

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PROPİFENAZON, PARASETAMOL VE KAFEİNİ
BİRLİKTE İÇEREN FARMASÖTİK PREPARATLARDAN
BU MADDELERİN KAPİLER ELEKTROFOREZ
YÖNTEMİYLE AYNI ANDA ANALİZİ**

Ecz. Deniz EMRE

**Analitik Kimya Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Nuran ÖZALTIN**

**ANKARA
2006**

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne:

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

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Sedef KIR
Hacettepe Üniversitesi

Danışman: Prof. Dr. Nuran ÖZALTIN
Hacettepe Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. Nursabah BAŞÇI
Hacettepe Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. Sacide ALTINÖZ
Hacettepe Üniversitesi

Üye: Doç. Dr. Erdal DİNÇ
Ankara Üniversitesi

ONAY:

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

Prof. Dr. Hakan S. ORER
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleşmesine katkılarından dolayı, aşağıdaki kişi ve kuruluşlara içtenlikle teşekkür ederim:

Sayın Prof. Dr. Nuran ÖZALTIN, tez danışmanım olarak bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösterdiği, destek olduğu ve emeğini esirgemediği için,

Analitik Kimya Anabilim Dalımızın saygıdeğer öğretim üyeleri, teorik ve pratik derslerde öğrettikleri değerli bilgiler için,

Sayın Doç. Dr. Erdal DİNÇ, karşılaştırma yönteminin uygulanmasında bilgi ve deneyimleriyle yardımcı olduğu için,

Sayın Uzm. Ecz. Emirhan NEMUTLU ve aynı laboratuvarı paylaştığım diğer dostlarım, tüm yardımları ve gösterdikleri samimiyet için,

Atabay İlaç Fabrikası A.Ş. ve Atabay Kimya San. ve Tic. A.Ş., tez konusu olan maddeleri sağladığı için,

Eczanemin çalışanları Ahmet ESEN ve Fatih ERDOĞDU, tez çalışmam sırasında eczanemin yükünü üstlendikleri için,

Değerli kayınbabam Ali AKSU ve merhum kayınvalidem Şükran AKSU, yaptıkları tüm yardımlar ve gösterdikleri samimiyet için,

Sevgili eşim Uzm. Ecz. Hale EMRE, her konuda bana destek olduğu ve hoşgörü gösterdiği için,

Sevgili annem ve babam, bu günlere gelmemi sağladıkları ve yüksek lisans eğitimi almama destek oldukları için.

ÖZET

Emre, D., Propifenazon, parasetamol ve kafeini birlikte içeren farmasötik preparatlardan bu maddelerin kapiler elektroforez yöntemiyle aynı anda analizi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2006.

Bu tez çalışmasında propifenazon (PRO), parasetamol (PAR) ve kafeinin (KAF) üçlü kombinasyonunu içeren farmasötik preparatlardan bu maddelerin kapiler elektroforez ile aynı anda analizi için yeni bir miseller elektrokinetik kapiler kromatografi yöntemi geliştirilmiştir. En iyi sonuçlar, çalışma elektroliti olarak 30 mM sodyum dodesilsülfat içeren 20 mM pH 9,0 borat tamponu kullanılmasıyla elde edilmiştir. İç standart olarak diflunisal (DİF) kullanılmıştır. Ayırım, eritilmiş silika kapilerde (50 μm iç çap, 44 cm toplam uzunluk, 35,5 cm etkin uzunluk) 25°C 'de, 50 mbar basınçla 3 s süreli hidrodinamik enjeksiyon ve 29 kV potansiyel uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Dedektör dalgaboyu 200 nm'dir. Bu şartlardaki göç zamanları PAR 5,17 dak, KAF 5,51 dak, DİF 7,20 dak ve PRO 9,37 dak olarak bulunmuştur. Yöntemin doğrusallık aralığı PAR ve KAF için 2-200 $\mu\text{g mL}^{-1}$, PRO için 3-200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ olarak saptanmıştır. Yöntemin gözlenebilme sınırı PAR ve KAF için 0,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$, PRO için 0,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Validasyon çalışmaları sonucunda geliştirilen yöntemin doğru, kesin, duyarlı, seçici, sağlam ve tutarlı olduğu ispatlanmıştır. Geliştirilen yöntemle Türkiye'de bulunan farklı ilaç firmalarının ürettiği üç ayrı farmasötik preparat analiz edilmiştir. Bu preparatlardan biri, kaynaklarda bulunan spektrum oranları türev spektrofotometrisiyle de analiz edilmiştir. İstatistiksel değerlendirme sonucunda, geliştirilen yöntem ve kaynaklardaki yöntemden elde edilen sonuçlar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Anahtar kelimeler: Farmasötik preparat, üçlü karışım, miseller elektrokinetik kapiler kromatografi, validasyon

ABSTRACT

Emre, D., Simultaneous Determination of Propyphenazone, Paracetamol and Caffeine in Combined Pharmaceutical Preparations by Capillary Electrophoresis, Hacettepe University Health Sciences Institute Analytical Chemistry Program Master of Sciences Thesis, Ankara, 2006. In this thesis study, a new micellar electrokinetic capillary chromatography method was developed to analyze pharmaceutical preparations containing ternary combination of propyphenazone (PRO), paracetamol (PAR) and caffeine (KAF) simultaneously by capillary electrophoresis. Best results were obtained by the use of 20 mM pH 9,0 borate buffer containing 30 mM sodiumdodecylsulphate as the background electrolyte. Diflunisal (DİF) was used as internal standard. The separation was performed through a fused silica capillary (50 μm internal diameter, 44 cm total length, 35.5 cm effective length) at 25°C with the application of 3 seconds of hydrodynamic injection at 50 mbar pressure and a potential of 29 kV. Detection wavelength was 200 nm. Under these conditions, the migration times were found to be 5.17 min for PAR, 5.51 min for KAF, 7.20 min for DİF, and 9.37 min for PRO. Linearity ranges for the method were determined as 2-200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for PAR and KAF and 3-200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for PRO. Limit of detections were found as 0.6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for PAR and KAF and 0.8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for PRO. According to the validation study, it was proved that the developed method was accurate, precise, sensitive, selective, rugged and robust. Three pharmaceutical preparations, which are produced by different drug companies in Turkey, were analyzed by the developed method. One of the same preparations was also analyzed by the derivative ratio spectrophotometric method reported in literature. No significant differences were found statistically between the results obtained from developed method and the method reported in literature.

Keywords: Pharmaceutical preparation, ternary mixture, micellar electrokinetic capillary chromatography, validation

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	x
ŞEKİLLER.....	xii
TABLolar	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Parasetamol	3
2.1.1. Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri	3
2.1.2. Farmakolojik, Farmakokinetik ve Farmakodinamik Özellikleri	4
2.2. Propifenazon	7
2.2.1. Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri	7
2.2.2. Farmakolojik, Farmakokinetik ve Farmakodinamik Özellikleri	8
2.3. Kafein	8
2.3.1. Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri	8
2.3.2. Farmakolojik, Farmakokinetik ve Farmakodinamik Özellikleri	10
2.4. Kaynaklardaki PRO, PAR, ve KAF Analiz Yöntemleri	11
2.4.1. Kapiler Elektroforez Yöntemleri.....	11
2.4.2. Spektrofotometrik Yöntemler.....	14
2.4.3. Kromatografik Yöntemler	17
2.4.4. Diğer Yöntemler	20
2.5. Kapiler Elektroforez	21
2.5.1. Teorik Bilgiler	21
2.5.2. Kapiler Özellikleri	26
2.5.3. Numune Enjeksiyonu	27
2.5.4. Güç Kaynağı	28
2.5.5. Kullanılan Dedektör Tipleri	28

2.5.6.	Miseller Elektrokinetik Kapiler Kromatografi.....	29
2.5.7.	Kapiler Elektroforezde Cihaz ve Yöntem Parametrelerinin Validasyon Parametreleri ile İlişkisi.....	34
3.	GEREÇ VE YÖNTEM	37
3.1.	Tez Çalışmasında Kullanılan Gereçler	37
3.1.1.	Kullanılan Cihazlar	37
3.1.2.	Kullanılan Kimyasal Maddeler	37
3.1.3.	Kullanılan Cam Malzemeler ve Diğer Sarf Malzemeleri	38
3.1.4.	Analizi Yapılan Farmasötik Preparatlar	38
3.2.	Deney İçin Gerekli Hazırlıklar	38
3.2.1.	Kullanılan Maddelerin Saflığı	38
3.2.2.	Çözeltilerin Hazırlanması	39
3.2.3.	Farmasötik Preparatların Analize Hazırlanması	40
3.2.4.	Sentetik Preparatların Hazırlanması	40
3.2.5.	Kullanılan Cam Malzemelerin Temizliği	41
3.3.	Yöntem Geliştirme ve Optimizasyon Deneyleri	41
3.3.1.	Kapilerin Şartlandırılması	41
3.3.2.	Numunenin Cihaza Verilmesi	41
3.3.3.	Uygulanacak Kapiler Elektroforez Yönteminin Seçilmesi	41
3.3.4.	MECC Yönteminin Optimizasyonu	42
3.3.5.	Kalibrasyon Eğrilerinin Hazırlanması	43
3.4.	Validasyon Deneyleri.....	43
3.5.	Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması	44
3.6.	Karşılaştırma Yöntemi	44
3.6.1.	Karşılaştırma Yönteminin Uygulanması	45
4.	BULGULAR.....	46
4.1.	Optimum Yöntem Parametrelerinin Belirlenmesi.....	46
4.1.1.	Çalışma Elektrolitinin Seçimi.....	46
4.2.	Cihaz Parametrelerinin Belirlenmesi	50
4.3.	Geliştirilen MECC Yönteminden Elde Edilen Bulgular.....	55
4.3.1.	Kalibrasyon Bulguları	58
4.3.2.	Yöntem Validasyonu Bulguları	60

4.3.3.	Farmasötik Preparatların Analiz Bulguları.....	67
4.3.4.	Karşılaştırma Yönteminin Bulguları.....	69
4.3.5.	Standart Ekleme Tekniğinin Uygulanması	73
5.	TARTIŞMA.....	75
5.1.	Analiz Yönteminin Seçimi.....	75
5.2.	Yöntem Geliştirme.....	76
5.3.	Geliştirilen Yöntemin Validasyonu	83
6.	SONUÇ VE ÖNERİLER	88
	KAYNAKLAR	90
	EKLER	
	EK 1. İstatistiksel Katsayıların Hesaplanması	
	EK 2. Tez İçinde Kullanılan İstatistiksel Testler	
	EK 3. Yazarın Özgeçmişi	

SİMGELER VE KISALTMALAR

$\bar{X}$	Aritmetik ortalama
%BH	% Bağıl Hata
μA	Mikroamper
μL	Mikrolitre
μm	Mikrometre
μM	Mikromolar
ACE	Afinite kapiler elektroforezi
BSS	Bağıl standart sapma
CCE	Kiral kapiler elektroforez
CE	Kapiler elektroforez
CEC	Kapiler elektrokromatografi (Dolgulu kolon elektrokromatografi)
CGE	Kapiler jel elektroforez
CIEF	Kapiler izoelektrik odaklama
CITP	Kapiler izotakoforez
cm	Santimetre
COX	Siklooksijenaz
CZE	Kapiler zon elektroforez
dak	Dakika
DİF	Diflunisal
EOF	Elektroosmotik akış
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
IR	İnfrared (Kızılötesi)
İS	İç standart
KAF	Kafein
KMK	Kritik Misel Konsantrasyonu
kg	Kilogram
kV	Kilovolt
L	Litre
LOD	Gözlenebilirlik sınırı

LOL	Doğrusallık limiti, Üst tayin sınırı
LOQ	Alt tayin sınırı
m	Metre
M	Molar
MCE	Mikroçip kapiler elektroforez
MCEC	Mikroçip kapiler elektrokromatografi
MECC	Miseller elektrokinetik kapiler kromatografi
MEEKC	Mikroemülsiyon elektrokinetik kromatografi
MEKC	Miseller elektrokinetik kromatografi
mL	Mililitre
mM	Milimolar
N	Etkinlik (Teorik tabaka sayısı); Normal (Değişim birimi olarak)
ng	Nanogram
nL	Nanolitre
nm	Nanometre
PAR	Parasetamol
pg	Pikogram
pL	Pikolitre
PN	Pik normalizasyonu
PRO	Propifenazon
r	Korelasyon katsayısı
R, r ²	Tanımlayıcılık katsayısı
s	Saniye
SDS	Sodyumdodesilsülfat
SH	Standart Hata
SS	Standart Sapma
t _{enj}	Enjeksiyon süresi
P _{enj}	Enjeksiyon basıncı
UV	Ultraviyole (Morötesi)
UV-GB	Ultraviyole – Görünür Bölge
V	Volt

ŞEKİLLER

Şekil 2.1. PAR molekülü	3
Şekil 2.2. PAR sentezi.	4
Şekil 2.3. PRO molekülü.	7
Şekil 2.4. PRO sentezi.	7
Şekil 2.5. KAF molekülü.	8
Şekil 2.6. KAF sentezi.	9
Şekil 2.7. Kapiler elektroforez cihazının şeması.....	22
Şekil 2.8. CZE'de iyonların elüsyon sırası.	24
Şekil 2.9. Eritilmiş silika kapilerin boyuna kesiti.....	26
Şekil 2.10. Yüzey aktif maddelerin genel moleküler yapısı.	31
Şekil 2.11. SDS molekülü.	32
Şekil 4.1. Çalışma elektrolitinin pH'sının analiz üzerine etkisi.	47
Şekil 4.2. Tampon derişiminin analiz üzerine etkisi.....	48
Şekil 4.3. Çalışma elektrolitindeki SDS derişiminin analiz üzerine etkisi.	49
Şekil 4.4. Çalışma elektrolitine uygulanan voltaja karşı akım grafiğı.	50
Şekil 4.5. Kapiler elektroforez cihazından elde edilen üç boyutlu elektroferogram ve spektrum.	51
Şekil 4.6. Enjeksiyon süresinin (t_{en}) analiz üzerine etkisi.	52
Şekil 4.7. Kapiler sıcaklığının analiz üzerine etkisi.....	53
Şekil 4.8. PAR, KAF ve PRO kalibrasyon eğrileri.....	58
Şekil 4.9. Geliştirilen MECC yöntemiyle elde edilen elektroferogramlar.....	68
Şekil 4.10. PAR, KAF ve PRO'nun çekilen UV absorbans spektrumları.	70
Şekil 4.11. Spektrum oranı türev spektrumları.	71
Şekil 4.12. Minoset® Plus tabletin standart ekleme tekniğı ile analizi.	74
Şekil 5.1. SDS derişiminin analiz süresi ve etkinlik üzerine etkisi.	77
Şekil 5.2. Çalışma elektrolitinin pH'sının analiz üzerine etkisi.	78
Şekil 5.3. Borat tamponu derişiminin analiz süresi ve etkinlik üzerine etkisi.	79
Şekil 5.4. Uygulanan voltajın analiz süresi ve etkinlik üzerine etkisi.	81
Şekil 5.5. Yöntem doğrusallığını kontrol grafikleri (n=30).....	84

TABLOLAR

Tablo 2.1. Türkiye piyasasında bulunan PRO, PAR, ve KAF kombinasyon preparatları.	2
Tablo 2.2. Kapiler elektroforezde kullanılan dedektörler.	29
Tablo 2.3. Kapiler elektroforezde cihaz parametrelerinin validasyon parametreleri ile ilişkisi	34
Tablo 3.1. Yöntem optimizasyonunda kullanılan tampon çözeltiler.....	42
Tablo 4.1. MECC yönteminin optimizasyonu.	54
Tablo 4.2. PAR, KAF, DİF ve PRO elektroforetik hızları.	55
Tablo 4.3. Geliştirilen MECC yöntemiyle elde edilen PAR, KAF, PRO ve DİF pikleri ile ilgili bilgiler.....	56
Tablo 4.4. Elektroferogramlardan elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirmesi (n=10).....	57
Tablo 4.5. Kalibrasyon eğrilerinin istatistiksel verileri (n=7).....	58
Tablo 4.6. Korelasyon katsayısının önem kontrolü.	59
Tablo 4.7. Doğrusallıktan ayrılış önem kontrolü.	59
Tablo 4.8. Geliştirilen MECC yöntemiyle PAR analizi için gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk bulguları.	61
Tablo 4.9. Geliştirilen MECC yöntemiyle KAF analizi için gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk bulguları.	62
Tablo 4.10. Geliştirilen MECC yöntemiyle PRO analizi için gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk bulguları.	63
Tablo 4.11. Geliştirilen MECC yöntemiyle sentetik preparatların analiz ve yöntemin tutarlılık bulguları (n=9).....	64
Tablo 4.12. Bilinen miktarlarda PAR, KAF ve PRO içeren karışımların geliştirilen MECC yöntemiyle analiz bulguları.	65
Tablo 4.13. Geliştirilen yönteme ait sağlamlık bulguları.	66
Tablo 4.14. Farmasötik preparatların geliştirilen MECC yöntemiyle analiz bulguları.	69
Tablo 4.15. Minoset® Plus tabletin geliştirilen MECC ve karşılaştırma yönteminden elde edilen analiz bulguları.	72
Tablo 4.16. Minoset® Plus tabletin MECC ve karşılaştırma yöntemleriyle standart ekleme tekniği kullanılarak yapılan analiz sonuçları (n=3).	73

1. GİRİŞ

Propifenazon (PRO), parasetamol (PAR), ve kafein (KAF), güçlü sinerjik etkiye sahip olduklarından, üçlü kombinasyonları halinde sıkça kullanılan analjezik ve antipiretik ilaçlardır. Bu üçlü kombinasyon, tek başına kullanılan PAR'dan, ibuprofenden ve aspirinden daha hızlı ve etkili analjezi sağlamaktadır (1). Oldukça sık kullanılan bu farmasötik preparatların analizi için valide edilmiş, doğru, kesin, kolay uygulanabilen, hızlı, özellikle de düşük maliyetli analiz yöntemlerine ihtiyaç vardır. Kapiler elektroforez, ilaç analizlerinde sıkça uygulanan bir yöntemdir. Adı geçen üçlü kombinasyondaki maddelerin aynı anda analizi için valide edilmiş bir kapiler elektroforez yöntemine kaynaklarda rastlanmamış olması, bizi bu çalışmaya yönlendirmiştir.

Bu çalışmanın amacı, üçlü karışım halindeki farmasötik preparatlardan PRO, PAR ve KAF'ın aynı anda analizi için varolan yöntemlere göre üstünlükleri olan alternatif bir analiz yöntemi geliştirmektir. Kapiler elektroforez, diğer analitik yöntemlere göre yöntem geliştirme süresi daha kısa, sarf malzeme tüketimi ve maliyeti daha az, ayırım etkinliği daha yüksek, hızlı, doğru, tutarlı ve kolay uygulanabilen bir yöntemdir (2). Bu nedenle kapiler elektroforez yöntemiyle PRO, PAR, ve KAF içeren üçlü karışımlarda her bir maddenin aynı anda miktar tayini için optimum yöntem parametreleri araştırılmış, optimize edilen yöntemin geçerliliğinin kanıtlanması amacıyla gözlenebilirlik sınırı, alt ve üst tayin sınırları, doğrusallık aralığı, kesinlik, doğruluk, seçicilik, sağlamlık ve tutarlılık gibi parametreler değerlendirilmiştir.

Üçlü karışım halindeki adı geçen maddelerin aynı anda analizi için geliştirilip valide edilen kapiler elektroforez yöntemi, Türkiye piyasasında satılan PRO, PAR ve KAF içeren üç farklı farmasötik preparat üzerinde uygulanmıştır. Bu preparatlardan biri kaynaklardaki başka bir yöntemle de analiz edilip yöntemler arasında elde edilen sonuçlar açısından fark olup olmadığı istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

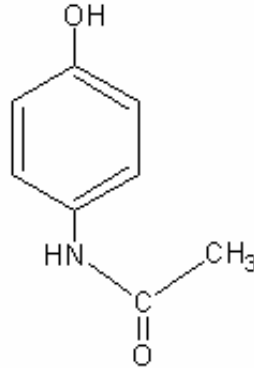
PAR, PRO, ve KAF, kombinasyon şeklinde tablet formundaki farmasötik preparatlarda kullanılmaktadır. Bu preparatlar baş, diş, kulak ve kas ağrılarında, dismenorede, zonada, nevraljilerde, fasiyal, interkostal, siyatik vb. romatizmal hastalıklardaki akut ağrılarda (örneğin dejeneratif eklem hastalığı, artrit, osteoartrit ve diğer iskelet-kas bozukluklarında), travma veya ameliyat sonrası ağrılarda, soğuk algınlığında, grip, tonsillit gibi üst solunum yolu hastalıklarında, kırıklık ve tutulmalarda, burkulma ve travma sonrası ağrılarda, ağrı kesici ve ateş düşürücü olarak kullanılır (3). Bu kombinasyonu içeren Türkiye'deki preparatlar ve etkin madde içerikleri Tablo 2.1.'de verilmiştir.

Tablo 2.1. Türkiye piyasasında bulunan PRO, PAR, ve KAF kombinasyon preparatları.

Preparatın Adı	Üretici Firması	Etkin madde miktarı (mg/tablet)		
		PAR	PRO	KAF
Aljil® tablet	Yeni İlaç ve Hammaddeleri San. Tic. A.Ş.	300	150	50
Minoset® Plus tablet	Roche Müstahzarları San. A.Ş.	250	150	50
Panalgin® tablet	Atabay İlaç Fabrikası A.Ş.	300	150	30

2.1. Parasetamol

2.1.1. Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri



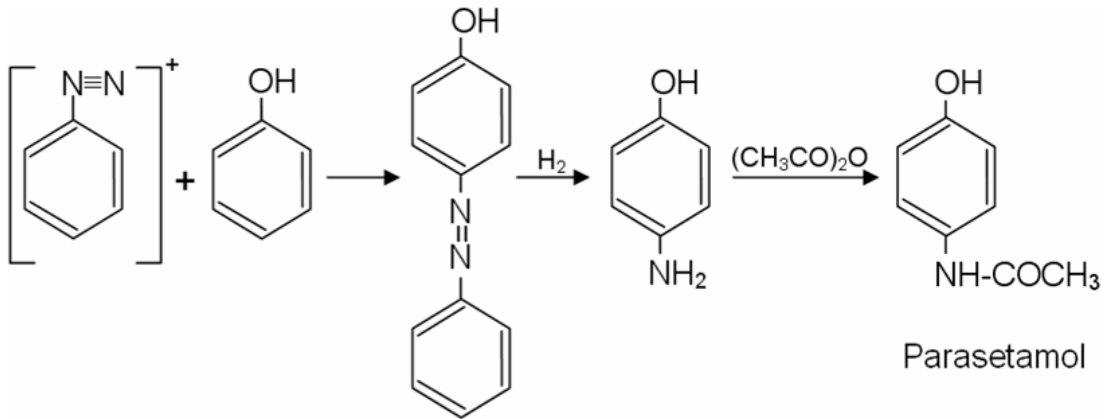
Şekil 2.1. PAR molekülü

Kapalı formülü $C_8H_9NO_2$ olan PAR'ın açık formülü Şekil 2.1'de gösterilmiştir. PAR'ın molekül ağırlığı 151,17 olup %63,56 C, %6,00 H, %9,27 N, %21,17 O içermektedir. PAR'ın kimyasal adı N-(4-Hidroksifenil)asetamid veya 4'-Hidroksiasetanilid'tir. PAR'ın diğer adları (sinonimleri) şunlardır: Asetaminofen; p-Hidroksiasetanilid; p-Asetamidofenol; p-Asetaminofenol; N-Asetil-p-aminofenol (4).

PAR beyaz kristal veya granül şeklinde bulunabilir. Erime noktası 169-170,5°C arasındadır. PAR'ın 1 g'ı yaklaşık 70 mL suda, 7-10 mL etanolde, 13 mL asetonda çözünür. Sıcak suda soğuk suya oranla daha fazla çözünür. Metanol, dimetilformamid, etilendiklorür ve etil asetatta çözünür, petrol eteri, pentan ve benzende çözünmez (4,5).

PAR'ın ayrışma sabitleri $pK_1 = -1,71 \pm 0,04$, $pK_2 = 9,68 \pm 0,06$ 'dır (6).

PAR'ın kimyasal sentezi Şekil 2.2'de gösterilmiştir. Anilinden hareketle hazırlanan diazonyum tuzu ve fenolün reaksiyonuyla oluşan ara ürünün redüksiyonu ile elde edilen p-aminofenol, asetik anhidritle reaksiyona sokularak PAR elde edilmektedir (7).



Şekil 2.2. PAR sentezi.

2.1.2. Farmakolojik, Farmakokinetik ve Farmakodinamik Özellikleri

PAR, mutad dozda oral alımının ardından tamamına yakını gastrointestinal kanaldan emilerek 30 dakika içinde analjezik etki göstermeye başlar ve 90 dakikada en yüksek plazma derişimine ulaşır. Analjezik etkisi 3 - 4 saat sürer. Oral biyoyararlanımı %63-89 olup karaciğerden ilk geçiş etkisine maruz kalma oranı düşüktür. Eliminasyon yarılanma ömrü 3,3 saattir (3,8).

Dismenoreye bağlı ağrılarda tek başına kullanılan 1000 mg PAR'ın analjezik etkisi, 400 mg naproksenden daha azdır (9). Yapılan çok merkezli, randomize, çift körlü, paralel gruplu karşılaştırma çalışmasında ise osteoartritte günde 4000 mg PAR kullanan bir hasta grubu (n=276) ile 750 mg naproksen kullanan diğer hasta grubu (n=275) arasında analjezik etkinlik açısından bir fark bulunmamış ve naproksene bağlı gastrointestinal kanama ve anemi yan etkileri bildirilmiştir (10). Diğer bir çalışmada da postoperatif analjezik etkinlik açısından oral kullanılan PAR, diklofeanak ve PAR-diklofeanak kombinasyonu arasında fark bulunmamıştır (11). PAR, PRO ve KAF'ın potansiyalize sinerjistik etkisi bulunmaktadır. Kombine olarak kullanılan PAR, PRO ve KAF, ağrı kesici olarak tek başına kullanılan PAR, ibuprofen ve aspirinden daha etkilidir (1).

PAR, yeni çıkan pek çok analjezik ilaca oranla oldukça ucuz, hamilelikte dahi güvenle kullanılabilen (güvenlik kategorisi B), teratojenik etkisi olmayan bir analjezik olup, aspirin ve ibuprofenden daha fazla kullanılmaktadır (12 -14). En eski ve en güvenilir ağrı kesicilerden olan

PAR'ın analjezik etki mekanizması, henüz kesin olarak bilinmemektedir. Sınıflandırmada non-steroidal antienflamatuvar ilaçların arasında düşünülmekle beraber, PAR etki ve yan etkileri bakımından bu sınıftaki diğer ilaçlardan farklıdır (15). Geçmiş yıllarda PAR'ın periferik prostaglandin sentezini inhibe ederek etki gösterdiği ileri sürülmüştür (15,16). Ancak son yıllarda yapılan çalışmalar PAR'ın periferik prostaglandin sentezi üzerinde zayıf inhibitör etkisi olduğu, daha çok merkezi siklo oksijenaz enzimlerinin bazı formlarını inhibe ederek analjezi sağladığı öne sürülmüştür (15,17). Lee ve diğ. (18)'nin çalışmasında ise PAR'ın periferik etkisinin de bulunduğu ve COX-2'nin bir alt türünü inhibe ettiği ileri sürülmüştür. Siklooksijenaz enziminin COX-3 adı verilen türü, beyinde prostaglandinlerin sentezinde rol oynamaktadır. Son yıllardaki araştırmalara göre, PAR'ın COX-1 ve COX-2 enzimlerini inhibe etmediği, COX-3 inhibisyonu ile analjezik ve antipiretik etki sağladığı gösterilmiştir (19-21). Bu, PAR'ın antienflamatuvar etkisinin olmayışını ve gastrointestinal yan etkilerinin bulunmayışını açıklamaktadır. Çünkü COX-1 inhibisyonu gastrointestinal yan etkilere sebep olmakta ve COX-2 inhibisyonu antienflamatuvar etki sağlamaktadır (22).

Organum vasculosum laminae terminalis (OVLT), üçüncü serebral ventrikülün ön duvarında bulunan bir organ olup vücut sıcaklığının düzenlendiği merkezdir. Tavşanlar üzerinde yapılan deneylere göre stafilokok enterotoksin-A, bu organdaki glutamat derişimini arttırmakta ve vücut sıcaklığı artmaktadır. PAR, OVLT'deki glutamat salınımını inhibe ederek antipiretik etki göstermektedir (23).

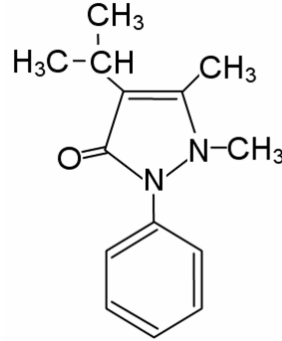
PAR, antienflamatuvar etkisi düşük olduğundan, bu tür etkinlik gerektiren endikasyonlarda kullanılmaz. Ancak antienflamatuvar ilaçların analjezik etkisini artırmak için onlarla birlikte kullanılabilir. PRO haricindeki non-steroidal antienflamatuvar ilaçlarla PAR'ın kombine kullanılması sonucunda, ekstra analjezik etki oluşup oluşmayacağına dair kanıt bulunmamaktadır (24). Antitrombotik etkinliği zayıftır; kanama süresini değiştirmez. PAR'ın solunum, kardiyovasküler sistem ve asit-baz dengesi üzerinde belirgin bir etkisi yoktur. Midede iritasyon ve kanama yapmaz. Protrombin sentezini etkilemez. Plazma proteinlerine fazla bağlanmaz. PAR,

oral yolla erişkinlerde 500-1000 mg dozunda verilir ve bu doz gerekirse 4-6 saatte bir tekrarlanır. Günlük en yüksek dozu 4 g olarak kabul edilir. Bazı kaynaklarda 3 g, bazılarında 2,6 g olarak belirtilmiştir. Böbrek yetmezliği olanlarda ve alkoliklerde doz azaltılmalıdır. Bu dozlarda 10 günden uzun süreyle kullanılması tavsiye edilmez. Çocuklarda hepatotoksisite potansiyeli daha düşük olduğundan, kg başına doz daha yüksek olup bir defada 10 mg kg^{-1} dozunda verilebilir. 6-12 yaş arası çocuklarda bir defada 30 mg kg^{-1} dozda PAR verilebilir. Bir defalık doz, bir yaşından küçük bebeklerde 60-120 mg ve 1-5 yaş arası çocuklarda 120-250 mg'dır. Daha yüksek biyoyararlanım için oral kullanılan PAR'ın aç karnına alınması önerilir (25). Mutad dozlarda PAR'ın yan etkileri çok nadir görülmekte olup alerjik reaksiyonlar (deri döküntüleri ve ürtiker) bildirilmiştir (3,26).

PAR'ın tamamına yakını karaciğerde metabolize edilir. %5'i değişmeden itrah edilirken, %90'ı glukuronid ve sülfat konjugatına dönüşür ve %5'i oksidasyonla N-asetil-p-benzokinonimin (NAPQI)'e dönüşür. NAPQI, reaktif bir madde olup hepatotoksiktir ve derhal glutatyon konjugatına ve ardından zararsız olan sistin ve merkaptürata dönüşerek itrah edilir. Ancak PAR dozu yükselince NAPQI oluşumu da artar ve karaciğerdeki glutatyon stoğu tükenince NAPQI, kovalent bağlarla karaciğer hücrelerinin mitokondri ve çekirdek proteinlerine bağlanır. Bunun sonucunda karaciğer nekrozu oluşur (27,28). Erişkinlerde 10 g üzerinde alınan PAR, 24 saat zarfında bulantı, kusma ve karın ağrısı gibi belirtilerle başlayan ve 2-3 gün sonra ortaya çıkan sarılık, karaciğer yetmezliği, hepatik ensefalopati ve böbrek yetmezliği ile seyreden öldürücü akut karaciğer nekrozuna sebep olur. Bir defada 20 g üzerinde PAR alınırca ölümle sonuçlanma olasılığı artar. Günde 5-8 g dozunda birkaç hafta alınması ile de karaciğer nekrozu ve ona bağlı ölüm yapabilir (25). Çocuklar yüksek dozdaki PAR'ın hepatotoksik etkisine daha dayanıklıdır. PAR'ın pediatrik toksik dozu 200 mg/kg olarak bildirilmiştir (29). PAR zehirlenmesinde SH-donörü olup glutatyon miktarını arttıran N-asetilsistein intravenöz yolla uygulanır (30).

2.2. Propifenazon

2.2.1. Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri

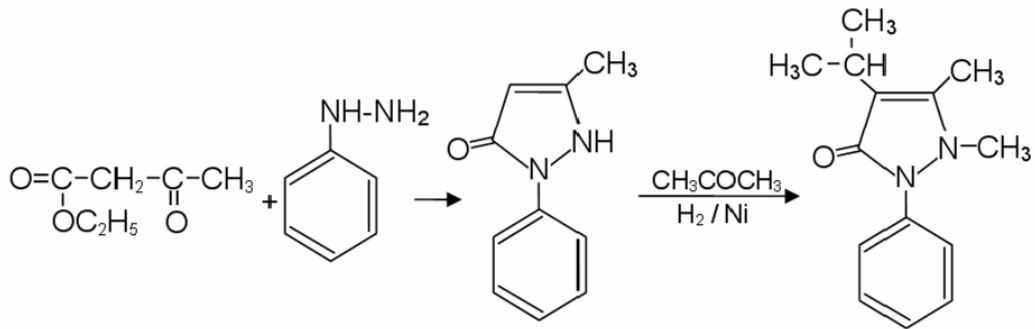


Şekil 2.3. PRO molekülü.

Kapalı formülü $C_{14}H_{18}N_2O$ olan PRO'nun açık formülü Şekil 2.3'de gösterilmiştir. PRO'nun molekül ağırlığı 230,31 olup %73,01 C, %7,88 H, %12,16 N, %6,95 O içermektedir. PRO'nun kimyasal adı 1,2-Dihidro-1,5-dimetil-4-(1-metiletil)-2-fenil-3H-pirazol-3-on olup diğer adları (sinonimleri) şunlardır: 4-İsopropilantipirin, 4-İsopropil-2,3-dimetil-1-fenil-3-pirazolin-5-on, 2,3-Dimetil-1-fenil-4-isopropilpirazolon, İsoipropilfenazon (4).

PRO beyaz kristal şeklinde bulunur. Erime noktası $103^{\circ}C$ 'dir. PRO'nun 1 g'ı yaklaşık 400 mL suda çözünür. Etanolde ve kloroformda çok çözünür, eterde çözünür (4,5). PRO'nun ayrışma sabiti $pK = 0,91 \pm 0,02$ 'dir (6).

PRO'nun kimyasal sentezi Şekil 2.4'de gösterilmiştir. Etil asetoasetatin fenil hidrazinle kondenzasyonu sonucu oluşan 1-fenil-3-metil-5-pirazolonun asetonla reaksiyonu sonucu oluşan ürünün redüksiyonu ile PRO elde edilmektedir (7).



Şekil 2.4. PRO sentezi.

2.2.2. Farmakolojik, Farmakokinetik ve Farmakodinamik Özellikleri

PRO, güçlü analjezik ve antipiretik, düşük antienflamatuvar etkinlik gösterir. Dipirona (metamizol) benzer etkiye sahiptir. Oral yoldan kullanılır (25). Yapılan bir klinik çalışmada, bir hasta grubuna tek başına 150 mg PRO verilirken, diğer hasta grubuna 150 mg PRO ve 250 mg PAR kombinasyonu verilmiştir. Ortalama doruk plazma düzeyi, tek başına PRO verilen grupta $0,37 \pm 0,08$ saatte $1,75 \pm 0,42 \text{ mg L}^{-1}$ iken, PRO/PAR verilen grupta $0,32 \pm 0,23$ saatte $2,48 \pm 0,94 \text{ mg L}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Kombine olarak kullanıldığında, PAR, PRO'nun doruk plazma düzeyini %40 civarında arttırmakta ve dolayısıyla analjezik etkisini potansiyalize etmektedir (1,25).

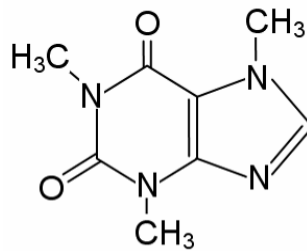
PRO ile kombine şekilde kullanılan KAF, PRO'nun antinositif (ağrı hissini azaltıcı, ağrı kesici) etkisini önemli şekilde arttırmaktadır (31).

PRO'nun tamamına yakını karaciğerde metabolize olur. Ana metabolit, glukuronit konjugatıdır. Eliminasyonun çoğu idrarla, bir kısmı da feçesle gerçekleşir (7).

PRO kullanımına bağlı yan etkiler kemik iliği depresyonu, su ve tuz retansiyonu, santral sinir sistemi eksitasyonu, duyarlı kimselerde herpes labialis ve anjiyoödem olarak bilinmektedir. Gebelikte ve küçük çocuklarda PRO kullanılması önerilmez (3,32).

2.3. Kafein

2.3.1. Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri



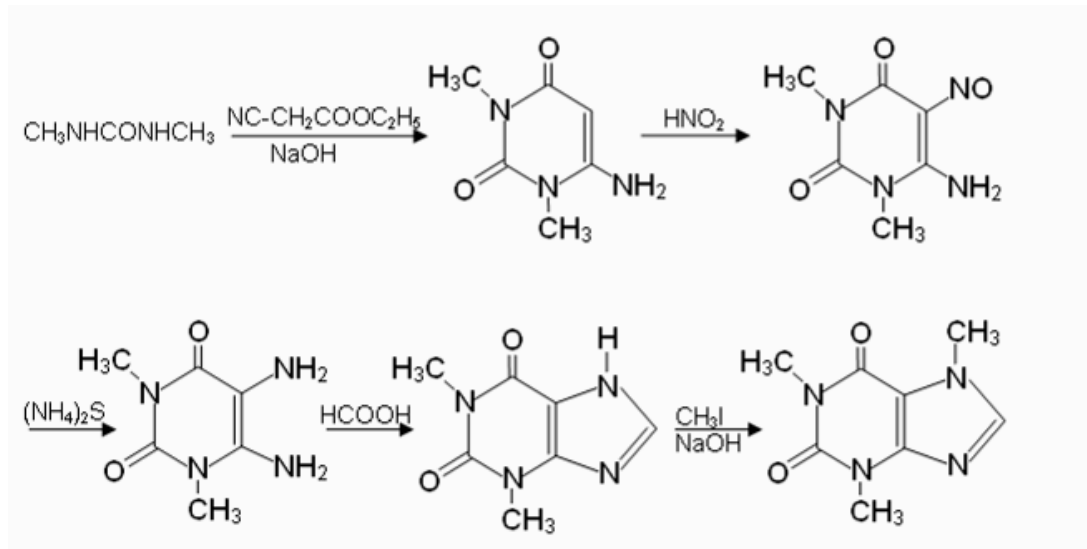
Şekil 2.5. KAF molekülü.

Kapalı formülü $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_2$ olan KAF'ın açık formülü Şekil 2.5'de gösterilmiştir. KAF'ın molekül ağırlığı 194,19 olup %49,5 C, %5,2 H, %28,9 N, %16,5 O içermektedir. KAF'ın kimyasal adı 3,7-Dihidro-1,3,7-trimetil-

1H-purin-2,6-dion veya 1,3,7-Trimetilksantin'dir. KAF'ın diğer adları (sinonimleri) şunlardır: Coffeine, Oxopurine, Thein, Guanine, Methyltheobromine, No-Doz (4).

KAF beyaz kristalize toz şeklinde bulunur. Erime noktası 238°C'dir. 178°C'de süblimleşir ve süblimleşen KAF soğutulunca heksagonal kristaller şeklinde yoğunlaşır. Katı KAF'a 5 mm uzaklıktan 1 mm Hg vakum uygulanınca 160-165°C'de hızlı süblimleşme sağlanır. Bu yolla hazır kahveden KAF süblimleştirilerek KAF'sız kahve hazırlanır ve aynı zamanda KAF da elde edilmiş olur. KAF'ın %1'lik sulu çözeltisinde pH 6,9'dur. KAF'ın 1 g'ı 46 mL suda, 5,5 mL 80°C suda, 1,5 mL kaynar suda, 66 mL etanolde, 22 mL 60°C alkolde, 50 mL asetonda, 5,5 mL kloroformda, 530 mL eterde, 100 mL benzende, 22 mL kaynar benzende çözünür (4). KAF'ın ayrışma sabiti $pK = -0,11 \pm 0,05$ 'tir (6).

KAF, kahveden elde edilmekle birlikte kimyasal sentezle de elde edilir (Şekil 2.6). N,N'-dimetilüre ve etilsiyanoasetatın alkali ortamda reaksiyonuyla elde edilen 6-amino-1,3-dimetilpirimidin-2,4-dionun nitroz asitle nitrozolanmasını takiben amonyum sülfür ile redüksiyonu ve formik asitle reaksiyonu sonucu teofilin elde edilir. Teofilinin sodyum hidroksitli ortamda metil iyodürle reaksiyonu sonucu KAF elde edilmektedir (7).



Şekil 2.6. KAF sentezi.

2.3.2. Farmakolojik, Farmakokinetik ve Farmakodinamik Özellikleri

KAF oral yolla 200-400 mg dozda alındığında psikostimulan etki gösterir. Uyanıklığı ve dikkati artırır, yorgunluğu azaltır, amfetaminlerin aksine bellek fonksiyonları üzerinde etkisi yoktur. KAF genelde bağımlılık oluşturmaz. Ancak günde 15-20 fincan kahve içenlerde bağımlılık görülmeye başlanır. 100-200 mg dozda oral alındığında benzodiazepinlerin anksiyolitik etkisini azaltırken, yüksek dozlarda alındığında anksiyete oluşturabilir. KAF analeptik amaçla sodyum benzoat kompleksi veya sitrat tuzu halinde intramüsküler veya subkutan olarak kullanılırken, prematüre apnesi görülen yenidoğanlarda intravenöz veya nazogastrik sondayla kullanılır (7).

Becker ve diğ. (33), KAF'ın santral sinir sistemi uyarıcısı ve hafif diüretik etkili olduğunu, astım, uyuşukluk, yorgunluk, yenidoğan apnesi ve postdural gerilim tipi baş ağrısında endike olduğunu belirtmiştir.

Choi ve diğ. (34), KAF'ın klinikte prematüre apnesi görülen yenidoğanlarda oral ve parenteral yoldan solunum stimülanı olarak kullanıldığını ve verildikten sonraki 24 saat içinde apne episodlarının frekansını %30-50 oranında azalttığını bildirmektedir. KAF bu endikasyonda günde bir kez verilebilme kolaylığı, oral absorpsiyonunun güvenilirliği ve terapötik penceresinin geniş olmasıyla teofiline tercih edilir. KAF migren veya baş ağrısına karşı kullanılmak üzere çoğu zaman analjeziklerle veya ergot alkaloidleri ile kombine edilir. Ayrıca uyuşukluk ve yorgunluk hallerine karşı da kullanılan bir ilaçtır. KAF santral sinir sistemini her düzeyde stimüle eden hafif bir uyarıcıdır; kalp ve kardiyovasküler sistemi de stimüle eder. KAF medüller solunum merkezini uyardığı gibi, bronş düz kasında da gevşeme meydana getirir. KAF istemli kasları ve gastrik asit salgılanmasını uyarır; böbrek kan akımını artırır ve hafif diüretik etki gösterir (32).

KAF gastrointestinal kanaldan tam olarak absorbe olur. Oral olarak alınmasını takiben plazma doruk konsantrasyon düzeylerine 50-75 dakika içinde ulaşılır. KAF tüm vücut sıvılarına hızla dağılır; kan-beyin engeli ile plasenta engelini hemen hızla aşar. Anne sütüne geçer. Yaklaşık % 17'si plazma proteinlerine bağlanır. KAF kısmen karaciğerde metabolize olur; gerek değişmemiş ilaç olarak gerekse metabolitleri halinde idrarla atılır.

Plazma yarı ömrü yetişkinlerde 3-4 saattir. Ancak KAF'ı annelerinden alan yenidoğanlarda plazma yarı ömrü çok daha uzun olup 80 saat kadardır. KAF'ın yan etkilerinin büyük bir bölümü farmakolojik etkilerinin şiddetlenmiş olarak ortaya çıkmasından kaynaklanır. KAF terapötik veya toksik olmayan doz düzeylerinde titreme, sinüs taşikardisi ve dikkatte artma meydana getirir. Diğer yan etkileri arasında diyare, heyecan hali, çarpıntılar, uykusuzluk, baş ağrısı ve kas seyirmeleri sayılabilir. Aşırı doz durumunda, KAF önemli ölçüde bulantı/kusma ve anksiyete yapabilir. Aşırı dozda KAF alınması kardiyak aritmiler, nöbetler (konvülsiyonlar) ve deliryum meydana getirebilir. KAF hafif bir diüretiktir. Poliüriye neden olabilir. 1992 yılında KAF yoksunluk sendromu kesin olarak tanımlanmıştır. Birkaç hafta boyunca KAF tüketen veya ilaç olarak alan hastalarda KAF kesildiğinde letarji, anksiyete, baş dönmesi veya baş ağrısı da dahil dikkate değer fiziksel ve psikiyatrik belirtiler gözlenir. KAF anksiyete hastalığı ve/veya panik hastalığı olan hastalarda bu olguların şiddetlenmesine yol açabileceği için dikkatle kullanılmalıdır. KAF, gebelikte ve emzirme süresince, tam olarak kesilmese bile dikkatle kullanılmalıdır. KAF süt içine az da olsa geçer ve bu yenidoğanda birikime yol açabilir. Süt veren annenin yüksek miktarda KAF alması bebeğin uyuma güçlüğü çekmesine ve hiperaktif olmasına neden olur. Bu nedenle süt veren anneler KAF içeren içecekleri sınırlı ölçüde kullanmalıdırlar. Hamilelik sırasında KAF alındığında, fetusta aritmi geliştiği bildirilmiştir. KAF, FDA'nın hamilelik kategorisinde C kategorisine giren bir ilaçtır (32).

2.4. Kaynaklardaki PRO, PAR, ve KAF Analiz Yöntemleri

2.4.1. Kapiler Elektroforez Yöntemleri

Pérez-Ruiz ve diğ. (35), PAR ve p-aminofenolün kapiler elektroforezdeki özelliklerini ve ayrımını incelemişler ve geliştirdikleri kapiler zon elektroforezi (CZE) yöntemini PAR içeren farmasötik preparatlara uygulamışlardır. Göç zamanı, pik simetrisi, etkinlik ve çözünürlük üzerinde etkisi olan çalışma elektrolitinin içeriği, derişimi ve pH'sı, uygulanan voltaj, kapiler uzunluğu gibi değişkenler incelenerek yöntem optimizasyonu yapılmıştır. PAR ve p-aminofenol ayrımı, 57 cm eritilmiş silika kapilerde

pH 9,5 50 mM Borat tamponunda, 18 kV voltaj uygulanarak 4 dakikada gerçekleştirilmiştir. Çalışma aralığı PAR için 0,2-200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ve p-aminofenol için 0,3-3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ olarak belirtilmiştir.

Heitmeier ve Blaschke (36), analjeziklerin insan idrarından analizi için kapiler elektroforez (CE) yöntemleri geliştirmişleridir. PAR, asetilsalisilik asit, antipirin, ibuprofen, naproksen, ketoprofen, PRO ve bu analjeziklerin metabolitlerinin analizi için yöntemler geliştirmişlerdir. Her madde ayrı ayrı analiz edilmiştir, karışım halinde yapılmamıştır. Asetilsalisilik asitin metabolitlerinin analizi için katodik taraftan enjeksiyon yapılmış ve analiz süresini kısaltmak için elektroosmotik akışı (EOF) yavaşlatan 1 mM spermin tetrahidroklorür tampona eklenerek kapiler iç çeperi kaplanmıştır. Nötral olduğundan CZE ile ayrımı yapılamayan antipirin için tampona 100 mM sodyum dodesil sülfat (SDS) eklenerek miseller elektrokinetik kapiler kromatografi (MECC) yöntemi uygulanmıştır. Diğer analjezikler için CZE – UV dizi diyot dedektör kullanılmıştır. Metabolitlerin verdiği piklerin hangi maddelere ait olduğunun teşhisinde CE – kütle spektrometrik dedektör kullanılmıştır.

Vogt ve Conradi (37), KAF ve diğer pürin bileşiklerinin gıda ve ilaçlardan analizi için MECC yöntemi geliştirmişlerdir. Geliştirdikleri yöntemi KAF, teobromin, teofilin içeren gıdalarda ve ilaçlarda uygulamışlardır.

Okamoto ve diğ. (38), siklodekstrinle modifiye edilmiş mikroemülsiyon elektrokinetik kromatografi (MEEKC) yöntemi geliştirerek soğuk algınlığında kullanılan 14 farklı etkin maddeyi içeren bir ilacı analiz etmişlerdir. Tiamin nitrat, KAF, PAR, riboflavin, gayafenezin, psödoefedrin hidroklorür, askorbik asit, etenzamid, DL-metilefedrin hidroklorür, dihidrokodein fosfat, ibuprofen, noskapin, karbinoksamin maleat ve bromheksin hidroklorür içeren 14 bileşenli bir karışımdaki maddelerin aynı anda analizini gerçekleştirmişlerdir. Siklodekstrin olmadan tiamin ve riboflavin ayrımının yetersiz olduğunu belirtmişlerdir. Farklı siklodekstrin türlerinin denenmesi sonucunda en iyi ayrımın 3 mM 2,6-di-O-metil- β -siklodekstrin ile sağlandığını ve tampon bileşeninin şöyle olduğunu belirtmişlerdir: %81 pentan, %6,61 butan-1-ol, %2 propan-2-ol, %4,47 SDS, %86,11 sodyum tetraborat 10 mM çözeltisi (oranlar

a/a cinsindendir).

Ashcroft ve diğ. (39), PAR , fenasetin ve metabolitlerinin idrardan analizi için CE – kütle spektrometri yöntemi geliştirmişlerdir. İdrar numuneleri -20°C’de dondurularak saklanmış, analiz edileceği zaman çözülerek direkt olarak ve katı faz ekstraksiyonunun ardından cihaza verilmiştir. PAR için çalışma aralığının 0,1 – 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ olduğu belirtilmiştir.

Zhao ve diğ. (40), KAF, teobromin, paraksantin, teofilin ve 1,3,7-trimetilürük asitin miktar tayini için MECC yöntemi geliştirmişlerdir. Yöntemin optimizasyonu için tampon içeriği, derişimi ve pH’sı, tampondaki misel derişimi, uygulanan voltaj ve enjeksiyon süresinin etkisi incelenmiştir. Geliştirilen yöntemde çalışma elektroliti olarak 40 mM SDS içeren 20 mM pH 11,0 fosfat tamponu kullanmışlardır. 35 cm etkin uzunlukta, 50 μm iç çaplı eritilmiş silika kapiler kullanarak 29 kV voltaj uygulamışlardır. Analiz süresi 3 dakika, KAF için doğrusal çalışma aralığı 1,5-194 $\mu\text{g mL}^{-1}$ olarak belirtilmiştir.

Pucci ve diğ. (41), PAR, KAF ve asetilsalisilik asit içeren tabletlerden bu maddelerin aynı anda analizi için ters faz kapiler elektrokromatografi (CEC) yöntemi geliştirmişlerdir. Ayırım, 5 μm C₈ sabit fazla doldurulmuş 75 μm iç çaplı 21,5 cm etkin uzunluğa sahip kapilerde gerçekleştirilmiştir. Hareketli faz 25 mM pH 3,0 amonyum format ve asetonitril (30:70 h/h) olup 210 nm’de UV-GB dedektör kullanılarak miktar tayini yapılmıştır. Çalışma aralıkları PAR, KAF ve asetilsalisilik asit için sırayla 20-160, 4-20, 50-200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ olarak belirtilmiştir.

Liu ve diğ. (42), PAR ve p-aminofenolün miktar tayini için yeni bir mikroçip kapiler elektroforez sistemi üretmişler ve bu sistem için analiz yöntemi geliştirmişlerdir. Mikroçipi üretmek için, plastifiye polietilen tereftalat (PET) film tabakası üstüne, bilgisayarda şekli tasarlanan çip görüntüsü laser yazıcı ile yazdırılmış, ardından ayna görüntüsü şeklinde yazdırılan iki film tam üst üste gelecek şekilde ısı ile birbirine yapıştırılmıştır. Yazıcı tonerinin olmadığı ince kanal 200 μm genişliğe, 10 μm derinliğe ve 5 cm etkin uzunluğa sahip kapiler görevi görmekte ve ayırım için bu kapilerin iki ucundan platin mikroeletrotlar yardımıyla 5000 V’a kadar voltaj uygulanmaktadır. Miktar tayini, çalışma elektrodu platin, referans elektrot Ag/AgCl, karşıt

elektrot platin olan dedektörde amperometrik olarak gerçekleştirilmektedir. Ayırım için geçen süre 84 saniye ve analiz süresi 3 dakika olup yöntemin alt tayin sınırı 5 μM olarak bildirilmiştir.

2.4.2. Spektrofotometrik Yöntemler

Dinç ve diğ. (43), spektrum oranları türev spektrofotometrisi ile PAR, PRO ve KAF içeren üçlü karışımda bu maddelerin aynı anda miktar tayinini yapmışlardır. Aynı çalışmada bu maddelerin aynı anda analizi için yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi de geliştirmişlerdir. Çalışmada HPLC yönteminin spektrofotometrik yöntemle göre daha spesifik ancak daha pahalı olduğu ve spektrofotometrik yöntemin ayırma gerek kalmadan sonuç verdiği belirtilmiştir. Bu çalışmadaki spektrum oranları türev spektrofotometrisi yöntemi, tez çalışmasında geliştirilen CE yöntemi için karşılaştırma yöntemi olarak seçilmiş olup, Bölüm 3.6'da ayrıntıları verilmiştir (Bkz. syf.44).

Dinç (44), PAR ve KAF içeren tabletlerden bu maddelerin aynı anda analizi için spektrum oranları türev spektrofotometri, *Vierordt* yöntemi ve HPLC yöntemlerini içeren karşılaştırmalı bir çalışma yapmıştır. Spektrum oranları türev spektrofotometrisi, oran spektrumlarının birinci türevlerinde KAF için 267,9 nm ve 291,0 nm'deki, PAR için 237,0 nm ve 251,8 nm'deki analitik sinyallerin ölçümüne dayanmaktadır. Kalibrasyon eğrileri, KAF için 4-40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ve PAR için 8-48 $\mu\text{g mL}^{-1}$ derişim aralıklarında çizilmiştir. *Vierordt* yönteminde PAR ve KAF'ın absorpsansları 242,9 nm ve 273,0 nm'de ölçülmüştür. Absorpsans değerleri matrisler şeklinde Matlab bilgisayar yazılımına girilerek program yardımıyla numunedeki madde miktarları hesaplanmıştır. İki spektrofotometrik yöntemin sonuçları ile HPLC yönteminden elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır. Üç yöntemle de doğru sonuca ulaşılabilirdiği, HPLC yönteminin daha spesifik ama daha pahalı olduğu belirtilmiştir.

Onur ve Acar (45), KAF ve PAR içeren tabletlerden etkin maddelerin aynı anda miktar tayinini birinci türev absorpsans spektrofotometrisi ile yapmışlardır.

Onur ve Acar (46), geliştirdikleri yöntemle KAF ve PRO karışımlarında,

kloroformdaki çözeltilerinin birinci türev UV spektrumlarındaki 308,2 nm'de PRO için, 263,8 nm'de KAF için $dA/d\lambda$ değerlerini okuyarak aynı anda miktar tayinlerini gerçekleştirmişler ve yöntemi bu karışımı içeren bir tablete uygulamışlardır.

Dinç ve diğ. (47), PRO ve KAF içeren üçlü karışımların tabletlerinden bu aktif bileşiklerin aynı anda analizi için spektrofotometrik “*wavelet*” analiz yöntemi geliştirmişlerdir. Bu yöntemde UV spektrofotometreden elde edilen spektrum verisi Matlab programına aktarılmakta ve bir dizi matematiksel işlemden geçirildikten sonra gürültüden arınmış yeni analitik sinyaller elde edilmektedir. Elde edilen yeni sinyallerde daha fazla sayıda sıfırı kesen nokta bulunmakta ve sinyal şiddeti artmaktadır.

Dinç ve Onur (48), PAR, KAF ve metamizol içeren üçlü karışımların analizini spektrum oranları türev spektrofotometrisi ile gerçekleştirmişlerdir.

Dinç (49), PAR, KAF ve metamizol içeren tabletlerden bu maddelerin aynı anda analizi için, çok değişkenli spektral verilere dayalı kemometrik kalibrasyon teknikleri kullanmıştır.

Dinç (50), askorbik asit, asetilsalisilik asit ve PAR içeren üçlü karışımın aynı anda analizini çift bölenli (*double divisor*) oran spektrumunun birinci türevini kullanarak spektrofotometrik olarak gerçekleştirmiştir. Üçlü karışımın UV absorbans spektrumu, bu karışımdaki iki maddenin aynı derişimlerinin UV absorbans spektrumlarının toplamına bölünmesiyle elde edilen oran spektrumunun birinci türevinden faydalanarak miktar tayini yapılmıştır. Örneğin, üçlü karışımdaki PAR miktar tayini için, üçlü karışımın spektrumu, askorbik asit ve asetilsalisilik asitin spektrumlarının toplamına bölünerek elde edilen oran spektrumunun birinci türevi kullanılmıştır.

Dinç ve diğ. (51), PAR ve mefenamik asit karışımını içeren farmasötik preparattan bu maddeleri aynı anda analiz için spektrum oranları türev spektrofotometrisi ve kemometrik yöntemleri kullanmıştır.

Vidal ve diğ. (52), PAR, PRO ve KAF'ın farmasötik preparatlardan aynı anda analizini tek akışlı çok değişkenli UV sensör (*single flow-through UV multiparameter sensor*) kullanarak gerçekleştirmişlerdir. Geliştirilen yöntemde peristaltik pompa, C₁₈ silika jel doldurulmuş 30 mm uzunlukta, 1 mm iç

apında n kolon, UV dedektörü ve bilgisayar kullanılmıştır. l karışımın enjeksiyonunun ardından su pompalanınca PAR ele edilmiştir. Suya hacimce %10 metanol eklenip pompalanınca KAF, metanol oranı %50 yapılarak PRO ele edilmiştir. Elentlerin miktar tayini, akış hücresindeki UV dedektör ile gerçekleştirilmiştir.

Afkhami ve Bahram (53), PAR, askorbik asit ve asetilsalisilik asit içeren l karışımdan bu maddelerin aynı anda analizini gerçekleştirmek için, oran spektrumları verilerinin merkezileştirilmesi ve elde edilen yeni verilerin dalgaboyuna karşı grafiğe geçirilerek oluşturulan sinyallerin maksimum değerlerinin kullanımına dayalı yöntemden faydalanmışlardır. Matlab bilgisayar yazılımıyla spektrumlar üzerinde bir dizi matematiksel işlemler yaparak miktar tayinini gerçekleştirmişlerdir.

Afshari ve Liu (54), PAR'ın serumdan analizi için spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir. Serumdaki serbest PAR, etil asetatla ekstre edildikten sonra asidik ortamda ısıtılarak p-aminofenole hidroliz edilmektedir. Ardından sodyum periyodatlı ortamda p-ksilenol ile reaksiyonu sonucu mavi renkli indofenol türevi oluşmaktadır. Bu bileřiїн 635 nm'deki absorbansından yola çıkılarak serumdaki PAR miktarı tayin edilmektedir. Geliştirilen yöntemin doğrusallık aralığı 25-600 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 'dir. Bu yöntemle, aşırı doz PAR alımını takiben meydana gelen zehirlenmelerde serumdaki serbest PAR düzeyi ölçülmektedir. Normal kullanım dozlarında ise plazmadaki PAR düzeyi bu yöntemin alt tayin sınırından daha düşüktür.

Bouhsain ve diğ. (55), farmasötik preparatlardan PRO ve KAF'ın aynı anda analizini Fourier Transform Infrared Spektroskopi yöntemiyle gerçekleştirmişlerdir. Alt tayin sınırları PRO için 0,06 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ve KAF için 1,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ olarak belirtilmiştir. Yöntemde kullanılan kloroformun distilasyon ile geri kazanılması için sistem geliştirilmiştir.

Moreira ve diğ. (56), toz halindeki farmasötik numunelerden PAR analizini floresans spektroskopisiyle yapmışlardır. Bu yöntemle, toz haline getirilen farmasötik preparat, hiçbir ön işlem yapmadan direkt analiz edilebilmektedir. Eksitasyon dalgaboyunu 333 nm, emisyon dalgaboyunu 382 nm olarak bulmuşlardır. PAR miktarının 100-400 mg g^{-1} olduğu

numunelerde, floresans şiddetinin derişimle doğru orantılı olduğu ve çalışma aralığının 43,1-55,7 mg g⁻¹ olduğu bildirilmiştir.

2.4.3. Kromatografik Yöntemler

Mamolo diğ. (57), PAR, PRO ve KAF'ın tabletlerden aynı anda miktar tayini için yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi geliştirmişlerdir. Uyguladıkları yöntem ters faz kromatografisi olup, hareketli faz olarak lineer gradient şeklinde su-metanol karışımı kullanmışlardır.

Di Pietra ve diğ. (58), fotokimyasal türevlendirme ve dizi diyot dedektör ile HPLC yöntemi geliştirerek PAR, PRO, KAF, klorfeniramin ve asetilsalisilik asitin analizini gerçekleştirmişlerdir. Geliştirdikleri yöntemde C₁₈ ve siyano kolonda ters faz kullanmışlardır. Yöntemi piyasadaki farmasötik preparatlara uygulamışlardır.

Franeta ve diğ. (59), tabletlerden PAR, KAF ve fenobarbitalin aynı anda analizi için HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Yöntemde C₁₈ kolon ve UV-görünür bölge (UV-GB) dedektör kullanmışlardır. Hareketli faz olarak pH 2,5'e fosforik asitle ayarlanmış asetonitril – su karışımı (25:75 h/h) kullanmışlardır. 207 nm'de ölçüm yapılmış ve validasyon parametreleri şu şekilde bulunmuştur: Doğrusallık r=0,998; Gün-içi kesinlik BSS=%0,58 - 2,18; Günler arası kesinlik BSS=%0,36 - 1,89; Doğruluk %geri kazanım=%98,35 - 99,14. Geliştirilen yöntem tabletlere uygulanmış ve sonuçlarda BSS= %0,99 - 1,21 olarak bulunmuştur.

Marin ve diğ. (60), PAR, fenilefrin ve klorfeniramin içeren kapsül ve saşelerden bu maddelerin aynı anda miktar tayinini HPLC yöntemiyle gerçekleştirip yöntemin validasyonunu yapmışlardır. Hareketli faz olarak 40 mM pH 6,0 fosfat tamponu (A) ve asetonitril (B) kullanmışlardır. Başlangıçta %92 A + %8 B olan hareketli faz, 8 dakika süresince doğrusal gradientle %75 A + %25 B olacak şekilde ayarlanmıştır. 8. dakikada %30 A + %70 B olarak ayarlanıp 5 dakika süreyle bu koşul devam etmiştir. Ardından ilk koşula (%92 A + %8 B) ayarlanıp 20. dakikaya kadar bu şekilde devam etmiştir. UV detektörle 215 nm'de fenilefrin ve klorfeniramin, 280 nm'de PAR miktar tayini yapılmıştır.

Kartal (61), PAR, KAF ve kodein fosfatın farmasötik preparatlardan

aynı anda analizi için HPLC yöntemi geliştirmiştir. Hareketli faz olarak 20/20/30/30 (h/h/h/h) 0,01M KH_2PO_4 , metanol, asetonitril, isopropanol karışımı kullanmıştır. Ayırım C_8 kolonda gerçekleştirilmiş ve 218 nm'de spektrofotometrik miktar tayini yapılmıştır. Yöntemin doğrusallık aralığı PAR için $0,4 - 1500 \mu\text{g mL}^{-1}$, KAF için $0,075 - 90 \mu\text{g mL}^{-1}$ ve kodein fosfat için $0,3 - 30 \mu\text{g mL}^{-1}$ olarak bulunmuştur.

Abou-Qare ve diğ. (62), PAR, KAF, asetilsalisilik asit ve piridostigmin bromürün sıçan plazma ve idrarından analizi için HPLC yöntemi geliştirip valide etmişlerdir. C_{18} katı faz ekstraksiyon kartuşu ile biyolojik numunelerden maddeler ekstre edilmiştir. HPLC yönteminde ayırım için ters faz C_{18} kolonu kullanılmıştır. 280 nm'de UV dedektörle miktar tayini yapılmıştır. Doğrusallık aralığı $100 - 1000 \text{ ng mL}^{-1}$ olarak belirlenmiştir.

Santos ve diğ. (63), atık sularda PAR, KAF, diklofenak, ibuprofen, ketoprofen, naproksen ve karbamazepinin aynı anda analizi için dizi diyot dedektörlü ve floresans dedektörlü HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Ön deriştirme ve temizlik amacıyla Oasis-HLB katı faz ekstraksiyon kartuşu kullanmışlardır. Ayırım için LiChrospher® 100 RP-18 kolon kullanmışlardır. Miktar tayininde ibuprofen ve naproksen için floresans dedektör, diğer maddeler için de dizi diyot dedektör kullanmışlardır. Çalışma aralığı $6,2-160 \text{ ng mL}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Yöntem, İspanya'nın Sevil şehrindeki 4 atık su arıtma tesisinden alınan örnekler üzerinde uygulanmıştır.

Jenseni ve diğ. (64), PAR ve iki metabolitinin (PAR glukuronid ve PAR sülfat) plazma ve idrardan miktar tayinini HPLC yöntemiyle yapmışlardır. Ayırım için C_{18} kolon kullanılmıştır. Hareketli faz olarak fosforik asitle pH 3,7'ye ayarlanmış 0,1M potasyum dihidrojen ortofosfat / isopropanol / tetrahidrofuran (100/1,5/0,1; h/h/h) karışımı kullanılmıştır. Yöntemin doğrusallık aralığı $100 - 20.000 \mu\text{M}$ olarak belirtilmiştir.

Portolés ve diğ. (65), 500 mg PAR içeren farmasötik formülasyon geliştirerek, bu formülasyonun biyoyararlanımını belirlemek için HPLC yöntemini kullanmışlardır. Sağlıklı gönüllülere ilaç verip belirli zamanlarda kan alarak plazmada PAR miktar tayini yapmışlardır.

Vertzoni ve diğ. (66), tavşanlara toksik dozda PAR verdikten sonra,

tavşanın plazması ve idrarındaki PAR ve metabolitlerinin miktar tayini için ters faz HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. PAR için çalışma aralığını 0,5-250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ olarak belirlemişlerdir.

Martínez-Algaba ve diğ. (67), antihistaminik ilaç kombinasyonlarındaki etkin maddeleri aynı anda analiz etmek için miseller sıvı kromatografisi yöntemini geliştirmişlerdir. Antihistaminik maddelerle kombine kullanılan KAF ve PAR'ın analizini de yapmışlardır. Yöntemde C_{18} kolon ve miseller hareketli faz için setiltrimetilamonyum bromür ve organik modifiyer olarak 1-propanol ve 1-butanol kullanmışlardır. Gözlenebilme sınırının KAF için 0,64 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ve PAR için 0,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ olduğu belirtilmiştir.

Sioufi ve Marfil (68), fenazon türevlerinin insan plazmasından tayini için gaz kromatografisi yöntemini kullanmışlardır.

Zühlke diğ. (69), PRO, fenazon, dimetilfenazon bu ilaçların metabolitlerinin içme sularından miktar tayini için gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi yöntemi geliştirmişlerdir. İçme suyu örnekleri Almanya'da Berlin - Oranienburg'daki, yakınında ilaç fabrikası bulunan bir içme suyu işleme tesisinden alınmıştır. Yöntemin alt tayin sınırının 3-6 ng L^{-1} olduğu belirtilmiş ve içme suyundaki analiz sonucunda, ilaç ve metabolitlerinin miktarları 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ altında bulunmuş ve izin verilen en yüksek değer olan 3 $\mu\text{g L}^{-1}$ altında olduğu bildirilmiştir.

Yegles ve Wennig (70), PRO'nun sakaldan tayini için gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi yöntemi geliştirmişlerdir. Yöntemde sakal numunesine uygulanan bir dizi ön işlemde elde edilen çözelti, C_{18} katı faz ekstraksiyon kartuşundan geçirilmekte ve gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi yöntemiyle miktar tayini yapılmaktadır. 600 mg PRO alan migren hastasının sakalında, ilaç alımından 48 saat sonra 170 pg mg^{-1} PRO tayin edilmiş olup ilaç alımından 2 gün sonra halen belirgin miktarda PRO tayin edilmiştir.

Rofdewald ve Drehsen (71), aralarında PRO'nun da bulunduğu bir dizi analjeziğin tükürükten analizi için ince tabaka kromatografisi yöntemi geliştirmişlerdir.

Ahrens (72), arasında PAR ve PRO'nun da bulunduğu bir dizi ilaç

etkin maddesinin idrardan analizini yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi – fiber optik tarama yöntemiyle gerçekleştirmişlerdir. Yöntemde ayırım ince tabaka kromatografisiyle gerçekleştirildikten sonra plak fiber optik düzenek ile taranarak oluşan lekelerin UV spektrumları direkt olarak elde edilmiştir. Geliştirilen yeni yöntemin, klasik dansimetrik analizden daha pratik, hızlı ve duyarlı olduğu ileri sürülmüştür.

2.4.4. Diğer Yöntemler

Goyal ve Singh (73), C₆₀-modifiye camı karbon elektrot kullanarak PAR'ın voltametrik miktar tayinini yapmıştır. Yöntemde Bioanalytical Systems (BAS) marka CV-50W voltametrik analizör, çalışma elektrodu olarak 3 mm çaplı fullerene (C₆₀) ile modifiye edilmiş camı karbon elektrot, referans elektrot olarak Ag/AgCl elektrot ve karşıt elektrot olarak platin tel kullanılmıştır. Uygulanan diferansiyel puls voltametri sonucunda PAR'ın oksidasyon pikinin potansiyelinin destek elektrolitinin pH'sına bağlı olduğu, pH arttıkça potansiyelin düştüğü belirtilmiştir. Bu yöntemde PAR'ın çalışma aralığının 0,05-1,5 mM olduğu bildirilmiştir.

Goyal ve diğ. (74), PAR miktar tayini için geliştirdikleri diferansiyel puls voltametri yönteminde, nanoteknoloji kullanılarak altınla modifiye edilmiş indiyum kalay oksit elektrot kullanmışlardır. Çalışma aralığının $2,0 \cdot 10^{-7}$ – $1,5 \cdot 10^{-3}$ M olduğunu bildirmişlerdir.

Staden ve Tsanwani (75), PAR'ın farmasötik formülasyonlardan analizi için akış enjeksiyonu sistemi geliştirmişlerdir. Yöntemin temeli, PAR'ın potasyum heksasiyanoferrat(III) ile oksidasyonu ve ardından amonyaklı ortamda fenolle reaksiyonu sonucunda mavi renkli ürün oluşması ve bu ürünün 630 nm'de spektrofotometrik miktar tayinine dayanmaktadır. Yöntemin alt tayin sınırının $0,2 \text{ mg L}^{-1}$, doğrusal cevap sınırının 60 mg L^{-1} olduğu bildirilmiştir.

Sell ve Koniuszweska, (76), PRO ve KAF karışımının miktar tayini için susuz ortamda diferansiyel spektrofotometrik titrasyon yöntemini kullanmışlardır. Titrant olarak 5 mM HClO₄ içeren asetik asit kullanılmıştır. Numuneler dioksanda çözülmüştür. Yöntem piyasadaki tabletlere uygulanmış ve PAR'ın analizde girişime neden olmadığı belirtilmiştir.

Tomasetti ve diğ. (77), PAR'ın tablet üretiminde kullanılan yardımcı maddelerle etkileşmesini incelemek amacıyla termal analiz yöntemi geliştirmişlerdir. Termogravimetri ve diferansiyel tarama kalorimetri yöntemleri uygulamışlardır. Polivinil pirolidon, magnezyum stearat, sitrik asit, aspartam, selüloz ve nişasta ile PAR'ın ikili karışımları termoanalitik açıdan geçimli iken, yüksek oranda mannitol içeren karışımda etkileşme bildirilmiştir. Bu yöntem miktar tayini yöntemi olmayıp termal etkileşmelerin incelendiği kalitatif bir yöntemdir.

2.5. Kapiler Elektroforez

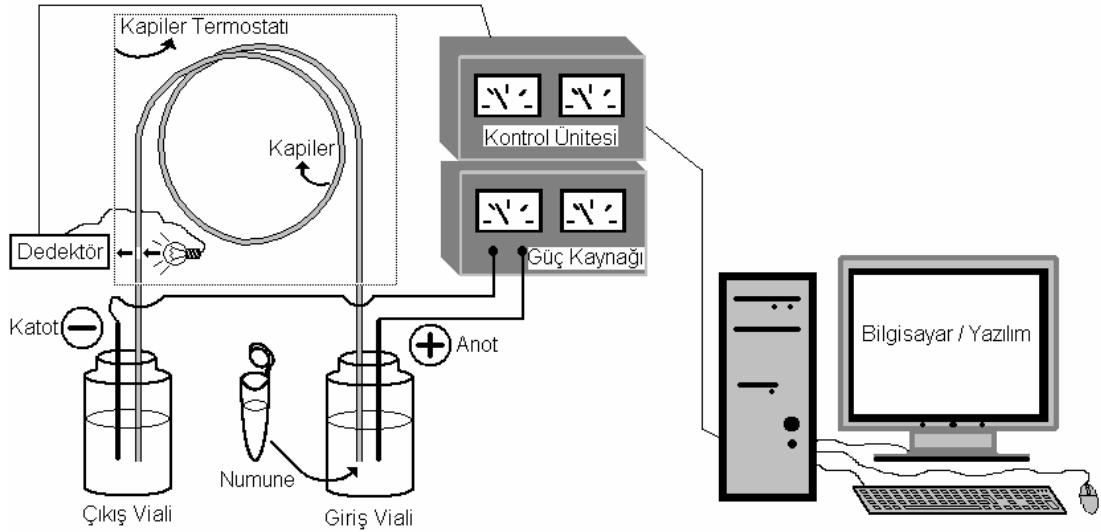
2.5.1. Teorik Bilgiler

Kapiler elektroforez, 1980'li yıllarda uygulanmaya başlanmış ve hızla yaygınlaşmış bir analitik yöntemdir (78 – 80).

Elektroforez, doğru akımın uygulandığı bir tampon çözeltide yüklü taneciklerin diferansiyel göç hızlarına dayanan bir ayırma yöntemidir. Elektroforez, bir düzlemde bulunan destek ortamında gerçekleştiriliyorsa “tabaka elektroforezi”, kapiler tüp içinde gerçekleştiriliyorsa “kapiler elektroforez” adını alır. Kapiler elektroforezde, 10 – 100 µm iç çaplı ve 40 – 100 cm uzunlukta kapiler tüpler kullanılır.

Kapilerin açık olan iki ucu, içi çalışma elektroliti ile dolu iki vial arasına yerleştirilmiştir. Kapilerin bir tarafından numune verilir ve viallere daldırılan iki elektrot arasına 30 kV'a kadar doğru akım potansiyeli uygulanır. Analit iyonları, uygulanan elektriksel alan nedeniyle kapilerin diğer ucuna doğru hareket ederler. Ayırım, analit iyonlarının göç hızlarının farkına dayanır. Ayırımı gerçekleştiren iyonların miktar tayinleri kapilerin diğer ucundaki bir dedektörle gerçekleştirilir (79).

Şekil 2.7'de UV spektrofotometrik dedektörlü bir kapiler elektroforez cihazının şeması görülmektedir.



Şekil 2.7. Kapiler elektroforez cihazının şeması.

(Şema ölçekli değildir. Kullanılan vialer genelde 1 mL hacimlidir. Kolay görülebilmesi amacıyla büyük çizilmişlerdir.)

Kapiler elektroforezde uygulanan yöntemlerin sınıflandırılması ve İngilizce kısaltmaları aşağıdadır (79,81,82).

- 1) Kapiler zon elektroforez (CZE)
- 2) Kapiler jel elektroforez (CGE)
- 3) Kapiler izotakofrez (CITP)
- 4) Kapiler izoelektrik odaklama (CIEF)
- 5) Kapiler elektrokromatografi
 - 5.a) Dolgulu kolon elektrokromatografi (CEC)
 - 5.b) Miseller elektrokinetik kapiler kromatografi (MEKC, MECC)
 - 5.c) Mikroemülsiyon elektrokinetik kromatografi (MEEKC veya MEECC)
 - 5.d) Kiral kapiler elektroforez (CCE)
 - 5.e) Afinite kapiler elektroforezi (ACE)
- 6) Mikroçip kapiler elektroforez ve elektrokromatografi (MCE, MCEC)

CZE, kapiler elektroforezin ilk uygulanmış olan temel türüdür. CZE’de, kapiler içindeki iyonlara iki kuvvet etki eder. Birincisi, uygulanan voltajdan kaynaklanan elektrik alanın iyon üzerinde oluşturduğu kuvvet (elektroforetik kuvvet), ikicisi de iyonun bulunduğu tamponun akışıdır (elektroosmotik akış). Elektrik alan, pozitif yüklü iyonlar (katyonlar) üzerinde negatif yüklü elektrot

(katod) yönüne doğru bir kuvvet oluştururken, negatif yüklü iyonlar (anyonlar) üzerinde de pozitif yüklü elektrot (anot) yönünde bir kuvvet oluşturur. Çözeltideki nötr moleküller elektrik alandan etkilenmez. Elektrik alanın oluşturduğu kuvvet, iyonlarda elektroforetik göç denen harekete neden olur. İyonların elektroforetik göç hızları, yük/çap oranlarına bağlıdır. Yük/çap oranı büyük olan iyonlar daha hızlı göç ederken, bu oranı küçük olan iyonlar daha yavaş göç eder. İyonların göçünü etkileyen diğer kuvvet elektroosmotik akıştır. Bu akışın nedeni, kapilerin iç çeperinde çalışma elektroliti ile SiO^- grupları arasında çift tabaka oluşmasıdır. Kapiler iç çeperinde pH 3,0'ın üzerinde silanol gruplarının ayrışması ile negatif yüklü SiO^- grupları oluşur. Çalışma elektrolitindeki pozitif yüklü iyonlar, kapiler çeperine yaklaşırlar. Çepere çok yakın olan pozitif yüklü iyonlar hareketsizdir. Ancak çeperden uzaklaştıkça, çeperle pozitif yüklü iyonlar arasındaki elektrostatik çekim zayıflar, kapilere uygulanan elektriksel alanın iyonlar üzerindeki kuvveti baskın gelir ve bu pozitif yüklü iyonlar topluca negatif yüklü elektroda (katot) doğru göç ederler. Bu toplu göç, kapiler içindeki tamponun katoda doğru akmasına neden olur. Bu akışa elektroosmotik akış (EOF) denir. Elektroosmotik akış hızı (v_{EOF}), Eşitlik 2.1.'e göre açıklanır.

$$v_{\text{EOF}} = E \cdot \mu_{\text{EOF}} \quad (2.1.)$$

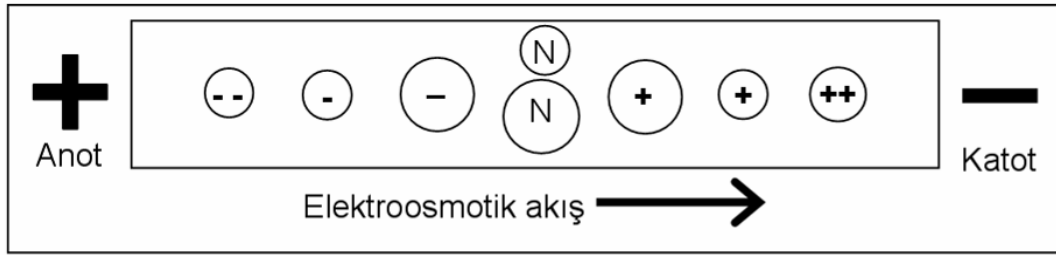
v_{EOF} : Elektroosmotik akış hızı,

E: Elektriksel alan (V cm^{-1})

μ_{EOF} : Elektroosmotik hareketlilik

Kapiler çeperine yakın olan hareketsiz katman ile merkeze yakın olan hareketli katmanın meydana getirdiği çift tabaka arasında oluşan potansiyele zeta potansiyeli (ξ) adı verilir. Çalışma elektrolitinin dielektrik sabiti arttıkça zeta potansiyeli düşer. Zeta potansiyeli arttıkça, çalışma elektrolitinin elektroosmotik hareketliliği artar.

Elektroosmotik ve elektroforetik etkiler sonucunda CZE'de elüsyon sırası aşağıdaki şekilde gösterilmiştir.



Şekil 2.8. CZE'de iyonların elüsyon sırası.

EOF'nin ölçülmesi için numune içine iyonize olmayan, dedektörle tanımlanabilen, saf, kapiler duvarıyla etkileşmeyen ve tamponda çözülebilen bir madde eklenebilir. Bu amaçla en sık metanol kullanılmakta olup, aseton, dimetilsülfoksit de kullanılabilir (83).

Elektroforetik hız, kapilerin etkin uzunluğu (başlangıçtan dedektöre kadar olan uzunluğu) ve maddenin göç zamanından hesaplanır (Eşitlik 2.2).

$$v_a = v_{EP} + v_{EOF} = \frac{\ell_{etkin}}{t_g} \quad (2.2)$$

v_a : Gözlenen elektroforetik hız,

v_{EP} : Maddenin elektroforetik hızı

v_{EOF} : EOF hızı,

ℓ_{etkin} : Kapilerin etkin uzunluğu,

t_g : Göç zamanı

EOF'yi hızlandırmak, yavaşlatmak, durdurmak veya tersine çevirmek için kapilerin iç yüzeyi değişik maddelerle kaplanabilir veya tampona değişik maddeler eklenebilir. Katyonik yüzey aktif maddeler tampona az miktarda eklenince EOF yavaşlamakta, katyonik yüzey aktif madde derişimi arttırılınca EOF durmakta, daha fazla eklenince de EOF ters yöne dönmektedir. Genelde pH'nın artmasıyla EOF artmaktadır. Çünkü yüksek pH'da kapiler iç çeperindeki SiO^- iyonizasyonu artar ve bu da EOF'de artışa neden olur.

Elektroosmozda kapiler içindeki elektrolit, düz kesitli bir yığın şeklinde akar. Kolon kromatografisindeki gibi parabolik akış profili oluşmaz. Akış

profilinin düz olması nedeniyle, EOF, kolon kromatografisinde olduğu gibi bant genişlemesine önemli ölçüde etki etmez. Yalnızca yüksüz moleküller difüzyonla dağılır, iyonlar dar zonlar oluşturarak ilerler. Kapiler elektroforezde bant genişlemesi iki nedenle gerçekleşir. Numune iyonlarının kapiler çeperine adsorpsiyonu bantın geriye doğru kuyruklanmasına neden olurken Joule ısınması bölgesel mikro konveksiyonlar oluşturarak bantın genişlemesine neden olur. Joule ısınması, kapilerden geçen elektrik akımı nedeniyle oluşan ısınmadır.

Kapiler sıcaklığındaki değişim çalışma elektrolitinin viskozitesini ve elektroosmotik hareketliliğini değiştirdiğinden, sonuçların tekrarlanabilirliği için sıcaklık, termostatlı sistem sayesinde sabit tutulur. Aksi takdirde kapilerin aşırı ısınması pik genişlemesine, tekrarlanamayan göç zamanına, numune bozunmasına veya elektrolit kaynaması sonucu elektrik iletkenliğinin kesilip deneyin başarısız olmasına neden olabilir.

Uygulanabilecek maksimum voltaj deneysel olarak bulunur. Voltaja karşı akım grafiği çizilerek doğrusallığın korunduğu en yüksek voltaj seçilir (83). Voltaj yükseldikçe pik genişliği azalmakta, ayırıcılık artmakta ve analiz süresi kısalmaktadır. Bu nedenle uygun olan en yüksek voltaj seçilir. 40 kV üstündeki voltajlar normal koşullarda uygulanmaz çünkü kıvılcımlarla elektrik boşalması ve kapilerin kırılması söz konusudur (84). Genelde 5-30 kV arası voltaj uygulanmaktadır. Ancak özel elektrik kalkanları kullanarak 120 kV'a kadar voltaj uygulanmış ve peptit analizinde 6,1 milyon teorik tabaka sayısına ulaşılmıştır (2).

Düşük tampon derişiminde analiz süresi kısılır. Ancak tampon derişimi çok düşük olursa geniş ve asimetric pikler oluşabilir. Eğer tampon derişimi numune derişiminden azsa pik genişlemesi veya kuyruklanması gözlenir. Genel kural olarak, tampon derişimi numune derişiminin en az 100 katı olmalıdır (83).

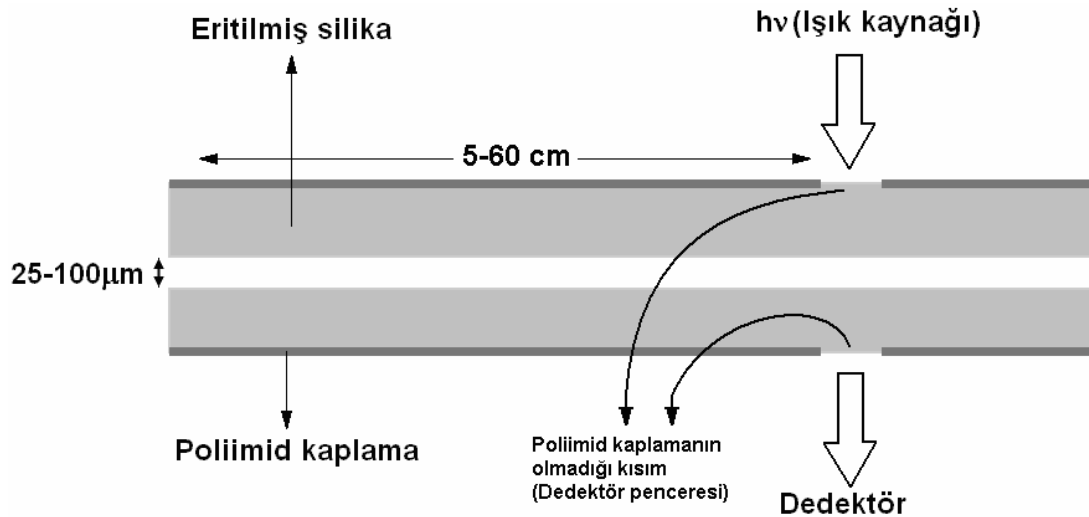
Çalışma elektrolitine eklenen organik çözücüler, vizkozite, dielektrik sabiti ve zeta potansiyel üzerinde etkilidir. Elektrolite metanol eklenmesi pik simetrisini ve ayırıcılığı iyileştirirken, asetonitril eklenmesi analiz süresini kısaltmaktadır (85 – 87).

CZE'deki en önemli değişkenlerden biri çalışma elektrolitinin pH'sıdır. Opioidler ve mirtazepin gibi bazik moleküller pH 2-4 gibi oldukça asidik tamponlarda ayrılabilirler. Non-steroidal antienflamatuvar ilaçlar gibi asidik molekülleri ayırmak içinse pH 9 ve üzerinde bir tampon kullanılır (88).

2.5.2. Kapiler Özellikleri

Kapiler elektroforezde kullanılacak kapilerin türü ve boyutları uygulanacak yöntem, analiz edilecek numune, istenen ayırıcılık ve uygun analiz süresine göre seçilir. Kapilerden beklenen, kısa analiz süresinde yeterli ayrımı sağlayabilmesidir. Kapilerin üretildiği materyalin elektrik iletkenliğinin olmaması, kimyasal olarak inert olması, dedektörle uyumlu olması (örneğin UV dedektör için kapilerin ışınları absorplamaması), ayrıca kapilerin kolay kırılmaması gerekir.

Eritilmiş silika günümüzde en sık kullanılan kapiler materyalidir. Kolay kırıldığı için dış kısmı poliimid ile kaplanıp sağlamlaştırılmıştır. UV dedektör kullanılacaksa, ışık yolunu kapatmaması için poliimid kaplama bu bölgeden kaldırılır (Şekil 2.9).



Şekil 2.9. Eritilmiş silika kapilerin boyuna kesiti.

Pyreks kapiler, eritilmiş silika kapilere göre daha sağlam olması ve dedektör penceresi açmaya gerek göstermemesine rağmen 280 nm'nin altında çalışılmama dezavantajına sahiptir. Teflon kapilerde homojen iç çap

elde edilemez ve ısı iletkenliği düşük olduğundan yüksek voltaj uygulanamaz. Bu nedenlerden dolayı eritilmiş silika, pyreks ve teflondan daha sık kullanılan bir kapiler materyalidir. Genelde iç çapı 25-100 µm olan eritilmiş silika kapiler kullanılır. Büyük çaplı kapilerde yüksek ısı açığa çıkar ve kapilerin iç duvarıyla merkezi arasındaki ısı farkı çok büyük olur. Küçük çaplı kapiler kullanılması ile UV dedektörlerde ışık yolunun küçülmesinden dolayı absorbands düşer ve pik yüksekliği azalır (83). Ayrıca çok küçük çaplı kapilerin partiküllerle tıkanma olasılığı yüksektir. Tıkanmaması için daha pahalı filtreler kullanmak gerekir.

Kapilerin tekrarlanabilir sonuçlar vermesi için ilk kullanımda ve her analizden önce şartlandırma işleminden geçirilmesi gerekir (83). Şartlandırmayla kapilerin iç çeperindeki silanol gruplarının iyonlaşma oranı, dolayısıyla EOF, her analizde aynı olur. Eritilmiş silika kapilerin içinden ilk kullanımdan önce 1,0 N NaOH 15 dakika süreyle geçirilir. Bundan sonra yapılacak her analizden önce sırasıyla 0,1N NaOH, su, ardından çalışma elektroliti geçirilir. Şartlandırma için gereken zaman kapiler uzunluğuyla ilgili olup deneysel olarak tespit edilir. Genelde 0,1N NaOH, su ve tamponu ikişer dakika geçirincede tekrarlanabilir sonuç almak mümkündür.

Kapiler elektroforezde tekrarlanabilir sonuçlar almak için kapiler sıcaklığının kontrolü önemlidir. Sıcaklığın değişmesiyle etkinlik, göç zamanı, enjeksiyon hacmi ve dedektör cevabı değişir. Ayrıca numune bozunmasına da neden olabilir. Kapiler sıcaklığının kontrolü, kapilerin içinde bulunduğu kasetin içine, istenen sıcaklığa termostatlı sistem ile ayarlanmış havanın fan ile üflenmesiyle sağlanır.

2.5.3. Numune Enjeksiyonu

Kapiler içine numune enjeksiyonu hidrodinamik veya elektrokinetik olarak yapılabilir.

Hidrodinamik enjeksiyon yapmanın üç yolu vardır. Bunlardan birincisi, kapilerin giriş tarafına konulan numune vialine basınç uygulanmasıdır. Genelde 50 mbar civarında 1-5 saniye arası basınç uygulanır. Ardından numune viali çıkarılıp çalışma elektrolit viali takılır ve voltaj uygulanarak analize devam edilir. Hidrodinamik enjeksiyonun ikinci yolu, numune viali

kapilerin giriş kısmındayken, çıkış kısmındaki elektrolit vialine vakum uygulanmasıdır. Uygulanan vakumla istenen miktardaki numune kapilere girince vakum kesilir, numune viali çıkarılıp çalışma elektrolit viali takılır ve voltaj uygulanarak analize devam edilir. Üçüncü hidrodinamik enjeksiyon yönteminde, sifon etkisinden yararlanılır. Kapilerin giriş kısmına takılan numune viali, çıkıştaki elektrolit vialinden daha yükseğe yerleştirilir. Yerçekiminin etkisiyle, numune kapilerin içine girer. Ardından numune viali çıkarılıp çalışma elektrolit viali takılır ve voltaj uygulanarak analize devam edilir.

Elektrokinetik enjeksiyonda kapilerin giriş kısmına numune viali yerleştirildikten sonra, numune vialiyle çıkış kısmındaki çalışma elektrolit viali arasında voltaj uygulanır. Oluşan elektrik alanın etkisiyle numunedeki iyonlar kapiler içine göç etmeye başlar. Numune vialindeki anot (+), çıkış vialindeki katot (-) olduğundan, ilk önce numunedeki anyonlar kapilere göç eder; ardından nötral bileşikler oluşan akış nedeniyle kapilere girer ve en son katyonlar girer. Bu voltajın uygulanmasından sonra numune viali çıkarılıp tampon viali takılır ve voltaj uygulanarak analize devam edilir (80).

2.5.4. Güç Kaynağı

Elektroforezi gerçekleştirmek için yüksek voltajlı güç kaynakları kullanmak gerekir. Genelde 30 kV'a kadar voltaj sağlayabilen, voltajı 0,01 kV duyarlılıkla ayarlanabilen doğru akım kaynakları kullanılır. Voltajın analiz süresince sabit kalması için cihaz kesintisiz güç kaynağına bağlanmalıdır. Kapilerden geçen akımın 50 μA 'den az olması istenir. 100 μA 'e kadar akım kabul edilebilirken, 125 μA 'den fazla akım Joule ısınmasına neden olur (89).

40 kV üstündeki voltajlar normal koşullarda uygulanmaz, çünkü kıvılcımlarla elektrik boşalması ve kapilerin kırılması söz konusudur (84). Genelde 5-30 kV arası voltaj uygulanmaktadır. Ancak özel elektrik kalkanları kullanarak 120 kV'a kadar voltaj uygulanmıştır (2).

2.5.5. Kullanılan Dedektör Tipleri

Kapiler elektroforezin birçok tipinde ayrılan analitlerin hepsi ortak bir noktadan geçtikleri için dedektörlerin tasarımı ve fonksiyonları HPLC'de

kullanılanlara benzer. Tablo 2.2’de, kapiler elektroforezde kullanılan dedektör tipleri ve gözlenebilme sınırları verilmiştir (79).

Tablo 2.2. Kapiler elektroforezde kullanılan dedektörler.

Dedektör tipi	Gözlenebilme Sınırı ^a (belirlenen mol)
Spektrofotometri	
Absorpsiyon ^b	$10^{-15} - 10^{-13}$
Floresans	
Kapilerden önce türevlendirme	$10^{-17} - 10^{-20}$
Kapilerde türevlendirme	$8 \cdot 10^{-16}$
Kapilerden sonra türevlendirme	$2 \cdot 10^{-17}$
Dolaylı floresans	$5 \cdot 10^{-17}$
Termal mercekle ^b	$4 \cdot 10^{-17}$
Raman ^b	$2 \cdot 10^{-15}$
Kütle spektrometri	10^{-17}
Elektrokimyasal	
İletkenlik ^b	10^{-16}
Potansiyometri	Belirtilmemiştir.
Amperometri	$7 \cdot 10^{-19}$
Radyometri ^b	10^{-19}

^a Burada verilen gözlenebilme sınırları 18 pL ile 10 nL’lik geniş bir enjeksiyon hacmi aralığından çıkarılmıştır.

^b Kütle gözlenebilme sınırı 1 nL enjeksiyon hacmi kullanılarak derişim gözlenebilme sınırından çevrilmiştir.

2.5.6. Miseller Elektrokinetik Kapiler Kromatografi

Klasik CZE ile yüksüz moleküllere sahip birden fazla maddenin ayrımı mümkün değildir. Çünkü uygulanan elektrik alanın yüksüz moleküller üzerinde etkisi yoktur ve tüm yüksüz moleküller EOF ile aynı hızda göç ederek birbirinden ayrılmadan elüe olurlar. Molekül yüklü bile olsa, yük/çap oranı birbirine yakın olan başka maddelerin molekülleriyle benzer elektroforetik hareketliliğe sahip olması muhtemeldir ve bu maddelerin ayrımı

CZE ile istenen ayırıcılıkta gerçekleştirilemeyebilir. Bu tür ayırmalarda MECC yöntemi başarılı sonuçlar vermektedir (90).

Muijselaar ve diğ. (91)'nin belirttiğine göre, miseller elektrokinetik kapiler kromatografi (MECC) veya diğer adıyla miseller elektrokinetik kromatografi (MEKC) ilk defa 1984 yılında Terabe ve diğ. tarafından uygulanmıştır. MECC yönteminde çalışma elektroliti içine, kritik misel konsantrasyonu üzerinde yüzey aktif madde eklenir. Yüzey aktif maddenin oluşturduğu miseller, çalışma elektrolitinde ikinci bir faz oluştururlar. Numune bileşenleri, sulu faz ile miselin içindeki hidrokarbon fazı arasında dağılıma uğrarlar. Miseller, kapilerde sulu fazdan daha yavaş ilerlediğinden, farklı polariteye sahip numune bileşenleri birbirinden ayrılmış olur.

Yüzey aktif maddenin molekülünün bir ucunda hidrofilik bir grup vardır. Hidrofilik grup uzun zincirli bir hidrofobik gruba bağlıdır. Yüzey aktif maddenin molekülleri düşük konsantrasyonlarda monomer halinde bulunurlar. Belli bir konsantrasyona ulaşıncaya, moleküllerin hidrofobik uçları bir araya gelir. Hidrofilik uçlar dışarıda kalacak şekilde küre şeklinde bir yapı oluşur. 40-100 molekülün bir araya gelerek oluşturduğu bu yapıya "misel" adı verilir. Misel oluşması için gereken en düşük yüzey aktif madde derişimine bu yüzey aktif maddenin "kritik misel konsantrasyonu" (KMK) denir. Kaç molekülün bir araya gelerek misel oluşturacağı ve KMK değeri, maddeden maddeye değışir. Sodyum dodesil sülfat (SDS) için KMK değeri 8,1 mM (ortamdaki diğer maddelere göre 1,3 – 14,8 mM arasında) civarındayken, bütıl-akrilat-bütıl-metakrilat-metakrilik asit kopolimeri de yüzey aktif madde olup tek molekülü ile misel görevi yapar ve KMK'si pratik olarak sıfırdır. (79, 91).

Yüzey aktif bileşiklerin yapılarında taşıdığı hidrofilik gruplar azalan hidrofilisite sırasına göre üç grupta toplanabilirler (7):

- a. $-\text{OSO}_2\text{ONa}$, $-\text{COONa}$, $-\text{SO}_2\text{Na}$, $=\text{N}^+=$, X^- , $-\text{OSO}_2\text{H}$, $-\text{SO}_2\text{H}$
- b. $-\text{OH}$, $-\text{SH}$, $-\text{O}-$, $=\text{CO}$, $-\text{CHO}$, $-\text{NO}_2$, $-\text{NH}_2$, $-\text{NHR}$, $-\text{NR}_2$, $-\text{CN}$,
 $-\text{CNS}$, $-\text{COOH}$, $-\text{COOR}$, $-\text{OPO}_3\text{H}_2$, $-\text{Cl}$, $-\text{Br}$, $-\text{I}$
- c. $-\text{CH}=\text{CH}-$, $-\text{C}\equiv\text{C}-$

Yüzey aktif bileşikler, yapılarında alifatik hidrokarbon zincirleri, arilalkil grupları ve polisiklik hidrokarbonlar gibi lipofilik gruplar taşırlar.

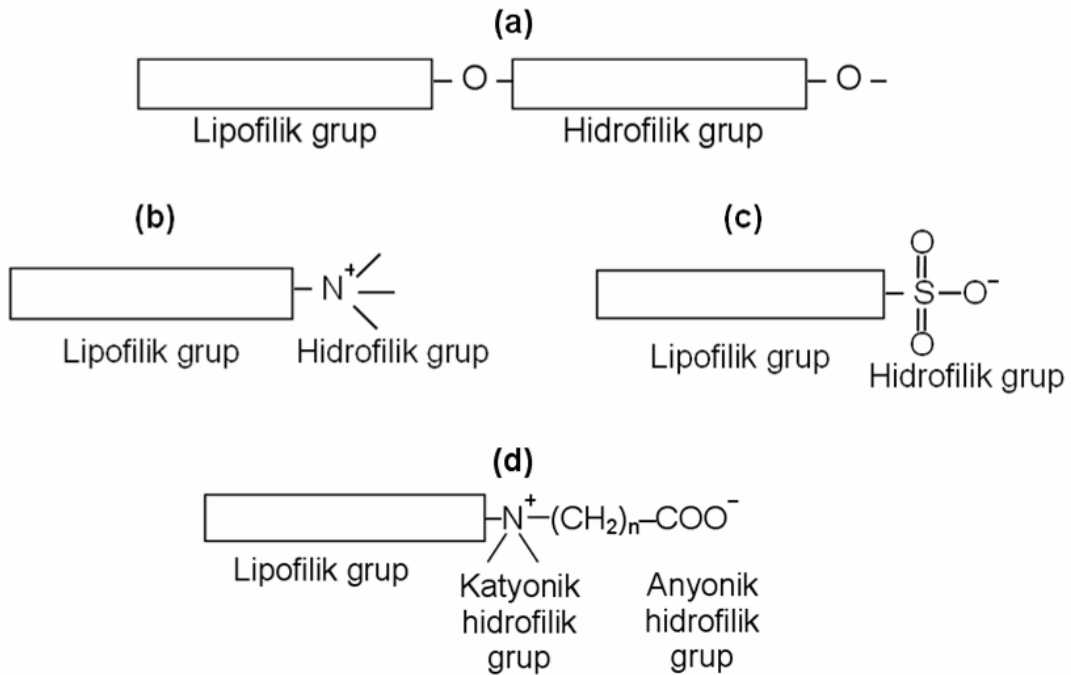
Yüzey aktif maddeler, taşıdıkları fonksiyonel grupların özelliklerine göre dört grupta toplanırlar (7):

1- Non-iyonik yüzey aktifler: Hidrofilik grupları iyonize olmayan gruplardır. Hidrofilik grup sıklıkla polioksietilen eter veya poliol esterleridir. Gliseril monostearat ve polisorbitat-80 bu yapıdadır (Şekil 2.10.a).

2- Katyonik yüzey aktifler: Hidrofilik grup katyon olup kuaterner amonyum tuzları veya büyük moleküllü alifatik aminler olabilir. Benzalkonyum klorür ve setilpiridinyum bromür bu gruptandır (Şekil 2.10.b).

3- Anyonik yüzey aktifler: Hidrofilik grup anyondur. Bu anyon, sülfat, sülfonat veya fosfat olabilir. Sabunlar, alkil sülfatlar, sodyum ksilen sülfonat örnek olarak verilebilir (Şekil 2.10.c).

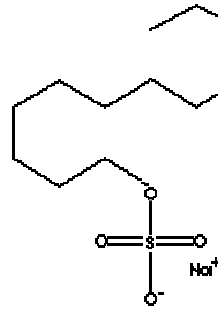
4- Amfoterik yüzey aktifler: Hidrofilik grup, biri anyon, diğeri katyon olmak üzere iki gruptan oluşur. Anyon olarak genelde sülfat, katyon olarak da amin veya kuaterner azot içerirler. N-lauril β -asetat örnek olarak verilebilir (Şekil 2.10.d).



Şekil 2.10. Yüzey aktif maddelerin genel moleküler yapısı.

a) Non iyonik b) Katyonik c) Anyonik d)Amfoterik

MECC yönteminde en sık kullanılan yüzey aktif madde SDS, diğer adıyla sodyum lauril sülfattır. SDS'nin erime noktası 204-207°C, özgül ağırlığı 1,05 g mL⁻¹, sudaki çözünürlüğü 150 g L⁻¹, %1'lik sulu çözeltisinin pH'sı 9-10 arasındadır. SDS'nin kapalı formülü CH₃(CH₂)₁₁OSO₃Na olup, açık formülü Şekil 2.11'de gösterilmiştir.



Şekil 2.11. SDS molekülü.

MECC'de kullanılan, SDS haricindeki yüzey aktifler şunlardır (91):

Anyonik yüzey aktifler: Sodyum N-lauril-N-metilürat, sodyum trioksietilen alkileter asetat, sodyum dioksietilen lauril eter sülfat, sodyum tetradeken sülfonat, sodyum oktil sülfat, magnezyum dodesil sülfat, disodyum 5,12-bis(dodesiloksimetil)-4,7,10,13-tetraoksa-1,16-heksadekanedisülfonat.

Katyonik yüzey aktifler: Dodesil trimetilamonyum bromür, setil trimetilamonyum bromür, setil trimetilamonyum klorür, tetradesil trimetilamonyum klorür, oktil trimetilamonyum klorür, dodesil trimetilamonyum klorür, desil trimetilamonyum klorür, tetrabutil amonyum klorür ve diğer tetrabutil amonyum tuzları.

Non-iyonik yüzey aktifler: Polioksietilen(20)sorbitan monolaurat (tween20), triton x-100, oktil-β-D-glukopiranosid, oktil-β-D-maltopiranosid, n-oktilsukroz, dekanoil-N-metilglukamid.

Makromoleküler yüzey aktiflerin tek bir molekülü bile misel görevi yapar ve bu yüzden KMK'si sıfırdır. Bütil-akrilat-bütil-metakrilat-metakrilik asit kopolimeri buna örnek olup MECC'de denenmiştir. Ayrıca enansiyomerleri ayırmak için kiral yüzey aktifler kullanılmaktadır. (91).

MECC'de genelde anyonik yüzey aktifler kullanılır. Oluşan miselin dış yüzeyi negatif yüklü olup elektrik alanda pozitif elektroda doğru hareket etme

eğilimindedirler. Tampon çözeltisi ise negatif elektroda doğru daha hızlı bir şekilde elektroosmotik akışla hareket eder. Anyonik miseller, oluşan denge sonucunda EOF yönünde hareket ederler ancak, misellerin hızı çözeltinin hızından düşüktür. Böylece, çalışma elektrolitinde iki farklı faz meydana gelir. Misellerin iç kısmındaki hidrofobik kısım, çalışma elektroliti içindeki polar olmayan moleküllerin çözünebileceği ikinci bir faz oluşturur. Bu faza “yalancı sabit faz” adı verilir. Yalancı sabit fazdan daha hızlı akan tampon çözeltisi hareketli faz görevi görür. Çalışma elektrolitinde bulunan numune bileşenleri, yalancı sabit faz ile su fazı arasında dağılıma (partisyon) uğrar. Polar maddeler su fazını tercih ederken, apolar maddeler yalancı sabit faz olan miseli tercih eder (79).

Nötral yüzey aktifler genelde MECC’de kullanılmaz, çünkü oluşturdıkları misellerin elektroforetik hareketlilikleri yoktur. Ancak peptit analizlerinde uygulamaları vardır. Ayrıca SDS ile nötral yüzey aktiflerin karışımları denenmiştir (91).

Nakamura ve (92) diğ., geliştirdikleri kapiler elektroforez yöntemiyle bazı anyonik yüzey aktiflerin KMK değerlerini tespit edip sonuçları kaynaklardaki diğer yöntemlerle karşılaştırmışlardır. Yöntemde EOF ile birlikte hareket eden nötral bir bileşik olan 2-naftalenmetanol belirteç olarak kullanılmıştır. Tampona eklenen SDS derişimine karşı 2-naftalenmetanolün göç zamanı grafiğe geçirildiğinde KMK’ye kadar sabit giden eğri, KMK’den sonra aniden yükselmekte ve bu sayede KMK tespit edilmektedir. Bu yöntemle SDS için KMK değeri 3,92 mM bulunmuştur. Boya çözünürlüğü (*dye solubilization*) yöntemiyle tespit edilen SDS KMK’sinin 3,53 mM, iletkenlik yöntemiyle tesbit edilen SDS KMK’sinin 4,02 mM olduğu belirtilmiştir.

Khaledi (93), SDS’nin KMK değerini 8,1 mM olarak bildirmiştir. Ancak tampon ortamının durumuna göre KMK değişmektedir. Genelde, elektrolitlerin eklenmesiyle yüzey aktif maddenin hidrofilik grupları arasındaki etkileşimler azaldığından misel oluşumu zorlaşır ve KMK artar. Asetonitril, aseton gibi aprotik organik çözücülerin %10’dan küçük oranlarda eklenmesiyle miseller daha stabil olurlar ve KMK düşer. Ancak %15’ten fazla

asetonitril veya %20'den fazla aseton eklenmesi miselleri dağıtıcı etki gösterir ve KMK artar. %35'e kadar metanol eklenmesi KMK'yi arttırırken, geniş bir aralıktaki oranlarda etanol eklenmesi KMK'yi en az %15 düşürür. SDS'nin KMK değeri farklı yöntemlerle farklı çözeltilerde ve değişik koşullar altında tespit edilmiştir. Sonuçlarda SDS için bulunan KMK değerleri 1,3 mM ile 14,8 mM arasında değişmektedir (94).

Bayrak (95), pH ve sıcaklığın SDS ve dodesiltrimetilamonyum bromürün misel oluşturması üzerindeki etkisini incelemiştir. KMK'ye ulaşıncı oluşan misellerin ışığı dağıttığını belirtilmiş ve buna dayanarak KMK ölçümleri türbidimetri yöntemiyle yapılmıştır. KMK değerleri SDS/HCl karışımında 25 mM, SDS/KOH karışımında 23 mM olarak bulunmuştur. Kuvvetli asidik ve kuvvetli bazik ortamlarda KMK değerinin arttığı, sıcaklığın artmasıyla KMK'nin azaldığı belirtilmiştir.

2.5.7. Kapiler Elektroforezde Cihaz ve Yöntem Parametrelerinin Validasyon Parametreleri ile İlişkisi

Yöntemde kullanılan cihaz parametreleri ile validasyon parametreleri arasındaki ilişkiler Tablo 2.3'te verilmiştir.

Tablo 2.3. Kapiler elektroforezde cihaz parametrelerinin validasyon parametreleri ile ilişkisi .

Cihaz Parametresi	Etkilediği Validasyon Parametresi
• Voltaj • Sıcaklık • Kapilerin durumu / şartlandırma	Göç zamanlarının kesinliği
• Enjeksiyon yöntemi • Sıcaklık • Cihaz yazılımının integrasyon yöntemi	Pik alanlarının kesinliği
• Dedektörün doğrusal cevap aralığı	Çalışma aralığı (alt ve üst tayin sınırları)
• Dedektörün gürültü miktarı • Kapiler boyutları • Kapilerin sisteme düzgün takılması	Gözlenebilme sınırı
• Cihaz yazılımının pik saflığını hesaplama yöntemi ve spektral analiz yöntemi	Seçicilik

Kapiler elektroforezde ayırma ve miktar tayininde geliştirilen yöntemin başarılı sayılması için analiz süresinin kısa, etkinliğin, seçiciliğin ve ayırıcılığının yüksek olması gerekir.

Analiz süresinin kısa olması için, yapılması gereken ön işlemlerin ve kapilerin şartlandırılmasının az zaman alması, ayrıca cihazdan elde edilen verilerle sonuca kısa zamanda ulaşılabilmesi gerekir. Kapiler elektroforezde ön işlemlerin basit olması ve kısa zaman alması, cihazdan elde edilen verinin yazılım yardımıyla anında sonuca dönüştürülmesi, analiz süresini kısaltmaktadır. Analizin tamamlanması için tüm numune bileşenlerinin dedektöre ulaşması gerektiğinden, bileşenlerin göç zamanlarının kısa olması önemlidir. Eşitlik 2.3'e göre, yüksek voltaj, kısa kapiler ve yüksek EOF ile kısa analiz süresi elde edilebilir (89).

$$t_g = \ell_{\text{etkin}} \cdot L_{\text{toplaml}} / \mu_g \cdot V \quad (2.3.)$$

t_g : Göç zamanı,

V : Uygulanan voltaj,

ℓ_{etkin} : Kapilerin etkin uzunluğu (Kapilerin başlangıcıyla dedektör arasındaki uzaklık),

L_{toplaml} : Kapilerin toplam uzunluğu

μ_g : Gözlenen elektroforetik hız (EOF hızı+Maddenin elektroforetik hızı).

Kapiler elektroforezde etkinlik, teorik tabaka sayısı ile belirlenir. Teorik tabaka sayısı göç zamanı ve pik genişliğine bağlıdır. Kapiler uzunluğu teorik tabaka sayısına bölünerek teorik tabakaya eşdeğer yükseklik bulunabilir (83).

$$N = 16 (t_g / w)^2 \quad (2.4.)$$

N : Teorik tabaka sayısı,

t_g : Göç zamanı,

w : Pik genişliği.

Eşitlik 2.4'e göre, sabit göç zamanında pik genişliği küçüldükçe etkinlik artar.

Eşitlik 2.5'e göre, kapiler elektroforezde uygulanan voltaj arttıkça etkinlik artmaktadır (79).

$$N = \mu_e \cdot V / 2D \quad (2.5.)$$

N: Teorik tabaka sayısı,

μ_e : Maddenin elektroforetik hareketliliği,

V: Uygulanan voltaj,

D: Maddenin difüzyon katsayısı.

Eşitlik 2.6'da seçicilik katsayısının hesaplanması görülmektedir.

$$\alpha = (t_2 - t_0) / (t_1 - t_0) \quad (2.6.)$$

α : Seçicilik katsayısı,

t_1 : Göç zamanı kısa olan maddenin göç zamanı,

t_2 : Göç zamanı uzun olan maddenin göç zamanı,

t_0 : Sadece EOF ile sürüklenen maddenin göç zamanı.

CZE'de çalışma elektrolitinin pH'sı ve organik çözücüler seçiciliği etkiler. MECC'de buna ek olarak çalışma elektrolitindeki yüzey aktif madde derişimi seçiciliği etkiler.

Ayırıcılık, komşu iki pikin birbirine olan uzaklığı ile ilgilidir ve Eşitlik 2.7'ye göre elektroferogramdan hesaplanır.

$$R = 2 \cdot (t_2 - t_1) / (w_1 + w_2) \quad (2.7.)$$

R: Ayırıcılık (Resolusyon),

t_1 : Göç zamanı kısa olan maddenin göç zamanı,

t_2 : Göç zamanı uzun olan maddenin göç zamanı,

w_1, w_2 : Komşu piklerin pik genişliği.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Tez Çalışmasında Kullanılan Gereçler

3.1.1. Kullanılan Cihazlar

- a. Kapiler Elektforez (Hewlett Packard Agilent 3D-CE, UV dizi diyot dedektörlü, bilgisayar kontrollü)
- b. pH metre (Mettler - Toledo, 0,01 pH hassasiyetli)
- c. Hassas terazi (Mettler, 0,1 mg hassasiyetli)
- d. Bilgisayar (Microsoft Windows® işletim sistemi ve Microsoft Office® yazılımı yüklü)
- e. Spektrofotometre (Shimadzu UV-1601 UV-görünür bölge, çift ışık yollu, 2 nm sabit slit aralığı, bilgisayar kontrollü olup karşılaştırma yönteminin uygulandığı bu spektrofotometre, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı'nda bulunmaktadır.)
- f. Ultrasonik banyo (Sonorex)
- g. Su saflaştırıcı (Milli-Q *Water purification system*)
- h. Buzdolabı (Bosch)
- i. Santrifüj (Nüve)
- j. Vorteks
- k. Manyetik karıştırıcı
- l. Otomatik pipet

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Parasetamol	Atabay Kimya San. ve Tic. A.Ş.
Propifenazon	Atabay Kimya San. ve Tic. A.Ş.
Kafein	Atabay Kimya San. ve Tic. A.Ş.
Diflunisal	Sigma
Sodyum dodesil sülfat	Sigma, CE grade
Borik asit	Sigma, CE grade
Sodyum hidroksit (NaOH) ..	Merck ve Hewlett Packard
Hidroklorik asit (HCl)	Merck
Fosforik asit	Merck
Sitrik asit	Merck

Metanol.....Merck
 Asetonitril.....Merck

3.1.3. Kullanılan Cam Malzemeler ve Diğer Sarf Malzemeleri

Tez çalışmalarında eritilmiş silika kapiler (35,5 cm etkin uzunluk, 44 cm toplam uzunluk; 50 µm iç çap), kapiler elektroforez viali (Pyrex®), cam pipet (1-10 mL, Pyrex®), balon joje (5-1000 mL, Pyrex®), beher (5-250 mL, Pyrex®), havan (cam), spatül (metal), tartım kabı (cam), otomatik pipet ucu (100 ve 1000 µL), filtre (0,45 µm, selülozik membran filtre) kullanılmıştır.

3.1.4. Analizi Yapılan Farmasötik Preparatlar

Geliştirilen analiz yöntemi, aşağıdaki üç farmasötik preparat üzerinde uygulanmıştır:

Panalgin® tablet (Atabay İlaç Fabrikası A.Ş.)

Minoset® Plus tablet (Roche Müstahzarları San. A.Ş.)

Aljil® tablet (Yeni İlaç ve Hammaddeleri A.Ş.)

3.2. Deney İçin Gerekli Hazırlıklar

3.2.1. Kullanılan Maddelerin Saflığı

Deneylerde kullanılan PAR, PRO ve KAF standartları, Atabay Kimya San. ve Tic. A.Ş.'den sağlanmıştır.

PAR Atabay Kimya San. ve Tic. A.Ş. tarafından üretilmiş olup analiz sertifikasında İngiliz, Avrupa ve Amerikan Farmakopelerine göre görünüş, teşhis, çözünürlük, erime noktası, ağır metal içeriği, 4-aminofenol gibi safsızlıkların miktarı, kuruma kaybı, su içeriği, sülfat külü, miktar tayini, elek testi, klorür, sülfat, sülfat, hemen karbonize olan madde miktarı, pH, uçucu organik safsızlık miktarı ve p-kloroasetanilid miktarı analiz sonuçlarının uygun olduğu belirtilmektedir.

PRO, Wuxi Hexia firması tarafından üretilmiş olup, ürün sertifikasında görünüm, erime derecesi, IR-spektrumu, sulu çözeltisinin pH'sı, ince tabaka kromatografisi ile analiz sonuçları, ağır metal miktarı, kuruma kaybı, sülfat külü, miktar tayini sonuçları belirtilmiş ve ürün İngiliz ve Avrupa farmakopelerine uygun bulunmuştur.

KAF, Shandong Xinhua Pharmaceutical Co Ltd. firması tarafından üretilmiş olup, analiz sertifikasında görünüm, tanımlama, erime noktası, sulu çözeltisinin görünümü ve pH'sı, kromatografiyle belirlenen safsızlık miktarı, sülfat külü, ağır metal, kuruma kaybı, miktar tayini, uçucu organik bileşik miktarı, diğer alkaloid miktarı, hemen karbonize olan madde miktarı, HPLC ile miktar tayini sonuçları verilmiş olup sonuçların İngiliz ve Amerikan farmakopelerine uyduğu belirtilmektedir. Bu bilgiler ışığında ve maddelerin çekilen UV spektrumları uyuştuğundan, ayrıca başka yöntemle saflık kontrolüne gerek duyulmamıştır.

3.2.2. Çözeltilerin Hazırlanması

Çözeltilerin hazırlanmasında kullanılan su, Milli-Q su saflaştırma cihazından elde edilen, 0,45 µm filtreden geçmiş saf sudur. Suyun saflık kontrolü cihazdaki entegre iletkenlik kontrolü ile yapılmaktadır.

CE çalışmalarında iç standart (İS) olarak diflunisal (DİF) kullanılmıştır.

PRO, PAR, KAF ve DİF stok çözeltilerinin hazırlanması: 10,0 mg madde analitik tartım kabının içinde hassas olarak tartılıp 10 mL balon jojeye aktarılır. Balon jojeye 5 mL su eklenip ultrasonik banyoda tamamen çözünmesi sağlandıktan sonra su ile 10 mL'ye tamamlanır. Sonuçta her üç madde için 1000 µg mL⁻¹ derişimindeki stok çözeltiler hazırlanır. Hazırlanan çözeltiler, buzdolabında saklanır ve kullanılacağı zaman laboratuvar sıcaklığına ulaşması beklenir.

100 mL 100 mM Borat tamponu: 0,6183 g borik asit tartılıp beherde 80 mL suda çözülür. Manyetik karıştırıcıyla sürekli karıştırılırken pH metre yardımıyla 1M sodyum hidroksit yavaş yavaş eklenerek pH istenilen değere getirilince balon jodede su ile 100 mL'ye tamamlanır.

1L 0,1F Hidroklorik asit çözeltisi: 1L'lik balon jojeye bir miktar su konulduktan sonra üzerine 8,44 mL derişik %37,5'lik HCl çözeltisi eklenir ve su ile tamamlanır.

1L 2,0 F Nitrik asit çözeltisi: 1L'lik balon jojeye bir miktar su konulduktan sonra üzerine 138,9 mL derişik nitrik asit eklenip su ile 1L'ye tamamlanır.

1L 1,0 F Sodyum hidroksit çözeltisi: 40,0 g NaOH tartılarak 1L'lik balon

jojede su ile çözölüp 1 litreye tamamlanır.

Çalışma elektrolitinin hazırlanması: 30 mM SDS içeren 20 mM pH 9,0 tamponundan 100 mL hazırlanması için 123,66 mg Borik asit ve 865,2 mg SDS tartılarak 100 mL'lik behere aktarılır. 80 mL su ile çözölür. Manyetik karıştırıcı ile köpürtmeden karıştırılırken pH metre yardımıyla 1M NaOH çözeltisinden damla damla eklenerek pH 9,0'a ayarlanır. Çözelti 100 mL'lik balon jojeye alınarak su ile 100 mL'ye tamamlanır.

3.2.3. Farmasötik Preparatların Analize Hazırlanması

20 adet tablet tartılarak havanda toz haline getirilir. Bir tablete eşdeğer ağırlıkta tablet tozu tartılarak 250 mL'lik balon jojeye alınır. 200 mL su eklenerek iyice karıştırılır ve ultrasonik banyoda 15 dakika bekletilir. Su ile hacim 250 mL'ye tamamlanır. İşlem sonunda, örneğin Minoset® tablet için, ambalajında 250 mg PAR, 150 mg PRO, 50 mg KAF içerdği belirtilen bir tablet, 250 mL'de çözölünce $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ PAR, $600 \mu\text{g mL}^{-1}$ PRO, $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ KAF içermesi gereken bir çözelti elde edilmiş olur. Bu çözeltiden bir miktarı santrifüj tüpüne alınarak santrifüj edildikten sonra, berrak çözeltiden otomatik pipetle 500 μL alınıp 10 mL'lik balon jojeye aktarılır ve su ile tamamlanırsa, tablet ambalajına göre $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ PAR, $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ PRO ve $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ KAF içermesi gereken bir çözelti elde edilmiş olur. Bu çözelti, 45 μm 'lik filtreden geçirilerek kapiler elektroforez cihazının vialine konur ve analiz yöntemi uygulanır.

3.2.4. Sentetik Preparatların Hazırlanması

Sentetik tablet hazırlanırken, bir tabletin ağırlığı 600 mg olacak şekilde etkin ve yardımcı maddeler eklenmiştir. Yardımcı madde oranları kaynaklardan bulunmuştur (96). Sentetik tablet, 135 mg avicel pH101, 13 mg magnezyum stearat, 2 mg polivinil pirolidon (PVP), 250 mg PAR, 150 mg PRO ve 50 mg KAF tartılarak hazırlanmıştır. Hazırlanan sentetik tabletin analize hazır hale getirilmesi için farmasötik preparatlara uygulanan işlemler yapılmıştır.

Plasebo, PRO, PAR ve KAF konulmadan, yardımcı maddeler yukarıda belirtilen miktarlarda karıştırılarak hazırlanmıştır.

3.2.5. Kullanılan Cam Malzemelerin Temizliği

Kullanılan cam malzemeler, sıcak eşme suyu ve deterjanlı su ile fırçalanarak yıkandıktan sonra, eşme suyu ile durulanmıştır. Ardından 2F nitrik asit çözeltisi içine konulup en az bir gece bekletilmiştir. Asitte bekletildikten sonra distile su ile 3 kez yıkanarak oda sıcaklığında kurutulmuştur.

3.3. Yöntem Geliştirme ve Optimizasyon Deneyleri

3.3.1. Kapilerin şartlandırılması

Analizler, 50 μm i çaplı eritilmiş silika kapiler kullanılarak yapılmıştır. Kapilerin toplam uzunluğu 44 cm, etkin uzunluğu 35,5 cm'dir.

İlk kullanımda, kapilerden 15 dakika 1,0 F NaOH geçirilmiştir. Her numune enjeksiyonundan önce sırasıyla 0,1 F NaOH, su ve çalışma elektroliti 2'şer dakika süreyle kapilerden geçirilerek şartlandırma yapılmıştır. Analiz sonunda cihaz kapatılmadan önce kapilerden 10 dakika su geçirilip kapiler içi su dolu olarak bırakılmıştır. Analizlere uzun süre ara verileceği zaman, kapilerden 30 dakika hava geçirilerek kurutulmuş ve kapiler kaseti kutusunda saklanmıştır.

3.3.2. Numunenin Cihaza Verilmesi

Miktar tayinini yapılacak her numuneye İS olarak aynı miktarda ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) DİF konulmuştur.

Numuneler, kapiler elektroforez cihazının viallerine konulmadan önce 0,45 μm filtreden geçirilerek kapileri tıkama olasılığı bulunan partküllerden arındırılmıştır. Ardından numune konulan vial cihaza yerleştirilmiştir. Kapiler şartlandırılması yapıldıktan sonra, 3 saniye süreyle 50 mbar basınçla hidrodinamik olarak numune enjeksiyonu yapılmıştır. Daha sonra, kapiler uçları çalışma elektrolitine daldırılarak 25°C'de 29 kV potansiyel uygulanıp elektroforez başlatılmıştır. Dizi diyot dedektör kullanılarak 200 nm dalgaboyunda elektroferogram elde edilmiştir.

3.3.3. Uygulanacak Kapiler Elektroforez Yönteminin Seçilmesi

PRO, PAR, ve KAF standartlarını ve DİF'i (İS), 50'şer $\mu\text{g mL}^{-1}$

derişimde içeren numune ile aşağıda anlatılan analiz denemeleri yapılmıştır. İlk deneylerde amaç, maddelerin ayrımını sağlamak olmuştur. Bu, elektroferogramdaki piklerin çakışmaması demektir. Yapılan deneyler sonucunda, CZE ile yapılan denemelerde yeteri kadar ayırıcılık ve seçicilik sağlanamadığından, daha başarılı sonuçlar veren MECC yöntemi seçilmiştir.

3.3.4. MECC Yönteminin Optimizasyonu

MECC yönteminde ayırma işleminin başarılı olması için kullanılan çalışma elektrolitinin bileşimi, derişimi ve pH'sı önemlidir. Tamponun bileşimi, istenilen pH'ya göre ayarlanır. Tamponlama kapasitesinin yeterli olması için uygun pH değeri, kullanılan zayıf asitin pKa'sı ± 1 'dir. Yöntemde tampon seçiminde kullanılan zayıf asitlerin pKa değerleri Tablo 3.1'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. Yöntem optimizasyonunda kullanılan tampon çözeltiler.

Tampon adı	pKa değeri	Hazırlanan tamponun pH'sı
Fosfat	2,12 (pKa1)	2,5
Sitrat	2,06 (pKa1)	2,5
Sitrat	4,74 (pKa2)	5,0
Fosfat	7,21 (pKa2)	7,0
Borat	9,24	8,5
Borat	9,24	9,0
Borat	9,24	9,5
Borat	9,24	10,0

Optimizasyon deneylerinde, tampon içeriği, derişimi ve pH'sı sistematik olarak değiştirilerek en uygun tampon tespit edilmiştir. MECC yönteminde, nötral bileşiklerin ayrımı kullanılan yüzey aktif maddenin oluşturduğu miseller aracılığıyla gerçekleştiği için, kullanılan yüzey aktifin derişimi önemlidir. Yüzey aktif madde olarak SDS seçilmiştir. Optimizasyon deneyleri sırasında değişik SDS derişimleri denenerek en uygun olanı tespit edilmiştir. Cihaza ait parametrelerin (kapiler kaset sıcaklığı, voltaj, enjeksiyon süresi, dalgaboyu) sistematik olarak değiştirilmesi ile ayırıcılık ve seçicilik açısından en uygun şartlar bulunmuştur. Bu analizler sırasında numunelerdeki PAR, PRO, KAF ve DİF derişimleri $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ 'dir.

3.3.5. Kalibrasyon Eğrilerinin Hazırlanması

PRO, PAR, ve KAF standartlarının her birinden 2, 3, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 125 ve 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ içeren çözeltiler, standart stok çözeltilerinden gerekli miktarlar alınarak suda hazırlanmıştır. Tüm kalibrasyon standart çözeltileri 10 mL'lik balon jojelerde hazırlanıp her birine 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ DİF iç standart olarak eklenmiştir. Analiz sonucunda elde edilen elektroferogramlardan, birbirinden ayrılan maddelerin göç zamanları ve pik alanları, bilgisayar yazılımı yardımıyla tespit edilmiştir.

Elektroferogram verileri Microsoft Excel® programına aktararak pik alanlarının göç zamanlarına oranı olan pik normalizasyonları (PN) hesaplanmıştır. Ardından maddenin PN'sinin, iç standardın (DİF) PN'sine oranı olan PN oranları hesaplanmıştır. Madde derişimine karşı PN oranlarının grafiği çizdirilerek doğrusal regresyon analizi sonucunda kalibrasyon eğrileri ve eğri denklemleri elde edilmiş, korelasyon (r) ve tanımlayıcılık (R veya r^2) katsayıları hesaplanmıştır.

3.4. Validasyon Deneyleri

Hazırlanan stok çözeltilerin kararlılığını belirlemek için stok çözelti ikiye ayrılıp biri oda sıcaklığında, diğeri buzdolabında bir gün bekletilmiştir. Daha sonra, geliştirilen yöntemle analiz edilmiştir. Bekletmeden önceki ve iki koşulda beklettikten sonraki UV spektrumları ve elektroferogramları karşılaştırıldığında, hiçbir bozunmaya rastlanmamıştır. Ayrıca stok çözeltilerin oda sıcaklığında 24 saat, buzdolabında 2 ay kararlı kaldığı gözlenmiştir.

Gözlenebilme sınırı (LOD), sinyal/gürültü (S/G) oranının 3 olduğu derişim dikkate alınarak bulunmuştur (97).

Doğrusallık aralığı, alt ve üst tayin sınırları belirlenmiştir. Alt tayin sınırı (LOQ), S/G oranının 10 olduğu değer ölçülerek bulunmuştur. Üst tayin sınırı (LOL), kalibrasyon eğrisinde doğrusallığın bozulduğu noktadır (97).

Gün içi kesinlik ve doğruluk çalışmaları, doğrusal çalışma aralığında LOQ'ya yakın, ortada ve LOL'ye yakın olmak üzere 3 derişimde (10, 50, 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$), her derişim için altı ayrı çözelti kullanılarak aynı gün içinde yapılmıştır.

Günler arası kesinlik ve doğruluk çalışmaları, 3 derişimde (10, 50,

100 $\mu\text{g mL}^{-1}$), her gün yeni çözeltiler hazırlanarak altı ayrı günde yapılmıştır.

Yöntem tekrarlanabilirliği için, aynı derişimde (50'şer $\mu\text{g mL}^{-1}$) standart maddeleri içeren karışım, geliştirilen yöntemle 10 kez analiz edilip, sonuçlar arasındaki BSS değeri hesaplanmıştır.

Kapiler elektroforez cihazının tekrarlanabilirliği için, aynı derişimdeki standart, 10 kez enjekte edilerek elde edilen elektroferogramlarda pik alanları ve göç zamanları incelenmiştir.

Geri kazanım, sentetik preparatların tekrarlı analizleri sonucunda konulan ve bulunan miktarlardan hesaplanmıştır (Bkz. Ek.1).

Yöntemin seçiciliğini değerlendirmek amacıyla bilinen miktarda PRO, PAR ve KAF içeren karışımlarda, bileşenlerden birinin miktarı değiştirilip diğerleri sabit tutularak sonuçlara etkisi incelenmiştir.

Yöntemin sağlamlık (*robustness*) çalışması için, yöntem parametrelerindeki küçük değişimlerin sonucu ne kadar etkilediği araştırılmıştır. Yöntemin tutarlılık (*ruggedness*) çalışması için farklı bir analizci tarafından, geliştirilen MECC yöntemi sentetik tabletlere uygulanmıştır.

3.5. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması

Yöntem, Türkiye ilaç pazarında bulunan Panalgine® tablet (Atabay İlaç Fabrikası A.Ş.), Aljil® tablet (Yeni İlaç ve Hammaddeleri San. Tic. A.Ş.) ve Minoset® Plus tablet (Roche Müstahzarları San. A.Ş.) müstahzarlarına uygulanmıştır. Tabletler eczanelerden temin edilmiştir.

Tablet numuneleri Bölüm 3.2.3. 'te anlatıldığı şekilde hazırlandıktan sonra 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ iç standart (DİF) eklenip analiz edilmiştir.

3.6. Karşılaştırma Yöntemi

Karşılaştırma yöntemi olarak, Dinç ve diğ. (43)'nin geliştirdiği spektrum oranları türev spektrofotometrisi yöntemi uygulanmıştır. Bu yöntemde PAR'ın, KAF'ın ve bu iki maddenin PRO ile üçlü karışımının UV absorbans spektrumları, PRO'nun spektrumuyla bölünmektedir. Elde edilen oran spektrumlarının birinci türevlerinde, KAF'ın x eksenini kestiği dalgaboyundaki PAR absorbansı, numunedeki PAR derişimiyle doğru orantılıdır. PAR'ın x

eksenini kestiği dalgaboyundaki KAF absorbansı da, numunedeki KAF derişimiyle doğru orantılıdır. Benzer şekilde, PRO'nun, KAF'ın ve üçlü karışımın spektrumları, PAR spektrumu ile bölündüğünde elde edilen oran spektrumunun birinci türevi alınmaktadır. Elde edilen spektrumda, KAF'ın x eksenini kestiği dalgaboyundaki PRO absorbansı, numunedeki PRO derişimiyle doğru orantılıdır. PRO'nun x eksenini kestiği dalgaboyundaki KAF absorbansı da, numunedeki KAF derişimiyle doğru orantılıdır. KAF miktarı, iki işlemle de elde edilebilmektedir.

3.6.1. Karşılaştırma Yönteminin Uygulanması (43)

Tüm numuneler, yöntemde belirtildiği şekilde, 1,0 M HCl çözeltisinde çözünmüştür. Standart stok çözeltiler $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ derişimde hazırlanmıştır. Stok çözeltilerden gereken miktarlarda standartlar alınarak 25 mL'lik balon jojelerde uygun seyreltmeler yapılmıştır. Kalibrasyonda 3, 5, 10, 15, 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ PAR standartları, 3, 6, 9, 12, 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ PRO standartları ve 1, 3, 6, 9, 12 $\mu\text{g mL}^{-1}$ KAF standartları kullanılmıştır.

Farmasötik preparat numunesi için Minoset[®] Plus tabletten 20 adet tartılarak havanda toz haline getirilmiştir. Bu tozdan 1 tablet ağırlığı kadar tartılıp 100 mL balon jojeye alınarak 0,1 M HCl eklenmiştir. 30 dakika karıştırıldıktan sonra, çözelti süzülüp kalıntı 3 kez 10 mL 0,1 M HCl ile yıkanmıştır. Hacim 100 mL'ye 0,1 M HCl ile tamamlandıktan sonra elde edilen tablet çözeltisi, 1:250 oranında seyreltilmiştir. Bu işlem 10 kez tekrarlanmıştır.

Yapılan kalibrasyondan sonra, standart maddelerle hazırlanan üçlü karışımların ve farmasötik preparat numunelerinin spektrumları çekilmiştir. Bunların, yukarıda belirtildiği şekilde oranları alınarak değerlendirme yapılmıştır.

Geliştirilen MECC yöntemiyle ve karşılaştırma yöntemiyle elde edilen sonuçlar, istatistiksel olarak değerlendirilerek aralarında fark olup olmadığına karar verilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Optimum Yöntem Parametrelerinin Belirlenmesi

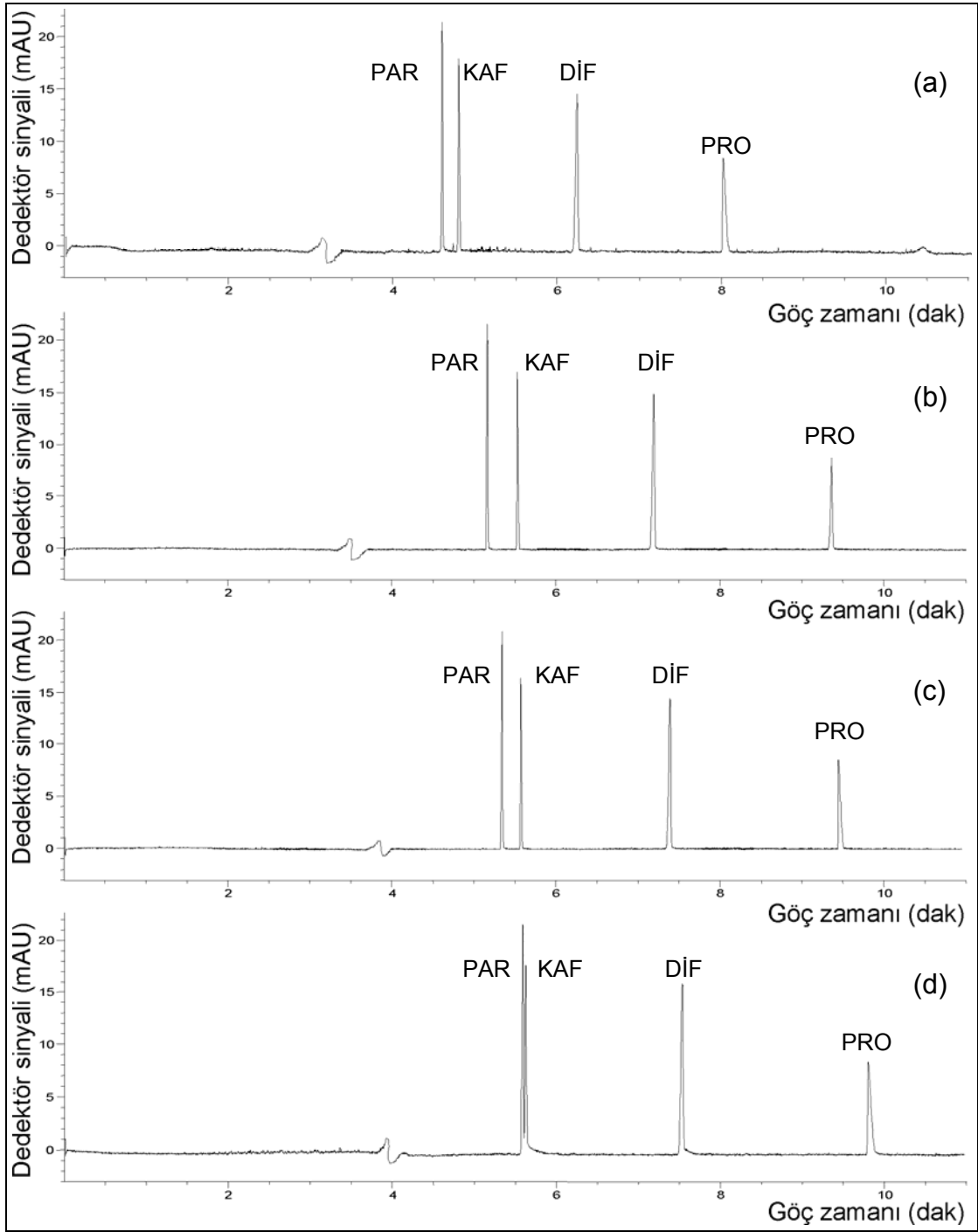
4.1.1. Çalışma Elektrolitinin Seçimi

Çalışma elektroliti olarak pH 2,5 ve 7,0 fosfat tamponu ve pH 2,5 ve 5,0 sitrat tamponu kullanılması sonucunda numune bileşenleri birbirinden ayrılmamıştır. Borat tamponuyla pH 8,5 – 10,0 arasında yapılan denemeler sonucunda en iyi ayırıcılık pH 9,0'da gözlenmiştir (Bkz. Şekil 4.1).

Kullanılan pH 9,0 borat tamponu derişimi 5 – 100 mM aralığında denenerek 20 mM tampon derişimi seçilmiştir (Bkz. Şekil 4.2).

0 – 100 mM aralığında SDS içeren 20 mM pH 9,0 Borat tamponu ile yapılan deneyler sonucunda optimum SDS derişiminin 30 mM olduğuna karar verilmiştir (Bkz. Şekil 4.3).

30 mM SDS içeren 20 mM pH 9,0 borat tamponuna % 5, 10 ve 15 oranlarında metanol eklenmesi ayırıcılık üzerinde olumlu etki yapmamakla birlikte, analiz süresini uzatmış ve elektroferogram zemininde (*baseline*) dalgalanmalara neden olmuştur. Aynı oranlarda asetonitril eklenmesi ile ayırıcılıkta artış gözlenmemiş, analiz süresinde de anlamlı bir azalma meydana gelmemiştir. Bu nedenle asetonitril, hem tampon hazırlama işlemini uzattığı, hem de çevre için toksik olduğu gerekçeleriyle tampona eklenmemesine karar verilmiştir.



Şekil 4.1. Çalışma elektrolitinin pH'sının analiz üzerine etkisi.

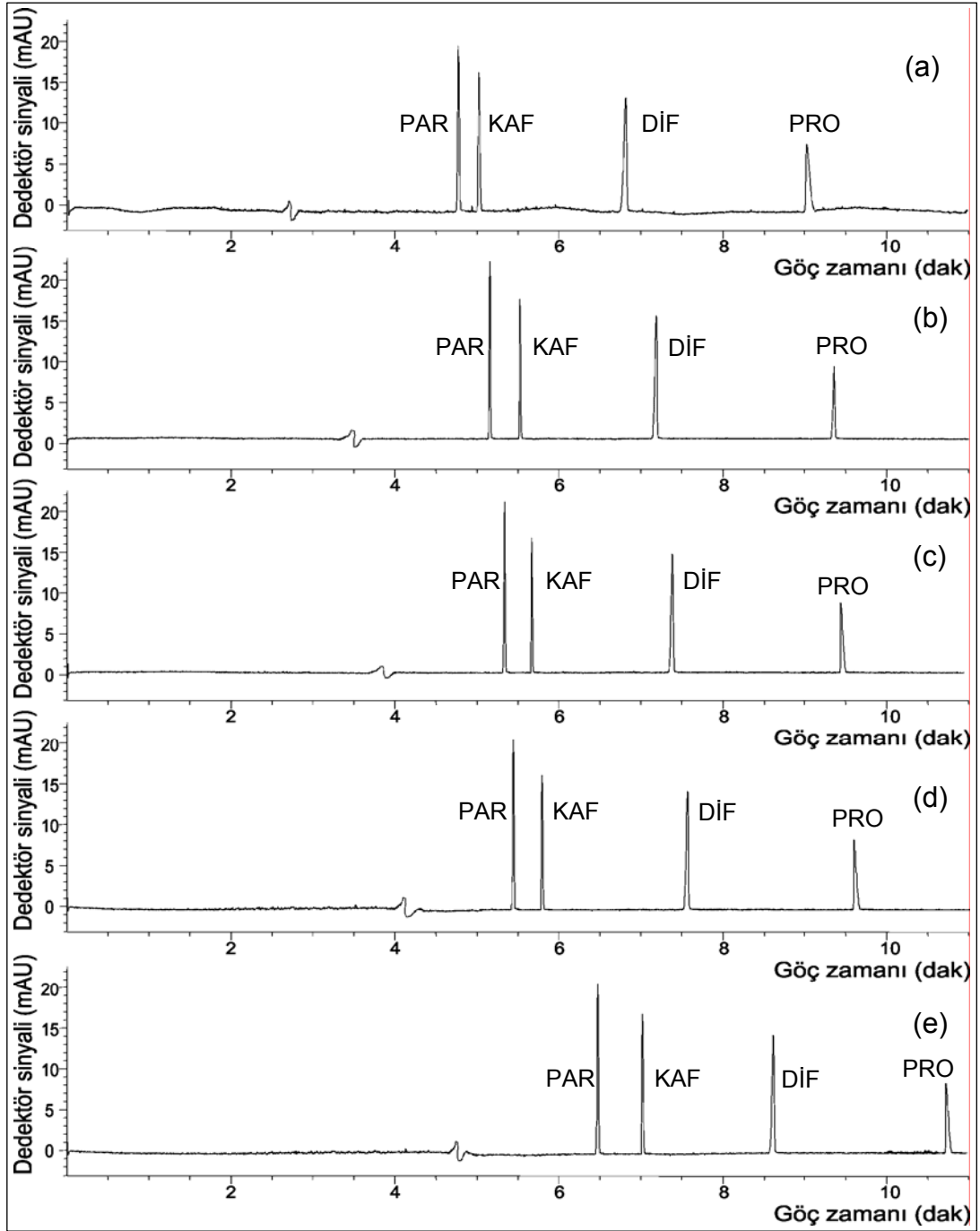
a) pH 8,5

b) pH 9,0

c) pH 9,5

d) pH 10,0

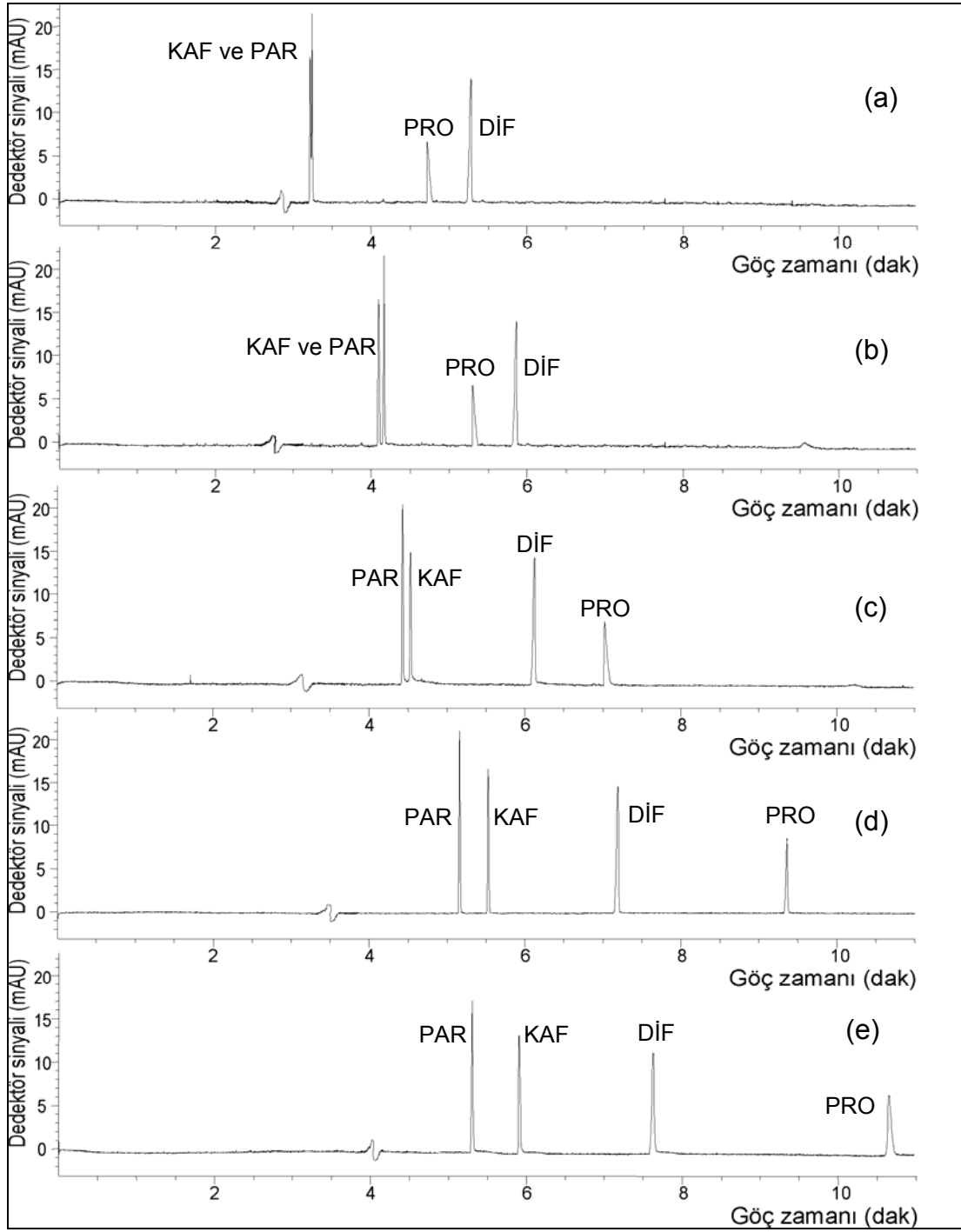
Koşullar: 30 mM SDS içeren 20 mM borat tamponu. $t_{enj} = 3$ s, $P_{enj} = 50$ mbar, $V = 29$ kV, 25°C , $\lambda = 200$ nm. PAR, KAF, DİF, PRO derişimi: 50 'şer $\mu\text{g mL}^{-1}$.



Şekil 4.2. Tampon derişiminin analiz üzerine etkisi.

a) 10 mM b) 20 mM c) 30 mM d) 50 mM e) 75 mM borat.

Koşullar: 30 mM SDS içeren pH 9,0 borat tamponu. $t_{enj} = 3$ s, $P_{enj} = 50$ mbar, $V = 29$ kV, 25°C , $\lambda = 200$ nm. PAR, KAF, DİF, PRO derişimi: 50 'şer $\mu\text{g mL}^{-1}$.



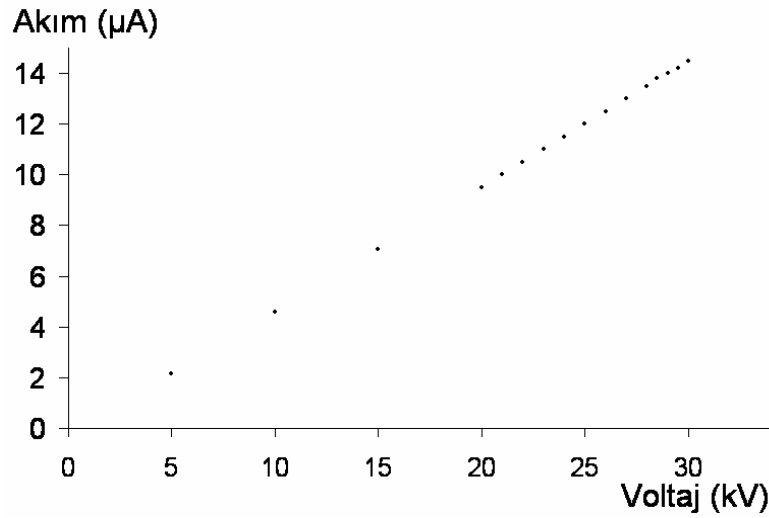
Şekil 4.3. Çalışma elektrolitindeki SDS derişiminin analiz üzerine etkisi.

a) 0 mM, b) 10 mM, c) 20 mM, d) 30 mM, e) 50 mM SDS.

Koşullar: 20 mM pH 9,0 borat tamponu, $t_{enj} = 3$ s, $P_{enj} = 50$ mbar, $V = 29$ kV, 25°C , $\lambda = 200$ nm, PAR, KAF, DiF, PRO derişimi: $50'$ şer $\mu\text{g mL}^{-1}$.

4.2. Cihaz Parametrelerinin Belirlenmesi

Elektroforez sırasında çalışma elektrolitine uygulanacak voltajın belirlenmesi için, voltaja karşı akım grafiği çizilmiştir (Şekil 4.4). Elde edilen grafikte 5 – 30 kV arasında uygulanan voltajla akımın doğrusal olarak arttığı ve yüksek voltajlarda doğrusallığın bozulmadığı görülmektedir. Tanımlayıcılık katsayısı $r^2=0,9999$ olarak hesaplanmıştır. Uygulanacak voltaj 29 kV olarak belirlenmiştir.



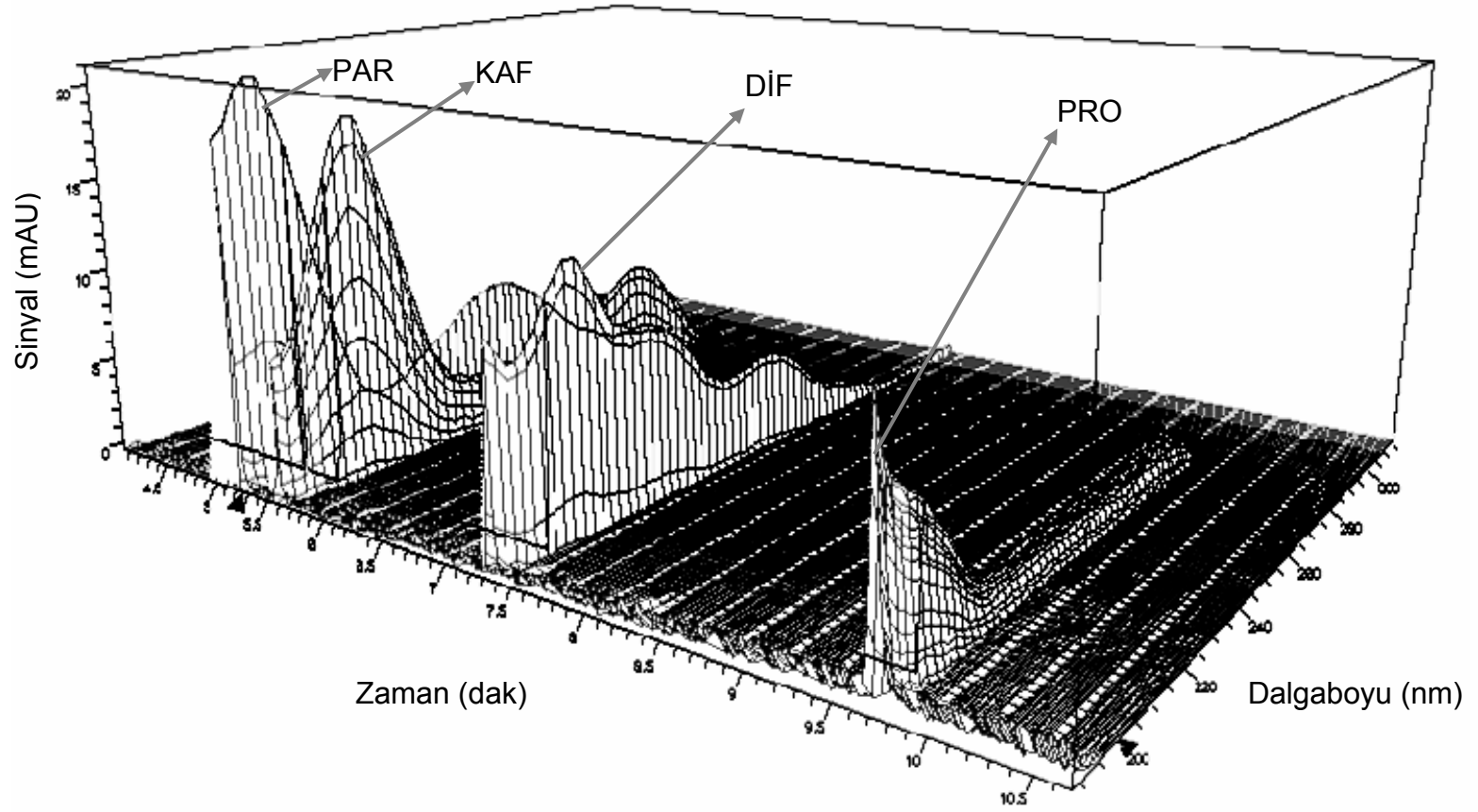
Şekil 4.4. Çalışma elektrolitine uygulanan voltaja karşı akım grafiği.

Üç boyutlu elektroferogram ve absorbands spektrumu grafiği incelenip dizi diyet dedektör dalgaboyu 200 nm olarak seçilmiştir. (Bkz.Şekil 4.5).

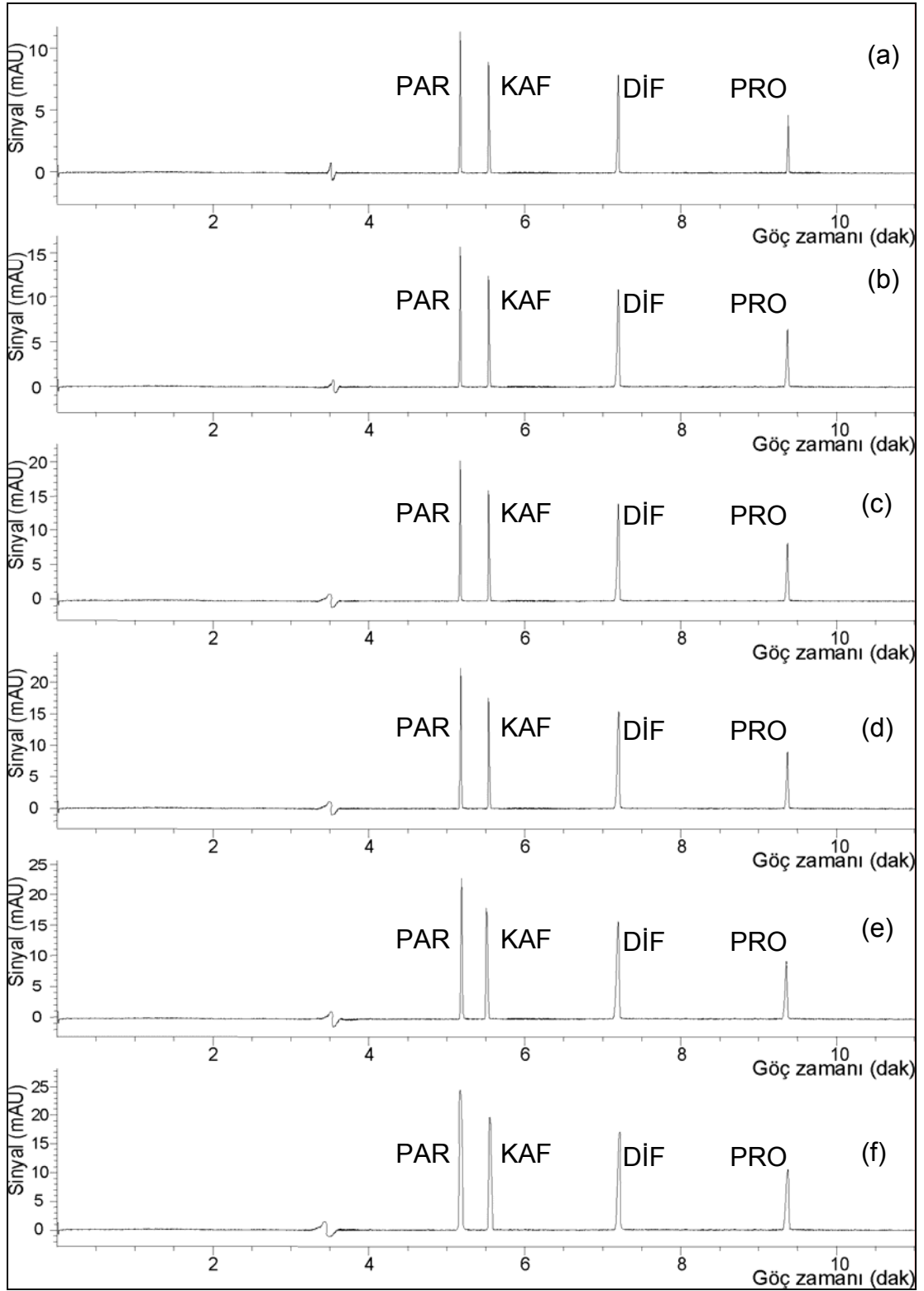
Enjeksiyon süresini (t_{enj}) belirlemek için, enjeksiyon basıncı (P_{enj}) olarak 50 mbar sabit basınç ile hidrodinamik enjeksiyonlar yapılarak farklı enjeksiyon süreleri denenmiştir (Bkz. Şekil 4.6). En uygun enjeksiyon süresinin 3 s olduğuna karar verilmiştir.

Kapilerin çalışma sıcaklığı 20 – 30°C arasında değiştirilerek en uygun sıcaklık olarak 25°C seçilmiştir (Bkz. Şekil 4.7).

MECC yönteminin optimizasyonu sonucunda çalışma elektroliti olarak 30 mM SDS içeren 20 mM pH 9,0 borat tamponu seçilmiştir. Cihaz parametreleri 50 mbar basınçla 3 s süreli hidrodinamik enjeksiyon, 29 kV voltaj, 25°C kapiler sıcaklığı ve 200 nm dalgaboyunda dizi diyet dedektör kullanımı şeklinde belirlenmiştir.



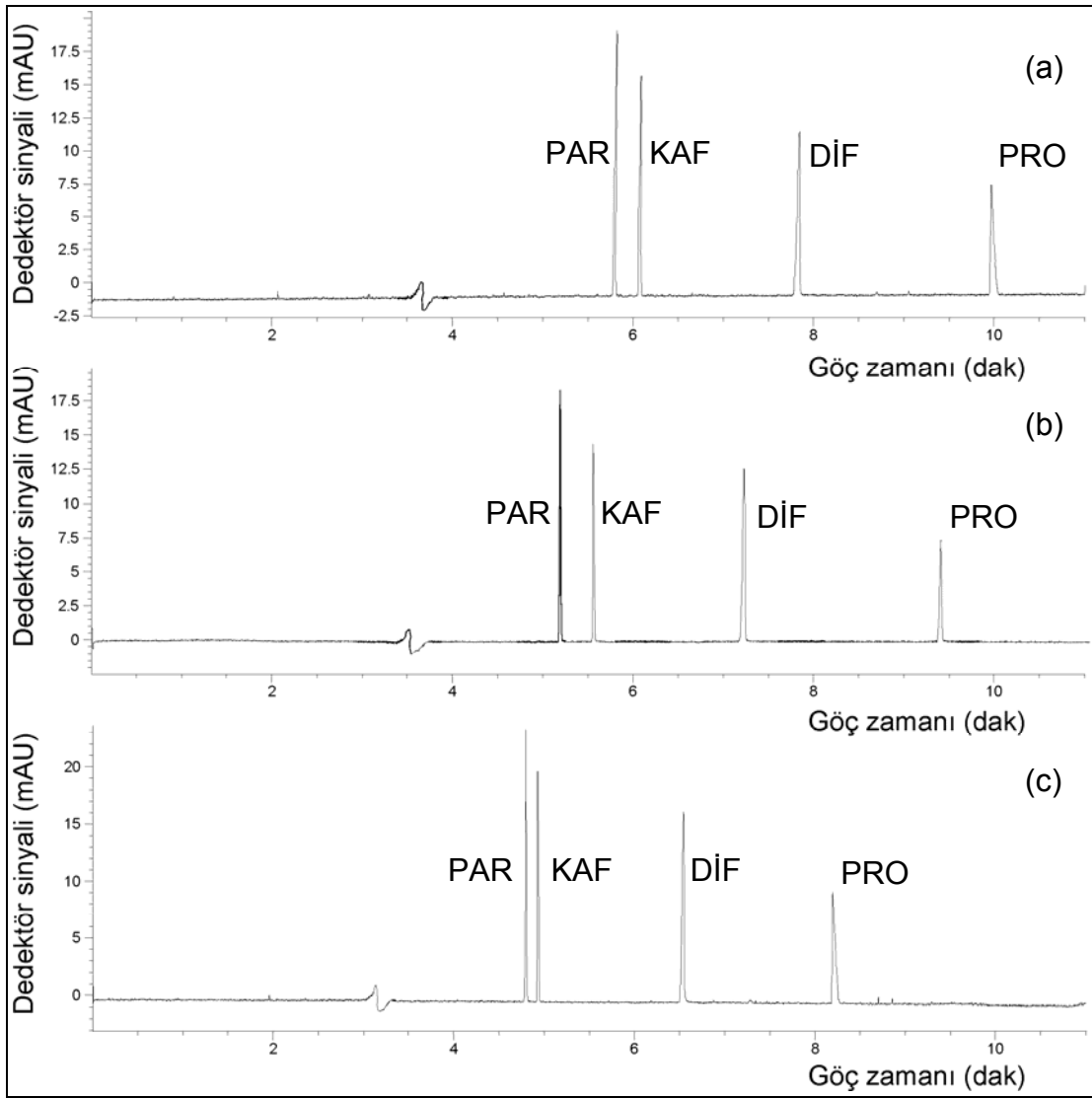
Şekil 4.5. Kapiler elektroforez cihazından elde edilen üç boyutlu elektroferogram ve spektrum.
Koşullar: 30 mM SDS içeren 20 mM pH 9,0 borat tamponu, $t_{enj} = 3$ s, $P_{enj} = 50$ mbar, $V = 29$ kV, 25°C ,
PAR, KAF, DİF ve PRO derişimi: $50\text{'şer } \mu\text{g mL}^{-1}$.



Şekil 4.6. Enjeksiyon süresinin (t_{enj}) analiz üzerine etkisi.

a) 1 s, b) 2 s, c) 3 s, d) 4 s, e) 5 s, f) 8 s.

Koşullar: 30 mM SDS içeren 20 mM pH 9,0 borat tamponu, P_{enj} =50 mbar, V =29 kV, 25°C, λ = 200 nm, PAR, KAF, DİF ve PRO derişimi: 50'şer $\mu\text{g mL}^{-1}$.



Şekil 4.7. Kapiler sıcaklığının analiz üzerine etkisi.

a) 20°C, b) 25°C, c) 30°C.

Koşullar: 30 mM SDS içeren 20 mM pH 9,0 borat tamponu, $t_{enj} = 3$ s, $P_{enj} = 50$ mbar,

$V = 29$ kV, $\lambda = 200$ nm. PAR, KAF, DİF, PRO derişimi: 50'şer $\mu\text{g mL}^{-1}$.

MECC yönteminin geliştirilmesi sırasında optimizasyonu yapılan parametreler Tablo 4.1'de açıklanmıştır. Yapılan deneylerde standart madde ve İS derişimleri $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ 'dir.

Tablo 4.1. MECC yönteminin optimizasyonu.

Araştırılan Parametre	Denenen	Seçilen
Tampon bileşimi ve pH'sı (10/ 25/ 50/ 75/ 100 mM derişimlerde değişik tamponlar denenip tüm tamponlara 30 mM SDS eklenmiştir.)	Fosfat, pH 2,5 Sitrat, pH 2,5 Sitrat, pH 5,0 Fosfat, pH 7,0 Borat, pH 8,5 Borat, pH 9,0 Borat, pH 9,5 Borat, pH 10	Borat, pH 9,0
Borat pH 9,0 tamponunun derişimi	5, 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100 mM Borat	20 mM Borat
20 mM pH 9,0 Borat tamponundaki SDS derişimi	20, 30, 40, 50, 100 mM SDS	30 mM SDS
Tampona organik çözücü eklenmesi	%5 Metanol %10 Metanol %15 Metanol %5 Asetonitril %10 Asetonitril %15 Asetonitril	Organik çözücü eklenmemesine karar verilmiştir.
Dedektör dalgaboyu	190 – 350 nm	200 nm
Uygulanan voltaj	5 – 30 kV	29 kV
Enjeksiyon süresi	1, 2, 3, 4, 5, 8 s	3 s (50 mbar)
Kapiler sıcaklığı	20, 25, 30°C	25°C

4.3. Geliştirilen MECC Yönteminden Elde Edilen Bulgular

Molekülleri nötral olan metanolün gözlenen elektroforetik hızı, EOF hızına eşittir. EOF'nin belirlenmesi için numuneye eklenen metanolün göç zamanı $3,5 \pm 0,1$ dak bulunmuştur. Toplam kapiler uzunluğu 44 cm, etkin kapiler uzunluğu 35,5 cm'dir.

Eşitlik 2.2'ye göre EOF hızı $v_{EOF} = 35,5 \text{ cm} / 3,5 \text{ dak} = 10,14 \text{ cm dak}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. Analizde kullanılan maddelerin elektroforetik hızları Tablo 4.2'de gösterilmiştir:

Tablo 4.2. PAR, KAF, DİF ve PRO elektroforetik hızları.

	PAR	KAF	DİF	PRO
Gözlenen elektroforetik hız (v_a) (cm dak^{-1})	6,86	6,44	4,93	3,79
Maddenin elektroforetik hızı (v_{EP}) (cm dak^{-1}) *	-3,28	-3,70	-5,21	-6,35

* Maddelerin hareket yönü EOF'nin tersine doğru olduğu için, elektroforetik hızları (-) olarak belirtilmiştir.

PAR, KAF, PRO ve DİF piklerine ait bilgiler Tablo 4.3'te verilmiştir. Elektroferogramlardan elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirmesi Tablo 4.4'te verilmiştir.

Tablo 4.3. Geliştirilen MECC yöntemiyle elde edilen PAR, KAF, PRO ve DİF pikleri ile ilgili bilgiler.*

	PAR	KAF	DİF	PRO
Ortalama göç zamanı (dak)	5,174 ± 0,006	5,513 ± 0,004	7,195 ± 0,007	9,366 ± 0,008
Pik simetrisi	1,01 ± 0,00	0,97 ± 0,00	1,14 ± 0,03	0,90 ± 0,01
Taban pik genişliği (dak)	0,017	0,018	0,033	0,044
Etkinlik (Teorik tabaka sayısı = N)	1.482.090	1.500.897	1.521.190	1.449.950
Alan	21,56 ± 0,12	19,76 ± 0,04	28,82 ± 0,24	23,74 ± 0,14
Pik yüksekliği (mAU)	19,71 ± 0,13	16,48 ± 0,04	13,24 ± 0,13	7,32 ± 0,04
Teorik tabakaya eşdeğer yükseklik (µm)	2,40	2,37	2,33	2,45
Pik saflık indisi	0,99	0,94	0,99	0,92
Ayırıcılık (R)	19,37 (PAR-KAF)		65,96 (KAF-DİF)	56,39 (DİF-PRO)
Seçicilik (α)	1,20 (PAR-KAF)		1,84 (KAF-DİF)	1,59 (DİF-PRO)

* n=10. Sonuçlar “Ortalama ± Standart Hata” şeklinde verilmiştir. Madde derişimi 50’şer µg mL⁻¹ ‘dir.

Tablo 4.4. Elektroferogramlardan elde edilen verilerin istatistiksel değeriendirmesi (n=10).

Konulan (50 µg mL ⁻¹)		Göç Zamanı	Pik Alanı	Pik Yüksekliği	Pik Genişliği	Pik Simetrisi	PN	Pik Yüks. Oranı	Alan Oranı	PN Oranı
PAR	$\bar{X}$	5,174	21,6	19,7	0,0173	1,01	4,17	1,49	0,75	1,04
	SS	0,020	0,2	0,2	0,0003	0,01	0,04	0,02	0,01	0,01
	BSS (%)	0,387	0,9	1,0	1,7341	0,99	0,96	1,34	1,33	0,96
	SH	0,006	0,1	0,1	0,0001	0,00	0,03	0,01	0,00	0,00
KAF	$\bar{X}$	5,513	19,8	16,5	0,0184	0,97	3,58	1,24	0,69	0,89
	SS	0,012	0,1	0,1	0,0002	0,01	0,02	0,01	0,00	0,00
	BSS (%)	0,218	0,5	0,6	1,0870	1,03	0,56	0,81	0,00	0,00
	SH	0,004	0,0	0,0	0,0001	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00
PRO	$\bar{X}$	9,366	23,7	7,3	0,0437	0,90	2,53	0,55	0,82	0,63
	SS	0,025	0,3	0,1	0,0010	0,02	0,05	0,00	0,01	0,00
	BSS (%)	0,267	1,3	1,4	2,2883	2,22	1,98	0,00	1,22	0,00
	SH	0,008	0,1	0,0	0,0003	0,01	0,02	0,00	0,00	0,00
DİF	$\bar{X}$	7,195	28,8	13,2	0,0327	1,14	4,01	-	-	-
	SS	0,024	0,7	0,3	0,0003	0,03	0,10	-	-	-
	BSS (%)	0,334	2,4	2,3	0,9174	2,63	2,49	-	-	-
	SH	0,008	0,2	0,1	0,0001	0,01	0,03	-	-	-

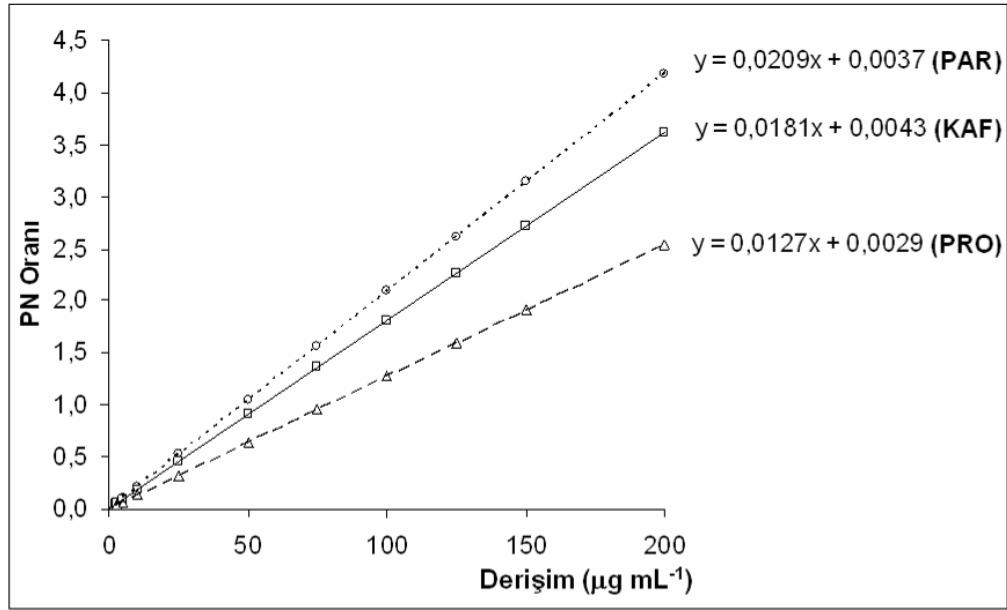
Madde derişimi 50'şer µg mL⁻¹ 'dir. (İstatistiksel hesaplamalar için Bkz. Ek.1)

$\bar{X}$: Aritmetik Ortalama SS: Standart Sapma BSS: Bağıl Standart Sapma SH: Standart Hata

PN: Pik Normalizasyonu (Pik alanının göç zamanına oranı)

4.3.1. Kalibrasyon Bulguları

Elektroferogramlardan madde miktarının hesaplanması için standart madde derişimine karşı pik normalizasyon (PN) oranları grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrileri çizilmiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. PAR, KAF ve PRO kalibrasyon eğrileri.

PAR ve KAF için 2 – 200 µg mL⁻¹, PRO için 3 – 200 µg mL⁻¹ derişim aralığında çalışılmıştır. Doğrusal çalışma aralığının seçimi Bölüm 4.3.2. 'de açıklanmıştır.

Farklı çözeltiler hazırlanarak elde edilen 7 kalibrasyon eğrisinin ortalama denklemleri ve istatistiksel değerleri Tablo 4.5'te verilmiştir (98).

Tablo 4.5. Kalibrasyon eğrilerinin istatistiksel verileri (n=7).

Madde Adı	Regresyon denklemi *	Eğimin standart hatası	Kesişimin standart hatası	Korelasyon katsayısı (r)	Tanımlayıcılık katsayısı (r ²)
PAR	y = 0,0209x + 0,0037	0,0001	0,0009	0,9999	0,9997
KAF	y = 0,0181x + 0,0043	0,0001	0,0005	0,9998	0,9996
PRO	y = 0,0127x + 0,0029	0,0003	0,0004	0,9999	0,9998

* y : PN Oranı x : Derişim (µg mL⁻¹)

Tablo 4.6’da, elde edilen kalibrasyon eğrileri için korelasyon katsayısının (r) tesadüfen bulunmuş bir değer olmadığı görülmektedir. Tablo 4.7’de, kalibrasyon eğrilerinin doğrusallıktan ayrılış önem kontrolü sonucunda, üçünün de doğrusal olduğu sonucuna varılmıştır. Kesişim, doğrunun y eksenini kestiği değerdir. Kesişimin sıfırdan ayrılışının önem kontrolü testi sonucunda kesişimin değeri sıfıra çok yakındır ancak sıfırdan farklı bulunmuştur (PAR $t_H=0,0244$; KAF $t_H=0,0268$; PRO $t_H=0,0552$; $t_T=1,98$ $p>0,05$) (99).

Tablo 4.6. Korelasyon katsayısının önem kontrolü.

	PAR	KAF	PRO
N	7	7	7
R	0,9997	0,9996	0,9998
S_r	0,0110	0,0126	0,0089
t_H	91,2666	79,0332	111,7866
t_T	2,57	2,57	2,57
Karar	“r” tesadüfi değildir. ($p<0,05$)	“r” tesadüfi değildir. ($p<0,05$)	“r” tesadüfi değildir. ($p<0,05$)

Tablo 4.7. Doğrusallıktan ayrılış önem kontrolü.

	PAR	KAF	PRO
RKT	102,7392	76,8340	34,1128
YOAKT	102,8091	76,9064	34,1315
RAKT	0,0700	0,0723	0,0187
RAKO	0,0007	0,0007	0,0002
RKO	102,7392	76,8340	34,1128
F_H	155643,5017	112585,4856	180549,4002
F_T	253,3	253,3	252,2
Karar	İlişki doğrusaldır. ($p<0,05$)	İlişki doğrusaldır. ($p<0,05$)	İlişki doğrusaldır. ($p<0,05$)

(İstatistiksel terimler ve testlerin hesaplanması için Bkz. Ek.2)

4.3.2. Yöntem Validasyonu Bulguları

Gözlenebilme sınırı (LOD), sinyal/gürültü (S/G) oranının 3 olduğu derişimdir (97). Elektroferogramın zemini (*baseline*) cihaz yazılımında büyütülerek çıktısı alınıp yapılan tekrarlı ölçümlerle PAR ve KAF için LOD $0,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ ve PRO için LOD $0,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. Ölçüm sonuçlarının BSS değerleri PAR ve KAF için %5,0; PRO için %3,3'tür.

Alt tayin sınırı (LOQ), S/G oranının 10 olduğu değer ölçülerek bulunur (97). PAR ve KAF için LOQ $2 \mu\text{g mL}^{-1}$, PRO için LOQ $3 \mu\text{g mL}^{-1}$ olup ölçümlerin BSS değerleri PAR ve KAF için %1,6; PRO için %1,3'tür.

Üst tayin sınırı (LOL), kalibrasyon eğrisinde doğrusallığın bozulduğu üst noktadır (97). PAR, KAF ve PRO için LOL $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ 'dir. LOQ ve LOL, çalışma aralığını belirler. Çalışma aralığı PAR ve KAF için $2-200 \mu\text{g mL}^{-1}$, PRO için $3-200 \mu\text{g mL}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır.

Yöntem doğruluğunun ölçütü % bağıl hata (% BH), kesinliğin ölçütü BSS'dir (97) (İstatistiksel katsayıların hesaplanması için Bkz. Ek.1). Gün içi kesinlik ve doğruluk çalışmaları, doğrusal çalışma aralığında olan 3 derişimde ($50, 10$ ve $100 \mu\text{g mL}^{-1}$), her derişim için altı ayrı çözelti kullanılarak aynı gün içinde yapılmıştır. Günler arası kesinlik ve doğruluk çalışmaları, 3 derişimde, her gün yeni çözeltiler hazırlanarak altı ayrı günde yapılmıştır. Bu çalışmaların sonuçları PAR, KAF ve PRO için sırasıyla Tablo 4.8, Tablo 4.9 ve Tablo 4.10'da verilmiştir.

Bölüm 3.2.4. 'te anlatıldığı şekilde hazırlanan sentetik preparata 300 mg PAR, 150 mg PRO ve 50 mg KAF konulmuştur. Geliştirilen MECC yöntemiyle ve karşılaştırma yöntemiyle (Bkz. Bölüm 3.6.1.) elde edilen sonuçlar Tablo 4.11'de verilmiştir. Farklı analizcinin etkisini araştırmak amacıyla yapılan analizin sonuçları da aynı tabloda verilmiştir.

Yöntemin seçiciliğinin araştırılması amacıyla, bilinen miktarlarda PAR, KAF ve PRO içeren karışımların geliştirilen yöntemle analiz bulguları Tablo 4.12'de verilmiştir. Hazırlanan numunelerdeki standart madde derişimleri, farmasötik preparatlardan hazırlanan numunelerdeki miktarlarda seçilmiştir.

Yöntemin sağlamlık ve tutarlılık (*robustness-ruggedness*) çalışması için, yöntem parametrelerdeki küçük değişimlerin sonucu ne kadar etkilediği incelenmiş (Bkz. Tablo 4.13) ve farklı bir analizcinin geliştirilen MECC yöntemini sentetik tablete uygulamasının sonuçları karşılaştırılmıştır (Bkz. Tablo 4.11).

Tablo 4.8. Geliştirilen MECC yöntemiyle PAR analizi için gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk bulguları.

PAR miktarı ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Gün içi ^a		Günler arası ^b	
	Bulunan miktar ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	%Bağıl Hata	Bulunan miktar ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	%Bağıl Hata
10	10,18 $\pm$ 0,02	1,80	10,15 $\pm$ 0,04	1,50
	10,12 $\pm$ 0,01	1,20	10,21 $\pm$ 0,03	2,10
	10,23 $\pm$ 0,03	2,30	10,18 $\pm$ 0,01	1,80
	9,88 $\pm$ 0,01	-1,20	9,94 $\pm$ 0,03	-0,60
	9,91 $\pm$ 0,02	-0,90	9,82 $\pm$ 0,01	-1,80
	10,05 $\pm$ 0,04	0,50	9,87 $\pm$ 0,02	-1,30
	$\bar{x}$: 10,06 $\pm$ 0,06		$\bar{x}$: 10,03 $\pm$ 0,07	
	SS : 0,14		SS : 0,17	
	BSS : %1,42		BSS : %1,71	
50	50,36 $\pm$ 0,03	0,72	51,09 $\pm$ 0,07	2,18
	49,94 $\pm$ 0,02	-0,12	50,41 $\pm$ 0,04	0,82
	50,15 $\pm$ 0,05	0,30	48,95 $\pm$ 0,05	-2,10
	49,62 $\pm$ 0,04	-0,76	49,82 $\pm$ 0,02	-0,36
	50,25 $\pm$ 0,06	0,50	49,64 $\pm$ 0,03	-0,72
	50,11 $\pm$ 0,08	0,22	49,59 $\pm$ 0,01	-0,82
	$\bar{x}$: 50,07 $\pm$ 0,11		$\bar{x}$: 49,92 $\pm$ 0,30	
	SS : 0,26		SS : 0,74	
	BSS : %0,52		BSS : %1,48	
100	100,47 $\pm$ 0,02	0,47	101,21 $\pm$ 0,04	1,21
	99,92 $\pm$ 0,06	-0,08	98,51 $\pm$ 0,02	-1,49
	100,51 $\pm$ 0,04	0,51	100,09 $\pm$ 0,06	0,09
	99,84 $\pm$ 0,03	-0,16	101,01 $\pm$ 0,04	1,01
	100,05 $\pm$ 0,08	0,05	99,12 $\pm$ 0,07	-0,88
	99,94 $\pm$ 0,05	-0,06	99,35 $\pm$ 0,02	-0,65
	$\bar{x}$: 100,12 $\pm$ 0,12		$\bar{x}$: 99,88 $\pm$ 0,44	
	SS : 0,29		SS : 1,08	
	BSS : %0,29		BSS : %1,08	

$\bar{x}$: Ortalama $\pm$ Standart hata, SS : Standart sapma, BSS : Bağıl standart sapma (İstatistiksel hesaplamalar için Bkz. Ek.1).

^a Gün içi çalışmalar; üç derişim seviyesinde altı ayrı çözelti kullanılarak aynı günde yapılmıştır.

^b Günler arası çalışmalar; üç derişim seviyesinde altı ayrı çözelti kullanılarak 6 ayrı günde yapılmıştır.

Tablo 4.9. Geliştirilen MECC yöntemiyle KAF analizi için gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk bulguları.

KAF miktarı ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Gün içi ^a		Günler arası ^b	
	Bulunan miktar ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	%Bağıl Hata	Bulunan miktar ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	%Bağıl Hata
10	9,93 $\pm$ 0,02	-0,74	9,66 $\pm$ 0,04	-3,40
	10,08 $\pm$ 0,01	0,77	9,89 $\pm$ 0,03	-1,11
	10,08 $\pm$ 0,04	0,84	10,71 $\pm$ 0,00	7,09
	9,93 $\pm$ 0,00	-0,72	9,78 $\pm$ 0,02	-2,25
	10,01 $\pm$ 0,02	0,07	9,84 $\pm$ 0,03	-1,64
	9,89 $\pm$ 0,01	-1,11	10,01 $\pm$ 0,04	0,10
	$\bar{X}$: 9,99 $\pm$ 0,03		$\bar{X}$: 9,98 $\pm$ 0,15	
	SS : 0,08		SS : 0,38	
	BSS : %0,83		BSS : %3,76	
50	50,28 $\pm$ 0,02	0,56	51,04 $\pm$ 0,05	2,07
	50,04 $\pm$ 0,00	0,08	49,02 $\pm$ 0,06	-1,96
	50,74 $\pm$ 0,05	1,49	51,09 $\pm$ 0,04	2,19
	49,96 $\pm$ 0,04	-0,08	49,80 $\pm$ 0,03	-0,40
	50,06 $\pm$ 0,01	0,12	50,06 $\pm$ 0,07	0,12
	49,38 $\pm$ 0,02	-1,23	49,48 $\pm$ 0,02	-1,03
	$\bar{X}$: 50,08 $\pm$ 0,18		$\bar{X}$: 50,08 $\pm$ 0,34	
	SS : 0,44		SS : 0,84	
	BSS : %0,88		BSS : %1,67	
100	100,01 $\pm$ 0,03	0,01	98,99 $\pm$ 0,05	-1,01
	99,94 $\pm$ 0,02	-0,06	101,23 $\pm$ 0,02	1,23
	100,24 $\pm$ 0,05	0,24	98,76 $\pm$ 0,03	-1,24
	99,57 $\pm$ 0,03	-0,43	99,49 $\pm$ 0,01	-0,51
	101,07 $\pm$ 0,01	1,07	101,11 $\pm$ 0,07	1,11
	99,51 $\pm$ 0,07	-0,49	100,69 $\pm$ 0,09	0,69
	$\bar{X}$: 100,06 $\pm$ 0,23		$\bar{X}$: 100,04 $\pm$ 0,45	
	SS : 0,57		SS : 1,10	
	BSS : %0,57		BSS : %1,10	

$\bar{X}$: Ortalama $\pm$ Standart hata, SS : Standart sapma, BSS : Bağıl standart sapma (İstatistiksel hesaplamalar için Bkz. Ek.1).

^a Gün içi çalışmalar; üç derişim seviyesinde altı ayrı çözelti kullanılarak aynı günde yapılmıştır.

^b Günler arası çalışmalar; üç derişim seviyesinde altı ayrı çözelti kullanılarak 6 ayrı günde yapılmıştır.

Tablo 4.10. Geliştirilen MECC yöntemiyle PRO analizi için gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk bulguları.

PRO miktarı ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Gün içi ^a		Günler arası ^b	
	Bulunan miktar ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	%Bağıl Hata	Bulunan miktar ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	%Bağıl Hata
10	10,03 $\pm$ 0,01	-0,3	9,88 $\pm$ 0,05	-1,21
	10,08 $\pm$ 0,04	-0,8	10,34 $\pm$ 0,01	3,36
	10,28 $\pm$ 0,02	-2,8	10,09 $\pm$ 0,06	0,87
	9,93 $\pm$ 0,05	0,7	9,93 $\pm$ 0,03	-0,74
	10,01 $\pm$ 0,02	-0,1	10,03 $\pm$ 0,02	0,27
	9,89 $\pm$ 0,01	1,1	9,92 $\pm$ 0,03	-0,84
	$\bar{X}$: 10,03 $\pm$ 0,06		$\bar{X}$: 10,03 $\pm$ 0,07	
	SS : 0,14		SS : 0,17	
	BSS : %1,37		BSS : %1,69	
50	50,94 $\pm$ 0,02	-1,88	48,73 $\pm$ 0,06	-2,53
	50,95 $\pm$ 0,00	-1,9	50,12 $\pm$ 0,03	0,24
	50,18 $\pm$ 0,04	-0,36	50,91 $\pm$ 0,05	1,83
	49,89 $\pm$ 0,01	0,22	50,45 $\pm$ 0,02	0,90
	50,30 $\pm$ 0,05	-0,6	50,38 $\pm$ 0,03	0,77
	51,01 $\pm$ 0,03	-2,02	51,24 $\pm$ 0,01	2,47
	$\bar{X}$: 50,55 $\pm$ 0,20		$\bar{X}$: 50,31 $\pm$ 0,35	
	SS : 0,48		SS : 0,87	
	BSS : %0,95		BSS : %1,73	
100	100,74 $\pm$ 0,02	-0,74	100,14 $\pm$ 0,07	0,14
	99,83 $\pm$ 0,05	0,17	99,90 $\pm$ 0,04	-0,10
	99,89 $\pm$ 0,04	0,11	100,03 $\pm$ 0,03	0,03
	99,22 $\pm$ 0,03	0,78	99,96 $\pm$ 0,04	-0,04
	100,68 $\pm$ 0,06	-0,68	100,13 $\pm$ 0,08	0,13
	100,15 $\pm$ 0,08	-0,15	99,93 $\pm$ 0,03	-0,07
	$\bar{X}$: 100,08 $\pm$ 0,23		$\bar{X}$: 100,01 $\pm$ 0,04	
	SS : 0,57		SS : 0,10	
	BSS : %0,57		BSS : %0,10	

$\bar{X}$: Ortalama $\pm$ Standart hata, SS : Standart sapma, BSS : Bağıl standart sapma (İstatistiksel hesaplamalar için Bkz. Ek.1).

^a Gün içi çalışmalar; üç derişim seviyesinde altı ayrı çözelti kullanılarak aynı günde yapılmıştır.

^b Günler arası çalışmalar; üç derişim seviyesinde altı ayrı çözelti kullanılarak 6 ayrı günde yapılmıştır.

Tablo 4.11. Geliştirilen MECC yöntemiyle sentetik preparatların analiz ve yöntemin tutarlılık bulguları (n=9).

Konulan miktar	Bulgular *		Farklı analizcinin bulguları *	
	Bulunan miktar (mg)	% Geri kazanım	Bulunan miktar (mg)	% Geri kazanım
PAR 300 mg	299,91 ± 0,07	99,97 ± 0,02	300,13 ± 0,07	100,04 ± 0,04
	299,94 ± 0,07	99,98 ± 0,02	300,06 ± 0,09	100,02 ± 0,02
	299,82 ± 0,11	99,94 ± 0,04	299,89 ± 0,07	99,96 ± 0,03
	299,89 ± 0,05	99,96 ± 0,02	299,81 ± 0,08	99,94 ± 0,02
	300,12 ± 0,19	100,04 ± 0,06	299,89 ± 0,06	99,96 ± 0,03
	299,99 ± 0,06	100 ± 0,02	300,11 ± 0,07	100,04 ± 0,02
	300,01 ± 0,07	100 ± 0,02	298,62 ± 0,08	99,54 ± 0,03
	299,98 ± 0,06	99,99 ± 0,02	299,92 ± 0,06	99,97 ± 0,02
	298,66 ± 0,08	99,55 ± 0,03	299,94 ± 0,09	99,98 ± 0,05
$\bar{X}$:	299,81	99,94	299,82	99,94
SS :	0,45	0,15	0,46	0,15
BSS :	%0,15	%0,15	%0,15	%0,15
İki analizcinin bulguları için Wilcoxon eşleştirilmiş iki örnek testi: $T_H=25 > T_T=6$, $p>0,05$.				
KAF 50 mg	49,58 ± 0,29	99,17 ± 0,58	50,08 ± 0,19	100,16 ± 0,23
	49,77 ± 0,14	99,54 ± 0,27	49,72 ± 0,12	99,44 ± 0,28
	49,77 ± 0,14	99,54 ± 0,27	49,87 ± 0,14	99,74 ± 0,27
	49,98 ± 0,12	99,95 ± 0,23	49,95 ± 0,11	99,90 ± 0,12
	50,08 ± 0,12	100,15 ± 0,25	50,11 ± 0,12	100,22 ± 0,15
	49,87 ± 0,01	99,73 ± 0,02	49,85 ± 0,11	99,70 ± 0,12
	49,77 ± 0,14	99,54 ± 0,27	50,03 ± 0,14	100,06 ± 0,17
	49,81 ± 0,16	99,63 ± 0,31	49,62 ± 0,16	99,24 ± 0,21
	50,1 ± 0,2	100,21 ± 0,4	49,78 ± 0,21	99,56 ± 0,31
$\bar{X}$:	49,86	99,72	49,89	99,78
SS :	0,19	0,39	0,17	0,33
BSS :	%0,39	%0,39	%0,34	%0,34
İki analizcinin bulguları için Wilcoxon eşleştirilmiş iki örnek testi: $T_H=21 > T_T=6$, $p>0,05$.				
PRO 150 mg	149,74 ± 0,11	99,83 ± 0,07	149,82 ± 0,12	99,88 ± 0,11
	149,99 ± 0,08	100 ± 0,06	150,02 ± 0,13	100,01 ± 0,09
	149,83 ± 0,2	99,89 ± 0,13	149,63 ± 0,17	99,75 ± 0,14
	150,08 ± 0,04	100,05 ± 0,03	150,09 ± 0,09	100,06 ± 0,08
	149,95 ± 0,05	99,97 ± 0,03	149,95 ± 0,14	99,97 ± 0,12
	149,64 ± 0,26	99,76 ± 0,17	149,64 ± 0,26	99,76 ± 0,07
	149,51 ± 0,31	99,67 ± 0,21	149,21 ± 0,31	99,47 ± 0,08
	149,99 ± 0,08	99,99 ± 0,05	149,89 ± 0,18	99,93 ± 0,06
	149,75 ± 0,18	99,83 ± 0,12	150,01 ± 0,18	100,01 ± 0,09
$\bar{X}$:	149,83	99,89	149,81	99,87
SS :	0,26	0,17	0,28	0,18
BSS :	%0,17	%0,17	%0,18	%0,18
İki analizcinin bulguları için Wilcoxon eşleştirilmiş iki örnek testi: $T_H=23 > T_T=6$, $p>0,05$.				

* Numuneler üçer kez çalışılmıştır. Sonuçlar "ortalama ± standart hata" şeklinde verilmiştir.

$\bar{X}$: Ortalama; SS : Standart sapma; BSS : Bağıl standart sapma (Bkz. Ek.1); T_H : Hesaplanan T değeri;

T_T : n=10 serbestlik derecesindeki teorik T değeri; p: Hesaplanan yanılma düzeyi (Bkz. Ek.2).

Tablo 4.12. Bilinen miktarlarda PAR, KAF ve PRO içeren karışımların geliştirilen MECC yöntemiyle analiz bulguları.*

PAR			KAF			PRO		
Konulan ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Bulunan ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	% Geri kazanım	Konulan ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Bulunan ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	% Geri kazanım	Konulan ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Bulunan ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	% Geri kazanım
50	50,05 $\pm$ 0,08	100,10	10	9,95 $\pm$ 0,06	99,50	30	30,13 $\pm$ 0,07	100,43
75	75,12 $\pm$ 0,30	100,16	10	10,03 $\pm$ 0,03	100,30	30	30,42 $\pm$ 0,07	101,40
100	100,44 $\pm$ 0,20	100,44	10	9,93 $\pm$ 0,04	99,30	30	30,07 $\pm$ 0,10	100,23
$\bar{X} = 100,23$			$\bar{X} = 99,70$			$\bar{X} = 100,69$		
SS = 0,18			SS = 0,53			SS = 0,62		
BSS = %0,18			BSS = %0,53			BSS = %0,62		
50	50,05 $\pm$ 0,08	100,10	10	9,95 $\pm$ 0,06	99,50	30	30,13 $\pm$ 0,07	100,43
50	50,17 $\pm$ 0,05	100,34	25	25,08 $\pm$ 0,03	100,32	30	30,00 $\pm$ 0,05	100,00
50	50,13 $\pm$ 0,03	100,26	50	50,05 $\pm$ 0,05	100,10	30	30,00 $\pm$ 0,02	100,00
$\bar{X} = 100,23$			$\bar{X} = 99,97$			$\bar{X} = 100,14$		
SS = 0,12			SS = 0,42			SS = 0,25		
BSS = %0,12			BSS = %0,42			BSS = %0,25		
50	50,05 $\pm$ 0,08	100,10	10	9,95 $\pm$ 0,06	99,50	30	30,13 $\pm$ 0,07	100,43
50	50,13 $\pm$ 0,03	100,26	10	10,00 $\pm$ 0,06	100,00	50	50,14 $\pm$ 0,11	100,28
50	49,94 $\pm$ 0,05	99,88	10	9,98 $\pm$ 0,02	99,80	75	75,11 $\pm$ 0,07	100,15
$\bar{X} = 100,08$			$\bar{X} = 99,77$			$\bar{X} = 100,29$		
SS = 0,19			SS = 0,25			SS = 0,14		
BSS = %0,19			BSS = %0,25			BSS = %0,14		

* Numuneler 4'er kez çalışılmıştır. Bulunan miktarlar $\pm$ standart hata şeklinde verilmiştir.

$\bar{X}$: Aritmetik ortalama SS: Standart Sapma BSS: Bağıl Standart Sapma

(İstatistiksel hesaplamalar için Bkz. Ek.1)

Tablo 4.13. Geliştirilen yönteme ait sağlamlık bulguları.

	PAR				KAF				PRO			
	Göç Zam. Oranı		PN Oranı		Göç Zam. Oranı		PN Oranı		Göç Zam. Oranı		PN Oranı	
	$\bar{X}$	BSS (%)	$\bar{X}$	BSS (%)	$\bar{X}$	BSS (%)	$\bar{X}$	BSS (%)	$\bar{X}$	BSS (%)	$\bar{X}$	BSS (%)
Standart koşullar	0,72	0,13	1,04	0,96	0,77	0,11	0,89	0,00	1,30	0,24	0,63	0,00
pH 8,9	0,72	0,10	1,04	0,85	0,77	0,21	0,89	0,12	1,29	0,20	0,62	0,08
pH 9,1	0,72	0,15	1,03	0,75	0,77	0,15	0,89	0,05	1,30	0,18	0,63	0,02
19 mM borat tamp.	0,71	0,23	1,04	1,03	0,76	0,30	0,89	0,03	1,28	0,27	0,63	0,03
21 mM borat tamp.	0,72	0,11	1,03	0,91	0,78	0,23	0,89	0,07	1,30	0,15	0,63	0,12
29 mM SDS	0,71	0,18	1,04	0,90	0,76	0,17	0,89	0,11	1,29	0,24	0,63	0,17
31 mM SDS	0,73	0,22	1,04	0,76	0,77	0,21	0,90	0,06	1,31	0,30	0,64	0,05
208 nm dedeksiyon	0,72	0,13	1,05	0,90	0,77	0,10	0,89	0,04	1,30	0,17	0,61	0,01
212 nm dedeksiyon	0,72	0,13	1,03	1,07	0,77	0,09	0,89	0,11	1,30	0,21	0,64	0,08
28 kV voltaj	0,72	0,12	1,04	0,75	0,77	0,14	0,89	0,20	1,30	0,26	0,63	0,14
30 kV voltaj	0,72	0,15	1,04	0,89	0,77	0,20	0,89	0,14	1,30	0,24	0,63	0,08
24°C sıcaklık	0,73	0,37	1,04	0,66	0,77	0,09	0,90	0,04	1,30	0,17	0,62	0,21
26°C Sıcaklık	0,71	0,23	1,04	1,08	0,77	0,12	0,89	0,10	1,28	0,34	0,63	0,17
Kruskal Wallis varyans analizi (KW _T =21,03)	KW=8,64		KW=11,15		KW=6,95		KW=1,15		KW=15,75		KW=8,71	

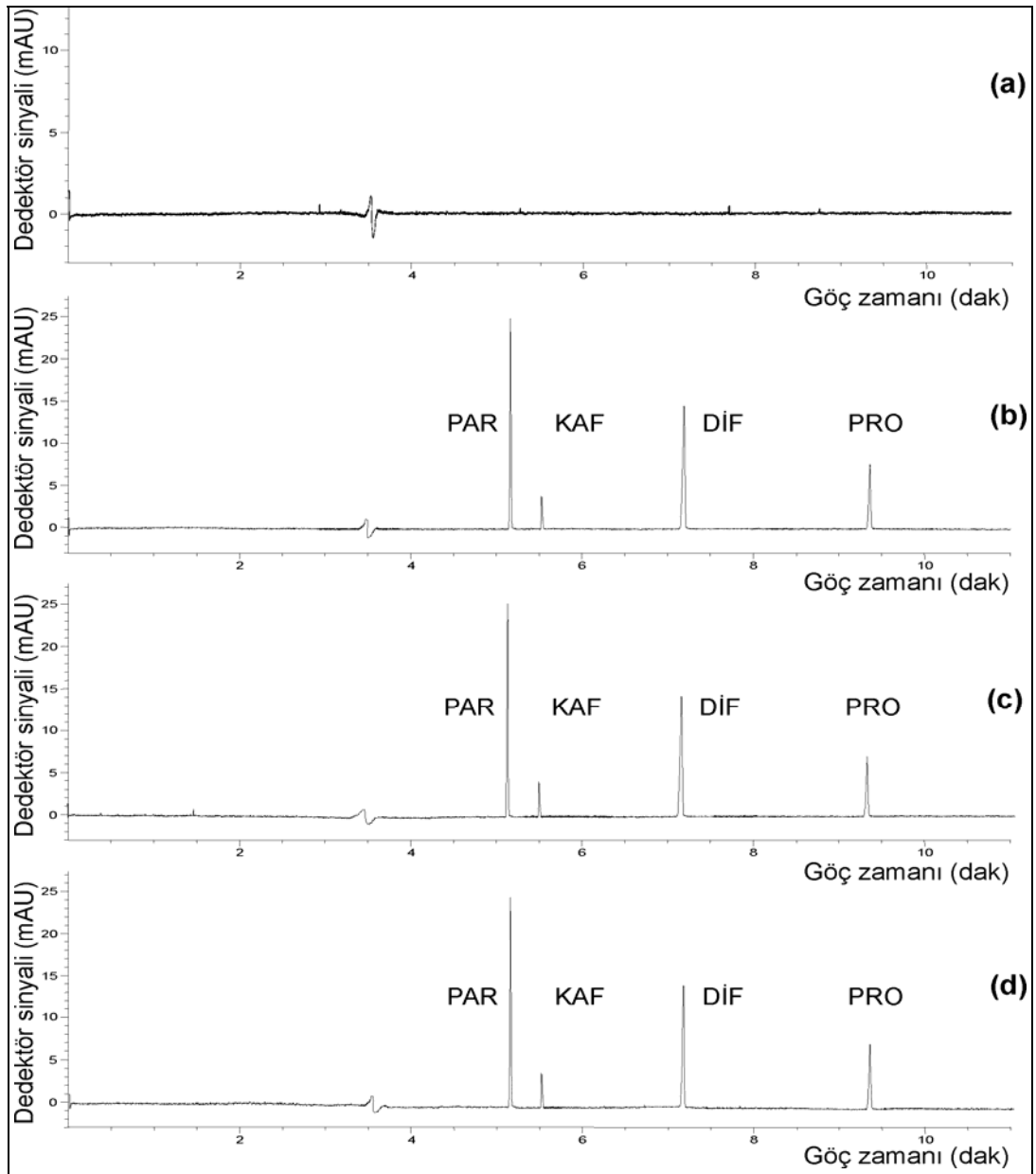
“Standart koşullar”: 30 mM SDS içeren 20 mM pH 9,0 Borat tamponu, 200 nm dedektör dalgaboyu, 29 kV çalışma voltajı, 25°C kapiler sıcaklığı. Maddelerin derişimleri 50’şer $\mu\text{g mL}^{-1}$ ’dir. Her koşul için 10 kez ölçüm yapıp sonuçlarda $\bar{X}$ ve BSS verilmiştir. Göç zamanı oranı: maddenin göç zamanının iç standardinkine oranı; Pik normalizasyonu (PN), pik alanının göç zamanına oranı; PN oranı, maddenin PN’sinin iç standardinkine oranıdır. KW_T: Kruskal Wallis varyans analizi için tablo değeri; KW: Kruskal Wallis varyans analizi ile hesaplanan test istatistiğidir (Bkz. Ek.2). Karar: Farklı koşullarda yapılan analiz sonuçları arasında fark yoktur (KW_T>KW; p<0,05).

4.3.3. Farmasötik Preparatların Analiz Bulguları

Tez çalışmasında, içerdikleri etkin madde miktarları Tablo 2.1’de verilen, Türkiye ilaç piyasasında bulunan PAR, PRO ve KAF kombinasyonu içeren farmasötik preparatlar analiz edilmiştir.

Şekil 4.9’da plasebo, PAR, KAF, DİF ve PRO standartları, sentetik numune ve farmasötik preparatların geliştirilen MECC yöntemiyle elde edilen elektroferogramları görülmektedir.

Farmasötik preparatlardan Aljil® tablet ve Panalgine® tabletin geliştirilen MECC yöntemiyle analiz bulguları Tablo 4.14’te verilmiştir. Minoset® Plus tablet, MECC yöntemiyle ve karşılaştırma yöntemiyle analiz edilmiş olup sonuçlar Tablo 4.15’te karşılaştırılmıştır.



Şekil 4.9. Geliştirilen MECC yöntemiyle elde edilen elektroferogramlar.

a) Plasebo

b) Standart PAR, KAF, PRO ve DİF

c) Sentetik preparat

d) Farmasötik preparat (Minoset® Plus tablet)

PAR: $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, KAF: $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, DİF: $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, PRO: $30 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Çalışma elektroliti: 30 mM SDS içeren 20 mM pH 9,0 borat tamponu.

Cihaz parametreleri: $t_{\text{enj}} = 3 \text{ s}$, $P_{\text{enj}} = 50 \text{ mbar}$, $V = 29 \text{ kV}$, 25°C , $\lambda = 200 \text{ nm}$.

Tablo 4.14. Farmasötik preparatların geliştirilen MECC yöntemiyle analiz bulguları.

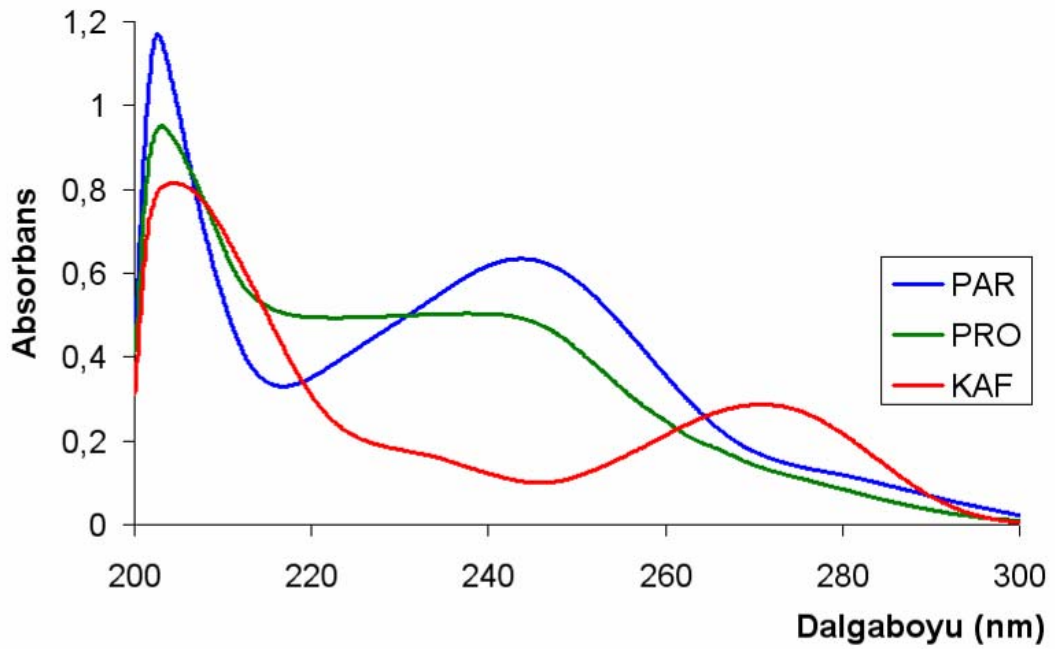
	Panalgin® tablet 300 mg PAR 30 mg KAF 150 mg PRO	Aljil® tablet 300 mg PAR 50 mg KAF 150 mg PRO
PAR	300,62 ± 0,01 300,14 ± 0,02 300,05 ± 0,05 299,86 ± 0,03 300,21 ± 0,04 298,93 ± 0,03 300,12 ± 0,01 300,31 ± 0,02 301,01 ± 0,03 299,91 ± 0,01	299,82 ± 0,04 301,14 ± 0,02 299,08 ± 0,05 300,67 ± 0,01 299,89 ± 0,03 299,25 ± 0,05 297,58 ± 0,02 300,44 ± 0,01 300,44 ± 0,04 300,70 ± 0,03
	$\bar{X}$: 300,12 ± 0,17 SS : 0,54 BSS : %0,18 GA : 299,74 < $\bar{X}$ < 300,50	$\bar{X}$: 299,90 ± 0,33 SS : 1,05 BSS : %0,35 GA : 299,15 < $\bar{X}$ < 300,65
KAF	30,07 ± 0,01 30,43 ± 0,02 30,08 ± 0,01 30,02 ± 0,01 30,07 ± 0,01 30,29 ± 0,01 29,97 ± 0,01 29,91 ± 0,01 30,09 ± 0,02 30,03 ± 0,01	50,12 ± 0,02 50,48 ± 0,01 49,95 ± 0,01 50,19 ± 0,01 50,12 ± 0,02 50,72 ± 0,02 50,17 ± 0,01 50,15 ± 0,02 50,05 ± 0,01 50,03 ± 0,02
	$\bar{X}$: 30,10 ± 0,05 SS : 0,15 BSS : %0,51 GA : 29,99 < $\bar{X}$ < 30,21	$\bar{X}$: 50,20 ± 0,07 SS : 0,23 BSS : %0,46 GA : 50,04 < $\bar{X}$ < 50,36
PRO	149,37 ± 0,02 150,40 ± 0,02 149,88 ± 0,01 150,12 ± 0,02 150,46 ± 0,02 150,79 ± 0,01 149,24 ± 0,03 150,91 ± 0,01 149,75 ± 0,03 150,43 ± 0,03	150,12 ± 0,01 149,87 ± 0,02 150,31 ± 0,03 149,72 ± 0,01 149,85 ± 0,02 150,09 ± 0,01 150,23 ± 0,03 149,35 ± 0,01 149,02 ± 0,03 150,80 ± 0,04
	$\bar{X}$: 150,14 ± 0,18 SS : 0,57 BSS : %0,38 GA : 149,73 < $\bar{X}$ < 150,55	$\bar{X}$: 149,94 ± 0,16 SS : 0,50 BSS : %0,33 GA : 149,53 < $\bar{X}$ < 150,30

$\bar{X}$: Ortalama ± Standart hata; GA: $\alpha=0,05$ yanılma düzeyi için güven aralığı;
SS: Standart Sapma; BSS: Bağıl Standart Sapma (Bkz. Ek.1)

4.3.4. Karşılaştırma Yönteminin Bulguları

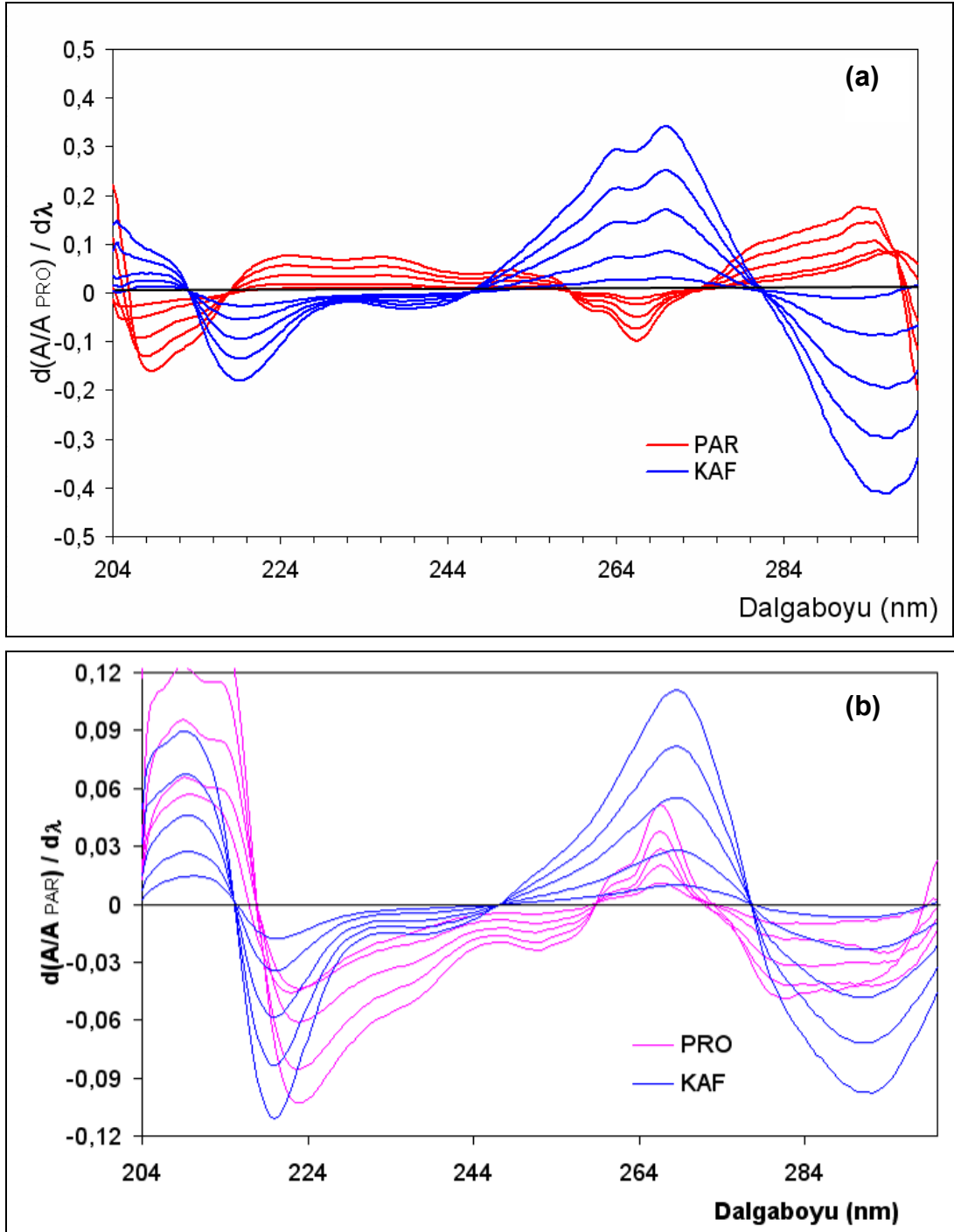
Dinç ve diğ. (43)'nin üçlü karışımlarda PAR, KAF ve PRO'nun aynı anda analizi için geliştirmiş olduğu spektrum oranları türev spektrofotometrisi (*derivative ratio spectra – zero crossing spectrophotometry*) yöntemi, karşılaştırma yöntemi olarak uygulanmıştır. Yöntemin teorik esası ve deneyin yapılışı Bölüm 3.6. 'te açıklanmıştır.

PAR, KAF ve PRO'nun 0,1N HCl içerisinde çekilen UV absorbans spektrumları Şekil 4.10'da verilmiştir. Artan derişimlerde standart madde içeren kalibrasyon çözeltilerinin oran spektrumlarının 1. türevi Şekil 4.11'da görülmektedir.



Şekil 4.10. PAR, KAF ve PRO'nun çekilen UV absorbans spektrumları.
(0,1N HCl içerisinde, PAR:10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, KAF: 6 $\mu\text{g mL}^{-1}$, PRO: 12 $\mu\text{g mL}^{-1}$)

Minoset® Plus tabletin analizi geliştirilen MECC yöntemi ve karşılaştırma yöntemiyle yapılarak sonuçlar Tablo 4.15'te verilmiştir. Elde edilen sonuçlara Wilcoxon eşleştirilmiş iki örnek testi uygulanmış ve sonuçlar arasında fark olmadığı ortaya çıkmıştır ($\alpha=0,05$ yanılma olasılığı).



Şekil 4.11. Spektrum oranı türev spektrumları.

a) PAR ve KAF spektrumlarının PRO ile bölümünün 1. türevi.

b) PRO ve KAF spektrumlarının PAR ile bölümünün 1. türevi.

Tablo 4.15. Minoset® Plus tabletin geliştirilen MECC ve karşılaştırma yönteminden elde edilen analiz bulguları.

Ambalajda yazan Miktar	MECC yöntemi ile bulunan miktar (mg)	Karşılaştırma yöntemi ile bulunan miktar (mg)
PAR 250 mg/tablet	250,96	249,36
	251,59	255,73
	251,86	252,47
	250,21	246,44
	249,85	251,19
	248,50	247,63
	249,92	250,03
	250,20	249,32
	251,94	250,75
	252,12	248,30
$\bar{X}$:	250,72 ± 0,37	250,12 ± 0,84
SS :	1,17	2,64
BSS :	%0,47	%1,06
Wilcoxon eşleştirilmiş iki örnek testi: $T_H=19 > T_T=8$, $p>0,05$.		
KAF 50 mg/tablet	50,11	49,09
	50,21	50,90
	49,93	49,80
	49,75	50,05
	50,29	50,46
	49,79	49,50
	50,81	49,95
	49,88	49,95
	49,86	50,03
	48,96	49,65
$\bar{X}$:	49,96 ± 0,15	49,94 ± 0,16
SS :	0,47	0,50
BSS :	%0,95	%1,00
Wilcoxon eşleştirilmiş iki örnek testi: $T_H=26 > T_T=8$, $p>0,05$.		
PRO 150 mg/tablet	149,85	156,28
	150,07	152,11
	148,97	147,98
	149,87	143,93
	151,63	141,75
	149,69	147,01
	150,22	149,79
	148,95	152,01
	150,81	147,13
	148,76	158,35
$\bar{X}$:	149,88 ± 0,28	149,63 ± 1,64
SS :	0,89	5,19
BSS :	%0,59	%3,47
Wilcoxon eşleştirilmiş iki örnek testi: $T_H=25 > T_T=8$, $p>0,05$.		

$\bar{X}$: Ortalama ± standart hata; SS : Standart sapma; BSS : Bağıl standart sapma (Bkz. Ek.1); T_H : Hesaplanan T değeri; T_T : n=10 serbestlik derecesindeki teorik T değeri; p: Hesaplanan yanılma düzeyi (Bkz. Ek.2).

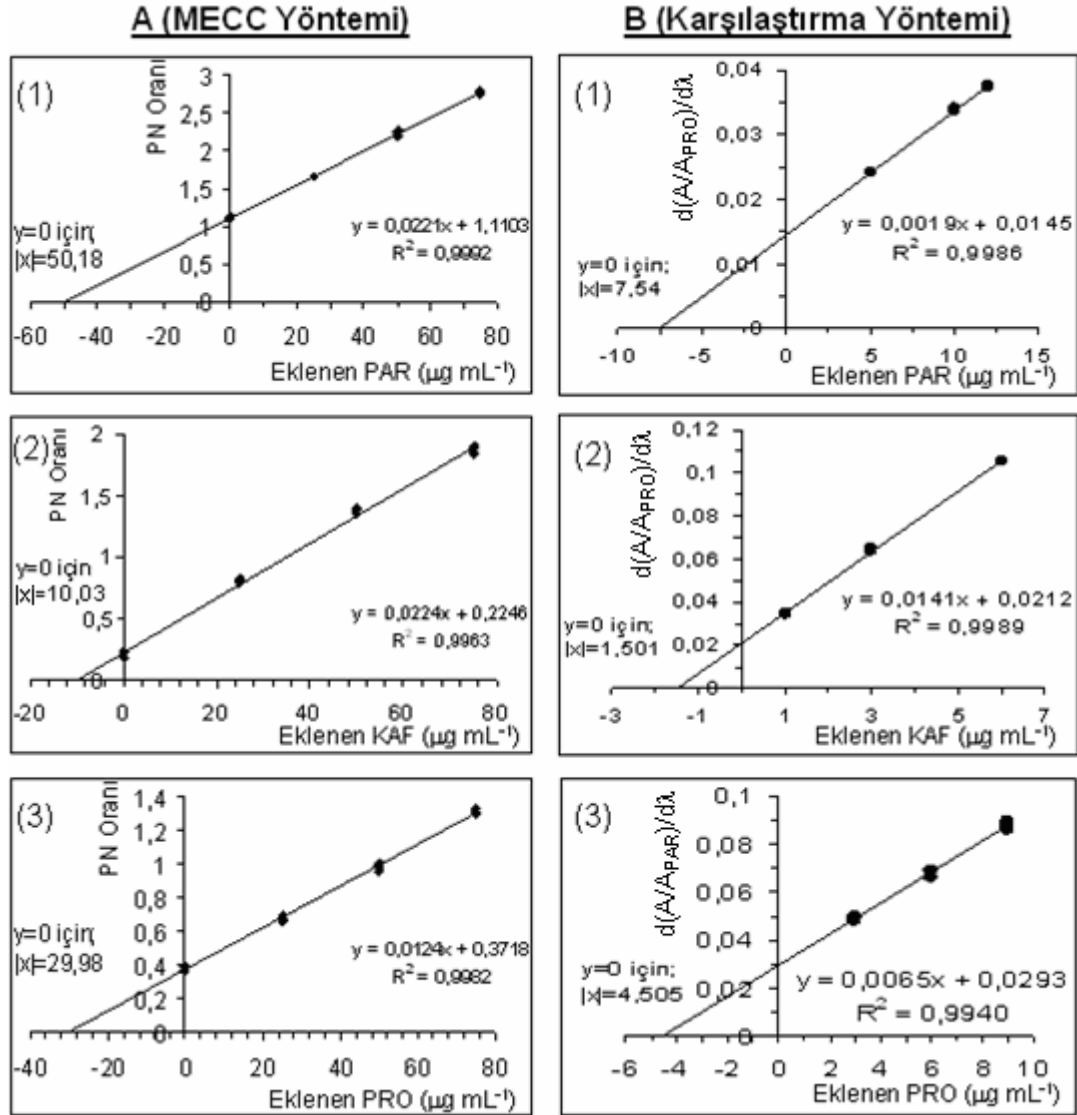
4.3.5. Standart Ekleme Tekniğinin Uygulanması

Minoset® Plus tablette miktar tayini standart ekleme tekniğiyle yapılmıştır. Bu yöntemde, aynı miktarda bilinmeyen numune içeren bir dizi çözelti hazırlanmıştır. İlk çözeltiye standart madde eklenmemiş, diğerlerine artan derişimlerde bilinen miktarda standart madde eklenip hacimleri aynı olan balon jöjelerde tamamlanmıştır. Analiz sonuçları eklenen madde derişimine karşı grafiğe geçirilmiştir. Grafikte elde edilen doğru, x eksenini negatif yönde kesmiştir. Bu noktanın mutlak değeri numunedeki madde derişimini vermiştir. İki yöntemden elde edilen grafikler Şekil 4.12’de görölmektedir.

Tablet numuneleri 3.2.3. ’de anlatıldığı şekilde hazırlanmıştır. MECC yönteminde standart ekleme tekniğinin uygulanması için tablet numunesinin hazırlanması sırasında, ambalajında 250 g PAR, 150 mg PRO, 50 mg KAF içediğı belirtilen bir tablettten hazırlanan numunede olması gereken derişimler sırasıyla 50, 30 ve 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ’dir. Numunede bulunan derişim, 5 ile çarpılınca, tabletteki miktarı mg cinsinden elde edilmektedir. Karşılaştırma yöntemi olarak kullanılan Dinç ve diğ. (43)’nin geliştirdiğı spektrum oranları türev spektrofotometrisi yöntemiyle standart ekleme tekniğinin uygulanması için hazırlanan tablet numunesinde bulunması gereken derişimler PAR, PRO ve KAF için sırasıyla 7,5; 4,5 ve 1,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ’dir. Numunede bulunan derişim, 100/3 katsayısı ile çarpılınca, tabletteki miktarı mg cinsinden elde edilmektedir. Buna göre, Şekil 4.12’deki grafiklerden elde edilen sonuçlar, Tablo 4.16’de görölmektedir. Bu tabloda karşılaştırma yöntemi ve MECC yöntemi ile elde edilen sonuçlar da istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır.

Tablo 4.16. Minoset® Plus tabletin MECC ve karşılaştırma yöntemleriyle standart ekleme tekniğı kullanılarak yapılan analiz sonuçları (n=3).

Ambalajda yazan miktar (mg/tablet)	Kalibrasyon		Standart Ekleme		Hesaplanan değer (KW)
	MECC yöntemi	Karşılaştırma yöntemi	MECC yöntemi	Karşılaştırma yöntemi	
PAR 250 mg	250,7 $\pm$ 0,4	250,1 $\pm$ 8	250,9 $\pm$ 0,3	251,4 $\pm$ 0,4	0,13
KAF 50 mg	50,0 $\pm$ 0,2	49,9 $\pm$ 0,2	50,1 $\pm$ 0,2	50,0 $\pm$ 0,2	0,15
PRO 150 mg	149,9 $\pm$ 0,3	149,6 $\pm$ 1,6	149,9 $\pm$ 0,3	150,1 $\pm$ 0,3	0,15
Kruskal Wallis varyans analizi (Bkz. Ek.2) sonucuna göre (KW _T =3,841), 4 yöntemden elde edilen sonuçlar arasında anlamlı bir fark yoktur (p>0,05).					



Şekil 4.12. Minoset® Plus tabletin standart ekleme tekniği ile analizi.

A) Geliştirilen MECC yöntemiyle elde edilen grafikler

(1. PAR, 2. KAF, 3. PRO.)

B) Karşılaştırma yöntemiyle elde edilen grafikler

(1. PAR, 2. KAF, 3. PRO.)

5. TARTIŞMA

5.1. Analiz Yönteminin Seçimi

PRO, PAR ve KAF'ı birlikte içeren farmasötik preparatlar, çok sık kullanılan analjezik ve antipiretik ilaçlardır (13). Bu preparatların rutin analizleri, üretimde kalite kontrol aşamasında yapılmaktadır. Kalite kontrol laboratuvarlarında kısa zamanda doğru ve tutarlı sonuç veren, uygulaması kolay, düşük maliyetli, aynı zamanda çevreyi kirletmeyen, valide edilmiş analiz yöntemlerine ihtiyaç vardır. Kaynaklarda, adı geçen maddelerin tek tek veya ikili karışımlar şeklinde miktar tayinleri için çok sayıda yöntem mevcuttur, ancak üçlü karışımın tek bir yöntemle aynı anda analiz edildiği yöntemler emek, zaman ve maliyet üstünlüğü açısından tercih edilmektedir. Üçlü karışımın aynı anda miktar tayini için kaynaklarda spektrofotometrik ve kromatografik yöntemler bulunmaktadır (43,52,57,58). Ayrıca çok sayıda farmasötik madde için geçerli olduğu ileri sürülen jenerik bir kapiler elektroforez yöntemi geliştirilmiştir (100). Ancak her madde için genel ayırım sağlayan bu tür jenerik yöntemlerin, analiz edilecek maddeler için özel olarak optimize ve valide edilen yöntemlerle aynı doğruluk, kesinlik, seçicilik ve duyarlılığa sahip olmadığı düşünülmektedir.

Kalite kontrol laboratuvarlarında miktar tayini amacıyla genelde HPLC ve UV-GB yöntemler uygulanmaktadır. HPLC yönteminde çevreyi kirleten organik çözücüler tüketilmektedir. Ayrıca bu çözücülerin çoğu ithal olup pahalıdırlar. Bunların yanısıra, kromatografik yöntemler, zaman alıcı ön işlemler gerektirirler. Spektrofotometrik yöntemlerle üçlü karışımları ayırma işlemi yapmadan direkt olarak analiz etmek mümkündür. Ancak bu yöntemlerde karmaşık matematiksel işlemler uygulanması gerekmektedir. Bu matematiksel işlemler bilgisayar yardımıyla yapılsa bile zaman almakta ve rutin analiz laboratuvarlarında uygulanabilmesi için kalifiye personel gerektirmektedir. Kapiler elektroforez, diğer analitik yöntemlere göre yöntem geliştirme süresi daha kısa, sarf malzeme tüketimi ve maliyeti daha az, ayırım etkinliği daha yüksek olan, hızlı, doğru, tutarlı ve kolay uygulanabilen bir yöntemdir (2).

PRO, PAR ve KAF'ı birlikte içeren farmasötik preparatlardan bu maddelerin aynı anda analizi için valide edilmiş bir kapiler elektroforez yöntemine rastlanmadığı için, kaynaklara katkı sağlayacağı düşünülmüş, bu yöntemin geliştirilmesi tez çalışması olarak seçilmiştir.

5.2. Yöntem Geliştirme

Yöntem geliştirme sırasında, ilk önce CZE yöntemiyle maddelerin birbirinden ayrılması için çalışılmıştır. CZE yöntemiyle maddelerin ayrılması için farklı bileşim ve derişimlerdeki çalışma elektrolitleri kullanılarak pH 2,5 – 10,0 aralığında denemeler yapılmıştır. Ayrıca metanol ve asetonitril değişik oranlarda çalışma elektrolitine eklenmiştir. Çalışma sıcaklığı ve uygulanan voltaj değiştirilmiştir. Ancak CZE'de elde edilen en iyi ayırmada dahi ayırıcılık ve seçicilik yeterli bulunmamıştır. Şekil 4.3 (a)'da, (SDS eklenmeden) CZE yöntemiyle elde edilen elektroferogramda, PAR ve KAF piklerinin ayrılmadığı görülmektedir. Numuneye metanol eklenmesi ile EOF tayin edilebilmektedir (97). PAR ve KAF, metanole yakın göç zamanına sahiptir, yani EOF ile birlikte göç etmektedirler. PAR ve KAF moleküllerinin iyonlaşma derecesi, CZE'de EOF'den ve birbirlerinden ayrılmalarına yetecek düzeyde değildir. PRO ise CZE elektroferogramlarında EOF'den sonra pik vermektedir.

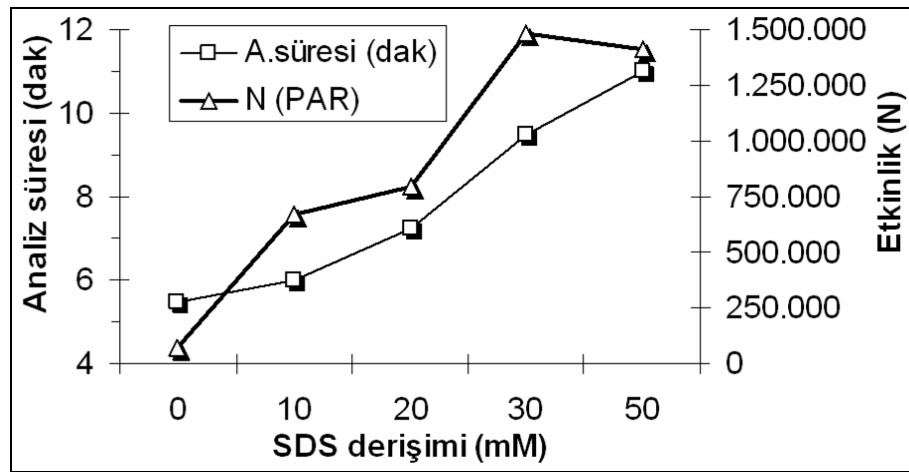
CZE ile ayrılamayan nötral bileşikler, MECC yöntemiyle ayrılabilir (91). CZE yöntemiyle yeteri kadar ayrılamayan PAR ve KAF için, MECC yöntemi uygulanarak ayırım gerçekleştirilmiştir.

MECC'de numune bileşenlerinin ayırımı miseller sayesinde gerçekleştiğinden, çalışma elektrolitindeki yüzey aktif madde derişimi önemlidir. Yüzey aktif madde derişimi KMK'nin altında olursa misel oluşumu gerçekleşmediğinden ötürü, nötral bileşiklerin ayırımı sağlanmaz. Çalışma elektrolitine gereğinden fazla yüzey aktif madde eklenmesi ise analiz süresinin uzamasına neden olur (92).

SDS, MECC'de en sık kullanılan yüzey aktif maddedir (91). Kaynaklarda diğer yüzey aktifler de denenmiştir. Örneğin, voltaj uygulandığında çalışma elektrolitinden geçen akım, SDS yerine dodesil sülfatın lityum tuzu (LiDS) kullanıldığında, daha düşüktür (100). SDS ile akımın 50 μ A'dan yüksek olduğu durumlarda LiDS tercih edilebilir. Ancak tez

çalışmasında geliştirilen MECC yönteminde akım $15 \mu\text{A}$ 'nın üstüne çıkmamıştır. Dolayısıyla LiDS değil, daha kolay bulunan ve ucuz olan SDS tercih edilmiştir.

Çalışma elektrolitindeki optimum SDS derişimi 30 mM olarak seçilmiştir. Daha düşük SDS derişimi yeterli ayırım sağlayamazken, daha yüksek derişimlerde ayırıcılık artmış ancak analiz süresi uzamıştır (Bkz. Şekil 4.3 ve Şekil 5.1). 100 mM SDS derişiminde analiz süresi 20 dakikaya çıkmıştır.

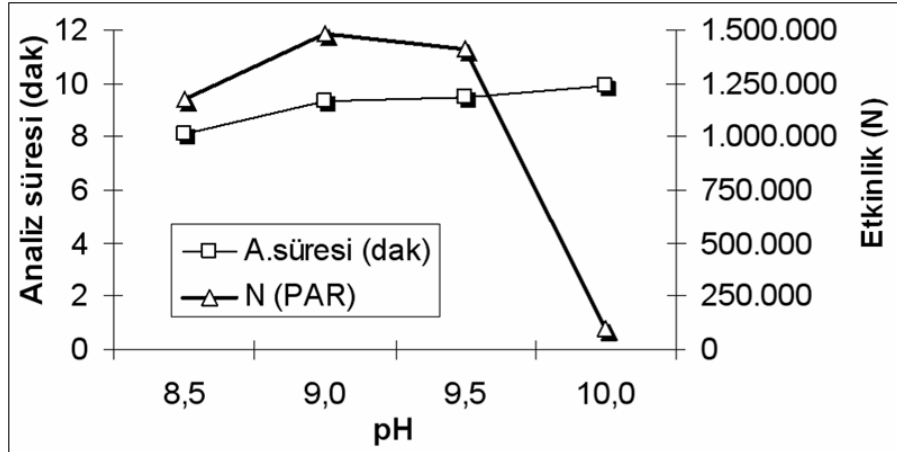


Şekil 5.1. SDS derişiminin analiz süresi ve etkinlik üzerine etkisi.

Koşullar: 20 mM pH 9,0 borat tamponu, $t_{enj} = 3 \text{ s}$, $P_{enj} = 50 \text{ mbar}$, $V = 29 \text{ kV}$, $\lambda = 200 \text{ nm}$. PAR, KAF, DİF, PRO derişimi: $50'şer \mu\text{g mL}^{-1}$.

EOF, eritilmiş silika kapilerin iç çeperindeki iyonize silanol grupları sayesinde meydana gelmektedir. Silanol gruplarının iyonizasyon oranı çalışma elektrolitinin pH'sına bağlıdır. Nishi ve diğ. (101)'nin belirttiğine göre, pH 8,0'a kadar silanol iyonizasyonu ile EOF artmakta, pH 8,0'dan sonra ise iyonlaşan silanol sayısı sabit kalmakta ve iyonik şiddet artışına bağlı olarak EOF azalması mümkün olmaktadır. Yapılan deneyler sonucunda, pH 2,5 – 8,5 arasında pH yükseldikçe EOF'de önemli artış gözlenirken, pH 8,5 – 10,0 arasında pH yükselmesi, EOF'de hafif bir artışa sebep olmuştur. pH, EOF'yi oldukça etkili şekilde değiştirdiğinden, doğru ve tekrarlanabilir sonuçlar almak için çalışma elektrolitinin pH'sı, tampon çözelti kullanımıyla sabit tutulmalıdır. Farklı pH aralıklarında tamponlama kapasitesine sahip fosfat, sitrat ve borat

tampon çözeltileri denenmiştir. Fosfat ve sitrat tamponlarında yeterli ayırım sağlanamamıştır. En iyi ayırıcılık ve etkinlik borat tamponunda gözlenmiştir. Borat tamponu ile pH 8,5-10,0 aralığında yapılan deneyler sonucunda en iyi ayırıcılık ve etkinlik pH 9,0'da gözlenmiştir (Bkz. Şekil 4.1 ve Şekil 5.2).

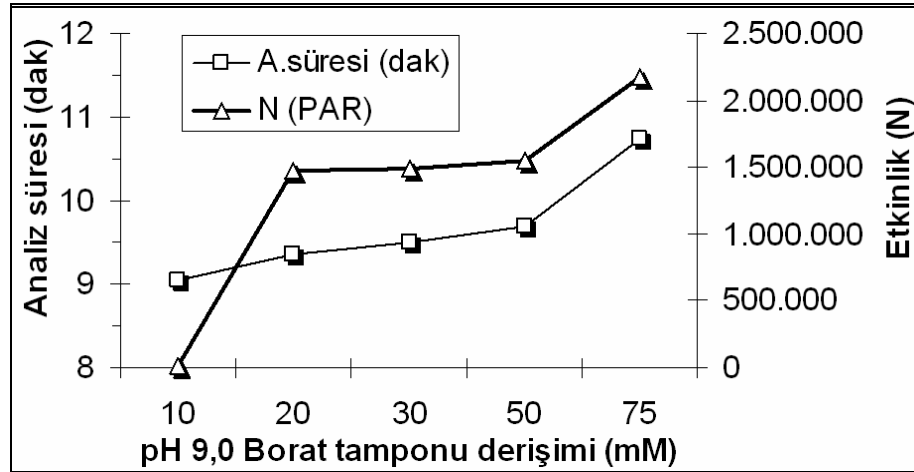


Şekil 5.2. Çalışma elektrolitinin pH'sının analiz üzerine etkisi.

Koşullar: 30 mM SDS içeren 20 mM borat tamponu, $t_{enj} = 3$ s, $P_{enj} = 50$ mbar, $V = 29$ kV, $\lambda = 200$ nm. PAR, KAF, DİF, PRO derişimi: 50'şer $\mu\text{g mL}^{-1}$.

pH 9,0 borat tamponunun derişimi arttıkça analiz süresi uzamaktadır. Bu tamponda 20 mM derişimde 9,5 dak süren analiz, 100 mM derişim denendiğinde 19,5 dak sürmüştür. Tampon derişiminin çok az olması pH'nın sabit tutulmasını sağlayamamakta ve elektroferogramda zemin (*baseline*) bozulmaktadır. Bu da alt tayin sınırını ve tekrarlanabilirliği etkiler. Ayrıca, tampon derişimi numune derişiminden küçük olursa asimetrik ve geniş pikler elde edilir (83).

Yeterli ayırıcılığın ve etkinliğin gözleendiği, analiz süresinin kısa olduğu ve zeminin yeterince düzgün olduğu pH 9,0 borat tamponu derişimi 20 mM olarak belirlenmiştir (Bkz. Şekil 4.2 ve Şekil 5.3).



Şekil 5.3. Borat tamponu derişiminin analiz süresi ve etkinlik üzerine etkisi.

Koşullar: 30 mM SDS içeren pH 9,0 borat tamponu, $t_{enj} = 3$ s,

$P_{enj} = 50$ mbar, $V = 29$ kV, $\lambda = 200$ nm. PAR, KAF, DİF, PRO derişimi: 50'şer $\mu\text{g mL}^{-1}$.

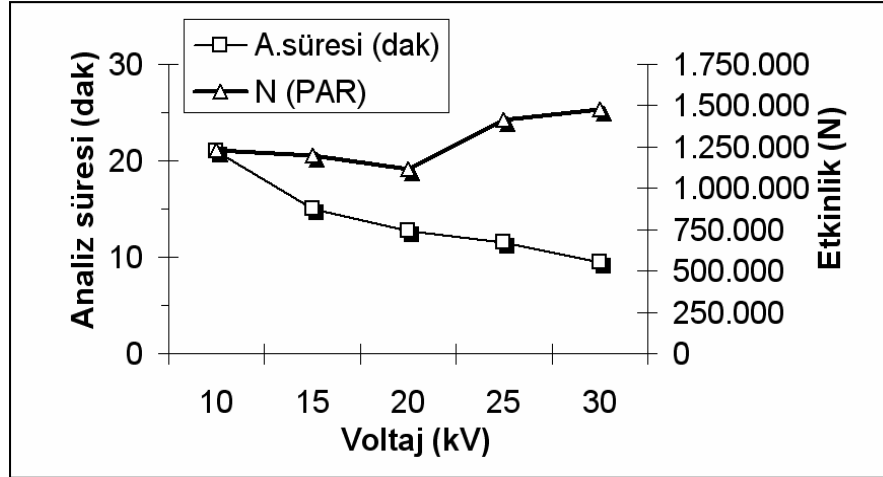
Çalışma elektrolitine eklenen organik çözücüler, vizkozite, dielektrik sabiti ve zeta potansiyel üzerinde etkilidir. Khaledi (93)'nin belirttiğine göre, asetonitril, aseton gibi aprotik organik çözücülerin %10'dan küçük oranlarda eklenmesiyle miseller daha kararlı olurlar ve KMK düşer. Eklenen SDS derişiminin sabit olduğu durumda, KMK'yi arttırıcı bir etki yapılinca, çözeltideki misel miktarı azalmaktadır. Misel miktarındaki azalma analiz süresini kısaltabilir ancak aynı zamanda ayırıcılık ve etkinlik de düşebilir. KMK'yi azaltıcı bir etki yapılması durumunda, misel miktarı artar. Misel miktarındaki artış, ayırıcılık ve etkinliği arttırırken, analiz süresinde uzamaya neden olabilir. MECC yöntemi geliştirilmesi sırasında yapılan deneyler sonucunda metanol ve asetonitril eklemenin, yöntemin analiz süresi, ayırıcılık ve etkinliğine faydalı etkisi olmadığı gözlenmiş olup organik çözücü eklenmemesine karar verilmiştir.

Bu durumda, çalışma elektroliti olarak, 30 mM SDS içeren 20 mM pH 9,0 borat tamponu seçilmiştir (Bkz. Tablo 4.1). Bu elektrolitte PAR, KAF, PRO ve DİF'in elektroforetik hızları Tablo 4.2'de verilmiştir.

Cihaz parametrelerinin sonuçları nasıl etkilediği araştırılarak dedektör dalgaboyu, uygulanacak voltaj, enjeksiyon süresi ve kapiler sıcaklığının optimal değerleri bulunmuştur.

Dedektör dalgaboyunun seçimi için üç boyutlu olarak elektroferogram ve absorbans spektrumunun aynı anda görüldüğü grafik incelenmiştir (Bkz.Şekil 4.5). Cihazın bilgisayar yazılımında bu grafikteki dalgaboyu değiştirilerek elektroferogram interaktif olarak gözlenebilmektedir. En düşük gözlenebilme sınırını elde etmek için maddenin en yüksek absorbans yaptığı dalgaboyunu seçmek esastır. Üç madde için en yüksek absorbansların elde edildiği dedektör dalgaboyu 200 nm olarak seçilmiştir. Cihaz bilgisayarındaki bu yazılım, seçilen bir zaman için, elde edilen UV absorbans spektrumunu vermektedir. Yazılım, pikin başlangıcında, ortasında ve sonundaki UV absorbans spektrumlarını inceleyerek otomatik olarak pik saflık indisini hesaplamaktadır. Pik saflık indisi 1'e yakın olması, ayrımın tam gerçekleştiğinin göstergesidir. Analizi yapılan maddeler için pik saflık indisleri 1'e yakın çıkmıştır (Bkz. Tablo 4.3). Geliştirilen MECC yönteminden elde edilen elektroferogramlarda pik simetrilerinin 1'e yakın olması ve teorik tabaka sayılarının yüksek olması yöntemin etkinliğinin yüksek olduğunun göstergesidir.

Çalışma elektrolitine uygulanan voltajın seçimi için 5 – 30 kV arasında değişen voltaja karşı akım grafiği çizilmiştir (Bkz. Şekil 4.4). Elde edilen grafikte $r^2 = 0,9999$ tanımlayıcılık katsayısı hesaplanmıştır. Çalışılan aralıkta voltaj arttıkça akım doğrusal olarak artmaktadır. Kapilerden geçen akımın 50 μA 'den az olması istenir. 100 μA 'e kadar akım kabul edilebilirken, 125 μA 'den fazla akım Joule ısınmasına neden olur (89). Ölçülen tüm akımlar 15 μA 'den azdır. Eşitlik 2.1'e göre uygulanan voltaj arttıkça EOF artmaktadır. Bu da analiz süresinin kısalması anlamına gelmektedir. Aynı zamanda kapiler elektroforezde teorik tabaka sayısı ile ilgili Eşitlik 2.5'e göre, uygulanan voltaj arttıkça etkinlik artmaktadır. Şekil 5.4'te, voltajın artışıyla etkinliğin arttığı ve analiz süresinin kısaldığı görülmektedir. Bu nedenle mümkün olan en yüksek voltajı seçmek gerekir. Validasyon için sağlamlık (*robustness*) çalışması amacıyla uygulanan voltajın 1 kV aşağısının ve yukarısının denenmesi gerekmektedir. Bunu yapabilmek için uygulanan voltaj 29 kV seçilmiştir. 29 kV ile 30 kV'luk voltaj uygulanması arasında analiz süresi açısından önemli bir fark bulunmamaktadır.



Şekil 5.4. Uygulanan voltajın analiz süresi ve etkinlik üzerine etkisi.

Koşullar: 30 mM SDS içeren 20 mM pH 9,0 borat tamponu, t_{enj} = 3 s,

P_{enj} = 50 mbar, λ = 200 nm. PAR, KAF, DİF, PRO derişimi: 50'şer $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Hidrodinamik numune enjeksiyonunda uygulanan basınç 50 mbar olup enjeksiyon süresinin analiz üzerine etkisi incelenmiştir (Bkz. Şekil 4.6). Enjeksiyon süresi arttıkça kapiler içine verilen madde miktarı da artmakta ve aynı derişimdeki numuneler için pik alanı ve pik yüksekliğinde artış gözlenmektedir. Bu, daha düşük derişimlerde çalışabilmek, yani gözlenebilme ve alt tayin sınırlarının düşmesi anlamına gelmektedir. Ancak enjeksiyon süresi arttıkça pik genişlikleri de artmakta, bu da ayırıcılık ve etkinliği azaltmaktadır. Yapılan deneylerde 1-8 s arasındaki enjeksiyon sürelerinden elde edilen elektroferogramlar incelenmiş ve en uygun sürenin 3 s olduğuna karar verilmiştir. Düşük gözlenebilme ve alt tayin sınırlarının daha önemli olduğu biyolojik kökenli numunelerden miktar tayini yapılıyor olsaydı daha yüksek enjeksiyon süresiyle daha düşük derişimlerde çalışmak mümkün olabilirdi ancak bu çalışmada geliştirilen yöntemin amacı farmasötik preparatlardan miktar tayini olduğu için, 3 s enjeksiyonla erişilen gözlenebilme ve alt tayin sınırları yeterli görülmüş ve enjeksiyon süresini arttırarak ayırıcılıktan ödün vermek tercih edilmemiştir.

Kapilerin analiz sırasındaki sıcaklığı, çalışma elektrolitinin viskozitesini değiştirdiği için EOF ve maddelerin göç zamanları üzerinde etkilidir. Çalışma sıcaklığının belirlenebilmesi için 20, 25 ve 30°C'de yapılan deneyler

sonucunda elde edilen elektroferogramlar incelenmiştir (Bkz. Şekil 4.7). 30°C’de analiz süresinin daha kısa olduğu ancak, PAR ve KAF piklerinin ayırıcılığının düştüğü gözlenmiştir. 20°C’de ise analiz süresi uzun olmakla birlikte ayırıcılıkta da artış gözlenmemiştir. Optimum sıcaklığın 25°C olduğuna karar verilmiştir. Cihazın analize başlaması için, kapiler sıcaklığının sabitlenmesi amacıyla ayarlanan sıcaklığa göre 2 – 10 dak beklemek gerekmektedir. Kapiler sıcaklığı için oda sıcaklığı olan 25°C’nin seçilmesi ile bu bekleme süresi en aza inmektedir.

Bu deneylerin sonucunda optimum cihaz parametreleri, dedektör dalgaboyu 200 nm, 50 mbar basınçla 3 s süreli hidrodinamik enjeksiyon, uygulanan voltaj 29 kV ve kapiler sıcaklığı 25°C olarak seçilmiştir (Bkz. Tablo 4.1).

Optimize edilen parametreler uygulanarak yapılan deneyler sonucunda elde edilen elektroferogramlardan madde miktarının hesaplanması için pik alanı, pik alan oranı (maddenin pik alanının iç standardın pik alanına oranı) , pik normalizasyonu (PN, pik alanının göç zamanına oranı) veya PN oranı (maddenin PN’sinin iç standardın PN’sine oranı) kullanılabilir. PN oranında BSS değerlerinin daha düşük olduğu Tablo 4.4’te görülmektedir. Sonuçlarda daha yüksek kesinlik elde etmek için hesaplamalarda PN oranı kullanılmıştır.

Kalibrasyon için bilinen miktarlarda standart madde içeren karışımların analizi sonucunda elde edilen elektroferogramlardan maddelerin PN oranları hesaplanmıştır. Madde derişimine karşı maddenin PN oranı grafiğe geçirilmiştir (Bkz. Şekil 4.8). Korelasyon analizi sonucunda r ve r^2 katsayıları ve regresyon analizi sonucunda kalibrasyon denklemi elde edilmiştir (Bkz. Tablo 4.5). Korelasyon katsayısının önem kontrolü testi sonuçları Tablo 4.6’da olup, korelasyon katsayılarının tesadüfen bulunmuş değerler olmadığı sonucuna varılmaktadır. Elde edilen kalibrasyon eğrisinde doğrusallıktan ayrılış testi yapılmıştır (Bkz. Tablo 4.7). $y = ax+b$ şeklindeki kalibrasyon denkleminde, b ’ye kesişim denir. Kesişim, doğrunun y eksenini kestiği değerdir. Kesişimin sıfırdan ayrılışının önem kontrolü testi yapılarak, kesişimin değerinin sıfırdan farklı, ancak sıfıra çok yakın olduğu

hesaplanmıştır. Sıfırdan farkının önemli olmadığı sonucuna varılmıştır (PAR $t_H=0,0244$; KAF $t_H=0,0268$; PRO $t_H=0,0552$; $t_T=1,98$ $p>0,05$).

Bilinmeyen numunelerde miktar tayini için, elektroferogramda standart madde ile aynı göç zamanına sahip piklerin (PAR: 5,17 dak, KAF: 5,51 dak ve PRO: 9,37 dak) PN oranları, Tablo 4.5'teki kalibrasyon denklemlerinde yerine konularak madde derişimleri hesaplanmıştır.

5.3. Geliştirilen Yöntemin Validasyonu

Geliştirilen MECC yönteminin validasyonu için gözlenebilme sınırı, alt ve üst tayin sınırları, doğrusal çalışma aralığı, kesinlik, doğruluk, seçicilik, sağlamlık ve tutarlılık çalışmaları yapılmıştır (97).

Kararlılık (Stabilite)

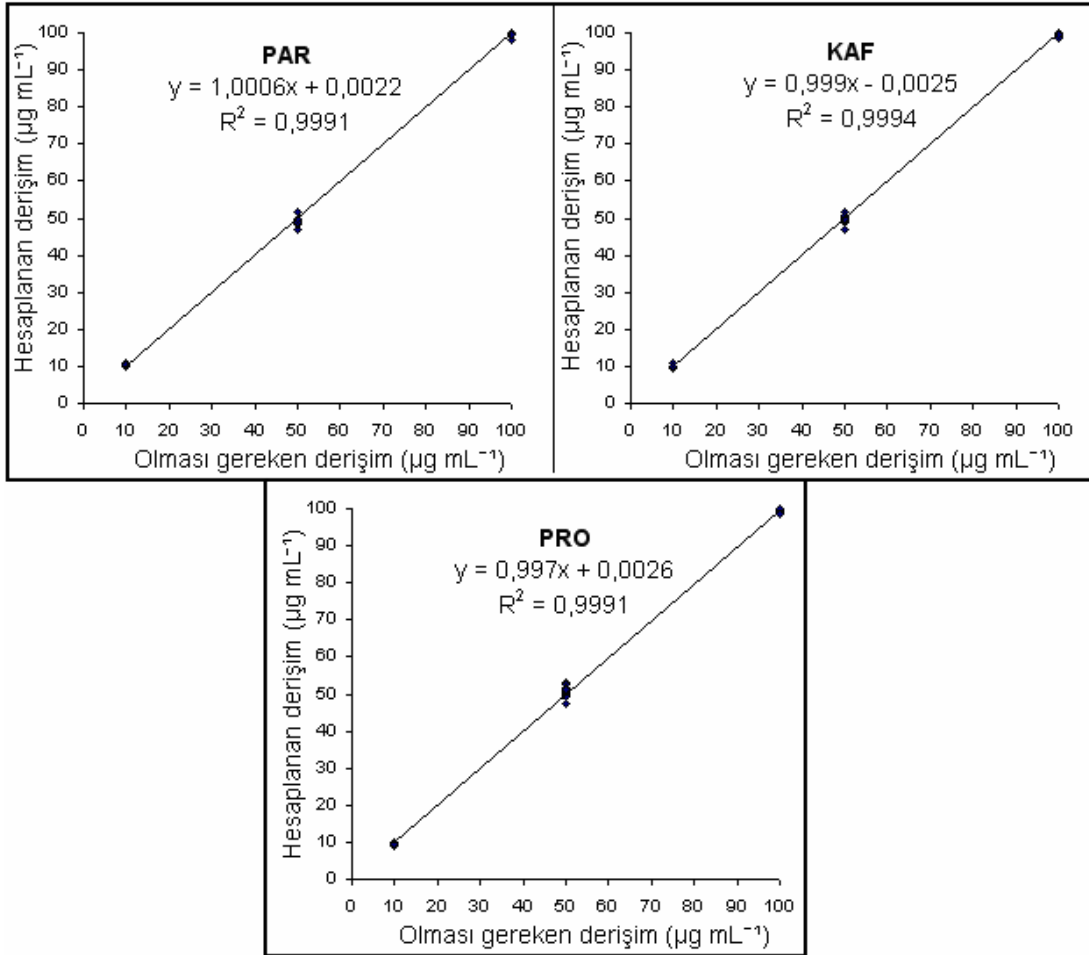
Çalışılan maddelerin $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ derişimindeki stok çözeltilerinin oda sıcaklığındaki ve buzdolabındaki kararlılığının belirlenmesi amacıyla iki ay boyunca UV spektrumları ve elektroferogramları incelenmiştir. Spektrumların herhangi bir kısmında absorbansta azalma veya dalgaboyu kayması gözlenmemiştir. Geliştirilen MECC yöntemiyle yapılan analizlerde herhangi bir bozunma ürününe rastlanmamış ve standart maddelerin göç zamanı ve pik alanlarında değişme olmamıştır. Çalışılan maddelerin stok çözeltileri minimum iki ay kararlıdır. Stok çözeltiler buzdolabında saklanmış ve kullanılacağı zaman oda sıcaklığına getirilerek pipetlemede sıcaklığa bağlı sıvı hacminin değişiminden doğabilecek hata en aza indirilmiştir.

Gözlenebilme ve Alt Tayin Sınırı

Gözlenebilme sınırı, maddenin pik yüksekliğinin, zemin gürültüsünün 3 katı olduğu zamanki derişimidir (97). Diğer bir ifadeyle, S/G oranının 3 olduğu değerdir. Gözlenebilme sınırları PAR ve KAF için $0,6 \mu\text{g mL}^{-1}$, PRO için $0,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Alt tayin sınırı, S/G oranının 10 olduğu değer olup, PAR ve KAF için $2 \mu\text{g mL}^{-1}$, PRO için $3 \mu\text{g mL}^{-1}$ olarak bulunmuştur. PRO, çalışılan dalgaboyunda PAR ve KAF'a oranla daha düşük absorbansa sahip olduğundan, alt tayin sınırı daha yüksektir. Farmasötik preparatlardan analiz için geliştirilen MECC yönteminin yeteri kadar duyarlı olduğu söylenebilir.

Doğrusal cevap sınırı (üst tayin sınırı) dedektör cevabının derişim artışıyla doğrusal olarak artmasının bozulduğu sınırdır. Geliştirilen MECC yöntemi için üst tayin sınırı $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. Alt tayin sınırı ile üst tayin sınırı arasındaki derişim aralığına çalışma aralığı (veya doğrusallık aralığı) denilmektedir (97). Bu aralık PAR ve KAF için $2\text{-}200 \mu\text{g mL}^{-1}$, PRO için $3\text{-}200 \mu\text{g mL}^{-1}$ olarak bulunmuştur.

Olmaları gereken derişime karşı yöntemle bulunan derişimler grafiğe geçirilince, $y=x$ benzeri bir doğru elde edilmesi, çalışılan aralıkta doğrusal sonuçlar elde edildiğinin göstergesidir. Her madde için 3 derişim seviyesinde, her derişimde $n=10$ tekrarlı analiz sonuçları Şekil 5.5'de gösterilmiştir.



Şekil 5.5. Yöntem doğrusallığını kontrol grafikleri ($n=30$).

Kesinlik ve Doğruluk

Kesinlik, sonuçların tekrarlanabilirliğinin göstergesidir. Sayısal ölçütü

BSS'dir. Bu katsayıya varyasyon katsayısı da denilmektedir. En az üç farklı derişimde (LOD'ye yakın, ortada ve LOL'ye yakın) ve her derişim için en az 3 analiz sonucunun bağıl standart sapmasının en yüksek %5 olması gerekir ancak alt tayin sınırındaki BSS %10 kabul edilmektedir (97). Geliştirilen analiz yönteminde üç farklı derişimde 6'şar kez yapılan gün içi ve günler arası analiz sonuçlarında düşük BSS değerleri elde edilmesi (gün içi %0,29-1,42; günler arası %0,10-3,76), kesinliğin yüksek olduğunun göstergesidir.

Doğruluk, ölçülen ve doğru olarak kabul edilen değerler arasındaki uyumun bir ölçüsüdür ve % bağıl hata (%BH) ile belirlenmektedir. Yöntemin doğruluğunun belirlenmesi için bilinen numunelerde en az 3 farklı derişimde her derişim için 3-10 analiz sonucu bulunmalıdır. Bulunan miktar için %BH (mutlak değeri) %5'i geçmemelidir ancak, alt tayin sınırı için %10 kabul edilmektedir (97). Geliştirilen yöntemin gün içi ve günler arası doğruluk çalışması üç farklı derişimde, 6 ayrı çözeltiyle yapılmış olup sonuçlarda yüksek doğruluk elde edilmiştir (%BH ($\pm$) gün içi %0,01 - 2,3; günler arası %0,03 - 3,40) (Bkz. Tablo 4.8-Tablo 4.10).

Geliştirilen MECC yönteminin tekrarlanabilirliğini belirlemek amacıyla, aynı derişimdeki standart 10 kez analiz edilip her üç madde için miktar tayini yapılmıştır. BSS değerleri PAR için %0,45; KAF için %0,68; ve PRO için %0,42 olarak bulunmuştur. Bu değerler yöntemin tekrarlanabilir olduğunu göstermektedir.

Kapiler elektroforez cihazının tekrarlanabilirliğini belirlemek amacıyla, aynı derişimdeki standart 10 kez analiz edilip sinyaller gözlenmiştir. Elde edilen elektroferogramlarda her üç madde ve İS pikleri için göç zamanlarının BSS değerleri %0,4'ten küçük, pik alanlarının BSS değerleri de %1'den küçük bulunmuştur. Bu da, cihazın tekrarlanabilir sonuçlar verdiğini göstermektedir.

Geri Kazanım

Geri kazanım, numuneye konulan maddenin ne kadarının analiz sonucu olarak bulunduğunu belirtir (97). Yöntemin geri kazanımının %100'den düşük olması durumunda, kalibrasyon numuneleri ve bilinmeyen numuneler aynı işlemde geçtiği için, tekrarlanabilir geri kazanım varsa doğru

sonuç elde edilebilir. Farmasötik preparattan miktar tayini yapıldığı için tabletteki maddenin ne kadarının numuneye geçtiğinin belirlenmesi amacıyla, sentetik tablet numunesi hazırlanmış (Bkz. bölüm 3.2.4.) ve içine bilinen miktarda madde konulup analiz sonucunda ne kadarının bulunduğu bakılmıştır. Geliştirilen yöntem için geri kazanım değerleri %100'e yakın olup tekrarlar arasındaki BSS düşüktür (Bkz. Tablo 4.11).

Seçicilik (Özgünlük)

Seçicilik, yöntemin diğer maddeler varlığında analizi yapılan maddenin miktarını doğru olarak tayin edebilme yeteneğidir (97). Şekil 4.9 (a)'da plasebonun elektroferogramı incelendiğinde, herhangi bir pike rastlanmaması, (c) ve (d)'de (b)'de gözlenenlerden fazla pik bulunmaması; ayrıca Tablo 4.11'de sentetik tablet çalışmalarında % geri kazanım değerlerinin yüksek olması, farmasötik preparattaki yardımcı maddelerin analiz yöntemini etkilemediğini, bu da yöntemin seçici olduğunu göstermektedir. Tablo 4.3'te görüldüğü gibi, pik saflık indislerinin 1'e yakın olması da, yöntemin seçiciliğinin bir ifadesidir.

Bilinen miktarlarda PAR, KAF ve PRO içeren karışımların geliştirilen MECC yöntemiyle analiz bulguları Tablo 4.12'de verilmiştir. Bu çalışmada karışımdaki bileşenlerden birinin miktarı değiştirilip diğerleri sabit tutulmuştur. Sonuçlar, bileşenler arasında girişim olmadığını göstermektedir. Birinin miktarının az veya çok olması, diğerlerinin sonucunu etkilememektedir. Bu durum da, yöntemin seçici olduğunun bir göstergesidir.

Sağlamlık ve Tutarlılık

Yöntemin sağlamlık (*robustness*) çalışması için, yöntem parametrelerindeki küçük değişimlerin, sonucu ne kadar etkilediği incelenmiştir. Bu amaçla çalışma elektrolitinin pH'sı, tampon derişimi, SDS derişimi, dedektör dalgaboyu, uygulanan voltaj ve kapiler sıcaklığı, standart koşulların alt ve üst değerlerinde olmak üzere değiştirilmiştir. Tablo 4.13'te yöntem parametrelerindeki küçük değişmelerin, sonucu değiştirmediği görülmektedir.

Tutarlılık (*ruggedness*) çalışması için ise, farklı bir analizcinin geliştirilen MECC yöntemini sentetik tablete uygulaması sonucunda, her iki analizcinin sonuçları karşılaştırılmıştır. Farklı kişilerin geliştirilen MECC

yöntemini uygulaması sırasında oluşabilecek küçük farklar, elde edilen sonucu değiştirmemektedir (Bkz. Tablo 4.11). Bu veriler, geliştirilen MECC yönteminin sağlam ve tutarlı olduğunu göstermektedir.

Farmasötik Preparatlara Uygulama

Geliştirilen ve validasyon parametreleri değerlendirilen (valide edilen) MECC yöntemi Tablo 2.1’de belirtilen farmasötik preparatların analizine uygulanmıştır. Analiz sonuçları Tablo 4.14’de verilmiştir. Bu preparatlardan Minoset® Plus tableti karşılaştırma yöntemiyle (43) de analiz edilmiştir. Bu yöntemle gözlenen UV absorbands spektrumları Şekil 4.10’da ve spektrum oranları türev spektrumları Şekil 4.11’de görülmektedir. Her iki yöntemle elde edilen analiz sonuçları Tablo 4.15’de verilmiştir. Ayrıca Minoset® Plus tablette miktar tayini her iki yöntemle standart ekleme tekniği uygulanarak da yapılmıştır. Bu teknikle elde edilen kalibrasyon grafikleri Şekil 4.12’de görülmektedir. Bu şekilde A kısmındaki standart ekleme kalibrasyon eğrilerine ait eğimlerin, maddelerin normal kalibrasyon eğrilerinin eğimleri ile aynı olduğu görülmektedir (Bkz. Şekil 4.8). Bu da farmasötik preparatlardaki yardımcı maddelerin, analizi etkilemediğini göstermektedir.

MECC ve karşılaştırma yöntemlerinde kalibrasyon eğrisi ve standart ekleme teknikleri ile elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında, aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (Bkz. Tablo 4.16). Bu çalışmalar da, geliştirilen MECC yönteminin doğruluğunu ve farmasotik preparatlara uygulanabileceğini göstermektedir.

Sonuç olarak bu tez çalışmasında PRO, PAR ve KAF’ı bir arada içeren farmasotik preparatlardan bu maddelerin aynı anda analizi için geliştirilen MECC yönteminin doğru, duyarlı, kesin, seçici, sağlam ve tutarlı olduğu gösterilmiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışmamızda PRO, PAR ve KAF'ı birlikte içeren farmasötik preparatlardan bu maddelerin aynı anda analizi için CE yöntemi geliştirilmiştir. Önce CZE yöntemi denenmiş ancak PAR ve KAF pikleri ayrılamamıştır. Daha sonra maddelerin nötral yapıları dikkate alınarak MECC yöntemi denenmiştir. Optimum cihaz parametreleri 50 mbar basınçla 3 s süreli hidrodinamik enjeksiyon, 29 kV voltaj uygulanması, 25°C kapiler sıcaklığı ve 200 nm dedektör dalgaboyu olarak saptanmış ve bu koşullarda en iyi ayrımı sağlayan çalışma elektroliti olarak 30 mM SDS içeren 20 mM pH 9,0 borat tamponu seçilmiştir.

Geliştirilen MECC yönteminin validasyonu için gözlenebilme sınırı, alt ve üst tayin sınırları, doğrusalılık, kesinlik, doğruluk, seçicilik (özgünlük), sağlamlık ve tutarlılık gibi validasyon parametreleri değerlendirilmiştir. Geri kazanım, uygun değerlerde bulunmuştur. Daha sonra, valide edilen yöntem Türkiye piyasasında satılmakta olan, PRO, PAR ve KAF'ı birlikte içeren 3 ayrı farmasötik preparata uygulanmış, bunlardan biri kaynaklardaki bir yöntemle de analiz edilmiştir. Analiz sonuçları incelendiğinde, her iki yöntemle bulunan sonuçlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı anlaşılmıştır.

Sonuç olarak, PRO, PAR ve KAF'ın kombinasyonunu içeren farmasötik preparatlardan bu maddelerin aynı anda analizi için doğru, duyarlı, kesin, seçici, tutarlı ve sağlam MECC yöntemi geliştirilmiştir.

Kaynaklarda bulunan jenerik yöntemler genel olarak bir çok ilacın analizinde uygulanabilmektedir ancak, bu yöntemlerin doğruluk, kesinlik, seçicilik ve duyarlılığı, maddelere özel olarak geliştirilip valide edilen yöntemlerden daha düşüktür (100). Adı geçen 3'lü kombinasyonu içeren farmasötik preparatlardan bu maddelerin aynı anda analizi için kaynaklarda valide edilmiş bir CE yöntemi bulunmadığından, tez çalışmasında geliştirilen ve valide edilen yöntemin kaynaklara katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Bu üçlü kombinasyonun farmasötik preparatlardan aynı anda analizi için kaynaklarda bulunan UV spektrofotometrik yöntemle, ayırma işlemine gerek kalmadan sonuç elde edilebilmektedir. Ancak bu yöntem yoğun matematiksel işlemler gerektirmektedir. Ayrıca, UV spektrofotometrik

yöntemde ayırma işlemi yapılmadığı için seçiciliğin düşüklüğü ve girişim olasılığı söz konusudur. Aynı analiz için kaynaklardaki HPLC yöntemlerinde ise toplam analiz süresi daha uzun ve maliyet daha yüksek olmasına karşın ayırma etkinliği daha düşüktür. Ayrıca HPLC’de kullanılan organik çözücüler, laboratuvarda gerekli önlemler alınsa da, bir miktarı havaya karışarak insan sağlığını olumsuz yönde etkilemekte ve deneyler sonucunda oluşan atıklar çevreyi ciddi boyutta kirletmektedir. Buna karşılık geliştirilen MECC yönteminde hiçbir uçucu organik madde kullanılmamaktadır. Kullanılan seyreltik sulu çözelti şeklindeki kimyasallar analiz başına en fazla 3 mL harcanmaktadır (2x1 mL tampon çözelti ve 1 mL numune çözeltisi).

Geliştirilen MECC yönteminin validasyon çalışmaları yapılmıştır. Validasyon çalışmalarının sonuçları, kaynaklarda rutin ilaç analizleri için belirtilen geçerlilik kriterlerini sağlamaktadır (102).

Bu üstünlükleri düşünüldüğünde, geliştirilen MECC yöntemi, kolay uygulanabilir ve toplam işletme maliyeti düşük olduğundan, rutin analiz laboratuvarlarında, pahalı bir yöntem olan HPLC’ye alternatif olarak önerilebilir.

KAYNAKLAR

1. Kiersch, T. A., Minic, M. R., The onset of action and the analgesic efficacy of Saridon (a propyphenazone/ paracetamol/ caffeine combination) in comparison with paracetamol, ibuprofen, aspirin and placebo (pooled statistical analysis). *Curr. Med. Res. Opin.*, 18, (2002), 18.
2. Altria, K. D., Overview of capillary electrophoresis and capillary electrochromatography., *J. Chrom. A.*, 856, (1999), 443-463.
3. Ommatay, R., *Vademecum 2005*, 26. baskı, Ankara, 2005.
4. Merck Research Laboratories, *The Merck Index*. XII. Baskı, Whitehouse Station, N.J., (1996), s. 9,268,1351.
5. Yurtsever, M.F., Kafein içeren karışımlarda bileşenlerin spektrofotometrik yöntemlerle miktar tayinleri ve bu yöntemlerin farmasötik preparatlara uygulanması, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Ankara, (1998).
6. Djokiç, D., Dumanoviç, D., Markoviç, D., Spectrophotometric characterization of some analgesics and antipyretics. *Talanta*, 36, (1989), 931-935.
7. Bilgin, A.A., Şafak, C., *Farmasötik Kimya*. Cilt 1, Irmak Matbaası, Ankara, (2000), s. 360.
8. Camu, F., Vanlersberghe, C., Pharmacology of systemic analgesics. *Best Prac. Research Clin. Anaesthes.*, 16, (2002), 475-488.
9. Milsom, I., Minic, M., Dawood, M.Y., Akin, M.D., Spann, J., Niland, N.F., Squire, R.A., Comparison of the efficacy and safety of nonprescription doses of naproxen and naproxen sodium with ibuprofen, acetaminophen, and placebo in the treatment of primary dysmenorea: a pooled analysis of five studies. *Clin. Therapeutics*, 24, (2002), 1384-1400.
10. Zinsenheim, J., Benson, G., Schweinle, J., Temple, A., Silber, S., Bowen, D., Comparison of paracetamol and naproxen for the management of mild-to-moderate osteoarthritis pain of the hip or knee. *J. Pain*, 5, (2004), 63.

11. Watson, M.W., Watson, M.J., Frame, W.T., A double blind, randomized trial to compare the analgesic effect of oral premedication with paracetamol, diclofenac, or diclofenac and paracetamol, on postoperative pain following surgical suction termination of pregnancy. *J. Ambulatory Surgery*, 12, (2005), 35-38.
12. Samra, O.M., Forouzan, I., Migraine treatment in pregnancy. Honorable Mention Manuscript, 9, (2002), 1-6.
13. How many people use retail analgesics?. [online]. <http://www.jr2.ox.ac.uk/bandolier/band106/b106-6.html>. [01/01/2006].
14. Macario, A., McCoy, M., The pharmacy cost of delivering postoperative analgesia to patients undergoing joint replacement surgery. *J. Pain*, 4, (2003), 22-28.
15. Ward, B., Williams, J.M.A., Paracetamol revisited: A review of the pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Acute Pain*, 2, (1999), 139-149.
16. Fiebich, B.L., Lieb, K., Hüll, M., Aicher, B., Ryn, J.V., Pairet, M., Engelhardt, G., Effects of caffeine and paracetamol alone or in combination with acetylsalicylic acid on prostaglandin E2 synthesis in rat microglial cells. *Neuropharmacology*, 39, (2000), 2205-2213.
17. Brooks, P., Use and benefits of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Amer. J. Med.*, 104, (1998), 9S-13S.
18. Lee, Y., Brahim, J., Carmona, G., Rowan, J., Lee, R., Dionne, R., Acetaminophen inhibition of COX-2 function in a clinical model of tissue injury. *J. Pain*, 6, (2005), S6
19. Schwab, J.M., Schluesener, H.J., Laufer, S., COX-3: just another COX or the solitary elusive target of paracetamol?. *The Lancet*, 361, (2003), 981-982.
20. Botting, R., COX-1 and COX-3 inhibitors. *Thrombosis Research*, 110, (2003), 269-272.

21. Botting, R., Ayoub, S.S., COX-3 and the mechanism of action of paracetamol/ acetaminophen. Prostaglandins, Leucotriens and Essential Fatty Acids, 72, (2005), 85-87.
22. Kuritzky, L., Weaver, A., Advances in rheumatology: Coxibs and beyond. J. Pain and Symptom Manage., 25, (2003), S6-S20.
23. Huang, W.T., Wang, J.J., Lin, M.T., Antipyretic effect of acetaminophen by inhibition of glutamate release after staphylococcal enterotoxin A fever in rabbits. Neuroscience Letters, 355, (2004), 33-36.
24. Curatolo, M., Sveticic, G., Drug Combinations in pain treatment: a review of the published evidence and a method for finding the optimal combination. Best Prac. Res. Clin. Anaesthes., 16, (2002), 507-519.
25. Kayaalp, S.O., Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. Cilt II, IX. Baskı, Feryal Matbaası, Ankara, 2000, s. 1040, 1042.
26. Morgan, S., Dorman, S., Paracetamol (acetaminophen) allergy. J Pain Symptom Manage., 27, (2004), 99-101.
27. Schug, S.A., Garret, W.R., Gillespie, G., Opioid and non-opioid analgesics. Best Prac. Res. Clin. Anaesthes., 17, (2003), 91-110.
28. Lasso-de-la-Vega, M.C., Zapater, P., Horga, J.F., Such, J., Miralles, M., Perez-Mateo, M., Esteban, A., Pharmacokinetic variations of paracetamol according to the severity of liver disease. J. Hepatology, 36, (2002), 257.
29. Burillo-Putze, G., Mintegui S., Munne P., Changes in pediatric toxic dose of acetaminophen. The Amer. J. Emerg. Med., 22, (2004), 223.
30. Hammett-Stabler, C.A., Pesce, A.J., Cannon, D.J., Urine drug screening in the medical setting. Clinica Chimica Acta, 315, (2002), 125-135.
31. Kraetsch, H.G., Hummel, T., Lötsch, J., Kussat, R., Kobal, G., Analgesic effects of propyphenazone in comparison to its combination with caffeine. Euro. J. Clin. Pharmacology, 49, (1996), 377-382.
32. Üstünes, L., RxMedia Farma. 2005. İnteraktif İlaç Bilgi Kaynağı Bilgisayar Programı. [CD-ROM]. Gemaş A.Ş., 2005.

33. Becker A.B., Simons K.J., Gillespie C.A., The bronchodilator effects and pharmacokinetics of caffeine in asthma. *N. Engl. J. Med.* 310, (1984), 743.
34. Choi A, Laurito C.E., Cunningham F.E., Pharmacologic management of postdural puncture headache. *Ann. Pharmacother.*, 30,(1996), 831.
35. Pérez-Ruiz, T., Martínez-Lozano, C., Tomás, V., Galera, R., Migration behaviour and separation of acetaminophen and p-aminophenol in capillary zone electrophoresis: Analysis of drugs based on acetaminophen. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 38, (2005), 87-93.
36. Heitmeier, S., Blaschke, G., Direct assay of nonopioid analgesics and their metabolites in human urine by capillary electrophoresis and capillary electrophoresis-mass spectrometry. *J. Chrom. B: Biomed. Sci. Applic.*, 721, (1999), 109-125.
37. Vogt, C., Conradi, S., Determination of caffeine and other purine compounds in food and pharmaceuticals by micellar electrokinetic chromatography. *J. Chem. Edu.*, 74, (1997), 1126-1130.
38. Okamoto, H., Nakajima, T., Ito, Y., Akedo, T., Shimada, K., Yamato, S., Simultaneous determination of ingredients in a cold medicine by cyclodextrin-modified microemulsion electrokinetic chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 37, (2005), 517-528.
39. Ashcroft, A.E., Major, H.J., Wilson, I.D., Nicholas, A., Nicholson, J.K., Application of capillary electrophoresis-mass spectrometry to the analysis of urine samples from animals and men containing paracetamol and phenacetine and their metabolites. *Anal. Commun.*, 34, (1997), 41-43.
40. Zhao, Y., Lunte, C.E., Determination of caffeine and its metabolites by micellar electrokinetic capillary electrophoresis. *J. Chrom. B*, 688, (1997), 265-274.
41. Pucci, V., Mandrioli, R., Raggi, M.A., Fanali, S., Reversed-phase capillary electrochromatography for the simultaneous determination of acetylsalicylic acid, paracetamol, and caffeine in analgesic tablets. *Electrophoresis*, 25, (2004), 615-621.

42. Liu, A.L., He, F.Y., Hu, Y.L., Xia, X.H., Plastified poly(ethylene terephthalate) (PET)-toner microfluidic chip by direct-printing integrated with electrochemical detection for pharmaceutical analysis. *Talanta*, 68, (2006), 1303-1308.
43. Dinç, E., Kökdil, G., Onur, F., Derivative ratio spectra-zero crossing spectrophotometry and LC method applied to the quantitative determination of paracetamol, propyphenazone and caffeine in ternary mixtures. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 26, (2001), 769-778.
44. Dinç, E., A comparative study of the ratio spectra derivative spectrophotometry, Vierord's method and high-performance liquid chromatography applied to the simultaneous analysis of caffeine and paracetamol in tablets. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 21, (1999), 723-730.
45. Onur, F., Acar, N., Determination of caffeine and paracetamol in pharmaceutical preparations by first derivative UV spectrophotometry. *FABAD Farm. Bil. Derg.*, 14, (1989), 1-8.
46. Onur, F., Acar, N., Determination of propifenazon and caffeine in sugar coated tablets by first derivative ultraviolet spectrophotometry. *J. Fac. Pharm. Gazi.*, 5, (1988), 167-174.
47. Dinç, E., Baleanu, D., Aboul-Enein, H.Y., Wavelet analysis for the multicomponent determination in a binary mixture of caffeine and propyphenazone in tablets. *Il Farmaco*, 59, (2004), 335-342.
48. Dinç, E., Onur, F., Application of a new spectrophotometric method for the analysis of a ternary mixture containing metamizol, paracetamol and caffeine in tablets. *Anal. Chim. Acta*, 359, (1998), 93-106.
49. Dinç, E., Linear regression analysis and its application to the multivariate spectral calibrations for the multiresolution of a ternary mixture of caffeine, paracetamol and metamizol in tablets. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 33, (2003), 605-615.
50. Dinç, E., The spectrometric multicomponent analysis of a ternary mixture of ascorbic acid, acetylsalicylic acid and paracetamol by the divisor-ratio

spectra derivative and spectra-zero crossing methods. *Talanta*, 48, (1999), 1145-1157.

51. Dinç, E., Yücesoy, C., Onur, F., Simultaneous spectrophotometric determination of mefenamic acid and paracetamol in a pharmaceutical preparation using ratio spectra derivative spectrophotometry and chemometric methods. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 28, (2002), 1091-1100.
52. Vidal, A.D., Barrales, P.O., Diaz, A.M., Simultaneous determination of paracetamol, caffeine and propyphenazone in pharmaceuticals by means of a single flow-through UV multiparameter sensor. *Microchim. Acta*, 141, (2003), 157-163.
53. Afkhami, A., Bahram, M., Mean centering of ratio spectra as a new spectrometric method for the analysis of binary and ternary mixtures. *Talanta*, 66, (2005), 712-720.
54. Afshari, J.T., Liu, T.Z., Rapid spectrophotometric method for the determination of acetaminophen in serum. *Anal. Chim. Acta*, 443, (2001), 165-169.
55. Bouhsain, Z., Garrigues, S., Guardia, M., Clean method for the determination of propyphenazone and caffeine in pharmaceuticals by flow injection fourier transform infrared spectrometry. *Analyst*, 122, (1997), 441-445.
56. Moreira, A.B., Oliveira, H.P.M., Atvars, T.D.Z., Dias, I.L.T., Neto, G.O., Zagotto, E.A.G., Kubota, L.T., Direct determination of paracetamol in powdered pharmaceutical samples by fluorescence spectroscopy. *Anal. Chim. Acta*, 539, (2005), 257-261.
57. Mamolo, M.G., Vio, L., Maurich, V., Simultaneous quantification of paracetamol, caffeine and propyphenazone by high-pressure liquid chromatography, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 3, (1985), 157-164.
58. Di Pietra, A.M., Gatti, R., Andrisano, V., Cavrini, V., Application of high-performance liquid chromatography with diode-array detection and on-line post-column photochemical derivatization to the determination of analgesics. *J. Chrom. A*, 729, (1996), 355-361.

59. Franeta, J.T., Agbaba, D., Eric, S., Pavkov, S., Aleksic, Vladimirov, S., HPLC assay of acetylsalicylic acid, paracetamol, caffeine and phenobarbital in tablets. *Il Farmaco*, 57, (2002), 709-713.
60. Marin, A., Garcia, E., Garcia, A., Barbas, C., Validation of a HPLC quantification of acetaminophen, phenylephrine and chlorpheniramine in pharmaceutical formulations: capsules and sachets. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 29, (2002), 701-714.
61. Kartal, M., LC method for the analysis of paracetamol, caffeine and codeine phosphate in pharmaceutical preparations. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 26, (2001), 857-864.
62. Abu-Qare, A.W., Abou-Donia, M.B., A validated HPLC method for the determination of pyridostigmine bromide, acetaminophen, acetylsalicylic acid and caffeine in rat plasma and urine. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 26, (2001), 939-947.
63. Santos, J.L., Aparacio, I., Alonso, E., Callejón, M., Simultaneous determination of pharmaceutically active compounds in wastewater samples by solid phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode array and fluorescence detectors. *Anal. Chim. Acta*, 550, (2005), 116-122.
64. Jensen L.S., Valentine, J., Milne, R.W., Evans, A.M., The quantification of paracetamol, paracetamol glucuronide and paracetamol sulphate in plasma and urine using a single high-performance liquid chromatography assay. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 34, (2004), 585-593.
65. Portolés, A., Puerro, M., Terleira, A., Rodríguez, A., Caturla, M.C., Fernández, N., Vargas, E., A new high-absorption-rate paracetamol 500-mg formulation: A comparative bioavailability study in healthy volunteers. *Curr. Therap. Res.*, 64, (2003), 401-411.
66. Vertzoni, M.V., Archontaki, H.A., Galanopoulou, P., Development and optimization of a reversed-phase high-performance liquid chromatographic method for the determination of acetaminophen and its major metabolites in

rabbit plasma and urine after a toxic dose. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 32, (2003), 487-493.

67. Martínez-Algaba, C., Bermúdez-Saldaña, J.M., Villauneva-Camañas, R.M., Sagrado, S., Medina-Hernández, M.J., Analysis of pharmaceutical preparations containing antihistamine drugs by micellar liquid chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 40, (2006), 312-321.
68. Sioufi, A., Marfil, F., Gas chromatographic determination of phenazone derivatives in human plasma. *J. Chrom.: Biomed. Applic.*, 146, (1978), 508-511.
69. Zühlke, S., Dünnebier, U., Heberer, T., Detection and identification of phenazone-type drugs and their microbial metabolites in ground and drinking water applying solid-phase extraction and gas chromatography with mass spectrometric detection. *J. Chrom. A*, 1050, (2004), 201-209.
70. Yegles, M., Wennig, R., Incorporation of propyphenazone in beard hair of a migraine patient. *Forensic Science International*, 107, (2000), 233-237.
71. Rofdewald, P., Drehzen, G., Rapid thin-layer chromatography of various weak analgesic in saliva. *J. Chrom. B: Biomed. Sci. Applic.*, 225, (1981), 427-432.
72. Ahrens, B., Blankenhorn, D., Spangenberg, B., Advanced fibre optical scannig in thin-layer chromatography for drug identification. *J. Chrom. B*, 772, (2002), 11-18.
73. Goyal, R.N., Singh, S.P., Voltammetric determination of paracetamol at C60-modified glassy carbon electrode. *Electrochimica Acta*, [online, article in press]. Elsevier. <http://www.sciencedirect.com> [30/01/2006].
74. Goyal, R.N., Gupta, V.K., Oyama, M., Bachheti, N., Differential pulse voltammetric determination of paracetamol at nanogold modified indium tin oxide electrode. *Electrochem. Comm.*, 7, (2005), 803-807.
75. Staden, J.F., Tsanwani, M., Determination of paracetamol in pharmaceutical formulations using a sequential injection system. *Talanta*, 58, (2002), 1095-1101.

76. Sell, E., Koniuszweska, A., Differentiating spectrophotometric titration in non-aqueous media of the propyphenazone-caffeine mixture in analgesic preparations. *Annales Acad. Med. Gedanensis*, 30, (2000), 203-208.
77. Tomasetti, M., Catalani, A., Rossi, V., Vecchio, S., Thermal analysis study of the interactions between acetaminophen and excipients in solid dosage forms and in some binary mixtures. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 37, (2005), 949-955.
78. Smith, N.W., Evans, M.B., Capillary zone electrophoresis in pharmaceutical and biomedical analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 12, (1994), 579-611.
79. Skoog, D., Holler, F.J., Nieman, T.A., *Enstrümantal Analiz.*, Çev. Kılıç, E., Köseoğlu, F., Yılmaz, H., Bilim Yayıncılık, Ankara, 1998, s. 778, 795.
80. Holland, L.A., Chetwyn, N.P., Perkins, M.D., Lunte, S.M., Capillary electrophoresis in pharmaceutical analysis. *Pharmaceutical Research*, 14, (1997), 372-387.
81. Belder, D., Ludwig, M., Surface modification in microchip electrophoresis. *Electrophoresis*, 24, (2003), 3595-3606.
82. Stachowiak, T.B., Svec, F., Fréchet, J.M.J., Chip electrochromatography. *J. Chrom. A*, 1044, (2004), 97-111.
83. Nemutlu, E., Meloksikamın farmasötik preparatlardan UV spektrofotometrisi ve kapiler elektroforez yöntemi ile analizi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Bilim Uzmanlığı Tezi, Ankara, (2002).
84. Poppe, H., Some reflections on speed and efficiency of modern chromatographic methods. *J. Chrom. A*, 778, (1997), 3-21.
85. Nemutlu, E., Kir, S., Method development and validation for the analysis of meloxicam in tablets by CZE. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 31, (2003), 393-400.
86. Özaltın, N., Nemutlu, E., Yardımcı, C., Süslü, İ., Application of micellar electrokinetic capillary chromatography for the determination of nifedipine and its degradation product in pharmaceutical preparations. *Anal. Letters*, 36, (2003), 371-387.

87. Nemutlu, E., Özaltın, N., Altınöz, S., Determination of rofecoxib, in the presence of its photodegradation product, in pharmaceutical preparations by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Anal. Bioanal. Chem.* 378, (2004), 504-509.
88. Altria, K.D., Current applications in the analysis of pharmaceuticals by capillary electrophoresis. *Trends in Anal. Chem.*, 17, (1998), 204-214.
89. Heiger, D.N, HP CE Partner, 3DCE-Basics, Hewlett Packard (CD-ROM), (1997) , s.176.
90. Nishi, H., Pharmaceutical applications of micelles in chromatography and electrophoresis. *J. Chrom. A*, 780, (1997), 243-264.
91. Muijselaar, P.G., Otsuka, K., Terabe, S., Micelles as pseudo-stationery phases in micellar electrokinetic chromatography. *J. Chrom. A*, 780, (1997), 41-61.
92. Nakamura, H., Sano, A., Matsuura, K., Determination of critical micelle concentration of anionic surfactants by capillary electrophoresis using 2 naphtelenemethonol as a marker for micelle formation. *Anal. Sci.*, 14, (1998), 379-382.
93. Khaledi, M.G., Micelles as separation media in high-performance liquid chromatography and high-performance capillary electrophoresis: overview and perspective. *J. Chrom. A*, 780, (1997), 3-40.
94. Lin, C.E., Determination of critical micelle concentration of surfactants by capillary electrophoresis. *J. Chrom. A*, 1037, (2004), 467-478.
95. Bayrak, Y., Micelle formation in sodium dodecyl sulphate and dodecyltrimethylammonium bromide at different tempratures. *Turk J. Chem.* 27, (2003), 487-492.
96. Geçgil, Ş., *Farmasötik Teknolojiye Başlangıç*. Cihan Matbaacılık, İstanbul, (1991).

97. Taverniers, I., Loose, M.D., Bockstaele, E.V., Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. Trends in Anal. Chem., 23, (2004), 535-552.
98. Sümbüloğlu, K., Sümbüloğlu, V., Biyoistatistik. Hatiboğlu Yayınları, 10. Baskı, Ankara, (2002), 48-152.
99. Alpar, R., Spor bilimlerinde uygulamalı istatistik. 2. Baskı, Nobel yayın dağıtım, Ankara, (2001), 155-169.
100. Altria, K.D., McLean, R., Development and optimization of a generic micellar electrokinetic capillary chromatography method to support analysis of a wide range of pharmaceuticals and excipients. J. Pharm. Biomed. Anal. 18, (1998), 807-813.
101. Nishi, H., Pharmaceutical applications of micelles in chromatography and electrophoresis. J. Chrom. A, 780, (1997), 243-264.
102. Ermer, J., Ploss, H.J., Validation in pharmaceutical analysis Part II: central importance of precision to establish acceptance criteria and for verifying and improving the quality of analytical data. J. Pharm. Biomed. Anal. 37, (2005), 859-870.

EKLER

EK 1. İstatistiksel Katsayıların Hesaplanması

Bağıl Standart Sapma Hesaplanması

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

SS: Standart Sapma

$\bar{X}$: Aritmetik ortalama

% Bağıl Hata Hesaplanması

$$\% \text{ Bağıl Hata (\%BH)} = \frac{(\text{Olmaması gereken miktar} - \text{Bulunan miktar})}{\text{Olmaması gereken miktar}} \times 100$$

Standart Hata Hesaplanması

$$\text{Standart Hata (SH)} = \frac{SS}{\sqrt{n}}$$

SS: Standart sapma

n : Ölçüm sayısı

%Geri Kazanım Hesaplanması

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

Evren Ortalaması Güven Aralığının Hesaplanması

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

μ : Evren ortalaması

$\bar{X}$: Örneklem ortalaması

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

t : Seçilen yanılma düzeyi (α) ve n-1 serbestlik derecesindeki t tablosundaki değer.

EK 2. Tez İçinde Kullanılan İstatistiksel Testler

Korelasyon Katsayısı Önem Kontrolü

Bu test ile bulunan korelasyon katsayısının önemli bir katsayı mı yoksa tesadüfe bağlı bir katsayı mı olduğu anlaşılmaktadır.

Testin yapılışı şu şekildedir:

1. H_0 : Korelasyon katsayısı tesadüfe bağlı bir değerdir ($r=0$).
2. Test istatistiğinin hesaplanması:

$$T = \frac{r}{S_r} \qquad S_r = \sqrt{\frac{1-r^2}{n-2}}$$

T: Test istatistiği,

r: Korelasyon katsayısı,

S_r : Korelasyon katsayısının standart hatası.

3. Yanılma olasılığı $\alpha=0,05$ seçilmiştir.
4. Serbestlik derecesi= $n-2$ (n: Ölçüm sayısı)
5. $\alpha=0,05$ yanılma düzeyinde ve $n-2$ serbestlik derecesindeki tablo t değerine bakılır.
6. Karşılaştırma: Hesapla bulunan t değeri tablo t değerinden büyükse H_0 reddedilir, küçükse kabul edilir.
7. Karar: a) Korelasyon katsayısı önemli bir değerdir, tesadüfen bulunmuş bir değer değildir (t=hesaplanan değer, $p<0,05$).
b) Korelasyon katsayısı önemli bir değer değildir, tesadüfen bulunmuş bir değerdir (t=hesaplanan değer, $p>0,05$)

Doğrusallıktan Ayrılış Önem Kontrolü

1. Kareler toplamı bulunur:

a) Regresyon Kareler Toplamı (RKT):

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

b) Y Ortalamadan Ayrılış Kareler Toplamı (YOAKT):

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

c) Regresyondan Ayrılış Kareler Toplamı (RAKT) hesaplanır:

$$RAKT = YOAKT - RKT$$

2. Serbestlik dereceleri bulunur:

a) Regresyon Serbestlik Derecesi (RSD) = 1

b) Y Ortalamadan Ayrılış Serbestlik Derecesi (YOASD) = n-1

c) Regresyondan Ayrılış Serbestlik Derecesi (RASD) = YOASD - YSD

3. Kareler ortalamaları bulunur:

a) Regresyon Kareler Ortalaması = RKT / RSD

b) Regresyondan Ayrılış Kareler Ortalaması (RAKO) = RAKT / RASD

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

5. Yanılma olasılığı $\alpha=0,05$ seçilmiştir.

6. $F=RKO / RAKO$

7. $p=0,05$ düzeyinde RSD ve RASD serbestlik derecelerindeki tablo F değerleri bulunur.

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

9. Karar: a) Derişim ile dedektör cevabı arasındaki ilişki doğrusaldır

(F =Hesaplanan değer, $p<0,05$).

b) Derişim ile dedektör cevabı arasındaki ilişki doğrusal değildir

(F =Hesaplanan değer, $p>0,05$).

Kesişimin Sıfırdan Ayrılışının Önem Kontrolü

$y = a + bx$ denklemindeki bir doğrudaki "a" kesişimi verir.

$$1. \quad S_{yx} = \frac{\sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n}}{n-1} \sqrt{\left[\frac{(1-r)^2(n-1)}{n-2} \right]}$$

$$2. \quad SH_{(a)} = \sqrt{S_{yx}^2 \left[\frac{1}{n} + \frac{(\bar{x})^2}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}} \right]}$$

3. H_0 = Kesişim değeri (a) sıfırdan farklıdır ($a \neq 0$).

4. Yanılma olasılığı $\alpha=0,05$ seçilmiştir.

6. Hesaplanan t değeri: $t_H = a / SH_{(a)}$

7. $p=0,05$ ve $n-2$ serbestlik derecesinde tablo t değerleri (t_T) bulunur.

8. Karşılaştırma: H_0 hipotezi, $t_H > t_T$ ise reddedilir, $t_H < t_T$ ise kabul edilir.

9. Karar: a) Kesişimin değeri sıfıra eşittir (t_H =Hesaplanan değer, $p < 0,05$).

b) Kesişimin değeri sıfırdan farklıdır (t_H =Hesaplanan değer, $p > 0,05$).

Wilcoxon Eşleştirilmiş İki Örnek Testi

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

H_0 = İki yöntemle elde edilen sonuçlar arasında fark yoktur.

$\alpha = 0,05$ yanılma düzeyi seçilmiştir.

Test istatistiğinin hesaplanması:

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

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

Karar:

- a) $T_H > T_t$ ise iki yöntemle elde edilen sonuçlar arasında fark yoktur (T_H = Hesaplanan T değeri, $p < 0,05$)
- b) $T_H < T_t$ ise iki yöntemle elde edilen sonuçlar arasında fark vardır (T_H = Hesaplanan T değeri, $p > 0,05$)

Kruskal Wallis Varyans Analizi

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

Test işlemleri:

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

Test istatistiğinin (KW) hesaplanması:

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

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

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

k : Grup sayısı;

n : Toplam denek sayısı.

H_0 = İki yöntemle elde edilen sonuçlar arasında fark yoktur.

$\alpha=0,05$ yanılma düzeyi için (grup sayısı – 1) serbestlik derecesindeki tablo değerine (KW_T) bakılır.

Karar: $KW_T > KW$ ise H_0 hipotezi kabul edilir.

$KW > KW_T$ ise H_0 hipotezi reddedilir.

EK 3. Yazarın Özgeçmişı***Ecz. Deniz EMRE***

Kişisel Bilgiler	<i>Memleket</i>	: Balıkesir, Ayvalık
	<i>Doğum Yılı</i>	: 1980
	<i>Medeni durum</i>	: Evli

Eğitim	<i>Lisans</i>	: Hacettepe Üni. Eczacılık Fak. (2002)
	<i>Lise</i>	: Çanakkale Fen Lis., İzmir Bornova M. Kemal Lis. (1998)
	<i>Ortaokul</i>	: Balıkesir Sırrı Yırcalı Anadolu Lis. (1995)
	<i>İlkokul</i>	: Ayvalık Sakarya İlkokulu (1991)

Yabancı Dil		: İngilizce
-------------	--	-------------

İş Deneyimi	<i>Araştırma Görevlisi</i>	: Hacettepe Üni. Eczacılık Fak. Analitik Kimya Anabilim Dalı, 2002-2004.
	<i>Hastane Eczacısı</i>	: Kayseri Yahyalı Devlet Hastanesi, 2004-2005.
	<i>Eczane Eczacısı</i>	: Kayseri Yahyalı, Şükran Eczaanesi, 2005- (devam ediyor).

Özel İlgi Alanları		: Temel bilimler, Bilişim teknolojisi, Dalgıçlık.
--------------------	--	---
