TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SÜLFONAMİDLERİ İÇEREN FARMASÖTİK PREPARATLARDAKİ ETKİN MADDELERİN CEVAP YÜZEY METODOLOJİSİNE DAYANAN AŞIRI PERFORMANSLI SIVI KROMATOGRAFİSİ İLE MİKTAR TAYİNLERİ

Zehra Ceren ERTEKİN ÖZKAN

ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Erdal DİNÇ

ANKARA
2021

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SÜLFONAMİDLERİ İÇEREN FARMASÖTİK PREPARATLARDAKİ ETKİN MADDELERİN CEVAP YÜZEY METODOLOJİSİNE DAYANAN AŞIRI PERFORMANSLI SIVI KROMATOGRAFİSİ İLE MİKTAR TAYİNLERİ

Zehra Ceren ERTEKİN ÖZKAN

ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Erdal DİNÇ

ANKARA

2021

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan		ii
Kabul ve Onay		iii
İçindekiler		iv
Önsöz		viii
Simgeler ve Kısaltmalar		x
Şekiller		xii
Çizelgeler		xviii
1. GİRİŞ		1
1.1.	Trimetoprim (TMP)	5
1.1.1.	Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri	5
1.1.2.	Farmakolojik Özellikleri	7
1.2.	Sülfadiyazin (SDZ)	8
1.2.1.	Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri	8
1.2.2.	Farmakolojik Özellikleri	10
1.3.	Sülfadoksin (SDX)	11
1.3.1.	Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri	11
1.3.2.	Farmakolojik Özellikleri	13
1.4.	Sülfadimidin (SDM)	14
1.4.1.	Kimyasal ve Fiziksel özellikleri	14
1.4.2.	Farmakolojik Özellikleri	16
1.5.	Antibakteriyel Tedavi ve Sülfonamid Grubu Antibiyotikler	16
1.6.	Etken Maddelerin Miktar Tayini İçin Kullanılan Analitik Yöntemler	24
1.6.1.	TMP Miktar Tayini İçin Uygulanan Analiz Yöntemleri	24
1.6.1.1.	Spektroskopik Yöntemler	24
1.6.1.2.	Kromatografik Yöntemler	27
1.6.1.3.	Elektroforetik Yöntemler	32
1.6.1.4.	Elektrokimyasal Yöntemler	32
1.6.2.	SDZ Miktar Tayini İçin Uygulanan Analiz Yöntemleri	33

1.6.2.1. Spektroskopik Yöntemler 34
1.6.2.2. Kromatografik Yöntemler 36
1.6.2.3. Elektroforetik Yöntemler 39
1.6.2.4. Elektrokimyasal Yöntemler 41
1.6.3. SDX Miktar Tayini İçin Uygulanan Analiz Yöntemleri 42
1.6.3.1. Spektroskopik Yöntemler 42
1.6.3.2. Kromatografik Yöntemler 44
1.6.3.3. Elektroforetik Yöntemler 50
1.6.3.4. Elektrokimyasal Yöntemler 51
1.6.4. SDM Miktar Tayini İçin Uygulanan Analiz Yöntemleri 52
1.6.4.1. Spektroskopik Yöntemler 53
1.6.4.2. Kromatografik Yöntemler 55
1.6.4.3. Elektroforetik Yöntemler 58
1.6.4.4. Elektrokimyasal Yöntemler 59

2. GEREÇ VE YÖNTEM 62
2.1. Gereç 62
2.1.1. Cihazlar ve Sarf Malzemeler 62
2.1.2. Bilgisayar Yazılımları 62
2.1.3. Kimyasallar 63
2.1.4. Farmasötik Preparatlar 63
2.2. Yöntem 64
2.2.1. Aşırı Performanslı Sıvı Kromatografisi (UPLC) 64
2.2.2. Deneysel Tasarım ve Optimizasyon 71
2.2.2.1. Temel Kavramlar 76
2.2.2.2. Deney Tasarımları 80
2.2.2.2.1. Tam Faktöriyel Tasarım (FFD) 82
2.2.2.2.2. Merkezi Bileşenli Tasarım (CCD) 83
2.2.2.2.3. Box-Behnken Tasarım (BBD) 85
2.2.2.3. Modelleme 86
2.2.2.4. Cevap Yüzey Grafikleri 89
2.2.3. Kromatografik Cevap Fonksiyonu 90

3. BULGULAR 93
3.1. SDZ ve TMP Karışımının Analizi 94
3.1.1. UPLC Yöntcminin Optimizasyonu 94
3.1.1.1. Tam Faktöriycl Tasarım vc Yöntcm Optimizasyonu 101
3.1.1.2. Box-Behnken Tasarım ve Yöntem Optimizasyonu 107
3.1.1.3. Merkezi Bileşenli Tasarım ve Yöntem Optimizasyonu 113
3.1.1.4. Tasarımların Karşılaştırılması 119
3.1.2. Kalibrasyon Eğrilerinin Hazırlanması 123
3.1.3. Yöntemlerin Validasyonu 127
3.1.4. Yöntemlerin Farmasötik Preparatlara Uygulanması 134
3.2. SDX vc TMP Karışımının Analizi 138
3.2.1. UPLC Yöntcminin Optimizasyonu 138
3.2.1.1. Box-Behnken Tasarım ve Yöntem Optimizasyonu 146
3.2.1.2. Merkezi Bileşenli Tasarım ve Yöntem Optimizasyonu 155
3.2.1.3. Tasarımların Karşılaştırılması 163
3.2.2. Kalibrasyon Eğrilerinin Hazırlanması 166
3.2.3. Yöntemlerin Validasyonu 170
3.2.4. Yöntemlerin Farmasötik Preparatlara Uygulanması 177
3.3. SDM ve TMP Karışımının Analizi 181
3.3.1. UPLC Yöntcminin Optimizasyonu 181
3.3.1.1. Tam Faktöriycl Tasarım vc Yöntcm Optimizasyonu 188
3.3.1.2. Box-Behnken Tasarım ve Yöntem Optimizasyonu 194
3.3.1.3. Merkezi Bileşenli Tasarım ve Yöntem Optimizasyonu 200
3.3.1.4. Tasarımların Karşılaştırılması 206
3.3.2. Kalibrasyon Eğrilerinin Hazırlanması 209
3.3.3. Yöntemlerin Validasyonu 214
3.3.4. Yöntemlerin Farmasötik Preparatlara Uygulanması 222

4. TARTIŞMA 228
4.1. SDZ ve TMP Karışımının Analizi 229
4.2. SDX ve TMP Karışımının Analizi 232
4.3. SDM ve TMP Karışımının Analizi 236

5. SONUÇ VE ÖNERİLER 240
ÖZET 243
SUMMARY 245
KAYNAKLAR 247
ÖZGEÇMİŞ 259

ÖNSÖZ

Bu tez kapsamında sülfonamidleri içeren veteriner preparatlardaki etken maddelerin miktar tayinlerini gerçekleştirmek üzere yeni aşırı performanslı sıvı kromatografisi yöntemleri geliştirilmiştir. Yöntem geliştirme aşamasında yeterli kromatografik ayrımı en kısa sürede sağlayacak kromatografik şartların belirlenmesi için cevap yüzey metodolojisinden yararlanılmıştır. Farklı deney tasarımları karşılaştırmalı olarak kullanılarak, deney tasarımının optimizasyon sürecini, optimal olarak tespit edilen kromatografik şartları ve analiz sonuçlarını nasıl etkilediği araştırılmıştır. Geliştirilen bu yöntemler, analitik validasyon çalışmaları ile geçerlilikleri kanıtlandıktan sonra iki farklı etken madde içeren veteriner preparatların analizi için başarıyla uygulanmıştır.

Bu tez çalışmasının planlanması, yürütülmesi ve sonuçlandırılmasında yakın ilgi ve desteğini gördüğüm, doktora eğitimim boyunca tecrübesi ve bilgisiyle bana yol gösterici olan, çalışkanlığına hayran olduğum çok kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Erdal DİNÇ'e teşekkür eder saygılarımı sunarım.

Lisans eğitimime başladığım günden itibaren mesleki birikimime sağladıkları katkılar için anabilim dalımızın sayın öğretim üyelerine, yakın ilgisi ve desteğiyle her zaman yanımda olan Doç. Dr. Özgür ÜSTÜNDAĞ'a teşekkür ederim. Analitik Kimya Anabilim Dalı'nda görev yapan ve beraber çalışmaktan mutluluk duyduğum arkadaşlarım Doç. Dr. M. Gökhan ÇAĞLAYAN, Dr. Burçin BOZAL PALABIYIK, Dr. Sevinç KURBANOĞLU, Dr. Engin ER, Leyla KARADURMUŞ, Göksu ÖZÇELİKAY ve Esra ÜNLÜ'ye destekleri ve hoşgörüleri için teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasında kullanmış olduğum ticari preparatları temin etmemi sağlayan Veteriner Hekim Mehmet ÜVEY'e teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimine başlamam ve sürdürmem için en büyük motivasyon kaynağım olan Dr. Gülin AMASYA, Uzm. Ecz. T. Mert SERİM, Uzm. Ecz. G. Rüya TOPAL,

Dr. Ezgi ÖNER, Uzm. Ecz. Sakine ATİLA KARACA ve Bahar AKYÜZ'e arkadaşlıkları ve destekleri için teşekkür ederim. Yanımda oldukları için şanslı hissettiğim arkadaşlarımın dışında, artık dünyaya dağılmış olan ve her daim özlediğim arkadaşlarıma bu çalışma sırasında gösterdikleri manevi destek için bir teşekkür borçluyum.

Bu çalışmadaki görselleri hazırlamak için bana yardımcı olan, hayattaki en iyi arkadaşım, eşim Berk ÖZKAN'a bana olan inancı ve sevgisinin yanında hayatıma kattıkları için de teşekkür ederim.

Geleceğimi ve mutluluğumu öncelikleri haline getirmiş olan anne ve babama koşulsuz sevgileri, fedakârlıkları ve bana aşıladıkları özgüven için minnettarım.

Bu çalışmayı şiddetin her türüyle mücadele etmek zorunda kalan kadınlara ithaf ediyorum.

SİMGELER VE KISALTMALAR

α	Seçicilik
ANOVA	Varyans analizi
BBD	Box-Behnken tasarım
BEH	Etilen köprülü hibrid
BSS	Bağıl standart sapma
C_{18}	Oktadesilsilan
C_8	Oktilsilan
CCD	Merkezi bileşenli tasarım
DNA	Deoksiribonükleik asit
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
FFD	Tam faktöriyel tasarım
GA	Güven aralığı
h	Pik yüksekliği
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
IR	Kızılötesi
KCF	Kromatografik cevap fonksiyonu
LC	Sıvı kromatografi
MeOH	Metanol
MS	Kütle spektrometri
N	Teorik tabaka sayısı
PABA	Para-amino benzoik asit
PDA	Fotodiyotdizisi dedektör
R	Ayırıcılık
RNA	Ribonükleik asit
SDM	Sülfadimidin
SDX	Sülfadoksin
SDZ	Sülfadiyazin
SS	Standart sapma
T	Kuyruklanma
t_0	Ölü zaman

t_R	Alıkonma zamanı
TMP	Trimetoprim
UPLC	Aşırı performanslı sıvı kromatografisi
UV	Ultraviyole
w	Taban genişliği

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Trimetoprimin kimyasal yapısı 5

Şekil 1.2. Trimetoprimin UV absorbans spektrumu 6

Şekil 1.3. Trimetoprimin IR spektrumu 6

Şekil 1.4. Sülfadiyazinin kimyasal yapısı 8

Şekil 1.5. Sülfadiyazinin UV absorbans spektrumu 9

Şekil 1.6. Sülfadiyazinin IR spektrumu 9

Şekil 1.7. Sülfadoksinin kimyasal yapısı 11

Şekil 1.8. Sülfadoksinin UV absorbans spektrumu 12

Şekil 1.9. Sülfadoksinin IR spektrumu 12

Şekil 1.10. Sülfadimidinin kimyasal yapısı 14

Şekil 1.11. Sülfadimidinin UV absorbans spektrumu 15

Şekil 1.12. Sülfadimidinin IR spektrumu 15

Şekil 1.13. Tetrahidrofolik asit sentezinin sülfonamidler ve diaminopirimidinler tarafından inhibisyonu (Clark, 2012) 18

Şekil 1.14. Para-aminobenzoik asit (PABA)'in kimyasal yapısı 20

Şekil 1.15. Sülfonamid grubu antibiyotiklerin genel yapısı 20

Şekil 1.16. Sülfonamidlerin sulu çözeltilerinde amfoterik davranışları 21

Şekil 2.1. UPLC cihazının şematik gösterimi 66

Şekil 2.2. Örnek bir UPLC kromatogramı ve temel kromatografik parametreler 68

Şekil 2.3. Literatürdeki kromatografi çalışmalarında cevap yüzey metodolojisinin kullanım oranlarının yıllara göre dağılımı 75

Şekil 2.4. Bir sistemin şematik gösterimi 76

Şekil 2.5. Tek faktörlü bir çalışmaya ait deney uzayı 76

Şekil 2.6. İki faktörlü bir çalışmaya ait deney uzayı 77

Şekil 2.7. Tek faktörlü bir çalışmaya ait kodlanmış faktör seviyeleri 78

Şekil 2.8. İki faktörlü bir çalışmaya ait kodlanmış faktör seviyeleri 78

Şekil 2.9. 2^2 ve 2^3 faktöriyel deney tasarımları 81

Şekil 2.10. 3^3 tam faktöriyel tasarım 82

Şekil 2.11. Üç faktörlü bir merkezi bileşenli tasarım 84

Şekil 2.12. Üç faktörlü Box-Behnken tasarım 85

Şekil 2.13. İki faktörlü bir modele ait cevap yüzey grafiği ve eş yükselti diyagramı 89

Şekil 3.1. Hareketli faz sistemindeki tamponun pH değerinin SDZ ve TMP ayrımına etkisini gösteren kromatogramlar 97

Şekil 3.2. Hareketli faz sistemindeki tampon yüzdesinin SDZ ve TMP ayrımına etkisini gösteren kromatogramlar 98

Şekil 3.3. Kolon sıcaklığının SDZ ve TMP ayrımına etkisini gösteren kromatogramlar 98

Şekil 3.4. Akış hızının SDZ ve TMP ayrımına etkisini gösteren kromatogramlar 99

Şekil 3.5. SDZ ve TMP için tam faktöriyel tasarıma göre elde edilen kromatogramlar 103

Şekil 3.6. SDZ-TMP için FFD ile elde edilen a) kolon sıcaklığı-tampon yüzdesi ile KCF, b) akış hızı-kolon sıcaklığı ile KCF, c) tampon yüzdesi-akış hızı ile KCF arasındaki ilişkiyi gösteren yüzey grafikleri ve eş yükselti diyagramları 106

Şekil 3.7. SDZ ve TMP için Box-Behnken tasarıma göre elde edilen kromatogramlar 109

Şekil 3.8. SDZ-TMP için BBD ile elde edilen a) Kolon sıcaklığı-tampon yüzdesi ile KCF, b) akış hızı-kolon sıcaklığı ile KCF, c) tampon yüzdesi-akış hızı ile KCF arasındaki ilişkiyi gösteren yüzey grafikleri ve eş yükselti diyagramları 112

Şekil 3.9. SDZ ve TMP için merkezi bileşenli tasarıma göre elde edilen kromatogramlar 115

Şekil 3.10. SDZ-TMP için CCD ile elde edilen a) Kolon sıcaklığı-tampon yüzdesi ile KCF, b) akış hızı-kolon sıcaklığı ile KCF, c) tampon yüzdesi-akış hızı ile KCF arasındaki ilişkiyi gösteren yüzey grafikleri ve eş yükselti diyagramları 118

Şekil 3.11. SDZ-TMP karışımı için farklı tasarımlar kullanılarak saptanan optimal kromatografik şartlarda kaydedilen kromatogramlar 121

Şekil 3.12. SDZ ve TMP karışımının analizi için hazırlanan kalibrasyon seti planı 123

Şekil 3.13. SDZ-TMP kalibrasyon setinin FFD-UPLC yöntemi ile 267 ve 230 nm'de kaydedilen kromatogramları 125

Şekil 3.14. SDZ-TMP kalibrasyon setinin CCD-UPLC yöntemi ile 267 ve 230 nm'de kaydedilen kromatogramları 126

Şekil 3.15. FFD-UPLC yöntemlerinin SDZ-TMP içeren veteriner preparatlarına uygulanması ile elde edilen kromatogramlar 135

Şekil 3.16. CCD-UPLC yöntemlerinin SDZ-TMP içeren veteriner preparatlarına uygulanması ile elde edilen kromatogramlar 136

Şekil 3.17. Kolon sıcaklığının SDX ve TMP ayrımına etkisini gösteren kromatogramlar 142

Şekil 3.18. Hareketli faz sistemindeki tamponun pH değerinin SDX ve TMP ayrımına etkisini gösteren kromatogramlar 142

Şekil 3.19. Hareketli faz sistemindeki tampon yüzdesinin SDX ve TMP ayrımına etkisini gösteren kromatogramlar 143

Şekil 3.20. Akış hızının SDX ve TMP ayrımına etkisini gösteren kromatogramlar 143

Şekil 3.21. SDX ve TMP için Box-Behnken tasarıma göre elde edilen kromatogramlar 148

Şekil 3.22. SDX-TMP için BBD ile elde edilen a) Kolon sıcaklığı-tampon pH'ı ile KCF b) kolon sıcaklığı-tampon yüzdesi ile KCF c) kolon sıcaklığı-akış hızı ile KCF d) tampon pH'ı-tampon yüzdesi ile KCF e) tampon pH'ı-akış hızı ile KCF f) tampon yüzdesi-akış hızı ile KCF arasındaki ilişkiyi gösteren yüzey grafikleri ve eş yükselti diyagramları 151

Şekil 3.23. SDX ve TMP için merkezi bileşenli tasarıma göre elde edilen kromatogramlar 157

Şekil 3.24. SDX-TMP için CCD ile elde edilen a) Kolon sıcaklığı-tampon pH'ı ile KCF b) kolon sıcaklığı-tampon yüzdesi ile KCF c) kolon sıcaklığı-akış hızı ile KCF d) tampon pH'ı-tampon yüzdesi ile KCF e) tampon pH'ı-akış hızı ile KCF f) tampon yüzdesi-akış hızı ile KCF arasındaki ilişkiyi gösteren yüzey grafikleri ve eş yükselti diyagramları 160

Şekil 3.25. SDX-TMP karışımı için BBD ve CCD tasarımları kullanılarak saptanan optimal kromatografik şartlarda kaydedilen kromatogramlar 165

Şekil 3.26. SDX ve TMP kalibrasyon seti diyagramı 167

Şekil 3.27. SDX-TMP kalibrasyon setinin BBD-UPLC yöntemi ile 250 ve 273 nm'de kaydedilen kromatogramları 168

Şekil 3.28. SDX-TMP kalibrasyon setinin CCD-UPLC yöntemi ile 250 ve 273 nm'de kaydedilen kromatogramları 169

Şekil 3.29. BBD-UPLC yönteminin TMP ve SDX içeren farmasötik preparatlara uygulanması ile elde edilen kromatogramlar 178

Şekil 3.30. CCD-UPLC yönteminin TMP ve SDX içeren farmasötik preparatlara uygulanması ile elde edilen kromatogramlar 179

Şekil 3.31. Kolon sıcaklığının SDM ve TMP ayrımına etkisini gösteren kromatogramlar 184

Şekil 3.32. Hareketli fazdaki 10 mM $(NH_4)_2CO_3$ çözeltisi yüzdesinin SDM ve TMP ayrımına etkisini gösteren kromatogramlar 185

Şekil 3.33. Akış hızının SDM ve TMP ayrımına etkisini gösteren kromatogramlar 185

Şekil 3.34. SDM ve TMP için tam faktöriyel tasarıma göre elde edilen kromatogramlar 190

Şekil 3.35. SDM-TMP için FFD ile elde edilen a) Kolon sıcaklığı-$(NH_4)_2CO_3$ yüzdesi ile KCF, b) akış hızı-kolon sıcaklığı ile KCF, c) $(NH_4)_2CO_3$ yüzdesi-akış hızı ile KCF arasındaki ilişkiyi gösteren yüzey grafikleri ve eş yükselti diyagramları 193

Şekil 3.36. SDM ve TMP için Box-Behnken tasarıma göre elde edilen kromatogramlar 196

Şekil 3.37. SDM-TMP için BBD ile elde edilen a) Kolon sıcaklığı-$(NH_4)_2CO_3$ yüzdesi ile KCF, b) akış hızı-kolon sıcaklığı ile KCF, c) $(NH_4)_2CO_3$ yüzdesi-akış hızı ile KCF arasındaki ilişkiyi gösteren yüzey grafikleri ve eş yükselti diyagramları 199

Şekil 3.38. SDM ve TMP için merkezi bileşenli tasarıma göre elde edilen kromatogramlar 202

Şekil 3.39. SDM-TMP için CCD ile elde edilen a) Kolon sıcaklığı-$(NH_4)_2CO_3$ yüzdesi ile KCF, b) akış hızı-kolon sıcaklığı ile KCF, c) $(NH_4)_2CO_3$ yüzdesi-akış hızı ile KCF arasındaki ilişkiyi gösteren yüzey grafikleri ve eş yükselti diyagramları 205

Şekil 3.40. SDM-TMP karışımı için farklı tasarımlar kullanılarak saptanan optimal kromatografik şartlarda kaydedilen kromatogramlar 207

Şekil 3.41. SDM ve TMP kalibrasyon seti diyagramı 210

Şekil 3.42. SDM-TMP kalibrasyon setinin FFD-UPLC yöntemi ile 268 ve 235 nm'de kaydedilen kromatogramları 211

Şekil 3.43. SDM-TMP kalibrasyon setinin BBD-UPLC yöntemi ile 268 ve 235 nm'de kaydedilen kromatogramları 212

Şekil 3.44. SDM-TMP kalibrasyon setinin CCD-UPLC yöntemi ile 268 ve 235 nm'de kaydedilen kromatogramları 213

Şekil 3.45. FFD-UPLC yönteminin SDM ve TMP içeren farmasötik preparatlara uygulanması ile elde edilen kromatogramlar 223

Şekil 3.46. BBD-UPLC yönteminin SDM ve TMP içeren farmasötik preparatlara uygulanması ile elde edilen kromatogramlar 224

Şekil 3.47. CCD-UPLC yönteminin SDM ve TMP içeren farmasötik preparatlara uygulanması ile elde edilen kromatogramlar 225

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. Faktör seviyeleri ve karşılık geldikleri fiziksel değerler 79

Çizelge 2.2. İki faktörlü bir deney planı için kodlanmış ve gerçek seviyelerin verildiği tasarım matrisi 81

Çizelge 3.1. SDZ ve TMP karışımının kromatografik analizleri için belirlenen parametreler 95

Çizelge 3.2. SDZ ve TMP için uygulanan FFD ve BBD tasarımlarında kullanılan faktörler ve bu faktörlerin seviyeleri 100

Çizelge 3.3. SDZ ve TMP için uygulanan CCD tasarımında kullanılan faktörler ve bu faktörlerin seviyeleri 100

Çizelge 3.4. Tam faktöriyel tasarım matrisi ile ölçülen, tahmin edilen ve artık KCF değerleri 102

Çizelge 3.5. SDZ-TMP için FFD ile elde edilen ampirik modele ait katsayılar ve istatistiksel sonuçları 104

Çizelge 3.6. SDZ-TMP karışımı için FFD tasarımla elde edilen optimal kromatografik şartlar 107

Çizelge 3.7. Box-Behnken tasarım matrisi ile ölçülen, tahmin edilen ve artık KCF değerleri 108

Çizelge 3.8. SDZ-TMP için BBD ile elde edilen ampirik modele ait katsayılar ve istatistiksel sonuçları 110

Çizelge 3.9. SDZ-TMP karışımı için Box-Behnken tasarımla elde edilen optimal kromatografik şartlar 113

Çizelge 3.10. Merkezi bileşenli tasarım matrisi ile ölçülen, tahmin edilen ve artık KCF değerleri 114

Çizelge 3.11. SDZ-TMP için CCD ile elde edilen ampirik modele ait katsayılar ve istatistiksel sonuçları 116

Çizelge 3.12. SDZ-TMP karışımı için merkezi bileşenli tasarımla elde edilen optimal kromatografik şartlar 119

Çizelge 3.13. SDZ-TMP karışımı için farklı tasarımlar kullanılarak elde optimal kromatografik şartlar 119

Çizelge 3.14. SDZ ve TMP etken maddelerini içeren veteriner preparatın kantitatif analizi için kullanılan UPLC yöntemlerine ait kromatografik şartlar 122

Çizelge 3.15. SDZ ve TMP etken maddeleri için elde edilen doğrusal regresyon verileri 127

Çizelge 3.16. SDZ ve TMP karışımının analizi için geliştirilen UPLC yöntemlerinin sistem uygunluk testi sonuçları 128

Çizelge 3.17. SDZ ve TMP içeren yapay karışım çözeltilerinin analiz sonuçları 129

Çizelge 3.18. SDZ ve TMP çözeltilerinin gün içi ve günler arası analizlerinin sonuçları 131

Çizelge 3.19. Standart ekleme numunelerinin analiz sonuçları 133

Çizelge 3.20. FFD-UPLC ve CCD-UPLC yöntemlerinin SDZ-TMP içeren veteriner preparatlarına uygulanması ile elde edilen miktar tayini sonuçları 137

Çizelge 3.21. SDX ve TMP karışımının kromatografik analizleri için belirlenen parametreler 139

Çizelge 3.22. SDX ve TMP için uygulanan Box-Behnken tasarımda kullanılan faktörler ve bu faktörlerin seviyeleri 144

Çizelge 3.23. SDX ve TMP için uygulanan merkezi bileşenli tasarımda kullanılan faktörler ve bu faktörlerin seviyeleri 145

Çizelge 3.24. Box-Behnken tasarım matrisi ile ölçülen, tahmin edilen ve artık KCF değerleri 147

Çizelge 3.25. SDX-TMP için BBD ile elde edilen ampirik modele ait katsayılar ve p-anlamlılık değerleri 149

Çizelge 3.26. SDX-TMP karışımı için Box-Behnken tasarımla elde edilen optimal kromatografik şartlar 154

Çizelge 3.27. Merkezi bileşenli tasarıma göre planlanan tasarım matrisi ve elde edilen KCF değerleri 156

Çizelge 3.28. SDX-TMP için CCD ile elde edilen ampirik modele ait katsayılar ve istatistiksel sonuçları 158

Çizelge 3.29. SDX-TMP karışımı için merkezi bileşenli tasarımla elde edilen optimal kromatografik şartlar 163

Çizelge 3.30. SDX-TMP karışımı için farklı tasarımlar kullanılarak elde optimal kromatografik şartlar 164

Çizelge 3.31. SDX ve TMP etken maddelerini içeren veteriner preparatın kantitatif analizi için kullanılan UPLC yöntemlerine ait kromatografik şartlar 166

Çizelge 3.32. SDX ve TMP etken maddeleri için elde edilen doğrusal regresyon verileri 170

Çizelge 3.33. SDX ve TMP karışımının analizi için geliştirilen UPLC yöntemlerinin sistem uygunluk testi sonuçları 171

Çizelge 3.34. SDX ve TMP içeren yapay karışım çözeltilerinin analiz sonuçları 172

Çizelge 3.35. SDX ve TMP çözeltilerinin gün içi ve günler arası analizlerinin sonuçları 174

Çizelge 3.36. Standart eklenme numunelerinin analiz sonuçları 176

Çizelge 3.37. BBD-UPLC ve CCD-UPLC yöntemlerinin SDX-TMP içeren veteriner preparatlarına uygulanması ile elde edilen miktar tayini sonuçları 180

Çizelge 3.38. SDM ve TMP için uygulanan cevap yüzey metodolojisinde sabit tutulan kromatografik şartlar 182

Çizelge 3.39. SDM ve TMP için uygulanan FFD ve BBD tasarımlarında kullanılan faktörler ve bu faktörlerin seviyeleri 186

Çizelge 3.40. SDM ve TMP için uygulanan CCD tasarımında kullanılan faktörler ve bu faktörlerin seviyeleri 187

Çizelge 3.41. Tam faktöriyel tasarım matrisi ile ölçülen, tahmin edilen ve artık KCF değerleri 189

Çizelge 3.42. SDM-TMP için FFD ile elde edilen ampirik modele ait katsayılar ve p-anlamlılık değerleri 191

Çizelge 3.43. SDM-TMP karışımı için tam faktöriyel tasarımla elde edilen optimal kromatografik şartlar 194

Çizelge 3.44. Box-Behnken tasarım matrisi ile ölçülen, tahmin edilen ve artık KCF değerleri 195

Çizelge 3.45. SDM-TMP için BBD ile elde edilen ampirik modele ait katsayılar ve p-anlamlılık değerleri 197

Çizelge 3.46. SDM-TMP karışımı için Box-Behnken tasarıma göre uygulanan cevap yüzey metodolojisi ile tespit edilen optimal kromatografik şartlar 200

Çizelge 3.47. Merkezi bileşenli tasarım matrisi ile ölçülen, tahmin edilen ve artık KCF değerleri 201

Çizelge 3.48. SDM-TMP için CCD ile elde edilen ampirik modele ait katsayılar ve istatistiksel sonuçları 203

Çizelge 3.49. SDM-TMP karışımı için merkezi bileşenli tasarımla elde edilen optimal kromatografik şartlar 206

Çizelge 3.50. SDM-TMP karışımı için farklı tasarımlar kullanılarak elde optimal kromatografik şartlar 206

Çizelge 3.51. SDM ve TMP etken maddelerini içeren veteriner preparatın kantitatif analizi için kullanılan UPLC yöntemlerine ait kromatografik şartlar 209

Çizelge 3.52. SDM ve TMP etken maddeleri için elde edilen doğrusal regresyon verileri 214

Çizelge 3.53. SDM ve TMP karışımının analizi için geliştirilen UPLC yöntemlerinin sistem uygunluk testi sonuçları 215

Çizelge 3.54. SDM ve TMP içeren yapay karışım çözeltilerinin analiz sonuçları 217

Çizelge 3.55. SDM ve TMP çözeltilerinin gün içi ve günler arası analizlerinin sonuçları 219

Çizelge 3.56. Standart ekleme numunelerinin analiz sonuçları 221

Çizelge 3.57. FFD-UPLC, BBD-UPLC ve CCD-UPLC yöntemlerinin SDM-TMP içeren veteriner preparatlarına uygulanması ile elde edilen miktar tayini sonuçları 226

Çizelge 3.58. FFD-UPLC, BBD-UPLC ve CCD-UPLC yöntemleriyle elde edilen analiz sonuçlarının ANOVA testi ile karşılaştırılması 227

1. GİRİŞ

Dünyanın artan nüfusu ile birlikte hızlı teknolojik gelişmelerin sonucu olarak, bütün sektörlerde olduğu gibi ilaç endüstrisinde de ticari ürünlerin sayısı ve çeşitliliğinde büyük bir artış olmuştur. Son yıllarda endüstriyel ürünlerin içerdiği bileşenlerin sayısında da önemli derecede bir artış olmuş ve endüstriyel ürünler gittikçe daha kompleks hale gelmiştir. Bu durum, ürünlerin kalite kontrol ve rutin analizleri için kullanılan analitik yöntemlerin geliştirilmesini zorlaştırırken maliyetlerini ve analiz sürelerini de arttırmıştır.

İlaç endüstrisinde bir farmasötik ürünün ve üretim sürecinin kalitesi, etkinliği ve güvenliğini sağlamak amacıyla geliştirilecek yöntemler için ilgili ülkelerin resmi kurumları tarafından belli yönergeler ve düzenlemeler oluşturulmuş, farmakopelerde bu düzenlemelere dair bölümler açılmıştır. Bu yönerge ve bölümlerde bitmiş ürün ve üretim sürecinde kullanılacak yöntemlerin validasyonu ile ilgili ayrıntılı bilgiler sunulmaktadır. Ancak farmasötik ürünlerin ve üretim süreçlerinin kalite kontrol ve rutin analizleri için geliştirilecek analitik yöntemlerin optimizasyonu ile ilgili bilgilerin kısıtlı olduğu bir gerçektir. Oysa bir analitik yöntemin validasyonundan önce bu yöntemin optimize edilmesi analitik kimya açısından oldukça önemlidir.

Yeni analiz yöntemlerinin geliştirilmesinde en kritik adım, uygun deneysel koşulların tespit edilmesidir. Bir sürecin sonunda elde edilen çıktının veya cevabın, istenen özelliklere sahip olması için gerekli olan koşulların belirlenmesine optimizasyon denir. Analiz yöntemlerinin optimizasyonunda genellikle en doğru, en kesin, en hassas ve en güvenilir analiz sonucuna ulaşılmasını sağlayan deneysel koşulların tespiti amaçlanır. Ayrıca, bir analiz yönteminin düşük maliyetli ve hızlı olması da amaçlandığı için deneysel koşulların bu hedefleri de sağlaması beklenmektedir.

Analitik kimyada geleneksel olarak kullanılan tek değişkenli optimizasyon yönteminde, analitik cevabı etkilediği ön görülen her deneysel koşul için bir optimal

değer saptanması amaçlanır. Bu yöntemde tüm deneysel koşullar sabit tutulurken, seçilen parametrenin farklı değerlerinde deneyler gerçekleştirilir ve bu parametrenin en uygun cevabı veren değeri tespit edilir. Bu işlem her bir değişken için tekrarlanarak, optimize edilmek istenen her parametrenin deneysel koşuluna karar verilir. Özellikle iki ve daha fazla parametrenin optimize edilmesi gereken durumlarda, tek değişkenli optimizasyon yöntemi belirsiz ve genellikle uzun bir zaman dilimini kaplar. Üstelik deneysel parametreler arasında bir etkileşim olduğu takdirde, tek değişkenli optimizasyon yöntemi ile gerçek optimal koşullara ulaşmak mümkün değildir.

Bu yüzden yeni analitik yöntemlerin geliştirilmesinde cevap yüzey metodolojisinin kullanımı gün geçtikçe daha çok önem kazanmaktadır. Cevap yüzey metodolojisinde, optimizasyon amacıyla gerçekleştirilecek deneyler önceden sistematik olarak planlanır ve bu deneyler sonucunda analitik cevabı etkilediği ön görülen her deneysel parametre ve bu parametrelerin etkileşimleri bir bütün olarak aynı anda değerlendirilir. Cevap yüzey metodolojisi, bir sürecin optimizasyonu için en az emekle en fazla bilginin elde edilmesini sağlarken, gerçek optimal koşullara matematiksel ve istatistiksel yöntemlerle kesin olarak ulaşılmasını mümkün kılar. Cevap yüzey metodolojisinde karar verilmesi gereken önemli noktalardan biri, hangi deney tasarımının kullanılması gerektiğidir. Bu tez çalışması, çoklu ilaç analizleri için geliştirilecek sıvı kromatografisi yöntemlerinde cevap yüzey metodolojisinin nasıl uygulanacağını ve hangi deney tasarımlarının kullanılması gerektiği konusunda kapsamlı bir araştırma sunmak amacıyla yapılmıştır.

Bu doktora tezi kapsamında, günümüz ilaç endüstrisinde sıklıkla tercih edilen bir aletli analiz yöntemi olan aşırı performanslı sıvı kromatografisi (UPLC) tekniği kullanılarak, sülfonamid grubu antibakteriyelleri içeren veteriner preparatlardaki etken maddelerin miktar tayini için yeni analiz yöntemleri geliştirilmiş ve yöntem geliştirme sırasında optimizasyon için cevap yüzey metodolojisinden yararlanılmıştır. Sülfonamid grubu antibakteriyeller özellikle veteriner hekimlikte sık kullanılırlar ve preparatlarında genellikle trimetoprimle kombine halde bulunurlar. Türkiye veteriner ilaç piyasasında bulunan sülfonamid-trimetoprim kombinasyonları aşağıda sıralanmıştır:

- Sülfadiyazin / trimetoprim
- Sülfadoksin / trimetoprim
- Sülfadimidin / trimetoprim
- Sülfametoksazol/trimetoprim
- Sülfaklorpridazin / trimetoprim
- Sülfadimetilprimidin / trimetoprim

Bu doktora tezinin konusu olarak yukarıda verilen kombinasyonların içinden sülfadiyazin/trimetoprim, sülfadoksin/trimetoprim ve sülfadimidin/trimetoprim karışımlarını içeren, tablet ve enjeksiyonluk çözelti formlarındaki veteriner preparatların analizi seçilmiştir. Tez konusu olan bu üç farklı ticari formülasyonun kalite kontrol ve rutin analizleri için cevap yüzey metodolojisi kullanılarak yeni UPLC yöntemleri geliştirilmiştir.

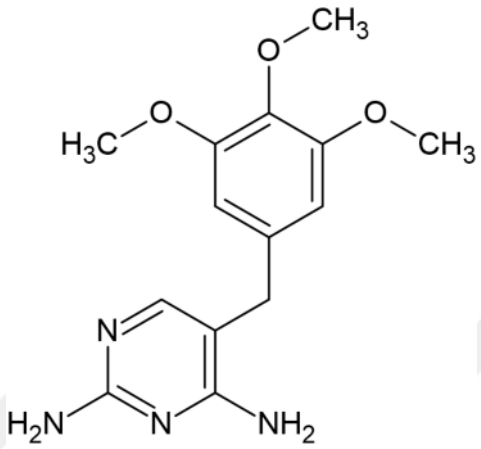
Cevap yüzey metodolojisi uygulanırken kromatogramlarda yeterli ayırıcılığa en kısa sürede ulaşılması hedeflenmiş ve bu hedef doğrultusunda bağımlı değişken olarak bir kromatografik cevap fonksiyonu kullanılmıştır. Böylece optimize edilecek yöntemlerin doğru, kesin, hassas ve güvenilir olması yanında kısa süreli ve düşük maliyetli olması da sağlanmıştır. Tez konusu olarak seçilen ilaç karışımları için farklı deney tasarımları kullanılarak, deney tasarımı seçiminin optimizasyon sürecini ve optimal olarak tespit edilen kromatografik şartları nasıl etkilediği araştırılmıştır. Her bir tasarımla elde edilen optimal koşulların kullanıldığı UPLC yöntemleri, yöntem geçerlilikleri ve sistem uygunluk testleri bakımından değerlendirildikten sonra, karşılaştırmalı olarak seçilen veteriner preparatların analizlerine uygulanmıştır.

Bu uygulamalar sonucunda, farklı deney tasarımlarına ait avantajların, dezavantajların ve sınırlandırmaların tartışılacağı, farklı deney tasarımlar sonucunda elde edilen optimal şartların birbirleriyle karşılaştırılacağı bir araştırmanın literatüre kazandırılması hedeflenmiştir. Ayrıca bu çalışma sonucunda geliştirilen UPLC yöntemlerinin Ar-Ge laboratuvarlarında ve ilaç endüstrisinde kullanılabilecek, literatürdeki yöntemlere alternatif olabilecek yöntemler olması da bu tez çalışmasının önemini arttırmaktadır. Yapılan literatür taramalarına göre bu doktora tezinin konusu

olan bileşiklerin ikili karışımlarının kromatografik analizlerinde optimizasyon çalışmaları için ilk kez cevap yüzey metodolojisi kullanılmıştır. Bu tez çalışması kapsamında uygulanan cevap yüzey metodolojisi sırasında bağımlı değişken olarak Rakić ve ark. (2012) tarafından geliştirilen "kromatografik cevap fonksiyonu" seçildiği için, optimal kromatografik koşulların en kısa sürede yeterli ayrım ve dar taban genişliği sağlayan yöntemler olması mümkün kılınmıştır. Böylece bu tez kapsamında geliştirilen UPLC yöntemleri literatürdeki yöntemlere göre daha kısa sürede etkin ayrımı sağlamıştır. Bu çalışma sonucunda yeni geliştirilen UPLC yöntemleri, Ar-Ge ve ilaç analiz laboratuvarlarında söz konusu maddelerin analizlerinde kullanılabilecek nitelikte, özgün, güvenilir ve ekonomik yöntemlerdir.

1.1. Trimetoprim (TMP)

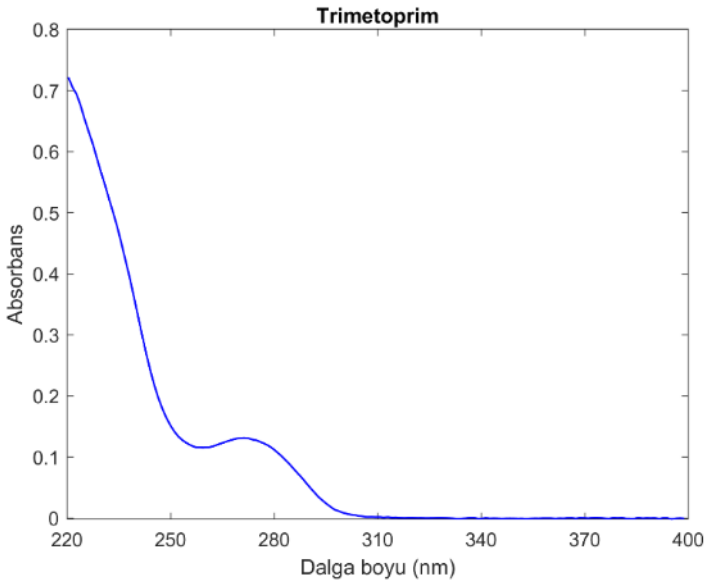
1.1.1. Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri



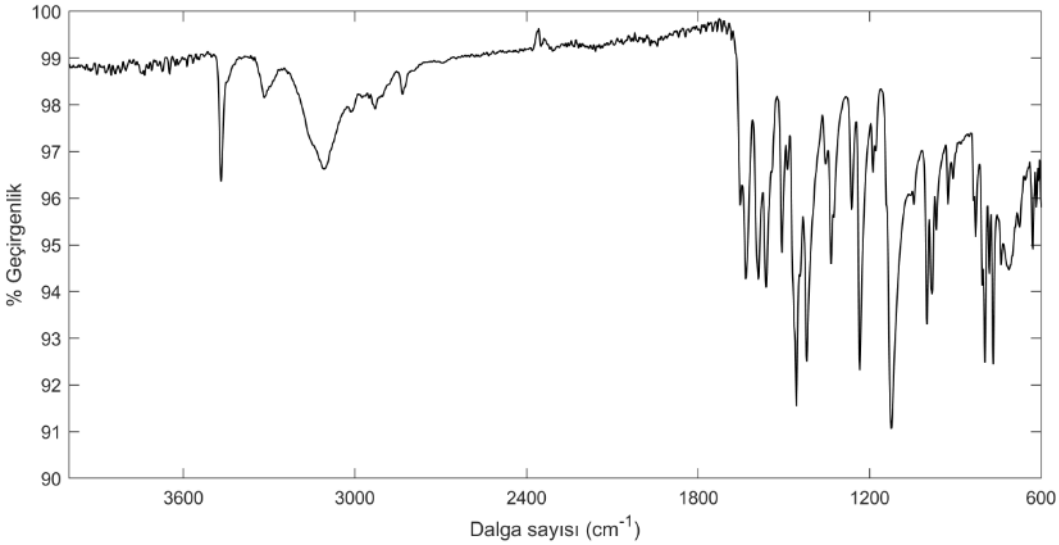
Şekil 1.1. Trimetoprimin kimyasal yapısı

IUPAC ismi	: 5-[(3,4,5-trimetoksifenil)metil]pirimidin-2,4-diamin
Kapalı formülü	: $C_{14}H_{18}N_4O_3$
Molekül ağırlığı	: 290,3 g/mol
pKa	: 6,6
logP	: 0,91
Erime noktası	: 199-203 °C

Trimetoprim beyaz veya sarımsı-beyaz bir tozdur. Suda çözünürlüğü 400 mg/L (25 °C) olup alkol ve asetonda hafifçe, kloroform ve metanolde az çözünür. Benzil alkolde serbestçe çözünür (Türk Farmakopesi, 2017; Manius, 1978). Trimetoprimin UV absorbans spektrumu Şekil 1.2'de, IR spektrumu ise Şekil 1.3'te sunulmuştur.



Şekil 1.2. Trimetoprimin UV absorbans spektrumu



Şekil 1.3. Trimetoprimin IR spektrumu

1.1.2. Farmakolojik Özellikleri

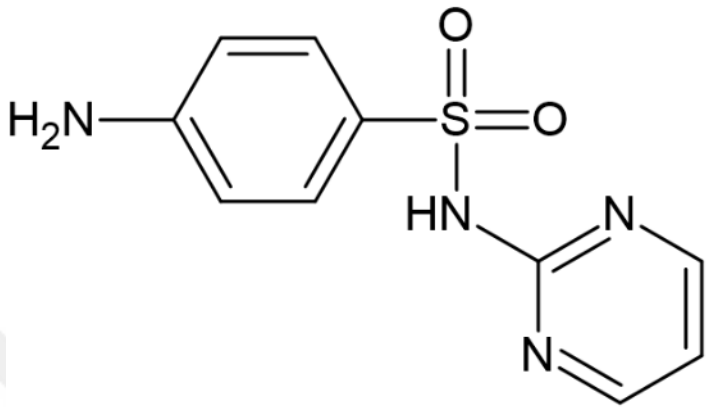
Trimetoprim, bakterideki dihidrofolat redüktaz enziminin güçlü bir inhibitörüdür. Dihidrofolat redüktaz enzimini inhibe ederek dihidrofolik asitin tetrahidrofolik asite indirgenmesini engeller. Bu enzimatik reaksiyonun inhibisyonu pürin, pirimidin ve aminoasit sentezinde kullanılan koenzimlerin azalmasına ve bakterisid etkiye yol açar. Bakteriyel dihidrofolat redüktaz enziminin trimetoprime afinitesi memeli hücresindeki enzime göre çok daha yüksek olduğu için trimetoprimin antibakteriyel etkisi oldukça seçicidir (Clark, 2012).

Trimetoprim zayıf bazik karakterc sahip, lipofilik bir moleküldür. Trimetoprim veteriner amaçlı kullanıldığında oral veya parenteral olarak uygulanabilir. Oral uygulamadan sonra tamamına yakını bağırsaktan hızla absorbe edilir. Trimetoprimin oral biyoyararlanımı geviş getiren hayvanlarda neredeyse sıfırdır, bu yüzden geviş getirme yaşına erişmiş küçükbaş ve büyük baş hayvanlarda oral değil parenteral yolla kullanılır. Dokulara ve vücut sıvılarına iyi nüfuz eder ve demetilasyonla metabolize olur. Zayıf bazik karakterli bir ilaç olduğu için plazmada antimikrobiyal konsantrasyona ulaştığında, idrardaki konsantrasyonu daha yüksek seviyededir, bu yüzden de idrar yolları enfeksiyonlarında oldukça etkindir. Sülfonamid bileşiklerine göre daha hızlı elimine olur, idrar yoluyla kolayca uzaklaştırılır (Altıntaş, 2006; Papich, 2017).

Trimetoprimin antibakteriyel spektrumu sülfonamidlerinkine benzer, gram-pozitif ve gram-negatif bakterilere karşı etkilidir ve geniş bir aerobik bakteri spektrumuna sahiptir. Trimetoprim sülfonamidlerden 20-50 kat daha etkin bir antibakteriyeldir. Beşeri amaçlı olarak komplike olmayan üriner kanal enfeksiyonlarının tedavi ve profilaksisinde, sistitte, otitis mediada ve turist diyaresinde kullanılır. Ayrıca oftalmik olarak antiseptik amaçla da kullanılır (Bushby ve Hitchings, 1968; RxMediaPharma, Mayıs 2017).

1.2. Sülfadiyazin (SDZ)

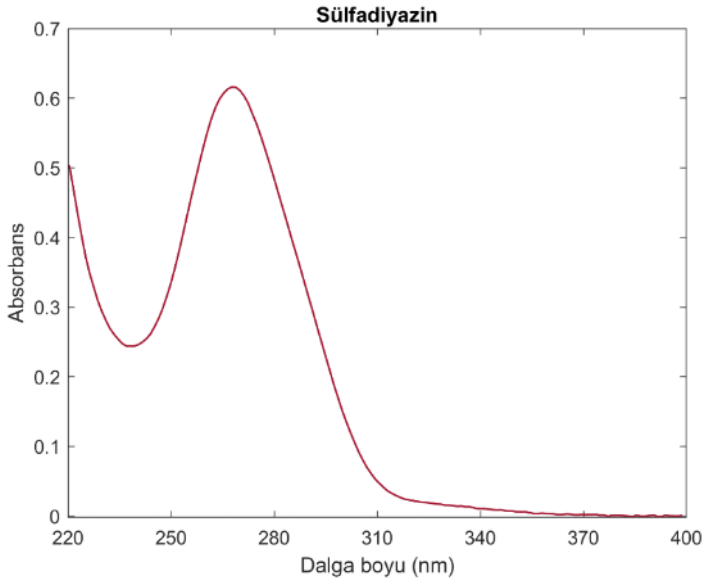
1.2.1. Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri



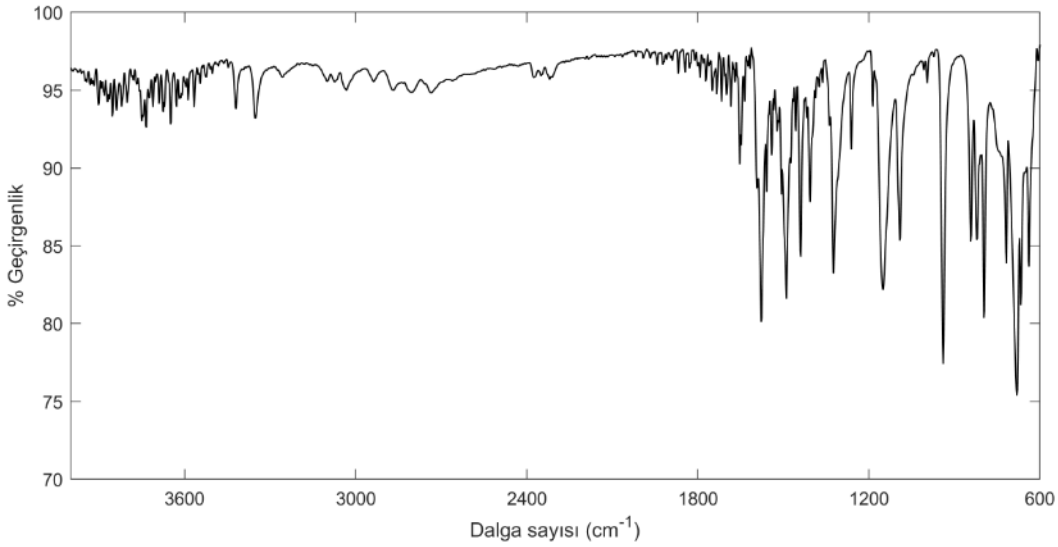
Şekil 1.4. Sülfadiyazinin kimyasal yapısı

IUPAC ismi	: 4-amino-N-(pirimidin-2-il)benzensülfonamit
Jenerik ismi	: Sülfadiyazin, sülfaprimidin, teradiazin
Kapalı formülü	: $C_{10}H_{10}N_4O_2S$
Molekül ağırlığı	: 250,276 g/mol
pKa	: 6,36
logP	: -0,09
Erime noktası	: 255,5 °C

Sülfadiyazin beyaz veya sarımsı-beyaz kristalize bir tozdur. Sudaki çözünürlüğü 77 mg/L'dir. Alkolde hafifçe çözünür. Alkali hidroksit çözeltilerde ve seyreltik mineral asitlerde çözünür (Türk Farmakopesi, 2017; Stober ve DeWitte, 1982). Sülfadiyazinin UV absorbans spektrumu Şekil 1.5'te, IR spektrumu Şekil 1.6'da sunulmuştur.



Şekil 1.5. Sülfadiyazinin UV absorbans spektrumu



Şekil 1.6. Sülfadiyazinin IR spektrumu

1.2.2. Farmakolojik Özellikleri

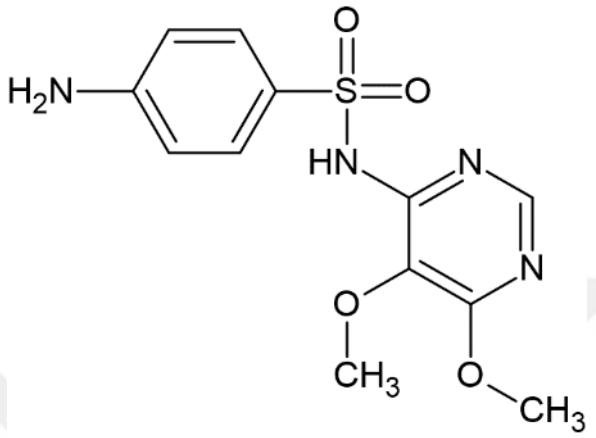
Sülfadiyazin, kısa-orta süreli etkiye sahip olan sülfonamid sınıfından sistemik bir antibakteriyeldir. Duyarlı olduğu mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyonlarda, karetokonjuktivit, malarya, menenjit, nokardiyoz, otitis media, parakoksidioidimikoz, piyeloneftir, şankroid, sistid, toksoplazmozis, trahom ve üriner kanal enfeksiyonlarında kullanılır (Zinner ve Mayer, 2015). Atlarda sülfadiyazinin oral absorbsiyonu %58, proteine bağlanma oranı %18-30 olarak bildirilmiştir (Papich, 2017).

Sülfadiyazin ve trimetoprim kombine halde;

- Kuzu, buzağı, oğlak, kedi ve köpeklerde solumun yolu, üriner sistem, gastrointestinal sistem ve yumuşak doku enfeksiyonlarında endikedir ve oral yolla kullanılır.
- İnek, kısrak ve koyunlarda genital kanal enfeksiyonlarında kullanılır. Post-partum enfeksiyonlarda intrauterin olarak kullanılır (Ceva, 2004a).
- Tatlı ve tuzlu su balıklarında bakteriyel hemorajik septisemi, kızıl ağız hastalığı, kolumnaris hastalığı, soğuk su vibriozisi, soğuk su hastalığı, gökkuşağı alabalık sendromu ve streptokok enfeksiyonlarında endikedir. Piyasada balık yemine ilave edilecek biçimde toz veya sıvı karışımlar halinde bulunur (Deva, 2017).

1.3. Sülfadoksin (SDX)

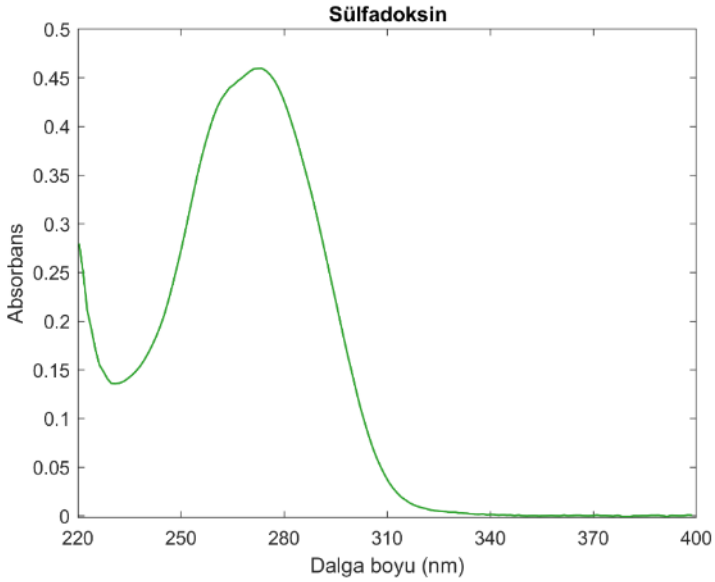
1.3.1. Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri



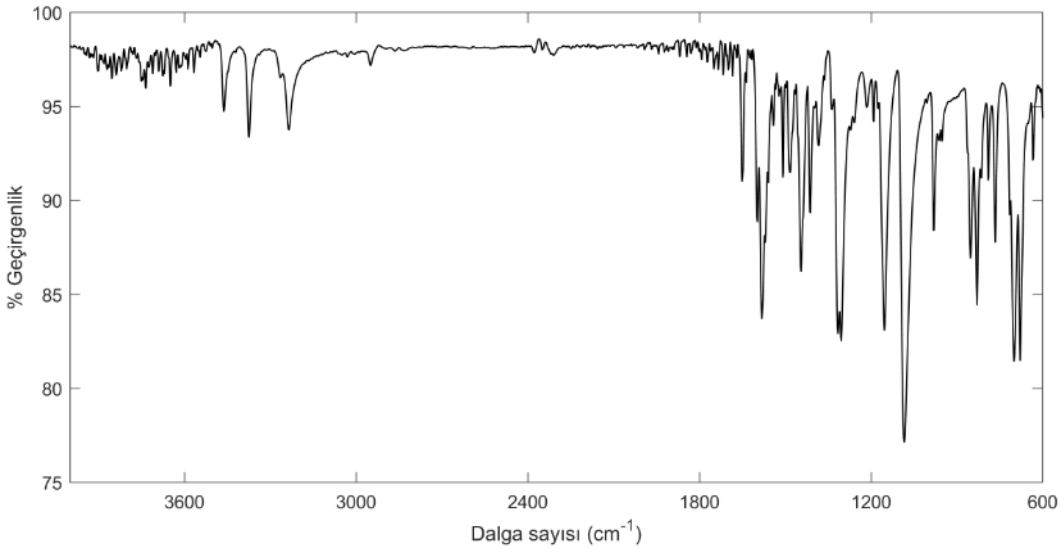
Şekil 1.7. Sülfadoksinin kimyasal yapısı

IUPAC ismi	: 4-amino-N-(5,6-dimethoxypyrimidin-4-yl)benzensülfonamit
Jenerik ismi	: Sülformetoksin, sülfortomidin, sülfadimoxinum
Kapalı formülü	: $C_{12}H_{14}N_4O_4S$
Molekül ağırlığı	: 310,3 g/mol
pKa	: 6,1
logP	: 1,27
Erime noktası	: 198 °C

Sülfadoksin beyaz veya sarımsı-beyaz kristalize bir tozdur. Suda çok az, alkol ve metanolde az çözünür. Alkali hidroksit çözeltilerinde ve seyreltik mineral asitlerde çözünür (Kapoor, 1988; Papich, 2017). Sülfadoksinin UV absorbans spektrumu Şekil 1.8'de IR spektrumu ise Şekil 1.9'da sunulmuştur.



Şekil 1.8. Sülfadoksinin UV absorbans spektrumu



Şekil 1.9. Sülfadoksinin IR spektrumu

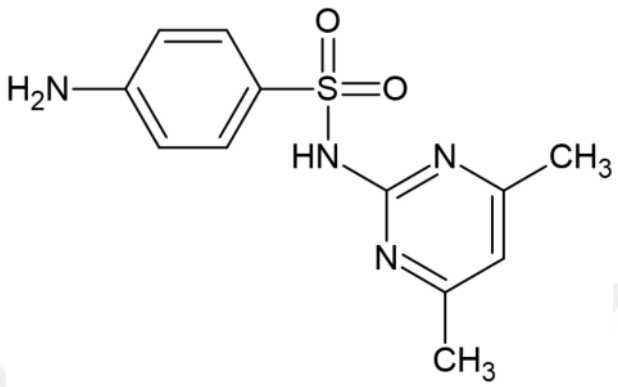
1.3.2. Farmakolojik Özellikleri

Sülfadoksin, uzun süreli etkiye sahip bir sülfonamiddir. Solunum ve üriner sistem enfeksiyonlarında tek başına veya trimetoprimle kombine olarak kullanılır. Sülfadoksinin büyük bölümü plazma proteinine bağlı olarak, bir kısmı ise iyonize olmamış halde taşınır. Tüm dokulara ve vücut sıvılarına nüfuz eder. Plazma ve dokulardaki etkin antibakteriyel konsantrasyonu iki günü aşkın bir süre devam eder (Provet, 2019).

Sülfadoksin ve trimetoprimin kombinasyonu sığır, koyun, keçi, at, kedi ve köpeklerde duyarlı mikroorganizmaların yol açtığı sindirim, solunum, ürogenital sistem ve viral hastalıklara eşlik eden sekonder bakteriyel enfeksiyonlarda endikedir. Özellikle solumun yolları enfeksiyonlarında, kolibasiloz, salmonelloz, aktinomikoz, listeriyoz, piyelonefrit, piyeten ve pododermatit sistemik tedavisinde; yara enfeksiyonları ve yumuşak doku enfeksiyonlarında lokal tedavilere destek olarak kullanılır. Parenteral çözelti halinde bulunan bu kombinasyon hayvan cinsine göre damar içi, kas içi veya deri altı olarak uygulanabilir (Provet, 2019). Sülfadoksin trimetoprim kombinasyonları sıtma tedavisi ve profilaksisinde endikedir, özellikle klorokine direnç gelişen vakalarda bu kombinasyon tercih edilir (Atemnkeng ve ark., 2007).

1.4. Sülfadimidin (SDM)

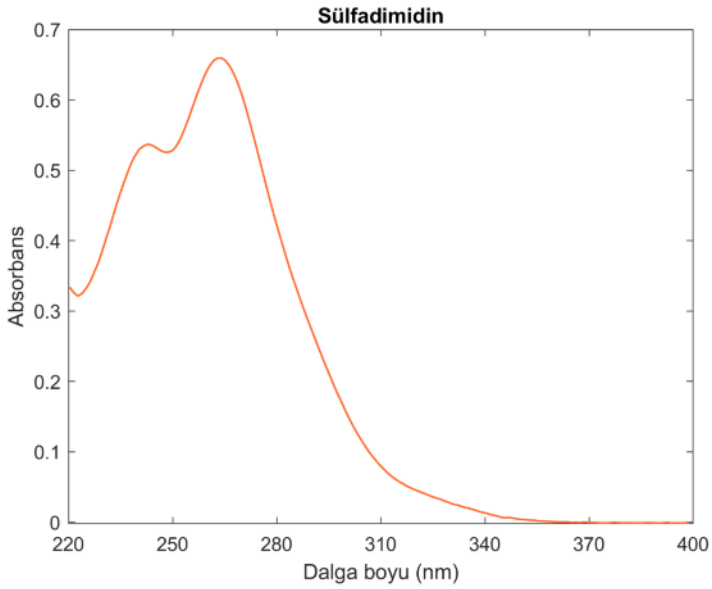
1.4.1. Kimyasal ve Fiziksel özellikleri



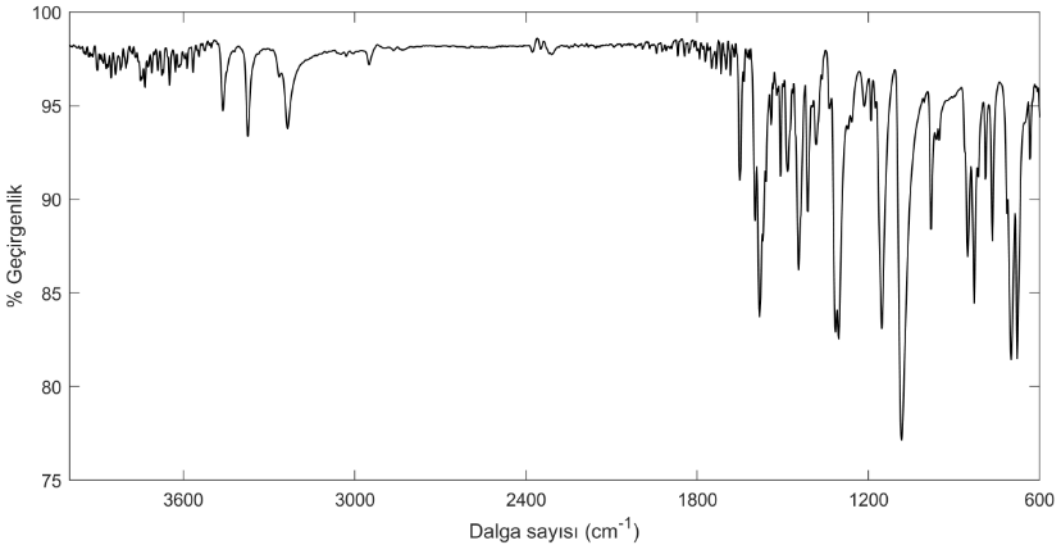
Şekil 1.10. Sülfadimidinin kimyasal yapısı

IUPAC ismi	: 4-amino-N-(4,6-dimetilpirimidin-2-il)benzensülfonamit
Jenerik ismi	:Sülfadimidin, sülfamidin, sülfametazin, sülfadimerazin
Kapalı formülü	: $C_{12}H_{14}N_4O_2S$
Molekül ağırlığı	: 278,3 g/mol
pKa	: 2,65 ve 7,4
logP	: 0,69
Erime noktası	: 197-200 °C.

Sülfadimidin beyaz veya beyazımsı kristalize bir tozdur. Suda çok az çözünür, asetonda çözünür, etanolde az çözünür. Alkali hidroksit çözeltilerinde ve seyreltik mineral asitlerde çözünür (Türk Farmakopesi, 2017; Papastephanou ve Frantz, 1978; Papich, 2017). Bu tez çalışmasında standart madde olarak sülfadimidinin sodyum tuzu kullanılmıştır. Sülfadimidin sodyumun UV absorbans spektrumu Şekil 1.11'de, IR spektrumu Şekil 1.12'de sunulmuştur.



Şekil 1.11. Sülfadimidinin UV absorbans spektrumu



Şekil 1.12. Sülfadimidinin IR spektrumu

1.4.2. Farmakolojik Özellikleri

Sülfadimidin, uzun süreli etkiye sahip bir sülfonamiddir. Tavuk ve hindilerde kanlı ishal tedavisinde, tavuklarda koriza ve kolerası, tavuk tifosu, hava kesesi enfeksiyonları ve E. Coli enfeksiyonlarında endikedir. Sığır, koyun ve keçilerde gastrointestinal sistem enfeksiyonlarında, koksidiyozis, kolibasilloz ve koliseptisemide kullanılır. Sindirim sisteminden hızla emilip plazma doruk konsantrasyonuna 2-8 saat arasında ulaşır, 12 saat süreyle etkin antimikrobiyal konsantrasyonda bulunur (Ceva, 2004b). Plazma proteinine bağlanma oranı sığır, keçi, koyun ve atlarda sırasıyla %79, %86, %77 ve %70'tir (Papich, 2017).

Sülfadimidin ve trimetoprim kombinasyonu sığır, at, kedi ve köpeklerde duyarlı bakterilerin meydana getirdiği solunum sistemi, sindirim sistemi, ürogenital sistem enfeksiyonlarında endikedir. Ayrıca duyarlı mikroorganizmaların sebep olduğu yumuşak doku enfeksiyonları, post-partum enfeksiyonlar ve septisemide de kullanılır (Bavet, 2018).

1.5. Antibakteriyel Tedavi ve Sülfonamid Grubu Antibiyotikler

Mikroorganizmaları öldürmek veya çoğalmalarını engellemek için kullanılan ilaçlar mikrobiyal ajanlar olarak adlandırılırlar. Bu ilaçlar tedavide hedef alınan mikroorganizmaların cinsine göre antibakteriyel, antifungal, antiviral gibi isimlerle sınıflandırılırlar. Genellikle antibiyotik olarak da adlandırılan antibakteriyel ilaçlar, bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde ve profilaksisinde kullanılırlar. Antibakteriyel ilaçlar bakterisid (bakteri hücrelerini öldürücü) veya bakteriostatik (bakteri hücrelerinin çoğalmasını engelleyici) özelliklere sahip olabilirler (Kayaalp, 2012).

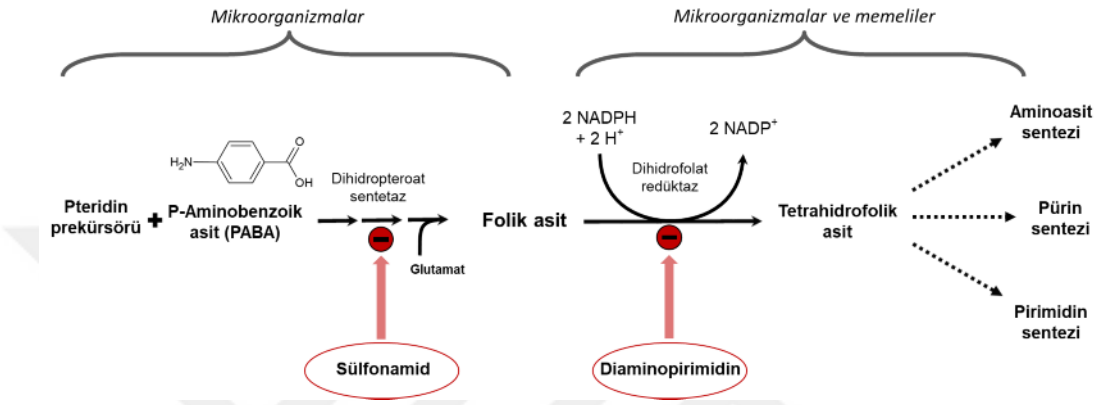
Antibakteriyel tedavinin temel amacı, bakteri üzerinde maksimum, organizma üzerinde ise minimum toksik etkiyi sağlamaktır. Seçici toksisite adı verilen bu prensibi uygulayabilmek için, konak organizma ile bakteriler arasındaki biyokimyasal

farklılıklardan yararlanılır. Bu farklılıklardan yararlanılarak geliştirilen temel mekanizmalar aşağıdaki gibidir (Clark, 2012; Trevor ve ark., 2010):

- *Bakteri hücre duvarının sentezini inhibe etmek:* Hücre duvarı, memeli hücrelerinin sahip olmadığı bir yapı olduğu için bakteri hücre duvarının sentezinin engellenmesi bakteri üzerinde yüksek seçicilikte toksisite sağlar. Penisilinleri ve sefalosporinleri de içeren bu antibiyotik grubu yapılarında beta-laktam halkası içerdikleri için beta-laktam antibiyotikleri olarak adlandırılırlar.
- *Bakterinin protein sentezini inhibe etmek:* Bakteri ribozomunun yapısı memeli ribozomundan farklı olduğu için, bakteriyel protein sentezini inhibe etmek mikroorganizmalar üzerinde selektif toksisite sağlar. Kloramfenikol, tetrasiklinler, aminoglikozidler ve makrolid antibiyotikleri bu sınıf içindedirler.
- *Bakteri nükleik asitinin sentezini veya fonksiyonunu inhibe etmek:* Seçici olarak mikrobik nükleik asit metabolizmasını bozan bakterisid antibiyotiklerden en önemlileri florokinolonlardır. Florokinolonlar bakteri hücresinde DNA sentezini inhibe eder ve hücre ölümüne sebep olurlar. Rifampin ise bakteri RNA polimerazını inhibe ederek bakterinin RNA ve dolayısıyla protein sentezi yapmasını engelleyerek etki eder.
- *Bakteri hücre duvarının yapısını bozmak:* İzoniazid, polimiksin, nistatin gibi antibiyotikler, hücre duvarının yapısını ve işlevini bozarak bakteri hücresi için hayati öneme sahip maddelerin dışarı sızmasına ve hücre ölümüne sebep olurlar.
- *Bakteri metabolizmasını inhibe etmek:* Bakteri içindeki bazı metabolik yolakları inhibe ederek bakterinin çoğalmasını veya canlılığını sürdürmesini engelleyen antibiyotiklerden en önemlileri sülfonamid grubu üyeleri ve diaminopirimidinlerdir. Bu ilaçlar kimyasal yapılarındaki benzerlik nedeniyle, folik asit metabolizmasındaki endojen bileşiklerin yerine geçerek yarışmalı inhibisyona sebep olurlar. Bu nedenle folik asit antagonistleri veya antimetabolit ilaçlar olarak da adlandırılırlar.

Pürin, pirimidin gibi DNA ve RNA prekürsörlerinin sentezi, metilasyon reaksiyonları, aminoasitlerin sentezi gibi hücre büyümesinde ve çoğalmasında rol oynayan süreçlerde folik asit ve folik asit içeren koenzimler kullanılır. Memeliler, folik asiti sentezleyemedikleri için B9 vitamini olarak da adlandırılan folik asiti

diyetlerinden sağlarlar. Bakteri hücre duvarı folik asite geçirgen olmadığı için bakteri hücresi yaşamını devam ettirebilmek için folik asiti hücre içinde sentezlemek zorundadırlar. Memeli ve bakteri hücrelerindeki bu metabolik farklılıktan dolayı, antibakteriyel aktivitede önemli hedeflerden biri folik asit biyosentezidir (Clark, 2012).



Şekil 1.13. Tetrahidrofolik asit sentezinin sülfonamidler ve diaminopirimidinler tarafından inhibisyonu (Clark, 2012)

Sülfonamidler bakteriler için endojen bir bileşik olan p-aminobenzoik asitin (PABA) sentetik türevleridirler. PABA folik asit biyosentezinin ilk basamağıdır. Sülfonamidlerin antibakteriyel etkisinin temel prensibi para-amino benzoik asitin (PABA) yapısal analogları olmalarıdır. Sülfonamidler, PABA ile yarışmalı olarak dihidropteroat sentetaza bağlanırlar. Bu enzimin substratı olarak davranıp folik asitin işlevsel olmayan formlarının sentezine yol açarlar. Yani folik asit sentezini engellemiş olurlar. Memeli hücrelerinde folik asit hücre dışından taşındığı için istenen biçimde selektif toksisite sağlanmış olur. Bir diaminoprimidin türevi olan trimetoprim ise yapısal olarak folik asite benzer ve aynı yolaktaki bir sonraki adımda folik asitle yarışmalı olarak dihidrofolat redüktaz enzimini inhibe edip tetrahidrofolik asit sentezini engeller. Bakteri dihidrofolat redüktazı, trimetoprim inhibisyonuna memelilerin enziminden 10000-100000 kat daha fazla duyarlıdır. Bu yüzden istenen selektivite sağlanmış olur (Clark, 2012). Bakteri hücresindeki folik asit metabolizmasının inhibisyonu, hücrelerdeki aminoasit ve nükleik asit sentezini etkilediği için bakteriostatik etkiye neden olur. Yalnız kullanıldıklarında bakteriostatik etkili olan bu folik asit antagonistleri, kombine olarak kullanıldıklarında ise bakterisit

etkilidirler. Aynı yolaktaki iki basamağın inhibisyonu ardışık blokaj olarak adlandırılır. Sülfonamid türevleri ile trimetoprimin kombine kullanımı ardışık blokaj sayesinde antibakteriyel sinerji ile sonuçlanır ve duyarlı organizmalar için bakterisiddir. Bu iki ajanın kombine kullanımında direnç daha azdır, antibakteriyel spekrum daha geniştir ve etkinlik tek ilaç tedavisine göre daha fazladır (Bushby ve Hitchings, 1968; Kahn ve ark., 1968; Zinner ve Mayer, 2015).

Sülfonamid grubu antibiyotikler

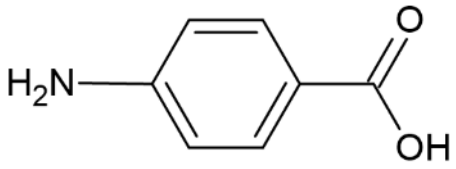
Sülfonamid grubu antibiyotiklerin tamamında bir sülfanilamid (p-aminobenzensülfonamid) yapısı bulunur. Sülfanilamid ilk kez 1908 yılında Gelmo tarafından sentezlenmiş fakat 1940'lara dek antibakteriyel etkisinin olduğu keşfedilmemiştir. Bu tarihten sonra, sülfanilamidin antibakteriyel etkileri araştırılmaya başlanmış ve günümüze dek yapısında sülfanilamid taşıyan 5400 molekül sentezlenmiş, bunların 25-30 kadarı klinik uygulamalarda kullanılmıştır. Aslında sülfanilamid fonksiyonel grubu içeren pek çok ilaç molekülü vardır ve bu ilaçlar antibakteriyel, diüretik, antidiyabetik, antienflamatuar gibi farklı farmakolojik etkilere sahiptirler. Fakat sülfonamid grubu ilaçlar dendiğinde akla ilk gelen farmakolojik etki antibakteriyel aktivitedir. Bunun nedeni piyasadaki ilk sülfonamidlerin antibakteriyel amaçla geliştirilmeleri; diğer farmakolojik etkilere sahip sülfonamid yapısı içeren ilaçların ise görece daha yeni olmalarıdır (van Miert, 1994).

Veterinerlikte sülfonamidlerin kullanılmaya başlanmasıyla hayvan hastalıklarının yayılma hızı ve ölüm oranlarında ciddi oranda azalma gözlenmiştir. Bu da sülfonamidlerin hayvan sağlığı alanında geniş kullanım alanına sahip olmasına neden olmuştur (Altıntaş, 2006). Veterinerlikte kullanılan başlıca sülfonamidler şunlardır: sülfabromometazin, sülfadimetoksin, sülfadimidin, sülfadiyazin, sülfadoksin, sülfaetoksipiridazin, sülfakinoksalin, sülfaklorpiridazin, sülfamerazin, sülfametoksazol, sülfanilamid, sülfanitran, sülfasalazin, sülfatiyazol, sülfisoksazol (Papich, 2017).

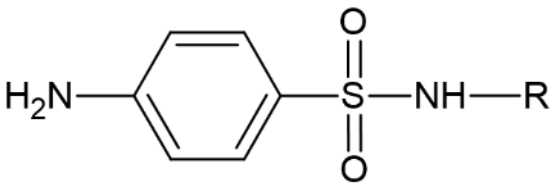
Bu tez kapsamında incelenecek olan sülfonamidler seçilirken, trimetoprim içeren kombine veteriner preparatlar incelenmiş ve Türkiye'de piyasada bulunan ürünlere göre karar verilmiştir. Hem beşeri hem veteriner amaçlı en sık kullanılan sülfonamid antibiyotiği sülfametoksazol ile ilgili literatürde pek çok çalışma bulunduğu için bu tez kapsamında değerlendirilmemiştir. Bu tez çalışmasında incelenen sülfonamid grubu antibiyotikler sülfadiyazin, sülfadoksin ve sülfadimidin olarak seçilmiştir.

Sülfonamid grubu antibiyotiklerin kimyasal yapıları

Sülfonamidlerin antibakteriyel etkisinin temel prensibi para-amino benzoik asitin (PABA) yapısal analogları olmalarıdır. Şekil 1.14 ve Şekil 1.15'te sırasıyla PABA'nın ve sülfonamidin moleküler yapıları sunulmuştur. En basit ve ilk sülfonamid antibiyotiği sayılan sülfanilamid, $-SO_2NH_2$ grubu ile para- pozisyonunda bir amino grubunun bağlandığı bir benzol halkasından ibarettir. Sülfonamid grubu ilaçlarda antibakteriyel etki için p-amino grubunun (N^4) serbest olması gereklidir. Şekil 1.15'te görülen sülfonilamin grubu azotu (N^1) üzerinden yapılacak değişikliklerle etkinliği ve farmakokinetiği birbirinden farklı pek çok sülfonamid grubu antibiyotik sentezlenmiştir (Papich, 2017).

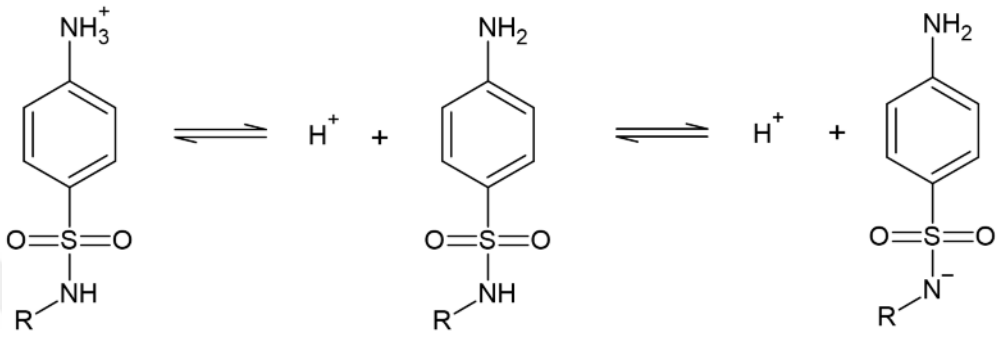


Şekil 1.14. Para-aminobenzoik asit (PABA)'in kimyasal yapısı



Şekil 1.15. Sülfonamid grubu antibiyotiklerin genel yapısı

Sülfonamidlerin pKa değerleri 5 ila 10 arasında değişir, bu yüzden çözünürlük, dağılım, proteine bağlanma ve antibakteriyel aktivite gibi özellikleri de grup içinde değişiklik gösterir. Sülfonamidler, sülfonil grubunun indüktif etkisinden dolayı amfoterik yapıdadırlar. Sulu çözeltilerinde katyonik, nötral veya anyonik formlarda bulunabilirler. Bu üç form, Şekil 1.16'da sunulmuştur.



Şekil 1.16. Sülfonamidlerin sulu çözeltilerindeki amfoterik davranışları

Sülfonamidlerin suda çözünürlükleri grup içinde farklılıklar göstersede genelde düşük veya çok düşüktür. Sudaki çözünürlükleri ortamın pH değeri arttıkça artar. Sodyum tuzlarının suda çözünürlüğü daha yüksektir. Zayıf asit karaktere sahip olan sülfonamid grubu ilaçlar tedavide zayıf asit veya bu zayıf asitlerin sodyum tuzları şeklinde kullanılırlar (Stober ve DeWitte, 1982).

Sülfonamid grubu antibiyotiklerin etki spektrumları

Sülfonamidler gram-pozitif ve gram-negatif organizmalara, enterobakterilere, klamidyalara ve *Nocardia*'ya karşı etkili, geniş spektrumlu antibiyotiklerdir. Ayrıca çoğu protozoa türüne karşı da etkilidirler. Folik asit yolağındaki inhibisyon sayesinde bakterilerin çoğalmasını durdurur veya gelişmesini engellerler, yüksek dozda kullanımlarında veya kombine kullanımlarında ise baktesid etki gösterirler. Bakterilerin hızlı gelişme ve çoğalma dönemlerinde daha etkili oldukları için özellikle akut hastalıkların tedavisinde kullanılırlar (Altıntaş, 2006; Clark, 2012).

Sülfonamid grubu antibiyotiklerin farmakokinetik özellikleri

Sülfonamidlerin farmakokinetikleri genel olarak benzer olsa da birbirleri arasında belli farklar da vardır. Çoğu sülfonamid mide bağırsak kanalından iyi absorbe edilir. Bazılarının emilimi ağızda başlasa da, asıl emilim bölgesi bağırsaklardır. Oral kullanımdan sonraki emilim, dağılım ve etki süreçleri özellikle bağırsak içeriğine göre değişir. Bağırsak içeriğinin artması ilacın emilimini yavaşlatır. Bu yüzden emilme hızı geviş getiren hayvanlarda düşük ve düzensiz, kedi ve köpeklerde daha yüksek, kanatlılarda ise en yüksektir ve tam emilme gerçekleşir. Oral kullanımın zor olduğu durumlarda parenteral uygulama tercih edilir. Özelikle besi hayvanları için kullanılan sülfonamid türevleri genellikle piyasada damar içi veya kas içi kullanıma uygun enjeksiyonluk çözeltiler halinde bulunmaktadırlar. Antibakteriyel etki için sülfonamidlerin kandaki miktarının 80-100 µg/mL olması yeterlidir (Papich, 2017). Sülfonamidlerin vücutta dağılımı genel olarak yüksektir, beyin-omurilik sıvısı hariç diğer vücut sıvılarına ve dokulara iyi nüfuz ederler. Dolaşımda başlıca serum albüminine, az miktarda da serum globulinine bağlanırlar, her bir sülfonamidin plazma proteinlerine bağlanma oranı farklıdır (%20-%95) (Kayaalp, 2012).

Sülfonamid antibiyotiklerinin temel metabolik yolağı para-amino grubundan asetilasyondur ve karaciğerde gerçekleşir. Oluşan metabolitin antibakteriyel etkisi yoktur ve çözünürlükleri çok azdır. Nötral ve asidik pH sahasında çökerek kristalüriye ve dolayısıyla böbrekte hasara yol açabilirler (Papich, 2017). Ana bileşik veya metabolitleri halinde globüler filtrasyonla veya tübüler salgılanmayla böbrek yoluyla atılırlar. Sülfonamidlerin yarılanma ömürleri 4-150 saat arası değişir (Kayaalp, 2012).

Sülfonamid grubu antibiyotiklerin klinik kullanımları

Sülfonamidler çok eski bir ilaç grubudurlar. Popülerlikleri zaman içinde azalsa da seçici olarak kullanılabilmeleri, direnç oluşumunun geç olması ve maliyetlerinin düşük olması nedeniyle hala yaygın biçimde kullanılmaktadırlar. Özellikle trimetoprimle kombine kullanılmaya başlandığında, sülfonamidlere olan ilgi tekrar canlanmıştır. Veterinerlikte sülfonamidlerin kullanılmaya başlanmasıyla hayvan

hastalıklarının yayılma hızı ve ölüm oranlarını ciddi oranda azalma gözlenmiştir. Bu da sülfonamidlerin hayvan sağlığı alanında geniş kullanım alanına sahip olmasına neden olmuştur. Sülfonamidler, hayvanlarda bakteriyel ve protozoal enfeksiyonların tedavisinde ve profilaksisinde kullanılan ilk ilaçlardandır. Sülfonamidler 50 yıldan fazladır klinikte kullanıldığı için, bir zamanlar bu ilaçlara duyarlı olan bakteriler artık direnç geliştirmişlerdir. Bu yüzden artık hem beşeri hem veteriner amaçlı olarak diaminoprimidinlerle kombine olarak kullanılmaktadırlar. Trimetoprim veya ometoprim gibi diaminopirimidin türevleriyle kombine kullanımlarında daha geniş bir etki spektrumuna sahip olurlar ve direnç gelişimini geciktirirler. Evcil hayvanlarda ise üçlü sülfa olarak adlandırılan ve üç farklı sülfonamid içeren ilaç preparatları da kullanılmaktadır. Sülfonamidlerin besi hayvanlarında kullanımı, gıdada ilaç kalıntılarının bulunmasını engellemek için sınırlandırılmıştır (Papich, 2017).

Sülfonamid grubu antibiyotikler başta kanatlılar olmak üzere tüm evcil hayvanlarda bakteriyel kaynaklı solunum, sindirim, idrar yolları ve merkezi sinir sistemi enfeksiyonlarının tedavisinde tek başlarına veya kombine halde yaygın biçimde kullanılırlar. Sülfonamid grubu antibiyotikler beşeri amaçla oküler, üriner ve yanık enfeksiyonlarında, ülseratif kolit, romatoid artrit ve toksoplazmoziste endikedirler (Papich, 2017; Zinner ve Mayer, 2015).

Sülfonamid-Trimetoprim Kombinasyonları

Sülfonamidler ve trimetoprimi hem beşeri olarak hem de kedi, köpek, at ve diğer hayvanlarda tek başlarına kullanmak yerine kombinasyonları halinde kullanmak tercih edilir. Birlikte kullanıldıklarında daha güçlü antibakteriyel etki gösterdikleri ve daha geç direnç oluşumu gözlendiği için bu kombinasyonlara "güçlendirilmiş sülfonamidler" de denmektedir. Tetrahidrofolik asit sentezindeki ardışık blokaj sayesinde elde edilen sinerjik antimikrobiyal etkinin maksimum olması için sülfonamid ve trimetoprim konsantrasyonlarının oranı 5:1 olmalıdır. Bu yüzden kombine formülasyonlar sülfonamid: trimetoprim oranı 5:1 olarak üretilir (Papich, 2017).

1.6. Etken Maddelerin Miktar Tayini İçin Kullanılan Analitik Yöntemler

1.6.1. TMP Miktar Tayini İçin Uygulanan Analiz Yöntemleri

Türk Farmakopesi'ne göre trimetoprim miktar tayini için susuz ortam titrasyonu kullanılır. 0,325 g numune 50 mL susuz asetik asit içinde çözülür. 0,1 M perklorik asit ile titre edilir. Dönüm noktası potansiyometrik olarak tayin edilir. 1 mL 0,1 M perklorik asit 29,03 mg trimetoprime eşdeğerdir (Türk Farmakopesi, 2017).

Literatürde bulunan trimetoprimin miktar tayinine yönelik çalışmalar incelendiğinde, içinde trimetoprim bulunan farmasötik preparatların analizi için çoğunluğu spekrofotometri olmak üzere HPLC, kapiler elektroforez ve voltametri gibi farklı yöntemlerin kullanıldığı görülmektedir. Trimetoprim tedavide nadiren yalnız başına kullanıldığı için, sadece trimetoprimin analizi için geliştirilmiş yöntemlerin sayısı görece azdır. Trimetoprim kombinasyonlarından literatürde en çok bahsi geçen karışım olan trimetoprim ve sülfametoksazol karışımının miktar tayini için spetrofotometrinin yanında kromatografik ve elektroforetik yöntemler de kullanılmıştır. Hayvansal gıda ürünleri, çevre numuneleri ve biyolojik sıvılarda yapılan analiz çalışmalarında trimetoprimin yanında çok sayıda etken maddenin analizinin de amaçlandığı ve çalışmalarda daha çok sıvı kromatografi-kütle spektrometri cihazının kullanıldığı görülmektedir.

1.6.1.1. Spektroskopik Yöntemler

Bonazzi ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada trimetoprimin sülfadiyazin, sülfametoksazol ve sülfametoksipiridazin ile kombinasyonlarını içeren üç farklı preparatın analizi için türev spektrofotometri ve fark spektrofotometri yöntemleri geliştirilmiştir. Bu yöntemlerle elde edilen analiz sonuçlarını karşılaştırmak amacıyla yeni bir HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Bu HPLC yönteminde sabit faz olarak C_{18} kolon ve 1,8 diaminooktan ve sodyum heptanosülfat içeren ve pH değeri 6,5 olan bir hareketli faz kullanılmıştır (Bonazzi ve ark., 1994).

Lemus Gallego ve Pérez Arroyo, bir göz damlası preparatında bulunan trimetoprim, deksametanoz ve polimiksin B etken maddelerinin aynı anda miktar tayinlerini gerçekleştirmek için spekrofotometrik yöntemler geliştirmişlerdir. Bu üç etken maddenin absorbans spektrumları birbiriyle çakıştığı için, geliştirdikleri yöntemlerde farklı kemometrik tekniklerden yararlanmışlardır. Üçlü karışımda bulunan etken maddelerin analizi için, spektrum oranları türev sıfır kesim yöntemi, kısmi en küçük kareler ve temel bileşen regresyonu tekniklerini kullanmışlardır. Geliştirilen yöntemlerin validasyon çalışmalarında, bu üç etken madde için geri kazanım oranları %95,5 ile %105,1 arasında elde edilmiştir. Geliştirilen yöntemler, bu üç etken maddeyi içeren göz damlası preparatlarının analizine başarıyla uygulanmıştır (Lemus Gallego ve Pérez Arroyo, 2001).

Mohamed ve arkadaşları, trimetoprim ve eritromisin içeren tabletlerin analizi için spektrofotometre kullanımına dayanan farklı kemometrik yöntemler geliştirmişlerdir. Trimetoprim ve eritromisinin spektrumları çakıştığı halde kullanılan üç kemometrik yöntemle bu etken maddelerin seçici olarak tayini mümkün olmuştur. Tabletlerde trimetoprim ve eritromisinin miktar tayini birinci türev spektrofotometri, çok değişkenli kalibrasyon ve kısmi en küçük kareler yöntemleri uygulanarak gerçekleştirilmiş ve analiz sonuçları arasında anlamlı bir fark olmadığı tespit edilmiştir (Mohamed ve ark., 2007).

2014'te yayınlanan bir çalışmada sülfametoksazol ve trimetoprimin mikromolar seviyede tayini için spektrofotometrik bir yöntem geliştirilmiştir. Absorbans spektrumlarının oranlarının birinci türevinin kullanıldığı bu yöntemde sülfametoksazolün tayini için 256 nm, trimetoprimin tayini içinse 293 nm'deki genlikler kullanılmıştır. Bu ilaçların kombine olarak bulunduğu tabletlerdeki yardımcı maddelerin analiz üzerine olan etkisinin giderilmesi için kalibrasyonda standart ekleme yöntemi kullanılmıştır. Her iki etken madde için doğrusal konsantrasyon aralığının 5-150 µM/L olduğu bu yöntem valide edildikten sonra ticari preparat analizi için uygulanmıştır (Hajianfl ve Ghobadi, 2014).

Adegoke ve arkadaşları tarafından trimetoprim ve sülfametoksazolün eş zamanlı spektrofotometrik analizi için kloranilik asit kullanılarak yük-transferi kompleksleştirmesi gerçekleştirilmiştir. Kompleksleştirme işlemlerinden sonra kaydedilen spektrumlarda her iki ilacın da kloranilik asitle oluşturdukları komplekslerin görünür bölgedeki sinyalleri kullanılarak kantitatif tayinleri gerçekleştirilmiştir (Adegoke ve ark., 2017).

Muchlisyam ve arkadaşları, trimetoprim ve sülfametoksazolün tabletlerdeki miktar tayini için oran spektrumlarının sıfır etrafında merkezileştirilmesine dayalı bir UV spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir. Sülfametoksazol için 271 nm ve trimetoprim için 257 nm'de ölçülen işlenmiş sinyal değerleri kullanılarak kalibrasyon eğrilerini oluşturmuş ve analitik validasyon işlemlerini gerçekleştirmişlerdir. Tabletlerin kantitatif analizi ile elde ettikleri sonuçlar etikette belirtilen sülfametoksazol miktarının %102,97 ila %103,65 arasında, trimetoprim miktarının ise %94,45 ila %98,71 arasındadır (Muchlisyam ve ark., 2018).

2011'de yayınlanan bir çalışmada sülfametoksazol ve trimetoprim içeren süspansiyon preparatının analizi için azaltılmış toplam yansımalı Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi kullanılmıştır. Karşılaştırmalı olarak kısmi en küçük kareler ve yapay sinir ağları tekniklerini kullandıkları bu çalışmada spektral aralık olarak 800–2500 cm^{-1} bölgesini seçilmiştir. Kullanılan kemometrik tekniklerin validasyonundan sonra, ticari preparat analizini gerçekleştirmişler ve her iki teknikle de kabul edilebilir sonuçlar bulmuşlardır. Fakat geri kazanım değerleri ve artık değerlerin dağılımına bakarak, yapay sinir ağları tekniğinin tahmin gücünün kısmi en küçük kareler tekniğine göre daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir (Khanmohammadi ve ark., 2011).

Dong ve arkadaşları, sülfametoksazol ve trimetoprim içeren tabletlerin tablet ağırlığının ve trimetoprim içeriğinin tayini için yakın kızılötesi spektroskopi yöntemini kullanmışlardır. 213 tablet örneğini 2:1 oranında ayırarak kalibrasyon ve tayin gruplarını oluşturup 7500–5900 cm^{-1} spektral alanındaki verilere, çeşitli ön işlemlerden sonra kısmi en küçük kareler tekniğini uygulamışlardır. Tartım ve HPLC yöntemlerinin referans yöntemler olarak kullanıldığı bu çalışmayla endüstriyel

üretimde süreç içi kontrol için uygulanabilecek hızlı ve pratik bir yöntem sunmuşlardır. Fakat bu yöntemle tablet içeriğinde bulunan sülfametoksazolün miktar tayini mümkün değildir (Dong ve ark., 2016).

Shan ve arkadaşları, toz karışımlarındaki trimetoprim tayini için yakın kızıl ötesi spektroskopisi yöntemi kullanılmıştır. Toplam 100 toz numunesi kullanılan bu yöntemde 3 farklı konsantrasyon seviyesi kullanılmış ve numuneler çalışma seti, izleme seti ve test seti olarak üç gruba ayrılmıştır. Dalga boyu seçiminde genetik algoritma kullanılan bu yöntemde, spektral veri analizi için iki farklı yöntem kullanılmıştır. Kısmi en küçük kareler yöntemi ve yapay sinir ağları yöntemiyle yapılan kantitatif analiz sonucunda elde edilen sonuçların, artık değerlerin dağılımı bakımından benzer olduğu belirtilmiştir (Shan ve ark., 2014).

1.6.1.2. Kromatografik Yöntemler

2002 yılında yayınlanan bir çalışmada, trimetoprim ve deksametazon içeren farmasötik göz damlası preparatlarının analizi için bir ters faz sıvı kromatografi yöntemi geliştirilmiştir. Sabit faz olarak C_{18} kolonun kullanıldığı bu çalışmada, %70 asetonitril %30 sodyum fosfat tamponu (10 mM) içeren bir hareketli faz kullanılmıştır. Yöntem geliştirme sırasında, hareketli fazda bulunan tamponun pH değeri 3, 4, 5, 6 ve 7'ye ayarlanarak enjeksiyonlar gerçekleştirilmiş, etken madde piklerinin alıkonma zamanlarında önemli bir değişiklik gözlemlenmediği için yöntemde pH 3 fosfat tamponu kullanılmıştır. Akış hızının 1 mL/dk olarak ayarlandığı bu yöntemde, alıkonma zamanları 2,2 dk ve 4,6 dk olan trimetoprim ve deksametazon için dedeksiyon dalga boyları sırasıyla 230 nm ve 242 nm olarak belirlenmiştir ve analizler 6 dk içinde tamamlanmıştır. Her iki etken madde için de 0,30-32 µg/mL çalışma aralığında uygun doğrusallık değerlerine ulaşılmıştır. Yakalama ve tayin sınırları trimetoprim için 0,15 µg/mL ve 0,50 µg/mL, deksametazon için 0,07 µg/mL ve 0,25 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Geliştirilen yöntem validasyon çalışmalarından sonra göz damlası preparatlarındaki etken maddelerin analizine başarıyla uygulanmıştır (Lemus Gallego ve Pérez Arroyo, 2002).

Ghanem ve Abu-Lafi trimetoprim ve sülfadimetoksin sodyum içeren oral çözeltinin kantitatif analizi için bir HPLC yöntemi geliştirmiş ve valide etmişlerdir. C_{18} kolonun kullanıldığı bu ters faz HPLC yöntemınde hareketli faz olarak pH değeri 5,7'ye ayarlanan su: asetonitril: trietilamin (700:299:1, *h/h/h*) karışımı kullanılmışlar ve UV dedektörü 254 nm'ye ayarlamışlardır. Etkin maddeleri ve farmasötik preparatı farklı stres koşullarında tuttuktan sonra degredasyon ürünlerinin sinyallerinin etkin madde pikleriyle çakışmadığını göstermişlerdir. Geliştirilen yöntem valide edildikten sonra ticari oral çözelti preparatına başarıyla uygulanmıştır (Ghanem ve Abu-Lafi, 2013).

Wang ve arkadaşları, trimetoprim ve berberin hidroklorür içeren farmasötik dozaj formlarının kantitatif analizi için stabilite göstergeli bir HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Kromatografik ayrım 25 cm uzunluğundaki C_{18} analitik kolonda, pH değeri 3'e ayarlanmış asetonitril ve 50 mM potasyum dihidrojen fosfat karışımının (30:70 (*h/h*)) hareketli faz olarak kullanıldığı şartlarda gerçekleştirilmiştir. Kalibrasyon, validasyon ve gerçek numune analizleri 271 nm'ye ayarlanan UV dedektör kullanılarak yapılmıştır. Trimetoprim ve berberin hidroklorür için çalışma aralıkları sırayla 1-30 µg/mL ve 2-60 µg/mL olarak belirlenmiştir. Geliştirilen yöntem kapsül preparatlarına uygulandığında etiketteki trimetoprim ve berberin hidroklorür miktarlarına göre elde edilen geri kazanım değerleri sırasıyla %98,3 ve %97,96 olarak tespit edilmiştir (Wang ve ark., 2013).

Blahova ve arkadaşları süt örneklerinde trimetoprim analizi için kullanılmak üzere bir katı faz ekstraksiyonunu takip eden bir HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Kesintisiz ve otomatik analiz için kolon değiştirici kullanarak, ters faz sorbent bazlı ön kolonda katı faz ekstraksiyonunu gerçekleştirmişler, analitik kolon olarak ters faz C_{18} kolon kullanmışlardır. Hareketli faz olarak pH 3'e ayarlanmış 100 mM fosfat tamponu ve asetonitril kullanılmıştır. Süt örneklerini santrifüjledikten sonra orta tabakadan aldıkları örnekleri sisteme enjekte etmiş ve kromatogramları 229 nm'de kaydetmişlerdir. 50-500 µg/mL doğrusal aralıkta yapılan çalışmada standart eklenmiş süt örneklerinin analizi gerçekleştirilmiş ve geri kazanım değerleri %85,0 ile %95,6 olarak bulunmuştur (Blahová ve ark., 2001).

Dinali ve arkadaşları inek sütünde trimetoprim ve sülfametoksazol tayini için bir HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Numune hazırlığı aşamasında manyetik moleküler baskılı katı faz ekstraksiyonu kullanarak bu iki etken maddenin süt örneklerinden seçici olarak ekstraksiyonunu sağlamışlardır. Geliştirilen HPLC yönteminde sabit faz olarak C_8 kolon kullanılmış, hareketli faz olarak %0,1 trietilamin sulu çözeltisi, asetonitril ve metanol (76:19:5, *h/h/h*) karışımı seçilmiştir. Kolon sıcaklığı 25 °C, akış hızı 1,5 mL/dk olan yöntemde analiz zamanı 10 dakikadır ve kromatogramlar 280 nm'de kaydedilmiştir. Etken maddeleri için doğrusal çalışma aralığı 0,5-20 µg/mL olarak belirlenmiş, kalibrasyon ve validasyon çalışmalarından sonra gerçek numune analizi gerçekleştirilmiş ve numunelerde 1,58 µg/mL sülfametoksazol, 7,07 µg/mL trimetoprim olduğu saptanmıştır (Dinali ve ark., 2020).

Gonzalez ve arkadaşları, 2015 tarihli çalışmalarında kurumuş plazma leke ve kurumuş idrar leke örneklerinden trimetoprim ve sülfametoksazol tayinini gerçekleştirmek için bir HPLC-MS/MS yöntemi geliştirmişlerdir. 50 mm uzunluktaki C_{18} kolonun kullandıkları kromatografik yöntemde hareketli fazı oluşturan A (% 0,1 formik asit içeren su) ve B (% 0,1 formik asit içeren asetonitril) bileşenlerinin oranları 95:5 (*h/h*) ile 55:45 (*h/h*) arasında değiştirerek 3,5 dakikalık bir gradient akış kullanmışlardır. Biyolojik sıvı lekesi bulunan 6 mm çapındaki örnekler metanol ile ekstrakte edildikten sonra geliştirilen yöntem kullanılarak analize tabi tutulmuştur (Gonzalez ve ark., 2015).

Yang ve arkadaşları, trimetoprim, ormetoprim ve diaveridinin hayvan yemlerinden analizi için bir UPLC-MS/MS yöntemi geliştirmişlerdir. Numune hazırlama tekniği olarak diklorometan kullanımına dayanan bir sıvı ekstraksiyon yöntemi geliştirmişlerdir. Ekstraksiyon sonrasında UPLC-MS/MS analizini gerçekleştirdikleri numunelerden kaynaklanan matris etkisinin değerlendirilmesi için ekstraksiyon sonrası standart ekleme yöntemini kullanmışlar ve matris etkisinin %15'in altında olduğunu kanıtlamışlardır. Trimetoprim için yakalama sınırı 15,55 µg/kg, tayin alt sınırı ise 18,92 µg/kg olan bu yöntem kullanılarak hayvan yemlerinde bu üç etken maddenin analizi gerçekleştirilmiştir. Üç farklı piyasa ürününün

analizinden sonra bir üründe 51 µg/kg omeprapol tayin edilmiş, hiçbir üründe trimetoprim ve diaveridin tespit edilmemiştir (Yang ve ark., 2016) .

Poirier Larabie ve arkadaşları, kentsel atık sulara maruz kalmış balıkların plazmasında diklofenak, ibuprofen, naproksen, salbutamol, sülfametoksazol ve trimetoprim miktar tayini için bir LC-MS/MS yöntemi geliştirmişlerdir. Katyon değişim katı faz ekstraksiyonuyla yapılan ön deriştirme basamağının ardından, C_{18} kolon ve 5 mM amonyum asetat tamponu (pH 5,5) içeren metanol-su karışımını gradient akışta kullanılarak bir 14 dakikalık bir kromatografik ayrım gerçekleştirmişlerdir. Pozitif moddaki iyon elektrosprey ile gerçekleştirilen iyonizasyonun ardından çoklu reaksiyon monitorizasyonuyla elde edilen her etken maddenin prekürsor iyona ait sinyalleri miktar tayini için kullanılmıştır. Geliştirilen yöntem, validasyon çalışmalarının ardından balık plazma örneklerine uygulanmış ve elde edilen analiz sonuçlarının izin verilen miktarlardan daha düşük olarak tespit edilmiştir (Poirier Larabie ve ark., 2017).

El-Najjar ve arkadaşları, içinde trimetoprimin de olduğu 10 farklı antibiyotiğin insan plazmasından analizi için bir UPLC-MS/MS yöntemi geliştirmişlerdir. Yoğun bakım ünitesindeki hastaların plazma ilaç düzeylerinin tespitinin hedeflendiği bu çalışma, Avrupa İlaç Ajansı'nın kılavuzlarına uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Ters faz kromatografik ayrım, 50 °C'ye ayarlanmış 50 mm uzunluğundaki pentoflorofenil kolon ve 4 dakikalık gradient akış ile sağlanmıştır. 2 mM amonyum asetat ve %0,1 formik asit içeren ve değişen oranlarda metanol ve su olmak üzere iki bileşenden oluşan bir hareketli faz 0,5 mL/dk akış hızında kullanılmıştır. Pozitif iyon modunda çalışan bir elektrosprey sistemi ile çalışan kütle spektrometresinde dedeksiyon için çoklu reaksiyon modu kullanılmıştır. Validasyon çalışmaları sonucunda tayin sınırı değerleri meropenem, seftadizim, piperasilin, ampisilin, flukloksasilin ve sülfametoksazol için 0,1 µg/mL; sefepim, benzilpenisilin ve trimetoprim için ise 0,05 µg/mL olarak belirlenmiştir. Geliştirilen ve valide edilen metod, gönüllülerden alınan plazma örneklerine başarıyla uygulanmıştır (El-Najjar ve ark., 2018).

Teglia ve arkadaşları içlerinde trimetoprimin de olduğu 17 etken maddenin analizi için UPLC-MS/MS yöntemi geliştirmişlerdir. Bu yöntemin geliştirilmesinde, kromatografik şartları daha önceki çalışmalarından modifiye etmişlerdir. Yöntemin hassasiyetini arttırmak amacıyla bu 17 etken maddenin kütle spektrometresinde verdikleri sinyallerin şiddetini arttırmayı hedeflemişlerdir. Bu amaçla en uygun kütle spektrometresi parametrelerine karar vermek için merkezi bileşenli tasarım kullanmışlardır. Önce kapiler voltajı, koni voltajı, ekstaktor voltaji ve radyo frekansı voltajının her bir etken maddenin sinyal şiddetine etkilerini modellemek için kesirli merkezi bileşenli tasarım kullanmışlardır. En küçük kareler yöntemiyle elde ettikleri modellerin korelasyon katsayıları genellikle düşük olduğu için, yapay sinir ağları yöntemini kullanmaya karar vermişler ve daha yüksek korelasyon katsayıları elde etmişlerdir. Geliştirdikleri bu modelden yararlanarak kapiler voltajı, koni voltajı, ekstaktor voltajı ve radyo frekansı voltajı için en uygun şartları saptamışlardır. Çok değişkenli optimizasyonun tek faktörlü klasik optimizasyon yöntemine göre avantajlarını göstermek için koni voltajının klasik yöntemle optimizasyonunu da gerçekleştirmişlerdir. Çalışma sonunda, çok değişkenli optimizasyon sayesinde yöntem geliştirme süresinin %54, analit sarfiyatının ise %80 azaltıldığını belirtmişlerdir. Geliştirilen yöntem valide edilmemiş, gerçek veya sentetik numunelerin analizi için uygulanmamıştır (Teglia ve ark., 2020).

Dispas ve arkadaşları, içinde trimetoprimin de olduğu yedi antibiyotiğin analizi için bir süperkritik akışkan kromatografisi yöntemi geliştirmişlerdir. Kromatografik yöntemin optimizasyonunda gradient öncesi izokratik zamanı, gradient zamanını ve gradient sonundaki metanol miktarına karar vermek için merkezi bileşenli tasarıma dayanan cevap yüzey metodolojisi kullanmışlardır. Sabit faz olarak 2-etilpiridin kullandıkları bu yöntemde hareketli faz olarak CO_2 ve MeOH karışımı optimal koşullara göre programlanan gradient akışta uygulanmıştır. Validasyon işlemlerinden sonra, geliştirilen yöntemle yapay karışımlarda antibiyotiklerin tayini gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada aynı etken maddelerin analizini gerçekleştirecek bir UPLC yöntemi de geliştirilmiş ve analiz sonuçları karşılaştırılmıştır. Bu iki yöntemle elde edilen analiz sonuçları istatistiksel olarak karşılaştırılmamış, fakat benzer olarak

ifade edilmiştir. Ayrıca UPLC yönteminin analitik performansının süperkritik sıvı akışkan kromatografisine göre daha iyi olduğu belirtilmiştir (Dispas ve ark., 2014).

1.6.1.3. Elektroforetik Yöntemler

Da Silva ve arkadaşları trimetoprim ve sülfametoksazolün farmasötik preparatlardan kantitatif tayini için bir kapiler elektroforez yöntemi geliştirmişlerdir. Taşıyıcı elektrolit olarak pH 7,1 lityum fosfat tamponunu kullanarak elektroforetik analiz sırasında trimetoprimin katyonik formda, sülfametoksazolün anyonik formda bulunmasını sağlayarak etkin bir ayrıma ulaşmışlardır. İkili iletkenlik dedektörü kullandıkları bu yöntemde analiz zamanı 2,6 dakika olarak belirlenmiştir. Geliştirilen yöntem doğrusallık, doğruluk ve tekrarlanabilirlik açısından valide edildikten sonra, trimetoprim ve sülfametoksazol içeren tablet formülasyonlarının kantitatif tayinine uygulanmıştır (Da Silva ve ark., 2013).

1.6.1.4. Elektrokimyasal Yöntemler

Carapuça ve arkadaşları, trimetoprimin farmasötik preparatlarda tayinine yönelik bir kare dalga katodik sıyırma voltametri yöntemi geliştirmişlerdir. Damlayan civa elektrodun kullanıldığı yöntemde destek elektroliti olarak pH 3,8 asetat tamponu kullanılmıştır ve biriktirme potansiyeli −0,6 V, biriktirme süresi 10 saniye, frekans 100 Hz, genlik 25 mV, potansiyel adımını 5 mV olarak optimize edilmiştir. Geliştirilen yöntem, sülfametoksazol ve trimetoprim içeren şurup preparatlarından timetoprimin seçici tayini için kullanılmış ve etikette belirtilen miktarla uyumlu sonuçlar elde edilmiştir (Carapuça ve ark., 2005).

Rebelo ve arkadaşları, balık çiftliklerinden temin edilen sularda trimetoprim analizi için potansiyometrik bir yöntem geliştirmişlerdir. Moleküler baskılı polimer kullanılarak trimetoprime seçici olmasını sağladıkları iyon seçici elektrodu, çalışma elektrodu olarak kullanmışlardır. Trimetoprim için çalışma aralığının 1-4 µg/mL olduğu çalışmada derişim ve potansiyelin logaritması arasında doğrusal bir ilişki kurularak standart ekleme yöntemine dayalı kalibrasyon, validasyon ve miktar tayini çalışmaları gerçekleştirilmiştir (Rebelo ve ark., 2011).

Pereira ve arkadaşları, sülfametoksazol, trimetoprim ve fenozapiridinin hızlı ve eş zamanlı tayini için amperometrik ölçüme dayanan bir seri akış enjeksiyon analiz yöntemi geliştirmişlerdir. Çalışma elektrodu olarak boron katkılı elmas elektrodun kullanıldığı çalışma, tablet preparatlarındaki bu üç etkin maddenin miktar tayini için başarıyla uygulanmıştır. Analiz sonuçlarının karşılaştırılması için bir HPLC metodundan yararlanılmıştır. Kullanılan HPLC yönteminde sabit faz olarak C_{18} kolon, hareketli faz olarak 50 mM fosfat tamponu ve asetonitril karışımı (40:60, *h/h*; pH 3,5) kullanılmıştır. Akış hızının 1,2 mL/dk olduğu bu yöntemde analiz zamanı 5 dakikadır, fakat HPLC yönteminin kromatogram, validasyon ve kalibrasyon verilerine yayında yer verilmemiştir. 3 tekrarın ortalaması kullanılarak, 4 numune analizi sonucunda elde edilen verilerle yapılan istatistiksel testte bu iki yöntem arasında anlamlı bir fark olmadığı belirtilmiştir (Pereira ve ark., 2016).

1.6.2. SDZ Miktar Tayini İçin Uygulanan Analiz Yöntemleri

Türk Farmakopesi'ne göre sülfadiyazin miktar tayini için primer aromatik aminoazot tayini yöntemi kullanılır. Temel olarak bir titrasyon tekniği olan bu yönteme göre 0,250 g numune 20 mL seyreltik hidroklorik asit ve 50 mL su karışımı içinde çözülür. Çözeltiye 3 g potasyum bromür eklenir ve buz banyosunda soğutulur. 0,1 M sodyum nitrit çözeltisi ile titre edilir ve eşdeğerlik noktası elektrometrik olarak tespit edilir. 0,1 M sodyum nitritin 1 mL'si 31,03 mg sülfadiyazine eşdeğerdir. Çözeltideki sülfadiyazinin tamamını diazonyum tuzuna dönüştükten sonra ortamda aşırısı bulunan nitrik asit, depolarizasyona neden olarak iki platin elektrot arasındaki akımın düşmesine neden olur ve galvanometrede izlenen bu düşüş titrasyondaki eşdeğerlik noktasının tespitinde kullanılır (Türk Farmakopesi, 2017).

Literatürde bulunan sülfadiyazinin miktar tayini için geliştirilen çalışmalar incelendiğinde, farmasötik preparatların kantitatif analizi için daha çok spektrofotometrik ve kapiler elektroforez yöntemlerinin kullanıldığı görülmektedir. Hayvansal gıda ürünleri, biyolojik sıvılar, hayvan yemleri ve çevre örneklerinden sülfadiyazinin miktar tayini için HPLC, HPLC-MS/MS ve kapiler elektroforez

yöntemlerinin kullanıldığı çalışmalar çoğunluktadır. Bu yöntemler genelde sülfadiyazinin yanında diğer sülfonamid bileşiklerinin de aynı anda tayinini gerçekleştirecek biçimde kullanılmışlardır. Voltametrik yöntemler kullanılarak gerçekleştirilen çalışmaların sadece sülfadiyazin etken maddesinin miktar tayinine yönelik olduğu görülmektedir.

1.6.2.1. Spektroskopik Yöntemler

Espinosa-Mansilla ve arkadaşları sülfadiyazin, trimetoprim, doksisiklin ve furaltadon etken maddelerinin aynı anda miktar tayini için kısmi en küçük kareler yöntemine dayanan bir spektrofotometrik bir yöntem geliştirmişlerdir. Çalışmada, kalibrasyon seti olarak sülfadiyazin, trimetoprim, doksisiklin ve furaltadon etken maddelerini sırasıyla 1-24 µg/mL, 1-48 µg/mL, 4-44 µg/mL ve 2-24 µg/mL konsantrasyon aralıklarında içeren 22 karışım çözeltisi kullanılmıştır. Validasyon ve numune konsantrasyonları da bu sınırlar içinde tutulmuştur. Geliştirilen yöntem, bu etken maddelerin farklı kombinasyonlarını içeren farmasötik preparatların analizinde başarıyla kullanılmıştır (Espinosa-Mansilla ve ark., 1995).

2002 yılında yayınlanan bir çalışmada sülfadiyazin ve trimetoprim içeren tabletlerin disolüsyon çalışması için akış enjeksiyon analiz yöntemi geliştirilmiştir. Akış enjeksiyon analizörü hatları disolüsyon kabına ve dilüent kabına bağlanıp sisteme filtre de eklendikten sonra gerekli seyreltmeler otomatik olarak gerçekleştirilerek numuneler detektöre verilmiştir. Dedektör olarak UV spektrofotometre kullanılan çalışmada, birinci türev spektrumları ve sıfır kesim tekniğinden yararlanılmıştır. Birinci türev spektrumlarındaki 288 nm'deki absorbans değerleri sülfadiyazin tayini için, 248 nm'deki absorbans değerleri ise trimetoprim tayini için kullanılmıştır. Sülfadiyazin ve trimetoprim için doğrusal çalışma aralıkları 1-35 µg/mL ve 1-30 µg/mL olarak belirlenmiştir. Geliştirilen yöntem, sülfadiyazin ve trimetoprim içeren oral dozaj formülasyonunun disolüsyon profilinin tayini için başarıyla kullanılmıştır (Galvez ve ark., 2002).

J. Fan ve arkadaşları, farmasötik preparatlardan sülfadiyazin tayini ile idrardan sülfametoksazol tayini için spektrofotometrik ölçüme dayanan akış enjeksiyon analiz yöntemleri geliştirmişlerdir. Bu iki etken madde için geliştirilen iki yöntemin esası, söz konusu aktif bileşiklerde bulunan serbest amino grubunun sodyum nitritle diazonyum bileşiğine dönüşmesi ve diazonyum bileşiklerinin kromojenik bir reaktifle reaksiyona girerek bir azo boyar madde oluşturmasına dayanmaktadır. Akış enjeksiyon sistemiyle gerçekleştirilen bu reaksiyon adımlarının ardından sülfadiyazin için 538 nm'de ve sülfametoksazol için 528 nm'de ölçülen absorbans değerleri kantitatif analiz için kullanılmıştır. Sülfadiyazin ve sülfametoksazol için sırasıyla 0,2-20 µg/mL ve 0,1-20 µg/mL doğrusal aralıkta gerçekleştirilen çalışmada tayin sınırları sülfadiyazin için 0,06 µg/mL ve sülfametoksazol için 0,05 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Geliştirilen yöntem, tek etken madde içeren farmasötik preparatların analizine ve sülfametoksazol uygulanan gönüllülerin idrar örneklerinin analizine başarıyla uygulanmıştır (Fan ve ark., 2003).

Hişmioğulları ve arkadaşları, 2010 yılında yaptıkları çalışmada, sülfadiyazin ve trimetoprim içeren veteriner preparatın analizi için spektrofotometrik bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu iki etken maddenin spektrumları girişim yaptığı için, 241, 257 ve 288 nm'deki absorbans verileri kullanılarak çok değişkenli bir klasik en küçük kareler yöntemi geliştirilmiştir. Doğrusal çalışma aralığının sülfadiyazin için 4-22 µg/mL ve trimetoprim için 3-18 µg/mL olduğu bu çalışmada, validasyon işlemi için sentetik karışımlardan elde edilen geri kazanım yüzdeleri değerlendirilmiştir. Geliştirilen yöntem 1000 mg sülfadiyazin ve 200 mg trimetoprim içeren ticari preparatlara uygulandığında sülfadiyazin ve trimetoprimin ortalama miktarları 991,7 mg ve 200,6 mg; standart sapma değerleri sırasıyla 11,6 mg ve 4,31 mg olarak bulunmuştur. Bu yöntem kullanılarak üç farklı koşulda (oda sıcaklığı, buzdolabı ve etüv) 12 ay boyunca saklanan preparatlar 3 ay aralıklarla analiz edilmiş ve etken madde miktarlarının gerekli sınırlar içinde olduğu saptanmıştır (Hişmioğulları ve ark., 2010).

1.6.2.2. Kromatografik Yöntemler

Khattab ve arkadaşları, üç farklı numuneden sülfadiyazin ve trimetoprim tayinini gerçekleştirmek için bir ince tabaka kromatografisi yöntemi geliştirmişlerdir. Numune olarak balık yemi, balık dokusu ve ticari enjektabl çözelti seçilmiştir. Seçilen numunelerden balık yemi ve balık dokusu üzerine sentetik olarak eklenen sülfadiyazin ve trimetoprim ilaçlarının analizi için önce basit bir ekstraksiyon işlemi uygulanmıştır. İnce tabaka kromatografisinde sabit faz olarak silika jel alümina tabakalar, hareketli faz olarak kloroform: tolüen: etanol: glasiyel asetik asit (27:27:6:6, *h/h/h/h*) karışımı kullanılmıştır. Dedektör olarak tarayıcı dansitometrenin kullanıldığı çalışmada, sülfadiyazin için 270 nm, trimetoprim için 225 nm'deki absorbans değerleri kullanılmıştır. Yöntemin validasyonu sırasında geri kazanım ve standart ekleme çalışmaları ile doğrusallık, doğruluk, kesinlik ve seçicilik parametreleri değerlendirilmiştir. Yakalama sınırı ve tayin sınırı değerleri tespit edilmemiştir (Khattab ve ark., 2014).

Lian ve arkadaşları, deniz suyunda sülfadiyazin kalıntı tayini için moleküler baskılanmış polimerlerle gerçekleştirilen katı faz ekstraksiyonunu takip eden bir HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Katı faz ekstraksiyonunun gerçekleştirileceği kartuş, sentezlenen moleküler baskılı polimerlerin cam bir kolon içine yerleştirilmesiyle elde edilmiştir. Standart çözeltiler ve numunelerin hepsi bu kartuştan geçirilerek ön derişitirme basamağına tabi tutulmuşlardır. Geliştirilen katı faz ekstraksiyonunu geri kazanımı %88 olarak bulunmuştur. HPLC metodunda 30 °C'de tutulan C_{18} kolon ve 1 mL/dk akış hızına ayarlanmış asetonitril su karışımı (25:75, *h/h*) kullanılmıştır. Yöntemin yakalama sınırı 0,05 µg/L, tayin alt sınırı 0,17 µg/L olarak hesaplanmıştır. 7 farklı bölgeden alınan deniz suyu örneklerinden ikisinde sülfadiyazin miktarı 0,33 ve 0,28 µg/L olarak tespit edilmiş, nedeninin bu bölgelere yakın balık çiftlikleri olabileceği belirtilmiştir (Lian ve ark., 2014).

He ve arkadaşları, yumurta örneklerinde sülfadiyazin kalıntılarının miktar tayini için moleküler baskılanmış polimerler kullanılarak geliştirilen bir katı faz ekstraksiyonunu yönteminin sonrasında uygulanan bir HPLC metodu geliştirmişlerdir.

HPLC metodunda sabit faz olarak C_{18} kolon, hareketli faz olarak asetonitril su karışımı (25:75, *h/h*) kullanılmıştır. Yöntemin validasyon çalışmaları sadece yakalama ve tayin sınırı hesapları ile sınırlı kalmıştır. Sülfadiyazin için hesaplanan tayin alt sınırı 1 µg/kg olup, yumurtada izin verilen kalıntı miktarından (100 µg/kg) çok daha düşüktür. Geliştirilen yöntem, standart eklenmiş yumurta örneklerine başarıyla uygulanmıştır (He ve ark., 2016).

Baere ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada domuz dokularından (böbrek, karaciğer, kas, yağ ve deri) sülfadiyazin ve trimetoprim analizi için farklı sıvı kromatografisi yöntemleri geliştirilmiştir. UV dedektör kullanılarak her bir etken maddenin analizi için C_{18} kolon kullanılan, iki ayrı yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi geliştirilmiştir. Sülfadiyazin tayini için geliştirilen yöntemde hareketli faz olarak %1 asetik asit içeren su-asetonitril karışımı (85:15, *h/h*); trimetoprim tayini için geliştirilen yöntemde ise %0,25 trietilamonyum asetat: asetonitril: metanol karışımı (80:15:5, *h/h/h*) kullanılmıştır. Dedeksiyon dalga boyu olarak sülfadiyazin için 270 nm, trimetoprim için 240 nm seçilmiştir. Sülfadiyazin ve trimetoprimin ayrı ayrı kalitatif analizini gerçekleştirmek amacıyla geliştirilen HPLC-MS yöntemlerinde de aynı sabit faz ve hareketli fazlar kullanılmıştır. Numune hazırlama ve ön deriştirme basamaklarında da her iki etken madde için farklı sıvı-sıvı ekstraksiyon ve katı-sıvı ekstraksiyon prosedürleri uygulanmıştır. Sülfadiyazin analiz yöntemlerinde iç standart olarak sülfamerazin, trimetoprim analiz yöntemlerinde ise iç standart olarak ormetoprim kullanılan yöntemler valide edilmişlerdir. Validasyon çalışmalarında geri kazanım yüzdeleri her iki etken madde için de %80 ile %110 arasında bulunmuştur. Hesaplanan tayin sınırları AB düzenlemesine göre belirlenmiş maksimum etken madde konsantrasyonlarının altında bulunmuştur. 5 gün boyunca trimetoprim ve sülfadiyazin içeren preparatın oral yolla uygulandığı domuzlar farklı günlerde kesilmiş ve etken maddelerin analizi, geliştirilen ve valide edilen yöntemler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonucunda, ilaç uygulanmasından 12 gün sonra kesilen hayvanlardaki ilaç kalıntılarının izin verilen kalıntı miktarlarının altında olduğu bulunmuştur (De Baere ve ark., 2000).

Croubels ve arkadaşları, hayvan yemlerindeki sülfadiyazin ve trimetoprimin tayini için iki kromatografik yöntem geliştirmişlerdir. İlaçlı yemlerin kalite kontrolünde kullanmak üzere yeni bir HPLC-UV yöntemi, ilaçsız hayvan yemlerindeki sülfadiyazin ve trimetoprim kalıntılarının tayininde kullanılmak üzere ise bir HPLC-MS/MS yöntemi geliştirmişlerdir. Örneklerden sülfadiyazin ve trimetoprimin kazanılması için su-metanol karışımı (50:50, *h/h*) ve etil asetat ile ekstraksiyon gerçekleştirilmiş, katı faz ekstraksiyonu için iyon değiştirici kartuş kullanılmıştır. C_{18} kolon kullanılan HPLC sisteminde hareketli faz olarak %0,5 asetik asit, %0,25 trietilamin, %5 metanol içeren su ve %5 metanol içeren asetonitril kullanılarak gradient akış kullanılmıştır. Dedeksiyon, sülfadiyazin için 270 nm'de, trimetoprim için 240 nm'de gerçekleştirilmiştir. HPLC-MS/MS sisteminde kromatografik ayrım, aynı sabit faz kullanılarak %1 oranında asetik asit içeren su-metanol karışımı (70:30, v *h/h*) ile izokratik olarak gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen yöntemler valide edildikten sonra gerçek numune analizleri gerçekleştirilmiştir. HPLC-UV yöntemiyle elde edilen yakalama sınırı değerleri sülfadiyazin ve trimetoprim için sırasıyla 1,16 mg/kg ve 0,390 mg/kg; HPLC-MS/MS yöntemiyle ise 0,052 mg/kg ve 0,022 mg/kg olarak hesaplanmıştır. Validasyon ve kantitasyon çalışmalarıyla her iki yöntemin de amacına uygun olarak kullanılabileceği kanıtlanmış, özellikle çok düşük yakalama sınırı değerlerine sahip olan HPLC-MS/MS yönteminin hayvan yemlerindeki kalıntı analizine uygun olduğu belirtilmiştir (Croubels ve ark., 2002).

Kujawinski ve arkadaşları trimetoprim, sülfadiyazin, sülfatiazol, sülfamerazin ve sülfametoksazolün aynı anda kalitatif analizleri için geliştirdikleri sıvı kromatografi kütle spektrometri yönteminde, kromatografik ayrım için C_{18} kolon ve pH 3 sodyum fosfat tamponu kullanmışlardır. Dedektör olarak izotop oran kütle spektrometresi kullandıkları için, organik çözücü içermeyen bir hareketli faz seçmişlerdir. Bileşiğe özgü karbon izotop oranı analizi kullanarak farmasötik preparatların orijinalliğinin değerlendirilebileceği bir yöntem sunmuşlardır (Kujawinski ve ark., 2012).

Zonaras ve arkadaşları, balık derisi ve kas dokusunda sülfadiyazin, trimetoprim ve sülfadiyazinin bir metabolitinin miktar tayini için bir sıvı kromatografi-kütle

spektrometri yöntemi geliştirmişlerdir. Numune hazırlığı aşamasında basınçlı sıvı ekstraksiyonu ve katı faz ekstraksiyonu art arda kullanılmış, kromatografik ayrım C_{18} kolon ve formik asit çözeltisi ile asetonitrilin kullanıldığı gradient akışla sağlanmıştır. Analitik validasyon çalışmalarından sonra, yerel marketlerden satın alınan numunelerin analizi için bu yöntem kullanılmıştır (Zonaras ve ark., 2016).

Meersche ve arkadaşları, gübre örneklerinde sülfadiyazin ve trimetoprimin de içinde bulunduğu yedi farklı veteriner amaçlı antibiyotiğin aynı anda tayinini gerçekleştirmek için bir UPLC-MS/MS yöntemi geliştirmişlerdir. Ön ekstraksiyon aşamasının ardından C_{18} kolon kullandıkları kromatografik yöntemde, 15 dakika süren ve formik asit, amonyum format, su ve metanolün farklı oranlarda kullanıldığı bir gradient akış programlamışlardır. Tandem MS/MS dedektörü kullanılan bu yöntem analitik olarak valide edildikten sonra gerçek numunelere başarıyla uygulanmıştır (Van den Meersche ve ark., 2016).

Robert ve arkadaşları, trimetoprim ve sülfadiyazinin de içinde bulunduğu 15 antibiyotiğin hayvan yemlerindeki eş zamanlı analizlerini gerçekleştirmek için bir UPLC tandem kütle spektrometri yöntemi geliştirmiş ve valide etmişlerdir. Yem örneklerinin numune hazırlığı aşamasında asidik ekstraksiyonu izleyen santrifüj işlemi ve katı faz ekstraksiyonu kullanılmıştır. Standart ekleme yöntemi ile gerçekleştirilen kalibrasyon çalışmalarından sonra yöntem valide edilmiş ve gerçek numunelerin analizine uygulanmıştır (Robert ve ark., 2016).

1.6.2.3. Elektroforetik Yöntemler

Berzas Nevado ve arkadaşları, trimetoprim, sülfadiyazin, sülfametoksazol, guaifenesin ve bromhekzin etken maddelerinin elektroforetik ayrımı için kapiler zon elektroforez yöntemini kullanmışlardır. Ayrımda elektrolit olarak 25 °C'deki 15 mM fosfat tamponu (pH 6,2) kullanılmış ve 30 kV potansiyel uygulanmıştır. 6 dakikada gerçekleştirilen ayrımdan sonra UV dedektöre giden maddelerin miktar tayinleri için, her bir maddenin maksimum absorbans yaptığı dalga boyları kullanılmıştır. Geri kazanım çalışmaları ile valide edilen yöntem kullanılarak analitlerden bir, iki veya

üçünü içeren farmasötik preparatların analizi gerçekleştirilmiştir. Tespit edilen etken madde içerikleri, etikette belirtilen miktarların %97,6 ila %102,9 'si arasında olduğu tespit edilmiştir (Berzas Nevado ve ark., 2001).

Fan ve arkadaşları, 2005'te yaptıkları çalışmada sülfadiyazin, sülfametoksazol ve trimetoprimin ticari preparatlardan tayinini gerçekleştirmek için mikro akışkan kapiler elektroforez yöntemi geliştirilmişlerdir. Numunenin sürekli biçimde uygulanması için mikroçip ve akış enjeksiyon sisteminden yararlanmışlardır. Üç etken maddenin ayrımı 30 mM, pH 6 fosfat tamponunun 2,0 mL/dk akış hızında kullanılması ve 1 kV potansiyel uygulanması ile 2 dakikalık analiz süresi içinde sağlanmıştır. Etken maddelerin doğrusal çalışma aralıkları 2-80 µg/mL olarak belirlenmiş, tekrar edilebilirlik yüksek derişim seviyelerinde değerlendirilmiştir. Geliştirilen yöntem, sülfametoksazol, trimetoprim ve sülfadiyazin etken maddelerini içeren farmasötik preparatların analizine başarıyla uygulanmıştır (Fan ve ark., 2005).

Chu ve çalışma arkadaşları, yenilebilir hayvan dokularından altı sülfonamid antibiyotiğinin analizi için bir kapiler elektroforez yöntemi geliştirmişlerdir. İçlerinde sülfadiyazin ve sülfadimidinin de olduğu bu altı sülfonamidin elektroforetik ayrımında kullanılacak taşıyıcının seçimi için borik asit ve fosforik asit tuzlarından oluşan farklı pH değerlerinde tampon sistemleri denemişlerdir. En uygun taşıyıcı sisteminin pH değeri 6,2 olan ve 40 mM $Na_2B_4O_7$ ile 25 mM KH_2PO_4 içeren tampon çözeltisi olduğuna karar vermişlerdir. Bu tampon sisteminin 18 kV potansiyelde kullanılmasıyla 17 dakika içinde etken maddelerin ayrımı gerçekleştirilmiş ve elektrokimyasal dedektör ile tayinleri gerçekleştirilmiştir. Hayvan dokularının üzerine eklenen standart maddelerin geliştirilen yöntemle analizi sonucunda geri kazanım oranları %81 ile %92 arasında tespit edilmiştir (Chu ve ark., 2009).

Tong ve arkadaşları, içlerinde sülfadiyazinin de bulunduğu altı farklı sülfonamid antibiyotiğinin atık sulardan analizinde kullanılmak üzere bir kapiler elektroforez yöntemi geliştirmişlerdir. Elektroforetik ayrımdan önce gerçekleştirilen ön deriştirme basamağında oyuk-fiber sıvı faz mikroekstraksiyonu kullanmışlardır. Kapiler elektroforez sisteminde etken maddelerin ayrımı için 12 g/L sodyum polistiren

sülfonat içeren 60 mM $Na_2B_4O_7/KH_2PO_4$ tamponu (pH 6,2) taşıyıcı olarak kullanılmış ve 18 kV potansiyel uygulanmıştır. Elektrokimyasal bir dedektörün kullanıldığı bu yöntemde 35 dakikalık analizde altı sülfonamidin elektroforetik ayrımı gerçekleştirilmiştir. Mikroekstraksiyon işlemiyle elde edilen zenginleştirme faktörleri 121 ile 996 arasında tespit edilmiştir. Yakalama sınırlarının 0,033 ve 0,44 ng/mL olduğu bu yöntemde geri kazanım oranları % 75 ile %109 arasında hesaplanmıştır (Tong ve ark., 2013).

1.6.2.4. Elektrokimyasal Yöntemler

Braga ve arkadaşları, sülfadiyazinin tablet preparatlarında analizi için etken maddenin indirgenmesine dayanan bir voltametrik yöntem geliştirmişlerdir. Üçlü elektrot sisteminin kullanıldığı yöntemde destek elektroliti pH 6,8 Britton-Robinson tamponu olarak seçilmiş ve indirgenme Ag/AgCl elektroduna karşı -1,49 voltta gözlenmiştir. Doğrusal alışma aralığı 15-85 µg/mL olarak belirlenen yöntemin yakalama sınırı 2,7 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Validasyon çalışmalarından sonra yöntem sülfadiyazin içeren tabletlere uygulanmış ve etiket miktarına göre %96,0 ila %104,6 arasında geri kazanım oranları elde edilmiştir (Braga ve ark., 2010).

Sadeghi ve Motaharian, 2013 tarihli çalışmalarında süt ve insan plazmasından sülfadiyazinin miktar tayini için voltametrik bir yöntem geliştirmişlerdir. Baskılı polimerle modifiye edilmiş karbon pasta elektrodunun kullanıldığı bu yöntemde diferansiyel puls tekniğiyle elde edilen sülfadiyazinin 0,92 V potansiyeldeki oksidasyon pikinin akım değerleri kaydedilmiştir. Sülfadiyazin için çalışma aralığı 0,05-25 µg/mL, yakalama sınırı 0,035 µg/mL olarak belirlenmiştir. Yöntemin doğruluğunu belirlemek için süt ve insan plazma örneklerine standart eklenerek yapılan analizlerde geri kazanım oranları % 69,7 ile %100,9 arasında hesaplanmıştır (Sadeghi ve Motaharian, 2013).

Vinay ve arkadaşları, sülfadiyazinin biyolojik numunelerden analizi için kullanılmak üzere karbon nanotüp ve molibden disülfür nanokompoziti ile modifiye ettikleri karbon pasta elektrot kullanmışlardır. Geliştirdikleri diferansiyel puls

voltametri yönteminde destek elektrolit olarak pH 7 fosfat tamponu kullanmışlardır. Kantitatif çalışmalar 0,5-22,5 µg/mL doğrusal çalışma aralığında gerçekleştirilmiş, Ag/AgCl elektroda karşı 0,94 V'ta elde edilen anodik pik kullanılmıştır. İdrar ve seruma eklenen sülfadiyazinin tayini için geliştirilen yöntem kullanılmış ve geri kazanım oranları %98,3 ile %102,2 arasında bulunmuştur (Vinay ve ark., 2020).

1.6.3. SDX Miktar Tayini İçin Uygulanan Analiz Yöntemleri

Türk Farmakopesi'ne göre sülfadoksin miktar tayini için titrimetrik primer aromatik aminoazot tayini yöntemi kullanılır. 0,250 g numune 50 mL seyreltik hidroklorik asit içinde çözülür, 3 g potasyum bromür eklendikten sonra çözelti buz banyosunda soğutulur. 0,1 M sodyum nitrit çözeltisi ile titre edilir ve eşdeğerlik noktası elektrometrik olarak tespit edilir. 0,1 M sodyum nitritin 1 mL'si 31,03 mg sülfadoksine eşdeğerdir (Türk Farmakopesi, 2017).

Literatürde sülfadoksinin miktar tayininin gerçekleştirildiği çalışmalar incelendiğinde, sıtma tedavisinde kullanılan sülfadoksin ve primetamin ikili kombinasyonunu içeren farmasötik preparatların analizine daha çok önem verildiği görülmektedir. Bu iki etken maddenin farmasötik dozaj formlarındaki miktar tayini için daha çok UV spektrofotometrik ve HPLC yöntemlerinin tercih edilmiştir. Kan ve idrar gibi biyolojik numunelerde sülfadoksin miktar tayini için daha çok HPLC-MS/MS yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem aynı zamanda çevre ve gıda numunelerinde sülfadoksinin de içinde bulunduğu çoklu ilaç kalıntısı analizleri için de kullanılmıştır. Sülfadoksin analizi için elektroforetik ve voltametrik yöntemlerin kullanıldığı çalışmalar da literatürde mevcuttur.

1.6.3.1. Spektroskopik Yöntemler

Onah ve Odeiani'nin 2002'de yayınladıkları çalışmada sülfadoksin ve primetamin içeren tabletlerin analizi için bir kompleks oluşumuna dayanan bir spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir. Sülfadoksin ve primetaminin kloranilik

asit ile oluşturdukları kompleksIerin maksimum absorbans dalga boyları sırasıyla 500 nm ve 520 nm olarak tespit edilmiştir. Spektrumların çakışıyor olmasına rağmen, maksimum absorbans dalga boyları kullanılarak kantitatif çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Yakalama sınırı ve tayin alt sınırları sırasıyla sülfadoksin için 5 µg/mL ve15 µg/mL, primetamin için 10 µg/mL ve 20 µg/mL olarak tespit edilmiştir. Bu iki etken maddeyi içeren ve dört farklı ticari tablet preparatı geliştirilen yöntemle analiz edilmiş ve etiket miktarına göre geri kazanım sonuçları sülfadoksin için %94,79 ile %98,06 arasında, primetamin için %93,75 ile %103,5 arasında tespit edilmiştir (Onah ve Odeiani, 2002).

Ochekpe ve çalışma arkadaşları, sülfadoksin ve primetamin içeren tablet preparatlarının in vitro çözünme hızı çalışmalarında kullanılmak üzere UV spektrofotometrik yöntemine dayanan analitik yöntemler geliştirmişlerdir. 0,1 M HCl asit çözeltisi, pH 4,5 fosfat tamponu ve pH 6,8 fosfat tamponu ortamlarında gerçekleştirilecek çözünme hızı deneylerinde kullanılması hedefiyle, bu ortamlarda hazırlanmış ikili karışımların spektrumları 190-400 nm arasında kaydedilmiştir. Kalibrasyon ve miktar tayini çalışmalarında, sülfadoksin ve primetamin spektrumlarının maksimum absorbans verdiği dalga boylarındaki absorbans değerleri kullanılmıştır. Bu dalga boyları sülfadoksin ile primetamin için sırasıyla 0,1 M HCl ortamında 210 nm ile 268 nm, pH 4,5 fosfat tamponu ortamında 212 nm ile 272 nm, pH 6,8 fosfat tamponu ortamında 215 nm ile 272 nm olarak belirlenmiştir. Kalibrasyon aralığının belirtilmediği bu çalışmada analitik validasyon verileri de paylaşılmamıştır. Geliştirilen spektrofotometrik yöntemler, üç farklı ortamda, 12 farklı markaya ait ürünlerin çözünme hızı deneylerinde uygulanmış ve preparatların çözünme hızı profillerinde anlamlı varyasyonlar olduğu belirtilmiştir (Ochekpe ve ark., 2012).

Meena ve Sandhya, 2013'te yayınlanan çalışmalarında sülfadoksin ve primetaminin kombine dozaj formlarından aynı anda analizleri için dual dalga boyu tekniğine dayanan bir spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir. Sülfadoksin için eşit absorbans değerine sahip olan dalga boyu çifti 246 nm ve 298 nm olarak, primetamin için 278 nm ve 295 nm olarak seçilmiştir. İkili karışımların spektrumlarında, bu dört dalga boyuna karşılık gelen absorbans değerleri kullanılarak sülfadoksin ve

primetamine ait kalibrasyon grafikleri elde edilmiştir. Sülfadoksin için 7-42 µg/mL ve primetamin için 3-18 µg/mL konsantrasyon aralığında gerçekleştirilen çalışmada yakalama sınırı sırasıyla 0,93 µg/mL ve 0,49 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Validasyon çalışmalarından sonra geliştirilen yöntem tablet dozaj formundaki farmasötik preparatlara başarıyla uygulanmıştır (Meena ve Sandhya, 2013).

Divya ve arkadaşlarının çalışmasında sülfadoksinin tabletlerden analizi için kobalt ile kompleksleşmesine dayanan spektrofotometrik yöntemler geliştirilmiştir. Sülfadoksinin vanilin ve p-dimethilaminobenzaldehit ile girdiği reaksiyon sonucu oluşan Schiff bazı, bir ligand oluşturup kobalt ile stabil ve yeşil renkli kompleksler oluşturmuşlardır. Vanilin kullanılan yöntemde maksimum absorbansın gözlendiği dalga boyu 665 nm, p-dimethilaminobenzaldehit kullanılan yöntemde ise 672 nm olmuştur. Doğrusal konsantrasyon aralığı her iki yöntem için de 20-100 µg/mL olarak belirlenmiş ve tespit edilen dalga boylarındaki absorbans değerleri kullanılarak kalibrasyon, validasyon ve gerçek numune analizleri gerçekleştirilmiştir (Divya ve ark., 2016).

1.6.3.2. Kromatografik Yöntemler

Edstein 1984 yılında yayınlanan çalışmasında, plazmadan sülfadoksin, pirimetamin ve sülfadoksinin asetillenmiş metabolitinin tayinini gerçekleştirmek için bir HPLC yöntemi geliştirmiştir. İç standart olarak kinin kullanılan bu yöntemin numune hazırlama aşamasında, fosfat tamponu ve etilen dikloridin kullanıldığı ekstraksiyon işleminden sonra ilaçlar organik faza geçmişler, organik faz kuruluğa dek uçurulduktan sonra kalıntı hareketli fazda çözülerek HPLC sistemine enjekte edilmiştir. C_{18} kolonda gerçekleştirilen kromatografik ayrım için hareketli faz olarak 0,005 M pentan sülfonik asit içeren metanol, asetonitril ve su (25:15:60, *h/h/h*) karışımı kullanılmıştır. 254 nm'de gerçekleştirilen bu yöntemde sülfadoksin için yakalama sınırı 50 ng/mL olarak hesaplanmıştır. Bu yöntem kullanılarak elde edilen geri kazanım yüzdeleri sülfadoksin için %78,6, asetilsülfadoksin için %75 pirimetamin için %85'tir (Edstein, 1984).

Traş ve arkadaşları, Angora keçilerinden alınan biyolojik örneklerde trimetoprim ve sülfadoksin analizini gerçekleştirmek için bir ekstraksiyon ve HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. C_{18} kolon ile metanol ve fosfat tamponundan oluşan bir hareketli fazın kullanıldığı bir kromatografik yöntem geliştirilmiştir. Yakalama sınırı her iki ilaç için 0,02 µg/mL olarak belirtilmiştir. Analitik yöntemle ilgili kalibrasyon, validasyon veya kromatogram bilgisi sunulmamıştır (Traş ve ark., 1998).

Plazmada içinde sülfadoksinin de bulunduğu altı sıtma ilacının aynı anda tayini için katı-faz ekstraksiyonunu izleyen bir HPLC yöntemi geliştirilmiştir. Katı faz ekstraksiyonu için C_{18} ekstraksiyon kolonları kullanılmıştır. Aynı cins analitik kolon kullanılarak, metanol, asetonitril, 1-hekzansülfonik asit ve sudan oluşan bir gradient akış sağlanarak iyon-çifti kromatografisi yöntemi geliştirilmiştir. Sülfadoksin için pik alanları 254 nm'de ölçülmüştür. Sülfadoksin için ekstraksiyonda geri kazanım %91,2, tayin sınırı ise 25 mg/mL olarak saptanmıştır (Eljaschewitsch ve ark., 1996).

Gbotosho ve arkadaşları, filtre kâğıdı üzerinde kurutulmuş tam kan lekesinden sülfadoksin analizini gerçekleştirmek amacıyla bir HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Tam kan numunelerine standart çözelti ekleyerek, numunelerin 0-100 µg/mL aralığında sülfadoksin ve 500 µg/mL iç standart (sülfisoksazol) içermesini sağlandıktan sonra, kan numunelerini filtre kâğıdına damlatmış ve bir gün boyunca kurumasını sağlamışlardır. Numune hazırlama basamağında kan lekesi bulunan filtre kâğıdı NH_4Cl çözeltisi içinde bekletilip asetonitril eklendikten sonra karıştırma ve santrifüj işlemlerine tabi tutulmuştur. Süpernatan, nitrojen gazı altında kurutulduktan sonra 0,1 M HCl içinde çözülerek kromatografik sisteme enjekte edilmiştir. C_{18} kolonda gerçekleştirilen kromatografik ayrımda hareketli faz olarak %1 trietilamin içeren 0,05 M fosfat tamponu, metanol ve asetonitril karışımı (70:17:13, *h/h/h*) kullanılmış; analit ve iç standarda ait piklerin alıkonma zamanları 6,3 dk ve 7,2 dk olarak tespit edilmiştir. Validasyon çalışmalarında sülfadoksin geri kazanım oranları %81,02 ile %85,60 arasında hesaplanmıştır. Validasyon çalışmalarının ardından, sülfadoksin kullanan gönüllülerin kanları filtre kâğıdına damlatıldıktan sonra aynı kurutma ve ekstraksiyon işlemleri uygulanmış ve sülfadoksin analizi başarıyla gerçekleştirilmiştir (Gbotosho ve ark., 2009).

Arayne ve arkadaşları 2010 yılında yayınlanan çalışmalarında sülfadoksin, pirametamin, meflokin ve ibuprofenin tayini için bir HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Bu dört etken maddenin kromatografik ayrımı için sabit faz olarak C_{18} kolon, hareketli faz olarak pH değeri fosforik asitle 2,6'ya ayarlanmış asetonitril-su karışımı (50:50, *h/h*) kullanılmıştır. Akış hızının 2 mL/dk olduğu bu kromatografik yöntemde, dedeksiyon dalga boyu 220 nm olarak ve pirimetamin, sülfadoksin, meflokin ve ibuprofenin alıkonma zamanları sırasıyla 1,55 dk, 1,82 dk, 2,34 dk ve 5,88 dk olarak belirlenmiştir. Validasyon çalışmalarının ardından, bu dört etken maddenin aynı anda analizine uygun olan bu yöntem, bu etken maddelerin ikili kombinasyonlarını içeren farmasötik preparatların analizine başarıyla kullanılmıştır (Arayne ve ark., 2010).

Mwalwisi ve arkadaşları sülfadoksin-primetamin ve sülfalen-primatamin kombinasyonlarını içeren farmasötik preparatların analizinde kullanılmak üzere bir HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Sülfadoksin, primetamin ve sülfalenin yanında bu etken maddelerin bazı safsızlıklarının kromatografik ayrımı C_{18} kolon ile %40 metanol ve %60 0,05 M KH_2PO_4 tamponu (pH 2,6) karışımı, 1,5 mL/dk akış hızında kullanılarak 15 dakikalık bir analiz süresinde gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen yöntemin validasyon çalışmaları tamamlandıktan sonra, yöntem iki farklı farmasötik preparatın analizine başarıyla uygulanmıştır (Mwalwisi ve ark., 2016)

Sanjay Pai ve arkadaşları sülfadoksin ve primetamin içeren farmasötik preparatların analizinde kullanılmak üzere bir HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Kromatografik ayrımı C18 kolon ile %80 asetonitril ve %20 20 mM sodyum asetat tamponundan (pH 6) oluşan bir hareketli faz kullanarak gerçekleştirmişlerdir. Akış hızının 1 mL/dk ve dedeksiyon dalga boyunun 224 nm olduğu bu yöntemde sülfadoksin ve primetaminin alıkonma zamanları 0,9 ve 1,2 dk olarak kaydedilmiştir. İç standart olarak kullanılan diklofenak sodyumun alıkonma zamanı ise 4,2 dk olarak tespit edilmiştir. Sülfadoksin ve primetamin için doğrusal çalışma aralıkları sırasıyla 60-200 µg/mL ve 3-10 µg/mL olarak belirlenmiş ve validasyon çalışmalarında her iki ilaç için uygun geri kazanım değerleri elde edilmiştir. Sülfadoksin ve primetamin için tayin sınırları sırasıyla 2,43 ve 0,80 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Geliştirilen analiz

yöntemi, validasyon çalışmaları tamamlandıktan sonra tablet preparatlarındaki sülfadoksin ve primetaminin miktar tayinine uygulanmıştır (Sanjay Pai ve ark., 2016).

2015'te pirimetamin, sülfadoksin ve artesunatın plazmadan tayini için bir LC-MS yöntemi geliştirilmiştir. İç standart olarak artemer adlı etken maddenin kullanıldığı yöntemde etil asetat ile sıvı-sıvı ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Sıvı kromatografisi yönteminde analitik kolon olarak Phenomenex C_{18} kolon, hareketli faz olarak her ikisi de %0,5 asetik asit içeren 20 mM amonyum asetat ve metanol bileşenleri kullanılmıştır. Pirimetamin, sülfadoksin ve artesunat için alıkonma zamanları sırasıyla 6,5 dk, 9,6 dk ve 13,9 dk olarak saptanmıştır. Kalibrasyon eğrileri primetamin için 5-30 ng/mL, sülfadoksin için 50-300 ng/mL ve artesunat için 25-150 ng/mL aralığında oluşturulmuştur. Gün-içi ve günler-arası kesinlik çalışmalarındaki bağıl standart sapma %8'in altındadır. Her üç etken maddenin de üç ay boyunca -20 °C'deki saklama koşulunda ve dondurma-çözdürme döngülerinde stabil olduğu belirtilmiştir (Sandhya ve Shijikumar, 2015).

Li ve arkadaşları 2016 tarihli çalışmalarında balık dokularındaki sülfonamid antibiyotiklerinin tayini için bir HPLC-MS/MS yöntemi geliştirmişlerdir. İçlerinde sülfadoksinin de olduğu bu dokuz ilacın balık dokularından ekstraksiyonu için yeni bir manyetik katı faz ekstraksiyonu metodu geliştirmişlerdir. Kromatografik ayrımı 40°C'deki C_{18} kolon üzerinde %0,1 formik asit çözeltisi ve metanolden oluşan 8 dakikalık bir gradient bir programla gerçekleştirmişlerdir. Kütle spektrometresinde elektrosprey iyonizasyon sonrası çoklu reaksiyon modunda monitorizasyon sağlanmıştır. Homojenize edilen doku örneklerine standart maddeler ilave edildikten sonra, bu numunelerden ekstrakte edilen süpernatant azot gazı altında uçurulduktan sonra kalıntı n-hekzanda çözülerek HPLC-MS/MS sistemine enjekte edilmiştir. Yapılan validasyon çalışmalarında geri kazanım oranları %74,87 ile %104,74 arasında, bağıl standart sapma değerleri ise %13'ün altında olarak tespit edilmiştir (Li ve ark., 2016).

Bacza Fonte ve arkadaşları, bal numunelerinden sülfadoksinin de içinde bulunduğu altı sülfonamid antibiyotiğinin miktar tayinini gerçekleştirmek için aynı hat

üzerinde otomatik bir katı faz ekstraksiyonunu izleyen bir UPLC-MS/MS yöntemi geliştirmişlerdir. Otomatize edilen bu katı faz ekstraksiyonu basamağı için moleküler baskılı polimerlerin kullanıldığı bir kolon kullanılmıştır. Bu adımda ön derişitirme gerçekleştirildikten sonra kromatografik analizde C_{18} kolon ile asetonitril ve %3 formik asit karışımı (50:50, *h/h*) kullanılmıştır. Piyasadan temin edilen bal numuneleri, geliştirilen yöntem kullanılarak başarıyla analiz edilmiştir (Baeza Fonte ve ark., 2018).

Blokland ve arkadaşları, 53 ilaç kalıntısının idrarda tespiti için dedektör olarak kütle spektrometresinin kullanıldığı iki boyutlu bir sıvı kromatografisi yöntemi geliştirmişlerdir. Sülfadoksin, sülfadimidin ve sülfadiyazinin de içlerinde bulunduğu bu ilaçların idrardan ekstraksiyonu için hidrofilik-lipofilik denge sorbenti içeren 96 kuyucuklu plakalar kullanılmıştır. İki boyutlu sıvı kromatografisinde ilk boyut için 50 °C'deki fenil kolonda %0,1 formik asit içeren su ve asetonitril karışımı 0,06 mL/dakikalık bir akışta gradient programlama ile kullanılmıştır. İkici boyut için ise 70 °C'deki fenil kolonda aynı hareketli faz bileşenleri ile 0,35 mL/dakikalık akışla gradient programla verilmiştir. Elde edilen iki boyutlu kromatogram incelendiğinde her bir etken maddenin, kendi ilaç sınıfına uygun olarak gruplar halinde ayrıldığı gözlenmiştir. İncelenen ilaçlar için yakalama sınırı 1-10 ng/mL arasında tespit edilmiştir (Blokland ve ark., 2018).

Khedr ve arkadaşları, bazı veteriner ilaç standartlarının stabilitelerini değerlendirerek geçerliliklerini test etmek için bu standartların tayinini sağlayan bir LC-MS/MS yöntemi geliştirmişlerdir. Geliştirilen kromatografik yöntemde C_{18} analitik kolon 40 °C'de tutulmuş, hareketli faz olarak 5 mM amonyum format tamponu ve metanolün oluşturduğu gradient programlı bir hareketli faz akışı sağlanmıştır. Aralarında sulfadoksinin de bulunduğu bu 37 ilacın standart çözeltileri hazırlanmış ve geliştirilen yöntem kullanılarak analizleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen konsantrasyonlar kullanılarak geri kazanım yüzdeleri hesaplanmış, böylece standartların saklama koşullarında raf ömrü boyunca stabil olup olmadıkları, metanolde hazırlanmış çözeltilerin bozunmadan ne kadar süre saklanabileceği belirlenmiştir (Khedr ve ark., 2019).

Xue ve arkadaşları, şişelenmiş su ve musluk suyu örneklerinden etken madde kalıntılarının ekstraksiyonu ve analizi için katı faz ekstraksiyonunu takip eden bir UPLC-MS/MS yöntemi geliştirmişlerdir. İçlerinde sülfadoksin, sülfadimidin, sülfadiyazin ve trimetoprimin de bulunduğu 44 etken madde için yapılan çalışmada numuneden analitlerin ekstraksiyonu için üç farklı katı faz ekstraksiyonu kartuşu kullanılmıştır. Farklı analitik kolonlar denendikten sonra 150 mm uzunluğundaki BEH C_{18} kolonun kullanılması uygun bulunmuştur. Her ikisi de %0,1 formik asit içeren asetonitril ve su bileşenlerinden oluşan bir gradient akış ile MS/MS dedektörle tüm etken maddelerin tayini 12 dakikalık bir kromatografik enjeksiyonla gerçekleştirilmiştir. Bu yöntem kullanılarak standart ekleme yöntemiyle geri kazanım çalışmaları gerçekleştirilmiş, kullanılan katı faz ekstraksiyonu kartuşlarının performansı değerlendirilmiştir. Tüm etken maddelerin ortalama en yüksek geri kazanım değerlerine hidrofilik-lipofilik denge fazı içeren kartuşlar ile ulaşılmıştır. Yöntem valide edildikten sonra gerçek su numunelerinden analiz çalışmaları yapılmıştır (Xue ve ark., 2020).

Tölgyesi ve arkadaşları, bal örneklerindeki antimikrobiyal ilaç kalıntılarının tespiti için LC-MS/MS tekniğine dayalı çoklu tarama yöntemi geliştirmişlerdir. İçlerinde sülfadoksin, sülfadiyazin, sülfadimidin ve tirmetoprimin de bulunduğu 36 ilacın tespitini amaçlayan çalışmada bal örnekleri %0,1 heptaflorobütirik asit içeren sulu çözeltiyle seyreltilip karıştırıldıktan sonra santrifüjlenerek elde edilen süpernatant katı faz ekstraksiyonu kartuşlarından geçirilmiştir. Kromatografik ayrım için C_{18} kolon kullanılmış, hareketli faz %0,1 heptaflorobütirik asit çözeltisi ve asetonitrilin gradient akışı ile elde edilmiştir. 33 dakikalık kromatografik ayrımdan sonra etken maddeler pozitif modda iyonlaştırılarak çoklu reaksiyon modunda izlenmişlerdir. Dört farklı kaynaktan gelen bal numuneleri geliştirilen yöntemle analiz edilmiş ve üç tanesinde ilaç kalıntıları gözlenmiştir (Tölgyesi ve ark., 2018).

Zhao ve arkadaşları, Oplegnathus türü balıklarda kalıntı olarak bulunan ve sülfadoksinin de içlerinde olduğu 80 veteriner ilacın analizini gerçekleştirmek için bir sıvı kromatografi-yüksek çözünürlüklü kütle spektrometresi yöntemi geliştirmişlerdir. Numune hazırlama aşamasında kullandıkları katı faz ekstraksiyon yönteminde çözücü

olarak %1 asetik asit ve 10 mM EDTA tuzu içeren asetonitril, metanol ve su karışımı (3:1:1, *h/h/h*) kullanmışlardır. Art arda iki kez yapılan yüksek hızlı santrifüj işlemi sonrasında elde edilen süpernatant, kromatografik sisteme enjekte edilmiştir. BEH C_{18} kolonun kullanıldığı kromatografik ayrım için %0,1 formik asit çözeltisi ve metanol gradient akışta kullanılmış ve 20 dakikada tüm ilaçların elüsyonu tamamlanmıştır. Hem pozitif hem de negatif elektrosprey iyonizasyonun ayrı ayrı kullanıldığı yüksek çözünürlüklü kütle spektrometresi ile hedef ilaçların tayini gerçekleştirilmiştir. Çalışmada tüm etken maddeler için üzerine ekleme kalibrasyon tekniği 0,25-1000 µg/kg aralığında uygulanmıştır. Validasyon çalışmaları tamamlandıktan sonra piyasadan temin edilen 42 örnek analiz edilmiştir. Analiz sonucunda 3 numunede yasaklı olan malahit yeşiline, bir örnekte izin verilen maksimum miktardan daha fazla norfloksasine rastlanmıştır. Bunun dışında farklı örneklerde kantitatif olarak tayin edilen 10 veteriner ilacın izin verilen sınırlarda olduğu görülmüştür (Zhao ve ark., 2017).

Bhoir ve arkadaşları, sülfadoksinin gönüllülerdeki plazma seviyelerini tespit etmek için süperkritik sıvı kromatografisi tekniğini kullanmışlardır. Numune hazırlığı aşamasında plazma proteinleri diklorometanla çöktürülmüştür. Omeprazolün iç standart olarak kullanıldığı çalışmada analitik kolon olarak Nucleosil C_{18} kolon kullanılmıştır. %7,4 metanol içeren süperkritik sıvı CO_2 'in hareketli faz olarak kullanılmasıyla sülfadoksinin matriks bileşenlerinden ve iç standarttan ayrımı gerçekleştirilmiştir. Kolon ve hareketli faz 40 °C'de tutulmuş, UV dedektör 265 nm'de kayıt almıştır. Sülfadoksinin çalışma aralığı 0,5-100 µg/mL olarak belirlenmiş, yöntemin yakalama sınırı 0,15 µg/mL, tayin alt sınırı ise 0,10 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Validasyon çalışmalarından sonra oral yolla sülfadoksin uygulanan gönüllülerden belirli zaman aralıklarıyla alınan plazma örneklerindeki sülfadoksin miktarları geliştirilen yöntem kullanılarak belirlenmiştir (Bhoir ve ark., 2001).

1.6.3.3. Elektroforetik Yöntemler

Amin ve arkadaşları tablet formundaki preparatlardan sülfadoksin ve primetamin analizini gerçekleştirmek için yeni bir kapiler elektroforez yöntemi

geliştirmişlerdir. Taşıyıcı elektrolit olarak 100 mM fosfat tamponu (pH 7,2) ve 330 V potansiyelin uygulandığı bu yöntemde UV dedektör 214 nm'ye ayarlanmıştır. 6 dakika süren bu analiz yöntemindc, primetamin vc sülfadoksin için göç zamanları sırasıyla 4,1 dk vc 5,2 dk olarak gözlenmiştir. Yöntem validasyonu sırasında doğrusallık, doğruluk ve kesinlik çalışmalarının ardından seçiciliğinin kanıtlanması için tablet preparatlarında sıkça kullanılan yardımcı maddelerden oluşan plasebo çözeltilerinin analizi de gerçekleştirilmiştir ve yardımcı madde sinyallerinin etken madde sinyallerine etki etmediği gösterilmiştir. Geliştirilen yöntem, başarıyla tablet preparatlarındaki sülfadoksin ve primetamin etken maddelerinin analizi için başarıyla uygulanmıştır (Λmin ve ark., 2012).

Lara vc arkadaşları 2009 tarihli çalışmalarında, su örnekleri̇nden sülfonamid ilaçlarının tayini için UV dedektörün kullanıldığı bir kapiler elektroforez yöntemi geliştirmişlerdir. Çalışmada kullanılan örnekler şişelenmiş su, çeşme suyu ve nehir suyu olarak seçilmiş ve sülfadoksin, sülfadimetoksin, sülfamerazin, sülfaklorpridazin ve sülfametoksazolden oluşan beş antibakteriyelin analizi hedeflenmiştir. Katı faz ekstraksiyon sorbenti içeren bir cihaz elektroforetik kapilerin önüne eklenerek, numunelerin analiz hattı içinde otomatik olarak bir ön deriştirme basamağında geçmesi sağlanmıştır. Elektroforetik akışta taşıyıcı tampon olarak pH 7,3 Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 (45 nM) tamponu kullanılmış ve 25 kV'luk bir potansiyel uygulanarak 8 dakika içinde elektroforetik ayrım sağlanmıştır. Validasyon çalışmaları sırasında, bu altı etken madde için hesaplanan yakalama sınırları 0,3 vc 0,6 ng/mL arasında hesaplanmıştır. Standart ekleme çalışmalarından elde edilen geri kazanım oranları %52,2-109,2 arasında, bağıl standart sapma değerleri %13,4'ün altında olarak rapor edilmiştir (Lara ve ark., 2009).

1.6.3.4. Elektrokimyasal Yöntemler

2015 tarihli bir çalışmada tablet ve idrar örneklerinde sülfadoksinin miktar tayini için elektrokimyasal bir yöntem geliştirmiştir. Referans elektrot olarak Λg/ΛgCl ve çalışma elektrodu olarak camsı karbon elektrodun kullanıldığı bu yöntemde destek elektrolit pH 3 fosfat tamponu olarak belirlenmiştir. Diferansiyel puls voltametrisi

uygulanarak sülfadoksin için 0,31-4,34 µg/mL konsantrasyon aralığında çalışılmıştır. Yakalama sınırının 0,01 µg/mL olarak hesaplandığı bu yöntem validasyon çalışmalarından sonra ticari preparatlar ve standart eklenmiş idrar numunelerindeki sülfadoksin miktarının tespiti için başarıyla uygulanmıştır (Gokavi ve Nandibewoor, 2015).

1.6.4. SDM Miktar Tayini İçin Uygulanan Analiz Yöntemleri

Türk Farmakopesi'ne göre sülfadimidin miktar tayini için titrimetrik primer aromatik aminoazot tayini yöntemi kullanılır. 0,250 g numune 20 mL seyreltik hidroklorik asit ve 50 mL su karışımı içinde çözülür. Çözeltiye 3 g potasyum bromür eklenir ve buz banyosunda soğutulduktan sonra 0,1 M sodyum nitrit çözeltisi ile titre edilir. Titrasyonun eşdeğerlik noktası elektrometrik olarak tespit edilir. 0,1 M sodyum nitritin 1 mL'si 27,83 mg sülfadimidine eşdeğerdir (Türk Farmakopesi, 2017).

Literatür incelendiğinde, sülfadimidinin miktar tayini için geliştirilen spektroskopik yöntemlerin içinde kolorimetri, spektroflorimetri ve Raman spektroskopisinin kullanıldığı çalışmalar olsa da çoğunlukla UV spektrofotometrinin tercih edildiği görülmektedir. Özellikle sülfadimidinin trimetoprim ve diğer sülfonamidlerle karışımlarının spektrofotometrik analizleri için bivariate kalibrasyon, temel bileşen regresyonu, kısmi en küçük kareler ve türev spektroskopisi gibi kemometrik yöntemlere başvurulduğu görülmektedir. Farmasötik preparatlar ve ilaçlı yemlerde sülfadimidin miktar tayini için spektrofotometrinin dışında HPLC ve kapiler elektroforez teknikleri de kullanılmıştır. Hayvansal gıdalarda sülfadimidin analizinin gerçekleştirilmesi için elektrokimyasal yöntemlerin kullanıldığı yöntemler de mevcuttur. Fakat hayvansal gıda ve çevre analizlerinde sülfadimidinin yanında pek çok ilacın da aynı anda analizleri için geliştirilen HPLC-MS/MS yöntemleri sayıca oldukça fazladır.

1.6.4.1. Spektroskopik Yöntemler

Sanchez Pena ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada sülfadiyazin veya sülfamerazin içeren karışımlardan sülfadimidin tayini için bir spektroflorimetrik yöntem geliştirmişlerdir. Bu etken maddeler zayıf floresans özellik gösterdikleri için, çalışma için hazırlanan her bir çözelti oda sıcaklığında 12 dakika boyunca UV lambası altında tutulmuş, böylece fotoindüklenmiş floresans özellik kazanmaları sağlanmıştır. Fotoindüklenme sonrasında 284 nm eksitasyon dalga boyunda elde edilen emisyon spektrumlarının birinci türevleri alınmış ve miktar tayini çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Etken maddelerin orijinal emisyon spektrumları çakıştığı için sülfadimidin tayini için karışımdaki diğer maddenin sıfır kesim noktasındaki birinci türev absorbans değerleri kullanılmıştır. Geliştirilen yöntemin doğruluğu, kesinliği ve seçiciliği sentetik ikili karışımlar ve ikili farmasötik preparatlar kullanılarak standart ekleme ve geri kazanım çalışmalarıyla kanıtlanmıştır (Sanchez Pena ve ark., 1995).

2003 yılında, sülfadimidinin veteriner dozaj formlarından analizini gerçekleştirmek için kolorimetrik bir yöntem geliştirilmiştir. İlaç çözeltisine 0-5 °C'deki asidik ortamda sodyum nitrit eklenmiş ve sülfadimidinin diazotasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu çözeltinin amonyak-su (1:10, *h/h*) karışımı ile muamele edilmesiyle oluşan sarı renkli çözeltinin 420 nm'de absorbansı ölçülmüş ve elde edilen absorbans değerleri kullanılarak kalibrasyon grafiği çizilmiştir. Sülfadimidin 0,2 - 0,6 µg/mL konsantrasyon aralığındayken elde edilen absorbans değerlerinin Beer kanununa uyduğu tespit edilmiştir. Katı dozaj formları toz haline getirildikten sonra çözelti haline getirilmiş ve bu yöntemle analiz edilmiştir. Önerilen yöntemle elde edilen sonuçlar farmakope referans metodu ile karşılaştırılmış ve aralarındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edilmiştir (Rami Reddy ve ark., 2003).

2004'te yayınlanan bir çalışmada trimetoprim ve sülfadimidin içeren örneklerin kantitatif tayini için spektrofotometre kullanımına dayanan üç farklı kemometrik yöntem geliştirilmiştir. Trimetoprim ve sülfadimidinin sırasıyla 0,98–17,5 µg/mL ve 1,16–17,5 µg/mL derişim aralıklarında Beer yasasına uydukları tespit edilmiştir. Bu konsantrasyon aralıklarında alınan UV absorbans spektrumları farklı kemometrik

yöntemlerle analiz edilmiştir. Bunlar oran türev spektrofotometrisi, birinci türev-bivariate kalibrasyon ve kısmi en küçük kareler yöntemleridir. Birinci türev-bivariate kalibrasyon yönteminde dalga boyu seçimi Kaiser tekniğiyle gerçekleştirilmiş, kısmi en küçük kareler yönteminde orijinal spektrumlarda ortogonal sinyal düzeltme işlemi uygulanmıştır. Sentetik karışımlarda gerçekleştirilen analizlerde geri kazanım oranları trimetoprim için %99,7 - %102,0 arasında, sülfadimidin için %99,3 ile %101 arasında bulunmuştur. Etken maddeler için hesaplanan yakalama ve tayin sınırı değerlerinin en düşük bulunduğu yöntemin oran türev spektroskopisi olduğu belirtilmiştir. Bu yöntemin yakalama ve tayin sınırları trimetoprim için 0,019 µg/mL ve 0,063 µg/mL; sülfadimidin için 0,145 µg/mL ve 0,483 µg/mL olarak tespit edilmiştir. Geliştirilen yöntemler, sülfadimidin ve trimetoprim içeren farmasötik preparatların çözünme hızı testlerine ve miktar tayini analizlerine başarıyla uygulanmıştır (Markopoulou ve ark., 2004).

Ni ve arkadaşları, sülfadimidin, sülfadiyazin, sülfametoksazol, sülfanilamid ve trimetoprimin birbirleriyle olan karışımlarından analizini gerçekleştirmek için farklı kemometrik modellerin kullanıldığı spektrofotometrik yöntemler geliştirmişlerdir. pH değeri 9,9 olan Britton-Robinson tamponu ve etanol karışımının çözücü olarak kullanıldığı bu çalışmada tüm etken maddeler için doğrusal kalibrasyon aralığı 1-24 µg/mL olarak belirlenmiştir. Çok değişkenli klasik en küçük kareler, temel bileşen regresyonu ve kısmi en küçük kareler yöntemlerinin kullanıldığı çalışmada, kalibrasyon çözeltilerinin derişimleri ortogonal tasarıma göre belirlenmiştir. Geliştirilen yöntemler, etken maddelerin bağımsız bir validasyon setinden analizleri için uygulanmış, geri kazanım oranları %100'e yakın ve bağıl standart sapma değerleri %2-%10 arasında tespit edilmiştir. Geri kazanım oranları bakımından çok değişkenli klasik en küçük kareler yönteminin diğer iki yönteme göre daha zayıf olduğu belirtilmiştir. Son olarak araştırılan etken maddelerin ikili kombinasyonlarını içeren farmasötik preparatların analizleri geliştirilen yöntemlerle başarıyla gerçekleştirilmiştir (Ni ve ark., 2006).

Zimmer ve Czarnecki, sülfadimidin ve trimetoprimin sentetik çözeltilerden kantitatif analizi türev spektrofotometrisine dayanan iki farklı yöntem

geliştirmişlerdir. Bunlardan ilki türev spektrumlarından iki farklı dalga boyuna oluşturulan lineer regresyon denklemlerinin kullanıldığı bir iki değişkenli kalibrasyon yöntemi, diğer birinci türev spektrumlarının sıfır kesim noktalarındaki değerlerin kullanıldığı yöntemdir. Doğrusal konsantrasyon aralığının her iki etken madde için de 2-20 µg/mL olduğu çalışmada çözücü olarak %0,5 oranında etanol içeren amonyum tamponu kullanılmıştır. Yapılan geri kazanım çalışmalarında trimetoprim ve sülfadimidin için iki değişkenli yöntemle %99,1 ve %99,6; sıfır kesim yöntemiyle %104,8 ve %111,7 değerleri elde edilmiştir. Gerçek numune analizinin yapılmadığı yöntemde, iki değişkenli türev spektrofotometrik yönteminin daha doğru sonuçlar verdiği belirtilmiştir (Zimmer ve Czarnecki, 2010).

2020'de yayınlanan bir çalışmada ördek etlerinde sülfadimidin ve sülfapiridin varlığının tespiti için kullanılabilecek bir Raman spektroskopisi yöntemi geliştirilmiştir. Altın nanopartiküller yardımıyla 557 ve 573 cm^{-1} 'deki Raman piklerinin kullanıldığı analitik yöntemin geliştirilmesinde temel bileşen analizi kullanılmıştır. Sülfadimidin, sülfapiridin, her iki ilacı da içeren ve her iki ilacı da içermeyen dört grup numuneden oluşan çalışma seti kullanılarak temel bileşen analizine dayalı bir sınıflandırma yapılmıştır. Sınıflandırmanın doğruluğu %90,44 olarak tespit edilmiştir (Ning ve ark., 2020).

1.6.4.2. Kromatografik Yöntemler

İlaçlı hayvan yemi karışımlarının saklama süresi boyunca sülfadimidinin stabilitesini araştırmayı amaçlayan bir çalışmada, sülfadimidin miktar tayini için bir HPLC yöntemi geliştirilmiştir. Analitik kolon olarak C_{18} ters faz kolonun seçildiği bu çalışmada hareketli faz olarak metanol-66 mM fosfat tamponu (pH 7,2) karışımı kullanılmıştır. 254 nm'de izlenen edilen sülfadimidin pikinin alıkonma zamanı 14,34 dakika olarak tespit edilmiştir. 6 ay boyunca farklı nem ve sıcaklık koşullarında tutulan yem numuneleri belli aralıklarla HPLC analizine tabi tutulmuş ve numunelerdeki ilaç içeriklerinin değişmediği tespit edilmiştir (Bernabéu ve ark., 2000).

Giegold ve arkadaşları, küçük partikül boyutuna sahip analitik kolonlar ve yüksek sıcaklığın kromatografik ayrım üzerine etkilerini incelemek için örnek analit grubu olarak sülfonamidleri ve trimetoprimi kullanmışlardır. 55 µg/mL derişim seviyesinde beş farklı sülfonamid ilacı (sülfadiyazin, sülfadimidin, sülfatiyazol, sülfamerazin, sülfametoksazol), üç farklı metabolit (N^4-asetilsülfadiyazin, N^4-asetilsülfamerazin, N^4-asetilsülfadimidin) ve trimetoprim içeren sentetik karışım üzerinde yapılan çalışmada analitik kolon olarak 50 mm uzunluğunda ve 3 mm çapındaki Zorbax C_{18} kolon kullanılmıştır. Hareketli faz olarak %0,1 formik asit içeren su ve %0,1 formik asit içeren asetonitril gradient programdaki iki bileşen olarak kullanılmıştır. Kısa zamanda kromatografik ayrımın gerçekleştirilmesi için viskozitesinin düşürülmesi ve kütle transferinin arttırılması amaçlandığı için oldukça yüksek kolon sıcaklığında çalışılmıştır. Tüm piklerin birbirinden ayrılabilmesi için hareketli faz bileşiminde ve kolon sıcaklığında gradient rejim uygulanmıştır. 80 °C ile başlayan gradient programda enjeksiyonun 1,1. dakikasında sıcaklık 80 °C'ye çıkarılmış, 0,4 dakika içinde 105 °C'ye ulaşılmıştır. Yazarlar, kolon sıcaklığını bu kadar kısa sürede bu kadar kontrollü olarak değiştirilebildiklerini rapor ettikleri çalışmalarında, yüksek kolon sıcaklığının kolon ömrüne olan etkisini araştırmamışlardır (Giegold ve ark., 2008).

2001 tarihli bir çalışmada ticari bir yem katkı sıvısındaki sülfadimidin ve trimetoprim tayini için diyod dizisi dedektörlü HPLC yöntemi geliştirilmiştir. Kromatografik ayrım metanol ve amonyum asetatın kullanıldığı gradient programlı bir hareketli faz ve C_{18} kolonla gerçekleştirilmiştir. Sülfadimidin ve trimetoprim için alıkonma zamanları sırasıyla 5,5 ve 12 dakika, kuyruklanma faktörleri 1,4 ve 1,6 olarak belirlenmiştir. Doğrusal çalışma aralığının her iki etken madde için 1-100 µg/mL olduğu yöntemde, yakalama sınırları sülfadimidin ve trimetoprim için sırasıyla 0,3 µg/mL ve 0,4 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Ticari üründeki sülfadimidin ve trimetoprim miktarları sırasıyla 10,7 ve 2,10 (%a/h) olarak bulunmuş ve bu sonuçların etikette verilen miktarlarla uyumlu olduğu belirtilmiştir (Cancho Grande ve ark., 2001).

Zheng ve arkadaşları, sülfadimidin, sülfadiyazin ve trimetoprimin de içlerinde bulunduğu 16 farklı antibiyotiğin ördek etinden analizini gerçekleştirmek için katı faz ekstraksiyonuyla kombine bir LC-MS/MS yöntemi geliştirmişlerdir. Analitik validasyon çalışmalarından sonra, gerçek numune analizleri gerçekleştirilmiş ve numunelerde bu ilaçların bulunmadığı saptanmıştır (Zheng ve ark., 2019).

2014 tarihli bir çalışmada trimetoprim, sülfadimidin, sülfadiyazin ve sülfametoksazolün de içlerinde bulunduğu 10 adet etken maddenin atık sulardan analizi için bir sıvı kromatografi tandem kütle spektrometri yöntemi geliştirilmiştir. Toplam 42 dakika süren kromatografik akıştan sonra etken maddelerin tayini pozitif iyon modunda gerçekleştirilmiştir. Numune hazırlama ve ön konsantrasyon işlemi olarak katı faz ekstraksiyonu kullanılan bu çalışmada etkin maddeler için doğrusal çalışma aralığı 1,26 ile 60 ng/mL olarak belirlenmiştir. Geliştirilen yöntem atık sulardaki antibiyotik kalıntıların miktar tayini için başarıyla uygulanmıştır (Periša ve Babič, 2014).

Patyra ve arkadaşları, hayvan yemlerinde sülfadimidin, sülfadiyazin, trimetoprim, tiamulin ve tilosinin aynı anda kantitatif analizleri için bir LC-MS yöntemi geliştirmişlerdir. Numune hazırlama aşamasında, ekstraksiyon için formik asit ve asetonitril kullanılmış, karıştırma ve santrifüj basamaklarından sonra süpernatant seyreltilerek süzülmüştür. Kromatografik yöntem için sabit faz olarak bifenil kolon, hareketli faz olarak %0,1 formik asit içeren asetonitril ve sudan oluşan bir gradient akış kullanılmıştır. Yöntem doğrusallık, geri kazanım, duyarlılık, seçicilik, yakalama sınırı ve tayin sınırı parametrelerine göre valide edilmiştir. Önerilen yöntem, iki farklı ilaçlı hayvan yemi ürününe uygulanmıştır. Elde edilen analiz sonuçlarının, üreticinin belirttiği tiamulin, tilosin ve sülfadimidin miktarları ile uyumlu olduğu belirtilmiştir (Patyra ve ark., 2018).

Huang ve arkadaşları, aralarında sülfadimidin, sülfadiyazin ve trimetoprimin de olduğu farklı gruplardan 19 farklı antibiyotiğin idrardan tayini için bir LC-MS/MS yöntemi geliştirmişlerdir. Numune hazırlama aşamasında dispersif katı faz ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır. Analitik kolon olarak C_{18} kullanılan çalışmada,

hareketli faz A (%0,1 formik asit içeren su) ve B (%0,1 formik asit içeren) bileşenlerinin gradient programlı akışı ile 15 dakikalık kromatografik enjeksiyonlar gerçekleştirilmiştir. MS/MS analizinde pozitif elektrosprey iyonlaştırılması ve çoklu reaksiyon modu kullanılmıştır. Validasyon çalışmalarından sonra gönüllülerden alınan gerçek numunelerin analizleri gerçekleştirilmiştir. Farklı numunelerde, bu 19 antibiyotikten 5 tanesi tayin edilmiştir (Huang ve ark., 2019).

Bortolotte ve arkadaşları, balık kas dokularında 25 antibakteriyel ilacın tayinini gerçekleştirmek üzere, asetonitril ve 0,1 M EDTA çözeltisinin kullanıldığı basit ve hızlı bir ekstraksiyon yönteminin ardından tüm ilaç etken maddelerinin aynı anda analizini gerçekleştirebilecek bir LC-MS/MS yöntemi geliştirmişlerdir. İçlerinde sülfadimidin, sülfadoksin, sülfadiyazin ve trimetoprimin de olduğu bu 25 ilaç etken maddesinin kısmi kromatografik ayrımını C_{18} kolon üzerinde, %0,1 formik asit içeren asetonitril ve su bileşenlerinin gradient akışında 11 dakika içinde gerçekleştirmişlerdir. Standart eklenmiş numunelerle gerçekleştirilen kalibrasyon ve validasyon çalışmalarıyla yöntemin geçerliliğini kanıtlamışlardır. Piyasadan temin edilen dil balığı örneklerinin analizi bu yöntemle gerçekleştirilmiş ve örneklerin ilaç kalıntısı yönünden yönetmeliklere uygunluğunu değerlendirmişlerdir (Bortolotte ve ark., 2019).

1.6.4.3. Elektroforetik Yöntemler

Hows ve arkadaşları, beta-laktam antibiyotikleri, sülfonamidler ve dihidrofolat redüktaz içeren sentetik karışımdaki etken maddelerin kapiler elektroforetik ayrımını sağlayan bir yöntem geliştirmişlerdir. İçlerinde trimetoprim, sülfadiyazin ve sülfadimidin de olan 26 ilacın elektroforetik ayrımı için cevap yüzey metodolojisi ve geleneksel tek değişkenli optimizasyon yöntemleri karşılaştırmalı olarak uygulamışlardır. Optimizasyon sürecinde tamponun pH değeri, tampondaki sürfaktan derişimi ve uygulanan potansiyel bağımsız değişkenler, pik sayısı ise bağımlı değişken olarak seçilmiştir. "Statgraphic" programı yardımıyla Box-Behnken tasarımın kullanıldığı optimizasyon yönteminde 15 deney gerçekleştirilmiş ve optimal şartlar pH 8,5, 100 mM sürfaktan ve 22 kV olarak tespit edilmiştir. Bu şartlarda kaydedilen

elektroferogramda 18 adet pik gözlenmiştir. Geleneksel optimizasyon yönteminde ise 40 deney gerçekleştirilerek 21 pikin gözlendiği şartlar pH 8,5; 100 mM sürfaktan ve 15 kV olarak tespit edilmiştir. Araştırmacılar, her iki yöntemle de tüm maddelerin ayrımını sağlayamamış olsalar da cevap yüzey metodolojisiyle benzer sonuçlara çok daha az deney sayısı ile ulaştıklarını belirtmişlerdir (Hows ve ark., 1997).

Wang ve arkadaşları sülfadiyazin, sülfadimidin ve trimetoprimin farmasötik preparatlardan kantitatif tayini için bir kapiler elektroforez yöntemi geliştirmişlerdir. pH değeri 6,2'ye ayarlanmış 20mM fosfat tamponunu taşıyıcı olarak kullanıldığı ve 28 kV potansiyel uygulandığı yöntemde etken maddelerin ayrımı 16 dakika içinde gerçekleştirilmiştir. Amperometrik tayin için karbon disk elektrodu ve Ag/AgCl elektrodu kullanılmış ve cevaplar 1275 mV'ta kaydedilmiştir. Geliştirilen yöntem, sülfadiyazin, sülfadimidin, trimetoprim etken maddelerinden ikisini veya üçünü içeren üç farklı farmasötik preparata uygulanmıştır. Beş tekrar için elde edilen sonuçlar etiket miktarıyla uyumlu, bağıl standart sapması %0,5 ila %5,37 arasında bulunmuştur (Wang ve ark., 1999).

1.6.4.4. Elektrokimyasal Yöntemler

2005 yılında, süt örneklerinden sülfadimidin analizi için önderiştirme ve voltametrik basamaklardan oluşan bir yöntem geliştirilmiştir. Önderiştirme basamağında moleküler baskılanmış polimere dayalı bir katı faz ekstraksiyonu yöntemi geliştirilmiştir. Miktar tayini için camsı karbon elektrotun kullanıldığı bir kare dalga voltametri yöntemi kullanılmıştır. Destek elektroliti olarak metanol ve asetik asit çözeltisinin karışımı (9:1, *h/h*) kullanılmış, doğrusal çalışma aralığı 0,6-112 µg/mL olarak belirlenmiştir. Çalışmada geliştirilen katı faz ekstaksiyonu yönteminin sülfadimidine seçiciliğinin zayıf olduğu gösterilmiştir. Ön deriştirme basamağından sonra elde edilen geri kazanım oranları sülfadimidin için %97,9 iken diğer sülfonamid ilaçları için bu oran %10,4 ve %69,0 olduğu tespit edilmiştir. Bu yüzden geliştirilen yöntemin süt örneklerine uygulanmasında numuneye sadece sülfadimidin standardı eklenmiş, girişim yapma ihtimali olan diğer ilaçların standartları kullanılmamıştır. Son olarak geliştirilen yöntem, iki farklı seviyede sülfadimidin eklenmiş süt örneklerine

uygulanmış ve geri kazanım oranları %100 ve %96 olarak hesaplanmıştır (Guzmán-Vázquez De Prada ve ark., 2005).

He ve Chen, domuz etindeki sülfadimidin, sülfadiyazin, sülfametoksazol ve sülfonamid kalıntılarının ayrı ayrı tayinini gerçekleştirmek için kullanılmak üzere bir camsı karbon elektrodu karbon nanotüple modifiye etmişlerdir. Sülfonamid tayini için optimize ettikleri deneysel koşulları daha sonra diğer üç etken maddenin analizi için de kullanmışlardır. Destek elektroliti olarak pH 2 Britton-Robinson tamponu seçilmiş, sülfadimidin, sülfadiyazin, sülfametoksazol ve sülfonamid için 0,927, 0,963, 1,013 ve 0,988 volttaki pik akımları kullanılarak kalibrasyon grafikleri çizilmiştir. Domuz eti örneklerine eklenen standart maddelerin tayini gerçekleştirilmiş ve yüksek geri kazanım sonuçlarına ulaşılmıştır (He ve Chen, 2016).

Su ve Cheng süt ve bal örneklerinde sülfadimidin tayini için bir voltametrik yöntem geliştirmişlerdir. Perde-baskılı karbon elektrodların üzerine iletken polimer nanokompozit ve manganoksit dökerek elde ettikleri modifiye elektrodları kullandıkları yöntemde kare dalga voltametrisi ile sülfadoksinin oksidasyon pikini 0,39 voltta gözlemlemişlerdir. Destek elektroliti olarak pH 3 fosfat tamponu kullanılmıştır. Çalışma aralığı 0,27-135,0 µg/mL olan yöntemin seçicilik çalışmalarında, ortamda bulunma ihtimali olan türlerin, sülfadimidin sinyalini %22'ye kadar değiştirdiği tespit edilmiştir. Validasyon çalışmasından sonra sülfadimidin eklenmiş bal ve süt örnekleri geliştirilen yöntemle analiz edilmiş ve yüksek geri kazanım oranlarına ulaşılmıştır. Yöntemi karşılaştırmak için C_{18} kolon ve metanol–su karışımının (35:65, *h/h*) kullanıldığı bir HPLC yöntemi geliştirilmiştir. Aynı numuneler HPLC yöntemi ile de analiz edilmiş, elde edilen sonuçlar elektrokimyasal analiz sonuçlarıyla istatistiksel olarak karşılaştırılmış ve iki yöntem arasında anlamlı bir fark bulunmadığı belirtilmiştir (Su ve Cheng, 2018).

Bu tezin amacı, veterinerlik alanında en sık kullanılan ilaç gruplarından olan sülfonamidlerin trimetoprim ile kombinasyonlarının analizi için yeni UPLC yöntemleri geliştirmektir. Çalışmanın amaçlarından bir diğeri ise, çoklu ilaç analizleri için geliştirilecek sıvı kromatografisi yöntemlerinde cevap yüzey metodolojisinin nasıl uygulanacağını ve hangi deney tasarımlarının kullanılması gerektiği konusunda kapsamlı bir araştırma sunmaktır. Ayrıca bu çalışma sonucunda geliştirilen UPLC yöntemlerinin araştırma-geliştirme laboratuvarlarında ve ilaç endüstrisinde kullanılabilecek, literatürdeki yöntemlere alternatif olabilecek yöntemler olması hedeflenmiştir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Cihazlar ve Sarf Malzemeler

- Waters Acquity H-Class UPLC sistemi: Dörtlü pompa, otomatik numune yöneticisi, sıcaklık kontrollü kolon bölmesi ve fotodiyot detektör (Waters, MA, ABD)
- Waters BEH C_{18} UPLC kolonu (çap:2,1; uzunluk:100 mm; partikül boyutu:1,7 µm; por açıklığı:130 Å)
- Shimadzu UV-2550 spektrofotometre (Shimadzu, Kyoto, Japonya)
- Mettler Toledo SevenCompact pHmetre (Mettler Toledo, Greifensee, İsviçre)
- Sartorius Entris 224-1S hassas terazi (Sartorius, Göttingen, Almanya)
- Isolab manyetik karıştırıcı (Isolab, Eschau, Almanya)
- Isolab ultrasonik banyo (Isolab, Eschau, Almanya)
- Sartorius Minisart selüloz nitrat membran filtre (gözenek çapı: 0,20 µm)
- Pall Acrodisk naylon şırınga ucu filtre (gözenek çapı: 0,20 µm)
- Waters cam vial (hacim: 2 mL)
- Farklı hacimlerde pipetler, balon jojeler, beherler ve diğer cam malzemeler

2.1.2. Bilgisayar Yazılımları

- Empower2 (Waters, MA, ABD)
- Excel 2016 (Microsoft, Washington, ABD)
- Matlab R2018b (Mathworks, MA, ABD)
- NX 11 (Siemens PLM Software, Texas, ABD)

2.1.3. Kimyasallar

- Metanol (Sigma-Aldrich)
- Ultra saf su (Merck Millipore)
- NaOH (Riedel-de Haën)
- HCOOH (Sigma-Aldrich)
- CH_3COOH (Sigma-Aldrich)
- $(NH_4)_2CO_3$ (Merck)
- Trimetoprim (Alfa Aesar)
- Sülfadiyazin (Alfa Aesar)
- Sülfadoksin (Alfa Aesar)
- Sülfadimidin sodyum (Sigma-Aldrich)

2.1.4. Farmasötik Preparatlar

- Biotrin Tablet

Sülfadiyazin……1000 mg/tablet

Trimetoprim……200 mg/tablet

- Animar Enjeksiyonluk Çözelti

Sülfadoksin……200 mg/mL

Trimetoprim……40 mg/mL

- Ba-Sülfa Enjeksiyonluk Çözelti

Sülfadimidin ……..200 mg/mL (Eşdeğer sülfadimidin sodyum ... 215,8 mg/mL)

Trimetoprim……40 mg/mL

2.2. Yöntem

2.2.1. Aşırı Performanslı Sıvı Kromatografisi (UPLC)

Maddelerin biri sabit biri hareketli olmak üzere birbiriyle karışmayan iki fazla girdikleri etkileşime göre farklı hızlarda hareket etmelerinden yararlanarak bir karışımdaki bileşenlerin ayrılmasını sağlayan teknikler, kromatografik teknikler olarak adlandırılır. Kromatografik teknikler uygulama biçimlerine, faz tiplerine veya ayrılmanın esasına göre farklı şekillerde sınıflandırılabilirler. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (High-Performance Liquid Chromatography → HPLC), kullanım alanı en yaygın olan kromatografik tekniktir. Hareketli faz sıvı halde olduğu için farmakopelerde ve literatürde kısaca sıvı kromatografisi olarak da adlandırılır. Sabit faz olarak çoğunlukla katı dolgu parçacıkları üzerine sabitlenmiş bir sıvı kullanılır. Sabit faz paslanmış çelikten veya polimer kolonlara sıkıştırılmış halde bulunduğu için HPLC aynı zamanda bir kolon kromatografisi tekniğidir. Sabit ve hareketli fazların ikisi de sıvı olduğu için sıvı-sıvı kromatografisi olarak sınıflandırılır. Ayrılması hedeflenen maddeler her iki fazda da belirli oranda çözünür ve dağılırlar, hareket hızlarını da bu oran belirler. Örneğin sabit fazda daha çok dağılan madde, sabit fazda en çok alıkonan madde olacağı için karışımdaki diğer maddelerden ayrılacaktır. Bu mekanizma "partisyon" olarak adlandırıldığı için, maddelerin bu esasa göre ayrılmasını sağlayan HPLC uygulamaları da partisyon kromatografisi olarak sınıflandırılır.

Partisyon kromatografisinin ilk örneklerinde, sabit fazı oluşturan durgun sıvı destek parçacıklarına fiziksel olarak adsorbe ettirilmiştir. Bu tür sabit fazların kullanım ömrü kısa olduğu ve tekrarlanabilirlik düşük olduğu için günümüzde dolgu parçacıklarına organik türlerin kimyasal olarak bağlanması ile üretilen sabit fazlar kullanılmaktadır. Bu tür sabit fazların üretimi için silika yapılı dolgu parçacıklarının yüzeyindeki hidroksil grupları organoklorosilan ile reaksiyona sokulur ve "organosiloksan" olarak adlandırılan yapılar oluşur. Bağlanan bu yapılarda bulunan grupların polar veya apolar doğada olması, üretilen sabit fazın da polarlığını ve

dolayısıyla kromatografik uygulamada maddelerin alıkonmalarını etkiler (Skoog ve ark., 2004).

Partisyon kromatografisi, hareketli ve sabit fazların bağıl polarlıklarına göre ikiye ayrılır:

- Normal faz kromatografi: Sabit fazdaki organosiloksan yapısında siyano, amino, trietilen glikol gibi grupların bulunduğu polar bir sabit faz ve hekzan, izopropil eter gibi apolar çözücülerden meydana gelen hareketli faz

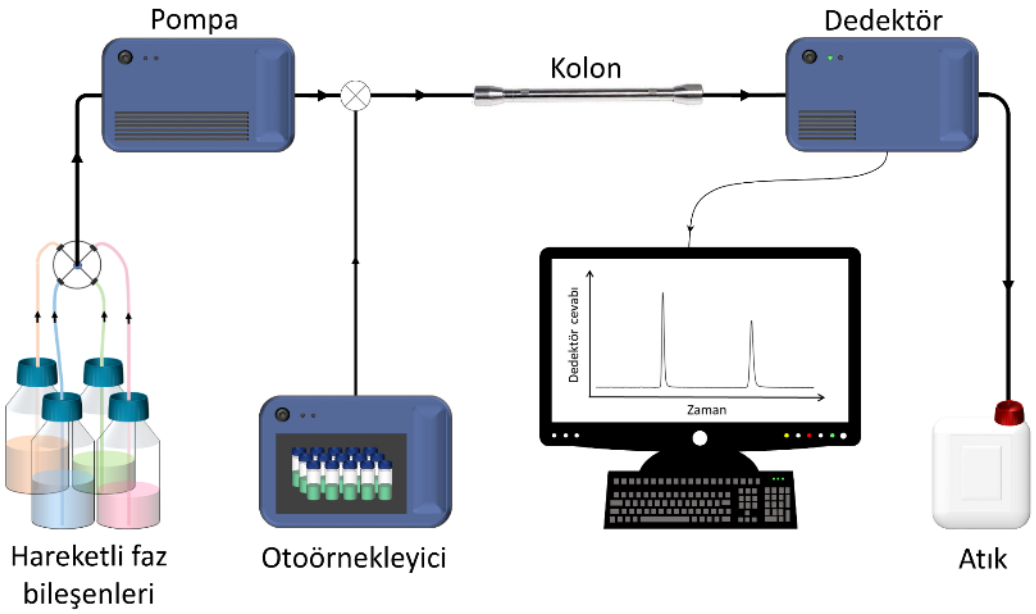
- Ters faz kromatografi: Sabit fazda organosiloksan yapısında C_8 veya C_{18} zincirlerin bulunduğu apolar bir sabit faz ve su, asetonitril, metanol gibi çözücülerden meydana gelen hareketli faz

Ters faz kromatografisinde sulu çözeltilerin kullanılabilmesi hem maliyeti hem de doğaya verilen zararı düşürür. Hareketli faz seçimi için pek çok seçenek vardır, özellikle hareketli fazın pH'ı ve polarlığı istenen biçimde ayarlanarak pek çok farklı analit için uygun olacak hareketli fazlar hazırlanabilir. Sabit ve hareketli faz arasında kurulan dengeye ulaşmak normal faz kromatografisine göre çok daha hızlıdır. Bu gibi nedenlerle özellikle farmasötik alanda en sık kullanılan analitik teknik ters faz sıvı kromatografisidir. Tüm HPLC ayrımı çalışmalarının dörtte üçünün ters faz kromatografisiyle gerçekleştirildiği tahmin edilmektedir (Bıyık, 2017; Skoog ve ark., 2004; Yabré ve ark., 2018).

Her alanda olduğu gibi, HPLC uygulamaları konusunda çalışan araştırmacılar da bu tekniğin performansını arttırmak için sürekli bir araştırma-geliştirme sürecinin içinde bulunurlar. HPLC'nin etkinliğini arttırmak için dolgu parçacıklarının boyutları giderek küçültülmüştür. HPLC için kullanılan ilk sabit fazlar 50-200 μm çaplı parçacıklarla doldurulmuş kolonlar iken, 1990'larda parçacık boyutları 3 μm'ye kadar inmiştir. Parçacık ve kolon çaplarının küçültülmesi ayrım etkinliğini arttırıp analiz

zamanını kısaltmaktadır. Fakat daha küçük parçacıkların kullanıldığı kolonlar, HPLC sistemi için çok daha yüksek basınçlarda çalışılmasını zorunlu kılmaktadır.

Waters firmasının 2004 yılında piyasaya çıkardığı aşırı basınçlı sıvı kromatografisi (Ultra-Performance Liquid Chromatography → UPLC) bu problemc bir çözüm olmuştur. UPLC, çok yüksek basınçlarda çalışması için tamamen baştan tasarlanmış bir sıvı kromatografi cihazıdır. Bu cihaz sayesinde dolgu parçacıkları 1,7 µm olan kolonlar kullanılarak çok daha kısa sürede, daha iyi ayrıma, yüksek kolon etkinliğine ve yüksek hassasiyete ulaşmak mümkündür (Mazzeo ve ark., 2005; Swartz, 2005; Wu ve Clausen, 2007).



Şekil 2.1. UPLC cihazının şematik gösterimi

Bu çalışmada kullanılan UPLC sistemi temel olarak pompa, numune yöneticisi, kolon ve dedektör olmak üzere dört temel parçadan oluşur ve Şekil 2.1'de bir şeması sunulmuştur. Üretici firmanın "dörtlü çözücü yöneticisi" olarak adlandırdığı pompa kısmı, dört farklı çözücü haznesindeki sıvıları istenen oranlarda düşük basınçlı ortamda karıştıktan sonra pulssuz ve 1000 bara kadar çıkabilen basınçlarla sabit bir akışla sisteme verilmesini sağlar. Numune yöneticisi ise numunelerin yerleştirildiği sıcaklık kontrollü bir bölmeden ve otomatik enjeksiyon ünitesinden ibarettir. Bu ünite, atmosferik basınçta bulunan numuneden istenen miktarın alınarak hareketli fazla

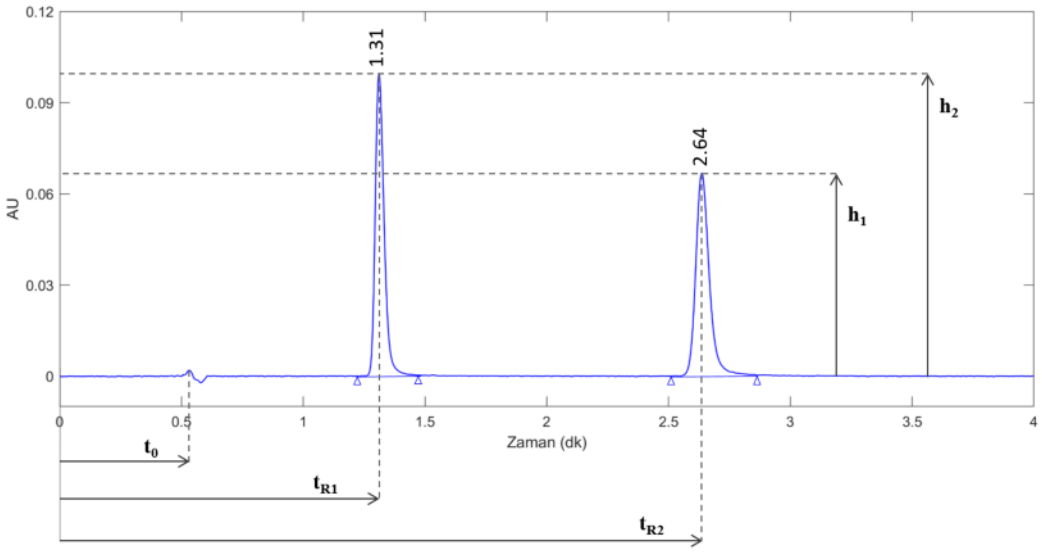
beraber kolon içine verilmesini sağlar. Otomatik enjeksiyon ünitesindeki basınç çeviriciler, enjeksiyon valfi ve numune döngüsü sayesinde kolon içindeki basıncın değişmesi önlenir. Ayrıca enjeksiyon öncesi veya sonrası şırınga iğnesinin yıkanmasıyla önceki enjeksiyonlardan kalıntıların kolona verilmesi engellenir. Kolonun bulunduğu bölme sıcaklık kontrollüdür, böylece istenen kolon sıcaklığı ayarlanabilir. Kolon bölmesindeki ön-ısıtıcı kullanılarak hareketli fazın kolona girmeden önce sabit fazla aynı sıcaklıkta olması sağlanır, böylece hareketli ve sabit faz arasındaki denge kolon boyunca sabit kalır. UPLC'ye özel 1,7 µm parçacıklı kolonlar kullanılarak bant genişlikleri düşürülmüştür ve oldukça dar pikler elde edilir. Bu piklerin hassas ve doğru tayini için dedektörün yüksek hızda sinyal ölçümü yapması gerekir. Cihazdaki fotodiyot dedektörün sinyal ölçüm hızı saniyede 20 ölçüm olarak ayarlanmıştır. Dedektörün optik çözünürlüğü 1,2 nm olup 190 ile 800 nm arasında kayıt alır. Böylece analitlerin absorbans spektrumları ve kromatogramlar yüksek hassasiyette kaydedilir.

Kullanılan UPLC sisteminin geleneksel HPLC'ye göre avantajları şunlardır:

- Analiz zamanı HPLC'ye göre 2-3 kat azaltılabilir.
- Aşırı basınç ve kolon dolgu materyalinin küçük parçacık boyutu sayesinde daha yüksek ayırıcılığa ulaşılır.
- Kolon çaplarının 1,0 – 4,6 mm olması ve küçük parçacık boyutu sayesinde hareketli fazın çok düşük akış hızlarında kullanılması mümkün olur. Çözücü sarfiyatı minimuma indirilir.
- Numune enjeksiyonu için gereken hacim çok daha düşüktür (0,5-5 µL).
- Pompa ve numune yöneticisinin tasarımı sayesinde enjeksiyon döngüsünün zamanı kısadır.
- Çözücü yöneticisi hareketli fazı istenen oranlarda yüksek hassasiyette ve tekrarlanabilir şekilde oluşturur ve pulssuz şekilde sisteme verir (Waters®, 2010).

Kromatogramların Yorumlanması

UPLC çalışmalarında sistemden elde edilen çıktı, dedektör sinyalinin zamana karşı grafiğe geçirilmesiyle elde edilen kromatogramlardır. Kolondan çıkan maddeler bir bant şeklinde ilerleyerek dedektörde sinyale neden oldukları için kromatogram üzerinde Gauss eğrisi şeklinde pikler oluştururlar. Uygulanan UPLC yönteminin geçerliliğini değerlendirmek, kalitatif ve kantitatif analizleri gerçekleştirmek için kromatogramlardaki bazı parametrelerin değerlendirilmesi gerekir. Ölü zaman, alıkonma zamanı, pik yüksekliği, taban genişliği gibi temel kromatografik parametreler, kromatogramdan kolayca tespit edilir. Ayrıca bu parametrelerin kullanıldığı eşitliklerle sistem uygunluk testlerinin sonuçları hesaplanır. UPLC sisteminde bu parametrelerin hesapları yazılım tarafından yapılmaktadır.



Şekil 2.2. Örnek bir UPLC kromatogramı ve temel kromatografik parametreler

- *Ölü zaman (t_0)*: Sabit fazda hiç etkileşime girmeyen türlerin kolonu terk ettiği zamandır. Numune çözücüsü de sabit fazla hiç alıkonulmadığı için kromatogramdaki taban çizgisinin bozulduğu ilk an olarak tespit edilir. Ölü zamanın tayini aynı zamanda urasil, potasyum bromür gibi polarlığı çok yüksek bileşiklerin sisteme enjekte edilmesi ile de mümkündür.

- *Alıkonma zamanı (t_R):* Numunenin enjeksiyonundan sonra analitin dedektöre ulaşması için geçen zamandır. Kromatogramdaki bir pikin zirve noktasının x eksenindeki izdüşümü, o analit için alıkonma zamanını ifade eder ve nitel analizi için belirleyicidir.
- *Pik yüksekliği (h):* Bir maddeye ait kromatografik pikin zirve noktasının y eksenindeki izdüşümüdür. Numunedeki analit derişimi ile artış gösterdiği için kantitatif analizde kullanılabilir.
- *Taban genişliği (w):* Kolondaki bant genişliğinin bir göstergesidir. Kromatogramda analite ait pikin taban çizgisi üzerinde başlangıç ve bitiş noktalarının arasındaki fark ölçülerek saptanabilir.
- *Pik alanı:* Kromatogramdaki bir pikin alanı o analitin numunedeki derişimi hakkında bilgi verir. Kantitatif analizler için tercih edilen parametre pik alanıdır.

Sistem Uygunluk Testleri

Bir sıvı kromatografi sistemiyle elde edilen verilerin doğruluk ve kesinliği, kromatografik sistemin uygun biçimde çalışmasına bağlıdır. Kromatografik sistemin amaçlanan analiz için uygun olup olmadığının belirlenmesi için sistem uygunluk testlerinin gerçekleştirilmesi ve önerilen sınırlarda sonuçların elde edilmesi gereklidir (Center for Drug Evaluation and Research, 1994; International Conference on Harmonization, 1994).

Kapasite faktörü (k'): Analit pikinin ölü zamana göre olan konumunu belirtir. Temel kromatografik parametreler kullanılarak Eşitlik 2.1'de verilen formülle hesaplanır. Tavsiye edilen k' değeri 2-8'dir.

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \qquad \text{(Eşitlik 2.1)}$$

Seçicilik (α): Ardışık iki pikin birbirlerine göre bağıl konumlarının bir ölçütüdür. Temel kromatografik parametreler kullanılarak Eşitlik 2.2'de sunulan formülle

hesaplanır. Önerilen değer α>2'dir. Ayırıcılık (R) rapor edildiği sürece zorunlu bir parametre değildir.

$$\alpha = \frac{k_1'}{k_2'} \qquad \text{(Eşitlik 2.2)}$$

Ayırıcılık (R): İki analit pikinin ayrımını ifade eden parametredir. Ayırıcılık pratik olarak, alıkonma zamanları arasındaki farkın ortalama taban pik genişliğine oranıdır. UPLC cihazına bağlı yazılım, ayırıcılığı Eşitlik 2.3'te sunulan formül ile hesaplar. Önerilen değer R>2'dir.

$$R = 1{,}18 \times \frac{t_{R_2} - t_{R_1}}{w_{1,\frac{h}{2}} + w_{2,\frac{h}{2}}} \qquad \text{(Eşitlik 2.3)}$$

Kuyruklanma (T): Simetri faktörü olarak da adlandırılan bu parametre analit pikinin bir Gauss eğrisi olup olmadığının değerlendirilmesi için kullanılır. İdeal bir Gauss eğrisi olan pike ait kuyruklanma faktörü 1'e eşittir. Bu sayıdan değerden sapmalar pik alanının hesabını güçleştirdiği için miktar tayininin doğruluğunu etkiler. Kromatografik piklerin kuyruklanma faktörünün 2'nin altında olması önerilir.

Enjeksiyon tekrar edilebilirliği: Art arda aynı numuneden yapılan enjeksiyonlarla ele edilen pik yüksekliği veya pik alanı değerlerinin bağıl standart sapması hesaplanarak tespit edilir. Kromatografik sistemi oluşturan pompa, kolon, dedektör gibi elemanların performansı hakkında bilgi verir, numune hazırlama veya numune eldesindeki varyasyonları dikkate almaz. En az 6 kez tekrarlanan enjeksiyonlarda % bağıl standart sapma değerinin 1'den düşük olması önerilir.

Teorik tabaka sayısı (N): Teorik tabaka sayısı, kolon uzunluğunun teorik tabaka yüksekliğine oranıdır ve kolon etkinliğinin bir ölçütüdür. Teorik tabaka sayısının büyük olması kolon etkinliğinin yüksek olduğu anlamına gelir. Teorik tabaka sayısı aşağıdaki formül ile hesaplanır ve önerilen değer > 2000'dir.

$$N = 16\left(\frac{t_R}{w}\right)^2 \qquad \text{(Eşitlik 2.4)}$$

2.2.2. Deneysel Tasarım ve Optimizasyon

Kemometri, kimyasal sistemlerden maksimum bilgiyi elde etmek ve en uygun deney sürecini tasarlamak için matematiksel ve istatistiksel yöntemleri kullanan kimya disiplinidir. Kimya ve ilgili disiplinlerdeki süreçlerde (ekstraksiyon, sentez, üretim, analiz gibi) hedeflenen amaca ulaşılmasını sağlayacak uygun deneysel koşulların saptanması için teorik bilgiler veya kişisel deneyimler her zaman yeterli olmayabilir. Böyle karmaşık durumlar, kemometri disiplini kapsamında deneysel tasarım ve optimizasyon tekniğinin kullanımını gerektirir.

Deneysel tasarım terimi, genel olarak iki anlamda kullanılır. Bunlardan ilki bir model oluşturabilmek amacıyla bir dizi deneyin planlanmasıdır. Bu model bir regresyon modeli veya ANOVA modeli olabilir. Plan dâhilinde gerçekleştirilen deneyler modelin kalitesini, örneğin regresyon katsayılarının kesinliğini veya modelin hassasiyetini etkiler. Deneysel tasarımın ikinci anlamı ise ürünlere veya süreçlere etki eden faktörlerin tespiti, bu faktörlerin etkisinin incelenmesi ve istenen özelliklere sahip çıktıların elde edilmesi için gerekli koşulların tespiti ile ilgilidir (Massart ve ark., 1998). Bu doktora tez kapsamında miktar tayini çalışmalarındaki regresyon modellerinin elde edilmesinde deneysel tasarım prensipleri uygulanmıştır. Fakat çalışmanın odak noktası deneysel tasarımın ikinci anlamıyla yani olan optimizasyonla ilgilidir.

Optimizasyon, bir süreç sonunda çıktıyı istenen biçimde alabilmek için çalışma koşullarının nasıl olması gerektiğinin saptanmasıdır. Araştırma ve geliştirme çalışmalarının en önemli hedefi çıktının yani cevabın iyileştirilmesidir ve bu hedefi gerçekleştirmek için çoğunlukla tek değişkenli optimizasyon tekniği uygulanır. Bu teknikte sistemdeki diğer değişkenler sabit tutulurken, bir parametrenin farklı seviyelerinde deneyler gerçekleştirilir ve bu parametrenin en uygun cevabı veren

seviyesi tespit edilir. Daha sonra her bir değişken için bu işlem tekrarlanır. Tek değişkenli optimizasyon ilk bakışta kolay bir yöntem gibi görünmesine rağmen pek çok dezavantajı beraberinde getirir (Komsta ve ark., 2018; Massart ve ark., 2003):

- Cevaba etki eden parametreler arasında etkileşim varsa gerçek optimal değer saptanamaz.
- Cevaba etki eden parametre sayısı fazlaysa çok sayıda deney yapmak gerekir, bu da kaynakların boşa harcanmasına neden olur.
- Optimal olarak belirlenen koşullar önce hangi parametrenin optimize edildiğine göre veya bu parametrenin seçilen seviyelerine göre değişir.
- Optimal olarak belirlenen koşullar çoğunlukla kabul edilebilir cevaplar verir fakat en iyi cevabın bulunduğu garanti edilemez.
- Optimizasyon için kullanılacak zaman, malzeme ve işgücü belirsizdir, bu yüzden kaynakların doğru kullanımı için önceden plan yapılamaz.
- Seçilen parametreler ve cevap arasındaki ilişki tam olarak açıklanamaz.

Bir sistemin optimizasyonu amacıyla izlenecek en doğru yaklaşım çok değişkenli deneysel tasarım ve optimizasyon metodolojisidir. Bu yaklaşımla mümkün olan en az sayıda deney yapılarak sistemle ilgili detaylı ve zengin bir bilgi birikimi elde edilir. Deneysel parametreler arasında etkileşim olan sistemlerde ise gerçek optimal şartların tespiti için çok değişkenli deneysel tasarım ve optimizasyon yöntemlerinin kullanımı bir gerekliliktir. Deneysel tasarım terminolojisinde, deney parametreleri kontrollü olarak değiştirilebildiği için bağımsız değişkenlerdir ve faktör olarak adlandırılırlar. Deneylerden elde edilen sonucun ölçülen değeri ise cevap olarak tanımlanır. Cevabın değeri faktörlere verilen değerlere yani deneysel koşullara göre değiştiği için, cevap bir bağımlı değişkendir. Faktörlerin cevap üzerine nasıl etki ettiğini açıklamak için, bağımlı ve bağımsız değişkenler arasında matematiksel bir ilişki kurulur ve bu ilişki model veya cevap fonksiyonu olarak adlandırılır. Temel olarak Eşitlik 2.5'teki gibi ifade edilen modelde faktörler x, cevaplar ise y sembolüyle gösterilir (Lundstedt ve ark., 1998; Massart ve ark., 1998).

$$y = f(x_1, x_2, \dots, x_n) \qquad \text{(Eşitlik 2.5)}$$

Bu model incelenerek cevaba hangi faktörlerin etkisinin olduğu veya bu etkinin ne kadar büyük olduğu anlaşılabilir. Fakat bu tür incelemelerin yapılabilmesi için modelin belirli bir formda oluşturulması gerekir ki bu, ancak deneylerin önceden bu amaca göre tasarlanması ve planlanan biçimde yürütülmesi ile mümkün olur. Eğer bu cevap fonksiyonu çok değişkenli ve ikinci dereceden bir modelse, cevabın minimum ve maksimum olması için değişkenlerin hangi değerde olması gerektiği tespit edilebilir. Bu koşulu sağlayan modellerin oluşturulması için kullanılan deneysel tasarım süreçleri genellikle cevap yüzey metodolojisi olarak adlandırılır. Cevap yüzey metodolojisi "İlgilenilen cevabın birden fazla faktörden etkilendiği durumlarda bu cevabı optimize etmek amacıyla sistemin modellenmesi ve analiz edilmesi için kullanılan matematiksel ve istatistiksel teknikler bütünü" olarak tanımlanır. Yani cevap yüzey metodolojisi, deneysel tasarımın bir alt başlığıdır. Aslında birden fazla faktörün olduğu her sistem, modelin derecesine bakılmaksızın en az bir cevap yüzeyi ile temsil edilerek incelenebilir. Bu yüzden literatürde deneysel tasarım ve cevap yüzey metodolojisi terimlerinin birbiri yerine kullanıldığı çalışmalar da mevcuttur (Brereton, 2003; Komsta ve ark., 2018; Lundstedt ve ark., 1998; Montgomery, 2013).

Optimizasyon amacıyla kullanılan cevap yüzey metodolojisi aşağıdaki basamaklar çerçevesinde uygulanır:

- Cevap veya cevapların seçimi
- Faktörlerin seçimi
- Faktör seviyelerinin belirlenmesi
- Deney tasarımının seçimi
- Deneylerin gerçekleştirilmesi
- Modelleme
- Optimal şartların hesaplanması

Karmaşık numunelerdeki analitlerin kalitatif ve kantitatif tayinleri için geliştirilen analitik yöntemler, çoğunlukla kromatografik ayrımı izleyen bir tayin yöntemine dayanır. Dedektör çeşidi çözülmeye çalışılan probleme göre değişse de, mutlaka belli bir dereceye kadar kromatografik ayrıma ihtiyaç duyulur. Bu yüzden kromatografik ayrım, analitik kimyacılar için kaçınılmaz bir tekniktir. Kromatografik

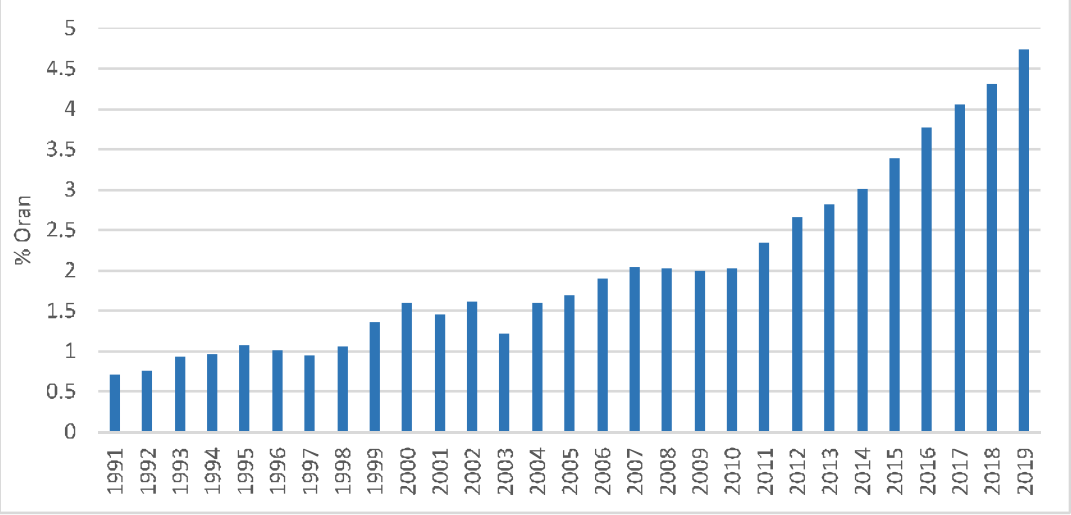
ayrımın optimizasyonu, yöntemin teşhis ve tayin gücünü, doğruluğunu ve güvenilirliğini etkileyen en önemli adımdır. HPLC veya UPLC yöntemlerinde analitlerin fizikokimyasal yapıları, sabit fazın özellikleri, hareketli fazın bileşimi, viskozitesi, dielektrik sabiti, pH derecesi, akış hızı gibi pek çok faktör hem yöntemin ayrım gücünü hem de analiz zamanını, pik şekillerini ve harcanan kimyasalların miktarını etkiler. Bu kadar çok parametrenin etki ettiği bu sistemlerde, araştırmacının rahatça takip ederek optimale ulaşabileceği fiziksel veya kimyasal bir yasa yoktur. Tek değişkenli optimizasyon kullanımı ile gerçek optimale ulaşmak mümkün değildir çünkü faktörler arası etkileşimler istisnasız olarak cevap üzerine etkilidirler. Bu yüzden, kromatografik yöntemlerin optimizasyonu büyük ölçüde araştırmacının deneyimine bağlıdır. Oysa gerçek optimal değerlere ulaşmak için kişisel beceri ve deneyim yerine, istatistiksel bir yöntem olan cevap yüzey metodolojisinin kullanılması gerekir. Cevap yüzey metodolojisi ile gerçekleştirilecek optimizasyon sayesinde mümkün olan en anlamlı bilgiyi, en akılcı ve ekonomik deneysel çalışmalarla elde etmek mümkündür (Duarte ve Capelo, 2006; Hibbert, 2012; Komsta ve ark., 2018; Massart ve ark., 2003).

Kromatografik sistemlerde cevap yüzey metodolojisinin kullanılması temel olarak dört avantaj sağlar:

- Cevap üzerine etkisi olan faktör etkileşimleri göz ardı edilmez. Doğru model kurulduğu takdirde sisteme ne kadar çok faktör etki ederse etsin, hem faktörlerin hem de faktör etkileşimlerinin cevaba etkisi tam olarak saptanır ve bu model kullanılarak gerçek optimal cevap için deneysel koşulların ne olması gerektiği tespit edilir.
- Sistemin optimizasyonu için, kromatografik sistem üzerine etkili olan parametrelerin fizikokimyasal detayları bilinmese de optimal cevaplara ulaşmak mümkündür. Teorik bilgisi güçlü veya bu sistemler üzerinde uzmanlaşmış çalışanlara ihtiyaç ortadan kalkar. Hatta modern teknolojiler sayesinde belirlenen deneysel tasarımı bir operatör olmadan da gerçekleştirebilecek kromatografik sistemler kullanılabilir.

- Deneysel planlama optimizasyondan önce yapıldığı için, bu süreçte kaç deney yapılması gerektiği, ne kadar zaman, kimyasal, para ve enerji harcanması gerektiği önceden belirlenir.
- Mümkün olan en fazla bilgi, akılcı deneysel çalışmalar sayesinde minimum deney ile elde edilir. Böylece daha az atık üretilir, zamandan, malzemeden, masraftan ve enerjiden tasarruf edilir.

Literatürdeki kromatografi çalışmalarında cevap yüzey metodolojisinin kullanım oranını belirlemek için "Web of Science" veri tabanında yapılan tarama sonucunda Şekil 2.3'te sunulan grafik elde edilmiştir. Bu grafikteki sütunlar cevap yüzey metodolojisi kullanılan kromatografi çalışmalarının tüm kromatografi çalışmalarının yüzde kaçı olduğunu göstermektedir. Şekil 2.3'te görüldüğü üzere kromatografik çalışmalarda cevap yüzey metodolojisinin kullanımı gün geçtikçe artmaktadır.

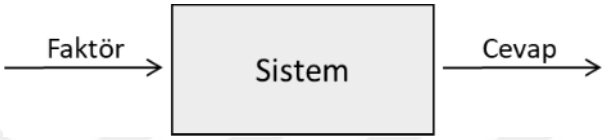


Şekil 2.3. Literatürdeki kromatografi çalışmalarında cevap yüzey metodolojisinin kullanım oranlarının yıllara göre dağılımı

2.2.2.1. Temel Kavramlar

Faktör

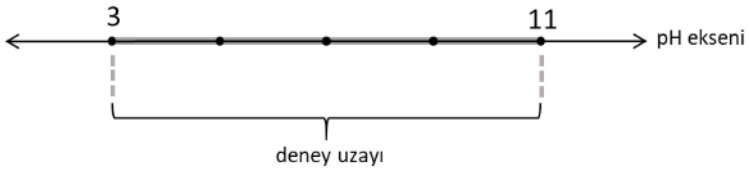
Cevap yüzey metodolojisinde cevaba etki etmesi beklenen ve kontrollü olarak değiştirilebilen koşullar, bağımsız değişken veya faktör olarak adlandırılır. Faktörler kantitatif veya kalitatif olabilirler. Değeri sayısal bir veri olarak ifade edilebilen sıcaklık, basınç, zaman gibi değişkenler kantitatif faktörlerdir. Organik çözücü cinsi, tampon çeşidi gibi faktörler kalitatif faktör olarak adlandırılırlar. Sistemdeki faktör sayısı, deney uzayındaki boyut sayısını belirler (Deming ve Morgan, 1993; Massart ve ark., 1998).



Şekil 2.4. Bir sistemin şematik gösterimi

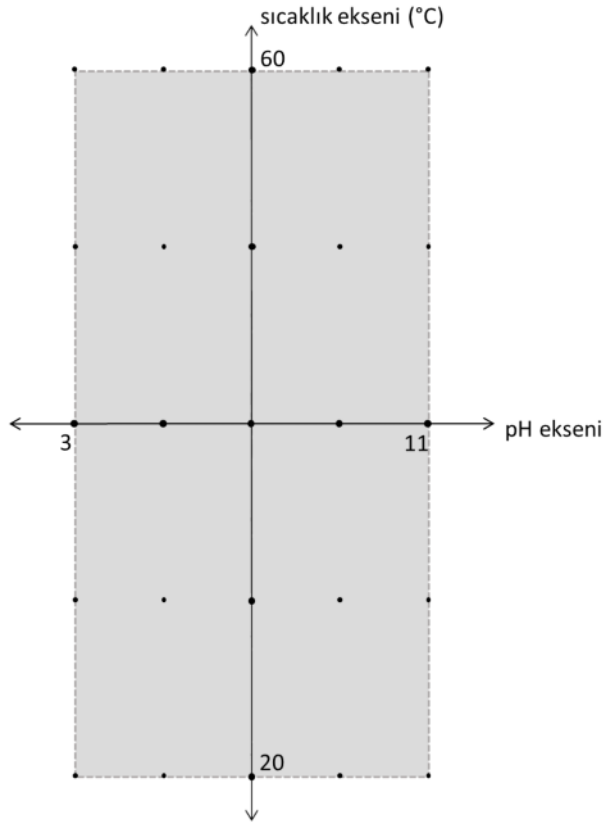
Faktör Seviyeleri ve Kodlanması

Deneysel tasarım işlemlerinde faktörlerin belirlenmesinden sonra, bu faktörlerin deneysel sınırları belirlenir. Bu sınırlar faktör seviyeleri olarak adlandırılır. Faktörlere atanan bu minimum ve maksimum değerler deney uzayının sınırlarını oluşturur (Massart ve ark., 1998). Örneğin, ortamın pH değerinin bir faktör olarak seçildiği bir optimizasyon işleminde, analitik sinyal farklı pH değerlerinde ölçülür. Ölçüm alınan pH değerlerinin 3, 5, 7, 9 ve 11 olduğunu varsayarsak, deney uzayının sınırlarını belirleyen değerler, ortam pH'ının minimum ve maksimum değerleri, yani 3 ve 11 olur. Bu çalışma için oluşturulan faktör seviyeleri bir eksen üzerinde Şekil 2.5'te sunulduğu gibi gösterilir.



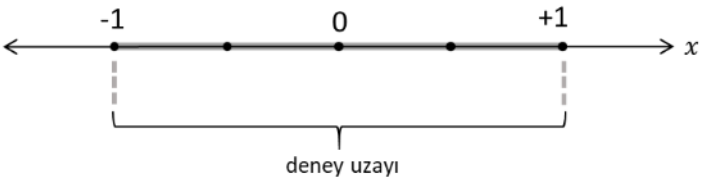
Şekil 2.5. Tek faktörlü bir çalışmaya ait deney uzayı

Çalışmada etkisi araştırılan ikinci bir faktör varsa, bu durumda deney uzayı iki boyutlu hale dönüşür. Örneğin, aynı çalışmada farklı ortam sıcaklıklarında her bir pH değeri için ölçüm yapıldığında, gerçekleştirilen her bir deney iki boyutlu bir koordinat sisteminde gösterilir. Sıcaklık değişkeni için faktör sınırları 20 °C ile 60 °C'dir. Şekil 2.6'da gösterilen gri renkli dikdörtgen bölge, iki boyutlu deney uzayını temsil eder. Bu şekilde noktalarla temsil edilen ve deney uzayında homojen olarak dağılmış olan farklı deneysel koşullar uygulanarak araştırmaya devam edilebilir veya aynı uzayda daha az sayıda deney yapmak için farklı bir plan yapılabilir. Çalışmaya üçüncü bir faktör eklendiğinde, çalışma alanı artık üç boyutlu bir deney uzayına dönüşür.



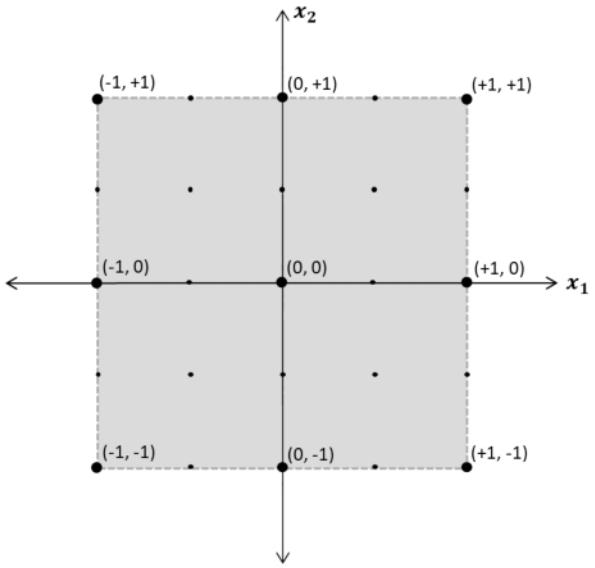
Şekil 2.6. İki faktörlü bir çalışmaya ait deney uzayı

Cevap yüzey metodolojisinde faktörlere verilen seviyeler genellikle -1 ile 1 arasında normalize edilerek kodlanır. Böylece deney uzayı her bir faktörün -1 ile +1 seviyeleri arasında tanımlanmış olur. Örneğin, Şekil 2.5'te verilen tek boyutlu deney uzayındaki pH seviyeleri normalize edildiğinde Şekil 2.7'daki gibi bir gösterim elde edilir.



Şekil 2.7. Tek faktörlü bir çalışmaya ait kodlanmış faktör seviyeleri

Şekil 2.6'da sunulan iki boyutlu deneysel tasarım çalışmasında kodlanmış faktör seviyeleri kullanıldığında deney uzayı Şekil 2.8'de verilen biçimde gösterilir. Her faktörün büyüklüğü artık eksende diğer faktörle aynı boyutta temsil edilir ve her bir faktör aynı ölçekte değerlendirilmiş olur. Bu çalışmadaki faktörlerin gerçek ve kodlanmış seviyeleri Çizelge 2.1'de sunulmuştur. Kodlama yöntemi sayesinde farklı fiziksel büyüklüklere sahip faktörlerin etkilerinin birbirleri ile daha kolay karşılaştırılabilmesi, cevap üzerinde anlamlı derecede değişiklik yapan faktörlerin ve etkileşimlerinin daha kolay saptanabilmesi mümkün olur. Ayrıca deney tasarımını sadeleştirdiği, modelleme ve hesaplamalarda kolaylık sağladığı için de araştırmacılar tarafından sıklıkla tercih edilir.



Şekil 2.8. İki faktörlü bir çalışmaya ait kodlanmış faktör seviyeleri

Çizelge 2.1. Faktör seviyeleri ve karşılık geldikleri fiziksel değerler

Kod	x_1 pH değeri	x_2 Sıcaklık (°C)
-1	3	20
+1	11	60

Cevap yüzey metodolojisinde faktör seviyelerinin ve dolayısıyla deney uzayının belirlenmesi oldukça önemlidir. Sınırların çok geniş olması, çoğunlukla gereksiz deneylerin yapılmasına ve modelin çalışılan bölgeyi temsil etme gücünün düşmesine neden olur. Sınırların dar olması, optimum bölgenin bu sınırlar dışında kalmasına ve gözden kaçmasına neden olur. Ayrıca cevaptaki varyansın küçük olmasına ve modeldeki terimin yeterince anlamlı olmamasına yol açabilir (Massart ve ark., 1998). Faktör seviyelerinin çok dar veya çok geniş olduğunu kavramak araştırmacının görevidir ve teknik bilgisi ile deneyimine bağlıdır (Massart ve ark., 2003). Örneğin, pH'daki değişimin 0,1 birim olması faktör sınırının çok dar, 5 birim olması ise çok geniş olduğu anlamına gelir. pH faktöründeki seviyeler arasında 1 birim olması pek çok sistem için uygundur (Steinberg ve Hunter, 1984).

Cevap

Deneysel tasarım ve optimizasyon çalışmalarında, önceden planlanan ve farklı koşullar kullanılarak uygulanan deneylerden sonra, her bir deneyden elde edilen sonuç ölçülebilir bir değer olarak kaydedilir. Kaydedilen bu değer cevap olarak adlandırılır. Kaydedilen cevabın değeri, sistemdeki faktörlerin seviyelerine göre değiştiği için, cevap sistemdeki bağımlı değişkendir. Araştırmacılar farklı sistemlerde farklı cevaplarla ilgilenirler. Ekstraksiyon işleminde verim yüzdesi bir cevapken, spektroskopik bir deneyde elde edilen analitik sinyalin şiddeti bir cevap olarak kaydedilir. Bazı sistemlerde araştırmacılar birden fazla cevapla ilgilenirler. Örneğin, kromatografik deneylerde hem ayırıcılık hem de analiz zamanı önemlidir ve her ikisi de cevap olarak kaydedilebilir.

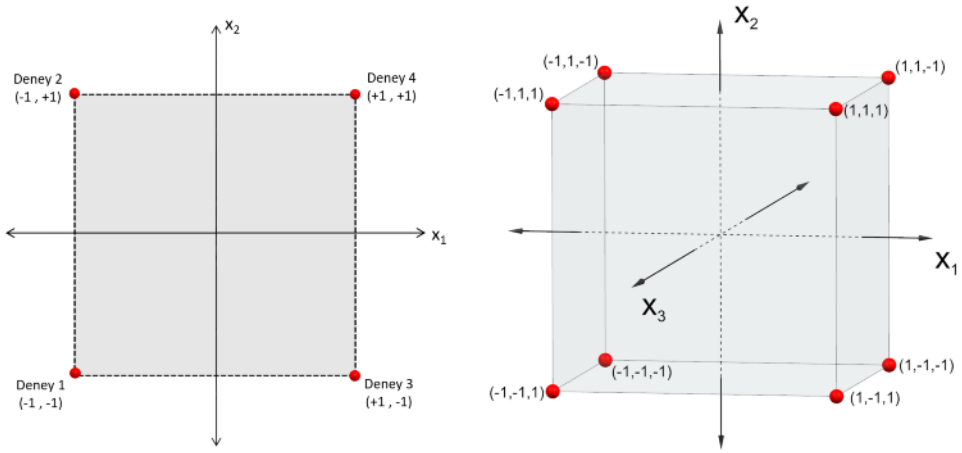
2.2.2.2. Deney Tasarımları

Cevap yüzey metodolojisinde, sistemle ilgili veri toplamak için gerçekleştirilecek deneyler planlanırken belli şablonlar kullanılır ve bu şablonlar deney tasarımları olarak adlandırılırlar. Çalışmalarda kullanılacak deney tasarımları amaca göre seçilir. Örneğin, sisteme hangi faktörlerin anlamlı derecede etki ettiğini, bu faktörlerin etkileşimlerinin anlamlı olup olmadığını saptamak için gerçekleştirilecek tarama çalışmalarında iki seviyeli deney tasarımları kullanılır. Amacı optimizasyon olan çalışmalarda ise üç seviyeli cevap yüzey tasarımları kullanılır. Seçilen deney tasarımına göre oluşturulan ve belirlenen deneysel koşullar kullanılarak uygulanacak deneylerin planını gösteren tablolara tasarım matrisi adı verilir. Tasarım matrisindeki her bir satır, gerçekleştirilecek her bir deneyin koşullarını verir. Tasarım matrislerinde, plan dâhilinde gerçekleştirilecek olan deneylerin koşulları kodlanmış seviyeler veya gerçek sayısal değerleri ile gösterilir. Deneyler gerçekleştirildikten sonra elde edilen cevaplar tasarım matrisinde yeni bir kolonda sunulur. Çizelge 2.2'de örnek bir tasarım matrisi sunulmuştur.

Her faktör için belirlenen seviyelerin farklı kombinasyonlarının kullanıldığı deney tasarımları faktöriyel tasarımlar olarak adlandırılır. Eğer faktör seviyeleri -1 ve +1'den oluşuyorsa bunlar, iki seviyeli faktöriyel tasarımlardır. İki seviyeli faktöriyel tasarımlar çoğunlukla tarama deneylerinde kullanıldıkları için tarama tasarımları olarak da adlandırılırlar. Çünkü iki seviyeli faktöriyel tasarımlarla elde edilen ampirik modeller doğrusal karakterlidir. Bu tasarımlar kullanılarak faktörlerin ve faktör etkileşimlerinin cevap üzerine etki edip etmedikleri veya hangi faktörlerin cevap üzerinde daha etkili oldukları anlaşılabilir (Brereton, 2003). k sayıda faktörün bulunduğu bir faktöriyel tasarıma göre deney sayısı 2^k formülüyle hesaplanır. Örneğin, iki faktör için $2^2 = 4$, üç faktör için $2^3 = 8$ deney yapmak gerekir. Faktör sayısı, deney uzayındaki boyut sayısını da belirlediği için, iki faktörlü bir tasarımda deney uzayı bir kareyi, üç faktörlü tasarımda bir küpü oluşturur. Oluşan bu deney uzayının köşe noktaları deney planındaki satırlara karşılık gelir. Örneğin, Çizelge 2.2'de verilen 2^2 faktöriyel deney tasarımına ait deney uzayı Şekil 2.9.a'da verilmiştir. Üç faktörlü bir sistem için oluşturulan 2^3 faktöriyel tasarımına ait deney uzayının gösterimi ise Şekil 2.9.b'de sunulmuştur.

Çizelge 2.2. İki faktörlü bir deney planı için kodlanmış ve gerçek seviyelerin verildiği tasarım matrisi

Deney no	Kodlanmış seviyeler		Gerçek koşullar		Cevaplar
	x_1	x_2	pH değeri	Sıcaklık (°C)	
Deney 1	-1	-1	3	20	Cevap 1
Deney 2	-1	+1	3	60	Cevap 2
Deney 3	+1	-1	11	20	Cevap 3
Deney 4	+1	+1	11	60	Cevap 4



Şekil 2.9. 2^2 ve 2^3 faktöriyel deney tasarımları

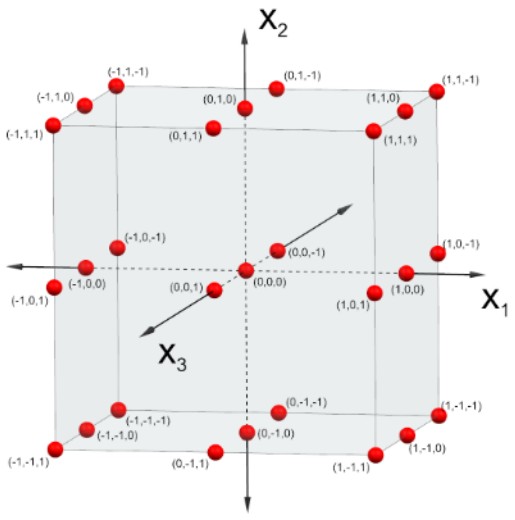
Deney sayısı, faktör sayısına göre üstel olarak arttığı için, çok faktörün bulunduğu sistemlerde tam faktöriyel tasarım yerine kesirli faktöriyel tasarım kullanılır. Deney sayısını azaltmak için faktöriyel tasarımdaki deneylerin belli bir kesri uygulanır. Belirlenen kesrin p olduğu, k faktörlü sistemlerde kesirli faktöriyel tasarımdaki deney sayısı 2^{k-p} şeklinde hesaplanır (Brereton, 2003).

Eğer cevabın hangi deneysel koşullarda optimal olacağı belirlenmek veya deney uzayında cevabın davranışı öngörülmek isteniyorsa, bu sistemi iki seviyeli tasarımlarla incelemek yeterli değildir. Bu amaçlarla kullanılacak tasarımların üç seviyeye sahip olmaları gerekir. Üç seviyeli tasarımların amacı sistemi mümkün olan en doğru ampirik modelle açıklamak, bu modeli kullanarak faktörlerin belli seviyelerinde hangi cevabın hangi değeri alacağını tahmin etmek ve cevabın belli bir değerde olması için hangi faktör seviyelerinin kullanılması gerektiğini belirlemektir. Üç seviyeli tasarımlarda, deney uzayının sınırları olan -1 ve +1 seviyelerinin ortalamasına denk

gelen değer 0 seviyesi olarak tanımlanır (Brereton, 2003). Üç seviyeli tasarımlar modellemenin önemli olduğu durumlarda kullanılırlar, bu yüzden incelenen faktörler genellikle kantitatif faktörlerden seçilir. Bu doktora tezindeki deneysel çalışmaların amacı optimal şartların belirlenmesi olduğu için cevap yüzey metodolojisi sırasında üç seviyeli tasarımlar kullanılmıştır.

2.2.2.2.1. Tam Faktöriyel Tasarım (FFD)

Tam faktöriyel tasarımlarda (Full Factorial Design →FFD) deney uzayı kare, küp veya hiperküp şeklinde olduğu için bu tasarımlar kübik tasarım olarak sınıflandırılır (Massart ve ark., 1998). Tam faktöriyel tasarımlar tarama değil optimizasyon amaçlı kullanıldıkları takdirde üç seviyeli olarak 3^k deney gerektirirler. Özellikle faktör sayısının üçten fazla olduğu durumlarda tam faktöriyel tasarımların kullanımı tercih edilmez. Çünkü deney sayısı, ampirik modeli oluşturacak terim sayısının çok üzerindedir, kaynakların ve zamanın kullanımı açısından etkin bir seçenek değildir (Massart ve ark., 2003). 3^3 tam faktöriyel deney tasarıma ait deney uzayı Şekil 2.10'da sunulmuştur. Bu şekil incelendiğinde, 2^3 faktöriyel tasarıma ait olan deney uzayıyla aynı hacmi kapladığı görülmektedir. Fakat artık küp halindeki uzayın sadece köşe noktaları değil, aynı zamanda küpün yüzeyinde ve kenarlarında bulunan noktaların da deney planında olduğu görülmektedir. Eklenen üçüncü seviye olan 0 seviyesi, eksenlere göre cevap değişiminin tanımlanmasında karesel etkilerin de bulunmasını yani ikinci dereceden bir modelin oluşturulmasını sağlar.



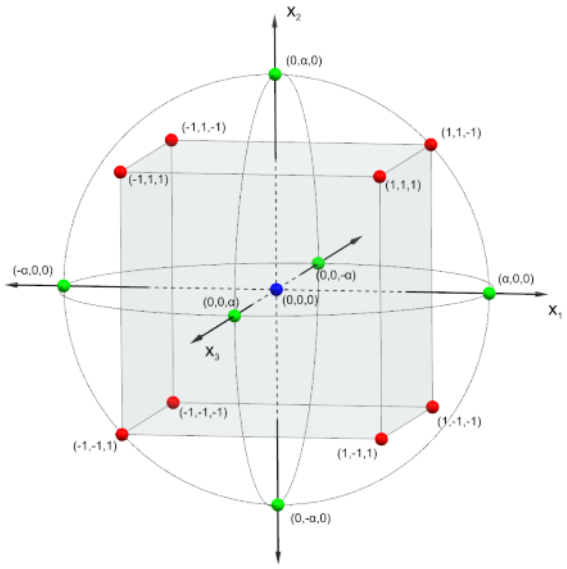
Şekil 2.10. 3^3 tam faktöriyel tasarım

2.2.2.2.2. Merkezi Bileşenli Tasarım (CCD)

Merkezi bileşenli tasarımlar (Central Composite Design → CCD), ikinci dereceden modellerin oluşturulması için en sık kullanılan tasarımlardır (Montgomery, 2013). Farklı tasarımlarda kullanılan noktaların birleştirilmesiyle elde edildikleri için "bileşenli" olarak adlandırılırlar. 3 faktörlü bir merkezi bileşenli tasarımı oluşturan bileşenleri aşağıdaki gibi sıralayabiliriz:

- Faktöriyel noktalar: Faktörlerin +1 ve -1 seviyelerinin tüm kombinasyonlarından oluşan noktalar, 2^3 tam faktöriyel tasarımın noktalarıdır ve üç boyutlu uzayda bir küpün köşelerindeki 8 noktaya karşılık gelir. Faktör sayısının k olduğu merkezi bileşenli tasarımlarda faktöriyel nokta sayısı 2^k olarak hesaplanır.
- Eksenel noktalar: Deney uzayının sınırında ve eksenlerin üzerinde olan bu noktalara yıldız noktalar da denmektedir. Eksenel noktaların konumu, tasarımda seçilen $+\alpha$, 0 ve $-\alpha$ değerlerine bağlıdır. Ayrıca tüm faktörlerin 0 konumunda olduğu merkez noktası da yıldız tasarımın içindedir. Faktör sayısının k olduğu merkezi bileşenli tasarımlarda eksenel nokta sayısı 2k+1 formülü ile hesaplanır.
- Tekrarlar: Merkezi bileşenli tasarımlarda hatayı saptamak için deney uzayının merkezinde yani orijin noktasında tekrarlı deneyler yapmak tercih edilir. Cevap yüzey metodolojisi genel olarak klasik istatistiği temel alır ve hata dağılımının homojen olduğu varsayılır. Tasarımdaki tekrar sayısı tipik olarak beştir ve n_0 ile gösterilir (Brereton, 2003).

Faktör sayısı k olan sistemler için oluşturulan merkezi bileşenli tasarımlarda deney sayısı $N = 2^k + (2k + 1) + n_0$ formülü ile hesaplanır. Üç faktörlü bir merkezi bileşenli tasarıma ait deney noktaları Şekil 2.11'de gösterilmiştir.



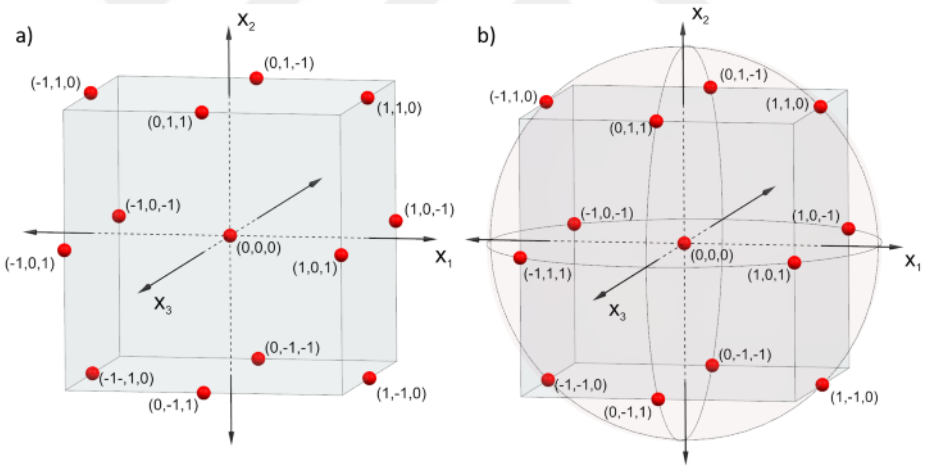
Şekil 2.11. Üç faktörlü bir merkezi bileşenli tasarım

Merkezi bileşenli tasarım, üç seviyeli tam faktöriyel tasarıma göre daha az deney gerektirdiği halde, sistemle ilgili oldukça fazla bilgi sunar. Tarama deneylerinde kullanılan iki seviyeli faktöriyel tasarım noktaları merkezi bileşenli tasarımın bir parçasıdır. Bu nedenle en baştan yeni plana göre deney yapmak yerine ekstra deneylerle iki seviyeli faktöriyel tasarımının merkezi bileşenli tasarıma dönüşmesi sağlanabilir. Böylece zaman ve kaynaklar daha tasarruflu kullanılmış olur (Zhang ve Xiaofeng, 2009).

Merkezi bileşenli tasarımda eksenel noktaların ve α değerinin seçimi sisteme göre ve amaca yönelik olarak değişir. Eksenel noktaların koordinat merkezinden uzak olması deneysel olarak uygulanabilir değilse veya sistemi zorluyorsa yüzeyel veya içe çizilmiş merkezi bileşenli tasarım kullanılarak deney uzayı daraltılır. α değerinin hesaplanışı, tasarımın sahip olması istenen özelliklere göre değişir. Örneğin, tasarımın dönebilir olması isteniyorsa eksenel noktanın konumu $\alpha = 2^{k\,4}$ formülü ile hesaplanır. Tasarımın dönebilir olması, bir noktadaki tayin varyansının sadece o noktanın merkeze uzaklığına bağlı olması demektir. Yani merkeze aynı uzaklıktaki tüm noktalardaki tayinin güvenilirliği, bulundukları yönden bağımsız olarak birbirine eşittir. Dönebilir tasarımlarda bir noktadaki tahmin güvenilirliği merkezden uzaklaştıkça azalır (Brereton, 2003; Massart ve ark., 1998).

2.2.2.2.3. Box-Behnken Tasarım (BBD)

Box-Behnken tasarım (Box-Behnken Design → BBD), ikinci dereceden modelleri oluşturmak için sık kullanılan tasarımlardan biridir. Şekil 2.12.a'da üç faktörlü bir sistem için uygulanan Box-Behnken tasarım gösterilmektedir. 3 faktör seviyesinin olduğu bu tasarım, aslında üç seviyeli tam faktöriyel tasarımın eksiltilmiş halidir. Tam faktöriyel tasarımdan çıkarılan noktalar, küpün köşelerine ve yüzeylerin merkezlerine denk gelir. Bu tasarımlarda da hatanın saptanabilmesi için merkez noktasında tekrarlar yapılır ve tekrar sayısı genellikle 3 veya 5 olarak tavsiye edilir. Faktör sayısı k olan sistemler için deney sayısı $N = 2k \times (k-1) + 1 + n_0$ formülü ile hesaplanır. Bu deney sayısı, merkezi bileşenli tasarımla elde edilen deney sayılarına çok yakındır ve elde edilen modelin açıklayıcılığı her iki tasarımda da benzerdir. Box-Behnken tasarım dönebilir özellikte olduğu için merkezi bileşenli tasarıma iyi bir alternatiftir (Myers ve ark., 2009).



Şekil 2.12. Üç faktörlü Box-Behnken tasarım

Box-Behnken tasarım her ne kadar bir küp üzerinde gösterilse de, kübik bir tasarım değildir. Deney noktalarının tamamı merkez noktadan eşit uzaklıktadır ve bu yüzden küresel bir tasarımdır. Box-Behnken tasarım noktalarının birleştirilmesiyle oluşturulan küresel deney uzayı Şekil 2.12.b'de sunulmuştur. Box-Behnken tasarımın bu özelliği bazı durumlarda avantajlı olabilir. Örneğin, bu ekstrem bölgeler deneysel olarak zorlayıcı koşullara denk geliyorsa, fiziksel olarak mümkün değilse veya maliyetliyse araştırmacı Box-Behnken tasarımı tercih edebilir (Komsta ve ark., 2018).

2.2.2.3. Modelleme

Bir deneyden elde edilen çıktı, deney koşullarına bağlı olarak değişecektir. Sistemin daha iyi anlaşılması, cevabın davranışının öngörülebilmesi, gerekirse cevabın optimize edilmesi için sistemdeki bağımlı değişken (cevap) ve bağımsız değişken (faktör) arasında bir ilişki kurmak gerekir. Faktörler ile cevap arasında kurulan bu matematiksel ilişkiye model, bu ilişkinin kurulmasına ise modelleme denir. Modelin oluşturulmasında fiziksel veya kimyasal bir yasa değil, deneysel olarak elde edilen cevaplar kullanıldığı için bu modeller ampirik model olarak da adlandırılırlar. Modeldeki terimlerin cevap üzerine daha fazla etki ettiğini anlamak ve bir faktörün değerinin değişmesiyle cevabın ne yönde değişeceğini öngörmek için bu modelin incelenmesi yeterlidir. Fakat bu gibi yorumları doğru olarak yapabilmek için faktör seviyelerinin kodlanmış olması gerekliidir. Böylece her faktör aynı ölçekte temsil edilir ve modeldeki katsayılar incelenerek aralarında karşılaştırma yapılabilir. Deneysel tasarım ve optimizasyon işlemlerinde faktörler ve cevap arasında kurulan ilişki genel olarak Eşitlik 2.6'daki gibi ifade edilir.

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^{k} \beta_i x_i + \sum_{i=1}^{k} \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{1 \le i \le j}^{k} \beta_{ij} x_i x_j \qquad \text{(Eşitlik 2.6)}$$

Bu eşitlikte y cevabı, β_0 kesim değerini, β_i doğrusal etki katsayısını, β_{ii} karesel etki katsayısını, β_{ij} faktörler arası etkileşim katsayısını, x_i ve x_j ise bağımsız değişkenleri göstermektedir. Cevap yüzey metodolojisinde modelleme, Eşitlik 2.6'daki katsayıların (β_0, β_i, β_{ii}, β_{ij}) saptanması anlamına gelir. Bu amaçla deney tasarımındaki her deneysel nokta için belirlenen faktör seviyelerinde deneyler gerçekleştirilerek y cevapları kaydedilir. Eşitlik 2.6'daki x_i ve x_j terimleri yerine ilgili faktörlerin seviyeleri; y yerine kaydedilen cevaplar yazılarak çoklu bir denklem sistemi elde edilir. Bu denklem sisteminin çözümü ile modeldeki tüm katsayılar tespit edilir. Bu model sayesinde deney yapmak zorunda kalmadan deney uzayındaki her bir noktada hangi cevabın alınacağı tespit edilebilir. Ayrıca cevabın belli bir değerde olması için faktör seviyelerinin ne olması gerektiği de belirlenebilir. Eşitlik 2.6'da sunulan model sisteme etki eden faktör sayısına göre uyarlanır. Örneğin, cevaba iki faktörün etki ettiği bir sistem için Eşitlik 2.7'de sunulan fonksiyon oluşturulur.

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{12}x_1x_2 \qquad \text{(Eşitlik 2.7)}$$

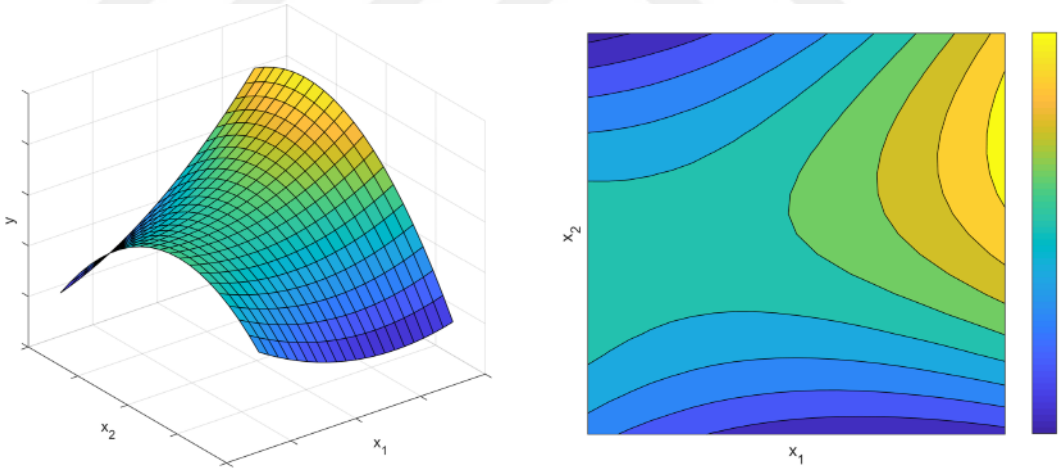
Bu modelde y cevabı, x_1 ve x_2 sırasıyla birinci ve ikinci faktörleri, b_0 kesim noktasını, b_1 ilk faktörün lineer etki katsayısını, b_2 ikinci faktörün lineer etki katsayısını, b_{11} ilk faktörün karesel etkisinin katsayısını, b_{22} ikinci faktörün karesel etkisinin katsayısını ve b_{12} iki faktör arasındaki etkileşimin katsayısını simgeler. Kesim noktası, faktörlerin 0 seviyesinde elde edilen cevabın değerine, yani deney uzayının merkez noktasındaki cevaba eşittir. Eğer bu fonksiyondaki karesel etki katsayıları sıfırdan farklıysa ($b_{11} \neq 0$; $b_{22} \neq 0$) bu model kuadratik model olarak adlandırılır. Kuadratik modellerin elde edilmeleri için üç seviyeli deney tasarımları kullanılır ve bu modellerin cevap grafiklerinde kavisler gözlemlenir. Bu kavisler sistemin maksimum veya minimum cevap verdiği bölgelerin teşhisine olanak verir. Bu yüzden optimal koşulların bulunması gerektiği durumlarda üç seviyeli deney tasarımları kullanılır. Karesel etki katsayıları sıfıra eşitse, bu model birinci derecedendir ve cevap üzerinde faktörlerin sadece doğrusal etkileri vardır. Birinci dereceden modellerin kullanım amacı optimal deney şartlarını bulmak değil, cevaba etkili olan faktörlerin ve faktör etkileşimlerinin tespit edilmesi ve incelenmesidir. Doğrusal modeller, iki seviyeli deney tasarımlarıyla elde edilirler. Eşitlik 2.7'deki faktörler arası etkileşim katsayısı sıfırdan farklıysa ($b_{12} \neq 0$), bu sistemde bir faktörün cevap üzerindeki etkisi, diğer faktörün seviyesine bağlı olarak değişir. Bu olay faktörler arası etkileşim olarak tanımlanır. Eşitlik 2.7'de verilen faktörler arası etkileşime sahip kuadratik eşitlikler, cevap yüzey metodolojisinde, pek çok sistem için en sık kullanılan modellerdir (Komsta ve ark., 2018; Massart ve ark., 2003).

Optimizasyon amaçlı cevap yüzey metodolojisinde kuadratik modellerin kullanımı genellikle yeterlidir. Üç ve daha yüksek dereceli modeller oldukça nadirdir ve sadece kuadratik modelin uygun olmadığına kesin olarak karar verilirse kullanılırlar. Bu modellerde terim sayısının artması çözümün karmaşıklaşmasına da neden olur. Fakat gerekli olduğu durumlarda üçüncü ve daha yüksek dereceden modeller de optimizasyon amacıyla kullanılabilir (Massart ve ark., 1998).

Modeldeki terimlerin hangilerinin daha anlamlı olduğunu değerlendirmek için yapılacak en basit işlem, model katsayılarının mutlak değerlerini karşılaştırmaktır. Bir terimin katsayısının mutlak değeri ne kadar büyükse, bu terimin cevap üzerine etkisi de o kadar güçlüdür. Fakat hangi terimlerin cevap üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik yaptığının saptanması için sadece gözlem yeterli olmaz. Bunun için istatistiksel testlerden yararlanılır (Brereton, 2003). Bir terime ait katsayı için hesaplanan t-değeri ne kadar büyükse, terimin cevap üzerine etkisi o kadar büyüktür. T-değeri t-tablo değerinden küçük olan katsayıların ise cevap üzerinde anlamlı etkileri yoktur (Brereton, 2003). Bunun dışında terime ait katsayı için hesaplanan p-değeri incelenerek de terimin cevap üzerinde anlamlı etkisinin olup olmadığına karar verilebilir. Her istatistiksel testte olduğu gibi, cevap yüzey metodolojisinde de modeldeki katsayıların anlamlılıklarının değerlendirilmesi için iki hipotez oluşturulur: Sıfır hipotezi (H_0: Model katsayısı = 0) ve alternatif hipotez (H_1: Model katsayısı $\neq$ 0). Eğer modeldeki bir katsayının p-değeri, seçilen α anlamlılık seviyesinden küçükse veya bu değere eşitse ($p \leq \alpha$) sıfır hipotezi reddedilir, alternatif hipotez kabul edilir. Model katsayısı 0'dan farklıdır, dolayısıyla söz konusu terim ile cevap arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki vardır. Eğer modeldeki katsayının p-değeri, seçilen anlamlılık seviyesinden büyükse ($p > \alpha$) sıfır hipotezi kabul edilir, alternatif hipotez reddedilir. Model katsayısı 0'a eşittir dolayısıyla söz konusu terimin cevap üzerine istatistiksel olarak anlamlı etkisi yoktur (Heiberger, 2015).

2.2.2.4. Cevap Yüzey Grafikleri

Sistemden elde edilen cevabın, faktörlerin bir fonksiyonu olarak çizilmesiyle elde edilen grafiklere cevap yüzeyi grafikleri denir. Cevap yüzey grafikleri, faktörlerin sisteme nasıl etki ettiğini görsel olarak sunar ve sistemin anlaşılmasını kolaylaştırırlar. Bu grafikler incelenerek faktörlerin doğrusal etkilerinin cevabı hangi yönde etkilediği, karesel etkisinin olup olmadığı, faktörler arasındaki ilişkinin cevap üzerinde ne kadar etkili olduğu anlaşılabilir ve sistemde ölçülen cevapların iyileştirilmesi de mümkün olur. İki faktörlü sistemlerin cevabı grafiksel olarak incelenirken kâğıt üzerinde üç eksen bulunur: faktörlere ait x_1 ve x_2 eksenleri ile cevaba ait y ekseni. Üç boyutlu olarak sunulan cevap yüzey grafiklerinin yanında iki boyutlu eş yükselti diyagramları de kullanılarak cevap davranışının daha kolay anlaşılması sağlanır. Şekil 2.13'te iki faktörlü bir modele ait cevap yüzey grafiği ve eş yükselti diyagramı sunulmuştur. Faktör sayısının ikiden fazla olduğu sistemlerde her faktör çifti için bir cevap yüzey grafiği oluşturulur.



Şekil 2.13. İki faktörlü bir modele ait cevap yüzey grafiği ve eş yükselti diyagramı

2.2.3. Kromatografik Cevap Fonksiyonu

Kromatografik sistemlerde seçilebilecek pek çok cevap mevcuttur. Bu cevaplar analizcinin ya da çalışılan kurumun isteklerine göre değişebilir. HPLC ve UPLC sistemlerinde genellikle kullanılan cevaplar şunlardır: alıkonma zamanı, ayırıcılık, pik simetrisi, kapasite faktörü, teorik tabaka sayısı, kolon basıncı, analiz zamanı (Massart ve ark., 2003). Araştırma amacına göre bu cevaplardan biri, birkaçı ya da hepsi cevap olarak seçilebilir. Cevaplardan sadece bir tanesinin seçimi genellikle başka bir cevaptan feragat edilmesine neden olabilir. Örneğin, sadece yüksek ayırıcılığın hedeflendiği bir cevap yüzey çalışmasında çok büyük ihtimalle analiz zamanı çok fazla uzayacak, belki de bu yüzden pik şekilleri bozulacaktır. Ya da kısa sürede analizin yapılmasını hedefleyen bir çalışmada ise ayırıcılık ve seçicilikten fedakârlık etmek gerekecektir. Bu yüzden bir kromatografik analiz yönteminin optimizasyonunda birden fazla cevabın seçimi gerekli olabilir. Böylece seçilen cevapların hepsinin birden olabildiğince istenene yakın olması mümkün olur. Bunu gerçekleştirebilmek için, bu faktörlerin geometrik ortalaması tek bir cevap olarak kullanılabilir (Derringer ve Suich, 1980). Diğer bir yaklaşımsa, kromatografik cevap fonksiyonları kullanmaktır. Kromatogramın kalitesini belirleyen ayırıcılık, seçicilik, pik şekli, analiz zamanı gibi kriterlerin hepsinin etki ettiği ölçülebilir bir sayısal değere dönüştürülebilir. Bu sayısal değer kromatografik cevap fonksiyonu (KCF) olarak adlandırılır (Komsta ve ark., 2018).

Kromatografik cevap fonksiyonlarının çoğunda, analitlerin ayrımını değerlendiren bir terim ve analiz zamanını değerlendiren bir terim bulunur (Divjak ve ark., 1998; Matos ve ark., 2013; Morris ve ark., 1996; Schlabach ve Excoffier, 1988). Tabi ki geliştirilen her KCF fonksiyonunun avantajları ve dezavantajları vardır. Örneğin Watson ve Carr'ın önerdiği KCF'de her pik çiftinin ayrım derecesi, cevaba aynı şekilde katkı sağlar (Watson ve Carr, 1979). Bu yüzden iki pikin tamamen ayrılmadığı fakat üçüncü pikin alıkonma zamanının çok yüksek olduğu şartlar da uygun cevap olarak kabul edilebilir (Komsta ve ark., 2018). Berridge'nin önerdiği KCF ise deneysel tasarımı oluşturan tüm kromatografik şartlarda piklerin tamamen ayrıldığı tasarımlar için oldukça uygundur. Fakat bu fonksiyonda tamamen çakışan bir

pik çiftiyle, kısmi olarak ko-elüe olan pik çiftinin cevaba katkısı aynıdır. Bu yüzden farklı derecelerde ko-elüsyonun gözlendiği deneysel tasarımlar için uygun bir cevap değildir (Berridge, 1982; Komsta ve ark., 2018).

Bu gibi örneklerden anlaşılabileceği gibi, tüm kromatografik çalışmalarda uygulanabilecek tek bir KCF yoktur. Bu yüzden de literatürde pek çok farklı KCF tanımlanmış ve uygulanmıştır (Alvarez-Segura ve ark., 2015; Jančić-Stojanović ve ark., 2011; Ortín ve ark., 2011; Peichang ve Hongxin, 1989). Araştırmacılar çalıştıkları sisteme ve hedefledikleri sonuca göre uygun bir KCF seçmelidir.

Bu tez çalışmasında, laboratuvarımızda daha önce de başarıyla kullanılmış ve farmasötik preparatların kromatografik ayrımı için uygun bulunan, Rakić ve arkadaşlarının geliştirdikleri, Eşitlik 2.8'de sunulan kromatografik cevap fonksiyonu tercih edilmiştir (Büker ve Dinç, 2017; Dinç ve ark., 2015; Rakić ve ark., 2012; Rouhani ve ark., 2017).

$$KCF = \left[a\left(1 - \frac{\sum_{i=1}^{N-1}\theta_{s,l}}{N-1}\right) + 1\right]\left[1 + \left(\frac{t_f}{t_{opt}}\right)^b\right]\left[1 + \frac{\sum w_i}{N}\right]^c \qquad \text{(Eşitlik 2.8)}$$

Bu eşitlikte; $\theta_{s,l}$ iki pik arasındaki ayrım derecesini, N beklenen pik sayısını, t_f son elüe olan pikin bitiş zamanını, t_{opt} istenen analiz zamanını, w_i taban çizgisindeki pik genişliğini, a, b ve c ise araştırmacı tarafından seçilecek katsayıları temsil etmektedir. Bu eşitlik, köşeli parantezler içinde verilen üç terimin bileşkesinden oluşmaktadır. Bu terimler sırasıyla ayrım, zaman ve pik genişliği ile ilişkilidirler. Yani bu KCF sadece ayrım ve analiz zamanını değil, pik genişliğini de dikkate alır.

İlk terim olan ayrım teriminde bulunan θ kriteri Carle'nin geliştirdiği bir fonksiyondur ve Eşitlik 2.9'da sunulmuştur (Carle, 1972).

$$\theta = 1 - \frac{H_v|t_{R,l} - t_{R,s}|}{|t_{R,v} - t_{R,s}||H_l - H_s| + H_s|t_{R,l} - t_{R,s}|} \qquad \text{(Eşitlik 2.9)}$$

Bu eşitlikte; θ iki pik arasındaki ayrım kriterini, $t_{R,v}$ piklerin birleştiği noktanın (vadinin) zamanını, H_v vadinin yüksekliğini, $t_{R,l}$ ve $t_{R,s}$ piklerin alıkonma zamanlarını, H_l ve H_s piklerin yüksekliklerini temsil etmektedir. θ kriterinin alabileceği değerler 0 ile 1 arasındadır. Tamamen çakışık pikler için $\theta = 0$ iken, tamamen ayrılmış pikleri için $\theta = 1$ olur. Bu yüzden θ'nın kullanıldığı kromatografik cevap fonksiyonlarında ayrımın çok fazla olması ve piklerin birbirinden çok uzak olması cevaba daha fazla katkı sağlamadığı için, optimizasyon uzun analiz süresine yol açmaz.

Eşitlik 2.8'de sunulan kromatografik cevap fonksiyonunda yüksek ayırıcılık, düşük taban genişliği ve kısa analiz zamanı olmak üzere üç farklı hedef aynı matematiksel eşitlikte kullanılır. Bir kromatografik yöntemin optimizasyonu sırasında, bağımlı değişken olarak bu fonksiyonun kullanılması ile optimal olarak saptanacak kromatografik şartların her üç hedefe de uygun olması sağlanmış olur.

3. BULGULAR

Bu doktora çalışmasında trimetoprim ile bir sülfonamid antibiyotiğinin ikili kombinasyonlarını içeren üç farklı veteriner preparatın kantitatif analizi için yeni aşırı performanslı sıvı kromatografisi yöntemleri geliştirilmiştir. Bu yöntemlerin geliştirilmesinde, kromatografik deneysel koşulların optimizasyonu için cevap yüzey metodolojisine dayanan farklı deney tasarımları ve buna bağlı olarak farklı matematiksel modeller kullanılmıştır. Kromatografik koşulların çok değişkenli optimizasyonunda, analit piklerinin dar bant genişliğini ve yeterli ayrımını en kısa sürede sağlayan bir cevap fonksiyonu kullanılmıştır. Cevap yüzey metodolojisine dayanarak saptanan kromatografik deneysel şartlar, analiz edilen her karışım için geliştirilen aşırı performanslı sıvı kromatografisi yönteminin optimal deneysel şartları olarak uygulanmıştır. Yeni geliştirilen UPLC yöntemlerinin validasyon çalışmaları tamamlandıktan sonra bu yöntemler iki bileşenli ticari veteriner preparatların analizlerine uygulanmıştır.

Bu tez çalışması kapsamında, sırasıyla sülfadiazin-trimetoprim, sülfadoksin-trimetoprim ve sülfadimidin-trimetoprim kombinasyonlarını içeren veteriner formülasyonlarındaki etken maddelerin, sabit faz olarak bir kolonun ve organik ve inorganik çözücü karışımlarından oluşan hareketli faz sistemlerinin kullanıldığı kromatografik ayrımı ve miktar tayinleri için yapılan çalışmalara ait deneysel bulgular sunulmaktadır. Bu tez çalışmasında analiz edilen her karışım için izlenen yol, yöntemlerin cevap yüzey metodolojisiyle optimizasyonları ile yöntemlerin validasyonlarından oluşan yöntem geliştirme basamağı ve geliştirilen analitik yöntemlerin gerçek numune analizine uygulanmaları şeklindedir.

3.1. SDZ ve TMP Karışımının Analizi

Tez çalışmasında SDZ (sülfadiyazin) ve TMP (trimetoprim) etken maddelerini içeren katı dozaj formundaki veteriner preparatın kantitatif analizinde kullanılmak üzere bir UPLC yöntemi geliştirmek hedeflenmiştir. Analiz yönteminin geliştirilmesinde yeterli kromatografik ayrımı en kısa sürede sağlayan kromatografik şartların saptanması için cevap yüzey metodolojisi kullanılmıştır. Cevap yüzey metodolojisi sırasında farklı deneysel tasarım modelleri kullanılarak, birbirinden farklı iki kromatografik şart elde edilmiştir. Bu şartlar kullanılarak geliştirilen UPLC yöntemleri, analitik validasyon çalışmalarından sonra ticari preparatların analizine uygulanmıştır.

3.1.1. UPLC Yönteminin Optimizasyonu

Yöntem optimizasyonunda ön deneyler: Analitik bir yöntemin geliştirilmesinde deneysel tasarım ve optimizasyon çalışmalarında cevap üzerine etki eden faktörler kalitatif ve kantitatif olarak iki grup içerisinde sınıflandırılabilir. SDZ ve TMP karışımına ait ön deneyler kapsamında, kalitatif ve kantitatif faktörlerin etkilerinin incelendiği çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bu tez çalışmasında yöntem geliştirme basamağında kalitatif kromatografik şartlardan olan kolon türü ve hareketli fazı oluşturan bileşenlerin türlerinin seçimi için cevap yüzey metodolojisi kullanılmamıştır. Ancak kromatografik yöntemlerin geliştirilmesinde, deneysel tasarım ve optimizasyon çalışmaları kantitatif faktör üzerinden gerçekleştirilmiştir.

SDZ-TMP kombinasyonunun analizi için yapılan ön denemelerde, laboratuvarda bulunan Waters Acquity marka BEH C_{18} (130Å, 1,7 µm, 2,1 mm x 100 mm) kolon ile hareketli fazı oluşturan organik ve inorganik bileşenlerin karışımlar kullanılarak etken maddelerin piklerinin alıkonma zamanları ve pik şekilleri araştırılmıştır. İlk önce hareketli faz sisteminde organik faz bileşenleri olarak asetonitril ve metanol test edilmiştir. Hareketli fazda asetonitril ile bir inorganik çözelti kullanıldığında SDZ ve TMP piklerinin ayrımı düşük olduğu için organik bileşen

olarak metanol kullanılmasının uygun olacağı sonucuna varılmıştır. İnorganik bileşen olarak formik asit ve sodyum format (HCOOH+HCOONa) karışımından oluşan tampon sisteminin kullanılması uygun bulunmuştur. Ayrıca tampon derişiminin ayrım üzerine etkisi incelenmiştir. Tampon sisteminin derişiminin analitlerin ayrımı üzerine belirgin bir etkisi olmadığı gözlenmiştir. Bu yüzden analiz işlemlerinde analitik kolon ve kromatografik cihazın daha uzun ömürlü kullanılabilmesi amacıyla hareketli fazda HCOOH+HCOONa tampon sisteminin derişiminin 20 mM olması uygun bulunmuştur. Ayrıca çalışmanın ön deneylerinde numune çözücüsü, enjeksiyon hacmi, numune odası sıcaklığı ve bileşiklerin dedeksiyonu için dalga boyu seçimi çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalar sonucunda belirlenen parametreler Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. SDZ ve TMP karışımının kromatografik analizleri için belirlenen parametreler

Analitik kolon	:	C_{18} 100 mm (130Å, 1,7 µm, 2,1 mm)
Hareketli faz	:	Metanol ve 20 mM HCOOH+HCOONa tamponu
Numune çözücüsü	:	Metanol: su (50:50, h/h)
Enjeksiyon hacmi	:	1 µL
Numune odası sıcaklığı	:	15 °C
Dedeksiyon dalga boyu	:	245 nm

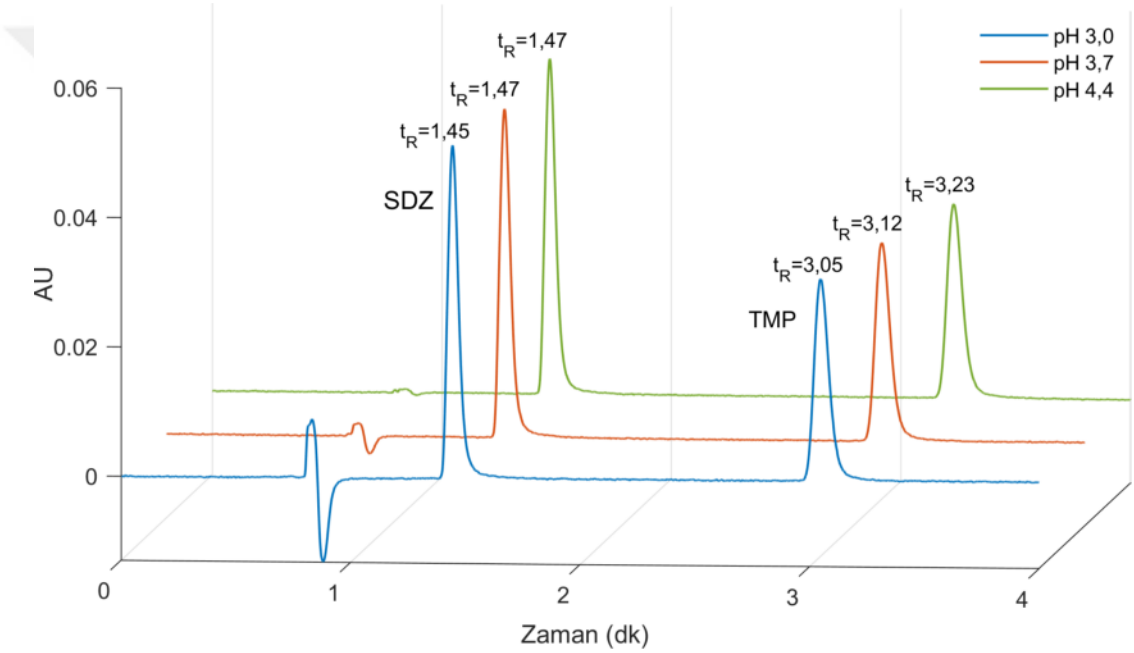
Faktörlerin seçimi ve seviyelerinin belirlenmesi: Daha sonraki deneysel çalışmalarda, hareketli fazdaki tampon oranı, kolon sıcaklığı ve akış hızının sabit tutulduğu kromatografik şartlarda, kullanılan HCOOH+HCOONa tamponunun pH değerinin SDZ ve TMP bileşiklerinin piklerinin ayrımı üzerine etkisi test edilmiştir. Bu test işleminde üç farklı pH (3,0, 3,7 ve 4,4) değerinde elde edilen kromatogramlar Şekil 3.1'de sunulmaktadır. Bu şekilden görüldüğü gibi tamponun pH değerinin etken madde piklerinin alıkonma süresi üzerine anlamlı bir etkisinin olmadığı sonucuna varılmıştır. Ancak hareketli fazda pH 4,4'teki sodyum format tampon sistemi kullanıldığında daha düşük şiddetli çözücü piki gözlenmiştir (Şekil 3.1). Bu nedenle hareketli faz sisteminde kullanılacak HCOOH+HCOONa tamponu için uygun değer pH 4,4 olarak seçilmiştir.

Hareketli fazdaki tampon yüzdesinin SDZ ve TMP bileşiklerinin alıkonma süreleri üzerine etkisini gözlemlemek ve deney tasarımındaki seviyelerini belirlemek için %55 ve %80 tampon içeren hareketli fazlar kullanılarak iki enjeksiyon yapılmıştır. 20 mM sodyum format tamponunun (pH 4,4) hareketli fazdaki yüzdesi dışında kalan diğer kromatografik şartların sabit tutulduğu (akış hızı 0,15 mL/dk; kolon sıcaklığı: 25°C) şartlarda 245 nm'de kaydedilen kromatogramlar Şekil 3.2'de sunulmuştur. Bu kromatogramlardan, tampon oranı %55 iken SDZ ve TMP bileşiklerinin kromatografik ayrımının tam olarak gerçekleşmediği ve alıkonma zamanlarının sırasıyla 1,84 dk ile 2,00 dk olduğu görülmektedir. Tampon oranı %80 olduğunda ise SDZ'nin alıkonma zamanı 3,29 dk ve TMP'nin alıkonma zamanının 8,49 dk olduğu gözlenmektedir. Hareketli fazdaki tampon yüzdesinin SDZ ve TMP'nin ayrımı üzerinde oldukça etkili olması nedeniyle cevap yüzey metodolojisindeki faktörlerden biri olmasına karar verilmiştir.

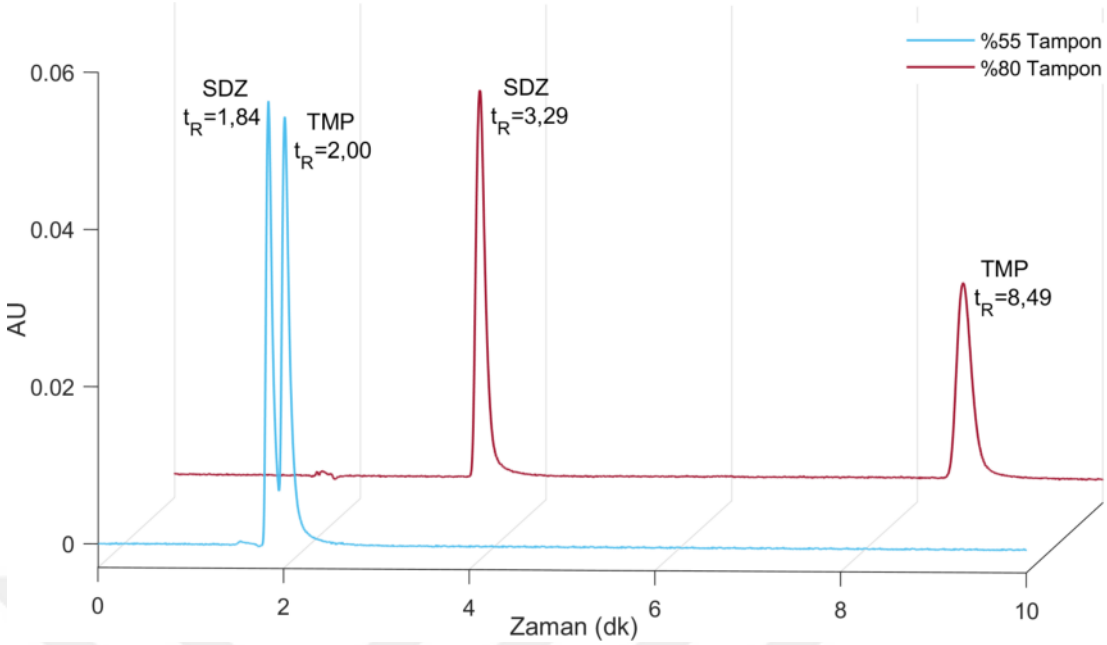
Kolon sıcaklığının aktif bileşiklerin (SDZ ve TMP) kromatografik ayrımı üzerine etkisini görmek için, diğer kromatografik faktörlerin sabit tutulduğu (%80 pH 4,4 sodyum format tamponu (20 mM) ve %20 metanol; akış hızı 0,15 mL/dk) ön çalışmalar yapılmıştır. Bu amaçla, kolon sıcaklığı 25 °C ve 45 °C olan koşullarda gerçekleştirilen iki farklı enjeksiyon ile Şekil 3.3'te sunulan kromatogramlar elde edilmiştir. İki farklı sıcaklıkta elde edilen kromatogramlardan da görüldüğü gibi, analiz edilen bileşiklerin kromatografik ayrımı, kolon sıcaklığına göre değişmektedir. 25 °C kolon sıcaklığında alıkonma zamanları SDZ için 3,28 dk ve TMP için 8,50 dk olarak belirlenmiştir. Oysa ve 45 °C'deki kolon sıcaklığında SDZ için 2,92 dk ve TMP için 6,38 dk alıkonma zamanları ile bileşenlerin kromatografik ayrımının gerçekleştiği gözlenmiştir. Dolayısıyla, kolon sıcaklığının bileşenlerin kolondaki alıkonmaları ve ayrımları üzerinde etkili olması nedeniyle, cevap yüzey metodolojisindeki faktörlerden biri olması uygun bulunmuştur.

Akış hızının SDZ ve TMP bileşiklerinin kromatografik davranışları üzerine etkisini test etmek ve deney tasarımındaki seviyelerini belirlemek için, diğer kromatografik şartların sabit tutulduğu (%80 20 mM sodyum format tamponu (pH 4,4) ve %20 metanol; kolon sıcaklığı: 25°C) fakat hareketli faz akış hızının 0,15 mL/dk ve

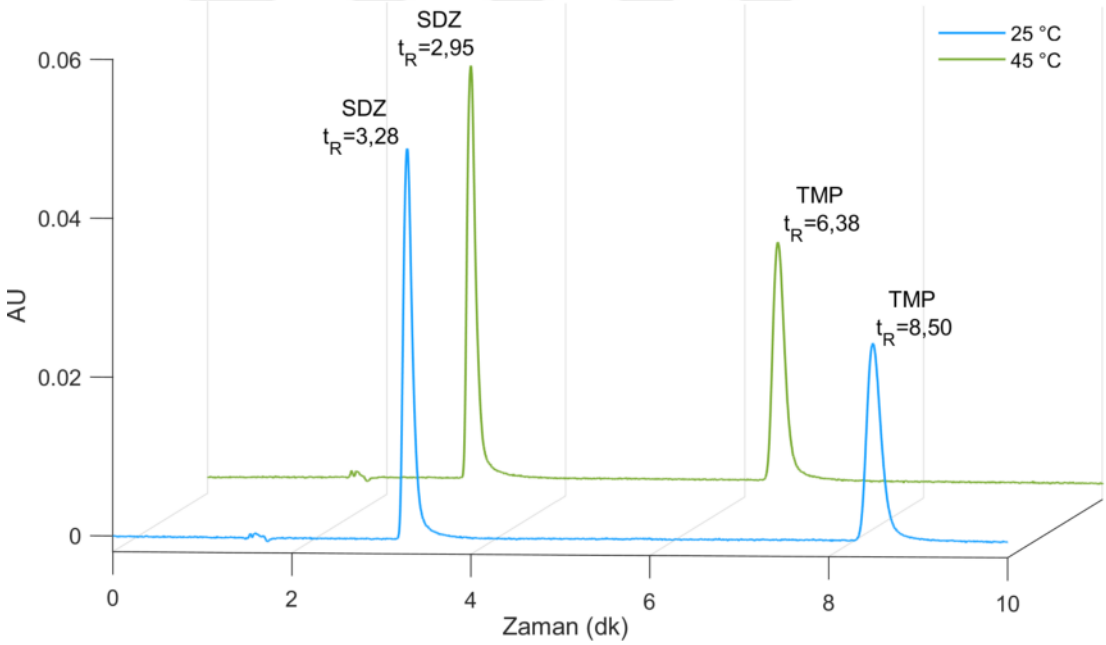
0,30 mL/dk olarak ayarlandığı iki farklı enjeksiyon yapılmıştır. Bu enjeksiyonların 245 nm'de kaydedilen kromatogramları Şekil 3.4'te sunulmaktadır. Bu şekilden görüldüğü üzere, hareketli fazın akış hızı SDZ ve TMP'nin alıkonma zamanlarına ve ayrım derecelerine etki etmektedir. 0,15 mL/dk akış hızıyla elde edilen kromatogramda SDZ ve TMP için alıkonma zamanları sırasıyla 3,29 dk ve 8,50 dk olarak; 0,30 mL/dk akış hızıyla ise 1,67 dk ve 8,50 dk olarak belirlenmiştir. Akış hızının kromatografik ayrım üzerine etki ettiği görüldüğü için bu parametrenin cevap yüzey metodolojisindeki faktörlerden biri olmasına karar verilmiştir.



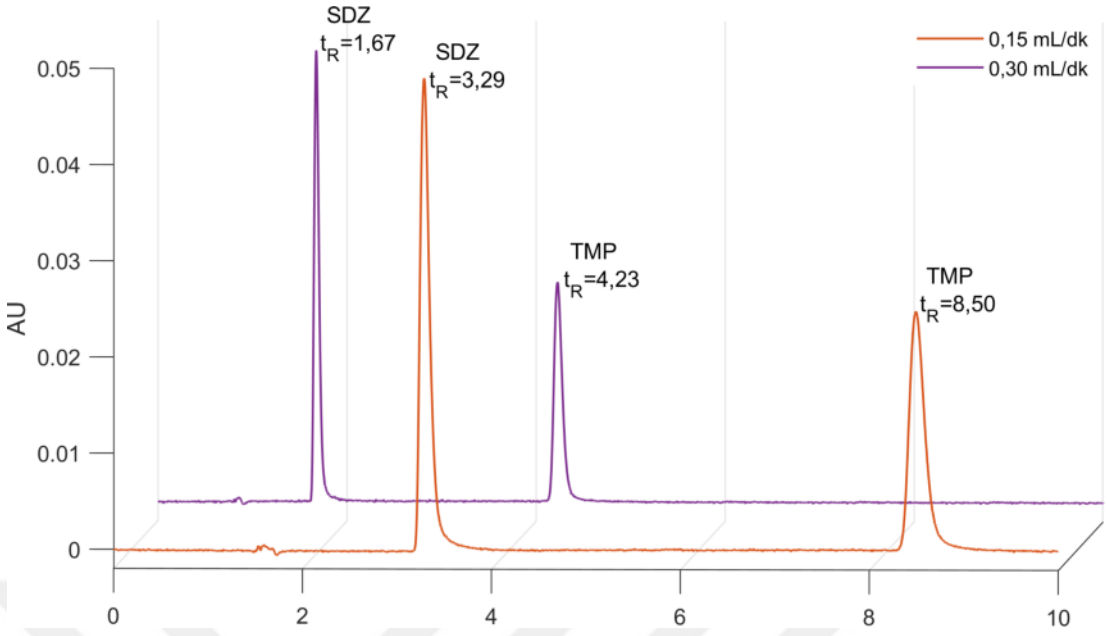
Şekil 3.1. Hareketli faz sistemindeki tamponun pH değerinin SDZ ve TMP ayrımına etkisini gösteren kromatogramlar



Şekil 3.2. Hareketli faz sistemindeki tampon yüzdesinin SDZ ve TMP ayrımına etkisini gösteren kromatogramlar



Şekil 3.3. Kolon sıcaklığının SDZ ve TMP ayrımına etkisini gösteren kromatogramlar



Şekil 3.4. Akış hızının SDZ ve TMP ayrımına etkisini gösteren kromatogramlar

Yukarıda bahsedilen ön deneme çalışmalarıyla tespit edilen ve SDZ-TMP kombinasyonunun analizinde bileşenlerin kromatografik ayrımı üzerine etki eden faktörlerin listesi aşağıda sunulmuştur:

1) Kolon sıcaklığı (°C)
2) Hareketli fazdaki tampon yüzdesi (%)
3) Hareketli fazın akış hızı (mL/dk)

Seçilen faktörler üzerine yapılan ön denemelerde, hareketli fazdaki 20 mM format tamponu için %55-80 aralığı, kolon sıcaklığı için 25-45 °C aralığı ve akış hızı için 0,10-0,30 mL/dk aralığı test edilmiştir. Faktörlerin ön denemelerdeki çalışma aralıkları ve faktör etkileşimlerinin kromatografik ayrım ve analiz zamanı üzerine etkileri de dikkate alınarak, faktör seviyeleri olarak kolon sıcaklığı için 30-50 °C, 20 mM format tamponunun hareketli fazdaki oranı için %52-78 ve hareketli fazın akış hızı için 0,16-0,28 mL/dk aralıklarının uygun olacağı tayin edilmiştir. Saptanan bu aralıklar -1, 0, ve +1 olmak üzere üç seviye için düzenlenmiştir. SDZ-TMP karışımının analizi için tam faktöriyel ve Box-Behnken tasarımlarının kullanıldığı cevap yüzey metodolojisindeki faktörler ve bu faktörlerin seviyeleri (-1, 0, +1) Çizelge 3.2'de sunulmuştur.

Çizelge 3.2. SDZ ve TMP için uygulanan FFD ve BBD tasarımlarında kullanılan faktörler ve bu faktörlerin seviyeleri

	x_1	x_2	x_3
Seviye	Kolon sıcaklığı (°C)	Tampon (%)	Akış hızı (mL/dk)
-1	30,0	52,0	0,16
0	40,0	65,0	0,22
+1	50,0	78,0	0,28

Çizelge 3.2'de sunulan faktör seviyeleri aynı zamanda merkezi bileşenli tasarımdaki -1, 0 ve +1 seviyeleri olarak da kullanılmıştır. Merkezi bileşenli tasarımın doğası gereği, her faktör için -1, 0 ve +1 seviyelerinin dışında $-\alpha$ ve $+\alpha$ seviyelerinin de belirlenmesi gerekir. SDZ ve TMP bileşikleri ile yapılan bu çalışmada, kromatografik sistemi zorlayıcı şartlar oluşmadan deney uzayını genişletmek mümkün olduğu için $-\alpha$ ve $+\alpha$ seviyeleri 1'den büyük ve koordinat merkezinden uzak olacak biçimde belirlenmiştir. α değeri tasarımın döndebilir özellikte olması için $\alpha = 2^{k\,4} = 2^{3\,4} \cong 1{,}682$ formülü ile hesaplanmıştır. Bu formüle ve her bir faktör için -1 ile +1 aralığına karşılık gelen deneysel sınırlara göre hesaplanmış olan merkezi bileşenli tasarıma ait faktör seviyeleri Çizelge 3.3'te sunulmuştur.

Çizelge 3.3. SDZ ve TMP için uygulanan CCD tasarımında kullanılan faktörler ve bu faktörlerin seviyeleri

	x_1	x_2	x_3
Seviye	Kolon sıcaklığı (°C)	Tampon (%)	Akış hızı (mL/dk)
$-\alpha$	23,2	43,1	0,12
-1	30,0	52,0	0,16
0	40,0	65,0	0,22
+1	50,0	78,0	0,28
$+\alpha$	56,8	86,9	0,32

SDZ ve TMP karışımının analizine yönelik UPLC yöntemlerinin geliştirilmesinde, optimal kromatografik şartların belirlenmesi için Çizelge 3.2'de sunulan faktör seviyelerine göre oluşturulan tam faktöriyel ve Box-Behnken tasarımlar; Çizelge 3.3'te sunulan faktör seviyelerine göre oluşturulan merkezi

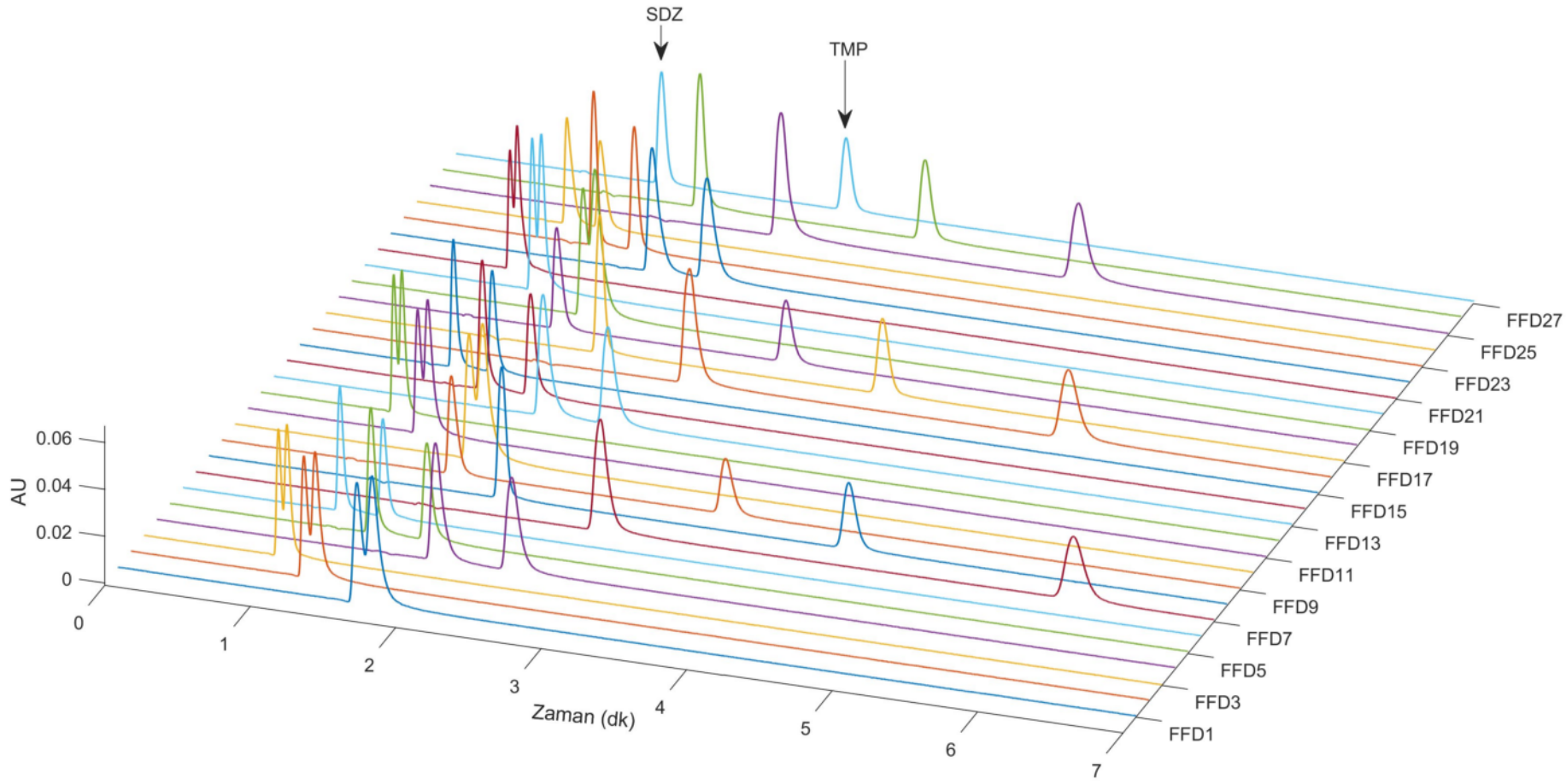
bileşenli tasarım kullanılarak cevap yüzey metodolojisi uygulanmış ve optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

3.1.1.1. Tam Faktöriyel Tasarım ve Yöntem Optimizasyonu

SDZ-TMP karışımının analizi için UPLC yöntemi geliştirilmesinde, yöntemin faktöriyel tasarım ile optimizasyonu için, Çizelge 3.2'de sunulan faktör seviyeleri kullanılmıştır. Tam faktöriyel tasarıma göre üç faktör ve üç seviye kullanıldığında deney sayısı $3^3 = 27$ olduğu için deneysel tasarım buna göre düzenlenmiştir. Tam faktöriyel deneysel tasarıma göre planlanan tasarım matrisi Çizelge 3.4'te sunulmuştur. 20 µg/mL SDZ ve 20 µg/mL TMP içeren numune, Çizelge 3.4'te verilen 27 farklı kromatografik koşul kullanılarak UPLC sistemine enjekte edilmiştir. Bu enjeksiyonlara ait 245 nm'de kaydedilen kromatogramlar Şekil 3.5'te verilmiştir. Elde edilen kromatogramların her biri için zaman ekseninde pik başlangıç ve pik bitiş noktaları, alıkonma zamanları, varsa vadi noktaları kaydedilmiştir. Piklerin zirve noktalarının ve varsa vadi noktasının y eksenindeki karşılıkları da kaydedildikten sonra her bir kromatograma ait kromatografik cevap fonksiyonu (KCF) değerleri hesaplanmıştır. Her bir kromatografik şart için hesaplanan KCF değerleri, Çizelge 3.4'te "Ölçülen" sütununda listelenmiştir. Modelleme sonrasında her deney için ampirik modelle hesaplanan KCF değerleri, aynı çizelgede "Tahmin edilen" sütununda, ölçülen ve tahmin edilen değerler arasındaki fark ise "Artık" sütununda verilmiştir.

Çizelge 3.4. Tam faktöriyel tasarım matrisi ile ölçülen, tahmin edilen ve artık KCF değerleri

	x_1 Kolon sıcaklığı (°C)	x_2 Tampon (%)	x_3 Akış hızı (mL/dk)	KCF Ölçülen	KCF Tahmin edilen	Artık
FFD1	-1	-1	-1	4,3975	4,4033	-0,0058
FFD2	-1	-1	0	3,9271	3,9265	0,0006
FFD3	-1	-1	+1	3,7707	3,7713	-0,0006
FFD4	-1	0	-1	2,7492	2,7508	-0,0016
FFD5	-1	0	0	2,3605	2,3536	0,0069
FFD6	-1	0	+1	2,2813	2,2780	0,0033
FFD7	-1	+1	-1	2,9273	2,9271	0,0002
FFD8	-1	+1	0	2,6088	2,6093	-0,0005
FFD9	-1	+1	+1	2,6108	2,6133	-0,0025
FFD10	0	-1	-1	4,5365	4,5318	0,0047
FFD11	0	-1	0	4,0713	4,0612	0,0101
FFD12	0	-1	+1	3,9014	3,9124	-0,0110
FFD13	0	0	-1	2,7806	2,7852	-0,0046
FFD14	0	0	0	2,3978	2,3942	0,0036
FFD15	0	0	+1	2,3241	2,3249	-0,0008
FFD16	0	+1	-1	2,8681	2,8673	0,0008
FFD17	0	+1	0	2,5549	2,5558	-0,0009
FFD18	0	+1	+1	2,5640	2,5660	-0,0020
FFD19	+1	-1	-1	4,6438	4,6348	0,0090
FFD20	+1	-1	0	4,1523	4,1705	-0,0182
FFD21	+1	-1	+1	4,0390	4,0279	0,0111
FFD22	+1	0	-1	2,7881	2,7941	-0,0060
FFD23	+1	0	0	2,4064	2,4093	-0,0029
FFD24	+1	0	+1	2,3484	2,3462	0,0022
FFD25	+1	+1	-1	2,7852	2,7820	0,0032
FFD26	+1	+1	0	2,4782	2,4768	0,0014
FFD27	+1	+1	+1	2,4935	2,4932	0,0003



Şekil 3.5. SDZ ve TMP için tam faktöriyel tasarıma göre elde edilen kromatogramlar

Çizelge 3.4'te sunulan ölçülen KCF değerleri ile bağımsız değişkenler arasındaki ilişkiyi modellemek için, en küçük kareler tekniğinden yararlanılarak ikinci dereceden polinomiyal bir fonksiyon oluşturulmuştur. Bu modeldeki terimlerin katsayıları ile katsayılara ait t-test ve p-değerleri Çizelge 3.5'te verilmiştir.

Çizelge 3.5. SDZ-TMP için FFD ile elde edilen ampirik modele ait katsayılar ve istatistiksel sonuçları

	Katsayı	t-test	p-değeri
Kesim değeri	2,394	618,23	1,94 x10-38
x_1	0,028	15,55	1,74 x10-11
x_2	-0,753	-419,87	1,39 x10-35
x_3	-0,230	-128,39	7,73 x10-27
x_1^2	-0,013	-4,10	7,44 x10-4
x_2^2	0,914	294,46	5,8 x10-33
x_3^2	0,161	51,80	3,73 x10-20
x_1x_2	-0,094	-42,88	9,05 x10-19
x_1x_3	0,006	2,85	1,12 x10-2
x_2x_3	0,080	36,22	1,55 x10-17

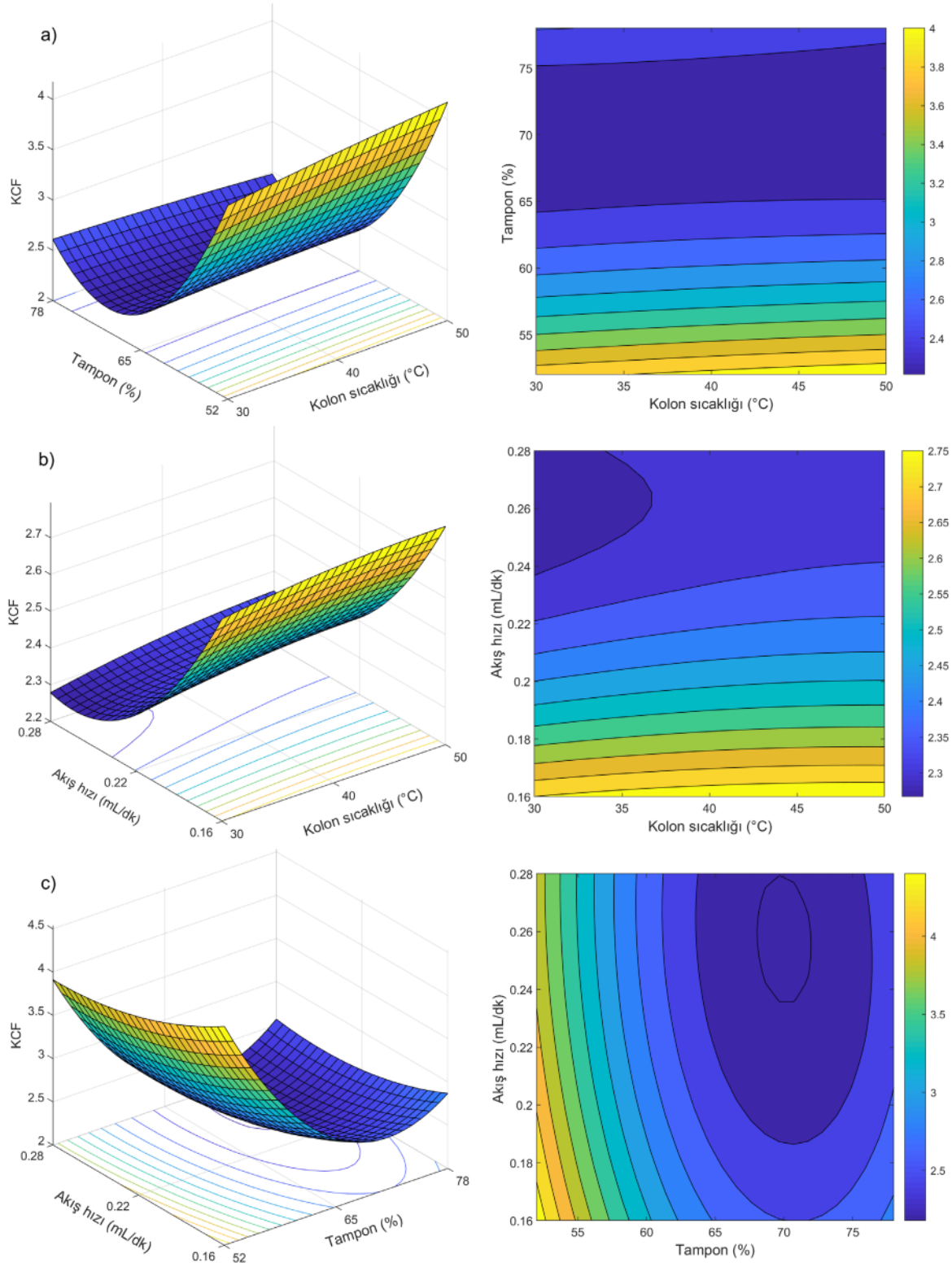
Çizelge 3.5'te görüldüğü üzere, modeldeki her terimin p-değeri, bu çalışmada seçilen anlamlılık seviyesi olan $\alpha = 0,05$'ten küçüktür ve t-test değerleri 2,11 olan t-tablo değerinden büyüktür. Yani 0,05 anlamlılık düzeyinde tüm terimler anlamlı derecede cevap üzerine etki etmektedir. Bu yüzden kromatografik cevabın modellenmesinde, tüm terimlerin kullanıldığı bir model gereklidir. Bu terimler kullanılarak oluşturulan matematiksel model Eşitlik 3.1'de verilmiştir.

$$y = 2,394 + 0,028x_1 - 0,753x_2 - 0,230x_3 - 0,013x_1^2 + 0,914x_2^2 + 0,161x_3^2 - 0,094x_1x_2 + 0,006x_1x_3 + 0,080x_2x_3$$

(Eşitlik 3.1)

Bu modelde y kromatografik cevap faktörünü, x_1, x_2 ve x_3 sırasıyla kolon sıcaklığı, tampon yüzdesi ve akış hızı değişkenlerinin doğrusal terimlerini, x_1^2, x_2^2 ve x_3^2 bu değişkenlerin karesel terimlerini, x_1x_2, x_1x_3 ve x_2x_3 ise bu değişkenlerin etkileşim terimlerini temsil etmektedir.

Tam faktöriyel tasarım kullanılarak elde edilen ve faktörlerin KCF üzerine olan ikili etkilerini gösteren cevap yüzey grafikleri ve eş yükselti diyagramları Şekil 3.6'da sunulmuştur. Bu şekil incelendiğinde, seçilen faktörlerin ve faktör etkileşimlerinin KCF üzerine genel olarak farklı oranlarda etki ettiği görülmektedir. Şekil 3.6.a'dan tampon yüzdesinin düşük seviyelerinde yüksek KCF değerlerine ulaşıldığı, %70 tampon seviyesinde düşük KCF değerleri elde edildiği gözlenmektedir. Aynı şekil incelendiğinde tampon yüzdesinin cevap üzerine etkisinin kolon sıcaklığının etkisine göre çok daha fazla olduğu görülmektedir. Grafikteki iç bükeylik tampon yüzdesi ekseninde olduğuna göre, bu faktörün karesel etkisi de cevap üzerinde oldukça etkilidir. Eş yükselti diyagramında görülen kolon sıcaklığı eksenine hemen hemen paralel olan çizgiler, bu faktörün cevaba etkisinin daha az olduğunu göstermektedir. Şekil 3.6.b'de akış hızının arttıkça KCF değerinin azaldığı görülmektedir. Aynı şekilden kolon sıcaklığı artışının KCF değerini az da olsa arttırdığı görülmektedir. Akış hızı eksenindeki iç bükeylik, akış hızının cevap üzerinde karesel bir etkisi olduğu anlamına gelir. Eş yükselti diyagramında hemen hemen birbirine paralel olan çizgiler, bu iki parametreden cevap üzerinde daha etkili olanın akış hızı olduğunu göstermektedir. Bu çizgilerin paralellikten uzaklaştığı bölge olan yüksek akış hızı değerlerinde, kolon sıcaklığının değişimiyle cevaptaki değişimin de arttığı gözlenmektedir. Bu durum düşük sıcaklık ve yüksek akış bölgesinde iki faktörün arasındaki etkileşimin de cevabı daha çok etkilediği anlamına gelir. Şekil 3.6.c'de akış hızının yüksek ve tampon yüzdesinin orta-yüksek olduğu bölgelerde KCF değerinin düşük değerler aldığı görülmektedir. Eş yükselti diyagramındaki yuvarlağa yakın eğriler, her iki faktörün de cevap üzerinde karesel etkisi olduğunu ve bu etkileri temsil eden terimlerin modelde aynı işarete sahip olduğunu göstermektedir. Bu yuvarlak çizgilerin elipse benziyor oluşu, akış hızı ve tampon yüzdesi faktörlerinin etkileşiminin de cevap üzerinde etkili olduğu anlamına gelmektedir.



Şekil 3.6. SDZ-TMP için FFD ile elde edilen a) kolon sıcaklığı-tampon yüzdesi ile KCF, b) akış hızı-kolon sıcaklığı ile KCF, c) tampon yüzdesi-akış hızı ile KCF arasındaki ilişkiyi gösteren yüzey grafikleri ve eş yükselti diyagramları

Eşitlik 3.1'de verilen model kullanılarak saptanan bağımsız değişkenlerin optimal değerleri Çizelge 3.6'da sunulduğu gibi hesaplanmıştır. Optimal olarak saptanan bu faktör değerlerinin cevap yüzey grafikleriyle de uyumlu olduğu gözlenmiştir.

Çizelge 3.6. SDZ-TMP karışımı için FFD tasarımla elde edilen optimal kromatografik şartlar

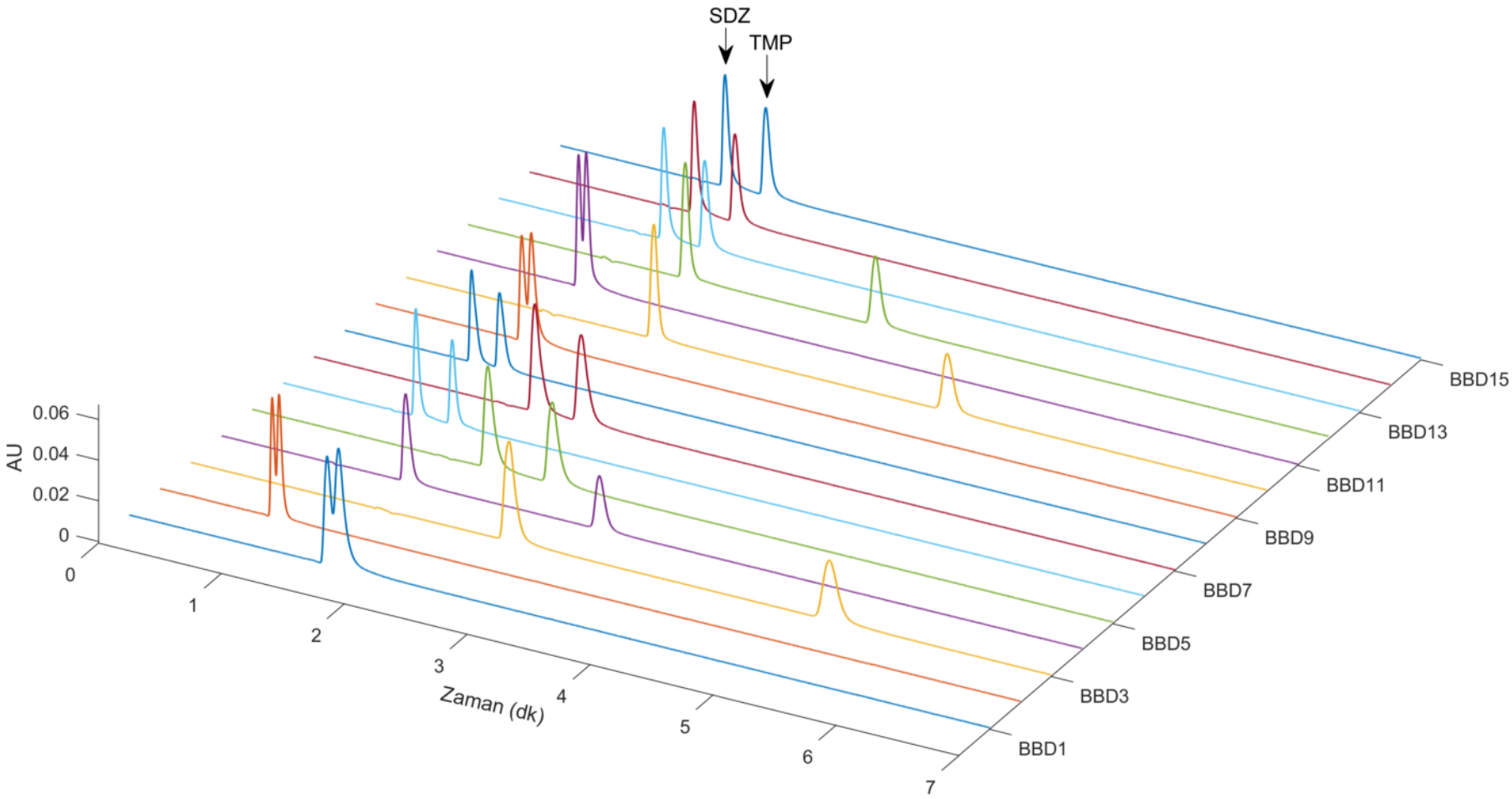
	Faktör adı	Optimal değer
x_1	Kolon sıcaklığı (°C)	38,5
x_2	Tampon yüzdesi (%)	69,9
x_3	Akış hızı (mL/dk)	0,26

3.1.1.2. Box-Behnken Tasarım ve Yöntem Optimizasyonu

SDZ-TMP karışımının analizi için UPLC yöntemi geliştirilmesinde, yöntemin Box-Behnken tasarım ile optimizasyonu için, Çizelge 3.2'de sunulan faktör seviyeleri kullanılmıştır. Üç faktörlü Box-Behnken tasarıma göre, merkez noktadaki tekrar sayısının üç olduğu bir tasarım matrisi oluşturularak Çizelge 3.7'de sunulmuştur. Box-Behnken tasarımda deney sayısı $N = 2k \times (k-1) + 1 + n_0$ formülü ile hesaplandığı için bu çizelgedeki deney sayısı 15'tir. 20 µg/mL SDZ ve 20 µg/mL TMP içeren numune, Çizelge 3.7'de verilen 15 kromatografik koşul kullanılarak UPLC sistemine enjekte edilmiştir. Bu enjeksiyonlara ait 245 nm'de kaydedilen kromatogramlar Şekil 3.7'de verilmiştir. Elde edilen kromatogramların her biri için zaman eksenindeki pik başlangıç ve pik bitiş noktaları, alıkonma zamanları, varsa vadi noktaları kaydedilmiştir. Piklerin zirve noktalarının ve vadi noktasının y eksenindeki karşılıkları da kaydedildikten sonra her bir kromatograma ait kromatografik cevap fonksiyonu (KCF) değerleri hesaplanmıştır. Her bir kromatografik şart için hesaplanan KCF değerleri, Çizelge 3.7'de "Ölçülen" sütununda listelenmiştir. Modelleme sonrasında her deney için ampirik modelle hesaplanan KCF değerleri, aynı çizelgede "Tahmin edilen" sütununda, ölçülen ve tahmin edilen değerler arasındaki fark ise "Artık" sütununda verilmiştir.

Çizelge 3.7. Box-Behnken tasarım matrisi ile ölçülen, tahmin edilen ve artık KCF değerleri

	x_1	x_2	x_3	KCF		
	Kolon sıcaklığı (°C)	Tampon (%)	Akış hızı (mL/dk)	Ölçülen	Tahmin edilen	Artık
BBD1	0	-1	-1	4,5210	4,5143	0,0067
BBD2	0	-1	+1	3,7360	3,7388	-0,0028
BBD3	0	+1	-1	2,8410	2,8383	0,0028
BBD4	0	+1	+1	2,6320	2,6388	-0,0067
BBD5	-1	0	-1	2,8190	2,8253	-0,0063
BBD6	-1	0	+1	2,2970	2,2938	0,0033
BBD7	+1	0	-1	2,7220	2,7253	-0,0032
BBD8	+1	0	+1	2,2880	2,2818	0,0062
BBD9	-1	-1	0	3,9440	3,9445	-0,0005
BBD10	-1	+1	0	2,5400	2,5365	0,0035
BBD11	+1	-1	0	3,8650	3,8685	-0,0035
BBD12	+1	+1	0	2,5010	2,5005	0,0005
BBD13	0	0	0	2,4570	2,4563	0,0007
BBD14	0	0	0	2,4560	2,4563	-0,0003
BBD15	0	0	0	2,4560	2,4563	-0,0003



Şekil 3.7. SDZ ve TMP için Box-Behnken tasarıma göre elde edilen kromatogramlar

Çizelge 3.7'de sunulan ölçülen KCF değerleri ile bağımsız değişkenler arasındaki ilişkiyi modellemek için, en küçük kareler tekniğinden yararlanılarak ikinci dereceden polinomiyal bir fonksiyon oluşturulmuştur. Bu modeldeki terimlerin katsayıları ile katsayılara ait t-test ve p-değerleri Çizelge 3.8'de verilmiştir.

Çizelge 3.8. SDZ-TMP için BBD ile elde edilen ampirik modele ait katsayılar ve istatistiksel sonuçları

	Katsayı	t-test	p-değeri
Kesim değeri	2,457	625,71	$2,10 \times 10^{-13}$
x_1	0,028	-11,65	$8,83 \times 10^{-05}$
x_2	-0,694	-288,69	$1,01 \times 10^{-11}$
x_3	-0,244	-101,39	$1,88 \times 10^{-09}$
x_1^2	-0,073	-20,46	$5,46 \times 10^{-06}$
x_2^2	0,829	234,16	$2,87 \times 10^{-11}$
x_3^2	0,148	41,71	$1,59 \times 10^{-07}$
x_1x_2	0,010	2,94	$3,78 \times 10^{-02}$
x_1x_3	0,022	6,47	$1,35 \times 10^{-03}$
x_2x_3	0,144	42,36	$1,47 \times 10^{-07}$

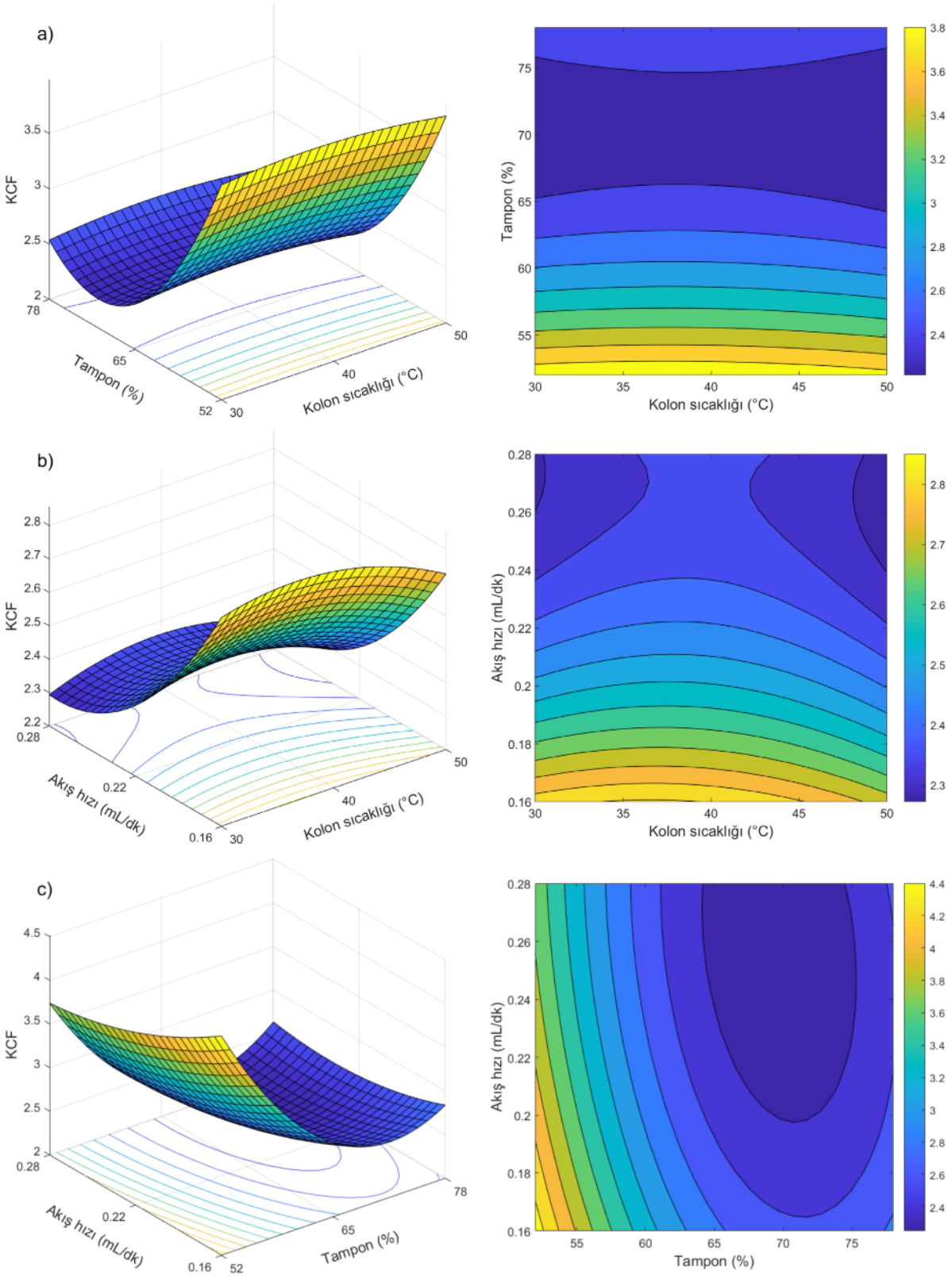
Çizelge 3.8'de görüldüğü üzere, modeldeki terimlerin p-değerleri, bu çalışmada seçilen anlamlılık seviyesi olan $\alpha = 0,05$'ten küçüktür ve t-test değerleri 2,57 olan t-tablo değerinden büyüktür. Yani 0,05 anlamlılık düzeyinde tüm terimler anlamlı derecede cevap üzerine etki etmektedir. Bu yüzden kromatografik cevabın modellenmesinde, tüm terimlerin kullanıldığı bir fonksiyon gereklidir. Kromatografik cevap fonksiyonunu anlamlı olarak etkileyen terimler kullanılarak oluşturulan matematiksel model Eşitlik 3.2'de verilmiştir.

$$y = 2,457 + 0,028x_1 - 0,694x_2 - 0,244x_3 - 0,073x_1^2 + 0,829x_2^2 + 0,148x_3^2 + 0,010x_1x_2 + 0,022x_1x_3 + 0,144x_2x_3 \quad \text{(Eşitlik 3.2)}$$

Bu modelde y kromatografik cevap faktörünü, x_1, x_2 ve x_3 sırasıyla kolon sıcaklığı, tampon yüzdesi ve akış hızı değişkenlerinin doğrusal terimlerini, x_1^2, x_2^2 ve

x_3^2 bu değişkenlerin karesel terimlerini, x_1x_2, x_1x_3 ve x_2x_3 ise bu değişkenlerin etkileşim terimlerini temsil etmektedir.

Box-Behnken tasarım kullanılarak elde edilen ve faktörlerin KCF üzerine olan ikili etkilerini gösteren cevap yüzey grafikleri ve eş yükselti diyagramları Şekil 3.8'de sunulmuştur. Bu şekil incelendiğinde, seçilen faktörlerin ve faktör etkileşimlerinin KCF üzerine genel olarak farklı oranlarda etki ettiği görülmektedir. Şekil 3.8.a'da verilen cevap yüzey grafiği ve eş yükselti diyagramı, tampon yüzdesinin düşük seviyelerinde yüksek KCF değerleri elde edildiğini ve en düşük KCF değerlerine yaklaşık %70 tampon seviyesinde ulaşıldığını göstermektedir. Aynı şekilden kolon sıcaklığının cevap üzerine etkisinin tampon yüzdesinin etkisine göre daha az olduğu görülmektedir. Tampon yüzdesi eksenindeki iç bükey kıvrım, bu faktörün cevap üzerindeki karesel etkisinin yüksek olduğu anlamına gelir. Şekil 3.8.b'de akış hızının arttıkça KCF değerinin azaldığı; kolon sıcaklığının orta seviyelerinde KCF değerinin genel olarak daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu şekilde akış hızının kıvrımı iç bükey, kolon sıcaklığının kıvrımı ise dış bükeydir. Bu nedenle oluşan "eyer şekli" bu iki faktörün karesel etkilerini temsil eden terimlerin farklı işaretlere sahip olduğu anlamına gelmektedir. Nitekim bu sonuç Eşitlik 3.2'de verilen ampirik model incelendiğinde de anlaşılmaktadır. Şekil 3.8.c'de akış hızının yüksek ve tampon yüzdesinin orta-yüksek olduğu bölgelerde KCF değerinin düşük değerler aldığı görülmektedir. Düşük tampon ve düşük akış hızı değerlerinde ise yüksek KCF değerleri gözlenmektedir. Eş yükselti diyagramındaki yuvarlağa yakın eğriler, her iki faktörün de cevap üzerinde karesel etkisi olduğunu, cevap yüzey grafiğindeki iç bükeylik ise bu etkilerin ikisinin de pozitif yönde olduğunu göstermektedir.



Şekil 3.8. SDZ-TMP için BBD ile elde edilen a) Kolon sıcaklığı-tampon yüzdesi ile KCF, b) akış hızı-kolon sıcaklığı ile KCF, c) tampon yüzdesi-akış hızı ile KCF arasındaki ilişkiyi gösteren yüzey grafikleri ve eş yükselti diyagramları

Eşitlik 3.2'de verilen model kullanılarak bağımsız değişkenlerin optimal değerleri Çizelge 3.9'da sunulduğu gibi hesaplanmıştır. Optimal olarak saptanan bu değerlerin cevap yüzey grafikleriyle yapılan yorumlama ile de uyumlu olduğu gözlenmiştir.

Çizelge 3.9. SDZ-TMP karışımı için Box-Behnken tasarımla elde edilen optimal kromatografik şartlar

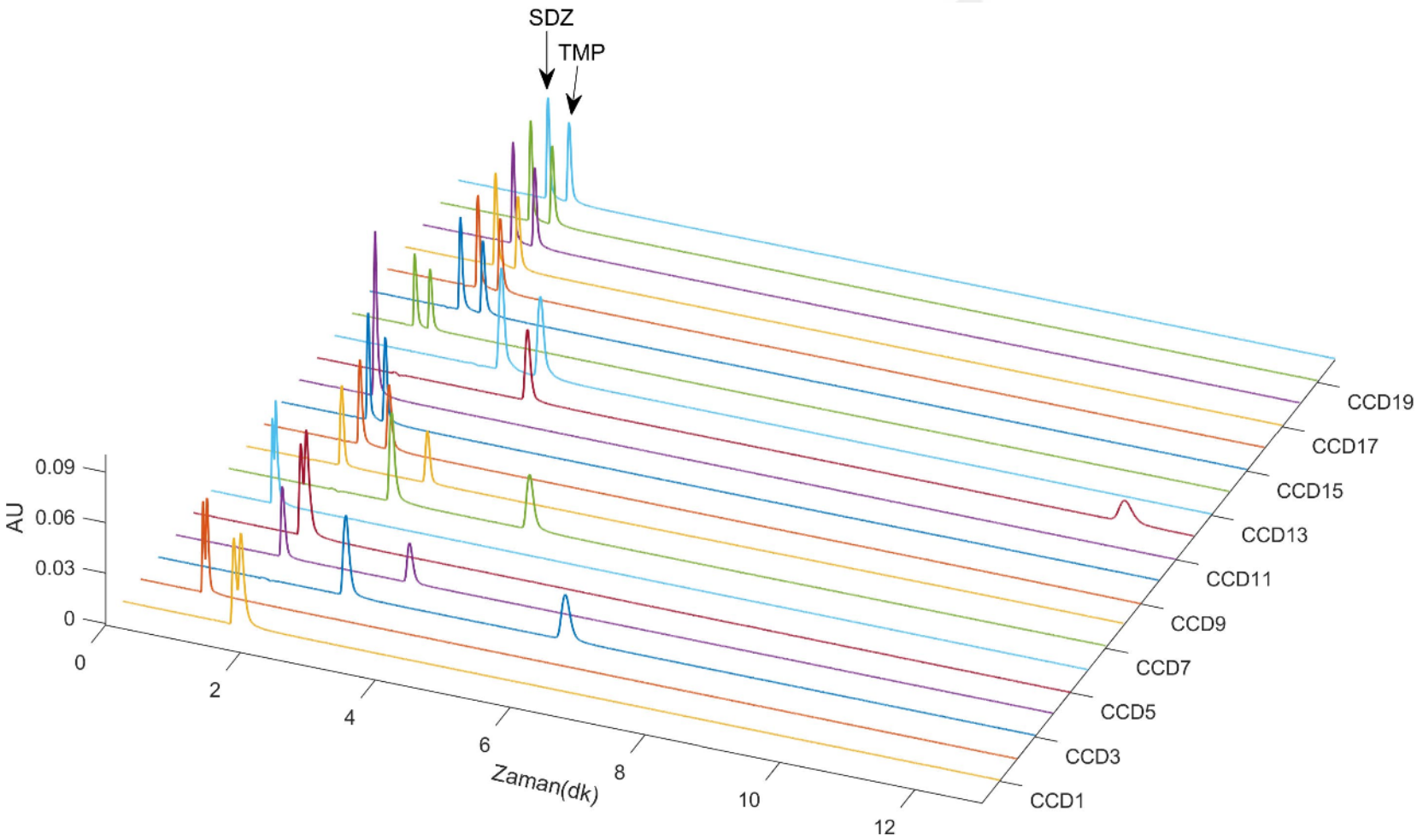
	Faktör adı	Optimal değer
x_1	Kolon sıcaklığı (°C)	39,3
x_2	Tampon yüzdesi (%)	69,7
x_3	Akış hızı (mL/dk)	0,26

3.1.1.3. Merkezi Bileşenli Tasarım ve Yöntem Optimizasyonu

SDZ-TMP karışımının analizi için UPLC yöntemi geliştirilmesinde, yöntemin merkezi bileşenli tasarım ile optimizasyonu için, Çizelge 3.3'te sunulan faktör seviyeleri kullanılmıştır. Üç faktörlü merkezi bileşenli tasarıma göre, merkez noktadaki tekrar sayısının beş olduğu tasarım matrisi Çizelge 3.10'da sunulmuştur. Merkezi bileşenli tasarımda deney sayısı $N = 2^k + (2k + 1) + n_0$ formülü ile hesaplandığı için bu tasarım matrisindeki deney sayısı 20'dir. 20 µg/mL SDZ ve 20 µg/mL TMP içeren numune, Çizelge 3.10'da verilen 20 kromatografik koşul kullanılarak UPLC sistemine enjekte edilmiştir. Bu enjeksiyonlara ait 245 nm'de kaydedilen kromatogramlar Şekil 3.9'da verilmiştir. Elde edilen kromatogramların her biri için zaman ekseninde pik başlangıç ve pik bitiş noktaları, alıkonma zamanları, varsa vadi noktaları kaydedilmiştir. Piklerin zirve noktalarının ve vadi noktasının y eksenindeki karşılıkları da kaydedildikten sonra her bir kromatograma ait kromatografik cevap fonksiyonu (KCF) değerleri hesaplanmıştır. Her bir kromatografik şart için hesaplanan KCF değerleri, Çizelge 3.10'da "Ölçülen" sütununda listelenmiştir. Modelleme sonrasında her deney için ampirik modelle hesaplanan KCF değerleri, aynı çizelgede "Tahmin edilen" sütununda, ölçülen ve tahmin edilen değerler arasındaki fark ise "Artık" sütununda verilmiştir.

Çizelge 3.10. Merkezi bileşenli tasarım matrisi ile ölçülen, tahmin edilen ve artık KCF değerleri

	x_1 Kolon sıcaklığı (°C)	x_2 Tampon (%)	x_3 Akış hızı (mL/dk)	KCF Ölçülen	KCF Tahmin edilen	KCF Artık
CCD1	-1	-1	-1	6,2223	6,2221	0,0002
CCD2	-1	-1	+1	5,2738	5,2741	-0,0003
CCD3	-1	+1	-1	3,4255	3,4233	0,0022
CCD4	-1	+1	+1	2,7486	2,7502	-0,0016
CCD5	+1	-1	-1	7,1624	7,1586	0,0038
CCD6	+1	-1	+1	6,2235	6,2235	0,0000
CCD7	+1	+1	-1	2,8669	2,8644	0,0025
CCD8	+1	+1	+1	2,2061	2,2041	0,0020
CCD9	$-\alpha$	0	0	2,1844	2,1837	0,0007
CCD10	$+\alpha$	0	0	2,5082	2,5120	-0,0038
CCD11	0	$-\alpha$	0	11,0620	11,0631	-0,0011
CCD12	0	$+\alpha$	0	5,3269	5,3289	-0,0020
CCD13	0	0	$-\alpha$	3,2749	3,2790	-0,0041
CCD14	0	0	$+\alpha$	1,9275	1,9265	0,0010
CCD15	0	0	0	2,1828	2,1828	0,0000
CCD16	0	0	0	2,1828	2,1828	0,0000
CCD17	0	0	0	2,1828	2,1828	0,0000
CCD18	0	0	0	2,1831	2,1828	0,0003
CCD19	0	0	0	2,1831	2,1828	0,0003
CCD20	0	0	0	2,1828	2,1828	0,0000



Şekil 3.9. SDZ ve TMP için merkezi bileşenli tasarıma göre elde edilen kromatogramlar

Çizelge 3.10'da sunulmuş olan ölçülen KCF değerleri ile bağımsız değişkenler arasındaki ilişkiyi modellemek için, en küçük kareler tekniğinden yararlanılarak ikinci dereceden polinomiyal bir fonksiyon oluşturulmuştur. Bu modeldeki terimlerin katsayıları ile katsayılara ait t-test ve p-değerleri Çizelge 3.11'de verilmiştir.

Çizelge 3.11. SDZ-TMP için CCD ile elde edilen ampirik modele ait katsayılar ve istatistiksel sonuçları

	Katsayı	t-test	p-değeri
Kesim değeri	2,183	2012,17	$2,29 \times 10^{-29}$
x_1	0,098	135,64	$1,18 \times 10^{-17}$
x_2	-1,705	-2368,43	$4,48 \times 10^{-30}$
x_3	-0,402	-558,65	$8,41 \times 10^{-24}$
x_1^2	0,058	83,28	$1,54 \times 10^{-15}$
x_2^2	2,125	3034,13	$3,77 \times 10^{-31}$
x_3^2	0,148	211,89	$1,36 \times 10^{-19}$
x_1x_2	-0,374	-397,56	$2,52 \times 10^{-22}$
x_1x_3	0,003	3,42	$6,55 \times 10^{-3}$
x_2x_3	0,069	73,07	$5,69 \times 10^{-15}$

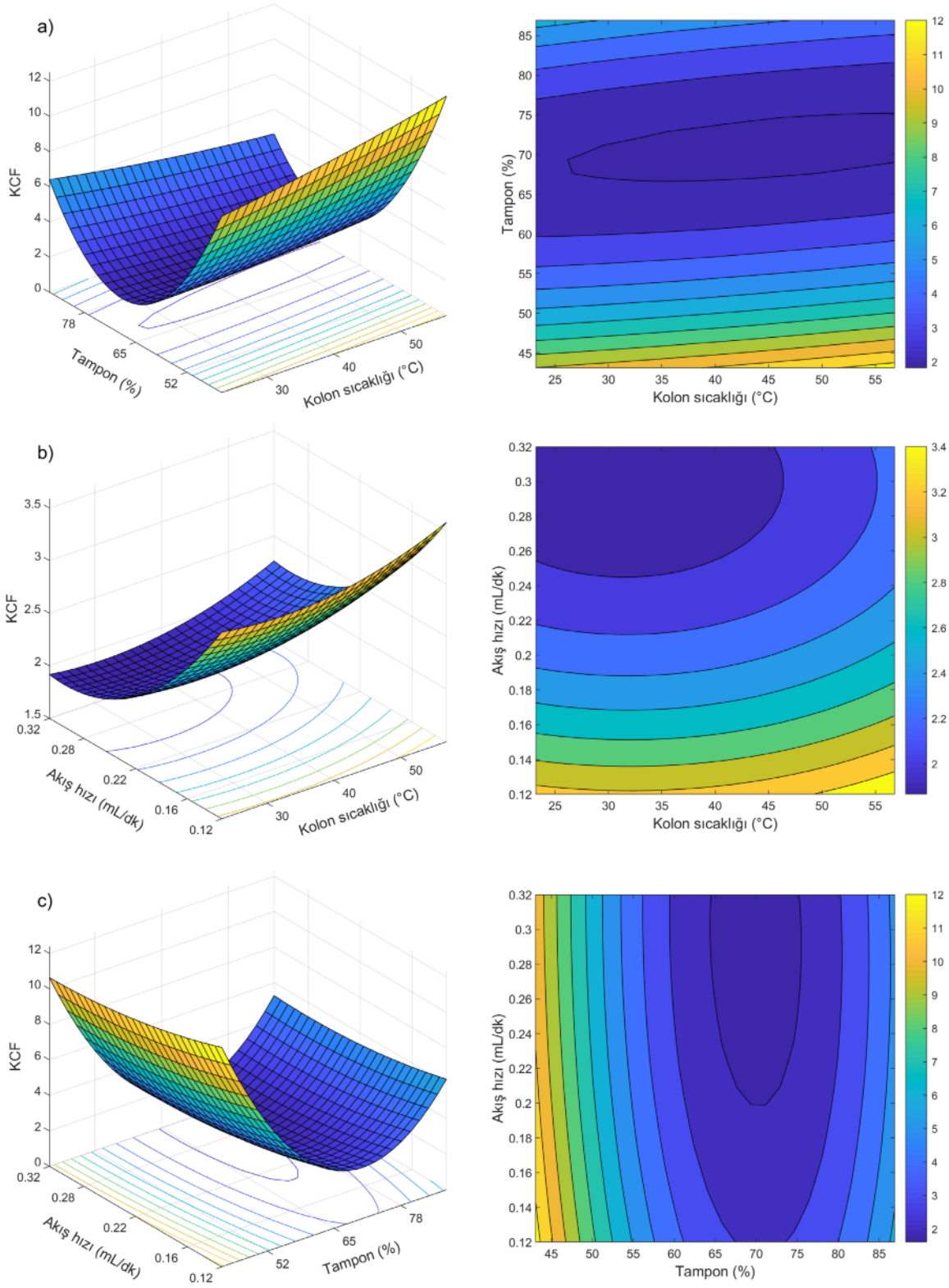
Çizelge 3.11'de görüldüğü üzere, modeldeki terimlerin p-değeri, bu çalışmada seçilen anlamlılık seviyesi olan $\alpha = 0,05$'ten küçüktür ve t-test değerleri, 2,23 olan t-tablo değerinden büyüktür. Yani 0,05 anlamlılık düzeyinde tüm terimler, cevap üzerine anlamlı derecede etkilidir. Bu yüzden cevabın modellenmesinde, tüm terimlerin kullanıldığı bir fonksiyon gereklidir. Cevabı anlamlı olarak etkileyen terimler kullanılarak oluşturulan matematiksel model, Eşitlik 3.3'te verilmiştir.

$$y = 2,183 + 0,098x_1 - 1,705x_2 - 0,402x_3 + 0,058x_1^2 + 2,125x_2^2 + 0,148x_3^2 - 0,374x_1x_2 + 0,003x_1x_3 + 0,069x_2x_3 \quad \text{(Eşitlik 3.3)}$$

Bu modelde y kromatografik cevap faktörünü, x_1, x_2 ve x_3 sırasıyla kolon sıcaklığı, tampon yüzdesi ve akış hızı değişkenlerinin doğrusal terimlerini, x_1^2, x_2^2 ve

x_3^2 bu değişkenlerin karesel terimlerini, x_1x_2, x_1x_3 ve x_2x_3 ise bu değişkenlerin etkileşim terimlerini temsil etmektedir.

Merkez bileşenli tasarım kullanılarak elde edilen ve faktörlerin KCF üzerine olan ikili etkilerini gösteren cevap yüzey grafikleri ve eş yükselti diyagramları Şekil 3.10'da sunulmuştur. Bu şekil incelendiğinde, seçilen faktörlerin ve faktör etkileşimlerinin KCF üzerine genel olarak farklı oranlarda etki ettiği görülmektedir. Şekil 3.10.a'da verilen cevap yüzey grafiği ve eş yükselti diyagramı, tampon yüzdesinin cevap üzerinde karesel bir etkisi olduğunu, düşük ve yüksek seviyelerinde KCF değerinin arttığını, en düşük KCF değerinin %70 civarında elde edildiğini göstermektedir. Aynı şekilde kolon sıcaklığının artışıyla KCF değerinin de arttığı, fakat bu faktörün etkisinin daha az olduğu gözlenmektedir. Şekil 3.10.b'de akış hızının arttıkça cevabın azaldığı; kolon sıcaklığının arttıkça KCF değerinin arttığı görülmektedir. Akış hızı ve kolon sıcaklığı etkisinin karesel etkileri sonucu iç bükey bir yüzey grafiği elde edilmiştir. Bu içbükey kıvrımın merkezi olan yüksek akış hızı ve düşük kolon sıcaklığı seviyelerinde düşük KCF değerleri elde edilmektedir. Şekil 3.10.c'de akış hızının yüksek ve tampon yüzdesinin orta-yüksek olduğu bölgelerde KCF değerinin düşük değerler aldığı görülmektedir. Tampon yüzdesi eksinindeki her küçük değişiklik, cevap üzerinde yüksek bir değişime sebep olduğuna göre, tampon yüzdesinin cevap üzerindeki etkisi oldukça baskındır.



Şekil 3.10. SDZ-TMP için CCD ile elde edilen a) Kolon sıcaklığı-tampon yüzdesi ile KCF, b) akış hızı-kolon sıcaklığı ile KCF, c) tampon yüzdesi-akış hızı ile KCF arasındaki ilişkiyi gösteren yüzey grafikleri ve eş yükselti diyagramları

Eşitlik 3.3'te verilen model kullanılarak bağımsız değişkenlerin optimal değerleri Çizelge 3.12'de sunulduğu gibi hesaplanıştır. Optimal olarak saptanan bu değerlerin cevap yüzey grafikleriyle yapılan yorumlama ile de uyumlu olduğu gözlenmiştir.

Çizelge 3.12. SDZ-TMP karışımı için merkezi bileşenli tasarımla elde edilen optimal kromatografik şartlar

	Faktör adı	Optimal değer
x_1	Kolon sıcaklığı (°C)	44,9
x_2	Tampon yüzdesi (%)	70,5
x_3	Akış hızı (mL/dk)	0,30

3.1.1.4. Tasarımların Karşılaştırılması

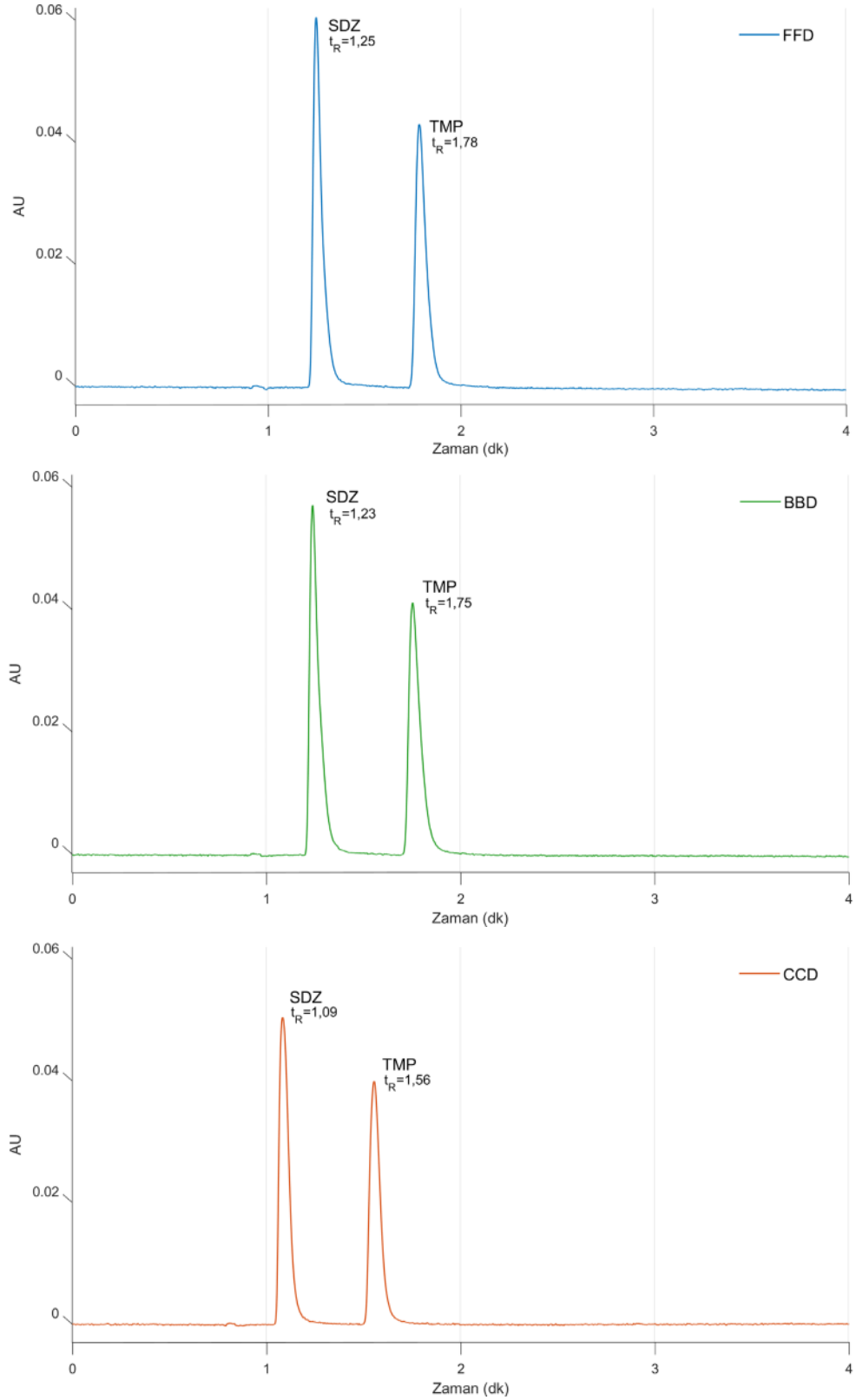
SDZ-TMP etken maddelerinin analizi için geliştirilmesi hedeflenen UPLC yönteminin optimizasyonunda, FFD, BBD ve CCD tasarımları kullanılarak üç farklı kromatografik şart optimal olarak belirlenmiştir. Her bir tasarımla elde edilen optimal şartlar Çizelge 3.13'te sunulmuştur. Çizelgede görüldüğü üzere, FFD ve BBD tasarımlarla elde edilen şartlar birbirinin hemen hemen aynısıdır. CCD tasarım ile elde edilen tampon yüzdesi değeri, diğer iki tasarımla elde edilen değerlere çok yakındır. Fakat CCD kullanılarak kolon sıcaklığı ve akış hızı için belirlenen değerler, diğer iki tasarımla belirlenen değerlerden daha yüksektir.

Çizelge 3.13. SDZ-TMP karışımı için farklı tasarımlar kullanılarak elde optimal kromatografik şartlar

	Faktör adı	FFD	BBD	CCD
x_1	Kolon sıcaklığı (°C)	38,5	39,3	44,9
x_2	Tampon yüzdesi (%)	69,9	69,7	70,5
x_3	Akış hızı (mL/dk)	0,26	0,26	0,30

Üç farklı tasarımın kullanıldığı cevap yüzey metodolojilerinin karşılaştırılabilmesi için, Çizelge 3.13'te sunulan üç farklı kromatografik koşul

kullanılarak, 20 µg/mL SDZ ve 20 µg/mL TMP içeren numune, UPLC sistemine enjekte edilmiştir. Bu enjeksiyonlara ait 245 nm'de kaydedilen kromatogramlar Şekil 3.11'de sunulmuştur. Bu kromatogramlardan da görüldüğü üzere, FFD ve BBD tasarımlarla elde edilen kromatografik şartların kullanıldığı enjeksiyonlarla elde edilen kromatogramlar birbirinin neredeyse aynısıdır. FFD ve BBD tasarımlarla elde edilen şartlarla elde edilen alıkonma zamanları sırasıyla SDZ için 1,25 dk ve 1,23 dk ve TMP için 1,78 dk ve 1,75 dk olarak tayin edilmiştir. Oysa CCD tasarımla elde edilen şartların kullanıldığı kromatogramda SDZ ve TMP'nin alıkonma zamanları daha küçük olup 1,09 dk ve 1,56 dk olarak saptanmıştır.



Şekil 3.11. SDZ-TMP karışımı için farklı tasarımlar kullanılarak saptanan optimal kromatografik şartlarda kaydedilen kromatogramlar

SDZ ve TMP kombinasyonunu içeren ticari veteriner preparatın kantitatif analizi için geliştirilecek UPLC yöntemlerinin kromatografik şartlarının belirlenmesinde tam faktöriyel (FFD), Box Behnken (BBD) ve merkezi bileşenli (CCD) tasarımlara dayalı cevap yüzey metodolojileri uygulanmış ve sonuçları Çizelge 3.13'te sunulmuştur. Bölüm 3.1.1'deki optimizasyon ve yöntem geliştirme basamağında, FFD ve BBD tasarımla benzer kromatografik sonuçlar elde edilmiştir (Çizelge 3.13 ve Şekil 3.11). SDZ-TMP karışımının analizlerinde kromatografik şartları arasında çok küçük fark bulunan bu iki yöntemi uygulamak yerine, FFD ve BBD tasarımlarla elde edilen şartların ortalaması uygulanmış ve bu yöntem tez içinde "FFD-UPLC yöntemi" olarak adlandırılmıştır. CCD tasarımla elde edilen kromatografik şartların kullanıldığı yöntem ise "CCD-UPLC yöntemi" olarak adlandırılmıştır. Cevap yüzey metodolojisiyle elde edilen ortalamaya dayalı FFD-UPLC yöntemi ile CCD-UPLC yöntemi için belirlenen tüm kromatografik koşullar Çizelge 3.14'te verilmiştir.

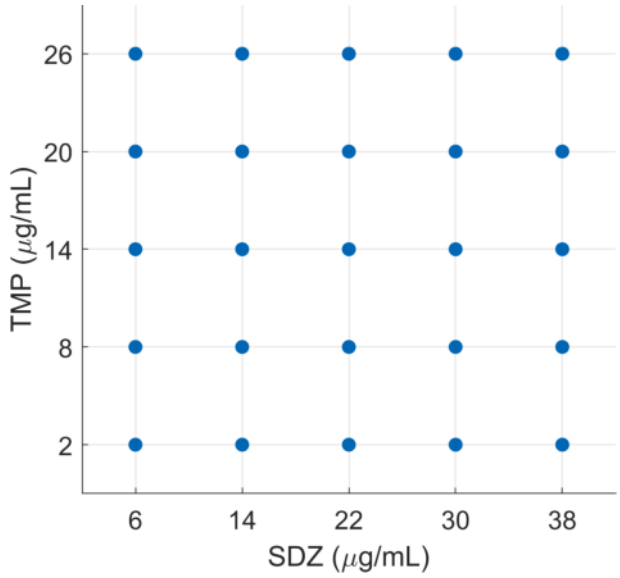
Çizelge 3.14. SDZ ve TMP etken maddelerini içeren veteriner preparatın kantitatif analizi için kullanılan UPLC yöntemlerine ait kromatografik şartlar

	FFD-UPLC	CCD-UPLC
Analitik kolon	C_{18} 100 mm	C_{18} 100 mm
Hareketli faz	Metanol ve 20 mM HCOONa (pH 4,4) karışımı	Metanol ve 20 mM HCOONa (pH 4,4) karışımı
Numune çözücüsü	Metanol: su (50:50, *h/h*)	Metanol: su (50:50, *h/h*)
Enjeksiyon hacmi	1 µL	1 µL
Numune odası sıcaklığı	15 °C	15 °C
Tampon yüzdesi (%)	69,8	70,5
Kolon sıcaklığı (°C)	38,9	44,9
Akış hızı (mL/dk)	0,26	0,30

3.1.2. Kalibrasyon Eğrilerinin Hazırlanması

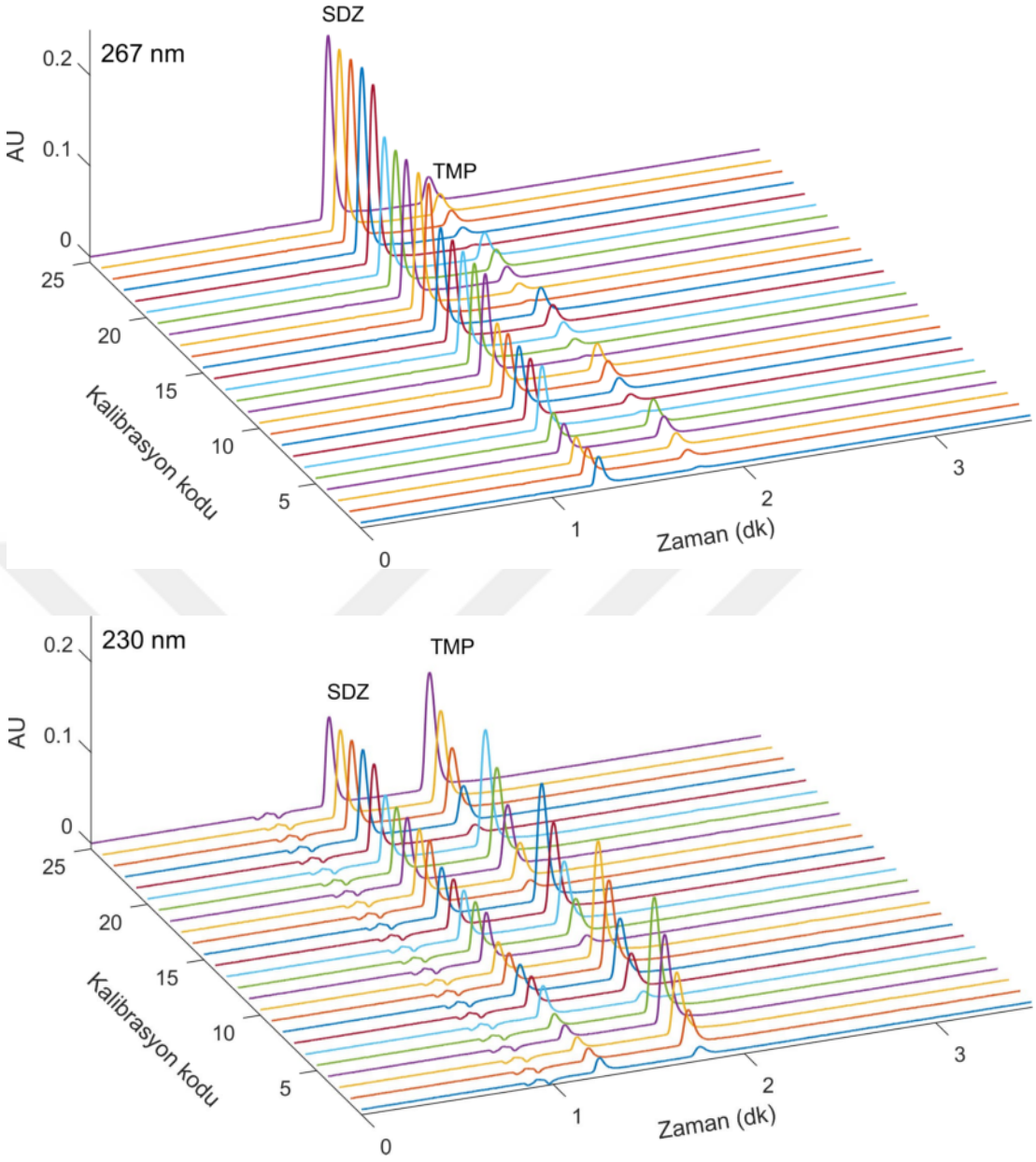
SDZ ve TMP karışımının analizi için hazırlanan tüm çözeltilerde ön deneylerde belirlenen metanol-su karışımı (50:50, *h/h*) çözücü olarak kullanılmıştır. SDZ stok çözeltisi için 20 mg standart madde 100 mL balon jojede çözücü ile tamamlanmıştır. TMP stok çözeltisi için 10 mg standart madde 100 mL balon jojede çözücü ile tamamlanmıştır. Standart maddelerin tam olarak çözünmesi için stok çözeltiler 5 dakika boyunca ultrasonik banyoda tutulmuştur. Kalibrasyon ve validasyon çalışmaları için her iki stok çözeltiden hesaplanan hacimler pipetlendikten sonra çözücü ile seyreltilmiş ve tüm çözeltiler günlük olarak hazırlanmıştır.

Kalibrasyon setinin planlanmasında faktöriyel tasarımdan yararlanılmıştır. SDZ için 6-38 µg/mL, TMP için 2-26 µg/mL konsantrasyon aralığında kalibrasyon çözeltileri hazırlanmıştır. SDZ ve TMP karışımının kalibrasyon setinin tam faktöriyel tasarımında beş seviye ve iki bileşen için 5^2=25 adet kalibrasyon çözeltisi hazırlanmıştır. Bu kalibrasyon setinin diyagramı Şekil 3.12'de sunulmuştur.

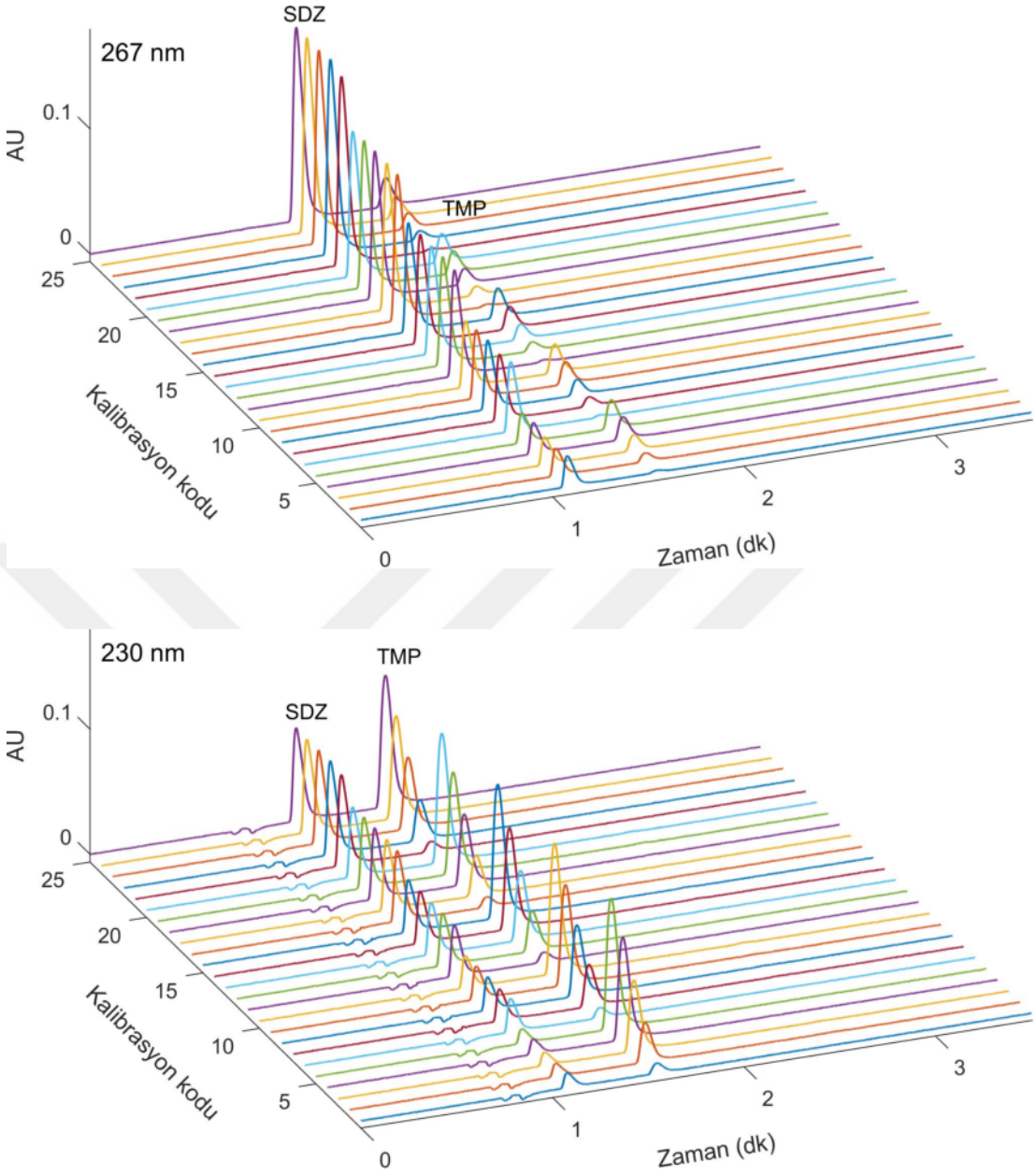


Şekil 3.12. SDZ ve TMP karışımının analizi için hazırlanan kalibrasyon seti planı

SDZ ve TMP bileşiklerini içeren tam faktöriyel kalibrasyon seti (veya konsantrasyon seti) FFD-UPLC ve CCD-UPLC yöntemlerinin Çizelge 3.14'te sunulan kromatografik koşullarında UPLC sistemine enjekte edilmiştir. FFD-UPLC yönteminde SDZ için 267 nm'de ve TMP için 230 nm'de PDA dedeksiyon ile kromatogramlar elde edilmiş ve Şekil 3.13'te sunulmuştur. Bu yöntem kullanılarak elde edilen kromatogramlarda SDZ ve TMP için alıkonma zamanları sırasıyla 1,24 dakika ve 1,77 dakika olarak tayin edilmiştir. CCD-UPLC yönteminin uygulanmasında SDZ için 267 nm'de ve TMP için 230 nm'deki PDA dedeksiyonu ile kromatogramların kaydı gerçekleştirilmiş ve Şekil 3.14'te gösterilmiştir. Bu yöntem için SDZ ve TMP için alıkonma zamanları sırasıyla 1,07 dakika ve 1,54 dakika olarak tayin edilmiştir.



Şekil 3.13. SDZ-TMP kalibrasyon setinin FFD-UPLC yöntemi ile 267 ve 230 nm'de kaydedilen kromatogramları



Şekil 3.14. SDZ-TMP kalibrasyon setinin CCD-UPLC yöntemi ile 267 ve 230 nm'de kaydedilen kromatogramları

FFD-UPLC ve CCD-UPLC yöntemlerinde bileşiklerin kalibrasyon eğrilerini elde etmek için, tam faktöriyel kalibrasyon setinde SDZ'nin 267 nm'deki ve TMP'nin 230 nm'deki pik alanları ve konsantrasyon değerleri arasındaki matematiksel ilişkinin doğrusal regresyon analizinden kalibrasyon denklemleri hesaplanmış ve istatistiksel sonuçlar Çizelge 3.15'te listelenmiştir. Validasyon ve gerçek numune analizi çalışmalarında SDZ ve TMP miktarları bu kalibrasyon denklemleri kullanılarak tayin edilmiştir.

Çizelge 3.15. SDZ ve TMP etken maddeleri için elde edilen doğrusal regresyon verileri

	FFD-UPLC		CCD-UPLC	
	SDZ	TMP	SDZ	TMP
Dalga boyu (nm)	267	230	267	230
Doğrusal aralık (µg/mL)	6-38	2-26	6-38	2-26
Eğim	2,847	3,111	2,495	2,748
Kesim	-1,151	0,473	-1,016	0,269
Korelasyon katsayısı	0,9992	0,9997	0,9991	0,9998
Eğimin standart hatası	0,024	0,016	0,022	0,012
Kesimin standart hatası	0,604	0,259	0,539	0,204
Korelasyon katsayısının standart hatası	1,382	0,672	1,233	0,528
Yakalama sınırı (µg/mL)	0,70	0,28	0,71	0,24
Tayin sınırı (µg/mL)	2,12	0,83	2,16	0,74

3.1.3. Yöntemlerin Validasyonu

SDZ-TMP karışımının analizi için geliştirilen UPLC yöntemlerinin validasyon çalışmaları sistem uygunluk testleri ve analitik validasyon testleri şeklinde iki basamakta gerçekleştirilmiştir.

Sistem uygunluk testleri: SDZ ve TMP bileşiklerini içeren bir çözelti, FFD-UPLC ve CCD-UPLC yöntemlerinin Çizelge 3.14'te özetlenen kromatografik şartları altında UPLC sistemine enjekte edilmiştir. 10 enjeksiyon sonucunda elde edilen

kromatogramlardaki sistem uygunluk parametreleri Waters Empower 2 yazılımında hesaplanarak ortalama değerleri Çizelge 3.16'da sunulmuştur.

Çizelge 3.16. SDZ ve TMP karışımının analizi için geliştirilen UPLC yöntemlerinin sistem uygunluk testi sonuçları

	FFD-UPLC		CCD-UPLC		Önerilen
	SDZ	TMP	SDZ	TMP	
Alıkonma zamanı (dk)	1,24	1,77	1,07	1,54	
Kapasite faktörü (k')	1,07	1,95	1,15	2,08	k' > 2
Ayırıcılık (R)	-	6,13	-	4,67	R > 2
Kuyruklanma faktörü (T)	1,58	1,45	1,64	1,46	T < 2
Teorik tabaka sayısı (N)	4140	5598	2480	4111	N > 2000
Alıkonma zamanı BSS	0,11	0,10	0,19	0,13	BSS < 1
Pik alanı BSS	0,89	1,15	0,97	1,17	BSS < 1

BSS: Bağıl standart sapma

Yöntem validasyon testleri: FFD-UPLC ve CCD-UPLC yöntemlerinin validasyonları geri kazanım, gün içi ve günler arası ile standart eklemc çalışmaları yapılarak gerçekleştirilmiştir.

Geri kazanım çalışması için etken maddelerin çalışma aralığı içinde, her iki etken maddeyi de farklı derişimlerde içeren 11 adet yapay karışım çözeltisi hazırlanmıştır. FFD-UPLC ve CCD-UPLC yöntemlerinin doğruluk ve kesinliğini değerlendirmek için, hazırlanan 11 adet yapay karışım çözeltisinin kromatogramları, yöntemlerin Çizelge 3.14'te özetlenen kromatografik koşullarında kaydedilmiştir. 267 nm'de kaydedilen kromatogramlarda SDZ bileşiğine ait olan pik alanları, 230 nm'de kaydedilen kromatogramlarda TMP bileşiğine ait olan pik alanları, kalibrasyon denklemlerinde yerlerine konularak yapay karışımlardaki etken maddelerin miktarları hesaplanmış, FFD-UPLC ve CCD-UPLC için Çizelge 3.17'de sunulmuştur. FFD-UPLC yöntemi ile elde edilen yüzde geri kazanım ile standart sapma değerleri SDZ için %100,16 ve 1,31; TMP için %99,30 ve 1,79 olarak hesaplanmıştır. CCD-UPLC yöntemi ile elde edilen yüzde geri kazanım ile standart sapma değerleri ise SDZ için %100,54 ve 1,06; TMP için %100,36 ve 1,74 olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 3.17. SDZ ve TMP içeren yapay karışım çözeltilerinin analiz sonuçları

	Konulan (µg/mL)		Bulunan (µg/mL)				Geri kazanım (%)			
			FFD-UPLC		CCD-UPLC		FFD-UPLC		CCD-UPLC	
Kod	SDZ	TMP	SDZ	TMP	SDZ	TMP	SDZ	TMP	SDZ	TMP
M1	6,00	7,00	6,14	6,95	6,12	7,28	102,27	99,31	102,03	104,05
M2	14,00	7,00	13,78	6,95	13,87	6,99	98,41	99,34	99,06	99,85
M3	22,00	7,00	21,68	7,10	21,83	6,94	98,56	101,48	99,24	99,14
M4	30,00	7,00	29,98	6,71	30,54	7,02	99,92	95,91	101,79	100,26
M5	38,00	7,00	38,24	6,87	37,90	6,80	100,63	98,18	101,67	97,08
M6	35,00	2,00	35,10	2,00	35,08	1,99	100,30	99,79	100,23	99,36
M7	35,00	8,00	35,21	7,93	34,96	8,01	100,59	99,17	99,90	100,17
M8	35,00	14,00	35,31	13,82	35,23	14,07	100,88	98,75	100,67	100,48
M9	35,00	20,00	35,41	20,23	35,52	20,13	101,18	101,13	101,49	100,63
M10	35,00	26,00	34,32	25,31	34,89	26,25	98,05	97,35	99,67	100,95
M11	35,00	7,00	35,33	7,13	35,06	7,14	100,95	101,89	100,16	102,01
						Ortalama	100,16	99,30	100,54	100,36
						Standart sapma	1,31	1,79	1,06	1,74
						Bağıl standart sapma	1,31	1,80	1,06	1,74
						Bağıl hata	0,16	-0,70	0,54	0,36

$$\text{Bağıl hata} = \frac{\text{konulan} - \text{bulunan}}{\text{konulan}} \times 100$$

Geliştirilen yöntemlerin doğruluk ve kesinlik açısından değerlendirilmesi için diğer bir validasyon testi olarak gün içi ve günler arası deneysel çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bunun için belirlenen test derişiminin %80'i (20 µg/mL SDZ + 4 µg/mL TMP), %100'ü (25 µg/mL SDZ + 5 µg/mL TMP) ve %120'si (30 µg/mL SDZ + 6 µg/mL TMP) olacak biçimde üç farklı konsantrasyon seviyesinde çözeltiler hazırlanmıştır. Hazırlanan bu çözeltiler, FFD-UPLC ve CCD-UPLC yöntemleri kullanılarak aynı gün içinde üç farklı saatte ve birbirini takip eden 3 günde analiz edilmiş ve ortalama sonuçları Çizelge 3.18'de özetlenmiştir. Her bir seviye için üç kez tekrar edilen analiz sonuçlarının ortalamaları "Bulunan" sütununda verilmiş olup, % geri kazanım, standart sapma, bağıl standart sapma ve bağıl hata değerleri aynı çizelgede verilmiştir.

Çizelge 3.18. SDZ ve TMP çözeltilerinin gün içi ve günler arası analizlerinin sonuçları

			FFD-UPLC					CCD-UPLC				
		Konulan (µg/mL)	Bulunan (µg/mL)	GK (%)	SS	BSS	BII	Bulunan (µg/mL)	GK (%)	SS	BSS	BII
Gün içi (n=3)	SDZ	20	20,17	100,83	0,11	0,55	0,83	20,20	101,00	0,02	0,09	1,00
		25	24,55	98,19	0,07	0,30	-1,81	24,53	98,11	0,05	0,22	-1,89
		30	29,48	98,27	0,03	0,12	-1,73	29,73	99,10	0,08	0,28	-0,90
	TMP	4	4,03	100,64	0,09	2,20	0,64	4,03	100,84	0,05	1,12	0,84
		5	5,03	100,65	0,05	1,02	0,65	4,91	98,24	0,05	1,01	-1,76
		6	6,06	101,04	0,12	1,94	1,04	6,04	100,73	0,15	2,53	0,73
		Konulan (µg/mL)	Bulunan (µg/mL)	GK (%)	SS	BSS	BH	Bulunan (µg/mL)	GK (%)	SS	BSS	BH
Günler arası (n=3)	SDZ	20	20,36	101,79	0,09	0,44	1,79	20,19	100,96	0,11	0,54	0,96
		25	24,63	98,53	0,09	0,36	-1,47	24,62	98,50	0,19	0,76	-1,50
		30	29,72	99,07	0,33	1,10	-0,93	29,90	99,67	0,17	0,56	-0,33
	TMP	4	4,05	101,32	0,06	1,49	1,32	4,06	101,62	0,10	2,41	1,62
		5	4,98	99,70	0,01	0,13	-0,30	4,97	99,44	0,11	2,14	-0,56
		6	6,00	99,94	0,05	0,85	-0,06	6,03	100,49	0,16	2,71	0,49

GK (%) : % Geri kazanım
SS : Standart sapma
BSS : Bağıl standart sapma
BII : Bağıl hata= $\frac{\text{konulan}-\text{bulunan}}{\text{konulan}} \times 100$

SDZ ve TMP bileşiklerini içeren katı dozaj formundaki yardımcı maddelerin etken maddelerin analizi üzerine etkisini değerlendirmek için standart ekleme tekniği uygulanmıştır. Standart ekleme çalışmaları için üç paralel olarak, üç farklı derişim seviyesinde çözeltiler hazırlanmıştır. Tüm seviyeler için 10 mL'lik balon jojelere öncelikle Bölüm 3.1.4'te açıklandığı gibi hazırlanan derişik tablet çözeltisinden 0,6 mL konulmuştur. Standart olarak eklenen derişim seviyeleri SDZ için 10, 15, 20 µg/mL ve TMP için 5, 12, 19 µg/mL olacak biçimde farklı hacimlerde alınan stok çözeltileri balon jojelere ilave edildikten sonra balon jojeler çözücü ile tamamlanmıştır. 0. seviye olarak adlandırılan derişim seviyesini hazırlamak için 0,6 mL derişik tablet çözeltisi 10 ml'ye seyreltilmiştir.

Standart ekleme çalışmaları için üç paralel hazırlanan standart çözeltiler, FFD-UPLC ve CCD-UPLC yöntemleri kullanılarak analiz edilmiştir. İlave edilen standart madde miktarlarının hesaplanması için, saptanan toplam miktarlardan 0. seviyedeki çözeltilerin analizinden elde edilen miktarlar (preparattan gelen miktarlar) çıkarılmıştır. Bu çalışmayla elde edilen sonuçların ortalamaları, geri kazanım yüzdeleri, bağıl standart sapma ve bağıl hata değerleri Çizelge 3.19'da sunulmuştur.

Çizelge 3.19. Standart ekleme numunelerinin analiz sonuçları

		Eklenen		Bulunan		Geri kazanım (%)		BSS		Bağıl hata	
		SDZ	TMP	SDZ	TMP	SDZ	TMP	SDZ	TMP	SDZ	TMP
FFD-UPLC	Tablet +	10	5	10,09	4,94	100,95	98,83	0,19	0,19	0,95	-1,17
	Tablet +	15	12	14,98	12,06	99,88	100,53	0,06	0,20	-0,12	0,53
	Tablet +	20	19	20,25	19,21	101,24	101,11	0,05	0,18	1,24	1,11
CCD-UPLC	Tablet +	10	5	10,15	4,99	101,48	99,71	0,30	0,16	1,48	-0,29
	Tablet +	15	12	14,81	11,93	98,71	99,42	0,12	0,03	-1,29	-0,58
	Tablet +	20	19	20,27	19,46	101,33	102,40	0,10	0,16	1,33	2,40

BSS: Bağıl standart sapma

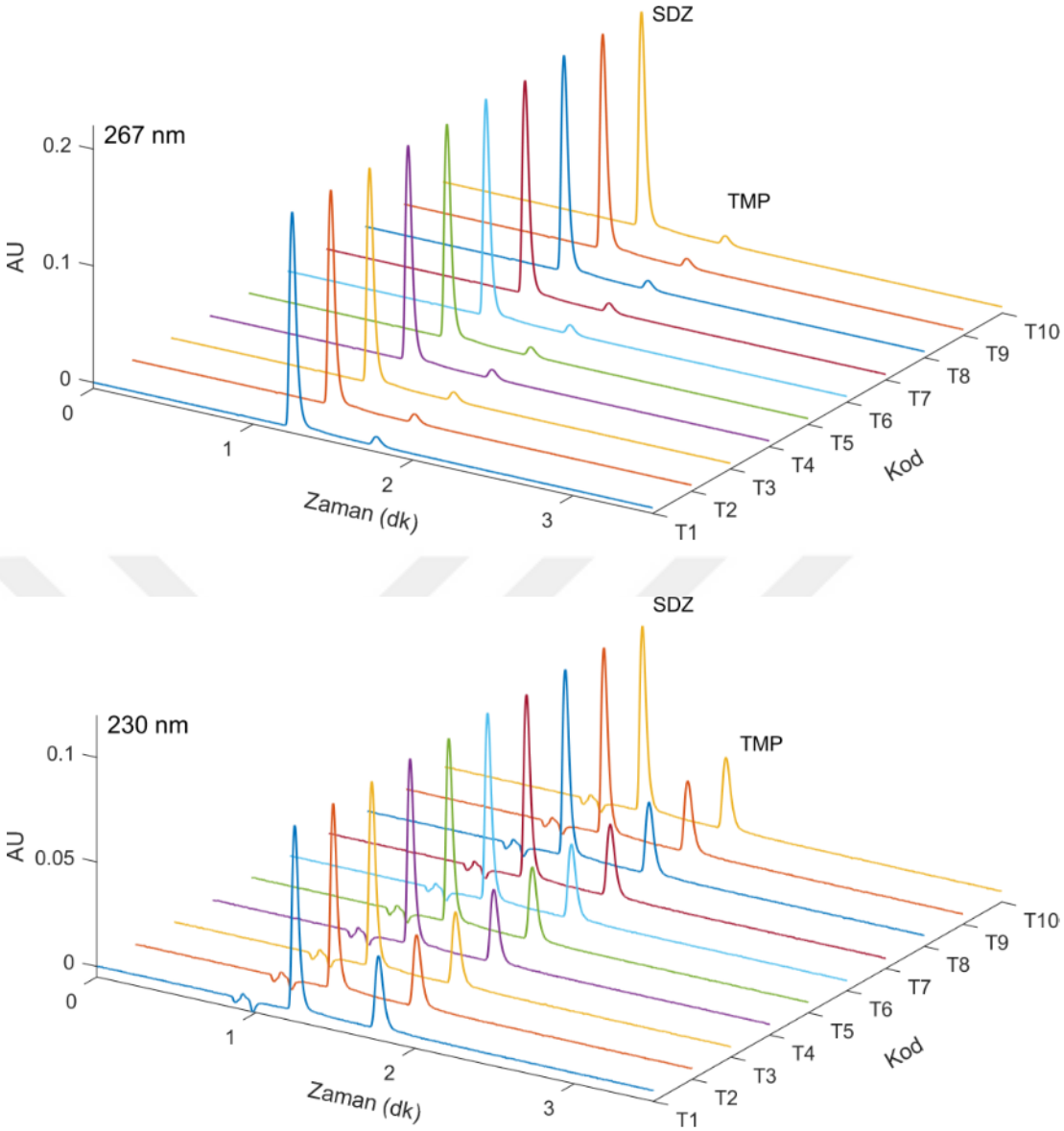
$$\text{Bağıl hata} = \frac{\text{konulan} - \text{bulunan}}{\text{konulan}} \times 100$$

3.1.4. Yöntemlerin Farmasötik Preparatlara Uygulanması

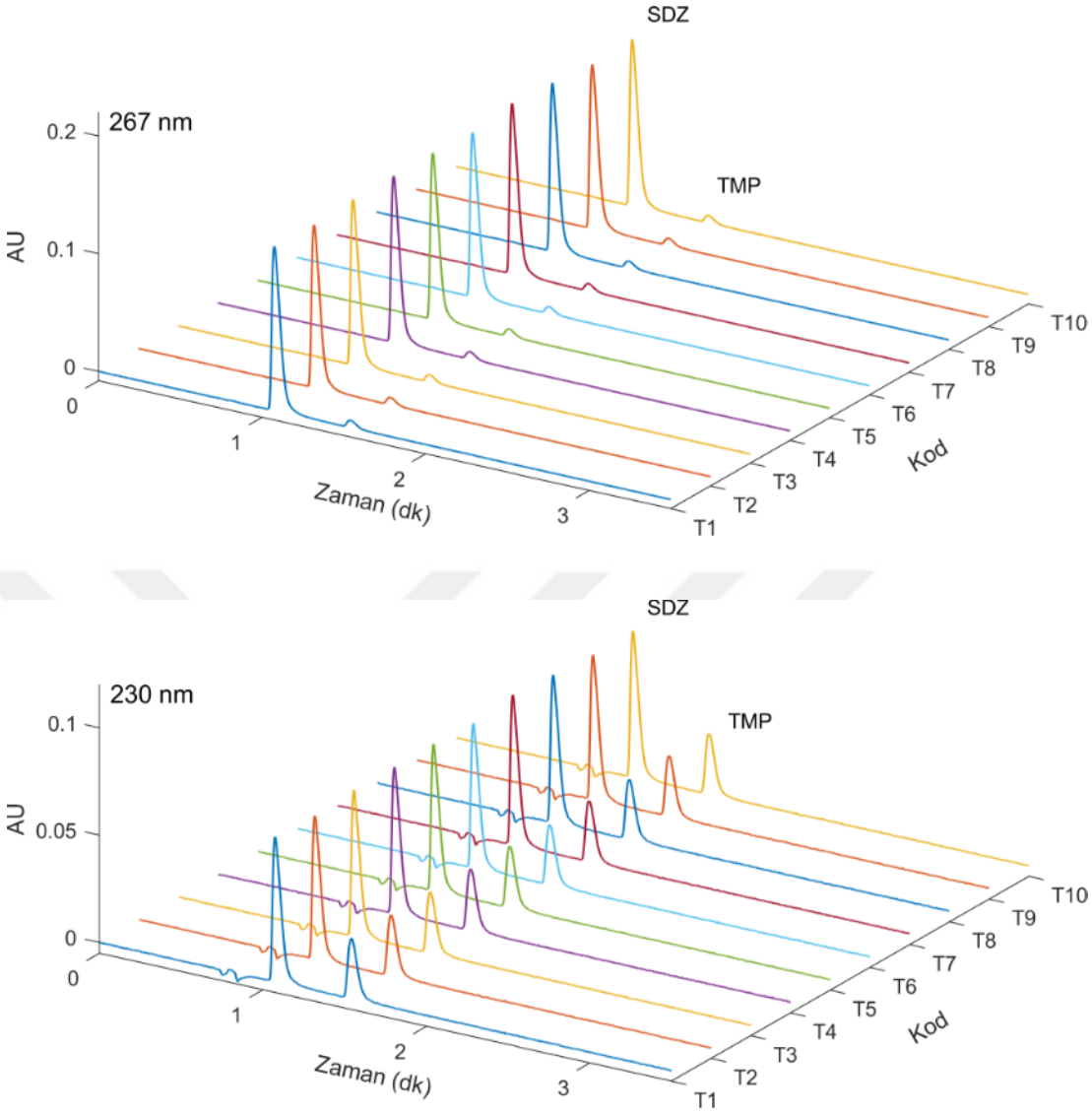
Optimize edilen UPLC yöntemlerinin ticari veteriner preparatlara uygulanması için 10 adet BİOTRİN tablet hassas terazide tartıldıktan sonra havanda toz edilmiştir. Kütle olarak 1/10 tablete karşılık gelen toz miktarı çözücü ile 100 mL'ye tamamlanmıştır. Balon joje içeriği 15 dakika ultrasonik banyoda ve 15 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra 0,2 µm por açıklığına sahip naylon membranlı şırınga ucu filtre ile süzülmüştür. Elde edilen filtrat, derişik tablet çözeltisi olarak adlandırılmıştır. Derişik tablet çözeltisi, SDZ ve TMP'nin doğrusal çalışma aralığına girecek biçimde 10 mL'lik balon joje içinde çözücü ile seyreltilmiştir. Bu işlem 10 kez tekrarlanarak UPLC sistemine enjekte edilecek gerçek numune çözeltileri elde edilmiştir.

Gerçek numune çözeltileri, FFD-UPLC ve CCD-UPLC yöntemlerinin Çizelge 3.14'te sunulan kromatografik şartları altında UPLC sistemine enjekte edilmiştir. FFD-UPLC yöntemi ile SDZ'nin miktar tayini için 267 nm'de ve TMP'nin miktar tayini için 230 nm'de PDA dedeksiyon ile kaydedilen kromatogramları Şekil 3.15'te sunulmuştur. CCD-UPLC yönteminin veteriner ticari ürünlerin kantitatif analizine uygulanmasında, SDZ miktar tayini için 267 nm'de ve TMP miktar tayini için 230 nm'de PDA dedeksiyon ile kromatogramlar kaydedilmiş ve Şekil 3.16'da gösterilmiştir.

SDZ ve TMP bileşiklerinin sırasıyla 267 nm ve 230 nm'de kaydedilen bu kromatogramlarındaki pik alanları ve etken maddelere ait olan kalibrasyon denklemleri kullanılarak veteriner preparatta bulunan etken madde miktarları hesaplanmıştır. Hesaplanan miktarlar mg/tablet olarak, ortalama, standart sapma, bağıl standart sapma, standart hata, bağıl hata ve güven aralığı değerleriyle birlikte Çizelge 3.20'de sunulmuştur.



Şekil 3.15. FFD-UPLC yöntemlerinin SDZ-TMP içeren veteriner preparatlarına uygulanması ile elde edilen kromatogramlar



Şekil 3.16. CCD-UPLC yöntemlerinin SDZ-TMP içeren veteriner preparatlarına uygulanması ile elde edilen kromatogramlar

Çizelge 3.20. FFD-UPLC ve CCD-UPLC yöntemlerinin SDZ-TMP içeren veteriner preparatlarına uygulanması ile elde edilen miktar tayini sonuçları

	FFD-UPLC		CCD-UPLC	
	SDZ (mg/tablet)	TMP (mg/tablet)	SDZ (mg/tablet)	TMP (mg/tablet)
T1	993,09	198,03	1000,65	201,12
T2	1013,06	196,32	986,53	193,52
T3	988,61	192,48	998,94	194,95
T4	988,13	200,41	1012,50	201,17
T5	992,85	200,16	1002,60	201,69
T6	986,47	201,53	991,41	193,33
T7	1010,44	192,36	1018,49	194,65
T8	1002,84	196,03	1015,86	201,20
T9	994,31	200,41	998,46	201,45
T10	1006,18	196,82	998,42	194,47
Ortalama	997,60	197,46	1002,38	197,76
SS	9,74	3,27	10,34	3,80
BSS	0,98	1,65	1,03	1,92
SH	3,08	1,03	3,27	1,20
GA	991,56-1003,63	195,43-199,48	995,97-1008,79	195,40-200,11
F-test	1,13	1,35	F-tablo: 3,18	
t-test	1,11	0,25	t-tablo: 2,26	

Etiket değeri: SDZ:1000 mg/tablet, TMP: 200 mg/tablet
SS: Standart sapma
BSS: Bağıl standart sapma
SH: Standart hata
GA: Güven aralığı (p=0,05 için)

Farklı tasarımlarla elde edilen FFD-UPLC ve CCD-UPLC adlı iki optimal kromatografik şartın birbiri yerine kullanılıp kullanılamayacağının tespiti için, bu yöntemlerin farmasötik preparatlara uygulanmasıyla elde edilen analiz sonuçları %95 güven aralığında F-testi ve t-testi kullanılarak istatistiksel olarak karşılaştırılmış ve sonuçlar Çizelge 3.20'de özetlenmiştir. F-testi kullanılarak yapılan karşılaştırmada F-tablo değeri 3,18 iken, SDZ için hesaplanan F-test değeri 1,13; TMP için hesaplanan F-test değeri ise 1,35 olarak hesaplanmıştır. F-test<F-tablo olduğu için analiz sonuçlarının varyansları arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tayin

edilmiştir. t-testi kullanılarak yapılan karşılaştırmada t-tablo değeri 2,26 iken, SDZ için hesaplanan t-test değeri 1,11; TMP için hesaplanan t-test değeri ise 0,25 olarak bulundu. t-test<t-tablo olduğu için analiz sonuçlarının ortalamaları arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edilmiştir. Bu veriler ışığında FFD-UPLC ve CCD-UPLC yöntemleri arasında anlamlı bir fark olmadığı sonucuna varılmıştır.

3.2. SDX ve TMP Karışımının Analizi

Bu tez çalışmasının hedeflerinden biri SDX (sülfadoksin) ve TMP (trimetoprim) etken maddelerini içeren ve enjeksiyonluk çözelti olarak piyasada bulunan veteriner preparatın miktar tayininde kullanılmak üzere bir UPLC metodu geliştirmektir. Bu analiz yönteminin geliştirilmesinde yeterli kromatografik ayrımı en kısa sürede sağlayan kromatografik şartların saptanması için cevap yüzey metodolojisi kullanılmıştır. Cevap yüzey metodolojisi sırasında iki farklı deneysel tasarım modeli kullanılarak, birbirinden farklı iki kromatografik şart elde edilmiştir. Bu şartlar kullanılarak geliştirilen UPLC yöntemleri, analitik validasyon çalışmalarından sonra ticari preparatların analizine uygulanmıştır.

3.2.1. UPLC Yönteminin Optimizasyonu

Yöntem optimizasyonunda ön deneyler: SDX ve TMP karışımına ait ön deneyler kapsamında, kalitatif ve kantitatif faktörlerin etken maddelerin alıkonma zamanları üzerine etkilerinin incelendiği çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Yöntem geliştirme basamağında kalitatif kromatografik şartlardan olan kolon türü ve hareketli fazı oluşturan bileşenlerin türlerinin seçimi için deneysel tasarım ve optimizasyon metodolojisi kullanılmamıştır. Kromatografik yöntemlerin geliştirme basamağında kantitatif faktörlerin optimizasyonu için cevap yüzey metodolojisi kullanılmamıştır.

SDX-TMP kombinasyonunun analizi için yapılan ön denemelerde, laboratuvarda bulunan Waters Acquity marka BEH C_{18} (130Å, 1,7 µm, 2,1 mm x 100

mm) kolon ile hareketli fazı oluşturan organik ve inorganik bileşenlerin karışımlar kullanılarak etken maddelerin piklerinin alıkonma zamanları ve pik şekilleri araştırılmıştır. İlk önce hareketli faz sisteminde organik faz bileşenleri olarak asetonitril ve metanol test edilmiştir. Hareketli fazda asetonitril ile bir inorganik çözelti kullanıldığında SDX ve TMP piklerinin ayrımı düşük olduğu için organik bileşen olarak metanol kullanılmasının uygun olacağı sonucuna varılmıştır. İnorganik bileşen olarak asetik asit ve sodyum asetat ($CH_3COOH+CH_3COONa$) karışımından oluşan tampon sisteminin kullanılması uygun bulunmuştur. Ayrıca tampon derişiminin ayrım üzerine etkisi incelenmiştir. 20 mM ve 40 mM asetat tamponu (pH 5,45) kullanılarak gerçekleştirilen deneylerde, tampon sisteminin derişiminin analitlerin ayrımı üzerine belirgin bir etkisi olmadığı gözlenmiştir. Bu yüzden analiz işlemlerinde analitik kolon ve kromatografik cihazın daha uzun ömürlü kullanılabilmesi amacıyla hareketli fazda $CH_3COOH+CH_3COONa$ tampon sisteminin derişiminin 20 mM olması uygun bulunmuştur. Ayrıca çalışmanın ön deneylerinde numune çözücüsü, enjeksiyon hacmi, numune odası sıcaklığı ve bileşiklerin dedeksiyonu için dalga boyu seçimi çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalar sonucunda belirlenen parametreler Çizelge 3.21'de verilmiştir.

Çizelge 3.21. SDX ve TMP karışımının kromatografik analizleri için belirlenen parametreler

Analitik kolon	:	C_{18} 100 mm (130Å, 1,7 µm, 2,1 mm)
Hareketli faz	:	MeOH ve 20 mM $CH_3COOH+CH_3COONa$ tamponu karışımı
Numune çözücüsü	:	Metanol: su (50:50, h/h)
Enjeksiyon hacmi	:	1 µL
Numune odası sıcaklığı	:	15 °C
Dedeksiyon dalga boyu	:	245 nm

Faktörlerin seçimi ve seviyelerinin belirlenmesi: Kolon sıcaklığının SDX ve TMP bileşiklerinin kromatografik ayrımı üzerine etkisini test etmek için, diğer kromatografik faktörlerin sabit tutulduğu (%30 metanol, %70 pH 4,0 asetat tamponu

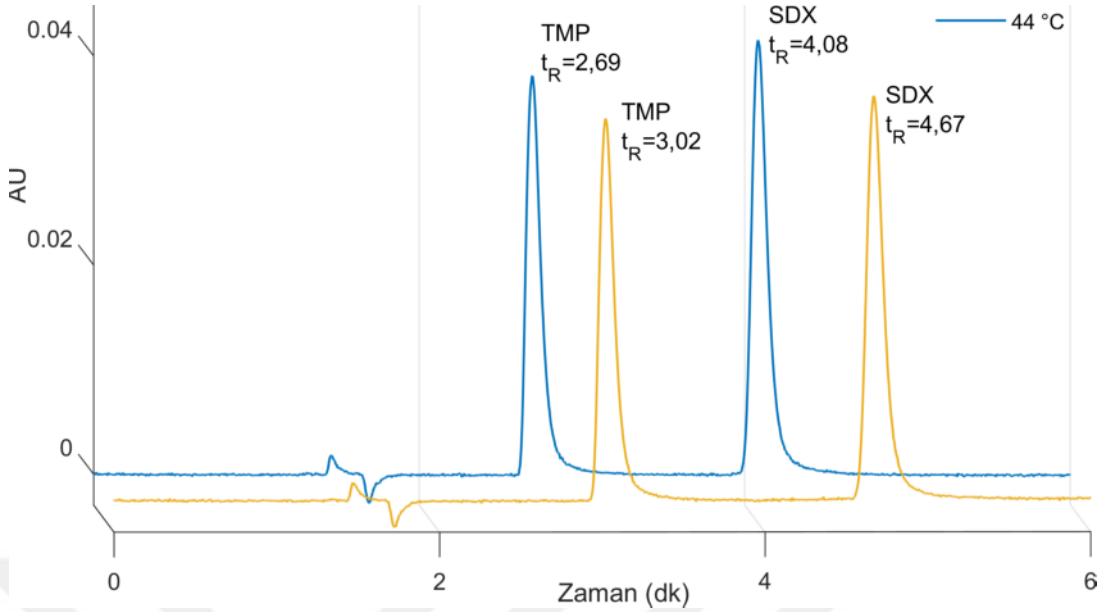
(20 mM); akış hızı: 0,22 mL/dk) ön çalışmalar yapılmıştır. Bu amaçla, kolon sıcaklığı 30 °C ve 44 °C olan koşullarda 15 µg/mL SDX ve 15 µg/mL TMP içeren bir çözeltinin enjeksiyonuyla elde edilen 245 nm'deki kromatogramlar Şekil 3.17'de verilmiştir. İki farklı sıcaklıkta elde edilen kromatogramlardan da görüldüğü gibi, analiz edilen bileşiklerin kromatografik ayrımı, kolon sıcaklığına göre değişmektedir. 30 °C kolon sıcaklığında alıkonma zamanları TMP için 3,02 dk ve SDX için 4,67 dk olarak belirlenmiştir. Oysa ve 44 °C'deki kolon sıcaklığında alıkonma zamanları TMP için 2,69 dk ve SDX için 4,04 dk olarak gözlenmiştir. Dolayısıyla, kolon sıcaklığının etken maddelerin alıkonma zamanları ve ayrımları üzerinde etkili olması nedeniyle, cevap yüzey metodolojisindeki faktörlerden biri olması uygun bulunmuştur.

Daha sonraki deneysel çalışmalarda, kullanılan CH_3COOH+CH_3COONa tamponunun pH değerinin SDX ve TMP bileşiklerinin piklerinin ayrımı üzerine etkisi test edilmiştir. Bu test işleminde diğer kromatografik faktörlerin sabit tutulduğu şartlarda (mobil faz: %30 metanol, %70 asetat tamponu (20 mM); akış hızı: 0,22 mL/dk; kolon sıcaklığı: 30 °C) pH değeri 4,0 ve 5,5 olan iki farklı tampon sistemi kullanılarak iki enjeksiyon yapılmış ve bu enjeksiyonlara ait 245 nm'deki kromatogramlar Şekil 3.18'de sunulmuştur. Bu kromatogramlardan da görüldüğü gibi, kullanılan asetat tamponunun pH değeri 4,0 iken TMP ve SDX için alıkonma zamanları 2,19 dk ve 3,39 dk olarak belirlenmiştir. pH değeri 5,5 olduğunda ise bu etken maddelere ait piklerin kromatografik ayrımının azaldığı ve alıkonma zamanlarının sırasıyla 2,76 dk ve 3,39 dk olarak kaydedildiği görülmektedir. Hareketli fazdaki asetat tamponunun pH değeri, alıkonma zamanları ve ayırıcılık üzerine etki ettiği için, cevap yüzey metodolojisindeki faktörlerden birinin tampon pH'ı olmasına karar verilmiştir.

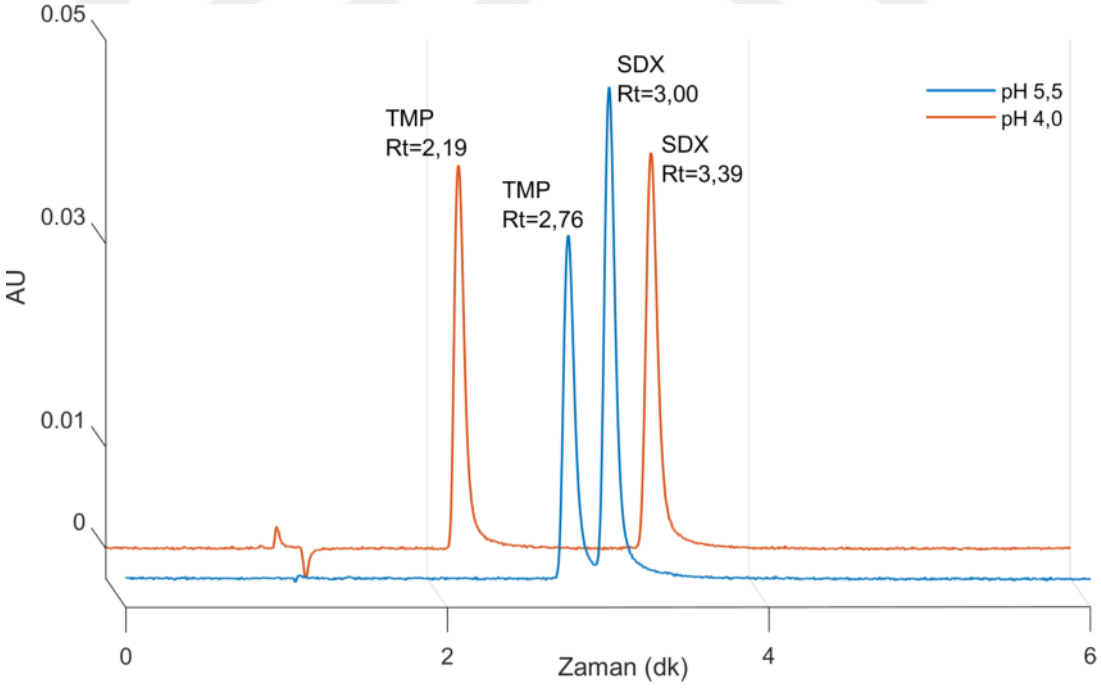
Hareketli fazdaki tampon yüzdesinin SDX ve TMP bileşiklerinin alıkonma süreleri üzerine etkisini gözlemlemek ve deney tasarımındaki seviyelerini belirlemek için %50 ve %70 tampon içeren hareketli fazlar kullanılarak iki enjeksiyon yapılmıştır. 20 mM sodyum asetat tamponunun (pH 4,0) hareketli fazdaki yüzdesi dışında kalan diğer kromatografik şartların sabit tutulduğu (akış hızı 0,16 mL/dk; kolon sıcaklığı: 30°C) şartlarda 245 nm'de kaydedilen kromatogramlar Şekil 3.19'da sunulmuştur. Bu

kromatogramlardan, tampon oranı %50 iken TMP ve SDX için alıkonma zamanlarının sırasıyla 1,63 dk ve 1,97 dk olduğu, tampon oranı %70'e çıktığında ise her iki bileşiğin de alıkonma zamanının arttığı ve TMP için 3,03 dk, SDX için 4,67 dk olduğu görülmektedir. Hareketli fazdaki tampon yüzdesinin ayrım üzerine etkisi beklendiği gibi oldukça yüksek olduğu için cevap yüzey metodolojisi ile optimize edilecek faktörlerden biri olmasına karar verilmiştir.

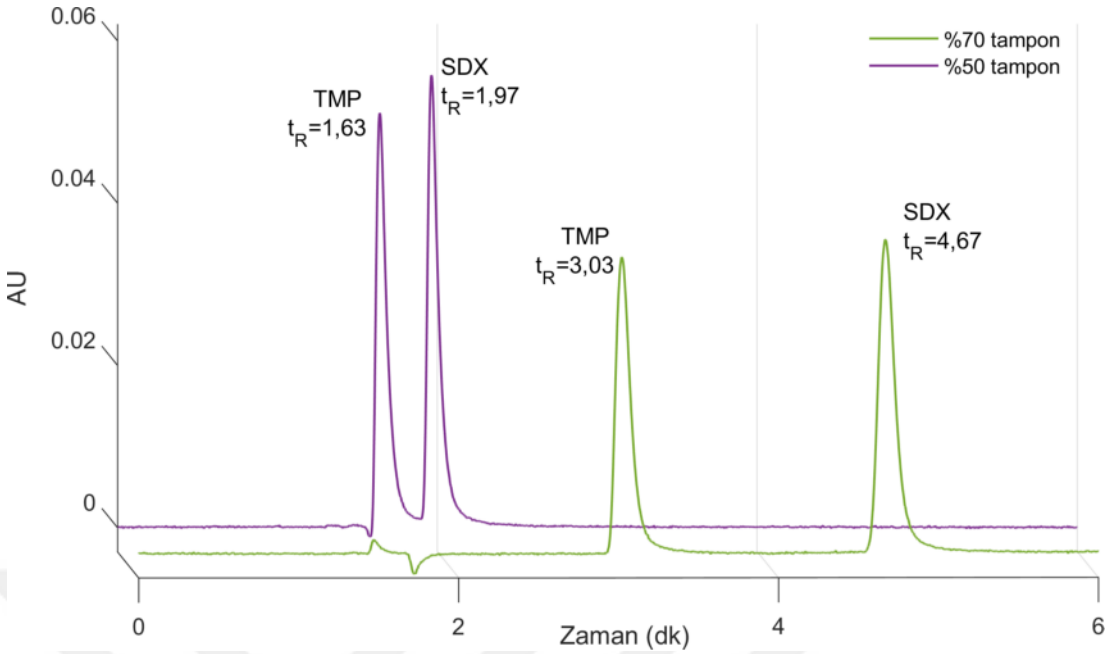
Akış hızının SDX ve TMP etken maddelerinin alıkonma zamanları üzerine etkisini test etmek ve deney tasarımındaki seviyelerini belirlemek için, diğer kromatografik şartların sabit tutulduğu (%30 metanol, %70 pH 4,0 asetat tamponu (20 mM); kolon sıcaklığı: 30 °C) fakat hareketli fazın akış hızının 0,16 mL/dk ve 0,22 mL/dk olarak ayarlandığı iki enjeksiyon yapılmıştır. Bu enjeksiyonlara ait 245 nm'de kaydedilen kromatogramlar Şekil 3.20'de verilmiştir. Bu şekilden görüldüğü üzere, 0,16 mL/dk akış hızıyla elde edilen kromatogramda TMP ve SDX için alıkonma zamanları sırasıyla 3,02 dk ve 4,67 dk olarak; 0,30 mL/dk akış hızıyla ise 2,19 dk ve 3,39 dk olarak belirlenmiştir. Hareketli fazın akış hızı SDX ve TMP'nin alıkonma zamanlarına ve ayrım derecelerine etki ettiği görüldüğü için bu parametrenin cevap yüzey metodolojisindeki faktörlerden biri olmasına karar verilmiştir.



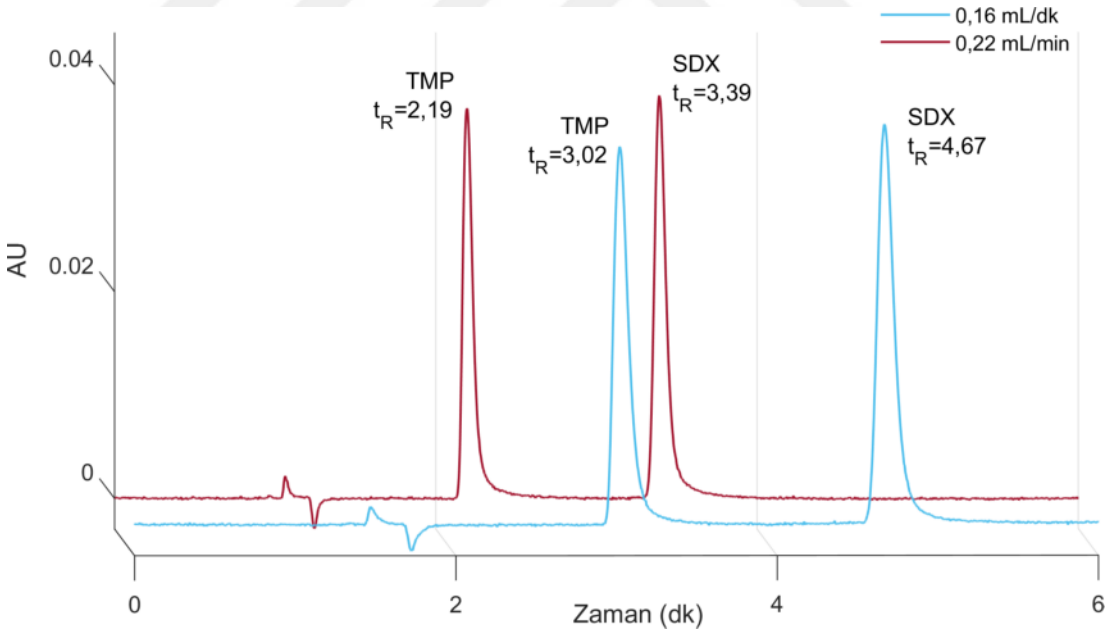
Şekil 3.17. Kolon sıcaklığının SDX ve TMP ayrımına etkisini gösteren kromatogramlar



Şekil 3.18. Hareketli faz sistemindeki tamponun pH değerinin SDX ve TMP ayrımına etkisini gösteren kromatogramlar



Şekil 3.19. Hareketli faz sistemindeki tampon yüzdesinin SDX ve TMP ayrımına etkisini gösteren kromatogramlar



Şekil 3.20. Akış hızının SDX ve TMP ayrımına etkisini gösteren kromatogramlar

Yukarıda bahsedilen ön deneme çalışmalarıyla tespit edilen ve SDX-TMP kombinasyonunun analizinde bileşenlerin kromatografik ayrımı üzerine etki eden faktörlerin listesi aşağıda sunulmuştur:

1) Kolon sıcaklığı (°C)

2) Hareketli fazdaki tamponun pH değeri
3) Hareketli fazdaki tampon yüzdesi (%)
4) Harekctli fazın akış hızı (mL/dk)

Seçilen faktörler üzerine yapılan ön denemelerde, kolon sıcaklığı için 30-44 °C aralığı, hareketli fazdaki 20 mM asetat tamponunun pH değeri için pH 4,0 ve 5,5 aralığı, hareketli fazdaki tampon yüzdesi için %50-70 aralığı ve akış hızı için 0,16-0,22 mL/dk aralığı test edilmiştir. Deneysel tasarım çalışmasında bu faktörlerin seviyelerine, ön denemelerdeki çalışma aralıkları, kromatografik sistemin sınırlandırmaları, faktör ve muhtemel faktör etkileşimlerinin kromatografik ayırıcılık ve analiz zamanları üzerine etkileri göz önünde bulundurularak karar verilmiştir. Faktör seviyeleri olarak kolon sıcaklığı için 35-60°C, tampon pH değeri için 3,75-5,75; tamponunun harekctli fazdaki oranı için %50-74 ve harekctli fazın akış hızı için 0,16-0,24 mL/dk aralıklarının uygun olacağı tayin edilmiştir. Bu saptanan aralıklar -1, 0, ve +1 olmak üzere üç seviye için düzenlenmiştir ve Box-Behnken tasarım için bu faktör seviyeler kullanılmıştır. SDX-TMP karışımının analizi için Box-Behnken tasarımının kullanıldığı cevap yüzey metodolojisindeki faktörler ve bu faktörlerin seviyeleri (-1, 0, +1) Çizelge 3.22'de sunulmuştur.

Çizelge 3.22. SDX ve TMP için uygulanan Box-Behnken tasarımda kullanılan faktörler ve bu faktörlerin seviyeleri

	x_1	x_2	x_3	x_4
Seviye	Kolon sıcaklığı (°C)	Tampon pH'ı	Tampon (%)	Akış hızı (mL/dk)
− 1	35	3,75	50	0,16
0	50	4,75	62	0,20
+ 1	65	5,75	74	0,24

4 faktörün ve 3 seviyenin olduğu bir tam faktöriyel tasarımda deney matrisi 3^4=81 deneye karşılık gelmektedir. 81 ayrı kromatografik şartın kullanıldığı bir cevap yüzey metodolojisi emek, zaman ve elde edilen bilgi oranı bakımından rasyonel olmadığı için SDX ve TMP için uygulanan cevap yüzey metodoloji çalışmalarında

sadece Box-Behnken ve merkezi bileşenli tasarımların kullanılmasına karar verilmiştir. Dört faktörlü bir merkezi bileşenli tasarımın dönebilir özellikte olması için tasarımdaki eksenel noktaların $\alpha = -2$ ve $\alpha = +2$ olması gerekir. Bu seviyeler merkezden çok uzak olduğu için çalışılan sistem için mümkün olmayan veya sistemi çok zorlanan şartların kombinasyonunu gerektirebilir. Nitekim bu çalışmada, Çizelge 2.22'de sunulan faktör seviyeleri merkezi bileşenli tasarım için uygun bulunmamıştır. Bu yüzden merkezi bileşenli tasarım için kullanılacak seviyeler planlanırken, Çizelge 3.22'deki seviyeler modifiye edilmiştir. Merkezi bileşenli tasarımda kromatografik sistemi fazla zorlamayacak, fakat cevapta yeterince değişikliğe sebep olacak aralıklar seçilerek, −2, −1, 0, +1 ve +2 olmak üzere beş seviye için düzenlenmiştir. SDX-TMP karışımının analizi için merkezi bileşenli tasarımın kullanıldığı cevap yüzey metodolojisindeki faktörler ve bu faktörlerin seviyeleri Çizelge 3.23'te sunulmuştur.

Çizelge 3.23. SDX ve TMP için uygulanan merkezi bileşenli tasarımda kullanılan faktörler ve bu faktörlerin seviyeleri

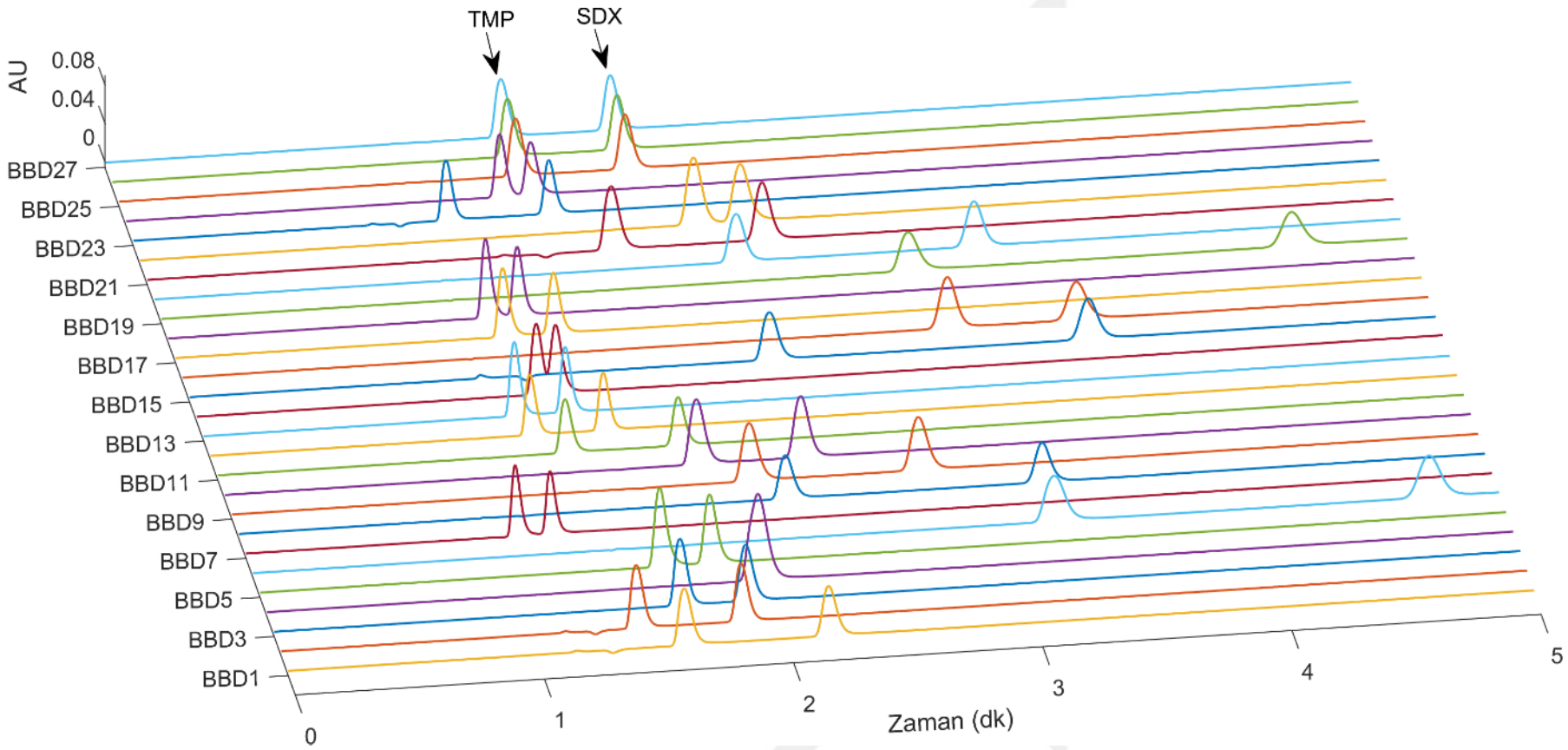
	x_1	x_2	x_3	x_4
Seviye	Kolon sıcaklığı (°C)	Tampon pH'ı	Tampon (%)	Akış hızı (mL/dk)
$-\alpha$	22	3,79	38	0,12
-1	32	4,27	50	0,16
0	42	4,75	62	0,20
$+1$	52	5,23	74	0,24
$+\alpha$	62	5,71	86	0,28

3.2.1.1. Box-Behnken Tasarım ve Yöntem Optimizasyonu

SDX-TMP karışımının analizi için UPLC yöntemi geliştirilmesinde, yöntemin Box-Behnken tasarım ile optimizasyonu için, Çizelge 3.22'de sunulan faktör seviyeleri kullanılmıştır. Deney sayısı $2k \times (k-1) + 1 + n_0$ formülü ile hesaplanan Box-Behnken tasarımda 4 faktör ve merkezi noktadaki iki tekrar ile çalışıldığı takdirde deney sayısı $2.4 \times (4-1) + 1 + 2 = 27$ olarak hesaplanır. Belirlenen faktör seviyeleri kullanılarak Box-Behnken tasarıma göre oluşturulan tasarım matrisi Çizelge 3.24'te sunulmuştur. 20 µg/mL SDX ve 20 µg/mL TMP içeren numune, bu tasarım matrisine göre ayarlanan 27 kromatografik şart kullanılarak UPLC sistemine enjekte edilmiştir. Bu enjeksiyonlara ait 245 nm'de kaydedilen kromatogramlar Şekil 3.21'de sunulmuştur. Elde edilen kromatogramların her biri için zaman eksenindeki pik başlangıç ve pik bitiş noktaları, alıkonma zamanları, varsa vadi noktaları kaydedilmiştir. Piklerin zirve noktalarının ve vadi noktasının y eksenindeki karşılıkları da kaydedildikten sonra her bir kromatograma ait kromatografik cevap fonksiyonu (KCF) değerleri hesaplanmıştır. Her bir kromatografik şart için hesaplanan KCF değerleri, Çizelge 3.24'te "Ölçülen" sütununda listelenmiştir. Modelleme sonrasında her deney için ampirik modelle hesaplanan KCF değerleri, aynı çizelgede "Tahmin edilen" sütununda, ölçülen ve tahmin edilen değerler arasındaki fark ise "Artık" sütununda verilmiştir.

Çizelge 3.24. Box-Behnken tasarım matrisi ile ölçülen, tahmin edilen ve artık KCF değerleri

	x_1	x_2	x_3	x_4	KCF		
	Kolon sıcaklığı (°C)	Tampon pH'ı	Tampon (%)	Akış hızı (mL/dk)	Ölçülen	Tahmin edilen	Artık
BBD1	-1	-1	0	0	2,3533	2,3458	0,0075
BBD2	+1	-1	0	0	3,0532	3,0633	-0,0102
BBD3	-1	+1	0	0	5,5751	5,5382	0,0369
BBD4	+1	+1	0	0	1,2918	1,2725	0,0193
BBD5	0	0	-1	-1	1,3585	1,3391	0,0194
BBD6	0	0	+1	-1	7,8410	7,7954	0,0456
BBD7	0	0	-1	+1	2,7828	2,8017	-0,0188
BBD8	0	0	+1	+1	2,9275	2,9201	0,0073
BBD9	-1	0	0	-1	4,8023	4,8352	-0,0328
BBD10	+1	0	0	-1	2,9402	2,9439	-0,0037
BBD11	-1	0	0	+1	2,9973	3,0116	-0,0143
BBD12	+1	0	0	+1	1,3695	1,3547	0,0148
BBD13	0	-1	-1	0	1,3936	1,3806	0,0130
BBD14	0	+1	-1	0	2,7995	2,7974	0,0021
BBD15	0	-1	+1	0	5,3639	5,3841	-0,0201
BBD16	0	+1	+1	0	5,3376	5,3687	-0,0310
BBD17	-1	0	-1	0	2,2976	2,2998	-0,0021
BBD18	+1	0	-1	0	2,6162	2,6299	-0,0136
BBD19	-1	0	+1	0	7,6962	7,6913	0,0049
BBD20	+1	0	+1	0	3,8064	3,8130	-0,0066
BBD21	0	-1	0	-1	3,1244	3,1293	-0,0050
BBD22	0	-1	0	-1	3,8745	3,8980	-0,0235
BBD23	0	+1	0	+1	1,5058	1,4910	0,0148
BBD24	0	+1	0	+1	2,1200	2,1237	-0,0038
BBD25	0	0	0	0	2,4528	2,4517	0,0011
BBD26	0	0	0	0	2,4510	2,4517	-0,0008
BBD27	0	0	0	0	2,4514	2,4517	-0,0003



Şekil 3.21. SDX ve TMP için Box-Behnken tasarıma göre elde edilen kromatogramlar

Çizelge 3.24'te sunulmuş olan ölçülen KCF değerleri ile bağımsız değişkenler arasındaki ilişkiyi modellemek için, en küçük kareler tekniğinden yararlanılarak ikinci dereceden ampirik bir model oluşturulmuştur. Bu modeldeki terimlerin katsayıları ile katsayılara ait t-test ve p-değerleri Çizelge 3.25'te verilmiştir.

Çizelge 3.25. SDX-TMP için BBD ile elde edilen ampirik modele ait katsayılar ve p-anlamlılık değerleri

	Katsayı	t-test	p-değeri
Kesim değeri	2,452	156,00	$3,23 \times 10^{-21}$
x_1	-0,887	-112,88	$1,57 \times 10^{-19}$
x_2	0,350	44,59	$1,06 \times 10^{-14}$
x_3	1,644	209,17	$9,59 \times 10^{-23}$
x_4	-0,853	-108,57	$2,50 \times 10^{-19}$
x_1^2	0,490	41,53	$2,46 \times 10^{-14}$
x_2^2	0,114	9,64	$5,29 \times 10^{-7}$
x_3^2	1,167	99,03	$7,52 \times 10^{-19}$
x_4^2	0,096	8,07	$3,45 \times 10^{-6}$
x_1x_2	-1,246	-91,53	$1,93 \times 10^{-18}$
x_1x_3	-1,052	-77,30	$1,46 \times 10^{-17}$
x_1x_4	0,059	4,31	$1,02 \times 10^{-3}$
x_2x_3	-0,358	-26,31	$5,57 \times 10^{-12}$
x_2x_4	-0,034	-2,50	$2,81 \times 10^{-2}$
x_3x_4	-1,585	-116,41	$1,08 \times 10^{-19}$

Çizelge 3.25'te görüldüğü üzere, modeldeki terimlerin p-değerleri, bu çalışmada seçilen anlamlılık seviyesi olan $\alpha = 0,05$'ten küçüktür ve t-test değerleri, 2,18 olan t-tablo değerinden büyüktür. Yani 0,05 anlamlılık düzeyinde tüm terimler anlamlı derecede cevap üzerine etki etmektedir. Bu yüzden kromatografik cevabın modellenmesinde, tüm terimlerin kullanıldığı bir fonksiyon gereklidir. Kromatografik

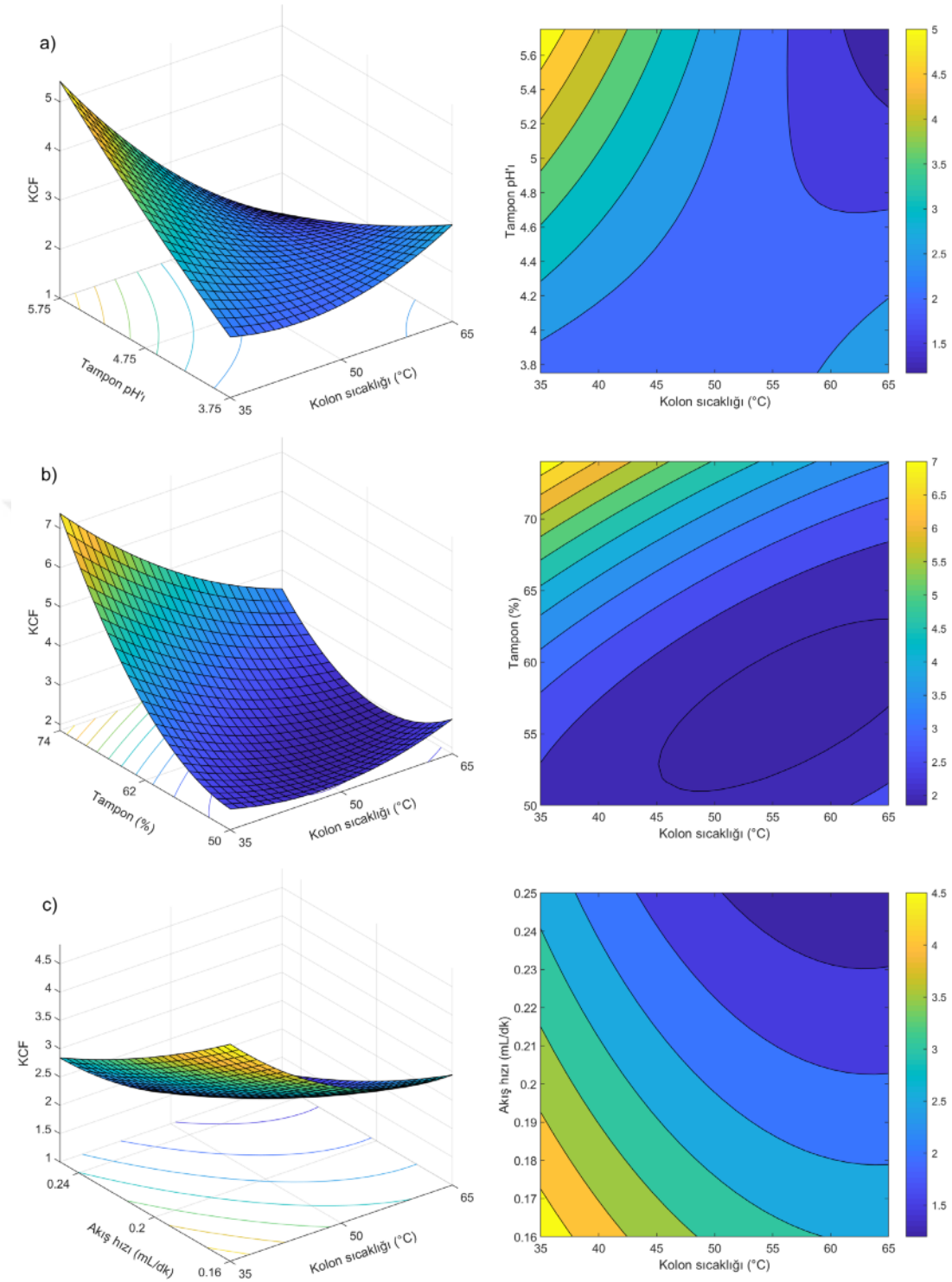
cevabı anlamlı olarak etkileyen terimler kullanılarak oluşturulan matematiksel model Eşitlik 3.4'te verilmiştir.

$$y = 2{,}452 - 0{,}887x_1 + 0{,}350x_2 + 1{,}644x_3 - 0{,}853x_4 + 0{,}490x_1^2 + 0{,}114x_2^2 + 1{,}167x_3^2 + 0{,}096x_4^2 - 1{,}246x_1x_2 - 1{,}052x_1x_3 + 0{,}059x_1x_4 - 0{,}358x_2x_3 - 0{,}034x_2x_4 - 1{,}585x_3x_4$$

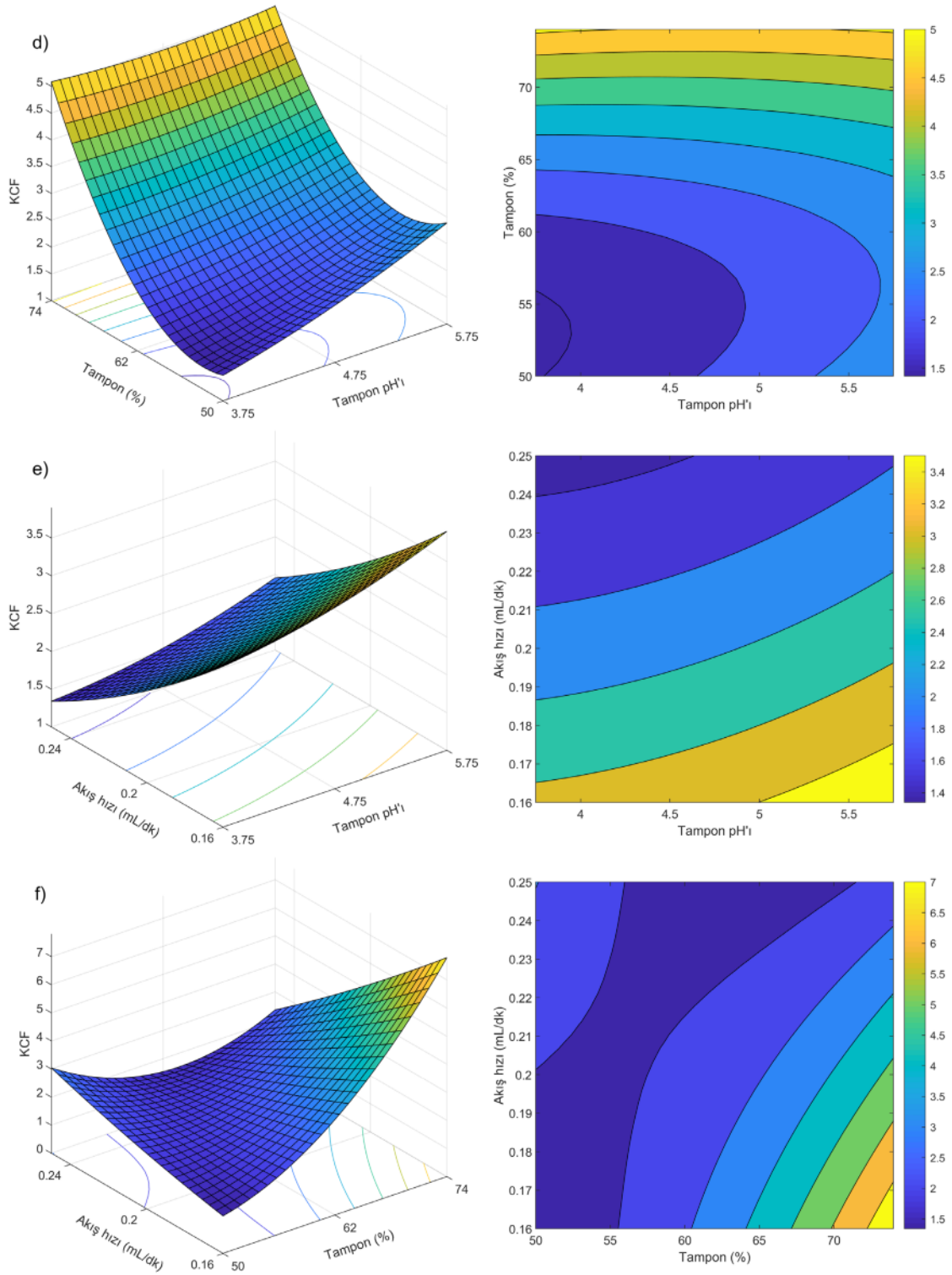
((Eşitlik 3.4)

Bu modelde y kromatografik cevap faktörünü; x1, x2, x3ve x4 sırasıyla kolon sıcaklığı, tampon pH'ı, tampon yüzdesi ve akış hızı değişkenlerinin doğrusal terimlerini; x_1^2, x_2^2, x_3^2 ve x_{34}^2 bu değişkenlerin üstel terimlerini; x_1x_2, x_1x_3, x_1x_4, x_2x_3, x_2x_4, ve x_3x_4 ise bu değişkenlerin etkileşim terimlerini temsil etmektedir.

Box-Behnken tasarım kullanılarak elde edilen ve faktörlerin KCF üzerine olan ikili etkilerini gösteren cevap yüzey grafikleri ve eş yükselti diyagramları Şekil 3.20'de sunulmuştur.



Şekil 3.22. SDX-TMP için BBD ile elde edilen a) Kolon sıcaklığı-tampon pH'ı ile KCF b) kolon sıcaklığı-tampon yüzdesi ile KCF c) kolon sıcaklığı-akış hızı ile KCF d) tampon pH'ı-tampon yüzdesi ile KCF e) tampon pH'ı-akış hızı ile KCF f) tampon yüzdesi-akış hızı ile KCF arasındaki ilişkiyi gösteren yüzey grafikleri ve eş yükselti diyagramları



Çizelge 3.22. Devam. SDX-TMP için BBD ile elde edilen a) Kolon sıcaklığı-tampon pH'ı ile KCF b) kolon sıcaklığı-tampon yüzdesi ile KCF c) kolon sıcaklığı-akış hızı ile KCF d) tampon pH'ı-tampon yüzdesi ile KCF e) tampon pH'ı-akış hızı ile KCF f) tampon yüzdesi-akış hızı ile KCF arasındaki ilişkiyi gösteren yüzey grafikleri ve eş yükselti diyagramları

Şekil 3.22'de sunulan cevap yüzey grafikleri ve eş yükselti diyagramları incelendiğinde, seçilen faktörlerin KCF üzerine farklı derecelerde etki ettikleri, faktörler arası etkileşimlerin de cevap üzerinde önemli değişiklikler yaptığı görülmektedir. Şekil 3.22.a, kolon sıcaklığı ve tampon pH'ı arasındaki etkileşimin cevap üzerinde önemli bir etkisi olduğunu göstermektedir. Kolon sıcaklığının ve tampon pH'ının yüksek olduğu bölge, en düşük KCF değerlerinin elde edildiği bölgedir. Tamponun pH değerinin yüksek olduğu ve kolon sıcaklığının düşük olduğu bölgede ise en yüksek KCF değerleri gözlenmektedir. Eş yükselti eğrisinde görülen "eyer" şekli, faktörlerin karesel etkilerinin de olduğu anlamına gelmektedir.

Şekil 3.22.b'de tampon yüzdesinin yüksek, kolon sıcaklığının düşük olduğu şartlarda KCF'nin yüksek değerler aldığı görülmektedir. KCF'nin en düşük olduğu bölge ise orta-yüksek kolon sıcaklığı ve düşük tampon yüzdesinin kullanıldığı şartlara karşılık gelmektedir. Bu bölge iç bükey kıvrımın merkezi olup, kolon sıcaklığı ve tampon yüzdesinin karesel etkilerinin cevabı etkilediğini göstermektedir. Eş yükselti eğrilerinin eksenlere çapraz oluşu kolon sıcaklığı ve tampon yüzdesi arasındaki etkileşimin cevap üzerinde etkili olduğu anlamına gelmektedir.

Şekil 3.22.c'de kolon sıcaklığı ve akış hızı arasındaki etkileşimin de cevap üzerine etkili olduğu görülmektedir. Bu şekilden akış hızı ve kolon sıcaklığının yüksek olduğu durumlarda düşük KCF değerleri; kolon sıcaklığı ve akış hızının düşük olduğu koşullarda ise yüksek KCF değerlerinin elde edildiği anlaşılmaktadır. Bu grafikte KCF değerinin daha dar bir bölgede değişiyor oluşu, akış hızı ve kolon sıcaklığı etkilerinin, diğer faktörlere göre nispeten daha düşük olduğunu gösterir. Tampon pH'ı ve tampon yüzdesinin cevap üzerine etkisini gösteren Şekil 3.22.d'de bu iki faktör arasındaki etkileşimin de KCF'nin üzerinde etkili olduğu görülmektedir. Özellikle bu etkileşim düşük tampon yüzdesi kullanılan bölgede daha fazladır. En düşük KCF değerinin gözlendiği bölge düşük tampon oranı ve düşük pH değerine

sahip tamponun kullanıldığı şartlardır. Tampon yüzdesi seviyesinin yüksek olduğu bölgede ise tampon pH'ının cevap üzerine etkisi daha azdır.

Şekil 3.22.c'de tampon pH'ı ve akış hızının KCF ile ilişkisini gösteren cevap yüzey grafiği ve eş yükselti grafiği verilmiştir. Bu grafikte, cevaptaki varyasyonun diğer grafiklere göre daha düşük olduğu göze çarpmaktadır. Bunun nedeni akış hızı ve tampon pH'ının cevap üzerine etkilerinin diğer faktör çiftlerine göre daha düşük olmasıdır. Fakat eş yükselti eğrilerinin grafikteki eksenlere paralel olmayışı, iki faktörün arasındaki etkileşmenin cevaba katkıda bulunduğu anlamına gelmektedir. En düşük KCF değeri, düşük pH ve yüksek akış hızı seviyelerinde gözlenmektedir. Akış hızı ve tampon yüzdesinin cevap ile ilişkisini gösteren Şekil 3.22.f'ye göre, yüksek tampon oranı ve düşük akış hızı seviyelerinde KCF değeri artmaktadır. Tampon yüzdesin azaldıkça ve akış hızı arttıkça KCF değerinin önce azaldığı, sonra tekrar arttığı görülmektedir. Bu durum, her iki faktörün de karesel etkilerinin olması nedeniyle ortaya çıkan ve eş yükselti grafiğinde kolayca fark edilen "eyer" şeklinin sonucudur. Bu şekilden tampon yüzdesi ve akış hızı arasındaki etkileşimin cevap üzerinde oldukça etkili olduğu da anlaşılmaktadır.

Eşitlik 3.4'te verilen model kullanılarak bağımsız değişkenlerin optimal değerleri Çizelge 3.26'da sunulduğu gibi hesaplanmıştır.

Çizelge 3.26. SDX-TMP karışımı için Box-Behnken tasarımla elde edilen optimal kromatografik şartlar

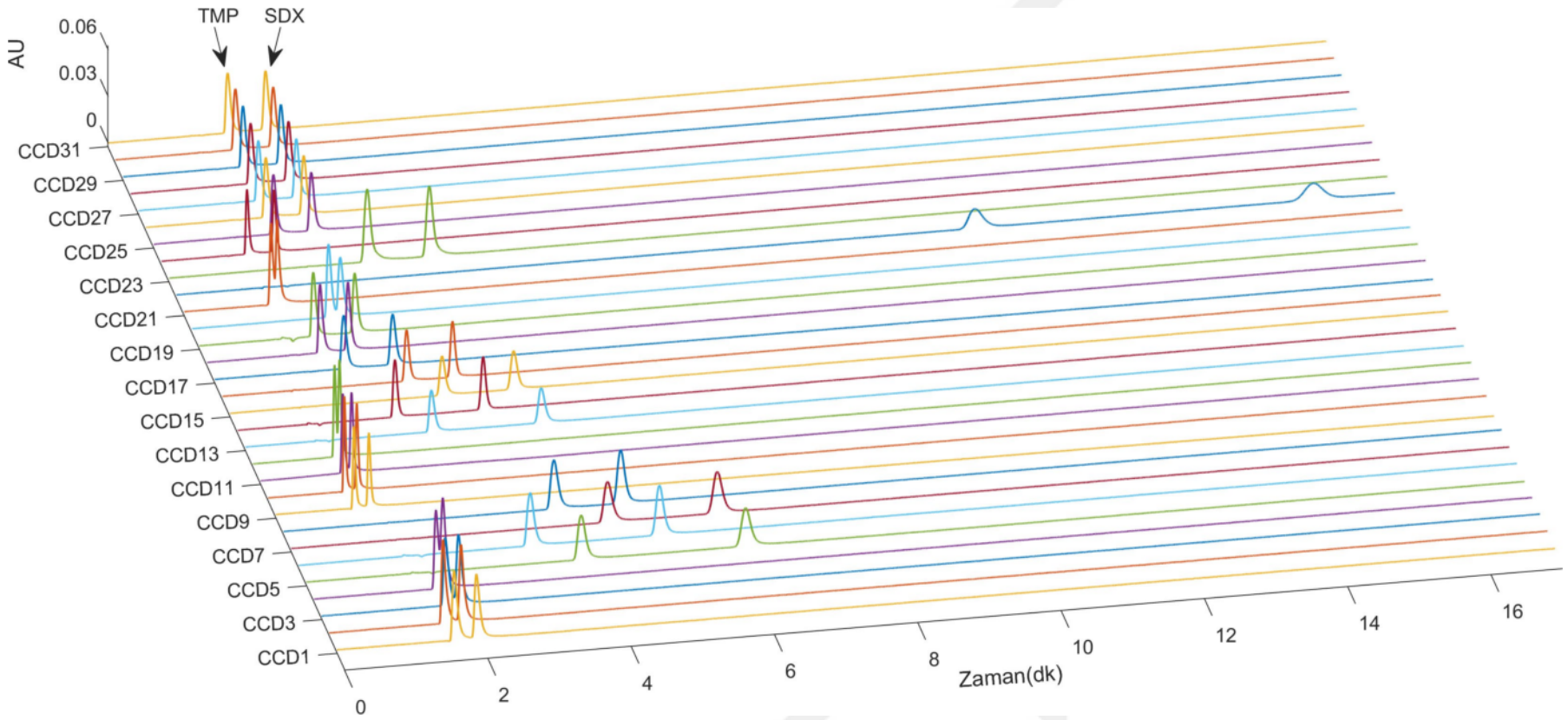
	Faktör adı	Optimal değer
x_1	Kolon sıcaklığı (°C)	56,8
x_2	Tampon pH'ı	4,84
x_3	Tampon yüzdesi (%)	55,6
x_4	Akış hızı (mL/dk)	0,20

3.2.1.2. Merkezi Bileşenli Tasarım ve Yöntem Optimizasyonu

SDX-TMP karışımının analizine yönelik geliştirilecek UPLC yönteminin merkezi bileşenli tasarım ile optimizasyonu için, Çizelge 3.23'te sunulan faktör seviyeleri kullanılmıştır. Deney sayısı $N = 2^k + (2k + 1) + n_0$ formülü ile hesaplanan merkezi bileşenli tasarımda dört faktör ve merkezi noktadaki altı tekrar ile çalışıldığı takdirde deney sayısı $2^4 + (2.4 + 1) + 6 = 31$ olarak hesaplanır. Belirlenen faktör seviyeleri kullanılarak merkezi bileşenli tasarıma göre oluşturulan tasarım matrisi Çizelge 3.27'de sunulmuştur. 20 µg/mL SDX ve 20 µg/mL TMP içeren numune, bu tasarım matrisindeki 31 kromatografik koşul kullanılarak UPLC sistemine enjekte edilmiştir. Bu enjeksiyonlara ait 245 nm'de kaydedilen kromatogramlar Şekil 3.23'te sunulmuştur. Elde edilen kromatogramların her biri için zaman eksenindeki pik başlangıç ve pik bitiş noktaları, alıkonma zamanları, varsa vadi noktaları kaydedilmiştir. Piklerin zirve noktalarının ve vadi noktasının y eksenindeki karşılıkları da kaydedildikten sonra her bir kromatograma ait kromatografik cevap fonksiyonu (KCF) değerleri hesaplanmıştır. Her bir kromatografik şart için hesaplanan KCF değerleri, Çizelge 3.27'de "Ölçülen" sütununda listelenmiştir. Modelleme sonrasında her deney için ampirik modelle hesaplanan KCF değerleri, aynı çizelgede "Tahmin edilen" sütununda, ölçülen ve tahmin edilen değerler arasındaki fark ise "Artık" sütununda verilmiştir.

Çizelge 3.27. Merkezi bileşenli tasarıma göre planlanan tasarım matrisi ve elde edilen KCF değerleri

	x_1 Kolon sıcaklığı (°C)	x_2 Tampon pH'ı	x_3 Tampon (%)	x_4 Akış hızı (mL/dk)	KCF Ölçülen	KCF Tahmin edilen	Artık
CCD1	-1	-1	-1	-1	2,4278	2,4219	0,0059
CCD2	1	-1	-1	-1	3,1375	3,1645	-0,0270
CCD3	-1	1	-1	-1	4,0255	4,0486	-0,0230
CCD4	1	1	-1	-1	6,0187	5,9577	0,0610
CCD5	-1	-1	1	-1	3,4082	3,4171	-0,0089
CCD6	1	-1	1	-1	2,6797	2,6553	0,0244
CCD7	-1	1	1	-1	3,1504	3,1407	0,0098
CCD8	1	1	1	-1	3,5214	3,5454	-0,0240
CCD9	-1	-1	-1	1	2,0968	2,0896	0,0072
CCD10	1	-1	-1	1	2,3666	2,3673	-0,0007
CCD11	-1	1	-1	1	2,9408	2,9561	-0,0153
CCD12	1	1	-1	1	4,3923	4,4004	-0,0080
CCD13	-1	-1	1	1	3,6398	3,6917	-0,0519
CCD14	1	-1	1	1	2,4712	2,4650	0,0062
CCD15	-1	1	1	1	2,6652	2,6551	0,0101
CCD16	1	1	1	1	2,5982	2,5950	0,0032
CCD17	$-\alpha$	0	0	0	2,1779	2,1487	0,0292
CCD18	$+\alpha$	0	0	0	2,8097	2,8311	-0,0214
CCD19	0	$-\alpha$	0	0	2,2471	2,2286	0,0185
CCD20	0	$+\alpha$	0	0	3,9746	3,9853	-0,0107
CCD21	0	0	$-\alpha$	0	5,1072	5,1111	-0,0039
CCD22	0	0	$+\alpha$	0	4,3127	4,3010	0,0117
CCD23	0	0	0	$-\alpha$	3,2183	3,2313	-0,0130
CCD24	0	0	0	$+\alpha$	1,9693	1,9486	0,0208
CCD25	0	0	0	0	2,5366	2,5370	-0,0003
CCD26	0	0	0	0	2,5375	2,5370	0,0005
CCD27	0	0	0	0	2,5356	2,5370	-0,0014
CCD28	0	0	0	0	2,5362	2,5370	-0,0008
CCD29	0	0	0	0	2,5372	2,5370	0,0002
CCD30	0	0	0	0	2,5355	2,5370	-0,0015
CCD31	0	0	0	0	2,5403	2,5370	0,0033



Şekil 3.23. SDX ve TMP için merkezi bileşenli tasarıma göre elde edilen kromatogramlar

Çizelge 3.27'de sunulmuş olan ölçülen KCF değerleri ile bağımsız değişkenler arasındaki ilişkiyi modellemek için, en küçük kareler tekniğinden yararlanılarak ikinci dereceden ampirik bir model oluşturulmuştur. Bu modeldeki terimlerin katsayıları ile bu katsayılara ait t-test ve p-değerleri Çizelge 3.28'de verilmiştir.

Çizelge 3.28. SDX-TMP için CCD ile elde edilen ampirik modele ait katsayılar ve istatistiksel sonuçları

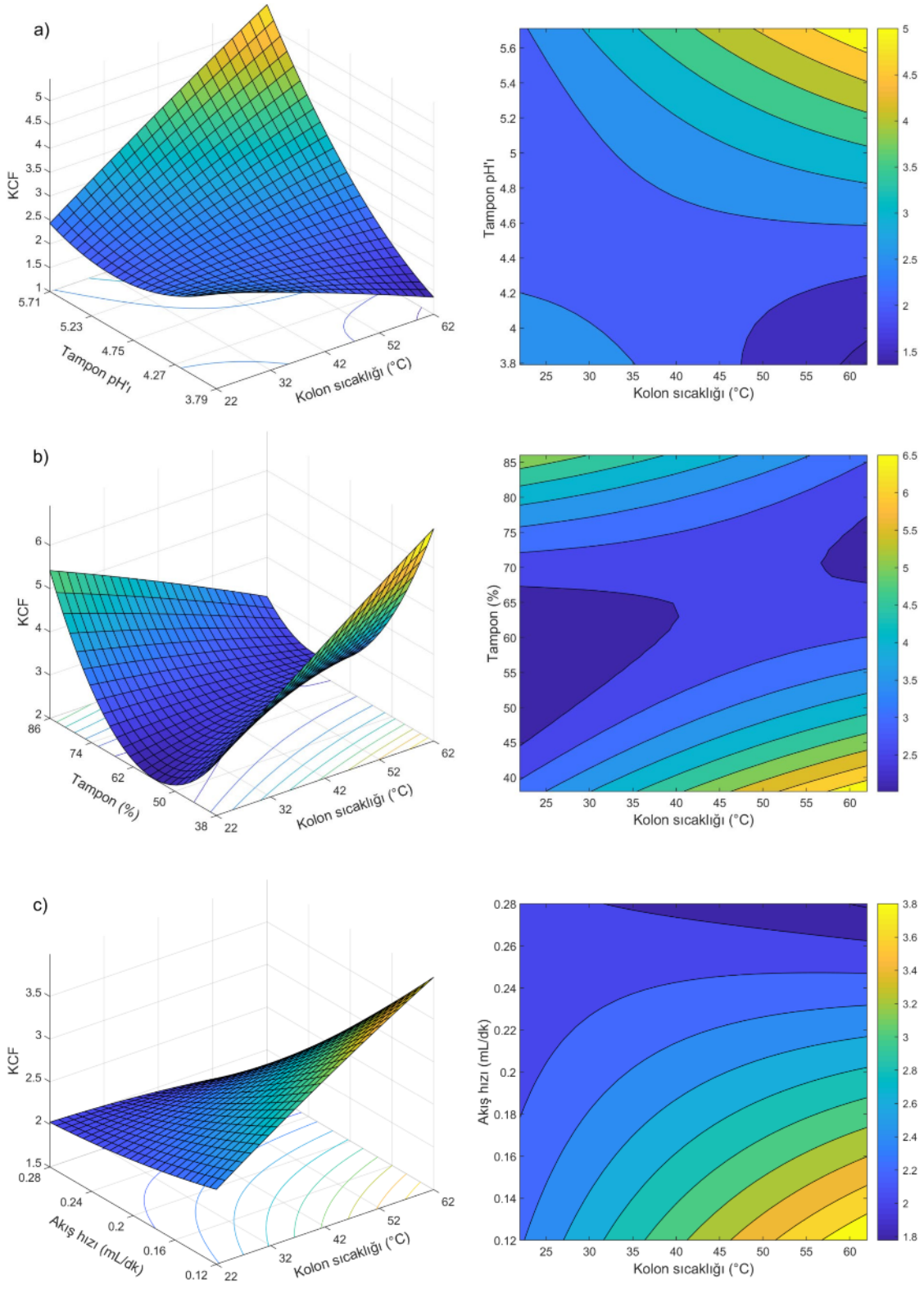
	Katsayı	t-test	p-değeri
Kesim değeri	2,537	244,19	$5{,}27 \times 10^{-30}$
x_1	0,171	30,41	$1{,}39 \times 10^{-15}$
x_2	0,439	78,27	$4{,}17 \times 10^{-22}$
x_3	-0,202	-36,10	$9{,}25 \times 10^{-17}$
x_4	-0,321	-57,15	$6{,}27 \times 10^{-20}$
x_1^2	-0,012	-2,29	$3{,}59 \times 10^{-2}$
x_2^2	0,142	27,72	$5{,}94 \times 10^{-15}$
x_3^2	0,542	105,49	$3{,}55 \times 10^{-24}$
x_4^2	0,013	2,57	$2{,}04 \times 10^{-2}$
x_1x_2	0,292	42,44	$7{,}13 \times 10^{-18}$
x_1x_3	-0,376	-54,73	$1{,}25 \times 10^{-19}$
x_1x_4	-0,116	-16,91	$1{,}25 \times 10^{-11}$
x_2x_3	-0,475	-69,24	$2{,}95 \times 10^{-21}$
x_2x_4	-0,190	-27,65	$6{,}16 \times 10^{-15}$
x_3x_4	0,152	22,08	$2{,}07 \times 10^{-13}$

Çizelge 3.28'de görüldüğü üzere, modeldeki terimlerin p-değerleri, bu çalışmada seçilen anlamlılık seviyesi olan $\alpha = 0{,}05$'ten küçüktür ve t-test değerleri, 2,12 olan t-tablo değerinden büyüktür. Yani 0,05 anlamlılık düzeyinde tüm terimler anlamlı derecede cevap üzerine etki etmektedir. Bu yüzden kromatografik cevabın modellenmesinde, tüm terimlerin kullanıldığı bir fonksiyon gereklidir. Kromatografik cevabı anlamlı olarak etkileyen terimler kullanılarak oluşturulan matematiksel model Eşitlik 3.5'te verilmiştir.

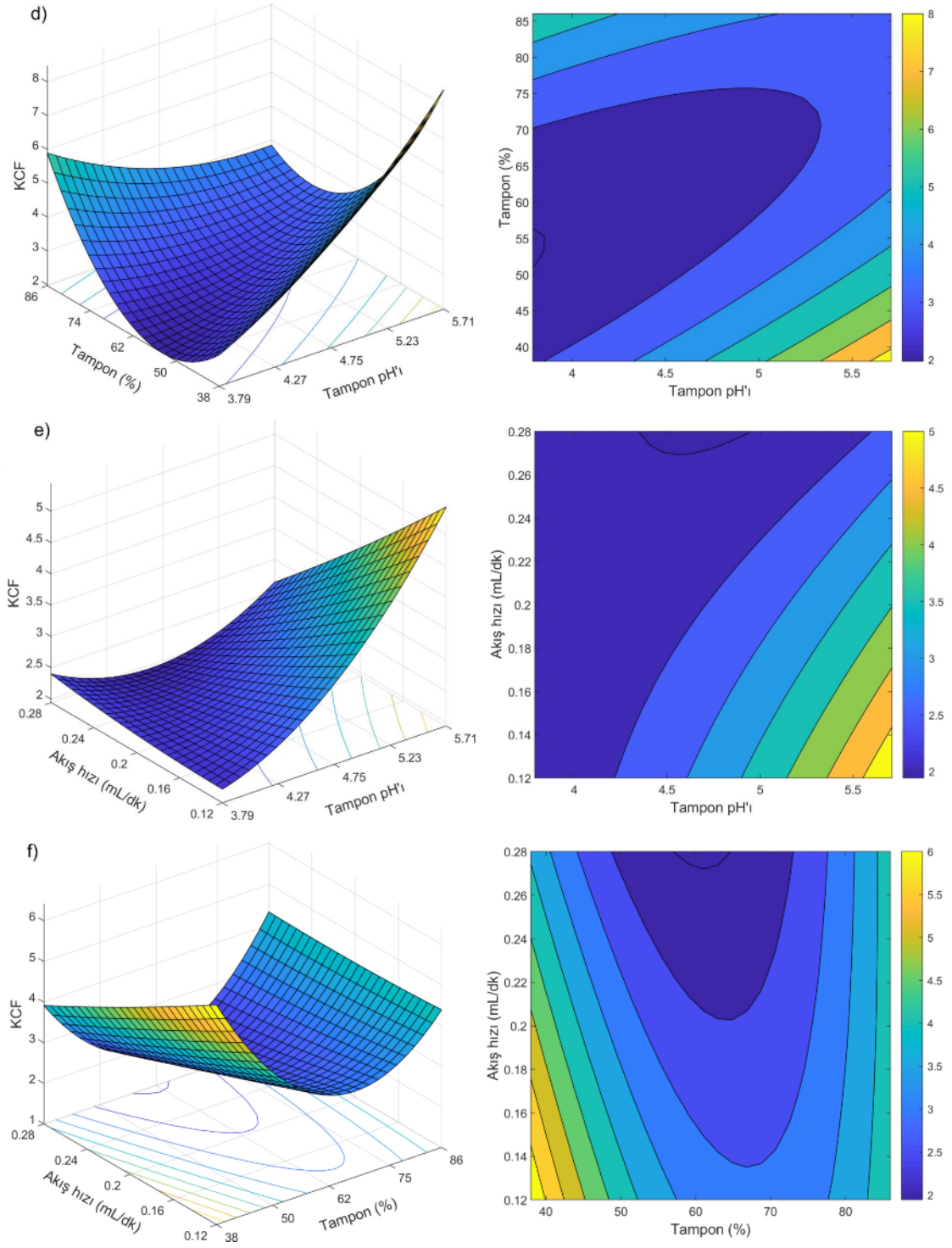
$$y = 2{,}537 + 0{,}171x_1 + 0{,}439x_2 - 0{,}202x_3 - 0{,}321x_4 - 0{,}012x_1^2 + 0{,}142x_2^2 + 0{,}542x_3^2 + 0{,}013x_4^2 + 0{,}292x_1x_2 - 0{,}376x_1x_3 - 0{,}116x_1x_4 - 0{,}476x_2x_3 - 0{,}190x_2x_4 + 0{,}152x_3x_4$$ (Eşitlik 3.5)

Bu modelde *y* kromatografik cevap faktörünü; x_1, x_2, $x_3$ve x_4 sırasıyla kolon sıcaklığı, tampon pH'ı, tampon yüzdesi ve akış hızı değişkenlerinin doğrusal terimlerini; x_1^2, x_2^2, x_3^2 ve x_{34}^2 bu değişkenlerin üstel terimlerini; x_1x_2, x_1x_3, x_1x_4, x_2x_3, x_2x_4, ve x_3x_4 ise bu değişkenlerin etkileşim terimlerini temsil etmektedir.

Merkezi bileşenli tasarım kullanılarak elde edilen ve faktörlerin KCF üzerine olan ikili etkilerini gösteren cevap yüzey grafikleri ve eş yükselti diyagramları Şekil 3.24'te sunulmuştur.



Şekil 3.24. SDX-TMP için CCD ile elde edilen a) Kolon sıcaklığı-tampon pH'ı ile KCF b) kolon sıcaklığı-tampon yüzdesi ile KCF c) kolon sıcaklığı-akış hızı ile KCF d) tampon pH'ı-tampon yüzdesi ile KCF e) tampon pH'ı-akış hızı ile KCF f) tampon yüzdesi-akış hızı ile KCF arasındaki ilişkiyi gösteren yüzey grafikleri ve eş yükselti diyagramları



Şekil 3.24. Devam. SDX-TMP için CCD ile elde edilen a) Kolon sıcaklığı-tampon pH'ı ile KCF b) kolon sıcaklığı-tampon yüzdesi ile KCF c) kolon sıcaklığı-akış hızı ile KCF d) tampon pH'ı-tampon yüzdesi ile KCF e) tampon pH'ı-akış hızı ile KCF f) tampon yüzdesi-akış hızı ile KCF arasındaki ilişkiyi gösteren yüzey grafikleri ve eş yükselti diyagramları

Şekil 3.24'te sunulan cevap yüzey grafikleri ve eş yükselti diyagramları incelendiğinde, seçilen faktörlerin KCF üzerine farklı derecelerde etki ettikleri, faktörler arası etkileşimlerin de cevap önemli değişiklikler yaptığı görülmektedir. Şekil 3.24.a'da sunulan cevap yüzey grafiği ve eş yükselti diyagramı, kolon sıcaklığı ve tampon pH'ı arasındaki etkileşimin ve faktörlerin karesel etkilerinin cevap üzerinde önemli bir etkisi olduğunu göstermektedir. Kolon sıcaklığının ve tampon pH'ının yüksek olduğu bölge en yüksek KCF değerlerinin elde edildiği bölgedir. Tampon pH değerinin düşük, kolon sıcaklığının yüksek olduğu bölgede ise en düşük KCF değerleri gözlenmektedir.

Şekil 3.24.b'de tampon yüzdesinin düşük, kolon sıcaklığının yüksek olduğu şartlarda KCF'nin yüksek değerler aldığı görülmektedir. Tampon yüzdesi eksenindeki belirgin iç bükey kıvrım bu faktöre ait karesel etkinin cevap üzerinde önemli bir etkisi olduğunu gösterir. Kolon sıcaklığı eksenindeki dış bükey kıvrım ise daha az belirgin olduğuna göre, bu faktörün karesel etkisi cevap üzerine göreceli olarak daha az etki etmektedir. Bu karesel etkilerin sonucu olarak ortaya çıkan "eyer" şeklinin faktör eksenlerine paralel olmayışı faktörler arası etkileşimin yüksek olduğu anlamına gelir. Nitekim Şekil 3.24.b'de düşük KCF seviyelerine neden olan iki farklı bölgenin olduğu görülmektedir: düşük kolon sıcaklığı ve düşük-orta tampon oranı ile yüksek kolon sıcaklığı ve yüksek-orta tampon oranı. Şekil 3.24.c'de kolon sıcaklığı ve akış hızı arasındaki etkileşimin de cevap üzerine etkili olduğu görülmektedir. Akış hızı ve kolon sıcaklığının yüksek olduğu durumlarda düşük KCF değerleri; kolon sıcaklığının yüksek ve akış hızının düşük olduğu koşullarda ise yüksek KCF değerlerinin elde edildiği anlaşılmaktadır. Bu grafikte KCF değerinin daha dar bir bölgede değişiyor oluşu, akış hızı ve kolon sıcaklığı etkilerinin, diğer faktörlere göre nispeten daha düşük olduğunu gösterir.

Tampon pH'ı ve tampon yüzdesinin cevap üzerine etkisini gösteren Şekil 3.24.d'de bu iki faktör arasındaki etkileşimin KCF'nin üzerinde etkili olduğu görülmektedir. Tampon yüzdesi ve tampon pH'ının düşük seviyelerinde düşük KCF değerleri gözlenmektedir. Tampon yüzdesinin düşük ve tampon pH'ının yüksek seviyelerinde ise yüksek cevap elde edilmektedir. Tampon yüzdesi eksenindeki iç

bükey kıvrım, bu faktörün karesel etkisinin de olduğuna işaret etmektedir. Şekil 3.24.e'de tampon pH'ı ve akış hızının KCF ile ilişkisini gösteren cevap yüzey grafiği ve eş yükselti grafiği verilmiştir. Bu iki faktör arasındaki etkileşimin cevap üzerindeki etkisi özellikle yüksek tampon seviyelerinde oldukça fazladır. Tampon pH'ının düşük seviyesinde akış hızından bağımsız olarak düşük KCF değerleri elde edilmektedir. Akış hızı ve tampon yüzdesinin cevap ile ilişkisini gösteren Şekil 3.24.f'ye göre düşük tampon oranı ve akış hızı seviyelerinde KCF değeri artmaktadır. KCF'nin en düşük değerleri aldığı bölge, tampon yüzdesinin orta seviyesi ve akış hızının yüksek seviyesindedir. Bu şekilde de tampon yüzdesinin karesel etkisi nedeniyle cevap yüzeyinde iç bükey kıvrım oluşmuştur.

Eşitlik 3.5'te verilen model kullanılarak bağımsız değişkenlerin optimal değerleri Çizelge 3.29'da sunulduğu gibi hesaplanmıştır.

Çizelge 3.29. SDX-TMP karışımı için merkezi bileşenli tasarımla elde edilen optimal kromatografik şartlar

	Faktör adı	Optimal değer
x_1	Kolon sıcaklığı (°C)	31,2
x_2	Tampon pH'ı	3,89
x_3	Tampon yüzdesi (%)	49,3
x_4	Akış hızı (mL/dk)	0,23

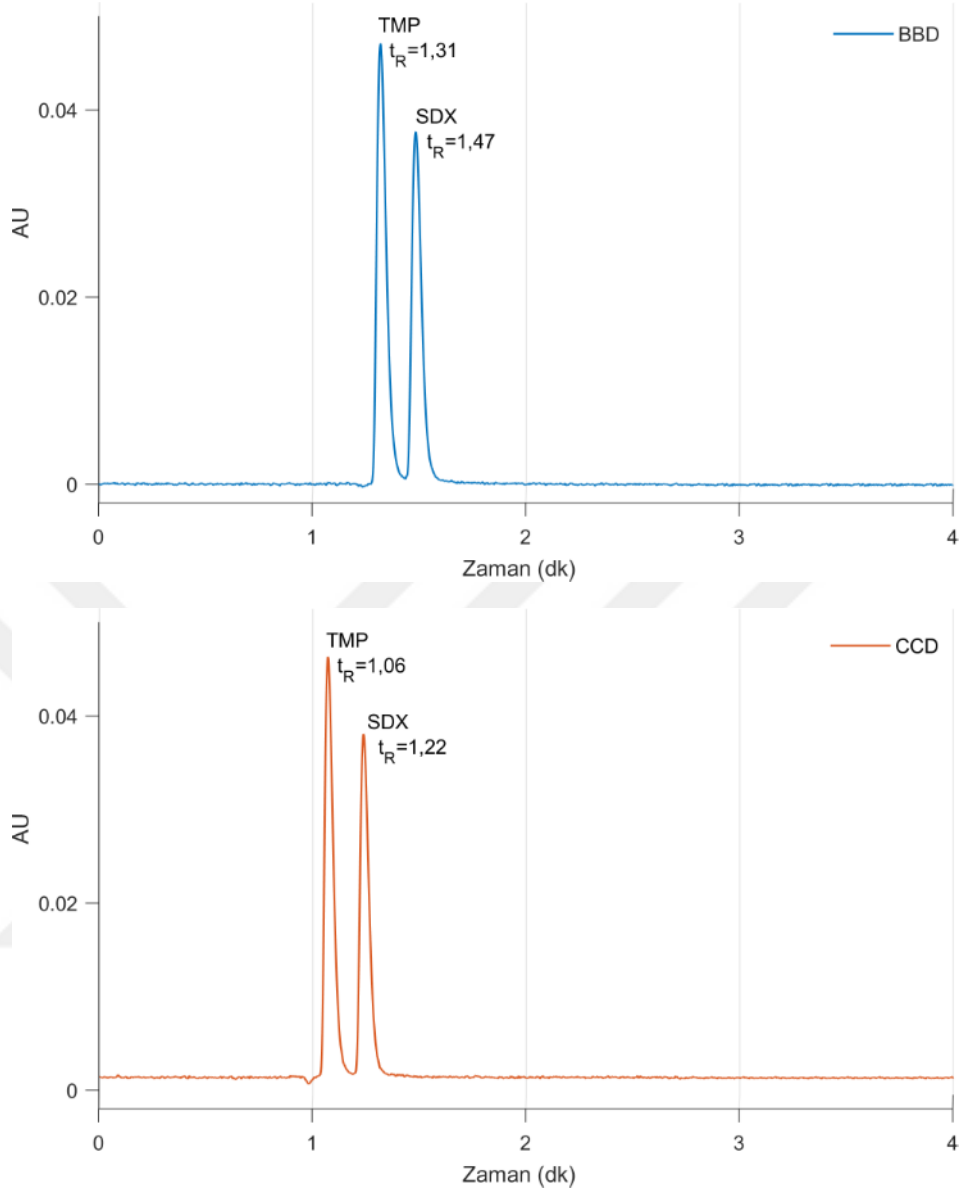
3.2.1.3. Tasarımların Karşılaştırılması

SDX ve TMP etken maddelerinin analizi için geliştirilmesi hedeflenen UPLC yönteminin optimizasyonunda BBD ve CCD tasarımları kullanılmıştır. Bu tasarımların kullanıldığı cevap yüzey metodolojisiyle elde edilen optimal şartlar Çizelge 3.30'da sunulmuştur. Çizelgede görüldüğü üzere farklı deney sahaları kullanıldığı için her bir faktör için optimal olarak saptanan değerler birbirlerinden farklıdır.

Çizelge 3.30. SDX-TMP karışımı için farklı tasarımlar kullanılarak elde optimal kromatografik şartlar

	Faktör adı	BBD	CCD
x_1	Kolon sıcaklığı (°C)	56,8	31,2
x_2	Tampon pH'ı	4,84	3,89
x_3	Tampon yüzdesi (%)	55,6	49,3
x_4	Akış hızı (mL/dk)	0,20	0,23

Bu iki farklı tasarımın kullanıldığı cevap yüzey metodolojilerinin karşılaştırılabilmesi için, Çizelge 3.30'da sunulan optimal kromatografik koşullar kullanılarak iki enjeksiyon gerçekleştirilmiştir. Bu enjeksiyonlara ait 245 nm'de kaydedilen kromatogramlar Şekil 3.25'te sunulmuştur. Bu şekil incelendiğinde BBD tasarımlarla elde edilen şartlarla TMP ve SDX için belirlenen alıkonma zamanları sırasıyla 1,31 dk ve 1,47 dk olduğu görülmektedir. CCD tasarım ile optimal olarak saptanan şartlar kullanıldığında ise, TMP ve SDX bileşiklerinin alıkonma zamanları sırasıyla 1,06 dk 1,27 dk olarak kaydedilmiştir. Ayırıcılık ve pik şeklinin benzer olduğu bu kromatogramlardaki piklerin alıkonma zamanları ve dolayısıyla analiz zamanı da birbirlerinden farklıdır.



Şekil 3.25. SDX-TMP karışımı için BBD ve CCD tasarımları kullanılarak saptanan optimal kromatografik şartlarda kaydedilen kromatogramlar

SDX ve TMP için yapılan çalışmalarda, Box-Behnken ve merkezi bileşenli tasarımların kullanıldığı cevap yüzey metodolojileri sonucunda iki farklı optimal kromatografik koşul saptanmıştır. Bu kromatografik koşulların kullanıldığı yöntemler optimizasyonda kullanılan tasarımların adlarına göre sırasıyla BBD-UPLC ve CCD-UPLC yöntemleri olarak adlandırılmıştır. Bu yöntemlerle gerçekleştirilen kantitatif çalışmalarda, cevap yüzey metodolojisi ile optimize edilen dört faktör (kolon sıcaklığı, tampon pH'ı, tampon yüzdesi, akış hızı) dışında kalan deneysel şartlar ön çalışmalarda belirlenmiştir. SDX ve TMP etken maddelerinin analizi için geliştirilen BBD-UPLC ve CCD-UPLC yöntemlerinin deneysel şartları Çizelge 3.31'de özetlenmiştir.

Çizelge 3.31. SDX ve TMP etken maddelerini içeren veteriner preparatın kantitatif analizi için kullanılan UPLC yöntemlerine ait kromatografik şartlar

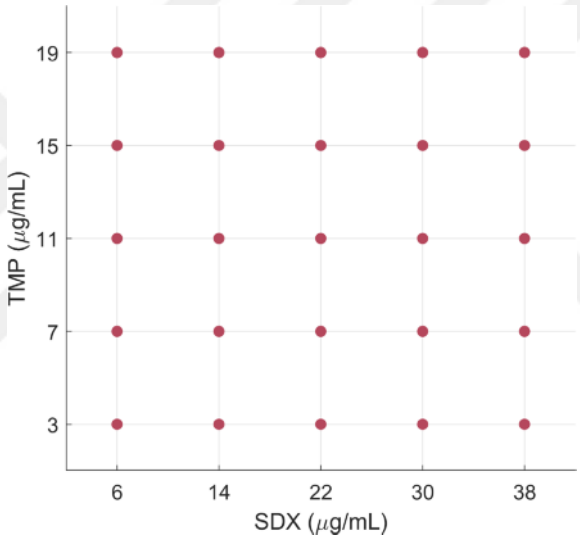
	BBD-UPLC	CCD-UPLC
Analitik kolon	C_{18} 100 mm	C_{18} 100 mm
Hareketli faz	Metanol ve 20 mM CH_3COONa karışımı	Metanol ve 20 mM CH_3COONa karışımı
Tampon yüzdesi (%)	55,6	49,3
Tampon pH'ı	4,84	3,89
Kolon sıcaklığı (°C)	56,8	31,2
Akış hızı (mL/dk)	0,20	0,23
Numune çözücüsü	MeOH: su (50:50, *h/h*)	MeOH: su (50:50, *h/h*)
Numune hacmi	1 µL	1 µL
Numune odası sıcaklığı	15 °C	15 °C

3.2.2. Kalibrasyon Eğrilerinin Hazırlanması

SDX ve TMP karışımının analizi için geliştirilen BBD-UPLC ve CCD-UPLC yöntemlerinin uygulamasında hazırlanan tüm çözeltilerde çözücü olarak ön deneylerde belirlenmiş olan metanol-su karışımı (50:50, *h/h*) kullanılmıştır. Standart çözeltilerin hazırlanması için öncelikle ayrı ayrı SDX ve TMP stok çözeltileri hazırlanmıştır. SDX stok çözeltisi için 20 mg standart madde 100 mL balon jojede çözücü ile tamamlanmıştır. TMP stok çözeltisi için 10 mg standart madde 100 mL

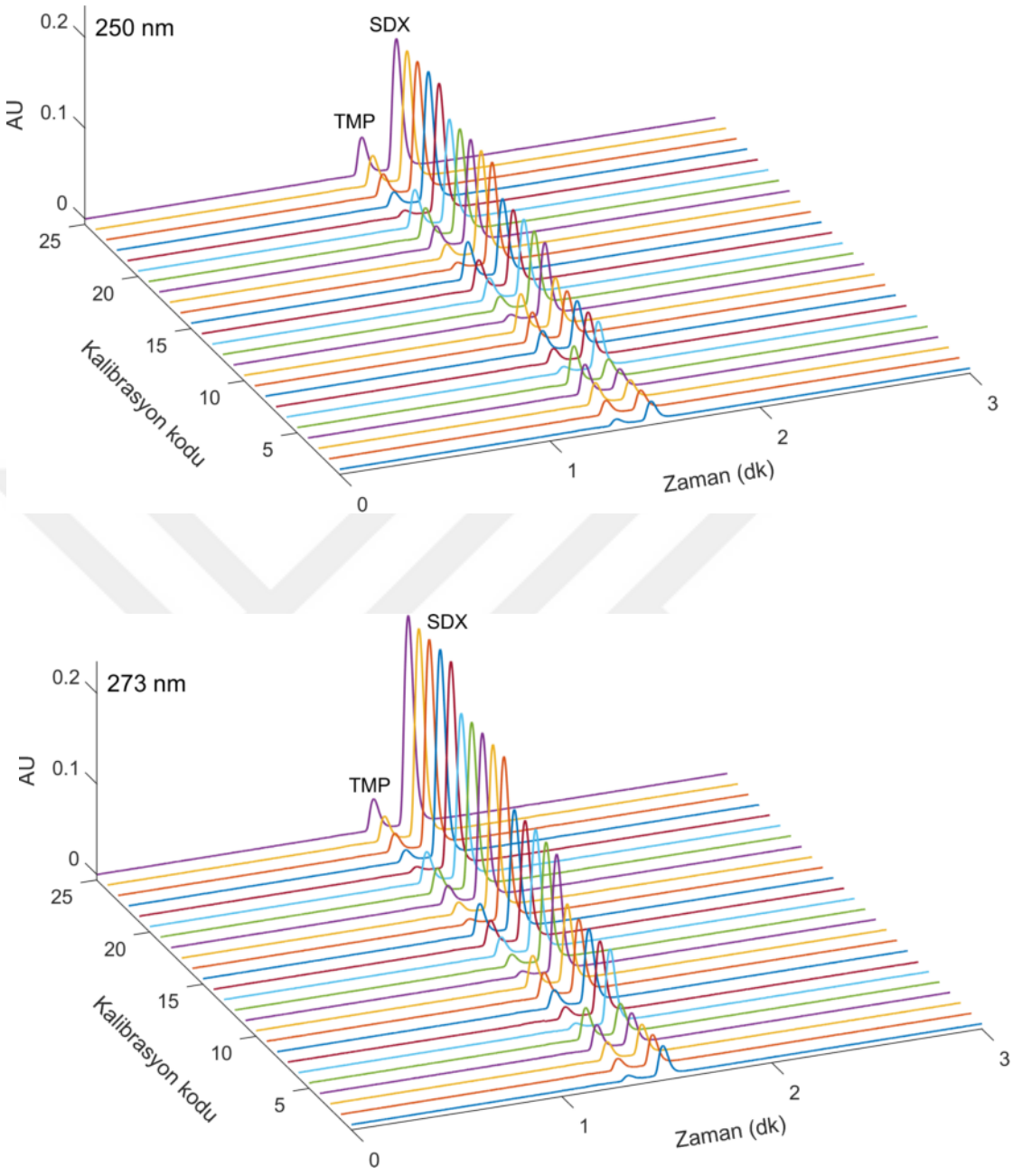
balon jojede çözücü ile tamamlanmıştır. Standart maddelerin tam olarak çözünmesi için stok çözeltiler 5 dakika boyunca ultrasonik banyoda tutulmuştur. Kalibrasyon ve validasyon çalışmaları için her iki stok çözeltiden belli hacimler pipetlendikten sonra ve çözücü ile seyreltilmiş ve tüm çözeltiler günlük olarak hazırlanmıştır.

Kalibrasyon setinin planlanmasında faktöriyel tasarımdan yararlanılmıştır. SDX için 6-38 µg/mL, TMP için 3-19 µg/mL konsantrasyon aralığında kalibrasyon çözeltileri hazırlanmıştır. SDX ve TMP karışımının kalibrasyon setinin tam faktöriyel tasarımında beş seviye ve iki bileşen için 5^2=25 adet kalibrasyon çözeltisi hazırlanmıştır. Bu kalibrasyon setinin diyagramı Şekil 3.26'da sunulmuştur.

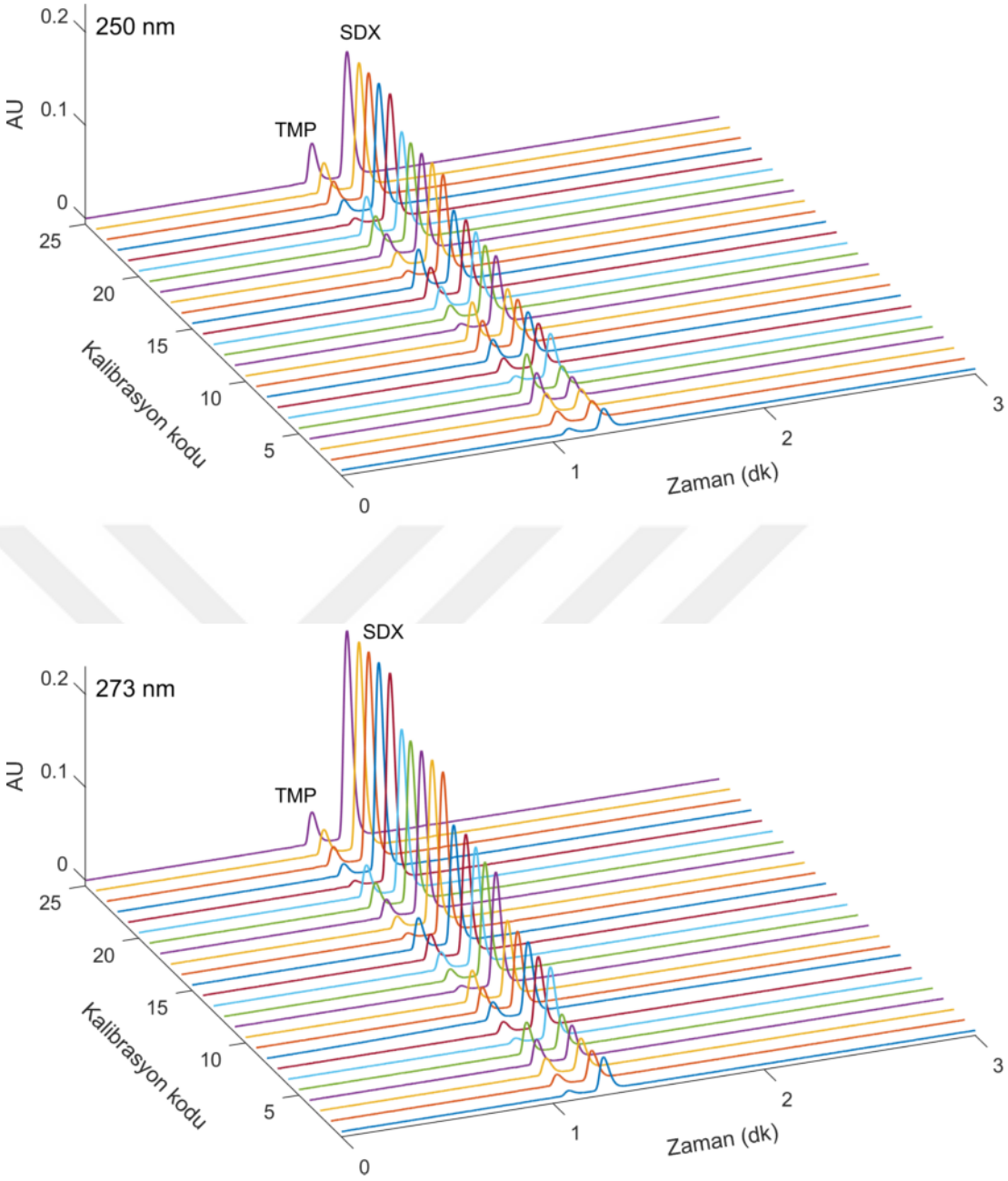


Şekil 3.26. SDX ve TMP kalibrasyon seti diyagramı

SDX ve TMP bileşiklerini içeren tam faktöriyel kalibrasyon seti, BBD-UPLC ve CCD-UPLC yöntemlerinin Çizelge 3.31'de sunulan kromatografik koşullarında UPLC sistemine enjekte edilmiştir. BBD-UPLC yönteminde TMP için 250 nm'de ve SDX için 273 nm'de PDA dedeksiyon ile kromatogramları elde edilmiş ve Şekil 3.27'de sunulmuştur. Bu yöntem kullanılarak elde edilen kromatogramlarda TMP ve SDX için alıkonma zamanları sırasıyla 1,31 dakika ve 1,47 dakika olarak tayin edilmiştir. CCD-UPLC yönteminin uygulanmasında TMP için 250 nm'de ve SDX için 273 nm'deki PDA dedeksiyonu ile kromatogramların kaydı gerçekleştirilmiş ve Şekil 3.28'de gösterilmiştir. Bu yöntem için TMP ve SDX için alıkonma zamanları sırasıyla 1,06 dakika ve 1,22 dakika olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.27. SDX-TMP kalibrasyon setinin BBD-UPLC yöntemi ile 250 ve 273 nm'de kaydedilen kromatogramları



Şekil 3.28. SDX-TMP kalibrasyon setinin CCD-UPLC yöntemi ile 250 ve 273 nm'de kaydedilen kromatogramları

BBD-UPLC ve CCD-UPLC yöntemlerinde bileşiklerin kalibrasyon denklemlerini elde etmek için, SDX'in 273 nm'deki ve TMP'nin 250 nm'deki pik alanları ile kalibrasyon setindeki konsantrasyon değerleri arasındaki matematiksel ilişki, doğrusal regresyon analizi ile hesaplanmış ve denklemlerin istatistiksel sonuçları Çizelge 3.32'de listelenmiştir. Validasyon ve numune analizi çalışmalarında SDX ve TMP miktarları bu kalibrasyon denklemleri kullanılarak tayin edilmiştir.

Çizelge 3.32. SDX ve TMP etken maddeleri için elde edilen doğrusal regresyon verileri

	BBD-UPLC		CCD-UPLC	
	SDX	TMP	SDX	TMP
Dalga boyu (nm)	273	250	273	250
Doğrusal aralık (µg/mL)	6-38	3-19	6-38	3-19
Eğim	3,358	1,145	2,878	1,032
Kesim	-2,454	0,070	0,097	-0,284
Korelasyon katsayısı	0,9996	0,9998	0,9997	0,9993
Eğimin standart hatası	0,020	0,005	0,013	0,008
Kesimin standart hatası	0,491	0,062	0,334	0,098
Korelasyon katsayısının standart hatası	1,122	0,142	0,760	0,224
Yakalama sınırı (µg/mL)	0,48	0,18	0,38	0,31
Tayin sınırı (µg/mL)	1,46	0,54	1,16	0,95

3.2.3. Yöntemlerin Validasyonu

BBD-UPLC ve CCD-UPLC yöntemlerinin validasyon çalışmaları sistem uygunluk ve analitik validasyon testleri olarak iki basamakta gerçekleştirilmiştir.

Sistem uygunluk testleri: SDX ve TMP bileşiklerini içeren çözelti, BBD-UPLC ve CCD-UPLC yöntemlerinin Çizelge 3.31'de özetlenen kromatografik şartlarda UPLC sistemine enjekte edilmiştir. 10 enjeksiyon sonucunda elde edilen kromatogramlardaki sistem uygunluk parametreleri Waters Empower 2 yazılımında hesaplanarak ortalama değerleri Çizelge 3.33'te sunulmuştur.

Çizelge 3.33. SDX ve TMP karışımının analizi için geliştirilen UPLC yöntemlerinin sistem uygunluk testi sonuçları

	BBD-UPLC		CCD-UPLC		Önerilen
	TMP	SDX	TMP	SDX	
Alıkonma zamanı (dakika)	1,31	1,47	1,06	1,22	
Kapasite faktörü (k')	1,39	1,69	1,12	1,44	k'>2
Ayırıcılık (R)	-	2,11	-	2,15	R > 2
Kuyruklanma faktörü (T)	1,57	1,47	1,63	1,58	T < 2
Teorik tabaka sayısı (N)	4493	5321	3501	4353	N > 2000
Alıkonma zamanı BSS	0,091	0,091	0,34	0,29	BSS < 1
Pik alanı BSS	0,98	0,88	0,77	0,49	BSS < 1

BSS : Bağıl standart sapma

Yöntem validasyon testleri: BBD-UPLC ve CCD-UPLC yöntemlerinin validasyonları geri kazanım, gün içi ve günler arası ile standart ekleme çalışmaları yapılarak gerçekleştirilmiştir.

Geri kazanım çalışması her iki analiti de farklı derişimlerde içeren 11 adet yapay karışım çözeltisi hazırlanmıştır. BBD-UPLC ve CCD-UPLC yöntemlerinin doğruluk ve kesinliğini değerlendirmek için hazırlanan 11 adet yapay karışım çözeltisinin kromatogramları, yöntemlerin Çizelge 3.31'de özetlenen kromatografik koşullarında kaydedilmiştir. 273 nm'de kaydedilen kromatogramlarda SDX bileşiğine ait olan pik alanları, 250 nm'de kaydedilen kromatogramlarda TMP bileşiğine ait olan pik alanları, kalibrasyon denklemlerinde yerlerine konularak yapay karışımlardaki etken maddelerin miktarları hesaplanmış, BBD-UPLC ve CCD-UPLC için Çizelge 3.34'te sunulmuştur. BBD-UPLC yöntemi ile elde edilen yüzde geri kazanım ile standart sapma değerleri SDX için %100,88 ve 1,67; TMP için %100,53 ve 1,73 olarak hesaplanmıştır. CCD-UPLC yöntemi ile elde edilen yüzde geri kazanım ile standart sapma değerleri SDX için %99,65 ve 1,72; TMP için %99,81 ve 1,56 olarak tayin edilmiştir.

Çizelge 3.34. SDX ve TMP içeren yapay karışım çözeltilerinin analiz sonuçları

	Konulan (µg/mL)		Bulunan (µg/mL)				Geri kazanım (%)			
			BBD-UPLC		CCD-UPLC		BBD-UPLC		CCD-UPLC	
Kod	SDX	TMP	SDX	TMP	SDX	TMP	SDX	TMP	SDX	TMP
M1	6,00	6,00	6,00	7,12	5,83	7,12	99,93	101,71	97,09	101,74
M2	14,00	6,00	14,00	6,94	13,74	7,03	99,97	99,21	98,15	100,47
M3	22,00	6,00	22,38	6,84	22,13	6,98	101,73	97,73	100,58	99,76
M4	30,00	6,00	30,49	6,95	30,06	6,94	101,64	99,29	100,21	99,09
M5	38,00	6,00	38,65	6,86	38,09	6,93	101,72	97,95	100,24	98,98
M6	30,00	3,00	29,52	3,04	29,92	3,01	98,42	101,21	99,73	100,27
M7	30,00	7,00	30,47	7,10	30,10	6,82	101,58	101,41	100,32	97,43
M8	30,00	11,00	29,72	11,27	29,18	10,84	99,08	102,47	97,26	98,59
M9	30,00	15,00	30,06	15,09	30,56	14,72	100,18	100,61	101,88	98,13
M10	30,00	19,00	30,26	19,52	29,54	19,49	100,86	102,76	98,48	102,59
M11	30,00	6,00	31,38	7,10	30,66	7,06	104,59	101,45	102,22	100,82
						Ortalama	100,88	100,53	99,65	99,81
						Standart sapma	1,67	1,73	1,72	1,56
						Bağıl standart sapma	1,65	1,72	1,72	1,56
						Bağıl hata	0,88	0,53	-0,35	-0,19

$$\text{Bağıl hata} = \frac{\text{konulan} - \text{bulunan}}{\text{konulan}} \times 100$$

SDX-TMP karışımının analizi için geliştirilen BBD-UPLC ve CCD-UPLC yöntemlerinin doğruluk ve kesinlik açısından değerlendirilmesi için diğer bir validasyon testi olarak gün içi ve günler arası deneysel çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bunun için belirlenen test derişiminin %80'i (24 µg/mL SDX + 4,8 µg/mL TMP), %100'ü (30 µg/mL SDX + 6 µg/mL TMP) ve %120'si (36 µg/mL SDX + 7,2 µg/mL TMP) olacak biçimde üç farklı konsantrasyon seviyesinde çözeltiler hazırlanmıştır. Hazırlanan bu çözeltiler, BBD-UPLC ve CCD-UPLC yöntemleri kullanılarak aynı gün içinde üç farklı saatte ve birbirini takip eden 3 günde analiz edilmiş ve ortalama sonuçları Çizelge 3.35'te özetlenmiştir. Her bir seviye için üç kez tekrar edilen analiz sonuçlarının ortalamaları "Bulunan" sütununda verilmiş olup, % geri kazanım, standart sapma, bağıl standart sapma ve bağıl hata değerleri aynı çizelgede sunulmuştur.

Çizelge 3.35. SDX ve TMP çözeltilerinin gün içi ve günler arası analizlerinin sonuçları

			FFD-UPLC					CCD-UPLC				
		Konulan (µg/mL)	Bulunan (µg/mL)	GK (%)	SS	BSS	BH	Bulunan (µg/mL)	GK (%)	SS	BSS	BH
Gün içi (n=3)	SDX	24	23,98	99,92	0,08	0,34	-0,08	24,05	100,21	0,15	0,62	0,21
		30	30,02	100,07	0,07	0,24	0,07	30,14	100,48	0,01	0,03	0,48
		36	36,03	100,09	0,02	0,05	0,09	36,26	100,73	0,08	0,21	0,73
	TMP	4,8	4,70	97,96	0,02	0,36	-2,04	4,82	100,47	0,03	0,59	0,47
		6	5,98	99,65	0,05	0,82	-0,35	6,02	100,33	0,19	3,12	0,33
		7,2	7,26	100,89	0,11	1,54	0,89	7,15	99,25	0,14	1,95	-0,75
		Konulan (µg/mL)	Bulunan (µg/mL)	GK (%)	SS	BSS	BH	Bulunan (µg/mL)	GK (%)	SS	BSS	BH
Günler arası (n=3)	SDX	24	23,96	99,84	0,13	0,53	-0,16	23,95	99,80	0,05	0,21	-0,20
		30	30,10	100,33	0,13	0,42	0,33	30,19	100,62	0,16	0,55	0,62
		36	36,08	100,22	0,10	0,28	0,22	36,26	100,74	0,08	0,21	0,74
	TMP	4,8	4,74	98,66	0,10	2,08	-1,34	4,83	100,65	0,03	0,56	0,65
		6	6,05	100,86	0,15	2,40	0,86	6,00	100,05	0,12	2,03	0,05
		7,2	7,30	101,33	0,10	1,34	1,33	7,08	98,33	0,01	0,21	-1,67

GK (%) : % Geri kazanım
SS : Standart sapma
BSS : Bağıl standart sapma
BH : Bağıl hata $= \frac{\text{konulan} - \text{bulunan}}{\text{konulan}} \times 100$

SDX ve TMP bileşiklerini içeren enjeksiyonluk çözelti olarak piyasada bulunan sıvı dozaj formundaki yardımcı maddelerin, etken maddelerin kantitatif tayini üzerine etkisini değerlendirmek için standart ekleme tekniği uygulanmıştır. Standart ekleme çalışmaları için üç paralel olarak, üç farklı derişim seviyesinde çözeltiler hazırlanmıştır. Tüm seviyeler için 10 mL'lik balon jojelere öncelikle Bölüm 3.2.4'te açıklandığı gibi hazırlanan derişik preparat çözeltisinden 1 mL konulmuştur. Standart olarak eklenen derişim seviyeleri sırasıyla SDX için 8, 12, 16 µg/mL ve TMP için 4, 8, 12 µg/mL olacak biçimde stok çözeltilerden farklı hacimler balon jojelere ilave edilmiş ve balon jojeler çözücü ile tamamlanmıştır. 0. seviye olarak adlandırılan derişim seviyesini hazırlamak için 1 mL derişik preparat çözeltisi 10 ml'ye seyreltilmiştir.

Standart ekleme çalışmaları için hazırlanan bu standart çözeltiler, BBD-UPLC ve CCD-UPLC yöntemleri kullanılarak analiz edilmiştir. İlave edilen standart madde miktarlarının hesaplanması için, saptanan toplam miktarlardan 0. seviyedeki çözeltilerin analizinden elde edilen miktarlar (preparattan gelen miktarlar) çıkarılmıştır. Üç paralel halinde yapılan bu çalışmayla elde edilen sonuçların ortalamaları, geri kazanım yüzdeleri, bağıl standart sapma ve bağıl hata değerleri Çizelge 3.36'da sunulmuştur.

Çizelge 3.36. Standart ekleme numunelerinin analiz sonuçları

		Eklenen		Bulunan		Geri kazanım (%)		BSS		Bağıl hata	
		SDX	TMP	SDX	TMP	SDX	TMP	SDX	TMP	SDX	TMP
BBD-UPLC	Çözelti +	8	4	7,99	3,98	99,83	99,52	0,37	1,90	-0,17	-0,48
	Çözelti +	12	8	12,04	8,10	100,30	101,25	0,88	0,90	0,30	1,25
	Çözelti +	16	12	16,21	11,95	101,29	99,58	0,14	0,57	1,29	-0,42
CCD-UPLC	Çözelti +	8	4	8,06	4,03	100,77	100,74	1,46	0,14	0,77	0,74
	Çözelti +	12	8	11,98	8,07	99,86	100,93	0,02	3,56	-0,14	0,93
	Çözelti +	16	12	16,38	12,03	102,37	100,25	0,69	1,63	2,37	0,25

BSS: Bağıl standart sapma

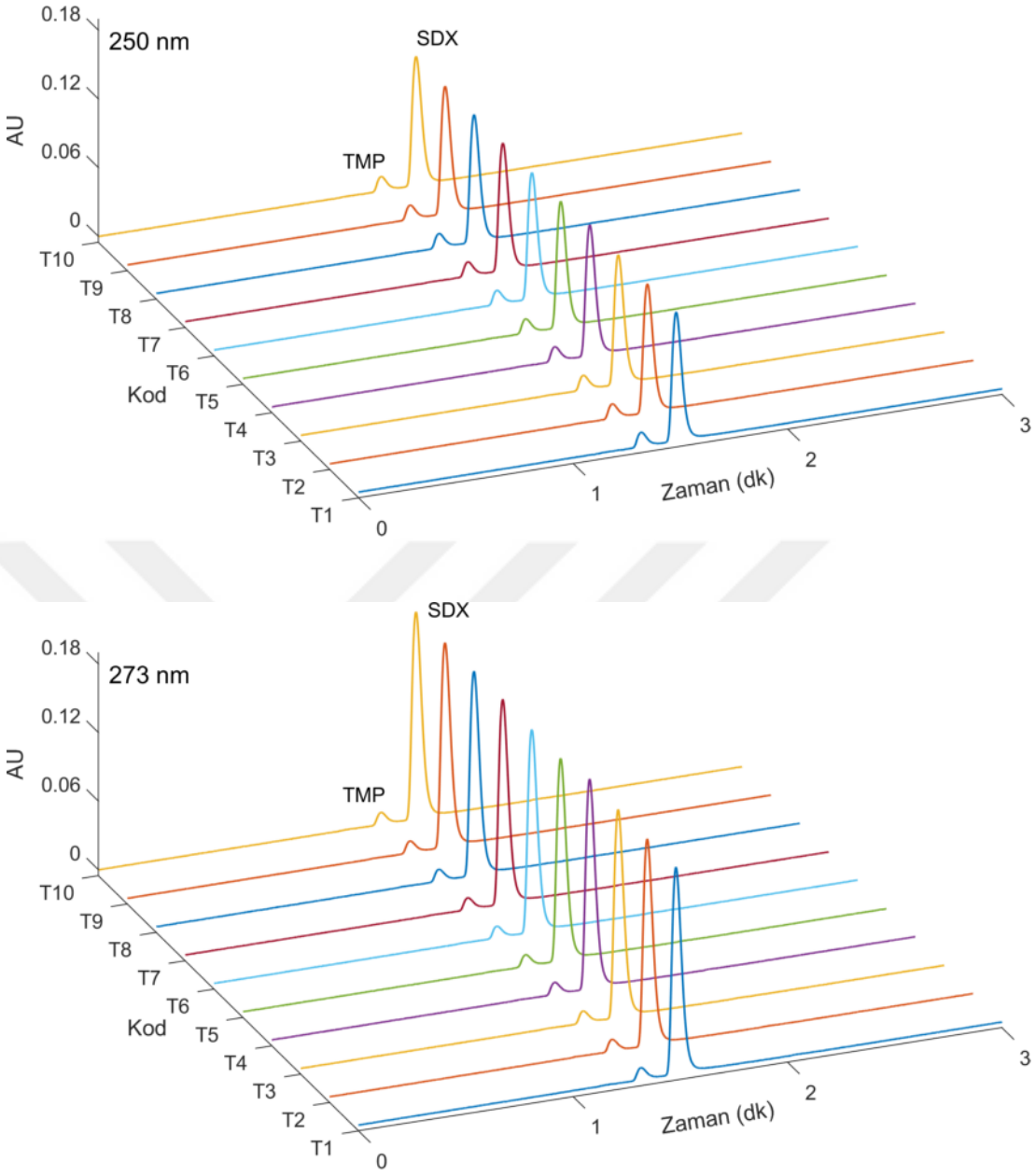
$$\text{Bağıl hata} = \frac{\text{konulan} - \text{bulunan}}{\text{konulan}} \times 100$$

3.2.4. Yöntemlerin Farmasötik Preparatlara Uygulanması

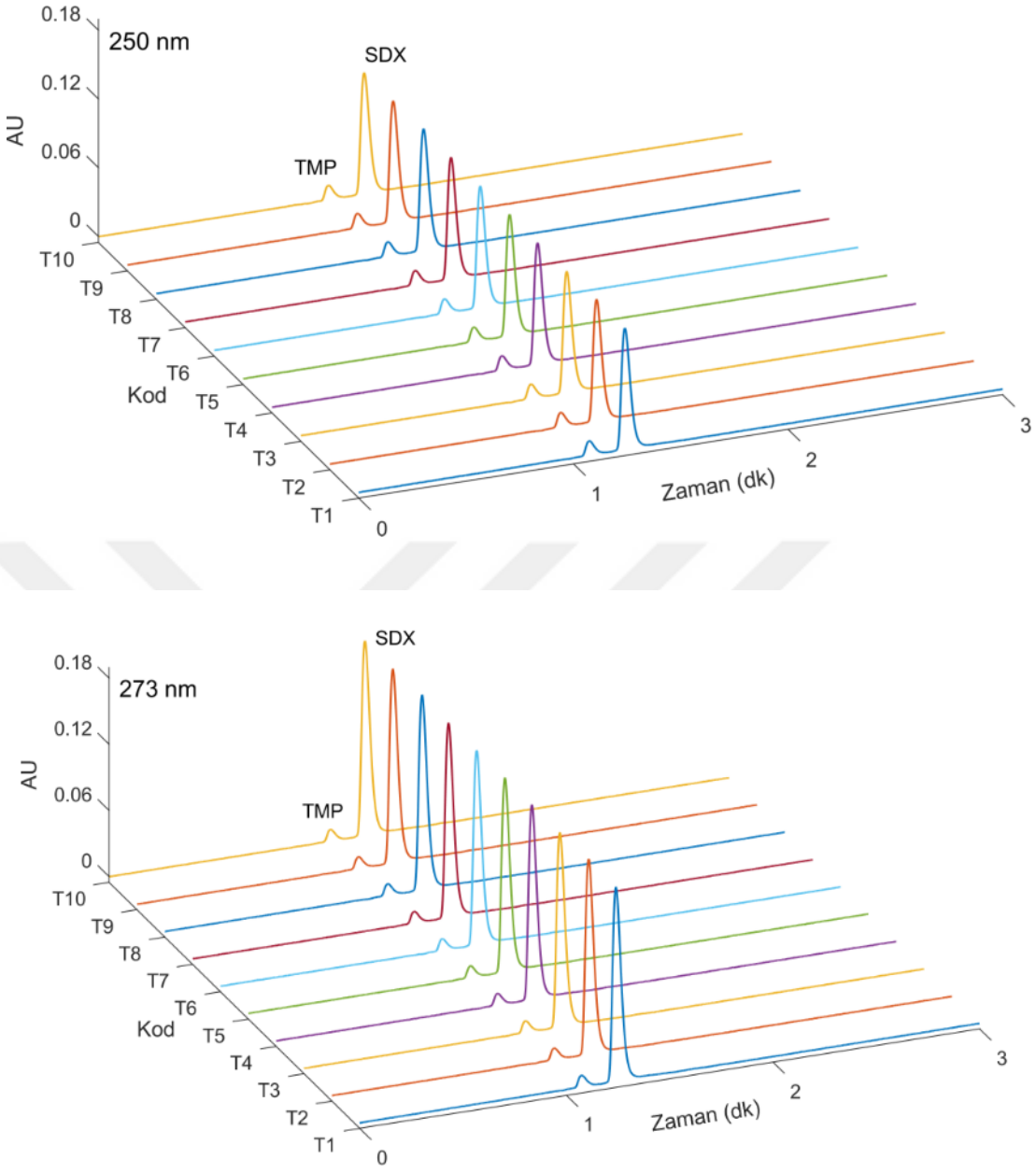
Optimize edilen UPLC yöntemlerinin ticari veteriner preparatlara uygulanması için, ANİMAR Enjeksiyonluk Çözelti ambalajından 0,1 mL hacmindeki çözelti 100 mL'lik balon jojeye alınmıştır. Balon joje hacmi çözücü ile tamamlanıp çalkalandıktan sonra 0,2 µm por açıklığına sahip naylon membranlı şırınga ucu filtre ile süzülmüştür. Elde edilen filtrat, derişik preparat çözeltisi olarak adlandırılmıştır. Derişik preparat çözeltisi, SDX ve TMP'nin doğrusal çalışma aralığına girecek biçimde 10 mL'lik balon joje içinde çözücü ile seyreltilmiştir. Bu işlem 10 kez tekrarlanarak UPLC sistemine enjekte edilecek gerçek numune çözeltileri elde edilmiştir.

Gerçek numune çözeltileri, BBD-UPLC ve CCD-UPLC yöntemlerinin Çizelge 3.31'de sunulan kromatografik şartları altında UPLC sistemine enjekte edilmiştir. BBD-UPLC yöntemi ile SDX'in miktar tayini için 273 nm'de ve TMP'nin miktar tayini için 250 nm'de PDA dedeksiyon ile kaydedilen kromatogramları Şekil 3.29'da sunulmuştur. CCD-UPLC yönteminin veteriner ticari ürünlerin kantitatif analizine uygulanmasında, SDX miktar tayini için 273 nm'de ve TMP miktar tayini için 250 nm'de PDA dedeksiyon ile kromatogramlar kaydedilmiş ve Şekil 3.30'da gösterilmiştir.

SDX ve TMP bileşiklerinin sırasıyla 273 nm ve 250 nm'de kaydedilen bu kromatogramlarındaki pik alanları ve etken maddelere ait olan kalibrasyon denklemleri kullanılarak veteriner preparatta bulunan etken madde miktarları hesaplanmıştır. Hesaplanan miktarlar etikette verilen birim olan mg/mL olarak, ortalama, standart sapma, bağıl standart sapma, standart hata, bağıl hata ve güven aralığı değerleriyle birlikte Çizelge 3.37'de sunulmuştur.



Şekil 3.29. BBD-UPLC yönteminin TMP ve SDX içeren farmasötik preparatlara uygulanması ile elde edilen kromatogramlar



Şekil 3.30. CCD-UPLC yönteminin TMP ve SDX içeren farmasötik preparatlara uygulanması ile elde edilen kromatogramlar

Çizelge 3.37. BBD-UPLC ve CCD-UPLC yöntemlerinin SDX-TMP içeren veteriner preparatlarına uygulanması ile elde edilen miktar tayini sonuçları

	BBD-UPLC		CCD-UPLC	
	SDX (mg/mL)	TMP (mg/mL)	SDX (mg/mL)	TMP (mg/mL)
T1	202,12	40,02	200,01	39,99
T2	202,02	40,01	200,41	40,12
T3	201,66	40,51	201,30	40,52
T4	201,46	41,53	200,11	41,05
T5	200,20	39,15	200,59	40,71
T6	199,95	40,57	199,39	39,91
T7	199,84	39,97	200,66	40,09
T8	200,16	39,81	201,54	39,97
T9	200,00	39,89	200,80	41,82
T10	202,12	40,02	202,28	41,34
Ortalama	200,95	40,15	200,71	40,55
SS	1,00	0,62	0,83	0,66
BSS	0,50	1,55	0,41	1,64
SH	0,32	0,20	0,26	0,21
GA	200,33 - 201,57	39,76-40,53	200,20-201,22	40,14-40,96
F-test	1,44	1,14	F-tablo: 3,18	
t-test	0,59	1,40	t-tablo: 2,26	

Etiket değeri: SDX:200 mg/mL, TMP: 40 mg/mL
SS: Standart sapma
BSS: Bağıl standart sapma
SH: Standart hata
GA: Güven aralığı (p=0,05 için)

Box-Behnken ve merkezi bileşenli tasarımlarla elde edilen BBD-UPLC ve CCD-UPLC isimli iki kromatografik yöntemin birbiri yerine kullanılıp kullanılamayacağının tespiti için, bu yöntemlerin farmasötik preparatlara uygulanmasıyla elde edilen analiz sonuçları istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. %95 güven aralığında gerçekleştirilen F-testi ve t-testi kullanılarak yapılan karşılaştırma sonuçları Çizelge 3.37'de özetlenmiştir. F-testi kullanılarak yapılan karşılaştırmada F-tablo değeri 3,18 iken, SDX için hesaplanan F-test değeri 1,44; TMP için hesaplanan

F-test değeri ise 1,14 olarak bulunmuştur. F-test<F-tablo olduğu için analiz sonuçlarının varyansları arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edilmiştir. t-testi kullanılarak yapılan karşılaştırmada t-tablo değeri 2,26 iken, SDX için hesaplanan t-test değeri 0,59; TMP için hesaplanan t-test değeri ise 1,40 olarak bulunmuştur. t-test<t-tablo olduğu için analiz sonuçlarının ortalamaları arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır. Bu veriler ışığında BBD-UPLC ve CCD-UPLC yöntemleri arasında anlamlı bir fark olmadığına karar verilmiştir.

3.3. SDM ve TMP Karışımının Analizi

Bu tez çalışmasının hedeflerinden biri SDM (sülfadimidin) ve TMP (trimetoprim) etken maddelerini içeren enjeksiyonluk çözelti formundaki veteriner preparatın kantitatif analizi için bir UPLC yöntemi geliştirmektir. Bu UPLC yönteminin geliştirilmesinde etkin kromatografik ayrımı en kısa sürede sağlayan kromatografik şartların saptanması için cevap yüzey metodolojisi ve kromatografik cevap fonksiyonu kullanılmıştır. Cevap yüzey metodolojisi sırasında farklı tasarımlar kullanılarak, birbirinden farklı üç kromatografik şart elde edilmiştir. Bu şartlar kullanılarak geliştirilen UPLC yöntemleri, analitik validasyon çalışmalarından sonra enjeksiyonluk çözelti preparatlarının kantitatif analizine uygulanmıştır.

3.3.1. UPLC Yönteminin Optimizasyonu

Yöntem optimizasyonunda ön deneyler: SDM ve TMP karışımına ait ön deneyler kapsamında, kalitatif ve kantitatif faktörlerin etkilerinin incelendiği çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada kalitatif kromatografik şartlardan olan kolon türü ve hareketli fazı oluşturan bileşenlerin türlerinin seçimi için cevap yüzey metodolojisi kullanılmamıştır. Cevap yüzey metodolojisinde kullanılacak bağımsız değişkenler ise kantitatif faktörlerden seçilmiştir.

SDM-TMP kombinasyonunun analizi için yapılan ön deneylerde, laboratuvarda bulunan Waters Acquity marka BEH C_{18} (130Å, 1,7 µm, 2,1 mm x 100 mm) kolon ile yapılan çalışmalarda hareketli faz olarak farklı organik ve inorganik bileşenlerin karışımları test edilmiş SDM ve TMP piklerinin alıkonma zamanları ve pik şekilleri araştırılmıştır. Hareketli faz sistemindeki organik faz bileşeni olarak asetonitril ve metanol test edilmiş, asetonitrilin kullanıldığı kromatogramlarda SDM ve TMP piklerinin ayrımı yetersiz olduğu için organik bileşen olarak metanolün kullanılmasında karar verilmiştir. İnorganik bileşen olarak $(NH_4)_2CO_3$ çözeltisi seçilerek, bu çözeltinin derişiminin ayrım üzerinde etkili olup olmadığını incelenmiştir. Çözeltideki $(NH_4)_2CO_3$ derişiminin SDM ve TMP bileşiklerinin alıkonma zamanları üzerine belirgin bir etkisi olmadığı gözlenmiştir. Bu nedenle çözeltideki tuz derişimi cevap yüzey metodolojisinde bir değişken olarak kullanılmamıştır. Kromatografik sistemin ve analitik kolonun daha uzun ömürlü kullanılabilmesi amacıyla çalışmalarda 10 mM $(NH_4)_2CO_3$ çözeltisinin kullanımı uygun bulunmuştur. Ayrıca çalışmanın ön deneylerinde numune çözücüsü, enjeksiyon hacmi, numune odası sıcaklığı ve bileşiklerin dedeksiyonu için dalga boyu seçimi çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalar sonucunda belirlenen parametreler Çizelge 3.38'de verilmiştir.

Çizelge 3.38. SDM ve TMP için uygulanan cevap yüzey metodolojisinde sabit tutulan kromatografik şartlar

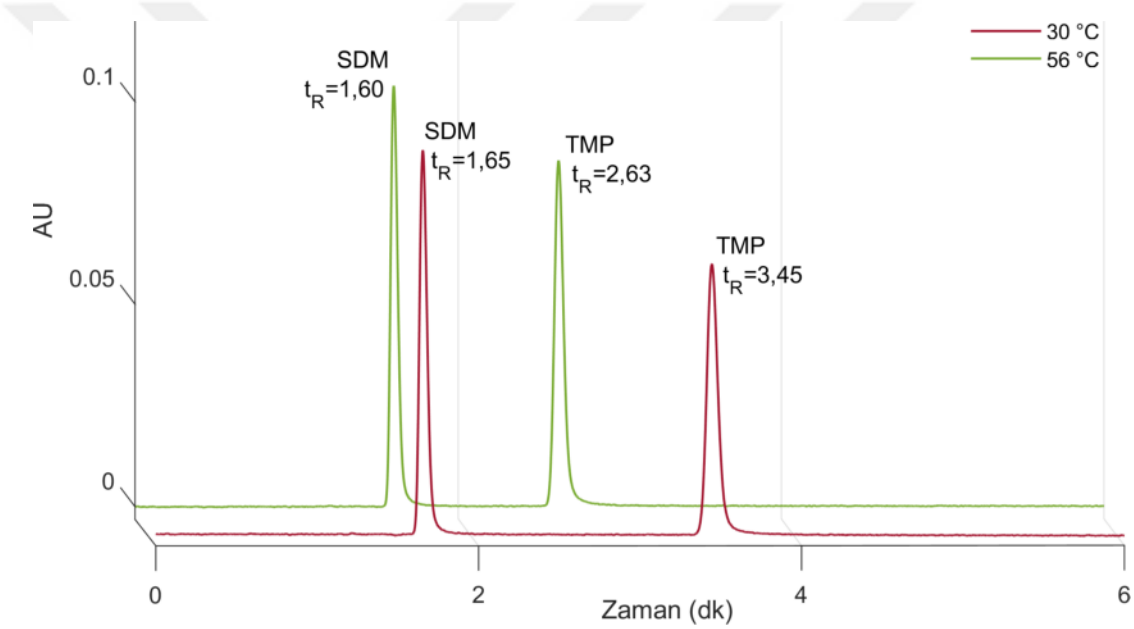
Analitik kolon	:	C_{18} 100 mm
Hareketli faz	:	Metanol ve 10 mM $(NH4)_2CO_3$ (pH 8,0) karışımı
Numune çözücüsü	:	Metanol: su (50:50, h/h)
Enjeksiyon hacmi	:	1 µL
Numune odası sıcaklığı	:	15 °C
Dedeksiyon dalga boyu	:	235 nm

Faktörlerin seçimi ve seviyelerinin belirlenmesi: Kolon sıcaklığının SDM ve TMP bileşiklerinin alıkonma zamanları üzerine etkisini test etmek ve bu faktörün deney tasarımındaki seviyelerinin belirlenmesinde ön bilgi sahibi olmak için kolon sıcaklığı 30 °C ve 56 °C olarak ayarlanmış iki enjeksiyon gerçekleştirilmiştir. Bu enjeksiyonlar sırasında kolon sıcaklığı dışındaki kromatografik şartlar sabit tutulmuştur (%65 10 mM $(NH_4)_2CO_3$ çözeltisi pH 8,0 ve %35 metanol; akış hızı 0,20 mL/dk). Bu enjeksiyonların 235 nm'de kaydedilen kromatogramları Şekil 3.31'de verilmiştir. Kolon sıcaklığı 30 °C olduğunda SDM ve TMP için alıkonma zamanları 1,65 dk ve 3,45 dk olarak belirlenirken kolon sıcaklığının 56 °C'ye çıkmasıyla alıkonma zamanları sırasıyla 1,60 dk ve 2,63 dk olarak kaydedilmiştir. Kolon sıcaklığının artışı özellikle TMP bileşiğinin alıkonma sürecini azalttığı ve dolayısıyla iki maddenin ayrımı üzerinde etkili olduğu için, bu parametrenin deneysel tasarım ve optimizasyondaki faktörlerden biri olmasına karar verilmiştir.

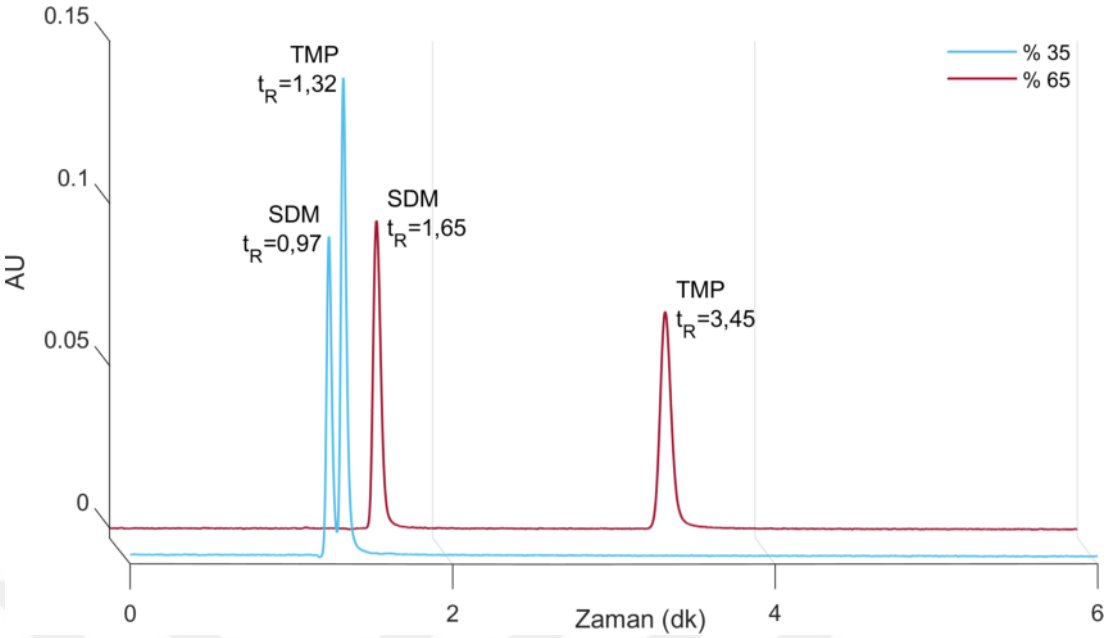
10 mM $(NH_4)_2CO_3$ çözeltisinin haraketli fazdaki oranının alıkonma zamanlarına ve ayırıcılığa etkisini gözlemlemek ve deney tasarımındaki seviyelerini belirlemek için, bu çözeltiyi %35 ve %65 oranında içeren hareketli fazlar kullanılarak iki farklı enjeksiyon yapılmıştır. Bu işlem sırasında diğer kromatografik şartlar sabit tutulmuştur (10 mM $(NH_4)_2CO_3$ çözeltisi pH 8,0 ve metanol karışımı; akış hızı: 0,20 mL/dk; kolon sıcaklığı: 30 °C). 235 nm'de kaydedilen bu enjeksiyonlara ait kromatogramlar Şekil 3.32'de sunulmuştur. %35 $(NH_4)_2CO_3$ çözeltisi içeren hareketli fazla SDM ve TMP'nin kromatografik ayrımı tam olarak gerçekleşmemiş olup bu bileşiklerin alıkonma zamanları sırasıyla 0,97 dk ve 1,32 dk olarak belirlenmiştir. %65 $(NH_4)_2CO_3$ çözeltisi içeren hareketli faz kullanımında ise SDM ve TMP bileşiklerinin alıkonma süreleri sırasıyla 1,65 dk ve 3,45 dk olarak tayin edilmiştir. Beklendiği üzere, hareketli fazdaki inorganik bileşenin yüzdesi, alıkonma zamanları ve ayırıcılık üzerinde oldukça etkili olmuştur.

Akış hızının SDM ve TMP bileşiklerinin kromatografik ayrımı üzerine etkisini test etmek ve deney tasarımındaki seviyelerini belirlemek için diğer kromatografik şartların sabit tutulduğu (%65 10 mM $(NH_4)_2CO_3$ çözeltisi (pH 8,0) ve %35 metanol karışımı; kolon sıcaklığı 30°C), fakat faz akış hızının 0,14 mL/dk ve 0,26 mL/dk olarak

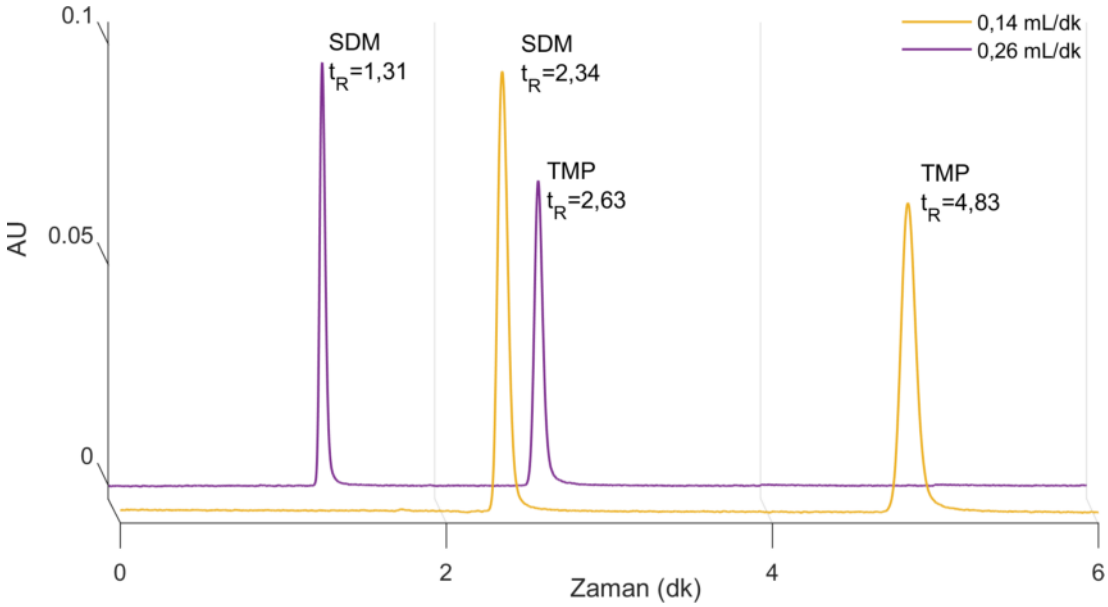
ayarlandığı iki farklı enjeksiyon yapılmıştır. Bu enjeksiyonların 235 nm'de kaydedilen kromatogramları Şekil 3.33'te gösterilmiştir. 0,14 mL/dk akış hızıyla elde edilen kromatogramda SDM ve TMP için alıkonma zamanları sırasıyla 2,34 dk ve 4,83 dk olarak kaydedilmiştir. Akış hızı 0,26 mL/dk'ya arttırıldığında ise alıkonma zamanları kısalarak sırasıyla 1,31 dk ve 2,63 dk olarak belirlenmiştir. Bu kromatogramların incelenmesiyle görüldüğü üzere, hareketli fazın akış hızı SDM ve TMP'nin alıkonma zamanlarına ve ayrım derecelerine etki etmektedir. Bu yüzden akış hızının cevap yüzey metodolojisindeki faktörlerden biri olmasına karar verilmiştir.



Şekil 3.31. Kolon sıcaklığının SDM ve TMP ayrımına etkisini gösteren kromatogramlar



Şekil 3.32. Hareketli fazdaki 10 mM $(NH_4)_2CO_3$ çözeltisi yüzdesinin SDM ve TMP ayrımına etkisini gösteren kromatogramlar



Şekil 3.33. Akış hızının SDM ve TMP ayrımına etkisini gösteren kromatogramlar

Yukarıda bahsedilen ön deneme çalışmalarıyla tespit edilen ve SDM-TMP kombinasyonunun analizinde bileşenlerin kromatografik ayrımı üzerine etki eden faktörlerin listesi aşağıda sunulmuştur:

1) Kolon sıcaklığı (°C)
2) Hareketli fazdaki $(NH_4)_2CO_3$ yüzdesi (%)
3) Hareketli fazın akış hızı (mL/dk)

Seçilen faktörler üzerine yapılan ön denemelerde, kolon sıcaklığı için 30-56 °C aralığı, hareketli fazdaki $(NH_4)_2CO_3$ oranı için %35-65 aralığı, ve akış hızı için 0,14-0,26 mL/dk aralığı test edilmiştir. Bu faktörlerin ön denemelerdeki çalışma aralıkları, faktörlerin ve etkileşimlerinin ayrım ile analiz zamanı üzerine etkileri dikkate alınarak, deneysel tasarım çalışmasındaki faktör aralıkları saptanmıştır. Bu faktörlerin cevap yüzey metodolojiyle uygun olan aralıkları kolon sıcaklığı için 26-76 °C, hareketli fazdaki $(NH_4)_2CO_3$ oranı için %33-69 ve akış hızı için 10-30 mL/dk olarak belirlenmiştir. Belirlenen bu aralıklar -1, 0, ve +1 olmak üzere üç seviye için düzenlenmiş ve tam faktöriyel ve Box-Behnken tasarımları için deney uzayı oluşturulmuştur. SDM-TMP karışımının analizi için tam faktöriyel ve Box-Behnken tasarımlarında kullanılan faktör seviyeleri Çizelge 3.39'da gösterilmiştir.

Çizelge 3.39. SDM ve TMP için uygulanan FFD ve BBD tasarımlarında kullanılan faktörler ve bu faktörlerin seviyeleri

	x_1	x_2	x_3
Seviye	Kolon sıcaklığı (°C)	$(NH_4)_2CO_3$ (%)	Akış hızı (mL/dk)
-1	26,0	33,0	0,10
0	49,0	51,0	0,20
+1	72,0	69,0	0,30

Çizelge 3.39'da sunulan faktör aralıkları, merkezi bileşenli tasarımın dış sınırları olarak kullanılmıştır. Merkezi bileşenli tasarımın doğası gereği -1, 0 ve +1 seviyelerinin dışında –α ve + α seviyeleri de olduğu için her faktör için 5 seviyenin belirlenmesi gerekir. SDM ve TMP bileşikleri üzerinde yapılan ön denemelerde, merkezi bileşenli tasarım için belirlenecek eksenel noktaların, UPLC sistemi için çok yüksek kolon basıncına veya çok yüksek kolon sıcaklıklarına yol açacak kromatografik şartların kullanımını gerektirdiği görülmüştür. Bu nedenle, SDM ve TMP bileşiklerinin analizi için merkezi bileşenli tasarımın planlanmasında, eksenel noktaların konumu Çizelge 3.39'da sunulan -1 ve +1 sınırlarına göre ayarlanmıştır. Bu amaçla, Çizelge 3.39'da faktörlerin +1 ve -1 seviyeleri için verilen değerler, +α ve –α seviyelerine dönüştürülmüştür. Tasarımın döndebilir özellikte olması için α değeri $2^{k/4} = 2^{3\,4} \cong 1{,}682$ olarak hesaplanmış ve her bir faktör için yeni +1, 0 ve -1 seviyeleri tespit edilmiştir. Bu merkezi bileşenli tasarım için hesaplanan faktör seviyeleri Çizelge 3.40'ta sunulmuştur.

Çizelge 3.40. SDM ve TMP için uygulanan CCD tasarımında kullanılan faktörler ve bu faktörlerin seviyeleri

	x_1	x_2	x_3
Seviye	Kolon sıcaklığı (°C)	$(NH_4)_2CO_3$ (%)	Akış hızı (mL/dk)
-α	26,0	33,0	0,10
-1	35,3	40,3	0,14
0	49,0	51,0	0,20
+1	62,7	61,7	0,26
+ α	72,0	69,0	0,30

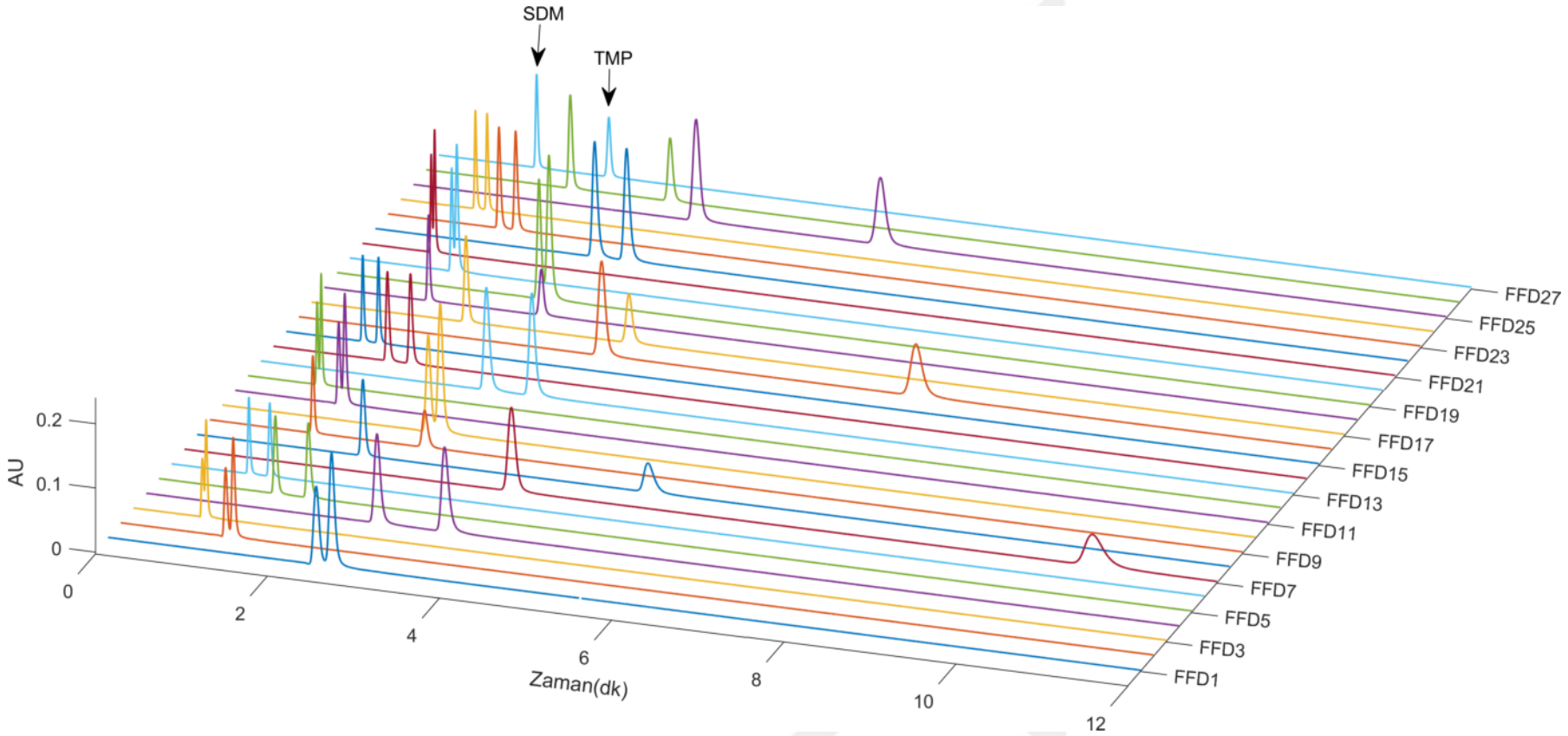
SDM ve TMP karışımının analizine yönelik UPLC yöntemlerinin geliştirilmesinde, optimal kromatografik şartların belirlenmesi için Çizelge 3.39'da sunulan faktör seviyelerine göre oluşturulan tam faktöriyel ve Box-Behnken tasarımlar ile Çizelge 3.40'ta sunulan faktör seviyelerine göre oluşturulan merkezi bileşenli tasarım kullanılarak cevap yüzey metodolojisi uygulanmış ve optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

3.3.1.1. Tam Faktöriyel Tasarım ve Yöntem Optimizasyonu

Tam faktöriyel tasarıma göre üç faktör ve üç seviye kullanıldığında uzaydaki deneysel nokta sayısı $3^3 = 27$ olarak hesaplanır. SDM-TMP çifti için belirlenen ve Çizelge 3.39'da sunulan faktör seviyelerine göre planlanan tasarım matrisi Çizelge 3.41'de sunulmuştur. 20 µg/mL SDM ve 20 µg/mL TMP içeren numune, bu tasarım matrisine göre ayarlanan 27 farklı kromatografik koşul kullanılarak UPLC sistemine enjekte edilmiştir. Bu enjeksiyonlara ait 235 nm'de kaydedilen kromatogramlar Şekil 3.34'te sunulmuştur. Elde edilen kromatogramların her biri için zaman eksenindeki pik başlangıç ve pik bitiş noktaları, alıkonma zamanları ve varsa vadi noktaları kaydedilmiştir. Piklerin zirve noktalarının ve varsa vadi noktasının y eksenindeki karşılıkları da kaydedildikten sonra her bir kromatograma ait kromatografik cevap fonksiyonu (KCF) değerleri hesaplanmıştır. Çizelge 3.41'de her bir kromatografik şart için elde edilen KCF değerleri "Ölçülen" sütununda listelenmiştir. Modelleme sonrasında, her deney için ampirik modelle hesaplanan KCF değerleri aynı çizelgede "Tahmin edilen" sütununda, ölçülen ve tahmin edilen değerler arasındaki fark ise "Artık" sütununda verilmiştir.

Çizelge 3.41. Tam faktöriyel tasarım matrisi ile ölçülen, tahmin edilen ve artık KCF değerleri

	x_1	x_2	x_3	KCF		
	Kolon sıcaklığı (°C)	$(NH_4)_2CO_3$ (%)	Akış hızı (mL/dk)	Ölçülen	Tahmin edilen	Artık
FFD1	-1	-1	-1	5,3432	5,4484	-0,1052
FFD2	-1	-1	0	1,9096	1,7566	0,1530
FFD3	-1	-1	+1	1,9431	1,8514	0,0917
FFD4	-1	0	-1	9,9469	10,4550	-0,5081
FFD5	-1	0	0	3,9614	4,0491	-0,0877
FFD6	-1	0	+1	1,5901	1,4298	0,1602
FFD7	-1	+1	-1	20,7753	19,9734	0,8019
FFD8	-1	+1	0	10,5663	10,8534	-0,2871
FFD9	-1	+1	+1	5,3013	5,5200	-0,2187
FFD10	0	-1	-1	4,2570	4,1704	0,0866
FFD11	0	-1	0	1,8718	1,7086	0,1633
FFD12	0	-1	+1	2,8952	3,0334	-0,1382
FFD13	0	0	-1	7,4042	7,6212	-0,2170
FFD14	0	0	0	2,5554	2,4453	0,1101
FFD15	0	0	+1	1,2527	1,0560	0,1967
FFD16	0	+1	-1	15,5350	15,5838	-0,0488
FFD17	0	+1	0	7,4679	7,6937	-0,2258
FFD18	0	+1	+1	3,6634	3,5903	0,0731
FFD19	+1	-1	-1	3,7709	3,6396	0,1313
FFD20	+1	-1	0	2,4601	2,4077	0,0523
FFD21	+1	-1	+1	4,5277	4,9625	-0,4348
FFD22	+1	0	-1	5,5495	5,5346	0,0150
FFD23	+1	0	0	1,7983	1,5886	0,2097
FFD24	+1	0	+1	1,5504	1,4293	0,1211
FFD25	+1	+1	-1	11,7857	11,9413	-0,1556
FFD26	+1	+1	0	5,1933	5,2812	-0,0880
FFD27	+1	+1	+1	2,5568	2,4078	0,1490



Şekil 3.34. SDM ve TMP için tam faktöriyel tasarıma göre elde edilen kromatogramlar

Çizelge 3.41'de sunulmuş olan ölçülen KCF değerleri ile bağımsız değişkenler arasındaki ilişkiyi modellemek için, en küçük kareler tekniğinden yararlanılarak ikinci dereceden polinomiyal bir fonksiyon oluşturulmuştur. Bu modeldeki terimlerin katsayıları, t-test ve p-değerleri Çizelge 3.42'de verilmiştir.

Çizelge 3.42. SDM-TMP için FFD ile elde edilen ampirik modele ait katsayılar ve p-anlamlılık değerleri

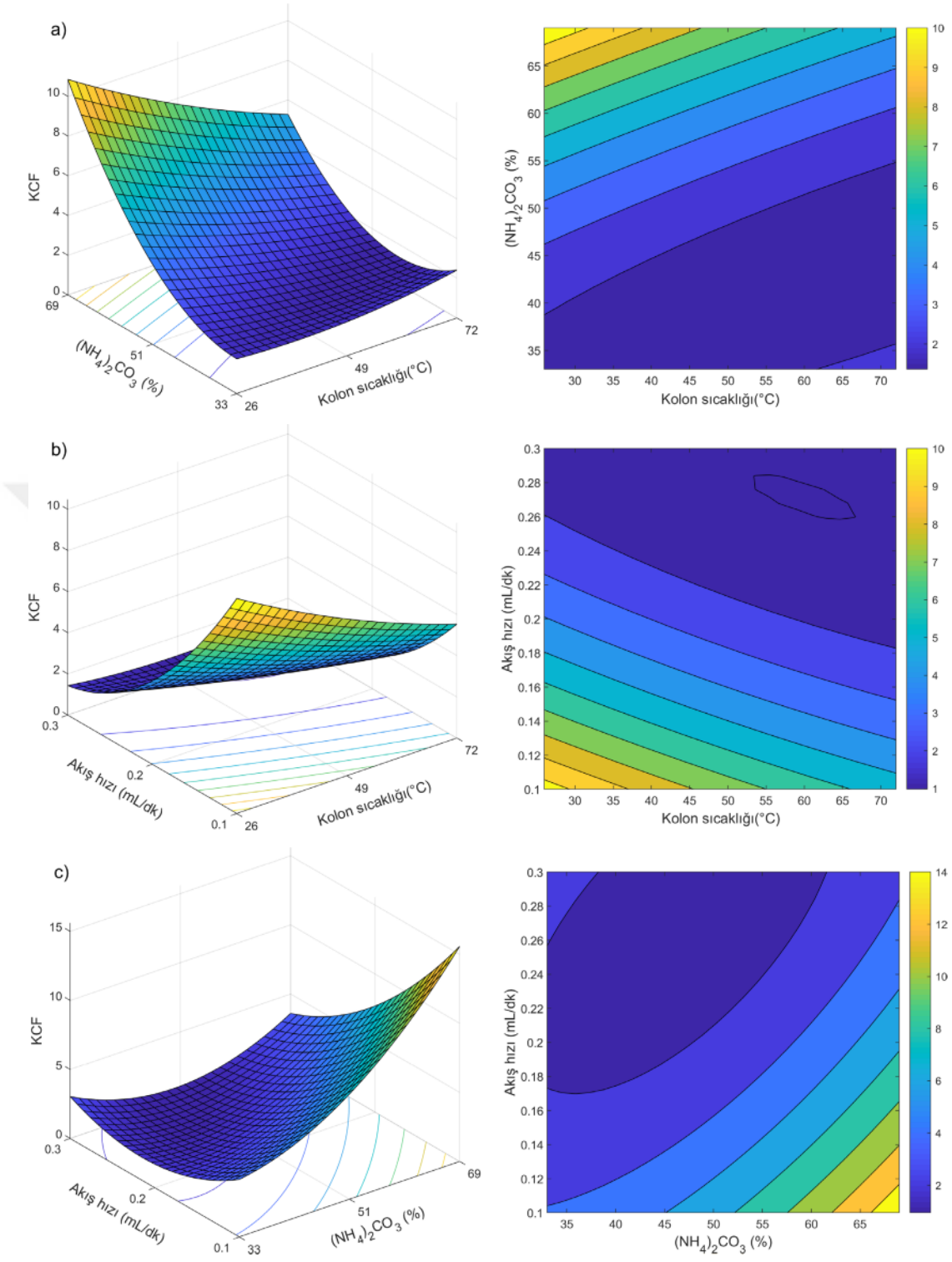
	Katsayı	t-test	p-değeri
Kesim değeri	2,4453	15,64	$1{,}91 \times 10^{-11}$
x_1	-1,2303	-16,81	$5{,}03 \times 10^{-12}$
x_2	2,9926	40,89	$2{,}03 \times 10^{-18}$
x_3	-3,2826	-44,84	$4{,}27 \times 10^{-19}$
x_1^2	0,3736	2,95	$9{,}03 \times 10^{-3}$
x_2^2	2,2559	17,79	$2{,}01 \times 10^{-12}$
x_3^2	1,8933	14,93	$3{,}32 \times 10^{-11}$
x_1x_2	-1,5558	-17,35	$3{,}00 \times 10^{-12}$
x_1x_3	1,2300	13,72	$1{,}27 \times 10^{-10}$
x_2x_3	-2,7141	-30,27	$3{,}14 \times 10^{-16}$

Çizelge 3.42'de görüldüğü üzere, modeldeki her terimin p-değeri, bu çalışmada seçilen anlamlılık seviyesi olan $\alpha = 0{,}05$'ten küçüktür ve t-test değerleri, 2,11 olan t-tablo değerinden büyüktür. Yani 0,05 anlamlılık düzeyinde tüm terimler anlamlı derecede cevap üzerine etki etmektedir. Bu yüzden kromatografik cevabın modellenmesinde, tüm terimlerin kullanıldığı bir fonksiyon gereklidir. Kromatografik cevabı anlamlı olarak etkileyen bu terimler kullanılarak oluşturulan matematiksel model Eşitlik 3.6'da verilmiştir.

$$y = 2{,}445 - 1{,}230x_1 + 2{,}993x_2 - 3{,}283x_3 + 0{,}374x_1^2 + 2{,}256x_2^2 + 1{,}893x_3^2 - 1{,}556x_1x_2 + 1{,}230x_3 - 2{,}714x_2x_3 \quad \text{(Eşitlik 3.6)}$$

Bu modelde y kromatografik cevap faktörünü, x_1, x_2 ve x_3 sırasıyla kolon sıcaklığı, $(NH_4)_2CO_3$ çözeltisinin yüzdesi ve akış hızı değişkenlerinin doğrusal terimlerini, x_1^2, x_2^2 ve x_3^2 bu değişkenlerin üstel terimlerini, x_1x_2, x_1x_3 ve x_2x_3 ise bu değişkenlerin etkileşim terimlerini temsil etmektedir.

Tam faktöriyel tasarım kullanılarak elde edilen ve faktörlerin KCF üzerine olan ikili etkilerini gösteren cevap yüzey grafikleri ve eş yükselti diyagramları Şekil 3.35'te sunulmuştur. Bu şekilden seçilen faktörlerin ve faktör etkileşimlerinin KCF üzerine genel olarak farklı biçimlerde etki ettiği görülmektedir. Şekil 3.35.a'dan hareketli fazda bulunan $(NH_4)_2CO_3$ çözeltisinin % değerinin düşük seviyelerinde genel olarak düşük KCF değerleri elde edildiği gözlenmektedir. En yüksek KCF değerlerine ise $(NH_4)_2CO_3$ oranlarının yüksek ve kolon sıcaklığının düşük olduğu şartlarda ulaşılmaktadır. Aynı şekilden bu iki faktör arasındaki etkileşimin cevap üzerinde oldukça etkili olduğu da anlaşılmaktadır. Özellikle yüksek $(NH_4)_2CO_3$ seviyelerinde, kolon sıcaklığı değişimi cevap üzerinde daha çok etkilidir. Şekil 3.35.b'de akış hızının ve kolon sıcaklığının arttıkça KCF değerinin azaldığı görülmektedir. En yüksek KCF değerlerine ise akış hızının ve kolon sıcaklığının düşük seviyelerinde ulaşılmaktadır. Eş yükselti çizgilerinin faktör eksenlerine paralel olmayışı, akış hızı ve kolon sıcaklığı arasındaki etkileşimin cevap üzerinde etkili olduğu anlamına gelmektedir. Şekil 3.35.c incelendiğinde en yüksek KCF değerlerine akış hızının düşük, $(NH_4)_2CO_3$ yüzdesinin yüksek seviyelerinde ulaşıldığı görülmektedir. Yüksek akış hızı ve düşük $(NH_4)_2CO_3$ yüzdesi şartlarında ise KCF daha düşük değerler almaktadır. Bu şekilde görselleştirilen iki faktör arasındaki etkileşim de KCF üzerinde oldukça etkilidir.



Şekil 3.35. SDM-TMP için FFD ile elde edilen a) Kolon sıcaklığı-$(NH_4)_2CO_3$ yüzdesi ile KCF, b) akış hızı-kolon sıcaklığı ile KCF, c) $(NH_4)_2CO_3$ yüzdesi-akış hızı ile KCF arasındaki ilişkiyi gösteren yüzey grafikleri ve eş yükselti diyagramları

Eşitlik 3.6'da verilen ampirik model kullanılarak saptanan bağımsız değişkenlerin optimal değerleri Çizelge 3.43'te sunulduğu şekilde hesaplanmıştır. Optimal olarak saptanan bu değerlerin cevap yüzey grafikleriyle de uyumlu olduğu gözlenmiştir.

Çizelge 3.43. SDM-TMP karışımı için tam faktöriyel tasarımla elde edilen optimal kromatografik şartlar

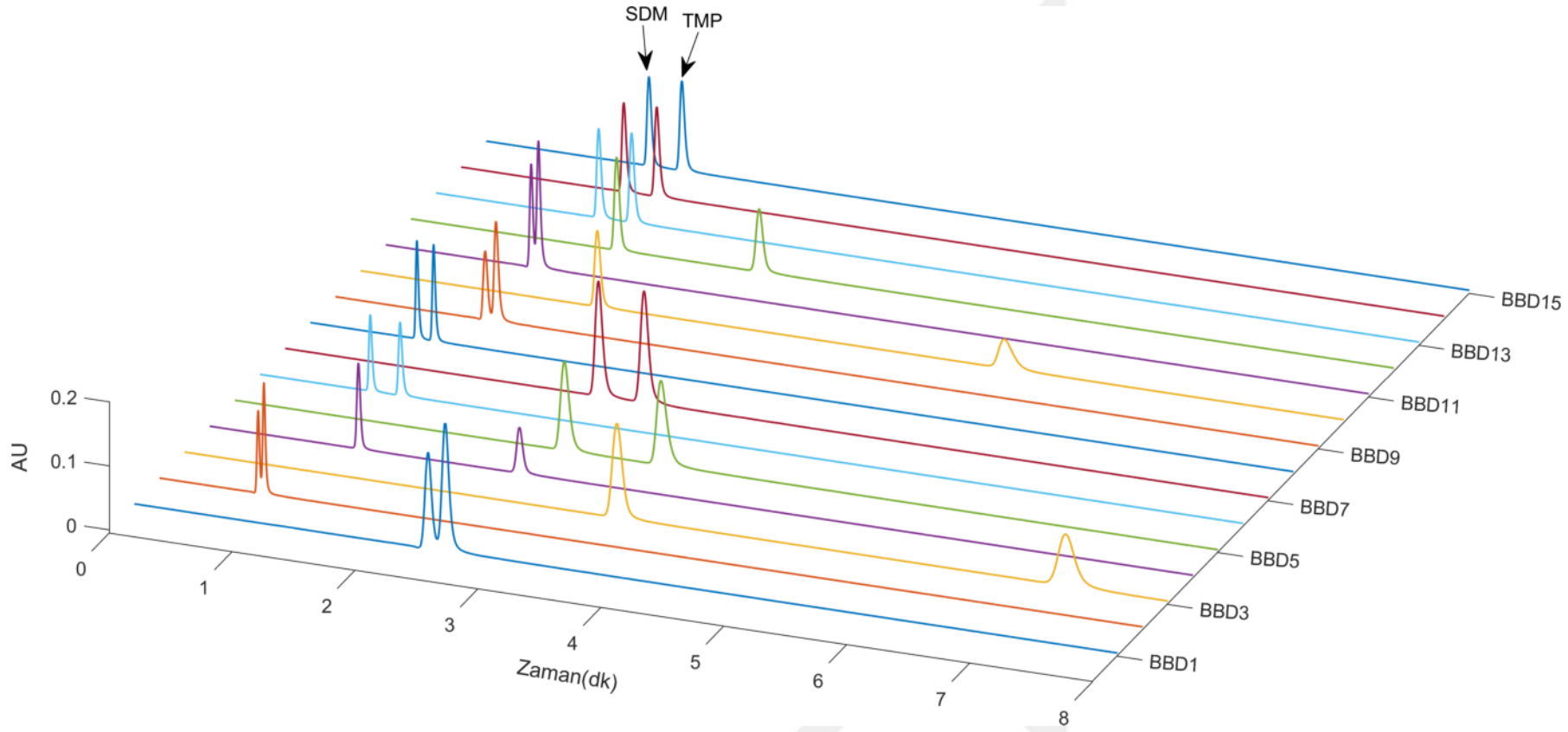
	Faktör adı	Optimal değer
x_1	Kolon sıcaklığı (°C)	48,5
x_2	$(NH_4)_2CO_3$ yüzdesi (%)	46,4
x_3	Akış hızı (mL/dk)	0,27

3.3.1.2. Box-Behnken Tasarım ve Yöntem Optimizasyonu

SDM-TMP karışımının analizi için geliştirilecek UPLC yönteminin optimizasyonu için Box-Behnken tasarımın oluşturulmasında, Çizelge 3.39'da sunulan faktör seviyeleri kullanılmıştır. Üç faktörlü Box-Behnken tasarıma göre, merkez noktadaki tekrar sayısının iki olduğu bir tasarım matrisi oluşturulmuş ve Çizelge 3.44'te sunulmuştur. Box-Behnken tasarımda deney sayısı $N = 2k \times (k-1) + 1 + n_0$ formülü ile hesaplandığı için, tasarım matrisindeki deney sayısı 15'tir. 20 µg/mL SDM ve 20 µg/mL TMP içeren numune, bu tasarım matrisine göre ayarlanan 15 kromatografik koşul kullanılarak UPLC sistemine enjekte edilmiştir. Bu enjeksiyonlara ait 235 nm'de kaydedilen kromatogramlar Şekil 3.36'da sunulmuştur. Elde edilen kromatogramların her biri için zaman eksenindeki pik başlangıç ve pik bitiş noktaları, alıkonma zamanları, varsa vadi noktalarının yanı sıra piklerin zirve noktalarının ve varsa vadi noktasının y eksenindeki karşılıkları kaydedilerek her bir kromatogram için kromatografik cevap fonksiyonu (KCF) değerleri hesaplanmıştır. Hesaplanan KCF değerleri, Çizelge 3.44'te "Ölçülen" sütununda listelenmiştir. Modelleme sonrasında her deney için ampirik modelle hesaplanan KCF değerleri, aynı çizelgede "Tahmin edilen" sütununda, ölçülen ve tahmin edilen değerler arasındaki fark ise "Artık" sütununda verilmiştir.

Çizelge 3.44. Box-Behnken tasarım matrisi ile ölçülen, tahmin edilen ve artık KCF değerleri

	x_1	x_2	x_3	KCF		
	Kolon sıcaklığı (°C)	$(NH_4)_2CO_3$ (%)	Akış hızı (mL/dk)	Ölçülen	Tahmin edilen	Artık
BBD1	0	-1	-1	4,5737	4,5461	0,0276
BBD2	0	-1	+1	3,1826	3,3743	-0,1917
BBD3	0	+1	-1	14,2438	14,0521	0,1917
BBD4	0	+1	+1	4,2043	4,2320	-0,0276
BBD5	-1	0	-1	8,0663	8,2241	-0,1579
BBD6	-1	0	+1	2,1202	2,0587	0,0615
BBD7	+1	0	-1	5,9600	6,0215	-0,0615
BBD8	+1	0	+1	1,3528	1,1950	0,1579
BBD9	-1	-1	0	2,0320	1,9018	0,1302
BBD10	-1	+1	0	9,2067	9,2406	-0,0339
BBD11	+1	-1	0	2,5594	2,5255	0,0339
BBD12	+1	+1	0	5,4202	5,5504	-0,1302
BBD13	0	0	0	3,1819	3,1885	-0,0065
BBD14	0	0	0	3,1993	3,1885	0,0108
BBD15	0	0	0	3,1842	3,1885	-0,0043



Şekil 3.36. SDM ve TMP için Box-Behnken tasarıma göre elde edilen kromatogramlar

Çizelge 3.44'te sunulmuş olan ölçülen KCF değerleri ile faktörler arasındaki ilişkiyi modellemek için, en küçük kareler tekniğinden yararlanılarak ikinci dereceden polinomiyal bir fonksiyon oluşturulmuştur. Bu modeldeki terimlerin katsayıları, t-test ve p-değerleri Çizelge 3.45'te verilmiştir.

Çizelge 3.45. SDM-TMP için BBD ile elde edilen ampirik modele ait katsayılar ve p-anlamlılık değerleri

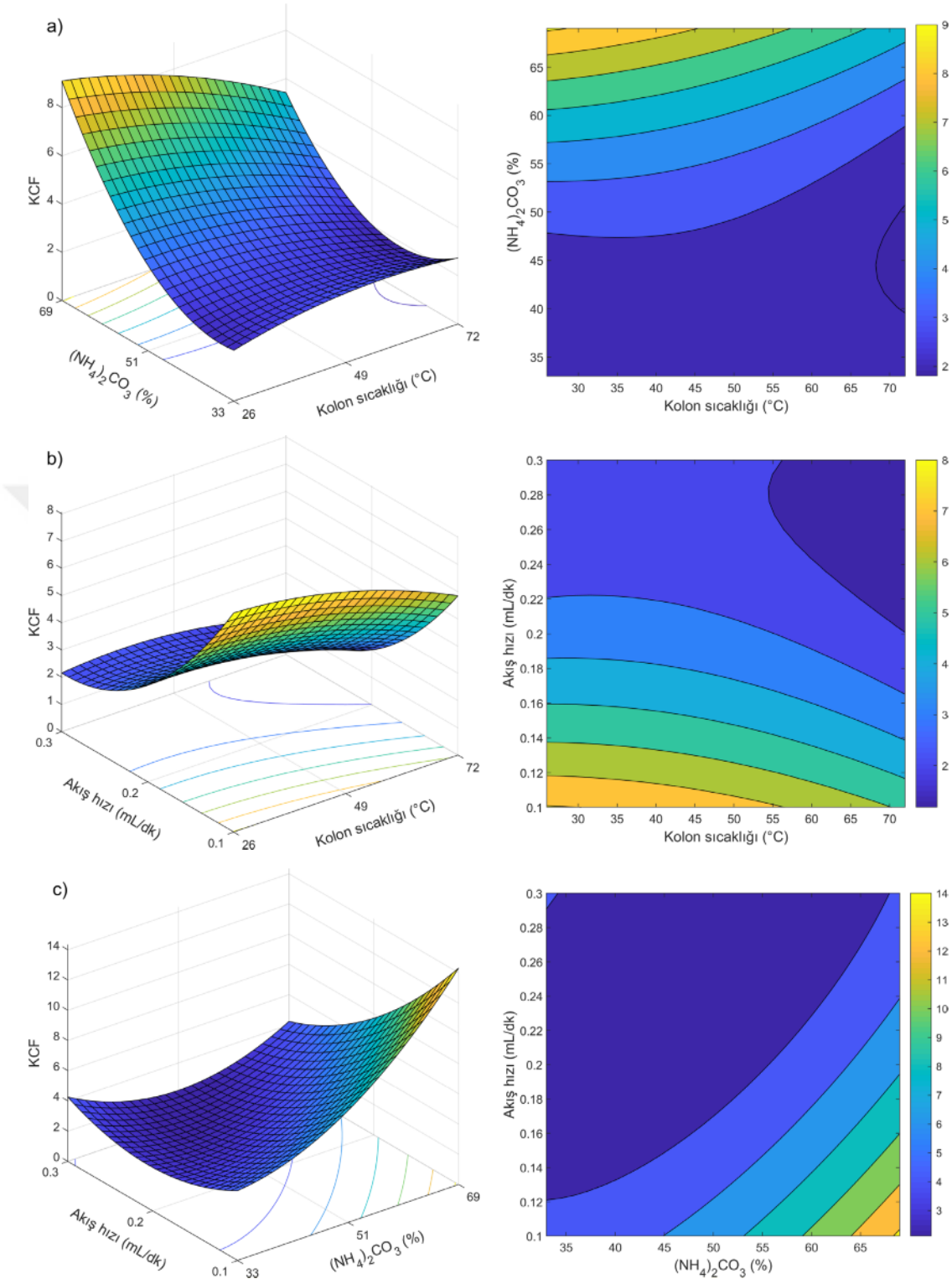
	Katsayı	t-test	p-değeri
Kesim değeri	3,1885	30,05	$7,65 \times 10^{-7}$
x_1	-0,7666	-11,80	$7,69 \times 10^{-5}$
x_2	2,5909	39,88	$1,87 \times 10^{-7}$
x_3	-2,7480	-42,30	$1,39 \times 10^{-7}$
x_1^2	-0,2801	-2,93	$3,27 \times 10^{-2}$
x_2^2	1,8962	19,83	$6,03 \times 10^{-6}$
x_3^2	1,4664	15,33	$2,14 \times 10^{-5}$
x_1x_2	-1,0785	-11,74	$7,89 \times 10^{-5}$
x_1x_3	0,3347	3,64	$1,49 \times 10^{-2}$
x_2x_3	-2,1621	-23,53	$2,58 \times 10^{-6}$

Çizelge 3.45'te görüldüğü üzere, modeldeki her terimin p-değeri, bu çalışmada seçilen anlamlılık seviyesi olan $\alpha = 0,05$'ten küçüktür ve t-test değerleri, 2,57 olan t-tablo değerinden büyüktür. Yani 0,05 anlamlılık düzeyinde tüm terimler anlamlı derecede cevap üzerine etki etmektedir. Bu yüzden kromatografik cevabın modellenmesinde, tüm terimlerin kullanıldığı bir fonksiyon gerekldir. KCF değerini anlamlı olarak etkileyen terimler kullanılarak oluşturulan matematiksel model Eşitlik 3.7'de verilmiştir.

$$y = 3,188 - 0,767x_1 + 2,591x_2 - 2,748x_3 - 0,280x_1^2 + 1,896x_2^2 + 1,466x_3^2 - 1,078x_1x_2 + 0,335x_1x_3 - 2,162x_2x_3 \quad \text{(Eşitlik 3.7)}$$

Bu modelde y kromatografik cevap faktörünü, x_1, x_2 ve x_3 sırasıyla kolon sıcaklığı, $(NH_4)_2CO_3$ (%) yüzdesi ve akış hızı değişkenlerinin doğrusal terimlerini, x_1^2, x_2^2 ve x_3^2 bu değişkenlerin üstel terimlerini, x_1x_2, x_1x_3 ve x_2x_3 ise bu değişkenlerin etkileşim terimlerini temsil etmektedir.

Box-Behnken tasarım kullanılarak elde edilen ve faktörlerin KCF üzerine olan ikili etkilerini gösteren cevap yüzey grafikleri ve eş yükselti diyagramları Şekil 3.37'de sunulmuştur. Şekil 3.37.a'da, hareketli fazdaki $(NH_4)_2CO_3$ yüzdesinin düşük seviyelerinde daha düşük KCF değerleri elde edildiği gözlenmektedir. En yüksek KCF değerlerine $(NH_4)_2CO_3$ yüzdesinin yüksek ve kolon sıcaklığının düşük seviyelerinde ulaşılmaktadır. $(NH_4)_2CO_3$ yüzdesinin düşük seviyelerinde, KCF değerinin kolon sıcaklığının değişimden daha az etkilendiği görülmektedir. Şekil 3.37.b'de akış hızının arttıkça KCF değerinin azaldığı gözlenmektedir. En yüksek KCF değerlerine akış hızının ve kolon sıcaklığının düşük seviyelerinde ulaşılmaktadır. Yüksek akış hızı seviyelerinde, kolon sıcaklığının cevap üzerine etkisi daha azdır. Eş yükselti çizgilerinin faktör eksenlerine paralel olmayışı, akış hızı ve kolon sıcaklığı arasındaki etkileşimin de cevap üzerinde oldukça etkili olduğu anlamına gelmektedir. Şekil 3.37.c incelendiğinde en yüksek KCF değerlerine akış hızının düşük, $(NH_4)_2CO_3$ yüzdesinin yüksek seviyelerinde ulaşıldığı anlaşılmaktadır. Her iki faktörün de karesel etkileri dolayısıyla oluşan içbükey yüzey grafiğinde, en düşük KCF değerlerinin akış hızının orta-yüksek ve $(NH_4)_2CO_3$ yüzdesinin orta-düşük seviyelerinde elde edildiği görülmektedir.



Şekil 3.37. SDM-TMP için BBD ile elde edilen a) Kolon sıcaklığı-$(NH_4)_2CO_3$ yüzdesi ile KCF, b) akış hızı-kolon sıcaklığı ile KCF, c) $(NH_4)_2CO_3$ yüzdesi-akış hızı ile KCF arasındaki ilişkiyi gösteren yüzey grafikleri ve eş yükselti diyagramları

Eşitlik 3.7'de verilen model kullanılarak bağımsız değişkenlerin optimal değerleri Çizelge 3.46'da sunulduğu gibi hesaplanmıştır. Optimal olarak saptanan bu değerlerin cevap yüzey grafikleriyle yapılan yorumlama ile de uyumlu olduğu gözlenmiştir.

Çizelge 3.46. SDM-TMP karışımı için Box-Behnken tasarıma göre uygulanan cevap yüzey metodolojisi ile tespit edilen optimal kromatografik şartlar

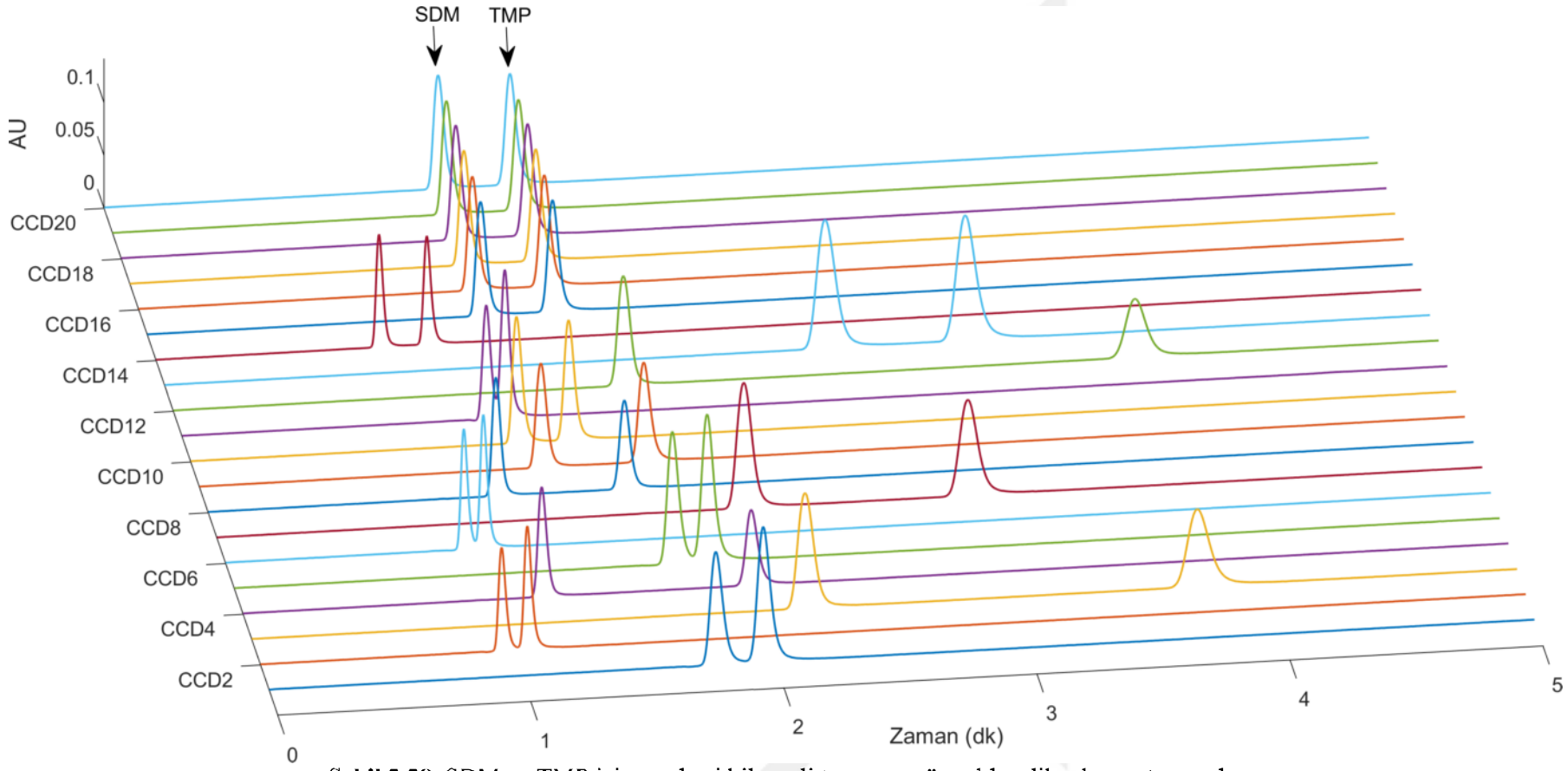
	Faktör adı	Optimal değer
x_1	Kolon sıcaklığı (°C)	43,0
x_2	$(NH_4)_2CO_3$ yüzdesi (%)	44,6
x_3	Akış hızı (mL/dk)	0,27

3.3.1.3. Merkezi Bileşenli Tasarım ve Yöntem Optimizasyonu

SDM ve TMP kombinasyonunun analizi için UPLC yöntemi geliştirilmesinde, yöntemin merkezi bileşenli tasarım ile optimizasyonu için, Çizelge 3.40'ta sunulan faktör seviyeleri kullanılmıştır. Üç faktörlü merkezi bileşenli tasarıma göre planlanan bir tasarım matrisindeki deney sayısı $N = 2^k + (2k + 1) + n_0$ formülü ile hesaplanır. Merkez noktada 5 adet tekrarın gerçekleştirildiği bir tasarım için bu formül kullanıldığında deney sayısı 20 olarak hesaplanmıştır. SDM-TMP karışımı için belirlenen merkezi bileşenli tasarım matrisi Çizelge 3.47'de sunulmuştur. Bu tasarım matrisine göre ayarlanan 20 kromatografik koşul kullanılarak 20 µg/mL SDM ve 20 µg/mL TMP içeren numune, UPLC sistemine enjekte edilmiştir. Bu enjeksiyonlara ait 235 nm'de kaydedilen kromatogramlar Şekil 3.38'de sunulmuştur. Elde edilen kromatogramların her biri için zaman eksenindeki pik başlangıç ve pik bitiş noktaları, alıkonma zamanları, varsa vadi noktaları kaydedilmiştir. Piklerin zirve noktalarının ve varsa vadi noktasının y eksenindeki karşılıkları da kaydedildikten sonra her bir kromatograma ait kromatografik cevap fonksiyonu (KCF) değerleri hesaplanmıştır. Her bir kromatografik şart için hesaplanan KCF değerleri, Çizelge 3.47'de "Ölçülen" sütununda listelenmiştir. Modelleme sonrasında her deney için ampirik modelle hesaplanan KCF değerleri, aynı çizelgede "Tahmin edilen" sütununda, ölçülen ve tahmin edilen değerler arasındaki fark ise "Artık" sütununda verilmiştir.

Çizelge 3.47. Merkezi bileşenli tasarım matrisi ile ölçülen, tahmin edilen ve artık KCF değerleri

	x_1 Kolon sıcaklığı (°C)	x_2 $(NH_4)_2CO_3$ (%)	x_3 Akış hızı (mL/dk)	KCF Ölçülen	KCF Tahmin edilen	KCF Artık
CCD1	-1	-1	-1	4,2459	4,2704	-0,0245
CCD2	-1	-1	+1	1,8346	1,7666	0,0680
CCD3	-1	+1	-1	9,8683	9,8600	0,0084
CCD4	-1	+1	+1	4,2154	4,2783	-0,0629
CCD5	+1	-1	-1	3,7246	3,7026	0,0220
CCD6	+1	-1	+1	2,4423	2,4916	-0,0493
CCD7	+1	+1	-1	7,5157	7,6246	-0,1089
CCD8	+1	+1	+1	3,3194	3,3358	-0,0164
CCD9	$-\alpha$	0	0	3,7732	3,7863	-0,0132
CCD10	$+\alpha$	0	0	2,5872	2,5161	0,0710
CCD11	0	$-\alpha$	0	2,9288	2,9582	-0,0294
CCD12	0	$+\alpha$	0	8,4562	8,3690	0,0872
CCD13	0	0	$-\alpha$	7,8414	7,7998	0,0416
CCD14	0	0	$+\alpha$	2,1034	2,0872	0,0163
CCD15	0	0	0	3,2609	3,2591	0,0018
CCD16	0	0	0	3,2514	3,2591	-0,0077
CCD17	0	0	0	3,2556	3,2591	-0,0034
CCD18	0	0	0	3,2577	3,2591	-0,0014
CCD19	0	0	0	3,2600	3,2591	0,0009
CCD20	0	0	0	3,2589	3,2591	-0,0001



Şekil 3.38. SDM ve TMP için merkezi bileşenli tasarıma göre elde edilen kromatogramlar

Çizelge 3.47'de listelenmiş olan ölçülen KCF değerleri ile bağımsız değişkenler arasındaki ilişkiyi modellemek için, en küçük kareler tekniğinden yararlanılarak ikinci dereceden polinomiyal bir fonksiyon oluşturulmuştur. Bu modeldeki terimlerin katsayıları ile katsayılara ait t-test ve p-değerleri Çizelge 3.48'de sunulmuştur.

Çizelge 3.48. SDM-TMP için CCD ile elde edilen ampirik modele ait katsayılar ve istatistiksel sonuçları

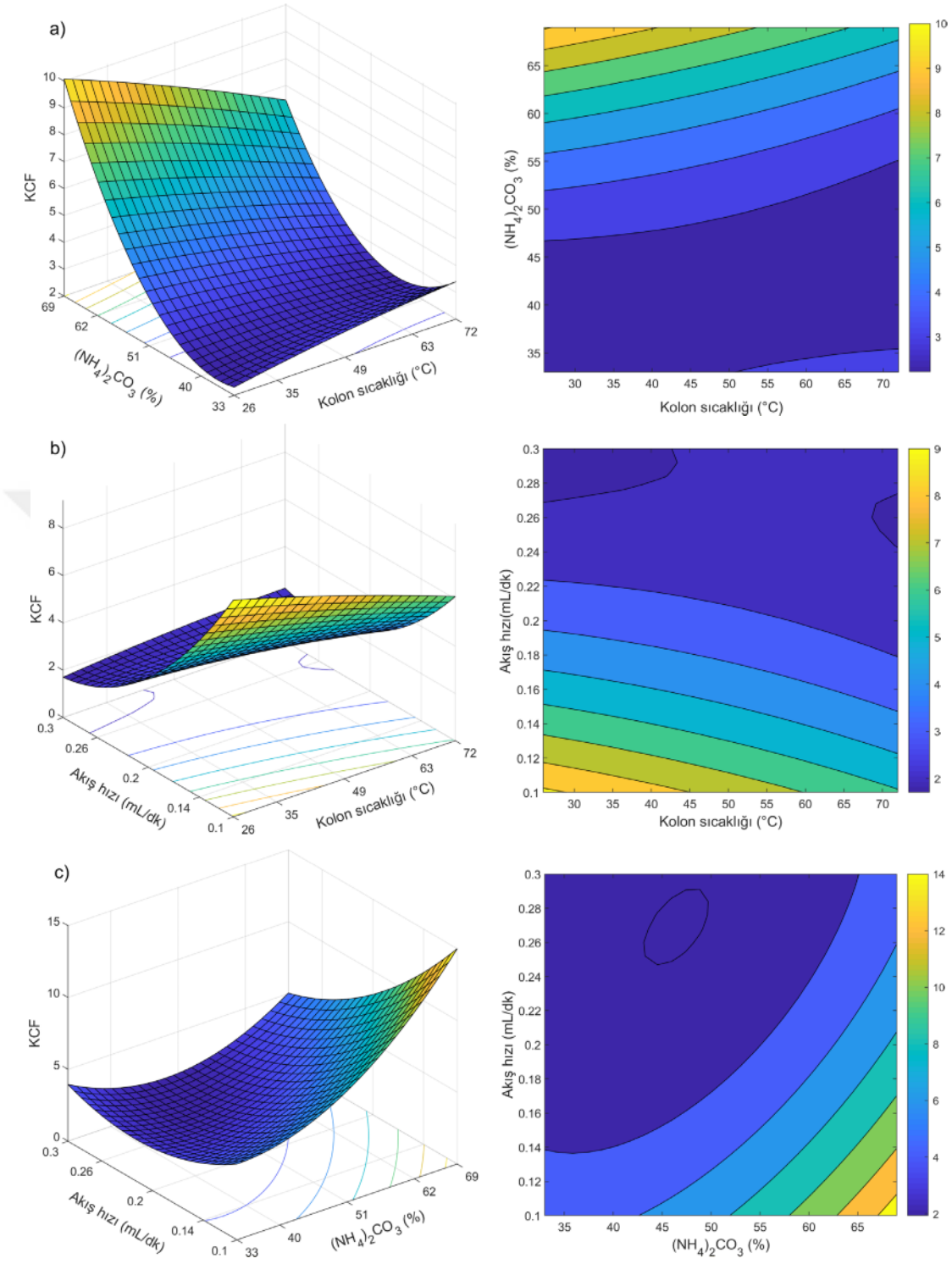
	Katsayı	t-test	p-değeri
Kesim değeri	3,2591	126,24	$2,39x10^{-17}$
x_1	-0,3776	-22,05	$8,27x10^{-10}$
x_2	1,6084	93,91	$4,59x10^{-16}$
x_3	-1,6982	-99,15	$2,67x10^{-16}$
x_1^2	-0,0381	-2,29	$4,53x10^{-2}$
x_2^2	0,8499	50,98	$2,04x10^{-13}$
x_3^2	0,5954	35,72	$7,03x10^{-12}$
x_1x_2	-0,4169	-18,63	$4,29x10^{-9}$
x_1x_3	0,3232	14,44	$5,03x10^{-8}$
x_2x_3	-0,7695	-34,38	$1,03x10^{-11}$

Çizelge 3.48'de görüldüğü üzere, modeldeki terimlerin p-değerleri, bu çalışmada seçilen anlamlılık seviyesi olan $\alpha = 0,05$'ten küçüktür ve t-test değerleri, 2,23 olan t-tablo değerinden büyüktür. Yani 0,05 anlamlılık düzeyinde tüm terimler anlamlı derecede cevap üzerine etki etmektedir. Bu yüzden kromatografik cevabın modellenmesinde, tüm terimlerin kullanıldığı bir eşitlik gereklidir. Kromatografik cevap fonksiyonu değerini anlamlı olarak etkileyen terimler kullanılarak oluşturulan matematiksel model, Eşitlik 3.8 de verilmiştir.

$$y = 3,259 - 0,378x_1 + 1,608x_2 - 1,698x_3 - 0,038x_1^2 + 0,850x_2^2 + 0,595x_3^2 - 0,417x_1x_2 + 0,323x_1x_3 - 0,770x_2x_3 \quad \text{(Eşitlik 3.8)}$$

Bu modelde y kromatografik cevap faktörünü, x_1, x_2 ve x_3 sırasıyla kolon sıcaklığı, tampon yüzdesi ve akış hızı değişkenlerinin doğrusal terimlerini, x_1^2, x_2^2 ve x_3^2 bu değişkenlerin üstel terimlerini, x_1x_2, x_1x_3 ve x_2x_3 ise bu değişkenlerin etkileşim terimlerini temsil etmektedir.

Merkezi bileşenli tasarım kullanılarak elde edilen ve faktörlerin KCF üzerine olan ikili etkilerini gösteren cevap yüzey grafikleri ve eş yükselti diyagramları Şekil 3.39'da sunulmuştur. Bu şekil incelendiğinde, seçilen faktörlerin ve faktör etkileşimlerinin KCF üzerine genel olarak farklı oranlarda etki ettiği görülmektedir. Şekil 3.39.a'ya göre, hareketli fazdaki $(NH_4)_2CO_3$ yüzdesinin düşük seviyelerinde düşük KCF değerleri elde edilmektedir. En yüksek KCF değerlerine $(NH_4)_2CO_3$ yüzdesinin yüksek ve kolon sıcaklığının düşük seviyelerinde ulaşılmaktadır. $(NH_4)_2CO_3$ yüzdesinin yüksek seviyelerinde KCF değerinin kolon sıcaklığının değişimden daha çok etkilendiği görülmektedir. Şekil 3.39.b'de akış hızının arttıkça KCF değerinin azaldığı görülmektedir. En yüksek KCF değerlerine akış hızının ve kolon sıcaklığının düşük seviyelerinde ulaşılmaktadır. Yüksek akış hızı seviyelerinde, kolon sıcaklığının cevap üzerine etkisi daha azdır. Eş yükselti çizgilerinin faktör eksenlerine paralel olmayışı, akış hızı ve kolon sıcaklığı arasındaki etkileşimin cevap üzerinde etkili olduğu anlamına gelmektedir. Şekil 3.39.c'ye göre en yüksek KCF değerlerine akış hızının düşük, $(NH_4)_2CO_3$ yüzdesinin yüksek seviyelerinde ulaşılmaktadır. Her iki faktörün de karesel etkileri dolayısıyla oluşan içbükey yüzey grafiğinde, en düşük KCF değerlerinin akış hızının yüksek ve $(NH_4)_2CO_3$ yüzdesinin orta-düşük seviyelerinde elde edildiği görülmektedir.



Şekil 3.39. SDM-TMP için CCD ile elde edilen a) Kolon sıcaklığı-$(NH_4)_2CO_3$ yüzdesi ile KCF, b) akış hızı-kolon sıcaklığı ile KCF, c) $(NH_4)_2CO_3$ yüzdesi-akış hızı ile KCF arasındaki ilişkiyi gösteren yüzey grafikleri ve eş yükselti diyagramları

Eşitlik 3.8'de verilen model kullanılarak bağımsız değişkenlerin optimal değerleri Çizelge 3.49'da sunulduğu gibi hesaplanmıştır. Optimal olarak saptanan bu değerlerin cevap yüzey grafikleriyle yapılan yorumlama ile de uyumlu olduğu gözlenmiştir.

Çizelge 3.49. SDM-TMP karışımı için merkezi bileşenli tasarımla elde edilen optimal kromatografik şartlar

	Faktör adı	Optimal değer
x_1	Kolon sıcaklığı (°C)	60,8
x_2	$(NH_4)_2CO_3$ yüzdesi (%)	48,0
x_3	Akış hızı (mL/dk)	0,26

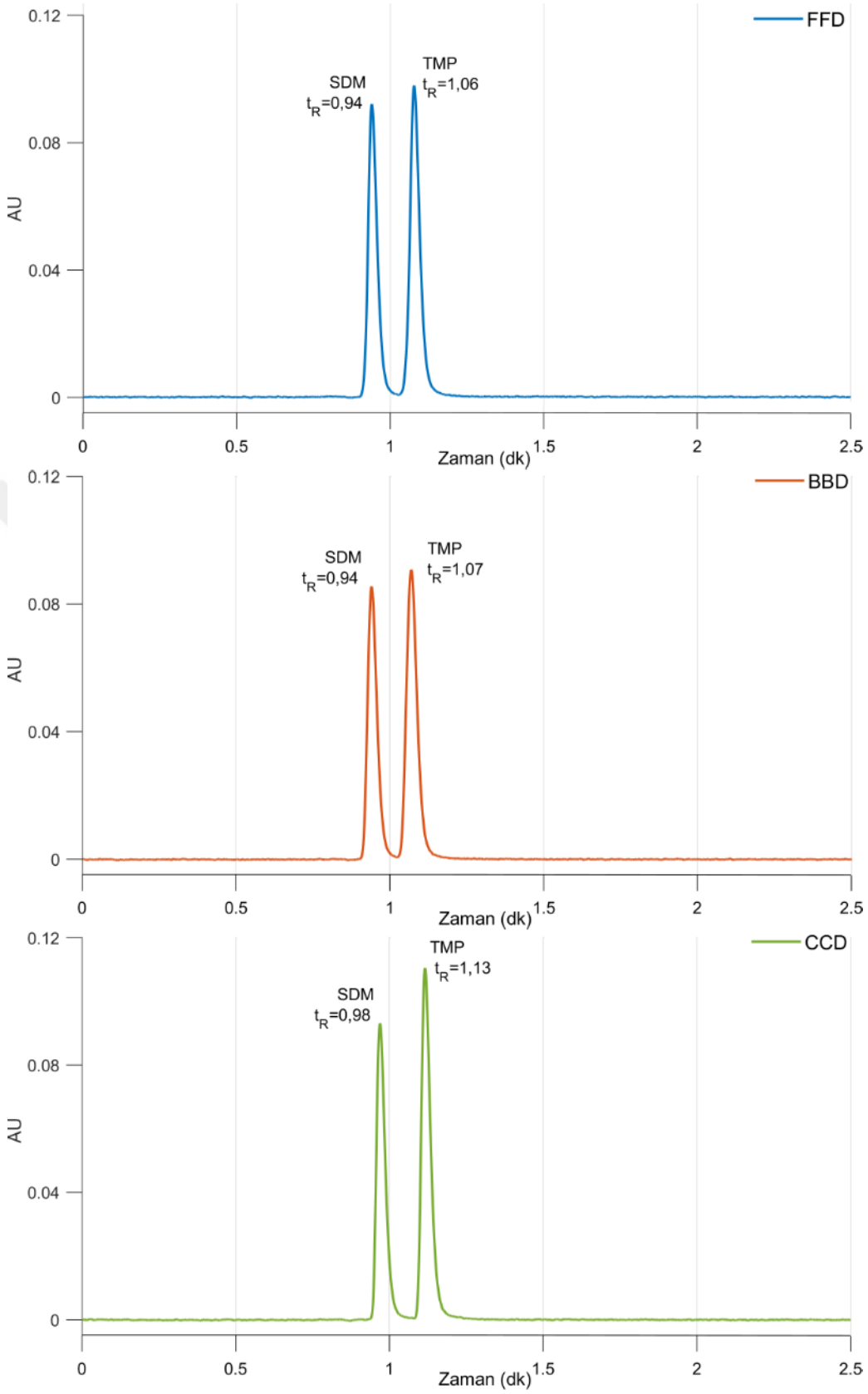
3.3.1.4. Tasarımların karşılaştırılması

SDM-TMP etken maddelerinin analizi için geliştirilmesi hedeflenen UPLC yöntemlerinin optimizasyonunda, FFD, BBD ve CCD tasarımları kullanılarak üç farklı kromatografik şart optimal olarak belirlenmiştir. Her bir tasarımla elde edilen optimal şartlar Çizelge 3.50'de özetlenmiştir.

Çizelge 3.50. SDM-TMP karışımı için farklı tasarımlar kullanılarak elde optimal kromatografik şartlar

	Faktör adı	FFD	BBD	CCD
x_1	Kolon sıcaklığı (°C)	48,5	43,0	60,8
x_2	$(NH_4)_2CO_3$ yüzdesi (%)	46,4	44,6	48,0
x_3	Akış hızı (mL/dk)	0,27	0,27	0,26

Aynı deneysel uzayı kullanan üç farklı tasarımın karşılaştırılabilmesi için, bu tasarımlarla elde edilen üç farklı optimal kromatografik şart kullanılarak 20 µg/mL SDM ve 20 µg/mL TMP içeren numune, UPLC sistemine enjekte edilmiştir. Bu enjeksiyonlardan elde edilen örnek birer kromatogram Şekil 3.36'da sunulmuştur.



Şekil 3.40. SDM-TMP karışımı için farklı tasarımlar kullanılarak saptanan optimal kromatografik şartlarda kaydedilen kromatogramlar

Şekil 3.40'taki kromatogramlar incelendiğinde, kromatografik şartlar farklı olmasına rağmen birbirine çok yakın alıkonma zamanları elde edildiği anlaşılmaktadır. FFD, BBD ve CCD tasarımlarla elde edilen optimal şartlarla elde edilen alıkonma zamanları SDM için sırasıyla 0,94; 0,94; 0,98 dk; TMP için ise sırasıyla 1,06; 1,07; 1,13 dk olarak tayin edilmiştir. Optimal olarak tespit edilen kromatografik şartlar her bir faktör için tek tek düşünüldüğünde birbirlerinden farklı olsa da; kolon sıcaklığı, $(NH_4)_2CO_3$ yüzdesi ve akış hızı için belirlenen şartların beraber kullanılmasıyla benzer kromatogramlar elde edilmiştir. Çizelge 3.50'de görüldüğü üzere, optimal olarak saptanan akış hızı değeri FFD ve BBD için aynıdır ve CCD ile optimal olarak belirlenen değere oldukça yakındır. Fakat kolon sıcaklığı ve $(NH_4)_2CO_3$ yüzdesi parametreleri için belirlenen optimal değerler birbirlerinden oldukça farklıdır. Fakat bu parametrelerin optimal değerlerini sayısal olarak karşılaştıracak olursak, her iki faktör için de sıralamanın BBD<FFD<CCD şeklinde olduğu görülmektedir. Yani optimal olarak saptanan kolon sıcaklığı değeri arttıkça, optimal olarak saptanan $(NH_4)_2CO_3$ yüzdesinin değeri de artmaktadır. Kolon sıcaklığının artışı pikler arasındaki ayırıcılığı azaltırken, $(NH_4)_2CO_3$ yüzdesinin artışı ise pikler arasındaki ayırıcılığı arttırmaktadır. Bu değişime bağlı olarak, bu faktörlerin ampirik modellerdeki matematiksel işaretleri de birbirinin tersidir, kolon sıcaklığının artışı KCF'yi azaltırken $(NH_4)_2CO_3$ yüzdesinin artışı KCF'yi azaltmaktadır.

Sonuç olarak, SDM ve TMP etken maddelerinin analizi için cevap yüzey metodolojisi ile tespit edilen bu üç optimal kromatografik şart kullanılarak üç ayrı UPLC yöntemi geliştirilmiştir. Bu analiz yöntemleri, optimizasyon basamağında kullanılan tam faktöriyel, Box-Behnken ve merkezi bileşenli tasarımlara göre sırasıyla "FFD-UPLC", "BBD-UPLC" ve "CCD-UPLC" yöntemleri olarak adlandırılmıştır. Bu yöntemlerin cevap yüzey metodolojisi ile optimize edilen kromatografik şartlarının yanı sıra, ön çalışmalarda belirlenen koşulları da içeren liste Çizelge 3.51'de özetlenmiştir.

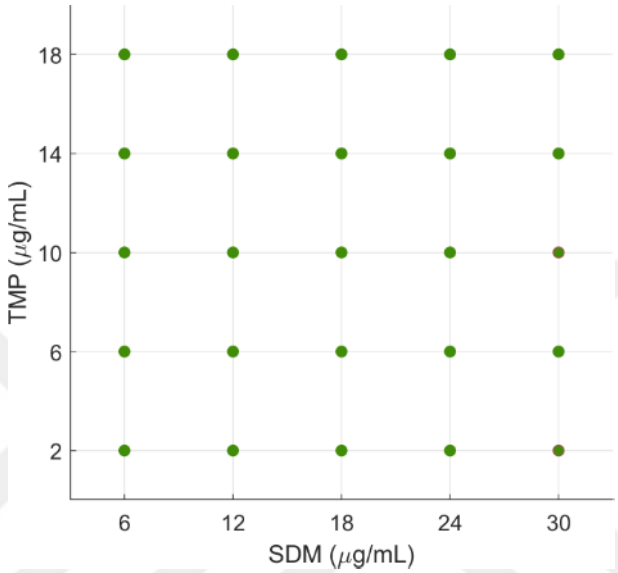
Çizelge 3.51. SDM ve TMP etken maddelerini içeren veteriner preparatın kantitatif analizi için kullanılan UPLC yöntemlerine ait kromatografik şartlar

	FFD-UPLC	BBD-UPLC	CCD-UPLC
Analitik kolon	C_{18} 100 mm	C_{18} 100 mm	C_{18} 100 mm
Hareketli faz	Metanol ve 10 mM $(NH_4)_2CO_3$ karışımı	Metanol ve 10 mM $(NH_4)_2CO_3$ karışımı	Metanol ve 10 mM $(NH_4)_2CO_3$ karışımı
$(NH_4)_2CO_3$ yüzdesi	46,4	44,6	48,0
Kolon sıcaklığı (°C)	48,5	43,0	60,8
Akış hızı (mL/dk)	0,27	0,27	0,26
Numune çözücüsü	Metanol: su (50:50, *h/h*)	Metanol: su (50:50, *h/h*)	Metanol: su (50:50, *h/h*)
Enjeksiyon hacmi	1 µL	1 µL	1 µL
Numune odası sıcaklığı	15 °C	15 °C	15 °C

3.3.2. Kalibrasyon Eğrilerinin Hazırlanması

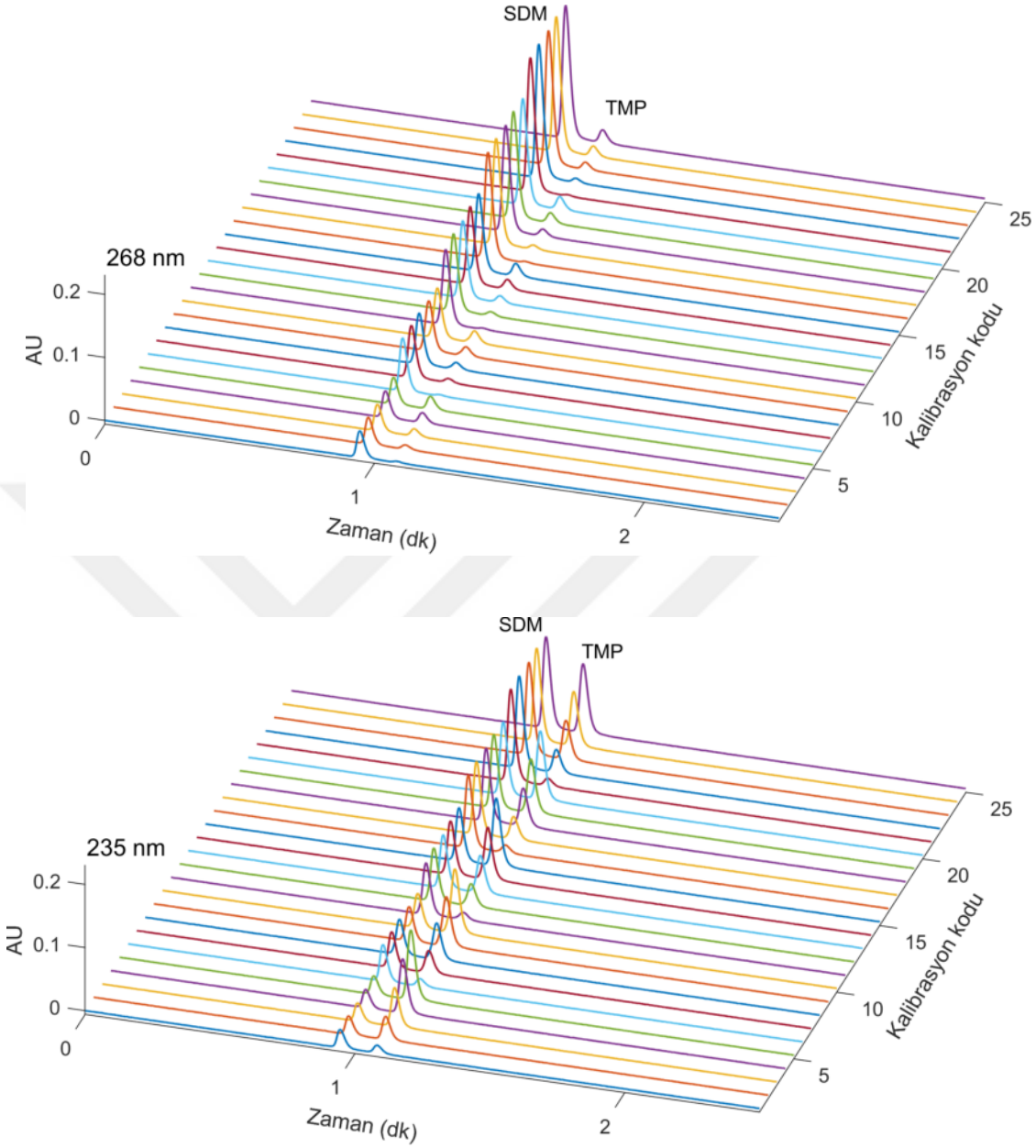
SDM ve TMP karışımının analizi için hazırlanan tüm çözeltilerde, ön deneylerde belirlenmiş olan metanol-su karışımı (50:50, *h/h*) çözücü olarak kullanılmıştır. Standart çözeltilerin hazırlanması için öncelikle SDM ve TMP stok çözeltileri ayrı ayrı hazırlanmıştır. SDM stok çözeltisi için 10 mg SDM'ye karşılık gelen 10,8 mg sülfadimidin sodyum standart maddesi 100 mL balon jojeye alınarak çözücü ile tamamlanmıştır. TMP stok çözeltisi için 10 mg standart madde 100 mL balon jojede çözücü ile tamamlanmıştır. Standart maddelerin tam olarak çözünmesi için stok çözeltiler 5 dakika boyunca ultrasonik banyoda tutulmuştur. Kalibrasyon ve validasyon çalışmaları için her iki stok çözeltiden belli hacimler pipetlendikten sonra ve çözücü ile seyreltilmiş ve tüm çözeltiler günlük olarak hazırlanmıştır.

SDM için 6-30 µg/mL, TMP için 2-18 µg/mL konsantrasyon aralığında kalibrasyon çözeltileri hazırlanmıştır. Kalibrasyon setinin planlanmasında faktöriyel tasarımdan yararlanılmıştır. SDM ve TMP karışımının kalibrasyon setinin tam faktöriyel tasarımında beş seviye ve iki bileşen için 5^2=25 adet kalibrasyon çözeltisi hazırlanmıştır. Bu kalibrasyon setinin diyagramı Şekil 3.41'de sunulmuştur.

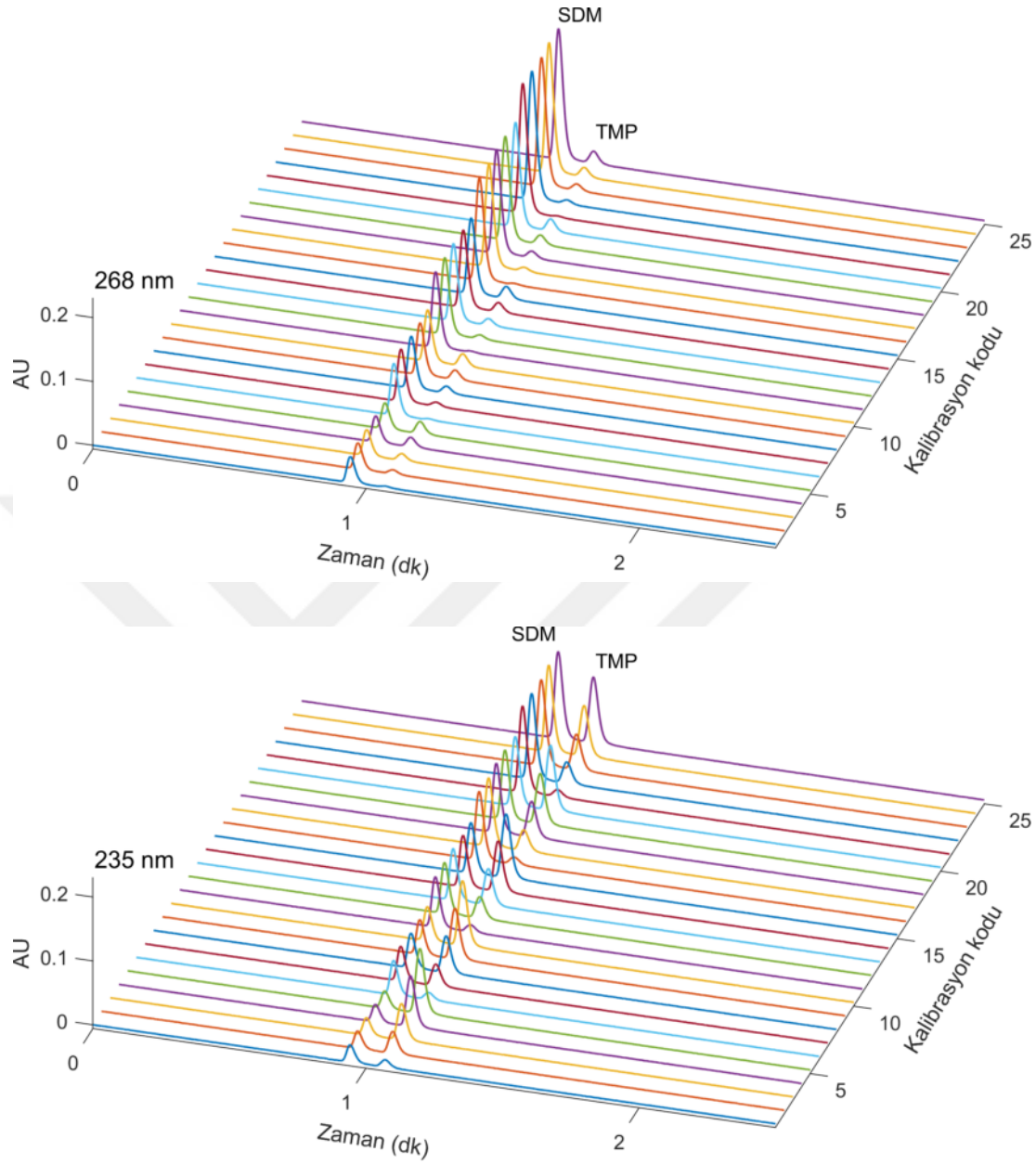


Şekil 3.41. SDM ve TMP kalibrasyon seti diyagramı

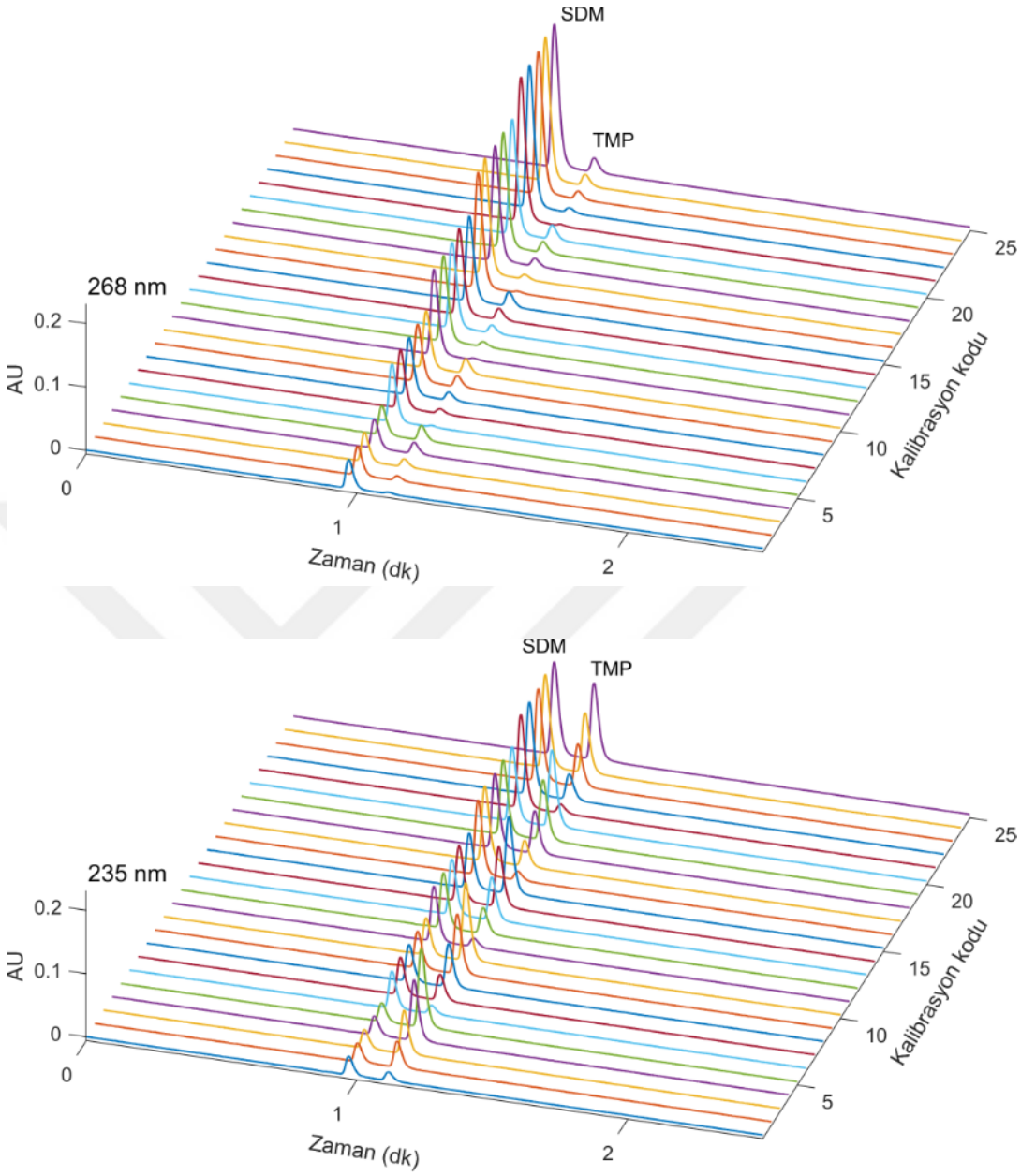
SDM ve TMP etken maddelerini içeren kalibrasyon çözeltileri, FFD-UPLC, BBD-UPLC ve CCD-UPLC yöntemlerinin Çizelge 3.51'de sunulan kromatografik koşullarında UPLC sistemine enjekte edilmiştir. Bu yöntemlerde SDM bileşiği için 268 nm ve TMP bileşiği için 235 nm'de PDA dedeksiyon ile kromatogramlar elde edilmiştir. FFD-UPLC yöntemi ile elde edilen kromatogramlar Şekil 3.42'de sunulmuş olup, SDM ve TMP için alıkonma zamanları 0,94 ve 1,06 dk olarak belirlenmiştir. Şekil 3.43'te sunulan BBD-UPLC yöntemi ile kaydedilen kromatogramlarda SDM ve TMP için alıkonma zamanları 0,95 ve 1,08 dk olarak gözlenmiştir. CCD-UPLC yöntemi kullanılarak SDM için 268 nm'de kaydedilen kromatogramlarda bu etken maddenin alıkonma zamanı 0,98 dk olarak, TMP için 235 nm'de kaydedilen kromatogramlarda ise TMP alıkonma zamanı 1,12 dk olarak belirlenmiş ve bu kromatogramlar Şekil 3.44'te sunulmuştur.



Şekil 3.42. SDM-TMP kalibrasyon setinin FFD-UPLC yöntemi ile 268 ve 235 nm'de kaydedilen kromatogramları



Şekil 3.43. SDM-TMP kalibrasyon setinin BBD-UPLC yöntemi ile 268 ve 235 nm'de kaydedilen kromatogramları



Şekil 3.44. SDM-TMP kalibrasyon setinin CCD-UPLC yöntemi ile 268 ve 235 nm'de kaydedilen kromatogramları

FFD-UPLC, BBD-UPLC ve CCD-UPLC yöntemlerinde, kalibrasyon setinin 268 nm'de kaydedilen kromatogramlarında SDM'nin ve 235 nm'de kaydedilen kromatogramlarında TMP'nin pik alanları ile bu bileşiklerin kalibrasyon setindeki konsantrasyon değerleri arasındaki doğrusal ilişkiyi açıklayan denklemler oluşturuldu. Bu değişkenlerin doğrusal regresyon analizi ile elde edilen kalibrasyon eğrilerine ait istatistiksel sonuçlar Çizelge 3.52'de sunulmuştur. Validasyon ve gerçek numune analizi çalışmalarında SDM ve TMP miktarları bu kalibrasyon denklemleri kullanılarak hesaplanmıştır.

Çizelge 3.52. SDM ve TMP etken maddeleri için elde edilen doğrusal regresyon verileri

	FFD-UPLC		BBD-UPLC		CCD-UPLC	
	SDM	TMP	SDM	TMP	SDM	TMP
Dalga boyu (nm)	268	235	268	235	268	235
Doğrusal aralık (µg/mL)	6-30	2-18	6-30	2-18	6-30	2-18
Eğim	2,479	2,332	2,498	2,329	2,610	2,401
Kesim	-0,251	0,574	-0,290	0,501	-0,168	1,284
Korelasyon katsayısı	0,9999	0,9998	0,9999	0,9996	0,9999	0,9994
Eğimin standart hatası	0,008	0,011	0,009	0,013	0,007	0,017
Kesimin standart hatası	0,167	0,122	0,174	0,148	0,136	0,196
Korelasyon katsayısının standart hatası	0,356	0,299	0,371	0,365	0,291	0,481
Yakalama sınırı (µg/mL)	0,22	0,17	0,23	0,21	0,17	0,27
Tayin sınırı (µg/mL)	0,67	0,52	0,70	0,64	0,52	0,81

3.3.3. Yöntemlerin Validasyonu

SDM-TMP karışımının analizi için geliştirilen UPLC yöntemlerinin validasyon çalışmaları sistem uygunluk testleri ve analitik validasyon testleri şeklinde iki basamakta gerçekleştirilmiştir.

Sistem uygunluk testleri: SDM ve TMP bileşiklerini içeren bir çözelti, FFD-UPLC, BBD-UPLC ve CCD-UPLC yöntemlerinin Çizelge 3.51'de özetlenen kromatografik şartları altında UPLC sistemine enjekte edilmiştir. 10 enjeksiyon sonucunda elde edilen kromatogramlardaki sistem uygunluk parametreleri Waters Empower 2 yazılımında hesaplanarak ortalama değerleri Çizelge 3.53'te listelenmiştir.

Çizelge 3.53. SDM ve TMP karışımının analizi için geliştirilen UPLC yöntemlerinin sistem uygunluk testi sonuçları

	FFD-UPLC		BBD-UPLC		CCD-UPLC		Önerilen
	SDM	TMP	SDM	TMP	SDM	TMP	
Alıkonma zamanı (dk)	0,94	1,06	0,95	1,08	0,98	1,12	
Kapasite faktörü (k')	1,09	1,38	1,08	1,40	1,15	1,47	k'>2
Ayırıcılık (R)	-	2,23	-	2,37	-	2,44	R > 2
Kuyruklanma faktörü (T)	1,34	1,31	1,34	1,30	1,34	1,28	T < 2
Teorik tabaka sayısı (N)	4966	5596	4846	5119	5323	5754	N > 2000
Alıkonma zamanı BSS	0,29	0,30	0,24	0,21	0,16	0,15	BSS < 1
Pik alanı BSS	0,63	0,91	0,28	0,55	0,48	0,44	BSS < 1

BSS: Bağıl standart sapma

Yöntem validasyon testleri: FFD-UPLC, BBD-UPLC ve CCD-UPLC yöntemlerinin validasyonları geri kazanım, gün içi ve günler arası ile standart ekleme çalışmaları yapılarak gerçekleştirilmiştir.

Geri kazanım çalışması için etken maddelerin çalışma aralığı içinde, her iki etken maddeyi de farklı derişimlerde içeren 11 adet yapay karışım çözeltisi hazırlanmıştır. FFD-UPLC, BBD-UPLC ve CCD-UPLC yöntemlerinin doğruluk ve kesinliğini değerlendirmek için hazırlanan bu çözeltilerin kromatogramları yöntemlerin Çizelge 3.51'de özetlenen kromatografik koşullarında kaydedilmiştir. 268 nm'de kaydedilen kromatogramlarda SDM bileşiğine ait olan pik alanları, 235 nm'de kaydedilen kromatogramlarda TMP bileşiğine ait olan pik alanları, kalibrasyon denklemlerinde yerlerine konularak yapay karışımlardaki etken

maddelerin miktarları FFD-UPLC, BBD-UPLC ve CCD-UPLC yöntemleri için ayrı ayrı hesaplanarak Çizelge 3.54'te "Bulunan" sütununda listelenmiştir. Bulunan bu miktarlardan hesaplanan yüzde geri kazanım değerleri ile bu değerlerin ortalama, standart sapma, bağıl standart sapma ve bağıl hata değerleri aynı çizelgede verilmiştir. FFD-UPLC yöntemi ile elde edilen ortalama geri kazanım yüzdesi ile standart sapma değerleri SDM için %101,02 ve 0,60; TMP için %100,46 ve 1,33 olarak hesaplanmıştır. BBD-UPLC yöntemi ile elde edilen ortalama yüzde geri kazanım ile standart sapma değerleri SDM için %99,57 ve 0,65; TMP için %99,91 ve 1,84 olarak tespit edilmiştir. CCD-UPLC yöntemi ile elde edilen ortalama yüzde geri kazanım ile standart sapma değerleri ise SDM için %100,85 ve 1,58; TMP için %100,65 ve 1,19 olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 3.54. SDM ve TMP içeren yapay karışım çözeltilerinin analiz sonuçları

	Konulan (µg/mL)		Bulunan (µg/mL)						Geri kazanım (%)					
			FFD-UPLC		BBD-UPLC		CCD-UPLC		FFD-UPLC		BBD-UPLC		CCD-UPLC	
Kod	SDM	TMP	SDM	TMP	SDM	TMP	SDM	TMP	SDM	TMP	SDM	TMP	SDM	TMP
M1	25,00	2,00	25,36	2,03	25,06	2,08	25,38	2,06	101,43	101,70	100,25	103,83	101,51	102,80
M2	25,00	6,00	25,43	5,95	25,03	6,03	25,44	6,06	101,74	99,23	100,11	100,49	101,74	100,92
M3	25,00	10,00	24,99	10,00	24,76	9,99	25,37	9,97	99,97	100,05	99,03	99,92	101,49	99,69
M4	25,00	14,00	25,20	14,04	24,84	13,99	25,38	14,00	100,79	100,26	99,36	99,96	101,52	99,98
M5	25,00	18,00	25,22	17,82	24,95	17,92	25,36	18,20	100,87	99,01	99,79	99,57	101,43	101,13
M6	6,00	5,00	6,11	4,92	6,04	4,86	5,82	4,93	101,76	98,35	100,64	97,12	97,04	98,53
M7	12,00	5,00	12,08	5,07	11,80	4,96	11,85	4,98	100,70	101,45	98,34	99,30	98,73	99,59
M8	18,00	5,00	18,02	5,00	17,88	4,92	18,06	5,03	100,12	99,93	99,34	98,32	100,32	100,67
M9	24,00	5,00	24,37	5,14	23,98	4,92	24,51	5,08	101,52	102,86	99,91	98,49	102,13	101,60
M10	30,00	5,00	30,35	5,06	29,78	4,99	30,57	5,02	101,15	101,23	99,27	99,81	101,90	100,47
M11	25,00	5,00	25,29	5,05	24,80	5,11	25,39	5,09	101,17	100,95	99,22	102,22	101,55	101,74
							Ortalama		101,02	100,46	99,57	99,91	100,85	100,65
							Standart sapma		0,60	1,33	0,65	1,84	1,58	1,19
							Bağıl standart sapma		0,60	1,32	0,65	1,84	1,57	1,18
							Bağıl hata		1,02	0,46	-0,43	-0,09	0,85	0,65

Geliştirilen yöntemlerin doğruluk ve kesinlik açısından değerlendirilmesi için diğer bir validasyon testi olarak gün içi ve günler arası deneysel çalışmalar yapılmıştır. Bu amaçla belirlenen test derişiminin %80'i (20 µg/mL SDM + 4 µg/mL TMP), %100'ü (25 µg/mL SDM + 5 µg/mL TMP) ve %120'si (30 µg/mL SDM + 6 µg/mL TMP) olacak biçimde üç farklı konsantrasyon seviyesinde çözeltiler hazırlanmıştır. Hazırlanan bu çözeltiler, FFD-UPLC, BBD-UPLC ve CCD-UPLC yöntemleri kullanılarak aynı gün içinde üç farklı saatte ve birbirini izleyen 3 günde analiz edilmiş ve ortalama sonuçları Çizelge 3.55'te özetlenmiştir. Her bir seviye için üç kez tekrar edilen analiz sonuçlarının ortalamaları "Bulunan" sütununda verilmiş olup bunun yanı sıra % geri kazanım, standart sapma, bağıl standart sapma ve bağıl hata değerleri aynı çizelgede listelenmiştir.

Çizelge 3.55. SDM ve TMP çözeltilerinin gün içi ve günler arası analizlerinin sonuçları

		FFD-UPLC						BBD-UPLC					CCD-UPLC				
		Konulan (µg/mL)	Bulunan (µg/mL)	GK (%)	SS	BSS	BH	Bulunan (µg/mL)	GK (%)	SS	BSS	BH	Bulunan (µg/mL)	GK (%)	SS	BSS	BH
Gün içi (n=3)	SDM	20	20,16	100,79	0,02	0,10	0,79	20,18	100,89	0,06	0,29	0,89	19,98	99,89	0,05	0,25	-0,11
		25	25,35	101,38	0,05	0,19	1,38	25,35	101,42	0,09	0,34	1,42	25,24	100,95	0,13	0,50	0,95
		30	29,97	99,90	0,07	0,22	-0,10	29,97	99,89	0,12	0,39	-0,11	30,05	100,17	0,05	0,17	0,17
	TMP	4	3,96	98,94	0,04	1,08	-1,06	4,04	101,07	0,03	0,79	1,07	4,04	101,02	0,06	1,58	1,02
		5	5,01	100,25	0,05	1,00	0,25	5,05	101,01	0,08	1,63	1,01	5,06	101,12	0,10	2,07	1,12
		6	5,98	99,62	0,04	0,60	-0,38	5,99	99,83	0,04	0,60	-0,17	6,05	100,82	0,10	1,68	0,82
		Konulan (µg/mL)	Bulunan (µg/mL)	GK (%)	SS	BSS	BH	Bulunan (µg/mL)	GK (%)	SS	BSS	BH	Bulunan (µg/mL)	GK (%)	SS	BSS	BH
Günler arası (n=3)	SDM	20	20,15	100,77	0,09	0,46	0,77	20,18	100,88	0,05	0,23	0,88	19,98	99,91	0,06	0,32	-0,09
		25	25,30	101,19	0,03	0,14	1,19	25,37	101,50	0,03	0,13	1,50	25,24	100,95	0,12	0,46	0,95
		30	29,92	99,72	0,08	0,25	-0,28	29,98	99,92	0,15	0,50	-0,08	30,00	99,99	0,02	0,06	-0,01
	TMP	4	3,97	99,31	0,06	1,48	-0,69	4,05	101,35	0,06	1,48	1,35	4,03	100,84	0,03	0,82	0,84
		5	4,99	99,87	0,09	1,77	-0,13	5,07	101,39	0,05	1,04	1,39	5,06	101,25	0,03	0,62	1,25
		6	5,99	99,83	0,11	1,89	-0,17	6,03	100,46	0,07	1,20	0,46	6,05	100,83	0,11	1,81	0,83

GK (%) : % Geri kazanım
SS : Standart sapma
BSS : Bağıl standart sapma
BH : Bağıl hata

Cevap yüzey metodolojisi ile optimize edilen kromatografik şartlarda SDZ ve TMP bileşiklerini içeren ve enjeksiyonluk çözelti olarak piyasada bulunan sıvı dozaj formundaki yardımcı maddelerin, etken maddelerin analizi üzerine etkisini değerlendirmek için standart ekleme tekniği uygulanmıştır. Bu amaçla 3 farklı derişim seviyesinde üç paralel olarak çözeltiler hazırlanmıştır. Tüm seviyeler için 10 mL'lik balon jojelere öncelikle Bölüm 3.3.4'te açıklandığı gibi hazırlanan derişik preparat çözeltisinden 1 mL konulmuştur. Standart olarak eklenen derişim seviyeleri SDM için 8, 10, 12 µg/mL ve TMP için 6, 10, 14 µg/mL olacak biçimde farklı hacimlerde alınan stok çözeltileri, balon jojelere ilave edilmiş ve balon jojeler çözücü ile tamamlanmıştır. Ayrıca 0. seviye olarak adlandırılan derişim seviyesini hazırlamak için 1 mL derişik preparat çözeltisi 10 ml'ye seyreltilmiştir.

Standart ekleme çalışmaları için üç paralel halinde hazırlanan standart çözeltiler, FFD-UPLC, BBD-UPLC ve CCD-UPLC yöntemleri kullanılarak analiz edilmiştir. İlave edilen standart madde miktarlarının hesaplanması için 0. seviyedeki çözeltilerin analizinden elde edilen miktarlar (preparattan gelen miktarlar), analiz sonucunda elde edilen toplam miktarlardan çıkarılmıştır. Üç paralel halinde yapılan bu çalışmayla elde edilen sonuçların ortalamaları, geri kazanım yüzdeleri, bağıl standart sapma ve bağıl hata değerleri Çizelge 3.56'da sunulmuştur.

Çizelge 3.56. Standart ekleme numunelerinin analiz sonuçları

		Eklenen		Bulunan		Geri kazanım (%)		BSS		Bağıl hata	
		SDM	TMP	SDM	TMP	SDM	TMP	SDM	TMP	SDM	TMP
	Çözelti +	8	6	8,10	6,10	101,31	101,69	0,50	0,68	1,31	1,69
FFD-UPLC	Çözelti +	10	10	10,05	9,98	100,48	99,85	0,34	1,46	0,48	-0,15
	Çözelti +	12	14	11,92	13,89	99,32	99,21	0,20	0,33	-0,68	-0,79
	Çözelti +	8	6	8,04	6,05	100,50	100,88	1,12	1,77	0,50	0,88
BBD-UPLC	Çözelti +	10	10	9,98	9,97	99,77	99,75	0,62	1,13	-0,23	-0,25
	Çözelti +	12	14	11,90	14,02	99,17	100,14	0,75	0,95	-0,83	0,14
	Çözelti +	8	6	7,98	6,07	99,72	101,24	1,77	1,93	-0,28	1,24
CCD-UPLC	Çözelti +	10	10	10,03	10,02	100,29	100,19	0,61	0,78	0,29	0,19
	Çözelti +	12	14	12,02	14,14	100,13	101,03	0,29	1,14	0,13	1,03

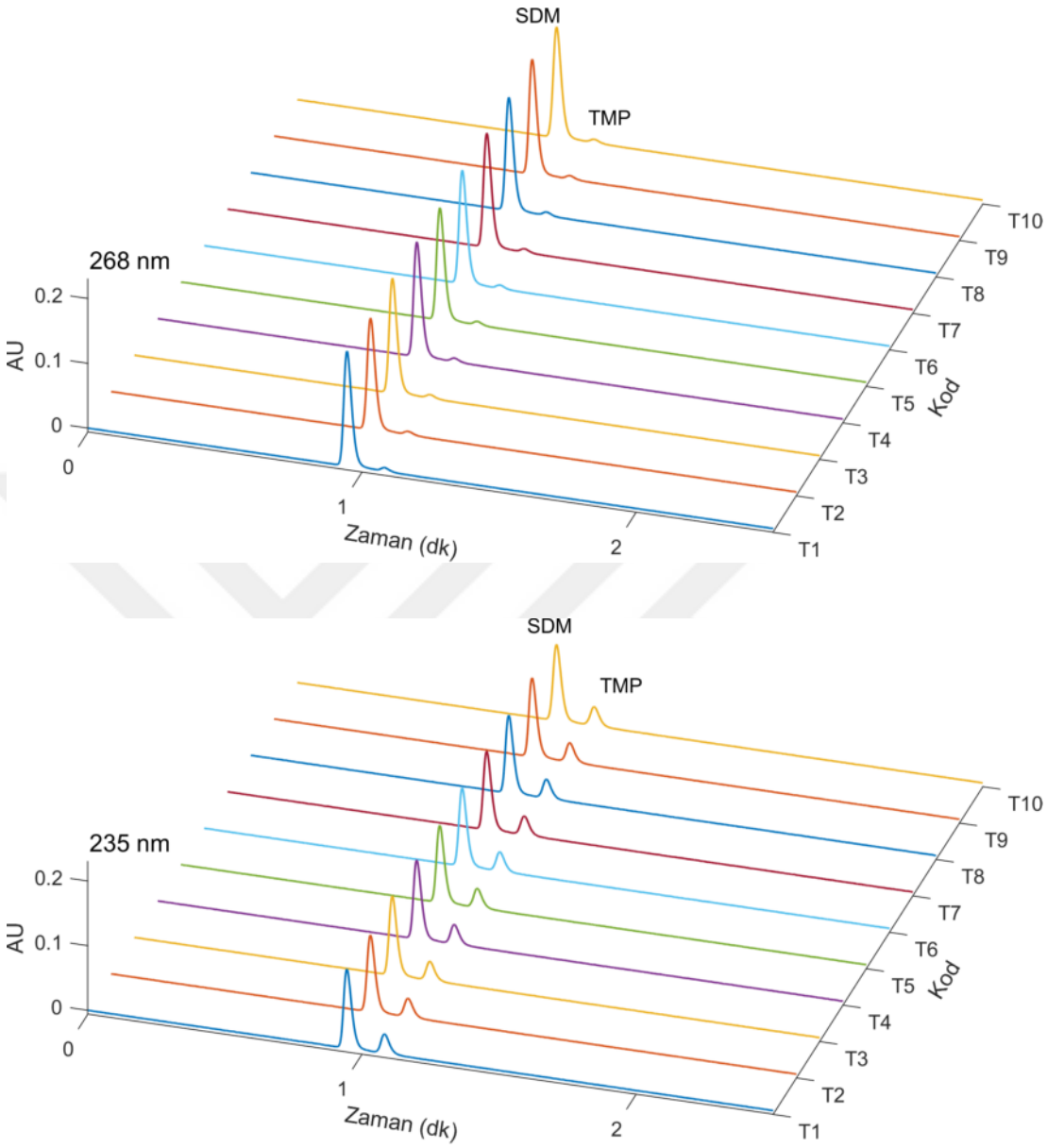
BSS: Bağıl standart sapma

3.3.4. Yöntemlerin Farmasötik Preparatlara Uygulanması

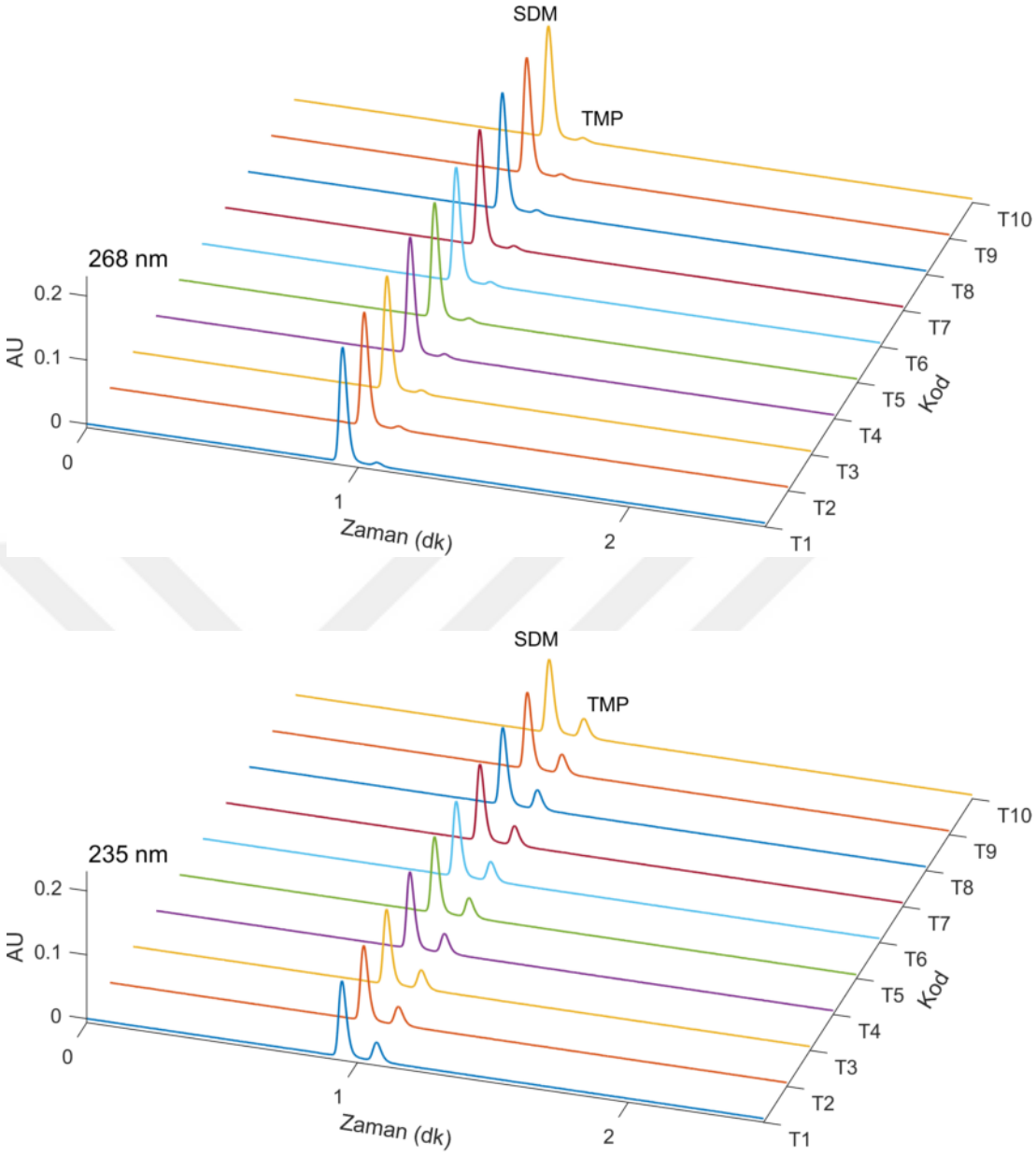
Geliştirilen yöntemlerin ticari veteriner preparatlara uygulanması için gerçek numune çözeltileri şu şekilde hazırlanmıştır: BA-SÜLFA TMP Enjeksiyonluk Çözelti ambalajından 0,1 mL hacmindeki çözelti 100 mL'lik balon jojeye alınmıştır. Balon joje hacmi çözücü ile tamamlanıp çalkalandıktan sonra 0,2 µm por açıklığına sahip naylon membranlı şırınga ucu filtre ile süzülmüştür. Elde edilen filtrat, derişik preparat çözeltisi olarak adlandırılmıştır. Derişik preparat çözeltisi, SDM ve TMP'nin doğrusal çalışma aralığına girecek biçimde 10 mL'lik balon joje içinde çözücü ile seyreltilmiştir. Bu işlem 10 kez tekrarlanarak ve UPLC sistemine enjekte edilecek gerçek numune çözeltileri elde edilmiştir.

Gerçek numune çözeltileri, FFD-UPLC, BBD-UPLC ve CCD-UPLC yöntemlerinin Çizelge 3.51'de listelenen koşulları altında UPLC sistemine enjekte edilmiştir. FFD-UPLC yöntemi ile SDM'nin miktar tayini için 268 nm'de ve TMP'nin miktar tayini için 235 nm'de PDA dedeksiyon ile kaydedilen kromatogramları Şekil 3.45'te sunulmuştur. BBD-UPLC yönteminin veteriner preparatının kantitatif analizine uygulanmasında, SDM miktar tayini için 268 nm'de ve TMP miktar tayini için 235 nm'de PDA dedeksiyon ile kromatogramlar kaydedilmiş ve Şekil 3.46'da gösterilmiştir. CCD-UPLC yöntemi ile elde edilen gerçek numune çözeltilerine ait enjeksiyonların SDM miktar tayini için 268 nm'de ve TMP miktar tayini için 235 nm'de PDA dedeksiyon ile kaydedilmiş kromatogramları ise Şekil 3.47'de verilmiştir.

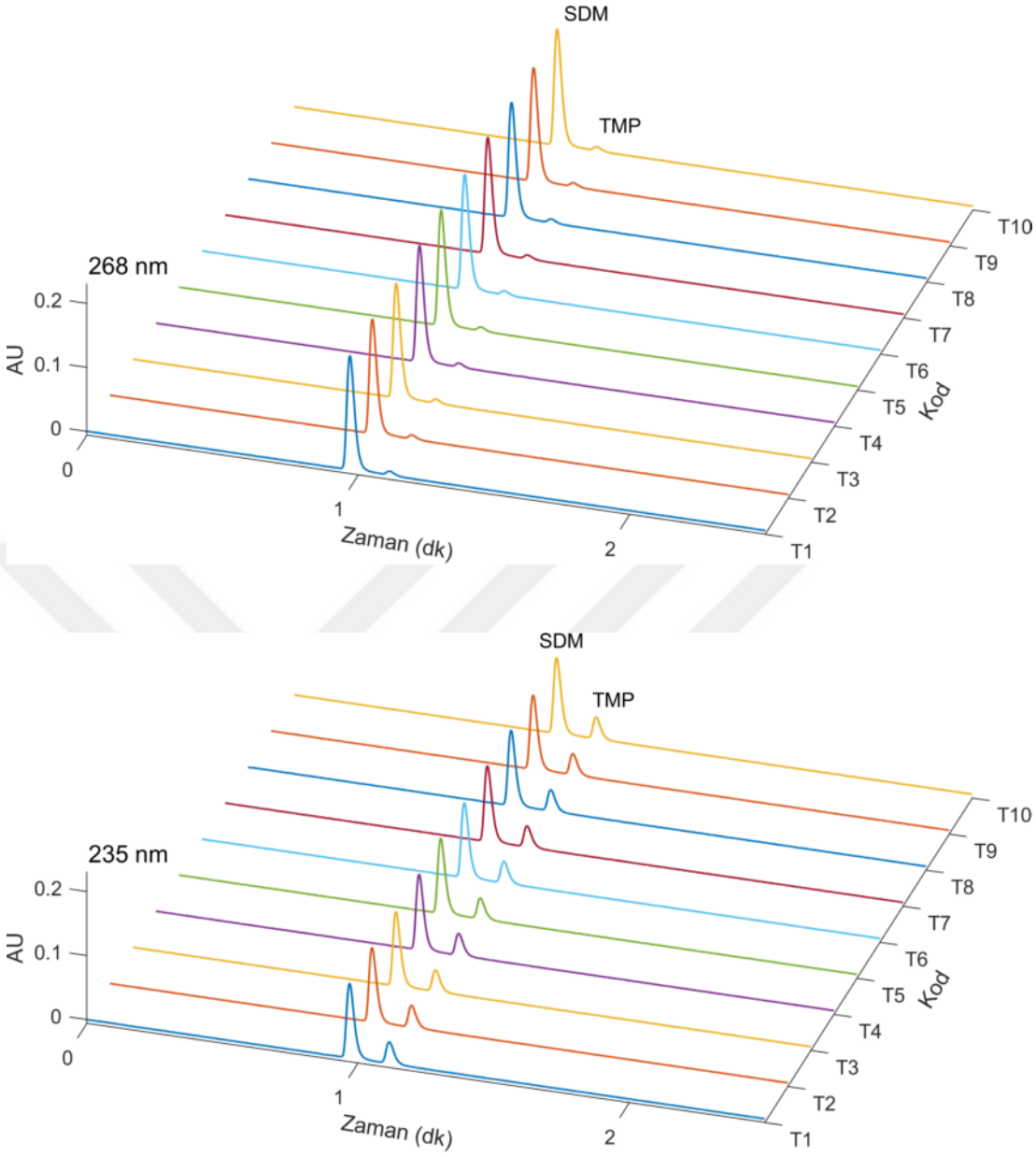
SDM ve TMP bileşiklerinin sırasıyla 268 nm ve 235 nm'de kaydedilen bu kromatogramlardaki pik alanları ile etken maddelere ait olan kalibrasyon eşitlikleri kullanılarak veteriner preparatta bulunan SDM ve TMP miktarları hesaplanmıştır. Hesaplanan miktarlar ambalaj üzerinde verilen birim olan mg/mL olarak, ortalama, standart sapma, bağıl standart sapma, standart hata, bağıl hata ve güven aralığı değerleriyle birlikte Çizelge 3.57'de sunulmuştur.



Şekil 3.45. FFD-UPLC yöntcminin SDM vc TMP içcrcn farmasötik prcparatlara uygulanması ile elde edilen kromatogramlar



Şekil 3.46. BBD-UPLC yönteminin SDM ve TMP içeren farmasötik preparatlara uygulanması ile elde edilen kromatogramlar



Şekil 3.47. CCD-UPLC yönteminin SDM ve TMP içeren farmasötik preparatlara uygulanması ile elde edilen kromatogramlar

Çizelge 3.57. FFD-UPLC, BBD-UPLC ve CCD-UPLC yöntemlerinin SDM-TMP içeren veteriner preparatlarına uygulanması ile elde edilen miktar tayini sonuçları

	FFD-UPLC		BBD-UPLC		CCD-UPLC	
	SDM (mg/mL)	TMP (mg/mL)	SDM (mg/mL)	TMP (mg/mL)	SDM (mg/mL)	TMP (mg/mL)
T1	200,13	39,67	199,64	39,86	200,99	40,08
T2	199,89	39,38	201,37	39,23	198,47	39,18
T3	201,51	39,88	199,19	41,10	198,37	39,22
T4	201,54	41,31	202,65	39,75	200,74	40,81
T5	198,82	40,41	200,58	39,79	199,79	40,58
T6	199,53	39,78	198,68	41,23	200,64	41,02
T7	201,65	39,61	200,43	38,96	202,48	39,52
T8	198,90	39,90	201,36	39,53	201,60	40,10
T9	200,54	39,45	202,48	39,70	198,59	40,13
T10	201,01	38,92	200,64	39,14	200,06	39,12
Ortalama	200,35	39,83	200,70	39,83	200,17	39,98
SS	1,07	0,65	1,31	0,77	1,39	0,69
BSS	0,54	1,63	0,65	1,92	0,69	1,74
SH	0,34	0,21	0,41	0,24	0,44	0,22
GA	199,69 - 201,02	39,43-40,23	199,89-201,51	39,35-40,30	199,31-201,03	39,54-40,41

Etiket değeri: SDM: 200 mg/mL, TMP: 40mg/mL
SS: Standart sapma
BSS: Bağıl standart sapma
SH: Standart hata
GA: Güven aralığı

Farklı tasarımların uygulanmasıyla optimize edilerek geliştirilen FFD-UPLC, BBD-UPLC ve CCD-UPLC adlı üç UPLC yönteminin birbiri yerine kullanılıp kullanılamayacağının tespiti için, bu yöntemlerin farmasötik preparatlara uygulanmasıyla elde edilen analiz sonuçları ANOVA testi kullanılarak karşılaştırılarak ve sonuçları Çizelge 3.58'de özetlenmiştir. α=0,05 anlamlılık düzeyinde ve $n_1 = 2$, $n_2 = 27$ serbestlik derecesinde uygulanan ANOVA testine ait F-tablo değeri 3,35 olarak tespit edilmiştir. SDM için hesaplanan F-test değeri 0,45 ve p-değeri 0,64 olarak; TMP için hesaplanan F-test değeri 0,14 ve p-değeri 0,87 olarak bulunmuştur. Her iki etken madde için de F-test < F-tablo ve p-değeri > 0,05 olduğu

için, FFD-UPLC, BBD-UPLC ve CCD-UPLC yöntemleri ile elde edilen miktar tayini sonuçları arasındaki farkın, %95 güven aralığında istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edilmiştir.

Çizelge 3.58. FFD-UPLC, BBD-UPLC ve CCD-UPLC yöntemleriyle elde edilen analiz sonuçlarının ANOVA testi ile karşılaştırılması

Etken madde	Varyasyon kaynağı	Kareler toplamı	Serbestlik derecesi	Kareler ortalaması	F-test	P-değeri	F-tablo
SDM	Gruplar arası	1,44	2	0,72	0,45	0,64	3,35
	Grup içi	43,16	27	1,60			
	Toplam	44,60	29				
TMP	Gruplar arası	0,14	2	0,07	0,14	0,87	3,35
	Grup içi	13,42	27	0,50			
	Toplam	13,81	29				

4. TARTIŞMA

Bu doktora tezinde sülfonamidleri içeren veteriner amaçlı farmasötik preparatlardaki etken maddelerin kantitatif analizi için cevap yüzey metodolojisine dayanan aşırı performanslı sıvı kromatografisi yöntemleri başarıyla geliştirilmiştir. Yeni geliştirilen UPLC yöntemleri Türkiye veteriner ilaç piyasasında bulunan üç farklı ticari veteriner formülasyonun kantitatif analizine uygulanmıştır. Doktora tez konusu olan SDZ-TMP, SDX-TMP ve SDM-TMP karışımlarının analizleri için UPLC yöntem geliştirme basamaklarında, kromatografik şartların belirlenmesi için farklı deney tasarımları uygulanmıştır. Farklı tasarımlar kullanılarak elde edilen optimal şartların karşılaştırılması için, her bir etken madde kombinasyonu için geliştirilen UPLC yöntemleri, seçilen veteriner preparatların kantitatif analizine uygulanarak analiz sonuçları birbirleriyle karşılaştırılmıştır.

Tez konusu olan etken maddelerin analizi için bugüne kadar uygulanan yöntemler hakkında yapılan literatür araştırmalarında, SDZ-TMP, SDX-TMP ve SDM-TMP kombinasyonlarının veteriner preparatlardan kantitatif analizi için UPLC yönteminin uygulanmadığı tespit edilmiştir. Ayrıca bu karışımları içeren veteriner preparatların klasik sıvı kromatografi yöntemleri ile analizlerinde cevap yüzey metodolojisinin kullanılmadığı gözlenmiştir.

Analitik kimyada yeni yöntemlerin geliştirilmesinde genellikle tek değişkenli optimizasyon tekniği kullanılır. Bu teknikte cevap üzerine etki eden faktörlerden birisi optimize edilirken, diğer faktörler sabit tutulur. Fakat bu teknik, faktörler arasında etkileşimin olduğu yöntemler için gerçek optimal değerlerin saptanmasında yetersiz kalabilir (Massart ve ark., 2003). Bu yüzden, bu tez çalışmasında UPLC yöntemlerinin optimizasyonu için tek değişkenli yaklaşım değil, cevap yüzey metodolojisi kullanılmıştır. Cevap yüzey metodolojisi ile geliştirilen UPLC yöntemlerindeki deneysel parametreler arasındaki ilişkiler ortaya çıkarılmış ve gerçek optimal koşullar, faktör etkileşimleri de göz önünde bulundurularak tespit edilmiştir. Bu çalışmada geliştirilen UPLC yöntemlerinin, yeterli kromatografik ayrımın sağlandığı, yeşil

kimya prensiplerine uygun olarak kısa analiz zamanına sahip, hızlı, seçici, doğru ve kesin yöntemler olması hedeflenmiştir. Bu hedefler doğrultusunda UPLC yöntemlerinin optimizasyonu için cevap yüzey metodolojisinin kullanımı ayrıca maksimum bilgiye minimum emek, zaman ve kimyasal harcanarak ulaşılmasını da sağlamıştır. Optimizasyon sürecinde cevap olarak, etkin kromatografik ayrımı ve dar taban genişliğini mümkün olan en kısa sürede sağlayan bir kromatografik cevap fonksiyonu (KCF) kullanılmıştır (Rakić ve ark., 2012). Böylece cevap yüzey metodolojisiyle geliştirilen UPLC yöntemleri, kısa alıkonma süresinde yüksek ayırıcılıkla ve düşük maliyet ile iki bileşenli kombinasyonların analizlerine olanak tanımıştır.

4.1. SDZ ve TMP Karışımının Analizi

SDZ ve TMP etken maddelerinin analizi için uygulanacak UPLC yönteminin geliştirilmesi sırasında cevap yüzey metodolojisiyle optimize edilecek üç faktör seçilmiştir: Kolon sıcaklığı, hareketli fazdaki HCOOH-HCOONa tamponunun yüzdesi ve akış hızı. Seçilen bu faktörlerin optimizasyonu için tam faktöriyel (FFD), Box-Behnken (BBD) ve merkezi bileşenli (CCD) tasarımlar uygulanmıştır. Faktörlerin seviyeleri için deneysel aralıklar, ön deneylerde gözlenen piklerin alıkonma zamanları, piklerin ayrım süresi ve kolon basıncı gibi parametreler dikkate alınarak gerçekleştirilmiştir. FFD ve BBD tasarımların uygulanması için kullanılan faktör seviyeleri Çizelge 3.2'de sunulmuştur. CCD tasarımda kolon sıcaklığı, hareketli fazdaki tampon yüzdesi ve akış hızı faktörleri için kullanılan – α ve + α seviyeleri ise Çizelge 3.3'te gösterilmiştir. Belirlenen faktör seviyelerine göre oluşturulan FFD, BBD ve CCD tasarım matrislerine göre sırasıyla 27, 15 ve 20 adet farklı koşul altında kromatogramlar çizdirilmiş (Şekil 3.5, Şekil 3.7 ve Şekil 3.9) ve KCF değerleri hesaplanmıştır (Çizelge 3.4, Çizelge 3.7 ve Çizelge 3.9). BBD tasarımın uygulanması için gerekli olan deney sayısının az olması, çalışma için önemli bir avantaj olmuştur. Bu üç tasarıma göre planlanan deneylerin içinde, CCD tasarımın eksenel noktalarında bulunan deneyler noktaları kolon sıcaklığı, sistem basıncı, analiz zamanı gibi parametrelerin çok düşük veya çok yüksek değerlerde olmasına neden olmuştur. Bu

deney noktaları kromatografik sistemi en çok zorlayan ve deneysel çalışmaların en zor basamakları olmuştur.

FFD, BBD ve CCD tasarımları için faktörler ve faktör etkileşimlerinin KCF ile regresyon analiziyle ikinci dereceden model denklemler hesaplanmıştır (Eşitlik 3.1, Eşitlik 3.2, Eşitlik 3.3). Elde edilen regresyon fonksiyonlarına ait katsayıların istatistiksel testleri gerçekleştirilmiş ve p-değerleri < p=0,05 olduğu için modellerdeki katsayıların anlamlı olduğu bulunmuştur (Çizelge 3.5, Çizelge 3.8, Çizelge 3.11). Ayrıca her bir tasarımdaki faktör etkileşimlerini görmek için cevap yüzey grafikleri ve eş yükselti eğrileri çizdirilmiştir (Şekil 3.6, Şekil 3.8, Şekil 3.10). Bu şekillerden faktörler arasında anlamlı etkileşimlerin bulunduğu görülmüştür. Özellikle FFD ve BBD ile elde edilen ve Şekil 3.6 ve Şekil 3.8'de sunulan cevap yüzey grafiklerinin birbirlerine büyük oranda benzediği gözlemlenmiştir. CCD ile elde edilen cevap yüzey grafiklerinin ise FFD ve BBD yüzey grafikleriyle uyumlu bir bölge içeren, fakat daha geniş sahayı gösteren grafikler olduğu görülmüştür (Şekil 3.10).

Elde edilen her bir model fonksiyon kullanılarak optimal kromatografik şartlar hesaplanmış ve Çizelge 3.13'te özetlenmiştir. Bu çizelgeden FFD ve BBD ile elde edilen şartların birbirine çok benzer olduğu, fakat CCD tasarımın kullanımıyla ile elde edilen optimal şartların daha farklı olduğu görülmektedir. Bunun nedeni CCD tasarımdaki eksenel noktalardan dolayı faktör sınırlarının diğer tasarımlara göre daha geniş olması olabilir. FFD ve BBD tasarımların kullanılmasıyla saptanan kromatografik şartlar birbirine çok yakın olduğu için, ortalamaları alınarak FFD-UPLC yönteminin şartları olarak uygulanmıştır. CCD tasarım sonucunda optimal olarak belirlenen kromatografik şartlar ise CCD-UPLC olarak adlandırılan analiz yönteminin şartları olarak uygulanmıştır.

SDZ-TMP karışımının analizi için geliştirilen FFD-UPLC ve CCD-UPLC olarak adlandırılan yöntemlerin optimal şartları Çizelge 3.14'te özetlenmiştir. Bu çizelgede görüldüğü üzere, FFD-UPLC yönteminde 38,9 °C'ye ayarlanmış Waters Acquity C18 BEH kolon (100 mm) ile metanol ve 20 mM pH 4,4 sodyum format tamponu (30,3:69,8, *h/h*) içeren hareketli faz 0,26 mL/dk akış hızında kullanılmıştır.

Bu koşullarda SDZ ve TMP için alıkonma zamanları sırasıyla 1,24 ve 1,77 dk olarak saptanmıştır (Şekil 3.11). CCD-UPLC yönteminde ise 44,9 °C'ye ayarlanmış Waters Acquity C18 BEH kolon (100 mm) ile metanol ve 20 mM pH 4,4 sodyum format tamponu (29,5:70,6, *h/h*) içeren hareketli faz 0,30 mL/dk akış hızında kullanılarak SDZ ve TMP için alıkonma zamanları sırasıyla 1,07 ve 1,54 dk olarak tayin edilmiştir (Şekil 3.11).

Kalibrasyon seti, validasyon seti ve gerçek numune çözeltileri FFD-UPLC ve CCD-UPLC yöntemlerinin kromatografik şartlarında UPLC sistemine enjekte edilmiş ve PDA dedektör ile kayıtları alınmıştır. Miktar tayini çalışmalarında SDZ ve TMP için sırasıyla 267 nm ve 230 nm'deki pik alanları kullanılmıştır. Çizelge 3.15'te bu yöntemlere ait doğrusal regresyon analiz sonuçları özetlenmiştir. Bu çizelgeden görülebileceği gibi her iki yöntemle de SDZ ve TMP için yüksek korelasyon katsayısı ile düşük yakalama ve tayin sınırı değerleri elde edilmiştir.

Geliştirilen FFD-UPLC ve CCD-UPLC yöntemlerinin sistem uygunluk testleri gerçekleştirilmiş ve sonuçları Çizelge 3.16'da sunulmuştur. Bu sonuçlar, geliştirilen kromatografik yöntemlerin sistem uygunluk parametreleri bakımından önerilen değerlere sahip olduğunu ve SDZ-TMP analizi için kullanılabilir olduğunu kanıtlamıştır. SDZ-TMP analizinde uygulanan yöntemlerin validasyonları için yapay karışımların analizi ile % geri kazanım çalışmaları gerçekleştirilmiş ve yöntemlerin doğrulukları ile kesinlikleri uygun olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 3.17). Gün içi ve günler arası analizlerle elde edilen ve Çizelge 3.18'de verilen sonuçlar, yöntemlerin yüksek kesinlikte olduğunu göstermiştir. Çizelge 3.19'da özetlenen standart ekleme çalışmalarının sonuçları her iki yöntemin de seçici olduğunu kanıtlamıştır.

Çalışmalarımızda, FFD-UPLC ve CCD-UPLC yöntemleri, SDZ ve TMP içeren BİOTRİN Tablet isimli veteriner preparatına başarıyla uygulanmış ve miktar tayini sonuçları Çizelge 3.20'de sunulmuştur. Bu sonuçlar, geliştirilen UPLC yöntemlerinin, ticari formülasyondaki etken maddelerin rutin analiz ve kalite kontrolü için uygun olduğunu göstermiştir. Bu yöntemlerin ticari veteriner preparatlara uygulanması ile elde edilen analiz sonuçları α=0,05 olasılık düzeyinde F-testi ve t-testi kullanılarak

karşılaştırılmıştır. Bu testler sonucunda, iki yöntemle elde edilen analiz sonuçları arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edilmiştir.

Bu sonuçlar ışığında SDZ ve TMP etken maddelerinin UPLC ile analizi için FFD ve BBD tasarımlarının kullanımı karşılaştırıldığında, BBD tasarımının düşük deney sayısına rağmen FFD ile aynı kromatografik koşulları sağladığı görülmüştür. Bu yüzden üç faktörlü kromatografik yöntemlerin optimizasyonunda BBD tasarımının FFD tasarımına göre daha hızlı, kolay ve ekonomik olduğu söylenebilir. CCD tasarım, deney sayısı bakımından BBD tasarıma göre dezavantajlı olsa da, FFD tasarıma göre daha az deney gerektirir fakat CCD tasarımın deneylerini gerçekleştirmek eksenel noktaların zorlayıcı koşullarından dolayı dezavantajlı olmuştur. Bu çalışmada CCD tasarımının kullanımıyla diğer iki tasarımla elde edilenlerden farklı kromatografik koşullar elde edilmiştir. CCD ile optimize edilen yöntemde alıkonma zamanları daha düşüktür, dolayısıyla analiz zamanı daha kısadır. Dolayısıyla CCD kullanımı, çalışmanın başında karar verilen yüksek ayrım ve düşük analiz zamanı hedefine daha yakın bir sonuç vermiştir. Ancak geliştirilen UPLC yöntemlerinin, hangi tasarımın kullanıldığından bağımsız olarak, ticari preparatlardaki SDZ ve TMP'nin seçici, doğru, kesin ve güvenilir miktar tayini için uygun olduğu görülmüştür.

4.2. SDX ve TMP Karışımının Analizi

SDX ve TMP bileşiklerini içeren veteriner preparatın analizi için uygulanacak UPLC yönteminin geliştirilmesi amacıyla cevap yüzey metodolojisiyle optimize edilecek dört faktör seçilmiştir: Kolon sıcaklığı, CH_3COOH-CH_3COONa tamponunun pH değeri, hareketli fazdaki CH_3COOH-CH_3COONa tamponunun yüzdesi ve akış hızı. Dört faktörlü bir sistem için tam faktöriyel tasarım 81 deney gerektirdiği için, SDX ve TMP karışımının analizi için Box-Behnken ve merkezi bileşenli tasarımlar uygulanmıştır. Ön çalışmalarda gözlemlenen alıkonma zamanları, analiz zamanı ve kolon basıncı gibi sınırlandırmalar dikkate alınarak belirlenen faktör seviyeleri BBD tasarım için Çizelge 3.22'de ve CCD için Çizelge 3.23'te verilmiştir. Bu faktörler seviyeleri, olabildiğince geniş ve kromatografik olarak uygulanabilir deney uzayları

oluşturabilmek amacıyla her iki tasarım için ayrı ayrı belirlenmiştir. BBD tasarım ile optimizasyon için Çizelge 3.24'te sunulan tasarım matrisine göre ayarlanan 27 farklı kromatografik koşul kullanılarak kromatogramlar çizdirilmiş ve Şekil 3.21'de sunulmuştur. CCD tasarım için Çizelge 3.27'de sunulan matrise göre 31 farklı kromatografik koşulda kaydedilen kromatogramlar ise Şekil 3.23'te verilmiştir. Çizdirilen her bir kromatogram için KCF değerleri hesaplanarak Çizelge 3.21 ve Çizelge 3.23'te listelenmiştir. Dört faktörün etki ettiği bir sistemde BBD ve CCD tasarımlarının gerektirdikleri deney sayısı birbirlerine daha yakındır. CCD tasarımın eksenel noktalarında bulunan deneyler noktaları kolon sıcaklığı, sistem basıncı, analiz zamanı gibi parametrelerin çok düşük veya çok yüksek değerlerde olmasına neden olmuştur. Bu deney noktaları kromatografik sistemi en çok zorlayan ve deneysel çalışmaların en zor basamakları olmuştur.

Hesaplanan KCF değerleri ile faktörler arasındaki ilişkinin modellenmesi için regresyon analizi gerçekleştirilmiş ve ikinci dereceden polinomiyal fonksiyonlar elde edilmiştir. BBD tasarım kullanılarak elde edilen model Eşitlik 3.4'te CCD tasarım ile elde edilen model ise Eşitlik 3.5'te verilmiştir. Bu modellerdeki katsayılara ait p-değerleri hesaplanarak p=0,05 değerinden küçük olduğu görülmüş ve modellerdeki tüm katsayıların anlamlı olduğuna karar verilmiştir (Çizelge 3.25, Çizelge 3.28). Ayrıca BBD ve CCD tasarımlardaki ikili faktör etkileşimlerini görselleştirmek için cevap yüzey grafikleri ve eş yükselti eğrileri çizdirilmiştir (Şekil 3.22 ve Şekil 3.24). Bu yüzey grafikleri incelendiğinde, her iki tasarımda da faktörler arasında anlamlı etkileşimlerin bulunduğu görülmektedir. Tasarımlardaki faktör seviyelerinin ve deneysel noktaların birbirinden farklı olması, BBD ve CCD tasarımlarla elde edilen yüzey grafiklerinin de birbirlerinden farklı olmasına neden olmuştur.

Regresyon analiziyle elde edilen modeller kullanılarak hesaplanan optimal kromatografik şartlar Çizelge 3.30'da özetlenmiştir. Bu çizelgede, BBD ve CCD tasarımların kullanımıyla belirlenen değerlerin birbirlerinden farklı olduğu görülmektedir. Bunun nedeni her iki tasarım için farklı faktör seviyelerinin seçilmiş olması ve gerçekleştirilen kromatografik deneylerin uzayda farklı noktalara denk gelmesi olabilir. BBD ve CCD tasarımların kullanılmasıyla optimal olarak belirlenen

kromatografik koşullar sırasıyla BBD-UPLC ve CCD-UPLC olarak adlandırılan analiz yöntemlerinin şartları olarak uygulanmıştır.

Her iki yöntemde de sabit faz olarak Waters Acquity C18 BEH kolon (100 mm) ve hareketli fazın organik bileşeni olarak metanol kullanılmıştır. BBD-UPLC yönteminin cevap yüzey metodolojisiyle optimize edilen kromatografik şartları 56,8 °C kolon sıcaklığı, %55,6 sodyum asetat tamponu (pH 4,84) ve 0,20 mL/dk akış hızı olarak belirlenmiştir. Bu koşullarda TMP ve SDX için alıkonma zamanları sırasıyla 1,31 ve 1,47 dk olarak saptanmıştır (Şekil 3.25). CCD-UPLC yönteminin kromatografik şartları ise 31,2 °C kolon sıcaklığı, %49,3 sodyum asetat tamponu (pH 3,89) ve 0,23 mL/dk akış hızı olarak belirlenmiş ve bu yöntemde TMP ve SDX için alıkonma zamanları sırasıyla 1,06 ve 1,22 dk olarak tayin edilmiştir (Şekil 3.25).

Kalibrasyon seti, validasyon seti ve gerçek numune çözeltileri BBD-UPLC ve CCD-UPLC yöntemlerinin kromatografik koşullarında UPLC sistemine enjekte edilmiş ve PDA dedektör ile kayıtları alınmıştır. Miktar tayini çalışmalarında SDX ve TMP için sırasıyla 273 nm ve 250 nm'deki pik alanları kullanılmıştır. Bu yöntemlere ait doğrusal regresyon analiz sonuçları Çizelge 3.32'de sunulmuştur. Bu çizelgeden her iki yöntemle de SDX ve TMP için yüksek korelasyon katsayısı ile düşük yakalama ve tayin sınırı değerlerinin elde edildiği görülmektedir.

SDX ve TMP analizi için geliştirilen BBD-UPLC ve CCD-UPLC yöntemlerinin sistem uygunluk testleri gerçekleştirilmiş ve sonuçları Çizelge 3.33'te sunulmuştur. Bu çizelgede, geliştirilen yöntemlere ait test sonuçlarının önerilen aralıklarda olduğu ve yöntemlerin SDZ-TMP analizi için uygulanabilir olduğu görülmektedir. Yöntemlerin validasyonu için yapay karışımların analizi ile % geri kazanım çalışmaları gerçekleştirilerek doğrulukları ile kesinlikleri değerlendirilmiştir (Çizelge 3.34). Gün içi ve günler arası kesinlik sonuçları Çizelge 3.35'de sunulmuştur. Çizelge 3.36'da özetlenen standart ekleme çalışmalarının sonuçları yöntemlerin seçici olduğunu göstermiştir.

Validasyon çalışmalarıyla SDX-TMP analizi için uygun olduğu kanıtlanan BBD-UPLC ve CCD-UPLC yöntemleri, SDX ve TMP etken maddelerini içeren ANİMAR Enjeksiyonluk Çözelti isimli veteriner preparatına başarıyla uygulanmış ve miktar tayini sonuçları Çizelge 3.37'de sunulmuştur. Bu sonuçlar, geliştirilen UPLC yöntemlerinin, veteriner amaçlı sıvı dozaj formunun rutin analiz ve kalite kontrolü için uygun olduğunu göstermiştir. BBD-UPLC ve CCD-UPLC yöntemlerinin ticari preparatlara uygulanması ile elde edilen analiz sonuçları α=0,05 anlamlılık seviyesinde F-testi ve t-testi kullanılarak karşılaştırılmıştır. Bu testler sonucunda, iki yöntemle elde edilen analiz sonuçları arasında anlamlı bir fark olmadığı tespit edilmiştir.

SDX ve TMP etken maddelerinin UPLC ile analizi için BBD ve CCD tasarımlarının kullanımını bu sonuçlarla karşılaştırmak, farklı deney sahaları kullanıldığı için uygun olmayabilir. Fakat optimal olarak belirlenen şartların uygulanmasıyla geliştirilen BBD-UPLC ve CCD-UPLC yöntemlerinin sistem uygunluk test sonuçları ve etken maddelerin alıkonma zamanları incelendiğinde, CCD-UPLC yöntemi ile daha kısa analiz zamanında benzer ayırıcılık değerine ulaşıldığı görülmektedir. Dolayısıyla CCD kullanımı, çalışmanın başında karar verilen yüksek ayrım ve düşük analiz zamanı hedefine daha yakın bir sonuç vermiştir. Bunun nedeni CCD tasarım için belirlenen faktör seviyelerinin sistemi açıklamak için BBD tasarımdaki seviyelere göre daha uygun olması olabilir. BBD tasarımında deney sayısı CCD'ye göre daha düşük olduğu için, cevap yüzey metodolojisinin daha hızlı ve ekonomik olarak uygulanmasını sağlamış, CCD tasarımın deneylerini gerçekleştirmek ise eksenel noktaların zorlayıcı koşullarından dolayı dezavantajlı olmuştur. Ancak cevap yüzey metodolojisiyle geliştirilen her iki yöntemin kısa sürede yeterli kromatografik ayrımı sağladığı ve veteriner preparatlardaki SDX ile TMP'nin seçici, doğru, kesin ve güvenilir miktar tayini için uygun olduğu görülmüştür.

4.3. SDM ve TMP Karışımının Analizi

SDM ve TMP bileşiklerini içeren veteriner preparatın analizi için kullanılacak UPLC yöntemlerinin geliştirilmesi sırasında cevap yüzey metodolojisiyle optimize edilecek üç faktör seçilmiştir: Kolon sıcaklığı, hareketli fazdaki $(NH_4)_2CO_3$ oranı ve akış hızı. Bu parametrelerin optimal değerlerinin bulunması için tam faktöriyel (FFD), Box-Behnken (BBD) ve merkezi bileşenli (CCD) tasarımlar uygulanmıştır. Ön deneylerde gözlemlenen alıkonma zamanları, analiz zamanı ve kolon basıncı gibi sınırlandırmalar dikkate alınarak faktör seviyeleri belirlenmiştir. FFD ve BBD tasarımlar için kullanılan faktör seviyeleri Çizelge 3.39'da sunulmuştur. Bu çizelgede sunulan seviyelere göre planlanacak bir CCD tasarımdaki eksenel noktalar kromatografik sistemi zorlayacağı için, bu tasarım için Çizelge 3.40'ta verilen seviyeler kullanılmıştır. Böylece uygulanan CCD tasarımın eksenel noktalarının, FFD ve BBD tasarımlardaki yüzeyel noktalara karşılık gelmesi ve tüm tasarımların merkez noktalarının aynı olması sağlanmıştır. Belirlenen bu faktör seviyelerine göre oluşturulan FFD, BBD ve CCD tasarım matrisleri oluşturulmuş ve Çizelge 3.41, Çizelge 3.44 ve Çizelge 3.47'de sunulmuştur. FFD, BBD ve CCD tasarımlara göre sırasıyla 27, 15 ve 20 adet farklı koşul altında kromatogramlar çizdirilerek (Şekil 3.34, Şekil 3.36 ve Şekil 3.38) her bir kromatogram için KCF değerleri hesaplanarak Çizelge 3.41, Çizelge 3.44 ve Çizelge 3.47'de listelenmişlerdir. BBD tasarımın uygulanması için gerekli olan deney sayısının az olması, çalışma için önemli bir avantaj olmuştur. FFD tasarımdaki düşük ve yüksek seviyelerin, CCD tasarımın eksenel noktaları olarak kullanılması ile kromatografik sistemi zorlamayan bir deneysel çalışma gerçekleştirilmiştir.

FFD, BBD ve CCD tasarımları için bağımsız değişkenler ile KCF değerlerinin regresyon analiziyle ikinci dereceden ampirik modeller oluşturulmuştur (Eşitlik 3.6, Eşitlik 3.7, Eşitlik 3.8). Model katsayılarının istatistiksel testleri gerçekleştirilerek p-değerleri $< p=0,05$ olduğu için modellerdeki katsayıların anlamlı olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 3.42, Çizelge 3.45, Çizelge 3.48). Ayrıca KCF değerleri ile faktörler arasındaki ilişki cevap yüzey grafikleri ve eş yükselti eğrileri ile görselleştirilmiştir (Şekil 3.35, Şekil 3.37 ve Şekil 3.39). Faktöriyel tasarımın köşe

noktaları dışında aynı deney uzayını kullanan bu tasarımlarla elde edilen bu cevap yüzey grafiklerinin birbirlerine büyük oranda benzediği gözlemlenmiştir.

FFD, BBD ve CCD tasarımlarla elde edilen modeller kullanılarak optimal kromatografik şartlar hesaplanmış ve Çizelge 3.50'de özetlenmiştir. Bu çizelgeden genel olarak her bir optimal şartın birbirinden farklı olduğu, fakat FFD ve BBD ile elde edilen şartların birbirine daha yakın olduğu gözlenmektedir. CCD tasarımın kullanımıyla elde edilen optimal şartların ise diğer iki şarta göre daha farklı değerler aldığı göze çarpmaktadır. Bunun nedeni BBD tasarımda deney yapılan noktaların tamamının FFD tasarımında da kullanılması, fakat iç sınırlı CCD için merkez nokta ve eksenel noktalar dışındaki deney noktalarının FFD'de kullanılmayan noktalara karşılık gelmesi olabilir. Optimal olarak tespit edilen bu kromatografik şartlar her bir faktör için tek tek düşünüldüğünde birbirlerinden farklı olsa da; kolon sıcaklığı, $(NH_4)_2CO_3$ yüzdesi ve akış hızı için belirlenen şartların beraber kullanılmasıyla benzer kromatogramlar elde edilmiştir (Şekil 3.40).

SDM ve TMP karışımının analizi için FFD, BBD ve CCD tasarımları kullanılarak optimize edilen UPLC yöntemleri sırayla FFD-UPLC, BBD-UPLC ve CCD-UPLC olarak adlandırılmış ve bu yöntemlerin kromatografik şartları Çizelge 3.51'de özetlenmiştir. FFD-UPLC yönteminde 48,5 °C'ye ayarlanmış Waters Acquity C_{18} BEH kolon (100 mm) ile metanol ve 10 mM $(NH_4)_2CO_3$ (53,6:46,4, *h/h*) içeren hareketli faz 0,27 mL/dk akış hızında kullanılmıştır. Bu koşullarda SDM ve TMP için alıkonma zamanları sırasıyla 0,94 ve 1,06 dk olarak saptanmıştır. BBD-UPLC yönteminde 43,0 °C'ye ayarlanmış Waters Acquity C_{18} BEH kolon (100 mm) ile metanol ve 10 mM $(NH_4)_2CO_3$ (55,4:44,6, *h/h*) içeren hareketli faz 0,27 mL/dk akış hızında kullanılarak SDM ve TMP için alıkonma süreleri sırasıyla 0,94 ve 1,07 dk olarak tayin edilmiştir. CCD-UPLC yönteminde ise 60,8 °C'ye ayarlanmış Waters Acquity C18 BEH kolon (100 mm) ile metanol ve 10 mM $(NH_4)_2CO_3$ (52:48, *h/h*) içeren hareketli faz 0,26 mL/dk akış hızında kullanılmıştır. Bu koşullarda SDZ ve TMP için alıkonma zamanları sırasıyla 0,98 ve 1,13 dk olarak saptanmıştır.

Kalibrasyon seti, validasyon seti ve gerçek numune çözeltileri FFD-UPLC, BBD-UPLC ve CCD-UPLC yöntemleri kullanılarak UPLC sistemine enjekte edilmiş ve PDA dedektör ile kayıtları alınmıştır. Miktar tayini çalışmalarında SDM ve TMP için sırasıyla 268 nm ve 235 nm'deki pik alanları kullanılmıştır. Bu yöntemlerin doğrusal regresyon analizi sonuçları Çizelge 3.52'de sunulmuştur. Bu çizelgeden görülebileceği gibi üç yöntemle de SDM ve TMP için yüksek korelasyon katsayısı ile düşük yakalama ve tayin sınırı değerleri elde edilmiştir.

FFD-UPLC, BBD-UPLC ve CCD-UPLC yöntemlerine ait sistem uygunluk testi sonuçları Çizelge 3.53'te verilmiştir. Bu sonuçlar, SDM-TMP analizi için geliştirilen kromatografik yöntemlerin sistem uygunluk parametreleri bakımından önerilen aralıklarda olduğunu göstermiştir. Yöntemlerin analitik validasyon işlemleri için yapay karışımların analizi ile % geri kazanım çalışmaları gerçekleştirilerek doğrulukları ile kesinlikleri değerlendirilmiştir (Çizelge 3.54). Gün içi ve günler arası analizlerle elde edilen ve Çizelge 3.55'te verilen sonuçlar, yöntemlerin yüksek kesinlikte; Çizelge 3.56'da özetlenen standart ekleme çalışmalarının sonuçları ise yöntemlerin seçici olduğunu göstermiştir.

Validasyon çalışmalarıyla uygunluğu kanıtlanan FFD-UPLC, BBD-UPLC ve CCD-UPLC yöntemleri SDM ve TMP içeren BA-SÜLFA TMP Enjeksiyonluk Çözelti isimli veteriner preparatına başarıyla uygulanmış ve miktar tayini sonuçları Çizelge 3.57'de sunulmuştur. Bu çizelgedeki sonuçlardan geliştirilen UPLC yöntemlerinin ticari veteriner preparatın rutin analiz ve kalite kontrolü için uygun olduğu anlaşılmaktadır. Bu üç farklı yöntemle elde edilen analiz sonuçları α=0,05 anlamlılık seviyesinde ANOVA kullanılarak karşılaştırılmıştır. Bu test sonucunda, üç farklı yöntemle elde edilen analiz sonuçları arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edilmiştir.

Bu sonuçlar ışığında SDM ve TMP etken maddelerinin UPLC ile analizi için FFD, BBD ve CCD tasarımlarının kullanımı karşılaştırılacak olursa, FFD ve BBD tasarımlarla elde edilen kromatografik koşulların birbirine çok yakın olduğu, CCD ile elde edilen optimal koşulun ise bu farklı olduğu görülmektedir. Buna rağmen, bu üç

farklı koşulla elde edilen kromatogramlar ve alıkonma zamanları arasında önemli bir fark yoktur. Yani her bir parametre için belirlenen optimal değer farklı olsa da, bu koşulların beraber kullanılmasıyla elde edilen kromatografik sonuç aynıdır. FFD, BBD ve CCD tasarımlarının kullanıldığı cevap yüzey metodolojileri sonucunda, deney sahasında farklı noktalar optimal olarak belirlenmiştir fakat bu noktalar aynı kromatografik sonucu veren şartlardır. Bunun nedeni, SDM-TMP ile yapılan çalışmada FFD, BBD ve CCD tasarımların hemen hemen aynı deney uzaylarını kullanmaları olabilir. Her üç tasarım da çalışmanın başında belirlenen yeterli kromatografik ayrım ve kısa analiz zamanı hedeflerine uygun sonuçlar vermiştir.

Bu durumda, tasarımları emek ve kullanılabilirlik açısından karşılaştırmak mümkündür. SDM ve TMP karışımının analizi için geliştirilecek UPLC yöntemının optimizasyonunda kullanılması en kolay ve en ekonomik olan tasarım, deney sayısının düşük olması nedeniyle BBD tasarımdır. En çok emeğin ve kimyasalın kullanıldığı tasarım ise FFD tasarımdır. Geliştirilen UPLC yöntemlerinin, hangi tasarımın kullanıldığından bağımsız olarak, ticari preparatlardaki SDM ve TMP'nin seçici, doğru, kesin ve güvenilir miktar tayini için uygun olduğu görülmüştür.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında SDZ-TMP, SDX-TMP ve SDM-TMP karışımlarını içeren ticari veteriner preparatlarındaki etken maddelerin miktar tayinlerini gerçekleştirmek amacıyla yeni UPLC yöntemleri geliştirilmiştir. Bu analiz yöntemlerinin geliştirilmesinde, optimal kromatografik şartların belirlenmesi için tam faktöriyel, Box-Behnken ve merkezi bileşenli tasarımların kullanımına dayanan cevap yüzey metodolojilerinden yararlanılmıştır.

SDZ-TMP, SDX-TMP ve SDM-TMP karışımlarının kromatografik analizlerinde optimizasyonun temel hedefi, en kısa analiz süresinde etkin kromatografik ayrımın sağlanması olarak belirlenmiştir. Bu hedef doğrultusunda uygulanan farklı deney tasarımları sonucunda elde edilen optimal koşullar, hedefe yakınlıkları ve uygulanabilirlikleri bakımından birbirleriyle karşılaştırılmıştır. Saptanan optimal koşulların kullanılmasıyla geliştirilen UPLC yöntemleri valide edildikten sonra farmasötik preparatlardaki etken maddelerin analizine başarıyla uygulamış ve analiz sonuçları birbirleriyle istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır.

SDZ-TMP karışımının analizi için gerçekleştirilen çalışmalarda, optimizasyon için tam faktöriyel, Box-Behnken ve merkezi bileşenli tasarımlar kullanılmıştır. Tam faktöriyel ve Box-Behnken tasarımlarla birbirine çok yakın kromatografik koşullar optimal olarak belirlenmiştir. Merkezi bileşenli tasarımın kullanımı ise, farklı kromatografik koşulların optimal olarak belirlenmesini sağlamıştır. Merkezi bileşenli tasarım ile elde edilen koşulların uygulanması ile hedefe daha yakın kromatogramlar elde edilmiştir. Geliştirilen UPLC yöntemleri, kalibrasyon ve validasyon çalışmalarından sonra SDZ ve TMP içeren farmasötik preparatlara başarıyla uygulanmıştır.

SDX-TMP karışımının analizi için gerçekleştirilen çalışmalarda dört parametrenin optimizasyonu için Box-Behnken tasarımı ve merkezi bileşenli tasarım kullanılmıştır. Kromatografik sistemin sınırlarını zorlayan koşullar uygulanamadığı

için, bu iki tasarım için deney uzayları birbirlerinden farklı olarak seçilmiştir. Bu tasarımların uygulanmasıyla elde edilen kromatografik şartlar birbirinden oldukça farklı olsa da, bu şartların kullanımıyla elde edilen kromatogramların belli ölçüde birbirine benzediği görülmüştür. Deney uzayı daha geniş olan merkezi bileşenli tasarım ile optimize edilen kromatografik şartlar daha hızlı bir analiz yöntemi geliştirmeye olanak sağlamıştır. Geliştirilen optimal yöntemler için kalibrasyon ve validasyon çalışmaları yapıldıktan sonra gerçek numunelerin analizleri başarıyla gerçekleştirilmiştir.

SDM-TMP karışımının analizi için gerçekleştirilen çalışmalarda optimizasyon için tam faktöriyel, Box-Behnken ve merkezi bileşenli tasarımlar kullanılmıştır. Bu tasarımlar sonucunda birbirinden farklı kromatografik şartlar optimal olarak belirlenmiştir. Tam faktöriyel ve Box-Behnken tasarımlarla belirlenen şartlar arasındaki farkın daha küçük olduğu görülmüştür. Merkezi bileşenli tasarımın belirlediği şartlar ise diğer iki tasarımla elde edilen optimal şartlardan oldukça farklıdır. Optimal olarak tespit edilen bu kromatografik şartlar her bir parametre için tek tek düşünüldüğünde birbirlerinden farklı olsa da, bu şartların kullanılmasıyla elde edilen kromatogramların birbirlerine oldukça benzer olduğu tespit edilmiştir. SDM-TMP analizi için geliştirilen üç farklı UPLC yöntemi de kalibrasyon ve validasyon çalışmalarından sonra, gerçek numunelerin analizleri için başarıyla uygulanmıştır.

Böylece bu doktora çalışmasında hedeflendiği gibi SDZ-TMP, SDX-TMP ve SDM-TMP karışımlarını içeren veteriner preparatlardaki etken maddelerin kantitatif analizi için yeni UPLC yöntemleri geliştirilmiştir. Bu yöntemlerin geçerlilikleri kanıtlandıktan sonra, geliştirilen bu özgün ve optimal yöntemler ticari preparatların analizlerine başarıyla uygulanmıştır.

Bu çalışmada, farklı deney tasarımlarıyla elde edilen optimal deneysel şartlar birbirlerinden farklı olsa da bu şartların uygulanmasıyla kaydedilen birbirine benzer kromatografik çıktılar elde edilmiştir. Ayırıcılık, alıkonma zamanı ve analiz zamanı gibi kromatografik çıktılar üzerinde daha etkili olan seçimin ise deney uzayı olduğu görülmüştür. Bu yüzden cevap yüzey metodolojisinde deney tasarımının seçimi,

zaman ve maliyet sınırlandırmalarının yanında deneysel koşulların uygulanabilirliği göz önünde bulundurularak yapılması önerilmektedir.

Bu çalışma, çoklu ilaç analizleri için geliştirilecek sıvı kromatografisi yöntemlerinin cevap yüzey metodolojisiyle optimizasyonu sırasında faktör seçimi, faktörlerin deneysel aralıklarının belirlenmesi ve deney tasarımının seçimi için yol gösterici olmuştur. Çalışmada farklı deney tasarımlarının kullanımının, avantajları, dezavantajları, sınırlandırmaları tartışılmış, bu tasarımların kullanımıyla elde edilen optimal koşullar birbirleriyle karşılaştırılarak literatürde bu konudaki boşluğun giderilmesine katkı sağlanmıştır.

ÖZET

Sülfonamidleri İçeren Farmasötik Preparatlardaki Etkin Maddelerin Cevap Yüzey Metodolojisine Dayanan Aşırı Performanslı Sıvı Kromatografisi ile Miktar Tayinleri

Bu doktora tezinde, trimetoprim ve sülfonamidleri içeren veteriner preparatların kantitatif analizi için yeni aşırı performanslı sıvı kromatografisi (UPLC) yöntemleri geliştirilmiştir. Bu kapsamda sülfadiazin-trimetoprim, sülfadoksin-trimetoprim ve sülfadimidin-trimetoprim kombinasyonları araştırma konusu olarak seçilmiştir. UPLC yöntemlerinin geliştirilmesinde cevap yüzey metodolojisinden yararlanılmıştır. Optimizasyon süreçlerinde dar taban genişliğini ve etkin kromatografik ayrımı en kısa sürede sağlayan deneysel koşulların belirlenmesi için tam faktöriyel, Box-Behnken ve merkezi bileşenli olmak üzere farklı deney tasarımları kullanılmıştır. Bu amaçla, cevap yüzey metodolojisindeki bağımlı değişken olarak literatürde daha önce tanımlanmış bir kromatografik cevap fonksiyonu seçilmiştir. Cevap yüzey metodolojisi gerçek optimal koşulların belirlenmesinin yanı sıra, faktörlerin ve faktör etkileşimlerinin cevap üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesini sağlamıştır.

Sülfadiyazin ve trimetoprimin analizi için yöntem geliştirme basamağında optimize edilecek üç kromatografik parametre seçilmiştir: kolon sıcaklığı, hareketli fazdaki tampon oranı ve akış hızı. Faktörlerin ve faktör etkileşimlerinin cevap üzerindeki etkilerini incelemek ve optimal kromatografik şartların belirlenmesi için tam faktöriyel, Box-Behnken ve merkezi bileşenli tasarımlar kullanılmıştır. Tam faktöriyel ve Box-Behnken tasarımlarla hesaplanan optimal faktör seviyeleri kolon sıcaklığı için 38,9 °C, sodyum format tamponunun hareketli fazdaki oranı için %69,8 ve akış hızı için 0,26 mL/dk'dır. Diğer yandan, merkezi bileşenli tasarım ile belirlenen optimal kromatografik koşullar 44,9 °C kolon sıcaklığı, hareketli fazda %70,6 sodyum format tamponu ve 0,30 mL/dk akış hızıdır. Sülfadiyazin ve trimetoprim içeren tabletlerin analizi için bu optimal koşullar kullanılarak her ikisi de 2 dakikalık analiz süresine sahip olan iki farklı UPLC yöntemi geliştirilmiştir. Optimize edilen bu UPLC yöntemleri, validasyon ve sitem uygunluk parametrelerinin değerlendirilmesinden sonra, veteriner amaçlı tabletlerdeki sülfadiyazin ve trimetoprimin miktar tayinleri için başarıyla uygulanmışlardır.

Sülfadoksin ve trimetoprimin miktar tayini için UPLC yönteminin geliştirilmesi sırasında bağımsız değişken olarak kolon sıcaklığı, tamponun pH değeri, hareketli fazdaki tampon yüzdesi ve akış hızı olmak üzere dört kromatografik parametre seçilmiştir. Bu parametrelerin optimal değerlerinin tayini için Box-Behnken ve merkezi bileşenli tasarımlar kullanılmıştır. Box-Behnken tasarımla elde edilen optimal koşullar kolon sıcaklığı için 56,8°C, sodyum asetat tamponunun pH değeri için 4,48, hareketli fazdaki sodyum asetat tamponunun yüzdesi için %55,6 ve akış hızı için 0,20 mL/dk olmuştur. Merkezi bileşenli tasarım ise farklı koşulların optimal olarak belirlenmesini sağlamıştır: 31,2 °C kolon sıcaklığı, %49,3 sodyum asetat tamponu (pH 3,89) ve 0,23 mL/dk akış hızı. Bu koşullar kullanılarak geliştirilen UPLC yöntemleri, 1,8 dakika içinde sülfadoksin ve trimetoprimin kromatografik ayrımını sağlamışlardır.

Optimal olarak saptanan kromatografik koşullar birbirinden farklı olsa da, her iki yöntemle de birbirine benzer kromatogramlar elde edilmiştir. Optimize edilen bu yöntemlerin geçerlilikleri, sistem uygunluk parametreleri ve analitik validasyon testleri ile kanıtlanmıştır. Valide edilmiş bu optimal yöntemler, sülfadoksin ve trimetoprim içeren veteriner amaçlı enjeksiyonluk çözelti preparatlarının analizine başarıyla uygulanmışlarıdır.

Sülfadimidin ve trimetoprimin analizinde optimize edilecek üç kromatografik faktör seçilmiştir: kolon sıcaklığı, hareketli fazdaki inorganik bileşenin yüzdesi ve akış hızı. Faktörlerin cevap üzerindeki etkisinin yorumlanması ve her bir faktörün optimal değerinin belirlenmesi için tam faktöriyel, Box-Behnken ve merkezi bileşenli tasarımlardan yararlanılmıştır. Tam faktöriyel, Box-Behnken ve merkezi bileşenli tasarımlarla sırasıyla kolon sıcaklığı için 48,5 °C, 43,0 °C, 60,8 °C, hareketli fazdaki amonyum karbonat oranı için %53,6, %55,4, %52,0 ve akış hızı için 0,27 mL/dk, 0,27 mL/dk, 0,26 mL/dk değerleri optimal olarak saptanmıştır. Bu optimal kromatografik koşullar kullanılarak geliştirilen üç farklı UPLC yöntemi ile sülfadimidin ve trimetoprimin analizi 1,5 dakika içinde gerçekleştirilmiştir. Tayin edilen kromatografik koşulların sayısal değerleri birbirinden farklı olsa da, her üç yöntemle de benzer kromatogramlar elde edilmiştir. Sistem uygunluk ve analitik validasyon parametrelerinin değerlendirilmesinden sonra, geliştirilen UPLC yöntemleri, veteriner amaçlı enjeksiyonluk çözeltilerdeki sülfadimidin ve trimetoprimin miktar tayinleri için başarıyla uygulanmışlardır.

Bu doktora tez çalışması, cevap yüzey metodolojisinin UPLC yöntemlerinin optimizasyonu için etkin bir yaklaşım olduğunu göstermiştir. Deney tasarımının seçimi, her bir parametre için optimal olarak saptanan değerleri etkilese de, bu optimal koşulların birlikte kullanımıyla elde edilen kromatografik çıktıyı kayda değer biçimde etkilememiştir. Bunun yanında, deney tasarımının seçimi deney sayısı ve deneysel çalışmaların süreci üzerinde oldukça etkili olmuştur. Bu çalışmada geliştirilen tüm yöntemlerin, seçilmiş veteriner preparatların analizi için uygun olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Sözcükler: Cevap yüzey metodolojisi, Deneysel tasarım, Optimizasyon, Sülfonamidler, UPLC

SUMMARY

Quantitative Analysis of Active Ingredients in Pharmaceutical Preparations Containing Sulfonamides with Ultra Performance Liquid Chromatography Based on Response Surface Methodology

In this Ph.D. thesis, new ultra-performance liquid chromatography (UPLC) methods were developed for the quantitative analysis of sulfonamides and trimethoprim in their combined pharmaceutical preparations for animal use. The selected combination of active substances to be investigated were sulfadiazine-trimethoprim, sulfadoxine-trimethoprim, and sulfadimidine-trimethoprim. The development of the UPLC methods was performed by response surface methodology. In the optimization procedures, different experimental designs, namely full factorial, Box-Behnken, and central composite designs, were used for the determination of chromatographic conditions which provide efficient resolution in the shortest period of analysis, while ensuring narrow peak widths. A chromatographic response function, which was previously described in the literature, was used as a dependent variable in the response surface methodology to reach this aim. The response surface methodology provided the determination of real optimal conditions, as well as the evaluation of factor and factor interaction effects on the response.

In the method development step for the analysis of sulfadiazine and trimethoprim, three chromatographic parameters were chosen to be optimized: column temperature, buffer ratio in mobile phase, and flow rate. Full factorial design, Box-Behnken design, and central composite design were used to evaluate the effects of factors and factor interactions and to determine the optimal chromatographic conditions. The optimal factor levels determined by the use of full factorial and Box-Behnken designs were 38.9 °C for column temperature, 69.8% for sodium formate buffer, and 0.26 mL/min for flow rate. On the other hand, the optimal chromatographic conditions estimated by central composite design were a column temperature of 44.9 °C, 70.6% sodium formate buffer, and a flow rate of 0.30 mL/min. These optimal conditions were used to develop two different UPLC methods with a run time of 2 minutes for the analysis of tablets containing sulfadiazine and trimethoprim. After validation and evaluation of the system suitability parameters, the optimized UPLC methods were successfully applied to the quantitative determination of sulfadiazine and trimethoprim in tablets for animal use.

In order to develop a UPLC method for the quantitative determination of sulfadoxine and trimethoprim, four chromatographic parameters, namely column temperature, pH of the buffer, buffer ratio in mobile phase, and flow rate were chosen as independent factors. Box-Behnken design, and central composite design were used to determine the optimal factor values. The optimal chromatographic conditions determined by the use of Box-Behnken design were 56.8 °C for column temperature, pH 4.84 sodium acetate buffer, 55.6% of sodium acetate buffer in mobile phase, and 0.20 mL/min for flow rate. The use of central composite design yielded a different set of conditions as following: column temperature of 31.2 °C, 49.3% sodium acetate

buffer with a pH value of 3.89, and a flow rate of 0.23 mL/min. These conditions were used in two different UPLC methods with a run time of 1.8 minutes for the quantitative analysis of sulfadoxine and trimethoprim. Although chromatographic conditions were different from each other, similar chromatograms were recorded with the application of both methods. The optimized methods were evaluated based on system suitability parameters and results of analytical validation tests. As the validity of the methods was confirmed, they were successfully implemented to analyze the veterinary solution for injection, containing sulfadoxine and trimethoprim.

Three chromatographic factors were chosen to be optimized for the analysis of sulfadimidine and trimethoprim: column temperature, percentage of inorganic modifier in mobile phase, and flow rate. Full factorial, Box-Behnken, and central composite designs were used to assess factor effects on the response and to calculate the optimal value for each factor. The optimal values, determined by the use of full factorial, Box-Behnken, and central composite designs, were 48.5, 43.0, and 60.8 °C for column temperature, 53.6%, 55.4%, and 52.0% for ammonium carbonate percentage in mobile phase, and 0.27, 0.27, and 0.26 mL/min for flow rate, respectively. These optimal values were applied for the development of three different UPLC methods with a run time less than 1.5 minutes for the quantification of sulfadimidine and trimethoprim. Even though the value for each chromatographic parameter was different from each other, similar chromatograms were recorded with all three methods. After evaluation of system suitability and analytical validation parameters, the optimized UPLC methods were successfully applied to the quantitative determination of sulfadimidine and trimethoprim in solution for injection dosage forms for animal use.

This study indicated that the response surface methodology was an efficient way for the optimization of UPLC methods. While the choice of the experimental design affected the values of optimal conditions, it had little effect on the chromatographic outcome achieved in the end. Besides, the number of experiments and the period of experimental work highly depended on the selected design. All methods developed in this study were found to be suitable for the analysis of selected pharmaceutical preparations.

Keywords: Experimental design, Optimization, Response surface methodology, Sulfonamides, UPLC

KAYNAKLAR

ADEGOKE OA, BABALOLA CP, KOTILA OA, OBUEBHOR O (2017). Simultaneous spectrophotometric determination of trimethoprim and sulphamethoxazole following charge-transfer complexation with chloranilic acid. *Arabian Journal of Chemistry,* **10:** S3848-S3860.

ALTINTAŞ L. (2006). *Ağızdan Kullanılan Bazı Sülfonamid Preparatlarının Broilerlerde Biyoeşdeğerliliği.* (Doktora Tezi), Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

ALVAREZ-SEGURA T, GÓMEZ-DÍAZ A, ORTIZ-BOLSICO C, TORRES-LAPASIÓ JR, GARCÍA-ALVAREZ-COQUE MC (2015). A chromatographic objective function to characterise chromatograms with unknown compounds or without standards available. *J Chromatogr A,* **1409:** 79-88.

AMIN NC, BLANCHIN MD, AKÉ M, FABRE H (2012). Capillary zone electrophoresis as a potential technique for the simultaneous determination of sulfadoxine and pyrimethamine in tablet formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,* **58(1):** 168-171.

ARAYNE MS, SULTANA N, SIDDIQUI FA, NASEEM S, QURESHI F (2010). Simultaneous determination of pyrimethamine, sulfadoxine, mefloquine, and ibuprofen in pharmaceutical formulations by RP-HPLC. *Medicinal Chemistry Research,* **19(9):** 1043-1054.

BAEZA FONTE AN, RODRÍGUEZ CASTRO G, LIVA-GARRIDO M (2018). Multi-residue analysis of sulfonamide antibiotics in honey samples by on-line solid phase extraction using molecularly imprinted polymers coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies,* **41(15-16):** 881-891.

BAVET, (2018). Ba-Sülfa TMP Prospektüsü. İstanbul: Bavet İlaç A.Ş.

BERNABÉU JA, TORRES-SUÁREZ AI, GIL-ALEGRE ME, CAMACHO MA (2000). Stability study of a sulfadimidine-containing medicated premix and its mixture with farm feed. *J Agric Food Chem,* **48(12):** 5969-5974.

BERRIDGE JC (1982). Unattended optimisation of reversed-phase high-performance liquid chromatographic separations using the modified simplex algorithm. *J Chromatogr A,* **244(1):** 1-14.

BERZAS NEVADO JJ, CASTAÑEDA PEÑALVO G, GUZMÁN BERNARDO FJ (2001). Determination of sulfametoxazole, sulfadiazine and associated compounds in pharmaceutical preparations by capillary zone electrophoresis. *J Chromatogr A,* **918(1):** 205-210.

BHOIR SI, BHOIR IC, BHAGWAT AM, SUNDARESAN M (2001). Determination of sulfadoxine in human blood plasma using packed-column supercritical fluid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications,* **757(1):** 39-47.

BIYIK E. (2017). *Timolol Maleat İçeren Ticari Farmasötik Preparatlardaki Etkin Maddelerin Spektrofotometrik ve Kromatografik Ölçümlere Dayalı Kemometrik Yöntemlerle Miktar Tayinleri.* (Doktora Tezi), Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

BLAHOVÁ E, BOVANOVÁ L, BRANDŠTETEROVÁ E (2001). Direct HPLC analysis of trimethoprim in milk. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies,* **24(19):** 3027-3035.

BLOKLAND MH, ZOONTJES PW, VAN GINKEL LA, VAN DE SCHANS MGM, STERK SS, BOVEE TFH (2018). Multiclass screening in urine by comprehensive two-dimensional liquid chromatography time of flight mass spectrometry for residues of sulphonamides, beta-agonists and steroids. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment,* **35(9):** 1703-1715.

BONAZZI D, ANDRISANO V, DI PIETRA AM, CAVRINI V (1994). Analysis of trimethoprim-sulfonamide drug combinations in dosage forms by UV spectroscopy and liquid chromatography (HPLC). *Farmaco,* **49(6):** 381-386.

BORTOLOTTE AR, DANIEL D, DE CAMPOS BRAGA PA, REYES FGR (2019). A simple and high-throughput method for multiresidue and multiclass quantitation of antimicrobials in pangasius (Pangasionodon hypophthalmus) fillet by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences,* **1124:** 17-25.

BRAGA OC, CAMPESTRINI I, VIEIRA IC, SPINELLI A (2010). Sulfadiazine determination in pharmaceuticals by electrochemical reduction on a glassy carbon electrode. *Journal of the Brazilian Chemical Society,* **21(5):** 813-820.

BRERETON RG. (2003). Experimental Design. In: *Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant* Ed.: Wiltshire, England: John Wiley & Sons. 15-117.

BÜKER E, DINÇ E (2017). A New UPLC Method with Chemometric Design-Optimization Approach for the Simultaneous Quantitation of Brimonidine Tartrate and Timolol Maleate in an Eye Drop Preparation. *J Chromatogr Sci,* **55(2):** 154-161.

BUSHBY SRM, HITCHINGS GH (1968). TRIMETHOPRIM, A SULPHONAMIDE POTENTIATOR. *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy,* **33(1):** 72-90.

CANCHO GRANDE B, GARCÍA FALCÓN MS, RODRÍGUEZ COMESAÑA M, SIMAL GÁNDARA J (2001). Determination of sulfamethazine and trimethoprim in liquid feed premixes by HPLC and diode array detection, with an analysis of the uncertainty of the analytical results. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* **49(7):** 3145-3150.

CARAPUÇA HM, CABRAL DJ, ROCHA LS (2005). Adsorptive stripping voltammetry of trimethoprim: Mechanistic studies and application to the fast determination in pharmaceutical suspensions. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,* **38(2):** 364-369.

CARLE GC (1972). Determination of chromatographic resolution for peaks of vast concentration differences. *Analytical Chemistry,* **44(11):** 1905-1906.

CDER, (1994). Reviewer Guidance, Validation of Chromatographic Methods, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), FDA, Rockville, MD, Amerika Birleşik Devletleri.

CEVA, (2004a). Biotrin Tablet Prospektüsü. İstanbul: Ceva Hayvan Sağlığı A.Ş.

CEVA, (2004b). Sulphamezathine %16 Oral Çözelti Prospektüsü. İstanbul: Ceva Hayvan Sağlığı A.Ş.

CHU Q, ZHANG D, WANG J, YE J (2009). Multi-residue analysis of sulfonamides in animal tissues by capillary zone electrophoresis with electrochemical detection. *Journal of the Science of Food and Agriculture,* **89(14):** 2498-2504.

CLARK MA. (2012). Lippincott's illustrated reviews. Pharmacology. (Ed. 5th). Baltimore, MD: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.

CROUBELS S, WASSINK P, DE BACKER P (2002). Simultaneous determination of sulfadiazine and trimethoprim in animal feed by liquid chromatography with UV and tandem mass spectrometric detection. *Analytica Chimica Acta,* **473(1-2):** 183-194.

DA SILVA IS, VIDAL DTR, DO LAGO CL, ANGNES L (2013). Fast simultaneous determination of trimethoprim and sulfamethoxazole by capillary zone electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection. *Journal of Separation Science,* **36(8):** 1405-1409.

DE BAERE S, BAERT K, CROUBELS S, DE BUSSER J, DE WASCH K, DE BACKER P (2000). Determination and quantification of sulfadiazine and trimethoprim in swine tissues using liquid chromatography with ultraviolet and mass spectrometric detection. *Analyst,* **125(3):** 409-415.

DEMING SN, MORGAN SL. (1993). Experimental Design: A Chemometric Approach. (Ed.). Amsterdam: Elsevier.

DERRINGER G, SUICH R (1980). Simultaneous-Optimization of Several Response Variables. *J Qual Technol,* **12(4):** 214-219.

DEVA, (2017). Diaqua Oral Toz Prospektüsü. Tekirdağ: Deva.

DINALI LAF, DE OLIVEIRA HL, TEIXEIRA LS, DA SILVA ATM, D'OLIVEIRA KA, CUIN A, BORGES KB (2020). Efficient development of a magnetic molecularly imprinted polymer for selective determination of trimethoprim and sulfamethoxazole in milk. *Microchemical Journal,* **154**.

DINÇ E, ERTEKIN ZC, ROUHANI G (2015). A new RP-UPLC method for simultaneous quantitative estimation of bisoprolol hemifumarate and hydrochlorothiazide in tablets using experimental design and optimization. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies,* **38(9):** 970-976.

DISPAS A, LEBRUN P, ZIEMONS E, MARINI R, ROZET E, HUBERT P (2014). Evaluation of the quantitative performances of supercritical fluid chromatography: From method development to validation. *J Chromatogr A,* **1353:** 78-88.

DIVJAK B, MODER M, ZUPAN J (1998). Chemometrics approach to the optimization of ion chromatographic analysis of transition metal cations for routine work. *Analytica Chimica Acta,* **358(3):** 305-315.

DIVYA K, NARAYANA B, SAMSHUDDIN S (2016). New spectrophotometric methods for the determination of sulfadoxine by the formation of Co(II) complexes. *Journal of Saudi Chemical Society,* **20:** S536-S540.

DONG Y, LI J, ZHONG X, CAO L, LUO Y, FAN Q (2016). High-throughput prediction of tablet weight and trimethoprim content of compound sulfamethoxazole tablets for controlling the uniformity of dosage units by NIR. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy,* **159:** 78-82.

DUARTE AC, CAPELO S (2006). Application of chemometrics in separation science. *J Liq Chromatogr R T,* **29(7-8):** 1143-1176.

EDSTEIN M (1984). Quantification of antimalarial drugs: I. Simultaneous measurement of sulphadoxine, N4-acetylsulphadoxine and pyrimethamine in human plasma. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications,* **305:** 502-507.

EL-NAJJAR N, HÖSL J, HOLZMANN T, JANTSCH J, GESSNER A (2018). UPLC–MS/MS method for therapeutic drug monitoring of 10 antibiotics used in intensive care units. *Drug Testing and Analysis,* **10(3):** 584-591.

ELJASCHEWITSCH J, PADBERG J, SCHÜRMANN D, RUF B (1996). High-performance liquid chromatography determination of pyrimethamine, dapsone, monoacetyldapsone, sulfadoxine, and N-acetyl-sulfadoxine after rapid solid-phase extraction. *Ther Drug Monit,* **18(5):** 592-597.

ESPINOSA-MANSILLA A, SALINAS F, DE ORBE PAYA I (1995). Simultaneous determination of sulfadiazine, doxycycline, furaltadone and trimethoprim by partial least squares multivariate calibration. *Analytica Chimica Acta,* **313(1-2):** 103-112.

FAN J, CHEN Y, FENG S, YE C, WANG J (2003). Flow-Injection Spectrophotometric Determination of Sulfadiazine and Sulfamethoxazole in Pharmaceuticals and Urine. *Analytical Sciences,* **19(3):** 419-422.

FAN L, LIU L, CHEN H, CHEN X, HU Z (2005). Continuous on-line concentration based on dynamic pH junction for trimethoprim and sulfamethoxazole by microfluidic capillary electrophoresis combined with flow injection analysis system. *J Chromatogr A,* **1062(1):** 133-137.

GALVEZ AM, MATEO JVG, MARTÍNEZ CALATAYUD J (2002). Simultaneous dissolution profiles of two drugs, sulfadiazine-trimethoprim and amitriptyline-perphenazine, in solid oral dosage forms by a FIA manifold provided with a single spectrophotometric detector. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,* **30(3):** 535-545.

GBOTOSHO GO, HAPPI CT, SIJUADE AO, SOWUNMI A, ODUOLA AMJ (2009). A simple cost-effective high performance liquid chromatographic assay of sulphadoxine in whole blood spotted on filter paper for field studies. *Malaria Journal,* **8(1):** 238.

GHANEM MM, ABU-LAFI SA (2013). Validation of a stability-indicating RP-HPLC method for the simultaneous determination of Trimethoprim and sulfadimethoxine sodium in oral liquid dosage form. *Scientia Pharmaceutica,* **81(2):** 459-474.

GIEGOLD S, TEUTENBERG T, TUERK J, KIFFMEYER T, WENCLAWIAK B (2008). Determination of sulfonamides and trimethoprim using high temperature HPLC with simultaneous temperature and solvent gradient. *J Sep Sci,* **31(20):** 3497-3502.

GOKAVI NM, NANDIBEWOOR ST (2015). Voltammetric determination of sulfadoxine and its application in pharmaceuticals and urine samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry Research,* **2(2):** 119-128.

GONZALEZ D, MELLONI C, POINDEXTER BB, YOGEV R, ATZ AM, SULLIVAN JE, MENDLEY SR, DELMORE P, DELINSKY A, ZIMMERMAN K, LEWANDOWSKI A, HARPER B, LEWIS KC, BENJAMIN DK, JR., COHEN-WOLKOWIEZ M (2015). Simultaneous determination of trimethoprim and sulfamethoxazole in dried plasma and urine spots. *Bioanalysis,* **7(9):** 1137-1149.

GUZMÁN-VÁZQUEZ DE PRADA A, MARTÍNEZ-RUIZ P, REVIEJO AJ, PINGARRÓN JM (2005). Solid-phase molecularly imprinted on-line preconcentration and voltammetric determination of sulfamethazine in milk. *Analytica Chimica Acta,* **539(1-2):** 125-132.

HAJIANFL R, GHOBADI K (2014). Successive ratio spectra derivative method for simultaneous determination of aspirin, ascorbic acid and paracetamol in some pharmaceutical formulations. *Journal of the Indian Chemical Society,* **91(5):** 961-967.

HE BS, CHEN WB (2016). Voltammetric determination of sulfonamides with a modified glassy carbon electrode using carboxyl multiwalled carbon nanotubes. *Journal of the Brazilian Chemical Society,* **27(12):** 2216-2225.

HE X, TAN L, WU W, WANG J (2016). Determination of sulfadiazine in eggs using molecularly imprinted solid-phase extraction coupled with high-performance liquid chromatography. *Journal of Separation Science,* **39(11):** 2204-2212.

HEIBERGER RMH, BURT (2015). Statistical Analysis and Data Display. (Ed. 2nd). New York: Springer.

HIBBERT DB (2012). Experimental design in chromatography: A tutorial review. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences,* **910:** 2-13.

HIŞMIOĞULLARı ŞE, YARSAN E, DINÇ E (2010). Spectral classical least square calibration approach for the simultaneous determination and stability test of Sulphadiazine and Trimethoprim in bolus. *Journal of Animal and Veterinary Advances,* **9(4):** 857-861.

HOWS MEP, PERRETT D, KAY J (1997). Optimisation of a simultaneous separation of sulphonamides, dihydrofolate reductase inhibitors and β-lactam antibiotics by capillary electrophoresis. *J Chromatogr A,* **768(1):** 97-104.

HUANG W, QIU Q, CHEN M, SHI J, HUANG X, KONG Q, LONG D, CHEN Z, YAN S (2019). Determination of 18 antibiotics in urine using LC-QqQ-MS/MS. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences,* **1105:** 176-183.

ICH Q2(R1) Validation of analytical procedures: Text and methodology, (1994). International Conference on Harmonization (ICH), EMEA, Londra, Birleşik Krallık.

JANČIĆ-STOJANOVIĆ B, RAKIĆ T, KOSTIĆ N, VEMIĆ A, MALENOVIĆ A, IVANOVIĆ D, MEDENICA M (2011). Advancement in optimization tactic achieved by newly developed chromatographic response function: application to LC separation of raloxifene and its impurities. *Talanta,* **85(3):** 1453-1460.

KAHN SB, FEIN SA, BRODSKY I (1968). Effects of trimethoprim on folate metabolism in man. *Clinical Pharmacology & Therapeutics,* **9(5):** 550-560.

KAPOOR VK. (1988). Sulfadoxine. In: *Analytical Profiles of Drug Substances* Ed.: Florey, K.: Academic Press. Vol. 17, 571-605.

KAYAALP SO. (2012). Akılcı tedavi yönünden tıbbi farmakoloji. (Ed.): Pelikan Yayıncılık.

KHANMOHAMMADI M, DALLALI N, BAGHERI GARMARUDI A, ZARNEGAR M, GHASEMI K (2011). Comparison of partial least squares and artificial neural network chemometric techniques in determination of sulfamethoxazole and trimethoprim in pharmaceutical suspension by ATR-FTIR spectrometry. *Spectroscopy,* **26(2):** 105-114.

KHATTAB F, RIAD S, REZK M, MARZOUK H (2014). Simultaneous determination of sulphadiazine sodium and trimethoprim in medicated fish feed, fish tissues and in their veterinary pharmaceutical formulation by thin-layer chromatography-densitometry. *J. Planar Chromatogr.-Mod. TLC,* **27(2):** 113-119.

KHEDR T, RYAD L, YOUSSEF AO (2019). Testing the validity of reference standard materials and stock solutions of veterinary drugs using LC-MS/MS. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment,* **36(3):** 405-412.

KOMSTA L, VANDER HEYDEN Y, SHERMA J. (2018). Chemometrics in Chromatography. (Ed.). Boca Raton, FL, USA: CRC Press, Taylor & Francis Group.

KUJAWINSKI DM, ZHANG L, SCHMIDT TC, JOCHMANN MA (2012). When other separation techniques fail: Compound-specific carbon isotope ratio analysis of sulfonamide containing pharmaceuticals by high-temperature- liquid chromatography-isotope ratio mass spectrometry. *Analytical Chemistry,* **84(18):** 7656-7663.

LARA FJ, GARCÍA-CAMPAÑA AM, NEUSÜSS C, ALÉS-BARRERO F (2009). Determination of sulfonamide residues in water samples by in-line solid-phase extraction-capillary electrophoresis. *J Chromatogr A,* **1216(15):** 3372-3379.

LEMUS GALLEGO JM, PÉREZ ARROYO J (2001). Spectrophotometric resolution of ternary mixtures of Dexamethasone, Polymyxin B and Trimethoprim in synthetic and pharmaceutical formulations. *Analytica Chimica Acta,* **437(2):** 247-257.

LEMUS GALLEGO JM, PÉREZ ARROYO J (2002). Simultaneous determination of dexamethasone and trimethoprim by liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,* **30(4):** 1255-1261.

LI J, LIU H, ZHANG J, LIU Y, WU L (2016). A novelty strategy for the fast analysis of sulfonamide antibiotics in fish tissue using magnetic separation with high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Biomed Chromatogr,* **30(8):** 1331-1337.

LIAN Z, HE X, WANG J (2014). Determination of sulfadiazine in Jiaozhou Bay using molecularly imprinted solid-phase extraction followed by high-performance liquid chromatography with a diode-array detector. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences,* **957:** 53-59.

LUNDSTEDT T, SEIFERT E, ABRAMO L, THELIN B, NYSTROM A, PETTERSEN J, BERGMAN R (1998). Experimental design and optimization. *Chemometr Intell Lab,* **42(1-2):** 3-40.

MANIUS GJ. (1978). Trimethoprim. In: *Analytical Profiles of Drug Substances* Ed.: Florey, K.: Academic Press. Vol. 7, 445-475.

MARKOPOULOU CK, MALLIOU ET, KOUNDOURELLIS JE (2004). Chemometric and derivative methods as flexible spectrophotometric approaches for dissolution and assaying tests in multicomponent tablets. *Farmaco,* **59(8):** 627-636.

MASSART DL, VANDEGINSTE BGM, BUYDENS LMC, DE JONG S, LEWI PJ, SMEYERS-VERBEKE J. (1998). Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A. (Ed.: Massart, D. L., Vandeginste, B. G. M., Buydens, L. M. C., De Jong, S., Lewi, P. J., Smeyers-Verbeke, J. 2nd Ed. Vol. 20). Amsterdam: Elsevier.

MASSART DL, VANDEGINSTE BGM, DEMING SN, MICHOTTE Y, KAUFMAN L. (2003). Chemometrics : A Textbook. (Ed.). Amsterdam, Hollanda: Elsevier.

MATOS JTV, DUARTE RMBO, DUARTE AC (2013). Chromatographic response functions in 1D and 2D chromatography as tools for assessing chemical complexity. *Trac-Trend Anal Chem,* **45:** 14-23.

MAZZEO JR, NEUE UD, KELE M, PLUMB RS (2005). Advancing LC performance with smaller particles and higher pressure. *Analytical Chemistry,* **77(23):** 460 A-467 A.

MEENA S, SANDHYA SM (2013). Validated spectrophotometric methods for simultaneous analysis of pyrimethamine and sulphadoxine in pharmaceutical dosage forms. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research,* **6(SUPPL.3):** 121-123.

MOHAMED AEMI, ABDELMAGEED OH, REFAAT IH (2007). Determination of two antibacterial binary mixtures by chemometrics-assisted spectrophotometry. *Journal of AOAC International,* **90(1):** 128-141.

MONTGOMERY DC. (2013). Design and Analysis of Experiments. (Ed. 8th Ed.): John Wiley & Sons.

MORRIS VM, HUGHES JG, MARRIOTT PJ (1996). Examination of a new chromatographic function, based on an exponential resolution term, for use in optimization strategies: application to capillary gas chromatography separation of phenols. *J Chromatogr A,* **755(2):** 235-243.

MUCHLISYAM, PARDEDE TR, SATIAWAN R (2018). Determination of simultaneous sulfamethoxazole and trimethoprim by ultraviolet spectrophotometry with mean centering of ratio spectra. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research,* **11:** 61-69.

MWALWISI YH, HOELLEIN L, KAALE E, HOLZGRABE U (2016). Development of a simple, rapid, and robust liquid chromatographic method for the simultaneous determination of sulfalene, sulfadoxine, and pyrimethamine in tablets. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,* **129:** 558-570.

MYERS RH, MONTGOMERY DC, ANDERSON-COOK CM. (2009). Response Surface Methodology : Process and Product Optimization Using Designed Experiments. (Ed. 3rd). Hoboken, N.J.: Wiley.

NI Y, QI Z, KOKOT S (2006). Simultaneous ultraviolet-spectrophotometric determination of sulfonamides by multivariate calibration approaches. *Chemometr Intell Lab,* **82(1-2 SPEC. ISS):** 241-247.

NING X, MU-HUA L, HAI-CHAO Y, SHUANG-GEN H, XIAO W, JIN-HUI Z, JIAN C, TING W, WEI H, YI-XIN S (2020). Classification of Sulfadimidine and Sulfapyridine in Duck Meat by Surface Enhanced Raman Spectroscopy Combined with Principal Component Analysis and Support Vector Machine. *Analytical Letters,* **53(10):** 1513-1524.

OCHEKPE NA, NGWULUKA NE, AGBOWURO AA, OBODOZIE OO (2012). Dissolution profiles of twelve brands of sulphadoxine pyrimethamine in the Nigerian market. *Dissolution Technologies,* **19(1):** 59-64.

ONAH JO, ODEIANI JE (2002). Simultaneous spectrophotometric determination of sulfadoxine and pyrimethamine in pharmaceutical formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,* **30(3):** 851-857.

ORTÍN A, TORRES-LAPASIÓ JR, GARCÍA-ÁLVAREZ-COQUE MC (2011). Finding the best separation in situations of extremely low chromatographic resolution. *J Chromatogr A,* **1218(16):** 2240-2251.

PAPASTEPHANOU C, FRANTZ M. (1978). Sulfamethazine. In: *Analytical Profiles of Drug Substances* Ed.: Florey, K.: Academic Press. Vol. 7, 401-422.

PAPICH MG. (2017). Sulfonamides and Potentiated Sulfonamides. In: *Veterinary Pharmacology and Therapeutics* Ed.: Riviere, J. E. Papich, M. G., Habooken, NJ, USA: Wiley. 10, 796-826.

PATYRA E, NEBOT C, GAVILÁN RE, CEPEDA A, KWIATEK K (2018). Development and validation of an LC-MS/MS method for the quantification of tiamulin, trimethoprim, tylosin, sulfadiazine and sulfamethazine in medicated feed. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment,* **35(5):** 882-891.

PEICHANG L, HONGXIN H (1989). An Intelligent Search Method for HPLC Optimization. *Journal of Chromatographic Science,* **27(12):** 690-697.

PEREIRA PF, DA SILVA WP, MUÑOZ RAA, RICHTER EM (2016). A simple and fast batch injection analysis method for simultaneous determination of phenazopyridine, sulfamethoxazole, and trimethoprim on boron-doped diamond electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry,* **766:** 87-93.

PERIŠA M, BABIČ S (2014). Simultaneous determination of pharmaceuticals and some of their metabolites in wastewaters by high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Journal of Separation Science,* **37(11):** 1289-1296.

POIRIER LARABIE S, HOUDE M, GAGNON C (2017). Determination of the bioavailability of selected pharmaceutical residues in fish plasma using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A,* **1522:** 48-55.

PROVET, (2019). Bakteral Enjeksiyonluk Çözelti Prospektüsü. Ankara: Provet Veteriner Ürünleri San. ve Tic. A.Ş.

RAKIĆ T, JANČIĆ STOJANOVIĆ B, MALENOVIĆ A, IVANOVIĆ D, MEDENICA M (2012). Improved chromatographic response function in HILIC analysis: application to mixture of antidepressants. *Talanta,* **98:** 54-61.

RAMI REDDY N, PRABHAVATHI K, CHAKRAVARTHY IE (2003). A simple and rapid spectrophotometric method for the analysis of sulfadimidine in pharmaceutical veterinary dosage forms. *Asian Journal of Chemistry,* **15(1):** 523-525.

REBELO TSCR, ALMEIDA SAA, GUERREIRO JRL, MONTENEGRO MCBSM, SALES MGF (2011). Trimethoprim-selective electrodes with molecularly imprinted polymers acting as ionophores and potentiometric transduction on graphite solid-contact. *Microchemical Journal,* **98(1):** 21-28.

ROBERT C, BRASSEUR PY, DUBOIS M, DELAHAUT P, GILLARD N (2016). Development and validation of rapid multiresidue and multi-class analysis for antibiotics and anthelmintics in feed by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment,* **33(8):** 1312-1323.

ROUHANI G, ERTEKIN ZC, DINÇ E (2017). A new UPLC approach for the quantitation of ephedrine and guaifenesin in a syrup formulation using multivariate optimization strategy. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies,* **40(7):** 333-339.

RXMEDIAPHARMA. (Mayıs 2017). İnteraktif İlaç Bilgi Kaynağı. (Ed.). İzmir, Turkey: GEMAŞ A.Ş.

SADEGHI S, MOTAHARIAN A (2013). Voltammetric sensor based on carbon paste electrode modified with molecular imprinted polymer for determination of sulfadiazine in milk and human serum. *Materials Science and Engineering: C,* **33(8):** 4884-4891.

SANCHEZ PENA M, ACEDO MJ, SALINAS F, MAHEDERO MC, AARON JJ (1995). Analysis of sulfamethazine in the presence of sulfamerazine or sulfadiazine by first-derivative photochemically induced fluorescence. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,* **13(9):** 1107-1112.

SANDHYA SM, SHIJIKUMAR PS (2015). A Simplified Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Method for Simultaneous Determination of Pyrimethamine, Sulphadoxine and Artesunate in Human Plasma. *journal of applied pharmaceutical science,* **5:** 109-114.

SANJAY PAI PN, DIAS C, SAWANT N (2016). Development and validation of a RP-HPLC method for the simultaneous estimation of sulfadoxine and pyrimethamine in combined dosage tablets. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research,* **50(3):** 489-494.

SCHLABACH TD, EXCOFFIER JL (1988). Multi-variate ranking function for optimizing separations. *J Chromatogr A,* **439(2):** 173-184.

SHAN H, FEI Y, HUAN Y, FENG G, FEI Q (2014). Quantitative near-infrared spectroscopic analysis of trimethoprim by artificial neural networks combined with modified genetic algorithm. *Chem Res Chinese U,* **30(4):** 582-586.

SKOOG DA, WEST DM, HOLLER FJ, CROUCH SR. (2004). Fundamentals of Analytical Chemistry (Ed. 8th). Belmont, Canada: Thomson Learning, Inc.

STEINBERG DM, HUNTER WG (1984). Experimental Design: Review and Comment. *Technometrics,* **26(2):** 71-97.

STOBER H, DEWITTE W. (1982). Sulfadiazine. In: *Analytical Profiles of Drug Substances* Ed.: Florey, K.: Academic Press. Vol. 11, 523-551.

SU YL, CHENG SH (2018). A novel electroanalytical assay for sulfamethazine determination in food samples based on conducting polymer nanocomposite-modified electrodes. *Talanta,* **180:** 81-89.

SWARTZ ME (2005). UPLC™: An introduction and review. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies,* **28(7-8):** 1253-1263.

TEGLIA CM, GUIÑEZ M, GOICOECHEA HC, CULZONI MJ, CERUTTI S (2020). Enhancement of multianalyte mass spectrometry detection through response surface optimization by least squares and artificial neural network modelling. *J Chromatogr A,* **1611.**

TÖLGYESI Á, BARTA E, SOHN M, SHARMA VK (2018). Determination of Antimicrobial Residues in Honey by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Food Analytical Methods,* **11(8):** 2043-2055.

TONG F, ZHANG Y, CHEN F, LI Y, MA G, CHEN Y, LIU K, DONG J, YE J, CHU Q (2013). Hollow-fiber liquid-phase microextraction combined with capillary electrophoresis for trace analysis of sulfonamide compounds. *Journal of Chromatography B,* **942-943:** 134-140.

TRAŞ B, ELMAS M, YAZAR E, BAŞ AL, KESKIN E, DAŞCI Z (1998). Concentrations of sulfadoxine and trimethoprim in plasma, lymph fluids and some tissues 24 h after intramuscular administration to angora goats. *Veterinary Quarterly,* **20(2):** 62-64.

TREVOR AJ, KATZUNG BG, MASTERS SB. (2010). Katzung ve Trevor Farmakoloji Sınav ve Gözden Geçirme. (Altan, M., Trans. Ed. 8th). Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri.

TÜRK FARMAKOPESİ (2017). Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu, Ankara, Türkiye.

VAN DEN MEERSCHE T, PAMEL EV, POUCKE CV, HERMAN L, HEYNDRICKX M, RASSCHAERT G, DAESELEIRE E (2016). Development, validation and application of an ultra high performance liquid chromatographic-tandem mass spectrometric method for the simultaneous detection and quantification of five different classes of veterinary antibiotics in swine manure. *J Chromatogr A,* **1429:** 248-257.

VAN MIERT ASJPAM (1994). The sulfonamide-diaminopyrimidine story*. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics,* **17(4):** 309-316.

VINAY MM, NAYAKA YA, BASAVARAJAPPA KV, MANJUNATHA P, PURUSHOTHAMA HT, YATHIRAJA RO (2020). Development of single walled carbon nanotube-molybdenum disulfide nanocomposite/poly-ethylene glycol modified carbon paste electrode as an electrochemical sensor for the investigation of sulfadiazine in biological samples. *Analytical and Bioanalytical Electrochemistry,* **12(2):** 155-167.

WANG A, GONG F, LI H, FANG Y (1999). Separation and determination of the active ingredients in tablets of composite sulphonamides by capillary zone electrophoresis with amperometric detection. *Analytica Chimica Acta,* **386(3):** 265-269.

WANG JC, ZHANG Q, CAI DF (2013). Stability-Indicating Validated HPLC Method for Analysis of Berberine Hydrochloride and Trimethoprim in Pharmaceutical Dosage Form. *Journal of Chemistry.*

WATERS®, (2010). Acquity UPLC H-Class System Guide. İrlanda: Waters Corporation.

WATSON MW, CARR PW (1979). Simplex algorithm for the optimization of gradient elution high-performance liquid chromatography. *Analytical Chemistry,* **51(11):** 1835-1842.

WU N, CLAUSEN AM (2007). Fundamental and practical aspects of ultrahigh pressure liquid chromatography for fast separations. *Journal of Separation Science,* **30(8):** 1167-1182.

XUE M, WU H, LIU S, HUANG X, JIN Q, REN R (2020). Simultaneous determination of 44 pharmaceutically active compounds in water samples using solid-phase extraction coupled with ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry,* **412(1):** 203-222.

YABRÉ M, FEREY L, SOMÉ IT, GAUDIN K (2018). Greening reversed-phase liquid chromatography methods using alternative solvents for pharmaceutical analysis. *Molecules,* **23(5).**

YANG YJ, LIU XW, LI B, LI SH, KONG XJ, QIN Z, LI JY (2016). Simultaneous determination of diaveridine, trimethoprim and ormetoprim in feed using high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Food Chemistry,* **212:** 358-366.

ZHANG Z, XIAOFENG B. (2009, 22-24 Jan. 2009). *Comparison about the Three Central Composite Designs with Simulation.* Paper presented at the 2009 International Conference on Advanced Computer Control.

ZHAO F, GAO X, TANG Z, LUO X, WU M, XU J, FU X (2017). Development of a simple multi-residue determination method of 80 veterinary drugs in Oplegnathus punctatus by liquid chromatography coupled to quadrupole Orbitrap mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences,* **1065-1066:** 20-28.

ZHENG W, ABD EL-ATY AM, KIM SK, CHOI JM, PARK DH, YOO KH, KANG YS, JEON JS, HACIMÜFTÜOĞLU A, SHIM JH, SHIN HC (2019). Development and validation of a solid-phase extraction method coupled with LC–MS/MS for the simultaneous determination of 16 antibiotic residues in duck meat. *Biomed Chromatogr,* **33(5)**.

ZIMMER Ł, CZARNECKI W (2010). Derivative spectrophotometric method for simultaneous determination of sulfadimidine and trimethoprim. *Annales Universitatis Mariae Curie-Sklodowska, Sectio DDD: Pharmacia,* **23(1):** 27-36.

ZINNER SH, MAYER KH. (2015). Sulfonamides and Trimethoprim. In: *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases* Ed.: Dolin, R. Blaser, M. J., Philadelphia: Saunders 8,410-418.e412.

ZONARAS V, ALEXIS M, KOUPPARIS M (2016). Development and validation of an LC–MS method for the simultaneous determination of sulfadiazine, trimethoprim, and N4-acetyl-sulfadiazine in muscle plus skin of cultured fish. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies,* **39(7):** 364-373.