

T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI



**ÖLÇÜLÜ DOZ İNHALASYONU ÜRÜNLERİNDE SIZABİLEN SAFSIZLIK
OLARAK YAĞ ASİTLERİNİN YÜKLÜ AEROSOL DEDEKTÖRLÜ YÜKSEK
PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ İLE BELİRLENMESİ**

SİNEM GÖRÜR

DOKTORA TEZİ

Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Turgut KILIÇ (Tez Danışmanı)
Prof. Dr. Ahmet Ceyhan GÖREN
Prof. Dr. Akın AZİZOĞLU
Prof. Dr. Onur TURHAN
Doç. Dr. Sema ÇARIKÇI

BALIKESİR, OCAK - 2025

ETİK BEYAN

Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak tarafımda hazırlanan “**Ölçülü Doz İnhalasyonu Ürünlerinde Sızabilen Safsızlık Olarak Yağ Asitlerinin Yüklü Aerosol Dedektörlü Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ile Belirlenmesi**” başlıklı tezde;

- Tüm bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Kullanılan veriler ve sonuçlarda herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Tüm bilgi ve sonuçları bilimsel araştırma ve etik ilkelere uygun şekilde sunduğumu,
- Yararlandığım eserlere atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,

beyan eder, aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Sinem GÖRÜR

ÖZET

ÖLÇÜLÜ DOZ İNHALASYONU ÜRÜNLERİNDE SIZABİLEN SAFSIZLIK OLARAK YAĞ ASİTLERİNİN YÜKLÜ AEROSOL DEDEKTÖRLÜ YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ İLE BELİRLENMESİ

DOKTORA TEZİ

SİNEM GÖRÜR

BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. TURGUT KILIÇ)

BALIKESİR, OCAK - 2025

Leachable çalışması için genel bir metot bulunmamakta olup, bu tez çalışması ile ilaç endüstrisinde ölçülü doz inhalasyonu olan bir ilaçta safsızlık olabilecek yağ asitleri analizi için yeni bir HPLC/CAD yöntemi geliştirilmesi ve geliştirilen bu metodun valide edilmesi amaçlanmaktadır.

Bu çalışmada ürünün valf kısmından sızabilecek yağ asitlerinin (miristik asit, linoleik asit, palmitik asit, oleik asit, elaidik asit, stearik asit, arakidik asit) leachable çalışmaları HPLC/CAD sisteminde yapılmış olup metot geliştirme aşamasında metot parametrelerinde, cihaz ve dedektör parametrelerinde değişimler yapılarak validasyona başlanacak tüm parametreler belirlenmiştir. Geliştirilen metodun validasyonunda; seçicilik (spesifiklik), doğrusallık (linearite) ve çalışma aralığı, LOD (Tespit Limiti) ve LOQ (Tayin Alt Limiti), doğruluk (geri kazanım), kesinlik (tekrarlanabilirlik-ara kesinlik), sağlamlık, stabilite parametreleri uygulanmıştır.

Geliştirilen analitik metotla kromatografik ayırmda sabit faz olarak C18 kolon, hareketli faz olarak ise mobil faz A (1000.0 mL saf su içerisine 0.5 mL formik asit) ve mobil faz B (1000.0 mL asetonitril içerisine 0.5 mL formik asit)' den oluşan gradient sistem kullanılmıştır. Validasyonda ise seçicilik parametresi ile metodun seçiciliği doğrulanmıştır, LOD ve LOQ değerleri belirlenmiştir; doğrusallık parametresiyle LOQ ile % 150 konsantrasyonları arasında sonuçların doğrusal olduğu gösterilmiştir; doğruluk parametresiyle geri kazanım elde edilmiştir; kesinlik parametresiyle tekrarlanabilir sonuçlar elde edilmiştir. Laboratvar içi kesinlik çalışmasıyla başka bir analist tarafından analiz tekrarlandığında benzer sonuçlar bulunmuştur. Sağlamlık parametresiyle formik asit miktarı 0.5 mL/L \pm % 5 ve kolon sıcaklığı 50°C \pm 2°C ayarlandığında sistem uygunluk şartları sağlanmıştır. Stabilite parametresi 10°C' de standart çözeltisi 48 saat; numune çözeltisi için 3 saat belirlenmiştir.

Sonuç olarak bu çalışmayla leachable olan yağ asitlerinin analizi için valide edilmiş bir metot elde edilmiştir.

ANAHTAR KELİMELELER: Ölçülü doz inhalasyon, sızabilen safsızlık, yağ asitleri, validasyon.

ABSTRACT

DETERMINATION OF LEACHABLE FATTY ACIDS IN METERED DOSE INHALATION PRODUCTS BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY EQUIPPED WITH CHARGED AEROSOL DETECTOR

**PH. D THESIS
SİNEM GÖRÜR**

**BALIKESİR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE
CHEMISTRY
(SUPERVISOR: PROF. DR. TURGUT KILIÇ)**

BALIKESİR, JANUARY - 2025

There is no universal method for leachable studies, and this thesis aims to develop a new HPLC/CAD method for the analysis of fatty acids, which could be potential impurities in a metered-dose inhalation drug in the pharmaceutical industry, and to validate the developed method.

In this study, the leachable analysis of fatty acids (myristic acid, linoleic acid, palmitic acid, oleic acid, elaidic acid, stearic acid, arachidic acid) that might leak from the valve part of the product was carried out using an HPLC/CAD system. During the method development phase, changes were made to method parameters, device and detector settings to determine all parameters required for validation. For the validation of the developed method, the following parameters were applied: selectivity (specificity), linearity and working range, LOD (limit of detection) and LOQ (limit of quantitation), accuracy (recovery), precision (repeatability-intermediate precision), robustness, and stability.

For the chromatographic separation with the developed analytical method, a C18 column was used as the stationary phase, and a gradient system consisting of mobile phase A (0.5 mL formic acid in 1000.0 mL of purified water) and mobile phase B (0.5 mL formic acid in 1000.0 mL of acetonitrile) was used as the mobile phase. During validation, the selectivity parameter confirmed the method's specificity, LOD and LOQ values were determined, and the linearity parameter demonstrated that the results were linear between LOQ and 150% concentrations. The accuracy parameter achieved recovery results, and the precision parameter ensured repeatable results. An intra-laboratory precision study showed that similar results were obtained when another analyst performed the analysis. With the robustness parameter, the system suitability conditions were met when the formic acid amount was adjusted to 0.5 mL/L \pm 5% and the column temperature to 50°C \pm 2°C. The stability parameter results showed that the standard solution was stable for 48 hours at 10°C, and the sample solution was stable for 3 hours at 10°C.

In conclusion, a validated method was obtained for the analysis of leachable fatty acids through this study.

KEYWORDS: Metered dose inhalation, leachable, fatty acids, validation.

Science Code / Codes: 20114, 20102.

Page Number : 103

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİL LİSTESİ	v
TABLO LİSTESİ	viii
SEMBOL LİSTESİ	ix
ÖNSÖZ	x
1. GİRİŞ	1
1.1 Extractables, Leachables	1
1.2 Yağ Asitleri	7
1.2.1 Yağ Asitlerinin Adlandırılması	7
1.2.1.1 Doymuş Yağ Asitleri	9
1.2.1.2 Doymamış Yağ Asitleri	10
1.3 HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi)	13
1.3.1 HPLC Cihazı ve HPLC Donanımı	14
1.3.1.1 Pompa (Çözücü Dağıtma Sistemi)	14
1.3.1.2 Kolonlar	14
1.3.1.3 Dedektörler	14
1.3.2 HPLC' de Temel Parametreler	16
1.3.2.1 Alıkonma Zamanı (Retention time)	16
1.3.2.2 Bağıl Alıkonma (Relative Retention)	16
1.3.2.3 Kapasite Faktörü (k')	16
1.3.2.4 Kolon Etkinliğini Belirleme	17
1.3.2.5 Kuyruklanma Faktörü (T)	17
1.3.2.6 Kromatografik Rezolüsyon	17
1.4 Analitik Metot Validasyon	18
1.4.1 Analitik Metot Validasyon Parametreleri	19
1.4.1.1 Seçicilik	21
1.4.1.2 LOD (Tespit Limiti) ve LOQ (Tayin Limiti)	21
1.4.1.3 Çalışma (Ölçüm) Aralığı ve Doğrusallık (Linearite)	22
1.4.1.4 Doğruluk	22
1.4.1.5 Kesinlik (Tekrarlanabilirlik)	23
1.4.1.6 Sağlamlık	23
1.4.1.7 Stabilité	24
2. DENEYSEL BÖLÜM	25
2.1 Materyal ve Yöntem	25
2.1.1 Materyal	25
2.1.2 Kullanılan Çözeltiler	27
2.1.2.1 Standart Çözelti Hazırlığı	27
2.1.2.2 Numune Çözelti Hazırlığı	27
2.1.3 Hesaplama	27
2.1.4 Limitler	27
2.1.6 Sistem Uygunluk Şartları	28

2.1.7 Standart ve Reaktif Bilgileri.....	28
2.2 Yöntemin Validasyonu	29
2.2.1 Metot Geliştirme	29
2.2.1.1 Sistemde İlk Deneme Enjeksiyonu.....	29
2.2.1.2 Standart Konsantrasyonu ve Mobil Faz Değişimi.....	31
2.2.1.3 Standart Konsantrasyonu, Mobil Faz Oran ve Enjeksiyon Hacmi Denemesi.....	33
2.2.1.4 Standart Konsantrasyon ve Enjeksiyon Hacim Deneme.....	34
2.2.1.5 S/N Denemeleri	35
2.2.1.6 Gradient Sistem Denemeleri	35
2.2.2 Yöntem Validasyon Parametreleri	36
2.2.2.1 Seçicilik.....	36
2.2.2.2 Doğrusallık	39
2.2.2.3 Çalışma Aralığı.....	41
2.2.2.4 LOD (Tespit Limiti)	41
2.2.2.5 LOQ (Nicelik Sınırı)	42
2.2.2.6 Doğruluk.....	42
2.2.2.7 Kesinlik	44
2.2.2.8 Tekrarlanabilirlik.....	44
2.2.2.9 Ara Kesinlik	45
2.2.2.10 Sağlamlık.....	46
2.2.2.11 Stabilite.....	46
2.2.2.12 Sistem Uygunluk	47
3. BULGULAR.....	48
3.1 Metot Geliştirme Sonuçları.....	48
3.1.1 Sistemde İlk Enjeksiyon.....	48
3.1.2 Standart Konsantrasyonu ve Mobil Faz Değişimi	48
3.1.2.1 Standart Konsantrasyonu ve Mobil Faz Oran Denemesi	53
3.1.2.2 Standart Konsantrasyon ve Enjeksiyon Hacim Deneme.....	53
3.1.2.3 S/N Denemeleri	54
3.1.2.4 Gradient Sistem Denemeleri	56
3.1.3 Yöntem Validasyon Parametreleri	57
3.1.3.1 Seçicilik.....	57
3.1.3.2 Doğrusallık	64
3.1.3.3 Çalışma Aralığı.....	78
3.1.3.4 LOD (Tespit Limiti)	79
3.1.3.5 LOQ (Nicelik Sınırı)	80
3.1.3.6 Doğruluk.....	81
3.1.3.7 Kesinlik	85
3.1.3.8 Tekrarlanabilirlik.....	85
3.1.3.9 Ara Kesinlik	86
3.1.3.10 Sağlamlık.....	88
3.1.3.11 Stabilite.....	91
3.1.3.12 Sistem Uygunluk	94
4. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	98
5. KAYNAKLAR	100
ÖZGEÇMİŞ	104

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1. 1: Extractable ve leachable tanımlarına örnek	2
Şekil 1. 2: Extractable ve leachable ilişkisi.....	2
Şekil 1. 3: Tablet paketleme sistemi	3
Şekil 1. 4: Çalışılan inhalasyon ürününün hem paketi hem içerik görünümü	4
Şekil 1. 5: Extractable ve leachable için analiz yöntemleri	6
Şekil 1. 6: Yağ Asitlerinin Yapısı	7
Şekil 1. 7: α -Linolenik asit	8
Şekil 1. 8: 9,12-Otadekadienoik (linoleik) asit	8
Şekil 1. 9: Miristik asit, palmitik asit, stearik asit ve arakidik asit yapıları	10
Şekil 1. 10: Oleik, linoleik ve linolenik asit üç boyutlu yapıları.....	12
Şekil 1. 11: Oleik, oleik ve elaidik asit cis, trans gösterimi	13
Şekil 2. 1: Thermo markalı CA dedektörlü HPLC.....	25
Şekil 3. 1: İlk standart kromatografi	48
Şekil 3. 2: Blank (çözücü) kromatografi	49
Şekil 3. 3: Standart karışım kromatografi	49
Şekil 3. 4: Miristik asit kromatografi	50
Şekil 3. 5: Linoleik asit kromatografi	50
Şekil 3. 6: Palmitik asit kromatografi	51
Şekil 3. 7: Oleik asit kromatografi	51
Şekil 3. 8: Elaidik asit kromatografi	52
Şekil 3. 9: Stearik asit kromatografi.....	52
Şekil 3. 10: Arakidik asit kromatografi.....	53
Şekil 3. 11: Standard karışım kromatografi	53
Şekil 3. 12: Standard karışım kromatografi	54
Şekil 3. 13: Standard karışım kromatografi	54
Şekil 3. 14: Standard karışım kromatografi	55
Şekil 3. 15: Standart karışım kromatografi	56
Şekil 3. 16: Standard karışım kromatografi	56
Şekil 3. 17: Blank kromatografi	59
Şekil 3. 18: Miristik asit kromatografi	59
Şekil 3. 19: Linoleik asit kromatografi	60
Şekil 3. 20: Palmitik asit kromatografi	60
Şekil 3. 21: Oleik asit kromatografi	61
Şekil 3. 22: Elaidik asit kromatografi	61
Şekil 3. 23: Stearik asit kromatografi.....	62
Şekil 3. 24: Arakidik asit kromatografi.....	62
Şekil 3. 25: Standart karışım kromatografi	63
Şekil 3. 26: Ekim yapılmamış numune kromatografi	63
Şekil 3. 27: Ekim yapılmış numune kromatografi	64
Şekil 3. 28: Miristik asit için doğrusallık sonuçları	65
Şekil 3. 29: Linoleik asit için doğrusallık sonuçları.....	67
Şekil 3. 30: Palmitik asit için doğrusallık sonuçları.....	69
Şekil 3. 31: Oleik asit için doğrusallık sonuçları	71
Şekil 3. 32: Elaidik asit için doğrusallık sonuçları.....	73
Şekil 3. 33: Stearik asit için doğrusallık sonuçları	75
Şekil 3. 34: Arakidik asit için doğrusallık sonuçları	77
Şekil 3. 35: LOD sonuçları.....	79

Şekil 3. 36: LOQ sonuçları.....	80
--	----

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1. 1: Ambalaj bileşeni ve dozaj form etkileşim olasılığı.....	4
Tablo 1. 2: Bazı yağ asitlerinin adlandırmasına dair örnekler.....	8
Tablo 1. 3: Doymuş yağ asitlerinin isimlendirilmesi	9
Tablo 1. 4: Doymamış yağ asitlerinin isimlendirilmesi.....	11
Tablo 1. 5: Metot validasyonunda gerekli kriterler	20
Tablo 2. 1: Ekipman parametreleri	26
Tablo 2. 2: Dedektör parametreleri.....	26
Tablo 2. 3: Gradient Sistem	26
Tablo 2. 4: Limitler.....	27
Tablo 2. 5: Sonuçların Raporlandırılması.....	28
Tablo 2. 6: Standart Bilgileri	28
Tablo 2. 7: Reaktif Bilgileri.....	29
Tablo 2. 8: Ekipman parametreleri	30
Tablo 2. 9: Dedektör parametreleri.....	30
Tablo 2. 10: Gradient Sistemi.....	34
Tablo 2. 11: Gradient Sistemi.....	36
Tablo 3. 1: Filtre deneme.....	57
Tablo 3. 2: Seçicilik sonuçları	58
Tablo 3. 3: Miristik asit için doğrusallık sonuçları.....	65
Tablo 3. 4: Linoleik asit için doğrusallık sonuçları	67
Tablo 3. 5: Palmitik asit için doğrusallık sonuçları	69
Tablo 3. 6: Oleik asit için doğrusallık sonuçları.....	71
Tablo 3. 7: Elaidik asit için doğrusallık sonuçları	73
Tablo 3. 8: Stearik asit için doğrusallık sonuçları	75
Tablo 3. 9: Arakidik asit için doğrusallık sonuçları	77
Tablo 3. 10: Miristik asit, linoleik asit, palmitik asit, oleik asit çalışma aralığı sonuçları .	78
Tablo 3. 11: Elaidik asit, stearik asit, arakidik asit çalışma aralığı sonuçları.....	79
Tablo 3. 12: LOD sonuçları	80
Tablo 3. 13: LOQ sonuçları.....	81
Tablo 3. 14: Miristik asit için doğruluk sonuçları	81
Tablo 3. 15: Linoleik asit için doğruluk sonuçları.....	82
Tablo 3. 16: Palmitik asit için doğruluk sonuçları.....	82
Tablo 3. 17: Oleik asit için doğruluk sonuçları	83
Tablo 3. 18: Elaidik asit için doğruluk sonuçları.....	83
Tablo 3. 19: Stearik asit için doğruluk sonuçları.....	84
Tablo 3. 20: Arakidik asit için doğruluk sonuçları.....	84
Tablo 3. 21: Sistem kesinliği sonuçları	85
Tablo 3. 22: Tekrarlanabilirlik sonuçları	85
Tablo 3. 23: Ara kesinliğe ait sonuçlar.....	86
Tablo 3. 24: Miristik asit, linoleik asit t test sonuçları	87
Tablo 3. 25: Palmitik asit ve oleik asit t Test sonuçları.....	87
Tablo 3. 26: Elaidik asit ve stearik asit t test sonuçları	88
Tablo 3. 27: Arakidik asit t Test sonuçları	88
Tablo 3. 28: Miristik asit sağlamlık sonuçları	89
Tablo 3. 29: Linoleik asit sağlamlık sonuçları.....	89

Tablo 3. 30: Palmitik asit sağlamlık sonuçları.....	89
Tablo 3. 31: Oleik asit sağlamlık sonuçları	90
Tablo 3. 32: Elaidik asit sağlamlık sonuçları.....	90
Tablo 3. 33: Stearik asit sağlamlık sonuçları.....	90
Tablo 3. 34: Arakidik asit sağlamlık sonuçları.....	91
Tablo 3. 35: Miristik asit, linoleik asit ve palmitik asit çözeltilerinin stabilitesi sonuçları	91
Tablo 3. 36: Oleik asit, elaidik asit ve stearik asit çözeltilerinin stabilitesi sonuçları	92
Tablo 3. 37: Arakidik asit çözeltilerinin stabilitesi sonuçları	92
Tablo 3. 38: Miristik asit, linoleik asit ve palmitik asit ekim yapılmış numune çözeltilerinin stabilitesi sonuçları	93
Tablo 3. 39: Oleik asit, elaidik asit ve stearik asit ekim yapılmış numune çözeltilerinin stabilitesi sonuçları.....	93
Tablo 3. 40: Arakidik asit ekim yapılmış numune çözeltilerinin stabilitesi sonuçları.....	94
Tablo 3. 41: Miristik asit sistem uygunluk sonuçları	94
Tablo 3. 42: Linoleik asit sistem uygunluk sonuçları.....	95
Tablo 3. 43: Palmitik asit sistem uygunluk sonuçları.....	95
Tablo 3. 44: Oleik asit sistem uygunluk sonuçları	95
Tablo 3. 45: Elaidik asit sistem uygunluk sonuçları.....	96
Tablo 3. 46: Stearik asit sistem uygunluk sonuçları	96
Tablo 3. 47: Arakidik asit sistem uygunluk sonuçları	97

SEMBOL LİSTESİ

α	: Alfa
β	: Beta
γ	: Gama
Δ	: Delta
ω	: Omega
mm	: Milimetre
μm	: Mikrometre
mg	: Miligram
ng	: Nanogram
μg	: Mikrogram
g	: Gram
μg	: Mikrogram
Hz	: Hertz
mL	: Mililitre
μL	: Mikrolitre
h/h	: Hacim/hacim

ÖNSÖZ

Doktora çalışmam boyunca tüm desteklerinden dolayı iş yerindeki müdürüm Osman Arslan'a

Tüm çalışma süresince bana desteği esirgemeyen ve değerli bilgilerini benimle paylaşan saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Turgut KILIÇ' a ve Doç. Dr. Sema ÇARIKÇI' ya

Her zaman yanımda olan, maddi ve manevi desteklerini hiç esirgemeyen babam Engin DERELİ' ye, annem Güler DERELİ' ye ve kardeşim Selin DERELİ' ye

Her zaman yanımda olan ve destekleyen sevgili eşim Fatih GÖRÜR' e

Sonsuz teşekkürler.

Balıkesir, 2025

Sinem GÖRÜR

1. GİRİŞ

Farmasötik ürünler hasta üzerinde yararlı olacak şekilde tasarlanmıştır. Bu ürünler için ideal olanı kimyasal olarak saf olmalarıdır. Fakat farmasötik preparatların üretimi ve stoklanması sürecinde birtakım safsızlıklar oluşabilir. Oluşan bu safsızlıklar hastaya hiçbir fayda sağlamamaktadır hatta hastanın sağlığı açısından ciddi riskler doğurabilirler. Bulunan safsızlıklara ait miktarları, özellikleri ve oluşum mekanizmaları ile ilgili bilgiler bilinmelidir. Bilinen bilgiler doğrultusunda bu safsızlıkların oluşumu en uygun şekilde kontrol altına alınmalı ya da önlenmelidir. Böylece safsızlıklardan kaynaklanan olumsuzluklar tamamen ortadan kalkmış ya da en aza indirgenmiş olacaktır [1-2].

Sızan sızıntılar ilaç ürününün etkinliğini, güvenliğini ve kalitesini etkileyebileceklerinden, farmasötik paketleme, sevkiyat sistemlerinin uygun koşullarda belirlemede, hem üreticiler hem tedarikçiler için bilimsel olarak sağlam bir sızıntı değerlendirme çalışmaları önemlidir. Bir sızıntı değerlendirme çalışması tasarlama süreci; bilim, kaynak temini, hasta sağlığı ve ürün kalitesini vurgulayarak etkin risk yönetimi arasında denge kuran bir süreçtir. Bu dengeyi sağlamak, ilaç ürünü üreticisinin yükümlülüğüdür ve geçerli yasal, düzenleyici gerekliliklerin dikkate alınmasını gerektirir [3].

Safsızlıkların nasıl kontrol edilebileceğine dair elde edilen yeni bilgilerin dikkate alınmasıyla, uluslararası otoriteler tarafından oluşturulan belirleyici ilkeler, yıllar içerisinde güncellenmiştir [4].

Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (US, FDA) ve Avrupa İlaç Ajansı (EMA) gibi kurumların yayınladıkları rehberlere göre medikal cihazlar ve ilaç ambalaj sistemleri için yapılan başvurularda extractable (ekstrakte edilebilir) ve leachable (sızabilir) safsızlık bilgileri mutlaka bulunmalıdır [5].

1.1 Extractables, Leachables

Extractables, laboratuvar koşulları altında, (yüksek sıcaklık, basınç, organik çözücüler, vb.) paketleme sistemi sırasında, sevkiyat sistemi sırasında, proses ekipmanında, dağıtım sisteminden üretim yüzeylerinden gibi birçok sebepten dolayı ekstrakte edilebilen ve farmasötik ürünlerin kontaminasyonuna yol açan organik ve inorganik kimyasal bileşiklerdir [6].

Ekstrakte edilebilir maddeler, ekstrakte edilebilir maddelerden türetilmiş olan maddeler ya da zorlu koşullarda yapılan ekstraksiyon esnasında oluşan kimyasal türlerin üretim, depolama ve paketleme bileşenlerinden salınma potansiyeline sahiptir. Yaygın ekstraksiyon tekniklerinden (sonikasyon, refleks, soxhlet, otoklav, mikrodalga vb.) bazılarına örnektir. [7-8-9].

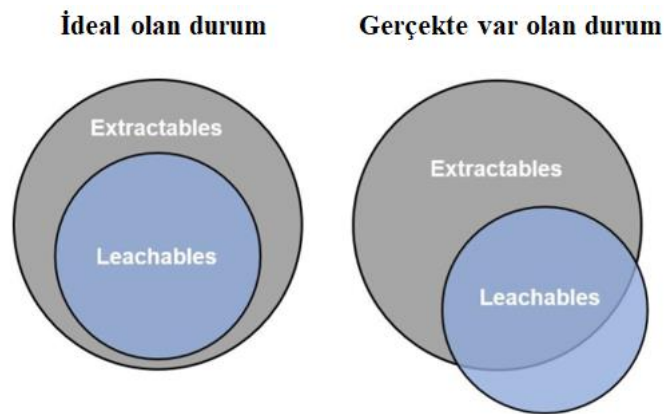
Leachable, ilaç formülasyonunda, direk temas halinde olduğu ambalajından veya paketleme sisteminde, sevkiyat sisteminde, proses ekipmanından ilaca geçen ve hastaya etki edebilen sızabilen safsızlıklardır. Sızabilen ambalaj safsızlıkları olarak da tanımlanabilir. [9].

Aşağıdaki Şekil 1.1' de bu tanımlara görsel olarak örnek verilmiştir. [10].



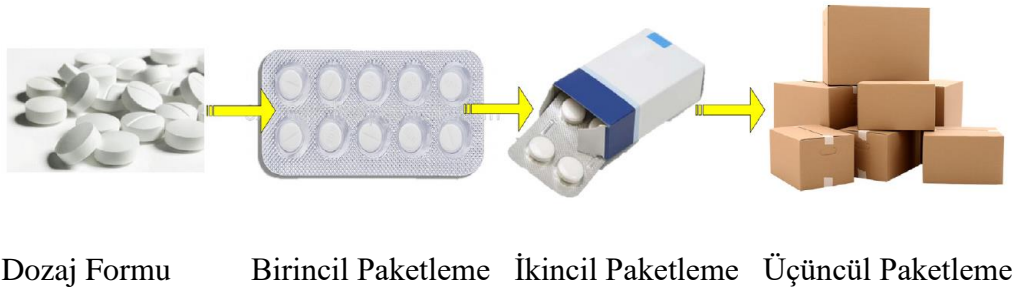
Şekil 1. 1: Extractable ve leachable tanımlarına örnek

Extractables ve Leachables ilişkisinde; Extractables işlemleri leachables işlemlerini de kapsamaktadır [9]. Aşağıdaki Şekil 1.2' de gösterilmiştir.



Şekil 1. 2: Extractable ve leachable ilişkisi

Paketleme sistemleri, dozaj formunu içeren ve koruyan paketleme bileşenlerinin tamamını oluşturur. Paketleme sistemleri birincil, ikincil ve üçüncül paketleme sistemleridir. Birincil paketleme bileşeni, ürünle (örnek olarak serum torbası) direkt temas halindedir. İkincil paketleme bileşeni, birincil paketleme bileşeniyle direkt temas halindedir ve ürün için ek koruma oluşturabilir. (örnek olarak serum torbasının üst kese veya toz örtüsü). Üçüncül paketleme bileşeni ise, ikincil bir paketleme bileşeni ile direkt temas halindedir ve nakliye ya da depolama sırasında ürüne ek koruma oluşturabilir. (örnek olarak fazla torbalanmış serum torbası için nakliye kartonu) [11]. Aşağıdaki Şekil 1.3' de örnek verilmiştir. [12].



Şekil 1. 3: Tablet paketleme sistemi

Kap ve kapak; farmasötik bileşen, yardımcı madde veya dozaj formu içeren bir ara bileşikler olup ürünle doğrudan temas içindedirler. Kap (örneğin, ampuller, şırıngalar, şişeler), kapaklar (örneğin vidalı kapaklar, tıplar) paketleme bileşenleridir [3].

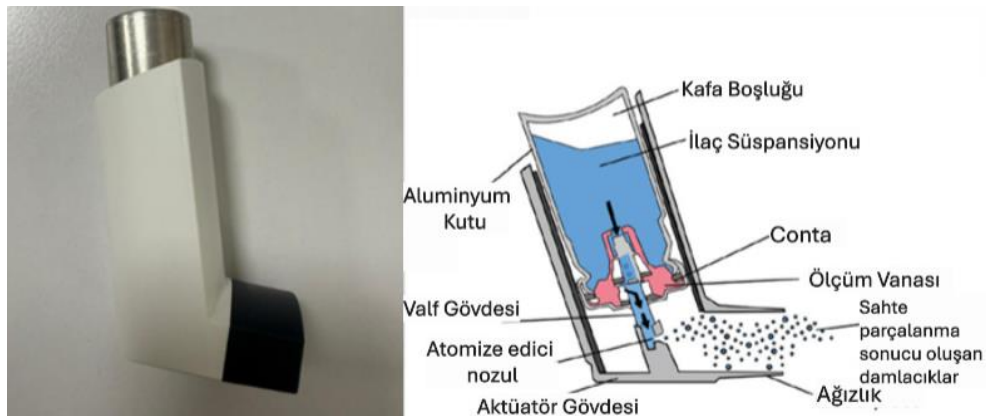
İlaç ambalajlarında kullanılan plastik, polimer, kauçuk ve cam malzeme karışımları, baskılı yüzeyler ve kaplamalar seçilirken ilaçların özellikleri dikkate alınarak seçilmelidir. Extractables ve leachables ilaç ürünlerinde kontaminasyonuna yol açabilecek yabancı maddeleri tanımlamada yardımcı olsa da bunların karakterizasyonunu ve ikisi arasındaki farkı anlamak açısından önem taşımaktadır [7-8].

İlaç ürünleri için hem extractables hem de leachables yönetimi, özellikle paketleme sistemi ile dozaj formu etkileşimi açısından birçok dozaj formu türü için farmasötik geliştirme ve düzenleyici başvuruların önemli bir parçası haline geldi, uygulama yoluna göre de aşağıdaki Tablo 1.1' de verilmiştir [3].

Tablo 1. 1 : Ambalaj bileşeni ve dozaj form etkileşim olasılığı

Uygulama Yöntemiyle İlgili Endişe Oranı	Ambalaj Bileşeni- Dozaj Form Etkileşim Olasılığı		
	Yüksek	Orta	Düşük
En Yüksek	İnhalasyon Aerosolleri ve Spreyleri	Enjeksiyonlar ve Enjekte Edilebilir Süspansiyonlar; İnhalasyon Solüsyonları	Steril Tozlar ve Enjeksiyon İçin Tozlar; İnhalasyon Tozları
Yüksek	Transdermal Merhemler ve Yamalar	Oftalmik Solüsyonlar ve Süspansiyonlar; Burun Aerosolleri ve Spreyler	-
Düşük	Topikal Solüsyonlar ve Süspansiyonlar; Topikal ve Lingual Aerosoller; Oral Solüsyonlar ve Süspansiyonlar	-	Oral Tabletler ve Oral (Sert ve Yumuşak Jelatin) Kapsüller; Topikal Tozlar; Oral Tozlar

Aşağıda en yüksek ambalaj bileşeni ve dozaj form etkileşim olasılığı olan inhalasyon aerosolleri ve spreyelerine ait görsel aşağıdadır. [13].



Şekil 1. 4: Çalışılan inhalasyon ürününün hem paketi hem içerik görünümü

İlaç ürünü sızıntıları için özel olarak önerilen eşikler ya hasta güvenliği hususlarına ya da analitik teknolojinin mevcut yeteneklerine dayanmaktadır. Güvenlik eşikleri, bir sızıntı değerlendirmesinde özellikle önemlidir çünkü mevcut analitik teknoloji, son derece düşük seviyelerde (yani, ng/mL; ng/g) yani eser miktarda organik ve inorganik kimyasal

maddelerin saptanmasına izin verir. Analitik Değerlendirme Eşiği (AET), bir sızıntının karakterize edilmesi ve toksikolojik değerlendirme için rapor edilmesi gereken veya bu değer üzerindeki eşik değeridir. Güvenlik Endişe Eşiği (SCT), altında bir sızıntının ihmal edilebilir güvenlik sunacak kadar düşük bir doza sahip olacağı eşik değeridir. AET, ilaç ürününün dozlama parametrelerini içeren faktörlere dayalı olarak SCT' den (veya diğer eşik kavramlarından) matematiksel olarak türetilir [3].

PQRI, düşük riskli SCT' nin 0.15 µg / gün, yüksek riskli SCT' nin ise 1,5 µg/gün olarak belirlenmesini tavsiye etmiştir bunun yanı sıra her iki eşikte de toksikolojik ve güvenlik açısından gerekçelendirilmiştir. Belirli şartlar altında kısa süreli maruz kalma ya da hayatı tehdit eden bir durumun tedavisi gibi durumlarda, SCT' nin 1,5 µg/gün' ün üzerine çıkarılabilir [9-14].

İlaç geliştirmede güvenlik eşiği kavramına örnek olarak, Oral İnhaler Nasal İlaç Ürünlerindeki (OINDP) bireysel organik sızıntılar için önerilen Ürün Kalite Araştırma Enstitüsü (PQRI) Güvenlik Endişe Eşiği (SCT) ve Nitelik Eşiği (QT) bulunur. SCT 0,15 µg/gün TDI' dir ve QT, tek bir organik sızma için 5 µg/gün TDI olarak önerilmektedir [3].

SCT' yi (0,15 µg/gün) AET' ye dönüştürmek için:

$$AET \left(\frac{\mu g}{ambalaj} \right) = \left(\frac{0.15 \mu g / gün}{doz / gün} \right) \times \left(\frac{\text{etiket doz}}{ambalaj} \right)$$

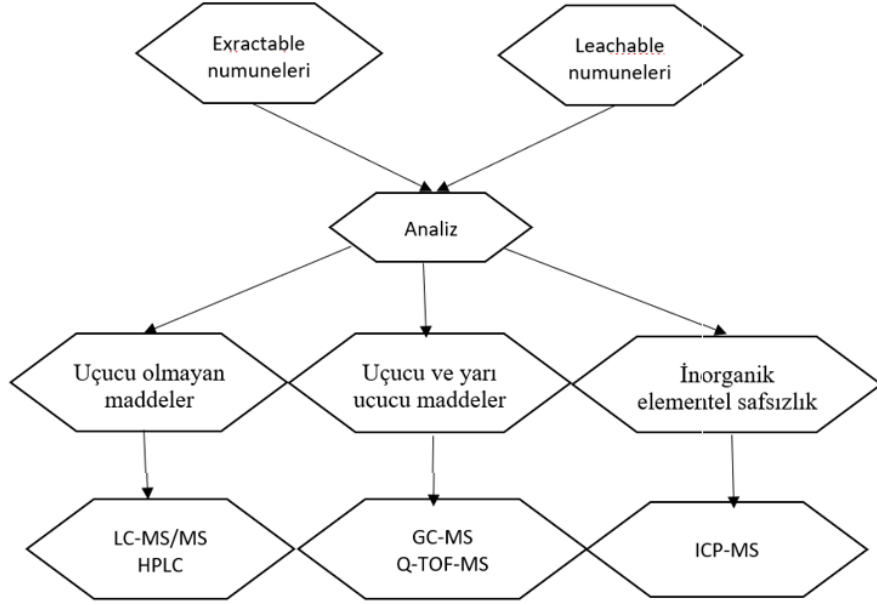
$$\text{Likit dozlar için; } AET \left(\frac{\mu g}{mL} \right) = \left(\frac{\mu g}{ambalaj} \right) \div \left(\frac{mL}{ambalaj} \right)$$

$$\text{Solid dozlar için; } AET \left(\frac{\mu g}{g} \right) = \left(\frac{\mu g}{ambalaj} \right) \div \left(\frac{g}{ambalaj} \right) \quad (1.1)$$

Genel olarak, extractable ve leachable analizlerinde 3 gruba ayrılabilirler;

- Uçucu olmayan maddeler.
- Uçucu ve yarı uçucu maddeler.
- İnorganik / elementel safsızlık.

Tüm bu numuneleri analiz etmek için valide edilmiş analitik yöntemler kullanılmalıdır. Aşağıdaki Şekil 1. 5' de gösterilmiştir [15].



Şekil 1. 5: Extractable ve leachable için analiz yöntemleri

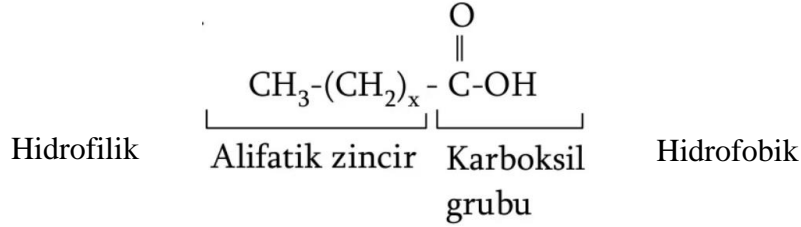
İlaç sektöründe extractables ve leachables riskini değerlendirmede iyi planlanmış bir extractables ve leachables çalışması çok önemlidir. Bu sebeple ilaç sektörü, extractables ve leachables bileşenlerini nitel ve nicel olarak tanımlamayı sağlayacak hassas ve doğru analitik yöntemleri geliştirmek bir anlamda zorunluluktur [16].

Extractables ve leachables çalışması için genel bir metot bulunmamaktadır, organik ve inorganik numunenin fiziksel ve kimyasal özelliğine göre yeni bir metodun geliştirilmesi gerekmektedir. İyi planlanmış bir extractables, leachables çalışması dört kademedendir [17-18].

1. İlacın üretim sürecinde kullanılan sistemlerin malzeme özelliği ve ambalaj için kullanılan malzeme hakkında bilgi toplanması,
2. Numune alımı, numune hazırlamak için ekstraksiyon ve analizler için uygun olan analitik değerlendirmeleri içeren bir çalışma protokolünün belirlenmesi,
3. Yapılan analizlerin sonucunda tayin edilen, bilinen veya yeni bileşiklerin değerlendirilmesinin yapılması,
4. Leachables' in tespiti, tanımlanması, miktarının tayini ve toksikolojik sınır değerinin belirlenmesi.

1.2 Yağ Asitleri

Yağ asitlerinin tamamı bir ucunda metil grubu (-CH₃) bulunduran, diğer bir ucunda ise suda çözünebilir karboksil grubu (-COOH) bulunduran uzun bir hidrokarbon zincirlerinden oluşan organik asitlerdir. Şekil 1.6 de gösterilmektedir [19-20].



Şekil 1. 6: Yağ Asitlerinin Yapısı

Yağ asitleri lipit sınıfındadırlar ve biyomoleküllerin hidrofobik ailesini oluştururlar, trigliseritlerin yapı taşlarıdır, bitkisel ya da hayvansal kaynaklı olabilirler. Bitki yapısında, mikroorganizmalar ve hayvanlarda yüzden fazla çeşitli yağ asitleri bulunmaktadır. Yağ asitleri, kompleks lipitler halinde organizmada hücrenin yapısında, az bir kısmı da serbest halde hücre ve dokularda bulunurlar [19-21].

Yağ asitlerinin birbirinden farklı olması, yapılarında buldukları karbon zincirinin uzunluğu, yapılarındaki bağların tek ya da çift oluşundan kaynaklanmaktadır. Yağ asitleri yapılarında bir veya daha fazla çift bağ bulundurabilirler. Yapısında çift bağ bulunduran yağ asitleri, doyurularak doymuş hale getirilebilirler. Yağ asitlerinde zincir uzunluğu arttıkça, uçuculuk ve suda eriyebilme özellikleri azalırken, karbon sayıları arttıkça yağ asidi sertleşir ve erime noktaları artar. Doğada bulunan yağ asitlerinin çoğunluğu düz zincirlidir, genellikle çift sayıda karbon atomuna sahiptirler. Ama tek sayıda karbon atomuna sahip yağ asitleri de bulunur. Genel olarak karbon sayıları 2 ile 34 arasında değişmekte olup bunların büyük bir çoğunluğu ilk çift bağ dokuzuncu ile onuncu karbonlar arasında bulunurken geriye kalan çift bağlar ise 12. ile 13. karbon arasında ya da 15. ve 16. karbonlar arasında bulunurlar. İkili bağlar bu yüzden konjuge değildir. Üçlü bağlara ise nadiren rastlanmaktadır [19-22].

1.2.1 Yağ Asitlerinin Adlandırılması

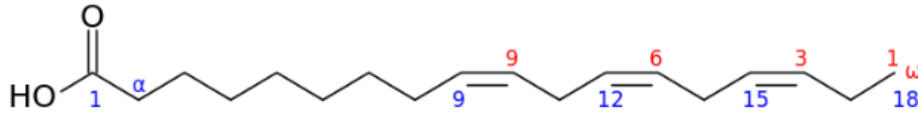
IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemist)' a göre sistematik olarak isimlendirmede delta (Δ) ve omega (ω) isimlendirilmesi gösterilmektedir [20].

Delta (Δ) isimlendirilmede, karbon atomlarının sayılma sırasına karboksil grubundan başlanır.

Omega (ω) isimlendirmede ise karbon atomları sayılma sırasına en sonda bulunan metil grubundan başlanır. Bazı yağ asitlerinin isimlendirilmesi Tablo 1.2’ de verilmiştir. Aşağıdaki Şekil 1.7’ de ise α -Linolenik asit açık yapıda gösterilmiştir [21-28].

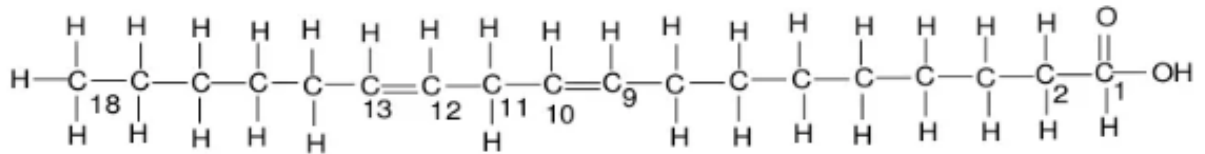
Tablo 1. 2: Yağ asitlerinin adlandırılmasına dair örnekler

İsim	Delta İsimlendirilmesi	Omega İsimlendirilmesi
Palmitik asit	C16:0	C16:0
Stearik asit	C18:0	C18:0
Linoleik asit	C18:2 $\Delta^{9, 12}$	C18:2 $\omega^{6, 9}$
α -Linoleik asit	C18:3 $\Delta^{9, 12, 15}$	C18:3 $\omega^{3, 6, 9}$
Arachidonik asit	C20:4 $\Delta^{5, 8, 11, 14}$	C20:4 $\omega^{6, 9, 12, 15}$
Ekosapentanoik asit	C20:5 $\Delta^{5, 8, 11, 14, 17}$	C20:5 $\omega^{3, 6, 9, 12, 15}$
Dokosaheksaenoik asit	C22:6 $\Delta^{4, 7, 10, 13, 16, 19}$	C22:6 $\omega^{3, 6, 9, 12, 15, 18}$



Şekil 1. 7: α -Linolenik asit

Sistemik adlandırmada ise karbon sayısının sonuna doymuş yağ asitlerinde -anoik doymamış yağ asitlerinde -enoik eki getirilir. Örnek olarak, 18 karbonlu (C18) doymuş bir yağ asidi olan stearik asit, oktadekanoik asit olarak adlandırılması, 18 karbonlu bir çifte bağ içeren oleik asit ise, oktadekenoik asit olarak adlandırılması, 18 karbonlu iki çifte bağ içeren linoleik asit ise, oktadekadienoik asit olarak adlandırılması verilebilir. Aşağıdaki Şekil 1.8’ de açık yapısı gösterilmiştir.



Şekil 1. 8: 9,12-Otadekadienoik (linoleik) asit

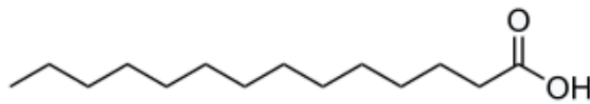
1.2.1.1 Doymuş Yağ Asitleri

Doymuş yağ asitlerinin hidrokarbon zincirleri çift bağ içermezler, tüm karbonlar hidrojenle doyurulmuştur. Asetik asit, bu tür asitlerin ilk üyesidir. Aşağıdaki Tablo 1.3' de örnekler verilmiştir. Hayvansal ve bitkisel yapılarda en fazla rastlananları palmitik ve stearik asittir. Diğer doymuş yağ asitlerine örnek olarak ise miristik asit ve arakidik asitin aşağıdaki Şekil 1.9' da yapıları verilmiştir. Karbon sayısı 10' dan az olanlar oda sıcaklığında sıvı, 10' dan daha fazla olanlar ise katı halde bulunurlar. Yağ asitlerindeki karbon sayıları arttıkça yağ asitleri sertleşmeye başlar ve erime noktaları artar [22-29].

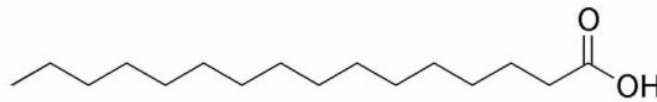
Tablo 1. 3: Doymuş yağ asitlerinin isimlendirilmesi

Yağ Asidinin Adı	Karbon İskeleti	Yapı Formülü
Asetik Asit	2:0	CH ₃ COOH
Propiyonik Asit	3:0	CH ₃ CH ₂ COOH
Bütirik Asit	4:0	CH ₃ (CH ₂) ₂ COOH
Kaproik Asit	6:0	CH ₃ (CH ₂) ₄ COOH
Kaprilik Asit	8:0	CH ₃ (CH ₂) ₆ COOH
Kaprik Asit	10:0	CH ₃ (CH ₂) ₈ COOH
Laurik Asit	12:0	CH ₃ (CH ₂) ₁₀ COOH
Miristik Asit	14:0	CH ₃ (CH ₂) ₁₂ COOH
Palmitik Asit	16:0	CH ₃ (CH ₂) ₁₄ COOH
Stearik Asit	18:0	CH ₃ (CH ₂) ₁₆ COOH
Arakidik Asit	20:0	CH ₃ (CH ₂) ₁₈ COOH
Behinik Asit	22:0	CH ₃ (CH ₂) ₂₀ COOH
Lingoserik Asit	24:0	CH ₃ (CH ₂) ₂₂ COOH
Serotik Asit	26:0	CH ₃ (CH ₂) ₂₄ COOH

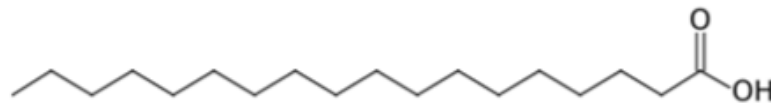
Miristik Asit



Palmitik Asit

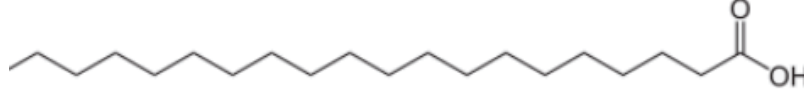


Stearik Asit



Şekil 1. 9 (devam)

Arakidik Asit



Şekil 1. 9: Miristik asit, palmitik asit, stearik asit ve arakidik asit yapıları

1.2.1.2 Doymamış Yağ Asitleri

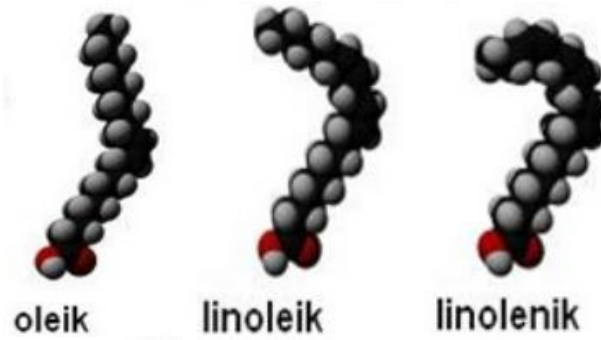
Doymamış yağ asitleri yapılarında bir veya daha fazla çift bağ bulundurlar, özellikleri çift bağın sayısına, bağların yerleşme durumlarına ve geometrik dizilimlerine göre değişim göstermektedir [23-30].

Yağ asitleri yapısında içerdiği çift bağ sayısına göre gruplandırılırlar. Eğer bir adet çift bağ mevcutsa tekli doymamış yağ asidi, birden fazla ise çoklu doymamış yağ asidi olarak adlandırılır. Çift bağın yeri “n”, “delta” ya da “omega” sembolleriyle gösterilebilir. Doğal yağların yapısındaki çift bağın konumu metil grubu ile başlanarak genellikle 3. veya 6. karbon atomunun ardından gelmektedir. Bunlar omega-3 ya da omega-6 olarak adlandırılırlar. Aşağıdaki Tablo 1.4’ de örnekler verilmiştir [24].

Tablo 1. 4: Doymamış yağ asitlerinin isimlendirilmesi

KARBON SAYISI	ADI	YAPISAL FORMÜLÜ
Trans -MUFA, Tekli Doymamış Yağ Asitleri		
C16:1 n7t	Palmitelaidik asit	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
C18:1 n9t	Elaidik asit	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
Cis -MUFA, Tekli Doymamış Yağ Asitleri		
C14:1 n5	Miristoleik asit	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_5\text{COOH}$
C16:1 n7	Palmitoleik asit	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_5\text{COOH}$
C17:1 n7	Heptdesenoik asit	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$
C18:1 n9	Oleik asit	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
C18:1 n7	Vaksenik asit	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_9\text{COOH}$
C20:1 n9	Ekosanoik asit	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_9\text{COOH}$
C22:1 n9	Erusik asit	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_{11}\text{COOH}$
C24:1 n9	Nervonik asit	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_{13}\text{COOH}$
n -6 PUFA, Çoklu Doymamış Yağ Asitleri		
C18:2 n6c	Linoleik asit	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2)_2(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$
C18:3 n6	γ -Linolenik asit	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2)_3(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$
C20:2 n6	Ekosadienoik asit	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2)_2(\text{CH}_2)_8\text{COOH}$
C20:3 n6	Ekosatrienoik asit	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2)_3(\text{CH}_2)_5\text{COOH}$
C20:4 n6	Arahidonik asit	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2)_4(\text{CH}_2)_5\text{COOH}$
C22:4 n6	Dokosatetraenoik asit	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2)_4(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$
n-3 PUFA, Çoklu Doymamış Yağ Asitleri		
C18:3 n3	α -Linolenik asit	$\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2)_3(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$
C20:3 n3	Ekosatrienoik asit	$\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2)_3(\text{CH}_2)_9\text{COOH}$
C20:5 n3	Ekosapentaenoik asit	$\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2)_3(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$
C22:5 n3	Dokosapentaenoik asit	$\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2)_5(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$
C22:6 n3	Dokosaheksaenoik asit	$\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2)_6(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$

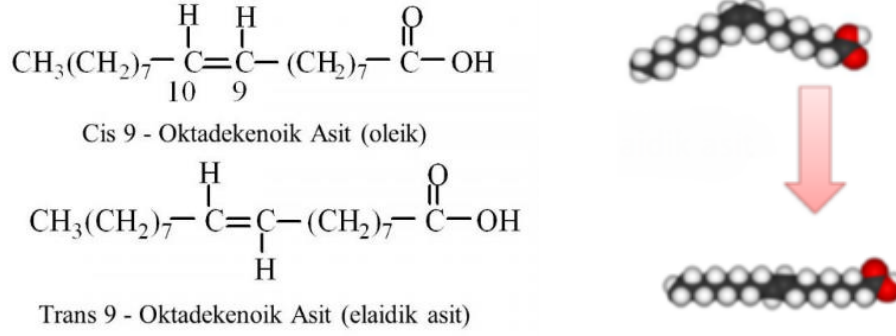
Doymamış yağ asitleri yapılarındaki çift bağların yanlarında bulunan karbon atomları cis ya da trans konumda bulunabilirler. Çift bağla birbirine bağlı atomlar bu bağın eksenini etrafında dönmeyebilirler. Bu yüzden cis izomeri durumunda yağ asidinin zinciri bu noktada bükülerek zincirin hareket serbestliği azalır. Zincir yapısında ne kadar çok cis konumlu çift bağ olursa, zincir esnekliğini o derece kaybederek eğri bir biçim alır. Örnek verilirse, bir adet çift bağa sahip olan oleik asitte "köşe" bulunmakta; linoleik asit, sahip olduğu iki çift bağ ile, şeklinde "büküm" meydana gelmektedir; α -linolenik asitin sahip olduğu üç cis bağıyla şeklinde "çengel" bir görünüme sahiptir. Aşağıdaki Şekil 1.10' da üç boyutlu yapıları verilmiştir [25].



Şekil 1. 10: Oleik, linoleik ve linolenik asit üç boyutlu yapıları

Trans konumda çift bağli karbonlara komşu iki hidrojen çift bağın karşı taraflarında yer aldığından dolayı zincir fazla eğilmez ve bu tür yağ asitlerinin şekilleri doymuş yağ asitlerine benzerler [25].

Çifte bağ içeren yağ asitleri geometrik izomeri gösterebilirler ve daha çok "cis" şekillerinde görülür. Çifte bağın yerine ve etrafındaki radikallerin durumuna göre farklı izomerler meydana gelebilir. Örneğin oleik asitin trans hali elaidik asittir. Aşağıdaki Şekil 1.11' de yapıları verilmiştir [25].



Şekil 1. 11: Oleik, oleik ve elaidik asit cis, trans gösterimi

1.3 HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi)

Bir karışımda bulunan bileşenlerin, hareketli (taşıyıcı) faz ile, sabit (durgun) faz üzerinden farklı hızlarla sürüklenmeleri açısından birbirlerinden ayrılma olayına kromatografi denir. Kromatografik yöntemler, kimyasal ya da fiziksel özellikler bakımından benzer karışımları, tamamiyle ve çok kısa sürelerde birbirlerinden ayırmak için kullanılır. Hareketli fazın sıvı olduğu çeşidine sıvı kromatografisi denir. Sıvı kromatografisi ayırma teknikleri arasında en yaygın kullanılanıdır [26].

Yüksek hızda ayırmaların yapıldığı sıvı kromatografi sistemlerine, Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (High Pressure Liquid Chromatography) denir ve kısaca HPLC olarak adlandırılmaktadır. Duyarlılığı, doğru kantitatif tayinlere kolaylıkla uyarlanabilir olması, uçucu olmayan yapıların veya sıcaklıkla kolayca bozunabilen yapıların ayrılmasına uygun olması, kolonunun üst üste pek çok kez kullanılabilmesi, yüksek tekrarlanabilirliğinin olması, nitel ve nicel analizlerde kullanılabilir olması ve özellikle yeni nesil ultra performans likit kromatografiler için analiz sürelerinin çok kısa olması sebebiyle HPLC'lerin kullanım alanını arttırmıştır. HPLC kullanım alanına ise birçok örnek verilecek olunursa, proteinler, nükleik asitler, hidrokarbonlar, karbonhidratlar, ilaçlar, terpenoidler, antibiyotikler, steroidler, çeşitli inorganik bileşikler örnek verilebilirler [11].

Normal faz ve ters faz olarak kullanımı vardır;

Normal faz sıvı kromatografisinde: hareketli faz apolar, sabit faz polardır. Ters faz sıvı kromatografisinde ise: hareketli faz polar, sabit faz apolardır. Bu sistemde metanol, asetonitril ve su gibi kullanılan polar çözücüler, hareketli fazdır, kolon ise apolardır. Ters

faz sıvı kromatografisinde kullanılan kolon çeşitlerine örnek olarak C18, C8, C4, C2, fenil gibi kolonlar verilebilir [27].

1.3.1 HPLC Cihazı ve HPLC Donanımı

HPLC temel olarak; pompa, enjektör, hareketli faz, kolon, dedektör ve kaydediciden oluşur. HPLC'nin çalışma prensibi, bileşenlerin kolon içerisindeki sabit faz ile etkileşerek farklı hızlarla ilerlemeleri üzerine kuruludur. Sabit faz ve hareketli faz arasındaki etkileşimler, bileşenlerin ayrılmasına yol açar. Karışım sabit faz etkileşimi karışımı oluşturan maddelerin değişik hızlarda ilerlemesine neden olur ve bu nedenle maddeler farklı zamanlarda sabit fazı terk ederek ayrılmış olurlar. Yüksek akış hızında kolona pompalanan sıvı taşıyıcı faz ayrılmanın daha kısa sürede ve tam olarak gerçekleşmesini sağlar. Kolon çıkışına bağlı olan dedektör sayesinde ayrılan madde belirlenip kaydedilir [11].

1.3.1.1 Pompa (Çözücü Dağıtma Sistemi)

HPLC' de en önemli kısımlardan biri çözücü pompalama sistemidir. Mobil fazı oluşturan çözücülerin, enjektör, kolon ve dedektör içerisinden belirli, sabit ya da değişken hızda belirli basınç altında geçmesini sağlar. Pompanın performansı, analitik sonuçların tekrarlanabilirliği, nicel değeri, gözlenebilirme sınırı gibi değerleri önemli ölçüde etkiler. Pompalama sistemleri, akış hızına göre, yapımındaki malzemeye göre, pompanın mobil fazı iletme mekanizmasına göre kategorize edilebilir [26].

1.3.1.2 Kolonlar

HPLC donanımının yapı taşlarından birisi olan kolon, karmaşık örneklerdeki bileşenlerin birbirinden iyi çözünürlükte ayrımından sorumlu sabit fazdır. Kolon imalatında yapı materyali olarak en sık tercih edilenler; 326 paslanmaz çelik, teflon, cam veya peek' dir. Kolonun ayırım gücü ve performansı yapıldığı materyaldan çok iç yüzeyinde kullanılan malzemenin kimyasal ve fiziksel özelliğinden etkilenmektedir. İç yüzeyde kullanılan bu kaplama malzemeleri çok çeşitlidir, analizin metoduna, mobil fazına analiz edilecek yapının özelliklerine göre seçilmelidir. Analitik kolonun iç çapı 2-5 mm aralığında, boyları ise çok çeşitli olup 30-300 mm aralığında değişmektedir [11-31].

1.3.1.3 Dedektörler

HPLC temel parçalarından biri ise dedektörlerdir. Kolondan çıkan maddeler, kolonun çıkışına yerleştirilen uygun bir dedektör ile ölçülür. Dedektör seçimi doğru ve hassas bir

analiz yapabilmek için son derece önemli bir etkiye sahiptir. İyi bir dedektörün duyarlı, doğrusal, seçici, koşullardan ve değişimlerden etkilenmeyen, numuneyi tahrip etmeyen, ucuz ve kolay kullanıma uygun olmalıdır [27].

Dedektörler, örnek bileşenlerini tayin ederken ölçtükleri fiziksel özelliklere göre 8 çeşittir. Ultraviyole/görünür bölge dedektörü (UV/VIS), fotodiyot array dedektörü (DAD), floresans dedektörü (FLD), refraktif indeks dedektörü (RID), elektrokimyasal dedektör (ECD), kütle dedektörü (MS), iletkenlik dedektörü (CAD) [32].

1) Ultraviyole / Görünür Bölge Dedektörü;

Lambert-Beer yasası uygulanır, absorbans ölçülür. Spektrum taraması yapılabilir, farklı dalga boylarında çalışılabilir veya dalga boyu zamana karşı programlama yapılabilir.

2) Fotodiyot Array Dedektörü (DAD);

Her elementin ayrı bir dalga boyundaki absorbansı eş zamanlı olarak ölçebilme özelliği vardır. Bu sayede 3 boyutlu kromatogramlar elde edilebilir ve istenilen her pikin çok hızlı spektrum taramasını görebilir. İstenilen dalga boyu aralığında çalışabilmesi bu dedektörün sağladığı önemli avantajlardan biridir.

3) Floresans Dedektörü (FLD);

Organik bileşiklerin yaklaşık %15' i floresans oluşturma yeteneğine sahiptir ve oluşan floresans ölçülmektedir. Ölçüm duyarlılığı UV/VIS dedektöre göre yaklaşık 103 kat fazladır.

4) Refraktif İndeks Dedektörü (RID);

Sıcaklığa karşı duyarlıdır ve bu nedenden dolayı da yoğunluk artabilir. Ortama gelen ışık kırılır ve hücreden ayrılır böylece ışığın (kırılma indisi) kantitatif olarak tayini yapılmış olur.

5) Elektrokimyasal Dedektörü (ECD);

Yükseltgenebilen ya da indirgenebilen maddeler olan elektroaktif maddeler kullanılır. Elektrik akımı ölçümüne dayanır.

6) Kütle Dedektör (MS);

Analizi yapılan bileşenin, o bileşenlere özgü yani spesifik kromatogramları tespit edilir. Kalitatif tayinler için ciddi bir öneme sahiptir.

7) İletkenlik Dedektörü (CAD)

CA (Charged Aerosol) dedektör, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ve ultra yüksek performanslı sıvı kromatografisi (UHPLC) ile birlikte kullanılabilen bir dedektördür ve numunedeki yüklü aerosol parçacıklarının miktarını ölçer [33].

Kromofor içermemeleri nedeniyle UV/Vis detektörleri kullanılarak tespit edilemeyen bileşiklerin analizinde yaygın olarak kullanılır ayrıca yüksek hassasiyetle iyi ayırım sağladığı için tercih edilir. Çalışma prensibi olarak incelendiğinde UV dedektörler konsantrasyona bağlıken, CA dedektörler ise kütleyle bağlıdır. CAD, antibiyotikler, iyonlar, lipidler, doğal ürünler, biyoyakıtlar, şekerler ve yüzey aktif maddeler dahil ancak bunlarla sınırlı olmamak üzere tüm uçucu olmayan ve birçok yarı uçucu analiti ölçebilir [33-34].

1.3.2 HPLC' de Temel Parametreler

1.3.2.1 Alıkonma Zamanı (Retention time)

Numunenin kolona enjeksiyonu ile pikin dedektöre ulaşması arasında geçen süreye alıkonma zamanı aynı zamanda tutunma süresi olarak tanımlanır. tR olarak gösterilir. Birimi genellikle dakika olarak tercih edilir. [28-35].

$$tR = VR / F \quad (1.2)$$

VR : Kolondan geçen çözücü hacmi

F : Akış hızı

1.3.2.2 Bağlı Alıkonma (Relative Retention)

Bağlı alıkonma 'Ayrırma faktörü' de denilebilir. Bağlı alıkonma, tutunma süreleri bilinen iki maddenin birbirine oranı olarak açıklanabilir [35].

1.3.2.3 Kapasite Faktörü (k')

Kapasite faktörü, aynı zamanda alıkonma faktörü ya da kapasite oranı olarak ifade edilir, ve numunenin kolon içinde kalış süresini ifade eder [28].

$$k' = (t_r - t_0) / t_0 \quad (1.3)$$

k': Kapasite faktörü

t₀: Alıkonmamış madde kolondan çıkış süresi

t_r : Alıkonmuş madde kolonu terk etme süresi

1.3.2.4 Kolon Etkinliğini Belirleme

Teorik plaka sayısından yararlanılır. Teorik plaka sayısı ya da teorik tabaka sayısı da denilebilir. N ile gösterilir. Tutunma süresiyle doğru orantılı, analiz süresiyle de ters orantılı bir ilişki mevcuttur [28-35].

$$N = 16 (t_r / W)^2 \quad (1.4)$$

N: Teorik plaka sayısı

W: Analiz için geçen zaman

t_r: Tutunma süresi

1.3.2.5 Kuyruklanma Faktörü (T)

Kromatogramda elde edilen pike ait, pik simetri ölçümünde kullanılmaktadır. [28].

$$T = W / 2f \quad (1.5)$$

W: Pike ait yükseklik özeliğinin %5 kadarına ait pikin genişliğidir.

f : Pike ait uzaklığın önünden maksimum dikeye olan uzaklığıdır.

1.3.2.6 Kromatografik Rezolüsyon

Kromatografi, karışım içindeki bileşenleri ayırma yöntemi olarak tanımlanırken rezolüsyon da ayırma yönteminin ölçüsü olarak tanımlanır. Kromatografik rezolüsyon; bileşenlere ait alıkonma zamanları arasındaki fark ile pik genişliği arasındaki oran olarak hesaplanır. [28].

$$R = (t_{r2} - t_{r1}) / [1/2 \times (W_1 + W_2)] \quad (1.6)$$

R : Kromatografik Rezolüsyon

t_{r1} : İlk pike ait alıkonma zamanı

t_{r2} : İkinci pike ait alıkonma zamanı

W₁ : İlk pike ait baseline genişliği

W₂ : İkinci pike ait baseline genişliği

1.4 Analitik Metot Validasyon

Bir numunenin, spesifik analizleri için uygulanan işlem veya işlem basamakları metot (yöntem) olarak adlandırılır. Bu metodun kabul görmesi için resmi test prosedürleri ile (ICH: (Uluslararası Harmonizasyon Topluluğu); EMA: (Avrupa İlaç Ajansı); USP (Amerika Birleşik Devletleri Farmakopesi), FDA: (Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi)) gerekli şartlar belirlenir. Yine bu resmi test prosedürlerine uyarak metot geliştirme yapılır. Metot geliştirmede ise metodun amacı, kapsamı, uygulanabilirliğini, kabul kriterlerinin belirlenmesi, kullanılan cihazların performanslarını, kullanılan materyallerin nitelendirilmesi yapılır. Geliştirilen yöntem dokümanite edilmelidir [36-37-38].

Validasyon, ilaç endüstrisinde ilacın, cihazın, metodun ve ürün parametrelerinin geliştirilmesi, üretim ve kontrolünde kullanılan temel işlemlerin ve cihazların sistematik olarak gözden geçirilmesi, önerilen üretim ve kontrol yöntemleri kullanıldığında tekrarlanabilir sonuçların alınacağından ve istenilen kalitenin sağlanacağından emin olunması için yapılan bir dizi süreç geliştirme işlemleridir [39-40].

Analitik metot validasyonu ise kullanılan bir analitik metodun valide olduğunun kanıtlanması ve dokümanite edilmesidir. Amacı ise analitik işlemin deneysel çalışmalarla raporlandırılmış ilgilenilen amaç doğrultusunda uygun olduğunun kanıtlanmasıdır [41].

Analitik Metot validasyonunda; GMP-GLP- cGMP (İyi Laboratuvar Uygulamaları-İyi Üretim Uygulamaları- Güncel İyi Üretim Uygulamaları), USP (Amerika Birleşik Devletleri Farmakopesi) / ICH (Uluslararası Harmonizasyon Topluluğu), FDA (Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi) gibi uluslararası kabul görmüş kuruluşların kriterleri kullanılır. Validasyon;

- Analitik metodun, daha önce çalışılmayan laboratuvarda analizi yapılacağı zaman
- Analitik metodun ilk defa geliştirildiğinde
- Rutinde analizi yapılan metodun içeriğinde farklılık yapıldığında
- Validasyonu olan metodun diğer laboratuvarda kullanıldığında
- Metodun kullanım şartlarına göre değişiklik yapıldığında
- İki farklı metodun arasındaki farklılıkları belirlerken
- Laboratuvar içinde gerçekleştirilen farklılıklar ve bu farklılıkların analiz değerlerini etkilediği durumlarda

- Validasyonu yapılmış ama uzun süredir kullanılmayan metotların yeniden kullanımına başlanmasında, gibi durumlarda yapılmaktadır [38].

Analitik metot validasyon, 3 ana grup olarak yapılmakta olup diğer analiz yöntemi olarak da yapılmaktadır.

- Miktar Tayini Analizinde: Bitmiş ürün ya da hammadde içeriğindeki etken madde miktarı tayin etmede kullanılmaktadır.
- İmpurite (Safsızlık) Analizinde: Bitmiş ürün ya da hammadde içeriğindeki safsızlıkları tayin etmede kullanılmaktadır.
- Çözünme Analizinde: Bitmiş ürün ya da hammadde içeriğindeki dissolüsyon miktarını tayin etmede kullanılmaktadır.
- Diğer Analiz Yöntemlerinde: Bitmiş ürün ya da hammadde tayininde yukarıdakilerden farklı analizlerde kullanılmaktadır.

1.4.1 Analitik Metot Validasyon Parametreleri

Metot validasyonu için resmi kurumların hangi kriterleri istediği aşağıdaki Tablo 1.5' de verilmiştir [42].

Tablo 1. 5: Metot validasyonunda gerekli kriterler

Seçicilik (Selectivity)	FDA, USP, ICH
Doğruluk (Accuracy)	FDA, USP, ICH
Kesinlik (Precision) Tekrarlanabilirlik (Repeatability) Ara kesinlik (Intermediate precision) Yenilebilirlik (Reproducibility)	FDA, USP, ICH ICH ICH ICH (Mutlak gereklilik değildir)
Tespit limiti (LOD)	USP, ICH
Miktar Tayini Limiti (LOQ)	FDA, USP, ICH
Doğrusallık (Linearity)	FDA, USP, ICH
Aralık (Range)	USP, ICH
Tutarlılık (Ruggedness)	USP
Sağlamlık (Robustness)	FDA, USP, ICH (Mutlak gereklilik değildir)
Stabilite (Stability)	FDA
Gerikazanım (Recovery)	FDA

Analitik metot validasyonun kimyasal analizlerin sonuçların doğruluğunu kanıtlayan parametrelerin sırasıyla yapılması gerekmektedir [43].

- Seçicilik (Spesifiklik)
- LOD (Tespit Limiti) ve LOQ (Tayin Alt Limiti)
- Doğrusallık (Linearity) ve Çalışma Aralığı
- Doğruluk (Geri Kazanım)
- Kesinlik
- Tekrarlanabilirlik
- Ara Kesinlik
- Sağlamlık
- Stabilite

1.4.1.1 Seçicilik

Validasyon parametrelerindeki mutlaka yapılması gereken bir parametredir ve metot geliştirme çalışmalarına bu parametreyle başlanmalıdır [44].

Analitik metodun seçiciliği, numune içerisindeki diğer matrislerden ayırabilmesidir. Geliştirilen metodun etken maddeye özgün olduğu kanıtlanmalıdır. Etken maddenin, içerdiği yardımcı maddeler ve diğer safsızlıklarla etkileşmediği ayrı ayrı tanımlandırılmalıdır [45].

1.4.1.2 LOD (Tespit Limiti) ve LOQ (Tayin Limiti)

Tespit limiti LOD, zemin (baseline) gürültüsünden farklı tespit edilen fakat miktarı belirlenemeyen en küçük analit konsantrasyonu olarak tanımlanır. Sisteme içerisinde etken olmayan blank çözeltisi enjeksiyon edilir ve bu enjeksiyonla gürültü hesaplanır. Sonra sinyal/gürültü oranlanır. Bu orandan faydalanılarak sinyal/gürültünün 3 olduğunda LOD' dir denir. Fakat bulunan değer kullanılan cihazlarla farklılık gösterir. ICH kriterlerine göre LOD ise standart sapmanın, eğime oranının 3.3 katıdır [44-46].

$$LOD = 3.3 SD/S \quad (1.7)$$

SD : Standart sapma

S : Eğim

Tayin Limiti (LOQ), hem doğruluk hem kesinlik çalışmalarının belirleyici faktörleri içerisinde kantitatif olarak hesaplanan en düşük madde miktarıdır. LOQ değerini hesaplamada da teşhis limiti (LOD) hesaplamasındaki gibi sinyal/gürültü' den yararlanır. Her ne kadar sinyal/gürültü oranı kullanılıp LOQ değeri hesaplanırsa da bu konsantrasyon doğruluk ve kesinlik sınırlarıyla uyumlu olmalıdır. Bu doğrultuda LOQ konsantrasyonu azalursa kesinlik değeri de azalır. Sinyal/gürültü oranı 10 olduğunda LOQ' dur denir. ICH kriterlerinde LOQ, standart sapmanın, eğimine oranının 10 katıdır [44].

$$LOQ = 10 SD/S \quad (1.8)$$

SD : Standart sapma

S : Eğim

1.4.1.3 Çalışma (Ölçüm) Aralığı ve Doğrusallık (Linearite)

Çalışma aralığının belirlenmesi, yöntemin uygulama aralığının belirlenmesi için yapılır. Kalibrasyon eğrisinde, ölçülen analitin konsantrasyon ve detektörden elde edilen yanıtın doğru orantılı olarak görüldüğü aralıktır [47].

Kalibrasyon eğrisi, ürünün yöntemine bağlı belirli sayıda ölçüm noktaları ile belirlenir. Eğri analitin bilinen derişimi ile oluşturulur. FDA' e göre en az 6 nokta, kör çözelti de eklenerek toplam 7 nokta olarak belirlenmiştir [48]. Grafik olarak sonuçlar verilir ve 'regresyon eşitliği' ile 'korelasyon katsayısı' belirlenir. Regresyon hesabı için excel formüllerden yararlanılabilir. Bu değerlere göre çalışma aralığının doğrusal olup olmadığı tespit edilir [47].

1.4.1.4 Doğruluk

Doğruluk, çok sayıdaki ölçüm sonuçlarının ortalamasının gerçek değere yakınlığıyla ölçülür. Gerçek değer ise sertifikalı referans materyalleri ile valide edilmiş yöntemin ölçümü sonucunda elde edilebilir. Doğruluk çalışması en az 3 farklı konsantrasyonda yapılmalıdır [47].

Konsantrasyonlar (yüksek, orta, düşük) olmak üzere her birinden üçer hazırlık yapılır. Plasebo içerisine miktarını bildiğimiz etken madde spike yapılır ve sonuçlar % geri kazanım olarak ifade edilir [43-49].

$$\% \text{ Geri Kazanım} = \frac{\text{Bulunan miktar} - \text{Numunedeki miktar}}{\text{Spike edilen miktar}} \times 100 \quad (1.9)$$

Hesaplanan sistematik hatanın gerçek değerle arasında önemli bir farkının bulunup bulunmadığı t-testi yapılarak kontrol edilebilir.

$$t = \frac{|\bar{X}_{\text{ortalama}} - \mu|}{SD/\sqrt{n}} \quad (1.10)$$

$\bar{X}_{\text{ortalama}}$ = Tekrarlanabilirlik veya tekrar elde edilebilirlik koşulları altında yapılan ölçümlerin ortalaması

μ = Bilinen değer (zenginleştirme miktarı)

SD= Tekrarlanabilirlik veya tekrar elde edilebilirlik koşulları altında yapılan ölçümlerin standart sapması

n= Tekrarlanabilirlik veya tekrar elde edilebilirlik koşulları altında yapılan ölçümlerin sayısı

1.4.1.5 Kesinlik (Tekrarlanabilirlik)

Analiz yönteminin kesinliği, spesifik analiz koşulları altında bir numunenin çoklu numunelerine tekrar tekrar uygulandığında, bireysel test sonuçları ile arasındaki uyumun derecesidir. ICH kriterleri, tekrarlanabilirlik parametresinin prosedür aralığı kapsamında en az dokuz çalışma (üç adet konsantrasyonun her biri ve her birinin üç tekrarı) veya test %100 konsantrasyonunda en az altı çalışma ile değerlendirilmesini istemektedir [50].

- **Sistem Kesinliği**

Metotdaki konsantrasyonu bilinen standardın ardışık alınan ölçüm sonuçlarının relatif standart sapması (RSD) değerlendirilerek sistemin kesinliği ölçülmüş olur [51].

- **Ara Hassasiyet**

Aynı analiz numunesinin farklı zamanlarda analizi yapıldığında elde edilen sonuçların tekrarlanabilir olması ve yapılan iki analiz sonucunun hassaslığının ölçüsüdür şeklinde tanımlanabilir. 6 adet numunenin farklı günlerde yapılan analiz sonuçları ve relatif standart sapmaları (RSD) değerlendirilir [51].

- **Tekrar Elde Edilebilirlik**

Farklı zamanlarda, farklı laboratuvarlarda farklı analistlerin, yaptıkları analiz sonucunda bulunan sonuçların tekrarlanabilir olmasıdır. Laboratuvarlar arasındaki hassasiyeti açıklar [51].

1.4.1.6 Sağlamlık

Analiz yöntemini uygularken kendi koşullardaki bazı küçük değişikliklerin analiz sonuçları üzerindeki etkisini inceler. Metot, kendi koşullarındaki ufak değişikliklerden ne kadar az etkileniyorsa o kadar sağlamdır. Sağlamlık çalışması yapılırken, pH, sıcaklık, dalga boyu, basınç gibi analiz sonucuna etki edebilecek faktörler belirlendikten sonra bu faktörler üzerinde küçük değişiklikler uygulanarak, analiz sonucuna etkisi belirlenir [47].

1.4.1.7 Stabilite

Stabilite (kararlılık), metotdaki gibi hazırlanan numunelerin analiz süresince zamana ve ortam koşullarına karşı bozunmadan sabit kaldığından emin olmak için yapılır [52].

2. DENEYSSEL BÖLÜM

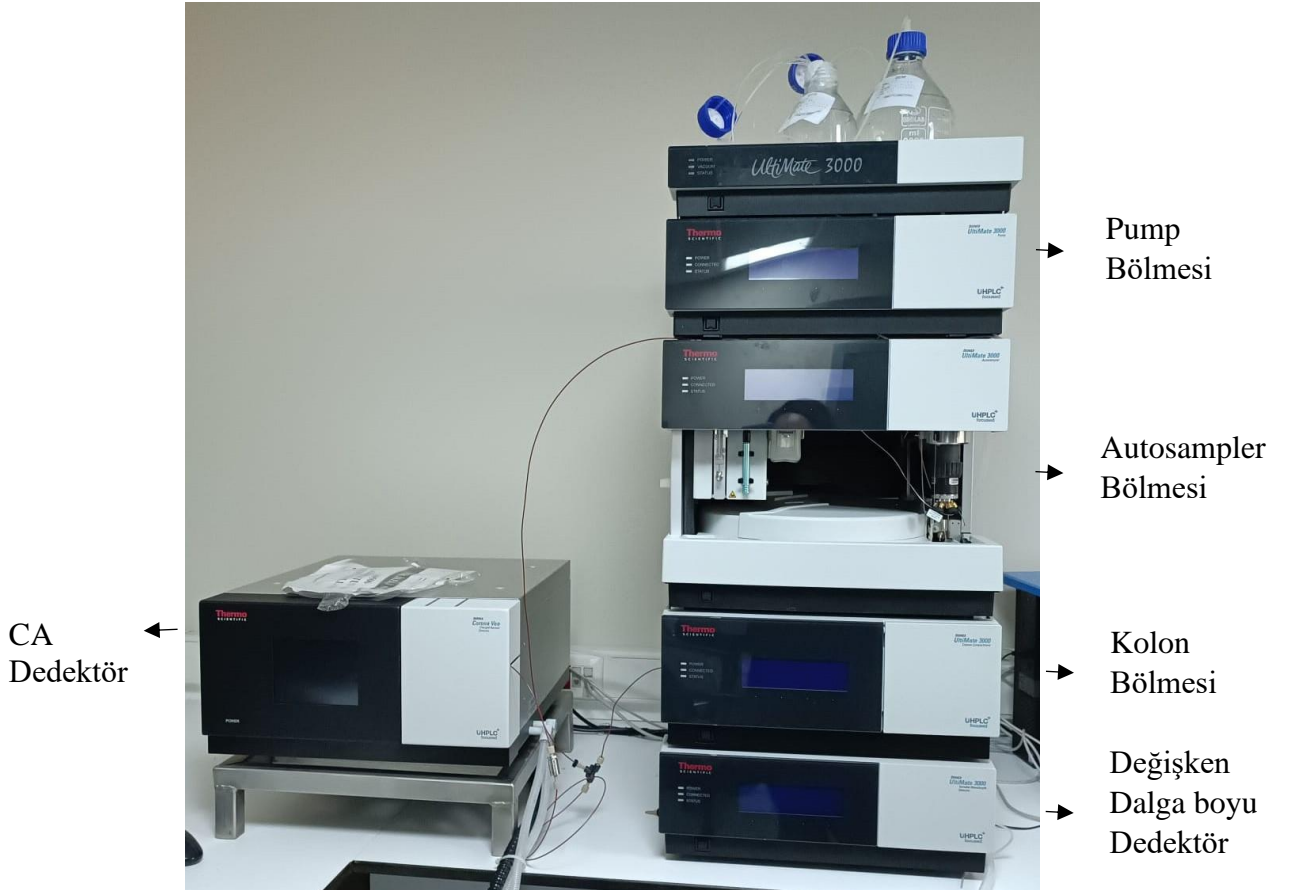
Çalışma Vem İlaç Sanayi ve Ticaret A. Ş. araştırma geliştirme laboratuvarında 2022-2024 yılları arasında yapıldı.

2.1 Materyal ve Yöntem

Ölçülü doz inhalasyon ürünlerinde sızabilen safsızlık olarak yağ asitlerinin analizinde ters faz HPLC ile metot geliştirme çalışmaları yapılarak validasyonu yapıldı. Metot validasyon parametrelerini uygulamak için gereken (GMP, USP, ICH, FDA gibi) uluslararası kuruluşlarca belirlenen kriterler uygulandı.

2.1.1 Materyal

HPLC sisteminde Thermo markalı CA (İletkenlik) dedektör kullanılarak Tablo 2.1' de verilen parametreler uygulandı. Kullanılan cihaz Şekil 2.1' de görülmektedir.



Şekil 2. 1: Thermo markalı CA dedektörlü HPLC

Tablo 2. 1: Ekipman parametreleri

Cihaz	Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000
Kolon Adı	Poroshell 120 EC-C18
Kolon Özellikleri	150 mm × 3,0 mm, 2.7 µm
Kolon Sıcaklığı	50°C
Numune Bölme Sıcaklığı	10°C
Dedektör	Yüklü Aerosol Dedektör (CAD)
Akış Hızı	1.0 mL/dakika
Enjeksiyon Hacmi	20 µL
Çözücü	%100 Asetonitril
Enjeksiyon Süresi	30 dk
Mobil Faz	Gradient Sistem

Kullanılan dedektör parametreleri Tablo 2.2' de verilmiştir.

Tablo 2. 2: Dedektör parametreleri

Evaporator Temperature	On
Evaporator Temperature Nominal	Low (35.0°C)
Evaporator Wait For Temperature Ready	Yes
Evaporator Wait For Temperature Ready Delta	5.0 [K]
CAD Data Collection Rate	2 [Hz]
CAD Filter Constant	1.0 [s]
CAD Power Function	1.00
Gain	100 pA Akış Hızı

Mobil faz ise mobil faz A ve mobil faz B olarak hazırlandı. Kullanılan gradient sistem Tablo 2.3' de verilmiştir.

Mobil Faz A: 1000.0 mL saf su içerisine 0.5 mL formik asit ilave edildi.

Mobil Faz B: 1000.0 mL asetonitril içerisine 0.5 mL formik asit ilave edildi.

Tablo 2. 3: Gradient Sistem

Zaman(dakika)	Mobil Faz A (%)	Mobil Faz A (%)
0.0	37.0	63.0
28.0	15.0	85.0
40.0	15.0	85.0
40.01	37.0	63.0
45.0	37.0	63.0

2.1.2 Kullanılan Çözeltiler

2.1.2.1 Standart Çözelti Hazırlığı

30.0 mg stearik asit tartıldı ve 100.0 mL' lik balon jofeye aktarıldı. 60.0 mL çözücü ve 20.0 mL metanol eklendi, 10 dakika ultrasonik banyoda bekletilerek hacmi tamamlandı. Hazırlanan çözeltiden 2.5 mL alındı ve 100.0 mL balon jofeye aktarıldı, 100.0 mL' ye tamamlandı. (Standart konsantrasyonu: 7.5 µg/mL)

2.1.2.2 Numune Çözelti Hazırlığı

Ürüne ait kanisterin üzeri temizlendi ve kurutuldu. Kurutulan kanister tartıldı (W1). Kanister -80 °C 1 saat donduruldu. 1 saatin sonunda kanister kesildi ve solüsyon 10.0 mL' lik balon jofeye transfer edilerek HFA (Norfloran, hfa 134a) gazının tamamen uçması beklendi. Kanisterin içi çözücü ile yıkanarak aynı balon jofeye aktarıldı. Çözücü ile 10.0 mL' ye tamamlandı. Boş kanister kurutuldu ve tartımı yapıldı (W2). Filtrelenmeden kullanıldı.

2.1.3 Hesaplama

$$\frac{A_{num}}{A_{std}} \times \frac{W_{std}}{100.0} \times \frac{2.5}{100.0} \times \frac{P}{100} \times \frac{10.0}{W_{num}} \times \frac{1}{L} \times 100 \times DF = \mu\text{g/kanister} \quad (2.1)$$

A_{num} : Numune çözeltisindeki sızabilen safsızlık pik alan

A_{std} : Standart çözeltisindeki stearik asit ortalama alan

W_{std} : Standart tartımı (mg)

W_{num} : Numune tartımı (W1- W2) (mg)

P : Standart potansi (%)

L : Etiket değeri (µg/ kanister)

DF : Düzeltme faktörü

2.1.4 Limitler

Limitler Tablo 2.4' de verilmiştir.

Tablo 2. 4: Limitler

Miristik Asit	Maksimum 75 µg/kanister
Linoleik Asit	Maksimum 75 µg/kanister
Palmitik Asit	Maksimum 75 µg/kanister
Oleik Asit	Maksimum 75 µg/kanister
Elaidik Asit	Maksimum 75 µg/kanister
Stearik Asit	Maksimum 75 µg/kanister
Arakidik Asit	Maksimum 75 µg/kanister

Yapılan çalışmalara ait elde edilen sonuçlar aşağıda gösterilmiştir; tüm asitlere ait piklerin bağıl alıkonma zamanları, hesap çubuğunda kullanılan düzeltme faktörleri (DF), nicelik sınırı (LOQ), belirleme sınırı (LOD) değerleri belirlenmiştir.

Tablo 2. 5: Sonuçların Raporlandırılması

Pik Adı	Bağıl Alıkonma Zamanı	Düzeltilme Faktörü (DF)	Nicelik Sınırı (µg/kanister) (LOQ)	Belirleme Sınırı (µg/kanister) (LOD)
Miristik Asit	0.37	8.3	3.3 µg/kanister	1.089 µg/kanister
Linoleik Asit	0.51	4.0	3.45 µg/kanister	1.139 µg/kanister
Palmitik Asit	0.65	1.5	1.2 µg/kanister	0.396 µg/kanister
Oleik Asit	0.72	1.5	7.5 µg/kanister	2.475 µg/kanister
Elaidik Asit	0.77	1.3	7.5 µg/kanister	2.475 µg/kanister
Stearik Asit	1.00	-	8.25 µg/kanister	2.723 µg/kanister
Arakidik Asit	1.31	1.0	7.5 µg/kanister	2.475 µg/kanister

2.1.5 Sistem Uygunluk Şartları

- Sistem mobil faz ile şartlandırılır.
- Çözücünden 1 enjeksiyon sisteme verilir.
- Standart çözeltisinden 6 ardışık enjeksiyon yapılır. Enjeksiyonlar arası % RSD \leq % 5.0 olmalıdır.
- 2 adet numune çözeltisi hazırlanarak her birinden 1 enjeksiyon verilir.
- Standart çözeltideki etkin madde pikinin kuyruklanma faktörü 2.0'den fazla olmamalıdır.
- Standart çözeltideki etkin madde pikinin teorik plaka sayısı \geq 2000 olmalıdır.

2.1.6 Standart ve Reaktif Bilgileri

Tablo 2.6 ve Tablo 2.7 analizde kullanılan standart ve reaktiflerin; lot numaraları, potensleri, hangi firmadan alındıkları ve son kullanma tarihleri gibi bilgileri içermektedir.

Tablo 2. 6: Standart Bilgileri

Standart Adı	Lot Numarası	Potens	Firma	Son Kullanma Tarihi
Miristik Asit	R14500	% 100	USP	USP Online
Linoleik Asit	2-XZL-5-1	% 98	TRC	19/03/2023
Palmitik Asit	P0090000/5	% 100	EP	EP Online
Oleik Asit	Y0001479/2	% 98.8	EP	EP Online
Elaidik Asit	14-MWC-133-1	% 95	TRC	11/03/2023
Stearik Asit	S1340000/4	% 100	EP	EP Online
Arakidik Asit	1-KOP-22-1	% 98	TRC	04/12/2025

Tablo 2. 7: Reaktif Bilgileri

Reaktif Adı	Lot Numarası	Firma	Son Kullanma Tarihi
Asetonitril	I1232830236	Supelco	31/08/2025
Metanol	2229705856	J.T.Baker	10/2024
Formik Asit	K50073264813	Merck	28/02/2023

2.2 Yöntemin Validasyonu

Yağ asitlerinin yapıları incelendi, DMF' lerine (Drug Master File FDA) bakıldı, farmakopeler (EP; European Pharmacopoeia, BP; British Pharmacopoeia, USP; United States Pharmacopoeia) ve yayınlar incelenerek gerekli doküman araştırmaları yapıldı.

Metot geliştirmede, kullanılacak olan metoda karar verildikten sonra standart ve numune konsantrasyonları belirlendi. Limitler ise USP' ye göre temel alındı.

Çalışmalara başlamadan önce gerekli standart, kolon, reaktifler temin edildi. Hplc sistemi, geliştirdiğimiz metodun özelliklerine (mobil faz, kolon, standart ve numune konsantrasyonu) uygun olarak hazırlandı. Deneme enjeksiyonları görüldü. Kabul kriterlerine ve limitlere uygun bir pik elde edene kadar denemelere devam edildi.

Tüm şartlar sağlandığında validasyona başlandı ve validasyon parametreleri tek tek uygulandı. Validasyon bittiğinde yağ asitlerine özgü sızabilen safsızlık analizi için valide edilmiş bir metot elde edildi.

2.2.1 Metot Geliştirme

2.2.1.1 Sistemde İlk Deneme Enjeksiyonu

HPLC sisteminde Thermo markalı CA (İletkenlik) dedektör kullanılarak Tablo 2.8' de verilen ekipman parametreleri ve Tablo 2.9' da verilen dedektör parametreleri uygulandı.

Tablo 2. 8: Ekipman parametreleri

Cihaz	Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000
Kolon Adı	Poroshell 120 EC-C18
Kolon Özellikleri	150 mm × 3,0 mm, 2.7 µm
Kolon Sıcaklığı	50°C
Numune Bölme Sıcaklığı	10°C
Dedektör	Yüklü Aerosol Dedektör (CAD)
Akış Hızı	1.0 mL/dakika
Enjeksiyon Hacmi	20 µL
Çözücü	%100 Asetonitril
Enjeksiyon Süresi	30 dk
Mobil Faz	İzokratik Sistem

Tablo 2. 9: Dedektör parametreleri

Evaporator Temperature	On
Evaporator Temperature Nominal	Low (35.0°C)
Evaporator Wait For Temperature Ready	Yes
Evaporator Wait For Temperature Ready Delta	5.0 [K]
CAD Data Collection Rate	10.0 [Hz]
CAD Filter Constant	1.0 [s]
CAD Power Function	1.00
Gain	100 pA Akış Hızı

Mobil Faz: Mobil faz A ve mobil faz B' nin (25:75) oranlarında karıştırılmasıyla oluşturuldu.

Mobil Faz A: 1000 mL saf suda 1 mL %0.85 fosforik asit (h:h)

Mobil Faz B: Asetonitril: Saf su (90:10) (h:h)

Kullanılan Standartlar: Miristik Asit, Palmitik Asit, Elaidik Asit, Stearik Asit, Arakidik Asit, Linoleik Asit, Oleik Asit.

Miristik Asit, Palmitik Asit, Elaidik Asit, Stearik Asit, Arakidik Asit Hazırlığı:

3.0 mg miristik asit, palmitik asit, elaidik asit, stearik asit, arakidik asit tartıldıktan sonra 100.0 mL' lik balon jöjeye alındı. Çözücüsünden 60.0 mL ve 20 mL metanol eklendi, 10 dk ultrasonic banyoda bekletildi. Çözücü ile hacmine tamamlandı. Bu çözeltiden 2.5 mL alındı, 100 mL balon jöjeye aktarıldı ve hacmine çözücü ile tamamlandı. (Miristik Asit, Palmitik

Asit, Elaidik Asit, Stearik Asit, Arakidik Asit, Linoleik Asit, Oleik Asit konsantrasyonları:
0.75 µg/mL)

Beş adet (miristik asit, palmitic asit, elaidik asit, stearik asit, arakidik asit) standart tartılıp bu şartlarda sisteme ilk standart enjeksiyonu verildi. Standart kromatogramı 3. bölümde Şekil 3.1' de verilmiştir.

2.2.1.2 Standart Konsantrasyonu ve Mobil Faz Değişimi

Sistemdeki diğer koşullar aynı kalarak standart konsantrasyonu ve mobil faz değişimi yapıldı.

Standartlar, konsantrasyon (0.3 mg/mL) artırılacak şekilde hazırlandı.

Miristik Asit Hazırlığı

1.5 mg miristik asit tartıldı. 5.0 mL' lik balon jodede üzerine çözücü ve metanolden 2'şer mL eklenip, 10 dakika ultrasonik banyo içerisinde bekletildi. Çözücü ile hacmine tamamlandı. (Miristik asit konsantrasyonu: 0.3 mg/mL)

Palmitik Asit Hazırlığı

1.5 mg palmitik asit tartıldı. 5.0 mL' lik balon jodede üzerine çözücüsünden ve metanolden 2'şer mL eklenip, 10 dakika ultrasonik banyo içerisinde bekletildi. Çözücü ile hacmine tamamlandı. (Palmitik asit konsantrasyonu: 0.3 mg/mL)

Elaidik Asit Hazırlığı

1.5 mg elaidik asit tartılarak 5.0 mL' lik balon jodaye transfer edildi. Çözücüsünden ve metanolden 2'şer mL eklendi. 10 dakika ultrasonik banyo içerisinde bekletildikten sonra 5.0 mL' lik hacmine tamamlandı. (Elaidik asit konsantrasyonu: 0.3 mg/mL)

Stearik Asit Hazırlığı

1.5 mg stearik asit tartılarak 5.0 mL' lik balon jodaye transfer edildi. Çözücüsünden ve metanolden 2'şer mL eklendi. 10 dakika ultrasonik banyo içerisinde bekletildikten sonra 5.0 mL' lik hacmine tamamlandı. (Stearik asit konsantrasyonu: 0.3 mg/mL)

Arakidik Asit Hazırlığı

1.5 mg arakidik asit tartıldı. 5.0 mL' lik balon jodede üzerine çözücüsünden ve metanolden 2'şer mL eklenip, 10 dakika ultrasonik banyo içerisinde bekletildi. Çözücü ile hacmine tamamlandı. (Arakidik asit konsantrasyonu: 0.3 mg/mL)

Stok Linoleik Asit Hazırlığı

Yaklaşık 20.0 mg linoleik asit 10.0 mL' lik balon joje içerisine tartılıp çözücüsünden 4.0 mL metanolden 2.0 mL eklenerek hacmi tamamlandı.

Linoleik Asit Hazırlığı

Stok linoleik asit çözeltisinden 0.7 mL alındı, 5.0 mL balon jeye aktarıldı ve hacmine çözücü ile tamamlandı. (Linoleik asit konsantrasyonu: 0.3 mg/mL)

Stok Oleik Asit Hazırlığı

Yaklaşık 20.0 mg oleik asit 10.0 mL' lik balon joje içerisine tartılıp çözücüsünden 4.0 mL metanolden 2.0 mL eklenerek hacmi tamamlandı.

Oleik Asit Hazırlığı

Stok oleik asit çözeltisinden 0.7 mL alındı, 5.0 mL balon jeye aktarıldı ve hacmine çözücü ile tamamlandı. (Oleik asit konsantrasyonu: 0.3 mg/mL)

Karışım Standart Hazırlığı

1.5 mg miristik asit, palmitik asit, elaidik asit, stearik asit, arakidik asit 5.0 mL'lik balon joje içerisine tartıldı. 1.0 mL çözücü ve 1.0mL metanol eklendi, 10 dk ultrasonik banyoda bekletildi. Stok linoleik asit ve stok oleik asit çözeltilerinden 0.7 mL alınarak aynı balon jeye aktarıldı ve hacmine çözücü ile tamamlandı. (Miristik Asit, Palmitik Asit, Elaidik Asit, Stearik Asit, Arakidik Asit, Linoleik Asit, Oleik Asit konsantrasyonları: 0.3 mg/mL).

- Mobil Faz: Mobil faz A ve mobil faz B' nin (25:75) oranlarında karıştırılmasıyla elde edildi.

Mobil Faz A: 100 mL saf suda % 0.5 formik asit (h:h)

Mobil Faz B: % 100 asetonitrilde % 0.5 formik asit (h:h)

Sisteme blank (çözücü) enjeksiyonu, standart karışım enjeksiyonu ve standartların yerlerini (retention time) belirlemek için tek tek enjeksiyonlar sisteme verildi. Kromatogramlar 3. Bölümde sırasıyla Şekil 3.2 ve Şekil 3.3, Şekil 3.4, Şekil 3.5 Şekil 3.6, Şekil 3.7, Şekil 3.8, Şekil 3.9, Şekil 3.10' da verilmiştir.

2.2.1.3 Standart Konsantrasyonu, Mobil Faz Oran ve Enjeksiyon Hacmi Denemesi

Standart konsantrasyonu 1.5 µg/ml hazırlandı.

Stok Miristik Asit, Palmitik Asit, Elaidik Asit, Stearik Asit, Arakidik Asit Hazırlığı

3.0 mg miristik asit, palmitik asit, elaidik asit, stearik asit, arakidik asit 50.0 mL' lik balon jojeye tartıldı ve içerisine 30.0 mL çözücüsünden, 10 mL metanolden eklendi, 10 dk boyunca ultrasonik banyo içerisinde bekletildikten sonra hacmi tamamlandı.

Stok Linoleik Asit ve Oleik Asit Hazırlığı

Yaklaşık 37.5 mg linoleik asit, oleik asit tartıldı ve 25.0 mL' lik balon jojeye aktarıldı. 20.0 mL çözücü ve 2.0 mL metanol eklendi. Çözücü ile hacmine tamamlandı. Bu çözeltiden 1 mL alındı, 10 mL balon jojeye aktarıldı ve hacmine çözücü ile tamamlandı.

Standart Hazırlığı

Stok miristik asit, palmitik asit, elaidik asit, stearik asit, arakidik asit çözeltisinden 2.5 mL alındı, 100 mL balon jojeye aktarıldı üzerine Stok linoleik asit ve oleik asit çözeltisinden 1 mL eklendi ve hacmine çözücü ile tamamlandı. (Miristik Asit, Palmitik Asit, Elaidik Asit, Stearik Asit, Arakidik Asit, Linoleik Asit, Oleik Asit konsantrasyonları: 1.5 µg/ml).

Mobil faz oranları ve enjeksiyon sürelerinin denemesi ve enjeksiyon hacmi denemeleri yapıldı. Gradient sistem aşağıdaki Tablo 2.10' da gösterilmiştir.

Tablo 2. 10: Gradient Sistemi

Zaman (dakika)	Mobil Faz A (%)	Mobil Faz B (%)
0	37	63
28	35	65
55	25	75
70	25	75
70.01	37	63
75	37	63

Standart kromatogramı Şekil 3.11' da verilmiştir.

2.2.1.4 Standart Konsantrasyon ve Enjeksiyon Hacim Deneme

Standart konsantrasyonu hesaplanması, USP' ye göre yapıldı [3].

AET Analitik Değerlendirme Eşiği Hesaplandı;

$$AET = (QT/\text{maksimum günlük alım dozu}) * (\text{kanister doz sayısı}) \quad (2.2)$$

$$AET = (5/8) \times 120 = 75 \mu\text{g}/\text{kanister}$$

Nitelik Eşiği (QT: Qualification Threshold); Bilinen safsızlıklarda 5, bilinmeyen safsızlıklarda 0.15 sabit değerini alındı.

$$LOQ (\text{Tayin Limiti}) = AET \text{ ya da } LOQ < AET \text{ olmalıdır.} \quad (2.3)$$

s/n değeri bunun için önemlidir.

$$\text{Standart konsantrasyonu : } (1 \text{ kanister}/10 \text{ mL}) * \text{limit} \quad (2.4)$$

$$: 7,5 \mu\text{g}/\text{mL} \text{ olarak hazırlandı.}$$

Stok Miristik Asit, Palmitik Asit, Elaidik Asit, Stearik Asit, Arakidik Asit Hazırlığı

3.0 mg miristik asit, palmitik asit, elaidik asit, stearik asit, arakidik asit 10.0 mL' lik balon joje içerisine tartıldı. Üzerine 6.0 mL çözücü ve 2.0 mL metanol eklendi, 10 dk boyunca ultrasonik banyo içerisinde bekletilip hacmi tamamlandı.

Stok Linoleik Asit ve Oleik Asit Hazırlığı

Yaklaşık 37.5 mg linoleik asit, oleik asit 50.0 mL' lik balon joje içerisine tartıldı ve 20.0 mL çözücüsünden 2.0 mL metanolden eklendi. Çözücü ile hacmine tamamlandı.

Standart Hazırlığı

Stok miristik asit, palmitik asit, elaidik asit, stearik asit, arakidik asit çözeltisinden 2.5 mL alındı, 100 mL balon jojeye aktarıldı üzerine Stok linoleik asit ve oleik asit çözeltisinden 1 mL eklendi ve hacmine çözücü ile tamamlandı. (Miristik Asit, Palmitik Asit, Elaidik Asit, Stearik Asit, Arakidik Asit, Linoleik Asit, Oleik Asit konsantrasyonları: 7.5 µg/ml).

Enjeksiyon hacmi denemeleri yapıldı. Standart karışım kromatogramı Şekil 3.12' de verilmiştir.

2.2.1.5 S/N Denemeleri

Kromatogram sonuçlarına göre s/n değerleri kontrol edildi;

Standart enjeksiyonun pik kesimlerini cihazda blank' e göre otomatik hesaplattığımızdaki kromatogram Şekil 3.13' de verilmiştir, cihazda manuel olarak dakika aralığı seçip hesaplattığımızdaki kromatogram Şekil 3.14' de verilmiştir.

Cihazın dedektör parametrelerindeki değerlerin de s/n oranına etkisi vardır. Bu değerler:

- CAD Power Function :1.00
- CAD Filter Constant : 1.0 [s]
- CAD Data Collection Rate: 10.0 [Hz]

Bu değerler değiştirilerek denemeler yapıldı.

Kromatogram pik kesim şartlarında 'smoothing type' değerleri (5-31) var bu değerlerin de s/n oranına etkisi vardır.

Tüm denemeler sonucunda en iyi şartlar sisteme verilğinde kromatogram Şekil 3.15' de verilmiştir.

2.2.1.6 Gradient Sistem Denemeleri

Enjeksiyon süremizi kısaltmak için gradient sistem denemeleri yapıldı. Gradient sistem aşağıdaki Tablo 2.11' de gösterilmiştir.

Tablo 2. 11: Gradient Sistemi

Zaman (dakika)	Mobil Faz A (%)	Mobil Faz B (%)
0.0	37	63
28	15	85
40	15	85
40.01	37	63
45	37	63

Bu gradient sistemle standart kromatogramı Şekil 3.16’da verilmiştir.

2.2.2 Yöntem Validasyon Parametreleri

2.2.2.1 Seçicilik

Kabul Kriterleri

- Çözücü ve placebo (etkin madde dışındaki kısım) kromatogramlarında etkin madde ve bilinen sızabilen safsızlıkların alıkonma zamanlarında başka bir safsızlığa ya da etkin maddeye ait pik gözlenmemelidir.
- Safsızlığa ait pikler etkin madde piki veya birbiriyle çakışmamalıdır.
- Filtre çalışmasında farklı filtre tipleri kullanılarak aralarındaki alan farklarından en uygun filtre seçilir.

%Fark Hesaplama : Mutlak (Filtreli alan –Filtresiz Alan) / Filtresiz Alan *100

Farklı filtre tipleri arasındaki alan farkı;

standart için $\leq \% 5.0$, safsızlık limiti $< \% 0.50$ ise fark $\leq \% 5.0$,

safsızlık limiti $\geq \% 0.50$ ise fark $\leq \% 3.0$ olması gerekmektedir.

Stok Miristik Asit Hazırlığı

10.0 mg miristik asit 100.0 mL’ lik balon jöjeye tartıldı. 60.0 mL çözücü ve 20.0 mL metanol eklendi. 10 dakika ultrasonik banyo içerisinde bekletildi. Çözücü ile hacmine tamamlandı. (Miristik Asit Konsantrasyonu: 100.0 µg/mL)

Miristik Asit Hazırlığı

Stok miristik asit çözeltisininin 7.5 mL’si 100.0 mL’ lik balon jöjeye aktarıldı. Çözücü ile hacmine tamamlandı. (Miristik Asit Konsantrasyonu: 7.5 µg/mL)

Stok Palmitik Asit Hazırlığı

10.0 mg palmitik asit tartılıp 100.0 mL' lik balon joje içerisine transfer edildi. 60.0 mL çözücü ve 20.0 mL metanol eklendi. 10 dakika ultrasonik banyo içerisinde bekletilerek hacmi tamamlandı. (Palmitik Asit Konsantrasyonu: 100.0 µg/mL)

Palmitik Asit Hazırlığı

Stok palmitik asit çözeltisinin 7.5 mL' si 100.0 mL' lik balon jojeye aktarıldı. Çözücü ile hacmine tamamlandı. (Palmitik Asit Konsantrasyonu: 7.5 µg/mL)

Stok Elaidik Asit Hazırlığı

10.0 mg elaidik asit tartıldı ve 100.0 mL' lik balon jojeye aktarıldı. 60.0 mL çözücü ve 20.0 mL metanol eklendi. 10 dakika ultrasonik banyoda bekletildi. Çözücü ile hacmine tamamlandı. (Elaidik Asit Konsantrasyonu: 100.0 µg/mL)

Elaidik Asit Hazırlığı

Stok elaidik asit çözeltisinin 7.5 mL' si 100.0 mL' lik balon jojeye aktarıldı. Çözücü ile hacmine tamamlandı. (Elaidik Asit Konsantrasyonu: 7.5 µg/mL)

Stok Stearik Asit Hazırlığı

10.0 mg stearik asit 100.0 mL' lik balon jojeye tartıldı üzerine çözücüsünden 60.0 mL ve metanolden 20.0 mL eklendi. 10 dakika boyunca ultrasonik banyo içerisinde bekletildi. Sonra hacmi tamamlandı. (Stearik Asit Konsantrasyonu: 100.0 µg/mL)

Stearik Asit Hazırlığı

Stok stearik asit çözeltisinin 7.5 mL' si 100.0 mL' lik balon jojeye aktarıldı. Çözücü ile hacmine tamamlandı. (Stearik Asit Konsantrasyonu: 7.5 µg/mL)

Stok Arakidik Asit Hazırlığı

10.0 mg arakidik asit 100.0 mL' lik balon joje içerisine tartılıp ve 60.0 mL çözücü ve 20.0 mL metanol eklendi. 10 dakika süreyle ultrasonik banyo içerisinde bekletilerek 100.0 mL' lik hacmi tamamlandı. (Arakidik Asit Konsantrasyonu: 100.0 µg/mL)

Arakidik Asit Hazırlığı

Stok arakidik asit çözeltilisinin 7.5 mL'si 100.0 mL' lik balon jøjeye aktarıldı. Çözücü ile hacmine tamamlandı. (Arakidik Asit Konsantrasyonu: 7.5 µg/mL)

Stok Linoleik Asit Hazırlığı

10.0 mg linoleik asit 100.0 mL' lik balon jøjeye tartılarak transfer edildi. Çözücüsünden 60.0 mL metanolden 20.0 mL üzerine eklendi. 10 dakika ultrasonik banyo içinde bekletilerek hacmi tamamlandı. (Linoleik Asit Konsantrasyonu: 100.0 µg/mL)

Linoleik Asit Hazırlığı

Stok linoleik asit çözeltilisinin 7.5 mL' si 100.0 mL' lik balon jøjeye aktarıldı. Çözücü ile hacmine tamamlandı. (Linoleik Asit Konsantrasyonu: 7.5 µg/mL)

Stok Oleik Asit Hazırlığı

10.0 mg oleik asit 100.0 mL' lik balon joje içine tartıldı. 60.0 mL çözücü ve 20.0 mL metanol eklendi. 10 dakika süreyle ultrasonik banyo içerisinde bekletildi. 100.0 mL' lik hacmi tamamlandı. (Oleik Asit Konsantrasyonu: 100.0 µg/mL)

Oleik Asit Hazırlığı

Stok oleik asit çözeltilisinin 7.5 mL' si 100.0 mL' lik balon jøjeye aktarıldı. Çözücü ile hacmine tamamlandı. (Oleik Asit Konsantrasyonu: 7.5 µg/mL)

Karışım Standart Hazırlığı

0.75 mL stok miristik asit, 0.75 mL stok palmitik asit, 0.75 mL stok elaidik asit, 0.75 mL stok stearik asit, 0.75 mL stok arakidik asit, 0.75 mL stok linoleik asit ve 0.75 mL stok oleik asit çözeltileri 10.0 mL' lik balon jøjeye aktarıldı. Çözücü ile hacmine tamamlandı.

Ekim Yapılmamış Numune Çözeltilisi Hazırlığı

Ürüne ait kanisterin üzeri temizlendi ve kurutuldu. Kurutulan kanister tartıldı (W1). Kanister -80 °C 1 saat donduruldu. 1 saatin sonunda kanister kesildi ve solüsyon 10.0 mL' lik balon jøjeye transfer edilerek HFA gazının tamamen uçması beklendi. Kanisterin içi çözücü ile yıkanarak aynı balon jøjeye aktarıldı. Çözücü ile 10.0 mL' ye tamamlandı. Boş kanister kurutuldu ve tartımı yapıldı (W2). Filtrelenmeden kullanıldı.

Ekim Yapılmış Numune Çözeltisi Hazırlığı

Ürüne ait kanisterin üzeri temizlendi ve kurutuldu. Kurutulan kanister tartıldı (W1). Kanister -80 °C 1 saat donduruldu. 1 saatin sonunda kanister kesildi ve solüsyon 10.0 mL' lik balon jojeye transfer edildi ve HFA gazının tamamen uçması beklendi. 0.75 mL stok miristik asit, 0.75 mL stok palmitik asit, 0.75 mL stok elaidik asit, 0.75 mL stok stearik asit, 0.75 mL stok arakidik asit, 0.75 mL stok linoleik asit ve 0.75 mL stok oleik asit çözeltileri 10.0 mL' lik balon jojeye aktarıldı. Kanisterin içi çözücü ile yıkanarak aynı balon jojeye aktarıldı. Çözücü ile 10.0 mL' ye tamamlandı. Boş kanister kurutuldu ve tartımı yapıldı (W2). Filtrelenmeden kullanıldı.

Sisteme ilk filtre çalışması verildiğindeki sonuçlar Tablo 3.1' de verilmiştir.

Seçicilik sonuçları Tablo 3.2' de verilmiştir.

Sisteme blank (çözücü) enjeksiyonu, standart karışım enjeksiyonu ve standartların yerlerini (retention time) belirlemek için tek tek enjeksiyonlar sisteme verildi. Kromatogramlar 3. Bölümde sırasıyla Şekil 3.17 ve Şekil 3.18, Şekil 3.19, Şekil 3.20 Şekil 3.21, Şekil 3.22, Şekil 3.23, Şekil 3.24, Şekil 3.25, Şekil 3.26, Şekil 3.27' de verilmiştir.

2.2.2.2 Doğrusallık

Bu parametrede konsantrasyona göre alanlarla grafik çizildi. En küçük kareler yöntemiyle regresyon doğru denklemi ve korelasyon katsayısı belirlendi ve yorumlandı.

LOQ ve % 150 konsantrasyonları arasında en az 6 farklı konsantrasyonda etkin madde ve bilinen safsızlıklar içeren çözeltiler hazırlandı. Düşük konsantrasyondan başlayarak sıra ile sisteme enjekte edildi. LOQ seviyesinden, en yüksek konsantrasyon seviyesinden ve %100' lük konsantrasyon seviyesinden sisteme 6 defa, diğer konsantrasyonlar 3 defa enjekte edildi.

Kabul Kriterleri

- $R \geq 0.990$
- $R^2 \geq 0.990$

$$\frac{y-\text{kesim noktası}}{\%100 \text{ Seviyesindeki Alan}} \times 100 \leq \%10.0 \quad (2.5)$$

Doğrusallık çözeltilerinin hazırlanışı; standartların stok hallerinin hazırlanışları seçicilik parametresinde verildi.

LOQ Seviyesi

0.44 mL miristik asit, 0.16 mL palmitic asit, 1.0 mL elaidik asit, 1.1 mL stearik asit, 1.0 mL arakidik asit, 0.46 mL linoleik asit ve 1.0 mL oleik asit çözeltileri 10.0 mL' lik balon joje içerisine transfer edilerek hacmi tamamlandı. (Konsantrasyonlar: Miristik Asit: 0.33 µg/mL, Palmitik Asit: 0.12 µg/mL, Elaidik Asit: 0.75 µg/mL, Stearik Asit: 0.825 µg/mL, Arakidik Asit: 0.75 µg/mL, Linoleik Asit: 0.345 µg/mL, Oleik Asit: 0.75 µg/mL)

% 50 Seviyesi

0.375 mL stok miristik asit, 0.375 mL stok palmitik asit, 0.375 mL stok elaidik asit, 0.375 mL stok stearik asit, 0.375 mL stok arakidik asit, 0.375 mL stok linoleik asit ve 0.375 mL stok oleik asit çözeltileri 10.0 mL' lik balon jojeye aktarıldı. Çözücü ile hacmine tamamlandı. (Konsantrasyonlar: Miristik Asit, Palmitik Asit, Elaidik Asit, Stearik Asit, Arakidik Asit, Linoleik Asit, Oleik Asit: 3.75 µg/mL)

% 80 Seviyesi

0.6 mL stok miristik asit, 0.6 mL stok palmitik asit, 0.6 mL stok elaidik asit, 0.6 mL stok stearik asit, 0.6 mL stok arakidik asit, 0.6 mL stok linoleik asit ve 0.6 mL stok oleik asit çözeltileri 10.0 mL' lik balon jojeye aktarıldı. Çözücü ile hacmine tamamlandı. (Konsantrasyonlar: Miristik Asit, Palmitik Asit, Elaidik Asit, Stearik Asit, Arakidik Asit, Linoleik Asit, Oleik Asit: 6.0 µg/mL)

% 100 Seviyesi

0.75 mL stok miristik asit, 0.75 mL stok palmitik asit, 0.75 mL stok elaidik asit, 0.75 mL stok stearik asit, 0.75 mL stok arakidik asit, 0.75 mL stok linoleik asit ve 0.75 mL stok oleik asit çözeltileri 10.0 mL' lik balon jojeye aktarıldı. Çözücü ile hacmine tamamlandı. (Konsantrasyonlar: Miristik Asit, Palmitik Asit, Elaidik Asit, Stearik Asit, Arakidik Asit, Linoleik Asit, Oleik Asit: 7.5 µg/mL)

% 120 Seviyesi

0.9 mL stok miristik asit, 0.9 mL stok palmitik asit, 0.9 mL stok elaidik asit, 0.9 mL stok stearik asit, 0.9 mL stok arakidik asit, 0.9 mL stok linoleik asit ve 0.9 mL stok oleik asit

çözeltileri 10.0 mL' lik balon jøjeye aktarıldı. Çözücü ile hacmine tamamlandı. (Konsantrasyonlar: Miristik Asit, Palmitik Asit, Elaidik Asit, Stearik Asit, Arakidik Asit, Linoleik Asit, Oleik Asit: 9.0 µg/mL)

% 150 Seviyesi

1.125 mL stok miristik asit, 1.125 mL stok palmitik asit, 1.125 mL stok elaidik asit, 1.125 mL stok stearik asit, 1.125 mL stok arakidik asit, 1.125 mL stok linoleik asit ve 1.125 mL stok oleik asit çözeltileri 10.0 mL'lik balon jøjeye aktarıldı. Çözücü ile hacmine tamamlandı. (Konsantrasyonlar: Miristik Asit, Palmitik Asit, Elaidik Asit, Stearik Asit, Arakidik Asit, Linoleik Asit, Oleik Asit: 11.25 µg/mL)

Sırasıyla doğrusallık çalışmaları ve grafikleri bölüm 3' de Tablo 3.3-Tablo 3.9 arasında ve Şekil 3.28- Şekil 3.34 arasında gösterilmiştir.

2.2.2.3 Çalışma Aralığı

Doğrusallık parametresinde çalışılan minimum ve maksimum konsantrasyonlarının % RSD' sine bakıldı.

Kabul Kriterleri

- LOQ seviyesi için standart enjeksiyonları arası % RSD ≤ % 15.0 olmalıdır.
- Maksimum seviyesi için standart enjeksiyonları arası % RSD ≤ % 5.0 olmalıdır.

Bu parametreyi test etmek için doğrusallık parametresinde hazırlanan LOQ ve % 150 konsantrasyondaki çözeltiler kullanıldı.

Miristik asit, linoleik asit, palmitik asit, oleik asit çalışma aralığı sonuçları bölüm 3' de Tablo 3.10' da verilmiştir. Elaidik asit, stearik asit, arakidik asit çalışma aralığı sonuçları bölüm 3' de Tablo 3.11' de verilmiştir.

2.2.2.4 LOD (Tespit Limiti)

Sinyal/Gürültü (Signal to noise (S/N)) oranı hesaplanarak ya da cihazdan hesaplatılarak dedeksiyon limiti (LOD) değeri belirlendi.

Kabul Kriterleri

- Sinyal/Gürültü oranı ≥ 3 olmalıdır.
- Belirleme Sınırı (LOD) = $\frac{3.3\chi\sigma}{S}$ (2.6)

σ : Standart sapma (regresyon doğrusunda artıklarının standart sapma veya y-kesim noktası standart sapma)

S: Regresyon doğrusunun eğimi

Doğrusallık çalışması yapılırken hazırlanan çözeltilere göre uygun S/N oranı belirlenerek LOD çözeltileri hazırlanarak sisteme verildi.

LOD sonuçları bölüm 3' de Tablo 3.12' de verilmiştir. Kromatogramı ise bölüm 3' de Şekil 3.35' de verilmiştir.

2.2.2.5 LOQ (Nicelik Sınırı)

Sinyal/Gürültü (Signal to noise (S/N)) oranı hesaplanarak ya da cihazdan hesaplatılarak nicelik limiti (LOQ) değeri belirlendi.

Kabul Kriterleri

- Nicelik sınırı (LOQ) safsızlık / raporlama seviyesindeki değerden büyük olmamalı.
- Sinyal/Gürültü oranı ≥ 10 olmalıdır.

$$\text{Nicelik Sınırı (LOQ)} = \frac{10x\sigma}{S} \quad (2.7)$$

σ : Standart sapma

Regresyon doğrusu artıklarının standart sapma veya y-kesim noktası standart sapma.

S: Regresyon doğrusu eğim

Doğrusallık çalışması yapılırken hazırlanan çözeltilere göre uygun S/N oranı belirlenerek LOQ çözeltileri hazırlanarak sisteme verildi.

LOD sonuçları bölüm 3 de Tablo 3.13' de verilmiştir. Kromatogramı ise bölüm 3' de Şekil 3.36' da verilmiştir.

2.2.2.6 Doğruluk

Teorik miktar ve deneysel bulunan miktar arasında karşılaştırma yapıldı.

Kabul Kriterleri

- Her bir geri kazanım değeri % 90.0 - % 110.0 arasında olmalı, % RSD \leq % 5.0
- LOQ seviyesi geri kazanımı değeri % 70.0 ila % 130.0 değerleri arasında olmalı, % RSD \leq % 15.0
- **% Geri Kazanım** = $\frac{\text{Deneysel (tespitedilen) Safsızlık}}{\text{Teorik (ilave edilen) Safsızlık}} \times 100$ (2.8)
- % 95 Güven aralığı hesaplanır.

Tüm doğruluk seviyelerinden 3' er hazırlık yapıldı. Tüm numunelerden sisteme enjekte edildi. Numunelerin geri kazanımları hesaplandı.

Standartların stok hallerinin hazırlanışları seçicilik parametresinde verildi.

LOQ Numune Hazırlığı

Ürüne ait kanisterin üzeri temizlendi ve kurutuldu. Kurutulan kanister tartıldı (W1). Kanister -80 °C 1 saat donduruldu. 1 saatin sonunda kanister kesildi ve solüsyon 10.0 mL' lik balon jöjeye transferi yapıldı ve HFA gazının tamamen uçması beklendi. 0.44 mL miristik asit, 0.16 mL palmitic asit, 1.0 mL elaidik asit, 1.1 mL stearik asit, 1.0 mL arakidik asit, 0.46 mL linoleik asit ve 1.0 mL oleik asit çözeltileri 10.0 mL' lik balon jöjeye aktarıldı. Kanisterin içi çözücü ile yıkanarak aynı balon jöjeye aktarıldı. Çözücü ile 10.0 mL' ye tamamlandı. Boş kanister kurutuldu ve tartımı yapıldı (W2). Filtrelenmeden kullanıldı. (Konsantrasyonlar: Miristik Asit: 0.33 µg/mL, Palmitik Asit: 0.12 µg/mL, Elaidik Asit: 0.75 µg/mL, Stearik Asit: 0.825 µg/mL, Arakidik Asit: 0.75 µg/mL, Linoleik Asit: 0.345 µg/mL, Oleik Asit: 0.75 µg/mL)

% 100 Numune Hazırlığı

Ürüne ait kanisterin üzeri temizlendi ve kurutuldu. Kurutulan kanister tartıldı (W1). Kanister -80 °C 1 saat donduruldu. 1 saatin sonunda kanister kesildi ve solüsyon 10.0 mL' lik balon jöjeye transferi yapıldı ve HFA gazının tamamen uçması beklendi. 0.75 mL stok miristik asit, 0.75 mL stok palmitik asit, 0.75 mL stok elaidik asit, 0.75 mL stok stearik asit, 0.75 mL stok arakidik asit, 0.75 mL stok linoleik asit ve 0.75 mL stok oleik asit çözeltileri 10.0 mL' lik balon jöjeye aktarıldı. Kanisterin içi çözücü ile yıkanarak aynı balon jöjeye aktarıldı. Çözücü ile 10.0 mL' ye tamamlandı. Boş kanister kurutuldu ve tartımı yapıldı

(W2). Filtrelenmeden kullanıldı. (Konsantrasyonlar: Miristik Asit, Palmitik Asit, Elaidik Asit, Stearik Asit, Arakidik Asit, Linoleik Asit, Oleik Asit: 7.5 µg/mL)

% 150 Numune Hazırlığı

1.125 mL stok miristik asit, 1.125 mL stok palmitik asit, 1.125 mL stok elaidik asit, 1.125 mL stok stearik asit, 1.125 mL stok arakidik asit, 1.125 mL stok linoleik asit ve 1.125 mL stok oleik asit çözeltileri 10.0 mL' lik balon jöjeye aktarıldı. Çözücü ile hacmine tamamlandı. (Konsantrasyonlar: Miristik Asit, Palmitik Asit, Elaidik Asit, Stearik Asit, Arakidik Asit, Linoleik Asit, Oleik Asit: 11.25 µg/mL)

Sırasıyla doğruluk sonuçları sırasıyla bölüm 3' de Tablo 3.14, Tablo 3.15, Tablo 3.16, Tablo 3.17, Tablo 3.18, Tablo 3.19, Tablo 3.20' de verilmiştir.

2.2.2.7 Kesinlik

Sistem Kesinliği

Valide edilen metottaki standardın 6 ardışık enjeksiyonlar arasındaki RSD' ye bakıldı.

Kabul Kriterleri

- 6 ardışık standart enjeksiyonu arasındaki % RSD \leq %5.0 olmalıdır.

Bu parametreyi test etmek için tekrarlanabilirlik çalışmasındaki standart enjeksiyonları kullanıldı.

Sistem Kesinliği sonuçları bölüm 3' de Tablo 3.21' de verilmiştir.

2.2.2.8 Tekrarlanabilirlik

Aynı analistin birbiri ardına yaptığı analiz tekrarlarının kararlılığına bakıldı.

Kabul Kriterleri

- | <u>% Sonuç</u> | <u>% RSD</u> |
|----------------------------------|------------------|
| Sonuç < % 0.1 | Değerlendirilmez |
| % 0.10 \leq Sonuç \leq % 0.5 | \leq % 10.0 |
| Sonuç > % 0.5 | \leq % 5.0 |
- % 95 Güven aralığı hesaplanır.

Seçicilik parametresinde hazırlanan standarttan 6 ardışık enjeksiyon ve her bir ekim yapılmış 6 adet numuneden 1 enjeksiyon yapıldı.

Tekrarlanabilirlik sonuçları bölüm 3' de Tablo 3.22' de verilmiştir.

2.2.2.9 Ara Kesinlik

Laboratuvardaki farklı değişimlerin analitik metodun kesinliğe farklılık yarattığını belirlemek için analiz, başka bir günde, aynı laboratuvarda, başka bir analistle 1 adet standart çözeltisi, 1 adet ekim yapılmamış numune çözeltisi, 6 adet ekim yapılmış numune çözeltisi hazırlanarak analiz yapıldı. Standarttan 6 ardışık enjeksiyon ve her bir numuneden 1 ardışık enjeksiyon yapıldı.

Kabul Kriterleri

<u>% Sonuç</u>	<u>% RSD</u>
Sonuç < % 0.1	Değerlendirilmez
% 0.10 ≤ Sonuç ≤ % 0.5	≤ % 10.0
Sonuç > % 0.5	≤ % 5.0

<u>% Sonuç</u>	<u>Fark</u>
Sonuç < % 0.10	Değerlendirilmez
% 0.10 ≤ Sonuç ≤ % 0.50	Mutlak fark ≤ 0.10
% 0.50 < Sonuç ≤ %1.0	Mutlak fark ≤ 0.20
Sonuç > % 1.0	% Fark ≤ % 20

$$\bullet \text{ Mutlak Fark} = |\text{Analiz 2 Sonucu} - \text{Analiz 1 Sonucu}| \quad (2.9)$$

$$\bullet \text{ \%Fark} = \frac{|\text{Analiz 2 Sonucu} - \text{Analiz 1 Sonucu}|}{\text{Analiz 1 Sonucu}} \times 100 \quad (2.10)$$

- % 95 Güven aralığı hesaplanır.
- Tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik parametresi için t test tablosu verilmelidir. t testi Microsoft Excel veri çözümlenme kullanılarak en az 6 sonuçla yapılır. Hesaplanan t testi sonucu t-std değerinden küçükse t testi uygundur.

Ara kesinlik sonuçları bölüm 3' de Tablo 3.23' de verilmiştir.

t test sonuçları ise sırasıyla Tablo 3.24, Tablo 3.25, Tablo 3.26, Tablo 3.27' de verilmiştir.

2.2.2.10 Sağlamlık

Analiz parametreleri değiştirilerek sistem uygunluk şartları kontrol edildi.

Kabul Kriterleri

- Sistem uygunluk kriterleri sağlanmalıdır.

Standart ve numune çözeltisi metotta belirtildiği gibi hazırlandı. Standarttan 6 ardışık enjeksiyon ve her bir ekim yapılmış numuneden 1 enjeksiyon yapıldı. Sistem uygunluk kriterleri kontrol edildi.

İki parametre değiştirildi:

- 1) Formik asit miktarı 0.5 mL/L \pm % 5 olarak ayarlandı.
- 2) Kolon sıcaklığı 50°C \pm 2°C ayarlandı.

Sağlamlık sonuçları sırasıyla bölüm 3 de Tablo 3.28, Tablo 3.29, Tablo 3.30, Tablo 3.31, Tablo 3.32, Tablo 3.33, Tablo 3.34' de verilmiştir.

2.2.2.11 Stabilite

Çözeltilerin zaman ya da ortam şartlarındaki farklılıkla bir değişim olup olmadığı belirlendi.

Çözelti Stabilitesi

Standart ve ekim yapılmış numune çözeltisi aynı koşullarda bekletilerek analiz edildi.

Kabul Kriterleri

- Standart alanları arasındaki % fark \leq % 5.0 olmalıdır.
- Safsızlık alanları arasındaki % fark \leq % 10.0 olmalıdır.

Hazırlanan standart ve numuneden 48 saat boyunca enjeksiyonlar verilerek stabilite kontrol edildi.

Çözelti stabilitesi sonuçları sırasıyla ve ekim yapılmış numune sonuçları sırasıyla, Tablo 3.35, Tablo 3.36, Tablo 3.37, Tablo 3.38, Tablo 3.39, Tablo 3.40' da verilmiştir.

2.2.2.12 Sistem Uygunluk

Kabul Kriterleri

- Standart çözeltilisinden 6 ardışık enjeksiyon yapılır. Enjeksiyonlar arası % RSD \leq % 5.0 olmalıdır.
- Standart çözeltideki etkin madde pikine ait kuyruklanma f6kt6r6 2.0' den fazla olmamalı.
- Standart çözeltideki etkin madde pikinin teorik plaka sayısı \geq 2000 olmalıdır.

Bu parametreyi test etmek için tekrarlanabilirlik çalışmasındaki standart enjeksiyonları kullanıldı.

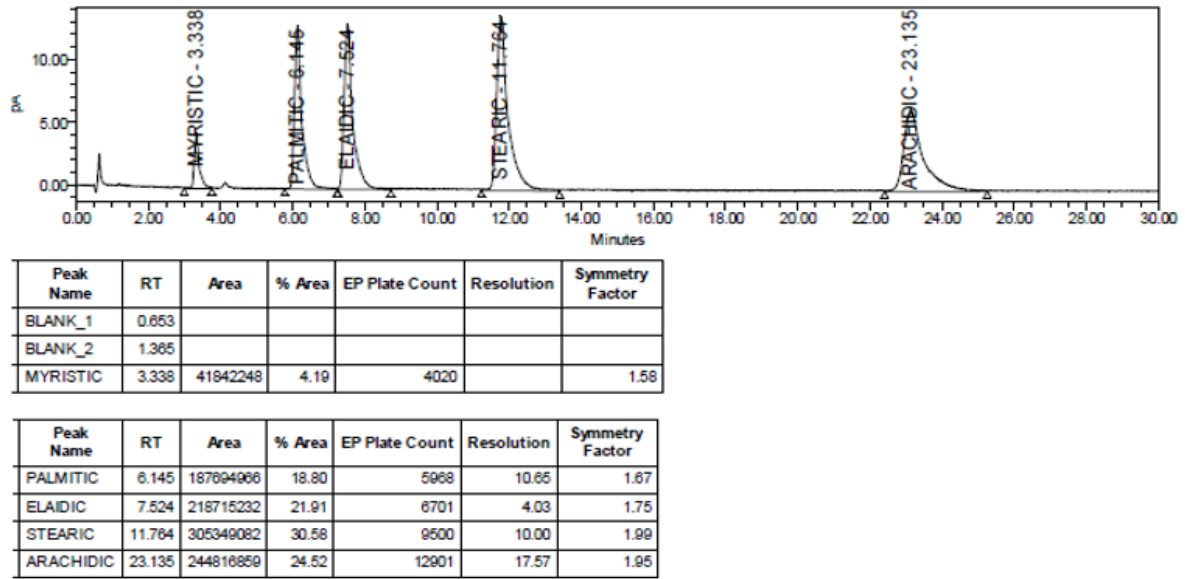
Sistem uygunluk sonuçları sırasıyla b6l6m 3' de Tablo 3.41-Tablo 3.47 arasında g6sterilmiştir.

3. BULGULAR

3.1 Metot Geliştirme Sonuçları

3.1.1 Sistemde İlk Enjeksiyon

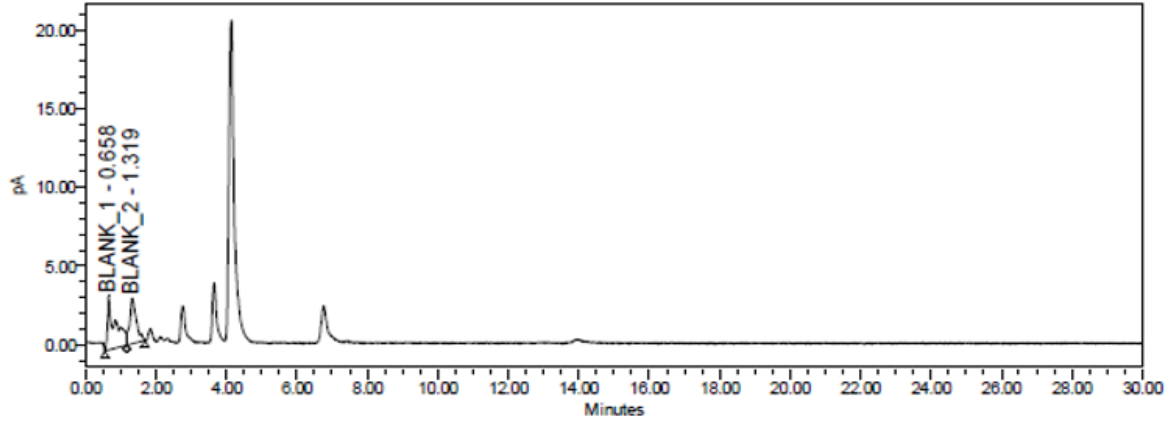
Şekil 3.1’ de verilen standart kromatogramında beş adet (miristik asit, palmitic asit, elaidik asit, stearik asit, arakidik asit) standart piklerinin hangi dakikalarda geldiği RT’leri (Retention Time) belirlendi.



Şekil 3. 1: İlk standart kromatografi

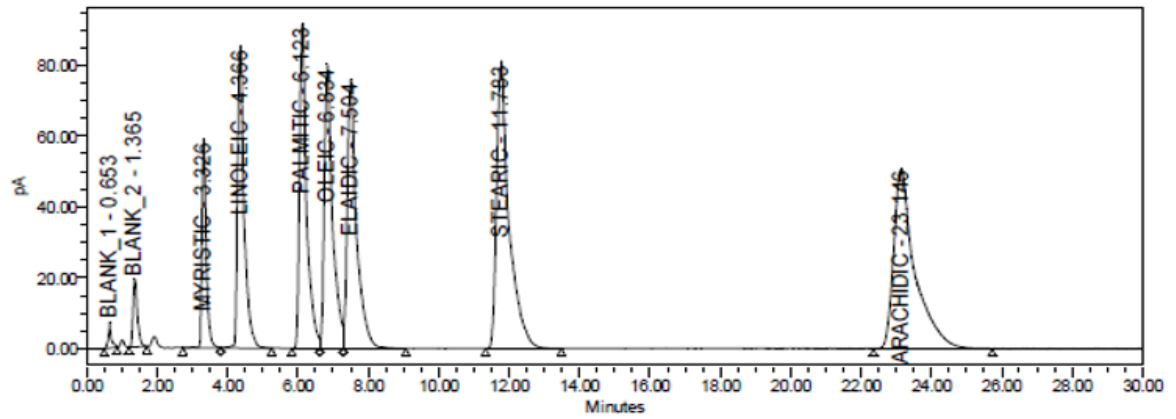
3.1.2 Standart Konsantrasyonu ve Mobil Faz Değişimi

Standart konsantrasyonu ve mobil faz değişiminde sisteme verilen enjeksiyonlarla, blank’ e ait (çözücü) RT, standartların hem tek tek hallerdeki hem de karışım halindeki RT’leri ve alanları belirlendi. Şekil 3.2’ deki kromatogramda Blank 1 ve Blank 2 çözücü piklerine ait RT’ ler ve alanlar belirlendi, Şekil 3.3’ deki kromatogramda hem çözücüye ait hem karışım standardındaki tüm standartların piklerine ait RT’ ler ve alanları belirlendi. Şekil 3.4, Şekil 3.5 Şekil 3.6, Şekil 3.7, Şekil 3.8, Şekil 3.9, Şekil 3.10’ da ise sırasıyla miristik asit, linoleik asit, palmitik asit, oleik asit, elaidik asit, stearik asit, arakidik asitin RT’ leri ve alanları belirlendi.



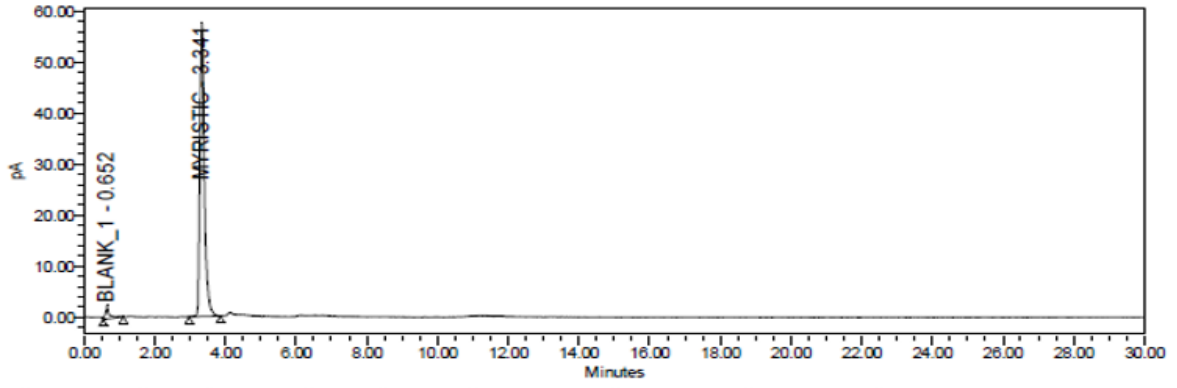
Peak Name	RT	Area	% Area	Height	EP Plate Count	Resolution
1 BLANK_1	0.658	50373016	57.27	3430644	352	
2 BLANK_2	1.319	37577923	42.73	2886802	300	2.976132e+000
3 MYRISTIC	3.361					
4 LINOLEIC	4.366					
5 PALMITIC	6.186					
6 OLEIC	6.959					
7 ELAIDIC	7.555					
8 STEARIC	11.918					
9 ARACHIDIC	23.386					

Şekil 3. 2: Blank (çözücü) kromatografisi



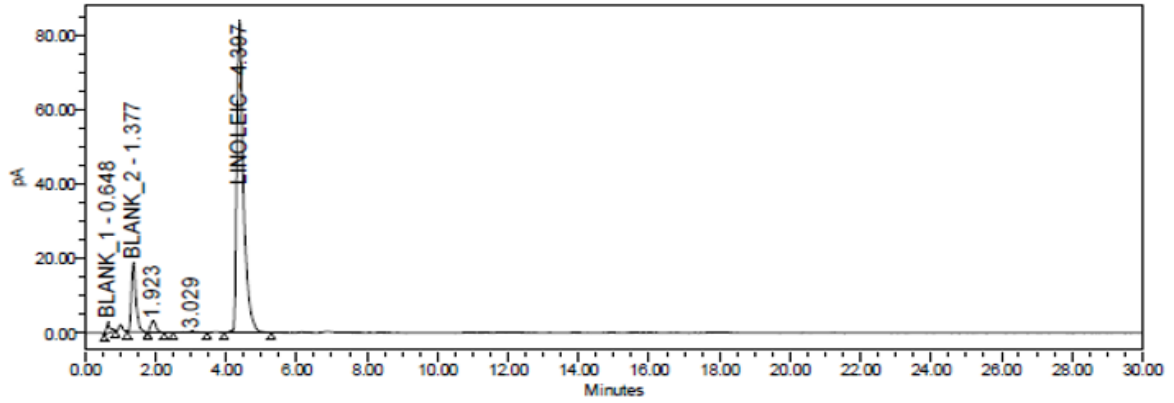
Peak Name	RT	Area	% Area	Height	Symmetry Factor	EP Plate Count	Resolution
1 BLANK_1	0.653	40946648	0.41	7357714	1.38	741	
2 BLANK_2	1.365	162538365	1.65	19108320	1.49	677	4.666235e+000
3 MYRISTIC	3.326	503538673	5.10	59001444	1.53	3994	9.355279e+000
4 LINOLEIC	4.366	1097833665	11.11	85362744	1.73	3322	4.060733e+000
5 PALMITIC	6.123	1292153916	13.08	91613754	1.83	5951	5.679442e+000
6 OLEIC	6.834	1290280450	13.06	80309183		5362	2.063625e+000
7 ELAIDIC	7.504	1380998834	13.98	76053803		5538	1.730887e+000
8 STEARIC	11.783	1983116688	20.07	81244786	1.87	7737	9.135419e+000
9 ARACHIDIC	23.146	2128602018	21.54	50992691	1.90	10373	1.577174e+001

Şekil 3. 3: Standart karışım kromatografisi



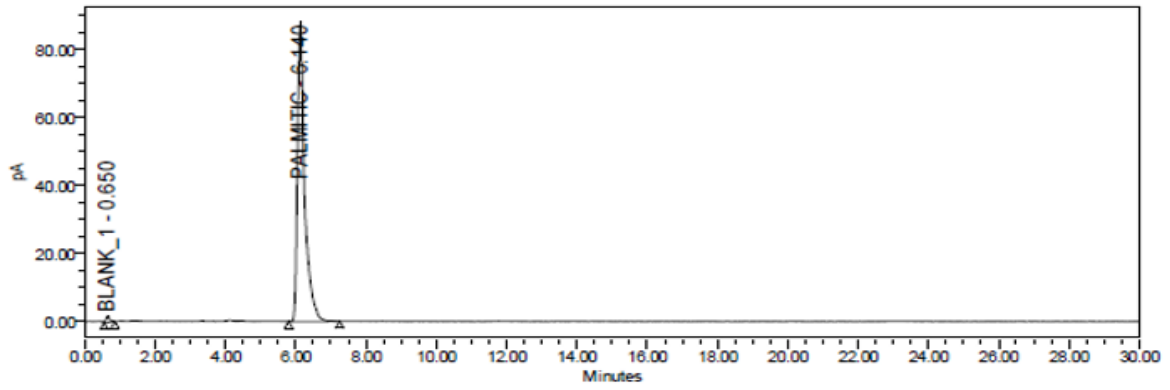
Peak Name	RT	Area	% Area	Height	Symmetry Factor	EP Plate Count	Resolution
1 BLANK_1	0.652	18841203	3.61	2706239	1.28	626	
2 BLANK_2	1.365						
3 MYRISTIC	3.341	503787409	96.39	57636456	1.38	4005	1.708857e+001
4 LINOLEIC	4.366						
5 PALMITIC	6.186						
6 OLEIC	6.959						
7 ELAIDIC	7.555						
8 STEARIC	11.918						
9 ARACHIDIC	23.386						

Şekil 3. 4: Miristik asit kromatografi



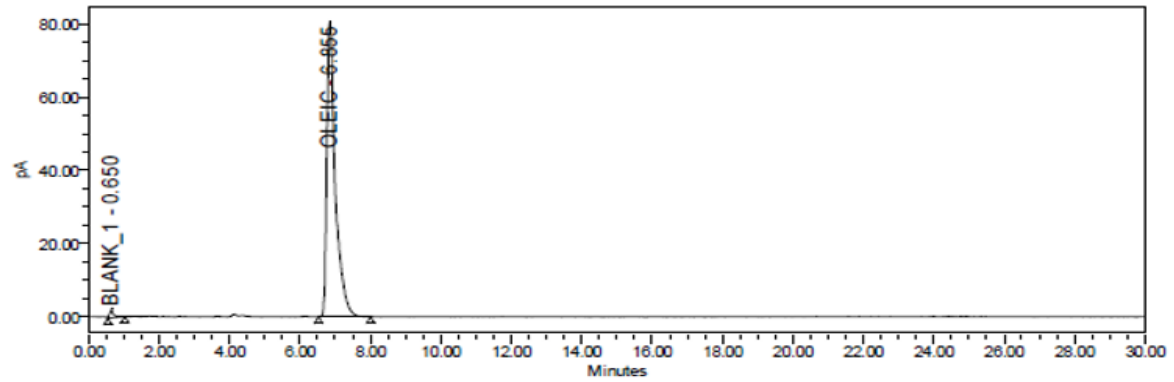
PeakName	RT	Area	% Area	Height	Symmetry Factor	EP Plate Count	Resolution
1 BLANK_1	0.648	20384521	1.55	3116947	1.61	660	
2 BLANK_2	1.377	166323439	12.63	18668175	1.36	641	4.593081e+000
3	1.923	32125146	2.44	3110373	1.35	798	2.236744e+000
4	3.029	6055364	0.46	326404	0.73	5212	5.035831e+000
5 MYRISTIC	3.361						
6 LINOLEIC	4.397	1091537721	82.92	83814799	1.59	3166	5.709831e+000
7 PALMITIC	6.186						
8 OLEIC	6.959						
9 ELAIDIC	7.555						

Şekil 3. 5: Linoleik asit kromatografi



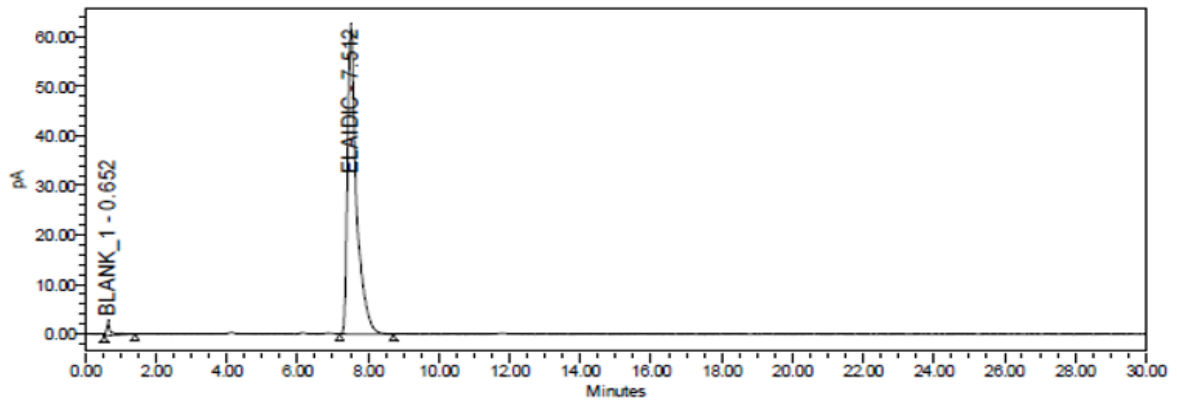
Peak Name	RT	Area	% Area	Height	Symmetry Factor	EP Plate Count	Resolution
1 BLANK_1	0.650	14004515	1.11	1998203	1.53	257	
2 BLANK_2	1.365						
3 MYRISTIC	3.361						
4 LINOLEIC	4.366						
5 PALMITIC	6.140	1251051041	98.89	88226634	1.69	5897	2.294398e+001
6 OLEIC	6.855						
7 ELAIDIC	7.555						
8 STEARIC	11.918						
9 ARACHIDIC	23.386						

Şekil 3. 6: Palmitik asit kromatografi



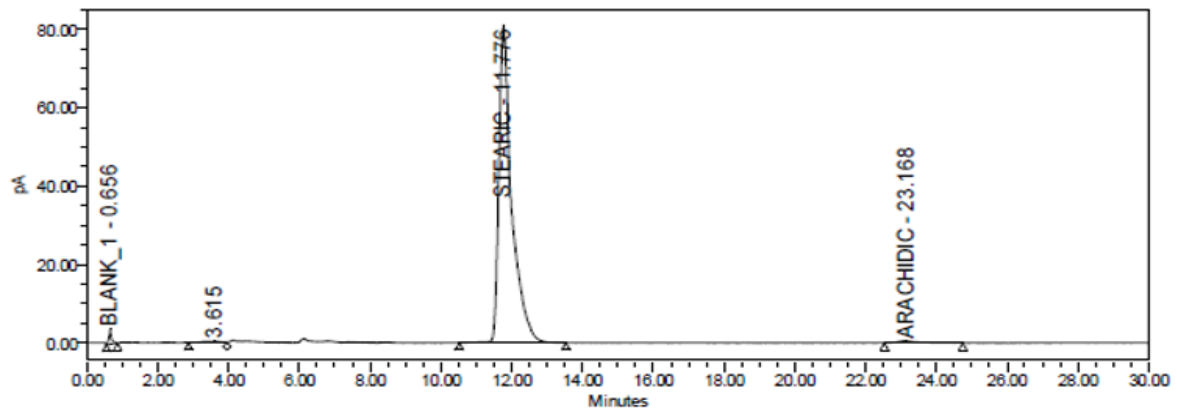
Peak Name	RT	Area	% Area	Height	Symmetry Factor	EP Plate Count	Resolution
1 BLANK_1	0.650	18175226	1.34	2539666	1.41	326	
2 BLANK_2	1.365						
3 MYRISTIC	3.361						
4 LINOLEIC	4.366						
5 PALMITIC	6.188						
6 OLEIC	6.855	1333543081	98.66	80620511	1.90	5381	2.402622e+001
7 ELAIDIC	7.555						
8 STEARIC	11.918						
9 ARACHIDIC	23.386						

Şekil 3. 7: Oleik asit kromatografi



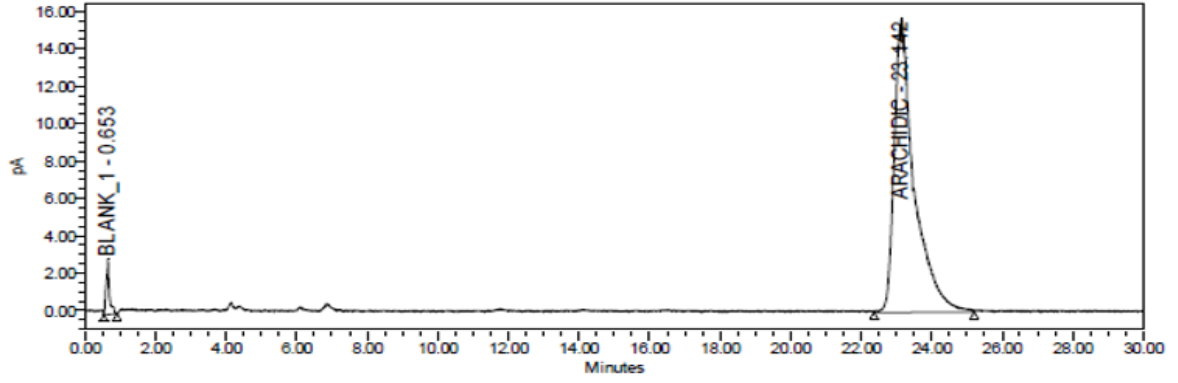
Peak Name	RT	Area	% Area	Height	Symmetry Factor	EP Plate Count	Resolution
1 BLANK_1	0.652	24627999	2.20	3245589	1.49	697	
2 BLANK_2	1.365						
3 MYRISTIC	3.361						
4 LINOLEIC	4.366						
5 PALMITIC	6.186						
6 OLEIC	6.959						
7 ELAIDIC	7.512	1092921125	97.80	62590748	1.92	5773	2.783651e+001
8 STEARIC	11.918						
9 ARACHIDIC	23.386						

Şekil 3. 8: Elaidik asit kromatografi



PeakName	RT	Area	% Area	Height	SymmetryFactor	EP Plate Count	Resolution
1 BLANK_1	0.656	18921616	0.90	3878105	1.50	848	
2 BLANK_2	1.365						
3 MYRISTIC	3.361						
4	3.615	18044246	0.86	448194		173	4.982963e+000
5 LINOLEIC	4.366						
6 PALMITIC	6.186						
7 OLEIC	6.959						
8 ELAIDIC	7.555						
9 STEARIC	11.776	2039147924	96.97	80978112	1.85	7483	9.949711e+000

Şekil 3. 9: Stearik asit kromatografi

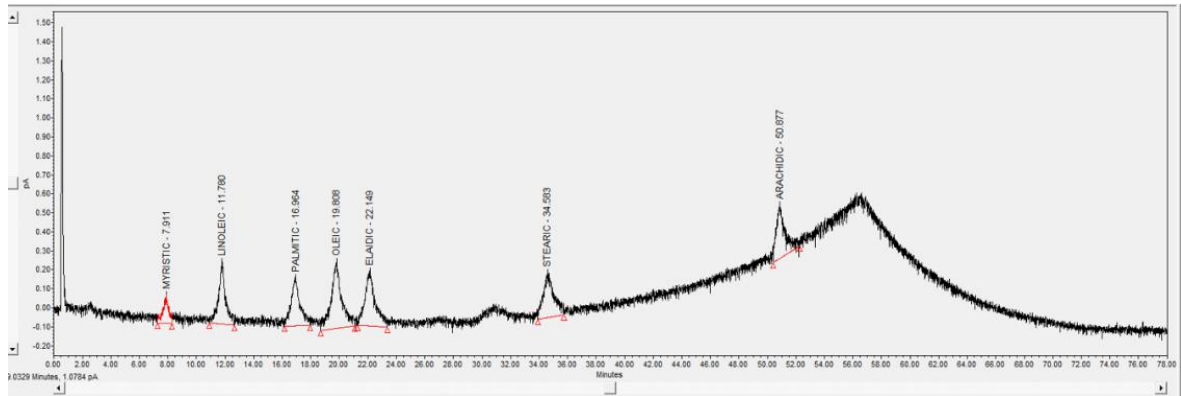


Peak Name	RT	Area	% Area	Height	Symmetry Factor	EP Plate Count	Resolution
1 BLANK_1	0.653	18610340	2.04	2091453	1.43	317	
2 BLANK_2	1.365						
3 MYRISTIC	3.361						
4 LINOLEIC	4.368						
5 PALMITIC	6.188						
6 OLEIC	6.959						
7 ELAIDIC	7.555						
8 STEARIC	11.918						
9 ARACHIDIC	23.142	615056403	97.06	15721826	1.92	11602	4.482661e+001

Şekil 3. 10: Arakidik asit kromatografı

3.1.2.1 Standart Konsantrasyonu ve Mobil Faz Oran Denemesi

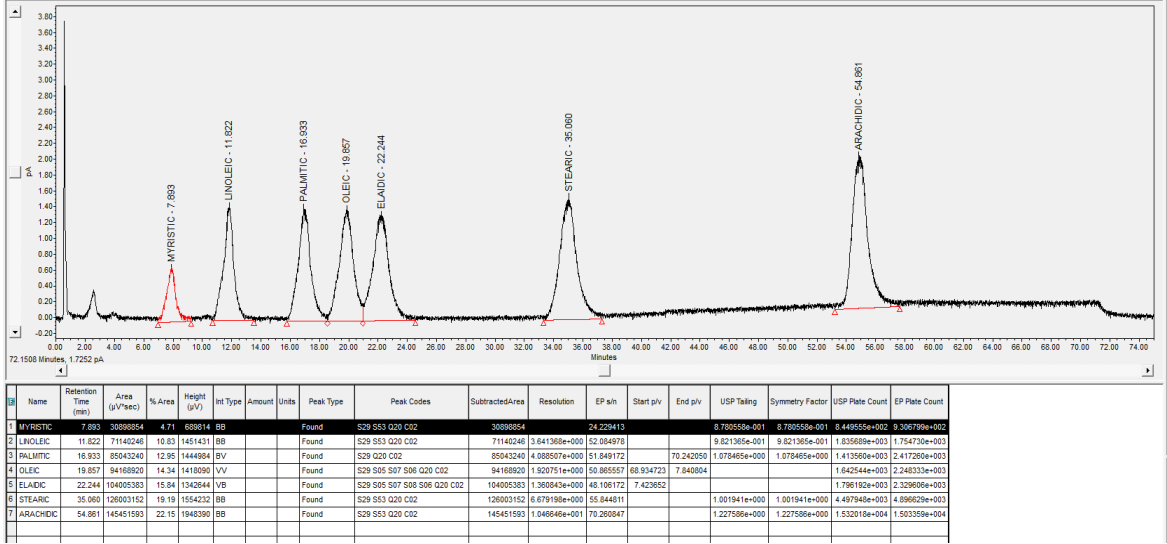
Standart konsantrasyonu düşürülerek 1.5 µg/ml hazırlandığında ve mobil faz oranı değiştirilip enjeksiyon süresi 75 dk'ya çıkartıldığında, standart karışım kromatogramı aşağıdaki Şekil 3.11' de belirtilmiştir. Sırasıyla miristik asit, linoleik asit, palmitik asit, oleik asit, elaidik asit, stearik asit, arakidik asitin RT' leri belirlendi.



Şekil 3. 11: Standard karışım kromatografı

3.1.2.2 Standart Konsantrasyon ve Enjeksiyon Hacim Deneme

Şekil 3.12' de verilen standart konsantrasyonu 7.5 µg/ml hazırlandı ve enjeksiyon hacmi 30 µL olarak standart karışım kromatogramı aşağıda gösterilmiştir.

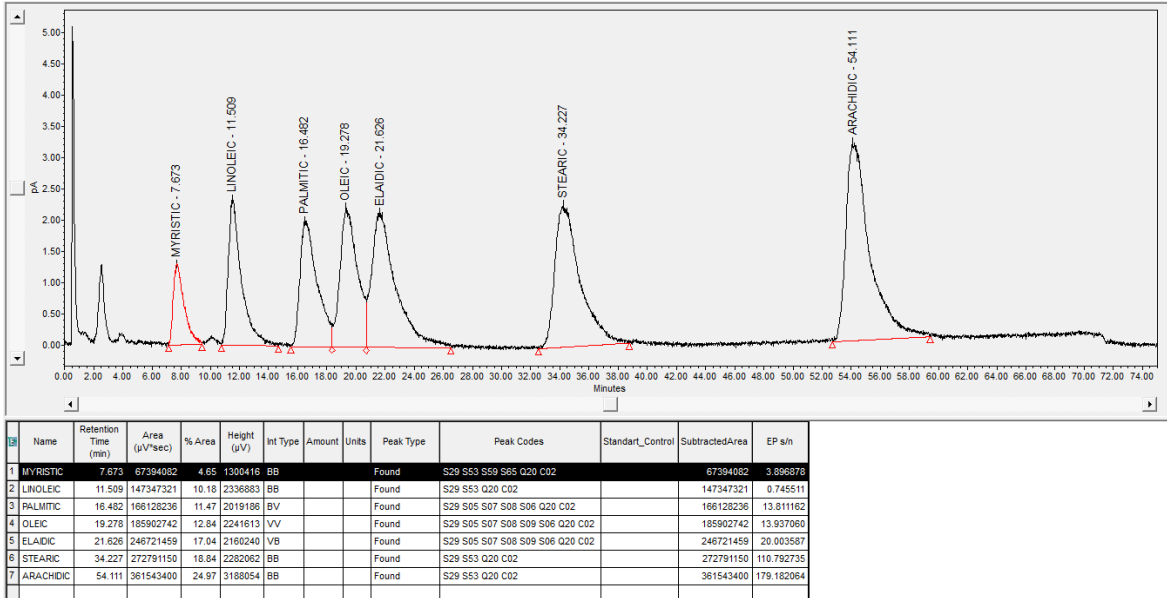


Şekil 3. 12: Standard karışım kromatografisi

Deneme sonucu kromatogramda piklerin RT' leri daha net belli olduğu için enjeksiyon hacminin 30 µL olmasına ve standart konsantrasyonunun 7.5 µg/ml olmasına karar verildi.

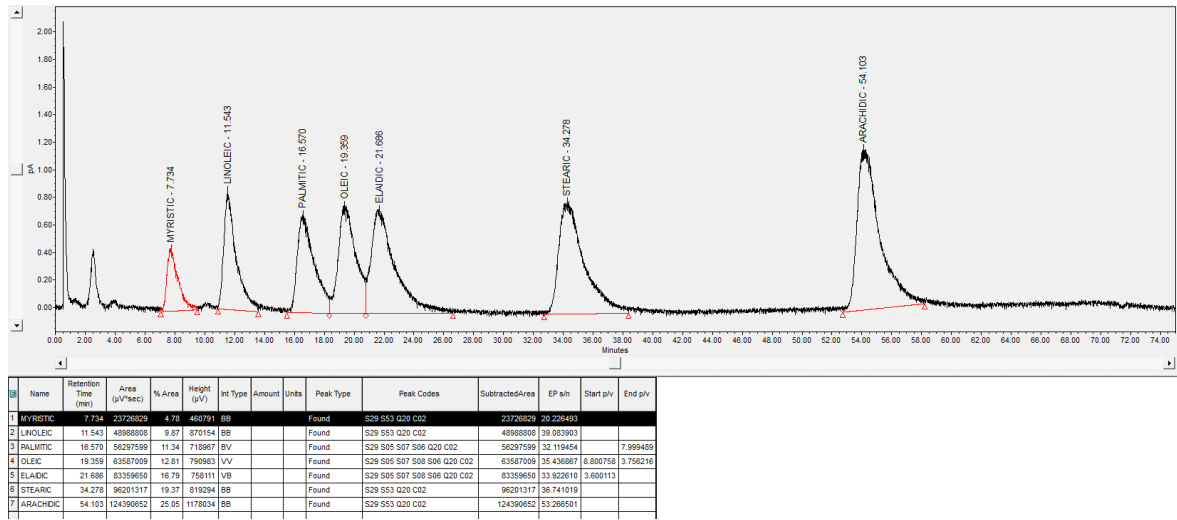
3.1.2.3 S/N Denemeleri

Standart enjeksiyonun pik kesimlerini cihazda blank' e göre otomatik hesaplattığımızda s/n değerleri Şekil 3.13' deki gibidir.



Şekil 3. 13: Standard karışım kromatografisi

Standart enjeksiyonun kesimlerini cihazda manuel olarak dakika aralığı seçip hesaplattığımızda s/n değerleri Şekil 3.14’deki gibidir.



Şekil 3. 14: Standard karışım kromatografisi

Bu denemeler sonucunda manuel kesime karar verildi ama hala s/n değerleri düşüktür dedektör parametrelerindeki değerlere denemeler yapıldı.

- CAD Power Function :1.00 di : 0.8-1.2-1.4 değerleri denendi.
- CAD Filter Constant : 1.0 [s] di : 0.2-5.0 değerleri denendi.
- CAD Data Collection Rate :10.0 [Hz] di: 2.0-5.0-20.0 değerleri denendi.

Denemeler sonucunda en iyi şartlar :

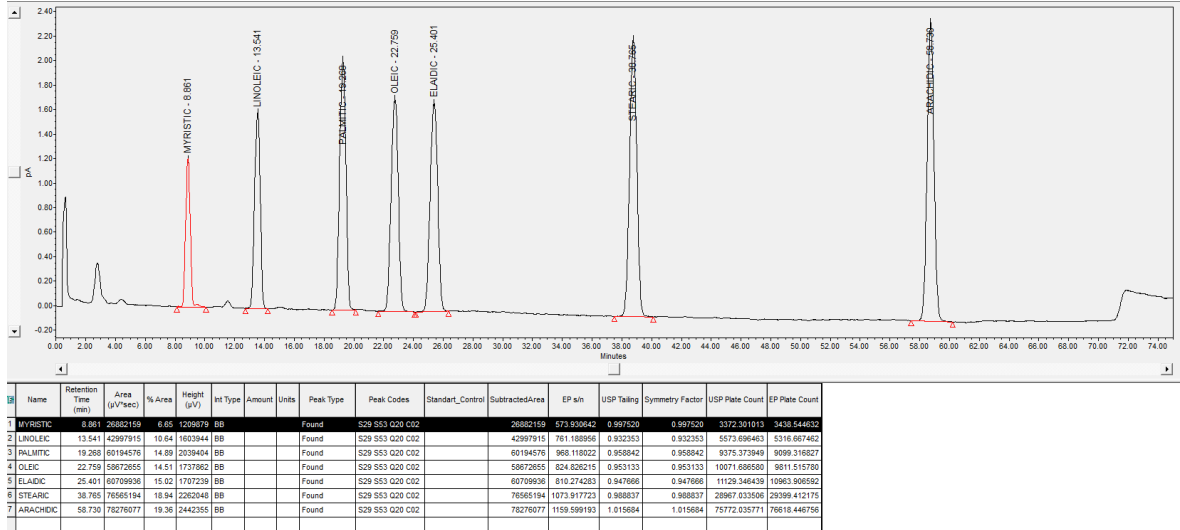
Power Function :1.0

Filter : 1.0

Data Collection Rate :2.0 olarak elde edildi.

‘smoothing type’ değerlerindeki (5-31) arasında denemeler yapıldı.

Bu denemelerle verilen standart enjeksiyonu aşağıdaki Şekil 3.15’de verilmiştir.

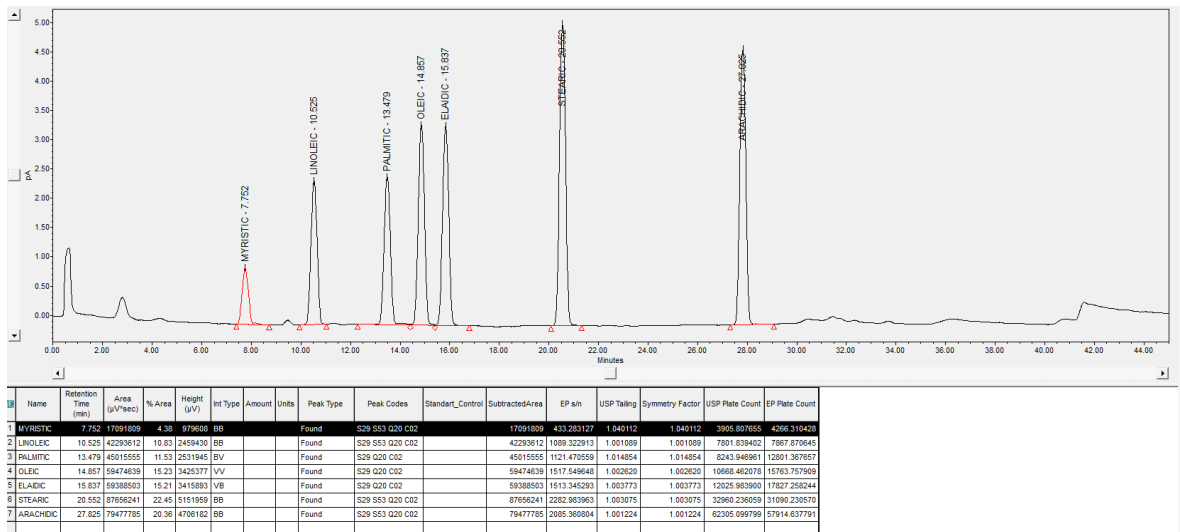


Şekil 3. 15: Standart karışım kromatografisi

Elde edilen kromatogramda piklerin RT'leri ve s/n değerleri uygun bulundu. Tüm denemeler sonucunda; kromatogramda "smoot" değeri en yüksek değer 31 olmasına ve dedektör parametreleri yukarıdaki en iyi şartlarla uygulanmasına karar verildi.

3.1.2.4 Gradient Sistem Denemeleri

Şekil 3.16 en son belirtilen gradient sistem denendiğindeki standart kromatogramını içermektedir. Bu kromatogramda piklerin RT'leri birbirinden net olarak ayrılmıştır, s/n değerleri ve kolon parametreleri uygun bulundu.



Şekil 3. 16: Standard karışım kromatografisi

Tüm metot geliştirme sonucunda; en son elde edilen bu şartlarda validasyona başlanılma kararı verildi.

3.1.3 Yöntem Validasyon Parametreleri

3.1.3.1 Seçicilik

Sisteme verilen ilk filtre çalışması sonuçları aşağıdaki Tablo 3.1' de verilmiştir.

Tablo 3. 1: Filtre deneme

Filtre Denemeleri	Filtresiz Alan	RC 0.45 µm		NY 0.45 µm		PTFE 0.45 µm	
		Alan	% Fark	Alan	% Fark	Alan	% Fark
Standart							
Miristik Asit	8377520	10141090	21,1	9290044	10,9	9939523	18,6
Linoleik Asit	29628067	26062781	12,0	25344362	14,5	26283876	11,3
Palmitik Asit	44026455	46614327	5,9	48228956	9,5	46391047	5,4
Oleik Asit	55755075	58945249	5,7	57189312	2,6	57487815	3,1
Elaidik Asit	56854722	54912544	3,4	52812310	7,1	54929434	3,4
Stearik Asit	82074836	81596325	0,6	81018044	1,3	80998866	1,3
Arakidik Asit	90372203	88363159	2,2	86806981	3,9	86742070	4,0
Numune							
Miristik Asit	9491284	9670230	1,9	9602521	1,2	9860246	3,9
Linoleik Asit	29884980	26344015	11,8	26499212	11,3	26433624	11,5
Palmitik Asit	48140984	49487992	2,8	48805563	1,4	47461967	1,4
Oleik Asit	57025663	59180214	3,8	58328012	2,3	56842962	0,3
Elaidik Asit	57584502	55180699	4,2	54999309	4,5	54366426	5,6
Stearik Asit	86486672	86744354	0,3	83414076	3,6	82375831	4,8
Arakidik Asit	96321263	88197636	8,4	88179286	8,5	86251668	10,5

Tablodaki sonuçlara bakılarak hem standartlar için hem numune için üç farklı filtre çalışmasına (RC 0.45 µm, NY 0.45 µm, PTFE 0.45 µm) ait elde edilen alanlar ve bu alanlar arası farklar hesaplandı. Bu farklara göre filtresiz kullanıma karar verildi.

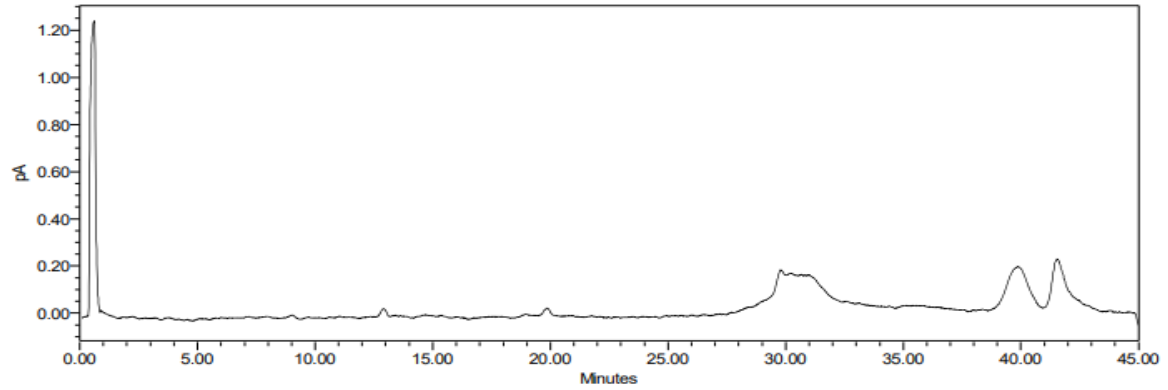
Sisteme verilen seçicilik sonuçları aşağıdaki Tablo 3.2' de verilmiştir.

Tablo 3. 2: Seçicilik sonuçları

Numune Adı	Alıkonma Zamanı	Bağlı Alıkonma Zamanı
Çözücü	-	-
Miristik Asit	7.4	0.37
Linoleik Asit	10.1	0.51
Palmitik Asit	12.9	0.65
Oleik Asit	14.3	0.72
Elaidik Asit	15.3	0.77
Stearik Asit	19.9	1.00
Arakidik Asit	26.0	1.31
Karışım Standart		
Miristik Asit	7.4	0.37
Linoleik Asit	10.1	0.51
Palmitik Asit	12.9	0.65
Oleik Asit	14.3	0.72
Elaidik Asit	15.2	0.76
Stearik Asit	19.9	1.00
Arakidik Asit	27.1	1.36
Numune		
Miristik Asit	-	-
Linoleik Asit	-	-
Palmitik Asit	-	-
Oleik Asit	-	-
Elaidik Asit	-	-
Stearik Asit	-	-
Arakidik Asit	-	-
Ekim Yapılmış Numune		
Miristik Asit	7.4	0.37
Linoleik Asit	10.1	0.51
Palmitik Asit	12.9	0.65
Oleik Asit	14.3	0.72
Elaidik Asit	15.2	0.76
Stearik Asit	19.9	1.00
Arakidik Asit	27.1	1.36

Bu tabloda ise sisteme tek tek verilen çözücü ve tüm asitlerin alıkonma zamanları ve bağlı alıkonma zamanları, karışım halinde sisteme verilen tüm yağ asitlerinin alıkonma zamanları ve bağlı alıkonma zamanları, sisteme verilen ekim yapılmış ve ekim yapılmamış numunedeki tüm yağ asitlerinin alıkonma zamanları ve bağlı alıkonma zamanları aynıdır ve

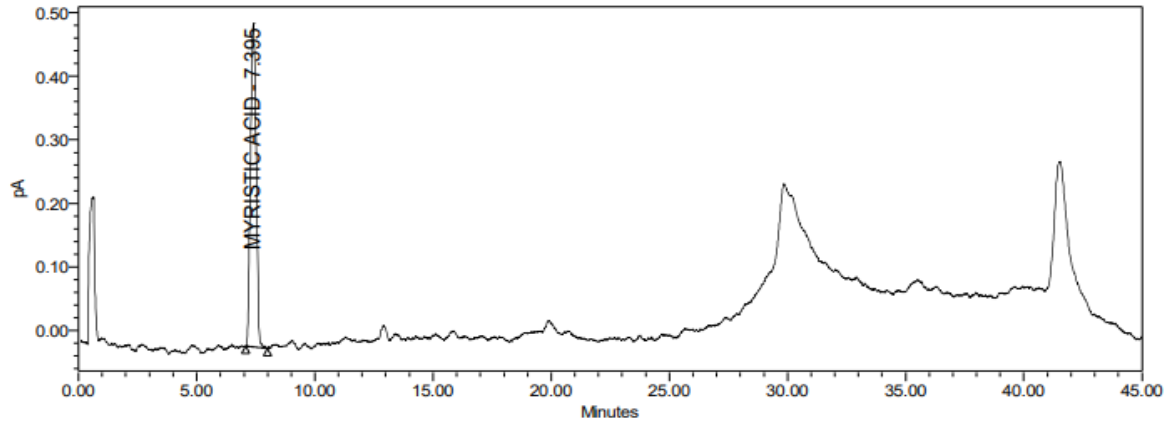
tüm pikler birbirlerinden ayrılmış durumdadır. Tek tek sisteme verilen blank kromatogramı aşağıda Şekil 3.17' de verilmiştir.



Peak Name	RT
1 MYRISTIC ACID	7.410
2 LINOLEIC ACID	10.014
3 PALMITIC ACID	12.959
4 OLEIC ACID	14.319
5 ELAIDIC ACID	15.271
6 STEARIC ACID	19.872
7 ARACHIDIC ACID	26.692

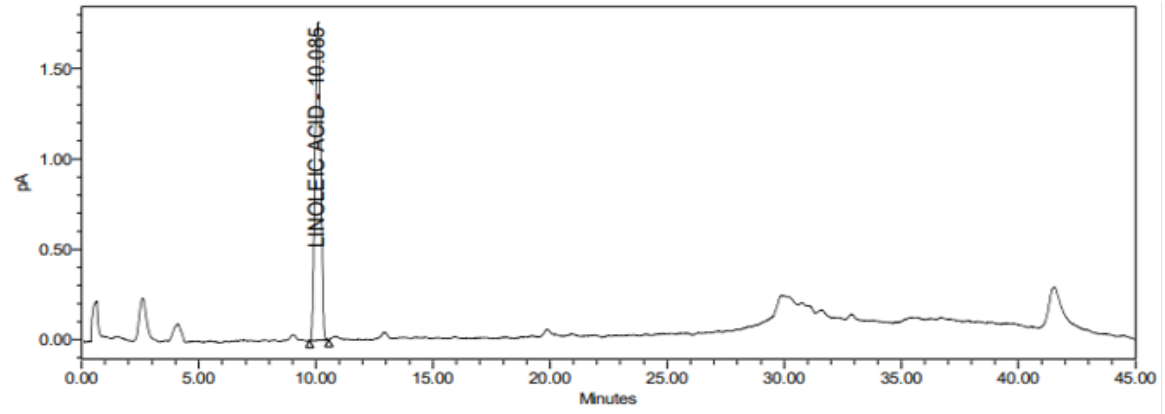
Şekil 3. 17: Blank kromatografi

Sisteme tek tek verilen miristik asit, linoleik asit, palmitik asit, oleik asit, elaidik asit, stearik asit, arakidik asit kromatogramları sırası ile Şekil 3.18- Şekil 3.24 arasında gösterilmiştir.



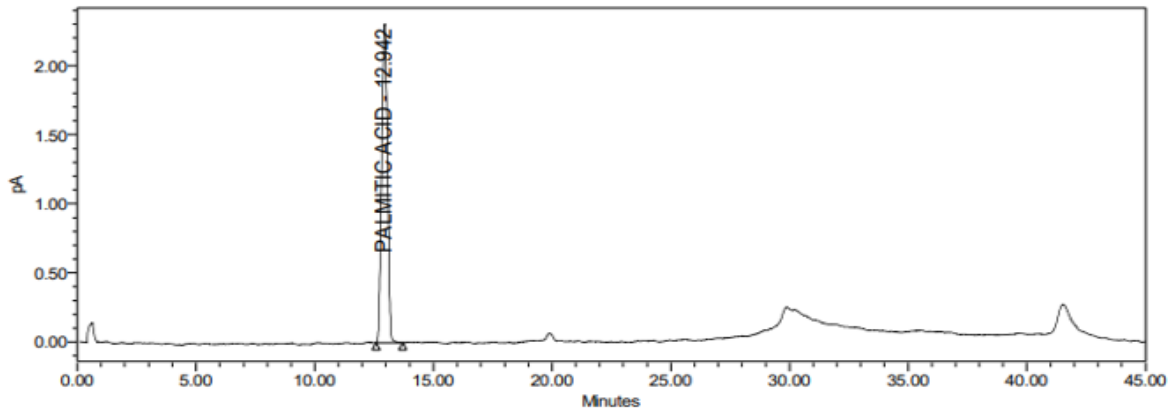
Peak Name	RT	Area	% Area	Height	USP Plate Count	USP Tailing	EP s/n
1 MYRISTIC ACID	7.395	8436178	100.00	509395	4044	1.0	226
2 LINOLEIC ACID	10.014						
3 PALMITIC ACID	12.959						
4 OLEIC ACID	14.319						
5 ELAIDIC ACID	15.271						
6 STEARIC ACID	19.872						
7 ARACHIDIC ACID	26.692						

Şekil 3. 18: Miristik asit kromatografi



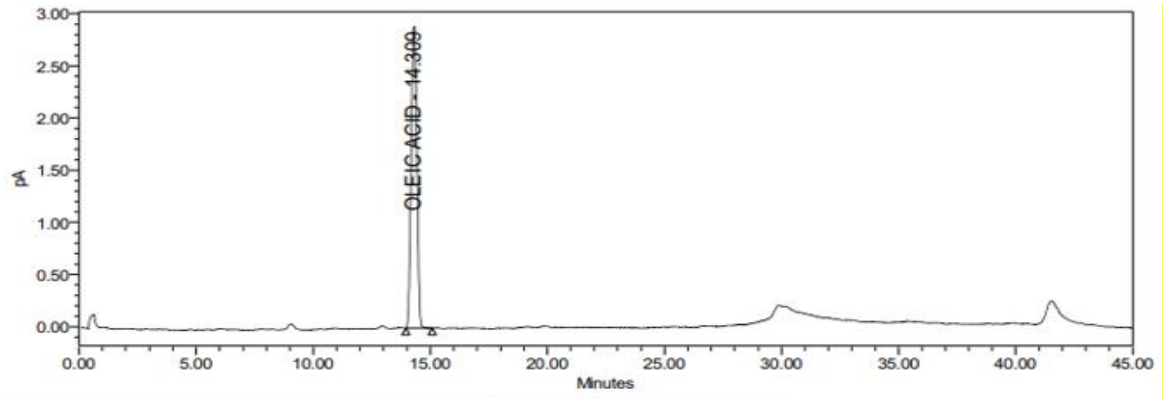
Peak Name	RT	Area	% Area	Height	USP Plate Count	USP Tailing	EP s/n
1 MYRISTIC ACID	7.410						
2 LINOLEIC ACID	10.085	29671451	100.00	1758787	7576	1.0	869
3 PALMITIC ACID	12.959						
4 OLEIC ACID	14.319						
5 ELAIDIC ACID	15.271						
6 STEARIC ACID	19.872						
7 ARACHIDIC ACID	26.692						

Şekil 3. 19: Linoleik asit kromatografi



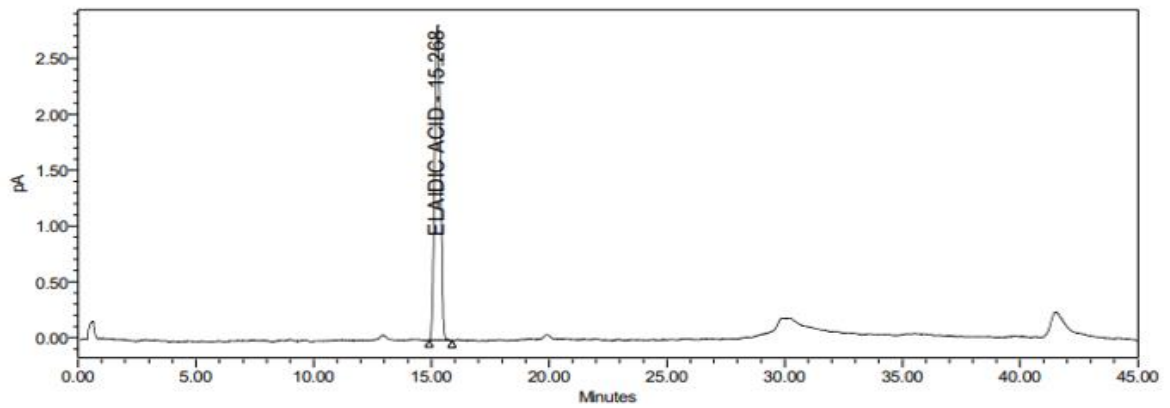
Peak Name	RT	Area	% Area	Height	USP Plate Count	USP Tailing
1 MYRISTIC ACID	7.410					
2 LINOLEIC ACID	10.014					
3 PALMITIC ACID	12.942	39092709	100.00	2306764	12282	1.0
4 OLEIC ACID	14.319					
5 ELAIDIC ACID	15.271					
6 STEARIC ACID	19.872					
7 ARACHIDIC ACID	26.692					

Şekil 3. 20: Palmitik asit kromatografi



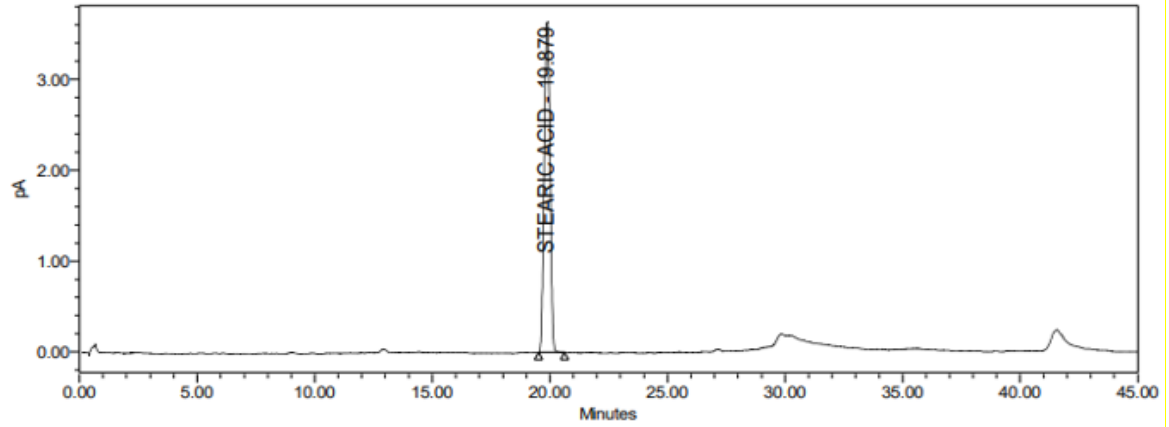
	Peak Name	RT	Area	% Area	Height	USP Plate Count	USP Tailing	EP s/n
1	MYRISTIC ACID	7.410						
2	LINOLEIC ACID	10.014						
3	PALMITIC ACID	12.959						
4	OLEIC ACID	14.309	49351687	100.00	2889062	15670	1.0	1209
5	ELAIDIC ACID	15.271						
6	STEARIC ACID	19.872						
7	ARACHIDIC ACID	26.692						

Şekil 3. 21: Oleik asit kromatografi



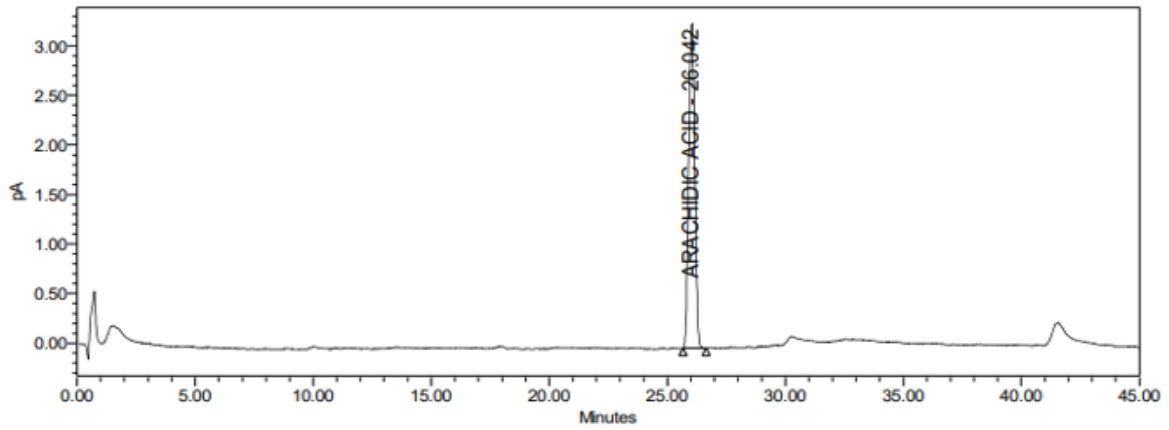
	Peak Name	RT	Area	% Area	Height	USP Plate Count	USP Tailing	EP s/n
1	MYRISTIC ACID	7.410						
2	LINOLEIC ACID	10.014						
3	PALMITIC ACID	12.959						
4	OLEIC ACID	14.319						
5	ELAIDIC ACID	15.268	48195399	100.00	2816134	17408	1.0	1196
6	STEARIC ACID	19.872						
7	ARACHIDIC ACID	26.692						

Şekil 3. 22: Elaidik asit kromatografi



	Peak Name	RT	Area	% Area	Height	USP Plate Count	USP Tailing	EP s/n
1	MYRISTIC ACID	7.410						
2	LINOLEIC ACID	10.014						
3	PALMITIC ACID	12.959						
4	OLEIC ACID	14.319						
5	ELAIDIC ACID	15.271						
6	STEARIC ACID	19.879	62132140	100.00	3637137	29587	1.0	1475
7	ARACHIDIC ACID	26.692						

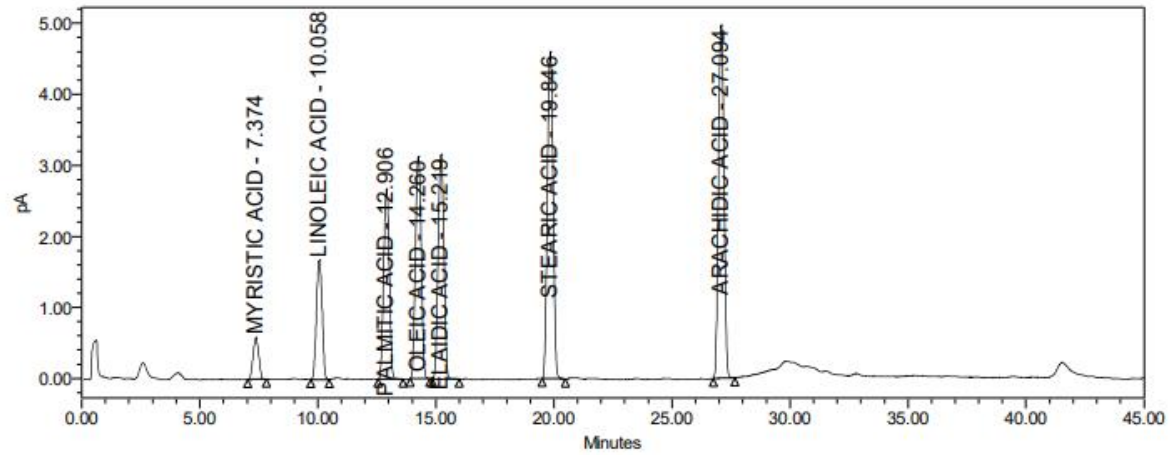
Şekil 3. 23: Stearik asit kromatografisi



	Peak Name	RT	Area	% Area	Height	USP Plate Count	USP Tailing
1	MYRISTIC ACID	7.410					
2	LINOLEIC ACID	10.014					
3	PALMITIC ACID	12.959					
4	OLEIC ACID	14.319					
5	ELAIDIC ACID	15.271					
6	STEARIC ACID	19.872					
7	ARACHIDIC ACID	26.042	58460334	100.00	3272114	46369	1.0

Şekil 3. 24: Arakidik asit kromatografisi

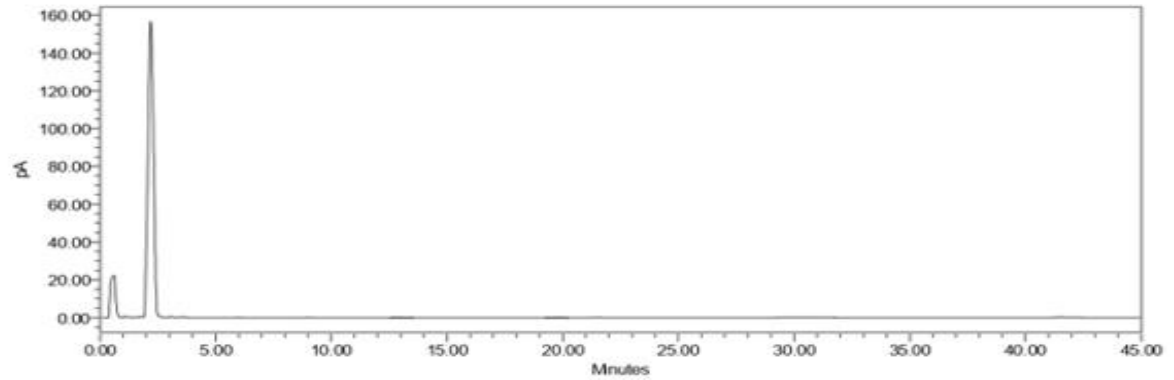
Sisteme tek verilen standart karışım kromatogramı aşağıda Şekil 3.25' de verilmiştir.



Peak Name	RT	Area	% Area	Height	Amount	USP Plate Count	USP Tailing	EP s/n
1 MYRISTIC ACID	7.374	9553107	2.72	581222	0.008	4015	1.0	383
2 LINOLEIC ACID	10.058	28193087	8.04	1674314	0.007	7650	1.0	1105
3 PALMITIC ACID	12.906	45032971	12.84	2674254	0.008	12534	1.0	1766
4 OLEIC ACID	14.260	53189091	15.16	3130991	0.007	15624	1.0	2068
5 ELAIDIC ACID	15.219	54020567	15.40	3162341	0.007	17566	1.0	2088
6 STEARIC ACID	19.846	77584814	22.12	4604723	0.007	30938	1.0	3041
7 ARACHIDIC ACID	27.094	83177985	23.71	4972289	0.007	59642	1.0	3284

Şekil 3. 25: Standart karışım kromatografisi

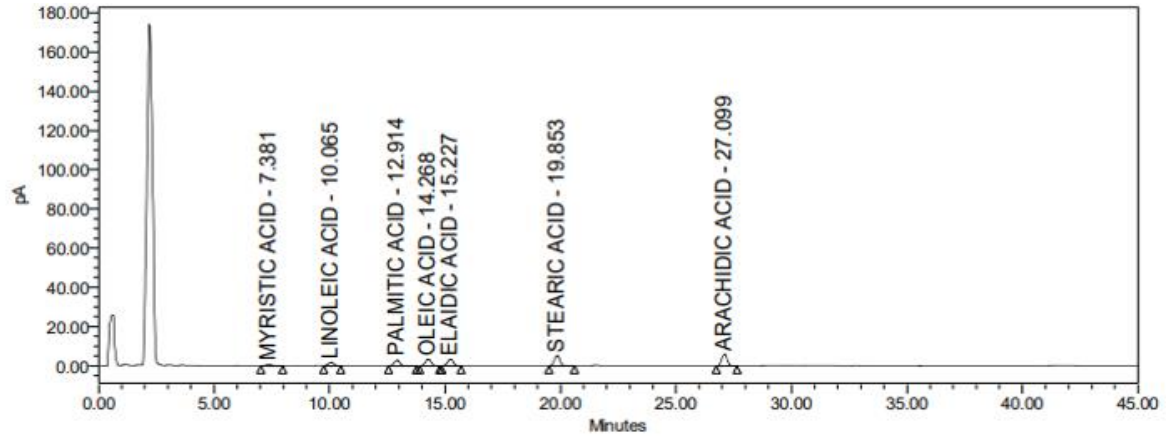
Sisteme tek verilen ekim yapılmamış numune kromatogramı aşağıda Şekil 3.26' da verilmiştir.



Peak Name	RT	Area	% Area	Height	Amount	Calc_Amount	USP Plate Count	USP Tailing	EP s/n
1 MYRISTIC ACID	7.410								
2 LINOLEIC ACID	10.014								
3 PALMITIC ACID	12.889								
4 OLEIC ACID	14.319								
5 ELAIDIC ACID	15.271								
6 STEARIC ACID	19.814								
7 ARACHIDIC ACID	26.692								

Şekil 3. 26: Ekim yapılmamış numune kromatografisi

Sisteme tek verilen ekim yapılmış numune kromatogramı aşağıda Şekil 3.27' de verilmiştir.



	Peak Name	RT	Area	% Area	Height	Amount	Calc_Amount	USP Plate Count	USP Tailing	EP s/n
1	MYRISTIC ACID	7.381	9491284	2.47	559452	0.000	71.730	3809	1.0	99
2	LINOLEIC ACID	10.065	29884980	7.76	1753493	0.000	79.027	7400	1.0	313
3	PALMITIC ACID	12.914	48140984	12.51	2808551	0.000	80.247	11909	1.0	502
4	OLEIC ACID	14.268	57025663	14.81	3282207	0.000	79.348	14842	1.0	587
5	ELAIDIC ACID	15.227	57584502	14.96	3326147	0.000	77.490	16491	1.0	594
6	STEARIC ACID	19.853	86486672	22.47	5083693	0.000	80.538	30353	1.0	909
7	ARACHIDIC ACID	27.099	96321263	25.02	5725929	0.000	79.761	58463	1.0	1024

Şekil 3. 27: Ekim yapılmış numune kromatografisi

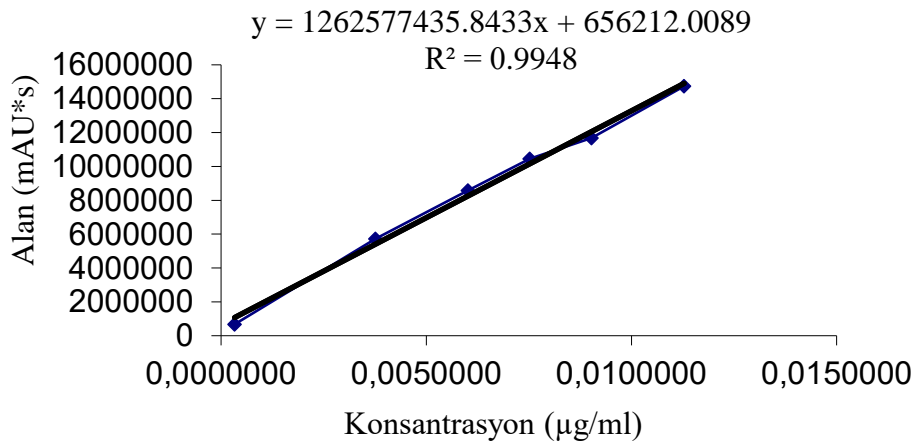
Numune çözeltisi kromatogramlarında sızabilen safsızlık piklerinin tutunma zamanında çözücünden kaynaklı oluşan bir pik gözlenmedi. Metot hem etken madde hem safsızlıkları için seçicidir. Piklerin saflığı kabul kriterlerine uygundur. Filtresiz kullanım uygun bulundu.

3.1.3.2 Doğrusallık

Doğrusallık sonuçları, miristik asit, linoleik asit, palmitik asit, oleik asit, elaidik asit, stearik asit, arakidik asit için aşağıdaki Tablo 3.3- Tablo 3.9 ve Şekil 3.28- Şekil 3.34 arasında gösterilmiştir. Konsantrasyona göre alanlarla grafik çizildi, en küçük kareler yöntemiyle regresyon doğru denklemi ve korelasyon katsayısı belirlendi, stearik asit standart seçilerek (referans alınarak) tüm asitlerin DF değerleri belirlendi.

Tablo 3. 3: Miristik asit için doğrulluk sonuçları

Standart No	Seviye	Cstandart	Astandart	Ortalama Astandart (Y1)	Hesaplanan Alan (Y2)	Alanlar Farkı (Y1-Y2)	Artık Kareler (Y1-Y2) ²
1	LOQ	0.0003304	675633	674616	1073368	39752	159003157504
			681414				
			648611				
			679544				
			665122				
697369							
2	50%	0.0037610	5567639	5717088	5404766	312322	97545031684
			5759085				
			5824541				
3	80%	0.0060176	8445116	8583778	8253898	329880	108820814400
			8842597				
			8463622				
4	100%	0.0075220	10343010	10454527	10153319	301208	90726259264
			10787787				
			10617506				
			10261196				
			10267666				
10449998							
6	120%	0.0090264	11571383	11675309	12052741	377432	142454914624
			11636340				
			11818203				
7	150%	0.0112830	14900219	14734647	14901879	167226	27964535076
			14935456				
			14989248				
			14729228				
			14330646				
14523086							



Şekil 3. 28: Miristik asit için doğrusallık sonuçları

$$y = 1262577435.8433x + 656212.0089 \quad (3.1)$$

$$R \text{ (Korelasyon Katsayısı)} = 0.9974$$

$$R^2 \text{ (Determinasyon Katsayısı)} = 0.9948$$

$$\text{RSS (Artık Kareler Toplamı)} = 626514712552$$

$$\frac{y\text{-kesim noktası}}{\%100 \text{ Seviyesindeki Alan}} \times 100 = \% 6.3 \quad (3.2)$$

$$\mathbf{RRF} \text{ (Rölatif Cevap Faktörleri)} = \frac{\text{safsızlık regresyon doğrusunun eğimi}}{\text{etkin madde std regresyon doğrusunun eğimi}} \quad (3.3)$$

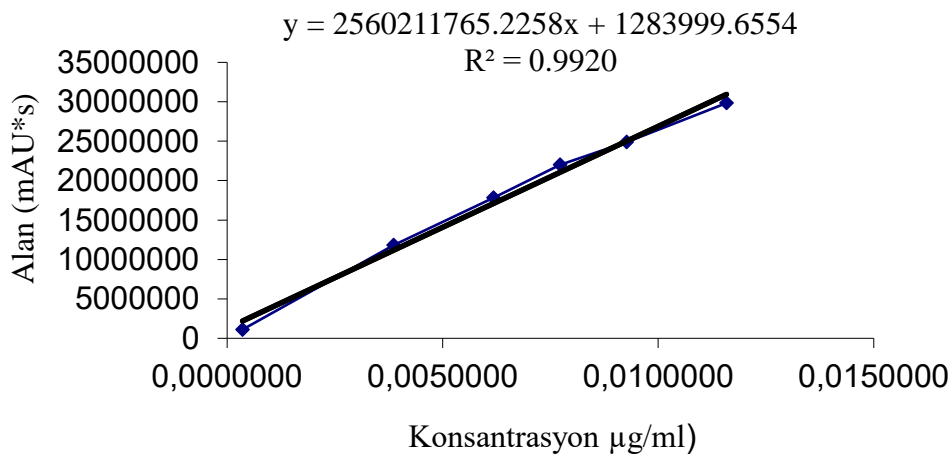
$$\mathbf{RRF} \text{ Miristik Asit} = \frac{1262577435.8433}{10445546725.3598} = 0.12$$

$$\mathbf{DF} \text{ (Düzeltilme Faktörü)}: \frac{1}{RRF} \quad (3.4)$$

$$\mathbf{DF} = \frac{1}{0.12} = 8.3$$

Tablo 3. 4: Linoleik asit için doğrusallık sonuçları

Standart No	Seviye	Cstandart	Astandart	Ortalama Astandart (Y1)	Hesaplanan Alan (Y2)	Alanlar Farkı (Y1-Y2)	Artık Kareler (Y1-Y2) ²
1	LOQ	0.0003560	1186184	1108312	2195435	1087123	1181836417129
			1281414				
			872203				
			1167083				
			980198				
			1162788				
2	50%	0.0038612	11799368	11805848	11169489	636359	404952776881
			11842762				
			11775415				
3	80%	0.0061779	17748560	17821966	17100732	721234	520178482756
			17839174				
			17878163				
4	100%	0.0077224	22488110	21998267	21054979	943288	889792250944
			21832437				
			21878132				
			22074044				
			22015078				
			21701802				
6	120%	0.0092669	24801874	24901559	25009229	107667	11592182889
			24883211				
			25019591				
7	150%	0.0115836	29301794	29834378	30910469	1106091	1223437300281
			29933192				
			29996724				
			29886760				
			29859459				
			30028339				



Şekil 3. 29: Linoleik asit için doğrusallık sonuçları

$$y = 2560211765.2258x + 1283999.6554 \quad (3.5)$$

$$R \text{ (Korelasyon Katsayısı)} = 0.9960$$

$$R^2 \text{ (Determinasyon Katsayısı)} = 0.9920$$

$$\text{RSS (Artık Kareler Toplamı)} = 4231789410880$$

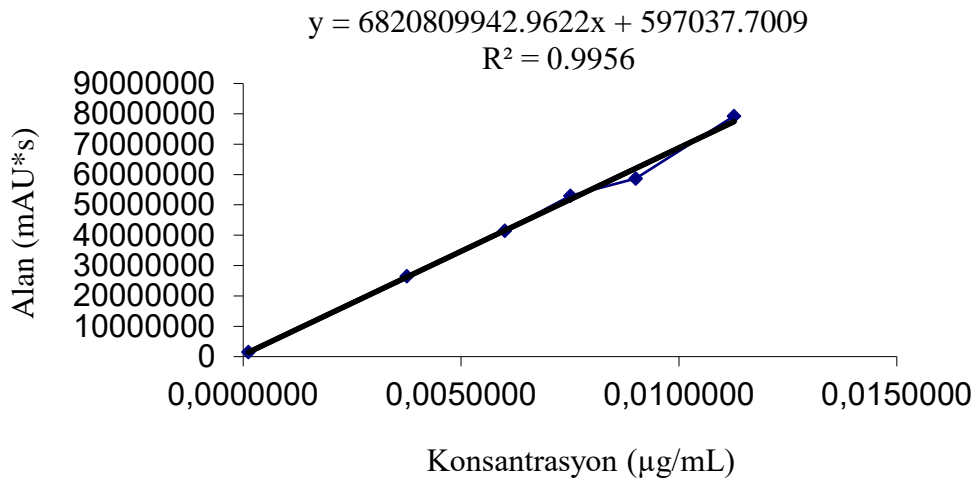
$$\frac{\text{y-kesim noktası}}{\%100 \text{ Seviyesindeki Alan}} \times 100 = \% 5.8 \quad (3.6)$$

$$\mathbf{RRF} \text{ Linoleik Asit} = \frac{2560211765.2258}{10445546725.3598} = 0.25$$

$$\mathbf{DF} = \frac{1}{0.25} = 4.0$$

Tablo 3. 5: Palmitik asit için doğrusallık sonuçları

Standart No	Seviye	Cstandart	Astandart	Ortalama Astandart (Y1)	Hesaplanan Alan (Y2)	Alanlar Farkı (Y1-Y2)	Artık Kareler (Y1-Y2) ²
1	LOQ	0.0001203	1628545	1542605	1417581	125024	15631000576
			1363729				
			1548971				
			1493821				
			1588301				
			1632265				
2	50%	0.0037550	26957404	26481217	26209179	272038	74004673444
			26389675				
			26096571				
3	80%	0.0060080	41086411	41472691	41576464	103773	10768835529
			41616511				
			41715152				
4	100%	0.0075100	52184335	53048934	51821320	1227614	1507036132996
			52898343				
			53427524				
			53796877				
			53674324				
			52312201				
6	120%	0.0090120	58193103	58737054	62066177	3329123	11083059949129
			59376830				
			58641229				
7	150%	0.0112650	78177132	79241682	77433462	1808220	3269659568400
			79400563				
			79895328				
			79759205				
			79104755				
			79113109				



Şekil 3. 30: Palmitik asit için doğrusallık sonuçları

$$y = 6820809942.9622x + 597037.7009 \quad (3.7)$$

$$R \text{ (Korelasyon Katsayısı)} = 0.9978$$

$$R^2 \text{ (Determinasyon Katsayısı)} = 0.9956$$

$$\text{RSS (Artık Kareler Toplamı)} = 15960160160074$$

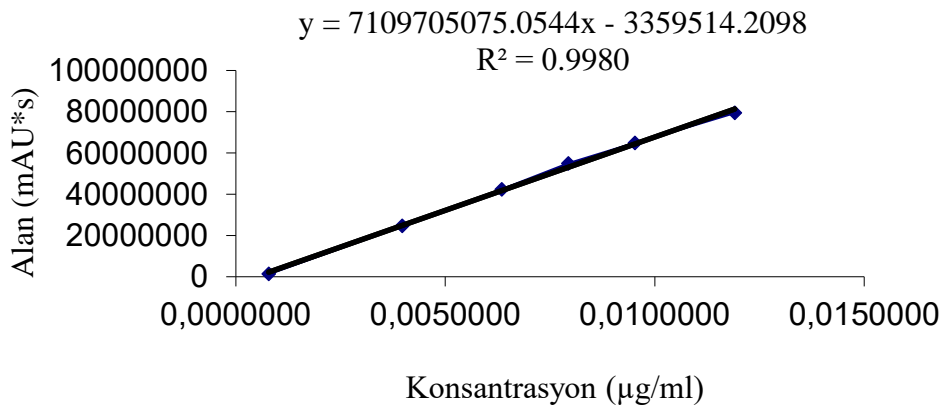
$$\frac{y\text{-kesim noktası}}{\%100 \text{ Seviyesindeki Alan}} \times 100 = \% 1.1 \quad (3.8)$$

$$\mathbf{RRF} \text{ Palmitik Asit } \frac{6820809942.9622}{10445546725.3598} = 0.65$$

$$\mathbf{DF} = \frac{1}{0.65} = 1.5$$

Tablo 3. 6: Oleik asit için doğrusallık sonuçları

Standart No	Seviye	Cstandart	Astandart	Ortalama Astandart (Y1)	Hesaplanan Alan (Y2)	Alanlar Farkı (Y1-Y2)	Artık Kareler (Y1-Y2) ²
1	LOQ	0.0007840	1133048	1323230	2214495	891265	794353300225
			1363729				
			1440269				
			1319854				
			1408024				
			1274458				
2	50%	0.0039700	25006845	24631082	24866015	234933	55193514489
			24838947				
			24047454				
3	80%	0.0063520	42227126	42387945	41801332	586613	344114811769
			42008635				
			42928075				
4	100%	0.0079400	55935785	54928125	53091544	1836581	3373029769561
			53091501				
			56386072				
			53616290				
			56351012				
			54188089				
6	120%	0.0095280	64475515	64898111	64381756	516355	266622486025
			64858922				
			65359895				
7	150%	0.0119100	79953299	79503722	81317073	1813351	3288241849201
			79715396				
			78431241				
			81072685				
			78466433				
			79383279				



Şekil 3. 31: Oleik asit için doğrusallık sonuçları

$$y = 7109705075.0544x - 3359514.2098 \quad (3.9)$$

$$R \text{ (Korelasyon Katsayısı)} = 0.9997$$

$$R^2 \text{ (Determinasyon Katsayısı)} = 0.9994$$

$$\text{RSS (Artık Kareler Toplamı)} = 8121555731270$$

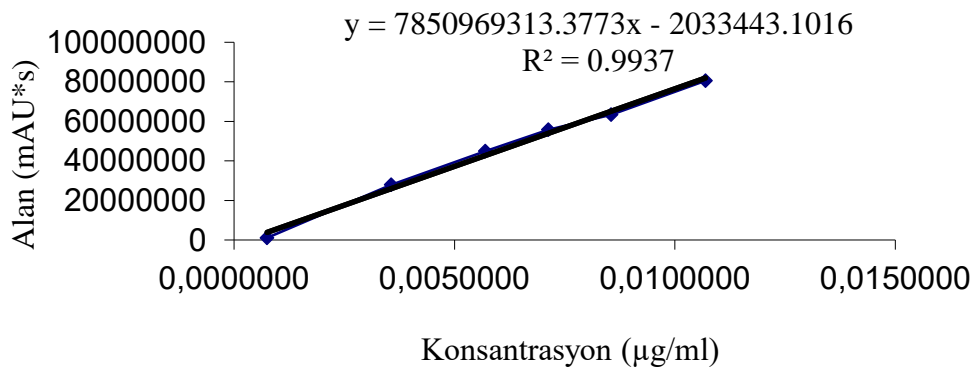
$$\frac{\text{y-kesim noktası}}{\%100 \text{ Seviyesindeki Alan}} \times 100 = \% 6.1 \quad (3.10)$$

$$\text{RRF Oleik Asit} = \frac{7109705075.0544}{10445546725.3598} = 0.68$$

$$\text{DF} = \frac{1}{0.68} = 1.5$$

Tablo 3. 7: Elaidik asit için doğrusallık sonuçları

Standart No	Seviye	Cstandart	Astandart	Ortalama Astandart (Y1)	Hesaplanan Alan (Y2)	Alanlar Farkı (Y1-Y2)	Artık Kareler (Y1-Y2) ²
1	LOQ	0.0007494	1044437	1094164	3850073	2755909	7595034416281
			1168025				
			1062827				
			922207				
			1169963				
			1197526				
2	50%	0.0035644	28072977	27931542	25950552	1980990	3924321380100
			28524726				
			27196923				
3	80%	0.0057030	44492581	44874913	42740635	2134278	4555142581284
			45355580				
			44776577				
4	100%	0.0071288	55533229	55769864	53934547	1835317	3368388490489
			55936389				
			55410339				
			55875528				
			56304105				
			55559594				
6	120%	0.0085546	63120392	63300090	65128459	1828369	3342933200161
			63276102				
			63503776				
7	150%	0.0106932	78009028	80552235	81918542	1366307	1866794818249
			79532049				
			81000564				
			80510277				
			81392095				
			82869394				



Şekil 3. 32: Elaidik asit için doğrusallık sonuçları

$$y = 7850969313.3773x - 2033443.1016 \quad (3.11)$$

$$R \text{ (Korelasyon Katsayısı)} = 0.9968$$

$$R^2 \text{ (Determinasyon Katsayısı)} = 0.9937$$

$$\text{RSS (Artık Kareler Toplamı)} = 24652614886564$$

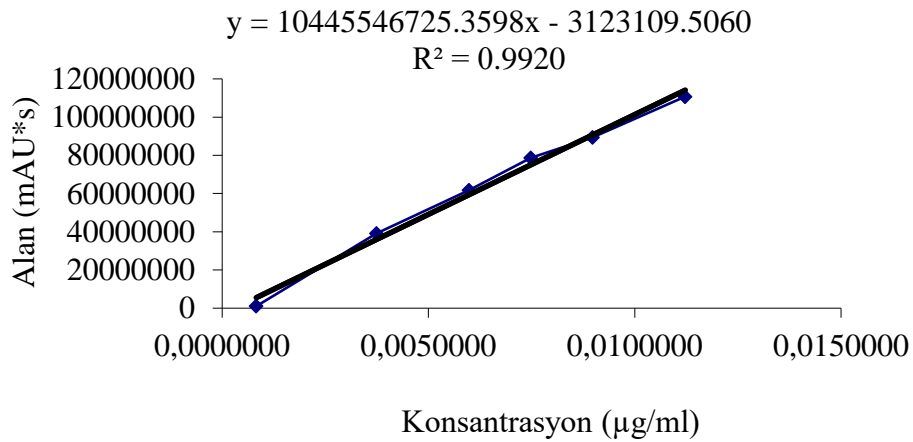
$$\frac{y\text{-kesim noktası}}{\%100 \text{ Seviyesindeki Alan}} \times 100 = \% 3.6 \quad (3.12)$$

$$\mathbf{RRF} \text{ Elaidik Asit } \frac{7850969313.3773}{10445546725.3598} = 0.75$$

$$\mathbf{DF} = \frac{1}{0.75} = 1.3$$

Tablo 3. 8: Stearik asit için doğrusallık sonuçları

Standart No	Seviye	Cstandart	Astandart	Ortalama Astandart (Y1)	Hesaplanan Alan (Y2)	Alanlar Farkı (Y1-Y2)	Artık Kareler (Y1-Y2) ²
1	LOQ	0.0008259	1029871	1030052	5503868	4473816	20015029601856
			1051463				
			1038164				
			916825				
			1115018				
1028973							
2	50%	0.0037410	39485598	39069658	35953681	3115977	9709312664529
			39108731				
			38614644				
3	80%	0.0059856	61949769	61817086	59399755	2417331	5843489162561
			61770633				
			61730857				
4	100%	0.0074820	78702228	78591612	75030471	3561141	12681725221881
			78632326				
			78152813				
			78816638				
			78572844				
78672821							
6	120%	0.0089784	89581471	89421861	90661187	1236326	1535928934276
			89173427				
			89510686				
7	150%	0.0112230	110126356	110725954	114107261	3381307	11433237028249
			109570086				
			110393434				
			110480788				
			111545288				
112239772							



Şekil 3. 33: Stearik asit için doğrusallık sonuçları

$$y = 10445546725.3598x - 3123109.5060 \quad (3.13)$$

$$R \text{ (Korelasyon Katsayısı)} = 0.9960$$

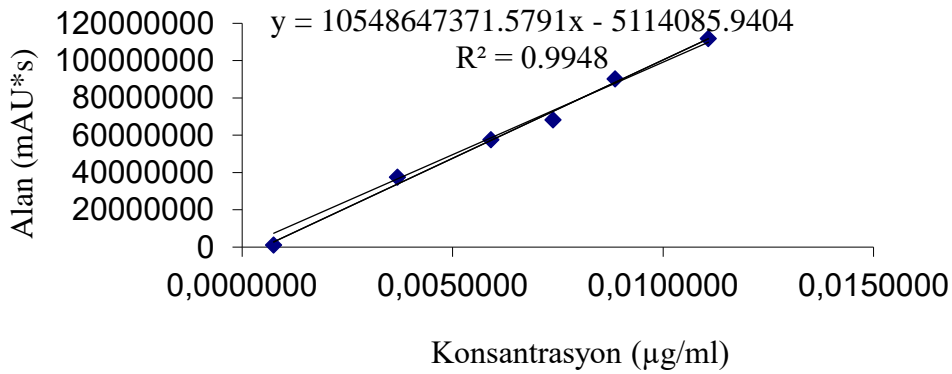
$$R^2 \text{ (Determinasyon Katsayısı)} = 0.9920$$

$$\text{RSS (Artık Kareler Toplamı)} = 61218722614352$$

$$\frac{y\text{-kesim noktası}}{\%100 \text{ Seviyesindeki Alan}} \times 100 = \% 4.0 \quad (3.14)$$

Tablo 3. 9: Arakidik asit için doğrusallık sonuçları

Standart No	Seviye	Cstandart	Astandart	Ortalama Astandart (Y1)	Hesaplanan Alan (Y2)	Alanlar Farkı (Y1-Y2)	Artık Kareler (Y1-Y2) ²
1	LOQ	0.0007492	995044	1121091	2788961	1667870	2781790336900
			1131110				
			1251520				
			1051459				
			1135631				
			1161781				
2	50%	0.0036927	37613617	37533816	34465564	3068252	9414170335504
			37637812				
			37350018				
3	80%	0.0059082	58083826	57617747	57537265	80483	6477513289
			57310204				
			57459210				
4	100%	0.0073853	68892914	68349405	72919440	4570035	20885219901225
			68160596				
			68610434				
			68288436				
			68125078				
			68018969				
6	120%	0.0088624	89983567	90281003	88301615	1979388	3917976854544
			89860895				
			90998548				
7	150%	0.0110780	111418944	111841151	111374357	466794	217896638436
			111379438				
			112289960				
			111043858				
			112072036				
			112842672				



Şekil 3. 34: Arakidik asit için doğrusallık sonuçları

$$y = 10548647371.5791x - 5114085.9404 \quad (3.15)$$

$$R \text{ (Korelasyon Katsayısı)} = 0.9974$$

$$R^2 \text{ (Determinasyon Katsayısı)} = 0.9948$$

$$\text{RSS (Artık Kareler Toplamı)} = 39980042984802$$

$$\frac{y\text{-kesim noktası}}{\%100 \text{ Seviyesindeki Alan}} \times 100 = \% 7.5 \quad (3.16)$$

$$\text{RRF Elaidik Asit} = \frac{10548647371.5791}{10445546725.3598} = 1.00$$

$$\text{DF} = \frac{1}{1.00} = 1.0$$

Metodun LOQ ile % 150 konsantrasyon aralığında doğrusal olduğu görüldü, sonuçlar kabul kriterlerine uygun bulundu.

3.1.3.3 Çalışma Aralığı

Miristik asit, linoleik asit, palmitik asit, oleik asit çalışma aralığı sonuçları aşağıdaki Tablo 3.10' da verilmiştir.

Tablo 3. 10: Miristik asit, linoleik asit, palmitik asit, oleik asit çalışma aralığı sonuçları

Enjeksiyon	Miristik Asit		Linoleik Asit		Palmitik Asit	
	Alan		Alan		Alan	
	LOQ	%150	LOQ	%150	LOQ	%150
1	675633	14900219	1186184	29301794	675633	14900219
2	681414	14935456	1281414	29933192	681414	14935456
3	648611	14989248	872203	29996724	648611	14989248
4	679544	14729228	1167083	29886760	679544	14729228
5	665122	14330646	980198	29859459	665122	14330646
6	697369	14523086	1162788	30028339	697369	14523086
Ortalama	674616	14734647	1108312	29834378	674616	14734647
SD	16465.888	260984.383	151400.576	268611.224	16465.888	260984.383
% RSD	2.4	1.8	13.7	0.9	2.4	1.8

Elaidik asit, stearik asit, arakidik asit çalışma aralığı sonuçları aşağıdaki Tablo 3.11' de verilmiştir.

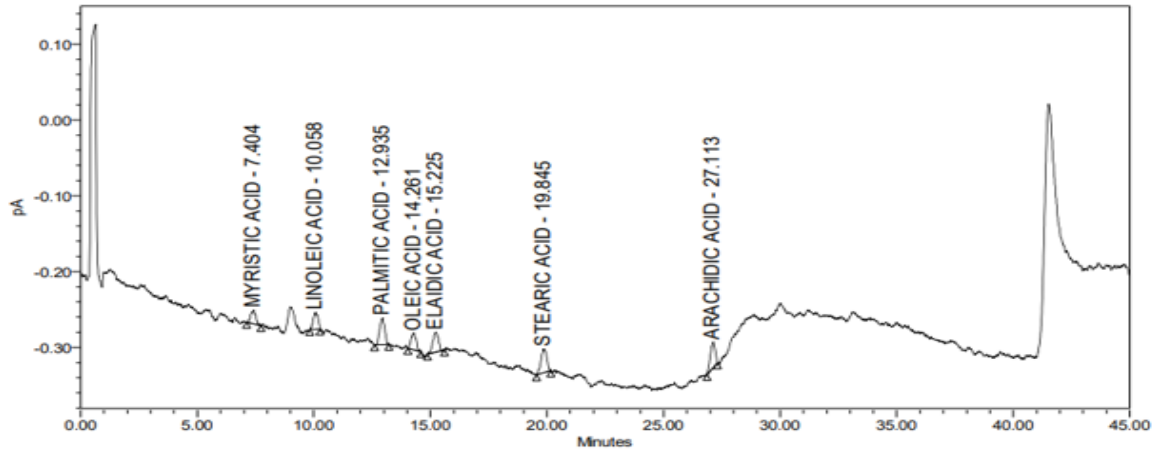
Tablo 3. 11: Elaidik asit, stearik asit, arakidik asit çalışma aralığı sonuçları

Enjeksiyon	Elaidik Asit		Stearik Asit		Arakidik Asit	
	Alan		Alan		Alan	
	LOQ	% 150	LOQ	% 150	LOQ	% 150
1	1044437	78009028	1029871	110126356	995044	111418944
2	1168025	79532049	1051463	109570086	1131110	111379438
3	1062827	81000564	1038164	110393434	1251520	112289960
4	922207	80510277	916825	110480788	1051459	111043858
5	1169963	81392095	1115018	111545288	1135631	112072036
6	1197526	82869394	1028973	112239772	1161781	112842672
Ortalama	1094164	80552235	1030052	110725954	1121091	111841151
SD	104793.731	1660483.745	64132.686	982769.317	89124.243	676002.291
% RSD	9.6	2.1	6.2	0.9	7.9	0.6

Tablodaki alanlara göre hesaplanan RSD değerleri kabul kriterlerine uygun bulundu. LOQ ve % 150 konsantrasyonları safsızlıkların alt ve üst seviyeleri olarak belirlendi.

3.1.3.4 LOD (Tespit Limiti)

LOD sonuçları Tablo 3.12' de verilmiştir. Kromatogramı ise Şekil 3.35 'de verilmiştir.



Peak Name	RT	Area	% Area	USP Plate Count	USP Tailing	EPs/n
1 MYRISTIC ACID	7.404	263069	9.09	7123	1.0	3
2 LINOLEIC ACID	10.058	321598	11.11	9312	1.0	4
3 PALMITIC ACID	12.935	515293	17.80	13818	1.0	4

4 OLEIC ACID	14.261	332426	11.48	19261	1.3	3
5 ELAIDIC ACID	15.225	433851	14.98	16874	0.8	4
6 STEARIC ACID	19.845	540940	18.68	30492	1.0	5
7 ARACHIDIC ACID	27.113	488058	16.86	66324	0.9	6

Şekil 3. 35: LOD sonuçları

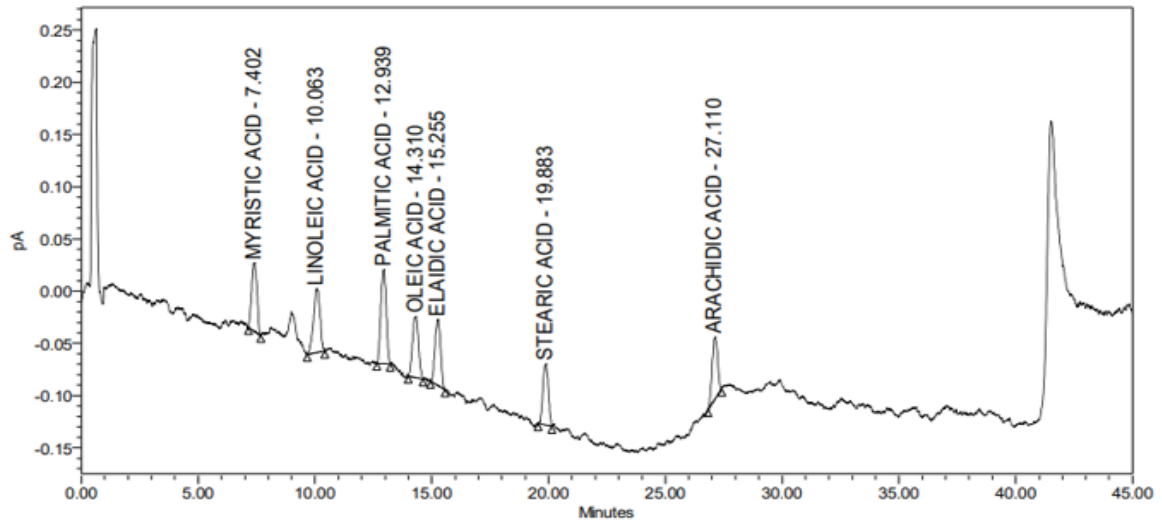
Tablo 3. 12: LOD sonuçları

	Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	$\mu\text{g/kanister}$	S/N
Miristik Asit	0.1089 $\mu\text{g/mL}$	1.089 $\mu\text{g/kanister}$	4
Linoleik Asit	0.1139 $\mu\text{g/mL}$	1.139 $\mu\text{g/kanister}$	4
Palmitik Asit	0.0396 $\mu\text{g/mL}$	0.396 $\mu\text{g/kanister}$	5
Oleik Asit	0.2475 $\mu\text{g/mL}$	2.475 $\mu\text{g/kanister}$	5
Elaidik Asit	0.2475 $\mu\text{g/mL}$	2.475 $\mu\text{g/kanister}$	4
Stearik Asit	0.2723 $\mu\text{g/mL}$	2.723 $\mu\text{g/kanister}$	5
Arakidik Asit	0.2475 $\mu\text{g/mL}$	2.475 $\mu\text{g/kanister}$	4

Kromatogramda ve tabloda görüldüğü gibi elde edilen S/N değerleri kabul kriterlerine uygun bulunmuştur.

3.1.3.5 LOQ (Nicelik Sınırı)

LOQ sonuçları Tablo 3.13' de verilmiştir. Kromatogramı ise Şekil 3.36' da verilmiştir.



Peak Name	RT	Area	% Area	USP Plate Count	USP Tailing	EPs/n
1 MYRISTIC ACID	7.402	1031848	13.46	4952	1.0	14
2 LINOLEIC ACID	10.063	1186184	15.47	6536	1.0	10
3 PALMITIC ACID	12.939	1452229	18.94	13915	1.0	11
4 OLEIC ACID	14.310	1038062	13.54	15316	1.0	10
5 ELAIDIC ACID	15.255	1044437	13.62	19119	1.0	11
6 STEARIC ACID	19.883	944810	12.32	36057	1.0	10
7 ARACHIDIC ACID	27.110	969288	12.64	60979	1.0	10

Şekil 3. 36: LOQ sonuçları

Tablo 3. 13: LOQ sonuçları

	Konsantrasyon (µg/mL)	µg/kanister	S/N
Miristik Asit	0.33 µg/mL	3.3 µg/kanister	10
Linoleik Asit	0.345 µg/mL	3.45 µg/kanister	12
Palmitik Asit	0.12 µg/mL	1.2 µg/kanister	10
Oleik Asit	0.75 µg/mL	7.5 µg/kanister	11
Elaidik Asit	0.75 µg/mL	7.5 µg/kanister	11
Stearik Asit	0.825 µg/mL	8.25 µg/kanister	10
Araکیدik Asit	0.75 µg/mL	7.5 µg/kanister	11

Kromatogramda ve tabloda görüldüğü gibi elde edilen S/N değerleri kabul kriterlerine uygun bulunmuştur.

3.1.3.6 Doğruluk

Miristik asit, linoleik asit, palmitik asit, oleik asit, elaidik asit, stearik asit, arakidik asit için sırasıyla doğruluk sonuçları Tablo 3.14- Tablo 3.20 arasında verilmiştir.

Tablo 3. 14: Miristik asit için doğruluk sonuçları

Seviye	Deneysel Değer (µg/mL)	Teorik Değer (µg/mL)	Geri Kazanım (%)	Ortalama (%)	SD	RSD (%)
LOQ	0.000331	0.000328	99.1	99.8	1.2	1.2
	0.000327	0.000331	101.2			
	0.000332	0.000329	99.1			
100	0.007516	0.007536	100.3	100.3	1.3	1.3
	0.007430	0.007551	101.6			
	0.007556	0.007481	99.0			
150	0.011274	0.011299	100.2	101.1	2.4	2.4
	0.011145	0.011569	103.8			
	0.011334	0.011251	99.3			
		Ortalama	100.4			
		SD	1.6			
		% RSD	1.6			
		%95 Güven Aralığı	1.2			

Tablo 3. 15: Linoleik asit için doğruluk sonuçları

Seviye	DeneySEL Değer (µg/mL)	Teorik Değer (µg/mL)	Geri Kazanım (%)	Ortalama (%)	SD	RSD (%)
LOQ	0.000343	0.000352	102.6	103.5	1.1	1.1
	0.000343	0.000359	104.7			
	0.000344	0.000355	103.2			
100	0.007453	0.007515	100.8	101.4	0.7	0.7
	0.007454	0.007610	102.1			
	0.007470	0.007574	101.4			
150	0.011179	0.011054	98.9	100.3	2.6	2.6
	0.011179	0.011021	98.6			
	0.011179	0.011544	103.3			
Ortalama			101.7			
SD			2.0			
% RSD			2.0			
%95 Güven Aralığı			1.5			

Tablo 3. 16: Palmitik asit için doğruluk sonuçları

Seviye	DeneySEL Değer (µg/mL)	Teorik Değer (µg/mL)	Geri Kazanım (%)	Ortalama (%)	SD	RSD (%)
LOQ	0.000121	0.000120	99.2	99.5	0.5	0.5
	0.000121	0.000120	99.2			
	0.000120	0.000120	100.0			
100	0.007536	0.007596	100.8	100.0	0.7	0.7
	0.007536	0.007499	99.5			
	0.007536	0.007515	99.7			
150	0.011304	0.011256	99.6	100.7	2.1	2.1
	0.011304	0.011245	99.5			
	0.011304	0.011652	103.1			
Ortalama			100.1			
SD			1.2			
% RSD			1.2			
%95 Güven Aralığı			0.9			

Tablo 3. 17: Oleik asit için doğruluk sonuçları

Seviye	Deneysel Değer (µg/mL)	Teorik Değer (µg/mL)	Geri Kazanım (%)	Ortalama (%)	SD	RSD (%)
LOQ	0.000751	0.000781	104.0	104.4	0.6	0.6
	0.000753	0.000784	104.1			
	0.000745	0.000783	105.1			
100	0.007512	0.007572	100.8	101.3	0.5	0.5
	0.007525	0.007612	101.2			
	0.007451	0.007588	101.8			
150	0.011269	0.011263	99.9	100.3	0.4	0.4
	0.011269	0.011314	100.4			
	0.011269	0.011333	100.6			
Ortalama			102.0			
SD			1.9			
% RSD			1.9			
%95 Güven Aralığı			1.5			

Tablo 3. 18: Elaidik asit için doğruluk sonuçları

Seviye	Deneysel Değer (µg/mL)	Teorik Değer (µg/mL)	Geri Kazanım (%)	Ortalama (%)	SD	RSD (%)
LOQ	0.000733	0.000741	101.1	101.7	0.7	0.7
	0.000731	0.000749	102.5			
	0.000744	0.000755	101.5			
100	0.007330	0.007415	101.2	102.3	1.0	1.0
	0.007330	0.007503	102.4			
	0.007330	0.007562	103.2			
150	0.010995	0.011263	102.4	104.0	1.7	1.6
	0.010995	0.011412	103.8			
	0.010995	0.011632	105.8			
Ortalama			102.7			
SD			1.5			
% RSD			1.5			
%95 Güven Aralığı			1.2			

Tablo 3. 19: Stearik asit için doğruluk sonuçları

Seviye	Deneysel Değer (µg/mL)	Teorik Değer (µg/mL)	Geri Kazanım (%)	Ortalama (%)	SD	RSD (%)
LOQ	0.000820	0.000816	99.5	100.1	0.6	0.6
	0.000821	0.000822	100.1			
	0.000820	0.000825	100.6			
100	0.007450	0.007510	100.8	100.7	0.2	0.2
	0.007450	0.007485	100.5			
	0.007450	0.007512	100.8			
150	0.011175	0.011624	104.0	103.8	0.4	0.4
	0.011175	0.011630	104.1			
	0.011175	0.011560	103.4			
Ortalama			101.5			
SD			1.8			
% RSD			1.8			
%95 Güven Aralığı			1.9			

Tablo 3. 20: Arakidik asit için doğruluk sonuçları

Seviye	Deneysel Değer (µg/mL)	Teorik Değer (µg/mL)	Geri Kazanım (%)	Ortalama (%)	SD	RSD (%)
LOQ	0.000735	0.000751	102.2	103.1	0.9	0.9
	0.000737	0.000766	103.9			
	0.000737	0.000761	103.3			
100	0.007354	0.007415	100.8	101.5	0.7	0.7
	0.007354	0.007462	101.5			
	0.007354	0.007510	102.1			
150	0.011031	0.011290	102.3	102.5	0.2	0.2
	0.011031	0.011312	102.5			
	0.011031	0.011333	102.7			
Ortalama			102.4			
SD			0.9			
% RSD			0.9			
%95 Güven Aralığı			0.7			

Doğruluk parametresinde yapılan enjeksiyonlar sonucunda % 100 ve % 150 seviyeleri için geri kazanım sonuçları % 90.0 – % 110.0, LOQ için % 70.0 – % 130.0 arasındadır ve kabul kriterlerine uygun bulundu.

3.1.3.7 Kesinlik

Sistem kesinliğine ait sonuçlar Tablo 3.21’ de gösterilmiştir.

Tablo 3. 21: Sistem kesinliği sonuçları

Enjeksiyon	Standart Alan						
	Miristik Asit	Linoleik Asit	Palmitik Asit	Oleik Asit	Elaidik Asit	Stearik Asit	Arakidik Asit
1	9553107	28193087	45032971	53189091	54020567	77584814	83177985
2	10137153	28371880	45906244	53780315	54398230	77777546	82740078
3	10000192	28163971	45637203	52750579	54312650	77243482	82772337
4	10064987	28194796	45860620	53147252	54640361	77255286	82163166
5	10271771	28396653	45860966	53426963	54385438	77511556	82760113
6	10206732	28170135	45979076	52880597	54396163	77623355	82701476
Ortalama	10038990	28248420	45712847	53195800	54358902	77499340	82719193
SD	256992	106219	352139	372846	199734	212254	324008
% RSD	2.6	0.4	0.8	0.7	0.4	0.3	0.4

6 ardışık standart enjeksiyonu arasındaki % RSD değerlerine bakıldı ve kabul kriterlerine uygun bulundu.

3.1.3.8 Tekrarlanabilirlik

Tablo 3.22’ de tekrarlanabilirlik sonuçları verilmiştir.

Tablo 3. 22: Tekrarlanabilirlik sonuçları

Enjeksiyon	Sonuç (µg/kanister)						
	Miristik Asit	Linoleik Asit	Palmitik Asit	Oleik Asit	Elaidik Asit	Stearik Asit	Arakidik Asit
1	71.730	79.023	80.242	79.348	77.486	80.538	79.758
2	67.825	79.422	82.342	79.374	77.400	81.088	78.842
3	69.222	78.010	79.627	78.316	76.590	79.436	76.247
4	68.511	77.830	79.150	78.546	75.791	79.553	77.408
5	68.065	80.649	81.460	80.982	77.957	81.227	79.191
6	68.294	79.971	81.964	80.596	78.249	81.400	79.282
Ortalama	68.941	79.151	80.798	79.527	77.246	80.540	78.455
SD	1.447	1.100	1.310	1.072	0.910	0.861	1.345
% RSD	2.1	1.4	1.6	1.3	1.2	1.1	1.7
% Güven Aralığı	1.519	1.155	1.375	1.125	0.955	0.904	1.412

Tekrarlanabilirlik parametresinde elde edilen sonuçların % RSD değerleri kabul kriterlerine uygun bulundu ve sonuçlara göre metot tekrarlanabilir bulundu.

3.1.3.9 Ara Kesinlik

Ara kesinlik sonuçları aşağıdaki Tablo 3.23' de belirtildiği gibidir.

Tablo 3. 23: Ara kesinliğe ait sonuçlar

Enjeksiyon	Sonuç (µg/kanister)						
	Miristik Asit	Linoleik Asit	Palmitik Asit	Oleik Asit	Elaidik Asit	Stearik Asit	Arakidik Asit
1	81.917	75.868	79.464	76.809	75.402	79.371	76.962
2	75.734	75.340	81.171	76.427	74.273	78.454	79.416
3	75.457	73.254	75.447	71.807	70.349	75.690	72.608
4	75.933	71.712	74.810	71.756	70.463	74.319	73.547
5	80.113	76.023	80.483	76.858	74.994	79.705	75.065
6	80.226	75.812	80.829	77.022	75.391	79.092	74.580
Ortalama	78.230	74.668	78.701	75.113	73.5	77.8	75.4
SD	2.840	1.776	2.833	2.588	2.415	2.225	2.473
% RSD	3.6	2.4	3.6	3.4	3.3	2.9	3.3
% 95 Güven Aralığı	2.981	1.864	2.974	2.716	2.535	2.335	2.596
Mutlak Fark	9.3	4.5	2.1	4.4	3.8	2.8	3.1

Tabloda elde edilen sonuçlara göre sonuçlar kabul kriterlerine uygun bulundu ve tekrarlanabilirlik sonuçlarına göre hesaplanan mutlak fark sonuçları da kabul kriterlerine uygun bulundu.

Miristik asit, linoleik asit, palmitik asit, oleik asit, elaidik asit, stearik asit, arakidik asit için sırasıyla t test sonuçları Tablo 3.24- Tablo 3.27 aralarında gösterilmiştir.

Tablo 3. 24: Miristik asit, linoleik asit t test sonuçları

Test	Miristik Asit <i>Myristic Acid</i>		Linoleik Asit <i>Linoleic Acid</i>	
	Tekrarlanabilirlik Sonuçları (µg/kanister)	Ara Kesinlik Sonuçları (µg/kanister)	Tekrarlanabilirlik Sonuçları (µg/kanister)	Ara Kesinlik Sonuçları (µg/kanister)
1	71.730	81.917	79.023	75.868
2	67.825	75.734	79.422	75.340
3	69.222	75.457	78.010	73.254
4	68.511	75.933	77.830	71.712
5	68.065	80.113	80.649	76.023
6	68.294	80.226	79.971	75.812
Ortalama	68.941	78.230	79.151	74.668
Hesaplanan t Test	3.15E-05		3.71E-04	
t std	2.23			

Tablo 3. 25: Palmitik asit, oleik asit t Test sonuçları

Test	Palmitik Asit		Oleik Asit	
	Tekrarlanabilirlik Sonuçları (µg/kanister)	Ara Kesinlik Sonuçları (µg/kanister)	Tekrarlanabilirlik Sonuçları (µg/kanister)	Ara Kesinlik Sonuçları (µg/kanister)
1	80.242	79.464	79.348	76.809
2	82.342	81.171	79.374	76.427
3	79.627	75.447	78.316	71.807
4	79.150	74.810	78.546	71.756
5	81.460	80.483	80.982	76.858
6	81.964	80.829	80.596	77.022
Ortalama	80.798	78.701	79.527	75.113
Hesaplanan t Test	1.31E-01		3.16E-03	
t std	2.23			

Tablo 3. 26: Elaidik asit ve stearik asit t test sonuçları

Test	Elaidik Asit		Stearik Asit	
	Tekrarlanabilirlik Sonuçları (µg/kanister)	Ara Kesinlik Sonuçları (µg/kanister)	Tekrarlanabilirlik Sonuçları (µg/kanister)	Ara Kesinlik Sonuçları (µg/kanister)
1	77.486	75.402	80.538	79.371
2	77.400	74.273	0.000	78.454
3	76.590	70.349	79.436	75.690
4	75.791	70.463	79.553	74.319
5	77.957	74.994	81.227	79.705
6	78.249	75.391	81.400	79.092
Ortalama	77.246	73.500	80.540	77.800
Hesaplanan t Test	5.06E-03		4.43E-01	
t std	2.23			

Tablo 3. 27: Arakidik asit t Test sonuçları

Test	Arakidik Asit	
	Tekrarlanabilirlik Sonuçları (µg/kanister)	Ara Kesinlik Sonuçları (µg/kanister)
1	79.758	76.962
2	78.842	79.416
3	76.247	72.608
4	77.408	73.547
5	79.191	75.065
6	79.282	74.580
Ortalama	78.455	75.400
Hesaplanan t Test	2.27E-02	
t std	2.23	

Tablodaki sonuçlara göre hesaplanan t testi sonucu tstd değerinden küçüktür ve t testi uygun bulundu. Sonuçlar metodun ara kesinlik parametresinin kabul kriterlerine göre uygun bulundu.

3.1.3.10 Sağlık

Sağlık sonuçları miristik asit, linoleik asit, palmitik asit, oleik asit, elaidik asit, stearik asit, arakidik asit için sırasıyla Tablo 3.28- Tablo 3.34 aralarında belirtilmiştir.

Tablo 3. 28: Miristik asit sağlamlık sonuçları

Formik Asit Miktarı	Standart % RSD	Teorik Plaka Sayısı	Kuyruklanma Faktörü
0.45 mL/L	1.7	3552	1.0
0.5 mL/L	2.6	3617	1.0
0.55 mL/L	1.9	3688	1.0
Sıcaklık (°C)	Standart % RSD	Teorik Plaka Sayısı	Kuyruklanma Faktörü
48°C	3.0	3840	1.0
50°C	2.6	3617	1.0
52°C	2.0	3394	1.0

Tablo 3. 29: Linoleik asit sağlamlık sonuçları

Formik Asit Miktarı	Standart % RSD	Teorik Plaka Sayısı	Kuyruklanma Faktörü
0.45 mL/L	1.6	6166	1.0
0.5 mL/L	0.4	6678	1.0
0.55 mL/L	0.7	6379	1.0
Sıcaklık (°C)	Standart % RSD	Teorik Plaka Sayısı	Kuyruklanma Faktörü
48°C	0.6	6741	1.0
50°C	0.4	6678	1.0
52°C	0.8	5785	1.0

Tablo 3. 30: Palmitik asit sağlamlık sonuçları

Formik Asit Miktarı	Standart % RSD	Teorik Plaka Sayısı	Kuyruklanma Faktörü
0.45 mL/L	1.9	10964	1.0
0.5 mL/L	0.8	11398	1.0
0.55 mL/L	0.8	11140	1.0
Sıcaklık (°C)	Standart % RSD	Teorik Plaka Sayısı	Kuyruklanma Faktörü
48°C	0.9	11767	1.0
50°C	0.8	11398	1.0
52°C	0.9	10202	1.0

Tablo 3. 31: Oleik asit sağlamlık sonuçları

Formik Asit Miktarı	Standart % RSD	Teorik Plaka Sayısı	Kuyruklanma Faktörü
0.45 mL/L	1.1	13070	1.0
0.5 mL/L	0.7	14214	1.0
0.55 mL/L	3.1	13308	1.0
Sıcaklık (°C)	Standart % RSD	Teorik Plaka Sayısı	Kuyruklanma Faktörü
48°C	0.3	13710	1.0
50°C	0.7	14214	1.0
52°C	0.6	12193	1.0

Tablo 3. 32: Elaidik asit sağlamlık sonuçları

Formik Asit Miktarı	Standart % RSD	Teorik Plaka Sayısı	Kuyruklanma Faktörü
0.45 mL/L	1.2	14810	1.0
0.5 mL/L	0.4	16030	1.0
0.55 mL/L	0.3	15220	1.0
Sıcaklık (°C)	Standart % RSD	Teorik Plaka Sayısı	Kuyruklanma Faktörü
48°C	0.6	15666	1.1
50°C	0.4	16030	1.0
52°C	0.6	14044	1.0

Tablo 3. 33: Stearik asit sağlamlık sonuçları

Formik Asit Miktarı	Standart % RSD	Teorik Plaka Sayısı	Kuyruklanma Faktörü
0.45 mL/L	0.8	27026	1.0
0.5 mL/L	0.3	29295	1.0
0.55 mL/L	0.5	27445	1.0
Sıcaklık (°C)	Standart % RSD	Teorik Plaka Sayısı	Kuyruklanma Faktörü
48°C	0.6	28883	1.0
50°C	0.3	29295	1.0
52°C	0.3	25373	1.0

Tablo 3. 34: Arakidik asit sağlamlık sonuçları

Formik Asit Miktarı	Standart % RSD	Teorik Plaka Sayısı	Kuyruklanma Faktörü
0.45 mL/L	0.6	54873	1.0
0.5 mL/L	0.4	57627	1.0
0.55 mL/L	0.9	54801	1.0
Sıcaklık (°C)	Standart % RSD	Teorik Plaka Sayısı	Kuyruklanma Faktörü
48°C	0.8	56831	1.0
50°C	0.4	57627	1.0
52°C	0.4	49780	1.0

Sistem uygunluk değerleri değiştirilen her bir parametre için (% RSD, teorik plaka sayısı ve kuyruklanma faktörü) değerlendirildi. Buna göre metot formik asit miktarı ve kolon sıcaklığı değişimlerine göre sağlam bulundu.

3.1.3.11 Stabilite

Miristik asit, linoleik asit ve palmitik asit çözelti stabilitesi sonuçları aşağıdaki Tablo 3.35’ de verilmiştir.

Tablo 3. 35: Miristik asit, linoleik asit ve palmitik asit çözelti stabilitesi sonuçları

Süre, saat	Miristik Asit		Linoleik Asit		Palmitik Asit	
	Alan	% Fark	Alan	% Fark	Alan	% Fark
Başlangıç	5757450	-	25208991	-	32234147	-
3	5845924	1.5	24905557	1.2	32359534	0.4
6	5769886	0.2	25596500	1.5	32735367	1.6
12	6063174	5.3	25052303	0.6	32070022	0.5
18	7145110	24.1	25242290	0.1	33553676	4.1
24	6552628	13.8	25066516	0.6	32402428	0.5
30	7196649	25.0	24885770	1.3	32755423	1.6
36	7360436	27.8	25193425	0.1	33985346	5.4
48	6826081	18.6	25707022	2.0	34263997	6.3

Oleik asit, elaidik asit ve stearik asit çözelti stabilitesi sonuçları aşağıdaki Tablo 3.36' da verilmiştir.

Tablo 3. 36: Oleik asit, elaidik asit ve stearik asit çözelti stabilitesi sonuçları

Süre, saat	Oleik Asit		Elaidik Asit		Stearik Asit	
	Alan	% Fark	Alan	% Fark	Alan	% Fark
Başlangıç	56500034	-	49887497	-	73807567	-
3	56507605	0.0	49992849	0.2	76176283	3.2
6	57214722	1.3	50392422	1.0	74658997	1.2
12	55082914	2.5	49370003	1.0	73822231	0.0
18	55973807	0.9	50031007	0.3	74028631	0.3
24	56146772	0.6	50005484	0.2	74128135	0.4
30	54494140	3.6	48487151	2.8	72486389	1.8
36	55733136	1.4	50040157	0.3	72975626	1.1
48	56946890	0.8	51021040	2.3	74449607	0.9

Araikidik asit çözelti stabilitesi sonuçları aşağıdaki Tablo 3.37' de verilmiştir.

Tablo 3. 37: Araikidik asit çözelti stabilitesi sonuçları

Süre, saat	Araikidik Asit	
	Alan	% Fark
Başlangıç	83949628	-
3	86117846	2.6
6	85599491	2.0
12	82618513	1.6
18	82407748	1.8
24	82319651	1.9
30	79750267	5.0
36	78829949	6.1
48	81340591	3.1

Miristik asit, linoleik asit ve palmitik asit ekim yapılmış numune çözelti stabilitesi sonuçları aşağıdaki Tablo 3.38’ de verilmiştir.

Tablo 3. 38: Miristik asit, linoleik asit ve palmitik asit ekim yapılmış numune çözelti stabilitesi sonuçları

Süre, saat	Miristik Asit		Linoleik Asit		Palmitik Asit	
	Alan	% Fark	Alan	% Fark	Alan	% Fark
Başlangıç	5778777	-	24312293	-	31882191	-
3	5644358	2.3	24987732	0.9	33230964	3.1
6	5973622	3.8	25212040	0.0	33903080	5.2
12	6533500	13.5	24937153	1.1	33832221	5.0
18	6815737	18.4	24985004	0.9	33777036	4.8
24	6843054	18.9	24824152	1.5	33541500	4.1
30	7067289	22.8	24176986	4.1	33139581	2.8
36	7575953	31.6	24609408	2.4	34162294	6.0
48	6670453	15.9	25871439	2.6	35213829	9.2

Oleik asit, elaidik asit ve stearik asit ekim yapılmış numune çözelti stabilitesi sonuçları aşağıdaki Tablo 3.39’ da verilmiştir.

Tablo 3. 39: Oleik asit, elaidik asit ve stearik asit ekim yapılmış numune çözelti stabilitesi sonuçları

Süre, saat	Oleik Asit		Elaidik Asit		Stearik Asit	
	Alan	% Fark	Alan	% Fark	Alan	% Fark
Başlangıç	55417918	-	49859073	-	75965164	-
3	56314805	0.3	51211210	2.7	77347101	4.8
6	56722304	0.4	50606068	1.4	76715410	3.9
12	55784290	1.3	50378030	1.0	75998436	3.0
18	56678198	0.3	50051500	0.3	76074283	3.1
24	54780252	3.0	49780011	0.2	74974804	1.6
30	53375465	5.5	47712995	4.4	73543042	0.4
36	54424539	3.7	49055793	1.7	73906689	0.1
48	57618732	2.0	51532601	3.3	78178047	5.9

Arakidik asit ekim yapılmış numune çözelti stabilitesi sonuçları aşağıdaki Tablo 3.40' da verilmiştir.

Tablo 3. 40: Arakidik asit ekim yapılmış numune çözelti stabilitesi sonuçları

Süre, saat	Arakidik Asit	
	Alan	% Fark
Başlangıç	85401495	-
3	86756436	3.3
6	86932905	3.6
12	85629496	2.0
18	84645300	0.8
24	83019232	1.1
30	80895829	3.6
36	80461012	4.2
48	85785249	2.2

Tablolardaki alanlar ve % fark hesaplarına göre;
Standart çözeltisi 10°C' de 48 saat stabil bulundu.
Numune çözeltisi 10°C' de 3 saat stabil bulundu.

3.1.3.12 Sistem Uygunluk

Miristik asit sistem uygunluk sonuçları aşağıdaki Tablo 3.41' da verilmiştir.

Tablo 3. 41: Miristik asit sistem uygunluk sonuçları

Enjeksiyon	Standart Alanı	Kuyruklanma Faktörü	Teorik Plaka Sayısı
1	9553107	1.0	4015
2	10137153	1.0	3581
3	10000192	1.0	3443
4	10064987	1.0	3535
5	10271771	1.0	3583
6	10206732	1.0	3544
Ortalama	10038990	1.0	3617
SD	256991.737	0.000	201.586
% RSD	2.6	0.0	5.6

Linoleik asit sistem uygunluk sonuçları aşağıdaki Tablo 3.42' de verilmiştir.

Tablo 3. 42: Linoleik asit sistem uygunluk sonuçları

Enjeksiyon	Standart Alanı	Kuyruklanma Faktörü	Teorik Plaka Sayısı
1	28193087	1.0	7650
2	28371880	1.0	6527
3	28163971	1.0	6440
4	28194796	1.0	6388
5	28396653	1.0	6589
6	28170135	1.0	6471
Ortalama	28248420	1.0	6678
SD	106219.436	0.000	481.476
% RSD	0.4	0.0	7.2

Palmitik asit sistem uygunluk sonuçları aşağıdaki Tablo 3.43' de verilmiştir.

Tablo 3. 43: Palmitik asit sistem uygunluk sonuçları

Enjeksiyon	Standart Alanı	Kuyruklanma Faktörü	Teorik Plaka Sayısı
1	45032971	1.0	12534
2	45906244	1.0	11280
3	45637203	1.0	10994
4	45860620	1.0	11196
5	45860966	1.0	11204
6	45979076	1.0	11179
Ortalama	45712847	1.0	11398
SD	352139.111	0.000	564.630
% RSD	0.8	0.0	5.0

Oleik asit sistem uygunluk sonuçları aşağıdaki Tablo 3.44' de verilmiştir.

Tablo 3. 44: Oleik asit sistem uygunluk sonuçları

Enjeksiyon	Standart Alanı	Kuyruklanma Faktörü	Teorik Plaka Sayısı
1	53189091	1.0	15624
2	53780315	1.0	14120
3	52750579	1.0	13780
4	53147252	1.0	13705
5	53426963	1.0	14085
6	52880597	1.0	13972
Ortalama	53195800	1.0	14214
SD	372846.002	0.000	709.870
% RSD	0.7	0.0	5.0

Elaidik asit sistem uygunluk sonuçları aşağıdaki Tablo 3.45' de verilmiştir.

Tablo 3. 45: Elaidik asit sistem uygunluk sonuçları

Enjeksiyon	Standart Alanı	Kuyruklanma Faktörü	Teorik Plaka Sayısı
1	54020567	1.0	17566
2	54398230	1.0	15897
3	54312650	1.0	15909
4	54640361	1.0	16073
5	54385438	1.0	15524
6	54396163	1.0	15209
Ortalama	54358902	1.0	16030
SD	199733.934	0.000	815.298
% RSD	0.4	0.0	5.1

Stearik asit sistem uygunluk sonuçları aşağıdaki Tablo 3.46' da verilmiştir.

Tablo 3. 46: Stearik asit sistem uygunluk sonuçları

Enjeksiyon	Standart Alanı	Kuyruklanma Faktörü	Teorik Plaka Sayısı
1	77584814	1.0	30938
2	77777546	1.0	28930
3	77243482	1.0	29395
4	77255286	1.0	29336
5	77511556	1.0	28153
6	77623355	1.0	29016
Ortalama	77499340	1.0	29295
SD	212254.095	0.000	919.387
% RSD	0.3	0.0	3.1

Arakidik asit sistem uygunluk sonuçları aşağıdaki Tablo 3.47' de verilmiştir.

Tablo 3. 47: Arakidik asit sistem uygunluk sonuçları

Enjeksiyon	Standart Alanı	Kuyruklanma Faktörü	Teorik Plaka Sayısı
1	83177985	1.0	59642
2	82740078	1.0	58098
3	82772337	1.0	58202
4	82163166	1.0	57179
5	82760113	1.0	56146
6	82701476	1.0	56493
Ortalama	82719193	1.0	57627
SD	324007.694	0.000	1287.844
% RSD	0.4	0.0	2.2

Tablolardaki 6 standart enjeksiyonu arasındaki % RSD değerleri, kuyruklanma faktörü ve teorik plaka sayısı kabul kriterlerine uygun bulundu.

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Leachable (sızabilir) analizleri, farmasötik ürünlerin güvenliğinin sağlanmasında ve düzenleyici gerekliliklere uygunluğunun değerlendirilmesinde hayati bir role sahiptir. Ambalaj materyalleri veya üretim sürecinden kaynaklanan yağ asitleri gibi potansiyel safsızlıklar, farmasötik ürünlerin etkinliğini, stabilitesini ve hasta güvenliğini doğrudan etkileyebilir. Bu nedenle, bu çalışmada, farmasötik ürünlerdeki sızabilen (leachable) safsızlıkların analizine yönelik yenilikçi bir yaklaşım sunarak, yüksek hassasiyet ve doğrulukta bir HPLC/CAD yöntemi geliştirildi ve valide edildi. Ölçülü doz inhalasyonu ürünlerinde valf kaynaklı sızabilen yağ asitlerinin (miristik asit, linoleik asit, palmitik asit, oleik asit, elaidik asit, stearik asit ve arakidik asit) tespiti için tasarlanan bu metot, endüstrinin ihtiyaç duyduğu güvenilir ve tekrarlanabilir bir analiz süreci sağladı.

Geliştirilen analitik metotta; cihaz ve dedektör parametreleri değiştirilerek yapılan denemeler sonucunda, kromatografik ayırma sabit faz olarak C18 kolon, hareketli faz olarak ise mobil faz A (1000.0 mL saf su içerisine 0.5 mL formik asit) ve mobil faz B (1000.0 mL asetonitrilde 0.5 mL formik asit) den oluşan gradient sistem kullanıldı.

Validasyonda ise tüm parametreler uygulandı. Bölüm 2 ve bölüm 3' de tüm yöntem denemeleri ve sonuçları verildi. Tüm verilere göre uygun sonuçlar elde edildi. Seçicilik parametresi ile metodun seçiciliği doğrulandı, LOD ve LOQ değerleri belirlendi; doğrusal parametresiyle LOQ ile %150 konsantrasyonları arasında sonuçların doğrusal olduğu gösterildi; doğruluk parametresiyle geri kazanım elde edildi; kesinlik parametresiyle tekrarlanabilir sonuçlar elde edildi. Laboratuvar içi kesinlik çalışmasıyla başka bir analist tarafından analiz tekrarlandığında benzer sonuçlar bulundu. Sağlık parametresiyle formik asit miktarı 0.5 mL/L \pm %5 ve kolon sıcaklığı 50°C \pm 2°C ayarlandığında sistem uygunluk şartları sağlandı. Stabilite parametresiyle standart çözeltisinin 10°C' de 48 saat; numune çözeltisinin ise 10°C' de 3 saat stabil denildiği sonuçlar elde edildi.

Metodun geliştirilmesi ve validasyonu sürecinde, ICH, USP ve FDA gibi uluslararası standartlara uygunluk sağlandı. Kullanılan yöntem, düşük LOD ve LOQ değerleri ile sızabilir yağ asitlerini eser seviyelerde bile tespit edebildi; doğruluk, kesinlik, seçicilik ve sağlık gibi validasyon parametrelerinde başarılı sonuçlar elde edildi. Ayrıca, bu metodun

gradient sistem kullanan bir mobil faz ile birleştirilmesi, kromatografik ayırımın doğruluğunu artırdı. Validasyon sonuçları, metodun tekrar edilebilir ve endüstriyel ölçekte uygulanabilir olduğunu kanıtlandı.

Bu çalışma, farmasötik ürünlerin kalite güvence süreçlerinde, hasta güvenliği ve düzenleyici gereklilikler açısından önemli bir boşluğu doldurmuş oldu. Geliştirilen metodun uygulamaları, ilaç endüstrisinde sızabilirlik çalışmalarının güvenilirliğini artırarak, farmasötik ambalajlama ve depolama sistemlerinin etkinliğini değerlendirme açısından büyük bir katkı sunuldu.

Sonuç olarak, bu çalışma, farmasötik ürünlerdeki sızabilir yağ asitlerinin analizi için yüksek hassasiyetli bir yöntem geliştirmiş ve endüstrideki kalite kontrol süreçlerine değerli bir katkı sundu. Geliştirilen yöntem, yalnızca hasta güvenliğini artırmakla kalmayıp, farmasötik ürünlerin düzenleyici uyum süreçlerine de destek olabilecek şekilde optimize edildi. Gelecekte, metodun farklı farmasötik ürün gruplarında uygulanabilirliğinin artırılması, metod geliştirmelerinde kütle spektrometresi (MS) gibi daha ileri teknoloji dedektörlerle entegre edilmesi değerlendirilebilir ve yeni analitik teknolojilerle desteklenmesi, endüstriyel inovasyonu güçlendirecektir. Ayrıca endüstriyel uygulayıcıların, leachable analizlerinin önemi ve metodun uygulanması konusunda eğitilmesi, sürecin verimliliğini artıracaktır.

5. KAYNAKLAR

- [1] D. Jenke, “Identification, analysis and safety assessment of leachables and extractables”
In TrAC-Trends in Analytical Chemistry, vol. 101, 2018.
- [2] European Medicines Agency (EMA), Guideline on setting specifications for related impurities in antibiotics, 2012.
- [3] USP-NF (1664) Assessment of Drug Product Leachables Associated with Pharmaceutical Packaging/Delivery Systems, 2015.
- [4] European Medicines Agency (EMA), Lessons learnt from presence of N-nitrosamine impurities in sartan medicines, 2019.
- [5] Food and Drug Administration, Guidance for Industry Container Closure Systems for Packaging Human Drugs and Biologics Chemistry, Manufacturing, and controls documentation, Office of Communications Training and Manufacturers Assistance, 20857May, (1999).
- [6] K. D’Silva, *Regional Marketing- Life Science Mass Spectrometry*, Thermo Fisher Scientific.
- [7] U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration (FDA), Code of Federal Regulations 21CFR211.94.
- [8] U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration (FDA), Current FDA Perspective on Leachable Impurities in Parenteral and Ophthalmic Drug Products, 2011.
- [9] Product Quality Research Institute (PQRI), Safety Thresholds and Best Practices for Extractables and Leachables in Orally Inhaled and Nasal Drug Products, In PQRI Drug Product Technical Committee, 2006.
- [10] *Extractables and Leachables Information*. (t.y.). Thermo Fisher Scientific. [Online] Erişim adresi: <https://www.thermofisher.com/tr/en/home/industrial/pharma-biopharma/pharma-biopharma-learning-center/pharmaceutical-qa-qc-information/extractables-leachables-information.html>. Erişim tarihi: 27 Ocak 2025.
- [11] Fj. Da. Skoog, Ta. Holler, Nieman, *Enstrümantal Analiz*, Bilim Yayıncılık, Çeviren: Kılıç E, Köseoğlu F, Yılmaz H, Ankara, Türkiye, s: 725-768, 1998.
- [12] B. Amarji, A. Kulkarni, P. K. Deb, R. Maheshwari, R. K. Tekade. Package development of pharmaceutical products: aspects of packaging materials used for pharmaceutical products, *Academic Press.*, 2018.

- [13] A. S. Alharbi, A. A. Yousef, S. A. Alharbi, A. Al-Shamrani, M. M. Alqwaiee, M. Almeziny, Y. S. Said, S. A. Alshehri, F. N. Alotaibi, R. Mosalli, K. A. Alawam, M. M. Alsaadi. Application of aerosol therapy in respiratory diseases in children: A Saudi expert consensus. *Annals of Thoracic Medicine*, 16(2), 188-218, 2021.
- [14] D. Ball, J. Blanchard, D. Jacobson-Kram, R. O. McClellan, T. McGovern, D. L. Norwood, L. Nagao, Development of safety qualification thresholds and their use, In orally inhaled and nasal drug product evaluation., *Toxicological Sciences*, 97(2), 226-236., 2007.
- [15] R. Phadke, R. Mali, & Gosar, A Extractables And Leachables-Pharmaceutical Review., *European Journal of Pharmaceutical and Medical Research*, 6(3), 474–483., 2019.
- [16] A. A. Wakankar, Y. J. Wang, E. Canova-Davis, S. Ma, D. Schmalzing, J. Grieco, T. Milby, T. Reynolds, K. Mazarella, E. Hoff, S. Gomez, & S. Martin-Moe, On developing a process for conducting extractable-leachable assessment of components used for storage of biopharmaceuticals. *In Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 99, Issue 5, 2010.
- [17] D. L. Norwood, D. Jenke, C. Manolescu, S. Pennino & N. Grinberg, *HPLC and LC/MS analysis of pharmaceutical container closure system leachables and* *In Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, vol. 32, Issues 11–12, 2009.
- [18] H. J. Vandenburg, A. A. Clifford, K. D. Bartle, J. Carroll, I. Newton, L. M. Garden, J. R. Dean, & C. T. Costley, Analytical extraction of additives from polymers, *In Analyst*, vol. 122, Issue 9, 1997.
- [19] G. Solomons, *Organik Kimya*, Literatür Yayınları, İstanbul, 2000.
- [20] M.I. Gurr, and A.T. James *Lipid Biochemistry An Introduction*. Zahlreiche Abb. Und Tab. London. 231 S., 1971.
- [21] R.K. Murray, P.A. Mayez, D. K. Granner, V.W. Rodwell, *Harper'in Biyokimyası* (Çevirenler: Menteş, G., Ersöz, B.), Barış Kitabevi, İstanbul, 1993.
- [22] B. Serpek ve L. Kalaycıoğlu *Biyokimya*. Ankara; Nobel Yayın Dağıtım, ss-457, 2000.
- [23] C. Tüzün, *Biyokimya*, Palme Yayınları, Ankara, 1992.
- [24] H.R. Horton, L.A. Mora, R.S. Ochs, J.D. Rawn, *Scrimgeour, K.G., Principles of Biochemistry*, Neil Patterson Publishers Prentice Hall International, Inc., USA., 1993.
- [25] F.P. Çağlar, “Tanacetum zahlbruckneri (NÁB.) grierson bitkisi üzerinde yağ asitleri tayini ve biyoaktivite çalışmaları“, Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi

- İstanbul, 2011.
- [26] C. İpek, “Türkiye’deki bal numunelerinde bulunan hidroksimetilfurfural miktarı, stabilitesi ve hidroksimetilfurfural miktar tayini analitik metod validasyonu“, Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi, İstanbul, 2012.
- [27] C. Çalışkan, “Askorbik asit miktar ve doz tekdüzeliği için metot geliştirilmesi ve Validasyonu“, Yüksek Lisans Tezi, Sakarya Üniversitesi, Sakarya, 2016.
- [28] M.A. Grashorn, Blanch, Ernährungsphysiologische Bedeutung der Omega-3-Fettsäuren und Möglichkeiten der Anreicherung in Eiern. Arch. Geflügelk., 60 (2), 49-58, 1995.
- [29] M. Aksoy, *Beslenme Biyokimyası* (5. Baskı), Hatipoğlu Yayınevi, 128, 2011.
- [30] B. Serpek ve L. Kalaycıoğlu *Biyokimya*, Ankara; Nobel Yayın Dağıtım, ss-457,2000.
- [31] G. Yalçın ‘*Kromatografik Analizin Temel İlkeleri ve Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi Uygulamaları*’, İstanbul, 1999.
- [32] Ö. Karalomlu, “Bazı peynir ve yoğurt ürünlerinde bulunan natamisin miktar tayini ve analitik metod validasyonu“, Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi, İstanbul, 2014.
- [33] N. Acworth, Ian; Kopaciewicz, W. Gamache, H. Paul (ed.). *Charged Aerosol Detection for Liquid Chromatography and Related Separation Techniques*. John Wiley & Sons, Inc. pp. 67–162., 2017.
- [34] T . Vehovec, and A. Obreza, Review of operation of principle and applications of the charged aerosol detector, *Journal of Chromatography A*, 1217(10), pp.1549-1556, 2010.
- [35] A. Şengül, “Bir Grup Oksidatif Stres Biyogöstergesinin Eş Zamanlı Tayini İçin İzokratik ve Gradient HPLC Yöntemlerinin Geliştirilmesi ve Analitik Yöntem Geçerliliği Çalışmaları“, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, İzmir, 2018.
- [36] European Medicines Agency (EMA), Guideline on bioanalytical method validation, Committee for Medicinal Products for Human Use, 2011.
- [37] Department of Health and Human Services Food and Drug Administration (FDA) Bioanalytical Method Validation, 2013.
- [38] Commission of the European Communities, Proceedings of the International Conference on Harmonisation (ICH), Validation of Analytical Procedures, 1995.
- [39] World Health Organization (WHO), (n,d.), Good manufacturing practices: guidelines on validation.
- [40] S. Gülhan, “*Validasyon*“, Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Mezunlar Derneği

- Eğitim Programı II, İstanbul, 1999.
- [41] H. Aydın, *Analitik Metotların Geliştirilmesi ve Validasyonu*. Ankara: Gazi Kitabevi., 2016.
- [42] Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation, FDA, 2001.
- [43] L. Huber “*Validation of analytical methods review and strategy*,” “Advanstar communication for publication in LC/GC international”, 2001.
- [44] S. J. Lindsay *High Performane Liquid Chromatogrephy Second Edition.*, London, 1992.
- [45] ICH, International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use ,validation of analytical prosedures text and methodology Q2(R1), 1994.
- [46] Ö. Söğütertaş ve A. Kayalı *Ankara Ecz. Fak. Derg.*, 34 (1), pp. 37 – 57, 2005.
- [47] A. Yılmaz, *Kimyasal analizlerde metot validasyonu ve verifikasyonu*, TURKLAB Rehber, No:01, 2012.
- [48] FDA, Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM), 2013.
- [49] G.A. Shabir, *Step-by-step analytical methods validaiton and protocol in the quality system compliance industry*, 2004.
- [50] ICH, Q2 (R1), “Validation of analytical procedures: text and methodology”, ICH Harmonised Tripartite Guideline, International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Chicago, USA, 2005.
- [51] C. Çalışkan, “Askorbik Asit Miktar ve Doz Tekdüzeligi İçin Metot Geliştirilmesi ve Validasyonu”, Yüksek lisans tezi, Sakarya Üniversitesi., Sakarya, 2016.
- [52] E. Alkan, “Flurbiprofenin farmasötik preparatlarda analitik yöntemlerle miktar tayini”, Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Erzurum, 2012.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Sinem GÖRÜR

Doğum tarihi ve yeri :

e-posta :

Öğrenim Bilgileri

Derece	Okul/Program	Yıl
Doktora	Balıkesir Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü/Kimya	2025
Y. Lisans	Balıkesir Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü/Kimya	2016
Lisans	Balıkesir Üniversitesi/Fen Edebiyat Fakültesi/Kimya Bölümü	2013
Lise	Kilimli (Yabancı Dil Ağırlıklı) Lisesi	2006