



**DENEYSEL TASARIM UYGULANARAK YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI
KROMATOĞRAFİSİ İLE HİDROKORTİZON TAYİNİ VE GEÇERLİ
KILINMASI**

Gülay ÇETİN TARLA

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

TEMMUZ 2024

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Gülay ÇETİN TARLA

17/07/2024

DENEYSEL TASARIM UYGULANARAK YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ İLE HİDROKORTİZON TAYİNİ VE GEÇERLİ KILINMASI

(Yüksek Lisans Tezi)

Gülay ÇETİN TARLA

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Temmuz 2024

ÖZET

Bu tezde kortikosteroid tedavisinde kullanılan ilaçlarda bulunan Hidrokortizon etkin maddesinin analizi için deneysel tasarım yöntemi ile HPLC sistemde analitik yöntem geliştirilerek validasyon süreçleri tamamlandı. Etkin maddelerin kromatografik şartlarda ayrılması için çeşitli çözücü sistemlerinde analiz denemeleri gerçekleştirildi. Devamında deneysel tasarım yöntemi ile analiz şartları optimize edildi. Deneysel tasarım ile optimizasyonda faktör olarak; akış hızı, hareketli faz pH değeri, hareketli faz organik oranı ve kolon sıcaklığı kullanıldı. Bu faktörlerin ve birbirleri ile olan etkileşimlerin, HPLC kromatogramında elde edilen hidrokortizon pikinin alan değeri ve teorik plaka sayısı üzerine etkileri incelendi. İncelemede 4 faktör için Merkezi Kompozit Tasarımı kullanıldı. Her faktör için 5 seviye belirlendi. Bu seviyeler akış hızı için 0,7-0,8-0,9-1,0-1,1 mL/min hareketli faz pH değeri için 2,0-2,5-3,0-3,5-4,0 hareketli faz organik oranı yüzdesi için 60-65-70-75-80 % (h:h) kolon sıcaklığı için 20-25-30-35-40°C olarak belirlendi. Faktörlerin en düşük seviyeleri için - α , düşük seviyeleri için -1 orta seviyeleri için 0 ve yüksek seviyeleri için +1 en yüksek seviyeleri için α işareti kullanıldı. Toplamda 31 deney gerçekleştirildi. Elde edilen deney sonuçlarının değerlendirilmesi için regresyon analizi yapıldı. Sonuçların güvenilirliğini kontrol etmek için ANOVA yapıldı. Elde edilen verilere göre bir model oluşturuldu. Oluşturulan model kullanılarak pik alan değerleri kaydedildi. Bu değerlerle deneysel olarak bulunan değerler arasındaki ilişki incelendi. İncelemede regresyon katsayısı 0,9998 olarak bulundu. Ve modelin uygun olduğuna karar verildi. Geliştirilen model kullanıldığında, hidrokortizonun HPLC ile analizi için optimum koşullar; akış hızı 0,7 mL/min, kolon sıcaklığı 37,5°C, hareketli faz pH değeri 4,0 ve hareketli faz bileşimi metanol/su 80/20 olarak bulundu. Hidrokortizon pik kromatogramları, deneysel tasarım ile tespit edilen optimum koşullarda, 254 nm de UV ve PDA dedektör ile elde edildi. Geliştirilen yöntemin, seçicilik, sistem uygunluk, doğrusalılık, çalışma aralığı doğruluk (geri kazanım), kesinlik (tekrarlanabilirlik, laboratuvar içi kesinlik), sağlamlık ve çözelti stabilitesi parametreleri incelenerek analitik yöntem validasyonu yapıldı.

Bilim Kodu : 20102

Anahtar Kelimeler : Deneysel tasarım, hidrokortizon, HPLC, validasyon

Sayfa Adedi : 85

Danışman : Prof. Dr. Özcan YALÇINKAYA

DETERMINATION AND VALIDATION OF HYDROCORTISON BY HIGH
PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY USING EXPERIMENTAL DESIGN
(M. Sc. Thesis)

G lay  ET N TARLA

GAZ  UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
July 2024

ABSTRACT

In this thesis, an analytical method was developed and validated using an experimental design approach for the determination of Hydrocortisone in drugs utilized in corticosteroid therapy via High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). Various solvent systems were evaluated to achieve optimal chromatographic separation of the active ingredient. Subsequently, experimental design methodologies were employed to optimize the analysis conditions. The factors considered for optimization included flow rate, mobile phase pH, organic ratio of the mobile phase, and column temperature. The effects of these factors and their interactions on the peak area and theoretical plate number of the hydrocortisone peak in the HPLC chromatogram were examined using a Central Composite Design. Five levels were established for each factor: flow rate (0.7-0.8-0.9-1.0-1.1 mL/min), mobile phase pH (2.0-2.5-3.0-3.5-4.0), organic ratio of the mobile phase (60-65-70-75-80% v/v), and column temperature (20-25-30-35-40 C). The factor levels were denoted as $-\alpha$ for the lowest, -1 for low, 0 for medium, $+1$ for high, and α for the highest levels. A total of 31 experiments were conducted. Regression analysis was performed to evaluate the experimental results, and ANOVA was utilized to assess the reliability of the findings. Based on the collected data, a model was constructed. Using this model, peak area values were recorded and compared with experimentally obtained values. The regression coefficient was determined to be 0.9998, indicating the model's suitability. The optimal HPLC conditions for hydrocortisone analysis were identified as a flow rate of 0.7 mL/min, column temperature of 37.5 C, mobile phase pH of 4.0, and a mobile phase composition of methanol/water at 80/20. Chromatograms of hydrocortisone peaks were obtained at 254 nm using UV and PDA detectors under these optimized conditions. The developed method was subjected to validation by examining parameters such as selectivity, system suitability, linearity, operating range, accuracy (recovery), precision (repeatability, in-laboratory precision), robustness and solution stability.

Science Code : 20102

Key Words : Experimental design, hydrocortisone, HPLC, validation

Page Number : 85

Supervisor : Prof. Dr.  zcan YALÇINKAYA

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez sürecimde bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösteren değerli danışmanım Sayın. Prof. Dr. Özcan YALÇINKAYA'ya ve tüm yardımları için Öğr. Gör. Dr. Berat ÇINAR ACAR'a öncelikli teşekkürlerimi sunmak isterim.

Ve tabi ki ailem... Koşulsuz sevgiyle tüm stresimi ve sıkıntımı göğsünde yumuşatan; hayatımı güzelleştiren annecim Elveda ÇETİN ve babacım Yüksel ÇETİN... En yakınlarım, kardeşlerim Tuba Nur ÇETİN ve Muhammet Ali ÇETİN... Bu tezin hazırlanmasında hoşgörüsü ve destekleyici tutumu ile hayatımı kolaylaştırmak için elinden gelen her şeyi yapan, beni her zaman cesaretlendiren, yol arkadaşım, sevgili eşim Harun TARLA... Hayattaki en büyük şanslısınız, sevgi ve şefkatiniz için sonsuz teşekkürler. Son olarak, en büyük fedakarlığı yapan, kıymetlim, ilham kaynağım, güzel kızım Pera TARLA'm... Daha karnımdayken stresini yaşadığım bu süreç ve tez, sana armağan olsun canım kızım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Deneysel Tasarım	5
2.1.1. Tanımı	5
2.1.2. Önemi	6
2.1.3. Tarama tasarımları.....	7
2.1.4. Optimizasyon tasarımları	12
2.1.5. Varyans analizi	15
2.1.6. Deneysel tasarımın analitik kimyada uygulamaları	16
2.2. Validasyon	17
2.2.1. Validasyon ve önemi	17
2.2.2. Validasyon türleri ve seviyeleri.....	18
2.2.3. Analitik yöntem validasyonu.....	19
2.2.4. Validasyon ile ilgili bazı örnekler	27
2.3. Çalışılacak İlaç Etkin Madde.....	29
2.3.1. Kimyasal yapı ve özellikleri.....	29
2.3.2. Farmakolojik özellikleri	30

	Sayfa
2.3.3. Analiz yöntemleri	30
3. MATERYAL METOT	33
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	33
3.2. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	33
3.3. Kullanılan Cihazlar	33
3.4. HPLC ile Analiz.....	34
3.4.1. Deneysel tasarım ile optimizasyon.....	34
3.4.2. Validasyon.....	34
3.4.3. Örnek analizi	37
4. BULGULAR	39
4.1. Kromatografik Şartların Belirlenmesi ve Deneysel Tasarım ile Optimizasyon.....	39
4.2. Validasyon	59
4.2.1. Seçicilik.....	59
4.2.2. Sistem uygunluğu	63
4.2.3. Doğrusallık	64
4.2.4 Gözlenebilme ve tayin sınırı.....	65
4.2.5. Çalışma aralığı.....	66
4.2.6. Doğruluk.....	66
4.2.7. Kesinlik	67
4.2.8. Sağlamlık.....	70
4.2.9. Stabilite.....	70
4.3. Örnek Analizi.....	71
5. SONUÇ	73
KAYNAKLAR	75
ÖZGEÇMİŞ	85

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. 3 Faktör için tam faktöriyel tasarım.....	8
Çizelge 2.2. 5 Faktör için kısmi faktöriyel tasarım.....	10
Çizelge 2.3. $2^{(6-2)}$ 16 deney için fraksiyonlu faktöriyel tasarım	10
Çizelge 2.4. Plackett-Burman tasarımı için üreticiler	11
Çizelge 2.5. 11 Faktör için Plackett-Burman tasarımı	11
Çizelge 2.6. 3 Faktör için merkezi kompozit tasarımı	13
Çizelge 2.7. 3 Faktör için Box-Behnken tasarımı.....	14
Çizelge 2.8. 3 Faktör için Doehlert tasarımı	14
Çizelge 2.9. Literatürde kayıtlı bazı deneysel tasarım uygulamalı çalışmalar	16
Çizelge 2.10. Analiz türüne göre çalışma limitleri	24
Çizelge 2.11. Literatürde kayıtlı bazı validasyon örnekleri	27
Çizelge 2.12. FDA farmakolojik sınıflandırması.....	30
Çizelge 2.13. Kromatografik yöntemler ile Hidrokortizon tayinine yönelik çalışmalar	31
Çizelge 2.14. Diğer yöntemler ile Hidrokortizon tayinine yönelik çalışmalar	31
Çizelge 3.1. Faktörler ve seviyeleri	34
Çizelge 4.1. Hidrokortizon'un HPLC cihazı ile tayininde analitik koşullara ait dört bağımsız değişkenle CCD modeline göre oluşturulan deney tasarımı.....	39
Çizelge 4.2. Hidrokortizonun HPLC cihazı ile tayininde analitik koşullara ait dört bağımsız değişkenin regresyon modelinin ANOVA sonuç tablosu.....	40
Çizelge 4.3. Hidrokortizonun HPLC cihazı ile tayininde analitik koşullara ait dört bağımsız değişkenlerin pik alanı regresyon analizine ait katsayılar, t ve P değerleri.....	42
Çizelge 4.4. Hidrokortizonun HPLC cihazı ile tayininde analitik koşullarından teorik plaka sayısına ait dört bağımsız değişkenle CCD modeline göre oluşturulan deney tasarımı.....	48
Çizelge 4.5. Hidrokortizonun HPLC cihazı ile tayininde analitik koşullara ait dört bağımsız değişkenin regresyon modelinin ANOVA sonuç tablosu.....	49

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.6. Hidrokortizonun HPLC cihazı ile tayininde analitik koşullara ait dört bağımsız değişkenlerin teorik plaka sayısı regresyon analizine ait katsayılar, t ve P değerleri	51
Çizelge 4.7. Optimizasyon çalışması analiz sonuçları.....	58
Çizelge 4.8. Seçicilik analiz sonuçları	63
Çizelge 4.9. Sistem uygunluğu analiz sonuçları	64
Çizelge 4.10. Doğrusallık analiz sonuçları	64
Çizelge 4.11. Kalibrasyon eğrisi değerleri.....	65
Çizelge 4.12. LOD ve LOQ analiz sonuçları.....	66
Çizelge 4.13. Doğruluk analiz sonuçları.....	66
Çizelge 4.14. Doğruluk saptanan içerik.....	67
Çizelge 4.15. Sistem kesinliği analiz sonuçları	67
Çizelge 4.16. Tekrarlanabilirlik analiz sonuçları.....	68
Çizelge 4.17. Ara kesinlik analiz sonuçları	69
Çizelge 4.18. Tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik analiz sonuç kıyaslaması	69
Çizelge 4.19. Sağlamlık analiz sonuçları.....	70
Çizelge 4.20. Standart çözelti stabilitesi analiz sonuçları.....	71
Çizelge 4.21. Numune çözelti stabilitesi analiz sonuçları	71
Çizelge 4.22. Hidrokortizon miktar tayini analiz sonuçları.....	71
Çizelge 4.23. Miktar tayini analiz sonuçlarının etiket değeri kıyaslamaları.....	72

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Gözlenebilme sınırı (LOD), tayin sınırı (LOQ) ve doğrusallık limiti (LOL) gösteren kalibrasyon eğrisi grafiği.....	23
Şekil 4.1. Deneysel sonuçlar ile öngörülen sonuçlar arasındaki ilişki.....	40
Şekil 4.2. Hidrokortizonun HPLC cihazı ile tayininde ana parametrelerin pik alanı üzerine tekli etkileri.....	42
Şekil 4.3. Hidrokortizonun HPLC cihazı ile tayininde pik alanı üzerine pH ve kolon sıcaklığın etkisi.....	44
Şekil 4.4. Hidrokortizonun HPLC cihazı ile tayininde pik alanı üzerine pH ve akış hızının etkisi.....	45
Şekil 4.5. Hidrokortizonun HPLC cihazı ile tayininde pik alanı üzerine pH ve mobil faz organik madde yüzdesinin etkisi.....	45
Şekil 4.6. Hidrokortizonun HPLC cihazı ile tayininde pik alanı üzerine kolon sıcaklığı ve akış hızının etkisi.....	46
Şekil 4.7. Hidrokortizonun HPLC cihazı ile tayininde pik alanı üzerine kolon sıcaklığı ve mobil faz organik madde yüzdesinin etkisi.....	47
Şekil 4.8. Hidrokortizonun HPLC cihazı ile tayininde pik alanı üzerine akış hızı ve mobil faz organik madde yüzdesinin etkisi.....	47
Şekil 4.9. Hidrokortizonun HPLC cihazı ile tayininde pik alanı değerlendirmelerine göre belirlenen optimum analiz koşulları.....	48
Şekil 4.10. Deneysel sonuçlar ile öngörülen sonuçlar arasındaki ilişki.....	49
Şekil 4.11. Hidrokortizonun HPLC cihazı ile tayininde ana parametrelerin teorik plaka sayısı üzerine tekli etkileri.....	51
Şekil 4.12. Hidrokortizonun HPLC cihazı ile tayininde teorik plaka sayısı üzerine pH ve kolon sıcaklığın etkisi.....	53
Şekil 4.13. Hidrokortizonun HPLC cihazı ile tayininde teorik plaka sayısı üzerine pH ve akış hızının etkisi.....	54
Şekil 4.14. Hidrokortizonun HPLC cihazı ile tayininde teorik plaka sayısı üzerine pH ve mobil faz organik madde yüzdesinin etkisi.....	54
Şekil 4.15. Hidrokortizonun HPLC cihazı ile tayininde teorik plaka sayısı üzerine kolon sıcaklığı ve akış hızının etkisi.....	55

Şekil	Sayfa
Şekil 4.16. Hidrokortizonun HPLC cihazı ile tayininde teorik plaka sayısı üzerine kolon sıcaklığı ve mobil faz organik madde yüzdesinin etkisi	56
Şekil 4.17. Hidrokortizonun HPLC cihazı ile tayininde teorik plaka sayısı üzerine akış hızı ve mobil faz organik madde yüzdesinin etkisi.....	56
Şekil 4.18. Hidrokortizonun HPLC cihazı ile tayininde teorik plaka değerlendirmelerine göre belirlenen optimum analiz koşulları	57
Şekil 4.19. Hidrokortizonun HPLC cihazı ile tayini için dört bağımsız değişkenle CCD modeline göre parametrelerin optimum değerleri	58
Şekil 4.20. Kör çözelti kromatogramı.....	59
Şekil 4.21. Kör çözelti 3D kromatogramı.....	60
Şekil 4.22. Plasebo çözeltisi kromatogramı.....	60
Şekil 4.23. Plasebo çözeltisi 3D kromatogramı	60
Şekil 4.24. Standart çözeltisi kromatogramı	61
Şekil 4.25. Standart çözeltisi purity plot kromatogramı	61
Şekil 4.26. Standart çözeltisi 3D kromatogramı	61
Şekil 4.27. Numune çözeltisi kromatogramı.....	62
Şekil 4.28. Numune çözeltisi purity plot kromatogramı.....	62
Şekil 4.29. Numune çözeltisi 3D kromatogramı.....	62
Şekil 4.30. Kalibrasyon Eğrisi	65

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklamalar
% RSD	Bağıl Standart Sapma
%	Yüzde
°C	Santigrad Derece
A	Farklı Tasarımlardaki Seviye
h	Hacim
k	Etken Sayısı
M	Mililitre
mg	Miligram
min	Mililitre
mL	Mililitre
N	Faktör Sayısı
N	Normal
T	Transpoze
X	Faktör
x	Tasarım Noktalarının Matrisi
Xort	Ortalama Değer

Kısaltmalar	Açıklamalar
AAS	Atomik Absorbsiyon Spektroskopisi
ACN	Asetonitril
AES	Atomik Emisyon Spektroskopisi
ANOVA	Varyans Analizi
CDD	Merkezi Kompozit Tasarım
DAD	Diyot Dedektörü
DAD	Diyot Dizisi Dedektörü
EMA	Avrupa İlaç Ajansı

Kısaltmalar	Açıklamalar
EP	Avrupa Farmakopesi
FDA	ABD Gıda ve İlaç İdaresi
FTIR	Fourier Dönüşümlü İnfrared Spektrometresi
GC	Gaz Kromatografisi
GMP	İyi Üretim Uygulamaları
H₂O₂	Hidrojen Peroksit
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
ICH	Uluslararası Uyumlandırma Konferansı
IDMS	İzotop Seyreltme Kütle Spektrometresi
LC	Sıvı Kromatografisi
LOD	Gözlenebilme Sınırı
LOQ	Tayin Sınırı
MeOH	Metanol
MS	Kütle Dedektörü
PDA	Fotodiyot Dizisi
RSD	Bağıl Standart Sapma
RSM	Tepki Yüzeyi Modellemesi
SPME	Katı Faz Mikroekstraksiyon
TLC	İnce Tabaka Kromatografisi
UHPLC	Ultra Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
USP	Amerika Birleşik Devletleri Farmakopesi
UV	Ultraviyole
VIS	Görünür

1. GİRİŞ

Literatür özeti

İlaç üretiminde ilaç etkin maddesine ilave olarak, renk, koku ve tat vermek, etkin madde stabilitesini sağlamak, estetik bir görünüş veya kullanım kolaylığı sağlamak gibi amaçlarla çeşitli yardımcı maddeler kullanılmaktadır. Yardımcı maddelerin yararı kullanım miktarlarına ve kalite özelliklerine de bağlı olduğundan insan sağlığına olan etkileri oldukça önemlidir. Bu nedenle ilaç etkin maddesinin ve yardımcı maddelerin bir arada analizi ilaç güvenliğinin, kalitesinin ve insan sağlığına olabilecek etkileri açısından oldukça önemlidir. Bu durum kesin, tekrarlı veriler üretebilen hızlı ve yüksek performanslı analiz yöntemlerinin geliştirilmesini gerektirmektedir. Hidrokortizon 100 mg/mL intravenöz enjeksiyon ve intravönöz infüzyon için liyofilize toz içeren flakon örneğinin analizinde ön işlemsiz karışımları ayırma ve tespit edebilme kabiliyetinin yanı sıra seçici ve hızlı olmasından dolayı HPLC en çok tercih edilen ve kullanılan yöntem olmuştur.

Bu çalışmada kortikosteroid tedavisinde kullanılan “Hidrokortizon 100 mg/mL intravenöz enjeksiyon ve intravönöz infüzyon için liyofilize toz içeren flakon” ilaç ürünü kullanıldı. İlaç içeriğini oluşturan etkin maddenin tek başına ya da diğer maddelerle birlikte analizine yönelik HPLC başta olmak üzere diğer birçok yöntem literatürde bulunmaktadır. Hidrokortizon, ilaç olarak verildiğinde kortizol hormonunun adıdır. İlaç örneklerindeki hidrokortizonun HPLC ile analizlerinde [1-14], UV, PDA, MS/MS, dedektörleri kullanılmıştır. HPLC dışında spektrofotometri [15-17], kolorimetri [18], TLC [19, 20], FTIR / FT-Raman [21] yöntemleri ile yapılmış çalışmalar da bulunmaktadır.

Yöntem geliştirme ve optimizasyon çalışmalarında, son yıllarda sıkça başvurulanan yöntemlerden biri de deneysel tasarım yöntemleridir. Bir deneysel çalışmada, deneyin performansını etkileyen parametrelerin doğru bir şekilde belirlenmesi ve bu parametrelerin kontrolü, güvenilir ve kesin sonuçların elde edilmesi açısından büyük önem taşır.

Yapılan deney çalışmalarında analiz sonuçlarını etkileyebilecek herhangi bir analitik parametre faktör olarak tanımlanır. Optimizasyon süreci ile faktörlere ait en uygun değerler tespit edilir. Deneysel tasarım yöntemleri, analitik kimyada optimum analiz koşullarının belirlenmesinde sıklıkla kullanılmaktadır. Klasik yöntemler ile optimizasyon süreçlerinde

faktörlere ait optimum değerler tespit edilirken, bir faktörün değeri değiştirilirken diğer tüm faktörler sabit tutularak çalışma yapılmaktadır. Bu tarz bir çalışmada incelenen faktör sayısının arttığı durumlarda incelenmesi gereken deney sayısı artmaktadır. Artan deney sayısı ile toplam süre ve maliyette artış yaşanmaktadır. Deneysel tasarım yöntemi faktörlerin etkisini tek tek incelemek yerine eş zamanlı incelemeye olanak sağladığından optimizasyonda deney sayısı, süre ve maliyet azalmaktadır. Deneysel tasarım ile faktörlerin bireysel etkilerinin yanında birbirleri ile olan etkileşimleri ve bu etkileşimlerin sonuca etkisi de incelenmektedir. Böylelikle deneysel tasarım yöntemi ile yapılan çalışmalarda klasik yöntemlere göre daha güvenilir sonuçlar elde edilmektedir [22-59].

Validasyon, üretim süreçleri için aynı şartlarda üretim yapıldığında aynı kalitede ürün eldesi sağlamak amacıyla, analiz süreçleri için yapılan çalışmanın belirlenen koşullar altında gerçekleştirildiğinde kesin, doğru ve tekrarlanabilir sonuçlar elde edileceğinin temin edilmesi için yürütülen çalışmalardır. Bu amaçla ilaç üretim prosesleri, etkin madde veya ürün analizlerinde kullanılacak olan tüm analitik yöntemler valide edilir. Analitik yöntem validasyonu, yeni bir analiz yöntemi geliştirildiğinde veya mevcut bir yöntemi değiştirdiğimizde, bu yöntemin güvenilirliğini ve doğruluğunu kanıtlamak için gerçekleştirilir. Bu süreç, yöntemin kantitatif (nicel) ve kalitatif (nitel) olarak doğru sonuçlar üretip üretmediğini belirlemeyi amaçlar. Bu, analiz yöntemlerinin güvenilirliğini sağlamak ve sonuçların güvenilirliğini artırmak için kritik bir adımdır.

Analitik yöntem validasyonu için uluslararası ve ulusal düzeyde birçok kuruluş tarafından belirlenmiş parametreler bulunmaktadır. Uluslararası düzeyde, analitik yöntem validasyonu için genellikle ICH, USP, EP, ve diğer ilgili kuruluşların kılavuzlarına başvurulur. Bu kılavuzlar, analitik yöntem validasyonu için gereken adımları, kabul edilebilir kriterleri ve uygun test prosedürlerini belirleyerek düzenleyici gerekliliklere uyum sağlanması açısından önemlidir. Seçicilik-spesifiklik, doğrusalılık, çalışma aralığı, doğruluk (geri kazanım), kesinlik (tekrarlanabilirlik, laboratuvar içi kesinlik), sağlamlık, gözlenebilme sınırı, tayin sınırı, çözelti stabilitesi ve stres testi olarak belirlenen bu parametreler incelenerek geliştirilen yöntemin validasyonu gerçekleştirilir. Literatür de çeşitli örneklerin HPLC ile analiz edildiği ve validasyon uygulamalarının yapıldığı birçok çalışma yer almaktadır [8, 60-76].

Tezin amacı

Bu tez çalışmasında böbrek üstü bezlerindeki problemlere bağlı olarak vücudun yeterli kortikosteroid üretmemesi durumunda (Primer veya sekonder adrenokortikal yetmezlik) kullanılan ilaçlarda bulunan hidrokortizonun analizi için HPLC yöntemi geliştirilmesi, deneysel tasarım yöntemi kullanılarak optimum koşulların belirlenmesi, geliştirilen yöntemin geçerli kılınması ve etkin maddeyi içeren intravenöz enjeksiyon/intravönöz infüzyon için liyofilize toz içeren flakon dozaj formlarına uygulanması amaçlanmıştır.

Hipotez

HPLC yöntemi ile geliştirilecek olan hidrokortizon etkin madde miktar tayini analiz yönteminin liyofilize toz ve farklı matrisler de içeren diğer farmasötik formlara kolaylıkla uygulanabileceği düşünülmektedir. Aynı zamanda optimum kromatografik şartların deneysel tasarım yoluyla tespit edilmesiyle oluşturulan bu yeni yöntemin, geleneksel yöntemlere kıyasla daha az enjeksiyon ve çözelti kullanımı gerektirerek, zaman ve maliyet tasarrufu sağlaması ve çevre dostu bir alternatif sunması beklenmektedir. Ayrıca Deneysel tasarım kullanımı, deney üzerinde etkili olan tüm faktörlerin hem kendi içlerinde hem de birbirleriyle olan etkileşimlerini detaylı bir şekilde inceleyerek, klasik yöntemlerle yapılan optimizasyondan daha kesin sonuçlar alınmasını sağlayacak bir yaklaşım olarak değerlendirilmektedir.

Hidrokortizon 100 mg/mL intravenöz enjeksiyon ve intravönöz infüzyon için liyofilize toz içeren flakon ürünün acil müdahale tedavisinde uzman tıbbi personel tarafından damar içi uygulamada kullanılıyor olması analiz süreçlerinin güvenilirliği, tekrarlanabilirliği, doğruluğu ve analiz sonuçlarının kesinliğinin önemini artırmaktadır. Bu önemde bir ilacın analitik yöntem geliştirme aşamalarının deneysel tasarım ile desteklenmesi ve geçerli kılınması kalite kontrol laboratuvarlarında hidrokortizon etkin maddesinin rutin analiz süreçlerine güvenilir bir yol olarak önerilebileceği ve böylelikle bilim ve ilaç sanayine katkı sağlayacağı düşünülmektedir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Deneysel Tasarım

2.1.1. Tanımı

Günümüz analistleri, deneylerden daha etkili sonuçlar alabilmek adına, bu deneylerin sistematik bir biçimde planlanmasının zorunlu olduğunu kabul etmekte ve bu planlama sürecinde istatistiksel ve kemometrik tekniklerden yararlanmaktadırlar.

Deneylerde, sonuçları etkileyebilecek her türlü koşul faktör olarak nitelendirilir. Bu faktörler, araştırmacının müdahale edebildiği kontrol edilebilir faktörler ve müdahale edemediği kontrol edilemeyen faktörler olmak üzere iki türde olabilir. Örnek olarak; bir araştırmacının çözeltinin saklama koşullarını ayarlayabilmesi bu durumu kontrol edilebilir bir faktör yaparken, rastgele örnekleme gibi ögeler, araştırmacının etki alanı dışında kaldığı için kontrol edilemeyen faktörler arasında yer alır. Sayısal bir ölçüm olmadığı durumlarda, bu faktörler her ikisi de nitel faktörler olarak kabul edilir. Sıcaklık, pH ve derişim gibi sayısal olarak belirlenebilen faktörler ise nicel faktörler olarak adlandırılır. Bir faktörün çeşitli değerleri ise farklı düzeyler olarak tanımlanmaktadır.

Bir deneyin doğru sonuçlar üretmesi için sonucu etkileyen faktörlerin belirlenmesi ve mümkünse kontrol edilmesi önemlidir. Analitik teknikler genellikle çok küçük miktarlardaki maddelerin analizi ile ilgilenir, bu nedenle cevabı en yüksek hassasiyette olacak şekilde bağlı olduğu faktörlerin sayısal değerleri belirlenmelidir. Bu değerlere "optimum değerler" denir.

Deneysel tasarım, deney koşullarının sistemli bir şekilde değiştirilmesiyle ölçülen cevaptaki değişimin incelenip yorumlanması için kullanılan istatistiksel bir yöntemdir [77].

Deneysel tasarım; tarama, optimizasyon ve modelleme olmak üzere üç aşamadan oluşur:

1. Tarama (Screening): Deneysel çalışmalar, sonuçları etkileyebilecek kritik faktörleri tespit etmek için gerçekleştirilir. Tarama aşaması, reaksiyon verimini etkileyen pH, derişim, sıcaklık gibi çeşitli değişkenler arasından hangilerinin önem taşıdığını, hangilerinin elimine edilebileceğini ve hangilerinin detaylı bir inceleme gerektirdiğinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilir. Tarama tasarımları, etkileşim etkileri yerine belirgin ana etkileri saptama yeteneği sayesinde, birçok

faktör içeren deneyleri değerlendirmek için tercih edilir. Bu tasarımlar aracılığıyla kritik faktörlerin belirlenmesi, sonraki aşama olan optimizasyon sürecine büyük katkı sağlar.

2. Optimizasyon: Tarama tasarımı tamamlandıktan sonra genellikle uygulanan yöntem optimizasyondur. Tarama yöntemiyle saptanan esas faktörlerin en uygun koşulları bulunmak üzere yapılır. Bu yaklaşım, deneyi yürüten araştırmacılara, faktörlerin deney üzerindeki etkileri hakkında ayrıntılı bilgiler sağlar ve en verimli sonuçları elde etmeye yarayan faktör kombinasyonlarını ortaya koyar. Özetle, bu tasarım, tüm olası faktör kombinasyonlarının tepki değerlerini tahmin ederek, ideal deney noktasını bulmaya yardımcı olur. Tepki Yüzeyi Modellemesi (RSM), önemli faktörler arasındaki etkileşimi ve hatta ikinci dereceden etkileri öngörmemize olanak tanır, böylece incelenen tepki yüzeyinin şekli hakkında bilgi ediniriz. RSM, istenen sonuçları elde etmek için tarama tasarımı ile bulunan faktörlerin optimum değerlerinin saptanması için kullanılmaktadır.
3. Modelleme: Tarama tasarımından elde edilen ve optimizasyon süreci sonrasında en uygun değerlere ulaşılan faktörlerin etkileri, bir matematiksel model aracılığıyla formüle edilir. Bu sayede, deneysel bulguların yanı sıra teorik hesaplamalarla da tahmin edilen sonuçlara ulaşılır. Deneysel sonuçların, teorik hesaplamalarla elde edilen tahminlerle uyumlu olması istenir [78].

2.1.2. Önemi

Geleneksel yöntemlerle, faktörlerin optimum değerleri genellikle diğer değerler sabitken yalnızca tek bir faktörün değiştirilmesiyle belirlenir. Aynı anda birden fazla değişkenin araştırılması durumunda, ilgili deney sayısı artmakta ve bu da kullanılan zamanın ve maliyetin artmasına neden olmaktadır. Deneysel tasarımda, istatistiksel bir yaklaşımla genellikle az sayıda seviye ile tüm faktörler aynı anda sistematik bir şekilde değiştirilir ve etkili faktörler tespit edilir. Sonrasında, belirlenen etkili faktörler ile farklı seviyelerde yine aynı anda sistematik bir şekilde değiştirilerek incelenir ve optimum değerler belirlenir. Bu nedenle klasik yöntemlere kıyasla, deneysel tasarım sayesinde daha az deney yaparak, daha az maliyet ile ve hızlı bir şekilde sonuca varılmaktadır. Deneysel tasarımın diğer bir kritik yararı da, klasik yaklaşımlarda yalnızca faktörlerin tekil etkilerinin değerlendirilmesine karşın, deneysel tasarımda faktörlerin hem kendi içlerindeki hem de birbirleriyle olan etkileşimlerinin ve bu etkileşimlerin sonuç üzerindeki etkisinin de analiz edilebilmesidir. Bu sayede, optimizasyon aşamasında elde edilen sonuçlar daha yüksek güvenilirlikte olmaktadır [79].

2.1.3. Tarama tasarımları

Bu yöntemler, deneysel çalışmalarda sonuçları etkileyebilecek kritik faktörleri tespit etmek amacıyla kullanılır. Tarama deneylerinde, az sayıda düzeydeki tüm faktörler, istatistiksel bir metodoloji kullanılarak eş zamanlı olarak değiştirilir. Bu değişikliklerin deney üzerindeki etkileri analiz edilir. Her faktörün deney üzerindeki etkisini belirlemek için sayısal veriler elde edilir. Elde edilen bu veriler, deney sonuçları üzerinde gerçekten etkili olan faktörleri saptamak için kullanılır.

Tarama sürecinde, genellikle faktöriyel ve Plackett-Burman tasarımları tercih edilir. Bu tasarımlar, deneylerde çok sayıda faktörün etkisini etkin bir şekilde değerlendirmek için kullanılır [80].

Faktöriyel tasarım

Deneysel tasarımın en sık uygulanan şeklidir. Bu yaklaşımda, deneydeki değişken faktörlerin etkisi, genellikle iki veya daha fazla seviyede incelenir. Faktöriyel tasarım, tam faktöriyel ve kısmi faktöriyel olmak üzere iki ana kategoriye ayrılır [81].

Tam faktöriyel tasarım

Tam faktöriyel tasarım, bir sonucu etkileyen değişkenlerin belirlenmesi ve bu değişkenlerin etkinlik derecesinin ölçülmesi için kullanılan, iki aşamalı bir tarama yöntemidir. Faktörler sayısının kısıtlı olduğu durumlarda bu yöntem oldukça faydalıdır. Bir deneysel tasarım çalışmasında, hangi faktörlerin dahil edileceği ve her bir faktör için kaç farklı seviyede inceleneceği kararlaştırılması kritik öneme sahiptir. Bu yöntemde deneyleri sayısı N^k formülü kullanılarak belirlenir. Seviyeler (-1 ve +1 ile tanımlanır), N faktör sayısı ve k etken sayısıdır. 2 faktör için 4 etken olduğu koşulda 16 deney, 5 etken olduğu durumda 32 deney tasarlanır. Eğer bir kimyasal tepkime, pH ve sıcaklık gibi değişkenlere bağlı olarak farklılık gösteriyorsa, bu durumda iki düzeyli ve iki faktörlü bir deney dizaynı oluşturulabilir. Bu bağlamda 2, seviye sayısı (-1 ve +1 olarak tanımlanır), k ise faktör sayısıdır. 2 faktör için deney sayısı 4 (2^2), 3 faktör için deney sayısı 8'dir (2^3). Tam faktöriyel tasarım dizaynı aşağıdaki şekilde oluşturulur.

1. Her faktörün güçlü ve zayıf seviyeleri tespit edilir.
2. Güçlü (+1) ve zayıf (-1) seviyeler için tasarım tablosu oluşturulur.
3. Deneysel çalışmada, kodlanmış değerlerin yerine faktörlerin asıl değerleri kullanılarak işlem yapılır.
4. Tasarım matrisi, elde edilen yanıtlar kullanılarak değerlendirilir.

Örnek olarak Çizelge 2.1’de, üç faktörlü (X1, X2, X3) bir deneyin olası tüm faktör seviye kombinasyonları 2x2x2=8 adet olacak şekilde gösterilmiştir. Sütunlardaki (+) simgesi, ilgili faktörün yüksek değerini temsil ederken, (-) simgesi düşük değerini ifade eder.”

Çizelge 2.1. 3 Faktör için tam faktöriyel tasarım

Deney Sayısı	X ₁	X ₂	X ₃	Cevap
1	-	-	-	y ₁
2	+	-	-	y ₂
3	-	+	-	y ₃
4	+	+	-	y ₄
5	-	-	+	y ₅
6	+	-	+	y ₆
7	-	+	+	y ₇
8	+	+	+	y ₈

Faktörlerin etkilerini tespit etmek amacıyla, aşağıdaki doğrusal denklemin c katsayıları belirlenir.

$$y = c X$$

Burada c katsayısı;

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

formülünden hesaplanır. Doğru denkleminde c katsayılarını yerleştirdiğimizde, sayısal değerlerine göre faktörlerin etkinliği belirlenebilir.

$$y = c_0 + c_1X_1 + c_2X_2 + c_3X_3 + c_{12}X_1X_2 + c_{13}X_1X_3 + c_{23}X_2X_3 + c_{123}X_1X_2X_3$$

Burada, tahmini cevap, c_0 , ortalama deneysel cevap, $c_1 - c_{123}$, metodun performansını etkileyen ve ana etken olarak adlandırılan, göz önünde tutulan faktörlerin tahmini etkilerini ifade eden katsayılar olarak sembolize edilir. c_{12} ’ den $c_{(N-1)N}$ ’ e kadar olan katsayılar ise

faktörlerin birbirleriyle etkileşimlerini ifade eder. Oluşturulan denklem ile faktörlerin birbirleriyle olan etkileşimi ve etkileşimlerden hangilerinin önemli olduğu hakkında bilgi edinilmektedir.

Azaltılmış faktöriyel tasarım

Deneylerde faktör sayısının fazla olduğu durumlarda, azaltılmış faktöriyel tasarımlar kullanılabilir. Örneğin yapılan bir HPLC analizinde analitin hazırlanmasından (numune tartımı, karıştırma süresi, sıcaklık, çözücü bileşimi), belirlenen kromatografik şartlara kadar (hareketli faz yapısı, sabit faz türü, pH, sıcaklık, analiz süresi, dedektör hassasiyeti, enjeksiyon hacmi) gibi birçok faktör etkilidir.

Faktör sayısı arttıkça deney sayısının da artmasıyla birlikte, faktörler arasındaki ikili, üçlü ve daha yüksek etkileşimlerin önemi azalabilir. Örneğin, 6 faktörlü bir çalışmada, 64'ten daha az deney yaparak faktörlerin etkileri incelenebilir. Uygulamada çok fazla olan deney sayısı tam faktöriyel tasarım hesabına göre hesaplananın $\frac{1}{2}$ 'si, $\frac{1}{4}$ 'ü, $\frac{1}{8}$ 'i vb şeklinde azaltılabilir. Fraksiyonel faktöriyel ve Plackett-Burman tasarımları, azaltılmış faktöriyel tasarımlar arasında en yaygın olarak kullanılanlardır.

Fraksiyonel faktöriyel tasarım

Fraksiyonel bir tasarım, tüm olası kombinasyonları değil, tam faktöriyel tasarımın sadece bir kısmını seçerek işlem sayısını azaltır. Fraksiyonel faktöriyel tasarımlar için tarama ve sağlamlık testlerinde yararlanır.

Bu tasarımda deney sayısı N^{k-p} formülüne göre hesaplanmaktadır. Deney sayısında p sayısı kadar bir azalma yaşanır. P sayısı faktör sayısı k'dan küçük olmalıdır. P=1 olduğu durumda tasarım yarı fraksiyonlu faktöriyel tasarım olarak adlandırılır. Fraksiyonel faktöriyel tasarımlarda çoğunlukla iki seviye kullanılır (N=2).

Çizelge 2.2'de 2 seviye ve 5 faktör durum için kısmi faktöriyel tasarım (2^{5-1}) şeklinde görülmektedir.

Çizelge 2.2. 5 Faktör için kısmi faktöriyel tasarım

Deney Sayısı	Faktörler					Cevap
	X1	X2	X3	X4	X5	
1	-	-	-	-	+	y ₁
2	+	-	-	-	-	y ₂
3	-	+	-	-	-	y ₃
4	+	+	-	-	+	y ₄
5	-	-	+	-	-	y ₅
6	+	-	+	-	+	y ₆
7	-	+	+	-	+	y ₇
8	+	+	+	-	-	y ₈
9	-	-	-	+	-	y ₉
10	+	-	-	+	+	y ₁₀
11	-	+	-	+	+	y ₁₁
12	+	+	-	+	-	y ₁₂
13	-	-	+	+	+	y ₁₃
14	+	-	+	+	-	y ₁₄
15	-	+	+	+	-	y ₁₅
16	+	+	+	+	+	y ₁₆

Diğer bir örnek 6 faktör için, $P=2$ kabul edildiğinde $2^{(6-2)}$ formülüne göre 16 adet deney yapılması gereklidir. $2^{(6-2)}$ fraksiyonel faktöriyel tasarımı Çizelge 2.3'te gösterilmiştir. Tabloda yer alan ilk 4 kolon x_1, x_2, x_3 ve x_4 faktörleridir. Eklenen diğer iki kolon ($p=2$) x_2, x_3, x_4 ve x_1, x_3, x_4 faktörlerinin birleştirilmesiyle oluşturulan x_5 ve x_6 faktörleridir.

Çizelge 2.3. $2^{(6-2)}$ 16 deney için fraksiyonlu faktöriyel tasarım

Deney Sayısı	Faktörler					
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅ (X ₂ X ₃ X ₄)	X ₆ (X ₁ X ₃ X ₄)
1	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	+	+	+
3	-	-	+	-	+	+
4	-	-	+	+	-	-
5	-	+	-	-	+	-
6	-	+	-	+	-	+
7	-	+	+	-	-	+
8	-	+	+	+	+	-
9	+	-	-	-	-	+
10	+	-	-	+	+	-
11	+	-	+	-	+	-
12	+	-	+	+	-	+
13	+	+	-	-	+	+
14	+	+	-	+	-	-
15	+	+	+	-	-	-
16	+	+	+	+	+	+

Fraksiyonel faktöriyel tasarımlarda deney sayısı azaltıldığından bazı faktörler arası etkileşimler incelenememektedir. Kısmi faktöriyel tasarımın avantajlarının yanı sıra bazı dezavantajları da bulunmaktadır.

1. İki seviyeden oluştuğundan parabolik faktörler incelenememektedir.
2. Tekrar deneyleri yapılmadığından hata hesabı yapılamamaktadır.
3. Deney tasarımına ait sonuçlar sadece ikinin katlarından oluşmaktadır.

Plackett-burman tasarımı

Tam faktöriyel ve fraksiyonel tasarım uygulamaları çok sayıda faktörün etkisini incelemeye elverişli değildir. Faktörler arası etkileşimin önemli olmadığı yani sadece faktörlerin birbirinden bağımsız etkilerinin incelenmesinin yeterli olacağı durumlarda Plackett-Burman tasarımından yararlanılabilir. Bu tasarımın kısıtlayıcı yanı sadece doğrusal modellere olanak sağlayabilmesidir. Yani ikili faktör etkileşimleri için çıkarım yapılamaz. Bu tasarımda, faktör sayısının bir fazlası kadar deney tasarlanmaktadır. Tasarımda geçerli olan deney sayısı, faktör sayısı ve üretici Çizelge 2.4'te yer almaktadır.

Çizelge 2.4. Plackett-Burman tasarımı için üreticiler

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

11 faktör ve 12 deney için Plackett-Burman tasarımı Çizelge 2.5'te yer almaktadır.

Çizelge 2.5. 11 Faktör için Plackett-Burman tasarımı

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

Plackett-Burman tasarımının özellikleri şu şekildedir;

- Birinci satır eşit düzeydedir. (-1 veya +1).
- İkinci satırda üretici kısım bulunmaktadır. Çizelge 2.4'te yer alan üreticilerden bir tanesi kullanılır. Faktör sayısı tek sayıdır ve deney sayısından bir eksiktir.
- İkinci satırın bir sütun kaydırılması ile üçüncü satır elde edilir. (Çizelge 2.5)
- Her faktör için yüksek ve düşük seviye sayısı eşittir, bu da kolonların birbirinden bağımsız olduğunu gösterir.

Plackett-Burman tasarımında, deney sayısı faktör sayısından bir fazladır; örneğin, 11 faktör için 12 deney belirlenir. Ancak, gerçekte 10 faktör olduğunda, 11. faktör sonucu etkilemeyen rastgele bir faktör olarak seçilir ve dummy faktör olarak adlandırılır. Tasarım tablosuna kesim noktası (b_0) eklenerek kare matris elde edilir. Bu durumda, b katsayıları aşağıdaki gibi hesaplanabilir.

$$b = D^{-1}y$$

2.1.4. Optimizasyon tasarımları

Tarama tasarımları, her faktörün etkilerini genel olarak inceleyen, 2 seviyeli bir yöntemdir. Tekrarlanan deney sayısını ve parabolik etkiler dikkate alınmamaktadır. Faktörler arasındaki etkileşimleri incelemenin mümkün olmadığı durumlar olabilir. Bu nedenle, bu tasarımlarla önemli faktörler belirlendikten sonra optimizasyon yapılır. Optimizasyona olan ihtiyaç, iki nedenden kaynaklanır. İlki, deneysel sonucu etkileyen faktörlerin optimum değerlerinin bulunmasıdır. Örneğin, kromatografik analizlerde ayırma gücünü etkileyen faktörlerden sıcaklık parametresi için optimizasyonu gibi. İkincisi, her faktörün sonuca olan etkisini gösteren matematiksel bir model oluşturulmasıdır. Optimizasyon tasarımlarında, tarama tasarımı ile tespit edilen etkili faktörlerin sonuca olan etkisi incelenmektedir. Bu sebeple de daha fazla seviye ile çalışılır. En sık kullanılan optimizasyon tasarımları Merkezi Kompozit Tasarım ve Box-Behnken Tasarımıdır [82, 83].

Merkezi kompozit tasarımı

Merkezi kompozit tasarımda, deney sayısı aşağıdaki formülle belirlenir.

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

Formülde, 2^k ifadesi faktöriyel tasarımlarda gerçekleştirilen deneylerin sayısını, $2k$ star deney sayısını ve 1 rakamı merkezi seviyedeki deney sayısını gösterir. 2^k için seviyeler (-1) ve (+1), $2k$ için $\pm\alpha$, 1 için ise (0)'dır [84]. Üç faktör için Merkezi Kompozit tasarımı örneği Çizelge 2.6'da yer almaktadır.

Çizelge 2.6. 3 Faktör için merkezi kompozit tasarımı

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

Box-behnken tasarımı

Box-Behnken tasarımı en az 3 seviyeye sahiptir ve en az üç faktöre sahip durumlarda uygulanabilir. Bu tasarım $[2k(k-1) + nc]$ sayıda noktadan oluşur. Bu formülde k faktör sayısını, nc merkezi deneme sayısını göstermektedir. Bu tasarımlarda 1. ve 2. dereceden model katsayılarının etkili şekilde kestirimi sağlanabilir. Fakat bu tasarımın kullanılabilmesi için en az üç faktörün nicel olması gerekmektedir. Aynı sayıda faktör olduğu durumlarda, merkezi kompozit tasarımına göre daha az sayıda nokta içerdiğinden daha pratiktir. Box–Behnken tasarımı, optimum değerın faktör aralığı ortasında olduğu bilinen, ikiden daha fazla faktörün bulunduğu sistemlerde önerilir [85]. 3 faktör için Box–Behnken tasarımı örneği Çizelge 2.7'de yer almaktadır.

Çizelge 2.7. 3 Faktör için Box-Behnken tasarımı

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

Doehlert tasarımı

Merkezi kompozit ve Box-Behnken tasarımları gibi döndürülebilir değildir. Farklı faktörler için farklı tahmin nitelikleri tanımlanabilir. Çok kullanışlı olduğundan farklı faktörler için farklı seviye rakamları vardır. Doehlert tasarımı faktör boşluğunu mümkün mertebe düzgün doldurmaya çalışır. Doehlert tasarımı k^2+k+nc noktadan oluşur. 3 faktör Doehlert tasarımı örneği Çizelge 2.8’de yer almaktadır.

Çizelge 2.8. 3 Faktör için Doehlert tasarımı

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

D-Optimal tasarım

Çözücü bileşimi ve çözünen derişim kombinasyonlarının uygun olmadığı gibi faktör alanı düzgün şekilde elde edilemediği durumlarda tercih edilir. Diğer avantajı ise deney sayısının belirlenebilir olmasıdır. Modeldeki etkilerin katsayılarını hesaplamak için bu sayı minimum olmalıdır. D-Optimal çözüm, belirli bir sayıda tasarım noktasını seçerek, bu noktaların optimal bir şekilde dağılımını sağlayarak "noktaların optimal dağılımı nedir?" sorusunu yanıtlar. Minimum bir tasarım incelendiğinde, sistem hakkındaki bilgiyi belirginleştirmek için daha fazla nokta eklemek aynı prensibe dayanır.

Karışım tasarımları

Karışım tasarımları, optimizasyonun yapıldığı deneydeki sonuçları etkileyen ana faktörlerin toplamı belirli bir sabit sayı ile sınırlandırıldığında kullanılır. Örneğin, kromatografik bir yöntemde, mobil faz bileşenlerinin toplamı %100 olmalıdır. Mobil fazın asetonitril, metanol ve su olmak üzere üç bileşenden oluştuğu durumda, mobil fazın bileşenlerindeki çözücülerin ağırlık veya hacim oranlarının toplamı 100'e eşit olmalıdır. Bu tür çalışmalarda, karışım tasarımları kullanılabilir. Bu tasarımlarda, bir bileşen sabit tutulurken diğer ikisi seçilir.

2.1.5. Varyans analizi

Varyans analizi, birden fazla grup ortalaması arasındaki farkların istatistiksel olarak önemli olup olmadığını test eden ve varsa bu farklılıkların hangi gruplar arasında olduğunu belirleyen bir istatistiksel yöntemdir. İşlem ANOVA testi olarak bilinir. Deneyisel tasarım yöntemlerinde ANOVA'nın avantajlarından faydalanılmaktadır.

ANOVA testi ve deneyel tasarım ilişkisi şu şekildedir;

Tarama tasarımları ile saptanan deneye etki eden faktörlerin anlamlı olup olmadığı ANOVA testi ile belirlenir. ANOVA testi ile yapılan analizler için iki hipotez oluşturulur.

H_0 : Faktör etkisi deney dizaynında anlamlıdır.

H_1 : Faktör etkisi deney dizaynında anlamlı değildir.

Bu hipotezlerin doğruluğuna yapılan analiz sonucuna göre karar verilir. Analiz sonuçlarından H_0 hipotezinin doğruluğu kanıtlanırsa, faktörlerin etkilerinin deney üzerinde anlamlı olduğu ve faktörlerin deney sonucuna etki ettiğini kanıtlanır. Optimizasyonda ise ANOVA ile, modelleme sonucu elde edilen teorik sonuçlarla, deneysel sonuçlar arasında anlamlı bir fark olup olmadığı değerlendirilir. Bu değerlendirme ile oluşturulan modelin güvenilirliği test edilmektedir.

2.1.6. Deneysel tasarımın analitik kimyada uygulamaları

Analitik kimyada, deneysel tasarım yaklaşımları kimyasal veya enstrümantal faktörleri optimize etmek için uygulanmıştır. Analitlerin miktarları genellikle eser seviyelerde olduğundan veya analitlerin doğrudan analizi için her zaman bazı girişimler olduğundan, bir analitik kimya tekniği genellikle ekstraksiyon, parçalanma, ayırma, saflaştırma vb. dahil olmak üzere bir numune hazırlama tekniği içerir. Bu teknikler deneysel tasarım yaklaşımları kullanılarak optimize edilebilmektedir. Numune hazırlığından sonra, analitlerin analizleri esas olarak kromatografi, elektroforez ve elektroanalitik ve spektroskopik tekniklerle gerçekleştirilir [86]. Çizelge 2.9’da literatürde kayıtlı bazı deneysel tasarım yöntemleri verilmiştir. Sonuç olarak deneysel tasarım, yüksek verimliliğe sahip üstün bir stratejidir ve analitik kimyanın tüm dallarında geniş uygulama alanı kazanmıştır [87].

Çizelge 2.9. Literatürde kayıtlı bazı deneysel tasarım uygulamalı çalışmaları

Örnek	Analit	Analiz Yöntemi	Deneysel Tasarım	Kaynak
Hava	PAH	GC×GC-MS	Merkezi kompozit	[22]
Su	Pestisit	GC-MS SPME	Fraksiyonel faktöriyel	[23]
Su	Bakım ürünleri	GC-MS SPME	Merkezi kompozit	[24]
Toz	Paraben	GC-MS	Merkezi kompozit	[25]
Fare	Biyojenik amin ve safsızlıkları	HPLC-Amperometri	Fraksiyonel faktöriyel	[26]
İlaç	Sulindak	HPLC-DAD	Tam faktöriyel	[27]
Bitki	Tersiyer alkaloid	HPLC-UV	Tam faktöriyel	[28]
Hava	12 iyonik per ve poliflorin alkil bileşikler	LC-MS/MS	Merkezi kompozit	[29]
İlaç	Protein	LC-MS/MS	Merkezi kompozit	[30]
Bal	SPE flavonoidler	Elektrokromatografi / MS	Tam faktöriyel	[31]
-	Doğal organik maddeler	LC	Tam faktöriyel	[32]
-	Asetil kolinesteraz	UHPLC	Merkezi kompozit	[33]
Gıda	Benzen	GC-IDMS	Fraksiyonel faktöriyel	[34]
-	Kompleks organik karışımlar	Moleküler eleme-LC	Merkezi kompozit	[35]
İlaç	Non steroid antiinflamatuvarlar	GC-MS, SPME	D-optimal	[36]
-	İyonik bileşikler	HPLC-UV	D ve G-optimal	[37]

Çizelge 2.9 (devam). Literatürde kayıtlı bazı deneysel tasarım uygulamalı çalışmalar

Örnek	Analit	Analiz Yöntemi	Deneysel Tasarım	Kaynak
İlaç	Salisilik asit, asetil salisilik asit, askorbik asit	Moleküler eleme LC-DAD	Box-Behnken	[38]
Karaciğer	Protein	LC-MS/MS	Ortogonal diziliş	[39]
Sentetik antikor	Protein A	Karışık mod kromatografisi	Box-Behnken	[40]
Su	Cr, Cu, Ni, Zn	ICP-OES	Fraksiyonel faktöriyel Merkezi kompozit	[41]
Plastik	Pt	AAS	Plackett-Burman Merkezi kompozit	[42]
Yüzey ve deniz suyu, biyolojik örnek	Mn (II)	FAAS	Tam Faktöriyel Doehlert	[43]
Su örnekleri	Hg	CVAAS	Plackett-Burman	[44]
Biyolojik örnekler	Zn (II)	FAAS	Tam Faktöriyel Doehlert	[45]
Su örnekleri	Fe (III)	GF-AAS	Doehlert	[46]
İdrar	Cu (II), Fe (II) Mn (II), Ni (II)	FAAS	Plackett-Burman Merkezi kompozit	[47]
Çeşitli su örnekleri	Al (III)	GF-AAS	Doehlert	[48]
Enantiyomerik saflığının tayini	RS86017	Elektroforez	Merkezi kompozit	[49]
-	β -agonistlerin ayrılması,	Elektroforez	Tam faktöriyel	[50]
Balık	Klorlanmış bileşikler	Elektroforez	ANN	[51]
İdrar	Antihistaminik	Elektroforez	Merkezi kompozit	[52]
Buğday	Gluten	Elektroforez	Faktöriyel	[53]
Nutrasötik	B2 vitamini, C vitamini	Elektroforez	D-optimum	[54]
Sızma zeytinyağı	13 fenolik bileşik	Elektroforez	Merkezi kompozit	[55]
Naproksen	İlaç maddeleri	Spektroflorimetri	Merkezi kompozit	[56]
Biyolojik sıvı	Protein	Floresans	Plackett-Burman	[57]
İlaç	Loksifoksifen	UV	-	[58]
Biyolojik sıvı	Anti-epilektik ilaçlar	DAD	Fraksiyonel faktöriyel	[59]

2.2. Validasyon

2.2.1. Validasyon ve önemi

Validasyon, ürün kalitesine etki edebilecek tüm malzeme ve süreçlerin önceden belirlenmiş koşullarda uygunabilirliğinin spesifikasyonları sağlayacak şekilde işlendiğini garanti altına almak amacıyla yürütülen çalışmalardır. Her zaman aynı kalitede ve aynı şartlarda üretim yaparak, tüm üretilen ürünlerin kalitesinin aynı olmasını sağlamaktır. Validasyon, ürün kalitesine etki edebilecek tüm malzeme ve süreçlerin önceden belirlenmiş spesifikasyonları sağlayacak şekilde yürütüleceğinin ispatlanması amacıyla gerçekleştirilen çalışmalardır. Valide edilen süreç bir üretim prosesi, analitik analiz yöntemi veya cihaz performansının her zaman aynı kalitede ve aynı şartlarda çalışıldığında, tüm sürecin kalitesinin aynı olmasını

sağlamaktır. Validasyon çalışmalarının türleri ve kapsamları gereği çeşitleri ve seviyeleri bulunmaktadır.

Validasyonun farklı endüstrilerdeki kullanım alanları da göz önüne alındığında, gerekliliği açıkça anlaşılır. Validasyon, ürünlerin ve süreçlerin güvenilirliğini, uyumluluğunu ve kalitesini sağlama konusunda temel bir rol oynar. Validasyon, işletmelerin yasal düzenlemelere uyum sağlaması ve müşterinin sisteme güven duyması konularında yardımcı olur. Validasyon birçok endüstri için ürünlerin ve süreçlerin doğruluğunu, güvenilirliğini ve uyumluluğunun belgelendirildiği vazgeçilmez bir gerekliliktir.

Validasyonun GMP kuralları için de yapılması gerekir. Validasyon işleminin ilaç sektörünün tüm süreçlerinde geniş bir uygulama alanı vardır. Her uygulama alanı validasyon yapılabilir ve bu sürecin uygun olabilmesi için, metodun belirli performans özelliklerini karşılaması gerekir. Dikkate alınması gereken performans özellikleri ilgilenilen konuya ve validasyonun kapsamına göre belirlenmektedir.

2.2.2. Validasyon türleri ve seviyeleri

Endüstride yapılan validasyonlar 4 temel başlıkta toplanır.

Temizlik validasyonu üretim alanında bulunan tüm ilgili ekipmanların temizlenmesi amacı ile yapılan çalışmaların bütünüdür. Üretim alanının temizliğinden sayısal veriler ile emin olunması adına son yapılan çalışmadan bir sonraki çalışmaya olabilecek bulaş riskinin değerlendirilebilmesi ve belirlenen limitler altında olduğunun kanıtlanması amacıyla gerçekleştirilir [88].

Analitik yöntem validasyonu analitik yöntem validasyonu, analitik prosedürün kalitatif ve kantitatif olarak doğru sonuçlar verdiğini belirleyen çalışmalardır. Validasyon, analitik bir yöntemin amaçlanan amaca uygunluğunu göstermek için kullanılan bir süreçtir. Validasyon prosedürleri, kalite kontrol ve mevzuata uygunluk amacıyla çeşitli endüstriyel komiteler, düzenleyici kurumlar ve standart kuruluşları tarafından geliştirilmiştir.

Ekipman validasyonu, bir ekipmanın kullanıcı ihtiyaçlarının yanı sıra çeşitli mevzuat ve güvenlik gereksinimlerini karşıladığından emin olmak için gereksinimlerini, özelliklerini ve kullanımlarını doğrulama sürecidir. Ekipman doğrulama süreci genellikle ISO 13485 ve ISO

9001 gibi kalite yönetimi standartlarını karşılamak için yapılır. Ekipman doğrulaması, Mevcut İyi Üretim Uygulamaları (CGMP) Düzenlemeleri de dahil olmak üzere iyi uygulamaların (GxP) temel bir bileşenidir ve yüksek riskli endüstrilerin güvenilir ürün kalitesini sağlamalarının ideal yoludur [89].

Validasyon ekipmanın sürekli olarak aynı kalite şartlarında performans göstereceğinin belgelenmesi ve kullanıcıya durumun garanti edilmesi için önemlidir.

Ekipman validasyonları iki aşamada gerçekleştirilir:

- Operasyonel Yeterlilik (OQ)
- Performans Yeterlilik (PQ).

Operasyonel yeterlilikte amaç ekipmanın gereken özelliklere tabi çalıştığının belgelenmesidir. Performans yeterliliğinde ise ekipmanın kalifikasyonunun son adımıdır. Bu aşamada, kullanıcı gereksinimlerinin karşılandığı doğrulanır ve belgelendirilir.

Proses validasyonu, prosesin belirlenen standartta ürünleri güvenilir bir şekilde üretebildiğini doğrulamak amacıyla bir ürünün tasarımı ve üretimi boyunca toplanan verilerin analizidir. Spesifik bir ürünün ilk basamaktan son basamağa kadar geçen sürede yer alan tüm prosedürün belgelendirilebilmesi için yapılmaktadır. EMA ve FDA gibi düzenleyici otoritelerin süreç doğrulamayla ilgili yayınlanmış kılavuzları vardır. Proses validasyonunun amacı, çeşitli girdilerin tutarlı ve yüksek kaliteli çıktılara yol açmasını sağlamaktır. Üretim süreçlerinin uçtan uca doğrulanması, ürün kalitesinin belirlenmesinde esastır çünkü kalite her zaman bitmiş ürün denetimiyle belirlenemez. Kalite için tüm sürecin standardize edilir [90].

2.2.3. Analitik yöntem validasyonu

Analitik Yöntem Validasyonu ICH Q2 R1'e göre, "Belirli bir sürecin önceden belirlenmiş spesifikasyonlarda ve kalite özelliklerinde tutarlı bir şekilde istenen sonucu üreteceğine dair yüksek derecede güvence sağlayan belgelenmiş bir kanıtın oluşturulması" olarak tanımlanır. Geliştirilen analitik yöntemin kabul edilebilirliğini kanıtlamak ve analitik metodun kantitatif ve kalitatif olarak doğru sonuçlar verdiğini ispatlama amacıyla yapılır.

Analitik yöntem validasyonu yeni bir yöntem geliştirildiğinde veya var olan yöntem özelliklerinde süreci etkileyecek değişiklikler yapıldığında gereklidir [91].

Analitik yöntem validasyonu şu durumlarda yapılır;

- Standart bir yön bir laboratuvarında ilk defa uygulanacağı zaman,
- Analiz için yeni yöntem geliştirildiğinde,
- Geçerliliği belirlenmiş bir yöntem başka bir laboratuvarında veya kişi tarafından farklı bir cihazla kullanılacağı yapılr.

Ayrıca şu durumlarda yeniden validasyon gerekli olabilir;

- İlaç maddesinin sentezindeki değişiklikler,
- Bitmiş ürünün bileşimindeki değişiklikler,
- Kullanımda olan yöntemde değişiklik yapıldığında,
- Metodun performansında zamanla değişim meydana geldiği anlaşıldığında yapılır.

Amaç

Analitik yöntem validasyonu, bir analitik prosedürün hem nicel hem de nitel olarak güvenilir sonuçlar ürettiğini doğrulamak ve bu yöntemin uygunluğunu onaylamak amacıyla yapılır.

Analitik yöntem validasyon parametreleri

Analitik yöntem validasyonunda kullanılmak üzere istatistiki verilerden yararlanılarak yöntemin güvenilirlik ve geçerlilik derecesinin saptanmasında kullanılan parametrelerdir. Analitik yöntem validasyon parametreleri uluslararası otoriteler tarafından belirlenmiştir. USP, EP, ICH, FDA vb. [91-93] gibi çeşitli resmi klavuzların farklılaştığı noktalar olmakla beraber temelde gerekli görülen validasyon parametreleri şu şekildedir:

1. Seçicilik – Spesifiklik
 2. Sistem Uygunluk
 3. Doğrusallık
 4. Gözlenebilme ve Tayin Sınırı
- Gözlenebilme Sınırı (LOD)

- Tayin Sınırı (LOQ)
- 5. Raporlama Seviyesi
- 6. Çalışma Aralığı
- 7. Doğruluk (Geri Kazanım)
- 8. Kesinlik
 - Sistem Kesinliği
 - Yöntem Kesinliği (Tekrarlanabilirlik)
 - Ara Kesinlik 1 (Laboratuvar İçi Kesinlik)
 - Ara Kesinlik 2 (Laboratuvar Arası Kesinlik)
- 9. Sağlamlık
- 10. Stabilitesi
- 11. Stres Testi

Seçicilik – Spesifiklik

Spesifiklik terimi, yöntemin tek bir analite yanıt verme yeteneğini ifade ederken, seçicilik terimi, yöntemin numunedeki birden fazla analite yanıt verebildiği anlamına gelir. İCH seçiciliği, safsızlık, bozunma bileşikleri ve matris bileşenleri gibi bileşenlerin varlığında analitin açık bir şekilde değerlendirilme kabiliyeti olarak tanımlar. Safsızlık, çözünme hızı ve miktar tayini testlerinin validasyonu sırasında seçiciliğinin araştırılması ile ilgili çalışmalar yapılmalıdır. Özellikle bozunma içeren testlerde metodun seçiciliği gösterilmelidir. Bu amaçla solvent, hareketli faz, plasebo, safsızlık ve degradasyon ürünlerine ait çözeltiler hazırlanıp analiz edilir.

Sistem uygunluk

Kullanılacak analitik ekipmanın analiz şartlarının uygunluğunun sistem uygunluk test parametreleri ile belirlenmesi gerekir. Sistem uygunluk testi, analiz yapıldığı zaman sistemin bu analize uygunluğundan emin olunması demektir. Her analitik yöntem uygun sistem uygunluk kriterleri içermelidir.

Tüm kromatografik analitik yöntemler, sistem uygunluk testleri ve bunun kabul kriterlerini içermelidir. Sistem uygunluk testleri sadece kromatografik yöntemler için değil her analitik

yöntem için sistemin çevre şartlarından bağımsız ve düzgün çalıştığının kanıtlanması amacı ile uygulanmalıdır.

Doğrusallık

Analitik prosedürün doğrusallığı, numune içerisinde analitin derişimi ile direkt olarak orantılı test sonuçları alma kabiliyetidir (verilen aralık içerisinde). Doğrusal ilişki, analitik prosedürün aralığına karşı değerlendirilmelidir. Önerilen prosedürü uygulayarak ilaç bileşenlerinin standart stok çözeltilerinin seyreltilmesi ile direkt olarak gösterilir.

Doğrusallık ICH kılavuzuna göre minimum 5 derişim kullanılarak çalışılır. Bu çözeltiler etkin maddeden (standart stok çözeltisini seyrelterek) ve/veya bitmiş ürün bileşenlerinin ayrı ayrı tartılmasıyla hazırlanabilir. Analiz edilen çözeltilerden alınan pik alanları/absorbansları ile teorik derişimler arasında regresyon analizi yapılır.

En düşük derişim seviyesinden ve en yüksek derişim seviyesinden yöntemde belirtilen standart enjeksiyon sayısı kadar (sınırları için), diğer derişim seviyelerinden 2'şer ve pik alanı cevapları kaydedilir. Derişimle cihaz cevabı arasında grafik çizilir ve regresyon analizi yapılır. Elde edilen grafik ve denklemde yer alan korelasyon katsayısı değerinden doğrusallık hakkında bilgi elde edilir. Bu değer analiz türüne ve ihtiyaca göre değişebilse de genellikle 0,997'den büyük veya eşit olması beklenir.

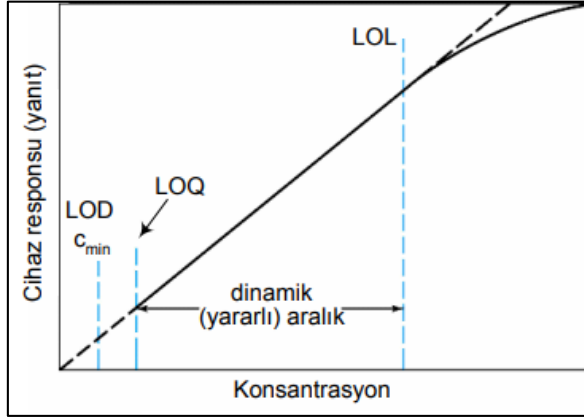
Gözlenebilme ve tayin sınırı

Gözlenebilme sınırı

Bir analitik yöntemin gözlenebilme sınırı; örnekteki bileşenin teşhis edilebilen en düşük derişimidir. Bu miktarın gerçek değer olarak belirlenmesi gerekmez. İlgili maddeler ve/veya bozunma ürünlerinin yöntem validasyonlarında uygulanır.

Tayin sınırı

Bir analitik yöntemin tayin sınırı, örnekteki bileşenlerin kabul edilebilir doğruluk ve kesinlikle tayin edilebilen en küçük miktardır. Safsızlık ve/veya bozunma ürünleri yöntem validasyonlarında uygulanır.



Şekil 2.1. Gözlenebilirlik sınırı (LOD), tayin sınırı (LOQ) ve doğrusallık limiti (LOL) gösteren kalibrasyon eğrisi grafiği

Raporlama seviyesi

Raporlama seviyesi, bir kimyasalın laboratuvar tarafından raporlanabilecek en küçük derişimi olarak tanımlanır. Bir laboratuvarın bir numunede bir kimyasalı tespit edememesi, kimyasalın numunede tamamen bulunmadığı anlamına gelmez. Numunedeki kimyasal derişimi test cihazının hassasiyetinin altında olduğu durumlar olabilir. Raporlama limitinin altındaki derişimler, analiz sonucunda tespit edilemeyen veya raporlama limitinden "daha az" olarak raporlanır. Raporlama limiti değeri tüm çalışma koşullarından etkilendiğinden genellikle her laboratuvar için ayrı hesaplanmalıdır. Raporlama seviyesi her laboratuvar için ayrı ayrı tanımlanır, bu nedenle aynı bileşliği test ederken farklı raporlama seviyeleri ile karşılaşmak alışılmadık bir durum değildir.

İlaç preparatlarında ürünün günlük alım dozu bilgisine göre ICH Q2A(R1) klavuzuna göre safsızlık yapıları için raporlama limitleri hesaplanmaktadır. Raporlama limitinin üstünde kalan safsızlık yapıları analiz sonucunda rapor edilir ve prosedürlerde tanımlanırlar.

Çalışma aralığı

Çalışma aralığı analitik metodun, çalışılacak numune içerisindeki komponenti kesin, lineer ve doğru tespit edebildiği derişimin oluşturduğu alt ve üst sınırların arasında bulunduğu bölge olarak tanımlanmaktadır. *ICH Q2(R1) Analitik Prosedürlerin Validasyonu* dökümanında [91] yer alan doğrusallık ve çalışma aralığına ilişkin değerler sunulmuştur. Analiz türüne göre belirlenmiş çalışma aralığının kapsaması gereken değerler Çizelge 2.10'da yer almaktadır.

Çizelge 2.10. Analiz türüne göre çalışma limitleri

Analiz Yöntemi	Alt Limit (%)	Üst Limit (%)
Miktar Tayini	80	120
İçerik Tekdüzeliliği	70	130
Çözünme Hızı	Limit Değerin -20	Limit Değerin +20
Safsızlık	Raporlama Seviyesi	120

Bir analitik yöntemin çalışma aralığı minimum tayin limiti ve maksimum doğrusallık limiti arasında kalacak şekilde belirlenebilmektedir. Bu aralık çalışılacak olan analitin gereksinimine göre daha dar alanda belirlenmektedir [94].

Doğruluk (Geri kazanım)

Bir analitik metodun doğruluğu, elde edilen test sonuçlarının gerçek değere olan yakınlığıdır. Geri kazanım ise analiz ortamındaki teorik miktarın yüzdesi olup analizi yapılan ilgili bileşiğin bulunan gerçek miktarı olarak ifade edilmektedir.

ICH kılavuzu, belirlenen aralığı kapsayacak şekilde minimum 3 derişim seviyesini minimum 9 analizini önermektedir. Etkin madde için yöntemde aksi belirtilmedikçe her birinden 3'er numune olacak şekilde %80, %100, %120 olarak 3 derişimde numune hazırlanır. Çalışmaya bağlı olarak derişim seviyeleri değişebilir. Numuneler aynı anda hazırlanan standarda karşı miktar tayinine alınır ve miktarları belirlenir. % Geri kazanım, teorik miktar (ilave edilen) ve pratikte bulunan miktar yardımıyla aşağıdaki eşitlikten hesaplanır.

$$\% \text{ Geri Kazanım} = \frac{\text{Deneysel (tespit edilen) miktar}}{\text{Teorik (ilave edilen) miktar}} \times 100$$

Doğruluğa ait 3 paralel enjeksiyonun bağıl standart sapması %2'den küçük veya eşit olmalıdır. Geri kazanımları ise %95 - %105 kriterini sağlamalıdır.

Bitmiş üründe %100 derişimde plasebo karışımına etkin maddenin %80, %100, %120 seviyelerinde ilavesiyle 3 derişimde ve her birinden 3'er numune hazırlanır. Çalışmaya bağlı olarak derişim seviyeleri değişebilir. Analiz süreci ve hesaplama basamağı etkin madde ile benzer yürütülür.

Kesinlik

Homojen bir örnekten alınmış çok sayıdaki numunenin tek tek elde edilmiş sonuçlarının birbiriyle olan uygunluk derecesidir. Seri ölçümlerin, korelasyon katsayısı, bağıl standart sapma veya güven aralığı ile ifade edilir.

Sistem kesinliği

Kısa zaman aralıkları ile yapılan ölçümler arasındaki kesinliği tanımlar. Doğrudan analiz metodunda kaynaklanan tekrarlanabilirlik ve varsa analiz sırasında kullanılan cihaza ait tekrarlanabilirlik ayrı ayrı değerlendirilmelidir.

Analiz yönteminde tarif edildiği şekilde standart çözeltisi hazırlanır ve yöntemde belirtildiği kadar ölçüm yapılır. Sonuçların ortalaması, standart sapması ve bağıl standart sapması hesaplanır. RSD değeri yöntemde belirtilen limite uygun olmalıdır.

Yöntem kesinliği (Tekrarlanabilirlik)

Metodun, aynı laboratuvar, aynı analist ve cihaz ile aynı seriden arka arkaya altı farklı numunenin (%100 derişimde) metoda göre çalışılması ile alınan sonuçların birbirlerine yakınlık derecesinin ölçülmesi prensibine dayanır. Analiz için 6 ayrı numune hazırlanır. Her numunenin analizi aynı anda hazırlanmış standarda karşı yapılır ve her numunedeki etkin madde % miktarı belirlenir. Analiz sonuçlarının ortalaması, standart sapması ve bağıl standart sapması hesaplanır. Bağıl standart sapma değeri etkin madde için %0,85 ve bitmiş ürün için %2'den küçük veya eşit olmalıdır.

Ara kesinlik 1 (Laboratuvar içi kesinlik)

Farklı günlerde, farklı analistler tarafından, mümkünse farklı cihazlar kullanılarak sistem kesinliğinin tekrar edilmesi ile örnekler arasındaki yakınlığı ifade eder. Çalışmalar aynı laboratuvarda olabilecek varyasyonları kapsayacak şekilde, gün, analist, ekipman vb. değişiklikleri içerir. Farklı bir analist tarafından 6 numune çözeltisi hazırlanarak yapılır. Elde edilen sonuçlar tekrarlanabilirlik numune sonuçları ile karşılaştırılır. Miktar tayini yönteminde tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik sonuçlarına ait toplam 12 numune sonucunun bağıl standart sapma değeri %2'den küçük veya eşit olmalıdır.

Ara kesinlik 2 (Laboratuvar arası kesinlik)

Bu çalışma eğer laboratuvar değişikliği veya analitik yöntem transferi söz konusu ise yapılır. Başlangıçta yapılan validasyon için düşünülmez. Aynı seri etkin madde veya bitmiş ürün hem başlangıç laboratuvarında hem de transferin yapılacağı laboratuvarında analize alınır.

Sağlamlık (Güvenilirlik)

Bir analitik yöntemin dayanıklılığı, yöntemin parametrelerinin kasıtlı olarak gerçekleştirilen küçük değişimlerden etkilenmeden kaldığının ölçüsüdür ve yöntemin normal kullanıldığı sürece güvenilirliğinin göstergesidir. Her analiz yöntemi veya kullanılan ekipman için sağlamlık değişkenleri farklılık gösterir. Gerçekleştirdiğimiz çalışma kapsamında sıvı kromatografisi sistemlerinde akış hızı, dedektör dalga boyu, hareketli fazın bileşimindeki değişimler, sabit fazın sıcaklığında meydana gelecek değişimlerden gerçek değer toleranslar ölçüsünde sapıyor olması sağlamlık göstergesi olarak kullanılabilir.

Çözelti stabilitesi

Validasyon çalışmalarında kullanılan çözeltiler tipik olarak oda sıcaklığında ve/veya buzdolabı şartlarında bekletilir. Sonuçlar taze hazırlanmış numune sonuçlarıyla karşılaştırılır. Etkin madde bozulana kadar veya eğer stabilse minimum 24 saat stabilitesi izlenir.

Numune ve standart çözeltileri başlangıçta verilen standart çözeltilerine karşı, sistem bozulmuş ise taze hazırlanmış standarda karşı belirli periyotlarla tekrar analize alınır. Standart için başlangıç değeri %100 kabul edilir ve diğer periyotlardaki standart % değeri hesaplanır. Numune için de sonuçlar % olarak hesaplanır ve % değişimler hesaplanır. Değişim miktarı %2'den büyük olmamalıdır.

Stres testi

Stabilite belirleyici yöntem, zaman içinde ilaç etkini ya da ilaç ürününde gerçekleşebilecek değişiklikleri kantitatif olarak tespit edebilme yeteneğine sahip valide edilmiş analitik yöntemlerdir. Bu tip yöntemler, etkin madde bozunma ürünleri, proses safsızlıkları, matris bileşenleri veya diğer potansiyel safsızlıkların varlığından etkilenmeden doğru şekilde belirleyebilme özelliğine sahiptir. Ürünlerin serbest bırakma aşamalarında yapılan testler

stabilite belirleyici nitelikte değiller ise kalitatif ve kantitatif olarak safsızlık ve bozunma ürünlerini belirleyebilecek analitik yöntemler ile desteklenmelidir. Stabilite çalışmaları için kullanılan analitik yöntemlerin stabilite belirleyecilik özellikleri olmalıdır. Stabilite belirleyici olma koşulu yapılırken aşağıdaki çalışmalar göz önünde bulundurulmalıdır [95].

Burada amaçlanan çözeltide %10 ile %20 arasında bir bozunma yaratabilmektedir. Hazırlanan bu çözeltiler ilgili analitik metoda uygun şekilde çalışılarak bozunma ürünlerinin tespit edilebilirliği kontrol edilir. Örneğin; 1 saat 0,5 M HCl veya 0,1 M HCl), baz hidroliz (örneğin; 1 saat 0,5 M NaOH veya 0,1 M NaOH), oksidasyon (örneğin; 1 saat %3 ile %30 arası H₂O₂) sıcaklık (örneğin 1 hafta 50°C – 60°C), ışık etkisi (örneğin 1 hafta UV/VIS ışık ya da gün ışığı) ve nem (örneğin 1 hafta %70 ile %80) gibi zorlanmış koşullara maruz bırakılmalıdır.

- Çözücü plasebo ve boş kapsül çözeltilerine ait kromatogramda etkin madde alıkonma zamanında gelen herhangi bir pik gözlenmemeli
- Safsızlık pikleri etkin maddeden ayrılmış olmalı
- Analit piki saf olmalı
- Spektrofotometrik yöntemlerde lasebo absorbansı numune çözeltisi absorbansının %3'ünden fazla olmamalıdır gibi kabul kriterlerinin de karşılanması gerekmektedir.

2.2.4. Validasyon ile ilgili bazı örnekler

Yapılan araştırmalarda çeşitli endüstrilerde uygulanan çok sayıda validasyon çalışmalarına rastlanmıştır. Bu tezin konusu olan ilaç etken maddelerinin HPLC ile analizi için yapılmış validasyon çalışmaları Çizelge 2.11' de verilmiştir.

Çizelge 2.11. Literatürde kayıtlı bazı validasyon örnekleri

Örnek	Etkin Madde	Kolon	Hareketli Faz	Dedektör	Parametreler	Kaynak
Tablet	Hidrokortizon Asetat ve Lidokainin	C18	MeOH:Saf Su (65:35)	UV	Seçicilik, Doğrusallık, Kesinlik ve Sağlamlık	[8]
Tablet	Levamisol	C18	MeOH:ACN:Su (50: 30: 20) (pH 4,6)	UV	Seçicilik, kesinlik, doğruluk, sağlamlık, LOD, LOQ	[60]
Tablet	Parasetamol, Lornoksikam	C18	KH ₂ PO ₄ (pH 3,5), ACN (55: 45)	UV	Seçicilik, doğrusallık, LOD, LOQ, kesinlik, doğruluk	[61]
Tablet	Prulifloksokin	C18	Amonyum Asetat (pH 5,8): ACN (12:88)	UV	Doğrusallık, LOD, LOQ	[62]

Çizelge 2.11. (devam) Literatürde kayıtlı bazı validasyon örnekleri

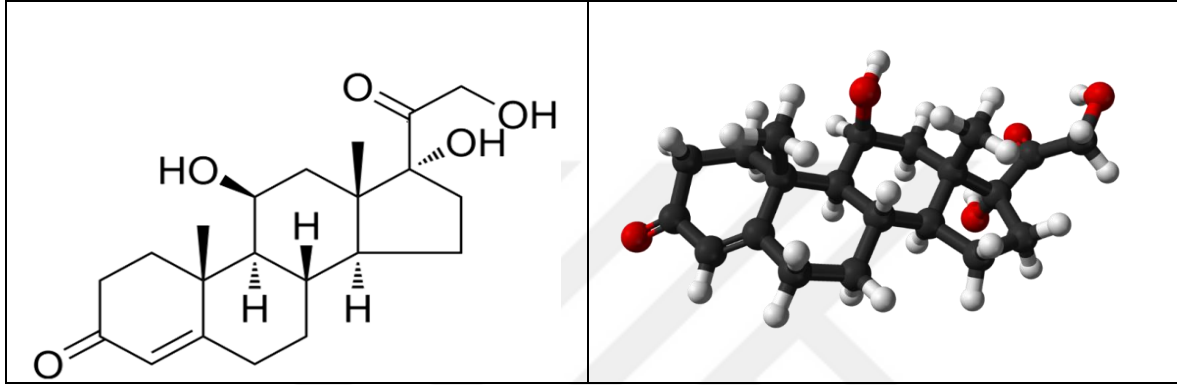
Örnek	Etkin Madde	Kolon	Hareketli Faz	Dedektör	Parametreler	Kaynak
Tablet	Doksilin hyclat	Siyano	ACN : Su (40:60)	UV	Seçicilik, doğrusalılık, doğruluk, kesinlik, sağlamlık	[63]
Tablet	Diflunisal Naproksen	C18	NaH ₂ PO ₄ (pH 3,4), ACN (50: 50)	DAD	Seçicilik, doğrusalılık, LOD, LOQ, kesinlik, stabilite, sağlamlık	[64]
Vitamin bileşimi	C vitamini ve B vitamin kompleksleri	C18	Amonyum fosfat tamponu trietilamin	UV	Seçicilik, doğrusalılık, LOD, LOQ, doğruluk, sağlamlık	[65]
İlaç	Sparflokasin, Dekametazon	C18	pH 3,0 MeOH : fosfat tamponu (60: 40)	DAD	LOD, LOQ, Doğrusallık	[66]
İlaç	Fenobarbital, Fenition	C18	A: MeOH : Su (38: 62) B: ACN: Su (25: 75)	UV	Sistem uygunluk, kesinlik, doğrusalılık, seçicilik, stabilite, sağlamlık	[67]
İlaç	Metokarbamol, Aspirin	C18	ACN, MeOH, %1'lik amonyum asetat (pH 7,5)	UV-DAD	Doğruluk, LOD, LOQ, doğrusalılık, kesinlik	[68]
İlaç	Pioglitazon hidroklorür	C18	ACN : MeOH (80:20)	Silikajel	Doğrusallık, Seçicilik, doğruluk	[69]
İlaç	Piroksikam Parasetamol	C8	ACN : 0.02 M fosfat tamponu (60: 40) (pH 3,0)	DAD	Doğrusallık, Seçicilik, doğruluk	[70]
İlaç	Rivaroksaban	C18	ACN : Su (55: 45)	UV	Doğrusallık, doğruluk, kesinlik, sağlamlık	[71]
İlaç	Rupatadin, Montelukast	C8	ACN : Su (90: 10)	UV	Seçicilik, doğrusalılık, kesinlik, doğruluk, sağlamlılık	[72]
İlaç	Olmesartan medoksomil	C18	Orta fosforik asit (pH 3), trietilamin, ACN	UV	Seçicilik, doğrusalılık, LOD, LOQ, doğruluk, kesinlik, seçicilik, sağlamlık	[73]
İnsan plazmasında ilaç	Zonisamid	C18	ACN, MeOH, Su (20: 10: 70)	UV	Seçicilik, doğruluk, kesinlik, doğrusalılık, LOD, LOQ, sağlamlık	[74]
Supozituar ilaç	Alobarbital, Adifenin Hidroklorid Parasetamol	C18	ACN, sodyum asetat asetik asit Alobarbital (pH 4,0) (60:40)	UV	Doğrusallık, kesinlik, doğruluk ve sağlamlık	[75]
Biyolojik sıvılarda	Celiprolol Enantiyomerleri	C18	n-hegzan, etanol trietilamin (70:30:0,4)	Floresans	Doğrusallık, LOD, LOQ	[76]

2.3. Çalışılacak İlaç Etkin Madde

Hidrokortizon

2.3.1. Kimyasal yapı ve özellikleri

Yapısal formülü:



Şekil 2.2. Molekül modelinin 2D gösterimi

Şekil 2.3. Molekül modelinin 3D gösterimi

Kimyasal Adı:	Hidrokortizon
IUPAC Adı:	(8S,9S,10R,11S,13S,14S,17R)-11,17-dihidroksi-17-(2-hidroksiasetil)-10,13-dimetil-2,6,7,8,9,11,12,14,15,16-dekahidro-1H-siklopenta[a] fenantren -3-on
Molekül formülü:	C ₂₁ H ₃₀ O ₅
Görünüm :	Beyaz , kristal toz
Molekül ağırlığı:	362,5 g/mol
Çözünürlüğü:	Sudaki çözünürlüğü yaklaşık 320 mg/mL'dir. Benzer şekilde metanol ve etanolde çözünür. Kloroformda az çözünür.
Stabilite:	Işık hassasiyeti
Depolama Koşulu:	İyi kapatılmış kaplarda kontrollü oda sıcaklığında saklanmalıdır

2.3.2. Farmakolojik özellikleri

Hidrokortizon, vücutta çift yönlü etki gösteren bir kortikosteroiddir. Hem glukokortikoid hem de mineralokortikoid olarak işlev görür. Bu, vücutta bulunan glukokortikoid ve mineralokortikoid reseptörlerine etki ederek, bu hormonların aktivasyonunu artırır. Yani, hem glukokortikoid hem de mineralokortikoid reseptörlerinin aktivasyonunu sağlayarak, vücuttaki çeşitli süreçlerde etkili olur. Sentetik kortikosteroidlere kıyasla, hidrokortizonun etkisi daha hafiftir. Örneğin, antiinflamatuvar etkileri bakımından, prednizolon yaklaşık olarak hidrokortizonun dört katı kadar güçlüyken, deksametazon yaklaşık kırk katı kadar güçlüdür.

Hidrokortizon, tıbbi olarak kullanıldığında kortizol hormonunun sentetik bir formudur. Kullanım alanları arasında adrenokortikal yetmezlik, adrenogenital sendrom, yüksek kan kalsiyumu, tiroidit, romatoid artrit, dermatit, astım ve KOAH gibi durumlar bulunur. Özellikle adrenokortikal yetmezlik için tercih edilen bir tedavi yöntemidir. Ağız yoluyla alınabilir, cilde uygulanabilir veya enjeksiyon yoluyla verilebilir. Ancak, uzun süreli kullanım sonrasında tedavinin durdurulması adım adım yapılmalıdır. Yan etkiler arasında ruh halindeki değişiklikler, enfeksiyon riskindeki artış ve ödem (şişlik) gibi durumlar yer alabilir [96]. Hidrokortizonun FDA farmakolojik sınıflandırması Çizelge 2.12’de yer almaktadır.

Çizelge 2.12. FDA farmakolojik sınıflandırması

FDA UNII	WI4X0X7BPJ
Aktif Kısım	HİDROKORTİZON
Farmakolojik Sınıflar	Yerleşik Farmakolojik Sınıf [EPC] – Kortikosteroid
	Etki Mekanizmaları [MoA] - Kortikosteroid Hormon Reseptör Agonistleri
FDA Farmakoloji Özeti	Hidrokortizon bir kortikosteroiddir. Hidrokortizonun etki mekanizması Kortikosteroid Hormon Reseptör Agonistidir.

2.3.3. Analiz yöntemleri

Hidrokortizon etkin madde analizlerinde çoğunlukla kromatografik yöntemler kullanılmıştır. Kromatografi analizleri haricinde literatürde spektrofotometrik, TLC ve MS yöntemleri ile yapılmış analiz örnekleri de bulunmaktadır. Hidrokortizonun HPLC analizleri Çizelge 2.13’te ve diğer analiz yöntemleri Çizelge 2.14’te yer almaktadır.

Çizelge 2.13. Kromatografik yöntemler ile Hidrokortizon tayinine yönelik çalışmalar

Örnek	Yöntem	Kolon	Hareketli faz	Dedektör	Kaynak
Merhem ve Krem	HPLC	C18	Metano/su (1:99)	UV	[1]
Fare Serumu	LC	C18	A: %0,05 Formik Asit içeren 10 Mm Amonyum Asetat B: %0,05 Formik Asit içeren Metanol içerisinde 10 mM Amonyum Asetat	MS/MS	[2]
Tablet ve Enjeksiyonluk Farmasötik Preparatlar	HPLC	ODS (C18), 4,6x150mm, 5µm	Metanol:Su:Asetik Asit (60:30:10, h/h/h)	254 nm / UV	[3]
İnsan Plazması	HPLC	C18	%60 Sulu Metanol	254 nm / UV	[4]
Sulu çözeltilerde ve biyolojik sıvılarda	HPLC	C18	ACN:0.05 M Fosfat Tampon (pH:2) (30:70, h/h)	232 nm / UV	[5]
Topikal dozaj formu	HPLC	C18	ACN:Tampon (75:25, h/h)	254 nm / UV	[6]
Farmasötik preparatlar	HPLC	C18	MeOH:NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ (0.1 mol L ⁻¹) (pH=4.5) (60:40, h/h)	245 nm / UV	[7]
Fitil	HPLC	C18	MeOH:Su(65:35, h/h), pH:2 (%85 ortofosforik asit ile)	250 nm / UV	[8]
Krem	HPLC	150x4,6mm, 5µm, C18	ACN:%0,05 Trifloroasetik Asit (60:40, h/h)	225 nm / PDA	[9]
%1 Hidrokortizon Krem	HPLC	25x4mm, C18	MeOH:ACN:Su (15:27:58, h/h/h)	238 nm / UV	[10]
At serumu	HPLC	4.6x250mm, 5µm, C18	ACN:Su (51:49, h/h), (0,1% Trifloro Asetik Asit içerir)	254 nm / PDA	[11]
Jel Formülasyonu	HPLC	Lichrospher RP18, 5mm, 4mm×25cm	0,02 MFosfat Tamponu:MeOH (40:60, h/h)	240 nm / UV	[12]
Topikal oftalmik merhem	HPLC	C18 column (250×4.6mm, 5µm)	Su (pH 2,2-ortofosforik asit):ACN (40:60, h/h)	244 nm / UV	[13]
İlaç preparatları	HPLC	Inertsil ODS-3; C18(150 mm x 4,6 mm, 5 µm)	50 mM Fosfat Tamponu (pH 5.0): ACN (50:50, h/h)	230 nm / UV	[14]

Çizelge 2.14. Diğer yöntemler ile Hidrokortizon tayinine yönelik çalışmalar

Örnek	Diğer Maddeler	Analiz Yöntemi	Kaynak
Kortikosteroid	-	FTIR, FT-Raman ve UV-Görünür Bölge Spektroskopisi	21
Tablet	-	TLC-Densitometrik Yöntem	19
Farmasötik Dozaj Formu	Siprofloksasin Hidroklorür	Spektrofotometri	15
Sentetik ve Farmasötik preparatlar	Nistatin ve Oksitetrasiklinin	Spektrofotometri	16
Farmasötik Preparat	Lidokain	Spektrofotometri	17
At İdrarı	-	LC/ESI-MS	97
Serum Kortizol ve Tükürük Kortizon	-	LC-MS/MS	98
Topikal Formülasyonlar	Klobetasol Propiyonat, Desonid	UPLC-MS/MS	99
Farmasötik Preparat	Kortizon ve İlgili Steroidler	Kolorimetrik Yöntem	18
Süt	-	TLC	20



3. MATERYAL METOT

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Hidrokortizon primer referans standardı (EP), orto-fosforik asit %85 (Merck), metanol HPLC kalite (J.T. Baker) kimyasalları kullanılmıştır. Ayrıca çalışmalar süresince gerekli tüm süreçlerde ultra saf su kullanılmıştır.

3.2. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

%20 (h:h) Metanol çözeltisi: Bir litrelik bir balon jojenin içine 200 mL metanol eklenir ve ardından ultra saf su eklenerek hacim tamamlanır.

%10 (h:h) Orto-fosforik asit çözeltisi: 100 mL'lik bir balon jojenin içine 11,8 mL %85 orto-fosforik asit eklenir ve ardından ultra saf su eklenerek hacim tamamlanır.

Mobil faz: Metanol: Ultra Saf Su (80:20 h/h) Çözeltinin pH değeri %10 orto-fosforik asit çözeltisi ile $4,0 \pm 0,05$ 'e ayarlanır.

3.3. Kullanılan Cihazlar

Kullanılan HPLC sistemi: PDA ve UV dedektör, 20 µL enjeksiyon ve empower programından oluşan bilgisayar sisteminden oluşan Waters yüksek performanslı sıvı kromatografi cihazıdır. Analiz 4,6 mm x 150 mm x 5 µm intersil ODS-3V C8 kolon ile gerçekleştirilmiştir. Analiz sürecinde kullanılan diğer cihazlar şu şekildedir:

- Mettler Toledo pH metre
- Mettler Toledo analitik hassas terazi (0,1 mg'a kadar duyarlı)
- Labcare 2-8°C buzdolabı
- Elga purelab ultra saf su cihazı
- Bandelin RK 100 H ultrasonik banyo
- Isolab manyetik karıştırıcı

3.4. HPLC ile Analiz

3.4.1. Deneysel tasarım ile optimizasyon

Hidrokortizon'un HPLC ile analizinde optimum koşulların tayini için faktörlerin ve birbirleri ile olan etkileşimlerinin pik şiddetine ve teorik plaka sayısına olan etkisi incelendi. Araştırma kapsamında 4 faktörlü Merkezi Kompozit Tasarım kullanıldı. Tasarım için değerlendirilecek faktörler ve seviyeleri Çizelge 3.1 de yer almaktadır. Optimizasyon için öncelikle 100 mL' lik balonjoje içerisine 10 mg hidrokortizon tartılarak %20 metanol ile çözüldükten sonra hacmine tamamlandı. Elde edilen çözelti ile oluşturulan tasarıma göre 254 nm'de 31 analiz gerçekleştirildi. Elde edilen her bir kromatogramdaki hidrokortizon piki için alan değerleri ve teorik plaka sayıları tek tek hesaplandı. Elde edilen verilere regresyon analizi yapıldı. Sonuçların güvenilirliğini test etmek için ANOVA yapıldı ve model oluşturuldu. Oluşturulan modelden yararlanılarak faktörlere ait optimum değerler hesaplandı. Sonuçlar Bölüm 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Faktörler ve seviyeleri

Seviye	pH	Kolon Sıcaklığı (°C)	Akış Hızı (mL/min)	Hareketli Faz* (% h:h)
	X1	X2	X3	X4
-α	2	20	0,7	60
-1	2,5	25	0,8	65
0	3	30	0,9	70
1	3,5	35	1	75
α	4	40	1,1	80

(*) Metanol cinsindendir.

3.4.2. Validasyon

Seçicilik

Analitik yöntem seçiciliğinin doğrulanması için HPLC sistemine çözücü, plasebo, standart ve numune çözeltilerinden birer enjeksiyon verilmiştir. Analiz yöntemi için UV dedektör ile çalışmaktadır. Analiz yönteminin doğrulanması olan validasyon aşamasında seçicilik çalışmalarında PDA dedektör kullanılmıştır. Analit piki altında olabilecek farklı pik yapılarının varsa tespiti ve pik saflığının tayini için 210-400 nm dalga boyu aralığında tarama işlemi gerçekleştirilmiştir. Peak purity ve purity angle değerleri üzerinden değerlendirmeler yapılarak pik saflığına karar verilmiştir. Sonuçlar Bölüm 4.2.1'de verilmiştir.

Sistem uygunluğu

Sistem uygunluğunun incelenmesinde 254 nm dalga boyu, 0,7 mL/min akış hızında hazır olan HPLC sistemine 0,1 mg/mL derişimde hidrokortizon içeren standart çözeltisinden altı enjeksiyon analiz yapılmıştır. Yine sistem uygunluğun diğer bir göstergesi olarak aynı derişimde hidrokortizon içeren başka bir standart çözeltisinden de iki enjeksiyon analiz yapılmıştır. İlk standardın altı enjeksiyonu; sistemin enjektör sisteminin, hareketli faz bileşiminin doğru olması, sabit faz bağlantısının düzgün yapılmış olması ve analiz için gerekli şartlanmanın tamamlanmış olması gibi durumların kontrolü için yapılmaktadır. İkinci standardın analiz amacı ise kromatografik sistemden önceki tüm süreçlerin kontrolü için önemlidir. İki standardın uyumuna bakılarak; kullanılan terazinin, ultra saf su sisteminin kalitesinin, varsa çözündürme sisteminde çalkalama veya santifürj işleminin her seferinde doğru çalıştığının kontrolü için yapılmaktadır. Sonuçlar Bölüm 4.2.2’de verilmiştir.

Doğrusallık

Hidrokortizon analizi için geliştirilen yöntemin doğrusallığını incelemek amacıyla 10mL’lik balon joje içerisine 10 mg hidrokortizon etkin maddesi tartılır ve çözücü ile çözünme sağlandıktan sonra hacmine tamamlanır. Hazırlanan çözeltiden ilgili seyreltme işlemleri yapılarak %20, %40, %60, %80, %100 ve %120 seviyeleri için doğrusallık çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltilerin C8 kolonda 80/20 metanol/ultra saf su hareketli fazı ile 0,7 ml/min izokratik akışta kromatogramları alındı. Kromatogramlar, spektrofotometrik dedektörle 254 nm’de kaydedildi ve pik alanları kaydedildi. derişimler ve pik alanları arasında regresyon analizi yapılmıştır. Sonuçlar Bölüm 4.2.3’te verilmiştir.

Gözlenebilme ve tayin sınırı

LOD ve LOQ değerleri sinyal/gürültü’ye dayandırılarak hesaplanmıştır. Sonuçlar Bölüm 4.2.4’te verilmiştir.

Çalışma aralığı

Çalışma aralığının belirlenmesinde Bölüm 3.4.2’de verilen doğrusallık parametresi için hazırlanmış olan çözeltiler kullanılmıştır. Sonuçlar Bölüm 4.2.5’da verilmiştir.

Doğruluk (Geri kazanım)

Doğruluk parametresi %80, %100 ve %120 olmak üzere üç seviyede incelenmiştir. Düşükten yükseğe her seviye için 80, 100 ve 120 mg hidrokortizon etkin madde ve yine her seviye için %100 bitmiş ürün içeriğine tekabül edecek miktarda plasebo içeriği eklenerek 100 mL balon joje içerisinde çözücü ile hacmine tamamlanmıştır. Doğruluk çözeltileri her seviyeden 3 paralel olacak şekilde toplamda 9 adet doğruluk çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltilerin kromatogramları, 250 mm, C8 kolonda, 0,7 mL/min akış hızında 80/20 metanol /ultra saf su hareketli fazı kullanılarak, 254 nm’de pik alanları kaydedilmiştir. Elde edilen pik alanı değerleri standart pik alan ve belirli olan derişim değerleri ile orantılandığında doğruluk numunelerinin derişimleri hesaplanarak yüzde geri kazanımları hesaplanmıştır. Sonuçlar Bölüm 4.2.6’te verilmiştir.

Kesinlik

Sistem kesinliği

Sistem kesinliği parametresi için HPLC sisteminde, C8 kolonda 0,7 mL/min akış hızında 80/20 metanol /ultra saf su hareketli fazı kullanılarak 254 nm’de standart çözeltisinden ardaşık şekilde 6 enjeksiyon analiz yapılmıştır. Sonuçlar Bölüm 4.2.7’de verilmiştir.

Yöntem kesinliği (Tekrarlanabilirlik)

Tekrarlanabilirlik parametresi bitmiş ürün numunesi kullanılarak %100 derişimde (1mg/mL) hazırlanan 6 adet çözeltilerin analiz edilmesi ile incelenmiştir. 10 mg etkin madde içeren bitmiş ürün numunesi tartılarak 100 mL balon joje içerisinde çözücü yardımı ile 5 dakika ultrasonik banyo aşamasından sonra çözücü ile hacmine tamamlanır. Tekrarlanabilirlik parametresi analiz yönteminin sadece etkin madde için değil plasebo gibi diğer tüm bileşenlerin etkisi altında da kesin ve doğru sonuçlar üretebildiğinin göstergesidir. Sonuçlar Bölüm 4.2.7’de verilmiştir.

Ara kesinlik (Laboratuvar içi kesinlik)

Ara kesinlik parametresi, tekrarlanabilirlik parametresinin aynı laboratuvar ortamında olmak şartı ile farklı analist, farklı gün, farklı cihaz gibi değişikliklerden en az iki farklılık olacak

şekilde tekrar edilmesidir. Ara kesinlik çalışmasında da 6 adet numune çözeltisi hazırlanmıştır. Ara kesinlik analiz sonuçları tekrarlanabilirlik sonuçlarının kriterlerini karşılamakla beraber toplamda 12 adet numune analiz sonucunun karşılaması gereken kabul kriterleri de bulunmaktadır. Sonuçlar Bölüm 4.2.7’de verilmiştir.

Sağlamlık

Sağlamlık parametresi standart ve numune çözeltileri için uygulanmıştır. Rutin analiz koşullarının kasıtlı olarak değiştirildiği analiz koşullarında 0,7 mL/min olan akış hızı düşük akış 0,65 mg/mL yüksek akış 0,75 mg/mL olacak şekilde değiştirilmiştir. 37,5°C olan kolon sıcaklığı kasıtlı değiştirilen koşullarda düşük sıcaklık 35°C ve yüksek sıcaklık 40°C olacak şekilde uygulanmıştır. Sonuçlar Bölüm 4.2.8’de verilmiştir.

Stabilite

Stabilite parametresi çözelti stabilitesi olarak çalışılmıştır. %100 derişimde hazırlanan standart ve numune çözeltileri 25°C oda koşulu ve 2-8°C buzdolabı koşulunda 48 saat muhafaza edilmişlerdir. Belirli zaman aralıklarında analize alınarak elde edilen pik alan verilerinden çözeltilerin belirli olan koşullardaki stabiliteleri değerlendirilmiştir. Sonuçlar Bölüm 4.2.9’de verilmiştir.

3.4.3. Örnek analizi

Hidrokortizonun ilaç örneklerinde HPLC yöntemi ile analizinde bu maddeyi içeren liyofilize toz örneğinden 10 mg etkin madde içeren toz numune 100 mL balon jojeye tartılır ve %20 metanol çözücüsü ile ultrasonik banyo yardımı ile de çözünmesi sağlandıktan sonra hacmine çözücü ile tamamlanır. Aynı yöntem ile hazırlanan 6 ayrı numune çözeltisi 0,45 µm PTFE filtreden süzülür. Elde edilen numune çözeltilerinin C₈ kolonda metanol/ultra saf su (80:20) hareketli fazı ile 0,7 ml/min izokratik akışta kromatogramları alındı. Kromatogramlar, spektrofotometrik dedektörle 254 nm’de kaydedildi ve pik alanları kaydedildi. Sonuçlar Bölüm 4.3’te verilmiştir.



4. BULGULAR

4.1. Kromatografik Şartların Belirlenmesi ve Deneysel Tasarım ile Optimizasyon

Liyofilize toz matrisinden hidrokortizonun HPLC ile tayininde Merkezi Kompozit Tasarım (CCD) modeli kullanılarak merkez noktalarda 7 tekrar ile dört farklı bağımsız değişkenin (pH (X1), kolon sıcaklığı (X2), akış hızı (X3) ve mobil faz organik yüzdesi (X4)) incelenmesi ile gerçekleştirilmiştir. Hidrokortizon tayini için Çizelge 4.1’de verilen değişken aralık ve seviyeler gösterilmiştir. Yapılan deneysel tasarım sonucundan elde edilen verilerle ise Çizelge 4.2’de en küçük kareler yöntemi kullanılarak regresyon işlemi yapılmıştır. Şekil 4.1’de elde edilen deneysel sonuçlar ile öngörülen sonuçlar arasındaki uyumun grafiği gösterilmiştir.

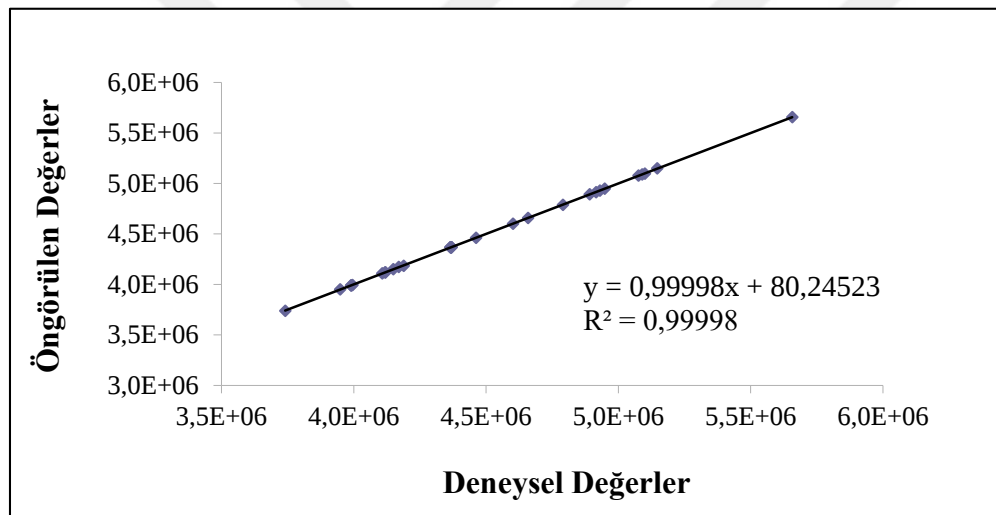
Hidrokortizon’un HPLC cihazı ile tayininde analitik koşullara ait dört bağımsız değişkenle CCD modeline göre oluşturulan deney tasarımı.

Çizelge 4.1. Hidrokortizon’un HPLC cihazı ile tayininde analitik koşullara ait dört bağımsız değişkenle CCD modeline göre oluşturulan deney tasarımı

Deney No	Kodlanmış Değerler				Pik Alanı Cevap Değerleri		
	X1	X2	X3	X4	Deneysel Değerler	Öngörülen Değerler	Artık Değerler
1	1	1	1	1	3994898	3993568	1330
2	1	1	1	-1	4119796	4118997	799
3	1	1	-1	1	4915764	4913812	1952
4	1	1	-1	-1	5075807	5078033	-2226
5	1	-1	1	1	3948735	3951763	-3028
6	1	-1	1	-1	4107859	4110162	-2303
7	1	-1	-1	1	4891429	4892412	-983
8	1	-1	-1	-1	5090120	5089602	518
9	-1	1	1	1	3989555	3990316	-761
10	-1	1	1	-1	4118622	4119197	-575
11	-1	1	-1	1	4930300	4929555	745
12	-1	1	-1	-1	5100012	5097227	2785
13	-1	-1	1	1	3990165	3989497	668
14	-1	-1	1	-1	4149154	4151349	-2195
15	-1	-1	-1	1	4948099	4949141	-1042
16	-1	-1	-1	-1	5146895	5149783	-2888
17	2	0	0	0	4601955	4600885	1070
18	-2	0	0	0	4658546	4657815	731

Çizelge 4.1. (devam) Hidrokortizon'un HPLC cihazı ile tayininde analitik koşullara ait dört bağımsız değişkenle CCD modeline göre oluşturulan deney tasarımı

Deney No	Kodlanmış Değerler				Pik Alanı Cevap Değerleri		
	X1	X2	X3	X4	DeneySEL Değerler	Öngörülen Değerler	Artık Değerler
19	0	2	0	0	4170215	4173140	-2925
20	0	-2	0	0	4188618	4183892	4726
21	0	0	2	0	3740817	3738685	2132
22	0	0	-2	0	5657034	5657365	-331
23	0	0	0	2	4461836	4462177	-341
24	0	0	0	-2	4790391	4788249	2142
25	0	0	0	0	4366282	4367446	-1164
26	0	0	0	0	4366794	4367446	-652
27	0	0	0	0	4369737	4367446	2291
28	0	0	0	0	4367677	4367446	231
29	0	0	0	0	4368461	4367446	1015
30	0	0	0	0	4364583	4367446	-2863
31	0	0	0	0	4368588	4367446	1142



Şekil 4.1. DeneySEL sonuçlar ile öngörülen sonuçlar arasındaki ilişki

Hidrokortizonun HPLC cihazı ile tayininde optimum analitik koşulların regresyon modelinin ANOVA sonuç tablosu Çizelge 4.2’de, regresyon analizine ait katsayılar, t ve P değerleri ise Çizelge 4.3’te verilmiştir.

Çizelge 4.2. Hidrokortizonun HPLC cihazı ile tayininde analitik koşullara ait dört bağımsız değişkenin regresyon modelinin ANOVA sonuç tablosu

	df	SS	MS	Model F	Anlamlılık
Regresyon	14	$6,18 \times 10^{12}$	$4,42 \times 10^{11}$	$6,40 \times 10^4$	$3,10 \times 10^{-35}$
Fark	16	$1,10 \times 10^8$	$6,90 \times 10^6$		
Toplam	30	$6,18 \times 10^{12}$			

Çoklu R= 0,99, R²= 0,99, Ayarlı R²= 0,99

Uygulanan modelin %95 güven aralığı içerisindeki ANOVA analizi incelenmiş ve model ile deneysel bulguların uyumu irdelenmiştir. Anlamlılık F değerinin 0,05'ten küçük olması (%95 güven aralığında) modelin istatistiksel olarak önemli olduğunu göstergesidir. Modelin Anlamlılık F değeri $3,10 \times 10^{-35}$ ($P < 0,05$) ve Model F değeri $6,40 \times 10^4$ olduğundan, regresyon istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur. Korelasyon katsayısı (R^2) değerinin %99,99 olarak belirlenmesi, gözlenen değerler ile öngörülen değerler arasında yüksek bir uyumluluk olduğunu göstermektedir (Çizelge 4.2).

Deneysel tasarım yöntemi ile Hidrokortizonun HPLC cihazı ile tayininde analitik koşullara ait dört bağımsız değişkenin denemelerinden elde edilen, pik alanlarının kodlanmamış değerler üzerinden gösterilen student t–testi ile elde edilen tam polinomal denklem Eşitlik 4.1’de verilmiştir.

$$y_{tam} = 4367446 - 14232 X_1 - 2688 X_2 - 479670 X_3 - 81518 X_4 + 65476 X_1 * X_1 - 47233 X_2 * X_2 + 82645 X_3 * X_3 + 64442 X_4 * X_4 + 10247 X_1 * X_2 + 4749 X_1 * X_3 + 863 X_1 * X_4 + 5101 X_2 * X_3 + 8242 X_2 * X_4 + 9698 X_3 * X_4 \quad (4.1)$$

t–testi ile elde edilen P değerleri kullanılarak regresyon analizi sonucu belirlenen katsayıların istatistiki olarak anlamlılık derecelerini gösteren polinomal denklem Eşitlik 4.2’de verilmiştir.

$$y_{anlamlı} = 4367446 - 14232 X_1 - 2688 X_2 - 479670 X_3 - 81518 X_4 + 65476 X_1 * X_1 - 47233 X_2 * X_2 + 82645 X_3 * X_3 + 64442 X_4 * X_4 + 10247 X_1 * X_2 + 4749 X_1 * X_3 + 5101 X_2 * X_3 + 8242 X_2 * X_4 + 9698 X_3 * X_4 \quad (4.2)$$

Polinomal denklemde bağımsız değişkenlerin sistem üzerindeki anlamlılık dereceleri belirlenen P değerleri kullanılarak regresyon analizi yapılmıştır. Yüksek ‘t’ değeri ($t > 2,12$) ve düşük ‘P’ değeri ($P < 0,05$) değişkenlere ait katsayının anlamlılık değerinin artması şeklinde yorumlanmaktadır.

Deneysel verilerden elde edilen sonuçlar doğrultusunda (Çizelge 4.3), Hidrokortizonun HPLC cihazı ile tayininin pik alanı üzerinde ana etkilerin tamamının azaltıcı yönde etki gösteren faktörler olarak önem taşıdıkları görülmektedir. Anlamlı olan kuadratik etkilerden kolon sıcaklığı dışındakilerin ise arttırıcı yönde etki gösteren faktörler olarak önem taşıdıkları görülmektedir.

İkili etkileşimlerin pH ve mobil faz organik madde yüzdesi (X_1X_4) dışında diğer etkileşimler düşük P değerine bağlı olarak istatistiki açıdan anlamlı ve artırıcı yönde etki gösterdikleri belirlenmiştir.

Çizelge 4.3. Hidrokortizonun HPLC cihazı ile tayininde analitik koşullara ait dört bağımsız değişkenlerin pik alanı regresyon analizine ait katsayılar, t ve P değerleri

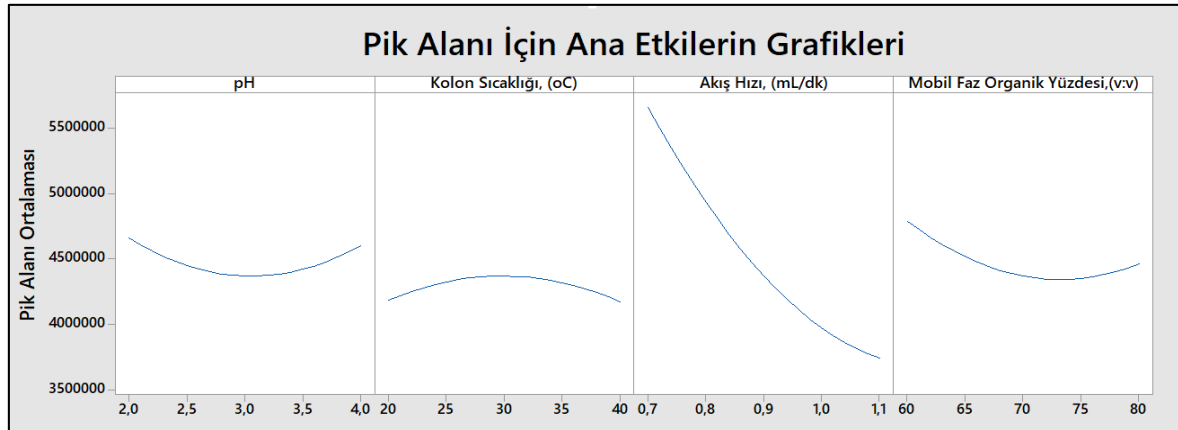
	<i>Katsayılar</i>	<i>Standart Hata</i>	<i>t Stat</i>	<i>P-değeri</i>
Kesişim	4367446	993	4400	$4,27 \times 10^{-50}$
X_1	-14232	536	-27	$1,17 \times 10^{-14}$
X_2	-2688	536	-5	$1,27 \times 10^{-4}$
X_3	-479670	536	-895	$4,99 \times 10^{-39}$
X_4	-81518	536	-152	$1,03 \times 10^{-26}$
X_1X_1	65476	491	133	$8,40 \times 10^{-26}$
X_2X_2	-47233	491	-96	$1,55 \times 10^{-23}$
X_3X_3	82645	491	168	$2,03 \times 10^{-27}$
X_4X_4	64442	491	131	$1,08 \times 10^{-525}$
X_1X_2	10247	657	16	$4,21 \times 10^{-11}$
X_1X_3	4749	657	7	$2,00 \times 10^{-6}$
X_1X_4	863	657	1	$2,07 \times 10^{-1}$
X_2X_3	5101	657	8	$8,08 \times 10^{-7}$
X_2X_4	8242	657	13	$1,07 \times 10^{-9}$
X_3X_4	9698	657	15	$9,61 \times 10^{-11}$

X_1 : pH, X_2 : Kolon Sıcaklığı ($^{\circ}\text{C}$), X_3 : Akış Oranı (mL/ min), X_4 : Mobil faz organik yüzdesi (%v:v)

*: İstatistiki olarak anlamlı

Hidrokortizonun HPLC cihazı ile tayininde analitik koşullara deneysel tasarım yöntemiyle incelendiği çalışmada; Anlamlılık F değeri ve Model F değeri kullanılarak yapılan regresyon analizi ile modelin istatistiki olarak anlamlı olduğu gösterilmiştir. Fakat tüm parametrelerin en düşük noktalarında optimum koşulların belirlenmesi, seçilen parametreler için belirlenen aralıkların yeniden gözden geçirilme gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Hidrokortizonun HPLC cihazı ile tayinine etki eden anlamlı parametrelerin tekli etkileri.



Şekil 4.2. Hidrokortizonun HPLC cihazı ile tayininde ana parametrelerin pik alanı üzerine tekli etkileri

pH etkisi: Regresyon analizi sonucu hidrokortizonun HPLC cihazı ile tayininde çözelti pH'sinin etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P=1,17 \times 10^{-14}$, $P<0,05$). pH'ye ait katsayının sıfırdan küçük olması (-14232) hidrokortizon analitinin HPLC tayininde pik alanı bakımından pH'nin kümülatif etkisinin negatif olduğunu göstermektedir.

Hidrokortizonun HPLC cihazı ile tayininde pH 2,0–3,0 aralığında pik alanının azaldığı 3,0–4,0 aralığında ise pik alanının arttığı tespit edilmiştir (Şekil 4.2). Şekil 4.2'deki grafikten en yüksek pik alanının pH 2,0 koşullarında $6,443 \times 10^6$ olarak elde edilmiştir.

Kolon Sıcaklığının Etkisi: Regresyon analizi sonucu hidrokortizonun HPLC cihazı ile tayininde kolon sıcaklığının etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P=1,27 \times 10^{-4}$, $P<0,05$). Kolon sıcaklığına ait katsayının sıfırdan küçük olması (-2688) hidrokortizon analitinin HPLC tayininde kolon sıcaklığının kümülatif etkisinin negatif olduğunu göstermektedir.

Hidrokortizonun HPLC cihazı ile tayininde kolon sıcaklığının 20°C – 30°C aralığında pik alanının arttığı 30°C – 40°C aralığında ise pik alanının azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 4.2). Şekil 4.2'deki grafikten en yüksek pik alanının $27,3^{\circ}\text{C}$ koşullarında $6,443 \times 10^6$ olarak elde edilmiştir.

Akış Hızının Etkisi: Regresyon analizi sonucu hidrokortizonun HPLC cihazı ile tayininde akış hızının etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P=4,99 \times 10^{-39}$, $P<0,05$). Akış hızına ait katsayının sıfırdan küçük olması (-479670) hidrokortizon analitinin HPLC tayininde akış hızının kümülatif etkisinin negatif olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte akış hızının katsayısının diğer parametrelere göre en büyük değerde tespit edilmesi, sonuç üzerine en baskın parametrenin akış hızı olduğunu göstermektedir.

Hidrokortizonun HPLC cihazı ile tayininde artan akış hızı ile pik alanının azaldığı tespit edilmiştir. Şekil 4.2'deki grafikten en yüksek pik alanı 0,7 mL/min koşullarında $6,443 \times 10^6$ olarak elde edilmiştir.

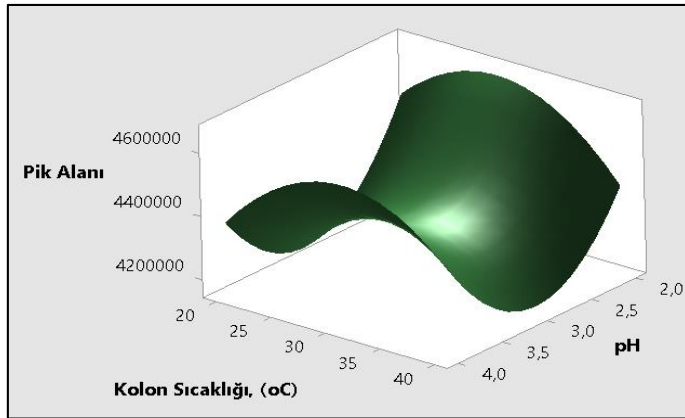
Mobil Faz Organik Yüzdesinin Etkisi: Regresyon analizi sonucu hidrokortizonun HPLC cihazı ile tayininde mobil faz organik yüzdesinin etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P=1,03 \times 10^{-26}$, $P<0,05$). Akış hızına ait katsayının sıfırdan küçük olması (-81518) hidrokortizon analitinin HPLC tayininde mobil faz organik madde yüzdesinin kümülatif etkisinin negatif olduğunu göstermektedir.

Hidrokortizonun HPLC cihazı ile tayininde %60'dan %75'e kadar artan mobil faz yüzdesi ile kümülatif etkinin azaldığı, fakat mobil faz organik madde yüzdesinin %75'den fazla olduğu durumlarda pik alanı bir miktar artışa neden olmadığı tespit edilmiştir. Şekil 4.2'deki grafikten en yüksek pik alanı %60 olduğu durumda tespit edilmiştir.

Hidrokortizonun HPLC cihazı ile tayinine etki eden anlamlı parametrelerin PİK ALANI üzerine birlikte etkileri:

pH ve kolon sıcaklığının pik alanına etkisi: Regresyon analizi sonucu hidrokortizonun HPLC cihazı ile tayininde pH ve kolon sıcaklığı anlamlı parametrelerin birlikte etkisi (Şekil 4.3) pik alanı üzerine istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. ($P = 4,21 \times 10^{-11}$, $P < 0,05$).

pH ve kolon sıcaklığına ait katsayının (10247) sıfırdan büyük olması, bu ikili etkileşimin etkisinin hidrokortizon analitinin HPLC cihazı ile tayinindeki pik alanı üzerine etkisinin pozitif olduğunu ifade etmektedir. Şekil 4.3'teki pH ve kolon sıcaklığına bağlı yüzey grafiğinden, en yüksek pik alanının pH 2,0 ve kolon sıcaklığının 27,3°C olduğu koşullarda $6,443 \times 10^6$ olarak elde edilmiştir.

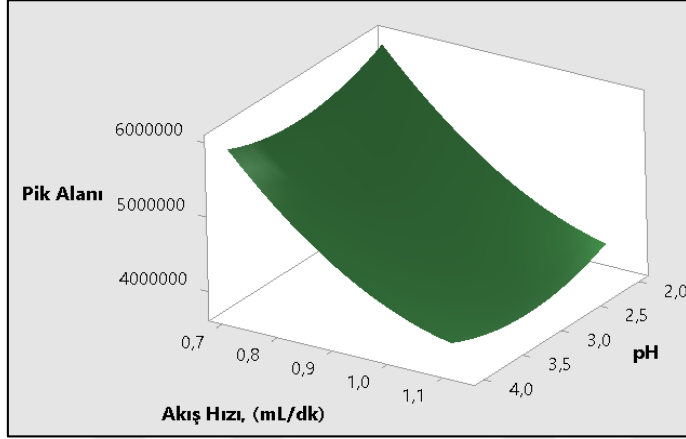


Şekil 4.3. Hidrokortizonun HPLC cihazı ile tayininde pik alanı üzerine pH ve kolon sıcaklığın etkisi

pH ve akış hızının pik alanına etkisi: Regresyon analizi sonucu hidrokortizonun HPLC cihazı ile tayininde pH ve akış hızının anlamlı parametrelerin birlikte etkisi (Şekil 4.4) pik alanı üzerine istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. ($P = 2,00 \times 10^{-6}$, $P < 0,05$).

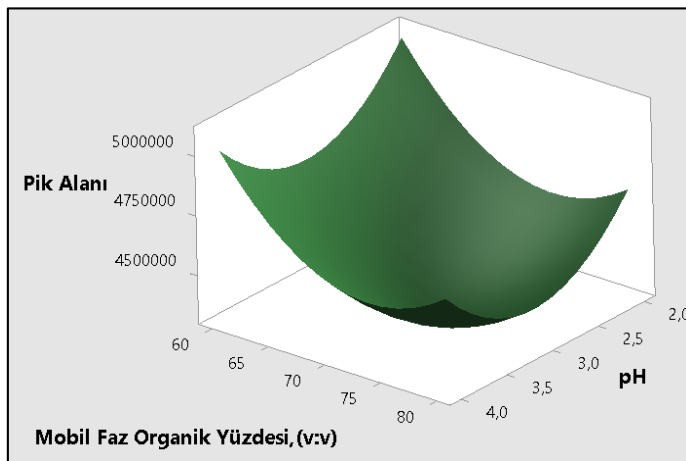
pH ve akış hızına ait katsayının (4749) sıfırdan büyük olması, bu ikili etkileşimin etkisinin hidrokortizon analitinin HPLC cihazı ile tayinindeki pik alanı üzerine etkisinin pozitif olduğunu

ifade etmektedir. Şekil 4.4'teki pH ve akış hızına bağlı yüzey grafiğinden, en yüksek pik alanının pH 2,0 ve akış hızının 0,7 mL/min olduğu koşullarda $6,443 \times 10^6$ olarak elde edilmiştir.



Şekil 4.4. Hidrokortizonun HPLC cihazı ile tayininde pik alanı üzerine pH ve akış hızının etkisi

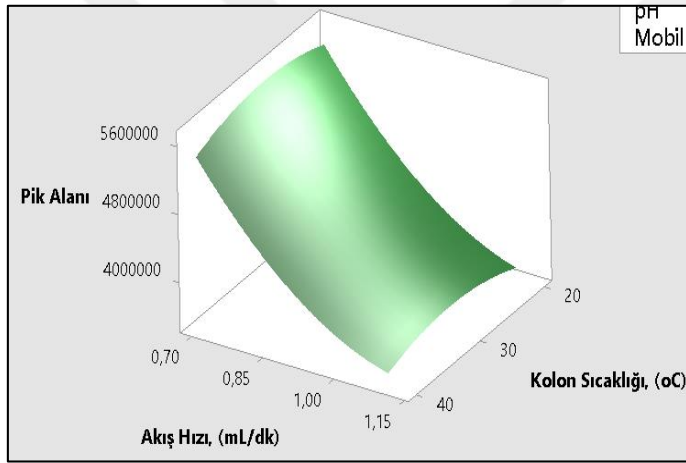
pH ve mobil faz organik madde yüzdesinin pik alanına etkisi: Regresyon analizi sonucu hidrokortizonun HPLC cihazı ile tayininde pH ve mobil faz organik madde yüzdesi anlamlı parametrelerin birlikte etkisi (Şekil 4.5) pik alanı üzerine istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ($P = 2,07 \times 10^{-1}$, $P > 0,05$). pH 2–4 ve mobil faz organik madde yüzdesi %60–%80 aralığı içerisindeki değişimlerin, istatistiksel olarak önemli etkilerinin bulunmadığı tespit edilmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Hidrokortizonun HPLC cihazı ile tayininde pik alanı üzerine pH ve mobil faz organik madde yüzdesinin etkisi

Kolon sıcaklığı ve akış hızının pik alanına etkisi: Regresyon analizi sonucu hidrokortizonun HPLC cihazı ile tayininde kolon sıcaklığı ve akış hızının anlamlı parametrelerin birlikte etkisi (Şekil 4.6) pik alanı üzerine istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. ($P= 8,08 \times 10^{-7}$, $P<0,05$).

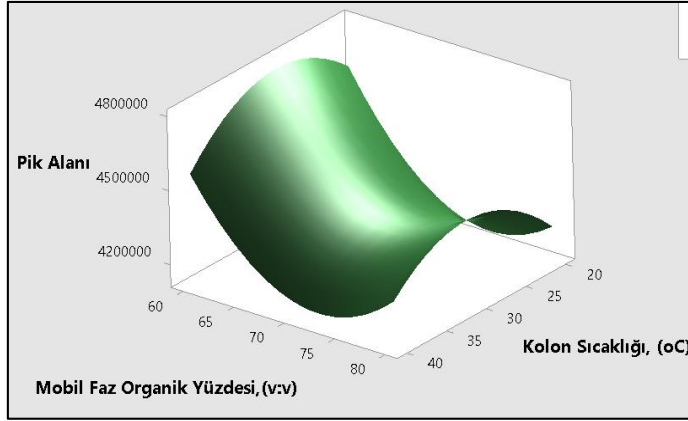
Kolon sıcaklığı ve akış hızına ait katsayının (5101) sıfırdan büyük olması, bu ikili etkileşimin etkisinin hidrokortizon analitinin HPLC cihazı ile tayinindeki pik alanı üzerine etkisinin pozitif olduğunu ifade etmektedir. Şekil 4.4'teki kolon sıcaklığı ve akış hızına bağlı yüzey grafiğinden, en yüksek pik alanının 27,3 °C'de ve akış hızının 0,7 mL/min olduğu koşullarda $6,443 \times 10^6$ olarak elde edilmiştir.



Şekil 4.6. Hidrokortizonun HPLC cihazı ile tayininde pik alanı üzerine kolon sıcaklığı ve akış hızının etkisi

Kolon sıcaklığı ve mobil faz organik madde yüzdesinin pik alanına etkisi: Regresyon analizi sonucu hidrokortizonun HPLC cihazı ile tayininde kolon sıcaklığı ve mobil faz organik madde yüzdesi anlamlı parametrelerin birlikte etkisi (Şekil 4.7) pik alanı üzerine istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. ($P= 1,07 \times 10^{-9}$, $P<0,05$).

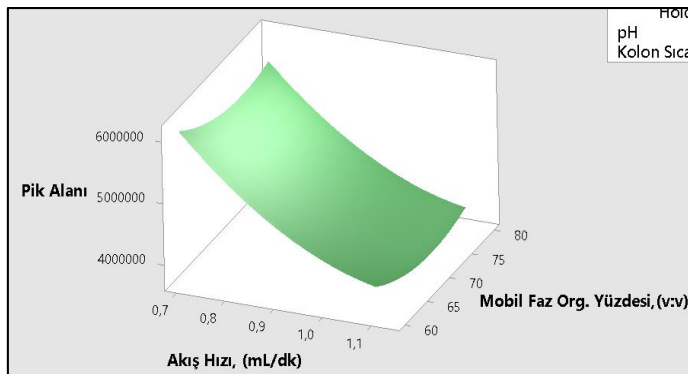
Kolon sıcaklığı ve mobil faz organik yüzdesine ait katsayının (8242) sıfırdan büyük olması, bu ikili etkileşimin etkisinin hidrokortizon analitinin HPLC cihazı ile tayinindeki pik alanı üzerine etkisinin pozitif olduğunu ifade etmektedir. Şekil 4.7'deki kolon sıcaklığı ve akış hızına bağlı yüzey grafiğinden, en yüksek pik alanının 27,3 °C'de ve mobil faz organik madde yüzdesinin %60 olduğu koşullarda $6,443 \times 10^6$ olarak elde edilmiştir.



Şekil 4.7. Hidrokortizonun HPLC cihazı ile tayininde pik alanı üzerine kolon sıcaklığı ve mobil faz organik madde yüzdesinin etkisi

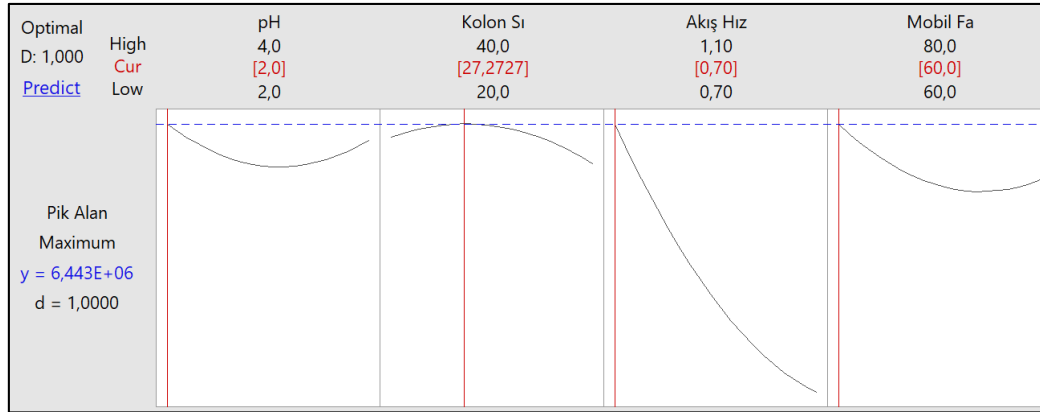
Akış hızı ve mobil faz organik madde yüzdesinin pik alanına etkisi: Regresyon analizi sonucu hidrokortizonun HPLC cihazı ile tayininde akış hızı ve mobil faz organik madde yüzdesi anlamlı parametrelerin birlikte etkisi (Şekil 4.8) pik alanı üzerine istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. ($P = 9,61 \times 10^{-11}$, $P < 0,05$).

Akış hızı ve mobil faz organik yüzdesine ait katsayının (9698) sıfırdan büyük olması, bu ikili etkileşimin etkisinin hidrokortizon analitinin HPLC cihazı ile tayinindeki pik alanı üzerine etkisinin pozitif olduğunu ifade etmektedir. Şekil 11'deki akış hızı ve akış hızına bağlı yüzey grafiğinden, en yüksek pik alanının 0,7 mL/min'de %60 olduğu koşullarda $6,443 \times 10^6$ olarak elde edilmiştir.



Şekil 4.8. Hidrokortizonun HPLC cihazı ile tayininde pik alanı üzerine akış hızı ve mobil faz organik madde yüzdesinin etkisi

Hidrokortizonun HPLC cihazı ile tayini için dört bağımsız değişkenle CCD modeline göre parametrelerin optimum değerleri Şekil 4.9'da yer almaktadır.



Şekil 4.9. Hidrokortizonun HPLC cihazı ile tayininde pik alanı değerlendirmelerine göre belirlenen optimum analiz koşulları

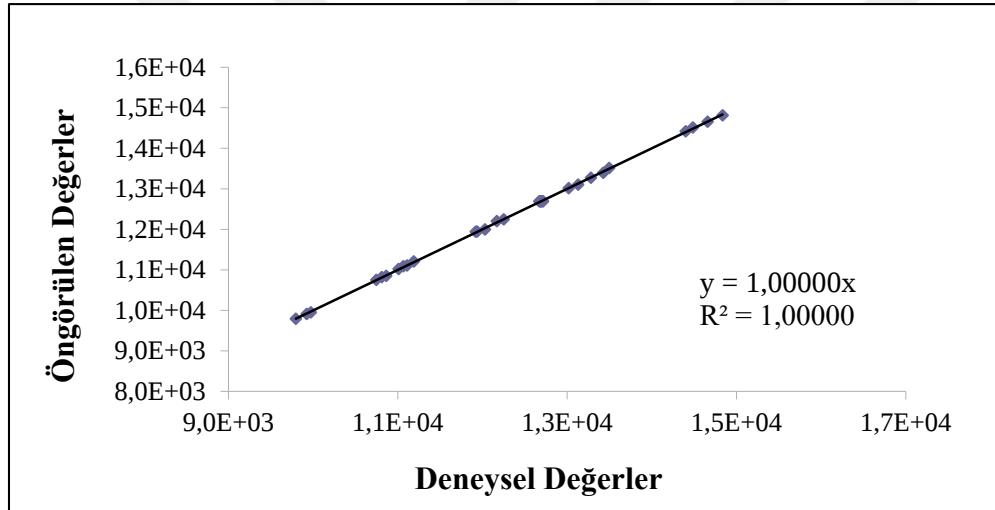
Liyofilize toz matrisinden hidrokortizonun HPLC ile tayininde Merkezi Kompozit Tasarım (CCD) modeli kullanılarak merkez noktalarda 7 tekrar ile dört farklı bağımsız değişkenin (pH (X1), kolon sıcaklığı (X2), akış hızı (X3) ve mobil faz organik yüzdesi (X4)) incelenmesi ile gerçekleştirilmiştir. Hidrokortizon tayini için Çizelge 4.4'te verilen değişken aralık ve seviyeler gösterilmiştir. Yapılan deneysel tasarım sonucundan elde edilen verilerle ise Çizelge 4.5'te en küçük kareler yöntemi kullanılarak regresyon işlemi yapılmıştır. Şekil 4.10'da elde edilen deneysel sonuçlar ile öngörülen sonuçlar arasındaki uyumun grafiği gösterilmiştir.

Çizelge 4.4. Hidrokortizonun HPLC cihazı ile tayininde analitik koşullarından teorik plaka sayısına ait dört bağımsız değişkenle CCD modeline göre oluşturulan deney tasarımı

Deney No	Kodlanmış Değerler				Teorik Plaka Sayısı Cevap Değerleri		
	X1	X2	X3	X4	DeneySEL Değerler	Öngörülen Değerler	Artık Değerler
1	1	1	1	1	13281	13273	8
2	1	1	1	-1	12031	11999	32
3	1	1	-1	1	14659	14653	6
4	1	1	-1	-1	13497	13515	-18
5	1	-1	1	1	11066	11087	-21
6	1	-1	1	-1	9924	9911	13
7	1	-1	-1	1	12252	12247	5
8	1	-1	-1	-1	11188	11206	-18
9	-1	1	1	1	13131	13103	28
10	-1	1	1	-1	11938	11946	-8
11	-1	1	-1	1	14401	14417	-16
12	-1	1	-1	-1	13428	13397	31
13	-1	-1	1	1	10864	10850	14
14	-1	-1	1	-1	9796	9792	4
15	-1	-1	-1	1	11921	11943	-22
16	-1	-1	-1	-1	11010	11021	-11
17	2	0	0	0	11110	11110	0
18	-2	0	0	0	10747	10754	-7
19	0	2	0	0	14485	14514	-29
20	0	-2	0	0	9974	9952	22

Çizelge 4.4. (devam) Hidrokortizonun HPLC cihazı ile tayininde analitik koşullarından teorik plaka sayısına ait dört bağımsız değişkenle CCD modeline göre oluşturulan deney tasarımı

Deney No	Kodlanmış Değerler				Teorik Plaka Sayısı Cevap Değerleri		
	X1	X2	X3	X4	DeneySEL Değerler	Öngörülen Değerler	Artık Değerler
21	0	0	2	0	12170	12202	-32
22	0	0	-2	0	14837	14812	25
23	0	0	0	2	13019	13016	3
24	0	0	0	-2	10810	10820	-10
25	0	0	0	0	12670	12692	-22
26	0	0	0	0	12690	12692	-2
27	0	0	0	0	12690	12692	-2
28	0	0	0	0	12716	12692	24
29	0	0	0	0	12688	12692	-4
30	0	0	0	0	12706	12692	14
31	0	0	0	0	12683	12692	-9



Şekil 4.10. DeneySEL sonuçlar ile öngörülen sonuçlar arasındaki ilişki

Hidrokortizonun HPLC cihazı ile tayininde optimum analitik koşulların regresyon modelinin ANOVA sonuç tablosu Çizelge 4.5'te, regresyon analizine ait katsayılar, t ve P değerleri ise Çizelge 4.6'da verilmiştir.

Çizelge 4.5. Hidrokortizonun HPLC cihazı ile tayininde analitik koşullara ait dört bağımsız değişkenin regresyon modelinin ANOVA sonuç tablosu

	df	SS	MS	Model F	Anlamlılık
Regresyon	14	$5,73 \times 10^7$	$4,09 \times 10^6$	$6,64 \times 10^3$	$2,31 \times 10^{-27}$
Fark	16	$9,87 \times 10^3$	$6,17 \times 10^2$		
Toplam	30	$5,73 \times 10^7$			

Çoklu R= 1,00, R²= 1,00, Ayarlı R²= 1,00

Uygulanan modelin %95 güven aralığı içerisindeki ANOVA analizi incelenmiş ve model ile deneysel bulguların uyumu irdelenmiştir. Anlamlılık F değerinin 0,05'ten küçük olması (%95 güven aralığında) modelin istatistiksel olarak önemli olduğunun göstergesidir. Modelin Anlamlılık F değeri $2,31 \times 10^{-27}$ ($P < 0,05$) ve Model F değeri $6,64 \times 10^3$ olduğundan, regresyon istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur. Korelasyon katsayısı (R^2) değerinin %100,0 olarak belirlenmesi, gözlenen değerler ile öngörülen değerler arasında yüksek bir uyumluluk olduğunu göstermektedir (Çizelge 4.5).

Deneysel tasarım yöntemi ile Hidrokortizonun HPLC cihazı ile tayininde analitik koşullara ait dört bağımsız değişkenin denemelerinden elde edilen, teorik plaka sayılarının kodlanmamış değerler üzerinden gösterilen student t-testi ile elde edilen tam (ve anlamlı) polinomal denklem Eşitlik 4.3'te verilmiştir.

$$y_{tam} = -33535 + 10407 X_1 + 554 X_2 - 43658 X_3 + 1067 X_4 - 1760 X_1 * X_1 - 4,59 X_2 * X_2 + 20378 X_3 * X_3 - 7,74 X_4 * X_4 - 6,7 X_1 * X_2 - 329 X_1 * X_3 + 11,8 X_1 * X_4 - 110,4 X_2 * X_3 + 0,98 X_2 * X_4 + 67,9 X_3 * X_4 \quad (4.3)$$

Polinomal denklemde bağımsız değişkenlerin sistem üzerindeki anlamlılık dereceleri belirlenen P değerleri kullanılarak regresyon analizi yapılmıştır. Yüksek 't' değeri ($t > 2,12$) ve düşük 'P' değeri ($P < 0,05$) değişkenlere ait katsayının anlamlılık değerinin artması şeklinde yorumlanmaktadır.

Deneysel verilerden elde edilen sonuçlar doğrultusunda (Çizelge 4.6), Hidrokortizonun HPLC cihazı ile tayininin teorik plaka sayısı üzerinde ana etkilerinden akış hızının azaltıcı, pH, kolon sıcaklığı ve mobil faz organik madde yüzdesinin ise arttırıcı yönde etki gösteren faktörler olarak önem taşıdıkları görülmektedir. Anlamlı olan kuadratik etkilerin tamamının azaltıcı yönde etki gösteren faktörler olarak önem taşıdıkları görülmektedir.

İkili etkileşimlerinden tümü düşük P değerine bağlı olarak istatistiki açıdan anlamlı ve pH ile kolon sıcaklığı, pH ile akış hızı, kolon sıcaklığı ile akış hızının azaltıcı yönde, pH ile mobil faz organik madde yüzdesi, kolon sıcaklığı ile mobil faz organik madde yüzdesi, akış hızı ile mobil faz organik madde yüzdesinin arttırıcı yönde etki göstermiştir.

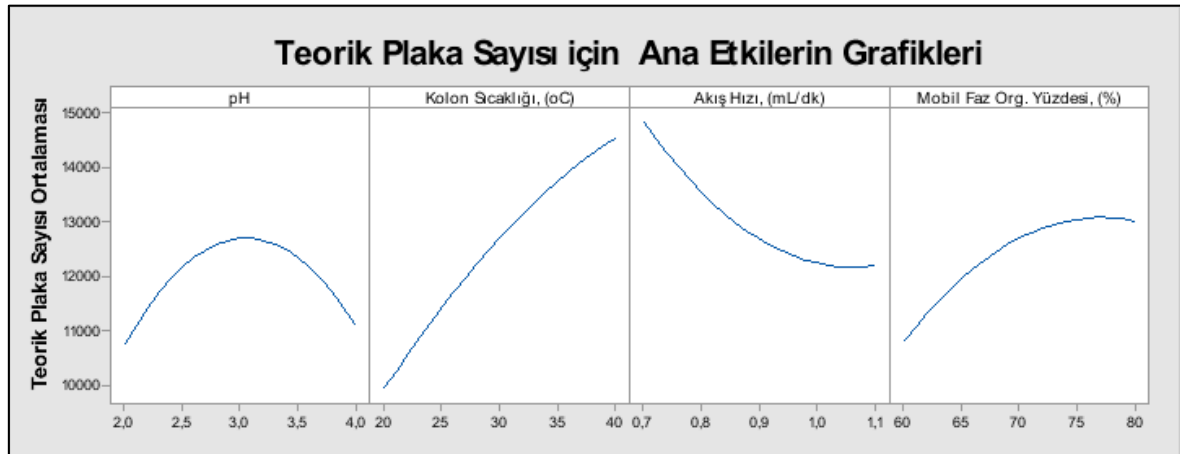
Çizelge 4.6. Hidrokortizonun HPLC cihazı ile tayininde analitik koşullara ait dört bağımsız değişkenlerin teorik plaka sayısı regresyon analizine ait katsayılar, t ve P değerleri

	Katsayılar	Standart Hata	t Stat	P-değeri
Kesişim	12692	9	1352	$6,67 \times 10^{-42}$
X ₁	89	5	18	$7,13 \times 10^{-12}$
X ₂	1140	5	225	$1,96 \times 10^{-29}$
X ₃	-652	5	-129	$1,48 \times 10^{-25}$
X ₄	549	5	108	$2,32 \times 10^{-24}$
X ₁ X ₁	-440	5	-95	$1,98 \times 10^{-23}$
X ₂ X ₂	-115	5	-25	$3,61 \times 10^{-14}$
X ₃ X ₃	204	5	44	$4,20 \times 10^{-18}$
X ₄ X ₄	-193	5	-42	$9,58 \times 10^{-18}$
X ₁ X ₂	-17	6	-3	$1,55 \times 10^{-2}$
X ₁ X ₃	-16	6	-3	$1,76 \times 10^{-2}$
X ₁ X ₄	30	6	5	$2,13 \times 10^{-4}$
X ₂ X ₃	-55	6	-9	$1,38 \times 10^{-7}$
X ₂ X ₄	25	6	4	$1,13 \times 10^{-3}$
X ₃ X ₄	34	6	5	$5,18 \times 10^{-5}$

X1: pH, X2: Kolon Sıcaklığı (°C), X3: Akış Oranı (mL/min), X4: Mobil faz organik yüzdesi (%v:v)

*: İstatistiki olarak anlamlı

Hidrokortizonun HPLC cihazı ile tayininde analitik koşullara deneysel tasarım yöntemiyle incelendiği çalışmada; Anlamlılık F değeri ve Model F değeri kullanılarak yapılan regresyon analizi ile modelin istatistiki olarak anlamlı olduğu gösterilmiştir.



Şekil 4.11. Hidrokortizonun HPLC cihazı ile tayininde ana parametrelerin teorik plaka sayısı üzerine tekli etkileri

pH etkisi: Regresyon analizi sonucu hidrokortizonun HPLC cihazı ile tayininde çözelti pH'sinin etkisi *istatistiksel olarak önemli* bulunmuştur ($P=7,13 \times 10^{-12}$, $P<0,05$). pH'ye ait katsayının sıfırdan büyük olması (89) hidrokortizon analitinin HPLC tayininde teorik plaka sayısı bakımından pH'nin kümülatif etkisinin pozitif olduğunu göstermektedir.

Hidrokortizonun HPLC cihazı ile tayininde pH 2,0–3,0 aralığında teorik plaka sayısının arttığı, pH=3'te maksimuma ulaştığı ve pH 3,0–4,0 aralığında ise azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 4.11). Şekil 4.11'deki grafikten en yüksek pik alanının pH 3,1 koşullarında 1723×10^4 olarak elde edilmiştir.

Kolon Sıcaklığının Etkisi: Regresyon analizi sonucu hidrokortizonun HPLC cihazı ile tayininde kolon sıcaklığının etkisi *istatistiksel olarak önemli* bulunmuştur ($P=1,96 \times 10^{-29}$, $P<0,05$). Kolon sıcaklığına ait katsayının sıfırdan büyük olması (1140) hidrokortizon analitinin HPLC tayininde kolon sıcaklığının kümülatif etkisinin pozitif olduğunu göstermektedir. Ayrıca kolon sıcaklığı parametresine ait katsayının diğer tüm parametrelerden daha büyük olması, parametreler arasında teorik plaka sayısı üzerine etkisinin en fazla olan parametre olduğunu göstermektedir.

Hidrokortizonun HPLC cihazı ile tayininde kolon sıcaklığının 20°C–40°C aralığında teorik plaka sayısının arttığı tespit edilmiştir (Şekil 4.11). Şekil 4.11'deki grafikten en yüksek teorik plaka sayısının 40,0°C koşullarında 1723×10^4 olarak elde edilmiştir.

Akış Hızının Etkisi: Regresyon analizi sonucu hidrokortizonun HPLC cihazı ile tayininde akış hızının etkisi *istatistiksel olarak önemli* bulunmuştur ($P=1,48 \times 10^{-25}$, $P<0,05$). Akış hızına ait katsayının sıfırdan küçük olması (-652) hidrokortizon analitinin HPLC tayininde akış hızının kümülatif etkisinin negatif olduğunu göstermektedir.

Hidrokortizonun HPLC cihazı ile tayininde artan akış hızı ile teorik plaka sayısının azaldığı tespit edilmiştir. Şekil 4.11'deki grafikten en yüksek pik alanı 0,7 mL/min koşullarında 1723×10^4 olarak elde edilmiştir.

Mobil Faz Organik Yüzdesinin Etkisi: Regresyon analizi sonucu hidrokortizonun HPLC cihazı ile tayininde mobil faz organik yüzdesinin etkisi *istatistiksel olarak önemli* bulunmuştur ($P=2,32 \times 10^{-24}$, $P<0,05$). Akış hızına ait katsayının sıfırdan büyük olması (549) hidrokortizon analitinin HPLC tayininde mobil faz organik madde yüzdesinin kümülatif etkisinin pozitif olduğunu göstermektedir.

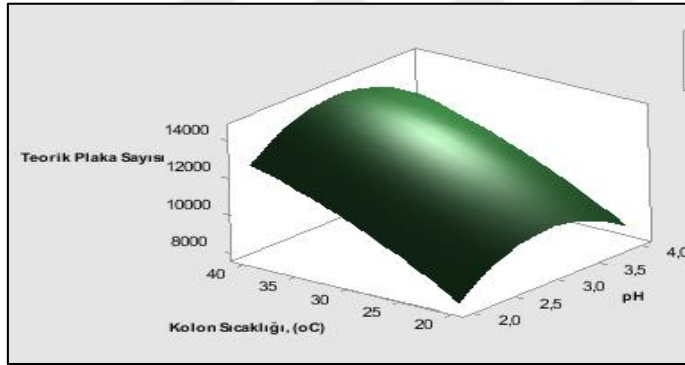
Hidrokortizonun HPLC cihazı ile tayininde %60'dan %76'e kadar artan mobil faz yüzdesi ile kümülatif etkinin arttığı, %77'de maksimuma ulaştığı ve sonrasında teorik plaka sayısının

bir miktar azaldığı tespit edilmiştir. Şekil 4.11'deki grafikten en yüksek teorik plaka sayısının mobil faz yüzdesinin %77 olduğu durumda elde edildiği tespit edilmiştir.

Hidrokortizonun HPLC cihazı ile tayinine etki eden anlamlı parametrelerin TEORİK PLAKA SAYISI üzerine birlikte etkileri:

pH ve kolon sıcaklığının teorik plaka sayısına etkisi: Regresyon analizi sonucu hidrokortizonun HPLC cihazı ile tayininde pH ve kolon sıcaklığı anlamlı parametrelerin birlikte etkisi (Şekil 4.12) teorik plaka sayısı üzerine *istatistiksel olarak önemli* bulunmuştur. ($P = 1,55 \times 10^{-2}$, $P < 0,05$).

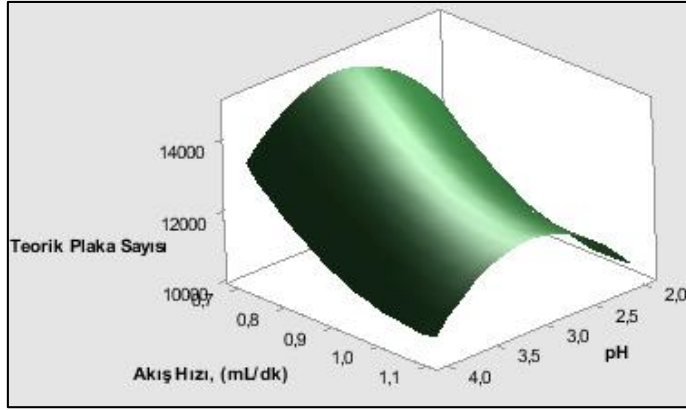
pH ve kolon sıcaklığına ait katsayının (-17) sıfırdan küçük olması, bu ikili etkileşimin etkisinin hidrokortizon analitinin HPLC cihazı ile tayinindeki teorik plaka sayısı üzerine etkisinin negatif olduğunu ifade etmektedir. Şekil 4.12'deki pH ve kolon sıcaklığına bağlı yüzey grafiğinden, en yüksek teorik plaka sayısının pH 3,1 ve kolon sıcaklığının 40°C olduğu koşullarda 1723×10^4 olarak elde edilmiştir.



Şekil 4.12. Hidrokortizonun HPLC cihazı ile tayininde teorik plaka sayısı üzerine pH ve kolon sıcaklığın etkisi

pH ve akış hızının teorik plaka sayısına etkisi: Regresyon analizi sonucu hidrokortizonun HPLC cihazı ile tayininde pH ve akış hızının anlamlı parametrelerin birlikte etkisi (Şekil 4.13) teorik plaka sayısı üzerine *istatistiksel olarak önemli* bulunmuştur. ($P = 1,76 \times 10^{-2}$, $P < 0,05$).

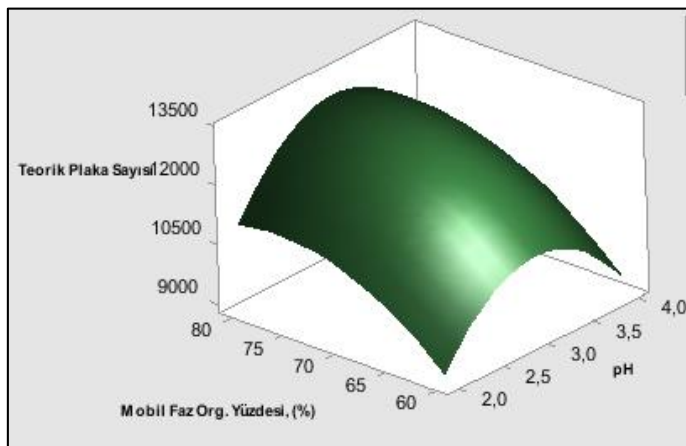
pH ve akış hızına ait katsayının (-16) sıfırdan küçük olması, bu ikili etkileşimin etkisinin hidrokortizon analitinin HPLC cihazı ile tayinindeki teorik plaka sayısı üzerine etkisinin negatif olduğunu ifade etmektedir. Şekil 4.13'teki pH ve akış hızına bağlı yüzey grafiğinden, en yüksek pik alanının pH 3,1 ve akış hızının 0,7 mL/min olduğu koşullarda 1723×10^4 olarak elde edilmiştir.



Şekil 4.13. Hidrokortizonun HPLC cihazı ile tayininde teorik plaka sayısı üzerine pH ve akış hızının etkisi

pH ve mobil faz organik madde yüzdesinin teorik plaka sayısına etkisi: Regresyon analizi sonucu hidrokortizonun HPLC cihazı ile tayininde pH ve mobil faz organik madde yüzdesinin anlamlı parametrelerin birlikte etkisi (Şekil 4.14) teorik plaka sayısı üzerine istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P= 2,13 \times 10^{-4}$, $P<0,05$).

pH ve mobil faz organik madde yüzdesine ait katsayının (30) sıfırdan büyük olması, bu ikili etkileşimin etkisinin hidrokortizon analitinin HPLC cihazı ile tayinindeki teorik plaka sayısı üzerine etkisinin pozitif olduğunu ifade etmektedir. Şekil 4.14'teki pH ve mobil faz organik madde yüzdesine bağlı yüzey grafiğinden, en yüksek teorik plaka sayısının $\text{pH}= 3,1$ 'de ve %77 mobil faz organik madde yüzdesi olduğu koşullarda 1723×10^4 olarak elde edilmiştir.

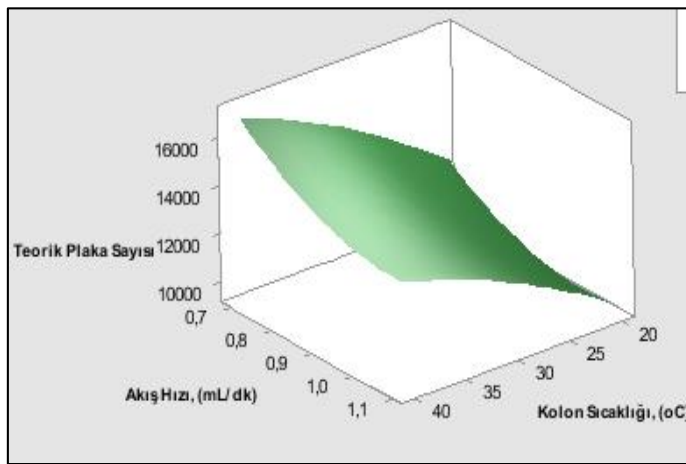


Şekil 4.14. Hidrokortizonun HPLC cihazı ile tayininde teorik plaka sayısı üzerine pH ve mobil faz organik madde yüzdesinin etkisi

Kolon sıcaklığı ve akış hızının teorik plaka sayısına etkisi: Regresyon analizi sonucu hidrokortizonun HPLC cihazı ile tayininde kolon sıcaklığı ve akış hızının anlamlı

parametrelerin birlikte etkisi (Şekil 4.15) pik alanı üzerine *istatistiksel olarak önemli* bulunmuştur ($P= 1,38 \times 10^{-7}$, $P<0,05$).

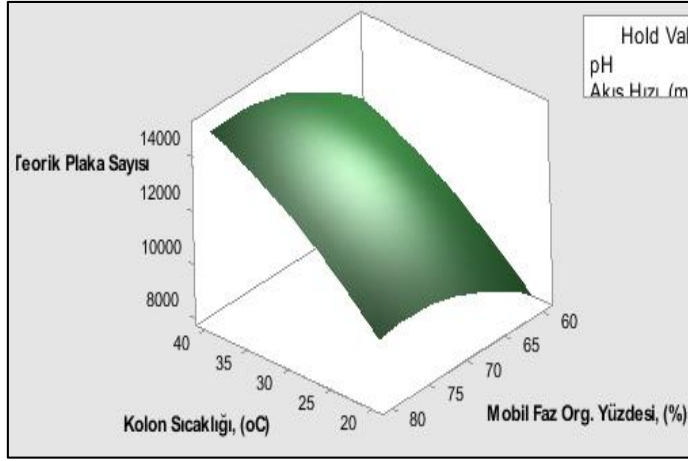
Kolon sıcaklığı ve akış hızına ait katsayının (-55) sıfırdan küçük olması, bu ikili etkileşimin etkisinin hidrokortizon analitinin HPLC cihazı ile tayinindeki teorik plaka sayısı üzerine etkisinin negatif olduğunu ifade etmektedir. Şekil 4.15'teki kolon sıcaklığı ve akış hızına bağlı yüzey grafiğinden, en yüksek pik alanının 40°C'da ve akış hızının 0,7 mL/min olduğu koşullarda 1723×10^4 olarak elde edilmiştir.



Şekil 4.15. Hidrokortizonun HPLC cihazı ile tayininde teorik plaka sayısı üzerine kolon sıcaklığı ve akış hızının etkisi

Kolon sıcaklığı ve mobil faz organik madde yüzdesinin teorik plaka sayısına etkisi: Regresyon analizi sonucu hidrokortizonun HPLC cihazı ile tayininde kolon sıcaklığı ve mobil faz organik madde yüzdesi anlamlı parametrelerin birlikte etkisi (Şekil 4.16) teorik plaka sayısı üzerine *istatistiksel olarak önemli* bulunmuştur. ($P= 1,13 \times 10^{-3}$, $P<0,05$).

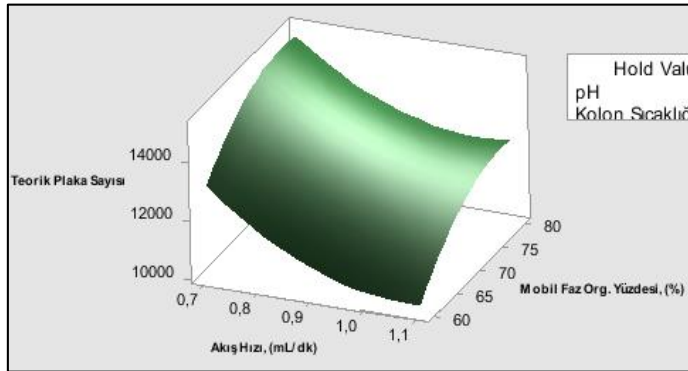
Kolon sıcaklığı ve mobil faz organik madde yüzdesine ait katsayının (25) sıfırdan büyük olması, bu ikili etkileşimin etkisinin hidrokortizon analitinin HPLC cihazı ile tayinindeki teorik plaka sayısı üzerine etkisinin pozitif olduğunu ifade etmektedir. Şekil 4.16'daki kolon sıcaklığı ve akış hızına bağlı yüzey grafiğinden, en yüksek pik alanının 40°C'da ve mobil faz organik madde yüzdesinin %77 olduğu koşullarda 1723×10^4 olarak elde edilmiştir.



Şekil 4.16. Hidrokortizonun HPLC cihazı ile tayininde teorik plaka sayısı üzerine kolon sıcaklığı ve mobil faz organik madde yüzdesinin etkisi

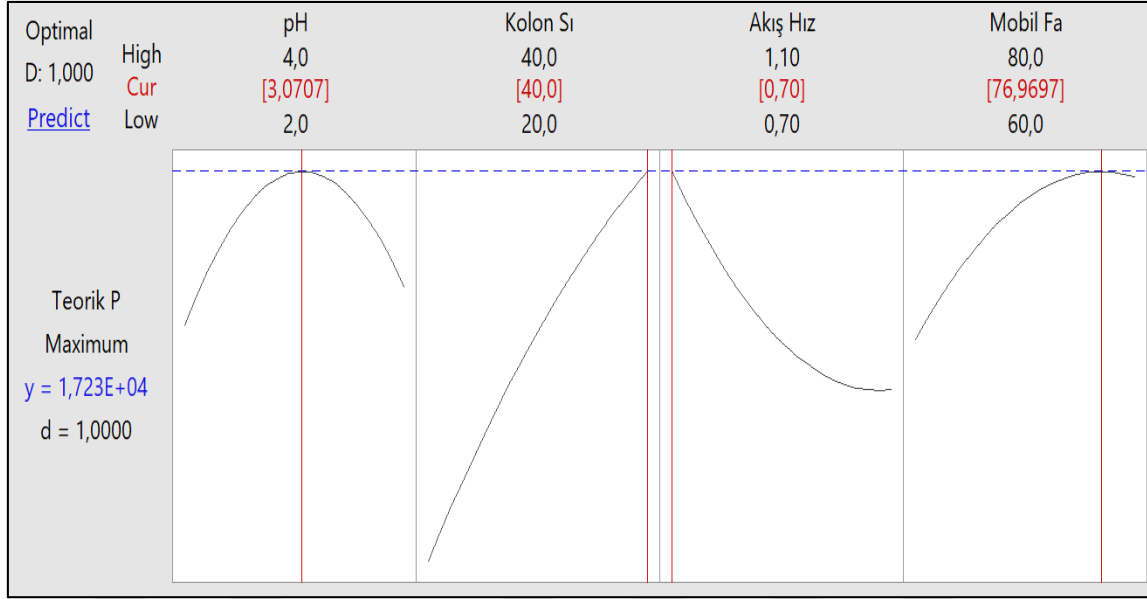
Akış hızı ve mobil faz organik madde yüzdesinin teorik plaka sayısına etkisi: Regresyon analizi sonucu hidrokortizonun HPLC cihazı ile tayininde akış hızı ve mobil faz organik madde yüzdesi anlamlı parametrelerin birlikte etkisi (Şekil 4.17) teorik plaka sayısı üzerine istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P = 5,18 \times 10^{-5}$, $P < 0,05$).

Akış hızı ve mobil faz organik madde yüzdesine ait katsayının (34) sıfırdan büyük olması, bu ikili etkileşimin etkisinin hidrokortizon analitinin HPLC cihazı ile tayinindeki alan değeri üzerine etkisinin pozitif olduğunu ifade etmektedir. Şekil 4.17'deki akış hızı ve akış hızına bağlı yüzey grafiğinden, en yüksek pik alanının 0,7 mL/min'da %77 olduğu koşullarda 1723×10^4 olarak elde edilmiştir.



Şekil 4.17. Hidrokortizonun HPLC cihazı ile tayininde teorik plaka sayısı üzerine akış hızı ve mobil faz organik madde yüzdesinin etkisi

Hidrokortizonun HPLC cihazı ile tayini için dört bağımsız değişkenle CCD modeline göre parametrelerin optimum değerleri Şekil 4.18'de yer almaktadır.

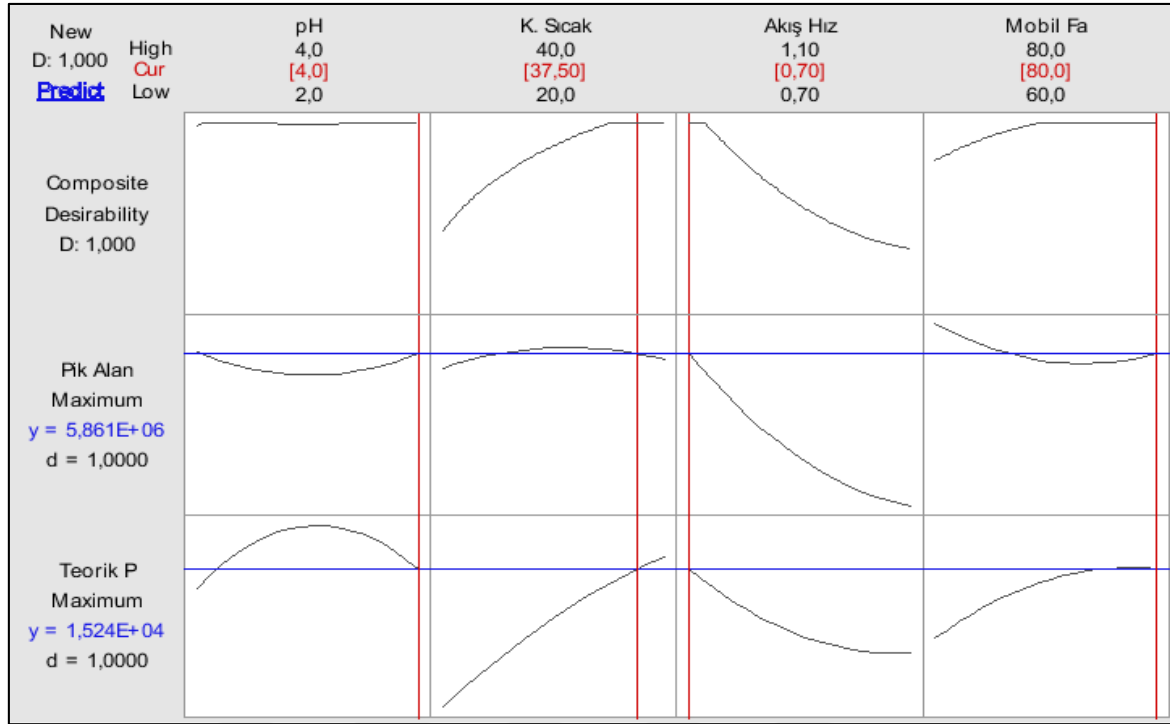


Şekil 4.18. Hidrokortizonun HPLC cihazı ile tayininde teorik plaka değerlendirmelerine göre belirlenen optimum analiz koşulları

Şu ana kadar yapılan tüm çalışmalar için pik alanı ve teorik plaka sayısı için ayrı ayrı optimum değerler bulunmuştur. Çalışmanın devamında pik alanı, teorik plaka sayısı ve ayrı ayrı ve her iki cevabın ortak yer aldığı 3 farklı optimizasyon tasarlanmıştır.

1. Pik alanı için 4 parametreden optimizasyon
2. Teorik plaka sayısı için 4 parametreden optimizasyon
3. Pik alanı + Teorik plaka sayısı için 4 parametreden optimizasyon

Hidrokortizonun HPLC cihazı ile tayini için dört bağımsız değişkenle CCD modeline göre pik alanına göre saptanan optimum koşullar Şekil 4.9'da, teorik plaka sayısına göre saptanan optimum Şekil 4.18'de ve pik alanı-teorik plaka sayısına göre saptanan optimum değerler Şekil 4.19'da yer almaktadır.



Şekil 4.19. Hidrokortizonun HPLC cihazı ile tayini için dört bağımsız değişkenle CCD modeline göre parametrelerin optimum değerleri (Pik Alanı ve Teorik Plaka Sayısı)

Gelinen son noktada pik alanı, sadece teorik plaka sayısı ve mix (Pik alanı + Teorik plaka sayısı) için bulunan optimum noktalardan 2 farklı günde 3'er paralel olmak üzere deneme analizleri yapıldı. Bu deneme sonuçları;

Çizelge 4.7. Optimizasyon çalışması analiz sonuçları

Deney No	pH	Kolon Sıcaklığı	Akış Hızı	Mobil Faz Organik Yüzdesi	Salı		Çarşamba	
					Pik Alanı	Teorik Plaka Sayısı	Pik Alanı	Teorik Plaka Sayısı
1	2	27,3	0,7	60	5687610	11498		
2	2	27,3	0,7	60	5706616	11502		
3	2	27,3	0,7	60	5661447	11506		
4	2	27,3	0,7	60			5691257	11508
5	2	27,3	0,7	60			5725015	11502
6	2	27,3	0,7	60			565205	11254
7	3,1	40	0,7	77	5265906	14033		
8	3,1	40	0,7	77	5350425	13535		
9	3,1	40	0,7	77	5403459	13546		
10	3,1	40	0,7	77			5201278	13725
11	3,1	40	0,7	77			5190157	13727
12	3,1	40	0,7	77			5207761	13647
13	4,0	37,5	0,7	80	5117905	14493		
14	4,0	37,5	0,7	80	5149234	13405		
15	4,0	37,5	0,7	80	5167472	13411		
16	4,0	37,5	0,7	80			5448763	13518
17	4,0	37,5	0,7	80			5556896	13462
18	4,0	37,5	0,7	80			5525583	13400

Minitabdan elde edilen sayısal verilerle sadece pik alanı açısından, teorik plaka sayısı açısından ve mix (Pik alanı + Teorik plaka sayısı) açısından optimum noktalar belirlenmiştir. Son geline değerlendirme aşamasında HPLC sisteminden elde edilen hidrokortizon piki için simetri faktörü, rezolüsyon, pikin omuz verip vermemesi ve alıkonma süresi gibi kriterlerde dikkate alınarak değerlendirmeler de tamamlanmıştır.

Bu sonuçlar doğrultusunda kromatografik şartlar hareketli faz oranı 80/20 metanol /su, pH 4,0 akış hızı 0,7 mL/min, ve kolon sıcaklığı 37,5 olarak belirlenmiştir. Bu koşullarda 254 nm’de UV-Vis dedektör ile elde edilen kromatogram Şekil 4.27’de verilmiştir. Alıkonma süresi 5,1 dakika olarak bulunmuştur.

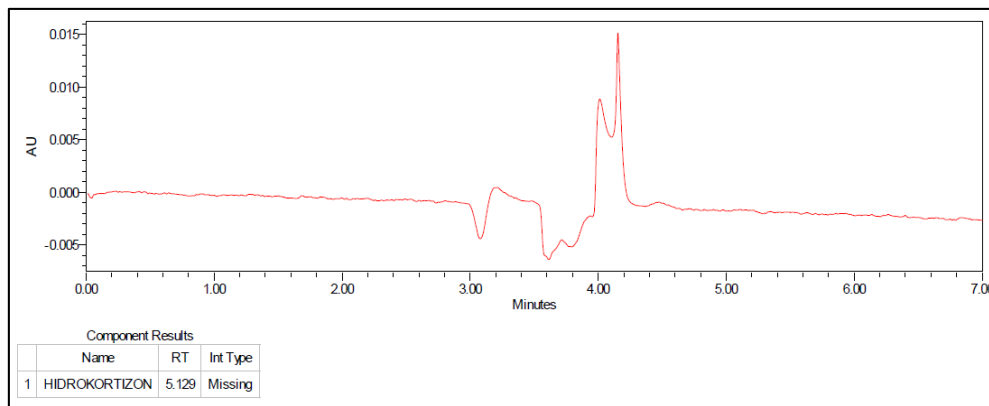
4.2. Validasyon

4.2.1. Seçicilik

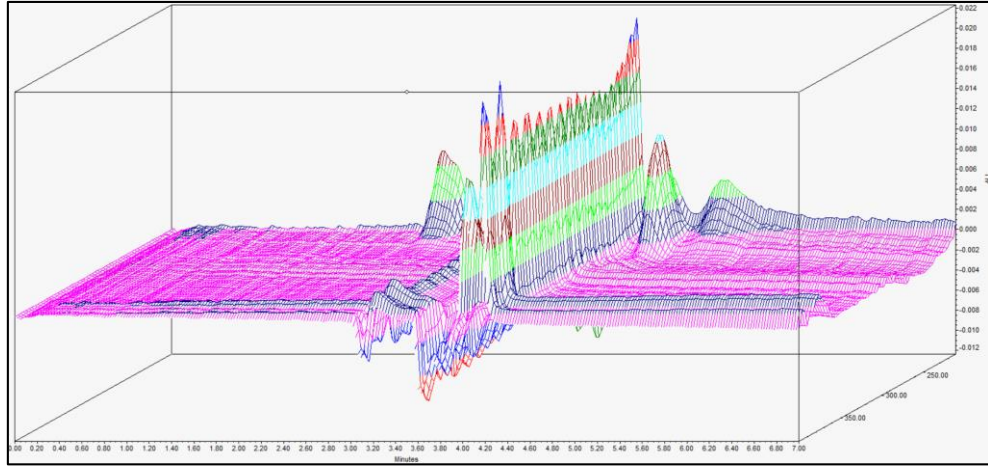
Seçicilik, numune ortamında bulunan bileşenlerin varlığında ilgilenilen analitin doğru ve spesifik şekilde ölçülebilmemesini sağlar.

Kabul kriteri

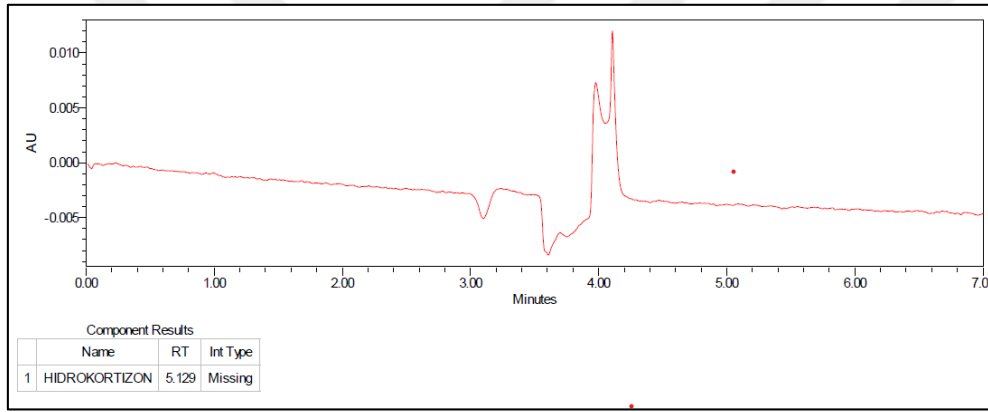
Çalışma neticesinde elde edilen kromatogramlar incelendiğinde tüm ilgili analit pikleri birbirinden tam olarak ayrılabilir. Ana pik, seyreltme çözeltisi ve plasebo çözeltileri gibi çözeltilerden gelen pikler ile girişim yapmamalıdır. Hidrokortizon piki için, “Pik saflığı açısı değeri “Pik saflığı eşiği” değerinden küçük olmalıdır.



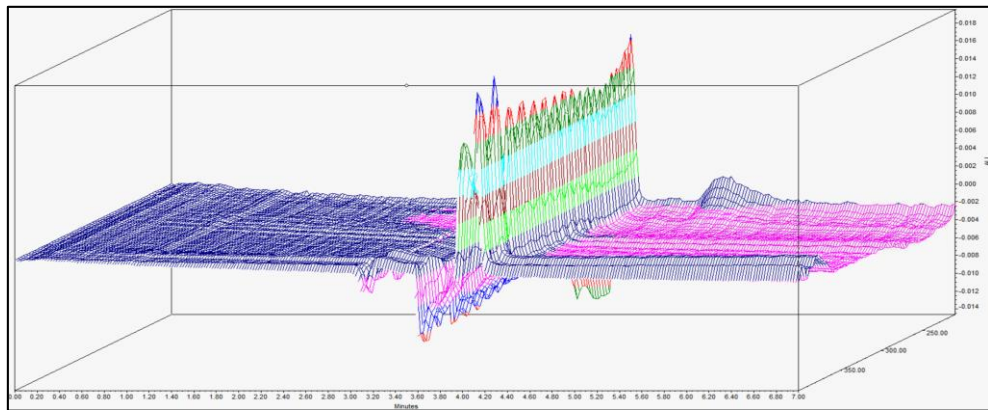
Şekil 4.20 .Kör çözelti kromatogramı



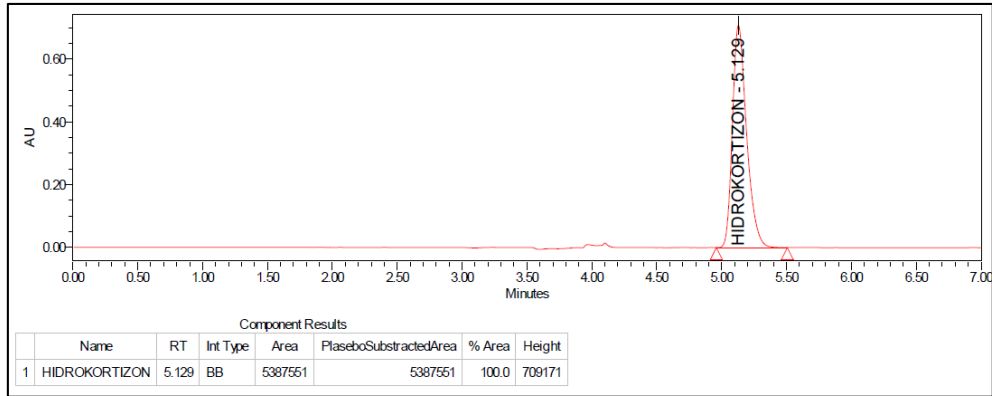
Şekil 4.21. Kör çözelti 3D kromatogramı



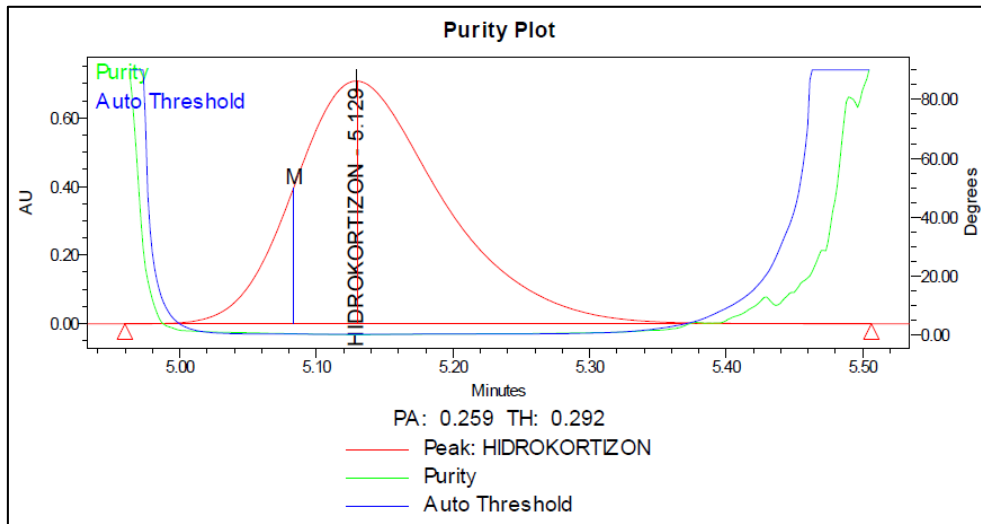
Şekil 4.22. Plasebo çözeltisi kromatogramı



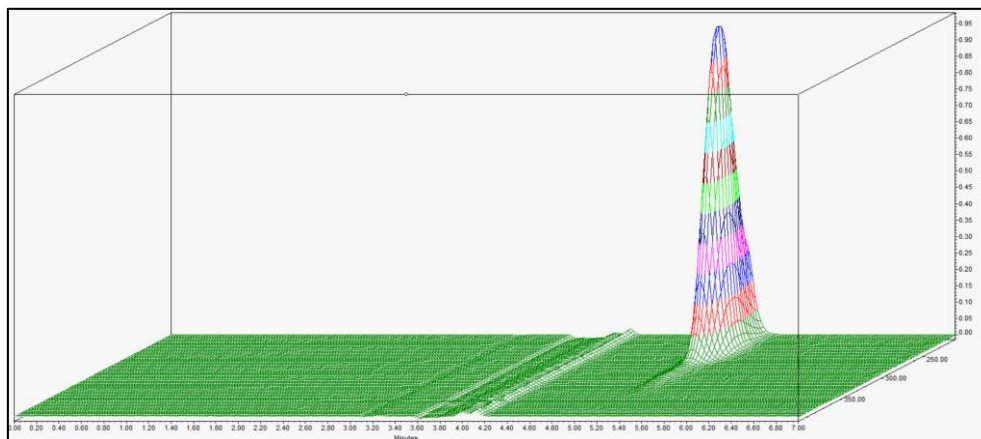
Şekil 4.23. Plasebo çözeltisi 3D kromatogramı



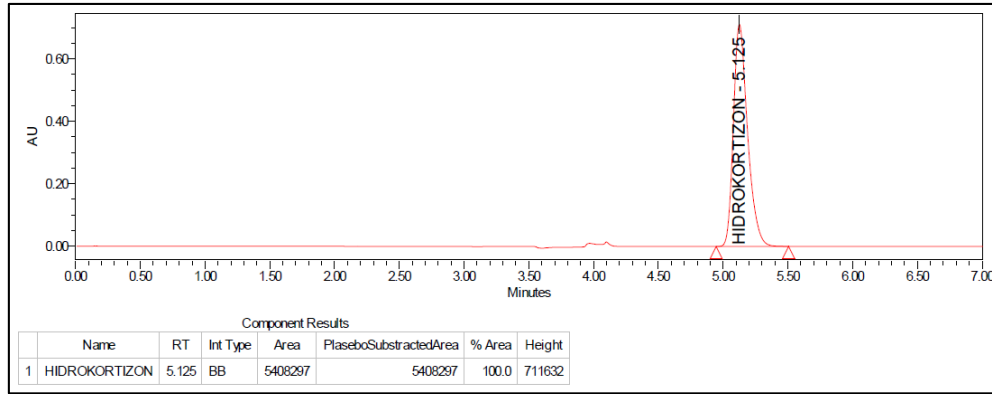
Şekil 4.24. Standart çözeltisi kromatogramı



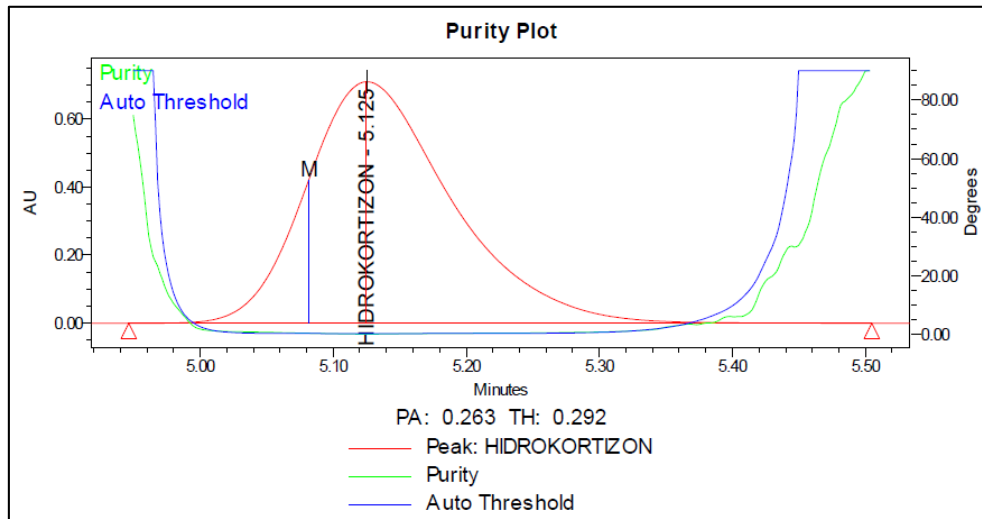
Şekil 4.25. Standart çözeltisi purity plot kromatogramı



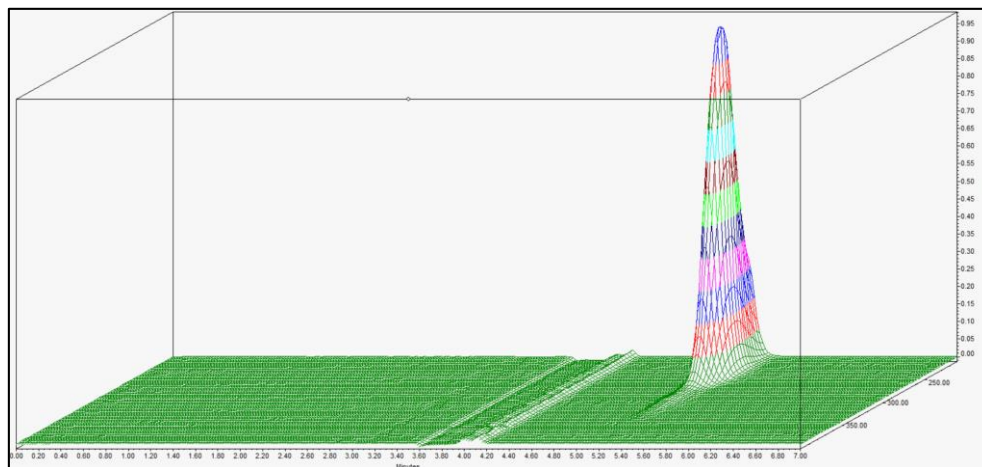
Şekil 4.26. Standart çözeltisi 3D kromatogramı



Şekil 4.27. Numune çözeltisi kromatogramı



Şekil 4.28. Numune çözeltisi purity plot kromatogramı



Şekil 4.29. Numune çözeltisi 3D kromatogramı

Çizelge 4.8. Seçicilik analiz sonuçları

Enjeksiyon	Pik Saflığı Açısı	Pik Saflığı Eşiği
Çözücü	-	-
Plasebo	-	-
Standart Çözeltisi	0,259	0,292
Numune Çözeltisi	0,263	0,292

Sonuçların değerlendirilmesi

Plasebo ve seyreltme çözeltilerinden girişim gözlenmemiş olup sonuçlar kabul kriterini karşılamıştır.

Her enjeksiyonda pik saflığı açısı pik saflığı eşiğinden küçük olup, sonuçlar kabul kriterine uygun bulunmuştur.

4.2.2. Sistem uygunluğu

Sistem uygunluğu parametresi analitik sistemin uygun şekilde çalıştığını, doğru ve kesin sonuçlar verdiğini doğrulamak amacıyla uygulanır. Sistemin uygunluğu standart çözeltinin altı tekrarlı enjeksiyonuyla ile belirlenir. Sistem uygunluğu her validasyon parametresi analizinin başında uygulanır.

Kabul kriteri

Standart çözelti ile elde edilen kromatogramlarda hidrokortizon pikinin simetri faktörü 2'den fazla olmamalıdır.

Standart çözelti ile elde edilen kromatogramlarda hidrokortizon pikinin teorik plaka sayısı 2000'den fazla olmalıdır.

Hidrokortizon pik alanlarının RSD değeri 6 tekrarlı enjeksiyon sonucunda %2,0'den fazla olmamalıdır.

Çizelge 4.9. Sistem uygunluğu analiz sonuçları

Enjeksiyon Sayısı	Alan	Alıkonma Süresi	Simetri Faktör	Teorik Plaka Sayısı
1	5543402	5,07	1,34	9301
2	5536679	5,07	1,34	9355
3	5540477	5,06	1,34	9341
4	5544268	5,07	1,34	9377
5	5541927	5,07	1,34	9372
6	5538869	5,07	1,34	9410
Ortalama	5540937			
%RSD	0,05			

Sonuçların değerlendirilmesi

Simetri faktörleri 1,34 olup kabul kriterine uygun bulunmuştur.

Teorik plaka sayısı 2000 değerden büyük olup kabul kriterine uygun bulunmuştur.

6 enjeksiyona ait % RSD 0,05 olup kabul kriterine uygun bulunmuştur.

Sistem uygunluk kriterleri karşılanmıştır.

4.2.3. Doğrusallık

%20, %40, %60, %80, %100, %120 ve %140 derişim düzeyinde kalibrasyon numuneleri hazırlanmıştır ve her derişimden 2'şer enjeksiyon verilmiştir.

Kabul kriteri

Regresyonun korelasyon katsayısı 0,997'den fazla olmalıdır.

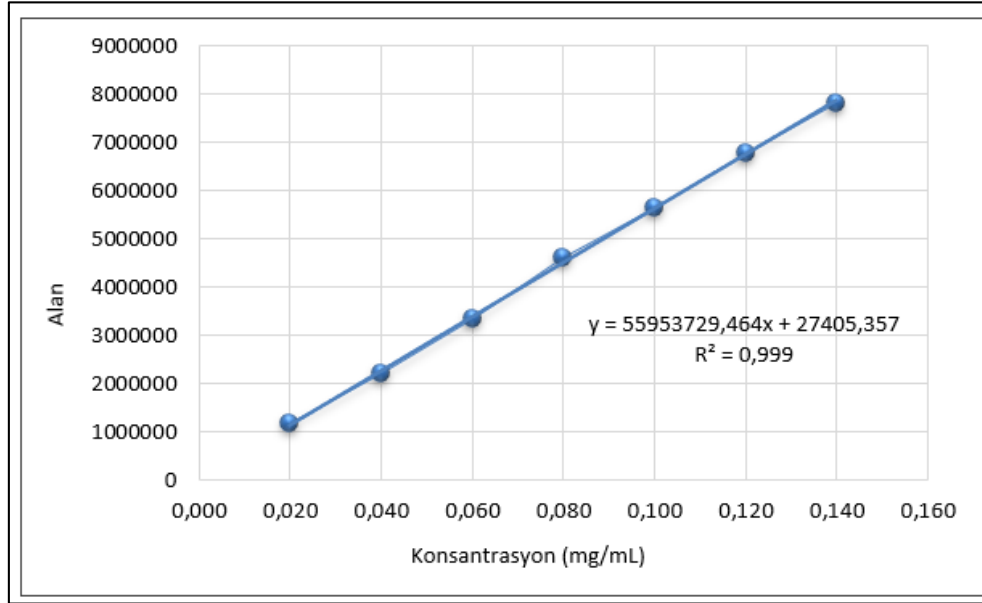
Eğim (m) ve kesişim raporlanır.

Çizelge 4.10. Doğrusallık analiz sonuçları

% Derişim Seviyesi	Derişim (mg/mL)	Alan-1	Alan-2	Ortalama Alan	% RSD
20	0,020	1159713	1161260	1160487	0,09
40	0,040	2221257	2212662	2216960	0,27
60	0,060	3343561	3311928	3327745	0,67
80	0,080	4613274	4608418	4610846	0,07
100	0,100	5630459	5648781	5639620	0,23
120	0,120	6790730	6755704	6773217	0,36
140	0,140	7795096	7799009	7797053	0,04

Çizelge 4.11. Kalibrasyon eğrisi değerleri

Eğim	55953729,464X
Kesişim	27405,357
R ²	0,999



Şekil 4.30. Kalibrasyon Eğrisi

Sonuçların değerlendirilmesi

Regresyon katsayısı 0,9997 olarak bulunmuş olup, sonuçlar kabul kriterini karşılamıştır.

4.2.4 Gözlenebilme ve tayin sınırı

LOD ve LOQ değerleri sinyal/gürültü'ye dayandırılarak hesaplanmıştır.

Kabul kriteri

LOD sınırı için ilgili kromatogramdan elde edilen sinyalin gürültüye oranının 3'ten büyük olması gerekir.

LOQ sınırı için ilgili kromatogramdan elde edilen sinyalin gürültüye oranının 10'dan büyük olması gerekir.

Çizelge 4.12. LOD ve LOQ analiz sonuçları

	Sinyal / Gürültü S/N	Konsantrasyon (mg/mL)
LOD	2,9	0,00004
LOQ	10,4	0,00010

Sonuçların değerlendirilmesi

S/N oranına göre LOD ve LOQ değerleri belirlenmiştir.

4.2.5. Çalışma aralığı

Doğrusallık analizi sonuçları, çalışma aralığının minimum 0,02 mg/mL ve maksimum 0,14 mg/mL derişim düzeylerinde olduğunu göstermiştir.

4.2.6. Doğruluk (Geri kazanım)

Metodun doğruluğu; doğrusallık aralığında belirtilen seviyeler için gösterilir. Her bir seviye için 3'er adet olmak üzere toplam 9 adet numune hazırlanmış ve % geri kazanımları hesaplanmıştır.

Kabul kriteri

Geri kazanımlar %95-105 kriterini sağlamalıdır.

Aynı derişimdeki 3 numunenin RSD'si %2'den fazla olmamalıdır.

Çizelge 4.13. Doğruluk analiz sonuçları

% Derişim Seviyesi	Derişim (mg/mL)	Alan-1	Alan-2	Ortalama
%80-1	0,080	4635469	4639365	4637417
%80-2	0,080	4617962	4639531	4628747
%80-3	0,080	4647645	4598271	4622958
%100-1	0,100	5570661	5539000	5554831
%100-2	0,100	5601022	5563588	5582305
%100-3	0,100	5615709	5617315	5616512
%120-1	0,120	6745060	6751413	6748237
%120-2	0,120	6691292	6751689	6721491
%120-3	0,120	6765490	6743245	6754368

Çizelge 4.14. Doğruluk saptanan içerik

% Derişim Seviyesi	Tayin Edilen Derişimi (mg/mL)	% Geri Kazanım	%Düzey içi Ortalama	% RSD
%80-1	0,084	104,62	104,44	0,16
%80-2	0,084	104,42		
%80-3	0,083	104,29		
%100-1	0,100	100,25	100,79	0,55
%100-2	0,101	100,75		
%100-3	0,101	101,36		
%120-1	0,122	101,49	101,39	0,26
%120-2	0,121	101,09		
%120-3	0,122	101,58		

Sonuçların değerlendirilmesi

Doğruluk numunelerinin % geri kazanımları %80, %100 ve %120 seviyeleri için sırasıyla RSD değerleri %80, %100 ve %120 seviyeleri için sırasıyla %0,38, %0,57 ve %0,87 olarak bulunmuş olup, sonuçlar kabul kriterini karşılamıştır.

Doğruluk numunelerinde ortalama geri kazanım %104,44, %100,79 ve %101,39 olarak hesaplanmış olup, sonuçlar kabul kriterini karşılamıştır.

4.2.7. Kesinlik

Kesinlik; sistem kesinliği, tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik çalışmaları ile belirlenmiştir

Sistem Kesinliği

Sistem Kesinliği analizleri için standart çözeltinin 6 tekrarlı enjeksiyonu gerçekleştirilmiştir.

Kabul kriteri

RSD değeri %2'den fazla olmamalıdır.

Çizelge 4.15. Sistem kesinliği analiz sonuçları

Enjeksiyon Sayısı	Alan Değeri
1	5605821
2	5669099
3	5604105
4	5626465
5	5667119
6	5638201
Ortalama	5635135
%RSD	0,51

Sonuçların değerlendirilmesi

% RSD değeri 0,51 olup kabul kriterine uygun bulunmuştur.

Yöntem kesinliği (tekrarlanabilirlik)

6 adet bitmiş ürün numunesinin çözeltilerinin metoda göre çalışılması ile alınan sonuçların birbirlerine yakınlık derecesinin ölçülmesi prensibine dayanır.

Kabul kriteri

6 adet bitmiş ürün numune sonucunun RSD değeri %2'den fazla olmamalıdır. Çalışılan numunelerin her birinin sonucu spesifikasyon limitleri içinde olmalıdır.

Çizelge 4.16. Tekrarlanabilirlik analiz sonuçları

Numune	Alan-1	Alan-2	Ortalama Alan	% Sonuç
1	5519744	5517341	5518543	99,6
2	5539714	5538095	5538905	99,9
3	5530480	5526030	5528255	99,7
4	5535627	5524527	5530077	99,8
5	5531911	5533038	5532475	99,8
6	5530199	5530327	5530263	99,8
			Ortalama	99,8
			RSD	0,12

Sonuçların değerlendirilmesi

Tekrarlanabilirlik numuneleri için RSD değerleri %0,12 olarak bulunmuş olup, numune sonuçlar spesifikasyon limitleri içerisinde yer almaktadır.

Sonuçlar kabul kriterini karşılamıştır.

Ara kesinlik (Laboratuvar içi kesinlik)

Sonuçlar, farklı gün ve farklı analist analizlerinden elde edilen sonuçlardır. Altı adet bitmiş ürün numunesi hazırlanmış ve bu numunelerden ikişer enjeksiyon verilmiştir. Ara kesinlik parametresi kabul kriterlerini karşılamıştır.

Kabul kriteri

6 adet bitmiş ürün numune sonucunun RSD değeri %2'den fazla olmamalıdır.

Tekrarlanabilirlik analiz sonuçları ile birlikte elde edilen 12 adet miktar tayini sonucu arasındaki RSD değeri %2'den fazla olmamalıdır.

Çalışılan numunelerin her birinin sonucu spesifikasyon sınırları içinde olmalıdır.

Çizelge 4.17. Ara kesinlik analiz sonuçları

Numune	Alan-1	Alan-2	Ortalama Alan	% Sonuç
1	5670681	5623479	5647080	100,2
2	5646290	5659136	5652713	100,3
3	5668720	5640105	5654413	100,3
4	5658575	5670682	5664629	100,5
5	5678108	5676011	5677060	100,7
6	5634162	5660970	5647566	100,2
			Ortalama	100,4
			RSD	0,21

Çizelge 4.18. Tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik analiz sonuç kıyaslaması

Analiz	Numune	% Sonuç
Tekrarlanabilirlik	99,6	99,6
	100,0	100,0
	99,8	99,8
	99,8	99,8
	99,8	99,8
	99,8	99,8
Ara Kesinlik	100,2	100,2
	100,3	100,3
	100,3	100,3
	100,5	100,5
	100,7	100,7
	100,2	100,2
Ortalama		100,1
% RSD		0,35

Sonuçların değerlendirilmesi

Ara kesinlik numuneleri için RSD değerleri %0,21 olarak bulunmuş olup, numune sonuçlar spesifikasyon limitleri içerisinde yer almaktadır.

Tekrarlanabilirlik ve arakesinlik numuneleri için RSD değerleri %1,15 olarak bulunmuş olup, sonuçlar kabul kriterini karşılamıştır.

Sonuçlar kabul kriterini karşılamıştır.

4.2.8. Sağlamlık

Analitik bir prosedürün sağlamlığı, prosedür parametrelerindeki küçük değişikliklerden etkilenmeden kalma kapasitesinin bir ölçüsüdür. Sağlamlık, normal kullanım sırasında yöntemin veya prosedürün uygunluğunu ve güvenilirliğini gösterir. Bir yöntemin sağlamlığı, sıcaklık, akış hızı, gibi parametre değişiklikleri ve bunların yöntem üzerindeki etkileri ile değerlendirilir.

Kabul kriteri

Değişim başlangıç değerinin %2'sinden fazla olmamalıdır.

Çizelge 4.19. Sağlamlık analiz sonuçları

Parametre	% Analiz Sonucu	%Değişim
Normal Analiz Koşulu	99,75	-
Akış Hızı (0,60 mL/min)	99,26	0,50
Akış Hızı (0,80 mL/min)	100,01	0,26
Kolon Sıcaklığı (35°C)	100,09	0,34
Kolon Sıcaklığı (40°C)	99,83	0,08

Sonuçların değerlendirilmesi

Sonuçlar kabul kriterini karşılamıştır.

4.2.9. Stabilité

Çözelti stabilitesi için oda sıcaklığında ve buzdolabında bekletilen standart ve test çözeltileri, ilk (t=0) hazırlanmış standart ve test çözeltisine karşı analiz edilmiştir.

Kabul kriteri

Elde edilen değerler, başlangıç değerinin %2'sinden farklı olmamalıdır.

Çizelge 4.20. Standart çözelti stabilitesi analiz sonuçları

Koşul / % Değişim	Başlangıç	24. saat	48.Saat
2-8°C		5511318	5611819
% Değişim	5543402	0,58	1,23
25°C		5526895	5524852
% Değişim		0,30	0,33

Çizelge 4.21. Numune çözelti stabilitesi analiz sonuçları

Koşul / % Değişim	Başlangıç	24. saat	48.Saat
2-8°C		5660229	5742218
% Değişim	5639744	0,36	1,82
25°C		5585214	5587416
% Değişim		0,97	0,93

Sonuçların değerlendirilmesi

Standart çözelti ve numune çözeltisi, oda sıcaklığı ve buzdolabı koşullarında 48 saat stabildir.

4.3. Örnek Analizi

Hidrokortizon 100 mg/mL intravenöz enjeksiyon ve intravöz infüzyon için liyofilize toz içeren flakon için bölüm 3.4.3’de anlatıldığı şekilde yapılan çalışmalar sonucunda Hidrokortizon etkin maddesi için Çizelge 4.22’deki veriler elde edilmiştir. Elde edilen hidrokortizon miktar tayini analiz sonuçlarının ilacın etiket değeri ile karşılaştırılması Çizelge 4.23’te yer almaktadır.

Çizelge 4.22. Hidrokortizon miktar tayini analiz sonuçları

Standart Tartımı (mg)	Standart Alan Değeri	Hidrokortizon (Alan Değeri)	Hidrokortizon (mg)
	5583402	5525843	99,4
	5539479	5552805	99,9
	5495477	5536955	99,6
100,1	5612568	5530250	99,5
	5556327	5542275	99,7
	5608869	5532586	99,5
Ortalama	5566020	5536786	99,6
Standart Sapma	40987	8821	0,16
% RSD	0,74	0,16	0,16

Çizelge 4.23. Miktar tayini analiz sonuçlarının etiket değeri kıyaslamaları

Deney Sayısı	Bulunan Değer (mg)	Etiket Değeri (mg)	% Geri Kazanım
1	99,4	100	99,4
2	99,9	100	99,9
3	99,6	100	99,6
4	99,5	100	99,5
5	99,7	100	99,7
6	99,5	100	99,5
Ortalama			99,6
Standart Sapma			0,2
% RSD			0,2

5. SONUÇ

Bu çalışmada, hidrokortizon miktar tayini analizi için geliştirilen HPLC yöntemi için hareketli faz bileşenleri, kolon sıcaklığı, pH ve akış hızı klasik yöntem ile yaklaşık olarak tespit edildikten sonra deneysel tasarımdan yöntemi ile optimum koşullar belirlenmiştir. Hidrokortizon etkin maddesi UV dedektör ile 254 nm’de saptanmıştır. İzokratik akış programında 7 dakikada gerçekleştirilen analizde 5,1 dakikada hidrokortizon pik eldesi sağlandı.

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

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

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



KAYNAKLAR

1. Lea, A. R., Kennedy, J. M., and Low, G. C. (1980). Analysis of hydrocortisone acetate ointments and creams by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 198(1), 41-47.
2. Wu, S., Li, W., Mujamdar, T., Smith, T., Bryant, M., and Tse, F. L. (2010). Supported liquid extraction in combination with LC-MS/MS for high-throughput quantitative analysis of hydrocortisone in mouse serum. *Biomedical Chromatography*, 24(6), 632-638.
3. Adi-Dako, O., Bekoe, S. O., Ofori-Kwakye, K., Appiah, E., and Peprah, P. (2017). Novel HPLC analysis of hydrocortisone in conventional and controlled-release pharmaceutical preparations. *Journal of Pharmaceutics*, 2017, 9495732.
4. Toothaker, R. D., Sundaresan, G. M., Hunt, J. P., Goehl, T. J., Rotenberg, K. S., Prasad, V. K., Craig, W. A., and Welling, P. G. (1982). Oral hydrocortisone pharmacokinetics: a comparison of fluorescence and ultraviolet high-pressure liquid chromatographic assays for hydrocortisone in plasma. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 71(5), 573-576.
5. Derendorf, H., Rohdewald, P., Hochhaus, G., and Möllmann, H. (1986). HPLC determination of glucocorticoid alcohols, their phosphates and hydrocortisone in aqueous solutions and biological fluids. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 4(2), 197-206.
6. Iqbal, D. N., Ashraf, A., Iqbal, M., and Nazir, A. (2020). Analytical method development and validation of hydrocortisone and clotrimazole in topical dosage form using RP-HPLC. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 6, 1-7.
7. Lemus Gallego, J., and Pérez Arroyo, J. (2002). Comparison of HPLC and multivariate regression methods for hydrocortisone and lidocaine analysis of pharmaceutical preparations. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 374, 282-288.
8. Jancic-Stojanović, B., Malenović, A., Marković, S., Ivanović, D., and Medenica, M. (2010). Optimization and validation of an RP-HPLC method for analysis of hydrocortisone acetate and lidocaine in suppositories. *Journal of AOAC International*, 93(1), 102-107.
9. Rasool, N., Kanwal, Q., Waseem, M., Mehrunnisa, A., and Khan, M. I. (2021). Analytical method development and determination of hydrocortisone acetate and fusidic acid simultaneously in cream formulation, by reversed-phase HPLC. *Biomedical Chromatography*, 35(3), e4997.
10. Hajkova, R., Solich, P., Dvořák, J., and Šícha, J. (2003). Simultaneous determination of methylparaben, propylparaben, hydrocortisone acetate and its degradation products in a topical cream by RP-HPLC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 32(4-5), 921-927.

11. Grippa, E., Santini, L., Castellano, G., Gatto, M. T., Leone, M. G., and Saso, L. (2000). Simultaneous determination of hydrocortisone, dexamethasone, indomethacin, phenylbutazone and oxyphenbutazone in equine serum by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 738(1), 17-25.
12. Galmier, M. J., Beyssac, E., Petit, J., Aiache, J. M., and Lartigue, C. (1999). Validation of a reversed-phase liquid chromatographic method for the determination of hydrocortisone phosphate disodium in a gel formulation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 20(1-2), 405-409.
13. Varaganti, M. S., Chengalva, P., and Gundala, A. (2019). Novel stability-indicating high-performance liquid chromatographic assay method for simultaneous estimation of hydrocortisone and tetracycline in bulk and pharmaceutical dosage form. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 12, 1407-1408.
14. Ibrahim, F., El-Deen, A. K., and Shimizu, K. (2018). Comparative study of two different chromatographic approaches for quantitation of hydrocortisone acetate and pramoxine hydrochloride in presence of their impurities. *Journal of Food and Drug Analysis*, 26(3), 1160-1170.
15. Lotfy, H. M., Hassan, N. Y., Elgizawy, S. M., and Saleh, S. S. (2013). Comparative study of new spectrophotometric methods; an application on pharmaceutical binary mixture of ciprofloxacin hydrochloride and hydrocortisone. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 58(3), 1892-1898.
16. Gallego, J. L., and Arroyo, J. P. (2002). Spectrophotometric determination of hydrocortisone, nystatin and oxytetracycline in synthetic and pharmaceutical preparations based on various univariate and multivariate methods. *Analytica Chimica Acta*, 460(1), 85-97.
17. Sarrafi, A. H., Bahmaei, M., and Mousavi, A. Z. (2010). Simultaneous spectrophotometric determination of lidocaine and hydrocortisone acetate in pharmaceutical preparations by multivariate calibration methods. *Journal of the Iranian Chemical Research*, 3, 31-36.
18. Schulz, E. P., and Neuss, J. D. (1957). Colorimetric assay for cortisone, hydrocortisone, and related steroids. *Analytical Chemistry*, 29(11), 1662-1665.
19. Pyka, A., Babuska-Roczniak, M., and Bochenska, P. (2011). Determination of hydrocortisone in pharmaceutical drug by TLC with densitometric detection in UV. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 34(9), 753-769.
20. Mooney, R. P., and Pasarela, N. R. (1966). Residue determination, thin-layer chromatographic procedure for determination of hydrocortisone acetate and alcohol residues in milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 14(1), 12-15.
21. Manivannan, P., Kumar, R. T., and Periyannayagasamy, V. (2009). Spectral analysis of hydrocortisone. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences*, 2(1), 1-5.

22. Yusa, V., Quintas, G., Pardo, O., Pastor, A., and de la Guardia, M. (2006). Determination of PAHs in airborne particles by accelerated solvent extraction and large-volume injection-gas chromatography-mass spectrometry. *Talanta*, 69(4), 807-815.
23. Passeport, E., Guenne, A., Culhaoglu, T., Moreau, S., Bouye, J. M., and Tournebize, J. (2010). Design of experiments and detailed uncertainty analysis to develop and validate a solid-phase microextraction/gas chromatography-mass spectrometry method for the simultaneous analysis of 16 pesticides in water. *Journal of Chromatography A*, 1217(33), 5317-5327.
24. Basaglia, G., Pasti L., and Pietrogrande M. C. (2011). Multi-residual GC-MS determination of personal care products in waters using solid-phase microextraction. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 399(6), 2257-2265.
25. Ramirez, N., Marce, R. M., and Borrull F. (2011). Determination of parabens in house dust by pressurised hot water extraction followed by stir bar sorptive extraction and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1218(37), 6226-6231.
26. Nguyen, A. T., Aerts, T., Van Dam, D., and De Deyn, P. P. (2010). Biogenic amines and their metabolites in mouse brain tissue Development, optimization and validation of an analytical HPLC method”, *Journal of Chromatography B*, 878(29), 3003-3014.
27. Krier, F., Brion, M., Debrus, B., Lebrun, P., Driesen, A., Ziemons, E., Evrard, B., and Hubert, P. (2011). Optimisation and validation of a fast HPLC method for the quantification of sulindac and its related impurities. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 54(4), 694-700.
28. Nistor, I., Cao, M., Debrus, B., Lebrun, P., Lecomte, F., Rozet, E., Angenot, L., Frederich, M., Oprean, R., and Hubert, P. (2011). Application of a new optimization strategy for the separation of tertiary alkaloids extracted from *Strychnos usambarensis* leaves. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 56(1), 30-37.
29. Beser, M. I., Pardo, O., Beltran, J., and Yusa, V. (2011). Determination of per- and polyfluorinated substances in airborne particulate matter by microwave-assisted extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1218(30), 4847-4855.
30. Switzar, L., Giera, M., Lingeman, H., Irth, H., and Niessen W. M. A. (2011). Protein digestion optimization for characterization of drug-protein adducts using response surface modeling. *Journal of Chromatography A*, 1218(13), 1715-1723.
31. Hadjmohammadi, M. R., and Nazari, S. S. S. J. (2010). Separation optimization of quercetin, hesperetin and chrysin in honey by micellar liquid chromatography and experimental design. *Journal of Separation Science*, 33(20), 3144-3151.
32. Duarte, R. M. B. O., and Duarte, A. C. (2011). Optimizing size-exclusion chromatographic conditions using a composite objective function and chemometric tools: Application to natural organic matter profiling. *Analytica Chimica Acta*, 688(1), 90-98.

33. Deshpande, G. R., Roy, A. K., Rao, N. S., Rao, B. M., and Reddy, J. R. (2011). Rapid screening of volatile ion-pair reagents using UHPLC and robust analytical method development using DoE for an acetyl cholinesterase inhibitor: Galantamine HBr. *Chromatographia*, 73, 639-648.
34. Vinci, R. M., Canfyn, M., De Meulenaer, B., De Schaetzen, T., Van Overmeire, I., De Beer, J., and Van Loco, J. (2010). Determination of benzene in different food matrices by distillation and isotope dilution HS-GC/MS. *Analytica Chimica Acta*, 672(1-2), 124-129.
35. Duarte, R. M. B. O., and Duarte, A. C. (2010). A new chromatographic response function for use in size-exclusion chromatography optimization strategies Application to complex organic mixtures. *Journal of Chromatography A*, 1217(48), 7556-7563.
36. Arroyo, D., Ortiz, M. C., and Sarabia, L. A. (2011). Optimization of the derivatization reaction and the solid-phase microextraction conditions using a D-optimal design and three-way calibration in the determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in bovine milk by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1218(28), 4487-4497.
37. Torres-Lapasio, J. R., Pous-Torres, S., Baeza-Baeza, J. J., and Garcia-Alvarez-Coque, M. C. (2011). Optimal experimental designs in RPLC at variable solvent content and pH based on prediction error surfaces. *Analytical Bioanalytical Chemistry*, 400(5), 1217-1230.
38. Hatambeygi, N., Abedi, G., and Talebi, M. (2011). Method development and validation for optimised separation of salicylic, acetyl salicylic and ascorbic acid in pharmaceutical formulations by hydrophilic interaction chromatography and response surface methodology. *Journal of Chromatography A*, 1218(35), 5995-6003.
39. Cao, J., Covarrubias, V. M., Straubinger, R. M., Wang, H., Duan, X., Yu, H., Qu, J., and Blanco, J. G. (2010). A rapid, reproducible, on-the-fly orthogonal array optimization method for targeted protein quantification by LC/MS and its application for accurate and sensitive quantification of carbonyl reductases in human liver. *Analytical Chemistry*, 82(7), 2680-2689.
40. Toueille, M., Uzel, A., Depoisier, J. F., and Gantier, R. (2011). Designing new monoclonal antibody purification processes using mixed-mode chromatography sorbents. *Journal of Chromatography B*, 879(13-14), 836-843.
41. Sereshti, H., Khojeh, V., and Samadi, S. (2011). Optimization of dispersive liquid-liquid microextraction coupled with inductively coupled plasma-optical emission spectrometry with the aid of experimental design for simultaneous determination of heavy metals in natural waters. *Talanta*, 83(3), 885-890.
42. Malaxechevarria, Y., and Millan, E. (2009). Application of experimental design to the optimization of a wet acid digestion procedure for Cd determination in plastic materials by atomic absorption spectrometry. *Spectroscopy Letters*, 42(1), 12-19.
43. Ferreira, A., Korn, M. G. A., and Ferreira, S. L. C. (2004). Multivariate optimization in preconcentration procedure for manganese determination in seawater samples by FAAS. *Microchimica Acta*, 146, 271-278.

44. Segade, S. R., and Tyson, J. F. (2007). Determination of methylmercury and inorganic mercury in water samples by slurry sampling cold vapor atomic absorption spectrometry in a flow injection system after preconcentration on silica C-18 modified. *Talanta*, 71, 1696-1702.
45. Dutra, R. L., Maltez, H. F., and Carasek, E. (2006). Development of an on-line preconcentration system for zinc determination in biological samples. *Talanta*, 69, 488-493.
46. Vanloot, P., Boudenne, J. L., Brach-Papa, C., Sergent, M., and Coulomb, B. (2007). An experimental design to optimize the flow extraction parameters for the selective removal of Fe(III) and Al(III) in aqueous samples using salicylic acid grafted on Amberlite XAD-4 and final determination by GF-AAS. *Journal of Hazardous Materials*, 147(1-2), 463-470.
47. Cespon-Romero, M., and Yebra, M. C. (2008). Determination of trace metals in urine with an on-line ultrasound-assisted digestion system combined with a flow-injection preconcentration manifold coupled to flame atomic absorption spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 609, 184-191.
48. Vanloot, P., Boudenne, L. J., Vassalo, L., Sergent, M., and Coulomb, B. (2007). Experimental design approach for the solid-phase extraction of residual aluminium coagulants in treated waters. *Talanta*, 73, 237-245.
49. Liu, M., Zheng, Y., Ji, Y., and Zhang, C. (2011). Development and validation of a capillary electrophoresis method for the enantiomeric purity determination of RS86017 using experimental design. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 55(1), 93-100.
50. Anurukvorakun, O., Suntornsuk, W., and Suntornsuk, L. (2006). Factorial design applied to a non-aqueous capillary electrophoresis method for the separation of beta-agonists. *Journal of Chromatography A*, 1134(1-2), 326-332.
51. Papadopoulos, V. D., Beligiannis, G. N., and Hela, D. G. (2011). Combining experimental design and artificial neural networks for the determination of chlorinated compounds in fish using matrix solid-phase dispersion. *Applied Soft Computing*, 11(8), 5155-5164.
52. Zhu, D., Li, X., Sun, J., and You, T. (2012). Chemometrics optimization of six antihistamines separations by capillary electrophoresis with electrochemiluminescence detection. *Talanta*, 88, 265-271.
53. Ronda, F., Rodríguez-Nogales, J. M., Sancho, D., and Gómez, B. O. M. (2008). Multivariate optimisation of a capillary electrophoretic method for the separation of glutenins. Application to quantitative analysis of the endosperm storage proteins in wheat. *Talanta*, 108(1), 287-296.
54. Orlandini, S., Giannini, I., Pinzauti, S., and Furlanetto, S. (2008). Multivariate optimisation and validation of a capillary electrophoresis method for the analysis of resveratrol in a nutraceutical. *Talanta*, 74(4), 570-577.

55. Ballus, C. A., Meinhart, A. D., Bruns, R. E., and Godoy, H. T. (2011). Use of multivariate statistical techniques to optimize the simultaneous separation of 13 phenolic compounds from extra-virgin olive oil by capillary electrophoresis. *Talanta*, 83(4), 1181-1187.
56. Shirinnejad, M., and Sarrafi, A. H. M. (2019). Dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic drop with central composite design for the spectrofluorometric determination of naproxen. *Journal of Fluorescence*, 29(4), 1039–1047.
57. Rao, R. N., Maurya, P. K., Shinde, D. D., Khalid, S., and Pharm, J. (2011). Precolumn derivatization followed by liquid chromatographic separation and determination of tramiprosate in rat plasma by fluorescence detector: Application to pharmacokinetics. *Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis*, 55(2), 282-287.
58. Space, J. S., Opio, A. M., Nickerson, B., Jiang, H., Dumont, M., and Berry, M. (2007). Validation of a dissolution method with HPLC analysis for lasofoxifene tartrate low dose tablets. *Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis*, 44(5), 1064-1071.
59. Vermeij, T. A. C., and Edelbroek, P. M. (2007). Robust isocratic high performance liquid chromatographic method for simultaneous determination of seven antiepileptic drugs including lamotrigine, ox carbazepine and zonisamide in serum after solid-phase extraction. *Journal of Chromatography B*, 857(1), 40-46.
60. Ravisankar, P., and Rao, G. D. (2013). Development and validation of Rp-HPLC method for determination of levamisole in bulk and dosage form. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 6(3), 169-173.
61. Talluri, M. V. N. K., Bairwa M. K., Dugga H. H. T., and Srinivas, R. (2012). Development and validation of Rp-HPLC and ultraviolet spectrophotometric methods of analysis for simultaneous determination of paracetamol and lornoxicam in pharmaceutical dosage forms. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 35(1), 129-140.
62. Locatelli, M., De Lutiis, F., and Carlucci, G. (2013). High performance liquid chromatography determination of prulifloxacin and five related impurities in pharmaceutical formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, (78-79), 27-33.
63. Kogawa, A. C., and Nunes Salgado, H. R. (2013). Quantification of doxycycline hyclate in tablets by HPLC-UV method. *Journal of Chromatographic Science*, 51(10), 919-925.
64. Maher, H. M. (2014). Development and validation of a stability-indicating HPLC-Dad method with ann optimization for the determination of diflunisal and naproxen in pharmaceutical tablets. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 37(5), 634-652.
65. Patil, S. S., and Srivastava, A. K. (2013). Development and validation of a liquid chromatography method for the simultaneous determination of eight water-soluble vitamins in multivitamin formulations and human urine. *Journal of AOAC International*, 96(6), 1273-1280.

66. Ashfaq, M. (2013). Simultaneous RP-HPLC determination of sparfloxacin and dexamethasone in pharmaceutical formulations. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Science*, 49(2), 301-309.
67. Hashem, Gouda, A. A., and Saleh, H. (2013). Development and validation of rapid stability indicating HPLC-determinations of antiepileptic drugs phenobarbital in suppositories and phenytoin in capsules as well as in urine sample. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 36(16), 2292-2306.
68. El-Din, M. S., Eid, M., and Zeid, A. M. (2013). Simultaneous determination of methocarbamol and Aspirin by RP-HPLC using fluorescence detection with time programming: its application to pharmaceutical dosage form. *Luminescence*, 28(3), 332-338.
69. Sharma, M. C. (2013). Extractive spectrophotometric analytical methods for the determination of pioglitazone hydrochloride in pharmaceutical dosage form and its comparison with Rp-HPLC and TLC densitometric methods. *Oxidation Communications*, 36(2), 441-450.
70. Khan, I. U., Ashfaq, M., and Razzaq, S. N. (2013). Simultaneous determination of piroxicam and paracetamol in pharmaceutical formulations using stability indicating HPLC method. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 36(19), 1437-1450.
71. Celebier, M., Recber, T., and Kocak, E. (2013). RP-HPLC method development and validation for estimation of rivaroxaban in pharmaceutical dosage forms. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 49(2), 359-366.
72. Kumar, N., Sangeetha, D., and Reddy, P. S. (2013). Development and validation of a stability indicating RP-UPLC method for simultaneous determination of rupatadine and montelukast in pharmaceutical formulation. *Current Pharmaceutical Analysis*, 9(1), 61-68
73. Jain, P. S., Chaudhari, A. J., and Surana, S. J. (2012). Development and validation of stability-indicating rp-hplc method for determination of olmesartan medoxomile in pharmaceutical dosage form and identification, characterization of alkaline degradation impurity of olmesartan medoxomile drug substance as well as drug product. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*, 18(4), 595-604.
74. Yeniceli, D. (2013). Development and validation of a simple and efficient HPLC method for the determination of zonisamide in pharmaceuticals and human plasma. *Journal Of Analytical Chemistry*, 68(5), 436-443.
75. Dinc, S., Donmez, O. A., and Asci, B. (2014). Chromatographic and chemometrics-assisted spectrophotometric methods for the simultaneous determination of allobarbitol, adiphenine hydrochloride, and paracetamol in suppository. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 37(4), 560-571.

76. Hefnawy, M., Al-Majed, A., and Al-Suwailem, A. (2013). HPLC method for analysis of celiprolol enantiomers in biological fluids and pharmaceutical formulation using immobilized polysaccharide-based chiral stationary phase and fluorescence detection. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 8(3), 1313-1323.
77. Demir, C. (2009). *II. Kemometri yaz okulu ders notları*. İzmir İleri Teknoloji Enstitüsü, İzmir.
78. Acıtaş, Ş., ve Şenoğlu, B. (2014). *İstatistiksel deneysel tasarım*. 3. Baskı. Ankara: Nobel Akademik Yayıncılık.
79. Hibbert, B. (2012). Experimental design in chromatography: a tutorial review. *Journal of Chromatography B*, 910, 2-13.
80. Araujo, P., and Brereton, R. (1996). Experimental design I: Screening. *Trends in Analytical Chemistry*, 15(2), 63-70.
81. Politis, S. N., Colombo, P., Colombo, G., and Rekkas, D. M. (2017). Design of experiments (DoE) in pharmaceutical development. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 43(6), 889-901.
82. Johnson, R., Miller, I., and Freund, J. E. (1990). *Miller & Freund's probability and statistics for engineers*. 4th Edition. Philadelphia: Prentice-Hall Int.
83. Hasgöl, Ö. (2010). Ürün ve süreçlerin geliştirilmesinde deney tasarımı: gıda sektöründe bir uygulama. *Yönetim ve Ekonomi Araştırmaları Dergisi*, 9(15), 42-67.
84. Bhattacharya, S. (2021). Central composite design for response surface methodology and its application in pharmacy. *IntechOpen*, 95835.
85. Ferreira, S. C., Bruns, R. E., Ferreira, H. S., Matos, G. D., David, J. M., Brandão, G. C., da Silva, E. G. P., Portugal, L. A., dos Reis, P. S., Souza, A. S., and Dos Santos, W. N. L. (2007). Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica Chimica Acta*, 597(2), 179-186.
86. Ebrahimi-Najafabadi, H., Leardi, R., and Jalali-Heravi, M. (2014). Experimental design in analytical chemistry – Part II: Applications. *Journal of AOAC International*, 97(1), 12-18.
87. Mousavi, L., Tamiji, Z., and Khoshayand, M. Z. (2018). Applications and opportunities of experimental design for the dispersive liquid–liquid microextraction method. *Talanta*, 190, 335-356.
88. Prabu, S. L., and Suriyaprakash, T. N. K. (2010). Cleaning validation and its importance in pharmaceutical industry. *Pharma Times*, 42(7), 21-5.
89. Jindal, D., Kaur, H., Patil, R. K., and Patil, H. C. (2020). Validation–in pharmaceutical industry: Equipment validation: A brief review. *Adesh University Journal of Medical Sciences and Research*, 2(2), 94-98.

90. Ozul, F., Can, K. R., Bilgiç, S. ve Şenel, S. (2022). İlaç endüstrisinde proses validasyonu ve tasarımıyla kalite (QbD) yaklaşımı. *Fabad Journal of Pharmaceutical Sciences*, 47(2), 241-264.
91. ICH Expert Working Group. (2005). Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*, Current Step 4 version, EU, Japan and USA.
92. İnternet: U.S. Pharmacopeia. (t.y.). (1225) Validation of compendial procedures (USP31) / General information. Web: http://www.uspbpep.com/usp29/v29240/usp29nf24s0_c1225.html adresinden 18 Mart 2024'te alınmıştır.
93. İnternet: U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. (2011). Current Good Manufacturing Practices (CGMP). Web: <https://www.fda.gov/drugs/pharmaceutical-quality-resources/current-good-manufacturing-practice-cgmp-regulations> adresinden 18 Mart 2024'te alınmıştır.
94. Skoog, D. A., Holler, F. J., and Crouch, S. R. (2007). *Principles of instrumental analysis*. Pacific Grove: Brooks Cole, 1039.
95. Ngwa, G. (2010). Forced degradation as an integral part of HPLC stability-indicating method development. *Drug Delivery Technology*, 10(5), 56-59.
96. İnternet: Drugs.com. (2024). Hydrocortisone (Topical) (Monograph). Web: <https://www.drugs.com/monograph/hydrocortisone.html> adresinden 14 Mayıs 2024'te alınmıştır.
97. Vonaparti, A., Lyris, E., Panderi, I., Koupparis, M., and Georgakopoulos, C. (2008). Direct injection LC/ESI-MS horse urine analysis for the quantification and identification of threshold substances for doping control. I. Determination of hydrocortisone. *Journal of Mass Spectrometry*, 43(9), 1255-1264.
98. Johnson, T. N., Whitaker, M. J., Keevil, B., and Ross, R. J. (2018). Bioavailability of oral hydrocortisone corrected for binding proteins and measured by LC-MS/MS using serum cortisol and salivary cortisone. *Journal of Bioequivalence and Bioavailability*, 10(1), 001.
99. Hotha, K. K., Ramamoorthy, S., and Patel, H. (2020). Studies on the stability of corticosteroids: degradation of clobetasol propionate, desonide and hydrocortisone in topical formulations by HPLC and UPLC-MS/MS. *American Journal of Analytical Chemistry*, 11(4), 147-171.





Gazili olmak ayrıcalıktır