



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

**HPLC İLE ENOKSOLON-BENZOKAİN-KLORHEKSİDİN'İN
AYRILMASI VE TAYİNİ**

CUMHUR ÖKÇELİK

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN
DOÇ. DR. ÜMİT ERGUN**

DÜZCE, 2018

T.C.
DÜZCE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HPLC İLE ENOKSOLON-BENZOKAİN-KLORHEKSİDİN'İN
AYRILMASI VE TAYİNİ

Cumhur ÖKÇELİK tarafından hazırlanan tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından Düzce Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Ümit ERGUN
Düzce Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Ümit ERGUN
Düzce Üniversitesi

Prof. Dr. Zehra YAZAN
Ankara Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Ersin ORHAN
Düzce Üniversitesi

Tez Savunma Tarihi: 03/07/2018

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

03 Temmuz 2018

Cumhur ÖKÇELİK

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimimde ve bu tezin hazırlanmasında gösterdiği her türlü destek ve yardımdan dolayı çok değerli hocam Doç. Dr. Ümit ERGUN'a en içten dileklerle teşekkür ederim.

Çalışma hayatımda olduğu gibi tez çalışmam boyunca da yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen sayın Dr. Mustafa KÖKTÜRK'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam boyunca değerli katkılarını esirgemeyen Nobel İlaç AR-GE ailesine şükranlarımı sunarım.

03 Temmuz 2018

Cumhur ÖKÇELİK

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ŞEKİL LİSTESİ.....	VII
ÇİZELGE LİSTESİ.....	VIII
ÖZET	IX
ABSTRACT	X
1. GİRİŞ.....	1
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	6
2.1. ANALİTİK YÖNTEM VALİDASYONU	8
2.1.1. Amaç	8
2.1.2. Miktar Tayini Yöntemi	8
2.1.3. Reaktifler	12
2.1.4. Miktar Tayini Testi Validasyon Parametreleri.....	12
2.1.5. Miktar Tayini Yöntem Validasyonu	12
2.1.5.1. Spesiflik.....	12
2.1.5.2. Doğruluk.....	15
2.1.5.3. Keskinlik.....	16
2.1.5.4. Doğrusallık ve Çalışma Aralığı	17
2.1.5.5. Güvenilirlik.....	17
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	20
3.1. SPESİFİKLİK.....	20
3.2. DOĞRULUK.....	33
3.3. KESİNLİK.....	36
3.3.1. Cihaz Kesinliği ya da Enjeksiyon Tekrarlanabilirliği.....	36
3.3.2. Ara Kesinlik.....	41
3.4. DOĞRUSALLIK VE ÇALIŞMA ARALIĞI	42
3.5. GÜVENİLİRLİK.....	46
3.5.1. Çözelti Stabilitesi.....	46

3.5.2. Küçük Değişiklikler	50
3.5.2.1. <i>Farklı Gradient Program</i>	50
3.5.2.2. <i>Farklı Akış Hızı</i>	53
3.5.2.3. <i>Farklı Kolon Sıcaklığı</i>	55
4. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	57
5. KAYNAKLAR.....	59
ÖZGEÇMİŞ	60



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 1.1. İyon değiştirme kromatografisi.	5
Şekil 2.1. Etken maddelerin açık yapıları.	6
Şekil 2.2. HPLC cihazları.	6
Şekil 3.1. Hareketli faz-A kromatogramı.....	21
Şekil 3.2. Hareketli faz-B kromatogramı.....	21
Şekil 3.3. Seyreltme çözeltisi kromatogramı.....	22
Şekil 3.4. Plasebo çözeltisi kromatogramı.....	22
Şekil 3.5. Test çözeltisi kromatogramı.	23
Şekil 3.6. Test çözeltisi pik saflığı kromatogramı.....	24
Şekil 3.7. Standart + plasebo çözeltisi kromatogram.....	25
Şekil 3.8. Standart + plasebo çözeltisi pik saflığı kromatogramı.....	26
Şekil 3.9. Standart + plasebo + safsızlıklar çözeltisi kromatogram.....	27
Şekil 3.10. Standart + plasebo + safsızlıklar çözeltisi pik saflığı kromatogram.....	28
Şekil 3.11. Standart + plasebo + safsızlıklar çözeltisi pik saflığı kromatogram.....	29
Şekil 3.12. Standart çözeltisi pik saflığı kromatogramı.....	30
Şekil 3.13. 18 α -glycyrrhetic acid çözeltisi pik saflığı kromatogramı.....	31
Şekil 3.14. Sistem uygunluk çözeltisi kromatogramı.....	31
Şekil 3.15. Sistem uygunluk çözeltisi pik saflığı kromatogramı.....	32
Şekil 3.16. Doğruluk kromatogramı (% 80).	35
Şekil 3.17. Doğruluk kromatogramı (% 100).	35
Şekil 3.18. Doğruluk kromatogramı (% 120).	36
Şekil 3.19. Kesinlik kromatogramı (standart).....	40
Şekil 3.20. Kesinlik kromatogramı (test).....	40
Şekil 3.21. Klorhekzidin HCl doğrusallık grafiği.....	43
Şekil 3.22. Benzokain doğrusallık grafiği.....	44
Şekil 3.23. Enoksolon doğrusallık grafiği.....	45
Şekil 3.24. Doğrusallık kromatogramı.....	46
Şekil 3.25. Çözelti stabilitesi standart çözelti kromatogramı (Başlangıç).....	48
Şekil 3.26. Çözelti stabilitesi standart çözelti kromatogramı (48 saat – 5 °C).....	48
Şekil 3.27. Çözelti stabilitesi standart çözelti kromatogramı (48 saat – 25 °C).....	49
Şekil 3.28. Çözelti stabilitesi test çözeltisi kromatogramı (Başlangıç).....	49
Şekil 3.29. Çözelti stabilitesi test çözeltisi kromatogramı (48 saat – 5 °C).....	50
Şekil 3.30. Güvenilirlik kromatogramı (Başlangıç).....	51
Şekil 3.31. Güvenilirlik kromatogramı (Gradient Program-1).....	52
Şekil 3.32. Güvenilirlik kromatogramı (Gradient Program-2).....	52
Şekil 3.33. Güvenilirlik kromatogramı (F=1.51 ml/dk).....	54
Şekil 3.34. Güvenilirlik kromatogramı (F=1.49 ml/dk).....	54
Şekil 3.35. Güvenilirlik kromatogramı (T=23 °C).....	56
Şekil 3.36. Güvenilirlik kromatogramı (T=27 °C).....	56

ÇİZELGE LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Çizelge 2.1. Etkenlerin kabul edilebilir geri kazanım oranları.....	7
Çizelge 2.2. Gradient program.....	9
Çizelge 2.3. Gradient kullanılan reaktifler.....	12
Çizelge 2.4. Etkenlerin kabul edilebilir geri kazanım değerleri.....	16
Çizelge 2.5. Gradient program 1.....	18
Çizelge 2.6. Gradient program 2.....	18
Çizelge 3.1. Çözeltilerin HPLC kromatogram değerleri.....	20
Çizelge 3.2. Klorhekzidin HCl çözeltisinin konsantrasyon ve geri kazanım.....	33
Çizelge 3.3. Benzokain çözeltisinin konsantrasyon ve geri kazanım değerleri.....	34
Çizelge 3.4. Enoksolon çözeltisinin konsantrasyon ve geri kazanım değerleri.....	34
Çizelge 3.5. Klorhekzidin HCl standart çözeltisi kromatogram değerleri.....	36
Çizelge 3.6. Benzokain standart çözeltisi kromatogram değerleri.....	37
Çizelge 3.7. Enoksolon standart çözeltisi kromatogram değerleri.....	37
Çizelge 3.8. Klorhekzidin HCl test çözeltisi kromatogram değerleri.....	38
Çizelge 3.9. Benzokain test çözeltisi kromatogram değerleri.....	38
Çizelge 3.10. Enoksolon Test çözeltisi kromatogram değerleri.....	39
Çizelge 3.11. Klorhekzidin HCl enjeksiyon sonucu değerleri.....	41
Çizelge 3.12. Benzokain enjeksiyon sonucu değerleri.....	41
Çizelge 3.13. Enoksolon enjeksiyon sonucu değerleri.....	42
Çizelge 3.14. Klorhekzidin HCl konsantrasyona bağlı kromatogram değerleri.....	43
Çizelge 3.15. Benzokain konsantrasyona bağlı kromatogram değerleri.....	44
Çizelge 3.16. Enoksolon konsantrasyona bağlı kromatogram değerleri.....	45
Çizelge 3.17. Etkenlerin standart çözeltilerinin 5 °C'deki kromatogram değerleri.....	46
Çizelge 3.18. Etkenlerin standart çözeltilerinin 25 °C'deki kromatogram değerleri.....	47
Çizelge 3.19. Etkenlerin test çözeltilerinin 5 °C'deki kromatogram değerleri.....	47
Çizelge 3.20. Etkenlerin test çözeltilerinin 25 °C'deki kromatogram değerleri.....	47
Çizelge 3.21. Etkenlerin gradient program % 1 değişim değerleri.....	50
Çizelge 3.22. Etkenlerin gradient program % 2 değişim değerleri.....	51
Çizelge 3.23. Etkenlerin akış hızı 1,51 ml/dk % değişim değerleri.....	53
Çizelge 3.24. Etkenlerin akış hızı 1,49 ml/dk % değişim değerleri.....	53
Çizelge 3.25. Etkenlerin 23 °C sıcaklıktaki % değişim değerleri.....	55
Çizelge 3.26. Etkenlerin 27 °C sıcaklıktaki % değişim değerleri.....	55

ÖZET

HPLC İLE ENOKSOLON-BENZOKAİN-KLORHEKSİDİN'İN AYRILMASI VE TAYİNİ

Cumhur ÖKÇELİK
Düzce Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi
Danışman: Doç. Dr. Ümit ERGÜN
Temmuz 2018, 59 sayfa

Antiseptik etkili klorheksidini, antienflamatuar etkili enoksolonu ve lokal etkili benzokaini bir arada içeren ve bu içeriğiyle ağız-boğaz bölgesindeki lokal irritasyonlara bağlı rahatsızlıkları ortadan kaldırmaya yardımcı olarak kullanılan Anzibel pastillerin maliyet, iş yükü ve zaman açısından daha ekonomik olması nedeniyle miktar tayini analizinin tek bir HPLC yöntemi geliştirilerek, gerekli validasyon çalışmaları tamamlanmıştır. Analizlerde 25°C 'de ACE 5 C18 4.6 x 150 mm, 5mm kolon, 250nm'de dalga boyunda 0.01 M KH₂PO₄ 'ın fosforik asit ile pH 3.0± 0.05'e ayarlanmış tampon çözeltisi ve asetonitril kullanılmıştır. Piklerin saflıkları PDA cihazda açığı ve eşik değerleri kontrol edilerek kanıtlanmıştır. Cihazda oluşabilecek küçük çaptaki kolon sıcaklığı değişimi, akış hızı değişimi ve gradient program değişikliklerinin yöntemi etkilemediği güvenilirlik çalışması ile kontrol edilmiştir. Yapılan çalışmalarda test ve standart çözeltisinin 48 saat boyunca stabil olduğu gözlemlenmiştir.

Anahtar sözcükler: Benzokain, Enoksolon, HLPC, Klorheksidin, Validasyon.

ABSTRACT

DETERMINATION AND DETERMINATION OF ENOXOLON-BENZOKAIN- CHLORHEXIIDINE BY HPLC

Cumhur ÖKÇELİK

Düzce University

Graduate School of Natural and Applied Sciences, Department of Chemistry

Master's Thesis

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ümit ERGUN

July 2018, 59 pages

Anzibel pastilles are used in the treatment of the diseases related to the local irritation in oropharyngeal area with the antiseptic effect of a chlorhexidine, antiinflammatory effect of an enoxolone and locally anesthetizing effect of benzocaine. Because of economic reasons such as cost, workload and time, a new simultaneous HPLC method has been developed for the quantitative analysis of anzibel pastilles and the validation studies have been completed. Analysis were performed at 25°C by using ACE 5 C18 4.6 x 150 mm, 5 mm column, mobile phase consisted of a mixture of 0.01 M KH_2PO_4 / H_3PO_4 buffer ($\text{pH} = 3.0 \pm 0.05$) and acetonitrile and PDA dedector set at 250 nm. The purities of the peaks were proved with the control of the angle and threshold values at PDA dedector. Small changes at column temperature, rate flow and gradient programme did not effect the method and this was controlled with the help of the reliability studies. Test and standard solutions were observed to be stabil for 48 hours.

Keywords: Benzocaine, Chlorhexidine, Enoxolone, HPLC, Validation.

1. GİRİŞ

Klorheksidin, bakteri hücre membranının stabilizasyonunu bozar ve membrandan penetre olur. Bakteri hücre sitoplazmasının presipite olmasına yol açar. Hücrenin oksijen kullanımını engelleyerek hücrede ATP düzeylerini düşürür ve sonuçta hücre membranının işlevini bozar. Gram-negatif bakterilerin dış membranlarını etkileyerek periplazmik enzimlerin salıverilmesine neden olur. Bu bakterilerin iç membranları yırtılmaz, fakat küçük molekülleri uptake etme yeteneği zayıflar. Klorheksidin düşük konsantrasyonda bakteristatik, yüksek konsantrasyonda ise bakterisid etki gösterir [1].

Klorheksidin'in antibakteriyel spektrumu gram-pozitif ve gram-negatif mikroorganizmaları, HIV dahil bazı virüsleri ve mantarları kapsar, fakat sporlara karşı sadece yüksek sıcaklıkta sporisid etki gösterir. Klorheksidin nötr veya hafif asidik pH'da daha etkilidir. Klorheksidin hidroklorür suda ve propilen glikolde kısmen çözünür, alkolde çok az çözünür [1].

Timo Pesonen ve arkadaşları 1994 yılında klorheksidin için ters fazlı bir HPLC sistemi yapmışlardır. Bu çalışmalarında % 95.2'lik bir geri kazanım elde etmişlerdir. Çalışmalarında gerekli validasyon çalışmalarını sunmuşlardır [2].

L. Havlikova ve arkadaşları 2006 yılında klorheksidin ve onun parçalanma ürünü olan p-kloroanilin için eş zamanlı saptanması için yeni bir hızlı izokratik ters fazlı HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Bu çalışmalarında % 99.72'lik bir geri kazanım elde etmişlerdir. Çalışmalarında gerekli validasyon çalışmalarını sunmuşlardır [3].

Yvette Ha ve arkadaşları 1995 yılında stabilite göstergeli bir HPLC metodu geliştirmişlerdir ve stabilite göstergeli metod bakımından gerekli çalışmalarını sunmuşlardır [4].

Flavia Angelica Masquio Fiorentino ve arkadaşları 2010 yılında klorheksidin spektrometri, kromatografi, kolorimetrik, katı faz ekstraksiyonu ve kapiler elektroforez gibi çeşitli tekniklerle analiz yöntemlerini karşılaştırarak biyolojik sıvılarda ve formülasyonlardaki klorheksidin miktarları tayini tartışmıştır [5].

Benzokain kısa etki süreli, Para-Amino Benzoik Asit (PABA) türevi, ester tipte bir lokal anesteziiktir. Beyaz renkli kristal yapılı toz veya renksiz kristaller halinde bulunur. Benzokain hücre membranında sinirsel uyarıların oluşum ve iletimini inhibe eder. Sinir hücresi zarını geri dönüşümlü olarak stabilize ederek sodyum iyonlarına yönelik geçirgenliğini azaltır. Böylece sinir hücresi zarının depolarizasyonu inhibe olur; bu da sinir uyarılarının başlatılmasını ve iletilmesini geçici olarak bloke eder. Benzokain suda çok az çözünür, eter ve alkolde serbestçe çözünür [1].

Paschoal ve arkadaşları 2000 yılında benzokain ve setilpiridinyumu bir arada analiz ettikleri spektrofotometrik bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntemde 231 nm'de % 97.50 310 nm'de % 96.50 geri kazanım elde etmişlerdir. Benzokain için yapılan lineerlik çalışmalarında korelasyon katsayısı 0.9999 olarak bulunmuştur. Çalışmalarında gerekli validasyon çalışmalarını sunmuşlardır [6].

Pérez-Lozano ve arkadaşları 2005 yılında benzokain, propilparaben ve benzil alkolün tek bir yöntemle analiz edildiği bir HPLC metodu geliştirmişlerdir. Benzokain için yapılan lineerlik çalışmalarında korelasyon katsayısı 0.9997 bulunmuştur. Bu yöntemde 99.64 ± 1.63 geri kazanım elde edilmiştir. Çalışmalarında gerekli validasyon çalışmalarını sunmuşlardır [7].

Hanan A. Merey 2016 yılında yapmış olduğu çalışmada farklı teknikler kullanarak spektrofotometrik yöntem ile benzokain için yöntem geliştirmiştir. Tüm teknikler için geri kazanım çalışmaları yapmıştır [8].

Hanan A. Merey ve arkadaşları 2014 yılında benzokain bozunma ürünü varlığında antipirin ve benzokain için bir HPLC metodu çalışmışlardır. Bu çalışmada benzokain için % 99.77 geri kazanım elde edilmiştir. Çalışmalarında gerekli validasyon çalışmalarını sunmuşlardır [9].

Enoksolon glisiretinik asit beta-amirin tipi pentasiklik bir triterpenoit türevidir. Beyaz veya beyazımsı kristal tozudur. Enoksolon ekspektoran ve antitussif aktivite gösterir. Glisiretinik asitin antienflamatuvar etkisi de bildirilmiştir. Enoksolon etanolde çözünür, metilen klorürde kısmen çözünür, suda pratik olarak çözünmez.

Somayeh Esmaeili ve arkadaşları 2006 yılında enoksolon için bir HPLC metodu yapmışlardır. Benzokain için yapılan lineerlik çalışmalarında korelasyon katsayısı 0.9995 olarak bulunmuştur. Çalışmalarında gerekli validasyon çalışmalarını sunmuşlardır [10].

V.Andrisano ve arkadaşları 1992 yılında diş macunlarındaki enoksolon için bir HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Farklı mobil fazlar ile elde ettikleri kromatogramları çalışmalarında sunmuşlardır [11].

Antiseptik etkili klorheksidini, antienflamatuar etkili enoksolonu ve lokal etkili benzokaini bir arada içeren ve bu içeriğiyle ağız-boğaz bölgesindeki lokal irritasyonlara bağlı rahatsızlıkları ortadan kaldırmaya yardımcı olarak kullanılan Anzibel Pastillerin maliyet, iş yükü ve zaman açısından daha ekonomik olması nedeniyle tek bir yöntemde miktar tayini analizini yapılması planlanmaktadır.

Tez çalışması kapsamında etkenlerin yapılarına uygun ortak bir HPLC yöntemi geliştirilerek, yöntemin geçerli olduğunu kanıtlayacak gerekli validasyon çalışmaları tamamlanacaktır. Validasyon kapsamında lineerlik, geri kazanım, enjeksiyon tekrarlanabilirliği, güvenilirlik, ara kesinlik ve çözelti stabilitesi parametreleri çalışılacaktır.

Litaratürlerde 3 etkenin bir arada miktarlandırılmasını sağlayacak bir çalışma yoktur. Yapılan çalışmalar ve analizler sonucunda üç etken içeren anzibel pastillerin tek bir HPLC yöntemi ile miktar tayini analizleri gerçekleştirilerek alternatif bir ürün olarak kullanılması düşünülmektedir.

- o HPLC (Yüksek Basınç Sıvı Kromatogramı)

HPLC analitik ayırma teknikleri amacı ile en yaygın kullanılan cihazdır. Yaygın kullanılma sebepleri duyarlılığı, kantitatif tayinlere kolaylıkla uyarlanabilir olması, uçucu olmayan veya sıcaklıkla kolayca bozunabilen bileşiklerin ayrılmasına uygunluğudur. En önemlisi ise sanayinin birçok bilim dalının ve toplumun birinci derecede ilgilendiği maddelere geniş bir şekilde uygulanabilirliğidir. Bu tip bileşiklere örnek olarak amino asitler, proteinler, nükleik asitler, karbonhidratlar, ilaçlar ve pestisitler verilebilir. HPLC ünitesi: Degasser, pompa, autosampler, kolon ve dedektör olmak üzere dört kısımdan oluşmaktadır. Degasser; mobil fazlarda mevcut çözünmüş gazların giderilmesini sağlar [12].

1970'lerden günümüze, Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (HPLC) tekniği, laboratuvarlarda organik maddeler için ayırma, analiz ve saflaştırmanın vazgeçilmez seçeneği olmuştur. HPLC kolonu neredeyse çözünemeyen tüm karışımları ayırabilir. HPLC günümüzde geniş çaplı moleköl analiz ve saflaştırmalarında öncü teknik olarak

tam yer edinmiştir. HPLC özellikle de peptit ve proteinlerin karakterizasyonunda merkezi teknik olmuş ve biyolojik ve biyomedikal bilimlerde son on yıldır çok hızlı sağlanan ilerlemede kritik roller üstlenmiştir.

Modern kromatografi tekniğini geliştiren Martin ve Synge 1941 yılında, hareketli fazın kolon boyunca yüksek basınçla itilmesi gerekliliğini düşünmüşlerdir. Buradan hareketle HPLC'ye bazen de yüksek basınç sıvı kromatografisi denilmektedir.

- Normal Faz Kromatografisi

Sabit faz polar (Silikajel-Polimer ve üzerine bağlanmış –CN, -NO₂ veya NH₂ dolgu maddeleri)

Mobil faz non-polar yada düşük polariteye sahip (Etil eter, Kloroform, Hekzan vb. çözücüler ve karışımları)

Düşük polariteye sahip analit kolondan ilk çıkar. Benzer özelliklere sahip maddelerin birbiri içinde dağılma özelliği yüksek olduğu için düşük polariteye sahip analit mobil fazda çok iyi çözünür ve kolondan ilk önce çıkar. Ayrıca yine aynı özellik sebebiyle apolar analit polar sabit fazla az etkileştiğinden dolayı kolonda kısa süre tutunabilir.

Alıkonma zamanını kısaltmak için mobil fazın polaritesi azaltılır. Alıkonma zamanını arttırmak için mobil fazın polaritesi artırılır. Düşük polariteye sahip mobil fazda alıkonma zamanları uzun, polaritesi arttırılmış mobil fazda alıkonma zamanları kısadır.

- Ters Faz Kromatografisi

Sabit faz apolar (Silikajel-Polimer ve üzerine bağlanmış C18, oktil veya fenil grupları, metil, etil ve –NH₂ gruplu dolgu maddeleri) Mobilfaz polar (Metanol, Asetonitril, Tetrahidrofuran gibi güçlü organik çözücülerin zayıf çözücü olan sulu veya tamponlanmış, pH ayarı yapılmış karışımları).

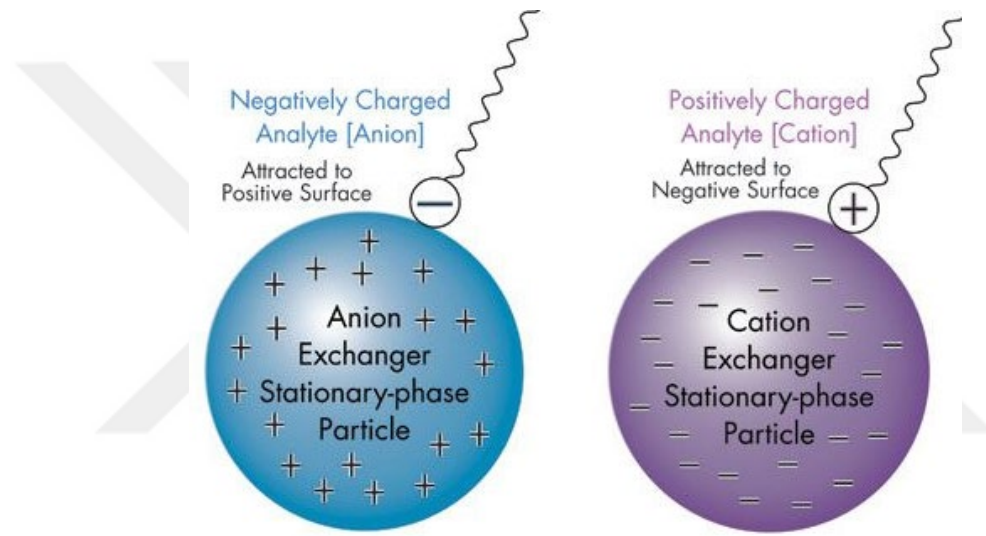
Yüksek polariteye sahip analit kolondan ilk çıkar. Benzer özelliklere sahip maddelerin birbiri içinde dağılma özelliği olduğu için yüksek polariteye sahip analit mobil fazda çok iyi çözünür ve kolondan ilk önce çıkar. Ayrıca yine aynı özellik sebebiyle polar analit apolar sabit fazla az etkileştiğinden dolayı kolonda kısa süre tutunabilir.

Alıkonma zamanını kısaltmak için mobil fazın polaritesi azaltılır. Alıkonma zamanını arttırmak için mobil fazın polaritesi artırılır. Yüksek polariteye sahip mobil fazda alıkonma zamanları uzun, polaritesi azaltılmış mobil fazda alıkonma zamanları kısadır.

- İyon Değişirme (Ion Exchange) HPLC

İster anyon ister katyon değiştirici olsun; tamponun pH'ı, kullanılan anyon veya katyon değiştiricinin doğal iyonik gücü ve peptitlerin yükü proteinlerin gecikme zamanlarını etkiler. En yaygın olarak sodyum veya potasyum iyonları katyon olarak, klor iyonları da anyon olarak kullanılır. HP IEC kolonları yüksek derecede pik genişlemesi veya elüsyon olmama durumu gösteren, peptitlerin apolar kalıntılarının neden olduğu hidrofobik karakteristikler gösterirler. Bu durum hareketli faza organik düzenleyici konulmasıyla giderilebilir [13].

Şekil 1.1'de iyon değiştirme kromatografisi şekil olarak anlatılmıştır.



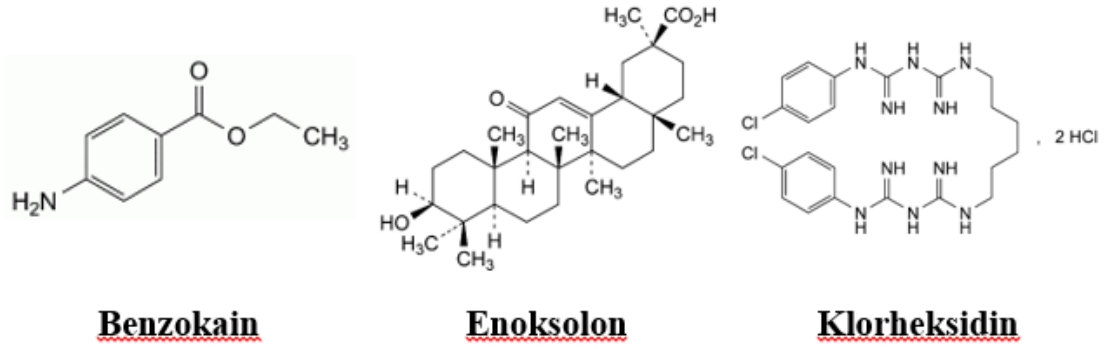
Şekil 1.1. İyon değiştirme kromatografisi.

- Chiral Ayırma

Fiziksel özellikleri aynı olan izomerlerin sabit fazla etkileşime girip izomer çifti olan diastereomere dönüştürülerek özel chiral kolonlar kullanılarak yapılan bir tekniktir.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

Şekil 2.1’de Etken maddelerin yapıları gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Etken maddelerin açık yapıları.



Şekil 2.2. HPLC cihazları.

Kullandığımız cihazların resimleri yukarıdadır. Çalışmalarımızda Waters e2695 numaralı ayırma modülünü, Waters 2998 numaralı Photodiode Array Dedector (PDA) Waters 2489 UV/Visible dedektör kullanılmıştır. Şekil 2.2’de Kullanılan cihazın resmi sunulmuştur.

Amacımızın maliyet, iş yükü ve zamandan tasarruf etmek olduğunu düşünerek

yapacağımız yöntemin de süresinin kısa olmasına çalıştığımızdan 150 cm'lik Kolon kullanılarak gerekli ayrımları sağlarsak daha kısa sürede tamamlanması planlanmaktadır. Çeşitli gradient programlar deneyerek 3 etken pikinin de istenilen RT getirilerek saf bir şekilde istenilen absorbanslarda elde edilmesi planlanmıştır. Sistem uygunluk şartları olarak her bir etken için,

- Alıkonma zamanı ve alanların Bağlı standart sapması % 0.85'ten küçük olmalıdır.
- Simetri faktörü Klorhekzidin için 0.8-1.8 arasında, Benzokain ve Enoksolon için 0.8-1.5 arasında olmalıdır.
- Teorik plaka sayısı 5000'den büyük olmalıdır.
- Klorhekzidin ile Benzokain'in RT' lerinin birbirine yakın olmasından dolayı arasındaki ayrışma 5'ten büyük olmalıdır.

Şeklinde ayarlanarak ilerde yönteme sorun oluşturabilecek parametreler ortadan kaldırılmıştır. Yöntem istenilen seviyeye geldikten sonra gerekli validasyon parametreleri çalışılmıştır. Bu kapsamda yapılan validasyon parametreleri ve her parametrede istenilen şartlar kararlaştırılmıştır. Bu şartlar,

a) Seçicilik parametresi için;

Klorhekzidin, Benzokain, Enoksolon ve safsızlıklarının alıkonma zamanında başka bir pike rastlanmamalıdır.

Klorhekzidin, Benzokain, Enoksolon ve safsızlıkları için pik saflığı açısı pik saflığı eşiğinden küçük olmalıdır.

b) Doğruluk parametresi için;

Çizelge 2.1'de Kabul edilebilir geri kazanım oranları gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. Etkenlerin kabul edilebilir geri kazanım oranları.

% Aktif içerik	Kabul Edilebilir Geri Kazanım
% 100	% 98-102
≥ %10	% 98-102
≥ %1	% 97-103
≥ %0.1	% 95-105

Klorhekzidin HCl : % 95 ≤ Geri Kazanım ≤ % 105

Benzokain : % 95 ≤ Geri Kazanım ≤ % 105

Enoksolon : % 95 ≤ Geri Kazanım ≤ % 105

c) Kesinlik parametresi için;

- Enjeksiyon Tekrarlanabilirliği: Bağlı Standart Sapma %0.85'ten fazla olmamalıdır
- Ara Kesinlik:

A - Analiz 1 ve cihaz I'den elde edilen sonuçların ve Analiz 2 ve cihaz II' den elde edilen sonuçların kendi içindeki bağlı standart sapma değeri % 2'den büyük olmamalıdır.

B - 12 analiz sonucunun bağlı standart sapma değeri % 2'den büyük olmamalıdır.

d) Doğrusallık parametresi için;

Korelasyon katsayısı (r) minimum 0.995 ve r² minimum 0.99 olmalıdır. y-kesişim % 100 seviyesindeki analit için elde edilen alanın % 2'sinden az olmalıdır.

e) Güvenilirlik parametresi için;

- Çözelti stabilitesi: Başlangıç değerinden değişim % 2.0'den fazla olmamalıdır.
- Küçük Değişiklikler: Simetri faktörü ve alandaki değişim Başlangıç değerinin % 2'den fazla olmamalıdır.

2.1. ANALİTİK YÖNTEM VALİDASYONU

2.1.1. Amaç

Amaç Anzibel Pastil analizlerinde kullanılan test yöntemlerinin geçerli olduğunu göstermektir.

2.1.2. Miktar Tayini Yöntemi

- Yöntem : HPLC
- Kolon : ACE 5 C18 4.6 x 150 mm, 5mm (veya eşdeğeri)
- Akış Hızı : 1.5 ml/dk
- Dalga Boyu : 250 nm
- Enjeksiyon Hacmi : 20 µl

- Kolon Sıcaklığı : 25°C
- Numune Sıcaklığı : 25°C
- Akış süresi : 12 dakika
- Tampon çözelti : 0.01 M Potasyum dihidrojen fosfat çözeltisi hazırlanır. Bu çözeltinin pH'sı % 85'lik fosforik asit ile 3.0 ± 0.05 'e ayarlanır.

Hareketli faz A : Tampon çözelti
Hareketli faz B : Su : Asetonitril (10:90)
Seyreltme Çözeltisi : Su : Asetonitril (50:50)

- Gradient Program

Çizelge 2.2'de Gradient program sunulmuştur.

Çizelge 2.2. Gradient program.

Zaman (dakika)	Hareketli Faz A (%)	Hareketli Faz B (%)
0	70	30
3	15	85
8	15	85
9	70	30
12	70	30

- Standart Çözeltisi

100 ml'lik balon jöjeye 50 mg Klorhekzidin HCl, 40 mg Benzokain ve 30 mg Enoksolon standardı tartılır. Bir miktar seyreltme çözeltisi eklenip ultrasonik banyoda 10 dakika bekletilir. Tamamen çözüldükten sonra hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlanır. Bu çözeltiden 50 ml'lik balon jöjeye 5.0 ml alınır ve hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlanır. Bu çözelti 2-3 ml ile doyurulmuş 0.45 mm PTFE filtreden süzülür ve viallenir. (CKlorhekzidin HCl = 0.05 mg/ml CBenzokain = 0.04 mg/ml CEnoksolon = 0.03 mg/ml).

- Test Çözeltisi

20 adet pastil tartılır, ortalama pastil ağırlığı belirlenir. 5 adet pastile eşdeğer pastil tozu 500 ml'lik balon jöjeye tartılır. Bir miktar seyreltme çözeltisi ilave edilip ultrasonik banyoda 15 dakika bekletilir. Tamamen çözüldükten sonra hacmine seyreltme çözeltisi

ile tamamlanır Bu çözelti 2-3 ml ile doyurulmuş 0.45 mm PTFE filtreden süzülür ve viallenir. (CKlorhekzidin HCl= 0.05 mg/ml CBenzokain= 0.04 mg/ml CEnoksolon= 0.03 mg/ml).

- Sistem Uygunluk Parametreleri
 - Sistem uygunluğu standart çözeltinin 6 ardışık enjeksiyonu ile kontrol edilir.
 - Alıkonma zamanı ve alanların Bağlı standart sapması %0.85'ten küçük olmalıdır.
 - Simetri faktörü Klorhekzidin için 0.8-1.8 arasında, Benzokain ve Enoksolon için 0.8-1.5 arasında olmalıdır.
 - Teorik plaka sayısı 5000'den büyük olmalıdır.
 - Klorhekzidin ve Benzokain arasındaki ayrışma 5'ten büyük olmalıdır.
- Alıkonma Zamanı

Klorhekzidin : ≈ 2.5 dakika

Benzokain : ≈ 3.2 dakika

Enoksolon : ≈ 6.5 dakika

- Çözelti Stabilitesi

Standart ve test çözelti oda ve buzdolabı koşullarında 48 saat stabildir.

- İşlem

Yöntemde belirtildiği gibi standart çözelti ve test çözeltileri hazırlanıp enjekte edilir. Sistem uygunluk parametreleri kontrol edilir. Kromatogramlar kaydedilir. Hesaplama bölümünde gösterilen formül ile Klorhekzidin HCl, Benzokain ve Enoksolon miktarları hesaplanır.

- Hesaplama

Klorhekzidin HCl İçin:

$$\text{mg Klorhekzidin HCl/ pastil} = \frac{A_t}{A_s} \times \frac{W_s \times 5 \times P \times (100 - Si)}{100 \times 50 \times 100} \times \frac{M_w \times 500}{W_t} \quad (2.1)$$

A_t : Test çözeltilisinden elde edilen Klorhekzidin alanı

A_s : Standart çözeltisinden elde edilen Klorhekzidin alanı

W_s : Standart tartımı (mg)

P : Standardın potensi

S_i : Standardın su içeriği

M_w : Ortalama pastil ağırlığı (mg)

W_t : Numunenin ağırlığı (mg)

Benzokain İçin:

$$\text{mg Benzokain/ pastil} = \frac{A_t}{A_s} \times \frac{W_s \times 5 \times P \times (100 - S_i)}{100 \times 50 \times 100} \times \frac{M_w \times 500}{W_t} \quad (2.2)$$

A_t : Test çözeltisinden elde edilen Benzokain alanı

A_s : Standart çözeltisinden elde edilen Benzokain alanı

W_s : Standart tartımı (mg)

P : Standardın potensi

S_i : Standardın su içeriği

M_w : Ortalama pastil ağırlığı (mg)

W_t : Numunenin ağırlığı (mg)

Enoksolon İçin:

$$\text{mg Enoksolon / pastil} = \frac{A_t}{A_s} \times \frac{W_s \times 5 \times P \times (100 - S_i)}{100 \times 50 \times 100} \times \frac{M_w \times 500}{W_t} \quad (2.3)$$

A_t : Test çözeltisinden elde edilen Enoksolon alanı

A_s : Standart çözeltisinden elde edilen Enoksolon alanı

W_s : Standart tartımı (mg)

P : Standardın potensi

S_i : Standardın su içeriği

M_w : Ortalama pastil ağırlığı (mg)

Wt: Numunenin ağırlığı (mg)

2.1.3. Reaktifler

Çizelge 2.3'te kullanılan reaktifler gösterilmektedir.

Çizelge 2.3. Gradient kullanılan reaktifler.

Reaktif ve Standartlar	Firma	Seri Numarası	Son Kullanma Tarihi
Klorheksidin HCl	EP	2.0	-
Benzokain	EP	1.0	-
Enoksolon	EP	1.0	-
Asetonitril	JT Baker	1403711002	03/2016
Fosforik Asit	Merck	K43584173 229	06/2017
KH ₂ PO ₄	Merck	AM0453073 342	08/2017
18 α -glycyrrhetic acid	Sigma-Aldrich	SLBD9388V	10/2016

2.1.4. Miktar Tayini Testi Validasyon Parametreleri

- Spesifiklik
- Doğruluk
- Kesinlik
Ara Kesinlik
Tekrarlanabilirlik
- Doğrusallık ve Çalışma Aralığı
- Güvenilirlik

2.1.5. Miktar Tayini Yöntem Validasyonu

2.1.5.1. Spesifiklik

Spesifiklik var olması beklenen diğer bileşenlerin varlığında analitin açık bir şekilde belirlenmesi yeteneğidir. Genellikle bu bir analitin safsızlıklarını kapsar, örneğin ilgili bileşikler testi, ağır metaller, artık çözücüler içeriği vs.

- Prosedür
- Hareketli faz-A enjekte edilir.

- Hareketli faz-B enjekte edilir.
- Seyreltme çözeltisi enjekte edilir.
- Plasebo çözeltisi enjekte edilir.
- Test çözeltisi enjekte edilir.
- Standart + plasebo çözeltisi enjekte edilir.
- Standart + plasebo + safsızlıklar çözeltisi enjekte edilir.
- Standart çözeltisi enjekte edilir.
- 18 α -glycyrrhetic acid çözeltisi enjekte edilir.
- Sistem uygunluk çözeltisi enjekte edilir.

Plasebo çözeltisi, sistem uygunluğu ve diğer çözeltiler miktar tayini koşullarında hazırlanır. Çözeltiler süzülüp enjekte edilir.

- Kriter

Klorhekzidin, Benzokain, Enoksolon ve safsızlıklarının alıkonma zamanında başka bir pike rastlanmamalıdır.

Klorhekzidin, Benzokain, Enoksolon ve safsızlıkları için pik saflığı açısı pik saflığı eşliğinden küçük olmalıdır.

- Plasebo Çözeltisinin Hazırlanışı

500 ml'lik balon jøjeye formülasyon birimine hazırlattırılan plasebodan 5 pastile eşdeğer plasebo tartılır. Bir miktar seyreltme çözeltisi ilave edilip ultrasonik banyoda 15 dakika bekletilir. Tamamen çözüldükten sonra hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlanır. Bu çözelti 2-3 ml ile doyurulmuş 0.45 mm PTFE filtreden süzülür ve viallenir.

- Test Çözeltisinin Hazırlanışı

20 adet pastil tartılır, ortalama pastil ağırlığı belirlenir. 5 adet pastile eşdeğer pastil tozu 500 ml'lik balon jøjeye tartılır. Bir miktar seyreltme çözeltisi ilave edilip ultrasonik banyoda 15 dakika bekletilir. Tamamen çözüldükten sonra hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlanır Bu çözelti 2-3 ml ile doyurulmuş 0.45 mm PTFE filtreden süzülür ve viallenir.

- Standart + Plasebo Çözeltisinin Hazırlanışı

500 ml'lik balon jöjeye formulasyon birimine hazırlattırılan plasebodan 5 pastile eşdeğer plasebo ile 25 mg Klorhekzidin HCl, 20 mg Benzokain ve 15 mg Enoksolon standardı tartılır. Bir miktar seyreltme çözeltisi ilave edilip ultrasonik banyoda 15 dakika bekletilir. Tamamen çözündükten sonra hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlanır. Bu çözelti 2-3 ml ile doyurulmuş 0.45 mm PTFE filtreden süzülür ve viallenir.

- Standart + Plasebo+ Safsızlıklar Çözeltisinin Hazırlanışı

10 ml'lik balon jöjeye 2.1 mg 18 α -glycyrrhetic acid safsızlığı tartılır, bir miktar seyreltme çözeltisi ilave edilip ultrasonik banyoda 5 dakika bekletilir. Tamamen çözündükten sonra hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlanır. Bu çözeltinin 1.0 ml'si 10 ml'ye seyreltme çözeltisi ile seyreltilir (stok_18 α -glycyrrhetic acid).

500 ml'lik balon jöjeye formulasyon birimine hazırlattırılan plasebodan 5 pastile eşdeğer plasebo ile 25 mg Klorhekzidin HCl, 20 mg Benzokain ve 15 mg Enoksolon standardı tartılır. Bir miktar seyreltme çözeltisi ilave edilip ultrasonik banyoda 15 dakika bekletilir. Oda sıcaklığına soğutulduktan sonra bu çözeltinin üzerine 5.0 ml stok_18 α -glycyrrhetic acid çözeltisinden alınır ve hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlanır ve çalkalanır. Bu çözelti 2-3 ml ile doyurulmuş 0.45 mm PTFE filtreden süzülür ve viallenir.

- Standart Çözeltisinin Hazırlanışı

100 ml'lik balon jöjeye 50 mg Klorhekzidin HCl , 40 mg Benzokain ve 30 mg Enoksolon standardı tartılır. Bir miktar seyreltme çözeltisi eklenip ultrasonik banyoda 10 dakika bekletilir. Tamamen çözündükten sonra hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlanır. Bu çözeltiden 50 ml'lik balon jöjeye 5.0 ml alınır ve hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlanır. Bu çözelti 2-3 ml ile doyurulmuş 0.45 mm PTFE filtreden süzülür ve viallenir.

- 18 α -glycyrrhetic acid Çözeltisinin Hazırlanışı

10 ml'lik balon jöjeye 2.1 mg 18 α -glycyrrhetic acid safsızlığı tartılır, bir miktar seyreltme çözeltisi ilave edilip ultrasonik banyoda 5 dakika bekletilir. Tamamen çözündükten sonra hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlanır. Bu çözeltinin 1 ml'si 10

ml'ye seyreltme çözeltisi ile seyreltilir. Bu çözeltinin 1 ml'si 100 ml'ye seyreltme çözeltisi ile seyreltilir. Bu çözelti 2-3 ml ile doyurulmuş 0.45 mm PTFE filtreden süzülür ve viallenir.

- Sistem Uygunluk Çözeltisinin Hazırlanışı

100 ml'lik balon jöjeye 50 mg Klorhekzidin HCl , 40 mg Benzokain ve 30 mg Enoksolon standardı tartılır. Bir miktar seyreltme çözeltisi eklenip ultrasonik banyoda 10 dakika bekletilir. Tamamen çözüldükten sonra hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlanır. Bu çözeltiden 50 ml'lik balon jöjeye 5.0 ml alınır ve hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlanır. Bu çözelti 2-3 ml ile doyurulmuş 0.45 mm PTFE filtreden süzülür ve viallenir.

2.1.5.2. Doğruluk

Plasebo ile tartılarak Klorhekzidin HCl, Benzokain ve Enoksolon'un % 80, % 100 ve % 120 konsantrasyonlarında 9 adet çözelti hazırlanır. Miktar tayini testindeki gibi çalışılır.

Numunelerin hazırlanışları şu şekildedir:

- % 80 Konsantrasyonunda Numune Çözeltisinin Hazırlanışı

500 ml'lik balon jöjeye formülasyon birimine hazırlattırılan plasebodan 5 pastile eşdeğer plasebo ile 20 mg Klorhekzidin HCl, 16 mg Benzokain ve 12 mg Enoksolon standardı tartılır. Bir miktar seyreltme çözeltisi ilave edilip ultrasonik banyoda 15 dakika bekletilir. Tamamen çözüldükten sonra hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlanır. Bu çözelti 2-3 ml ile doyurulmuş 0.45 mm PTFE filtreden süzülür ve viallenir. (CKlorhekzidin HCl =0.040 mg/ml, CBenzokain=0.032 mg/ml, CEnoksolon=0.024 mg/ml).

- % 100 Konsantrasyonunda Numune Çözeltisinin Hazırlanışı

500 ml'lik balon jöjeye formülasyon birimine hazırlattırılan plasebodan 5 pastile eşdeğer plasebo ile 25 mg Klorhekzidin HCl, 20 mg Benzokain ve 15 mg Enoksolon standardı tartılır. Bir miktar seyreltme çözeltisi ilave edilip ultrasonik banyoda 15 dakika bekletilir. Tamamen çözüldükten sonra hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlanır. Bu çözelti 2-3 ml ile doyurulmuş 0.45 mm PTFE filtreden süzülür ve viallenir (CKlorhekzidin HCl =0.050 mg/ml, CBenzokain=0.040 mg/ml, CEnoksolon=0.030 mg/ml).

o % 120 Konsantrasyonunda Numune Çözeltisinin Hazırlanışı

500 ml'lik balon jojeye formulasyon birimine hazırlattırılan plasebodan 5 pastile eşdeğer plasebo ile 30 mg Klorhekzidin HCl, 24 mg Benzokain ve 18 mg Enoksolon standardı tartılır. Bir miktar seyreltme çözeltisi ilave edilip ultrasonik banyoda 15 dakika bekletilir. Tamamen çözündükten sonra hacmine seyreltme çözeltisi ile tamamlanır. Bu çözelti 2-3 ml ile doyurulmuş 0.45 mm PTFE filtreden süzülür ve viallenir (CKlorhekzidin HCl =0.060 mg/ml, CBenzokain=0.048 mg/ml, CEnoksolon=0.036 mg/ml).

Kriter:

Çizelge 2.4'te etkenlerin kabul edilebilir geri kazanım değerleri gösterilmektedir.

Çizelge 2.4. Etkenlerin kabul edilebilir geri kazanım değerleri.

% Aktif içerik	Kabul Edilebilir Geri Kazanım
% 100	% 98-102
≥ %10	% 98-102
≥ %1	% 97-103
≥ %0.1	% 95-105

Klorhekzidin HCl : % 95 ≤ Geri Kazanım ≤ % 105

Benzokain : % 95 ≤ Geri Kazanım ≤ % 105

Enoksolon : % 95 ≤ Geri Kazanım ≤ % 105

$$\% \text{ Geri kazanım} = \frac{\text{Bulunan konsantrasyon}}{\text{Bulunan konsantrasyon}} \times 100 \quad (2.4)$$

2.1.5.3. Keskinlik

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

1. Cihaz Keskinliği ya da Enjeksiyon Tekrarlanabilirliği

Test, standart çözeltisinin 6 ardışık enjeksiyon ile yapılır.

Kriter: Bağıl Standart Sapma % 0.85'ten fazla olmamalıdır.

2. Ara Kesinlik

Ara kesinlik laboratuvar içindeki değişikliklerin; farklı günlerde, farklı analistler, farklı cihazlar vs. kesinliğini ifade eder.

Ara kesinlik parametresi bitmiş üründen elde edilen sonuçlarla hesaplanır. Ör: Basılan tabletler havanda toz edilir, yöntemde belirtildiği gibi numune hazırlanır. Böylece yöntemin çalışılabilirliği ürün bazında tespit edilmiş olur.

Her bir analist tarafından 6 adet % 100 konsantrasyonunda numune çözeltisi hazırlanır.

Tüm numune çözeltileri birinci analist tarafından, I. cihazda analiz edilir.

Tüm numune çözeltileri ikinci analist tarafından, II cihazda analiz edilir.

Bütün sonuçlar kıyaslanıp bağıl standart sapma hesaplanır.

Kriter:

1- 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 % 2'den büyük olmamalıdır.

2- 12 analiz sonucunun bağıl standart sapma değeri % 2'den büyük olmamalıdır.

2.1.5.4. Doğrusallık ve Çalışma Aralığı

Doğrusallık çalışması bir konsantrasyon aralığındaki numune çözeltilerindeki analit cevabının konsantrasyonla doğru orantılı olduğunun gösterilmesidir.

Aşağıdaki Çizelgede belirtilen konsantrasyon aralığında standart çözeltiler hazırlanır. Eğim, kesişim, korelasyon katsayısı elde edilir.

Kriter:

Korelasyon katsayısı (r) minimum 0.995 ve r^2 minimum 0.99 olmalıdır. y-kesişim % 100 seviyesindeki analit için elde edilen alanın % 2'sinden az olmalıdır.

2.1.5.5. Güvenilirlik

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

1. Çözelti Stabilitesi

Yöntemde belirtildiği gibi standart ve test çözeltisi hazırlanır. Bu çözeltilerden; başlangıçta, 6 saat sonra, 24 saat sonra ve 48 saat sonra enjeksiyonlar yapıp, analiz edilir. Çözeltiler bu süre zarfında oda ve buzdolabı sıcaklığında korunur. Sonuçlar başlangıç değeri ile kıyaslanır ve % değişim hesaplanır.

$$\%Değişim = \frac{(Dt - Di)}{Di} \times 100 \quad (2.5)$$

Dt : Herhangi bir t anında bulunan değer

Di : Başlangıçta bulunan değer

Kriter: Başlangıç değerinden değişim % 2.0'den fazla olmamalıdır.

2. Küçük Değişiklikler

Bu bölümde metoda özel parametrelerden 3 tanesi seçilir. Klorhekzidin, Benzokain ve Enoksolon alan ve simetri faktörü için seçilen parametrelerin etkisi % değişim olarak hesaplanır.

A) Farklı Gradient Program

Yöntemde belirtildiği gibi standart çözeltisi hazırlanır. Bu çözeltilerden yöntemde belirtilen gradient program ile ve gradient program-1 ve gradient program-2'e değiştirildikten sonra enjeksiyonlar yapılır. Sonuçlar başlangıç değeri ile kıyaslanır ve % değişim hesaplanır. Çizelge 2.5'te Gradient program-1 gösterilmiştir.

Çizelge 2.5. Gradient program 1.

Zaman (dakika)	Hareketli Faz A (%)	Hareketli Faz B (%)
0	72	28
3	16	84
8	16	84
9	72	28
12	72	28

Çizelge 2.6'da Gradient program – 2 gösterilmiştir.

Çizelge 2.6. Gradient program 2.

Zaman (dakika)	Hareketli Faz A (%)	Hareketli Faz B (%)
0	68	32
3	14	86
8	14	86
9	68	32
12	68	32

Kriter: Başlangıç değerinden değişim % 2'den fazla olmamalıdır.

B) Farklı Akış Hızı

Yöntemde belirtildiği gibi standart çözeltisi hazırlanır. Bu çözeltiden yöntemde belirtilen akış hızı ile ve akış hızı 1.51 ml/dk ve 1.49 ml/dk'ye değiştirildikten sonra enjeksiyonlar yapılır. Sonuçlar başlangıç değeri ile kıyaslanır ve % değişim hesaplanır.

Kriter: Başlangıç değerinden değişim % 2'den fazla olmamalıdır.

C) Farklı Kolon Sıcaklığı

Yöntemde belirtildiği gibi standart çözeltisi hazırlanır. Bu çözeltiden yöntemde belirtilen kolon sıcaklığı ile ve T=27 °C ve T=23 °C kolon sıcaklıkları ile enjeksiyonlar yapılır. Sonuçlar başlangıç değeri ile kıyaslanır ve % değişim hesaplanır.

Kriter: Başlangıç değerinden değişim % 2'den fazla olmamalıdır.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

Yapılan çalışmalar sonucu 12 dakikalık enjeksiyon süresinde 3 etkeninde çıkartıldığı bir HPLC yöntemi yapılmış ve valide edilebilmiştir.

3.1. SPESİFİKLİK

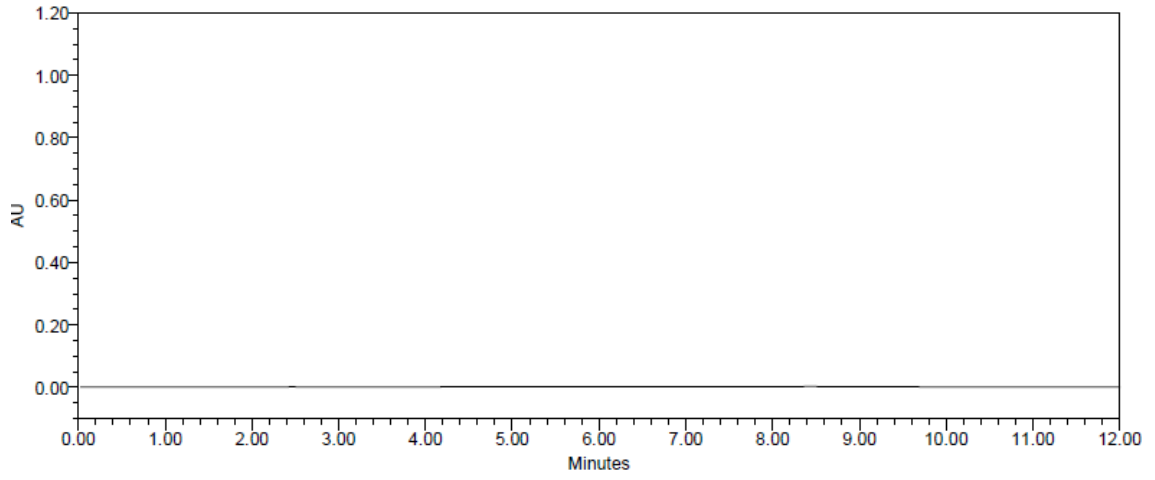
Sonuç: Klorheksidin, Benzokain, Enoksolon ve safsızlıklarının alıkonma zamanında başka bir pike rastlanmamıştır.

Klorheksidin, Benzokain, Enoksolon ve safsızlıkları için pik saflığı açısı pik saflığı eşliğinden küçüktür.

Çizelge 3.1’de çözeltilerin HPLC kromatogram değerleri gösterilmiştir.

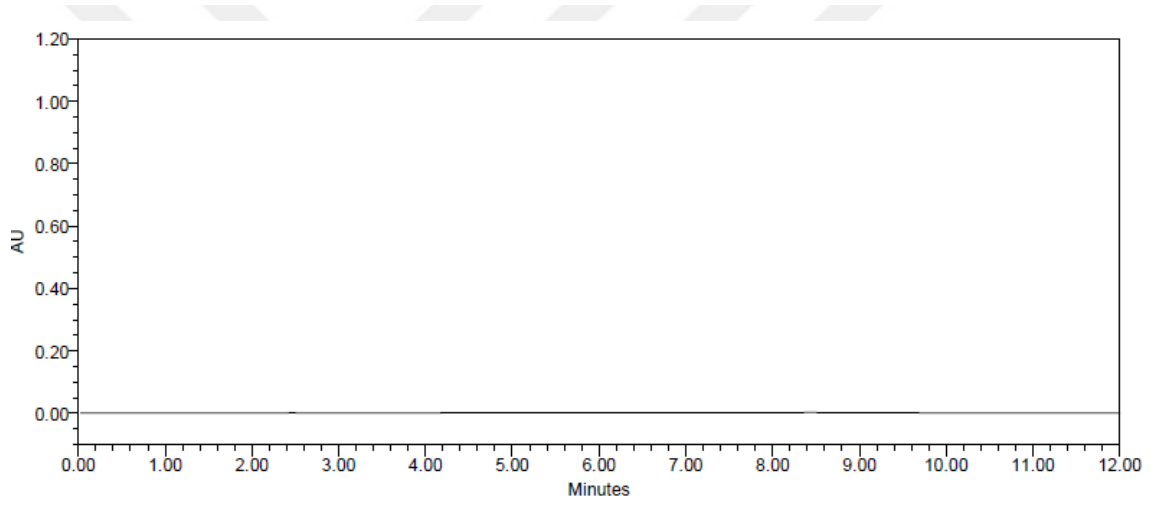
Çizelge 3.1. Çözeltilerin HPLC kromatogram değerleri.

Bileşenler		Alıkonma Zamanı	Bağlı alıkonma zamanı	Pik saflığı açısı	Pik saflığı eşığı
Hareketli Faz – A		-	-	-	-
Hareketli Faz – B		-	-	-	-
Seyreltme Çözeltisi		-	-	-	-
Plasebo		-	-	-	-
Test Çözeltisi	Klorhekzidin	2.498	1.00	0.476	0.609
	Benzokain	3.267	1.31	0.089	0.368
	Enoksolon	6.486	2.60	0.580	0.987
Standart + Plasebo	Klorhekzidin	2.507	1.00	0.507	0.622
	Benzokain	3.272	1.31	0.243	0.453
	Enoksolon	6.490	2.59	0.163	0.312
Standart + Plasebo + Safsızlıklar	Klorhekzidin	2.507	1.00	0.501	0.612
	Benzokain	3.272	1.31	0.250	0.462
	Enoksolon	6.488	2.59	0.161	0.313
Standart	Klorhekzidin	2.497	1.00	0.493	0.541
	Benzokain	3.263	1.31	0.243	0.425
	Enoksolon	6.477	2.59	0.167	0.329
18 α -glycyrrhetic acid		-	-	-	-
Sistem Uygunluk	Klorhekzidin	2.497	1.00		
	Benzokain	3.263	1.31		
	Enoksolon	6.477	2.59		



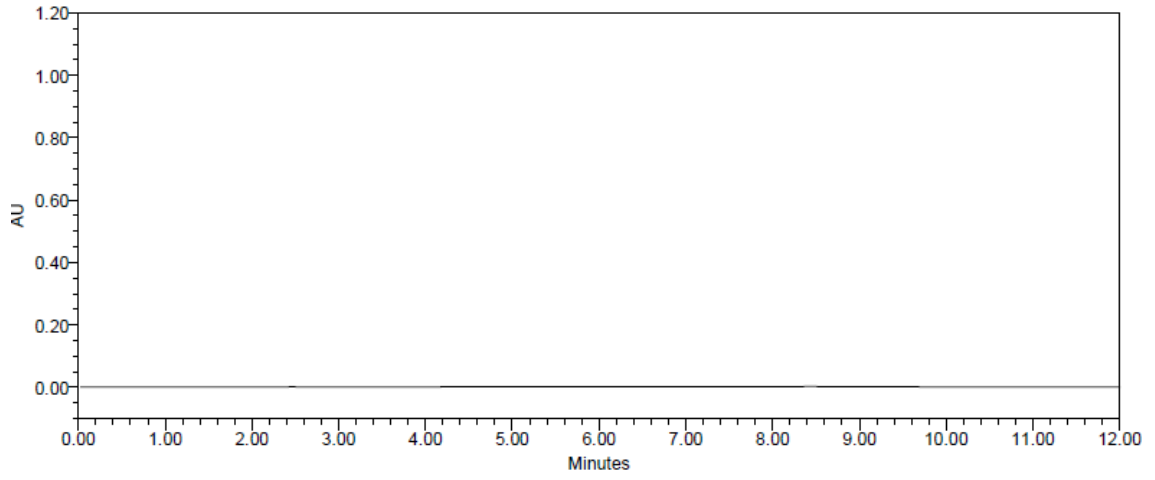
Şekil 3.1. Hareketli faz-A kromatogramı.

Şekil 3.1'de Hareketli faz-A kromatografı gösterilmektedir.



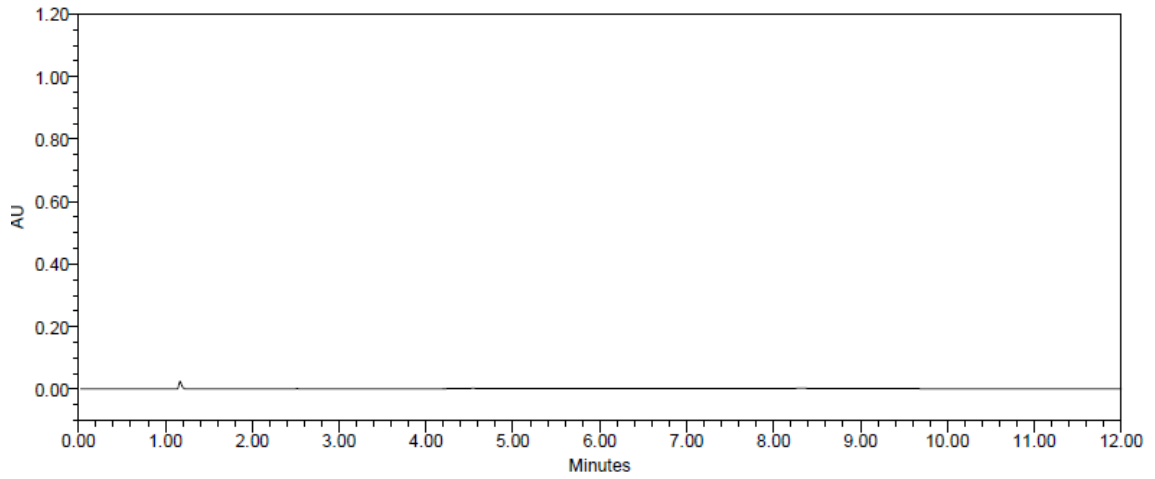
Şekil 3.2. Hareketli faz-B kromatogramı.

Şekil 3.2'de Hareketli faz-B kromatografı gösterilmektedir.



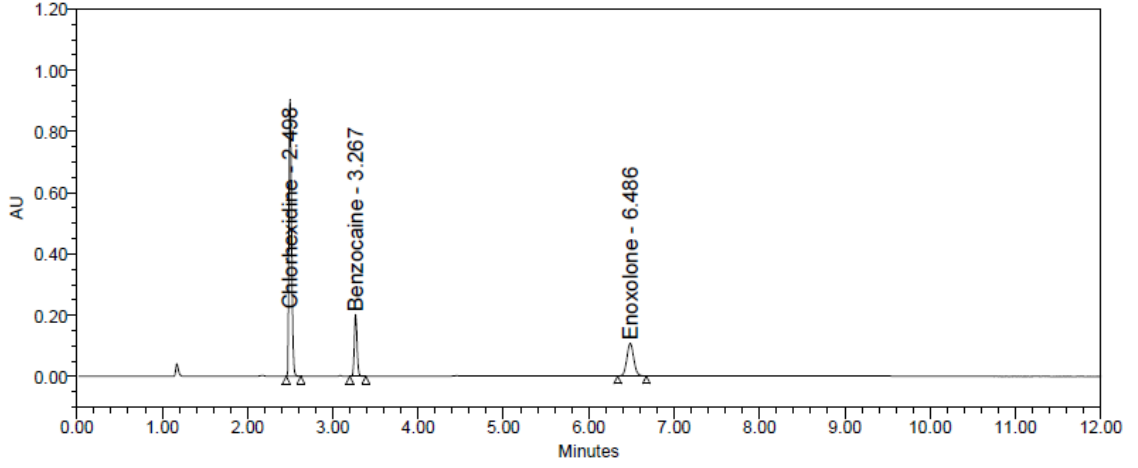
Şekil 3.3. Seyreltme çözeltisi kromatogramı.

Şekil 3.3'te Seyreltme çözeltisi kromatografı gösterilmektedir.



Şekil 3.4. Plasebo çözeltisi kromatogramı.

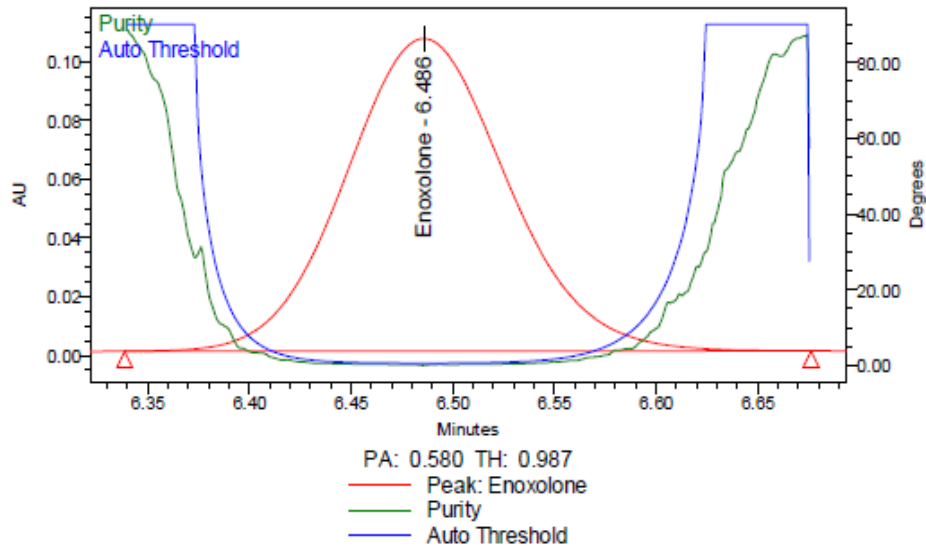
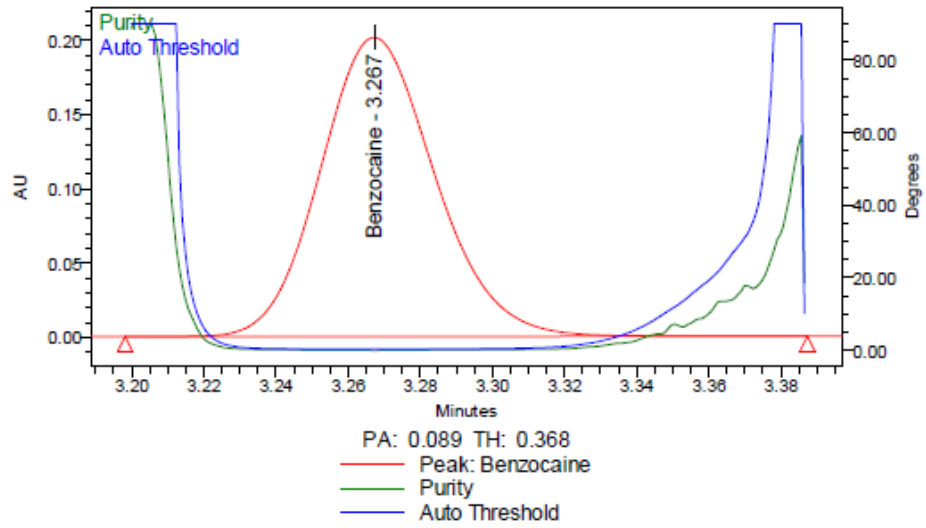
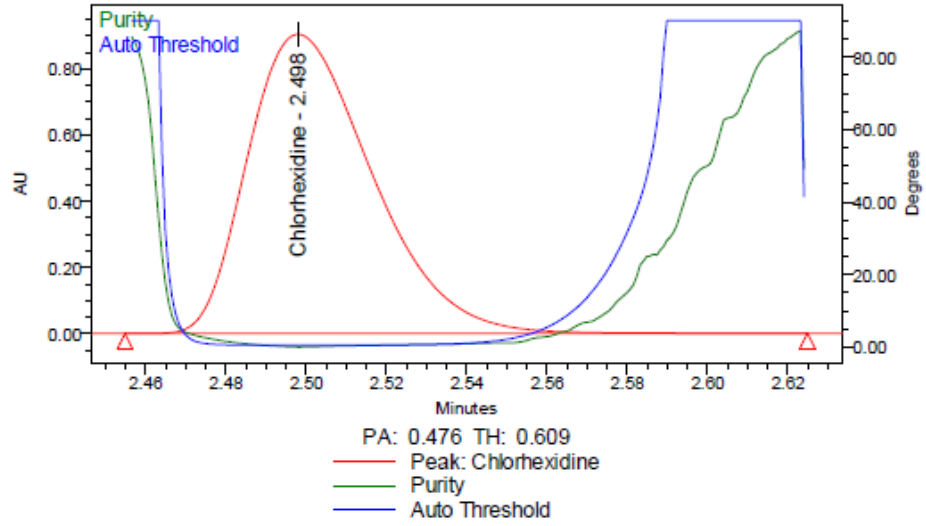
Şekil 3.4'te Plasebo kromatografı gösterilmektedir.



	Pik Adı	Pik Süresi	Alan	Saflık Açısı	Saflık Eşiği
1	Klorhekzidin	2.498	1945929	0.476	0.609
2	Benzokain	3.267	446471	0.089	0.368
3	Enoksolon	6.486	592612	0.58	0.987

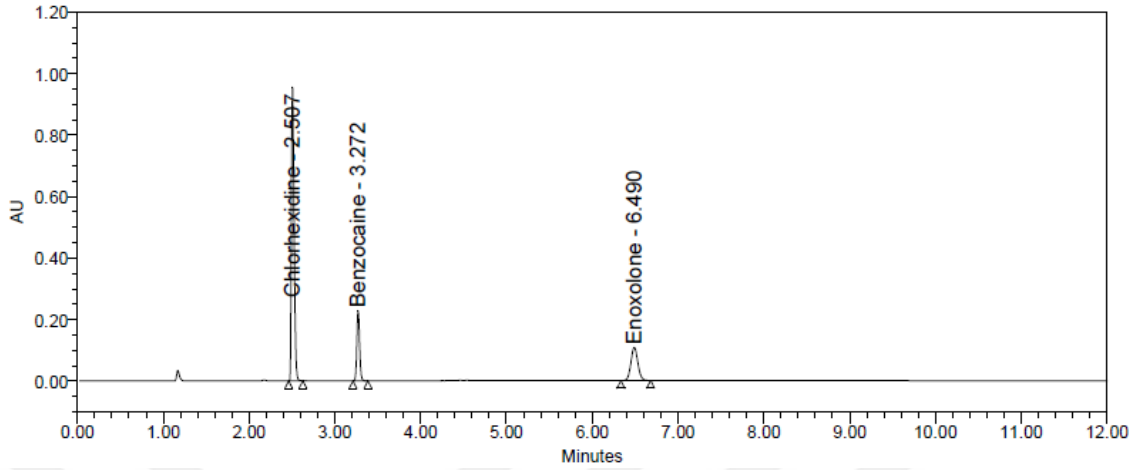
Şekil 3.5. Test çözeltisi kromatogramı.

Şekil 3.5'te gösterilen test çözeltisi kromatografi için kullanılan değerler, CKlorhekzidin HCl=0.05 mg/ml, CBenzokain=0.04 mg/ml CEnoksolon=0.03 mg/ml'dir.



Şekil 3.6. Test çözeltisi pik saflığı kromatogramı.

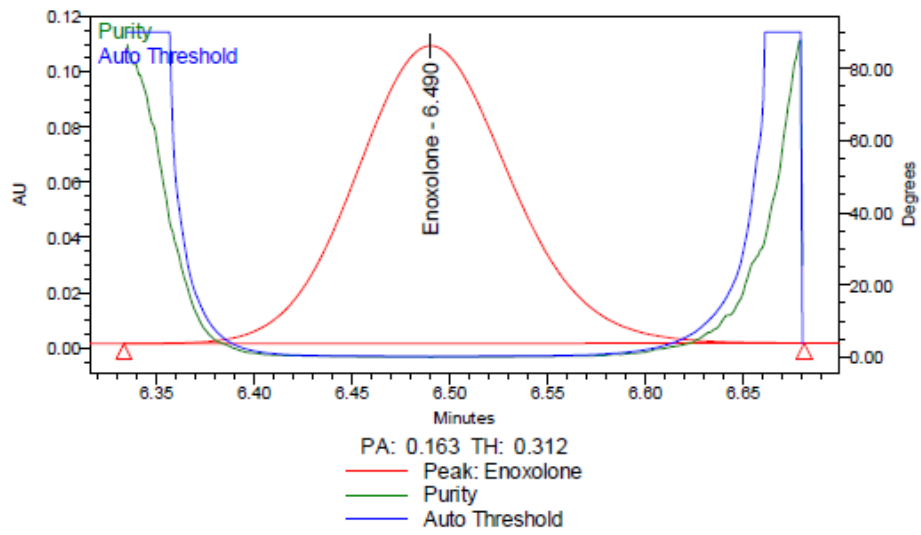
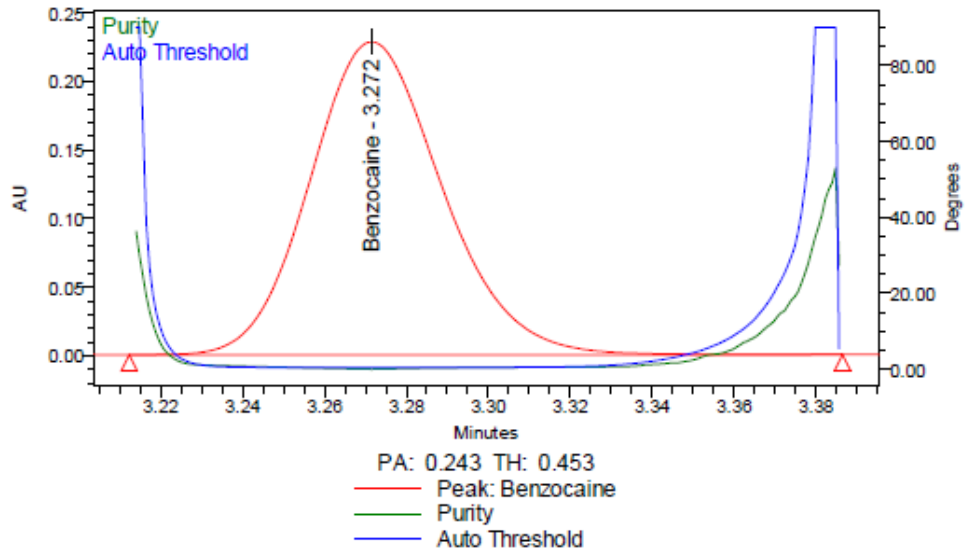
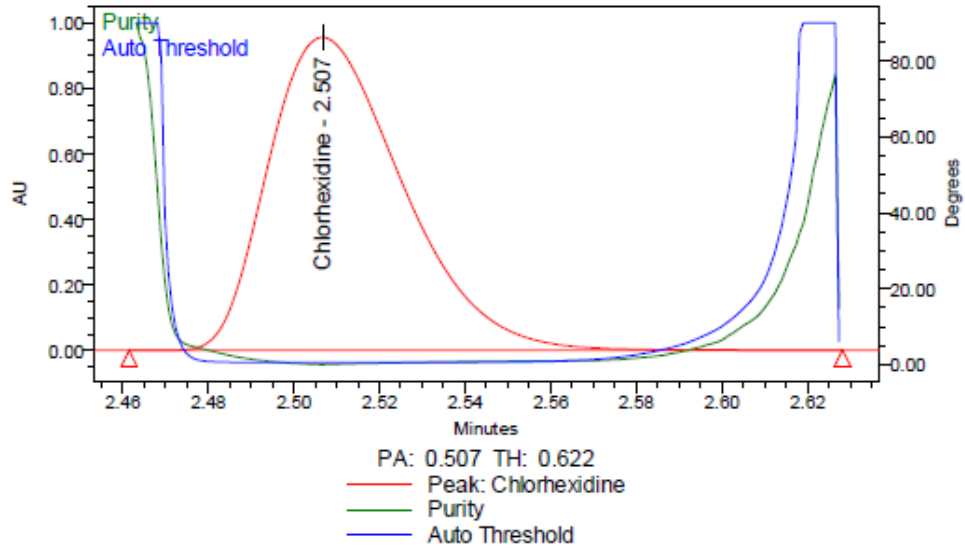
Şekil 3.6'da test çözeltisi pik saflığı gösterilmektedir.



	Pik Adı	Pik Süresi	Alan	Saflık Açısı	Saflık Eşiği
1	Klorhekzidin	2.507	2076975	0.507	0.622
2	Benzokain	3.272	513737	0.243	0.453
3	Enoksolon	6.490	603689	0.163	0.312

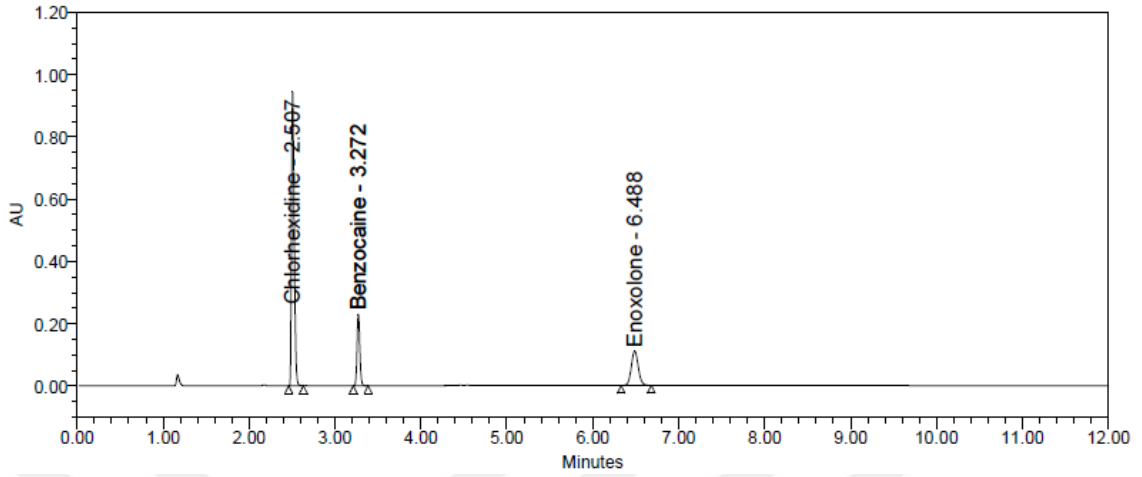
Şekil 3.7. Standart + plasebo çözeltisi kromatogramı.

Şekil 3.7'de gösterilen standart+plasebo çözeltisi kromatografisi için kullanılan değerler; CKlorhekzidin HC=0.05 mg/ml, CBenzokain =0.04 mg/ml CEnoksolon =0.03 mg/ml'dir.



Şekil 3.8. Standart + plasebo çözeltisi pik saflığı kromatogramı.

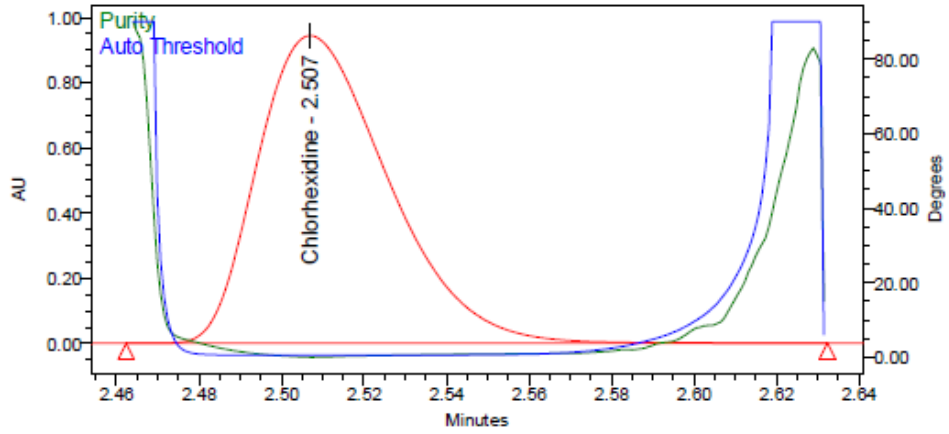
Şekil 3.8’de Standart + plasebo çözeltisi pik saflığı gösterilmektedir.



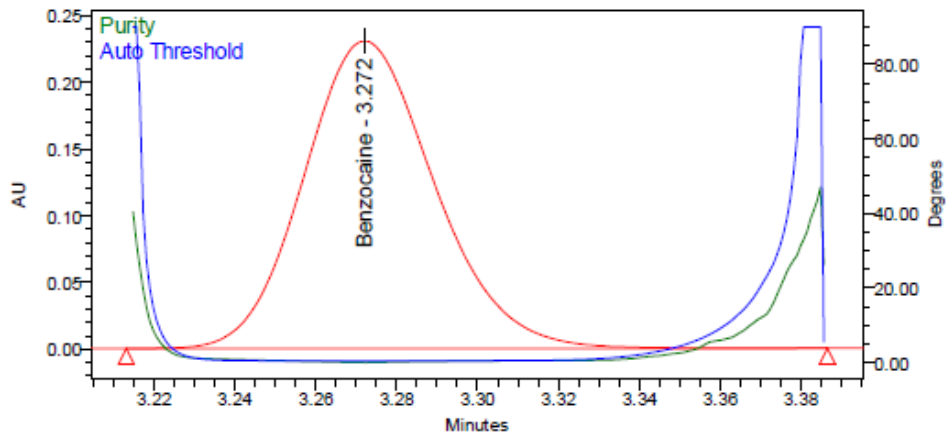
	Pik Adı	Pik Süresi	Alan	Saflık Açısı	Saflık Eşiği
1	Klorhekzidin	2.507	2072251	0.501	0.612
2	Benzokain	3.272	518703	0.250	0.462
3	Enoksolon	6.488	619403	0.161	0.313

Şekil 3.9. Standart + plasebo + safsızlıklar çözeltisi kromatogram.

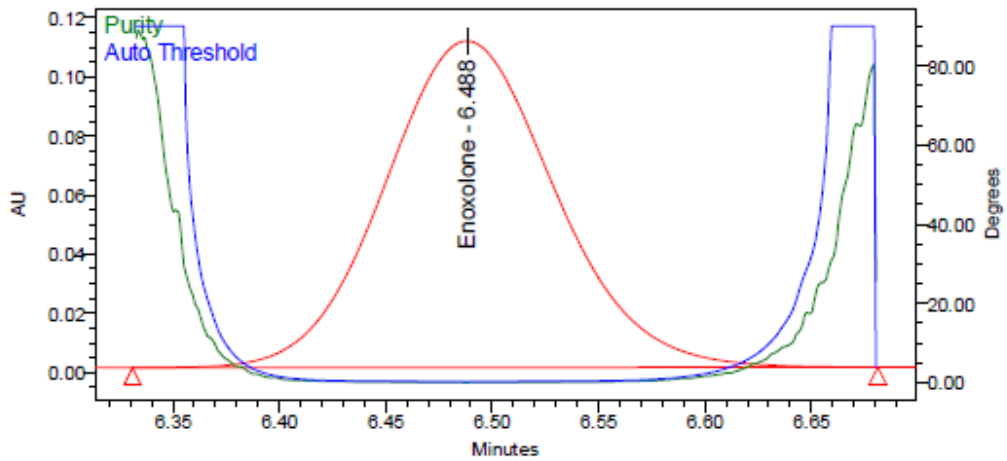
Şekil 3.9’da gösterilen standart+plasebo+safsızlıklar çözeltisi kromatografisi için kullanılan değerler; CKlorhekzidin HCl = 0.05 mg/ml, CBenzokain=0.04 mg/ml, CEnoksolon=0.03 mg/ml, C18 α -glycyrrhetic acid= 0.00021 mg/ml’dir.



PA: 0.501 TH: 0.612
 — Peak: Chlorhexidine
 — Purity
 — Auto Threshold



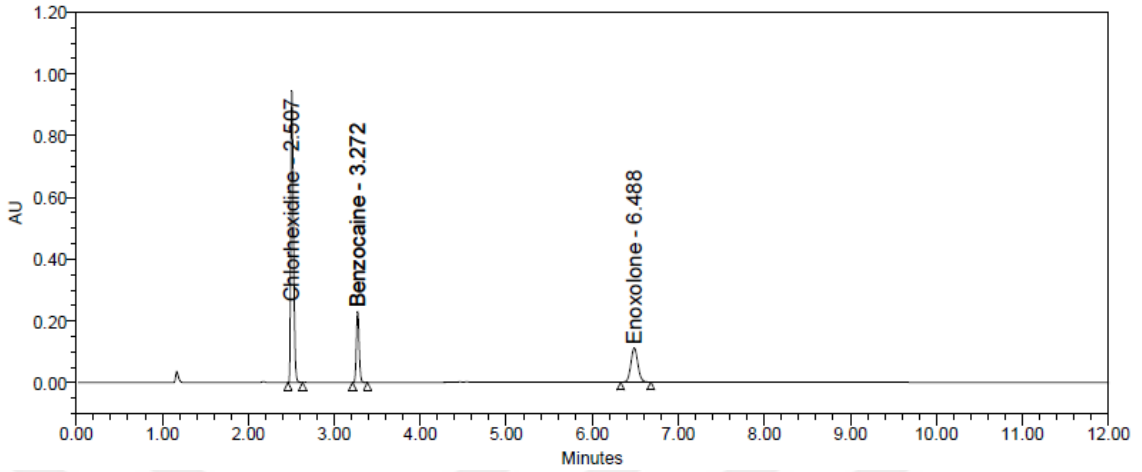
PA: 0.250 TH: 0.462
 — Peak: Benzocaine
 — Purity
 — Auto Threshold



PA: 0.161 TH: 0.313
 — Peak: Enoxolone
 — Purity
 — Auto Threshold

Şekil 3.10. Standart + plasebo + safsızlıklar çözeltisi pik saflığı kromatogram.

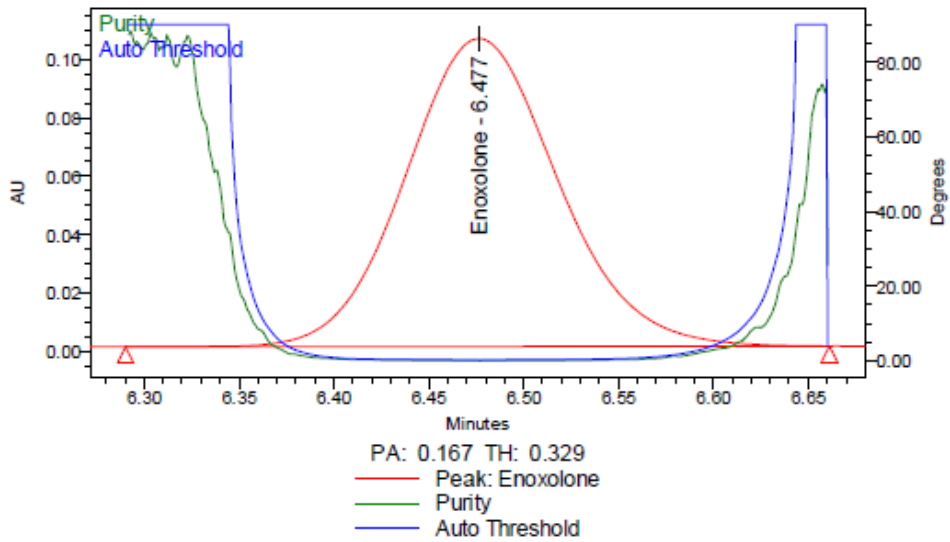
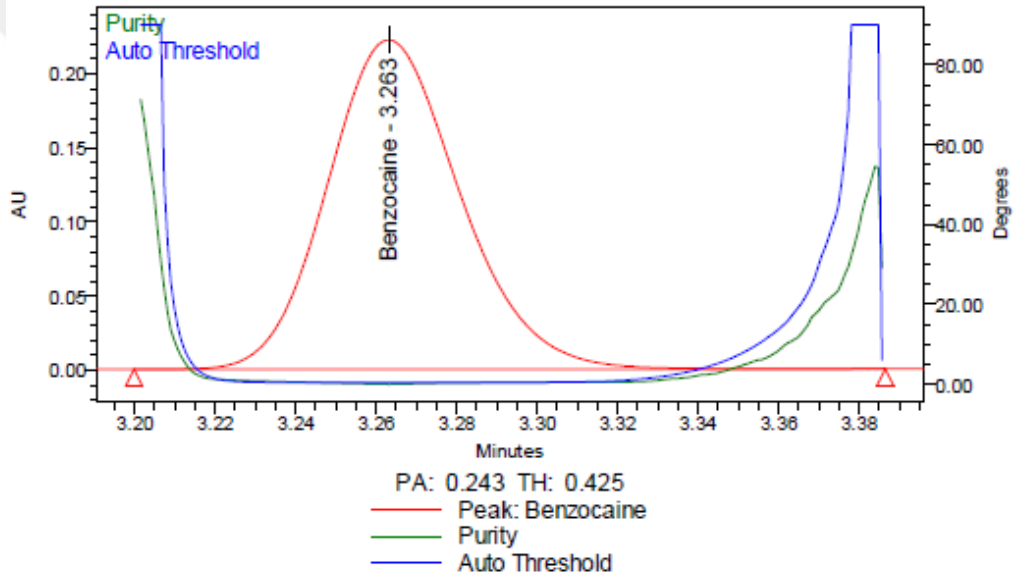
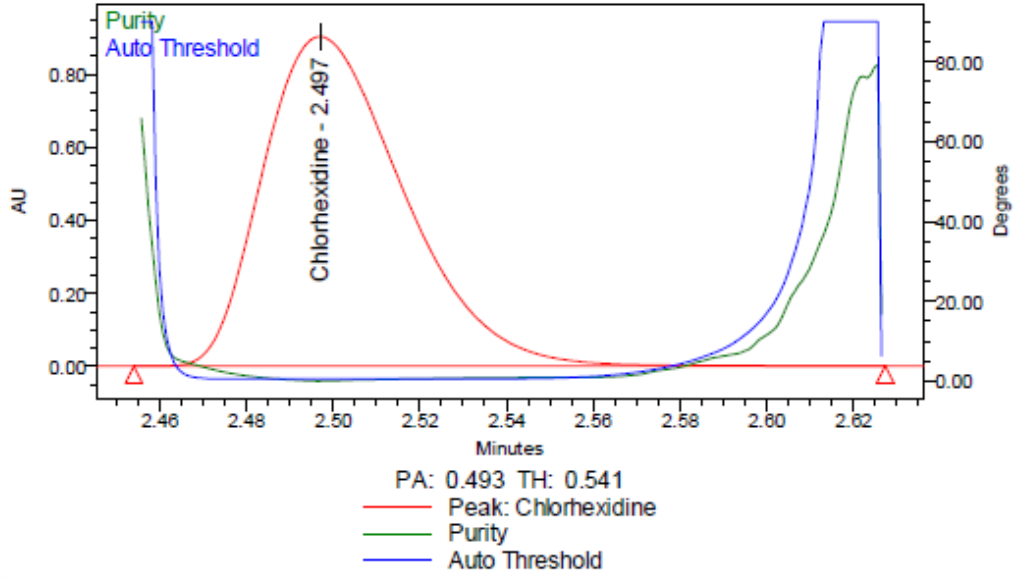
Şekil 3.10'da Standart + plasebo +safsızlıklar çözeltisi pik saflığı gösterilmektedir.



	Pik Adı	Pik Süresi	Alan	Saflık Açısı	Saflık Eşiği
1	Klorhekzidin	2.597	2030141	0.493	0.541
2	Benzokain	3.272	510204	0.243	0.425
3	Enoksolon	6.488	591465	0.167	0.329

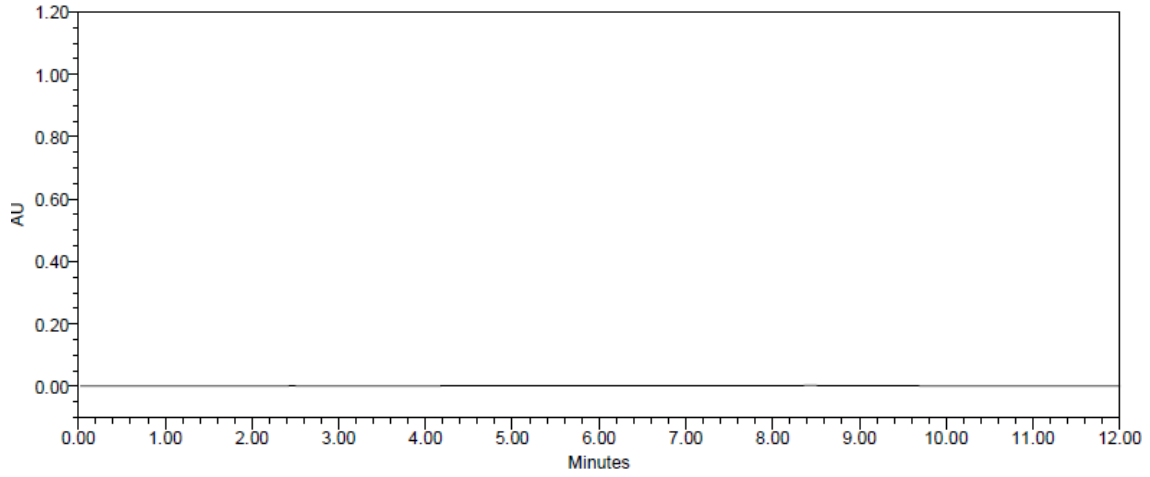
Şekil 3.11. Standart + plasebo + safsızlıklar çözeltisi pik saflığı kromatogram.

Şekil 3.11'de gösterilen standart+plasebo çözeltisi kromatografi için kullanılan değerler; CKlorhekzidin HCl=0.05 mg/ml, CBenzokain=0.04 mg/ml, CEnoksolon=0.03 mg/ml'dir.



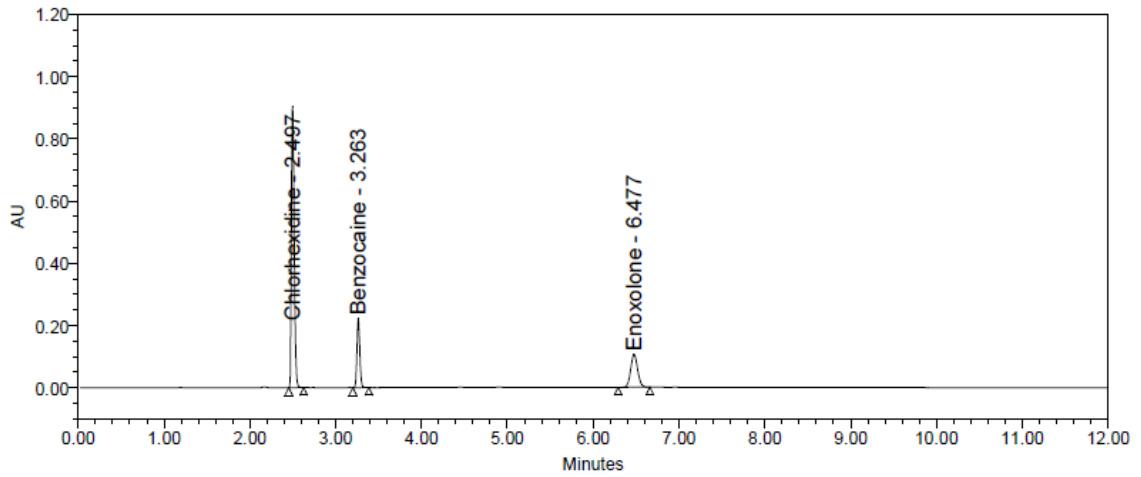
Şekil 3.12. Standart çözeltisi pik saflığı kromatogramı.

Şekil 3.12’de Standart çözeltisi pik saflığı gösterilmektedir.



Şekil 3.13. 18 α -glycyrrhetic acid çözeltisi pik saflığı kromatogramı.

Şekil 3.13’te α -glycyrrhetic acid çözeltisi pik saflığı gösterilmektedir.

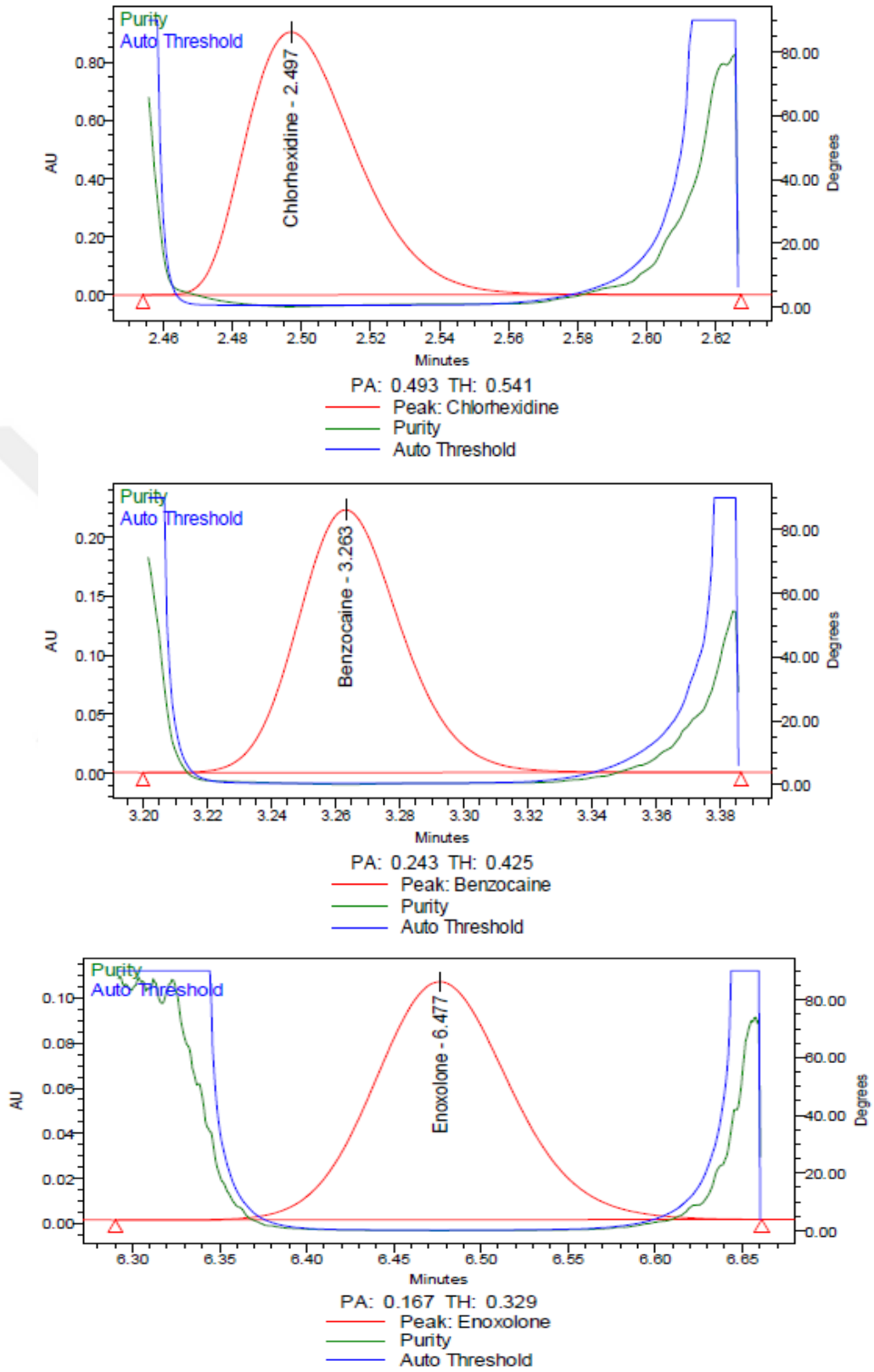


	Pik Adı	Pik Süresi	Alan	Saflık Açısı	Saflık Eşiği	Simetri Faktörü	Plaka sayısı	Ayrırma Gücü
1	Klorhekzidin	2.497	2030141	0.493	0.541	1.41036	2.81e+004	
2	Benzokain	3.263	510204	0.243	0.425	1.15366	4.67e+004	1.28e+001
3	Enoksolon	6.477	591465	0.167	0.329	1.01879	3.08e+004	3.11e+001

Şekil 3.14. Sistem uygunluk çözeltisi kromatogramı.

Şekil 3.14’te gösterilen sistem uygunluk çözeltisi kromatografisi için kullanılan değerler; CKlorhekzidin HCl=0.05 mg/ml, CBenzokain=0.04 mg/ml, CEnoksolon=0.03 mg/ml’dir.

Şekil 3.15’te Sistem uygunluk çözeltisi pik saflığı gösterilmektedir.



Şekil 3.15. Sistem uygunluk çözeltisi pik saflığı kromatogramı.

3.2. DOĞRULUK

○ Sonuç

Miktar tayini yöntemi için doğruluk kriteri geçerlidir. Bu yöntem için doğruluk kriteri belirlenmiştir. Bu sonuca göre, % 80, % 100 ve % 120 geri kazanım yeterlidir. Ortalama geri kazanım değeri Klorheksidin HCl için % 98.79, Benzokain için % 99.75 ve Enoksolon için % 100.08'dir. Bu değerler sınırlar içinde olduğu için Anzibel Pastil Miktar Tayini yöntemi doğruluk parametresine göre uygundur.

Çizelge 3.2'de Klorheksidin HCl çözeltisinin konsantrasyon ve geri kazanım değerleri gösterilmektedir.

Çizelge 3.2. Klorheksidin HCl çözeltisinin konsantrasyon ve geri kazanım.

Klorheksidin HCl	Hazırlanan Konsantrasyon (mg/ml)	Bulunan Konsantrasyon (mg/ml)	Geri Kazanım %
% 80	0.0403	0.0398	98.76
	0.0407	0.0400	98.28
	0.0415	0.0409	98.55
% 100	0.0543	0.0534	98.34
	0.0502	0.0497	99.00
	0.0501	0.0496	99.00
% 120	0.0609	0.0603	99.01
	0.0599	0.0592	98.83
	0.0599	0.0595	99.33
Ortalama % Geri Kazanım :			98.79
Geri Kazanım %'ın 95% Güven Aralığı Sınırları :			98.526-99.057

Çizelge 3.3'te Benzokain çözeltisinin konsantrasyon ve geri kazanım değerleri gösterilmektedir.

Çizelge 3.3. Benzokain çözeltisinin konsantrasyon ve geri kazanım değerleri.

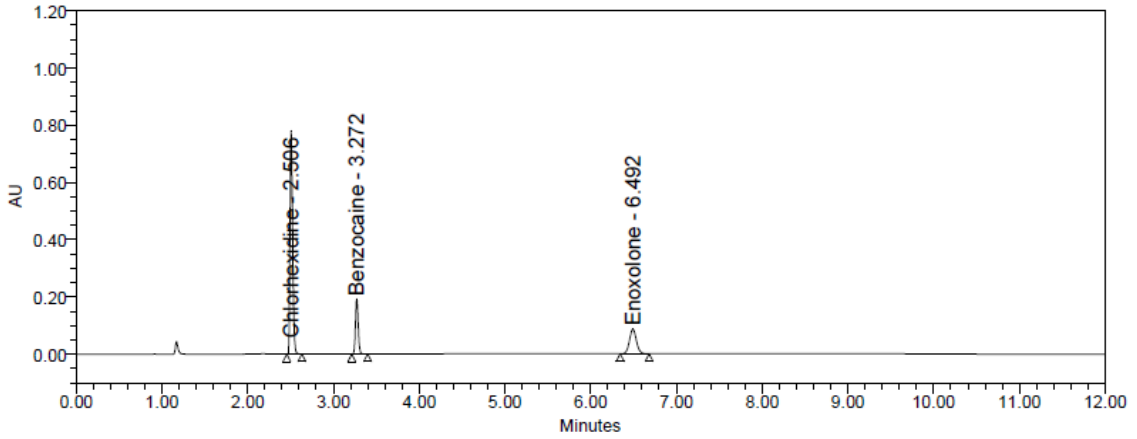
Benzokain	Hazırlanan Konsantrasyon (mg/ml)	Bulunan Konsantrasyon (mg/ml)	Geri Kazanım %
% 80	0.0334	0.0333	99.70
	0.0322	0.0321	99.69
	0.0324	0.0322	99.38
% 100	0.0397	0.0396	99.75
	0.0401	0.0398	99.25
	0.0403	0.0402	99.75
% 120	0.0483	0.0482	99.79
	0.0481	0.0482	100.21
	0.0481	0.0482	100.21
Ortalama % Geri Kazanım :			99.75
Geri Kazanım %'ın 95% Güven Aralığı Sınırları :			99.504-99.993

Çizelge 3.4'te Enoksolon çözeltisinin konsantrasyon ve geri kazanım değerleri gösterilmektedir.

Çizelge 3.4. Enoksolon çözeltisinin konsantrasyon ve geri kazanım değerleri.

Enoksolon	Hazırlanan konsantrasyon (mg/ml)	Bulunan konsantrasyon (mg/ml)	Geri Kazanım %
% 80	0.0238	0.0239	100.42
	0.0238	0.0236	99.16
	0.0238	0.0240	100.84
% 100	0.0306	0.0304	99.35
	0.0302	0.0301	99.67
	0.0305	0.0308	100.98
% 120	0.0362	0.0361	99.72
	0.0372	0.0373	100.27
	0.0372	0.0373	100.27
Ortalama % Geri Kazanım :			100.08
Geri Kazanım %'ın % 95 Güven Aralığı Sınırları :			99.585-100.566

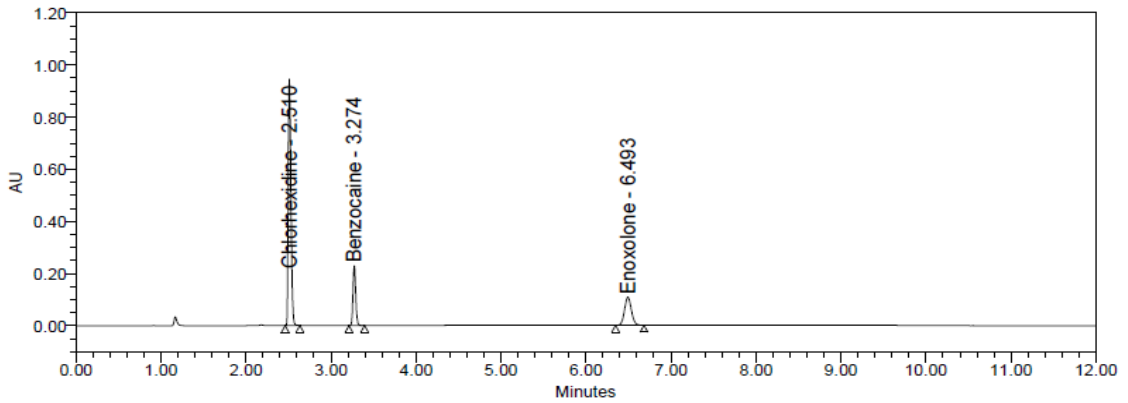
Şekil 3.16'da gösterilen doğruluk kromatografisi için kullanılan değerler, CKlorhekzidin HCl =0.040 mg/ml, CBenzokain =0.032 mg/ml, CEnoksolon =0.024 mg/ml'dir.



	Pik Adı	Pik Süresi	Alan
1	Klorhekzidin	2.506	1658756
2	Benzokain	3.272	428151
3	Enoksolon	6.492	478222

Şekil 3.16. Doğruluk kromatogramı (% 80).

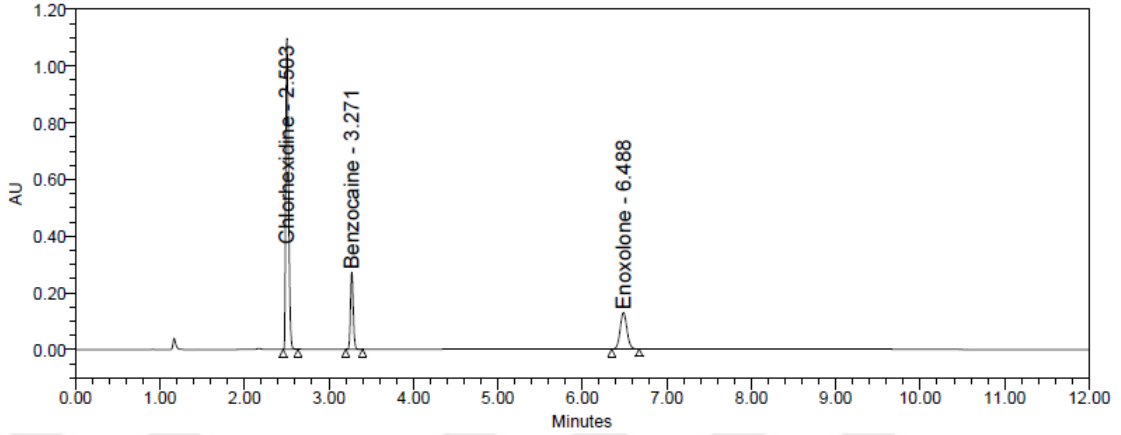
Şekil 3.17'de gösterilen doğruluk kromatogramı (%100). için kullanılan değerler; CKlorhekzidin HCl =0.050 mg/ml, CBenzokain=0.040 mg/ml, CEnoksolon=0.030 mg/ml'dir.



	Pik Adı	Pik Süresi	Alan
1	Klorhekzidin	2.510	2075342
2	Benzokain	3.274	513309
3	Enoksolon	6.493	603130

Şekil 3.17. Doğruluk kromatogramı (% 100).

Şekil 3.18’de gösterilen doğruluk kromatogramı (% 120) için kullanılan değerler, CKlorhekzidin HCl=0.060 mg/ml, CBenzokain=0.048 mg/ml, CEnoksolon=0.036 mg/ml’dir.



	Pik Adı	Pik Süresi	Alan
1	Klorhekzidin	2.503	2517674
2	Benzokain	3.271	620425
3	Enoksolon	6.488	722775

Şekil 3.18. Doğruluk kromatogramı (% 120).

3.3. KESİNLİK

3.3.1. Cihaz Kesinliği ya da Enjeksiyon Tekrarlanabilirliği

- Sonuç

Bağıl Standart Sapma % 0.85’ten fazla değildir. Yöntem uygundur.

Çizelge 3.5’te Klorhekzidin HCl standart çözeltisi kromatogram değerleri gösterilmektedir.

Çizelge 3.5. Klorhekzidin HCl standart çözeltisi kromatogram değerleri.

Enjeksiyon Sayısı	Alıkonma Zamanı	Alan
1	2.500	2029098
2	2.500	2029945
3	2.497	2029779
4	2.496	2030115

Çizelge 3.5. (devam). Klorhekzidin HCl standart çözeltisi kromatogram değerleri.

5	2.513	2028886
6	2.496	2019749
Ortalama	2.500	2027929
Standart Sapma	0.006	4036
Bağıl Standart Sapma	0.259	0.199
%95 Güven Aralığı Sınırları	2.494-2.507	2023693-2032165

Çizelge 3.6'da Benzokain standart çözeltisi kromatogram değerleri gösterilmektedir.

Çizelge 3.6. Benzokain standart çözeltisi kromatogram değerleri.

Enjeksiyon Sayısı	Alıkönma Zamanı	Alan
1	3.265	509161
2	3.265	509309
3	3.265	509579
4	3.262	509921
5	3.276	509677
6	3.266	507574
Ortalama	3.267	509204
Standart Sapma	0.005	842
Bağıl Standart Sapma	0.148	0.165
%95 Güven Aralığı Sınırları	3.261-3.272	508319-510088

Çizelge 3.7'de Benzokain standart çözeltisi kromatogram değerleri gösterilmektedir.

Çizelge 3.7. Enoksolon standart çözeltisi kromatogram değerleri.

Enjeksiyon Sayısı	Alıkönma Zamanı	Alan
1	6.480	590518
2	6.480	591540
3	6.478	590881
4	6.476	590188
5	6.492	590378

Çizelge 3.7. (devam). Enoksolon standart çözeltisi kromatogram değerleri.

6	6.481	588578
Ortalama	6.481	590347
Standart Sapma	0.006	989
Bağıl Standart Sapma	0.086	0.168
%95 Güven Aralığı Sınırları	6.475-6.487	589309-591385

Çizelge 3.8'de Klorhekzidin HCl test çözeltisi kromatogram değerleri gösterilmektedir.

Çizelge 3.8. Klorhekzidin HCl test çözeltisi kromatogram değerleri.

Enjeksiyon Sayısı	Alıkonma Zamanı	Alan
1	2.500	1960426
2	2.501	1959821
3	2.500	1960058
4	2.504	1962887
5	2.505	1966325
6	2.502	1966150
Ortalama	2.502	1962611
Standart Sapma	0.002	3016
Bağıl Standart Sapma	0.084	0.154
%95 Güven Aralığı Sınırları	2.500-2.504	1959446-1965776

Çizelge 3.9'da Benzokain test çözeltisi kromatogram değerleri gösterilmektedir.

Çizelge 3.9. Benzokain test çözeltisi kromatogram değerleri.

Enjeksiyon Sayısı	Alıkonma Zamanı	Alan
1	3.266	449871
2	3.265	449779
3	3.264	449964
4	3.269	450295
5	3.269	451216

Çizelge 3.9. (devam). Benzokain test çözeltisi kromatogram değerleri.

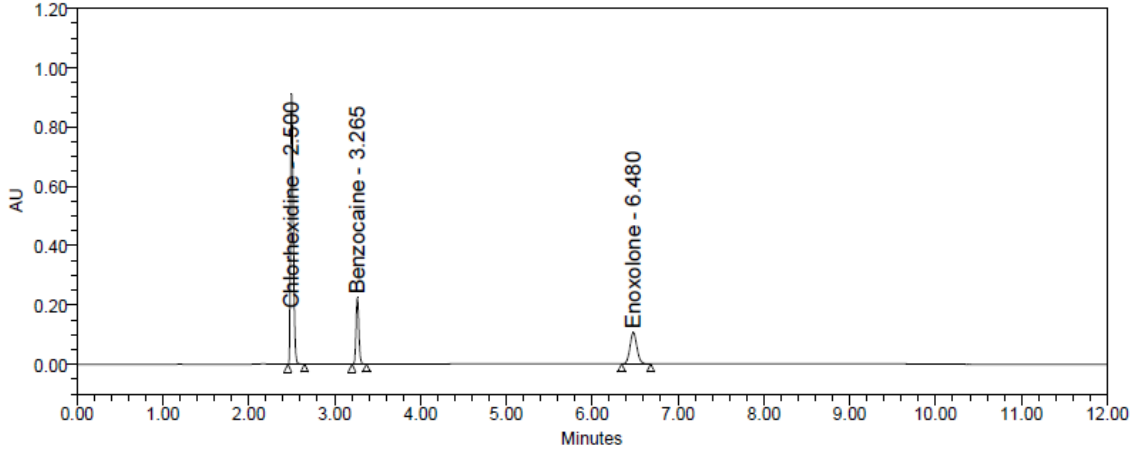
6	3.267	451035
Ortalama	3.267	450360
Standart Sapma	0.002	621
Bağıl Standart Sapma	0.063	0.138
%95 Güven Aralığı Sınırları	3.264-3.269	449709-451011

Çizelge 3.10'da Enoksolon test çözeltisi kromatogram değerleri gösterilmektedir.

Çizelge 3.10. Enoksolon Test çözeltisi kromatogram değerleri.

Enjeksiyon Sayısı	Alınma Zamanı	Alan
1	6.480	595364
2	6.479	595432
3	6.478	596018
4	6.485	596173
5	6.485	597940
6	6.483	597397
Ortalama	6.482	596387
Standart Sapma	0.003	1056
Bağıl Standart Sapma	0.047	0.177
%95 Güven Aralığı Sınırları	6.478-6.485	595279-597495

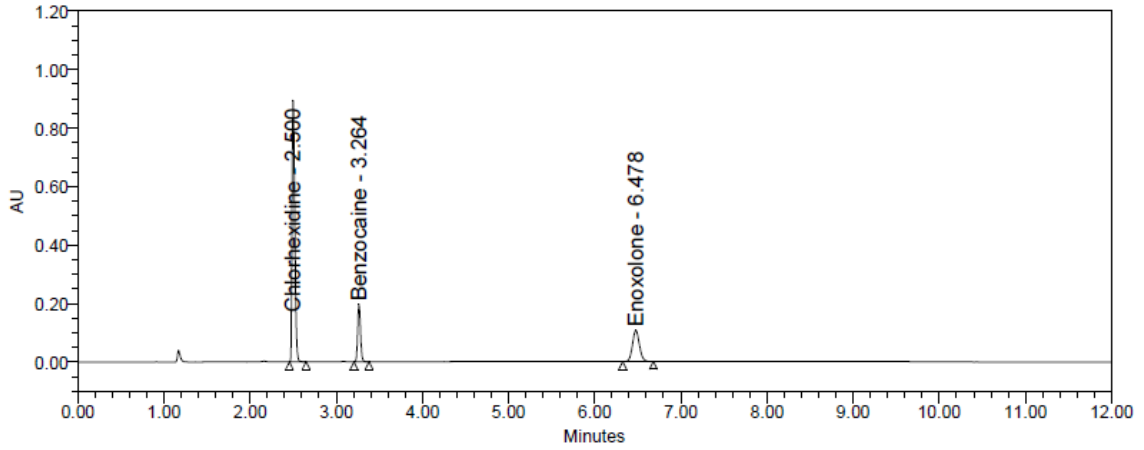
Şekil 3.19'da gösterilen kesinlik kromatogramı (standart) için kullanılan değerler; CKlorhekzidin HCl=0.05 mg/ml, CBenzokain=0.04 mg/ml, CEnoksolon=0.03 mg/ml'dir.



	Pik Adı	Pik Süresi	Alan
1	Klorhekzidin	2.500	2029098
2	Benzokain	3.265	509161
3	Enoksolon	6.480	590518

Şekil 3.19. Kesinlik kromatogramı (standart).

Şekil 3.20'de gösterilen kesinlik kromatogramı (standart) için kullanılan değerler; CKlorhekzidin HCl=0.05 mg/ml, CBenzokain=0.04 mg/ml, CEnoksolon=0.03 mg/ml'dir.



	Pik Adı	Pik Süresi	Alan
1	Klorhekzidin	2.500	1960058
2	Benzokain	3.264	449964
3	Enoksolon	6.478	596018

Şekil 3.20. Kesinlik kromatogramı (test).

3.3.2. Ara Kesinlik

Sonuç:

1 - 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 %2'den küçüktür.

2 - 12 analiz sonucunun bağıl standart sapma değeri %2'den küçüktür.

Çizelge 3.11'de Klorhekzidin HCl enjeksiyon sonucu değerleri gösterilmektedir.

Çizelge 3.11. Klorhekzidin HCl enjeksiyon sonucu değerleri.

Ara Kesinlik	Analist 1	Analist 2
	I.Cihaz (mg/pastil)	II.Cihaz (mg/pastil)
Numune 1	5.10	5.03
Numune 2	5.15	5.02
Numune 3	5.13	4.94
Numune 4	5.17	4.91
Numune 5	5.10	4.94
Numune 6	5.11	4.92
Ortalama (mg/pastil)	5.13	4.96
Bağıl standart sapma (%)	0.561	1.043
12 analiz sonucunun Bağıl standart sapma (%)	1.899	
%95 güven aralığı sınırları	4.983-5.104	

Çizelge 3.12'de Klorhekzidin HCl enjeksiyon sonucu değerleri gösterilmektedir.

Çizelge 3.12. Benzokain enjeksiyon sonucu değerleri.

Ara Kesinlik	Analist 1	Analist 2
	I. Cihaz (mg/pastil)	II. Cihaz (mg/pastil)
Numune 1	3.93	3.93
Numune 2	4.08	4.00
Numune 3	3.92	3.91
Numune 4	3.89	3.93
Numune 5	4.01	4.01

Çizelge 3.12. (devam). Benzokain enjeksiyon sonucu değerleri.

Numune 6	3.95	3.94
Ortalama (mg/pastil)	3.96	3.95
Bağlı standart sapma (%)	1.759	1.042
12 analiz sonucunun Bağlı standart sapma (%)	1.385	
%95 güven aralığı sınırları	3.924-3.993	

Çizelge 3.13'te Enoksolon enjeksiyon sonucu değerleri gösterilmektedir.

Çizelge 3.13. Enoksolon enjeksiyon sonucu değerleri.

Ara Kesinlik	Analist 1	Analist 2
	I.Cihaz (mg/pastil)	II.Cihaz (mg/pastil)
Numune 1	3.07	3.02
Numune 2	2.96	2.96
Numune 3	2.99	2.97
Numune 4	3.03	3.02
Numune 5	3.03	2.97
Numune 6	3.01	2.97
Ortalama (mg/pastil)	3.01	2.99
Bağlı Standart Sapma (%)	1.252	0.914
12 Analiz Sonucunun Bağlı Standart Sapma (%)	1.169	
%95 Güven Aralığı Sınırları	2.978-3.022	

3.4. DOĞRUSALLIK VE ÇALIŞMA ARALIĞI

Sonuç

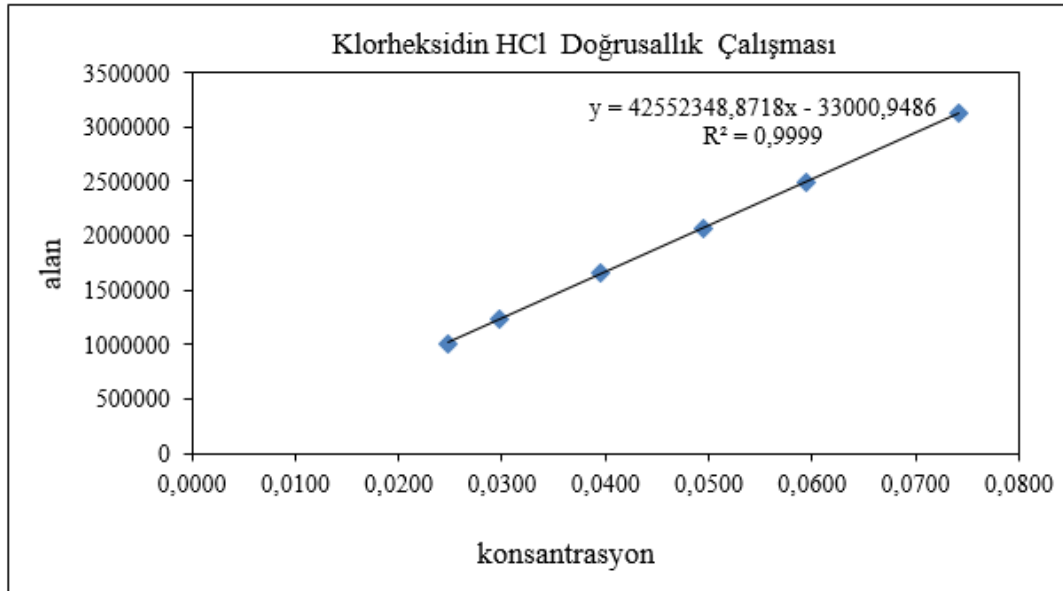
Yöntem miktar tayini testi için doğrusallık kriterine uyar. y-kesişi, % 100 seviyesindeki analit için elde edilen; Klorheksidin alanının % 1.60'ı , Benzokain alanının % 0.25'i ve Enoksolon alanının % 0.28'idir.

Çizelge 3.14'te Klorheksidin HCl konsantrasyona bağlı kromatogram değerleri gösterilmektedir.

Çizelge 3.14. Klorhekzidin HCl konsantrasyona bağlı kromatogram değerleri.

Çözelti Seviyesi	Klorhekzidin HCl Konsantrasyonu (mg/ml)	Enjeksiyonların Alan Ortalaması	Hesaplanan Alan
% 50	0.0248	1008428	1010330
% 60	0.0297	1216714	1239588
% 80	0.0396	1633286	1661161
% 100	0.0495	2049858	2065301
% 120	0.0594	2466429	2498812
% 150	0.0743	3091287	3126114
		Eğim : 42552348.8718	
		Kesişim : -33000.9486	
		R : 0.9999	
		R²: 0.9999	
		y = mx + n : y = 42552348.8718 x - 33000.9486	

Şekil 3.21’de Klorhekzidin HCl doğrusallık grafiği çizilir;



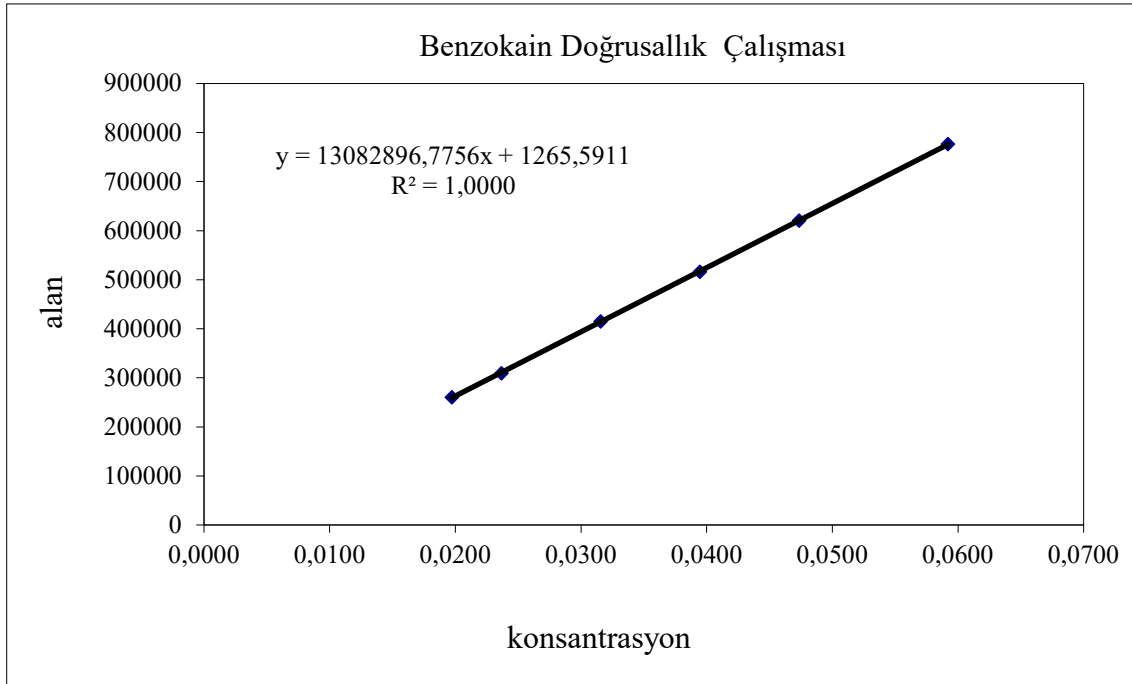
Şekil 3.21. Klorhekzidin HCl doğrusallık grafiği.

Çizelge 3.15’te Benzokain konsantrasyona bağlı kromatogram değerleri gösterilmektedir.

Çizelge 3.15. Benzokain konsantrasyona bağlı kromatogram değerleri.

Çözelti Seviyesi	Benzokain Konsantrasyonu (mg/ml)	3 Enjeksiyonun Alan Ortalaması	Hesaplanan Alan
% 50	0.0197	260696	259432
% 60	0.0237	309590	311065
% 80	0.0316	415333	414331
% 100	0.0395	516387	517598
% 120	0.0474	620758	620864
% 150	0.0592	776291	775764
Eğim :		13082896.7756	
Kesişim :		1265.5911	
R :		0.9999	
R²:		1.000	
y = mx + n :		y = 13082896.7756 x + 1265.5911	

Şekil 3.22’de Benzokain doğrusallık grafiği çizilir;



Şekil 3.22. Benzokain doğrusallık grafiği.

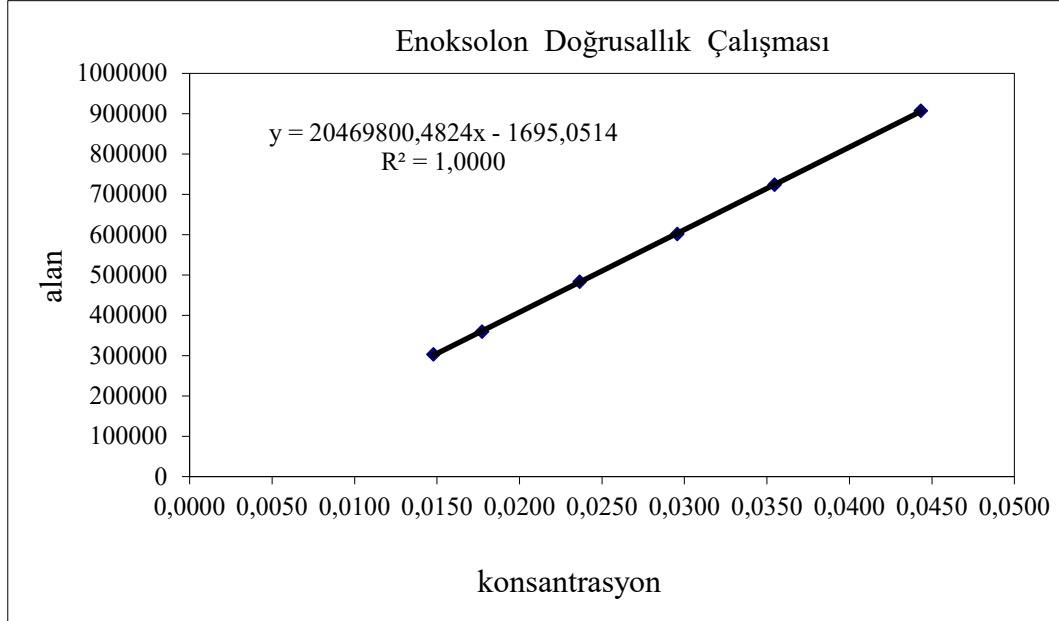
Çizelge 3.16’da Enoksolon konsantrasyona bağlı kromatogram değerleri

gösterilmektedir.

Çizelge 3.16. Enoksolon konsantrasyona bağlı kromatogram değerleri.

Çözelti Seviyesi	Enoksolon Konsantrasyonu (mg/ml)	3 Enjeksiyonun Alan Ortalaması	Hesaplanan Alan
% 50	0.0148	302796	300829
% 60	0.0177	359392	361334
% 80	0.0236	483295	482343
% 100	0.0296	601743	603353
% 120	0.0355	724093	724362
% 150	0.0443	906779	905877
		Eğim :	20469800.4824
		Kesişim :	-1695.0514
		R :	0.9999
		R²:	1.000
		y = mx + n :	y = 20469800.4824 x - 1695.0514

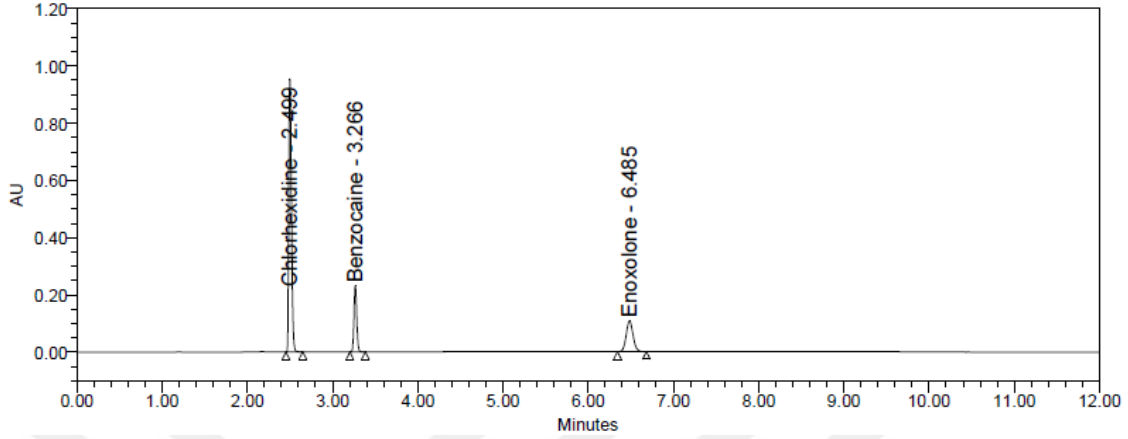
Şekil 3.23'te Enoksolon doğrusallık grafiği çizilir;



Şekil 3.23. Enoksolon doğrusallık grafiği.

Şekil 3.24'te gösterilen doğrusallık kromatogramı için kullanılan değerler;

CKlorhekzidin HCl=0.05 mg/ml, CBenzokain=0.04 mg/ml, CEnoksolon=0.03 mg/ml'dir.



	Pik Adı	Pik Süresi	Alan
1	Klorhekzidin	2.499	2064482
2	Benzokain	3.266	516492
3	Enoksolon	6.485	602105

Şekil 3.24. Doğrusallık kromatogramı.

3.5. GÜVENİLİRLİK

3.5.1. Çözelti Stabilesi

Sonuç: Standart ve test çözeltisi oda ve buzdolabı koşullarında 48 saat boyunca stabildir.

Çizelge 3.17'de Etkenlerin standart çözeltilerinin 5 °C'deki kromatogram değerleri gösterilmiştir.

Çizelge 3.17. Etkenlerin standart çözeltilerinin 5 °C'deki kromatogram değerleri.

	Başlangıç	6. saat	% Değişim	24. saat	% Değişim	48. saat	% Değişim
Klorhekzidin	2013661	2043706	1.492	2024488	0.538	2045103	1.561
Benzokain	504163	507395	0.641	505444	0.254	508539	0.868
Enoksolon	588461	597357	1.512	589606	0.195	596869	1.429

Çizelge 3.18’de Etkenlerin standart çözeltilerinin 25 °C’deki kromatogram değerleri gösterilmiştir.

Çizelge 3.18. Etkenlerin standart çözeltilerinin 25 °C’deki kromatogram değerleri.

	Başlangıç	6. saat	% Değişim	24. saat	% Değişim	48.saat	% Değişim
Klorhekzidin	2013661	2043256	1.470	2029781	0.801	2049892	1.799
Benzokain	504163	510778	1.312	507649	0.691	513950	1.941
Enoksolon	588461	590090	0.277	589197	0.125	596503	1.367

Çizelge 3.19’da Etkenlerin test çözeltilerinin 5 °C’deki kromatogram değerleri gösterilmiştir.

Çizelge 3.19. Etkenlerin test çözeltilerinin 5 °C’deki kromatogram değerleri.

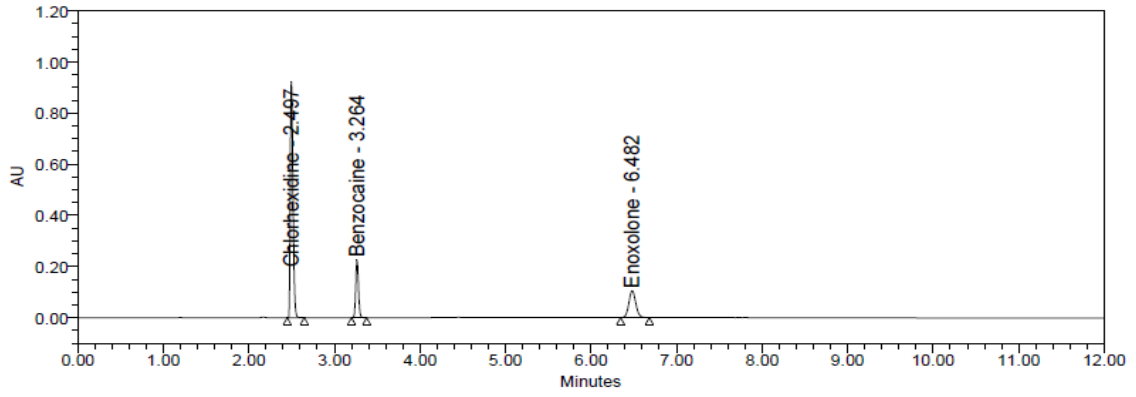
	Başlangıç	6. saat	% Değişim	24. saat	% Değişim	48.saat	% Değişim
Klorhekzidin	1942864	1953255	0.535	1970166	1.405	1970944	1.445
Benzokain	445658	446031	0.084	454462	1.975	453856	1.839
Enoksolon	592569	596624	0.684	601914	1.577	603581	1.858

Çizelge 3.20’de Etkenlerin test çözeltilerinin 25 °C’deki kromatogram değerleri gösterilmiştir.

Çizelge 3.20. Etkenlerin test çözeltilerinin 25 °C’deki kromatogram değerleri.

	Başlangıç	6. saat	% Değişim	24. saat	% Değişim	48.saat	% Değişim
Klorhekzidin	1942864	1980475	1.936	1924025	-0.970	1975799	1.695
Benzokain	445658	450934	1.184	450946	1.186	450704	1.132
Enoksolon	592569	603300	1.811	598906	1.069	603047	1.768

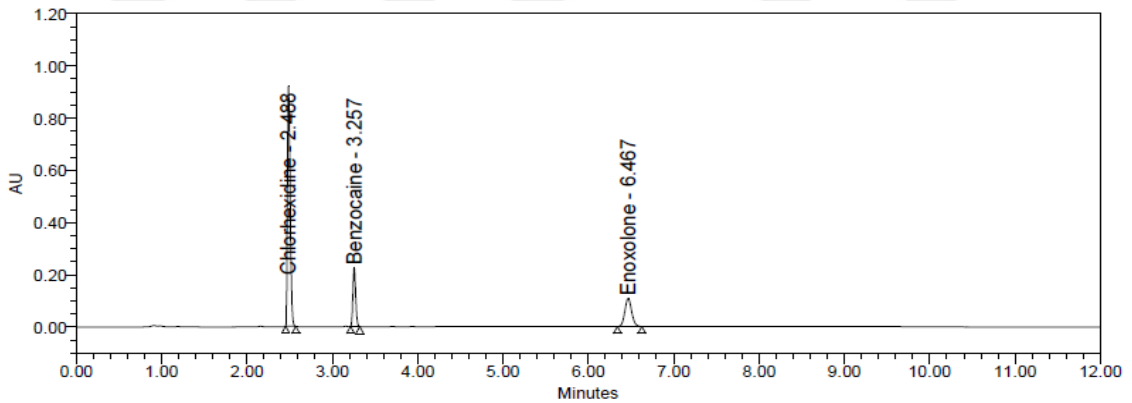
Şekil 3.25’te gösterilen çözelti stabilitesi standart çözelti kromatogramı (Başlangıç) için kullanılan değerler; CKlorhekzidin HCl=0.05 mg/ml, CBenzokain=0.04 mg/ml, CEnoksolon =0.03 mg/ml’dir.



	Pik Adı	Pik Süresi	Alan
1	Klorhekzidin	2.497	2010094
2	Benzokain	3.264	502659
3	Enoksolon	6.482	586437

Şekil 3.25. Çözelti stabilitesi standart çözelti kromatogramı (Başlangıç).

Şekil 3.26'da gösterilen Çözelti stabilitesi standart çözelti kromatogramı (48 saat – 5 °C). için kullanılan değerler; CKlorhekzidin HCl=0.05 mg/ml, CBenzokain=0.04 mg/ml, CEnoksolon=0.03 mg/ml'dir.

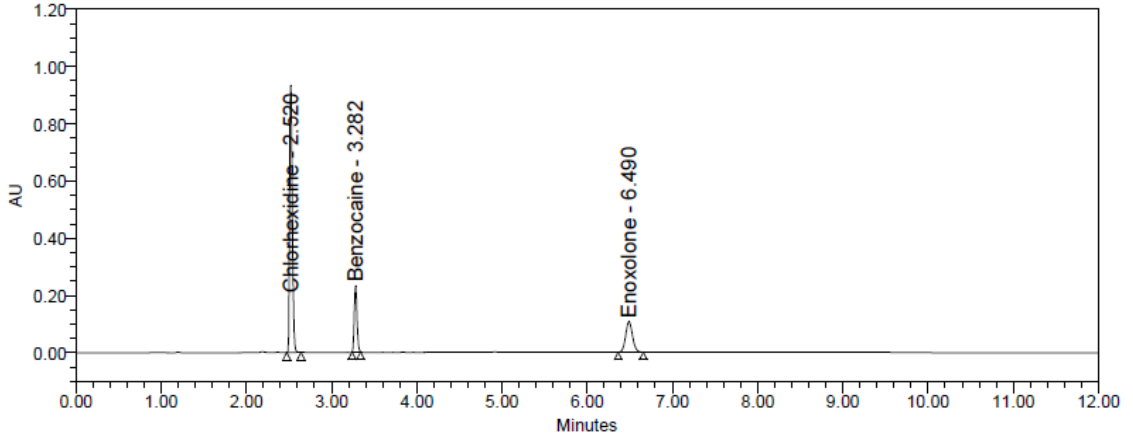


	Pik Adı	Pik Süresi	Alan
1	Klorhekzidin	2.488	2045103
2	Benzokain	3.257	508539
3	Enoksolon	6.467	596869

Şekil 3.26. Çözelti stabilitesi standart çözelti kromatogramı (48 saat – 5 °C).

Şekil 3.27'de gösterilen Çözelti stabilitesi standart çözelti kromatogramı (48 saat – 25 °C). için kullanılan değerler; CKlorhekzidin HCl =0.05 mg/ml, CBenzokain =0.04

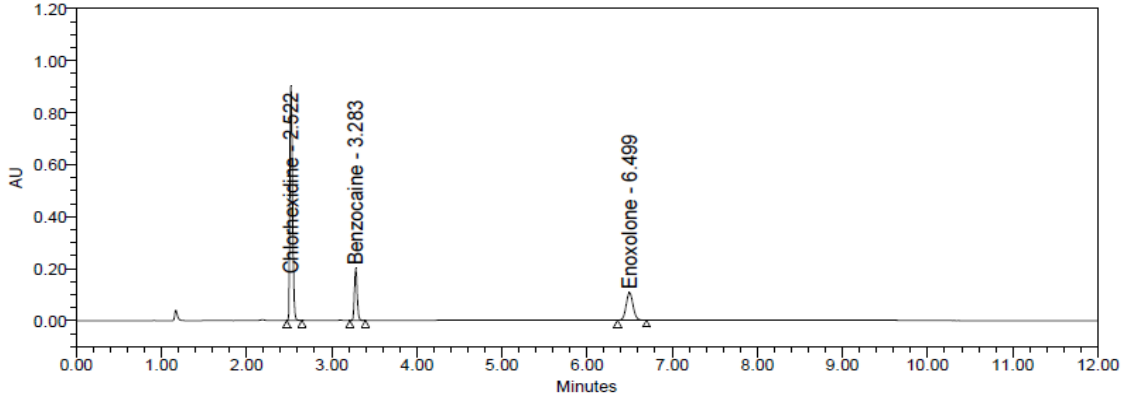
mg/ml, CEnoksolon =0.03 mg/ml'dir.



	Pik Adı	Pik Süresi	Alan
1	Klorhekzidin	2.520	2049892
2	Benzokain	3.282	513950
3	Enoksolon	6.490	596503

Şekil 3.27. Çözelti stabilitesi standart çözelti kromatogramı (48 saat – 25 °C).

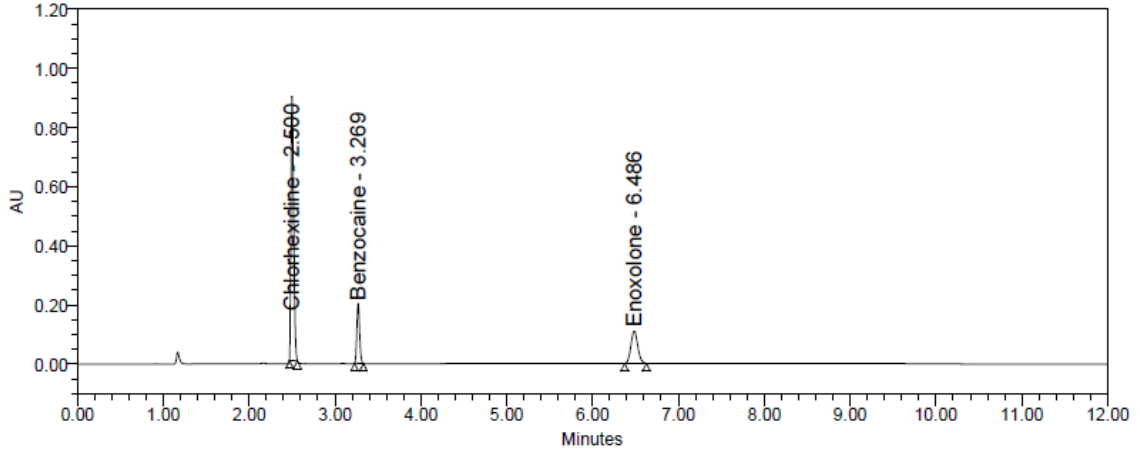
Şekil 3.28'de gösterilen Çözelti stabilitesi test çözeltisi kromatogramı (Başlangıç).için kullanılan değerler; CKlorhekzidin HCl=0.05 mg/ml, CBenzokain=0.04 mg/ml, CEnoksolon=0.03 mg/ml'dir.



	Pik Adı	Pik Süresi	Alan
1	Klorhekzidin	2.522	1939437
2	Benzokain	3.283	445102
3	Enoksolon	6.499	592804

Şekil 3.28. Çözelti stabilitesi test çözeltisi kromatogramı (Başlangıç).

Şekil 3.29'da gösterilen Çözelti stabilitesi test çözeltisi kromatogramı (48 saat - 5°C).için kullanılan değerler; CKlorhekzidin HCl=0.05 mg/ml, CBenzokain=0.04 mg/ml, CEnoksolon =0.03 mg/ml'dir.



	Pik Adı	Pik Süresi	Alan
1	Klorhekzidin	2.500	1970944
2	Benzokain	3.269	453856
3	Enoksolon	6.486	603581

Şekil 3.29. Çözelti stabilitesi test çözeltisi kromatogramı (48 saat – 5 °C).

3.5.2. Küçük Değişiklikler

3.5.2.1. Farklı Gradient Program

Sonuç: Başlangıç değerinden değişim % 2'den fazla değildir. Yöntem uygundur.

Çizelge 3.21'de Etkenlerin gradient program % 1 değişim değerleri gösterilmiştir.

Çizelge 3.21. Etkenlerin gradient program % 1 değişim değerleri.

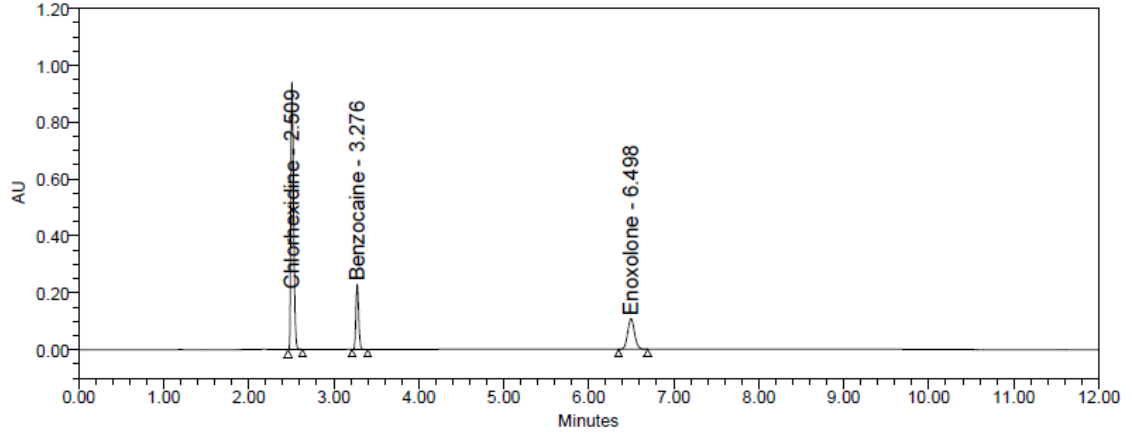
	Başlangıç		Gradient program-1		% Değişim	
	Alan	Simetri faktörü	Alan	Simetri faktörü	Alan	Simetri faktörü
Klorhekzidin	2083744	1.408	2083869	1.429	0.006	1.491
Benzokain	518450	1.155	518989	1.146	0.104	-0.779
Enoksolon	603711	1.086	604872	1.087	0.192	0.092

Çizelge 3.22’de Etkenlerin gradient program % 2 değışim değeri gösterilmiştir.

Çizelge 3.22. Etkenlerin gradient program % 2 değışim değeri.

	Başlangıç		Gradient program-2		% Değişim	
	Alan	Simetri faktörü	Alan	Simetri faktörü	Alan	Simetri faktörü
Klorhekzidin	2083744	1.408	2089505	1.406	0.276	-0.142
Benzokain	518450	1.155	518016	1.149	-0.084	-0.519
Enoksolon	603711	1.086	605674	1.086	0.325	0.000

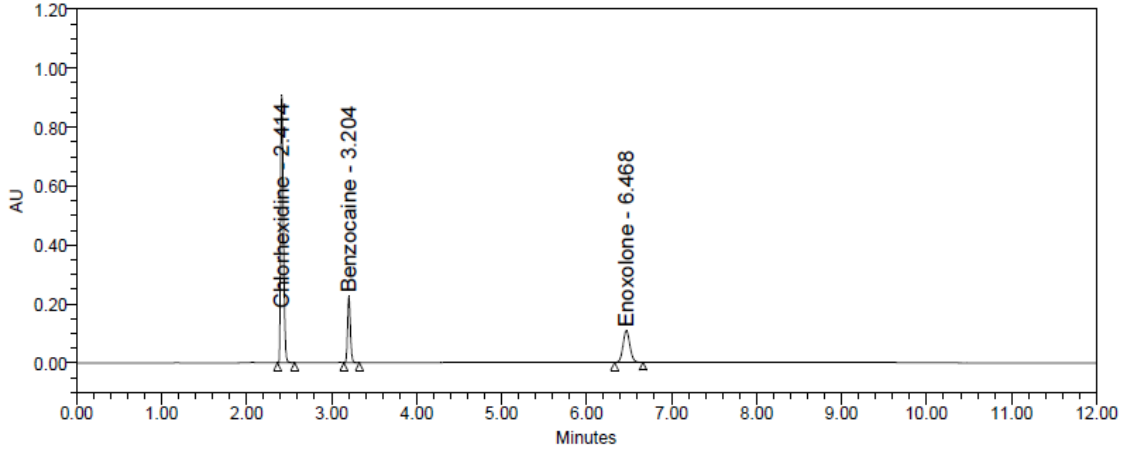
Şekil 3.30’da gösterilen Güvenilirlik kromatogramı (Başlangıç), için kullanılan değeri; CKlorhekzidin HCl=0.05 mg/ml, CBenzokain=0.04 mg/ml, CEnoksolon=0.03 mg/ml’dir.



	Pik Adı	Pik Süresi	Alan	Simetri Faktörü
1	Klorhekzidin	2.509	2082500	1.41e+000
2	Benzokain	3.276	518268	1.52e+000
3	Enoksolon	6.498	603577	1.09e+000

Şekil 3.30. Güvenilirlik kromatogramı (Başlangıç).

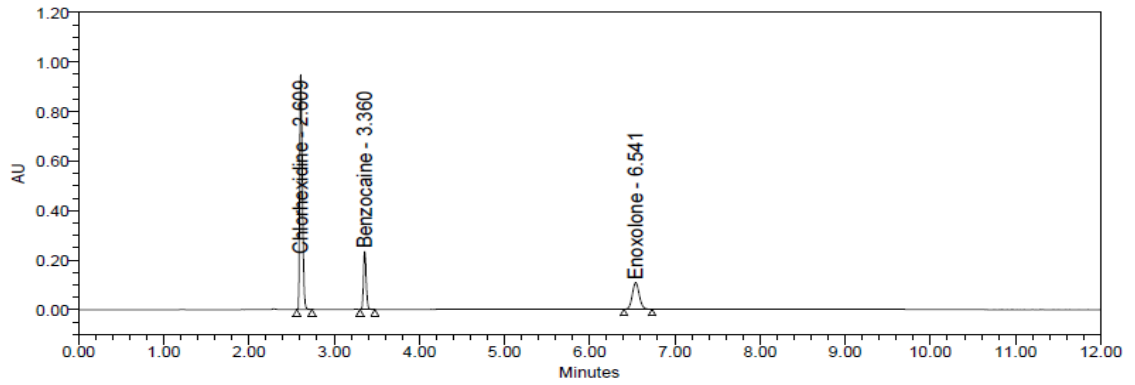
Şekil 3.31’de gösterilen Güvenilirlik kromatogramı (Gradient Program-1) için kullanılan değeri; CKlorhekzidin HCl =0.05 mg/ml, CBenzokain =0.04 mg/ml, CEnoksolon =0.03 mg/ml’dir.



	Pik Adı	Pik Süresi	Alan	Simetri Faktörü
1	Klorhekzidin	2.414	2084240	1.43e+000
2	Benzokain	3.204	519216	1.14e+000
3	Enoksolon	6.468	604790	1.09e+000

Şekil 3.31. Güvenilirlik kromatogramı (Gradient Program-1).

Şekil 3.32’de gösterilen Güvenilirlik kromatogramı (Gradient Program-2).için kullanılan değerler; CKlorhekzidin HCl =0.05 mg/ml, CBenzokain =0.04 mg/ml, CEnoksolon =0.03 mg/ml’dir.



	Pik Adı	Pik Süresi	Alan	Simetri Faktörü
1	Klorhekzidin	2.609	2087471	1.41e+000
2	Benzokain	3.360	517374	1.15e+000
3	Enoksolon	6.541	605398	1.09e+000

Şekil 3.32. Güvenilirlik kromatogramı (Gradient Program-2).

3.5.2.2. Farklı Akış Hızı

Sonuç: Başlangıç değerinden değişim % 2'den fazla değildir. Yöntem uygundur.

Çizelge 3.23'te Etkenlerin akış hızı 1,51 ml/dk % değişim değerleri gösterilmiştir.

Çizelge 3.23. Etkenlerin akış hızı 1,51 ml/dk % değişim değerleri.

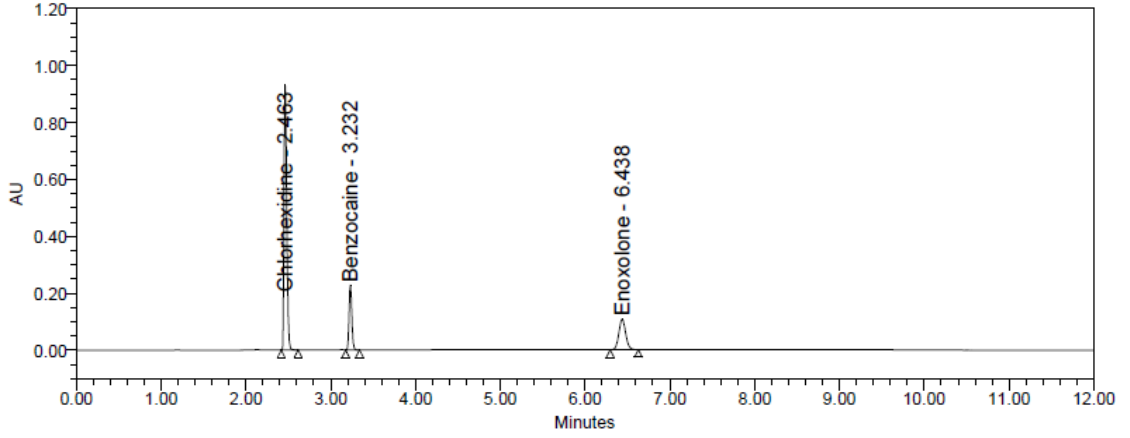
	Başlangıç		F= 1.51 ml/dk		% Değişim	
	Alan	Simetri faktörü	Alan	Simetri faktörü	Alan	Simetri faktörü
Klorheksidin	2083744	1.408	2067953	1.423	-0.758	1.065
Benzokain	518450	1.155	514382	1.151	-0.785	-0.346
Enoksolon	603711	1.086	600304	1.087	-0.564	0.092

Çizelge 3.24'te Etkenlerin akış hızı 1,49 ml/dk % değişim değerleri gösterilmiştir.

Çizelge 3.24. Etkenlerin akış hızı 1,49 ml/dk % değişim değerleri.

	Başlangıç		F= 1.49 ml/dk		% Değişim	
	Alan	Simetri faktörü	Alan	Simetri faktörü	Alan	Simetri faktörü
Klorheksidin	2083744	1.408	2100634	1.420	0.811	0.852
Benzokain	518450	1.155	522095	1.148	0.703	-0.606
Enoksolon	603711	1.086	608661	1.088	0.820	0.184

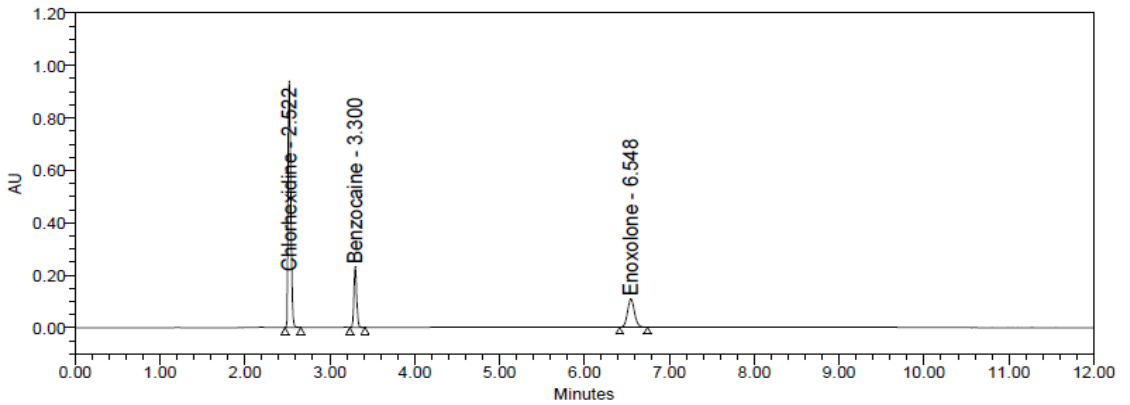
Şekil 3.33'te gösterilen Güvenilirlik kromatogramı (F=1.51 ml/dk). için kullanılan değerler; CKlorheksidin HCl =0.05 mg/ml, CBenzokain =0.04 mg/ml, CEnoksolon =0.03 mg/ml'dir.



	Pik Adı	Pik Süresi	Alan	Simetri Faktörü
1	Klorhekzidin	2.463	2068451	1.42e+000
2	Benzokain	3.232	514673	1.15e+000
3	Enoksolon	6.438	600150	1.09e+000

Şekil 3.33. Güvenilirlik kromatogramı (F=1.51 ml/dk).

Şekil 3.34'te gösterilen Güvenilirlik kromatogramı (F=1.49 ml/dk). için kullanılan değerler; CKlorhekzidin HCl =0.05 mg/ml, CBenzokain =0.04 mg/ml, CEnoksolon =0.03 mg/ml'dir.



	Pik Adı	Pik Süresi	Alan	Simetri Faktörü
1	Klorhekzidin	2.522	2100972	1.42e+000
2	Benzokain	3.300	522340	1.14e+000
3	Enoksolon	6.548	608592	1.09e+000

Şekil 3.34. Güvenilirlik kromatogramı (F=1.49 ml/dk).

3.5.2.3. Farklı Kolon Sıcaklığı

Sonuç: Başlangıç değerinden değişim % 2’den fazla değildir. Yöntem uygundur.

Çizelge 3.25’te Etkenlerin 23 °C sıcaklıktaki % değişim değerleri gösterilmiştir.

Çizelge 3.25. Etkenlerin 23 °C sıcaklıktaki % değişim değerleri.

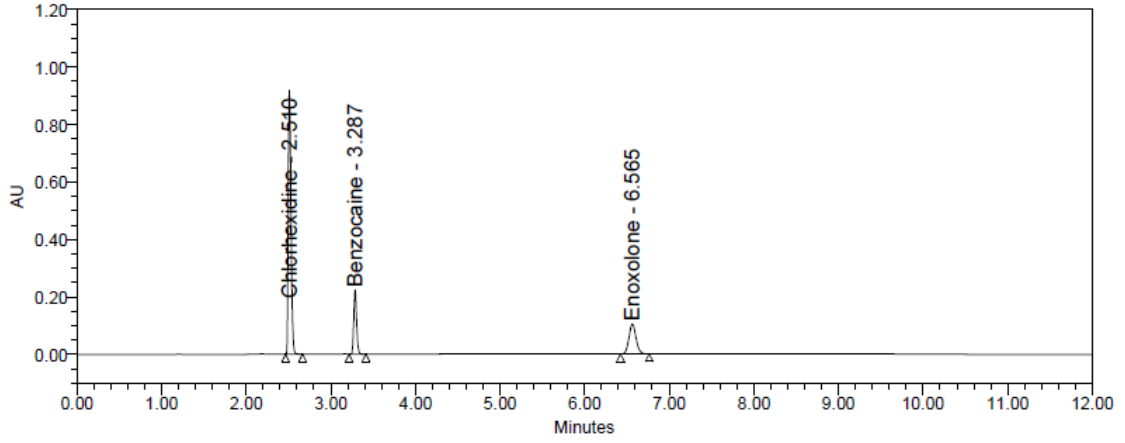
	Başlangıç		T=23°C		% Değişim	
	Alan	Simetri faktörü	Alan	Simetri faktörü	Alan	Simetri faktörü
Klorhekzidin	2083744	1.408	2084617	1.413	0.042	0.355
Benzokain	518450	1.155	518053	1.165	-0.077	0.866
Enoksolon	603711	1.086	603632	1.098	-0.013	1.105

Çizelge 3.26’da Etkenlerin 27 oC sıcaklıktaki % değişim değerleri gösterilmiştir.

Çizelge 3.26. Etkenlerin 27 °C sıcaklıktaki % değişim değerleri.

	Başlangıç		T=27°C		% Değişim	
	Alan	Simetri faktörü	Alan	Simetri faktörü	Alan	Simetri faktörü
Klorhekzidin	2083744	1.408	2085504	1.420	0.084	0.852
Benzokain	518450	1.155	520804	1.134	0.454	-1.818
Enoksolon	603711	1.086	604877	1.072	0.193	-1.289

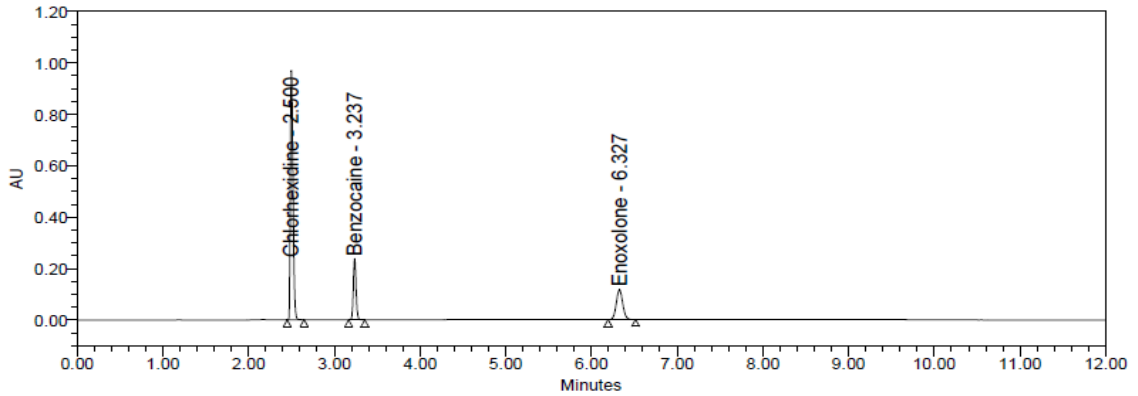
Şekil 3.35’te gösterilen Güvenilirlik kromatogramı (T=23 °C) için kullanılan değerler; CKlorhekzidin HCl=0.05 mg/ml, CBenzokain=0.04 mg/ml, CEnoksolon=0.03 mg/ml’dir.



	Pik Adı	Pik Süresi	Alan	Simetri Faktörü
1	Klorhekzidin	2.510	2084038	1.41e+000
2	Benzokain	3.287	518396	1.16e+000
3	Enoksolon	6.565	602850	1.09e+000

Şekil 3.35. Güvenilirlik kromatogramı (T=23 °C).

Şekil 3.36'da gösterilen Güvenilirlik kromatogramı (T=27 °C) için kullanılan değerler; CKlorhekzidin HCl=0.05 mg/ml, CBenzokain=0.04 mg/ml, CEnoksolon=0.03 mg/ml'dir.



	Pik Adı	Pik Süresi	Alan	Simetri Faktörü
1	Klorhekzidin	2.500	2084746	1.42e+000
2	Benzokain	3.237	524550	1.11e+000
3	Enoksolon	6.327	605553	1.073+000

Şekil 3.36. Güvenilirlik kromatogramı (T=27 °C)

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan çalışmalar sonucu 12 dakikalık enjeksiyon süresinde 3 etkeninde çıkartıldığı bir HPLC yöntemi yapılmış ve valide edilebilmiştir. Etkenlerin alıkonma zamanları,

Klorheksidin : \approx 2.5 dakika

Benzokain : \approx 3.2 dakika

Enoksolon : \approx 6.5 dakika

Olarak ayarlanmıştır.

Sistem uygunluk şartları, her bir etken için ;

- Alıkonma zamanı ve alanların Bağlı standart sapması % 0.85'ten küçük bulunmuştur
- Simetri faktörü Klorheksidin için 0.8-1.8 arasında, Benzokain ve Enoksolon için 0.8-1.5 arasında bulunmuştur.
- Teorik plaka sayıları 5000'den büyük bulunmuştur.
- Klorheksidin ile Benzokain'in arasındaki ayırışma 5'ten büyüktür.

Validasyon çalışmaları sonucunda,

a) Seçicilik parametresi için;

Klorheksidin, Benzokain, Enoksolon ve safsızlıklarının alıkonma zamanında başka bir pike rastlanmamıştır.

Klorheksidin, Benzokain, Enoksolon ve safsızlıkları için pik saflığı açısı pik saflığı eşliğinden küçüktür.

b) Doğruluk parametresi için;

Miktar tayini yöntemi için doğruluk kriteri geçerlidir. Bu yöntem için doğruluk kriteri belirlenmiştir. Bu sonuca göre, % 80, % 100 ve % 120 geri kazanım yeterlidir. Ortalama geri kazanım değeri Klorheksidin HCl için % 98.79, Benzokain için % 99.75 ve Enoksolon için % 100.08'dir. Bu değerler sınırlar içinde olduğu için Anzibel Pastil Miktar Tayini yöntemi doğruluk parametresine göre uygundur.

c) Kesinlik parametresi için;

Enjeksiyon Tekrarlanabilirliği: Bağıl Standart Sapma % 0.85'ten fazla değildir. Yöntem uygundur.

Ara Kesinlik

A- 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 % 2'den küçüktür.

B- 12 analiz sonucunun bağıl standart sapma değeri % 2'den küçüktür.

d) Doğrusallık parametresi için;

Yöntem miktar tayini testi için doğrusallık kriterine uyar. y-kesişimi, % 100 seviyesindeki analit için elde edilen; Klorheksidin alanının % 1.60'ı, Benzokain alanının % 0.25'i ve Enoksolon alanının % 0.28'idir.

e) Güvenilirlik parametresi için;

Çözelti stabilitesi: Başlangıç değerinden değişim % 2.0'den fazla değildir. Yöntem uygundur.

Küçük Değişiklikler; Simetri faktörü ve alandaki değişim Başlangıç değerinin % 2'den fazla değildir. Yöntem uygundur.

5. KAYNAKLAR

- [1] RxMediaPharma, *Bilgisayar Programı*, İnteraktif İlaç Bilgi Kaynağı, 2017.
- [2] T. Personen, J. Holmalahti and J. Pohjola, "Determination of chlorhexidine in saliva using high-performance liquid chromatography," *Journal of Chromatography and Biomedical Applications*, vol. 665, no. 1, pp. 222-225, 1995.
- [3] L. Havlíková, L. Matyssová, L. Nováková, R. Hájková and P. Solich, "HPLC determination of chlorhexidine gluconate and *p*-chloroaniline in topical ointment," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 43, pp. 1169-1173, 2007.
- [4] Y. Ha and A. P. Cheung, "New stability-indicating high performance liquid chromatography assay and proposed hydrolytic pathways of chlorhexidine," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 14, pp. 1327-1334, 1996.
- [5] F. Fiorentino, M. Corrêa, H. Regina and N. Salgado, "Analytical Methods for the Determination of Chlorhexidine: A Review," *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, vol. 40, no.2, pp. 89-101, 2010.
- [6] L. R. Paschoal and W. A. Ferreira, "Simultaneous determination of benzocaine and cetylpyridinium chloride in tablets by first-derivative spectrophotometric method," *Il Farmaco*, vol. 55, pp. 687-693, 2000.
- [7] P. P. Lozano, E. G. Montoya, A. Orriols, M. Minarro, J. R. Tico and J. M. Sune-Negre. "A new validated method for the simultaneous determination of benzocaine, propylparaben and benzyl alcohol in a bioadhesive gel by HPLC," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 39, pp. 920-927, 2005.
- [8] H. A. Merey, "Simple spectrophotometric methods for the simultaneous determination of antipyrine and benzocaine," *Bulletin of Faculty of Pharmacy*, vol. 54, pp. 181-189, 2016.
- [9] H. A. Merey and H. E. Zaazaa, "Validated simultaneous determination of antipyrine and benzocaine HCl in the presence of benzocaine HCl degradation product," *Royal Society of Chemistry: Analytical Methods*, vol. 6, pp. 6044-6050, 2014.
- [10] S. Esmaeili, F. Naghibi, M. Mosaddegh and N. Nader, "Determination of 18 β -Glycyrrhetic Acid in Glycyrrhiza glabra extract by HPLC," *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, vol. 2, pp. 137-141, 2006.
- [11] V. Andrisano, V. Cavrini and D. Bonazzi, "HPLC determination of 18 β -glycyrrhetic and glycyrrhizic acids in toothpastes after solid phase extraction," *Chromatographia*, vol. 35, no. 3, pp. 167-172, 1993.
- [12] Anonim. (2017, 12 Haziran). [Online]. Erişim: <http://gidaerge.akdeniz.edu.tr/cihazlar.i32.yuksek-performansli-sivi-kromatografisi-hplc->
- [13] Anonim. (2017, 12 Haziran). [Online]. Erişim: <http://biyokure.org/hplc/5384/>

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Cumhur ÖKÇELİK
Doğum Tarihi ve Yeri : 29.10.1984- MALATYA
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : cokcelik@hotmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Y. Lisans	Analitik Kimya	Düzce Üniversitesi	2018
Lisans	Kimya Bölümü	İnönü Üniversitesi	2009
Lise	Fen Bilimleri	Malatya Sümer Lisesi	2001