preparatlardır. Yapılarında %20-50 oranında pudra bulunmaktadır. Yumuşak veya katı pat oluşları, pudra oranına göre değişir. Akamaz özelliktedirler. Cilt üzerinde koruyucu bir tabaka oluştururlar. Yapılarındaki toz maddeler nedeniyle kurutucu etkiye sahiptirler. Yağsız patlar suda çözünerek kolay temizlenirler. Uygulandıkları bölgede sıvı kısmı uçarak, çok koyu kıvamlı katı kısmı kalır. Yağlı patlar, çok koyu kıvamlı olup çok zor sürülür ve çok zor temizlenirler. Yağlayıcı, koruyucu ve oklüzif etkileri vardır [5].

Sıvağlar yarı katı preparatların taşıyıcı kısmıdır. İdeal bir sıvağın sahip olması gereken özellikler [3, 4]:

- Etken maddeyi rahatlıkla salabilmelidir.
- Deride zararlı etki oluşturmamalıdır.
- Uygulamadan sonra deride bir müddet kalabilmelidir.
- Kullanım süresince bozulmamalıdır.
- Su tutma kabiliyeti olmalıdır.
- Etken maddeyle geçimli olmalıdır.
- Ucuz olmalıdır.
- Penetrasyon yeteneği yüksek olmalıdır (koruyucu merhemler hariç).
- Deriye uygun pH değerine sahip olmalıdır.

Sıvağlar; hidrokarbon sıvağları, absorbsiyon sıvağları, su ile yıkanabilen sıvağlar ve suda çözünebilen sıvağlar olmak üzere dört sınıfa ayrılır.

Hidrokarbon sıvağları yağlı sıvağlardır. Su içermezler ve kolaylıkla su tutmazlar. Suda çözünmedikleri için deriden kolayca uzaklaştırılamazlar. Deri üzerinde örtücü bir tabaka oluştururlar [3, 4]. Vazelin, domuz yağı, hint yağı ve yer fıstığı yağı hidrokarbon sıvağlarına örnektir.

Absorbsiyon sıvağları su tutma kabiliyeti yüksek olan sıvağlardır. Kozmetikte ve eczacılıkta sıkça kullanılırlar. Antiseptik ilaçlar bu sıvağlar aracılığıyla daha yüksek oranla deriye geçebilirler. Deriyi yumuşatma özelliğine sahiptirler. Genellikle su/yağ emülsiyonu oluştururlar. Susuz lanolin ve hidrofilik vazelin bu tip sıvağlara örnektir [3, 4].

Su ile yıkanabilen sıvağlar yağ/su emülsiyon tipindeki sıvağlardır. Dış fazı su olan kremler bu grupta yer alır. Yapılarında su ihtiva ederler. Suda çözünmezler fakat dış fazları su olduğu için kolaylıkla yıkanabilirler. Dış fazın su olmasından dolayı mikrobiyolojik üremeye açıktırlar. Hidrofilik merhem bu tip sıvağlara örnektir [3, 4].

Suda çözünebilen sıvağlar yağsız merhem sıvağları olarak da adlandırılırlar. Yapılarında su içermezler ancak suda çözünme ve yıkanabilme özelliklerine sahiptirler. Polietilen glikol merhemi bu tip sıvağlara örnektir [3, 4].

2.4. Kromatografi

Kromatografi kelimesi Latince chroma (renk) ve graphein (yazmak) kelimelerinin birleşmesinden oluşmuş, renk yazımı yani kolonda ayrılan farklı renkteki bileşenlerin oluşturduğu bantların görüntülenmesidir. Kromatografi ilk defa bir Rus botanikçi olan Tswett tarafından 1906 yılında keşfedilmiştir. Tswett yeşil yaprakları parçalayarak petrol eteriyle muamele etmiş, elde ettiği renkli çözeltiyi (ekstrakt), toz halindeki kalsiyum karbonatla doldurulduğu bir kolondan geçirerek yaprakta bulunan renkli maddeleri kolonun çeşitli yerlerinde bantlar halinde ayırmayı başarmıştır [44].

Kromatografi, bir karışımda bulunan kimyasal maddelerin, hareketli bir faz yardımıyla sabit faz üzerinden geçirilirken, numunenin fazlar arasındaki farklı fiziksel ve kimyasal etkileşimlerine dayanarak birbirlerinden ayrılması yöntemidir. Bu ayrılmayı sağlayan etkileşimler, moleküllerin adsorpsiyon, dağılma, afinite, iyon değişimi özelliklerindeki veya molekül ağırlıklarındaki farklardır. Bu nedenle karışımdaki bileşenlerden bazıları sabit faz ile daha çok etkileşerek sistemde yavaş hareket ederken, bir kısmı ise hareketli faza daha çok meyilli olduğundan kolonu daha hızlı terk eder [44].

Kromatografik analizler üç ana başlık altında sınıflandırılabilir. Bunlar [44]:

1. Ayrılma mekanizmalarına göre
 - Adsorpsiyon kromatografi
 - Dağılma (partisyon) kromatografi
 - İyon değiştirme kromatografi
 - Jel filtrasyon (moleküler eleme) kromatografi
 - İyon çifti kromatografi
 - Afinite kromatografi
2. Hareketli faz tipine göre
 - Sıvı kromatografi
 - Gaz kromatografi
3. Uygulama biçimine göre
 - Kolon kromatografi
 - Düzlemsel kromatografi

2.4.1. Ayrılma mekanizmalarına göre kromatografi

Adsorpsiyon kromatografi

Katı veya sıvı moleküllerin, sıvı veya gaz moleküllerini çekim kuvvetleri yardımıyla yüzeyde tutmasına adsorpsiyon denir. Katı bir madde ile bileşik arasındaki adsorpsiyon, bileşiğin katı faz ile zayıf Van der Waals, elektrostatik çekimler ve dipol-dipol etkileşimlerine dayanır ve tersinirdir. Sabit faz aktif yüzeyli bir katıdır, yüzey enerjilerini azaltmak için çevrelerindeki maddeleri kendilerine doğru çekerler ve yüzeylerinde tutarlar. Adsorpsiyon kromatografisinde karışımdaki bileşenlerin ayrılması, sabit katı fazın tutucu kuvvetiyle, hareketli fazın itici kuvveti arasındaki yarışa bağlıdır. Sabit faz yüzeyine az tutunan bileşen, hareketli fazla daha çok etkileşeceğinden kolonu daha önce terk ederken, sabit faz ile daha çok etkileşen bileşik katı yüzeyine daha kuvvetli tutunarak kolonu daha geç terk eder [44].

Adsorpsiyon kromatografi, polarlıkları farklı bileşenlerden oluşan karışımların ayrılmasında iyi sonuç verir. Polar sabit faz olarak en çok alümina ve silikajel, hareketli faz olarak apolar veya çok az polar olan benzen, oktan, kloroform gibi sıvılar kullanılır. Sabit ve hareketli fazın seçimi, ayırımı yapılacak bileşiklerin polaritesine, kimyasal özelliklerine bağlı olarak yapılır. Genelde polar maddeler için polar çözücüler apolar maddeler için apolar çözücüler kullanılır. Sabit fazın, ayrılması istenen maddeleri parçalamaması, kimyasal reaksiyon vermemesi, adsorpsiyon kapasitesinin yüksek olması ve adsorpladıkları maddeleri kolaylıkla geri bırakması gerekir. Kromatografik analizlerde sabit fazın polaritesi hareketli fazın polaritesinden daha büyük olduğunda ‘normal faz kromatografi’, hareketli fazın polaritesi daha büyük olduğunda ise ‘ters faz kromatografi’ olarak isimlendirilir [44].

Dağılma (partisyon) kromatografi

Dağılma kromatografisinde, maddeler sıvı olan sabit faz ile sıvı veya gaz olan hareketli faz arasında dağılır. Dağılma kromatografisinde destek, sıvı sabit fazın adsorplandığı katı bir materyaldir. 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 sabittir ve dağılma katsayısı (K_d)

ile ifade edilir. K_d değerleri birbirinden farklı olan maddeler kromatografik sistem içerisinde farklı hızlarda ilerleyerek birbirlerinden ayrılırlar [44].

$$K_d = C_s / C_m$$

C_s : Maddenin sabit fazdaki derişimi

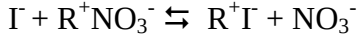
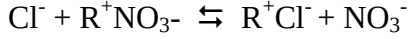
C_m : Maddenin hareketli fazdaki derişimi

İyon değiştirme kromatografi

Biyolojik materyalleri birbirinden ayırma yöntemlerinden biri olan iyon değiştirme kromatografi biyomolekülleri, onların anyonik ve katyonik yük farkına dayanarak ayırır. Bu kromatografi, bir katı maddenin yapısında bulunan iyonları, içinde bulunduğu çözeltideki aynı özellikte yüke sahip diğer iyonlarla bir dengeye göre değiştirilmesi özelliğine dayanır. Bu amaçla kullanılan katı maddelere iyon değiştiriciler denir. İyon değiştirme kromatografi, kullanılan iyon değiştiricinin anyon veya katyon değiştirmesine göre anyon değiştirme kromatografi veya katyon değiştirme kromatografi olarak adlandırılır [44].

İyon değiştiriciler inorganik ($\text{Na}_2\text{Al}_2\text{Si}_4\text{O}_{12}$, Na_2P , kil, zeolit) ve organik olmak üzere ikiye ayrılır. Bunlar katyonik, anyonik veya amfoter reğineler olabilir. İyon değiştirme kromatografi analit iyonlarının, ters yüklü destek katının iyonlarına olan ilgisine dayalı bir ayırmadır. Sabit faz zayıf ya da kuvvetli katyon ya da anyon değiştirici bir reğinedir. Reğinenin sabit yükü (-) ise buna ‘katyon değiştirici reğine’, (+) ise ‘anyon değiştirici reğine’ adı verilir. Ayırma sırasında reğinenin tamamen iyonlaşmış durumda olması gerekmektedir. Hareketli faz genellikle tamponlanmış, istenen iyonların oluşmasını sağlayan belli bir pH değerinde ve yükü katının sabit yükünün zıt iyonunu içeren sulu çözeltidir [44].

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 zayıf bağlanan, uygun yükte olmayan veya yüksüz olan bileşenler kolonu daha hızlı terk eder [44]. Örneğin, Cl^- ve I^- karışımının nitrat bağlanmış anyon değiştirici reğine (RNO_3) ile ayrılmasında geçerli dengeler aşağıdaki gibidir;



R: Çözünmeyen matriks

R^+NO_3^- : Anyon değiştirici

Hareketli fazın derişimi ve pH'sı ile kompleks oluşturucu etki, iyon değiştirmeyi etkileyen başlıca faktörlerdir [44].

Jel filtrasyon (moleküler eleme) kromatografisi

Karışımdaki makromoleküllerin molekül büyüklüklerine göre ayrılması esasına dayanır. Sabit faz ve hareketli faz aynı yapı ve bileşimdedir. Sabit faz destek görevi yapan, kimyasal olarak inert bir jel ya da gözenekli bir organik bileşiktir. Hareketli faz sabit fazdaki gözenekleri doldurur. En içteki gözeneklere ulaşabilen küçük moleküllü bileşenler kolonda uzun süre kalırken, büyük moleküller daha kısa sürede kolonu terk ederler. Değişik türde sabit fazlar kullanılarak aynı anda farklı büyüklükteki moleküller birbirinden ayrılabilir. Sabit faz olarak hidrofilik ya da hidrofobik jeller kullanılır. Hidrofilik jeller, sulu ortamda şişerek sulu çözelti ile kullanılırken (jel filtrasyon kromatografisi), hidrofobik jellerden organik çözücülerde çözünebilen polimerlerin ayrılmasında yararlanılır (jel permasyon kromatografisi) [44].

İyon çifti kromatografisi

Özellikle iyonlaşabilen asidik veya bazik maddelerin ayrılmasında kullanılan iyon çifti kromatografisi, hareketli faza ilave edilen iyon çifti reaktifin sabit faz tarafından adsorplanması ve iyonize olmuş maddelerin bu iyon çiftleri ile iyonik etkileşime girerek birbirinden ayrılması esasına dayanır [44].

Afinite kromatografisi

Matriks adı verilen katı bir destek materyaline ligandın kovalent olarak immobilize edilmesi işlemine dayanan bir tür adsorbsiyon kromatografisidir. Afinite kolonundan saflaştırılması istenilen molekülü içeren bir karışım geçirilirse sadece istenen molekül, ligand tarafından tutulur, safsızlıklar kolondan uygun bir tamponla ayrılır. Kolonda tutulan

molekül spesifik çözeltilerle kolondan elue edilir. Antijen antikor, enzim substrat, reseptör ilaç gibi oldukça seçici etkileşimlere dayanan bir kromatografi çeşididir [44].

2.4.2. Hareketli faz tipine göre kromatografi

Faz tiplerine göre kromatografi Sıvı Kromatografi veya Gaz Kromatografi olarak sınıflandırılır. Sıvı kromatografide hareketli faz sıvıdır. Sabit faz tiplerine göre sıvı - katı ve sıvı - sıvı kromatografi olarak alt gruplara ayrılır. Ancak pratikte bu sınıflandırma yerine daha çok ayrılma mekanizmalarına göre yapılan sınıflandırma kullanılmaktadır. Sıvı - katı kromatografi (adsorpsiyon kromatografi) ilk defa 1906 yılında Tswett tarafından keşfedilmişken, sıvı - sıvı kromatografi (dağılma kromatografi) ise ilk kez 1941 yılında Martin ve Synge tarafından uygulanmıştır [44, 45].

Klasik sıvı kromatografi ile gerçekleştirilen analizlerde hareketli fazın difüzyon hızı düşüktür. Kolon tekrarlanabilirliğinde problemler yaşanmakla birlikte oluşturulan sistem kişisel hatalara açıktır. Bu problemlere çözüm amacıyla 1960'lı yıllarda gerçekleştirilen çalışmalarda daha küçük ve homojen kolon partikülleri elde etmek, difüzyon yolunu kısaltmak ve hareketli fazın hızını arttırmak gibi hedefler belirlenmiştir. Bu çalışmaların sonucunda 1965 yılında Yale Üniversitesi'nde yüksek performanslı sıvı kromatografi geliştirilmiştir [44].

Gaz kromatografi hareketli fazın gaz olduğu kromatografi tekniğidir. Yeterli uçuculuğa sahip olan maddelerin analizlerinde ve ayrılmasında kullanılan bir yöntemdir. Analizin kısa sürede ve çok duyarlı şekilde yapılabilmesi yöntemin üstünlüğüdür. Hareketli faz olarak azot, helyum, argon gibi gazlar kullanılır. Sabit faz ise alumina, silika gibi bir katı olabilir. Gaz kromatografi sabit faz tiplerine göre gaz - katı ve gaz - sıvı kromatografi olarak alt gruplara ayrılır. Gaz-katı kromatografi adsorpsiyon olayına dayandığından elde edilen kromatogramlardaki kuyruklanma problemi nedeniyle daha az kullanılır. Gaz-sıvı kromatografide yüzeyi geniş gözenekli katı maddeye özel bir sıvı emdirilir. Bu sıvı, katı maddenin gözenekleri dahil bütün yüzeyine dağılır ve sabit bir faz gibi davranır. Hareketli gaz fazı bu fazın içinden kolayca geçer. Analizi yapılacak numune içindeki maddeler bu iki faz arasında dağılırlar [44].

2.4.3. Uygulama biçimine göre kromatografi

Kromatografik analizler uygulama biçimine göre aşağıdaki şekilde sınıflandırılmaktadır [44]:

- Düzlemsel Kromatografi
 - Kağıt Kromatografisi
 - İnce Tabaka Kromatografisi
- Kolon Kromatografisi
 - Gaz Kromatografisi
 - Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

Kağıt kromatografi

Genellikle süzgeç kağıdına adsorbe edilen maddelerin, uygun bir çözücü yardımı ile kağıt üzerinde farklı hareket etmeleri esasına dayanan bir ayırma yöntemidir. Kağıt destek görevi görürken, sabit faz süzgeç kağıdının yapısında doğal olarak içerdiği su molekülleridir. Hareketli faz çözücü veya çözücü karışımlarıdır. Maddelerin birbirlerinden ayrılmaları kağıt üzerinde hareket eden çözücü ile kağıdın içerdiği su arasındaki dağılma dengesine dayanır. Hareketli faz kağıt üzerinde kılcal etkiyle ilerler ve karışımdaki maddeleri sürükleyerek ayrılmalarını sağlar [44].

İnce tabaka kromatografi

İnce tabaka kromatografide sabit faz olarak silikajel, alüminyum oksit, toz selüloz veya talk gibi adsorban maddelerin cam ya da metal üzerine düzgün bir şekilde kaplandığı plakalar kullanılır. Adsorban maddelerin sahip olması gereken özellikler [44]:

- Yüksek miktarda maddenin tutunabilmesine izin vermeli,
- Üzerinde adsorbe olmuş madde başka çözücüler kullanılarak geri alınabilmeli,
- Numune ve çözücülerle kimyasal reaksiyon vermemeli,
- Renklendirici ayıraçlarla reaksiyona girmemeli,
- Yapısı çözücünün geçmesine elverişli olmalıdır.

İnce tabaka kromatografisi sıvı-katı veya sıvı-sıvı kromatografi şeklinde olabilir. Karışımdaki maddelerin ayrılması, katı yüzeyindeki farklı adsorpsiyon veya dağılma ilgilerine bağlı olarak gerçekleşir. İnce tabaka üzerinde kılcal kanallardan ilerleyen çözücü, karışımdaki bileşenleri sabit faza olan ilgileri ile ilişkili olarak farklı hızlarla sürükler ve birbirinden ayırır. Plaka üzerinde, belli bir süre sonra, bileşenlerin yol aldığı uzaklık ile çözücünün ulaştığı uzaklığın oranı, alıkonma faktörü (R_f) olarak hesaplanır ve bu değerler kalitatif analizde kullanılır. R_f daima 1'den küçüktür. Maddeye ait fiziksel bir sabittir ve maddeye ait diğer özelliklerin belirlenmesinde, maddenin tanınmasında yardımcı olur. R_f değeri aşağıdaki formül ile hesaplanır [44].

$$R_f = A / B$$

A: Maddenin aldığı yol

B: Çözücünün aldığı yol

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC)

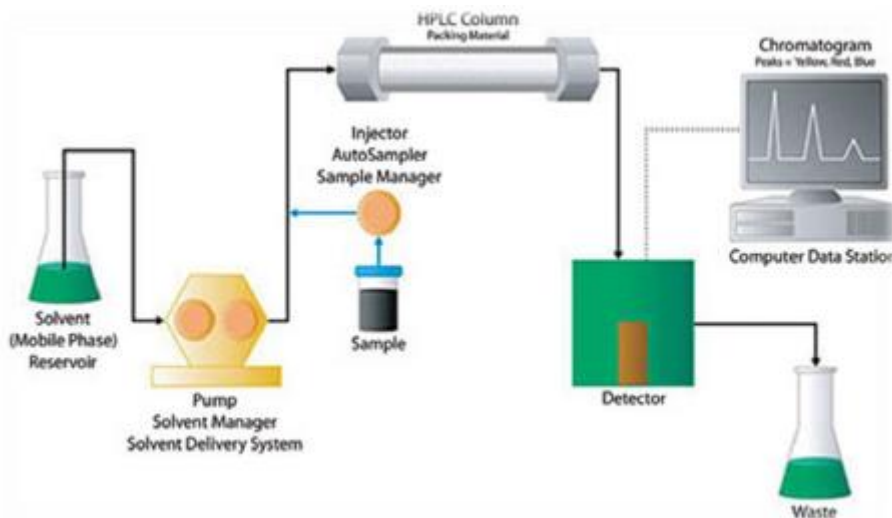
Sıvı fazda çözünebilen kompleks karışımların bileşenlerine kolay ve hızlı bir şekilde ayrılması ve duyarlılığının oldukça yüksek olması nedeniyle farmasötik bilimler, gıda, kimya ve çevre analizleri gibi alanlarda Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi oldukça sık kullanılmaktadır [46]. Farklı örneklerle uygulanabilmesi, hareketli faz açısından alternatiflerin fazla oluşu, tekrarlanabilirlik, duyarlılık ve hız gibi özelliklerinin yüksek olması HPLC'nin kullanımını arttırmıştır ve tekniğin ilerlemesinde önemli rol oynamıştır [47]. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi yüksek sıcaklıklarda bozulan ve uçucu olmayan proteinler, nükleik asitler, aminoasitler, ilaçlar, hidrokarbonlar ve pestisit gibi bileşenlerin kalitatif ve kantitatif tayinlerinde oldukça sık kullanılmaktadır [48].

HPLC ile analizde uygun çözücüde çözünmüş numune karışımı yüksek basınç altında kolondan geçirilerek bileşenlerine ayrılır. Kolon içerisindeki dolgu malzemesi sabit faz görevini üstlenmektedir. Numunede karışımındaki bileşenler ile dolgu malzemesi (sabit faz) arasındaki etkileşim, kromatografik ayırımın derecesini ve performansını belirler [49]. Bileşenler ile hareketli ve sabit faz arasında istenilen etkileşim, kullanılan sabit faz ve çözücülerin değiştirilmesiyle sağlanır [50].

HPLC’ de hareketli faz sıvı, sabit faz ise kolon içerisine doldurulmuş çok küçük ve homojen katı veya katı yüzeyine emdirilmiş sıvı taneciklerdir. Uygun akış hızını elde etmek için hareketli faza yüksek basınç uygulanması gerekmektedir. Kromatografik ayırma esnasında numune kolon içerisindeki sabit bir faz üzerinde akmakta olan hareketli faz içerisine enjekte edilir. Numune içerisinde bulunan farklı bileşenlerin sabit fazla etkileşimi de farklı olacağından bu bileşenler farklı zamanlarda kolon çıkışına ulaşır ve karışımı oluşturan bileşenler birbirlerinden ayrılır [51]. Kolondan çıkan bileşenler uygun bir dedektör yardımıyla tespit edilir [52].

Yüksek performans, yüksek rezolüsyonu ifade etmektedir. Hareketli fazın yüksek basınçla ilerlemesi sağlandığı için yüksek basınçlı sıvı kromatografi olarak da adlandırılır. Yüksek performans sadece basıncın değil birçok faktörün bir araya gelmesiyle oluştuğundan yüksek performanslı sıvı kromatografisi adlandırması kullanılmaktadır. Çok küçük çaplı kolon dolgu maddelerinin kullanımı bant genişlemesi azaltarak daha dar piklerin elde edilmesini sağlar [53].

Bir HPLC cihazı hareketli faz haznesi, pompa, enjektör, kolon, dedektör ve bilgisayarlı sinyal işlemci bölümlerinden oluşmaktadır. Pompa vasıtası ile hareketli faz sistemde ilerlerken enjektör bölümünden verilen numune ile birlikte kolona girer. Kolonda numune bileşenleri birbirinden ayrılır. Ayrılan bileşenler farklı zamanlarda kolonu terk edip dedektöre ulaşırlar. Her bir bileşenin zamana karşı dedektörde oluşturdukları cevap, elektriksel sinyal yoluyla bilgisayara aktarılır [54].



Şekil 2.11. HPLC cihazının şematik gösterimi [53]

HPLC cihazları bir ya da daha fazla 200 - 1000 mL hareketli faz içeren cam veya çelikten yapılmış haznelere sahiptir. Hareketli fazın bulunduğu hazneler kolon ve dedektör sisteminde olumsuz etkilere sebep olan çözünmüş gazların etkilerinin giderilmesi için gaz giderici ünitelere (degasser) bağlanmıştır. Gaz kabarcıkları genellikle dedektör performansının bozulmasına ve bant genişlemesine neden olduğundan hareketli faz hazneye doldurulmadan önce vakum altında süzülerek hem hareketli faz içerisindeki partiküller tutulmakta hem de çözünmüş gazlar giderilmektedir [44, 54].

Hareketli fazın bileşimi, alıkonma zamanı ve seçiciliği etkileyen en önemli faktördür [53]. Bu nedenle HPLC ile analizlerin başarısı büyük ölçüde doğru hareketli faz sisteminin seçimine bağlıdır. Hareketli faz olarak kullanılabilecek çözücülerin kaynama noktasının çok yüksek olmaması, viskozitelerin düşük olması ve kullanılacak dedektör ile uyumlu olması gerekmektedir (Çizelge 2.3) [52].

Çizelge 2.3. Hareketli faz olarak kullanılan bazı çözücüler ve özellikleri [52]

Çözücü	Kaynama noktası (°C)	Viskozite (cp)	Polarite (p')	Kırılma indisi
Hekzan	69	0,31	0,1	1,376
Diklorometan	40	0,44	3,1	1,424
Etil asetat	77	0,43	4,4	1,372
Kloroform	61	0,57	4,1	1,446
Tetrahidrofuran	66	0,55	4,0	1,407
Asetonitril	82	0,38	5,8	1,344
Metanol	65	0,55	5,1	1,328
Su	100	1,00	10,2	1,333

Hareketli faz, kromatografik sisteme izokritik elüsyon veya gradient elüsyon şekilde uygulanabilir. Sabit bileşimdeki tek bir hareketli faz kullanılarak gerçekleştirilen ayırma tekniğine izokritik elüsyon denir. Bu tip elüsyonda hareketli faz polaritesinin sabit olması sebebiyle, kolon dolgu malzemesine ilgi duyan bileşenleri kolondan uzaklaştırmak zorlaşır [54]. Çok bileşene sahip numunelerde analiz süresi boyunca sabit bileşimdeki hareketli faz kullanımı elüsyon problemlerine yol açar ve bazı bileşenler kolonu çok geç terk eder. Bu sorunu ortadan kaldırmak amacıyla gradient elüsyon tekniği sıklıkla kullanılmaktadır [52].

Analiz süresi boyunca hareketli faz bileşiminin değiştirilebildiği ve polariteleri birbirinden farklı iki veya üç çözücü kullanılarak gerçekleştirilen ayırma tekniğine gradient elüsyon denir. Modern HPLC cihazları, çözücülerin hacimsel oranlarını zamanla değiştirebilecek

şekilde iki ya da üç hazneden aldığı çözücülerini bir karıştırma odasında değişen hızlarda bir araya getiren sistemlere sahiptir [55]. Gradient elüsyonda çözücüler kolona girmeden önce karıştırılarak hareketli fazın bileşimi kromatografi süresi boyunca doğrusal olarak değişmektedir. Hareketli fazın polaritesi zamanla değiştirilerek, numune bileşenlerinin sabit faza olan ilgileri değiştirilir ve ayırım sağlanır [54].

Pompa sistemleri

Pompa sistemi HPLC cihazının en önemli parçalarından biridir. Pompanın performansı analiz sonuçların tekrarlanabilirliğini önemli ölçüde etkiler [56]. HPLC cihazlarında kullanılan pompaların 400 atmosfer basınca kadar basınç üretebilmesi, puls içermeyen basınç çıkışının olması, 0,1 – 10 mL/dk akış hızının hassas ve tekrarlanabilir olarak ayarlanabilmesi ve korozyona karşı dayanıklı olması gerekir. HPLC’de kullanılan pompalar pistonlu pompalar, sürgülü pompalar ve pnömatik pompalar olarak üç şekilde sınıflandırılır.

Pistonlu pompalar en yaygın kullanılan HPLC pompalarıdır. Motor kontrollü bir pistonun ileri ve geri hareket etmesiyle çözücünün pompalandığı küçük bir silindirden oluşur. Sırayla açılıp kapanan iki motor musluğu çözücünün silindir içine giriş çıkışını kontrol eder. Çok küçük hacimdeki (35 – 400 µL) çözücülerini gönderebilmesi, gradient elüsyona uygun çalışabilmesi, akış hızının sabit olması, çözücü viskozitesi, geri basınçtan etkilenmemesi ve çıkış basıncının yüksek olması bu pompaların en önemli avantajlarıdır. En büyük dezavantajı pulslu bir akış sağlaması nedeniyle kromatogramın zemin çizgisi üzerinde gürültü sinyali oluşturmastır [57].

Sürgülü pompalar bir kademeli motordan güç alan vidalı güdüm mekanizması ile kumanda edilen sızdırmaz bir sürgüye sahip, şırınga benzeri silindirik bir kaptan ibarettir. Viskoziteden ve geri basınçtan bağımsız bir akış üretirler. Çıkış akımı pulssuzdur. Sınırlı çözücü kapasitesi (≈ 250 mL) ve çözücü değiştirilmesi gerektiğinde karşılaşılan güçlükler sakıncaları arasındadır [57].

Pnömatik pompalar gaz basıncı ile çalışırlar. Gaz basıncı küçük alanlı bir pistonu iten büyük alanlı bir pistonla etki eder. Gaz basıncı böylece pistonların yüzey alanları oranında kuvvetlenir. Sabit basınçtaki sıvı sisteme dağıtılır [56]. Pulssuz, pahalı olmayan fakat

sınırlı kapasiteye sahip bu pompalarda çıkış basıncı düşüktür. Çıkış hızı kolon geri basıncına ve çözücü viskozitesine bağlıdır. Pnömatik pompalar gradient elüsyon için uygun değildir [44].

Enjektör

Enjektör, numunenin sisteme verildiği düzenektir. HPLC sistemlerinde manuel ve bilgisayar sistemli oto-enjektörler olmak üzere iki çeşit enjektör mevcuttur. Manuel enjektörlerde valf önce doldurma (load) pozisyonuna getirilerek basınçlı ortamdan izole edilir. Numune bir şırınga yardımıyla loop içerine doldurulur. Doldurulan numune hacmi, loop hacmini geçerse, fazla olan miktar otomatik olarak dışarıya atılır. Valf daha sonra enjeksiyon (inject) pozisyonuna getirilerek, numune hareketli faz içine enjekte edilmiş olur. Loop hacimleri genellikle 5 μ L – 5 mL arasında değişmektedir. Loop hacmi küçüldükçe hata oranı arttığından tekrarlanabilirlik kötüleşmektedir [54].

Otomatik enjektörler kullanarak istenilen hacimlerde numune sisteme tekrarlanabilir olarak enjekte edilebilir [54]. Enjekte edilen numune, yüksek basınçta ilerlemekte olan hareketli faz tarafından kolona doğru sürüklenir. Numunenin kolona ulaşması çok küçük bir hacim içinde fazla seyrelmeden gerçekleşir. Numunenin seyreltiği durumlarda yayvan pikler elde edilir [54].

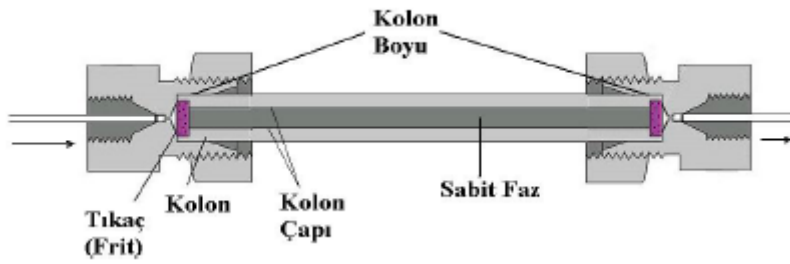
Kolonlar

Kromatografik ayırma numunenin sabit ve hareketli fazlar arasındaki etkileşime bağlıdır. Kolon dolgu maddesi olarak kullanılan sabit fazlar, numunenin fiziksel ve kimyasal özelliklerine göre değişkenlik gösterirler. Kullanılacak sabit faz, numune ve hareketli faza karşı inert ve kararlı olmalı, yüksek akış hızı ve basınçtan etkilenmemelidir [49].

HPLC kolonları paslanmaz çelikten, nadiren kalın cidarlı düz cam borulardan üretilir. Kolonlarının boyu 10 – 30 cm, iç çapları 4 – 10 mm, kullanılan dolgu maddesinin tanecik büyüklüğü 5 – 10 μ m arasında değişmektedir. Günümüzde en sık tercih edilen kolonlar 25 cm uzunluğa ve 4,6 mm iç çapa sahip, 5 μ m tanecik büyüklüğünde dolgu maddesi ile doldurulmuş, 40000 – 60000 tabaka/metre içeren kolonlardır [57].

Dolgu maddesi olarak kullanılan maddeler gözenekli ya da gözeneksiz yapıda cam veya polimerlerdir. Gözeneksiz yapıdaki kolon dolgu maddelerinin çapları 30-40 μm 'dir. Yüzeylerine gözenekli yapıda alümina, silika ya da iyon değiştirme reçinesi kaplanır. Bazı uygulamalarda ise adsorbsiyon yoluyla ya da yayılmış bir sıvı şeklinde ikinci bir kaplama yapılır. Bu tip kolonlar sadece koruyucu kolon olarak kullanılır. Gözenekli yapıda olan alümina, silika ve iyon değiştirme reçinelerin çapları 3 – 10 μm arasındadır. Günümüzde en çok silika dolgu ile yapılan kolonlar kullanılmaktadır. Gözenekli madde ne olursa olsun, yüzeyleri film şeklindeki organik maddeyle fiziksel ya da kimyasal olarak kaplanır [54].

Hareketli fazın kolon içine girdiği ve çıktığı uçlarda delikli yapıda sıvının geçişine izin veren ancak dolgu maddesinin geçişine izin vermeyen iki tıkaç (frit) bulunur (Şekil 2.12.) [54].



Şekil 2.12. HPLC kolonu [54]

Doğru kolon tipi ve dolgu maddesinin kullanımı HPLC sisteminin performansını etkilerken, kolon uzunluğu, dolgu maddesinin özelliği ve tanecik boyutu kolon verimliliğini etkiler [58].

Kolon boyutu arttıkça bileşenler arasında rezolüsyon (ayrım) artar. Ancak kolon uzunluğunu arttırmak, analiz süresinin uzamasına, daha çok hareketli faz tüketilmesine ve sistem geri basıncının artmasına neden olur [58].

Dolgu malzemesi olarak seçilen silika, pik şeklini ve alıkonma zamanını direkt olarak etkiler. Silika yüksek oranda ağır metal kalıntıları içerdiğinden, bu kalıntılar heterosiklik yapılar ve amin türleriyle etkileşime girerler. Ayrıca küçük tanecik boyutlu silika kullanımı, hareketli faz ile etkileşen yüzey alanını artırır ve ligandların daha kontrollü bağlanmasına imkân sağlar. Ticari olarak satılmakta olan birçok kolondaki taneciklerin boyutları hemen hemen eşittir. Dolgu maddesinin tanecik boyutu azaldıkça, kolon

performansı yükselir. Sonuçta teorik plaka sayısı ve kromatografik ayırımın etkinliği artar [58].

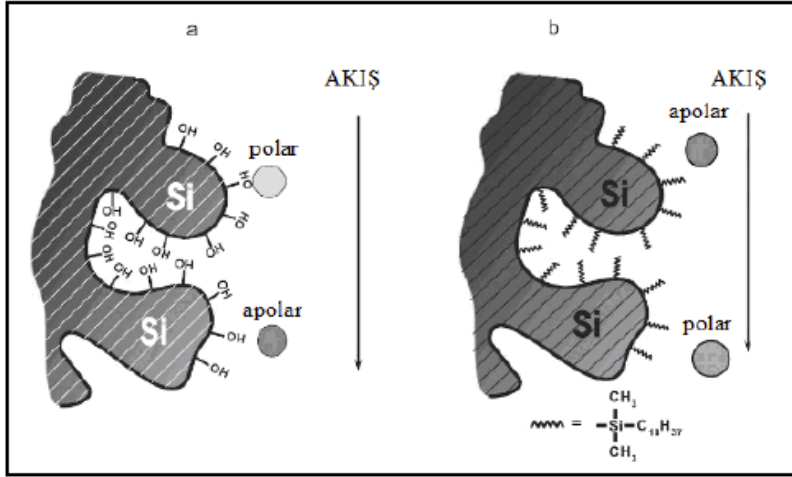
Yöntem geliştirme için en önemli hususlardan biri de spesifik kimyasal ligandların bağlandığı silika destek yapısının yani dolgu maddesinin seçimidir. Ters faz ve normal faz en sık kullanılan kromatografi türleridir [58].

Normal faz kromatografisi, sabit fazın polar, hareketli fazın daha az polar olduğu kromatografik ayırma tekniğidir. Numune içerisindeki maddelerden polaritesi yüksek olanlar, düşük olanlara kıyasla sabit fazda daha uzun tutunurlar. Bu sebeple kolonu ilk olarak düşük polaritedeki bileşenler terk eder. Normal faz kromatografideki çekim kuvvetleri genellikle dipol-dipol ve hidrojen bağı (polar) etkileşimleridir [59].

Ayırma, analitin polar sabit faz (çoğunlukla silika veya alümina) üzerindeki adsorpsiyon desorpsiyon dengesine dayanmaktadır. Sabit fazın yapısında bulunan silanol (Si-OH) grupları ile polaritesi yüksek analitler arasındaki güçlü etkileşim sebebiyle, polar analitler kolon içerisinde daha uzun süre kalmaktadır. Numune bileşenleri tarafından polar sabit faz yüzeylerinin kolayca kirletilmesi, bu tekniğin dezavantajıdır. Bu dezavantajı ortadan kaldırmak amacıyla silanol gruplarına amino, siyano gibi fonksiyonel gruplar eklenmiştir. [60]. Normal faz kromatografide silika, siyano (CN), amino (NH₂) ve diol (—OH)₂ gibi fonksiyonel gruplara sahip dolgu maddeleri tercih edilmektedir. Hekzan ve diklorometan gibi apolar çözücüler ise en çok kullanılan hareketli fazlardır [61]. Sabit faz olarak en çok kullanılan kolon dolgu maddelerinin polarlık sıralaması silika > amino > diol > siyano şeklindedir [49].

Sabit fazın hareketli faza kıyasla daha az polar olduğu kromatografik ayırma tekniği ters faz kromatografidir. Ters faz kromatografide çekim kuvvetleri genellikle hidrofobik etkileşimlerdir. Ayırma işlemi maddelerin, daha az polar sabit faz ve polar hareketli faz arasındaki dağılma katsayılarına bağlı olarak gerçekleşir. Sabit faz olarak en çok, silika yüzeyine C18 (oktadesil) gruplarının bağlandığı sistemler tercih edilir [60]. Ayrıca C8, C4, C2 ve fenil kullanılan diğer sabit faz çeşitleridir. Su, metanol, asetonyitril gibi çözücüler ise ters faz kromatografide en sık kullanılan hareketli fazlardır [62].

Numune içerisindeki apolar bileşenler, hidrofobik yapıdaki C18 gruplarıyla daha kuvvetli etkileştiklerinden sabit fazda daha uzun süre tutunurlar. Bu sebeple kolonu ilk olarak polar bileşenler terk eder (Şekil 2.13.) [60].



Şekil 2.13. HPLC’de normal faz (a) ve ters faz (b) kolonda polar ve apolar bileşiklerin akışı [60]

C18 gibi daha uzun karbon zincirine sahip kolonlar ile daha az polar bileşenlerin ayrılması sağlanırken, C2 ya da C8 gibi daha kısa zincirli kolonlar polar bileşenlerin ayrılmasında kullanılır [63, 64]. Sabit fazın türü ve kimyası ile hareketli fazın türü ve derişimi, bileşenlerin kolondaki tutunma sürelerini belirler. Bununla birlikte sıcaklık ve pH’da ayrımı etkileyen diğer önemli parametrelerdir [49].

Dedektörler

Kolonda ayrımı gerçekleştirilen bileşenler alıkonma zamanlarına göre dedektör tarafından tespit edilir. Bileşen, hareketli faz ile birlikte kolon boyunca sürüklendikten sonra dedektöre ulaşır. İdeal bir dedektörün sahip olması gereken özellikler şunlardır:

- Düşük miktarlarda bileşenleri tespit edebilmek için sinyal/gürültü oranı yüksek olmalıdır.
- Cevap zamanı hızlı olmalıdır.
- Hareketli fazdaki bileşim, sıcaklık ve akış hızı değişikliklerine duyarlı olmalıdır.
- Bütün bileşenlere cevap vermelidir ya da tahmin edilebilir bir seçiciliğe sahip olmalıdır.
- Yeterli hassasiyete sahip olmalıdır.

- Doğrusal çalışma aralığı geniş olmalıdır.
- Tekrarlanabilirliği ve kararlılığı yüksek olmalıdır.
- Kullanımı kolay ve yüksek güvenilirlikte olmalıdır.
- Bant genişlemesini engellemek için ölçüm hücresinin hacmi minimum hacimde olmalıdır.
- Numuneye zarar vermemelidir.

Analiz edilecek maddenin fiziksel ve kimyasal özelliklerine göre, kullanılacak olan dedektör tipi değişir. Dedektörler ölçüm yaptıkları fiziksel özelliklere göre 7 çeşide ayrılmaktadır.

Ultraviole /görünür (UV-vis) bölge dedektörü

Kolondan çıkan bileşenlerin 190–700 nm dalga boyları aralığında absorbansının ölçüldüğü dedektörlerdir ve nicel analizlerde Lambert – Beer yasası geçerlidir. Işık kaynağı olarak UV bölgede döteryum lamba, görünür bölgede ise tungsten lamba kullanılır. Birçok absorbans dedektörü çift ışın demetlidir. Işın demetlerinden birisi elüe edilmiş çözeltiliden, diğeri ise şiddetinin azaltılması için bir filtreden geçirilir. Bu demetleri ölçmek için birbiriyle uyumlu çalışan iki fotoelektrik dedektör veya ışın yolu kesicili bir sistem kullanılır. Bu durumda tek fototüp yeterli olur. Her iki durumda da kromatogram, dönüştürülmüş iki sinyal oranının logaritmasının zamana karşı çizilen grafiğinden meydana gelmektedir [65].

Fotodiyot dizisi transducer (DAD)’ın ultraviole /görünür bölge dedektöründen farkı, 512 elemente sahip bir yüzeyde, her bir elementin farklı bir dalga boyundaki absorbansını eş zamanlı ölçebilmesidir. Bu nedenle her bir analit için spektrum taraması yapmak ve 3 boyutlu kromatogramlar elde etmek mümkündür. Ayrıca istenilen dalga boyu aralığında çalışma imkânı sağlamaktadır. Işık kaynağı olarak döteryum ve tungsten lambalar kullanılır [54]. DAD dedektörde, bütün dalga boylarını içeren ışık numuneden geçtikten sonra çok kanallı polikromatöre girer ve dalga boylarına ayrılarak diyot serisine gönderilir. Her bir diyotun farklı dalga boylarını algılamasıyla, bütün dalga boylarındaki absorbans eş zamanlı ölçülmüş olur [66]. DAD dedektör ile piklerin saflık kontrolleri yapılabilmektedir. Bu amaçla birkaç spektrum üst üste konulup, karşılaştırılabilir. Tüm dalga boylarında spektrumlar çakışıyor ise bileşene ait pik saftır [53].

Ticari spektroskopik cihazlarda fotodiyot dizisi, yük enjeksiyon düzenekli (CID) ve yük eşleşmiş düzenekli (CCD) olmak üzere üç çeşit çok kanallı dedektör kullanılmaktadır. Fotodiyot dizisi dedektörler fotoduyarlı elementlerin lineer olarak düzenlendiği tek boyutlu dönüştürücülerdir. CID ve CCD'lerin ise her bir fotoduyarlı elementi iki boyutlu dizi şeklinde oluşmaktadır. Yük enjeksiyon ve yük eşleşmiş dedektörlerin ortak fonksiyonu, dedektör yüzeyinin çeşitli alanlarından yüklerin toplanması ve sonra birikmiş yüklerin kısa bir sürede ölçülmesidir. Her iki düzenekte de yükün toplanma alanından dedeksiyon alanına transfer edilmesiyle ölçüm gerçekleşir. Bu nedenle her iki dedektör zaman zaman yük aktarım dedektörü (CTD) olarak da adlandırılır [44].

Fotodiyot dizisi dedektörler duyarlılık, dinamik aralık ve sinyal/gürültü oranı açısından foton çoğaltıcı tüpler ile boy ölçüşemezler. Bu sebeple, absorpsiyon spektrometrisi gibi yüksek hassasiyet ve geniş dinamik aralık gerektirmeyen teknikler için kullanılırlar. Buna karşılık, çok kanallı olma avantajı ile birlikte yük aktarım dedektörlerinin performans karakteristikleri foton çoğaltıcı tüpleri zaman zaman geride bırakmaktadır. Bu dedektörlerin modern spektroskopik cihazlarda kullanımı giderek artmaktadır [44].

Floresans dedektörü

Floresans dedektörlerinde, ışık kaynağı olarak civa veya zenon lambası kullanılmaktadır. Duyarlılığı UV/VIS dedektöre göre en az 10 kat fazladır [44]. Floresans ışına, uyarıcı dalga boyundaki ışına 90 derece açıyla yerleştirilmiş bir fotoelektrik dedektör yoluyla izlenmektedir. Uygun dalga boyundaki ışık hücreden geçerek daha yüksek dalga boylu ışına, dik konuma yerleştirilmiş dedektör tarafından tespit edilir. Emisyon tüm yönlerde doğru gerçekleştiğinden, ışığı toplayıcı kollektörler dedektörün içerisinde yer almaktadır. Seçicilik, duyarlık ve ışık yoğunluğu daha büyük bir hücre kullanılarak arttırılabilir [67]. Düşük floresans özellik gösteren maddeler, floresans özellik gösteren reaktifler ile türevlendirilerek floresans şiddetleri arttırılabilir [60].

İletkenlik dedektörü (CDD)

İletkenlik ölçümüne dayalı dedektörlerdir. Daha çok anyon ve katyon analizlerinde kullanılmaktadır. Sıcaklık kontrolü oldukça önemlidir. Hareketli fazın iletkenliği ne kadar düşük olursa, oluşan zemin sinyali ve gürültü de o derece az olmaktadır [54].

Refraktif indeks dedektörü

Kırılma indisinin ölçüldüğü dedektörlerdir. Numune bileşenlerinin bulunduğu ortamın yoğunluğu fazla olduğundan, gelen ışık kırılarak hücreyi terk eder. Ölçülen kırılma oranlarından nicel tayin gerçekleştirilir. Bu dedektörlerin neredeyse tüm analitlere cevap vermesi en önemli avantajıdır. Ancak duyarlılıkları diğer dedektör tiplerinden oldukça düşüktür. Bununla birlikte sıcaklığa karşı oldukça hassas olan bu dektörler ile çalışılırken, sıcaklık değişiminin derecenin binde birkaçından daha az değişecek şekilde kontrol edilmeleri gerekir [44].

Elektrokimyasal dedektör

Elektroaktif maddelerin tayini için kullanılırlar. Bileşenler belirli bir potansiyel değerlerinde indirgenebilir ya da yükseltgenebilir olmalıdır. Ölçülen fiziksel özellik elektrik akımıdır [44]. Elektroaktif maddelerin indirgenmesi/yükseltgenmesi sonucu oluşan akım, akış hücresinin uçlarında yer alan elektrotlar vasıtasıyla ölçülür. Seçiciliği ve hassasiyeti yüksektir. Nörotransmitterlerin, katekolaminlerin, fenolik hidroksillerin, amino ve nitro gibi fonksiyonel grupların tayinlerinde sıklıkla kullanılır. Elektrot yapı malzemesi olarak karbon dışında altın, gümüş ve platin kullanılabilir [60].

Kütle spektrometrik dedektör (MS)

Kütle dedektörleri ile bileşenlerin hem yapı tayinleri hem de miktar tayinleri gerçekleştirilebilmektedir. Sıvı kromatografi ile kütle spektrometriyi birleştirmedeki en temel sorun, kütle spektrometrisi ile vakum koşullarında çalışılırken sıvı kromatografide çözücü hacminin çok fazla olmasıdır. Bu sorunu ortadan kaldırmak amacıyla çeşitli ara bağlantılar kullanılmaktadır. Bu amaçla kolonu terk eden eluent iki kısma ayrılarak çok az bir kısmı kütle analizörüne gönderilir ya da numune bir buharlaştırma hücresine aktarılır. Burada çözücü buharlaştırıldıktan sonra geriye kalan kalıntı iyonlaşma hücresinde iyonlaştırılır. Termosprey yönteminde ise kolondan çıkan elüent, ısıtılmış bir kılcal boru içinden aerosol jeti halinde geçirilmek suretiyle buharlaştırılır. Sprey içinde, elüente eklenmiş amonyum asetat gibi bir tuz yardımıyla analit iyonlaştırılır. Ancak termosprey yöntemi yalnızca amonyum asetat gibi tuzları çözebilecek polar hareketli fazlarda yani polar analitler için kullanılabilir [44, 65].

Elektrosprey iyonizasyon (ESI), uçucu olmayan moleküllerin iyonlaştırılmasında uygulanan bir yöntemdir. Elüent, sisleştirci aracılığıyla spreya haline dönüştürülür. Elektriksel alanda oluşturulan bu spreya sıcak azot gazı (150- 350°C) gönderilir. Bu nedenle damlacıklar küçülmeye başlarken coulomb patlaması sebebiyle de büyüme davranışı sergilerler. Moleküller bu iki kuvvet arasında kalarak gaz fazındaki iyonlar oluşur [68, 69].

Atmoseferik basınç kimyasal iyonizasyon (APCI) yönteminde elüent, kapiler bir prob vasıtasıyla azot gazı ile ısıtılmış bölgeye gönderilir ve aerosol buharlaştırılmaya başlanır. Bu yöntemde kullanılan yüksek voltajlı (2,5 – 3 kV) metal korona iğnesi çözücü moleküllerini iyonlaştırır. Çözücü iyonları ile örnek molekülleri kimyasal reaksiyona girerek gaz fazındaki analit iyonları oluşur [70].

Kütle spektrometride moleküllerden gaz fazında iyonlar oluşturulur ve bu iyonlar kütlelerine göre birbirinden ayrılarak kaydedilir. İyonların bağıl miktarlarının (kütle/yük) oranlarına göre çizilmiş grafiğine kütle spektrumu denir. Bir maddenin kütle spektrumunun elde edilebilmesi için analitin önce gaz fazına geçirilmesi ve daha sonra iyonlaştırılması gerekir. Örnek önce kütle spektrometrenin vakum altında tutulan giriş kısmına gönderilir ve madde gaz fazında değilse, ısıtılarak gaz fazına geçmesi sağlanır. Gaz haline getirilmiş maddenin molekülleri ince bir delikten difüzyon ile iyonlaşma bölgesine sızarak. Örneğin ve uygulamanın türüne göre çeşitli iyonlaştırma yöntemleri uygulanır. Kütle spektrometresinde kütle ayırıcısından geçen iyonlar dedektör tarafından algılanır. İyonları algılamak üzere kullanılan dedektörlerin en basiti Faraday kabıdır [44].

Kütle spektrometresinde gözlenen piklerin yüksekliği örnekte bulunan maddenin derişimi ile doğru orantılı olduğundan bu yöntem, nicel analiz amacıyla da kullanılır. Bu yöntemle nicel analiz, 10^{-9} – 10^{-6} g gibi çok az analit miktarı ile ve yüksek duyarlılıkla yapılır. Kütle spektrometresi ile alkaloidler, terpenler, steroidler, ilaçlar, petrol ürünlerinin nitel ve nicel analizi yapılabilir [44].

Evaporatif ışık dağıtıcı dedektör

Bu dedektörlerde kolondan ayrılan numune bir sisleştirciye gönderilerek, azot ya da hava akımıyla ince bir sis haline getirilir. Sisleştirilmiş numune, sıcaklığı kontrol altında tutulan

bir tüpten geçirilerek çözücüsü uzaklaştırılır ve geriye maddenin mikrokürecikleri kalır. Bu mikrokürecikler bir lazer demetinden geçirilir. Etrafa yayılan ışıklardan parçacık akımına dik yöndeki ışın demeti bir silikon fotodiyotla ölçülür. Bu yöntemin uçucu olmayan tüm maddelere uygulanabilmesi ve tekrarlanabilirliğinin yüksek olması önemli bir avantajdır.

2.5. Analitik Yöntem Validasyonu

Uluslararası harmonizasyon topluluğunun (ICH) yayımladığı analitik yöntemlerin validasyonu rehberinde (Q2 (R1)) belirtildiği üzere; validasyonun hedefi, analitik yöntemin tasarlanış amacına uygun olduğunu ispatlamaktır [1]. Uluslararası temel ve uygulamalı kimya birliğinin (IUPAC) yayımladığı yöntem validasyonu rehberinde ise ulusal ve uluslararası yönetmeliklere uyum için güvenilir analitik yöntemlerin gerekli olduğu belirtilmiştir. Bu sebeple laboratuvarlar istenilen kalitedeki veriyi sağlayabilmek için bir takım önlemler almaktadırlar. Valide analitik yöntemlerin kullanımı bu önlemlerin en başında gelmektedir. Güvenilir analitik veri oluşturmak için yöntem validasyonu önemlidir [71]. Amerikan gıda ve ilaç dairesi (FDA), dünya sağlık örgütü (WHO) ve avrupa ilaç ajansı (EMA) gibi birçok otoritenin analitik yöntem validasyonu hakkında hazırladığı kılavuzlar bulunmaktadır. Analitik yöntem validasyonunun aşağıdaki koşullarda uygulanması uygundur.

- Ortaklaşa gerçekleştirilecek bir çalışmanın maliyetli bir şekilde uygulanmasından önce yöntemin uygulanabilirliğini sağlamak,
- Ortaklaşa çalışmanın mümkün olmadığı ya da ortaklaşa çalışma verilerinin kullanılamaz olduğu durumlarda analitik yöntemlerin güvenilirliğini kanıtlamak,
- Kullanıma hazır valide edilmiş yöntemlerin doğru kullanıldığından emin olmak [71].

Etken maddenin sentezinde, bitmiş ürün içeriğinde ya da analitik yöntemde değişiklik olduğu durumlarda validasyonun tekrar edilmesi gerekebilir [1].

Seçicilik, teşhis limiti (LOD), tayin alt limiti (LOQ), doğrusallık, aralık, cihaz kesinliği (enjeksiyon tekrarlanabilirliği), yöntem kesinliği, ara kesinlik ve doğruluk parametreleri tipik validasyon parametreleridir. [1, 72, 73].

Seçicilik

Seçicilik, numunede var olması beklenen bileşenlerin varlığında analitin, açık bir şekilde değerlendirilebilmesi yeteneğidir. Bu bileşenler genellikle safsızlıklar ve matristir [1]. Diğer bir ifadeyle seçicilik, girişimler varlığında analitin doğru bir şekilde tayin edilebilme derecesidir [71].

Teşhis limiti (LOD) ve tayin alt limiti (LOQ)

Analitin numune içerisinde teşhis edilebildiği ancak miktarının kesin olarak tayin edilemediği en düşük derişime teşhis limiti denir. [1, 73]. Diğer bir deyişle, numune içerisindeki analit miktarının sıfırdan farklı olduğu en düşük derişimdir [71]. Teşhis limiti belirlemek için görsel değerlendirme, sinyal/gürültü oranı, analit yanıtı ve eğimin standart sapması, kör ölçümün standart sapması ve kalibrasyon eğrisi gibi bir çok yaklaşım kullanılmaktadır.[1, 73].

Tayin alt limiti ise, numune içerisindeki analitin uygun kesinlik ve doğruluk ile tayin edilebildiği en düşük derişimdir. Safsızlık tayini gibi numune içerisindeki miktarları düşük olan bileşenler için tayin alt limiti önemli bir validasyon parametresidir [1].

Doğrusallık

Bir analitik yöntemin belirli bir derişim aralığındaki doğrusallığı, elde edilen test sonuçlarının numunedeki analit derişimi ile orantısal olma yeteneğidir. [1, 73].

Doğrusallığın belirlenmesinde, derişime karşılık elde edilen analitik sinyal grafiğe geçirilerek eğim, kesişim ve korelasyon katsayısı değerleri hesaplanır. En az beş farklı derişim seviyesinin kullanılması tavsiye edilmektedir [1].

Kesinlik

Bir analitik yöntemin kesinliği, öngörülen koşullar altında aynı homojen numunenin çoklu örneklemeinden elde edilen bir dizi ölçüm arasındaki uyumun yakınlığını ifade eder [1]. Standart sapma ve bağıl standart sapma terimleri ile tarif edilir [71].

Kesinlik parametresi incelenirken gerçek (orijinal) numunelerin kullanılması tavsiye edilir. Ancak orijinal numunelerin bulunmaması durumunda sentetik olarak hazırlanmış numune ya da numune çözeltileri kullanılabilir [1].

Cihaz kesinliği parametresi için aynı gün içerisinde, aynı cihaz kullanılarak, aynı numune çözeltisinin % 100'lük derişim seviyesinde altı ardışık ölçümü gerçekleştirilir. Yöntem kesinliği (tekrarlanabilirlik) parametresi ise aynı gün içerisinde, %100' lük derişimde altı farklı numune çözeltisinin test edilmesiyle gerçekleştirilir. [1, 73].

Ara kesinlik parametresi ise farklı günler, farklı analistler ve farklı cihazlar gibi laboratuvar içi varyasyonları ifade eder. [1, 73]. Her bir analist, farklı günlerde %100' lük derişim seviyesinde altı farklı numune çözeltisi hazırlayarak farklı cihazlarda test eder.

Doğruluk

Bir analitik yöntemin doğruluğu, kabul edilen referans bir değer ile bulunan değer arasındaki yakınlığı ifade eder [1]. Bir başka deyişle, analiz sonuçlarının gerçek değere olan yakınlığıdır [73]. Etken maddenin bilinen miktarı, ilaç bileşenlerinin (yardımcı maddelerin) sentetik karışımına eklenerek doğruluk çalışması gerçekleştirilir. Safsızlık çalışmalarında ise, safsızlıkların bilinen derişimdeki miktarları numune üzerine ilave edilir. Doğruluk parametresi için üç farklı derişim seviyesinde toplam dokuz tayin gerçekleştirilir. Sonuçlar geri kazanım yüzdesi olarak raporlanır [1].

%100' lük derişim seviyesi, analitik yöntemdeki test (numune) çözeltisinin derişimini ifade etmektedir [1, 73]. %80 ve %120'lik derişimler ise numune derişimi (%100) üzerinden hesaplanarak, analitik yöntemin doğruluk çalışmasının gerçekleştirilmesinde kullanılır.

2.6. İstatistiksel Testler

Hipotez testi içeren araştırmalarda en çok kullanan testlerden birisi de t-testi'dir. Sayısal değişkenlerin ya da grupların arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olup olmadığını anlamak, ya da tespit edilen ortalama değer in öngörülen değerden farklı olup olmadığını tespit etmek için kullanılmaktadır. t testinin birden çok çeşidi bulunmaktadır ve doğru veri yapısına uygun testi seçmek oldukça önemlidir.

Bağımsız örneklem t-testi (Independent two samples t-test)

Birbirinden bağımsız iki örneklemin birbirinden farklı ortalamalara sahip olup olmadığını anlamak için uygulanır. Burada kritik olan nokta gruplara dahil olma şartının incelenen değişkenden tamamen bağımsız olmasıdır. Başka bir ifadeyle karşılaştırılan iki grup ya da iki örneklem birbiriyle ilişkili olmamalıdır.

Bağımlı (Eşleştirilmiş) örneklem t-testi (two sample paired t-test)

Aynı denek birden fazla teste tabi tutulduğu durumda, ilk örnek ile sonraki örneklerin karşılaştırılması için kullanılmaktadır. Örneğin bir tedavi süreci başlamadan önce kilosu ölçülen hastaların tedavi bitiminde ölçülen kilosu ile karşılaştırılması için bu test uygulanır. Bağımsız örneklem testinden farkı, önce ve sonra değerlerinin her denek için eşleştirilerek, aradaki farkın tüm örneklem için istatistiksel açıdan farklı olup olmadığının araştırılmasıdır. İki farklı normal dağılımdan alınmış iki farklı örneklem olduğu düşünülmez. Tek bir normal dağılımdan elde edilen bir örneklem test edilir.

Bağımsız tek örneklem t-testi (one sample t-test)

Önceden ortalaması bilinen bir dağılım ile elimizdeki örneklemin karşılaştırılması amacıyla uygulanır. Bununla birlikte elde edilen örneklemin varsayılan bir dağılımdan fark gösterip göstermediğini anlamak için de kullanılmaktadır [74].

İki varyans arasındaki farkı tespit etmek için F testi kullanılır. İki normal dağılıma sahip popülasyondan iki bağımsız örneklem seçtiğimizde S_1^2/S_2^2 varyanslarının dağılımı, F dağılımını oluşturur. Varyanslar içinde büyük olan her zaman paya yazılır [75].

2.7. Etofenamat, Benzil Nikotinat, Benzil Alkol, Benzaldehit, Flufenamik Asit Tayini

Dong ve arkadaşları [76], benzaldehiti N-asetilhidrazin akridon ile türevlendirdikten sonra floresans dedektörlü HPLC ile tayin etmişlerdir. Katalist olarak trikloroasetik asit kullanılmış ve optimum türevlendirme 40 °C'de 30 dakikada yapılmıştır. Ters faz SB-C18 analitik kolonda gradient elüsyon ile ayrılan benzaldehit türevinin 371 nm uyarma, 421 nm emisyon dalga boyunda floresans şiddeti ölçülmüştür. Benzaldehit için doğrusal derişim

aralığı 0,003 – 5 nmol/mL olup geliştirilen yöntem insan serumunda semikarbazit duyarlı amin oksidaz aktivite tayininde kullanılmıştır.

Gümüştas ve arkadaşları [77], sıçan derisi üzerinden etofenamat tayini ve stabilite çalışması için seçiciliği ve güvenilirliği yüksek ters faz HPLC (RP-HPLC) yöntemi geliştirip valide etmişlerdir. Bu amaçla, en iyi rezolüsyon sağladıkları XSelect HSS T3 XP (150 mm × 4.6 mm 2.5µm) analitik kolonda 45°C kolon sıcaklığında hareketli faz olarak %0.1 H₃PO₄ (pH 7.0):asetonitril (40:60, h/h) karışımı kullanılmış ve etofenamat 10 µL enjeksiyon hacminde 1.0 mL/dakika akış hızında 285 nm dalga boyunda tayin edilmiştir.

Masoumi ve arkadaşları [78], bazı enjektabl farmasötik formülasyonlarda eser miktarda bulunan benzaldehiti çok duvarlı polianilin karbon nanotüp kompozit fiber kullanarak katı faz mikroekstraksiyon işleminin ardından gaz kromatografi ile tayin etmişlerdir. Sıcaklık (60°C), süre (15 dakika) ve karıştırma hızı (700 rpm) mikroekstraksiyon parametreleri optimize edilmiş ve bu koşullarda doğrusal derişim aralığı 25-100 ng/mL olarak bulunmuştur. Bağlı standart sapma sonuçları % 1.0 – 6.8 arasında olup tayin ve teşhis sınırı sırasıyla 25 ve 10 ng/mL olarak hesaplanmıştır.

Shetti ve arkadaşları [79], grafen oksiti karbon macun matriksi ile karıştırarak flufenamik asit tayini için sensör görevi görecekt grafen oksit modifiye karbon elektrot tasarlamışlardır. Flufenamik asit, grafen oksit modifiye karbon elektrod yüzeyinde pH 4,2’de zenginleştirilmiş, duyarlılık, rezolüsyon ve seçicilik parametreleri çalışılmıştır. Geliştirilen elektrod ile flufenamik asit doğrusal derişim aralığı 0,001-0,09 µM ve teşhis sınırı 5,0 nM olarak bulunmuştur. Kimyasal olarak modifiye edilen elektrot idrar numunelerinde flufenamik asit tayini için kullanılmıştır.

Darwish ve arkadaşları [80], krem formülasyonundaki farmasötik bir üründe betametazon dipropiyonat, klotrimazol ve benzil alkolün eşzamanlı tayininde 3 farklı kemometrik yöntem (temel bileşen regresyonu, kısmi en küçük kareler, yapay sinir ağları) kullanmışlardır. Modelleme yapılandırması için çok seviyeli çoklu faktör deneysel dizaynı adapte edilmiştir. Tasarlanan modellerin tahmin gücünü değerlendirmek için üç farklı analitin farklı derişimlerde 12 çözeltisi hazırlanmıştır. Metanol içerisinde hazırlanan standart ve numune çözeltilerinin UV/VIS spektrofotometre ile absorbans ölçümleri yapılmıştır.

Peraman ve arkadaşları [81], yeni ilaç başvuruları sırasında analitik yöntem geliştirme çalışmalarının Amerika Gıda ve İlaç Dairesi'nin (Food and Drug Administration, FDA) güncel ruhsatlandırma gerekliliklerine uyum sağlaması açısından tasarımıyla kalite (QbD) yaklaşımını gerçekleştirmek amacıyla etofenamat dozaj formları için RP-HPLC yöntemi geliştirip, farklı laboratuvarlarda valide etmişlerdir. HPLC cihazında optimizasyon çalışmaları sonrasında metanol : %0,2 trietilamin çözelti karışımı (85: 15, h/h) (pH 6,5) hareketli faz olarak seçilmiş, analitik kolon olarak Qualisil Gold C18 (250 mm × 4,6 mm 5 µm) kullanılmış ve 20 µL enjeksiyon hacminde 1,2 mL/dakika akış hızında hareketli faz içinde hazırlanan standart ve numuneler fotodiyot dizisi dedektör ile 286 nm'de tayin edilmiştir.

Vandersee ve arkadaşları [82], topikal ilaç ve kozmetiklerin transdermal penetrasyon yollarını daha iyi anlamak için 6 erkek gönüllü üzerinde çalışmışlar ve vazoaaktif bir madde olan benzil nikotinatın hem açık hem de kıl folikülleri ile örtülü olan bölgelere topikal olarak uygulanması sonrası deneklerin kan akışındaki değişiklikleri lazer dopler flovmetri tekniği ile ölçmüşlerdir.

Muhammadi ve arkadaşları [83], enjektabl farmasötik formülasyonlarda eser miktarda bulunan benzaldehiti, katı faz mikroekstraksiyon işleminin ardından alev iyonlaşma dedektörlü gaz kromatografi ile tayin edip yöntemi valide etmişlerdir. Polianilin dönüşümlü voltametri ile platin tel elektrot üzerinde biriktirilmiş, ekstraksiyon ve desorpsiyon zamanları, sıcaklık, tuz etkisi ve gaz kromatografi parametreleri optimize edilmiştir. Geliştirilen yöntem uygun koşullarda 50-800 ng/mL derişim aralığında doğrusal olup bağıl standart sapma sonuçları % 0,75 – 8,64 arasındadır. Tayin ve teşhis sınırı ise sırasıyla 50 ve 16 ng/mL'dir.

Haddadi ve arkadaşları [84], enjektabl formülasyon çözeltilerinde benzaldehit tayini için katı faz ekstraksiyonun ardından dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyon tekniği ile yeni bir analitik yöntem geliştirmişlerdir. Numunelerden benzaldehitin katı faz ekstraksiyonu C-18 sorbent ile gerçekleştirilmiş ve asetonitril ile sorbentten elüe edilen benzaldehit çözeltisine dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyon işlemi uygulanarak HPLC ile tayin edilmiştir. Optimum koşullar altında benzaldehit kalibrasyon grafiğinin doğrusal derişim aralığı 0,5 – 500 µg/L, teşhis limiti 0,08 µg/L ve 4 ardışık ölçüm için bağıl standart sapma % 5,8'dir.

Peraman ve arkadaşları [85], etofenamat stabilite çalışmasında etofenamat ve bozunma ürünlerinin tayini için RP-HPLC yöntemi geliştirip valide etmişlerdir. Etofenamat asidik, bazik, ısı, ışık ve peroksit bozulmalarına maruz bırakılarak, oluşan bozulma ürünleri 20 µL enjeksiyon hacminde 1.0 mL/dakika hareketli faz akış hızında HPLC fotodiyot dizisi dedektör ile 286 nm’de tayin edilmiştir. Etken madde metanol içerisinde çözölmüş, pH 6,0 fosfat tampon çözeltisi ve metanol (20: 80, h/h) karışımı hareketli faz olarak seçilmiş ve sabit faz olarak C18 (250 mm × 4,6 mm 5 µm) Qualisil BDS analitik kolon kullanılmıştır.

Pulgarin ve arkadaşları [86], idrar numunelerinde mefenamik ve flufenamik asitin eşzamanlı tayini için terbiyum duyarlı luminesans yöntemi kullanmışlar ve flufenamik ve mefenamik asit için teşhis sınırlarını sırasıyla 3,73 µg/L ve 14,61 µg/L olarak bulmuşlardır.

Mashayekhi ve arkadaşları [23], non-steroid anti-inflamatuvar ilaçların enjektabl formölasyonlarında bulunan benzil alkolün toksik oksidasyon ürünü olan benzaldehit dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyon sonrası alev iyonlaştırma dedektörlü gaz kromatografi ile tayin etmişlerdir. Ekstraksiyon solventi olarak 43,0 µL 1,2-dikloroetan ve dağıtıcı solvent olarak 1,0 mL asetonitril çözeltisi kullanılmıştır. Yöntemin, benzaldehit tayininde 1,0 – 1000 µg/L derişim aralığında doğrusal olduğu ve teşhis sınırının 0,2 µg/L olduğu bildirilmiştir.

Mbah [87], sulu çözeltilerde $50 \pm 0,2$ °C sıcaklıkta ve 2,0 – 10,0 pH aralığında benzil nikotinat degradasyonunu HPLC kullanarak takip etmiştir. Zorbax SB-CN 150 × 4,6 mm, 3,5 µm analitik kolonunda hareketli faz olarak metanol, su ve asetik asit karışımı (50: 50: 1, h/h/h) kullanılmış ve metanol içerisinde hazırlanan benzil nikotinat 10 µL enjeksiyon hacminde, 1,0 mL/dakika hareketli faz akış hızında 254 nm dalga boyunda tayin edilmiştir.

Parys ve Pyka [88], nikotinik asit ve esterleri; metil nikotinat, etil nikotinat, izopropil nikotinat, butil nikotinat, hekzil nikotinat ve benzil nikotinatın kimyasal kararlılığını araştırmak amacıyla ince tabaka kromatografi (ITK) kullanmışlardır. Nikotinik asit tayini için ITK’de hareketli faz olarak metanol - benzen (50: 50, h/h) kullanılırken esterler için aseton – n-hekzan (40: 60, h/h) hareketli faz olarak seçilmiştir. Etanol içinde çözölen numunelerin 5 µL’si 120 °C’de 30 dakika aktive edilmiş silica jel 60 F₂₅₄ dolgu maddesi ile kaplanmış plakalara enjekte edilerek plakalar 120 °C’de 1, 2, 3, 4, 5, 6 ve 7 saat

ısıtılmış ve hareketli fazlar ile kromatografik ayırım sağlandıktan sonra spektrodansitometrik ölçümler gerçekleştirilmiştir.

Hewala ve arkadaşları [89], farmasötik preparatlarda granisteron hidroklorür, benzil alkol, granisteronun ana bozunma ürünü olan 1-metil-1H-indazol-3-karboksilik asit ve benzil alkolün ana bozunma ürünü benzaldehitin eşzamanlı tayinine olanak sağlayan hızlı ve duyarlı ters faz HPLC yöntemi geliştirip, valide etmişlerdir. İç standart olarak nafazolin hidroklorür kullanılmıştır. Kromatografik ayırma için Hypersil BDS C8 (250 mm × 4,6 mm, 5µm) analitik kolonu (25°C), hareketli faz olarak asetonitril: 0,05M potasyum dihidrojen fosfat: trietilamin (22: 100: 0,15, h/h/h) (pH 4,8) karışımı kullanılmış ve analitler fotodiyot dizisi dedektör ile 210 nm’de tayin edilmiştir.

Sabir [90], bezil alkol, etilen glikol monofenil eter, metil hidroksibenzoat, etil hidroksibenzoat, propil hidroksibenzoat ve butil hidroksibenzoat gibi koruyucu maddelerin eş zamanlı tayinine imkan sağlayan HPLC yöntemi geliştirip, valide etmişlerdir. Metanol içinde çözülen altı analit, fotodiyot dizisi dedektörlü HPLC ile 10 µL enjeksiyon hacminde, 30°C kolon sıcaklığında, C18 (250 mm × 4,0 mm, 5 µm) ters faz kolonu kullanılarak gradient akışta 12 dakikadan az bir sürede ayrılarak 258 nm dalga boyunda tayin edilmiştir. Yöntem ICH rehberine uygun şekilde valide edilmiştir.

Lopez-Florez ve arkadaşları [91], çok yönlü akış yollu optosensörü fotokimyasal olarak indüklenmiş floresans spektrometride flufenamik asit tayinine uygulamışlardır. Flufenamik asit sülfürik asitli ortamda 258 nm dalga boyunda uyarılarak (UV ışığa maruz bırakılarak) güçlü floresant özelliğe sahip foto-ürün oluşturulmuş, C18 silikajel üzerinde oluşan foto-ürünün 442 nm dalga boyunda yaptığı emisyon şiddeti ölçülmüştür. Algılama bölgesi H₂SO₄/MeOH çözeltisi ile rejenere edilmiştir. Yöntemin serum, idrar ve farmasötik numunelerde ön hazırlık işlemi gerektirmeden flufenamik asit tayini için kullanılabileceği gösterilmiştir.

Rizk ve arkadaşları [92], enjektabl formülayonlarda piroksikam ve benzil alkolü dördüncü derece türev spektrofotometri (UV-VIS Spectrophotometer) ile tayin etmişlerdir. Standart ve numunelerin hazırlanmasında çözücüsü olarak metanol kullanılmış ve yöntemin 2-100 µg/mL aralığında doğrusal olduğu, teşhis sınırının 0,07 µg/mL olduğu bildirilmiştir.

Patil ve arkadaşları [93], midazolam etken maddesinin enjektabl formülasyonlarında bulunan benzil alkol içeriğini gaz kromatografi ile tayin etmişlerdir. Analizler, Chromosorb HP %5 karbovaks kolon (2 m x 3,6 mm) kullanılarak Gaz Kromatografi - Alev İyonlaşma Dedektörü ile yapılmıştır.

De la Pena ve arkadaşları [94], idrar numunelerinde flufenamik ve meklofenamik asit tayininde paralel faktör analizi uygulayarak ikinci dereceden çok değişkenli kalibrasyon tekniğine dayanan spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir. Misel ortamı kullanılarak hem floresans şiddetinde iyileştirme hem de analitlerin biyolojik ortamdan ayrılmasına olanak sağlanmıştır. Flufenamik asit için doğrusal çalışma aralığı 0,15- 4,00 µg/mL, meklofenamik asit için 0,25- 6,00 µg/mL olup standart ekleme yöntemi ile ikinci dereceden kalibrasyon metodunun kullanımı idrar matrisinden gelen girişim etkisini ortadan kaldırmış ve idrar numunelerinde eş zamanlı flufenamik asit ve meklofenamik asit tayini yapmaya imkan sağlamıştır.

Kazemifard ve arkadaşları [95], diklofenak sodyum ve benzil alkolün parenteral formülasyonlarında nörotoksik bir madde olan benzaldehitin kalitatif ve kantitatif tayini için polarografik yöntem geliştirmişlerdir. Ag-AgCl referans elektrod kullanılarak Britton – Robinson tampon (pH 9,15) içerisinde -1,39 voltta, 0,1M LiCl çözeltisi içerisinde ise -1,41 voltta diferansiyel puls tespit edilmiştir. İndirgeme basamağı benzil alkol oluşumuna karşılık gelen 2-elektron prosesini içerir. Dönüşümlü voltamogramın anodik kısmında herhangi bir pik gözlenmemiştir. Teşhis limiti 10 ng/mL, tayin limiti 30 ng/mL ve doğrusal aralık 50 mg/mL olarak bulunmuştur.

Bender ve arkadaşları [96], bel ağrısı ve diz sinoviti rahatsızlığı olan hastalarda iyontoforez tedavisinin ardından serum ve eklem sıvılarındaki etofenamat miktarını UV dedektörlü HPLC ile tayin etmişlerdir. Numuneleri çözmek için asetonitril: metanol (1: 1, h/h) karışımı kullanılmış, santifüj işleminin ardından elde edilen kalıntı distile su ile çözülerek Nucleosil 100-7, C18 (250 mm × 4,0 mm, Macherey-Nagel) analitik kolonda metanol: su: asetik asit (77: 33: 0,1, h/h/h) hareketli fazı ile ayrılmış ve 286 nm dalga boyunda etofenamat miktar tayini yapılmıştır.

Abdel Hamid ve arkadaşları [97], diklofenak sodyum, flufenamik asit, indometasin ve ketoprofeni kütle dedektörlü yüksek performanslı sıvı kromatografi ile tayin etmişlerdir.

Analitler Shim-pack GLC-CN kolonda asetonyitril: 20 mM amonyum asetat çözeltisinin (5:1, h/h) hareketli faz (1 ml/dk akış hızı) olarak kullanıldığı kütle dedektörünün tek iyon izleme modunda tayin edilmiştir. Kalibrasyon eğrisi flufenamik asit ve diklofenak sodyum için 50-300 ng/mL, ketoprofen ve indometasin için 100-500 ng/mL derişim aralığında doğrusal olup teşhis sınırı 0,5 – 4,0 ng arasında bulunmuştur.

Beckerman ve arkadaşları [98], 12 gönüllü hasta üzerinde yağlı çözelti içerisindeki farklı etofenamat dozlarının kas içine uygulanmasının ardından plazmadaki etofenamat, flufenamik asit ve fenamat miktar tayinlerini Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatogtafi (HPTLC) ile gerçekleştirmişlerdir.

Dannhardt ve arkadaşları [17], plazma ve dokularda etofenamat ve metaboliti flufenamik asiti HPLC ile tayin etmişlerdir. Dimetil sülfoksit içinde hazırlanan etofenamat ve flufenamik asit kana eklenmiş ve asetonyitril/metanol (1: 1, h/h) karışımı ilavesinden sonra santrijüj edilmiştir. Santrifüj sonrası supernatant su ile seyreltilip oktadesil ters faz ekstraksiyon kolonundan (6 mL; Baker no. 70206) geçirildikten sonra metanol: su: 1g/L EDTA (2: 1: 1, h/h/h) ile yıkanarak elue edilmiştir. Eluantın 2 mL'si Nucleosil 7 C18 (250 mm × 4,0 mm) analitik kolona enjekte edilerek 1,0 mL/dakika akış hızında 286 nm dalga boyunda tayin edilmiş ve etofenamatın flufenamik asite dönüşmediği gözlenmiştir.

Dell ve arkadaşları [99], biyolojik numunelerde etofenamatın gaz – sıvı kromatografi ile tayininde etofenamat benzil eteri iç standart olarak kullanmışlardır. Gaz kromatografi ile analizden önce idrar numuneleri ekstraksiyon ve ön-deriştirme işlemlerine tabi tutulmuş, plazma ve organ homejenatlarına ise ince tabaka kromatografi (ITK) ile ön-saflaştırma işlemi uygulanmıştır. Ayrıca iltihaplı ve iltihapsız sıçan patilerinde gaz – sıvı kromatografi ile etofenamat tayini gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçların ITK/florensans ölçüm sonuçları ile örtüştüğü görülmüştür.

Dell ve arkadaşları [100], biyolojik numunelerde etofenamat tayininde ayırma işlemi için ince tabaka kromatografi kullanmışlardır. Etofenamatın nicel tayini metaboliti olan flufenamik aside dönüştürülerek gerçekleştirilmiş ve CCl₄/trikloroasetik asit içerisinde 372 nm'de uyarılarak, 445 nm emisyon dalga boyunda florimetrik ölçümler yapılmıştır. Etofenamat ITK, türleme, UV ve floresans spektrometri ile teşhis edilmiş ve metabolitlerinden ayırt edilmiştir.

3. YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar

Shimadzu LC-2010A HT HPLC cihazı

Thermo MOS-1 Hypersil C8 (125 mm × 4,6 mm × 5µm) kolon

UV-görünür bölge spektrometresi (Hewlett Packard 8453 diode array spektrometre)

pH metre (Metrohm 780)

Metanol (J.T.Baker - HPLC grade-min. %99,8)

Asetonitril (J.T.Baker – Far UV / HPLC grade - min.%99,8)

KH₂PO₄ (J.T.Baker – min. %99)

CH₃COONa susuz (Merck – Emsure® ACS, Reag. Ph Eur - min.%99,0)

Orto H₃PO₄ %85 (Merck – Emprove® Essential Ph Eur, BP, JPE, NF, E338 - %85,0 – 85,7)

KOH pellet (Merck – Emprove® exp Ph Eur, BP, JP, NF, FCC, E525 – min. %85,0)

CH₃COOH susuz (Merck – Emsure® ACS, ISO, Reag. Ph Eur – min. %99,8)

2-propanol (Merck - Emsure® ACS, ISO, Reag. Ph Eur – min. %99,8)

3.2. Hareketli Faz, Plasebo ve Standart Analit Çözeltilerinin Hazırlanması

3.2.1. Tampon, asit ve baz çözeltileri

pH 3,5 fosfat tampon çözeltisinin hazırlanmasında 1,36 g KH₂PO₄ tartılıp deiyonize suda çözüldükten sonra 0,1 M H₃PO₄ çözeltisi pH 3,5'e kadar damla damla ilave edildi ve hacim 1000 mL'ye deiyonize su ile tamamlandı. pH ölçümleri Metrohm 780 model pH metre ile gerçekleştirildi.

10 mM KH₂PO₄ çözeltisinin (pH 4,7) hazırlanmasında 1,36 g KH₂PO₄ tartılıp deiyonize suda çözüldükten sonra hacim 1000 mL'ye deiyonize su ile tamamlandı. pH ölçümleri Metrohm 780 model pH metre ile gerçekleştirildi.

pH 7,0 fosfat tampon çözeltisinin hazırlanmasında 1,36 g KH₂PO₄ tartılıp deiyonize suda çözüldükten sonra 0,1 M KOH çözeltisi pH 7,0'e kadar damla damla ilave edildi ve hacim 1000 mL'ye deiyonize su ile tamamlandı. pH ölçümleri Metrohm 780 model pH metre ile gerçekleştirildi.

pH 4,0 asetat tampon çözeltisi hazırlamak için 0,82 g CH_3COONa tartılıp deiyonize suda çözüldükten sonra 0,1 M CH_3COOH çözeltisi pH 4,0'e kadar damla damla ilave edildi ve hacim 1000 mL'ye deiyonize su ile tamamlandı. pH ölçümleri Metrohm 780 model pH metre ile gerçekleştirildi.

pH 5,0 asetat tampon çözeltisi hazırlamak için 0,82 g CH_3COONa tartılıp deiyonize suda çözüldükten sonra 0,1 M CH_3COOH çözeltisi pH 5,0'e kadar damla damla ilave edildi ve hacim 1000 mL'ye deiyonize su ile tamamlandı. pH ölçümleri Metrohm 780 model pH metre ile gerçekleştirildi.

10 mM CH_3COONa (pH 7,4) çözeltisi hazırlamak için 0,82 g CH_3COONa tartılıp deiyonize suda çözüldükten sonra hacim 1000 mL'ye deiyonize su ile tamamlandı. pH ölçümleri Metrohm 780 model pH metre ile gerçekleştirildi.

3.2.2. Plasebo

Susuz sitrik asit, trisodyum sitrat, metil 2-hidroksietil selüloz, izopropil miristat, polioksietilen 100 stearat, gliserol monostearat yardımcı maddeleri ve sıcak deiyonize su kullanılarak krem plasebosu hazırlandı.

3.2.3. Standart analit çözeltileri

Validasyon parametrelerinden doğruluk ve kesinlik çalışmalarında kullanılacak standart çözeltiler ve sentetik numune çözeltileri aşağıda açıklanan şekilde hazırlanmıştır. Kesinlik çalışmasında kullanılacak çözelti %100 derişim seviyesinde hazırlanan sentetik numune çözeltisi olup bu çözelti limit derişimde (%1,0) safsızlıkları içeren numune çözeltisidir.

Standart çözelti 1: 1200 mg etofenamat, 180 mg benzil alkol ve 120 mg benzil nikotinat tartılıp metanolde çözüldükten sonra balonjojede metanol ile 100 mL'ye tamamlandı.

Standart çözelti 2: 12 mg etofenamat miristat, 12 mg etofenamat palmitat ve 12 mg etofenamat stearat tartılıp metanolde çözüldükten sonra balonjojede metanol ile 100 mL'ye tamamlandı.

Standart çözelti 3: 18 mg benzaldehit tartılarak metanolde çözülüp balonjojede metanol ile 100 mL'ye tamamlandıktan sonra bu çözeltinin 10 mL'si metanol ile 100 mL'ye seyreltildi.

Standart çözelti 4: 12 mg flufenamik asit, 12 mg dekarboksil, 12 mg dietilen glikol diflufenamat ve 12 mg flufenamik asit bütilester tartılıp metanolde çözüldükten sonra balonjojede metanol ile 100 mL'ye tamamlandı.

11 analiti içeren standart analit karışımı: Standart çözelti 1,2,3,4'ün her birinden 10'ar mL alınıp hacim 100 mL'ye metanol ile tamamlandı.

%80 derişim seviyesinde sentetik numune çözeltisi: 1,2 g plasebo tartılıp metanolde çözüldükten sonra standart çözelti 1,2,3,4'ün her birinden 8'er mL eklenip hacim 100 mL'ye metanol ile tamamlandı. 0,45µm filtreden süzöldü.

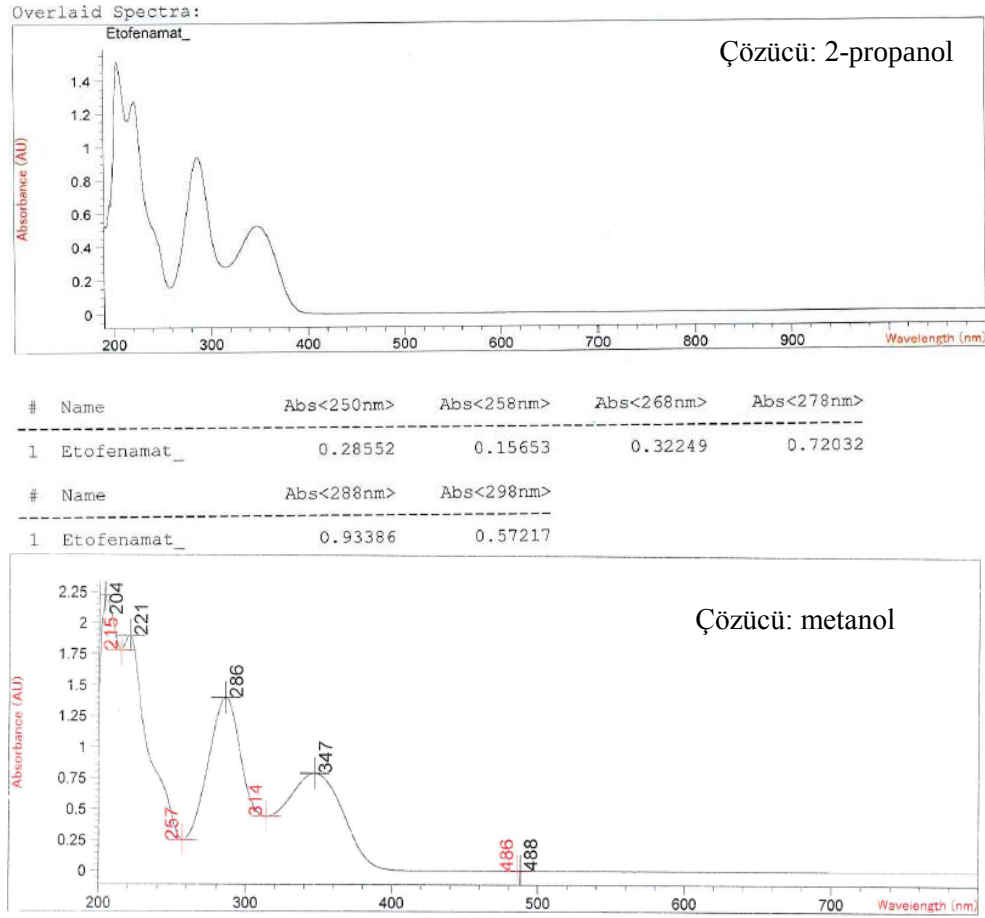
%100 derişim seviyesinde sentetik numune çözeltisi: 1,2 g plasebo tartılıp metanolde çözüldükten sonra standart çözelti 1,2,3,4'ün her birinden 10'ar mL eklenip hacim 100 mL'ye metanol ile tamamlandı. 0,45µm filtreden süzöldü.

%120 derişim seviyesinde sentetik numune çözeltisi: 1,2 g plasebo tartılıp metanolde çözüldükten sonra standart çözelti 1,2,3,4'ün her birinden 12'sher mL eklenip hacim 100 mL'ye metanol ile tamamlandı. 0,45µm filtreden süzöldü.

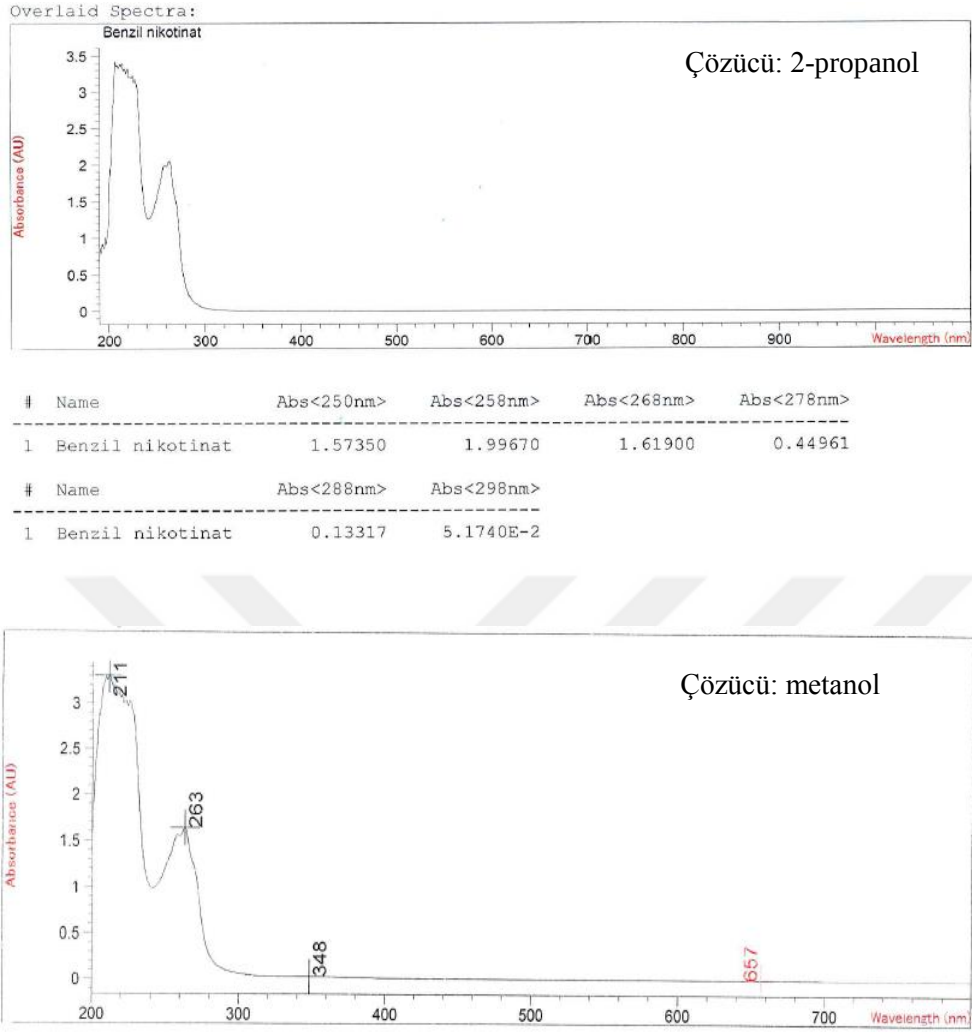
Ticari krem numune çözeltisi: 1,2 g ticari krem numunesi tartılıp metanolde çözüldükten sonra balonjojede metanol ile 100 mL'ye tamamlandı. 0,45µm filtreden süzöldü.

3.3. Etken Madde, Koruyucu, Safsızlık ve Yağ Asitlerinin UV-Görünür Bölge Spektrumları

Etofenamat, benzil nikotinat, benzil alkol, etofenamat miristat, etofenamat palmitat, etofenamat stearat, benzaldehit, flufenamik asit, dekarboksil, dietilen glikol diflufenamat ve flufenamik asit bütilester standartlarının her biri ayrı ayrı 2-propanol ve metanol içerisinde çözülerak 200-900 nm dalga boyu aralığında Hewlett Packard 8453 diode array spektrometre ile spektrumları alınmış ve standart çözeltilere ait UV-görünür bölge spektrumları sırasıyla Şekil 3.1.(a-k)'da gösterilmiştir.

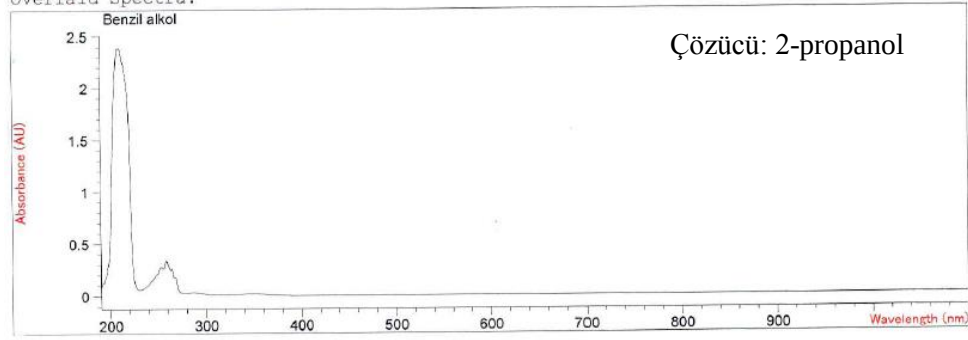


Şekil 3.1.a. Etofenamat (0,024 mg/mL) UV-görünür bölge spektrumu



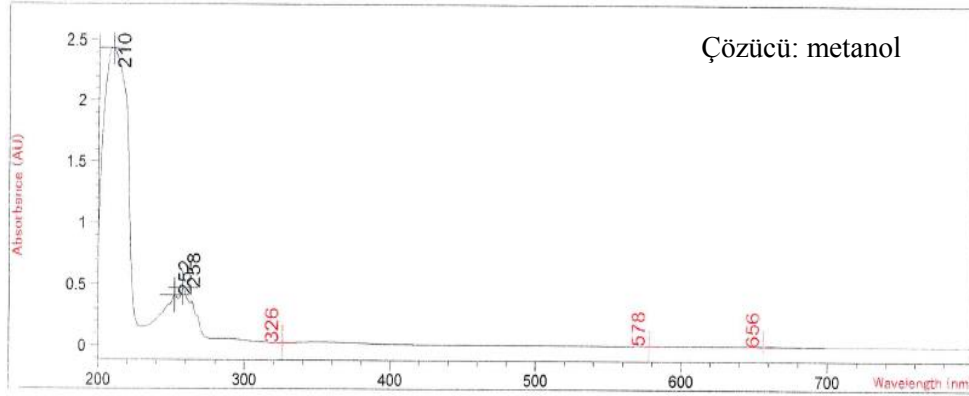
Şekil 3.1. (devam) **b.** Benzil nikotinat (0,12 mg/mL) UV- görünür bölge spektrumu

Overlaid Spectra:

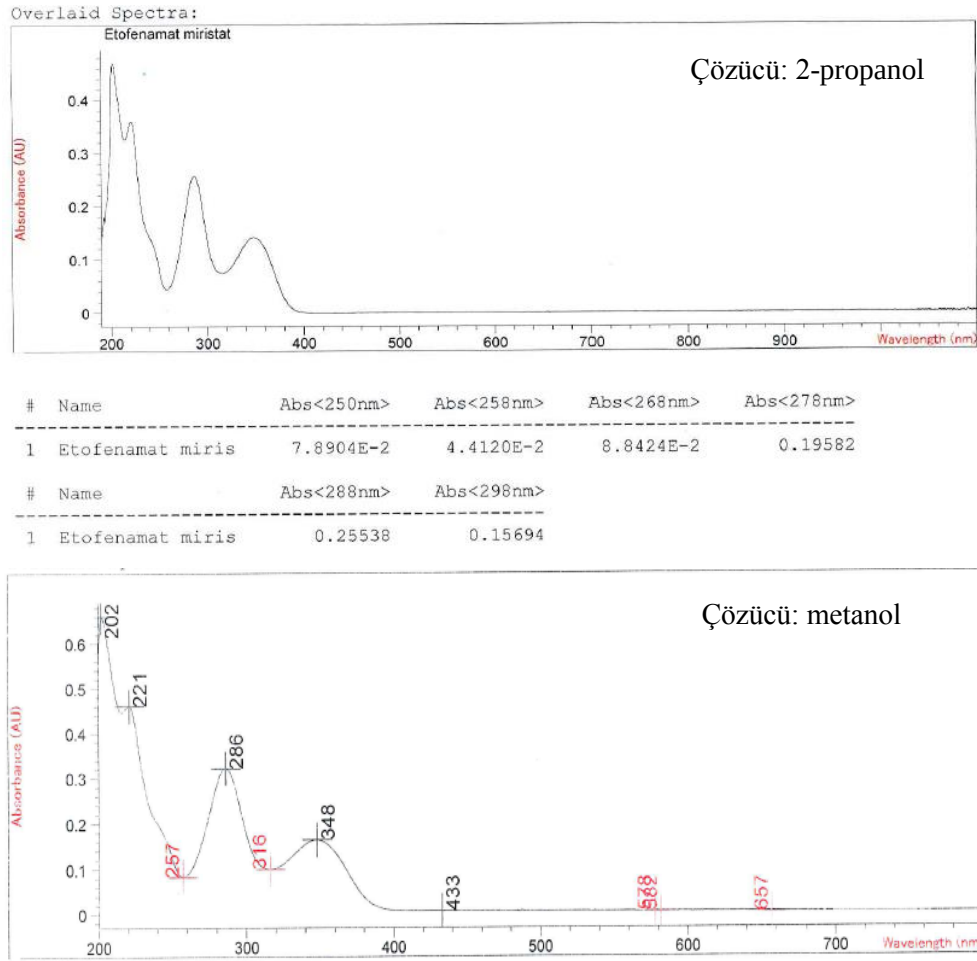


#	Name	Abs<250nm>	Abs<258nm>	Abs<268nm>	Abs<278nm>
1	Benzil alkol	0.22097	0.34023	0.18127	2.6760E-2

#	Name	Abs<288nm>	Abs<298nm>
1	Benzil alkol	3.2865E-2	1.9920E-2

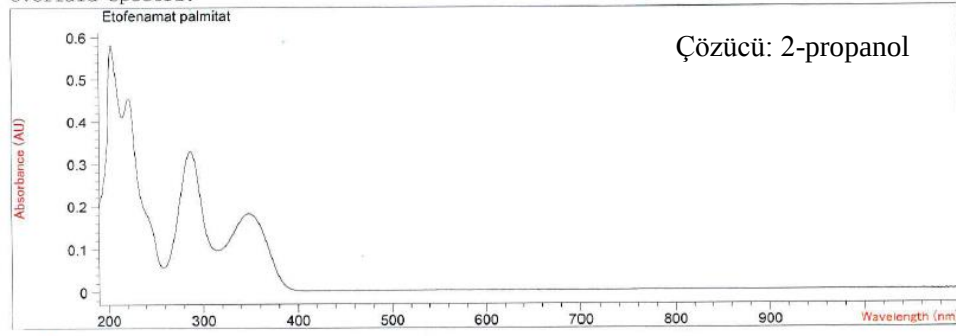


Şekil 3.1. (devam) c. Benzil alkol (0,18 mg/mL) UV- görünür bölge spektrumu



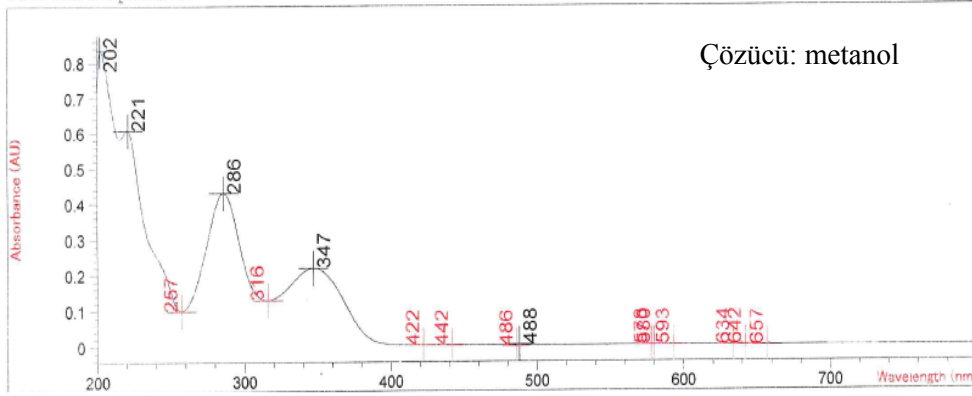
Şekil 3.1. (devam) d. Etofenamat miristat (0,012 mg/mL) UV- görünür bölge spektrumu

Overlaid Spectra:

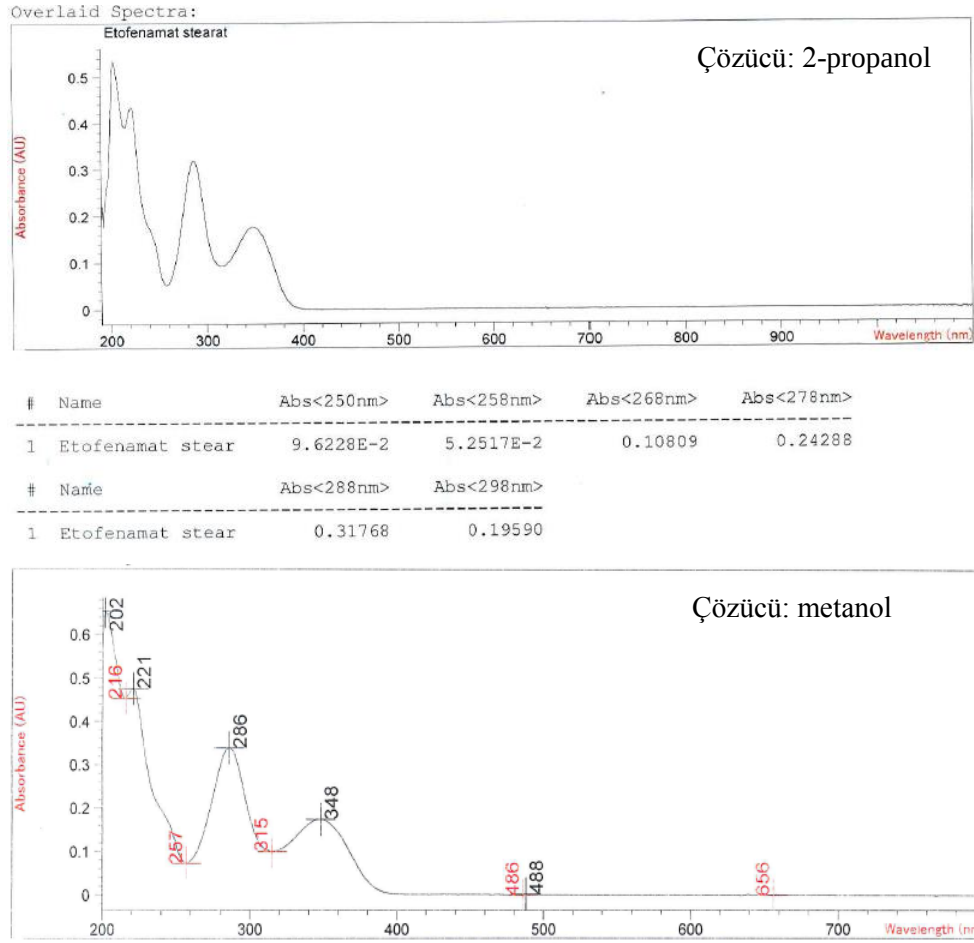


#	Name	Abs<250nm>	Abs<258nm>	Abs<268nm>	Abs<278nm>
1	Etofenamat palmi	0.10223	5.6785E-2	0.11333	0.25185

#	Name	Abs<288nm>	Abs<298nm>
1	Etofenamat palmi	0.32872	0.20288

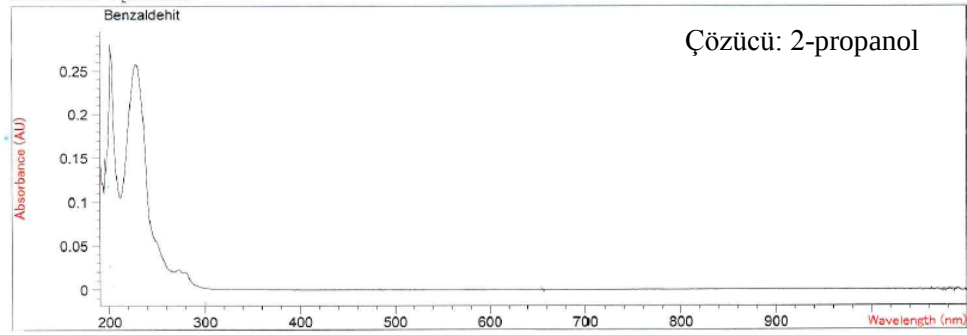


Şekil 3.1. (devam) e. Etofenamat palmitat (0,012 mg/mL) UV- görünür bölge spektrumu



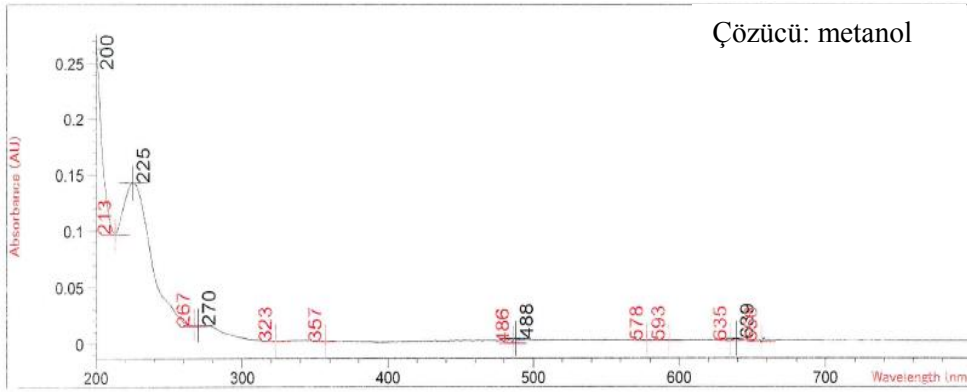
Şekil 3.1. (devam) f. Etofenamat stearat (0,012 mg/mL) UV- görünür bölge spektrumu

Overlaid Spectra:



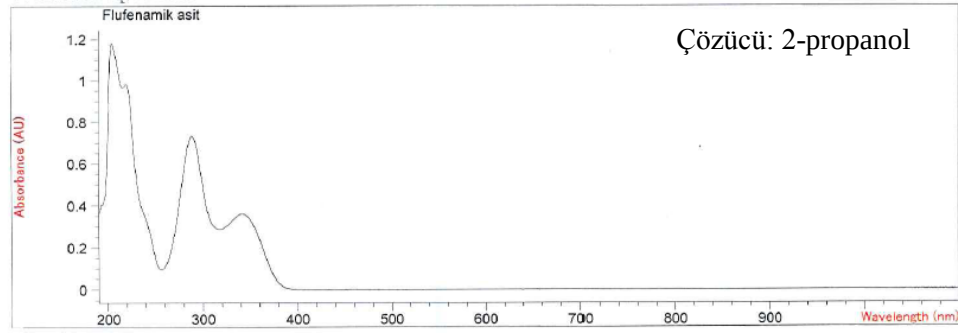
#	Name	Abs<250nm>	Abs<258nm>	Abs<268nm>	Abs<278nm>
1	Benzaldehit	5.2097E-2	2.9557E-2	2.0320E-2	1.9341E-2

#	Name	Abs<288nm>	Abs<298nm>
1	Benzaldehit	6.2523E-3	2.2283E-3



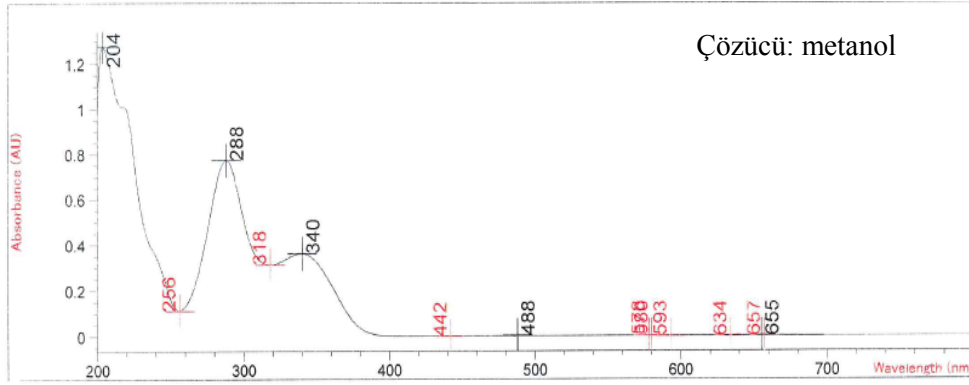
Şekil 3.1. (devam) **g.** Benzaldehit (0,0018 mg/mL) UV- görünür bölge spektrumu

Overlaid Spectra:

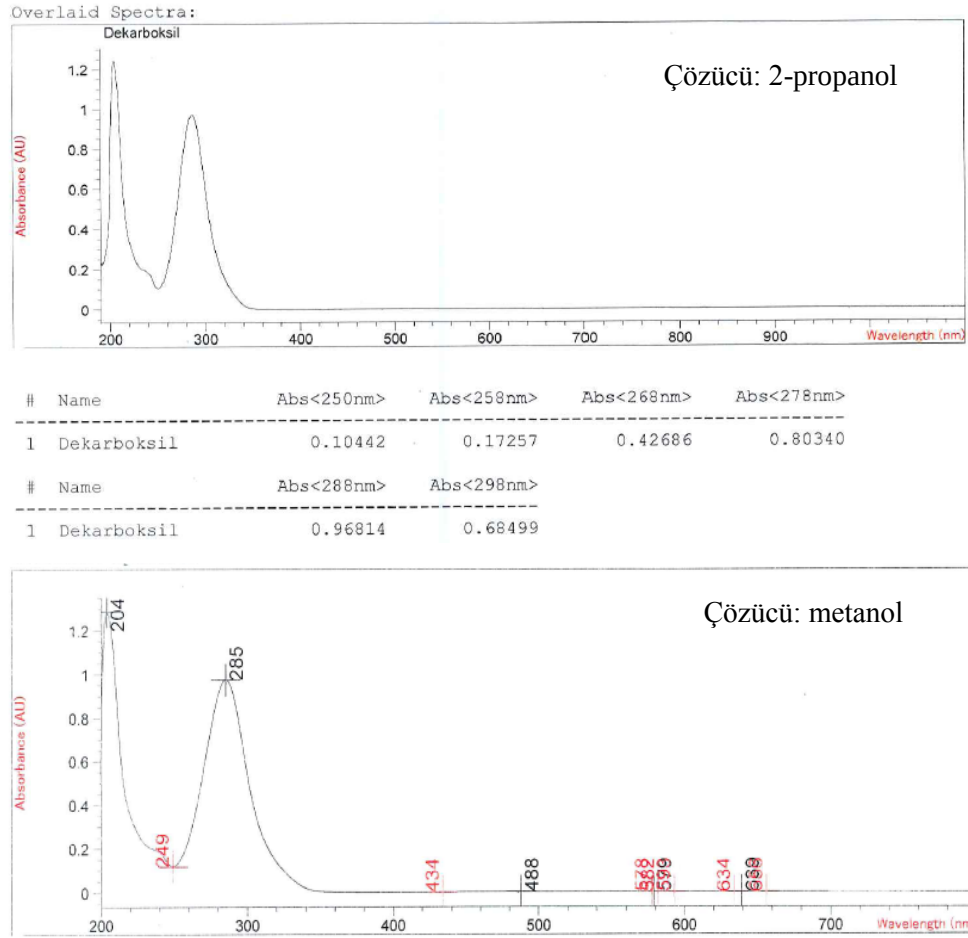


#	Name	Abs<250nm>	Abs<258nm>	Abs<268nm>	Abs<278nm>
1	Flufenamik asit	0.14137	9.9490E-2	0.22212	0.51100

#	Name	Abs<288nm>	Abs<298nm>
1	Flufenamik asit	0.73304	0.54151

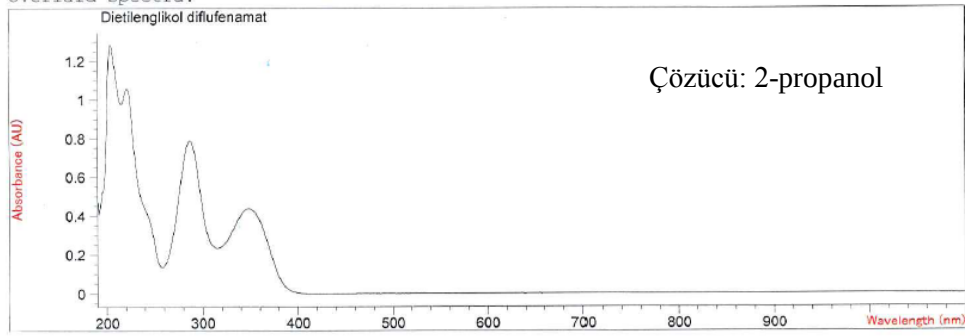


Şekil 3.1. (devam) **h.** Flufenamik asit (0,012 mg/mL) UV- görünür bölge spektrumu



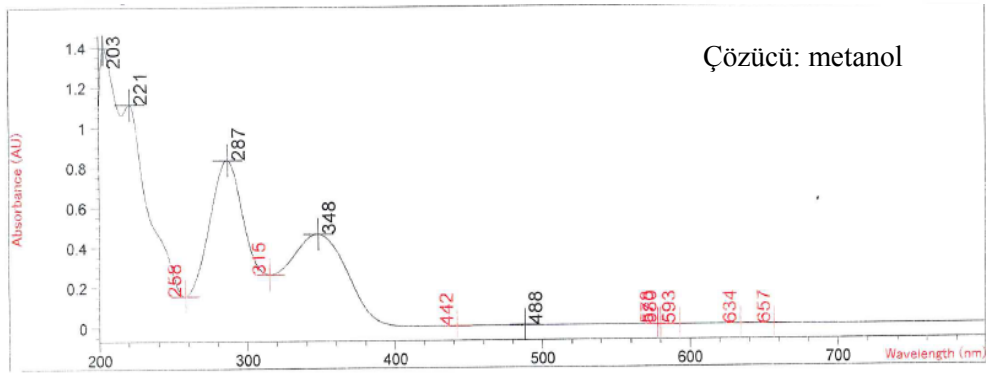
Şekil 3.1. (devam) i. Dekarboksil (0,012 mg/mL) UV- görünür bölge spektrumu

Overlaid Spectra:

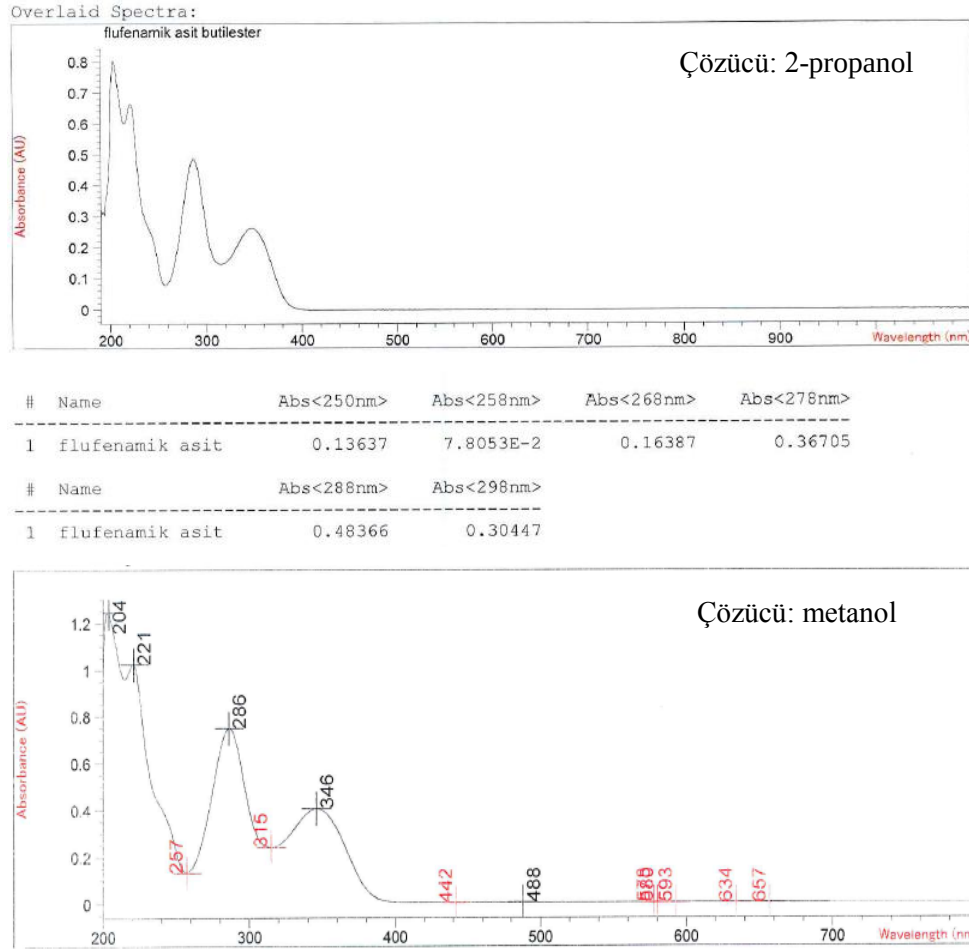


#	Name	Abs<250nm>	Abs<258nm>	Abs<268nm>	Abs<278nm>
1	Dietilenglikol d	0.24612	0.13551	0.26751	0.59686

#	Name	Abs<288nm>	Abs<298nm>
1	Dietilenglikol d	0.78518	0.50295



Şekil 3.1. (devam) j. Dietilenglikol diflufenamat (0,012 mg/mL) UV-görünür bölge spektrumu



Şekil 3.1. (devam) **k.** Flufenamik asit butilester (0,012 mg/mL) UV- görünür bölge spektrumu

Çözücü olarak metanol kullanıldığında daha yüksek duyarlık elde edildiğinden (Şekil 3.1.a-k) ve ekonomik olduğundan çalışmaların devamında çözücü olarak metanol kullanıldı.

Farmasötik preparatlarda etken madde yanında formülasyondaki koruyucu ve safsızlıkların miktarları düşük olduğundan, HPLC ile tek dalga boyunda eş zamanlı olarak etken madde ve safsızlıkların tayinleri duyarlık açısından zordur. Eş zamanlı ve duyarlı tayin için çok kanallı fotodiyot serili dedektör (PDA), yük enjeksiyon düzenekli dedektör (CID), yük eşleşmiş düzenekli dedektör (CCD) ve yük aktarım dedektörleri (CTD) kullanılabilir. Böylece analitlerin tüm spektrumları hakkında bilgi toplanırken her analit için en duyarlı dalga boyunda eş zamanlı analiz imkânı elde edilir. Çok kanallı dedektörün bulunmadığı HPLC/UV-görünür bölge dedektörlü cihazımızda, benzil nikotinat, benzil alkol, benzaldehit en yüksek absorbansın elde edildiği 258 nm dalga boyunda tayin edilirken, analiz sırasında dalga boyu değiştirilerek farmasötik preparatlarda daha düşük derişimdeki etofenamat miristat, etofenamat palmitat,

etofenamat stearat tayini 286 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. Duyarlılık problemi olmayan flufenamik asit, dekarboksil, dietilen glikol diflufenamat ve flufenamik asit butilester 258 nm dalga boyunda tayin edilmiştir. Etofenamat için en duyarlı dalga boyu 286 nm olup, farmasötik preparat içindeki miktarı fazla olduğundan Beer yasasından sapmamak için daha duyarsız olan 258 nm dalga boyunda tayin edilmiştir.

3.4. Etken Madde, Koruyucu, Safsızlık ve Yağ Asitlerinin Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografi (HPLC) ile Analizinde Hareketli Faz Seçimi ve Gradient Akış Programı

Etken madde (etofenamat, benzil nikotinat), koruyucu (benzil alkol), safsızlık (benzaldehit, flufenamik asit, dekarboksil, dietilenglikol diflufenamat, flufenamik asit bütilester) ve yağ asitlerinin (etofenamat miristat, etofenamat palmitat, etofenamat stearat) tayini 10 µL enjeksiyon hacminde, Shimadzu LC-2010A HT HPLC cihazında Thermo MOS-1 Hypersil (125 mm × 4,6 mm × 5 µm) kolon ile 2,0 mL/dak hareketli faz akış hızında, gradient akış programında (Çizelge 3.1), 40°C kolon sıcaklığında ve 258 nm ile 286 nm dalga boylarında gerçekleştirilmiştir.

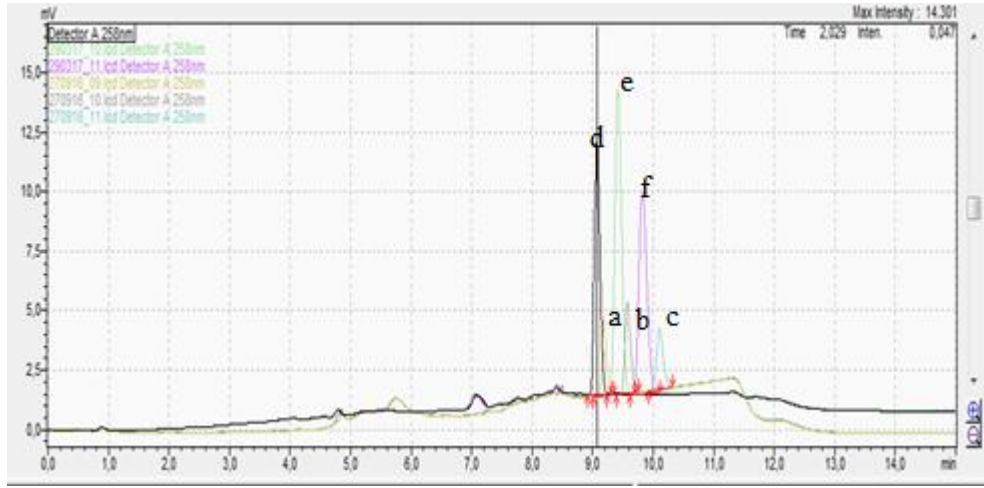
Sıvı kromatografide alıkonma faktörünü (k) değiştirerek kolon ayırma gücünü iyileştirmek için hareketli faz olarak fosfat tamponu (pH 3,5, 4,7 ve 7,0): asetonitril ve asetat tamponu (pH 4,0 ve 5,0): metanol farklı gradient akış programlarında denenmiş, 10 mM CH₃COONa (pH 7,4): metanolün Çizelge 3.1'deki gradient akış programında hareketli faz olarak kullanılmasıyla en iyi kromatografik ayırım sağlanmıştır.

Çizelge 3.1. HPLC gradient akış programı

Zaman (dk.)	10 mM Sodyum Asetat (pH 7,4) (%)	Metanol (%)
0	90	10
4	40	60
6	30	70
7	10	90
9,1	10	90
10	10	90
11	90	10
12	90	10
15	90	10

Şekil 3.2'de gradient akışta (Çizelge 3.1) 258 ve 286 nm dalga boylarında etofenamat miristat, etofenamat palmitat ve etofenamat stearatın tekli standartlarına ait üst üste

çakıştırılmış kromatogramlar görülmektedir. Etofenamat miristat, etofenamat palmitat ve etofenamat stearata ait kromatogramların 258 nm ve 286 nm dalga boylarındaki pik alanları dikkate alındığında 286 nm dalga boyunda duyarlılıkta yaklaşık 4 kat artış gözlenmiştir (Çizelge 3.2). Şekil 3.2'ye göre en düşük alıkonma zamanının 9,1 dak, en yüksek alıkonma zamanının 10,1 dak olduğu görülmektedir. 258 nm dalga boyundaki duyarlılıkları 286 nm dalga boyuna göre daha düşük olan etofenamat miristat, etofenamat palmitat ve etofenamat stearat için alıkonma zamanları dikkate alınarak dalga boyu gradienti uygulanması düşünülmüş ve bu amaçla dalga boyu 9. dakikadan 12. dakikaya kadar 286 nm'ye ayarlanmıştır (Çizelge 3.3)



Şekil 3.2. Gradient akışta 258 ve 286 nm dalga boylarında etofenamat miristat, etofenamat palmitat ve etofenamat stearat standartlarına ait çakıştırılmış kromatogramlar a) 9,2. dak etofenamat miristat - 258 nm, b) 9,6. dak etofenamat palmitat - 258 nm, c) 10,1. dak etofenamat stearat - 258 nm, d) 9,1. dak etofenamat miristat - 286 nm, e) 9,5. dak etofenamat palmitat - 286 nm, f) 9,8. dak etofenamat stearat - 286 nm

Çizelge 3.2. Etofenamat miristat, etofenamat palmitat ve etofenamat stearat'a ait kromatogramların pik alanları

	Pik Alanı (258 nm)	Pik Alanı (286 nm)
Etofenamat miristat	16981	68067
Etofenamat palmitat	23972	98125
Etofenamat stearat	19409	78315

Çizelge 3.3. HPLC gradient akış ve gradient dalga boyu programı

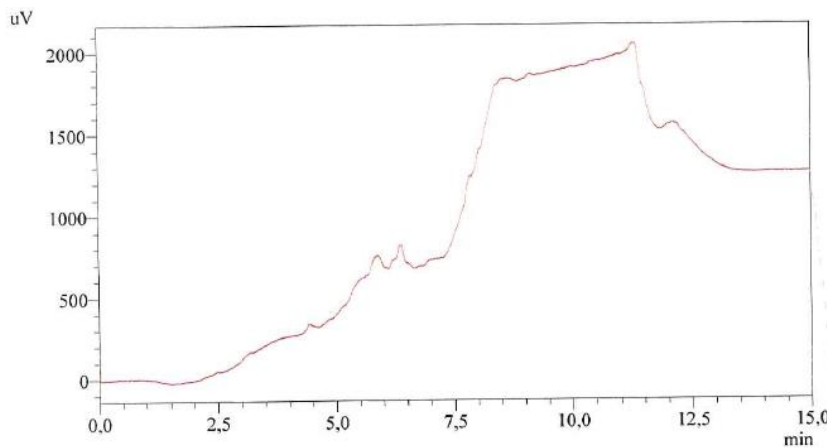
Zaman (dk.)	10 mM Sodyum Asetat (pH 7,4) (%)	Metanol (%)	Dalga boyu (nm)
0	90	10	258
4	40	60	258
6	30	70	258
7	10	90	258
9,1	10	90	286
10	10	90	286
11	90	10	286
12	90	10	258
15	90	10	258



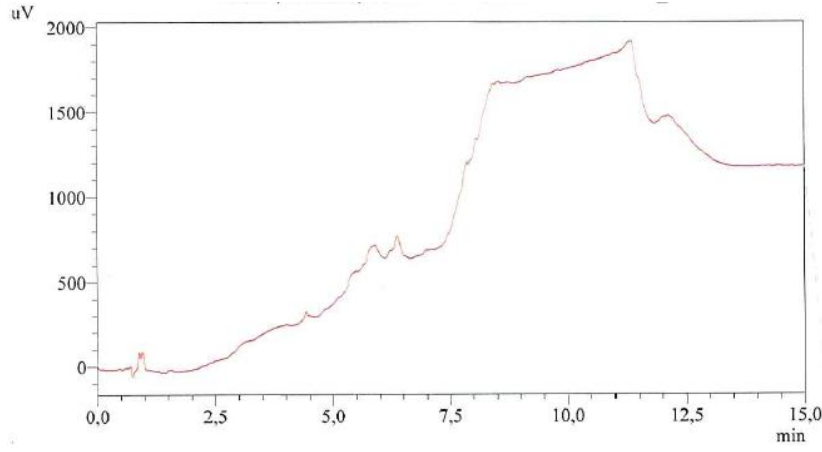
4. BULGULAR

Metanol içerisinde hazırlanan etofenamat, benzil nikotinat, benzil alkol, etofenamat miristat, etofenamat palmitat, etofenamat stearat, benzaldehit, flufenamik asit, dekarboksil, dietilen glikol diflufenamat ve flufenamik asit bütilester hareketli faz olarak 10 mM CH_3COONa (pH 7,4) ve metanolün kullanıldığı gradient akış programında (Çizelge 3.1) HPLC ile analiz edilmiştir. Shimadzu LC-2010A HT HPLC cihazında sabit faz olarak Thermo MOS-1 Hypersil 125 mm x 4,6 mm x 5 μ , analitik kolonu kullanılmıştır. Kolon sıcaklığı 40°C, akış hızı 2,0 mL/dakika ve enjeksiyon hacmi 10 μL 'dir.

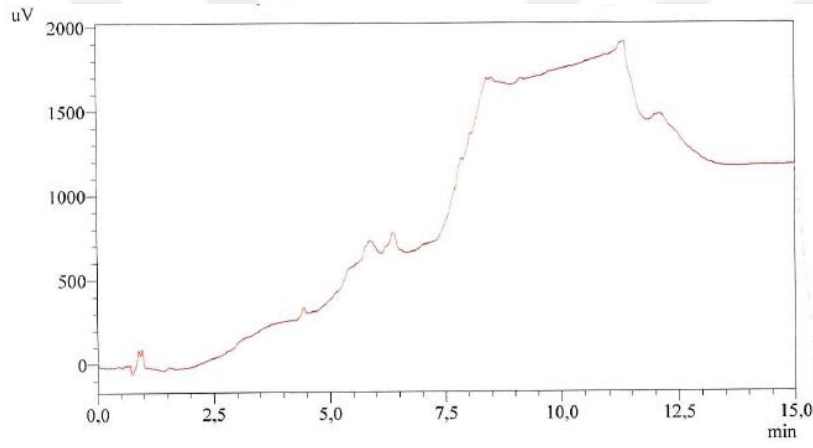
HPLC ile analizde tekli ve karışım halinde alınan kromatogramlar Şekil 4.1-17'de gösterilmiştir. [Hareketli faz (Şekil 4.1), metanol (Şekil 4.2), plasebo (Şekil 4.3), etofenamat (Şekil 4.4), benzil alkol (Şekil 4.5), benzil nikotinat (Şekil 4.6), etofenamat miristat (Şekil 4.7), etofenamat palmitat (Şekil 4.8), etofenamat stearat (Şekil 4.9), benzaldehit (Şekil 4.10), flufenamik asit (Şekil 4.11), dekarboksil (Şekil 4.12), dietilen glikol diflufenamat (Şekil 4.13), flufenamik asit bütilester (Şekil 4.14), 11 analitin çakışmış haldeki kromatogramı (Şekil 4.15), 11 analitin karışım halindeki kromatogramı (Şekil 4.16) ve sentetik numune çözeltisine ait kromatogram (Şekil 4.17)]. 11 adet analiti içeren (etofenamat, benzil nikotinat, benzil alkol, etofenamat miristat, etofenamat palmitat, etofenamat stearat, benzaldehit, flufenamik asit, dekarboksil, dietilen glikol diflufenamat ve flufenamik asit bütilester) karışımın HPLC ile toplam analiz süresi 15 dakikadır.



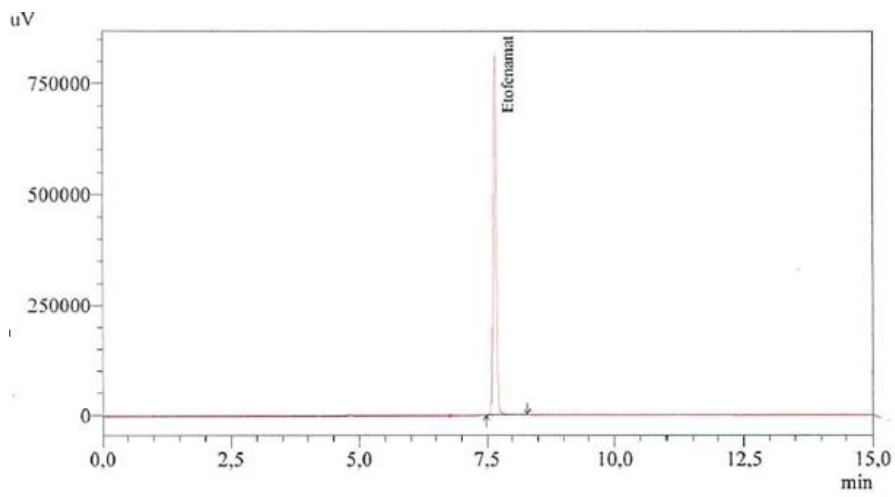
Şekil 4.1. 10 mM CH_3COONa (pH 7,4) ve metanol (hareketli faz) kromatogramı



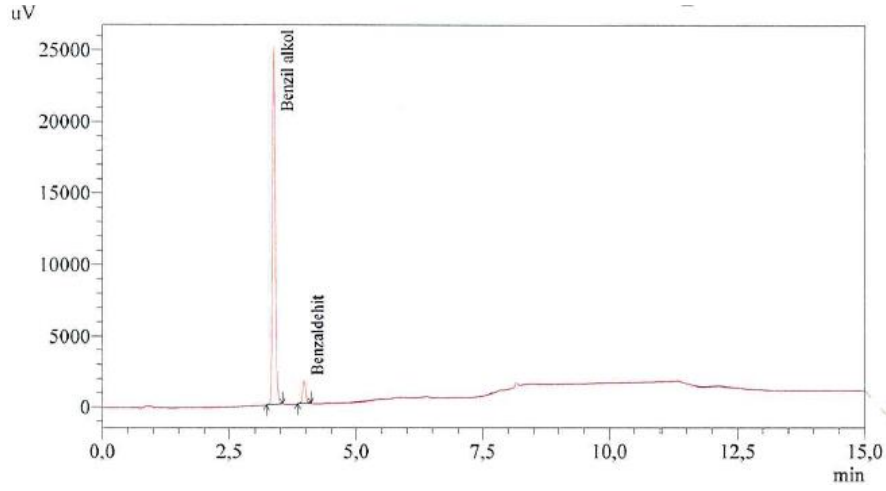
Şekil 4.2. Metanol kromatogramı



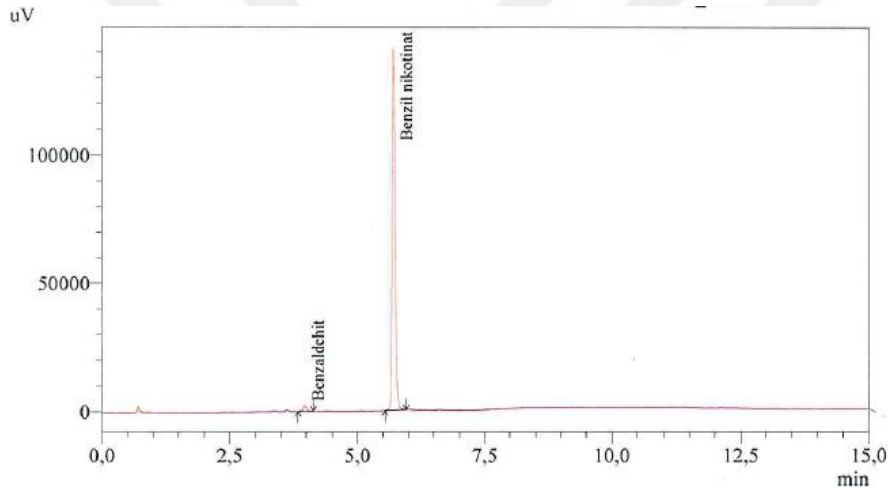
Şekil 4.3. Plasebo kromatogramı



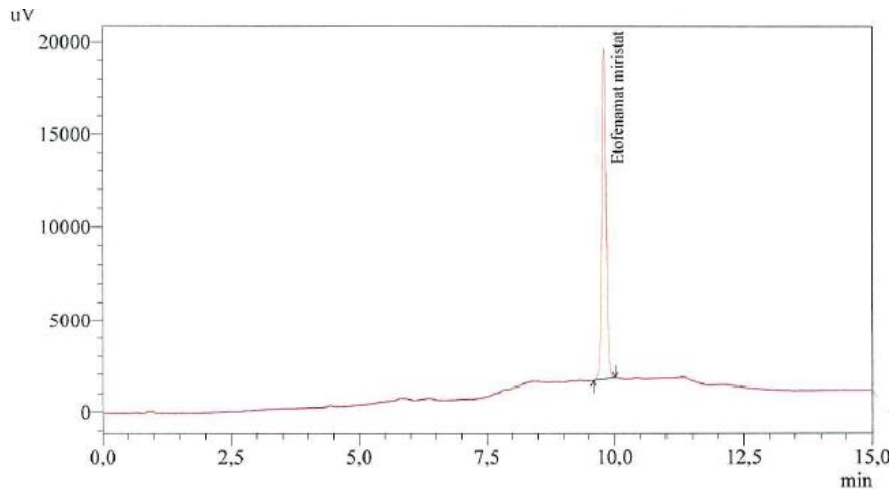
Şekil 4.4. Etofenamat (1,2 mg/mL) kromatogramı (t_R : 7,647 dak)



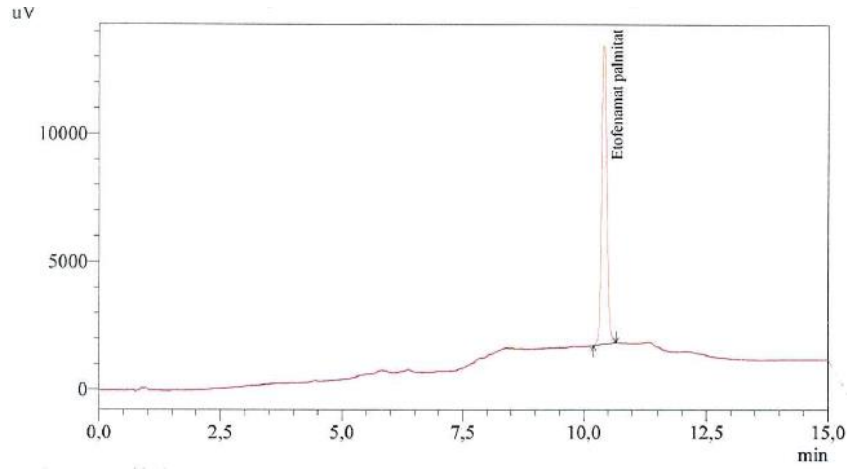
Şekil 4.5. Benzil alkol (0,18 mg/mL) kromatogramı (t_R : 3,366 dak)



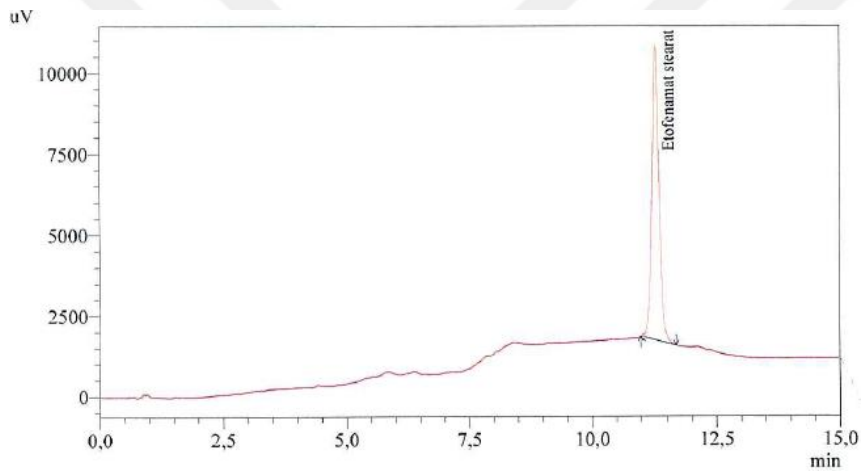
Şekil 4.6. Benzil nikotinat (0,12 mg/mL) kromatogramı (t_R : 5,703 dak)



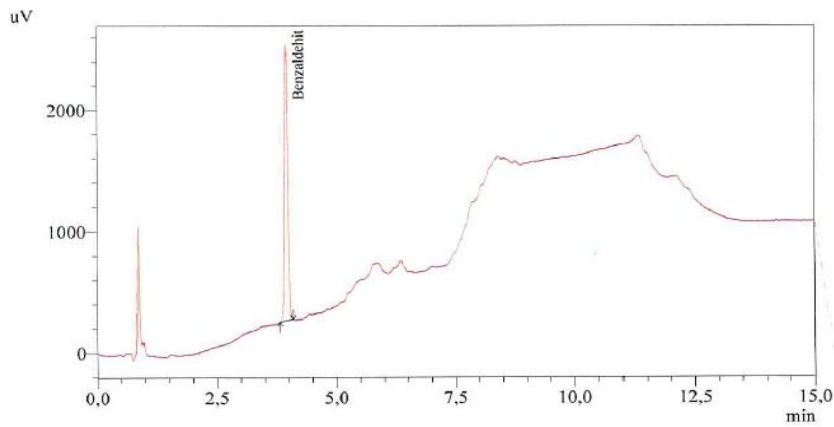
Şekil 4.7. Etofenamat miristat (0,012 mg/mL) kromatogramı (t_R : 9,794 dak)



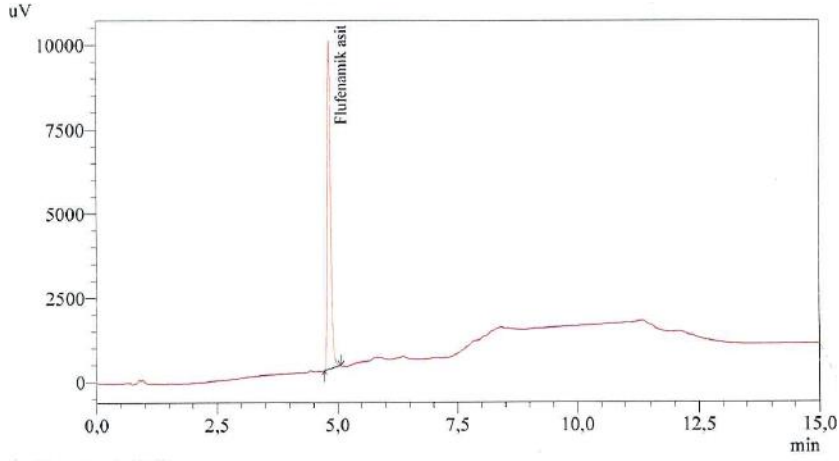
Şekil 4.8. Etöfenamat palmitat (0,012 mg/mL) kromatogramı (t_R : 10,417 dak)



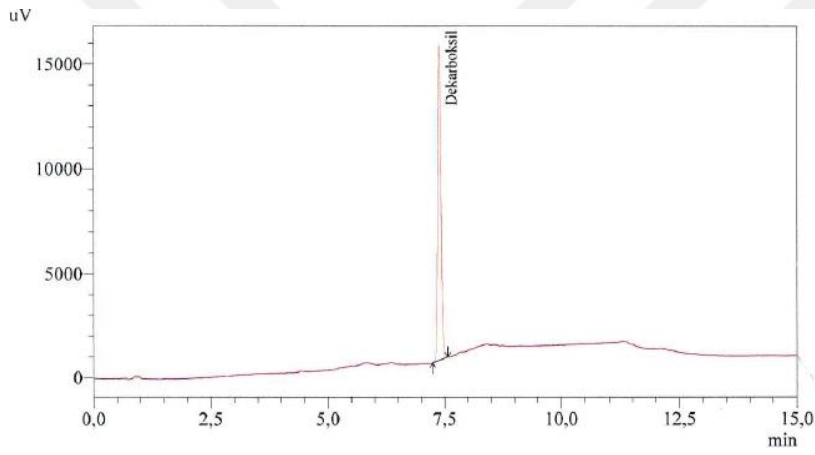
Şekil 4.9. Etöfenamat stearat (0,012 mg/mL) kromatogramı (t_R : 11,270 dak)



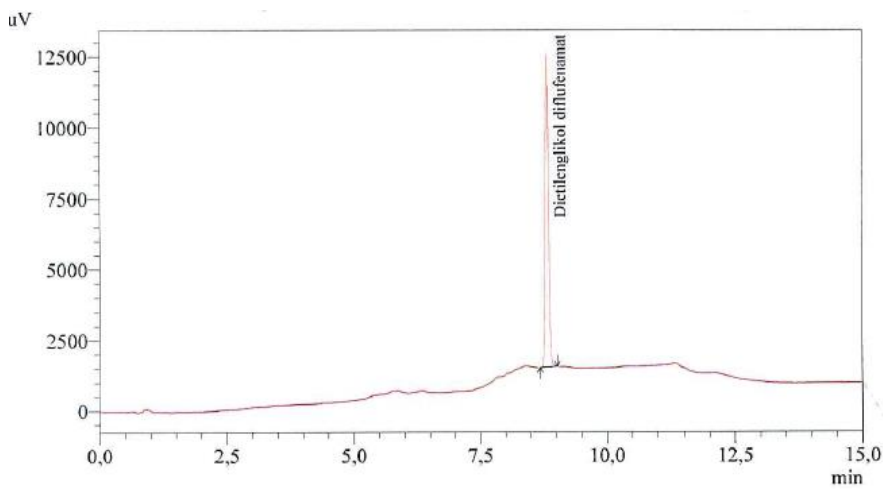
Şekil 4.10. Benzaldehit (0,0018 mg/mL) kromatogramı (t_R : 3,951dak)



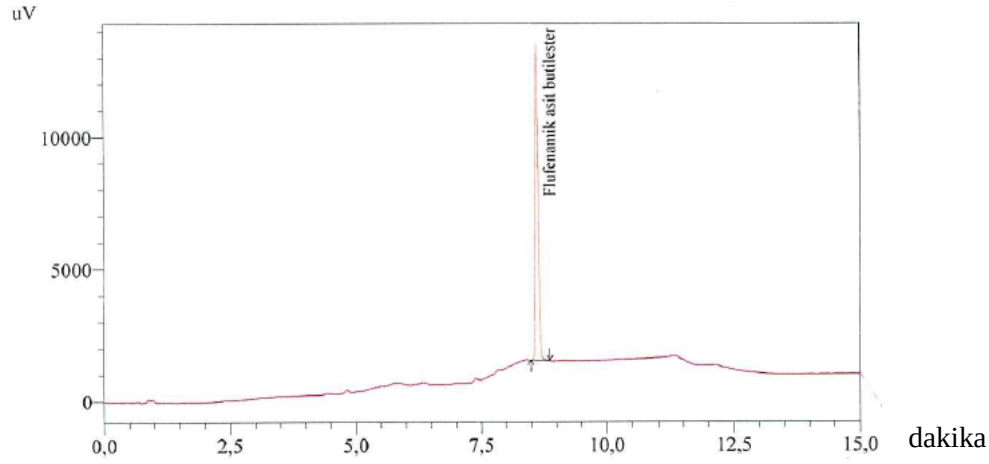
Şekil 4.11. Flufenamik asit (0,012 mg/mL) kromatogramı (t_R : 4,823 dak)



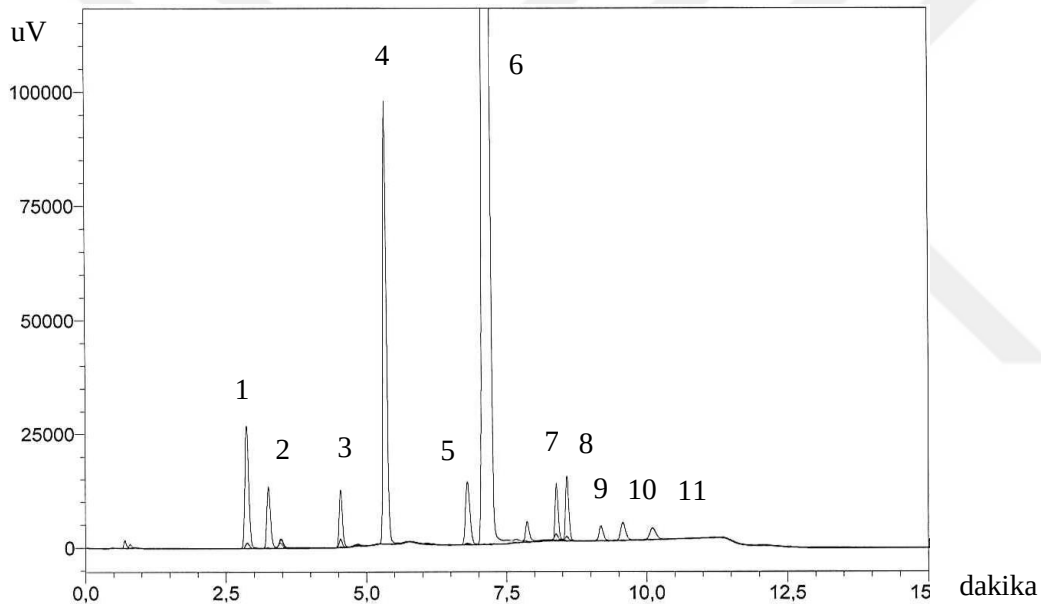
Şekil 4. 12. Dekarboksil (0,012 mg/mL) kromatogramı (t_R : 7,379 dak)



Şekil 4.13. Dietilenglikol diflufenamat (0,012 mg/mL) kromatogramı (t_R : 8,816 dak)



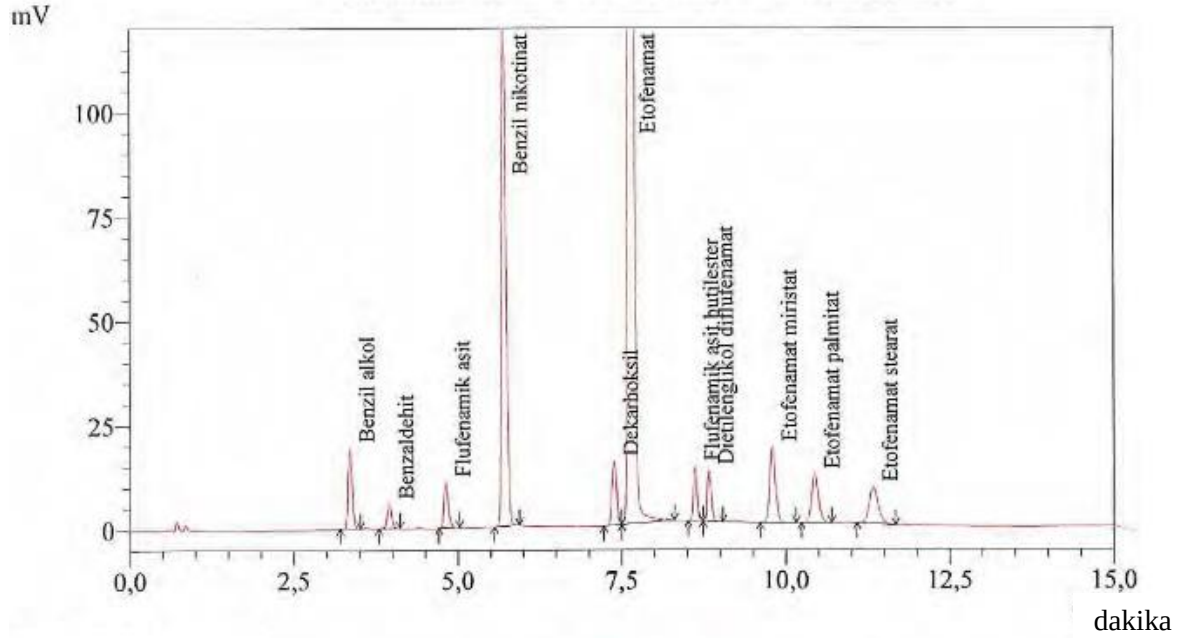
Şekil 4.14. Flufenamik asit butilester (0,012 mg/mL) kromatogramı (t_R : 8,609 dak)



Şekil 4.15. Etofenamat, benzil nikotinat, benzil alkol, etofenamat miristat, etofenamat palmitat, etofenamat stearat, benzaldehit, flufenamik asit, dekarboksil, dietilen glikol diflufenamat ve flufenamik asit bütilestere ait çakıştırılmış kromatogram

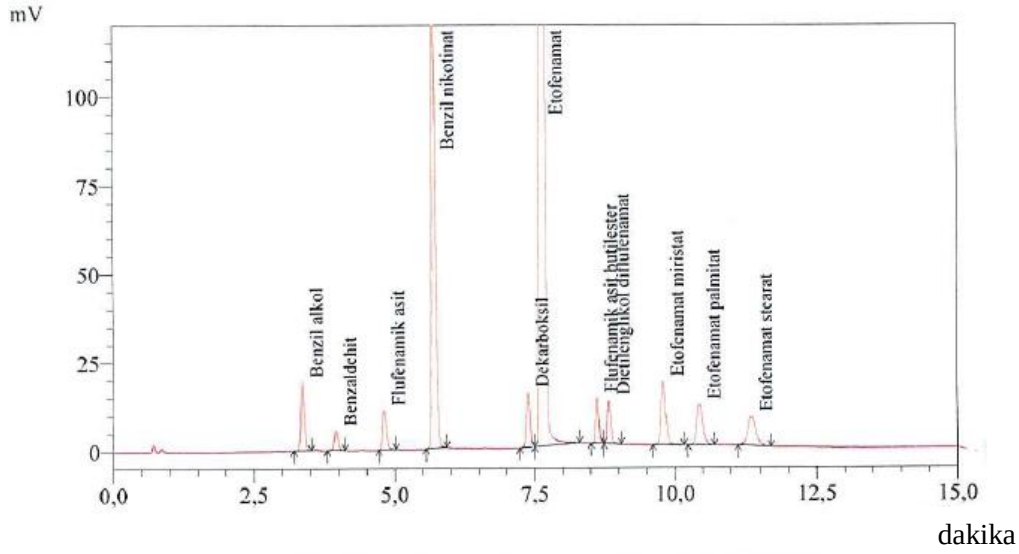
1. Benzil alkol 2,870 dak.
2. Benzaldehit 3,466 dak.
3. Flufenamik asit 4,538 dak.
4. Benzil nikotinat 5,334 dak.
5. Dekarboksil 6,803 dak.
6. Etofenamat 7,138 dak.
7. Flufenamik asit bütilester 8,391 dak.
8. Dietilenglikoldiflufenamat 8,579 dak.

- 9.Etofenamat miristat 9,186 dak.
 10.Etofenamat palmitat 9,576 dak.
 11.Etofenamat stearat 10,106 dak.



Peak #	Name	Ret. Time	Area	Height	Ther. Plat.	Fail. Fac	Res.
1	Benzil alkol	3,352	86008	19542	10395	1,2	0,0
2	Benzaldehit	3,950	27319	5794	12828	1,1	4,4
3	Flufenamik asit	4,809	51470	11093	20085	1,4	6,2
4	Benzil nikotinat	5,701	588423	128775	28043	1,2	6,6
5	Dekarboksil	7,381	77443	15499	40609	1,2	11,9
6	Etofenamat	7,644	3667111	826495	54577	1,2	1,9
7	Flufenamik asit butilester	8,615	50975	13082	83689	1,2	7,8
8	Dietilenglikol diflufenamat	8,830	52232	12383	75683	1,2	1,7
9	Etofenamat miristat	9,795	110400	18176	52479	1,2	6,4
10	Etofenamat palmitat	10,439	86419	11677	41589	1,1	3,4
11	Etofenamat stearat	11,331	85168	8819	31010	1,2	3,9
Total			4882967	1071335			

Şekil 4.16. Etofenamat (1,2 mg/mL), benzil nikotinat (0,12 mg/mL), benzil alkol (0,18 mg/mL), etofenamat miristat (0,012 mg/mL), etofenamat palmitat (0,012 mg/mL), etofenamat stearat (0,012 mg/mL), benzaldehit (0,0018 mg/mL), flufenamik asit (0,012 mg/mL), dekarboksil (0,012 mg/mL), dietilenglikol diflufenamat (0,012 mg/mL) ve flufenamik asit bütilester (0,012 mg/mL) karışımına ait kromatogram



Peak #	Name	Ret. Time	Area	Height	Ther. Plat.	Fail. Fac	Res.
1	Benzil alkol	3,354	85983	19444	10767	1,2	0,0
2	Benzaldehit	3,951	27267	5811	13057	1,1	4,5
3	Flufenamik asit	4,809	51594	11207	20432	1,4	6,3
4	Benzil nikotinat	5,698	587567	128884	27755	1,2	6,6
5	Dekarboksil	7,377	77573	15675	40886	1,2	11,9
6	Etofenamat	7,636	3668405	828262	54655	1,2	1,9
7	Flufenamik asit butilester	8,609	50759	13078	84953	1,2	7,8
8	Dietilenglikol diflufenamat	8,824	52208	12480	76631	1,2	1,7
9	Etofenamat miristat	9,793	110043	18100	51802	1,2	6,5
10	Etofenamat palmitat	10,442	85898	11527	41098	1,1	3,4
11	Etofenamat stearat	11,341	81028	8357	30637	1,2	3,9
Total			4878325	1072826			

Şekil 4.17. Sentetik numune çözeltisine ait kromatogram - Etofenamat (1,2 mg/mL), benzil alkol (0,18 mg/mL), benzil nikotinat (0,12 mg/mL), etofenamat miristat (0,012 mg/mL), etofenamat palmitat (0,012 mg/mL), etofenamat stearat (0,012 mg/mL), benzaldehit (0,0018 mg/mL), flufenamik asit (0,012 mg/mL), dekarboksil (0,012 mg/mL), dietilenglikol diflufenamat (0,012 mg/mL), flufenamik asit butilester (0,012 mg/mL)

Şekil 4.16 ve 4.17 incelediğinde, 11 analitin karışım halindeki kromatogramı ile plasebo içerisinde hazırlanmış sentetik numune çözeltisine ait kromatogramın alıkonma zamanları ve pik alanları açısından benzer olduğu görülmektedir. Ardışık iki pik arasındaki rezolüsyonun 1,5'ten büyük olması, tüm piklerin birbirinden uygun olarak ayrıldığını göstermektedir. Analitler, numune matrisinde bulunması muhtemel bileşenlerin varlığında ayrı ayrı tespit edilmektedir.

Tüm analit pikleri için kuyruklanma faktörünün 1,5'in altında olması, dar bantlı pikler elde edildiğini göstermektedir. Teorik plaka sayıları 10000 – 85000 arasında olup, kolon etkinliği yüksektir.

5. ANALİTİK YÖNTEM VALİDASYONU

Analitik yöntem validasyonu için ICH Q2(R1) rehberindeki seçicilik, teşhis limiti (LOD), tayin alt limiti (LOQ), doğrusallık, aralık, cihaz kesinliği (enjeksiyon tekrarlanabilirliği), yöntem kesinliği, ara kesinlik ve doğruluk parametreleri incelenmiştir [1].

5.1. Seçicilik

Seçicilik, analitin numunede bulunması muhtemel bileşenlerin varlığında doğru olarak değerlendirilmesidir. Bu amaçla numune matrisinde bulunması muhtemel bileşenlerin analitin alıkonma sürelerine ve pik alanına etkisi incelenmiştir. Hareketli faz, çözücü (metanol), plasebo, etofenamat, benzil alkol, benzil nikotinat, etofenamat miristat, etofenamat palmitat, etofenamat stearat, benzaldehit, flufenamik asit, dekarboksil, dietilenglikol diflufenamat ve flufenamik asit butilester standart çözeltilerinin kromatogramları Şekil 4.1–14’te gösterilmiştir. Standart analit çözeltilerinin ve plasebo içerisinde karışım halindeki standart analitlerin alıkonma zamanları Çizelge 5.1’de görülmektedir. Plasebo içerisinde etken madde ve safsızlıkların alıkonma zamanlarında, pik alanlarında artış olmaması yöntemin seçici olduğunu göstermektedir. Bağlı alıkonma zamanları etofenamat pikine göre hesaplanmıştır. $R \geq 1,5$ kriteri sağlanmıştır.

Çizelge 5.1. Numune matrisinde bulunması beklenen bileşenlerin alıkonma zamanları

Bileşenler	Standart Alıkonma Zamanı (t_R)	Bağlı Alıkonma Zamanı (Rt_R)	Plasebo içerisinde Standart Alıkonma Zamanı (t_R)	Plasebo içerisinde Bağlı Alıkonma Zamanı (Rt_R)	Ardışık Pikler Arasındaki Ayırışma (R)
Hareketli Faz	-	-	-	-	-
Çözücü	-	-	-	-	-
Plasebo	-	-	-	-	-
Etofenamat	7,647	1	7,636	0,999	1,9
Benzil alkol	3,366	0,440	3,354	0,439	-
Benzil nikotinat	5,703	0,746	5,698	0,745	6,6
Etofenamat miristat	9,794	1,281	9,793	1,281	6,5
Etofenamat palmitate	10,417	1,362	10,442	1,366	3,4
Etofenamat stearate	11,270	1,474	11,341	1,483	3,9
Benzaldehit	3,951	0,517	3,951	0,517	4,5
Flufenamik asit	4,823	0,631	4,809	0,629	6,3
Dekarboksil	7,379	0,965	7,377	0,965	11,9
Dietilenglikol diflufenamat	8,816	1,153	8,824	1,154	1,7
Flufenamik asit butilester	8,609	1,126	8,609	1,126	7,8

5.2. Teşhis Limiti (LOD) ve Tayin Alt Limiti (LOQ)

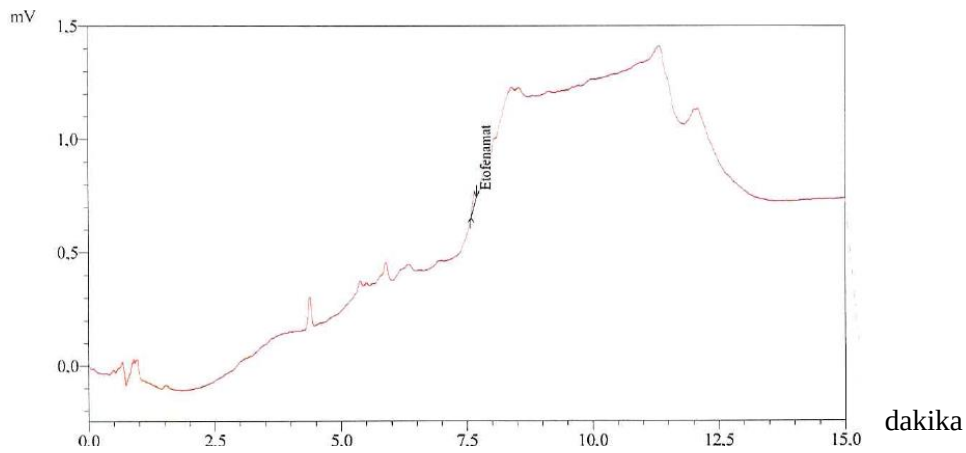
Teşhis limiti ve tayin alt limitinin belirlenmesinde ICH Q2(R1) rehberinde belirtilen sinyal/gürültü yaklaşımı kullanılmıştır. Her bir analitin bilinen derişimdeki çözeltisinin sinyali ile kör sinyalinin karşılaştırılmasıyla teşhis edilebilecek en düşük derişimler hesaplanmıştır. Sinyal/gürültü oranı pik yükseklikleri kullanılarak hesaplanmıştır. LOQ hesaplamaları Şekil 5.1-11 kromatogramları üzerinden yapılmıştır. Teşhis limiti için 3:1, tayin alt limiti için 10:1 sinyal/gürültü oranı kabul edilmiştir. Her bir analit için teşhis ve tayin alt limiti aşağıdaki formüle göre hesaplanmış ve sonuçlar Çizelge 5.2’de verilmiştir.

$$\text{Teşhis limiti (mg/mL)} = \frac{3 \times \text{Derişim}}{\text{Sinyal/Gürültü Oranı}}$$

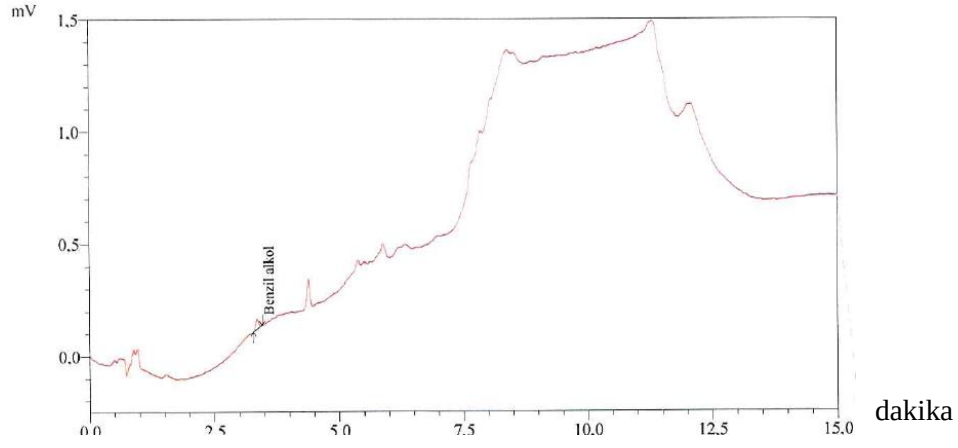
$$\text{Tayin alt limiti (mg/mL)} = \frac{10 \times \text{Derişim}}{\text{Sinyal/Gürültü Oranı}}$$

Çizelge 5.2. Teşhis limiti ve tayin alt limiti

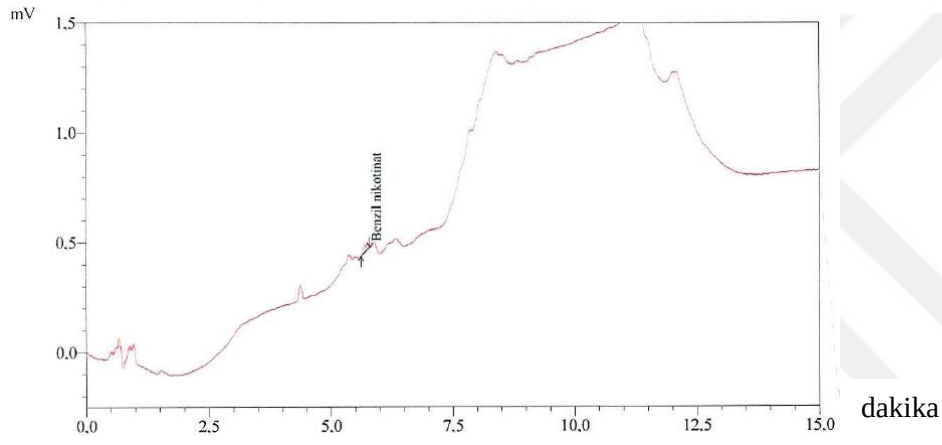
	Derişim (mg/mL)	Sinyal/Gürültü Oranı	Teşhis Limiti (LOD) (mg/mL)	Tayin Alt Limiti (LOQ) (mg/mL)	LOQ Derişiminde Sinyal/Gürültü Oranı
Etofenamat	1,2183	197811,9	$1,86 \times 10^{-5}$	$6,2 \times 10^{-5}$	10,06
Benzil alkol	0,2096	4441	$1,41 \times 10^{-4}$	$4,70 \times 10^{-4}$	9,14
Benzil nikotinat	0,1374	25366,4	$1,62 \times 10^{-5}$	$5,40 \times 10^{-5}$	9,43
Etofenamat miristat	0,01416	2983,1	$1,41 \times 10^{-5}$	$4,70 \times 10^{-5}$	9,84
Etofenamat palmitat	0,012	1842,4	$1,95 \times 10^{-5}$	$6,50 \times 10^{-5}$	10,91
Etofenamat stearat	0,0125	1933,8	$1,95 \times 10^{-5}$	$6,50 \times 10^{-5}$	9,55
Benzaldehit	0,001839	386,2	$1,44 \times 10^{-5}$	$4,80 \times 10^{-5}$	10,36
Flufenamik asit	0,0122	1865	$1,95 \times 10^{-5}$	$6,50 \times 10^{-5}$	10,04
Dekarboksil	0,011	3103,2	$1,05 \times 10^{-5}$	$3,50 \times 10^{-5}$	10,24
Dietilenglikol diflufenamat	0,01349	2417,8	$1,68 \times 10^{-5}$	$5,60 \times 10^{-5}$	10,62
Flufenamik asit butilester	0,01539	1740,6	$2,64 \times 10^{-5}$	$8,80 \times 10^{-5}$	10,42



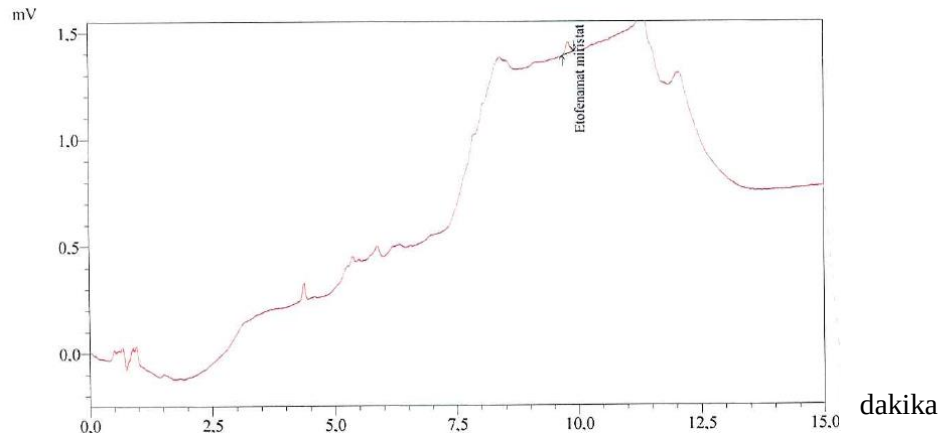
Şekil 5.1. Etöfenamat kromatogramı



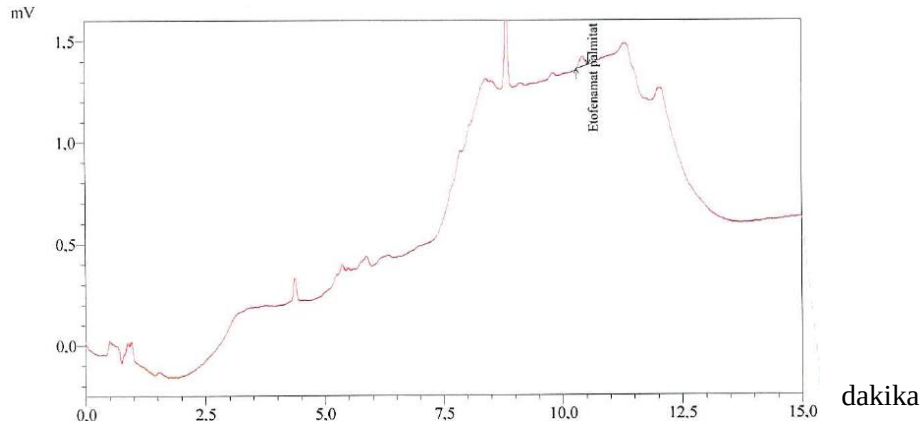
Şekil 5.2. Benzil alkol kromatogramı



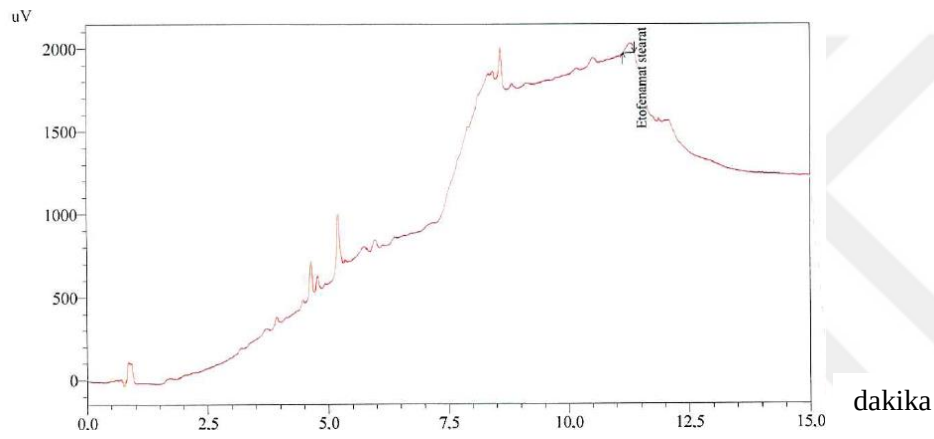
Şekil 5.3. Benzil nikotinat kromatogramı



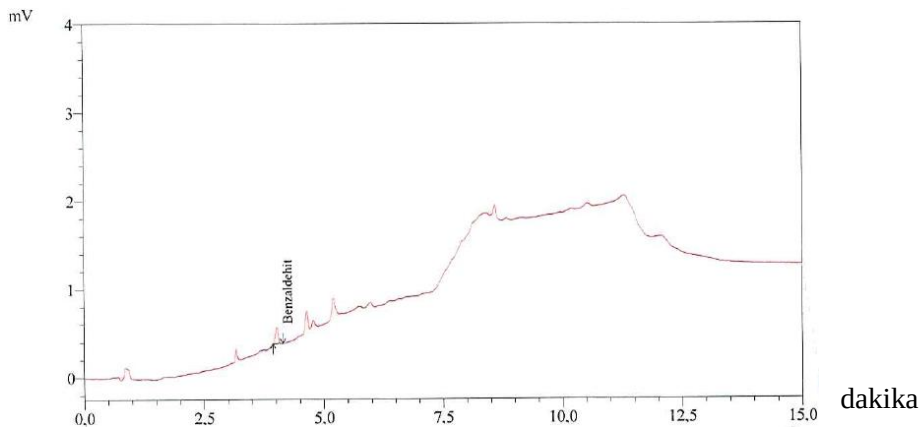
Şekil 5.4. Etofenamat miristat kromatogramı



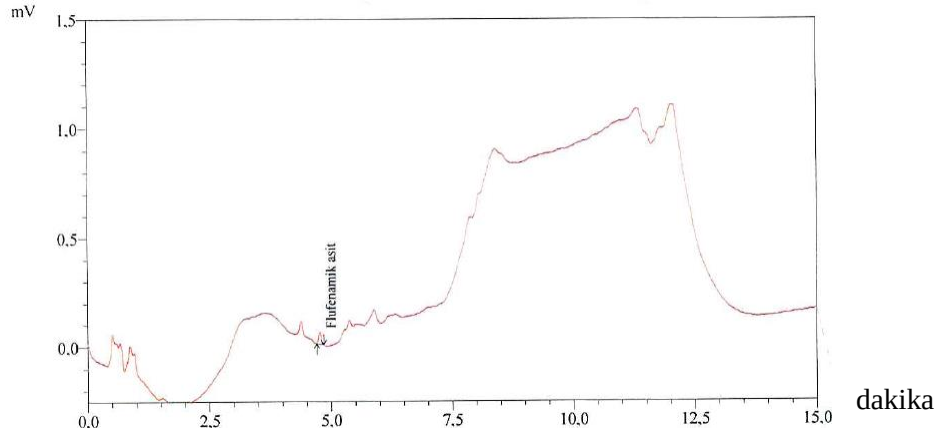
Şekil 5.5. Etofenamat palmitat kromatogramı



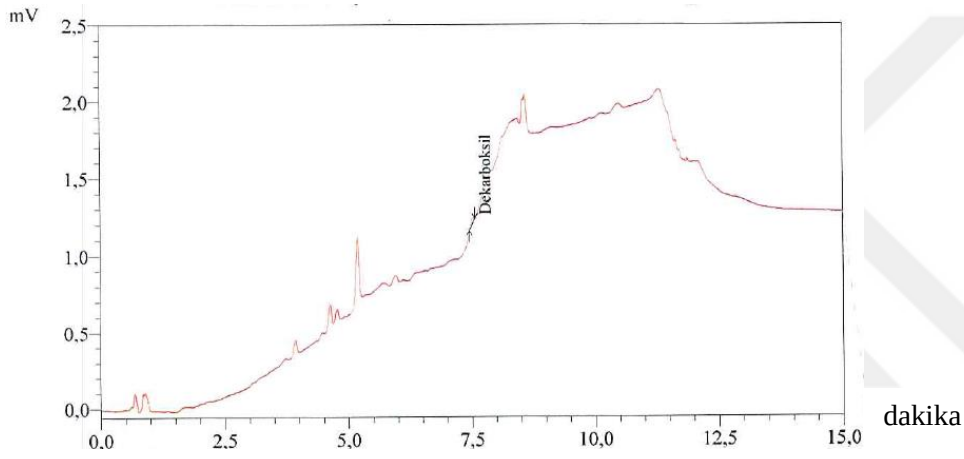
Şekil 5.6. Etofenamat stearat kromatogramı



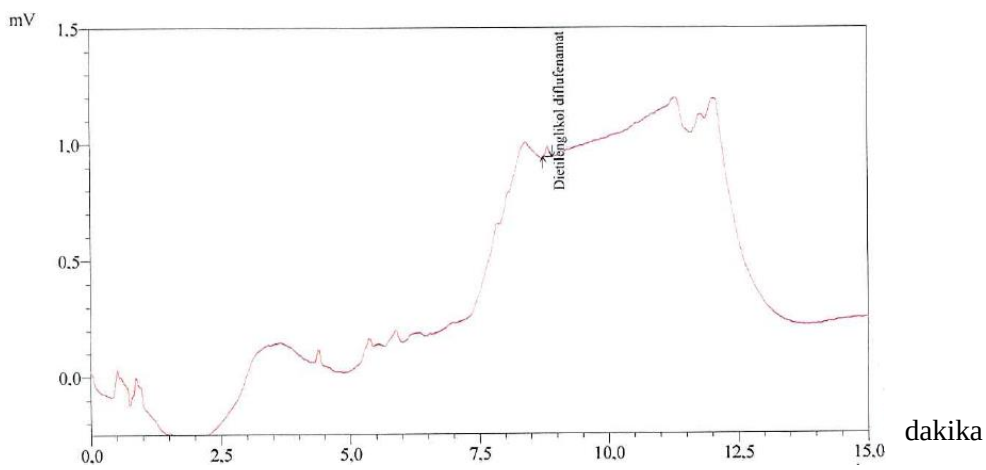
Şekil 5.7. Benzaldehit kromatogramı



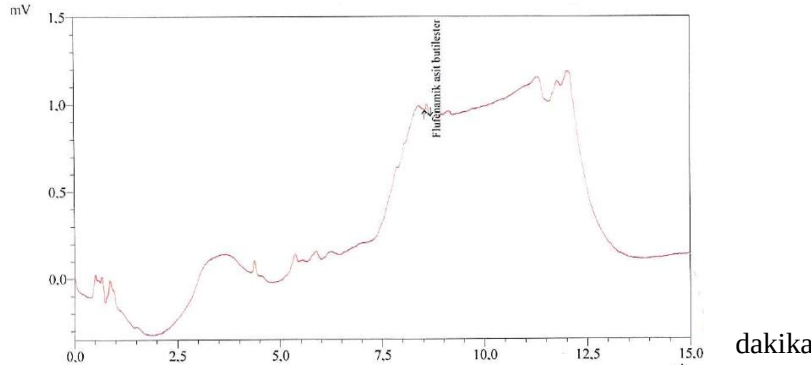
Şekil 5.8. Flufenamik asit kromatogramı



Şekil 5.9. Dekarboksil kromatogramı



Şekil 5.10. Dietilenglikol diflufenamat kromatogramı



Şekil 5.11. Flufenamik asit butilester kromatogramı

5.3. Doğrusallık

Doğrusallığın belirlenebilmesi için ICH Q2(R1) rehberinde belirtildiği üzere en az 5 farklı derişim kullanılmıştır. Her bir derişim seviyesinde üç enjeksiyon yapılmıştır. Pik alanlarına karşı derişim grafiğe geçirilmiş ve kalibrasyon doğrusunun eğimi (m), y eksenini kesim noktası, bakiye kareler toplamı (R^2) ve korelasyon katsayısı (r) değerleri grafik üzerinde gösterilmiştir.

Madde miktarı tayininde kullanılan etofenamat, benzil alkol ve benzil nikotinat analitleri için doğrusallık çalışması hedef derişimin LOQ - %120'si arasında, safsızlıklar için ise ICH rehberinde belirtildiği üzere, raporlama seviyesinden (LOQ) spesifikasyon sınırının %120'sine kadar olan derişim aralığında gerçekleştirilmiştir (Çizelge 5.3-13).

Çizelge 5.3. Etofenamat doğrusal derişim aralığı

Derişim seviyesi	Derişim (mg/mL)	Pik Alanı
LOQ	$6,20 \times 10^{-5}$	250
%20	0,24	738342
%40	0,48	1470155
%60	0,72	2210026
%80	0,96	2946648
%90	1,08	3312799
%100	1,22	3727047
%110	1,32	4012276
%120	1,44	4406100
Eğim		3059726,5
Kesişim		6055,4
Bakiye kareler toplamı (R^2)		1,0000
Korelasyon katsayısı (r)		1,0000

Çizelge 5.4. Benzil alkol doğrusal derişim aralığı

Derişim seviyesi	Derişim (mg/mL)	Pik Alanı
LOQ	$4,7 \times 10^{-4}$	221
%20	$3,8 \times 10^{-2}$	18367
%40	$7,5 \times 10^{-2}$	38091
%60	0,12	56424
%80	0,15	75143
%90	0,17	84045
%100	0,19	94245
%110	0,21	102970
%120	0,22	111212
Eğim Kesişim Bakiye kareler toplamı (R^2) Korelasyon katsayısı (r)		496656,7 385,4 0,9997 0,9998

Çizelge 5.5. Benzil nikotinat doğrusal derişim aralığı

Derişim seviyesi	Derişim (mg/mL)	Pik Alanı
LOQ	$5,40 \times 10^{-5}$	152
%20	$2,34 \times 10^{-2}$	102554
%40	$4,58 \times 10^{-2}$	202690
%60	$6,92 \times 10^{-2}$	302178
%80	$9,22 \times 10^{-2}$	409368
%90	0,10	459958
%100	0,12	509079
%110	0,13	556717
%120	0,14	611714
Eğim Kesişim Bakiye kareler toplamı (R^2) Korelasyon katsayısı (r)		4419550,0 448,8 0,9999 0,9999

Çizelge 5.6. Etofenamat miristat doğrusal derişim aralığı

Derişim seviyesi	Derişim (mg/mL)	Pik Alanı
LOQ	$4,60 \times 10^{-5}$	344
%0,25	$3,54 \times 10^{-3}$	26941
%0,50	$7,08 \times 10^{-3}$	45771
%1,00	$1,42 \times 10^{-2}$	109527
%1,20	$1,70 \times 10^{-2}$	125829
Eğim Kesişim Bakiye kareler toplamı (R^2) Korelasyon katsayısı (r)		7563885,2 1578,9 0,9947 0,9973

Çizelge 5.7. Etofenammat palmitat doğrusal derişim aralığı

Derişim seviyesi	Derişim (mg/mL)	Pik Alanı
LOQ	$6,60 \times 10^{-5}$	378
%0,25	$3,00 \times 10^{-3}$	20475
%0,50	$6,00 \times 10^{-3}$	41857
%1,00	$1,20 \times 10^{-2}$	84015
%1,20	$1,44 \times 10^{-2}$	104018
Eğim		7182893,6
Kesişim		801,1
Bakiye kareler toplamı (R^2)		0,9994
Korelasyon katsayısı (r)		0,9997

Çizelge 5.8. Etofenammat stearat doğrusal derişim aralığı

Derişim seviyesi	Derişim (mg/mL)	Pik Alanı
LOQ	$6,50 \times 10^{-5}$	490
%0,25	$3,13 \times 10^{-3}$	21803
%0,50	$6,25 \times 10^{-3}$	45922
%1,00	$1,25 \times 10^{-2}$	90707
%1,20	$1,50 \times 10^{-2}$	107728
Eğim		7221026,3
Kesişim		18,9
Bakiye kareler toplamı (R^2)		0,9998
Korelasyon katsayısı (r)		0,9999

Çizelge 5.9. Benzaldehit doğrusal derişim aralığı

Derişim seviyesi	Derişim (mg/mL)	Pik Alanı
LOQ	$4,30 \times 10^{-5}$	743
%0,25	$4,31 \times 10^{-4}$	8812
%0,50	$8,62 \times 10^{-4}$	17949
%1,00	$1,72 \times 10^{-3}$	35739
%1,20	$2,07 \times 10^{-3}$	42535
Eğim		20673649,7
Kesişim		51,4
Bakiye kareler toplamı (R^2)		0,9999
Korelasyon katsayısı (r)		0,9999

Çizelge 5.10. Flufenamik asit doğrusal derişim aralığı

Derişim seviyesi	Derişim (mg/mL)	Pik Alanı
LOQ	$6,70 \times 10^{-5}$	221
%0,25	$3,05 \times 10^{-3}$	11629
%0,50	$6,10 \times 10^{-3}$	23068
%1,00	$1,22 \times 10^{-2}$	45818
%1,20	$1,46 \times 10^{-2}$	54881
Eğim		3746009,7
Kesişim		109,4
Bakiye kareler toplamı (R^2)		1,0000
Korelasyon katsayısı (r)		1,0000

Çizelge 5.11. Dekarboksil doğrusal derişim aralığı

Derişim seviyesi	Derişim (mg/mL)	Pik Alanı
LOQ	$3,60 \times 10^{-5}$	147
%0,25	$2,75 \times 10^{-3}$	19030
%0,50	$5,50 \times 10^{-3}$	37878
%1,00	$1,10 \times 10^{-2}$	76096
%1,20	$1,32 \times 10^{-2}$	91851
Eğim		6953869,2
Kesişim		180,3
Bakiye kareler toplamı (R^2)		1,0000
Korelasyon katsayısı (r)		1,0000

Çizelge 5.12. Dietilenglikol diflufenamat doğrusal derişim aralığı

Derişim seviyesi	Derişim (mg/mL)	Pik Alanı
LOQ	$5,7 \times 10^{-5}$	195
%0,25	$3,37 \times 10^{-3}$	12443
%0,50	$6,75 \times 10^{-3}$	23921
%1,00	$1,35 \times 10^{-2}$	49715
%1,20	$1,62 \times 10^{-2}$	59871
Eğim		3701429,1
Kesişim		273,2
Bakiye kareler toplamı (R^2)		0,9997
Korelasyon katsayısı (r)		0,9998

Çizelge 5.13. Flufenamik asit butilester doğrusal derişim aralığı

Derişim seviyesi	Derişim (mg/mL)	Pik Alanı
LOQ	$8,50 \times 10^{-5}$	197
%0,25	$3,85 \times 10^{-3}$	11560
%0,50	$7,70 \times 10^{-3}$	23278
%1,00	$1,54 \times 10^{-2}$	46072
%1,20	$1,85 \times 10^{-2}$	55740
Eğim		3011304,1
Kesişim		24,7
Bakiye kareler toplamı (R^2)		1,0000
Korelasyon katsayısı (r)		1,0000

Etopenamat, benzil alkol, benzil nikotinat, etopenamat miristat, etopenamat palmitat, etopenamat stearat, benzaldehit, flufenamik asit, dekarboksil, dietilenglikol diflufenamat, flufenamik asit butil ester için doğrusal aralık, regresyon eşitliği, bakiye kareler toplamı (R^2) ve korelasyon katsayısı (r) değerleri Çizelge 5.14’de gösterilmiştir. Bakiye kareler toplamı (R^2) ve korelasyon katsayısı (r) değerlerinin sırasıyla 0,9947-1,0000 ve 0,9973-1,0000 olması, Çizelge 5.14’te verilen analit derişimleri ile pik alanları arasında pozitif doğrusal ilişki olduğunu göstermektedir.

Çizelge 5.14. Doğrusal aralık

Analit	Doğrusal Aralık (mg/mL)	Regresyon Eşitliği	R^2	r
Etopenamat	LOQ – 1,44	$y = 3059726,5x + 6055,4$	1,0000	1,0000
Benzil alkol	LOQ – 0,22	$y = 496656,7x + 385,4$	0,9997	0,9998
Benzil nikotinat	LOQ – 0,14	$y = 4419550,0x - 448,8$	0,9999	0,9999
Etopenamat miristat	$LOQ - 1,70 \times 10^{-2}$	$y = 7563885,2x - 1578,9$	0,9947	0,9973
Etopenamat palmitat	$LOQ - 1,44 \times 10^{-2}$	$y = 7182893,6x - 801,1$	0,9994	0,9997
Etopenamat stearat	$LOQ - 1,50 \times 10^{-2}$	$y = 7221026,3x - 18,9$	0,9998	0,9999
Benzaldehit	$LOQ - 2,07 \times 10^{-3}$	$y = 20673649,7x - 51,4$	0,9999	0,9999
Flufenamik asit	$LOQ - 1,46 \times 10^{-2}$	$y = 3746009,7x + 109,4$	1,0000	1,0000
Dekarboksil	$LOQ - 1,32 \times 10^{-2}$	$y = 6953869,2x - 180,3$	1,0000	1,0000
Dietilenglikol diflufenamat	$LOQ - 1,62 \times 10^{-2}$	$y = 3701429,1x - 273,2$	0,9997	0,9998
Flufenamik asit butil ester	$LOQ - 1,85 \times 10^{-2}$	$y = 3011304,1x - 24,7$	1,0000	1,0000

5.4. Kesinlik

5.4.1. Cihaz kesinliği

Cihaz kesinliği, aynı çözeltili ve aynı cihaz kullanılarak limit (etken madde derişiminin %1,0'i) derişimde safsızlıkları içeren numune çözeltisinin ard arda 6 enjeksiyonu ile elde edilmiştir. Ortalama, standart sapma ve bağıl standart sapma sonuçları Çizelge 5.15-25'de gösterilmiştir.

Çizelge 5.15. Etofenamati (1,2 mg/mL) için cihaz kesinliği

Enjeksiyon Sayısı	Pik Alanı	Alıkonma Zamanı
1	3667111	7,644
2	3688885	7,644
3	3681937	7,640
4	3720204	7,644
5	3727390	7,643
6	3693351	7,647
Ortalama	3696479,67	7,644
Standart sapma	23064,12	0,002
Bağıl standart sapma	0,62	0,03

Çizelge 5.16. Benzil alkol (0,18 mg/mL) için cihaz kesinliği

Enjeksiyon Sayısı	Pik Alanı	Alıkonma Zamanı
1	86008	3,352
2	89631	3,348
3	86611	3,350
4	88247	3,354
5	87251	3,352
6	86755	3,351
Ortalama	87417,17	3,351
Standart sapma	1318,44	0,002
Bağıl standart sapma	1,51	0,06

Çizelge 5.17. Benzil nikotinat (0,12 mg/mL) için cihaz kesinliği

Enjeksiyon Sayısı	Pik Alanı	Alıkonma Zamanı
1	588423	5,701
2	591332	5,717
3	590089	5,695
4	599290	5,711
5	599809	5,703
6	592259	5,698
Ortalama	593533,67	5,704
Standart sapma	4836,78	0,008
Bağıl standart sapma	0,81	0,15

Çizelge 5.18. Etofenamat miristat (0,012 mg/mL) için cihaz kesinliği

Enjeksiyon Sayısı	Pik Alanı	Alıkonma Zamanı
1	110400	9,795
2	110399	9,795
3	110327	9,801
4	111221	9,806
5	112251	9,792
6	111355	9,800
Ortalama	110992,17	9,798
Standart sapma	763,36	0,005
Bağıl standart sapma	0,69	0,05

Çizelge 5.19. Etofenamat palmitat (0,012 mg/mL) için cihaz kesinliği

Enjeksiyon Sayısı	Pik Alanı	Alıkonma Zamanı
1	86419	10,439
2	86918	10,435
3	86823	10,442
4	87976	10,454
5	87925	10,427
6	87516	10,451
Ortalama	87262,83	10,441
Standart sapma	638,06	0,010
Bağıl standart sapma	0,73	0,10

Çizelge 5.20. Etofenamat stearat (0,012 mg/mL) için cihaz kesinliği

Enjeksiyon Sayısı	Pik Alanı	Alıkonma Zamanı
1	85168	11,331
2	86689	11,320
3	85537	11,325
4	86959	11,328
5	91042	11,299
6	83899	11,342
Ortalama	86549,00	11,324
Standart sapma	2462,87	0,014
Bağıl standart sapma	2,85	0,13

Çizelge 5.21. Benzaldehit (0,0018 mg/mL) için cihaz kesinliği

Enjeksiyon Sayısı	Pik Alanı	Alıkonma Zamanı
1	27319	3,950
2	27617	3,951
3	27646	3,944
4	27889	3,958
5	27916	3,948
6	27672	3,949
Ortalama	27676,50	3,950
Standart sapma	216,71	0,005
Bağıl standart sapma	0,78	0,12

Çizelge 5.22. Flufenamik asit (0,012 mg/mL) için cihaz kesinliği

Enjeksiyon Sayısı	Pik Alanı	Alıkonma Zamanı
1	51470	4,809
2	51858	4,837
3	51661	4,808
4	52118	4,824
5	52367	4,816
6	51755	4,806
Ortalama	51871,50	4,817
Standart sapma	324,21	0,012
Bağıl standart sapma	0,63	0,25

Çizelge 5.23. Dekarboksil (0,012 mg/mL) için cihaz kesinliği

Enjeksiyon Sayısı	Pik Alanı	Alıkonma Zamanı
1	77443	7,381
2	78587	7,387
3	77924	7,378
4	79042	7,383
5	79056	7,383
6	78492	7,384
Ortalama	78424,00	7,383
Standart sapma	636,38	0,003
Bağıl standart sapma	0,81	0,04

Çizelge 5.24. Dietilenglikol diflufenamat (0,012 mg/mL) için cihaz kesinliği

Enjeksiyon Sayısı	Pik Alanı	Alıkonma Zamanı
1	52232	8,830
2	52619	8,828
3	52538	8,829
4	53069	8,835
5	53095	8,828
6	52776	8,829
Ortalama	52721,50	8,830
Standart sapma	330,76	0,003
Bağıl standart sapma	0,63	0,03

Çizelge 5.25. Flufenamik asit butilester (0,012 mg/mL) için cihaz kesinliği

Enjeksiyon Sayısı	Pik Alanı	Alıkonma Zamanı
1	50975	8,615
2	51346	8,615
3	51208	8,614
4	51767	8,620
5	51593	8,615
6	51395	8,615
Ortalama	51380,67	8,616
Standart sapma	279,33	0,002
Bağıl standart sapma	0,54	0,03

Etofenamat, benzil alkol, benzil nikotinat, etofenamat miristat, etofenamat palmitat, etofenamat stearat, benzaldehit, flufenamik asit, dekarboksil, dietilenglikol diflufenamat, flufenamik asit butil ester için bağıl standart sapma değerlerinin 0,54- 2,85 aralığında olması sonuçların birbirine yakınlığını yani istatistiksel olarak cihaz kesinliğini ispatlamaktadır.

5.4.2. Yöntem kesinliği

Yöntem kesinliği aynı gün içerisinde limit (etken madde derişiminin %1,0'i) derişimde safsızlıkları içeren 6 farklı numune çözeltisinin test edilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Her bir analit için elde edilen bağıl standart sapma değerleri Çizelge 5.26'da gösterilmiştir.

Çizelge 5.26. Yöntem kesinliği

Analit adı	Bağıl standart sapma (n=6)
Etofenamat	0,28
Benzil alkol	1,12
Benzil nikotinat	0,39
Etofenamat miristat	0,30
Etofenamat palmitate	0,93
Etofenamat stearate	2,02
Benzaldehit	0,31
Flufenamik asit	0,59
Dekarboksil	0,24
Dietilenglikol diflufenamat	0,25
Flufenamik asit butilester	0,42

Etofenamat, benzil alkol, benzil nikotinat, etofenamat miristat, etofenamat palmitat, etofenamat stearat, benzaldehit, flufenamik asit, dekarboksil, dietilenglikol diflufenamat, flufenamik asit butil ester için bağıl standart sapma değerlerinin 0,24-2,02 aralığında olması istatistiksel olarak yöntemin kesinliğini göstermektedir.

5.4.3. Ara kesinlik

Ara kesinlik farklı günlerde, farklı cihazlarda ve farklı analistler tarafından sınır (etken madde derişiminin %1,0'i) derişimde safsızlıkları içeren numune çözeltilerinin test

edilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Her bir analist 6 ayrı numune çözeltisi hazırlamış, toplamda 12 adet numune çözeltisine ait sonuçlar değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 5.27– 37’de gösterilmiştir.

Çizelge 5.27. Etofenamot için ara kesinlik

Ara Kesinlik Etofenamot (mg/g)		
	Analist - 1 HPLC – 1	Analist - 2 HPLC - 2
Numune -1	100,2	100,3
Numune -2	100,2	99,9
Numune -3	100,1	100,4
Numune -4	100,4	100,7
Numune -5	99,9	100,6
Numune -6	99,6	100,5
Ortalama	100,1	100,4
Std. Sapma	0,28	0,28
%RSD (n=6)	0,28	0,28
t test	$t_{\text{hesaplanan}} < t_{\text{tablo}} (2,05 < 2,23)$	
F test	$F_{\text{hesaplanan}} < F_{\text{tablo}} (1,02 < 5,05)$	

Çizelge 5.28. Benzil alkol için ara kesinlik

Ara Kesinlik Benzil alkol (mg/g)		
	Analist - 1 HPLC – 1	Analist - 2 HPLC - 2
Numune -1	15,6	15,3
Numune -2	15,2	15,4
Numune -3	15,3	15,2
Numune -4	15,5	15,4
Numune -5	15,3	15,3
Numune -6	15,2	15,7
Ortalama	15,3	15,4
Std. Sapma	0,17	0,16
%RSD (n=6)	1,12	1,05
t test	$t_{\text{hesaplanan}} < t_{\text{tablo}} (0,34 < 2,23)$	
F test	$F_{\text{hesaplanan}} < F_{\text{tablo}} (1,10 < 5,05)$	

Çizelge 5.29. Benzil nikotinat için ara kesinlik

Ara Kesinlik Benzil nikotinat (mg/g)		
	Analist - 1 HPLC – 1	Analist - 2 HPLC - 2
Numune -1	9,8	9,8
Numune -2	9,7	9,8
Numune -3	9,8	9,8
Numune -4	9,7	9,8
Numune -5	9,7	9,8
Numune -6	9,7	9,7
Ortalama	9,7	9,8
Std. Sapma	0,04	0,04
%RSD (n=6)	0,39	0,36
t test	$t_{\text{hesaplanan}} < t_{\text{tablo}} (1,86 < 2,23)$	
F test	$F_{\text{hesaplanan}} < F_{\text{tablo}} (1,60 < 5,05)$	

Çizelge 5.30. Etofenamit miristat için ara kesinlik

Ara Kesinlik Etofenamit miristat (%)		
	Analist - 1 HPLC – 1	Analist - 2 HPLC - 2
Numune -1	1,031	1,030
Numune -2	1,029	1,028
Numune -3	1,030	1,026
Numune -4	1,025	1,037
Numune -5	1,025	1,036
Numune -6	1,023	1,036
Ortalama	1,027	1,032
Std. Sapma	0,003	0,005
%RSD (n=6)	0,30	0,47
t test	$t_{\text{hesaplanan}} < t_{\text{tablo}} (2,13 < 2,23)$	
F test	$F_{\text{hesaplanan}} < F_{\text{tablo}} (2,14 < 5,05)$	

Çizelge 5.31. Etofenammat palmitat için ara kesinlik

Ara Kesinlik Etofenammat palmitat (%)		
	Analist - 1 HPLC – 1	Analist - 2 HPLC - 2
Numune -1	1,037	1,033
Numune -2	1,037	1,034
Numune -3	1,038	1,031
Numune -4	1,023	1,015
Numune -5	1,016	1,016
Numune -6	1,022	1,015
Ortalama	1,029	1,024
Std. Sapma	0,010	0,010
%RSD (n=6)	0,93	0,94
t test	$t_{\text{hesaplanan}} < t_{\text{tablo}} (0,87 < 2,23)$	
F test	$F_{\text{hesaplanan}} < F_{\text{tablo}} (1,02 < 5,05)$	

Çizelge 5.32. Etofenammat stearat için ara kesinlik

Ara Kesinlik Etofenammat stearat (%)		
	Analist - 1 HPLC – 1	Analist - 2 HPLC - 2
Numune -1	1,005	1,049
Numune -2	1,022	1,022
Numune -3	1,017	1,040
Numune -4	0,989	1,011
Numune -5	1,012	1,019
Numune -6	1,051	1,052
Ortalama	1,016	1,032
Std. Sapma	0,020	0,017
%RSD (n=6)	2,02	1,65
t test	$t_{\text{hesaplanan}} < t_{\text{tablo}} (1,48 < 2,23)$	
F test	$F_{\text{hesaplanan}} < F_{\text{tablo}} (1,45 < 5,05)$	

Çizelge 5.33. Benzaldehit için ara kesinlik

Ara Kesinlik Benzaldehit (%)		
	Analist - 1 HPLC – 1	Analist - 2 HPLC - 2
Numune -1	1,018	1,014
Numune -2	1,012	1,009
Numune -3	1,015	1,006
Numune -4	1,013	1,019
Numune -5	1,019	1,011
Numune -6	1,011	1,016
Ortalama	1,015	1,013
Std. Sapma	0,003	0,005
%RSD (n=6)	0,31	0,47
t test	$t_{\text{hesaplanan}} < t_{\text{tablo}} (0,92 < 2,23)$	
F test	$F_{\text{hesaplanan}} < F_{\text{tablo}} (2,13 < 5,05)$	

Çizelge 5.34. Flufenamik asit için ara kesinlik

Ara Kesinlik Flufenamik asit (%)		
	Analist - 1 HPLC – 1	Analist - 2 HPLC - 2
Numune -1	1,004	0,992
Numune -2	1,001	1,009
Numune -3	1,012	0,999
Numune -4	0,997	0,989
Numune -5	0,999	0,998
Numune -6	0,996	0,992
Ortalama	1,002	0,997
Std. Sapma	0,006	0,007
%RSD (n=6)	0,59	0,73
t test	$t_{\text{hesaplanan}} < t_{\text{tablo}} (1,31 < 2,23)$	
F test	$F_{\text{hesaplanan}} < F_{\text{tablo}} (1,51 < 5,05)$	

Çizelge 5.35. Dekarboksil için ara kesinlik

Ara Kesinlik Dekarboksil (%)		
	Analist - 1 HPLC – 1	Analist - 2 HPLC - 2
Numune -1	1,016	1,014
Numune -2	1,016	1,013
Numune -3	1,012	1,015
Numune -4	1,016	1,020
Numune -5	1,012	1,018
Numune -6	1,011	1,017
Ortalama	1,014	1,016
Std. Sapma	0,002	0,003
%RSD (n=6)	0,24	0,26
t test	$t_{\text{hesaplanan}} < t_{\text{tablo}} (1,60 < 2,23)$	
F test	$F_{\text{hesaplanan}} < F_{\text{tablo}} (1,21 < 5,05)$	

Çizelge 5.36. Dietilenglikol diflufenamat için ara kesinlik

Ara Kesinlik Dietilenglikol diflufenamat (%)		
	Analist - 1 HPLC – 1	Analist - 2 HPLC - 2
Numune -1	0,999	0,996
Numune -2	0,997	1,002
Numune -3	1,000	0,998
Numune -4	0,993	1,001
Numune -5	0,995	0,997
Numune -6	0,996	1,001
Ortalama	0,997	0,999
Std. Sapma	0,002	0,002
%RSD (n=6)	0,25	0,25
t test	$t_{\text{hesaplanan}} < t_{\text{tablo}} (1,71 < 2,23)$	
F test	$F_{\text{hesaplanan}} < F_{\text{tablo}} (1,08 < 5,05)$	

Çizelge 5.37. Flufenamik asit butilester için ara kesinlik

Ara Kesinlik Flufenamik asit butilester (%)		
	Analist - 1 HPLC – 1	Analist - 2 HPLC - 2
Numune -1	0,912	0,919
Numune -2	0,914	0,915
Numune -3	0,918	0,921
Numune -4	0,908	0,914
Numune -5	0,913	0,917
Numune -6	0,908	0,905
Ortalama	0,912	0,915
Std. Sapma	0,004	0,006
%RSD (n=6)	0,42	0,62
t test	$t_{\text{hesaplanan}} < t_{\text{tablo}} (1,08 < 2,23)$	
F test	$F_{\text{hesaplanan}} < F_{\text{tablo}} (2,15 < 5,05)$	

Hesaplanan t ve F değerlerinin tablo değerlerinden küçük olması; farklı günlerde, farklı HPLC cihazları ile çalışan analistlerin, tayin sonuçları arasında %95 güven aralığında anlamlı bir fark olmadığını ve ara kesinlik parametresinin istatistiksel olarak uygun olduğunu göstermektedir.

5.5. Doğruluk

Geliştirilen yöntemle elde edilen analiz sonuçlarının, gerçek değere olan yakınlığını tespit etmek amacıyla; %80, %100 ve %120 derişim seviyelerinin her birinde etken madde ve safsızlıkları içeren 3'er çözelti hazırlanarak analiz edildi. Ortalama geri kazanım sonuçları Çizelge 5.38'de verilmiştir.

Çizelge 5.38. Geri kazanım sonuçları

Analit	Ortalama Geri Kazanım (%)
Etofenamat	100,0
Benzil alkol	101,8
Benzil nikotinat	97,3
Etofenamat miristat	102,6
Etofenamat palmitat	102,5
Etofenamat stearat	101,7
Benzaldehit	101,0
Flufenamik asit	100,1
Dekarboksil	101,2
Dietilenglikol diflufenamat	99,7
Flufenamik asit butilester	91,5

Etofenamat, benzil alkol, benzil nikotinat, etofenamat miristat, etofenamat palmitat, etofenamat stearat, benzaldehit, flufenamik asit, dekarboksil, dietilenglikol diflufenamat, flufenamik asit butil ester için geri kazanım sonuçlarının %91,5- 102,6 aralığında olması yöntemin doğruluğunu göstermektedir.

5.6. Ticari Numune Analizi

ICH Q2 (R1) rehberine göre valide edilen yöntem, eczaneden temin edilen ticari numunelere uygulanmıştır. Krem formülasyonunda etofenamat, benzil nikotinat ve benzil alkol içeren dört farklı firmaya ait farmasötik ürün analiz edilmiştir. Bu ürünlerin formülasyon bilgilerinde yer alan miktarları etofenamat için 100 mg/g, benzil nikotinat için 10 mg/g ve benzil alkol için 15 mg/g'dır. Geliştirdiğimiz yöntemle elde edilen analiz sonuçları Çizelge 5.39'da verilmiştir.

Çizelge 5.39. Ticari numunelerdeki etken madde, saflık ve yağ asidi esteri miktarları

Analit	Ticari Numune -1	Ticari Numune -2	Ticari Numune -3	Ticari Numune -4
Etofenamat (mg/g)	100,1	100,7	101,3	100,8
Benzil alkol (mg/g)	14,8	14,9	15,2	15,1
Benzil nikotinat (mg/g)	10,3	10,1	10,20	10,17
Etofenamat miristat (%)	0,040	0,033	0,022	0,007
Etofenamat palmitat (%)	0,047	0,014	0,033	0,025
Etofenamat stearat (%)	Tespit Edilmedi	Tespit edilmedi	Tespit Edilmedi	Tespit edilmedi
Benzaldehit (%)	0,026	0,015	0,044	0,056
Flufenamik asit (%)	0,151	0,033	0,023	0,017
Dekarboksil (%)	0,018	Tespit edilmedi	Tespit Edilmedi	Tespit edilmedi
Dietilenglikoldiflufenamat (%)	0,097	0,097	0,119	0,152
Flufenamik asit butilester (%)	0,165	Tespit edilmedi	Tespit Edilmedi	Tespit edilmedi

Çizelge 5.40. Formülasyon miktarına göre istatistiksel değerlendirme

Analit	Ticari Numune -1	Ticari Numune -2	Ticari Numune -3	Ticari Numune -4
Etofenamat	$t_{\text{hesaplanan}} < t_{\text{tablo}}$ (0,13 < 4,303)	$t_{\text{hesaplanan}} < t_{\text{tablo}}$ (2,96 < 4,303)	$t_{\text{hesaplanan}} < t_{\text{tablo}}$ (3,37 < 4,303)	$t_{\text{hesaplanan}} < t_{\text{tablo}}$ (4,10 < 4,303)
Benzil alkol	$t_{\text{hesaplanan}} < t_{\text{tablo}}$ (3,14 < 4,303)	$t_{\text{hesaplanan}} < t_{\text{tablo}}$ (0,49 < 4,303)	$t_{\text{hesaplanan}} < t_{\text{tablo}}$ (1,65 < 4,303)	$t_{\text{hesaplanan}} < t_{\text{tablo}}$ (0,75 < 4,303)
Benzil nikotinat	$t_{\text{hesaplanan}} < t_{\text{tablo}}$ (3,59 < 4,303)	$t_{\text{hesaplanan}} < t_{\text{tablo}}$ (1,54 < 4,303)	$t_{\text{hesaplanan}} < t_{\text{tablo}}$ (2,69 < 4,303)	$t_{\text{hesaplanan}} < t_{\text{tablo}}$ (2,54 < 4,303)

Ticari numuneler için bulunan sonuçlara t-test uygulanmış ve hesaplanan t değerleri ile tablo değeri Çizelge 5.40'da verilmiştir. Hesaplanan t değerlerinin tablo değerinden küçük olması, ticari numunelerde bulunan miktarlar ile formülasyonda beyan edilen miktarlar arasında %95 güven aralığında anlamlı bir fark olmadığını göstermekte ve yöntemin doğruluğunu istatistiksel olarak ispatlamaktadır.

6. TARTIŞMA ve SONUÇ

Farmasötik kalite kontrol laboratuvarlarında yarı-katı ürünler için hızlı, duyarlı ve güvenilir test metotlarına ihtiyaç duyulması, bu çalışmanın ana amacını oluşturmuştur. Bu sebeple etken madde, safsızlık ve yağ asidi esterleri için eş zamanlı nicel tayin imkanı sağlayan yöntem geliştirilmiştir.

Çözücü olarak 2-propanolün, hareketli faz olarak 10 mM KH_2PO_4 (pH 3,5, 4,7 ve 7,0) /asetonitril çözeltisinin 30 dakikalık gradient akış programında kullanıldığı şartlarda, flufenamik asit ve dekarboksil analitlerine ait pikler tespit edilememiştir. Hareketli faz olarak 10 mM sodyum asetat (pH 4,0 ve 5,0) /metanol çözeltisinin kullanıldığı gradient elusyonda ise flufenamik asit ve benzil nikotinat piklerine ait alıkonma zamanlarının dalga boyu değişim zamanı ile çakışması, piklerde bozulmaya yol açmıştır. Bununla birlikte zemin gürültüsünün artması, benzaldehit pik alanının uygun şekilde integrasyonuna imkan vermemiştir.

Çözücü olarak metanolün, hareketli faz olarak 10 mM sodyum asetat (pH 7,4)/metanol çözeltisinin 30 dakikalık gradient akış programında kullanıldığı şartlarda tüm analitler uygun rezolüsyon ile birbirinden ayrılmıştır. Kromatografik süreyi 20 dakikaya düşürmek için gradient akış programı değiştirilmiş ancak benzil nikotinat molekülünün yapısındaki yan bileşikler ile benzil alkol ve benzaldehit pikleri arasında girişim gözlenmiştir. Kromatografik süreyi 15 dakikaya düşürmek için gerçekleştirilen gradient akış programı değişikliğinde ise yine yukarıda bahsedilen girişim ile birlikte dietilenglikol diflufenamat ve flufenamik asit bütilester piklerinin girişim yaptığı görülmüştür.

Çözücü olarak metanolün, hareketli faz olarak 10 mM sodyum asetat (pH 7,4)/metanol çözeltisinin gradient akış programında (Çizelge 3.1) kullanıldığı şartlarda 11 analit, 15 dakikada tayin edilmiştir. HPLC cihazında sabit faz olarak Thermo MOS-1 Hypersil C8 125 mm x 4,6 mm x 5 μm , analitik kolonu kullanılmış, 40°C kolon sıcaklığında, 2,0 mL/dakika akış hızında ve 10 μL enjeksiyon hacminde tayin gerçekleştirilmiştir. Etofenamat, benzil alkol, benzil nikotinat, etofenamat miristat, etofenamat palmitat, etofenamat stearat, benzaldehit, flufenamik asit, dekarboksil, dietilenglikol diflufenamat, flufenamik asit bütilester için alıkonma zamanları sırasıyla 7.647, 3.366, 5.703, 9.794, 10.417, 11.270, 3.951, 4.823, 7.379, 8.816 ve 8.609 dakikadır.

Farmasötik preparatlarda etken madde yanında formülasyondaki koruyucu ve safsızlıkların miktarları düşük olduğundan, HPLC ile tek dalga boyunda eş zamanlı olarak etken madde ve safsızlıkların tayinleri duyarlık açısından zordur. Duyarlığı iyileştirmek için çok kanallı dedektörler kullanılarak her analit için en duyarlı dalga boyunda eş zamanlı analiz imkânı bulunur. HPLC cihazında benzil nikotinat, benzil alkol, benzaldehit en yüksek absorbansın elde edildiği 258 nm dalga boyunda tayin edilirken, analiz sırasında dalga boyu değiştirilerek farmasötik preparatlarda daha düşük derişimdeki etofenamat miristat, etofenamat palmitat, etofenamat stearat tayini 286 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. Duyarlılık problemi olmayan flufenamik asit, dekarboksil, dietilen glikol diflufenamat ve flufenamik asit butilester 258 nm dalga boyunda tayin edilmiştir. Etofenamat için en duyarlı dalga boyu 286 nm olup, farmasötik preparat içindeki miktarı fazla olduğundan Beer yasasından sapmamak için duyarlığı düşük olan 258 nm dalga boyunda tayin edilmiştir. Böylece dalga boyu $t = 0$ için 258 nm'ye ayarlanmış ve gradient elüsyonun 9,1 ci dakikasında 286 nm'ye değiştirilmiştir.

Validasyon çalışmalarında ICH Q2 (R1) rehberi referans alınarak seçicilik, doğrusalılık, kesinlik, doğruluk, teşhis sınırı ve tayin alt limiti parametreleri hesaplanarak analitik yöntem valide edilmiş ve ticari numuneler için yöntemin uygulugu istatistiksel olarak ispatlanmıştır.

İki pikin birbirinden uygun olarak ayrılıp ayrılmadığını gösteren rezolüsyon (R) değerleri hesaplanmış ve kromatogramda ard arda pikler için rezolüsyonun 1,5'ten büyük olduğu görülmüştür. Böylece analitlerin birbirinden uygun olarak ayrıldığı ispatlanmıştır.

Etken maddeler için hedef derişimlerinin LOQ ile %120'si arasında, safsızlıklar için ise ICH rehberine göre raporlama seviyesinden (LOQ) spesifikasyon sınırının %120'sine kadar olan derişim aralığında en az 5 derişimde hazırlanan standartlarla çizilen kalibrasyon doğrularının korelasyon katsayıları $1 \geq r > 0.997$ olarak hesaplanmıştır. Böylece etken madde ve safsızlıklar için, geliştirilen yöntemin ICH rehberine göre belirlenen derişim aralığında doğrusal olduğu görülmüştür.

Kabul edilebilir doğruluk ve kesinlik seviyesinde belirlenebilen en düşük derişim olan tayin alt limiti etofenamat için $6,2 \times 10^{-5}$ mg/mL, benzil alkol için $4,7 \times 10^{-4}$ mg/mL, benzil nikotinat için $5,4 \times 10^{-5}$ mg/mL, etofenamat miristat için $4,7 \times 10^{-5}$ mg/mL, etofenamat

palmitat için $6,5 \times 10^{-5}$ mg/mL, etofenamat stearat için $6,5 \times 10^{-5}$ mg/mL, benzaldehit için $4,8 \times 10^{-5}$ mg/mL, flufenamik asit için $6,5 \times 10^{-5}$ mg/mL, dekarboksil için $3,5 \times 10^{-5}$ mg/mL, dietilenglikol diflufenamat için $5,6 \times 10^{-5}$ mg/mL, flufenamik asit bütilester için $8,8 \times 10^{-5}$ mg/mL olarak hesaplanmıştır.

Gün içi yöntem kesinliği için bağıl standart sapma sonuçları %0.24 ile 2.02 arasında olup kabul edilebilir değerler arasındadır.

Ara kesinlik çalışmaları aynı laboratuvarında, farklı günlerde, farklı kişiler tarafından, farklı HPLC cihazı ile yapılmış ve çalışma sonuçları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde sonuçlar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır (Çizelge 5.27-37).

Sonucun doğru veya doğru kabul edilen değere yakınlığını gösteren ve yöntemin doğruluğunu ispatlayan yöntemlerden biri olan geri kazanım çalışmalarında, analitlere ait ortalama geri kazanım sonuçları %91.5 – 102.6 arasında olup kabul edilebilir sınırlar içerisindedir. Ayrıca geliştirilen yöntem ile ticari krem numuneleri analiz edilmiş ve bulunan sonuçlarla formülasyon miktarları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür (Çizelge 5.40).

Tüm validasyon sonuçları değerlendirildiğinde; hızlı, seçici, kesinliği ve duyarlılığı yüksek bir tayin yöntem geliştirilmiştir. Geliştirilen yöntem, etofenamat, benzil alkol ve benzil nikotinat içeren krem formülasyonundaki farmasötik preparatların rutin kalite kontrol analizlerinde kolay, hızlı, seçici ve duyarlı bir yöntem olarak uygulanabilir.



KAYNAKLAR

1. İnternet: Web: <https://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/quality-guidelines.html>. Son Erişim Tarihi: 21.08.2019.
2. İnternet: Web: <https://acikders.ankara.edu.tr/mod/resource/view.php?id=62234>. Son Erişim Tarihi: 21.08.2019.
3. Geçgil, Ş. (1991). *Farmasötik Teknoloji'ye Başlangıç*. İstanbul: Cihan Matbaacılık, 74-83
4. Swarbrick J, Boylan, B. J. (1991). *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. New York: Marcei Dekker Inc, 954-965
5. Aydemir, E. H. (2012a). Yerel tedavi (bölüm 2): Taşıyıcılar, yapı ve işlevleri. *Archives of the Turkish Dermatology & Venerology/Turkderm*, 46(4).
6. Kudo, C., Kori, M., Matsuzaki, K., Yamai, K., Nakajima, A., Shibuya, A., Niwa, H., Kamisaki, Y., and Wada, K. (2003). Diclofenac inhibits proliferation and differentiation of neural stem cells. *Biochemical pharmacology*, 66(2), 289-295.
7. Simmons, D. L., Botting, R. M., and Hla, T. (2004). Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacological reviews*, 56(3), 387-437.
8. Kayaalp, O. (2002). *Tıbbi farmakoloji*. Hacettepe-Taş Kitapçılık: Ankara, 916-994.
9. Keskin, İ. (2011). *Nonsteroidal Antiinflatuar İlaça Prenatal Maruz Kalmanın Periferik Sinir Gelişimi Üzerindeki Olumsuz Etkilerine Karşı Melatoninin Nöroprotektif Etkiliğinin Morfolojik Olarak Değerlendirilmesi*. Selçuk Üniversitesi, Konya, 22-23.
10. İnternet: Web: <https://www.edqm.eu/en/european-pharmacopoeia-ph-eur-9th-edition>. Son Erişim Tarihi: 21.08.2019.
11. İnternet: Web: <https://www.drugbank.ca/unearth/q?utf8=%E2%9C%93&query=etofena+mat&searcher=drugs>. Son Erişim Tarihi: 21.08.2019.
12. İnternet: Web: <https://www.ilacprospektusu.com/ara/ilac/etken-madde/etofenamat>. Son Erişim Tarihi: 21.08.2019.
13. İnternet: Web: http://www.veerchemie.com/our_products/benzyl-nicotinate/. Son Erişim Tarihi: 21.08.2019.
14. Abramovic, Z., Sustarsic, U., Teskac, K., Sentjurs, M., and Kristl, J. (2008). Influence Of Nanosized Delivery Systems With Benzyl Nicotinate And Penetration Enhancers On Skin Oxygenation. *International Journal of Pharmaceutics*, 359(1-2), 220-227.
15. Kristl, J., Abramović, Z., and Šentjurs, M. (2003). Skin oxygenation after topical application of liposome-entrapped benzyl nicotinate as measured by EPR oximetry in vivo: influence of composition and size. *AAPS PharmSci*, 5(1), 19.

16. İnternet: Web: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Flufenamic-acid>. Son Erişim Tarihi: 21.08.2019.
17. Dannhardt, G., Laufer, S., and Lehr, M. (1988). HPLC determination of etofenamate and flufenamic acid in biological material. *Clinical chemistry*, 34(12), 2580-2581.
18. İnternet: Web: <https://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=TR&language=tr&productNumber=F9005&brand=SI&PageToGoToURL=https%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fproduct%2Fsi%2Ff9005%3Fang%3Den>. Son Erişim Tarihi: 21.08.2019.
19. İnternet: Web: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5632>. Son Erişim Tarihi: 21.08.2019.
20. İnternet: Web: <http://drugcentral.org/drugcard/2788>. Son Erişim Tarihi: 21.08.2019.
21. İnternet: Web: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5632#section=Acute-Effects>. Son Erişim Tarihi: 21.08.2019.
22. İnternet: Web: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Benzaldehyde>. Son Erişim Tarihi: 21.08.2019.
23. Mashayekhi, H. A., Rezaee, M., Garmaroudi, S. S., Montazeri, N., and Ahmadi, S. J. (2011). Rapid and sensitive determination of benzaldehyde arising from benzyl alcohol used as preservative in an injectable formulation solution using dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography. *Analytical Sciences*, 27(8), 865-868.
24. İnternet: Web: http://www.merckmillipore.com/TR/tr/product/msds/MDA_CHEM-801756. Son Erişim Tarihi: 21.08.2019.
25. İnternet: Web: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Etofenamate-Myristate>. Son Erişim Tarihi: 21.08.2019.
26. İnternet: Web: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Etofenamate-Palmitate>. Son Erişim Tarihi: 21.08.2019.
27. İnternet: Web: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Etofenamate-Stearate>. Son Erişim Tarihi: 21.08.2019.
28. Plume, C. (1970). L'étude pharmacologique des toxicites. *Ann. Med. Vet.*, 114, 481-490.
29. İnternet: Web: <http://dergiler.ankara.edu.tr/dergiler/11/615/7937.pdf>. Son Erişim Tarihi: 21.08.2019.
30. Cheymol, J., Boissier, J., Lechat, P. (1961). Principles of the study of the toxicity of a new drug. *Therapie*, 16, 326-340.

31. Cheymol, J., Sabourdy, M., Beauvallet, M., Portet, R., Tuffrau, H. (1964). Variation of toxicity in an animal species according to the strain. study in the mouse. *Therapie*, 19, 323-343.
32. İnternet: Web: <https://www.ccohs.ca/oshanswers/chemicals/ld50.html>. Son Erişim Tarihi: 21.08.2019.
33. Jakobovic, H. R., Ackerman, A. B. (1992). *Structure and function of the skin: development, morphology and physiology*. WB Saunders Company: Philadelphia, 3-87.
34. Katz, M., Poulsen, B. J. (1971). Absorption of drugs through the skin: Concepts in Biochemical Pharmacology: Springer, 103-174.
35. Moore, L., Chien, Y. (1988). Transdermal Drug Delivery: A Review of Pharmaceutics, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics. *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems*, 4(4), 285-349.
36. İnternet: Web: <https://training.seer.cancer.gov/melanoma/anatomy/>. Son Erişim Tarihi: 21.08.2019.
37. Aydemir, E. H. (2012b). Yerel Tedavi (Bölüm I): Temel İlkeler ve Emilim. *TÜRKDERM-Deri Hastalıkları ve Frengi Arşivi*, 46(3), 117-120.
38. Yüksel, A., Tarımcı, N. (1988). Deriden emilme: Biyolojik mekanizmaya bir bakış. *Marmara Pharmaceutical Journal*, 4, 35-44.
39. Ağabeyoglu I, U. A. (1985). Deriden Emilme. *Fabad Farmasotik Bilimler Dergisi*, 10, 82-87.
40. İnternet: Web: Dermatolojide Topikal Tedavi. <https://www.frmtr.com/tip-biyoloji-farmakoloji/1326267-dermatolojide-topikal-tedavi-tip.html>. Son Erişim Tarihi: 21.08.2019.
41. Lachman, L., H.A. Lieberman, and J.L. Kanig, *The theory and practice of industrial pharmacy*. 1976: Lea & Febiger Philadelphia, 5.
42. Özen, G. (2009). *Farmasötik Kremlerde UV Türev Spektrofotometrisi ve Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi Yöntemleri ile İzokonazol Nitrat ve Diflukortolon Valerat Miktar Tayini*. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü, Ankara, 11-12.
43. Yasemin, Y. (2004). *Kozmetik Bilimi*. Ankara: Nobel Tıp Kitapevleri, 12.
44. Skoog, D. A., Holler, F. J., and Nieman, T. A. (1998). *Principles of instrumental analysis*: Saunders College Publishing, 45.
45. Engelhardt, H. (2004). One century of liquid chromatography: From Tswett's columns to modern high speed and high performance separations. *Journal of chromatography B*, 800(1-2), 3-6.

46. Zotou, A. (2012). An overview of recent advances in HPLC instrumentation. *Central European Journal of Chemistry*, 10(3), 554-569.
47. E Erdoğan, Ö. (2014). *Protein Temelli Yeni Bir HPLC Kolon Dolgu Maddesinin Hazırlanması ve Bazı Rasemik Bileşiklerin bu Kolon Üzerinden Enantiyomerik Rezolüsyonu*. Dicle Üniversitesi, Diyarbakır, 14-16.
48. Alver, E. (2005). *Basit Bir Yöntemle Hazırlanan A-Alüminanın Yüksek Basınç Sıvı Kromatografide (HPLC) Kolon Dolgu Maddesi Olarak ve Bazı İnorganik Anyonların Tayininde Kullanılması*. Kırıkkale Üniversitesi, Kırıkkale, 7-8.
49. Sağ, E. (2014). *Protein Ayırma Teknolojisi İçin HPLC Kolon Dolgu Materyali Tasarımı*, in *Fen Bilimleri Enstitüsü*. 2014, Cumhuriyet Üniversitesi: Sivas. p. 3-4.
50. Saylan, Y., *Boronat Afinité Kromatografisi İçin Monolitik HPLC Kolonlarının Hazırlanması*, in *Fen Bilimleri Enstitüsü*. 2011, Hacettepe Üniversitesi: Ankara. p. 13-14.
51. Moldoveanu, S.C., David, V. (2012). *Essentials in modern HPLC separations*. Newnes.
52. Kaplan, C. (2015). *Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi İle Letrozolün Farmasötik Preparatlarda Miktar Tayini*. İstanbul Üniversitesi, İstanbul, 9-10.
53. Yanık, S. (2014). *Naproksen'in Voltametri ve Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Teknikleri ile İlaç Dozaj Formlarından Miktarının Belirlenmesi*, in *Fen Bilimleri Enstitüsü*, Çanakkale 18 Mart Üniversitesi: Çanakkale, 33-34.
54. Ulusoy, E. (2010). *Anzer Balı ve Poleninin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi İle Fenolik Bileşiminin Belirlenmesi ve Antioksidan Özellikleri*, *Fen Bilimleri Enstitüsü*. Karadeniz Teknik Üniversitesi: Trabzon. p. 23-24.
55. Hanai, T.T. (2007). *HPLC: a practical guide*. New York: Royal Society of Chemistry, 5.
56. Aközlü, A. (2012). *Kayseri ve Civarında Geleneksel Yollarla Üretilen Pekmezlerdeki Hidroksimetil Furfural Miktarlarının Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ile Tayini*. Erciyes Üniversitesi, Kayseri, 16-17.
57. Güdücü, N. (2014). *Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ile Bitki Koruma Ürünlerinin Çoklu Kalite Kontrolü için Yöntem Geliştirilmesi*. Gazi Üniversitesi, Ankara, 18-20.
58. Keşkek, M. (2016). *Trokserutin ve Karbazokromun Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yöntemi ile Farmasötik Preparatlardan Miktar Tayini*. İstanbul Üniversitesi, İstanbul, 14-15.
59. İnternet: Web: McPolin, O. (2009) *An introduction to HPLC for pharmaceutical analysis*. Lulu.com. Son Erişim Tarihi: 21.08.2019.

60. Dong, M. W. (2006). *Modern HPLC for practicing scientists*: John Wiley & Sons. 47-111.
61. Schoenmakers, P. J., van Molle, S., Hayes, C. M., and Uunk, L. G. (1991). Effects of pH in reversed-phase liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 250, 1-19.
62. Dean, J. A., (1980). *Introduction to modern liquid chromatography* (Snyder, LR). London: ACS Publications, 56.
63. Meyer, V. R. (2013). *Practical high-performance liquid chromatography*: New York: John Wiley & Sons, 12.
64. Weston, A., Brown, P. R. (1997). *High performance liquid chromatography & capillary electrophoresis: principles and practices*. New York: Elsevier, 5.
65. Gündüz, T. (2001). *İnstrümental analiz*. Ankara: Gazi Büro Kitapevi, 3.
66. Harris, D.C. (2007). *Quantitative Chemical Analysis*. New York: Freeman and Company, 6.
67. Kafalı, H. (2008). *Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Kolon Sonrası Türevlendirme ile 7 Adet Sulfonamid Tespitinin Metot Validasyonu*. Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta, 61-63.
68. Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F., Whitehouse, C. M. (1989). Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*, 246(4926), 64-71.
69. Gaskell, S. J. (1997). Electrospray: principles and practice. *Journal of mass spectrometry*, 32(7), 677-688.
70. Yinon, J. (2004). Analysis of explosives by LC/MS. *Advances in Forensic Applications of Mass Spectrometry*, 231-274.
71. İnternet: Web: <http://publications.iupac.org/pac/2002/pdf/7405x0835.pdf>. Son Erişim Tarihi: 21.08.2019.
72. İnternet: Web: <https://www.fda.gov/media/87801/download>. Son Erişim Tarihi: 21.08.2019.
73. İnternet: Web: https://www.who.int/medicines/areas/quality_safety/quality_assurance/28092018Guideline_Validation_AnalyticalMethodValidation-Appendix4_QAS16-671.pdf. Son Erişim Tarihi: 21.08.2019.
74. İnternet: Web: <https://tezverianaliz.com/biyoistatistik-dershanesi/t-test-students-t-test/>. Son Erişim Tarihi: 21.08.2019.
75. İnternet: Web: www.baskent.edu.tr > ~tkorkmaz > ISLE244 > ikiortalamafark testleri. Son Erişim Tarihi: 21.08.2019.

76. Dong, X., Tang, J., Ren, Y., and Chen, X. (2019). Development of a HPLC-FL method to determine benzaldehyde after derivatization with N-acetylhydrazine acridone and its application for determination of semicarbazide-sensitive amine oxidase activity in human serum. *RSC Advances*, 9(12), 6717-6723.
77. Gumustas, M., Tuba Sengel-Turk, C., Badilli, U., Amasya, G., Ozkan, S. A., and Tarimci, N. (2017). Optimization of Stability Indicating LC Method for the Sensitive In vitro Determination from Solid Lipid Nanoparticles and Ex vivo Analysis from Rat Skin of Etofenamate. *Current Pharmaceutical Analysis*, 13(1), 63-71.
78. Masoumi, V., Mohammadi, A., Khoshayand, M. R., and Ansari, M. (2017). Application of polyaniline–multiwalled carbon nanotubes composite fiber for determination of benzaldehyde in injectable pharmaceutical formulations by solid-phase microextraction GC–FID using experimental design. *Journal of Analytical Chemistry*, 72(3), 264-271.
79. Shetti, N. P., Nayak, D. S., Malode, S. J., Kulkarni, R. M., Kulkarni, D. B., Teggi, R. A., and Joshi, V. V. (2017). Electrooxidation and determination of flufenamic acid at graphene oxide modified carbon electrode. *Surfaces and Interfaces*, 9, 107-113.
80. Darwish, H. W., Elzanfaly, E. S., Saad, A. S., and Abdelaleem, A. E.-B. (2016). Full spectrum and selected spectrum based multivariate calibration methods for simultaneous determination of betamethasone dipropionate, clotrimazole and benzyl alcohol: Development, validation and application on commercial dosage form. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 169, 50-57.
81. Peraman, R., Bhadraya, K., Reddy, Y. P., Reddy, C. S., and Lokesh, T. (2015). Analytical quality by design approach in RP-HPLC method development for the assay of etofenamate in dosage forms. *Indian journal of pharmaceutical sciences*, 77(6), 751.
82. Vandersee, S., Erdmenger, U., Patzelt, A., Beyer, M., Meinke, M. C., Darvin, M. E., and Lademann, J. (2016). Significance of the follicular pathway for dermal substance penetration quantified by laser Doppler flowmetry. *Journal of biophotonics*, 9(3), 276-281.
83. Mohammadi, A., Mohammadi, S., Bayandori Moghaddam, A., Masoumi, V., and Walker, R. B. (2013). Electropolymerized Fluorinated Aniline-Based Fiber for Headspace Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatographic Determination of Benzaldehyde in Injectable Pharmaceutical Formulations. *Journal of chromatographic science*, 52(9), 971-976.
84. Haddadi, H., Rezaee, M., Semnani, A., Mashayekhi, H. A., and Hosseini, A. (2014). Application of solid-phase extraction coupled with dispersive liquid–liquid microextraction for the determination of benzaldehyde in injectable formulation solutions. *Chromatographia*, 77(13-14), 951-955.

85. Peraman, R., Nayakanti, D., Dugga, H., and Kodikonda, S. (2013). Development and validation of a stability-indicating assay of etofenamate by rp-hplc and characterization of degradation products. *Scientia pharmaceutica*, 81(4), 1017-1028.
86. Murillo Pulgarin, J., Molina, A. A., and Ferreras, F. M. (2012). Simultaneous Determination of Mefenamic and Flufenamic Acids in Real Samples by Terbium-Sensitized Luminescence. *Analytical Letters*, 45(18), 2807-2822.
87. Mbah, C. (2010). Degradation kinetics of benzyl nicotinate in aqueous solution. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 72(1), 46.
88. Parys, W., Pyka, A. (2010). Use of tlc and densitometry to evaluate the chemical stability of nicotinic acid and its esters on silica gel. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 33(7-8), 1038-1046.
89. Hewala, I., El-Fatatre, H., Emam, E., and Mubrouk, M. (2010). Development and application of a validated stability-indicating HPLC method for simultaneous determination of granisetron hydrochloride, benzyl alcohol and their main degradation products in parenteral dosage forms. *Talanta*, 82(1), 184-195.
90. Shabir, G. A. (2007). Method development and validation of preservatives determination (benzyl alcohol, ethylene glycol monophenyl ether, methyl hydroxybenzoate, ethyl hydroxybenzoate, propyl hydroxybenzoate, and butyl hydroxybenzoate) using HPLC. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 30(13), 1951-1962.
91. López-Flores, J., Fernández-De Córdova, M. L., and Molina-Díaz, A. (2007). Multicommutated flow-through optosensors implemented with photochemically induced fluorescence: determination of flufenamic acid. *Analytical Biochemistry*, 361(2), 280-286.
92. Rizk, M., Ibrahim, F., Hefnawy, M., and Nasr, J. (2006). Fourth order derivative spectrophotometric determination of benzyl alcohol in piroxicam injections. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 53(4), 767-772.
93. Patil, D., Mangaonkar, K., and Swati, R. L. (2006). Gas Chromatographic Determination of Benzyl Alcohol in Midazolam Injection. *Asian Journal of Chemistry*, 18(2), 1509.
94. de la Peña, A. M., Díez, N. M., Gil, D. B., Olivieri, A., & Escandar, G. (2006). Simultaneous determination of flufenamic and meclofenamic acids in human urine samples by second-order multivariate parallel factor analysis (PARAFAC) calibration of micellar-enhanced excitation–emission fluorescence data. *Analytica Chimica Acta*, 569(1-2), 250-259.
95. Kazemifard, A. G., Moore, D. E., and Mohammadi, A. (2002). Polarographic determination of benzaldehyde in benzyl alcohol and sodium diclofenac injection formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 30(2), 257-262.

96. Bender, T., Bariska, J., Rojkovich, B., and Bálint, G. (2001). Etofenamate levels in human serum and synovial fluid following iontophoresis. *Arzneimittelforschung*, 51(06), 489-492.
97. Abdel-Hamid, M. E., Novotny, L., and Hamza, H. (2001). Determination of diclofenac sodium, flufenamic acid, indomethacin and ketoprofen by LC-APCI-MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 24(4), 587-594.
98. Beckermann, B., Bock, E., Kamp, R., and Dell, H. (1990). Plasma level studies in volunteers after intramuscular injection of various doses of etofenamate in an oily solution. *Arzneimittel-Forschung*, 40(3), 305-311.
99. Dell, H., Fiedler, J., Jacobi, H., and Kolle, J. (1981). Gas-liquid chromatographic determination of etofenamate/Determination, method and use in biological material (author's transl). *Arzneimittel-Forschung*, 31(1), 17-21.
100. Dell, H., Fiedler, J., and Wäsche, B. (1977). Analysis of etofenamate. Particular determination in biological material (author's transl). *Arzneimittel-Forschung*, 27(6B), 1312-1316.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : ÇALIKOĞLU, Mehmet
 Uyuğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 08/10/1982 Zonguldak
 Medeni hali : Evli
 Telefon : 0549 7934577
 e-mail : mcalikoglu67@hotmail.com



Eğitim Derecesi	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Doktora	Gazi Üniversitesi /Eczacılık Fakültesi / Analitik Kimya Anabilim Dalı	Devam ediyor
Yüksek lisans	Gazi Üniversitesi /Eczacılık Fakültesi / Analitik Kimya Anabilim Dalı	2011
Lisans	Karadeniz Teknik Üniversitesi /Rize Fen Edebiyat Fakültesi /Kimya Bölümü	2004
Lise	Mehmet Çelikel Lisesi	2000

İş Deneyimi, Yıl	Yer	Görev
2019 – devam ediyor	Bayer Türk	CMO Kalite Müdürü
2015 - 2019	Bayer Türk	Proje Müdürü -Kalite
2013 - 2015	Bayer Türk	Analist
2013 - 2013	Biofarma İlaç	Validasyon Şefi
2006 - 2013	Nobel İlaç	Validasyon Şefi

Yabancı Dil

İngilizce

Hobiler

Doğa yürüyüşleri yapmak, belgesel izlemek, yüzmek



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..