

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ASKORBİK ASİT MİKTAR VE DOZ TEKDÜZELİĞİ
İÇİN METOT GELİŞTİRİLMESİ VE VALİDASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Cem ÇALIŞKAN

Enstitü Anabilim Dalı : **KİMYA**
Enstitü Bilim Dalı : **ORGANİK KİMYA**
Tez Danışmanı : **Doç. Dr. Mehmet NEBİOĞLU**

Temmuz 2016

**T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ASKORBİK ASİT MİKTAR VE DOZ TEKDÜZELİĞİ
İÇİN METOT GELİŞTİRİLMESİ VE VALİDASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Cem ÇALIŞKAN

Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA

Enstitü Bilim Dalı : ORGANİK KİMYA

Bu tez 01 / 07 / 2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği ile kabul edilmiştir.

**Doç. Dr.
Mehmet NEBİOĞLU
Jüri Başkanı**

**Yrd. Doç. Dr.
Aysel KÜÇÜK TUNCA
Üye**

**Yrd. Doç. Dr.
Sezen SİVRİKAYA
Üye**

BEYAN

Tez içindeki tüm verilerin akademik kurallar çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, görsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uygun şekilde sunulduğunu, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezde yer alan verilerin bu üniversite veya başka bir üniversitede herhangi bir tez çalışmasında kullanılmadığını beyan ederim.

Cem ÇALIŞKAN

20.05.2016

TEŐEKKÖR

Yüksek lisans çalışmalarım için tez yöneticiliğini kabul ederek, tezin planlanmasından yazılmasına kadar tüm aşamalarında bilgi, tecrübe ve yardımlarından sürekli olarak faydalandığım değerli danışman hocam Doç. Dr. Mehmet NEBİOĞLU' na teőekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim boyunca manevi desteği ile her an yanımda olan sevgili aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	.v
ŞEKİLLER LİSTESİ	vii
TABLolar LİSTESİ	viii
ÖZET.....	ix
SUMMARY	x

BÖLÜM 1.

GİRİŞ.....	1
------------	---

BÖLÜM 2.

KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	3
2.1. Askorbik Asit (C Vitamini).....	3
2.1.1. Askorbik asidin kimyasal özellikleri	3
2.1.2. Askorbik asidin sentezi	4
2.1.3. Askorbik asidin işlevleri ve alımı	5
2.1.4. Askorbik asidin kullanımı.....	6
2.2. Analitik Metot Validasyonu	6
2.2.1. Neler valide edilir	7
2.2.2. Validasyon parametreleri	8
2.3. Kromatografi.....	13
2.3.1. Gaz kromatografisi (GC)	15
2.3.2. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC).....	15
2.3.3. HPLC cihazı ve HPLC sistem türleri.....	16
2.3.4. Çözücü Dağıtma Sistemi	17

2.3.4.1. Akış hızına göre pompalar.....	17
2.3.4.2. Pompanın yapıldığı malzemeye göre pompalar.....	18
2.3.4.3. Mobil faz iletim mekanizmasına göre pompalar.....	18
2.3.5. Kolonlar.....	19
2.3.6. Dedektörler.....	20
2.3.6.1. Ultraviole / Görünür Bölge Dedektörü.....	20
2.3.6.2. Fotodiyot Array Dedektörü (DAD).....	20
2.3.6.3. Floresans Dedektörü (FLD).....	21
2.3.6.4. İletkenlik Dedektörü (CDD).....	21
2.3.6.5. Refraktif İndeks Dedektörü (RID).....	21
2.3.6.6. Elektrokimyasal Dedektörü (ECD).....	21
2.3.6.7. Kütle Dedektörü (MS).....	21
BÖLÜM 3.	
DENEYSEL ÇALIŞMALAR	22
3.1. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler Ve Cihazlar.....	22
3.2. Askorbik Asit Miktar Tayini HPLC Analizi İçin Analitik Metot Validasyonu	23
3.2.1. Kromatografik şartlar.....	23
3.2.2. Spesifiklik	23
3.2.3. Doğruluk	31
3.2.4. Kesinlik	33
3.2.4.1. Cihaz kesinliği ya da enjeksiyon tekrarlanabilirliği.....	33
3.2.4.2. Metot kesinliği	33
3.2.4.3. Arakesinlik.....	34
3.2.5. Doğrusallık ve çalışma aralığı	35
3.2.6. Güvenilirlik	40
3.2.6.1. Çözelti stabilitesi.....	41
3.2.6.2. Metot dayanıklılığı.....	41
BÖLÜM 4.	
SONUÇ VE TARTIŞMA	44

KAYNAKLAR	47
ÖZGEÇMİŞ	50

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

AA	: Askorbik Asit
B	: Kesim noktası
CDD	: Herhangi bir t anında bulunan değer
CRS	: Chemical reference substances
DAD	: Foto diyot array dedektörü
Di	: Başlangıçta bulunan değer
Dt	: İletkenlik dedektörü
ECD	: Elektro kimyasal dedektör
EP	: European pharmacopoeia
FDA	: Food and drug administration
FI	: Akış injeksiyon analizi
FLD	: Floresans dedektörü
g	: Gram
GC	: Gaz kromatografisi
GMP	: Good manufacturing practice (iyi üretim uygulamaları)
h/h	: Hacim/hacim
HPLC	: High pressure liquid chromatography (yüksek basınçlı sıvı kromatografisi)
ICH	: International conference on harmonization
k'	: Ayrım faktörü
LOD	: Limit of detection (tespit limiti)
LOQ	: Limit of quantification (tayin limiti)
m	: Eğim
mg	: Miligram
mL/dk.	: Mililitre/dakika

mm	: Milimetre
MS	: Kütle dedektörü
nm	: Nanometre
o-fosforik	: Orto-fosforik
PEEK	: Polietiletilketon
psi	: Basınç birimi
r	: Korelasyon katsayısı
RID	: Refraktif indeks dedektörü
RP	: Ters faz
rpm	: Revolution per minute (dönüş hızı)
TEFLON	: Politetrafloroetilen (PTFE)
USP	: United states pharmacopeia
WS	: Working standard (çalışma standardı)
y	: Pik alanı
⁰ C	: Santigrat derece
μ l	: Mikrolitre
μ m	: Mikrometre
%	: Yüzde
\pm	: Artı-eksi
>	: Büyüktür
\geq	: Büyük eşit

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Askorbik asit (C Vitamini).	3
Şekil 2.2. Askorbik asidin oksidasyon reaksiyonu.	4
Şekil 2.3. Askorbik asidin sentezi.	5
Şekil 3.1. Seyreltme çözeltisi kromatogramı.	25
Şekil 3.2. Plasebo çözeltisi kromatogramı.	26
Şekil 3.3. Standart çözeltisi kromatogramı.	27
Şekil 3.4. Standart çözeltisi saflık eğrisi.	27
Şekil 3.5. Test çözeltisi kromatogramı.	28
Şekil 3.6. Test çözeltisi saflık eğrisi.	28
Şekil 3.7. Plasebo + hammadde çözeltisi kromatogramı.	29
Şekil 3.8. Plasebo + hammadde çözeltisi saflık eğrisi.	29
Şekil 3.9. Diosmin çözeltisi kromatogramı	30
Şekil 3.10. Hesperin çözeltisi kromatogramı.	30
Şekil 3.11. Doğrusallık grafiği.	37
Şekil 3.12. %20 Standart çözeltisi kromatogramı.	38
Şekil 3.13. %40 Standart çözeltisi kromatogramı	38
Şekil 3.14. %80 Standart çözeltisi kromatogramı.	39
Şekil 3.15. %100 Standart çözeltisi kromatogramı.	39
Şekil 3.16. %120 Standart çözeltisi kromatogramı	40
Şekil 3.17. %140 Standart çözeltisi kromatogramı.	40
Şekil 4.1. pH 5.5. tampon çözelti ve C18 kolon kullanılan analiz kromatogramı.	44
Şekil 4.2. pH 3.3. tampon çözelti ve NH ₂ kolon kullanılan analiz kromatogramı	45
Şekil 4.3. pH 3.3. tampon çözelti ve C18 kolon kullanılan analiz kromatogramı	45
Şekil 4.4. pH 3.3 tampon çözelti: asetonitril (50:50) ve C18 kolon kullanılan analiz kromatogramı.	45
Şekil 4.5. pH 3.3 tampon çözelti: asetonitril (95:5) ve C18 kolon kullanılan analiz kromatogramı.	46

TABLolar LİSTESİ

Tablo 3.1. Askorbik asidin miktar tayini için kullanılan cihaz ve ekipmanlar.	22
Tablo 3.2. Askorbik asidin miktar tayini için kullanılan kimyasallar.....	22
Tablo 3.3. Askorbik asit için geri kazanım sonuçları.....	32
Tablo 3.4. Geri kazanım limitleri.....	32
Tablo 3.5. Enjeksiyon tekrarlanabilirliği sonuçları.....	33
Tablo 3.6. Metot kesinliği sonuçları.	34
Tablo 3.7. Arakesinlik sonuçları.	35
Tablo 3.8. Doğrusallık sonuçları.....	37
Tablo 3.9. Oda koşulları çözelti stabilitesi sonuçları.	41
Tablo 3.10. Buzdolabı koşulları çözelti stabilitesi sonuçları.	41
Tablo 3.11. pH değişikliği sonuçları.	42
Tablo 3.12. Kolon sıcaklığı sonuçları.	42
Tablo 3.13. Farklı kolon sonuçları.	43

ÖZET

Anahtar kelimeler: Askorbik Asit, HPLC, Ters Faz, Validasyon

Bu çalışmada, askorbik asit, diosmin, hesperidin aktif etken maddelerini içeren farmasotik formülasyonda askorbik asitin miktarının tayin edilmesi için hızlı ve basit bir sıvı kromatografi yöntemi belirlenmiştir. Fosfat Tamponu (pH 3,3) ve Asetonitrilden (95:5) (v/v) oluşan mobil faz ile birlikte Inertsil ODS-3V (250×4,6 mm, 5µm) kolon kullanılarak izokratik bir elüsyonla 4 dakika içerisinde 1,0 ml/dk akış hızı, 25°C' lik numune sıcaklığı ve 50 µl enjeksiyon hacmi ile 210 nm dalga boyunda askorbik asit tayin edilmiştir. Yöntem 4,4-31,1 µg/ml konstrasyon aralığında lineer bir profil göstermiştir. Standart çözeltisinin 6 enjeksiyonundan elde edilen pik alanları arasındaki RSD değeri %0,02' dir. Ortalama geri kazanım değeri ise %99,30'dur.

Çabuk bozunabilen askorbik asitin, bu yöntemle kısa sürede ve güvenilir sonuç vererek, farklı farmasotik formülasyonlar için de endüstriyel olarak kullanılabilceği belirlenmiştir.

METHOD DEVELOPMENT AND VALIDATION FOR ASCORBIC ACID QUANTITY AND DOSAGE UNIFORMITY

SUMMARY

Keywords: Ascorbic Acid, HPLC, Reverse Phase, Validation, Dosage Uniformity

In this study, a fast and simple liquid chromatography method is set for the determination of the amount of ascorbic acid in the pharmaceutical formulation comprising active ingredients ascorbic acid, hesperidin, and diosmin. Ascorbic acid was determined at 210 nm wavelength under isocratic elution conditions of 4 minutes with 1.0 mL/min flow rate, at 25°C sample temperature and 50 µl injection volume with a mobile phase containing phosphate buffer (pH 3.3) and acetonitrile (95:5) (v/v) using a column Inertsil ODS-3V (250x4.6 mm, 5µm). The method indicated a linear profile in the range of 4.4-31.1 µg/ml concentration. RSD value between the peak areas obtained from six injections of the standard solution is 0.02%. Average recovery value was found to be 99.30%.

This method gives reliable results for determining the amount of fastly biodegradable ascorbic acid can be also used in industry for various pharmaceutical formulations containing ascorbic acid.

BÖLÜM 1. GİRİŞ

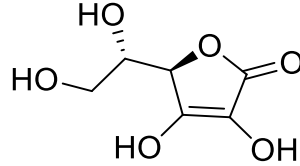
C vitamini olarak bilinen Askorbik asit (AA), insan beslenmesinde suda çözünen vitaminlerin en önemlilerindedir. Askorbik asit ve kalsiyum askorbatlar, farmasotik preparatlarda ve gıda endüstrisinde antioksidan olarak kullanılmaktadır. Bu özelliği ile büyüme ve gelişme için gereklidir. Ayrıca hücre yenilenmesinde, korunmasında ve oksidatif strese karşı vücudun korunmasını sağlayan güçlü bir antioksidan olarak önemli bir rol oynar [1-4]. Bu özelliklerinden dolayı, AA yaygın olarak yiyeceklerde, içeceklerde ve ilaç ürünlerinde antioksidan ajanı olarak kullanılmaktadır [5]. AA, vücutta bağ doku, kemik, diş, kan damarı çeperlerinin şekillenmesinde, aminoasit ve demir'in vücuda özümlemesine yardımcı olur. C vitamini bakımından eksik bir diyetle skorbüt hastalığının gelişmesine neden olabilir. Fakat daha yüksek konsantrasyon seviyelerinde böbrek taşı oluşumuna sebep olur [6, 7]. C vitamini yaygın hastalıklardan olan kardiovasküler hastalıklar ve kanserden ölüm oranını ve bunların etkisini azaltır. Bitkiler ve hayvanlar kendi C vitaminlerini yapar ama insanlar yapamaz. Bu nedenle insanlar bunu diğer kaynaklardan almaya ihtiyacı vardır. C vitamini doğada geniş oranda yiyeceklerde özellikle sebze ve meyvelerde bulunmaktadır. Ama AA'nın dayanıklılığı sınırlıdır. Depolama esnasında, hazırlama ve pişirme esnasında yiyeceklerden kaybolabilir. Ticari ürünlerin raf ömrünü uzatmak için antioksidant olarak örneğin şaraplara eklenir. Hazır ilaçlar, insan diyetlerinde C vitamini kaynağını sağlayacak AA'e sahiptir. AA'nın geniş kullanımı ve büyük öneminin yanında, birçok analitik teknik farklı seviyelerde ve farklı matrislerde AA'nın belirlenmesini amaçlar. Bunlar titrimetri, voltametri, potansiyometri, florometri, akış enjeksiyon analizi (FI), spektrofotometrik ve kromatografidir. Bu yöntemler, meyve suyu, sebze ve içecekler gibi kompleks materyallerden yapılan AA analizinde çok etkilidir. Spektrofotometrik metodlar hızlı ve kolaylığı yüzünden daha caziptir. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi, hedef aktif madde belirleme olduğunda hassas ve seçici bir yöntemdir. Farmasotik ve

kozmetik sanayilerinde stabilite analizleri için kullanılan süreklilik gösteren bir analiz yöntemidir [8-10]. Çoğu spektrofotometrik metotlar AA'nın azaltıcı etkisine dayanır [11].

BÖLÜM 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Askorbik Asit (C Vitamini)

C vitamini, Askorbik asit olarak da bilinir, su da eritilebilen ve bir çok işlevi olan vitamindir (Şekil 2.1.). Çoğu hayvan kendi C vitaminlerini glikozdan üretebilirler [12]. İnsanlar, bazı meyve yarasaları, hint domuzu ve insan benzeri primatlar C vitamini üretmediklerinden bunu besinlerinden almak zorundadırlar. Bütün taze sebze, meyve ve etler bir miktar C vitamini içerir. Ancak C vitamini ısıya hassas olduğundan pişirme esnasında hızla bozular. Askorbik asitin biyolojik ve teknolojik öneminden dolayı yiyecek alanında onun rutin ve güvenilir tayini için hızlı ve seçici metotlara büyük ilgi gösterilir.

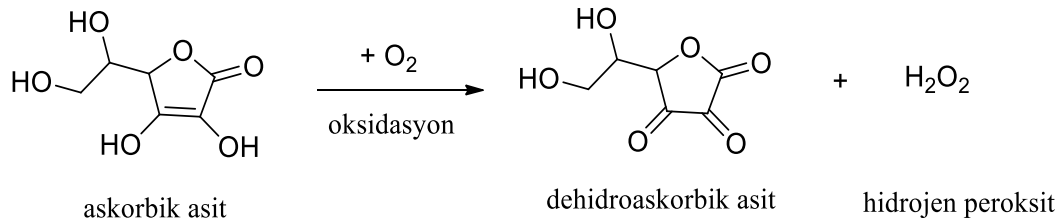


Şekil 2.1. Askorbik asit (C vitamini)

2.1.1. Askorbik asidin kimyasal özellikleri

C vitamini kimyasal olarak askorbik asidin ışığı sola döndüren enantiyomeridir. Ticari C vitamini genelde askorbik asit kristallerinden veya askorbik asitin kalsiyum veya sodyum tuzlarından oluşmaktadır. Askorbik asit, serbest oksijeni gıdadaki okside olabilen yapılardan daha önce yakalayarak koruma sağlarlar (Şekil 2.2.).

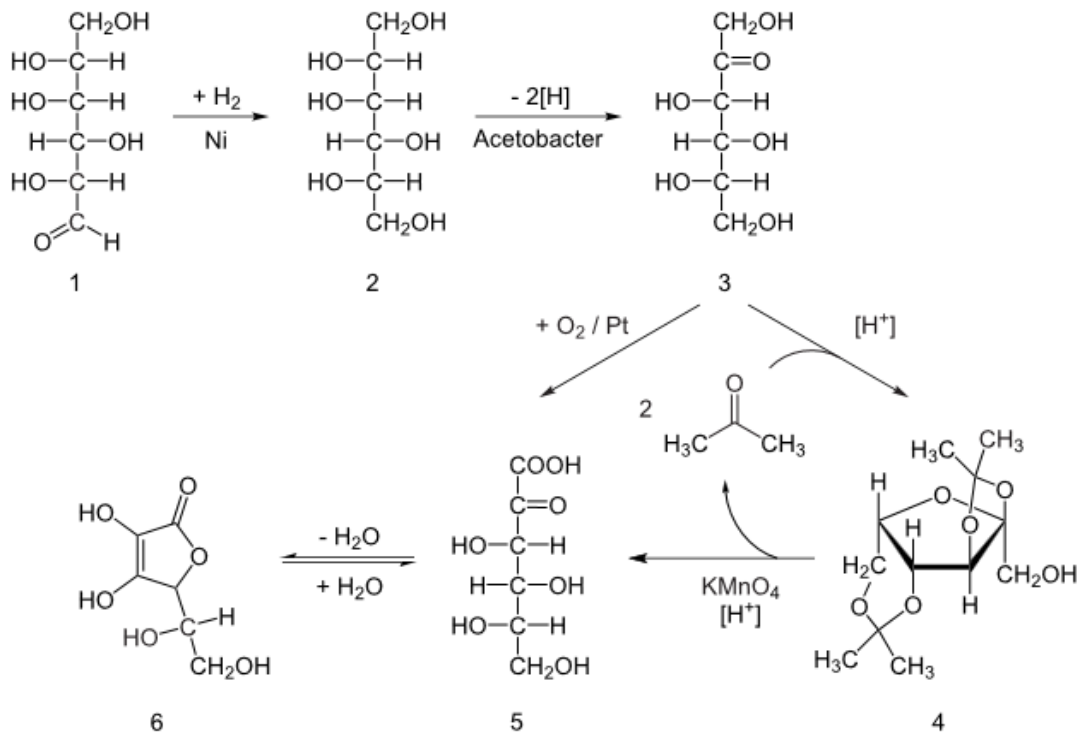
Askorbik asidin en önemli kimyasal özelliklerinden birisi de redoks potansiyeli olup, indirgen ajan ve serbest radikal yakalayıcısı olarak davranmasına neden olur ve bir H iyonu vererek serbest radikal zincirini inhibe eder.



Şekil 2.2. Askorbik asidin oksidasyon reaksiyonu

2.1.2. Askorbik asidin sentezi

Piyasada yalnız sentezle elde edilmiş askorbik asit vardır. Bugün geniş ölçekte uygulanan yöntem Reichstein ve arkadaşları tarafından bulunmuştur (Şekil 2.3.). Bu sentez yönteminde D glikozdan (1) yola çıkılır, bu maddenin katalitik hidrojenlenmesiyle aldehit grubu primer alkol grubuna indirgenerek D sorbid (2) meydana gelir. Bu bileşiğin *Acetobacter xylinum* ile biyokimyasal yükseltgenmesiyle L-sorboz (3) oluşur. Bu madde C5 ve C6 atomlarında L-askorbik asit biçimlenmesindedir. Bunun platin katalizörü ile birlikte doğrudan doğruya oksijenle veya diaseton türevinin alkali ortamda potasyum permanganatla yükseltgenmesiyle, diaseton 2 keto-L-gulonik asit (4) meydana gelir. 4 no'lu bileşiğin suda ısıtılmasıyla aseton ayrılır, serbest 2-keto -L-gulonik asit (5) meydana gelir. Aynı madde L-gulonik asidin kromik asit veya vanadyum katalizörü ile birlikte kloratlarla seçimli olarak yükseltgenmesiyle de elde edilir. Bunun da seyreltik anorganik asitlerle kaynatılmasıyla laktonlaşma ve enolleşme meydana gelir [13].



Şekil 2.3. Askorbik asidin sentez reaksiyonu

2.1.3. Askorbik asidin işlevleri ve alımı

C vitamini vücudumuzun çoğu dokularına sağlamlığını veren kolajenin üretiminden alyuvarların işlenmesine kadar çok sayıda görevi vardır. Aşırı derecede C vitamini eksikliğine skorbüt adı verilir. Skorbütün belirtileri: halsizlik, kolayca kanayan dişetleri, ciltte morluklar, eklemlerde ağrı ve kıvrılan saçlardır. Ağır skorbüt günde 50-100 mg C vitamini ile engellenebilir. Günde 50-1500 mg alan insanlar klinik belirtisiz skorbüt halindedirler. İnsanın büyük çoğunluğu, batı toplumları dahil, bu durumdadır. Bunun nedeni ağır skorbütü engelleyen miktarın ötesinde C vitamini alımının tıpta daha kabul edilmemiş olmasındandır. Bu durumun temel belirtileri zayıf bağışıklık sistemi, alerji, kanser, mide ülseri ve kalp ve damar hastalıklarına elverişliliklerdir. Yapay C vitaminiyle bitkilerden elde edilen C vitamini arasında herhangi bir kimyasal veya etkisel fark yoktur. C vitamini çeşitli şekillerde alınabilir. Ağız yoluyla tablet olarak yutulabilir. Ancak eczanede satılan C vitaminlerinin dozu genelde düşük olmakla beraber, kilo başına fiyatı da yüksek olabilmektedir. En ucuz ve en uygun şekli toz halinde, % 99,5 veya daha yüksek saflıkta, tıbbi askorbik asit

kristalleridir. Günlük doz (3-20 gram) küçük dozlara bölünerek büyük bir bardak su veya meyve suyuna karıştırılarak yutulabilir. Asitlikten rahatsız olanlar bir bardak suya askorbik asit koyup yarı miktarda sodyum bikarbonat (kabartma tozu) ekleyerek asitliği yok edebilirler. Bu durumda sodyum askorbat içilmiş olunur.

On yaşından küçük çocuklara yaşları kadar gram askorbik asit verilmesi tavsiye edilir. Ağır hastalıklarda, özellikle viral enfeksiyonlarda ve kanserde hastalara damardan, günde 20 ile 300 gram sodyum askorbat verilmesi her zaman ağrıların, ateşin ve diğer semptomların hızla azalmasına, kanser dışında çoğu zaman hastanın iyileşmesine ve kanser durumunda hastanın ömrünün önemli ölçüde uzamasına yol açmaktadır. Yüksek dozlu C vitamini alımını ortomoleküler tıbbın babası, yüzyılın kimyageri, Nobel ödülü sahibi Linus Carl Pauling yaygınlaştırmıştır [12].

2.1.4. Askorbik asidin kullanımı

Askorbik asit birçok ilaçlarda, besin ve içeceklerin vitamince zenginleştirilmesinde kullanılır. Askorbik asitce zengin besinler, indirgen ortamdan ötürü teneke kutularda daha iyi saklanabilmektedir. Teneke kutularda saklanan meyve sularının askorbik asidi hiç eksilmezken, plastik kutularda saklanan meyve sularında fazla miktarda askorbik asit kaybı saptanmıştır. Askorbik asit oksijen tutma özelliğine sahiptir. Onun için renk solması ve doğal kokularını kaybetme gibi özel besinler için önemli bir antioksidanttır. Çabuk soğutularak dondurulmuş meyveler erime sırasında doğal renk ve kokularını yitirirler. Bunları dondurmadan önce saf askorbik asit katılmakla bu sakıncalar önlenabilmektedir. Oksijen hoş gitmeyen değişiklikleri yapmadan önce askorbik asit tarafından tutulur. Bu şekilde dondurulmuş şeftali, kayısı ,elma, üzüm, muz, armut, ananas gibi meyvelerde 20 yıldan beri askorbik asit antioksidan olarak kullanılmaktadır [13].

2.2. Analitik Metot Validasyonu

Validasyon, ilaçların geliştirilmesi, üretim ve kontrolünde kullanılan temel işlemlerin ve makinelerin sistematik olarak gözden geçirilmesi, önerilen üretim ve kontrol

yöntemleri kullanıldığında tekrarlanabilir sonuçların alınacağından ve istenilen kalitenin sağlanacağından emin olunması için yapılan işlemlerdir [14]. Analitik metod validasyonu ise; analizlerde kullanılan metodun valide olduğunu kanıtlamaktır. Bu tanımlananın dışında USP XXI Supplement 9 Analitik metod validasyonunu şu şekilde tanımlamıştır: Analitik metod validasyonu, metodun performans özelliklerinin hedeflenen analitik uygulamaların amacına uygun olup olmadığını, laboratuvar çalışmaları ile gösterilmesidir. ICH Guideline Q2A, validasyonun temel amacının analitik bir prosedürün tasarlanan maksadına uygunluğunu ispatlamaktır şeklinde ifade etmiştir. Analitik metod validasyonunun amacı;

- Potansiyel hataların kaynaklarını tanımlamak ve tayin etmek
- Metodun amaca uygun olup olmadığını saptamak
- Metodun kestirimler yapmaya uygun olduğunu ispatlamak
- FDA' in taleplerini yerine getirmek

şeklinde ifade edilebilir. Validasyonun bize sağladığı bazı faydalar vardır. Bu faydalar;

- Regülasyonlara uyum
- Metotlardaki verilerin güvenilirliği
- Verilerin tekrarlanabilirliği, doğruluğu, seçiciliği

olarak açıklanabilir.

2.2.1. Neler valide edilir

USP'ye göre analiz yöntemleri 3 gruba ayrılmıştır. Bunlar;

- Grup I, hammadde veya bitmiş ürün içindeki aktif maddenin (koruyucular dahil) tayininde kullanılan yöntemler

- Grup II, hammaddedeki safsızlıkları veya bitmiş ürünlerdeki parçalanma ürünlerini tayin etmeye yarayan yöntemler
- Grup III, ürünün performans özelliklerini (dissolüsyon profili, içerik eşdağılımı v.b.) tayin için kullanılan yöntemler

Bu yöntemlerin kullanım amacına göre valide edilecek parametrelerde farklılık göstermektedir.

2.2.2. Validasyon parametreleri

Validasyon parametreleri, analiz yöntemlerinde valide edilecek parametreleri açıklamaktadır. GMP, ICH/USP, FDA'in yayımladıkları validasyon kılavuzlarında yapılması istenen çeşitli validasyon parametreleri belirtilmektedir [15]. Validasyon ile ilgili yayımlanan kılavuzlar;

- 1978 cGMP
- 1987 FDA validasyon kılavuzu
- 1989 Supplement 9 USP XXI
- 1994 FDA reviewer kılavuzu
- 1995 ICH validasyon tanımları
- 1997 ICH validasyon metodolojisi
- 1999 Supplement 10 USP 23
- 2000 FDA draft validasyon kılavuzu

GMP validasyon parametreleri;

- Doğruluk
- Hassasiyet
- Seçicilik
- Tekrar elde edilebilirlik

ICH/USP validasyon parametreleri;

- Seçicilik
- Doğrusallık
- Doğrusallık aralığı
- Doğruluk
- Hassasiyet (Tekrarlanabilirlik ve Ara Hassasiyet)
- Tespit edilebilirlik limit
- Tayin edilebilirlik limiti

1978 cGMP validasyon parametreleri;

- Doğruluk
- Hassasiyet
- Seçicilik
- Tekrar elde edilebilirlik

ICH/USP validasyon parametreleri;

- Seçicilik
- Doğrusallık
- Doğrusallık aralığı
- Doğruluk
- Hassasiyet (Tekrarlanabilirlik ve Ara Hassasiyet)
- Tespit edilebilirlik limiti
- Tayin edilebilirlik limiti

1987 FDA Kılavuzları validasyon parametreleri;

- Seçicilik
- Doğrusallık (&Doğrusallık aralığı)
- Doğruluk

- Geri Kazanım
- Ruggedness

1994 FDA Reviewer Kılavuzu validasyon parametreleri;

- Doğruluk
- LOD/LOQ
- Doğrusallık
- Hassasiyet
- Doğrusallık Aralığı
- Geri kazanım
- Dayanıklılık
- Çözelti stabilitesi
- Seçicilik

2000 FDA Draft Kılavuzu validasyon parametreleri;

- Doğruluk
- LOD/LOQ
- Doğrusallık
- Hassasiyet
- Doğrusallık Aralığı
- Geri kazanım
- Dayanıklılık
- Çözelti stabilitesi
- Seçicilik
- Stress çalışmaları

Seçicilik (Spesifiklik): Seçicilik analitik bir metodun, analiz edilecek maddeyi diğer bileşenlerin varlığında ölçebilme yeteneğidir. Kullanılan yöntemin sadece o etken maddeye özgün ve spesifik olmasıdır. Bir etken maddenin yanma, safsızlıkları, parçalanma ürünleri ve diğer yan ürünleri ile plasebo maddeler ilave edildiği zaman

bizim yöntemimiz sadece etken maddeyi ölçebilmeli, diğerleri ile reaksiyon vermemelidir. Seçicilik bu iki grup analiz arasındaki farklılıktır. Amaç etken madde miktarını tayin etmek için kullanılan yöntemde, üretim formülündeki yada kullanılan diğer kimyasalların etken maddeyle karışmadığını göstermektir. Seçicilikte yapısal olarak birbirine benzer bileşikler ayırt edebilmelidir.

Doğrusallık: Analit konsantrasyonu ile elde edilen cevap arasında direkt ve orantılı bir ilişkinin olduğunun gösterilmesidir. Sinyale karşı analit konsantrasyonu grafiği görsel olarak incelenerek, istatistiksel metodlar kullanılarak lineer regresyon $y=mx+b$ korelasyon katsayısı, y kesim noktası (b), eğim (m), artık kareler toplamı değerlendirilir. ICH tavsiyelerine göre en az 5 konsantrasyon seviyesi gereklidir [16-20].

Doğrusallık aralığı: Uygun bir seviyede hassasiyet, doğruluk ve doğrusallığın elde edildiği, numunedeki analitin, minimum ve maksimum konsantrasyon aralığıdır. Genellikle doğrusallık çalışmalarında belirlenir. Metodun kabul edilebilir doğrusallık, doğruluk ve hassasiyet sağladığının gösterildiği aralık seçilir. Belirlenen minimum aralık hammadde ve bitmiş ürün miktar tayini için test konsantrasyonunun %80-120'si; içerik eşdağılımı miktar tayini için test konsantrasyonunun %70-130'u; dissolüsyon test metodu için spesifikasyonlarda belirtilen aralığın $\pm\%20$ 'si; safsızlık miktar tayini için safsızlık spesifikasyonunun %120'si olmalıdır.

Doğruluk: Bir analiz yönteminin doğruluğu elde edilen test sonuçlarının gerçek değere olan yakınlığıdır. Analitik prosedürlerde belirtilen aralıkta çalışılmalıdır. En az 3 konsantrasyon seviyesi ve her bir konsantrasyondan 3'er numune ile çalışılmalıdır. Doğruluk, analiz sonucu elde edilen miktarın, ilave edilen gerçek miktarın geri kazanılan miktarı olarak tanımlanır. % Geri kazanım olarak da ifade edilir.

Hassasiyet: Aynı homojen numunedeki yapılan numuneleme işlemlerinden elde edilen bir dizi ölçümlerin birbirine olan yakınlığının ifadesidir. Hassasiyet terimleri 6 seviyede incelenir;

- Tekrarlanabilirlik
- Ara hassasiyet
- Tekrar elde edilebilirlik
- Sistem kesinliği
- Sağlamlık
- Dayanıklılık

Tekrarlanabilirlik (Kesinlik): Bir analiz yönteminin kesinliği, kısa zaman zarfında, aynı çalışma koşullarında, elde edilen hassasiyeti belirtir. %100 konsantrasyon seviyesinde 6 ölçüm ile değerlendirilir. Bir diğer değerlendirme durumu ise en az 9 ölçüm (3 farklı konsantrasyon ve 3'er numune)'dür.

Ara hassasiyet: Bir analiz yönteminin ara hassasiyeti, aynı analiz numunesinin uzun zaman aralıklarında analizi yapıldığında elde edilen sonuçların tekrarlanabilir olmasıdır. Farklı zamanlarda, yapılan iki analiz sonucunun hassaslığının ölçüsüdür şeklinde de tanımlanabilir. 6 adet numunenin farklı günlerdeki analiz sonuçları ve relatif standart sapmaları değerlendirilir.

Tekrar elde edilebilirlik: Tekrar elde edilebilirlik, farklı zamanlarda, farklı laboratuvarlarda farklı analistlerin, yaptıkları analizin sonucunda elde edilen sonuçların tekrarlanabilir olmasıdır. Laboratuvarlar arası hassasiyeti açıklar. Ara hassasiyet çalışılmışsa gerek yoktur.

Sistem kesinliği: Homojen numuneden (konsantrasyonu bilinen standart) ardışık olarak alınan ölçüm sonuçlarının relatif standard sapması değerlendirilerek sistemin kesinliği ölçülmüş olur. Aynı numuneden ardışık 10 ölçüm alınması gereklidir.

Sağlamlık: 1994 yılında sağlamlık iptal edilmiş ve dayanıklılık ile değiştirilmiştir. Aynı numunelerin, farklı şartlar altında analiz edilerek elde edilen test sonuçlarının tekrar elde edilebilirliğinin ölçümüdür. Bu şartlar, farklı analist, farklı laboratuvar,

farklı cihaz, farklı lot numaralı reaktifler, farklı analiz süreleri, farklı sıcaklıklar, farklı günler vs. olabilir.

Dayanıklılık: Metot parametrelerinde yapılan kasıtlı değişikliklerden metodun etkilenmeden kalabilme kapasitesinin ölçümüdür. Hassasiyet terimleri basit bir şekilde özetlenecek olursa;

- Tekrarlanabilirlik (Bir analiz 6 numune)
- Ara hassasiyet (İki analiz)
- Tekrar elde edilebilirlik (İki laboratuvar)
- Sistem kesinliği (10 adet ardışık ölçüm)
- Sağlamlık (Bir çok değişken)
- Dayanıklılık (Kasıtlı değişiklikler)

Tespit edilebilirlik limiti (Kalitatif Teşhis Limiti): Numunedeki analitin, %95 güvenilirlikte tespit edilebileceği en düşük miktardır. Genellikle bu seviyelerde kantitatif sonuçlar elde edilemez.

Tayin edilebilirlik limiti (Kantitatif Tayin Limiti): Numunedeki analitin, uygun doğruluk ve hassasiyet ile %95 güvenilirlikte tayin edilebileceği en düşük konsantrasyondaki miktardır. Bu parametre özellikle impürite gibi düşük maddelerin analizinde önem taşır.

Tespit ve Tayin edilebilirlik limitleri;

- Görsel olarak (cihaz kullanılmayan metodlar için)
- Sinyal: Gürültü oranına dayandırılarak

2.3. Kromatografi

Kromatografi, bir karışımdaki iki yada daha fazla bileşenin, hareketli (taşıyıcı) bir faz yardımıyla, sabit (durgun) bir faz arasından değişik hızlarda hareket etmeleri esasına dayanır. Kromatografik yöntemlerle, kimyasal ve fiziksel özellikleri birbirine

çok yakın bileşenlerden oluşan karışımları, tümüyle, kolayca ve kısa sürede ayırmak olanaklıdır.

Kromatografide durgun faz, bir katı veya katı yüzeyine kaplanmış bir sıvı fazdır. Durgun fazın üzerinden akan hareketli faz ise bir gaz veya sıvı fazdır. Hareketli fazın sıvı olduğu kromatografi türüne sıvı kromatografi; hareketli fazın gaz olduğu kromatografi türüne ise gaz kromatografi denir. Gaz kromatografi, gaz, uçucu sıvı ve katı karışımlar için uygulanan bir tekniktir. Sıvı kromatografi ise özellikle ısı kararsız ve uçucu olmayan örnekler için uygulanır. Bir kantitatif analiz tekniği olan kromatografide amaç, anlamlı bir süre içinde iyi bir ayırma yapmaktır [21].

Kromatografinin sınıflandırılması:

1. Ayrılma mekanizmalarına göre:
 - a. Adsorpsiyon kromatografisi
 - b. Dağılma kromatografisi
 - c. İyon değiştirme kromatografisi
 - d. Moleküler eleme kromatografisi
 - e. İyon çifti kromatografisi
 - f. Afinite kromatografisi
2. Uygulama biçimine göre:
 - a. Düzlemsel kromatografi
 - Kağıt kromatografisi
 - İnce tabaka kromatografisi
 - b. Kolon kromatografisi
 - Gaz kromatografisi
 - Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC)
3. Faz tipine göre
 - a. Gaz kromatografisi
 - Gaz-Katı kromatografisi
 - Gaz-Sıvı kromatografisi
 - b. Sıvı kromatografisi
 - Sıvı-Katı kromatografisi

- Sıvı-Sıvı kromatografisi

2.3.1. Gaz kromatografisi (GC)

Bir karışımda gaz halinde bulunan veya kolayca buharlaştırılabilen bileşenlerin birbirinden ayrılması amacıyla gaz kromatografisi yöntemi kullanılır. Bu yöntemde ayrılma, bileşenlerin farklı katı yüzeylerdeki farklı adsorpsiyon ilgilerine göre gerçekleşir. Numunede bulunan bileşenler, kolona tutunma ilgilerine göre farklı zamanlarda kolonu terk ederek dedektöre ulaşırlar. Dedektör bu maddeleri algılayıp numune konsantrasyonları ile orantılı olarak elektriksel bir cevap üretir. Gaz kromatografisi yönteminde inert bir katı dolgu maddesi üzerine uçucu olmayan bir sıvı kaplanması yerine, bu sıvı filminin doğrudan ince bir cam veya silika kapiler borunun iç yüzeyine tutundurulur. 0,2-0,5 mm iç çapında ve 10-50 m gibi çok uzun kapiler kolonlar kullanılır. Bu nedenle kapiler kolonların verimliliği ve ayırıcılığı, dolgu kolonlara oranla çok daha iyidir. Gaz kromatografi cihazlarında sıcaklık kontrolünü sağlayan kolon fırını bulunmaktadır. Bu nedenle, diğer kromatografik tekniklerin aksine sıcaklık değişimi de alıkonma süresini değiştirmekte kullanılabilir. Hareketli faz olarak helyum, azot veya argon gibi inert bir gaz kullanılır ve bu gaza taşıyıcı gaz adı verilir [21].

2.3.2. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC)

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi bir ayırma tekniği olarak tüm analitik ayırma teknikleri arasında en yaygın kullanılanıdır. Bir sıvıda çözülmüş ayrılacak bileşenler, bir kolon içerisinde bulunan genellikle katı bir destek üzerindeki sabit faz ile farklı etkileşmelere girerek, kolon içinde değişik hızlarda ilerler. Kolonu değişik zamanlarda terk ederler ve böylece birbirlerinden ayrılırlar. Burada taşıyıcı faz olan sıvı, pompalarla kolona basıldığından yüksek akış hızındadır. Bu nedenle ayırma daha kısa sürede ve tam olarak gerçekleşmektedir. Ayrılan bileşik, kolon çıkışına bağlanan uygun bir detektörle tespit edilip miktarıyla orantılı olarak kaydedilir.

Yüksek hızda gerçekleştirilen ayırmaların yapıldığı sıvı kromatografi sistemlerine, Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (High Pressure Liquid Chromatography) denir. Duyarlılığı, doğru kantitatif tayinlere kolaylıkla uyarlanabilir olması, uçucu olmayan türlerin veya sıcaklıkla kolayca bozunabilen türlerin ayrılmasına uygun olması, kolonunun pek çok kez kullanılabilir olması, yüksek tekrarlanabilirliğe sahip olması, nitel ve nicel analizlerde kullanılabilir olması ve özellikle yeni nesil ultra performans likit kromatografiler için çok kısa analiz süreleri HPLC'lerin kullanım alanını arttırmıştır. Amino asitler, proteinler, nükleik asitler, hidrokarbonlar, karbohidratlar, ilaçlar, terpenoidler, pestisitler, antibiyotikler, steroidler, metal-organik türler ve çeşitli inorganik bileşikler HPLC kullanım alanına örnek sayılabilirler [22].

Normal faz sıvı kromatografisi: Hareketli fazın apolar, sabit fazın polar olduğu sistemlere normal faz sistemler denir.

Ters faz sıvı kromatografisi: Hareketli fazın polar, sabit fazın apolar olduğu sistemlere ters faz (RP) sistemler denir. Bu sistemde kolon apolar, hareketli faz ise metanol, asetonitril ve su gibi polar çözücülerdir. Geliştirilen bu teknikte örnek ve kolon hidrofobik bir etkileşim oluşturur. C18, C8, C4, C2, fenil gibi kolonlar ters faz sıvı kromatografisinde kullanılan kolon çeşitleridir.

2.3.3. HPLC cihazı ve HPLC sistem türleri

HPLC cihazı; çözücü dağıtma bölümü pompa, örnekleyici, ayırma kolonu, dedektör ve kaydedici sistem olmak üzere başlıca dört bölümden oluşur. HPLC tekniğinde hareketli fazın bileşimine göre izokratik ve dereceli elüsyon olmak üzere iki tür sistem vardır. İzokratik elüsyon; tek pompa kullanılarak sabit bileşenlerdeki bir hareketli fazla yapılan elüsyondur. Eğer ayrılması gereken bileşenlerin k' değerleri yakınsa hareketli faz olarak sabit bileşende bir çözücü veya çözücü karışımı kullanılarak k' istenilen değerde tutulabilir. Dereceli elüsyon; birden fazla pompa kullanılarak polariteleri birbirinden farklı hareketli fazlarla yapılan elüsyondur. k' değerleri birbirinden çok farklı olan çok bileşenli örnekler için tek bir çözücü bulmak

olanaksızdır. Bu durumda dereceli elüsyona başvurulur. Ayırma sırasında önceden saptanan ve zayıf elüsyon yapan çözücünden, kuvvetli elüsyon yapan bir çözücüye giderek kolona ardı ardına farklı kuvvetteki çözücüler pompalanır. Dereceli elüsyon genellikle çözücü karışımları kullanılarak sağlanır. Bunun dışında hareketli fazın bazı özellikleri değiştirilerek de dereceli elüsyon yoluna gidilebilir. Bunlardan bazıları iyonik kuvvetin, pH'ın değiştirilmesi, hidrojen bağı yapma özelliğinden yararlanma, dielektirik sabitinin değiştirilmesidir [21].

2.3.4. Çözücü dağıtma sistemi (pompa)

Çözücü pompalama sistemi HPLC'de en önemli kısımlardan biridir. Kolon giriş ve çıkışı arasında oluşturulması gereken yüksek basınç farkı, kolon girişine bir pompa yoluyla uygulanan basınç ile sağlanır. Pompanın performansı, analitik sonuçlardaki tekrarlanabilirliği, nicel değeri, gözlenebilme sınırı vb. değerleri büyük ölçüde etkiler. Mobil fazı oluşturan çözücü karışımlarının, enjektör, kolon ve dedektör içerisinden belirli, sabit veya değişken bir hızda, belirli basınç altında geçmesini sağlar. HPLC donanımında yer alan pompalama sistemleri, akış hızına göre, pompanın yapımında kullanılan malzemeye göre ve pompanın mobil fazı iletme mekanizmasına göre olmak üzere 3 farklı şekilde kategorize edilebilmektedir [21].

2.3.4.1. Akış hızına göre pompalar

Microbore Pompa Sistemleri: İç çapı 2 mm'ye kadar olan kolonlar için kullanılır ve 1-250 mL/dk. aralığında akış hızı sağlarlar.

Standart Bore Pompa Sistemleri: Analitik HPLC uygulamalarında en sık kullanılan pompa sistemi olup 100 mL–10 mL/dk. aralığında akış hızı sağlarlar. Yarı preparatif HPLC uygulamalarında iç çapı 12 mm'ye kadar olan kolonlar için tercih edilirler.

Preparatif Pompa Sistemleri: Analitik HPLC uygulamalarının dışında çalışma alanlarında kullanılır ve 10 mL/dk.'dan büyük akış hızı sağlarlar.

2.3.4.2. Pompanın yapıldığı malzemeye göre pompalar

Metalik: En çok tercih edilen metalik malzeme, mekanik dayanıklılığı, aşınma direnci ve iyi termal stabilitesi nedeniyle 316 paslanmaz çeliktir. Mobil fazın bileşenlerinden çok azı 16 paslanmaz çeliğe zarar verebilir. Bir diğer metalik malzeme alternatifi ise titanyum'dur. Mekanik dayanıklılık özellikleri 316 paslanmaz çeliğe benzemekle birlikte, aşınma direnci ve kimyasallara karşı inertliği daha fazladır. Titanyum ve çelik materyaller 6000 psi basınca kadar dayanıklıdırlar. Metalik materyallerin sakıncaları olarak ise yüksek maliyetleri, kuvvetli asidik ortamlara dayanıksızlık, biyolojik örneklerle geçimsizlik sayılabilir.

Ametalik: Metalik pompaların bahsedilen sakıncaları sebebiyle ametalik materyaller de pompa imalinde kullanılmaktadır. Bu amaçla en çok polietilen (PEEK), politetrafloroetilen (TEFLON) ve seramik materyaller tercih edilmektedir. TEFLON biyolojik örnekler ve asidik ortamlarla geçimli olmakla birlikte 2000 psi basıncın üzerisi için dayanıklı değildir. PEEK ise 5000 psi basınca kadar dayanıklı olup 316 paslanmaz çeliğe zarar veren asidik çözeltilere dayanıklıdır. Ancak HPLC uygulamalarında kullanılan bir çok organik çözücülere dayanıksızdır. Seramik yapı materyali olarak safir 20 yılı aşkın süredir pompalarda özellikle piston parçalarının imalatında kullanılmaktadır. Bu tür malzemeler iyi kimyasal stabiliteye sahip olmakla beraber çok yüksek maliyetleri uygulamalarında kısıtlamalar getirmektedir.

2.3.4.3. Mobil faz iletim mekanizmasına göre pompalar

Şırınga Tip Pompalar: Çok kullanılmamakla birlikte akış hızının 100 mL/dk.'dan daha az olduğu uygulamalarda tercih edilmektedirler. 10-50 mL hacminde bir şırıngaya pistonun elektrik motoruyla ittirilmesiyle akış sağlanmaktadır. Sağlanabilecek mobil faz akış süresi şırınganın hacmi ile sınırlı olup, yeniden dolum sırasında akış kesilmek zorundadır.

Piston Pompalar: Modern HPLC donanımının standart parçasıdır. Yapısı 2 kısım hareketli parçadan oluşur. Bunlar, kontrol vanaları ve pistondur.

2.3.5. Kolonlar

Modern HPLC donanımının 4 temel yapı taşından birisi olan kolon, karmaşık örneklerde bileşenlerin birbirinden iyi çözünürlükle ayırımından sorumlu sabit fazdır. Kolon imalatında yapı materyali olarak 316 paslanmaz çelik, TEFLON, cam veya PEEK en sık tercih edilenlerdir. Kolonun ayırım gücü ve performansı yapıldığı materyalden çok, iç yüzeyine yapılan kaplamada kullanılan malzemenin kimyasal ve fiziksel özelliklerinden etkilenmektedir. Kullanılan bu tür kaplama malzemeleri çok çeşitli olup, kullanılacak mobil fazın ve uygulanacak HPLC metodunun özelliklerine ve analizi yapılacak örneğin bilinen kimyasal ve fiziksel özelliklerine göre seçilmelidir. Seçilecek kolonun HPLC uygulamasında kullanılacak akış hızı ve dolayısıyla oluşacak basınca dayanıklı olmasına dikkat edilmelidir. Birçok analitik kolonun iç çapı 2-5 mm aralığında değişmektedir. Kolon iç çapı arttıkça akış hızı ve iç doldurma hacmi artmakta ama oluşacak piklerin çözünürlüğü dolayısıyla duyarlılık azalmaktadır. Kolonların boyları (uzunluğu) çok çeşitli olup genellikle 30-300 mm aralığında değişmektedir. Kolon uzunluğu arttıkça örnek bileşenlerinin ayırımı daha iyi olmakta fakat analiz süresi uzadığı için daha fazla mobil faz harcanmaktadır. İlk HPLC çalışmalarda kullanılan sabit faz materyalleri olarak alümina ve silica gibi polar sabit fazlar kullanılmıştır. Daha iyi ayırımlar yapılabilmesi için sabit ve hareketli fazda parametre değişikliklerine ihtiyaç duyulmuştur. Bu ihtiyaç modifiye silikanın doğuşunu sağlamıştır. Karbon yapısıyla modifiye edilmiş silica, apolar hareketli fazdan polar hareketli faza geçişi sağlamıştır. Sabit faz çeşitliliğinin çok olması, normal faz çalışmadan ters faz çalışmaya olan eğilimi arttırmıştır. Bu gelişim normal faz çalışmada ayırımı zor olan birçok madde için kolaylık sağlamıştır. Genel olarak kolonlar tarih sürecinde düzensiz partiküller içeren birinci nesil kolonlar, küresel partiküller içeren kolonlar ve yeni nesil monolitik kolonlar olarak gelişim göstermiştir. İyi bir kolon dolgu maddesi kararlı olmalıdır ve hem hareketli faz çözücülerine hem de örnek çözeltilere karşı inert olmalıdır. Geniş yüzey alanına, düzgün olarak dağılmış ve hareketli faza kolay erişebilir açık yapısal yüzeye sahip olmalıdır. Yüksek basınç ve yüksek akış hızlarından etkilenmemelidir. Yeni nesil kolonlar, bugüne kadar geliştirilmemiş seviyede verimlilik, pH dayanımı, uygulanabilirlik ve tekrarlanabilirlik sağlarlar.

HPLC çalışmalarını daha basit kılar, aşırı asidik ve bazik örneklerde rahatlıkla çalışır. Analitik kolonun ömrünü artırmak amacıyla, analitik kolondan önce genellikle kısa bir kolon yerleştirilir. Bu kolonun görevi, sadece partikül haldeki maddeleri ve çözücü içindeki yabancı maddeleri tutmak değil, aynı zamanda numune içinde bulunan ve durgun faza tersinmez olarak bağlanan bileşenleri de tutmaktır. Emniyet kolonundaki dolgu maddesinin bileşimi, analitik kolondakine çok benzer olmalıdır. Bununla beraber, basınç düşüşünü en aza indirmek için tanecik boyutu genellikle daha büyüktür [21].

2.3.6. Dedektörler

Dedektörler HPLC donanımının 4 temel parçasından birini oluşturur. Kolondan çıkan maddelerin derişimi kolon çıkışına yerleştirilen uygun bir dedektör ile ölçülür. Dedektör seçimi doğru ve hassas bir analiz yapabilmek için son derece önemlidir. İyi bir dedektörün duyarlı, doğrusal, seçici, koşullardan ve değişimlerden etkilenmeyen, numuneyi tahrip etmeyen, ucuz ve kolay kullanıma uygun olmalıdır.

Dedektörler, örnek bileşenlerini tayin ederken ölçtükleri fiziksel özelliklere göre, 8 çeşittir:

2.3.6.1. Ultraviöle / Görünür Bölge Dedektörü

Absorbans ölçülür. Lambert-Beer yasası geçerlidir. Spektrum taraması yapmak, farklı dalga boyunda çalışmak veya dalga boyunu zamana karşı programlamak mümkündür.

2.3.6.2. Fotodiyot Array Dedektörü (DAD)

UV/VIS dedektörden farkı, 512 elementden oluşan bir yüzeyde, her elementin ayrı bir dalga boyundaki absorbansı eş zamanlı olarak ölçebilmesidir. Bu sayede 3 boyutlu kromatogramlar almak ve istenilen her pikin çok hızlı spektrum taramasını görebilmek olasıdır. Ayrıca istenilen dalga boyu aralığında çalışabilmesi bu

dedektörün sağladığı bir diğer önemli avantajdır. Kullanılan ışık kaynağı döteryum veya tungsten lambadır.

2.3.6.3. Floresans Dedektörü (FLD)

Organik maddelerin yaklaşık %15'i floresans oluşturma yeteneğine sahiptir. Oluşan floresans ölçülmektedir. Kullanılan ışık kaynağı ksenon lamba olup, duyarlılığı UV/VIS dedektöre göre yaklaşık 103 kat fazladır.

2.3.6.4. İletkenlik Dedektörü (CDD)

İletkenlik ölçülür. Daha çok anyon ve katyon analizlerinde kullanılır. Sıcaklık kontrolü çok önemlidir. Bu sebeple kolon fırını içerisinde çalışılmalıdır. Kullanılan hareketli fazın iletkenliği ne denli düşük olursa oluşan gürültü de o denli düşük olur.

2.3.6.5. Refraktif İndeks Dedektörü (RID)

Kırılma indisi ölçülür. Sıcaklıktan etkilenir. Örnek bileşenlerinin bulunduğu ortamda yoğunluk artacağından gelen ışık kırılarak hücreyi terkeder. Işığın ölçülen kırılma oranından (kırılma indisi) kantitatif tayin yapılır.

2.3.6.6. Elektrokimyasal Dedektör (ECD)

Elektroaktif maddeler analizlenebilir. Yani bileşenler, belirli potansiyel değerlerinde yükseltgenebilir veya indirgenebilir olmalıdır. Ölçülen fiziksel özellik tayin sırasında oluşan elektrik akımıdır.

2.3.6.7. Kütle Dedektörü (MS)

Örnek bileşenlerine ait çok özgün kromatogramlar elde edilir, dolayısıyla özellikle kalitatif tayinlerde teşhis amaçlı kullanımlarda çok önemli bir dedektördür [23].

BÖLÜM 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar

Deneysel çalışmalarda kullanılacak kimyasallar, cihazlar, gerekli malzemeler seçilmiş ve çalışılacak parametreler belirlenmiştir. Askorbik asidin miktar tayininde kullanılacak cihazların ve kimyasal maddelerin özellikleri tablolarla belirtilmiştir. (Tablo 3.1. ve 3.2.)

Tablo 3.1. Askorbik asidin miktar tayini için kullanılan cihaz ve ekipmanlar.

Cihaz	Seri no ve firma	Özellikleri
HPLC	A12SM4927A/ Waters	Yüksek basınçlı sıvı Kromatografisi, UV dedektör
HPLC	S12SM4265A/ Waters	Yüksek basınçlı sıvı Kromatografisi, DAD dedektör
Kolon	GL.Sciences Inc.	Inertsil ODS-3V, 250×4.6 mm 5 µm
Analitik terazi	B124152490/ Mettler toledo	Hassas terazi
pH metre	Methrom	692pH / İyon metre
Karıştırıcı	Heidolph MR 3001K	1250 rpm

Tablo 3.2. Askorbik asidin miktar tayini için kullanılan kimyasallar.

Kimyasal	Seri no ve firma	Son kullanım tarihi
Askorbik Asit CRS	4 / EP	Güncel
Askorbik Asit	TL01210753 / DSM	10.2015
Dipotasyum Hidrojen Fosfat	1100601043 / J.T. Baker	02.2016
Asetonitril	SZBD011SV / Sigma Aldrich	09.2015
Fosforik Asit	K426614 133 / Merck	08.2016

3.2. Askorbik Asit Miktar Tayini HPLC Analizi İçin Analitik Metod Validasyonu

3.2.1. Kromatografik şartlar

Kolon	: INERTSIL ODS-3V 250 x 4,6mm 5µm veya eşdeğeri
Dalga boyu	: 210 nm
Akış hızı	: 1,0 ml/dk.
Kolon sıcaklığı	: 25°C
Numune sıcaklığı	: 25°C
Enjeksiyon hacmi	: 50 µl
Enjeksiyon süresi	: 8 dk.
Yaklaşık Alınma Zamanı	: Askorbik Asit 3,5 dk.
Seyreltme Çözeltisi	: Hareketli Faz

Fosfat Tampon: 4,35 g dipotasyum hidrojen fosfat R 1000 ml su içerisinde çözülmüştür. pH 3,3'e o-fosforik asit ile ayarlanmıştır.

Hareketli Faz: Fosfat Tamponu: Asetonitril (95:5) (h/h) oranında karıştırılmıştır. Filtre ve degaze edilmiştir.

3.2.2. Spesifiklik

Spesifiklik çalışmaları esnasında kullanılmış olan çözeltiler aşağıdaki gibi hazırlanmıştır.

Standart Çözelti: 22,2 mg Askorbik Asit WS hassas bir şekilde tartılarak 100 ml' lik balon joje içerisine aktarılmıştır. 70 ml seyreltme çözeltisi ilave edilmiştir. Ultrasonik banyoda çözünmesi sağlanmıştır. Hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlanmıştır. Bu çözeltinin 2,0 ml'si hassas pipet ile 20,0 ml'lik balon jojeye aktarılmıştır ve hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlanarak iyice karıştırılmıştır. 0,45 µm PTFE filtreden süzümüştür.

Test Çözeltisi: Tam tartılmış 22,2 mg Askorbik Asit'e eşdeğer tablet tozu (yaklaşık 166 mg) 100 ml'lik balon jöjeye aktarılmıştır. 70 ml seyreltme çözeltisi ilave edilmiş, ultrasonik banyoda 3 dk tutularak çözülmüştür. Hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlanmıştır. Bu çözeltinin 2,0 ml'si hassas pipet ile 20,0 ml'lik balon jöjeye aktarılmıştır ve hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlanarak iyice karıştırılmıştır. 0,45 µm PTFE filtreden süzölmüştür.

Plasebo çözeltisinin hazırlanışı: Tam tartılmış 22,2 mg Askorbik Asit'e eşdeğer plasebo tozu 100 ml'lik balon jöjeye aktarılmıştır. 70 ml seyreltme çözeltisi ilave edilip ultrasonik banyoda 3 dk tutularak çözülmüştür. Bu çözeltinin 2,0 ml'si hassas pipet ile 20,0 ml'lik balon jöjeye aktarılmış ve hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlanarak iyice karıştırılmıştır. 0,45 µm PTFE filtreden süzölmüştür.

Plasebo + Hammadde çözeltisinin hazırlanışı: Tam tartılmış 22,2 mg Askorbik Asit'e eşdeğer plasebo tozu ve 22,2 mg Askorbik asit 100 ml'lik balon jöjeye aktarılmıştır. 70 ml seyreltme çözeltisi ilave edilip ultrasonik banyoda 3 dk tutularak çözülmüştür. Bu çözeltinin 2,0 ml'si hassas pipet ile 20,0 ml'lik balon jöjeye aktarılmış ve hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlanarak iyice karıştırılmıştır. 0,45 µm PTFE filtreden süzölmüştür.

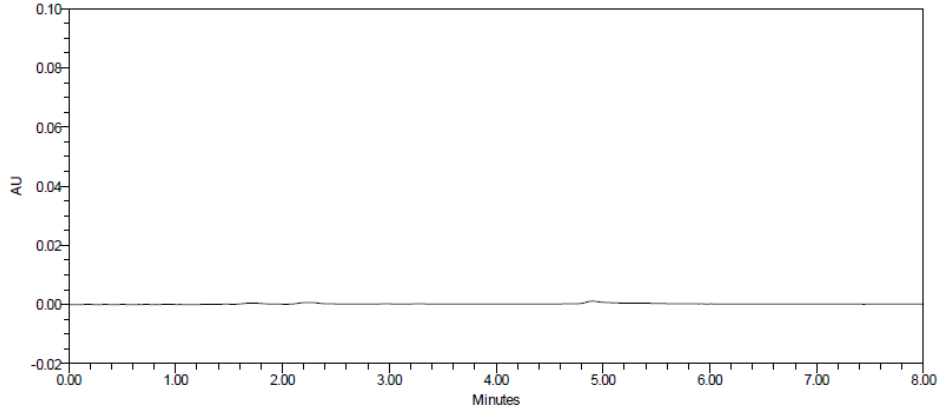
Diosmin çözeltisi hazırlanışı: Tam tartılmış 22,2 mg Askorbik Asit'e eşdeğer diosmin 100 ml'lik balon jöjeye aktarılmıştır. 70 ml seyreltme çözeltisi ilave edilip ultrasonik banyoda 3 dk tutularak çözülmüştür. Bu çözeltinin 2,0 ml'si hassas pipet ile 20,0 ml'lik balon jöjeye aktarılmış ve hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlanarak iyice karıştırılmıştır. 0,45 µm PTFE filtreden süzölmüştür.

Hesperidin çözeltisi hazırlanışı: Tam tartılmış 22,2 mg Askorbik Asit'e eşdeğer hesperidin 100 ml'lik balon jöjeye aktarılmıştır. 70 ml seyreltme çözeltisi ilave edilip ultrasonik banyoda 3 dk tutularak çözülmüştür. Bu çözeltinin 2,0 ml'si hassas pipet ile 20,0 ml'lik balon jöjeye aktarılmış ve hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlanarak iyice karıştırılmıştır. 0,45 µm PTFE filtreden süzölmüştür.

Etken madde miktarını tayin etmek için kullanılan HPLC yönteminde, üretim formülündeki ya da kullanılan mobil fazdaki kimyasalların etken madde pikine girişim yapmadığını göstermek için :

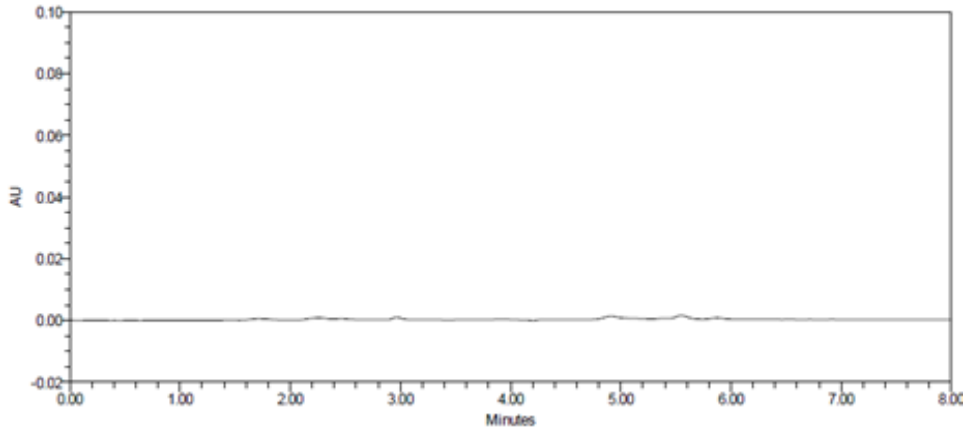
- Seyreltme çözeltisi
- Plasebo çözeltisi
- Standart çözeltisi
- Plasebo + Hammadde çözeltisi
- Test çözeltisi
- Diosmin çözeltisi
- Hesperidin çözeltisi

etken madde miktar tayini şartlarında kalibre edilmiş HPLC cihazına ayrı ayrı enjekte edilerek sonuçlar değerlendirilir. Etken madde alıkonma zamanında başka pik görülmemelidir. Bütün bileşenlerin pik saflıkları uygun olmalıdır. Sonuçların uygunluğu analiz metodunun spesifik ve kesin sonuç veren bir yöntem olduğunu gösterir.



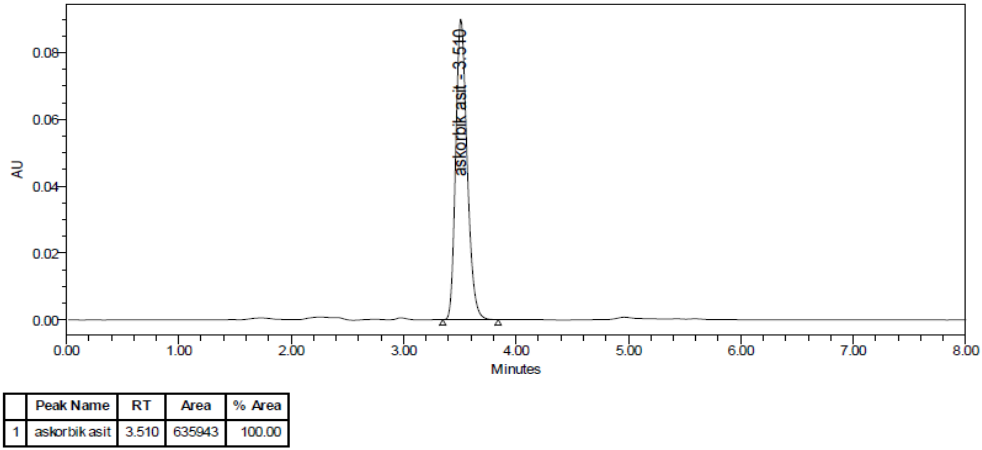
Şekil 3.1. Seyreltme çözeltisi kromatogramı

Seyreltme çözeltisi kromatografik şartlarda belirtildiği gibi hazırlanmış, sisteme enjekte edilmiştir. Kromatogramdan da görüldüğü gibi etken madde alıkonma zamanında pik görülmemektedir.



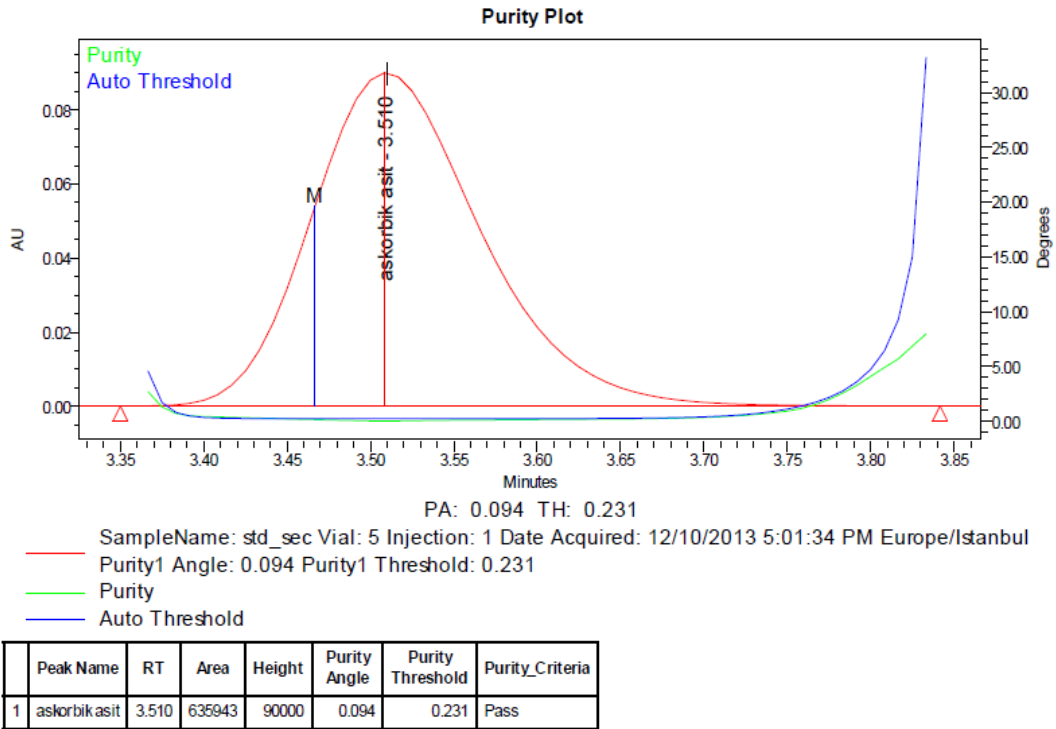
Şekil 3.2. Plasebo çözeltisi kromatogramı

Plasebo çözeltisi spesifiklik bölümünde belirtildiği gibi hazırlanmış, sisteme enjekte edilmiştir. Kromatogramdan da görüldüğü gibi plasebo kaynaklı hiçbir yardımcı madde, etken madde alıkonma zamanında bir girişime neden olmamaktadır.



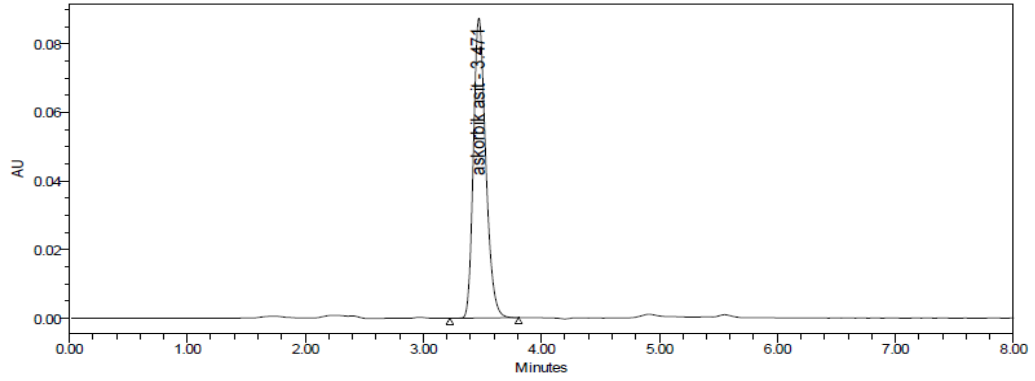
Şekil 3.3. Standart çözeltisi kromatogramı

Standart çözeltisi spesifiklik bölümünde belirtildiği gibi hazırlanmış, sisteme enjekte edilmiştir. Belirtilen konsantrasyonda, kromatogramdan görüldüğü gibi alan ve alıkonma zamanları belirlenmiştir.



Şekil 3.4. Standart çözeltisi saflık eğrisi

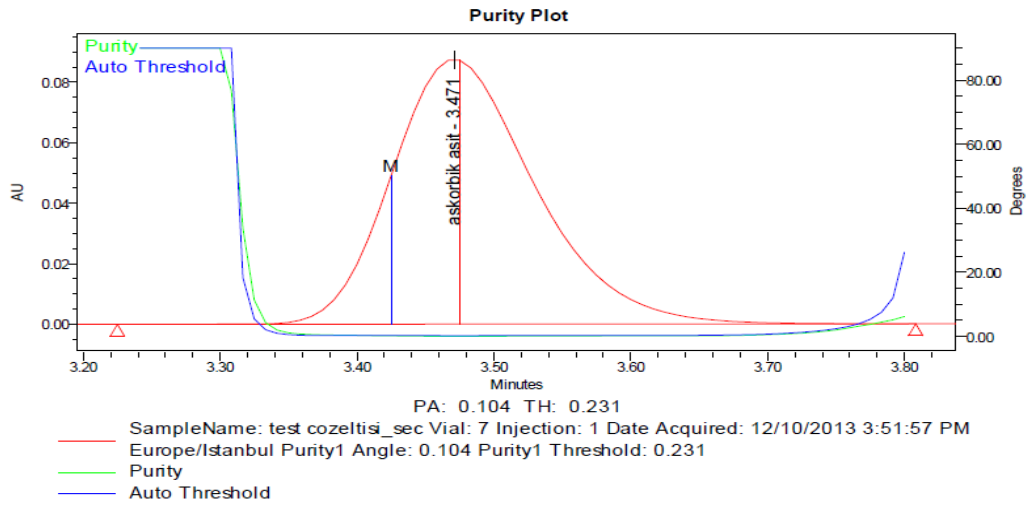
Hazırlanan standart çözeltisinden, DAD dedektör yardımı ile elde edilen pik saflığı kromatogramını incelediğimizde saflık kriteri (purity criteria) bize elde edilen pikin saf olarak geçtiğini (pass) göstermektedir.



Peak Name	RT	Area	% Area
1 askorbik asit	3.471	636881	100.00

Şekil 3.5. Test çözeltisi kromatogramı

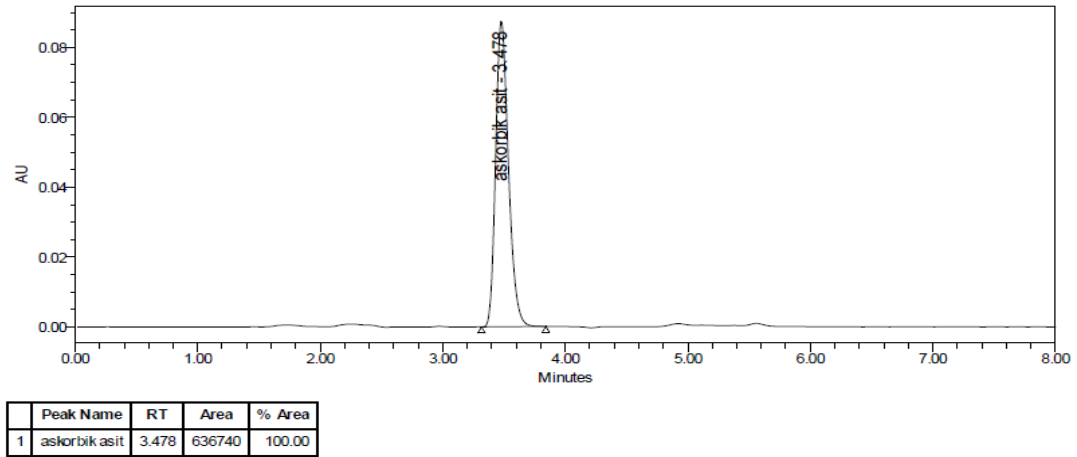
Test çözeltisi spesifiklik bölümünde belirtildiği gibi hazırlanmış, sisteme enjekte edilmiştir. Belirtilen konsantrasyonda, kromatogramdan görüldüğü gibi alan ve alıkonma zamanları belirlenmiştir.



Peak Name	RT	Area	Height	Purity Angle	Purity Threshold	Purity_Criteria
1 askorbik asit	3.471	636881	87453	0.104	0.231	Pass

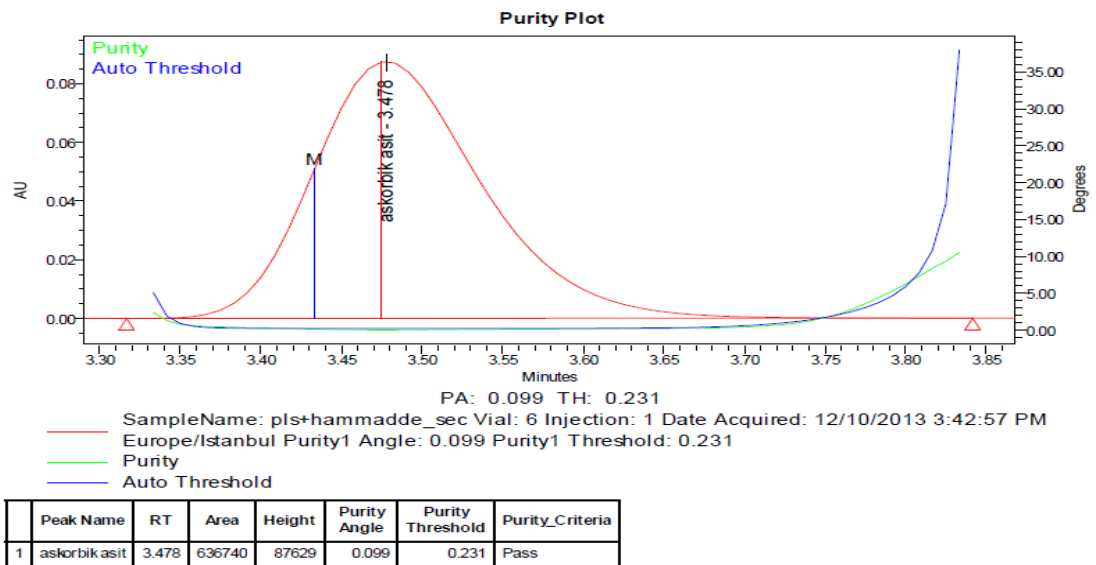
Şekil 3.6. Test çözeltisi saflık eğrisi

Hazırlanan test çözeltisinden, DAD dedektör yardımı ile elde edilen pik saflığı kromatogramını incelediğimizde saflık kriteri (purity criteria) bize elde edilen pikin saf olarak geçtiğini (pass) göstermektedir.



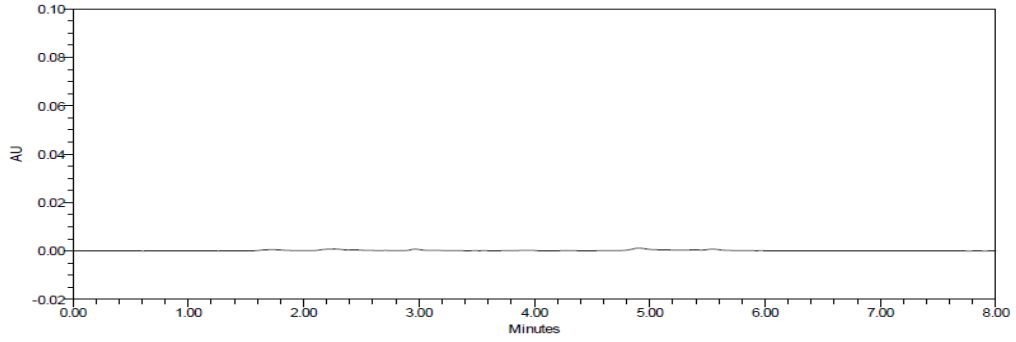
Şekil 3.7. Plasebo + hammadde çözeltisi kromatogramı

Plasebo+hammadde çözeltisi spesifiklik bölümünde belirtildiği gibi hazırlanmış, sisteme enjekte edilmiştir. Belirtilen konsantrasyonda, kromatogramdan görüldüğü gibi alan ve alıkonma zamanları belirlenmiştir.



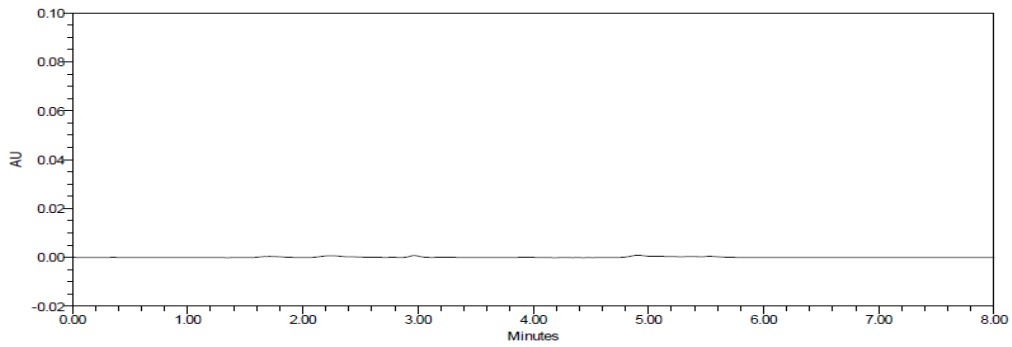
Şekil 3.8. Plasebo + hammadde çözeltisi saflık eğrisi

Hazırlanan plasebo+hammadde çözeltisinden, DAD dedektör yardımı ile elde edilen pik saflığı kromatogramını incelediğimizde saflık kriteri (purity criteria) bize elde edilen pikin saf olarak geçtiğini (pass) göstermektedir.



Şekil 3.9. Diosmin çözeltisi kromatogramı

Diosmin çözeltisi spesifiklik bölümünde belirtildiği gibi hazırlanmış, sisteme enjekte edilmiştir. Kromatogramdan da görüldüğü gibi diosmin hammaddesi kaynaklı bir pik, etken madde alıkonma zamanında bir girişime neden olmamaktadır.



Şekil 3.10. Hesperidin çözeltisi kromatogramı

Hesperidin çözeltisi spesifiklik bölümünde belirtildiği gibi hazırlanmış, sisteme enjekte edilmiştir. Kromatogramdan da görüldüğü gibi hesperidin hammaddesi kaynaklı bir pik, etken madde alıkonma zamanında bir girişime neden olmamaktadır.

Yaklaşık olarak 3,5 dakikada gelen askorbik asit pikini etkileyen bir pik görülmemektedir. Askorbik asidin pik saflığı da uygun görülmektedir. Bu metod askorbik asit için spesifiktir.

3.2.3. Doğruluk

Plasebo ile beraber ayrı ayrı tartılarak 80%, 100%, 120% konsantrasyonlarında 9 adet çözelti hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltiler 3'er kez sisteme enjekte edilmiştir. Miktar tayinindeki gibi çalışılmıştır.

Doğruluk numuneleri aşağıdaki gibi hazırlanmıştır.

%80'lik doğruluk numunesinin hazırlanması: Tam tartılmış 22,2 mg Askorbik Asit'e eşdeğer plasebo tozu ve 17,76 mg Askorbik asit 100 ml'lik balon jöjeye aktarılmıştır. 70 ml seyreltme çözeltisi ilave edilip ultrasonik banyoda 3 dk tutularak çözülmüştür. Bu çözeltinin 2,0 ml'si hassas pipet ile 20,0 ml'lik balon jöjeye aktarılmış ve hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlanarak iyice karıştırılmıştır. 0,45 µm PTFE filtreden süzölmüştür.

%100'lük doğruluk numunesinin hazırlanması: Tam tartılmış 22,2 mg Askorbik Asit'e eşdeğer plasebo tozu ve 22,20 mg Askorbik asit 100 ml'lik balon jöjeye aktarılmıştır. 70 ml seyreltme çözeltisi ilave edilip ultrasonik banyoda 3 dk tutularak çözülmüştür. Bu çözeltinin 2,0 ml'si hassas pipet ile 20,0 ml'lik balon jöjeye aktarılmış ve hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlanarak iyice karıştırılmıştır. 0,45 µm PTFE filtreden süzölmüştür.

%120'lik doğruluk numunesinin hazırlanması: Tam tartılmış 22,2 mg Askorbik Asit'e eşdeğer plasebo tozu ve 26,64 mg Askorbik asit 100 ml'lik balon jöjeye aktarılmıştır. 70 ml seyreltme çözeltisi ilave edilip ultrasonik banyoda 3 dk tutularak çözülmüştür. Bu çözeltinin 2,0 ml'si hassas pipet ile 20,0 ml'lik balon jöjeye aktarılmış ve hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlanarak iyice karıştırılmıştır. 0,45 µm PTFE filtreden süzölmüştür.

Tablo 3.3. Askorbik asit için geri kazanım sonuçları.

Test	Tartılan hammadde (mg/ml)	Hesaplanan hammadde (mg/ml)	Geri kazanım %
80%	0,017673	0,017593	99,55
	0,017653	0,017557	99,46
	0,017663	0,017492	99,03
100%	0,022107	0,021896	99,05
	0,022117	0,021867	98,87
	0,022126	0,021866	98,82
120%	0,026490	0,026439	99,81
	0,026480	0,026428	99,80
	0,026480	0,026302	99,33
Ortalama geri kazanım:			99,30
Geri kazanımın 95% güven aralığı sınırları :			± 0,29

Ortalama geri kazanım değeri %99,30'dur (Tablo 3.3.). Bu sonuca göre, %80, %100, %120 için geri kazanım yeterlidir ve Askorbik asit aktif madde miktar tayini testi için "doğruluk" metot validasyon parametresi yöntemi uygundur.

Tablo 3.4. Geri kazanım limitleri.

% Aktif içerik	Kabul edilebilir geri kazanım
% 100	98-102 %
> %10	98-102 %
> %1	97-103 %
> %0,1	95-105 %

Geri kazanım limitleri etken madde / yardımcı madde oranına göre belirlenmektedir. Etken madde / yardımcı madde oranına göre uygun geri kazanım limitleri Tablo 3.4.'de verilmektedir.

3.2.4. Kesinlik

Bir analitik yöntemin kesinliği homojen numunenin tekrarlanan analizlerinden elde edilen sonuçlarının dağılım miktarıdır.

3.2.4.1. Cihaz kesinliği ya da enjeksiyon tekrarlanabilirliği

Test, en az %100 konsantrasyonda hazırlanan standart çözeltinin 6 enjeksiyonu ile yapılır. Standart çözeltisi spesifiklikteki gibi hazırlanır.

Tablo 3.5. Enjeksiyon tekrarlanabilirliği sonuçları.

Enjeksiyon sayısı	Alan	Alıkonma zamanı
1	639708	3,501
2	639646	3,498
3	639979	3,500
4	639701	3,498
5	640005	3,497
6	639719	3,501
Ortalama	639793	3,499
Standart sapma	156	0,002
Bağıl std. sapma, %	0,02	0,05

Bağıl standart sapma %2,0'dan fazla olmamalıdır. Pik alanının bağıl standart sapması ve pik alıkonma zamanının sırasıyla %0,02 ve %0,05 olması analizde kullanılan yöntemin cihaz kesinliği ya da enjeksiyon tekrarlanabilirliğinin uygun olduğunu göstermiştir (Tablo 3.5.).

3.2.4.2. Metot kesinliği

Metot kesinliği yöntemi, spesifiklikte anlatıldığı gibi 6 adet test numunesi hazırlanarak yapılmıştır.

Tablo 3.6. Metot kesinliği sonuçları.

Metot Kesinliği	(%, sonuç)
Çözelti 1	99,76
Çözelti 2	99,67
Çözelti 3	99,54
Çözelti 4	99,58
Çözelti 5	99,59
Çözelti 6	99,61
Ortalama (% , sonuç)	99,63
Bağıl standart sapma (%)	0,08
%95 güven aralığı sınırları	±0,09

6 analiz sonucunun bağıl standart sapma değeri maksimum %2,0 olmalıdır. 6 analiz sonucunun bağıl standart sapma değeri %0,08 ve numunelerin ortalama miktar tayini % 99,63'dür (Tablo 3.6.). Sonuçlar yöntemin metot kesinliğinin uygun olduğunu göstermektedir.

3.2.4.3. Ara kesinlik

- Arakesinlik laboratuvar içindeki değişikliklerin; farklı günlerde, farklı analistler, vs. kesinliğini ifade eder.
- Arakesinlik parametresi bitmiş üründen elde edilen sonuçlarla hesaplanmıştır.
- Her bir analist tarafından 6 adet 100 % konsantrasyonunda numune çözeltisi metotdaki gibi hazırlanmıştır.
- Tüm numune çözeltileri birinci analist tarafından, I. cihazda analiz edilmiştir.
- Tüm numune çözeltileri ikinci analist tarafından, II. cihazda analiz edilmiştir.
- Bütün sonuçlar kıyaslanıp bağıl standart sapma hesaplanmıştır.

Tablo 3.7. Arakesinlik sonuçları.

Arakesinlik	Analist 1	Analist 2
	I.Cihaz (mg/tablet, sonuç)	II.Cihaz (mg/tablet, sonuç)
Çözelti 1	99,76	99,24
Çözelti 2	99,67	98,54
Çözelti 3	99,54	98,69
Çözelti 4	99,58	98,50
Çözelti 5	99,59	100,43
Çözelti 6	99,61	98,18
Ortalama (mg/tablet, sonuç)	99,63	98,93
Bağıl standart sapma (%)	0,08	0,82
12 analiz sonucunun bağıl standart sapması (%)		0,66
%95 güven aralığı sınırları		±0,42

Analiz 1 ve cihaz I'den elde edilen sonuçların ve Analiz 2 ve cihaz II'den elde edilen sonuçların kendi içindeki bağıl standart sapma değeri maksimum %2,0 olmalıdır. Ayrıca 12 analiz sonucunun bağıl standart sapma değeri de maksimum %2,0 olmalıdır. Analiz 1 ve cihaz I'den elde edilen sonuçların bağıl standart sapma değeri, 0,08% ve Analiz 2 ve cihaz II'den elde edilen sonuçların bağıl standart sapma değeri 0,82% dir. 12 analiz sonucunun bağıl standart sapma değeri 0,66% dir. Bu sonuçlara göre yöntemin arakesinliği uygundur.

3.2.5. Doğrusallık ve çalışma aralığı

- Doğrusallık çalışması bir konsantrasyon aralığındaki numune çözeltilerindeki analit cevabının konsantrasyonla doğru orantılı olduğunun gösterilmesidir.
- 20%, 40%, 80%, 100%, 120% ve 140% konsantrasyon aralığında standart çözeltiler hazırlanmıştır.
- 100% standart çözeltisi 6 kez, diğer standart çözeltiler 3'er kez enjekte edilmiştir.
- Doğrusallık grafiği çizilmiştir,
- Eğim, kesişim ve korelasyon katsayısı elde edilmiştir.

Doğrusallık çözeltileri aşağıdaki gibi hazırlanmıştır.

Stok Standart Çözeltisi: 22,2 mg Askorbik Asit WS hassas bir şekilde tartılarak 100 ml' lik balon joje içerisine aktarılmıştır. 70 ml seyreltme çözeltisi ilave edilmiştir. Ultrasonik banyoda çözünmesi sağlanmıştır. Hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlanmış, karıştırılmıştır. 0,45µm PTFE filtreden süzölmüştür.

%20 Standart Çözeltisi: Stok Standart çözeltisinden 1 ml 50 ml'lik balon jojeye alınmış ve hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlanmıştır. Bu çözelti 0,45 µm PTFE filtreden süzölerek HPLC vialine aktarılmıştır.

%40 Standart Çözeltisi: Stok Standart çözeltisinden 2 ml 50 ml'lik balon jojeye alınmış ve hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlanmıştır. Bu çözelti 0,45 µm PTFE filtreden süzölerek HPLC vialine aktarılmıştır.

%80 Standart Çözeltisi: Stok Standart çözeltisinden 4 ml 50 ml'lik balon jojeye alınmış ve hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlanmıştır. Bu çözelti 0,45 µm PTFE filtreden süzölerek HPLC vialine aktarılmıştır.

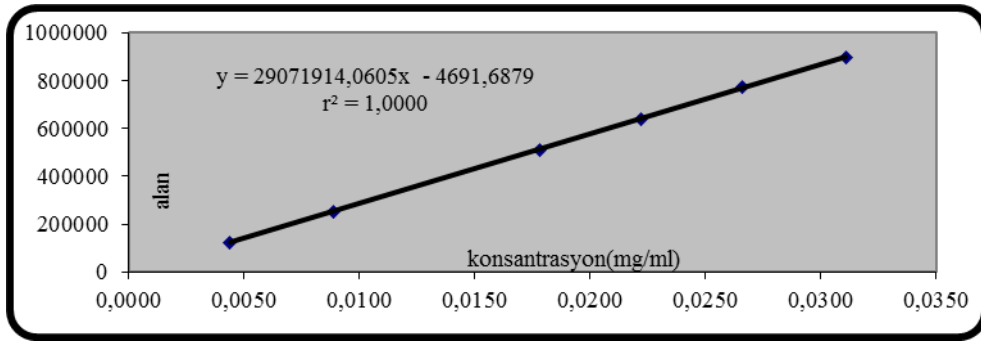
%100 Standart Çözeltisi: Stok Standart çözeltisinden 5 ml 50 ml'lik balon jojeye alınmış ve hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlanmıştır. Bu çözelti 0,45 µm PTFE filtreden süzölerek HPLC vialine aktarılmıştır.

%120 Standart Çözeltisi: Stok Standart çözeltisinden 6 ml 50 ml'lik balon jojeye alınmış ve hacmine seyreltme çözeltisi çözeltisi ile tamamlanmıştır. Bu çözelti 0,45 µm PTFE filtreden süzölerek HPLC vialine aktarılmıştır.

%140 Standart Çözeltisi: Stok Standart çözeltisinden 7 ml 50 ml'lik balon jojeye alınmış ve hacmine seyreltme çözeltisi çözeltisi ile tamamlanmıştır. Bu çözelti 0,45 µm PTFE filtreden süzölerek HPLC vialine aktarılmıştır.

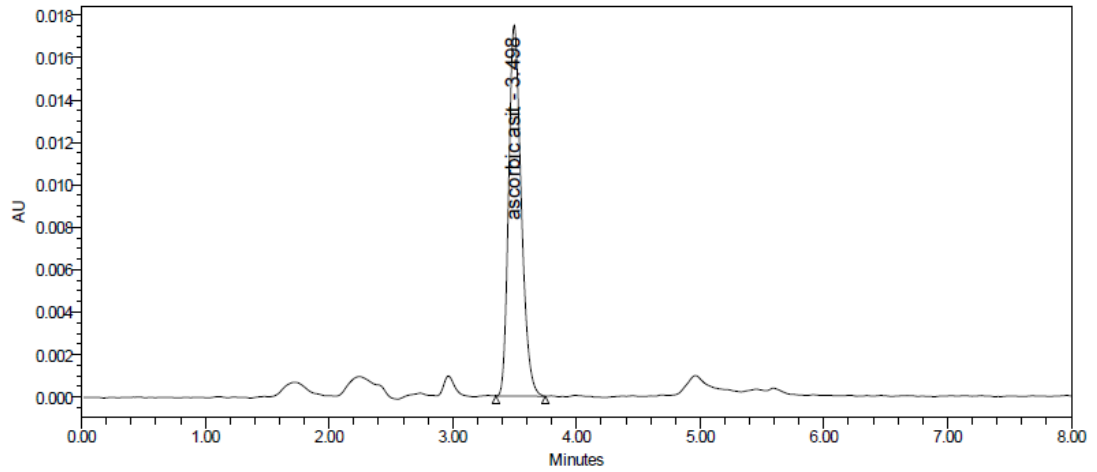
Tablo 3.8. Doğrusallık sonuçları.

Çözelti seviyesi	Hammadde konsantrasyonu (mg/ml)	Enjeksiyonun alan ortalamaları	Hesaplanan alan
20 %	0,0044	124304	123225
40 %	0,0089	253721	254048
80 %	0,0178	510599	512788
100 %	0,0222	639778	640705
120 %	0,0266	772138	768621
140 %	0,0311	898293	899445
Eğim :		29071914,0605	
Kesişim :		-4691,6879	
r :		1,0000	
r ² :		1,0000	
y = mx + n :		2,91.10 ⁷ x-4,7.10 ³	



Şekil 3.11. Doğrusallık grafiği.

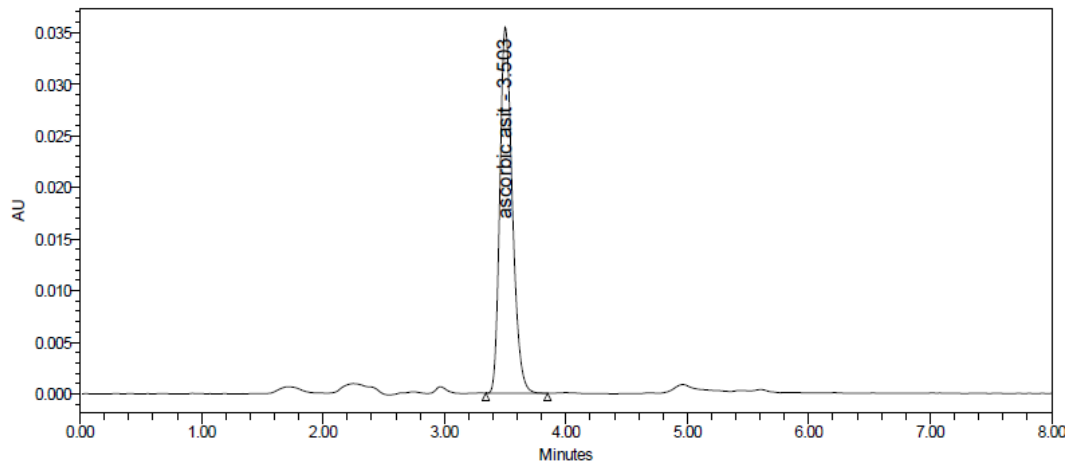
Korelasyon katsayısı(r) minimum 0,995 ve (r^2) minimum 0,99 olmalıdır. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, Askorbik asit için doğrusal sonuçların elde edildiği görülmüştür. Askorbik asit için korelasyon katsayısı $r \geq 1,0000$ bulunmuştur (Tablo 3.8. ve Şekil 3.11.). Bu yöntem Askorbik asit için doğrusal bir yöntemdir.



Peak Name	RT	Area	% Area
1 ascorbic asit	3.498	124733	100.00

Şekil 3.12. %20 Standart çözeltisi kromatogramı.

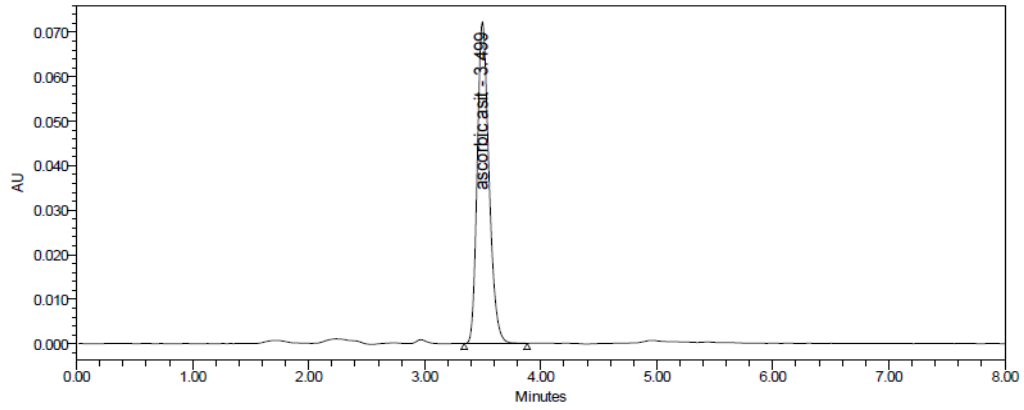
Doğrusallık çözeltilerinde anlatıldığı gibi hazırlanan %20'lik standart çözeltisinin kromatogramı Şekil 3.12.'de görüldüğü gibidir.



Peak Name	RT	Area	% Area
1 ascorbic asit	3.503	253422	100.00

Şekil 3.13. %40 Standart çözeltisi kromatogramı.

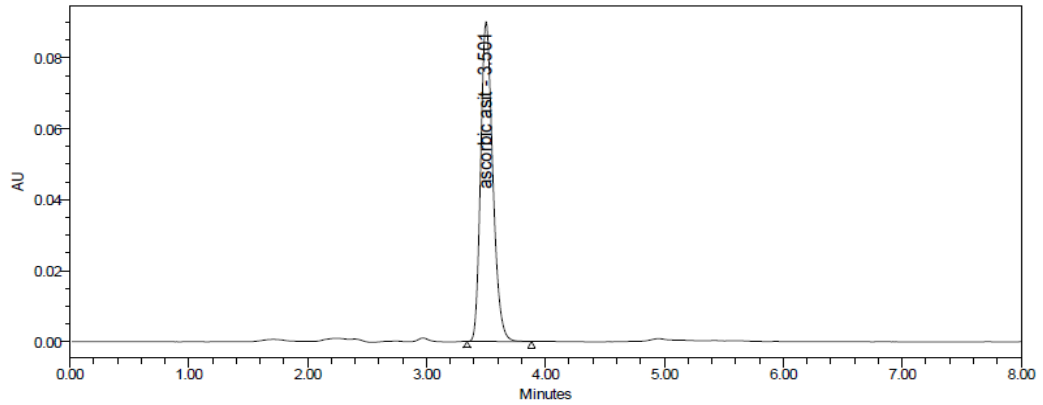
Doğrusallık çözeltilerinde anlatıldığı gibi hazırlanan %40'lık standart çözeltisinin kromatogramı Şekil 3.13.'de görüldüğü gibidir.



Peak Name	RT	Area	% Area	
1	ascorbic asit	3.499	510576	100.00

Şekil 3.14. %80 Standart çözeltisi kromatogramı.

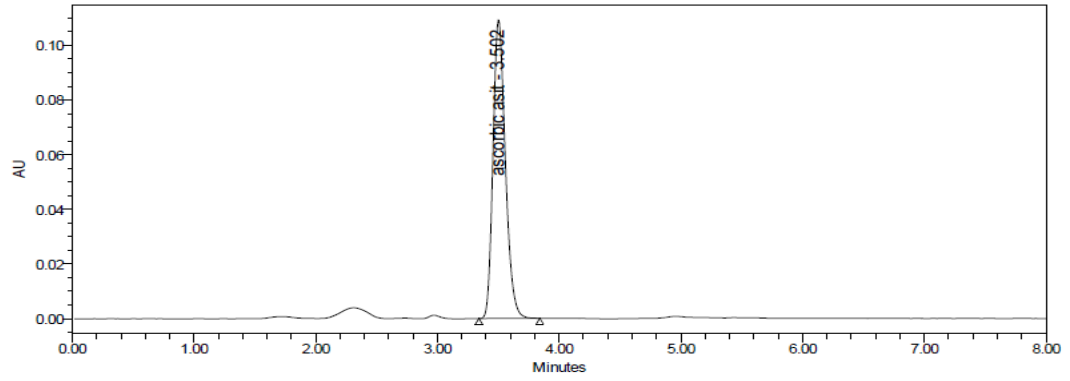
Doğrusallık çözeltilerinde anlatıldığı gibi hazırlanan %80'lik standart çözeltisinin kromatogramı Şekil 3.14.'de görüldüğü gibidir.



Peak Name	RT	Area	% Area	
1	ascorbic asit	3.501	639708	100.00

Şekil 3.15. %100 Standart çözeltisi kromatogramı.

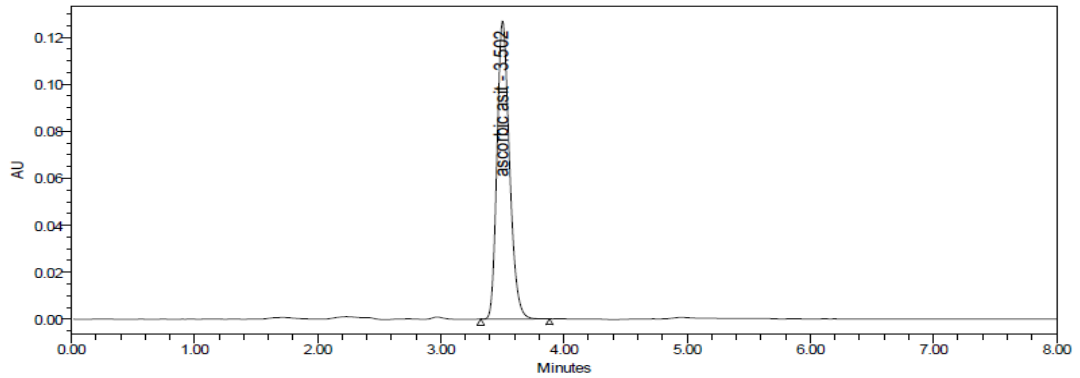
Doğrusallık çözeltilerinde anlatıldığı gibi hazırlanan %100'lük standart çözeltisinin kromatogramı Şekil 3.15.'de görüldüğü gibidir.



Peak Name	RT	Area	% Area
1 ascorbic asit	3.502	771722	100.00

Şekil 3.16. %120 Standart çözeltisi kromatogramı.

Doğrusallık çözeltilerinde anlatıldığı gibi hazırlanan %120'lik standart çözeltisinin kromatogramı Şekil 3.16.'da görüldüğü gibidir.



Peak Name	RT	Area	% Area
1 ascorbic asit	3.502	898214	100.00

Şekil 3.17. %140 Standart çözeltisi kromatogramı.

Doğrusallık çözeltilerinde anlatıldığı gibi hazırlanan %140'lık standart çözeltisinin kromatogramı Şekil 3.17.'de görüldüğü gibidir.

3.2.6. Güvenilirlik

Bir analitik prosedürün güvenilirliği, analitik prosedürün küçük fakat dikkatli yöntem parametreleri değiştirildiğinde etkilenmeden kalma kapasitesinin bir ölçüsüdür. Ayrıca normal kullanımda kararlılığını gösterir.

3.2.6.1. Çözelti stabilitesi

Yöntemde belirtildiği gibi standart ve numune çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözeltiler oda ve buzdolabı koşullarında başlangıçta, 6 saat sonra, 24 saat sonra ve 48 saat sonra analiz edilmiştir. Sonuçlar başlangıç değeri ile kıyaslanmış ve % değişim hesaplanmıştır. (Denklem 3.1)

$$\%Değişim = (D_i - D_t) / D_i \times 100$$

D_t: Herhangi bir t anında bulunan değer

D_i: Başlangıçta bulunan değer

(3.1)

Tablo 3.9. Oda koşulları çözelti stabilitesi sonuçları.

Oda koşullarında	Başlangıç	6. saat	% Değişim	24. saat	% Değişim	48. saat	% Değişim
Standart askorbik asit alanı	639708	636326	0,53	591059	7,60	562284	12,10
Numune askorbik asit alanı	636551	637426	0,14	585313	8,05	544467	14,47

Tablo 3.10. Buzdolabı koşulları çözelti stabilitesi sonuçları.

Buzdolabı koşullarında	Başlangıç	6. saat	% Değişim	24. saat	% Değişim	48. saat	% Değişim
Standart askorbik asit alanı	639708	637841	0,29	588771	7,96	558781	12,65
Numune askorbik asit alanı	636551	636483	0,01	584532	8,17	546852	14,09

3.2.6.2. Metod dayanıklılığı

Bu bölümde metoda özel kritik sayılabilecek parametrelerden 3 tanesi seçilmiştir.

1. pH değışikliği

Yöntemde belirtildiği gibi standart çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözelti hareketli fazın başlangıç pH'sı (pH:3.30), pH:3.25 ve pH:3.35 olarak değiştirildikten sonra analiz edilmiştir. Sonuçlar başlangıç değeri ile kıyaslanmış ve % değişim hesaplanmıştır.

Tablo 3.11. pH değişikliği sonuçları.

	Başlangıç (pH:3,30)	Değişim Sonrası (pH:3,35)	% Değişim
Askorbik Asit Alanı	628905	628535	0,06
	Başlangıç (pH:3,30)	Değişim Sonrası (pH:3,25)	% Değişim
Askorbik Asit Alanı	628905	628210	0,11

2. Kolon sıcaklığı

Yöntemde belirtildiği gibi standart çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözelti başlangıç kolon sıcaklığında ve kolon sıcaklığı $\pm 2^{\circ}\text{C}$ değiştirildikten sonra analiz edilmiştir. Sonuçlar başlangıç değeri ile kıyaslanmış ve % değişim hesaplanmıştır.

Tablo 3.12. Kolon sıcaklığı sonuçları.

	Başlangıç (25°C)	Değişiklikten sonra (23°C)	% Değişim
Askorbik Asit Alanı	628905	623210	0,91
	Başlangıç (25°C)	Değişiklikten sonra (27 °C)	% Değişim
Askorbik Asit Alanı	628905	619703	1,46

3. Farklı kolon

Yöntemde belirtildiği gibi standart çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözelti metotda belirtilen kolonda ve farklı lot numaralı kolonda analiz edilmiştir. Sonuçlar başlangıç değeri ile kıyaslanmış ve % değişim hesaplanmıştır.

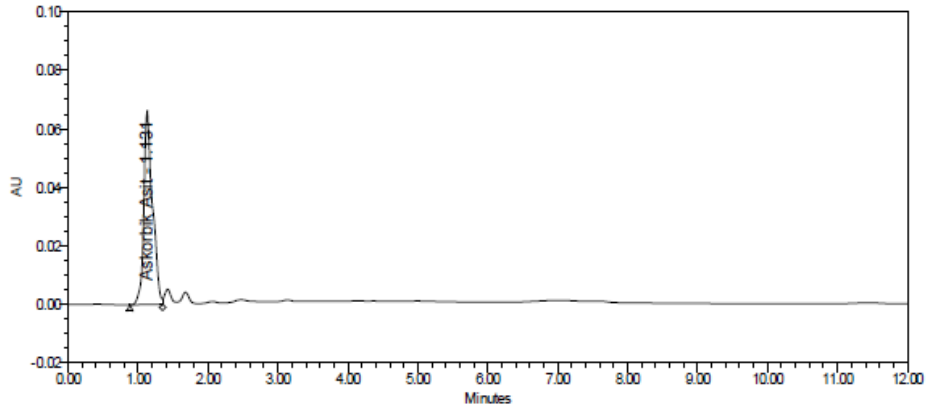
Tablo 3.13. Farklı kolon sonucu.

	Başlangıç	Farklı kolon	% Değişim
Askorbik Asit Alanı	628905	626835	0,33

Tüm yapılan bu değişikliklerde başlangıç değerinden değişim %2,0'den fazla olmamalıdır. Yapılan bu çalışmaların sonucu yöntemin metot dayanıklılık parametresi için uygunluğu tespit edilmiştir.

BÖLÜM 4. SONUÇ VE TARTIŞMA

Yaptığımız çalışmada farklı aktif maddeler içeren bir farmasotik formülasyon da çabuk bozulan askorbik asitin miktarını belirlemede kullanılacak analitik yöntemler denenmiştir. Yapılan denemeler ilk olarak uygun hareketli faz belirlemek üzerine olmuştur. pH 3,0 ve pH 5,5 aralığında asidik olan askorbik asit için denemeler yapıldı. Başlangıç kolonu olarak bir C18 kolonundan yola çıkılmıştır. Yapılan denemelerde pH 5,5 tampon çözelti ve C18 kolonun kullanılmış olduğu analizde askorbik asit ölü zamanda gelmiştir (Şekil 4.1.).

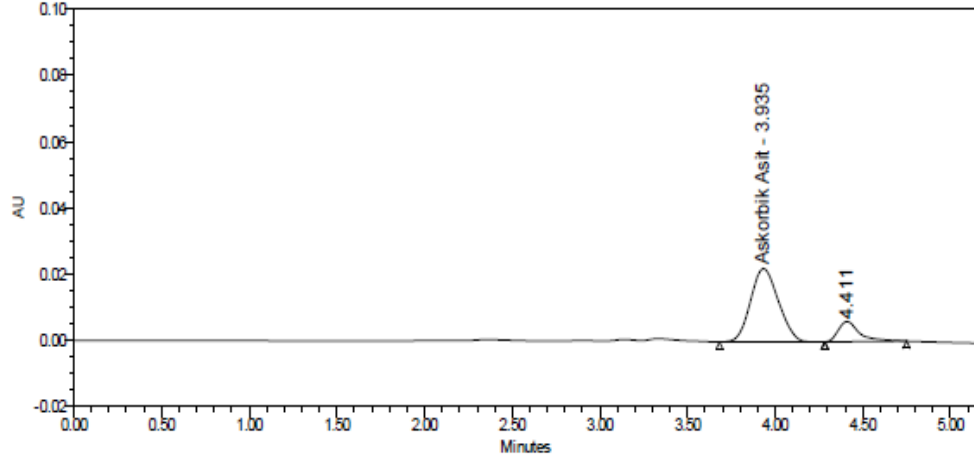


Şekil 4.1. pH 5.5 tampon çözelti ve C18 kolon kullanılan analiz kromatogramı.

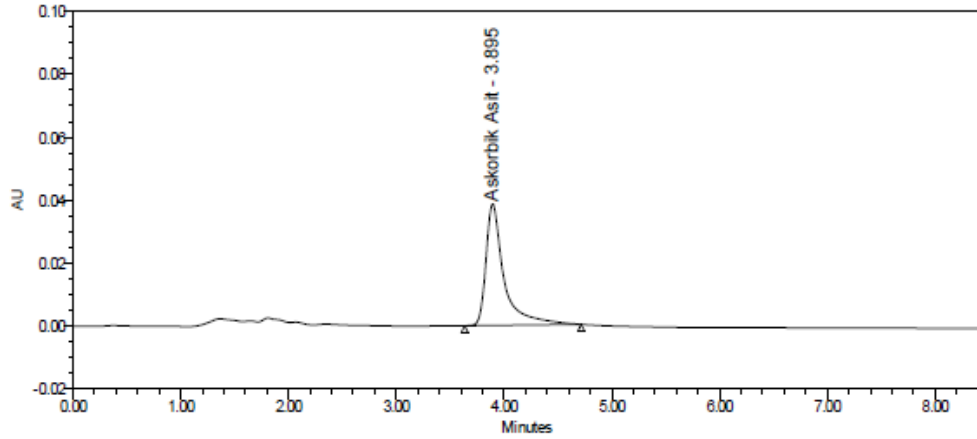
C18 kolon denemelerinin yanında, NH_2 kolon denemesi de yapılmış olup, güvenilir sonuçlar elde edilmemiştir. Pahalı ve hassas bir kolon iç yapısı olduğu için NH_2 kolonunun, daha düzgün sonuçlar veren bir C18 kolonu, yöntem için tespit edilmiştir (Şekil 4.2.).

pH 3,3 tampon çözelti farklı asetonitril oranlarıyla karışımlar oluşturup farklı kolonlarda denemeler yapılmıştır. Asidik bir tampon çözeltinin analizin tekrarlanabilirliği için uygun olduğu, ancak pik keskinliği için asetonitril ihtiyacının

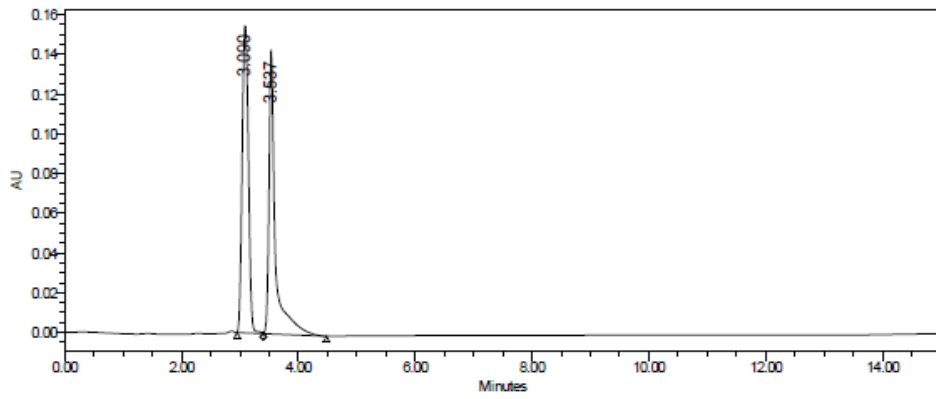
miktarını belirlemek için denemeler yapıp uygun asetonitril oranı belirlenmiştir (Şekil 4.3.).



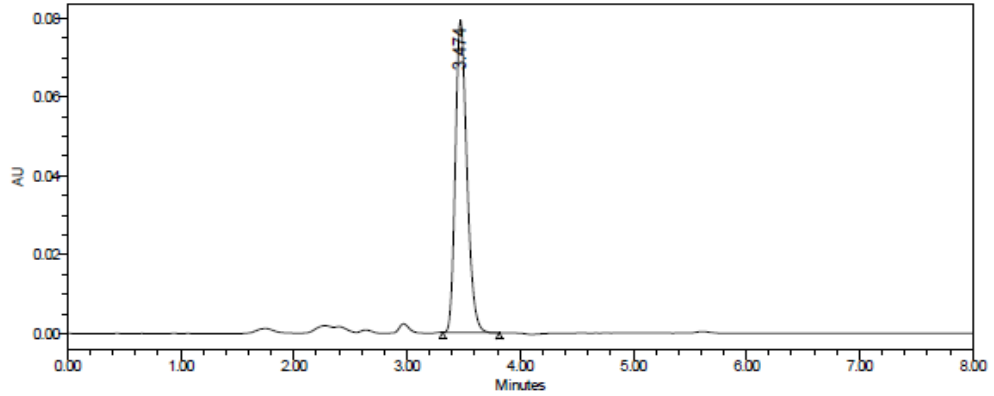
Şekil 4.2. pH 3.3 tampon çözelti ve NH₂ kolon kullanılan analiz kromatogramı.



Şekil 4.3. pH 3.3 tampon çözelti ve C18 kolon kullanılan analiz kromatogramı.



Şekil 4.4. pH 3.3 tampon çözelti:asetonitril (50:50) ve C18 kolon kullanılan analiz kromatogramı.



Şekil 4.5. pH 3.3 tampon çözelti:asetonitril (95:5) ve C18 kolon kullanılan analiz kromatogramı.

Yapılan denemeler sonucu sadece tampon kullanıldığı zaman pik keskinliği ve simetri faktörünün uygun olmadığı, asetonitril miktarının fazla olması durumunda ise askorbik asit pikinin bölünmesine yol açtığı görülmüştür (Şekil 4.4.). Uygun tampon ve asetonitril oranı denemelerle belirlenmiştir (Şekil 4.5.). Geliştirilen bu yöntemin validasyon sonuçları incelendiğinde askorbik asit miktar tayini için ne kadar güvenilir, çözelti stabilitesi yeterli, doğrusal olarak cevap veren, geri kazanım oranı yüzde yüze yakın ve tekrarlanabilir enjeksiyon standart sapmasının uygun olduğu ortaya konmuştur.

Sonuç olarak; bu çalışmada diosmin ve hesperidin aktif maddelerini de içeren bir formülasyon da askorbik asit miktar tayinini belirlemede kullanılacak, hiç bir ön işlem ve türevlendirme gerektirmeyen, tek basamak da hazırlanan basit çözelti hazırlığı belirlenmiştir. Standart ve numune enjeksiyon tekrarlanabilirliği yüksek, bağıl standart sapması düşüktür. Piyasada kolay ulaşılabılır ve ucuz bir kolon olan C18 seçilmiştir. Hareketli faz belirlenirken çok az miktarda su içerisinde çözünmüş tuz ve asetonitrilden faydalanılmıştır. Az miktarda kullanılan organik çevreye daha az zarar verilmesi açısından uygundur. Düşük maliyet ve çok çabuk bozunmaya uğrayan askorbik asit tayini için hızlı bir sıvı kromatografi yöntemi belirlenmiştir.

KAYNAKLAR

- [1] Gökçe Aşkın., İlaç ve bazı meyvelerdeki askorbik asit miktarının voltametrik tekniklerle belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Kimya Bölümü, 2008.
- [2] O. Arrigoni, C.D. Tullio, Ascorbic acid: more than just an antioxidant, *Biochimica et Biophysica Acta* 11569 (2002) 1–9.
- [3] S. Sen, R. Chakraborty, The role of antioxidants in human health, in: S. Andreescu, M. Hepel (Eds.), *Oxidative Stress: Diagnostics, Prevention, and Therapy*, ACS Symposium series, Washington, 2011, pp. 1–37 (Chapter 1).
- [4] S.J. Padayatty, A. Katz, Y.H. Wang, P. Eck, O. Kwon, J.H. Lee, S.L. Chen, C. Corpe, A. Dutta, S.K. Dutta, M. Levine, Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention, *Journal of the American College of Nutrition* 22 (2003) 18.
- [5] Pablo R. Dalmasso, Maria L. Pedano, Gustavo A. Rivas, Electrochemical determination of ascorbic acid and paracetamol in pharmaceutical formulations using a glassy carbon electrode modified with multi-wall carbon nanotubes dispersed in polyhistidine, *Sensors and Actuators B* 173 (2012) 732–736.
- [6] M.G. Gioia, P. Andreatta, S. Boschetti, R. Gatti, Development and validation of a liquid chromatographic method for the determination of ascorbic acid, dehydroascorbic acid and acetaminophen in pharmaceuticals, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 48 (2008) 331–339.
- [7] Vinod Kumar Gupta, Ajay Kumar Jain, Sudhir Kumar Shoora, Multiwall carbon nanotube modified glassy carbon electrode as voltammetric sensor for the simultaneous determination of ascorbic acid and caffeine, *Electrochimica Acta* 93 (2013) 248–253.
- [8] Adriana M. Maiaa, Andr´e Rolim Babya, Wilson J. Yasaka, Eunice Suenaga, Telma M. Kaneko, Maria Val´eria R. Velasco, Validation of HPLC stability-indicating method for Vitamin C in semisolid pharmaceutical/cosmetic preparations with glutathione and sodium metabisulfite, as antioxidants, *Talanta* 71 (2007) 639–643.

- [9] M. Bakshi, S. Singh, Development of validated stability-indicating assay methods—critical review, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 28 (2002) 1011.
- [10] P.A. Marshall, V.C. Trenerry, C.O. Thompson, The Determination of Total Ascorbic Acid in Beers, Wines, and Fruit Drinks by Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography, *J. Chromatogr. Sci.* 33 (1995) 426.
- [11] Apak, R., Özyürek, M., Tütem, E., Sözgen, K., Güçlü, K., Spectrofotometric determination of ascorbic acid using cupper(II)-neocuproine reagent in beverages and pharmaceuticals : *Science Direct Talanta* (65) 1226-1232, 2005.
- [12] http://tr.wikipedia.org/wiki/C_Vitamini, Erişim Tarihi: 11.10.2015.
- [13] Turan, B., Kuşburnundan C Vitamini izolasyonu ve çekirdek yağlarının incelenmesi , Yüksek Lisans Tezi , İ.T.Ü., Kimya Mühendisliği Bölümü, İstanbul, 1991.
- [14] Gülhan, S., " Validasyon", Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Mezunlar Derneği Eğitim Programı II, İstanbul, 1999.
- [15] Bolat, T, " Analitik Metod Validasyonu", Dolunay Eğitim Merkezi, İstanbul, 2004.
- [16] S.I.D. Simões, C.V. Eleutério, M.E.M. Cruz, M.L. Corvo, M.B.F. Martins, Biochemical changes in arthritic rats: dehydroascorbic and ascorbic acid levels, *Eur. J. Pharm. Sci.* 18 (2003) 185–189.
- [17] V. Kmetec, Simultaneous determination of acetylsalicylic, salicylic, ascorbic and dehydroascorbic acid by HPLC, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 10 (1992) 1073–1076.
- [18] M.A. Kall, C. Andersen, Improved method for simultaneous determination of ascorbic acid and dehydroascorbic acid, isoascorbic acid and dehydroisoascorbic acid in food and biological samples, *J. Chromatogr. B* 730 (1999) 101–111.
- [19] M. Taus, I. Kranner, D. Grill, Simultaneous Determination of Ascorbic Acid and Dehydroascorbic Acid in Plant Materials by High Performance Liquid Chromatography, *Phytochem. Anal.* 7 (1996) 69–72.
- [20] ICH Harmonized Tripartite Guideline, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1), Brookwood Medical Publications: Richmond, UK.
- [21] İpek, C., Türkiye’deki bal numunelerinde bulunan hidrosimetilfurfural miktarı, stabilitesi ve hidrosimetilfurfural miktar tayini analitik metod

validasyonu, Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul, 2012.

- [22] Skoog Da, Holler Fj, Nieman Ta., Enstrümantal Analiz, Bilim Yayıncılık, Çeviren: Kılıç E, Köseoğlu F, Yılmaz H, Ankara, Türkiye, s: 725-768, 1998.
- [23] Özlem Karalomlu, Bazı peynir ve yoğurt ürünlerinde bulunan natamisin miktar tayini ve analitik metod validasyonu, Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul, 2014.

ÖZGEÇMİŞ

Cem Çalışkan, 13.04.1986 da İstanbul'da doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Yalova'da tamamladı. 2003 yılında Yalova Lisesi, Fen Bölümü'nden mezun oldu. 2003 yılında başladığı Uludağ Üniversitesi Kimya Bölümü'nü 2009 yılında bitirdi. 2012 yılında Sakarya Üniversitesi, Kimya Bölümü'ne tezli yüksek lisansını yapmak için girdi ve 2016 yılında mezun olmak için çalışıyor. 2011 – 2013 yılları arasında Neutec İlaç Sanayi ve Tic. A.Ş.'de ar-ge analisti olarak çalıştı. Bu süre içerisinde şirketin yeni ürün projelerinin formülasyon ve analitik çalışmalarında aktif rol aldı. Şu anda World Medicine İlaç Sanayi ve Tic. A.Ş.'de analitik geliştirme uzmanı olarak görev yapmaktadır.