

K.K.T.C.
YAKIN DOĞU ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PARASETAMOL TABLET PREPARATLARINDAN ETKİN
MADDESİNİN YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ
YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ

Kim. Cemile ADATAŞ

Analitik Kimya Programı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

LEFKOŞA

2011

K.K.T.C.
YAKIN DOĞU ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PARASETAMOL TABLET PREPARATLARINDAN ETKİN
MADDESİNİN YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ
YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ

Kim. Cemile ADATAŞ

Analitik Kimya Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Sedef KIR

LEFKOŞA
2011

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne:

Bu çalışma jürimiz tarafından Analitik Kimya Programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Hakkı ERDOĞAN
Hacettepe Üniversitesi



Danışman : Prof. Dr. Sedef KIR
Hacettepe Üniversitesi



Üye : Yrd. Doç. Dr. Banu KEŞANLI
Yakın Doğu Üniversitesi



ONAY:

Bu tez, Yakın Doğu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.



Prof. Dr. İhsan ÇALIŞ
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yazar, bu çalışmanın gerçekleşmesine katkılarından dolayı, aşağıda adı geçen kişi ve kurumlara içtenlikle teşekkür eder.

Tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Sedef KIR, tezin oluşumundan tamamlanmasına kadar geçen süreçte, değerli fikirleri ile tezi yönlendirmiş, tezimin tamamlanması için yardım ve yoğun destek vermiştir.

Assist. Prof. Dr. Hayati ÇELİK ve Uzm. Kimyager Mustafa ÇELEBİER, laboratuvar çalışmalarımda fedakarlık, yardım ve destek vermişlerdir.

Sayın Prof. Dr. Hakkı ERDOĞAN ve Yrd. Doç. Dr. Banu KEŞANLI, değerli zamanlarını ayırarak tezimin jürisine katılmışlar.

Nişanlım Mustafa YAŞLI, tezin içindekiler kısmının yapılmasına yardımcı olmuş, tezim süresince desteği olmuştur.

Tez çalışmalarım süresince aile bireylerim ve arkadaşlarıma sonsuz sevgi ve anlayışla destek olmuşlardır.

ÖZET

Adataş C., Parasetamol Tablet Preparatlarından Etkin Maddesinin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yöntemi İle Belirlenmesi, Yakın Doğu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Programı Yüksek Lisans Tezi, K.K.T.C., 2010.

Parasetamol (asetaminofen), ağrı kesici ve ateş düşürücü etkisi olan nonsteroidal bir ilaçtır. Parasetamolün tayini için % 40 MeOH + % 60 H₂O' da hareketli faz kullanılarak Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti'nde satılan sadece parasetamol içeren farmasötik preparatlardaki parasetamol miktar tayini için yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi geliştirilmiştir ve yöntemin geçerliliği kanıtlanmıştır. HPLC yönteminde; iç standart kafein ile birlikte Eclipse XDB-C₁₈, (5µ m, 4,6 x150 mm) analitik kolon kullanılmıştır. Maddeler metanol : su (40:60, h/h) karışımı hareketli faz ile 0.8 mL dak.⁻¹ akış hızında elue edilmiştir. Spektrofotometre dedektörü 250 nm dalga boyuna ayarlanmıştır. Seçilen kromatografik koşullarda parasetamolün alıkonma zamanı 2.4-2.6 dak.'dır. Geliştirilen yöntem, doğrusallık, aralık, özgünlük, doğruluk, kesinlik, duyarlılık, kararlılık, tekrarlanabilirlik, sağlamlık ve tutarlılık parametrelerine göre değerlendirilmiştir. Parasetamol için doğrusallık HPLC yönteminde 0.1- 40 µg mL⁻¹'dir. Gözlenebilme sınırı (LOD) 0.03 µg mL⁻¹, Alt tayin sınırı (LOQ) ise, 0.07 µg mL⁻¹'dir. Ayrıca HPLC yönteminin, kaynakta yer alan UV-spektrofotometri yöntemine göre daha güvenli olduğunu ve parasetamol preparatlarındaki analizlerinin güvenilirliğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Parasetamol, HPLC, UV- Spektrofotometrisi, tablet.

ABSTRACT

Adataş C., Identification of the Drug Active Substance in Paracetamol Tablet Preparates by High-Performance Liquid Chromatography Method, Near East University, Institute of Health Sciences, Analytical Chemistry Program, Master Thesis, T.R.N.C., 2011.

Paracetamol (acetaminophen) is a non-steroid drug that has pain killer and fever reliever indications. High-performance liquid chromatography (HPLC) method has been developed for the determination of quantity of paracetamol in pharmaceutical preparates sold in T.R.N.C. Caffeine was used as an internal standard and Eclipse XDB-C₁₈, (5µ m, 4,6x150 mm) was used as an analytic column. Methanol:water (40:60 v/v) solvent mixture was used as the mobile phase with 0.8 mL minute⁻¹ flow rate. Spectrophotometer detector was set to 250 nm for optimal detection. Under these chromatographic conditions, retention time of paracetamol was found to be 2.4-2.6 minutes. The validity of the HPLC method developed here has been also studied. The HPLC method developed in this study was evaluated for its linearity, originality, validity, certainty, sensitivity, stability, repeatability, robustness and consistency parameters. Linearity of paracetamol was 0.1- 40 µg mL⁻¹, limit of detection (LOD) was 0.03 µg mL⁻¹ and limit of quantitation (LOQ) was 0.07µg mL⁻¹. Besides it has been shown that the HPLC method discussed here for analysis of paracetamol preparates is more reliable than UV-vis spectrophotometer method reported in the literature.

Keywords: Paracetamol, HPLC, UV-spectrophotometer, validation.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Parasetamol	2
2.1.1. Parasetamolün Fiziksel Özellikleri	2
2.1.2. Parasetamol Sentez Yöntemleri	3
2.1.3. Parasetamolün Kimyasal Özellikleri	4
2.1.4. Farmakolojik Özellikleri	6
2.1.5. Analiz Yöntemleri	7
2.2. Kromatografi	15
2.2.1. Adsorbsiyon Kromatografisi	18
2.2.2. Dağılma Kromatografisi	18
2.2.3. İyon Çifti Kromatografisi	21
2.2.4. İyon Değişirme Kromatografisi	23
2.2.5. Eleme Kromatografisi	24
2.2.6. Afinite Kromatografisi	24
2.2.7. Kromatografide Temel Parametreler	24
2.2.8. Hareketli Faz Bileşiminin Ayırma Etkisi	33
2.2.9. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)	34
2.2.10. HPLC Cihazı Bölümleri	34
2.3. Spektrofotometri	39
2.3.1. Ultraviyole /Görünür Bölge Moleküler Absorpsiyon Spektrokopisi	43

2.3.2. Organik Bileşiklerin Absorpsiyonu	43
2.3.3. UV/GB Spektrofotometreleri	44
3. GEREÇ VE YÖNTEM	46
3.1. Tez Çalışmasında Kullanılan Gereçler	46
3.1.1. Cihazlar	46
3.1.2. Kimyasal Maddeler	46
3.1.3. Sarf Malzemeler	46
3.1.4. Analizi Yapılan Farmasötik Preparatlar	46
3.2. Deneyler İçin Gerekli Hazırlıklar	47
3.2.1. Etkin Maddelerin Saflığı	47
3.2.2. Çözeltilerin Hazırlanması	47
3.2.3. Farmasötik Preparatların Analize Hazırlanması	48
3.2.4. Spektrofotometri Yöntemiyle Farmasötik Preparatların Analizleri	48
3.2.5. HPLC ve Spektrofotometre Yöntemiyle Farmasötik Preparatların Karşılaştırılması	49
3.3. Analiz Yönteminin Geliştirilmesi	49
3.3.1. Kromatografik Koşulların Saptanması ve Optimizasyonu	49
3.3.2. Kalibrasyon Eğrilerinin Hazırlanması	50
3.3.3. Yöntemlerin Validasyonu Çalışmaları	50
3.3.4. Sistemin Uygunluk Testi	53
3.4. Farmasötik Preparatların Analizi	54
4. Bulgular	55
4.1. HPLC Yöntemi Optimizasyon Bulguları	55
4.1.1. Parasetamol Analizi için Dalga Boyu Taraması	55
4.1.2. Sabit Faz	55
4.1.3. Hareketli Fazın Belirlenmesi	56
4.1.4. Organik Çözücü Türü ve Miktarının Standart Parasetamol Ayırımına Etkisi	56
4.1.5. Hareketli Faz Akış Hızlarının Belirlenmesi	58
4.1.6. İç Standart Seçimi	64

4.1.7. Enjeksiyon Hacminin Belirlenmesi	65
4.2. HPLC Yönteminin Validasyon Bulguları	67
4.2.1. Doğrusallık ve Aralık	67
4.2.2. Özgünlük	70
4.2.3. Doğruluk ve Kesinlik	71
4.2.4. Duyarlılık	74
4.2.5. Analit Çözeltinin Kararlılığı	74
4.2.6. Tekrarlanabilirlik	75
4.2.7. Sağlamlık	76
4.2.8. Tutarlılık	77
4.2.9. Sistem Uygunluk Testleri	78
4.3. HPLC ile Farmasötik Preparatların Analiz Bulguları	78
4.4. HPLC Yöntemi ve UV-spektrofotometri Yöntemi ile Farmasötik Preparatların Analizlerinin Karşılaştırılması	85
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	89
KAYNAKLAR	94
EKLER	101

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Parasetamolün kristal görünüşü ve molekül yapısı	2
Şekil 2.2. Fenol ve nitrik asit reaksiyonu ile parasetamol sentezi	3
Şekil 2.3. Fenol ve asetik anhidrit reaksiyonu ile parasetamol sentezi	4
Şekil 2.4. Fenol ve diazonyum tuzunun reaksiyonu ile parasetamol sentezi	4
Şekil 2.5. Parasetamolün 4-aminofenole hidrolizi	5
Şekil 2.6. 4-Aminofenolün kinonimine dönüşümü	5
Şekil 2.7. Elüsyon kromatografisi ile A ve B bileşenlerinin ayrılma diyagramı	17
Şekil 2.8. Elüsyonun çeşitli basamaklarında dedektör sinyali	18
Şekil 2.9. Kapasite faktörünün hesaplanması	26
Şekil 2.10. Van Deemter eğrisi	29
Şekil 2.11. Ayrıcılığın seçicilikle ve kapasite faktörü ile değişimi	31
Şekil 2.12. Elüsyon izotermi ve pik şekilleri	32
Şekil 2.13. Pik asimetri oranının hesaplanması	33
Şekil 2.14. HPLC cihazı kısımlarının şematik gösterimi	35
Şekil 2.15. Çözelti üzerine düşürülen bir ışın demetinde oluşabilecek olaylar	41
Şekil 2.16. Tek (a) ve Çift (b) ışın yollu spektrofotometre	46
Şekil 4.1. Parasetamolün metanoldaki absorpsiyon spektrumu	55
Şekil 4.2. Hareketli faz metanol oranına göre alıkonma zamanının değişimi	57
Şekil 4.3. Hareketli faz metanol oranına göre pik asimetri oranının değişimi	57
Şekil 4.4. Hareketli faz metanol oranına göre teorik tabaka sayısının değişimi	57
Şekil 4.5. Hareketli faz metanol oranına göre eşdeğer teorik tabaka yüksekliğinin değişimi	57
Şekil 4.6. % 20 MEOH+% 80 H ₂ O hareketli faz akış hızı ile alıkonma zamanının değişimi	59
Şekil 4.7. % 20 MEOH+% 80 H ₂ O hareketli faz akış hızı ile pik asimetri oranının değişimi	59

Şekil 4.8.	% 20 MEOH+% 80 H ₂ O hareketli faz akış hızı ile teorik tabaka sayısının değişimi	59
Şekil 4.9.	% 20 MEOH+% 80 H ₂ O hareketli faz akış hızı ile eşdeğer teorik tabaka yüksekliğinin değişimi	59
Şekil 4.10.	% 30 MEOH+% 70 H ₂ O hareketli faz akış hızı ile alıkonma zamanının değişimi	60
Şekil 4.11.	% 30 MEOH+% 70 H ₂ O hareketli faz akış hızı ile pik asimetri oranının değişimi	60
Şekil 4.12.	% 30 MEOH+% 70 H ₂ O hareketli faz akış hızı ile teorik tabaka sayısının değişimi	61
Şekil 4.13.	% 30 MEOH+% 70 H ₂ O hareketli faz akış hızı ile eşdeğer teorik tabaka yüksekliğinin değişimi	61
Şekil 4.14.	% 40 MEOH+% 60 H ₂ O hareketli faz akış hızı ile alıkonma zamanının değişimi	62
Şekil 4.15.	% 40 MEOH+% 60 H ₂ O hareketli faz akış hızı ile pik asimetri oranının değişimi	62
Şekil 4.16.	% 40 MEOH+% 60 H ₂ O hareketli faz akış hızı ile teorik tabaka sayısının değişimi	62
Şekil 4.17.	% 40 MEOH+% 60 H ₂ O hareketli faz akış hızı ile eşdeğer teorik tabaka yüksekliğinin değişimi	62
Şekil 4.18.	% 80 MEOH+% 20 H ₂ O hareketli faz akış hızı ile alıkonma zamanının değişimi	63
Şekil 4.19.	% 80 MEOH+% 20 H ₂ O hareketli faz akış hızı ile pik asimetri oranının değişimi	63
Şekil 4.20.	% 80 MEOH+% 20 H ₂ O hareketli faz akış hızı ile teorik tabaka sayısının değişimi	64
Şekil 4.21.	% 80 MEOH+% 20 H ₂ O hareketli faz akış hızı ile eşdeğer teorik tabaka yüksekliğinin değişimi	64

Şekil 4.22.	Parasetamolün HPLC ile analizine ait kromatogra	66
Şekil 4.23.	Parasetamol için HPLC yöntemi kalibrasyon eğrisi (n=15)	67
Şekil 4.24.	Parasetamolün HPLC yöntemi ile çalışma aralığında elde edilen kalibrasyon eğrisi	68
Şekil 4.25.	Geliştirilen yöntemin doğrusallığın kontrol grafiği	69
Şekil 4.26.	10 µg mL ⁻¹ parasetamol standart çözeltisinin HPLC yöntemi ile analizine ait kromatogram	70
Şekil 4.27.	Aspar [®] tablet çözeltisinin HPLC yöntemi ile analizine ait kromatogram	71

TABLOLAR DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2.1. Normal faz ve ters faz sıvı kromatografisi karşılaştırılması	20
Tablo 2.2. Zıt faz karşı iyon tipleri ve uygulamaları	22
Tablo 2.3. Ayrılan madde tipine göre hareketli faz pH seçimi	23
Tablo 3.1. Sistem uygunluk test kriterleri	53
Tablo 4.1. Metanol yüzdesinin kromatografik parametrelere etkisi	56
Tablo 4.2. % 20 MEOH+% 80 H ₂ O içeren hareketli fazda farklı akış hızındaki kromatografik bulgular	58
Tablo 4.3. % 30 MEOH+% 70 H ₂ O içeren hareketli fazda farklı akış hızlarındaki kromatografik bulgular	60
Tablo 4.4. % 40 MEOH+% 60 H ₂ O içeren hareketli fazda farklı akış hızlarındaki kromatografik bulgular	61
Tablo 4.5. % 80 MEOH+% 20 H ₂ O içeren hareketli fazda farklı akış hızlarındaki kromatografik bulgular	63
Tablo 4.6. Eklenen iç standart miktarının kromatografik parametreler üzerine etkisi	65
Tablo 4.7. Parasetamolün HPLC sistemi ile analizinde belirlenen kromatografik koşullar	66
Tablo 4.8. Çalışma aralığındaki derişimlerde sistem uygunluk test değerleri	68
Tablo 4.9. Parasetamolün HPLC ile analizinden elde edilen kalibrasyon eğrisinin doğrusallıktan ayrılış ve korelasyon katsayısının önem kontrolü	69
Tablo 4.10. HPLC ile parasetamolün gün içi analiz kesinlik ve doğruluk bulguları	72
Tablo 4.11. HPLC ile parasetamolün günler arası analiz kesinlik ve doğruluk bulguları	73
Tablo 4.12. Stok parasetamol çözeltinin kararlılığı	74
Tablo 4.13. Parasetamol analizinde sistem tekrarlanabilirlik bulguları	75
Tablo 4.14. HPLC yöntemine ait sağlamlık bulguları	76
Tablo 4.15. HPLC yöntemine ait tutarlılık bulguları	77

Tablo 4.16.	Parasetamol için elde edilen sistem uygunluk parametreleri	78
Tablo 4.17.	Bristol® tablet analiz bulguları	79
Tablo 4.18.	Aspar® tablet analiz bulguları	80
Tablo 4.19.	Panadol® tablet analiz bulguları	81
Tablo 4.20.	Pirofen® tablet analiz bulguları	82
Tablo 4.21.	Pharmadol® tablet analiz bulguları	83
Tablo 4.22.	Parol® tablet analiz bulguları	84
Tablo 4.23.	Bristol® tablet analiz bulgularının UV- spektrofotometrisi yöntemi bulguları ile karşılaştırılması	85
Tablo 4.24.	Aspar® tablet analiz bulgularının UV- spektrofotometrisi yöntemi bulguları ile karşılaştırılması	86
Tablo 4.25.	Panadol® tablet analiz bulgularının UV- spektrofotometrisi yöntemi bulguları ile karşılaştırılması	86
Tablo 4.26.	Pirofen® tablet analiz bulgularının UV- spektrofotometrisi yöntemi bulguları ile karşılaştırılması	87
Tablo 4.27.	Pharmadol® tablet analiz bulgularının UV- spektrofotometrisi yöntemi bulguları ile karşılaştırılması	87
Tablo 4.28.	Parol® tablet analiz bulgularının UV- spektrofotometrisi yöntemi bulguları ile karşılaştırılması	88

EKLER

Ek 1. Korelasyon Katsayısı ve Doğrusallıktan Ayrılış Önem Kontrolü	101
Ek 2. İstatistiksel Katsayıların Hesaplanması	105
Ek 3. t-testi	107
Ek 4. Wilcoxon Eşleştirilmiş İki Örnek Testi	108
Ek 5. Kruksal Wallis Varyans Analizi	109

1.GİRİŞ

Parasetamol (N-asetil-p-aminofenol veya p-asetaminofenol) non-steroidal anti-inflamatuar bir ilaçtır. Ağrı eşiğini yükseltmek yoluyla analjezik, hipotalamustaki termoregülasyon merkezi üzerindeki etkisi yolu ile de antipiretik bir etki gösterir. Yaygın bir şekilde ağrı kesici ve ateş düşürücü olarak kullanılır (*Beaver ve Million, 1980; Mehlish, 2002*). Parasetamol uygun olmayan saklama koşullarında 4-aminofenol ve asetik asite dönüşmektedir (*Mohamed ve diğerleri, 1997*).

Parasetamol ağızdan alındığında tamamen ve hızla mide ve bağırsaklarda emilir. İlaç alındıktan 30-60 dak sonra maksimum plazma konsantrasyonuna ulaşır. Parasetamol bütün dokulara hızla dağılır ve % 90 oranında karaciğerde metabolize olur. Plazma proteinlerine bağlanması zayıftır. Plazma yarı ömrü 2.4 saattir. Parasetamolün çok az bir miktarı, % 5'i hiç değişmeden böbrekler vasıtası ile vücuttan atılmaktadır (*HSDB-Hazardous, 2001*). Parasetamolün farmakolojik olarak etkisiz ana metabolitleri glukoronid (% 55) ve sülfat (% 35) konjugatlarıdır (*Stadapharm GMBH, 2000*).

Günümüze kadar, parasetamolün nicel analizi için titrimetrik (*Jedrzejewsk, 1969*), spektrofotometrik (*Milch ve Szabo, 1991*), spektrofotometrik (*Bloomfield, 2002; Milch ve Szabo, 1991; Mohamed ve diğerleri, 1997*), yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) (*European pharmacopeia, 2005; Sena ve diğerleri, 1979*) gibi yöntemler kullanılmıştır. Bunlar arasında, kromatografik yöntemler etkin ve çabuk olması, güvenilir sonuç alınması ve özgünlük açısından oldukça önem kazanmıştır.

Bu tez kapsamında, parasetamolün miktar tayini için metanol içeren hareketli faz kullanılarak yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi geliştirilmesi, yöntemin geçerliliğinin kanıtlanması ve Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti'nde satılan 500 mg parasetamol içeren farmasötik preparatların analizlerinin yapılması amaçlanmıştır.

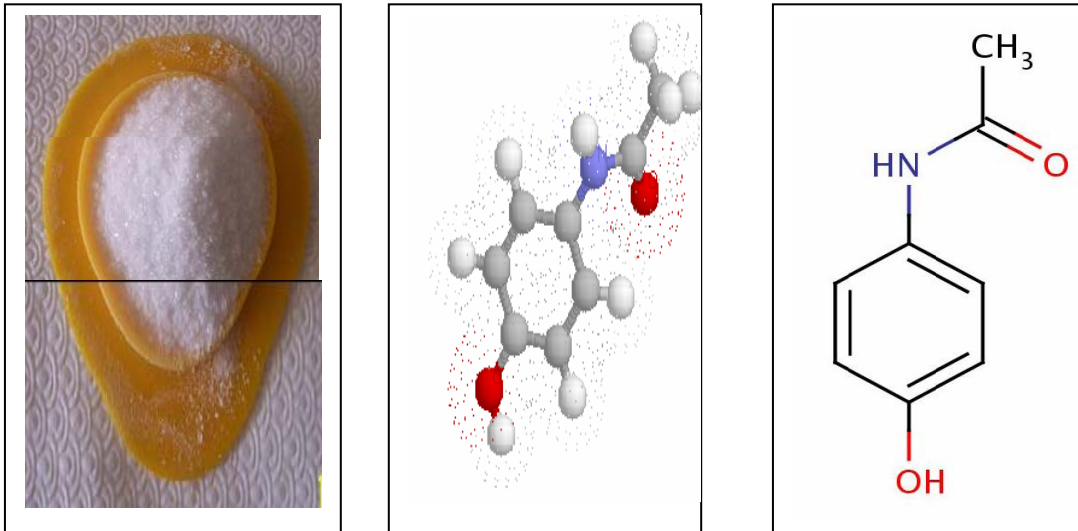
2. GENEL BİLGİLER

2.1.Parasetamol (Asetaminofen)

Asetanilidin analjezik etkisinin 1886 yılında tesadüfen bulunması dikkatleri p-aminofenol türevleri üzerine çekmiştir. Takip eden yıllarda asetanilidin toksisite göstermesi ve organizmada etkiden sorumlu N-asetil-p-aminofenole dönüşmesiyle bu grup üzerinde çok sayıda çalışmalar yapılmış ve bu çalışmalar sonucu toksik olmayan p-asetamidofenol yapısında bileşik geliştirilmiştir.

2.1.1 Parasetamolün Fiziksel Özellikleri

Parasetamol (Şekil 2.1), kapalı formülü $C_8H_9NO_2$ (MA:151 g/mol) olan N-(4-hidroksifenil)-asetamit veya 4-hidroksiasetanilit yapısında beyaz, kristal, acı tatta bir maddedir. Parasetamolün erime noktası $169-170^{\circ}C$ 'dir (Budari, 1996). Parasetamol, zayıf bir asittir. Doymuş sulu çözeltisinin pH'sı 5.5- 6.5 ($25^{\circ}C$) arasında değişir (Fairbrother, 1974). Parasetamolün pKa değeri ise 9.5'dir (Perez-Ruiz ve diğerleri, 2005).



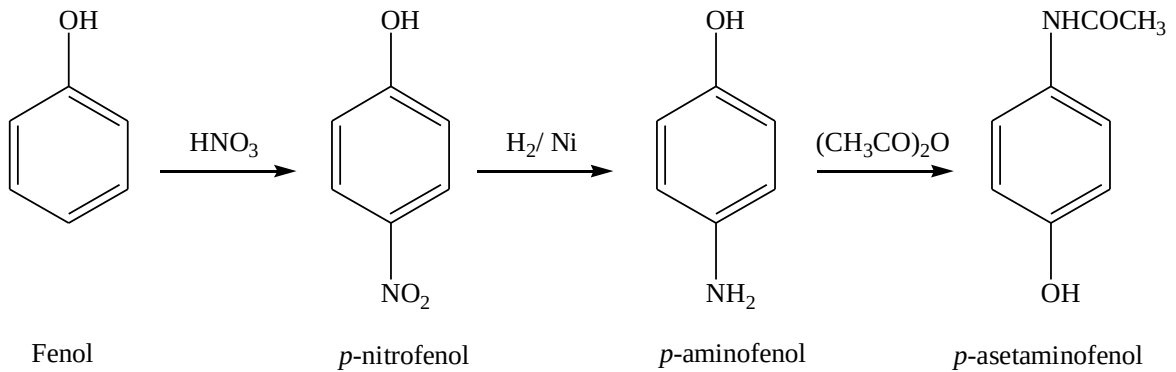
Şekil.2.1. Parasetamolün kristal görünüşü ve molekül yapısı

Parasetamolün, ultraviyole spektrumu, su, asidik su, metanol, asidik metanol ve sodyum metoksit içeren metanolde alınmıştır (*El-Obeid ve Al-Badr*, 1985). Sulu ortamda spektrumda 242 nm dalga boyunda bir ana pik ve 280 nm dalga boyunda bir minor pik gözlenmiştir. Ortama asit eklenmesi, her iki pikte değişikliğe neden olmamıştır. Metanollu ortamda ise, 243 nm dalga boyunda ana pik gösterir ve bu pikin konumu ortama asit eklenmesiyle etkilenmez. Ancak ortama, sodyum metoksit eklenmesi, 243 nm'den 262 nm dalga boyuna batokromik bir kaymaya neden olmaktadır. Bu kırmızıya kayma parasetamolün p-asetamidofenolat iyonlarına iyonize olmasıyla açıklanmaktadır.

Parasetamol, sıcak su, sodyum hidroksit çözeltisi, metanol, etanol, dimetilformamit, etilen diklorür, aseton ve etil asetatla çözünür; eter, petrol eteri, pentan ve benzende ise çözünmez (*El-Obeid ve Al-Badr*, 1985).

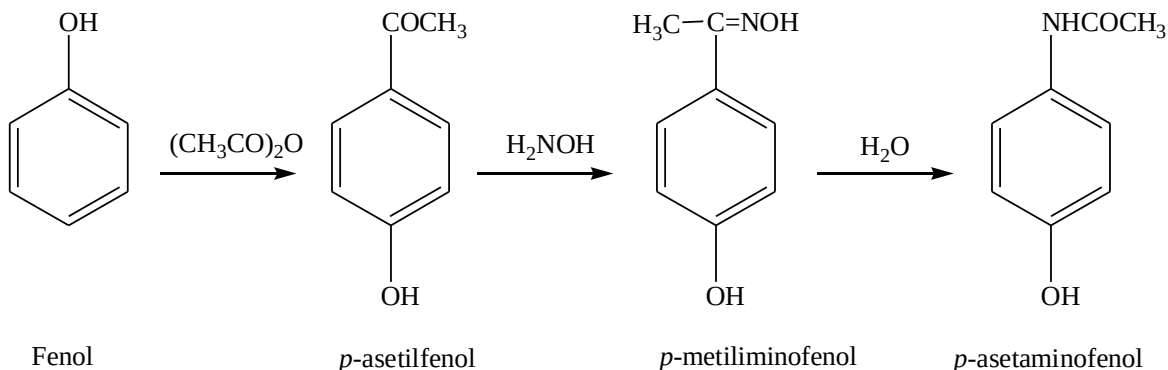
2.1.2 Parasetamol Sentezi

Parasetamol yaygın bir kullanıma sahip olması sebebiyle büyük miktarda üretilmekte ve sentezinde çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Parasetamolün ticari üretimi için sıklıkla fenolden hareket edilmektedir. Fenolün nitrolanması sonucu oluşan o-nitrofenol ve p-nitrofenol karışımı, distilasyonla izomerlerine ayrılır. Kazanılan p-nitrofenol izomeri indirgenerek p-aminofenol oluşur ve bu bileşiğin asetillenmesiyle parasetamole ulaşılmaktadır (Şekil 2.2) (*Korolkovas*, 1988).



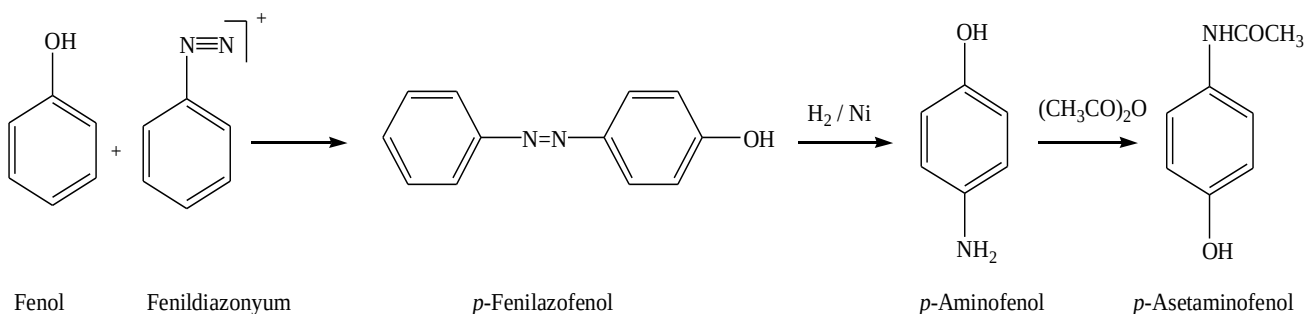
Şekil 2.2. Fenolden hareket ile parasetamol sentezi

Diğer bir yöntemde, fenol ve asetik anhidrit reaksiyonu ile oluşan *p*-asetilfenol önce hidroksilaminle oksim türevine dönüştürülür. Oksim türevinin tiyonül klorür ve potasyum iyodürle reaksiyonu sonucu parasetamol meydana gelmektedir (Şekil 2.3) (Tüzün, 1975).



Şekil 2.3. Fenol ve asetik anhidrit reaksiyonu ile parasetamol sentezi

Parasetamol sentezinde başka bir yöntem ise fenol ve diazonyum tuzunun reaksiyonuna dayanmaktadır (Şekil 2.4) (Akgün ve diğerleri, 2004).

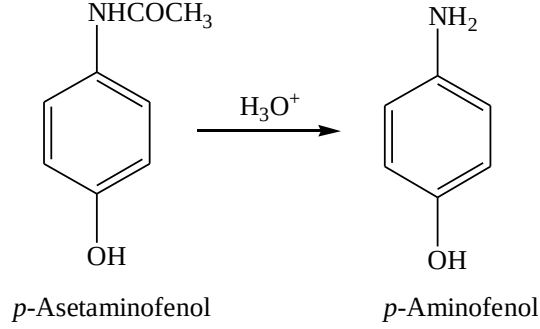


Şekil 2.4. Fenol ve diazonyum tuzunun reaksiyonu ile parasetamol sentezi

2.1.3. Parasetamolün Kimyasal Özellikleri

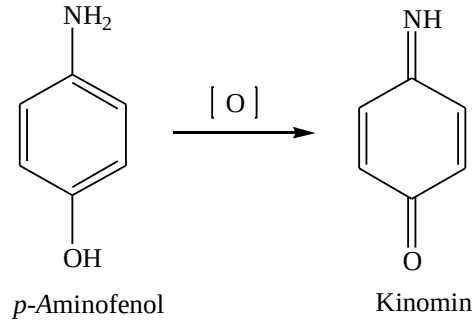
Kuru ve saf parasetamol, 45°C 'ye kadar kararlıdır. Parasetamol sentezinde; sentez başlangıç maddeleri, reaktifler ve çözücülerin kalitesi, reaksiyon koşulları, saflaştırma işlemi ve uygun olmayan saklama koşulları (sıcaklık, pH v.b.) gibi faktörler nedeniyle çeşitli safsızlıklar ortaya çıkar. Bu safsızlıklardan en önemlisi 4-aminofenoldür. 4-aminofenol, parasetamol sentezi sırasında hareket maddesi olarak kullanılır. (Bkz. Bölüm 2.1.2). Ayrıca

parasetamol nemli koşullarda saklandığı takdirde 4-aminofenole hidroliz olur. (Şekil 2.5). Parasetamolün 4-aminofenol hidrolizi hem asit hem baz katalizli ortamda gerçekleşmektedir (Fairbrother, 1974; Criado ve diğerleri, 2000).



Şekil 2.5. Parasetamolün 4-aminofenole hidrolizi

Parasetamolün oksidasyonunda, bileşiğin oksidasyonunun yanı sıra safsızlık olarak bilinen 4-aminofenolün kinomin ve diğer bileşiklere dönüştüğü bildirilmiştir (Şekil 2.6) (El-Obeid ve Al-Badr, 1985). Bu olay, renk değişimiyle gözlenebilmektedir. Yapılan çalışmalar sonucu, 4-aminofenolün teratojenik ve nörotoksik etki gösterdiği bildirilmiştir (Medina ve diğerleri, 1999).



Şekil 2.6. 4-Aminofenolün kinomine dönüşümü

2.1.4. Farmakolojik Özellikleri

Parasetamol benzeri diğer analjezik ilaçlardan farklı olarak hipotalamus ve omurilik gibi peroksidlerden az olan ortamda prostaglandin sentezini inhibe edebilir ve etkisi erken başlar; plazma düzeyi 30-60 dak içinde maksimuma erişir. Absorpsiyonu besinler tarafından azaltılır. İlk dozdan sonra analjezik etkisi 3-4 saat kadar devam eder. Parasetamolün büyük kısmı karaciğerde glukuronik asitle ve sülfatla konjüge edilir ve böbreklerden bu şekilde itrah edilir. Mutad dozda eliminasyon yarılanma ömrü 2.4 saattir, non-lineer eliminasyon kinetiği göstermesi nedeniyle aşırı dozda 7.3 saate kadar çıkabilir (*Kayaalp, 1995*).

Parasetamolün solunum, kardiyovasküler sistem ve asit-baz dengesi üzerinde belirgin bir etkisi yoktur. Midede irritasyon yapmaz. Protrombin sentezini pek etkilemez. Plazma proteinlerine fazla bağlanmaz. Aspirinin aksine oral antikoagülanlarla belirgin bir etkileşme göstermez. Aspirinden farklı olarak ürik asit itrahını etkilemez ve ürikozürik ilaçların etkinliğini azaltmaz.

Parasetamolü sıvı farmasötik şekiller içinde vermek mümkündür. Bundan dolayı, parasetamol özellikle bebek ve çocuklar için hazırlanan eliksir, süspansiyon vb. şekillerdeki sıvı analjezik etkili müstahzarların yapımında kullanılır.

Parasetamol oral yoldan 500-1000 mg dozda verilir. Gerekirse bu doz 4-6 saatte bir tekrarlanır. Günlük maksimum dozu genellikle 4 g olarak kabul edilir. Bazı kaynaklarda 3 g hatta 2.6 g olarak belirtilmiştir. Böbrek yetmezliği olanlarda ve alkoliklerde bu doz azaltılmalıdır. Yukarıda belirtilen dozda 5-10 günden fazla kullanılması tavsiye edilmez. Çocuklarda, hepatoksisite potansiyeli daha düşük olduğu için kg başına verilen doz daha yüksektir; bir defada 10 mg kg⁻¹ dozunda verilir (*Kayaalp, 1995*).

6-12 yaşlar arasında bir defalık dozun 20-30 mg kg⁻¹'a çıkartılabileceği bildirilmiştir. Parasetamol, yemek sırasında veya yemekten sonra alınırsa, biyoyararlanımı belirgin şekilde azalır; onun için aç karnına alınması tercih edilir. Parasetamol oral dozuna eşit dozlarda rektal yoldan da verilebilir.

2.1.5. Analiz yöntemleri

Ramos ve arkadaşları, parasetamolün tayini için yeni bir akış enjeksiyonlu/ Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (FI/FTIR) yöntemi önermişlerdir. Önerilen yöntem, analitin p-aminofenol oluşturmak üzere alkali hidrolizine ve p-aminofenolün de p-benzokinon-monoimin oluşturmak üzere potasyum ferrisiyanür ile oksidasyon reaksiyonuna ve sonunda p-benzokinon formuna oksidasyonu temeline dayanır. Reaksiyonun kimyası, spektrumun hem görünür hem de IR bölgesinde çalışılmış ve yöntem akış enjeksiyon uygulamasıyla geliştirilmiştir. Reaksiyon oda sıcaklığında sulu ortamda gerçekleşmiştir. Sulu çözeltilere uygun CIRCLE® IR aksesuarının mikro-akış versiyonu kullanılmıştır. Ölçümler fenolik OH deformasyon (1274.1 cm⁻¹) ve hidroliz ürünü p-aminofenolün aromatik halka (1498.2 cm⁻¹) titreşimleri kullanılarak yapılmıştır. Yöntem ticari tabletlerdeki parasetamol tayininde kullanılmıştır (*Ramos ve diğerleri*, 1998).

Nagaraja ve arkadaşları, alkali ortamda parasetamol ve fenasetinin sodyum 1,2 naftakinon -4-sulfonat ve setiltrimetilamonyum bromür ile hidroliz ürünlerinin tayininde hızlı, duyarlı ve basit bir spektrofotometrik yöntem önermektedir. Parasetamol ve fenasetin için sırasıyla 570 ve 500 nm'de absorbans ölçümü yapılmış ve molar absorbtiviteyi 1.118x10⁴ ve 4.54x10³ L mol⁻¹ cm⁻¹ olarak bulunmuştur. Renkli türler parasetamol için 1-20 µg mL⁻¹ ve fenasetin için 2-24 µg mL⁻¹ konsantrasyon aralığında Beer yasasına uymuşlardır. Setiltrimetilamonyum bromür ilavesi ile duyarlılık artırılmıştır. Yöntem parasetamol ve fenasetinin çeşitli farmasötik preparatlarda ve laboratuvar yapımı tabletlerde tayini için kullanılmış ve istatistiksel olarak elde edilen sonuçlar resmi yöntem sonuçlarıyla karşılaştırılmıştır (*Nagaraja ve diğerleri*, 1998).

Medina ve arkadaşları salisilamid ve parasetamolün katı faz UV spektrofotometre ile tayini için sürekli ve çok parametrelili bir sensör tanımlamışlardır. Bu bileşenleri içeren numune, anyonik değiştirici dolgulu bir sisteme enjekte edilmiş ve 300 nm’de sürekli absorbans ölçümü yapılmıştır. 300 nm’deki kalibrasyon grafikleri parasetamol için 2.5-40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ aralığında, salisilamid için ise 5-80 $\mu\text{g mL}^{-1}$ aralığında birbirlerinin varlığında doğrusaldır; RSD değerleri parasetamol için % 0.60 ve salisilamid için % 0.36 ve örnekleme hızı 36 saat⁻¹’dir. Salisilamid ve parasetamolün 1:5 ve 5:1 oranlarındaki karışımları oldukça iyi derecede ayrılmışlardır. Önerilen bu yöntem, bir ayırma basamağı gerektirmemektedir ve bu bileşenlerin farmasötik preparatlardan tayininde kullanılmıştır (*Medina ve diğerleri*, 1999).

Shervington ve Sakhnini, parasetamol ve p- süstitüe türevlerinin tablet dozaj formlarında miktar tayini için bir yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi geliştirmişlerdir. Kolon, 10 μm oktadesilsilan sabit fazından oluşmaktadır. Mobil faz, asetonitril ve su (7:3) karışımıdır. Parasetamol, O-asetilasetaminofen, O-etilasitaminofen, O-(2-nitrobenzenosülfonil) asetaminofen, O-benzilase-taminofen ve O-(3,5dinitrobenzoil) asetaminofen için alıkonma zamanları sırasıyla 2.83; 3.25; 3.56; 3.78; 4.37 ve 6.03 dak olarak bulunmuştur (*Shervington ve Sakhnini*, 2000).

Canada ve arkadaşları, parasetamol tayini için, UV optik duyarlı bir sistem geliştirmişlerdir. Sistem parasetamolün uygun bir aktif katı destek doldurulmuş (anyon değiştirici reçine) akış hücresindeki alıkonma konsantrasyonuna bağlı olarak katı faz üzerinde 264 nm’deki doğal absorbansının sürekli izlenmesine dayanmaktadır. Numune, basit bir tek kanallı FIA (akış enjeksiyon) manifoldu kullanılarak pH 11’de 0.08 M sodyum klorür akışına enjekte edilmiştir. Analitik sinyal oluştuğunda parasetamol katı destek üzerinden taşıyıcı çözelti yardımıyla kendiliğinden desorbe olmuştur. 0.5-8.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ konsantrasyon aralığında ve 40 saat⁻¹ örnekleme hızı ile doğrusal bir cevap alınmıştır. Mevcut akış enjeksiyon sistemleri ile karşılaştırıldığında duyarlılıkta ve seçicilikte dikkate değer bir iyileşme elde edilmiştir. Önerilen yöntemin farmasötik tabletler içindeki parasetamol tayininde de başarıyla uygulandığı belirtilmiştir (*Canada ve diğerleri*, 2000).

Monser ve Darghouth, parasetamol ve bozunma ürünleri 4-aminofenol ve 4-klorasetanilitin eşzamanlı tayinine olanak sağlayan, basit, hızlı ve kullanışlı bir yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi geliştirmişlerdir. Kromatografik ayırım poroz grafit karbon kolonda (PGC), asetonitril/0.05 M potasyum fosfat tamponu (pH 5.5) 80/20 (h/h) isokratik karışımı kullanılarak 244 nm’de UV dedeksiyonu ile yapılmıştır. 1-50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ parasetamol ve 5-40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 4-aminofenol ve 4-klorasetanilit konsantrasyon aralıklarında hazırlanan kalibrasyon doğrularının korelasyon katsayıları 0.99’dan büyüktür. LOD değerleri, parasetamol için 0.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 4-aminofenol ve 4-klorasetanilit için ise 0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ’dir. Önerilen sıvı kromatografik yöntem, ticari olarak kullanılan parasetamol dozaj formlarının analizlerinde % 98-103 geri kazanımla başarıyla uygulanmıştır (Monser ve Darghouth, 2002).

British Pharmacopeia 2004, parasetamol miktar tayini için bir yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemini önermiştir. Yöntemde, kolon C_{18} (4.6 mm x 25 cm, 5 μm), hareketli faz 17.9 g L^{-1} disodyum hidrojen fosfat, 7.8 g L^{-1} sodyum dihidrojen fosfat, 4.6 g L^{-1} tetrabütülamonyum hidroksit içeren metanol (375:375:250), akış hızı 1.5 mL dak^{-1} , dedektör 245 nm ve enjeksiyon hacmi 20 μL ’dir (BP, 2004).

Oliva ve arkadaşları, parasetamolün tabletlerdeki tayini için seçici bir spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir. Bu teknik, geçerli resmi yöntemlerden duyarlılık, basitlik, hız ve daha düşük maliyet açısından üstündür. Kullanılan yöntem sülfürik asit katalizörlüğünde, parasetamol ile etil asetoasetat arasındaki reaksiyon ile kumarinik bileşen oluşumuna dayanır. 446 nm’de uyarılan reaksiyon ürünü 478 nm’de yüksek floresans özellik gösterir. Çalışmada doğrusal konsantrasyon aralığı 0.1-0.4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ve LOD 57 ng mL^{-1} ’dir (Oliva ve diğerleri, 2005).

Katı formdaki parasetamolün doğal floresansı, farmasötik preparatlardaki parasetamolün direkt analizleri için hızlı, güçlü ve basit yöntemlerin geliştirilmesine olanak vermektedir. Moeira ve arkadaşlarının önerdikleri yöntem her türlü spektrofotometreye kolayca uygulanabilmekte ve kimyasal bir ön işlem gerektirmemektedir. Floresans ölçümleri

($\lambda_{ex}=333$ nm; $\lambda_{em}=382$ nm), laktoz, nişasta, poli(vinilpirolidon), pudra ve stearik asit ile seyreltilmiş toz örneklerden direkt olarak alınabilmektedir. Farmasötik preparatlardaki parasetamol haricindeki diğer bileşenlerin etkileri tartışılmıştır. Floresans şiddeti, 100-400 mg g⁻¹ parasetamol konsantrasyon aralığında doğrusaldır. Ölçüm hızı, 200 saat⁻¹'tir. Farklı konsantrasyonlardaki örneklerin analizlerinden LOD 13.0 ve LOQ 43.1 – 55.7 mg g⁻¹ aralıklarında bulunmuştur. Önerilen yöntem farmasötik preparatlara uygulanmış ve RSD (n=20) % 2.7'den küçük bulunmuştur (*Moreira ve diğerleri*, 2005).

Zhao ve arkadaşları, parasetamolün indirekt tayini için, luminol-potasyum hekzasiyanoferrat (III) ($K_3[Fe(CN)_6]$) kemilüminesans reaksiyonuna parasetamolün inhibe edici etkisine dayalı bir kapiler elektroforez-kemilüminesans tayin yöntemi önermişlerdir. Kemilüminesans sinyalinin bastırılması, parasetamol konsantrasyonu ile orantılı olmaktadır. Maksimum kemilüminesans sinyali, 0.5 mM luminol içeren 30 mM sodyum borat tamponu (pH=9.4) ve okside edici çözelti olarak 0.8 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ içeren 100 mM sodyum hidroksit çözeltisi kullanılarak elde edilmiştir. Optimum koşullar altında, doğrusal aralık 6.6×10^{-10} – 6.6×10^{-8} M ($r=0.9999$) ve LOQ 5.6×10^{-10} M (S/N=3) parasetamol olarak elde edilmiştir. Yöntem farmasötik preparatlarda ve biyolojik numunelerde parasetamol tayinine başarıyla uygulanmıştır (*Zhao ve diğerleri*, 2006).

Hanaee, parasetamol ve kodeinin eşzamanlı tayini için birinci türev UV spektrofotometresi, yöntemi kullanmıştır. Parasetamol, 263.4 nm'deki birinci türev absorbans değeri kullanılmıştır. Önerilen yöntemle kodein ve parasetamolün konsantrasyonları birbirlerine girişim etkileri olmadan hesaplanabilmektedir. İşlem basit ve hızlıdır, doğru ve kesin sonuçlar sunmaktadır (*Hanaee*, 1997).

Dinç, tablet formülasyonlarda kafein ve parasetamolün eş zamanlı analizleri için spektrofotometrik yöntemler önermiştir. Oransal türev spektrofotometrisi yöntemi kafein için 267.9 ve 291.0 nm ve parasetamol için birinci türev spektrumlarında 237.0 ve 251.8 nm'de ölçülen analitik sinyallerinin oranlarına dayanmaktadır. Kalibrasyon grafiği kafein için 4-40 µg mL⁻¹ ve parasetamol için 8-48 µg mL⁻¹ konsantrasyon aralığında hazırlanmıştır. Vierordt

yönteminde ise parasetamol ve kafeinin A_1^1 (% 1.1 cm) değerleri sıfırıncı derece spektrumlarında 242.9 ve 273.0 nm’lerde tayin edilmiştir. A_1^1 (% 1.1 cm) değerleri için bir matriks yazılmış ve her iki etken maddenin miktarları Matlab yazılımı yardımıyla hesaplanmıştır. Bu spektrofotometrik yöntemlerle elde edilen sonuçlar, yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi sonuçlarıyla karşılaştırılmıştır (*Dinç, 1999*).

Franeta ve arkadaşları, asetilsalisilik asit, parasetamol, kafein ve fenobarbitalin tabletlerde aynı anda tayini için yüksek performanslı sıvı kromatografisi sistemi ile tayin önermişlerdir. Ayırım, Bio Sil HL C₁₈, 5 µm, 250x4.6 mm kolon ile yapılmıştır. Asetonitril-su (25:75 h/h) karışımının pH’sı fosforik asit ile 2.5’e ayarlanarak hareketli faz olarak 2.0 mL dak⁻¹ akış hızında kullanılmış ve 207 nm’de UV dedeksiyon yapılmıştır. Alıkonma zamanı, kapasite faktörü, pik asimetrisi, seçicilik faktörü ve ayırıcılık (rezolüsyon) gibi kromatografik parametreler tayin edilmiştir. parasetamol için validasyon parametreleri; doğrusallık ($r > 0.998$), gün içi kesinlik (RSD: % 0.36-1.89), günler arası kesinlik (RSD: % 0.58-2.18), duyarlılık (LOD: 9×10^{-5} - 1.7×10^{-4} mg mL⁻¹ ve LOQ: 2.5×10^{-4} - 5.6×10^{-4} mg mL⁻¹), doğruluk (geri kazanım: % 98.35-99.14) ve tekraredilebilirlik (geri kazanım) değerleri: % 99.93-102.11 olarak elde edilmiştir. Önerilen yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi asetilsalisilik asit, parasetamol, kafein ve fenobarbitalin farmasötik tabletlerde tayini için uygulanmıştır (*Franeta ve diğerleri, 2002*).

United States Pharmacopeia XXVI, parasetamol miktar tayini için bir yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemini önermiştir. Yöntemde, kolon C₁₈ (3.9 mm x 30 cm), mobil faz distile su: metanol (3:1), akış hızı 1.5 mL dak⁻¹, dedektör 243 nm ve enjeksiyon hacmi 10 µL’dir (*USP, 2003*).

United States Pharmacopeia XXVI, parasetamol-kafein karışımı için yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntem önermiştir. Yöntemde, kolon C₁₈ (4.6 mm x 10 cm), mobil faz distile su: metanol: glasiyel asetik asit (69:28:3), akış hızı 2 mL dak⁻¹, dedektör 275 nm ve enjeksiyon hacmi 10 µL’dir (*USP, 2003*).

United States Pharmacopeia XXVI, parasetamol-kodein karışımı için yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemini önermiştir. Yöntemde, kolon C₁₈ (4.6 mm x 25 cm), mobil faz pH 2.35 fosfat tamponu: metanol (92:8), akış hızı 1.5 mL dak⁻¹, dedektör 214 nm ve enjeksiyon hacmi 10 µL'dir (USP, 2003).

Sena ve Poppi, farmasötik formülasyonlardaki asetilsalisilik asit, parasetamol ve kafein tayini için çoklu kalibrasyon ve UV spektrofotometrik ölçümlere 230-300 nm dayalı basit ve hızlı bir analitik yöntem önermişlerdir. Salisilik asit ve parasetamol için 10.0-15.0 µg mL⁻¹ ve kafein için 2.0-6.0 µg mL⁻¹ konsantrasyon aralığında dokuz farklı konsantrasyonda kalibrasyon eğrisi hazırlanmıştır. İşlem dört farklı pH değerinde (2.0, 3.0, 4.0 ve 5.0) tekrar edilmiştir. Her bir pH değeri için PLS modeli oluşturulmuş ve sentetik karışım setinin tayininde kullanılmıştır. En iyi model pH 5.0'te elde edilmiştir. Ticari tabletler içindeki bu etken maddelerin tayininde elde edilen sonuçlar üretici tarafından belirtilen değerlere uyumludur ve geri kazanım değerleri % 94.7 ve % 104.5 arasındadır (Sena ve Poppi, 2004).

Azhagvuel ve Sekar, tabletlerde, setirizin dihidroklorür, parasetamol ve fenilpropanolamin hidroklorürün ayırımı ve miktar tayini için basit, seçici ve ekonomik bir kapiler zone elektroforez yöntemi önermişlerdir. Analitlerin ayırımı için 10 mM sodyum tetraborat (pH 9.0) çözeltisi elektrolit çözelti olarak uygun bulunmuştur. Ayırım için 76 cm uzunluğunda (etkin uzunluk 64.5 cm) erimiş silika kapiler kullanılmıştır. Analitler, 20 kV (akım 21 µA) voltaj uygulanmasıyla 10 dak içinde tamamen ayrılmışlar ve dedeksiyon 195 nm' de UV dedektör ile yapılmıştır. Analitlerin miktar tayininde iç standart olarak ibuprofen kullanılmıştır. Setirizin dihidroklorür, parasetamol ve fenilpropanolamin hidroklorür için doğrusallık sırasıyla 2-50 µg mL⁻¹ ($r^2 = 0.9982$), 10-1000 µg mL⁻¹ ($r^2 = 0.9978$) ve 10-100 µg mL⁻¹ ($r^2 = 0.9986$) konsantrasyon aralıklarında sağlanmıştır. Önerilen yöntem, analitleri içeren tablet halindeki preparatlara uygulanmış ve geri kazanım değerleri > % 98.60 bulunmuştur. Setirizin dihidroklorür, parasetamol ve fenilpropanolamin hidroklorür için LOQ değerleri sırasıyla 2.0, 2.0 ve 4.0 µg mL⁻¹ olarak bulunmuştur. Farmasötik tabletlerde katkı maddelerinden gelebilecek bir girişime rastlanmamıştır. Önerilen yöntem, bu analitleri içeren tablet dozaj formundaki preparatlar için basit ve uygulanabilir (Azhagvuel ve Sekar, 2007).

Felix ve arkadaşları, parasetamolün farmasötik formülasyonlarda miktar tayini için karbon film resistör elektrot kullanarak amperometrik dedeksiyonlu bir akışa enjeksiyon analiz yöntemi geliştirmişlerdir. Bu sensor, yüzeyinde kimyasal bir modifikasyona gerek kalmadan, parasetamol için keskin ve tekrarlanabilir akım pikleri oluşumu sağlamıştır. Çalışmada fosfat tamponu kullanılarak geniş bir doğrusal çalışma aralığında (8.0×10^{-7} – 5.0×10^{-4} mol L⁻¹) oldukça yüksek duyarlılık ($0.143 \text{ A mol}^{-1} \text{ L cm}^{-2}$) ve düşük bir dedeksiyon limiti değerine (1.36×10^{-7} mol L⁻¹) ulaşılmıştır. Önerilen yeni yöntem ticari farmasötik ürünlere uygulanmış ve spektrofotometrik yöntemlerle elde edilen sonuçlarla uyumlu olduğu görülmüştür (*Felix ve diğerleri*, 2007).

Zen ve Ting, kimyasal olarak modifiye edilmiş Nafion®/rutenyum oksit piroklor elektrot kullanarak kare-dalga voltametri ile farmasötik formülasyonlardaki parasetamol ve kafeinin aynı anda tayinini gerçekleştirmişlerdir. Camsı karbon elektrot kimyasal olarak modifiye edilmiş elektrotla kıyaslandığında, kimyasal olarak modifiye edilmiş elektrot ile oksidasyon potansiyellerinden katodik yönde belirgin bir kayma gözlenmiştir ve hem kafein hemde parasetamolün akım cevaplarında belirgin bir artış olmuştur. 0.05 M perklorik asit içinde elde edilen kalibrasyon eğrileri, kafein ve parasetamol için sırasıyla 10-250 ve 5-250 µM arasında doğrusaldır. Kafein ve parasetamol için LOD değerleri sırasıyla 2.2 ve 1.2 µM'dır. Yöntemin kafein ve parasetamolün mevcut farmasötik formlardaki seçici ölçümleri için hiçbir ön işleme gerek duymayan pratik analitik yöntem olduğu gösterilmiştir (*Zen ve Ting*, 1997).

Kartal, parasetamol, kafein ve kodein fosfatın tayini için doğru, basit, tekraredilebilir ve duyarlı bir yöntem geliştirmiş ve valide etmiştir. Parasetamol, kafein ve kodein fosfat, µbondapak C₈ kolon ile 1.0 mL dak⁻¹ akış hızında isokratik elüsyonla ayrılmışlardır. Hareketli faz 0.01 M KH₂PO₄, metanol, asetonitril ve izopropil alkolün 420/20/30/30 (h/h/h/h) oranındaki karışımıdır ve spektrofotometrik dedeksiyon 215 nm'de yapılmıştır. Parasetamol, kafein ve kodein fosfatın tayini için doğrusal aralık sırasıyla 0.400-1500 µg mL⁻¹, 0.075-90 µg mL⁻¹ ve 0.300-0.30 µg mL⁻¹'dir. Yöntemin, doğrusal, tekrar edilebilir, spesifik, duyarlı ve güçlü olduğu gösterilmiştir (*Kartal*, 2001).

Dinç ve Baleanu, tabletlerdeki parasetamol ve kafeinin eşzamanlı analizi için kimyasal bir ayırım prosedürü kullanmadan CLS (Klasik En Küçük Kareler) ve PCR (Temel Bileşen Regresyonu) teknikleri önermişlerdir. Kemometrik kalibrasyon, 0.1 M HCl içinde hazırlanan ve her iki analiti de içeren numune setinin 215-285 nm aralığındaki spektral bölgede 15 farklı dalga boyunda absorbanları ölçülerek yapılmıştır. Elde edilen kemometrik kalibrasyon numunelerdeki kafein ve parasetamol tayini için kullanılmıştır. Rakamsal hesaplamalar 'MAPLE V' yazılımı kullanılarak yapılmıştır. Bu iki tekniğinin sentetik karışımlara uygulanmasıyla CLS ve PCR tekniklerinde elde edilen ortalama geri kazanım parasetamol için % 99.5 olarak bulunmuştur. Sonuçlar, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yöntemi ile karşılaştırılmış ve iki yöntemin farmasötik tabletlere başarıyla uygulanabileceği belirtilmiştir (Dinç ve Baleanu, 2002).

Emre ve Özaltın, parasetamol, kafein ve propifenazon üçlü karışımlarını içeren farmasötik preparatlarda bu etken maddelerin analizi için yeni bir miseller elektrokinetik kapiler kromatografi yöntemi geliştirmişlerdir. En iyi sonuçlar, 30 mM sodyum dodesil sülfat içeren 20 mM pH 9.0 borat tamponu kullanılarak elde edilmiştir. Çalışmada diflunisal iç standart olarak kullanılmıştır. Ayırım, erimiş silika kapilerde (50 µm iç çap, 44 cm toplam uzunluk, 35.5 cm efektif uzunluk), 25°C'de ve 50 mbar basınç altında 3 sn hidrodinamik enjeksiyon ile 29 kV potansiyel uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Dedeksiyon dalga boyu 200 nm'dir. Bu koşullar altında göç zamanları parasetamol için 5.174 dak, kafein için 5.513 dak, diflunisal için 7.195 dak ve propifenazon için 9.366 dak olarak bulunmuştur. Doğrusal konsantrasyon aralığı parasetamol ve kafein için 2-200 µg mL⁻¹ ve propifenazon için 3-200 µg mL⁻¹ 'dir. LOD değerleri parasetamol ve kafein için 0.6 µg mL⁻¹ ve propifenazon için 0.8 µg mL⁻¹ olarak bulunmuştur. Validasyon çalışması sonuçlarına göre yöntem doğru, kesin, sağlam, duyarlı ve spesifiktir. Türkiye'de farklı firmalar tarafından üretilen üç farmasötik form, önerilen yöntemle analiz edilmiştir (Emre ve Özaltın, 2006).

2.2. Kromatografi

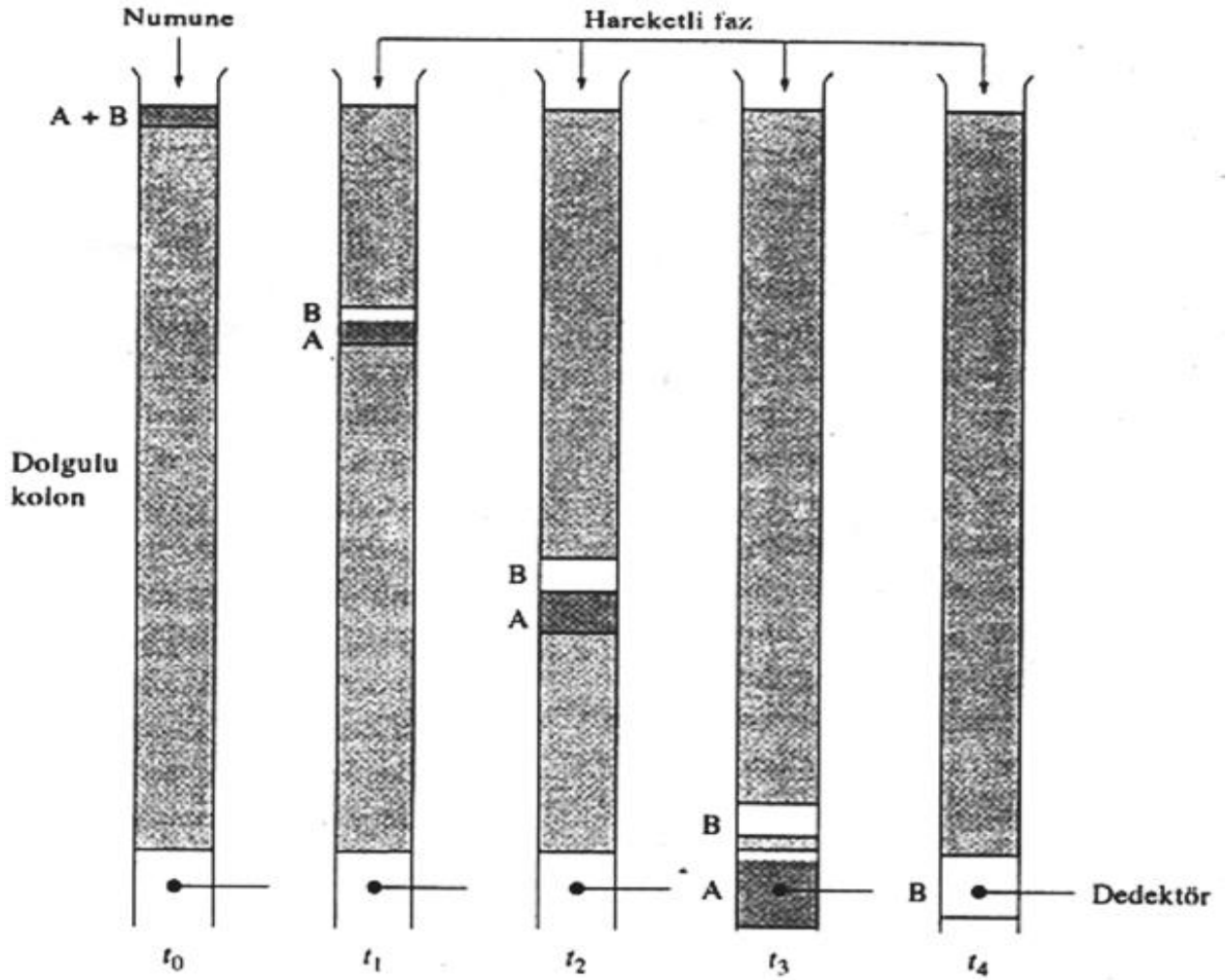
Kromatografi, kimyasal bileşenlerin ayrılması, tanınması ve tayini için yaygın olarak kullanılan bir analitik yöntemdir. Kromatografik ayırimda maddeler karışmayan iki faz arasında dağılırlar. Bir kolon içinde veya düz bir yüzeyde tutturulmuş faza sabit faz, sabit fazın üzerinden veya arasından geçen analiti de içeren faza hareketli faz adı verilir. Kromatografi, gaz veya sıvı haldeki bir hareketli fazla ilerleyen karışımındaki bileşenlerin, sabit fazdan geçme hızlarına bağlı olarak ayrıldıkları bir tekniktir. Karışımı oluşturan bileşenlerin birbirlerinden ayrılmasıyla nitel ve nicel analizleri mümkün olur.

1892'de Reed tarafından ortaya atılmış olan ilk kuramda, kolon yardımı ile bir karışımın ayrılabilceği söylenmiştir. 1906 yılında Tswett adlı araştırmacı, kolon kromatografisini kullanarak klorofili pigmentlerine ayırmıştır. Adsorban olarak CaCO_3 'ün kullanıldığı bu ayırım ile ilk kez katı-sıvı kromatografisi kullanılmıştır. Türk asıllı Rus araştırmacı olan Izmailov 1938'de ince tabaka kromatografisini keşfetmiş ve bu yöntem 1950 yılında Stahl tarafından pratikte kullanılış şekli ile tanıtılmıştır. Martin-Synge (1941) kolon dağılma kromatografisi esaslarından bahsetmiş ve sıvı-sıvı kromatografisi ortaya çıkmıştır. Martin-James gaz-sıvı kromatografisini geliştirmiş ve diğer yöntemlerden farklı olarak hareketli fazda gaz kullanılmış ve bu çalışma Nobel ödölüne layık görülmüştür (1952). Huber ve Hulsman adlı araştırmacılar kolon teknolojisini geliştirerek yüksek performanslı pompa sistemleri ve duyarlı dedektörlerin kullanılması ile yüksek performanslı sıvı kromatografisinin temellerini ortaya atmışlardır (1967).

Kromatografik yöntemler iki şekilde sınıflandırılabilir. Birincisinde, hareketli ve sabit fazların fiziksel olarak nasıl temas ettikleri esas alınır. Kolon kromatografisinde, sabit faz ince

bir kolonda tutulur ve hareketli faz yerçekim veya basınç altında bu sabit fazın arasından geçmeye zorlanır. Düzlemsel kromatografide, sabit faz düz bir plaka üzerine veya bir kağıdın gözenekleri arasına tutturulur ve bu durumda hareketli faz sabit faz arasından kapiler etkisiyle veya madde aktarımını sağlayan yer çekimi etkisiyle hareket eder. Her iki kromatografinin de dayandığı ilkeler aynıdır. Kromatografinin bir diğer sınıflandırılması, kullanılan hareketli fazın tipine göredir; sıvı kromatografi, gaz kromatografi ve süper kritik akışkan kromatografi. Kullanılan hareketli fazlar sırasıyla sıvı, gaz ve süperkritik akışkandır. Sadece sıvı kromatografi, hem kolonlarla hem de düzlemsel yüzeyler üzerinde gerçekleştirilebilir; gaz kromatografi ve süperkritik akışkan kromatografi yalnız kolonlarda gerçekleştirilebilir.

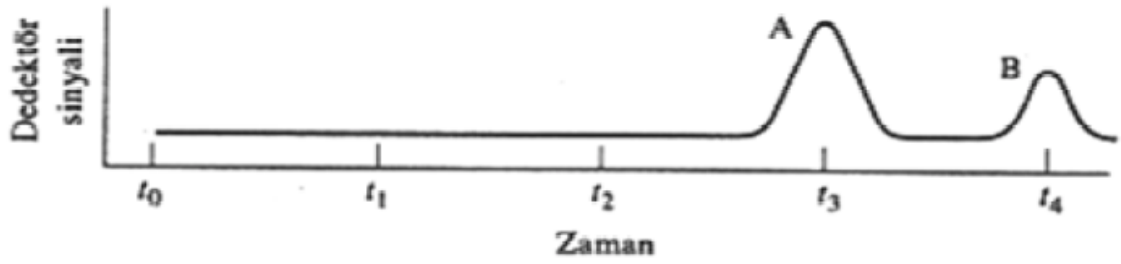
Elüsyon işlemi bir kolondan sürekli taze çözücü geçirerek çözünmüş bileşenin sabit faz boyunca hareket ettirilerek ayrılması ve kolon sonunda toplanmasıdır. Kolona katılan hareketli faz, numunenin bir bölümünü içeren çözücüyü kolonda ilerlemeye zorlar ve bu arada hareketli fazla sabit fazın yeni bölümleri arasında numune tekrar bölüşülür. Kolona sürekli çözücünün verilmesi, hareketli ve sabit faz arasında sürekli madde aktarımı yaparak, çözünen madde moleküllerini kolonda aşağıya taşır. Fakat çözünen madde hareketi sadece hareketli fazda olduğu için, çözünen maddelerin kolonda göç ettiği ortalama hızı, onun hareketli fazda geçirdiği zaman ile orantılıdır. Sabit fazın kuvvetle tuttuğu maddeler kolondan daha geç elüe olurlar. Hızlarda oluşan bu fark sonucu, karışımındaki bileşenler kolon boyunca bant veya bölgeler şeklinde ayrılırlar. Ayrılan bileşenler kolondan yeterli miktarda hareketli faz geçirilmesiyle izole edilirler (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Elüsyon kromatografisi ile A ve B bileşenlerinin ayrılma diyagramı

Şekil 2.7’de görüleceği gibi B, sabit faz tarafından A’ya göre daha kuvvetli tutulduğu için göç sırasında geçmektedir. Kolondan aşağıya hareketleri sırasında aralarındaki uzaklığın arttığı açıkça görülmektedir.

Çözünenin herhangi bir özelliğine cevap veren bir dedektör kolonun sonuna konulur ve sinyal zamana (veya eklenen hareketli faz hacmine) karşı grafiğe geçirilirse, bir dizi pik elde edilir (Şekil 2.8). Böyle bir grafiğe kromatogram adı verilir ve hem nitel hem de nicel analizde kullanılır.



Şekil 2. 8. Elüsyonun çeşitli basamaklarında dedektör sinyali.

Kromatografik yöntemlerde sabit faz, hareketli faz ve numune arasındaki etkileşimlere bağlı olarak çeşitli mekanizmalar kullanılır. Bu mekanizmalara dayanarak kromatografi, adsorpsiyon, dağılma, iyon değiştirme, moleküler eleme, iyon çifti ve afinite kromatografisi şeklinde sınıflandırılır (*Hamilton ve Sewel, 1982*).

2.2.1. Adsorbsiyon Kromatografisi

Adsorpsiyon kromatografisinin esası ayrılacak olan molekülleri tersinir olarak adsorplayan bir katı faz ile sıvı veya gaz hareketli faz arasındaki gerçekleşen olaydır. Sabit fazda bulunan tutunma gözenekleri için madde ve hareketli faz molekülleri yarışma halindedir. Silika ve alumina gibi adsorban maddelerin yüzeyleri polar olduğundan, polar moleküller bu yüzeylere ilgi gösterirler ve dipol-dipol, dipol indirgenmiş dipol ve hidrojen bağı gibi etkileşimlerle tutulurlar. Polar maddeleri ayırmak için polar sabit faz, apolar maddeleri ayırmak için apolar sabit faz kullanılır. Bir maddenin tutunma gücü, molekülündeki fonksiyonel grup türüne ve sayısına bağlıdır.

2.2.2. Dağılma Kromatografisi

Dağılma kromatografisi eylemsiz (inert) bir destek malzemesine tutturulmuş veya destek katıya kimyasal olarak bağlanmış sıvı bir sabit faz ile sıvı hareketli faz arasında maddelerin dağılması esasına dayanır. Ayrılacak maddeler sabit ve hareketli faz arasında dağılma katsayılarına göre dağılırlar. Bu dağılma sonucunda farklı hızlarda göçerler ve ayırma

gerçekleşir. Çözünen madde kolonda sadece hareketli fazla taşındığından, ortalama göç hızı, çözünen maddelerin hareketli fazda geçirdiği zamanın sabit fazda geçirdiği zamana oranına bağlıdır. Sabit faz tarafından kuvvetli tutulan türler için bu oran küçük, hareketli fazda tutulma büyük ise aynı oran büyüktür (*Hamilton ve Sewel, 1982*).

Bu teknik sıvı-sıvı ve sıvı-bağlı faz kromatografisi olmak üzere iki alt sınıfa ayrılabilir. İki teknik arasındaki fark, katı parçacıklar yüzeyine sabit fazın tutturulmasındaki yöntem farkından kaynaklanır. Sıvı-sıvı tekniğinde sabit faz katı yüzeyine fiziksel adsorpsiyonla; bağlı faz tekniğinde ise kovalent kimyasal bağlarla tutunur. Bağlı faz dolgu maddeleri, fiziksel olarak yüzeye tutturulmuş dolgulara göre daha kararlı olma gibi bir üstünlüğe sahiptir. Yüzeye fiziksel olarak tutturulan fonksiyonel gruplar zamanla hareketli fazda çözünerek sürüklenabilir ve etkisizleştirilebilir. Bağlı faz dolgu maddelerinin sakıncası ise; biraz daha sınırlı numune kapasitesine sahip olmalarıdır (*Skoog ve diğerleri, 1999*).

Sabit faz ile hareketli fazın polaritelerine göre normal faz ve ters faz sıvı kromatografisi olmak üzere iki tip dağılma kromatografisinden söz edilir.

a) Normal Faz Sıvı Kromatografisi

Sabit faz polaritesi, hareketli faz polaritesinden daha yüksek olduğu durumda sıvı kromatografisi normal faz olarak tanımlanır. Normal faz yüksek performanslı sıvı kromatografide sıklıkla kullanılan kolon dolgu maddeleri silika veya alümina, kullanılan hareketli fazlar, ise daha düşük polariteli hekzan, izo-propil, metilen klorür, metil bütül eter, kloroform ve bunların karışımları olabilir (*Meyer, 1988*). Silika üzerine farklı polaritelerdeki -CN, -NO₂ ve -NH₂ gibi gruplar bağlanarak farklı sabit fazlar elde edilebilir. Normal faz sıvı kromatografisi ile polarlığı en az olan madde kolondan en önce elüe olur (*Skoog ve diğerleri, 1999*).

b) Ters Faz Sıvı Kromatografisi

Sabit faz polaritesinin hareketli faz polaritesinden düşük olduğu bu yöntemde polarlığı en çok olan madde kolondan önce elüe olur. Bu yöntem apolar sabit fazda tutunmayı tercih eden maddeleri ayırmada başarılıdır. Alkil zincirlerinin kimyasal olarak bağlanmasıyla oluşturulan sabit fazlardan en sık kullanılanı oktil veya oktadesil silan bağlı dolgu maddeleridir. Bu tür dolgu maddelerinde uzun zincirli hidrokarbon grupları parçacık yüzeyine dik ve birbirine paralel şekilde yerleştirilerek apolar bir yüzey elde edilmiş olur. C₈ veya daha kısa zincirli hidrokarbonlar, sikloheksil ve fenil bağlı sabit fazlar da kullanılmaktadır. Fenil grupları alkil gruplarına göre daha polardır (Meyer, 1988). Hareketli faz ise, metanol, asetonitril veya terahidrofuran gibi çözücülerini içeren sulu çözeltilerdir (Skoog ve diğerleri, 1999).

Ters-faz sıvı ve normal-faz sıvı kromatografisinde madde, polaritesinin sabit faz polaritesine yakınlığına göre kolonda alıkonulur ve hareketli faz polaritesine yakın olan maddeler kolonu önce terk eder (Tablo 2.1).

Tablo 2.1. Normal faz ve ters faz sıvı kromatografisi karşılaştırılması

	Normal-faz	Ters-faz
Sabit Faz Polaritesi	Yüksek	Düşük
Hareketli Faz Polaritesi	Ortadan düşüğe	Ortadan yükseğe
Elüsyon sırası	Az polar	Polar önce

HPLC ile ilaç analizi yapabilmek için yaygın olarak dağılma kromatografisi uygulanır. Bu kromatografi türünde uygun bir analiz yapabilmek için maddenin belli bir çözücünde çözünmüş olması gerekir. Maddenin apolar veya polar olmasına göre maddenin polaritesine yakın bir sabit faz seçilir. Örneği oluşturan bileşenlerin iyi ayrılabilmesi için sabit faz ile hareketli faz polaritesi farklı olmalıdır. İlaç analizlerinde ilaçların genellikle kısmen apolar maddeler olmalarından dolayı ters faz sıvı kromatografisi tercih edilir.

2.2.3. İyon Çifti Kromatografisi

İyon çifti (veya eşleşmiş iyon) kromatografisi, iyonik türlerin ayrılması ve tayini için kullanılan bir tür ters faz dağılma kromatografisidir. Hareketli faz metanol, asetonitril gibi bir organik çözücü içeren sulu tampon ve tayin edilecek bileşik ile zıt yüklü karşıt iyon içeren bir iyonik bileşikten meydana gelmiştir (*Skoog ve diğerleri*, 1998). Karşıt iyon analitle birleşerek ters faz dolgu maddesi ile alıkonulabilen nötral iyon çifti oluşturan bir iyondur. Karşı iyonlar numune iyonlarının polar olamayan sabit fazda alıkonmasını arttıracak alkil grupları içerirler. İyonize olabilen maddelerin dağılma kromatografisiyle iyi bir ayrımı genellikle sorunludur. Hareketli faz pH'sının denetlenmesiyle sulu ortamda iyonlaşabilen bu maddelerin ters faz kolonla ayrımı sağlanabilir. Bu işleme iyon bastırma denir ve hareketli faz pH'sı analitin pKa değerine yakın olduğunda pH'da yapılan küçük değişiklikler alıkonma süresinde büyük değişikliklere yol açabilir. İyon bastırma tekniği, analitin kuvvetli asidik ($pK_a \leq 3$) ve kuvvetli bazik ($pK_a \geq 8$) olduğu koşullarda uygulanır. Ancak aşırı pH değerleri çelik kolonda korozyona, bağlanmış sabit fazın ayrılmasına veya silika destek maddesinin çözülmesine neden olabilir. Böyle durumlarda, hareketli faza, karşı iyon adı verilen maddeler eklenerek ayırım iyileştirebilirler. Hareketli faza eklenen iyon, ya iyon çifti oluşturarak ya da ayrılan madde ile kromatografik etkileşme için yarışarak veya dolgu maddesindeki silanol uçlarının dinamik olarak kapatarak kromatografik ayrımı gerçekleştirebilirler (Tablo 2.2).

İyon çifti oluşumuna etki eden faktörler;

1. Karşı iyon tipi ve ayrılan maddeyle etkileşme derecesi,
2. Karşı iyonun boyutu,
3. Karşı iyon derişimi,
4. Ortamın pH'sı,
5. Hareketli fazdaki organik çözücü tipi ve miktarı,
6. Sıcaklık,
7. Sabit faz yüzeyinin karşı iyonla kaplanma derecesidir.

Tablo 2.2. Zıt faz karşı iyon tipleri ve uygulamaları

Karşı iyon tipi	Uygulaması
Kuvaterner aminler (tetraetil, tetrametil, trimetilamonyum)	Kuvvetli asitler, sülfolanmış boyalar, karboksilik asitler, hidrokortizon ve tuzlar
Bis-(2-etilhegzil) fosfat	Fenoller
Tersiyer aminler (triethylamin)	Sülfonatlar, karboksilik asitler
Alkil sülfonik asitler (metan, pentan, hegzan, heptan veya hegzan sülfonik asit)	Kuvvetli ve zayıf bazlar, benzalkonyum tuzları, katekolaminler, peptidler, opium alkaloidleri
Perklorik asit	Aminler, peptidler
Alkil sülfonatlar (oktil, desil, dodesil)	Sülfonik asit benzeri etki

İyon çifti oluşturucu maddenin derişimi, hareketli fazda yeterli miktarda karşıt iyon bulunabilmesi ve sabit faz yüzeyindeki artık silanol gruplarının tamamen kaplanabilmesi için önemlidir. Özellikle pik simetrisi bozuk olan maddeler için sabit fazın tamamen kaplanması istenir. Karşıt iyonun zincir uzunluğu ve hareketli fazdaki derişimi yeterliyse bağlı fazın çok yüksek oranda kaplanması beklenir. Karşı iyon derişimindeki değişim, alıkonma süresini ve buna bağlı olarak kapasite faktörünü değiştirirken seçicilik bu değişimden belirgin olarak etkilenmez.

İyonize olmayıp yük kazanmayan maddeler kısa zincirli (C_5-C_8) iyon çifti oluşturucu maddelerle etkileşmeye girmez. Bunların alıkonma süreleri ve pik simetrisi değişmez. Bu nedenle hareketli fazın pH'sı hem ayrılan maddenin hem de karşı iyonun en fazla iyonlaştığı değerde tutulmalıdır. En yüksek alıkonma süresi ayrılan madde ve iyon çifti oluşturucu madde tamamen iyonlaştığında elde edilir. İyon çifti oluşturucu maddenin iyonlaşma hızı yüksekse alıkonmayı maddenin iyonlaşma hızı denetler. Ayrılan madde tipine göre uygun hareketli faz pH aralıkları Tablo 2.3'te verilmiştir (*Krstulovic ve Brown, 1982; Başcı ve diğerleri, 1998*).

Tablo 2.3. Ayrılan madde tipine göre hareketli faz pH seçimi

Ayrılan madde tipi	Hareketli faz pH aralığı	Sonuç
Kuvvetli asitler ($pK_a < 2$)	2.0-7.4	Bu pH aralığında madde iyonlaşır.
Zayıf asitler ($pK_a > 2$)	6.0-7.4	Bu pH aralığında madde iyonlaşır.
	2.0-5.0	Maddenin iyonlaşması bastırılır.
Kuvvetli bazlar ($pK_a > 8$)	2.0-8.0	Bu pH aralığında madde iyonlaşır.
Zayıf bazlar ($pK_a < 8$)	2.0-5.0	Bu pH aralığında madde iyonlaşır.
	6.0-7.4	Maddenin iyonlaşması bastırılır.

Hareketli faza ilave edilen iyon çiftleri polaritesi düşük olan sabit faz tarafından absorplanır. İyonize olmuş maddeler bu iyon çiftleri ile iyonik etkileşime girerek kolonda tutunurlar. Maddelerin alıkonmaları ilave edilen iyon çifti reaktifinin derişimi ile değişir. İyon çifti reaktiflerinin C_8 ve C_{18} sabit fazları ile etkileşimi güçlü olduğundan bu teknikte en çok kullanılan sabit fazlardır.

2.2.4. İyon Değiştirme Kromatografisi

İyonların (katyon-anyon) yer değiştirmesine dayanan bu kromatografide, sabit fazda bulunan iyonlarla numunedeki aynı yüklü iyonlar yer değiştirir. İyonik halde veya iyonlaşabilen madde ya da pH'ya bağlı olarak iyonlaşabilen moleküllerin ayırımı için kullanılan bir yöntemdir. İyon değiştirici dolgu maddeleri silika üzerine iyonik fonksiyonel grupların bağlanmasıyla elde edilir. İyon değiştirme mekanizmasında hareketli fazın pH'sı ve iyonik gücü alıkonma süresi üzerinde, hareketli fazın organik çözücü içeriğine oranla daha fazla etkilidir. Ayrılacak madde ile sabit faz arasında ne kadar kuvvetli bağ ve elektrostatik çekim oluşursa alıkonma o kadar güçlü olur (Meyer, 1988; Snyder ve diğerleri, 1988).

2.2.5. Eleme Kromatografisi

Eleme kromatografisi, molekül ağırlık farkı çok büyük olan bileşikler içeren karışımları ayırmak için kullanılır (*Skoog ve diğerleri*, 1998). Eleme kromatografisinde esas olarak sabit faz ile fizikokimyasal etkileşim olmaktadır. Dolgu maddesinin gözenek büyüklüğü ve numunede bulunan moleküllerin boyutu alıkonma süresini etkiler. Büyük moleküller dolgu maddesinin gözeneklerine (porlarına) girmeyerek hareketli faz ile birlikte hızla sürüklenir ve kolonu önce terkederler. Küçük moleküller porları dolduran hareketli faza difüze olurlar. Bunların ortalama hızları porlarda geçirdikleri zamana bağlıdır. Orta büyüklükteki moleküller ise sadece bazı porlara difüze olurlar, bu nedenle ortalama bir hızla hareket ederler. Eleme kromatografisi genellikle polimerleri ayırmak için kullanılır. Alıkonma zamanı ile molekül ağırlığı arasında çizilen grafikten bir polimerin molekül ağırlık dağılımı bulunabilir.

2.2.6. Afinite Kromatografisi

Afinite kromatografisi sabit faz olarak modifiye edilen ligant bağlı jel matriks ile protein molekülü arasındaki spesifik etkileşime dayanır. Sabit faz bir antikor gibi davranarak sadece etkileşen antijen yüzeyi olan protein molekülünün bağlanmasına izin verir. Hareketli faz bileşimi veya pH değiştirilerek bu proteinin kolonda elüe olması sağlanır (*Skoog ve diğerleri*, 1998).

2.2.7. Kromatografide Temel Parametreler

i. Alıkonma Zamanı ve Kapasite Faktörü

Numunenin enjeksiyonundan sonra dedektöre ulaşması için geçen zamana alıkonma zamanı denir (t_R). Alıkonma zamanı terimi yerine alıkonma hacmi de kullanılır. Bir maddenin alıkonma hacmi (V_R) bir bileşenin sabit fazdan elüe olması için gerekli olan hareketli faz hacmi olup alıkonma zamanı ve hacimsel akış hızından (F) hesaplanabilir.

$$V_R = t_R F \quad (2.1)$$

Alıkonma hacmi temel kromatografik parametre olan dağılım katsayısı (K) ile aşağıdaki eşitlik gereği doğrudan ilişkilidir.

$$V_R = V_M + K V_S \quad (2.2)$$

V_m : Kolondaki hareketli faz hacmi

V_s : Kolondaki sabit faz hacmidir.

Dağılım katsayısı (K) ise; analitin sabit fazdaki molar derişiminin (C_s) hareketli fazdaki derişimine (C_m) oranıdır.

$$K = C_s / C_m \quad (2.3)$$

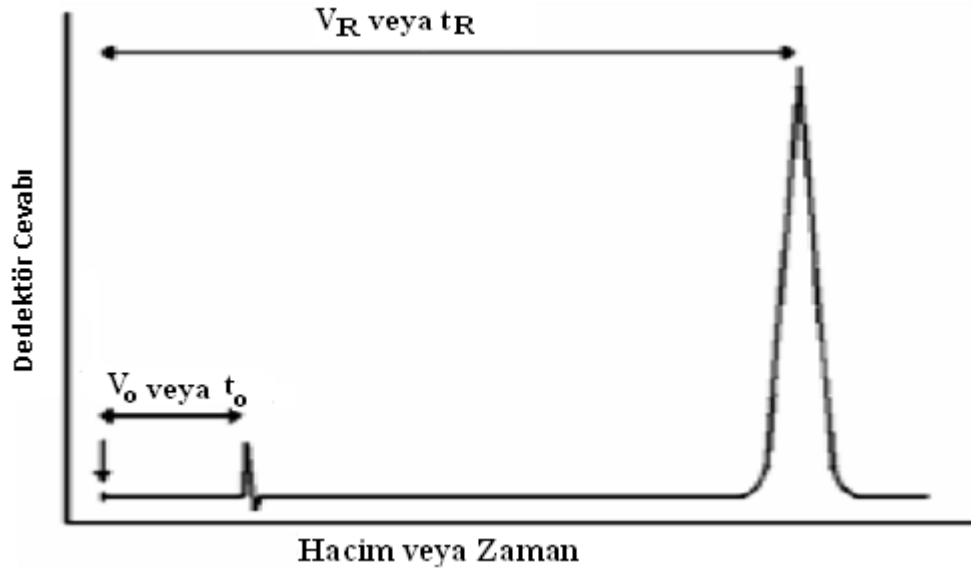
Bir maddenin alıkonma hacmi, ölü hacim (V_0) terimini içerecek biçimde de tanımlanabilir. Kapasite faktörü (k') olarak bilinen bu kavram eşitlik 2.4'de verilmiştir.

$$k' = (V_R - V_0) / V_0 \quad (2.4)$$

Elüsyon sırasında hacimsel akış hızı (F) sabitse eşitlik;

$$k' = (t_R - t_0) / t_0 \quad (2.5)$$

biçiminde yazılabilir. Kolon ile herhangi bir etkileşmeye girmeyen maddeler ölü zamanda elüe edilirler. Eşitlik 2.5'te t_0 sırası ile ölü hacim ve ölü zaman olarak tanımlanmıştır (Şekil 2.9).



Şekil 2. 9. Kapasite faktörünün hesaplanması

Kapasite faktörü dağılımdaki derişimlere bağı olup dağılım katsayısı ile ilişkilidir.

$$k' = K \times V_s/V \quad (2.6)$$

Kapasite faktörü her maddenin kendine özgüdür ve uygun bir hareketli faz-sabit faz çifti seçildiğinde belirli bir karışımdaki her bir bileşen için farklı kapasite faktörü değerleri elde edilir. İyi bir ayırım için kapasite faktörünün 1-10 arasında olması beklenir. Hesaplanan $k' < 1$ ise maddenin kolonda çok az tutunduğu, $k' > 10$ ise maddenin kolonda çok fazla tutunarak analiz süresini aşırı uzattığı düşünülür.

ii. Seçicilik

İki maddeye ait kapasite faktörlerinin oranı seçicilik (α) veya ayırım faktörü olarak adlandırılır ve aşağıdaki eşitlikle verilir.

$$A = k'_2 / k'_1 = (t_{R2} - t_o) / (t_{R1} - t_o) \quad (2.7)$$

Bu eşitlikte, k'_1 kısa alıkonma zamanlı maddenin, k'_2 ise daha uzun alıkonma zamanlı maddenin kapasite faktörü olarak tanımlanmıştır. Seçicilik, esas olarak sabit faz özelliklerine bağlıdır ancak hareketli faz bileşimi de seçiciliği etkiler. Deneysel çalışmada iki pikin seçiciliğinin 1'den büyük olması beklenir.

iii. Kolon Etkinliği

Kolon etkinliği, pik genişliği ile ilgilidir. Etkinliği yüksek olan kolonlar, dar pikler verirler ve bu kolonlarla maddeleri ayırmak daha kolaydır. Başarılı bir kromatografinin asıl amacı dar bir kromatografik bant dolayısıyla yüksek bir ayırıcılık elde etmektir. Kromatografik kolon etkinliğinin nicel bir ölçüsü olarak, birbirleriyle ilgili iki terim kullanılmaktadır. Bunlar, teorik tabaka yüksekliği (H) ve teorik tabaka sayısı (N)'dir. Bu iki terim arasında eşitlik 2.8'deki bağıntı da vardır.

$$N=L/H \quad (2.8)$$

L: Kolon dolgu uzunluğu

Kromatografik kolonun etkinliği teorik tabaka sayısı arttıkça ve teorik tabaka yüksekliği azaldıkça artar. Kolon tipi ve boyutu, hareketli faz bileşimi ve akış hızına bağlı olarak kolon etkinliği değişmektedir.

Teorik tabaka sayısını elde edebilmek için aşağıdaki formül kullanılabilir.

$$N= 16 / (t_R/w)^2 \quad (2.9)$$

t_R : Alıkonma zamanı

w: Pik zemin genişliği

Pik genişliğinin ölçülmesinde karşılaşılabilecek hatalardan kaçınmak için N değeri hesaplamada başka bir seçenek, $w_{1/2}$, yani yarı yükseklikteki pik genişliği değeri kullanılmasıdır.

$$N = 5.54 (t_R/w_{1/2})^2 \quad (2.10)$$

Kromatografik kolondaki ayırma olaylarına matematiksel yaklaşım, 1950'li yıllarda Hollandalı kimya mühendisi Van Deemter'in kendi adı ile anılan eşitliğin bulunması ile sonuçlanan incelemeleri ile başlamıştır.

$$H = A + B/u + Cu \quad (2.11)$$

H: Teorik tabaka yüksekliği (cm)

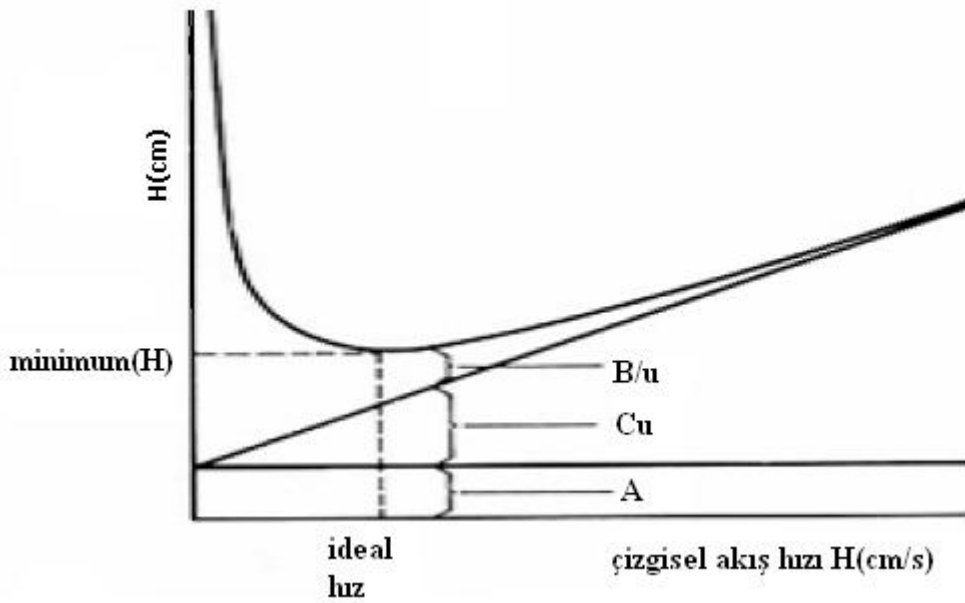
A: Çoklu akış yolları ve Eddy difüzyonu

B: Boyuna difüzyon

C: Fazlar arasındaki kütle aktarımı

u: Çizgisel hız

Bir kromatografi kolonunun etkinliğinin sağlanması için önce bu kolon için kullanılacak optimum akış hızının saptanması gerekir. H değerinin küçültülmesi için bir dizi önlem alınarak kolonun etkinliği artırılabilir (Şekil 2.10).



Şekil 2.10. Van Deemter eğrisi

Eşitlik 2.11'deki akış hızından bağımsız olan A değeri, madde moleküllerinin kolonda ilerlerken farklı yollar izlemesi nedeniyle büyür. Farklı uzunluktaki yolları izleyen madde moleküllerinin kolonda kalış süreleri de farklı olur. Bütün moleküllerin kolon boyunca ilerlemesi sırasında kromatografik bantta genişleme gözlenir. Bu olaya Eddy difüzyonu denir. Kolon dolgu maddesinin çok küçük tanecikli olarak alınması ile A' nın değeri küçültülebilir.

Formüldeki ikinci terim boyuna difüzyon terimi olup özellikle düşük akış hızlarında önem kazanır. Bu terimin katkısı bileşenlerin hareketli faz içindeki difüzyon katsayılarının değerleri ile doğru orantılı olarak artar. B 'nin değeri kolon sıcaklığının azaltılması ile küçülür. Kolona basınç uygulayarak da B 'nin değerinin küçültülmesi mümkündür.

Formülün üçüncü terimi yüksek akış hızlarında önem kazanan kütle aktarımı terimidir. Akış hızı arttıkça bileşenlerin iki faz arasında dağılma dengelerine ulaşabilmeleri için gereken süre azalır ve dolayısı ile dağılma dengesine tam olarak erişilemez. Bu terimdeki C değerinin küçültülebilmesi için hareketli sıvı fazın viskozitesinin az olması, kolon sıcaklığının

arttırılması, sabit faz ince bir sıvı film ile kaplıysa bu filmin kalınlığının çok küçük bir değere sahip olması gerekir.

iv. Ayırıcılık

Kromatografik işlemlerde kolon etkinliği ve çözücü etkinliğinin ortak etkisi ayırıcılık kavramıyla ifade edilir. Ayırıcılık (R), genel olarak aşağıdaki eşitlikle verilmektedir:

$$R = 2 (t_{R2} - t_{R1}) / (w_1 + w_2) \quad (2.12)$$

t_{R1} =Birinci numunenin alıkonma zamanı

t_{R2} =İkinci numunenin alıkonma zamanı

w_1 =Birinci numunenin oluşan pik aralığının genişliği

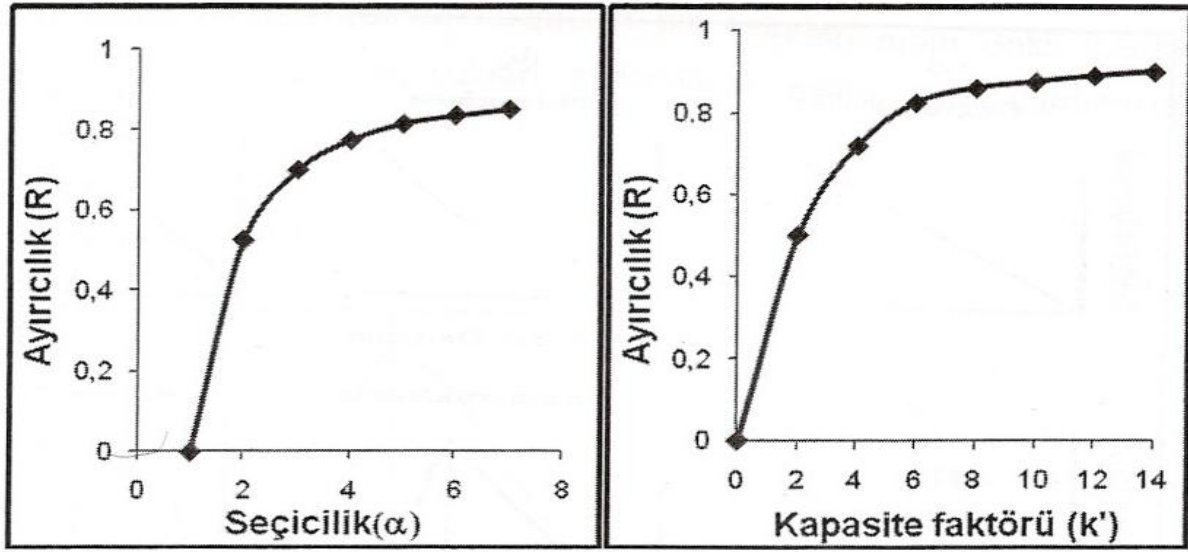
w_2 =İkinci numunenin oluşan pik aralığının genişliği

Ayırıcılığın; kapasite faktörü (k'), seçicilik (α) ve kolon etkinliği (N) terimleriyle ilişkisi aşağıdaki eşitlikle ifade edilebilir

$$R = (1/4) [(\alpha-1) / \alpha] [k' / (k'+1)] N^{1/2} \quad (2.13)$$

Nicel kromatografik analizler için iki pikin birbirinden tamamen ayrıldığı $R \geq 1.5$ değeri en uygundur.

Genel olarak seçicilik arttıkça ayırıcılığın da artması beklenir. Fakat belli bir seçicilik değerinden sonra toplam ayırıcılıkta gerçek bir iyileşme olmadan farklı alıkonma sürelerine sahip madde pikleri elde edilebilir. Seçicilik dışında kalan terimler sabit kabul edilerek seçiciliğe karşı ayırıcılık grafiğe işaretlendiğinde bu davranış açıkça görülmektedir (Şekil 2.11). Kromatografik ayırımın başarı ile gerçekleşmesi için $\alpha > 1$ olmalıdır, $\alpha = 1$ olduğunda iki bileşik ayrılamaz. Seçicilik, hareketli ve sabit fazın bileşimi ile değişir. Birbirine yakın piklerde seçicilik 1'e yakındır.



Şekil 2. 11. Ayırıcılığın seçicilikle ve kapasite faktörü ile değişimi

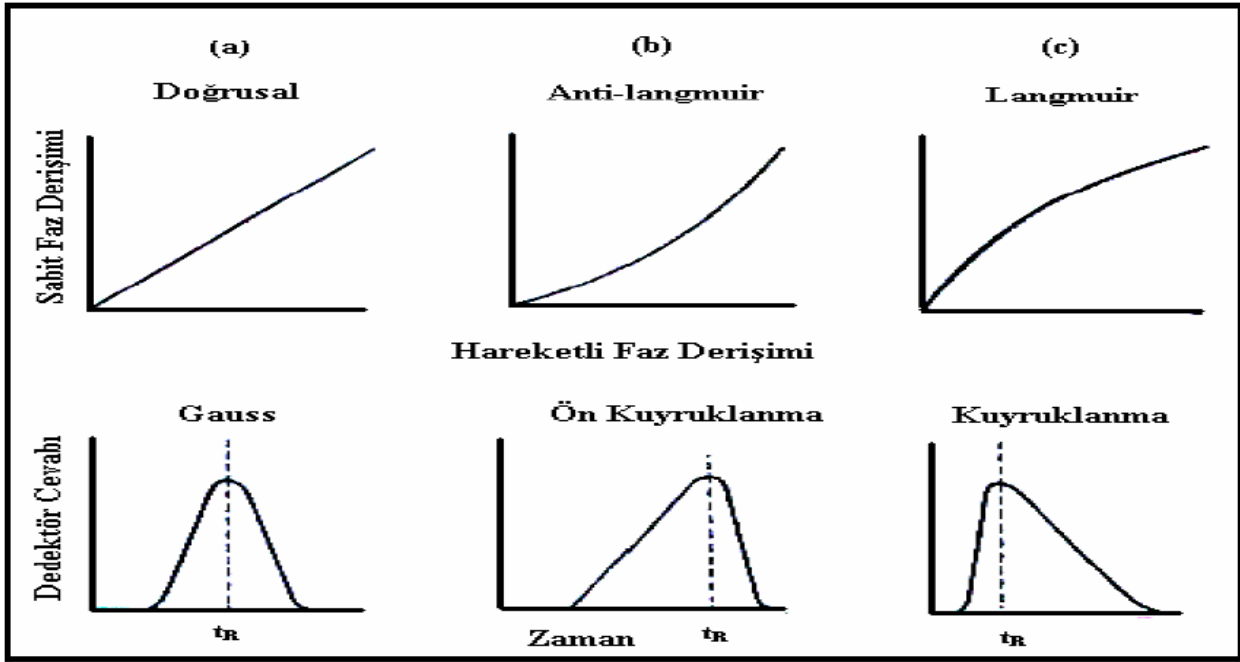
Etkinlik faktörü olarak da tanımlanan N , akış hızı, kolon uzunluğu veya dolgu maddesinin tanecik boyutu ile değişir. Etkinlik faktörü, pik genişliği ile ilgilidir. Ayırıcılık, N 'in karekökünün bir fonksiyonu olduğu için N 'deki büyük artışlar ayırıcılıkta küçük değişiklikler meydana getirir.

Kapasite faktörünün ayırıcılık üzerine etkisi bu kavramdan türetilmiş olan seçiciliğin etkisine benzer. Kapasite faktörü dışındaki bütün terimler sabit kabul edildiğinde kapasite faktörünün toplam ayırıcılığa etkisi Şekil 2.11'de görülmektedir. $k' = 0$ olduğunda herhangi bir ayırma işlemi gerçekleşmez. Ayrıca k' değeri arttıkça $k'/(k'+1)$ değeri bire yaklaşır ve kapasite faktöründeki artışın toplam ayırıcılığa etkisi kalmaz. Kapasite faktörü için en uygun değerler 1 ile 10 arasındadır ve daha çok hareketli faz özelliklerine göre değişir.

v. Pik Simetrisi

Analitin hareketli faz denge derişimi (C_m) sabit fazdaki denge derişimine (C_8) karşı grafiğe geçirildiğinde bir dizi ilişki elde edilir. Şekil 2.12'deki ilişki doğrusal olup eğimi

dağılım katsayısını verir. Bütün C_m değerlerinde K sabit olduğu için kromatografik bant bütün derişimlerde aynı hızda hareket eder ve simetrik bir elüsyon piki elde edilir.



Şekil 2.12. Elüsyon izotermi ve pik şekilleri

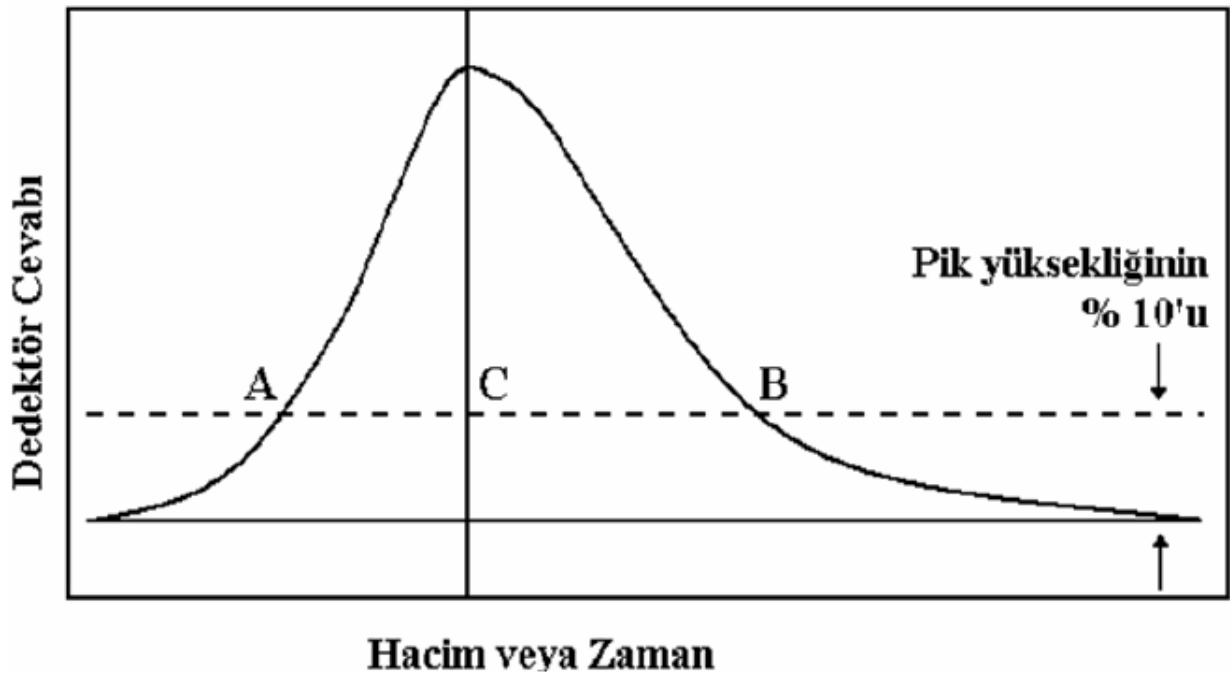
İç bükey ilişkisi (Şekil 2.12-b), kolonda fazla miktarda madde olduğunu gösterir. Bu durumda sabit fazdaki madde-madde etkileşimleri madde çözücü etkileşimlerinden daha baskındır. Bu durum K değerinin artmasına ve doğrusal olmayan ilişki elde edilmesine neden olur. Elüsyon eğrisinin önünde bir alan oluşur. Bu duruma ön kuyruklanma ya da yüklenme denir ve ayrılan maddenin alıkonma süresi derişimle artar.

Eğer moleküller arası kuvvetler maddeyi sabit faz yüzeyinde bir katman oluşturacak biçimde tutuyorsa ilişki dışbükey olur (Şekil 2.12-c) ve elüsyon eğrisinde pik kuyruklanması görülür, böylece artan madde derişimiyle alıkonma zamanı azalır. Doğrusallıktan sapma nicel analizi güçleştirdiği ve alıkonma sürelerinin nitel analizde kullanımını engellediği için kromatografik koşullar simetrik elüsyon piki sağlanacak şekilde düzenlenir.

Pik simetrisinin belirlenmesinde; pik asimetri oranı (PAO) Şekil 2.13'te tanımlanan CB ve CA uzunlukları kullanılarak eşitlik 2.14 yardımıyla hesaplanır.

$$PAO = CB / CA \quad (2.14)$$

İyi bir ayırma işleminde, $PAO < 1.5$ olması istenir (*Sena MM ve diğerleri, 2004*)



Şekil 2.13. Pik asimetri oranının hesaplanması

2.2.8. Hareketli Faz Bileşiminin Ayırma Etkisi

Sıvı kromatografisinde iyi bir ayırma için uygun çözücü çifti seçilerek ayrılan maddenin kapasite faktörü değiştirilebilir. İki veya daha fazla sayıda madde aynı kapasite faktörü ile elüe edilirse hareketli faz seçiciliği yeterli değildir ve değiştirilmesi gerekir. Hareketli faz çözeltilerine ayırma kalitesini arttırmak amacıyla ilave edilen maddeler düzenleyici olarak adlandırılır. Ters faz sıvı kromatografisi hareketli fazları genellikle su ve organik çözücü karışımlarından oluşmaktadır. Organik düzenleyici olarak kısmen düşük

polariteli metanol, asetonitril ve tetrahidrofuran gibi çözücüler kullanılır. Seçiciliğin iyileştirilmesi için kullanılabilecek çözücü sayısı sınırlı olmasına rağmen bazı koşullarda organik düzenleyici tipi değiştirilerek yeterli seçicilik elde edilebilir. Ters faz tekniğinde düzenleyici olarak tamponlarda kullanılır. Hareketli fazın pH'sı dikkatlice ayarlanarak zayıf asit ve bazların seçiciliği optimize edilebilir. Bazı numunelerde piklerdeki kuyruklanmayı azaltmak amacıyla hareketli faza iyon çifti reaktifi trietilamin, sülfonik asit türevleri asit ilave edilerek ikincil mekanizmalar yardımıyla düzenleyici olarak kullanılabilirler.

2.2.9. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Sıvı hareketli fazın basınç yardımıyla kolona gönderildiği sistemlere yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) denir. Yüksek performans; yüksek hız ve yüksek ayırıcılığı ifade eder. Yüksek performans çok küçük çaplı (< 20 mikron) kolon dolgu maddeleri kullanılarak bant genişlemesinin azaltılması ve daha dar piklerin elde edilmesi ile sağlanır. Kolon boyunca hareketli fazın ilerlemesini sağlamak için yüksek basınç gereklidir. Bu nedenle yöntem, HPLC, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi olarak da adlandırılır.

2.2.10. HPLC Cihazı Bölümleri

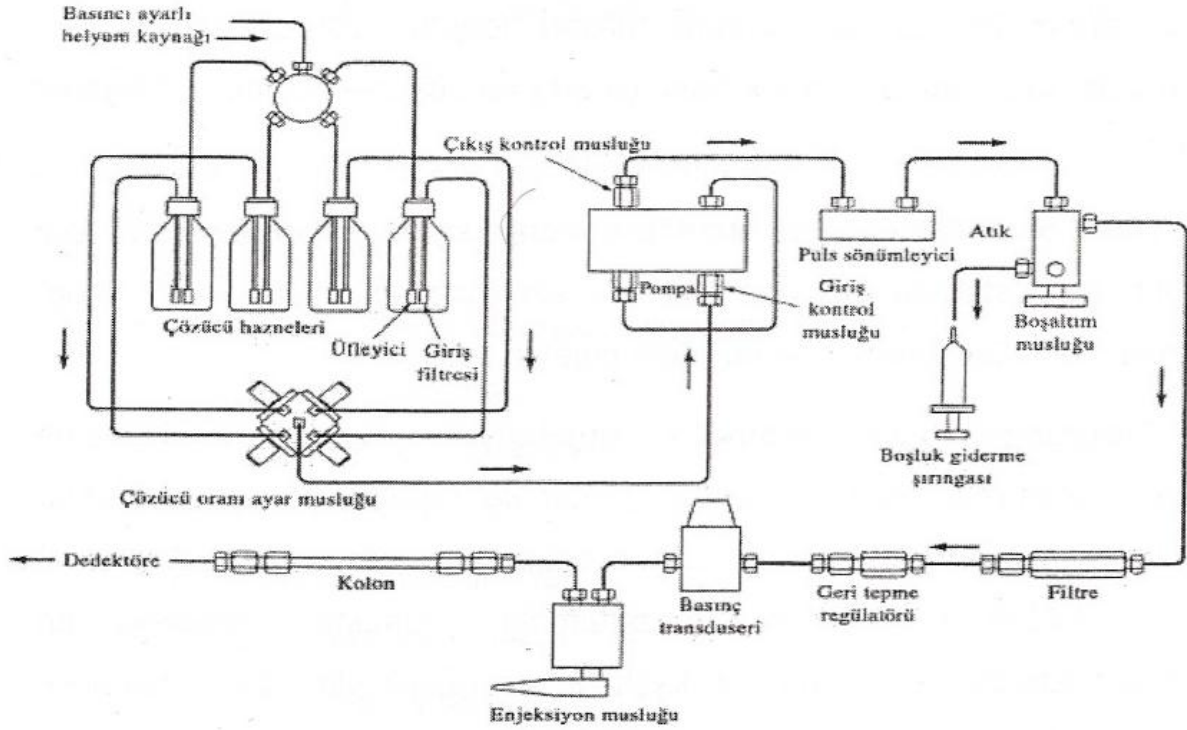
HPLC cihazının kısımları enjektör, pompa, kolon, dedektör ve kaydediciden oluşur ve Şekil 2.14'te şematik olarak gösterilmiştir. Organik çözücü ve tampondan etkilenmemesi için bütün materyal korozyona dayanıklı malzemelerden yapılır.

i. Pompalar

Hareketli fazın kolon boyunca akışını sağlamak için kullanılırlar. Akışın sabit ve deneylerin tekrarlanabilir olması için hareketli fazın pompalanma hızı sabit olmalıdır. Pompalar iki tiptir;

1. Sabit basınç pompaları: İlk geliştirilen pompalardır. Hareketli faz bir haznede bulunur ve bu hazne azot gibi eylemsiz bir gaz yardımıyla basınç altında tutulur; bu basınç hareketli fazın akışını sağlar.

2. Sabit hacim pompaları: Basıncı motor sağlar. Herhangi bir nedenle sistemin geçirgenliği bozulursa veya çözücünün vizkositesi değişirse oluşan iç basınç değişikliği motorla sağlanan basınç değişikliği ile kapatılır. Özellikle gradient elüsyonlarda bu tip pompalar kullanılmalıdır.



Şekil 2.14. HPLC cihazı kısımlarının şematik gösterimi

ii. Hareketli Faz

Hareketli fazın bileşimi alıkonmayı ve seçiciliği en çok etkileyen faktördür. Hareketli fazın kromatografik özelliklerini etkileyen faktörler aşağıda verilmiştir:

1. Ayrımı etkileyen çözücü özellikleri: Elüsyon gücü ve seçicilik.
2. İşletime bağlı özellikler: Viskozite, bastırılabilirlik, dedektörle geçimlilik, kolon ile geçimlilik, numune ile etkileşmeler, saflık ve içinde çözünmüş gaz oranı.
3. Güvenirlik özellikleri: Buharlaşılabılme özelliği.

iii. Enjektörler

Manuel enjeksiyon valfleri: Enjeksiyon valfleri yüksek basınçlı bir ortama numune aktarmak amacıyla kullanılan sistemlerdir. Enjeksiyon valfinin numune yükleme ve enjeksiyon olmak üzere iki konumu vardır. Yükleme konumunda "loop" (kangal) basınçlı ortamdan izole edilir ve bir şırınga yardımı ile istenilen numune miktarı "loop"a doldurulur. Enjeksiyon konumunda "loop" tekrar yüksek basınçlı ortama dönerek numuneyi sisteme aktarır.

Basit otomatik enjektörler: Manuel enjeksiyon valfine benzer bir valf kullanılır. Bu sistemde numune şişesine azot basıncı uygulayarak "loop" doldurulur ve valfin dönmesi ile numune enjekte edilir.

Programlanabilen otomatik enjeksiyon sistemleri: Numune "loop"unu doldurmak için hassas bir motor ile hareket ettirilen şırıngalar kullanılır. Enjektörle çekilen hacim kontrol edilerek istenilen miktarda numune "loop"a doldurulur. Böylece küçük miktarlardaki numune enjeksiyonları gerçekleştirilebilmekte ve numune kayıpları en düşük olmaktadır. İstenilen sayıda enjeksiyonu peş peşe yapmak mümkündür.

iv. Kolonlar

Sabit fazı taşıyan kolonlar genellikle paslanmaz çeliktir, 4-10 mm iç çapında ve 10-30 cm boyunda olabilirler. Son yıllarda uzunluğu 3-7.5 cm ve iç çapı 1-4.6 mm olan yüksek performanslı mikro kolonlar da imal edilmeye başlanmıştır. Dolgu maddesi taneciklerinin çapı 1.7-10 μ m kadardır ve sistemin performansını büyük ölçüde belirleyen niteliktir. Tanecikler,

gözenekli veya pelliküler yapıda olabilir. Gözenekli yapılar preparatif amaçla; pelliküler olanlar analitik amaçla kullanılır. Tanecik çapı küçük ve gözenekli yapılar hem analitik hem de preparatif kromatografi amacıyla kullanılır. Analitik amaçla kullanılan dolgu maddesinde kütle aktarımı daha hızlı, etkinlik daha yüksek, kolonun yeniden dengelenmesi ise çok hızlıdır. Silika, alümina gibi katılar sahip oldukları -OH grupları nedeniyle polar bileşenlerdir ve normal-faz sıvı kromatografisinde kullanılır. -OH grubu yerine -C₁₈H₃₅ gibi bir hidrakerbon bağlanırsa katı yüzey apolar özellik kazanır. Kolonların ömrü kullanıma göre değişir. Kolon ömrünü uzatmak için ön kolon kullanılabilir.

v. Dedektörler

HPLC sisteminin en önemli parçalarından biridir ve iki grup altında toplanırlar.

a. Maddeye Yönelik Dedektörler: Hareketli faz içindeki maddenin özelliklerini tayin ederler ve en yaygın kullanılan türleri aşağıda verilmiştir:

1. Fotometrik dedektörler (UV, GB, IR fotometreleri)
2. Floresans dedektörler
3. Elektrokimyasal dedektörler
4. Ayırım sonrası tepkime dedektörleri
5. Radyoaktivite dedektörleri
6. Elektron yakalayıcı dedektörler
7. Kütle spektrometresi

b. Çözeltiliye Yönelik Dedektörler: Çözeltinin içindeki maddeye değil, maddenin çözeltisine özgü dedektörlerdir ve aşağıdaki şekilde sınıflandırılabilir:

1. Refraktif indeks dedektörleri
2. Dielektrik sabiti dedektörleri
3. Kondüktivite dedektörleri
4. Yoğunluk dedektörleri

Bu çalışmada UV/GB dedektörü kullanıldığından, bu dedektör hakkında bilgi verilecektir.

UV/GB Dedektör

En çok kullanılan dedektör tipi UV/GB dedektörlerdir. Birçok organik bileşiğin absorpsiyonu yüksek olduğundan yüksek duyarlılıkta ölçüm yapılabilir, böylece duyarlılık ve seçicilik artırılır. Sıcaklık ve akış hızı değişikliklerine fazla duyarlı değildir, bu nedenle gradient elüsyon için idealdir. Bu dedektörler sabit dalga boylu veya değişken dalga boylu olabilir.

Değişken dalga boylu dedektörlerde ışık kaynağı olarak 190-400 nm'de kuartz-iyot veya tungsten halojen lambaları kullanılır.

Dizi diyot dedektör (DAD) bir tür UV/GB dedektörüdür. Optik sistemi, döteryum lambasından yayılan polikromatik ışığı, akış hücresinin üzerine yollar. Bu ışık daha sonra optik ağ üzerinde dağılır ve çok sayıda diyottan oluşan foto diyot dizisi üzerine düşer. DAD 200-700 nm dalga boylu aralığının 0.1 sn aralıklarla tespit edebilmektedir. Analiz edilecek maddelerin maksimum dalga boyları farklı olduğunda DAD'ler birden fazla dalga boyunda ölçüm alabilir. Kromatografik piklerin saflık kontrolünde veya birden fazla pikten oluşup oluşmadıklarının tayininde oldukça sık kullanılır. Bu amaçla, piklerin elüsyonu sırasında birkaç spektrum kayıt edilerek, spektrumlar üst üste konup karşılaştırılabilir. Bütün dalga boylarında spektrumlar üst üste çakışıyorsa madde piki saftır. Eğer enjekte edilen piklerin sayısından daha az pik elde edilmişse saflık kontrolleri yararlı ipuçları verir. DAD'in özellikleri aşağıdaki şekilde sıralanabilir:

1. Aynı anda spektrumun bütün dalga boylarında piklerin ölçümü yapılabilir.
2. Tek bir enjeksiyonla maksimum dalga boyları saptanabilir.
3. Aynı anda birden fazla dalga boyunda kromatogramlar ve kromatogramlardaki piklerin UV/GB spektrumları alınabilir.

4. Kromatografik olarak ayrılamamış piklerin nicel analizi yapılabilir (Referans dalga boyu kullanılarak maddelerin ayrılması sağlanır).
5. Spektrumların karşılaştırılması yöntemi ile pik saflığının tespiti yapılabilir.
6. Pik kimliğinin doğrulanması yapılabilir.

2.3. Spektrofotometri

Işık ile madde arasındaki etkileşmeyi inceleyen bilim dalı olan spektroskopi; görünür ışınları yanı sıra X- ışınları, ultraviyole (morötesi) ve infrared (kızılötesi) bölgeleri, mikro dalgaları ve radyo frekanslarını da içine alır. Spektrokimyasal yöntemler, inorganik ve organik bileşiklerin nicel ve nitel tayinlerinde yaygın kullanımlarının yanı sıra, molekül yapılarının aydınlatılmasında da en sık başvurulanan araçlardır (*Skoog ve diğerleri*, 1999).

Spektroskopi, bir örnekteki atom, molekül veya iyonların, bir enerji düzeyinden diğerine geçişleri sırasında absorplanan ya da yayılan elektromanyetik ışımının ölçülmesi ve yorumlanmasıdır. Her atom, molekül veya iyonun elektromanyetik ışıma ile kendine özgü ilişkisi vardır ve bunların dönme, titreşim ve elektronik enerjilerindeki değişiklikler spektroskopinin temelini oluşturur.

Spektrofotometri, ışık enerjisinin absorpsiyonuna dayalı bir yöntemdir. Işık ise elektromanyetik bir radyasyondur ve frekansı (γ) veya dalga boyu (λ) ile karakterize edilir. Frekans ve dalga boyu arasında $\gamma \times \lambda = c$ bağıntısı vardır. Burada c , ışımının hızıdır. Işımanın vakumdaki yayılma hızı, frekanstan bağımsız ve en yüksek değerindedir.

Enerji ise:

$$E = h \cdot c / \lambda \quad (2.15)$$

formülleriyle ifade edilir (h =plank sabiti = 6.62×10^{-27} erg sn⁻¹ ve $c = 3 \times 10^{10}$ cm sn⁻¹). Bu eşitliğe göre dalga boyu küçüldükçe elektromanyetik ışımının enerjisi artar.

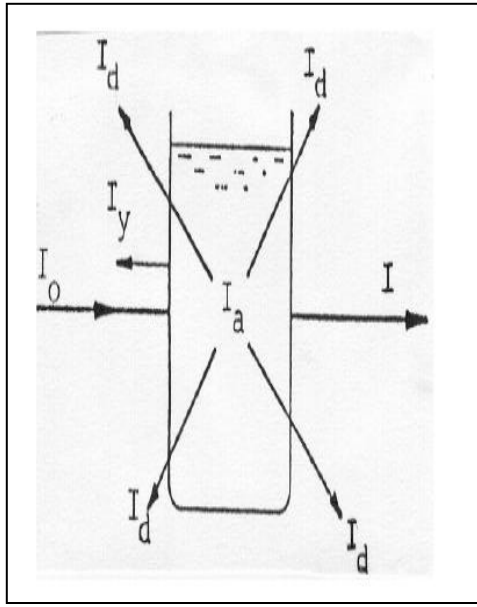
Elektromanyetik ışıma uzayda çok büyük bir hızla hareket eden bir enerji türüdür. Elektromanyetik ışımanın en çok karşılaşılan türleri, gözle algıladığımız görünür ışık ve ısı şeklinde algıladığımız infrared (kırmızı ötesi) ışınlarıdır; x-ışınları, ultraviyole (mor ötesi), mikrodalga ve radyo ışımaları ise elektromanyetik ışımanın diğer türleridir. Işımanın girişim (interferans) ve kırınım (difraksiyon) gibi davranışlarını tanımlamak için elektromanyetik dalga özelliğinden yararlanılır. Bir metal yüzeyinden ışıma ile elektronların koparılması (fotoelektrik olay) ve ışıma enerjisinin bir madde tarafından soğurulması (absorpsiyonu) ve yayılması (emisyonu) olaylarını açıklamak için ise dalga modeli yetersiz kalır. Bu olayı açıklamak için ışımanın tanecik özelliklerini göz önüne almak, yani elektromanyetik ışımayı enerji taşıyan ve foton adı verilen enerji paketleri oluşturan tanecikler olarak düşünmek gerekir. Işımanın madde ile etkileşmelerini açıklayabilmek için bu iki model bir arada düşünülmektedir (*Skoog ve diğerleri*, 1998).

Işın; atom ve moleküller tarafından absorbe edilebilir. Absorbe edilen enerji kuantlıdır ve elektronların düşük enerjili orbitallerden (temel hal) daha yüksek enerjili orbitallere (uyarılmış hal) geçmesine neden olur. Ama her enerji absorbe edilemez; ancak iki enerji seviyesi arasındaki farka eşit bir enerji absorbe edilebilir.

Vakumdan şeffaf bir madde ortamına giren ışın, maddenin atom molekülleriyle etkileşir. Etkileşme ışının elektriksel alanı ile maddenin bağ elektronları arasında olur ve maddenin yapısı bağlı olarak değişir. Bu etkileşme sonucu başlıca şu olaylar meydana gelir:

1. Işının geçmesi veya kırılması
2. Işının yansımaları
3. Işının dağılması
4. Işının saçılması
5. Işının absorpsiyonu ve emisyonu

Çözelti üzerine bir ışın demeti düşünüldüğünde oluşabilecek olaylar Şekil 2.15’de gösterilmiştir.



I_0 : Giren ışın şiddeti

I : Çıkan ışın şiddeti

I_a : Absorplanan ışın şiddeti

I_d : Dağılan ışın şiddeti

I_y : Yansıyan ışın şiddeti

Şekil 2.15. Çözelti üzerine düşürülen bir ışın demetinde oluşabilecek olaylar

$$I_0 = I_a + I_y + I_d + I \quad (2.16)$$

Işının absorpsiyonu üzerine düştüğü atom, iyon veya molekülün derişim ile orantılı olarak ilk kez Lambert ve Beer tarafından ortaya konulmuştur. Beer'a göre bir çözeltiden geçen monokromatik ışın demetinin şiddeti, çözeltinin derişimi ile logaritmik, üstel veya geometrik olarak azalır.

$$I = I_0 \cdot 10^{-aC} \quad (2.17)$$

I_0 gelen ışının şiddeti, I çözeltiyi terk eden ışının şiddeti, a çözeltinin türüne ve monokromatik ışının dalga boyuna bağlı bir sabit, C ise çözeltinin derişimidir. Beer yasası, oldukça düşük derişimlerde analit içeren ortamların absorpsiyon davranışları başarılı bir şekilde ifade eder. Yüksek derişimlerde (genellikle > 0.01 M) absorpsiyon yapan moleküller arasındaki uzaklık çok azalır ve moleküller komşularının yük dağılımlarını etkiler. Bu etkileşim sonucu moleküllerin absorplama özellikleri değişir. Etkileşim derişime bağlı olduğu için derişim arttıkça doğrusallıktan sapmalar olur. Analit ayrıştığında (dissosiyasyon), çeşitli

türlerle birleştğinde (assosiyasyon) veya çözücü ile farklı absorpsiyon spektrumu olan bir ürün vermek üzere tepkime verdiğinde Beer yasasından belirgin sapmalar görülür.

Lambert'e göre, bir çözeltiden geçen monokromatik bir ışın demetinin şiddeti, çözelti içinde aldığı yolla logaritmik, üstel veya geometrik olarak azalır.

$$I = I_0 \cdot 10^{-ab} \quad (2.18)$$

b: ışın demetinin çözelti içinde aldığı yol

Yukarıda açıklanan iki kanun birleştirilerek,

$I = I_0 \cdot 10^{-abC}$ elde edilir. Eşitliğin eksi logaritması alınır,

$$\log I_0 / I = A = abC \quad (2.19)$$

Bu eşitlik kısaca, $A = abC$ (2.19) şeklinde verilir ve bu eşitlikten derişim (C) hesaplanabilir. Bu bağıntıda A değeri C'ye karşı grafiğe geçirilirse eğimi a x b olan bir doğru elde edilir.

Derişimin mol L^{-1} alınması halinde A'yi C'ye bağlayan eşitlikte katsayı ϵ ile gösterilir ve molar absorpsiyon katsayısı ya da molar absorbtivite adını alır.

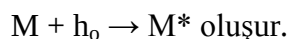
$$A = \epsilon bC \quad (2.20)$$

A değeri C'ye karşı grafiğe geçirilirse bir doğru elde edilir, ancak her zaman düzgün bir doğru elde edilemez. Absorbans ışın yolu ile doğrusal değişir, bunun çok az istisnası vardır. Diğer taraftan, b sabit tutulurken, derişim ile ölçülen absorbans arasındaki doğrusal ilişkiden sapmalarla sık sık karşılaşılır. Böyle sapmaların (hataların) çeşitli nedenleri olabilir. Bu sapmaların bazıları olayın doğasından ileri gelir ve Beer yasasına gerçek sınırlamalarını

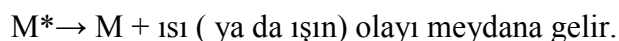
gösterir. Diğerleri absorpsiyon ölçümlerinin yapılış tarzı veya derişim değıştikçe oluşan kimyasal değışim sonucu oluşmaktadır (*Gündüz*, 1988).

2.3.1. Ultraviyole/Görünür Bölge Moleküler Absorpsiyon Spektroskopisi

UV/GB ışınları ile uyarılma, düşük enerjili atomik veya moleküler orbitallerdeki elektronların daha yüksek enerjili orbitallere çıkarılması sonucu oluşur. Uyarılmada ışının absorplanabilmesi için enerjisinin iki orbitalin enerjileri arasındaki farka eşit olması gerekmektedir. Bir maddenin ışın veya elektromagnetik enerjiyi absorblaması olayı iki basamaklıdır. Birinci basamakta;



M^* , ışın absorplayarak uyarılmış bir atom, iyon veya moleküldür. Uyarılmış olan böyle bir taneciğin ömrü 10^{-8} sn kadardır. İkinci basamakta;



UV/GB ışınlarının absorpsiyonu genellikle bağ elektronlarının uyarılmasından kaynaklanır ve sonuçta absorpsiyon piklerinin dalga boyları bağ tipi ile ilişkilidir. Moleküllerin maksimum absorpsiyon yaptıkları dalga boyu ve o dalga boyundaki absorptivite katsayıları o moleküldeki fonksiyonel grupların yapısı ve saf olup olmadığı ile ilgili bilgi verir.

2.3.2. Organik Bileşiklerin Absorpsiyonu

Dalga boyu 180-780 nm aralığına düşen ışınların organik moleküller tarafından absorpsiyonu, bağ oluşumunda doğrudan yer alan veya oksijen, kükürt, azot, halojen gibi atomların değerlik katmanlarında lokalize olmuş elektronlar ile fotonlar arasındaki etkileşmeden ortaya çıkar.

Bir organik molekülün absorpsiyon yapacağı dalga boyu, bu moleküldeki çok sayıda elektronun atomlara ne kadar sıkı tutunduğına bağlıdır. Karbon-karbon, karbon-hidrojen gibi

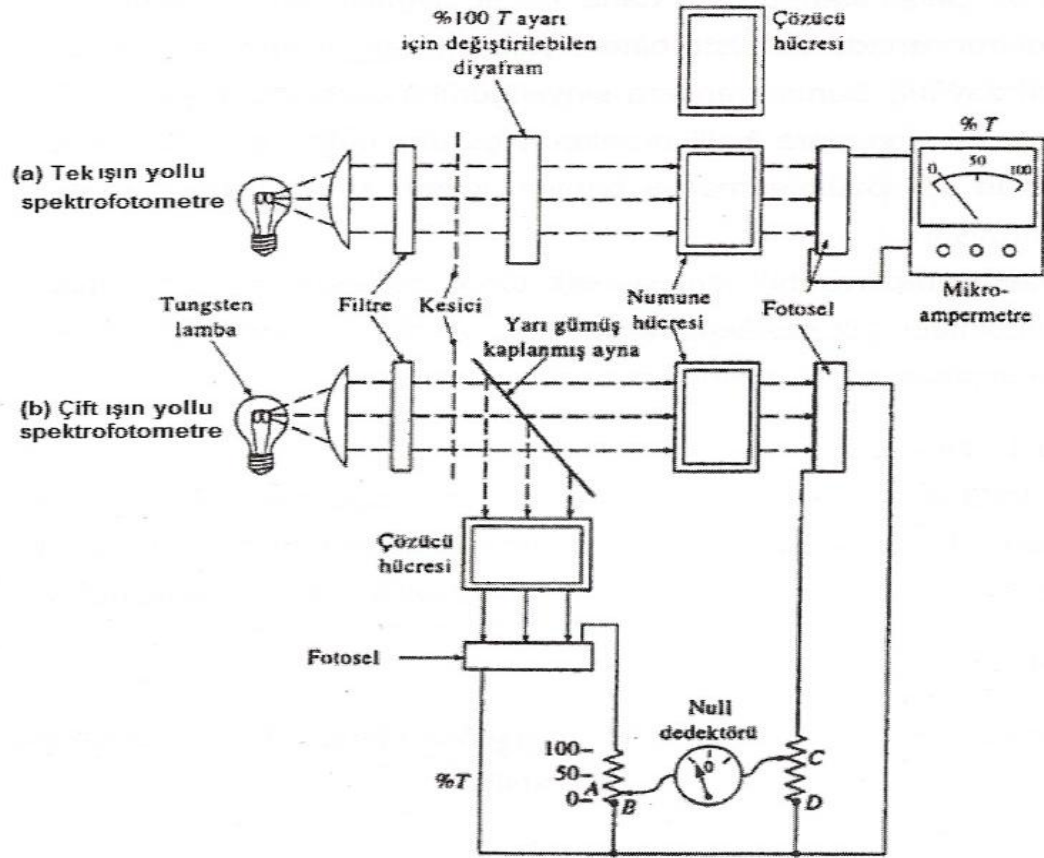
tekli bağlardaki ortaklaşmış elektronlar öylesine sıkı bağlıdırlar ki, bu elektronların uyarılması için gerekli enerji, vakum ultraviyole bölgesinde (180 nm'nin altında) ışınlar gerektirir. Organik moleküllerin ikili ve üçlü bağlarındaki elektronların uyarılması daha az enerji ister. UV/GB'de absorpsiyon yapan doymamış fonksiyonel gruplara kromofor denir. Birden çok kromoforun konjuge olması, pik maksimumlarını uzun dalga boylarına kaydırır ve UV/GB'deki absorpsiyon piklerinde titreşimlere bağlı bir genişleme olur. Bu da, absorpsiyon maksimumunun kesin olarak tayinini zorlaştırır.

Heteroatom (oksijen, azot, kükürt, halojen gibi) içeren organik moleküllerde 170-250 nm dalga boyu ışınlarla uyarılabilen ortaklaşmamış elektronlar vardır. Bu bileşiklerin bazıları (alkoller, eterler) çözücü olarak kullanılırlar ve bu çözücülerin absorpsiyonu sebebiyle, spektrumları 180-200 nm'de kesmek gerekir. Bazı hallerde, halojen ve kükürtlü bileşiklerin tayini için bu tip absorpsiyondan yararlanılır (*Skoog ve diğerleri*, 1999).

2.3.3. UV/GB Spektrofotometreleri

Spektrofotometrelerde ölçüm için dar bir ışın bandı elde etmek amacı ile şebeke veya prizma tipi monokromatörler kullanılır. Spektrofotometrelerin ölçümlerde kullanılan dalga boyunu sürekli değiştirme üstünlüğü vardır ve bu şekilde bütün bir spektrum elde edilir. UV bölgede yaklaşık 180-200 nm'den başlar ve görünür bölgenin tamamını 800 nm civarına kadar tarayabilir. Tek ışın yollu, çift ışın yollu (Şekil 2.16) ve alt ışın yollu spektrofotometreler bulunmaktadır.

Çift ışın yollu spektrofotometreler, 190-750 nm aralığında çalışmak üzere tasarlanmıştır. Cihaz, sıra ile devreye giren tungsten ve döteryum lambaları, grating monokromatörü ve bir fotoçoğaltıcı dedektörden oluşmuştur. Işın bölücü, motorla dönen, üç bölmeli bir disktr. Bu diskin üç bölmelerinden biri saydam, ikincisi saydam, üçüncüsü ise opaktır. Her dönüşte dedektör üç ayrı sinyal alır. Üç sinyal, elektronik olarak işlenerek geçirgenlik veya absorbans göstergeden okunur (*Skoog ve diğerleri*, 1998).



Şekil 2.16. Tek (a) ve Çift (b) ışın yollu spektrofotometre

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Tez Çalışmasında Kullanılan Gereçler

3.1.1 Cihazlar

HPLC sistemi	Agilent 1100
- pompa	
-Oto örnekleyici	
-UV Dedektör	
UV-GB spektrofotometre	Shimadzu

3.1.2. Kimyasal Maddeler

Parasetamol ($C_8H_9NO_2$), Sigma, $\geq$ % 99 saflıkta

Urasil ($C_4H_4N_2O_2$), Sigma

Kafein ($C_8H_{10}N_4O_2$) , Sigma, $\geq$ % 99 saflıkta

Metanol (CH_3OH), Sigma-Aldrich, $\geq$ % 99.9 saflıkta

Etanol (C_2H_5OH), Merck, $\geq$ % 96 saflıkta

3.1.3. Sarf Malzemeler

Kolon (Eclipse XDB- C_{18} , 5 μ m, 4.6 x150 mm)

3.1.4. Analizi Yapılan Farmasötik Preparatlar

Parasetamol içeren 5 farklı farmasötik preparatta çalışıldı. Bunlar; L Holde Bristol Laboratories Code BL 50[®] (Parasetamol BP 500 mg/tablet) , Parol[®] (Parasetamol 500 mg/tablet), Aspar[®] (Parasetamol 500 mg/tablet), Panadol[®] (Parasetamol 500 mg/tablet), Pirofen[®] (Parasetamol 500 mg/tablet), Pharmadol[®] (Parasetamol 500 mg/tablet). Farmasötik preparatlar Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti'nde bulunan eczanelerden temin edilmiştir.

3.2. Deneyler İçin Gerekli Hazırlıklar

3.2.1. Etkin Maddelerin Saflığı

UV Spektrofotometri yöntemi kullanılarak etkin maddelerin saflığı kontrol edilmiştir.

3.2.2. Çözeltilerin Hazırlanması

Parasetamol stok çözeltisinin ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$) hazırlanması: 0.05 g standart parasetamol tartılır ve 100 mL'lik balon jojeye aktarılır, az miktarda % 100'lük metanol eklenip ultrasonik banyoda 15 dak tamamen çözünmesi sağlanır ve 100 mL'ye % 100'lük metanol ile tamamlanır.

Kafein stok çözeltisinin ($1000 \mu\text{g mL}^{-1}$) hazırlanması: 0.025 g standart kafein tartılır ve 25 mL'lik balon jojeye aktarılır, az miktarda %100'lük metanol eklenip ultrasonik banyoda 15 dak tamamen çözünmesi sağlanır ve 25 mL'ye % 100'lük metanol ile tamamlanır.

Hareketli faz çözeltilerinin hazırlanması:

% 80 metanol çözeltinin hazırlanması: 100 mL'lik balon jojeye 20 mL distile su, 80 mL % 100'lük metanol konularak 15 dak ultrasonik banyoda karıştırılır.

% 70 metanol çözeltinin hazırlanması: 100 mL'lik balon jojeye 30 mL distile su, 70 mL % 100'lük metanol konularak 15 dak ultrasonik banyoda karıştırılır.

% 60 metanol çözeltinin hazırlanması: 100 mL'lik balon jojeye 40 mL distile su, 60 mL % 100'lük metanol konularak 15 dak ultrasonik banyoda karıştırılır.

% 50 metanol çözeltinin hazırlanması: 100 mL'lik balon jojeye 50 mL distile su, 50 mL % 100'lük metanol konularak 15 dak ultrasonik banyoda karıştırılır.

% 40 metanol çözeltinin hazırlanması: 100 mL'lik balon jojeye 60 mL distile su, 40 mL % 100'lük metanol konularak 15 dak ultrasonik banyoda karıştırılır.

% 30 metanol çözeltinin hazırlanması: 100 mL'lik balon jojeye 70 mL distile su, 30 mL % 100'lük metanol konularak 15 dak ultrasonik banyoda karıştırılır.

% 20 metanol çözeltinin hazırlanması: 100 mL'lik balon jojeye 80 mL distile su, 20 mL % 100'lük metanol konularak 15 dak ultrasonik banyoda karıştırılır.

% 15 metanol çözeltinin hazırlanması: 100 mL'lik balon jojeye 85 mL distile su, 15 mL % 100'lük metanol konularak 15 dak ultrasonik banyoda karıştırılır.

% 10 metanol çözeltinin hazırlanması: 100 mL'lik balon jojeye 90 mL distile su, 10 mL % 100'lük metanol konularak 15 dak ultrasonik banyoda karıştırılır.

3.2.3. Farmasötik Preparatların Analize Hazırlanması

HPLC ile yapılan analizlerde; 5 adet tablet alınarak 500 mL'lik balon jojeye konulur ve % 100'lük metanol eklenir, vorteks kullanılarak iyice karıştırılır. Ultrasonik banyoda 30 dak bekletilir ve 500 mL'ye % 100'lük metanol ile tamamlanır. Santrifüj edilerek ayrılır (5000 mg μL^{-1}). 200 μL santrifüjate alınarak ependorf tüpe konulur, üstüne 800 μL hareketli faz eklenir (1000 mg μL^{-1}). Son çözeltiden 25 μL alınıp 975 μL hareketli faz eklenerek (25 mg μL^{-1}) analize hazır hale getirilir.

UV spektrofotometre ile yapılan analizlerde; otomatik mikropipetle, hazırlanan 5000 mg μL^{-1} farmasötik preparat çözeltisinden 10 μL alınarak etanolla 2000 μL 'ye seyreltilerek (25 mg μL^{-1}) analize hazırlanır.

3.2.4. Spektrofotometri Yöntemiyle Farmasötik Preparatların Analizleri

Spektrofotometre sıfırlandıktan sonra kör çözelti olarak % 100'lük etanol kullanılmıştır. Standart parasetamolün % 100'lük etanol çözeltisiyle hazırlanan 5 mg μL^{-1} , 10 mg μL^{-1} , 20 mg μL^{-1} , 25 mg μL^{-1} ve 40 mg μL^{-1} 'lik çözeltileri, sırasıyla spektrofotometrede 205 nm'de ölçülür (*Kır ve diğerleri*, 1991). Daha sonra hazırlanan farmasötik preparat çözeltileri sırasıyla ölçülür.

3.2.5. HPLC ve Spektrofotometri Yöntemi ile Farmasötik Preparatların Karşılaştırılması

3.2.3 bölümde anlatıldığı gibi hazırlanan farmasötik preperat çözeltileri her biri ilk önce HPLC ile ard arda (n=5) analiz edilir. Sonra UV-spektrofotometre için hazırlanan çözeltiler ile ard arda (n=5) analiz edilir, elde edilen derişimleri istatistiksel olarak karşılaştırılır.

3.3. Analiz Yönteminin Geliştirilmesi

3.3.1. Kromatografik Koşulların Saptanması ve Optimizasyonu

Kromatografik koşullar: HPLC sisteminde, Eclipse XDB-C₁₈ (5 µm, 4.6 x150 mm i.ç.) analitik kolon kullanılmıştır. Oda sıcaklığında (20-25°C) % 80'lik metanol çözeltisi ultrasonik banyoda 15 dak bekletilerek çözünmüş gazlar uzaklaştırıldıktan sonra kolonun şartlandırılması için kullanılmıştır. HPLC sistemi ile günlük çalışmanın başlangıcında 2-3 dak cihaz üzerindeki kol açılarak (akış hızı: 5 mL dak⁻¹) HPLC borularından çıkışa kadar % 80'lik metanol geçirilir. Sonra akış hızı 0.2 mL dak⁻¹ düşürölüp, kol yavaşca kapatılır. 2-3 dak sonra akış hızı 0.8 mL dak⁻¹'ya çıkartılarak 15 dak hareketli faz geçirilir. Daha sonra gürültünün en aza indiğı ve sabit kaldığı zemin değeri elde edilene kadar hareketli faz geçirilmiş ve analizler gerçekleştirilmiştir. Kromatografik koşullardaki ölü hacim değeri metanol enjeksiyonu ile ölçölmüştür.

Hareketli fazdaki metanol miktarının saptanması için % 80, % 70, % 60, % 50, % 40, % 30, % 20, % 15 ve % 10 oranları, hareketli fazın akış hızının saptanması için 0.4 mL dak⁻¹, 0.5 mL dak⁻¹, 0.6 mL dak⁻¹, 0.8 mL dak⁻¹, 1 mL dak⁻¹, akış hızları test edilmiştir.

Bu çalışmalar sırasında, kromatografik davranışın incelendiğı hareketli fazda hazırlanan parasetamolün standart çözeltileri kullanılmış ve UV/GB dedektör ile teşhis yapılmıştır.

3.3.2. Kalibrasyon Eğrilerinin Hazırlanması

0.1, 0.5, 5, 10, 20 ve 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ derişimdeki parasetamol çözeltileri, stok parasetamol çözeltilisinden hazırlanıp, hareketli faz (% 40 MeOH + % 60 H₂O) çözeltisiyle seyreltilmiştir. Çözeltilere son derişim 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ olacak şekilde kafein stok çözeltisi iç standart olarak eklenmiştir.

3.3.3. Yöntemlerin Validasyonu Çalışmaları

Yöntem validasyonu için doğrusallık, aralık, özgünlük, doğruluk, kesinlik, duyarlılık, kararlılık, tekrarlanabilirlik, sağlamlık ve tutarlılık parametreleri incelenmiş (*Ermer*, 2001; *Shabir*, 2007) ve sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir (*Alpar*, 2001).

Doğrusallık

Doğrusallık aralığını saptamak için hazırlanan artan derişimlerdeki (0.1-40 $\mu\text{g mL}^{-1}$) standart çözeltiler HPLC cihazında 246 nm’de analiz edilmiş, kromatogramlar kaydedilmiştir. Kalibrasyon eğrileri, parasetamol derişimlerine karşı; parasetamolün pik alanı/ kafein pik alanı oranının grafiğe geçirilmesiyle oluşturulmuştur. Kalibrasyon eğrilerine ait regresyon denklemleri ve korelasyon katsayıları hesaplanmıştır. Kalibrasyon eğrilerinin doğrusallıktan ayrılış ve korelasyon katsayılarının önem kontrolüne ait istatistiksel değerlendirmeler (Ek 1) yapılmıştır.

Aralık

Belirlenen aralık, normal olarak doğrusallık çalışmalarından elde edilir ve işlemin amaçlanan kullanımına bağlıdır. Aralık, analitik işlemin belirlenen aralık içinde analit içeren örneklere uygulandığı zaman, analitik yöntemin kabul edilebilir doğruluk, doğrusallık ve kesinliği sağlayabildiğini göstermek için tespit edilmiştir (*ICH Q2(R1)*, 2005).

Özgünlük (Seçicilik)

Yöntemin özgünlüğü için standart parasetamol ve tablet çözeltilerinin analizleri ile elde edilen kromatogramlar karşılaştırılmıştır. Parasetamolün farmasötik preparat içindeki yardımcı maddelerle girişim yapıp yapmadığı araştırılmıştır.

Doğruluk

Analiz sonrasında elde edilen değerlerin gerçek değerlere yakınlığını gösteren gün içi ve günler arası doğruluk çalışmaları için 0.5, 10 ve 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ olmak üzere üç farklı derişimde altışar çözelti hazırlanmış ve aynı gün içinde analizleri gerçekleştirilmiştir.

Gün içi doğruluk çalışmaları, aynı gün içinde üç farklı derişimlerde hazırlanan altı çözeltinin analizlerinden elde edilen cevapların % bağıl hata (BHATA) değerlerinin hesaplanması ile yapılmıştır (n=6). Günler arası doğruluk değerleri ise 3 farklı derişimdeki çözeltilerin ard arda 6 gün hazırlanması ile elde edilen çözeltilerin cevaplarının (n=6) % bağıl hata değerleri ile ifade (Ek 2) edilmiştir.

Kesinlik

Analiz sonuçlarının birbirine yakınlığını gösteren kesinlik değerleri % bağıl standart sapma (BSS) ile verilmiştir.

Gün içi kesinlik çalışmaları için; 0.5, 10 ve 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ olmak üzere üç farklı derişimde altışar çözelti hazırlanmış, aynı gün içinde analizleri gerçekleştirilmiş ve % bağıl standart sapma değerlerinin hesaplanması ile yapılmıştır (n=6). Günler arası kesinlik değerleri ise 3 farklı derişimdeki çözeltilerin ard arda 6 gün hazırlanması ile elde edilen çözeltilerin cevaplarının (n=6) % bağıl standart sapma değerleri ile ifade (Ek 2) edilmiştir.

Duyarlılık (Gözlenebilirlik Sınırı ve Alt Tayin Sınırı)

Analiz yönteminin duyarlılığının kanıtlanması amacıyla geliştirilen yöntemlerin gözlenebilirlik sınırı (LOD) ve alt tayin sınırı (LOQ) saptanmıştır. HPLC yönteminin gözlenebilirlik sınırı, sinyal/gürültü (S/G) oranı 3 olduğunda saptanabilen parasetamol derişimi olarak alınmıştır. Alt tayin sınırı ise, S/G oranı 10 olduğunda saptanabilen parasetamol derişimi olarak alınmıştır (*ICH Q2(R1)*, 2005).

Kararlılık

Buzdolabında (+4 °C) saklanan 500 µg mL⁻¹ 'lik parasetamol stok çözeltisinin kararlılığını saptamak için dört ay süresince her ay parasetamol stok çözeltisi seyreltilerek hazırlanan 10 µg mL⁻¹ parasetamol ve 10 µg mL⁻¹ kafein içeren çözeltinin analizi yapılmış ve HPLC'de elde edilen pik alan değerleri istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır.

Tekrarlanabilirlik

Yöntemlerin tekrarlanabilirlik çalışmalarında; doğrusallık aralığına giren 10 µg mL⁻¹ derişimde parasetamol içeren on ayrı çözelti hazırlanmış ve aynı gün içinde analizleri yapılmıştır. Parasetamolün HPLC yöntemi ile analizde enjeksiyon tekrarlanabilirliği için, 10 µg mL⁻¹ parasetamol çözeltinin aynı vialden 10 kez tekrarlanan enjeksiyonu ile elde edilen pik alanlarının % bağıl standart sapma değerleri hesaplanmıştır.

Sağlamlık

Geliştirilen HPLC yönteminin sağlamlığının sınanması için, metanol oranı ve akış hızı parametrelerinde yapılan küçük değişimler sonucu bulguların ne kadar etkilendiği araştırılmıştır.

Tutarlılık

HPLC’de farklı araştırmacının etkisi incelenmiştir. Araştırmacı 1. ve araştırmacı 2. olmak üzere iki farklı araştırmacı tarafından hazırlanan, $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ derişimde parasetamol çözeltileri ($n=5$) HPLC yöntemi ile ayrı ayrı analiz edilip istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır.

3.3.4. Sistemin Uygunluk Testi

Sistem uygunluk testi cihazın, elektronik parçaların, analitik işlemlerin ve örneklerin bir arada değerlendirilebilmesi temelini esas alır (*ICH Q2(R1)*, 2005). Sistem uygunluğu testleri farmakopelerde özellikle kromatografik yöntemler için talep edilmektedir. Geliştirilen HPLC yönteminin sistem uygunluğu; United States Pharmacopeia (2005)’de belirtilen (Tablo 3.1) enjeksiyon kesinliği, kapasite faktörü, ayırıcılık, teorik tabaka sayısı ve pik asimetri oranına göre değerlendirilmiştir (*USP*, 2005). Test için aynı standart çözeltinin 6 tekrarlı enjeksiyonu sonucunda elde edilen veriler kullanılmıştır.

Tablo 3.1. Sistem uygunluk test kriterleri

Test edilen parametre	Sınır değeri
Enjeksiyon kesinliği	$BSS \leq \%2$, $n > 5$
Kapasite faktörü (k')	> 2
Ayırıcılık (R_s)	> 1.5
Pik asimetri oranı (PAO)	≤ 1.5
Teorik tabaka sayısı (N)	> 2000

BSS:Bağıl standart sapma, n:Enjeksiyon sayısı

3.4. Farmasötik Preparatların Analizi

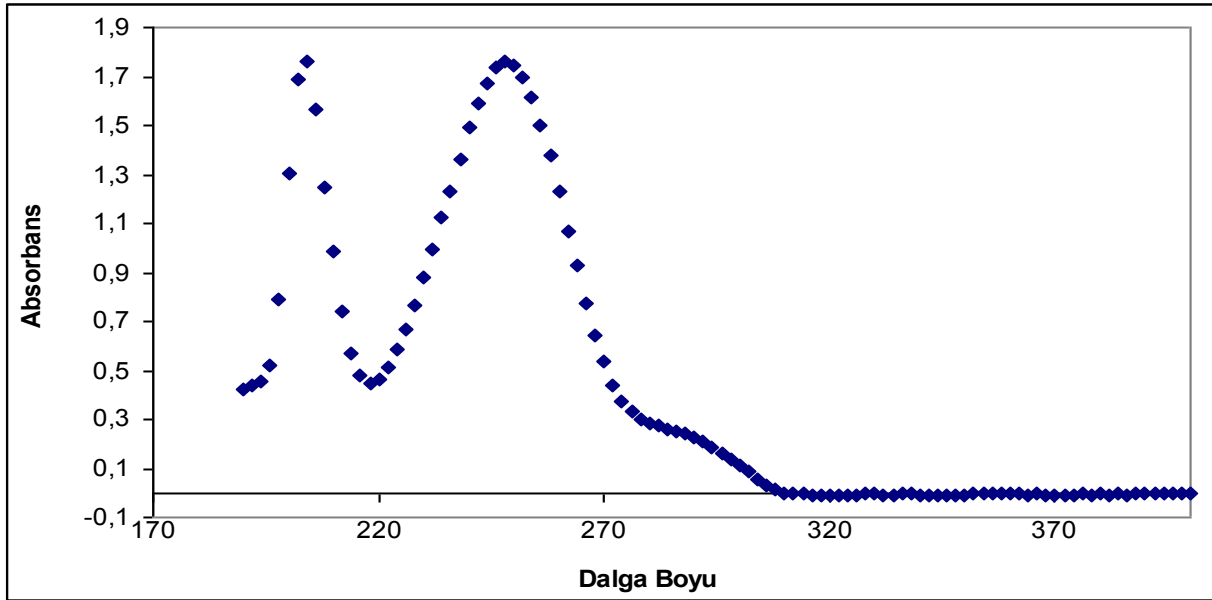
3.3.4 bölümde anlatıldığı şekilde hazırlanan farmasötik preparat numuneleri optimize ve valide edilen HPLC yöntemi ile analiz edilmiş ve parasetamol / iç standart (kafein) pik alan oranları regresyon denkleminde yerine konularak parasetamol miktarları bulunmuş ve sonuçlardan tablet içindeki parasetamol miktarları hesaplanmıştır.

4. BULGULAR

4.1. HPLC Yöntemi Optimizasyon Bulguları

4.1.1. Parasetamol Analizi için Dalga Boyu Taranması

Standart parasetamolün $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ 'lik stok çözeltisinin 180 – 400 nm dalga boyu aralığında UV spektrumu alındığında standart parasetamolün 204-205 nm ve 246 nm'de absorbens yaptığı saptanmıştır. Parasetamol maddesinin absorbensı HPLC'de UV/GB dedektör kullanılarak 204, 205 ve 246 nm dalga boylarında $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ derişimine karşı ölçülmüştür. Standart parasetamolün absorbensının en büyük olduğu 246 nm ölçüm dalga boyu olarak seçilmiştir.



Şekil 4.1. Parasetamolün metanoldaki absorbsiyon spektrumu

4.1.2. Sabit Faz

Bu çalışmada standart parasetamolün ve kafeinin kromatografik ayrımında Eclipse XDB-C₁₈, (5 μm , 4,6 x150 mm i.ç.) analitik kolon kullanılmıştır.

4.1.3. Hareketli Fazın Belirlenmesi

Hareketli faz bileşiminin belirlenmesinde; hareketli faz organik çözücü türü ve oranı ile akış hızının kromatografik ayırma etkileri incelenmiştir.

4.1.4. Organik Çözücü Türü ve Miktarının Standart Parasetamol Ayırımına Etkisi

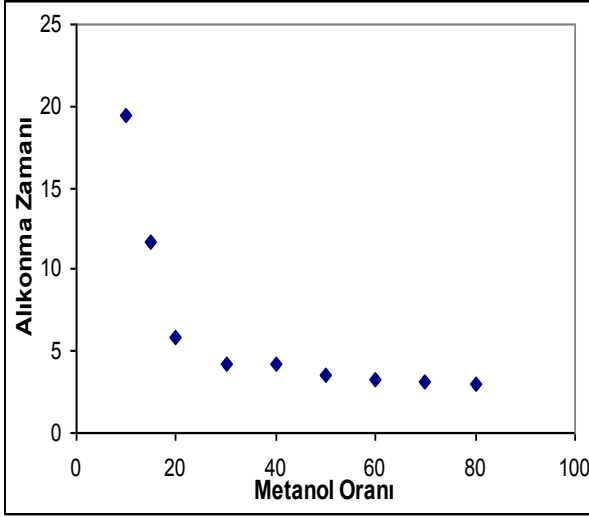
Hareketli faz olarak metanol yüzdesinin değiştirildiği metanol-su karışımları kullanılarak kromatografik parametrelere etkileri incelenmiştir. Hareketli faz içeriğindeki metanol oranı arttıkça zaman maddenin alıkonma zamanının azaldığı gözlenmiştir (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Metanol yüzdesinin kromatografik parametrelere etkisi

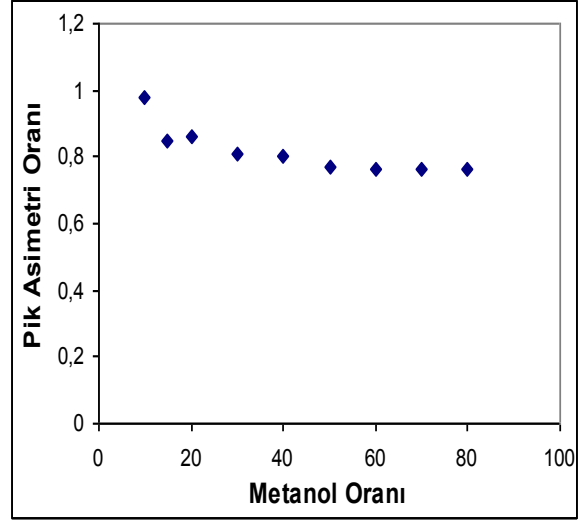
	Parametreler			
MeOH (%)	t_R	PAO	N	H
10	19.387	0.98	41428	37
15	11.690	0.95	40275	47
20	5.878	0.86	38372	84
30	4.186	0.81	49679	65
40	4.189	0.80	48044	164
50	3.546	0.77	45528	110
60	3.287	0.76	22064	131
70	3.119	0.76	19669	378
80	3.015	0.76	44554	162

Parasetamol derişimi: 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, MeOH: Metanol, t_R : Alıkonma zamanı, PAO: Pik asimetri oranı, N: Teorik tabaka sayısı, H:Eşdeğer teorik plaka yüksekliği, $\lambda_{\text{(dalga boyu)}}$:246 nm, $V_{\text{(akış hızı)}}$: 0.8 mL dak⁻¹

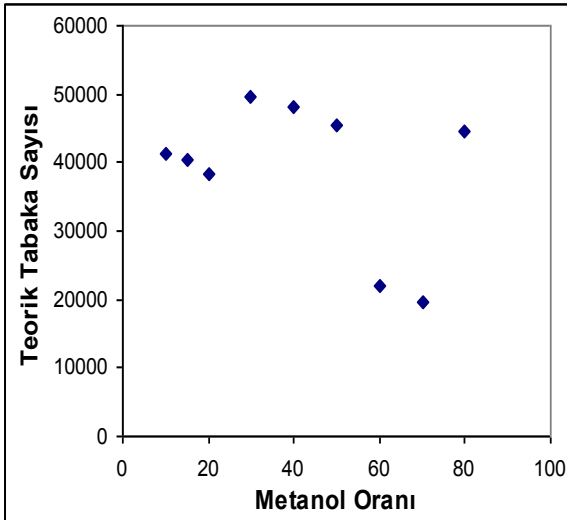
Hareketli fazdaki metanol oranı ile alıkonma zamanı, pik asimetri oranı, teorik tabaka sayısı ve eşdeğer teorik tabaka yüksekliğinin değişimi incelendiğinde (Şekil 4.2 - 4.5), teorik tabaka sayısının en yüksek ve pik asimetri oranının bire yakın olduğu ve en uygun alıkonma zamanını sağlayan % 40 metanol yüzdesi ile çalışılması düşünülmüş ve akış hızı belirlenmesi çalışmalarına geçilmiştir.



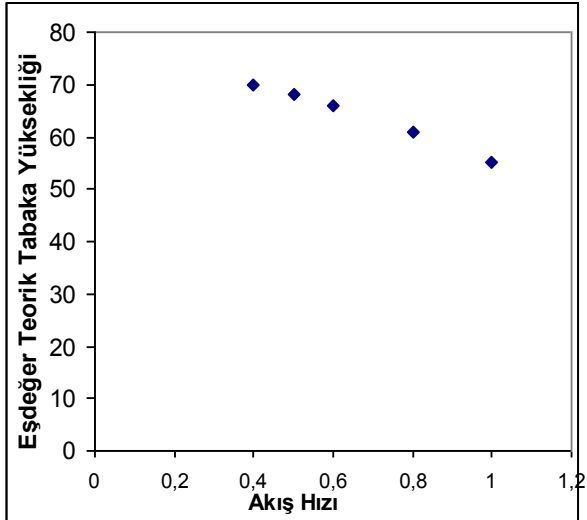
Şekil 4.2. Hareketli faz metanol oranına göre alıkonma zamanının değişimi



Şekil 4.3. Hareketli faz metanol oranına göre pik asimetri oranının değişimi



Şekil 4.4. Hareketli faz metanol oranına göre teorik tabaka sayısının değişimi



Şekil 4.5. Hareketli faz metanol oranına göre eşdeğer teorik tabaka yüksekliğinin değişimi

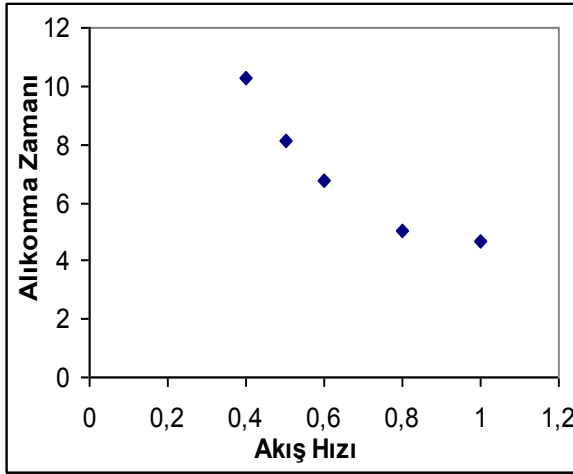
4.1.5. Hareketli Faz Akış Hızlarının Belirlenmesi

Hareketli faz akış hızının parasetamol analizine etkisinin incelenmesinde, 246 nm’de, % 20 metanol + % 80 su, % 80 metanol + % 20 su, % 30 metanol + % 70 su, ve % 40 metanol + % 60 su içeren dört farklı hareketli faz sistemi kullanılmıştır. Her bir hareketli faz 0.4, 0.5, 0.6, 0.8 ve 1 mL dak⁻¹ akış hızlarında HPLC sistemine verilerek kromatografik parametrelere akış hızındaki değişimin etkileri incelenmiştir (Tablo 4.2 - 4.5, Şekil 4.6 - 4.20).

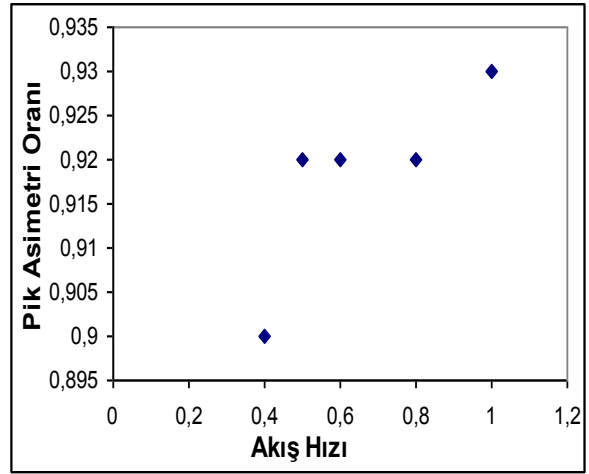
Tablo 4.2. % 20 MeOH+ % 80 H₂O içeren hareketli fazda farklı akış hızlarındaki kromatografik bulgular

Akış Hızı (mL dak ⁻¹)	Alan (mAUxsn)	Yükseklik (mAU)	Pik Genişliği (dak)	PAO	t _R (dak)	N	H
0.4	971	70	0.211	0.90	10.276	37907	70
0.5	764	68	0.173	0.92	8.154	35506	68
0.6	637	66	0.147	0.92	6.737	33515	66
0.8	474	61	0.119	0.92	5.035	28692	61
1	387	55	0.108	0.93	4.644	29584	55

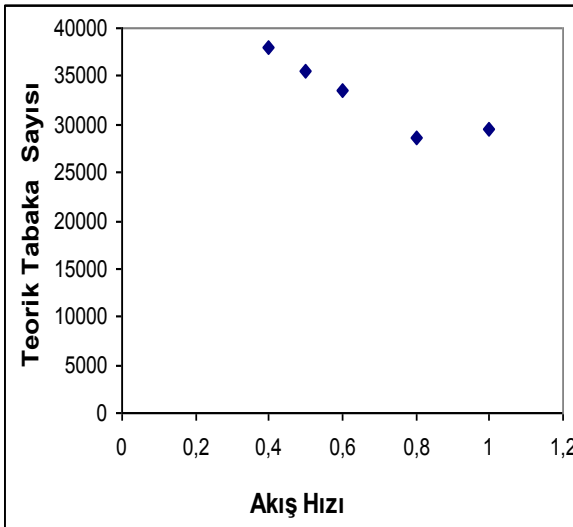
Parasetamol derişimi: 5 µg mL⁻¹, MeOH: Metanol, t_R: Alıkonma zamanı, PAO: Pik asimetri Oranı, N: Teorik tabaka sayısı, H:Eşdeğer teorik plaka yüksekliği, λ(dalga boyu):246 nm.



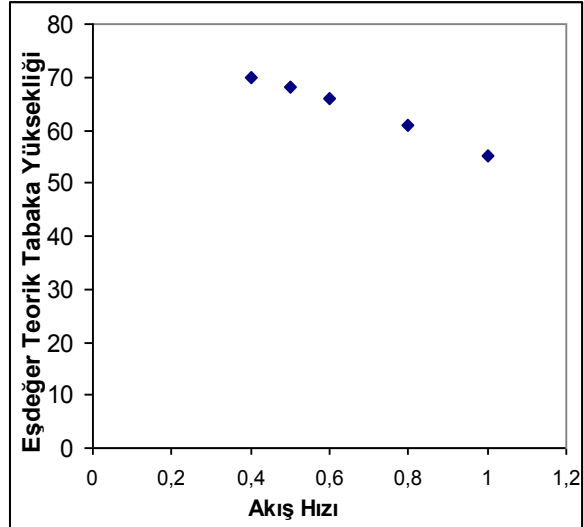
Şekil 4.6. % 20 MeOH + % 80 H₂O hareketli faz akış hızı ile alıkonma zamanı değişimi



Şekil 4.7. % 20 MeOH + % 80 H₂O hareketli fazı akış hızı ile pik asimetri oranının değişimi



Şekil 4.8. % 20 MeOH + % 80 H₂O hareketli faz akış hızı ile teorik tabaka sayısının değişimi

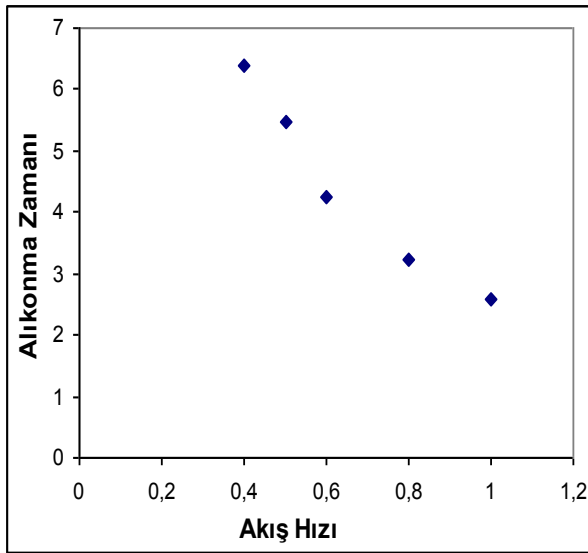


Şekil 4.9. % 20 MeOH + % 80 H₂O hareketli faz akış hızı ile eşdeğer teorik tabaka yüksekliğinin değişimi

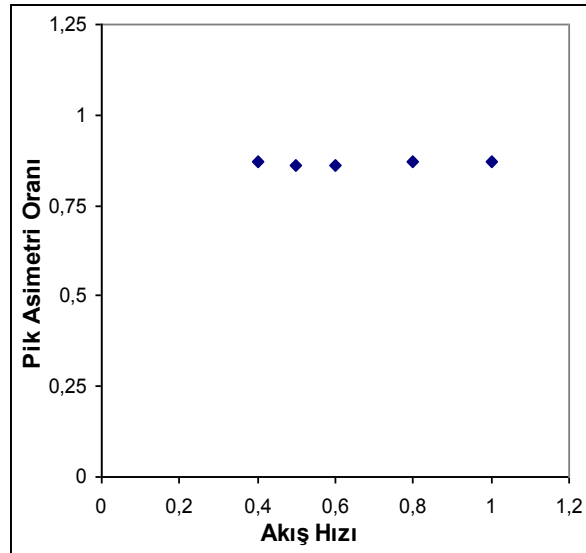
Tablo 4.3. % 30 MeOH+ %70 H₂O içeren hareketli fazda farklı akış hızlarındaki kromatografik bulgular

Akış Hızı (mL dak ⁻¹)	Alan (mAUxsn)	Yükseklik (mAU)	Pik Genişliği (dak)	PAO	t _R (dak)	N	H
0.4	925	74	0.157	0.87	6.389	26456	85
0.5	715	76	0.136	0.86	5.486	24798	81
0.6	649	89	0.110	0.86	4.245	23828	83
0.8	481	80	0.091	0.87	3.240	16777	80
1	374	71	0.080	0.87	2.589	16926	71

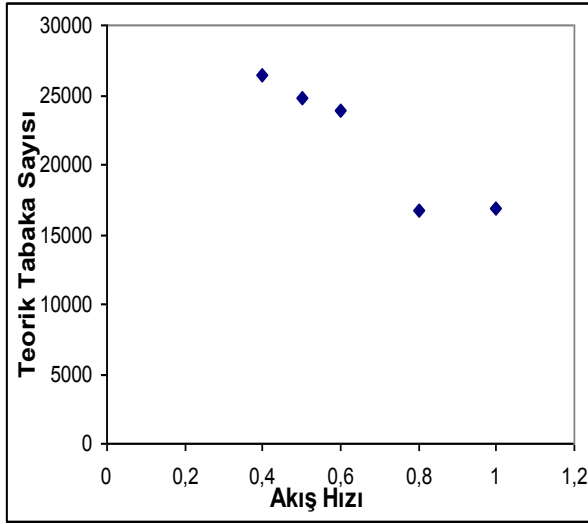
Parasetamol derişimi: 5 µg mL⁻¹, MeOH: Metanol, t_R: Alıkonma zamanı, PAO: Pik asimetri Oranı, N: Teorik tabaka sayısı, H:Eşdeğer teorik plaka yüksekliği, λ(dalga boyu):246 nm.



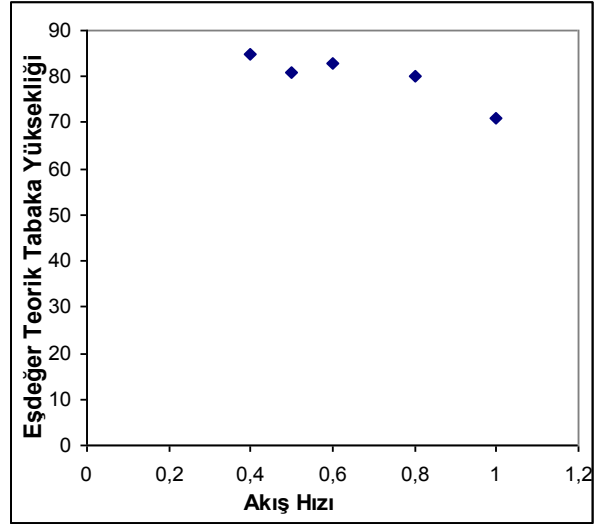
Şekil 4.10. % 30 MeOH + % 70 H₂O hareketli faz akış hızı ile alıkonma zamanının değişimi



Şekil 4.11. % 30 MeOH + % 70 H₂O hareketli faz akış hızı ile pik asimetri oranının değişimi



Şekil 4.12. % 30 MeOH + % 70 H₂O hareketli fazı akış hızı ile teorik tabaka sayısının değişimi

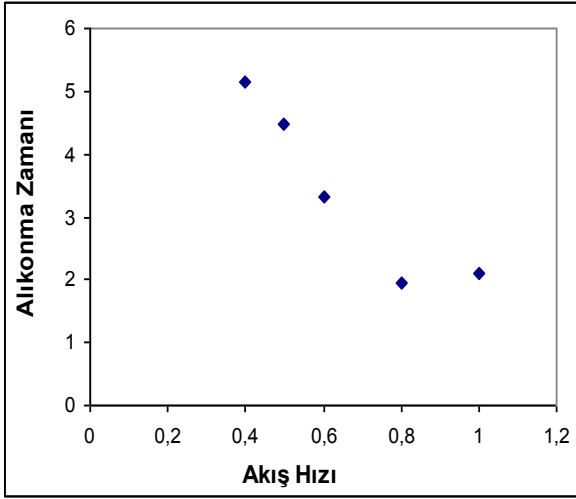


Şekil 4.13. % 30 MeOH + % 70 H₂O hareketli faz akış hızı ile eşdeğer teorik tabaka yüksekliğinin değişimi

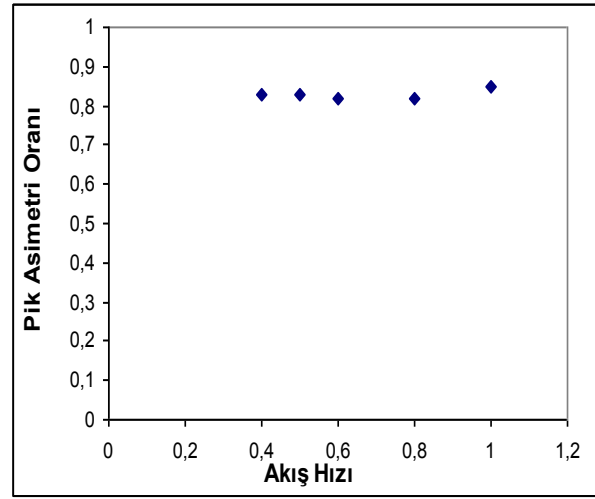
Tablo 4.4. % 40 MeOH+ % 60 H₂O içeren hareketli fazda farklı akış hızlarındaki kromatografik bulgular

Akış Hızı (mL dak ⁻¹)	Alan (mAUxsn)	Yükseklik (mAU)	Pik Genişliği (dak)	PAO	t _R (dak)	N	H
0.4	1012	101	0.1415	0.83	5.136	26666	95
0.5	890	98	0.1265	0.83	4.468	25997	91
0.6	630	95	0.1007	0.82	3.342	23828	89
0.8	185	94	0.0757	0.82	1.952	20283	80
1	378	83	0.0689	0.85	2.101	16926	71

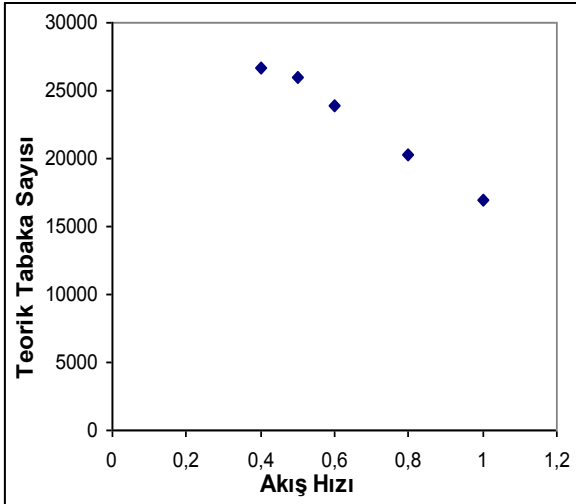
Parasetamol derişimi: 5 µg mL⁻¹, MeOH: Metanol, t_R: Alıkonma zamanı, PAO: Pik asimetri oranı, N: Teorik tabaka sayısı, H:Eşdeğer teorik plaka yüksekliği, λ(dalga boyu):246 nm.



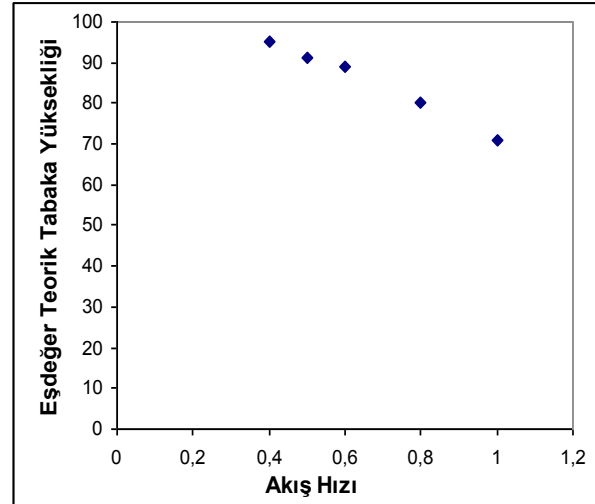
Şekil 4.14. % 40 MeOH + % 60 H₂O hareketli faz akış hızı ile alıkonma zamanının değişimi



Şekil 4.15. % 40 MeOH + % 60 H₂O hareketli faz akış hızı ile pik asimetri oranının değişimi



Şekil.4.16. % 40 MeOH+% 60 H₂O hareketli faz akış hızı ile teorik tabaka sayısının değişimi

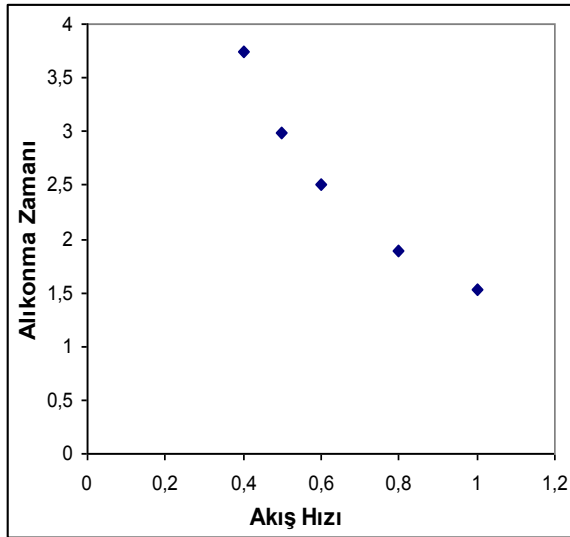


Şekil 4.17. % 40 MeOH+% 60 H₂O hareketli faz akış hızı ile eşdeğer teorik tabaka yüksekliğinin değişimi

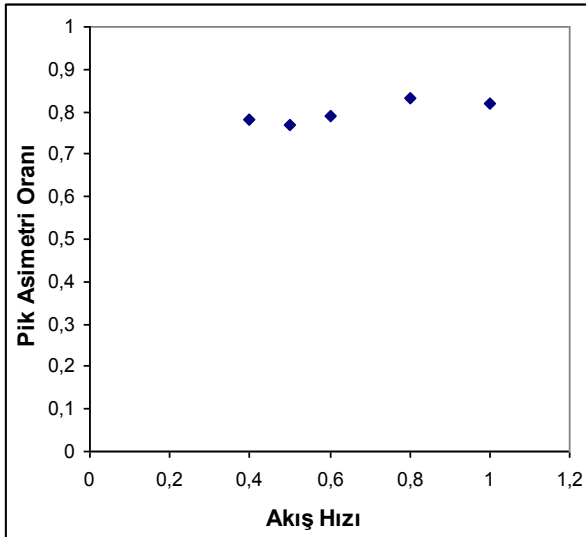
Tablo 4.5. % 80 MeOH+ % 20 H₂O içeren hareketli fazda farklı akış hızlarındaki kromatografik bulgular

Akış Hızı (mL dak ⁻¹)	Alan (mAUxsn)	Yükseklik	Pik Genişliği (dak)	PAO	t _R (dak)	N	H
0.4	1205	165	0.1104	0.78	3.75	18450	165
0.5	969	163	0.0886	0.77	2.99	18259	163
0.6	909	177	0.0764	0.79	2.50	17132	177
0.8	768	161	0.0728	0.83	1.88	10636	161
1	514	139	0.0553	0.82	1.52	12088	139

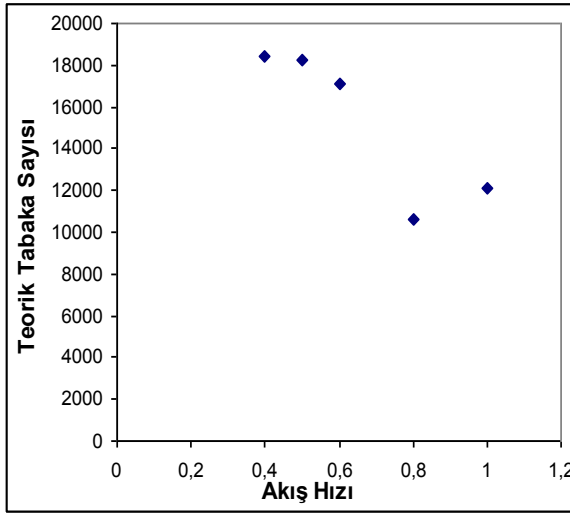
Parasetamol derişimi: 5 µg mL⁻¹, MeOH: Metanol, t_R: Alıkonma zamanı, PAO: Pik asimetri oranı, N: Teorik tabaka sayısı, H:Eşdeğer teorik plaka yüksekliği, λ(dalga boyu):246 nm.



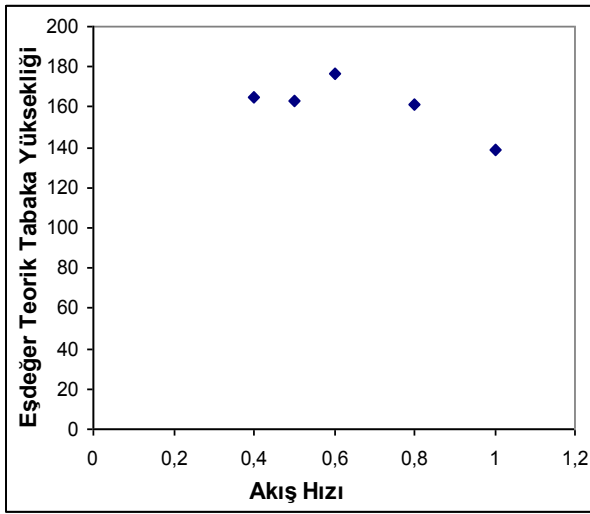
Şekil 4.18. % 80 MeOH + % 20 H₂O hareketli faz akış hızı ile alıkonma zamanının değışimi



Şekil 4.19. % 80 MeOH + % 20 H₂O hareketli faz akış hızı ile pik asimetri oranının değışimi



Şekil.4.20. % 80 MeOH + % 20 H₂O hareketli faz akış hızı ile teorik tabaka sayısının değişimi



Şekil 4.21. % 80 MeOH + % 20 H₂O hareketli faz akış hızı ile eşdeğer teorik tabaka yüksekliğinin değişimi

Farklı oranda metanol içeren hareketli fazlarda yapılan çalışmalarda akış hızlarındaki artışla orantılı olarak piklerin alanı, genişliği, alıkonma zamanları, teorik tabaka sayısı ve eşdeğer teorik plaka yüksekliğinin azaldığı saptanmıştır. Pik simetrisinin de en uygun olduğu % 40 MEOH + % 60 H₂O hareketli faz ile 0.8 mL dak⁻¹ akış hızı en uygun ortam olarak seçilmiştir.

4.1.6. İç Standart Seçimi

Parasetamolün HPLC yöntemi analizinde iç standart olarak kafein kullanılmış ve kafeinin derişiminin belirlenmesi için 5 µg mL⁻¹ ve 10 µg mL⁻¹ kafein eklenmesi ile saptanan şartlarda analizler yapılmıştır (Tablo 4.6).

Kapasite faktörü ve seçiciliğin hesaplanmasında, ölü zamanın (t₀) belirlenmesi için 1µg mL⁻¹ urasil kullanılmıştır.

Tablo 4.6. Eklenen iç standart miktarının kromatografik parametreler üzerine etkisi

	t_R	PAO	k'	N	α	R_s	Kafeinin Alanı	Kafeinin Yüksekliği
5 ppm Standart Parasetamol + 1ppm Urasil + 5 ppm Kafein	0.636	0.82	0.33	15745	2.47	17.48	150	23
5 ppm Standart Parasetamol + 1ppm Urasil + 10 ppm Kafein	0.684	0.83	0.31	18257	2.41	9.90	292	43

t_R =alınma zamanı, PAO=Pik Asimetri Oranı, k' =Kapasite Faktörü, N=Teorik Tabaka Sayısı, α =Seçicilik, R_s =Ayrıcılık, kromatografik koşullar; % 40 MeOH+ % 60 H₂O hareketli faz, 0.8 mL dak⁻¹ akış hızı, λ = 246 nm.

4.1.7. Enjeksiyon Hacminin Belirlenmesi

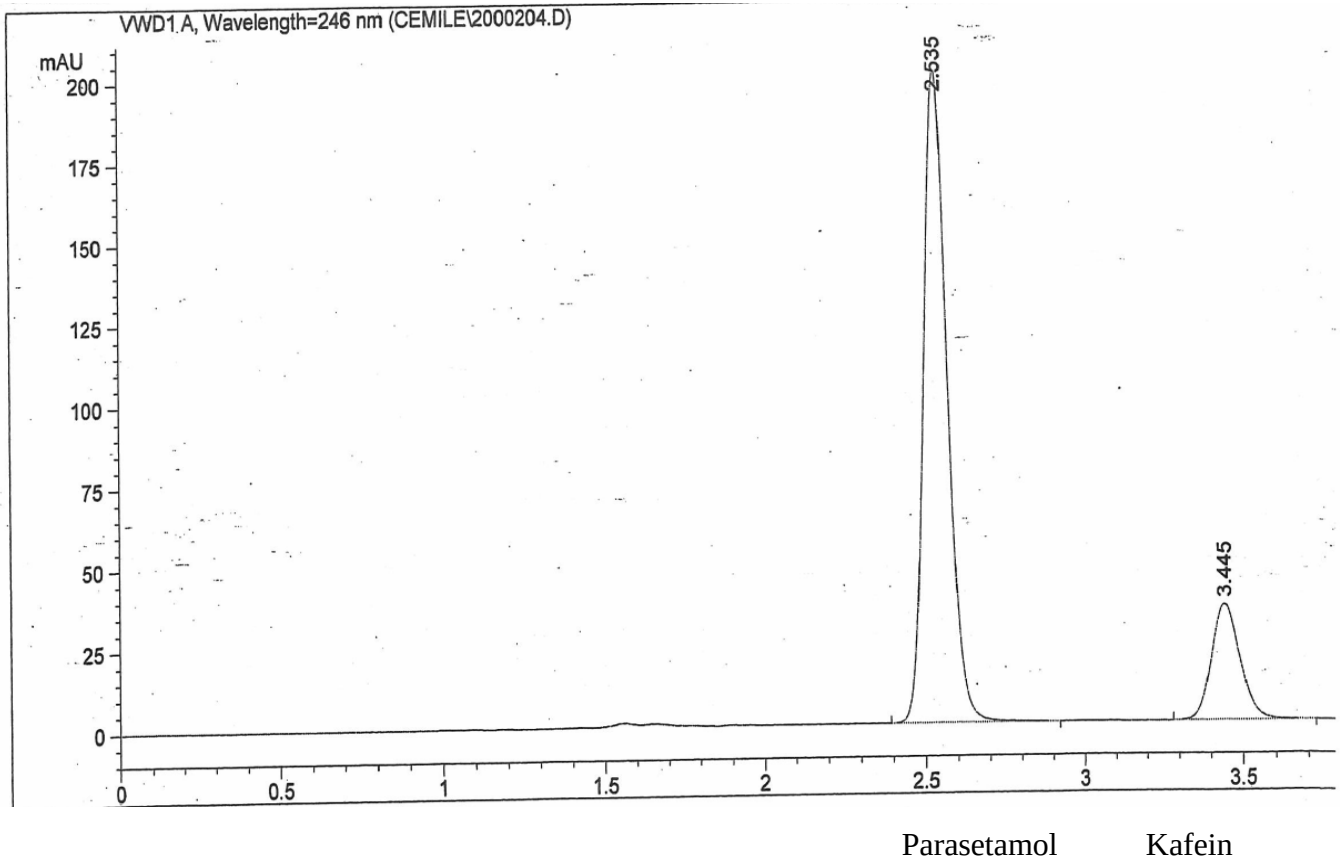
“Loop” hacmi 20 μ L olduğundan tüm enjeksiyonlar 20 μ L yapılmıştır.

Yapılan çalışmalar sonucunda HPLC için belirlenen kromatografik koşullar Tablo 4.7’te verilmiştir.

Saptanan optimum koşullarda parasetamolün alınma zamanı; 2.535 dak olarak bulunmuştur. İç standart olarak kullanılan kafeinin alınma zamanı ise 3.445 dak’dır (Şekil 4.22).

Tablo 4.7. Parasetamolün HPLC sistemi ile analizinde belirlenen kromatografik koşullar

Kolon	Eclipse XDB-C ₁₈ , 5µm, 4.6 x150 mm
Dedektör	246 nm
Akış Hızı	0.8 mL dak ⁻¹
Enjeksiyon Hacmi	20 µL
Hareketli Faz	% 40 MeOH + % 60 H ₂ O

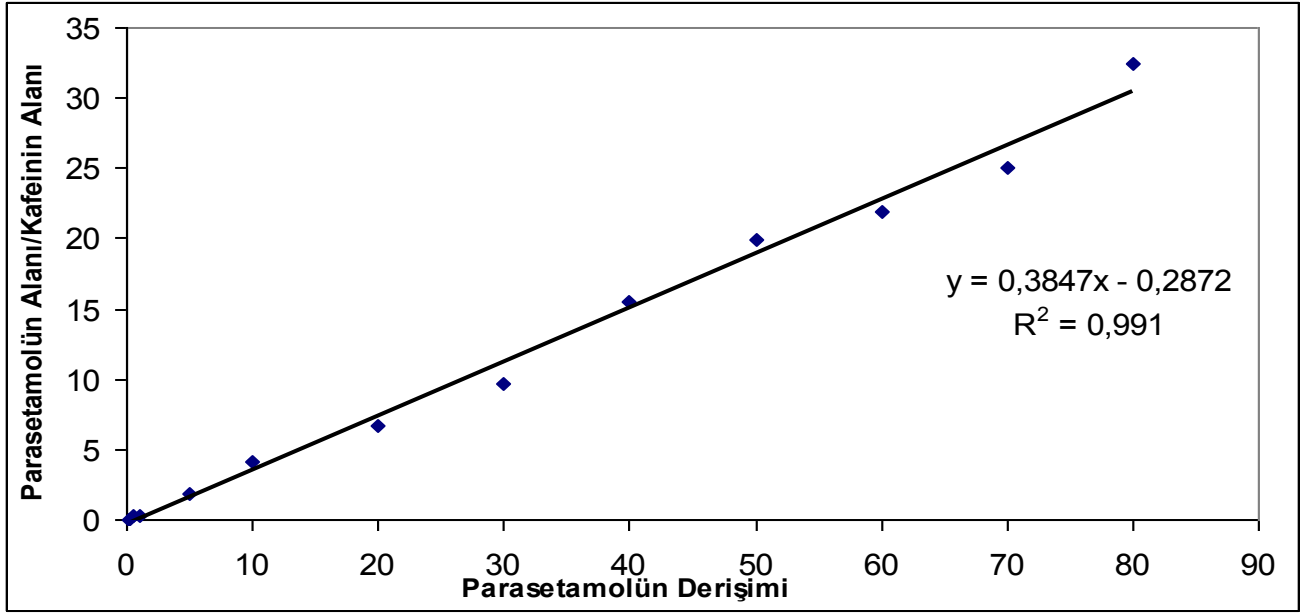
**Şekil 4.22.** Standart Parasetamolün HPLC ile analizine ait kromatogram

Parasetamolün derişimi; 10 µg mL⁻¹, iç standart (kafein) derişimi; 10 µg mL⁻¹, kromatografik koşullar; % 40 MeOH+ % 60 H₂O hareketli faz, 0.8 mL dak⁻¹ akış hızı, λ= 246 nm.

4.2. HPLC Yönteminin Validasyon Bulguları

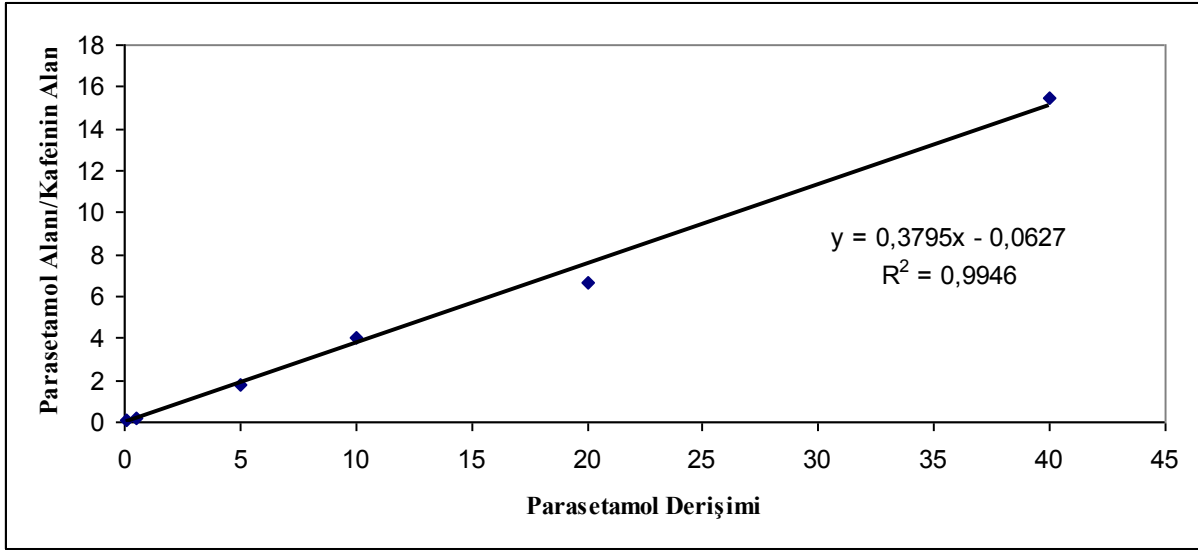
4.2.1. Doğrusallık ve Aralık

Parasetamol derişimleri, parasetamol pik alanının iç standart olarak seçilen kafein pik alanı oranına karşı grafiğe geçirildiğinde 0.05 ile 80 $\mu\text{g mL}^{-1}$ aralığında doğrusal olan kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir (Şekil 4.23).



Şekil 4.23. Parasetamol için HPLC yöntemi kalibrasyon eğrisi (n=15) (Derişim $\mu\text{g mL}^{-1}$ olarak verilmiştir).

Derişim ve alan oranları arasındaki doğrusal ilişkiden yararlanılarak 0.1- 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ çalışma aralığı olarak seçilmiştir. Çalışma aralığında (0.1, 0.5, 5, 10, 20 ve 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$), oluşturulan kalibrasyon eğrisi Şekil 4.24'de ve elde edilen sisteme uygunluk parametreleri Tablo 4.8.'te verilmiştir.



Şekil 4.24. Parasetamolün HPLC yöntemi ile çalışma aralığında elde edilen kalibrasyon eğrisi. (Parasetamol derişimi: µg mL⁻¹).

Tablo 4.8. Çalışma aralığındaki derişimlerde sistem uygunluk test değerleri

Derişim (µg mL ⁻¹)	t _R	PAO	k'	N	Rs
0.1	2.63	0.83	0.34	14825	9.65
0.5	2.84	0.84	0.32	15849	9.64
5	2.86	0.83	0.32	16184	9.80
10	2.46	0.84	0.35	11997	8.91
20	2.73	0.83	0.36	13083	9.83
40	2.46	0.85	0.35	12335	8.90

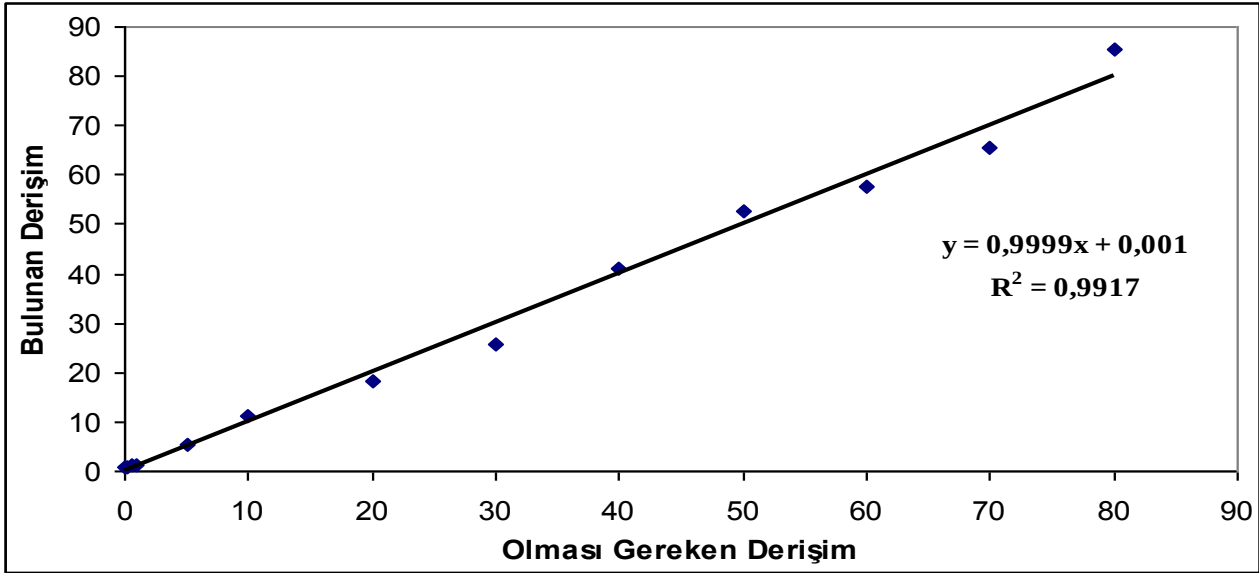
t_R=alınma zamanı, PAO=Pik Asimetri Oranı, k'=Kapasite Faktörü, N=Teorik Tabaka Sayısı, Rs=Ayırıcılık

Kalibrasyon eğrisinin doğrusallıktan ayrılış önem kontrolü ve korelasyon katsayısının önem kontrolü istatistiksel değerlendirmelerine ait veriler Tablo 4.9'da ve yöntemin doğrusallık kontrol grafiği Şekil 4.25'de verilmiştir.

Tablo 4.9. Parasetamolün HPLC ile analizinden elde edilen kalibrasyon eğrisinin doğrusallıktan ayrılış ve korelasyon katsayısının önem kontrolü

Korelasyon Katsayısı Önem Kontrolü						
N	R	S _r	t _H	t _T		
6	0,9972	0,0367	738,4420	2,78		
t _H >t _T : Korelasyon katsayısı tesadüfe bağlı bir değer değildir (p>0,05).						
Doğrusallıktan Ayrılış Önem Kontrolü						
RKT	YOAKT	RAKT	RAKO	RKO	F _H	F _T
168,9222	169,8421	0,9201	42,2305	168,9222	4,00	7,70
F _H >F _T : Derişim ile pik alan oranı arasındaki ilişki doğrusaldır (p>0,05).						

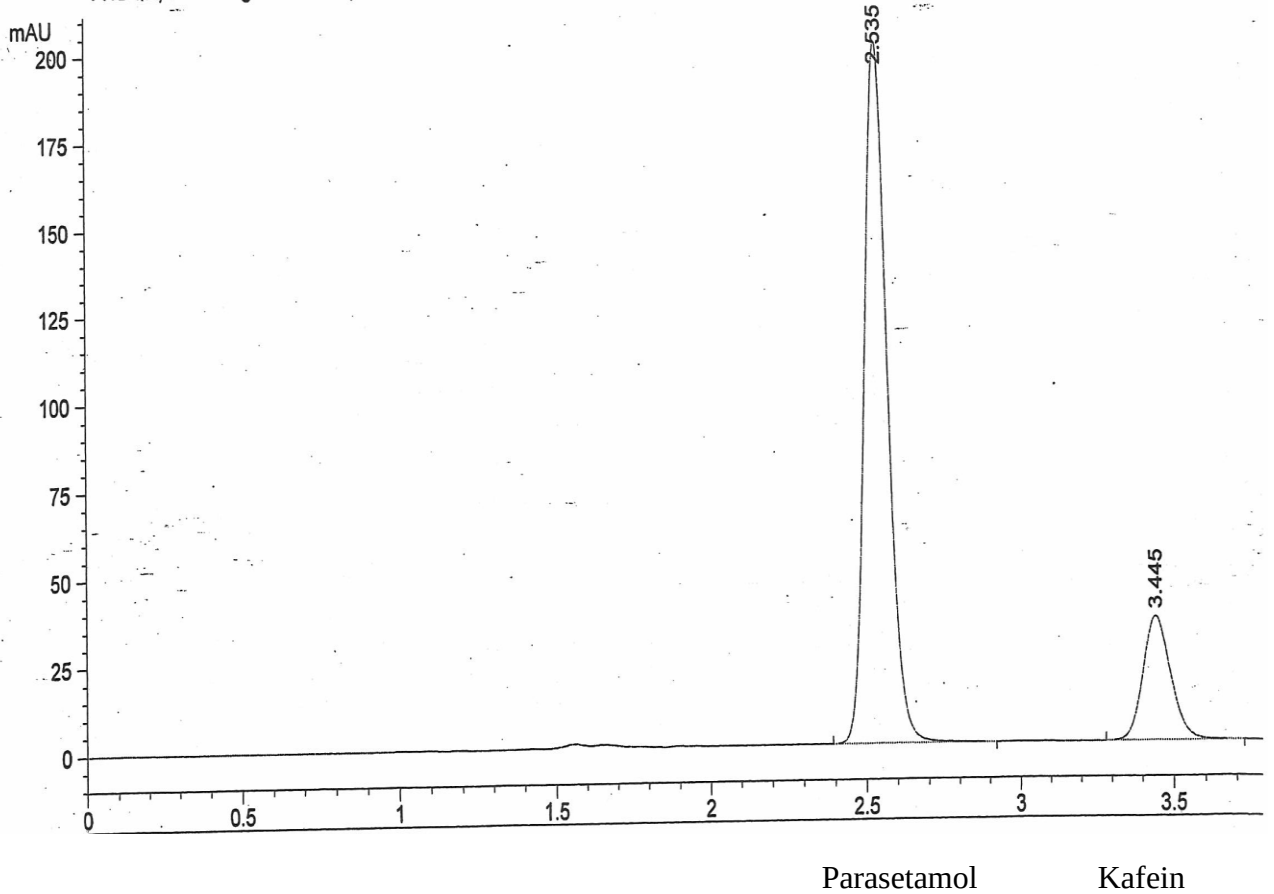
İstatistiksel terimler ve hesaplamalar için Bkz. Ek 1



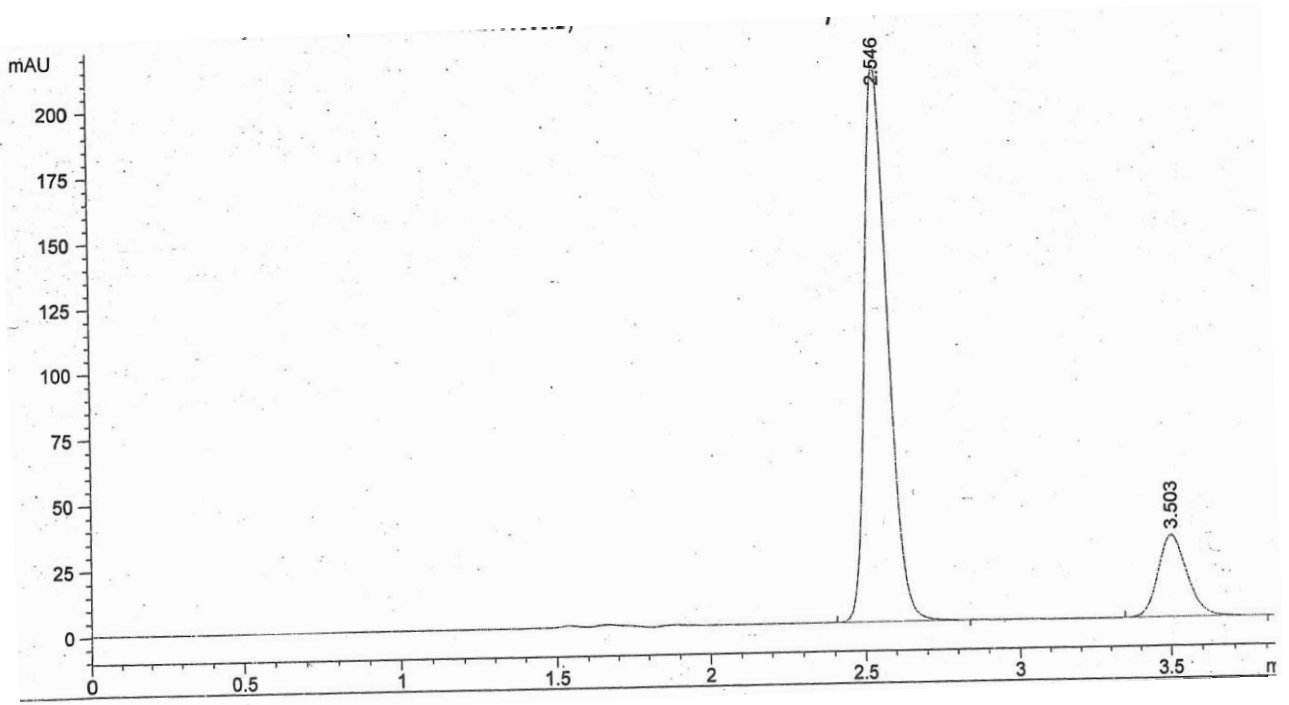
Şekil 4.25. Geliştirilen yöntemin doğrusallık kontrol grafiği (Kromatografik koşullar; % 40 MeOH+ % 60 H₂O hareketli faz, 0.8 mL.dak⁻¹ akış hızı, λ= 246 nm, Derişim: µg mL⁻¹).

4.2.2. Özgünlük

Yöntemin özgürlüğünün sınanması için, $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ parasetamol standart çözeltisi ve tablet çözeltisine $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ kafein çözeltisi eklenmiş, kromatogramları alınmış ve karşılaştırılmıştır (Şekil 4.26 ve Şekil 4.27).



Şekil 4.26. $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ parasetamol standart çözeltisinin HPLC yöntemi ile analizine ait kromatogram (İç standart (kafein) derişimi = $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, kromatografik koşullar; % 40 MeOH+ % 60 H₂O hareketli faz, 0.8 mL dak^{-1} akış hızı, $\lambda = 246 \text{ nm}$.)



Şekil 4.27. Aspar® tablet çözeltisinin HPLC yöntemi ile analizine ait kromatogram (İç standart (kafein) derişimi = $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, kromatografik koşullar; % 40 MeOH+ % 60 H_2O hareketli faz, 0.8 mL dak^{-1} akış hızı, $\lambda = 246 \text{ nm.}$)

4.2.3. Doğruluk ve Kesinlik

Geliştirilen HPLC yönteminin gün içi ve günler arası doğruluk (BHATA) ve kesinlik (BSS) bulgularına göre parasetamol için gün içi ve günler arasında en düşük doğruluk değeri 0.05 ve en düşük kesinlik değeri 1.37 olarak hesaplanmıştır (Tablo 4.10 - 4.12).

Tablo 4.10. HPLC ile parasetamolün gün içi analiz kesinlik ve doğruluk bulguları

Eklenen Derişim ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Cevap	Bulunan Derişim ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Ortalama Derişim ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	SS	BSS (%)	BHATA (%)	SH
0.50	0.40 0.39 0.40 0.38 0.39 0.40	0.52 0.51 0.52 0.50 0.51 0.52	0.51	0.010	1.95	2.40	0.004
10.00	7.67 7.59 7.68 7.11 7.94 6.98	9.91 9.81 9.93 9.19 10.27 9.02	9.69	0.230	2.37	3.10	0.094
40.00	30.89 31.40 30.58 30.95 30.39 31.44	39.91 40.57 39.51 39.99 39.26 40.62	39.98	0.548	1.37	0.05	0.022

(Cevap: Parasetamolün alanı/İç standartın (Kafein) alanı, SH: Standart hata, SS: Standart sapma, BSS:

Bağıl standart sapma, BHata: Bağıl hata (istatistiksel hesaplamalar için bkz. Ek 2). Kromatografik koşullar;
% 40 MeOH+ % 60 H₂O hareketli faz, 0.8 mL dak⁻¹ akış hızı, λ = 246 nm)

Tablo 4.11. HPLC ile parasetamolün günler arası analiz kesinlik ve doğruluk bulguları

Eklenen Derişim ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Cevap	Bulunan Derişim ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Ortalama Derişim ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	SS	BSS (%)	BHATA (%)	SH
0.50	0.49 0.47 0.50 0.49 0.52 0.49	0.49 0.47 0.50 0.49 0.52 0.48	0.49	0.018	3.66	1.60	0.007
10.00	9.86 10.05 9.26 9.86 10.34 9.97	9.99 10.17 9.38 9.98 10.47 10.10	10.02	0.359	3.58	1.50	0.150
40.00	39.47 40.02 38.05 39.24 40.79 38.88	39.99 40.55 38.55 39.76 41.33 39.39	39.93	0.960	2.40	0.17	0.390

(Cevap: Parasetamolün alanı/İç standartın (Kafein) alanı, SH: Standart hata, SS: Standart sapma, BSS: Bağlı standart sapma, BHata: Bağlı hata (istatistiksel hesaplamalar için bkz. Ek 2). Kromatografik koşullar; % 40 MeOH+ % 60 H₂O hareketli faz, 0.8 mL.dak⁻¹ akış hızı, λ = 246 nm)

4.2.4. Duyarlılık

Parasetamolün gözlenebilme sınırı (LOD) $0.03 \mu\text{g mL}^{-1}$ (S/G=3), alt tayin sınırı (LOQ) ise $0.07 \mu\text{g mL}^{-1}$ (S/G=10) olarak bulunmuştur.

4.2.5. Analit Çözeltinin Kararlılığı

Parasetamolün çözelti kararlılığının belirlenmesi için Bölüm 3.3.3’de verilen koşullarda bekletilen stok parasetamol çözeltisinin HPLC ile analizi yapılmış ve bulunan sonuçlar aynı derişimdeki yeni hazırlanmış çözelti sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Stok parasetamol çözeltisi karanlıkta ve buzdolabında ($+4^{\circ}\text{C}$ ’de) 4 ay saklandığında anlamlı bir bozunma olmadığı saptanmıştır ($p < 0.05$, Tablo 4.12).

Tablo 4.12. Stok parasetamol çözeltinin kararlılığı

Buzdolabında ve karanlıkta	Başlangıçta ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	1. Ay ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	2. Ay ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	3. Ay ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	4. Ay ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Eklenen	10.86	10.84	10.67	10.91	10.75
Derişim	10.85	10.80	10.74	10.95	10.79
($10 \mu\text{g mL}^{-1}$)	10.83	10.86	10.65	10.88	10.76
X_{ort}	10.85	10.85	10.69	10.91	10.77
Bağıl Hata (%)	8.50	8.50	6.90	9.10	7.70
% Değişim	1.09	1.09	1.07	1.09	1.08
KW > KWT: İki yöntemle elde edilen sonuçlar arasında 4 ay saklandığında anlamlı bir bozunma olmadığı saptanmıştır ($p > 0.05$).					

(Sonuçlar Friedman iki yönlü varyans analizine göre ($p < 0,05$) test edilmiştir. (Bkz. Ek). X_{ort} = ortalama. Kromatografik koşullar; % 40 MeOH+ % 60 H_2O hareketli faz, , 0.8 mL dak^{-1} akış hızı, $\lambda = 246 \text{ nm}$)

4.2.6. Tekrarlanabilirlik

10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ derişimdeki parasetamol çözeltisinin 10 kez enjekte edilmesi ile elde edilen pik alan oranları ve bağıl standart sapma değerleri Tablo 4.13'te verilmiştir.

Tablo 4.13. Parasetamol analizinde sistem tekrarlanabilirlik bulguları (Derişim: 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, n=10)

Pik alan oranı (Parasetamol/Kafein)	Parasetamol derişimi ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
5.46	9.56
5.45	9.53
5.47	9.56
5.47	9.56
5.44	9.51
5.44	9.51
5.48	9.57
5.47	9.56
5.44	9.51
5.45	9.53
X_{ort}	9.54 $\pm$ 0,0064
SS	0.02
BSS (%)	0.20
GA	7.27-7.29

(X_{ort} = ortalama, SS:Standart sapma, BSS: % Bağıl standart sapma,GA:Güven aralığı (α :0,05)
(Bkz. Ek 2).

4.2.7. Sağlamlık

Geliştirilen HPLC yönteminin sağlamlığının sınanması için sabit derişimde ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$) parasetamol kullanılarak, yöntem parametrelerindeki küçük değışimlerin sonucu ne kadar etkilediğı incelenmiştir. Yöntemin hareketli faz oranında, akış hızında ve dalga boyunda yapılan değışiklikler sonucunda elde edilen bulgular ile optimum koşulda saptanan bulgular istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Bulgular arasında istatistiksel açıdan fark olmaması yöntemin sağlam olduğunu göstermiştir (Tablo 4.14).

Tablo 4.14. HPLC yöntemine ait sağlamlık bulguları (n=5)

İncelenen Parametreler	Parasetamol derişimi ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	BSS (%)	SS	t hesap
Akış Hızı (0.7 mL dak^{-1})	6.16 ± 0.01	0.14	0.0085	1.644
Akış Hızı (0.9 mL dak^{-1})	5.02 ± 0.08	1.30	0.0650	2.060
Dalga Boyu (244 nm)	5.17 ± 0.08	1.35	0.0700	1.317
Dalga Boyu (248 nm)	4.62 ± 0.06	1.23	0.0570	4.554
Hareketli Faz MeOH Oranı (% 38)	5.10 ± 0.24	4.12	0.2100	0.294
Hareketli Faz MeOH Oranı (% 42)	5.31 ± 0.35	5.71	0.3030	1.580

(Eklenen Parasetamol derişim: $5 \mu\text{g mL}^{-1}$, BSS: Bağlı standart sapma, SS: Standart sapma. Sonuçlar tek tek optimum şartlarda bulunan sonuçlarla t-testi kullanılarak karşılaştırılmıştır: $t_{\text{tablo}}=2,776 > t$ hesap ($p>0.05$) (Bkz. Ek 3). Kromatografik koşullar; % 40 MeOH+ % 60 H₂O hareketli faz, 0.8 mL dak^{-1} akış hızı, $\lambda=246 \text{ nm}$)

4.2.8. Tutarlılık

Geliştirilen HPLC yönteminin tutarlık testi için farklı araştırmacılar tarafından yapılan analiz bulgularının istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Tablo 4.15'te verilen bulgular arasında istatistiksel açıdan fark bulunmaması yöntemin tutarlı olduğunu göstermiştir.

Tablo 4.15. HPLC yöntemine ait tutarlılık bulguları (n=5)

	1. Araştırmacı		2. Araştırmacı	
	Bulunan miktar ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Geri kazanım (%)	Bulunan miktar ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Geri kazanım (%)
	24.93	99.73	24.65	98.60
	24.54	98.16	24.56	98.24
	24.92	99.69	24.44	97.76
	24.82	99.26	24.27	97.08
	24.67	98.67	24.64	98.56
X_{ort}	24.78	99.10	24.51	98.05
SS	0.18	0.68	0.16	0.63
BSS	% 0.74	% 0.68	% 0.65	% 0.64
İki analizcinin bulguları için Wilcoxon eşleştirilmiş iki örnek testi: $T_H=1 > T_T=0$, ($p>0.05$).				

(Eklenen Parasetamol miktarı: $25 \mu\text{g mL}^{-1}$. X_{ort} : ortalama, SS: Standart sapma, BSS: Bağıl standart sapma, (istatistiksel hesaplamalar için bkz. Ek 2). T_H : Hesaplanan T değeri; T_T : n=5 serbestlik derecesindeki teorik T değeri; p: Hesaplanan yanılma düzeyi (Bkz. Ek 4). Kromatografik koşullar; % 40 MeOH+ % 60 H₂O hareketli faz, 0.8 mL.dak⁻¹ akış hızı, λ = 246 nm)

4.2.9 Sistem Uygunluk Testleri

Sistem uygunluk çalışması, $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ parasetamol standart çözeltisinin 6 tekrarlı enjeksiyonu ile gerçekleştirilmiştir. Parasetamol etkin maddesine için sistem parametreleri olarak alıkonma zamanı, kapasite faktörü, ayırıcılık, pik asimetri oranı değerleri Tablo 4.16'da verilmiştir.

Tablo 4.16. Parasetamol için elde edilen sistem uygunluk parametreleri (n=6)

Parametre	Sistemde bulunan değeri
Alıkonma zamanı (dak)	2.489
Alıkonma zamanı BSS'sı (%)	0.924
Kapasite faktörü	3.220
Ayırıcılık	9.800
Pik asimetri oranı	0.840
Teorik tabaka sayısı	16568

4.3. HPLC ile Farmasötik Preparatların Analiz Bulguları

Farmasötik preparatlarda bulunan parasetamolün geliştirilen HPLC yöntemi ile analiz sonuçları Tablo 4.17 - 4.22'de sunulmuştur.

Tablo 4.17. Bristol® tablet analiz bulguları

N	Etikette belirtilen miktar (500 mg)	
	Bulunan miktar (mg)	%
1	480	96
2	515	103
3	475	95
4	484	97
5	515	103
6	482	96
7	520	104
8	515	103
9	484	97
10	515	103
X _{ort}	498.50±13.46	99.70±2.69
SS	18.67	3.74
BSS (%)	3.75	3.75
GA	485.04-511.96	97.01-102.39

(X_{ort}: ortalama, SS: Standart sapma, BSS: Bağıl standart sapma, GA: Güven aralığı
(istatistiksel hesaplamalar için bkz. Ek 2). Kromatografik koşullar; % 40 MeOH +
% 60 H₂O hareketli faz, 0.8 mL dak⁻¹, akış hızı, λ= 246 nm)

Tablo 4.18. Aspar[®] tablet analiz bulguları

N	Etikette belirtilen miktar (500 mg)	
	Bulunan miktar (mg)	%
1	500	100
2	485	97
3	498	100
4	491	98
5	496	99
6	500	100
7	498	99
8	485	97
9	500	100
10	490	98
X _{ort}	494.30±4.37	98.80±0.89
SS	6.06	1.23
BSS (%)	1.23	1.24
GA	489.93-494.67	97.91-99.69

(X_{ort}: ortalama, SS: Standart sapma, BSS: Bağıl standart sapma, GA: Güven aralığı (istatistiksel hesaplamalar için bkz. Ek 2). Kromatografik koşullar; % 40 MeOH + % 60 H₂O hareketli faz, 0.8 mL dak⁻¹, akış hızı, λ= 246 nm)

Tablo 4.19. Panadol[®] tablet analiz bulguları

	Etikette belirtilen miktar (500 mg)	
N	Bulunan miktar (mg)	%
1	473	95
2	435	87
3	438	88
4	444	89
5	470	94
6	465	93
7	473	95
8	444	89
9	470	94
10	470	93
X _{ort}	458.20±11.10	91.70±2.23
SS	15.20	3.90
% BSS	3.50	3.70
GA	447.10-469.30	89.47-93.93

(X_{ort}: ortalama, SS: Standart sapma, BSS: Bağıl standart sapma, GA: Güven aralığı
(istatistiksel hesaplamalar için bkz. Ek 2). Kromatografik koşullar; % 40 MeOH +
% 60 H₂O hareketli faz, 0.8 mL dak⁻¹, akış hızı, λ = 246 nm)

Tablo 4.20. Pirofen[®] tablet analiz bulguları

N	Etikette belirtilen miktar (500 mg)	
	Bulunan Miktar (mg)	%
1	464	93
2	448	90
3	453	91
4	482	97
5	464	93
6	453	91
7	484	97
8	464	92
9	482	96
10	484	96
X _{ort}	467.80±10.20	93.60±1.92
SS	14.15	2.67
BSS (%)	3.02	2.85
GA	457.60-478.00	91.68-95.52

(X_{ort}: ortalama, SS: Standart sapma, BSS: Bağlı standart sapma, GA: Güven aralığı
(istatistiksel hesaplamalar için bkz. Ek 2). Kromatografik koşullar; % 40 MeOH +
% 60 H₂O hareketli faz, 0.8 mL dak⁻¹, akış hızı, λ= 246 nm)

Tablo 4.21 Pharmadol[®] tablet analiz bulguları

N	Etikette belirtilen miktar (500 mg)	
	Bulunan miktar (mg)	%
1	499	100
2	444	89
3	443	89
4	489	98
5	489	98
6	502	100
7	443	89
8	443	89
9	493	99
10	490	98
X _{ort}	473.50±21.05	94.90±3.68
SS	29.19	5.14
BSS (%)	6.16	5.43
GA	452.45-494.55	91.22-98.58

(X_{ort}: ortalama, SS: Standart sapma, BSS: Bağıl standart sapma, GA: Güven aralığı
(istatistiksel hesaplamalar için bkz. Ek 2). Kromatografik koşullar; % 40 MeOH +
% 60 H₂O hareketli faz, 0.8 mL dak⁻¹, akış hızı, λ= 246 nm)

Tablo 4.22. Parol[®] tablet analiz bulguları

N	Etikette belirtilen miktar (500)	
	Bulunan miktar (mg)	%
1	505	101
2	464	93
3	466	93
4	468	94
5	489	98
6	504	101
7	471	94
8	465	93
9	471	94
10	490	98
X _{ort}	479.30±11.67	95.90±2.40
SS	16.19	3.33
BSS(%)	3.38	3.47
GA	467.63-490.97	93.50-98.30

(X_{ort}: ortalama, SS: Standart sapma, BSS: Bağlı standart sapma, GA: Güven aralığı
(istatistiksel hesaplamalar için bkz. Ek 2). Kromatografik koşullar; % 40 MeOH +
% 60 H₂O hareketli faz, 0.8 mL dak⁻¹, akış hızı, λ= 246 nm)

4.4. HPLC Yöntemi ve UV-spektrofotometri Yöntemi ile Farmasötik Preparatların Analizlerinin Karşılaştırılması

Farmasötik preparatlarda bulunan parasetamolün geliştirilen HPLC yöntemi ile elde edilen analiz sonuçları kaynaktaki UV-spektrofotometri yöntemi ile karşılaştırılmış ve sonuçlar Tablo 4.23 - 4.28’de sunulmuştur.

Tablo 4.23. Bristol® tablet analiz bulgularının UV- spektrofotometrisi yöntemi bulguları ile karşılaştırılması (n=5)

	HPLC	UV- SPEKTROFOTOMETRİSİ
	Bulunan derişim (mg tablet ⁻¹)	Bulunan derişim (mg tablet ⁻¹)
X _{ort}	494.30	486.40
SS	6.06	25.70
BSS (%)	1.23	5.28
GA	±4.37	±29.54

(X_{ort}: Ortalama derişim, SS: Standart sapma, BSS: Bağlı standart sapma, GA: Güven aralığı.

Sonuçlar tek tek normal şartlarda bulunan sonuçlarla t-testi kullanılarak karşılaştırılmıştır. t_{hesap}=0,953,

t_{tablo}= 2,16 > t_{hesap} (p>0.05) Bkz. Ek 3)

Tablo 4.24. Aspar[®] tablet analiz bulgularının UV-spektrofotometrisi yöntemi bulguları ile karşılaştırılması (n=5).

	HPLC	UV-SPEKTROFOTOMETRİSİ
	Bulunan derişim (mg tablet ⁻¹)	Bulunan derişim (mg tablet ⁻¹)
X _{ort}	498.50	588.00
SS	18.67	34.63
BSS (%)	3.75	5.89
GA	±13.46	±39.80

(X_{ort}: Ortalama derişim, SS: standart sapma, BSS: % Bağlı standart sapma, GA: Güven aralığı.

Sonuçlar tek tek normal şartlarda bulunan sonuçlarla t-testi kullanılarak karşılaştırılmıştır. $t_{hesap} = 6,615$, $t_{tablo} = 2,16 < t_{hesap}$ (p<0.05) Bkz. Ek 3)

Tablo 4.25. Panadol[®] tablet analiz bulgularının UV-spektrofotometri yöntemi bulguları ile karşılaştırılması (n=5).

	HPLC	UV-SPEKTROFOTOMETRİSİ
	Bulunan derişim (mg tablet ⁻¹)	Bulunan derişim (mg tablet ⁻¹)
X _{ort}	458.20	563.80
SS	15.82	44.13
BSS (%)	3.45	7.83
GA	±11.41	±50.72

(X_{ort}: Ortalama derişim, SS: Standart sapma, BSS: Bağlı standart sapma, GA: Güven aralığı.

Sonuçlar tek tek normal şartlarda bulunan sonuçlarla t-testi kullanılarak karşılaştırılmıştır. $t_{hesap} = 3,61$, $t_{tablo} = 2,16 < t_{hesap}$ (p<0.05) Bkz. Ek 3)

Tablo 4.26. Pirofen® tablet analiz bulgularının UV-spektrofotometri yöntemi bulguları ile karşılaştırılması (n=5)

	HPLC	UV- SPEKTROFOTOMETRİSİ
	Bulunan derişim (mg tablet ⁻¹)	Bulunan derişim (mg tablet ⁻¹)
X _{ort}	467.80	546.20
SS	14.15	39.77
BSS (%)	3.02	7.28
GA	±10.20	±45,71

(X_{ort}: Ortalama derişim, SS: Standart sapma, BSS: Bağlı standart sapma, GA: Güven aralığı.

Sonuçlar tek tek normal şartlarda bulunan sonuçlarla t-testi kullanılarak karşılaştırılmıştır. $t_{hesap} = 5,723$, $t_{tablo} = 2,16 < t_{hesap}$ (p<0.05) Bkz. Ek 3)

Tablo 4.27. Pharmadol® tablet analiz bulgularının UV-spektrofotometri yöntemi bulguları ile karşılaştırılması (n=5)

	HPLC	UV- SPEKTROFOTOMETRİSİ
	Bulunan derişim (mg tablet ⁻¹)	Bulunan derişim (mg tablet ⁻¹)
X _{ort}	473.50	531.00
SS	29.19	45.40
BSS (%)	6.16	8.55
GA	±21.05	±52.18

(X_{ort}: Ortalama derişim, SS: Standart sapma, BSS: Bağlı standart sapma, GA: Güven aralığı.

Sonuçlar tek tek normal şartlarda bulunan sonuçlarla t-testi kullanılarak karşılaştırılmıştır. $t_{hesap} = 2,999$, $t_{tablo} = 2,16 < t_{hesap}$ (p<0.05) Bkz. Ek 3)

Tablo 4.28. Parol[®] tablet analiz bulgularının UV-spektrofotometri yöntemi bulguları ile karşılaştırılması (n=5)

	HPLC	UV- SPEKTROFOTOMETRİSİ
	Bulunan derişim (mg tablet ⁻¹)	Bulunan derişim (mg tablet ⁻¹)
X _{ort}	479.30	573.60
SS	16.19	34.90
BSS (%)	3.38	6.09
GA	±11.67	±40.11

(X_{ort}:Ortalama derişim SS:Standart sapma, BSS: % Bağlı Standart Sapma,GA: Güven Aralığı.

Sonuçlar tek tek normal şartlarda bulunan sonuçlarla t-testi kullanılarak karşılaştırılmıştır. t_{hesap}=7,30, t_{tablo}= 2,16 <t hesap (p<0.05) Bkz. Ek 3)

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada parasetamolün farmasötik preparatlarda kalite kontrol tayini için basit, güvenilir ve geçerli HPLC yöntemi geliştirilmesi ve yöntemin validasyonu yapılarak farmasötik tabletlerdeki parasetamolün miktar tayininde uygulanabilirliğinin gösterilmesi amaçlanmıştır.

Parasetamolün HPLC yöntemi ile analizinde Eclipse XDB-C₁₈, 5µm, 4,6x150 mm kolonu, hareketli faz olarak MeOH ve H₂O (40:60 v/v) karışım çözeltisi ve 0.8 ml dak⁻¹ akış hızı seçilmiştir. UV dedektör ile 246 nm dalga boyunda seçilen kromatografik koşullardaki parasetamol ve kafeinin (iç standart) alıkonma zamanları sırasıyla 2.565± 0.080 ve 3.520±0.208 dak'dır.

Parasetamol absorpsiyonunun en büyük olduğu dalga boyunun saptanması için 10 µg mL⁻¹ derişimdeki parasetamol çözeltisinin UV spektrumu alındı. UV spektrumunda 246 ve 205 nm dalga boyunda maksimum absorpsiyon (Şekil 4.1'de) gözlenmiştir. Metanol de 205 nm dalga boyunda absorpsiyon verdiğiinden çalışma dalga boyu 246 nm olarak seçilmiştir.

HPLC'de organik çözücünün tipi ve derişimi maddelerin alıkonmasını etkileyen birincil faktördür. Maddenin sabit faz üzerindeki derişimi hareketli fazdaki organik çözücünün derişimine, polaritesine ve hidrofilik özelliğine bağlı olarak değişmektedir. Bu nedenle organik çözücü polaritesi ve derişimi önem taşımaktadır.

Parasetamol, metanolde çözündüğü için hareketli faz olarak metanol seçilmiştir. Metanol derişiminin değişimi alıkonma zamanlarına göre incelendiğinde (Şekil 4.2) % 20, % 30, % 40 ve % 80 metanol oranları içeren çözeltilerin alıkonma zamanlarının 3 dak'dan büyük olduğu görülmüştür. Ayrıca bu oranlarda metanol içeren hareketli faz çözeltileri ile yapılan çalışmalarda United States Pharmacopeia (2005)'deki sistem uygunluk parametrelerine teorik tabaka sayısı (N) > 2000, pik asimetri oranı (PAO) ≤ 1.5 uygunluk saptanmıştır. Böylece %

20, % 30, % 40 ve % 80 oranında metanol içeren hareketli faz çözeltilerinin 5 farklı akış hızında incelenmesine karar verilmiştir.

Hareketli faz akış hızının, alıkonma zamanı (Şekil 4.6, 4.10, 4.14, 4.18), pik asimetri oranı (PAO) (Şekil 4.7, 4.11, 4.15, 4.19), teorik tabaka sayısı (N) (Şekil 4.8, 4.12, 4.16, 4.20) ve eşdeğer teorik tabaka yüksekliği (H) (Şekil 4.9, 4.13, 4.17, 4.21) ile değişimlerine bakılarak düşük alıkonma zamanını, uygun pik asimetri oranı, yüksek teorik tabaka sayısı, düşük eşdeğer teorik tabaka yüksekliği veren % 40 MeOH+% 60 H₂O hareketli faz ve 0.8 mL dak⁻¹ akış hızı olarak seçilmiştir.

Kaynak taraması sonucunda iç standart olarak kafeinin kullanılmasına karar verilmiştir. Kullanılan kafein derişiminin belirlenmesinde, USP (2005)'de bildirilen sistem uygunluk kriterleri açısından 5 ve 10 µg mL⁻¹ kafein derişimleri araştırılmış, parametrelerde fark bulunmaması üzerine pik alanı ve yüksekliğinin daha fazla olduğu 10 µg mL⁻¹ kafein derişimi iç standart derişimi olarak belirlenmiştir (Tablo 4.6).

HPLC yönteminde parasetamol pik alanlarının derişimine karşı grafiğe geçirilmesi ile elde edilen kalibrasyon eğrisinin parasetamol için 0.05-80 µg mL⁻¹ aralığında doğrusal olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.23). Parasetamol için çalışma aralığı olarak 0.1- 40 µg mL⁻¹ seçilmiş (Şekil 4.24) ve bu aralıktaki derişimler sistem uygunluk parametreleri açısından değerlendirilmiştir (Tablo 4.8). Kalibrasyon doğrusunun doğrusallıktan ayrılış ve korelasyon katsayısının önem kontrolü yapılarak doğrusallıktan ayrılışın önemsiz olduğu ve korelasyon katsayısının tesadüfî bir değer olmadığı istatistiksel olarak ispatlanmıştır (Tablo 4.9)

Ayrıca doğrusallık kontrol grafiği çizilmiş ve eğrinin eğiminin bir ve r değerinin büyük olması geliştirilen yöntemin doğrusal olduğunu göstermiştir (Şekil 4.25).

Şekil 4.26 ve Şekil 4.27’de yer alan standart parasetamol çözeltisinin kromatogramı ile tablet çözeltisinin kromatogramı karşılaştırıldığında aralarında fark olmaması yöntemin özgün olduğunu göstermektedir.

Yöntemin gün içi ve günler arası doğruluk çalışmaları parasetamolün 0.50, 10.00 ve 40.00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ olmak üzere üç farklı derişimindeki bağımsız numunelerin tekrarlı (n=6) analizleriyle yapılmıştır. Geliştirilen yöntemin gün içi analizlerinin sonucunda hesaplanan bağıl hata değerleri; % 2.40, % 3.10 ve % 0.05; günler arası sonuçlarından elde edilen verilere dayanarak bağıl hata değerleri; % 1.60, % 1.50 ve % 0.17 olarak hesaplanmıştır (Tablo 4.10 ve Tablo 4.11). Analitik sonuçlarda en yüksek bağıl hata değerinin 5’i geçmemesi koşulu göz önüne alındığında (Ermer, 2001; Green, 1996) yöntem gün için ve günler arasında doğru bulunmuştur.

Sonuçların kesinliğinin göstergesi olan bağıl standart sapma; üç farklı derişimde hazırlanan çözeltilerin analizleri sonucunda hesaplanmıştır (n=6). Geliştirilen yöntemin gün içi analizleri sonucunda hesaplanan BSS değerleri; % 1.95, % 2.37 ve % 1.37; günler arası sonuçlardan elde edilen verilere dayanarak hesaplanan BSS değerleri % 3.66, % 3.58 ve % 2.40 olarak hesaplanmıştır (Tablo 4.10 ve Tablo 4.11). En yüksek BSS değerinin 5’i geçmemesi koşulu göz önüne alındığında (Ermer, 2001; Green, 1996) gün içi ve günler arasında yöntemin kesin olduğu saptanmıştır.

Yöntemin duyarlılığı, gözlenebilirlik sınırı olarak (LOD), sinyal/gürültü (S/G) oranı 3 olduğunda saptanan derişim 0.03 $\mu\text{g mL}^{-1}$, alt tayin sınırı (LOQ) ise, (S/G) oranı 10 olduğunda saptanan derişim 0.07 $\mu\text{g mL}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Geliştirilen yöntemin farmasötik preparattan analiz için yeterli duyarlılıkta (Ermer, 2001; Shabir, 2007) olduğu belirlenmiştir.

Analit çözeltisinin kararlılığının araştırılmasında, parasetamol stok çözeltisi buzdolabında +4°C’de bekletilerek her ay stabilite çalışmaları yapılmış ve 4 ay süresince parasetamolün alıkonma zamanında değişim olmadığı, derişim değerlerindeki değişimin % 2’nin altında olduğu bulunmuştur. Ayrıca her ay elde edilen değerler arasında istatistiksel

olarak anlamlı bir fark olmadığı gösterilmiş ve stok çözeltinin buzdolabında saklandığında 4 ay kararlı olduğu sonucuna varılmıştır (Tablo 4.12).

Yöntemin tekrarlanabilirliği, $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ parasetamol çözeltisinin aynı gün içindeki 10 tekrarlı ölçüm sonucunda elde edilen BSS değerlerinin değerlendirilmesi ile yapılmıştır. % 0.02 olarak bulunan BSS değerinin kaynaklarda bildirilen % 2'den (Shabir, 2007) küçük olması cihazın tekrarlanabilir sonuçlar verdiğini göstermiştir (Tablo 4.13).

Yöntemin sağlamlık çalışmalarında, hareketli faz metanol oranı, akış hızı ve dalga boyu gibi yöntem parametrelerinde yapılan değişikliklerin parasetamolün miktar tayinini ne kadar etkilediği araştırılmıştır. İstatistiksel değerlendirme sonucunda, akış hızı ve hareketli faz MeOH oranındaki değişimlerden sonuçların etkilenmediği [$t_{\text{hesap}} < t_{\text{taplo}} = 2.776$ ($P>0.05$)], dalga boyundaki değişikliklerden sonuçların etkilendiğini [$t_{\text{hesap}} > t_{\text{taplo}} = 2.776$ ($P>0.05$)] bulunmuştur (Tablo 4.14). Yöntemin dalga boyunda meydana gelebilecek değişimlere karşı hassas olduğu bu nedenle cihazda dalga boyunun ayarlanmasında dikkatli olunması gerektiği sonucuna varılmıştır.

İki farklı araştırmacı tarafından gerçekleştirilen tutarlılık çalışmalarında, parasetamol için doğrusallık aralığına giren $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ derişimdeki parasetamol standart çözeltilerinin analizleri yapılmıştır. İki farklı araştırmacının yaptığı deney sonuçları arasında istatistiksel açıdan fark bulunmadığından yöntemin tutarlı olduğunu sonucuna varılmıştır [$T_H=1 > T_T=0$, $p<0,05$] (Tablo 4.15).

Sistem uygunluk çalışmasında, $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ parasetamol standart çözeltisinin aynı gün içinde 6 tekrarlı ölçüm sonucunda elde edilen parametreler (Tablo 4.16) USP (2005)'de belirtilen sistem uygunluk parametrelerine (Tablo 3.1) göre değerlendirilmiş ve kriterleri sağladığı görülmüştür. HPLC sistemi geliştirilen yöntemin çalışmasına uygun bulunmuştur.

Optimize ve valide edilen HPLC yöntemi Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti'nde ilaç piyasasında satılan sadece parasetamol içeren Bristol[®], Aspar[®], Panadol[®], Pirofen[®], Pharmadol[®], Parol[®] isimli farmasötik preparatların analizlerine uygulanmıştır (Tablo 4.17-4.22).

Geliştirilen HPLC yöntemi ve kaynakta yer alan UV-spektrofotometrisi yöntemleri ile yapılan farmasötik preparat analiz sonuçları istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır (Tablo 4.23-4.28). Karşılaştırma sonucunda $T_H > T_{\text{tablo}}$, $p > 0,05$ olarak bulunduğundan her iki yöntem arasında fark bulunmamıştır.

United States Pharmacopeia XXVI'de parasetamol analizi için bildirilen HPLC yönteminde (*USP XXVI*, 2003) hareketli faz akış hızı 1.5 mL dak⁻¹ olduğundan, söz konusu yöntemde geliştirilen yöntemle göre daha fazla hareketli faz kullanılması gerekmektedir.

Geliştirilen yöntemde parasetamol için LOD değeri 0.03 µg mL⁻¹ olarak bulunmuştur. Kaynaklarda HPLC yöntemi ile yapılan analizlerde parasetamol için en düşük LOD değeri 0.1 µg mL⁻¹ olarak Monser ve Darghouth tarafından bulunmuştur. (*Monser ve Darghouth*, 2002). Tez çalışmasında geliştirilen yöntemin gözlenebilirlik sınırı düşük olduğundan yöntemin daha duyarlı olduğu saptanmıştır.

Bu tez çalışmasında parasetamolün analizi için geliştirilen doğru, kesin, seçici, tutarlı ve sağlam HPLC yönteminin spektrofotometrik yöntemlere göre daha güvenilir olduğu bu nedenle başta ilaç endüstrisi olmak üzere araştırma-geliştirme ve kalite kontrol laboratuvarlarında parasetamolün rutin analizi için önerilebileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

Akgün, H., Balkan, A., Bilgen, A. A., Çalış, Ü., Gökhan, N., Dalkara, S., Erdoğan, H., Erol, D.D., Erkan, M., Özkanlı, F., Palaska, E., Saraç, S., Şafak, C., Tozkoparan, B., (2004). Farmasötik Kimya, Hacettepe Üniversitesi Yayınevi, s. 570.

Alpar, R. (2001). Spor bilimlerine uygulamalı istatistik (2 bs.). Ankara: Nobel yayın dağıtım.

Azhagvuel S, Sekar R. (2007). Metod development and validation for the simultaneous determination of cetirizine dihydrochloride, paracetamol, and phenylpropanolamine hydrochloride in tablets by capillary zone electrophoresis. J. Pharm. Biomed. Anal.

Başçı, N., Temizer, A., Bozkurt, A. Işimer, A., (1998). Optimization of mobile phase in the separation of β -blockers by HPLC. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 18 (4-5), 745-750.

Beaver, W.T., Mc Million, D., (1980). J. Clin. Pharmacol., 2, 215-223.

Bloomfield, M.s., (2002). A sensitive and rapid assay for 4- aminophenol in paracetamol drug and tablet formulation, by flow injection analysis with spectrophotometric detection. Talanta, 58, 1301-1310.

British Pharmacopoeia (2004). Volume 1-2, Her Majesty's Stationary Office, London.

Budari, S., (1996). Acetaminophen, The Merck Index- encyclopedia of chemicals, Drugs and Biologicals, s. 9.

Canada MJA, Reguera MIP, Medina AR, Cordova MLF, Diaz AM. (2000). Fast determination of paracetamol by using a very simple photometric flow-through sensing device. *J. Pharm. Biomed. Anal*; 22; 59-66.

Criado, A., Cardenes, S., Galego, M., Valcarcel, M., (2000). Fast urinary screening for paracetamol using on-line microwave assisted hydrolysis and spectrophotometric detection. *Analyst*, 125, 1179-1183.

Dinç E, Baleanu D. (2002). Two new spectrophotometric approaches to the multicomponent analysis of the acetaminophen and caffeine in tablets by classical least-squares and principal component regression techniques. *II Farmaco*; 57: 33-37.

Dinç E. (1999). A comparative study of the ratio spectra derivative spectrophotometry, Vierordt's method and high-performance liquid chromatography applied to the simultaneous analysis of caffeine and paracetamol in tablets. *J. Pharm. Biomed. Anal*; 21:723-730.

El-Obeid, H.A., Al-Badr, A.A., (1985). Acetaminophen. *Analytical profiles of drug substances*, Volume 14, s. 552-553.

El-Obeid, H.A., ve Al-Badr, A.A., (1985). Acetaminophen. *Analytical profiles of drug substances*, Vol. A4, s. 568.

Emre D, Özaltın N. (2006). Simultaneous determination of paracetamol, caffeine and propyphenazone in ternary mixtures by micellar electrokinetic capillary chromatography. *J. Chromatogr B*.

Ermer, J. (2001). Validation in pharmaceutical analysis. Part I: An integrated approach. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 24 (5-6), 755-767.

European pharmacopeia. (2005). 2184-2185.

Fairbrother, J.E., Acetaminophen. (1974). Analytical profiles of drug substances, Vol. 3, s. 1-109.

Felix FS, Brett CMA, Angnes L. (2007). Carbon film resistor electrode for amperometric determination of acetaminophen in pharmaceutical formulations. J. Pharm.Biomed. Anal; 43: 1622-1627.

Franeta JT, Agbaba D, Eric S, Pavkov S, Aleksic M, Vladimirov S. (2002). HPLC assay of acetylsalicylic acid, paracetamol, caffeine and phenobarbital in tablets. II Farmaco; 57: 709-713.

Gündüz, T. (1988). Instrümental analiz. Ankara: Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi yayınları.

Green, J. (1996). A practical guide to analytical method validation. Anal. Chem, 68, 305A-309A.

Hamilton, R. J., Sewell, P. A. (1982). Introduction to high performance liquid chromatography (2bs.). London: Chapman and :Hall.

Hanaee J. (1997). Simultaneous determination of acetaminophen and codeine in pharmaceutical preparations by derivative spectrophotometry. Pharm. Acta Helvetiae; 72: 239-241.

HSDB-Hazardous. (2001). Substances Data Bank Produced by., US National Library of Medicine Provided By: Canadian Centre of Occopational Healthand Safety, Iss.

ICH Q2(R1) (2005). Validation of analytical procedures: Text and Methodology (International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Geneva, Switzerland, May.

Jedrzejewsk, W. (1969). J. Chem. Anal., 4, 73.

Kartal M. (2001). LC method for the analysis of paracetamol, caffeine and codeine phosphate in pharmaceutical preparations. J. Pharm. Biomed. Anal; 26: 857-864.

Kayaalp O., (1995). Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji, yedinci baskı, 2. cilt., Feryal Matbaacılık, Ankara.

Korolkovas, A., (1988). Essentials of medicinal chemistry, John Wiley Sons, Newyork, Cilt 1, s. 257.

Krstulovic, A.M., Brown, P.R. (1982). Reversed-Phase high-performance Liquid chromatography. New York: John Wiley and Sons.

Medina AR, Cordova MLF, Diaz AM. (1999). A very simple resolution of the mixture paracetamol and salicylamide by flow injection-solid phase spectrophotometry. Anal. Chim. Acta; 394: 149-158.

Mehlish, D.R., (2002). J. Am. Dent. Assoc., 133, 861-871.

Meyer, V.R., (1988). Practical high performance liquid chromatography (V. Cottrell, Çev.): John Wiley and Sons.

Milch, G., Szabo, E., (1991) Derivative Spectrophotometric assay of acetaminophen and spectrophotometric assay of acetaminophen and spectrofluorimetric determination of its main impurity. J. Pharm. Bio., Anal., 9, 1107.

Mohamed, F.A., Abdullah,. M.A., Shammed, S.M., (1997) .Selective Spectrophotometric Determination of p-Aminophenol and Acetaminophen. Talanta , 44, 61-68.

Monser L, Darghouth F. (2002). Simultaneous LC determination of paracetamol and related compounds in pharmaceutical formulations using a carbon-based column. *J. Pharm. Biomed. Anal.*; 27: 851-860.

Moreira AB, Oliveira HPM, Atvars TDZ, Dias ILT, Neto GO, Zagatto EAG, Kubota LT. (2005). Direct determination of paracetamol in powdered pharmaceutical samples by fluorescence spectroscopy. *Anal. Chim. Acta*; 539: 257-261.

Nagaraja P, Murthy KCS, Rangappa KS. (1998). Spectrophotometric method for the determination of paracetamol and phenacetin. *J. Pharm. Biomed. Anal.*; 17: 501-506.

Oliva MA, Olsina RA, Masi AN. (2005). Selection Spectrofluorimetric method for paracetamol determination through coumarinic compound formation. *Talanta*; 66: 229-235.

Perez-Ruiz, T., Martinez-Lozano, C., Tomas, V., ve Galera, R., (2005). Migration behaviour and separation of acetaminophen and p-aminophenol in capillary zone electrophoresis: analysis of drug based on acetaminophen. *J. Pharm. Bio. Anal.*, 38:1, 87-93.

Ramos ML., Tyson JF, Curan DJ. (1998). Determination of acetaminophen by flow injection with on-line chemical derivatization: investigations using visible and FTIR spectrophotometry. *Anal. Chim. Acta*; 364: 107-116.

Kır S, Şafak C, Türeli A, Temizer A. (1991). Determination of paracetamol and methocarbamol in a pharmaceutical preparation using second derivative spectrophotometry. *Hacettepe Üniversitesi. Eczacılık Fakültesi. Analitik Kimya. Ankara.*

Sena MM, Poppi RJ. (2004). N-ways PLS applied to simultaneous spectrophotometric determination of acetylsalicylic acid, paracetamol and caffeine. *J. Pharm. Biomed. Anal.*; 34: 27-34.

Sena, F. J., Piechocki, J. T., Li, K. L. (1979). Stability-indicating assay of acetaminophen in ana effervescent tablet by ion pain high performance liquid chromatograph, J. Pharm, Sci, 68, 1465-6.

Shabir, G. (2007). Evaluation and application of best ractice in analytical method validation. Journal of Liquid Chomatography & Related Technologies, 30 (3), 311-333.

Shervington LA, Sakhnini N. (2000). A quantitative and qualitative high performance liquid chromatographic determination of acetaminophen and five of its para- substituted derivatives. J. Pharm. BIomed. Anal; 24: 43-49.

Skoog, D., Holler, F.J., Neiman, T.A. (1998). Enstrümantal analiz ilkeleri (1 bs.). Ankara: Bilim Yayıncılık.

Skoog, D., West, D., Holler, F.J. (1999). Analitik kimya temelleri 2 (7 bs., c. 2). Ankara: Bilim Yayıncılık.

Snyder L.R., Glajch, J.L., Kirkland, J.J. (1988). Practical HPLC method development. New York: John Wiley and Sons.

Stadapharm GMBH (2000) :Schriftliche Mitterlung Derfa. Stada An Das Landesum Weltamt Brandenburg. Vom. 17,01,2000, Zitiert in Hanish Et Al., 2002.

Sümbüloğlu K., Sümbüloğlu V., (2007). Biyoistatistik. (12 bs.). Ankara: Hatipoğlu Yayınevi.

The United States Pharmacopoeia XXVI, (2003). US Pharmacopoeial Convention, Inc., Rockville.

The United States Pharmacopeia.(2005) Rockville: The National Formulary, United States Pharmacopeial Convention.

Tüzün, C., (1975). Aromatik bileşikler, Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi yayınları Sayı 117, s. 161.

Zen JM, Ting YS. (1997). Simultaneous determination of caffeine and acetaminophen in drug formulations by square-wave voltammetry using a chemically modified electrode. Anal. Chim. Acta; 342: 175-180.

Zhao S, Bai W, Yuan H, Xiao D. (2006). Dedection of paracetamol by capillary electrophoresis with chemiluminescence dedection. Anal. Chim. Acta; 559: 195-199.

EKLER

Ek. 1. Korelasyon Katsayısı ve Doğrusallıktan Ayrılış Önem Kontrolü

Bulunan korelasyon katsayısının önemli bir katsayı mı yoksa tesadüfe bağlı bir katsayı mı olduğu test edilmiştir.

Testin yapımında işlemler:

1. Ho: Korrelasyon katsayısı tesadüfe bağlı bir değerdir ($r=0$)
2. Test istatistiğinin hesaplanması:

$$T = \frac{r}{S_r}$$

$$S_r = \sqrt{\frac{1 - r^2}{n-2}} \quad (\text{korelasyon katsayısının standart hatası})$$

3. Yanılma olasılığı olarak $\alpha = 0.05$ seçilmiştir.
4. Serbestlik derecesi= $n-2$
5. $\alpha = 0.05$ düzeyinde ve 4. Madde de bulunan serbestlik derecesinde tablo t değerine bakılır.

6. Karşılaştırma: Hesapla bulunan t değeri tablo t değerinden büyükse H_0 hipotezi reddedilir, küçükse kabul edilir.
7. Karar: Korrelasyon katsayısı önemli bir değerdir, tesadüfen bulunmuş bir değer değildir ($t =$ hesapla bulunan değer, $P < 0.05$), veya korelasyon katsayısı önemli bir değer değildir, tesadüfen bulunmuş bir değerdir ($t =$ Hesapla bulunan değer, $p > 0.05$).

Doğrusallıktan Ayrılış Önem Kontrolü

1. Kareler toplamları bulunur:

- a) Regresyon Kareler Toplamı (RKT):

$$RKT = \frac{\left[\sum xy - \frac{(\sum x)(\sum y)}{n} \right]^2}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}$$

- b) Y ortalamadan Ayrılış Kareler Toplamı (YOAKT):

$$YOAKT = \sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n}$$

- c) Regresyondan ayrılış Kareler Toplamı= RAKT= YOAKT –RKT

2. Serbestlik dereceleri bulunur:

- a) Regresyon Serbestlik Dereceleri (RSD)= 1
- b) Y Ortalamadan Ayrılış Serbestlik Derecesi= YOASD = n-1
- c) Regresyondan ayrılış Serbestlik Derecesi= RASD= YOASD- RSD

3. Kareler ortalamaları bulunur:

- a) Regresyon Kareler Ortalaması= RKT/ RSD
- b) Regresyondan Ayrılış Kareler Ortalaması = RAKO = RAKT/ RASD

4. H_0 = Derişim ile dedektör cevabı arasındaki ilişki doğrusal değildir.

5. Yanılma olasılığı $\alpha = 0.05$ seçilmiştir.

6. $F = RKO / RAKO$

7. $p = 0.05$ düzeyinde RSD ve RASD serbestlik derecelerindeki tablo F değerleri bulunur.

8. Karşılaştırma: Hesapla bulunan F değeri tablo F değerinden büyükse H_0 hipotezi reddedilir, küçükse kabul edilir.

9. Karar: Derişim ile dedektör cevabı arasındaki ilişki doğrusaldır ($F =$ Hesapla bulunan, $p < 0.05$) veya doğrusal değildir ($F =$ Hesapla bulunan, $p > 0.05$)

Kesişimin sıfırdan ayrılışının önem kontrolü

1.

$$S_{yx} = \frac{\Sigma y^2 - (\Sigma x)^2/n}{n-1} \left[\frac{(1-r)^2(n-1)}{n-2} \right]^{1/2}$$

$$2. S_{H(a)} = (S_{yx})^2 \left[\left(\frac{1}{n} \right) + \bar{X}^2 \left(\frac{\Sigma x^2 - (\Sigma x)^2}{n} \right) \right]$$

3. H_0 = Kesişim değeri (a) sıfıra eşittir.

4. Yanılma olasılığı $p=0.05$ seçilmiştir.

$$5. t_H = a / S_{H(a)}$$

6. $\alpha = 0.05$ düzeyinde t_T değerleri bulunur.

3. Karşılaştırma: Hesapla bulunan t değeri tablo t değerinden büyükse H_0 hipotezi reddedilir, küçükse kabul edilir.

4. Karar: Kesişim değeri sıfıra eşittir. (t_H = hesapla bulunan, $p > 0.05$) veya kesişim değeri sıfırdan farklıdır (t_H = hesapla bulunan, $p < 0.05$) (*Sümbüloğlu K. ve Sümbüloğlu V., 2007*).

Ek 2. İstatistiksel Katsayıların Hesaplanması

Bağıl Standart Sapma Hesaplanması

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

SS: Standart sapma

$\bar{X}$: Aritmetik ortalama

% Bağıl Hata Hesaplanması

$$\% \text{ Bağıl Hata (\%BH)} = \frac{[(\text{Olması gereken miktar} - \text{Bulunan miktar})]}{\text{Olması gereken miktar}}$$

Standart Hata Hesaplaması

$$\text{Standart Hata (SH)} = \frac{SS}{(n)^{1/2}}$$

SS: Standart Sapma

n: Ölçüm Sayısı

% Geri Kazanım Hesaplanması

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

Evren Ortalaması Güven Aralığının Hesaplanması

$$\mu = \bar{X} \pm S_{\bar{x}} t \quad \text{veya} \quad \bar{X} - S_{\bar{x}} t < \mu < \bar{X} + S_{\bar{x}} t$$

μ : Evren ortalaması

—

$\bar{X}$: Örneklem ortalaması

$S_{\bar{x}}$: Standart hata

t: Seçilen yanılma düzeyi (α) ve n-1 serbestlik derecesindeki t tablosundaki değer (*Sümbüloğlu K. ve Sümbüloğlu V., 2007*).

Ek 3. t- testi

İki ortalama arasında fark olup olmadığını test eder.

$$S^2 = [(n_1-1) s_1^2 + (n_2-1) s_2^2] / (n_1 + n_2 -2)$$

$$t = (\bar{X}_1 - \bar{X}_2) / s (1/n_1 + 1/n_2)^{1/2}$$

n_1 : 1. yöntemin ölçüm sayısı

n_2 : 2. yöntemin ölçüm sayısı

s_1 : 1. yöntemin standart sapması

s_2 : 2. yöntemin standart sapması

—

$\bar{X}_1$: 1. yöntemin ortalaması

—

$\bar{X}_2$: 2. yöntemin ortalaması

Serbestlik derecesi = $n_1 + n_2 - 2$

1. H_0 = İki ortalama arasında fark yoktur.
2. $\alpha = 0.05$ yanılma düzeyinde ve $n_1 + n_2 - 2$ serbestlik derecesindeki tablo t değerine bakılır.
3. Karşılaştırma: Hesapla bulunan t değeri tablo t değerinden büyükse H_0 hipotezi reddedilir, küçükse kabul edilir.
4. Karar:
 - a) Ortalamalar arasında fark yoktur ($t = \text{Hesaplanan değer}, p > 0.05$)
 - b) Ortalamalar arasında fark vardır ($t = \text{Hesaplanan değer}, p < 0.05$) (*Sümbüloğlu K. ve Sümbüloğlu V., 2007*).

Ek 4. Wilcoxon Eşleştirilmiş İki Örnek Testi

Aynı örneklerin değişik iki durumundaki ölçüm sonuçları arasında fark olup olmadığının belirlenmesinde $n < 25$ ise uygulanan önemlilik testidir.

H_0 = İki yöntemle elde edilen sonuçlar arasında fark yoktur.

$\alpha = 0.05$ yanılma düzeyi seçilmiştir.

Test istatistiğinin hesaplanması:

İki yöntemden elde edilen sonuçlar iki sütun şeklinde yan yana yazılır. Sağda yeni bir sütuna satırlar arasındaki farklar $\pm$ işaretleriyle birlikte yazılır. Ardından farklar küçükten büyüğe doğru sıralanır ve sıra no. verilir. Sıra no.ların önüne farklardaki $\pm$ işaretleri yazılır. + ve – işaretli sıra no. grupları arasında işareti sayıca az olan grup toplanır. Elde edilen değer, hesapla bulunan T değeridir (T_H).

Ölçüm sayısı (n) serbestlik derecesindeki tablo T değerine bakılır.

Karar:

- $T_H > T_t$ ise iki yöntemle elde edilen sonuçlar arasında fark yoktur (T_H = Hesaplanan T değeri, $p < 0.05$)
- $T_H < T_t$ ise iki yöntemle elde edilen sonuçlar arasında fark vardır (T_H = Hesaplanan T değeri, $p > 0.05$) (*Sümbüloğlu K. ve Sümbüloğlu V., 2007*).

Ek. 5. Kruskal Wallis Varyans Analizi

Parametrik test varsayımları yerine getirilmediğinde, bir değişken yönünden ikiden fazla bağımsız grup arasında fark olup olmadığının belirlenmesinde kullanılır.

Test işlemleri:

Bütün gruptaki değerler küçükten büyüğe doğru tek dizi halinde sıralanır ve her bir değere sıra numarası verilir. Aynı değerler için ortalama sıra numarası hesaplanıp aynı olan değerlere verilir.

Test istatistiğinin (KW) hesaplanması:

$$KW = \frac{12}{n(n+1)} \left[\sum_{j=1}^k \frac{T_j^2}{n_j} \right] - k(n+1)$$

T_j = j. gruptaki değerlerin sıra numaraları toplamı (her bir grup için);

n_j = j. gruptaki denek sayısı (her bir grup için);

k = Grup sayısı

n = Toplam denek sayısı

H_0 = İki yöntemle elde edilen sonuçlar arasındaki fark yoktur.

$\alpha = 0.05$ yanılma düzeyi için (grup sayısı-1) serbestlik derecesindeki tablo değerine (KW_T) bakılır.

Karar :

$KW_T > KW$ ise H_0 hipotezi kabul edilir.

$KW_T < KW$ ise H_0 hipotezi reddedilir (*Sümbüloğlu K. ve Sümbüloğlu V., 2007*).