T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÇOK BİLEŞENLİ KARIŞIMLARIZN HPLC İLE ANALİZİ İÇİN DENEYSEL TASARIM VE VALİDASYON

MESUT KOÇ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI
ANALİTİK KİMYA PROGRAMI

DANIŞMAN
DOÇ. DR. BÜRGE AŞÇI

İSTANBUL, 2014

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÇOK BİLEŞENLİ KARIŞIMLARIZN HPLC İLE ANALİZİ İÇİN DENEYSEL TASARIM VE VALİDASYON

Mesut KOÇ tarafından hazırlanan tez çalışması 22/07/2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Bürge Aşçı

Yıldız Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Bürge Aşçı

Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Prof. Dr. Sıdıka Sungur

Yeni Yüzyıl Üniversitesi _____

Doç. Dr. Özlem Aksu Dönmez

Yıldız Teknik Üniversitesi _____

ÖNSÖZ

Tez çalışmam süresince bilgi ve tecrübesiyle beni yönlendiren, hiçbir konuda yardımlarını esirgemeyen, hoşgörülü ve anlayışlı tez danışmanım, Sayın. Doç. Dr. Bürge Aşçı'ya ve tüm yardımları için Araş.Gör. Dr. Şule Dinç'e teşekkür ederim.

Ayrıca laboratuvar çalışmamda yardımları bulunan değerli arkadaşlarım Gökçe YILMAZ, Muhammet KALIN ve Buluthan KARAHAL'a teşekkür ediyor hayatlarında başarılar diliyorum.

Temmuz 2014

Mesut KOÇ

İÇİNDEKİLER

Sayfa

SİMGE LİSTESİ vii

KISALTMA LİSTESİ viii

ŞEKİL LİSTESİ ix

ÇİZELGE LİSTESİ x

ÖZET xi

ABSTRACT xiii

BÖLÜM 1

GİRİŞ 1

1.1 Literatür Özeti 1
1.2 Tezin Amacı 2
1.3 Hipotez 2

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER 3

2.1 Deneysel Tasarım 3
2.1.1 Tanımı 3
2.1.2 Önemi 4
2.1.3 Tarama Tasarımları 6
2.1.3.1 Faktöriyel Tasarım 6
2.1.3.1.1 Tam Faktöriyel Tasarım 6
2.1.3.1.2 Fraksiyonel Faktöriyel Tasarım 8
2.1.3.2 Plackett-Burman Tasarımı 9
2.1.4 Optimizasyon Tasarımları 11
2.1.4.1 Merkezi Kompozit Tasarım 11
2.1.4.2 Box-Behnken Tasarımı 12
2.1.4.3 Doehlert Tasarımı 13
2.1.4.4 D-optimal Tasarım 14
2.1.5 Varyans Analizi 15
2.1.6 Faktöriyel Tasarımın Analitik Kimyada Uygulamaları 15
2.2 Validasyon 21

2.2.1 Validasyonun Tanımı ve Önemi 21
2.2.2 Endüstride Validasyon Çeşitleri....21
2.2.3 Analitik Yöntem Validasyonu....22
2.2.3.1 Amaç....22
2.2.3.2 Analitik Yöntem Validasyon Parametreleri 22
2.2.3.2.1 Seçicilik/Spesifiklik....23
2.2.3.2.2 Stabilite....23
2.2.3.2.3 Doğrusallık 23
2.2.3.2.4 Çalışma Aralığı....24
2.2.3.2.5 Doğruluk....24
2.2.3.2.6 Kesinlik (Tekrarlanabilirlik)....24
2.2.3.2.6.1 Gün İçi Tekrarlanabilirlik....25
2.2.3.2.6.2 Günler Arası Tekrarlanabilirlik 25
2.2.3.2.6.3 Laboratuvarlar Arası Tekrarlanabilirlik....25
2.2.3.2.7 Tutarlılık....25
2.2.3.2.8 Miktar Tayini Limiti ve Tanıma Limiti....26
2.2.3.2.8.1 Tanıma Limiti (LOD) 26
2.2.3.2.8.2 Miktar Tayin Limiti (LOQ) 26
2.2.3.2.9 Güvenilirlik 26
2.2.4 Validasyon İle İlgili Bazı Örnekler.... 26
2.3. Çalışılacak İlaç EtkenMaddeleri....33
2.3.1 Kimyasal Yapı ve Özellikleri….....33
2.3.1.1 Sinkokain hidroklorik asit 33
2.3.1.2 Fluokortolon Pivalat 34
2.3.1.3 Fluokortolon Kaproat....35
2.3.2 Farmakolojik özellikleri....35
2.3.3. Analiz yöntemleri....36

BÖLÜM 3

DENEYSEL BÖLÜM....38

3.1 Kullanılan Kimyasallar 38
3.2 Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması....38
3.3 Kullanılan Cihazlar 38
3.4 HPLC ile Analiz....39
3.4.1 Kromatografik Şartların Belirlenmesi ve Optimizasyonu....39
3.4.1.1 Klasik Yöntem ile Şartların Belirlemesi....39
3.4.1.2 Deneysel Tasarım İle Optimizasyon 40
3.4.2 Validasyon....41
3.4.2.1 Doğrusallık 41
3.4.2.2 Gün İçi ve Günler Arası Tekrarlanabilirlik 41
3.4.2.3 Doğruluk....41
3.4.2.4 Tanıma ve Tayin Sınırı (LOD, LOQ)....42
3.4.2.5 Çözelti Dayanıklılığı 42
3.4.3 Örnek Analizi....42

BÖLÜM 4

SONUÇ VE ÖNERİLER 43

4.1 Kromatografik Şartların Belirlenmesi ve Optimizasyonu 43
4.1.1 Klasik Yöntem ile Şartların Belirlenmesi 43
4.1.2 Deneysel Tasarım ile Optimizasyon 43
4.1.2.1 Merkezi Kompozit Tasarımı 43
4.1.2.2 Veri Değerlendirme 45
4.1.2.3 Modelleme 48
4.2 Validasyon 51
4.2.1 Doğrusallık 51
4.2.2 Gün İçi ve Günler Arası Tekrarlanabilirlik 55
4.2.3 Doğruluk 55
4.2.4 Tanıma ve Tayin Sınırı (LOD-LOQ) 55
4.2.5 Çözelti Dayanıklılığı 58
4.3 Örnek Analizi 58
4.4 Tartışma 60

KAYNAKLAR 61

ÖZGEÇMİŞ 78

SİMGE LİSTESİ

k Faktör sayısı
x Faktör
N Deney sayısı
a Farklı tasarımlardaki seviye
x Tasarım noktalarının matrisi
T Transpoze

KISALTMA LİSTESİ

AAS Atomic absorption spectroscopy (Atomik absorbsiyon spectroskopisi)
AES Atomic Emission Spectroscopy (atomik Emisyon Spektroskopisi)
ANOVA Analysis Of Variance (Varyans Analizi)
DAD Diode Array Detector (Diyot Dedektörü)
FTIR Foyler Transform Infrared Spectrometr (Fourier Dönüşümlü İnfrared Spektrometresi)
GF Graphite Furnace (Grafit Fırın)
GMP Good Manufacturing Practices (İyi Üretim Uygulamaları)
HPLC High Performance Liquid Chromatography (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi)
ICH International Conference on Harmonisation (Uluslararası Uyumlandırma Konferansı)
ICP Inductively Coupled Plasma (İndüktif Eşleşmiş Plazma)
IR Infrared (Kızıl ötesi)
LC Liquid Chromatography (Sıvı Kromatografisi)
LOD Limit of Detection (Tanıma sınırı)
LOQ Limit of Quantification (Tayin sınırı)
OES Optical Emission Spectrometry (Optik Emisyon Spektrometresi)
QS Quantity Sufficient (Yeterli Miktarda)
RSD Relative Standard Deviation (Bağıl Standart Sapma)
SPME Solid phase microextraction (Katı Faz Mikroekstraksiyon)
TOF-MS Time Of Flight Mass Spectrometry (Uçuş zamanı kütle spektrometresi)
UV Ultraviolet (Mor ötesi)
VIS Visible (Görünür)

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2. 1 pH ve katalizör konsantrasyonuna bağlı olarak reaksiyon verimindeki değişme.....4
Şekil 2. 2 Katalizör konsantrasyonu 2,0 mM da sabit tutularak bulunan optimum pH 5
Şekil 2. 3 pH 3,4'te sabit tutularak bulunan optimum konsantrasyon 5
Şekil 4. 1 Merkezi Kompozit Tasarımı ile elde edilen Pareto grafiği 46
Şekil 4. 2 Faktörlerin değerleri ile ayırma gücünün değişimi 46
Şekil 4. 3 Faktör etkileşimleri ve ayırma gücüne etkileri 47
Şekil 4.4 Deneysel Ayırma Gücü Değerleri İle Teorik Ayırma Gücü Değerleri Grafiği……..48
Şekil 4.5 Merkezi Kompozit Tasarımı ile elde edilen MF ve V faktörleri arasındaki tahmini cevap yüzeyleri ve kontur grafikleri (asit miktarı 2 … de sabit tutularak elde edilen değişim) 49
Şekil 4.6 Merkezi Kompozit Tasarımı ile elde edilen MF ve A faktörleri arasındaki tahmini cevap yüzeyleri ve kontur grafikleri (akış hızı 1,3 mL\ dak da sabit tutularak elde edilen değişim) 49
Şekil 4.7 Merkezi Kompozit Tasarımı ile elde edilen V ve A faktörleri arasındaki tahmini cevap yüzeyleri ve kontur grafikleri (mobil faz oranı %71,6 da sabit tutularak elde edilen değişim) 49
Şekil 4.8 Sinkokain(1), flokartolon pivalat(2) ve flokartolon kaproat(3) kromatogramı 50
Şekil 4. 9 Sinkokain doğrusallık grafiği.....52
Şekil 4.10 Flokartalon pivalat doğrusallık grafiği.....53
Şekil 4.11 Flokartalon kaproat doğrusallık grafiği.....54

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa
Çizelge 2. 1 Faktör için Tam Faktöriyel Tasarım 7
Çizelge 2. 2 Faktör için fraksiyonlu faktöriyel tasarım 8
Çizelge 2. 3 Plackett-Burman tasarımı için üreticiler 9
Çizelge 2. 4 11 Faktör için Plackett-Burman tasarımı 10
Çizelge 2. 5 Faktör için merkezi kompozit tasarımı 12
Çizelge 2. 6 3 Faktör için Box-Behnken tasarımı 13
Çizelge 2. 7 3 Faktör için Doehlert tasarımı 14
Çizelge 2. 8 Atomik spektroskopide deneysel tasarımın uygulandığı çalışmalar 16
Çizelge 2. 9 Kromatografik analizlerde deneysel tasarımın uygulandığı çalışmalar 17
Çizelge 2.10 Elektroforez ile analizlerde deneysel tasarımın uygulandığı çalışmalar 19
Çizelge 2.11 HPLC ile analizlerde validasyon aşamasında kullanılan deneysel tasarımlar 20
Çizelge 2.12 Analiz amacına göre değişen parametreler 23
Çizelge 2.13 İlaç etken maddelerinin HPLC ile analizinde uygulanan validasyon çalışmaları 27
Çizelge 2.14 Kromatografik yöntemle sinkokain tayinine yönelik çalışmalar 37
Çizelge 3. 1 Denenen kromatografik koşullar 39
Çizelge 3. 2 Faktörler ve seviyeleri 40
Çizelge 4. 1 Merkezi Kompozit Tasarımı ile elde edilen ayırma gücü değerleri 44
Çizelge 4. 2 Regresyon analizi sonuçları 45
Çizelge 4. 3 ANOVA sonuçları 47
Çizelge 4. 4 Faktörlerin optimum değerleri 50
Çizelge 4. 5 Sinkokain'in ölçü eğrisine ait pik alanları değerleri 52
Çizelge 4. 6 Sinkokain'in regresyon analizine ait parametreler 52
Çizelge 4. 7 Flokartolon pivalatın ölçü eğrisine ait pik alanları değerleri 53
Çizelge 4. 8 Flokartolon pivalatın regresyon analizine ait parametreler 53
Çizelge 4. 9 Flokartolon kaproatın ölçü eğrisine ait pik alanları değerleri 54
Çizelge 4.10 Flokartolon kaproatın regresyon analizine ait parametreler 54
Çizelge 4.11 LOD-LOQ değerleri 55
Çizelge 4.12 Gün içi tekrarlanabilirlik 56
Çizelge 4.13 Günler arası tekrarlanabilirlik 56
Çizelge 4.14 Doğruluk 57
Çizelge 4.15 Örnek Analiz Sonuçları 58
Çizelge 4.16 Analiz sonuçlarının Etiket değerleri ile Karşılaştırması 59

ÖZET

ÇOK BİLEŞENLİ KARIŞIMLARIZN HPLC İLE ANALİZİ İÇİN DENEYSEL TASARIM VE VALİDASYON

Mesut KOÇ

Analitik Kimya Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Bürge AŞÇI

Bu tezde hemoroid tedavisinde kullanılan ilaçlarda bulunan Sinkokain, Fluokortolon pivalat ve Fluokortolon kaproat'ın bir arada analizi için HPLC yöntemi geliştirilmiştir.

Öncelikle bu maddelerin kromatografik olarak ayrılması için çeşitli çözücü sistemleri denendi. Daha sonra deneysel tasarım kullanılarak analiz şartları optimize edildi. Deneysel Tasarım ile optimizasyonda faktör olarak; asit miktarı, akış hızı ve hareketli faz oranı kullanıldı. Bu faktörlerin ve aralarındaki etkileşimlerin, HPLC kromatogramındaki piklerin ayırma gücü üzerine etkileri incelendi. İncelemede 3 faktör için Merkezi Kompozit Tasarımı kullanıldı. Her faktör için 5 seviye seçildi. Bu seviyeler asit miktarı için %0,3-1-2-3-3,68 akış hızı için 1,3-1,5-1,8-2,1-2,6 hareketli faz oranı için 71,6-75-80-85-88,4 olarak belirlendi. Faktörlerin en düşük seviyeleri için -1,682, düşük seviyeleri için –1 orta seviyeleri için 0 ve yüksek seviyeleri için +1 en yüksek seviyeleri için 1,682 işareti kullanıldı. Toplam 20 deney yapıldı. Sonuçlarının değerlendirilmesi için regresyon analizi yapıldı. Ayırma gücüne en etkili faktör hareketli fazın bileşimini (MV; A)olmakla birlikte, mobil fazın ikinci dereceden etkisinin (AA) ve akış hızının (V; B) da etkili olduğu anlaşılmaktadır. Sonuçların güvenilirliğini test etmek için ANOVA yapıldı. Elde edilen verilere göre ayırma gücüne ilişkin bir model oluşturuldu. Oluşturulan model kullanılarak ayırma gücü değerleri elde edildi. Bu değerlerle deneysel olarak bulunan değerler arasındaki ilişki incelendi. İncelemede regresyon katsayısı 0,9464 olarak bulundu. Ve modelin uygun olduğuna karar verildi. Geliştirilen model kullanıldığında, sinkokain,fluokortolon pivalat ve floukortolon kaproat HPLC ile bir arada analizi için optimum koşullar; akış hızı 1,38 mL/dak ve hareketli faz bileşimi metanol /su/asit 71,6 / 26,4 / 2 olarak bulundu.

Maddelerin kromatogramları, deneysel tasarım ile bulanan optimum koşullarda, 240 nm de spektrofotometrik dedektör kullanılarak kaydedildi.

Geliştirilen yöntemin, doğrusallık, tekrarlanabilirlik, doğruluk, tanınma ve tayin sınırı ve dayanıklılık parametreleri incelenerek analitik yöntem validasyonu yapıldı. Doğrusallık parametresi için, sinkokain,fluokortolon pivalat ve fluokortolon kaproat'ın konsantrasyonları ile pik alanları arasındaki ilişki incelendi. Elde edilen sonuçların regresyon analizi yapıldığında regresyon katsayısı (R^2) sırası ile 0,999; 0,996; 0,999 olarak bulundu. Tekrarlanabilirlik parametresi için, her maddenin 3 farklı konsantrasyonda hazırlanan çözeltilerinin aynı gün içinde 3 kez ve 4 farklı günde analizi yapıldı. sinkokain,fluokortolon pivalat ve fluokortolon kaproat için sırasıyla aynı gün içinde yapılan analizlerde 1,4541-2,0738; 0,8237-1,4042; 0,7447-1,980; farklı günlerde yapılan analizlerde 1,036-2,007; 1,457-2,099; 1,754-2,003 % RSD değerleri elde edildi. Doğruluk için, incelenen maddeleri içeren örnek çözeltisi içine sinkokain,fluokortolon pivalat ve fluokortolon kaproat 3 farklı konsantrasyonda ilave edilerek analizi yapıldı. Supozituar için sırası ile 95,4-100,3; 101,16-101,87; 103,83-105 pomat için sırası ile 97,43-104 ; 99,75-104,58 ; 103,92-105,25 % geri kazanım değerleri elde edildi. Sinkokain,fluokortolon pivalat ve fluokortolon kaproat için sırası ile tanıma sınırı 0,128;0,142;0,203 μg mL^{-1}, tayin sınırı 0,428;0,477;0,677 μg mL^{-1} olarak hesaplandı. Çözeltilerin stabilitelerini incelemek için su ve hareketli faz içerisinde, oda sıcaklığında ve $4C^{o}$'de belli sürelerde bekletilerek analiz edildi. Sinkokain,fluokortolon pivalat ve fluokortolon kaproat'ın tüm şartlarda, en az 2 ay boyunca bozulmadığı görüldü.

Geliştirilen yöntem kullanılarak bu maddeleri içeren pomat ve supozituar örnekleri analiz edildiğinde % RSD değerleri sırası ile sinkokain için 1.79 ve 0.93, fluokortolon pivalat için 1.65 ve 1.69, fluokortolon kaproat için 1.81 ve 1.63 olarak bulundu. Analiz sonucunda elde edilen değerler ile ilaç etiketi üzerindeki değerler karşılaştırıldığında, pomat ve fitil örnekleri için sırasıyla fluokortolon pivalat için 98,80 ve 100,48 ,fluokortolon kaproat için 97,68 ve 100,65, sinkokain için 98,25 ve 99,79 % geri kazanım değerleri elde edildi.

Anahtar Kelimeler: Sinkokain, fluokortolon pivalat ve fluokortolon kaproat, HPLC, validasyon, deneysel tasarım.

ABSTRACT

EXPERIMENTAL DESIGN AND VALIDATION FOR ANALYSIS OF MULTICOMPONENT MIXTURES WITH HPLC

Mesut KOÇ

Department of Analytical Chemistry

MSc. Thesis

Advisor: Assoc. Prof. Bürge AŞÇI

In this thesis, a HPLC method is developed for analysis of cinchocaine,fluocortolone pivalate,fluokortolone caproate, which are added to the drugs used in the treatment of hemorrhoids.

First of all, several solvent systems were carried out to separate these substances chromatographically. Then analytical conditions were optimized by using experimental design. pH, flow rate and mobile phase ratio were selected as optimization factors in the experimental design. Effects of these factors and the interactions between them on resolution between peaks in HPLC chromatogram were analyzed. Central composite design was used for analysis of the 3 factors. 5 levels were selected for each factor. These levels were determined as acid amount %0,3-1-2-3-3,68, flow rate 1,3-1,5-1,8-2,1-2,6 mobile phase ratio 71,6-75-80-85-88,4. The values; -1,682, for lowest,-1,for low 0, for middle, +1, for high,+1,682 for highest levels of the factors were used. 20 experiments were done in total. Regression analysis was used for evaluation of the results. It was determined that mobile phase ratio is the most efficient factor; the second effect of mobile phase and flow rate are also effective. ANOVA was performed to test reliability of the results. According to the data obtained a model was created with respect to the resolution. Resolution values were obtained by using the model. The relationship

between these values and the empirical values has been examined. Regression coefficient was found 0.9464 at the end of the examination. And it was decided that the model is appropriate. When the model was used, the optimum conditions for the simultaneous analysis of cinchocaine, fluocortolone pivalate, fluocortolone caproate were found as flow rate 1,3 mL min^{-1} and mobile phase combination methanol /water/acid , 71,6 / 26,4 / 2.

Chromatograms of the substances were recorded by using spectrophotometric detector at 240nm, the optimum conditions found in the experimental design.

Analytical method validation was made by the examination of the linearity, repeatability, accuracy, limit of quantification and detection and stabilitiy parameters. The correlation between the peak areas and the concentrations of cinchocaine, fluocortolone pivalate, fluocortolone caproate was examined for linearity parameter. The correlation coefficients (R^2) were found 0,999; 0,996; 0,999 respectively by regression analysis of the results. The solutions which were prepared at 3 different concentrations of each substance were analyzed 3 times within the same day and 4 times on different days for the repeatability parameter. In the analysis, RSD% values were obtained in the analysis performed for cinchocaine,fluocortolone pivalate,fluocortolone caproate, respectively, on the same day 1,454-2,074; 0,824-1,404; 0,745-1,980, on different days 1,036-2,007; 1,457-2,099; 1,754-2,003. In order to calculate accuracy, analyses were performed by the addition of 3 different concentrations of cinchocaine,fluocortolone pivalate,fluocortolone caproate into the examined samples which contain the substances. The recovery percentage values were obtained for suppositories, respectively 95,4-100,3 ; 101,16-101,87 ; 103,83-105, for ointments respectively, 97,43-104 ; 99,75-104,58 ; 103,92-105,25. The limit of detection values were calculated as 0,128 ; 0,142 ; 0,203 μg mL^{-1}, and the limit of quantification values were calculated as 0,428;0,477;0,677 μg mL^{-1} for cinchocaine, fluocortolone pivalate, fluocortolone caproate respectively. In order to determine stabilities of the substances, they were analyzed both in water and the mobile phase and both at 4^0C and room temperature. It was determined that cinchocaine, fluocortolone pivalate, fluocortolone caproate are stable at any condition at least two month.

When the ointment and suppository samples which includes these substances are analyzed by the developed method % RSD values are found for cinchocaine 1,79 and 0,93, for fluocortolone pivalate 1,65 and 1,69, for fluocortolone caproate 1,81 and 1,63 respectively. When we compare the analyse results with the values at the drug label of ointment and suppository samples % recovery values are obtained for fluocortolone pivalate 98,80 and 100,48, for fluocortolone caproate 97,68 and 100,65, for cinchocaine 98,25 and 99,79 respectively.

Keywords: Cinchocaine, fluocortolone pivalate, fluocortolone caproate, HPLC, validation, experimental design.

BÖLÜM 1

GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

Bir deneysel çalışmada o deneyin performansını etkileyecek parametrelerin belirlenmesi ve kontrolü, doğru ve güvenilir sonuçların eldesinde oldukça önemlidir. Deney sonuçlarını etkileyebilecek herhangi bir deneysel parametre faktör olarak isimlendirilir. Faktörlerin en uygun değerleri ile yapılan bir çalışma ise cevap sinyalini büyülterek maddelerin çok küçük miktarlarının analizine imkan vermektedir. Bu en uygun faktör değerinin belirlendiği aşamaya optimizasyon adı verilir. Son yıllarda deneysel tasarımlar, analitik kimyada optimum analiz koşullarının saptanmasında sıklıkla kullanılmaktadır. Bu tasarımlar ile optimizasyonda deney sayısı, süre ve maliyet azalmaktadır. Bu tasarımlarla faktörlerin bireysel etkilerinin dışında birbirleri ile etkileşimleri ve bu etkileşimlerin sonuca etkisi de incelenmektedir. Bu nedenle deneysel tasarımlar kullanılarak yapılan çalışmalarda klasik yöntemlere göre daha güvenilir sonuçlar elde edilmektedir. Deneysel tasarıma en çok başvurulan yöntemler atomik spektroskopi[8-27], kromatografi[28-84] ve elektroforezdir[85-118]. Ayrıca literatür araştırmalarında UV-VIS spektroskopi [2], [3], yakın IR [4], Floresans spektroskopi [5] ve elektroanalitik yöntemlerle [6], [7] analizlerde de deneysel tasarım uygulanmasına rastlanmıştır. Deneysel tasarım, geliştirilen analitik yöntemlerin geçerliliğini kontrol etmek amacı ile yapılan validasyon çalışmalarında da tutarlılık parametresinin incelmesinde kullanılmaktadır[48,119-124].

Validasyon, aynı kalitede ve aynı şartlarda üretim yaparak, tüm üretilen ürünlerin kalitesinin aynı olmasını sağlamak amacıyla yürütülen çalışmalardır. Bu amaçla

temizlik yöntemleri, makine/ekipman, proses ve analitik yöntem valide edilir. Validasyon işlemi tüm ürünlerin kalite kontrollerine uygulanabilir. Özellikle insan sağlığı açısından büyük önem taşıyan ilaç ve gıda endüstrisinde geniş uygulama alanına sahiptir. Analitik Yöntem validasyonu, yeni bir analiz yöntemi tasarlandığında bu yöntemin kabul edilebilirliğini kanıtlamak ve analitik prosedürün kantitatif ve kalitatif olarak doğru sonuçlar verdiğini belirleyebilmek amacı ile yapılır. Yöntem validasyonu için çeşitli uluslar arası ve ulusal kuruluşlarca tanımlanmış parametreler bulunmaktadır. Seçicilik (spesifiklik), dayanıklılık, doğrusallık, doğruluk ve geri kazanabilirlik, kesinlik (tekrarlanabilirlik), tutarlılık, tanıma sınırı, tayin sınırı ve güvenilirlik olarak belirlenen bu parametreler incelenerek geliştirilen yöntemin validasyonu yapılır. Yapılan literatür araştırmasında, gıda katkı maddelerinin HPLC ile analizinde, validasyon uygulamasına yönelik pek çok çalışmaya rastlanmıştır[125-165].

Kortikosteroid olan Fluokortolon kaproat ve Fluokortolon pivalat, topikal iltihabi durumlar üzerinde etkili ilaç etken maddeleridir. Ayrıca kaşıntı önleyici/iyileştirici ve kan damarlarını büzücü etkileri de vardır. Literatürde, fluokortolon ve esterleri, HPLC, TLC [166], UV[167], [168] HPTLC [169], HPLC [170], HPLC-MS [171], Raman Spektroskopisi [172] ve çeşitli polarografi [173] yöntemleri ile tayin edilmiştir. Sinkokain bir lokal anesteziktir (hissizleştiren bir ilaçtır) ve ağrıyı hafifletir. Literatür araştırmalarında sinkokain miktar tayini için en çok kromatografik yöntemlere rastlanmıştır Kromatografik yöntemler dışında spektrofotometrik, florimetrik yöntemlerle yapılmış çalışmalar da bulunmaktadır. Sinkokain, fluokortolon pivalat ve fluokortolon kaproat hemoroid tedavisinde kullanılan ilaçlarda bir arada bulunmaktadır. Literatürde bu 3 etken maddenin bir arada tayinine yönelik bir çalışma bulunmamaktadır.

1.2 **Tezin Amacı**

Bu tezde hemoroid tedavisinde kullanılan ilaçlarda bulunan Sinkokain, fluokortolon pivalat ve fluokortolon kaproat'ın bir arada analizi için HPLC yöntemi geliştirilmesi, valide edilmesi ve bu maddeleri içeren ilaçların analiz edilmesi amaçlanmıştır.

1.3 **Hipotez**

Sinkokain, fluokortolon pivalat ve fluokortolon kaproat'ın HPLC ile bir arada analizi için kromatografik şartların belirlenmesinde, deneysel tasarım kullanılarak, klasik

yönteme göre daha az sayıda deney yapılıp, daha kısa sürede sonuca ulaşılması ve dolayısıyla maliyetin azalması beklenmektedir. Ayrıca hem bireysel etkileri hem de faktörlerin birbirleri ile etkileşimleri ve bu etkileşimlerin sonuca etkisi inceleneceğinden daha güvenilir sonuçlar elde edilmesi öngörülmektedir. Bu tez kapsamında geliştirilen ve valide edilen yöntem, ilaç kalite kontrol laboratuvarlarında bu maddeleri içeren ilaçların rutin analizlerinde kullanılabilecektir. Bu sayede bu tez çalışması ile ilaç sanayisine hizmet edileceği düşünülmektedir.

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER

2.1 Deneysel Tasarım [1]

2.1.1 Tanımı

Bir deneyden elde edilen sonuçları etkileyen herhangi bir deneysel koşul, faktör olarak adlandırılır. Faktörler araştırmacı tarafından kontrol edilebilen ve kontrol edilemeyen olarak iki türde olabilir. Örneğin; çözeltinin saklama koşulları araştırmacı tarafından değiştirilebildiği için bu tür bir faktör kontrol edilebilirken, rastgele örnekleme içeren bir faktör kontrol edilemeyen faktördür. Sayısal bir değer verilmediğinden bu faktörlerin her ikisine de nitel faktörler denir. Sayısal olarak düzenlenebilen sıcaklık, pH ve derişim gibi faktörlerde nicel faktörler olarak isimlendirilir. Bir faktörün aldığı farklı değerler ise farklı seviyeler olarak ifade edilir.

Bir deneyden doğru sonuç elde edebilmek için sonucu etkileyecek faktörlerin belirlenmesi ve mümkünse kontrol edilmesi gerekir. Analitik teknikler çoğu zaman maddelerin çok küçük miktarlarının analizi ile ilgilendiğinden cevabın bağlı olduğu faktörlerin sayısal değerleri elde edilecek cevabı en üst değerde olmasını sağlayacak şekilde seçilmesi gerekir. Bu değerlere optimum değerler denir.

Deneysel tasarım, deney koşullarını etkileyecek faktörlerin seviyelerinin sistematik bir şekilde değiştirilmesi ile ölçülen cevaptaki değişimin gözlenmesi ve yorumlanması için kullanılan istatistiksel bir tekniktir. Deneysel tasarım; tarama, optimizasyon ve modelleme olmak üzere 3 aşamadan oluşur.

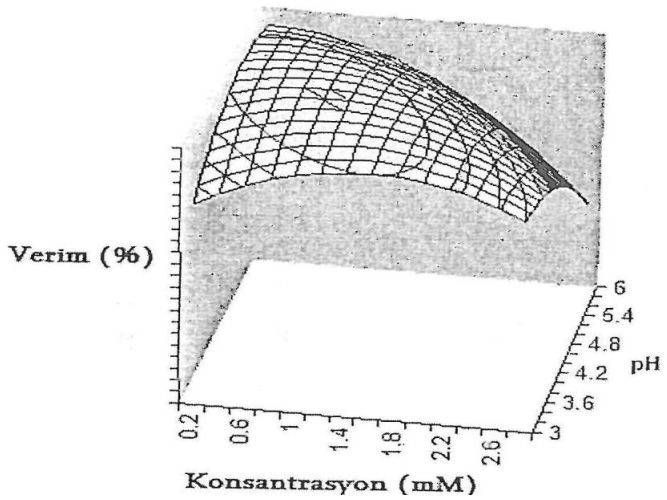
1. Tarama (Screening): Deneysel çalışmalarda sonucu etkileyen önemli faktörleri belirlemek amacı ile yapılır. Tarama tasarımları ile bir kimyasal reaksiyonun verimini etkileyen faktörler, kullanılan reaktif konsantrasyonu, katalizör konsantrasyonu, sıcaklık, pH, reaksiyon süresi, karıştırma hızı, vb. 10 faktör etkilediği dikkate alındığında bu faktörlerden hangilerinin önemli olduğu, hangilerinin elimine edilebileceğine ve hangilerinin ayrıntılı olarak incelenmesi gerektiğine karar verilir.

2. Optimizasyon: Tarama tasarımları ile bulunan önemli faktörlerin optimum değerlerinin belirlenmesi için yapılır.

3. Modelleme: Tarama tasarımı ve optimizasyon sonucu her bir faktörün etkisi matematiksel modelle ifade edilir. Böylece deneysel olarak bulunan sonucun yanında, hesapla tahmini sonuç da bulunmuş olur. Beklenen sonucun deneysel olarak gerçekleşip gerçekleşmediği kontrol edilir.

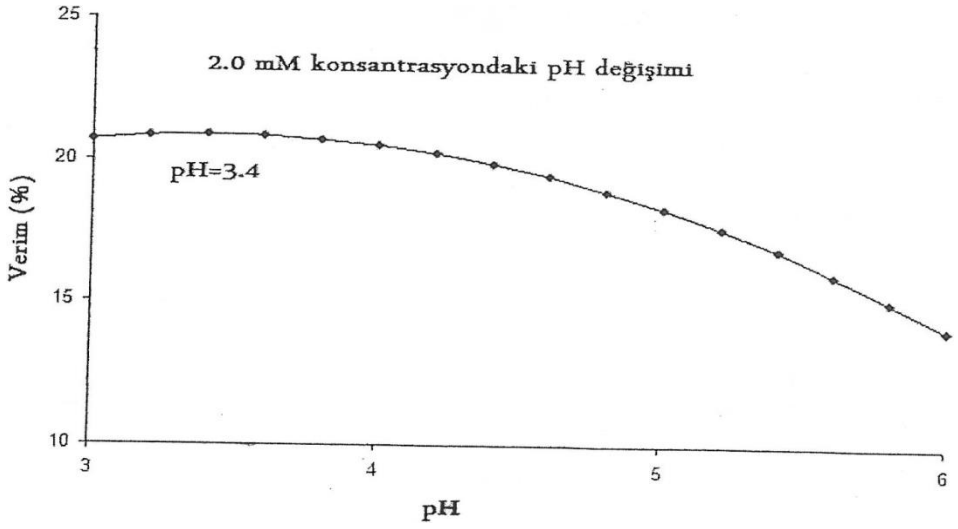
2.1.2 Önemi

Klasik yöntemlerle faktörlerin optimum değerleri, bir faktörün değerini değiştirme diğerlerini ise sabit tutma yöntemi ile belirlenmektedir. Çok sayıda faktör incelendiğinde çok fazla deney yapılması gerekmekte bu nedenle de zaman alıcı ve maliyetli olmaktadır. Deneysel tasarımda ise istatistiksel bir yaklaşımla öncelikle az sayıda seviye ile bütün faktörler sistematik olarak aynı anda değiştirilir ve etkili faktörler bulunur. Daha sonra sadece etkili faktörler, farklı seviyelerde yine aynı anda sistematik olarak değiştirilerek incelenir ve optimum değerler bulunur. Bu nedenle klasik yönteme göre daha az sayıda deney yapılarak daha kısa sürede sonuca ulaşılmaktadır. Dolayısıyla maliyet de azalmaktadır. Deneysel tasarımın en önemli avantajı ise klasik yöntemlerde sadece faktörlerin bireysel olarak etkileri incelenirken deneysel tasarımda hem bireysel etkileri hem de faktörlerin birbirleri ile etkileşimleri ve bu etkileşimlerin sonuca etkisi incelenmektedir. Bu sayede daha güvenilir sonuçlar elde edilmektedir. Deneysel tasarımın önemi bir örnekle de açıklanabilir. Bu çalışmada pH ve katalizör konsantrasyonunun optimum değerlerinin bulunması için önce deneysel tasarım ve optimizasyon yöntemi kullanılmış, işlem sonunda pH:4,4 ve katalizör konsantrasyonu 1,0 mM olarak bulunmuştur (Şekil 2.1).



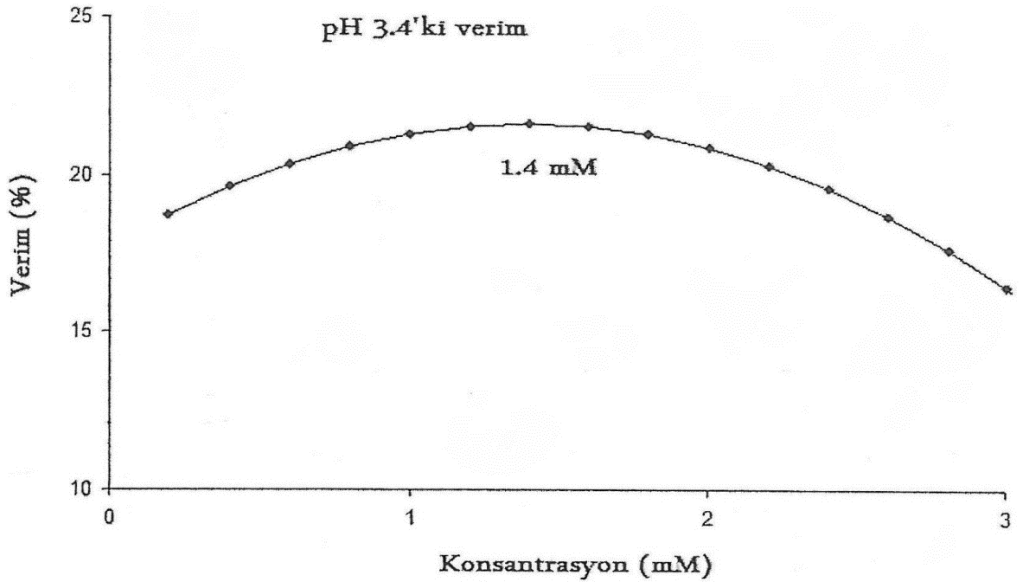
Şekil 2.1 pH ve katalizör konsantrasyonuna bağlı olarak reaksiyon verimindeki değişme.

pH ve katalizör konsantrasyonu klasik yöntem ile optimize edilmek istendiğinde katalizör konsantrasyonu 2,0 mM'da sabit tutularak pH değiştirilmiş ve optimum pH 3,4 olarak bulunmuştur (Şekil 2.2).



Şekil 2.2 Katalizör konsantrasyonu 2,0 mM da sabit tutularak bulunan optimum pH

pH=3,4 optimum olarak bulunduktan sonra pH bu değerde sabit tutularak konsantrasyon değiştirilmiştir. Optimum konsantrasyon 1,4 mM olarak bulunmuştur. (Şekil 2.3)



Şekil 2. 3 pH 3,4'te sabit tutularak bulunan optimum konsantrasyon

Çalışmada optimum değerler deneysel tasarım ve optimizasyon yöntemi ile pH 4,4 ve katalizör konsantrasyonu 1,0 mM olarak bulunurken klasik yöntem ile yapılan çalışmalarda pH 3,4 ve konsantrasyon 1,4 mM olarak bulunmuştur. Değerler birbirinde çok farklıdır. Bu farkın nedeni, optimum değerlerin bulunmasında, deneysel tasarım yönteminde pH ve konsantrasyon arasındaki etkileşim göz önüne alınırken klasik yöntemde göz ardı edilmiş olmasıdır.

2.1.3 Tarama Tasarımları

Bu tasarımlar deneysel çalışmalarda sonucu etkileyen önemli faktörleri belirlemek için kullanılır. Tarama tasarımlarında, istatistiksel bir yaklaşımla öncelikle az sayıda seviye ile bütün faktörler sistematik olarak aynı anda değiştirilir. Bu değişimlerin deney sonuçlarına etkisi incelenir. Her bir faktörün etkisi için sayısal değerler elde edilir. Bu değerler doğrultusunda deney sonuçlarına gerçekten etki eden faktörler bulunur.

Tarama aşamasında en çok faktöriyel tasarım ve Plackett-Burman tasarımları kullanılır.

2.1.3.1 Faktöriyel Tasarım

Deneysel tasarımın en çok uygulanan şeklidir. Bu tasarımla deneyi etkileyen faktörlerin iki ya da daha fazla seviyesinde cevap üzerindeki etkileri incelenir. Faktöriyel tasarım tam faktöriyel ve fraksiyonlu faktöriyel tasarım olarak 2'ye ayrılır.

2.1.3.1.1 Tam Faktöriyel Tasarım

Tam faktöriyel tasarım sonuç üzerine etki eden faktörlerin hangileri ve ne kadar etkili olduğunu anlamada kullanılan iki seviyeli bir tarama tasarımıdır.

Bu tasarımda deney sayısı 2^k formülü ile hesaplanır. Bir kimyasal reaksiyon pH ve sıcaklığa bağlı olarak değişiyorsa, iki seviyeli iki faktörlü bir deney tasarlanabilir. Burada 2, seviye sayısı (-1 ve +1 olarak kodlanır), k ise faktör sayısıdır. 2 faktör için deney sayısı 4 (2^2), 3 faktör için deney sayısı 8'dir (2^3). Tam faktöriyel tasarım tablosu aşağıdaki şekilde oluşturulur.

1. Her bir faktör için yüksek ve düşük seviyeler belirlenir. Örneğin sıcaklık 30^{o}C ve 60^{o}C, pH 4 ve 6.

2. Yüksek (+1) ve düşük (-1) seviyelere göre tasarım tablosu oluşturulur.

3. Kodlanmış değerler yerine faktörlerin gerçek değerleri yerleştirilerek deneysel çalışma gerçekleştirilir.

4. Etkileşimler de dikkate alınarak tasarım matrisi analiz edilir.

Örnek olarak 3 faktörlü (X_1, X_2, X_3) bir deneyde faktör seviyelerinin 2x2x2=8 adet mümkün kombinasyonları Çizelge 2.1 de gösterilmiştir. Her sütundaki (+) işareti faktörün yüksek seviyedeki değerini (-) işareti ise faktörün düşük seviyedeki değerini gösterir.

Çizelge 2.1 3 faktör için tam faktöriyel tasarım

Deney sayısı	X_1	X_2	X_3	Cevap
1	-	-	-	y_1
2	+	-	-	y_2
3	-	+	-	y_3
4	+	+	-	y_4
5	-	-	+	y_5
6	+	-	+	y_6
7	-	+	+	y_7
8	+	+	+	y_8

Faktörlerin etkisini belirlemek için aşağıda verilen doğrusal denklemdeki b katsayıları hesaplanır.

$y=b\,X$

Burada b katsayısı;

$b=(X'X)^{-1}X'y$

formülünden hesaplanır. b katsayıları doğru denkleminde yerine konulur.

$y= b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 + b_{123}x_1x_2x_3$

2.1.3.1.2 Fraksiyonel Faktöriyel Tasarım

Tam faktöriyel tasarımda her bir faktörün ve etkileşimlerinin deney sonucuna etkileri incelenir. 2^k formülüne göre 7 faktör için 128 deney, 10 faktör için 1024 deney yapılması gerekir. Burada görüldüğü gibi faktör sayısı artıkça deney sayısı da çok fazla arttığı için bu yöntem pratik olmamaktadır. Birçok durumda faktörler arasındaki ikili, üçlü ve daha yüksek etkileşimler çok önemli olmayabilir. Bu durumda örneğin 7 faktör için 128'den daha az deney yaparak faktörlerin etkileri incelenebilir. Gereğinden fazla olan bu deney sayısı tam faktöriyel tasarımın 1/2'si, 1/4'ü, 1/8'i vs. şeklinde alınarak azaltılabilir. Bu tasarımlar fraksiyonlu faktöriyel tasarım olarak adlandırılmaktadır. Fraksiyonlu faktöriyel tasarımda deney sayısı 2^{k-p} formülünden hesaplanır. Deney sayısı p sayısı kadar bir azalma gösterir. Örneğin p=1 için tasarım yarı fraksiyonlu tasarım adını alır. Çizelge 2.2'de 2 seviyeli 5 faktörlü fraksiyonlu faktöriyel tasarım (2^{5-1}) görülmektedir.

Çizelge 2.2 5 faktör için fraksiyonlu faktöriyel tasarım

Deney sayısı	**Faktörler** X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	**Cevap**
1	-	-	-	-	+	y_1
2	+	-	-	-	-	y_2
3	-	+	-	-	-	y_3
4	+	+	-	-	+	y_4
5	-	-	+	-	-	y_5
6	+	-	+	-	+	y_6
7	-	+	+	-	+	y_7
8	+	+	+	-	-	y_8
9	-	-	-	+	-	y_9
10	+	-	-	+	+	y_{10}
11	-	+	-	+	+	y_{11}
12	+	+	-	+	-	y_{12}
13	-	-	+	+	+	y_{13}
14	+	-	+	+	-	y_{14}
15	-	+	+	+	-	y_{15}
16	+	+	+	+	+	y_{16}

Fraksiyonel faktöriyel tasarımda deney sayısı azaltılırken bazı faktörler arası etkileşimler incelenemez. Belirlenen amaca göre tam faktöriyel veya fraksiyonel faktöriyel tasarım kullanılmalıdır. Fraksiyonel faktöriyel tasarımın birçok avantajları olmakla beraber bazı eksiklikleri de vardır;

1. Deneysel tasarım sadece iki seviyeli olduğu için parabolik terimler incelenememektedir.

2. Tekrar edilen deneyler olmadığı için hata hesabı yapılamamaktadır.

3. Deneysel tasarım sadece ikinin katları şeklindedir.

2.1.3.2 Plackett-Burman Tasarımı

Çok sayıda faktörün etkisi incelenmek istendiğinde tam faktöriyel ve fraksiyonel faktöriyel tasarım yöntemlerin pratik olarak uygulanması zorlaşmaktadır. Sadece faktörlerin kendi etkileri incelendiğinde, yani faktörler arasındaki etkileşimlerin önemli olmadığı durumlarda Plackett-Burman tasarımı pratik olarak uygulanabilir. Bu tasarımda geçerli olan deney sayısı, faktör sayısı ve üretici Çizelge 2.3'de gösterilmiştir.

Çizelge 2. 3 Plackett-Burman tasarımı için üreticiler

Deney Sayısı	**Faktörler**	**Üretici**
8	7	+ + + - + - -
12	11	+ + - + + + - - - + -
16	15	+ + + + - +- ++- - + - - -
20	19	+ + - + + + + - + - + - - - - + + -
24	23	+ + + + + - + - + + - - + + - - + - + - - - -

11 faktör ve 12 deneyi içeren Plackett Burman tasarımı Çizelge 2.4'de gösterilmektedir.

Çizelge 2.4 11 Faktör için Plackett-Burman tasarımı

DENEYLER	FAKTÖRLER										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+
3	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-
4	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+
5	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+
6	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+
7	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-
8	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-
9	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-
10	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+
11	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-
12	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+

Bu tasarımın bazı özellikleri vardır.

- Birinci satır aynı seviyeye sahiptir(-1 veya +1).
- İkinci satır üretici satırdır. Çizelge 2.3'deki üreticilerden birisi kullanılır. Faktör sayısı her zaman tek sayı ve deney sayısı faktör sayısından bir fazladır.

- Üçüncü satırın ikinci satırın bir yana kaydırılması ile elde edilir (Çizelge 2.4).
- Bütün faktörler için yüksek ve düşük seviye sayısı eşittir. Bu da kolonların birbiri ile ortagonal (kolonlar birbirinden bağımsız) olduğunu gösterir.

Plackett Burman tasarımda faktör sayısı deney sayısından bir düşüktür 11 faktör için 12 deney yapmak gerekir. Ancak gerçekte 10 faktör var ise 11. faktör sonuç üzerinde herhangi bir etkisi olmayan rastgele bir faktör seçilir. Bu faktöre dummy faktör denilir. Tasarım tablosuna kesim noktası (b_0) ilave edildiğinde kare matris elde edilir. Bu durumda b katsayıları aşağıdaki gibi hesaplanabilir.

$b = D^{-1}y$

Tasarım tablosunda kodlanmış değerler kullanıldığında b katsayıları her bir kolon ölçülen değerlerle (y) çarpıldıktan sonra deney sayısına bölünerek de hesaplanabilir.

$$b_j = \sum_{i=1}^{N} X_{ij}\, y_i \frac{1}{N}$$

2.1.4 Optimizasyon Tasarımları

Tarama tasarımları 2 seviye ile her bir faktörün etkilerini genel olarak inceleyen yöntemlerdir. Tekrarlanan deney sayısı ve parabolik etkileri incelemez. Bazı durumlarda faktörler arasındaki etkileşimleri incelemek mümkün değildir. Bu nedenle bu tasarımlar ile önemli faktörler belirlendikten sonra detaylı inceleme yani optimizasyon yapılır. İki nedenle optimizasyona ihtiyaç vardır. Birincisi, deneysel sonucu etkileyen faktörlerin optimum değerlerini bulmaktır. Örneğin, organik sentezde maksimum verimi etkileyen faktörlerin veya kromatografik ayırmada ayırma gücünü etkileyen faktörlerin optimizasyonu gibi. İkinci neden ise, her bir faktörün sonuca etkisini gösteren matematiksel modelin oluşturulmasıdır. Örneğin, bir ürünün FTIR spektrumu ile ürünün özelliği ve üretim prosesi arasındaki ilişki kurulmasına ihtiyaç duyulabilir. Optimizasyon tasarımlarında sadece, tarama tasarımı ile bulunan etkili faktörlerin sonuca etkisi incelenir. Bu aşamada daha fazla seviye ile çalışılır. Tekrarlanan deney sayısı, parabolik etkiler ve faktörler arasındaki etkileşimler hesaplanır.

En yaygın kullanılan optimizasyon tasarımları Merkezi Kompozit Tasarım, Box-Behnken Tasarımı, Doehlert Tasarımı ve D-optimal Tasarımı'dır.

2.1.4.1 Merkezi Kompozit Tasarım

Merkezi kompozit tasarımda deney sayısı aşağıdaki formüle göre belirlenir.

Deney sayısı $=2^k + 2k + 1$ (k: faktör sayısı)

Formüldeki 2^k tam faktöriyel veya fraksiyonlu faktöriyel tasarımdaki deney sayılarını, 2k star tasarım deney sayısını ve 1 ise orta seviyedeki deney sayısını gösterir. 2^k'daki seviyeler (-1) ve (+1), 2k'dakiler ±α ,1'deki ise (0) dır. α değeri dairesel ve ortagonal tasarıma göre farklı seviyeler alır. α Dairesel tasarımda $\pm\sqrt[4]{2^k}$, ortagonal tasarımda ise $\pm\sqrt{k}$ formüle göre hesaplanır. 3 faktör için Merkezi Kompozit tasarımı örneği Çizelge 2.5'da verilmiştir.

Çizelge 2.5 3 faktör için merkezi kompozit tasarımı

Deney Sayısı	Faktörler		
	X_1	X_2	X_3
1	0	0	0
2	-1	0	0
3	+1	0	0
4	0	-1	0
5	0	+1	-1
6	0	0	+1
7	0	0	-0,5
8	-0,5	-0,5	-0,5
9	-0,5	+0,5	-0,5
10	0,5	+0,5	-0,5
11	0,5	-0,5	0,5
12	-0,5	-0,5	0,5
13	-0,5	+0,5	0,5
14	0,5	+0,5	0,5
15	0,5	-0,5	0,5

2.1.4.2 Box-Behnken Tasarımı

Box-Behnken tasarımı üç ya da daha fazla seviyeye sahiptir ve üç ya da daha fazla faktöre sahip problemlere uygulanabilir. Faktöriyel veya ekstremum noktaları yoktur. Bu tasarım (2k(k-1))+nc sayıda noktadan oluşur. Bu sayı merkez kompozit tasarıma göre daha az, üç faktör için ise Doehlert tasarım ile aynıdır. Box-Behnken tasarımı, optimum değerin faktör aralığı ortasında olduğu bilinen, ikiden daha fazla faktörün bulunduğu sistemlerde önerilir. 3 faktör için Box-Behnken tasarımı örneği Çizelge 2.6'da verilmiştir.

Çizelge 2.6 3 Faktör için Box-Behnken tasarımı

Deney Sayısı	**Faktörler**		
	A	**B**	**C**
1	-1	-1	0
2	+1	-1	0
3	-1	+1	0
4	+1	+1	0
5	-1	0	-1
6	+1	0	-1
7	-1	0	+1
8	+1	0	+1
9	0	-1	-1
10	0	+1	-1
11	0	-1	+1
12	0	+1	+1
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0

2.1.4.3 Doehlert Tasarımı

Doehlert tasarımları, merkez kompozit ve Box-Behnken dizaynları gibi döndürülebilir değildir örneğin, farklı faktörler için farklı tahmin nitelikleri verebilir. Ancak çok kullanışlı olup farklı faktörler için farklı seviye sayıları vardır. Böylece, önemli faktörler daha fazla seviyelerde ölçülebilir. Bu tasarım verilen faktör boşluğunu mümkün olduğunca düzgün olarak doldurmaya çalışır. Bir Doehlert tasarımı k^2+k+nc noktadan oluşur. 3 faktör için Doehlert tasarımı örneği Çizelge 2.7'de verilmiştir.

Çizelge 2.7 3 Faktör için Doehlert tasarımı

Deney Sayısı	Faktörler		
	A	B	C
1	0	0	0
2	1	0	0
3	0,5	0,866	0
4	0,5	0,289	0,817
5	-1	0	0
6	-0,5	-0,866	0
7	-0,5	-0,289	-0,817
8	0,5	0,866	0
9	0,5	0,289	-0,817
10	-0,5	0,866	0
11	0	0,577	-0,817
12	-0,5	0,289	0,817
13	0	-0,577	0,817

2.1.4.4 D-optimal Tasarım

D-optimal tasarımlar, çözücü bileşimi ve çözünen konsantrasyonlarının kombinasyonlarının uygun olmaması gibi faktör alanı düzgün bir şekilde elde edilebilir olmadığında tercih edilir. Bir başka kullanışlı yanı ise deney sayısı belirlenebilir. Bu sayı modeldeki etkilerin katsayılarını hesaplamak için minimum olmalıdır (etkilerin sayısı + terim sabiti). D-Optimal çözüm, toplam sayıdan tasarım noktalarını seçerek noktaların optimal dağılımı nedir sorusunu cevaplar. Bu, X XT determinantının maksimize edilmesiyle gösterilebilir (X tasarım noktalarının matrisi, T transpoze). Minimum bir tasarım analiz edildiğinde, aynı prensiple sistem hakkındaki bilgiyi belirginleştirmek için daha fazla nokta eklenebilir. (buluthadan alacağım yer ile aynı deneysel tasarım ve optimizasyon)

2.1.5 Varyans Analizi

Varyans analizi, ikiden fazla popülasyonun ortalamaları arasında anlamlı fark olup olmadığını, anlamlı bir fark varsa hangi spesifik popülasyon ortalamasının diğerlerinden farklı olduğunu bulmak için kullanılan istatistiksel bir işlemdir. Ve kısaca ANOVA olarak bilinir. Deneysel tasarım yöntemlerinde de ANOVA'nın avantajlarından yararlanır. ANOVA tarama tasarımlarında ve optimizasyonda farklı amaçla kullanılır. Tarama tasarımlarında, faktörlerin etkileri sayısal olarak hesaplanır. Bu sayısal değerler ANOVA ile incelenerek değerlerin anlamlı olup olamadığı yani faktörün deney sonucunda etkili olup olmadığına karar verilir. Optimizasyonda ise ANOVA ile modelleme sonucu elde edilen teorik sonuçlarla, deneysel sonuçlar arasında anlamlı fark olup olmadığı belirlenir. Böylelikle oluşturulan modelin güvenilirliği test edilir.

2.1.6 Faktöriyel Tasarımın Analitik Kimyada Uygulamaları

Analitik Kimyada çeşitli yöntemlerle yapılan analizlerde analiz sonuçlarını etkileyen faktörlerin belirlenmesi ve optimum değerlerinin bulunması amacı ile deneysel tasarımdan yararlanılmaktadır. Deneysel tasarıma en çok başvurulan yöntemler atomik spektroskopi, kromatografi ve elektroforezdir. Çizelge 2.8'de atomik spektroskopi, Çizelge 2.9'da kromatografi, Çizelge 2.10'da elektroforez ile yapılan analizlerde kullanılan deneysel tasarım yöntemleri verilmiştir. Ayrıca literatür araştırmalarında UV-VIS spektroskopi [2], [3], yakın IR [4], Floresans spektroskopi [5] ve elektroanalitik yöntemlerle [6], [7] analizlerde de deneysel tasarım uygulanmasına rastlanmıştır. Deneysel tasarım, geliştirilen analitik yöntemlerin geçerliliğini kontrol etmek amacı ile yapılan validasyon çalışmalarında da tutarlılık parametresinin incelmesinde kullanılmaktadır. Çizelge 2.11'de HPLC ile yapılan analizlerde validasyon aşamasında kullanılan deneysel tasarım yöntemleri verilmiştir.

Çizelge 2.8 Atomik spektroskopide deneysel tasarımın uygulandığı çalışmalar

Analit	**Örnek**	**Analiz Yöntemi**	**Deneysel Tasarım**	**Kaynak**
Cr, Cu, Ni, Zn	Su	ICP-OES	Fraksiyonel faktöriyel Merkezi kompozit	[8]
Pt	Plastik	AAS	Plackett-Burman Merkezi kompozit	[9]
Rutenyum		AAS	Tam Faktöriyel	[10]
Cu	Yağ	AAS	Fraksiyonel faktöriyel Merkezi kompozit	[11]
Mn (II)	Yüzey ve deniz suyu, biyolojik örnek	FAAS	Tam Faktöriyel Doehlert	[12]
Hg	Su örnekleri	CVAAS	Plackett-Burman	[13]
V (II), Cu (II)	Deniz suyu	ICP-OES	Tam Faktöriyel Doehlert	[14]
Pb (II)	Musluk suyu, toprak, siyah çay, evsel atık	FAAS	Tam Faktöriyel	[15]
Cu (II)	Alkolsüz içecek	FAAS	Fraksiyonlu faktöriyel	[16]
Cu (II)	Çeşitli su örnekleri	FAAS	Tam Faktöriyel Doehlert	[17]
Pt (IV)	Musluk suyu	ICP-OES	Tam Faktöriyel	[18]
Cu (II)	Musluk ve nehir suyu	FAAS	Fraksiyonlu faktöriyel	[19]
Zn (II)	Su örnekleri yapraklar, pirinç unu	FAAS	Tam Faktöriyel Doehlert	[20]
Cu (II)	Doğal yiyecekler, çeşitli unlar, Yapraklar	FAAS	Doehlert	[21]
Zn (II)	Biyolojik örnekler	FAAS	Tam Faktöriyel Doehlert	[22]
Fe (III)	Su örnekleri	GF-AAS	Doehlert	[23]
Cu (II), Fe (II) Mn (II), Ni (II)	İdrar	FAAS	Plackett-Burman Merkezi kompozit	[24]
Al (III)	Çeşitli su örnekleri	GF-AAS	Doehlert	[25]
Cd (II)	İçme suyu	FAAS	Tam Faktöriyel Doehlert	[26]
Pb (II)	Çeşitli su örnekleri	ICP-AES	Tam Faktöriyel Box-Behnken	[27]

Çizelge 2. 9 Kromatografik analizlerde deneysel tasarımın uygulandığı çalışmalar

Analit	**Örnek**	**Analiz Yöntemi**	**Deneysel Tasarım**	**Kaynak**
Akrilamid	Kahve	LC-MS	Merkezi kompozit	[28]
-	Hava	GC-DMS	Tam faktöriyel	[29]
PAH	Hava	GC×GC–MS	Merkezi kompozit	[30]
Kalıntı	İlaç	GC-FID SPME	Tam faktöriyel	[31]
Estrojenik bileşikler	Çevresel örnekler	GC–MS	Merkezi kompozit	[32]
Polisiklik aromatik hidrokarbonlar	Süt	GC–MS	Merkezi kompozit	[33]
Uyuşturucu	İdrar	GC–MS	Tam faktöriyel Merkezi kompozit	[34]
-	Farklı polaritelerde örnekler	GC–MS	Tam faktöriyel	[35]
Bakım ürünleri	Su	GC–MS SPME	Merkezi kompozit	[36]
Pestisit	Su	GC–MS SPME	Fraksiyonel faktöriyel	[37]
Organik kirleticiler	Su	GC–MS	Tam faktöriyel	[38]
Bozunma ürünleri	Kan	GC–MS	Tam faktöriyel Merkezi kompozit	[39]
Paraben	Toz	GC–MS	Merkezi kompozit	[40]
Polihalojenlenmiş bileşikler	Biyolojik sıvı	GC–MS/MS	Plackett-Burman Merkezi kompozit	[41]
Biyojenik amin ve bozunma ürünleri	Fare beyini	HPLC-amperometri	Fraksiyonel faktöriyel	[42]
-	İlaç	HPLC-DAD	Tam faktöriyel	[43]
Kanabinoit	Bitki	HPLC-DAD	Tam faktöriyel	[44]
Sulindak	İlaç	HPLC-DAD	Tam faktöriyel	[45]
Poliribosil-ribitol fosfat	Aşı	HPLC-amperometri	Merkezi kompozit	[46]
Tersiyer alkaloit	Bitki	HPLC-UV	Tam faktöriyel	[47]
Safsızlık	Pridinol mezilat	HPLC-UV	Tam faktöriyel	[48]
Organik asit	Endüstriyel atık	HPLC-UV	Merkezi kompozit	[49]
Sephalosporin	Plazma ve amniyotik sıvı	HPLC-UV	Tam faktöriyel	[50]
2-Arilimidazoline türevleri	-	HPLC-UV	Tam faktöriyel	[51]
Üre asitleri	-	Moleküler eleme, LC-UV	Merkezi kompozit	[52]
Selüloz türevleri	İlaç	LC-buharlaştırıcı ışık saçılımı	Tam faktöriyel	[53]
Estrojenik bileşikler	Bira	LC–MS	Tam faktöriyel	[54]
Kortizonlar	-	LC–MS semi preparatif	Tam faktöriyel	[55]
12 iyonik per ve poliflorin alk bileşikleri	Hava	LC–MS/MS	Merkezi kompozit	[56]

Çizelge 2.9' un devamı

Analit	**Örnek**	**Analiz Yöntemi**	**Deneysel Tasarım**	**Kaynak**
Sideroforlar	-	LC–MS/MS	Merkezi kompozit	[57]
Protein	İlaç	LC–MS/MS	Merkezi kompozit	[58]
Pestisit	Hava	Mikrodalga destek ekstraksiyon,LC-MS/MS	Merkezi kompozit	[59]
Binafitil türevleri		Elektrokromatografi-MS	Merkezi kompozit	[60]
SPE flavonoidler	Bal	Elektrokromatografi MS	Tam faktöriyel	[61]
Sulfonamid kalıntıları	-	Moleküler eleme-LC	Tam faktöriyel	[62]
Doğal organik maddeler	-	Moleküler eleme-LC	Tam faktöriyel	[63]
	Kompleks organik karışımlar	Moleküler eleme-LC	Merkezi kompozit	[64]
Metoprolol	İlaç	Süperkritik akışkan	Tam faktöriyel	[65]
Asetil kolinesteraz		UHPLC	Merkezi kompozit	[66]
2,4,6-trikloroanisol	Şarap	GC-ECD	Box-Behnken	[67]
Benzen	Gıda	GC–IDMS	Fraksiyonel faktöriyel	[68]
Anabolik steroid		GC–MS	Doehlert	[69]
Metabolit	Kan	GC–MS	D-optimal	[39]
Non steroid antiflamatuvarlar	İlaç	GC–MS, SPME	D-optimal	[70]
-	Fare	GC–TOFMS	D-optimal	[71]
Sulindak	İlaç	HPLC-UV	Kompozit dizayn	[72]
Silika sentezi	-	HPLC-UV	Tam Faktöriyel	[73]
Organik bileşikler		HPLC-UV	D-optimal	[74]
İyonik bileşikler		HPLC-UV	D ve G-optimal	[75]
-	Çay	HPLC-UV	Karışık dizayn	[76]
Organik asit	-	Moleküler eleme LC-DAD	Kompozit dizayn	[77]
Salisilik asit, asetil salisilik asit, askorbik asit	İlaç	Moleküler eleme LC-DAD	Box-Behnken	[78]
Asit	-	LC-MS	Merkezi kompozit	[79]
Protein	Karaciğer	LC-MS/MS	Ortagonal diziliş	[80]
Geniposit ve genipin	-	LC-MS/MS	Fraksiyonel faktöriyel	[81]
Monolitik polimerler		LC-UV	D-optimal	[82]
Protein A	Sentetik antikor	Karışık mod kromatografisi	Box-Behnken	[83]
Sentetik polimer sentezi		Moleküler eleme MS	D-optimal	[84]

Çizelge 2.10 Elektroforez ile analizlerde deneysel tasarımın uygulandığı çalışmalar

Analit	**Örnek**	**Deneysel Tasarım**	**Kaynak**
Etambutol hidroklorür	İlaç preparatı	Box–Behnken	[85]
Akonitin ve hipoksantin	Kurtboğan şifalı ot	Merkezi kompozit	[86]
Huperzine	Farmasötik ürün ve biyolojik sıvı	ANN	[87]
RS86017	Enantiyomerik saflığının tayini	Merkezi kompozit	[88]
Peptidlerin ayrılması	Siklodekstrinli ortam	Merkezi kompozit	[89]
β-bloker enantiyomerik ayrılması	-	Fraksiyonel Faktöriyel	[90]
Arbutin, kojik asit ve Hidrokinon	Kozmetik	Tam faktöriyel	[91]
Antihistaminler	İlaç, idrar ve serum	Tam faktöriyel	[92]
Sığır kazeinlerin	-	Faktöriyel Merkezi kompozit	[93]
Glutatyon ve amino asit	İnsan kanı	Tam faktöriyel	[94]
Non-steroidlerin enantiyomerik ayrılması	Anti-inflamatuvar ilaç	Merkez kompozit	[94]
β-agonistlerin ayrılması,	-	Tam faktöriyel	[96]
H-Tyr-(d) Arg-Phe-Phe-NH_2 ve ilgili 9 bileşik	-	ANN	[97]
Çinko, sodyum, kalsiyum ve magnezyum	Su	Faktöriyel	[98]
Deksfenfluraminin enantiyomerik saflığının tayini	Anorektik ilaç	Plackett-Burman	[99]
Klorlanmış bileşikler	Balık	ANN	[100]
Kodein ve parasetamol	İlaç	Merkezi kompozit	[92]
Antihistaminik	İdrar	Merkezi kompozit	[101]
İmmunoglobilin	İnsan sıvısı	Fraksiyonel faktöriyel Merkezi kompozit	[102]
Klomifenin Z ve E izomerleri	-	Plackett-Burman	[103]
İbuprofen, kodein fosfat ve safsızlıkları	Analzejik ilaç	Fraksiyonel faktöriyel	[104]
Rufloksasin hidroklorür	Kaplamalı masalar	Plackett-Burman Doehlert	[105]
Pilokarpin ve bozunma ürünleri	-	Fraksiyonel faktöriyel	[106]
Tetrasiklin klortetrasiklin oksitetrasiklin doksisiklin	İlaç	Faktöriyel Merkezi kompozit	[107]
Streptomisin oksitetrasiklin	Antimikrobiyaller antibiyotik	Merkezi kompozit	[108]

Çizelge 2.10'un devamı

Analit	Örnek	Deneysel Tasarım	Kaynak
Enalapril, lisinopril, quinapril, fosinopril, perindopril, ramipril, benazepril, cilazapril	İlaç	Tam faktöriyel	[109]
Gamma-aminobütirik asit	Biyolojik örnek	Plackett-Burman Merkezi kompozit	[110]
V-aminobütirik asit	Mikro diyalizat	Faktöriyel	[111]
Gluten	Buğday	Faktöriyel	[112]
C vitamini, B2 vitamin flavanonlar hidroksisinnami asit.	Nutrasötik	D-optimum	[113]
Glukosinolat	-	Doehlert	[114]
Sitalopramın enantiyomerik ayrılması	İlaç	Plackett–Burman Faktöriyel tasarım	[115]
Yağ asitleri	-	Tam faktöriyel	[116]
13 fenolik bileşik	Sızma zeytinyağı	Merkezi kompozit	[117]
Nörotransmitter amino asit	-	Merkezi kompozit	[118]

Çizelge 2.11 HPLC ile analizlerde validasyon aşamasında kullanılan deneysel tasarımlar

Analit	Örnek	Analiz Yöntemi	Deneysel Tasarım	Kaynak
Safsızlık	Pridinol	UV	Fraksiyonel faktöriyel	[48]
(2S,3R)-2-amino-3-oktadekanol hidro-kloritin	İlaç	UV	Plackett-Burman	[119]
Protein	Biyolojik sıvı	Floresans	Plackett-Burman	[120]
Loksifoksifen	İlaç	UV	-	[121]
pregabalin, gabapentin ve vigabatrin	Biyolojik sıvı	Floresans	Plackett- Burman	[122]
Anti-epilektik ilaçlar	Biyolojik sıvı	DAD	Fraksiyonel faktöriyel	[123]
	İlaç	UV	Plackett-Burman	[124]

2.2 Validasyon

2.2.1 Validasyonun Tanımı ve Önemi

Validasyon, ürün kalitesine etki edebilecek tüm imkan ve operasyonların önceden belirlenmiş spesifikasyonları sağlayacak şekilde işlendiğini garanti altına almak amacıyla yürütülen çalışmalardır. Her zaman aynı kalitede ve aynı şartlarda üretim yaparak, tüm üretilen ürünlerin kalitesinin aynı olmasını sağlamaktır.

Validasyonun GMP kuralları için yapılması gerekir. Validasyon, kaliteyi güvence altına alır, değişkenliği en aza indirger, iyi kontrol edilmiş, güvenilir prosesler oluşmasını sağlar, ekipman ve prosesler hakkında daha iyi bilgi sahibi olunmasını, bozuk çıkan malın imhası, yeniden işlem görmesi, yeniden örnek alınması, ekstradan analiz yapılması gibi olaylardan kaynaklı maliyeti azaltır, verimliliği arttırır ve organizasyon içindeki birimlerde koordinasyon, iletişim ve bilgi akışını arttırır.

Validasyon işlemi tüm ürünlerin kalite kontrollerine uygulanabilir. Ülkemizde validasyon işlemi genellikle ilaç sektöründe geniş uygulama alanı bulmaktadır.

2.2.2 Endüstride Validasyon Çeşitleri

Endüstride yapılan validasyonlar 4 ana başlık altında toplanır.

Temizlik işleri validasyonu, imalat alanında bulunan tüm imalatla ilgili ekipmanların temizlenmesi amacı ile yapılan çalışmalardır.

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

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

Proses validasyonu**,** spesifik olarak bir ürünün araştırma kademesinden final ürün haline gelene kadar geçen sürede yapılan çalışmalardır.

2.2.3 Analitik Yöntem Validasyonu

2.2.3.1 Amaç

Analitik yöntem validasyonu, tasarlanmış analitik yöntemin kabul edilebilirliğini kanıtlamak ve analitik prosedürün kantitatif ve kalitatif olarak doğru sonuçlar verdiğini belirlemek amacıyla yapılır.

2.2.3.2 Analitik Yöntem Validasyon Parametreleri

Yöntem validasyonu için parametreler uluslararası komitelerce, ulusların farklı kuruluşları tarafından ve literatürde tanımlanmıştır. Fakat bazı tanımlar kurumlara göre farklılık gösterebilir. Validasyon parametrelerinin deney sırası hakkında resmi bir yönerge yoktur. Yöntemin özelliğine göre en uygun sıra oluşturulur. En çok kabul gören validasyon parametreleri ve sırası aşağıda verilmiştir.

1. Seçicilik - Spesifiklik
2. Stabilite
3. Doğrusallık
4. Çalışma aralığı
5. Doğruluk ve geri kazanabilirlik
6. Kesinlik(tekrarlanabilirlik)
    - Gün içi tekrarlanabilirlik
    - Günler arası tekrarlanabilirlik
    - Laboratuvarlar arası tekrarlanabilirlik
7. Tutarlılık
8. Tanıma limiti(LOD)
9. Miktar tayini limiti(LOQ)
10. Güvenilirlik

Yöntem validasyonu için gerekli parametreler analizin amacına göre de farklılık gösterir. Analizler genel olarak 3 amaçla yapılır.

1. Hammadde veya bitmiş ürün içindeki aktif maddenin tayini
2. Hammadde de ki safsızlıkların veya bitmiş üründeki parçalanma ürünlerinin tayini
3. Ürünün performans özelliklerinin tayini

Çizelge 2. 12’ de analiz amacına göre değişen parametreler gösterilmektedir:

Çizelge 2.12 Analiz amacına göre değişen parametreler

Parametreler	**1**	**2**	**3**
Seçicilik	+	+	-
Doğrusallık	+	+	+
Çalışma aralığı	+	+	*
Doğruluk ve geri kazanım	+	+	*
Kesinlik	+	+	+
Tutarlılık	+	+	+
Tanıma limiti	+	+	*
Miktar tayin limiti	+	+	*
Güvenirlilik	+	+	+

(*): Spesifik testlere bağlı olarak gerekirse yapılır.

2.2.3.2.1 Seçicilik/Spesifiklik

Spesifiklik, genellikle bir tek analit için üretilen yönteme karşılıktır. Seçicilik ise birbirinden ayırt edilen ya da edilemeyen kimyasal içerikler için kullanılmıştır. Kısacası; girişim yapan maddeler varlığında analitin doğru olarak ölçebilirliğini ifade eder. Likit kromatografisinde seçicilik, optimum ayırma ve kolon koşullarının seçimiyle elde edilmiştir. Seçiciliğin üstünlüğü, kullanılan analiz yönteminde sadece o etken maddeye özgün ve spesifik olduğunu ifade etmesidir. Bizim yöntemimiz sadece etken maddeyi ölçebilmeli ve diğerleri ile reaksiyon vermemelidir.

2.2.3.2.2 Stabilite

Etken madde ile maddenin parçalandıktan sonra meydana gelen parçalanma ürünlerinin ve miktarlarının birbirinden bağımsız olarak ayrı ayrı tespit edebilme özelliğidir.

2.2.3.2.3 Doğrusallık

Doğrusallık, yöntemin verilen bir alanda örnek içindeki analitin konsantrasyonu ile cihaz sinyali arasındaki ilişki olarak ifade edilir. Analit konsantrasyonun %25-150'si olacak şekilde en az 5 farklı konsantrasyonda çözeltiler hazırlanır ve cihaza verilir. Konsantrasyonla cihaz cevabı arasında grafik çizilerek regresyon analizi yapılır. Hesaplanan korelasyon katsayısı değeri doğrusallık hakkında bilgi edinmemizi sağlar. Bu değer 0,997'den büyük veya eşit olmalıdır.

2.2.3.2.4 Çalışma Aralığı

Bir analitik yöntemin çalışma aralığı; kesinlik, doğruluk ve doğrusallık belirlenirken üst ve alt aralıklarıdır. Örneğin analiz konsantrasyonu yöntemin çalışma aralıklarını belirler. ICH' ye göre analiz konsantrasyonu:

Kimyasal analizlerde : %80-%120

Safsızlık analizlerinde : %50-%120 olmalıdır.

2.2.3.2.5 Doğruluk

Doğruluk, yöntem ile elde edilen test sonuçlarının gerçek değerle uygunluğunun bir ölçüsüdür. Doğruluk değerlendirilmesi birçok yolla elde edilebilir:

I. Referans yöntemi ile örnek yönteminin karşılaştırılması yapılabilir. Bu yaklaşımda referans yönteminin belirsizliği bilinmektedir.

II. Konsantrasyonları bilinen bir örneğin analizi ile tayin edilebilir. Bir sertifikalı örnek ve ölçülmüş doğru değer kıyaslanır.

% Geri kazanım bulunan sonuçların gerçek değere yakınlığının ölçülmesidir. Elimizde sertifikalı örnek bulunmuyorsa boş deneme çözeltisine konsantrasyonu bilinen hacimde ve ağırlıkta analit eklenir. Sonra matriksten, analitin ekstraksiyonu sonucu elde edilen analitin standart çözeltilere göre % geri kazanımları hesaplanır. Bu sayede boş deneme çözeltisine ilave edilen etken maddenin tam olarak geri kazanıp kazanılmadığı anlaşılır. Elde edilen geri kazanım değerleri $\%100 \pm 3$ limitleri içinde olmalıdır. Ama analit konsantrasyonu çok düşük olduğu zaman bu sınır genişler. Beklenen geri kazanım örnek matriksine ve analit konsantrasyonuna bağlıdır.

2.2.3.2.6 Kesinlik (Tekrarlanabilirlik)

Bir yöntemin kesinliği birkaç kez enjeksiyon yapıldığında sonuçların birbirine uygunluk derecesidir. Yani homojen bir karışımdan, birden fazla örnek alındığında elde edilen sonuçların birbiriyle uyumlu olmasıdır. Bir yöntemin kesinliği genellikle test sonuçlarının % RSD (bağıl standart sapma) değeri ile ölçülür. Kesinlik için kabul edilebilirlik sınırı yapılan analizin türüne bağlıdır. İlaç analizlerinde kabul edilebilirlik sınırı %2'nin altında iken, çevre ve gıda analizlerinde matrikse, analit konsantrasyonuna ve analiz tekniklerine bağlı olarak %2 ile %20 arasında değişmektedir.

Tekrarlanabilirlik gün içi, günler arası ve laboratuvarlar arası olmak üzere 3 kategoride incelenir.

2.2.3.2.6.1 Gün İçi Tekrarlanabilirlik

Bir analistin laboratuvarda bir ekipman ile kısa zamanda analizi gerçekleştirdiğinde elde edilen sonuçların tutarlılığıdır. 2 ya da 3 farklı konsantrasyonda aynı standartlar kullanılarak hazırlanan çözeltiler, aynı gün içerisinde, aynı cihazlarla, aynı analist tarafından 3 ya da 4 kez analiz edilir ve % RSD hesaplanır.

2.2.3.2.6.2 Günler Arası Tekrarlanabilirlik

Aynı laboratuarda farklı günlerde elde edilen sonuçların birbiri ile tutarlılığıdır. 2 ya da 3 farklı konsantrasyonda farklı standartlar kullanılarak hazırlanan çözeltiler, farklı günlerde, aynı cihazlarla, aynı analist tarafından 3 ya da 4 kez analiz edilir ve % RSD hesaplanır.

2.2.3.2.6.3 Laboratuvarlar Arası Tekrarlanabilirlik

Laboratuvarlar arası tekrarlanabilirlik, farklı laboratuvarlardan elde edilen sonuçların birbiri ile tutarlılığıdır. Farklı laboratuvarlarda, farklı analistlerle ve farklı işlevsel, çevresel şartlar altında ama aynı yöntem ile analiz tekrarlanır. Eğer yöntem farklı laboratuarlarda kullanılacaksa bu validasyon parametresi önemlidir. Bir yöntemin laboratuvarlar arası tekrarlanabilirliğini, oda içindeki sıcaklık ve nem farklılıkları, farklı tecrübe ve farklı gayretteki analistler, farklı özellikteki donanım, malzeme ve aletlerdeki koşulların varyasyonları, farklı şirketlerin kolonları, çözücüler, belirteçler ve farklı kalitedeki aletler etkiler.

2.2.3.2.7 Tutarlılık

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

2.2.3.2.8 Miktar Tayini Limiti ve Tanıma Limiti

2.2.3.2.8.1 Tanıma Limiti (LOD)

Bir maddenin % 95 ya da % 99 güvenirlilik sınırı içinde teşhis edilebildiği minimum miktarı olarak tanımlanmıştır. Genellikle bu seviyelerde güvenilir kantitatif sonuçlar elde edilemez.

2.2.3.2.8.2 Miktar Tayin Limiti (LOQ)

Bir maddenin % 95 ya da % 99 güvenirlik sınırı içinde tayin edilebilen minimum miktarı olarak tanımlanır. Bu miktar analiz koşullarında, kabul edilebilir kesinlik ve doğruluk değerlerine sahip tayin edilebilecek en düşük konsantrasyondaki madde miktarıdır. Bu parametre özellikle hammadde veya bitmiş üründeki safsızlık, parçalanma ürünü gibi düşük miktardaki maddelerin analizinde önem taşımaktadır.

2.2.3.2.9 Güvenilirlik

Güvenilirlik testleri, yöntemde ufak değişiklikler yapıldığı zaman sonuçların yine de uygun olduğunu göstermek için yapılır. Örneğin sıvı kromatografisinde akış hızı, dedektör, dalga boyu veya hareketli faz bileşiminin gerçek değerinden toleranslar ölçüsünde sapması sonucu analizlerin bu sapmalardan etkilenip etkilenmediği tespit edilir.

2.2.4 Validasyon İle İlgili Bazı Örnekler

Yapılan araştırmalarda çeşitli endüstrilerde uygulanan çok sayıda validasyon çalışmalarına rastlanmıştır. Bu tezin konusu olan ilaç etken maddelerinin HPLC ile analizi için yapılmış validasyon çalışmaları Çizelge 2. 13’ de verilmiştir.

Çizelge 2.13 İlaç etken maddelerinin HPLC ile analizinde uygulanan validasyon çalışmaları

Örnek	**Etken Madde**	**Hareketli Faz**	**Kolon**	**Dedektör**	**Parametreler**	**Kaynak**
Tablet	Levamisol	Metanol, asetonitril (pH 4,6), su 50: 30: 20	C_{18}	UV	Spesifiklik, kesinlik, doğruluk, güvenilirlik, LOD, LOQ	[125]
Tablet	Famoditin	Asetonitril, destile su, trimetilen, fosforik asit 49,9: 49, 9: 0,1: 0,1	C_{18}	DAD	Doğrusallık, spesifiklik, doğruluk, kesinlik, uygunluk, stabilite	[126]
İlaç	Sulpirid Mebeverin hidroklorid	Asetonitril, su 70: 30	Siyano	UV	Doğrusallık, seçicilik, doğruluk, güvenilirlik	[127]
Tablet	Parasetamol Lornoksikam	Potasyumdihidrojenfosfat (pH 3,5), asetonitril 55: 45	C_{18}	UV	Doğrusallık, kesinlik, doğruluk, spesifiklik, LOD, LOQ	[128]
Gıda takviyesi	Alifatik tioller	Metanol, trietilamonyumfosfat (pH 3) 70: 30	C_{18}	UV-DAD	Seçicilik, doğrusallık, LOD, LOQ, kesinlik, doğruluk, tutarlılık	[129]
Tablet	Prulifloksokin	Amonyum asetat (pH 5,8) asetonitril 12: 88	C_{18}	UV	Doğrusallık, LOD, LOQ	[130]
İlaç	Ezetimib Simvastatin	Metanol, asetonitril, ortofosforik asit 75: 20: 5	C_{18}	UV	Spesifiklik, doğrusallık, LOD, LOQ, kesinlik, güvenilirlik	[131]
Tablet	Doksilin hyclat	Su, asetonitril 60: 40	Siyano	UV	Doğrusallık, seçicilik, doğruluk, kesinlik, güvenilirlik	[132]

28

Çizelge 2.13’ un devamı

İlaç	Diltiazem	Etanol, fosforik asit (pH 2,5) 35: 65	C_{18}	UV	Doğrusallık, kesinlik, LOQ, doğruluk, seçicilik, spesifiklik	[133]
İlaç	Permetrin izomerleri	Etanol, fosforik asit (pH 3) 67: 33	C_{18}	UV		[134]
Paslanmaz çelik kaplama	Seftriakson Sodyum	Asetonitril, su (pH 7,pH 5) 39: 55: 5.5: 0.5	Silikajel	UV	Uygunluk, spesifiklik, doğrusallık, LOD, LOQ, kesinlik, doğruluk	[135]
Tablet	Diflunisal Naproksen	Sodyum dihidrojen fosfat (pH 3,4) ,asetonitril 50: 50	C_{18}	DAD	Lineerlik, LOD, LOQ, kesinlik, güvenilirlik, spesifiklik, stabilite	[136]
İlaç	Diaserein kapsül	(pH 2,7) asetonitril, metanol 70: 10: 20	C_{18}	UV	LOD, LOQ, doğrusallık, kesinlik, doğruluk.	[137]
Tablet ve şurup	Bromhegzin Klorfenilamin Parasetamol Psödoefedrin	Trimetilamin fosforik asit tamponu(pH 4,0), metanol 35: 65	Siyano kolon	UV	Lineerlik, doğruluk tekrarlanabilirlik, kesinlik, spesifiklik, güvenilirlik	[138]
Vitamin karışımı	7 tane B kompleks vitamin C vitamini	Amonyum fosfat tamponu trietilamin	C_{18}	UV	Doğrusallık, LOD, LOQ, doğruluk, özgünlük ve güvenilirlik	[139]
-	Febuksostat	Sodyum asetat tamponu asetonitril 40: 60	C_{18}	UV		[140]

29

Çizelge 2.13' un devamı

İlaç	Enalapril Hidrokloritasit	Fosforik asit, asetonitril tamponu	C_{18}	UV	Kesinlik, doğruluk doğrusallık	[141]
İlaç Biyolojik sıvı	Seftriakson Sefaklor	Asetonitril, metanol, Trietilamin	C_{18}	UV	Doğrusallık, LOD, LOQ	[142]
İlaç	Glimepirid	Potasyum fosfat tamponu (pH 6,5) ,metanol 34: 66	C_{18}	UV	Doğrusallık, LOD, LOQ	[143]
İlaç	Sparfloksasin Deksametazon	Metonol, fosfat tamponu (pH 3,0) 60: 40	C_{18}	DAD	Doğrusallık, LOD, LOQ	[144]
İlaç	RabeprazoleSodyum ve safsızlıkları	-	C_{18}	DAD	Doğrusallık, LOD, LOQ	[145]
İlaç	Fenobarbital Fenition	Metanol, su 38: 62 ACN, su 25: 75	C_{18}	UV	Doğrusallık, kesinlik uygunluk, spesifiklik, stabilite, sağlamlık	[146]
İlaç	Metokarbamol Aspirin	Asetonitril, %1'lik amonyum asetat (pH 7,5), metanol	C_{18}	UV-DAD	LOD, LOQ , % geri kazanım, doğruluk, kesinlik	[147]

Çizelge 2.13’ un devamı

Topikal preparasyonlarda	Diltiazem	Etanol, Fosforik asit (pH 2,5) 35: 65	C_{18}	UV	Özgünlük, seçicilik, doğrusallık, kesinlik, doğruluk, güvenilirlik	[133]
İlaç	Ezetimbe	Asetonitril, sodyum hidrojen fosfat (pH 7,0) 55: 45	C_{18}	UV	Özgünlük, seçicilik, doğrusallık, kesinlik, doğruluk, güvenilirlik, LOD, LOQ	[148]
İlaç	Pioglitazon hidroklorür	Asetonitril, metanol 80: 20	C_{18}	Silikajel	Seçicilik, doğrusallık, duyarlılık, doğruluk	[149]
İlaç	Klorfeniramin Fenilefrin, Hidroklorid, Parasetamol Kafein	Bazik fosfat tamponu, asetonitril 93: 07	C_{18}	UV	Duyarlılık, doğruluk	[150]
İlaç	Piroksikam Parasetamol	Asetonitril, 0.02 M fosfat tamponu(pH 3,0) 60: 40	C_8	DAD	-	[151]
İlaç	İrinotekan hidroklorür	orto-fosforik asit, metanol asetonitril 60: 20: 20	C_{18}	UV	Özgünlük, doğrusallık, doğruluk, kesinlik, LOD, LOQ	[152]

31

Çizelge 2.13' un devamı

İlaç	Rivaroksaban	ACN, su 55: 45	C_{18}	UV	Lineerlik, doğruluk, kesinlik, güvenilirlik	[153]
İlaç formları	Famotidin	Asetonitril, distile su, trietilamin fosforik asit 49,9: 49,9: 0,1: 0,1	C_{18}	DAD	Doğrusallık, doğruluk, özgünlük, duyarlılık, stabilite çalışmaları,	[154]
İlaç	Prulifloksasin, Ulifloksasin ve safsızlıkları	Amonyum asetat tamponu (pH 5,8) asetonitril 12: 88	Silikajel	UV	LOD, LOQ, QC, ULOQ	[130]
İlaç	Rupatadin ve Montelukast	Asetonitril, su 90: 10	C_8	UV	Özgünlük, doğrusallık, kesinlik, doğruluk, sağlamlılık	[155]
Bozunma ürünleri varlığında ilaç formları	Esitalopram oksalat Klonazepam	Asetonitril, fosfat tampon, trietilamin 70: 30	C_{18}	UV	Lineerlik, LOD LOQ	[156]
İnsan sıvısı	Pirazinamit İzoniazid, Streptomisin Etambütol Rifampin	Metanol, su, formik asit, amonyum asetat 65: 35	Silikajel	UV	Seçicilik, güvenilirlik, doğrusallık, doğruluk, kesinlik	[157]
İlaç	Olmesartan medoksomil	Orta fosforik asit (pH 3), trietilamin B-Asetonitril	C_{18}	UV	Doğrusallık, kesinlik, doğruluk, LOD, LOQ, seçicilik sağlamlık	[158]
İlaç	Moksifloksasin Prednizolon	Fosfat tamponu (pH 2,8) metanol 38: 62	C_8			[159]

32

Çizelge 2.13’ un devamı

İlaç	Montelukast Feksofenadin hidroklorid	Metanol, o-fosforik asit 90: 10	C_{18}		-	[160]
-	Kandesartan sileksetil	Fosfat tamponu (pH 2,8) asetonitril 60: 40	C_{18}	UV	Doğruluk, duyarlılık, doğrusallık, seçicilik, güvenilirlik, LOD, LOQ	[161]
Kombine formlarında	Metokarbamol Aspirin	Asetonitril dihidrojenfosfat tamponu 30: 70	C_8	Floresans	Seçicilik, doğrusallık, doğruluk, inter, gün içi kesinlik	[147]
İlaç İnsan plazmasında	Zonisamid	Asetonitril, metanol damıtılmış su 20: 10: 70	C_{18}		Doğruluk, kesinlik, doğrusallık, seçicilik, güvenilirlik, LOD, LOQ	[162]
Supozituar ilaç	Alobarbital, Adifenin Hidroclorid Parasetamol	Asetonitril, sodyum asetat asetik asit(pH 4,0) Alobarbital 60: 40	C_{18}	UV	Lineerlik, kesinlik, doğruluk ve güvenilirlik	[163]
Hidroklorid varlığındaki çözeltileri	Losartan potasyum Valsartan, Telmisartan İrbesartan anjiotensin-II-reseptör	Potasyum dihidrojen fosfat (pH 6,0) asetonitril 80: 20	C_{18}	UV	Doğrusallık, doğruluk, kesinlik, LOD, LOQ,	[164]
Biyolojik sıvılarda İlaç formülasyonlarında	Celiprolol Enantiyomerleri	n-hegzan, etanol trietilamin 70: 30: 0,4	C_{18}	Floresans	Lineerlik, LOD, LOQ	[165]

33

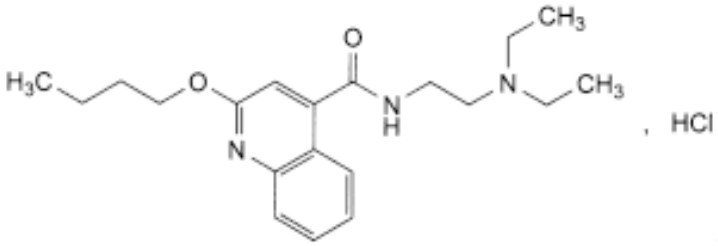
2.3 Çalışılacak İlaç Etken Maddeleri

Sinkokain - Fluokortolon Pivalat- Fluokortolon Kaproat

2.3.1 Kimyasal Yapı ve Özellikleri

2.3.1.1 Sinkokain

Yapısal formülü:



Kimyasal adı: Sinkokain

2-butoksi-N-[2 - (dietilamino) etil]-kuinolin-4-karboksamid hidroklorür

Molekül formülü: $C_{20}H_{29}N_3O_2$, HCl

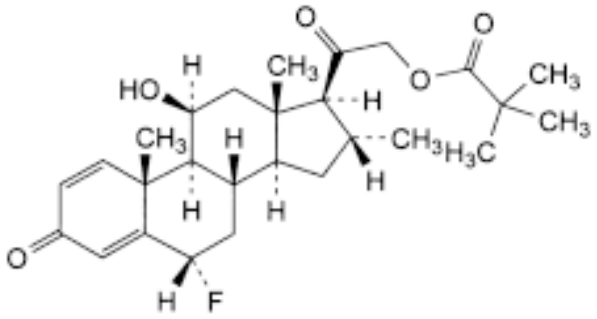
Görünümü: Beyaz, kırık beyaz, kristal toz veya renksiz kristal toz

Molekül ağırlığı: 379,9 gr/mol

Çözünürlüğü: Suda çözünürlüğü yüksektir. Aynı zamanda alkol, aseton, metilen klorür içerisinde de rahatça çözülebilir

2.3.1.2 Fluokortolon pivalat

Yapısal formülü:



Kimyasal adı: Fluokortolon Pivalat

6α-Floro-11β-hidroksi-16α-metil-3 ,20-dioksopregna-1 ,4-dien-21-il
2,2 - dimetilpropanoat

Molekül formülü: $C_{27}H_{37}FO_5$

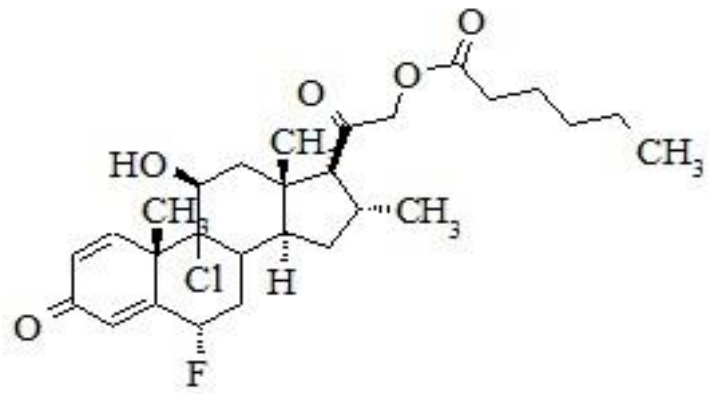
Görünüm: Beyaz, kırık beyaz, kristal toz

Molekül ağırlığı: 460,6 gr/mol

Çözünürlüğü: Suda çözünmez. Metilen klorür ve dioksinde çözülür. Etanolde de yeteri miktarda çözürlüğü vardır.

2.3.1.3 Fluokortolon Kaproat

Yapısal formülü:



Kimyasal adı: Fluokortolon Kaproat

6α, 11β, 16α)-6-Floro-11-hidroksi-16-metil-21-[(1-oksoheksil) oksi] pregna-1 ,4-dien-3 ,20-dion; 6α-Floro-11β ,21-dihidroksi-16α-metilpregna-1 ,4-dien-3 ,20-dion 21-Hekzanoat

Molekül formülü: $C_{28}H_{39}FO_5$

Görünümü: Beyaz, kırık beyaz, kristal toz veya renksiz kristal toz

Molekül ağırlığı: 474,6 gr/mol

Çözünürlüğü: Suda çözünmez. Etanolde de yeteri miktarda çözürlüğü vardır.

2.3.2 Farmakolojik Özellikleri

Fluokortolon ve esterleri kaproat, alkol ve pivalat, sentetik kortikosteroidtir. Fluokortolon kaproat, alkol veya pivalat esterinden daha uzun süreli etkiye sahiptir. Genelde krem veya merhem olarak %0,1 veya %0,25 konsantrasyonlarında kullanılırlar Sinkokain, kuvvetli ağrı kesicidir. Etkisini lokal olarak gösterir bu nedenle lokal anestezide kullanılmaktadır. Kokainden 5 kat, prokainden 15 kat daha güçlüdür. Bununla birlikte önemli ölçüde zehirlidir. Sinkokain genelde, konjunktival anestezi üretmek için, göz için merhemde, omurga veya yüzeysel anestezi üretmek için seyreltik çözeltide serbest baz veya hidroklorid olarak kullanılır.

2.3.3 Analiz Yöntemleri

Literatürde, fluokortolon ve esterleri, TLC [166], UV spektrofotometri [167]; [168], HPTLC [169], HPLC [170], HPLC-MS [171], Raman Spektroskopisi [172] ve çeşitli polarografi [173] yöntemleri ile tayin edilmiştir. Cudina ve arkadaşları da 2000 yılında supozituar lerde bulunan fluokortolon pivalat ve fluokortolon heksanoat'ın ayrılması ve belirlenmesi için bir ters faz HPLC metodu geliştirmiştir. Geliştirilen bu metotta maddeler, C_{18} kolan, metanol-asetonitril-su ve glasial asetik asit mobil fazı kullanarak, 3.0 ml/dk akış hızıyla ayrılmış ve 238 nm'de bir UV dedektörü kullanılarak dedekte edilmiştir.

Rohatagi ve arkadaşları 1996 yılında yaptıkları çalışmada plazma içerisindeki fluokortolon miktarını yine ters faz HPLC kullanarak analiz etmiştir.

Literatür araştırmalarında sinkokain miktar tayini için en çok kromatografik yöntemlere rastlanmıştır. Çizelge 2.14' de kromatografik yöntemle sinkokain tayinine yönelik çalışmalar verilmiştir. Kromatografik yöntemler dışında diğer analiz yöntemleri ile yapılan çalışmalarda vardır. Ohino ve Sakai 1981 [174] yılında sinkokain ve difenhidramin, Sakai 1982 [175] de sinkokain ve klorfenilamin melaat'i spektrofotometrik olarak tayın etmiştir. Saleh ve Askal 1995 [176] de çeşitli lokal anestezilerde ilaç hazırlamada spektrofotometrik yöntem kullanılmışlardır. Sotto ve arkadaşları 2009 [177] da klorpenamin ve sinkokain tayini için matematiksel olarak farklı bir spektrofotometrik yöntem kullanmışlardır. El-Kindy ve arkadaşları 1998 [178] de sinkokainin bozunma ürünlerini, Mohammad Abdul-Azim ve arkadaşları 2007 [179] de sinkokain karışımı içinde asedisulfon miktarını türev spektrofotometrik yöntemi ile tayin etmiştir. Essig ve Kovar 2001 [180] de florimetrik yöntemle ilaçtaki sinkokain tayinini tarama ve video dansitometri ile yapmışlardır. Komersky 2003 [181] te voltametrik Ensafi 2011 [182] de potansiyometrik yöntem ile sinkokain tayini yapmıştır.

Çizelge 2.14 Kromatografik yöntemle sinkokain tayinine yönelik çalışmalar

Diğer Etken Madde	**Yöntem**	**Mobil Faz**	**Durucu Faz**	**Dedektör**	**Kaynak**
Lipid nanopartiküller	HPLC	Asetonitril/trimetil fosfat tamponu	C_{18}	UV	[183]
Telperison	LC-MS-MS	Metanol/Amonyum fosfat	C_{18}	UV	[184]
Nimodipin	HPLC-MS-MS	Asetonitril/Amonyum asetat	C_{18}	MS	[185]
Naphazolin	LC-MS-MS	Amonyum format /asetonitril	Monolitik silikaspin	MS	[186]
Asedisülfon	LC-TLC	Metanol/tetrahidrofuran /asetik asid (45:5:0.5)	C_8	-	[187]
Diphenhidramin, Fenilefrin,Alletoin	Elektro-kinetik	-	-	-	[188]
Mepivakain, kokain, Tetrakain, Lidokain, Prokain	GC-MS	-	DB-1	MS	[189]
Paroksetin	HPLC	Asetonitril / fosfat	C_{18}	Floresans	[190]
Paroksetin	HPLC	Asetonitril/fosfat		Floresans	[191]
Krotomaton, Gliserhizinik asit, Klorheksidin	HPLC	Sodyum dodosil sülfat ve Propanol	C_8	-	[192]
-	LC	Asetonitril/fosfat	C_8	Floresans	[193]
-	GC	-	C_{18}	Yüzey iyonizasyon	[194]
-	HPLC	-	-	Floresans	[195]
-	GC	-	-	Azot fosfor	[196]

BÖLÜM 3

DENEYSEL BÖLÜM

3.1 Kullanılan Kimyasallar

Sinkokain , fluokortolon pivalat, fluokortolon kaproat (Bayer) asedik asit, amonyum asetat, potasyum dihidrojen fosfat, hidroklorik asit, potasyum klorür (Merck) metanol, asotonitril HPLC saflıktadır. Çalışmalar süresince ultra saf su kullanılmıştır.

3.2 Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

Fluokortolon Pivalat çözeltisi (200 µg/ml): 0,02g Fluokortolon Pivalat katısı tartılıp, bir miktar metanol ile çözüldü. 100 ml'lik balon jojede hacmine tamamlandı.

Fluokortolon Kaproat çözeltisi (200 µg/ml): 0,02g Fluokortolon Kaproat katısı tartılarak bir miktar metanol ile çözüldü. 100 ml'lik balon jojede hacmine tamamlandı.

Sinkokain çözeltisi (500 µg/mL): 0,05g Sinkokain katısı bir miktar metanolde çözülerek 100 mL'lik balon jojede hacmine tamamlandı.

HCI/KCI tamponu (pH 2) 0,025 M hidroklorikasit çözeltisi üzerine potasyum klorür çözeltisi eklenerek ilgili pH'a pH metre ile ayarlandı.

Asetat tamponu (pH 6): 0,025 M asetik asit üzerine amonyum asetat çözeltisi eklenerek ilgili pH'a pH metre ile ayarlandı.

Fosfat tamponu (pH 7): 0,025 M potasyum dihidrojen fosfat üzerine potasyum hidrojen fosfat çözeltisi eklenerek ilgili pH a pH metre ile ayarlandı.

3.3 Kullanılan Cihazlar

620 InoLab pH metre ve cam elektrodu, Chiltern magnetik karıştırıcı, Sartorius analitik terazi (0.1 mg'a kadar duyarlı), Anzak ultrasonik banyo, hamilton enjektör, 4.6mmx 150mmx5 μm intersil ODS-3V C_{18} kolon, LC-20 AT pompa, SPD-20A UV-VIS dedektör, 7725 (20 μL) enjeksiyon ve bilgisayar sisteminden oluşan Shimadzu HPLC.

3.4 HPLC ile Analiz

3.4.1 Kromatografik Şartların Belirlenmesi ve optimizasyon

3.4.1.1 Klasik Yöntem ile Şartların belirlenmesi

Sinkokain, fluokortolon pivalat, fluokortolon kaproat'ın HPLC yöntemi ile bir arada analizi için uygun şartların belirlenmesi amacı ile 10 mL' lik balonjoje içerisine 500 μg mL^{-1} Sinkokain ve 200 μg mL^{-1} fluokortolon pivalat ve fluokortolon kaproat çözeltilerinden 0,6'şar mL konulduktan sonra hacmine tamamlandı. Hazırlanan çözelti C_{18} kolon içeren kromatografa enjekte edildi. Kromatografi işlemi izokratik teknik uygulanarak çeşitli hareketli faz karışımlarında, farklı pH ve akış hızlarında tekrar edildi. Denenen koşullar Çizelge 3.1'de verilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen sonuçlar Bölüm 4.1.1' de verilmiştir.

Çizelge 3.1 Denenen Kromatografik Koşullar

Hareketli faz	**Oran**	**pH**	**Akış hızı** mL/dak		
Su-Methanol	10/90 15/85 20/80 25/75	- - - -	1,5 1,5 1,5 1,5	1,8 1,8 1,8 1,8	2 2 2 2
HCL/KCL - Asetonitril	15/85	2	1,5		2
Asetat tampon -Asetonitril	15/85	6	1,5		2
Fosfat tampon- Asetonitril	15/85	7	1,5		2
Asetonitril-Su	15/85	-	1,5		2
Asetat tampon -Methanol	15/85	6	1,5		2
Fosfat tampon- Methanol	15/85	7	1,5		2

3.4.1.2 Deneysel Tasarım İle Optimizasyon

Sinkokain, fluokortolon pivalat, fluokortolon kaproat'ın HPLC ile birarada analizi için optimum koşulların bulunması için faktörlerin ve birbirleri ile etkileşimlerinin ayırma gücüne etkisi incelendi. İncelemede 3 faktörlü Merkezi Kompozit Tasarım kullanıldı. Tasarım için seçilen faktörler ve seviyeleri Çizelge 3.2 de verilmiştir. Optimizasyon için öncelikle bu maddelerin 10 mL' lik balonjoje içerisine 500 μg mL^{-1} sinkokain ve 200 μg mL^{-1} fluokortolon pivalat ve fluokortolon kaproat çözeltilerinden 0,6'şar mL konulduktan sonra hacmine tamamlandı. Elde edilen sentetik karışımın hazırlanan tasarıma göre 240 nm de 20 kez kromotogramı alındı. Ve her bir kromotogramdaki, tüm ardaşık piklere ait ayırma gücü değerleri tek tek hesaplandı. Hesaplanan değerlere regresyon analizi yapıldı. Sonuçların güvenilirliğini test etmek için ANOVA yapıldı. Elde edilen veriler doğrultusunda model oluşturuldu. Oluşturulan model kullanılarak faktörlerin optimum değerleri hesaplandı. Sonuçlar Bölüm 4.1.2'de verilmiştir.

Çizelge 3. 1 Faktörler ve seviyeleri

Seviye	Hareketli Faz (%)	Akış Hızı (mL/dak)	Asit Miktarı (%)
	MF	V	A
-1.68179	71,6	1,3	0,30
-1	75,0	1,5	1,00
0	80,0	1,8	2,00
1	85,0	2,1	3,00
1.68179	88,4	2,6	3,68

*Metanol cinsindendir. Asit ilavesinden sonra su ile 100'e tamamlanarak hareketli faz hazırlanmıştır

3.4.2 Validasyon

3.4.2.1 Doğrusallık

Sinkokain, fluokortolon pivalat ve fluokortolon kaproat' ın bir arada analizi için geliştirilen yöntemin doğrusallığını incelemek amacı ile 10 mL' lik balonjoje içersine 500 μg mL^{-1} sinkokain, 200 μg mL^{-1} fluokortolon pivalat ve fluokortolon kaproat çözeltilerinden 0,2-1,0 mL alındıktan sonra hacmine tamamlandı. Hazırlanan çözeltilerin C_{18} kolonda 1,3 mL/dk akış hızında 71,6/26,4/2 metanol /su/asetik asit hareketli fazı ile izokratik teknik kullanılarak kromatogramı alındı. Kromatogramlar, spektrofotometrik dedektörle 240 nm, de izlendi ve pik alanları hesaplandı. Pik alanları ile konsantrasyon arasında ölçü eğrileri çizilerek regresyon analizi yapıldı. İşlemler 3 kez tekrarlandı. Sonuçlar Bölüm 4.2.1'de verilmiştir.

3.4.2.2 Gün İçi ve Günler Arası Tekrarlanabilirlik

Sinkokain, fluokortolon pivalat ve fluokortolon kaproat' ın bir arada analizi için geliştirilen yöntemin, gün içi ve günler arası tekrarlanabilirliği incelemek amacı ile doğrusal alan içinde olacak şekilde 3 ayrı konsantrasyon seçildi. Seçilen konsantrasyondaki çözeltileri hazırlamak amacı ile her biri 500 μg mL^{-1}' lik sinkokain, 200 μg mL^{-1}' lik fluokortolon pivalat ve fluokortolon kaproat çözeltilerinden 10 mL' lik balon jojeye I. seviye için 0,4 mL; II. seviye için 0,6 mL; III. seviye için 0,8 mL alınarak hacmine tamamlandı. Hazırlanan çözeltilerin, gün içi tekrarlanabilirlik için aynı gün

içerisinde 3 kez, günler arası tekrarlanabilirlik için 4 farklı günde bir kez C_{18} kolonda 1,3 mL/dk akış hızında 71,6/26,4/2 metanol /su/ asetik asit hareketli fazı kullanılarak 240 nm de kromatogramları alındı ve pik alanları belirlendi. İlgili ölçü eğrileri yardımı ile maddelerin konsantrasyonları bulundu. Geri kazanım yüzdeleri ve bağıl standart sapmaları hesaplandı. Sonuçlar Bölüm 4.2.2'de verilmiştir.

3.4.2.3 Doğruluk

Sinkokain, fluokortolon pivalat ve fluokortolon kaproat' ın bir arada analizi için geliştirilen yöntemin doğruluğunu incelemek amacı ile öncelikle sinkokain, fluokortolon pivalat ve fluokortolon kaproat içeren 0,7 gr pomat ve 1 adet supozituar ayrı ayrı metanol ile çözülerek 50 mL' lik balonjojelerde hacmine tamamlanarak örnek çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan örnek çözeltilerinden 5 ml alınarak üzerine 500 μg mL^{-1}'lik sinkokain ve 200 μg mL^{-1} fluokortolon pivalat ve fluokortolon kaproat çözeltilerinden I. seviye için 0,2 mL, II. seviye için 0,4 mL; III. seviye için 0,6 mL eklenip hacmine tamamlandı. Hazırlanan çözeltilerin kromatogramları, C_{18} kolonda 1,3 mL/dk akış hızında 71,6/26,4/2 metanol /su/ asetik asit hareketli fazı kullanılarak, 240 nm' de alınarak pik alanları belirlendi. İlgili ölçü eğrisi yardımı ile maddelerin konsantrasyonları bulundu. Yüzde geri kazanımları hesaplandı. Sonuçlar Bölüm 4.2.3'de verilmiştir.

3.4.2.4 Tanıma ve Tayin Sınırı (LOD, LOQ)

Sinkokain, fluokortolon pivalat ve fluokortolon kaproat' ın bir arada analizi için geliştirilen yöntemin tanıma ve tayin sınırının hesaplanması için boş deneme çözeltisinin, C_{18} kolonda 1,3 mL/dk akış hızında 71,6/26,4/2 metanol /su/ asetik asit hareketli fazı kullanılarak, 240 nm' de kromatogramı alındı. Boş deneme çözeltisinin, her bir maddeye ait pikin alıkonma zamanındaki pik alanı ölçüldü. Bu işlem 10 kez tekrar edildikten sonra standart sapma hesaplandı. Standart sapmasının tanınma sınırı için 3 katı, tayin sınırı için 10 katı pik alanı kabul edilerek bunlara karşılık gelen madde konsantrasyonları ilgili ölçü eğrileri yardımıyla bulundu. Sonuçlar Bölüm 4.2.4'de verilmiştir.

3.4.2.5 Çözelti Dayanıklılığı

Sinkokain, fluokortolon pivalat ve fluokortolon kaproat' ın çözücü içerisindeki dayanıklılığını saptamak amacı ile su ve hareketli faz içerisinde 10 μg mL^{-1}'lik çözeltileri

hazırlandı. Hazırlanan çözeltilerin oda sıcaklığında ve 4C°'de belli aralıklarla, C_{18} kolonda 1,3 mL/dk akış hızında 71,6/26,4/2 metanol /su/ asetik asit hareketli fazı kullanılarak, 240 nm' de kromatogramları alındı. Sonuçlar Bölüm 4.2.5'de verilmiştir.

3.4.3 Örnek Analizi

Sinkokain, fluokortolon pivalat ve fluokoortolon kaproat içeren 0,7 gr pomat ve 1 adet supozituar ayrı ayrı metanol ile çözülüp 50 mL' lik balonjojelerde hacmine tamamlanarak örnek çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan örnek çözeltilerinin C_{18} kolonda 1,3 mL/dak akış hızında 71,6/26,4/2 metanol /su/ asetik asit hareketli fazı kullanılarak 240 nm' de kromatogramı alındı ve pik alanları belirlendi. İlgili ölçü eğrisi yardımı ile maddelerin konsantrasyonları bulundu. İlaç etiketindeki değerleri ile karşılaştırılarak yüzde geri kazanımları hesaplandı. Sonuçlar Bölüm 4.3'de verilmiştir.

BÖLÜM 4

SONUÇ ve ÖNERİLER

4.1 Kromatografik Şartların Belirlenmesi ve optimizasyon

4.1.1 Klasik Yöntem İle Şartların Belirlenmesi

Sinkokain, fluokortolon pivalat ve fluokortolon kaproat'ın HPLC ile bir arada analizi için kromatografik şartların belirlenmesi amacı ile Bölüm 3.4.1.1'de anlatıldığı şekilde çalışıldı. Bu çalışmalar sonucunda C_{18} kolonda 1,3 mL/dk akış hızında 80/20 metanol/su hareketli fazının kromatografik ayırma için en uygun olduğu görüldü.

4.1.2 Deneysel Tasarım İle Optimizasyonu

4.1.2.1 Merkezi Kompozit Tasarımı

Sinkokain, fluokortolon pivalat ve fluokortolon kaproat'ın HPLC ile bir arada analizi için kromatografik ayrılmayı etkileyen faktör ve etkileşimleri belirlemek ve bunların optimum değerlerini saptamak amacı ile Bölüm 3.4.1.2 de anlatıldığı şekilde çalışıldı. 5 seviyeli 3 etkenli Merkezi Kompozit Tasarımı ile elde edilen deneysel ayırma gücü (rezolüsyon) değerleri Çizelge 4.1 de görülmektedir.

Çizelge 4.1 Merkezi Kompozit Tasarımı ile elde edilen ayırma gücü değerleri

Deney No	**Mobil Faz Oranı (%) (A)**	**Akış Hızı (mL/dak) (B)**	**Asit Miktarı (%) (C)**	**Mobil Faz Oranı (%) (A)**	**Akış Hızı (mL/dak) (B)**	**Asit Miktarı (%) (C)**	***Rezolüsyon (R_{12}x R_{23})**
1	-1	-1	-1	75	1,5	1	96,537
2	1	-1	-1	85	1,5	1	16,244
3	1	1	-1	85	2,1	1	10,236
4	-1	1	-1	75	2,1	1	66,394
5	-1	1	1	75	2,1	3	44,957
6	1	1	1	85	2,1	3	9,598
7	1	-1	1	85	1,5	3	14,362
8	-1	-1	1	75	1,5	3	78,441
9	0	0	-1,682	80	1,8	0,3	23,695
10	0	0	1,682	80	1,8	3,68	32,459
11	0	-1,682	0	80	1,3	2	43,453
12	0	1,682	0	80	2,6	2	21,667
13	-1,682	0	0	71,6	1,8	2	144,340
14	1,682	0	0	88,4	1,8	2	7,360
15	0	0	0	80	1,8	2	37,659
16	0	0	0	80	1,8	2	43,019
17	0	0	0	80	1,8	2	38,220
18	0	0	0	80	1,8	2	35,697
19	0	0	0	80	1,8	2	42,171
20	0	0	0	80	1,8	2	41,519

* Rezolüsyon; (R_{12}x R_{23}) ün çarpım değeridir.R_{12} sinkokain ve fluokortolon pivalat; R_{23} flokartalon pivalat ve fluokortolon kaproata ait pikler arasındaki ayırma gücü değerleridir.

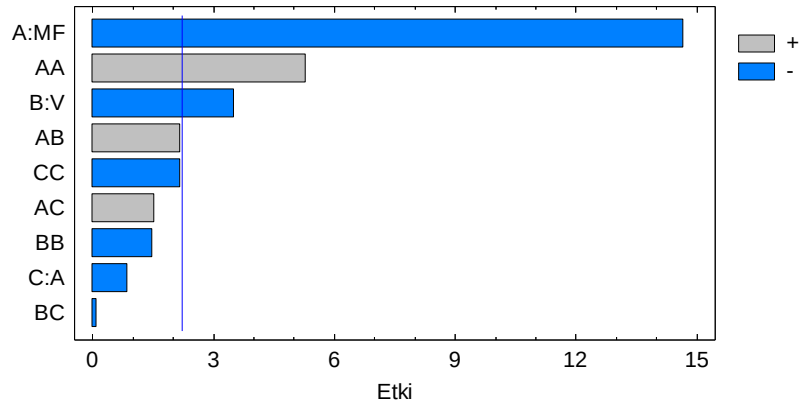
4.1.2.2 Veri Değerlendirme

Her bir faktörün tek ve birbirleri ile etkileşimine ait etki değerlerini hesaplamak amacı ile Merkezi Kompozit Tasarımı uygulanarak elde edilen ayırma gücü değerlerine regresyon analizi yapıldı. Sonuçlar Çizelge 4.2'de, bu sonuçlar doğrultusunda elde edilen Pareto grafiği Şekil 4.1'de verilmiştir. Regresyon analizi sonuçları ve Pareto grafiğinden, ayırma gücü üzerinde mobil fazın bileşiminin (MV; A), mobil fazın ve asit miktarının ikinci dereceden etkileşimlerinin (AA),(CC) ve akış hızının (V; B) etkili olduğu anlaşılmaktadır. P değerleri 0,05 in altında olan bu faktörler ayırma gücü üzerinde en büyük etkiye sahiplerken akış hızının (AB) etkileşimi de azımsanmayacak ölçüde etkili bir etkileşimdir.

Çizelge 4.2 Regresyon analizi sonuçları

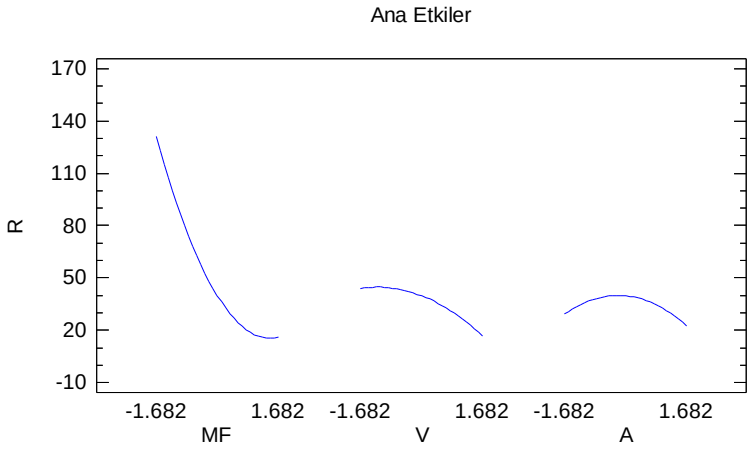
Faktörler	**Regresyon Katsayısı**	**p değeri**
Kesim noktası	37,12	0,0000
A	-34,14	**0,0000***
B	-8,13	**0,0058***
C	-2,00	0,4103
AA	12,31	**0,0004***
AB	6,61	0,0549
AC	4,63	0,1592
BB	-3,32	0,1735
BC	-0,26	0,9978
CC	-4,90	**0,0160***
Çoklu R	0,982	
R^2	0,965	
Ayarlı R^2	0,933	

*Etkili faktörler ve etkileşimler(p değeri<0. 05)

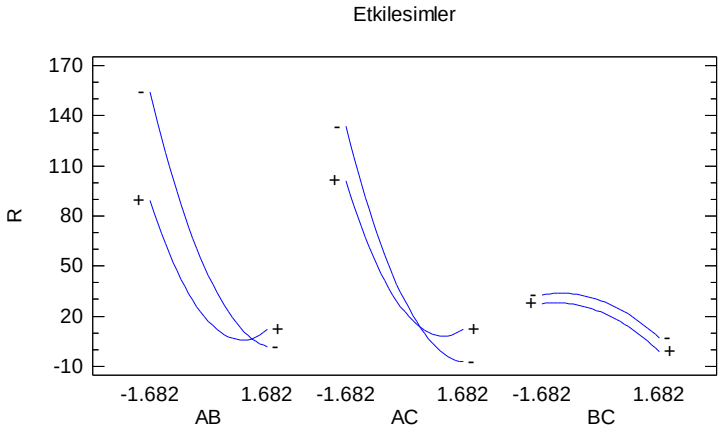


Şekil 4.1 Merkezi Kompozit Tasarımı ile elde edilen Pareto grafiği

Ana faktörlerin ayırma gücüne etkisi Şekil 4.2'de, faktör etkileşimlerinin ayırma gücüne etkisi Şekil 4.3'de daha ayrıntılı olarak verilmiştir. Şekil 4.2'den mobil faz oranı ve akış hızı ile ayırma gücü arasında ters bir ilişki olduğu, artan faktör değerlerine karşılık rezolüsyonun azaldığı, asit miktarının rezolüsyon değeri ile önce arttığı sonra tekrar azaldığı görülmektedir. Şekil 4.3'den mobil faz oranı ile akış hızı (AB) ve mobil faz oranı ile asit miktarı (AC) arasında az da olsa bir ekileşimin olduğu, akış hızı ile asit miktarı (BC) arasında ise paralel doğrulardan bir etkileşimin olmadığı anlaşılmaktadır.



Şekil 4.2 Faktörlerin ayırma gücüne etkileri



Şekil 4.3 Faktör etkileşimlerinin ayırma gücüne etkileri

Regresyon analizi sonuçlarının güvenilirliğini kontrol etmek amacı ile ANOVA yapıldı. ANOVA sonuçları Çizelge 4.3'de verilmiştir. ANOVA sonuçlarından $^{0,05}F_{1,9}$ = 5,12 tablo değerinden büyük A ve B faktörü ile A nın ikinci derceden etkileşiminin ayırma gücü üzerinde daha etkili olduğu anlaşılmaktadır. Varyans analizi sonucu p değeri 0,05'ten küçük AB ve C nin ikinci dereceden etkileşimlerinin ise kritik değere yakın olduğu ve etkisinin az olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.3 ANOVA sonuçları

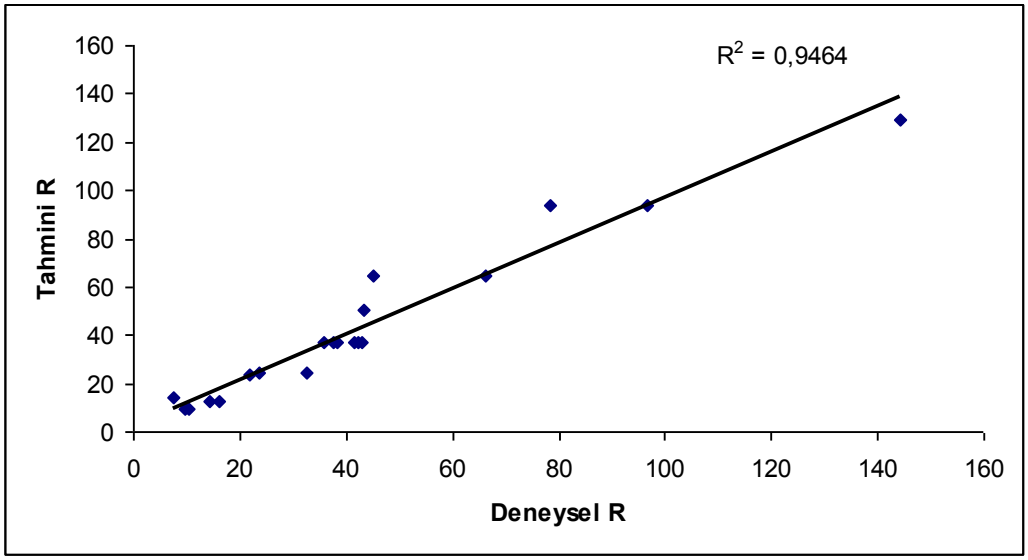
Değişim Kaynağı	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F
A	1	15918,80	15918,80	215,11
B	1	902,50	902,50	12,20
C	1	54,64	54,64	0,74
AA	1	2069,72	2069,72	27,97
AB	1	349,40	349,41	4,72
AC	1	171,22	171,22	2,31
BB	1	158,97	158,97	2,15
BC	1	0,55	0,55	0,01
CC	1	346,75	346,75	4,69
Hata	10	740,02	74,02	
Toplam	19	20977,70		

4.1.2.3 Modelleme

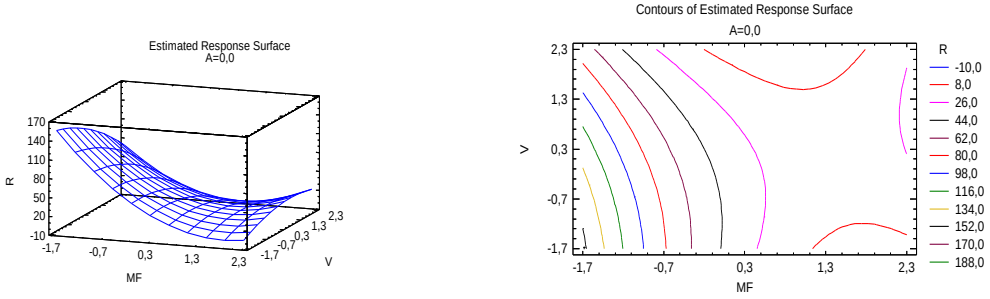
Regresyon analizi ve ANOVA sonuçlarına göre ana faktörler ve etkili etkileşimlerin katsayılarından oluşturulan model aşağıdadır.

R = 37,12 - 34,14*MF - 8,13*V + 12,31*MF^2 + 6,61*MF*V - 4,90*A^2

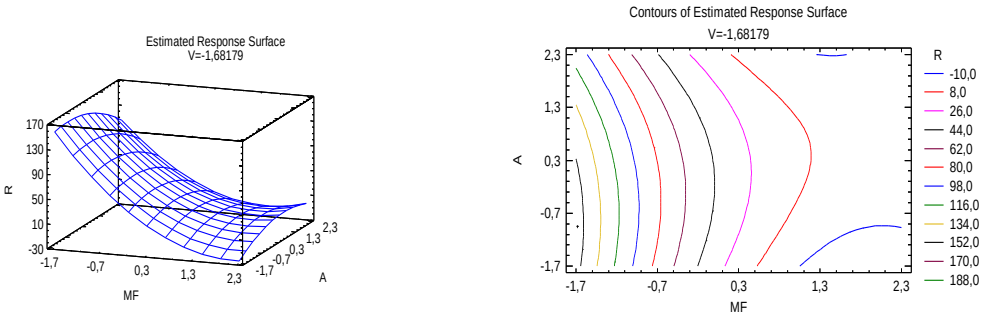
Oluşturulan model kullanılarak elde edilen tahmini ayırma gücü değeri ile deneysel olarak bulunan ayırma gücü değerleri arasındaki ilişkiyi incelemek amacıyla regresyon analizi yapıldığında R^2: 0,9464 olarak bulunmuştur.Regresyon analizi sonucunda elde edilen grafik Şekil 4.4 de verilmiştir. Elde edilen regresyon modelinden her bir değişken için çizilen yüzey cevapları Şekil 4.5 - 4.7'de verilmiştir. Şekillerden hareketli faz bileşiminin ve akış hızının düşük değerlerine karşılık gelen ayırma gücü değerlerinin daha yüksek olduğu anlaşılmaktadır.



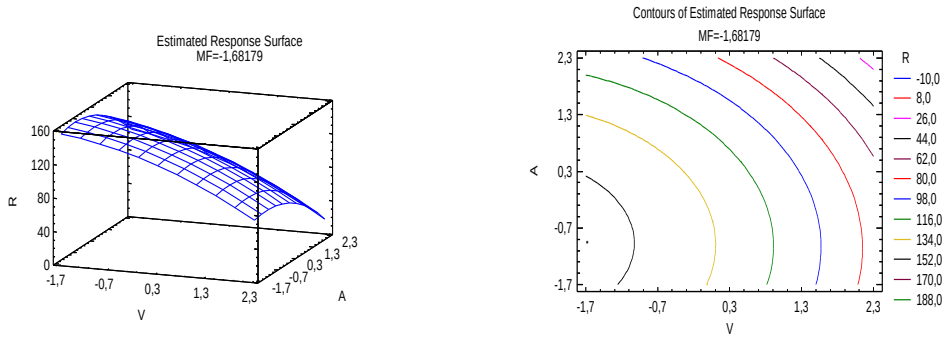
Şekil 4.4 Deneysel Ayırma Gücü Değerleri İle Teorik Ayırma Gücü Değerleri Grafiği



Şekil 4.5 Merkezi Kompozit Tasarımı ile elde edilen MF ve V faktörleri arasındaki tahmini cevap yüzeyleri ve kontur grafikleri (asit miktarı % 2 de sabit tutularak elde edilen değişim)



Şekil 4.6 Merkezi Kompozit Tasarımı ile elde edilen MF ve A faktörleri arasındaki tahmini cevap yüzeyleri ve kontur grafikleri (akış hızı 1,3 mL\ dak da sabit tutularak elde edilen değişim)



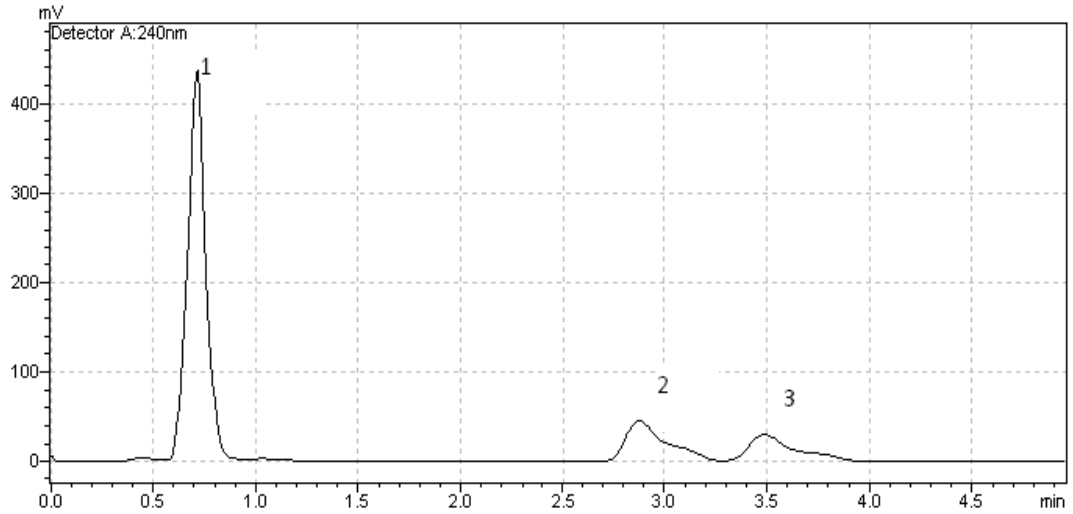
Şekil 4.7 Merkezi Kompozit Tasarımı ile elde edilen V ve A faktörleri arasındaki tahmini cevap yüzeyleri ve kontur grafikleri (mobil faz oranı %71,6 da sabit tutularak elde edilen değişim)

Oluşturulan model kullanılarak ayırma gücünün en yüksek olmasını sağlayan kodlu ve gerçek faktör seviyeleri hesaplandı. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.4'de verilmiştir. Bu şartlarda ayırma gücü değeri 161,728 olmaktadır.

Çizelge 4. 4 Faktörlerin optimum değerleri

Faktör	**Düşük**	**Yüksek**	**Optimum değer (kodlu)**	**Optimum değer (gerçek)**
Mobil Faz Oranı (%) (MF)	-1.68179	1.68179	-1.68179	71,6
Akış Hızı (mL/dak)(V)	-1.68179	1.68179	-1.68179	1,3
Asit Miktarı (%) (A)	-1.68179	1.68179	0,000636763	2,0

Bu sonuçlar doğrultusunda kromatografik şartlar akış hızı 1,3 mL/dak ve hareketli faz oranı 71,6/26,4/2 metanol /su/ asetik asit olarak belirlenmiştir. Bu koşullarda 240 nm'de spektrofotometrik dedektör ile elde edilen kromatogram Şekil 4.8'de verilmiştir. Alıkonma zamanları dakika cinsinden 0,75; 2,9; 3,5 olarak bulunmuştur.



Şekil 4.8 Sinkokain(1),fluokortolon pivalat(2) ve fluokortolon kaproat(3) kromatogramı

4.2 Validasyon

4.2.1 Doğrusallık

Sinkokain, fluokortolon pivalat ve fluokortolon kaproat' ın bir arada analizi için geliştirilen yöntemin doğrusallığını incelemek amacıyla Bölüm 3.4.2.1'de anlatıldığı şekilde çalışıldı. Çalışmalar sonucunda hesaplanan pik alanları ortalaması, standard sapma ve bağıl standard sapma değerleri sinkokain için Çizelge 4.5'da, fluokortolon pivalat için Çizelge 4.7'de, fluokortolon kaproat' için Çizelge 4.9'da verilmiştir. Çizelge 4.6'da Sinkokain, Çizelge 4.8'da fluokortolon pivalat, Çizelge 4.10'da fluokortolon kaproat için oluşturulan her bir ölçü eğrisinin regresyon analizine ait parametreler yer almaktadır. Regresyon analizlerinin ortalama değerleri kullanılarak elde edilen doğru denklemleri ve oluşturulan ölçü eğrileri sinkokain için Şekil 4.9'da, fluokortolon pivalat için Şekil 4.10'de, fluokortolon kaproat için Şekil 4.11'de verilmiştir.

4.2.2 Gün İçi ve Günler Arası Tekrarlanabilirlik

Sinkokain, fluokortolon pivalat ve fluokortolon kaproat'ın bir arada analizi için geliştirilen yöntemin, gün içi ve günler arası tekrarlanabilirliği incelemek amacı ile Bölüm 3.4.2.2'de anlatıldığı şekilde yapılan çalışmalar sonucu elde edilen değerler gün içi tekrarlanabilirlik için Çizelge 4.12' de, günler arası tekrarlanabilirlik için Çizelge 4.13' de verilmiştir.

4.2.3 Doğruluk

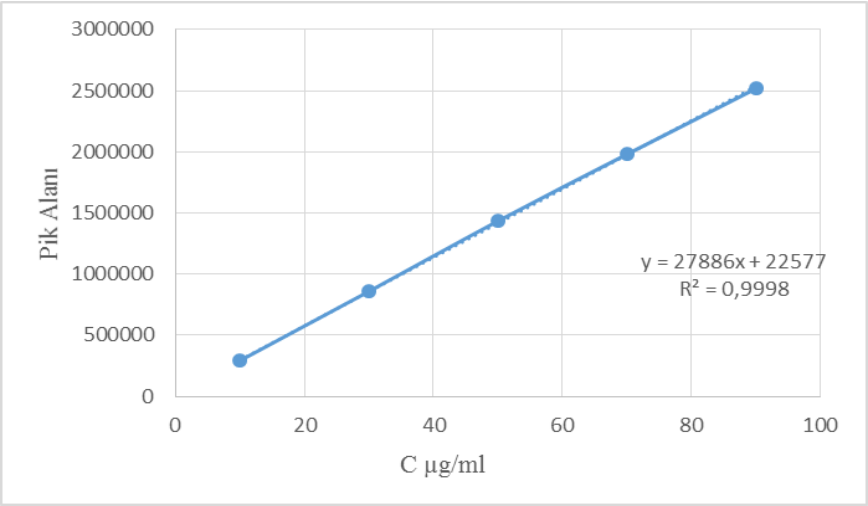
Sinkokain, fluokortolon pivalat ve fluokortolon kaproat'ın bir arada analizi için geliştirilen yöntemin doğruluğunu incelemek amacı ile Bölüm 3.4.2.3'de anlatıldığı şekilde yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen değerler Çizelge 4.14' de verilmiştir.

Çizelge 4. 5 Sinkokain'in ölçü eğrisine ait pik alanları değerleri

NO	C ($\mu g\ mL^{-1}$)	A1	A2	A3	ORT	STD	%RSD
1	10	294162	285514	294229	291301,7	5012,378	1,721
2	30	875227	848517	852422	858722	14426,490	1,680
3	50	1461214	1405195	1427943	1434784	28173,740	1,964
4	70	2012224	1997289	1942754	1980756	36567,750	1,847
5	90	2553426	2462320	2541038	2518928	49413,710	1,962

Çizelge 4. 6 Sinkokain'in regresyon analizine ait parametreler

	1	2	3	Ortalama
a	30998	25597	27065	27886,666
b	84969	1321	-18560	25576,666
R^2	0,999	0,999	0,999	0,999
Sa	482,647	78605,999	294,714	26461,120
Sb	27725,96	16105,89	16930,02	20253,960



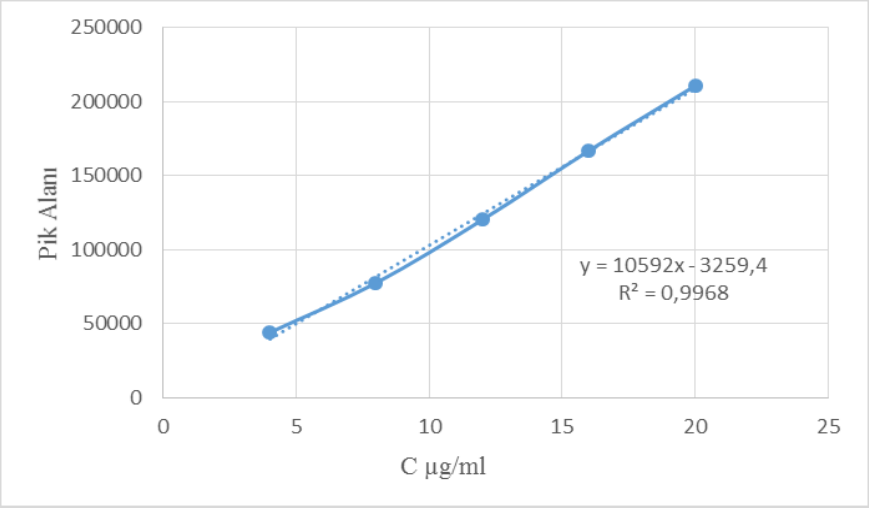
Şekil 4. 9 Sinkokain doğrusallık grafiği

Çizelge 4. 7 Fluokortolon pivalatın ölçü eğrisine ait pik alanları değerleri

NO	C ($\mu g\ mL^{-1}$)	A1	A2	A3	ORT	STD	%RSD
1	4	44603	43679	43180	43820,67	722,001	1,648
2	8	78707	75728	77747	77394	1520,548	1,965
3	12	120560	122288	117725	120191	2303,771	1,917
4	16	164914	170632	165225	166923,7	3215,273	1,927
5	20	211446	214188	207057	210897	3597,060	1,706

Çizelge 4.8 Fluokortolon pivalatın regresyon analizine ait parametreler

	1	2	3	Ortalama
a	9882	11848	10046	10592
b	6438	-15834	382,8	-3259,400
R^2	0,997	0,994	0,995	0,996
Sa	289,867	12904,672	383,379	4525,973
Sb	3845,53	171199,82	5086,10	60043,820



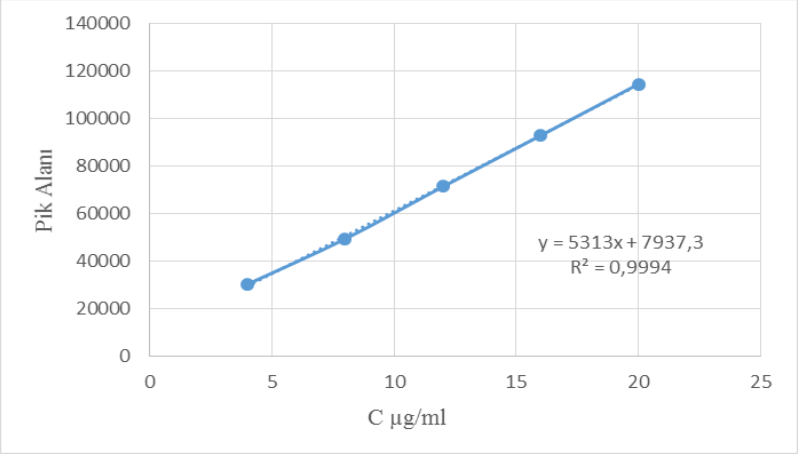
Şekil 4.10 Fluokortolon pivalat doğrusallık grafiği

Çizelge 4. 9 Fluokortolon kaproatın ölçü eğrisine ait pik alanları değerleri

NO	C ($\mu g\ mL^{-1}$)	A1	A2	A3	ORT	STD	%RSD
1	4	30042	30685	29483	30203,33	601,489	1,991
2	8	50118	49623	48198	49313	996,836	2,021
3	12	71697	72303	70073	71357,67	1153,076	1,616
4	16	93880	91076	93871	92942,33	1616,298	1,739
5	20	114485	117095	112364	114648	2369,708	2,067

Çizelge 4. 10 Fluokortolon kaproatın regresyon analizine ait parametreler

	1	2	3	Ortalama
a	6224	4621	5093	5312,667
b	7140	15866	806,1	7937,367
R^2	0,996	0,996	0,998	0,999
Sa	5097,598	150,176	4163,154	41616,689
Sb	67627,28	1992,31	55230,48	41616,689



Şekil 4.11 Fluokortolon kaproat doğrusallık grafiği

4.2.4 Tanıma ve Tayin Sınırı (LOD-LOQ)

Sinkokain, fluokortolon pivalat ve fluokortolon kaproat' ın bir arada analizi için geliştirilen yöntemin tanınma ve tayin sınırlarının belirlenmesi için bölüm 3.4.2.4'de anlatıldığı gibi yapılan çalışmalar sonucunda Çizelge 4.11' de ki değerler elde edilmiştir.

Çizelge 4.11 LOD-LOQ değerleri

	Sinkokain	Fluokortolon pivalat	Fluokortolon kaproat
LOD(µg mL^{-1})	0,128	0,142	0,203
LOQ(µg mL^{-1})	0,428	0,477	0,677

4.2.5 Çözelti Dayanıklılığı

Sinkokain, fluokortolon pivalat ve fluokortolon kaproat'ın çözücü içerisindeki dayanıklılığını incelemek için Bölüm 3.4.2.5'de anlatıldığı şekilde çalışıldığında Sinkokain, fluokortolon pivalat ve fluokortolon kaproat'ın tüm şartlarda en az 2 ay boyunca bozulmadığı görüldü.

Çizelge 4.12 Gün içi tekrarlanabilirlik

	Sinkokain			Fluokortolon pivalat			Fluokortolon kaproat		
	30	50	70	8	12	16	8	12	16
1	30,913	52,384	66,870	8,022	12,300	16,192	8,374	12,960	16,161
2	32,032	50,312	68,831	8,221	11,998	16,312	8,223	12,652	17,055
3	31,551	50,942	68,822	8,027	12,029	16,045	8,301	12,462	14,446
Xort	31,499	51,213	68,174	8,090	12,109	16,183	8,299	12,691	15,888
S	0,458	0,867	0,923	0,093	0,136	0,110	0,062	0,205	0,273
%RSD	1,454	2,074	1,658	1,404	1,115	0,824	0,745	1,980	1,718
%Geri Kazanım	104,995	102,426	97,392	101,125	100,910	101,143	103,737	105,762	98,306

Çizelge 4. 13 Günler arası tekrarlanabilirlik

	Sinkokain			Fluokortolon pivalat			Fluokortolon kaproat		
	30	50	70	8	12	16	8	12	16
1	30,513	50,984	66,871	7,922	12,500	15,891	8,374	12,760	16,161
2	31,498	50,913	68,174	7,909	12,109	15,582	8,342	12,691	15,888
3	32,056	49,049	68,822	8,026	11,865	15,468	7,956	12,063	15,434
4	30,626	48,873	67,881	7,707	11,743	15,094	8,224	12,441	16,210
Xort	31,173	49,955	67,937	7,891	12,054	15,634	8,224	12,514	15,923
S	0,637	0,996	0,704	0,112	0,289	0,285	0,165	0,273	0,308
%RSD	2,007	1,994	1,036	1,457	2,099	1,791	2,003	1,754	1,935
%Geri Kazanım	103,911	99,909	94,748	98,638	100,452	97,715	102,800	104,282	99,521

Çizelge 4.14 Doğruluk

	Örnekten gelen		**Konulan**	**Bulunan**		**% Geri Kazanım**	
	Pomat	**Supozituar**		**Pomat**	**Supozituar**	**Pomat**	**Supozituar**
Sinkokain ($\mu g\ mL^{-1}$)	35,00	10,00	10,00	44,74	19,54	97,43	95,40
			20,00	54,65	54,79	98,25	98,95
			30,00	66,20	65,09	104,00	100,30
Fluokortolon pivalat ($\mu g\ mL^{-1}$)	6,44	6,12	4,00	10,43	10,17	99,75	101,25
			8,00	14,80	14,27	104,50	101,87
			12,00	18,99	18,26	104,58	101,16
Fluokortolon kaproat ($\mu g\ mL^{-1}$)	6,65	6,30	4,00	10,86	10,50	105,25	105,00
			8,00	15,04	14,64	104,87	104,25
			12,00	19,12	18,76	103,92	103,83

4.3 Örnek Analizi

Sinkokain, fluokortolon pivalat ve fluokortolon kaproat içeren pomat ve supozituar örneklerinin analizi için bölüm 3.4.4 de anlatılığı şekilde yapılan çalışmalar sonucunda Çizelge 4.15 deki değerler elde edilmiştir. Elde edilen sonuaçların ilaç etiketindeki değerlerle karşılaştırılması da Çizelge 4.16 de verilmiştir.

Çizelge 4.15 Örnek Analiz Sonuçları

Örnek	Deneme sayısı	Fluokortolon Kaproat	Fluokortolon Pivalat	Sinkokain
POMAT µg mg^{-1}	1	0,948	0,912	5,056
	2	0,948	0,941	4,974
	3	0,911	0,896	4,854
	4	0,918	0,901	4,853
	5	0,913	0,896	4,824
	Ortalama	0,928	0,909	4,912
	Standard sapma	0,017	0,016	0,089
	% RSD	1,810	1,650	1,790
SUPOZİTUAR mg supozituar $^{-1}$	1	0,605	0,640	0,994
	2	0,624	0,651	1,011
	3	0,631	0,627	0,987
	4	0,601	0,625	0,988
	5	0,609	0,623	1,004
	Ortalama	0,614	0,633	0,997
	Standard sapma	0,011	0,011	0,009
	% RSD	1,630	1,690	0,930

Çizelge 4.16 Analiz sonuçlarının Etiket değerleri ile Karşılaştırması

	POMAT			**SUPOZİTUAR**		
	Etiket ($\mu g\ mg^{-1}$)	**Bulunan ($\mu g\ mg^{-1}$)**	**% Geri Kazanım**	**Etiket (μg fitil $^{-1}$)**	**Bulunan (μg fitil $^{-1}$)**	**%Geri Kazanım**
Sinkokain	5,000	4,912	98,250	1,000	0,997	99,700
Fluokortolon Pivalat	0,920	0,909	98,800	0,630	0,633	100,480
Fluokortolon Kaproat	0,950	0,928	97,680	0,610	0,614	100,650

4.4 Tartışma

Bu çalışmada, sinkokain, fluokortolon pivalat ve fluokortolon kaproat bir arada analizi için geliştirilen HPLC yönteminde, çalışılacak hareketli faz bileşenleri, pH ve akış hızı klasik yöntem ile yaklaşık olarak bulunduktan sonra deneysel tasarımdan yararlanılarak optimum koşullar belirlenmiştir. Maddeler spektrofotometrik dedektörle 240 nm'de saptanmıştır. Maddelerin bir arada analizi, izokratik teknik kullanılarak 5 dakikada gerçekleştirilmiştir.

Geliştirilen yöntemin doğrusallığının incelenmesinde, maddelerin örnekler içindeki miktarları göz önüne alınarak belirlenen konsantrasyon aralığında, pik alanı ile konsantrasyon arasındaki ilişkiden yararlanılmıştır. Hazırlanan 3 ayrı ölçü eğrisi sonuçlarının birbirleri ile tutarlı olduğu ve regresyon katsayılarının uygun olduğu görülmüştür.

Geliştirilen yöntemin tekrarlanabilirlik parametrelerinin incelenmesi için belirlenen konsantrasyon aralığı içinde olacak şekilde farklı konsantrasyonda sentetik karışımlar hazırlanmış ve analiz edilmiştir. Kabul edilebilirlik için üst limit olan % 2'nin altında RSD değerleri elde edilmiştir.

Geliştirilen yöntemin doğruluk parametresinin incelemesi için Örnek içersine farklı konsantrasyonlarda maddelerden eklenerek hazırlanan çözeltiler analiz edildiğinde analitik açıdan kabul edilebilir sınırlar içinde (95-105) geri kazanım değerleri elde edilmiştir.

KAYNAKLAR

[1] Demir C. (2009). II. Kemometri yaz okulu ders notları, İzmir İleri Teknoloji Enstitüsü, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, İzmir.

[2] Munoz M.A., Carmona C. ve Balon M., (2004). "The ground and singlet excited-state hydrogen-bonding interactions of N-methylindole with trifluoroethanol in n-hexane: a model to explain the anomalous fluorescence of indole in polar protic solvents", Chemical Physics Letters, 393(1): 217-221.

[3] Lemos V.A., Vieira D.R., Novaes C.G., Rocha M.E., Santos M.S. ve Yamaki R.T., (2006). "Preconcentration Systems Using Polyurethane Foam/Me-BDBD for Determination of Copper in Food Samples", Microchimica Acta, 153(3-4): 193-201.

[4] Wortel V., Hansen W.G. ve Wiedemann S., (2001). "Optimising multivariate calibration by robustness criteria", Journal of near IR, 9(2): 141-151.

[5] Wiberg K., Sterner A. ve Jacobsson S.P., (2004). "Simultaneous determination of albumin and immunoglobulin G with fluorescence spectroscopy and multivariate calibration", Talanta, 62(3): 567-574.

[6] Ensafi A.A, (2003). "Determination of ascorbic acid by electrocatalytic voltammetry with methylene mavisi" Analytical Letters, 36(3): 591-604.

[7] Gonzalez M.J., Renedo O.D, Lomillo M.A. ve Martinez M.J., (2004). Determination of gallium by adsorptive stripping voltammetry." 62(3): 457-462.

[8] Sereshti H., Khojeh V. ve Samadi S., (2011). "Optimization of dispersive liquid-liquid microextraction coupled with inductively coupled plasma-optical emission spectrometry with the aid of experimental design for simultaneous determination of heavy metals in natural waters", Talanta, 83(3):885-890.

[9] Malaxechevarria Y. ve Millan E., (2009). "Application of Experimental Design to the Optimization of a Wet Acid Digestion Procedure for Cd Determination in Plastic Materials by Atomic Absorption Spectrometry", Spectroscopy Letters, 42(1): 12-19.

[10] Benzo Z., Salas J., Araujo PW., Camardiel A. ve Carrion N., (1998). "Estimation of experimental parameters for the determination of ruthenium by flame atomic absorption spectroscopy" Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 40(1):109-117

[11] Lelievre C., Hennequin D., Barillier D. ve Lemasson F., (1996). "Development of an electrothermic method for rapid determination of trace metals in butter by atomic absorption spectroscopy. Application of the experimental design theory to the determination of copper", ANALUSIS, 24(2): 9-42.

[12] Ferreira A., Korn M.G.A. ve Ferreira S.L.C., (2004). "Multivariate optimization in preconcentration procedure for manganese determination in seawater samples by FAAS" Microchimica Acta, 146: 271-278.

[13] Segade S.R. ve Tyson J.F., (2007). "Determination of methylmercury and inorganic mercury in water samples by slurry sampling cold vapor atomic absorption spectrometry in a flow injection system after preconcentration on silica C-18 modified", Talanta, 71: 1696-1702.

[14] Ferreira S.L.C., Queiroz A.S., Fernandes M.S. ve Dos Santos H.C., (2002). "Application of factorial designs and Doehlert matrix in optimization of experimental variables associated with the preconcentration and determination of vanadium and copper in seawater by inductively coupled plasma optical emission spectrometry", Spectrochimica Acta Part B, 57: 1939-1950.

[15] Soylak M., Narin İ., Bezerra M.A. ve Ferreira S.L.C., (2005). "Factorial design in the optimization of preconcentration procedure for lead determination by FAAS", Talanta, 65: 895-899.

[16] Castro M.T.P.O. ve Baccan N., (2005). "Application of factorial design in optimization of preconcentration procedure for copper determination in soft drink by flame atomic absorption spectrometry", Talanta, 65: 1264-1269.

[17] Tarley C.R.T., Santos W.N.L., Santos C.M., Arruda M.A.Z. ve Ferreira S.L.C., (2004). "Analytical Letters, 'Factorial design and doehlert matrix in optimization of flow system for preconcentration of copper on polyurethane foam loaded with 4-(2-pyridylazo)-resorcinol", 37(7): 1437-1455.

[18] Cerutti S., Salonia J.A., Ferreira S.L.C., Olsina R.A ve Martinez L.D., (2004). "Factorial design for multivariate optimization of an on-line preconcentration system for platinum determination by ultrasonic nebulization coupled to inductively coupled plasma optical emission spectrometry", Talanta, 63: 1077-1082.

[19] Hashemi P., Bagheri S. ve Fathi M.R., (2005). "Factorial design for optimization of experimental variables in preconcentration of copper by a chromotropic acid loaded Q-Sepharose adsorbent", Talanta, 68: 72-78

[20] Santos W.N.L., Santos C.M.C. ve Ferreira S.L.C., (2003). "Application of three-variables Doehlert matrix for optimisation of an on-line pre-concentration system for zinc determination in natural water samples by flame atomic absorption spectrometry", Microchemical Journal, 75: 211-221.

[21] Ferreira S.L.C., Bezerra M.A., Dos Santos W.N.L. ve Neto B.B., (2003). "Application of Doehlert designs for optimisation of an on-line preconcentration system for copper determination by flame atomic absorption spectrometry", Talanta, 61: 295-303.

[22] Dutra R.L., Maltez H.F. ve Carasek E., (2006). "Development of an on-line preconcentration system for zinc determination in biological samples", Talanta, 69: 488-493.

[23] Vanloot P., Boudenne J.L., Brach-Papa C., Sergent M. ve Coulomb B., (2007). "An experimental design to optimize the flow extraction parameters for the selective removal of Fe(III) and Al(III) in aqueous samples using salicylic acid grafted on Amberlite XAD-4 and final determination by GF-AAS", Journal of Hazardous Materials, 147(1-2): 463-470.

[24] Cespon-Romero M. ve Yebra M.C., (2008). "Determination of trace metals in urine with an on-line ultrasound-assisted digestion system combined with a flow-injection preconcentration manifold coupled to flame atomic absorption spectrometry", Analytica Chimica Acta, 609: 184-191.

[25] Vanloot P., Boudenne L.J., Vassalo L., Sergent M. ve Coulomb B., (2007). "Experimental design approach for the solid-phase extraction of residual aluminium coagulants in treated waters", Talanta, 73: 237-245.

[26] Santos W.N.L., Costa J.L.O., Araujo R.G.O. ve Costa A.C.S., (2006). "An on-line pre-concentration system for determination of cadmium in drinking water using FAAS", Journal of Hazardous Materials, 137(3): 1357-1361.

[27] Zougagh M., De Torres A.G., Alonso E.V., Pavon J.M.C., (2004). "Automatic on line preconcentration and determination of lead in water by ICP-AES using a TS-microcolumn", Talanta, 62: 503-510.

[28] Pardo O., Yusa V., Coscolla C., Leon N. ve Pastor A., (2007). "Determination of acrylamide in coffee and chocolate by pressurised fluid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry", Food Additives & Contaminants, 24: 663-672.

[29] Molina M.A., Zhao W., Sankaran S., Schivo M., Kenyon N.J. ve Davis C.E., (2008). "Design-of-experiment optimization of exhaled breath condensate analysis using a miniature differential mobility spectrometer (DMS)", Analytica Chimica Acta, 628 (2): 155-161.

[30] Yusa V., Quintas G., Pardo O., Pastor A. ve de la Guardia M., (2006). "Determination of PAHs in airborne particles by accelerated solvent extraction and large-volume injection-gas chromatography-mass spectrometry", Talanta, 69(4): 807-815.

[31] Legrand S., Dugay J. ve Vial J., (2003). "Use of solid-phase microextraction coupled with gas chromatography for the determination of residual solvents in pharmaceutical products", Journal of Chromatography A, 999(1-2): 195-201.

[32] Vallejo A., Fernandez L.A., Olivares M., Prieto A., Etxebarria N., Usobiaga A. ve Zuloaga O., (2010) . "Optimization of large volume injection-programmable temperature vaporization-gas chromatography-mass spectrometry analysis for the determination of estrogenic compounds in environmental samples", Journal of Chromatography A, 1217(52): 8327-8333.

[33] Bianchi F., Careri M., Mangia A. ve Mattarozzi M. ve Musci M., (2008). "Experimental design for the optimization of the extraction conditions of polycyclic aromatic hydrocarbons in milk with a novel diethoxydiphenylsilane solid-phase microextraction fiber", Journal of Chromatography A, 1196–1197: 41-45.

[34] Costa S., Barroso M., Castanera A. ve Dias M., (2010). "Design of experiments, a powerful tool for method development in forensic toxicology: application to the optimization of urinary morphine 3-glucuronide acid hydrolysis", Analitical and Bioanalitical Chemistry, 396(7): 2533-3542.

[35] Vincelet C., Roussel J.M. ve Benanou D., (2010). "Experimental designs dedicated to the evaluation of a membrane extraction method: membrane-assisted solvent extraction for compounds having different polarities by means of gas chromatography-mass detection" Analitical and Bioanalitical Chemistry, 396(6):2285-2292.

[36] Basaglia G., Pasti L. ve Pietrogrande M.C., (2011). "Multi-residual GC-MS determination of personal care products in waters using solid-phase microextraction" Analitical and Bioanalitical Chemistry, 399: 2257-2265.

[37] Passeport E., Guenne A., Culhaoglu T., Moreau S., Bouye J.M. ve Tournebize J., (2010). 'Design of experiments and detailed uncertainty analysis to develop and validate a solid-phase microextraction/gas chromatography-mass spectrometry method for the simultaneous analysis of 16 pesticides in water ", Journal of Chromatography A, 1217(33): 5317-5327.

[38] Prieto A., Zuloaga O., Usobiaga A., Etxebarria N. ve Fernandez L.A., (2007). "Development of a stir bar sorptive extraction and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry method for the simultaneous determination of several persistent organic pollutants in water samples", Journal of Chromatography A, 1174(1-2): 40-49.

[39] Jiye A., Trygg J., Gullberg J., Johansson A.I., Jonsson P., Antti H., Marklund S.L. ve Moritz T., (2005). "Extraction and GC/MS Analysis of the Human Blood Plasma Metabolome", Analtical Chemistry, 77(24): 8086-8094.

[40] Ramirez N., Marce R.M. ve Borrull F., (2011). "Determination of parabens in house dust by pressurised hot water extraction followed by stir bar sorptive extraction and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry", Journal of Chromatography A, 1218(37): 6226-6231.

[41] Yusa V., Pardo O., Pastor A. ve De La Guardia M., (2006). "Optimization of a microwave-assisted extraction large-volume injection and gas chromatography-ion trap mass spectrometry procedure for the determination of polybrominated diphenyl ethers, polybrominated biphenyls and polychlorinated naphthalenes in sediments", Analytica Chimica Acta, 557(1-2): 304-313.

[42] Nguyen A.T., Aerts T., Van Dam D. ve De Deyn P.P., (2010). "Biogenic amines and their metabolites in mouse brain tissue Development, optimization and validation of an analytical HPLC method", Journal of Chromatography B, 878(29): 3003-3014.

[43] Debrus B., Lebrun P., Ceccato A., Caliaro G., Rozet E., Nistor I., Oprean R., Ruperez F.J., Barbas C., Boulanger B. ve Hubert P., (2011). "Application of new methodologies based on design of experiments, independent component analysis and design space for robust optimization in liquid chromatography", Analytica Chimica Acta, 691(1-2): 33-42.

[44] De Backer B., Debrus B., Lebrun P., Theunis L., Dubois N., Decock L., Verstraete A., Hubert P. ve Charlier C., (2009). "Innovative development and validation of an HPLC/DAD method for the qualitative and quantitative determination of major cannabinoids in cannabis plant material", Journal of Chromatography B, 877 (32): 4115-4124.

[45] Krier F., Brion M., Debrus B., Lebrun P., Driesen A., Ziemons E., Evrard B. ve Hubert P., (2011). "Optimisation and validation of a fast HPLC method for the quantification of sulindac and its related impurities", Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 54(4): 694-700.

[46] Belfast M., Lu R., Capen R., Zhong J., Nguyen M.A., Gimenez J., Sitrin R. ve Mancinelli R., (2006). "A practical approach to optimization and validation of a HPLC assay for analysis of polyribosyl-ribitol phosphate in complex combination vaccines", Journal of Chromatography B, 832(2): 208-215.

[47] Nistor I., Cao M., Debrus B., Lebrun P., Lecomte F., Rozet E., Angenot L., Frederich M., Oprean R. ve Hubert P., (2011). "Application of a new optimization strategy for the separation of tertiary alkaloids extracted from Strychnos usambarensis leaves", Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 56(1): 30-37.

[48] Bianchini R.M., Castellano P.M. ve Kaufman T.S., (2009). "Development and validation of an HPLC method for the determination of process-related impurities in pridinol mesylate, employing experimental designs", Analytica Chimica Acta, 654(2): 141-147.

[49] Destandau E., Vial J., Jardy A., Hennion M.C., Bonnet D. ve Lancelin P., (2006). "Robustness study of a reversed-phase liquid chromatographic method for the analysis of carboxylic acids in industrial reaction mixtures", Analytica Chimica Acta, 572(1): 102-112.

[50] Nemutlu E., Kir S., Katlan D. ve Beksac M.S., (2009). "Simultaneous multiresponse optimization of an HPLC method to separate seven cephalosporins in plasma and amniotic fluid: Application to validation and quantification of cefepime, cefixime and cefoperazone", Talanta, 80(1): 117-126.

[51] Vucicevic K., Popovic G., Nikolic K., Vovk I. ve Agbaba D., (2009). "An Experimental Design Approach to Selecting the Optimum HPLC Conditions for the Determination of 2-Arylimidazoline Derivatives' Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies, 32(5): 656-667.

[52] Quiming N.S., Denola N.L., Saito Y., Catabay A.P. ve Jinno K., (2008). "Chromatographic behavior of uric acid and methyl uric acids on a diol column in HILIC", Chromatographia, 67(7-8): 507-515.

[53] RashanJr J. ve Chen R., (2007). "Developing a versatile gradient elution LC/ELSD method for analyzing cellulose derivatives in pharmaceutical formulations", Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 44(1): 23-28.

[54] Maragou N.C., Rosenberg E., Thomaidis N.S. ve Kouppa M.A., (2008). "Direct determination of the estrogenic compounds 8-prenylnaringenin, zearalenone, alpha- and beta-zearalenol in beer by liquid chromatography-mass spectrometry", Journal of Chromatography A, 1202(1): 47-57.

[55] Cole D.C., Pagano N., Kelly M.F. ve Ellingboe J., (2004). "Use of design of experiments to optimize high-throughput semipreparative LC and LC/MS methods", Journal of Combinatorial Chemistry, 6(1): 78-82.

[56] Beser M.I., Pardo O., Beltran J. ve Yusa V., (2011). "Determination of per- and polyfluorinated substances in airborne particulate matter by microwave-assisted extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry", Journal of Chromatography A, 1218(30): 4847-4855.

[57] Moberg M., Bergquist J. ve Bylund D., (2006). "A generic stepwise optimization strategy for liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry methods" Journal of Mass Spectrometry, 41(10): 1334-1345.

[58] Switzar L., Giera M., Lingeman H., Irth H., ve Niessen W.M.A., (2011). "Protein digestion optimization for characterization of drug-protein adducts using response surface modeling" Journal of Chromatography A, 1218(13):1715-1723.

[59] Coscolla C., Yusa V., Beser M.I. ve Pastor A., (2009). "Multi-residue analysis of 30 currently used pesticides in fine airborne particulate matter (PM 2.5) by microwave-assisted extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry" Journal of Chromatography A, 1216 (51): 8817-8827.

[60] He J. ve Shamsi S.A., (2009). "Multivariate approach for the enantioselective analysis in micellar electrokinetic chromatography-mass spectrometry I. Simultaneous optimization of binaphthyl derivatives in negative ion mode", Journal of Chromatography A, 1216(5): 845-856.

[61] Hadjmohammadi M.R. ve Nazari S.S.S.J., (2010). "Separation optimization of quercetin, hesperetin and chrysin in honey by micellar liquid chromatography and experimental design" Journal of Separation Science, 33(20): 3144-3151.

[62] Davies M.P., De Biasi V. ve Perrett D., (2004). "Approaches to the rational design of molecularly imprinted polymers", Analytica Chimica Acta, 504(1): 7-14.

[63] Duarte R.M.B.O. ve Duarte A.C., (2011). "Optimizing size-exclusion chromatographic conditions using a composite objective function and chemometric tools: Application to natural organic matter profiling", Analytica Chimica Acta, 688(1): 90-98.

[64] Duarte R.M.B.O. ve Duarte A.C., (2010). "A new chromatographic response function for use in size-exclusion chromatography optimization strategies Application to complex organic mixtures", Journal of Chromatography A, 1217(48): 7556-7563.

[65] Lundgren J., Salomonsson J., Gyllenhaal O., Johansson E., (2007). "Supercritical fluid chromatography of metoprolol and analogues on aminopropyl and ethylpyridine silica without any additives", Journal of Chromatography A, 1154 (1-2): 360-367.

[66] Deshpande G.R., Roy A.K., Rao N.S., Rao B.M. ve Reddy J. R., (2011). "Rapid Screening of Volatile Ion-Pair Reagents Using UHPLC and Robust Analytical Method Development Using DoE for an Acetyl Cholinesterase Inhibitor: Galantamine HBr", Chromatographia 73: 639-648.

[67] Martendal E., Budziak D. ve Carasek E., (2007). "Preparation and application of NiTi alloy coated with ZrO2 as a new fiber for solid-phase microextraction", Journal of Chromatography A, 1164(1-2): 18-24.

[68] Vinci R.M., Canfyn M., De Meulenaer B., De Schaetzen T., Van Overmeire I., De Beer J. ve Van Loco J., (2010). 'Determination of benzene in different food matrices by distillation and isotope dilution HS-GC/MS", Analytica Chimica Acta, 672(1-2): 124-129.

[69] Hadef Y., Kaloustian J., Portugal H. ve Nicolay A., (2008). "Multivariate optimization of a derivatisation procedure for the simultaneous determination of nine anabolic steroids by gas chromatography coupled with mass spectrometry", Journal of Chromatography A, 1190(1-2): 278-285.

[70] Arroyo D., Ortiz M.C. ve Sarabia L.A., (2011). "Optimization of the derivatization reaction and the solid-phase microextraction conditions using a D-optimal design and three-way calibration in the determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in bovine milk by gas chromatography-mass spectrometry", Journal of Chromatography A, 1218(28): 4487-4497.

[71] Pan L., Qiu Y., Chen T., Lin J., Chi Y., Su M., Zhao A. ve Jia W., (2010). "An optimized procedure for metabonomic analysis of rat liver tissue using gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry", Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 52(4): 589-596.

[72] Cotton M.L. ve Down G.R.B., (1983). "Reversed-phase high-performance liquid-chromatography of sulindac and related-compounds using a computer-simulation" , Journal of Chromatography A, 259: 17-36.

[73] Dabre R., Schwammle A., Lammerhofer M. ve Lindner W., (2009). "Statistical optimization of the silylation reaction of a mercaptosilane with silanol groups on the surface of silica gel", Journal of Chromatography A, 1216(16): 3473-3479.

[74] Le Mapihan K., Vial J. ve Jardy A., (2004). "Reversed-phase liquid chromatography column testing: robustness study of the test", Journal of Chromatography A, 1061(2): 149-158.

[75] Torres-Lapasio J.R., Pous-Torres S., Baeza-Baeza J.J. ve Garcia-Alvarez-Coque M.C., (2011). "Optimal experimental designs in RPLC at variable solvent content and pH based on prediction error surfaces", Analytical Bioanalytical Chemistry, 400(5): 1217-1230.

[76] Borges C.N., Bruns R.E., Almeida A.A. ve Scarminio I.S., (2007). "Mixture-mixture design for the fingerprint optimization of chromatographic mobile phases and extraction solutions for Camellia sinensis", Analytica Chimica Acta, 595(1-2): 28-37.

[77] Guo Y., Srinivasan S. ve Gaiki S., (2007). "Investigating the effect of chromatographic conditions on retention of organic acids in hydrophilic interaction chromatography using a design of experiment", Chromatographia 66(3-4): 223-229.

[78] Hatambeygi N., Abedi G. ve Talebi M., (2011). "Method development and validation for optimised separation of salicylic, acetyl salicylic and ascorbic acid in pharmaceutical formulations by hydrophilic interaction chromatography and response surface methodology', Journal of Chromatography A, 1218(35): 5995-6003.

[79] Seto C., Bateman K.P. ve Gunter B., (2002). "Development of generic liquid chromatography-mass spectrometry methods using experimental design", Journal of American Society for Mass Spectrometry, 13(1): 2-9.

[80] Cao J., Covarrubias V.M., Straubinger R.M., Wang H., Duan X., Yu H., Qu J. ve Blanco J.G., (2010). "A Rapid, Reproducible, On-the-Fly Orthogonal Array Optimization Method for Targeted Protein Quantification by LC/MS and Its Application for Accurate and Sensitive Quantification of Carbonyl Reductases in Human Liver", Analytical Chemistry, 82(7): 2680-2689.

[81] Wang S.S.C., Liao H.J., Lee W.C., Huang C.M. ve Tsai T.H., (2008). "Using orthogonal array to obtain gradient liquid chromatography conditions of enhanced peak intensity to determine geniposide and genipin with electrospray tandem mass spectrometry", Journal of Chromatography A, 1212(1-2) 68-75.

[82] Urban J., Svec F. ve Frechet J.M.J., (2010). "Hypercrosslinking: New approach to porous polymer monolithic capillary columns with large surface area for the highly efficient separation of small molecules", Journal of Chromatography A,1217(52): 8212-8221.

[83] Toueille M., Uzel A., Depoisier J.F. ve Gantier R., (2011). "Designing new monoclonal antibody purification processes using mixed-mode chromatography sorbents' Journal of Chromatography B, 879(13-14): 836-843.

[84] Gruendling T., Guilhaus M. ve Barner-Kowollik C., (2009). „Design of Experiment (DoE) as a Tool for the Optimization of Source Conditions in SEC-ESI-MS of Functional Synthetic Polymers Synthesized via ATRP", Macromolecular Rapid Communications, 30(8): 589-597.

[85] Ragonese R, Macka M., Hughes J. ve Petocz P., (2002). "The use of the Box-Behnken experimental design in the optimisation and robustness testing of a capillary electrophoresis method for the analysis of ethambutol hydrochloride in a pharmaceutical formulation", Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 27(6): 995-1007

[86] Liu H., Wen Y., Luan F. ve Gao Y., (2009). "Application of experimental design and radial basis function neural network to the separation and determination of active components in traditional Chinese medicines by capillary electrophoresis", Analytica Chimica Acta, 638(1) 88-93.

[87] Ben Hameda A., Elosta S. ve Havel J., (2005). "Optimization of the capillary zone electrophoresis method for Huperzine A determination using experimental design and artificial neural Networks", Journal of Chromatography A, 1084(1–2): 7-12.

[88] Liu M., Zheng Y., Ji Y. ve Zhang C., (2011). "Development and validation of a capillary electrophoresis method for the enantiomeric purity determination of RS86017 using experimental design", Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 55(1): 93-100.

[89] Loukas Y. L., Sabbah S. ve Scriba G. K.E., (2001). "Method development and validation for the chiral separation of peptides in the presence of cyclodextrins using capillary electrophoresis and experimental design", Journal of Chromatography A, 931(1–2): 141-152.

[90] Vargas M.G., Heyden Y.V., Maftouh M. ve Massart D.L., (1999). "Rapid development of the enantiomeric separation of beta-blockers by capillary electrophoresis using an experimental design approach", Journal of Chromatography A, 855(2):681-693.

[91] Lin Y.H., Yang Y.H. ve Wu S.M., (2007). "Experimental design and capillary electrophoresis for simultaneous analysis of arbutin, kojic acid and hydroquinone in cosmetics", Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 44(1): 279-282.

[92] Capella-Peiró M.E., Bose D., Rubert M. F. ve Esteve-Romero J., (2006). "Optimization of a capillary zone electrophoresis method by using a central composite factorial design for the determination of codeine and paracetamol in pharmaceuticals", Journal of Chromatography B, 839(1–2): 95-101.

[93] Ortega N., Albillos S.M. ve Busto M.D., (2003). "Application of factorial design and response surface methodology to the analysis of bovine caseins by capillary zone electrophoresis", Food Control, 14(5): 307-315.

[94] Žunić G. ve Spasić S., (2008). "Capillary electrophoresis method optimized with a factorial design for the determination of glutathione and amino acid status using human capillary blood", Journal of Chromatography B, 873(1): 70-76.

[95] Ficarra R., Cutroneo P., Aturki Z., Tommasini S., Calabrò M.L., Phan-Tan-Luu R., Fanali S. ve Ficarra P., (2002). "An experimental design methodology applied to the enantioseparation of a non-steroidal anti-inflammatory drug candidate", Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 29(6): 989-997.

[96] Anurukvorakun O., Suntornsuk W. ve Suntornsuk L., (2006). "Factorial design applied to a non-aqueous capillary electrophoresis method for the separation of beta-agonists", Journal of Chromatography A, 1134 (1–2): 326-332.

[97] Brunnkvist H., Karlberg B., Astervik Å. ve Granelli I., (2004). "Experimental design-based development of a rapid capillary electrophoresis method for determining impurities in the tetrapeptide H-Tyr-(D)Arg-Phe-Phe-NH_2", Journal of Chromatography B, 80(2): 293-300

[98] González J. A., Galindo-Riaño M. D. ve García-Vargas M., (2003). "Factorial designs applied to the development of a capillary electrophoresis method for the analysis of zinc, sodium, calcium and magnesium in water samples", Talanta, 59(4): 775-783

[99] Boonkerd S., Detaevernier M.R., Vander Heyden Y., Vindevogel J. ve Michotte Y., (1996). "Determination of the enantiomeric purity of dexfenfluramine by capillary electrophoresis: Use of a Plackett-Burman design for the optimization of the separation", Journal of Chromatography A, 736(1–2): 281-289.

[100] Papadopoulos V. D., Beligiannis G. N. ve Hela D. G., (2011). "Combining experimental design and artificial neural networks for the determination of chlorinated compounds in fish using matrix solid-phase dispersion", Applied Soft Computing, 11(8): 5155-5164.

[101] Zhu D., Li X., Sun J. ve You T., (2012). "Chemometrics optimization of six antihistamines separations by capillary electrophoresis with electrochemiluminescence detection", Talanta, 88: 265-271.

[102] Armenta J. M., Gu B., Humble P. H., Thulin C. D. ve Lee M. L., (2005). "Design and evaluation of a coupled monolithic preconcentrator-capillary zone electrophoresis system for the extraction of immunoglobulin G from human serum", Journal of Chromatography A, 1097(1–2): 171-178.

[103] Bempong D. K. ve Honigberg I. L., (1996). "Multivariate analysis of capillary electrophoresis separation conditions for Z-E isomers of clomiphene", Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 15(2): 233-239.

[104] Persson-Stubberud K. ve Åström O., (1998). "Separation of ibuprofen, codeine phosphate, their degradation products and impurities by capillary electrophoresis - I. Method development and optimization with fractional factorial design", Journal of Chromatography A, 798 (1–2): 307-314.

[105] Furlanetto S., Orlandini S., La Porta E., Coran S. ve Pinzauti S., (2002). "Optimization and validation of a CZE method for rufloxacin hydrochloride determination in coated tablets", Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 28(6): 1161-1171.

[106] Persson K. ve Åström O., (1997). "Fractional factorial design optimization of the separation of pilocarpine and its degradation products by capillary electrophoresis", Journal of Chromatography B: 697(1–2): 207-215

[107] Mamani M.C.V., Farfán J. A. , Reyes F.G. R. ve Rath S.,(2006). "Simultaneous determination of tetracyclines in pharmaceuticals by CZE using experimental design", Talanta, 70 (2): 236-243.

[108] Maia P.P., Amaya-Farfán J., Rath S. ve Reyes F.G.R., (2007). "Simultaneous determination of streptomycin and oxytetracycline in agricultural antimicrobials by CZE after an experimental design", Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 43 (2): 450-456

[109] Hillaert S., Vander Heyden Y. ve Van den Bossche W., (2002). "Optimisation by experimental design of a capillary electrophoretic method for the separation of several inhibitors of angiotensin-converting enzyme using alkylsulphonates", Journal of Chromatography A, 978(1–2): 231-242.

[110] Fabre H. ve Mesplet N., (2000). "Robustness testing for a capillary electrophoresis method using the "short-end injection" technique", Journal of Chromatography A, 897(1–2): 329-338

[111] Ehlen J.C., Albers H.E. ve Breyer E.D., (2005). "MEKC-LIF of gamma-amino butyric acid in microdialysate: Systematic optimization of the separation conditions by factorial analysis", Journal of Neuroscience Methods, 147 (1): 36-47.

[112] Ronda F., Rodríguez-Nogales J.M., Sancho D. ve Gómez B.O.M., (2008). "Multivariate optimisation of a capillary electrophoretic method for the separation of glutenins. Application to quantitative analysis of the endosperm storage proteins in wheat", Talanta, 108 (1): 287-296.

[113] Orlandini S., Giannini I., Pinzauti S. ve Furlanetto S., (2008). "Multivariate optimisation and validation of a capillary electrophoresis method for the analysis of resveratrol in a nutraceutical", Talanta, 74(4): 570-577.

[114] Paugam L., Ménard R., Larue J.P. ve Thouvenot D. (1999). "Optimization of glucosinolate separation by micellar electrokinetic capillary chromatography using a Doehlert's experimental design", Journal of Chromatography A, 864(1): 155-162.

[115] Nevado J.J.B., Cabanillas C.G., Llerena M.J.V. ve Robledo V.R., (2005). "Enantiomeric determination, validation and robustness studies of racemic citalopram in pharmaceutical formulations by capillary electrophoresis", Journal of Chromatography A, 1072(2): 249-257.

[116] De Oliveira M.A.L., Micke G.A., Bruns R.E. ve Tavares M.F.M., (2001). "Factorial design of electrolyte systems for the separation of fatty acids by capillary electrophoresis", Journal of Chromatography A, 924 (1–2): 533-539.

[117] Ballus C.A., Meinhart A.D., Bruns R.E. ve Godoy H.T., (2011). "Use of multivariate statistical techniques to optimize the simultaneous separation of 13 phenolic compounds from extra-virgin olive oil by capillary electrophoresis", Talanta, 83(4): 1181-1187.

[118] Wan H., Öhman M. ve Blomberg L.G., (2001). "Chemometric modeling of neurotransmitter amino acid separation in normal and reversed migration micellar electrokinetic chromatography", Journal of Chromatography A, 916(1-2): 255-263.

[119] Den Brok M.W.J., Nuijen B., Miranda E., Floriano P., Munt S., Manzanares I. ve Beijnen J.H., (2003). 'Development and validation of a liquid chromatography-ultraviolet absorbance detection assay using derivatisation for the novel marine anticancer agent ES-285-HCl [(2S,3R)-2-amino-3-octadecanol hydrochloride] and its pharmaceutical dosage form", Journal of Chromatography A, 1020(2): 251-258.

[120] Rao R.N., Maurya P.K., Shinde D.D., Khalid S. ve Pharm J., (2011). "Precolumn derivatization followed by liquid chromatographic separation and determination of tramiprosate in rat plasma by fluorescence detector: Application to pharmacokinetics", Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis, 55(2): 282-287.

[121] Space J.S., Opio A.M., Nickerson B., Jiang H., Dumont M. ve Berry M., (2007). "Validation of a dissolution method with HPLC analysis for lasofoxifene tartrate low dose tablets", Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis, 44(5): 1064-1071.

[122] Vermeij T.A.C. ve Edelbroek P.M., (2004). "Simultaneous high-performance liquid chromatographic analysis of pregabalin, gabapentin and vigabatrin in human serum by precolumn derivatization with o-phtaldialdehyde and fluorescence detection", Journal Chromatography B, 810(2): 297-303.

[123] Vermeij T.A.C. ve Edelbroek P.M., (2007). "Robust isocratic high performance liquid chromatographic method for simultaneous determination of seven antiepileptic drugs including lamotrigine, ox carbazepine and zonisamide in serum after solid-phase extraction", Journal of Chromatography B, 857(1): 40-46.

[124] Ye C., Liu J., Ren F. ve Okafo N., (2000). "Design of experiment and data analysis by JMP (R) (SAS institute) in analytical method validation", Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 23(2-3): 581-589.

[125] P. Ravisankar. ve G. Devala Rao., (2013). ''Development and Validation of Rp-HPLC Method for Determination of Levamisole in Bulk And Dosage Form''. Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research, 6(3).

[126] Ul Hassan, S. S., Ahmad,I., Ayub, M., Ishtiaq, S., Hayat, M. M., Khalid, N., Ansari, M. T. ve Uzair, M.,(2012). ''Development and Validation of RP-HPLC Method for Determination of Famotidine and its Application in Quality Control of Different Pharmaceutical Dosage Forms''. Uncorrected prof

[127] Ibrahim A. N. ve Mohammed A.,(2010). ''Development and validation of stability indicating HPLC and HPTLC methods for determination of sulpiride and mebeverine hydrochloride in combination''. European Journal of Medicinal Chemistry,45.

[128] Talluri, M. V. N. K., Bairwa M. K., Dugga H. H. T. ve Srinivas, R.,(2012). ''Development and Validation of Rp-HPLC and Ultraviolet Spectrophotometric Methods of Analysis for Simultaneous Determination of Paracetamol and Lornoxicam in Pharmaceutical Dosage Forms''.Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies,35(1):129-140.

[129] Gatti,R. ve Vitellaro,V., (2013). ''High performance liquid chromatography analysis of aliphatic thiolsin alimentary supplements and pharmaceuticals using menadioneas a new useful derivatization reagent''. Analytica Chimica Acta, 804:273-279.

[130] Locatelli,M., De Lutiis, F. ve Carlucci G., (2013). ''High Performance Liquid Chromatography Determination of Prulifloxacin and Five Related Impurities in Pharmaceutical Formulations''. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,78-79(27-33)

[131] Krishnaveni .G. ve Sathyannarayana, P.V.V.,(2013). ''Method Development and Validation for Simultaneous Determination of Ezetimibe and Simvastatin in Combined Pharmaceutical Dosage Form By Rp-HPLC Method''. International Journal of Pharmaceutical and Life Sciences, 2(2):60.

[132] Kogawa, A. C. ve Nunes Salgado, H. R., (2013). ''Quantification of Doxycycline Hyclate in Tablets by HPLC-UV Method ''. Journal of Chromatographic Science ,51(10):919-925.

[133] Sadeghi, F., Navidpour,F., Bayat,S. ve Afshar, M., (2013). ‘‘Validation and Uncertainty Estimation of an Ecofriendly and Stability-Indicating HPLC Method for Determination of Diltiazem in Pharmaceutical Preparations’’. Hindawi Publishing Corporation Journal of Analytical Methods in Chemistry, 353814.

[134] Afshar, M., Salkhordeh, N. ve Rajabi, M., (2013). ‘‘An Ecofriendly and Stability- Indicating HPLC Method for Determination of Permethrin Isomers: Application to Pharmaceutical Analysis’’. Journal of Chemistry, 697831

[135] Akl,M., Ahmed,M. ve Ramadan,A., (2011). ‘‘Validation of an HPLC-UV method for the determination of ceftriaxone sodium residues on stainless steel surface of pharmaceutical manufacturing equipments’’. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,55(2):247-52

[136] Maher, H. M.,(2014). ‘‘Development and Validation of a Stability-Indicating HPLC-Dad Method with Ann Optimization for the Determination of Diflunisal and Naproxen in Pharmaceutical Tablets’’. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 37(5):634-652.

[137] Raju, T. V. R., Kumar, S. R. ve Srinivas, A., (2014). ‘‘Development and Validation of a Stability-Indicating Rp-HPLC Method for the Estimation of Diacerein Impurities in Api and Pharmaceuical Formulation’’. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 37(4):498-515.

[138] Vignaduzzo, S. E. ve Kaufman, T. S., (2013). ‘‘Development and Validation of a HPLC Method for the Simultaneous of Determination Bromhexine, Chlorpheniramine, Paracetamol, and Pseudoephedrine in Their Combined Cold Medicine Formulations ’’. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 36(20): 2829-2843.

[139] Patil, S. S. ve Srivastava, A. K.(2013). ‘‘Development and Validation of a Liquid Chromatography Method for the Simultaneous Determination of Eight Water-Soluble Vitamins in Multivitamin Formulations and Human Urine’’. Journal of Aoac International . 96 (6) :1273-1280

[140] Mukthinuthalapati, M. A., Bandaru, S. P. K. ve Bukkapatnam, V., (2013). ‘‘Development and Validation of a Stability-Indicating RP-HPLC Method for the Determination of Febuxostat (a Xanthine Oxidase Inhibitor)’’. Journal of Chromatographic Science, 51(10):931-938.

[141] Uslu, B. ve Ozden, T., (2013). ‘‘HPLC and UPLC Methods for the Simultaneous Determination of Enalapril and Hydrochlorothiazide in Pharmaceutical Dosage Forms’’. Chromatographia, 76(21-22):1487-1494.

[142] Shah, J., Jan, M. R.ve Shah,S.,(2013). ‘‘Development and Validation of HPLC Method for Simultaneous Determination of Ceftriaxone and Cefaclor in Commercial Formulations and Biological Samples’’. Journal Of The Mexican Chemical Society , 57(4):314-320.

[143] Bonfilio, R., Peres, C. ve Salgado, H. R. N.,(2013).‘‘Multivariate Development and Validation of a Stability-Indicating HPLC Method for the Determination of Glimepiride in Tablets’’. Journal of Aoac International, 96(5):960-967.

[144] Ashfag,M., (2013). ‘‘Simultaneous RP-HPLC determination of sparfloxacin and dexamethasone in pharmaceutical formulations’’. Brazilian Journal of Pharmaceutical Science, 49(2):301-309.

[145] Nawaz,S. M.(2013). ‘‘Validation and Application of a New Reversed Phase HPLC Method for In Vitro Dissolution Studies of Rabeprazole Sodium in Delayed-Release Tablets’’. Journal of Analytical Methods in Chemistry. 976034.

[146] Hashem, Gouda,A.A. ve Saleh,H.,(2013). ‘‘Development And Validation Of Rapid Stability Indicating HPLC-Determinatıons Of Antiepileptic Drugs Phenobarbital In Suppositories And Phenytoin In Capsules As Well As In Urine Sample’’. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies 36(16): 2292-2306.

[147] El-Din, M. S., Eid, M. ve Zeid, A. M.,(2013). ‘‘Simultaneous Determination of Methocarbamol and Aspirin by RP-HPLC Using Fluorescence Detection with Time Programming: its Application to Pharmaceutical Dosage Form’’. Luminescence ,28(3):332-338.

[148] Panjwani, G., Shetty, R. ve Shenoy, G., (2013). ‘‘Development and Validation of a new Reversed-phase HPLC Method for the Determination of Ezetimibe in Pharmaceutical Dosage forms’’. Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research, 47(1):7-12.

[149] Sharma, M. C., (2013). ‘‘Extractive Spectrophotometric Analytical Methods For The Determination Of Pioglitazone Hydrochloride In Pharmaceutical Dosage Form And Its Comparison With Rp-HPLC And TLC Densitometric Methods’’.Oxidation Communications, 36(2):441-450.

[150] Redasani, V. K., Gorle, A. P. ve Badhan, R. A., (2013). ‘‘Simultaneous Determination of Chlorpheniramine Maleate, Phenylephrine Hydrochloride, Paracetamol and Caffeine in Pharmaceutical Preparation By Rp-HPLC’’. Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly 19(1):57-65.

[151] Khan, I. U., Ashfaq, M.ve Razzaq, S. N., (2013). ‘‘Simultaneous Determination of Piroxicam and Paracetamol in Pharmaceutical Formulations Using Stability Indicating HPLC Method’’. Journal Of Liquid Chromatography & Related Technologies, 36(19):1437-1450.

[152] Reddy, S., Sudhakar Babu, K. ve Kumar, N.,(2013). ‘‘A validated RP-HPLC method for the determination of Irinotecan hydrochloride residues for cleaning validation in production area’’. Revista Cubana de Farmacia, 47(1) :45-53.

[153] Celebier, M., Recber, T.ve Kocak, E., (2013). ‘‘RP-HPLC method development and validation for estimation of rivaroxaban in pharmaceutical dosage forms’’. Brazilian Journal Of Pharmaceutical Sciences, 49(2):359-366.

[154] Ul Hassan, S. S., Ahmad, I.ve Ayub, M., (2013). ‘‘Development and Validation of RP-HPLC Method for Determination of Famotidine and its Application in Quality Control of Different Pharmaceutical Dosage Forms’’. Journal Of The Chemical Society Of Pakistan, 35(3):809-814.

[155] Kumar, N., Sangeetha, D. ve Reddy, P. S., (2013). ‘‘Development and Validation of a Stability Indicating RP-UPLC Method for Simultaneous Determination of Rupatadine and Montelukast in Pharmaceutical Formulation’’.Current Pharmaceutical Analysis, 9(1):61-68

[156] Kakde, R. B., Satone, D.D.ve Gadapayale, K. K., (2013). ‘‘Stability-Indicating RP-HPLC Method for the Simultaneous Determination of Escitalopram Oxalate and Clonazepam’’. Journal of Chromatographic Science, 51(6):490-495.

[157] Zhou, Z., Wu, X.ve Wei, Q., (2013). ‘‘Development and validation of a hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of five first-line antituberculosis drugs in plasma’’. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 405(19):6323-6335.

[158] Jain, P. S.,Chaudhari, A. J.ve Surana, S. J., (2012). ‘‘Development and Validation Of Stability-Indicating Rp-Hplc Method for Determination of Olmesartan Medoxomile in Pharmaceutical Dosage Form and Identification, Characterization of Alkaline Degradation Impurity of Olmesartan Medoxomile Drug Substance As Well As Drug Product’’. Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly,18(4):595-604.

[159] Razzaq, S. N., Khan, I. U.ve Mariam, Irfana., (2012). ‘‘Stability indicating HPLC method for the simultaneous determination of moxifloxacin and prednisolone in pharmaceutical formulations’’. Chemistry Central Journal, 6(94).

[160] Pankhaniya, M., Patel, P.ve Shah, J. S.,(2013). ‘‘Stability-indicating HPLC Method for Simultaneous Determination of Montelukast and Fexofenadine Hydrochloride’’. Indian Journal Of Pharmaceutical Sciences,75(3):284-290.

[161] Issa, Y. M.,Hussien, E. M.ve Ibrahim, M. M., (2013). ‘‘Stability-Indicating Methods for the Determination of Candesartan Cilexetil in Bulk Drug and Pharmaceutical Formulations’’ . Journal of AOAC International,96(3):580-586.

[162] Yeniceli, D., (2013). ‘‘Development and validation of a simple and efficient HPLC method for the determination of zonisamide in pharmaceuticals and human plasma’’. Journal Of Analytical Chemistry, 68(5):436-443.

[163] Dinc, S., Donmez, O. A. ve Asci, B.,(2014). ‘‘Chromatographic and Chemometrics-Assisted Spectrophotometric Methods For The Simultaneous Determination Of Allobarbital, Adiphenine Hydrochloride, and Paracetamol In Suppository’’. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 37(4):560-571.

[164] Elshanawane, A.A., Abdelaziz, L.M. ve Kamal, M. M.,(2014). ‘‘Quantitative Determination Of Four Angiotensin-II-Receptor Antagonists In Presence Of Hydrochlorothiazide By A Gradient Technique HPLC In Their Pharmaceutical Preparations’’. Journal Of Liquid Chromatography & Related Technologies, 37(2):171-186.

[165] Hefnawy, M., Al-Majed, A. ve Al-Suwailem, A.,(2013). ‘‘HPLC Method for Analysis of Celiprolol Enantiomers in Biological Fluids and Pharmaceutical Formulation Using Immobilized Polysaccharide-Based Chiral Stationary Phase and Fluorescence Detection’’. Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures,8(3) :1313-1323.

[166] Heinisch, G. ve Matous, H., (1984) ‘‘Differentiation of drug substances’’. Society Pharmaceutical, 52, 82-90.

[167] Amin, M., (1987). ‘‘Simultaneous determination of fluocortolone, fluocortolone caproate and nicotinic acid benzyl ester in pharmaceutical preparations by TLC’’. Analitical Chemistry, 328, 114-116.

[168] Taylor, M.R. ve Westwood, A.S., (1993). ‘‘An investigation of drug detectionin equine urine samples by modern TLC’’.Planar Chromatography, 6, 415-418.

[169] Amin, M., (1980). ‘‘Quantitative analysis of steroid hormones in pharmaceutical preparations by HPTLC’’. 9-37.

[170] Rehm, K.D. ve Steinigen, M., (1982). ‘‘Analytical testing of corticosteroid-containing dermal preparations’’.172, 888-892.

[171] Stanley, S.M.R., Wilhelmi, B.S., Rodger, J.P.ve Guthrie, A., (1994). ‘‘Detection of corticosteroid by high –performance liquid-chromatography negative-ion chemical-ionization mass-spectrometry using a particle-beam interface’’. Biological Mass-Spectrum, 23, 483-491.

[172] Gamot, A.P., Vergoten, G., Sandermon, M. ve Fleury, G., (1985) ‘‘Raman spectroscopy study of corticosteroid derivatives of fluocortolene, trimethylacetate and caproate’’.Talanta, 32, 373-382.

[173] Kubes, J., Volke, J. ve Pospisilova, B., (1986). ‘‘Differental pulsed polarographic(DPP) determination of steroid hormones in ointments and creams and the use of DPP determination of content uniformity and dissolution of solid dosage forms’’.35, 265-269.

[174] Ohino, N. ve Sakai, T., (1981). ‘‘Simultaneous spectrophotometric determination of dibucaine and diphenhydramine using thermochromism of ion-associates’’. Bunsekı Kagaku , 30, 398-402.

[175] Sakai, T., (1982). ‘‘Simultaneous spectrophotometric determination of dibucaine and chlorpheniramine maleate in pharmaceuticals using thermochromism of ion associates’’. Analyst, 107, 640-646.

[176] Saleh, G. ve Askal, HF., (1995). ‘‘Spectrophotometric determination of certain local-anesthetics in pharmaceutical preparations’’. Analytical Letters, 28, 2663-2671

[177] Sotto, C., Contreras, D., Toral, M. ve İnes, İ. (2009). ‘‘Simultaneous determination of dibucaine and chlorphenamine maleate using different mathematical spectrophotometric approaches’’.Journal of the Chilean Chemical Society, 54, 113-118.

[178] El-Kindy, A., Korony, M.A. ve Bedair, M.F., (1998) ‘‘First derivative spectrophotometric and high-performance liquid-chromatography determination of cinchocaine hydrochloride in presence of its acid degradation product’’. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 17, 1357-1370.

[179] Mohammad, M.A.A., Zawilla, N.H. ve El-Anwar, F.M., (2007). ‘‘Column and thin-layer chromatographic methods for the simultaneous determination of acediasulfone in the presence of cinchocaine , and cefurozime in the presence of its hydrolytic degradation products’’. Journal of Aoac International, l90, 405-413.

[181] Komersky-Lovric, S., Vukasinovic, N. ve Penovski, E., (2003). ‘‘Voltammetric determination of microparticles of some local anesthetics and antithusics immobilized on the graphite electrode’’. Elektroanalysis, 15, 544-547.

[180] Essig, S. ve Kovar, KA., (2001) ‘‘Fluorimetric determination of cinchocaine in a pharmaceutical drug by scanning and video densitometry’’.Chromatographia, 53, 321-322.

[182] Ensafi, A.A. ve Allafchian, A.R., (2011) ‘‘Potentiometric sensor for the determination of dibucaine in pharmaceutical preparations and electrochemical study of the drug with BSA’’. Bulletin of the Korean Chemical Society, 32, 2722-2726.

[183] Barbosa, R.M., Klassen, A. ve Marcato, P.D., (2013). ‘‘Validation of an HPLC method for the determination of dibucaine encapsulated in solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers’’.Latin American Journal of Pharmacy , 32, 1362-1369

[184] Choi, C., Park, J. ve Lee, H., (2012) . ‘‘Determination of tolperisone in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry for clinical application’’. Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences , 911, 59-63.

[185] Elsayed, M.M.A., (2007) ‘‘Rapid determination of cinchocaine in skin by high-performance liquid chromatography’’. Biomedical Chromatography, 21, 491-496.

[186] Saito, T., Morita, S. ve Kishiyama, İ., (2008). ‘‘Simultaneous determination of dibucaine and naphazoline in human serum by monolithic silica spin column extraction and liquid chromatography-mass spectrometry’’. Journal Of Chromatography B-Analytical Technologies In The Biomedical and Life Sciences, 872, 186-190.

[187] Mohammad, M.A.A., Zawilla, N.H. ve El-Anwar, F.M., (2007). ‘‘Column and thin-layer chromatographic methods for the simultaneous determination of acediasulfone in the presence of cinchocaine , and cefurozime in the presence of its hydrolytic degradation products’’. Journal of Aoac International, l90, 405-413.

[188] Okamoto, H., Uetake, A.ve Tamaya, R., (2001). ‘‘Simultaneous determination of ingredients in an ointment by hydrophobic interaction electrokinetic chromatography’’. Journal of Chromatography, 929, 133-141.

[189] Ohshima, T. ve Takayasu, T., (1999). ‘‘Simultaneous determination of local anesthetics including ester-type anesthetics in human plasma and urine by gas chromatography mass spectrometry with solid-phase extraction’’. Journal of Chromatography, 726, 185-194.

[190] Lopez-Calull, C. ve Dominguez, N., (1999) ‘‘Determination of paroxetine in plasma by high-performance liquid chromatography for bioequivalence studies’’. Journal of Chromatography, 724, 393-398.

[191] Shin, JG., Kim, KA.ve Yoon, YR., (1998). ‘‘Rapid simple high-performance liquid chromatographic determination of paroxetine in human plasma’’. Journal of Chromatography, 713, 452-456.

[192] Izumoto, S., Machida, Y.ve Nishi, H., (1997). ‘‘Chromatography of crotamiton and its application to the determination of active ingredients in ointments’’. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 15, 1457-1466.

[193] Gupta, RN., (1994) ‘‘Column liquid-chromatographic determination of paroxetine in human serum using solid-phase extraction’’. Journal of Chromatography B-Biomedical Applications, 661, 362-365.

[194] Hattori, H., Yamamoto, S. ve Yamada, T., (1991). ‘‘Determination of local-anesthetics in body-fluids by gas-chromatography with surface-ionization detection’’. Journal of Chromatography-Biomedical Applications, 564, 278-282.

[195] Igarashi, K., Kasuya, F. ve Fukui, M., (1987) ‘‘Determination of dibucaine and its metabolites in human- urine by high-performance liquid-chromatography with fluorescence detector’’. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 35, 3033-3036.

[196] Igarashi, K., Kasuya, F. ve Mori, E., (1987). ‘‘Determination of dibucaine in biological samples by gas-chromatography with a nitrogen phosphorus detector’’. Journal of Chromatography-Biomedical Applications, 415, 407-412.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı :Mesut KOÇ

Doğum Tarihi ve Yeri :27.04.1990 Sivas

Yabancı Dili :İngilizce

E-posta :mesut.koc@windowslive.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Y. Lisans	Analitik Kimya	Yıldız Teknik Üniversitesi	-
Lisans	Kimya	Yıldız Teknik Üniversitesi	2012
Lise	Sayısal	Hasan Şadoğlu Lisesi (YDA)	2008