



**T.C.**  
**NECMETTİN ERBAKAN**  
**ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**TABLETLERDE PARASETAMOL VE TRAMADOL HİDROKLORİDİN ANA  
BİLEŞEN REGRESYONU VE KİSMİ EN KÜÇÜK KARE YÖNTEMLERİYLE  
EŞ ZAMANLI SPEKTROFOTOMETRİK TAYİNİ**

**Nermin PINARCIK**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Biyoteknoloji Anabilim Dalı**

**Temmuz-2022**  
**KONYA**  
**Her Hakkı Saklıdır**

## ÖZET

### YÜKSEK LİSANS TEZİ

# TABLETLERDE PARASETAMOL VE TRAMADOL HİDROKLORİDİN ANA BİLEŞEN REGRESYONU VE KİSMİ EN KÜÇÜK KARE YÖNTEMLERİYLE EŞ ZAMANLI SPEKTROFOTOMETRİK TAYİNİ

**Nermin PINARCIK**

**Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoteknoloji Anabilim Dalı**

**Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Faysal SELİMOĞLU**

**2022, 100 Sayfa**

**Jüri**

**Dr. Öğr. Üyesi Faysal SELİMOĞLU**

**Dr. Öğr. Üyesi İlker AKIN**

**Doç. Dr. Önder ALICI**

İlaç endüstrisi ürünlerinin çeşitliliği gerek doz gerekse de kullanılacak olan ilaç içeriklerinin farmasötik ve tıbbi araştırma süreçleri sonrasında ortaya çıkarılan tedavilerin süre ve maliyeti, günümüz şartlarında çok önemlidir. Özellikle tedavisi güç ve zaman alan hastalıklara karşı üretilen ve kullanılan kombine ilaç içeriklerinin miktar tayinlerinde, analitik yöntemler önemli araçlardır ve bu yöntemlere ihtiyaç giderek artmaktadır. Kombine ilaçlar hedefe yönelik terapinin en önemli araçlarından ve her geçen gün daha fazla sayıda hastanın yaşamına katkıda bulunmaya devam etmektedir. Bu ve benzeri tip müstahzarların içerik ve miktar tayinine dönük kantitatif tayinlerde, en çok kullanılan kemometrik yöntemlerden ikisi ana bileşen regresyonu (PCR) ve kısmi en küçük kareler (PLS) dir. Bu yöntemler matematiksel olarak ele alındığında her bir müstahzarın miktar tayinine dönük aletli analiz yöntemlerinden elde edilen dataların analizinde, doğru, güvenilir ve hızlı sonuçlar elde etmeye imkan sağlar.

Bu tez çalışmasında kombine bir ticari tablet formülasyonu olan Zaldiar'ın içeriğini teşkil eden, tramadol hidroklorür (TRA) ve parasetamolün (PAR) eşzamanlı tayini, miktar tayini, ekstraksiyon veya ön ayırma gibi işlemler kullanılmadan karışımdan elde edilen UV-spektrofotometrik verilerine ana bileşen regresyonu ve kısmi en küçük kareler yöntemleri uygulanarak gerçekleştirildi. Analitlerin spektrofotometrik tayini için, PAR için 6-36 µg/mL ve TRA için 4-10 µg/mL doğrusal konsantrasyon aralıklarında; PAR ve TRA içeren 16 farklı karışımdan oluşan bir kalibrasyon seti, sırasıyla 2<sup>4</sup> tam fraksiyonel tasarım modeli kullanılarak hazırlandı. Örneklerin absorbansları 215-280 nm ( $\Delta\lambda=0.1$  nm) arasında ölçüldü. Kalibrasyon seti için absorbans veri seti 215-280 nm ( $\Delta\lambda=0.1$  nm) arasındaki absorpsiyon spektrumlarından gelen datalar kullanılarak elde edildi, devamında konsantrasyon ve absorbans setleri kullanılarak PCR ve PLS kalibrasyonu yapıldı.

Deney sonuçlarının kemometrik yöntemlerle karşılaştırılması amacıyla, PAR/TRA ikili kombinasyonlarını içeren karışımların kantitatif çözünürlüğü için oran spektrumları-birinci türev spektrofotometrisi geliştirilmiştir. Önerilen kemometrik yöntemler PCR ve PLS ve oran spektrumları-birinci türev yaklaşımları validasyon örnekleri incelenerek doğrulandı ve ticari tablet örneklerinin analizine uygulandı. Analiz sonuçları, önerilen yöntemlerin TRA ve PAR'ın ikili karışımlarını içeren ticari tablet formülasyonlarının kalite kontrol ve rutin analizlerinde kantitatif analiz için çok uygun olduğunu göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Parasetamol; Kısmi en küçük kareler; Ana bileşen regresyonu; Oran spektrumları-birinci türev spektrofotometrisi; eş zamanlı belirleme; tramadol hidroklorür

**Amaç:** Bu yüksek lisans tez kapsamında parasetamol (PAR) ve tramadol hidroklorür (TRA) nın da bulunduğu ikili kombine farmasötik preparatların kantitatif analizi için, yeni bir UV-spektrofotometrik yönteminin geliştirilip valide edilmesi amaçlanmıştır.

**Materyal ve Metot:** Parasetamol ve Tramadol hidroklorür etken madde karışımlarını içeren kombine farmasötik preparatların miktar tayini için düşük maliyetli ve kısa analiz zamanlı, UV absorpsiyon ölçümlerine dayalı PLS ve PCR kemometrik analiz yöntemleri kullanılmıştır. Kemometrik analiz sonuçlarını doğrulamak için ise oran spektrumları-birinci türev yöntemi kullanılmıştır.

**Bulgular:** PLS ve PCR kalibrasyonu için PAR 6-36 µg/mL ve TRA 4-22 µg/mL lineer konsantrasyon aralığındaki 16 farklı kalibrasyon seti kullanılmıştır. Oran spektrumu-birinci türev yönteminin uygulanması için sırasıyla 6-36 µg/mL ve TRA 4-22 µg/mL konsantrasyon aralığında PAR ve TRA standartlarının kalibrasyon çözeltileri ayrı ayrı hazırlanmıştır. Yöntemleri doğrulamak için sentetik karışımın bağımsız bir doğrulama seti kullanılmıştır. ANOVA test sonuçları, önerilen kemometrik yöntemlerin ve oran spektrumları-ilk türev aracının, ticari tabletlerin kantitatif analizi açısından karşılaştırılabilir sonuçlar verdiğini göstermiştir.

**Sonuç:** Bu tez çalışmasında yeni önerilen PCR ve PLS kalibrasyonları ve oran spektrumları-birinci türev yöntemleri, ticari tabletlerde PAR ve TRA' nın kalite kontrolü ve rutin analizi için yararlı kemometrik yöntemler olduğu sonucuna varılmıştır.

## **ABSTRACT**

### **BS THESIS**

# **SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF PARACETAMOL AND TRAMADOL HYDROCHLORID BY PRINCIPAL COMPONENT REGRESSION AND PARTIAL LEAST SQUARES METHODS**

**Nermin PINARCIK**

**THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF  
NECMETTİN ERBAKAN UNIVERSITY, BIOTECHNOLOGY DEPARTMENT**

**Dr. Öğr. Üyesi Faysal Selimoğlu**

**2022, 100 Pages**

**Jury**

**Dr. Öğr. Üyesi Faysal Selimoğlu**

**Dr. Öğr. Üyesi İlker AKIN**

**Doç. Dr. Önder ALICI**

The diversity of the products of the pharmaceutical industry, both the dose and the drug ingredients to be used, the duration and cost of the treatments revealed after the pharmaceutical and medical research processes are very important in today's conditions. Analytical methods are important tools for the determination of the ingredients of combined drugs produced and used especially against diseases that are difficult to treat and ineffective, and the need for these methods is increasing. Combined drugs are one of the most important tools of targeted therapy and continue to contribute to the lives of more and more patients. The most commonly used chemometric methods for quantification are principal component regression (PCR) and partial least squares (PLS). These methods, when considered mathematically, allow to calculate how much each preparation is absorbed and to obtain fast results.

In this thesis, which is combined with a commercial tablet formulation Zaldiar the contents of Tramadol Hydrochloride (TRA) and paracetamol (PAR) simultaneous determination assay, extraction or pre-separation processes such as obtained from the mixture without the use of UV-spectrophotometric methods was performed by applying principal component and partial least squares regression to the data. For the spectrophotometric determination of analytes, a calibration set consisting of 16 different mixtures containing PAR and TRA in linear concentration ranges of 6-36 µg/mL for PAR and 4-10 µg/mL for TRA was prepared as 24 complete fractional designs, respectively. The absorbances of the samples were measured between 215-280 nm ( $\Delta\lambda=0.1$  nm). The absorbance data set for the calibration set was obtained between 215-280 nm ( $\Delta\lambda=0.1$  nm). PCR and PLS calibration were performed using concentration and absorbance sets.

To compare the experimental results with chemometric methods, ratio spectra-first derivative spectrophotometry was developed for the quantitative resolution of binary mixtures containing PAR-TRA combinations. The proposed chemometric methods (PCR and PLS) and ratio spectra-first derivative approaches were validated by examining validation samples and applied to the analysis of commercial tablet samples. The analysis results showed that the proposed methods are very suitable tools for the routine analysis and quantification of TRA and PAR in commercial tablets.

**Keywords:** Paracetamol; partial least squares; principal component regression; ratio spectra-first derivative spectrophotometry; simultaneous determination; tramadol hydrochloride.

**Aim:** In this master thesis, it is aimed to develop and validate a new spectrophotometer method for the quantitative analysis of dual combined pharmaceutical preparations including paracetamol (PAR) and tramadol hydrochloride (TRA).

**Materials and Methods:** Two chemometric tools (PLS and PCR) based on UV complete absorption measurements with low cost and short analysis time were used for the numerical solution of combined pharmaceutical preparations containing paracetamol and Tramadol hydrochloride active ingredient mixtures. Ratio spectra-first derivative method was used to validate the chemometric analysis results.

**Results:** For PLS and PCR calibration, 16 different calibration set solutions were prepared in a linear concentration range using PAR (6-36  $\mu\text{g/mL}$ ) and TRA (4-22  $\mu\text{g/mL}$ ) standards. For the application of the ratio spectrum-first derivative method, calibration solutions of PAR and TRA standards in the concentration range of 6-36  $\mu\text{g/mL}$  and TRA 4-22  $\mu\text{g/mL}$ , respectively, were prepared separately. An independent validation set of the synthetic mixture was used to validate the methods. ANOVA test results showed that the proposed chemometric methods and ratio spectra-first derivation tool gave comparable results in terms of quantitative analysis of commercial tablets.

**Conclusion:** The newly proposed PCR and PLS calibrations and ratio spectra-first derivative in this thesis study methods, PAR and TRA' in commercial tablets

## ÖNSÖZ

Bu yüksek lisans tez çalışmasında tramadol hidroklorür ve parasetamol içeren farmasötik preparatın kantitatif analizi hiçbir ayırma işlemi uygulanmadan sinyal işleme ve çok değişkenli kalibrasyon yöntemleri geliştirilerek gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen analitik yöntemlerin tramadol hidroklorür ve parasetamol bileşiklerini içeren tabletlerin kalite kontrol ve rutin analizlerine uygulanabileceğini, yöntemlerin analitik validasyonu yapılarak analiz sonuçlarıyla ortaya konmuştur. Bu tez kapsamında çalışma amacına ulaşılmıştır.

Yüksek lisans tezindeki konu seçimi, çalışmalarımın planlanması, yürütülmesi ile sonuçlandırılmasında yakın ilgi ve desteğini esirgemeyen, bilgi ve deneyimlerini aktaran danışman Hocam Dr. Öğr. Üyesi Faysal Selimoğlu' na teşekkür eder, sonsuz saygılarımı sunarım.

Nermin PINARCIK  
KONYA-2022

## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	iv
ABSTRACT.....	vi
ÖNSÖZ .....	viii
İÇİNDEKİLER .....	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	1
TABLolar DİZİNİ .....	2
1. GİRİŞ .....	3
2. GENEL BİLGİLER .....	7
2.1. Parasetamol (Asetaminofen).....	7
2.1.1. Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri.....	7
2.1.2. Farmakolojik Özellikleri.....	7
2.1.3. Farmakokinetik Özellikleri .....	9
2.2. Tramadol Hidroklorür .....	10
2.2.1. Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri.....	10
2.2.2. Farmakolojik Özellikleri.....	10
2.2.3. Farmakokinetik Özellikleri .....	12
2.3. Zaldiar .....	15
3. KAYNAK ARAŞTIRMASI .....	17
3.1. Parasetamol Miktar Tayini İçin Uygulanan Analiz Yöntemleri .....	17
3.1.1. UV-Vis Spektrofotometri .....	17
3.1.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC).....	19
3.1.3. Ters Faz Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (RP-HPLC).....	21
3.1.4. Gaz Kromatografisi - Tandem Kütle spektrometrisi (GC-MS) .....	23
3.1.5. Tandem Kütle Spektrometrisi (UPLC-MS/MS) .....	24
3.1.6. Voltametik .....	24
3.1.7. Elektrokimya.....	26
3.1.8. Kapiller Elektrophorez (CE).....	26
3.1.9. Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR Spektroskopisi) .....	27
3.2. Tramadol hidroklorür Miktar Tayini İçin Uygulanan Analiz Yöntemleri.....	28
3.2.1. UV-spektrofotometri.....	28
3.2.2. Floresan Spektroskopisi.....	30
3.2.3. Sıvı Kromatografi-Tandem Kütle Spektrometrisi (LC-MS/MS).....	31
3.2.4. Gaz kromatografi-kütle spektrometrisi (GC-MS).....	32
3.2.5. Elektrokemilüminesans ile Kapiller Elektrophorez (CE-CL) .....	32
3.2.6. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrometresi (FT-IR) ve Fourier Dönüşümü Raman Spektroskopisi (FT-Raman) .....	33
3.2.7. Voltametri .....	34

3.3. Tramadol Ve Parasetamol Kombinasyonlarının Eş Zamanlı Kantitatif Tayini İçin Uygulanan Analiz Yöntemleri .....	35
3.3.1. Ters Fazlı Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (RP-HPLC) .....	35
3.3.2. Ultra Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (UHPLC).....	36
3.3.3. UV spektrofotometri .....	37
3.3.4. Ultra-Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (UHPLC) .....	38
3.3.5. Normal Fazlı Sıvı Kromatografi-Tandem Kütle Spektrometrisi (LC-MS/MS) .....	38
3.3.6. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrometresi (FTIR).....	39
3.3.7. UV spektrofotometrisi ve UHPLC .....	40
3.3.8. Ters Fazlı Sıvı Kromatografik Yöntem (HPLC) .....	41
3.3.9. Elektrokimya.....	42
<b>4. MATERYAL VE YÖNTEM.....</b>	<b>43</b>
4.1. Spektrofotometri .....	43
4.2. Lambert-Beer Eşitliği .....	45
4.3. UV ve Görünür Alan (Visible) Spektrofotometrisi .....	47
4.4. Kemometri .....	49
4.4.1. Çok Değişkenli Kalibrasyon Algoritmaları (Multivariate calibration algorithms).....	53
4.4.2. PCR (Temel Bileşen Regresyon) Yöntemi .....	54
4.4.3. PLS (Kısmi En Küçük Kareler) Yöntemi .....	55
4.4.4. Konsantrasyon Setinin Tasarımı .....	57
4.4.5.Çapraz Validasyon İşlemi (Cross-Validation Procedure).....	58
4.4.6.Birinci Türev Spektrofotometrisi .....	58
4.5. Kullanılan Cihazlar Ve Kimyasallar .....	60
4.5.1. Cihazlar .....	60
4.5.2. Kimyasallar .....	60
<b>5.ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA.....</b>	<b>61</b>
5.1. Standart Solusyonların Hazırlanması.....	61
5.2. Örnek Çözeltinin Hazırlanması .....	62
5.3. PCR Yönteminin Çalışılması.....	62
5.4. PLS Yönteminin Çalışılması .....	63
5.5. PCR ve PLS metotlarının spektral grafik gösterimi .....	63
5.6.Oran Spektrumları Birinci Türev Spektrofotometrisi .....	64
5.7. Önerilen Yöntemlerin Doğrulanması.....	66
5.8. Kemometrik Kalibrasyonlar İçin Yapılan Hesaplamalar.....	67
5.9.Ticari Tabletlerin Analizi.....	68
<b>6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER .....</b>	<b>70</b>
6.1. Sonuçlar .....	70
6.2.Öneriler .....	70
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>72</b>

## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Simgeler

a	sabit sayı
b	temel bileşenlerin sayısı
$A^0$	Agstrom
A	Asetaminofen
A	Absorbans
C	Konsantrasyon
d	Birinci Türev
$d^2$	İkinci Türev
$\epsilon$	Absorbsiyon molar katsayısı
$\mu$	Mikron
$\mu\text{g}$	Mikro Gram
$\mu\text{L}$	Mikro Litre
$\mu\text{A}$	Mikro Amper
$\mu\text{m}$	Mikro Metre
g	Gram
$I_0$	Gelen ışığın şiddeti
I	Örnekten çıkan ışığın şiddeti
ACN	Asetonitril
$\text{CH}_3\text{COOH}$	Asetik Asit
DM	Domperidon
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	Di- potasyum fosfat
m	Eğim
M	Molar
mL	Mililitre
mm	Milimetre
cm	Santi Metre
mM:	Milimolar
NaOH	Sodyum Hidroksit
N	Azot
nm	Nanometre
pH	Power of Hydrogen
pKa	Asit Ayrışma Sabiti
v/v	Hacim/Hacim
$\lambda$	Dalga Boyu
$\Delta\lambda$	Dalga boyu değişimi
T	Transmitans
V	Volt
X	Bağımlı Değişken
Y	Bağımsız Değişken
T	X için sayı matrisi
U	Y için sayı matrisi
P	X için yük matrisi
Q	Y için yük matrisi
E	X-kalıntı matrisi
F	Y-kalıntı matrisi
W	max korvanyans

## Kısaltmalar

AAS	Atomik Absorbsiyon Spektrometresi
ASA	Asetilsalisilik Asit(Acetylsalicylic Acid)
ARGE	Araştırma Geliştirme
Bio-DLLME:	Bio-Dispersive Liquid–Liquid Microextraction
CAS	Court Of Arbitration
COX	Siklooksijenaz
DES	Deep Eutectic Solvent
EDX	X-Ray Energy
EEM	Uyarma–Emisyon Matrisi
EIS	Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi
EMA	European Medicines Agency
EME	Elektromembran Ekstraksiyon Katodu
f	fonksiyon
FDA	Food and Drug Administration
FT-IR	Fourier Transform Infrared Spektrometresi
GC	Camsı Karbon
GC-MS	Gaz Kromatografisi -Tandem Kütle spektrometrisi
HBD	Hydrogen Bond Donor
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IMS	İyon saçılma kütle spektroskopisi
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
ICH	Uluslararası Uyumlaştırma Konferansı
LC–MS/MS	Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry
LOD ( $\mu\text{g/mL}$ )	Limit of detection
LOQ ( $\mu\text{g/mL}$ )	Limit of quantitation
M	Regresyon Denkleminin Eğimi
MI-SPE:	Molecular İmprinting Solid-Phase Extraction
n	Regresyon Denkleminin Kesim Noktası
NMR	Nükleik Manyetik Rezonans
PAR	Parasetamol
PCR	Principal Component Regresyon
PLS	Partial Least Squares
PRESS	Prediction Error Sum Of Squares
r	Regresyon Denkleminin Korelasyon Katsayısı
R	Regresyon Denkleminin Korelasyon Katsayısı
RSD	Relative Standard Deviation
RMSEP	Root Mean Standard Error of Prediction
RP-HPLC	Reversed-phase HPLC
SA-DES-ME	Shaker-Assisted Deep Eutectic Solvent Microextraction
SE	Standart Hata
SE(m)	Eğimin standart hatası
SE(n)	Kesimin standart hatası
SE(r)	Doğrusal regresyonun standart hatası
SEC	Kalibrasyon Eğrisi Standart Hata
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
SEP	Standart Error of Prediction
SS	Standart Sapma
TEM	Transmission Electron Microscope

TRA	Tramadol hidroklorür
UV-Visble	Ultra Viyole Görünür bölge
UHPLC	Ultra High Performance Liquid Chromatography
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography
Wavelength	Dalga Boyu
WHO (DSÖ)	World Health Organization
XPS	Ekstrude Polistren

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1.1. Biyoteknolojinin ilişkili olduğu disiplinler .....	4
Şekil 2.1.1.1. Parasetamolün açık formülü .....	7
Şekil 2.1.3.1. Parasetamol metabolizması .....	9
Şekil 2.2.1.1. Tramadol hidroklorürün açık formülü.....	10
Şekil 2.2.2.1. Tramadol hidroklorürün kimyasal yapısı .....	12
Şekil 2.2.3.1. Ağrı kesicilerin etki mekanizması .....	13
Şekil 2.2.3.2. Tramadolün anahtar faz I metabolitleri. ....	14
Şekil 4.1.1. Elektromanyetik spektrum .....	44
Şekil 4.1.2. Absorbsiyon spektrumu .....	44
Şekil 4.2.1. Numune üzerine gönderilen ( $I_0$ ) ve çıkan ( $I$ ) ışığın şiddeti ( $\ell$ =ışığın numune içinde aldığı yol) .....	46
Şekil 4.3.1. Elektromanyetik dalga boyu spektral olarak gösterimi.....	47
Şekil 4.3.2. UV-Görünür Bölge spektrofotometresi dalga boyları.....	48
Şekil 4.3.3. UV-GB Spektrofotometrenin şematik gösterimi.....	48
Şekil 4.4.1. Kemometrinin ilişkili olduğu disiplinler .....	51
Şekil 4.4.1.1. Çok değişkenli veri analizi teknikleri.....	53
Şekil 4.4.3.1. PLS <sub>2</sub> kalibrasyon şeması .....	56
Şekil 4.4.6.1. Absorbans ve türev eğrisi spektrumları.....	59
Şekil 5.1.1. PCR ve PLS kalibrasyonunun hazırlanması için kalibrasyon numune seti tasarımı.....	61
Şekil 5.5.1. a) 35.5 µg/mL PAR (—), 4.1 µg/mL TAR (—) için örnek tabletteki absorpsiyon spektrumları, b) 6-36 µg/mL PAR and 4-22 µg/mL TRA konsantrasyon aralığı, c) 6-36 µg/mL ve 4-22 µg/mL aralığında farklı PAR ve TRA konsantrasyonları içeren kalibrasyon seti spektrumları .....	64
Şekil 5.6.1. a) PAR (kırmızı çizgi), TRA (siyah çizgi) ve bunların ikili karışımının (mavi çizgi) (bölen olarak 10 µg/mL TRA kullanıldığında) oran spektrumları b) PAR' ın Oran spektrumlarının birinci türevi (kırmızı çizgi), TRA (siyah çizgi) ve bunların ikili karışımı (mavi çizgi).....	65

**TABLULAR DİZİNİ**

<b><u>Tablo No</u></b>	<b><u>Sayfa No</u></b>
<b>Tablo 4.1.1.</b> Elektromanyetik spektral bölgeleri.....	45
<b>Tablo 5.1.1.</b> 2 <sup>4</sup> Faktöriyel tasarım kullanılarak hazırlanan PAR ve TRA içeren konsantrasyon seti.....	62
<b>Tablo 5.6.1.</b> Kalibrasyon eğrilerinin istatistiksel sonuçları.....	66
<b>Tablo 5.7.1.</b> PCR ve PLS yöntemleri ile ikili karışımda PAR ve TRA' nın geri kazanım sonuçları.....	66
<b>Tablo 5.7.2.</b> Önerilen analitik tekniklerle standart ekleme yönteminden elde edilen geri kazanım sonuçları .....	67
<b>Tablo 5.8.1.</b> PCR ve PLS yöntemleri için istatistiksel parametreler.....	68
<b>Tablo 5.9.1.</b> PCR ve PLS ile tabletlerde PAR ve TRA belirleme sonuçları.....	69
<b>Tablo 5.9.2.</b> Ticari tabletlere PCR ve PLS yöntemleri kullanılarak elde edilen geri kazanım sonuçları .....	69

## 1. GİRİŞ

Artan dünya nüfusu ile aşırı sanayileşme ve tüketimin sonucu olarak oluşan çevre kirliliğindeki artış, stres ortamı tedavisi güç olan hastalık türlerinin ortaya çıkıp yaygınlaşmasına yol açmıştır. Hastalığın tedavisinin güçleşip, uzaması hızlı ve daha etkili tedavi yöntemlerine dönük ihtiyacı ortaya çıkarmaktadır. Gerek çeşidi bol hastalıkların tedavisinde kullanılan tek bir etken madde ile üretilen preparatlara insanların bağışıklık kazanması gereksede hastalıkların tedavi çeşitliliği gerektirmesi yada ilaçların farmakolojik tesirinin ile dünyada ve Türkiye ilaç piyasasında, iki ya da daha fazla etkin madde içeren kombine preparatların üretimi beraberinde getirmiştir. Kombine ilaçlar hedefe yönelik terapinin en önemli araçlarından ve her geçen gün daha fazla sayıda hastanın yaşamına katkıda bulunmaktadır. Özellikle hedefe yönelik uygulanan birden çok etken madde içeren kombine akıllı ilaçlar kanser tedavisinde ve diğer birçok hastalıkta yan etkileri azaltmak içinde kullanılmaktadır (Bello ve ark., 2001).

Canlılar ve ekosistem için; fizik, kimya, biyoloji, gibi temel bilim ve alt dalları, tıp, veterinerlik, farmakoloji gibi medikal bilimlerde içine alan multidisipliner sahada yapılan tüm araştırmalar neticesinde toplanan bilgileri işleyip birleştirmeye dönük teknolojik araçları kullanarak, matematik ve istatistiğin entegrasyonu eşliğinde günümüzün multidisipliner bir bilim dalı olan biyoteknolojinin popülerliğini ve tesir alanı giderek artmaktadır (Başbülül, 2020). Biyoteknoloji kelime anlamı olarak insan, hayvan ve bitki hücrelerinin fonksiyonlarını anlamak ve amaca uygun şekilde değiştirmek amacıyla uygulanan çeşitli yöntem, işlem ve biyosüreç temelli üretimi tanımlamak için kullanılan bir terimdir. Diğer tanımı da biyolojik araç, sistem ve süreçlerin üretim ve hizmet endüstrilerine uygulanmasıdır. Çeşitli yararlı maddelerin üretilmesi için biyolojik özellikleri kullanan bir teknoloji olması ve biyolojik araçlar tarafından üretilen materyallerin daha iyi ürün ve hizmet vermek üzere bilim ve mühendislik ilkelerinin uygulanması da biyoteknolojiyi diğer bilimlerden ayrı kılar.

Yukarıda da bahsedildiği üzere biyoteknolojinin uygulama alanları, enzim, atık, çevre, yenilenebilen kaynaklar, ziraat-hayvancılık, gıda, sağlık, terapötikler, tanı kitleri alanındaki teknolojileridir (Faassen ve Hitzmann, 2015). Sağlık alanındaki uygulamalar: Yeni ilaçların oluşturulması, ilaçların sadece hastalıklı bölgeye ulaşmasının sağlanması, hastalık tanılarının geliştirilmesi, aşıların geliştirilmesi, insan genomunun anlaşılması ve gen tedavisidir. Terapötikler alanında yapılan uygulamalar: Hastalıkların kontrolünde ve tedavisinde kullanılan farmasötik ürünlerin üretimi, antibiyotik üretimi, aşı üretimi, gen

tedavisi ile ilgili ürünlerin üretimi gibi alanlardır. Biyoteknoloji sanayisinin en büyük alt dilimi olan kırmızı biyoteknoloji olarak da adlandırılan sağlık biyoteknolojisinin, hedefi tıbbın önleyici, tanı koyucu, tedavi edici ve yenileyici işlevlerine hizmet etmektir.



Şekil 1.1. Biyoteknolojinin ilişkili olduğu disiplinler

Terapötik tıp alanına yönelik elde edilen biyoteknolojik materyallerin formülasyonunda en öne çıkan bilimdalı analitik kimyadır. Tamda bu yönü itibariyle interdisipliner sahada elde edilen verilerin doğru, kesin sonuca dönük tesirini arttıran analitik kimyanın detaylı veri analizinde başvurduğu kemometrinin önemi biyoteknolojik sahanın ilaç analiz kısmı içinde büyük önem arz etmektedir (Ertokuş ve ark., 2019).

İlaç analizindeki analitik yaklaşım, belirli bir maddenin kimyasal bileşenlerinin ya da bileşenlerden bir bölümünün niteliğinin ve niceliğinin belirlenmesini inceleyen kimyasal analiz koludur. Analitik kimya ilaç içeriğinin kantitatif tayininin yapıldığı bilim dalıdır. Tam bir kimyasal analiz için hem kalitatif hem de kantitatif analiz gereklidir (Selimoğlu ve ark. 2021) Analitik kimyada kimyasal analiz kalitatif ve kantitatif olmak üzere iki şekilde uygulanır. Analitik kimya ve ilgili alanlarda, içeriği çok çeşitli karışımları düşük maliyetli ve ön ayırma adımı kullanmadan çözmek için

yeni yöntem veya tekniklerin geliştirilmesi gereklidir. Özellikle insan sağlığı için ilaç endüstrisinde ilacın formülasyon öncesinde ve sonrasında ticari farmasötik ürünlerindeki kimyasalların analizi ve kalite kontrolü, sağlık bakanlığı ve ilgili kurumlarca yasa, yönetmelik ve yönergelerle zorunlu olduğundan dolayı analitik kimyanın analiz ve yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır (Fares ve ark., 2022-Shaik ve ark.,2022). Bu nedenle ilaç ve tedaviye dönük biyoteknolojik endüstrinin hedeflerinden biriside elde edilen preparatlarının üretiminde ham madde analizi ve üretimi esnasında kalite kontrol için hızlı, ucuz ve kolay, uygulanabilir sonuçlar veren analiz yöntemlerinin geliştirilmesidir. İlaç piyasasında kombine preparatların artışına paralel olarak bu farmasötik ticari ürünlerin kalite kontrol ve rutin analizleri de giderek zorlaşmaktadır. Kombine preparatlardaki miktar tayininin içerikteki çeşitlilikten ötürü kantitatif analizi geleneksel yöntemlerle imkansız kılan zorlukları beraberinde barındırmaktadır. Maddenin bileşimini aydınlatmak amacıyla uygulanan metotların teorik ve pratik yönlerini inceleyen bilim dalına analitik kimya denir. İlaç içerik ve miktar tayini için analitik kimyaya ihtiyaç vardır.

Günümüzde ilaç endüstrisi ve klinik araştırmalarda, kombine ilaçların analizi için pek çok enstrümental analiz yöntemleri kullanılmaktadır. Bunlardan analizlerde en popüler teknik yüksek performanslı sıvı kromatografisi HPLC “High performance liquid chromatography” kullanılmaktadır. Kombine preparatlardaki etken maddelerin yakın kimyasal ve fiziksel özelliğe sahip olmaları ile birlikte yardımcı maddelerin girişimleri ile istenen kromatografik ayrımları ya yapılamamakta ya da gereğinden fazla analiz süresi harcanmakta ve maliyetli olmaktadır. İlaç endüstri sanayiinde, kalite kontrol laboratuvarı ve ARGE çalışmalarında birden fazla aktif bileşiği içeren karışımların analizinde yüksek teknolojiye sahip ayırma tekniklerine dayalı yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemlerle çalışmak hem zaman alıcı, hem de ekonomik yönden pahalı ve karmaşık bileşenlerden oluşmaktadır. Deney koşullarının optimizasyonunun usandırıcı olması ve beklenen kalitede sonuçların alınamaması, ekonomik, hızlı, kolay uygulanabilir ve doğru sonuçlar verebilen analitik kemometrik yöntemlere yönelime neden olmuştur. Analiz işlemlerinde daha doğru ve daha kesin analitik sonuçlara ulaşmak için, günümüzün modern yeni sinyal işleme ve çok değişkenli matematiksel kalibrasyon algoritmaları klasik analitik yaklaşımlarıyla kombine olarak kullanılması yeni yöntemleri doğurmuştur. Son zamanlarda kemometrik çok değişkenli kalibrasyon ve sinyal işleme yöntemleri, kemometrik olarak spektral, kromatografik ve diğer analitik cihazlarda kompleks karışımların analizi için uygulanmaktadır. Çok değişkenli

kemometrik yöntemlerden geliştirilen kalibrasyon ve sinyal işleme yöntemleri şimdilerde, spektral, kromatografik ve diğer analitik cihazlarda kompleks karışımların analizi için kemometrik metotlar eşliğinde uygulanmaktadır.

Analitik kimyanın yöntem ve teknikleri analiz işlemlerinde vazgeçilemez öneme sahiptir. Analiz işlemlerinde kapiller elektroforez, spektrofotometrik, Atomik Absorbsiyon Spektrometresi “AAS”, Fourier Transform Infrared Spektrometresi (FTIR), Gaz Kromatografi ve Gaz Kromatografi Kütle Spektrometresi “GC/GC-MS”, HPLC, UHPLC “Ultra performance high pressure liquid chromatography” ve birçok elektrokimyasal yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemlerin uygulanmasındaki analiz işlemlerinin temel avantajları, analiz yöntemlerinin kolay uygulanabilirliği, analiz maliyeti, analiz hızı, sonuçların doğruluğu ve kesinliğidir.

Kemometrik çalışmalarda sinyal işleme ve çok değişkenli kalibrasyonlar, bütün analitik cihazlarda uygulanabilmesine rağmen en çok spektrofotometrik çalışmalarda kullanıldığı bilinmektedir. Nedeni ise spektrofotometrik cihazlarda kolay, hızlı ve tekrar edilebilir sonuçların elde edilmesidir. (Baleanu ve ark 2001, Dinç ve ark 2003, Dinç ve ark 2005).

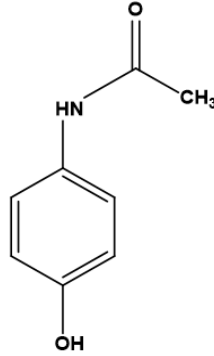
Türkiye ilaç piyasasında parasetamol ve diğer aktif bileşikleri içeren çok sayıda ticari preparat bulunmaktadır. Bu ticari preparatlar tablet, efervesan tablet, kapsül, flakon, ampul ve şurup şeklinde formları hastaların tedavisi için piyasaya sürülmüştür. Kombine preparatların kalite kontrol ve rutin analizleri ilaç endüstrisi ve klinik araştırmaları açısından önemlidir.

Bu çalışmanın temel amacı, parasetamol ve tramadol hidroklorür içeren analjezik ve antiinflamatuvar özellikte kombine preparatların analizi için pahalı analitik cihazlar gerektiren, analiz süresi uzun ve analiz maliyeti pahalı olan ayırma yöntemlerine alternatif daha hızlı, ekonomik ve daha güvenilir kemometrik çok değişkenli kalibrasyon yöntemlerinin geliştirilmesidir. Yüksek lisans tez kapsamında, farmasötik ilaç kombinasyonunda etkin maddelerin, hiçbir ayırma işlemi gerektirmeksizin ve aynı anda miktar tayinlerinde, temel bileşen regresyon PCR “Principal component regresyon” ve kısmi en küçük kareler PLS “Partial least squares” çok değişkenli kalibrasyon yöntemleri ile oran spektrumları-birinci türev spektrofotometrisi “First derivative absorption spectrophotometry” geliştirildi. Analiz sonuçları, kullanılan yöntemlerin rutin analizde çok uygun araçlar olduğunu göstermiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Parasetamol (Asetaminofen)

#### 2.1.1. Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri



Şekil 2.1.1.1. Parasetamolün açık formülü

**Molekül Formülü:** C<sub>8</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>2</sub>

**Molekül Ağırlığı:** 151,17 g/mol

**CAS numarası:** 103-90-2

**IUPAC name:** N-(4-Hydroxyphenyl)acetamide.

**Erime Noktası:** 169 °C

**Kaynama Noktası:** 500 °C

**Yoğunluğu:** 1.263 gr/cm<sup>3</sup>

**pKa:** 9,38

#### 2.1.2. Farmakolojik Özellikleri

Parasetamol (asetaminofen), ağrı kesici ve ateş düşürücü etkiye sahip bir ilaç etken maddesidir. Ağrı yönetimi için tek başına veya opioidlerle kombinasyon halinde ve antipiretik bir ajan olarak kullanılan analjezik bir ilaçtır. Parasetamol üretimine Nitrobenzen'den başlar ve katalitik hidrojenasyon yöntemiyle hidrojeni kullanarak Paraaminophenol'u yani ana hammaddeyi üretir sonra asetilasyon reaksiyonu ile paraaminophenolü acetica acid anhydrid ile muamele ederek parasetamolü elde eder. Aynı kimyasal bileşiğin kimyasal adından türetilen iki resmi adı parasetamol (Avrupa'da kullanılan uluslararası isim) ve asetaminofen (ABD'de kullanılan uluslararası isim: N-asetil-para aminofenoldür (Lee ve Simmons, 2018). Parasetamol, fenasetin ve asetanilidin ana metabolitidir. PAR ilaç formülasyonlarında tek başına veya diğer aktif bileşiklerle kombinasyon halinde sıklıkla kullanılan aktif bir farmasötik bileşiktir. PAR, beyne giden ağrı sinyallerinin yoğunluğunu azaltarak ve beyinde vücut ısısını düzenleyerek vücutta analjezik ve antipiretik etkilere sahiptir (İssa ve ark, 2011).

PAR ağızdan alındığında gastrointestinal sistemde hızla emilir (Bynum, 2008). İlaç oral uygulamadan sonra 0,5-2 saat içinde en yüksek plazma konsantrasyonuna ulaşır. Hızlı bir şekilde tüm dokulara eşit olarak dağılır (Garrido-Suárez ve ark, 2021). Hafif ve orta şiddette ağrı ve ateş için yaygın olarak kullanılan reçetesiz analjezik ve antipiretik bir ilaçtır. Düşük dozlarda zararsız olan PAR, aşırı dozda alındığında doğrudan hepatoksik potansiyele sahiptir, akut karaciğer hasarına ve ilerleyen zamanlarda akut karaciğer yetmezliğinden ölüme neden olabilir. PAR bütün dokulara hızla dağılır. Oral uygulamayı takiben gastrointestinal sistemden PAR emilim hızı, mide boşalma hızının bir fonksiyonudur ve genellikle hızlıdır ve uygulamayı takiben 1/2 ila 2 saat içinde serbest ilacın doruk plazma konsantrasyonlarına ulaşılmasıyla tamamlanır.

Analjezik etkisi yeni nesil analjeziklere göre hafif kalmış olsa da gastrointestinal sistemde yan etkisinin hemen hemen olmaması, güvenilirliği ve de gebelerde kullanılabilmesi PAR'ın her zaman ön planda kalmasını ve klasik bir analjezik olmasını sağlar. PAR, dünya çapında en sık alınan analjeziktir, yaygın olarak Tylenol olarak da bilinen PAR Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından ağrı durumlarında birinci basamak tedavi olarak önerilmektedir (Ennis, 2016). İlk olarak 1951 yılında ABD FDA tarafından onaylanmıştır ve şurup formu, normal tabletler, efervesan tabletler, enjeksiyon, fitil ve diğer formlar dahil olmak üzere çeşitli formlarda mevcuttur.

Baş ağrısı, diş ağrısı, soğuk algınlığı, migren, adet sancıları ve gribal enfeksiyonlara bağlı ağrı, nevralji, nevrin, siyatik, lumbago, kas ve eklem ağrıları, orta kulak ağrıları, sinüzit, soğuk algınlığı ve grip semptomlarının giderilmesi, burkulma ve cerrahi operasyonlara veya yaralanmalara bağlı ağrılarda, hafif veya orta dereceli ağrıyı hafifletmek için kullanılan yaygın bir ilaçtır (Bertolini ve ark, 2006; Ogemdi, 2019). Bunun yanında yüksek ateş durumunda ateş düşürücü olarak kullanılır. Ayrıca, birden fazla semptomu tedavi etmek için birden fazla aktif bileşene sahip kombinasyon ilaçlarında da kullanılır. Hayvan ve klinik çalışmalar, PAR'ın asetilsalisilik asidinkine eşit antipiretik ve analjezik aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. Asetilsalisilik asite duyarlılığı olan hastalarda alternatif ilaç olarak da kullanılır. PAR, kodein, oksikodon ve hidrokodon gibi ağrı kesicilerle kombinasyon halinde yaygın olarak reçete edilen birçok ilaçta kullanılır. Ocak 2011'de FDA, PAR içeren reçeteli ilaçların aşırı dozlarının, ABD'deki tüm PAR ile ilişkili karaciğer hasarı vakalarının yaklaşık yarısından sorumlu olduğunu bildirmiştir (FDA,USA&Drug). PAR doz aşımı, Amerika Birleşik Devletleri'nde ve diğer birçok ülkede hepatotoksisite ve akut karaciğer yetmezliğinin en sık nedenidir (Jaeschke, 2010). Kronik karaciğer hastalığı olmayan ve günde üç veya

daha fazla alkollü içecek içmeyen kişiler için, önerilen oral PAR dozu, günde 3 gramı geçmemek üzere, her dört ila altı saatte bir 660 ila 1.000 mg'dır (Christina, 2018).

### 2.1.3.Farmakokinetik Özellikleri

PAR proksimal ince bağırsaktan iyi emilir ve karaciğerde önemli ilk geçiş metabolizmasına maruz kalmaz (Ward ve Alexander-Williams, 1999). Gıdaların birlikte uygulanmasının PAR'ın emilim hızını yavaşlattığı gösterilmiştir, kafein ise emilimini hızlandırır (Stillings ve ark., 2000). PAR metabolizması öncelikle karaciğerde meydana gelirken, eliminasyon neredeyse tamamen böbrek yoluyla gerçekleşir (şekil 2.1.3.1). Terapötik dozların emilimini takiben, yaklaşık % 90'ı, idrarla atılan toksik olmayan metabolitler oluşturmak için glukuronidasyon ve sülfatlama ile metabolize edilir. Mevcut maksimum önerilen yetişkin PAR dozu günde 4.000 miligramdır (Brandt, 2000).

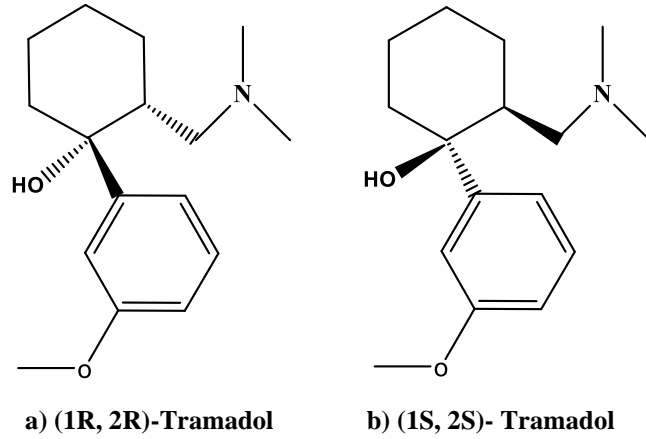
PAR, ürünlerde tek aktif bileşen olarak bulunur ve ayrıca soğuk algınlığı, grip, alerji, ağrı ve uykusuzluğu tedavi etmek için kullanılan ürünlerde diğer ilaçlarla birleştirilir. PAR ciddi cilt reaksiyonlarına neden olabilir, ancak bunlar çok nadirdir. Semptomlar arasında cildin kızarıklığı, kurdeşen, kabarcıklar ve cildin üst tabakasının ve alt tabakalarının ayrılması bulunur (U.S.FOOD&DRUG). PAR kullanımında sağlık uzmanınıza başvurulması öngörülen yan etkiler deri döküntüsü, kaşıntı veya kurdeşen, yüzün, dudakların veya dilin şişmesi gibi alerjik reaksiyonlar, solunum problemleri, ağız içi de dahil olmak üzere cildin kızarıklığı, kabarması, soyulması veya gevşemesi, ateş, baş ağrısı, döküntü, bulantı veya kusma ile boğaz ağrısı, idrarın geçirilmesinde sorun veya idrar miktarında değişiklik, olağandışı kanama veya morarma, alışılmadık derecede zayıf veya yorgun, gözlerin veya cildin sararmasıdır (Acetaminophen effervescent tablets, Cleveand Clinic). PAR'ın vücuttaki metabolizması şekil 2.1.3.1 deki gibidir.



Şekil 2.1.3.1. Parasetamol metabolizması

## 2.2. Tramadol Hidroklorür

### 2.2.1. Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri



Şekil 2.2.1.1. Tramadol hidroklorürün açık formülü

**Molekül Formülü:** C<sub>16</sub>H<sub>26</sub>ClNO<sub>2</sub>

**Molekül Ağırlığı:** 299.8 g/mol

**CAS numarası:** 36282-47-0

**IUPAC name:** ( 1R,2R )-2- (dimetilamino)metil]-1-(3-metoksifenil)sikloheksan-1-ol;hidroklorür

**Erime Noktası:** 180 -181 °C (356 - 358 °F)

**pKa:**9,41

### 2.2.2.Farmakolojik Özellikleri

Tramadol hidroklorür, akut ve kronik ağrının tedavisinde kullanılan bir opioid ajandır (Pujia ve ark., 2012). Tramadol, çeşitli ağırlı durumlarda iyi analjezik özelliklere ve iyi tolere edilebilirlik profiline sahip olan, oral yoldan uygulanan steroidal olmayan bir antienflamatuar ilaçtır (Gutstein HG, 2001). TRA, iki enantiyomerden oluşan bir rasemik karışıma sahiptir ve piyasada bulunan ürün, Şekil:2.2.1.1'de gösterildiği gibi (1R,2R) ve (1S,2S) enantiyomerlerinin rasemik (1:1) karışımını içerir (Scott ve Perry, 2000). TRA'nın monoaminerjik etkisi, antidepresan ilaçlara benzer. Tramadol hidroklorürün kimyasal adı (±) cis- 2-[(dimetilamino)metil]-1-(3-metoksifenil sikloheksanol hidroklorürdür (Bavaskar ve ark, 2010).

Tramadol hidroklorür, ilk olarak 1977 de Batı Almanya'da pazarlanan bir opioid analjeziktir. 2016'da tramadol, tek başına veya PAR ile kombinasyon halinde, oral ve enjeksiyon yoluyla kullanıma yönelik ürünlerde mevcuttu (Wiffen ve ark,2017).

Tramadol, yapısal olarak (kodein) ve (morfin) ile ilişkili merkezi etkili bir sentetik opioid analjeziktir. Opioidler, morfin benzeri etkiler üretmek için opioid reseptörleri üzerinde hareket eden maddelerdir. Opioid, vücutta morfin gibi etki gösteren kimyasal maddelerdir. Ana kullanım amaçları analjezidir. Bu ajanlar merkezi sinir sistemindeki ve gastrointestinal sistemdeki opioid reseptörlerine bağlanarak etki gösterirler. Bu bağlanma sonucu hem istenen hem de istenmeyen etkiler oluşur (Feng ve ark., 2012).

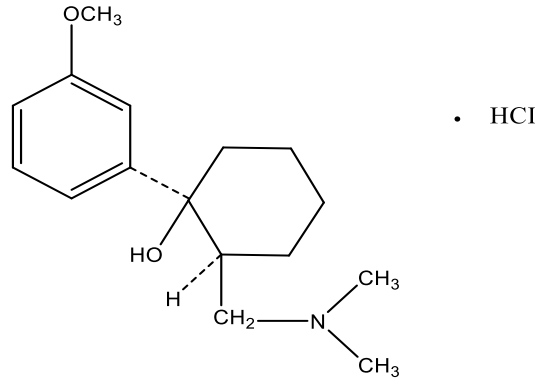
TRA, bir dizi farklı ağrı durumunu tedavi etmek için kullanılır. TRA, geleneksel opioidlerden yalnızca bir  $\mu$ -opioid agonisti olarak değil, aynı zamanda serotonin geri alım inhibisyonu ve noradrenalin geri alım inhibisyonu da dahil olmak üzere analjezik etkisine katkıda bulunabilecek bir dizi başka özelliğe sahip olması bakımından diğerlerinden farklıdır.

Tıbbi olarak, anestezi de dahil olmak üzere, öncelikle ağrıyı gidermek için kullanılırlar. İyi tolere edilebilirlik profili ve multimodal etki mekanizması nedeniyle, TRA genellikle orta ila şiddetli ağrının tedavisi için daha düşük riskli bir opioid seçeneği olarak kabul edilir. Dünya Sağlık Örgütü'nün ağrı merdiveninde 2. Adım seçeneği olarak kabul edilir (Derry ve ark, 2017) ve morfinin potensinin yaklaşık 1/10'u kadardır (Kress ve ark., 2016). TRA, (+) ve (-)enantiyomerlerin rasemik bir karışımı olarak mevcuttur. (+)enantiyomeri,  $\mu$ -opioid reseptörlerine karşı yalnızca zayıf bir afiniteye sahiptir ve serotonin geri alımını engellerken (-)enantiyomer, omurilikte noradrenalin geri alımını engeller (Bozkurt 2005; Scott 2000). Bir başka deyişle (+) TRA enantiyomeri en güçlü serotonin geri alım inhibitörüdür, oysa (-) TRA enantiyomeri en güçlü norepinefrin ve serotonin geri alım inhibitörüdür (Raffa ve ark, 1993). Noradrenerjik ve serotonerjik aktiviteyi bağımsız olarak geliştirerek, merkezi sinir sisteminde (CNS) analjezi etkilerini üretmek için birlikte çalışırlar.

TRA, diğer geleneksel opioid ilaçlarından farklıdır, çünkü sadece bir  $\mu$ -opioid agonisti olarak hareket etmekle kalmaz, aynı zamanda ağrı modülasyonunda yer alan nörotransmitterlerin etkilerini modüle ederek monoaminleri etkiler. TRA, travma, renal veya biliyer kolik ve doğumdan kaynaklanan ağrıyı azaltmak için ve ayrıca malign veya malign olmayan kaynaklı kronik ağrının, özellikle nöropatik ağrının tedavisi için etkili ve iyi tolere edilen bir ajandır. (Grond ve Sablotzki, 2004). Nöropatik ağrı genellikle ağrı kesici dediğimiz hasarlı dokudan kaynaklanan ağrı için kullanılanlardan farklı ilaçlar ile tedavi edilir. TRA 2008'de Duehmke'nin çalışmasında nöropatik ağrı tedavisinde de kullanıldığı anlaşılmıştır. Elde edilen kanıtlarda, 100 ila 400 mg tramadolün periferik nöropatik ağrı için etkili bir semptomatik tedavi olduğuna

göstermiştir (Martindale, 2016). PAR ile kombine edildiğinde, günlük dozaj tipik olarak her biri 37.5 mg tramadol ve 325 mg parasetamol içeren maksimum sekiz tablettir. TRA ile tedavi, kabızlık, mide bulantısı, sedasyon ve ağız kuruluğu gibi yan etkilere neden olabilir ve bunların tümü tedavi kesildikten sonra düzeler. TRA, bulantı, baş dönmesi ve ağız kuruluğu gibi tipik opioid yan etkileri ile ilişkilidir, ancak kusma ve kabızlık geleneksel opioidlere göre daha az sorun teşkil etmektedir. TRA'nın eşzamanlı serotonerjik tedavi ile kullanımı serotonin sendromu riski taşır (Beakley, 2015).

Günümüzde yapılan çalışmalarda opioid tedavisinin vücutta morfin gibi etki gösteren birçok ciddi yan etkisi olduğunu göstermektedir. Uzun süreli opioid kullanımı endokrin, immün, kardiyovasküler, solunum, gastrointestinal ve sinir sistemleri üzerinde önemli etkilere sahip olabilir. Çalışmalar, uzun süreli opioid tedavisinin kırık, enfeksiyon, kardiyovasküler komplikasyon, uyku bozukluğu solunum, bağırsak disfonksiyonu, aşırı doz ve mortalite riskini artırdığını göstermektedir. (Kotlińska-Lemieszek ve Żylicz, 2022) Tramadol hidroklorür, farmasötik formülasyonda tek başına veya diğer aktif bileşiklerle yaygın olarak kullanılmaktadır. Tramadol ve parasetamol kombinasyonu, orta ila şiddetli ağrının semptomatik tedavisi için kullanılır (Dhillon,2010-Osipova ve ark, 2006). Parasetamol ve tramadol kombinasyonu, merkezi sinir sistemi üzerinde etkili olan bir ağrı kesici preparattır (Szalek, 2014).TRA'nın kimyasal formülü şekil 2.2.2.1 deki gibidir.

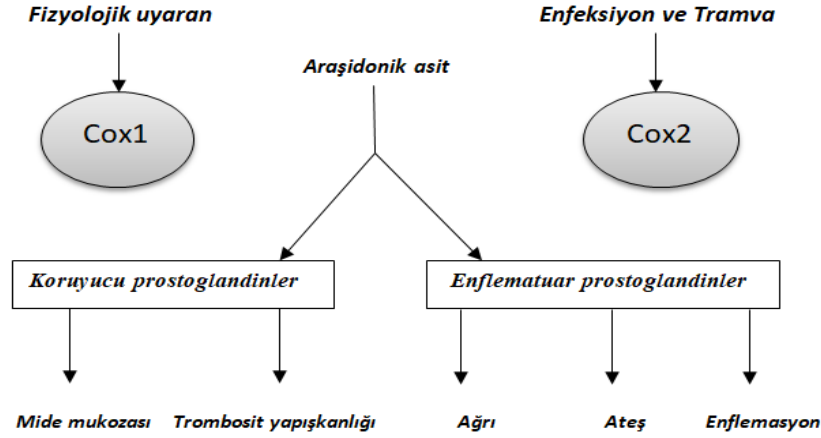


Şekil 2.2.2.1. Tramadol hidroklorürün kimyasal yapısı

### 2.2.3.Farmakokinetik Özellikleri

TRA analjezik bir ilaçtır ve  $\mu$ -opioid reseptörlerini aktive ederek ve serotonin ve noradrenalin geri alımını inhibe ederek ağrıyı hafifletir. (Zhang, 2017). Bilimsel olarak herhangi bir sorunun olduğu bölgede, araşidonik asidin yıkım ürünü olarak ortaya "prostaglandin" ler çıkar. Ortaya çıkan prostaglandinler ise sinir uçlarını uyararak ağrıyı tetikler. Kullandığımız ağrı kesiciler siklooksijenaz (COX2) enzimini inhibe ederek

prostaglandin sentezini engeller. Böylece ağrı duyusu ortadan kalkar, yani ağrı kesilir (Şekil 2.2.3.1).

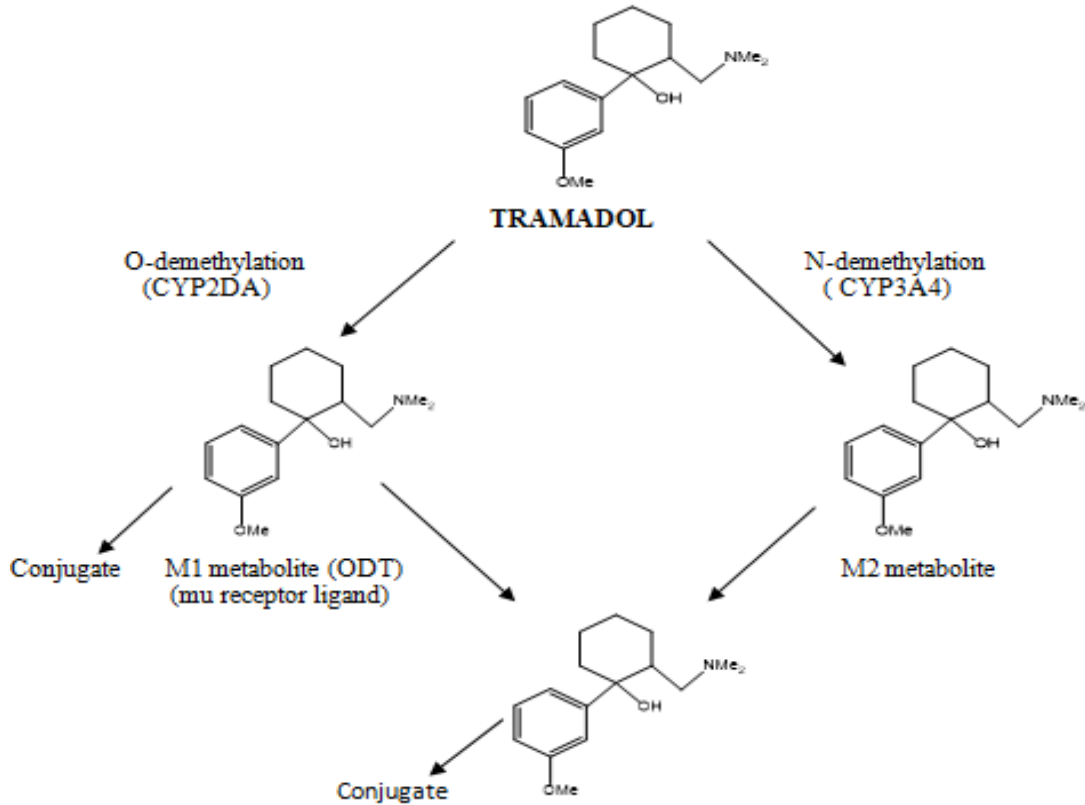


Şekil 2.2.3.1. Ağrı kesicilerin etki mekanizması

TRA, merkezi analjezik etkiye sahip sentetik bir 4-fenil-piperidin kodein analogudur. Hem TRA hem de O-desmetil metaboliti, seçici, zayıf OP3-reseptör ( $\mu$ ) agonistleridir. Eylem tarzı yeterince anlaşılmamıştır (Minami,2015). TRA, karaciğerde sitokrom P450 izoenzimleri CYP3A4 ve CYP2D6 aracılığıyla N ve O demetilasyon ve glukuronidasyon veya sülfatlama ile metabolize edilir. Tramadolün analjezik etkisinin yaklaşık %40'ı, tramadolün sitokrom P450 enzimi CYP2D6 aracılığıyla karaciğerde hızlı metabolizmasıyla oluşturulan O-desmetil tramadol (M1) tarafından sağlanır (Bozkurt, 2005- Grond, 2004). Tramadol ayrıca karaciğerde sitokrom P450 izoenzim CYP3A4 aracılığıyla N-demetilasyon ve glukuronidasyon veya sülfatlama ile metabolize edilir (Grond 2004). TRA, CYP450 enzimleri 3A4 ve 2D6 tarafından ikisi aktif olan üç ana metabolite dönüştürülür. (+)-Tramadol ve (+)-M1 metabolitlerinin her ikisi de opioid analjezik etkilerinin çoğunu üretmek için  $\mu$ -opioid reseptörüne bağlanır (Zanger ve Schwab,2013). Bununla birlikte, (+)-M1 yüksek afiniteli bir liganddır ve düşük afiniteli bir opioid agonisti olan ana bileşikten daha güçlü analjezik etkiler üretir.

CYP450 (sitokrom450) aracılı faz-I metabolik reaksiyonlar faz-II konjugasyon reaksiyonlarından daha yavaş olduğundan, CYP substrat ilaçlarının genel metabolik düzeninde hız sınırlayıcı hale gelirler. Şekil 2.2.2.3'de gösterilen tramadolün faz I metabolizması, CYP2D6 ve CYP3A4 tarafından katalize edilir ve aktif M1 metabolitine O-demetilasyon reaksiyonu CYP2D6 tarafından katalize edilir. Tramadolün yaklaşık% 80'i, karaciğer CYP içeriğinin sadece %1 ila %5'ini temsil eden, kolayca doymuş, düşük

kapasiteli, yüksek afiniteli bir enzim olan CYP2D6 tarafından şekil 2.2.3.2 de verildiği gibi metabolize edilir (Miotto ve ark.,2017).



Şekil 2.2.3.2. Tramadolün anahtar faz I metabolitleri.

Karaciğerde metabolize olmasına rağmen, değişmemiş TRA ve metabolitleri esas olarak idrarla atılır (King ve ark., 2011). Kronik ağrı, kanser, bel ağrısı, kas-iskelet sistemi değişikliği veya nöropati gibi çeşitli altta yatan hastalıklardan veya sendromlardan kaynaklanabilir. Opioid agonistler normalde bu durumu tedavi etmek için kullanılır (Nuckols, 2014). TRA, orta-şiddetli ağrıyı tedavi etmek için kullanılan opioid sınıfının merkezi etkili sentetik bir analjeziktir. TRA ve aktif metaboliti, ağırlıklı olarak mu-opioid reseptörlerine bağlanma mekanizması yoluyla anti-nosiseptif üretir. Uygun dozlama rejimi ve uyum, tedavinin başarısı için kritik öneme sahiptir. (Nossaman, 2010).

Günümüzde ise Huang ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada tramadolün epitelyal-mezenkimal geçişi düzenleyebileceği ve meme kanseri hücrelerinde sitotoksik etkilere sahip olabileceği sonucuna varılmıştır. TRA, meme kanseri hücrelerinin ilerlemesini engeller ve özellikle üçlü negatif meme kanseri için kombinasyon tedavisi için bir aday olabileceği ve meme kanseri için umut verici bir tedavi stratejisi olduğu görülmüştür (Huangve ark., 2022).

### 2.3.Zaldiar

Etken madde olarak her bir film tablet 37.5mg Tramadol Hydrochloride /325 mg Paracetamol içeren kombine ilaç, sinir sistemi ağrı kesici, ateş düşürücü, uyuşturucu etkiye sahip ilaç türüdür. Zaldiar ilacı orta veyahut şiddetli ağrıların semptomatik tedavisinde kullanılmaktadır. Zaldiar tabletin etken maddesinden birisi olan tramadol, etkili bir sentetik opioid analjeziktir.

Zaldiar akut (kısa sürede) yüksek dozda alındığında ciddi karaciğer toksisitesine (zehirlenmesine) neden olur. Erişkinlerde kronik (uzun süreli) dozlarda alındığında karaciğer hasarına neden olabilir. Yoğun deri döküntüleri, kurdeşen, tüm vücutta derinin kızarması, şiddetli kaşınma, kabarcıklar, deri soyulması ve şişmesi, mukoz membranlarda iltihaplanma nadir görülen yan etkilerdendir. TRA -merkezi etkili opiat- ve PAR -opiat olmayan, salisilat olmayan analjezik- oral olarak uygulanan sabit kombinasyon tableti, orta ila şiddetli akut ağrısı olan hastalarda ve aralıklı alevlenmelerle karakterize kronik ağrılı durumları olan hastalarda etkili analjezi sağlar. TRA/PAR (37.5/325 mg tablet), tek başına tramadolden daha hızlı bir etki başlangıcı ve monoterapi olarak her iki ajandan daha uzun bir etki süresi sağlar. (McClellan ve Scott, 2003).

Farklı etki mekanizmalarına sahip analjezik ajanların rasyonel kombinasyonları, her bir ilacın eşanaljezik dozlarına kıyasla daha iyi etkinlik ve/veya tolere edilebilirlik ve güvenlik sağlayabilir. Farklı ajanları birleştirmek, birden çok nedeni içeren karmaşık ağrı durumlarında da etkinliği artırır. PAR, zayıf bir opioid ajanın kombinasyonları yaygın olarak kullanılmaktadır. Böyle bir kombinasyon, parasetamol artı tramadol, bu iki ilacın köklü tamamlayıcı farmakokinetiğinden ve etki mekanizmalarından yararlanır. Bu kombinasyon, hayvan çalışmalarında gerçek bir sinerji göstermiştir ve ayrıca parasetamol ve tramadol birleşimi uzun süreli analjezik etki gösterir. Çok sayıda çalışma, hem akut hem de kronik ağrıda parasetamol artı tramadolün etkinliğini ve tolere edilebilirliğini doğrulamıştır (Schug, 2006). Çeşitli hastalıklarla ilişkili kronik ağrının tedavi prensipleri ve yöntemleri çok ortak noktaya sahiptir. Ağrının iyileştirilmesi, öncelikle ortaya çıkmasına neden olan altta yatan hastalığı belirlemeyi amaçlar. Çoğu durumda amaç, ağrının yoğunluğunu ve süresini azaltmak, hastanın fonksiyonel yeteneklerini geliştirmek ve hastayı günlük yaşama uyarlamaktır. Örneğin osteoartritinin tedavisi için en bilineni Avrupa Birliği'nin 2000 yılında romatizmaya karşı tavsiyeleri idi. Bu bağlamda Rusya' da yapılan bir araştırmada osteoartrit tedavisinde reçete edilen Non-steroidal antiinflamatuvar ilaçlar NSAID'ler ve

parasetamole karşı Zaldiar tanıtılmış ve kullanılmıştır. Uygulamada 37.5 mg tramadol ve 325 mg PAR içeren efervesan tablet, PAR veya NSAID'ler tarafından sağlanabilenden daha fazla etkinliğe ihtiyaç duyan hastalar için ikinci basamak bir ajan olarak tanımlanabildiği ortaya konmuştur (Anan'eva ve ark, 2007). Zaldiar farklı formlarda da üretilebilir. İspanyadaki bir çalışmada yine tramadol hidroklorür/parasetamol (37.5 mg/325 mg) oranında üretilen Paxiflas adında mentol aromalı ve suya ihtiyaç duymadan ağızda dağılan tabletler formunda üretilmiş ve Zaldiar ile arasında emilim hızı ve büyüklüğü açısından biyoeşdeğerliliği gösterdiği anlaşılmıştır (Tornero-Tornero ve ark., 2017). Diğer yapılan bir çalışmada Diyabetik polinöropatinin neden olduğu nörolojik ağrılı diabetes mellitus tip II'li 30 hastanın tedavisinde kullanılmış ve ağrıların %30- 50 oranında azaldığı görülmüştür (Danilov ve Zharkova 2007). Parasetamol ve tramadol HCl dünyanın pekçok yerinde farklı isimlerde üretilmektedir. Türkiye ve Avustralya'da Zaldiar, Fransa da Ixprim, İspanya da Paxiflas isimleri ile üretilmektedir.

### **3.KAYNAK ARAŞTIRMASI**

#### **3.1. Parasetamol Miktar Tayini İçin Uygulanan Analiz Yöntemleri**

##### **3.1.1.UV-Vis Spektrofotometri**

Hoang ve arkadaşları (2014) yaptığı çalışmada birinci dereceden türev ve dalgacık dönüşümlerinin UV spektrumlarına ve oran spektrumlarına uygulanması, kombine tabletlerinde ibuprofen ve parasetamolün eşzamanlı olarak belirlenmesi için önerilmişti. Birinci dereceden türev ve dalgacık dönüşümlerinin spektrumlara kombine kullanımı üzerine yeni bir hibrit yaklaşım da tartışıldı. Bu uygulamada, DWT, CWT ve FWT, en yüksek spektral geri kazanımları sağlamak için optimize edilmiştir. Dönüştürülmüş sinyallerin genliklerinin ölçülmesiyle ibuprofen 12-32 mg/L ve parasetamol 20-40 mg/L doğrusal konsantrasyon aralıklarındaki kalibrasyon grafikleri elde edildi. Önerdiğimiz spektrofotometrik yöntemler, hassasiyet ve doğruluk açısından HPLC ile istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır.

Shah ve Jasani (2017) yaptıkları çalışmada üç basit termometrik destekli UV-Görünür Spektrofotometrik yöntem, Klasik En Küçük Kare (CLS), Kısmi En Küçük Kare (PLS) ve Temel Bileşen Regresyonu (PCR), herhangi bir kimyasal ayırma ve herhangi bir grafik olmaksızın farmasötik dozaj formunda PAR ve TOL'nin eşzamanlı tahmini için geliştirilmiştir. 220-280 nm aralığında çalışılan ilaçların UV absorpsiyon spektrumları, Parasetamol için 5-25 µg/ml ve Tolperisone Hidroklorür için 1.5 -7.5 µg/ml konsantrasyon aralığında her iki ilaç için de Beer yasasına uyuldu. Kemometrik kalibrasyon için eğitim seti olarak yirmi beş (25) karışık solüsyon ve validasyon seti olarak 16 karışık solüsyon hazırlanmıştır. Emicilik veri matrisi, 3 nm aralıklarla 220 ila 280 nm arasında yirmi bir dalga boyu noktasında emicilik ölçülerek elde edildi.

Pekcan Ertokuş ve arkadaşları (2019) yaptıkları çalışmalarında tablet ilaç numunesinde bulunan parasetamol, asetilsalisilik asit ve kafein etken maddelerinin ultraviyole spektrofotometrisi yöntemi ile elde edilen sonuçlarının kemometrik metotlarla birlikte değerlendirilmesi ile tayini gerçekleştirmiş. Deneysel çalışmada maddelerin tek tek saf haldeki spektrumları elde edildikten sonra her bir ilaç etken maddesinden alınarak sentetik karışım hazırlanmıştır. Bir sonraki aşamada tablet numunesi analizi yapılmıştır. Kemometrik yöntemlerden, temel bileşen regresyonu yöntemi (PCR) ve kısmi en küçük kareler yöntemi (PLS), sentetik karışım ve tablet numunesindeki miktar tayininde başarı ile uygulanmıştır. Elde edilen veriler, istatistik olarak incelendiklerinde hem hesaplanan geri kazanım değerleri yüksek hem de standart

sapmalar yeterince küçüktür. Ayrıca yöntemin uygunluğu açısından F-testi uygulanmış ve sonuçlar uyumlu bulunmuştur. Uygulanan kemometrik yöntemler yardımıyla elde edilen sonuçlar son derece hızlı, basit ve güvenilir sonuçlardır.

Doğan ve arkadaşları (2020) yaptıkları bir çalışmada, PAR'ın UV-VIS spektrofotometre ile tayininden önce sentetik üre ve farmasötik numunelerde ekstraksiyonu için yeni, basit ve ucuz bir çalkalayıcı destekli derin ötektik solvent mikro ekstraksiyon (SA-DES-ME) prosedürü geliştirmiştir. SA-DES-ME prosedürü, kolin klorür (ChCl)/betain (Bet) ve farklı hidrojen bağı donörleri (HBD) ile hazırlanan derin ötektik çözücüler (DES) olan parasetamolün seçici ekstraksiyonuna dayanır. DES'ler, parasetamol içeren kompleksin numune çözeltisinden ayrılması için ekstraksiyon çözücüsü olarak kullanılmış. Deneysel yöntemde optimum koşullar altında, iyi doğrusallık  $50\text{--}800 \mu\text{g L}^{-1}$ , kantitatif geri kazanımlar %94.2–107.1, düşük tespit limiti  $14,9 \mu\text{g L}^{-1}$  ve yüksek hassasiyet geliştirme faktörü 135 gibi analitik sonuçlar elde edilmiş; tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik analizi için nispi standart sapmalar (%RSD) %3.3'ten az olarak tespit edilmiş. Önerilen prosedür, standart ekleme kullanılarak farmasötik numunelerde ve sentetik ürede parasetamolün ekstraksiyonu ve belirlenmesine başarıyla uygulanmıştır.

Chefirat ve arkadaşları (2020) yaptıkları çalışmada, sınırlı kaynaklara sahip laboratuvarlarda kullanılacak toksikolojik acil durumlar için geçerli olan UV/Visble spektrofotometri ile bir plazma parasetamol tahlil yönteminin doğrulanmasını önermektedir. Spektrofotometri ile plazma üzerindeki parasetamol tayini için Glynn ve Kendal yöntemine dayalı analitik optimizasyonlar yapılmıştır. Avrupa İlaç Ajansı'nın (EMA) kılavuzu, yöntemin analitik doğrulaması için ana referans olarak alınmıştır. 40 ila  $400 \mu\text{g/mL}$  arasındaki tahlil aralığında  $r=0.9941$  korelasyon katsayısı ile iyi doğrusallık elde edilmiş ve elde edilen doğruluk ve uygunluk, doğrulama protokolünün gerekliliklerini yerine getirmiştir. Algılama ve niceleme sınırları sırasıyla  $10 \mu\text{g/mL}$  ve  $40 \mu\text{g/mL}$ 'dir. Valide edilmiş yöntemle yapılan analiz, tüketilen kimyasallar ve reaktifler açısından enzim immünoassay yönteminden 20 kat daha ucuzdur. Sonuç EMA' nın gereksinimlerine göre doğrulanmış ve geleneksel yöntemlere göre düşük maliyetli rutin ve alternatif bir yöntem olduğu sonucuna varılmıştır.

Farid ve arkadaşları (2022) yaptıkları UV-spektrofotometri çalışmasında çok değişkenli yaklaşımları kullanan spektrofotometrik veri analizi uygulamasını

kullanmışlardır. Bu uygulamalardan biri, safsızlıkların varlığında aktif bileşenlerin analizidir. Dört kemometrik destekli spektrofotometrik yöntem, yani temel bileşen regresyonu (PCR), kısmi en küçük kareler (PLS), yapay sinir ağları (ANN) ve çok değişkenli eğri çözünürlüğü değişen en küçük kareler (MCR-ALS) önerildi ve doğrulanmıştır. Geliştirilen kemometrik yöntemler, P-Aminofenol (PAP), P-Nitrofenol (PNP), Asetanilid (ACT) ve P-PAR safsızlıkları ile birlikte PAR, Kloroasetanilid (CAC). ve Fenilefrin HCl (PHE)'nin ciddi şekilde örtüşen spektrumunu çözmek için karşılaştırıldı. Dört çok değişkenli kalibrasyon yöntemi, PAR safsızlıklarının daha fazla nicelenmesiyle PAR ve PHE'nin aynı anda belirlenmesinde başarılı oldu. Böylece önerilen yöntemler, herhangi bir ayırma aşamasına gerek kalmadan kullanılabilir ve farmasötik formülasyon analizi için başarıyla uygulanabilir olduğu görüldü. Ayrıca, önerilen kemometrik yöntemlerle elde edilen sonuçlar ile resmi olanlar arasındaki istatistiksel karşılaştırma, önemli farklılıklar göstermedi.

### 3.1.2.Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Vertzoni ve arkadaşları (2003) yaptıkları çalışmada, toksik bir dozdan sonra tavşan plazmasında ve idrarında asetaminofen (parasetamol) ve başlıca metabolitleri glukuronid (AG) ve sülfat (AS) konjugatlarının belirlenmesi için 242 nm' de tespit edilen ters fazlı yüksek performanslı bir sıvı kromatografik yöntem (HPLC) optimize edilerek geliştirilmiş ve doğrulanmış. m-Aminofenol dahili standart (IS) olarak kullanılmış, 5 mm partikül boyutuna sahip bir Hypersil BDS RP-C18 kolonu (250×4.6 mm), %1 CH<sub>3</sub>COOH (pH 6.5) ve metanol (95:5,v) içeren KH<sub>2</sub>P0<sub>4</sub> 0.05 M sulu tampon çözeltisinden oluşan bir mobil faz ile dengelenmiş. Akış hızı 1.5 ml/dk idi. Parasetamol, AG ve AS' nin kalibrasyon eğrileri plazmada 0,5-250, 1-200, 0,5-100 mg/ml ve idrar matrisinde 1-200, 0,5-150, 0,5-100 µg/ml konsantrasyon aralıklarında lineer olarak bulunmuş. Tüm vakalarda tespit ve miktar tayini sınırları hesaplandı ve ayrıca kapsamlı kurtarma çalışmaları yapılmış. Plazmada A, AG ve AS için gün içi bağıl standart sapma (R.S.D.) sırasıyla %5, %4,2'den az ve idrarda %4, 7,4'ten az iken, karşılık gelen günler arası değerler sırasıyla %7, %6, %4 ve %5, %8, %6 olarak tespit edilmiş.

Walash ve arkadaşları (2017) yaptıkları çalışmada hammadde ve farmasötik formülasyonlarında famotidin, parasetamol ve diklofenakın üçlü bir karışımının eşzamanlı tahmini için basit, hassas ve hızlı bir HPLC yöntemi geliştirmiştir. Analiz C üzerinde yapıldı, mobil fazlı kolon (250 mm×4.6 mm, 5-µm partikül boyutu) metanol ve görünür pH 3.5 ile 0.01 M sodyum dihidrojen fosfattan 80:20, v/v oluşmuştu. UV

dedektörü 280 nm'de çalıştırıldı ve atık sular iç standart olarak felodipin kullanılarak 1,0 mL/dak akış hızıyla pompalanmış. Optimum kromatografik koşullar altında çalışma süresi 6 dakikadan azdır. Famotidin, parasetamol ve diklofenak için sırasıyla 5-100 µg/mL, 10-300 µg/mL ve 5-100 µg/mL konsantrasyon aralığında doğrusallık, doğruluk ve hassasiyetin kabul edilebilir olduğu bulunmuştur. Yöntemin duyarlılığı, famotidin, parasetamol ve diklofenak için sırasıyla 3,22 µg/mL, 8,93 µg/mL ve 4,16 µg/mL nicelme sınırı olan çalışılan ilaçların belirlenmesine izin verir. Önerilen yöntemin yüksek duyarlılığı ve basitliği, çalışılan ilaçların kombine tabletlerinde başarılı bir şekilde belirlenmesinin yanı sıra, dozaj formlarında ve ibuprofen ile kombine tabletlerinde famotidinin belirlenmesini sağlar. Ayrıca, önerilen yöntem ICH kılavuzlarına göre tamamen doğrulanmıştır.

Abbasi ve arkadaşları (2019) yaptıkları çalışmada parasetamolün insan idrar örneklerinden ekstraksiyonu için biyo-dispersif sıvı-sıvı mikroekstrasyonu (Bio-DLLME) ile kombine edilen moleküler baskı katı faz ekstraksiyonu (MI-SPE) olan analitik bir yöntem oluşturmuştur. Bu çalışmada, parasetamol ilk olarak idrar örneğinden, ekstraksiyon çözücüsü olarak rhamnolipid biyosümfaktanlarından oluşan biyoagregalara ekstre edilmiş. Ekstraktın katı faz ekstraksiyonu ile temizlenmesi, doğrudan kartuşa ekstrakt çözeltisi eklenerek gerçekleştirilmiş. Çözeltinin pH'ı 50 mM fosfat tamponu kullanılarak 8'e ayarlanmış. Son olarak kolonda kalan analit 1.0 mL metanol ile yıkandı ve kantitatif analiz için sıvı kromatografi sistemine enjekte edilmiş. Bu protokol, parasetamolün geri kazanımlarını ve zenginleşmesini önemli ölçüde artırdı. Optimize koşullar altında, önerilen yöntem ( $1-200 \mu\text{g L}^{-1}$ ), düşük algılama limitleri ( $0,33 \mu\text{g L}^{-1}$ ) ve nicelme aralığında iyi bir doğrusallık sağlamış. Parasetamol için ekstraksiyon geri kazanımının yüzdesi %96-103,8, ekstraksiyon işleminin zenginleştirme faktörü değeri 368 olarak bulunmuştur.

Patel ve arkadaşları (2020) yaptıkları çalışmada iki basit, spesifik, hassas, kıyı etkili, zaman açısından verimli ve kombine tablet dozaj formunda Parasetamol ve Diklofenak'ın aynı anda belirlenmesi için doğru yöntemler açıklanmaktadır. Birinci yöntem, eş zamanlı soru yöntemi olup UV Görünür Spektrofotometrik yöntemle absorpsiyona dayanmaktadır. İlaçların absorpsiyon maksimum değerleri Parasetamol için 247 nm ve Diklofenak Sodyum için 276 nm olarak bulundu. İkinci yöntem, Parasetamol ve Diklofenak'ın RP-18 (4,6 mm X 2,5 cm) kolonu ve aşağıdakilerden oluşan bir mobil faz kullanılarak simülasyon tayini için basit, spesifik, doğru, kıyı etkili

ve zaman verimli ters fazlı yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntem geliştirilmiştir. Asetonitril Metanol (90:10 v/v) akış hızı 1ml/dak. Parasetamol ve Diklofenak Sodyum'un rasyonel süresi sırasıyla 2,8 dakika ve 3,9 dakika olarak bulundu. Her iki ilacın tahmininde eşzamanlı denklem yöntemi ve Q-analiz yöntemi kullanılmıştır. Her iki yöntem de istatistiksel olarak doğrulanmış iyi bir doğruluk ve kesinlik göstermektedir. Bu yöntemler ön ayırma gerektirmez ve bu nedenle kalite kontrol laboratuvarlarında her iki ilacın rutin analizi için kullanılabilir. İkinci yöntem, RP-18 (4,6 mm×2,5 cm) kolonu ve 1 ml/dk akış hızında Asetonitril: Metanol (90:10 v/v)'den oluşan bir mobil faz kullanılarak Parasetamol ve Diklofenak'ın eş zamanlı tayini için geliştirilmiştir. Parasetamol ve Diklofenak'ın alıkonma süresi, Parasetamol ve Diklofenak tahmininde kullanılan diğer yöntemden çok daha kısa olan sırasıyla 2,8 dakika ve 3,9 dakika olarak bulundu. Parasetamol ve Diklofenak için lineerlik sırasıyla 20- 200 µg/ml ve 300- 500 µg/ml aralığında kurulmuştur. Parasetamol ve Diklofenak'ın yüzde geri kazanımları sırasıyla %99.56 ve %103.05 aralığında bulunmuş. Önerilen yöntem, QC seviyesi için Parasetamol ve Diklofenak'ın aynı anda belirlenmesi için kesin, doğru, seçici ve hızlıdır.

### 3.1.3. Ters Faz Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (RP-HPLC)

Meyer ve Karst (2001) idrarda parasetamolün (asetaminofen; N-acetyl-4-aminofenol) belirlenmesi için yeni bir yöntem çalışmışlardır. Ters fazlı HPLC ayırımından sonra parasetamol, H2O2 tarafından yaban turpu peroksidaz katalizi ile oksitlenmiş. Tespit, 329 nm'lik bir uyarma dalga boyunda ve 435 nm'lik bir emisyon dalga boyunda florimetrik olarak gerçekleştirilmiş. İdrar örneklerine parasetamol eklenmiş, seyreltilmiş ve başka bir ön işleme tabi tutulmadan doğrudan enjekte edilmiş. Bu koşullar altında, saptama sınırı  $2 \times 10^{-1}$  mol.L<sup>-1</sup> idi ve niceleme sınırı  $7 \times 10^{-1}$  mol.L<sup>-1</sup> bulunmuş. Yöntem, UV-Visble ile HPLC'ye dayalı farklı yaklaşımlar ile doğrulanmış.

Devi ve arkadaşlarının (2013) yaptıkları çalışmada ise parasetamol için, Ters Faz Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (RP-HPLC) ile basit ve tekrarlanabilir bir yöntem geliştirilmiştir. Parasetamol, C18 sütununda [4.6x250mm, partikül boyutu 5µm], 207nm'lik UV tespitinde pH değeri 3,5 olan orto fosforik asit tamponu kullanılarak ayrılmış. Asetonitril (ACN) ve suyun izokratik elüsyonu, çeşitli oranlarda ve akış hızlarında mobil bir faz olarak kullanılmış, sonunda 25:75 v/v ACN ve su 1 mL/dak akış hızı ile ayarlanmış. Doğrusallık, doğruluk, hassasiyet, günler arası ve gün içi değişim gibi istatistiksel doğrulama parametreleri kontrol edilmiş, ayrıca parasetamol

konsantrasyonlarının tespit sınırı ve niceleme sınırı 120 ng/mL ve 360 ng/mL olarak bulunmuştur. Parasetamolün geri kazanım ve tahlil çalışmaları %99 ila %102 arasındaydı ve önerilen yöntemin parasetamolün kalite kontrol analizi için benimsenebileceğini kanısına varılmış.

Kanthale ve arkadaşları (2020) de yaptıkları çalışmada; İzokratik HPLC yöntemlerinin geliştirilmesi ve optimize edilmesi, çeşitli faktörlerin aynı anda belirlenmesini gerektiren zor bir işlemdir. Parasetamol (PAR) ve İbuprofenin (IBU) toplu halde ve farmasötik formülasyonda eşzamanlı tahmini için basit, doğru, hızlı ve kesin bir kemometrik destekli RP-HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Yöntem, bağımlı değişkenler (akış hızı, metanol ve pH) hakkında endişe duyarak mobil fazın optimizasyonu için deney (DOE) yaklaşımının tasarımını içerir ve bunların sonuçları, ilaçların tutma süresi (Rt) ve çözünürlüğü boyunca algılanmıştır. Deneme çalışmalarına dayanarak, yazılım tarafından oluşturulan optimize edilmiş koşul, PAR'ın ayrılması için kullanıldı ve Thermo C18 Kolonunda IBU (150 mm×4,6 mm i.d., 5 µm). Kromatografik ayırma, metanol ve sodyum dihidrojen fosfat tamponundan (88.3: % 11.7 v/v) oluşan optimize edilmiş mobil faz kullanılarak, pH 2.5'e ayarlanmış, 1.2 mL/dak akış hızında teslim edilmiş ve tespit 222 nm'de gerçekleştirilmiştir. Saklama süresi (Rt) PAR için 2,241 dakika ve IBU için 3,535 dakika olarak bulundu. Geliştirilen yöntem ICH yönergelerine göre doğrulandı. PAR ve İbu'nun kalibrasyon eğrilerinin sırasıyla 6.5-39 µg/mL ve 8-48 µg/mL aralığında doğrusal olduğu bulundu. İki bileşiğin geri kazanımları çeşitli seviyelerde %100'e yakındı. Bu yöntem, bu ilaçların toplu ve farmasötik formülasyonlarda rutin kalite kontrol analizi için başarıyla uygulanabilir olduğu sonucuna varıldı.

Palur ve Koganti (2020) yaptıkları çalışmada tablet dozaj formunda Parasetamol, Difenhidramin Hidroklorür, Kafein ve Fenilefrin Hidroklorür'ün eş zamanlı tayini için kemometrik destekli UV spektrofotometrik ve RP-HPLC yöntemleri geliştirilmiş ve karşılaştırmıştır. UV-Spektrofotometrik analiz, Temel bileşen regresyon yöntemi (PCR) ve kısmi en küçük kareler regresyon yöntemi (PLSR) olmak üzere iki kemometrik model uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Kromatografik yöntem, tepki yüzey metodolojisi - Merkezi Kompozit Tasarım (CCD) uygulanarak geliştirilmiş ve optimize edilmiş. Bu yöntemler, seçilen formülasyonda bulunan ilaçların miktar tayini için ilk olarak düşünülmüş. PCR ve PLSR modelleri, 1 nm veri aralığı ile 240-320 nm dalga boyu aralığında karmaşık UV spektrumlarını çözmek için başarıyla doğrulanmış ve

uygulanmıştır. RP-HPLC yönteminde, tanımlanan kritik faktörler metanol içeriği %45-55 h/h ve akış hızı 0,75-0,85 mL/dak idi ve seçilen yanıtlar dördüncü elute edilmiş bileşenin alıkonma süresi ( $R_{t4}$ ) ve çözünürlük birinci ve ikinci ayrıştırılmış bileşenler arasında ( $RS_{1,2}$ ) idi. Metanol-potasyum dihidrojen ortofosfat tamponundan (pH 3; 10 mM) (50:50, v/v) oluşan mobil fazdan ve 0.81 mL akış hızından oluşan kromatografik yöntem koşullarının optimizasyonu için Derringer'in arzu edilirlilik işlevi kullanıldı. 220 nm'lik bir algılama dalga boyu ile dak/%95 güven aralığındaki tek yönlü ANOVA, geliştirilen yöntemler arasında anlamlı bir farklılık olmadığını ortaya koymuştur.

### 3.1.4. Gaz Kromatografisi - Tandem Kütle Spektrometrisi (GC-MS)

Albero ve arkadaşlarının (2014) yaptığı çalışmada biyosolidlerde farmasötik ilaçların belirlenmesi için analitik bir yöntem geliştirilmiştir. Numuneler asidik bir su ve aseton karışımı (1:2, v/v) ile ekstrakte edildi ve etil asetat: metanol (90:10, v/v) ile salınan ekstraktların temizlenmesi için desteklenen sıvı ekstraksiyonu kullanılmış. Bileşikler, t-bütildimetilsilil türevlerini oluşturmak için sililasyondan sonra matris eşleşme kalibrasyonu kullanılarak gaz kromatografisi-tandem kütle spektrometresi ile belirlenmiş. Bu yöntem, karmaşık matrislerin analizi için oldukça basit bir işlem, ucuz cam eşyaların kullanımı ve düşük çözücü hacimleri gibi çeşitli avantajlar sunar. Geliştirilen yöntemle %70 ile %120 arasında değişen nispi standart sapmalar (RSD)  $\leq$  %13 ve tespit sınırları 0,5 ile 3,6 ng g<sup>-1</sup> arasında değişen tatmin edici ortalama geri kazanımlar elde edilmiş. Yöntem daha sonra Madrid ve Katalonya' da (İspanya) toplanan biyosolid örneklerine başarıyla uygulanmış. Çalışılan örneklerde, 1.1 µg g<sup>-1</sup>'e (salisilik asit) kadar olan seviyelerde on altı hedef bileşikten on biri tespit edilmiş ve analiz edilen tüm örneklerde ibuprofen, kafein, parasetamol ve fenofibrat saptanmıştır.

Alnuwaiser (2021) yaptığı çalışmada dört numune ile birlikte kafein standart numunesi; azdol, citymol, amidol ve panadol UV Vis ve GC MS spektrometrelerinde incelenmek üzere hazırlanmıştır. UV-Vis için numuneler sıvı halde hazırlanırken GC-MS için numuneler gaz halinde hazırlandı. UV-Vis analizi, parasetamolün varlığını ve kafeinin kaybolduğunu gösterir. GC-MS için hem PAR hem de kafein mevcuttur. Bu sonuç, UV-Vis analizindeki sıvı halin, kafein spektrumunun sıvı ile örtüşmesine neden olan güçlü moleküller arası etkileşime neden olduğu gerçeğiyle ilgili olabilir. Bu tür bir örtüşme, numunelerin gaz halindeyken incelendiği GC-MS için mevcut değildir. Bu, kafeinin tüm numunelerde bulunduğu anlamına gelir.

### 3.1.5. Tandem Kütle Spektrometrisi (UPLC-MS/MS)

Mohamed ve arkadaşları (2019) yaptıkları çalışmada birlikte formüle edilen ilaçların kantitatif tahmini için tandem kütle spektrometrisi (UPLC-MS/MS) yöntemine bağlı yeni bir ultra performanslı sıvı kromatografisi oluşturmaya odaklanmıştır. Mısırlı gönüllülerde insan plazmasında parasetamol (PAR), psödoefedrin hidroklorür (PSD) ve bromfeniramin maleat (BRP) çalışılmıştır. Çalışmada hedef ilaçların farklı etnik popülasyonlara birlikte uygulanmasının farmakokinetiklerini etkileyip etkilemediğini tanımayı amaçlanmıştır. İlaç ekstraksiyonu, etil asetat yardımıyla sıvı-sıvı ekstraksiyon tekniğini içeriyordu. Ters faz UPLC separasyonu, Agilent Zorbax SB C18 (50 mm×2.1 mm, 1.8 µm) kolonunda asetonitril: % 0.1 formik asit (70:30 v/v) kullanılarak mobil faz olarak gerçekleştirilmiş. Pozitif elektrosprey iyonizasyonu ve çoklu reaksiyon izleme kullanılmış. Kısa analiz süresi (1 dak) günde birçok insan plazma örneğinin analizine izin verdiği için umut vericiydi. Geliştirilen yöntem, PAR için 0.05–20.0 µg/mL, PSD için 1.0–500.0 ng/mL ve BRP için 0.1–50.0 ng/mL doğrusal aralıklar gösterdi. Geliştirilen yöntemin ayrıntılı bir doğrulaması, tüm doğrulama parametreleri sonuçlarının tatmin edici olduğu FDA kılavuzlarına uygun olarak gerçekleştirilmiştir. UPLC-MS/MS yöntemi, kombine dozaj formlarının Mısırlı sağlıklı gönüllülere oral yoldan uygulanmasından sonra üç ilacın farmakokinetiğini incelemek için kullanılmıştır. Farmakokinetik çalışma etik kurulun mutabakatından sonra gerçekleştirilmiştir. Yeni geliştirilen yöntemle elde edilen farmakokinetik sonuçlar;  $C_{Max}$  (ng/mL) 8001.77, 127.76, 1.92,  $t_{Max}$  (h) PAR, PSD ve BRP için sırasıyla 0.75, 1.5, 4.0 ve  $t$  (h) 3.3, 4.65, 16.26, bu sonuçlar diğer ırklar üzerinde yapılan diğer bildirilen klinik çalışmalardan elde edilenlerle karşılaştırılmıştır PAR ve PSD'nin farmakokinetik parametrelerinin, farklı etnik popülasyonlardan gönüllülere aynı doz verildiğinde etkilenmediği açıktı. Ek olarak, PSD ve BRP'nin PAR ile birlikte uygulanması, PAR'ın farmakokinetiğini değiştirmemiştir. PSD'nin PAR ve BRP ile birlikte uygulandığında farmakokinetiği, benorilat ve klorfeniramin ile birlikte uygulandığında neredeyse benzerdi, ancak  $C_{1/2Max}$  PSD, kafein, klorfeniramin ve klerestin ile birlikte uygulandığında büyük ölçüde etkilendi.

### 3.1.6. Voltametri

Švorc ve arkadaşları (2012) değiştirilmemiş bor katkılı elmas elektrot üzerinde parasetamol ve penisilin V'nin aynı anda belirlenmesi için basit, hassas ve seçici bir kare dalga voltametri yöntemi geliştirmiştir. Karışımda bulunan her iki ilacın

oksidasyon tepe potansiyelleri arasında yaklaşık 0.35 V'luk iyi potansiyel ayrımı bulundu. Döngüsel voltametri ile parasetamolün yarı tersinir dalga verdiği ve penisilin V'nin tersinmez oksidasyon zirvesi sağladığı bulundu. Optimum deney koşullarını seçmek için destekleyici elektrolit, pH ve tarama hızının her iki ilacın voltametrik yanıtı üzerindeki etkisi incelenmiştir. Kantitatif eşzamanlı belirleme için optimal koşullar, pH 5.0'da asetat tampon çözeltisinde elde edildi. Parasetamol ve penisilin V'nin oksidasyon zirvesi, konsantrasyonlarının artmasıyla tepe akımlarında sistematik bir artış gösterdi. Parasetamol ve penisilin V'in aynı anda belirlenmesi için kalibrasyon eğrileri, her iki ilaç için 0,4 ila 100  $\mu\text{M}$  konsantrasyon aralığında iyi doğrusal tepkiler sergiledi. Algılama limiti, parasetamol ve penisilin V için sırasıyla 0.21 ve 0.32  $\mu\text{M}$  olarak belirlendi. Yöntem, insan idrarında yaygın olarak bulunan enterferanların etkisi ihmal edilebilir olduğunda, iyi hassasiyet, tekrarlanabilirlik (10  $\mu\text{M}$  PAR ve PEN karışım çözeltisi için %1.5 ve %2.1'lik RSD) ve seçiciliği kanıtlamıştır. Önerilen yöntemin pratik analitik faydası, insan idrar örneklerinde parasetamol ve penisilin V'nin eş zamanlı tayini ile gösterildi ve bağımsız bir yöntem olarak yüksek performanslı sıvı kromatografi yöntemi kullanılarak elde edilenlere benzer sonuçlar elde edildi.

Uzak (2019) yaptığı çalışmada karbon nanotüp, samaryum ve tungsten nopaçacıklardan oluşan yeni bir voltametrik platform hazırlamıştır. Önerilen voltametrik platform, ilaç ürünlerdeki dopamine ve parasetamol saptanması için kullanılmıştır. Birçok elektrotla karşılaştırıldığında bu elektrot sistemi ( $\text{Sm}_2\text{O}_3\text{-NPs/W-NPs/CNTs/GCE}$ ), DA ve PAR için yüksek katalitik etki göstermiş ve elektrokimyasal davranışlarını geliştirmiştir. Önerilen elektrot, DA için 0.180 V civarında iyi tanımlanmış bir yükseltgenme piki verirken 0.178 V civarında yine bir indirgenme piki vermekte ve pik potansiyelleri arasındaki fark 2 mV olarak hesaplanmıştır. Önerilen platform PAR için de 0,390 V civarında iyi tanımlanmış yükseltgenme piki verirken 0,388 V civarında yine bir indirgenme piki elde edilmiştir. PAR için de pik potansiyelleri arasındaki fark 2 mV olarak hesaplanmıştır. DA ve PAR'nin saptanmaları, kare dalga voltametri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Önerilen elektrot yüzeyinde, DA ve PAR'nin  $4.0 \times 10^{-9}$  M ile  $2.5 \times 10^{-7}$  M konsantrasyon aralığında doğrusal olduğu gözlenmiştir. Kompozit malzeme DA ve PAR için sırasıyla  $7.0 \times 10^{-9}$  M ve  $1.0 \times 10^{-10}$  M bir saptama sınırlarına olanak vermiştir. Ayrıca,  $\text{Sm}_2\text{O}_3\text{-NPs/W-NPs/CNTs/GCE}$ , yüzeyinde DA ve PAR için mükemmel tekrarlanabilirlik, yüksek kesinlik ve yüksek doğruluk elde edilmiştir. Kompozit tabaka temelli platform, ilaçlarda DA ve PAR'nin saptanmasına başarılı bir şekilde uygulanmıştır.

### 3.1.7.Elektrokimya

Bharathi ve arkadaşları (2018) yaptıkları çalışmada parasetamol (N-asetil-p-aminofenol, asetaminofen; PAR) için doğru bir niceleme yöntemi geliştirmişlerdir. Parasetamol tayini için çeşitli analitik prosedürler mevcuttur, bunlar arasında titrimetri, florimetri, kolorimetri, spektrofotometri, kromatografi, enzimatik yöntemler ve elektrokatalitik yöntemler bulunur. Elektrokimyasal yöntem, basit prosedürü, düşük maliyeti, hızlı tepkisi, yüksek seçiciliği ve daha iyi hassasiyeti nedeniyle parasetamol tayini için en iyi yöntemlerden biridir. Yapılan çalışmada, GCE'nin elektrokimyasal polimerizasyon yöntemi ile modifikasyonu için krom (III) Schiff baz kompleksi kullanılmış. Modifiye GCE, 0.4 V' ta anodik bir potansiyel sergileyen ve anodik akım 15,2  $\mu\text{A}$ ' dır. Çıplak GCE, oksidasyon potansiyelini 0,5 V'ta gösterir ve akım 14,5  $\mu\text{A}$ 'dır. Modifiye GCE, PAR tayini için daha iyi elektrokatalitik aktivite gösterir. Sonuç olarak, krom (III) Schiff baz komplekslerinin parasetamol tespiti için daha iyi bir elektrokatalitik sensör olarak kullanılabilceği sonucuna varılmıştır.

Arancibia ve arkadaşlarının (2019) ilk kez yeni bir karbon macun (CP), tek duvarlı karbon nanotüpler (SWCNT'ler) ve Nd<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (NdOX) kompozitini çalışmış. Bu çok yönlü kompozit (NdOX-SWCNT/CPE), parasetamolün (PCM) oksidasyonuna uygulanmış. Yeni oluşturulan yüzey, taramalı elektron mikroskopu (SEM), elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) ve döngüsel voltametri (CV) ile karakterize edildi. Sonuç olarak, kompozit için tek başına karbon macununa göre daha fazla iletkenlik ve daha yüksek bir yüzey alanı göstermiş. Öte yandan, anodik tepe potansiyelleri 0,67'den 0,57 V'ye kaymıştır. Tespit limitleri NdOXSWCNT/CPE ile 0,05 mmol/L ve SWCNT/CPE ile 0,50 mmol/L idi. Göreceli standart sapmalar (RSD'ler) %1,5'tir (n=7). Yöntemlerin doğruluğu ve etkileşimi, bilinen miktarlarda PCM, ürik asit, dopamin, askorbik asit, kafein, asetilsalisilik asit, tartrazin, gün batımı sarısı, cazibe kırmızısı, rutin, morin ve metal iyonları eklenmiş bir idrar kimyası kontrolü ile değerlendirilmiş. Son olarak, çocuklar için tabletler, tozlar ve şuruplar gibi farmasötik dozaj formlarında PCM'yi ölçmek için kompozitin yeniliği ve kullanılabilirliği değerlendirilmiştir.

### 3.1.8.Kapiller Elektroforez (CE)

Zhao ve arkadaşları (2006) yaptıkları çalışmada parasetamolün dolaylı tespiti, bir luminol–potasyum heksasiyanoferrat (III) K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]-CL reaksiyonu üzerindeki inhibitör etkisine dayanan bir kılcal elektroforez–kemilüminesans (CE-CL) tespit

sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiş. Parasetamol, ayırma kılcal damarına göç etmiş ve burada çalışan tamponda bulunan luminol ile karıştırılmış. Ayırma kılcal çıkışı, tespit penceresine ulaşmak için reaksiyon kılcalına yerleştirilmiş. Dört yönlü bir pleksiglas derzi ayırma kılcalını ve reaksiyon kılcalını yerinde tutmuş,  $K_3[Fe(CN)_6]$  çözeltisi bir tişört içine sifonlanmış ve algılama penceresine akmış. Ayırma kılcal çıkışının ucunda CL gözlenmiş. Yüksek ve sabit arka planı sağlamak için  $K_3[Fe(CN)_6]$  oksitlenmiş luminolün CL reaksiyonu kullanıldı. Parasetamol CL reaksiyonunu inhibe ettiğinden, ters çevrilmiş bir parasetamol zirvesi tespit edilebilir ve CL baskılama derecesi parasetamol konsantrasyonu ile orantılıdır. Maksimum CL sinyali, 0.5 mm luminol içeren 30 mM sodyum borat (pH 9.4) elektroforetik tamponu ve 100 mM NaOH çözeltisinde 0.8 mm  $K_3[Fe(CN)_6]$  oksitleyici çözeltisi ile gözlenmiş. En uygun koşullar altında, parasetamol için  $6.6 \times 10^{-10}$  ila  $6,6 \times 10^{-8}$  M ( $r=0.9999$ ) arasında doğrusal bir aralık ve  $5.6 \times 10^{-10}$  M (sinyal-gürültü oranı=3) tespit sınırı elde edilmiş.  $5.0 \times 10^{-9}$  M parasetamol ( $n=11$ ) için tepe alanının nispi standart sapması (RSD) % 2.9 idi. Yöntemin farmasötik ve biyolojik örneklerin analizi için uygulanabilirliği incelenmiştir.

Cunha ve arkadaşları (2017) yaptıkları çalışmada Parasetamol, farmasötik formülasyonlarda aşağıdaki bileşiklerden biriyle kombinasyon halinde yaygın olarak bulunan aktif bir bileşendir: kodein, orfenadrin, prometazin, skopolamin ve tramadol. Bu çalışmada, farmasötik numunelerdeki bu aktif bileşenlerin belirlenmesi için benzersiz bir analitik yöntem öneriyoruz. Yöntem, kapasitif olarak eşleşmiş temassız iletkenlik tespiti ile kılcal elektroforeze dayanmaktadır. Ayırma, 20 mmol/L  $\beta$ -alanin, 4 mmol/L sodyum klorür, 4  $\mu$ mol/L sodyum hidroksit (pH 9.6) içeren optimize edilmiş bir arka plan elektroliti kullanılarak kaynaşmış, bir silika kılcal damar (50 cm toplam uzunluk, 40 cm etkili uzunluk ve 50  $\mu$ m id) üzerinde gerçekleştirildi. Her numune tek bir çalışmada ( $\leq 2$  dakika) analiz edilebilir ve tespit sınırları skopolamin, tramadol, orfenadrin, prometazin, kodein ve parasetamol için sırasıyla 2.5, 0.62, 0.63, 2.5, 15 ve 1.6  $\mu$ mol/L idi. Çivili örnekler için geri kazanım değerleri % 94 ile % 104 arasındaydı.

### 3.1.9. Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR Spektroskopisi)

Rohani ve Hojjati (2006) yaptıkları çalışmada ATR-FTIR cihazı ve kemometri kullanılarak farklı solüsyonlardaki parasetamol konsantrasyonunun ölçülmesi için bir girişimde bulunmuştur. Parasetamol konsantrasyonu, su kütlesi yüzdesi ve sıcaklık için iki kalibrasyon modeli oluşturmak için kısmi en küçük kareler (PLS) algoritması uygulamış. Modeller ve hatalar doğrulama veri setleri ve teşhis araçları kullanılarak

analiz edilmiş. Modeller daha sonra 5-40 °C sıcaklık aralığında saf izopropanol, saf su ve izopropanol-su karışımlarında parasetamolün (PAR) çözünürlüğünü değerlendirmek için kullanılmış. İzopropanol-su karışımlarında parasetamolün çözünürlüğü su kütlelerinin yaklaşık %20'sinde maksimumu gösterir. Bazı seçilmiş veri noktaları için, FTIR tarafından ölçülen çözünürlük, gravimetrik yöntem kullanılarak ölçülen karşılık gelen çözünürlük ile iyi bir uyum içindedir ve saf izopropanol ve sudaki çözünürlük, literatürde bildirilen verilerle makul bir uyum içinde olduğu görülmüştür.

Carvalho Rocha ve arkadaşları (2011) yaptıkları çalışmada farmasötik formülasyonlarda parasetamol ve yardımcı maddelerin geliştirilmesi ve analizi için görüntüleme spektroskopisi ve kemometrik araçlar kullanmıştır. Çalışmada ilacın tablet yüzeyindeki dağılımını incelemek için konsantrasyon haritaları oluşturulmuş. Parasetamol ve yardımcı madde konsantrasyonlarını tahmin etmek için geliştirdikleri PLS regresyonuna dayalı çok değişkenli modeller geliştirilmiş. Modellerin yapımında %30.0–90.0 (w/w) konsantrasyon aralığında aktif prensibi içeren tablet formunda 31 numune kullanılmış ve validasyon numuneleri için %5'in altında hatalar tespit edilmiş. Son olarak, ilahtaki dağılımın incelenmesi, aktif madde ve yardımcı maddelerin konsantrasyonunun dağılım haritaları aracılığıyla gerçekleştirilmiş. Haritaların analizi, tabletlerdeki aktif ilke ve yardımcı maddeler arasındaki bütünlüğü göstermiştir. Bir bileşenin yüksek konsantrasyonuna sahip bölge, özellikle diğerinin yokluğuna veya düşük konsantrasyonuna sahip olmalıdır. Böylece parasetamol ilaç kalitesinin izlenmesi için alternatif bir yöntem sunulmuştur.

### **3.2. Tramadol hidroklorür Miktar Tayini İçin Uygulanan Analiz Yöntemleri**

#### **3.2.1.UV-spektrofotometri**

Kadıoğlu ve Küçük (2005) yaptığı çalışmada ampul dozaj formlarında tramadol hidroklorür tayini için yeni geliştirilen iki basit ve hassas yöntem tarif edilmiş ve doğrulanmıştır. Spektrofotometrik yöntem için ölçümler 200-400 nm aralığında UV-Vis Spektrofotometre kullanılarak yapılmış. Standart ve numunelerin çözeltileri metanol ve su ortamında hazırlanmış, tramadolün UV absorpsiyon spektrumları, her iki ortam için sırasıyla 275 ve 271 nm' de maksimum absorpsiyonlarla izlenmiş. Tramadolün standart kalibrasyon eğrileri, 10-100 µg ml<sup>-1</sup>'lik son seyreltme ile konsantrasyon aralığında absorbans ve konsantrasyonun çizilmesiyle oluşturulmuş. HPLC yöntemi için ters faz kromatografisi, %75 0.01 M fosfat tamponunda, %25 asetonitrilden oluşan izokratik bir mobil faza sahip bir Phenomenex Bondclone C18 kolonu kullanılarak yapıldı (pH 3).

Atık su 218 nm'de bir DAD detektörü üzerinde izlendi. Metanol ve su için 0.5–40 µg ml<sup>-1</sup> aralığında doğrusal yanıt ( $r > 0.99$ ) gözlenmiş ve altı farklı durumda çalıştırılmış. Yöntemler, farmasötik ampul formlarına tam olarak uygulandı, aynı zamanda iki farklı çözücü ortamdaki karşılaştırma için de uygulanarak doğrulanmış ve sağlam olduğu kanıtlanmıştır.

Hosny ve Ismaiel (2012) yaptıkları bir çalışmada insan idrarında tramadol analizi için basit, hassas ve hızlı bir yöntem geliştirmiş ve doğrulamıştır. Analit, tek bir sıvı-sıvı ekstraksiyonu kullanılarak bazlaştırılmış idrardan izole edilmiş ve daha sonra spektrofotometri ile analiz edilmiş. Kalibrasyon eğrileri 10-50 µg/mL aralığında doğrusaldı, kantitatiflik sınırı ve tespit sınırı hesaplanmış. Yöntem, seyreltmeden sonra tramadolü daha yüksek konsantrasyonlarda (250 µg/mL) belirlemek için de geçerliydi. Elde edilen yöntem, gün içi ve günler arası hassasiyeti sırasıyla %6,3 ve %9,5, doğruluğu ise sırasıyla  $\pm 9,9$  ve  $\pm 3,8$  olarak bulunmuş.

Sheibani & Haghpaizir (2014) yaptıkları çalışmada tramadol tayini için basit ve hızlı iyon hareketlilik spektrometresi (IMS) yöntemi tanımlamıştır. Fluence IMS'lerde olabilecek çalışma enstrümantal parametreleri araştırılmış ve optimize edilmiştir (sıcaklık; enjeksiyon: 220 ve IMS hücresi: 190 C, akış hızı; taşıyıcı:300 ve sürüklenme:600 mL/dakika, voltaj; korona: 2300 ve sürüklenme: 7000 V, darbe genişliği: 100 ms). Optimum koşullar altında, insan plazması, tükürük, serum ve idrar örneklerinde tramadol tayini için kalibrasyon eğrileri R<sup>2</sup> 0.998 ile iki büyüklük sırasına göre doğrusal olarak bulunmuş. Algılama sınırları ve quan titasyon sınırları sırasıyla 0.1 ile 0.3 ve 0.3 ile 1 ng/mL arasındaydı. Göreceli standart sapmalar %7,5 ile 8.8 arasındaydı. Geri kazanım sonuçları (%90'e 103.9), önerilen yöntemin farklı biyolojik numunelerde tramadol analizi için uygulanabileceğini göstermektedir.

Kumar ve arkadaşları (2020) yaptıkları çalışmada Tramadol HCL'nin ilaç dozaj formunda güvence altına alınması için multilineer regresyon tekniği ile hassas ve kesin bir UV spektroskopik tekniği geliştirmiştir. Bu teknik, seçilen 5 dalga boyunda absorbans ve konsantrasyon arasındaki ara bağlantıyı kullanarak doğrusal regresyon denklemlerine dayanır. Teknik 20-120 µg/ mL aralığında hassas, doğrusal ve doğrudur. Çok doğrusal regresyon yöntemi ile sayısal analiz kullanılmıştır. Tramadol HCL'nin dökme ilaç dozaj formunda değerlendirilmesi için elde edilen bilgiler, çok değişkenli analitik teknikten sonra üst düzey doğruluk ve hassasiyeti kanıtlamıştır. Daha sonra, bu

teknik karmaşık olmayan matematiksel içeriklerle son derece değerlidir ve diğer spektroskopik tekniklerden daha güvenilirdir, rutin analiz için kalibrasyon modellerinde bir uygulama önermektedir. Geliştirilen ve onaylanmış yöntem, Tramadol HCL'nin dökme ve farmasötik formülasyonda nicelleştirilmesi için yararlıdır. Doğrulama parametreleri ICH Kılavuzlarına göre idi.

Amani ve arkadaşları (2021) yaptıkları çalışmada Covid-19 öncesi ve sırasında Kisangani'de tramadol kalitesini değerlendirmek için basit ve pahalı olmayan bir UV-Vis spektroskopik yöntemi kullanmışlardır. Analitik kantitatif yöntem için, seçilen faktörlerin, yani çözünme ortamının pH'ı, küvet tipi ve dalga boyunun optimal seviyelerini ayarlamak için deneysel bir tasarım uygulanmıştır. 80-120<sup>-1</sup> µg·mL içindeki kapsül farmasötik formülasyonunu dikkate alarak konsantrasyon aralığında, altı Kisangani belediyesinin eczanelerinden ve hastanelerinden 89 tramadol örneğini analiz edilmiştir. pH absorbans üzerinde anlamlı bir etki gösterirken, kuvars küvet ve dalga boyu göstermedi. Tipik bir 100 µg·mL<sup>-1</sup> tramadol çözeltisi 272 nm'de 0.64'lük bir absorbans verdi. Doğrulama, %6'lık bir önyargı ile gözlemlenen bir matris etkisini vurguladı. 0,9372' lik bir düzeltme faktörü, doğruluk profilini iyileştirmeye izin verdi ve daha sonra tamamen %10 kabul sınırlarına dahil edilmiş. Kalite kontrol, 89 numunedan 25'inin üretim lisansı, DRC'deki kayıt durumu ve içerik açısından uyumlu olmadığını ortaya koydu. Bu çalışma, Kisangani'de analitik stratejinin güçlendirilmesinin bir ihtiyaç olduğunu göstermiştir.

### 3.2.2.Floresan Spektroskopi

Alves ve Poppi (2013) yaptıkları çalışmada, asetilsalisilik asit (ASA), parasetamol (asetaminofen) ve kafein karışımına dayanan bir farmasötik preparatta farklı ekşiyanlar kullanıldığında, katıların ön yüz floresan spektroskopisinde matris düzeltmesi için parçalı doğrudan standardizasyonun (PDS) uygulanmasını rapor etmişlerdir. Daha önceki çalışmalarda belirtildiği gibi, farklı ekşiyanların kullanımı ve oranları bir yer değiştirmeye, floresan yoğunluğunda veya bant profilinde bir değişikliğe neden olabilir. Bu önemli dezavantajın üstesinden gelmek için, tüm uyarma emisyonu floresan spektrumlarını model geliştirme için kullanılanlara dönüştürmek için bir standardizasyon stratejisi benimsenmiş. Sırasıyla 265 ila 405 nm ve 300 ila 480 nm arasında değişen uyarma ve emisyon dalga boylarının kullanıldığı bir uyarma-emisyon matrisi (EEM) kullanılmıştır. ASA, parasetamol ve kafein için sırasıyla 8.2 mg/g, 10.9 mg/g ve 2.7 mg/g RMSEP değerleri ile katlanmamış kısmi en küçük kareler (U-PLS)

kullanılarak ve üç analit için %5'ten az nispi hatalarla mükemmel sonuçlar elde edilmişti.

### 3.2.3.Sıvı Kromatografi-Tandem Kütle Spektrometrisi (LC–MS/MS)

Shrivastav ve arkadaşları (2009) yaptıkları çalışmada İnsan plazmasındaki tramadol ve aktif metaboliti O desmetiltramadolün eş zamanlı tayini için hızlı, hassas ve doğru bir sıvı kromatografi–tandem kütle spektrometresi (LC–MS/MS) tahlili, iç standart olarak propranolol (IS) kullanılarak geliştirmişler. Analitler ve IS, asetonitril kullanılarak protein çökeltisi yoluyla 200 L alikot insan plazmasından ekstrakte edildi. Kromatografik ayırma, izokratik koşullar altında bir Aquasil C18 (100 mm×2.1 mm, 5 m) kolonunda 2.0 dakikalık bir çalışma süresinde sağlandı. Analitlerin tespiti tandem kütle spektrometresi, pozitif iyon ve çoklu reaksiyon izleme (MRM) kazanım modunda çalışma ile yapıldı. Yöntem seçiciliği, hassasiyeti, doğrusallığı, hassasiyeti ve doğruluğu, geri kazanımı, matris etkisi, iyon sup basıncı/arttırımı, stabilitesi ve seyreltme bütünlüğü açısından tam olarak doğrulanmıştır. Tramadol için 1.0 ila 600.0 ng/mL ve O–desmetiltramadol için 0.5-300.0 ng/mL arasında doğrusal bir dinamik aralık oluşturulmuş. Yöntem, oruç koşulu altındaki 27 sağlıklı Hintli erkek denekte 200 mg tramadol tablet formülasyonunun biyoeşdeğerlik çalışmasına tam olarak uygulanmıştır.

Abdel-Megied ve Badr El-din (2019) yaptıkları çalışmada, alprazolam, diazepam, klorfeniramin maleat, difenilhidramin ve parasetamol gibi bazı şüpheli yanlış etiketlenmiş ilaçların varlığında tramadol hidroklorürün eşzamanlı tayini için oldukça hassas bir LC-MS/MS yöntemi geliştirilmiştir. Hazırlanan örnekler bir API 4000 kütle spektrometresi üzerinde bir Eclipse C kullanılarak analiz edilmiştir, sütun (3,5 µm, 4,6×100 mm). % 0.01 formik asit, asetonitril ve metanolün (60:20:20 v/v/v) oluşan mobil faz, 0.7 mL/dak akış hızında izokratik bir elüsyon ile pompalandı. Algılama, çoklu reaksiyon izleme modunda üçlü-dörtlü tandem kütle spektrometresinde gerçekleştirildi. Önerilen yöntem, Uluslararası Uyumlaştırma Konferansı (ICH) kılavuzlarına göre doğruluk, hassasiyet, doğrusallık, tespit sınırı ve nicelik sınırı açısından başarıyla doğrulanmıştır. Tramadol hidroklorür, alprazolam, diazepam, klorfeniramin maleat, difenilhidramin ve parasetamol için kalibrasyon lineer aralığı 5-500 ng mL<sup>-1</sup> idi. Sonuçlar, uygulanan yöntemin, gerçek tramadol tabletlerinin önceden ayrılmadan sahte olanlardan ayırt edilmesi için umut verici olduğunu ortaya koymuştur.

### 3.2.4. Gaz kromatografi-kütle spektrometrisi (GC-MS)

Leis ve arkadaşları (2004) yaptıkları çalışmada insan plazmasında tramadol tayini için bir gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC-MS) sunmuşlardır. İlacın bir N-etil analogunun sentezi ve insan plazmasındaki tramadolün kantitatif ölçümü için dahili bir standart olarak kullanımı tarif edilmiştir. Yöntem, plazma pH'ında ekstraksiyonu ve yetersiz doyunlaştırılmış ilacın, sırasıyla tramadol ve iç standardın tespiti için m/z 58 ve 73 kullanılarak gaz kromatografisi-elektron iyonizasyon kütle spektrometresi ile analizini içerir. Kalibrasyon eğrisi 5-640 ng/ml plazma aralığında doğrusaldır ( $r = 0.9999$ ). Yöntem yukarıda belirtilen kalibrasyon aralığında doğrulanmış. Plazma örneklerinde çözelti stabilitesi, tramadolün uzun ve kısa süreli stabilitesi, donma çözülme stabilitesi ile gün içi ve gün içi hassasiyet ve doğruluğa ilişkin veriler değerlendirilerek sunulmuştur. Yöntemin ilacın farmakokinetik profiline uygulanması gösterilmiştir.

Xu ve Liu (2017) insan idrarından metamfetamin (MA), pethidin (PD), ketamin (KT) ve tramadol (TD) ekstraksiyonu ve analizi için gaz kromatografisi-iyon tuzağı kütle spektrometresi (GC-MS) ile birlikte basit ve hızlı bir dispersif sıvı-sıvı mikroekstraksiyon (DLLME) tekniği geliştirmiştir. Bu çalışmada, ekstraksiyon çözücüsünün tipi ve hacmi, dağıtıcı çözücünün tipi ve hacmi, ekstraksiyon süresi ve pH değeri ve tuz etkisi gibi ekstraksiyon işlemini etkileyen farklı parametreler incelenmiş ve optimize edilmiştir. Optimize edilmiş koşullar altında, zenginleştirme faktörü 185 ile 226 arasında değişmekte ve ortalama geri kazanım %80.45 ile %95.55 arasında değişmektedir. Doğrusal aralık 10,0–1000,0 µg/L, algılama ve kantasyon sınırı sırasıyla 0,43–1,96 µg/L ve 1.44–6.53 µg/L aralığındaydı. Bağıl standart sapmalar %1.98–%3.90 aralığındaydı ( $n=7$ ). Elde edilen sonuçlar, DLLME'nin GC-MS ile kombine edilmesinin, insan idrarında MA, PD, KT ve TD tayini için hızlı ve basit bir yöntem olduğunu göstermektedir.

### 3.2.5. Elektrokemilüminesans ile Kapiler Elektroferez (CE-CL)

Li ve Ju (2006) yaptıkları çalışmada son kolon modu ile elektrokemilüminesans tespiti ile CE-CL standardına dayalı insan idrarında eş zamanlı izlenmesi için basit ve hassas bir yöntem geliştirdi. Optimize edilmiş koşullar altında, önerilen yöntem etamsilat, tramadol ve lidokain için sırasıyla  $5.0 \times 10^{-8}$  ile  $5.0 \times 10^{-5}$ ,  $1.0 \times 10^{-7}$  ile  $1.0 \times 10^{-4}$  ve  $1.0 \times 10^{-7}$  ile  $1.0 \times 10^{-4}$  M LODs  $8.0 \times 10^{-9}$  M (36 amol),  $1.6 \times 10^{-8}$  (72 amol) ve  $1.0 \times 10^{-8}$  M (45 amol) (S/N=3) lineer aralıklar vermiştir. Pratik uygulama için, numunenin iyonik

gücünün etkisini ortadan kaldırmak için pH 11'de etil asetat ile bir ekstraksiyon adımı gerçekleştirilmiştir. İnsan idrarında farklı seviyelerde etamsilat, tramadol ve lidokainin geri kazanımları %87 ile %95 arasındaydı. Bu yöntem, iki ilaçlı hastadan alınan klinik idrar örneklerinde etamsilat, tramadol ve lidokainin eşzamanlı tespiti için kullanıldı. Bu ilaçların çeşitli amaçlarla izlenmesi için bu yöntem, klinik ve biyokimyasal laboratuvarlarda değerliydi.

### **3.2.6. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrometresi (FT-IR) ve Fourier Dönüşümü Raman Spektroskopisi (FT-Raman)**

Arjunan ve arkadaşları (2014) yaptıkları çalışmada, O-desmetiltramadol, klinikte yaygın olarak kullanılan tramadolün ana metabolitlerinden biridir ve analjezik aktiviteye sahiptir. O-desmetil tramadol hidroklorürün FTIR ve FT-Raman spektrumları, sırasıyla  $4000-400\text{ cm}^{-1}$  ve  $4000-100\text{ cm}^{-1}$  bölgelerinde katı fazda kaydedilmiş. Gözlenen temeller, farklı normal titreşim modlarına atanır. Teorik çalışmalar, hidroklorür tuzu olarak yapılmıştır. Bileşiğin yapısı 6-31G ve cc-pVDZ baz setleri kullanılarak B3LYP yöntemi ile optimize edilmiştir. Optimize edilmiş bağ uzunluğu ve bağ açıları, X-ışını verileriyle ilişkilendirilir. Deneysel dalga sayıları, DFT yöntemleriyle belirlenen ölçeklenmiş titreşim frekansları ile karşılaştırıldı. IR ve Raman yoğunlukları, cc pVDZ ve 6-31G(d,p) temel setleri kullanılarak B3LYP yöntemi ile belirlenir. Elektrostatik potansiyel (elektron+çekirdek) dağılımını göstermek için molekülün toplam elektron yoğunluğu ve moleküler elektrostatik potansiyel yüzeyleri B3LYP/cc-pVDZ yöntemi kullanılarak oluşturulmuştur. HOMO ve LUMO enerjilerinin elektronik özellikleri ölçüldü. Molekül içi yük transferinin varlığını göstermek için O-desmetiltramadol hidroklorürün doğal bağ orbital analizi yapılmıştır. Molekülün H ve C NMR kimyasal kaymaları analiz edilmiştir.

Taghizade ve arkadaşları (2021) yaptıkları çalışmada, plazma, hastane atıkları ve nehirde siprofloksasin (CIP), tramadol (TRA) ve famotidinin (FA) eş zamanlı spektrofotometrik tayini için manyetik katı faz ekstraksiyonuna dayalı hassas, basit ve ucuz bir yöntem geliştirmiştir. Bu amaçla  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO-COOH}$  nanokompozit sentezlenmiş ve Fourier transform kızılötesi spektroskopisi (FT-IR) ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile karakterize edilmiştir. pH, sorbent miktarı, ekstraksiyon süresi, elüsyon solventi ve hacmi ve desorpsiyon süresi gibi parametrelerin ekstraksiyon verimliliği üzerindeki etkileri değerlendirildi ve optimize edilmiştir. Optimum ekstraksiyon koşulları altında: 50 mg  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO-COOH}$  nanokompozit, pH 5,

ekstraksiyon süresi 20 dak, 20 mL numune hacmi ve 2 mL metanol ile ayrıştırma: 4 dakikada amonyum (0,2 M), CIP için iyi doğrusallık (0.03–1.5 mg), TRA (0.05–3 mg) ve FA (0.05–3 mg) kabul edilebilir bir belirleme katsayısı ( $R^2 > 0.99$ ) ile elde edildi. Bu ilaçların absorpsiyon UV spektrumları pek örtüşmez; bu nedenle, eş zamanlı spektrofotometrik tayinleri için uygun kalibrasyon yöntemlerinin kullanılması yararlı bulunmuştur. Ön-konsantrasyondan sonra, UV spektrumunu 240-320 nm analiz etmek ve ilaçların optimum koşullar altında eş zamanlı tespiti için çok değişkenli bir kalibrasyon tekniği olarak kısmi en küçük kareler regresyonu (PLS) kullanılmıştır. Önerilen yöntemin sonuçları, CIP, TRA ve FA ile ilişkili karışımların tahmin setinin düşük ortalama kare farkı (RMSD) ve yüksek korelasyon katsayısını ( $R^2$ ) gösterdi. Geliştirilen yöntem aynı zamanda plazma, hastane atığı ve nehir suyundan oluşan çivili numunelerde üç ilacın eş zamanlı tayini için de uygulandı. PLS ile elde edilen geri kazanımlar %85-101 aralığında bulunmuştur.

### 3.2.7.Voltametri

Fakhari ve arkadaşları (2015) bu çalışmada, idrar örneklerinden model analit olarak tramadolün elektroanalizi için elektrokimyasal saptama ile birlikte elektromembran destekli katı faz mikro ekstraksiyonuna (EM-SPME) dayanan yeni bir analitik strateji sunmayı amaçlamaktadır. Bu amaçla, indirgenmiş grafen oksit (r-GO) spin kaplı kurşun kalem, elektrokimyasal analizde sadece SPME ve güçlendirilmiş elektromembran ekstraksiyon katodu (EME) için katı bir sorbent olarak değil, aynı zamanda çalışma elektrodu (kalem modifiye elektrot) olarak da kullanılmıştır. Ekstraksiyon verimliliğini etkileyen farklı değişkenlerin optimizasyonu için Box-Behnken tasarımı ve yanıt yüzeyi metodolojisi kullanılmıştır. Optimize edilmiş durumda, tramadolün tespit limiti  $0.0030 \mu\text{g mL}^{-1}$  olarak elde edildi. Yöntemin dinamik aralıkları 0.010 ila 0.50 ve 0.50 ila  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  aralığında elde edildi. Spme'yi EME ile birleştirme işlemi, idrar örneklerinde yöntemin tespit sınırını azaltır. Ek olarak, EM-SPME, asitlerin, karbonhidratların, anyonların ve ayrıca ölçüm sırasında düşük log P'yi baskılayan diğer polar bileşiklerin müdahale edici etkisini ortadan kaldırabilir.

Yunusoğlu ve arkadaşları (2020) yaptıkları çalışmada, modifikasyonsuz bir bor katkılı elmas (BDD) elektrodu kullanılarak asetaminofen (PAR) ve tramadol hidroklorürün (TRA) bireysel, seçici ve eşzamanlı nicelleştirilmesini açıklamaktadır. Döngüsel voltammetrik ölçümler, PAR ve TRA ikili karışımlarının profilinin, Britton-Robinson (BR) tampon pH 3.0'da yaklaşık +1.04V (PAR için) ve +1.61V (TRA için)

olmak üzere iki geri dönüşümsüz oksidasyon zirvesi ile kendini gösterdiğini ortaya koymuştur. TRA oksidasyon zirvesi, anyonik yüzey aktif madde, sodyum dodesil sülfat (SDS) varlığında önemli ölçüde iyileşirken, ACP sinyali değişmedi.  $8 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> içeren BR- Britton-Robinson- tamponu pH 3.0'da kare dalga sıyırma modu kullanılarak SDS, açık devre voltajı altında 30 s birikmesinden sonra, BDD elektrodu, PAR ve TRA'nın aynı anda 1.0-70 µg mL aralıklarında ölçülmesi için kullanılabilir. ( $6.6 \times 10^{-6}$ – $4.6 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>) ve 1,0–70 µg mL<sup>-1</sup>( $3.3 \times 10^{-6}$ – $2.3 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>), 0,11 µg/mL<sup>-1</sup> algılama sınırları ile ( $7.3 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup>) ve 0,13 µg mL<sup>-1</sup>( $4.3 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup>). Önerilen yaklaşımın pratik uygulanabilirliği, farmasötik dozaj formlarında PAR ve/veya TRA'nın bireysel ve eşzamanlı nicelleştirilmesi için test edilmiştir.

### **3.3. Tramadol Ve Parasetamol Kombinasyonlarının Eş Zamanlı Kantitatif Tayini İçin Uygulanan Analiz Yöntemleri**

#### **3.3.1. Ters Fazlı Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (RP-HPLC)**

Karunakaran ve arkadaşları (2012) yaptıkları çalışmada yüksek doz parasetamol (PAR) ve düşük doz domperidon (DM) ve tramadol HCL (TRA) içeren bir kombinasyon ilaç ürünü için RP-HPLC yöntemini gösteren bir stabilite geliştirdi. Analitler, 1.0 mL/dk akış hızında 70:25:5 (v/v) oranında %0.1v/v trifloroasetik asit: asetonitril: metanolden oluşan bir ters faz kolonu ve izokratik bir mobil faz ile iyi bir şekilde ayrıştırıldı. Atık su 272 nm'de izlendi. İlaç ürünleri asit, baz, peroksit, termal ve fotolitik bozunmanın gerilme koşullarına tabi tutuldu ve foto diyot dizi detektörü kullanılarak PAR, TRA ve DM'nin tepe homojenliği elde edildi. Bozunma ürünleri PAR, TRA ve DM tepe noktalarından iyi bir şekilde çözüldü, böylece yöntemin stabilitesini gösteren doğası gösterildi. Deney, PAR için 165-495 µg/mL, TRA için 18,75-56,25 µg/mL ve DM için 5-15 µg/ mL arasında doğrusaldı. Tablet yüksek ve düşük dozda ilaç içermesine rağmen, gün içi ve gün içi varyasyonlar < %2.0 idi. Önerilen yöntem ICH yönergelerine göre doğrulanmış ve stabilite ve homojenlik testlerinin yanı sıra farmasötik preparatlardaki kombine ilaçların kalite kontrolü için uygun olduğu kanıtlanmıştır.

Kamble ve Singh (2012) yaptıkları çalışmada ticari tıbbi tabletlerde parasetamol ve tramadolün kantitatif tayini için basit, izokratik, hızlı ve doğru ters fazlı yüksek performanslı sıvı kromatografi yöntemi geliştirmiştir. Kromatografik ayırma, ortofosforik asitli su pH 3.4 kullanılarak bir İnertsil C18 (250mmx4.6 mm, 5µm) kolon üzerinde sağlandı: mobil faz olarak metanol (60:40, v/v) ve 228 nm'de UV tespiti

yapıldı. Parasetamol ve tramadol arasındaki kromatografik çözünürlükler beşten fazla bulundu. Parasetamol ve tramadol için doğrusal aralık şunlardı. Her analit için  $\geq 0.999$  korelasyon katsayıları ile 20.8-39.0  $\mu\text{g/ml}$  ve 2.4-4.5  $\mu\text{g/ml}$  elde edildi. Tramadol ve parasetamol için retansiyon süresi sırasıyla 2.1 ve 3.9 dk olarak bulundu. Parasetamol ve tramadol stres koşullarına (hidroliz asit-baz oksidasyonu, fotoliz ve termal bozunma) tabi tutuldu ve gerilmiş numuneler yöntem kullanılarak analiz edildi. En büyük bozulma asitte, baz, termal, oksidasyon ve fotolizde minör olarak gözlemlendi. Zorla bozunma çalışmaları, yöntemin gücünü gösteren kararlılığı kanıtlamaktadır.

Pereira ve arkadaşları (2021) yaptıkları çalışmada; Parasetamol (PAR), kafein (CAF) ve tramadol hidroklorür (TRA) birçok klinik amaç için yaygın olarak kullanılan önemli ilaçlardır. İçeriklerinin belirlenmesi en büyük ilgi alanıdır. Bu doğrultuda farmasötik formülasyonlarda CAF ve TRA tayini için fotodiyot dizisi tespiti ile hızlı, basit ve hassas izokratik RP-HPLC yöntemi geliştirilmiştir. Bir floresan dedektör sistemi kullanılarak tramadol için geliştirilmiş bir hassas prosedür de geliştirilmiştir. AC<sub>18</sub> kolon ve metanol/fosfattan oluşan hareketli bir faz kullanıldı. LOD'lar, fotodiyot dizisi tespiti kullanılarak parasetamol, kafein ve tramadol hidroklorür için sırasıyla 0.2  $\mu\text{g/mL}$ , 0.1  $\mu\text{g/mL}$  ve 0.3  $\mu\text{g/mL}$  olarak bulundu. Alternatif olarak, tramadol için LOD, floresan dedektörü ile 0.1  $\mu\text{g/mL}$ 'ye düşürüldü. Diğer dikkate değer analitik rakamlar, aynı sıralı analitler (floresan dedektörü dahil) için 0.8–270  $\mu\text{g/mL}$ , 0.4–250  $\mu\text{g/mL}$  ve 1.0–300 (0.2–40)  $\mu\text{g/mL}$  doğrusal konsantrasyon aralıklarını içerir. Önerilen yöntem, tablet dozaj formlarında üç ilacın kantitatif tayini için başarıyla uygulanmıştır.

### 3.3.2. Ultra Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (UHPLC)

Liu ve arkadaşları (2004) çalışmalarında Tramadol tabletlerinde tramadol hidroklorür ve parasetamolün eş zamanlı tayini için HPLC yöntemini oluşturulmasını amaç edinmişlerdir. Yöntemde kromatografik kolon Diamasil C18 ve mobil faz asetonitril-0.005 mol/L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.01 mol/ L<sup>-1</sup> içeren) idi. Trietilamin, pH 3.2, V:V=1:4.3), algılama dalga boyu 215 nm, kolon sıcaklığı 35 °C, akış hızı: 1.0 mL/dak<sup>-1</sup> ve enjeksiyon 10  $\mu\text{L}$  idi. Sonuç olarak sırasıyla 9,92-49,60 mg L<sup>-1</sup> ve 85.34-426.70 mgL<sup>-1</sup> kütle konsantrasyonlarında tramadol hidroklorür ve parasetamol iyi bir doğrusal korelasyon gösterdi ve korelasyon katsayıları 'r' sırasıyla 0.9999 ve 0.9998 idi. Yöntem hassasiyeti rsd'leri ortalama geri kazanımlar % 0.7 ve %0.1 (n=6), ortalama geri kazanımlar %100.1 ve %100.0 ve yöntem rsd'leri sırasıyla % 0.1 ve %0.1 (n=9) idi.

Sonuç Tramadol hidroklorür ve para-asetamido aynı anda belirlenebilir Fenol içeriği birden fazla numune grubunun kalite kontrolünde kullanılabilir.

### 3.3.3. UV spektrofotometri

Toral ve arkadaşları (2008) yaptıkları çalışmada ikinci türev spektrofotometrik ile asetaminofen (A) ve tramadol (T) 'nin eş zamanlı tayini için hızlı bir yöntem geliştirilmiştir. Çalışmalarında A ve T'nin spektral davranışlarından çözücü olarak etanol seçilmiştir.  $\lambda$  değeri 210 nm için 8.000 yumuşatma faktörü ve 1.000.000 ölçek faktörü seçilmiştir çünkü bu koşullarda hatadan kaçınmak için sinyal/gürültü oranı tercih edilmiştir. Bu koşullar altında, farmasötik formülasyonlarda bulunan 17/1'lik bir molar ilişkide A/T'nin eşzamanlı olarak belirlenmesi de mümkündür. 285.7 nm'de ikinci türev değeri, A'nın sıfır geçiş noktasına karşılık gelen konsantrasyona bağlıdır. Öte yandan, T 296.0 ila 400.0 nm arasında absorbe etmez, bu nedenle grafik yöntemiyle bir belirleme için 308.0 nm seçildi. A ve T için tespit aralıkları sırasıyla  $8.1 \times 10^{-7}$ - $51 \times 10^{-5}$  mol/L ve  $3.4 \times 10^{-7}$ - $5.0 \times 10^{-5}$  mol/L idi ve daha önce ayrılmadan iyi hassasiyet ve doğrulukla belirlenebilir. Yardımcı maddeler Zafin® tableti kullanılarak interferentlerle ilgili bir çalışma yapıldı. Geri kazanımlar sırasıyla A ve T için  $\%97.4 \pm 2.0$  ve  $\%100.6 \pm 1.7$  idi. Her iki ilacı da içeren bu tablet, iyi bir doğruluk ve hassasiyet gösteren geliştirilen yöntemler kullanılarak analiz edildi.

Abdel-Latif ve El-Zinati (2015) Karışımlarda Parasetamol ve Tramadol hidroklorürün çözünürlüğü için birinci türev sıfır mertebeden geçiş spektrumlarının kullanımına ilişkin karşılaştırmalı bir çalışma, birinci türev yönteminin her iki bileşiğin çözülmesinde ve nicelleştirilmesinde başarısını gösteren elde edilmiştir. İkinci türev yerine birinci türevin kullanılması sinyal-gürültü oranının artmasına neden olur. Hazırlanan karışımların absorpsiyon spektrumları 200-500 nm aralığında tarandı. Lineer konsantrasyon aralıkları sırasıyla parasetamol ve Tramadol hidroklorür için 25-112 ve 6-48  $\mu\text{g mL}^{-1}$  idi. Yöntem, iyi seçiciliğe, yüksek hassasiyete ve aşırı düşük bağıl hataya sahip karışımlardaki her iki bileşiğin konsantrasyonlarını tahmin etmek için başarıyla kullanılmıştır. İstatistiksel karşılaştırma  $\%95$  güven düzeyinde t-testi kullanılarak yapıldı. Birinci türev yöntemi ile elde edilen sonuçlar ile her iki bileşik için kabul edilen değerler arasında anlamlı istatistiksel fark yoktu. Ayrıca, yüzde hataları çok düşüktü, bu da çalışmamızın hem hassasiyet hem de doğruluk açısından avantajlarına katkıda bulunuyor.

### 3.3.4. Ultra-Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (UHPLC)

Gouda ve arkadaşları (2011) yaptıkları çalışmada steroidal olmayan anti-enflamatuar ilaçlar (NSAID'ler), insan ve veteriner hekimlikte en sık kullanılan gruptur, çünkü ateş ve hafif ağrı tedavisi için reçetesiz temin edilebilirler. Bu ilaçların klinik ve farmasötik analizleri, kalite kontrol ve farmakodinamik ve farmakokinetik çalışmalar için etkili analitik prosedürler gerektirir. Çeşitli analitik ve farmasötik kimya ile ilgili jour mekanik yayımlanan literatürün kapsamlı bir araştırma yaptı ve geliştirdi ve-steroid anti-enflamatuar, coxibs, arylalkanoic asitleri, 2-arylpropi herhangi bir cinsel asitleri (profens) bazı sivil belirlenmesi için kullanılan analitik yöntemleri ve N-toplu uyuşturucu (fenamic asitler) arylanthranilic asitler, formülasyonlar ve biyolojik sıvılar gözden geçirilmiştir. Bu gözden geçirme, 1985'ten 2010'a kadar olan süreyi kapsar. UV ve türev olmak üzere 145 spektrofotometrik yöntem; metal kompleksleşmesi, redoks reaksiyonları, iyon çifti oluşumu, yük transfer kompleksleşmesi ve çeşitli; akış enjeksiyonu spektrofotometrisi ve spektroflorometrik yöntemlerin eşleştirilmesine dayanan görünür yöntemlerdi.

### 3.3.5. Normal Fazlı Sıvı Kromatografi-Tandem Kütle Spektrometrisi (LC-MS/MS)

Abdel-Megied ve El-din (2019) yaptıkları çalışmada, alprazolam, diazepam, klorfeniramin maleat, difenilhidramin ve parasetamol gibi yanlış etiketlenmiş bazı ilaçların varlığında tramadol hidroklorürün eş zamanlı olarak belirlenmesi için oldukça hassas bir LC-MS / MS yöntemi geliştirilmiştir. Önceden hazırlanmış numuneler, bir Eclipse C18 sütunu (3.5  $\mu\text{m}$ , 4.6 $\times$ 100 mm) kullanılarak bir API 4000 kütle spektrometresi üzerinde analiz edildi. %0.01 formik asit, asetonitril ve metanolden (60:20:20 v/v/v) oluşan mobil faz, 0.7 mL/dk<sup>-1</sup> akış hızında izokratik bir elüsyon ile pompalandı. Tespit, çoklu reaksiyon izleme modunda üçlü dörtlü ple tandem kütle spektrometresinde sağlandı. Önerilen yöntem, doğruluk, kesinlik, doğrusalık, tespit sınırı ve kantitatif sınır ile ilgili Uluslararası Har Monizasyon Konferansı yönergelerine göre başarıyla doğrulanmıştır. Tramadol hidroklorür, alprazolam, diazepam, klorfeniramin maleat, difenilhidramin ve parasetamol için kalibrasyon doğrusal aralığı 5-500 ng mL<sup>-1</sup> idi. Sonuç olarak; uygulanan yöntemin, orijinal tramadol tabletlerinin önceden ayrılmadan sahte olanlardan farklılaştırılması için umut verici olduğunu ortaya koydu.

Zhu ve arkadaşları (2007) yaptıkları çalışmada bu çalışma, yüksek performanslı bir sıvı kromatografisi-elektrosprey iyonizasyonu-kütle sunar iç standart olarak fenasetin kullanılarak insan plazmasında tramadol ve asetaminofenin eş zamanlı tayini için spektrometrik (LC-ESI-MS) yöntem. Doymuş sodyum bikarbonat ile alkalizasyondan sonra, her iki bileşik de insan plazmasından etil asetat ve HPLC ile Hanbon likrosfer CN kolonu üzerinde%0.5 formik asit-metanol (40:60, v/v) içeren mobil fazlı 10 mM amonyum asetat tamponu ile 1 mL dk akış hızında ayrıldı) 1 Analitler, tek dört kutuplu kütle spektrometresinde elektrosprey iyonizasyonu kullanılarak belirlendi.LC-ESI-MS, tramadol için  $[M+H]^+$  m/z 264.3,  $[M+H]^+$  m/z'de hedef iyonlar kullanılarak pozitif seçilmiş iyon izleme (SIM) modunda gerçekleştirildi asetaminofen için 152,2 ve fenasetin için  $[M+H]^+$  m/z 180,2. Kalibrasyon eğrileri tramadol için 5-600 ng mL) 1 ve asetamino fen için 0.03-16 lg mL) 1 aralığında doğrusaldı. Çalışmalar arası nispi standart sapmalar tramadol için %14.4 ve asetaminofen için %12.3'ten azdı. Çalışma içi göreceli standart sapmalar tramadol için %9.3 ve asetaminofen için %7.9'dan azdı. Tramadol ve asetaminofen için ortalama plazma ekstraksiyon geri kazanımı %82.7-85.9 ve % 83.6-85.3 aralığındaydı. Yöntem, sağlıklı Çinli gönüllülerde yeni bir tramadol/asetaminofen tablet formülasyonunun farmakokinetiğini incelemek için uygulandı.

### 3.3.6. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrometresi (FTIR)

Foroughi ve arkadaşları (2019) yaptıkları çalışmada CUO nanoleaves ( $La^{3+}$  - CuO fern benzeri nanoleaves) gibi lantan katkılı eğrelti otunu sentezlemek için yenilikçi ve usta tek aşamalı bir yaklaşım oluşturmuştur. Eğreltiotu benzeri  $La^{3+}$  -CuO nanoleavlarının morfolojisi ve yapısı FT-IR, EDX, SEM, XPS ve TEM teknikleri kullanılarak karakterize edilir.  $La^{3+}$ -CuO/MWCNTs nanokompozitleri modifiye camsı karbon (GC) elektrodunu imal etmek için MWCNTs/GC üzerindeki damla döküm eğrelti benzeri  $La^{3+}$ -CuO nano yaprak süspansiyonu kullanılmış. Tramadolün elektrokimyasal davranışsal değerlendirmesi için diferansiyel puls volüm tammetrik analizi (DPV) ve siklik voltametri (CV) uygulanmış ve MWCNTs/GC,  $La^{3+}$  - CuO/MWCNTs/GC ve çıplak GC üzerindeki oksidasyon performansı karşılaştırıldı. Elde edilen sonuçlar, eğreltiotu benzeri  $La^{3+}$ -CuO nanoleavlarının ve çok duvarlı karbon nanotüplerin amal gamasyonunun, sensör hassasiyetinde önemli bir iyileşme sağlayacağını göstermiştir. Kantitatif tramadol saptamasını elde etmek için 0.5-900.0  $\mu$ M doğrusal aralıkta 0,014  $\mu$ m'lik bir sınır saptaması belirlenmiştir. Dahası, bu

sensörün aynı anda tramadol ve asetaminofeni belirlemek için elverişli olduğu kanıtlanmıştır. Ek olarak, tramadol ve asetaminofen klinik tahlili için faydalı olacak fabrika sensörü tarafından büyük hassasiyet ve stabilite gösterilmiştir.

### 3.3.7. UV spektrofotometrisi ve UHPLC

Glavanović ve arkadaşları (2016) tramadol ve parasetamol karışımı tabletlerde kemometrik yöntemleri çalışmışlardır. Parasetamol-tramadol tabletlerinde parasetamol ve tramadolün eş zamanlı kantitatif tayini için UV spektrofotometrik yöntemler geliştirilmiştir. Elde edilen spektrofotometrik veriler, tabletlerdeki aktif madde içeriğini belirlemek için kısmi en küçük kareler (PLS) ve PLS (GA-PLS) yöntemleriyle birleştirilmiş genetik algoritma vasıtasıyla işlenmiştir. Spektroskopik verilerin kemometrik işlenmesiyle elde edilen sonuçlar, valide edilmiş ultra yüksek performanslı sıvı kromatografik (UHPLC) yöntemiyle elde edilenlerle istatistiksel olarak karşılaştırılmış. Geliştirilen kemometrik modeller tarafından elde edilen verilerin doğruluğu ve kesinliği, ilaçların sentetik karışımının analiz edilmesiyle ve geri kazanımın yanı sıra bağıl standart hatanın (RSE) hesaplanmasıyla doğrulandı. PLS ve GA-PLS algoritmaları kullanılarak belirlenen parasetamol miktarları ile UHPLC analizi ile elde edilenler arasında istatistiksel olarak iyi bir uyum bulunurken, tramadol için GA-PLS sonuçlarının PLS'ye kıyasla daha güvenilir olduğu kanıtlanmıştır. En basit ve en doğru ve kesin modeller, parasetamol için PLS yöntemi (ortalama geri kazanım %99,5, RSE %0,89) ve tramadol için GA-PLS yöntemi (ortalama geri kazanım %99,4, RSE %1,69) kullanılarak oluşturulmuştur.

Srinivasan ve arkadaşları (2007) yaptıkları bir çalışmada kombine tablet hazırlığında aseklofenak ve tramadol kombinasyonunun parasetamol ile eşzamanlı olarak belirlenmesi için türev spektrofotometrik bir prosedür geliştirmiştir. İlaçların tablet özleri damıtılmış suda hazırlanmıştır. Sıfır geçiş noktası tekniği ve kompanzasyon tekniği, kombine formülasyonlardaki her ilacın miktarını tahmin etmek için kullanılmış ve karşılaştırılmıştır. Kalibrasyon grafikleri, parasetamol ile kombinasyon halinde her ilacın 24 mg/ml'ye kadar sıfır kesişimi ile doğrusaldır ( $r=0.9999$ ).  $p=0.05$  anlamlılık düzeyindeki saptama limitleri sırasıyla 0.5 mg/ml aseklofenak, tramadol ve parasetamol olarak hesaplandı.

Belal ve arkadaşları (2009) UV algılamalı (HPLC-UV) yüksek performanslı sıvı kromatografisi ve kütle spektrometresi (GC-MS) teknikleriyle gaz kromatografisi kullanılarak ikili bir karışımda parasetamol (PAR) ve tramadol hidroklorürün (TRA)

eşzamanlı tayini için iki basit, hızlı ve seçici analitik prosedür geliştirmiştir. HPLC, fosfat tamponu pH 6.3 ve asetonitrilden 90:10, v/v oluşan bir mobil faz kullanarak iki bileşiği bir Hypurity Advance kolonunda çözdü. PAR ve TRA, 220 nm'de UV emilimleri ile tespit edildi. GC-MS, sıcaklık programlaması ile %100 dimetilpolisiloksan (Rtx-1) sütunu kullanılarak iki bileşiğin ayrılmasını içeriyordu. PAR'ın kütle spektrumu 151'de [M] ve  $m/z$  109'da bir baz tepe noktası ile karakterize edilirken, TRA kütle spektrumu 263'te [M] ve  $m/z$  58'de bir baz tepe noktası ile karakterize edildi. Her iki yöntemde de analitlerin nicelleştirilmesi, tepe alanlarının ölçülmesine dayanıyordu. Doğrusallık, aralıklar, hassasiyet, doğruluk, algılama ve nicelme limitleri dahil olmak üzere önerilen yöntemlerin güvenilirliği ve analitik performansı istatistiksel olarak doğrulanmıştır. Kalibrasyon eğrileri, HPLC yöntemi kullanılarak hem PAR hem de TRA için 10-400  $\mu\text{g/mL}$  aralığında ve GC-MS yöntemi kullanılarak PAR ve TRA için sırasıyla 75-500 ve 25-350  $\mu\text{g/mL}$  aralıklarında lineerdi. Önerilen yöntemler, laboratuvarında hazırlanan karışımlarda ve ticari olarak temin edilebilen tablet formülasyonunda iki bileşiğin belirlenmesi için başarıyla uygulanmıştır. Yaygın farmasötik adjuvanlardan girişim pikleri gözlenmedi. Sonuçlar, türev spektrofotometrik yöntemle elde edilenlerle olumlu bir şekilde karşılaştırılmış.

### 3.3.8. Ters Fazlı Sıvı Kromatografik Yöntem (HPLC)

Chandra ve arkadaşları (2012) yaptıkları çalışmada farmasötik dozaj formunda aseklofenak (ACF), parasetamol (PAR) ve tramadol hidroklorürün (TRA) eşzamanlı tahmini için basit, hassas ve doğru bir ters fazlı sıvı kromatografik yöntem geliştirilmiştir. Kromatografik ayırma, ortam sıcaklığında bir HiQ-Sil™ HS C18 sütununda (250×4,6 mm i.d., 5  $\mu\text{m}$  partikül boyutu), kromatek analitik kolonunda elde edildi. Mobil faz 40: 60 (v/v); fosfat tamponu (pH 6.0): metanol. Akış hızı 1.0  $\text{mL}^{-1}$  min olarak ayarlandı ve UV tespiti 270 nm'de gerçekleştirildi. ACF, PAR ve TRA için tutma süresi (tR) sırasıyla  $0.02 \pm 14.567$ ,  $0.01 \pm 3.133$  ve  $0.02$  dakika  $\pm 7.858$  olarak bulunmuştur. Önerilen yöntemin doğrulanması doğrusallık, hassasiyet, sağlamlık, algılama sınırı, nicelik sınırı, özgüllük, doğruluk ve sistem uygunluğu için gerçekleştirilmiştir. Doğrusal dinamik aralıklar ACF için 40–160  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , PAR için 130–520  $\mu\text{g mL}^{-1}$  ve TRA için 15–60  $\mu\text{g/mL}^{-1}$  idi. Geliştirilen yöntem, farmasötik dozaj formundaki adlandırılmış ilaçların rutin kalite kontrol analizleri için kullanılabilir.

### 3.3.9. Elektrokimya

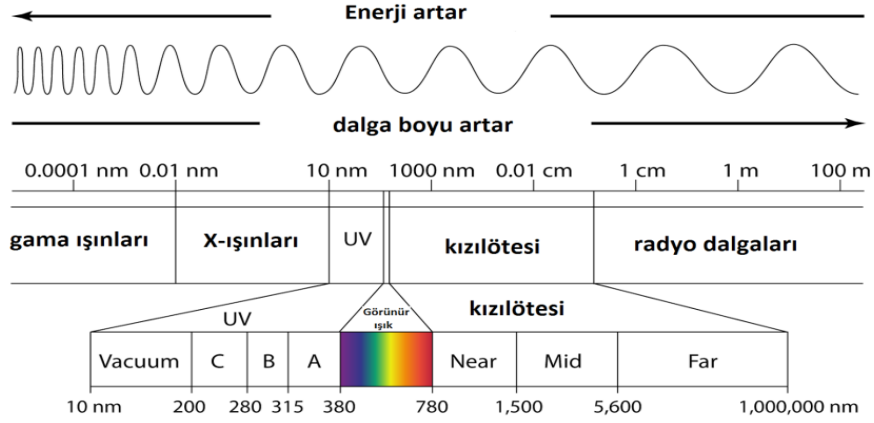
Kozak ve arkadaşları (2021) yaptıkları çalışmada kombine ilaçlarda parasetamol (PAR), diklofenak (DF) ve tramadolün (TRA) eş zamanlı tayini için sodyum dodesil sülfat (aSPCE/SDS) ile modifiye edilmiş elektrokimyasal olarak aktifleştirilmiş ekran baskılı bir karbon elektrot önermiştir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve SDS yüzey modifikasyonu ile elektrokimyasal aktivasyondan sonra elektrotun yüzey morfolojisi ve elektrokimyasal davranışındaki değişiklikler, taramalı elektron mikroskobu (SEM), döngüsel voltametri (CV) ve elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) ile incelenmiştir. pH ve tampon konsantrasyonu, SDS konsantrasyonu ve teknik parametreler gibi aSPCE/SDS'nin tepkileri üzerindeki çeşitli parametrelerin etkisi araştırıldı. Optimize edilmiş koşullar (-0.4 V'luk Eacc., 120 s'lik tacc., 150 mV'luk ΔEA, 250 mV'luk s<sup>-1</sup>'lik v ve 10 ms'lik tm) kullanılarak, aSPCE/SDS, konsantrasyon aralıklarında iyi bir doğrusal tepki gösterdi. PAR için 5,0×10<sup>-8</sup>–2,0 × 10<sup>-5</sup>, DF için 1,0×10<sup>-9</sup>–2,0×10<sup>-7</sup> ve 1,0×10<sup>-8</sup>–2,0×10<sup>-7</sup> ve 2,0×10<sup>-7</sup>–2,0×TRA için 10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup>. PAR, DF ve TRA 'nın eş zamanlı tespiti sırasında elde edilen saptama limitleri sırasıyla 1.49 ×10<sup>-8</sup> mol L<sup>-1</sup>, 2.10×10<sup>-10</sup> mol L<sup>-1</sup> ve 1.71×10<sup>-9</sup> mol L<sup>-1</sup>'dir. aSPCE/SDS'nin seçiciliği, çevresel ve biyolojik numunelerde yaygın olarak bulunan bazı inorganik ve organik maddelerin PA, DF ve TRA yanıtları üzerindeki etkisinin incelenmesiyle değerlendirildi. Son olarak, aSPCE/SDS kullanan diferansiyel puls adsorptif sıyırma voltametik (DPAdSV) prosedürü, farmasötiklerin yanı sıra nehir suyu ve serum numunelerinde PAR, DF ve TRA' nın belirlenmesi için başarıyla uygulandı.

## 4. MATERYAL VE YÖNTEM

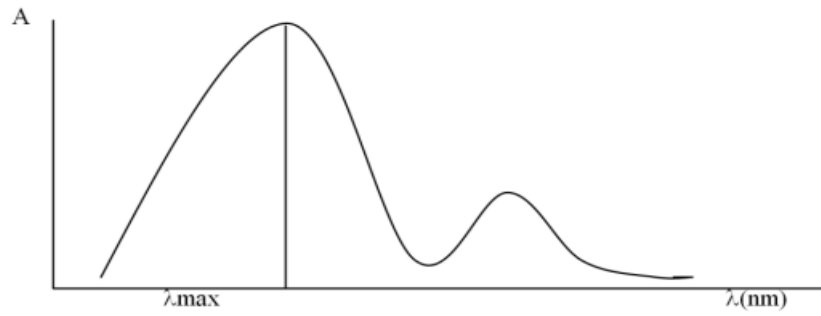
### 4.1. Spektrofotometri

Spektroskopi ışık veya radyasyonun maddeler tarafından emilmesi ve yayılması şeklindeki ışık-madde etkileşimlerinin ölçülmesi ve incelenerek yorumlanmasıdır. En geniş tanımıyla spektroskopi, yüklü ve yüksüz taneciklerle maddenin etkileşmesi sonucu meydana gelen olayların tümüdür (Merey, 2015). Elektromanyetik radyasyon ve madde arasındaki etkileşimden kaynaklanan elektromanyetik spektrumları, radyasyonun dalga boyunun veya frekansının bir fonksiyonu olarak ölçen ve yorumlayan genel çalışma alanıdır. Spektrofotometri, bir malzemenin dalga boyunun bir fonksiyonu olarak yansıma veya iletim özelliklerinin nicel ölçümü ile ilgili elektromanyetik spektroskopinin bir dalıdır (Allen, 2009). Spektro spektrumdan, foto ise ışıktan gelmektedir. Spektrofotometri, farklı dalga boylarındaki bir ışık demetinin yoğunluğunu ölçebilen spektrofotometreler olarak bilinen fotometreleri kullanır. Analiz edilen örnek üzerine ışın demetini filtreler kullanarak ayıran ve gönderen aletler fotometre olarak adlandırılırken, yarıklar ya da prizmalar aracılığı ile bu seçiciliği yapan aletler ise spektrofotometre olarak adlandırılır. Kimyasal reaksiyon denge noktasında ilgili reaktanların ve ürün konsantrasyonlarını belirlemek için, çözeltinin ışık geçirgenliği spektrofotometri kullanılarak test edilebilir.

Atom, molekül veya iyonların, bir enerji düzeyinden diğerine geçişleri sırasında absorplanan, saçılan veya yayılan elektromanyetik ışımının ölçülmesini ve yorumlanmasını inceleyen bilim dalına spektrofotometri denir. Bir maddenin yapısını belirleme ve maddeyi karakterize etme amacı ile elektromanyetik dalganın madde ile etkileşimini absorpsiyon, emisyon, saçılma gibi olayları inceleyen bilim dalı spektroskopidir (Yavaş, 2019). Dalga boyu, frekans veya enerjinin bir fonksiyonu olarak elektromanyetik ışımının şiddeti spektrum olarak adlandırılır. Spektrofotometreler içinde bulundurdukları ışık kaynağı ile numuneye bir ışık gönderir ve yansıyan ışığa ait 380-740 nm arasında rengin yansıma enerji grafiğini ölçer. Frekans değerleri farklı olan ışınım, bu değerler dikkate alınarak sıralandığında elektromanyetik spektrum elde edilir (şekil 4.1.1). Absorbsiyon spektrumuna örnek şekil 4.1.2 deki gibidir.



Şekil 4.1.1. Elektromanyetik spektrum



Şekil 4.1.2 Absorbsiyon spektrumu

Çözelti içindeki madde miktarını çözülden geçen veya çözeltinin tuttuğu ışın miktarından faydalanarak ölçme işlemine fotometri denir. UV-Görünür bölgedeki her geçişe karşı farklı bir dalga boyu absorplanır. Absorplanan ışığın miktarı absorbans olarak ölçülür. Absorbans molekülün yapısına, ışığın dalga boyuna, ışığın çözelti içinde aldığı yolun uzunluğuna ve çözelti derişimine bağlıdır. Bilinen artan derişimlerdeki çözeltilerin absorbansları ölçülüp, derişim absorbans grafiği çizerek bir kalibrasyon doğrusu elde edilir. Bilinmeyen derişimdeki maddenin aynı şartlarda absorbansı okunarak kalibrasyon doğrusu yardımıyla derişimi bulunabilir (Temel, 2019). Dalga boyu, metre, cm, mm, mikron ( $\mu$ ), nanometre (nm), angström ( $\text{Å}$ ) gibi birimlerle ifade edilir. Bunların arasındaki ilişki;  $1 \text{ cm} = 10^4 \mu = 10^7 \text{ nm} = 10^8 \text{ Å}$  ( $1 \mu = 1000 \text{ m}\mu$ ), ( $1 \text{ nm} = 1 \text{ m}\mu = 10 \text{ Å}$ ) şeklindedir. Değişik ışınım tipleri frekanslarına göre enerji düzeylerine ait spektral bölge ve dalga boyu uzunlukları Tablo 4.1.1 de verildiği gibidir.

**Tablo 4.1.1.** Elektromanyetik spektral bölgeleri

<b>Spektral Bölge</b>	<b>Dalga Boyu</b>	<b>Uyarılma Sonucu</b>
Gama ışınları	0.0001-0.01 nm	Çekirdek reaksiyonları
X ışınları	0.01-10 nm	İç elektronların transisyonu
Uzak UV	10-200 nm	Atom veya moleküllerin iyonizasyonu
Yakın UV	200-380 nm	Dış yörünge elektronların transisyonu
Visibl	380-780 nm	Dış yörünge elektronların transisyonu
Yakın IR	0.78-1.5 $\mu$	Moleküler vibrasyon ve rotasyon
IR	1.5-25 $\mu$	Moleküler vibrasyon ve rotasyon
Uzak IR	25 $\mu$ -1 mm	Moleküler rotasyon
Mikro dalgalar	0.1-100 cm	Moleküler rotasyon
Radyo dalgaları	100 cm-10-15km	Nükleer manyetik rezonans

#### 4.2.Lambert-Beer Eşitliği

Işık ile madde arasındaki etkileşmeden yararlanılarak gerçekleştirilen analiz yöntemleri, az analiz materyali gerektirmesi, seçiliği ve doğruluk derecesinin yüksek oluşu nedeniyle analitik amaçlar için sıkça kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden biri olan spektrofotometri ışık enerjisinin absorpsiyonuna dayalı bir yöntemdir. Işık ise elektromanyetik bir radyasyondur, frekansı ( $\nu$ ) ve dalga boyu( $\lambda$ ) ile karakterize edilir. Enerji ise;  $E=h.\nu$  veya  $E=h.c/\lambda$  ( $h$ =plank sabiti: $6,62 \times 10^{-27}$  erg.sn ve  $c=3 \times 10^{10}$  cm/sn) formülleriyle ifade edilir. Bu eşitliklere göre ışığın dalga boyu büyüdükçe enerjisinin azalmasına karşılık dalga boyu küçüldükçe enerjisi artar (Dinç ve Üstündağ, 2009). Bir çözeltilen monokromatik ışın geçirildiğinde çözeltinin absorpsiyonu, çözelti içindeki soğurucu maddenin konsantrasyonuna ve optik yoldaki çözelti kalınlığına bağlıdır (Erek, 2020).

Maddenin ışığı soğurma (absorblama) derecesini ölçmek ve bundan yararlanarak derişimi saptamak için, soğurma ile derişim arasındaki ilişki bilinmelidir. Saydam bir çözeltiliye gönderilen ışın demetinin şiddetinin azalması, gönderilen ışın demetinin şiddeti kadar, içinden geçtiği çözeltideki moleküllerin konsantrasyonu ve gönderilen ışın demetinin geçtiği yolun uzaklığı ile de ilgili ve doğru orantılıdır. Işığın absorpsiyonunun üzerine düştüğü atom, iyon veya molekülün konsantrasyonu ile orantılı olarak ilk teori Lambert ve Beer tarafından ortaya konulmuştur (Swinehart, 1962). Beer' e göre aynı derinlikte bir çözeltilen geçen ve çözelti tarafından absorbe edilen monokromatik bir ışın demetinin şiddeti çözeltinin konsantrasyonu ile logaritmik, üstel veya geometrik olarak azalır. Lambert'e göre, bir çözeltilen geçen monokromatik bir ışın demetinin şiddeti, çözelti içinde aldığı yolla logaritmik, üstel veya geometrik

olarak azalır. Lambert-Beer yasası, ışığın bir madde içindeki transmisyonu olan  $T$  ile soğrulma katsayısı  $\alpha$  ve ışığın madde içinde gittiği uzaklık  $\ell$  'nin çarpımı arasında logaritmik bir ilişki olduğunu ifade eder. (Üstündağ, 2003). Monokromatik ışığın madde tarafından absorpsiyonunu ölçer. Monokromatik (tek dalga boylu ışımaya) ve  $I_0$  şiddetindeki bir ışık demeti, kalınlığı  $\ell$  (cm) olan bir tüpte bulunan çözeltideki herhangi bir molekül tarafından absorblandığında şiddeti azalır ve tüpü  $I$  şiddetinde terk eder (Aktaş ve Yavaş, 2019).

Yukarıda söylenenlere göre iki kanunu birleştirirsek şöyle ifade edilebilir: % Geçirgenlik  $T=I/I_0$  ve  $I=I_0 \cdot 10^{-\epsilon c \ell}$  denklemleri elde edilir.

**Absorbans**, gelen ışının şiddetindeki azalmadır ve Lambert Beer teoremi ile hesaplanır.  $A\lambda = -\log_{10}(I/I_0) = \log(I_0/I)$  denklemi ile elde edilir. Absorbans ile konsantrasyon arasındaki ilişkiyi ise  $A = \epsilon \cdot \ell \cdot c$  ifade eder ve bu denklemden konsantrasyon hesaplanır.

Burada;

$I_0$  = Gelen ışığın şiddeti

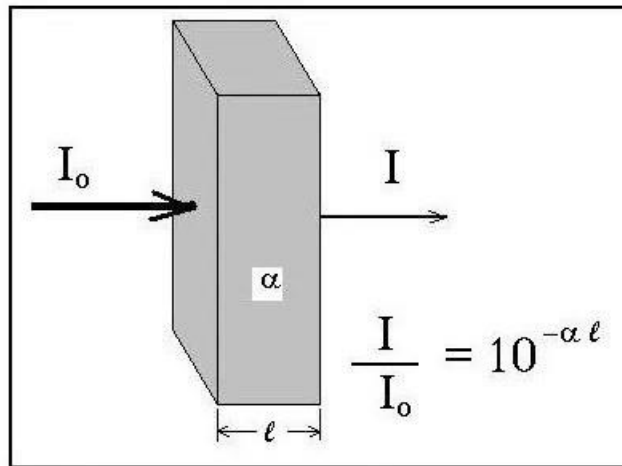
$I$  = Örnekten çıkan ışığın şiddeti

$\ell$  = Işığın örnek içinden geçtiği yolun uzunluğu (cm)

$c$  = Konsantrasyon (g/L)

$\epsilon$  = Konsantrasyon mol/litre ise absorpsiyon katsayısı epsilon ile gösterilir ve molar absorptivite olarak adlandırılır.

$A$  = Absorbans 'tır (Mäntelev ve Deniz, 2017).

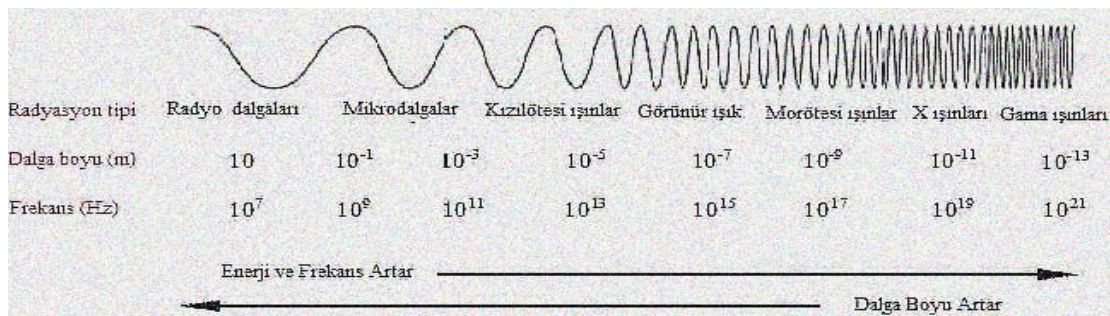


**Şekil 4.2.1.** Numune üzerine gönderilen ( $I_0$ ) ve çıkan ( $I$ ) ışığın şiddeti ( $\ell$ =ışığın numune içinde aldığı yol)

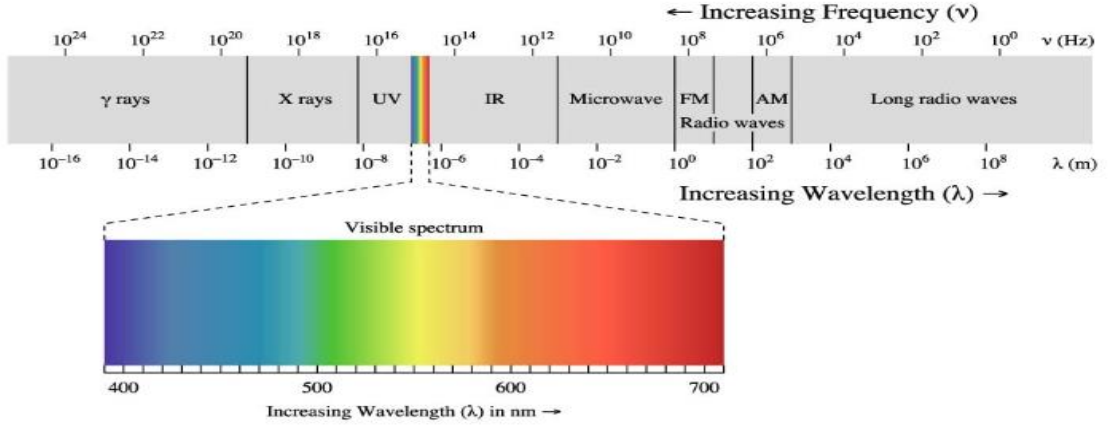
### 4.3. UV ve Görünür Alan (Visble) Spektrofotometrisi

Bir örnekteki atom, molekül veya iyonların bir enerji düzeyinden diğere geçişleri sırasında absorplanan veya yayılan elektromanyetik ışımın ölçülmesi ve yorumlanmasına “spektroskopi” denir. Atom, molekül veya iyonun elektromanyetik ışıma ile etkileşimi sonucu dönme, titreşim ve elektronik enerji seviyelerinde değişiklikler spektroskopinin temelini oluşturur (Hernández ve ark., 2018). Pratikte bütün bu dalga boylarında ışınım verecek ve bunların arasından da hangilerinin absorblandığını saptayacak tek bir cihaz yapmak mümkün olmadığından, belirli dalga boyları arasında çalışan cihazlar geliştirilmiştir. Dalga boyları binlerce metreye varan radyo dalgalarıyla analizlerin yürütüldüğü aletler ‘Manyetik Rezonans’, dalga boyu 200-750 nm arasındaki ışınlarla çalışan aletlere ‘UV (ultraviyole) -Görünür Alan’ ve 2500-25000 nm dalga boylarındaki ışınlarla çalışan aletlere ‘Infrared Spektrofotometresi’ adı verilir. Bu aletlerden yararlanılarak yürütülen analiz yöntemlerine de sırasıyla, NMR, UV-Görünür Alan ve IR-Spektroskopileri denir (Açıkders, Ankara).

UV-GB Spektroskopisi 390–760 nm dalga boyu aralığındaki ışığın madde tarafından absorpsiyonunu veya geçirimini ölçmeye dayanmaktadır (Luypaert ve ark., 2007). Görünür bölgedeki ışınlar, UV ve IR bölgelerinde bulunan ışınlar, X ışınları,  $\gamma$  ışınları, mikro dalgalar ve radyo dalgaları elektromanyetik radyasyona örnek gösterilebilecek ışınım tipleridir (Şekil 4.3.1). Bunları birbirinden farklılaştıran özellikleri ise, frekanslarının birim zamandaki titreşim sayısıdır. İnsan gözü  $\lambda$ : 400-750 nm frekans değerleri arasındaki ışınımları algılayabilir (Şekil 4.3.2) ve bu bölgedeki ışınımlar gözümüze mor, mavi, yeşil, sarı, turuncu ve kırmızı renklerde görünürler. Görünür ışığın altındaki bölgeye (100-400nm) ‘UV Görünür bölgesi’, üstündeki bölgeye (800nm-25 $\mu$ ) ‘Infrared bölgesi’ adı verilmiştir (Üstündağ, 2003).



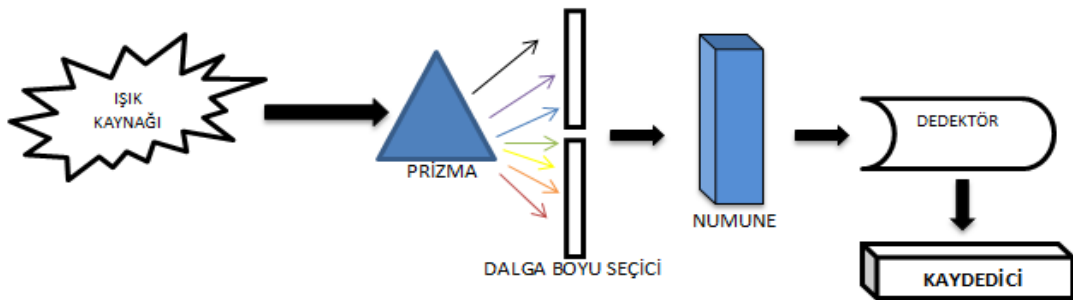
Şekil 4.3.1. Elektromanyetik dalga boyu spektral olarak gösterimi



Şekil 4.3.2. UV-Görünür Bölge spektrofotometresi dalga boyları

Bir çözeltiliye gönderilen ışığın şiddeti ve katettiği yol sabit tutulursa sonuç doğrudan çözeltideki atom ve moleküllerin konsantrasyonu ile ilişkili hale gelir ve böylece UV spektrofotometresinde kantitatif analiz ölçümleri için en yaygın kullanılan yöntemlerden biridir (Skoog, 1999). Hem organik hem de inorganik maddelerin tayininde kullanılabilmesi son zamanlardaki gelişmelerle  $10^{-6}$ - $10^{-7}$  M civarına kadar duyarlı olması yöntemi çekici hale getirmiştir. UV-GB spektrofotometre cihazı başlıca kısımları:

- Işık kaynağı,
- Monokromatör (dalga boyu seçicisi),
- Örnek kabı (numune haznesi),
- Dedektör (algılayıcılar),
- Kaydedicidir.



Şekil 4.3.3. UV-GB Spektrofotometrenin şematik gösterimi

Spektrofotometre'nin çalışma prensibi, incelenecek örnek spektrometre ile fotometre arasına ve küvet olarak adlandırılan, genellikle sert plastikten ya da kuartzdan yapılan özel tüp içine yerleştirilir. Maddenin absorpsiyon aralığı bulunduktan sonra spektrometre ile bu aralıkta örneğe monokromatik bir ışın gönderilir. Gönderilen ışık, küvetteki örnekten geçtikten sonra fotometreye ulaşır. Spektrometreden gönderilen ışık ile fotometreye ulaşan ışık arasındaki fark bize absorblama miktarını verir. Absorplanan ışığın miktarı absorbans olarak ifade edilir. Absorbans maddenin cinsine, ışığın dalga boyuna, ışığın çözelti içinde aldığı yolun uzunluğuna ve çözelti derişimi ile hesaplanabilir (Temel, 2019).

#### 4.4. Kemometri

Kimyasal sistemlerden matematiksel ve istatistiksel yöntemlerin uygulanmasıyla bilgi çıkarma bilimine kemometri denir. Kemometri, kimyasal verilerin analizi (verilerden bilgi çıkarma) ve deney verilerinin maksimum bilgi içermesini sağlama (deneylerin tasarımı) ile ilgili kimya dalıdır. Kimya, biyokimya, tıp, biyoloji ve kimya mühendisliğindeki sorunları ele almak için çok değişkenli istatistik, uygulamalı matematik ve bilgisayar bilimi gibi temel veri analitik disiplinlerini de sıklıkla kullanan disiplinler arası bilimdir. Kimyadaki en eski analitik deneylerin bile bir tür kemometri içerdiği iddia edilebilirse de, bu alanın 1970'lerde bilgisayarların bilimsel araştırma için giderek daha fazla kullanılmasıyla ortaya çıktığı kabul edilmektedir. "Kemometri" terimi, 1971 yılında Svante Wold tarafından icat edildi (Wold, 1995) ve kısa bir süre sonra bu alanda öncü olan Svante Wold ve Bruce R. Kowalski tarafından 1974 yılında Uluslararası Kemometri Topluluğu tarafından bu disiplinin ilk resmi açıklaması yapıldı. Wold, İsveç Umeå Üniversitesi'nde organik kimya profesörü ve Kowalski, Seattle Washington Üniversitesi'nde analitik kimya profesörüyü.

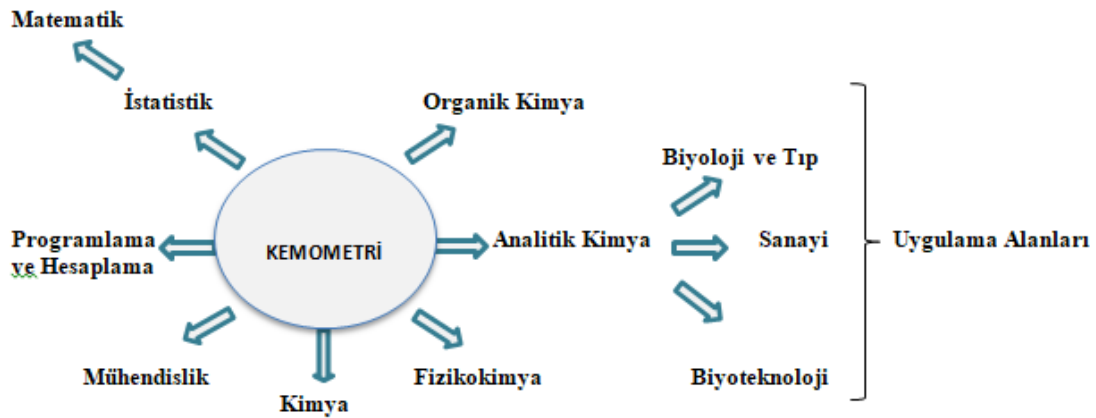
Kemometri, en genel anlamda, yararlı bilgileri çıkarmak için çeşitli sayısal tekniklerle veri işleme sanatıdır. Kantitatif Analiz için kemometrik teknikler, çeşitli yöntemleri izleyerek bir laboratuvar veya üretim ortamında kantitatif analitik kalibrasyonların nasıl üretileceğini ve kullanılacağını, analitik kalibrasyonların geliştirilmesi için gereken zaman ve kaynakların nasıl tahmin edileceğini ve çok çeşitli sistemlerle sağlanan nicel yazılımın nasıl kullanılacağını gösterir (Kramer, 1998). Çeşitli yöntemlerle elde edilen kimyasal verilere matematiksel tekniklerin uygulanması ile bu verilerden daha fazla yararlı bilgilerin özümlemesi olarak tanımlanmaktadır.

Kemometri, optimal ölçüm prosedürleri ve deneyleri tasarlamak veya seçmek için matematik, istatistik ve mantığı birleştiren bir disiplindir. Kimyasal verileri analiz ederek maksimum ilgili kimyasal bilginin çıkarılmasını sağlar ve kimyasal sistemleri anlamada yardımcı olur (Kumar, 2017). 1980'lerde bu alanda üç özel dergi çıktı: *Journal of Chemometrics*, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* (*Kemometri ve Akıllı Laboratuvar Sistemleri*) ve *Journal of Chemical Information and Modeling* (*Kimyasal Bilgi ve Modelleme Dergisi*). *Chemometrics* ve *Intelligent Laboratory Systems* dergisinde verilen tanım: 'Kemometri, en uygun ölçüm prosedürlerini ve deneylerini tasarlamak, seçmek ve kimyasal verileri analiz ederek maksimum kimyasal bilgi sağlamak için, resmi mantığı kullanan matematiksel, istatistiksel, kimyasal bir disiplindir (Héberger, 2008). Bu dergiler, kemometride hem temel hem de metodolojik araştırmaları kapsamaya devam etmektedir. Şu anda, mevcut kemometrik yöntemlerin rutin uygulamalarının çoğu genellikle uygulamaya yönelik dergilerde yayınlanmaktadır (ör. Uygulamalı Spektroskopi, Analitik Kimya, Anal. Chim. Açta., Talanta). Kemometri üzerine birkaç önemli kitap/monografi de ilk olarak 1980'lerde basıldı, Malinowski'nin ilk baskısı da dahil. Kimyada Faktör Analizi, Sharaf, Illman ve Kowalski's Kemometri, Massart vd. Kemometri: bir ders kitabı ve Martens ve Naes tarafından hazırlanan Çok Değişkenli Kalibrasyon' dur.

Günümüzde kemometrik yöntemlerin gelişmesiyle birden fazla etken madde içeren farmasötik ürünlerin kantitatif analizi ön ayırma işlemi ve grafik işlemi gerektirmeksizin hızlı, doğru ve hassas olarak gerçekleştirilmektedir. Kemometrik hesap yöntemlerini spektrofotometrik, elektrokimyasal ve kromatografik ölçüm cihazlarından elde edilen verilere uygulamak mümkündür (Baleanu ve ark.,2001). Kemometri içerik olarak, tanımlayıcı ve açıklayıcı istatistik, sinyal işleme, deneysel tasarım, modelleme, kalibrasyon, optimizasyon, yapı tanıma, sınıflandırma, yapay akıl yöntemleri, resim işleme, bilgi ve sistem kuramı, gibi kavram ve uygulamaları kemometrinin konularını barındırır. Analitik verilerin işlenmesinde, uygulamalı matematik ve istatistik temel araçlardır. Sinyallerin işlenmesi, düzleştirme, filtreleme, türev ve integrasyon için kullanılan algoritmalar vasıtasıyla gerçekleştirilir. Fourier ve dalgacık dönüşümü gibi yöntemler sinyal işlemek için kullanılan yöntemlerdir (Brereton ve ark.,1992).

Yüksek verimli deneysel çalışmalar, deneysel tasarım ve kantitatif değerlendirme yöntemlerine dayanır. Deneysel tasarım ve kantitatif değerlendirmeler matematiksel modeller veya tasarımlar vasıtasıyla başarılabilir. Deneysel tasarım ve

optimizasyon konusunda çok sayıda teknik bilgi notu ve kitap analitikçiler tarafından yazılmıştır. Bu konuda ilk analitik uygulamalı kitaplardan biri Cornell tarafından yazılmıştır (Cornell,1990). Kemometrik yöntemlerin kullanıcısı analitik kimyacılar olsa da laboratuvar ve analiz çalışması yapan diğer branşlarla sıkı ilişki içindedir. Özellikle son yıllarda Biyoteknolojide ARGE çalışmalarında kemometrik yöntemler birçok alanda uygulanmaktadır. Aşağıdaki şemada da (şekil 4.4.1) görüldüğü gibi kemometrik çalışmalarda diğer ilgili disiplinlerin ihtiyaçları ölçüsünde uygulamalı matematik ve istatistik bilgisine sahip olmaları gerektirdiği açıktır.



Şekil 4.4.1. Kemometrinin ilişkili olduğu disiplinler

Farmasötik ürünlerin çoğunda genelde birden fazla etken madde bulunabilir ve bu etken maddelerin aynı bölgede absorpsiyon vermeleri sonucunda spektral girişimleri nedeniyle doğrudan kantitatif analizleri mümkün olmadığı için bir ayırma işlemi ardından ancak analizleri yapılabilir. Bu sorun UV-görünür alan spektrofotometre kullanımını kısıtlayıcı faktör olmuş, pahalı ve kompleks cihazlar olan HPLC kullanımını gerektirmiştir. Günümüzde karışım analizlerinde UV-görünür alan spektrofotometrisi, kemometrik yöntemlerin kullanımıyla tekrar güncellik kazanmıştır.

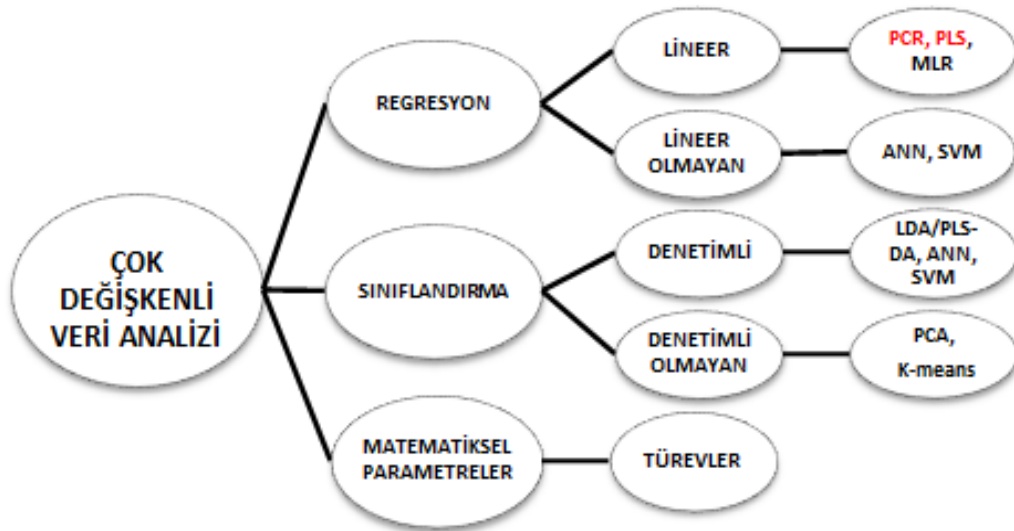
İki veya daha fazla aktif bileşiği içeren karışımlarda, aktif bileşiklerin hiçbir ayırma işlemi kullanmadan analizi birçok branşın temel problemlerinden birisidir. Karışım halindeki numunelerin analizi için çeşitli kromatografik ve spektrofotometrik yöntemlerin yaygın olarak kullanıldığı çalışmalarda görülmektedir. Düşük miktarlarda numunelerin analizi için gelişmiş analitik cihazlar geliştirilmesine rağmen klasik analitik cihazlardan elde edilen verilerin çeşitli matematiksel algoritmalara tabi tutularak yöntemlerin hassasiyeti ve sonuçların doğruluğu artırılmaya çalışılmaktadır. Örneğin yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi, cihazın pahalı olması ve

kromatografik şartların optimizasyonun uzun zaman alması gibi dezavantajlara sahiptir. Diğer taraftan türev spektrofotometrisi gibi klasik grafik işlemlere dayanan yöntemler ikili karışımların analizi için kullanılabilmelerine rağmen ikiden daha fazla aktif bileşiği içeren numunelerin analizinde yetersiz kalmaktadır (Dinç ve Üstündağ, 2006). Kompleks karışımların kantitatif analizinde kemometrik yöntemler, spektrumlardan ölçülen absorbans değerleri ile konsantrasyonlar arasındaki kalibrasyon algoritmalarına göre kalibrasyonlar hazırlanır ve bu kalibrasyonlarda çok sayıda dalga boyunun ölçümlerde kullanılması sonucunda ortalama nedeniyle gürültü piklerinin etkisi ya tamamen ortadan kaldırılır ya da azaltılır (Adams,1995).

Son zamanlarda kompleks karışımların analizi için temel bileşen regresyonu (PCR) ve kısmi en küçük kareler(PLS) yöntemleri bilgisayar programları yardımıyla kullanılmaktadır. Bu kemometrik kalibrasyonların hesaplanması matris matematiği içeren bilgisayar programları ile yapılmaktadır. Kimyasal analizde işlenecek verilere temel oluşturan sinyaller, ölçüm cihazından çıktığı şekli ile analog ve sayısal sinyal olarak ikiye ayrılabilir. Sayısal sinyallerin daha az gürültü bileşeni içermesi, elektriksel girişimlere daha az uğraması ve bilgisayarlı sistemlere uyumlu oluşu gibi üstünlükleri vardır. Kemometri disiplininde rastgele veriler, sırasıyla istatistiğin tanımlayıcı ve açıklayıcı yöntemleriyle test ve karakterize edilir. Analitik verilerin işlenmesinde, istatistik ve uygulamalı matematik kemometrinin temel araçlarıdır. Sinyallerin işlenmesi, düzleştirme, filtreleme, türev ve integrasyon için kullanılan algoritmalar vasıtasıyla gerçekleştirilir. Fourier ve dalgacık dönüşümü sinyal işlemek için kullanılan yöntemlerdir. Kemometrik uygulamaların geneli kompleks hesaplamalar içerir. Bu hesaplamaları elle ya da basit hesap makineleriyle gerçekleştirmek mümkün olmadığından dolayı bilgisayar programlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Kemometrik hesaplamalarda genellikle EXCEL, MATLAB, MİNİTAB ve diğer paket programlar kullanılmaktadır (Sarıdağ, 2017). Kemometri; analitik kimya, gıda kimyası, çevre kimyası, adli tıp, biyoloji, biyoteknoloji ve arkeoloji gibi alanlarda sıkça kullanılmaktadır. Organik kimyacılar ve farmasötik (ilaç) kimyacıları, reaksiyon koşullarının optimizasyonunda, deneysel tasarım veya ilaç tasarımında, yapı-etki ilişkisi çalışmalarında kemometriyi kullanmaktadırlar (Dinç, 2009).

#### 4.4.1. Çok Değişkenli Kalibrasyon Algoritmaları (Multivariate calibration algorithms)

İki veya daha fazla aktif bileşiği içeren karışımlarda bu aktif bileşiklerin ayırma işlemine tabi tutulmaksızın analizi birçok disiplinin temel problemlerinden birisidir. Karışım halindeki numuneler için çeşitli spektrofotometrik ve kromatografik yöntemlerin yaygın olarak kullanıldığı çalışmalar görülmektedir. Bazı durumlarda bahsedilen yöntemlerin iyi sonuçlar vermediği de görülmüştür (Dinç ve Üstündağ, 2005). Bu nedenlerden dolayı daha düşük miktarlarda numunelerin analizi için analitik cihazlar geliştirilmesine rağmen klasik analitik cihazlardan elde edilen verilerin çeşitli matematiksel algoritmalara tabi tutularak yöntemlerin hassasiyeti ve sonuçların doğruluğu artırılmaya çalışılmaya devam etmektedir (Kitiş, 2011). Modern otomatik analiz yöntemleri çok sayıda veriyi kolayca elde etmemize olanak sağlanmaktadır. Çok değişkenli veri analizi teknikleri şekil 4.4.1.1 de verilmiştir. Klinik biyokimya ve kimya özellikle ARGE çalışmalarında numunelerin her biri için birçok analiti saptamada rutin olarak kullanılmaktadır. Her bir örnek için birçok değişkenin ölçüldüğü durumlarda, çok değişkenli veri üretilmektedir (Miller, 2008). Tez çalışmasında kullanılan PCR ve PLS kemometrik teknikleri, karmaşık karışımların analizinde ve analitik kimyanın çeşitli alanlardaki birçok uygulamada kullanılan iki güçlü tekniktir. Bu teknikler, analitlerin eşzamanlı tahmini için tüm spektrumdan veri çıkarır ve hassasiyetle hızlı analiz sağlar.



Şekil 4.4.1.1.Çok değişkenli veri analizi teknikleri

#### 4.4.1.1. Lineer Regresyon Analizi

Bir X bileşiğinin seçilen  $\lambda_i$  dalga boyunda spektrofotometrik bir tayin için iki değişken (konsantrasyon ve absorbans) arasındaki bir lineer regresyon denklemi aşağıda verilen eşitlik ile tarif edilebilir:

$$A_{X_i} = b_{X_i} \times C_X + a_{X_i}$$

Burada A, seçilen  $\lambda_i$  dalga boyunda X bileşiğinin absorbansını,  $C_X$  X bileşiğinin konsantrasyonunu ( $\mu\text{g/mL}$ ),  $b_{X_i}$  lineer regresyon denkleminin eğimini,  $a_{X_i}$  modellenen lineer regresyonun kesimini ifade etmektedir. Bu kesim değeri gerçek ve deneysel lineer regresyon doğruları arasındaki farkı göstermektedir (Kaiser, 1972).

#### 4.4.2. PCR (Temel Bileşen Regresyon) Yöntemi

Kemometrik yöntemlerden biri olan PCR yöntemi konsantrasyon seti için ölçülen absorbans verilerinin dekompozisyonu ile birbirine dik (ortogonal) doğrular elde edilmesi esasına dayanır. Elde edilen doğrular kurulacak kalibrasyonun koordinat sistemidir. Burada açıklanan PCR algoritması Martens ve Naes (1984) tarafından verilen sisteme göre açıklanmaktadır. PCR kalibrasyonu kurulmasındaki basamaklar şu şekildedir:

- Analiz edilecek maddenin derişim ve absorbans verilerinin varyans-kovaryansı bulunur.
- Varyans-kovaryans saçılma matriksinin öz vektörleri ve öz değerleri hesaplanır.
- Seçilen öz değere karşılık gelen öz vektör kalibrasyonun lineer bileşenidir.

PCR algoritmasında genel lineer regresyon denklemi:  $C = a + b.A$

C: analiz edilecek maddenin derişimidir.

a: sabit sayı

b: temel bileşenlerin ve C-loading matriksinin (q) çarpımından elde edilir.

$$b = P \times q$$

Burada P öz vektörlerin matriksidir, öz vektörler kolon matriksi en uygun öz değere (faktöre) ya da öz değerlere (faktörlere) karşılık gelmektedir. q vektörü C- loadings olarak adlandırılır ve T (sayı matriksi) üzerinden C'nin regresyonu ile tayin edilir.

$$q = D \times T^T \times Y_0$$

Burada D diagonal matriks olup her bir öz değerin tersine eşittir.  $t_1$  sayı matriksi aşağıdaki eşitlikten elde edilebilir:

$$t_1 = A_0 \times P_1$$

Ortalanmış absorbans ( $A_o$ ) ve ortalanmış derişim ( $C_o$ ) ile gösterilebilir. Burada a sabiti genel lineer regresyon denklemi kullanılarak aşağıdaki eşitlikten hesaplanabilir:

$$a = C_{0rt} - A_{0rt} \cdot T \times b$$

Her bir aşamada elde edilen değerler  $C = a + b.A$  denkleminde yerine koyarak numunenin bilinmeyen derişimi hesaplanır (Martens, 1989).

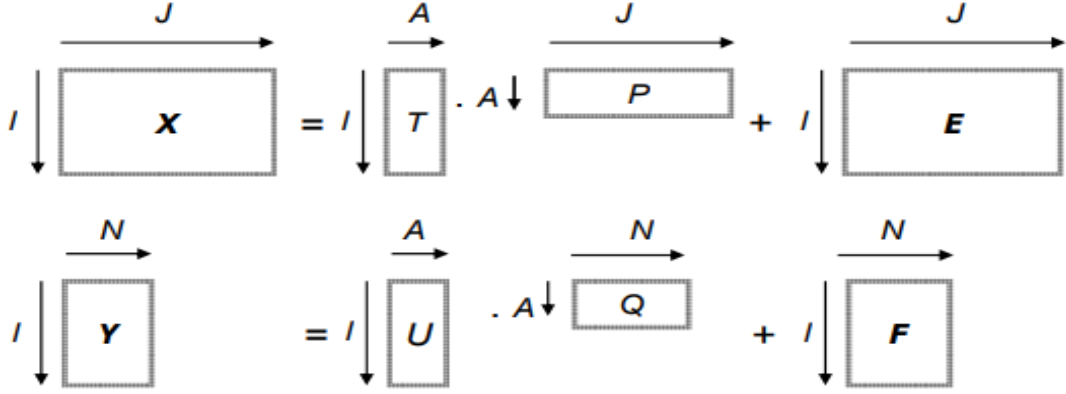
### PCR Yönteminin Avantajı

- Dalga boyu seçimi gerektirmez, genellikle bütün spektral alan ya da bu spektral alanın geniş bir bölge si kullanılabilir
- Çoklu bileşen analiz için kullanılabilir
- Analiz edilecek bileşenlerin bilinmesi şartıyla çok kompleks karışımlar için kullanılabilir
- Bazen orijinal kalibrasyon karışımlarda bulunan fakat numunede bulunmayan bileşenli numunelerin miktar tayininde kullanılabilir
- Kalibrasyon için lülen absorbansların dekompozisyon işleminden sonra uygun öz vektörlere karşılık seçilen öz değerlerin deneysel ortamdan ve lm aletlerinden gelen gurultunun eliminasyonuna olanak sağlar (Dinç, 2007).

### 4.4.3. PLS (Kısmi En Kuk Kareler) Yöntemi

Tez alışmamızda kullandığımız diğer kemometrik yöntem PLS yöntemidir. Kemometrik kalibrasyonlardan en yaygın ve popüler olanıdır. PLS yönteminde kalibrasyonun kurulması için kullanılan PLS algoritmalarına göre, ortogonalize edilmiş PLS algoritması (orthogonalized PLS algorithm) ve ortogonalize olmayan PLS algoritması (non-orthogonalized PLS algorithm) gibi şekilleri vardır. Ortogonalize PLS ve ortogonalize olmayan PLS algoritması arasındaki temel fark X'den faktörlerin ıkarılmasındadır. PLS kalibrasyonunun  $PLS_1$  ve  $PLS_2$  şeklinde iki tipi söz konusudur.  $PLS_1$  de bir bileşik model içerisinde iken;  $PLS_2$  de bütün bileşikler modele dahil edilmektedir. PLS kalibrasyonu, sayı vektörleri vasıtasıyla X ve Y blokları arasındaki ilişkiye dayanır. PLS algoritmasına göre sıfır etrafında merkezileştirilmiş X-

değişkeninin matrisi ve sıfır etrafında merkezleştirilmiş Y-değişkeninin parçalanması aşağıdaki şekilde gibidir. PLS yönteminin PCR den farkı, PCR de temel bileşenler yalnızca X değişkenlerinin veri değerleriyle belirlenirken, PLS de hem X hem Y değişkenlerinin veri değerleri, bileşenlerin oluşturulmasını etkilemektedir.



Şekil 4.4.3.1.PLS<sub>2</sub> kalibrasyon şeması (Dinç, 2007)

PLS algoritması bağımlı ve bağımsız değişkenlerin dekompozisyonuna dayanır. Spektrofotometrik bir çalışmada, absorbans (A) ve konsantrasyon (C), A<sub>0</sub> ve C<sub>0</sub> vektör matrislerini verecek şekilde ortalama işlemine tabi tutulur.

Ortogonal PLS algoritması için verilen denklemler şu şekildedir:

- $X = T \cdot P^T + E$
- $Y = U \cdot Q^T + F$
- $Y = X \cdot B + F$
- $B = W(P^T \cdot W)^{-1} Q^T$

Burada:

X: bağımlı değişken

Y: bağımsız değişken (örneğin derişimi)

T: X için sayı matrisi

U: Y için sayı matrisi

P: X için yük matrisi

Q: Y için yük matrisi

E: X-kalıntı matrisi

F: Y-kalıntı matrisi

W: max kovaryans

PCR algoritmasında olduğu gibi bu katsayılar (B) lineer regresyon denkleminde yerine konursa analiz edilecek numunenin absorbans değerleri bu eşitlikte yerine yazılarak hesaplanabilir (Martens, 2000).

### **PLS Yönteminin Avantajı**

- Tek aşamalı bir dekompozisyon ve regresyon işlemi gerektirir
- Kalibrasyonda kullanılan öz vektörler analiz edilen bileşenler ile en geniş ortak spektral değişimin olduğu bölge ile doğrudan ilişkilidir.
- Kalibrasyonlar genellikle kalibrasyon setinin bilinmeyen numunelerden beklenen değişik derişimler yansıtması daha fazla güvenilirlik sağlayacaktır.
- Yalnızca analiz edilecek bileşenlerin bilinmesi durumunda kompleks karışımlar için kullanılabilir.
- Bazı durumlarda orijinal kalibrasyon karışımlarında bulunan fakat numunede olmayan bileşenli numunelerin miktar tayininde de kullanılabilir.
- Bu tekniklerin hepsi spektral kantitatif analiz için uygulanırken literatürdeki sebepler genellikle PLS'nin tahmin gücünün yüksek olduğunu göstermektedir. Birçok durumda PLS metotları PCR' den daha iyi sonuçlar verir.

#### **4.4.4. Konsantrasyon Setinin Tasarımı**

Kemometrik (PCR, PLS) kalibrasyonlar için konsantrasyon seti ya rastgele yada analizi yapılacak numunede yer alan maddelerin konsantrasyonlarını içerecek şekilde kalibrasyon (konsantrasyon) setinin tasarımı yapılır. Simetrik kalibrasyon setinin planlamasında analiz edilecek maddelerin konsantrasyonları, kalibrasyon setinin içinde ana kümenin permütasyonları şeklinde alt kümeler oluşturulur. Kemometrik çalışmalarda rastgele kalibrasyon setinin hazırlanmasından ziyade, analiz edilecek maddelerin konsantrasyonlarına göre simetrik bir kalibrasyon setinin hazırlanması, elde edilecek sonuçların doğruluğu ve hataların minimize edilmesi için tercih edilen bir durumdur. Çalışmalarda konsantrasyon (derişim) seti hazırlanmasında, çeşitli tasarım şekilleri verilmekle birlikte rastgele hazırlanan konsantrasyon setleri de kullanılabilir.

#### 4.4.5.Çapraz Validasyon İşlemi (Cross-Validation Procedure)

Kemometrik kalibrasyonların validasyonu için kalibrasyonu ve tayin basamaklarında kalibrasyonun standart hatası (standard error of calibration → SEC) ve tayinin (tahminin) standart hatası (standard error of prediction →SEP) gibi parametreler kullanılmaktadır. SEC ve SEP değerlerinin minimum yapan kalibrasyon koşulları ve F-istatistiği kullanılır.

Kalibrasyon performanslarını değerlendirmek için, kemometrik kalibrasyonların SEC ve SEP değerleri yanında, bilinen ve tahmin edilen konsantrasyon değerlerinin lineer regresyon analizi yapılarak, korelasyon katsayısı (r), doğrunun eğim (m) ve kesim (n) değerleri kullanılır. PCR ve PLS kalibrasyonlarının kurulmasında faktör seçimi için çapraz validasyon prosedürü (cross-validation procedure) kullanılır. Bunun için karelerin tahmin (tayin) hatalarının toplamı (prediction error sum of squares → PRESS) hesaplanır. Optimal faktör sayısını bulmak için önerilen kriterler minimum PRESS değeri ve F-istatistiğidir (Patrono ve ark., 2001).

#### 4.4.6.Birinci Türev Spektrofotometrisi

UV-Görünür bölge absorpsiyon spektrofotometrisi yapısal ve analitik problemlerin bir bölümünün çözümünde çok faydalı olan analiz tekniklerinden biridir. Bazı durumlarda bir çözümlenmiş bileşenlerin UV-Görünür Bölge Spektrofotometresi ile kantitatif tayini, spektral benzerlikler ve bir bileşenin zayıf absorpsiyon bandının diğer bileşenlerin güçlü absorpsiyon bandları ile örtülmesi sebebiyle zorlaşır. Bu durumda türev spektrumları çok faydalı olmuştur. Türev uygulamaları bu sorunların tümüne birden belli oranda çözüm getirebilmekte, karakteristik pikleri az olan spektrumların ayırım gücünü büyük oranda artırmaktadır. Türev spektrofotometrisi zaman içinde UV-Görünür Bölge Absorpsiyon Spektrofotometrisi, IR ve Raman Spektrofotometrisi, NMR spektrometrisi, Alev Emisyon ve Absorpsiyon spektrometrisi, Gaz kromatografisi, elektroanalitik yöntemler ve reaksiyon kinetiklerinin incelenmesi gibi çeşitli metotlarda kullanılmıştır (Talsky ve ark., 1978).

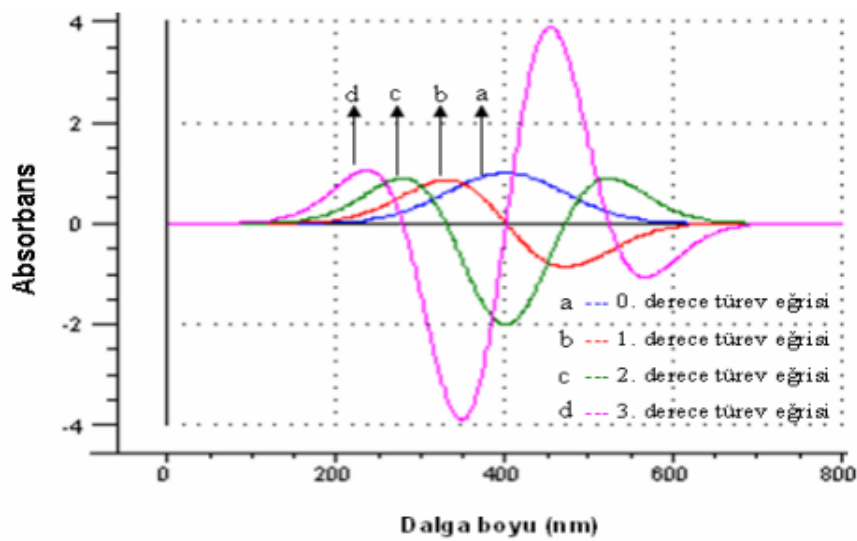
Bir fonksiyonu gösteren eğrinin herhangi bir noktasındaki teğetin eğimi matematikte 'türev' olarak adlandırılır. Türev spektrofotometrisinin prensibi; dalga boylarına karşılık absorbans değerlerinin türevlendirilmesi esasına dayanır. Bu yöntemde analizi yapılacak maddenin dalga boylarına karşılık gelen absorbans değerlerinin 1. veya daha yüksek dereceli türevleri dalga boyuna karşı alınarak

spektrum elde edilir (Ergün, 2003). Bir spektrum absorpsiyon (A) ve dalga boyu ( $\lambda$ ) değerlerine bağlı olup matematiksel olarak  $A = f(\lambda)$  fonksiyonu olarak tanımlanır. x bağımsız, y bağımlı değişken olmak üzere,  $A = f(\lambda)$  fonksiyonun her bir noktasındaki teğetinin eğimi yani türev ifadesi  $\frac{dA}{d\lambda}$  dir (Özen, 2009).

Türev spektrofotometride absorpsiyon değerleri yani absorpsiyon spektrumları söz konusu olduğunda ifade  $\frac{dA}{d\lambda}$  şeklinde olacaktır. Eğer spektrumun her bir noktasındaki teğet eğimleri yani türev değerleri hesaplanıp, dalga boyunun fonksiyonu olarak grafiğe geçirilecek olursa “1.türev absorpsiyon spektrumu” elde edilir. Türev absorpsiyon spektrumları 1., 2., 3., ...n. derecelerde olabilir ve bu spektrumlar sırasıyla,

$$\left( \frac{dA}{d\lambda}, \frac{d^2A}{d\lambda^2}, \dots, \frac{d^nA}{d\lambda^n} \right) \text{ olarak ifade edilir (Onur ve Yücesoy,1988).}$$

Türev absorpsiyon spektrofotometri; türev spektrumlarına ait verilerin matematiksel bir türev fonksiyonu şeklinde tanımlanarak kullanılması esasına dayalı bir analiz yöntemidir. Türev eğrilerinin hazırlanması matematiksel işlemler gerektirir. Orjinal spektrum her bir noktasındaki türevinin hesaplanması ve bulunan sonuçların grafiğe geçirilerek türev eğrilerinin hazırlanması oldukça zordur. Bilgisayar yardımı ile hesaplamalar yapılabilir. Günümüzde 1’den 4’e kadar türev eğrisi çizen cihazlar bulunmaktadır. Yalnız 3. türevden sonra türev spektrumu alınması pek istenmemektedir. Çünkü ana maddenin yapısı her türev alındığında bozulur (Alkan ve Yılmaz, 2012).



Şekil 4.4.6.1. Absorbans ve türev eğrisi spektrumları

## Yöntemin avantajları

- Türev spektrofotometrisi, teğetlerin eğimi olduğuna göre yöntem analitiksel bantların eğimleri hakkında bilgi verir ve dönüm noktalarının tespit edilebilir hale gelmesini sağlar.
- Genellikle orijinal spektrumlar üst üste binen, çakışan bantlardan oluşmuştur. Bu spektrumların türevi alınarak bantların belli oranda birbirlerinden ayrılması sağlanır.
- Bu yöntemle herhangi bir ayırma işlemi yapılmaksızın karışım içinde bulunan etkin maddelerin aynı anda miktar tayinleri yapılabilir.
- Etkin maddelerin miktar tayini preparat içerisinde bulunan diğer matris bileşenlerin varlığında da yapılabilir.
- Bilindiği gibi spektrofotometride bulanık çözeltilerin normal spektrumları büyük oranda hataya sebep olur, fakat bulanıklığın oluşturduğu bu olumsuz etki türev spektrumları alınarak tamamen ortadan kaldırılabilir.

## 4.5. Kullanılan Cihazlar Ve Kimyasallar

### 4.5.1. Cihazlar

Bu tez çalışmasında spektral kayıtlar bir UV-Visble spektrofotometresi (UV-2550, Shimadzu) ile gerçekleştirilmiştir. Kaydedilen absorpsiyon verileri Microsoft Excel programına aktarılmış ve daha sonra MATLAB (Mathworks Inc., ABD) programında PCR ve PLS algoritmaları ile işlenmiştir. Tüm rakamlar MATLAB yazılımı kullanılarak çizildi. MATLAB' da yazılmış özel m-file programı kullanılarak PCR ve PLS algoritmalarının uygulamaları ve oran spektrumlarının türev hesaplamaları yapılmıştır. Analitlerin analizi sırasında çözeltiler, 0.45 µm gözenek boyutlu nylon şırınga filtresi ile süzülmüştür.

### 4.5.2. Kimyasallar

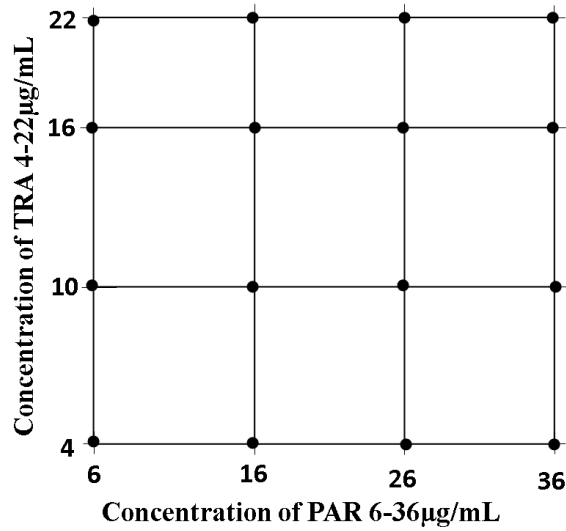
Çalışmada kullanılan tüm kimyasallar analitik kalitededir ve metanol Riedel-de Haën (Almanya) tarafından sağlanmıştır. Analizde kullanılan kimyasallar: Parasetamol ve Tramadol hidroklorür (Abdi İbrahim İlaç Sanayi ve Ticaret A.Ş. %98, İstanbul-Türkiye), metanol (%99,7- Almanya) firmasından temin edilmiştir.

Çalışmada kullanılan kombine ilaç Zaldiar® tablet başına 325 mg Parasetamol ve 37.5 mg Tramadol hidroklorür içeren ticari tabletler Abdi İbrahim İlaç Sanayi ve Ticaret A.Ş. tarafından karşılanmıştır.

## 5.ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

### 5.1. Standart Solusyonların Hazırlanması

PAR (20 mg/100 mL) ve TRA (10 mg/100 mL) stok çözeltileri metanol içinde hazırlandı. Kalibrasyon ve validasyon setlerinin çözeltileri stok çözeltiler ile hazırlanmış ve çözeltiler metanol ile işaretle 10 mL'e kadar tamamlanmıştır. Regresyon analizi için, PAR (6-36  $\mu\text{g/mL}$ ) ve TRA (4-22  $\mu\text{g/mL}$ ) için Şekil 5.1.1 de gösterildiği gibi lineer bir konsantrasyon aralığında 16 farklı kalibrasyon seti solüsyonu hazırlandı. Devamında, bu kalibrasyon setini oluşturan karışım, uygulanacak yöntemlerin validasyonunu kontrol etmek için kullanıldı. Oran spektrumu-birinci türev yönteminin uygulanması için sırasıyla 6-36  $\mu\text{g/mL}$  ve TRA 4-22  $\mu\text{g/mL}$  konsantrasyon aralığında PAR ve TRA standartlarının kalibrasyon çözeltileri ayrı ayrı hazırlanmıştır. Yöntemleri doğrulamak için sentetik karışımın bağımsız bir doğrulama seti kullanıldı. 6-36  $\mu\text{g/mL}$  ve 4-22  $\mu\text{g/mL}$  konsantrasyon aralığında PAR ve TRA içeren kalibrasyon numune setinin bileşimi Tablo 5.1.1'de sunulmuştur.



Şekil 5.1.1. PCR ve PLS kalibrasyonunun hazırlanması için kalibrasyon numune seti tasarımı

**Tablo 5.1.1.** <sup>24</sup> Faktöriyel tasarım kullanılarak hazırlanan PAR ve TRA içeren konsantrasyon seti

No	Concentration ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )	
	PAR	TRA
C1	6.00	4.00
C2	6.00	10.00
C3	6.00	16.00
C4	6.00	22.00
C5	16.00	4.00
C6	16.00	10.00
C7	16.00	16.00
C8	16.00	22.00
C9	26.00	4.00
C10	26.00	10.00
C11	26.00	16.00
C12	26.00	22.00
C13	36.00	4.00
C14	36.00	10.00
C15	36.00	16.00
C16	36.00	22.00

## 5.2. Örnek Çözeltinin Hazırlanması

Örnek çözeltiyi hazırlamak için 10 adet tablet hassas bir şekilde tartıldı ve bir havanda toz haline getirildi. 1/8 tablet içeriğine eşdeğer PAR ve TRA içeren numune, 100 mL metanol içinde çözülmesi sağlandı. Nihai tablet çözeltisi, 1 saat boyunca manyetik bir karıştırıcı üzerinde karıştırıldı ve 0.45  $\mu\text{m}$ ' lik bir şırınga filtresinden süzüldü. Daha sonra nihai çözeltiler, metanol ile çalışma konsantrasyon aralığına seyreltildi. Bu metotla elde edilen numunenin en son halinin spektrumu 215-280 nm ( $\Delta\lambda=0.2$  nm) arasında kaydedildi. Bu işlem 10 kez tekrarlandı.

## 5.3. PCR Yönteminin Çalışılması

Kemometrik kalibrasyon yöntemlerinden biri olan temel bileşen regresyonu (PCR), ölçülen absorbans veri setinin ayrıştırılmasıyla ortogonal çizgiler elde edilmesine dayanır. PCR modelinin matematiksel ifadesi, tekil ilacın tepe alanının oranı (R) ve ilaç konsantrasyonu seti (C) olarak verilebilir.

Sırasıyla ortalama merkezleme ile  $R_o$  ve  $C_o$  olarak yeniden işlendiler. Matematiksel denklemde,  $b = P \times q$  olarak tanımlanan b katsayısı belirlendi ve P özvektörlerin matrisi q ise,  $q = D \times T^T \times R_o$  ile verilen C-loading yükleridir.  $T^T$ , puan matrisinin transpoze

edilmesidir. T ve D, bileşenlere seçilen özdeğerlerin tersi olan diyagonal bir matristir. Numunelerdeki ilacın içeriği, C tahmini =  $b \times R_{\text{numune}}$  ile tahmin edildi.

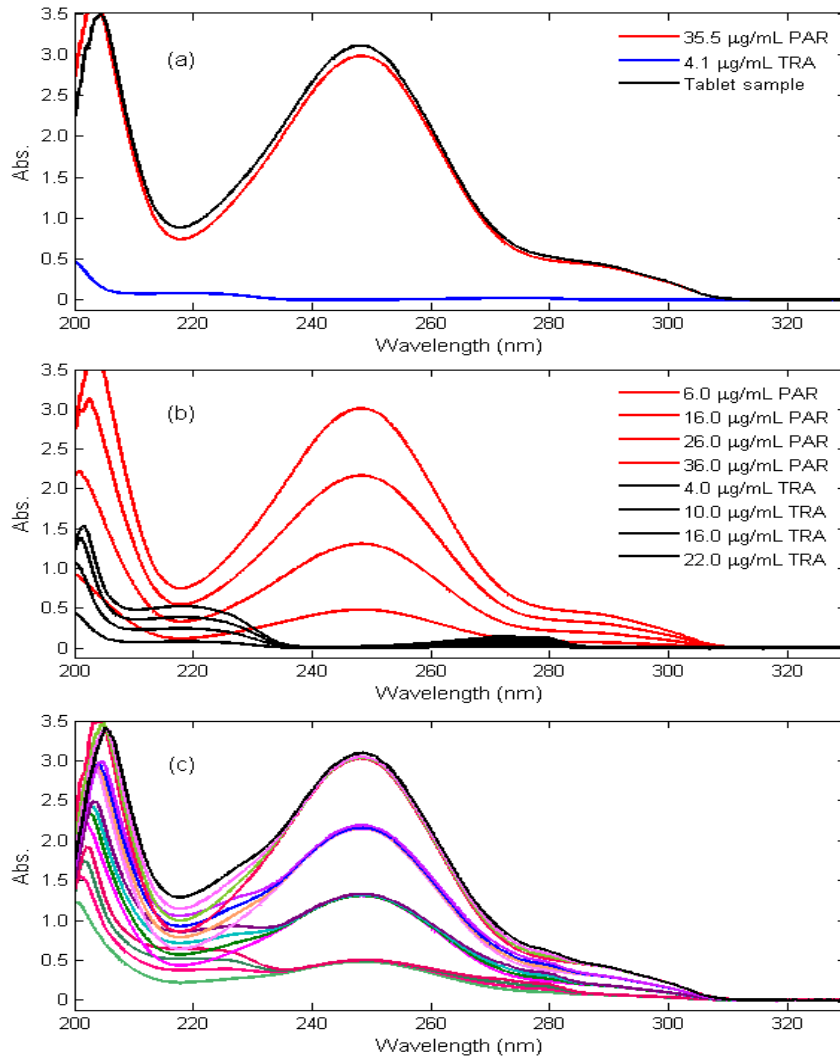
#### 5.4. PLS Yönteminin Çalışılması

Kısmi En Küçük Kareler (PLS) kalibrasyon yöntemi, hem konsantrasyon hem de absorbans matrisinin gizli değişkenler olarak birleştirilmesiyle elde edildi, yani  $A = T \times P^T + E$  ve  $C = UQ + F$  formüllerinde yerine konarak hesaplandı.

Lineer regresyon uygulanarak  $C = a + b.A$ , burada b vektörü  $b = W(PTW)^{-1}Q$  ile sunulan sabit,  $a = C_{\text{mean}} - A_{\text{mean}}^T \cdot b$  olarak elde edildi. Bu denklem, numunelerdeki bilinmeyen aktif bileşik konsantrasyonunun hesaplanmasını sağladı. Bu çalışmada veri analizi için MATLAB 7.0 yazılımındaki PLS toolbox 3.0 kullanılmıştır.

#### 5.5. PCR ve PLS metotlarının spektral grafik gösterimi

PAR ve TRA spektrumları, şekil 5.5.1.a' da gösterildiği gibi 200-300 nm dalga boyu aralığında çakıştı. Bu durumda, film tabletlerde PAR ve TRA' nın eşzamanlı kantitatif analizi, doğrudan absorbans ölçüm yöntemiyle mümkün değildi. Her iki ilacın da numunelerinde miktar tayini için UV absorbans ölçümlerine PCR ve PLS algoritması kullanılarak bu sorunun çözüleceği sonucuna varıldı. Ön deneylerden, doğrusal çalışma konsantrasyonu aralığı, Şekil 5.5.1.b'de gösterildiği gibi belirlendi. PAR ve TRA' nın çalışma konsantrasyon aralıklarının sırasıyla 6-36  $\mu\text{g}$  ve 4-22  $\mu\text{g}$  arasında lineer olduğu bulundu (şekil 5.5.1.b). Kemometrik kalibrasyonlar PCR ve PLS' yi oluşturmak için,  $2^4$  faktöriyel tasarıma göre 16 farklı karışım içeren kalibrasyon numuneleri seti hazırlandı (şekil 5.1.1). Kalibrasyon setinin UV spektrumları, Şekil 5.5.1.c'de gösterildiği gibi 200-330 nm spektral aralığında kaydedildi.



**Şekil 5.5.1.** a) 35.5 µg/mL PAR (—), 4.1 µg/mL TRA (—) için örnek tabletteki absorpsiyon spektrumları, b) 6-36 µg/mL PAR and 4-22 µg/mL TRA konsantrasyon aralığı, c) 6-36 µg/mL ve 4-22 µg/mL aralığında farklı PAR ve TRA konsantrasyonları içeren kalibrasyon seti spektrumları

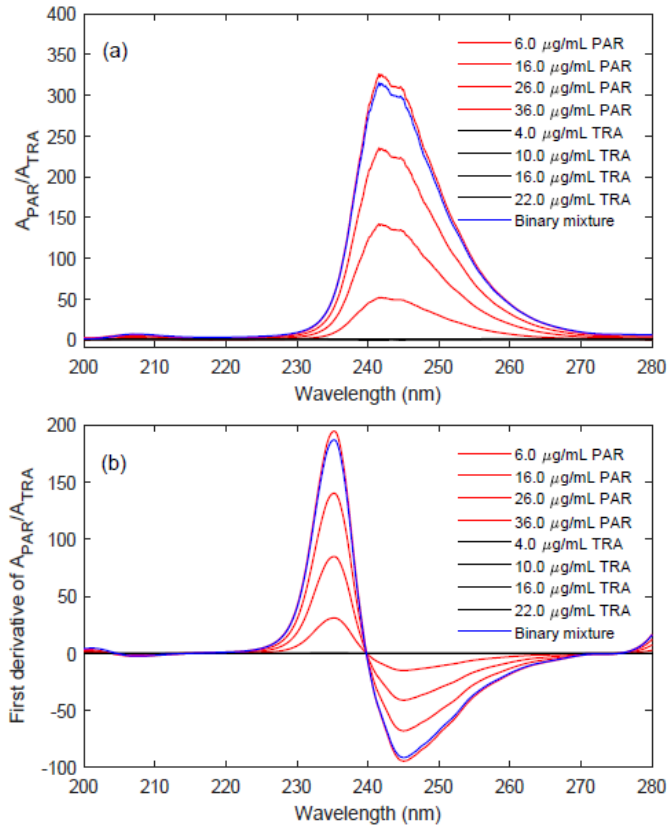
### 5.6.Oran Spektrumları Birinci Türev Spektrofotometrisi

Standart PAR ve TRA çözeltilerinin 6-36 µg/ml ve 4-22 µg/ml TRA çalışma aralığında absorpsiyon spektrumları  $\Delta\lambda = 0.1$  nm aralıklarla 200-330 nm arasında kaydedildi (bkz. Şekil 5.5.1. b). Validasyon ve ticari tablet örnekleri için benzer spektral kayıt koşulları kullanılmıştır. Saf PAR ve ikili karışımının absorpsiyon spektrumları, 10 µ/mL TRA standart spektrumuna bölündü ve ardından oran spektrumları ve daha sonra PAR ve ikili karışımının oran spektrumları, şekil 5.6.1 a'da gösterildiği gibi elde edildi.

PAR oran spektrumlarının birinci türevi ve ikili karışımı, Şekil 5.6.1 b'de gösterildiği gibi 200-280 nm aralığında  $\Delta\lambda=4$  nm ile hesaplanmıştır. Örneklerdeki PAR, oran spektrumlarının oran spektrumlarının ilk türev sinyalinin, maksimum Numunelerdeki PAR, PAR analizi ve bir kalibrasyon eğrisi elde etmek için dalga

boyunun maksimumuna karşılık gelen 235,5 nm'de oran spektrumlarının birinci türev sinyalinin ölçülmesiyle belirlendi. Standardın kalibrasyon grafiği olan PAR için istatistiksel sonuçlar Tablo 5.6.1'de verilmiştir.

Aynı şekilde, saf TRA ve ikili karışımının absorpsiyon spektrumlarından, standart spektrum 16  $\mu\text{g/mL}$  PAR'ın Şekil 5.6.1 a'da gösterildiği gibi bölünmesiyle oran spektrumları elde edildi. TRA'nın oran spektrumunun birinci türevi ve karşılık gelen ikili karışım  $\Delta\lambda=4$  nm ile elde edildi. TRA konsantrasyonunun, minimum dalga boyu noktasına karşılık gelen 280 nm'de oran spektrumunun birinci türeviyle orantılı olduğu gözlemlendi. 280 nm dalga boyunda bir kalibrasyon eğrisi elde edilmiş ve ardından sonuçlar Tablo 5.6.1'de sunulmuştur. Bu kalibrasyon eğrisi, analiz edilen numunelerde TRA tespiti için kullanılmıştır.



**Şekil 5.6.1:** a) PAR (kırmızı çizgi), TRA (siyah çizgi) ve bunların ikili karışımının (mavi çizgi) (bölen olarak 10  $\mu\text{g/mL}$  TRA kullanıldığında) oran spektrumları b) PAR'ın Oran spektrumlarının birinci türevi (kırmızı çizgi), TRA (siyah çizgi) ve bunların ikili karışımı (mavi çizgi).

**Tablo 5.6.1.** Kalibrasyon eğrilerinin istatistiksel sonuçları

Wavelength	235.5 nm	280.0 nm
m	0.0168	5.4349
n	0.0098	-2.0971
r	0.9996	1.0000
SE(m)	0.0003	0.0215
SE(n)	0.0051	0.5112
SE(r)	0.0047	0.4805
LOD ( $\mu\text{g/mL}$ )	0.9104	0.2822
LOQ ( $\mu\text{g/mL}$ )	3.0347	0.9406

LOD: Limit of detection

LOQ: Limit of quantitation

### 5.7. Önerilen Yöntemlerin Doğrulanması

Kemometrik kalibrasyonların (PCR ve PLS teknikleri) ve oran spektrumu-birinci türev yönteminin validasyonu, validasyon parametreleri kullanılarak ve test numuneleri ve standart ilave numuneleri analiz edilerek gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, farklı konsantrasyon seviyelerinde PAR ve TRA içeren dokuz sentetik karışım, Tablo 5.7.1'de gösterildiği gibi bağımsız bir doğrulama seti olarak hazırlandı.

PCR ve PLS kalibrasyonları ve oran spectra-birinci türev yöntemi uygulamalarında ortalama geri kazanımlar ve bağıl standart sapmalar hesaplanmış ve Tablo 5.7.1'de sunulmuştur. Geri kazanım çalışmalarında PCR ve PLS'nin validasyonu için yeterli sayısal değerler elde edilmiştir. Laboratuvarımızda hazırlanan sentetik karışımlarda her iki bileşiğin analizi için bu yöntemler uygulanarak kesin ve doğru sonuçlar rapor edilmiştir.

**Tablo 5.7.1:** PCR ve PLS yöntemleri ile ikili karışımda PAR ve TRA' nın geri kazanım sonuçları.

Added ( $\mu\text{g/ mL}$ )		Recovery (%)					
		PCR		PLS		RS-FDS	
PAR	TRA	PAR	TRA	PAR	TRA	PAR	TRA
6.0	4.0	100.0	99.5	100.8	101.4	101.7	101.0
16.0	4.0	99.8	102.9	100.2	99.6	99.7	100.5
26.0	4.0	97.6	102.8	98.4	104.1	97.1	100.2
36.0	4.0	101.0	104.4	100.7	100.5	101.5	98.5
35.0	4.0	100.8	101.0	101.4	99.2	101.3	101.1
35.0	10.0	98.5	100.2	99.0	98.7	99.3	98.5
35.0	16.0	98.9	98.7	99.3	99.3	99.8	96.8
35.0	22.0	98.0	100.9	98.5	99.7	98.8	99.1
35.5	4.1	99.3	101.3	99.7	98.8	99.7	101.1
	Mean	99.3	101.3	99.8	100.1	99.9	99.6
	SD	1.19	1.80	1.07	1.71	1.46	1.53
	RSD	1.19	1.78	1.07	1.71	1.46	1.53

SD: standard deviation

RSD: Relative standard deviation

Yöntemlerin seçiciliğini test etmek için ticari tablet çözeltisine uygun miktarda PAR ve TRA standartları eklenmiştir. Standart ekleme çözeltileri, PAR için 6-36 µg/mL ve TRA için 4-22 µg/mL aralığında üç farklı analit bileşiminde hazırlandı. Bu işlemler, her konsantrasyon seviyesi için üç kez tekrarlandı. Geri kazanım sonuçları ve bunların standart sapmaları elde edildi bu ölçüme ait sonuçlar Tablo 5.7.2’de gösterilmiştir. Sonuçlar, tabletlerin analizi sırasında ekşiyanların hiçbir etkileşimi olmadığını gösterdi. Bu nedenle, önerilen PCR ve PLS teknikleri ve oran spektrumu-birinci türev spektrofotometrisinin, oral tabletlerde PAR ve TRA bileşiklerini belirlemek için çok uygun olduğu bulundu.

**Tablo 5.7.2.** Önerilen analitik tekniklerle standart ekleme yönteminden elde edilen geri kazanım sonuçları

	Added (µg/mL)		Found (µg/mL)					
	PAR	TRA	PCR		PLS		RS-FDS	
	PAR	TRA	PAR	TRA	PAR	TRA	PAR	TRA
Formulation	2.0	3.5	2.02	3.58	2.05	3.55	2.07	3.48
Formulation	12.0	8.5	12.16	8.73	12.16	8.69	12.23	8.20
Formulation	22.0	18.5	22.46	19.05	22.53	19.10	22.88	18.04
Recovery (%)								
			PCR		PLS		RS-FDS	
	PAR	TRA	PAR	TRA	PAR	TRA	PAR	TRA
			101.1	102.4	102.5	101.3	103.3	99.4
			101.3	102.7	101.4	102.3	101.9	96.5
			102.1	103.0	102.4	103.2	104.0	97.5
RSD (%)								
			PCR		PLS			
	PAR	TRA	PAR	TRA	PAR	TRA	PAR	TRA
			3.25	1.89	1.38	3.19	0.91	3.42
			2.59	1.01	2.63	0.94	2.16	0.64
			0.71	0.57	0.75	1.19	0.44	1.46

\*Sonuçlar, her konsantrasyon seviyesi için ortalama üç kez elde edilmiştir.

## 5.8. Kemometrik Kalibrasyonlar İçin Yapılan Hesaplamalar

Kemometrik kalibrasyon modellerinin verimliliği birkaç yolla açıklanmaktadır. En yaygın tanım, standart tahmin hatası (SEP) ve (SEC) ile gösterilen standart kalibrasyon hata hesaplamalarıdır.

$$SEP / SEC = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (C_i^{Added} - C_i^{Found})^2}{n}} \quad (1)$$

$C_i^{Added}$  İlacın eklenen konsantrasyonunun nerede olduğunu gösterir;  $C_i^{Found}$  ilacın tahmini konsantrasyonu ve n, sentetik karışımların toplam sayısıdır. Kalibrasyon adımının tahmin hatası kareler toplamı (PRESS) şu şekilde hesaplandı:

$$PRESS = \sum_{i=1}^n (C_i^{Added} - C_i^{Found})^2 \quad (2)$$

Üç faktörlü PCR ve PLS kemometrik kalibrasyonlarının uygulanmasında SEP, SEC ve PRESS değerleri Tablo 5.8.1’de listelenmiştir.

**Tablo 5.8.1.** PCR ve PLS yöntemleri için istatistiksel parametreler

Parameters	PCR		PLS	
	PAR	TRA	PAR	TRA
SEC	0.7030	0.1473	0.3730	0.5160
SEP	0.3013	0.1429	0.2173	0.1783
PRESS	0.4125	0.9391	0.3480	0.7949

PAR ve TRA için kalibrasyon eğrilerinin parametreleri Tablo 5.6.1’de sunulmuştur. Tablodan da görülebileceği gibi, PAR için 6-36 µg/mL ve TRA için 4-22 µg/mL çalışma konsantrasyonu aralığı için daha yüksek korelasyon katsayıları rapor edilmiştir. LOD ve LOQ değerlerinin sayısal sonuçları Tablo 5.6.1’de verilmiştir. Sonuçlar, önerilen prosedürlerin numunelerin analizine uygulanabilirliği açısından yöntemlerin geçerliliğinin kabul edilebilir sınırlar içinde bulunduğunu göstermiştir.

### 5.9. Ticari Tabletlerin Analizi

Kemometrik yöntemlerin gerçek örneklere uygulanmasında, ticari tabletlerde PAR ve TRA'nın kantitatif analizi için PCR ve PLS teknikleri ve oran spectra-birinci türev spektrofotometrik araç kullanılmıştır. Ticari tabletlere ait analiz bulguları Tablo 5.9.1’de belirtilmiştir. Ticari ilaç formülasyonunda PAR ve TRA'nın eş zamanlı kantitatif analizi için hem PCR hem de PLS kalibrasyonları ile oran spektrumu-birinci

türev yönteminin tatmin edici sonuçlar verdiği sonucuna varılmıştır. Önerilen yöntemlerin tahlil sonuçları ile tablet formülasyonunun talep edilen etiketi açısından iyi bir anlaşma elde edildi.

**Tablo 5.9.1.** PCR ve PLS ile tabletlerde PAR ve TRA belirleme sonuçları

Exp No.	mg/tablet					
	PCR		PLS		RS-FDS	
	PAR	TRA	PAR	TRA	PAR	TRA
1	320.6	38.9	321.1	37.2	329.0	37.5
2	329.4	36.8	328.9	37.7	325.3	37.4
3	327.3	37.7	327.5	37.5	326.6	38.3
4	323.7	38.1	324.8	37.1	320.4	37.8
5	331.8	38.9	329.3	36.8	328.5	37.5
6	328.3	37.9	328.6	36.4	325.3	36.6
7	329.0	38.6	329.5	38.4	325.3	36.0
8	330.0	36.9	328.8	37.4	327.1	37.4
9	329.2	36.6	329.1	35.6	326.3	38.6
10	328.2	37.1	327.4	38.1	329.1	39.2
Mean	327.7	37.8	327.5	37.2	326.3	37.6
SD	3.27	0.87	2.65	0.82	2.55	0.92
RSD	1.00	2.30	0.81	2.20	0.78	2.46

PCR ve PLS yöntemlerinin ticari tabletlere uygulanmasıyla elde edilen deneysel geri kazanım sonuçları, yeni önerilen oran spektrumu-birinci türev yöntemiyle sağlananlarla karşılaştırıldı. Kemometrik ve oransal spektrum birinci türev yöntemleriyle elde edilen ticari tabletlerin analiz sonuçlarını karşılaştırmak için %95 güven sınırı ile tek yönlü ANOVA testi uygulandı. İstatistiksel sonuçlar, önerilen yöntemlerle elde edilen tahlil sonuçları arasında önemli bir fark olmadığını gösterdi (bkz. Tablo 5.9.2).

**Tablo 5.9.2.** Ticari tabletlere PCR ve PLS yöntemleri kullanılarak elde edilen geri kazanım sonuçları

	Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
PAR	Between Groups	13.4	2	6.68	0.92	0.41	3.32
	Within Groups	217.8	30	7.26			
	Total	231.2	32				
TRA	Between Groups	1.9	2	0.93	1.36	0.27	3.32
	Within Groups	20.5	30	0.68			
	Total	22.4	32				

SS: Sum of Squares (kareler toplamı)

Df: Degree of Freedom (serbestlik oranı)

MS: Mean Square (karelerin eğimi)

## 6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

### 6.1. Sonuçlar

Analitik kimya ve ilgili alanlarda, karmaşık karışımları düşük maliyetli ve ön ayırma adımı kullanmadan çözmek için yeni yöntem veya tekniklerin geliştirilmesi gerekli olabilir. Özellikle UV spektrofotometrik yöntem, farmasötik dozaj formlarındaki ilaçları analiz etmek için çok basit ve kolaydır. Bununla birlikte, doğrudan UV spektrofotometrik ölçümler, aynı dalga boyu aralığındaki ilaçların örtüşen sinyalleri nedeniyle beklenen analiz sonucunu vermeyebilir. Böyle bir durumda, çok değişkenli spektral verilerin kullanımına dayalı kemometrik yöntemler, karmaşık numunelerin analizi için bir seçenektir. Ek olarak, spektral verilerin türev ve oran spektra-türev tekniklerinin kullanılması, genellikle iki bileşenli karışımın veya üç bileşenli karışımların çözümü için başarılı sonuçlar verir. Bu çalışmada, analiz edilen ilaçların ikili karışımlarını çözmek için geleneksel analitik yöntemlere basit ve alternatif yöntemler sağlamak için matematiksel araçlar olarak kemometrik PCR ve PLS kullanılmıştır. Kemometrik yöntemlerin analiz sonuçlarını karşılaştırmak için ilgili ilaçların ticari tabletlerinin analizine oran spektrumu birinci türev yöntemi uygulandı.

### 6.2.Öneriler

Bu makalede, analiz edilen ilaçların (PAR ve TRA) iki bileşenli karışımının ve ticari tabletlerinin kantitatif çözünürlüğü için, düşük maliyetli ve kısa analiz süresi ile ve ön ayırma adımı kullanmadan gibi alternatif yöntemler ile ilk kez tam UV absorbans ölçümlerine dayalı iki kemometrik araç (PCR ve PLS) önerilmiştir. Kemometrik analiz sonuçlarını doğrulamak için, bu çalışmanın aynı problemi için yeni önerilen oran spektrumu-birinci türev yöntemi kullanılmıştır. ANOVA test sonuçları, önerilen kemometrik yöntemlerin ve oran spektrumu-birinci türev yönteminin, ticari tabletlerin kantitatif analizi açısından karşılaştırılabilir sonuçlar verdiğini göstermiştir. Glavanović ve arkadaşlarının (2016) UV ve UHPLC ile yaptıkları çalışmada PAR-TRA karışımının analizine PLS kalibrasyonu uygulanmıştır. Ancak ek prosedürle çalışma dalga boyu seçimine dayanan bu PLS yöntemi, uygulanan deneysel koşullar açısından PLS uygulamamızdan çok farklıdır. Bir diğer çalışmada Srinivasan ve arkadaşları (2007), aynı karışımdaki ilgili ilaçların kantitatif tahminine ikinci türev spektrofotometrinin uygulanması ile ilgilidir. Yeni önerilen oran spektra-birinci türevin, basitliği ve uygulanabilirliği nedeniyle aynı problemin çözümü için ikinci türev

spektrofotometrisine alternatif bir yöntem olduğu sonucuna vardık. Sonuç olarak, yeni önerilen PCR ve PLS kalibrasyonları ve oran spektrumu-birinci türev yöntemlerinin, ticari tabletlerde PAR ve TRA'nın kalite kontrolü ve rutin analizi için faydalı kemometrik yöntemler olduğu gösterilmiştir.

## KAYNAKLAR

- Abbasi, S., Haeri, S. A., & Sajjadifar, S. (2019). Bio-dispersive liquid liquid microextraction based on nano rhamnolipid aggregates combined with molecularly imprinted-solid phase extraction for selective determination of paracetamol in human urine samples followed by HPLC. *Microchemical Journal*, 146, 106-114.
- Abdel-Megied, A. M., & Badr El-din, K. M. (2019). Development of a novel LC–MS/MS method for detection and quantification of tramadol hydrochloride in presence of some mislabeled drugs: Application to counterfeit study. *Biomedical Chromatography*, 33(6), e4486.
- Abdel-Megied, A. M., & Badr El-din, K. M. (2019). Development of a novel LC–MS/MS method for detection and quantification of tramadol hydrochloride in presence of some mislabeled drugs: Application to counterfeit study. *Biomedical Chromatography*, 33(6), e4486.
- Acetaminophen effervescent tablets, Cleveand Clinic  
<https://my.clevelandclinic.org/health/drugs/18282-acetaminophen-effervescent-tablets>
- Adams, M. J. (1995). *Chemometrics in Analytical Spectroscopy*, Thomas, Graham House. *Science Park, Cambridge. edi, 2*, 187.
- Aktaş, A. H., & Yavaş, U. (2019). *Yüksek Tansiyon Tedavisinde Kullanılan Bazı İlaç Etkin Maddelerinin UV/VIS Spektrofotometrik ve Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografik (HPLC) Yöntemlerle İncelenmesi ve Elde Edilen Verilerin Kemometrik Yöntemlerle Değerlendirilmesi*. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 23(1), 175-184.
- Albero, B., Sánchez-Brunete, C., Miguel, E., Aznar, R., & Tadeo, J. L. (2014). Determination of selected pharmaceutical compounds in biosolids by supported liquid extraction and gas chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1336, 52-58.
- Alkan, E., & Yılmaz, B. (2012). *Flurbiprofenin Farmasötik Preparatlarda Analitik Yöntemlerle Miktar Tayini*. *Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, Erzurum*, 1-76.
- Allen, DW; Cooksey, C; Tsai, BK (Nov 13, 2009). "Spectrophotometry". NIST. Retrieved Dec 23, 2018.

- Alnuwaiser, M. A. (2021). Utilization of both UV and GC-MS spectroscopy to track the estimation of caffeine and acetaminophen in a number of paracetamol analgesic drugs.
- Alves, J. C. L., & Poppi, R. J. (2013). Pharmaceutical analysis in solids using front face fluorescence spectroscopy and multivariate calibration with matrix correction by piecewise direct standardization. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 103, 311-318.
- Amani, M. B., Kindenge, J. M., Baruti, E. T., Bakiantima, E. N., Agasa, S. B., Hubert, P., & Marini Djang'eing'a, R. (2021). Quality Control of Tramadol in Kisangani: Development, Validation, and Application of a UV-Vis Spectroscopic Method. *American Journal of Analytical Chemistry*, 12(8), 295-309.
- Anan'eva, L. P., Starovoytova, M. N., Desinova, O. V., Gukasyan, D. A., & Denisov, L. N. (2007). Zaldiar (tramadol/atsetaminofen) v lechenii khronicheskoy boli pri osteoartroze. *Consilium Medicum*, 9(12), 76-81.
- Arancibia, V., Penagos-Llanos, J., Nagles, E., García-Beltrán, O., & Hurtado, J. J. (2019). Development of a microcomposite with single-walled carbon nanotubes and Nd<sub>2</sub>O<sub>3</sub> for determination of paracetamol in pharmaceutical dosage by adsorptive voltammetry. *Journal of pharmaceutical analysis*, 9(1), 62-69.
- Arjunan, V., Santhanam, R., Marchewka, M. K., & Mohan, S. (2014). Comprehensive quantum chemical and spectroscopic (FTIR, FT-Raman, <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR) investigations of O-desmethyltramadol hydrochloride an active metabolite in tramadol—An analgesic drug. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 122, 315-330.
- Baleanu B., Dinç E, ve Onur F. (2001). "Spectrophotometric multicomponent analysis of a mixture of metamizol, acetaminophen and caffeine in pharmaceutical formulations by two chemometric techniques", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 26, 949-957.
- Baptistao, M., de Carvalho Rocha, W. F., & Poppi, R. J. (2011). Quality control of the paracetamol drug by chemometrics and imaging spectroscopy in the near infrared region. *Journal of Molecular Structure*, 1002(1-3), 167-171.
- Başbülbül, G., & Biyoteknoloji, M. (2020). *Bakteri Yüzey Gösterim Tekniği İle Rekombinant Nükleaz Enziminin Saflaştırılması* (Master's Thesis).

- Bavaskar S.R., Agrawal,A.D., Agrawal,Y.S, Amrutkar,A.N, Badhe,N.L., Kawatikwar, P.S, Spectrophotometric Estimation of Tramadol Hydrochloride in Bulk and Tablet Dosage Form. *Asian J. Research Chem.* 3(3): July- Sept. 2010; Page 714-715.
- Beakley BD, Kaye AM, Kaye AD. Tramadol, Pharmacology, Side Effects, and Serotonin Syndrome: A Review. *Pain Physician* 2015;18(4):395-400. [PUBMED: 26218943]
- Belal, T., Awad, T., & Clark, R. (2009). Determination of paracetamol and tramadol hydrochloride in pharmaceutical mixture using HPLC and GC-MS. *Journal of chromatographic science*, 47(10), 849-854.
- Bello, L., Carrabba, G., Giussani, C., Lucini, V., Cerutti, F., Scaglione, F., & Bikfalvi, A. (2001). Low-dose chemotherapy combined with an antiangiogenic drug reduces human glioma growth in vivo. *Cancer research*, 61(20), 7501-7506.
- Bertolini A, Ferrari A, Ottani A, Guerzoni S, Tacchi R, Leone S (2006). "Paracetamol: new vistas of an old drug". *CNS Drug Rev.* 12 (3–4): 250-75.
- Bharathi, K., Kumar, S. P., Prasad, P. S., & Narayanan, V. (2018). Voltammetric determination of paracetamol by N, N'-bis (salicylaldimine)-benzene-1, 2-diamine chromium (III) Schiff base complex modified GCE. *Materials Today: Proceedings*, 5(2), 8961-8967.
- Bozkurt P. Use of tramadol in children. *Paediatric Anaesthesia* 2005;15(12):1041-7.
- Brandt, K. D. (2000). The role of analgesics in the management of osteoarthritis pain. *American journal of therapeutics*, 7(2), 75-90.
- Brereton, R. G., Scott, D. R., Massart, D. L., Dessy, R. E., Hopke, P. K., Spiegelman, C. H., & Wegscheider, W. (1992). Chemometrics tutorials II.
- Bynum, W. F. (2008). *History of medicine: a very short introduction* (Oxford: Oxford University Press)
- Chandra, P., Rathore, A. S., Lohidasan, S., & Mahadik, K. R. (2012). Application of HPLC for the simultaneous determination of aceclofenac, paracetamol and tramadol hydrochloride in pharmaceutical dosage form. *Scientia pharmaceutica*, 80(2), 337-352.
- Chefirat, B., Zergui, A., Belmessabih, M. N., Rahmani, C., & Rezk-kallah, H. (2020). Validation of a spectrophotometric method for the determination of paracetamol in plasma applicable for toxicological emergencies in laboratories with limited resources. *Toxicologie Analytique et Clinique*, 32(4), 266-277.

- Christina Johnson, How to Protect Your Liver from Acetaminophen, UCSan Diego Health, June 29, 2018
- Cornell, J. A. (1990). Experiments with mixtures: design models and the analysis of mixture data. New York, NY, USA: John Willey & Sons.
- Crouch, Stanley; Skoog, Douglas A. (2007). Principles of instrumental analysis. Australia: Thomson Brooks/Cole. ISBN 978-0-495-01201-6.
- Cunha, R. R., Ribeiro, M. M., Muñoz, R. A., & Richter, E. M. (2017). Fast determination of codeine, orphenadrine, promethazine, scopolamine, tramadol, and paracetamol in pharmaceutical formulations by capillary electrophoresis. *Journal of separation science*, 40(8), 1815-1823.
- Danilov, A. B., & Zharkova, T. R. (2007). Pharmacotherapy with zaldiar of the pain syndrome in diabetic polyneuropathy. *Zhurnal Nevrologii i Psikhiiatrii Imeni SS Korsakova*, 107(9), 27-31.
- Devi, T. A., Setti, A., Srikanth, S., Nallapeta, S., Pawar, S. C., & Rao, J. V. (2013). Method development and validation of paracetamol drug by RP-HPLC. *Journal of Medical & Allied Sciences*, 3(1).
- Dhillon, S. (2010). Tramadol/paracetamol fixed-dose combination. *Clinical drug investigation*, 30 (10), 711-738.
- Dinç E ve Baleanu D. (2002). "Two new spectrophotometric approaches to the multicomponent analysis of the acetaminophen and caffeine in tablets by classical least-squares and principal component regression techniques", *IL Farmaco*, 57, 33-37.
- Dinç E. ve Üstündağ Ö. (2003). "Spectrophotometric quantitative resolution of hydrochlorothiazide and spironolactone in tablets by chemometric analysis methods, *IL Farmaco*, 58, 1151-1161.
- Dinç, E., & Üstündağ, Ö. (2005). Tabletlerde hidrokloratiazid ve losartan ikili karışımının kantitatif analizi için HPLC verilerine çok değişkenli kalibrasyon tekniklerinin uygulanması. *Kromatografi*, 61 (5), 237-244.
- Dinç, E. (2007). Kemometri çok değişkenli kalibrasyon yöntemleri. *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 27(1), 61-92.
- Dinç, E., & Üstündağ, Ö. (2006). Lineer Regresyon fonksiyonlarına dayalı çok değişkenli kalibrasyonlar ve Analitik uygulamaları. *Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 26 (2), 87-111.

- Dinç, E., 2009. Kemometrik Gçlem ve Yöntemlerin Analitik Kimyadaki Tipik Uygulamaları. Uygulamalı Kemometri Yaz Okulu Notları, 13-17.
- Dinç, E., Baleanu, D., & Onur, F. (2001). Spectrophotometric multicomponent analysis of a mixture of metamizol, acetaminophen and caffeine in pharmaceutical formulations by two chemometric techniques. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 26 (5-6), 949-957.
- Doğan, B., Elik, A., & Altunay, N. (2020). Determination of paracetamol in synthetic urea and pharmaceutical samples by shaker-assisted deep eutectic solvent microextraction and spectrophotometry. *Microchemical Journal*, 154, 104645.
- El-Zinati, A. M., & Abdel-Latif, M. S. (2015). Simultaneous determination of paracetamol and tramadol in pharmaceutical tablets by derivative UV-Vis absorption spectrophotometry. *The Open Analytical Chemistry Journal*, 8(1).
- Ennis ZN, Dideriksen D, Vaegter HB, Handberg G, Pottegard A: Acetaminophen for Chronic Pain: A Systematic Review on Efficacy. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2016 Mar;118(3):184-9. doi: 10.1111/bcpt.12527. Epub 2015 Dec 28.
- Erdik, D.E., (2008). Organik kimyada spektroskopik yöntemler (Beşinci Baskı). Gazi Kitabevi,10-60, Ankara.
- Erek, F. (2020). Bazı ilaç etken maddelerinin tayini için spektrofotometrik yöntem geliştirilmesi.
- Ergün, E. (2003). *Klorofil A Ve B'nin Türev Spektrofotometrik Yöntem İle Tayini* (Doctoral dissertation, Fen Bilimleri Enstitüsü -Yüksek Lisans Tezi).
- Ergün, E. (2003). *Klorofil a ve b'nin türev spektrofotometrik yöntem ile tayini. İstanbul Teknik Üniversitesi* (Doctoral dissertation, Yüksek Lisans Tezi).
- Ertokuş, G.P., Akkaya, A. M., Mermertaş, Z., & Kurşunlu, R. (2019). İlaç Formülasyonundaki Asetilsalisilik Asit, Parasetamol ve Kafeinin Kemometrik Metotlarla Tayini. *Dokuz Eylül Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Fen ve Mühendislik Dergisi*, 21(61), 185-194.
- Faassen, S. M., & Hitzmann, B. (2015). Fluorescence spectroscopy and chemometric modeling for bioprocess monitoring. *Sensors*, 15(5), 10271-10291.
- Fakhari, A. R., Sahragard, A., Ahmar, H., & Tabani, H. (2015). A novel platform sensing based on combination of electromembrane-assisted solid phase microextraction with linear sweep voltammetry for the determination of tramadol. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 747, 12-19.

- Farid, J. F., Mostafa, N. M., Fayez, Y. M., Essam, H. M., & ElTanany, B. M. (2022). Chemometric quality assessment of Paracetamol and Phenylephrine Hydrochloride with Paracetamol impurities; comparative UV-spectrophotometric implementation of four predictive models. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 265, 120308.
- Feng, Y., He, X., Yang, Y., Chao, D., H Lazarus, L., & Xia, Y. (2012). Current research on opioid receptor function. *Current drug targets*, 13(2), 230-246.
- Foroughi, M. M., Jahani, S., & Nadiki, H. H. (2019). Lanthanum doped fern-like CuO nanoleaves/MWCNTs modified glassy carbon electrode for simultaneous determination of tramadol and acetaminophen. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 285, 562-570.
- Garrido-Suárez, B. B., Garrido, G., Menéndez, A. B., Merino, N., Valdés, O., Delgado-Hernández, R., & Granados-Soto, V. (2021). Synergistic interaction between amitriptyline and paracetamol in persistent and neuropathic pain models: An isobolographic analysis. *Neurochemistry International*, 150, 105160.
- Glavanović, S., Glavanović, M., & Tomišić, V. (2016). Simultaneous quantitative determination of paracetamol and tramadol in tablet formulation using UV spectrophotometry and chemometric methods. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 157, 258-264.
- Gouda, A. A., El-Sayed, M. I. K., Amin, A. S., & El Sheikh, R. (2013). Spectrophotometric and spectrofluorometric methods for the determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs: a review. *Arabian Journal of Chemistry*, 6(2), 145-163.
- Grond S, Sablotzki A. Clinical pharmacology of tramadol. *Clinical Pharmacokinetics* 2004;43(13):879-932. [DOI: 10.2165/00003088-200443130-00004]
- Grond, S., & Sablotzki, A. (2004). Clinical pharmacology of tramadol. *Clinical pharmacokinetics*, 43(13), 879-923.
- Gutstein HG, Akil H.. Opioid analgesics. In Hardman JG, Limbird LE, Gilman AG, editors. *Goodman and Gillman's The Pharmacological basis of Therapeutics*. 10 th ed. McGraw-Hill: London; 2001. p. 569-620.
- Héberger, K. (2008). Chemoinformatics—multivariate mathematical—statistical methods for data evaluation. *Medical Applications of Mass Spectrometry*, 141–169. doi:10.1016/b978-044451980-1.50009-4.

- Hernández C, Peris-Garcia E, Garcia-Alvarez-Coque M. C, Ruiz Angel M. J, Suitability of 1-hexyl-3- methylimidazolium ionic liquids for the analysis of pharmaceutical formulations containing tricyclic antidepressants. *Journal of Chromatography*. 2018; 1559(1); 118–127.
- Hoang, V. D., Ly, D. T. H., Tho, N. H., & Minh Thi Nguyen, H. (2014). UV Spectrophotometric simultaneous determination of paracetamol and ibuprofen in combined tablets by derivative and wavelet transforms. *The Scientific World Journal*, 2014.
- Hojjati, H., & Rohani, S. (2006). Measurement and prediction of solubility of paracetamol in water–isopropanol solution. Part 1. Measurement and data analysis. *Organic Process Research & Development*, 10(6), 1101-1109.
- Hollingshead J, Dühmke RM, Cornblath DR. Tramadol for neuropathic pain. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2006, Issue 3. [DOI: 10.1002/14651858.CD003726.pub3]  
[https://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile.php/51384/mod\\_resource/content/0/UV%20Spektroskopisi.pdf](https://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile.php/51384/mod_resource/content/0/UV%20Spektroskopisi.pdf) [Erişim tarihi: 02 Nisan 2022].
- <https://my.clevelandclinic.org/health/drugs/18282-acetaminophen-effervescent-tablets> [Erişim tarihi: 4 Nisan 2022].
- <https://my.clevelandclinic.org/health/drugs/18282-acetaminophen-effervescent-tablets> [Erişim tarihi: 20 Mayıs.2022].
- [https://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=S113480462017000200059&script=sci\\_arttext&tlng=pt](https://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=S113480462017000200059&script=sci_arttext&tlng=pt) (Paxiflas(r): nueva combinación bucodispersable de tramadol/paracetamol para el tratamiento del dolor moderado a intenso. [Erişim tarihi: 09 Mayıs 2022].
- [https://tr.wikisko.ru/wiki/Chemometrics#cite\\_note-Malinowski1980-2](https://tr.wikisko.ru/wiki/Chemometrics#cite_note-Malinowski1980-2) [Erişim tarihi: 02 Mayıs 2022].
- <https://www.fda.gov/consumers/articulos-en-espanol/no-tome-dosis-doble-de-acetaminofen> [Erişim tarihi: 05 Mayıs 2022].
- <https://www.fda.gov/media/156139/download> [Erişim tarihi: 04 Mayıs 2022].
- Huang, Y. H., Sue, S. H., Wu, Z. S., Huang, S. M., Lee, S. Y., & Wu, Z. F. (2022). Antitumorigenic Effect of Tramadol and Synergistic Effect With Doxorubicin in Human Breast Cancer Cells. *Frontiers in Oncology*, 12, 811716-811716. doi: 10.3389/fonc.2022.811716. (ORIGINAL RESEARCH article/ *Front. Oncol.*, 26 January 2022)

- Ismaiel, O. A., & Hosny, M. M. (2012). Development and validation of a spectrophotometric method for the determination of tramadol in human urine using liquid-liquid extraction and ion pair formation. *Int J Instrum Sci*, 1, 34-40.
- Issa, Y. M., Zayed, S. I., & Habib, I. H. (2011). Simultaneous determination of ibuprofen and paracetamol using derivatives of the ratio spectra method. *Arabian Journal of Chemistry*, 4(3), 259-263.
- Jaeschke H, Bajt M.L., 9.21-Mechanisms of Acetaminophen Hepatotoxicity *Comprehensive Toxicology (Second Edition) Volume 9*, 2010, Pages 457-473
- Kaiser H., Zur definition von selectivität, spezifität und empfindlichkeit von analysenverfahren *Anal. Chem.*, 260, 252 (197)
- Kamble, R. M., & Singh, S. G. (2012). Stability-indicating RP-HPLC method for analysis of paracetamol and tramadol in a pharmaceutical dosage form. *E-Journal of Chemistry*, 9(3), 1347-1356.
- Kanthale, S. B., Thonte, S. S., Pekamwar, S. S., & Mahapatra, D. K. (2020). Development of a Rapid Chemometric Reverse Phase HPLC Method for the Simultaneous Estimation of Paracetamol and Ibuprofen in Bulk and Tablet Formulation. *Int J Cur Res Rev/ Vol*, 12(23), 98.
- Karunakaran, K., Navaneethan, G., & Elango, K. P. (2012). Development and validation of a stability-indicating RP-HPLC method for simultaneous determination of paracetamol, tramadol HCl and domperidone in a combined dosage form. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 11(1), 99-106.
- King, S., Forbes, K., Hanks, G. W., Ferro, C. J., & Chambers, E. J. (2011). A systematic review of the use of opioid medication for those with moderate to severe cancer pain and renal impairment: a European Palliative Care Research Collaborative opioid guidelines project. *Palliative medicine*, 25(5), 525-552.
- Kitiş F., 2011. İlaç numunelerinde kafein ve parasetamol'ün kemometrik yöntemlerle tayinleri. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 60s, Isparta.
- Kotlińska-Lemieszek, A., & Żylicz, Z. (2022). Less Well-Known Consequences of the Long-Term Use of Opioid Analgesics: A Comprehensive Literature Review. *Drug Design, Development and Therapy*, 16, 251.
- Kozak, J., Tyszczyk-Rotko, K., Wójciak, M., & Sowa, I. (2021). Electrochemically Activated Screen-Printed Carbon Sensor Modified with Anionic Surfactant

- (aSPCE/SDS) for Simultaneous Determination of Paracetamol, Diclofenac and Tramadol. *Materials*, 14(13), 3581.
- Kramer, R. (1998). Chemometric techniques for quantitative analysis. CRC Press.
- Kress, H. G., Koch, E. D., Kosturski, H., Steup, A., Karcher, K., Dogan, C., ... Eerdeken, M. (2016). Direct conversion from tramadol to tapentadol prolonged release for moderate to severe, chronic malignant tumour-related pain. *European Journal of Pain*, 20(9), 1513–1518.
- Kumar, K. (2017). Principal component analysis: Most favourite tool in chemometrics.
- Kumar, N., Manikandan, K., & Kathiravan, M. K. (2020). Spectroscopic Estimation of Tramadol using Multilinear Regression Analysis. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 13(5), 2282-2286.
- Küçük, A., & Kadioğlu, Y. (2005). Determination of tramadol hydrochloride in ampoule dosage forms by using UV spectrophotometric and HPLC-DAD methods in methanol and water media. *Il Farmaco*, 60(2), 163-169.
- Lee, J.J. and D.L. Simmons, Antipyretic therapy: Clinical pharmacology, in Handbook of clinical neurology. 2018, Elsevier. p. 869-881
- Leis, H. J., Fauler, G., & Windischhofer, W. (2004). Synthesis of d1-N-ethyltramadol as an internal standard for the quantitative determination of tramadol in human plasma by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 804(2), 369-374.
- Li, J., & Ju, H. (2006). Simultaneous determination of ethamsylate, tramadol and lidocaine in human urine by capillary electrophoresis with electrochemiluminescence detection. *Electrophoresis*, 27(17), 3467-3474.
- Luybaert J, Massart DL, and Heyden YV, "Near-infrared spectroscopy applications in pharmaceutical analysis." *Talanta* 72, no. 3, (2007), p: 865-883
- Mäntele, W., & Deniz, E. (2017). UV–VIS absorption spectroscopy: Lambert-Beer reloaded. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 173, 965–968. doi:10.1016/j.saa.2016.09.037
- Martens, H., Martens, M., *Multivariate Analysis of Quality*, Chichester, Wiley (2000)
- Martens, H., Næs, T., *Multivariate Calibration*, Chichester, Wiley (1989)
- McClellan, K., & Scott, L. J. (2003). Tramadol/paracetamol. *Drugs*, 63(11), 1079-1086.

- Merey, G., Aletli Analiz Yöntemleri (Analiz Çeşitleri ve Temel Kavramlar) [http://web.hitit.edu.tr/dersnotlari/gokcemerey\\_13.10.2015\\_7L4W.pdf](http://web.hitit.edu.tr/dersnotlari/gokcemerey_13.10.2015_7L4W.pdf) [Erişim tarihi: 02.06.2022].
- Meyer, J., & Karst, U. (2001). Determination of paracetamol (acetaminophen) by HPLC with post-column enzymatic derivatization and fluorescence detection. *Chromatographia*, 54(3), 163-167.
- Miller, J., & Miller, J. (2008). Analitik kimyacılar için istatistik ve kemometri. Çev. Ahmet Uyanık, İlke Yayınevi, 312s, Ankara. Minami K, Ogata J, Uezono Y. What is the main mechanism of tramadol?. *Naunyn Schmiedebergs Archives of Pharmacology* 2015;388:999-1007. [DOI: 10.1007/s00210-015-1167-5]
- Miotto, K., Cho, A. K., Khalil, M. A., Blanco, K., Sasaki, J. D., & Rawson, R. (2017). Trends in tramadol: pharmacology, metabolism, and misuse. *Anesthesia & Analgesia*, 124(1), 44-51.
- Mohamed, D., Hassan, O., Bahnasawy, N., Elnoby, A. S., & Mowaka, S. (2019). UPLC-MS/MS estimation of paracetamol, pseudoephedrine hydrochloride and brompheniramine maleate in plasma: Application to a pharmacokinetic study on healthy Egyptian volunteers based on ethnic difference. *Microchemical Journal*, 150, 104146.
- National Library of Medicine (National Center for Biotechnology Information (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Acetaminophen>) [Erişim tarihi: 06 Mayıs 2022].
- National Library of Medicine (National Center for Biotechnology Information <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/33741> [Erişim tarihi: 10 Mayıs 2022].
- Nossaman, V. E., Ramadhyani, U., Kadowitz, P. J., & Nossaman, B. D. (2010). Advances in perioperative pain management: use of medications with dual analgesic mechanisms, tramadol & tapentadol. *Anesthesiology clinics*, 28(4), 647-666.
- Nuckols TK, Anderson L, Popescu I, et al. Opioid prescribing: a systematic review and critical appraisal of guidelines for chronic pain. *Ann Intern Med*. 2014;160:38-47.
- Ogemdi, I.K., A Review on the Properties and Uses of Paracetamol. *International Journal of Pharmacy and Chemistry*, 2019. 5(3): p. 31.
- Onur, F., Yücesoy, C., Türev spektrofotometrisi, *FABAD J. Pharm. Sci.*, 13, 462- 469 (1988).

- Osipova, N. A., Osipova, V. V., Lubitsev, N. I., & Lukianov, M. V. (2006). 691 Tramadol/Paracetamol (Zaldiar): Experience Of Treatment Of 10,411 Patients In Russia. *European Journal of Pain*, 10(S1), S180c–S180.
- Özen, G., 2009, Farmasötik kremlerde UV türev spektrofotometrisi ve yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yöntemleri ile izokonazol nitrat ve diflukortolon valerat miktar tayini, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 20-24
- Palur, K., Archakam, S. C., & Koganti, B. (2020). Chemometric assisted UV spectrophotometric and RP-HPLC methods for simultaneous determination of paracetamol, diphenhydramine, caffeine and phenylephrine in tablet dosage form. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 243, 118801.
- Patel, B. N., Sharma, N., Sanyal, M., & Shrivastav, P. S. (2009). An accurate, rapid and sensitive determination of tramadol and its active metabolite O-desmethyltramadol in human plasma by LC–MS/MS. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 49(2), 354-366.
- Patel, R. K., Patel, K. R., Patel, J. G., Patel, R., & Patel, Y. (2020). A Review On Analytical Method Validation Of Diclofenac Sodium And Paracetamol Tablet Dosage Form.
- Patrono C., Collier B., Dalen JE., FitzGerald GA., Fuster V., Gent M, Hirsh J., Roth G., Platelet-active drugs: the relationships among dose, effectiveness, and side effects. *Chest*; 2001. 119: 39-63.
- Pekcan Ertokuş, G., Akkaya, A. M., Mermertaş, Z., & Kurşunlu, R. (2019). İlaç Formülasyonundaki Asetilsalisilik Asit, Parasetamol ve Kafeinin Kemometrik Metotlarla Tayini. *Dokuz Eylül Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Fen ve Mühendislik Dergisi*, 21(61), 185-194.
- Pereira, F. J., Rodríguez-Cordero, A., López, R., Robles, L. C., & Aller, A. J. (2021). Development and validation of an RP-HPLC-PDA method for determination of paracetamol, caffeine and tramadol hydrochloride in pharmaceutical formulations. *Pharmaceuticals*, 14(5), 466.
- Pujia, F., Coppola, G., Anastasio, M. G., Brienza, M., Vestrini, E., Valente, G. O., & Pierelli, F. (2012). Cutaneous silent period in hand muscles is lengthened by tramadol: Evidence for monoaminergic modulation?. *Neuroscience Letters*, 528(1), 78-82.

- Raffa, R. B., Friderichs, E. L. M. A. R., Reimann, W. O. L. F. G. A. N. G., Shank, R. P., Codd, E. E., Vaught, J. L., & Selve, N. O. R. M. A. (1993). Complementary and synergistic antinociceptive interaction between the enantiomers of tramadol. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 267(1), 331-340.
- Resonance, 22(8), 747–759. doi:10.1007/s12045-017-0523-9
- Sarıdağ, A. M. (2017). Bazı antibiyotik ilaç numunelerinin PCR ve PLS ile HPLC ve/veya spektrofotometrik tayinleri (Master's thesis, Fen Bilimleri Enstitüsü).
- Schug, S. A. (2006). Combination analgesia in 2005—a rational approach: focus on paracetamol–tramadol. *Clinical rheumatology*, 25(1), 16-21.
- Scott LJ, Perry CM. Tramadol: a review of its use in perioperative pain. *Drugs* 2000;60(1):139-76. [DOI: 10.2165/00003495-200060010-00008]
- Scott, L. J., & Perry, C. M. (2000). Tramadol. *Drugs*, 60(1), 139-176.
- Shah, U. H., & Jasani, A. H. (2017). Chemometric assisted spectrophotometric methods for simultaneous determination of paracetamol and tolperisone hydrochloride in pharmaceutical dosage form. *Eurasian Journal of Analytical Chemistry*, 12(3), 211-222.
- Sheibani, A., & Haghpaizir, N. (2014). Application of ion mobility spectrometry for the determination of tramadol in biological samples. *journal of food and drug analysis*, 22(4), 500-504.
- Skoog D A, West D M &Holler F J (1999). Analitik kimya temelleri.(Çev. Kılıç E &Köseoğlu F).Bilim Yayıncılık.(Orijinal eserin yayın tarihi, 1996), 497-598, Ankara.
- Srinivasan, K. K., Alex, J., Shirwaikar, A. A., Jacob, S., Kumar, M. S., & Prabu, S. L. (2007). Simultaneous derivative spectrophotometric estimation of aceclofenac and tramadol with paracetamol in combination solid dosage forms. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 69(4), 540.
- Stillings M, Havlik I, Chetty M, et al. Comparison of the pharmacokinetic profiles of soluble aspirin and solid paracetamol tablets in fed and fasted volunteers. *Current Medical Research and Opinion* 2000; 16: 115–24.
- Švorc, L., Sochr, J., Tomčík, P., Rievaj, M., & Bustin, D. (2012). Simultaneous determination of paracetamol and penicillin V by square-wave voltammetry at a bare boron-doped diamond electrode. *Electrochimica Acta*, 68, 227-234.
- Swinehart, D. F. (1962). Bira-lambert yasası. *Kimya Eğitimi Dergisi*, 39(7), 333.

- Szałek, E., Karbownik, A., Murawa, D., Połom, K., Urbaniak, B., Grabowski, T., & Cieśla, S. (2014). The pharmacokinetics of the effervescent vs. conventional tramadol/paracetamol fixed-dose combination tablet in patients after total gastric resection. *Pharmacological Reports*, 66(1), 159-164.
- Taghizade, M., Ebrahimi, M., Fooladi, E., & Yoosefian, M. (2021). Simultaneous spectrophotometric determination of the residual of ciprofloxacin, famotidine, and tramadol using magnetic solid phase extraction coupled with multivariate calibration methods. *Microchemical Journal*, 160, 105627.
- Talsky, G., Mayring, L., & Kreuzer, H. (1978). High-Resolution, Higher-Order UV/VIS Derivative Spectrophotometry. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 17(11), 785-799.
- Temel, S. (2019). Paroxetin etken maddesinin tayini için yeni spektrofotometrik yöntem geliştirilmesi (Master's thesis, Sağlık Bilimleri Enstitüsü).
- Thomas S.P., Sankar H.K., *A simple colorimetric method for estimation of tramadol hydrochloride in pure and tablet dosage forms*, Indian J Pharmacol. 2016 Sep-Oct; 48(5): 550–554. doi: 10.4103/0253-7613.190746
- Toral, M., Rivas, J., Saldias, M., Soto, C., & Orellana, S. (2008). Simultaneous determination of acetaminophen and tramadol by second derivative spectrophotometry. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 53(2), 1543-1547.
- Tornero-Tornero, C., Galván, J., García, I., Boyer, M., & Orduña-Valls, J. (2017). Paxiflas (r): nueva combinación bucodispersable de tramadol/paracetamol para el tratamiento del dolor moderado a intenso. *Revista de la Sociedad Española del Dolor*, 24(2), 59-67.
- Tramadol hydrochloride. In: Brayfield A editor(s). *Martindale-the complete drug reference* (available at [medicinescomplete.com](http://medicinescomplete.com)) (accessed 21 November 2016). 8th Edition. Pharmaceutical Press, 2016.
- U.S.FOOD&DRUG, Drug Safety and Availability, Comunicado de la FDA sobre la seguridad de los medicamentos: FDA advierte que el medicamento antipirético y analgésico acetaminofén (paracetamol) puede causar reacciones poco comunes pero serias en la piel (<https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/comunicado-de-la-fda-sobre-la-seguridad-de-los-medicamentos-fda-advierte-que-el-medicamento>)

- Uzak, Y. (2019). *Dopamine ve asetaminofenin eş zamanlı saptanması için bir voltametrik yöntemin geliştirilmesi* (Master's thesis, Fen Bilimleri Enstitüsü).
- Üstündağ Ö. ve Dinç E. (2003). Simultaneous resolution of a binary mixture of captopril and hydrochlorothiazide in tablets by bivariate and multivariate spectral calibrations, *Die Pharmazie*, 58, 623-628
- Üstündağ, E.Ö., & Dinç, E., Anjiyotensin II Reseptör Antagonistleri İçeren Farmasötik Preparatlardaki Etkin Maddelerin Spektral Olarak “Sürekli Dalgacık Dönüşüm” Yöntemleriyle Miktar Tayinleri, *Analitik Kimya Anabilim Dalı*, 2009-Ankara.
- Üstündağ, Ö., (2003) Hidroklorotiazid İçeren Farmasötik Preparatlardaki Etkin Maddelerin Kemometrik Yöntemlerle Miktar Tayinleri, Yüksek Lisans Tezi, Ankara.
- Vertzoni, M. V., Archontaki, H. A., & Galanopoulou, P. (2003). Development and optimization of a reversed-phase high-performance liquid chromatographic method for the determination of acetaminophen and its major metabolites in rabbit plasma and urine after a toxic dose. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 32(3), 487-493.
- Walash, M. I., Ibrahim, F., & Abo El Abass, S. (2017). Development and validation of HPLC method for simultaneous estimation of famotidine, paracetamol and diclofenac in their raw materials and pharmaceutical formulation. *Analytical Chemistry Letters*, 7(3), 421-437.
- Ward B, Alexander-Williams JM. Paracetamol revisited: a review of the pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Acute Pain* 1999; 2: 140–9.
- Wiffen, P. J., Derry, S., & Moore, R. A. (2017). Tramadol with or without paracetamol (acetaminophen) for cancer pain. *Cochrane Database of Systematic Reviews*
- Wold, S. (1995). Chemometrics; what do we mean with it, and what do we want from it. *Chemometrics and intelligent laboratory systems*, 30(1), 109-115. doi:10.1016/0169-7439(95)00042-9
- Xu, F., & Liu, L. (2019). Simultaneous determination of free methamphetamine, pethidine, ketamine and tramadol in urine by dispersive liquid–liquid microextraction combined with GC–MS. *Forensic Sciences Research*, 4(2), 188-194.
- Y.M. Issa, S.I.M Zayed, I.H.I. Habib. *Arabian Journal Of Chemistry*, 4(3), s. 259-263. (2011) <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2010.06.044>

- Yaman, M. (2005). The improvement of sensitivity in lead and cadmium determinations using flame atomic absorption spectrometry. *Analytical Biochemistry*, 339(1), 1-8.
- Yavaş, U. *Yüksek tansiyon tedavisinde kullanılan bazı ilaç etken maddelerinin UV-Vis spektrofotometrik ve yüksek basınçlı sıvı kromatografik (HPLC) yöntemlerle incelenmesi ve elde edilen verilerin kemometrik yöntemlerle değerlendirilmesi* (Master's thesis, Fen Bilimleri Enstitüsü),2019.
- Yunusoğlu, O., Allahverdiyeva, S., Yardım, Y., & Şentürk, Z. (2020). A Simple Approach to Simultaneous Electroanalytical Quantification of Acetaminophen and Tramadol Using a Boron-doped Diamond Electrode in the Existence of Sodium Dodecyl Sulfate. *Electroanalysis*, 32(2), 429-436.
- Zanger, U. M., & Schwab, M. (2013). Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacology & therapeutics*, 138(1), 103-141.
- Zhang, J., Chen, L., Sun, Y., & Li, Y. (2017). Tramadol differentially regulates M1 and M2 macrophages from human umbilical cord blood. *Inflammopharmacology*, 25(5), 533–541.
- Zhao, S., Bai, W., Yuan, H., & Xiao, D. (2006). Detection of paracetamol by capillary electrophoresis with chemiluminescence detection. *Analytica Chimica Acta*, 559(2), 195-199.
- Zhu, T., Ding, L., Guo, X., Yang, L., & Wen, A. (2007). Simultaneous determination of tramadol and acetaminophen in human plasma by LC–ESI–MS. *Chromatographia*, 66(3), 171-178.