

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SOĞUK ALGINLIĞI VE ÖKSÜRÜK
TEDAVİSİNDE KULLANILAN
ŞURUPLARDAKİ AKTİF MADDELERİN
HPLC METODUYLA TAYİN EDİLMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Hatice ÇAĞLAR
ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Doç. Dr. S. Ebru BÜYÜKTUNCEL

MALATYA-2012

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SOĞUK ALGINLIĞI VE ÖKSÜRÜK
TEDAVİSİNDE KULLANILAN
ŞURUPLARDAKİ AKTİF MADDELERİN
HPLC METODUYLA TAYİN EDİLMESİ

Hatice ÇAĞLAR

Danışman Öğretim Üyesi: Doç. Dr. S. Ebru BÜYÜKTUNCEL

Bu araştırma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
2010/131 proje numarası ile desteklenmiştir.

MALATYA-2012

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

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

İmza

Jüri Başkanı

Prof. Dr. Sema ERDEMOĞLU



Danışman

Doç. Dr. Ebru BÜYÜKTUNCEL



Üye

Doç. Dr. Nurullah ŞANLI



ONAY :

Bu tez, İnönü Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu...../...../2012 tarih ve 2012/.....sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Sedat YILDIZ

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tezimin her aşamasında benden desteklerini ve özverisini esirgemeyen danışmanım Sn. Doç. Dr. S. Ebru BÜYÜKTUNCEL'e; plasebo şurubun hazırlanmasında bana yardımcı olan Sn. Yrd. Doç. Dr. M. Sinan KAYNAK'a ve sevgili arkadaşım Sn. Arş. Gör. Müge ATEŞ'e ve benden hiçbir zaman manevi desteklerini esirgemeyip her zaman yanımda olan anneme, babama, abilerime ve eşime teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Öksürük ve soğuk algınlığında kullanılan farmasötik preparatlar dünyanın en geniş formülasyonlarından biridir. Bu preparatlar; lezzet verici ajanlar, sakkaroz, asit düzenleyiciler, doğal ya da suni renklendirici, tatlandırıcılar, koruyucular gibi geniş spektrumlu yardımcı maddeler ve birkaç etken madde içeren kompleks formülasyonları temsil etmektedir. Bu katkı maddelerinin çoğunluğu, bazik azotlu amino bileşiklerin karışımı olarak bulunurlar ve fiziksel ve kimyasal özelliklerinin benzerlikleri nedeniyle bu farmasötik formların ayrılması oldukça karmaşıktır.

Öksürük ve soğuk algınlığı ilaçlarında bulunan psödoefedrin HCl, feniramin maleat, asetaminofen, guaifenesin, pirilamin maleat, klorfeniramin maleat, triprolidin HCl, dextrometorfan HBr, difenhidramin HCl nin eşzamanlı tayini için yeni, basit ve duyarlı bir metot geliştirilerek valide edilmiştir. Bu bileşiklerin ayrılması, izokratik elüsyon kullanılarak Nucleodur gravity C18 kolonla 37.9 dakikada gerçekleştirilmiştir. Mobil faz için; hacimce %10 luk ortofosforik asit ilavesiyle pH'ı 3.0'a ayarlanmış 80 mM KH_2PO_4 'dan %62 ve metanolden %38 oranında karıştırılmıştır. Bu bileşiklerin kromatografik ayrılma işlemi 0.75 mL/dk akış hızında ve oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. İç standart olarak 2,4,6-trimetoksibenzaldehit kullanılmıştır. Ultraviyole absorpsiyon 210 nm'de izlenmiştir.

Seçicilik, kalibrasyonun (eğrisinin) doğrusallığı, doğruluk, günüçi ve günler arası kesinlik, geri kazanım ve zorlanmış bozunma çalışmaları metot validasyonunun bir parçası olarak incelenmiştir. Önerilen sıvı kromatografi metodu; soğuk algınlığı ve öksürükte kullanılan şurup ve tabletler gibi farklı farmasötik ilaçların rutin analizinde başarıyla uygulanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Ters faz sıvı kromatografi, eşzamanlı tayin, öksürük şurubu, validasyon, soğuk algınlığı ilaçları, zorlanmış bozunma

Destekleyen kurumlar: İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi (Proje no:2010/131)

DETERMINATION OF ACTIVE INGREDIENTS IN COLD COUGH SYRUPS BY HPLC

Cough and cold pharmaceutical preparations are one of the most extended formulations in the world. These preparations represent complex formulations containing several active ingredients and a broad spectrum of excipients such as flavoring agents, saccharose, acidulants, natural or artificial coloring and flavoring agents, dyes, sweeteners and preservatives. The majority of these ingredients are present as a mixture of basic nitrogenous amino compounds and their separation in pharmaceutical forms is quite complicated due to similarities of their physical and chemical properties.

A new simple and sensitive liquid chromatographic method has been developed and validated for the simultaneous determination of pseudoephedrine HCl, pheniramine maleate, acetaminophen, guaifenesin, pyrilamine maleate, chlorpheniramine maleate, triprolidine HCl, dextromethorphan HBr, diphenhydramine HCl in cough and cold pharmaceuticals. The separation of these compounds was achieved within 37.9 min on a Nucleodur gravity C18 column using an isocratic elution. The mobile phase was a mixture of 38% methanol, 62% of 80 mM KH_2PO_4 aqueous solution adjusted to pH 3.0, to which was added 10% (v/v) orthophosphoric acid. The chromatographic separation of these compounds performed at room temperature, with flow rate of 0.75 mL/min. The internal standard was 2,4,6-trimethoxybenzaldehyde. An ultraviolet absorption at 210 nm was monitored.

The selectivity, linearity of calibration, accuracy, intraday and interday precision, recovery and forced degradation studies were examined as parts of the method validation. The proposed liquid chromatographic method was successfully applied for the routine analysis of these compounds in different cough and cold pharmaceutical preparations such as syrups and tablets.

Key words: Reversed-phase liquid chromatography, simultaneous determination, cough syrup, validation, cold formulations, forced degradation

Supported By: İnönü University Scientific Researches Unit (Project no:2010/131)

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
TABLolar DİZİNİ	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Öksürük Olayı	3
2.2. Soğuk Algınlığı	3
2.2.1. Soğuk Algınlığı Tedavisinde Kullanılan İlaçlarda Bulunan Etken Maddeler	5
2.2.1.1. Dekstrometorfan Hidrobromür	5
2.2.2.2. Difenhidramin Hidroklorür	5
2.2.1.3. Psödoefedrin Hidroklorür	5
2.2.1.4. Asetaminofen	5
2.2.1.5. Triprolidin Hidroklorür	6
2.2.1.6. Klorfeniramin Maleat	6
2.2.1.7. Feniramin Maleat	6

2.2.1.8. Pirilamin Maleat	7
2.2.1.9. Guaifenesin	7
2.3. Kromatografik Analiz Yöntemleri	7
2.3.1. Ayrılma Mekanizmalarına Göre Sıvı Kromatografi Metodları	8
2.3.1.1. Adsorpsiyon (Tutunma) Kromatografisi	8
2.3.1.2. Dağılma Kromatografisi (Partisyon Kromatografisi)	8
2.3.1.2.1. Ters Faz Kromatografi	9
2.3.1.2.2. Normal Faz Kromatografi	9
2.3.1.3. İyon Değişirme Kromatografisi	10
2.3.1.4. Jel Filtrasyon (Moleküler Eleme) Kromatografisi	10
2.3.1.5. Affinite Kromatografisi	11
2.3.2. Yüksek Başınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC)	12
2.3.2.1. Yüksek Başınçlı Sıvı Kromatografisi Cihazı	12
2.3.2.1.1. Çözücü Haznesi	13
2.3.2.1.2. Pompa Sistemi	15
2.3.2.1.3. Enjeksiyon Sistemi	16
2.3.2.1.4. Kolon Sistemi	17
2.3.2.1.5. Kolon Dolgu Maddesi	17
2.3.2.1.6. Dedektörler	18
2.3.2.1.6.1. UV/GB Absorbans Dedektörleri	19
2.3.2.1.6.2. Fotodiyot Dizisi Dedektörü (PDA)	20
2.3.2.1.6.3. Floresans Dedektörleri	20
2.3.2.1.6.4. Kırılma İndisi Dedektörleri	20
2.3.2.1.6.5. Elektrokimyasal Dedektörler	21

2.3.2.1.6.6. Evaporatif Işık Saçma Dedektörü (ELSD)	21
2.3.2.1.6.7. Kütle Spektrometresi (MS)	22
2.3.3. Ters Faz Kromatografide Metot Optimizasyonu	23
2.3.3.1. HPLC Ayırmalarında pH Etkisi	23
2.3.3.2. Organik Eluent Bileşiminin Analitin İyonizasyonuna ve Ayırmaya Etkisi	26
2.3.4. Kromatografide Sistem Uygunluk Testleri	28
2.3.4.1. Kapasite faktörü (k')	28
2.3.4.2. Seçicilik Faktörü (α)	28
2.3.4.3. Ayırıcılık (R)	28
2.3.4.4. Kolon Etkinliği (Teorik Plaka Sayısı)	29
2.3.4.5. Kuyruklanma Faktörü (T) ve Asimetri Faktörü	29
2.3.5. Analitik Yöntem Validasyonu Parametreleri	30
2.3.5.1. Seçicilik, Özgünlük	30
2.3.5.2. Kesinlik (Precision)	30
2.3.5.3. Doğruluk (Accuracy)	31
2.3.5.4. Geri Kazanım (Recovery)	31
2.3.5.5. Kalibrasyon/ Standart Eğrisi	31
2.3.5.6. Hassasiyet (Sensitivity)	32
2.3.5.7. Saptama Alt Sınırı (LOD)	32
2.3.5.8. Alt Tayin Sınırı (LOQ)	33
2.3.5.9. Sağlamlık (Robustness)ve Tutarlık (Ruggedness)	34
2.3.5.10. Stres Testleri	35
2.4. Literatür Özeti	36

3.GEREÇ VE YÖNTEM	41
3.1. Reaktif ve Materyaller	41
3.2. Cihazlar	42
3.3. Yöntem	44
3.3.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanması	44
3.3.2. Plasebo Şurup Örneğinin Hazırlanması	45
3.3.3. Şurup ve Tablet Örneklerinin Hazırlanması	45
3.3.4. Plasebo Şurup Örneği Matriksinde Kalibrasyon	45
3.3.5. Stres Testi İçin Çözeltilerin Hazırlanması	45
3.3.6. Kromotografik Şartların Ayarlanması	45
4. BULGULAR	47
4.1. Foto Diyot Dizisi Dedektörü Kullanarak Etken Maddelerin Ayrımının Optimize Edilmesi	47
4.2. Sistem Uygunluk Parametrelerinin Hesaplanması	50
4.2.1. Kapasite Faktörü (k')	50
4.2.2. Seçicilik Faktörü (α) ve Ayrıcılık(R)	51
4.2.3. Teorik Tabaka Sayısı (N), Kuyruklanma ve Asimetrik Faktör	52
4.3. Metot Validasyonu	53
4.3.1. Seçicilik ve Kalibrasyon Eğrisi	53
4.3.2. Kesinlik ve Doğruluk	56
4.3.3. Stres Testleri	58
4.4. Şurup Örneklerindeki Etken Madde Miktarları	59
4.5. Tablet Örneklerindeki Etken Madde Miktarları	65
5. TARTIŞMA	68

6. SONUÇ VE ÖNERİLER	71
7. KAYNAKLAR	73
ÖZGEÇMİŞ	80

SİMGELER VE KISALTMALAR

HPLC	Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
HPLC-MS	Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi
RP	Ters Faz
GC	Gaz Kromatografisi
LC	Sıvı Kromatografisi
UV-GB	Ultraviyole-Görünür bölge
TLC	İnce Tabaka Kromatografisi
PDA	Diyot Dizisi Dedektörü
R^2	Açıklayıcılık Katsayısı
% CV	Varyasyon Katsayısı
ACN	Asetonitril
MeOH	Metanol
LOD	Saptama Alt Sınırı
LOQ	Alt Tayin Sınırı

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Silika yüzeyine alkil zinciri bağlanması	9
Şekil 2.2. Ayrılma mekanizmalarına göre sıvı kromatografisinin sınıflandırılması	11
Şekil 2.3. HPLC sisteminin şematik gösterimi	13
Şekil 2.4. On-line solvent vakum degazörünün şematik gösterimi	14
Şekil 2.5. Gradient programlama sisteminin şematik gösterimi	14
Şekil 2.6. HPLC sisteminde kullanılan şırınga tipi ve pistonlu pompanın şematik diyagramı	16
Şekil 2.7. Lupa örnek yüklenmesi ve mobil faz akışıyla pompadan kolona gönderilmesi	17
Şekil 2.8. HPLC’de UV dedektörlerdeki sıvı akış hücresi	19
Şekil 2.9. PDA’nın şematik gösterimi	20
Şekil 2.10. Evaporatif ışık saçma dedektörünün şematik gösterimi	21
Şekil 2.11. LC/MS sisteminin blok gösterimi	22
Şekil 2.12. Bazık bir analitin iyonizasyonuna pH’nın etkisi	23
Şekil 2.13. Bazık bir analitin alıkonması üzerine pH’nın etkisi	23

Şekil 2.14. Asidik bir analitin alıkonması üzerine pH'nın etkisi	24
Şekil 2.15. Mobil faz pH'sının iyonize olabilen bileşiklerin alıkonma zamanına etkisi	25
Şekil 2.16. Asidik ve bazik bileşikler için pH'ya karşı teorik alıkonma faktörü	25
Şekil 2.17. Mobil fazdaki organik kompozisyonun değişimine bağlı olarak kromatogramdaki değişimler.	27
Şekil 2.18. Pik kuyruklanma faktörünün tayini	29
Şekil 4.1. Mobil fazdaki tampon yüzdesine bağlı olarak alıkonma zamanlarındaki değişim	47
Şekil 4.2. Tampon derişimine bağlı olarak alıkonma zamanlarındaki değişim	48
Şekil 4.3. Mobil faz pH'sının etken maddelerin alıkonma zamanlarına etkisi	49
Şekil 4.4. Etken maddelerin kromatografik ayrımının gösterimi	49
Şekil 4.5. Plasebo şurubun ve standart maddelerin analizi sonrasında elde edilen kromatogramlar	53

Şekil 4.6. Feniramin maleata ait kalibrasyon grafiği	54
Şekil 4.7. Etken maddelerin kromatografik ayrımının gösterimi	59
Şekil 4.8. Corsal şuruba ait kromatogram	59
Şekil 4.9. Actidem şuruba ait kromatogram	59
Şekil 4.10. Actifed şuruba ait kromatogram	60
Şekil 4.11. Aferin şuruba ait kromatogram	60
Şekil 4.12. Benical şuruba ait kromatogram	60
Şekil 4.13. Katarin şuruba ait kromatogram	61
Şekil 4.14. Kongest şuruba ait kromatogram	61
Şekil 4.15. Peditus şuruba ait kromatogram	61
Şekil 4.16. Sudafed şuruba ait kromatogram	62
Şekil 4.17. Gerakon tablete ait kromatogram	65
Şekil 4.18. Sudafed tablete ait kromatogram	65
Şekil 4.19. Corsal tablete ait kromatogram	65
Şekil 4.20. Kongest tablete ait kromatogram	66

TABLÖLAR DİZİNİ**Tablo 1.1.** Klinik uygulamalar için tavsiyeler**Tablo 2.1.** Kolon kromatografisinin sınıflandırılması 4**Tablo 2.2.** Gazların sudaki çözünürlükleri 8**Tablo 2.3.** Kolonlar için akış hızları 13**Tablo 2.4.** Yaygın HPLC dedektörleri ve özellikleri 15**Tablo 2.5.** Literatür özeti 19**Tablo 3.1.** Çalışmada kullanılan etken maddeler 36**Tablo 3.2.** Çalışmada kullanılan reaktifler 41**Tablo 3.3.** Kullanılan kimyasalların molekül şekilleri ve IUPAC a göre 41

adlandırılması 42

Tablo 3.4. Plasebo şurubun bileşenleri ve miktarları**Tablo 3.5.** HPLC’de kromatografik koşullar 44**Tablo 3.6.** Etken maddelerin tayininde kullanılan maksimum dalga 46

boyları (DAD dedektör) 46

Tablo 4.1. Etken maddelerin alıkonma zamanları**Tablo 4.2.** Kapasite faktörleri 49

Tablo 4.3. Seçicilik faktörleri ve ayırıcılık değerleri	50
Tablo 4.4. Teorik tabaka sayısı, kuyruklanma faktörü ve asimetri faktörü değerleri	51
Tablo 4.5. Etken maddelerin kalibrasyon eğrileri	52
Tablo 4.6. Etken maddelerin kesinlik ve doğruluk değerleri	55
Tablo 4.7. Stres testleri sonunda elde edilen % geri kazanım değerleri	57
Tablo 4.8. Piyasadaki şuruplarda bulunan etken madde konsantrasyonları	58
Tablo 4.9. Şuruplarda analiz sonucu hesaplanan etken madde konsantrasyonları ve % bağıl hata değerleri	63
Tablo 4.10. Piyasadaki tabletlerde bulunan etken madde konsantrasyonları	64
Tablo 4.11. Tabletlerde Analiz sonucu hesaplanan etken madde konsantrasyonları ve % bağıl hata değerleri	67

1. GİRİŞ

Soğuk algınlığı birçok virüsün neden olabileceği yaygın bir hastalıktır. Bir kişiden diğerine kolayca geçebilir (1). Soğuk algınlığı sinüsler, kulaklar ve bronşları etkiler. Soğuk algınlığının belirtileri; hapşıırma, burun akıntısı, burun tıkanıklığı, boğaz ya da boğaz kaşıntısı, öksürük, ses kısıklığı, baş ağrısı, hararet, üşüme ve genel olarak kendini iyi hissetmeme gibi genel belirtiler vardır (2, 3).

Soğuk algınlığının tedavisinde; kullanılan antihistaminiklerin, eski ("birinci kuşak", "sedatif") ve daha yeni "ikinci kuşak", "sedatif olmayan" antihistaminikler olmak üzere iki sınıfı vardır. Çalışmalar birinci kuşak antihistaminiklerin soğuk algınlığının belirtileri olan hapşıırma ve burun akıntısını azaltmada oldukça etkili olduğunu göstermiştir (4).

İbuprofen ve naproksen gibi steroid olmayan antiinflatuvar ilaçlar soğuk algınlığında karşılaşılan, inflamasyon, ağrı ve ateş tedavisinde etkilidir. Ayrıca steroid olmayan antiinflatuvar ilaçlar, yüksek ateş, üşüme, kas ağrısı ve genel olarak kendini iyi hissetmeme gibi belirtileri tedavi etmek için tıbbi uygulamada kullanılmaktadır (5).

Psödoefedrin gibi alfa-adrenerjik agonist dekonjestanlar, burundaki mukus zarının damarlarını daraltarak burunun açılmasını sağlarlar (6).

Öksürük kesici ilaçlar, kodein gibi doğal narkotikler ve dekstrometorfan gibi sentetik narkotiklerdir. Öksürük kesici ilaçlar beyindeki öksürük refleks merkezini baskılanmasında rol oynarlar (7).

Genel olarak kullanılan öksürük şuruplarının içeriğinde; öksürüğü kesmeyi sağlayan etken madde, koruyucu ve tatlandırıcı katkı maddesi kapsamında; asit düzenleyiciler, doğal ve yapay renklendiriciler ve tatlandırıcı maddeler vardır. Bu bileşikler farmasötik maddelerde çok farklı oranlarda ve doğal yapısından çok farklı bir kimyasal formda bulunurlar. Tüm bu durumlar analitik problemleri arttırmaktadır. Ayrıca farmasötiklerin içeriğindeki maddelerin bozunma ürünlerinin analizi de farmasötiklerin kararlılıklarını belirlemede oldukça önemlidir. Bu amaçla farmasötiklerin içindeki bu etken maddelerin, katkı maddelerinin, koruyucuların ve bozunma ürünlerinin tayini için literatürlerde birkaç farklı yöntem belirtilmiştir.

Bunlar;

- Ultraviyole (UV), Floresans veya Kütle (MS) dedektör bağlanmış HPLC
- Ultraviyole-Görünür Bölge (UV-GB) Spektroskopisi,
- Raman Spektroskopisi,
- İnce Tabaka Kromatografisi (TLC),
- Gaz Kromatografisi (GC),
- MS dedektör bağlı GC,
- Kapiler Elektroforez ve
- Çoklu Spektrofotometrik metotlardır.

Bunlardan HPLC-UV, HPLC-Floresans veya HPLC-MS cihazları analizde en çok kullanılan cihazlardır (8).

Bu çalışmanın amacı, soğuk algılığı ve öksürük tedavisinde kullanılan şuruplarda, eş zamanlı etken madde tayini için basit enstrümantasyonlu bir LC metodu geliştirmektir. Optimize edilen tayin metodu valide edildikten sonra şurup ve tabletlerin dışındaki diğer ticari preperatların analizinde kullanılabilmesi hedeflenmektedir. Ayrıca şuruplar ve tabletlerin yapısındaki etken maddelerin asidik, bazik ve peroksit ortamında sistem kararlılık testleri uygulanarak şurubun ve tabletlerin ticari değeri üzerinde önemli bir faktör olan kararlılıkları da belirlenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. ÖKSÜRÜK OLAYI

Öksürük çoğu zaman solunum yollarının, veya onun dışında kalan belirli bazı yerlerin, irritasyonu sonucu oluşur. İnsan ve bazı deney hayvanlarında uyarılmaları sonucu kolayca öksürüğe neden olan solunum yolu bölgeleri, larinks, karina, trakea ve büyük bronşların mukozasıdır. Solunum ağacının daha derin (yani alveollere yakın) bölgelerinin uyarılması o kadar kolay öksürük oluşturmaz. Plevra, periton, diyafragma, dış kulak yolu ve orta kulak epiteli ve mediastinumun uyarılması da öksürüğe neden olur.

Beyin sapında 4. ventrikülün tabanında medulla oblongata ve pons içinde öksürük ile ilgili uyarıları taşıyan sinir liflerinin sonlandığı nöron topluluklarından oluşan bir öksürük merkezinin varlığı genellikle kabul edilir. Kedide bu yerler, elektriksel olarak stimüle ile ilgili çeşitli kasların koordineli bir şekilde çalıştırılmasını sağlar. Öksürük merkezindeki nöronlar solunum merkezinin mutad kimyasal stimulanları olan CO₂ ve pH'ye duyarlı değildir (9).

Opioid (morfin benzeri) ilaçlar öksürük merkezi üzerinde belirgin inhibisyon yaparlar. Buradaki nöronlarda bu ilaçların yaptığı inhibisyona opioid reseptörler aracılık eder. Ancak söz konusu nöronlarda μ reseptörleri yanında, opioid reseptörlerin 3 klasik tipi dışında kalan 'öksürük kesici' tipteki varlıkları tartışmalı olan hipotetik reseptörler de bulunur. Öksürük kesici tipteki reseptörlerin iki önemli özelliği morfin antagonisti nalokson ile bloke edilmemeleri ve diğer opioid reseptör tiplerine göre daha az stereoselektif olmaları ve bu nedenle hem dekstro izomeri ve hem de levo izomeri ilaçlar tarafından önemli ölçüde aktive edilmeleridir. Halbuki morfinin analjezik etkisinde rol oynayan μ reseptörleri sadece levo izomerleri tarafından etkilenirler. Kodein ve dekstromethorfan esas olarak öksürük kesici tipteki reseptörler üzerinden inhibisyon yaparlar ve antitusif etkileri nalokson ile önemli ölçüde bloke edilemez.

2.2. SOĞUK ALGINLIĞI

Soğuk algınlığına en çeşitli solunum virüsleri (çoğunlukla rinovirüs) olmaktadır. Yetişkinlerde yıllık 2 veya 4 defa çocuklarda 6 veya 8 defa olabilir. Soğuk algınlığı ilk atakta boğaz ağrısı, kırgınlık, ve düşük derecede ateşle

nitelendirilebilir. Bu belirtiler birkaç gün içinde geçer ve ilk ataklardan sonraki 24-48 saat içinde burun tıkanıklığı, burun akıntısı ve öksürük takip eder.

Soğuk algınlığı tedavisinde etkili antiviral bulunmadığından ve korunma için birkaç etkili önlem olduğundan, tedavi belirtileri gidermeye yönelik olmalıdır. Kullanılan en genel tedavi piyasadaki antihistamin, dekonjestan, öksürük kesici ve balgam sökücü ilaçlardır. Bu ilaçlar tek başına veya kombine şekilde kullanılabilir.

Soğuk algınlığı antiviral bir hastalık olmakla beraber, bakteriyel komplikasyonlar mevcut olmadığında bile antibiyotiklerin hastaya verilmesi uygun değildir. Sistemik incelemeler göstermiştir ki antibiyotiklerin soğuk algınlığı tedavisinde hiçbir rolü yoktur. Çünkü antibiyotikler semptom süresi ve şiddetini azaltmada etkisiz kalması ve gastrointestinal yan etki riski, tedavi maliyeti ve bakterilerin antibiyotik direnci arttırmasından dolayıdır (10).

Tablo 1.1. Klinik uygulamalar için tavsiyeler

Klinik Öneri	Bulgu Değerlendirmesi	Referans lar
Antibiyotikler çocuk veya yetişkinde soğuk algınlığı tedavisi için tavsiye edilmez.	A	11,12
Dekstrometorfan soğuk algınlığına bağlı öksürük de yetişkinler için bir tedavi seçeneğidir.	B	13,14
Üç güne kullanılan topikal intranasal veya oral nazal dekonjestanlar, gençler ve yetişkinler için bir tedavi seçeneğidir.	B	15,16,17
Pahalı olmasına rağmen Topikal ipratropium, altı yaşından büyük çocuklarda ve erişkinlerde burun tıkanıklığı için bir tedavi seçeneğidir.	B	18
Kodein ve diğer narkotikler, dekstrometorfan, antihistaminikler ve kombine antihistaminik / dekonjestanlar çocuklarda öksürük veya diğer soğuk algınlığı belirtilerinin tedavisi için tavsiye edilmez.	B	13,15,19,20
Faydaları yan etkileri ağır bastığı takdirde eski birinci kuşak antihistaminikler ve kombine antihistaminik / dekonjestanlar yetişkinlerde öksürük ve soğuk algınlığı semptomları için tedavi seçeneğidir.	B	21
Mevcut tamamlayıcı tedaviler arasında, C vitamini profilaksisi soğuk belirtilerin şiddetini ve süresini azaltabilir, ancak, C vitamini, çinko ve ekinezya aktif tedavi için tavsiye edilmez.	B	22,23
A = tutarlı, kaliteli hasta odaklı bulgu; B = tutarsız veya sınırlı kaliteli hasta odaklı bulgu; C = orta görüş, hastalık odaklı , genel uygulama, uzman görüşü veya olgu serisi. Bulgu derecelendirme sistemi hakkında bilgi için, http://www.aafp.org/afpsort.xml bakın.		

2.2.1. Soğuk Algınlığı Tedavisinde Kullanılan İlaçlarda Bulunan

Etken Maddeler

2.2.1.1. Dekstrometorfan Hidrobromür

Sentetik bir morfinan türevidir; yapıcı morfine benzer. Narkotik analjezik bir ilaç olan levorfanol un D- şekli olan dekstrotorfanın metoksi türevidir. D- stereoizomer olması ve diğer yapısal özellikleri nedeniyle, klasik opioid reseptörlerine affinitesi düşüktür. μ reseptörleri etkilemediğinden analjezik etki yapmaz. Öksürük kesici tipi reseptörleri etkileyerek öksürük merkezini inhibe eder. Antitusif etki gücü kodeininkine eşittir veya daha fazladır ve biraz daha uzun sürer. Eşit antitusif etki yapan dozlarda bu iki ilaç santral sinir sisteminde benzer derecede depresyon yaparlar; fakat dekstrometorfan, kodeinden farklı olarak analjezik değildir ve konstipan etkisi yoktur. Mukozayı kurutmaz ve siliyumların hareketini bozmaz, solunum merkezini, yüksek dozları hariç, deprese etmez. İlaç bağımlılığı yapma potansiyeli çok düşüktür; uluslararası kontrol dışında tutulmuştur.

2.2.1.2. Difenhidramin Hidroklorür

Sentetik bir ilaçtır ve genellikle periferik etkileriyle (spazmolitik ve/veya lokal anestezi etki) öksürük refleksini inhibe ederler. Ayrıca difenhidramin hidroklorür klasik antihistaminik (histamin H1-reseptör blokörü) ilaçtır. Difenhidramin spazmolitik etki yanında öksürük merkezi üzerinde inhibitör etkiye de sahiptir ve bu bakımdan antitusif etki yapar; bu bakımdan antihistaminik ilaçlar içinde en etkili olanıdır. Klasik antihistaminik ilaçların mutad yan etkileri olan sedasyon ve antikolinergik yan tesirler oluşturur.

2.2.1.3. Psödoefedrin Hidroklorür:

Efedrinin stereoizomeridir; Efedra türü bitkilerde doğal olarak bulunur. İlaç olarak, sentetik üretilen rasemik ve dekstro şekilleri kullanılır. Efedrin gibi hem direkt ve hem de indirekt sempatomimetik etkinlik gösterir.

Tek başına veya öksürük şurupları içinde, burun mukozasında ve solunum yollarının diğer kısımlarında dekonjestiyon yapmak için ağızdan verilir.

2.2.1.4. Asetaminofen (Parasetamol)

Asetaminofen aspirininkine, yaklaşık olarak eşit derecede analjezik etki yapar. Antipiretik etkiside onunkine yakın güçtedir; fakat aspirinden farklı olarak, antiinflamatuvar etkinliği oldukça düşüktür ve bu tür etkinlik gerektiren

indikasyonlarda kullanılmaz. Ancak antiinflatuvar ilaçların analjezik etkisini artırmak için onlarla birlikte kullanılabilir. Asetaminofen, benzeri diğer analjezik ilaçlardan farklı olarak, hipotalamus ve omurilik gibi peroksidlerden fakir ortamda prostaglandin sentezini inhibe edebilir; antipiretik ve analjezik etkilerinin, sırasıyla, hipotalamus ve omurilik arka boynuzunda prostaglandin sentez ve salıverilmesini inhibe etmesi ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür.

Ağız yoluyla alındığında asetaminofen, çabuk absorbe edilir ve etkisi erken başlar; plazma düzeyi ½-1 saat içinde maksimuma erişir. Absorpsiyonu besinler tarafından azaltılır. Bir dozdan sonra analjezik etkisi 3-4 saat kadar devam eder.

2.2.1.5. Triprolidin HCl

Bir alkilamine türevi olan triprolidin HCl, hafif sedatif ve antimuskarinik etkili bir sedatif antihistaminiktir. Ürtiker ve rinit içeren alerjik durumların ve kaşıntılı deri hastalıklarında semptomlarının giderilmesi için kullanılır. Triprolidin HCl, rinitte genellikle pseudoefedrinle birlikte kullanılırken, soğuk algınlığı ve öksürük tedavisinde diğer preparatlarla birlikte kullanılır (24).

2.2.1.6. Klorfeniramin Maleat

Bir alkil türevi olan klorfeniramin maleat antimuskarinik aktiviteye sahip olup, orta derecede sedasyona sebep olan sedatif bir antihistaminiktir. Klorfeniramin maleat ürtiker, rinit, konjuktivit, anjioödem ve kaşıntılı deri rahatsızlıklarını içeren alerjik durumların semptomlarının giderilmesinde kullanılır. Soğukalgınlığı ve öksürüğün semptomatik tedavisinde bileşik preparatların ortak bileşenidir. Klorfeniramin maleat anafilaktik şokun acil tedaviye ek olarak intravenöz şekilde verilebilir (24).

2.2.1.7. Feniramin Maleat

Feniramine, alkil türevidir, antimuskarinik ve orta derecede sedatif etkileri olan sedatif bir antihistaminiktir. Klorfeniramin maleat ürtiker, rinit, konjuktivit, anjioödem ve kaşıntılı deri rahatsızlıklarını içeren alerjik durumların semptomlarının giderilmesinde kullanılır. Feniramine antiemetik özelliğinden dolayı hareket hastalığının kontrolünde ve önlenmesinde kullanılır. Öksürük ve soğukalgınlığı tedavisinde preparatlarda bileşen olarak kullanılır. Burun ve göz preparatlarında dekonjestanlara kombinasyon halinde de kullanılır (24).

2.2.1.8. Pirilamin Maleat (Mepiramin Maleat)

Pirilamin, etilendiamin türevi, antimuskarinik ve sedatif özellikli bir sedasyon oluşturan bir antihistaminiktir. Pirilamin, aşırıduyarlılık reaksiyonlarının ve kaşıntılı deri rahatsızlıklarının semptomlarının giderilmesinde kullanılır. Soğukalgınlığı ve öksürüğün semptomatik tedavisi için bileşik preparatların yaygın bileşenidir (24).

2.2.1.9. Guaifenesin

Guaifenesinin, dirençli balgamin miktarını arttırırken viskozitesini düşürür ve balgamlı öksürük için ekspektoran olarak kullanılır (24). Ayrıca guaifenesin balgamsız öksürüğün giderilmesinde ve soğukalgınlığı ilaçlarında öksürüğün giderilmesi amaçlı antitussif olarak kullanılır.

2.3. KROMATOĞRAFİK ANALİZ YÖNTEMLERİ

Kromatografi, bir karışımda bulunan bileşenlerin birbirinden ayrılmasını gerçekleştiren yöntemlerin genel adıdır. Bu yöntemlerde genellikle belli uzunluktaki bir kolon bir dolgu maddesi ile doldurulur ve bu madde *sabit faz* adını alır. Örnek kolonun bir ucundan sokulur ve bir *hareketli faz* ile kolonun bir ucundan öteki ucuna kadar sürüklenerek taşınır. Dolgu maddesi ile etkileşmesi nedeniyle bu taşınım sırasında örnek kolondaki sabit faz tarafından bir miktar tutulur. Bu tutulma, örnekteki farklı bileşenler için farklı miktarda olur (25).

Kromatografik yöntemler ikiye ayrılır. *Kolon kromatografide* durgun faz dar bir boruda tutulur, hareketli faz ise, yerçekimi veya basınç etkisiyle borudan geçirilir. *Düzlemsel kromatografide* ise, durgun faz düz bir yüzeyde veya kağıdın gözeneklerinde tutulur. Bu durumda hareketli faz, durgun faz üzerinde kılcal etki veya yerçekimi etkisiyle hareket eder.

Tablo 2.1’de gösterildiği gibi kromatografik metotlar, sıvı, gaz veya süperkritik akışkan olmak üzere, hareketli fazın yapısına bağlı olarak üç sınıfta verilebilir. Bu tablonun ikinci kolonunda durgun fazın yapısına ve fazlar arası dengenin niteliğine bağlı olarak beş tür sıvı kromatografisi, üç türde gaz kromatografisi tekniği bulunduğu görülmektedir (26).

Tablo 2.1. Kolon kromatografisinin sınıflandırılması

Genel Sınıflandırma	Özel Metot	Sabit Faz	Denge Türü
1.Gaz kromatografisi (GC) (Hareketli faz: gaz)	a-Gaz-sıvı kromatografisi (GLC)	Sıvının katı bir yüzeye bağlanması veya adsorbe olması	Gaz ve sıvı arasındaki partiyon
	b-Gaz-katı kromatografisi	Katı	Adsorpsiyon
	c- Bağlı-gaz fazı	Katı bir yüzeye bağlı organik türler	Sıvı ve bağlı yüzey arasında partiyon
2.Sıvı kromatografisi (LC) (Hareketli faz: sıvı)	a- Sıvı-sıvı veya partiyon	Sıvının katı bir yüzeye bağlanması veya adsorbe edilmesi	Karışmayan sıvılar arasında partiyon
	b- Sıvı-katı yada adsorpsiyon	Katı	Adsorbsiyon
	c- İyon değişimi	İyon değiştirici reçine	İyon değişimi
	d- Boyut eleme	Polimerik bir katının boşlukları içindeki sıvı	Partiyon/eleme
	e- Afinite	Katı bir yüzeye özel bir grup sıvının bağlanması	Sıvı yüzey ile sıvı mobil faz arasındaki partiyon
3.Süperkritik akışkan kromatografisi (SFC) (hareketli faz: süperkritik akışkan)		Katı bir yüzeye organik bir grubun bağlanması	Süperkritik sıvı ve bağlı yüzey arasında dağılma

2.3.1. Ayrılma Mekanizmalarına Göre Sıvı Kromatografisi Metodları

2.3.1.1. Adsorpsiyon (Tutunma) Kromatografisi

Adsorpsiyon, bir karışımda bulunan sıvı, gaz veya buhar halindeki maddelerin katı faz üzerine tutunmasıdır. Bu yöntemde bileşenlerin birbirinden ayrılması katı yüzeyindeki farklı adsorpsiyon ilgilerinden ötürü gerçekleşir. Sıvı-katı veya adsorpsiyon kromatografisine genellikle sabit faz olarak silika veya alümina kullanılır.

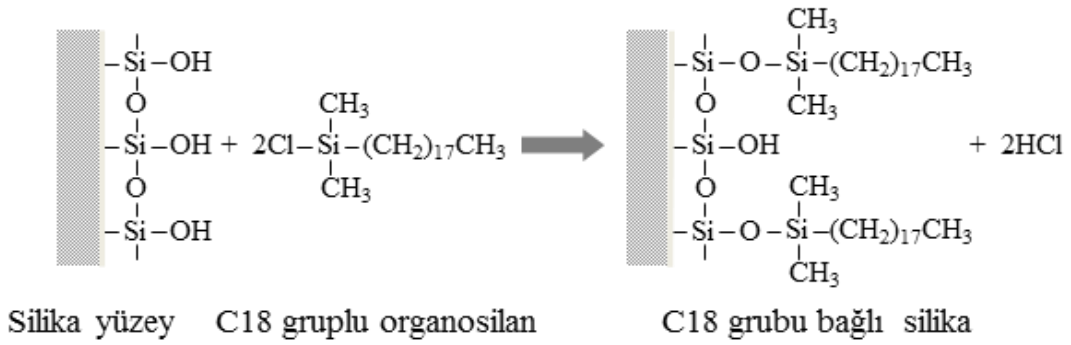
2.3.1.2. Dağılma Kromatografisi (Partiyon Kromatografisi)

En çok HPLC’de kullanılan dağılma kromatografisinde sabit faz, hareketli fazla karışmayan bir sıvıdır. Dağılma kromatografisinin ilk formlarında sıvı-sıvı kolonlar kullanılmıştır. Modern LC sistemlerinde, bunlar sıvı bağlı faz kolonları ile yer değiştirmiştir. Sıvı-sıvı kromatografide sabit sıvı faz dolgu maddesine fiziksel adsorpsiyonla tutturulmuştur. Bağlı faz kromatografisinde ise kimyasal olarak

bağlanmıştır. Böylece, hareketli fazda çözünmeyen yüksek kararlılıkta dolgular elde edilmiştir. Bağlı faz kolonlar, gradient elüsyon teknikleriyle de uyumludur (27).

2.3.1.2.1. Ters Faz Kromatografi

Dağılma kromatografisi, hareketli faz ve sabit fazların polaritelerine göre farklılandırılabilir. Ters faz sıvı kromatografide sabit faz, nonpolarlardır. Hareketli faz polar çözücülerdir (Su, metanol, asetonitril ve sulu tampon çözeltiler gibi). En çok kullanılan ters faz dolgu maddeleri, silika yüzeyine bağlanmış alkil zincirleridir.



Şekil 2.1. Silika yüzeyine alkil zincirinin bağlanması

Pratikte en sık kullanılan alkil grupları C18 (n-oktadesil) ve C8 (n-oktil) dir. Alıkonma, sabit fazın hidrokarbon zincirleri ve analitin hidrokarbon zincirleri arasındaki hidrofobik etkileşime dayanır. Analitin polaritesi ters faz kromatografideki elüsyon sırasını belirler. En polar analitler önce elue olur, bunu nonpolar bileşikler izler. Moleküllerin dissosiasyonu, alıkonma üzerinde güçlü bir etkiye sahiptir. Yüklü formda analitler, daha hidrofiliktirler ve nötral formlarına göre daha erken elue olurlar (28, 29, 30).

2.3.1.2.2. Normal Faz Kromatografi

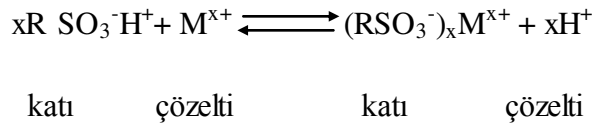
Ters faz kromatografinin tersine, normal faz kromatografide sabit faz polar, hareketli faz nonpolarlardır. Mobil faz olarak genellikle organik solvent karışımları kullanılır (dietileter, diklorometan, kloroform, hekzan gibi). Ticari normal faz bağlı dolgular, silika yüzeyin siyano, diol, amino, dimetilamino gibi polar fonksiyonel gruplarla kimyasal olarak modifiye edilmesiyle elde edilir. Analit ve sabit faz arasındaki baskın etkileşimler polar etkileşimlerdir. Daha az polar bileşikler ilk elue olurken, daha polar bileşikler kolonu daha geç terk eder (28, 29, 30).

2.3.1.3. İyon Değiştirme Kromatografisi

Maddelerin iyonik grupları ile iyon değiştiricilerdeki iyonik grupların eşdeğer miktarlarının karşılıklı yer değiştirmesi esasına dayanır. İyon değiştirme kromatografisi, kullanılan iyon değiştiricinin anyon veya katyon aktarmasına göre sırasıyla anyon veya katyon değiştirme kromatografisi olarak adlandırılır.

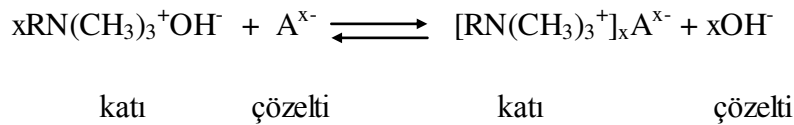
Katyon değiştirici reçinelerin en genel aktif bölgeleri, kuvvetli bir asit olan sülfonik asit grubu (SO_3^-H^+) ve zayıf bir asit olan ($-\text{COO}^-\text{H}^+$)'dur. Anyonik iyon değiştiriciler, kuvvetli bir baz olan tersiyer amin grupları ($-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+\text{OH}^-$) veya daha zayıf baz olan primer amin gruplarını ($-\text{NH}_3^+\text{OH}^-$) içermektedir.

Sülfonik asit tipi bir iyon değiştirici, M^{x+} katyonu içeren bir sulu çözelti ile temas ettiği zaman, aşağıdaki gibi gösterilen bir yer değiştirme dengesi meydana gelir:



Burada $\text{R SO}_3^-\text{H}^+$ büyük bir polimer molekülüne tutunmuş çok sayıdaki sülfonik asit grubundan bir tanesidir.

Benzer şekilde, kuvvetli bazik iyon değiştirici, A^{x-} anyonu ile, aşağıdaki denklemde gösterildiği gibi etkileşebilir:



Her anyon sağa doğru oluşan tepkimeler gereği anyon değiştiriciye tutunurken ters yöndeki tepkimelerle anyon değiştiriciden ayrılırlar.

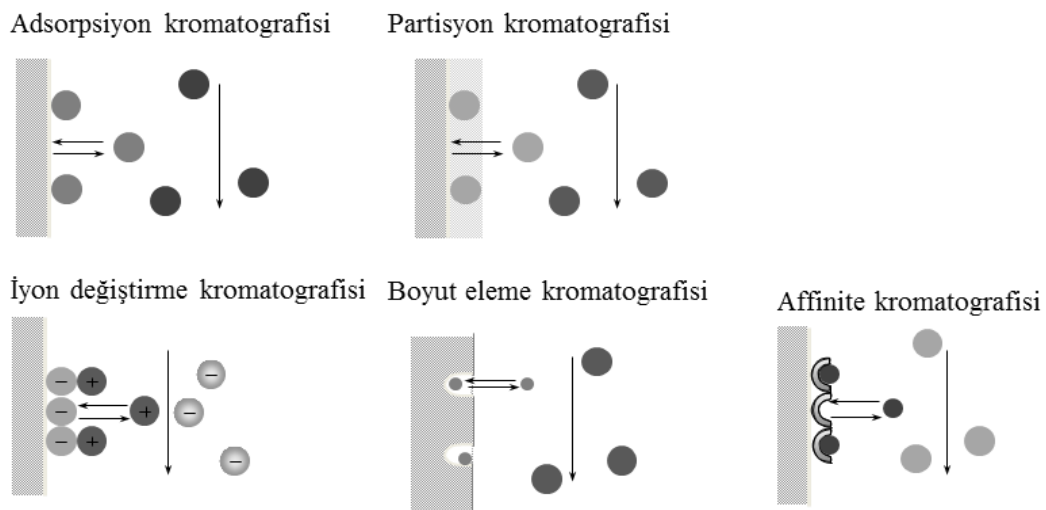
2.3.1.4. Jel Filtrasyon (Moleküler Eleme) Kromatografisi

Karışımındaki maddelerin molekül büyüklüklerine göre ayrılması esasına dayanır. Boyut-eleme kromatografisi, özellikle yüksek mol kütleli türlere uygulanabilen güçlü bir tekniktir. Dolgu maddeleri, çözünen madde ve çözücü moleküllerinin içine difizlenebileceği düzgün bir gözenek ağı içeren küçük boyutlu

(~ 10µm) silis veya polimer partiküllerden meydana gelmiştir. Gözenekler içinde moleküller, etkin bir şekilde yakalanır ve hareketli faz akımı ile uzaklaştırılır. Gözenek içinde ortalama kalma süresi, analit molekülün etkin büyüklüğüne bağlıdır. Dolgu maddesinin ortalama gözenek açıklığından daha büyük olan moleküller dışarıda tutulurlar ve böylece hiç alıkonmazlar. Bu gibi türler ilk olarak elue edilirler. Gözeneklerden önemli derecede küçük çapa sahip olan moleküller, gözeneklere nüfuz eder ve uzun süre tutulmuş olurlar. Orta boyuttaki moleküllerin dolgu maddesinin içine ortalama nüfuz etme özellikleri yarıçaplarına bağlıdır. Boyut-eleme ayırmalarında diğer yöntemlerden farklı olarak analit ve sabit faz arasında kimyasal ve fiziksel etkileşimler yoktur.

2.3.1.5. Affinite Kromatografisi

Affinite kromatografisi, ayırma teknolojisinde eşsiz bir yer tutmaktadır. Bunun nedeni biyomolekülü (ayrılacak madde), biyolojik fonksiyonu veya kimyasal yapısından dolayı tanıyarak ayırma ve saflaştırma işlemini gerçekleştiren tek ayırma yöntemi olmasıdır. Antijen-antikor, enzim-substrat-reseptör-ilaç gibi oldukça spesifik etkileşimlere dayanır. Kullanılan dolgu maddeleri spesifik ligand bağlı partiküller veya makromoleküllerdir. Sabit faz, özel bir proteine karşı gelen antikor ise, bir protein karışımı kolondan geçirildiği zaman, sadece antikor ile etkileşen protein kolona bağlanır. Daha sonra bu protein pH'nın değiştirilmesi ile antikordan ayrılarak elue edilir.



Şekil 2.2. Ayırma mekanizmalarına göre sıvı kromatografisinin sınıflandırılması (31).

2.3.2. Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Klasik sıvı kromatografisinde numune ve hareketli faz kolonun üstünden ilave edilir. Hareketli fazın kolondan aşağıya inmesi esnasında, numunedeki bileşenlerin bantlar halinde ayrılmaları sağlanır. Bantların iyi ayrılmamaları durumunda daha uzun kolonlar kullanılır. Böyle durumlarda da saatlerce beklemek gerekir. Alternatif olarak da kolondaki dolgu maddesi inceltir. Bu yapıldığı zaman da yine çok uzun süre beklemek gerekir. Bilim adamları kolonu uygun büyüklükte dolgu maddesiyle doldurmuşlar ve kolonun üstünden yüksek basınç uygulamışlardır. Böylece daha iyi sonuçlar almışlardır. Böyle, küçük dolgu maddeleriyle doldurularak yüksek basınç altında bir kolonda yapılan kromatografi türlerine *yüksek performans (basınçlı) sıvı kromatografisi* denir.

Yüksek performans sıvı kromatografisi, bütün analitik ayırma metotları arasında en çok kullanılanıdır. Bunun nedeni, bu metodun:

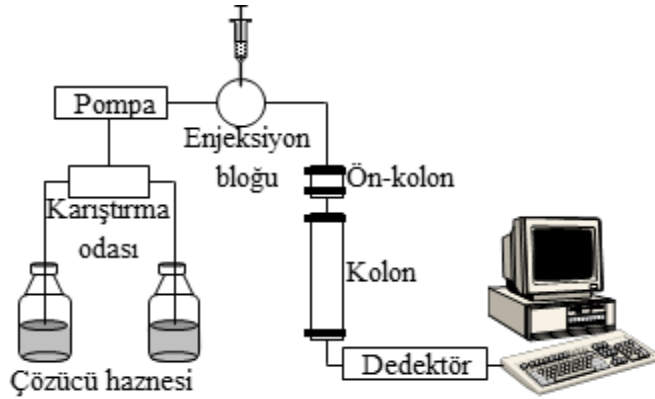
1. Hassas olması,
2. Sıcaklığa hassas olan maddelere bile uygulanabilmesi,
3. Doğruluk dereceleri ve kesinlikleri yüksek sonuçlar vermesidir.

Metodun uygulanabildiği başlıca alanlar şöyledir: a. nükleik asitler, b. terpenoitler, c. pestisitler, d. antibiyotikler, e. steroidler, f. proteinler, g. aminoasitler, h. Hidrokarbonlar, i. karbonhidratlar, j. metal organik bileşikler, k. bazı inorganik maddelerdir (32).

2.3.2.1. Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi Cihazı

Şekilde şematik olarak gösterilen bir HPLC sistemi aşağıdaki bileşenlerden oluşur:

1. Çözücü haznesi
2. Pompa
3. Enjektör
4. Kolon
5. Dedektör



Şekil 2.3. HPLC sisteminin şematik gösterimi

Sistemin çalışma prensibi basittir. Pompa, çözücüyü kolon boyunca belli bir hızda iter. Örnek enjeksiyonu esnasında, çözücü enjeksiyon bloğundan geçerek, örneği kolona taşır. Kolonda örnek bileşenleri ayrılır ve ayrılan bileşenler dedektörde tayin edilir. Çoğu cihazda, eluent ve kolonun sıcaklığını kontrol etmek mümkündür. Pık genişlemesini azaltmak için, özellikle enjeksiyon sistemi ve dedektördeki ölü hacim küçük tutulmalıdır (28).

2.3.2.1.1. Çözücü Haznesi

Çözücü hazneleri, cam veya paslanmaz çelikten yapılırlar. HPLC’de mobil faz olarak kullanılan tüm çözücüler, haznelere konmadan önce, LC sistemini kolaylıkla tıkayabilecek asılı partikülleri uzaklaştırmak için süzülmalıdır.

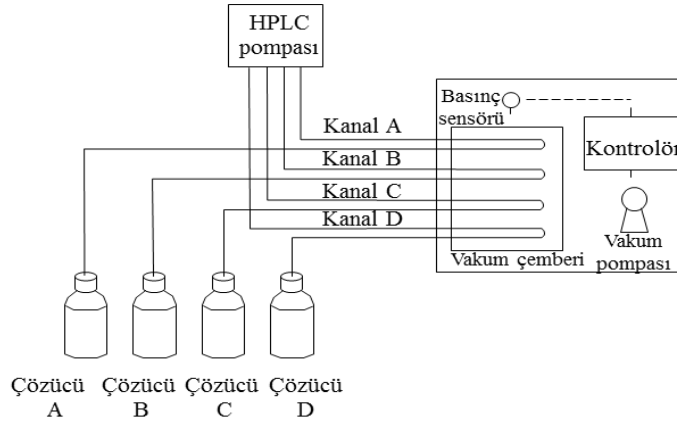
HPLC’de karşılaşılan problemlerin biri, mobil faz içinde çözünmüş havadır. Oluşan hava kabarcıkları, kolonun içine yayılabilir. Bu kabarcıklar, dedektörden geçtiklerinde, ciddi ve kabul edilemez bir gürültüye ve akış hızında azalmaya neden olurlar. Bu yüzden çözünmüş gazlar ya helyum veya azot gazıyla, ya da ultrasonik banyoda uzaklaştırılmalıdır. Tabloda oksijen gazının sudaki çözünürlüğünün helyum ve azotla karşılaştırıldığında en yüksek olduğu görülmektedir (33).

Tablo 2.2. Gazların sudaki çözünürlükleri

Gaz	Çözünürlük (mL/100 mL su) 15°C
He	0.94
N ₂	2.37
O ₂	4.89

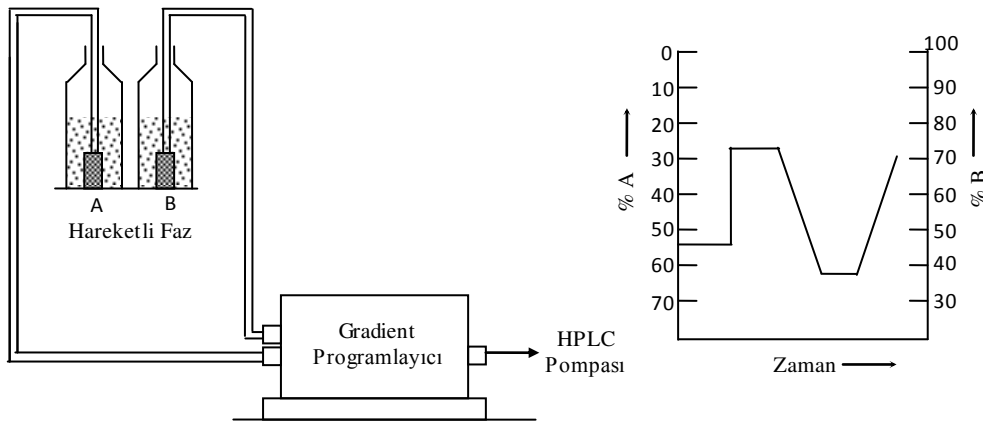
Helyum gazı kullanmak külfetli ve pahalıdır. On-line vakum degazörlerinin kullanımı daha pratik ve etkilidir. Şekil 2.4.’deki vakum degazörünü şematik olarak göstermektedir. Degazörün içindeki solvent, yarı geçirgen polimer membranlar

yoluyla, havası boşaltılmış çemberin içine geçer. Burada daha küçük gaz molekülleri elimine edilir. Günümüzde vakum degazörleri, çoğu HPLC sisteminde bulunmaktadır (34).



Şekil 2.4. On-line solvent vakum degazörünün şematik gösterimi

HPLC’de, ayırma ya izokratik ya da gradient elüsyonla gerçekleştirilebilir. İzokratik metotta solvent bileşimi ayırma boyunca değişmez. Daha kısa analiz süresinde daha iyi ayırma, genellikle eluent bileşiminin analiz boyunca aşamalı olarak değiştiği gradient elüsyon kullanılarak elde edilir. Gradient elüsyonda, polaritede farklılık gösteren iki veya daha fazla solvent sistemi kullanılır (28).



Şekil 2.5. Gradient programlama sisteminin şematik gösterimi (35).

İki tür solvent programlayıcı vardır:

1. Düşük basınç gradient programlayıcı
2. Yüksek basınç gradient programlayıcı

1. Düşük basınç gradient programlayıcı: Düşük basınç gradient programlayıcı adından da anlaşılacağı gibi, haznelerden çözücüyü atmosfer basıncında alır, gerekli oranlarda karıştırır ve sonra bu karışım, örnek valfini ve kolonu besleyen uygun bir yüksek basınç pompasına geçer.

2. Yüksek basınç gradient programlayıcı: Bu programlayıcıda, çözücü hazneden doğrudan bir pompayla çekilir. Bu, her bir solvent için bir pompa demektir. Örnek valfine ve kolona dağılan solvent karışımı yüksek basınçta oluşturulur (33).

2.3.2.1.2. Pompa Sistemi

LC sistemlerinde üç kritik kısım vardır. Bunların en önemlisi ayırmanın gerçekleştiği kolondur. İkincisi, ayrılmanın izlendiği ve her elue olan maddenin kantitatif tayinini sağlayan dedektördür. Üçüncüsü, yüksek kolon verimi ve yüksek çözünürlük sağlamak için, çok küçük partiküllerden oluşan kolon yatağından, hareketli fazı akış için zorlayan pompadır. HPLC kolonlarından iyi performans almak, dolgu maddesi olarak küçük partiküllerin kullanılması ve bu yüzden de yüksek basınç pompaları kullanılması sonucunda olur.

Sıvı kromatografisi pompaları için belli kritik özellikler vardır. Bunlar;

1. Pompa 6000 psi a kadar basınçta (en yüksek 10.000 psi) sürekli olarak çalışma yeteneğine sahip olmalıdır.
2. Akış hızı aralığı uygun olmalıdır. Tablo 2.3’de farklı tipte kolon çalışmaları için gerekli akış hızı aralıkları gösterilmektedir.
3. Doğru kalitatif ve kantitatif analiz için, akış hızı doğruluğu $\% \pm 1$ ve akış hızı kesinliği $\% \pm 0,1$ olması tavsiye edilir.
4. Pompadan gelen akış pulssuz (vurusuz) olmalıdır. Tamamen vurusuz akış, diyagram ve piston tipi pompalarda hemen hemen imkansızdır. Bununla birlikte pompa böyle vuruları azaltacak şekilde tasarlanmalıdır (33).
5. Korozyona karşı dayanıklı olmalıdır (28, 29).

Tablo 2.3. Kolonlar için akış hızları

Kolon tipi	Pompa akış hızı aralığı (mL/dk)
Küçük kolonlar (çap: 0.25-2.0 mm)	0.002-2.00
Normal analitik kolon (çap:1.5-10 mm)	0.2-10.0

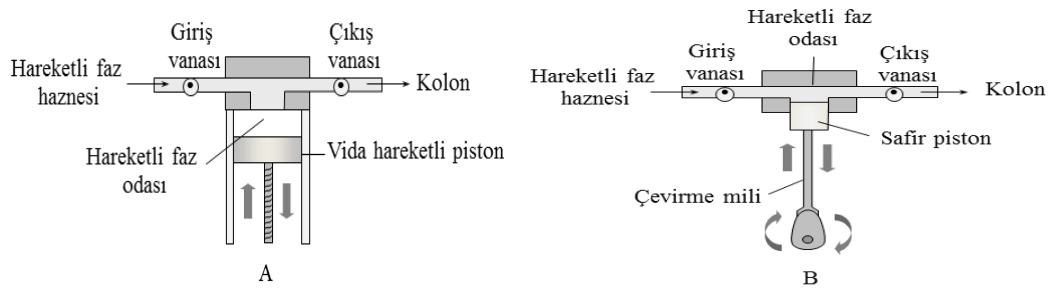
LC sisteminde başlıca iki tip pompa kullanılır:

1. Sürgülü pompalar (Şırınga tipi pompalar)

2. Pistonlu pompalar

1. **Sürgülü pompalar:** Sürgülü pompalar bir motor yardımıyla elektriksel olarak çalışan şırınga tipi bir pistondan oluşur (33). Yaklaşık 200 mL hacmi içine çeker ve sonra vurusuz olarak HPLC sistemine verir (28). Bu pompalar da, viskozite ve geri basınçtan bağımsız bir akış üretir. Avantajı vurusuz çıktı vermesidir. Dezavantajı sınırlı solvent kapasitesidir. Bu tip pompalar, ayırım için küçük mobil faz hacimleri gerektiren, mikrogözenekli kolonlara mobil faz sağlamak için kullanılır (29, 33).

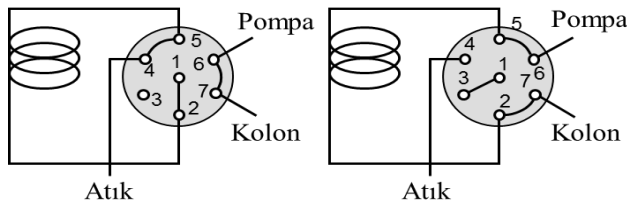
2. **Pistonlu pompalar:** Pistonlu pompalar, genellikle motor kontrollü bir pistonun ileri-geri hareketle çözücüyü pompaladığı küçük bir bölmeden meydana gelmiştir. Sırasıyla açılıp kapanan iki küresel kontrol valfi, silindirin içine ve dışına çözücü akışını kontrol eder. Çözücü doğrudan piston ile temas halindedir. Pistonlu pompaların dezavantajı vurulu bir akış üretmeleridir. Vurular kromatogramda zemin çizgisinde gürültü olarak görüleceğinden, sönümlenmesi gereklidir. Modern LC cihazları, bu vuruları azaltmak için, çift yönlü pompa başlıkları kullanırlar. Pistonlu pompaların avantajları, küçük iç hacimleri (35-400 μ L), yüksek çıkış basınçları (10000 psi'a kadar), gradient elüsyona uyumlulukları, büyük solvent kapasitesi, kolon geri basıncı ve solvent viskozitesinden büyük ölçüde bağımsız sabit akış hızlarıdır (29).



Şekil 2.6. HPLC sisteminde kullanılan şırınga tipi (A) ve pistonlu pompanın (B) şematik diyagramı (31).

2.3.2.1.3. Enjeksiyon Sistemi

Örnek enjeksiyon sistemi 1 μ L-500 μ L aralıktaki hacimlere olanak vermelidir. Mikro HPLC'de, örnek hacimleri çok daha düşüktür (<1 μ L). Sistemde enjeksiyon boyunca basınç sabit tutulmalıdır. En çok kullanılan enjeksiyon sistemi Şekilde gösterilmektedir.



Şekil 2.7. Lupa örnek yüklenmesi ve mobil faz akışıyla pompadan kolona gönderilmesi (35).

Enjeksiyon sistemi, örnek halkasına (lupuna) bağlı altı yollu bir valftan oluşur. Yükleme pozisyonunda, örnek, bir sıringayla halkanın içine enjekte edilir. Bu sırada mobil fazın pompadan kolona akışı devam etmektedir. Valfin enjeksiyon pozisyonuna çevrilmesiyle, mobil faz akışı örnek halkasının içinden geçerek örneği kolona taşır. Otomatik örnek enjeksiyon sistemleri, yüksek kesinlikle örnek verilmesi için tercih edilir (28). Çok sayıda örneğin kısa sürede analizine imkan sağlar.

2.3.2.1.4. Kolon Sistemi

Çoğu HPLC kolonları, paslanmaz çelikten veya metal bir tüpün içine yerleştirilmiş kalın duvarlı cam tüpten oluşmuştur. Kolon materyali olarak PEEK (polieter eter keton) da kullanılabilir. Kolon iç çapı 2.1 ile 7.6 mm arasında değişirken, kolon uzunluğu genellikle 1cm'den yaklaşık 30 cm'ye kadar değişir. Sıvı kromatografi kolonları 3-10 μm partikül boyutunda dolgu maddesi ile doldurulur. Standart bir kolon, 250 mm uzunluğunda, 4.6 mm iç çapındadır ve 5 μm 'lık partiküllerle doldurulmuştur. Böylece, yaklaşık olarak metre başına 50000 teorik tabaka sayısı elde edilebilir.

Daha uzun ve daha ince bir kolon ve daha küçük partikül boyutu daha iyi ayırım demektir. Bununla birlikte, kolonun geri basıncı artar. Bir pompanın kapasitesi, kolon boyutlarını ve partikül boyutunu belirler (28).

2.3.2.1.5. Kolon Dolgu Maddesi

Sıvı kromatografisinde peliküler (kabuklu) ve gözenekli partiküller olmak üzere iki tür dolgu maddesi kullanılır. Peliküler partiküller, 30-40 μm çapında küresel, gözeneksiz, cam veya polimerik taneciklerdir. İnce, gözenekli silika, alumina, polistiren-divinilbenzen sentetik reçinesi veya iyon değiştirici bir reçine tabakası bu taneciklerin yüzeyine yerleştirilir. Küçük gözenekli mikropartiküller, bu büyük peliküler partiküllerin yerini almıştır.

LC için gözenekli dolgu maddeleri, 3-10 µm çapında, gözenekli mikropartiküllerden meydana gelir. Bu partiküller, silika, alumina, sentetik reçine polistiren-divinilbenzen veya iyon değiştirici bir reçineden oluşur. Silika sıvı kromatografide en yaygın olan dolgu maddesidir (29).

1. Silika: Silika-bazlı malzemeler yüksek kolon verimi sağlar ve bunlar yüksek mekanik güce sahiptirler.

Bir silika partikülün yüzeyi uygun kimyasal reaksiyonlarla kolaylıkla modifiye edilebilen siyanol (SiOH) gruplarıyla kaplıdır. Bir silika partikülün en önemli özellikleri, şekli, boyutu, gözenekliliği, gözenek boyutu ve yüzey alanıdır. Bu özellikler, üretim süreçlerine bağlıdır. Farklı üreticilerin partikülleri, oldukça farklı karakteristik ve performans gösterebilirler (28).

2. Polimerik Partiküller: Son zamanlarda polimerik malzemelerin HPLC’de kullanımı artmıştır. Bunun bir nedeni polimer partiküllerin pH kararlılığının iyi olmasıdır. Tüm pH aralığında kullanılabilirler. Silika ile karşılaştırıldığında bu maddelerin dezavantajı düşük kolon etkinliğidir. Buna ek olarak; bazı polimerik malzemeler çok yüksek basınca dayanamazlar veya solvent tarafından şişebilirler.

En sık kullanılan polimerik maddeler polistiren-divinilbenzen ve metakrilattır. Polimerik dolgu maddeleri özellikle iyon kromatografisinde yaygın olarak kullanılır (28).

2.3.2.1.6. Dedektörler

Sıvı kromatografide dedektörler iki grupta toplanırlar:

- 1. Maddeye Yönelik (Spesifik) Dedektörler:** Hareketli faz içindeki maddenin özelliklerini tayin ederler (Maddenin absorpsiyonu, floresansı veya difüzyon akımı gibi)
- 2. Çözeltiye Yönelik (Genel) Dedektörler:** Mobil fazın genel bir özelliğinin tayin ederler (kırılma indisi veya iletkenliği gibi). Burada madde, hareketli fazın özelliklerindeki değişimle dolaylı olarak belirlenir (28, 29).

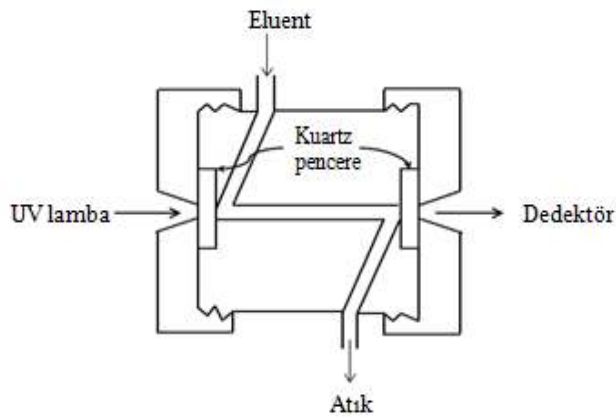
Tablo 2.4. Yaygın HPLC dedektörleri ve özellikleri (34).

Dedektör	Analit/Özellikler	Duyarlılık
UV/GB absorbans	Spesifik: UV kromoför gruplu bileşikler	ng
Diyot dizisi	Spesifik: UV/GB dedektörleriyle aynı, UV spektrumu da sağlar	ng
Floresans	Spesifik: Doğal floresans maddeler veya floresan etiketli bileşikler	fg-ng
Kırılma indisi	Genel: Polimerler, şekerler, trigliseritler, organik asitler, ekşiyanlar.	0.1-10 µg
Evaporatif ışık-saçma	Genel: Uçucu olmayan veya yarı uçucu bileşikler, gradiente uyumludur	ng'dan düşük
Elektrokimyasal	Spesifik: Elektro-aktif bileşikler	pg
İletkenlik	Spesifik: Anyonlar ve kationlar, organik asitler, yüzey aktif maddeler	ng ppm-ppb
Radyoaktivite	Spesifik: Radyoaktif-etiketlenmiş bileşikler	Düşük düzeyler
Kütle spektrometre	Hem genel hem spesifik: Kesin tespit	fg-pg-ng

2.3.2.1.6.1. UV/GB Absorbans Dedektörleri

En fazla kullanılan dedektörlerdir. Tıpkı bir UV/GB absorbans dedektörü, döteryum lambası ve küçük bir akış hücresine ışığı odaklamak için bir monokromatörden oluşur (34).

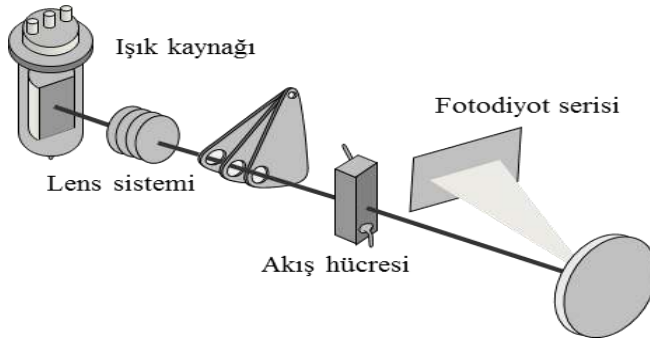
Şekil 2.8'de Z şeklinde sıvı akış hücresi şekli görülmektedir. Bu hücre kromatografik kolon çıkışında eluentin absorpsiyonu ölçmek için kullanılır. Pik genişlemesini önlemek için kuvvet hacmi azaltılır ve 1-10 µL arasında tutulur. Hücresinin yol uzunluğu 2 ile 10 mm arasında değişir. UV bölgede ölçümler için hücre pencereleri kuartz olmalıdır.

**Şekil 2.8.** HPLC'de UV dedektörlerdeki sıvı akış hücresi (28).

UV/GB absorbans dedektörlerinin önemli performans karakteristikleri, duyarlılıkları ve doğrusal aralığının geniş olmasıdır (34).

2.3.2.1.6.2. Fotodiyot Dizisi Dedektörü (PDA)

Fotodiyot serisi dedektörü, çok kanallı bir dedektördür. UV kaynağından çıkan ışık akış hücresinden geçene kadar dalgaboyu bileşenlerine ayrılmaz (35). Akış hücresinden geçtikten sonra her bir dalgaboyunda ışığın şiddetini ölçen diyod dizisi üzerinde dağılır (şekil altta). PDA'nın sahip olduğu 512 ila 1024 diyot bütün dalgaboylarında tarama yaparak sürekli spektral bilgi verir (34). Fotodiyot serisi dedektörü tek bir analizle farklı dalgaboylarında eşzamanlı kromatogramların toplanmasına imkan sağlar (36). Bilgi absorbansın alıkonma zamanı ve dalgaboyuna bağlı olarak kaydedilmesiyle üç boyutlu gösterim şeklinde elde edilir (28).



Şekil 2.9. PDA'nın şematik gösterimi (31).

2.3.2.1.6.3. Floresans Dedektörleri

UV dedektörlerle karşılaştırıldığından 1000 kat daha yüksek hassasiyete sahiptirler (28). Bir floresans dedektörü, civa buhar lambası veya ksenon yüksek basınç lambası, uyarma ve emisyon dalgaboylarını seçmek için, uyarma ve emisyon monokromatörü, kare akış hücresi ve yayılan ışımayı güçlendirmek için bir fotoçoğaltıcıdan oluşur (34).

2.3.2.1.6.4. Kırılma İndisi Dedektörleri

Bir kırılma indisi dedektörü, saf eluent ile örnek bileşenini içeren eluent arasındaki kırılma indisi farkını ölçer. Hemen hemen bütün maddelere cevap verir. Fakat bu dedektörler diğer dedektörlere göre daha düşük hassasiyete sahiptirler. Sıcaklığa büyük ölçüde bağımlıdır ve bu yüzden sabit sıcaklık sağlanmalıdır ($\pm 0.001^\circ\text{C}$). Mobil faz içindeki değişimlere duyarlı olduğundan, gradient elüsyon için uygun değildir. Kırılma indisi tayini, şeker, trigliserit, organik asit, farmasötik

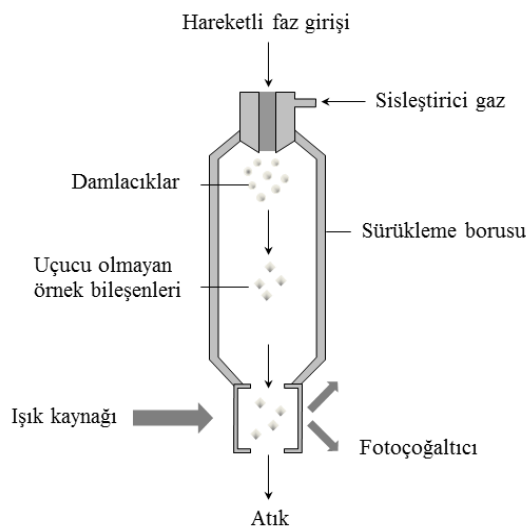
katkı maddeleri ve polimerler gibi düşük kromoforik aktivite gösteren bileşikler için kullanılır (28, 29, 34).

2.3.2.1.6.5. Elektrokimyasal Dedektörler

Elektrokimyasal dedektörler, en hassas dedektörlerden birisidir. Bu dedektör, indirgenebilen ve yükseltgenebilen maddelere cevap verir. Elektriksel çıktısı, elektrot yüzeyinde meydana gelen reaksiyonların neden olduğu elektron akışından kaynaklanır (33). Elektrokimyasal tayin için amperometri, voltametri, kulorimetri ve iletkenlikten yararlanılabilir (28). Elektroanalitik prosedürler henüz optik dedektörler kadar kapsamlı kullanılsa da, yüksek hassasiyet, kolaylık ve yaygın uygulanabilirlik gibi pek çok avantaja sahiptir. Elektrokimyasal dedektörlerin başlıca kısıtlaması, gradient elüsyona uyumlu olmamasıdır (29).

2.3.2.1.6.6. Evaporatif Işık Saçma Dedektörü (ELSD)

HPLC için yeni tip dedektörlerden biridir. Bu dedektörde, kolondan çıkan eluent sisleştiriciye geçer. Burada azot veya hava akışıyla ince bir sise dönüştürülür. Daha sonra bu ince zerrecikler, mobil fazın buharlaştığı ve ince analit partiküllerinin oluştuğu, sıcaklık kontrollü bir sürüklenme borusuna taşınır. Bir lazer veya polikromatik ışın, analit partikül bulutunun içinden geçer (29). Saçılan ışın bir fotoçoğaltıcıyla tayin edilir (34). Bu yüzden ELS dedektörleri, uçucu olmayan analit ve uçucu mobil fazla sınırlandırılmıştır. Bununla beraber, gradient elüsyonla kullanıma uygundur (36). Ayrıca, kırılma indisi dedektöründen önemli ölçüde daha hassastır (gözlenebilme limiti 0.2 ng/μL) (29).

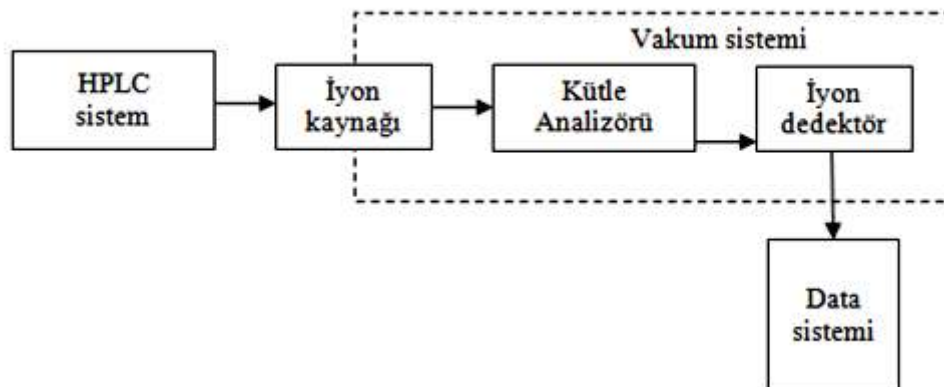


Şekil 2.10. Evaporatif ışık saçma dedektörünün şematik gösterimi (31).

2.3.2.1.6.7. Kütle Spektrometresi (MS)

HPLC'nin çok yönlülüğü ve kütle spektrometresinin teşhis gücünün birleşmesiyle oluşan en son analitik teknik LC/MS'dir (34). Bununla birlikte, bu iki tekniğin birleştirilmesinde, önemli problemler vardır. Kütle spektrometresi için, gaz fazında örnek gereklidir. Sıvı kromatografisinin çıktısı, bir çözücü içinde çözünmüş sıvıdır. İlk olarak bu solvent buharlaştırılmalıdır. Buharlaştırıldığında da, LC solventi, GC'deki taşıyıcı gazdan 10-1000 kat daha fazla gaz hacmi oluşturur. Bundan dolayı, solventlerin çoğu uzaklaştırılmalıdır.

Solvent uzaklaştırma ve LC kolon arayüzey problemlerini çözmek için farklı cihazlar geliştirilmiştir. Bugün en popüler yaklaşımlar, düşük akış hızı atmosferik basınç iyonlaştırma tekniğini kullanır. Şekil 2.25'de tipik bir LC/MS sisteminin blok diyagramı gösterilmektedir. HPLC sistemleri, çoğunlukla $\mu\text{L}/\text{dk}$ akış hızında nanoölçekli kapiler LC sistemleridir. Alternatif olarak, bazı arayüzeyler, geleneksel HPLC'ler için tipik olan 1-2 mL/dk akış hızına imkan verir. En yaygın iyonlaştırma kaynakları elektron sprey iyonlaştırma ve atmosferik basınçta kimyasal iyonlaştırmadır. HPLC'nin kütle spektrometresi ile kombinasyonu yüksek seçicilik sağlar. Çünkü ayrılmayan pikler, yalnızca seçilen kütlelerin izlenmesiyle izole edilebilir. Bu kombinasyon molekül kütlesi, yapısal bilgi ve kesin kantitatif analiz de sağlar. Bazı kompleks karışımlar için LC/MS kombinasyonu yeterli çözünürlük sağlamaz. Son yıllarda, tandem kütle spektrometreleri oluşturmak için iki veya daha fazla kütle analizörü bağlanması uygulanabilir hale gelmiştir (29).



Şekil 2.11. LC/MS sisteminin blok gösterimi

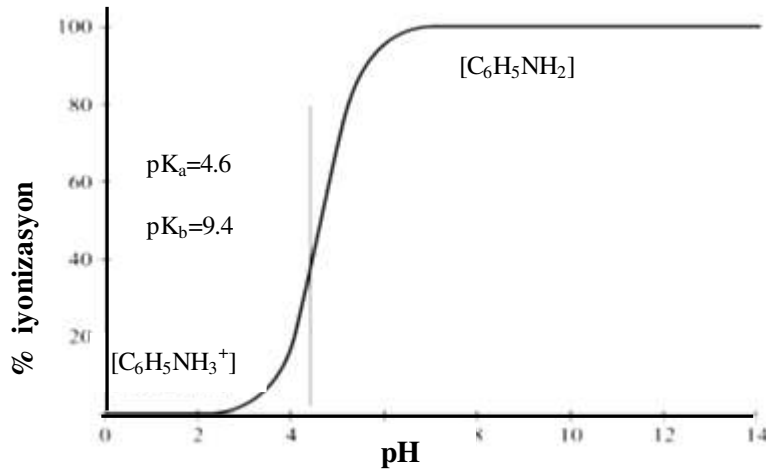
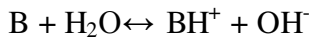
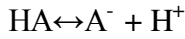
2.3.3. Ters Faz Kromatografide Metot Optimizasyonu

2.3.3.1. HPLC Ayırmalarında pH Etkisi

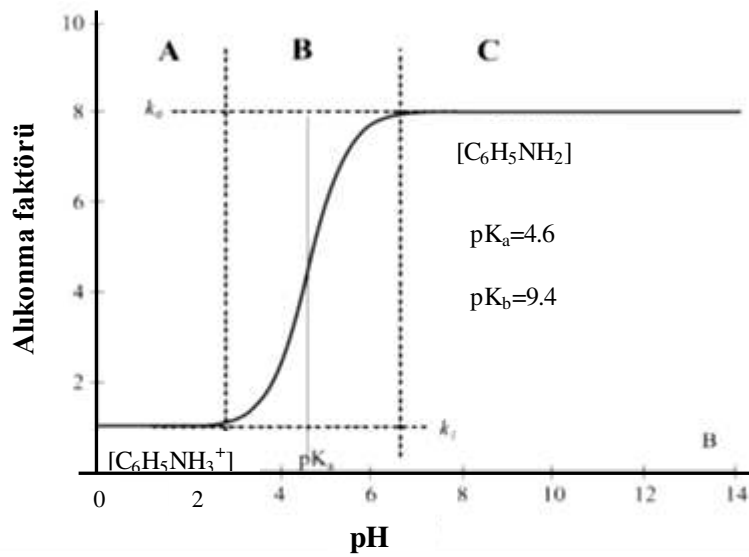
İlaç moleküllerinin çok büyük kısmı zayıf asit/baz karakterdedir ve iyonizasyon derecelerini iki faktör belirler:

- Molekölün yapısı, yani pK_a değeri
- Bulunduğu ortamın pH değeri

Zayıf asitlerde ortamın pH'sı arttıkça iyonize fraksiyon, zayıf bazlarda ise iyonize olmayan fraksiyon artmaktadır:



Şekil 2.12. Bazık bir analitin iyonizasyonuna pH'nın etkisi



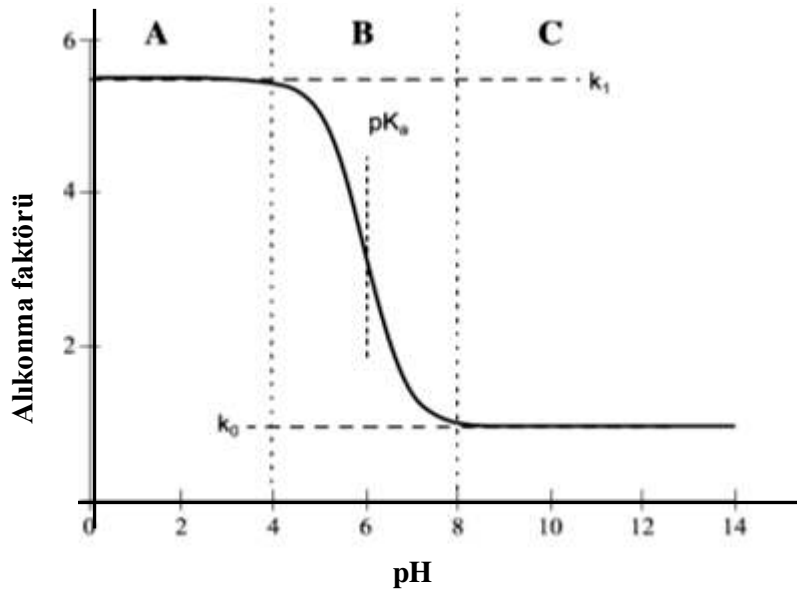
Şekil 2.13. Bazık bir analitin alkonması üzerine pH'nın etkisi

Mobil fazın pH'sının bazık bileşenlerin alıkonması üzerine etkisi üç bölgeye ayrılarak incelenebilir (Şekil 2.13).

A Bölgesi: Bu bölgede en düşük alıkonma zamanını gösteren tamamen protonize olmuş analit (katyonik form) en hidrofilik formdadır. Hidrofobik sabit fazla etkileşimi yok denecek kadar azdır. Protik solventlerle çözülme eğilimi daha fazladır. Bu iyonik bileşiklerin alıkonmasında önemli ölçüde azalmaya neden olur.

B Bölgesi: Kısmi protonlaşma bölgesidir. Analitin mobil fazda iki formda da bulunması, zayıf pik şekline ve kararsız alıkonmaya neden olur. Analit nötral formda sabit fazla daha güçlü etkileşime gireceğinden, daha uzun süre alıkonur. Bu durum kromatografik bandın önünde, protonlanmış moleküllerin artan oranıyla mobil fazdaki iyonlaşma dengesinin kaymasına neden olur. Bu bölgede, mobil faz pH'sındaki küçük bir değişme, analitin alıkonma zamanını önemli ölçüde kaydırır.

C Bölgesi: Bu bölgede analit en uzun alıkonma zamanını gösteren nötral formdadır (en hidrofobik durum) (37).

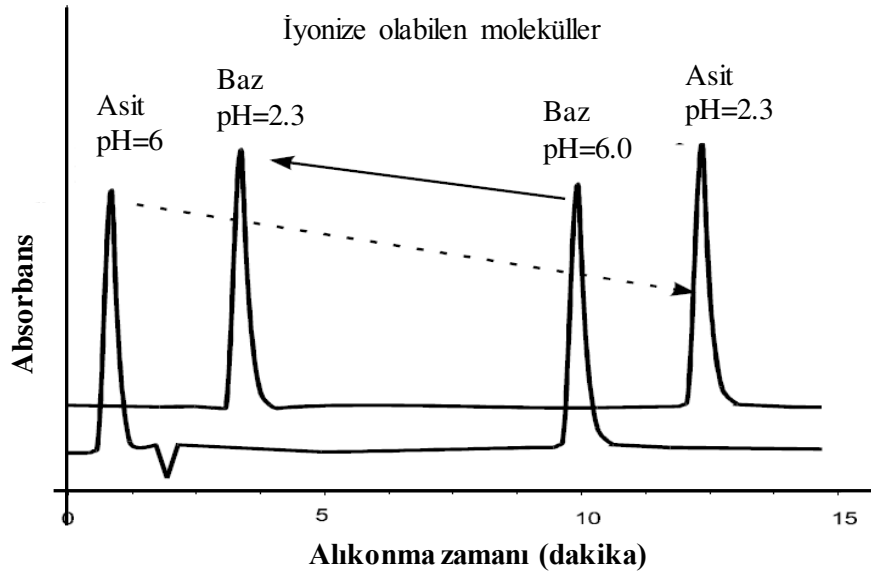


Şekil 2.14. Asidik bir analitin alıkonması üzerine pH'nın etkisi

Asidik bileşikler için de benzer alıkonma eğrileri elde edilebilir. Burada alıkonma davranışı bazık bileşiklerin ayna görüntüsü şeklindedir (Şekil 2.14).

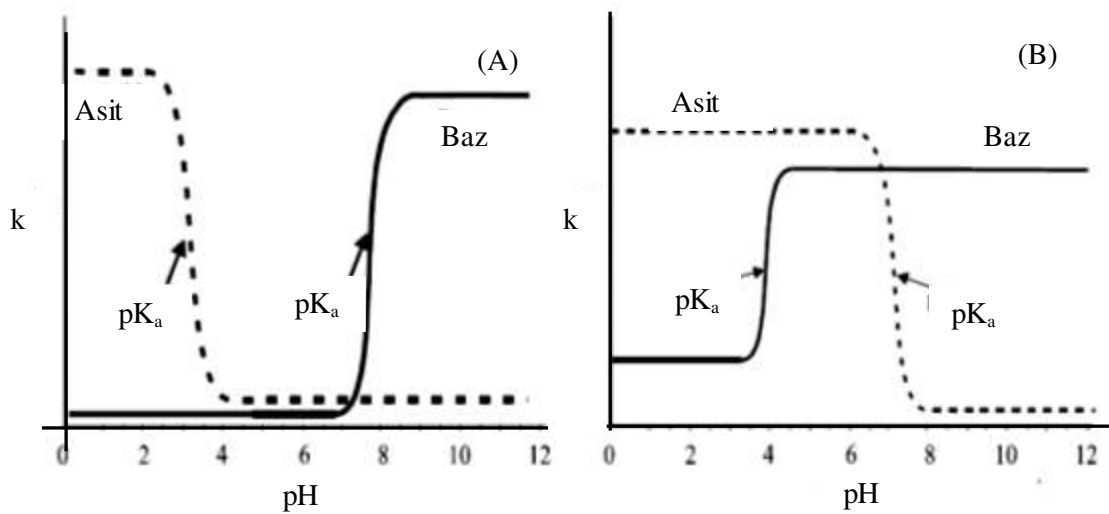
Karışımındaki analitlerin pK_a değerinin bilinmesi çok önemlidir. Örneğin, biri asidik, biri bazık iki analit alalım. Bu iki analitten oluşan bir karışım pH 2.3 ve pH

6.0'da analiz edildiğinde, bazik analit pH 2.3'de daha az, pH 6.0'da daha çok alıkonacaktır. Asidik bileşen ise pH 2.3'de daha çok ve pH 6.0'da daha az tutunacaktır (Şekil 2.15).



Şekil 2.15. Mobil faz pH'sının iyonize olabilen bileşiklerin alıkonma zamanına etkisi

Asidik bileşenler fenolik bileşikler gibi ($pK_a=8-10$) zayıf asit veya karboksilik asitler gibi ($pK_a=3-4$) kuvvetli asitler olabilir. Bazik bileşenler de aniline gibi zayıf baz ($pK_a=4.6$) veya sekonder veya tersiyer aminler gibi ($pK_a=7-10$) kuvvetli bazlar olabilir. Şekil 2.16 zayıf/kuvvetli asidik ve zayıf/kuvvetli bazik bileşikler için pH'ya karşı teorik alıkonma faktörünü göstermektedir.



Şekil 2.16. Asidik ve bazik bileşikler için pH'ya karşı teorik alıkonma faktörü

(A) Kuvvetli asit ve kuvvetli baz (B) Zayıf asit ve zayıf baz (38).

Ters faz kromatografisi, kolonu kısa sürede terketmeleri nedeniyle iyonize olmuş bileşiklerin ayırımında genellikle yeterli olmaz. Bu durumlarda mobil fazın pH'sı ayarlanarak bileşiklerin iyonize olmayan forma geçmeleri sağlanır ve ayırım iyonize olmayan formlar üzerinden gerçekleştirilir.

Sonuç olarak mobil fazın pH'sı:

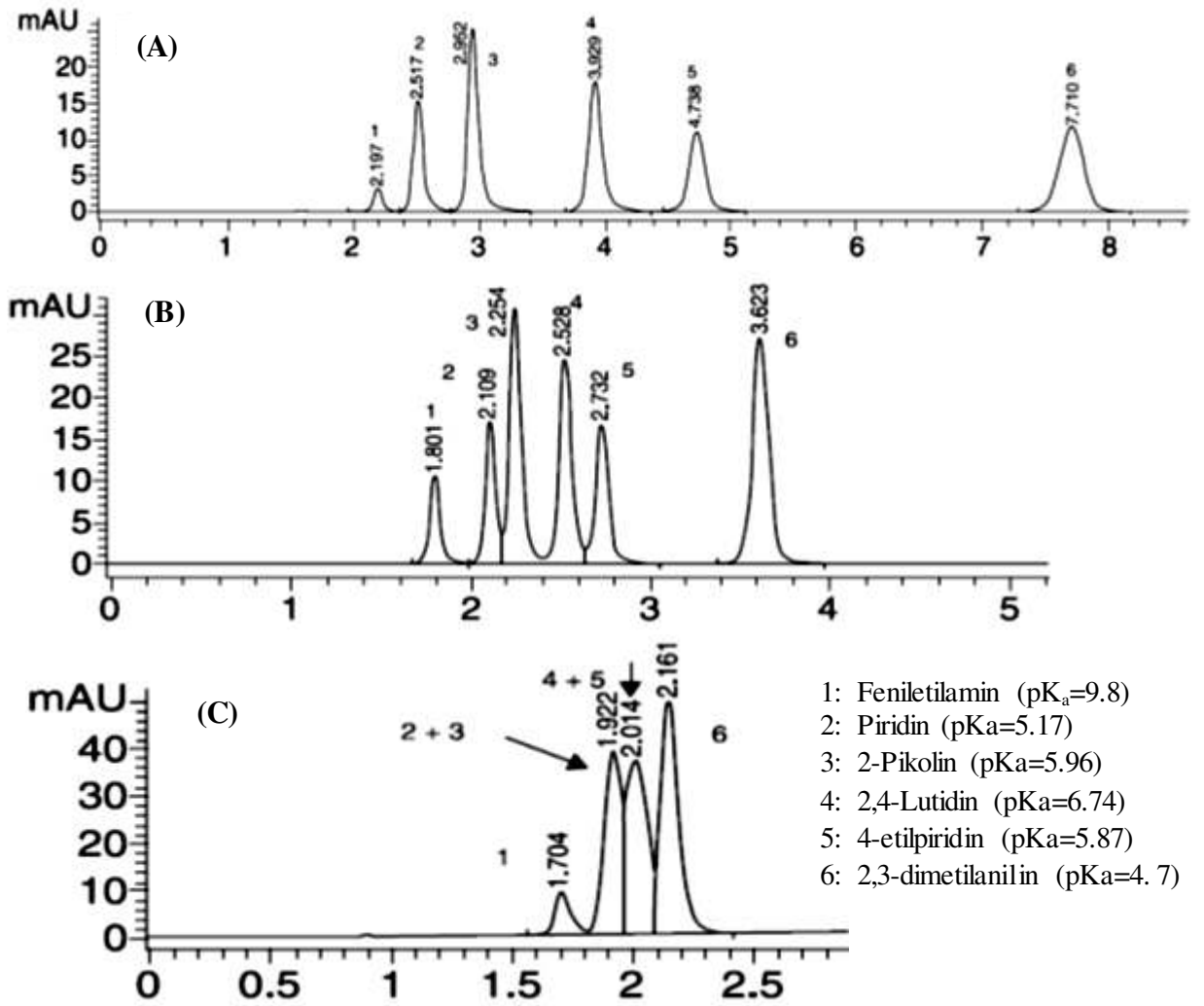
- analitin iyonizasyonu ve sabit fazla etkileşmesi
- sabit fazın yapısı, özellikleri, bağlı fazın stabilitesi ve silika matrisin dissolüsyonu üzerinde etkilidir.

Bu nedenle pH, seçicilik ve alıkonma zamanının ayarlanmasında ve ayırcılığın optimizasyonun da etkin bir araçtır. Ancak bu amaçlarla pH'da yapılacak değişikliklerin, ters faz kolon materyalinin dayanıklı olduğu pH sınırları (pH : 2-8) içinde kalması gerektiği unutulmamalıdır. Bağlı faz üretim teknolojisindeki son gelişmelerle üretilen yeni kolonlarda çalışma aralığı pH 1-12'ye kadar genişletilmiştir.

2.3.3.2. Organik Eluent Bileşiminin Analitin İyonizasyonuna ve Ayırmaya Etkisi

Çözeltideki organik molekül içeriğinin artmasıyla, ayrışma azalır (dielektrik sabitinin azalmasıyla, ayrılmış iyonların kararlılığı azalır), böylece çözeltinin pH değeri artar. Espinose ve arkadaşları tarafından (39), organik içerikteki bir artışın mobil fazın dielektrik sabitini azaltacağı belirtilmiştir. Daha düşük dielektrik sabiti asidin iyonlaşma sabiti K_a 'nın daha düşük olması ve sonuç olarak daha büyük pK_a değerleri elde edilmesidir. Organik içeriğin, asidik analitin pK_a değerini artırarak ayrışma sabitini etkilemesi beklenir. Diğer taraftan organik eluent bazı analitlerin ayrışmasını, pK_a değerini azaltacak şekilde ters yönde etkileyecektir.

Genellikle nötral bileşiklerin seçiciliği organik kompozisyonun değişmesinden etkilenmez. Bununla birlikte iyonlaşabilen bileşikler için, değişen organik bileşim analitin iyonlaşma durumunda değişmeye neden olabilir ve seçicilikte değişikliklere yol açar. Örneğin Şekil 2.17'de gösterilen deneylerde organik kompozisyon %30 asetonitrilden, %80 asetonitrile yükseltildiğinde seçicilikte göze çarpan değişiklikler gözlenmiştir (37).



Şekil 2.17. Mobil fazdaki organik kompozisyonun değişimine bağlı olarak kromatogramdaki değişimler. (A) %30 asetonitril:%70 20 mM fosfat, pH 7. (B) %50 asetonitril:%50 20 mM fosfat, pH 7. (C) %80 asetonitril:%20 20 mM fosfat, pH 7.

Bu durum hem mobil fazın sulu kısmının pH'sındaki değişmeye, hem de organik bileşenin eklenmesi üzerine analitin iyonizasyonundaki değişmeye bağlanabilir.

2.3.4. Kromatografide Sistem Uygunluk Testleri

Sistem uygunluk parametreleri, analiz esnasında sistemin doğru olarak işlediğini göstermek için incelenmelidir. Bu parametreler sırasıyla açıklanmıştır. (40).

2.3.4.1. Kapasite faktörü (k')

Kapasite faktörü kromatografide çok kullanılan bir parametredir. Bu faktörle analizi yapılan kolon içinde göç etme hızları tayin edilir. Bir tür için kapasite faktörü (k') birden küçükse, elüsyon süresi çok kısa olur dolayısıyla türün alıkonulma zamanını doğru olarak ölçmek mümkün olmaz. Buna karşılık, 10-15 olursa, elüsyon süresi çok uzun olur. İyi bir kromatografik ayırmada, türler için kapasite faktörlerinin 2-10 olması iyi sonuç verir.

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (2.1)$$

t_R : Bileşiğin alıkonma zamanı

t_0 : Ölü zaman (tutunmayan bileşiğin alıkonma zamanı)

2.3.4.2. Seçicilik Faktörü (α)

Bir kolonda A ve B gibi iki tür için seçicilik katsayısı

$$\alpha = \frac{K_B}{K_A} \quad (2.2)$$

şeklinde tanımlanır; daha kuvvetli tutunan B türü için partiyon oranı K_B , daha az kuvvetle tutunan veya daha hızlı kolonda elüe edilen A türü için ise aynı sabit K_A dir. Bu tanıma göre α daima birden büyüktür.

2.3.4.3. Ayırcılık (R)

R bir numunede bulunan bileşenlerin birbirinden ne derece ayrıldıklarını gösteren kantitatif bir terimdir. A ve B bileşeni için bu terim şu şekilde ifade edilir:

$$R = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{k'_B}{1+k'_B} \right) \left(\frac{\alpha-1}{\alpha} \right) \quad (2.3)$$

R değerinin 1.5 olması iki bileşiğin tamamen ayrıldığını gösterir.

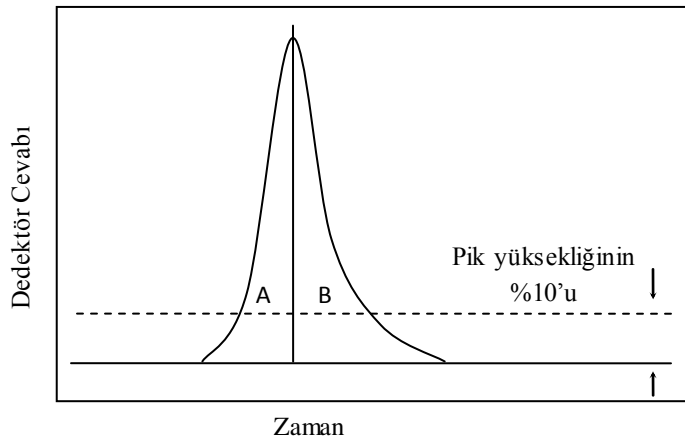
2.3.4.4. Kolon Etkinliği (Teorik Plaka Sayısı)

Bir ayırmada kolon etkinliği, sabit fazın performansına dayanır. Teorik tabaka sayısı kromatografik kolon etkinliğini kantitatif olarak ifade etmek için kullanılır. Bir kromatografik kolonun etkinliği tabaka sayısı ile artar. N değeri, kromatogramlardan ölçülen alıkonma süresi ile o pikin taban genişliğinden hesaplanır. N değeri 2000'den daha büyük olmalıdır.

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

2.3.4.5. Kuyruklanma Faktörü (T) ve Asimetri Faktörü

Kuyruklanma faktörü pik asimetrisini gösterir.



Şekil 2.18. Pik kuyruklanma faktörünün tayini

$$\text{Pik kuyruklanma faktörü} = \frac{A + B}{2A} \quad (2.5)$$

Pik kuyruklanma faktörünün 1 olması pikin simetrik olduğunu gösterir. Bu değer, $0.5 \leq T \leq 2$ aralığında olmalıdır,

$$\text{Pik asimetri faktörü} = \frac{B}{A} \quad (2.6)$$

Pik asimetri faktörü değerinin >1.5 olması kolonun değişmesi gerektiğini gösterir. (36).

2.3.5. Analitik Yöntem Validasyonu Parametreleri

Analitik işlemlerin validasyonunun amacı, bilimsel bütünlük ve uygunluğun sağlanması, gereken amaç için yeterli güvenilir ve tekrarlanabilir sonuçların alınmasıdır (41).

Bir analitik metodun validasyonu, laboratuvar çalışmaları ile belirlenen süreçtir. Validasyon, kelime anlamıyla onaylama, doğrulama anlamına gelir ve uygulanan analitik yöntemin onaylanabilir oluşu, onun valide edilmesine bağlıdır. Validasyon bir metodun veya ölçüm sisteminin belirlenen amaca uygun olduğunun test edilerek yazılı kayıtlarla onaylanmasıdır (42, 43).

Kimyasal analiz yöntemleri, analizi yapanların ihtiyaçlarına cevap verecek belirli kriterlere sahip olmalıdır.

2.3.5.1. Seçicilik, Özgünlük (Selectivity)

Seçicilik ve özgünlük terimleri genellikle birbirlerinin yerine kullanılır. Seçicilik, bir metodun, ilgilenilen analiti, bir örnek matrisindeki diğer bileşenler varlığında ve deneyde belirtilen koşullar altında, diğer bileşenlerin girişimi olmaksızın doğru ve spesifik olarak tayin etme kabiliyetidir (44). Bir analit veya analit grubu için tamamen seçici olan bir metodun, spesifik (özgün) olduğu söylenir (45).

2.3.5.2. Kesinlik (Precision)

Yöntemin kesinliği, aynı homojen örnekten alınan çoklu örneklerden elde edilen bir seri ölçüm arasındaki uyuşmanın yakınlığıdır (46, 47). Biyoanalitik bir metodun kesinliği, rastgele hatanın bir ölçüsüdür ve aynı örneğin tekrarlanan ölçümleri arasındaki uyuşma olarak tanımlanır. Yüzde varyasyon katsayısı veya tekrarlanan ölçümlerin relatif standart sapması olarak ifade edilir (48).

$$\%CV = (\text{standart sapma} / \text{ortalama}) \times 100 \quad (2.7)$$

Kesinlik 3 seviyede değerlendirilebilir: Tekrarlanabilirlik, orta kesinlik ve tekrar üretilebilirlik.

Tekrarlanabilirlik, aynı analizcinin, aynı metodolojiyi, aynı ekipmanı ve aynı reaktifleri kullanarak, aynı zaman aralığında örneğin gün içinde tekrar etme kabiliyetini tanımlar (49).

Kesinlik, 3 farklı matrikste, derişim başına minimum 5 tayin yapılarak ölçülmelidir. Çalışılan konsantrasyon aralığında 2 veya 3 derişim önerilir. En azından 5 veya 6 tayin, 2 veya 3 farklı konsantrasyonda yapılmalı ve yakın standart farklılığı hesaplanmalıdır.

Orta kesinlik, aynı metodolojinin farklı günler, farklı analizciler, farklı cihazlar, farklı tedarikçilerden alınan standartlar ve reaktifler gibi farklı koşullarda tekrarlanma kabiliyetidir (50, 51).

ICH tarafından tanımlanan tekrar yapılabilirlik, laboratuvarlar arasındaki kesinlik olarak ifade edilir. Amaç, farklı laboratuvarlarda aynı sonuçları veren bir metot geliştirilmesidir.

2.3.5.3. Doğruluk (Accuracy)

Analitik yöntemin doğruluğu, yöntem ile elde edilen deneme sonuçlarının gerçek değere yakınlığıdır. Gözlenen uyuşmanın yakınlığı, toplam hata denilen sistematik ve rasgele hataların toplamı temeline dayanır (52, 53).

Doğruluk için gerçek değer birçok farklı yoldan elde edilebilir. Bu yollardan biri; yöntemin sonuçlarını, yerleşik yöntemlerden birinin sonuçları ile karşılaştırmaktır (43). Diğer sertifikalı referans materyal (CRM) ile karşılaştırmaktır. Doğruluk çalışmaları “Spiked” örneklerle (geri alma-recovery testleri) de yapılabilir.

Doğruluk, konsantrasyon başına minimum 5 tayin yapılarak ölçülmelidir. Muhtemel konsantrasyon aralığında minimum 3 derişim önerilir.

2.3.5.4. Geri Kazanım (Recovery)

Bir testteki analitin geri kazanımı, saf güvenilir standartın doğru konsantrasyonu için elde edilen dedektör cevabıyla, biyolojik matrikse eklenen ve oradan ekstrakte edilen bir miktar analitten elde edilen dedektör cevabının karşılaştırılmasıdır. Analitin geri kazanımı %100 olmak zorunda değildir, fakat bir analitin ve iç standartın geri kazanım aralığı tutarlı, kesin ve tekrarlanabilir olmalıdır.

$$\text{Geri kazanım} = \frac{\text{Matrikse eklenen analitin cevabı (işlem görmüş)}}{\text{Saf standart analitin cevabı (işlem görmemiş)}} \quad (2.8)$$

2.3.5.5. Kalibrasyon/ Standart Eğrisi (Calibration/Standard Curve)

Ölçüm aralığı; yöntemin kesinlik, gerçeklik gibi kriterleri kabul edilebilir düzeylerde karşılayabildiği analit konsantrasyonu aralığıdır. Bir kalibrasyon eğrisi,

analitin bilinen konsantrasyonları ile cihaz cevabı arasındaki ilişkidir. Bir kalibrasyon eğrisi örnekteki her bir analit için üretilmelidir. Cevap ve konsantrasyon arasındaki ilişkiyi tanımlamak için yeterli sayıda standart kullanılmalıdır. Doğrusallık beş veya daha fazla standartın, üç ila altılık seriler halinde enjekte edilmesiyle tayin edilir. Cevap analit konsantrasyonu ile orantılı olmalıdır. Sonuçlara uygulanan lineer regresyon eşitliği sıfırdan çok farklı olmayan bir kesim noktasına sahip olmalıdır. Sıfırdan farklı bir kesim noktası elde edilirse, bunun metodun doğruluğu üzerine etkisi olmadığı gösterilmelidir (54).

2.3.5.6. Hassasiyet (Sensitivity)

Analitik bir metodun hassasiyeti kalibrasyon doğrusunun eğiminden tayin edilir. Eğer konsantrasyondaki küçük değişimler, cevap fonksiyonunda daha büyük değişimlere neden oluyorsa, metodun hassas olduğu söylenir. Analitin bir birim artışının, sinyal büyüklüğüne etkisini gösteren bir kriterdir.

$$\text{Hassasiyet} = \frac{\text{Ölçüm sinyali}}{\text{Konsantrasyon}} \quad (2.9)$$

2.3.5.7. Saptama Alt Sınırı (LOD) (Limit of Detection)

Bir biyoanalitik prosedürün analiti, sistemin gürültü sinyalinden güvenilir olarak farklılandığı en düşük derişime karşılık gelen sinyaldir. LOD'nin tayini, görerek sinyal:gürültü oranının ölçülmesiyle veya kör (blank) örneğinin cevabının standart sapmasının ölçülmesiyle gerçekleştirilir. Kesinliği (%CV) nin %20'den küçük veya eşit olması gerekir. Elde edilen pikler, kromatografik kriterlere uygun olmalıdır (pik şekli, pik simetrisi) (55).

LOD kromatografi gibi sürekli kayıt alan teknikler için, gürültü seviyesinin 3 katı olarak alınır. Diğer taraftan IUPAC'a göre LOD,

$$Y_{\text{LOD}} = Y_{\text{blank}} + 3\sigma_{\text{blank}} \quad (2.10)$$

eşitliğini kullanarak hesaplanır (56).

Y_{blank} = blank sinyalinin ortalama değeri

σ_{blank} = blank sinyalinin standart sapması

Bunlar minimum 10 bağımsız kör örneğinden alınan ölçümlerle elde edilir. Alternatif olarak, eğer kör örneği, herhangi bir sinyal üretmiyorsa (örneğin voltametri), analitin kabul edilebilir en düşük derişimine getirilen 10 bağımsız blank örneği ölçülür ve

$$Y_{LOD}=3 \sigma \quad (2.11)$$

olarak hesaplanır. σ alınan bir set ölçümün standart sapmasıdır.

Bununla birlikte, LOD'nin sinyal birimi olarak ifade edilmesi mantıklı değildir. LOD'nin analit konsantrasyon biriminde kullanılması daha çok tavsiye edilir. Bu yüzden, Y_{LOD} değerleri, kalibrasyon fonksiyonu kullanılarak Z_{LOD} 'ye çevrilirse;

$$Y = a + bZ$$

a: kesim noktası

b: eğim

$$Z_{LOD} = \frac{Y_{LOD} - a}{b} \quad (2.12)$$

Daha sonra, doğrunun sıfır noktasından geçtiği düşünülürse, son LOD değeri

$$Z_{LOD} = \frac{3\sigma_{blank}}{b} \quad (2.13)$$

dir (57).

2.3.5.8. Alt Tayin Sınırı (LOQ) (Limit of Quantification)

Uygun kesinlik ve doğrulukla örnek içindeki analitin tayin edilebildiği en düşük miktar ya da örnek içindeki analitin doğru ve kesin olarak ölçülebildiği en düşük derişimdir. Kromatografi gibi sürekli kayıt alan teknikler için, genellikle gürültü düzeyinin 10 katı olarak kabul edilir (57).

ICH Q2R1 tarafından önerilen diğer yaklaşımlar “örneğin standart sapması ve eğim” e dayanır (50). Alt tayin sınırı,

$$Z_{LOQ} = \frac{10\sigma}{b} \quad (2.14)$$

olarak ifade edilir.

σ = cevabın standart sapması

b= kalibrasyon eğrisinin eğimi

Analitik zemin cevabının büyüklüğü, uygun sayıda blank (kontrol, boş) örneğinin analiz edilmesiyle ve bu cevapların standart sapmasının hesaplanmasıyla gerçekleştirilir. Analit piki cevabı % 20 kesinlik ve % 80-120 doğrulukla elde edilmelidir.

2.3.5.9. Sağlamlık (Robustness) ve Tutarlık (Ruggedness)

Sağlamlık, USP (United States Pharmacopeia) ve ICH (International Conference on Harmonization) tarafından şöyle tanımlanmıştır:

Metot parametrelerindeki küçük fakat daha önceden düşünülmüş değişikliklerden etkilenmeden kalan bir ölçümün kapasitesi, onun normal uygulamalar esnasında güvenilirliğinin bir göstergesidir. Sağlamlık, yöntemin bir veya birden daha fazla göstergesi değiştirildiğinde tekrar validasyona ihtiyacı olup olmadığına karar verilmesini sağlar (50, 51)

Tipik varyasyonlara örnekler:

- a. Analitik çözeltilerin kararlılığı (Stabilitesi),
- b. Ekstraksiyon zamanı.

Sıvı kromatografisinde, tipik varyasyonlara örnekler:

- c. Hareketli fazın pH sının değişiminin etkisi,
- d. Hareketli faz bileşiminin değişiminin etkisi,
- e. Farklı kolonlar,
- f. Sıcaklık,
- g. Akış Hızı.

USP tutarlılığı şöyle tanımlamıştır;

- Farklı laboratuvarlar,
- Farklı analizciler,
- Farklı enstrumanlar,
- Farklı reaktif lotları (partileri),
- Farklı analiz günleri,

gibi normal deney koşullarının farklı olduğu durumda, aynı örneklerin analiziyle elde edilen test sonuçlarının tekrar üretilebilirlik derecesidir. Bu faktörler yazılan analitik metodun dışındaki faktörlerdir.

İç ve dış varyasyonlar, analitik validasyon paketinde yanlış olarak sıklıkla birbiriyle karışmaktadır. İç ve dış analitik parametreler ayrılmalıdır ve ayrı ayrı değerlendirilmelidir.

2.3.5.10. Stres Testleri

Bir ilaç maddesinin stres testi, bozunma yollarının ve molekülün iç kararlılığının tespit edilebilmesine ve analitik metodun gücünü gösteren kararlılık göstergelerinin valide edilebilmesine yardımcı olan bozunma ürünlerini belirlememizi sağlar.

Stres testinin türü ilaç maddesine ve söz konusu ilaç ürününün tipine bağlıdır. Stres testlerinin ilaç maddelerinin tek serisi üzerinden gerçekleştirilmesi muhtemeldir. Test, ilaç maddelerinin üzerine sıcaklık artışının etkisini (10°C'lik artışlarla), uygun nemi (örneğin; %75 veya daha fazla bağıl nem), oksidasyonu ve fotolizi içermelidir. Stres testi, ilaç maddesinin, geniş bir pH aralığında hidrolize karşı duyarlılığını da değerlendirmelidir. Fotostabilite testi de stres testlerinin ayrılmaz bir parçası olmalıdır.

Stres şartları altında; bozunma ürünlerini incelemek, bozunma yollarının tespit edilmesinde, uygun analitik prosedürlerinin geliştirilmesi ve valide edilmesinde faydalıdır. Bununla birlikte, eğer bozunma ürünlerinin hızlandırılmış veya uzun süreli saklama koşullarında oluşmadığı gösterilmişse, bu tür bir inceleme bazı bozunma ürünleri için gerekli olmayabilir. Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar, düzenleyici kurumlara sunulan bilgilerin ayrılmaz bir parçası olacaktır (58).

2.4. Literatür Özeti

Tablo 2.5. Soğuk algınlığı ve öksürük tedavisinde kullanılan farmasötik preparatlarda aktif maddelerin HPLC metoduyla tayin edilmesi

Bileşik	Örnek	Teknik	Şartlar	Notlar	Referans
Asetaminofen, ibuprofen ve klorzoksazon	Farmasötik Formülasyonlar	HPLC (UV-GB Dedektör)	Mobil Faz: ACN- %2 Trietilamin (pH 3.2, % 5 lık ortofosforik asitle ayarlanmış), (50:50, h:h). Çalışılan Dalgaboyu: 215 nm. Kolon: Kromasil C8, (5 µm, 25 cmx4.6 mm). Enjeksiyon Hacmi: 20 µL.	Doğrusallık: Her üç madde içinde 2–10 mg/ mL. LOQ değerleri; asetaminofen, ibuprofen ve klorzoksazon için sırasıyla 10, 50 ve 20 ng/mL.	59
Parasetamol, klorfeniramin maleat	İnsan Plazması	LC-MS-MS	Mobil Faz: SU-ACN (80-20, 0.5% formik asit ve 1 m M pentafloropropionik anhidrit. Akış Hızı: 1 mL/dk Kolon: Kromasil C18 (50x4.6 mm, 5 µm). Enjeksiyon Hacmi: 50 µL.	Parasetamol için LOQ : 0.5 µg/mL, çalışma aralığı: 0.5 µg/mL-25µg/mL, Ortalama mutlak geri kazanım: 0.5, 5 ve 15 mg/ml derişim için sırasıyla %17.7, % 20.1ve %23.6, Klorfeniramin maleat için: LOQ: 2 ng/mL, Çalışma aralığı: 0.2 ng/mL-50 ng/mL, Ortalama mutlak geri kazanım: : 1,10 ve 30 ng/mL derişim için sırasıyla %75.2, %76.6 ve %78.7.	60
Fenilpropanolanim HCl, guaifenesin ve difenilpiralin HCl	Şuruplar	HPLC (UV-GB Dedektör)	Mobil Faz: ACN-Trietilamin (pH 3.5, % 5 lık ortofosforik asitle ayarlanmış), (35:65, h:h) Akış hızı 1.2 mL/dk. Çalışılan Dalgaboyu: 210 nm. Kolon: Shimpak® C8 (25 cmx4.6 mm, 10 µm) Enjeksiyon Hacmi: 20 µL.	Doğrusallık: Fenilpropanolanim HCl 10–30 mg/ mL, guaifenesin 50–150 mg/ mL ve difenilpiralin HCl 1.5–4.5 mg/mL. Fenilpropanolanim HCl, guaifenesin ve difenilpiralin HCl için LOD değerleri sırasıyla 10, 25, 25 ve 25 ng/ mL dir ve LOQ değerleri de sırasıyla 25, 50, 50 ve 50 ng/ mL dir.	61

Asetilasisilik asit, parasetamol, kafein, fenobarbital	Tablet	HPLC (UV-GB Dedektör)	Mobil Faz: ACN-Su (25/75, h/h), pH 2.5 e fosforik asitle ayarlanmış. Akış Hızı 2.0 mL/dk. Kolon: Bio SiL HL C18 (250×4.6 mm, 5µm). Çalışılan Dalgaboyu: 207 nm. Enjeksiyon Hacmi: 20 µL.	Doğrusallık ($R^2 = 0.998$), Güniçi kesinlik (RSD: %0.36-1.89), Günlerarası kesinlik (RSD: 0.58-2.18%), LOD: 9×10^{-5} - 1.7×10^{-4} mg/mL ve LOQ: 2.5×10^{-4} - 5.6×10^{-4} mg/mL, doğruluk (geri kazanım: %98.35-99.14), Tekrarüretilebilirlik (% geri kazanım değerleri: %98.74-102.08, %99.93-102.11, %98.25-102.12, %98.15-102.3)(RSD: %1.21-1.85)	62
Kodein fosfat, efedrin HCl, klorfeniramin maleat	Öksürük- Soğukalgınlığı Şurup Formülasyonu	HPLC (UV-GB Dedektör)	Mobil Faz: MeOH-Asetik Asit-Trietilamin (980:15:6, h/h) ve Su-Asetik Asit-Trietilamin (980:15:6, h/h), gradient elüsyon. Kolon: Zorbax XDB C8 (150×4.6 mm, 5 µm). Akış Hızı: 1.5 mL/dk. Çalışılan Dalgaboyu: 254 nm. Enjeksiyon Hacmi: 20 µL.	Kodein Fosfat, efedrin HCl, klorfeniramin maleat için sırasıyla: Güniçi kesinlik; %RSD: 0.20, 0.45, 0.33. Günlerarası kesinlik; %RSD: 0.57, 0.53, 1.13. Geri kazanım: Farklı konsantrasyon seviyelerindeki üç analit için geri kazanım değerleri %100±2 kabul kriterini karşılar.	63
Asetaminofen, psödoefedrin HCl ve dekstrometorfan HBr	Farmasötik Formülasyonlar	HPLC (UV-GB Dedektör)	Mobil Faz: Heptansülfonik asit sodyum tuzu: Metanol:ACN (25:57:18, h/h) pH:3.3. Çalışılan Dalgaboyu: 220 nm. Kolon: A Hypersil CN kolon (150×5.0 mm, 5 µm) Akış hızı 1.0 mL/dk. Enjeksiyon Hacmi: 20 µL.	Asetaminofen, psödoefedrin HCl, dekstrometorfan HBr için sırasıyla: Doğrusallık: 2.06-20.6 µg/mL; 0.202-2.02 mg/mL; 0.042-1.06 mg/mL. LOQ: 0.98 µg/mL, 0.10 mg/mL; 0.02 mg/mL.	64
Teofilin anhidrit, guaifenesin, difenhidramin HCl, metil paraben, propil paraben, sodyum benzoate	Farmasötikler	HPLC (UV-GB Dedektör)	Mobil Faz: 25 mM KH_2PO_4 (pH fosforik asitle 3.2 ye ayarlanmış):ACN (60:40, h/h). Kolon: Shim-pack RP-18 (250×4.6 mm, 4.6 µm). Akış Hızı: 2 mL/dk. Çalışılan Dalgaboyu : 222 nm. Enjeksiyon Hacmi: 20 µL.	Teofilin Anhidrit, guaifenesin, difenhidramin HCl, metil paraben, propil paraben, sodyum benzoate için sırasıyla: Doğrusallık 5.0-33.0 µg/mL, 3-21 µg/mL, 1.2-4.0 µg/mL, 0.3-3.0 µg/mL, 0.4-2.0 µg/mL, 0.5-4.0 µg/mL, LOD; 1.59×10^{-2} µg/mL, 1.90×10^{-2} µg/mL, 2.38×10^{-2} µg/mL, 2.14×10^{-2}	65

				$\mu\text{g/mL}$, 2.40×10^{-4} $\mu\text{g/mL}$, 2.02×10^{-2} $\mu\text{g/mL}$, LOQ: 5.30×10^{-2} $\mu\text{g/mL}$, 6.33×10^{-2} $\mu\text{g/mL}$, 7.93×10^{-2} $\mu\text{g/mL}$, 7.13×10^{-2} $\mu\text{g/mL}$, 8.0×10^{-2} $\mu\text{g/mL}$, 6.73×10^{-2} $\mu\text{g/mL}$ % Geri kazanım: 100.1, 100.2, 99.8, 100.0, 99.9, 100.1.	
Fenilefrin HCl, parasetamol, klorfeniramin maleat ve dekstrometorfan HBr	Farmasötikler	HPLC (UV-GB Dedektör)	Mobil Faz: ACN–Sodyum perklorat (pH 3, 0.01 M) (25:75, v/v). Çalışılan Dalgaboyu: 204 nm. Kolon: ACE C18 kolon (250mmx4.6 mm, 5 μm). Akış hızı 1.4 mL/dk. Enjeksiyon Hacmi: 20 μL .	Fenilefrin HCl, klorfeniramin Maleat, parasetamol ve dekstrometorfan HBr için sırasıyla: Doğrusallık: 0.48–52 $\mu\text{g/mL}$, 4–240 $\mu\text{g/mL}$, 0.48–44 $\mu\text{g/mL}$, 0.4–19 $\mu\text{g/mL}$. LOQ: 0.08 $\mu\text{g/mL}$, 0.29 $\mu\text{g/mL}$, 0.24 $\mu\text{g/mL}$, 0.38 $\mu\text{g/mL}$. LOD: 0.03 $\mu\text{g/mL}$, 0.10 $\mu\text{g/mL}$, 0.08 μg mL, 0.13 $\mu\text{g/mL}$. %Geri Kazanım Değerleri: 99.83, 99.10, 99.80, 99.90.	66
Psödoefedrin HCl, feniramine maleate, guaifenesin, pirilamin maleat, klorfeniramin maleat, dekstrometorfan HCl	Öksürük ve Soğuk algınlığı ilaçları	HPLC (UV-GB Dedektör)	Mobil Faz: Metanol:Dihidrojen Fosfat Tamponu (45:55, h/h), fosfat tamponunun pH ı 3 e ayarlanmış. İzokratik elüsyon. Kolon: Kromasil LC18 (150mmx4.6 mm, 5 μm). Çalışılan Dalgaboyu: 220 nm. Akış Hızı: 1 mL/dk.	Doğrusallık: Psödoefedrin HCl, Feniramine Maleate, Klorfeniramin Maleat için konsantrasyon aralığı 5-50 $\mu\text{g/mL}$, Guaifenesin, Prilamin Maleat, Dekstrometorfan HCl, Sodyum Benzoat, Metil Paraben için 50-600 $\mu\text{g/mL}$ dir. Psödoefedrin HCl, feniramine Maleate, klorfeniramin Maleat, guaifenesin, pirilamin Maleat, dekstrometorfan HCl için sırasıyla: LOD: 0.2 $\mu\text{g/mL}$, 0.03 $\mu\text{g/mL}$, 0.03 $\mu\text{g/mL}$, 0.04 $\mu\text{g/mL}$, 0.1 $\mu\text{g/mL}$, 0.06 $\mu\text{g/mL}$. LOQ: 0.66 g/mL, 0.1 g/mL, 0.13 g/mL, 0.13 g/mL, 0.33 g/mL, 0.2 g/mL.	67

Psödoefedrin HCl, kodein fosfat, triprolidin HCl	Sıvı Dozaj Formları	HPLC (UV-GB Dedektör)	Mobil Faz: Metanol:Asetat tamponu (pH:6.9):ACN(85:5:10, h/h). Çalışılan Dalgaboyu: 254 nm. Kolon: C18 ters faz kolonu (250mm×4.0mm, 5 µm). Akış hızı: 1.5 mL/dk. Enjeksiyon Hacmi: 5 µL.	Psödoefedrin HCl, kodein fosfat, triprolidin HCl için sırasıyla: Doğrusallık: 0.06–1.0 mg/mL, 0.02–1.0 mg/mL, 0.0025–1.0 mg/mL. % Geri kazanım değerleri: 99.8, 99.4 ve 98.6. Günler arası kesinlik, (%R.S.D): 0.7, 0.6 ve 0.6.	68
Klorfeniramin maleat, fenilefrin	Farmasötik Dozaj Formları	RP-HPLC (UV-GB Dedektör)	Mobil Faz: ACN ve Fosfat tamponu 55:45 (h/h) (pH 5.6 ± 0.02, trietilamin ile ayarlanmış) Çalışılan Dalgaboyu: 255 nm Kolon: C18 (250 mm × 8 mm, 10 µm) Akış Hızı: 1 mL/dk. Enjeksiyon Hacmi: 20 µL.	Klorfeniramin maleat ve fenilefrin için sırasıyla: Doğrusallık: 10 – 70 µg/ml, 10 – 70 µg/ml. LOD: 0.23 µg/ml ve 0.15 µg/ml. LOQ: 0.40 µg/ml ve 0.32 µg/ml. % Gerikazanım Değerleri: 101.09 ve 98.99 aralığında. %RSD: % 0.78 ve % 0.60 aralığında. R ² : 0.9995 ve 0.9993.	69
Parasetamol, metil paraben, etil paraben ve propil paraben	Tıbbi Süspansiyonlar ve Tabletler	RP-HPLC (UV-GB Dedektör)	Mobil Faz: ACN-tetrahidrofuran-su 21:13:66 (h/h/h)pH 3.0 (formik asitle ayarlanmış) Çalışılan Dalgaboyu: 249 nm Kolon: Lichrosorb RP8 (150×4.6mm, 5 µm). Akış Hızı: 1 mL/dk. Enjeksiyon Hacmi: 10 µL.	Parasetamol, metil paraben, etil paraben ve propil paraben için sırasıyla: Doğrusallık: 25–160 µg/ml; 20–128 µg/ml; 5–40 µg/ml ve 5–32 µg/ml. R ² : 0.9997, 0.9999, 0.9999 ve 0.9998. Doğruluk: %100±2 LOD: 0.014 µg/ml, 0.017 µg/ml, 0.013 µg/ml, 0.012 µg/ml. LOQ: 18 µg/ml, 14 µg/ml, 4 µg/ml, 4 µg/ml. Gerikazanım: %99.92–101.07±1.03, %99.67–101.04±0.97,%99.57- 101.13±1.14, %98.96–100.11±1.17.	70

Klorfeniramin maleat, fenilefrin HCl, parasetamol, kafein	Farmasötikler	RP-HPLC (UV-GB Dedektör)	Mobil Faz: Difosfat tamponu (0.05 M, pH 4.0)-ACN (93:07, h/h). Çalışılan Dalgaboyu: 215 nm Kolon: Inertsil ODS C18 ((250 mm × 4mm, 5µm) Akış Hızı: 1.5 mL/dk. Enjeksiyon Hacmi: 20 µL	Klorfeniramin maleat, fenilefrin HCl, parasetamol, kafein için sırasıyla: % Geri kazanım: %99.38-%101.48, %100.29-%101.68, %100.65-%101.29 ve %98.74-%100.25. Gün içi ve günler arası kesinlik (RSD): < %2. LOD: 0.29 µg/ml, 0.41 µg/ml, 38 µg/ml, 2.4 µg/ml. LOQ: 0.4 µg/ml, 0.51 µg/ml, 49 µg/ml, 3.3 µg/ml.	71
---	---------------	--------------------------	--	---	----

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Reaktif ve Materyaller

Çalışmamızda kullanılan etken maddeler Tablo 3.1 ve reaktifler Tablo 3.2’de verilmiştir.

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan etken maddeler

Reaktifin Adı	Özellikler	Firmanın Adı	Katalog No
Asetaminofen	≥%99	Sigma-Aldrich	A 7085
(+)- Pseudoefedrin HCl	≥%99	Fluka	82448
Feniramin Maleat	≥%99	Sigma	P-69023
Guaifenesin	%98	Aldrich	G5627
Pirilamin Maleat	≥%99	Sigma	P5514
S-(±)-Klorfeniramin Maleat	≥%99	Sigma	C4915
Tripolidin HCl	≥%99	Sigma	T6764
Dekstrometorfan HBr	≥%99	Sigma-Aldrich	D9684
Difenhidramin HCl	≥%98	Sigma	D3630
2,4,6-trimetoksi benaldehit	≥%98	Fluka	92134

Tablo 3.2. Çalışmada Kullanılan Reaktifler

Reaktifin Adı	Özellikler	Firmanın Adı	Katalog No
Metanol	≥%99.9	Sigma-Aldrich	34885
Sunset Yellow	≥%95	Fluka	68775
Potasyum Dihidrojen Fosfat	%98	Riedel-de Haën	04243
Ortofosforik Asit	%85	J.T Baker	5854
Sorbitol	%70	Doğa İlaç	507221770
1,2-Propilen Glikol	%99.5	Sigma-Aldrich	W294004
Sodyum Sakkarin	≥%98	Sigma	S1002
Gliserol	%87	Riedel-de Haën	15524

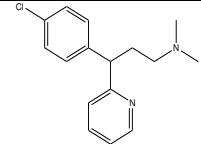
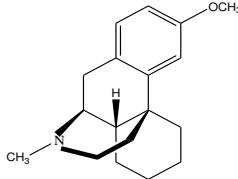
3.2. Cihazlar

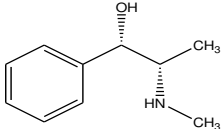
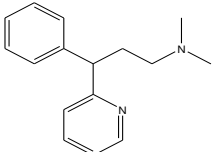
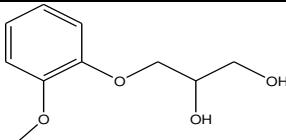
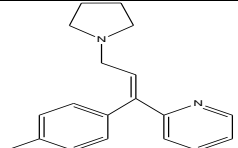
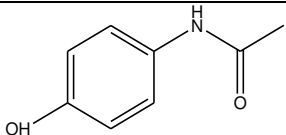
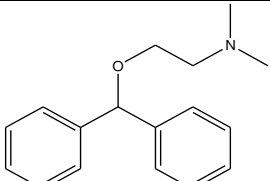
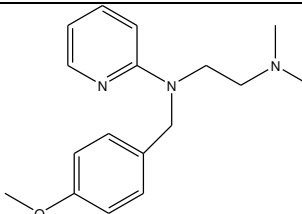
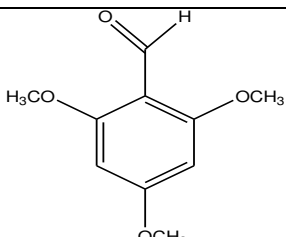
Kullanılan HPLC sistemi; G1379A model degazör, G1311A kuarternier pompa, G1315B diyot dizisi dedektör (PDA), 20 µL enjeksiyon lüpuna sahip 7725İ Rheodyne enjeksiyon bloğu ve kolon firması ile donatılmış Agilent 1100 G serisi yüksek performanslı sıvı kromatografi cihazıdır. Ayırım, % 18 karbon endcapping (kapalı uçlu) Nucleodur Gravity C18 analitik kolon (4.0mm x 250mm, 5µm) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu kolonun özelliği olan monofonksiyonel alkilsilanlarla yüksek yoğunluklu kaplama, fazlarda yüksek karbon içeriği ve çok düşük silanofilik aktivite sonucudur. Bu durum bazı ilaçlar gibi polar bileşiklerin elüsyonunda piklerin bölünmemesini sağlar. Analizler yapılırken kullanılan diğer cihazlar aşağıda belirtilmiştir:

- pH metre (Hanna instruments pH 211 microprocessor)
- Vorteks karıştırıcı (Velp scientifica)
- Magnetik karıştırıcı (RO5 power IKA-Werke)
- Derin dondurucu, -45 °C' de (Shin)
- Hassas terazi (Acculab ATL 224-İ)
- Sıcaklık ve zaman ayarlı degazör, (Sonorex dijital 10p, Bandelin)
- Su saflaştırma sistemi (New Human Power I, Korea)

Çalışmamızda etken maddelerin IUPAC adlandırması, molekül formülü, molekül ağırlığı ve molekül şekli Tablo 3.3 'de verilmiştir.

Tablo 3.3. Kullanılan kimyasalların molekül şekilleri ve IUPAC'a göre adlandırılması

Standartlar	IUPAC ismi	Molekül formül	Molekül ağırlığı (g/mol)	Molekül Şekli
S-(+) Klorfeniramin Maleat	2-[p-Chloro-α-(2-dimethylaminoethyl) benzyl]pyridine	$C_{16}H_{19}ClN_2C_4H_4O_4$	390.87	
Dekstrometorfan HBr	(9S,13S,14S)-3-Methoxy-17-methylmorphinan hydrobromide	$C_{18}H_{25}NO.HBr.2H_2O$	370.32	

(+)-Pseudoefedrin HCl	(1S,2S)-2-Methylamino-1-phenylpropan-1-ol	$C_{10}H_{15}NO \cdot HCl$	201.70	
Feniramine Maleat	N,N-Dimethyl-γ-phenyl-2-pyridinepropanamine	$C_{16}H_{20}N_2 \cdot C_4H_4O_4$	356.4	
Guaifenesin	3-(2-Methoxyphenoxy)-1,2-propanediol	$C_{10}H_{14}O_4$	198.2	
Tripolidin HCl	2-[(1E)-1-(4-Methylphenyl)-3-(1-pyrrolidiny)-1-propenyl]pyridine	$C_{19}H_{22}N_2 \cdot HCl$	332.88	
Asetaminofen	N-(4-Hydroxyphenyl)acetamide	$C_8H_9NO_2$	151.17	
Difenhidramin HCl	2-Diphenylmethoxy-N,N-dimylethanamine	$C_{17}H_{21}NO \cdot HCl$	291.82	
Pirilamin Maleat	N-[(4-Methoxyphenyl)methyl]-N',N'-dimethyl-N-2-pyridinyl-1,2-ethanediamine	$C_{17}H_{23}N_3O \cdot C_4H_4O_4$	401.5	
2,4,6-trimetoksi benzaldehit	2,4,6-Trimethoxy-benzaldehyd	$C_{10}H_{12}O_4$	196.21	

3.3. Yöntem

3.3.1 Standart Çözeltilerin Hazırlanması

Analitik saflıktaki standart maddeler hassas terazide sırasıyla; klorfeniramine maleat tuzundan 0.1422 g, feniramin maleat tuzundan 0.1483 g, pirilamine maleat tuzundan 0.1407 g, pseudoefedrine HCl tuzundan 0.1221 g, guaifenesinden 0.1000 g, aseaminofenden 0.1000 g, difenhidramin HCl tuzundan 0.1143 g, triprolidin HCl tuzundan 0.1131 g, dekstrometorfan HBr tuzundan 0.1279 g ve 2,4,6-Trimetoksibenzaldehitten 0.1000 g tartılarak metanol ile çözüldükten sonra balon jode 10 mL' ye seyreltilerek, 10000 ppm'lik ana stok çözeltisi hazırlanmıştır. Stoklar karanlık ortamda buzdolabında +4°C'de muhafaza edilmiştir. Ara stok çözeltileri günlük olarak, ana stok çözeltilerinden hazırlanmıştır. Seyreltmeler mobil faz çözeltisiyle yapılmıştır.

3.3.2. Plasebo Şurup Örneğinin Hazırlanması

100 mL plasebo şurup örneği hazırlamak için kullanılması gereken maddeler ve miktarları Tablo 3.4'de verilmiştir.

Tablo 3.4. Plasebo şurubun bileşenleri ve miktarları (72)

Madde	Miktarı
Sitrik Asit	0.3 g
Gliserin	10 g
Propilen Glikol	10 g
Sodyum Benzoat	0.02 g
Sodyum Karboksimetil Selüloz	0.1 g
Sorbitol	20 g
Sodyum Sakkarin	0.04 g
Sunset Yellow	Yeterli miktarda
Portakal Aroması	1 damla
Tarçın Aroması	1 damla

3.3.3. Şurup ve Tablet Örneklerinin Hazırlanması

Her ticari şurup örneğinde 1 mL alınıp balon jode 10 mL'ye mobil faz ile seyreltilip vorteks yardımıyla 15 dk iyi bir şekilde karıştırılıp 0.45 µm gözenek çapına sahip bir membran ile süzildükten sonra cihaza enjekte edilmiştir.

Tablet örnekleri 50 mL'lik balon jodelerde suyla çözüldükten sonra 45 dk boyunca ultrasonik banyoda tutulmak suretiyle iyi bir şekilde çözümleri sağlanmıştır. Çözünme işlemi bittikten sonra 0.45 µm gözenek çapına sahip bir membran yardımıyla süzülüp bu süzüntüden 0.5 mL alınıp mobil faz yardımıyla 5 mL'ye tamamlanmıştır.

3.3.4. Plasebo Şurup Örneği Matriksinde Kalibrasyon

Şuruplardan ve tabletlerden gelecek matriks etkisini görmek için, kalibrasyon eğrileri, etken madde içermeyen plasebo matriksinde oluşturulmuştur. Farklı derişimlerdeki analitler plasebo örneğine eklenmek suretiyle kalibrasyon kontrolleri sağlanmıştır. İç standart madde olan 2,4,6-trimetoksibenzaldehit kalibrasyon kontrollerine eklenmiştir ve ölçümler bu şekilde alınmıştır.

3.3.5. Stres Testi için Çözeltilerin Hazırlanması

Stres testlerinde analizlenecek çözeltileri hazırlamak için; 10000 ppm'lik ana stok çözeltisinden, son derişimi 1000 ppm olacak şekilde hazırlanan ara stok çözelti plasebo ile seyreltili. Bu çözeltiden son derişimi 200 ppm olacak şekilde hazırlanan çözeltiler bozunma şartlarına bağlı olarak sırasıyla 0.1 M HCl, 0.1 M NaOH ve % 10 ve %30'luk H₂O₂ ile seyreltili. Asidik ve bazik ortamda hazırlanan çözeltiler 2 saat, 80 °C ve 8 saat, 80 °C'de ısıtılırken, H₂O₂ ile hazırlanan çözeltiler oda sıcaklığında 2 saat ve 8 saat bekletilir ve 0.45 µm çaplı membran filtrelerde süzildükten sonra cihaza enjekte edildi (73).

3.3.6. Kromatografik Şartların Ayarlanması

Öksürük ve soğuk algınlığı tedavisinde kullanılan şuruplarda ve tabletlerde bulunan etken maddelerin tayin edilmesi ters faz sıvı kromatografisi yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Mobil faz bileşimi optimize edilerek en iyi kromatografik ayırım şartları belirlenmiştir.

Tablo 3.5. HPLC’de kromatografik koşullar

Kromatografik Koşulların Belirlenmesi	
Cihaz	Agilent 1100G serisi
Kolon	Nucleodur Gravity C ₁₈ kolonu (4.0 mm x 250 mm, 5µm)
Dedektör	Diyot dizisi dedektörü (DAD)
Hareketli Faz	MeOH:KH ₂ PO ₄ (38:62), İzokratik Elüsyon
Akış Hızı	0.75 mL / dk
Analiz Süresi	37.9 dakika
Enjeksiyon Hacmi	20 µL

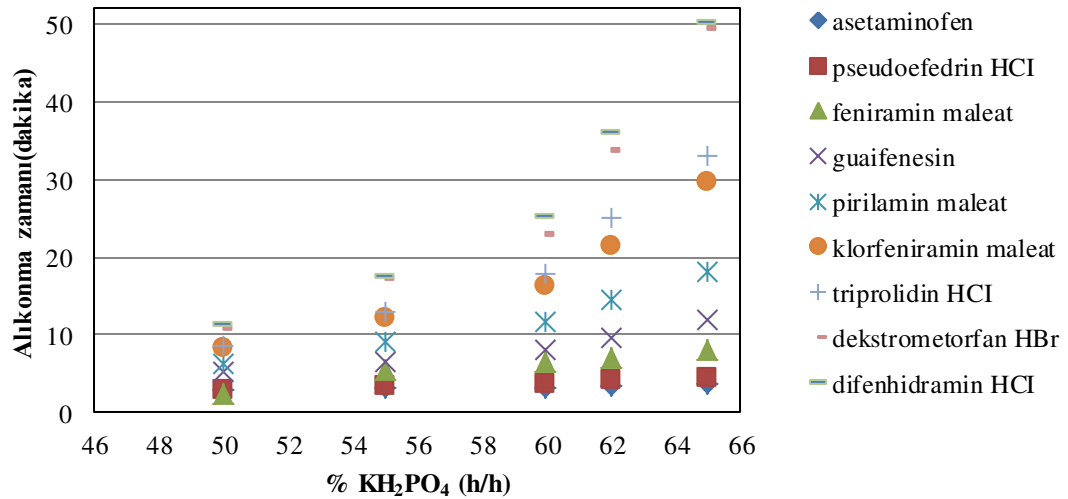
Tablo 3.6. Etken maddelerin tayininde kullanılan maksimum dalgaboyları (PDA dedektör)

Madde	λ_{maks}
Psödoefedrin HCl Feniramin Maleat Guaifenesin Pirilamin Maleat 2,4,6-trimetoksibenzaldehit Klorfeniramin Maleat Triprolidin HCl Dekstrometorfan HBr Difenhidramin HCl	210 nm
Asetaminofen	254 nm

4. BULGULAR

4.1. Foto Diyot Dizisi Dedektörü Kullanarak Etken Madde Ayrımının Optimize Edilmesi

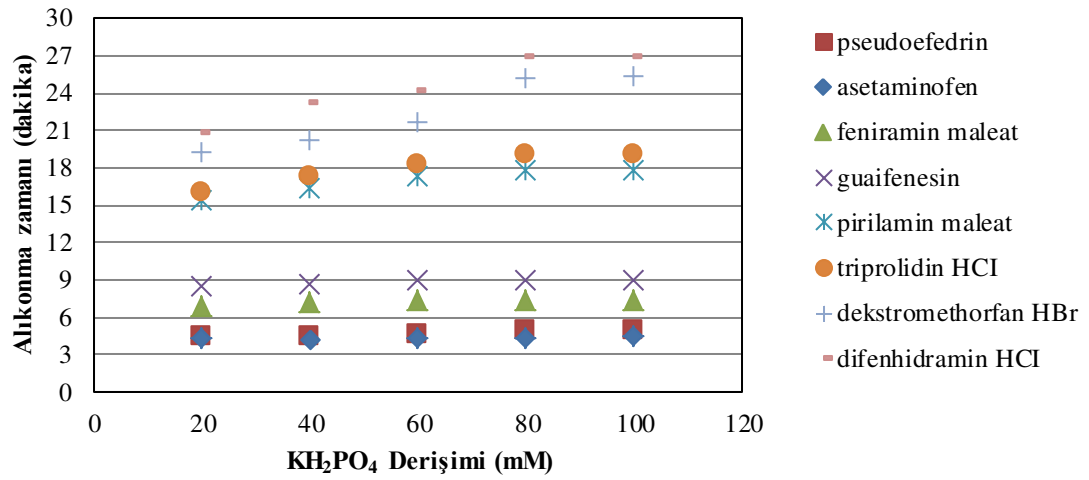
Mobil fazın bileşiminin belirlenmesi için öncelikle hacimce yüzde KH_2PO_4 ve MeOH oranları taranmıştır. Bunun amaçla farklı yüzdelerde KH_2PO_4 ve MeOH içeren mobil fazlar hazırlanmıştır ve maddelerin alıkonma zamanlarına etkisi araştırılmıştır. Denemeler sırasında organik eluent miktarının azalmasıyla mobil fazın dielektrik sabitinin artırdığı buna bağlı olarak da etken maddelerin alıkonma zamanlarının arttığı gözlenmiştir. Bu taramalar sonrasında mobil fazda hacimce en uygun tampon yüzdesinin Şekil 4.1’de görüldüğü gibi ayrılmanın en iyi olduğu %62 KH_2PO_4 oranı olduğuna karar verilmiştir.



Şekil 4.1. Mobil fazdaki tampon çözelti yüzdesine bağlı olarak alıkonma zamanlarındaki değişim

Mobil fazın hacimce yüzde oranları belirlendikten sonra, mobil fazda bulunan KH_2PO_4 tamponunun derişiminin belirlenmesi amaçlanmıştır. Tampondaki KH_2PO_4 derişimi 20, 40, 60, 80 ve 100 mM olacak şekilde çözeltiler hazırlanmıştır. %62’lik farklı derişimlerde KH_2PO_4 çözeltileri ile %38 metanol karıştırılarak hazırlanan mobil fazda etken maddelerin ayrımı incelenmiştir. Analizler sonunda en iyi ayrılmanın Şekil 4.2’de görüldüğü gibi tampon derişiminin 80 mM ve 100 mM olduğu şartlarda olduğu saptanmıştır. İki derişimin alıkonma zamanlarına etkisi aynıdır. Tampon derişiminin fazla olmasının hem kimyasal madde sarfiyatı hem de

cihaz açısından dezavantaj olacağı düşünülerek daha düşük olan 80 mM tampon derişiminde karar kılınmıştır.



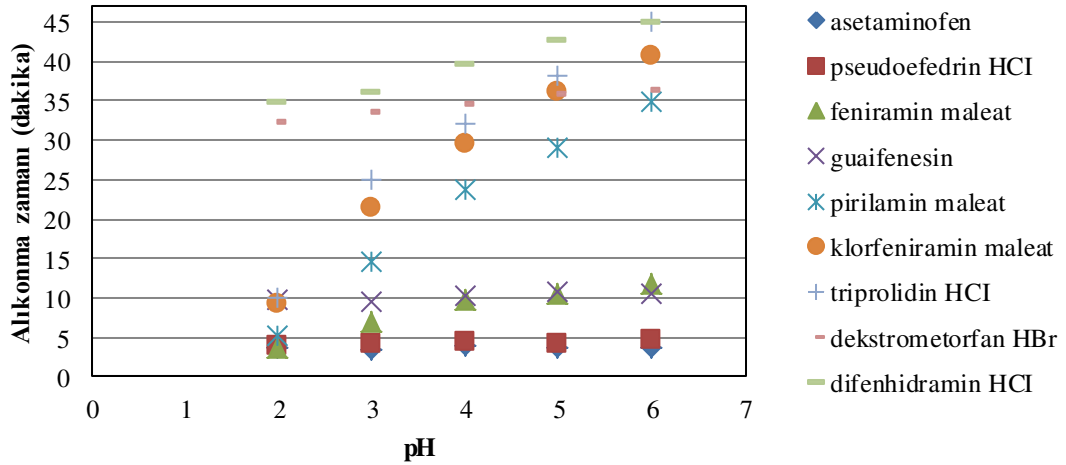
Şekil 4.2. Tampon çözelti derişimine bağı olarak alkonma zamanlarındaki değışim

Mobil fazın hacimce yüzde oranları ve tampon derişimi belirlendikten sonra, mobil fazın pH'ının alkonma zamanları üzerine etkisi araştırılmıştır. Bunun için öncelikle tüm etken maddelerin pK_a değıerleri bilgisayar ortamında hesaplanmıştır. Tüm etken maddelere ait pK_a değıerleri Tablo 4.1'de görölmektedir.

Tablo 4.1. Etken maddelerin pK_a değıerleri (74)

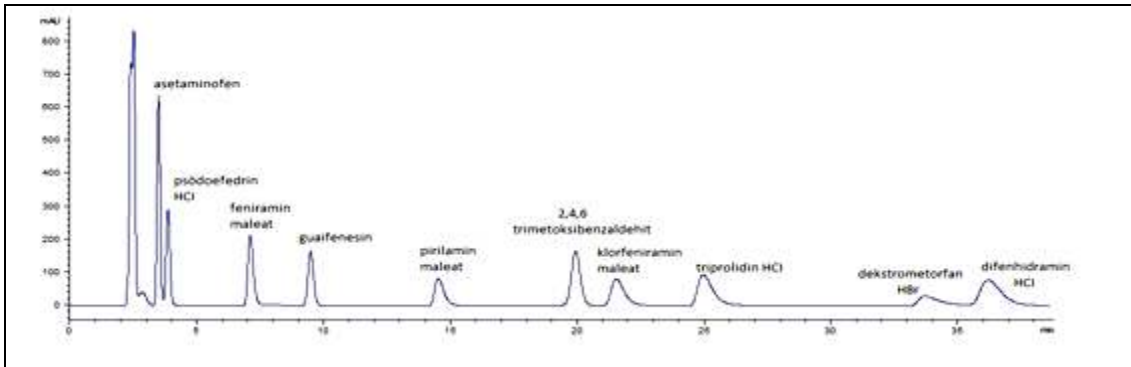
Standartlar	pK _a Değıerleri
Asetaminofen	9.46
Psödoefedrin HCl	9.52
Feniramin Maleat	9.48
Guaifenesin	13.6
Pirilamin Maleat	8.76
Klorfeniramin Maleat	9.47
Tripolidin HCl	8.64
Dekstrometorfan HBr	9.85
Difenhidramin HCl	8.87

Değerlere bakıldığında pK_a değerlerinin 8.5 in üstünde olduğu görülmektedir. Zayıf bazik maddelerin ayrılması söz konusu olduğunda mobil faza bir tampon eklenerek pH'sının kontrol altında tutulması önerilir (36). Tampon çözeltinin pH'sı %10 luk ortofosforik asit ilavesiyle, sırasıyla 2, 3, 4, 5 ve 6'ya ayarlanmıştır. En iyi ayrımın Şekil 4.3'de görüldüğü gibi pH 3'de olduğu anlaşılmıştır.



Şekil 4.3. Tampon pH'sının etken maddelerin alıkonma zamanlarına etkisi

Mobil faz bileşimi optimize edildikten sonra (%62 KH_2PO_4 ve %38 metanol), etken maddelerin ayrılması, 0.75 mL/dk akış hızında, oda sıcaklığında Nucleodur gravity C18 kolonda 37.9 dakikada gerçekleştirilmiştir. İç standart olarak 2,4,6 trimetoksibenzaldehit kullanılmıştır. Ultraviyole absorpsiyon 210 nm'de izlenmiştir.



Şekil 4.4. Etken maddelerin kromatografik ayrımının gösterimi ($\lambda = 210$ nm)

Bağıl alıkonma zamanları beş farklı günde, her bir etken maddenin alıkonma zamanının, iç standardın alıkonma zamanına oranlanmasıyla hesaplanmıştır (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. Etken maddelerin bağıl alıkonma zamanları (n=5)

Pik	Standartlar	Bağıl Alıkonma Zamanı	% CV
1	Asetaminofen	0.1795	3.8033
2	Psödoefedrin HCl	0.1988	0.7379
3	Feniramin Maleat	0.3725	0.7258
4	Guaifenesin	0.4898	0.4365
5	Pirilamin Maleat	0.7704	0.5706
6	2.4.6-trimetoksibenzenaldehyt	1.000	1
7	Klorfeniramin Maleat	1.1317	0.2217
8	Tripolidin HCl	1.3234	0.3126
9	Dekstrometorfan HBr	1.7550	0.2972
10	Difenhidramin HCl	1.8844	0.4412

4.2. Sistem Uygunluk Parametrelerinin Hesaplanması

4.2.1. Kapasite Faktörü (k')

t_0 zamanı, KBr kullanılarak hesaplanmıştır ve 2.3196 ± 0.01504 dk olarak bulunmuştur. Buna göre her bir madde için kapasite faktörleri Tablo 4.3'de verilmiştir. Dekstrometorfan HBr ve difenhidramin HCl haricinde kapasite faktörleri $0.5 < k' < 10$ aralığında hesaplanmıştır.

Tablo 4.3. Kapasite faktörleri

Standartlar	Kapasite Faktörü (k')
Asetaminofen	0.526
Pseudoefedrin HCl	0.691
Feniramin Maleat	2.180
Guaifenesin	3.170
Pirilamin Maleat	5.562
2.4.6-Trimetoksi benaldehit	7.495
Klorfeniramin Maleat	8.628
Tripolidin HCl	9.256
Dekstrometorfan HBr	13.898
Difenhidramin HCl	14.990

4.2.2. Seçicilik Faktörü (α) ve Ayırıcılık (R)

Hesaplanan seçicilik faktörü ve ayırıcılık değerleri Tablo 4.4'de verilmiştir. Asetaminofen ve psödoefedrin HCl için ayırıcılık değeri 1.3801, dekstrometorfan HBr ve difenhidramin HCl için ise 1.4995 olarak bulunmuştur. Bunun dışındaki bütün maddelerin ayırıcılık değerleri 1.5'in üzerindedir.

Tablo 4.4. Seçicilik faktörleri ve ayırıcılık değerleri

Standartlar	Seçicilik Faktörü(α)	Ayırıcılık(R)
Asetaminofen-Pseudoefedrin HCl	1.3156	1.3801
Pseudoefedrin HCl-Feniramin Maleat	3.1531	6.0079
Feniramin Maleat-Guaifenesin	1.4538	4.1485
Guaifenesin-Pirilamin Maleat	1.7546	8.1243
Pirilamin Maleat-2,4,6-trimetoksibenzaldehit	1.3475	4.6743
2,4,6-trimetoksi benaldehit –Klorfeniramin Maleat	1.1511	3.3256
Klorfeniramin Maleat-Triprolidin HCl	1.1886	3.2791
Triprolidin HCl-Dekstrometorfan HBr	1.3552	5.5341
Dekstrometorfan HBr-Difenhidramin HCl	1.0786	1.4995

4.2.3. Teorik Tabaka Sayısı (N), Kuyruklanma ve Asimetri Faktörü

Hesaplanan tüm kuyruklanma faktörü değerleri $0.5 \leq T \leq 2$ aralığında bulunmuştur. Asimetri faktörü değerleri ise dekstrometorfan HBr ve difenhidramin HCl dışındaki diğer tüm maddelerde 1.5'den küçüktür. Teorik tabaka sayısı değerleri >2000 olarak bulunmuştur.

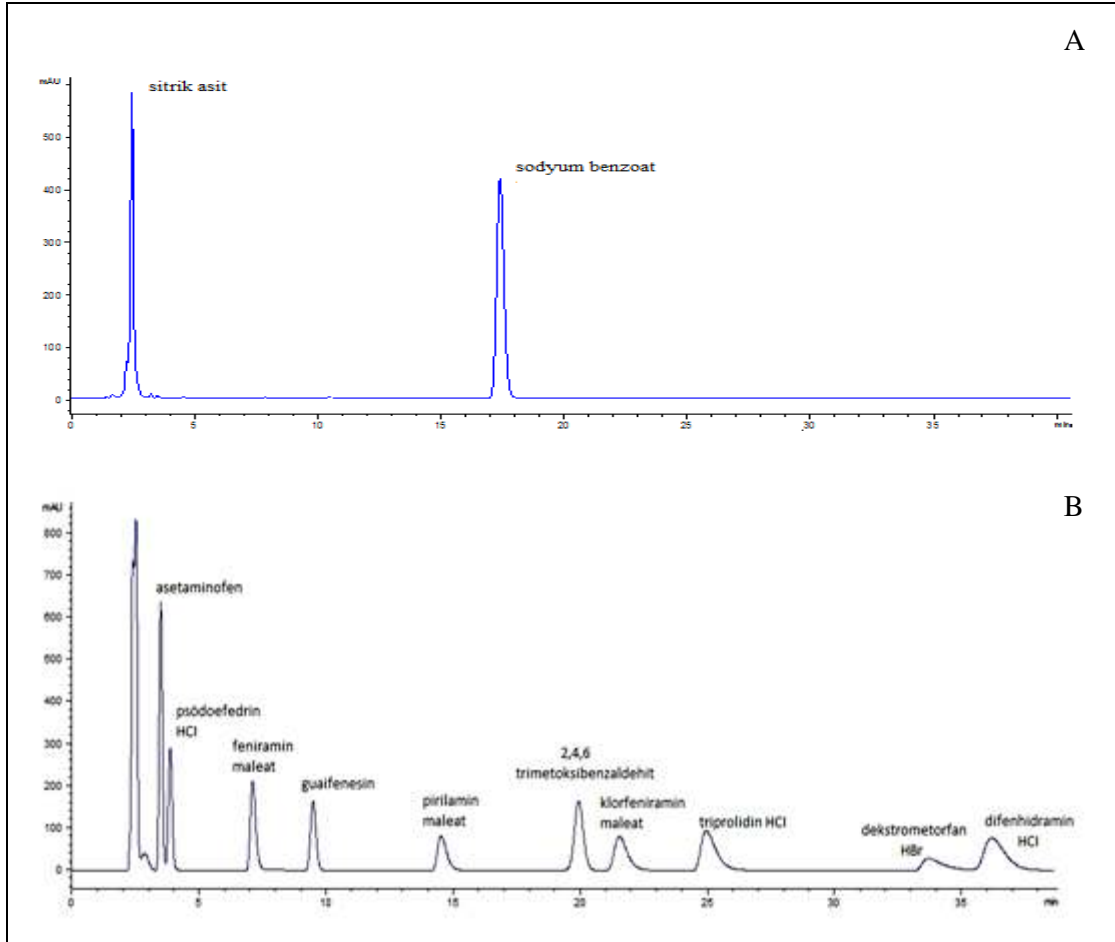
Tablo 4.5. Teorik tabaka sayısı, kuyruklanma faktörü ve asimetri faktörü değerleri

Standartlar	Teorik Tabaka Sayısı (N)	Pik Kuyruklanma Faktörü	Pik Asimetri Faktörü
Asetaminofen	3168.73	0.900	0.800
Pseudoefedrin HCl	2635.11	0.833	0.667
Feniramin Maleat	4890.34	1.166	1.333
Guaifenesin	7947.41	1.062	1.125
Pirilamin Maleat	6752.83	1.071	1.142
Klorfeniramin Maleat	8230.64	1.250	1.483
Triprolidin HCl	8196.33	1.400	1.387
Dekstrometorfan HBr	7708.72	1.555	2.111
Difenhidramin HCl	8889.72	1.250	1.500

4.3. Metot Validasyonu

4.3.1. Seçicilik ve Kalibrasyon Eğrisi

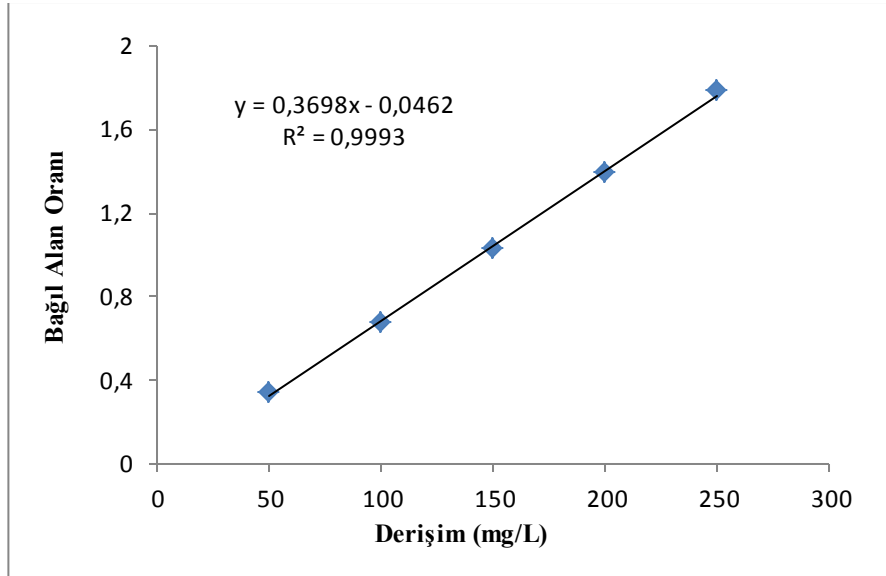
Yöntemin seçici olup olmadığını göstermek için hazırlanan plasebo örneği sisteme verilmiştir. Standart maddelerin alıkonma zamanında plasebodan kaynaklı herhangi bir örtücü pik bulunmadığı saptanmıştır.



Şekil 4.5. Plasebo şurup (A) ve standart maddelerin (B) analizi sonrasında elde edilen kromatogramlar ($\lambda = 210$ nm).

Her bir etken maddenin, çalışma aralıkları tespit edilmiştir. Etken maddelere ait pik alanları, iç standardın pik alanına bölünerek elde edilen bağıl alan değerleri konsantrasyona karşı grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur. Doğrusal aralıkta, 5 farklı günde, beş farklı konsantrasyonda gerçekleştirilen enjeksiyonlar sonucu elde edilen kalibrasyon eğrilerinin denklemleri tablo 4.6'da verilmiştir.

Elde edilen kalibrasyon eğrilerinin açıklayıcılık katsayıları $R^2 \geq 0.999$ olarak hesaplanmıştır. Feniramin maleata ait kalibrasyon grafiği Şekil 4.6'da görülmektedir.



Şekil 4.6. Feniramin maleata ait kalibrasyon grafiği

Saptama alt tayin sınırı belirlenirken plaseboya eklenen etken maddeler, S/G oranı yaklaşık olarak 3 oluncaya kadar seyreltilmiştir. Alt tayin sınırı belirlenirken, plaseboya eklenen etken maddeler bileşikler, S/G oranı yaklaşık olarak 10 oluncaya kadar seyreltilmiştir. Sinyal düzeyinin gürültü düzeyine oranının üç katına ($S/G=3$) karşılık gelen derişim değeri, saptama alt sınırı (LOD) değeri olarak verilmiştir. Sinyal düzeyinin gürültü düzeyine oranının on katına ($S/G=10$) karşılık gelen derişim değeri alt tayin sınırı (LOQ) değeri olarak verilmiştir. Etken maddelerin LOD ve LOQ değerlerinin belirlenmesi için; her bir madde için 5 kez çalışılmış ve % RSD değerleri 0.256-1.109 aralığında bulunmuştur.

Tablo 4.6. Etken maddelerin kalibrasyon eğrileri (PDA dedektör)

	Asetaminofen	Psödoefedrin HCl	Feniramin Maleat	Guaifenesin	Pirilamin Maleat	Klorfeniramin Maleat	Tripirolidin HCl	Dekstrometorfan HBr	Difenhidramin HCl
Kalibrasyon Denklemi (y=mx+b)	$y=0.3659x+0.0583$	$y=0.3x+0.0134$	$y=0.3698x-0.0462$	$y=0.2798x+0.0225$	$y=0.2236x-0.0015$	$y=0.3101x-0.0205$	$y=0.4438x+0.0116$	$y=0.2556x-0.0351$	$y=0.4565x-0.0059$
Kesim Noktası (ss)	0.0222	0.0047	0.0188	0.0175	0.0011	0.0092	0.0162	0.0046	0.0243
Eğim (ss)	0.0244	0.0071	0.0099	0.0162	0.0012	0.0085	0.0058	0.0007	0.0091
R²	0.9993	0.9997	0.9993	0.9991	0.9999	1	0.9998	0.9990	0.9997
Çalışma Aralığı (mg/L)	0.2-250	0.5-250	0.5-250	1-250	5-250	2.5-250	2.5-250	10-250	5-250
LOD (mg/L)	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2	0.5	0.75	2.5	0.75
LOQ (mg/L)	0.3	0.5	0.75	1	5	2.5	2.5	10	5

4.3.2. Kesinlik ve Doğruluk

Kesinlik ve doğruluk değerleri düşük, orta ve yüksek olmak üzere 3 farklı konsantrasyonda hazırlanan kontrol örneklerinde birbirini izleyen 5 farklı günde günler arası ve beş kere gün içinde olmak üzere hesaplanmıştır. Kesinlik bağıl standart sapma olarak (%RSD) ve doğruluk yüzde geri kazanım olarak ifade edilmiştir.

Tablo 4.7. Etken maddelerin kesinlik ve doğruluk değerleri

		Gün İçi		Günler Arası	
	Eklenen (mg/L)	Kesinlik (% RSD)	Doğruluk (% Geri kazanım)	Kesinlik (% RSD)	Doğruluk (% Geri kazanım)
Asetaminofen	50	1.4420	101.6520	1.4658	101.9980
	100	0.6876	100.3878	0.6902	101.2141
	250	1.0201	100.5995	1.1025	102.3410
Pseudoefedrin HCl	50	3.3608	98.7927	3.7541	96.3060
	100	1.3449	100.0609	1.3457	100.212
	250	0.3759	99.9519	0.3854	100.5387
Feniramin Maleat	50	2.3691	99.1892	2.3499	100.1165
	100	1.2286	101.1458	1.2427	103.1933
	250	1.0122	99.4358	1.0065	100.057
Guaifenesin	50	0.9491	100.8194	0.9569	101.0235
	100	0.7833	100.2711	0.7854	100.3749
	250	2.2236	101.6682	2.5607	103.1516
Pirilamin Maleat	50	3.9870	101.2402	4.0364	103.0688
	100	3.3658	100.8789	3.3954	101.0122
	250	3.9282	99.0023	3.8890	100.0521
Klorfeniramin Maleat	50	2.5739	101.8374	2.6212	102.056
	100	0.5632	100.9189	0.5684	100.9465
	250	1.4962	101.3465	1.5163	102.9471
Tripirolidin HCl	50	2.2186	100.0368	2.9564	101.5857
	100	1.6736	102.1042	1.7089	103.2254
	250	2.0286	101.1976	2.6815	103.8761
Dekstrometorfan HBr	50	2.0466	99.5917	2.9157	102.0081
	100	2.0346	101.4256	2.0636	101.9875
	250	1.2113	100.8714	1.2218	101.0159
Difenhidramin HCl	50	1.1565	100.66	1.1641	101.1572
	100	0.4162	100.2087	0.4170	100.8704
	250	0.4766	99.4162	0.4738	99.9141

4.3.3. Stres Testleri

Stres testleri alkali, asidik ve oksidatif ortam şartlarında gerçekleştirilmiştir. Çalışmalar sonunda elde edilen % geri kazanım değerleri Tablo 4.8’de görülmektedir.

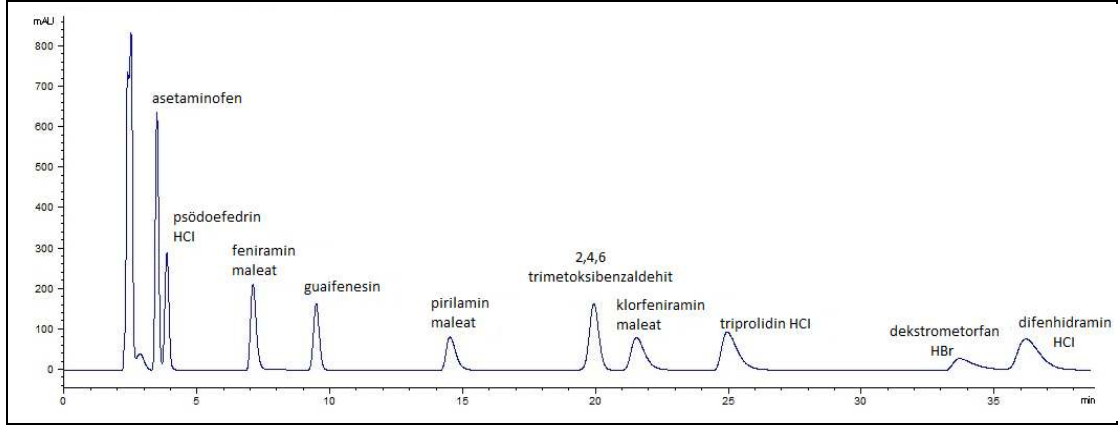
Tablo 4.8. Stres testleri sonunda elde edilen % geri kazanım değerleri

	% Geri Kazanım					
	HCl		H ₂ O ₂		NaOH	
	2 Saat, 80 °C	8 Saat, 80 °C	2 Saat, 24(±2) °C	8 Saat, 24(±2) °C	2 Saat, 80 °C	8 Saat, 80 °C
Asetaminofen	56.12	0	99.5	86.3	53.8	0
Psödoefedrin HCl	73.07	65.8	97.3	95.6	80.5	74.6
Feniramin Maleat	Pik şekli kötü	Pik şekli kötü	93.1	84.3	70.9	57.2
Guaifenesin	94.1	91.9	98.2	95.7	83.5	63.8
Pirilamin Maleat	76.7	36.3	89.9	86.2	46.8	0
Klorfeniramin Maleat	90.4	78.2	94.7	75.9	54.9	20.9
Triprolidin HCl	81.1	71.7	90.4	79.4	23.3	0
Dekstrometorfan HBr	84.7	63.9	98.8	92.7	93.0	36.4
Difenhidramin HCl	18.9	6.6	97.5	85.9	30.3	0

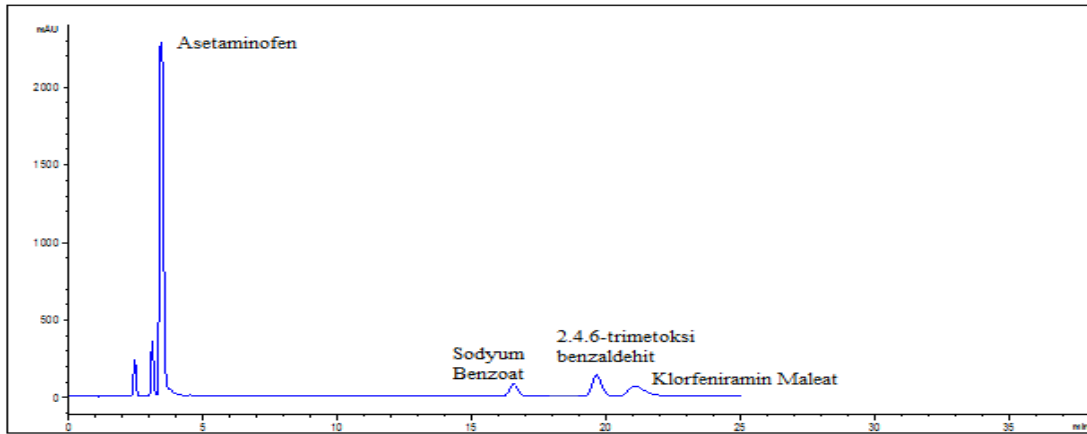
Sonuçlar ele alındığında en az bozunmanın oksidatif stres şartlarında olduğu görülmektedir. Alkali ortamda asetaminofen, pirilamin maleat, triprolidin HCl ve difenhidramin HCl 8 saatlik ısıtma işlemi sonunda tamamen bozunmuştur. Asidik stres şartlarında ise guaifenesin gibi bazı piklerde bozunma çok fazla olmazken asetaminofen ve difenhidramin HCl’de büyük oranda bozunma olduğu görülmektedir.

4.4. Şurup Örneklerindeki Etken Madde Tayini

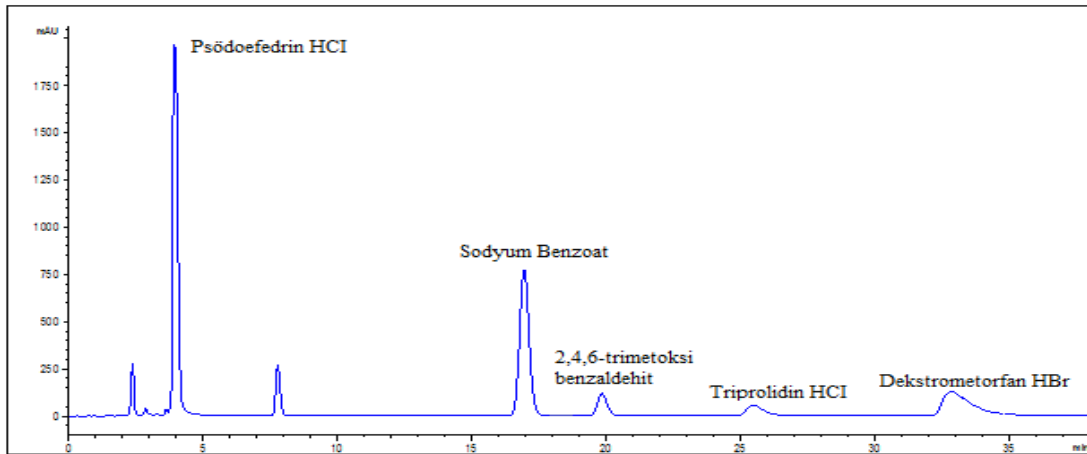
Piyasadan edinilen şurup örnekleri 10 kat seyreltikten sonra vorteks karıştırıcı yardımıyla 15 dk karıştırılmış ve 0.45 µm gözenek çaplı membran kullanılarak süzülüp cihaza enjekte edilmiştir. Her şurup örneği 3 kez çalışılmıştır.



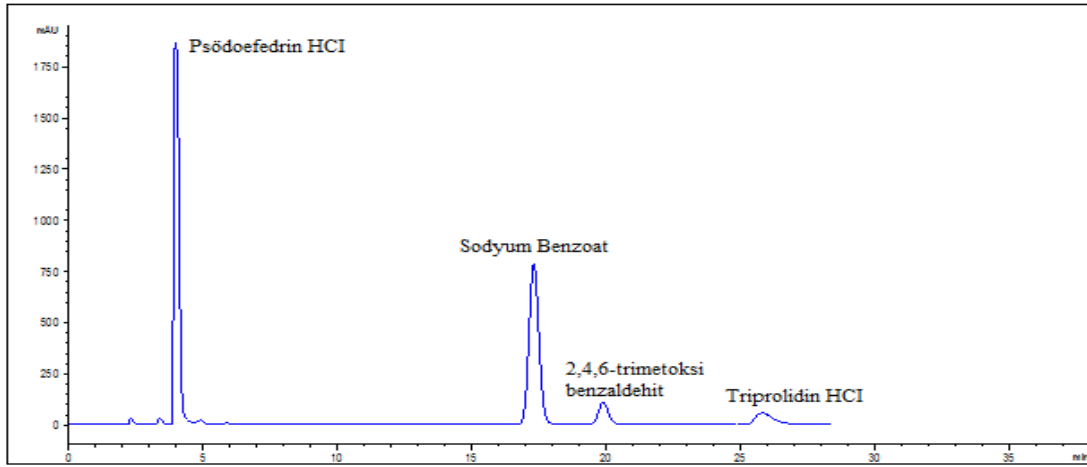
Şekil 4.7. Etken maddelerin kromatografik ayrımının gösterimi



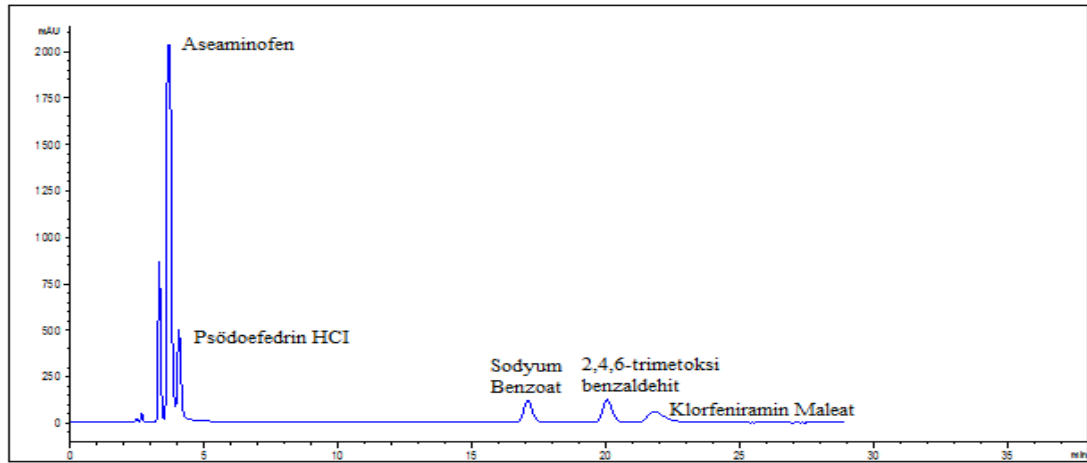
Şekil 4.8. Corsal şuruba ait kromatogram.



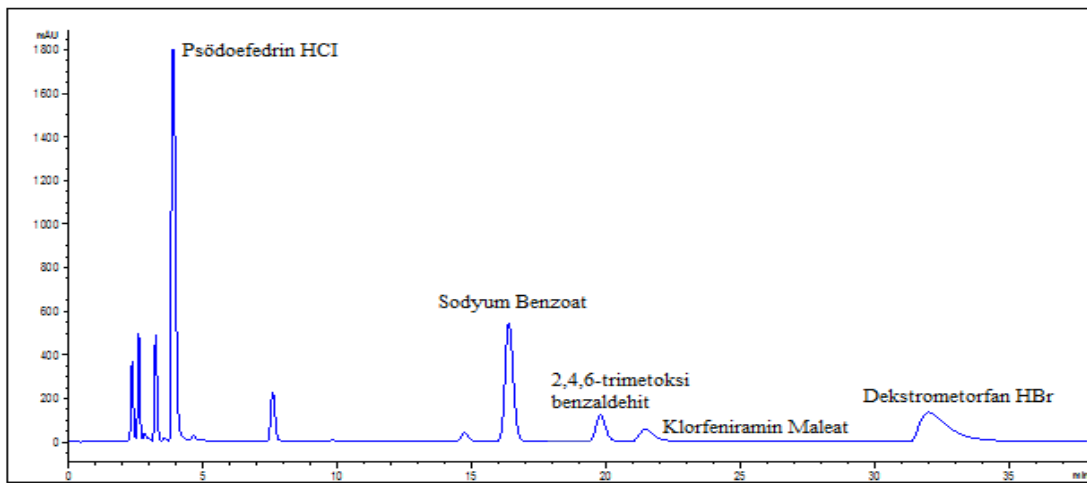
Şekil 4.9. Actidem şuruba ait kromatogram.



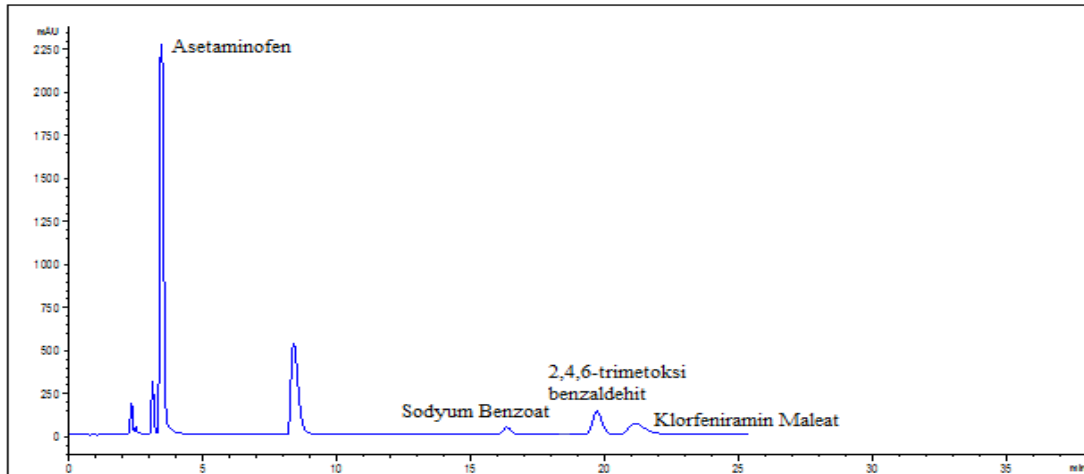
Şekil 4.10. Actifed şuruba ait kromatogram.



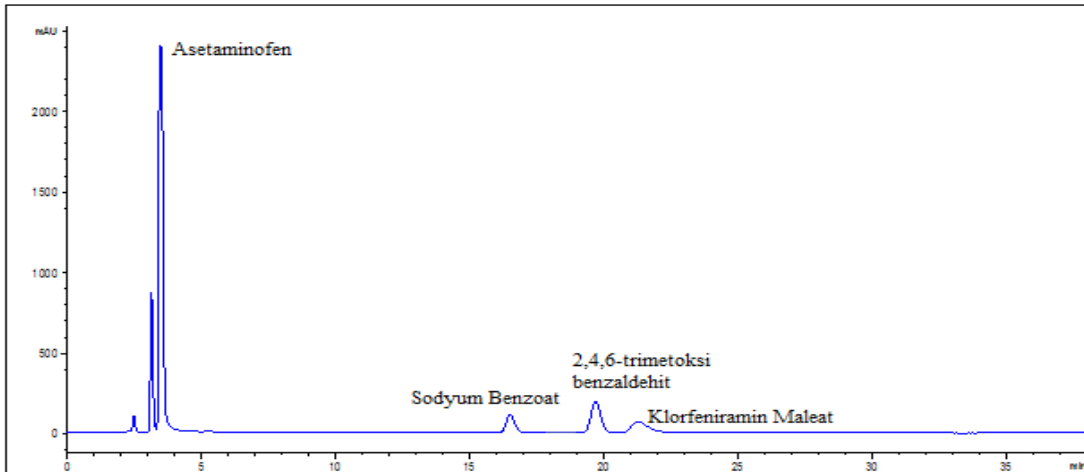
Şekil 4.11. Aferin şuruba ait kromatogram.



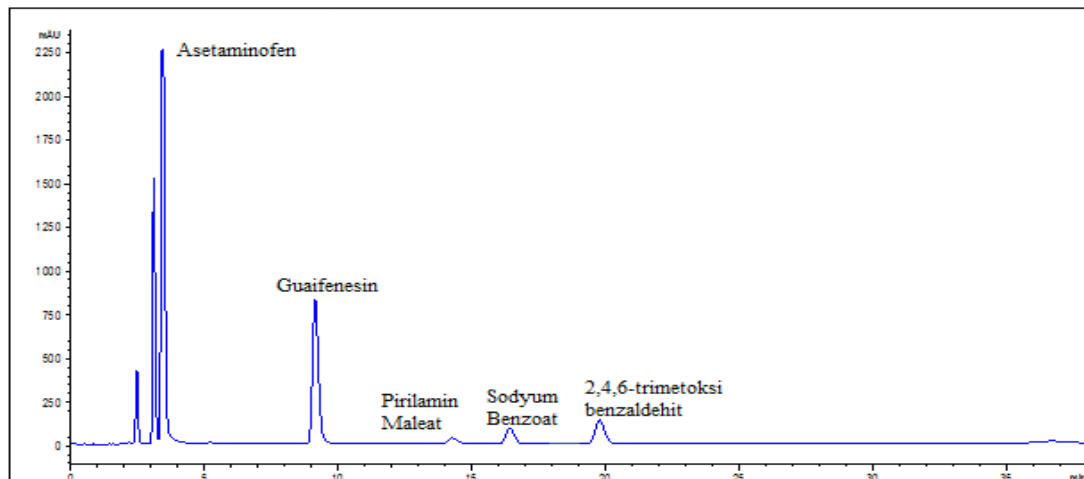
Şekil 4.12. Benical şuruba ait kromatogram.



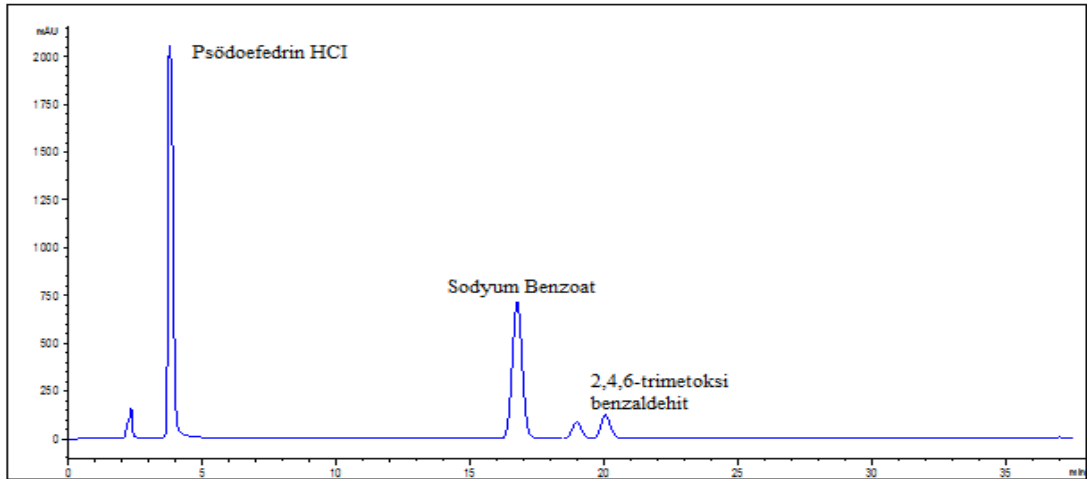
Şekil 4.13. Katarin şuruba ait kromatogram



Şekil 4.14. Kongest şuruba ait kromatogram.



Şekil 4.15. Peditus şuruba ait kromatogram.



Şekil 4.16. Sudafed şuruba ait kromatogram.

Analizlenen şurup örneklerinde bulunan etken maddelerin konsantrasyonları Tablo 4.9’da, analiz sonucunda bulunan etken madde konsantrasyonları ve % bağıl hata değerleri Tablo 4.10’da görülmektedir.

Tablo 4.9. Piyasadaki şuruplarda bulunan etken madde konsantrasyonları

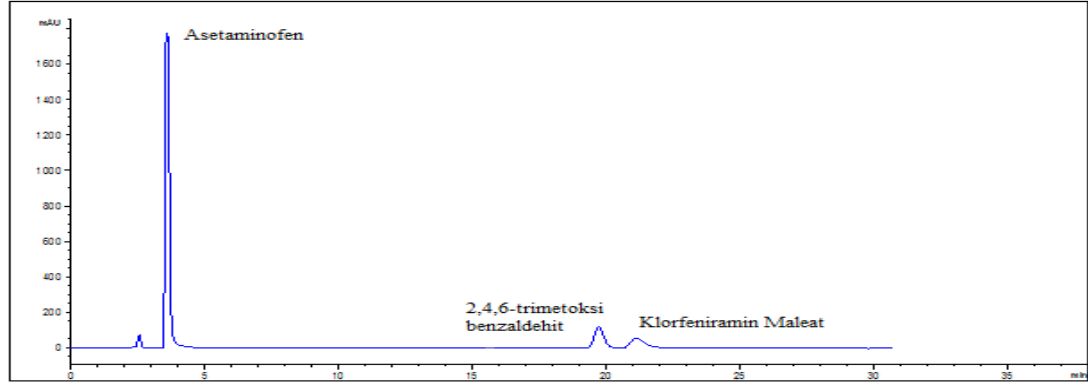
	Actidem	Actifed	Aferin	Benical	Corsal	Katarin	Kongest	Peditus	Sudafed
	Derişim (mg/L)	Derişim (mg/L)	Derişim (mg/L)	Derişim (mg/L)	Derişim (mg/L)	Derişim (mg/L)	Derişim (mg/L)	Derişim (mg/L)	Derişim (mg/L)
Asetaminofen			32000		24000	24000	32000	24000	
Guaifenesin								10000	
Klorfeniramin Maleat			200	400	400	200	200		
Pirilamin Maleat								1250	
Psödoefedrin HCl	6000	6000	3000	4000					6000
Triprolidin HCl	250	250							
Dekstrometorfan HBr	2000			2000					

Tablo 4.10. Analiz sonucu hesaplanan etken madde konsantrasyonları ve % bağıl hata değerleri

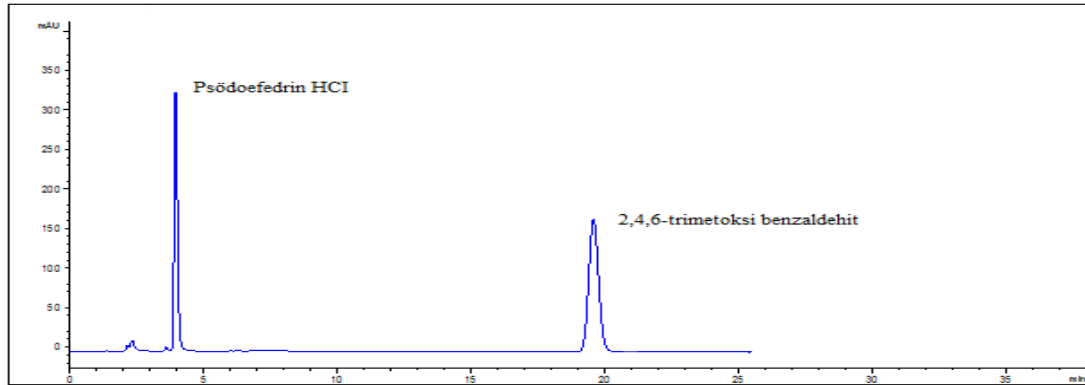
[illegible]

4.5. Tablet Örneklerindeki Etken Madde Miktarları

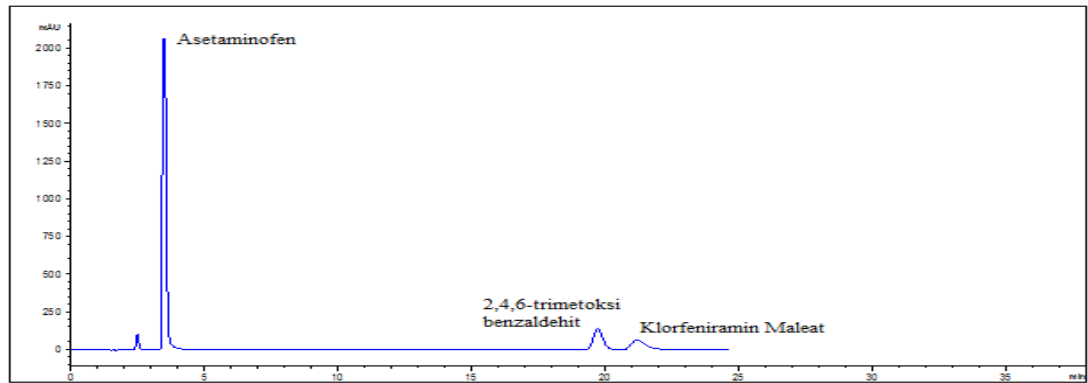
Daha önce belirtilen ön işlemlerden geçirilen ticari tablet örnekleri cihaza enjekte edilmiştir. Her tablet örneği için 3 kez çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlar ve kromatogram örnekleri aşağıda verilmiştir.



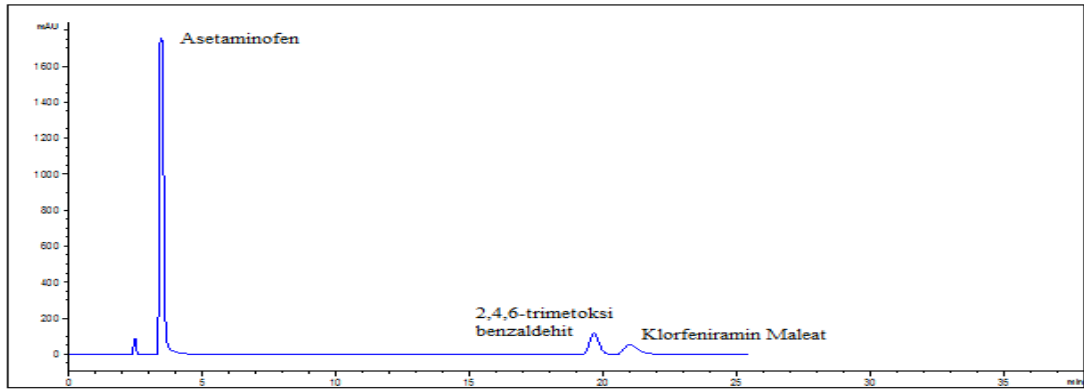
Şekil 4.17. Gerakon tablete ait kromatogram.



Şekil 4.18. Sudafed tablete ait kromatogram.



Şekil 4.19. Corsal tablete ait kromatogram.



Şekil 4.20. Kongest tablete ait kromatogram.

Analizlenen tablet örneklerinde bulunan etken maddelerin konsantrasyonları Tablo 4.11’de analiz sonucunda bulunan etken madde konsantrasyonları ve Tablo 4.12’de % bağıl hata değerleri görülmektedir.

5. TARTIŞMA

Literatürde HPLC-DAD yöntemiyle soğukalgınlığı tedavisinde kullanılan tablet ve şuruplardaki etken maddeleri tayin eden çalışmalar mevcuttur.

Franeta ve arkadaşları, tabletlerde asetilasisilik asit, parasetamol, kafein, fenobarbital etken maddelerinin tayinini HPLC-DAD yöntemiyle yapmışlardır. Ayırma işleminde mobil faz olarak hacimce 25/75 oranlarında asetonitril ve suyun karıştırılıp pH'nın fosforik asitle 2.5'e ayarlanmasıyla oluşturulan mobil faz kullanılmıştır. Kullanılan kolon Bio SiL HL C18 (250×4.6 mm, 5µm) kolondur. 207 nm dalgaboyunda çalışılmıştır. R^2 değeri 0.998'dir. Yöntemin dezavantajı eşzamanlı olarak az sayıda maddenin analizlenmiş olmasıdır ve R^2 değerinin düşük olmasıdır (62).

Ghulam ve arkadaşları, tabletlerde ve tıbbi süspansiyonlarda parasetamol, metil paraben, etil paraben ve propil parabenin tayinini UV-GB dedektörü bağlı ters faz HPLC cihazı ile yapmışlardır. Mobil faz pH'ı formik asitle 3.0'a ayarlanmış asetonitril-tetrahidrofur-an-su (21:13:66, h/h/h) karışımıdır. 249 nm dalgaboyunda çalışmışlardır. Lichrosorb RP8 (150x4.6mm, 5 µm) kolon kullanmışlardır. Parasetamol, metil paraben, propil paraben ve etil paraben için çalışma aralığı sırasıyla; 25–160 µg/mL; 20–128 µg/mL; 5–40 µg/mL ve 5–32 µg/mL'dir. Bizim çalışmamızda parasetamol için belirlenen çalışma aralığı ise 0.2-250 µg/mL'dir (70). Buradan parasetamol için saptanan çalışma aralığının dar olduğu görülmektedir. Ayrıca çalışmada tek bir etken maddenin analizlenmesi de yöntemin dezavantajlarından biridir.

Maithani ve arkadaşları, farmasötik dozaj formlarında klorfeniramin maleat ve fenilefrin analizini ters faz HPLC yöntemiyle gerçekleştirmişlerdir. Mobil faz olarak; asetonitril-fosfat tamponu 55:45 (h/h) oranında karıştırılmış ve pH'ı trietilamin ile 5.6 ± 0.02 e ayarlanmıştır. 255 nm dalgaboyunda çalışmışlardır. C18 (250 mm × 8 mm, 10 µm) kolon kullanarak ayırma işlemini gerçekleştirmişlerdir. Klorfeniramin maleat ve fenilefrin için çalışma aralığı sırasıyla; 10–70 µg/mL, 10–70 µg/mL'dir. Klorfeniramin maleat için R^2 değeri 0.9995 iken fenilefrin için 0.9993'tür (69). Bizim çalışmamızda ise klorfeniramin maleat için saptanan çalışma aralığı

ve R^2 değeri ; 2.5-250 $\mu\text{g/mL}$ ve 1'dir. Buradan hareketle Maithani ve arkadaşlarına ait çalışmada, çalışma aralığının dar ve R^2 değerinin düşük olduğu görülmektedir.

Tunus' da yapılan bir çalışmada Louhaichi ve arkadaşları, soğuk algınlığı ve öksürük şuruplarında bulunan psödoefedrin HCl, feniramine maleate, guaifenesin, pirilamin maleat, klorfeniramin maleat, dekstrometorfan HBr nin HPLC ile tayininde mobil faz olarak pH'sı 3 e ayarlanmış metanol ve pH'sı 3'e ayarlanmış dihidrojen fosfat tamponu (45:55, h/h) kullanmışlardır. İzokratik elüsyon uygulayarak maddelerin ayrımını gerçekleştirmişlerdir. 220 nm dalgaboyunda Kromasil LC18 (150mm×4.6 mm, 5 μm) kolon yardımıyla ayrımı gerçekleştirmişlerdir. Psödoefedrin HCl, feniramine maleate, klorfeniramin maleat için çalışma aralığı 5-50 $\mu\text{g/mL}$, guaifenesin, pirilamin maleat, dekstrometorfan HBr, sodyum benzoat, metil paraben için 50-600 $\mu\text{g/mL}$ 'dir. Psödoefedrin HCl, feniramine maleate, klorfeniramin maleat, guaifenesin, pirilamin maleat, dekstrometorfan HBr için sırasıyla: LOD değerleri; 0.2 $\mu\text{g/mL}$, 0.03 $\mu\text{g/mL}$, 0.03 $\mu\text{g/mL}$, 0.04 $\mu\text{g/mL}$, 0.1 $\mu\text{g/mL}$, 0.06 $\mu\text{g/mL}$ iken LOQ değerleri 0.66 $\mu\text{g/mL}$, 0.1 $\mu\text{g/mL}$, 0.13 $\mu\text{g/mL}$, 0.13 $\mu\text{g/mL}$, 0.33 $\mu\text{g/mL}$, 0.2 $\mu\text{g/mL}$ 'dir. Yine aynı şekilde R^2 değerleri de şöyle sıralanmaktadır; 0.999, 0.999, 0.999, 0.999, 0.999 ve 0.999'dur (67). Bizim çalışmamızda ise psödoefedrin HCl, feniramin maleat ve klorfeniramin maleat için bulunan çalışma aralıkları sırasıyla şöyledir; 0.5-250 $\mu\text{g/mL}$, 0.5-250 $\mu\text{g/mL}$ ve 2.5-250 $\mu\text{g/mL}$ 'dir. Louhaichi ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya nazaran daha geniş bir çalışma aralığının belirlendiği görülmektedir. Çalışmamızda psödoefedrin HCl, feniramine maleate, klorfeniramin maleat, guaifenesin, pirilamin maleat ve dekstrometorfan HBr için bulunan R^2 değerleri şöyledir; 0.9997, 0.9993, 1, 0.9991, 0.9999 ve 0.9990'dur. Buradan çalışmamızda bulunan R^2 değerlerinin daha yüksek olduğu görülmektedir. Ayrıca çok sayıda etken maddenin analizini yapmış olmamızda yöntemimizin diğer bir avantajıdır.

Qi ve arkadaşları, soğukalgınlığı tedavisinde yeni ilaç formülasyonlarında kullanılmak üzere asetaminofen, psödoefedrin HCl ve dekstrometorfan HBr'nin analizini gerçekleştirmişlerdir. Qi ve arkadaşları, mobil faz olarak heptansülfonik asit sodyum tuzu-metanol-ACN (25:57:18, h/h/h) belirtilen oranlarda karıştırılıp pH'sı 3.3'e ayarlanmıştır. A Hypersil CN (150x5.0 mm, 5 μm) normal faz kolon kullanılarak 220 nm dalgaboyunda çalışılmıştır. Asetaminofen, psödoefedrin HCl, dekstrometorfan HBr için sırasıyla çalışma aralığı 2.06-20.6 $\mu\text{g/mL}$; 0.202-2.02

mg/mL; 0.042-1.06 mg/mL. LOQ değerleri ise 0.98 µg/mL, 0.10 mg/mL; 0.02 mg/mL'dir (64). Bu yöntemin dezavantajı çalışma aralığının dar ve LOQ değerlerinin yüksek olmasıdır.

Nagaralli ve arkadaşları insan plazmasında ve farmasötik formülasyonlarda bulunan setirizin HCl ve parasetamol tayinini HPLC ile gerçekleştirmişlerdir. Mobil faz olarak asetonitril-su (55:45, h/h) kullanmışlardır. 230 nm dalgaboyunda analizi gerçekleştirmişlerdir. Kolon olarak CLC C18 (250x4.6 mm, 5 µm) kolon kullanmışlardır. Setirizin HCl ve parasetamol için çalışma aralığı ve R^2 değerleri sırasıyla; 0.715-55 µg/mL, 0.55-39 µg/mL ve 0.9985-0.9957'dir. LOD ve LOQ değerleri ise setirizin HCl için 0.248 µg/mL ve 0.550 µg/mL, parasetamol için ise 0.208 µg/mL 0.715 µg/mL'dir (75). Çalışmamızda parasetamol için belirlenen çalışma aralığı, 0.2-250 µg/mL'dir. Aralığın geniş olması bize parasetamol tayininde avantaj sağlamaktadır. Yine parasetamol için belirlenen LOD ve LOQ değerleri ise 0.1 µg/mL ve 0.2 µg/mL, R^2 değeri ise 0.9993'tür. Bu da Nagaralli ve arkadaşlarının çalışmasında parasetamol için çalışma aralığının dar, LOD ve LOQ değerlerinin yüksek ve R^2 değerinin düşük olduğunu göstermektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Soğuk algınlığı ve öksürük şuruplarında aktif madde olarak bulunan psödoefedrin HCl, feniramin maleat, asetaminofen, guaifenesin, pirilamin maleat, klorfeniramin maleat, triprolidin HCl, dekstrometorfan HBr ve difenhidramin HCl ters faz HPLC-DAD yöntemiyle eş zamanlı olarak tayin edilmiştir.

Yöntemimizi optimize etmek amacıyla öncelikle mobil fazın hacimce yüzde KH_2PO_4 ve MeOH oranları taranmıştır. Daha sonra, mobil fazda bulunan KH_2PO_4 tamponunun derişimi belirlenmiştir. Mobil fazın pH'nın alıkonma zamanları üzerine etkisi araştırılmıştır. 9 aktif maddenin kromatografik ayrımı % 62 KH_2PO_4 (80 mM, pH=3) ve % 38 metanol içeren mobil faz çözeltisi kullanılarak, oda sıcaklığında, 0.75 mL/dk akış hızında, 210 nm dalga boyunda 37.9 dakikada gerçekleştirilmiştir. İç standart olarak 2,4,6-trimetoksi benzaldehit kullanılmıştır.

Analiz esnasında sistemin doğru olarak işlediğini göstermek amacıyla her bir aktif madde için sistem uygunluk parametreleri hesaplanmıştır.

Optimize edilen yöntem valide edilmiştir. Seçicilik, kalibrasyonun (eğrisinin) doğrusallığı, saptama alt sınırı (LOD), doğruluk, günüçi ve günler arası kesinlik, geri kazanım ve zorlanmış bozunma çalışmaları metot validasyonunun bir parçası olarak incelenmiştir. Yöntemimizin seçici olduğu standart maddelerin alıkonma zamanında plasebodan kaynaklı herhangi bir örtücü pik gelmediği gösterilerek kanıtlanmıştır. Tayin edilen bileşikler için farklı derişimlerde günüçi ve günlerarası kesinlik değerleri (%RSD) sırasıyla 0.3759-3.9870 ve 0.3854- 4.0364 aralığında olduğu hesaplanmıştır. Günüçi ve günlerarası doğruluk değerleri (% geri kazanım) sırasıyla 98.7927-102.1042 ve 96.3060-103.8761 aralığında bulunmuştur.

Her bileşiğin asidik, bazık ve oksidatif stres şartlarında ne kadar bozunduğu belirlenmiştir. Sonuçlar ele alındığında en az bozunmanın oksidatif stres şartlarında olduğu görülmektedir.

Geliştirilen yöntemimiz soğuk algınlığı ve öksürükte kullanılan şurup ve tabletler gibi farklı farmasötik ilaçların rutin analizinde başarıyla uygulanmıştır. Piyasadan temin edilen Actidem, Actifed, Aferin, Benical, Corsal, Katarin, Kongest, Peditus ve Sudafed şuruplarında yapılan analizlerde bağıl yüzde hata 0.0106-8.245 aralığındadır. Benical, Corsal, Gerekon, Kongest, Sudafed ve Theraflu tabletlerinde yapılan analizlerde bağıl yüzde hata 0.007-1.6833 aralığındadır.

Yöntemimizin en önemli avantajı çok sayıda aktif maddenin analizinin eş zamanlı olarak yapılmış olmasıdır. Çok sayıda aktif maddenin tek bir yöntemle tayini, piyasada bulunan çok sayıda tablet ve şurubun rutin analizine olanak sağlamıştır.

KAYNAKLAR

1. <http://www.aafp.org/afp/2007/0215/p522.html>
2. Gwaltney, J.M.Jr. (2000). *The Common Cold. In Principles and Practices of Infectious Diseases* (5. Bs). New York: Churchill Livingstone.
3. Gwaltney, J.M.Jr., J. Hendley, G. Simon, W.S.J. Jordan. (1967). Rhinovirus infections in an industrial population. II. Characteristics of illness and antibody response. *JAMA*.
4. Doyle, W.J., T.P. McBride, D.P. Skoner, B.R. Maddern, J.M. Gwaltney, Jr., and M. Uhrin. (1988). A double-blind, placebo-controlled clinical trial of the effect of chlorpheniramine on the response of the nasal airway, middle ear and eustachian tube to provocative rhinovirus challenge. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 7, 229-238.
5. Insel, P.A. (1996). *In Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, J.G. Hardman, L.E. Limbird, P.B. Molinoff, R.W. Ruddon, A.G. Gilman (Ed.). *Analgesic-antipyretin and antiinflammatory agents and drugs employed in the treatment of gout* (s.617-657). New York: McGraw Hill.
6. Hoffman, B.B., and R.J. Lefkowitz. (1996). *In Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics.*, J.G. Hardman, L.E. Limbird, P.B. Molinoff, R.W. Ruddon, A.G. Gilman (Ed.). *Catecholamines, sympathomimetic drugs, and adrenergic receptor antagonists* (s.199-248). New York: McGraw Hill.
7. Reisine, T., and G. Pasternak. (1996). *In Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics* (9. bs), New York: McGraw Hill.
8. Marin A., Garcia E., Garcia A., Barbas C. (2002). Validation of a HPLC quantification of acetaminophen, phenylephrine and chlorpheniramine in pharmaceutical formulations: capsules and sachets. *Journal Of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 29, 701-714.
9. Chou, D.T., Wang, S.C. (1975). Studies on the localization of central cough mechanism; site of action of antitussive drugs. *J. Pharmacol Exp. Ther.*, 194(3), 499-505.
10. www.aafp.org/afp

11. Arroll, B., Kenealy, T. (2005). Antibiotics for the common cold and acute purulent rhinitis. *Cochrane Database Syst Rev.* 3, CD000247
12. Fahey, T., Stocks, N., Thomas, T. (1998). Systematic review of the treatment of upper respiratory tract infection. *Arch. Dis. Child.*, 79, 225–230.
13. Schroeder, K., Fahey, T. (2004). Over-the-counter medications for acute cough in children and adults in ambulatory settings. *Cochrane Database Syst Rev.* 4, CD001831.
14. Pavesi, L., Subburaj, S., Porter-Shaw, K. (2001). Application and validation of a computerized cough acquisition system for objective monitoring of acute cough: a meta-analysis. *Chest.* 120:1121–8.
15. Taverner, D., Latte, J., Draper, M. (2004). Nasal decongestants for the common cold. *Cochrane Database Syst Rev.* 3, CD001953.
16. Eccles, R., Jawad, M.S., Jawad, S.S., Angello, J.T., Druce, H.M. (2005). Efficacy and safety of single and multiple doses of pseudoephedrine in the treatment of nasal congestion associated with common cold. *Am J Rhinol*, 19, 25–31.
17. Del Mar, C., Glasziou, P. (2003) Upper respiratory tract infection. *Clin Evid.*, 10, 1747–1756.
18. Hayden, F.G., Diamond, L., Wood, P.B., Korts, D.C., Wecker, M.T. (1996) Effectiveness and safety of intranasal ipratropium bromide in common colds. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med.*, 125, 89–97.
19. www.pediatrics.aappublications.org/cgi/content/full/114/1/e85
20. Schroeder, K., Fahey, T. (2002). Should we advise parents to administer over the counter cough medicines for acute cough? Systematic review of randomised controlled trials. *Arch Dis Child.* 86, 170–175.
21. Sutter, A.I., Lemiengre, M., Campbell H., Mackinnon H.F. (2003). Antihistamines for the common cold. *Cochrane Database Syst Rev.*, 3, CD001267.
22. Linde, K., Barrett, B., Wölkart, K., Bauer, R., Melchart, D. (2006). Echinacea for preventing and treating the common cold. *Cochrane Database Syst Rev.* 1, CD000530.

23. Douglas RM, Hemila H, D'Souza R, Chalker EB, Treacy B. (2004) *Vitamin C for preventing and treating the common cold*. Cochrane Database Syst Rev. 4, CD000980.
24. Sweetman, S.C. (2002). *Martindale The Complete Drug Reference* (33. bs.). London : Pharmaceutical Press.
25. Yıldız A., Genç Ö. (1993). *Enstrümantal Analiz*. (1. bs). Ankara: Hacettepe Üniversitesi Yayınları.
26. Skoog, D. A., Holler F. J., West, D. M. (1991). *Analitik Kimya Temelleri*. (7. bs). Ankara: Bilim Yayıncılık.
27. Skoog, D. A., Holler E. J., Crouch, S. R. (2007). *Principles of Instrumental Analysis* (6.bs.). Kanada: Thomson Brooks / Cole.
28. Mermet, M., Otto, M. V. (2004). *Analytical Chemistry: A modern Approach to Analytical Science* (2.bs.). Germany: Wiley-Vch.
29. Skoog, D. A., Holler E. J., Crouch, S. R. (2007). *Principles of Instrumental Analysis* (6.bs.). Kanada: Thomson Brooks / Cole.
30. Robinson, J. F., Robinson, K. A. (1998). *Contemporary Chemical Analysis*. New Jersey: Prentice Hall Ptr, Inc.
31. David S. Hage, James D. Carr (2011). *Analytical Chemistry and Quantitative Analysis*. (International Edition.). New Jersey: Pearson
32. Gündüz, T. (2007). *İnstrümantal Analiz*. (10. bs). Ankara: Gazi Kitabevi.
33. Cazes, J. (2005). *Ewing's Analytical Instrumentation Handbook* (3.bs.). New York, U.S.A: Marcel Dekker.
34. Ahuja, S., Dong, M. W. (2005). *Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC*. (6. Bs.). New York, North Carolina: Elsevier, Academic Press.
35. Kenkel, J. (1994). *Analytical Chemistry for Technicians* (2.bs.) Washington, D.C: Lewis Publishers.
36. Snyder, L. R., Kirkland, J. J., Glajch, J. L. (1997). *Practical HPLC Method Development* (2.Bs.), Kanada: A Wiley-Interscience Publication.
37. HPLC for Pharmaceutical Scientists, Kazekevich, Yuri, LoBrutto, Rosario. 2007 by John Wiley & Sons.

38. LoBrutto, R., Kazakevich, Y.V., Retention of ionizable components in reversedphase HPLC, in S. Kromidas (ed.), Practical Problem Solving in HPLC, Wiley-VCH (2000), New York, pp. 122–158.
39. Espinosa, S., Bosch, E., Roses, M., Acid–base constants of neutral bases in acetonitrile–water mixtures, *Anal. Chim. Acta* 454 (2002), 157–166.
40. Zakeri-Milani, P., Barzegar-Jalali, M., Tajerzadeh, H., Azarmi, Y., Valizadeh, H. (2005). Simultaneous Determination of Naproxen, Ketoprofen and Phenol Red in Samples from Rat Intestinal Permeability Studies: HPLC Method Development and Validation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 39, 624-630.
41. Chan, C.C., Lam, H., Lee, Y.C., Zhang X.M. (2004). Analytical Method Validation and Instrument Performance Verification, New Jersey:Wiley-Interscience.
42. Lang, J.R., Bolton, S. (1991). A comprehensive method validation strategy for bioanalytical applications in the pharmaceutical industry. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 5, 357- 361.
43. Pastelnick, L.A. (1994) Drug and the Pharmaceutical Sciences. NewYork and Basel:Marcel Dekker Inc.
44. EURACHEM Guide. (1998). A laboratory guide to method validation and related topics.
45. WELAC. (1993). Western European Laboratory Accreditation Cooperation, Guidance Documents.
46. International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Validation of analytical procedures, Q2A, (1995). Geneva.
47. Rodriguez, L.C., Campana, A.M., Linares, C.J., Ceba, M.R. (1993). Estimation of performance characteristics of an analytical method using the data set of the calibration experiment, *Analytical Letters*, 26, 1243-1258.
48. Causon, R. (1997). Validation of chromatographic methods in biomedical analysis viewpoint and discussion. *Journal of Chromatography B*, 689,175-180.

49. Gardner, J.A., Coleman, S., Farrow, S.G. (1993). Why worry about your analytical methods? *Analytical Proceedings*, 30, 183-185.
50. International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Text on validation of analytical procedures, Q2A, 1994.
51. International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Validation of analytical procedures: Methodology, Q2B, 1996.
52. International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Validation of analytical procedures, ICH-Q2A, 1995.
53. US FDA, General principles of validation, Center for Drug Evaluation and Research (CDER),(1987). Rockville, Maryland.
54. James Agalloco, Frederick J. Carleton. (2008). Validation of Pharmaceutical Processes (2. bs). Informa Healthcare USA, Inc.
55. Jime'Neza, C., Venturaa, R., Seguraa, J. (2002). Validation of Qualitative Chromatographic Methods: Strategy in Q Antidoping Control Laboratories. *Journal of Chromatography B*, 767, 341–351.).
56. IUPAC, Compendium of Analytical Nomenclature, Definitive Rules 1987, Blackwell Scientific Publications, (1997), Oxford, UK.
57. González, A.G., Herrader, M. Á. (2007). A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 26(3), 227-238.
58. ICH Guidance for Industry Q1A(R2) Stability Testing of New Drug Substances and Products, 2003.
59. Ravisankar, S., Vasudevan, M., Gandhimathi, M., Suresh, B. (1998). Reversed-phase HPLC method for the estimation of acetaminophen, ibuprofen and chlorzoxazone in formulations. *Talanta*, 46, 1577-1581.
60. Celma, C., Allué, J.A., Pruñonosa, C., Obach, R. (2000). Simultaneous determination of paracetamol and chlorpheniramine in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal Of Chromatography A*. 870, 77-86.

61. Vasudevan, M., Ravisankar, S., Sathiyarayanan, A., Chandan, R.S. (2000). Simultaneous estimation of phenylpropanolamine HCl, guaiphenesin and diphenylpyraline HCl in syrups by LC. *Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis*, 24, 25-31.
62. Franeta, J.T., Agbaba, D., Eric, S., Pavkov, S., Aleksic, M., Vladimirov, S. (2002). HPLC assay of acetylsalicylic acid, paracetamol, caffeine and phenobarbital in tablets. *IL Farmaco*, 57, 709-713.
63. Darryl, J.H., Cheung, H.Y. (2003). A chromatographic method for rapid and simultaneous analysis of codeine phosphate, ephedrine HCl and chlorpheniramine maleate in cough-cold syrup formulation. *Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis*, (30), 1595-1601.
64. Qi, M.L., Wang, P. Zhou L., Gu, J.L., Fu, R.N. (2003). Simultaneous determination of acetaminophen, dextromethorphen hydrobromide and pseudoephedrine hydrochloride in a new drug formulation for cold treatment by HPLC. *Chromatographia*, 57, 139-142.
65. Alaa, E., Samy, E., Ahmed, M. (2006). Application and validation of chemometrics-assisted spectrophotometry and liquid chromatography for the simultaneous determination of six-component pharmaceuticals. *Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis*, 41, 421-430.
66. Palabyik, M., Onur, F. (2007). The simultaneous determination of phenylephrine hydrochloride, paracetamol, chlorpheniramine maleate and dextromethorphan hydrobromide in pharmaceutical preparations. *Chromatographia*, 66, S93-S96.
67. Louhaichi, M.R., Jebali, S., Loueslati, M.H., Adhoum, N., Monser, L. (2009). Simultaneous determination of pseudoephedrine, pheniramine, guaifenesin, pyrilamine, chlorpheniramine and dextromethorphan in cough and cold medicines by high performance liquid chromatography. *Talanta*, 78, 991-997.
68. Manassraa, A., Khamisa, M., El-Dakikya, M., Abdel-Qaderb, Z., Al-Rimawia, F. (2010). Simultaneous HPLC analysis of pseudoephedrine hydrochloride, codeine phosphate, and triprolidine hydrochloride in liquid dosage forms. *Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis*, 51, 991-993.

69. Maithani M et al.(2010). Development and validation of a RP-HPLC method for the determination of chlorpheniramin maleat and phenylephrine in pharmaceutical dosage form. *IJCP*, 5,(05).
70. Ghulam, A.S., Shafique, A.A. (2011). Determination of paracetamol, methyl parahydroxybenzoate, ethyl parahydroxybenzoate, propyl parahydroxybenzoate in medicinal suspension and tablets by RPLC/UV-DAD. 34, 719–729.
71. Redasani, V.K., Gorle, A.P., Badhan, R.A., Jain, P.S., Surana, S.J. (2012). Simultaneous determination of chlorpheniramin maleat and phenylephrine HCl, paracetamol and caffeine in pharmaceutical preparation by RP-HPLC. *Chemical Industry and Chemical Engineering*. Quarterly OnLine-First Issue 00, 42-42.
72. Rowe, R.C., Sheskey, P.J., Cook, W.G., Fenton, M.E. (2009). *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. UK: Pharmaceutical Press.
73. Seshachalam, U., Narasimha Rao, D.V.L., Haribabu, B., Chandrasekhar, K.B. (2007). Determination of Atazanavir in the Presence of its Degradation Products by a Stability-Indicating LC Method. *Chromatographia*. 65, 355-358.
74. <http://www.chemaxon.com/marvin/sketch/index.php>
75. Nagaralli, B.S., Seetharamappa, J., Gowda, B.G., Melwanki, M.B. (2003). Liquid chromatographic determination of ceterizine hydrochloride and paracetamol in human plasma and pharmaceutical formulations. *Journal of Chromatography B*. 798, 49-54.

ÖZGEÇMİŞ

1983 yılında Malatya’ da doğdu. İlköğretimini Malatya Gazi İlkokulu’nda, orta öğretimini Atatürk Ortaokulu’nda, lise öğrenimini Malatya Süper Lisesi’nde tamamladı. 2003 yılında İnönü Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümüne girdi. 2007 yılında mezun oldu. 2009 yılında İnönü Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı’nda yüksek lisansa başladı. 2011 yılında İnönü Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı’nda Araştırma Görevlisi olarak çalışmaya başladı. Halen aynı Anabilim Dalı’nda çalışmaya devam etmektedir.