



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

**AMPROLYUM HİDROKLORÜR, VİTAMİN K₃, METİL PARABEN
VE PROPİL PARABEN'İN HPLC YÖNTEMİYLE AYRILMASI VE
TAYİNİ**

AKIN OSANMAZ

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. ÜMİT ERGUN**

DÜZCE, 2019

T.C.
DÜZCE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**AMPROLYUM HİDROKLORÜR, VİTAMİN K₃, METİLPARABEN
VE PROPİLPARABEN'İN HPLC YÖNTEMİYLE AYRILMASI VE
TAYİNİ**

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

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Ümit ERGUN

Düzce Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Ümit ERGUN

Düzce Üniversitesi

Prof. Dr. Erdal DİNÇ

Ankara Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Nuri Cenk COŞKUN

Düzce Üniversitesi

Tez Savunma Tarihi: 27/06/2019

BEYAN

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

27 Haziran 2019

Akın OSANMAZ

TEŞEKKÜR

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

Bugüne gelene kadar her zaman yanımda olduklarını hissettiren annem ve babam, tez çalışmam boyunca değerli katkılarını hiç bir zaman esirgemeyen hayat arkadaşım Esen BAYRAKTAR'a sonsuz teşekkür ederim.

27 Haziran 2019

Akın OSANMAZ

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
ÇİZELGE LİSTESİ.....	viii
KISALTMALAR.....	ix
SİMGELER	x
ÖZET	xi
ABSTRACT	xii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ (HPLC).....	5
1.1.1. HPLC Donanımı.....	6
1.1.1.1. Mobil Faz.....	6
1.1.1.2. Pompa	6
1.1.1.3. Enjektör.....	7
1.1.1.4. Kolon.....	7
1.1.1.5. Dedektör.....	7
1.1.2. HPLC Sistem Türleri.....	7
1.1.3. Kromatografik Yöntemler.....	7
1.1.3.1. Normal Faz Kromatografisi	7
1.1.3.2. Ters Faz Kromatografisi.....	8
1.2. İYON DEĞİŞTİRME KROMATOĞRAFİ	8
1.3. KİRAL AYIRMA KROMATOĞRAFİ.....	9
1.4. BOYUT DIŞLAMA KROMATOĞRAFİ.....	9
2. MATERYAL VE YÖNTEMİ	10
2.1. ANALİTİK YÖNTEM VALİDASYONU	13
2.1.1. Amaç	13
2.1.2. Miktar Tayini Yöntemi.....	13
2.1.3. Reaktifler	17
2.1.4. Miktar Tayini Testi Validasyon Parametreleri.....	17
2.1.5. Miktar Tayini Yöntem Validasyonu.....	18
2.1.5.1. Spesifiklik.....	18
2.1.5.2. Sistem Uygunluk.....	20
2.1.5.3. Doğrusallık ve Çalışma Aralığı	22
2.1.5.4. Doğruluk	23
2.1.5.5. Kesinlik	25
2.1.5.6. Güvenirlilik	28

3. BULGULAR VE TARTIŞMA	30
3.1. SPESİFİK LİK.....	30
3.2. SİSTEM UYGUNLUK	35
3.3. DOĞRUSALLIK VE ÇALIŞMA ARALIĞI.....	36
3.4. DOĞRULUK.....	41
3.5. KESİNLİK.....	46
3.5.1. Sistem Kesinliği	46
3.5.2. Yöntem Kesinliği (Tekrarlanabilirlik)	48
3.5.3. Ara Kesinliği	51
3.6. GÜVENİRLİK	57
3.6.1. Çözelti Stabilesi.....	57
3.6.2. Küçük Değişikler	63
3.6.2.1. Farklı Akış Hızı.....	63
3.6.2.2. Farklı Kolon Sıcaklığı.....	66
4. SONUÇ VE ÖNERİLER	69
5. KAYNAKLAR.....	72
ÖZGEÇMİŞ.....	74

ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1.1. HPLC şeması.	6
Şekil 1.2. İyon değiştirme kromatografisi.	8
Şekil 2.1. Etken maddelerin açık yapıları.	10
Şekil 2.2. HPLC cihazları.	11
Şekil 3.1. Seyreltme çözeltisi.	31
Şekil 3.2. Plasebo çözeltisi kromatogramı.	31
Şekil 3.3. Amprolyum HCl standart çözeltisi kromatogramı.	32
Şekil 3.4. Vitamin K ₃ standart çözeltisi kromatogramı.	32
Şekil 3.5. Metilparaben standart çözeltisi kromatogramı.	33
Şekil 3.6. Propilparaben standart çözeltisi kromatogramı.	33
Şekil 3.7. Standart çözeltisi kromatogramı.	34
Şekil 3.8. Test çözeltisi kromatogramı.	34
Şekil 3.9. Amprolyum HCl doğrusallık grafiği.	37
Şekil 3.10. Vitamin K ₃ doğrusallık grafiği.	38
Şekil 3.11. Metilparaben doğrusallık grafiği.	39
Şekil 3.12. Propilparaben doğrusallık grafiği.	40
Şekil 3.13. Doğrusallık kromatogramı.	41
Şekil 3.14. Doğruluk kromatogramı %50.	44
Şekil 3.15. Doğruluk kromatogramı %100.	45
Şekil 3.16. Doğruluk kromatogramı %150.	46
Şekil 3.17. Sistem kesinlik I.gün kromatogramı.	47
Şekil 3.18. Sistem kesinlik II.gün kromatogramı.	48
Şekil 3.19. Yöntem kesinlik kromatogramı (standart).	50
Şekil 3.20. Manzara yöntem kesinlik kromatogramı (test).	51
Şekil 3.21. Ara kesinlik kromatogramı (standart).	56
Şekil 3.22. Ara kesinlik kromatogramı (test).	57
Şekil 3.23. Çözelti stabilitesi standart çözelti kromatogramı (başlangıç).	61
Şekil 3.24. Çözelti stabilitesi standart çözelti kromatogramı (90 saat).	62
Şekil 3.25. Çözelti stabilitesi test çözelti kromatogramı (başlangıç).	62
Şekil 3.26. Çözelti stabilitesi test çözelti kromatogramı (90 saat).	63
Şekil 3.27. Güvenilirlik kromatogramı (başlangıç).	64
Şekil 3.28. Güvenilirlik kromatogramı (akış hızı=0.66 mL/dk).	65
Şekil 3.29. Güvenilirlik kromatogramı (akış hızı=0.54 mL/dk).	65
Şekil 3.30. Güvenilirlik kromatogramı (başlangıç).	67
Şekil 3.31. Güvenilirlik kromatogramı (kolon sıcaklığı=30 °C).	67
Şekil 3.32. Güvenilirlik kromatogramı (kolon sıcaklığı=20 °C).	68

ÇİZELGE LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Çizelge 2.1. Kullanılan reaktifler.....	17
Çizelge 2.2. Hazırlanan doğrusallık çözeltileri.....	23
Çizelge 2.3. Hazırlanan doğruluk çözeltileri	24
Çizelge 3.1. Çözeltilerin HPLC kromatogram değerleri.	30
Çizelge 3.2. Pik alanların ve alıkonma zamanların bağıl standart sapması değerleri.....	35
Çizelge 3.3. İki standart çözeltisi arasındaki uyum değerleri	36
Çizelge 3.4. Sistem uygunluk parametresinin HPLC kromatogram değerleri	36
Çizelge 3.5. Amprolyum HCl konsantrasyona bağlı kromatogram değerleri.	37
Çizelge 3.6. Vitamin K ₃ konsantrasyona bağlı kromatogram değerleri.....	38
Çizelge 3.7. Metilparaben konsantrasyona bağlı kromatogram değerleri.	39
Çizelge 3.8. Propilparaben konsantrasyona bağlı kromatogram değerleri	40
Çizelge 3.9. Amprolyum HCl çözeltisinin konsantrasyon ve geri kazanım.	42
Çizelge 3.10. Vitamin K ₃ çözeltisinin konsantrasyon ve geri kazanım.	42
Çizelge 3.11. Metilparaben çözeltisinin konsantrasyon ve geri kazanım.....	43
Çizelge 3.12. Propilparaben çözeltisinin konsantrasyon ve geri kazanım.....	43
Çizelge 3.13. Sistem kesinlik parametresinin I.gün değerleri.	46
Çizelge 3.14. Sistem kesinlik parametresinin II.Gün değerleri	47
Çizelge 3.15. Amprolyum HCl yöntem kesinlik parametresinin değerleri.	48
Çizelge 3.16. Vitamin K ₃ yöntem kesinlik parametresinin değerleri.....	49
Çizelge 3.17. Metilparaben yöntem kesinlik parametresinin değerleri	49
Çizelge 3.18. Propilparaben yöntem kesinlik parametresinin değerleri.	50
Çizelge 3.19. Amprolyum HCl ara kesinlik parametresinin değerleri.	52
Çizelge 3.20. Amprolyum HCl enjeksiyon sonucu değerleri.	52
Çizelge 3.21. Vitamin K ₃ ara kesinlik parametresinin değerleri.....	53
Çizelge 3.22. Vitamin K ₃ enjeksiyon sonucu değerleri.	53
Çizelge 3.23. Metilparaben ara kesinlik parametresinin değerleri.	54
Çizelge 3.24. Metilparaben enjeksiyon sonucu değerleri	54
Çizelge 3.25. Propilparaben ara kesinlik parametresinin değerleri.	55
Çizelge 3.26. Propilparaben enjeksiyon sonucu değerleri.....	55
Çizelge 3.27. Bileşenlerin % değişim değerleri.....	55
Çizelge 3.28. Amprolyum HCl standart çözeltilerinin kromatogram değerleri	57
Çizelge 3.29. Amprolyum HCl test çözeltilerinin kromatogram ve % değişim değerleri.	58
Çizelge 3.30. Vitamin K ₃ standart çözeltilerinin kromatogram değerleri.....	58
Çizelge 3.31. Vitamin K ₃ test çözeltilerinin kromatogram ve % değişim değerleri.....	59
Çizelge 3.32. Metilparaben test çözeltilerinin kromatogram ve % değişim değerleri....	59
Çizelge 3.33. Metilparaben test çözeltilerinin kromatogram ve % değişim değerleri....	60
Çizelge 3.34. Propilparaben standart çözeltilerinin kromatogram değerleri	60
Çizelge 3.35. Propilparaben test çözeltilerinin kromatogram ve % değişim değerleri...	61
Çizelge 3.36. Etkenlerin akış hızı 0,66 ml/dk % değişim değerleri.....	63
Çizelge 3.37. Etkenlerin akış hızı 0,54 mL/dk % değişim değerleri.	64
Çizelge 3.38. Etkenlerin 30 °C sıcaklıktaki % değişim değerleri	66
Çizelge 3.39. Etkenlerin 20 °C sıcaklıktaki % değişim değerleri.	66

KISALTMALAR

AMP HCl	Amprolyum hidroklorür
A.S.K	Amprolyum HCl, sulfakuinoksalin sodyum ve vitamin K ₃ sodyum bisülfid (menadion sodyum bisülfid olarak) içeren tozlar
DAD	Diyot array dedektör
EP	Avrupa farmakopesi
ICH	Uluslararası harmonizasyon topluluğu
MP	Metilparaben
NF	Ulusal formüller
PDA	Fotodiyot array dedektör
PTFE	Politetrafloroetilen
PP	Propilparaben
USP	Amerika birleşik devletleri farmakopesi

SİMGELER

°C	Santigrat derece
C	Konsantrasyon
d	Yoğunluk
dk	Dakika
Ex	Eksitasyon
Em	Emisyon
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
mm	Milimetre
nm	Nanometre
P	Potensi
RSD	Bağıl standart sapma
RT	Alıkonma zamanı
R	Korelasyon katsayısı

ÖZET

AMPROLYUM HİDROKLORÜR, VİTAMİN K₃, METİLPARABEN VE PROPİLPARABEN'İN HPLC YÖNTEMİYLE AYRILMASI VE TAYİNİ

Akın OSANMAZ
Düzce Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi
Danışman: Doç. Dr. Ümit ERGUN
Haziran 2019, 73 sayfa

Antiprotozoal etkili amprolyum hidroklorürü, pıhtılaşmayı önleme açısından etkili vitamin K₃'ü ve antimikrobiyal koruyucu etkili metilparaben ve propilparabeni bir arada içeren ve bu içeriğiyle sıtma hastalığı, kala-azar hastalığı ve uyku hastalığını ortadan kaldırmaya yardımcı olarak kullanılan bu oral çözeltinin zaman açısından avantajı nedeniyle miktar analizi için eşzamanlı bir HPLC yöntemi geliştirilmiş ve gerekli validasyon parametreleri yapılmıştır. Analizlerde 25°C'de inertsil C8-3 4,6 x 250 mm, 5 µm kolon, 254 nm'de dalga boyunda heptan-1-sülfonik asit sodyum tuzu, glasiyel asetik asit, trietilamin tampon çözeltisi, asetonitril ve metanol kullanılmıştır. Cihazda oluşabilecek küçük çaptaki kolon sıcaklığı değişimi ve akış hızı değişiminin yöntemi etkilemediği güvenilirlik çalışması ile kontrol edilmiştir. Yapılan çalışmalarda test ve standart çözeltisinin 90 saat boyunca stabil olduğu gözlemlenmiştir.

Anahtar sözcükler: Amprolyum hidroklorür, Vitamin K₃, Metilparaben, Propilparaben, HPLC validasyon.

ABSTRACT

SEPERATION AND ANALYSIS OF AMPROLIUM HYDROCHLORIDE, VITAMIN K₃, METHYLPARABEN AND PROPYLPARABEN WITH HPLC METHOD

Akin OSANMAZ

Düzce University

Graduate School of Natural and Applied Sciences, Department of Chemistry

Master's Thesis

Supervisor: Assist. Doç. Dr. Umit ERGUN

June 2019, 73 pages

Assay analysis and required validation parameters of oral solutions including antiprotozoal effective amprolium HCl, preventing clotting effective vitamin K₃ and antimicrobial preservative effective methylparaben and propylparaben which are used to help eliminate malaria disease, kala-azar disease and sleep disease were performed in a simultaneous HPLC method due to its advantage in terms of time. Analysis were carried out at 25°C by using inertsil C8-3 4.6 x 250 mm, 5 µm column, PDA detector set at 254 nm, mobile phase formed of a mixture of heptane-1-sulfonic acid sodium salt, glacial acetic acid, triethylamine and acetonitrile and methanol. Selectivity, system suitability, linearity and accuracy parameters were studied and acceptable results were achieved. Small changes at column temperature and flow rate did not affect the method and this was controlled with the help of the reliability study. Test and standard solutions were observed to be stable for 90 hours.

Keywords: Amprolium hydrochloride, Vitamin K₃, Methylparaben, Propylparaben, HPLC validation.

1. GİRİŞ

Veteriner ilaçları çiftlik hayvanlarında yaygın olarak kullanılır. Hayvansal üreticiler için tahakkuk edebilecek ekonomik faydalar sayesinde sınırlı beslenme koşullarında hayvanları sağlıklı tutan, genel olarak kontrol edilen bir hastalık Eimeria protozoa'nın neden olduğu koksidiyozdur. Koksidiyozis özellikle kümes hayvanlarını etkiler ve herhangi bir kontrol önlemi uygulanmadığı takdirde, bir çiftliğin bütün popülasyonunu bir kaç gün içinde yok edebilir. İlaçların çoğu genellikle önleyici bir önlem olarak, suda veya yem de ağız yoluyla uygulanır [1].

Rogers ve arkadaşları 1960 yılında, amprolyum kanatlılarda, hindilerde, sığırlarda, koyunlarda, keçi ve domuzlarda koksidiyoz salgınlarını tedavi etmek ve önlemek için kullanılmıştır [2].

Amprolyum hidroklorür bir koksidiostat ve anti-protozoal maddedir. Coccidia parazitlerine karşı etki eder. Amprolyum hidroklorür ham materyali, birçok yaygın coccidia suşlarının ookistlerinin sporülasyonuna müdahale eder. Başka bir deyişle, amprolyum hidroklorür, taiimin metabolizmasını etkileyecek ve karbonhidrat sentezini önleyecek bir tiamin analog tıbbi malzemedir. Amprolyum hidroklorür su, metanol, etanol ve dimetilformamid içinde çözünür. İzopropanol, butanol, etil asetat ve asetonitril içinde pratik olarak çözünmez [3].

Amprolyum hidroklorürün aşırı dozu, broylerlerde kilo alımını azaltabilir ve başka sonuçlara neden olabilir. Amprolyum hidroklorür yüksek dozlarda çok uzun bir süre kullanırsanız, B1 vitamini eksikliğine neden olabilir [3].

Fukumoto ve arkadaşları 1987 yılında, çalıştıkları metodun Yem Analizi Standartları yöntemine göre listelenmiş ve gelişmiş bir yöntem olduğu belirtmişlerdir. Bu yöntemin, bir ön karışımdaki Amprolyum miktarının metanol ile ekstre edilmesi, solvent ile seyreltilmesi, engelleyici maddelerin nötr bir alümina mini-kolon ile uzaklaştırılması ve ultraviyole spektrofotometreli bir sıvı kromatografi kullanılarak ölçülmesi amaçlanmıştır. Bu çalışmalarında %99.1-101.8'lik bir geri kazanım elde etmişlerdir. Çalışmalarında gerekli validasyon çalışmalarını sunmuşlardır [2].

Abhilekha P.ve arkadaşları tarafından 2015 yılında bir çalışmada amprolyum

hidroklorür ve sulfakuinoksalin sodyum için ters fazlı HPLC metodu geliştirilmiştir. Bu çalışmada, kanatlı kuşlar için kullanılan toz dozaj formlarında formülasyonun ana bileşenleri olan amprolyum hidroklorür ve sulfakuinoksalin sodyum miktarının kantitatif olarak tahmin edilmesi için basit, hızlı ve doğru bir yöntem HPLC kullanılarak geliştirilmiştir. Metot, Uluslararası Uyum Konferansı (ICH) kurallarına göre doğrusalılık, hassasiyet, doğruluk ve sağlamlık açısından doğrulanmıştır [4]. Bu çalışmalarında %101.34'lik bir geri kazanım elde etmişlerdir. Bu çalışmada gerekli validasyon çalışmalarını sunmuşlardır [5].

Mahmoud Mohamed Ali ve arkadaşları tarafından 2017 yılında yapılan bir çalışmada amprolyum hidroklorür (AMP) ve Etopabat için ters fazlı HPLC metodu geliştirilmiştir. Bu çalışmada AMP'nin hızlı, doğru ve etkin bir şekilde belirlenmesini sağlamak için analitik yöntem geliştirilmiştir. Bu çalışmada %99.47'lik bir geri kazanım elde etmişlerdir ve gerekli validasyon çalışmalarını sunmuşlardır [6].

Mashhour Ghanem ve arkadaşları tarafından 2012 yılında yapılan bir çalışmada A.S.K. tozda amprolyum hidroklorür, sulfakuinoksalin sodyum ve vitamin K₃ tayinleri için ters fazlı, ZIC-HILIC kolon (250 mm×4.6 mm, 5 µm) kullanılarak HPLC metodu geliştirilmiştir. Spesifiklik, doğruluk, kesinlik, doğrusalılık, çalışma aralığı, sağlamlık ve gibi parametreler çalışılmıştır. Yöntemin sonuçları, ICH/USP kılavuzlarına göre yapılmıştır ve kriterlerine uygun bulunmuştur. Bu çalışmada %98.9'lik bir geri kazanım elde etmişlerdir ve gerekli validasyon çalışmalarını sunmuşlardır [7].

Salama ve arkadaşları tarafından 2018 yılında yapılan bir çalışmada amprolyum hidroklorür (AMP) için geliştirilmiş kromatografik bir yöntem geliştirmişlerdir. Yöntemin doğruluğu ve kesinliği, aynı günde (gün içi) ve üç günde saf formda AMP'nin üç farklı konsantrasyonunun (100, 300 ve 500 ng/ml) belirlenmesi için önerilen prosedürü uygulayarak belirlenmiştir. Ardışık günler (günler arası), daha sonra yüzde geri kazanım (%R) olarak doğruluk ve yüzde bağıl standart sapma (%RSD) olarak kesinlik hesaplanmıştır. Yöntemin doğruluğu, standart ekleme tekniği uygulanarak da belirlenmiştir [8].

Vitaminler vücutta metabolik olayların normal bir şekilde meydana gelmesi ve sağlıklı durumun sürdürülmesi için gerekli olan, besinler içinde küçük miktarlarda alınan organik bileşenlerdir. K Vitamini lipofilik ve hidrofobik vitaminler grubuna verilen isimdir. K vitamini 1929'da Kopenhag üniversitesinden Profesör Henrik Dam'ın

kolesterol hakkındaki çeşitli araştırmaları sonucu keşfedilmiş, kan pıhtılaşması ile ilişkili olduğu saptandığı için de önceleri koagülasyon vitamini (yani pıhtılaşma vitamini) olarak adlandırılmıştır [9-11]. Bağırsaktaki emilimi, taşınması ve doku dağılımı ile ilişkili olarak önemli farklılıklar ortaya çıkabilmektedir. Kanamanın önlenmesi için gerekli olan Vitamin K₃, yem için gerekli vitamin premikslerinin ve veterinerlikte kullanılan en önemli vitaminlerden bir tanesidir. Vitamin K₃ özellikle bu vitamini kendi metabolizmalarında sentezleyemeyen çiftlik hayvanlarının (tavuk, balık ve domuz) yemlerine eklenmektedir [9].

Ayrıca K vitamininin kanser hücrelerinin büyümesini in vivo ve in vitro olarak inhibe ettiği de tespit edilmiştir. Ek olarak ateroskleroz ve kalsifiye arteriyel plak önlenmesi ve tedavisinde de önemli bir kofaktör olabileceği düşünülmektedir. K vitamininin başlıca diyet kaynağı yeşil yapraklı sebzelerdir [11].

Mashhour ve arkadaşları tarafından 2013 yılında yapılan bir çalışmada Vitamin K₃ Mono Bisulfit için ters fazlı HPLC metodu geliştirilmiştir. Bu yöntemde, ZIC-HILIC (250 mm × 4.6 mm, 5 µm) kolon ve PDA dedektör ile 261 nm dalga boyunda çalışma yapılmıştır. Bu yöntem, ICH ve USP kılavuzlarına (USP34 / NF29) göre doğrulanmıştır. Bu çalışmalarında %99.1-101.8'lik bir geri kazanım elde etmişlerdir ve gerekli validasyon çalışmalarını sunmuşlardır [12].

Elton ve arkadaşı tarafından 1981 yılında yapılan bir çalışmada balık yağı ve yemlerde yağda çözünen vitaminlerin HPLC ile ayrılması için yaptıkları çalışmada kolon olarak MicroPak-CN kullanmışlardır. Hareketli faz olarak balık yağında ve yemlerde, metilen klorür-kloroform-hekzan (3:2:15 v:v:v) kullanılmıştır. Toz yem numuneleri n-hekzan-kloroform-etanol (6:3.5:0.5 v:v:v) içinde çözülmüştür ve enjeksiyondan önce santrifüjlenmiştir. Bu yöntemle A, D, E, K₃ vitaminlerinde başarılı sonuçlar alınmıştır [13].

Yousif Rojeab ve arkadaşları tarafından 2017 yılında yapılan bir çalışmada vitamin C ve Vitamin K₃'ü bir arada analiz ettikleri HPLC bir yöntemi geliştirmişlerdir. Hareketli faz olarak %50 metanol- %49 su- %1 glasiyel asetik asit, akış hızı 1 mL/min, kolon ise ters-faz-C18, 254 nm dalga boyunda UV-Visible dedektör kullanılmıştır. Bu yöntemde gün içi (6 numune için) vitamin C ve K₃ için sırasıyla %92.2 - %102.0 ve %99.4 - %106.7, günler arasında (12 numune için) vitamin C ve K₃ için %96.9 - %99.1 ve %91.7 - %100.4 geri kazanım elde etmişlerdir. Bu iki çalışma için yapılan lineerlik

alışmalarında korelasyon katsayısı 0.9991 olarak bulunmuştur. alışmalarında gerekli validasyon çalışmalarını sunmuşlardır [14].

Oliver ve arkadaşları tarafından 1995 yılında yapılan bir çalışmada yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile plazmada anti kanser ilaç vitamin K₃'ün belirlenmesi için yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntemde hareketli faz %70 Metanol - %30 su, kolon olarak ise ODS (5 µm, 250 x 4.6 mm ID), 265 nm dalga boyunda UV dedektör kullanılmıştır. Bu yöntemde Vitamin K₃ için % 82.4 ± 7.69 (n=7) geri kazanım elde edilmiştir. Gün içi ve günler arasında yapılan kalibrasyon eğrisinden korelasyon katsayısı r>0.999 olarak bulunması sonucunda iyi bir lineerlik olduğu kanıtlanmıştır. Yapılan çalışmada gerekli validasyon çalışmalarını sunmuşlardır [15].

Chang-Zhi ve arkadaşları tarafından 2010 yılında yapılan bir çalışmada vitamin K₃ miktarını belirlemek için floresan spektroeletrokimya yöntemi geliştirilmiştir. Bu alışma floresans dedektör kullanılarak uyarma dalga boyu (Ex) 309 nm; emisyon dalga boyu (Em) 420 nm dalga boylarında gerçekleştirilmiştir. Bu alışma için yapılan lineerlik çalışmalarında korelasyon katsayısı 0.9991 olarak bulunmuştur. Bu yöntemde Vitamin K₃ için bağıl standart sapma <%4.3 (n=5), %97-%105 geri kazanım elde edilmiştir. alışmalarında gerekli validasyon çalışmalarını sunmuşlardır [16].

Klaczko ve arkadaşları tarafından 2002 yılında kompleks vitamin preparatlarında K₁ vitamini içeriğini belirlemek için HPLC metodu geliştirilmiştir. 248 nm dalga boyunda UV dedektör, kolon olarak ise C18 (250 x 4.6 mm, 5 µm), hareketli faz metanol kullanılmıştır. Bu alışma için yapılan lineerlik çalışmalarında korelasyon katsayısı 0.9999 olarak bulunmuştur. alışmalarında gerekli validasyon çalışmalarını sunmuşlardır [17].

Parabenler, molekül içindeki farklı alkil grubu (metil, etil, propil, butil, heptil ve benzilparaben) içeren p-hidroksibenzoik asit esterleridir. İnce yapılı, renksiz ve kokusuzdur. Havada, su ve asit çözeltilerinin etkisi altında kararlı ve dağılmaya karşı dirençlidirler. Asidik ortamlarda, maya ve küflere karşı aktivite gösterirler, ayrıca fungistik olarak aktiftirler. Ama onlar bakterilere karşı etkili değildir. Alkil grubunun zincir uzunluğundaki artışla, parabenlerdeki antiseptik aktivite artar ve sudaki çözünürlükleri azalır. Özellikleri nedeniyle, parabenler farmasötik, gıda ve kozmetik endüstride kullanılan popüler antiseptikler haline gelmiştir. Bu grubun bileşikleri arasında metil ve propilparaben en yaygın şekilde kullanılır Parabenler ürünlerin daha

uzun süre dayanması için kullanılır; Kimyasal özellikleri sayesinde bileşenleri daha uzun süre daha taze tutan etkili koruyucular sağlar. Bu koruyucular ürünleri yayma ve zarar vermeden önce küf ve mantarları öldürür [18].

Giorgio Grosa ve arkadaşları tarafından 2006 yılında yapılan bir çalışmada öksürük şurubunun içindeki Guaifenesin, metilparaben ve propilparaben miktarını belirlemek için HPLC metodu geliştirmişlerdir. 254 nm ve 276 nm dalga boylarında ayarlanan DAD dedektörü, kolon olarak ise C18 (150 x 4.6 mm, 5 µm) kullanılmıştır. Hareketli faz ise A mobil fazı sulu fosfat tamponu (pH 3.0, 10 mM) / Asetonitril 25/75 (v/v), B mobil fazı Metanol. A ve B mobil fazı isokritik olarak hazırlanmıştır. A:B, 85/15 (v/v) ve 1 mL/dk akış hızı ile analizlenmiştir. Bu çalışma için yapılan lineerlik çalışmalarında korelasyon katsayısı 0.999 olarak bulunmuştur. Bu yöntemde guaifenesin, metilparaben ve propilparaben için bağıl standart sapma sırasıyla; %0.8, %0.7 ve %0.4, geri kazanım ise; %100.5, %100.3 ve %100.7 elde edilmiştir. Çalışmalarında gerekli validasyon çalışmalarını sunmuşlardır [19].

Enzo Sottofattori ve arkadaşları tarafından 1998 yılında yapılan bir çalışmada yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile kozmetik kremlerde parabenler'in belirlenmesi yöntemidir. Bu yöntemde hareketli faz %40 metanol - %60 monobazik sodyum fosfat (pH 3.5: 0.025 M), kolon olarak ise siyano-propil kullanılmıştır. Bu yöntemde 220 ve 240 nm dalga boylarında metilparaben ve propilparaben için %100.97 ve %99.2 geri kazanım elde edilmiştir. Çalışmalarında gerekli validasyon çalışmalarını sunmuşlardır [20].

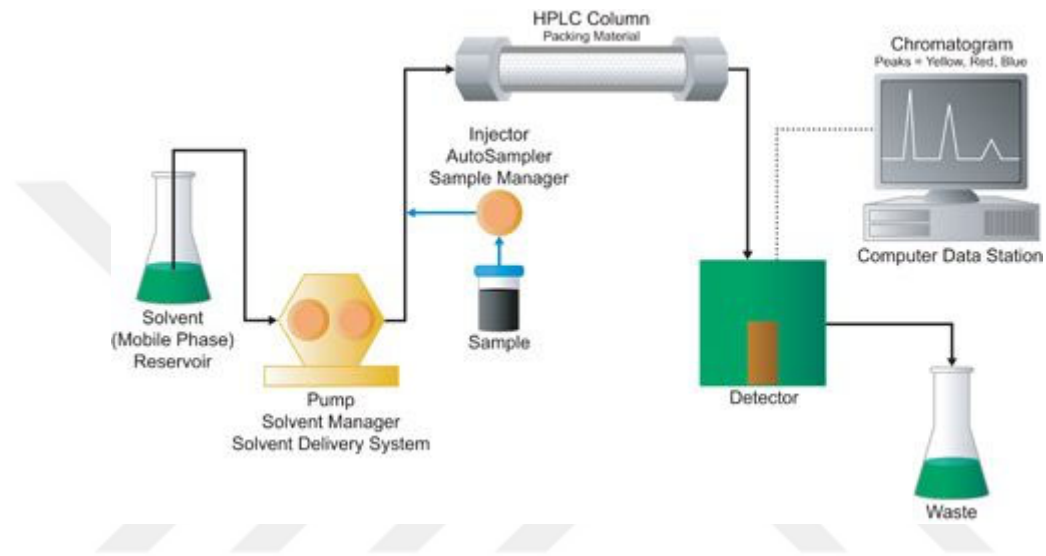
Bahrudin Saad ve arkadaşları tarafından 2005 yılında yapılan bir çalışmada Benzoik Asit, Sorbik Asit, Metilparaben ve Propilparaben için ters fazlı HPLC metodu geliştirmişlerdir. Bu çalışmada Metilparaben (MP) ve Propilparaben (PP) 'nin hızlı, doğru ve etkin bir şekilde belirlenmesini sağlamak için analitik yöntem geliştirilmiştir. Bu çalışmada MP için %100.5, PP için %102.1'lik bir geri kazanım elde etmişlerdir. Çalışmalarında gerekli validasyon çalışmalarını sunmuşlardır [21].

1.1. YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ (HPLC)

HPLC, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (eski adıyla Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi olarak adlandırılır) anlamına gelir. Bir karışımdaki bileşenleri ayırmak, her bir bileşeni tanımlamak ve her bir bileşeni ölçmek için kullanılan kromatografik bir

tekniktir. Yöntem genel olarak bir sıvı çözücü akışı kullanarak kolona gönderilen katı bir adsorban malzemeden geçirilen bir sıvı numunesini içerir. Numunedeki her bir analit, adsorban materyalden biraz farklı şekilde etkileşime girerek analitlerin akışını geciktirir. Etkileşim zayıfsa, analitler kolondan kısa bir süre içinde akarlar ve etkileşim güçlüyse elüsyon süresi uzundur [22].

1.1.1. HPLC Donanımı



Şekil 1.1. HPLC şeması [23].

1.1.1.1. Mobil Faz

Örnek bileşenlerini, sabit faz (kolon) boyunca taşıyan, çeşitli fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip çözelti veya çözücü karışımlarıdır. Kullanılacak mobil fazın seçiminde, analizi yapılacak örnek madde bileşenlerinin özellikleri, kullanılacak sabit faz ve dedektörün özellikleri vb. birçok parametreye dikkat edilmelidir.

Sabit faz; Mobil faz içerisinde gelen örneğe ait bileşenlerin etkileşime girdikleri ve belirli ölçüde alıkonuldukları fazdır.

Alıkonma; Mobil faz içerisinde gelen, analizi yapılacak maddeye ait bileşenlerin sabit faz ile etkileşime girerek belirli oranda tutulması daha doğrusu yavaşlatılması ve böylece daha geç olarak sabit fazı terk etmesi olayıdır.

1.1.1.2. *Pompa*

HPLC donanımında yer alan pompalama sistemleri, akış hızına göre, pompanın yapımında kullanılan malzemeye göre ve pompanın mobil fazı iletme mekanizmasına göre olmak üzere 3 farklı şekilde kategorize edilebilmektedir.

1.1.1.3. *Enjektör*

HPLC donanımını oluşturan enjektör örneğin sabit faz (kolon) öncesinde mobil faza enjekte edilmesi için kullanılır. Elle kumanda edilen manuel ve bilgisayar kumandalı oto-enjektörler olmak üzere 2 çeşidi bulunmaktadır.

1.1.1.4. *Kolon*

Modern HPLC donanımının 4 temel yapı taşından birisi olan kolon, karmaşık örneklerde bileşenlerin birbirinden iyi çözünürlükle ayırımından sorumlu sabit fazdır. Kolon imalatında yapı materyali olarak 316 paslanmaz çelik, teflon, cam veya PEEK en sık tercih edilenlerdir.

1.1.1.5. *Dedektör*

HPLC donanımında 4 temel bileşenden birisi olan dedektörler, örnek bileşenlerini tayin ederken ölçtükleri fiziksel özelliklere göre, 8 çeşittir; Ultraviyole/Görünür Bölge Dedektörü (UV/VIS), Fotodiyot Array Dedektörü (DAD), Floresans Dedektörü (FLD), İletkenlik Dedektörü (CDD), Refraktif İndeks Dedektörü (RID), Elektrokimyasal Dedektör (ECD), Kütle Dedektörü (MS) ve Evaporatif Işık Dağıtıcı Dedektör (ELSD).

1.1.2. HPLC Sistem Türleri

- İsokritik Sistem; Tek pompa, tek solvent, solvent karışımı olabilir. Ayırım yetersizdir.
- Düşük Basıncılı Gradient Sistem; Tek Pompa, maksimum 4 farklı mobil faz, karışma pompadan öncedir.
- Yüksek Basıncılı Gradient Sistem; 2 yada 3 pompa, 2 yada 3 farklı mobil faz karışma pompadan sonradır.

1.1.3. Kromatografik Yöntemler

1.1.3.1. *Normal Faz Kromatografisi*

Normal faz HPLC, ismine rağmen en yaygın HPLC yöntemi değildir. Normal faz

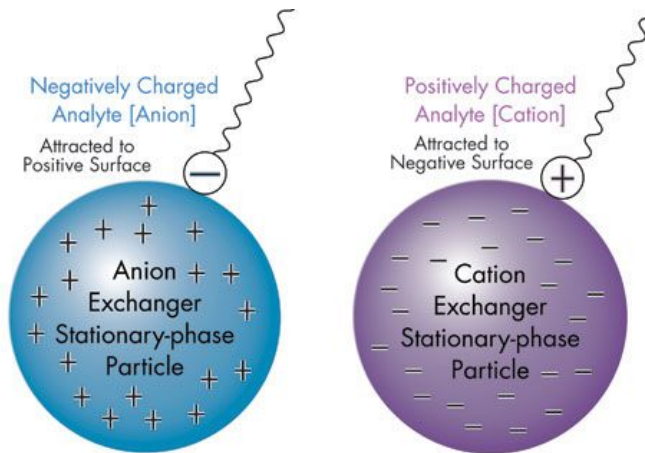
HPLC, hareketli faz olarak polar olmayan çözücüler ve sabit faz olarak silika parçacıkları kullanır. Normal HPLC'de, polar bileşikler, polar olmayan bileşiklere kıyasla durağan fazda polar silikona daha uzun süre yapışır. Bu nedenle polar olmayan bileşikler normal HPLC'de daha hızlı elüe eder. Gözenek boyutları genellikle yaklaşık 3 mikrondur. Kullanılan kolonlar silica gel, cyano, amino, diol veya nitro kolonlardır [24].

1.1.3.2. Ters Faz Kromatografi

Ters fazlı HPLC, en yaygın HPLC türüdür. Ters fazlı HPLC'de, durağan faz hidrokarbon zincirleri (tipik olarak 8-18 karbon uzunluğunda) ile modifiye edilir, bu da kolonun polar olmamasına neden olur. Bir polar çözücü de kullanılır. Ters HPLC'de, numunedeki polar moleküller, solvent ile daha hızlı ayrıştırmasına neden olan güçlü çekicilikler geliştirir. Ayrıca polar olmayan durağan faz ile etkileşime girmeyeceklerdir. Polar olmayan bileşikler Van Der Waals ve sabit faz ile dispersiyon etkileşimi geliştirir, bu nedenle daha yavaş salınırlar [24].

1.2. İYON DEĞİŞTİRME KROMATOĞRAFI

İster anyon ister katyon değiştirici olsun; tamponun pH'ı, kullanılan anyon veya katyon değiştiricinin doğal iyonik gücü ve peptitlerin yükü proteinlerin gecikme zamanlarını etkiler. En yaygın olarak sodyum veya potasyum iyonları katyon olarak, klor iyonları da anyon olarak kullanılır. HP IEC kolonları yüksek derecede pik genişlemesi veya elüsyon olmama durumu gösteren, peptitlerin apolar kalıntılarının neden olduğu hidrofobik karakteristikler gösterirler. Bu durum hareketli faza organik düzenleyici konulmasıyla giderilebilir [25].



Şekil 1.2. İyon değiştirme kromatografisi [25].

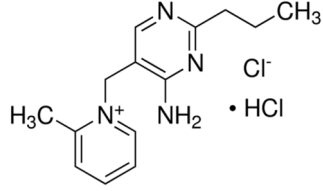
1.3. KİRAL AYIRMA KROMATOĞRAFI

Enantiyomerlerin ayrılmasında kullanılan bir tekniktir; bir enantiyomere karşı diğerinden daha fazla aktif olan ve reaksiyona girebilen bir chiral sabit faz kullanılır [26].

1.4. BOYUT DIŞLAMA KROMATOĞRAFI

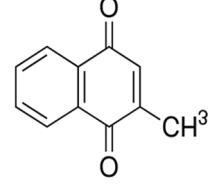
Sıvı kromatografisi, boyut dışlama HPLC genellikle peptit/protein ayırımları ve moleküler ağırlık analizleri için kullanılır. Denaturant varlığı veya yokluğunda, üçüncül veya dördüncül yapılar moleküler ağırlığı analizleriyle gösterilebilir. Bazı uygulamalar ideal SEC davranışlarını gerektirir, ayırımlar sadece çözelti boyutuna dayanır. Ama en yeni HP SEC kolonları, uzun ya da kısa boyutlarda ve anyoniktir. İstenmeyen elektrostatik etkileşimler engellenmezse, bazı özellikler, artı yüklü peptit yan zincirleriyle etkileşimlere neden olur. Elüentin iyonik gücünün üstünde, elektrostatik etkiler en aza indirildiği için, 0.1-0.4 M tuz içeren sıvı fosfat tamponları (ph 5.0-7.5) SEC ile peptit ve protein analizinde hareketli faz olarak kullanılır. Elektrostatik etkileşimler baskın etken olduğunda tuz konsantrasyonları çok yüksek ise, peptit-protein veya protein-protein etkileşimleri engellenir. Farklı kolon materyalleri istenilmeyen kolon davranışlarının görülmesine neden olabilir [25].

2. MATERYAL VE YÖNTEM



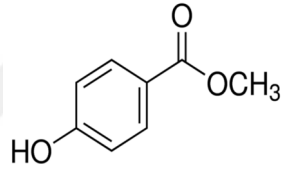
Ampromium Hidroklorür

MA:315.24 g/mol



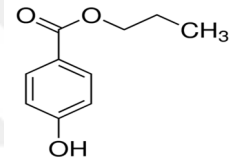
Vitamin K₃

MA:172.18 g/mol



Metilparaben

MA:152.15 g/mol



Propilparaben

MA:180.20 g/mol

Şekil 2.1. Etken maddelerin açık yapıları.



Şekil 2.2. HPLC cihazları.

Bu tez çalışmasında kullanılan cihazlar şekil 2.2.'de görülmektedir. Çalışmalarımızda SHIMADZU Prominence, Shimadzu LC-20AT pompa, DGU-20A5 degazer, SIL-20A HT otosampler, CTO-10AS VP kolon fırını, SPD-M20A PDA dedektör ve SHIMADZU prominence-i LC-2030C UV/Visible dedektör kullanılmıştır.

Amacımızın maliyet, iş yükü ve zamandan tasarruf etmek olduğunu düşünerek yapacağımız yöntemde çalışmamızı 5 μ m, 4.6 x 250 mm kolon kullanılarak keskin ayrımlar planlanmaktadır. İzokratik programlar deneyerek 4 etken pikinin de istenilen RT getirilerek saf bir şekilde istenilen absorbanslarda elde edilmesi planlanmıştır. Sistem uygunluk şartları olarak her bir etken için,

- Etken maddelere ait piklerin teorik plaka sayısı 2000'den az olmamalıdır.
- Etken maddelere ait piklerin kuyruklanma faktörü 0,8 – 1,2 arasında olmalıdır.
- Etken maddelere ait pik alanların ve alıkonma zamanların bağıl standart sapması <%2 olmalıdır.
- Aynı konsantrasyonda hazırlanan iki standart çözelti arasındaki benzerlik %98-%102 arasında olmalıdır.
- Birbirine yakın iki pik arasındaki ayrışma minimum 2,00 olmalıdır.
- Amprolyum standart kromatogramında Amprolyum HCl ve 2-picoline pikleri arasındaki ayrışma minimum 7,0 olmalıdır.

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

Seçicilik parametresi için;

- Etken maddelerin alıkonma zamanında çözücü, koruyucu madde veya plasebodan kaynaklanan herhangi bir pik olmamalıdır.
- Amprolyum standart kromatogramında Amprolyum HCl ve 2-picoline pikleri arasındaki ayrışma minimum 7 olmalıdır.
- Birbirine yakın iki pik arasındaki rezolüsyon minimum 2,00 olmalıdır.
- Bileşenlere ait piklerin pik saflığı açısı değerleri 0,99-1,01 arasında olmalıdır.

Doğrusallık parametresi için;

- Korelasyon katsayısı (r) minimum 0.995 ve r^2 minimum 0.99 olmalıdır.
- Doğrunun y-eksenini kestiği nokta doğrunun eğim değerinin $\pm$ % 2.0 aralığında olmalıdır.

Doğruluk parametresi için;

- Her etken maddenin geri kazanımı % 98,0 - % 102,0 arasında olmalıdır.
- % Geri kazanım sonuçlarının ortalaması %95- %105 güvenilirlik sınırları içinde olmalıdır.

Kesinlik Parametresi İçin; Bağlı Standart Sapma %2,00'den büyük olmamalıdır.

Sistem Kesinliği Parametresi için;

- 1. Gün ve 2. Gün elde edilen sonuçların kendi arasındaki bağlı standart sapma değeri %2,00'den büyük olmamalıdır.
- Pik alanları ve alıkonma zamanları arasındaki bağlı standart sapma (RSD) %2'den büyük olmamalıdır.

Yöntem kesinliği (tekrarlanabilirlik) parametresi için; hazırlanan 6 farklı test çözeltisinin analiz sonuçları arasındaki bağlı standart sapma değeri %2,00'den büyük olmamalıdır.

Ara Kesinlik Parametresi için;

- Analiz 1 ve cihaz I'den elde edilen sonuçların ve Analiz 2 ve cihaz II' den elde

edilen sonuçların kendi arasındaki bağıl standart sapma değeri %2,00'den büyük olmamalıdır.

- 12 analiz sonucunun bağıl standart sapma değeri %2,00'den büyük olmamalıdır.
- Aynı konsantrasyonda hazırlanan iki standart çözelti arasındaki benzerlik %98-%102 arasında olmalıdır.
- Birbirine yakın iki pik arasındaki ayrışma minimum 2,00 olmalıdır.

Güvenilirlik Parametresi İçin;

- Çözelti stabilitesi, başlangıç değerinden değişim % 2.0'den fazla olmamalıdır.

Küçük değişiklikler, Güvenilirlik çalışmaları analiz sonuçları ortalaması ile normal şartlardaki analiz sonuçları ortalaması arasındaki fark maksimum $\pm\%2$ olmalıdır.

2.1. ANALİTİK YÖNTEM VALİDASYONU

2.1.1. Amaç

Amaç Oral Çözelti analizlerinde kullanılan test yöntemlerinin geçerli olduğunu göstermektir.

2.1.2. Miktar Tayini Yöntemi

Yöntem	: HPLC
Kolon	: GL Sciences Inertsil C8-3, 5 μ m, 4.6 X 250 mm
Akış Hızı	: 0.6 mL/dk
Dalga Boyu	: 254 nm
Enjeksiyon Hacmi	: 10 μ l
Kolon Sıcaklığı	: 25°C
Numune Sıcaklığı	: 25°C
Akış süresi	: 50 dakika
Tampon çözelti	: 6 g heptan-1-sülfonik asit sodyum tuzu tartılır ve 500 mL deiyonize suda çözülür. Üzerine 12 mL glasiyel asetik asit ve 2 mL trietilamin eklenir.

Mobil Faz : Tampon çözelti: Metanol: Asetonitril (50:45:50)
oranında karıştırıldıktan sonra degaze edilir.

Seyreltme Çözeltisi : Su: Metanol: Asetonitril (50:45:50)

Stok Amprolyum HCl Çözeltisi; 100 mL'lik balon jojeye 250 mg amprolyum HCl standardı tartıldı. Seyreltme çözeltisi ile çözünüp hacmi 100 mL'ye tamamlandı. ($c = 2,5$ mg/mL)

Stok Vitamin K₃ Çözeltisi; 100 mL'lik balon jojeye 20 mg vitamin K₃ standardı tartıldı. Seyreltme çözeltisi ile çözünüp hacmi 100 mL'ye tamamlandı. Bu çözeltiden 1 mL alındı, 10 mL'lik balon jojeye aktarıldı ve seyreltme çözeltisi ile seyreltildi. ($c = 0,02$ mg/mL)

Stok Metilparaben Çözeltisi; 100 mL'lik balon jojeye 18 mg metilparaben standardı tartıldı. Seyreltme çözeltisi ile çözünüp hacmi 100 mL'ye tamamlandı. Bu çözeltiden 5 mL alındı, 50 mL'lik balon jojeye aktarıldı ve seyreltme çözeltisi ile seyreltildi. ($c = 0,018$ mg/mL)

Stok Propilparaben Çözeltisi; 100 mL'lik balon jojeye 20 mg propilparaben standardı tartıldı. Seyreltme çözeltisi ile çözünüp hacmi 100 mL'ye tamamlandı. Bu çözeltiden 1 mL alındı, 100 mL'lik balon jojeye aktarıldı ve seyreltme çözeltisi ile seyreltildi. ($c = 0,002$ mg/mL)

Standart Çözeltisi; stok amprolyum HCl, stok vitamin K₃, stok metilparaben, stok propilparaben çözeltilerinden 4'er mL alınarak 20 mL'lik balon jojeye aktarıldı ve seyreltme çözeltisi ile hacmi 20 mL'ye tamamlandı. Bu çözelti 2-3 mL ile doyurulmuş 0,45 mm PTFE filtreden süzüldü ve viallendi. ($C_{\text{Amprolyum HCl}} = 0,5$ mg/mL, $C_{\text{Vitamin K}_3} = 0,004$ mg/mL, $C_{\text{Metilparaben}} = 0,0036$ mg/mL, $C_{\text{Propilparaben}} = 0,0004$ mg/mL)

Test Çözeltisi; 50 mL'lik balon jojeye 0,5 mL numune alınıp seyreltme çözeltisi ile çözüldü. Daha sonra bu çözeltiden 4,0 mL alındı, 20 mL'lik balon jojeye aktarıldı ve seyreltme çözeltisi ile seyreltildi. Bu çözelti 2-3 mL ile doyurulmuş 0,45 mm PTFE filtreden süzüldü ve viallendi. ($C_{\text{Amprolyum HCl}} = 0,5$ mg/mL, $C_{\text{Vitamin K}_3} = 0,004$ mg/mL, $C_{\text{Metilparaben}} = 0,0036$ mg/mL, $C_{\text{Propilparaben}} = 0,0004$ mg/mL)

Sistem uygunluk parametreleri;

- Etken maddelere ait pik alanların ve alıkonma zamanların bağıl standart sapması $< \%2$ olmalıdır.

- Etken maddelere ait piklerin teorik plaka sayısı 2000'den az olmamalıdır.
- Etken maddelere ait piklerin kuyruklanma faktörü 0,8 – 1,2 arasında olmalıdır.
- Aynı konsantrasyonda hazırlanan iki standart çözelti arasındaki benzerlik %98-%102 arasında olmalıdır.
- Birbirine yakın iki pik arasındaki ayrışma minimum 2,00 olmalıdır.

Alıkonma Zamanı;

Vitamin K₃ : ~ 4.6 dakika

2-picoline : ~ 8,0 dakika

Metilparaben : ~ 15,0 dakika

Amprolyum HCl : ~ 18,4 dakika

Propilparaben : ~ 40,0 dakika

Çözelti stabilitesi; Standart ve test çözelti oda koşullarında 90 saat stabildir.

İşlem; Yöntemde belirtildiği gibi standart çözelti ve test çözeltileri hazırlanıp enjekte edilir. Sistem uygunluk parametreleri kontrol edilir. Kromatogramlar kaydedilir. Hesaplama bölümünde gösterilen formül ile Amprolyum HCl, Vitamin K₃, Metilparaben ve Propilparaben miktarları hesaplanır.

$$Amprolyum\ HCl\ (mg/mL) = \frac{A_n \times (W_s / 100 \times 4 / 20) \times (P / 100) \times 1000 \times d}{A_s \times (W_n / 50 \times 4 / 20)} \quad (2.1)$$

A_n = Test çözeltisinden elde edilen Amprolyum HCl pik alan

A_s = Standart çözeltisinden elde edilen Amprolyum HCl pik alanı

W_s = Standart tartımı (mg)

W_n = Numune tartımı (mg)

P = Standart potensi (as is basis) (%)

d = Numune yoğunluğu (g/mL)

Limit değerleri;

Teorik : 250 mg /mL

Limit : 237,5 – 262,5 mg /mL

$$\text{Vitamin K}_3 \text{ (mg/mL)} = \frac{A_n \times (W_s \div 100 \times 1 \div 10 \times 4 \div 20) \times (P \div 100) \times 1000 \times d}{A_s \times (W_n \div 50 \times 4 \div 20)} \quad (2.2)$$

A_n = Test çözeltisinden elde edilen Vitamin K₃ pik alanı

A_s = Standart çözeltisinden elde edilen Vitamin K₃ pik alanı

W_s = Standart tartımı (mg)

W_n = Numune tartımı (mg)

P = Standart potensi (as is basis) (%)

d = Numune yoğunluğu (g/mL)

Limit değerleri;

Teorik : 2 mg/mL

Limit : 1,9 – 2,1 mg/mL

$$\text{Metilparaben (mg/mL)} = \frac{A_n \times (W_s \div 100 \times 1 \div 10 \times 4 \div 20) \times (P \div 100) \times 1000 \times d}{A_s \times (W_n \div 50 \times 4 \div 20)} \quad (2.3)$$

A_n = Test çözeltisinden elde edilen Metilparaben pik alanı

A_s = Standart çözeltisinden elde edilen Metilparaben pik alanı

W_s = Standart tartımı (mg)

W_n = Numune tartımı (mg)

P = Standart potensi (as is basis) (%)

d = Numune yoğunluğu (g/mL)

Limit değerleri;

Teorik : 1,8 mg/mL

Limit : 1,71 – 1,89 mg/mL

$$Propilparaben(mg/mL) = \frac{A_n \times (W_s \div 100 \times 4 \div 20) \times (P \div 1000) \times 1000 \times d}{A_s \times (W_n \div 50 \times 4 \div 20)} \quad (2.4)$$

A_n = Test çözeltisinden elde edilen Propilparaben pik alanı

A_s = Standart çözeltisinden elde edilen Propilparaben pik alanı

W_s = Standart tartımı (mg)

W_n = Numune tartımı (mg)

P = Standart potensi (as is basis) (%)

d = Numune yoğunluğu (g/mL)

Limit değerleri;

Teorik : 2 mg/mL

Limit : 1,9 – 2,1 mg/mL

2.1.3. Reaktifler

Çizelge 2.1. Kullanılan reaktifler.

Reaktif/Standart Adı	Firma	Lot Numarası	Son Kullanma Tarihi
Amprolyum HCl	USP	H0K314	-
Metilparaben	EP	4.0	-
Propilparaben	EP	4.0	-
Vitamin K ₃	EP	1.0	-
Heptane-1-sulfonic acid sodium salt	Merck	K48578106 704	-
Glasiyel asetik asit	PanReac AppliChem	0001069344	03.2023
Trietilamin	Merck	S7047452 528	-
Metanol	Merck	I837707 626	30.06.2019
Asetonitril	Merck	I820030 608	30.06.2019

2.1.4. Miktar Tayini Testi Validasyon Parametreleri

- Spesifiklik

- Sistem Uygunluk
- Doğrusallık ve Çalışma Aralığı
- Doğruluk
- Kesinlik (Yöntem Kesinlik , Sistem Kesinlik , Ara Kesinlik)
- Güvenirlilik

2.1.5. Miktar Tayini Yöntem Validasyonu

2.1.5.1. Spesifiklik

Bir analitik prosedürün seçiciliği veya özgünlüğü o prosedürün karışım içerisinde bulunan etken maddeyi (maddeleri) (etken madde, safsızlıklar, yardımcı maddeler) doğru olarak (Başka herhangi bir etki, girişim olmaksızın) saptayabilme yeteneğidir.

Prosedür;

- Seyreltme çözeltisi enjekte edilir.
- Plasebo çözeltisi enjekte edilir.
- Amprolyum HCl standart çözeltisi enjekte edilir.
- Vitamin-K₃ standart çözeltisi enjekte edilir.
- Metilparaben standart çözeltisi enjekte edilir.
- Propilparaben standart çözeltisi enjekte edilir.
- Standart çözeltisi enjekte edilir.
- Test çözeltisi enjekte edilir.

Plasebo çözeltisi miktar tayini koşullarında hazırlanır. Çözeltiler süzülüp enjekte edilir.

Kriter;

- Amprolyum HCl, Vitamin K₃, Metilparaben ve Propilparaben alıkonma zamanında başka bir pike rastlanmamalıdır.
- Amprolyum standart kromatogramında Amprolyum HCl ve 2-picoline pikleri arasındaki ayrışma minimum 7 olmalıdır.
- Birbirine yakın iki pik arasındaki rezolüsyon minimum 2,00 olmalıdır.
- Bileşenlere ait piklerin pik saflığı açısı değerleri 0,99-1,01 arasında olmalıdır.

Plasebo çözeltisinin hazırlanışı; 50 ml'lik balon jojeye formülasyon birimine hazırlattırılan plasebodan 0,5 mL plasebo tartıldı. Bir miktar seyreltme çözeltisi ilave

edilip çözüldükten sonra hacmi seyreltme çözeltisi ile 50 mL'ye tamamlandı. Bu çözeltiden 4 mL alındı, 20 mL'lik balon jojeye aktarıldı ve hacmi seyreltme çözeltisi ile tamamlandı. Bu çözelti 2-3 mL ile doyurulmuş 0.45 mm PTFE filtreden süzüldü ve viallendi.

Amprolyum HCl çözeltisinin hazırlanışı; 100 mL'lik balon jojeye 250 mg Amprolyum HCl standardı tartıldı. Bir miktar seyreltme çözeltisi ilave edilip çözüldükten sonra hacmi seyreltme çözeltisi ile 100 mL'ye tamamlandı. Bu çözeltiden 4 mL alındı, 20 mL'lik balon jojeye aktarıldı ve hacmi seyreltme çözeltisi ile tamamlandı. Bu çözelti 2-3 mL ile doyurulmuş 0.45 mm PTFE filtreden süzüldü ve viallendi. ($c = 0,5 \text{ mg/mL}$)

Vitamin K₃ çözeltisinin hazırlanışı; 100 mL'lik balon jojeye 20 mg Vitamin K₃ standardı tartıldı. Bir miktar seyreltme çözeltisi ilave edilip çözüldükten sonra hacmi seyreltme çözeltisi ile 100 mL'ye tamamlandı. Bu çözeltiden 1 mL alındı, 10 mL'lik balon jojeye aktarıldı ve hacmi seyreltme çözeltisi ile tamamlandı. Daha sonra bu çözeltiden 4 mL alındı, 20 mL'lik balon jojeye aktarıldı ve hacmi seyreltme çözeltisi ile tamamlandı. Bu çözelti 2-3 mL ile doyurulmuş 0.45 mm PTFE filtreden süzüldü ve viallendi. ($c = 0,004 \text{ mg/mL}$)

Metilparaben çözeltisinin hazırlanışı; 100 mL'lik balon jojeye 18 mg Metilparaben standardı tartıldı. Bir miktar seyreltme çözeltisi ilave edilip çözüldükten sonra hacmi seyreltme çözeltisi ile 100 mL'ye tamamlandı. Bu çözeltiden 1 mL alındı, 10 mL'lik balon jojeye aktarıldı ve hacmi seyreltme çözeltisi ile tamamlandı. Daha sonra bu çözeltiden 4 mL alındı, 20 mL'lik balon jojeye aktarıldı ve hacmi seyreltme çözeltisi ile tamamlandı. Bu çözelti 2-3 mL ile doyurulmuş 0.45 mm PTFE filtreden süzüldü ve viallendi. ($c = 0,0036 \text{ mg/mL}$)

Propilparaben çözeltisinin hazırlanışı; 100 mL'lik balon jojeye 20 mg Propilparaben standardı tartıldı. Bir miktar seyreltme çözeltisi ilave edilip çözüldükten sonra hacmi seyreltme çözeltisi ile 100 mL'ye tamamlandı. Bu çözeltiden 1 mL alındı, 100 mL'lik balon jojeye aktarıldı ve hacmi seyreltme çözeltisi ile tamamlandı. Daha sonra bu çözeltiden 4 mL alındı, 20 mL'lik balon jojeye aktarıldı ve hacmi seyreltme çözeltisi ile tamamlandı. Bu çözelti 2-3 mL ile doyurulmuş 0.45 mm PTFE filtreden süzüldü ve viallendi. ($c = 0,0004 \text{ mg/mL}$)

Stok Amprolyum HCl çözeltisinin hazırlanışı; 100 mL'lik balon jojeye 250 mg Amprolyum HCl standardı tartıldı. Bir miktar seyreltme çözeltisi ilave edilip

çözündükten sonra hacmi seyreltme çözeltisi ile 100 mL'ye tamamlandı. ($c = 2,5$ mg/mL)

Stok Vitamin K₃ çözeltisinin hazırlanışı; 100 mL'lik balon jojeye 20 mg Vitamin K₃ standardı tartıldı. Bir miktar seyreltme çözeltisi ilave edilip çözündükten sonra hacmi seyreltme çözeltisi ile 100 mL'ye tamamlandı. Bu çözeltiden 1 mL alındı, 10 mL'lik balon jojeye aktarıldı ve hacmi seyreltme çözeltisi ile tamamlandı. ($c = 0,02$ mg/mL)

Stok Metilparaben çözeltisinin hazırlanışı; 100 mL'lik balon jojeye 18 mg Metilparaben standardı tartıldı. Bir miktar seyreltme çözeltisi ilave edilip çözündükten sonra hacmi seyreltme çözeltisi ile 100 mL'ye tamamlandı. Bu çözeltiden 1 mL alındı, 10 mL'lik balon jojeye aktarıldı ve hacmi seyreltme çözeltisi ile tamamlandı. ($c = 0,018$ mg/mL)

Stok Propilparaben çözeltisinin hazırlanışı; 100 mL'lik balon jojeye 20 mg Propilparaben standardı tartıldı. Bir miktar seyreltme çözeltisi ilave edilip çözündükten sonra hacmi seyreltme çözeltisi ile 100 mL'ye tamamlandı. Bu çözeltiden 1 mL alındı, 100 mL'lik balon jojeye aktarıldı ve hacmi seyreltme çözeltisi ile tamamlandı. ($c = 0,002$ mg/mL)

Standart çözeltisinin hazırlanışı; 20 mL'lik balon jojeye Stok Amprolyum HCl, Stok Vitamin K₃, Stok Metilparaben ve Stok Propilparaben çözeltilerinden 4'er mL alındı, 20 mL'ye seyreltme çözeltisi ile tamamlandı. Bu çözelti 2-3 mL ile doyurulmuş 0.45 mm PTFE filtreden süzüldü ve viallendi. ($C_{\text{Amprolyum HCl}} = 0,5$ mg/mL; $C_{\text{Vitamin-K3}} = 0,004$ mg/mL; $C_{\text{MP}} = 0,0036$ mg/mL; $C_{\text{PP}} = 0,0004$ mg/mL)

Test çözeltisinin hazırlanışı; 0,5 mL numune hassas olarak 50 mL'lik balon jojeye tartıldı. Bir miktar seyreltme çözeltisi ilave edilip çözündükten sonra hacmi seyreltme çözeltisi ile 50 mL'ye tamamlandı. Bu çözeltiden 4 mL alındı, 20 mL'lik balon jojeye aktarıldı ve hacmi seyreltme çözeltisi ile tamamlandı. Bu çözelti 2-3 mL ile doyurulmuş 0.45 mm PTFE filtreden süzüldü ve viallendi ($C_{\text{Amprolyum HCl}} = 0,5$ mg/mL; $C_{\text{Vitamin-K3}} = 0,004$ mg/mL; $C_{\text{MP}} = 0,0036$ mg/mL; $C_{\text{PP}} = 0,0004$ mg/mL)

2.1.5.2. Sistem Uygunluk

Sistem uygunluğu çalışması, koruyucu madde analizleri için sistemin ve metodun uygun olduğunu kanıtlamak için yapılır. Bu amaçla hazırlanan standart (%100) çözeltisinden ardışık olarak 6 enjeksiyon yapılarak pik alanları ve piklerin alıkonma zamanı (RT) arasındaki bağıl standart sapma (RSD) değerleri incelenir. Aynı konsantrasyonda ikinci bir standart çözeltisi hazırlanıp ardışık 3 kez sisteme enjekte edilip iki standart

arasındaki uyuma bakılır.

Elde edilen kromatogramlardan yararlanılarak aşağıdaki sistem uygunluğu parametreleri incelenir.

Stok Amprolyum HCl çözeltisinin hazırlanışı; 100 mL'lik balon jojeye 250 mg Amprolyum HCl standardı tartıldı. Bir miktar seyreltme çözeltisi ilave edilip çözündükten sonra hacmi seyreltme çözeltisi ile 100 mL'ye tamamlandı. ($c = 2,5$ mg/mL)

Stok Vitamin K₃ çözeltisinin hazırlanışı; 100 mL'lik balon jojeye 20 mg Vitamin K₃ standardı tartıldı. Bir miktar seyreltme çözeltisi ilave edilip çözündükten sonra hacmi seyreltme çözeltisi ile 100 mL'ye tamamlandı. Bu çözeltiden 1 mL alındı, 10 mL'lik balon jojeye aktarıldı ve hacmi seyreltme çözeltisi ile tamamlandı. ($c = 0,02$ mg/mL)

Stok Metilparaben çözeltisinin hazırlanışı; 100 mL'lik balon jojeye 18 mg Metilparaben standardı tartıldı. Bir miktar seyreltme çözeltisi ilave edilip çözündükten sonra hacmi seyreltme çözeltisi ile 100 mL'ye tamamlandı. Bu çözeltiden 1 mL alındı, 10 mL'lik balon jojeye aktarıldı ve hacmi seyreltme çözeltisi ile tamamlandı. ($c = 0,018$ mg/mL)

Stok Propilparaben çözeltisinin hazırlanışı; 100 mL'lik balon jojeye 20 mg Propilparaben standardı tartıldı. Bir miktar seyreltme çözeltisi ilave edilip çözündükten sonra hacmi seyreltme çözeltisi ile 100 mL'ye tamamlandı. Bu çözeltiden 1 mL alındı, 100 mL'lik balon jojeye aktarıldı ve hacmi seyreltme çözeltisi ile tamamlandı. ($c = 0,002$ mg/mL)

Standart çözeltisinin hazırlanışı; 20 mL'lik balon jojeye Stok Amprolyum HCl, Stok Vitamin K₃, Stok Metilparaben ve Stok Propilparaben çözeltilerinden 4'er mL alındı, 20 mL'ye seyreltme çözeltisi ile tamamlandı. Bu çözelti 2-3 mL ile doyurulmuş 0.45 mm PTFE filtreden süzüldü ve viallendi. ($C_{\text{Amprolyum HCl}} = 0,5$ mg/mL; $C_{\text{Vitamin-K3}} = 0,004$ mg/mL; $C_{\text{MP}} = 0,0036$ mg/mL; $C_{\text{PP}} = 0,0004$ mg/mL)

Kriter;

- Etken maddelere ait piklerin teorik plaka sayısı 2000'den az olmamalıdır.
- Etken maddelere ait piklerin kuyruklanma faktörü 0,8 – 1,2 arasında olmalıdır.
- Etken maddelere ait pik alanların ve alıkonma zamanların bağıl standart sapması $< 2\%$ olmalıdır.

- Aynı konsantrasyonda hazırlanan iki standart çözelti arasındaki benzerlik %98-%102 arasında olmalıdır.
- Birbirine yakın iki pik arasındaki ayırışma minimum 2,00 olmalıdır.
- Amprolyum standart kromatogramında Amprolyum HCl ve 2-picoline pikleri arasındaki ayırışma minimum 7,0 olmalıdır.

2.1.5.3. Doğrusallık ve Çalışma Aralığı

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

Bu amaçla etkin maddenin %50, %75, %100, %125 ve %150 çalışma konsantrasyonlarındaki standart çözeltiler aşağıda belirtildiği gibi hazırlanır. Hazırlanan doğrusallık çözeltilerinin her birinden 3'er kez enjeksiyon yapılır ve alınan sonuçlara göre standart eğrisi çizilir.

$$Y = mX + n$$

$$Y = \text{Alan [hesaplanan]}$$

$$X = \text{Konsantrasyon [mg/mL]}$$

$$m = \text{Regresyon doğrusunun eğimi}$$

$$n = \text{Doğrunun Y-eksenini kestiği nokta}$$

$$R^2 = \text{Korelasyon katsayısı}$$

Doğrusallık stok standart çözeltileri aşağıda belirtildiği gibi hazırlandı.

Stok Amprolyum HCl çözeltisinin hazırlanışı; 100 mL'lik balon jöjeye 250 mg Amprolyum HCl standardı tartıldı. Bir miktar seyreltme çözeltisi ilave edilip çözüldükten sonra hacmi seyreltme çözeltisi ile 100 mL'ye tamamlandı. (c= 2,5 mg/mL)

Stok Vitamin K₃ çözeltisinin hazırlanışı; 100 mL'lik balon jöjeye 20 mg Vitamin K₃ standardı tartıldı. Bir miktar seyreltme çözeltisi ilave edilip çözüldükten sonra hacmi seyreltme çözeltisi ile 100 mL'ye tamamlandı. Bu çözeltiden 1 mL alındı, 10 mL'lik balon jöjeye aktarıldı ve hacmi seyreltme çözeltisi ile tamamlandı. (c= 0,02 mg/mL)

Stok Metilparaben çözeltisinin hazırlanışı; 100 mL'lik balon jöjeye 18 mg Metilparaben

standartı tartıldı. Bir miktar seyreltme çözeltisi ilave edilip çözündükten sonra hacmi seyreltme çözeltisi ile 100 mL'ye tamamlandı. Bu çözeltiden 1 mL alındı, 10 mL'lik balon jojeye aktarıldı ve hacmi seyreltme çözeltisi ile tamamlandı. (c= 0,018 mg/mL)

Stok Propilparaben çözeltisinin hazırlanışı; 100 mL'lik balon jojeye 20 mg Propilparaben standartı tartıldı. Bir miktar seyreltme çözeltisi ilave edilip çözündükten sonra hacmi seyreltme çözeltisi ile 100 mL'ye tamamlandı. Bu çözeltiden 1 mL alındı, 100 mL'lik balon jojeye aktarıldı ve hacmi seyreltme çözeltisi ile tamamlandı. (c= 0,002 mg/mL)

Aşağıdaki tabloda belirtilen konsantrasyon aralığında standart çözeltilerinden doğrusallık çözeltileri hazırlandı. Eğim, kesişim, korelasyon katsayısı elde edildi.

Çizelge 2.2. Hazırlanan doğrusallık çözeltileri.

Doğrusallık Standart Çözeltisi (%)	İlave Edilen Spike Stok Standart Çözeltileri (mL)	Son Hacim (mL)
50	2	20
75	3	20
100	4	20
125	5	20
150	6	20

Kriter;

- Korelasyon katsayısı (r) minimum 0.995 ve r^2 minimum 0.99 olmalıdır. Doğrunun y-eksenini kestiği nokta doğrunun eğim değerinin $\pm$ % 2.0 aralığında olmalıdır.

2.1.5.4. Doğruluk

Analiz sonucunda bulunan değer ile beklenen veya kabul edilen teorik değer arasındaki uygunluk derecesidir. Doğruluk değeri analitik metodun hatasızlık göstergesidir.

Aşağıda belirtildiği gibi doğruluk çözeltileri hazırlandı. Her bir konsantrasyonda 3 doğruluk çözeltisi hazırlanıp her biri sisteme 3 kez enjekte edildi. Analiz sonuçları %geri kazanım olarak ifade edilir ve aşağıdaki formüle göre hesaplanır.

$$\% \text{ Geri kazanım} = \frac{\text{BulunanKonsantrasyon}(mg / ml)}{\text{EklenenKonsantrasyon}(mg / ml)} \times 100$$

Doğruluk stok standart çözeltileri aşağıda belirtildiği gibi hazırlandı.

Stok Amprolyum HCl çözeltisinin hazırlanışı; 100 mL'lik balon jojeye 250 mg Amprolyum HCl standardı tartıldı. Bir miktar seyreltme çözeltisi ilave edilip çözündükten sonra hacmi seyreltme çözeltisi ile 100 mL'ye tamamlandı. (c= 2,5 mg/mL)

Stok Vitamin K₃ çözeltisinin hazırlanışı; 100 mL'lik balon jojeye 20 mg Vitamin K₃ standardı tartıldı. Bir miktar seyreltme çözeltisi ilave edilip çözündükten sonra hacmi seyreltme çözeltisi ile 100 mL'ye tamamlandı. Bu çözeltiden 1 mL alındı, 10 mL'lik balon jojeye aktarıldı ve hacmi seyreltme çözeltisi ile tamamlandı. (c= 0,02 mg/mL)

Stok Metilparaben çözeltisinin hazırlanışı; 100 mL'lik balon jojeye 18 mg Metilparaben standardı tartıldı. Bir miktar seyreltme çözeltisi ilave edilip çözündükten sonra hacmi seyreltme çözeltisi ile 100 mL'ye tamamlandı. Bu çözeltiden 1 mL alındı, 10 mL'lik balon jojeye aktarıldı ve hacmi seyreltme çözeltisi ile tamamlandı. (c= 0,018 mg/mL)

Stok Propilparaben çözeltisinin hazırlanışı; 100 mL'lik balon jojeye 20 mg Propilparaben standardı tartıldı. Bir miktar seyreltme çözeltisi ilave edilip çözündükten sonra hacmi seyreltme çözeltisi ile 100 mL'ye tamamlandı. Bu çözeltiden 1 mL alındı, 100 mL'lik balon jojeye aktarıldı ve hacmi seyreltme çözeltisi ile tamamlandı. (c= 0,002 mg/mL)

Stok plasebo çözeltisinin hazırlanışı; 50 mL'lik balon jojeye formülasyon birimine hazırlattırılan plaseboda 0,5 mL plasebo tartıldı. Bir miktar seyreltme çözeltisi ilave edilip çözündükten sonra hacmi seyreltme çözeltisi ile 50 mL'ye tamamlandı.

Doğruluk (% Geri kazanım) çözeltileri aşağıdaki tabloda belirtildiği gibi hazırlandı. Her bir konsantrasyondan 3 numune hazırlandı ve her bir numune 3 kez sisteme enjekte edildi.

Çizelge 2.3. Hazırlanan doğruluk çözeltileri.

Doğruluk Standart Çözeltisi (%)	Etkin maddeler doğruluk stok çöz (mL)	Plasebo Stok (mL)	Son hacim (mL)
50	2	4	20
100	4	4	20
150	6	4	20

Kriter;

- Her bir geri kazanım % 98,0 - % 102,0 arasında olmalıdır.

- %geri kazanım sonuçlarının ortalaması %95 güvenilirlik sınırları içinde olmalıdır.

2.1.5.5. Kesinlik

Bir analiz yönteminin kesinliği, homojen bir karışımdan alınan numuneye ait analiz sonuçlarının birbiriyle uyumlu olmasıdır. Kesinlik parametresi genellikle analiz sonuçlarının RSD (Bağıl Standart Sapması) değeriyle ölçülür. Kesinlik çalışması, sistem kesinliği, yöntem kesinliği (tekrarlanabilirlik) ve ara kesinlik (laboratuvar içi tekrarlanabilirlik) testleri ile değerlendirilir.

Sistem Kesinliği; Miktar tayini analizlerinde kullanılan sistemin kesinliği, hazırlanan standart çözeltisinin ardışık 6 enjeksiyonundaki veriler kullanılarak test edilir. Her biri sisteme, aynı çalışma şartlarında kısa zaman aralığında enjekte edilir. Sistem kesinliğinde pik alanları ve alıkonma zamanları arasındaki bağıl standart sapma (RSD) değerleri incelenir.

Ayrıca laboratuvar içi kesinlik yapıldığı gün sistem kesinliğinin uygun olduğunu kanıtlamak amacıyla ikinci gün sistem kesinliği çalışması yapılır.

Stok Amprolyum HCl çözeltisinin hazırlanışı; 100 mL'lik balon jojeye 250 mg Amprolyum HCl standardı tartıldı. Bir miktar seyreltme çözeltisi ilave edilip çözündükten sonra hacmi seyreltme çözeltisi ile 100 mL'ye tamamlandı. (c= 2,5 mg/mL)

Stok Vitamin K₃ çözeltisinin hazırlanışı; 100 mL'lik balon jojeye 20 mg Vitamin K₃ standardı tartıldı. Bir miktar seyreltme çözeltisi ilave edilip çözündükten sonra hacmi seyreltme çözeltisi ile 100 mL'ye tamamlandı. Bu çözeltiden 1 mL alındı, 10 mL'lik balon jojeye aktarıldı ve hacmi seyreltme çözeltisi ile tamamlandı. (c= 0,02 mg/mL)

Stok Metilparaben çözeltisinin hazırlanışı; 100 mL'lik balon jojeye 18 mg Metilparaben standardı tartıldı. Bir miktar seyreltme çözeltisi ilave edilip çözündükten sonra hacmi seyreltme çözeltisi ile 100 mL'ye tamamlandı. Bu çözeltiden 1 mL alındı, 10 mL'lik balon jojeye aktarıldı ve hacmi seyreltme çözeltisi ile tamamlandı. (c= 0,018 mg/mL)

Stok Propilparaben çözeltisinin hazırlanışı; 100 mL'lik balon jojeye 20 mg Propilparaben standardı tartıldı. Bir miktar seyreltme çözeltisi ilave edilip çözündükten sonra hacmi seyreltme çözeltisi ile 100 mL'ye tamamlandı. Bu çözeltiden 1 mL alındı, 100 mL'lik balon jojeye aktarıldı ve hacmi seyreltme çözeltisi ile tamamlandı. (c=

0,002 mg/mL)

Standart çözeltisinin hazırlanışı; 20 mL'lik balon jojeye Stok Amprolyum HCl, Stok Vitamin K₃, Stok Metilparaben ve Stok Propilparaben çözeltilerinden 4'er mL alındı, 20 mL'ye seyreltme çözeltisi ile tamamlandı. Bu çözelti 2-3 mL ile doyurulmuş 0.45 mm PTFE filtreden süzüldü ve viallendi. ($C_{\text{Amprolyum HCl}} = 0,5 \text{ mg/mL}$; $C_{\text{Vitamin-K}_3} = 0,004 \text{ mg/mL}$; $C_{\text{MP}} = 0,0036 \text{ mg/mL}$; $C_{\text{PP}} = 0,0004 \text{ mg/mL}$)

Kriter:

- 1. Gün ve 2. Gün elde edilen sonuçların kendi arasındaki bağıl standart sapma değeri %2,00'den büyük olmamalıdır.⁷
- Pik alanları ve alıkonma zamanları arasındaki bağıl standart sapma (RSD) %2'den büyük olmamalıdır.

Yöntem Kesinliği (Tekrarlanabilirlik); Miktar tayini analitik metodun yöntem kesinliği, analiz metodunda belirtildiği gibi bağımsız olarak hazırlanan 6 farklı test çözeltisinin analiz sonuçlarına göre değerlendirilir. Test çözeltilerinin her biri sisteme, aynı çalışma şartlarında kısa zaman aralığında enjekte edilir.

Stok Amprolyum HCl çözeltisinin hazırlanışı; 100 mL'lik balon jojeye 250 mg Amprolyum HCl standardı tartıldı. Bir miktar seyreltme çözeltisi ilave edilip çözündükten sonra hacmi seyreltme çözeltisi ile 100 mL'ye tamamlandı. ($c = 2,5 \text{ mg/mL}$)

Stok Vitamin K₃ çözeltisinin hazırlanışı; 100 mL'lik balon jojeye 20 mg Vitamin K₃ standardı tartıldı. Bir miktar seyreltme çözeltisi ilave edilip çözündükten sonra hacmi seyreltme çözeltisi ile 100 mL'ye tamamlandı. Bu çözeltiden 1 mL alındı, 10 mL'lik balon jojeye aktarıldı ve hacmi seyreltme çözeltisi ile tamamlandı. ($c = 0,02 \text{ mg/mL}$)

Stok Metilparaben çözeltisinin hazırlanışı; 100 mL'lik balon jojeye 18 mg Metilparaben standardı tartıldı. Bir miktar seyreltme çözeltisi ilave edilip çözündükten sonra hacmi seyreltme çözeltisi ile 100 mL'ye tamamlandı. Bu çözeltiden 1 mL alındı, 10 mL'lik balon jojeye aktarıldı ve hacmi seyreltme çözeltisi ile tamamlandı. ($c = 0,018 \text{ mg/mL}$)

Stok Propilparaben çözeltisinin hazırlanışı; 100 mL'lik balon jojeye 20 mg Propilparaben standardı tartıldı. Bir miktar seyreltme çözeltisi ilave edilip çözündükten sonra hacmi seyreltme çözeltisi ile 100 mL'ye tamamlandı. Bu çözeltiden 1 mL alındı, 100 mL'lik balon jojeye aktarıldı ve hacmi seyreltme çözeltisi ile tamamlandı. ($c = 0,002 \text{ mg/mL}$)

Standart çözeltisinin hazırlanışı; 20 mL'lik balon jojeye Stok Amprolyum HCl, Stok Vitamin K₃, Stok Metilparaben ve Stok Propilparaben çözeltilerinden 4'er mL alındı, 20 mL'ye seyreltme çözeltisi ile tamamlandı. Bu çözelti 2-3 mL ile doyurulmuş 0.45 mm PTFE filtreden süzüldü ve viallendi. ($C_{\text{Amprolyum HCl}} = 0,5 \text{ mg/mL}$; $C_{\text{Vitamin-K}_3} = 0,004 \text{ mg/mL}$; $C_{\text{MP}} = 0,0036 \text{ mg/mL}$; $C_{\text{PP}} = 0,0004 \text{ mg/mL}$)

Test çözeltisinin hazırlanışı: 0,5 mL numune hassas olarak 50 mL'lik balon jojeye tartıldı. Bir miktar seyreltme çözeltisi ilave edilip çözüldükten sonra hacmi seyreltme çözeltisi ile 50 mL'ye tamamlandı. Bu çözeltiden 4 mL alındı, 20 mL'lik balon jojeye aktarıldı ve hacmi seyreltme çözeltisi ile tamamlandı. Bu çözelti 2-3 mL ile doyurulmuş 0.45 mm PTFE filtreden süzüldü ve viallendi. ($C_{\text{Amprolyum HCl}} = 0,5 \text{ mg/mL}$; $C_{\text{Vitamin-K}_3} = 0,004 \text{ mg/mL}$; $C_{\text{MP}} = 0,0036 \text{ mg/mL}$; $C_{\text{PP}} = 0,0004 \text{ mg/mL}$)

Kriter;

- Hazırlanan 6 farklı test çözeltisinin analiz sonuçları arasındaki bağıl standart sapma değeri %2,00'den büyük olmamalıdır.

Ara Kesinlik (laboratuvar içi tekrarlanabilirlik);

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

Ara kesinlik parametresi bitmiş üründen elde edilen sonuçlarla hesaplanır. Yöntemde belirtildiği gibi numune hazırlanır. Böylece yöntemin çalışılabilirliği ürün bazında tespit edilmiş olur.

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

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

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

Bütün sonuçlar kıyaslanıp bağıl standart sapma hesaplanır.

Stok Amprolyum HCl çözeltisinin hazırlanışı; 100 mL'lik balon jojeye 250 mg Amprolyum HCl standardı tartıldı. Bir miktar seyreltme çözeltisi ilave edilip çözüldükten sonra hacmi seyreltme çözeltisi ile 100 mL'ye tamamlandı. ($c = 2,5 \text{ mg/mL}$)

Stok Vitamin K₃ çözeltisinin hazırlanışı; 100 mL'lik balon jojeye 20 mg Vitamin K₃ standardı tartıldı. Bir miktar seyreltme çözeltisi ilave edilip çözüldükten sonra hacmi seyreltme çözeltisi ile 100 mL'ye tamamlandı. Bu çözeltiden 1 mL alındı, 10 mL'lik balon jojeye aktarıldı ve hacmi seyreltme çözeltisi ile tamamlandı. ($c = 0,02 \text{ mg/mL}$)

Stok Metilparaben çözeltisinin hazırlanışı; 100 mL'lik balon jojeye 18 mg Metilparaben standardı tartıldı. Bir miktar seyreltme çözeltisi ilave edilip çözündükten sonra hacmi seyreltme çözeltisi ile 100 mL'ye tamamlandı. Bu çözeltiden 1 mL alındı, 10 mL'lik balon jojeye aktarıldı ve hacmi seyreltme çözeltisi ile tamamlandı. ($c = 0,018 \text{ mg/mL}$)

Stok Propilparaben çözeltisinin hazırlanışı; 100 mL'lik balon jojeye 20 mg Propilparaben standardı tartıldı. Bir miktar seyreltme çözeltisi ilave edilip çözündükten sonra hacmi seyreltme çözeltisi ile 100 mL'ye tamamlandı. Bu çözeltiden 1 mL alındı, 100 mL'lik balon jojeye aktarıldı ve hacmi seyreltme çözeltisi ile tamamlandı. ($c = 0,002 \text{ mg/mL}$)

Standart çözeltisinin hazırlanışı; 20 mL'lik balon jojeye Stok Amprolyum HCl, Stok Vitamin K₃, Stok Metilparaben ve Stok Propilparaben çözeltilerinden 4'er mL alındı, 20 mL'ye seyreltme çözeltisi ile tamamlandı. Bu çözelti 2-3 mL ile doyurulmuş 0.45 mm PTFE filtreden süzüldü ve viallendi. ($C_{\text{Amprolyum HCl}} = 0,5 \text{ mg/mL}$; $C_{\text{Vitamin-K3}} = 0,004 \text{ mg/mL}$; $C_{\text{MP}} = 0,0036 \text{ mg/mL}$; $C_{\text{PP}} = 0,0004 \text{ mg/mL}$)

Test çözeltisinin hazırlanışı; 0,5 mL numune hassas olarak 50 mL'lik balon jojeye tartıldı. Bir miktar seyreltme çözeltisi ilave edilip çözündükten sonra hacmi seyreltme çözeltisi ile 50 mL'ye tamamlandı. Bu çözeltiden 4 mL alınarak, 20 mL'lik balon jojeye aktarıldı ve hacmi seyreltme çözeltisi ile tamamlandı. Bu çözelti 2-3 mL ile doyurulmuş 0.45 mm PTFE filtreden süzüldü ve viallendi. ($C_{\text{Amprolyum HCl}} = 0,5 \text{ mg/mL}$; $C_{\text{Vitamin-K3}} = 0,004 \text{ mg/mL}$; $C_{\text{MP}} = 0,0036 \text{ mg/mL}$; $C_{\text{PP}} = 0,0004 \text{ mg/mL}$)

Kriter;

- Analiz 1 ve cihaz I'den elde edilen sonuçların ve Analiz 2 ve cihaz II'den elde edilen sonuçların kendi arasındaki bağıl standart sapma değeri %2,00'den büyük olmamalıdır.
- 12 analiz sonucunun bağıl standart sapma değeri %2,00'den büyük olmamalıdır.
- Aynı konsantrasyonda hazırlanan iki standart çözelti arasındaki benzerlik %98-%102 arasında olmalıdır.
- Birbirine yakın iki pik arasındaki ayrışma minimum 2,00 olmalıdır.

2.1.5.6. Güvenilirlik

Bir analitik yöntemin sağlamlığı, yöntem parametrelerinde yapılan küçük fakat önemli değişimlerden etkilenmeden kaldığının ölçüsüdür ve yöntemin normal kullanıldığı sürede

güvenilir olduğunun göstergesidir.

Çözelti Stabilitesi;

Yöntemde belirtildiği gibi standart ve test çözeltisi hazırlanır. Bu çözeltilerden; başlangıçta, 3 saat, 6 saat, 12 saat, 15 saat, 21 saat, 25 saat, 35 saat, 60 saat, 72 saat ve 90 saat sonra enjeksiyonlar yapıp, analiz edilir. Çözeltiler bu süre zarfında oda sıcaklığında korunur. Sonuçlar başlangıç değeri ile kıyaslanır ve % değişim hesaplanır.

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

Dt : Herhangi bir t anında bulunan değer

Di : Başlangıçta bulunan değer

Kriter; Başlangıç ile her periyot analiz sonuçları arasındaki değişim $\pm\%2$ olmalıdır.

Küçük Değişiklikler;

Bu çalışmada hareketli faz akış hızı ve kolon fırını sıcaklığında değişiklikler yapılarak etken madde miktar tayini analizi yapılır. Bulunan analiz sonuçları prosedürde belirtilen şartlarda aynı bitmiş ürün için yapılan analiz sonuçları ile karşılaştırılır.

Farklı Akış Hızı; Yöntemde belirtildiği gibi standart çözeltisi hazırlanır. Bu çözeltiden yöntemde belirtilen akış hızı 0.66 mL/dk ve 0,54 mL/dk'ye değiştirildikten sonra enjeksiyonlar yapılır. Sonuçlar başlangıç değeri ile kıyaslanır ve % değişim hesaplanır.

Kriter; Başlangıç değerinden değişim $\pm\%2$ olmalıdır.

Farklı Kolon Sıcaklığı; Yöntemde belirtildiği gibi standart çözeltisi hazırlanır. Bu çözeltiden yöntemde belirtilen kolon sıcaklığı ile ve T=30°C ve T=20°C kolon sıcaklıkları ile enjeksiyonlar yapılır. Sonuçlar başlangıç değeri ile kıyaslanır ve % değişim hesaplanır.

Kriter; Başlangıç değerinden değişim $\pm\%2$ olmalıdır.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

Yapılan çalışmalar sonucu 50 dakikalık enjeksiyon süresinde 4 etkeninde çıkartıldığı bir HPLC yöntemi yapılmış ve valide edilebilmiştir. Validasyon çalışmaları sonucunda;

3.1. SPESİFİKLİK

Sonuç;

Amprolyum HCl, Vitamin K₃, Metilparaben ve Propilparaben alıkonma zamanında başka bir pike rastlanmamıştır.

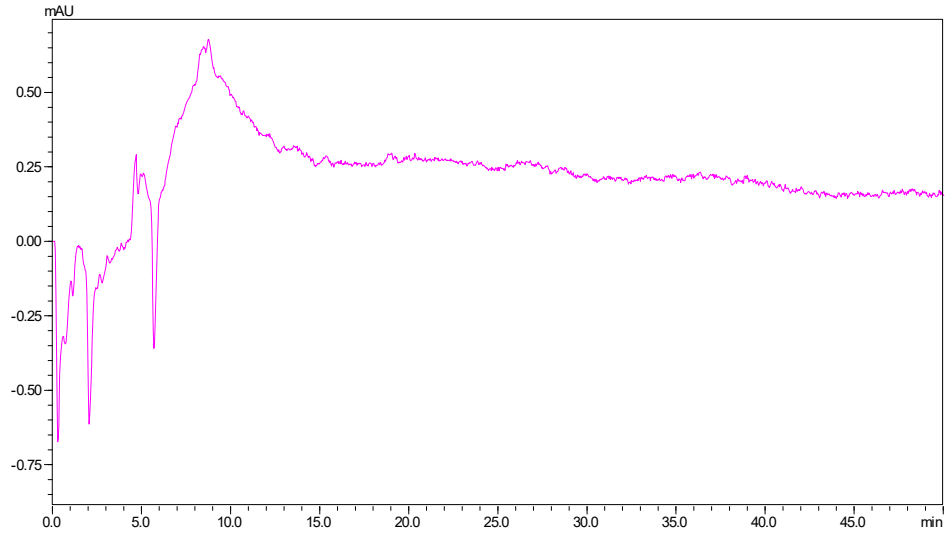
Amprolyum standart kromatogramında Amprolyum HCl ve 2-picoline pikleri arasındaki ayrışma 18'dir.

Birbirine yakın iki pik arasındaki ayrışma 3,7'den büyüktür.

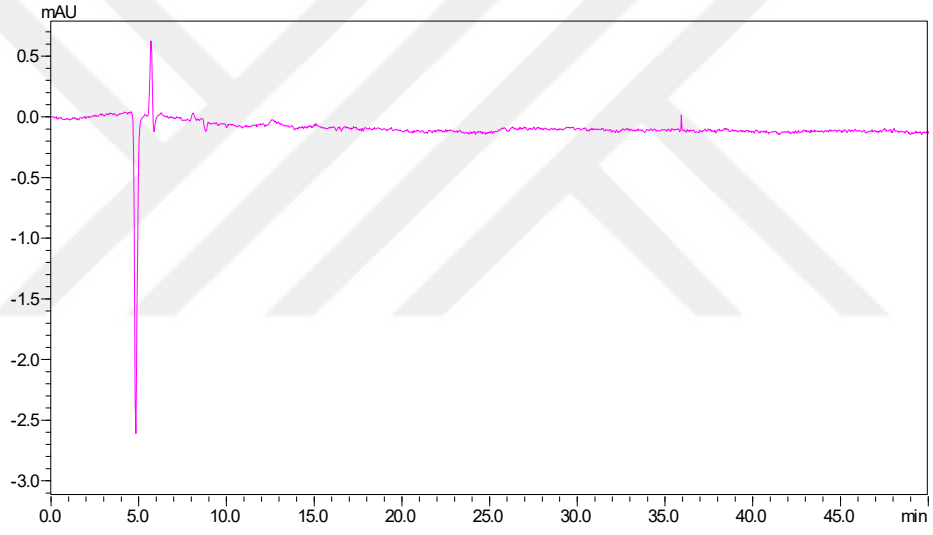
Bileşenlere ait piklerin pik saflığı açısı değerleri 0,991 ile 1,000 arasındadır.

Çizelge 3.1. Çözeltilerin HPLC kromatogram değerleri.

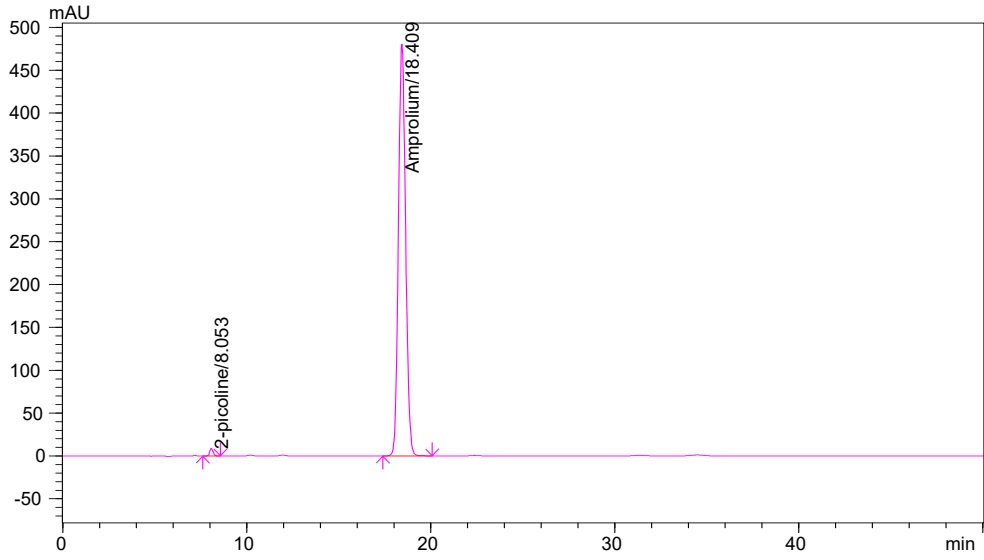
Bileşenler		Bağlı alıkonma zamanı (R.T.)	Alan	Rezolüsyon	Pik Saflığı açısı
Plasebo		-	-	-	-
Çözücü		-	-	-	-
2-picoline		8,053	112740	-	-
Amprolyum HCl		18,409	13094975	18,0	1,000000
Vitamin K ₃		4,682	87500	-	0,991152
Metilparaben		14,984	371323	-	0,999978
Propilparaben		39,594	35016	-	0,992122
Standart Çözeltisi	Vitamin K ₃	4,678	130985	-	0,991222
	Metilparaben	15,006	373386	5,4	0,999964
	Amprolyum HCl	18,438	13100609	5,0	1,000000
	Propilparaben	39,675	37605	3,8	0,992122
Test Çözeltisi	Vitamin K ₃	4,668	120063	-	0,991539
	Metilparaben	14,993	325725	5,3	0,999999
	Amprolyum HCl	18,424	12712520	5,0	1,000000
	Propilparaben	39,708	34296	4,3	0,992222



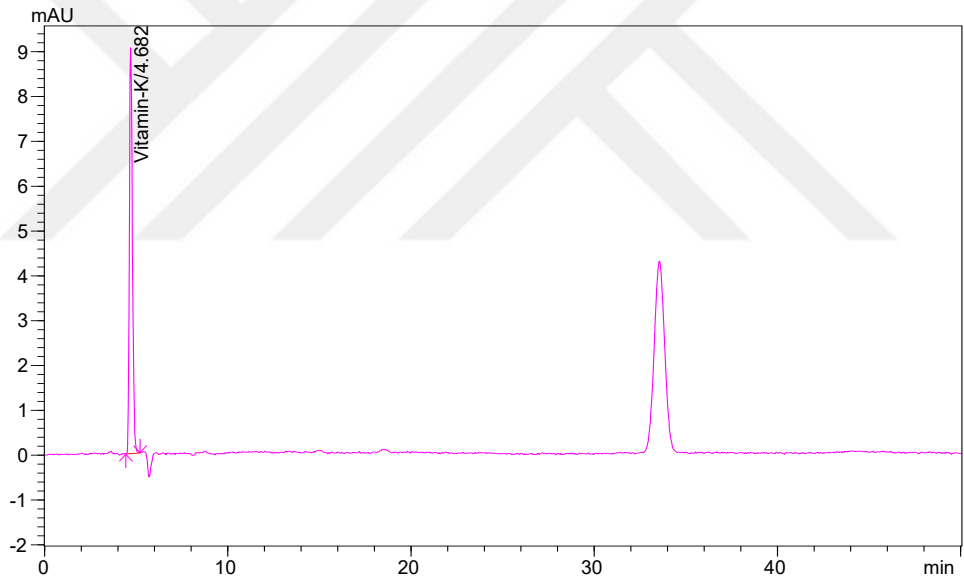
Şekil 3.1. Seyreltme çözeltisi kromatogramı.



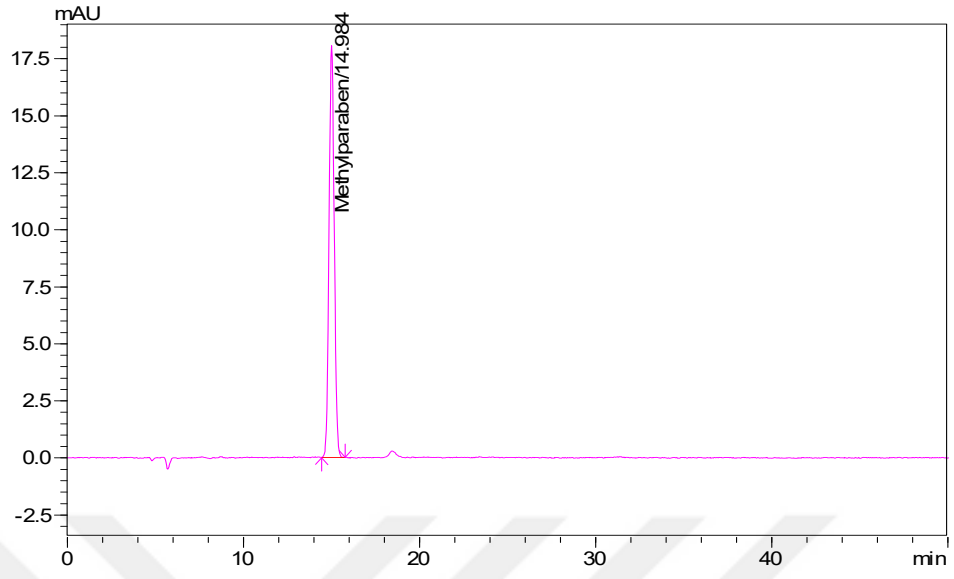
Şekil 3.2. Plasebo çözeltisi kromatogramı.



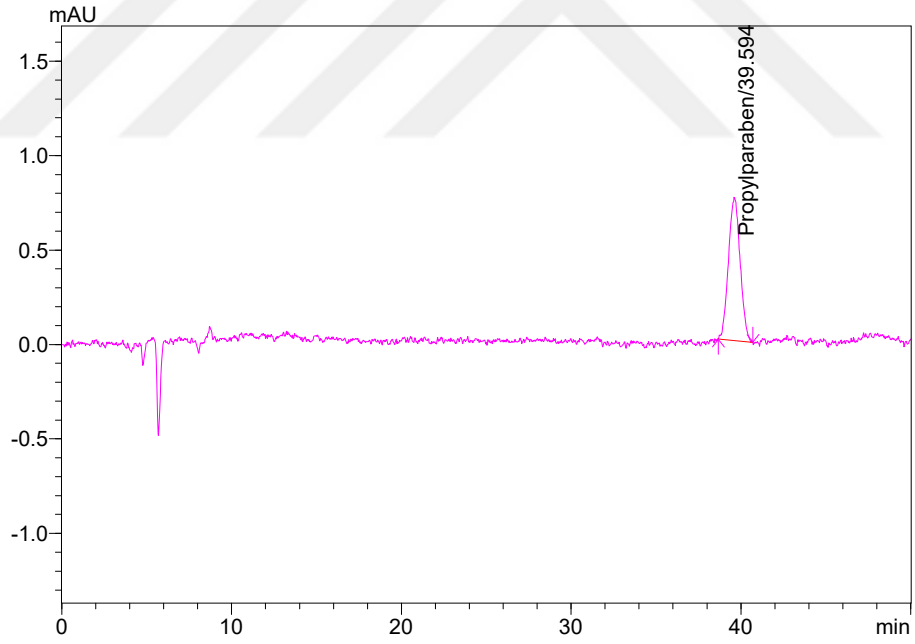
Şekil 3.3. Amprolium HCl standart çözeltisi kromatogramı ($C_{\text{Amprolium HCl}} = 0.5$ mg/mL).



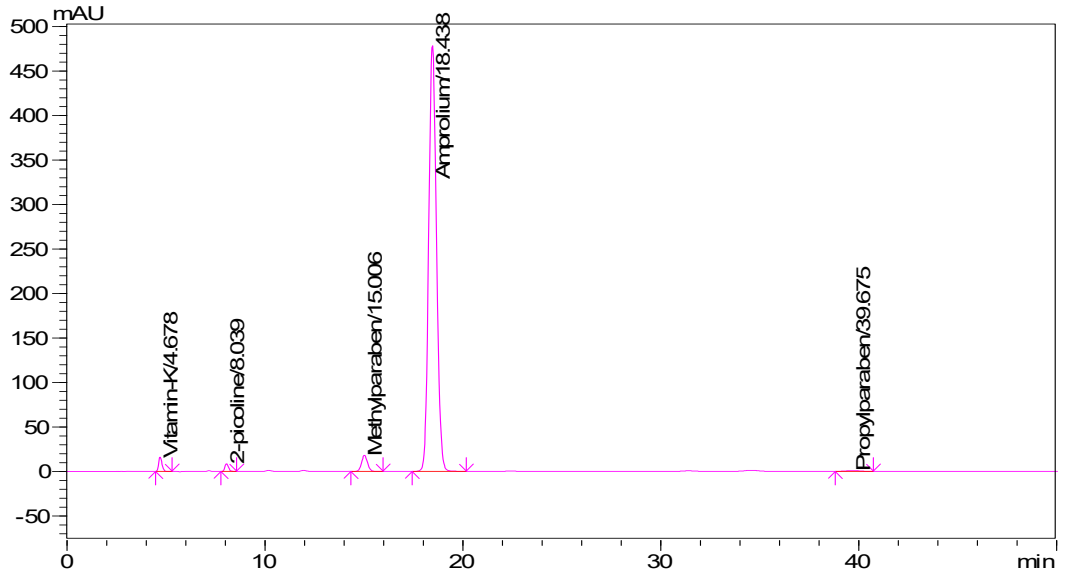
Şekil 3.4. Vitamin K₃ standart çözeltisi kromatogramı ($C_{\text{Vitamin K}_3} = 0.004$ mg/mL).



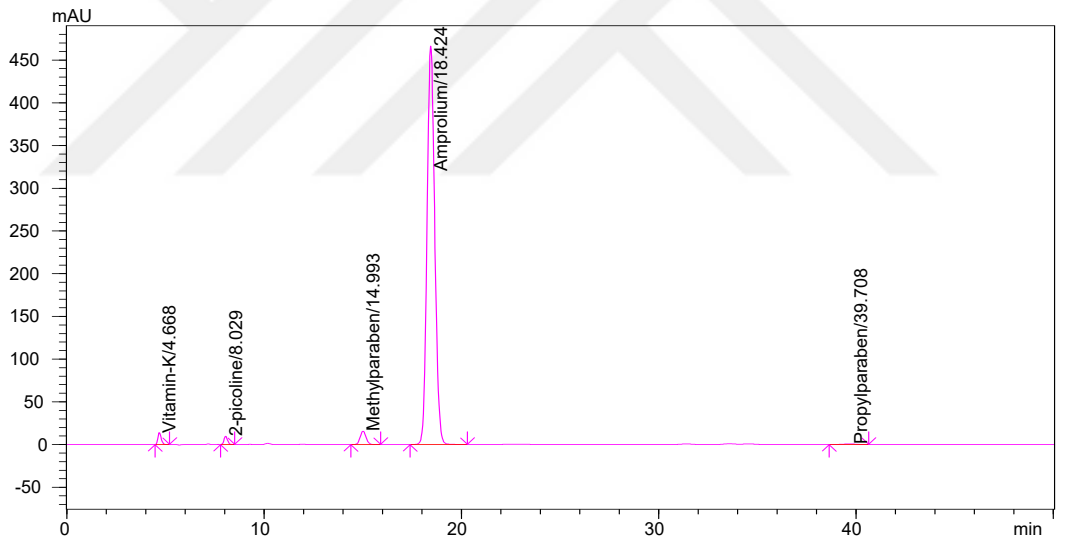
Şekil 3.5. Metilparaben standart çözeltisi kromatogramı.
($C_{\text{Metilparaben}} = 0.0036 \text{ mg/mL}$).



Şekil 3.6. Propilparaben standart çözeltisi kromatogramı ($C_{\text{Propilparaben}} = 0.0004 \text{ mg/mL}$).



Şekil 3.7. Standart çözeltisi kromatogramı ($C_{\text{Amprolyum HCl}}=0.5 \text{ mg/mL}$; $C_{\text{Vitamin K3}}=0.004 \text{ mg/mL}$; $C_{\text{Metilparaben}}=0.0036 \text{ mg/mL}$, $C_{\text{Propilparaben}}=0.0004 \text{ mg/mL}$).



Şekil 3.8. Test çözeltisi kromatogramı ($C_{\text{Amprolyum HCl}}=0.5 \text{ mg/mL}$; $C_{\text{Vitamin K3}}=0.004 \text{ mg/mL}$; $C_{\text{Metilparaben}}=0.0036 \text{ mg/mL}$, $C_{\text{Propilparaben}}=0.0004 \text{ mg/mL}$).

3.2. SİSTEM UYGUNLUK

Sonuç;

Etken maddelere ait piklerin teorik plaka sayısı 2500'den büyüktür.

Etken maddelere ait piklerin kuyruklanma faktörü 0,8 – 1,2 arasındadır.

Etken maddelere ait pik alanların ve alıkonma zamanların bağıl standart sapması %1,6'dan küçüktür.

Aynı konsantrasyonda hazırlanan iki standart çözelti arasındaki benzerlik %99-%101,7 arasındadır.

Amprolyum standart kromatogramında Amprolyum HCl ve 2-picoline pikleri arasındaki ayrışma 18'dir.

Birbirine yakın iki pik arasındaki ayrışma 3,7'den büyüktür.

Çizelge 3.2. Pik alanların ve alıkonma zamanların bağıl standart sapması değerleri.

Standart 1	Vitamin K ₃		Amprolyum HCl		Metilparaben		Propilparaben	
	R.T.	Alan	R.T.	Alan	R.T.	Alan	R.T.	Alan
1	4,691	189918	18,413	13074944	15,004	374697	39,648	40181
2	4,684	190092	18,408	13075567	14,999	373649	39,601	41243
3	4,686	189916	18,401	13072674	14,998	373543	39,610	40367
4	4,690	190074	18,411	13069415	15,004	372568	39,674	40532
5	4,685	190069	18,674	13063906	15,121	373762	40,334	41717
6	4,658	189654	18,880	13054796	15,208	371866	40,605	40191
Ortalama	4,68	189954	18,53	13068550	15,06	373348	39,91	40705
SD	0,01	166,98	0,20	7982,69	0,09	992,43	0,44	631,91
RSD	0,26%	0,09%	1,09%	0,06%	0,59%	0,27%	1,11%	1,55%
Standart 2	R.T.	Alan	R.T.	Alan	R.T.	Alan	R.T.	Alan
1	4,681	187829	19,018	13014819	15,284	365473	40,757	39769
2	4,683	188369	18,871	13012045	15,221	364838	40,511	39703
3	4,662	188176	18,841	13009845	15,197	363936	40,413	39538
Ortalama	4,675	188125	18,910	13012236	15,234	364749	40,560	39670
SD	0,01	273,64	0,09	2492,51	0,04	772,36	0,18	118,98
RSD	0,25%	0,15%	0,50%	0,02%	0,29%	0,21%	0,44%	0,30%

Çizelge 3.3. İki standart çözeltisi arasındaki uyum değerleri.

Etken Maddeler	Tartım (mg)	Kons. (mg/mL)	UYUM (%)
Vitamin K ₃	Std 1: 41,8	0,004	99,28
	Std 2: 41,1	0,004	
Amprolyum HCl	Std 1: 250,7	0,49087	100,27
	Std 2: 250,3	0,49009	
Metilparaben	Std 1: 18,9	0,00377	100,19
	Std 2: 18,5	0,00369	
Propilparaben	Std 1: 20,8	0,00042	101,62
	Std 2: 20,6	0,00041	

Çizelge 3.4. Sistem uygunluk parametresinin HPLC kromatogram değerleri.

Bileşenler		Bağlı Alıkonma Zamanı (R.T.)	Alan	Rezolüsyon (R)	Kuyruklanma Faktörü (Tf)	Teorik Plaka Sayısı (N)
Plasebo		-	-	-	-	-
Çözücü		-	-	-	-	-
2-picoline		8,053	112740	-	-	-
Amprolyum HCl		18,409	13094975	18,0	1,154	9276
Vitamin K ₃		4,682	87500	-	1,127	3878
Metilparaben		14,984	371323	-	1,121	9988
Propilparaben		39,594	35016	-	1,101	15080
Standart Çözeltisi	Vitamin K ₃	4,678	130985	-	1,191	2979
	Metilparaben	15,006	373386	5,4	1,132	9795
	Amprolyum HCl	18,438	13100609	5,0	1,154	9227
	Propilparaben	39,675	37605	3,8	1,012	13548
Test Çözeltisi	Vitamin K ₃	4,668	120063	-	1,135	4211
	Metilparaben	14,993	325725	5,3	1,128	9839
	Amprolyum HCl	18,424	12712520	5,0	1,153	9278
	Propilparaben	39,708	34296	4,3	0,888	13769

3.3. DOĞRUSALLIK VE ÇALIŞMA ARALIĞI

Sonuç;

Yöntem miktar tayini testi için doğrusallık kriterine uyar. Korelasyon katsayısı (r); 0.999'den, (r^2); 0.998'den büyüktür. Doğrunun y-eksenini kestiği nokta doğrunun eğim % değerleri; Amprolyum HCl %0.743, Vitamin K₃ %0.007, Metilparaben %0.011 ve

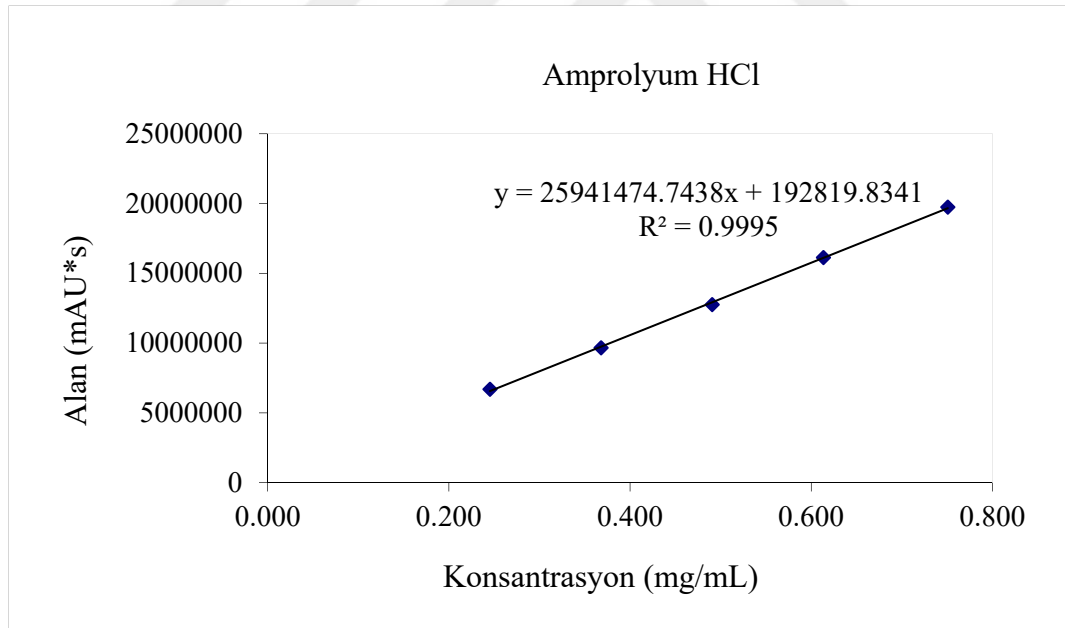
Propilparaben %0.001'dir.

Amprolyum HCl;

Çizelge 3.5. Amprolyum HCl konsantrasyona bağlı kromatogram değerleri.

Çözelti Seviyesi (%)	Amprolyum HCl Konsantrasyonu (mg/mL)	Enjeksiyonların Alan Ortalaması (mAU*s)	RSD (%)
50	0,245	6688408	0,01
75	0,368	9664416	0,03
100	0,491	12761506	0,04
125	0,613	16133446	0,03
150	0,751	19742328	0,02
m	25941474,74		
n	192819,8341		
R	0,9997		
R²	0,9995		
y = mx + n	25941474,7438x + 192819,8341		

Amprolyum HCl doğrusallık grafiği çizilir;



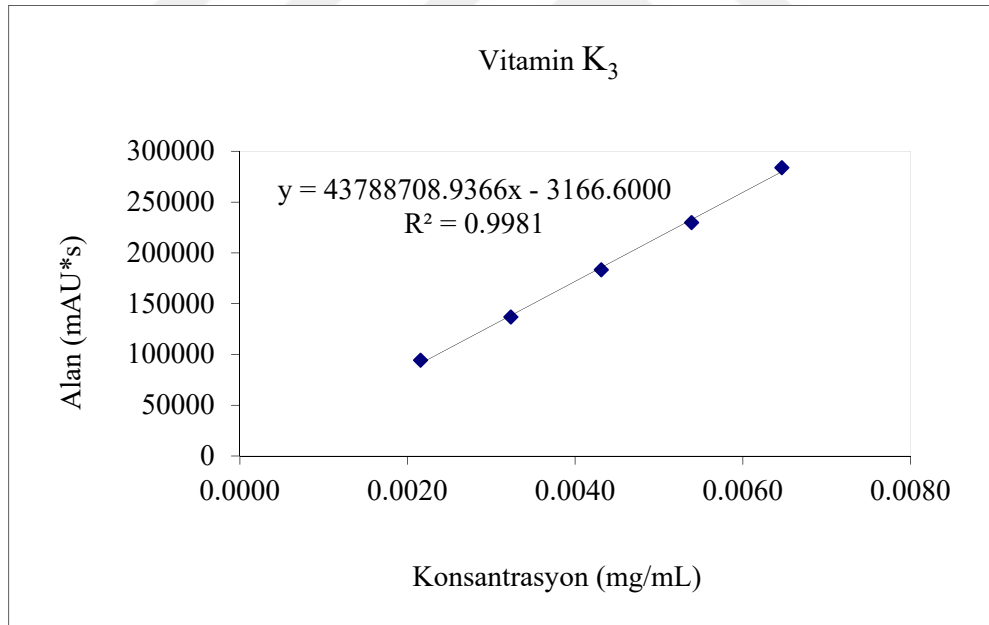
Şekil 3.9. Amprolyum HCl doğrusallık grafiği.

Vitamin K₃;

Çizelge 3.6. Vitamin K₃ konsantrasyona bağlı kromatogram değerleri.

Çözelti Seviyesi (%)	Vitamin K ₃ Konsantrasyonu (mg/mL)	Enjeksiyonların Alan Ortalaması (mAU*s)	RSD (%)
50	0,0022	94346	0,12
75	0,0032	136796	0,19
100	0,0043	183288	0,07
125	0,0054	229790	0,08
150	0,0065	283817	0,07
m	43788708,9366		
n	-3166,6		
R	0,9991		
R²	0,9981		
y = mx + n	43788708,9366x – 3166,6000		

Vitamin K₃ doğrusallık grafiği çizilir;



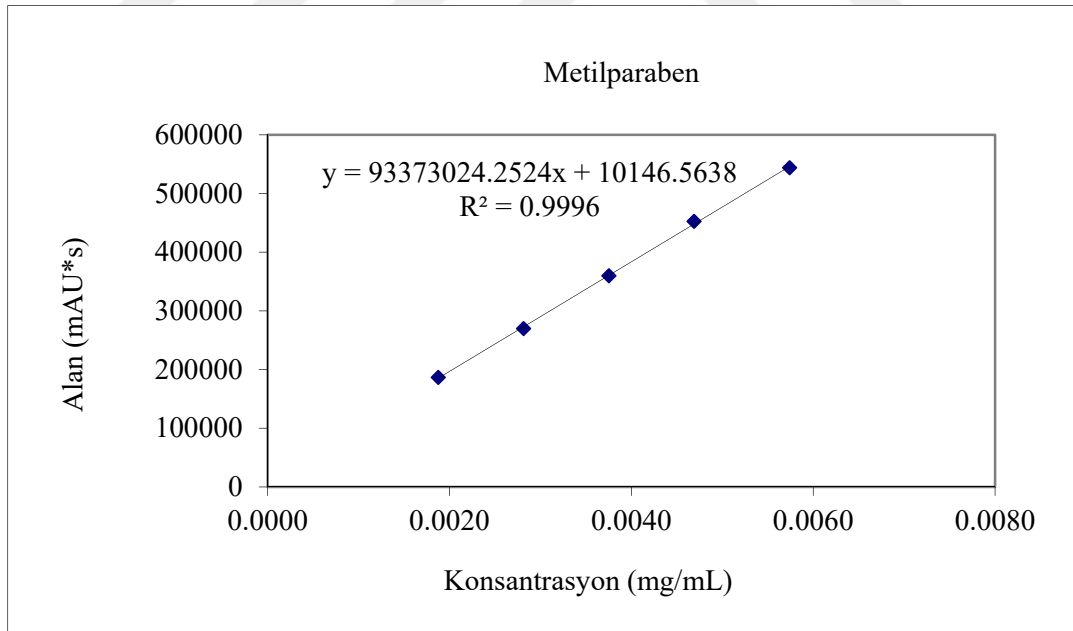
Şekil 3.10. Vitamin K₃ doğrusallık grafiği.

Metilparaben;

Çizelge 3.7. Metilparaben konsantrasyona bağlı kromatogram değerleri.

Çözelti Seviyesi (%)	Metilparaben Konsantrasyonu (mg/mL)	Enjeksiyonların Alan Ortalaması (mAU*s)	RSD (%)
50	0,0019	186584	0,28
75	0,0028	269993	0,48
100	0,0038	359966	0,29
125	0,0047	452532	0,24
150	0,0057	543894	0,14
m	93373024,2524		
n	10146,5638		
R	0,9998		
R²	0,9996		
y = mx + n	93373024,2524x + 10146,5638		

Metilparaben doğrusallık grafiği çizilir;



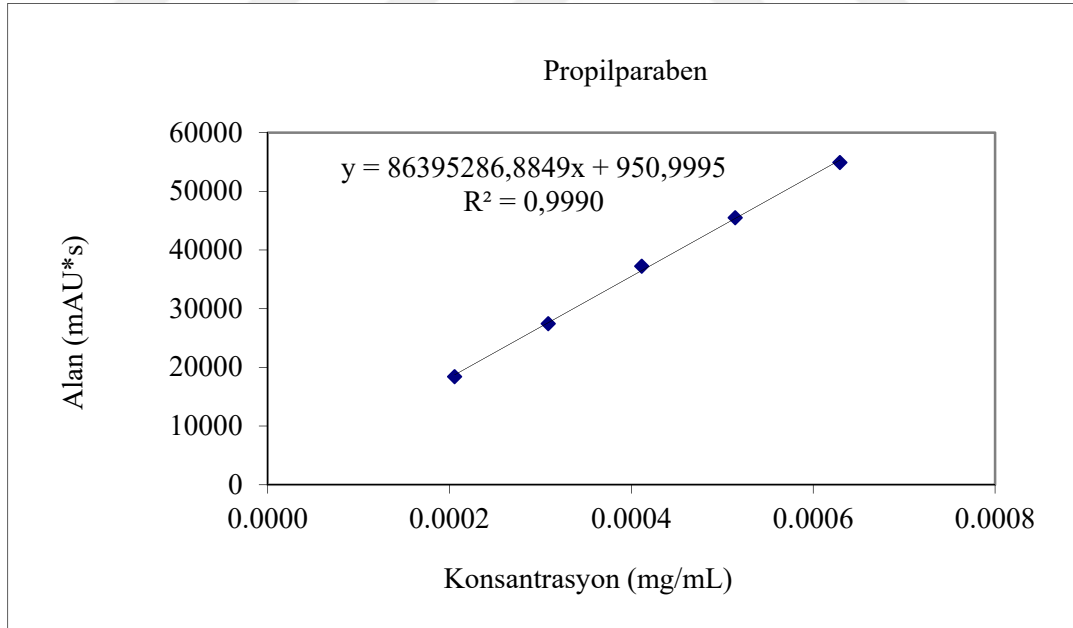
Şekil 3.11. Metilparaben doğrusallık grafiği.

Propilparaben

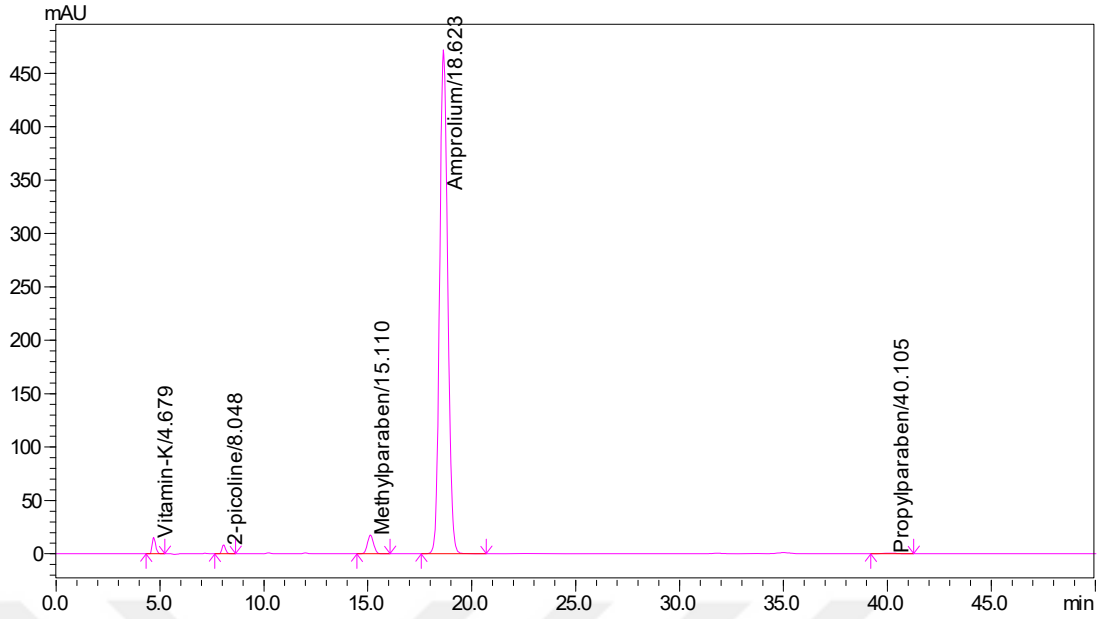
Çizelge 3.8. Propilparaben konsantrasyona bağlı kromatogram değerleri.

Çözelti Seviyesi (%)	Propilparaben Konsantrasyonu (mg/mL)	Enjeksiyonların Alan Ortalaması (mAU*s)	RSD (%)
50	0,0002	18432	1,72
75	0,0003	27436	0,73
100	0,0004	37231	1,80
125	0,0005	45495	0,31
150	0,0006	54916	0,92
m	86395286,8849		
n	950,9995		
R	0,9995		
R²	0,9990		
y = mx + n	86395286,8849x + 950,9995		

Propilparaben doğrusallık grafiği çizilir;



Şekil 3.12. Propilparaben doğrusallık grafiği.



ID#	Name	Ret. Time	Area
1	Vitamin-K3	4.679	184084
2	2-picoline	8.048	105562
3	Methylparaben	15.110	360022
4	Amprolium HCl	18.623	12767434
5	Propylparaben	40.105	36629

Şekil 3.13. Doğrusallık kromatogramı ($C_{\text{Amprolium HCl}}=0.5 \text{ mg/mL}$; $C_{\text{Vitamin K}_3}=0.004 \text{ mg/mL}$; $C_{\text{Metilparaben}}=0.0036 \text{ mg/mL}$, $C_{\text{Propilparaben}}=0.0004 \text{ mg/mL}$).

3.4. DOĞRULUK

Sonuç; Miktar tayini yöntemi için doğruluk kriteri geçerlidir. Bu yöntem için doğruluk kriteri belirlenmiştir. Bu sonuca göre, %50, %100 ve %150 geri kazanım yeterlidir. Ortalama geri kazanım değeri Amprolium HCl için %100,41, Vitamin K₃ için %100,77, Metilparaben için %100,59 ve Propilparaben için %99,68'dir. Bu değerler sınırlar içinde olduğu için Oral Çözelti Miktar Tayini yöntemi doğruluk parametresine göre uygundur.

Amprolyum HCl;

Çizelge 3.9. Amprolyum HCl çözeltisinin konsantrasyon ve geri kazanım.

Amprolyum HCl Doğruluk Çözeltileri (%)		Eklenen konsantrasyon (mg/mL)	Bulunan konsantrasyon (mg/mL)	Geri kazanım (%)
50	1	0,250	0,254	101,75
	2	0,250	0,254	101,58
	3	0,250	0,253	101,49
100	1	0,499	0,494	98,93
	2	0,499	0,499	100,02
	3	0,499	0,494	98,92
150	1	0,749	0,747	99,80
	2	0,749	0,756	100,95
	3	0,749	0,751	100,24
Ortalama % Geri Kazanım				100,41
Geri Kazanım %'in %95 Güven Aralığı Sınırları				99,58 - 101,24

Vitamin K₃;

Çizelge 3.10. Vitamin K₃ çözeltisinin konsantrasyon ve geri kazanım.

Vitamin K ₃ Doğruluk Çözeltileri (%)		Eklenen konsantrasyon (mg/mL)	Bulunan konsantrasyon (mg/mL)	Geri kazanım (%)
50	1	0,00216	0,00219	101,49
	2	0,00216	0,00219	101,26
	3	0,00216	0,00219	101,48
100	1	0,00432	0,00434	100,42
	2	0,00432	0,00434	100,36
	3	0,00432	0,00433	100,31
150	1	0,00648	0,00648	100,04
	2	0,00648	0,00656	101,13
	3	0,00648	0,00651	100,44
Ortalama % Geri Kazanım				100,77
Geri Kazanım %'in %95 Güven Aralığı Sınırları				100,35 - 101,20

Metilparaben;

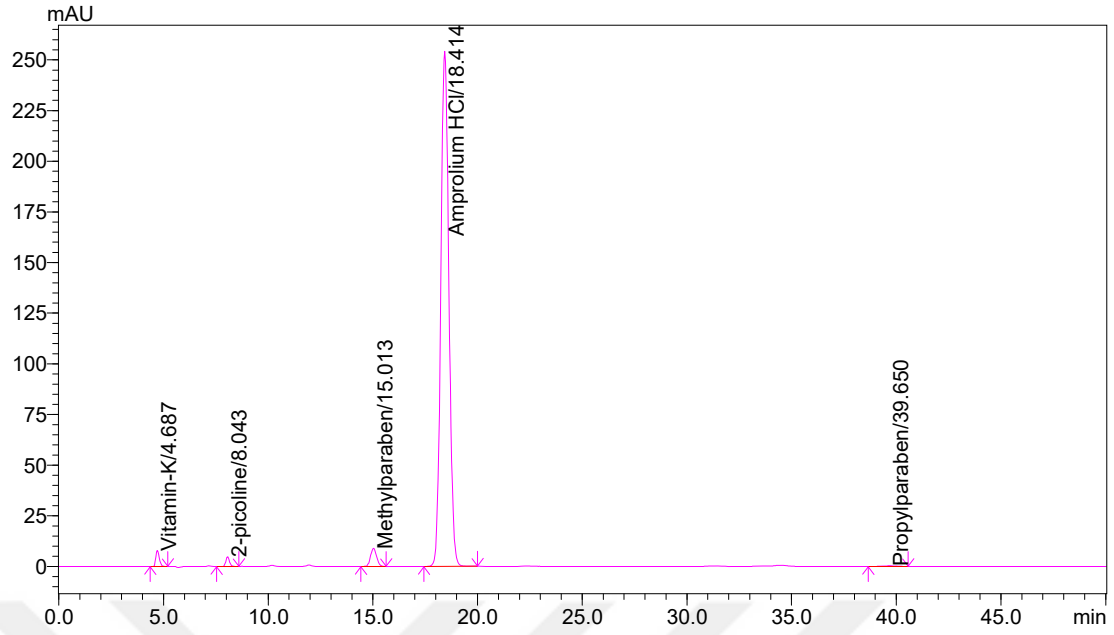
Çizelge 3.11. Metilparaben çözeltisinin konsantrasyon ve geri kazanım.

Metilparaben Doğruluk Çözeltileri (%)		Eklenen konsantrasyon (mg/mL)	Bulunan konsantrasyon (mg/mL)	Geri kazanım (%)
50	1	0,0019	0,0018	98,82
	2	0,0019	0,0018	99,01
	3	0,0019	0,0018	98,61
100	1	0,0037	0,0038	101,37
	2	0,0037	0,0038	101,50
	3	0,0037	0,0038	101,44
150	1	0,0056	0,0057	100,95
	2	0,0056	0,0057	101,76
	3	0,0056	0,0057	101,86
Ortalama % Geri Kazanım				100,59
Geri Kazanım %'in %95 Güven Aralığı Sınırları				99,56 – 101,62

Propilparaben;

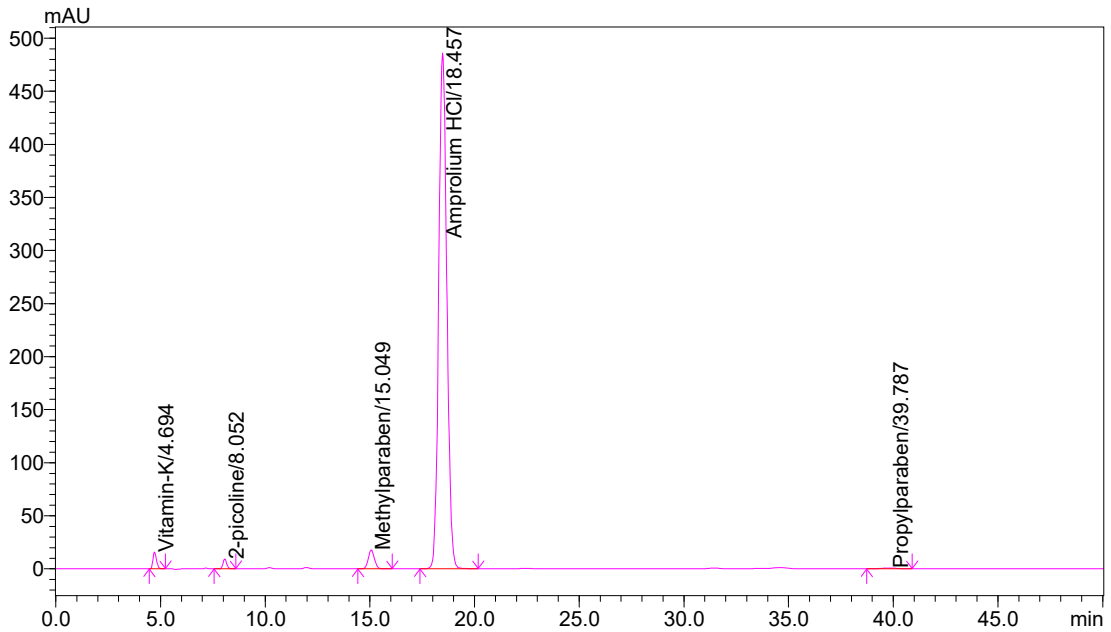
Çizelge 3.12. Propilparaben çözeltisinin konsantrasyon ve geri kazanım.

Propilparaben Doğruluk Çözeltileri (%)		Eklenen konsantrasyon (mg/mL)	Bulunan konsantrasyon (mg/mL)	Geri kazanım (%)
50	1	0,0002	0,0002	100,43
	2	0,0002	0,0002	98,88
	3	0,0002	0,0002	99,24
100	1	0,0004	0,0004	98,82
	2	0,0004	0,0004	99,23
	3	0,0004	0,0004	98,97
150	1	0,0006	0,0006	100,58
	2	0,0006	0,0006	100,06
	3	0,0006	0,0006	100,95
Ortalama % Geri Kazanım				99,68
Geri Kazanım %'in %95 Güven Aralığı Sınırları				99,07 – 100,30



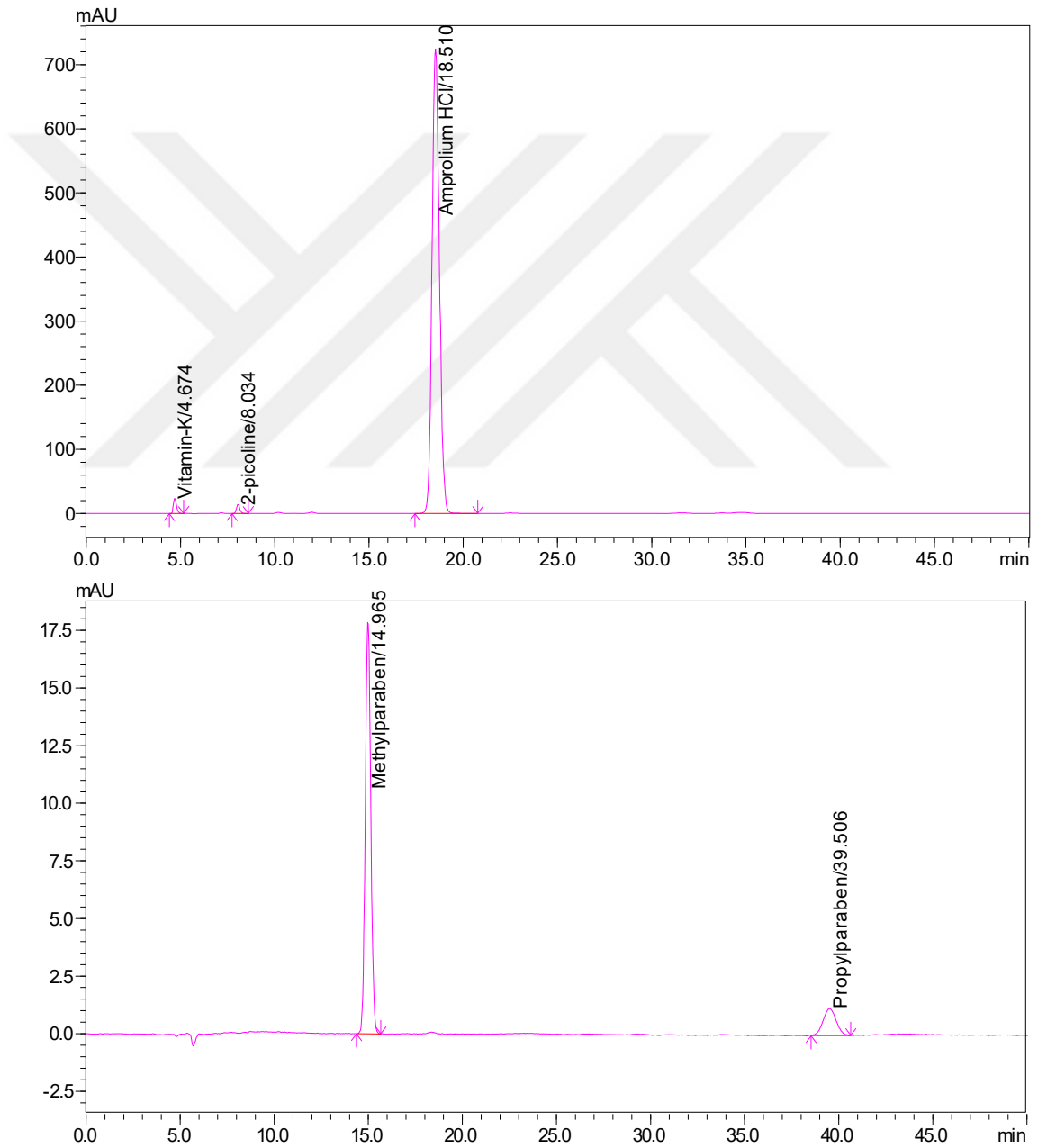
ID#	Name	Ret. Time	Area
1	Vitamin-K3	4.687	93462
2	2-picoline	8.043	59367
3	Methylparaben	15.013	181740
4	Amprolium HCl	18.414	6787088
5	Propylparaben	39.650	18141

Şekil 3.14. Doğruluk kromatogramı %50 ($C_{\text{Amprolium HCl}}=0.25 \text{ mg/mL}$; $C_{\text{Vitamin K3}}=0.002 \text{ mg/mL}$; $C_{\text{Metilparaben}}=0.0018 \text{ mg/mL}$, $C_{\text{Propilparaben}}=0.0002 \text{ mg/mL}$).



ID#	Name	Ret. Time	Area
1	Vitamin-K3	4.694	188018
2	2-picoline	8.052	116907
3	Methylparaben	15.049	363554
4	Amprolium HCl	18.457	13007297
5	Propylparaben	39.787	38654

Şekil 3.15. Doğruluk kromatogramı %100 ($C_{\text{Amprolium HCl}}=0.5 \text{ mg/mL}$; $C_{\text{Vitamin K3}}=0.004 \text{ mg/mL}$; $C_{\text{Metilparaben}}=0.0036 \text{ mg/mL}$, $C_{\text{Propilparaben}}=0.0004 \text{ mg/mL}$).



ID#	Name	Ret. Time	Area
1	Vitamin-K3	4.674	281702
2	2-picoline	8.034	178383
3	Methylparaben	14.965	538367
4	Amprolium HCl	18.510	19591909
5	Propylparaben	39.506	55986

Şekil 3.16. Doğruluk kromatogramı %150 ($C_{\text{Amprolium HCl}}=0.75 \text{ mg/mL}$; $C_{\text{Vitamin K3}}=0.006 \text{ mg/mL}$; $C_{\text{Metilparaben}}=0.0054 \text{ mg/mL}$, $C_{\text{Propilparaben}}=0.0006 \text{ mg/mL}$).

3.5. KESİNLİK

3.5.1. Sistem Kesinliği

Sonuç;

1. Gün ve 2. Gün elde edilen sonuçların kendi arasındaki bağıl standart sapma değeri %2,00'den küçüktür.

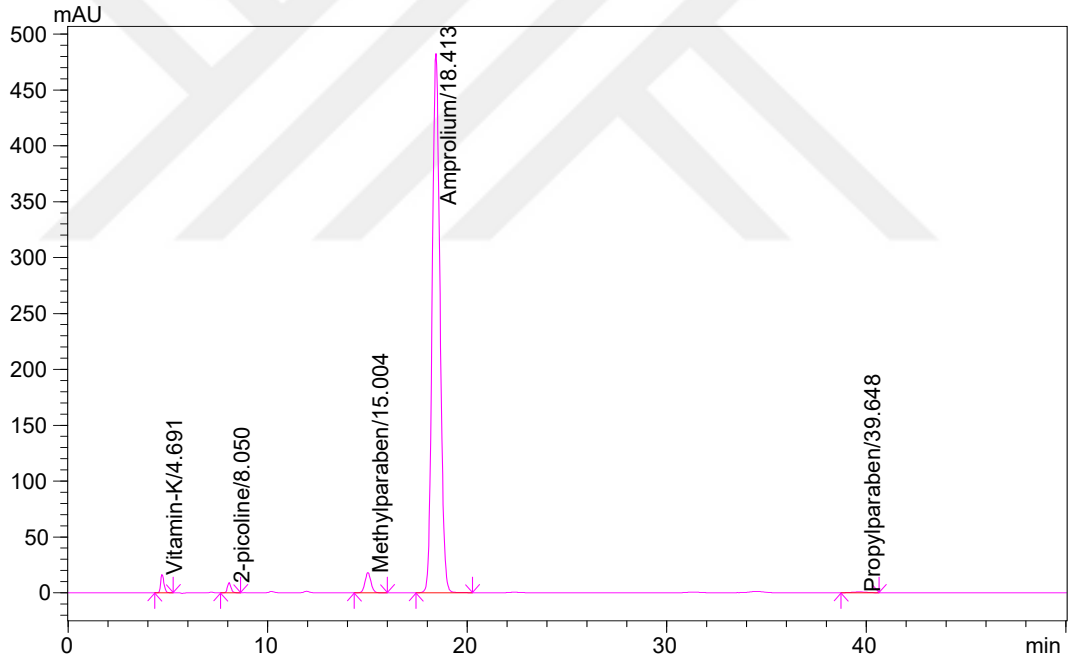
Pik alanları ve alıkonma zamanları arasındaki bağıl standart sapma (RSD) %2,00'den küçüktür.

Çizelge 3.13. Sistem kesinlik parametresinin I.gün değerleri.

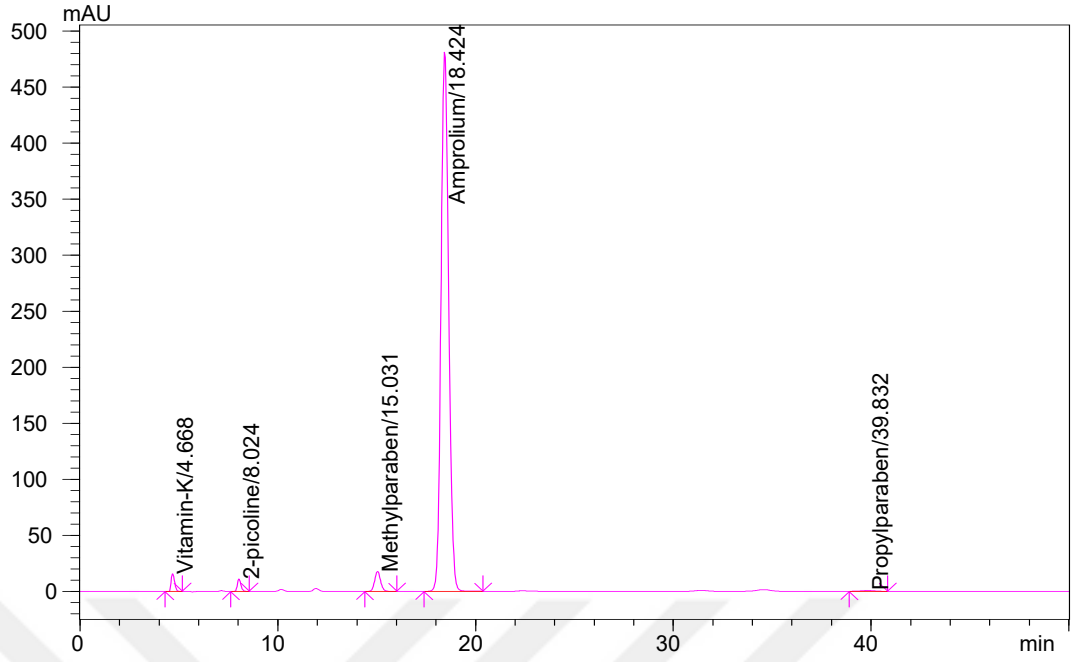
I.Gün								
Enjeksiyo n (I.Gün)	Vitamin K ₃		Amprolyum HCl		Metilparaben		Propilparaben	
	R.T.	Alan	R.T.	Alan	R.T.	Alan	R.T.	Alan
1	4,691	189918	18,413	13074944	15,004	374697	39,648	40181
2	4,684	190092	18,408	13075567	14,999	373649	39,601	41243
3	4,686	189916	18,401	13072674	14,998	373543	39,610	40367
4	4,690	190074	18,411	13069415	15,004	372568	39,674	40532
5	4,685	190069	18,674	13063906	15,121	373762	40,334	41717
6	4,658	189654	18,880	13054796	15,208	371866	40,605	40191
Ortalama	4,682	189954	18,531	13068550	15,056	373348	39,912	40705
SD	0,01	166,98	0,20	7982,69	0,09	992,43	0,44	631,91
RSD	0,26%	0,09%	1,09%	0,06%	0,59%	0,27%	1,11%	1,55%

Çizelge 3.14. Sistem kesinlik parametresinin II.gün değerleri.

II.Gün								
Enjeksiyon (II.Gün)	Vitamin K ₃		Amprolyum HCl		Metilparaben		Propilparaben	
	R.T.	Alan	R.T.	Alan	R.T.	Alan	R.T.	Alan
1	4,668	187868	18,424	12964907	15,031	366807	39,832	33399
2	4,683	188144	18,455	12966129	15,053	366772	39,849	34199
3	4,671	187758	18,446	12961564	15,044	366766	39,824	33031
4	4,692	187636	18,474	12960087	15,068	366854	39,885	34709
5	4,680	188021	18,478	12957167	15,064	366693	39,887	34465
6	4,679	187869	18,473	12954354	15,062	366730	39,893	32097
Ortalama	4,679	187883	18,458	12960701	15,054	366770	39,862	33650
SD	0,01	181,23	0,02	4495,53	0,01	56,52	0,03	994,49
RSD	0,18%	0,10%	0,11%	0,03%	0,09%	0,02%	0,08%	1,96%



Şekil 3.17. Sistem kesinlik I.gün kromatogramı.



Şekil 3.18. Sistem kesinlik II.gün kromatogramı.

3.5.2. Yöntem Kesinliği (Tekrarlanabilirlik)

Sonuç;

Miktar tayini analiz sonuçları arasındaki bağıl standart sapma (RSD) %2,00'den küçüktür.

Amprolyum HCl;

Çizelge 3.15. Amprolyum HCl yöntem kesinlik parametresinin değerleri.

Enj.	Standart Çözelti		Test Çözelti		Miktar (mg/mL)
	R.T.	Alan (mAU*s)	Num Tart. (mg)	Alan (mAU*s)	
1	18,413	13074944	533,7	12186757	247,66
2	18,408	13075567	520,3	11958537	249,28
3	18,401	13072674	538,5	12123391	244,17
4	18,411	13069415	521,4	12173193	253,22
5	18,674	13063906	534,6	12181887	247,14
6	18,88	13054796	522,2	12188706	253,15
Ortalama	18,53	13068550	-	12135412	249,10
SD	0,20	7982,69	-	89992,40	3,57
RSD	1,09%	0,06%	-	0,74%	1,43%

Vitamin K₃;

Çizelge 3.16. Vitamin K₃ yöntem kesinlik parametresinin değerleri.

Enj.	Standart Çözelti		Test Çözelti		Miktar (mg/mL)
	R.T.	Alan (mAU*s)	Num Tart. (mg)	Alan (mAU*s)	
1	4,691	189918	533,7	165474	2,047
2	4,684	190092	520,3	161174	2,045
3	4,686	189916	538,5	164255	2,013
4	4,69	190074	521,4	161498	2,044
5	4,685	190069	534,6	163138	2,014
6	4,658	189654	522,2	161527	2,042
Ortalama	4,68	189954	-	162844	2,034
SD	0,01	166,98	-	1750,96	0,02
RSD	0,26%	0,09%	-	1,08%	0,78%

Metilparaben;

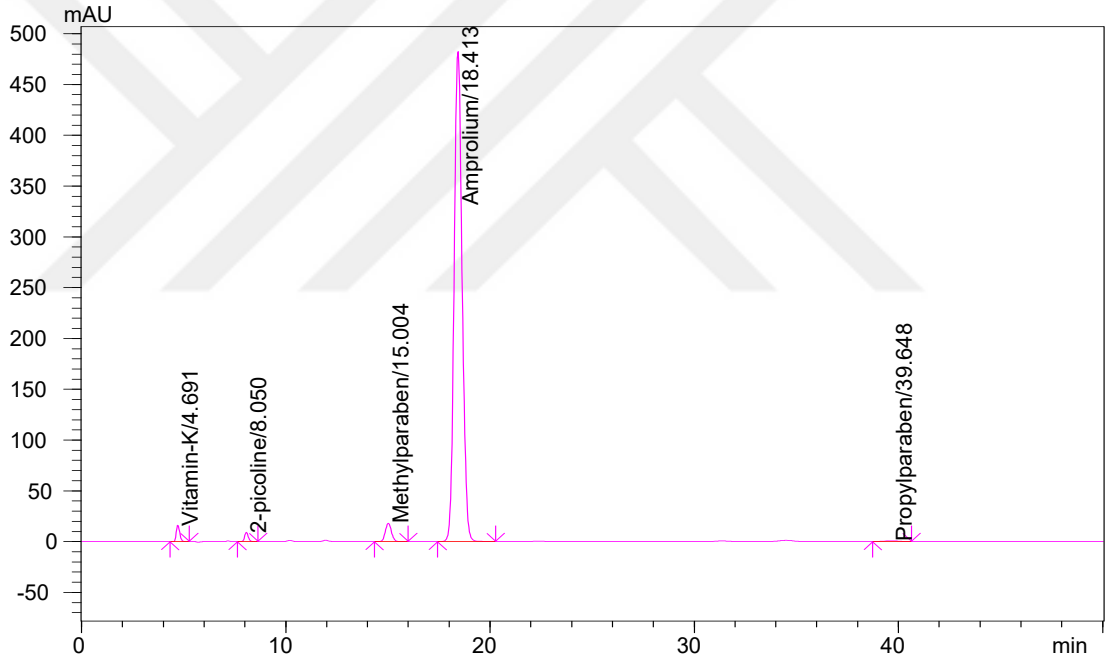
Çizelge 3.17. Metilparaben yöntem kesinlik parametresinin değerleri.

Enj.	Standart Çözelti		Test Çözelti		Miktar (mg/mL)
	R.T.	Alan (mAU*s)	Num Tart. (mg)	Alan (mAU*s)	
1	15,004	374697	533,7	315924	1,727
2	14,999	373649	520,3	305229	1,711
3	14,998	373543	538,5	315257	1,708
4	15,004	372568	521,4	310626	1,738
5	15,121	373762	534,6	314400	1,716
6	15,208	371866	522,2	314114	1,755
Ortalama	15,06	373348	-	312592	1,726
SD	0,09	992,43	-	4046,45	0,02
RSD	0,59%	0,27%	-	1,29%	1,04%

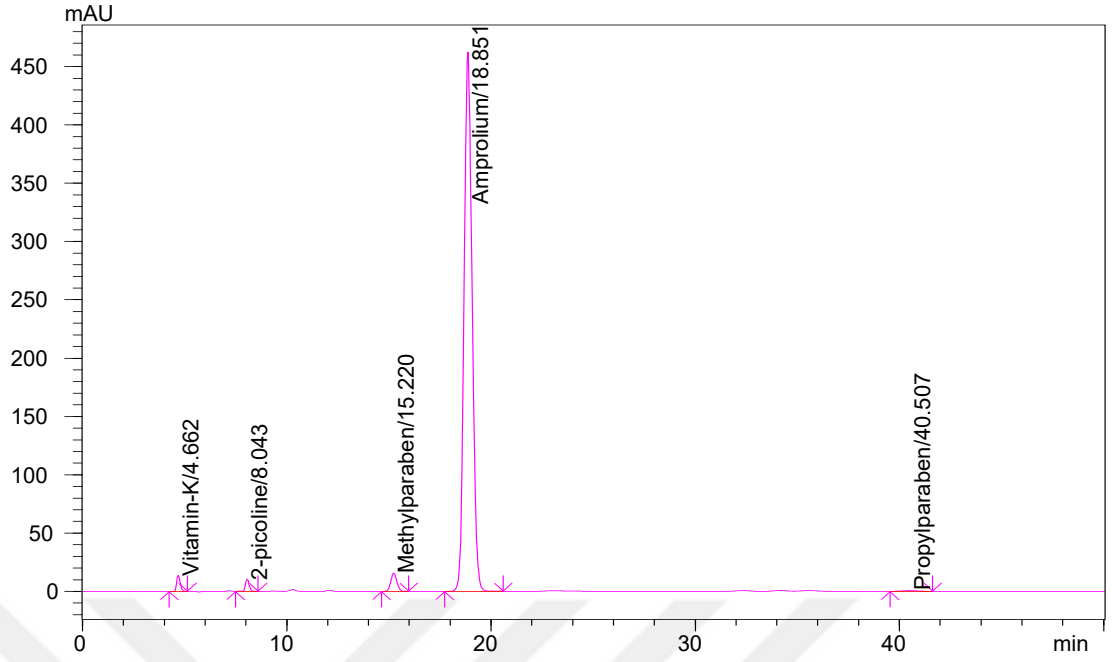
Propilparaben;

Çizelge 3.18. Propilparaben yöntem kesinlik parametresinin değerleri.

Enj.	Standart Çözelti		Test Çözelti		Miktar (mg/mL)
	R.T.	Alan (mAU*s)	Num Tart. (mg)	Alan (mAU*s)	
1	39,648	40181	533,7	36202	0,202
2	39,601	41243	520,3	35934	0,206
3	39,61	40367	538,5	36508	0,202
4	39,674	40532	521,4	35557	0,203
5	40,334	41717	534,6	36119	0,201
6	40,605	40191	522,2	35174	0,201
Ortalama	39,91	40705	-	35916	0,203
SD	0,44	631,91	-	480,26	0,00
RSD	1,11%	1,55%	-	1,34%	0,89%



Şekil 3.19. Yöntem kesinlik kromatogramı (standart) ($C_{\text{Amprolium HCl}}=0.5 \text{ mg/mL}$; $C_{\text{Vitamin K3}}=0.004 \text{ mg/mL}$; $C_{\text{Metilparaben}}=0.0036 \text{ mg/mL}$, $C_{\text{Propilparaben}}=0.0004 \text{ mg/mL}$).



Şekil 3.20. Yöntem kesinlik kromatogramı (test) ($C_{\text{Ampromium HCl}}=0.5 \text{ mg/mL}$; $C_{\text{Vitamin K3}}=0.004 \text{ mg/mL}$; $C_{\text{Metilparaben}}=0.0036 \text{ mg/mL}$, $C_{\text{Propilparaben}}=0.0004 \text{ mg/mL}$).

3.5.3. Ara Kesinlik

Sonuç;

Analiz 1 ve cihaz I'den elde edilen sonuçların ve Analiz 2 ve cihaz II' den elde edilen sonuçların kendi arasındaki bağıl standart sapma değeri %2,00'den küçüktür.

12 analiz sonucunun bağıl standart sapma değeri %2,00'den küçüktür.

Aynı konsantrasyonda hazırlanan iki standart çözelti arasındaki değişim $\pm\%2$ arasındadır.

Birbirine yakın iki pik arasındaki ayrışma minimum 2,00'dir.

Amprolyum HCl;

Çizelge 3.19. Amprolyum HCl ara kesinlik parametresinin değerleri.

Enj.	Standart Çözelti		Test Çözelti		Miktar (mg/mL)
	R.T.	Alan (mAU*s)	Num Tart. (mg)	Alan (mAU*s)	
1	18,424	12964907	527,0	12133496	251,69
2	18,455	12966129	528,9	12122406	250,55
3	18,446	12961564	526,9	12098520	251,01
4	18,474	12960087	533,0	12179023	249,79
5	18,478	12957167	535,0	12120119	247,65
6	18,473	12954354	542,1	12165258	245,32
Ortalama	18,458	12960701	-	12136470	249,34
SD	0,02	4495,53	-	30178,49	2,41
RSD	0,11%	0,03%	-	0,25%	0,97%

Çizelge 3.20. Amprolyum HCl enjeksiyon sonucu değerleri.

Ara Kesinlik	Amprolyum HCl Miktar (mg/mL)	
	I.Cihaz	II.Cihaz
Numune 1	247,66	251,69
Numune 2	249,28	250,55
Numune 3	244,17	251,01
Numune 4	253,22	249,79
Numune 5	247,14	247,65
Numune 6	253,15	245,32
Ortalama	249,10	249,34
SD	3,57	2,41
RSD (%)	1,43	0,97
12 analiz sonucunun RSD (%)	1,17	
% 95 güven aralığı sınırları	247,03 – 251,41	

Vitamin K₃;

Çizelge 3.21. Vitamin K₃ ara kesinlik parametresinin değerleri.

Enj.	Standart Çözelti		Test Çözelti		Miktar (mg/mL)
	R.T.	Alan (mAU*s)	Num Tart. (mg)	Alan (mAU*s)	
1	4,668	187868	527,0	161004	2,029
2	4,683	188144	528,9	162465	2,040
3	4,671	187758	526,9	161441	2,035
4	4,692	187636	533,0	163958	2,043
5	4,68	188021	535,0	164058	2,037
6	4,679	187869	542,1	165721	2,030
Ortalama	4,679	187883	532,150	163108	2,036
SD	0,01	181,23	5,87	1792,87	0,01
RSD	0,18%	0,10%	1,10%	1,10%	0,27%

Çizelge 3.22. Vitamin K₃ enjeksiyon sonucu değerleri.

Ara Kesinlik	Vitamin K ₃ Miktar (mg/mL)	
	I.Cihaz	II.Cihaz
Numune 1	2,047	2,029
Numune 2	2,045	2,040
Numune 3	2,013	2,035
Numune 4	2,044	2,043
Numune 5	2,014	2,037
Numune 6	2,042	2,030
Ortalama	2,034	2,036
SD	0,02	0,01
RSD (%)	0,78	0,27
12 analiz sonucunun RSD (%)	0,56	
% 95 güven aralığı sınırları	2,026 – 2,044	

Metilparaben;

Çizelge 3.23. Metilparaben ara kesinlik parametresinin değerleri.

Enj.	Standart Çözelti		Test Çözelti		Miktar (mg/mL)
	R.T.	Alan (mAU*s)	Num Tart. (mg)	Alan (mAU*s)	
1	15,031	366807	527,0	311323	1,745
2	15,053	366772	528,9	311568	1,740
3	15,044	366766	526,9	311436	1,746
4	15,068	366854	533,0	315740	1,750
5	15,064	366693	535,0	316078	1,745
6	15,062	366730	542,1	314524	1,714
Ortalama	15,054	366770	-	313445	1,740
SD	0,01	56,52	-	2255,04	0,01
RSD	0,09%	0,02%	-	0,72%	0,76%

Çizelge 3.24. Metilparaben enjeksiyon sonucu değerleri.

Ara Kesinlik	Metilparaben Miktar (mg/mL)	
	I.Cihaz	II.Cihaz
Numune 1	1,727	1,745
Numune 2	1,711	1,740
Numune 3	1,708	1,746
Numune 4	1,738	1,750
Numune 5	1,716	1,745
Numune 6	1,755	1,714
Ortalama	1,726	1,740
SD	0,02	0,01
RSD (%)	1,04	0,76
12 analiz sonucunun RSD (%)	0,97	
% 95 güven aralığı sınırları	1,720 – 1,746	

Propilparaben;

Çizelge 3.25. Propilparaben ara kesinlik parametresinin değerleri.

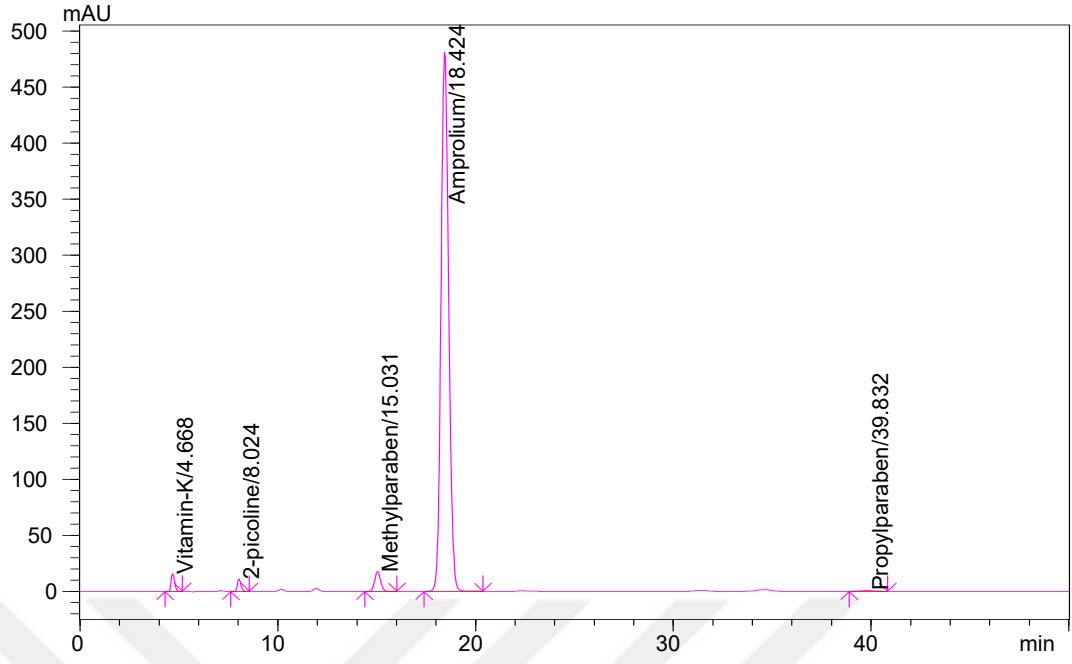
Enj.	Standart Çözelti		Test Çözelti		Miktar (mg/mL)
	R.T.	Alan (mAU*s)	Num Tart. (mg)	Alan (mAU*s)	
1	39,832	33399	527,0	31493	0,206
2	39,849	34199	528,9	31273	0,204
3	39,824	33031	526,9	31363	0,205
4	39,885	34709	533,0	31388	0,203
5	39,887	34465	535,0	31861	0,205
6	39,893	32097	542,1	32446	0,206
Ortalama	39,862	33650	532,150	31637	0,205
SD	0,03	994,49	5,87	446,09	0,00
RSD	0,08%	1,96%	1,10%	1,41%	0,63%

Çizelge 3.26. Propilparaben enjeksiyon sonucu değerleri.

Ara Kesinlik	Propilparaben Miktar (mg/mL)	
	I.Cihaz	II.Cihaz
Numune 1	0,202	0,206
Numune 2	0,206	0,204
Numune 3	0,202	0,205
Numune 4	0,203	0,203
Numune 5	0,201	0,205
Numune 6	0,201	0,206
Ortalama	0,203	0,205
SD	0,00	0,00
RSD (%)	0,89	0,63
12 analiz sonucunun RSD (%)	0,94	
% 95 güven aralığı sınırları	0,202 – 0,205	

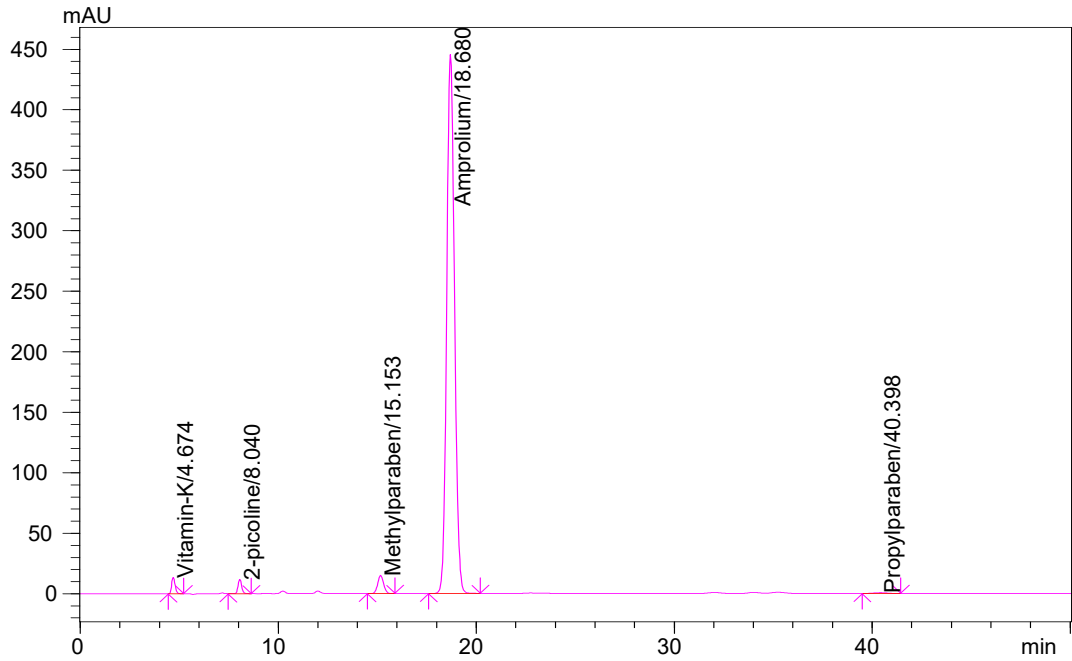
Çizelge 3.27. Bileşenlerin % değişim değerleri.

Bileşenler	Miktar (mg/mL)		% Değişim
	I. Cihaz	II. Cihaz	
Vitamin K ₃	2,034	2,036	0,07
Amprolyum HCl	249,104	249,335	0,09
Metilparaben	1,726	1,740	0,82
Propilparaben	0,203	0,205	1,11



ID#	Name	Ret. Time	Area	Resolution (R)
1	Vitamin-K ₃	4.668	187868	-
2	2-picoline	8.024	139087	8.865
3	Methylparaben	15.031	366807	14.085
4	Amprolium HCl	18.424	12964907	4.984
5	Propylparaben	39.832	33399	20.618

Şekil 3.21. Ara kesinlik kromatogramı (standart) ($C_{\text{Amprolium HCl}}=0.5 \text{ mg/mL}$; $C_{\text{Vitamin K}_3}=0.004 \text{ mg/mL}$; $C_{\text{Metilparaben}}=0.0036 \text{ mg/mL}$, $C_{\text{Propilparaben}}=0.0004 \text{ mg/mL}$).



ID#	Name	Ret. Time	Area	Resolution (R)
1	Vitamin-K ₃	4.674	161004	-
2	2-picoline	8.040	153064	8.845
3	Methylparaben	15.153	311323	14.337
4	Amprolium HCl	18.680	12133496	5.161
5	Propylparaben	40.398	31493	20.695

Şekil 3.22. Ara kesinlik kromatogramı (test) ($C_{\text{Amprolium HCl}}=0.5 \text{ mg/mL}$; $C_{\text{Vitamin K}_3}=0.004 \text{ mg/mL}$; $C_{\text{Metilparaben}}=0.0036 \text{ mg/mL}$, $C_{\text{Propilparaben}}=0.0004 \text{ mg/mL}$).

3.6. GÜVENİLİRLİK

3.6.1. Çözelti Stabilitesi

Sonuç;

Standart ve test çözeltisi oda koşullarında 90 saat boyunca stabildir.

Başlangıç ile her periyot analiz sonuçları arasındaki değişim $\pm\%2$ 'den fazla değildir.

Amprolium HCl;

Çizelge 3.28. Amprolium HCl standart çözeltilerinin kromatogram değerleri.

Standart Çözelti	Tartım (mg)	Kons. (mg/mL)	Alan
Başlangıç	250,7	0,491	13100609
3.saat			13100924
6.saat			13095689
12.saat			13089937
15.saat			13091483
21.saat			13099380
25.saat			13106270
35.saat			13109006
60.saat			13101678
72.saat			13097745
90.saat			13120278
			Ortalama
		SD	8474,401
		RSD (%)	0,06

Çizelge 3.29. Amprolyum HCl test çözeltilerinin kromatogram ve % değişim değerleri.

Test Çözelti	Tartım (mg)	Alan	Miktar (mg /mL)	Değişim (%)
Başlangıç	533,7	12712520	257,71	-
3.saat		12710595	257,67	-0,02
6.saat		12703295	257,62	-0,04
12.saat		12698256	257,63	-0,03
15.saat		12693076	257,50	-0,08
21.saat		12701799	257,52	-0,08
25.saat		12700032	257,35	-0,14
35.saat		12693228	257,15	-0,22
60.saat		12699065	257,42	-0,11
72.saat		12685532	257,22	-0,19
90.saat		12679548	256,66	-0,41
		Ortalama	257,67	
		SD	0,302	
		RSD (%)	0,12	

Vitamin K₃;

Çizelge 3.30. Vitamin K₃ standart çözeltilerinin kromatogram değerleri.

Standart Çözelti	Tartım (mg)	Kons. (mg/mL)	Alan
Başlangıç	41,8	0,004	191520
3.saat			191813
6.saat			190728
12.saat			190357
15.saat			189995
21.saat			190662
25.saat			190452
35.saat			190752
60.saat			190876
72.saat			191048
90.saat			191375
			Ortalama
		SD	536,597
		RSD (%)	0,28

Çizelge 3.31. Vitamin K₃ test çözeltilerinin kromatogram ve % değişim değerleri.

Test Çözelti	Tartım (mg)	Alan	Miktar (mg /mL)	Değişim (%)
Başlangıç	533,7	166333	2,04	--
3.saat		166261	2,04	-0,20
6.saat		165964	2,04	0,19
12.saat		165602	2,04	0,17
15.saat		165492	2,05	0,29
21.saat		165651	2,04	0,04
25.saat		166197	2,05	0,48
35.saat		165879	2,04	0,13
60.saat		166065	2,04	0,18
72.saat		165828	2,04	-0,06
90.saat		165611	2,03	-0,36
		Ortalama	2,04	
		SD	0,005	
		RSD (%)	0,22	

Metilparaben;

Çizelge 3.32. Metilparaben standart çözeltilerinin kromatogram değerleri.

Standart Çözelti	Tartım (mg)	Kons. (mg/mL)	Alan
Başlangıç	18,9	0,004	373386
3.saat			373972
6.saat			373563
12.saat			371913
15.saat			372238
21.saat			374550
25.saat			374668
35.saat			375709
60.saat			374505
72.saat			375326
90.saat			373833
			Ortalama
		SD	1171,718
		RSD (%)	0,31

Çizelge 3.33. Metilparaben test çözeltilerinin kromatogram ve % değişim değerleri.

Test Çözelti	Tartım (mg)	Alan	Miktar (mg /mL)	Değişim (%)
Başlangıç	533,7	325725	1,78	-
3.saat		324781	1,77	-0,45
6.saat		325634	1,78	-0,08
12.saat		323675	1,78	-0,24
15.saat		324252	1,78	-0,15
21.saat		326483	1,78	-0,08
25.saat		324682	1,77	-0,67
35.saat		326311	1,77	-0,44
60.saat		326592	1,78	-0,03
72.saat		326688	1,78	-0,22
90.saat		326034	1,78	-0,02
		Ortalama	1,78	
		SD	0,004	
		RSD (%)	0,21	

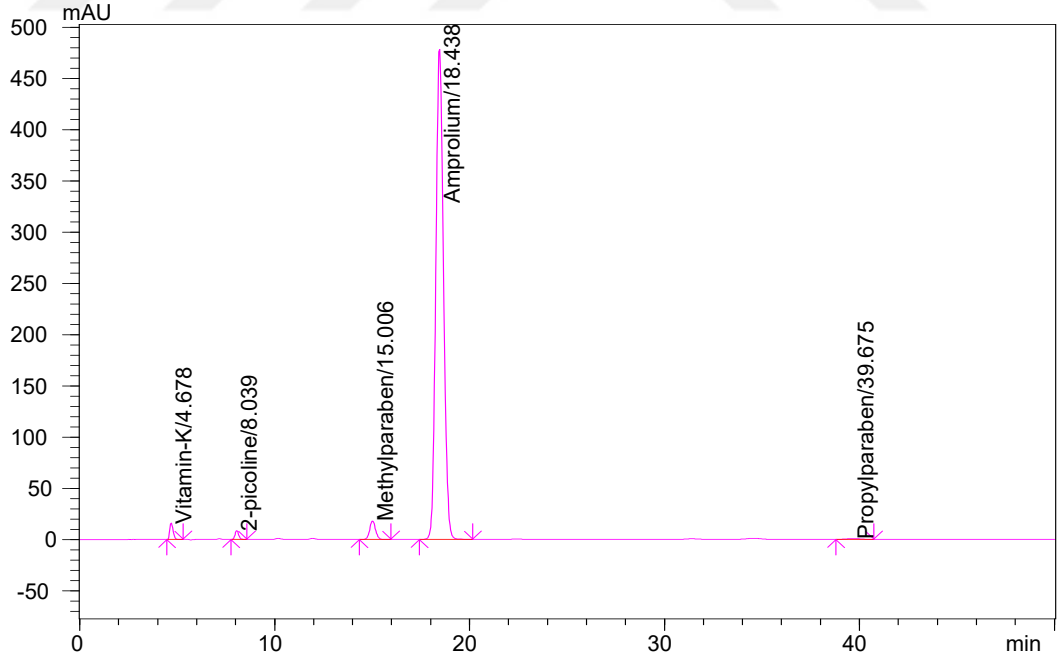
Propilparaben;

Çizelge 3.34. Propilparaben standart çözeltilerinin kromatogram değerleri.

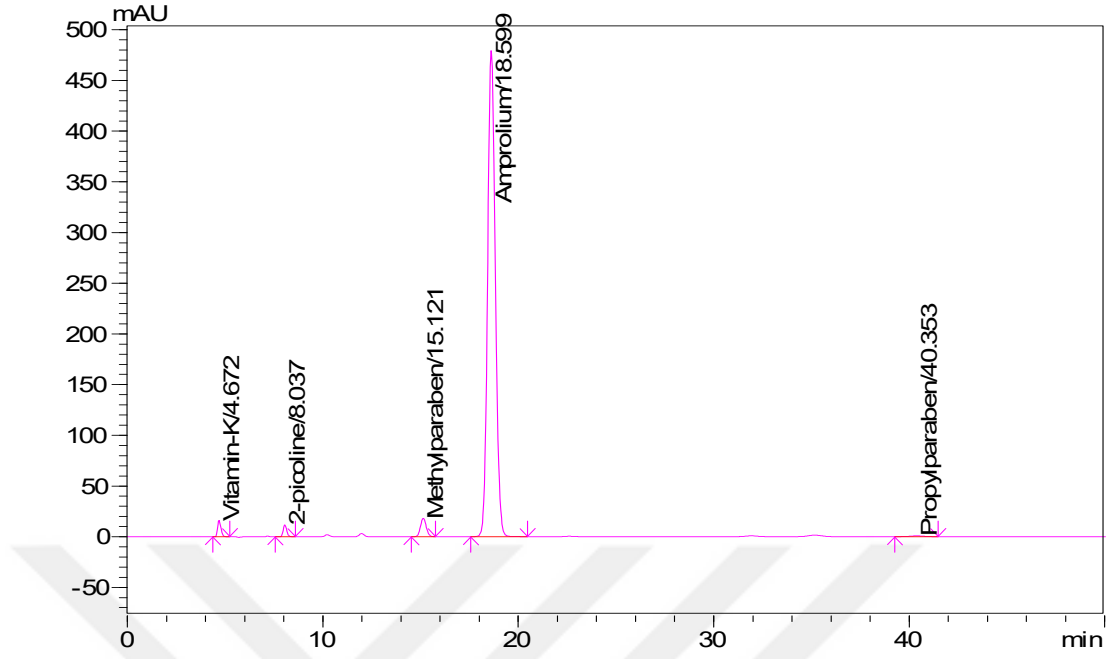
Standart Çözelti	Tartım (mg)	Kons. (mg/mL)	Alan
Başlangıç	20,8	0,0004	37605
3.saat			39166
6.saat			38935
12.saat			39278
15.saat			39371
21.saat			39359
25.saat			38923
35.saat			39022
60.saat			40473
72.saat			38973
90.saat			40078
			Ortalama
		SD	723,00
		RSD (%)	1,84

Çizelge 3.35. Propilparaben test çözeltilerinin kromatogram ve % değişim değerleri.

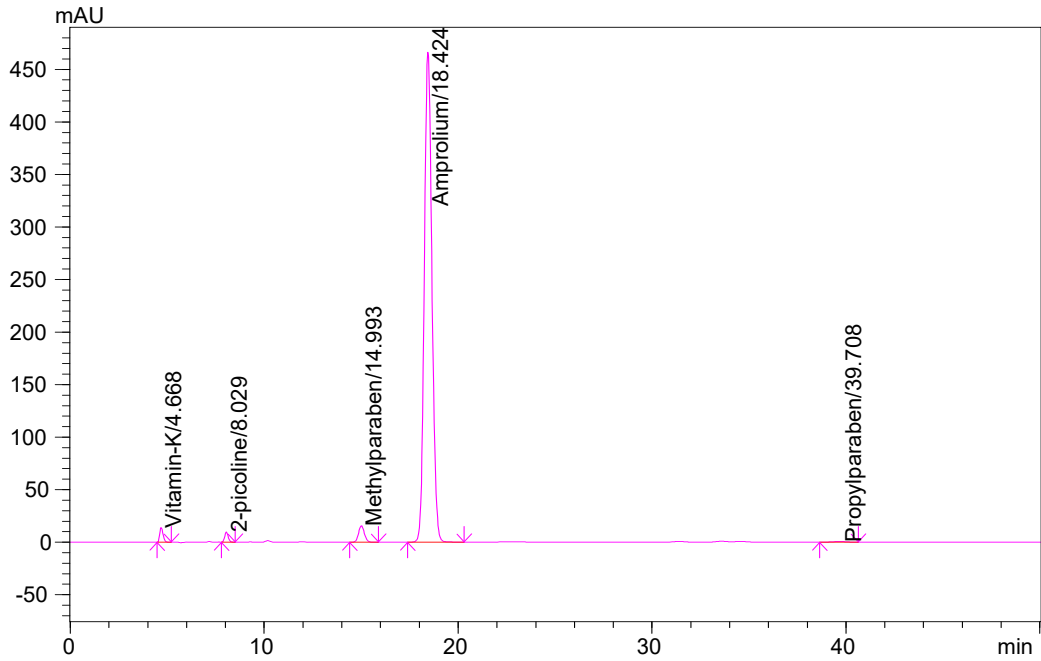
Test Çözelti	Tartım (mg)	Alan	Miktar (mg /mL)	Değişim (%)
Başlangıç	533,7	34296	0,205	--
3.saat		35175	0,202	-1,55
6.saat		35575	0,205	0,19
12.saat		35519	0,203	-0,85
15.saat		36401	0,208	1,36
21.saat		35288	0,201	-1,72
25.saat		34958	0,202	-1,54
35.saat		35993	0,207	1,12
60.saat		36938	0,205	0,07
72.saat		35060	0,202	-1,38
90.saat		36022	0,202	-1,47
		Ortalama	0,204	
		SD	0,002	
		RSD (%)	1,07	



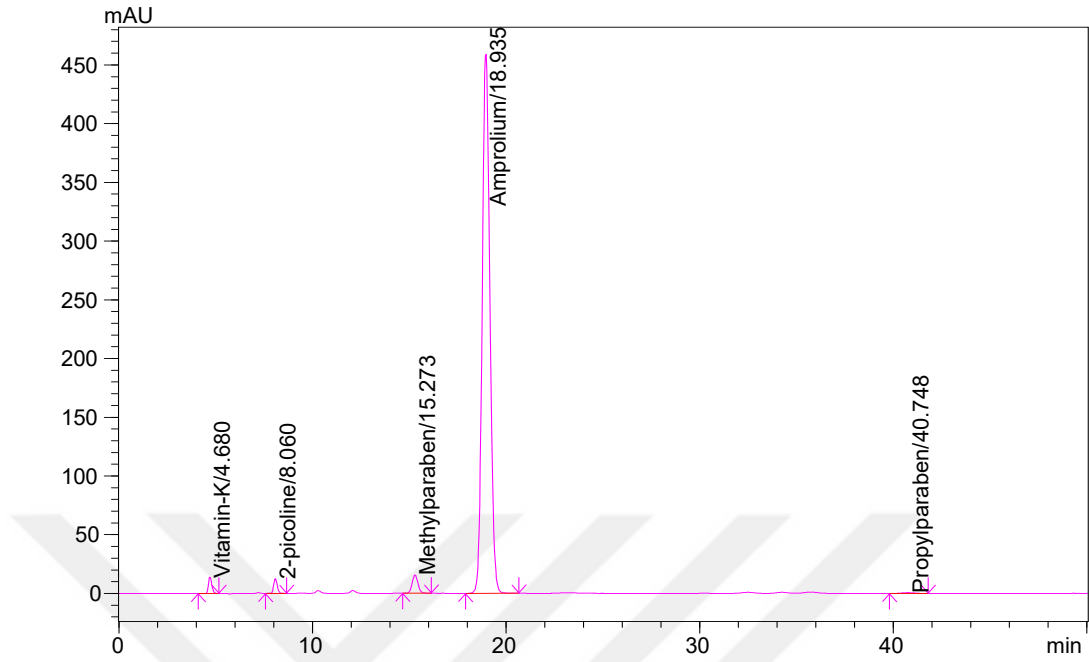
Şekil 3.23. Çözelti stabilitesi standart çözelti kromatogramı (başlangıç) ($C_{\text{Ampromium HCl}} = 0.5 \text{ mg/mL}$; $C_{\text{Vitamin K3}} = 0.004 \text{ mg/mL}$; $C_{\text{Metilparaben}} = 0.0036 \text{ mg/mL}$, $C_{\text{Propilparaben}} = 0.0004 \text{ mg/mL}$).



Şekil 3.24. Çözelti stabilitesi standart çözelti kromatogramı (90 saat) ($C_{\text{Amprolium HCl}}=0.5$ mg/mL; $C_{\text{Vitamin K3}}=0.004$ mg/mL; $C_{\text{Metilparaben}}=0.0036$ mg/mL, $C_{\text{Propilparaben}}=0.0004$ mg/mL).



Şekil 3.25. Çözelti stabilitesi test çözelti kromatogramı (başlangıç) ($C_{\text{Amprolium HCl}}=0.5$ mg/mL; $C_{\text{Vitamin K3}}=0.004$ mg/mL; $C_{\text{Metilparaben}}=0.0036$ mg/mL, $C_{\text{Propilparaben}}=0.0004$ mg/mL).



Şekil 3.26. Çözelti stabilitesi test çözelti kromatogramı (90 saat) ($C_{\text{Amprolyum HCl}}=0.5$ mg/mL; $C_{\text{Vitamin K3}}=0.004$ mg/mL; $C_{\text{Metilparaben}}=0.0036$ mg/mL, $C_{\text{Propilparaben}}=0.0004$ mg/mL).

3.6.2. Küçük Değişiklikler

3.6.2.1. Farklı Akış Hızı

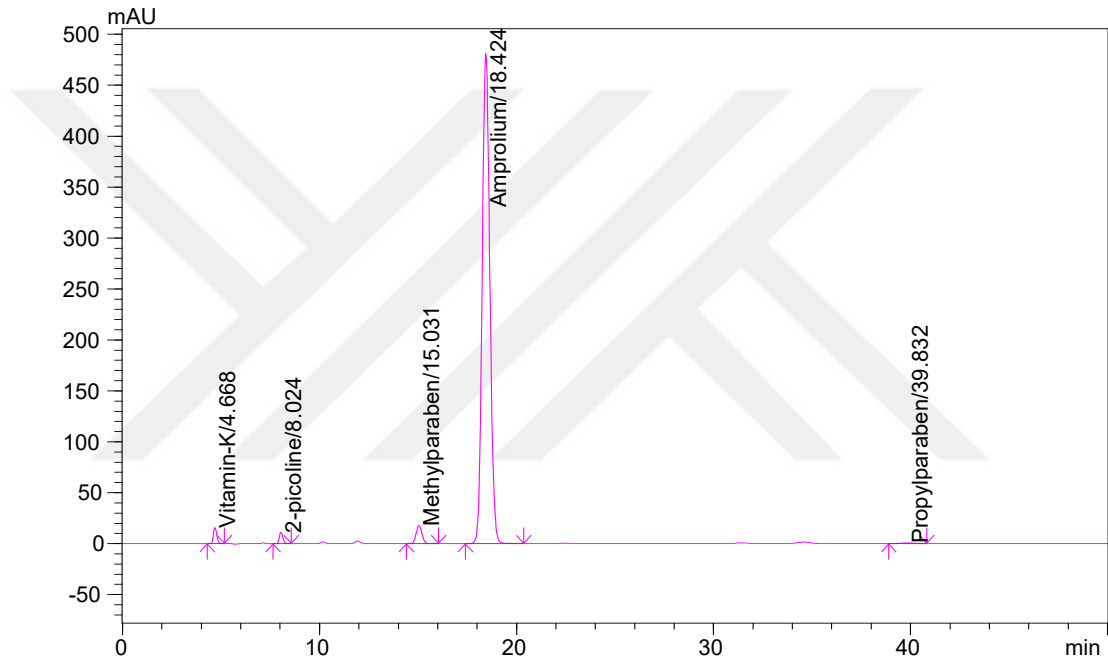
Sonuç; Başlangıç değerinden değişim $\pm 2\%$ 'den fazla değildir. Yöntem uygundur.

Çizelge 3.36. Etkenlerin akış hızı 0,66 mL/dk % değişim değerleri.

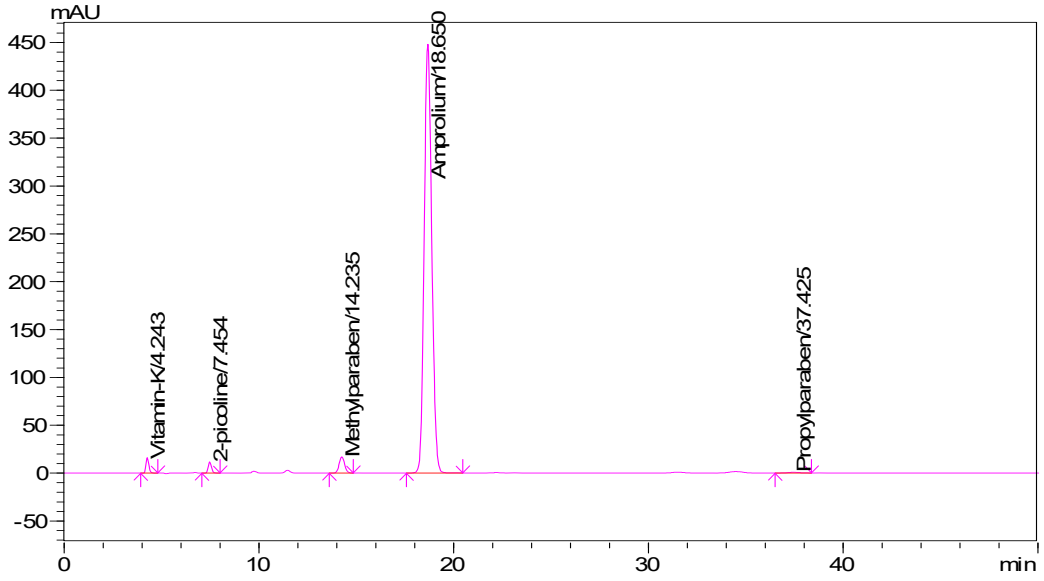
Etken Maddeler	0,60 mL/dk			0,66 mL/dk			Değişim (%)
	RT	Alan	Miktar (mg/mL)	RT	Alan	Miktar (mg/mL)	
Vitamin K ₃	4,679	187883	2,036	4,232	171345	2,040	0,22
Amprolyum HCl	18,458	12960701	249,34	18,186	12046913	251,47	0,85
Metilparaben	15,054	366770	1,740	13,983	330871	1,746	0,33
Propilparaben	39,862	33650	0,205	37,217	30285	0,206	0,50

Çizelge 3.37. Etkenlerin akış hızı 0,54 mL/dk % değişim değerleri.

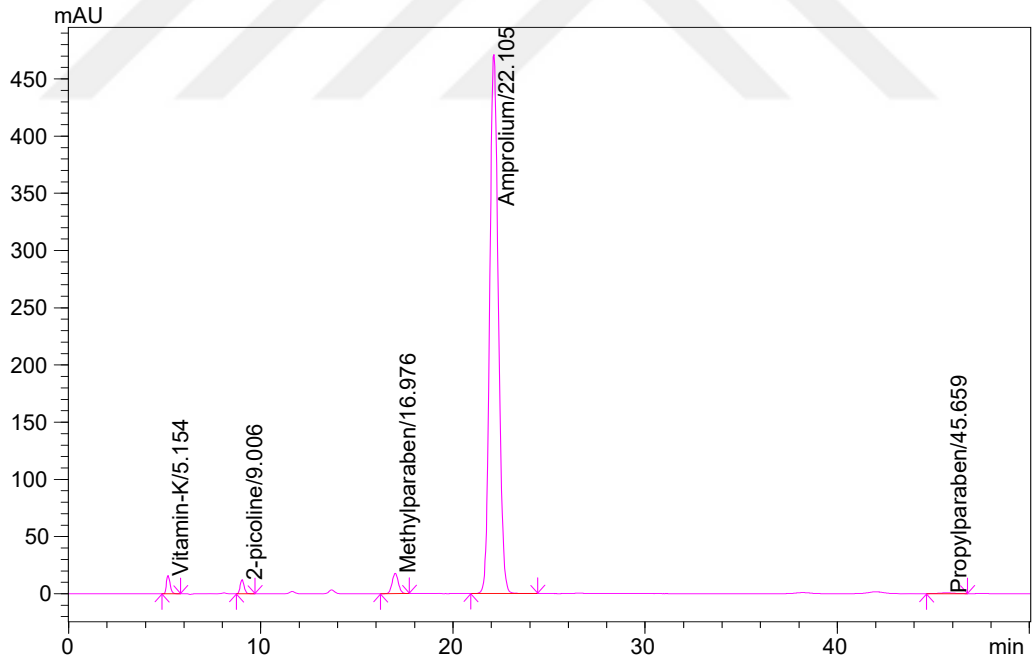
Etken Maddeler	0,60 mL/dk			0,54 mL/dk			Değişim (%)
	RT	Alan	Miktar (mg/mL)	RT	Alan	Miktar (mg/mL)	
Vitamin K ₃	4,679	187883	2,036	5,162	209057	2,044	0,39
Amprolyum HCl	18,458	12960701	249,34	22,359	14712580	251,09	0,70
Metilparaben	15,054	366770	1,740	17,089	403833	1,751	0,63
Propilparaben	39,862	33650	0,205	46,140	38495	0,203	-0,70



Şekil 3.27. Güvenilirlik kromatogramı (başlangıç) ($C_{\text{Amprolyum HCl}}=0.5 \text{ mg/mL}$; $C_{\text{Vitamin K}_3}=0.004 \text{ mg/mL}$; $C_{\text{Metilparaben}}=0.0036 \text{ mg/mL}$, $C_{\text{Propilparaben}}=0.0004 \text{ mg/mL}$).



Şekil 3.28. Güvenilirlik kromatogramı (akış hızı= 0.66 ml/dk) ($C_{\text{Amprolium HCl}}=0.5$ mg/mL; $C_{\text{Vitamin K3}}=0.004$ mg/mL; $C_{\text{Metilparaben}}=0.0036$ mg/mL, $C_{\text{Propilparaben}}=0.0004$ mg/mL).



Şekil 3.29. Güvenilirlik kromatogramı (akış hızı= 0.54 ml/dk) ($C_{\text{Amprolium HCl}}=0.5$ mg/mL; $C_{\text{Vitamin K3}}=0.004$ mg/mL; $C_{\text{Metilparaben}}=0.0036$ mg/mL, $C_{\text{Propilparaben}}=0.0004$ mg/mL).

3.6.2.2. Farklı Kolon Sıcaklığı

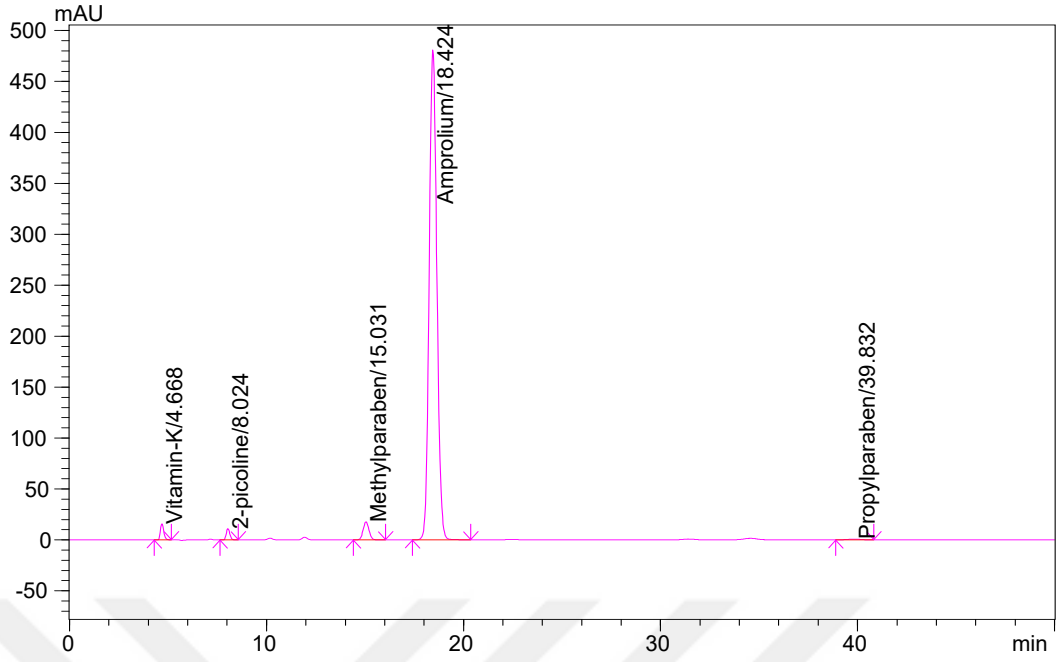
Sonuç; Başlangıç değerinden değişim $\pm 2\%$ 'den fazla değildir. Yöntem uygundur.

Çizelge 3.38. Etkenlerin 30°C sıcaklıktaki % değişim değerleri.

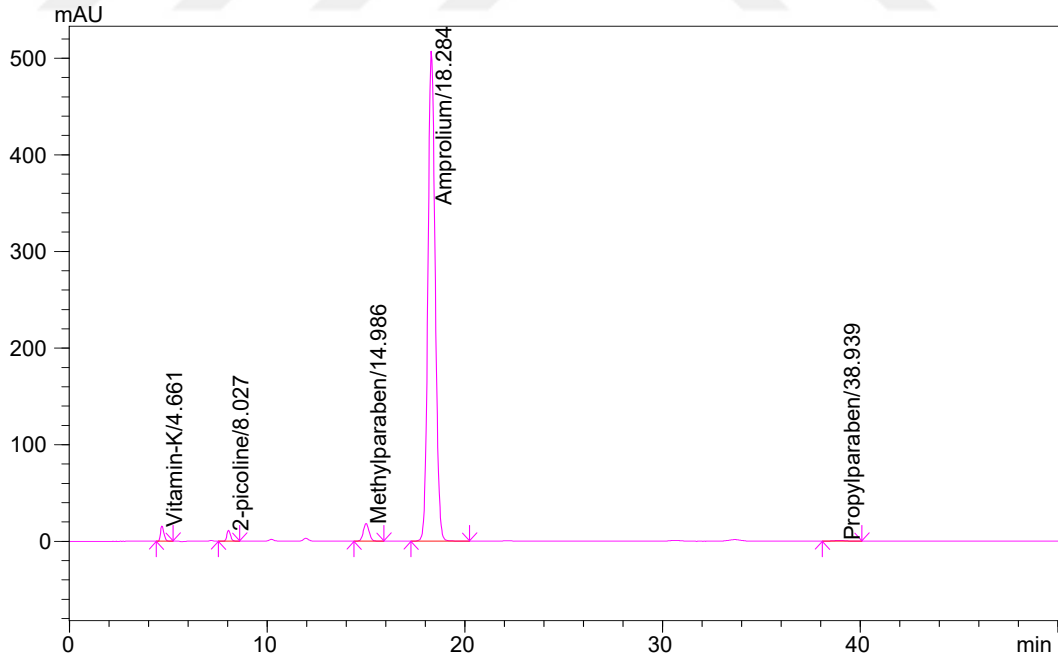
Etken Maddeler	25°C			30°C			Değişim (%)
	RT	Alan	Miktar (mg/mL)	RT	Alan	Miktar (mg/mL)	
Vitamin K ₃	4,679	187883	2,036	4,658	187543	2,036	0,04
Amprolyum HCl	18,458	12960701	249,34	17,989	12950236	252,36	1,21
Metilparaben	15,054	366770	1,740	14,823	366443	1,746	0,33
Propilparaben	39,862	33650	0,205	38,754	34219	0,203	-0,96

Çizelge 3.39. Etkenlerin 20°C sıcaklıktaki % değişim değerleri.

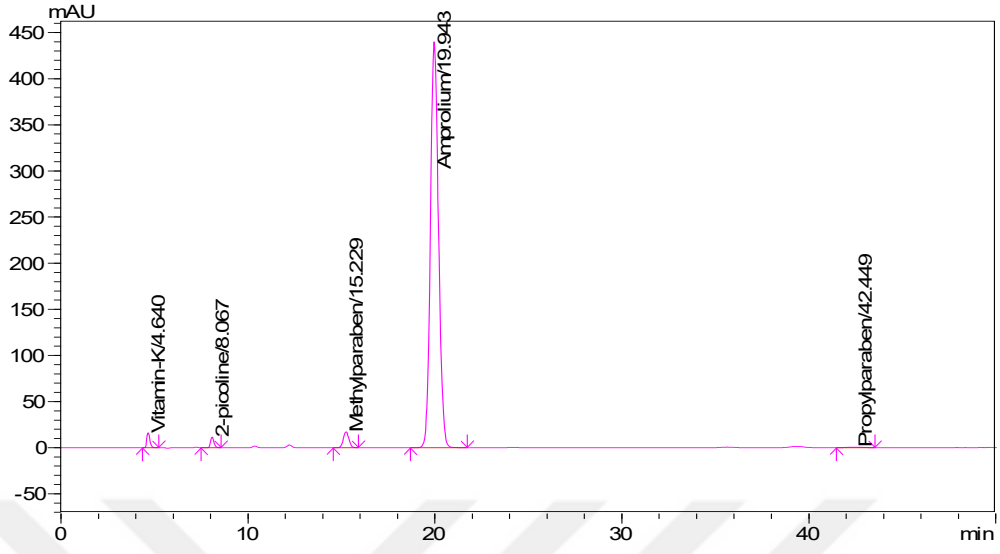
Etken Maddeler	25°C			20°C			Değişim (%)
	RT	Alan	Miktar (mg/mL)	RT	Alan	Miktar (mg/mL)	
Vitamin K ₃	4,679	187883	2,036	4,646	187687	2,038	0,11
Amprolyum HCl	18,458	12960701	249,34	20,756	13232040	251,35	0,81
Metilparaben	15,054	366770	1,740	15,648	364457	1,750	-0,59
Propilparaben	39,862	33650	0,205	43,034	34189	0,203	-1,01



Şekil 3.30. Güvenilirlik kromatogramı (başlangıç) ($C_{\text{Amprolum HCl}}=0.5 \text{ mg/mL}$; $C_{\text{Vitamin K3}}=0.004 \text{ mg/mL}$; $C_{\text{Metilparaben}}=0.0036 \text{ mg/mL}$, $C_{\text{Propilparaben}}=0.0004 \text{ mg/mL}$).



Şekil 3.31. Güvenilirlik kromatogramı (kolon sıcaklığı= 30°C) ($C_{\text{Amprolum HCl}}=0.5 \text{ mg/mL}$; $C_{\text{Vitamin K3}}=0.004 \text{ mg/mL}$; $C_{\text{Metilparaben}}=0.0036 \text{ mg/mL}$, $C_{\text{Propilparaben}}=0.0004 \text{ mg/mL}$).



Şekil 3.32. Güvenilirlik kromatogramı (kolon sıcaklığı= 20°C) ($C_{\text{Ampicilium HCl}}=0.5$ mg/mL; $C_{\text{Vitamin K3}}=0.004$ mg/mL; $C_{\text{Metilparaben}}=0.0036$ mg/mL, $C_{\text{Propilparaben}}=0.0004$ mg/mL).

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan çalışmalar sonucu 50 dakikalık enjeksiyon süresinde 4 etkeninde çıkartıldığı bir HPLC yöntemi yapılmış ve valide edilebilmiştir. Etkenlerin alıkonma zamanları,

Vitamin K ₃	: ~ 4.6 dakika
2-picoline	: ~ 8,0 dakika
Metilparaben	: ~ 15,0 dakika
Amprolyum HCl	: ~ 18,4 dakika
Propilparaben	: ~ 40,0 dakika

Olarak ayarlanmıştır.

Validasyon çalışmaları sonucunda, Seçicilik parametresi için; Amprolyum HCl, Vitamin K₃, Metilparaben ve Propilparaben alıkonma zamanında başka bir pike rastlanmamıştır.

Amprolyum standart kromatogramında Amprolyum HCl ve 2-picoline pikleri arasındaki ayrışma 18'dir.

Birbirine yakın iki pik arasındaki ayrışma 3,7'den büyüktür.

Bileşenlere ait piklerin pik saflığı açısı değerleri 0,991 ile 1,000 arasındadır.

Sistem uygunluk parametresi için;

Sistem uygunluk şartları, her bir etken için;

- Etken maddelere ait piklerin teorik plaka sayısı 2500'den büyüktür.
- Etken maddelere ait piklerin kuyruklanma faktörü 0,8 – 1,2 arasındadır.
- Etken maddelere ait pik alanların ve alıkonma zamanların bağıl standart sapması %1,6'dan küçüktür.
- Aynı konsantrasyonda hazırlanan iki standart çözelti arasındaki benzerlik %99-%101,7 arasındadır.
- Amprolyum standart kromatogramında Amprolyum HCl ve 2-picoline pikleri arasındaki ayrışma 18'dir.

- Birbirine yakın iki pik arasındaki ayrışma 3,7'den büyüktür.

Doğrusallık parametresi için;

Yöntem miktar tayini testi için doğrusallık kriterine uyar. Korelasyon katsayısı (r); 0.999'den, (r^2); 0.998'den büyüktür. Doğrunun y-eksenini kestiği nokta doğrunun eğim % değerleri; Ampulyum HCl %0.743, Vitamin K₃ %0.007, Metilparaben %0.011 ve Propilparaben %0.001'dir.

Doğruluk parametresi için;

Miktar tayini yöntemi için doğruluk kriteri geçerlidir. Bu yöntem için doğruluk kriteri belirlenmiştir. Bu sonuca göre, %50, %100 ve %150 geri kazanım yeterlidir. Ortalama geri kazanım değeri Ampulyum HCl için %100,41, Vitamin K₃ için %100,77, Metilparaben için %100,59 ve Propilparaben için %99,68'dir. Bu değerler sınırlar içinde olduğu için Oral Çözelti Miktar Tayini yöntemi doğruluk parametresine göre uygundur.

Keskinlik parametresi için, Sistem Keskinliği;

1. Gün ve 2. Gün elde edilen sonuçların kendi arasındaki bağıl standart sapma değeri %2,00'den küçüktür.

Pik alanları ve alıkonma zamanları arasındaki bağıl standart sapma (RSD) %2,00'den küçüktür.

Yöntem Keskinliği (Tekrarlanabilirlik);

Miktar tayini analiz sonuçları arasındaki bağıl standart sapma (RSD) %2,00'den küçüktür.

Ara Keskinlik;

Analiz 1 ve cihaz I'den elde edilen sonuçların ve Analiz 2 ve cihaz II' den elde edilen sonuçların kendi arasındaki bağıl standart sapma değeri %2,00'den küçüktür.

12 analiz sonucunun bağıl standart sapma değeri %2,00'den küçüktür.

Aynı konsantrasyonda hazırlanan iki standart çözelti arasındaki değişim $\pm$ %2 arasındadır.

Birbirine yakın iki pik arasındaki ayrışma minimum 2,00'dir.

Güvenilirlik parametresi için, Çözelti Stabilesi;

Standart ve test çözeltisi oda koşullarında 90 saat boyunca stabildir.

Başlangıç ile her periyot analiz sonuçları arasındaki değişim $\pm 2\%$ 'den fazla değildir.

Küçük Değişiklikler;

Başlangıç değerinden değişim $\pm 2\%$ 'den fazla değildir. Yöntem uygundur.



5. KAYNAKLAR

- [1] A. Martínez-Villalba, E. Moyano and M.T. Galceran, "Analysis of amprolium by hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry," *Journal of Chromatography A*, c. 1217, ss. 5802–5807, 2010.
- [2] E.F. Rogers, "Thiamine antagonists," *Annals of the New York Academy of Sciences*, c. 98, ss. 412-429, 1962.
- [3] Anonim. (2009). [Online]. Erişim: <https://www.fengchengroup.com/vet-api-and-premix/veterinary-antibiotics/amprolium-hydrochloride-or-amprolium-hcl-cas.html#>
- [4] ICH Harmonized Tripartite Guideline, "Validation of Analytical Procedures: Text Order and Methodology Q2 (R1)," International Conference on Harmonization, Geneva, ss. 1-13, 2005.
- [5] A.P. Mantri, R. Mubeen S., N. Kandepu and S. Kumar, "Simultaneous Estimation of Sulfaquinoxaline Sodium and Amprolium Hydrochloride By RP- HPLC," *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, c. 6(3), ss. 1097-1100, 2015.
- [6] M.M. Ali, M.A.A. Ahmed and M.I. Shinger, "Development and Validation of RP-HPLC Method for Simultaneous Determination of Amprolium HCl and Ethopabate in Their Combination Drug," *Chemical and Biomolecular Engineering*, c. 2(1), ss. 51- 56, 2017.
- [7] M. Ghanem, S. Abu-Lafi, R. Karaman and H. Hallak, "Validated HPLC Method to Simultaneously Determine Amprolium Hydrochloride, Sulfaquinoxaline Sodium and Vitamin K₃ in A.S.K Powder on ZIC-HILIC Column," *Pharmaceutica Analytica Acta*, c. 3(7), ss. 2153-2435, 2012.
- [8] F.M. Salama, K.A.M. Attia, R.A.M.S. Abdul-Aziz and M.M. El-Attar, "Native Spectrofluorimetric Determination of Amprolium in Bulk and Pharmaceutical Formulation," *Innoriginal International Journal of Sciences*, c. 5(3), ss. 42-45, 2018.
- [9] Anonim. (1999). [Online]. <http://www.oxyvit.com/tr/urunler/vitamin-k3>.
- [10] "Vitamin K₂," *Alternative Medicine Review*, c. 14(3), ss. 284-293, 2009.
- [11] S.A. New, "Bone health: the role of micronutrients," *British Medical Bulletin*, c. 55(3), ss.619-633, 1999.
- [12] M.M. Ghanem, S.A. Abu-Lafi and H.O. Hallak, "Validation of a Stability-hyperbolic Indicating Hydrophilic Interaction Liquid Chromatographic Method for the Quantitative Determination of Vitamin K₃ (Menadione Sodium Bisulfite) in Injectable Solution Formulation," *Scientia Pharmaceutica*, c. 81, ss. 733-747, 2013.
- [13] R.R. Elton-Bott and C.I. Stacey, "High-performance liquid chromatographic separation of the fat-soluble vitamins in cod liver oil and feeds," *Analytica Chimica Acta*, c. 127, ss. 213-218, 1981
- [14] Y. Rojeab, M. Hassoun, E. Hazelet and D. Myers, "HPLC Method Development and Validation for Simultaneous Quantification of Vitamins C and K₃ in Hard

- Gelatin Capsules for their Potential Benefit in Postoperative Total Joint Arthroplasty,” *Scient Open Access Journal: Annals of Clinical Research and Trials*, c. 1 (2), ss. 1-7, 2017.
- [15] O.Y.-P. Hu, C.-Y. Wu, W.-K. Chan and F.Y.-H. Wu, “Determination of anticancer drug vitamin K₃ in plasma by high-performance liquid chromatography,” *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications*, c. 666, ss. 299-305, 1995.
- [16] Z. Chang-Zhi, L. Ying, D. Hong, X. Hua-Jun and J. Kui, “Analysis of Vitamin K₃ by a Fluorescent Spectroelectrochemistry Method,” *Chemical Research in Chinese Universities*, c. 26(5), ss. 742-745, 2010.
- [17] G. Klaczko and E. L. Anuszkowska, “Determination of the content of vitamin K, in complex vitamin preparations by the HPLC method,” *Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research*, c. 59(2), ss. 93-97, 2002.
- [18] P.D. Darbre, A. Aljarrah, W.R. Miller, N.G. Coldham, M.J. Sauer and G.S. Pope, “Concentrations of parabens in human breast tumours,” *Journal of Applied Toxicology*, c. 24, ss. 5-13, 2004.
- [19] G. Grosa, E.D. Grosso, R. Russo and G. Allegrone, “Simultaneous, stability indicating, HPLC-DAD determination of guaifenesin and methyl and propylparabens in cough syrups,” *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, c. 41, ss. 798-803, 2006.
- [20] E. Sottofattori, M. Anzaldi, A. Balbi and G. Tonello, “Simultaneous HPLC determination of multiple components in a commercial cosmetic cream,” *Journal of multiple components in a commercial cosmetic cream,” Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, c. 18, ss. 213-217, 1998.
- [21] B. Saad, M.F. Bari, M.I. Saleh, K. Ahmad, M.K.M. Talib “Simultaneous determination of preservatives (benzoic acid, sorbic acid, methylparaben and propylparaben) in foodstuffs using high-performance liquid chromatography,” *Journal Chromatography A*, c. 1073, ss. 393-397, 2005.
- [22] Anonim. (2019). [Online]. Erişim: <httpswww.silicycle.comfaqhplcwhat-is-hplc>.
- [23] Anonim. (2019). [Online]. Erişim: httpwww.waters.comwatersen_USHow-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work%3Fnav.htmllocale=en_us&cid=10049055.
- [24] Anonim. (2016 26 Temmuz). [Online]. Erişim: <httpswww.discoveryscientificolutions.comitem54>.
- [25] Anonim. (2019 17 Mayıs). [Online]. Erişim: <http://biyokure.org/hplc/5384/>.
- [26] Anonim. (2016). [Online]. Erişim: httpbilsenbesergil.blogspot.compblog-page_291.html.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Akın Osanmaz
Doğum Tarihi ve Yeri : 03.06.1983 - Ankara
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : akin_osanmaz@yahoo.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Y. Lisans	Kimya	Düzce Üniversitesi	2019
Lisans	Kimya	Ankara Üniversitesi	2006
Lise	Sayısal/Fen	Dikmen Lisesi	2002