



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK
LİSANS
TEZİ

**OFTALMİK DAMLALARDA SÜLFASETAMİD
SODYUM, BETAMETAZON, METİL PARABEN
VE PROPİL PARABEN AYRIMI VE MİKTAR
TAYİNİ İÇİN YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ**

ONUR DEMİR

ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI

EYLÜL 2021



**OFTALMİK DAMLALARDA SÜLFASETAMİD SODYUM,
BETAMETAZON, METİL PARABEN VE PROPİL PARABEN AYRIMI
VE MİKTAR TAYİNİ İÇİN YÖNTEM
GELİŞTİRİLMESİ**

Onur DEMİR

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

EYLÜL 2021

Onur DEMİR tarafından hazırlanan “OFTALMİK DAMLALARDA SÜLFASETAMİD SODYUM, BETAMETAZON, METİL PARABEN VE PROPİL PARABEN AYRIMI VE MİKTAR TAYİNİ İÇİN YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ / OY ÇOKLUĞU ile Gazi Üniversitesi Analitik Kimya Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Nilgün GÜNDEN GÖĞER

Analitik Kimya Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Y. Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

Başkan: Prof. Dr. Bengi USLU

Analitik Kimya Anabilim Dalı, Ankara Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Y. Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

Üye: Prof. Dr. H. Eda ŞATANA KARA

Analitik Kimya Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Y. Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

Tez Savunma Tarihi: 07.09.2021

Jüri üyeleri tarafından YÜKSEK LİSANS tezi olarak uygun görülmüş olan bu tez Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Adviye Gülçin SAĞDIÇOĞLU CELEP
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Onur DEMİR

05/08/2021

OFTALMİK DAMLALARDA SÜLFASETAMİD SODYUM, BETAMETAZON, METİL
PARABEN VE PROPİL PARABEN AYIRIMI VE MİKTAR TAYİNİ İÇİN YÖNTEM
GELİŞTİRİLMESİ
(Yüksek Lisans Tezi)
Onur DEMİR

GAZİ ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK
BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Eylül 2021

ÖZET

Bu çalışma, oftalmik damlalarda bulunan *Sülfasetamid sodyum(SFS)*, *Betametazon(BTM)*, *Metil paraben(MP)* ve *Propil paraben(PP)* tayini için türev spektrofotometrik ve kromatografik yöntem geliştirilmesini içermektedir. Türev spektrofotometrik yöntemde, çözücü olarak metanol kullanılmış ve girişimin olmadığı türev dalga boyu değerleri seçilerek, *SFS* için 4.türev $n=17\ 268\ \text{nm}$ 'de, *BTM* için 3.türev $n=21\ 236\ \text{nm}$ 'de, toplam paraben için 3.türev $n=11\ 283\ \text{nm}$ 'de miktar tayinleri yapılmıştır. Doğrusal çalışma aralığı *SFS*, *BTM* ve *MP-PP* için sırasıyla 6,0-14,0, 10,0-30,0 ve 4,0-12,0 $\mu\text{g/mL}$ olarak alınmıştır. Spektrofotometrik tayin çalışmalarında LOD değerleri *SFS*, *BTM* ve *MP-PP* için sırasıyla 0,58; 0,89 ve 1,14 $\mu\text{g/mL}$ bulunmuştur. Kromatografik yöntem olarak geliştirilen RP-HPLC'de Agilent Zorbax Eclipse XDB, C_{18} (3.0x75mm, 3.5 μm) kolon kullanılmış, mobil faz olarak su ve asetonitril (55:45 h/h) uygulanmıştır, mobil faz akış hızı 0,5 mL/dak. dır ve 250 nm. de UV dedektör ile dedeksiyon yapılmıştır. Yöntemindeki doğrusal çalışma aralığı *SFS*, *BTM*, *MP* ve *PP* için sırasıyla, 3,0-7,0 $\mu\text{g/mL}$; 1,5-3,5 $\mu\text{g/mL}$; 0,6-1,4 $\mu\text{g/mL}$ ve 0,6-1,4 $\mu\text{g/mL}$ dir. Validasyon çalışmalarında bulunan LOD değerleri, *SFS*, *BTM*, *MP* ve *PP* için sırasıyla 0,37; 0,052; 0,021 ve 0,012 $\mu\text{g/mL}$ bulunmuştur. Geliştirilen kromatografik ve spektrofotometrik yöntemlerin sonuçları doğruluk ve kesinlik açısından istatistiksel olarak karşılaştırılmış ve iki yöntem arasında anlamlı bir fark olmadığı bulunmuştur.

Bilim Kodu : 1004
Anahtar Kelimeler : *Sülfasetamid sodyum*, *Betametazon*, *Metil paraben*, *Propil paraben*, HPLC, UV Türev spektrofotometrisi
Sayfa Adedi : 114
Danışman : Prof. Dr. Nilgün GÜNDEN GÖĞER

METHOD DEVELOPMENT FOR SEPARATION AND QUANTITATIVE
DETERMINATION OF SULFACETAMIDE SODIUM, BETAMETHASONE, METHYL
PARABEN AND PROPYL PARABEN IN OPHTHALMIC DROPS

(M.Sc. Thesis)

Onur DEMİR

GAZI UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

September 2021

ABSTRACT

This study includes the development of spectrophotometric and chromatographic methods for determination of *Sulfacetamide sodium*(SFS) and *Betamethasone*(BTM) active agents, *Methyl paraben*(MP) and *Propyl paraben*(PP) excipient substance in a pharmaceutical ophthalmic drop. In spectrophotometric method, fourth order derivative at 268 nm n=17 was selected for the determination of SFS, third order derivative of the at 236 nm n=21 was selected for the determination of BTM and third order derivative of the 283 nm n=11 was selected for the determination of together MP and PP. Linear operating range was obtained as 6,0-14,0, 10,0-30,0 ve 4,0-12,0 µg/mL for SFS, BTM, and MP-PP respectively. The LOD values were found to be 0,58; 0,89 and 1,14 and µg/mL for SFS, BTM and MP-PP, in spectrophotometric method, respectively. As chromatographic method, the reverse phase high performance liquid chromatographic (RP- HPLC) method has been developed by using column Agilent Zorbax Eclipse XDB C₁₈ (3.0x75mm, 3.5µm). The mobil phase consisted water and acetonitrile (55:45 v/v), the flow rate was 0.5 ml/min and the UV detector was detected at 250 nm. The linear ranges in the method were 3,0-7,0 µg/mL; 1,5-3,5 µg/mL; 0,6-1,4 µg/mL and 0,6-1,4 µg/mL for SFS, BTM, MP and PP, respectively. The LOD values in the validation studies were 0,37; 0,052; 0,021 and 0,012 µg/mL for SFS, BTM, MP and PP in RP-HPLC method respectively. The results of the chromatographic and spectrophotometric methods developed were statistically compared with each other in terms of accuracy and precision, and there was no significant difference between the two methods.

Science Code : 1004

Key Words: : *Sulfacetamide sodium, Betamethasone, Methyl Paraben, Propyl Paraben,*
HPLC, Derivative UV Spectrophotometry

Page Number : 114

Supervisor : Prof. Dr. Nilgün GÜNDEN GÖĞER

TEŞEKKÜR

Çalışmalarında yaşadığım her zorlukta danışabildiğim, bilimsel katkılarıyla yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen Yüksek Lisans tezimi planlayan ve yöneten, hoşgörü ve anlayışla her konuda yanımda olan sevgili tez Hocam *Sayın Prof. Dr. Nilgün Günden Göğer'e*,

Çalışmalarım boyunca bana her konuda yardımcı olan ve desteğini esirgemeyen, deneysel çalışmalarımı yürütürken fikir alışverişinde bulunduğum ve tez çalışmam boyunca desteğini esirgemeyen *Çiğdem Kanbeş Dindar'a ve Cem Erkmen'e*,

Anabilim Dalı'ndaki destekleri için Prof. Dr. Uğur Tamer, Prof. Dr. Nusret Ertaş, Prof. Dr. H. Eda Şatana Kara, Doç. Dr. Aysel Berkkan ve Doç. Dr. Orkun Alp'e,

Laboratuvarının kapılarını sonuna kadar açan *Prof. Dr. Yeşim Özkan'a*,

Etken madde standartlarını temin etmem konusundaki yardımlarından dolayı Assos İlaç Kimya Gıda Ürünleri Üretim ve Tic. A.Ş. Ticari İşler Müdürü *Simla Egeli'ye*

Etken madde standartlarını temin etmem konusundaki yardımlarından dolayı *Ekin Kimya Ailesine*,

Yüksek Lisans eğitimine başlamam konusunda yardımcı olan *Dr. Süha Miraç Kaya'ya*,

Desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen Abim *Oğuz Demir* ve Eşi *Kübra Demir'e*,

Ömrünü ömrüme harcayan, hayatım boyunca sevgi ve desteklerini eksik etmeyen *Anne ve Babama*,

Yüksek Lisans dönemim boyunca beni yalnız bırakmayan, zor zamanlarımda desteğini esirgemeyen her türlü zorluğa birlikte göğüs gerdiğimiz Eşim *Burcu'ya* ve yaşama sevincim olan oğullarım *Furkan ve Yusuf'a* en içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xi
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xviii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Giriş ve Amaç.....	3
2.2. Sülfonamidler.....	4
2.2.1. Etki Mekanizması ve Antibakteriyel Etkinlikleri.....	4
2.2.2. Farmakokinetikleri.....	5
2.2.3. Yan Etkileri.....	5
2.3. Kortikosteroidler.....	5
2.4. Sülfasetamid Sodyum.....	6
2.4.1. Sülfasetamid Sodyum'un kimyasal ve fiziksel özellikleri.....	6
2.4.2. Sülfasetamid Sodyum'un farmakolojik özellikleri.....	7
2.4.3. Sülfasetamid Sodyum içeren müstahzarlar.....	7
2.5. Betametazon.....	8
2.5.1. Betametazon'un kimyasal ve fiziksel özellikleri.....	8
2.5.2. Betametazon'un farmakolojik özellikleri.....	9
2.5.3. Betametazon içeren müstahzarlar.....	10
2.6. Metil Paraben.....	14
2.6.1. Metil Paraben'in kimyasal ve fiziksel özellikleri.....	14
2.6.2. Metil Paraben'in farmakolojik özellikleri.....	14
2.7. Propil Paraben.....	15
2.7.1. Propil Paraben'in kimyasal ve fiziksel özellikleri.....	15
2.7.2. Propil Paraben'in farmakolojik özellikleri.....	15
2.8. Oftalmik Preparatlar.....	16
2.9. Analiz Yöntemleri.....	17

	Sayfa
2.9.1. <i>Sülfasetamid Sodyum</i>	17
2.9.2. <i>Betametazon</i>	19
2.9.3. <i>Metil Paraben</i>	21
2.9.4. <i>Propil Paraben</i>	24
2.10. UV Spektrofotometrisi.....	27
2.10.1. UV Türev spektrofotometrisi.....	28
2.11. Kromatografi.....	30
2.11.1. Kromatografinin sınıflandırılması.....	31
2.11.2. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC).....	34
2.11.3. HPLC’de Temel Parametreler.....	36
2.12. Analitik Yöntem Validasyonu.....	38
3. GEREÇ VE YÖNTEM	43
3.1. Gereç.....	43
3.1.1. Kimyasal malzemeler.....	43
3.1.2. Kullanılan araç ve gereçler.....	43
3.1.3. Kullanılan oftalmik damla.....	43
3.2. UV Türev Spektrofotometrisi Yöntemi için Ön Çalışmalar.....	44
3.2.1. <i>Sülfasetamid Sodyum</i> ’un UV spektrumunun alınması.....	44
3.2.2. <i>Betametazon</i> ’un UV spektrumunun alınması.....	44
3.2.3. <i>Metil Paraben-Propil Paraben</i> Karışımının UV spektrumunun alınması....	44
3.2.4. <i>Sülfasetamid Sodyum, Betametazon ve Metil Paraben-Propil</i> <i>Paraben</i> karışımının UV spektrumunun alınması.....	44
3.2.5. <i>Sülfasetamid Sodyum, Betametazon ve Metil Paraben-Propil</i> <i>Paraben</i> numunesinin UV spektrumunun alınması.....	45
3.2.6. <i>Metil Paraben ve Propil Paraben</i> ’in spektrumunun alınması.....	45
3.2.7. <i>Sülfasetamid Sodyum, Betametazon ve Metil Paraben-Propil</i> <i>Paraben</i> ’in çalışma dalga boylarının seçilmesi.....	45
3.2.8. UV Türev spektrofotometrisi yöntemi ile <i>Sülfasetamid Sodyum,</i> <i>Betametazon ve Metil Paraben-Propil Paraben</i> kalibrasyon grafikleri.....	46
3.2.9. UV Türev spektrofotometrisi yöntemi ile oftalmik damlalarda <i>Sülfasetamid</i> <i>Sodyum, Betametazon ve Metil Paraben-Propil Paraben</i> miktar tayini.....	47

3.2.10. Oftalmik damlalarda UV Türev spektrofotometrisi yöntemi ile <i>Sülfasetamid Sodyum, Betametazon ve</i> <i>Metil Paraben- Propil Paraben</i> geri kazanımı.....	47
3.2.11. UV Türev spektrofotometrisi yönteminde validasyon.....	48
3.3. RP- HPLC Yöntemi ile Oftalmik Damlalarda <i>Sülfasetamid Sodyum,</i> <i>Betametazon, Metil Paraben ve Propil Paraben</i> Tayini.....	48
3.3.1. Çözeltilerin hazırlanması.....	48
3.3.2. RP- HPLC yöntemi ile <i>Sülfasetamid Sodyum, Betametazon,</i> <i>Metil Paraben ve Propil Paraben</i> tayini optimizasyonu.....	49
3.3.3. RP- HPLC yöntemi ile <i>Sülfasetamid Sodyum, Betametazon,</i> <i>Metil Paraben ve Propil Paraben</i> kalibrasyon grafikleri.....	50
3.3.4. RP- HPLC yöntemi ile Oftalmik Damlalarda <i>Sülfasetamid</i> <i>Sodyum, Betametazon, Metil Paraben ve Propil Paraben</i> miktar tayini.....	50
3.3.5. RP- HPLC yöntemi ile <i>Sülfasetamid Sodyum, Betametazon,</i> <i>Metil Paraben ve Propil Paraben</i> geri kazanımı.....	51
3.3.6. RP- HPLC yönteminde validasyon.....	51
4. BULGULAR.....	55
4.1. <i>Sülfasetamid Sodyum, Betametazon ve Metil Paraben-Propil Paraben</i> UV Spektrumları.....	55
4.2. Sentetik Karışımı Çözeltisi ve Oftalmik Damla Çözeltisinin UV Spektrumları.....	56
4.3. UV-Türev Spektrofotometrisi Yöntemi Sonuçları.....	57
4.3.1. UV Türev spektrofotometrisi yöntemi ile miktar tayini için uygun dalga boyunun belirlenmesi.....	57
4.3.2. UV Türev spektrofotometrisi yöntemi ile miktar tayini için seçilen dalga boyları.....	76
4.3.3. UV Türev spektrofotometrisi yöntemi kalibrasyon grafikleri.....	78
4.3.4. UV Türev spektrofotometrik yöntemde tekrarlanabilirlik.....	81
4.3.5. UV Türev spektrofotometrik yöntem ile oftalmik damlalarda etken madde miktar tayini sonuçları.....	82
4.3.6. UV Türev spektrofotometrik yöntem ile geri kazanım sonuçları.....	83
4.4. RP- HPLC ile <i>Sülfasetamid Sodyum, Betametazon, Metil Paraben ve</i> <i>Propil Paraben</i> Tayini.....	84

Sayfa

4.4.1. Yöntemin optimizasyonu.....	84
4.4.2. Kalibrasyon grafikleri.....	89
4.4.3. RP - HPLC yönteminin oftalmik damlalarda uygulanması ve geri kazanım çalışması sonuçları.....	93
4.4.4. RP - HPLC yöntemi Sistem Uygunluk Testleri (SUT).....	96
4.4.5. Sağlamlık çalışmaları.....	97
4.4.6. RP- HPLC yöntemi hızlı bozundurma testleri.....	99
4.4.7. UV Türev Spektrofotometrisi ve HPLC yöntemleri ile elde edilen sonuçların istatistiksel olarak karşılaştırılması.....	99
5. TARTIŞMA.....	101
5.1. Optimizasyon Çalışmaları.....	101
5.2. Literatür Bulguları ile Karşılaştırma.....	103
5.3. Validasyon ve SUT.....	105
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	107
KAYNAKLAR.....	109
ÖZGEÇMİŞ.....	114

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. <i>Sülfasetamid sodyum</i> 'un kimyasal ve fiziksel özellikleri.....	6
Çizelge 2.2. <i>Sülfasetamid sodyum</i> içeren müstahzarlar.....	7
Çizelge 2.3. <i>Betametazon</i> 'un kimyasal ve fiziksel özellikleri.....	8
Çizelge 2.4. <i>Betametazon</i> içeren müstahzarlar.....	10
Çizelge 2.5. <i>Metil Paraben</i> 'in kimyasal ve fiziksel özellikleri.....	14
Çizelge 2.6. <i>Propil paraben</i> 'in kimyasal ve fiziksel özellikleri.....	15
Çizelge 2.7. <i>Sülfasetamid sodyum</i> analiz yöntemleri.....	17
Çizelge 2.8. <i>Betametazon</i> analiz yöntemleri.....	19
Çizelge 2.9. <i>Metil Paraben</i> analiz yöntemleri.....	21
Çizelge 2.10. <i>Propil Paraben</i> analiz yöntemleri.....	24
Çizelge 2.11. Ters-faz sıvı kromatografisi sabit faz dolgu materyalleri.....	35
Çizelge 2.12. Normal faz ve ters faz sıvı kromatografisinin karşılaştırılması.....	35
Çizelge 2.13. USP'ye göre sistem uygunluk testleri hesaplama eşitlikleri.....	37
Çizelge 2.14. FDA kılavuzu sistem uygunluk testi için başlangıç kabul kriterleri.....	38
Çizelge 2.15. Hızlandırılmış bozunma çalışması.....	41
Çizelge 4.1. Etken Maddelerin miktar tayini yapılabilecek UV Türev derecesi, n ve dalga boyu değerleri.....	75
Çizelge 4.2. UV türev spektrofotometrik yöntemin analitik parametreleri.....	80
Çizelge 4.3. Günler arası tekrarlanabilirlik çalışması sonuçları.....	81
Çizelge 4.4. Gün içi tekrarlanabilirlik çalışması sonuçları.....	81
Çizelge 4.5. Oftalmik damlalarda <i>Sülfasetamid sodyum</i> miktar tayini sonuçları.....	82
Çizelge 4.6. Oftalmik damlalarda <i>Betametazon</i> miktar tayini sonuçları.....	82
Çizelge 4.7. Oftalmik damlalarda <i>Metil Paraben- Propil Paraben</i> miktar tayini sonuçları.....	82
Çizelge 4.8. UV türev spektrofotometrik yöntemle geri kazanım sonuçları.....	83
Çizelge 4.9. Mobil faz akış hızının kromatografik parametrelere etkisi.....	86
Çizelge 4.10. Enjeksiyon hacminin kromatografik parametrelere etkisi.....	87
Çizelge 4.11. Kolon sıcaklığının kromatografik parametrelere etkisi.....	88
Çizelge 4.12. Optimizasyon çalışmaları sonucunda belirlenen kromatografik koşullar.....	89
Çizelge 4.13. RP-HPLC yönteminin analitik performans verileri.....	91
Çizelge 4.14. RP- HPLC yöntemi gün içi tekrarlanabilirlik çalışması sonuçları.....	92

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.15. RP- HPLC yöntemi günler arası tekrarlanabilirlik çalışması.....	93
Çizelge 4.16. Oftalmik damlalarda <i>Sülfasetamid Sodyum</i> miktar tayini sonuçları.....	93
Çizelge 4.17. Oftalmik damlalarda <i>Betametazon</i> miktar tayini sonuçları.....	94
Çizelge 4.18. Oftalmik damlalarda <i>Metil Paraben</i> miktar tayini sonuçları.....	94
Çizelge 4.19. Oftalmik damlalarda <i>Propil paraben</i> miktar tayini sonuçları.....	94
Çizelge 4.20. RP - HPLC ile geri kazanım çalışması sonuçları.....	95
Çizelge 4.21. RP - HPLC yönteminde elde edilen SUT sonuçları.....	96
Çizelge 4.22. RP-HPLC yönteminde mobil faz akış hızının sağlamlığa etkisi.....	97
Çizelge 4.23. RP-HPLC yönteminde dalga boyunun sağlamlığa etkisi.....	98
Çizelge 4.24. RP-HPLC yönteminde kolon sıcaklığının sağlamlığa etkisi.....	98
Çizelge 4.25. Stres koşulları altında <i>Sülfasetamid sodyum, Betametazon, Metil Paraben ve Propil paraben</i> bozunma miktarları.....	99
Çizelge 4.26. UV Türev ve HPLC Yöntemlerinin Student t Testi ve Fisher Testi ile karşılaştırılması.....	99
Çizelge 5.1. Farklı örneklerde <i>Sülfasetamid sodyum, Betametazon, Metil Paraben ve Propil paraben</i> tayini.....	103
Çizelge 5.2. Bu çalışmada <i>Sülfasetamid sodyum, Betametazon, Metil paraben ve Propil paraben</i> tayini.....	105

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Sülfasetamid Sodyum'un açık formülü.....	6
Şekil 2.2. Betametazon'un açık formülü.....	9
Şekil 2.3. Metil Paraben'in açık formülü.....	14
Şekil 2.4. Propil Paraben'in açık formülü.....	15
Şekil 2.5. Basit bir Gauss pikinin 1-4. türev spektrumları.....	29
Şekil 2.6. Örtüşen iki Gauss pikinin 1-4. türev spektrumları.....	29
Şekil 2.7. HPLC cihazının şematik gösterimi.....	34
Şekil 4.1. 14 µg/mL Sülfasetamid sodyum, 30 µg/mL Betametazon ve 15 µg/mL Metil Paraben-Propil Paraben UV spektrumları.....	55
Şekil 4.2. 14 µg/mL Metil Paraben ve 15 µg/mL Propil Paraben UV Spektrumları.....	56
Şekil 4.3. Oftalmik damla ve sentetik karışım çözeltilerinin UV spektrumları.....	57
Şekil 4.4. 14 µg/mL Sülfasetamid Sodyum, 30 µg/mL Betametazon ve 15 µg/mL Metil Paraben-Propil Paraben'e ait üst üste çekilmiş 1.türev (n=5) UV spektrumları.....	58
Şekil 4.5. 14 µg/mL Sülfasetamid Sodyum, 30 µg/mL Betametazon ve 15 µg/mL Metil Paraben-Propil Paraben'e ait üst üste çekilmiş 1.türev (n=7) UV spektrumları.....	58
Şekil 4.6. 14 µg/mL Sülfasetamid Sodyum, 30 µg/mL Betametazon ve 15 µg/mL Metil Paraben-Propil Paraben'e ait üst üste çekilmiş 1.türev (n=9) UV spektrumları.....	59
Şekil 4.7. 14 µg/mL Sülfasetamid Sodyum, 30 µg/mL Betametazon ve 15 µg/mL Metil Paraben-Propil Paraben'e ait üst üste çekilmiş 1.türev (n=11) UV spektrumları.....	59
Şekil 4.8. 14 µg/mL Sülfasetamid Sodyum, 30 µg/mL Betametazon ve 15 µg/mL Metil Paraben-Propil Paraben'e ait üst üste çekilmiş 1.türev (n=13) UV spektrumları.....	60
Şekil 4.9. 14 µg/mL Sülfasetamid Sodyum, 30 µg/mL Betametazon ve 15 µg/mL Metil Paraben-Propil Paraben'e ait üst üste çekilmiş 1.türev (n=17) UV spektrumları.....	60
Şekil 4.10. 14 µg/mL Sülfasetamid Sodyum, 30 µg/mL Betametazon ve 15 µg/mL Metil Paraben-Propil Paraben'e ait üst üste çekilmiş 1.türev (n=21) UV spektrumları.....	61

Şekil	Sayfa
Şekil 4.11. 14 µg/mL Sülfasetamid Sodyum, 30 µg/mL Betametazon ve 15 µg/mL Metil Paraben-Propil Paraben'e ait üst üste çekilmiş 1.türev (n=25) UV spetrumları.....	61
Şekil 4.12. 14 µg/mL Sülfasetamid Sodyum, 30 µg/mL Betametazon ve 15 µg/mL Metil Paraben-Propil Paraben'e ait üst üste çekilmiş 2.türev (n=5) UV spektrumları.....	62
Şekil 4.13. 14 µg/mL Sülfasetamid Sodyum, 30 µg/mL Betametazon ve 15 µg/mL Metil Paraben-Propil Paraben'e ait üst üste çekilmiş 2.türev (n=7) UV spektrumları.....	63
Şekil 4.14. 14 µg/mL Sülfasetamid Sodyum, 30 µg/mL Betametazon ve 15 µg/mL Metil Paraben-Propil Paraben'e ait üst üste çekilmiş 2.türev (n=9) UV spektrumları.....	63
Şekil 4.15. 14 µg/mL Sülfasetamid Sodyum, 30 µg/mL Betametazon ve 15 µg/mL Metil Paraben-Propil Paraben'e ait üst üste çekilmiş 2.türev (n=11) UV spektrumları.....	64
Şekil 4.16. 14 µg/mL Sülfasetamid Sodyum, 30 µg/mL Betametazon ve 15 µg/mL Metil Paraben-Propil Paraben'e ait üst üste çekilmiş 2.türev (n=13) UV spektrumları.....	64
Şekil 4.17. 14 µg/mL Sülfasetamid Sodyum, 30 µg/mL Betametazon ve 15 µg/mL Metil Paraben-Propil Paraben'e ait üst üste çekilmiş 2.türev (n=17) UV spektrumları.....	65
Şekil 4.18. 14 µg/mL Sülfasetamid Sodyum, 30 µg/mL Betametazon ve 15 µg/mL Metil Paraben-Propil Paraben'e ait üst üste çekilmiş 2.türev (n=21) UV spektrumları.....	65
Şekil 4.19. 14 µg/mL Sülfasetamid Sodyum, 30 µg/mL Betametazon ve 15 µg/mL Metil Paraben-Propil Paraben'e ait üst üste çekilmiş 2.türev (n=25) UV spektrumları.....	66
Şekil 4.20. 14 µg/mL Sülfasetamid Sodyum, 30 µg/mL Betametazon ve 15 µg/mL Metil Paraben-Propil Paraben'e ait üst üste çekilmiş 3.türev (n=5) UV spektrumları.....	67
Şekil 4.21. 14 µg/mL Sülfasetamid Sodyum, 30 µg/mL Betametazon ve 15 µg/mL Metil Paraben-Propil Paraben'e ait üst üste çekilmiş 3.türev (n=7) UV spektrumları.....	67

Şekil	Sayfa
Şekil 4.22. 14 µg/mL Sülfasetamid Sodyum, 30 µg/mL Betametazon ve 15 µg/mL Metil Paraben-Propil Paraben'e ait üst üste çekilmiş 3.türev (n=9) UV spektrumları.....	68
Şekil 4.23. 14 µg/mL Sülfasetamid Sodyum, 30 µg/mL Betametazon ve 15 µg/mL Metil Paraben-Propil Paraben'e ait üst üste çekilmiş 3.türev (n=11) UV spektrumları.....	68
Şekil 4.24. 14 µg/mL Sülfasetamid Sodyum, 30 µg/mL Betametazon ve 15 µg/mL Metil Paraben-Propil Paraben'e ait üst üste çekilmiş 3.türev (n=13) UV spektrumları.....	69
Şekil 4.25. 14 µg/mL Sülfasetamid Sodyum, 30 µg/mL Betametazon ve 15 µg/mL Metil Paraben-Propil Paraben'e ait üst üste çekilmiş 3.türev (n=17) UV spektrumları.....	69
Şekil 4.26. 14 µg/mL Sülfasetamid Sodyum, 30 µg/mL Betametazon ve 15 µg/mL Metil Paraben-Propil Paraben'e ait üst üste çekilmiş 3.türev (n=21) UV spektrumları.....	70
Şekil 4.27. 14 µg/mL Sülfasetamid Sodyum, 30 µg/mL Betametazon ve 15 µg/mL Metil Paraben-Propil Paraben'e ait üst üste çekilmiş 3.türev (n=25) UV spektrumları.....	70
Şekil 4.28. 14 µg/mL Sülfasetamid Sodyum, 30 µg/mL Betametazon ve 15 µg/mL Metil Paraben-Propil Paraben'e ait üst üste çekilmiş 4.türev (n=5) UV spektrumları.....	71
Şekil 4.29. 14 µg/mL Sülfasetamid Sodyum, 30 µg/mL Betametazon ve 15 µg/mL Metil Paraben-Propil Paraben'e ait üst üste çekilmiş 4.türev (n=7) UV spektrumları.....	72
Şekil 4.30. 14 µg/mL Sülfasetamid Sodyum, 30 µg/mL Betametazon ve 15 µg/mL Metil Paraben-Propil Paraben'e ait üst üste çekilmiş 4.türev (n=9) UV spektrumları.....	72
Şekil 4.31. 14 µg/mL Sülfasetamid Sodyum, 30 µg/mL Betametazon ve 15 µg/mL Metil Paraben-Propil Paraben'e ait üst üste çekilmiş 4.türev (n=11) UV spektrumları.....	73
Şekil 4.32. 14 µg/mL Sülfasetamid Sodyum, 30 µg/mL Betametazon ve 15 µg/mL Metil Paraben-Propil Paraben'e ait üst üste çekilmiş 4.türev (n=13) UV spektrumları.....	73

Şekil	Sayfa
Şekil 4.33. 14 µg/mL Sülfasetamid Sodyum, 30 µg/mL Betametazon ve 15 µg/mL Metil Paraben-Propil Paraben'e ait üst üste çekilmiş 4.türev (n=17) UV spektrumları.....	74
Şekil 4.34. 14 µg/mL Sülfasetamid Sodyum, 30 µg/mL Betametazon ve 15 µg/mL Metil Paraben-Propil Paraben'e ait üst üste çekilmiş 4.türev (n=21) UV spektrumları.....	74
Şekil 4.35. 14 µg/mL Sülfasetamid Sodyum, 30 µg/mL Betametazon ve 15 µg/mL Metil Paraben-Propil Paraben'e ait üst üste çekilmiş 4.türev (n=25) UV spektrumları.....	76
Şekil 4.36. 14 µg/mL Sülfasetamid Sodyum 4.türev (n=17) UV spektrumu	76
Şekil 4.37. 30 µg/mL Betametazon 3.türev (n=21) UV spektrumu	77
Şekil 4.38. 15 µg/mL Metil paraben-Propil Paraben 3.türev (n=11) UV spektrumu.....	77
Şekil 4.39. UV Türev Spektrofotometrisi yöntemi ile (4. Türev, n=17, 268 nm) Sülfasetamid Sodyum tayininde kullanılan kalibrasyon grafiği, Derişim aralığı: 6,0-14,0 µg/mL.....	78
Şekil 4.40. UV Türev Spektrofotometrisi yöntemiyle (3.türev, n=21, 236 nm) Betametazon tayininde kullanılan kalibrasyon grafiği, Derişim aralığı: 10-30 µg/mL.....	79
Şekil 4.41. UV Türev Spektrofotometrisi yöntemiyle (3.türev, n=11, 283 nm) Metil Paraben- Propil Paraben tayininde kullanılan kalibrasyon grafiği, Derişim aralığı: 4,0-12,0 µg/mL.....	80
Şekil 4.42. Sülfasetamid Sodyum, Betametazon, Metil Paraben ve Propil Paraben içeren karışıma ait kromatogram.....	84
Şekil 4.43. Kromatografik koşullar: Mobil Faz: Su/Asetonitril, akış hızı: 0,6 mL/dak., kolon sıcaklığı 25°C, mobil faz oranı: a) 45:55, b) 55:45, c) 60:40, d) 65:35.....	85
Şekil 4.44. Kromatografik koşullar: Mobil faz: Su/Asetonitril (55:45 h/h), enjeksiyon hacmi 10,0 µL, kolon sıcaklığı 25°C, Akış Hızı: (a) 0,4 (b) 0,5 (c) 0,6 (d) 0,7, 5,0 µg/mL SFS, 2,5 µg/mL BTM, 1,0 µg/mL MP, 1,0 µg/mL PP içeren standart çözelti.....	86
Şekil 4.45. Kromatografik koşullar: Mobil faz: Su/Asetonitril (55:45 h/h), akış hızı: 0,5 mL/dak, kolon sıcaklığı 25°C, enjeksiyon hacmi: (a)1,0 (b)5,0 (c)10,0 (d)15,0 (e)20,0, 5,0 µg/mL SFS, 2,5 µg/mL BTM, 1,0 µg/mL MP, 1,0 µg/mL PP içeren standart çözelti.....	87

Şekil**Sayfa**

Şekil 4.46. Kromatografik koşullar: Mobil faz: Su/Asetonitril (55:45 h/h), akış hızı: 0,5 mL/dak, enjeksiyon hacmi 5,0 µL, kolon sıcaklığı: (a)25,0 (b)30,0 (c)35,0 (d)40,0, 5,0 µg/mL SFS, 2,5 µg/mL BTM, 1,0 µg/mL MP, 1,0 µg/mL PP içeren standart çözelti.....	88
Şekil 4.47. RP - HPLC yöntemi ile SFS kalibrasyon grafiği, Derişim aralığı: 3,0- 7,0 µg/mL.....	89
Şekil 4.48. RP - HPLC yöntemi ile BTM kalibrasyon grafiği, Derişim aralığı: 1,5- 3,5 µg/mL.....	90
Şekil 4.49. RP - HPLC yöntemi ile MP kalibrasyon grafiği, Derişim aralığı: 0,6- 1,4 µg/m.....	90
Şekil 4.50. RP - HPLC yöntemi ile PP kalibrasyon grafiği, Derişim aralığı: 0,6- 1,4 µg/mL.....	91
Şekil 4.51. Kromatografik koşullar: Mobil faz: Su/Asetonitril (55:45 h/h), akış hızı: 0,5 mL/dak, kolon sıcaklığı 25°C, Enjeksiyon Hacmi 5,0 µL, 5,0 µg/mL SFS, 2,5 µg/mL BTM, 1,0 µg/mL MP, 1,0 µg/mL PP içeren standart çözelti.....	92
Şekil 4.52. Kromatografik koşullar: Mobil faz: Su/Asetonitril (55:45 h/h), akış hızı: 0,5 mL/dak, kolon sıcaklığı 25°C, enjeksiyon hacmi 5,0 µL.....	96

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklamalar
µg	Mikrogram
k'	Kromatografide Kapasite Faktörü
mL	Mililitre
mmol	Milimol
N	Kromatografide Tabaka Sayısı
ng	Nanogram
PAs	Pik asimetri oranı
R	Kromatografide Rezolüsyon, Ayırma Gücü
tR	Kromatografide Alıkonma zamanı
α	Kromatografide Seçicilik Faktörü
Kısaltmalar	Açıklamalar
SFS	<i>Sülfasetamid Sodyum</i>
BH	Bağlı Hata
BSS	Bağlı standart Sapma
BTM	<i>Betametazon</i>
GC	Gaz Kromatografisi
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography (Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi)
MP	<i>Metil Paraben</i>
LOD	Limit of Dedection (Teşhis Sınırı)
LOQ	Limit of Quantification (Tayin Sınırı)
MS	Kütle Spektrometri
PB	<i>Propil Paraben</i>
SUT	Sistem Uygunluk Testleri

1. GİRİŞ

Sülfasetamid sodyum (SFS), sülfonamid grubu bir antibiyotiktir. *SFS* oftalmik solüsyonu veya merhemi bakteriyel konjuktivit tedavisinde ve trahom tedavisinde adjuvant olarak etkilidir [1].

Betametazon (BTM), serbest alkol formunda ya da esterlenmiş formlarında kullanılan, başlıca glukokortikoid aktivitesine sahip bir kortikosteroiddir [2]

Metil paraben (MP) ve *Propil paraben (PP)*, kozmetik, gıda ürünleri ve farmasötik formülasyonlarda antimikrobiyal bir koruyucu olarak yaygın kullanılır. Tek başına, parabenlerle veya diğer antimikrobiyal ajanlarla kombinasyon halinde kullanılabilir [3]

Türk ilaç pazarında *SFS* ve *BTM* etken maddelerini içeren oftalmik damla bulunmaktadır. Ayrıca, piyasada bulunan çeşitli farmasötik formlarda *SFS* ve *BTM*'u ayrı ayrı içeren çeşitli preparatlar mevcuttur. Bu maddeleri içeren karışımların ayrımı ve miktar tayini yapılabilmesi için ekonomik, çevreci ve kolay yöntemlerin geliştirilmesi gerekmektedir.

Bu çalışmada oftalmik damlada bulunan *SFS* ve *BTM* etken maddelerinin rutin analizlerde herhangi bir ayırma işlemine tabi tutulmadan aynı anda kantitatif tayinlerine yönelik ekonomik, kolay, duyarlı ve hızlı bir analitik teknik geliştirilmesi amaçlanmıştır. *SFS*, *BTM* ve *Parabenlerin* aynı anda UV spektrofotometrik yöntemle tayinleri mümkün değildir. Bu nedenle, *SFS*, *BTM* ve *Paraben*'lerin eş zamanlı tayini için UV-Türev spektrofotometrisi yöntemi kullanılmıştır. Daha sonra, *SFS*, *BTM*, *MP* ve *PP*'in aynı anda analizleri için RP-HPLC yöntemi geliştirilmiş ve yöntemler kıyaslanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Giriş ve Amaç

Sülfasetamid sodyum, bakteriyostatik aktiviteye sahip sentetik bir sülfonil asetamid türevidir. *Sülfasetamid'in* tuz formudur. *Betametazon*, 9 alfa-floro-16 beta-metil prednizolon yapısında olan ve ağız yoluyla veya cilt yüzeyine uygulanarak kullanılan glukokortikoid türüdür. *Sülfasetamid sodyum* ve *Betametazon* kombinasyonu genel olarak gözün ön kısmında gelişebilecek alerjik ve iltihabi hastalıkların bölgesel tedavisinde ve bu hastalıkların önlenmesinde kullanılır.

Türk ilaç pazarında *Sülfasetamid sodyum* ve *Betametazon* kombinasyonu içeren bir oftalmik damla, *Sülfasetamid sodyum*'un tek başına kullanıldığı akne losyonu ve Prednizolon ile birlikte kullanıldığı oftalmik damla mevcuttur. *Betametazon* 'un kullanıldığı formülasyonlar ise Fusidik Asit kombinasyonunu içeren krem, Kalsipotriol içeren pomad, Kliokinol içeren krem, Gentamisin içeren merhem, Salisilik asit içeren losyondur.

Çalışmanın amacı, *Sülfasetamid sodyum*, *Betametazon*, *Metil Paraben* ve *Propil Paraben*'i birlikte içeren oftalmik damlalarda, etken maddelerin miktar tayinleri için rutin analizlerde kullanılabilecek hızlı, kolay ve duyarlı analiz yöntemleri geliştirilmesidir. Hedef, önerilen analiz yöntemleri ile *Sülfasetamid sodyum*, *Betametazon*, *Metil paraben* ve *Propil paraben*'in bir arada bulunduğu oftalmik damlalarda etken maddelerin herhangi bir ayırma işlemine tabi tutulmadan aynı anda miktar tayinlerinin yapılabilmesini sağlamaktır.

Bu çalışma kapsamında oftalmik damlaların içeriğini oluşturan *Sülfasetamid sodyum*, *Betametazon* ve *Paraben*lerin aynı anda miktar tayinleri için UV türev spektroskopisi ve Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile yöntem geliştirilmesi ve bu yöntemlerin *Sülfasetamid sodyum*, *Betametazon*, *Metil paraben* ve *Propil paraben*'i birlikte içeren oftalmik damlalarında uygulanması amaçlanmıştır.

2.2. Sülfonamidler

Sülfonamidler, bakteri enfeksiyonlarının tedavi ve önlenmesinde sistematik olarak kullanılmış olan ilk etkin kemoterapötiklerdir. Sülfonamidler, Penisilin'in tedaviye girmesinden önce 1930'larda bakteri enfeksiyonlarına karşı kullanılabilecek en önemli ve en popüler ilaçları oluşturuyorlardı. Sülfonamidler, esas itibariyle sülfanilamid maddesinin türevleridir. Bu maddenin sülfonamid ($\text{SO}_2\text{-NH}_2$) grubundaki hidrojen atomlarından birinin yerine uygun radikaller bağlanarak çeşitli sülfonamid türevleri sentez edilmiştir. Sülfonamidler, idrar yolu enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılmıştır. Sodyum tuzunun %30'luk solüsyonu veya %10'luk merhemi göze lokal olarak uygulanabilir [4].

2.2.1. Etki Mekanizması ve Antibakteriyel Etkinlikleri

Sülfonamide duyarlı organizmalar, memelilerin aksine dış kaynaklardan folat kullanamazlar ve onu PABA (p-amoksibenzoik asit)'dan sentezlemek zorundadırlar. Bu yolak pürinlerin ve nükleik asitlerin sentezi için gereklidir. PABA'nın yapısal analogları olarak sülfonamidler, dihidropteorat sentazı ve folat üretimini inhibe ederler. Sülfonamidler hem Gram-pozitif hem de Gram-negatif bakterilerle, *Nocardia* türleri, *Chlamydia trichomatis* ve bazı protozoaları inhibe ederler. *Escheria coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella*, *Shigella* ve *Enterobacter* türleri gibi bazı enterik bakterileri de inhibe ederler. İlginçtir ki, riketsiyalar sülfonamidler tarafından inhibe edilmez, tersine büyümeleri hızlanır. Anaeroblara karşı aktiviteleri zayıftır. *Pseudomonas aeruginosa*, sülfonamid antibiyotiklerine intrinsik olarak dirençlidir. Sülfonamidlerin bir dihidrofolat redüktaz inhibitörüyle (trimetoprim veya primetamin) kombinasyonları folat sentezinin ardışık basamaklarını inhibe ettikleri için sinerjik aktivite oluşturur [1].

Sülfonamidlerin etkisi, bakteriyostatik niteliktedir. Çok yüksek konantrasyonlarda bakterisid etki yapabilirler. İdrarda serbest sülfonamid konsantrasyonu plazmadakinin 10-20 katına çıkabilir. Bu nedenle sülfonamidler idrarda bakterisid etki gösterebilirler [1].

2.2.2. Farmakokinetikleri

Sülfonamidler üç ana gruba ayrılabilir:

- Oral, Emilebilen
- Oral, Emilemeyen
- Topikal

Oral, emilebilen sülfonamidler yan ömürleri göz önüne alınarak kısa, orta ve uzun etkili olarak gruplanabilir. Mideden ve ince barsaktan emilirler ve dokulara, sıvılara (sinir sistemi ve serebrospinal sıvı dahil), plasentaya ve fetüse yaygın olarak dağılırlar, %20'den %90'ı aşan dereceler arasında değişen oranlarda serum proteinlerine bağlanırlar. Terapötik yoğunluklarının, kanda 40-100 µg/mL arasındadır. Kan seviyeleri genellikle ağızdan alınımından 2-6 saat sonra en yüksek düzeye ulaşır. Emilen ilacın bir kısmı karaciğerde asetillenir veya glukuronidlenir. Sülfonamidler ve inaktif metabolitleri idrarla, başlıca glomerüler filtrasyonla atılır. İleri böbrek yetmezliğinde, sülfonamidlerin dozunun azaltılması gerekir [1].

2.2.3. Yan Etkileri

Oral kullanılan kısa etkili sülfonamidlerin yaklaşık %5 oranında yan etki oluşturduğu saptanmıştır. Bunlar, kısmen ilaca karşı alerjiye ve kısmen de ilacın direkt toksik etkisine bağlıdır. Depo sülfonamidleri alanlarda yan etki sıklığı daha yüksek bulunmuştur [4].

2.3. Kortikosteroidler

Kortikosteroidler, 1950 yılından beri astım tedavisinde kullanılırlar ve etkilerine, kısmen inflamatuvar sitokin üretiminin inhibisyonunun aracılık ettiği geniş anti inflamatuvar etkinlikleri ile oluşturdukları kabul edilir. Direkt olarak hava yolu düz kasını gevşetmezler ancak düzenli alındıklarında, bronşial reaktiviteyi azaltırlar ve astım alevlenmelerinin sıklığını azaltırlar. Hava yolu tıkanması üzerine etkileri, bronşial mukozada kısmen tıkanmış damarları kasıcı etkileri, 3-reseptör agonistlerinin etkisini potansiyalize etmelerinden dolayıdır, ancak en önemli etkileri, astmatik hava yollarının, lenfosit, eozinofil ve mast hücreleri ile infiltrasyonunu inhibe etmeleridir.

Astım semptomları sıklıkla oluşuyorsa ya da bronkodilatör tedaviye rağmen ciddi hava yolu tıkanıklığı sürüyorsa, inhale kortikosteroidler başlanmalıdır. Ciddi semptomları ya da ciddi hava yolu tıkanıklığı olan hastalar için oral ve inhale kortikosteroid kombinasyonu ile tedaviye başlanması uygundur [1].

Klinik Kullanımları

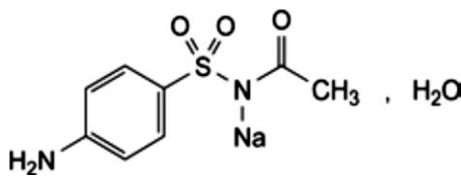
Kortikosteroidlerle ilgili klinik çalışmalar, sürekli olarak astımın tüm belirtilerini iyileştirmede semptomların ciddiyeti, havayolu çapı testleri ve bronşial reaktivite, alevlenmelerin sıklığı ve hayat kalitesinin etkili olduğunu göstermiştir. Kronik verildiklerinde ciddi yan etkileri olduğu için oral ve parenteral kortikosteroidler, acil tedavi gerektiren, bronkodilatörler ile yeterli düzelmeyen, idame tedavisine rağmen semptomları kötüleşen hastalar için tercih edilir [1].

2.4. Sülfasetamid Sodyum

2.4.1. Sülfasetamid Sodyum'un kimyasal ve fiziksel özellikleri

Çizelge 2.1. Sülfasetamid sodyum'un kimyasal ve fiziksel özellikleri [5,6]

Kimyasal Adı	Sodyum asetil[(4-aminofenil)sülfonil]azanid
Kapalı Formülü	$C_8H_9N_2NaO_3S \cdot H_2O$
Molekül Ağırlığı	254,2 g/mol
Erime Noktası	180-184°C
Çözünürlüğü	Su, Susuz Etanol
Rengi, formu	Beyaz katı, Açık Sarı katı toz
Saklama Koşulları	Işıktan Korunmalıdır.



Şekil 2.1. Sülfasetamid Sodyum'un açık formülü

2.4.2. Sülfasetamid Sodyum'un farmakolojik özellikleri

Sülfasetamid sodyum etkinliğinin yüksek ve toksisitesinin düşük olması nedeniyle göz enfeksiyonlarının tedavisinde merhem ve göz damlası şeklinde, bakteriyel deri enfeksiyonlarının tedavisinde ise çözelti ve merhem formlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Sülfasetamid sodyum sulu çözeltisinin pH'sının 7,4 olması nedeniyle oftalmik kullanım için ideal bir ilaçtır. Gastrointestinal yoldan alındığında ise hızlı bir şekilde absorbe edilir ve değişikliğe uğramadan idrarla atılır. Biyolojik yarılanma ömrü 7-13 saat arasındadır [7].

Sülfasetmid Sodyum'un duyarlı olduğu mikroorganizmalar; *Streptokoklar*, *Stafilokoklar*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas pyocyanea*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella species*, *Proteus vulgaris*, *Actinomyces*'dir [8].

2.4.3. Sülfasetamid Sodyum içeren müstahzarlar

Sülfasetamid sodyum içeren müstahzarlar, Çizelge 2.2.'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.2. *Sülfasetamid Sodyum* içeren müstahzarlar [8]

Müstahzar İsmi	Farmasötik Form	<i>Sülfasetamid Sodyum</i> Derişim	Müstahzardaki Diğer Maddeler
Sivex	Losyon	<i>Sülfasetamid Sodyum</i> 100 mg/g	Hyaluronik asit Sodyum tiyosülfat Potasyum dihidrojen fosfat Disodyum hidrojen fosfat dihidrat Disodyum EDTA Sodyum metil paraben Saf su
Sulfufar Krem %10	Krem	<i>Sülfasetamid Sodyum</i> 100 mg/g	Sülfür dioksit Setil Alkol Makrogol-6-setostearil eter Makrogol-25-setostearil eter Propil paraben Metil paraben Sıvı parafin Polietilen glikol İzopropil miristat Simetikon Disodyum edetat Mikrokristalin selüloz Saf su

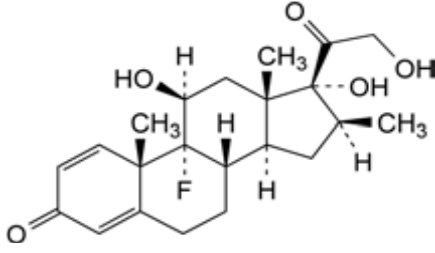
Müstahzar İsmi	Farmasötik Form	Sülfasetamid Sodyum Derişim	Müstahzardaki Diğer Maddeler
Blephamide Oftalmik	Göz Damlası	%10,0 Sülfasetamid Sodyum	%0,2 Prednisolon asetat Benzalkonyum klorür Polivinil alkol Polisorbat 80 Edetat sodyum Dibazik sodyum fosfat heptahidrat Potasyum fosfat monobazik anhidrit Sodyum tiyosülfat pentahidrat pH ayarı için hidroklorik asit ve/veya sodyum hidroksit Saf su
Suprenil Steril Oftalmik Süspansiyon	Göz Damlası	Sülfasetamid sodyum 500 mg/5 mL	Prednisolon asetat Fenilefrin hidroklorür Polivinil alkol Fenilmerkürü nitrat Antipirin Tween 80 Sodyum tiosülfat Dibazik sodyum fosfat anhidrat Monobazik sodyum fosfat Disodyum edetat Enjeksiyonluk su
Brumeton	Göz Damlası	Betametazon 1 mg/mL Sülfasetamid Sodyum 100 mg/mL	Sodyum tiyosülfat Sodyum bisülfat Sodyum edetat Metil P-hidroksi benzoat Propil P-hidroksi benzoat Etoksilenmiş lanolin esterleri Polisorbat 80

2.5. Betametazon

2.5.1. Betametazon'un kimyasal ve fiziksel özellikleri

Çizelge 2.3. Betametazon'un kimyasal ve fiziksel özellikleri [5,6]

Kimyasal Adı	9-Floro-11 β ,17,21-trihidroksi-16 β -metilpregna-1,4-dien-3,20-dion
Kapalı Formülü	C ₂₂ H ₂₉ FO ₅
Molekül Ağırlığı	392,5 g/mol
Erime Noktası	250-253°C
Çözünürlüğü	Suda ve etanolde az metilen klorürde daha az çözünür.
Rengi, formu	Beyaz kristal toz
Saklama Koşulları	2-30°C arasında saklanmalıdır. Işıktan korunmalıdır.



Şekil 2.2. *Betametazon*'un açık formülü

2.5.2. *Betametazon*'un farmakolojik özellikleri

Betametazon antienflamatuar, antipruritik ve vazokonstriktif etkili topikal bir kortikosteroiddir. Alerjik durumların tedavisinde, alerjik cevapla ilgili mast hücreleri ve eozinofiller gibi bazı hücre tiplerinin alerjik cevaplarını azaltırlar. Antienflamatuar etkilerini lökositik asit hidrolazların salımını azaltarak, makrofajların enflamasyon yerinde birikmesini önleyerek, lökositlerin kapiller duvarına yapışmasını engelleyerek, kapiller membranın geçirgenliğini ve buna bağlı ödemi önleyerek, histamin ve kinin salımını inhibe ederek ve skar doku oluşumunu engelleyerek gösterirler. *Betametazon* güçlü glukokortikoid aktiviteye ve ihmal edilebilir mineralokortikoid aktiviteye sahiptir.

Kortikosteroid ayrıca enjekte edilebilir bir süspansiyon olarak da mevcuttur ve diğer durumlar arasında endokrin bozuklukları, gastrointestinal bozukluklar ve romatizmal bozukluklar dahil bir dizi enflamatuar hastalıklar için kullanılabilir.

Topikal bir kortikosteroidin gücünü belirleyebilen birkaç yapısal değişiklik vardır. Örneğin, spesifik karbonlarda bir halojen içeren veya esterler içeren kortikosteroidler, artmış lipofiliklik nedeniyle daha etkilidir. Bu nedenle betametazon dipropionat ve betametazon valerat içeren topikal ürünler arasında belirgin bir fark vardır. Betametazon dipropionat, gücünü artıran 2 ester içerirken, betametazon valeratın sadece bir esteri vardır ve daha az güçlüdür.

Betametazon dahil olmak üzere herhangi bir topikal kortikosteroidin Emilimi ve gücü, steroidin verildiği taşıyıcıya bağlıdır. Örneğin, betametazon dipropionat %0,05 merhem oldukça güçlü bir topikal steroid olarak sınıflandırılırken, betametazon dipropionat %0,05 krem veya losyon orta derecede güçlü olarak kabul edilir. Kortikosteroidler ağırlıklı olarak idrarda elimine edilir.

2.5.3. Betametazon içeren müstahzarlar

Betametazon içeren müstahzarlar, Çizelge 2.4.'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.4. *Betametazon* içeren müstahzarlar [8]

Müstahzar İsmi	Farmasötik Form	Betametazon Derişimi	Müstahzardaki Diğer Maddeler
Cales Enjeksiyonluk Süspansiyon	Enjektabl Preparat	<i>Betametazon</i> 3 mg/1 mL <i>Betametazon</i> Asetat 3,0 mg/1 mL	Sodyum fosfat dibazik anhidrat Sodyum hidrojen fosfat Disodyum EDTA Benzalkonyum klorür (%17)
Celestone Chronodose Süspansiyon	Enjektabl Preparat	<i>Betametazon</i> 3 mg/1 mL <i>Betametazon</i> Asetat 3,0 mg/1 mL	Sodyum dihidrojen fosfat dihidrat Disodyum hidrojen fosfat anhidr Disodyum edetat Benzalkonyum klorür Enjeksiyonluk su
Dipromed Süspansiyon	Enjektabl Preparat	<i>Betametazon</i> Dipropiyonat 6,43 mg (5,0 mg <i>Betametazona</i> Eşdeğer) <i>Betametazon</i> Sodyum Fosfat 2.63 mg (2,0 mg <i>Betametazona</i> Eşdeğer)	Disodyum EDTA Sodyum fosfat dibazik susuz Metil parahidroksi benzoat E218 Propil parahidroksi benzoat E216 Benzil alkol Sodyum karboksi metil selüloz Polietilen glikol 3350 Sodyum klorür Polisorbat 80 Hidroklorik asit konsantresi Enjeksiyonluk su.
Diprosan Enj	Enjektabl Preparat	<i>Betametazon</i> Dipropiyonat 6,43 mg (5,0 mg <i>Betametazona</i> eşdeğer) <i>Betametazon</i> Sodyum Fosfat 2.63 mg (2,0 mg <i>Betametazona</i> eşdeğer)	Sodyum fosfat dibazik susuz Sodyum klorür Disodyum edetat Polisorbat 80 Benzil alkol Metil paraben Propil paraben
Betnovate	Krem	%0,1 <i>Betametazon</i> Valerat	Klorokresol Setomakrogol Setostearil alkol Beyaz yumuşak parafin Sıvı parafin Sodyum asit fosfat Fosforik asit Sodyum hidroksit Saf su
Betnovate	Merhem	%0,1 <i>Betametazon</i> Valerat	Beyaz yumuşak parafin Sıvı parafin Setostearil alkol

Müstahzar İsmi	Farmasötik Form	Betametazon Derişimi	Müstahzardaki Diğer Maddeler
Betnovate Losyon	Losyon	%0,1 Betametazon Valerat	İzopropil alkol Metil P-Hidroksi benzoat Lambritol wax Dietilen glikol monostearat Setostearil asit Setomakrogol 1000 Sıvı parafin Gliserin Sitrik asit Sodyum hidroksit Distile su
Betnovat	Saç Losyonu	%0,1 Betametazon Valerat	İzopropil alkol Karbomer Sodyum hidroksit Saf su
Betnovat-C	Krem	%0,1 Betametazon (Valerat Esteri)	%3 a/a Kliokinol Klorokrezol Setomakrogol 1000 Setostearil alkol Beyaz yumuşak parafin Sıvı parafin Sodyum dihidrojen fosfat dihidrat Fosforik asit Sodyum hidroksit Saflaştırılmış su
Betnovat-C	Merhem	%0,1 Betametazon (Valerat Esteri)	%3 a/a Kliokinol Beyaz yumuşak parafin Sıvı parafin
Fucicort	Krem	Betametazon Valerat 1 mg/g	Fusidik asit 20 mg Klorokrezol Setostearil alkol
Fusix Dermacort	Krem	Betametazon Valerat 1 mg/g	Fusidik asit 20 mg Setstearil alkol Makrogol setostearil eter Klokresol Sodyum hidrojen fosfat dihidrat Sıvı parafin Beyaz yumuşak parafin Sodyum hidroksit Deiyonize su
Fucitec Plus	Krem	Betametazon Valerat 1 mg/g	Fusidik Asit 20 mg Setamakrogol Setostearil alkol Klorokrezol Sıvı parafin Sodyum dihidrojen fosfat Monohidrat Beyaz vazelin Sodyum hidroksit Saf su

Müstahzar İsmi	Farmasötik Form	Betametazon Derişimi	Müstahzardaki Diğer Maddeler
Stafine Cort	Krem	Betametazon Valerate 1 mg/g	20 mg Fusidik asite eşdeğer miktarda, 21,1266 mg fusidik asit Hemihidrat Sıvı parafin Vazelin flant Butil hidroksianizol (E320) Klorokrezol Setostearil alkol Gliserol Konsantre hidroklorik asit Polisorbat 60 Saf su
Tirecort	Krem	Betametazon Valerat 1 mg/g	20 mg Fusidik asit Makrogol setostearil eter 20 Setostearil alkol Beyaz yumuşak parafin Klorokrezol Bütıl hidroksi anisol (E320) Sıvı parafin Saf su Sodyum dihidroje dihidrat Sodyum hidroksit Hidroklorik asit
Celestone Chronodose	Ampül	3 mg Betametazon Asetat, 3,947 mg Betametazon Disodyum Fosfat	Disodyum fosfat (susuz) Monosodyum fosfat (monohidrat) Disodyum etilendiamin tetra asetat (dihidrat) Benzalkonyum klorür Enjeksiyonluk su
Belogent	Krem	Betametazon Dipropiyonat 0,5 mg/g	Klorokrezol Sodyum dihidrojen fosfat Monohidrat Fosforik asit Makrogol setilstearat eter Setil Stearil alkol Sıvı parafin Beyaz yumuşak parafin Sodyum hidroksit Saf su
Belogent	Merhem	Betametazon Dipropiyonat 0,5 mg/g	1 mg Gentamisin sülfat Sıvı parafin Beyaz yumuşak parafin
Betasalic	Losyon	Her 1 gram losyon dipropiyonat formunda 0,5 mg'a eşdeğer Betametazon	20 mg Salisilik asit Sodyum EDTA Hidroksipropil metil selüloz Sodyum hidroksit İzopropil alkol Saf Su

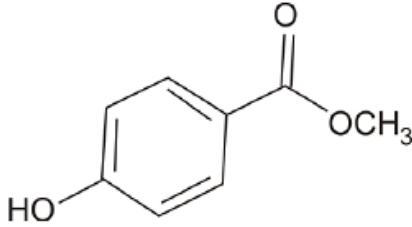
Müstahzar İsmi	Farmasötik Form	Betametazon Derişimi	Müstahzardaki Diğer Maddeler
Betasalic	Merhem	Her 1 gram losyon dipropiyonat formunda 0,5 mg'a eşdeğer <i>Betametazon</i>	30 mg Salisilik asit Sıvı parafin Beyaz yumuşak parafin
Dermabel	Krem	<i>Betametazon</i> (dipropiyonat) 0,5 mg/g	Klorokrezol Sodyum dihidrojen fosfat Monohidrat fosforik asit Makrogol setilstearat eter Setil stearyl alkol Sıvı parafin
Diprospan	Enjektabl Preparat	<i>Betametazon</i> Dipropiyonat: 6,43 mg (5,0 mg <i>Betametazon</i> Eşdeğer) <i>Betametazon</i> Sodyum Fosfat: 2.63 mg (2,0 mg <i>Betametazon</i> Eşdeğer)	Sodyum fosfat dibazik susuz Sodyum klorür Disodyum edetat Polisorbat 80 Benzil alkol Metil paraben Propil paraben Sodyum karboksi metil selüloz Poliyeten glikol Enjeksiyonluk su
Psorcutan Beta	Pomad	<i>Betametazon</i> Dipropiyonat 0,5 mg/g	0,05 mg kalsipotriol Sıvı parafin Polioksi propilen-15-stearil eter A-tokoferol Beyaz yumuşak parafin
Psocal Beta Merhem	Merhem	<i>Betametazon</i> Dipropiyonat 0,5 mg/g	0,05 mg kalsipotriol Sıvı parafin Polioksi propilen-11- stearil eter(butil hidroksitoluen (E321)) Vitamin E(a-tokoferol) Beyaz yumuşak parafin
Potrical-B Merhem	Merhem	<i>Betametazon</i> Dipropiyonat 0,5 mg/g	0,05 mg Kalsipotriole Sıvı parafin Polioksi propilen-15- stearil eter A-tokoferol Vazelin
Brumeton	Oftalmik damla	<i>Betametazon</i> 1 mg/mL Sülfasetamid Sodyum 100 mg/mL	Sodyum tiyosülfat Sodyum bisülfat Sodyum edetat Metil p-hidroksi benzoat propil p-hidroksi benzoat Etoksilenmiş lanolin esterleri Polisorbat 80

2.6. Metil Paraben

2.6.1. Metil Paraben'in kimyasal ve fiziksel özellikleri

Çizelge 2.5. Metil Paraben'in kimyasal ve fiziksel özellikleri [3]

Kimyasal Adı	Metil-4-hidroksibenzoat
Kapalı Formülü	$C_8H_8O_3$
Molekül Ağırlığı	152,15 g/mol
Erime Noktası	125-128°C
Çözünürlüğü	Etanol ve Eterde çözünür.
Rengi, formu	Beyaz Kristal toz
Saklama Koşulları	Oda sıcaklığında ve hava geçirmeyen kaplarda saklanmalıdır.



Şekil 2.3. Metil Paraben'in açık formülü

2.6.2. Metil Paraben'in farmakolojik özellikleri

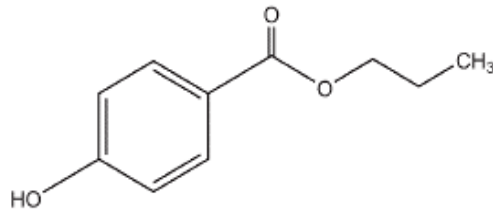
Metil Paraben kozmetik, gıda ürünleri ve farmasötik formülasyonlarda antimikrobiyal bir koruyucu olarak yaygın kullanılır. Tek başına, parabenlerle veya diğer antimikrobiyal ajanlarla kombinasyon halinde kullanılabilir. Kozmetikte, *metil paraben* en sık kullanılan antimikrobiyal koruyucudur. Parabenler geniş bir pH aralığında etkilidir ve maya ve küflere karşı en etkili olmalarına rağmen geniş bir antimikrobiyal aktivite spektrumuna sahiptir. Alkil parçasının zincir uzunluğu arttıkça antimikrobiyal aktivite artar, ancak suda çözünürlük azalır; bu nedenle etkili koruma sağlamak için sıklıkla bir paraben karışımı kullanılır. Parabenlerin zayıf çözünürlüğü nedeniyle, paraben tuzları (özellikle sodyum tuzu) formülasyonlarda daha sık kullanılmaktadır. *Metil paraben* (%0,18) ve *propil paraben* (%0,02) birlikte çeşitli parenteral farmasötik formülasyonların korunması için kullanılır [3].

2.7. Propil Paraben

2.7.1. Propil Paraben'in kimyasal ve fiziksel özellikleri

Çizelge 2.6. Propil Paraben'in kimyasal ve fiziksel özellikleri [3]

Kimyasal Adı	Propil 4-hidroksibenzoat
Kapalı Formülü	$C_{10}H_{12}O_3$
Molekül Ağırlığı	180,20 g/mol
Erime Noktası	96-99°C
Çözünürlüğü	Aseton, Eter, Etanolde çözünür.
Rengi, formu	Beyaz kristal toz
Saklanması	Oda sıcaklığında ve hava geçirilmeyen kaplarda saklanmalıdır.



Şekil 2.4. Propil Paraben'in açık formülü

2.7.2. Propil Paraben'in farmakolojik özellikleri

Propil paraben kozmetik, gıda ürünleri ve farmasötik formülasyonlarda antimikrobiyal bir koruyucu olarak yaygın olarak kullanılır. Zayıf çözünürlüğü nedeniyle, paraben tuzları (özellikle sodyum tuzu) formülasyonlarda daha sık kullanılmaktadır. Sentetik olarak üretilir. Birçok bitki ve böceklerde bulunan doğal bir madde olarak ortaya çıkar. Parabenlerin, gram pozitiflere karşı etkisi gram negatif organizmalara olan etkisinden daha fazladır. Pseudomonas'lara karşı zayıf etkilidir. Parabenlerin maya ve küflere karşı öldürme aktivitesi bakterilere göre daha fazladır. Sık sık diğer koruyucularla birlikte kullanılırlar.

Parabenler organik asit olup, organik asitlerin etkinliği ortamın pH'sına, asidin dissosiyasyon olmasına ve antimikrobiyal maddenin etkisine bağlıdır. Dissosiyasyon olmamış ve lipofilik olan organik asitler hücre membranlarından kolaylıkla geçtikleri için daha yüksek antimikrobiyal etkiye sahip oldukları ifade edilmektedir. Ortamın pH değeri arttığında özellikle gıda zehirlenmesi yapan ve bozunmaya neden olan bakterilerin yaşadığı pH 5,5-5,8'da pek çok

organik asit mikrobiyal inhibitör olarak etkin olamazken, parabenler nötral pH'da dissosiyeye olmadan kalmakta ve pH 7'ye kadar etkin bir inhibitör özellik göstermektedirler. Bu özelliklere ek olarak sahip oldukları yüksek pH değeri nedeniyle de bakteri, küf ve mayalara karşı etkilidirler. Bu nedenle parabenlerin pH 7 ve üzerindeki gıdalarda antimikrobiyal olarak kullanabilmeleri mümkün olmaktadır.

Propil parabenin metabolizması çalışılan bir araştırmada, propil parabenin insanlarda oral alımdan sonra hızla emildiği ve sistematik olarak dağıldığı bildirilmektedir. Ayrıca propil parabenin atılmadan önce büyük çoğunluğunun metabolize olduğu ve insan vücudunda serbest formunda nadiren bulunduğu tespit edilmiştir.

2.8. Oftalmik Preparatlar

Oftalmik çözeltiler topikal olarak göz mukozasına veya iç dokularına tatbik için kullanılırlar. Göz dokularının özel ve duyarlı yapıları nedeniyle oftalmik çözeltiler parenteral çözeltiler gibi hazırlanırlar. Göz damlaları ve banyoları içerisinde bulunacak mikro organizmalar ve özellikle *Bacillus Pyocyaneus*, *Pseudomonas* türleri, göz mukozasında ve yaralı gözde korneayı bozup enfeksiyonlar meydana getirirler. Bundan ötürü oftalmik çözeltiler steril çözeltilerdir.

Bakterisitler etkenlerle, kaplarla ve damlalıklarla geçimli ve gözde irritasyon yapmayan özellikte olmalıdırlar. Ameliyatlarda kullanılacak oftalmik çözeltilere koruyucu (bakterisid) madde konmaz. Bu çözeltiler tek dozlu kablarda ve sterilize edilmiş halde bulunmalıdırlar. Yabancı cisim ve korneal aşınmaları teşhis için kullanılacak (Fluorescein gibi) göz damlaları da steril ve tercihan tek dozlu kaplara konmuş olmalıdır. Bu iş tamponlar ile temin edilir. Göz yaşının pH'sı 7,4 dür ve hafif tamponlama özelliği vardır. Ancak oldukça asit karakterdeki Pilocarpin HCl, Adrenalin bitartarat vb. maddeleri karşılayamaz.

Oftalmik çözeltiler için en iyi pH 7,4 ise de bu pH'da bazı maddeler çözünmez, bazıları çöker, bazıları dayanıklı olmaz. Bu durumda yapılacak iş, çözeltiyi pH 7,4'e yakın fakat en stabil pH'da tutmaktır [9].

Gözyaşının kan ile aynı osmotik basınca sahip olduğu kabul edilir. Osmoz nedeniyle irritan bir etkinin meydana gelmememesi için, oftalmik çözeltinin izotonik veya hipertonik olması

istenir. Oftalmik çözeltilerin hazırlanmasında, etken maddeyi çözmek, terapötik etkiyi ve stabiliteyi arttırmak, ya da hasta gözde ağrı yapmasını önlemek gibi amaçlarla bu çözeltilere tamponlayıcı maddelerin de ilavesi çoğu zaman gerekli olmaktadır [10].

2.9. Analiz Yöntemleri

2.9.1. Sülfasetamid Sodyum

Sülfasetamid sodyum içeren çeşitli matrikslerde analiz yöntemleri Çizelge 2.7.'de özetlenmiştir.

Çizelge 2.7. *Sülfasetamid Sodyum* analiz yöntemleri

Numune	Diğer Maddeler	Yöntem	Koşullar	Çalışma Aralığı	LOD	Ref.
Standart	-	LC	Kolon: End-capped octadecylsilyl silica gel Mobil Faz: Glasiyel asetik asit, metanol, su (1:10:89 h/h) Dedektör: UV Dalga Boyu: 254 nm	-	-	[5]
Standart	-	LC	Kolon: End-capped octadecylsilyl silica gel Mobil Faz: Glasiyel asetik asit, metanol, su Dedektör: UV Dalga Boyu: 254 nm Akış Hızı: 0,8 mL/dak	-	-	[6]
Standart	-	LC	Kolon: 4,6-mm x 25 cm Mobil Faz: Su, asetonitril, glasiyel asetik asit (89:10:1 h/h) Dalga Boyu: 254 nm Akış Hızı: 1,5 mL/dak	-	-	[11]
Su	Sülfanilamid Sülfadiazin Sülfatiazol Sülfamerazin Sülfadimidin Sülfametoksipiridazin Sülfadoksin Sülfametoksazol Sülfisoksazol Sülfadimetoksin	UHPLC	Kolon: Hypersil Gold C ₁₈ Mobil Faz: %0,3(h/h) Formik asit, asetonitril Dedektör: DAD Dalga Boyu: 260-280 nm	25-1000 µg/mL	6,87 µg/mL	[12]
Oftalmik Süspansiyon	Prednizolon asetat	HPLC	Kolon: Zorbax ODS Mobil Faz: Metanol, su (80:20, h/h), pH: 5,0 Dedektör: UV Dalga Boyu: 254 nm	5,0–350,0 µg/mL	-	[13]

Numune	Diğer Maddeler	Yöntem	Koşullar	Çalışma Aralığı	LOD	Ref.
Su	Sülfadiazin Sülfamerazin Sülfametazin Sülfametoksipiridazin Sülfakloropiridazin Sülfametoksazol Sülfisoksazol	UHPLC	Kolon: Agilent Eclipse Plus C ₁₈ (1,8 µm, 2,1 × 50 mm) Mobil Faz: Metanol, %0,1 Formik asit çözeltisi (68:32 h/h) Dedektör: FLD Dalga Boyu: 405- 495 nm	0,05–5 µg/L	9,3 ng/L	[14]
Atık Su	Sülfadiazin Sülfatiazol Sülfametazin Sülfametoksipiridazin Sülfametoksazol	MEPS/LC	Kolon: C ₁₈ Chrom Sep (250 mm x 3,0 mm, i.d.) Mobil Faz: TFA çözeltisi, asetonitril, metanol (80:12:8 h/h) Dedektör: DAD Dalga Boyu: 269 nm	5-200 ng/mL	-	[15]
Hayvansal Gıda	Sülfadiazin Sülfatiazol Sülfametazin Sülfametoksazol	HPLC	Kolon: Eclipse-XDB- C ₁₈ (250 mm × 4,6 mm, 5 µm) Mobil Faz: Fosfat tamponu 30 mmol/L, metanol (pH:4,5), gradient Dedektör: DAD Dalga Boyu: 210 nm	-	-	[16]
Yumurta	Sülfadiazin Sülfatiazol Sülfametazin Sülfamethoksipiridazin Sülfametoksazol	HPLC	Kolon: C ₁₈ Chrom Sep HPLC (250 mm × 3,0 mm, i.d.) Mobil Faz: Asetonitril, metanol (60:40 h/h) Akış hızı: 1,0 mL/dak Dedektör: DAD Dalga Boyu: 269 nm	30-300 ng/g	-	[17]
Yumurta	Sülfatiazol Sülfamerazin Sülfametazin Sülfametoksipiridazin Sülfametizol Sülfakloropiridazin Sülfametoksazol Sülfadimetoksin Sülfakuinoksalin	LC-ESI- MS/MS	Kolon: C ₁₈ 150 × 4,6 mm, 5 µm Mobil Faz: Su, asetonitril(%0,1 formik asit), gradient Akış hızı: 1,0 mL/dak Dedektör: API 5000	-	-	[18]
Bal	Sülfaguanidin Sülfisomidin Sülfanilamid (I.S*) Sülfapridin Sülfatiazol Sülfametazin Sülfametizol Sülfamoksol Sülfamonometoksin Sülfameter Sülfakloropiridazin Sülfadoksin Sülfametoksazol Sülfadimetoksin	HPLC	Kolon: A Zorbax Extended C ₁₈ (12 mm × 4,6 mm; 5 µm) Mobil Faz: Asetonitril, asetat tampon (pH 4,50, 20 mM) (27:73 h/h) Akış hızı: 0,3 mL/dak Dalga Boyu: 405-495 nm	1-100 ng/g	0,3 ng/g	[19]

Numune	Diğer Maddeler	Yöntem	Koşullar	Çalışma Aralığı	LOD	Ref.
Süt	Sülfanilamid Sülfadiazin Sülfatiazol Sülfamerazin Sülfametizol	HPLC	Kolon: MerckLichrospher RP18 5 μ m 250 $\times$ 4 mm Mobil Faz: Formik Asit çözeltisi, asetonitril, metanol (80:3:17 h/h) Dedektör: Diod Array Dalga Boyu: 265 nm	50-500 μ g/kg	-	[20]

IS*: İnternal Standart

2.9.2. Betametazon

Betametazon içeren çeşitli matrislerde analiz yöntemleri Çizelge 2.8.'de özetlenmiştir.

Çizelge 2.8. *Betametazon* analiz yöntemleri

Numune	Diğer Maddeler	Yöntem	Koşullar	Çalışma Aralığı	LOD	Ref.
Standart	-	LC	Kolon: End-capped octadecylsilyl silica gel Mobil Faz: Asetonitril, su Akış Hızı: 2,5 mL/dak Dedektör: UV Dalga Boyu: 254 nm	-	-	[5]
Standart	-	LC	Kolon: End-capped octadecylsilyl silica gel ($l = 0,25$ m, $\varnothing = 4,6$ mm, 5 μ m) Mobil Faz: Asetonitril, su Akış Hızı: 2,5 mL/dak Dedektör: UV Dalga Boyu: 254 nm	-	-	[6]
Standart	-	LC	Kolon: 4,6-mm x 25 cm Mobil Faz: Su, asetonitril (63:37 h/h) Akış Hızı: 1,0 mL/dak Dalga Boyu: 240 nm	-	-	[11]
Farmasötik Krem	Kliokinol	LC	Kolon: Shim-Pack (150 mm x 4.6 mm i.d) CLC-cyanopropylbonded Mobil Faz: Metanol, 0,02 M Sodyum dihidrojen fosfat (55:45 h/h) (pH: 4,0) Akış hızı: 1 mL/dak Dedektör: SPD- 20A Uv detector Dalga Boyu: 240 nm	2-30 μ g/mL	0,46 μ g/mL	[21]
Farmasötik Krem, Jel ve Merhem	-	UHPLC	Kolon: (30 mm x 2 mm i.d., 2,2 μ m) Mobil Faz: Asetonitril, su (60:40 h/h) Akış hızı: 0,2 mL/dak Dedektör: DAD* Dalga Boyu: 254 nm	5-200 μ g/mL	-	[22]

Numune	Diğer Maddeler	Yöntem	Koşullar	Çalışma Aralığı	LOD	Ref.
Dermato Farmokinetik Çalışması	-	LC-MS	Kolon: Shim-pack VP-ODS C ₁₈ (150 × 2,0 mm, 5 µm) Mobil Faz: Asetonitril, %0,2 formik asit içeren 1 mM amonyum asetat tampon, gradient Akış hızı: 0,2 mL/dak Dedektör: MS	0,5-300 µg/mL	-	[23]
İnsan Plazması	-	UPLC-MS/MS	Kolon: Luna C ₁₈ (150 mm×2,0 mm, 5 µm) Mobil Faz: Metanol, su (20 mM amonyum asetat) (70:30 h/h) Dedektör: MS/MS	2,525.10 ⁻⁹ -403,9.10 ⁻⁹ mol/dm ³	-	[24]
Farmasötik Krem	Butenafin hidroklorür	HPLC	Kolon: C ₁₈ (250 x 4,6 mm id) Mobil Faz: Metanol ve su, gradient Akış hızı: 1,0 mL/dak Dedektör: DAD Dalga Boyu: 254 nm	2,5- 25 µg/mL	0,46 µg/mL	[25]
Farmasötik Şurup	Deksklorfeniramin maleat, Sodyum benzoat	HPLC	Kolon: C ₁₈ Mobil Faz: Asetonitril, 0,02 M fosfat tamponu ph: 2,7 (35:65 h/h) Akış hızı: 1,0 mL/dak Dedektör: UV Dalga Boyu: 254 nm	6,0-15,9 µg/mL	0,10 µg/mL	[26]
Farmasötik Topikal	Fusidik asit, Klotrimazol, Kalkipotriol monohidrat	HPLC	Kolon: C ₁₈ (4.6 × 250mm, 5 µm) Mobil Faz: Asetonitril, su (36:65 h/h) Akış hızı: 1 mL/dak Dedektör: UV Dalga Boyu: 230 nm	0,5-20 µg/mL	0,1449 µg/mL	[27]
Farmasötik Merhem	Kalkipotriol monohidrat	HPLC	Kolon: Onyx Monolithic C ₁₈ Mobil Faz: Metanol, su, asetik asit, gradient Akış hızı: 2 mL/dak Dedektör: UV Dalga Boyu: 264 nm	2-100 µg/mL	0,33 µg/mL	[28]
Farmasötik Tablet	Deksametason	UPLC-MS/MS	Kolon: BEH C ₁₈ (50 mm x 2,1 mm, 1,7 µm) Mobil Faz: Asetonitril, %0,1 (h/h) asetik asit çözeltisi Dalga Boyu: 451>361 m/z on MRM mode	10-1500 ng/mL	1,0 ng/mL	[29]

DAD*: Diyod Array Dedektör

2.9.3. Metil Paraben

İlaç matrislerinde *Metil paraben* içeren analiz yöntemleri Çizelge 2.9.'da özetlenmiştir.

Çizelge 2.9. *Metil Paraben* analiz yöntemleri

Numune	Diğer Maddeler	Yöntem	Koşullar	Çalışma Aralığı	LOD	Ref.
Farmasötik Dozaj Formu	Sertakonazol nitrat, Sorbik asit	HPLC-DAD	Kolon: Venusil XBP CN (4,6 × 250 mm, 5 µm) Mobil Faz: Fosfat tampon pH: 2,5 - asetonitril, gradient Akış hızı: 1,8 mL/dak Dedektör: DAD* Dalga Boyu: 225 nm	1-250 µg/mL	0,21 µg/mL	[30]
Oral ve Enjektabl Formülasyon	Propil paraben, Propil paraben sodyum	HPLC	Kolon: 5 µm SGE C ₁₈ HQ 105 (25 cm × 4,6 mm), Mobil Faz: Asetat tamponu pH:4,0, metanol (18:82 h/h) Akış hızı: 1 mL/dak Dedektör: UV Dalga Boyu: 254 nm	0,02-0,2 mg/mL	1,50 µg/mL	[31]
Oral ve Enjektabl Formülasyon	Propil paraben, Propil paraben sodyum	HPLC	Kolon: 5µm SGE C ₁₈ HQ 105 column (25 cm × 4.6 mm) Mobil Faz: Asetat tampon, asetonitril pH:4,0 (20:80 h/h) Akış hızı: 1,0 mL/dak Dedektör: UV Dalga Boyu: 254 nm	0,01-0,14 mg/mL	0,60 µg/mL	[315]
Şurup	Levodropropizin, Propil paraben	GC-MS	Kolon: Inertsil® C ₁₈ , (250 mm x 4,6mm, 5µm) Mobil Faz: Asetonitril, %0,1 trietilamin çözeltisi ph: 3,0 (50:50 h/h) Akış hızı: 1,0 mL/dak Dedektör: UV Dalga Boyu: 240 nm	1,625-13,0 µg/mL	0,071 µg/mL	[32]
Oral Pediatrik Süspansiyon	İbuprofen, impurite C, impurite A, Propil paraben, Sodyum benzoat	HPLC	Kolon: Eurospher II column (C ₁₈ 5 lm, 150 mm 9 4,6 mm) Mobil Faz: 100 mL %0,05 TFA içinde 5,0 g SDS, 6,6 g bütan-1-ol, 0,8 g n-heptandan Akış hızı: 1 mL/dak Dedektör: DAD Dalga Boyu: 254 nm	20-60 µg/mL	-	[33]

Numune	Diğer Maddeler	Yöntem	Koşullar	Çalışma Aralığı	LOD	Ref.
Şurup	Pizotifen, Propil paraben, Sintesis impurite A-B	HPLC	Kolon: Waters X-terra RP18 (250x 4,6mm i.d, 5 mm) Mobil Faz: Asetonitril, tetrahydrofuran, 0,1 M potasyum dihidrojen fosfat pH: 3,5 (4,59 mM heptan sulfonat) (38:1,5:62 h/h) Akış hızı: 1 mL/dak Dedektör: DAD Dalga Boyu: 220 nm	150- 350 µg/mL	-	[34]
Farmasötik Preperatlar	Etil paraben, Propil paraben, Butil paraben	TLC	RP-18WF254S (20 cmx 10 cm), Mobil Faz: Metanol Dedektör: UV Dalga Boyu: 254 nm	0,46-2,47 µg/spot	0,37 µg/mL	[35]
Şurup	Parasetamol, Pseudoefedrin, Triprolidin, Propil paraben, Sodyum benzoat, P-aminofenol, Triprolidin Z-izomeri, 4-hidroksi benzoik asit, 4-klorasetilid	HPLC	Kolon: C ₁₈ Mobil Faz: 2,6 mM heksansulfonik asit sodyum tuzu içeren 28 mM sodyum dihidrojen fosfat pH: 3,0 fosforik asit- asetonitril, gradient Dedektör: UV Dalga Boyu: 214 nm	0,1-20 µg/mL	-	[36]
Farmasötik Formülasyon	Deksametason, Klorfeniramin maleat, Propil paraben	HPLC	Kolon: C ₁₈ (5 µm particle size, 250 mm, 4,6 mm id) Mobil Faz: 0,1 M amonyum asetat tamponu, asetonitril pH: 3,0 (60:40 h/h) Akış hızı: 1 mL/dak Dalga Boyu: 220 nm	4-100 µg/mL	0,09 µg/mL	[37]
Oral Farmasötik Preparatlar	Granisetron hidroklorür, 1-metil-1H-indazol-3-karboksilik asit Sodyum benzoat, Propil paraben, 4-hidroksi benzoik asit	HPLC	Kolon: Symmetry Shield RP18 (100 × 4,6 mm id, 3,5 µm) Mobil Faz: 0,05 M Potasyum dihidrojen fosfat tamponu (pH: 3,0), fosforik asit (30:70 h/h) Akış hızı: 2 mL/dak Dalga Boyu: 240 nm	40-120 µg/mL	1,24 µg/mL	[38]
Merhem	Butil paraben	HPLC	Kolon: oktadesil silica (ODS) C ₁₈ (4,6 mm × 25 cm, 5 µm) Mobil Faz: Asetonitril, metanol, fosfat tamponu (10:40:50 h/h) Akış hızı: 1 mL/dak Dedektör: UV Dalga Boyu: 270 nm	100-500 µg/mL	0,87 µg/mL	[39]

Numune	Diğer Maddeler	Yöntem	Koşullar	Çalışma Aralığı	LOD	Ref.
Süspansiyon	Propil paraben, Loratadin	UPLC	Kolon: BEH- C ₁₈ (carbon 17,7 %) ve BEH-Shield RP18 (carbon 16,6 %) (100 x 2,1 mm, 1,7 µm) Mobil Faz: 0,01 M potasyum hidrojen fosfat, metanol-asetonitril (50:50 h/h) Akış hızı: 0,45mL/dak Dedektör: Diod array Dalga Boyu: 254 nm	8-16 µg/mL	0,07 µg/mL	[40]
Lubrikant Formülasyonu	P-hidroksi benzoik asit, 2-Fenoksietanol, Etil-p-hidroksi benzoat, Propil-p- hidroksi benzoat, İso-Butil-p- hidroksi benzoat, n-Butil-p- hidroksi benzoat	HPLC	Kolon: C ₁₈ ChromSpher polymeric octadecylsilane (ODS)-encapsulated spherical silica Mobil Faz: Asetonitril, tetrahidrofuran, su (22:14: 64 h/h) Akış hızı: 1,5 mL/dak Dedektör: UV Dalga Boyu: 258 nm	43,5-217,5 µg/mL	24,0 µg/mL	[41]
Kozmetik, Temizlik Ajanı ve İlaç	Metil isotiazolinon, Metil kloroisotiazolinon, Benzil alkol, Sodyum benzoat	UHPLC	Kolon: Chromolith fast gradient reversed-phase 18e Mobil Faz: Asetonitril, %0,1 formik asit, gradient Akış hızı: 0,7 mL/dak Dedektör: UV Dalga Boyu: 257 nm	0,25-10,0 µg/mL	0,06 µg/mL	[42]
Pedikulozis İlacı	Fenotrin, Propil-4 hidroksi benzoat	HPLC	Kolon: Lichrosorb C ₁₈ , 150mm x 4,6mm x 5 µm Mobil Faz: Metanol, su (80:20 h/h) Akış hızı: 1,0 mL/dak Dedektör: UV Dalga Boyu: 254 nm	0,08-0,64 mg/mL	0,03 mg/mL	[43]
Topikal Ürünler	Benzil alkol, Benzoik asit, Fenoksi etanol, Sorbik asit, Propil paraben, Etil paraben, Butil paraben	UPLC	Kolon: C ₁₈ (2,1mm x 100 mm, 1,7 µ) Mobil Faz: % 0,1 ortofosforik asit, metanol, asetonitril, gradient Akış hızı: 0,2 mL/dak Dedektör: PDA Dalga Boyu: 255 nm	-	-	[44]
Vajinal Jel	Metronidazol, Propil paraben	HPLC	Kolon: C ₁₈ (250 mm × 4,6 mm, 5 µm) Mobil Faz: Asetonitril, %0,3 fosforik asit çözeltisi (20:80 h/h) Akış hızı: 1,0 mL/dak Dedektör: UV Dalga Boyu: 260 nm	5-40 µg/mL	0,1 µg/mL	[46]

Numune	Diğer Maddeler	Yöntem	Koşullar	Çalışma Aralığı	LOD	Ref.
Atık Su	Diklofenak, Flufenamik asit, Ketoprofen, Naproksen, Bezafibrat, Fenofibrat, Gemfibrozil, Etil paraben, Propil paraben, Butil paraben, 4-Hidroksi benzofenon, Benzofenon 1, Benzofenon 3, Benzofenon 6, Benzofenon 8	UPLC-MS	Kolon: Acquity Uplc Beh C ₁₈ (1,7 µm; 2,1 × 50 mm) Mobil Faz: 13mM amonyum format tamponu (pH: 9,25 formik asit) ve metanol, gradient Akış hızı: 350 µL/dak Dedektör: Electrospray tandem mass spectrometry	13,0-800,0 ng/g	4,0 ng/g	[45]

*DAD: Diyod Array Dedektör

2.9.4. Propil Paraben

İlaç matrislerinde *Propil paraben* içeren analiz yöntemleri Çizelge 2.10.'da özetlenmiştir.

Çizelge 2.10. *Propil Paraben* analiz yöntemleri

Numune	Diğer Maddeler	Yöntem	Koşullar	Çalışma Aralığı	LOD	Ref.
Oral ve Enjeksiyonluk Preparatlar	Metil paraben, Metil paraben sodyum	HPLC	Kolon: 5µm SGE C ₁₈ HQ 105 (25 cm × 4,6 mm) Mobil Faz: Asetat tampon, asetonitril pH:4,0 (18:82 h/h) Akış hızı: 1,0 mL/dak Dedektör: UV Dalga Boyu: 254 nm	0,004-0,04 mg/mL	0,50 µg/mL	[31]
Oral ve Enjektabl Preparatlar	Metil paraben, Metil paraben sodyum	HPLC	Kolon: 5µm SGE C ₁₈ HQ 105 column (25 cm × 4,6 mm) Mobil Faz: Asetat tampon, asetonitril pH:4,0 (20:80 h/h) Akış hızı: 1,0 mL/dak Dedektör: UV Dalga Boyu: 254 nm	0,002-0,03 mg/mL	0,18 µg/mL	[31]
Şurup	Levodropropizin, Metil paraben	HPLC	Kolon: Inertsil C ₁₈ (250 mm x 4,6mm, 5µm) Mobil Faz: Asetonitril, % 0,1 trietilamin pH: 3,0 (50:50 h/h) Akış hızı: 1,0 mL/dak Dedektör: UV Dalga Boyu: 240 nm	0,25-2,0 µg/mL	0,04 µg/mL	[32]

Numune	Diğer Maddeler	Yöntem	Koşullar	Çalışma Aralığı	LOD	Ref.
Farmasötik Dozaj Formları	Para-hidroksi benzoat, Metil paraben, Etil paraben, Butil paraben	HPLC	Kolon: Waters Cortecs C ₁₈ (2,7 µm, 4,6 x 150 mm) Mobil Faz: Su, asetonitril, %0,1 ortofosforik asit (100:900:1 h/h) Akış hızı: 0,8 mL/dak Dedektör: UV Dalga Boyu: 254 nm	0,05-0,52 µg/mL	0,0259 µg/mL	[47]
Farmasötik Preparatlar	Metil paraben, Etil paraben, Butil paraben	HP-TLC	Mobil Faz: Metanol, su Akış hızı: 0,5 mL/dak Dedektör: UV Dalga Boyu: 254 nm	0,54-3,24 µg/spot	0,13 µg/spot	[48]
Oral Pediatrik Süspansiyon	İbuprofen, Impurite A, Impurite C, Sodyum benzoat, Metil paraben, Propil paraben,	HPLC	Kolon: Eurospher II C ₁₈ (150 mm x 4,6 mm i.d., 5 µm) Mobil Faz: 3,3 g SDS, 6,6 g butan-1-ol, 0,8 g n-heptan 100 mL % 0,05 TFA'da. Akış hızı: 1 mL/dak Dedektör: DAD Dalga Boyu: 254 nm	10-30 µg/mL	-	[33]
Şurup	Pizotifen, Metil paraben, Sentez impuritesi A ve B pizotifen	HPLC	Kolon: Waters X-terra RP18 (250x 4,6mm i.d, 5 µm) Mobil Faz: Asetonitril, tetrahidrofur, 0,1 M potasyum dihidrojen fosfat pH: 3,5 (4,59 mM heptan sulfonat) (38:1,5:62 h/h) Akış hızı: 1 mL/dak Dedektör: DAD Dalga Boyu: 220 nm	45-105 µg/mL	-	[34]
Şurup	Parasetamol Psedoefedrin, Triprolidin, Metil paraben, Sodyum benzoat, P-aminofenol, Triprolidin Z-izomeri, 4-hidroksi benzoik asit, 4-klorasetailid	HPLC	Kolon: C ₁₈ Mobil Faz: 2,6 mM heksansulfonik asit sodyum tuzu içeren 28 mM sodyum dihidrojen fosfat pH: 3,0, gradient Dedektör: UV Dalga Boyu: 214 nm	0,1-10 µg/mL	0,03 µg/mL	[36]
Farmasötik Formülasyon	Deksametason, Klorfeniramin maleat, Metil paraben	HPLC	Kolon: C ₁₈ (5 µm, 250 mm, 4,6 mm id) Mobil Faz: 0,1 M amonyum asetat tamponu, asetonitril pH: 3,0 (60:40 h/h) Akış hızı: 1 mL/dak Dalga Boyu: 220 nm	7-50 µg/mL	0,85 µg/mL	[37]

Numune	Diğer Maddeler	Yöntem	Koşullar	Çalışma Aralığı	LOD	Ref.
Oral Farmasötik Preparat	Granisetron hidroklorür, 1-metil-1H-indazol-3-karboksilik asit, Sodyum benzoat, Metil paraben, 4-hidroksi benzoik asit	HPLC	Kolon: Symmetry Shield RP18 (100 × 4,6 mm id, 3,5 µm) Mobil Faz: 0,05 M Potasyum dihidrojen fosfat tamponu (pH: 3,0), fosforik asit (30:70 h/h) Akış hızı: 2 mL/dak Dalga Boyu: 240 nm	10-30 µg/mL	0,671 µg/mL	[38]
Pedikulozis İlacı	Fenotrin, Metil-4- hidroksi benzoat	HPLC	Kolon: Lichrosorb C ₁₈ , 150mm x 4,6mm and 5 µm Mobil Faz: Metanol, su (80:20 h/h) Akış hızı: 1,0 mL/dak Dedektör: UV Dalga Boyu: 254 nm	0,05-0,40 mg/mL	0,02 mg/mL	[43]
Lubrikant Formülasyonu	P-hidroksi benzoik asit, 2-Fenoksietanol, Etil-p-hidroksi benzoat, Propil-p-hidroksi benzoat, İso-Butil-p-hidroksi benzoate, n-Butil-p-hidroksi benzoat	HPLC	Kolon: C ₁₈ Chrom Spher polymeric oktadesil silane (ODS) enkapsulat sferikal silika Mobil Faz: Asetonitril, tetrahidrofuran, su (22:14: 64 h/h) Akış hızı: 1,5 mL/dak Dedektör: UV Dalga Boyu: 258 nm	5,4-27,0 µg/mL	3,5 µg/mL	[41]
Topikal Ürünler	Benzil alkol, Benzoik asit, Fenoksi etanol, Sorbik asit, Propil paraben, Etil paraben, Butil paraben	UPLC	Kolon: C ₁₈ (2,1mm x 100 mm, 1,7µ) Mobil Faz: % 0,1 ortofosforik asit, metanol, asetonitril, gradient Akış hızı: 0,2 mL/dak Dedektör: DAD Dalga Boyu: 255 nm	-	-	[44]
Atık Su	Diklofenak, Flufenamik asit, Ketoprofen, Naproksen, Bezafibrat, Fenofibrat, Gemfibrozil, Etil paraben, Metil paraben, Butil paraben, 4-Hidroksi benzofenon, Benzofenon 1, Benzofenon 3, Benzofenon 6, Benzofenon 8	UPLC-MS	Kolon: Acquity Uplc Beh C ₁₈ (1,7 µm; 2,1 × 50 mm) Mobil Faz: 13mM amonyum format tamponu (pH: 9,25 formik asit), metanol, gradient Akış hızı: 350 µL/dak Dedektör: Electrospray tandem mass spectrometry	5,0-480,0 ng/g	2,0 ng/g	[45]

Numune	Diğer Maddeler	Yöntem	Koşullar	Çalışma Aralığı	LOD	Ref.
Diş Jeli	Kolin salisilat, Lidokain hidroklorür, Metil paraben	HPLC	Kolon: ACE C ₁₈ (250 × 4,6 mm, 5 µm) Mobil Faz: Asetonitril, fosfat tamponu pH: 3,0, gradient Akış hızı: 1,0 mL/dak Dedektör: DAD Dalga Boyu: 260 nm	4,0-6,0 µg/mL	0,09 µg/mL	[49]
Vajinal Jel	Metronidazol, Metil paraben	HPLC	Kolon: C ₁₈ (250 mm × 4,6 mm, 5 µm) Mobil Faz: Asetonitril ve %0,3 fosforik asit çözeltisi (20:80 h/h) Akış hızı: 1,0 mL/dak Dedektör: UV Dalga Boyu: 260 nm	2,5-20 µg/mL	0,05 µg/mL	[46]

2.10. UV Spektrofotometrisi

Elektromanyetik spektrumun 100-200 nm dalga boyları arası vakum ultraviyole olarak, 200-380 nm dalga boyları arası ise ultraviyole olarak adlandırılır. Bir molekülün total enerjisi, elektronik, titreşimsel ve dönme enerjileri toplamıdır. Bu durum, $E_{Total}=E_{Elektronik}+E_{Titreşim}+E_{Dönme}$ şeklinde ifade edilir.

Bir molekül, E_0 olarak belirtilen temel enerjisi seviyesinde UV ışığını absorbladıktan sonra E_1 olarak belirtilen bir üst enerji seviyesine yani uyarılmış değerine yükselir. İki enerji seviyesi arasındaki enerji farkı ($E_1-E_0=\Delta E$) absorplanan enerjiyi verir.

Elektronik enerji seviyeleri arasında geçişe neden olan bu enerji farkı ile ışığın hızı (c), dalga boyu(λ) ve frekansı(ν) arasında şu ilişki vardır:

$$E=h\nu= hc/\lambda \quad (Eş. 2.1)$$

Enerji farkı ile absorplanan ışığın dalga boyu arasında ters bir orantı vardır, enerji farkı ne kadar küçükse, dalga boyu o kadar büyüktür. Molekül tarafından absorblanan ultraviyole ışınlar, bağ elektronlarının elektronik enerji seviyelerini etkiler ve moleküler orbitaldeki elektronların daha yüksek enerjili orbitallere sıçramasına neden olur.

UV-Vis bölgedeki ışınların moleküller tarafından absorplanması ile elektronik enerji seviyelerindeki pek çok geçişin yanı sıra, titreşim ve dönme enerji seviyelerinde de geçişler olur. Her geçişe karşı farklı bir dalga boyu absorplanır. Bu dalga boylarının yan yana dizilmesiyle ortaya çıkan molekülün absorpsiyon spektrumu bir bant spektrumudur.

Absorpsiyonun şiddeti ise elektronların uyarılmış duruma geçebilme olasılıklarına ve ayrıca bu uyarılmış durumun polarlığına bağlıdır. Elektronik geçişin dipol momentinde neden olduğu değişim ne kadar büyük ise absorpsiyon şiddeti o kadar büyük olur. Absorplanan ışığın miktarı absorbans olarak ölçülür. Absorbans molekülün yapısına, ışığın dalga boyuna, ışığın çözelti içinde aldığı yolun uzunluğuna ve çözelti derişimine bağlıdır. Bu durum, Lambert-Beer Kanunu olarak aşağıdaki gibi ifade edilir [52].

$$A = \epsilon \cdot l \cdot C \quad (\text{Eş. 2.2})$$

A: Absorbans, ϵ : Çözünen maddeye ve dalga boyuna bağlı molar absorptivite katsayısı (L/mol.cm), l: Işığın çözelti içinde aldığı yol (cm), C: Derişim (mol/L)

l sabit tutulduğunda, a, ϵ ve l'yi içeren orantı katsayısı olmak üzere Lambert-Beer ifadesi şu şekilde yazılabilir:

$$A = a \cdot C \quad (\text{Eş. 2.3})$$

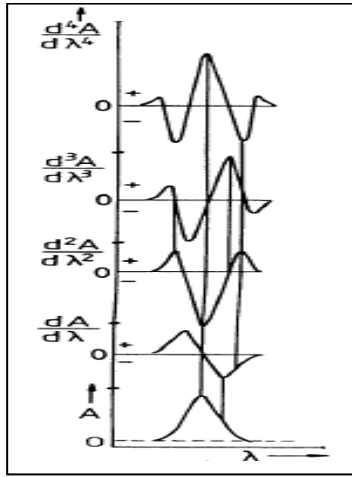
Absorbans, çözelti derişimi ile orantılı olup absorbansın derişimle değişimini veren grafik, orijinden geçen ve eğimi a'ya eşit olan bir doğru şeklindedir. Bilinen artan derişimlerdeki çözeltilerin absorbansları ölçülüp, derişim absorbans grafiği çizerek bir kalibrasyon doğrusu elde edilir. Bilinmeyen derişimdeki maddenin aynı şartlarda absorbansı okunarak kalibrasyon doğrusu yardımıyla derişimi bulunabilir.

Kolorimetrik analiz, bir renk reaktifinin yardımıyla bir çözeltideki bileşiğin derişimini belirleme yöntemidir. Hem organik bileşiklere hem de inorganik bileşiklere uygulanabilir.

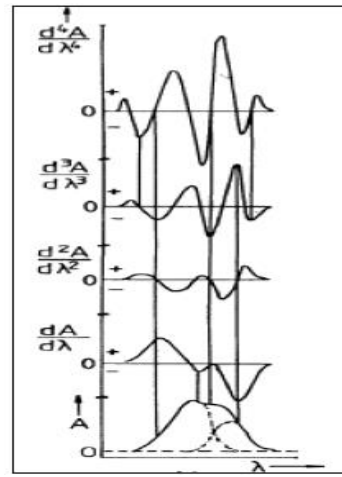
2.10.1. UV Türev spektrofotometrisi

UV spektrofotometrisi, ilaç analizlerinde kullanım kolaylığı ve düşük maliyeti nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak, aynı dalga boyu aralığında spesifik pikleri olan

maddelerin karışımları UV-Vis spektroskopisi ile analiz edildiğinde spektral girişim nedeniyle analizin güçleştiği bilinmektedir. Bu soruna UV türev spektroskopisi yöntemi bir çözüm olabilmektedir. Türev yönteminde, x bağımsız, y bağımlı değişken olmak üzere, bir fonksiyonun herhangi bir noktasındaki türevi dx/dy 'dir. Absorpsiyon spektrumları söz konusu olduğunda türev $dA/d\lambda$ olacaktır. Spektrumun her bir noktasındaki türev değerleri hesaplanıp dalga boyunun bir fonksiyonu olarak grafiğe geçirildiğinde 1. Türev absorpsiyon spektrumu elde edilir. Buna benzer şekilde 2., 3.,...n türev spektrumları sırasıyla $d^2A/d\lambda^2$, $d^3A/d\lambda^3$, $d^nA/d\lambda^n$ değerleri ile dalga boyları arasında oluşturulabilir. Orginal spektrumla karşılaştırıldığında türev derecesi arttıkça piklerin keskinleşmesi ve daralmasıyla rezolüsyon artmaktadır. Böylece spektral olarak birbirine girişim yapan piklerin ayrımı sağlanmaktadır.



Şekil 2.5. Basit bir Gauss pikinin 1-4. türev spektrumları [50]



Şekil 2.6. Örtüşen iki Gauss pikinin 1-4. türev spektrumları [50]

UV Türev Spektrofotometrisi Yönteminin Avantajları

- UV Türev Spektroskopisi yöntemi, seçicilik sağlar.
- Küçük dalga boyu aralığında bile, iki veya daha fazla örtüşen pik varlığında absorbands bantları tanımlanabilir.
- Güçlü ve keskin absorbands piklerinin varlığında zayıf ve küçük absorbands pikleri tanımlanabilir.
- Geniş absorbands spektrumu, maksimum spektrumda belirli dalga boyu hakkında net bir fikir verir.
- Zemin Sinyali varlığında bile, kantitatif analiz, türev değerleri ve konsantrasyon seviyeleri arasında doğrusal bir ilişki olduğu için yapılabilir [52].

UV Türev Spektrofotometrisi Yönteminin Dezavantajları

Bir temel spektrumdaki küçük değişiklikler türev spektrumunu güçlü bir şekilde değiştirebilir. Sıfır mertebe spektrumları için farklı spektrofotometreler kullanıldığında sonuçları benzer şekilde değiştirebilir, ancak bunların türevlendirilmesi farklı görünebilir. Bunun sonucunda da zayıf tekrarlanabilirlik elde edilir [53].

2.11. Kromatografi

Kromatografi, kompleks karışımlarda bulunan bileşenleri ayırmak için kullanılan bir yöntemdir. Tüm kromatografik ayırmalarda numune, gaz veya sıvı (ya da süperkritik bir akışkan) olan bir mobil faz ile taşınır. Bu mobil faz, bir kolonda veya bir katı yüzeyde sabitleştirilmiş (ve kendisiyle karışmayan) bir sabit faz içinden geçmeye zorlanır. Sabit ve mobil fazlar, numune bileşenlerinin bu fazlarda farklı oranlarda dağılacağı şekilde seçilir. Kromatografik ayırma sırasında sabit faz tarafından kuvvetle tutunan numune bileşenleri, mobil fazın akışıyla çok yavaş hareket ederler. Buna karşılık, sabit faz tarafından zayıfça tutunan bileşenler, hızlı hareket ederler. Bu hareket hızlarının farklılığı sonucu, numune bileşenleri kalitatif ve/veya kantitatif olarak analiz edilebilen farklı bantlar ve bölgeler şeklinde ayrılırlar.

Kromatografik yöntemler için çeşitli sınıflandırmalar yapılmıştır. Bu sınıflandırmalardan birinde mobil ve sabit fazların fiziksel olarak nasıl temas ettirildikleri esas alınır. Kolon kromatografide sabit faz ince bir kolonda tutulur ve mobil faz yer çekimi veya basınç etkisiyle bu kolondan geçirilir. Düzlemsel kromatografide ise, sabit faz düz bir yüzeyde veya bir kağıdın gözenekleri arasında tutulur. Bu durumda mobil faz, sabit faz üzerinde kılcal etki veya yerçekimi etkisi ile hareket eder.

Kromatografinin daha temel bir sınıflandırması, kullanılan sabit ve mobil fazların tipleri ve fazlar arasında madde aktarımını sağlayan dengelere göre yapılır: Sıvı kromatografi, gaz kromatografi ve süperkritik akışkanlı kromatografi.

2.11.1. Kromatografinin sınıflandırılması

Kromatografik analizler üç ana başlık altında sınıflandırılabilir. Bunlar.

- Ayrılma mekanizmalarına göre;
Adsorpsiyon kromatografi, Dağılma (partisyon) kromatografi, İyon değiştirme kromatografi, Jel filtrasyon (moleküler eleme) kromatografi, İyon çifti kromatografi, Afinite kromatografi
- Mobil faz tipine göre;
Sıvı kromatografi, Gaz kromatografi
- Uygulama biçimine göre;
Kolon kromatografi, Düzlemsel kromatografi

Adsorpsiyon kromatografi

Katı veya sıvı moleküllerin, sıvı veya gaz moleküllerini çekim kuvvetleri yardımıyla yüzeyde tutmasına adsorpsiyon denir. Katı bir madde ile bileşik arasındaki adsorpsiyon, bileşiğin katı faz ile zayıf Van der Waals, elektrostatik çekimler ve Dipol-Dipol etkileşimlerine dayanır ve tersinirdir. Sabit faz aktif yüzeyli bir katıdır, yüzey enerjilerini azaltmak için çevrelerindeki maddeleri kendilerine doğru çekerler ve yüzeylerinde tutarlar. Adsorpsiyon kromatografisinde karışımdaki bileşenlerin ayrılması, sabit katı fazın tutucu kuvvetiyle, mobil fazın itici kuvveti arasındaki yarışa bağlıdır. Sabit faz yüzeyine az tutunan bileşen, mobil fazla daha çok etkileşeceğinden kolonu daha önce terk ederken, sabit faz ile daha çok etkileşen bileşik katı yüzeyine daha kuvvetli tutunarak kolonu daha geç terk eder.

Adsorpsiyon kromatografi, polarlıkları farklı bileşenlerden oluşan karışımların ayrılmasında iyi sonuç verir. Polar sabit faz olarak en çok alümina ve silikajel, mobil faz olarak apolar veya çok az polar olan benzen, oktan, kloroform gibi sıvılar kullanılır. Sabit ve mobil fazın seçimi, ayırımı yapılacak bileşiklerin polaritesine, kimyasal özelliklerine bağlı olarak yapılır. Genelde polar maddeler için polar çözücüler apolar maddeler için apolar çözücüler kullanılır. Sabit fazın, ayrılması istenen maddeleri parçalamaması, kimyasal reaksiyon vermemesi, adsorpsiyon kapasitesinin yüksek olması ve adsorpladıkları maddeleri kolaylıkla geri bırakması gerekir. Kromatografik analizlerde sabit fazın polaritesi mobil fazın polaritesinden daha büyük olduğunda ‘normal faz kromatografi’, mobil fazın polaritesi daha büyük olduğunda ise ‘ters faz kromatografi’ olarak isimlendirilir.

Dağılma (partisyon) kromatografisi

Dağılma kromatografisinde, maddeler sıvı olan sabit faz ile sıvı veya gaz olan mobil faz arasında dağılır. Dağılma kromatografisinde destek, sıvı sabit fazın adsorplandığı katı bir materyaldir. Birbiriyle karışmayan iki sıvıdan, yani iki fazdan oluşan bir faz sistemi içine konulan madde bu sıvılardaki çözünürlüğüne bağlı olarak iki faz arasında dağılır ve dengeye ulaşır. Böyle bir sistemde maddelerin dağılması sabittir ve dağılma katsayısı (K_d) ile ifade edilir. K_d değerleri birbirinden farklı olan maddeler kromatografik sistem içerisinde farklı hızlarda ilerleyerek birbirlerinden ayrılırlar.

$$K_d = C_s / C_m$$

C_s : Maddenin sabit fazdaki derişimi

C_m : Maddenin mobil fazdaki derişimi

İyon değiştirme kromatografisi

Genellikle iyonik materyalleri birbirinden ayırma yöntemlerinden biri olan iyon değiştirme kromatografisi biyomolekülleri, onların anyonik ve katyonik yük farkına dayanarak ayırır. Bu kromatografisi, bir katı maddenin yapısında bulunan iyonların, içinde bulunduğu çözeltideki aynı özellikte yüke sahip diğer iyonlarla bir dengeye göre değiştirmesi özelliğine dayanır. Bu amaçla kullanılan katı maddelere iyon değiştiriciler denir. İyon değiştirme kromatografisi, kullanılan iyon değiştiricinin anyon veya katyon değiştirmesine göre anyon değiştirme kromatografisi veya katyon değiştirme kromatografisi olarak adlandırılır.

İyon değiştiriciler inorganik ($\text{Na}_2\text{Al}_2\text{Si}_4\text{O}_{12}$, Na_2P , kil, zeolit) ve organik olmak üzere ikiye ayrılır. Bunlar katyonik, anyonik veya amfoter reçineler olabilir. İyon değiştirme kromatografisi analit iyonlarının, ters yüklü destek katının iyonlarına olan ilgisine dayalı bir ayırmadır. Sabit faz zayıf ya da kuvvetli katyon ya da anyon değiştirici bir reçinedir. Reçinenin sabit yükü (+) ise buna ‘katyon değiştirici reçine’, (-) ise ‘anyon değiştirici reçine’adı verilir. Ayırma sırasında reçinenin tamamen iyonlaşmış durumda olması gerekmektedir. Mobil faz genellikle tamponlanmış, istenen iyonların oluşmasını sağlayan belli bir pH değerinde ve yükü katının sabit yükünün zıt iyonunu içeren sulu çözeltidir. Yüğü, mobil fazın zıt iyonları ile aynı olan iyonik yapıdaki örnek bileşenleri katıya bağlanmak için zıt iyonlarla yarışır. Zıt iyonu yerinden ederek katıya kuvvetle bağlanan

uygun yükte bileşenler kolonda uzun süre kalırken, katıya zayıf bağlanan, uygun yükte olmayan veya yüksüz olan bileşenler kolonu daha hızlı terk eder. Mobil fazın derişimi ve pH'sı ile kompleks oluşturuu etki, iyon değiştirmeyi etkileyen başlıca faktörlerdir.

Jel filtrasyon (moleküler eleme) kromatografi

Karışımındaki makromoleküllerin molekül büyüklüklerine göre ayrılması esasına dayanır. Sabit faz ve mobil faz aynı yapı ve bileşimdedir. Sabit faz destek görevi yapan, kimyasal olarak inert bir jel ya da gözenekli bir organik bileşiktir. Mobil faz sabit fazdaki gözenekleri doldurur. En içteki gözeneklere ulaşabilen küçük moleküllü bileşenler kolonda uzun süre kalırken, büyük moleküller daha kısa sürede kolonu terk ederler. Değişik türde sabit fazlar kullanılarak aynı anda farklı büyüklükteki moleküller birbirinden ayrılabilir. Sabit faz olarak hidrofilik ya da hidrofobik jeller kullanılır. Hidrofilik jeller, sulu ortamda şişerek sulu çözeltiler ile kullanılırken (jel filtrasyon kromatografi), hidrofobik jellerden organik çözücülerde çözünebilen polimerlerin ayrılmasında yararlanılır (jel permasyon kromatografi).

İyon çifti kromatografi

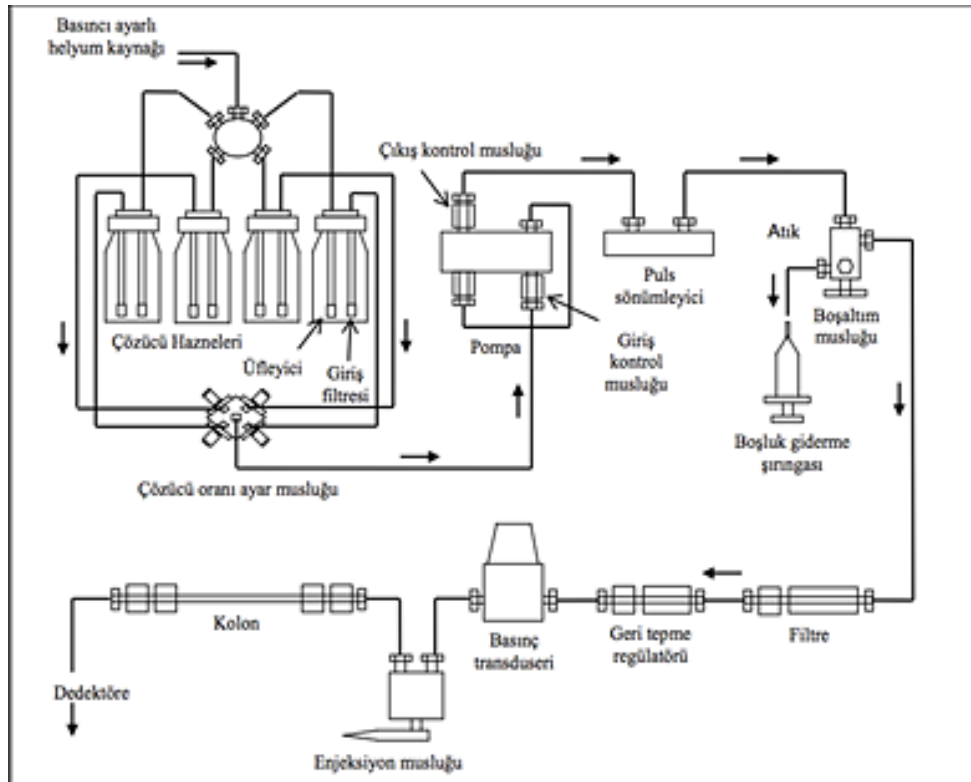
Özellikle iyonlaşabilen asidik veya bazik maddelerin ayrılmasında kullanılan iyon çifti kromatografi, mobil faza ilave edilen iyon çifti reaktifin sabit faz tarafından adsorplanması ve iyonize olmuş maddelerin bu iyon çiftleri ile iyonik etkileşime girerek birbirinden ayrılması esasına dayanır.

Afinite kromatografi

Matriks adı verilen katı bir destek materyaline ligandın kovalent olarak immobilize edilmesi işlemine dayanan bir tür adsorbsiyon kromatografisidir. Afinite kolonundan saflaştırılması istenilen molekülü içeren bir karışım geçirilirse sadece istenen molekül, ligand tarafından tutulur, safsızlıklar kolondan uygun bir tamponla ayrılır. Kolonda tutulan molekül spesifik çözeltilerle kolondan elue edilir. Antijen - antikor, enzim - substrat, reseptör - ilaç gibi oldukça seçici etkileşimlere dayanan bir kromatografi türüdür.

2.11.2. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC)

Kromatografi, kompleks karışımlarda bulunan bileşenleri ayırmak için kullanılan bir yöntemdir. Tüm kromatografik ayırmalarda numune, gaz veya sıvı (ya da süperkritik bir akışkan) olan bir mobil faz ile taşınır. Bu mobil faz, bir kolonda veya bir katı yüzeyde sabitleştirilmiş (ve kendisiyle karışmayan) bir sabit faz içinden geçmeye zorlanır. Sabit ve mobil fazlar, numune bileşenlerinin bu fazlarda farklı oranlarda dağılacağı şekilde seçilir. Kromatografik ayırma sırasında sabit faz tarafından kuvvetle tutunan numune bileşenleri, mobil fazın akışıyla çok yavaş hareket ederler. Buna karşılık, sabit faz tarafından zayıfça tutunan bileşenler, hızlı hareket ederler. Bu hareket hızlarının farklılığı sonucu, numune bileşenleri kalitatif ve/veya kantitatif olarak analiz edilebilen farklı bantlar ve bölgeler şeklinde ayrılırlar. HPLC cihazı; dedektör, pompa, kolon, degazör ve örnekleyici olmak üzere beş kısımdan oluşmaktadır. Şekil 2.7’de bir HPLC cihazı şematik gösterimi verilmiştir.



Şekil 2.7. HPLC cihazının şematik gösterimi

Ters faz sıvı dağılma kromatografisi

Sabit fazın mobil faza kıyasla daha az polar olduğu kromatografik ayırma tekniği ters faz kromatografidir. Ters faz kromatografide çekim kuvvetleri genellikle hidrofobik etkileşimlerdir. Ayırma işlemi maddelerin, daha az polar sabit faz ve polar mobil faz arasındaki dağılma katsayılarına bağlı olarak gerçekleşir. Sabit faz olarak en çok, silica yüzeyine C₁₈ (oktadesil) gruplarının bağlandığı sistemler tercih edilir. Numune içerisindeki apolar bileşenler, hidrofobik yapıdaki C₁₈ gruplarıyla daha kuvvetli etkileştiklerinden sabit fazda daha uzun süre tutunurlar. Bu sebeple kolonu ilk olarak polar bileşenler terk eder [54].

Çizelge 2.11. Ters-faz sıvı kromatografisi sabit faz dolgu materyalleri

Materyal	Kimyasal Adı	Kısaltması
Oktil	Si-(CH ₂)-CH ₃	C ₈
Oktadesil	Si-(CH ₂) ₁₇ -CH ₃	C ₁₈
Fenil	Si-(CH ₂) ₃ -C ₆ H ₅	C ₆ H ₅
Siyanopropil	Si-(CH ₂) ₃ -CN	CN
Aminopropil	Si-(CH ₂) ₃ -NH ₂	NH
Diol	Si-(CH ₂) ₃ -OCH(OH)-CH ₂ -OH	-
Pentafloro fenil	Si-(CH ₂)-CH	PFP

Normal faz sıvı dağılma kromatografisi

Normal faz sıvı dağılma kromatografisinde sabit faz nispeten polar, mobil faz apolardır. Sabit faz olarak genellikle silika veya alümina kullanılırken mobil faz olarak ise düşük polariteli hekzan, metilen klorür, metil butil eter, kloroform ve bunların karışımları kullanılmaktadır. Silika üzerine farklı polaritelerdeki -CN, -NO₂ ve -NH₂ gibi gruplar bağlanarak, farklı sabit fazlar elde edilebilir. Normal faz sıvı kromatografisi ile polarlığı en az olan madde kolondan en önce sürüklenir.

Çizelge 2.12. Normal faz ve ters faz sıvı kromatografisinin karşılaştırılması

İncelenen Özellik	Ters Faz	Normal Faz
Sabit Faz Polaritesi	Düşük	Yüksek
Mobil Faz Polaritesi	Ortadan yükseğe	Düşükten ortaya
Kolonu terk etme sırası	En polar önce	En az polar önce
Mobil fazın polarite artış etkisi	Elüsyon zamanını artırır	Elüsyon zamanını azaltır.

2.11.3. HPLC’de Temel Parametreler

Teorik tabaka sayısı (N)

Kolonda tabakaların olduğu varsayılır ve bunlar teorik tabaka olarak adlandırılır. Teorik tabaka sayısı ‘N’ kolon verimliliğinin göstergesidir [55].

Kapasite faktörü (k')

Analitin alıkonma zamanı ve ölü zaman ile hesaplanır. k': 1-5 arasında olmalıdır [55].

Seçicilik faktörü (α)

İki pikin kapasite faktörlerini birbirine oranıdır. İyi bir ayırım için $\alpha < 1$ olması gerekir [55].

Rezölüsyon

Rezölüsyon, art arda gelen iki pikin birbirinden ayrılma derecesini gösterir. $R > 1,5$ olmalıdır [55].

Çizelge 2.13. USP'ye göre sistem uygunluk testleri hesaplama eşitlikleri

Teorik tabaka sayısı	$N = 16 \times \left(\frac{t_R}{W} \right)^2$	N: teorik tabaka sayısı t_R : alıkonma zamanı W: pik genişliği
Kuyruklanma faktörü	$T = \frac{W_{0.05}}{2 \times \alpha_{0.05}}$	T: kuyruklanma faktörü $W_{0.05}$: pikin %5 yüksekliğindeki pik genişliği $\alpha_{0.05}$: pikin %5 yüksekliğindeki ilk yarısının genişliği
Simetri faktörü	$As = \frac{\beta_{0.10}}{\alpha_{0.10}}$	As: asimetri faktörü $\beta_{0.10}$: pikin %10 yüksekliğindeki ikinci yarısının genişliği $\alpha_{0.10}$: pikin %10 yüksekliğindeki ilk yarısının genişliği
Rezölüsyon (Ayrım gücü)	$Rs = 2 \times \frac{t_R - t_{Rp}}{W + W_p}$	R: ayırım gücü t_R : alıkonma zamanı t_{Rp} : önceki pikin alıkonma zamanı W: pik genişliği W_p : önceki pikin pik genişliği
Kapasite faktörü	$k' = \frac{t}{t_0} - 1$	k' : kapasite faktörü t: alıkonma zamanı t_0 : ölü zaman
Bağıl alıkonma zamanı	$\frac{k'_2}{k'_1} = \frac{t_2 - t_0}{t_1 - t_0}$	α : bağıl alıkonma zamanı k'_1 : birinci pikin kapasite faktörü k'_2 : ikinci pikin kapasite faktörü t_1 : birinci pikin alıkonma zamanı t_2 : ikinci pikin alıkonma zamanı t_0 : ölü zaman

Sistem Uygunluk Testleri

Sistem uygunluk testleri genel olarak tüm analitik sistemin veya HPLC'nin (laboratuvar, analist, kolon, cihaz ve reaktif dahil) analiz metoduna uygun bir şekilde çalışıldığından emin olunması amacıyla laboratuvarlar tarafından kullanılır. Sistem uygunluk testlerinin amacı, kromatografik olarak sistemin düzgün (piklerin kolon etkinliği, ayırım faktörü, kuyruklanma katsayısı, kapasite faktörü) ve tekrarlanabilir performansından (standart çözeltilerinin tekrar analizlenmesi ile) emin olmak için kromatografik sonuçları izlemektir. USP'ye göre sistem

uygunluk parametreleri sıvı kromatografisi metodlarının olmazsa olmaz bir kısmıdır. Analize başlanabilmesi ve uygun bir şekilde tamamlanabilmesi için kromatografik sistemin gerekli görülen sistem uygunluk parametrelerinin yeterli olduğunu ispat etmek için kullanılır. Çizelge 2.14.'de FDA kılavuzu sistem uygunluk testi için başlangıç kabul kriterleri verilmiştir.

Çizelge 2.14. FDA kılavuzu sistem uygunluk testi için başlangıç kabul kriterleri

Parametre	Limit
Kapasite Faktörü	$k' > 2$
Enjeksiyon tekrarlanabilirliği (Kesinlik)	$RSD < \%1, n \geq 5$
Ayrım Faktörü	$R_s > 2$
Kuyruklanma Faktörü	$T \leq 2$
Pik Etkinliği (Teorik Plaka Sayısı)	$N > 2000$

Enjeksiyon kesinliği, RSD (bağıl standart sapma) olarak ifade edilir ve kromatografik sistemin performansını gösterir.

2.12. Analitik Yöntem Validasyonu

Uluslararası harmonizasyon topluluğunun (ICH) yayımladığı analitik yöntemlerin validasyonu rehberinde (Q2 (R1)) belirtildiği üzere; validasyonun hedefi, analitik yöntemin tasarlanış amacına uygun olduğunu ispatlamaktır [56]. Bu sebeple laboratuvarlar istenilen kalitedeki veriyi sağlayabilmek için bir takım önlemler almaktadırlar. Güvenilir analitik veri oluşturmak için yöntem validasyonu önemlidir [57].

Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA), Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Avrupa İlaç Ajansı (EMA) gibi birçok otoritenin analitik yöntem validasyonu hakkında hazırladığı kılavuzlar bulunmaktadır.

Etken maddenin sentezinde, bitmiş ürün içeriğinde ya da analitik yöntemde değişiklik olduğu durumlarda validasyonun tekrar edilmesi gerekebilir [56]. Seçicilik, teşhis limiti (LOD), tayin limiti (LOQ), doğrusalılık, cihaz kesinliği (tekrarlanabilirlik), yöntem kesinliği ve doğruluk, validasyon parametreleridir [56].

Seçicilik

Seçicilik, numunede var olması beklenen bileşenlerin varlığında analitin, açık bir şekilde değerlendirilebilmesi yeteneğidir. Bu bileşenler genellikle safsızlıklar ve matristir [57]. Diğer bir ifadeyle seçicilik, girişimler varlığında analitin doğru bir şekilde tayin edilebilme derecesidir [57].

Teşhis limiti (LOD) ve Tayin limiti (LOQ)

Analitin numune içerisinde teşhis edilebildiği ancak miktarının kesin olarak tayin edilemediği en düşük derişime teşhis limiti denir. Teşhis limiti belirlemek için görsel değerlendirme, sinyal/gürültü oranı, analit yanıtı ve eğimin standart sapması, kör ölçümün standart sapması ve kalibrasyon eğrisi gibi bir çok yaklaşım kullanılmaktadır [56].

Tayin limiti ise, numune içerisindeki analitin uygun kesinlik ve doğruluk ile tayin edilebildiği en düşük derişimdir. Safsızlık tayini gibi numune içerisindeki miktarları düşük olan bileşenler için tayin alt limiti önemli bir validasyon parametresidir [56].

$$LOD = 3 \times SS/m$$

$$LOQ = 10 \times SS/m$$

SS: Kesişim noktasının standart sapması, m: Kalibrasyon grafiğinin eğimi

Doğrusallık

Bir analitik yöntemin belirli bir derişim aralığındaki doğrusallığı, elde edilen test sonuçlarının numunedeki analit derişimi ile orantısal olma yeteneğidir [56]. Doğrusallığın belirlenmesinde, derişime karşılık elde edilen analitik sinyal grafiğe geçirilerek eğim, kesişim ve korelasyon katsayısı değerleri hesaplanır. En az beş farklı derişim seviyesinin kullanılması tavsiye edilmektedir [56].

Kesinlik

Bir analitik yöntemin kesinliği, öngörülen koşullar altında aynı homojen numunenin çoklu örneklemeinden elde edilen bir dizi ölçüm arasındaki uyumun yakınlığını ifade eder [56].

Standart sapma ve bağıl standart sapma terimleri ile tarif edilir [57]. Cihaz kesinliği parametresi için aynı gün içerisinde, aynı cihaz kullanılarak, aynı numune çözeltisinin %100'lük derişim seviyesinde altı ardışık ölçümü gerçekleştirilir. Yöntem kesinliği (tekrarlanabilirlik) parametresi ise aynı gün içerisinde, %100'lük derişimde altı farklı numune çözeltisinin test edilmesiyle gerçekleştirilir [56].

Doğruluk

Bir analitik yöntemin doğruluğu, kabul edilen referans bir değer ile bulunan değer arasındaki yakınlığı ifade eder, bir başka deyişle, analiz sonuçlarının gerçek değere olan yakınlığıdır [56].

Etken maddenin bilinen miktarı, ilaç bileşenlerinin (yardımcı maddelerin) sentetik karışımına eklenerek doğruluk çalışması gerçekleştirilir. Safsızlık çalışmalarında ise, safsızlıkların bilinen derişimdeki miktarları numune üzerine ilave edilir. Doğruluk parametresi için üç farklı derişim seviyesinde toplam dokuz tayin gerçekleştirilir. sonuçlar geri kazanım yüzdesi olarak raporlanır. %100'lük derişim seviyesi, analitik yöntemdeki test (numune) çözeltisinin derişimini ifade etmektedir. %80 ve %120'lik derişimler ise numune derişimi (%100) üzerinden hesaplanarak, analitik yöntemin doğruluk çalışmasının gerçekleştirilmesinde kullanılır [56].

İstatistiksel Testler

Hipotez testi içeren araştırmalarda en çok kullanan testlerden biri *t* testi'dir. *t* testi, sayısal değişkenlerin ya da grupların arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olup olmadığını anlamak, ya da tespit edilen ortalama değer in öngörülen değerden farklı olup olmadığını tespit etmek için kullanılmaktadır. *t* testinin birden çok türü bulunmaktadır ve doğru veri yapısına uygun testi seçmek oldukça önemlidir.

İki varyans arasındaki farkı tespit etmek için ise F testi kullanılır. İki normal dağılıma sahip popülasyondan iki bağımsız örneklem seçtiğimizde S_1^2/S_2^2 varyanslarının dağılımı, F dağılımını oluşturur. Varyanslar içinde büyük olan her zaman paya yazılır [58].

Hızlandırılmış bozundurma çalışması

Hızlandırılmış bozundurma çalışmalarında etken maddenin hızlı bozunmasını sağlayacak çeşitli stres koşulları uygulanır. Daha sonra elde edilen çözeltilerin analiz sonuçları taze çözeltiliye ait analiz sonuçları ile kıyaslanır [59]. Bu çalışmada da uygulanan stres koşulları aşağıdaki Çizelge 2.15.'de verilmiştir.

Çizelge 2.15. Hızlandırılmış bozundurma çalışması

Stres Koşulu	Uygulama Biçimi
UV	100 mg katı etken madde saat camı içerisinde 1 gün UV ışık altında bekletilir ve daha sonra geliştirilen yöntem ile analiz edilir.
Asit Hidrolizi	0,01 M (2 saat) ve 1,0 M HCl (12-24 saat içinde) içerisinde hazırlanan etken madde analiz edilir.
Baz hidrolizi	0,01 M (2 saat) ve 1,0 M NaOH (12-24 saat içinde) içerisinde hazırlanan etken madde analiz edilir.
Yükseltgenme	0,01 M (2 saat) ve 1,0 M H ₂ O ₂ (12-24 saat içinde) içerisinde hazırlanan etken madde analiz edilir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Kimyasal malzemeler

Kimyasal maddelerden gelebilecek safsızlıkları engellemek için yüksek saflıkta kimyasallar ve deiyonize su kullanılmıştır. Etken maddeler çeşitli ilaç firmalarından temin edilmiştir.

- Metanol
- Asetonitril
- Asetik Asit
- Fosforik Asit
- NaOH
- HCl

3.1.2. Kullanılan araç ve gereçler

- Saf Su Cihazı: Millipore Direct-Q 3UV System A10 ultra saf su sistemi
- Analitik Terazisi: Mettler Toledo XSE104
- Çeşitli hacimlerde balon joje, hacmi belirli deney tüpleri, beherler, çeşitli ölçülerde mikropipetler kullanılmıştır.
- UV-Vis Spektrofotometre: Specord 50 Plus, Analytik Jena, 1 cm kuvarz hücre
- HPLC: Agilent Technologies- 1220 Infinity LC

3.1.3. Kullanılan oftalmik damla

Brumeton Göz Damlası; 1 mL’de 100 mg Sülfasetamid sodyum, 1,0 mg Betametazon, 0,5 mg Metil p-oksi benzoat (Metil Paraben), 0,1 mg Propil p-oksi benzoat (Propil Paraben), 0,02 mg Fenil civa asetat içerir.

3.2. UV Türev Spektrofotometrisi Yöntemi için Ön Çalışmalar

3.2.1. Sülfasetamid Sodyum 'un UV spektrumunun alınması

10,0 mg standart *Sülfasetamid sodyum* hassas terazi ile tartılıp metanolde çözöldükten sonra 10,0 mL ye tamamlandı. Bu çözeltiden 140 µL alınıp metanol ile 10,0 mL ye seyreltildi. Böylece elde edilen 14 µg/mL *Sülfasetamid* çözeltisinin 200-400 nm dalga boyu aralığında UV spektrumu alındı.

3.2.2. Betametazon'un UV spektrumunun alınması

10,0 mg standart *Betametazon* hassas terazi ile tartılıp metanolde çözöldükten sonra 10,0 mL ye tamamlandı. Bu çözeltiden 300 µL alınıp metanol ile 10,0 mL ye seyreltildi. Böylece elde edilen 30 µg/mL *Betametazon* çözeltisinin 200-400 nm dalga boyu aralığında UV spektrumu alındı.

3.2.3. Metil Paraben-Propil Paraben Karışımının UV spektrumunun alınması

8,34 mg standart *Metil paraben* ve 1,66 mg *Propil paraben* hassas terazi ile tartılıp metanolde çözöldükten sonra 10,0 mL ye tamamlandı. Bu çözeltiden 150 µL alınıp metanol ile 10,0 mL ye seyreltildi. Böylece elde edilen 12,5 µg/mL *Metil paraben* ve 2,5 µg/mL *Propil Paraben* (Toplamda 15 µg/mL *Paraben*) çözeltisinin 200-400 nm dalga boyu aralığında UV spektrumu alındı.

3.2.4. Sülfasetamid Sodyum, Betametazon ve Metil Paraben-Propil Paraben karışımının (Sentetik Karışım) UV spektrumunun alınması

Saf standart etken maddelerden oluşan karışım, 14 µg/mL *Sülfasetamid sodyum*, 0,14 µg/mL *Betametazon* ve 0,084 µg/mL *Metil Paraben- Propil Paraben* içerecek şekilde hazırlandı. Hazırlanan çözeltinin 200-400 nm dalga boyu aralığında UV spektrumu alındı. Çözücü olarak metanol kullanıldı.

3.2.5. *Sülfasetamid Sodyum, Betametazon ve Metil Paraben-Propil Paraben* numunesinin UV spektrumunun alınması

Numune karışımı, oftalmik damladan hareketle, 14 µg/mL *Sülfasetamid sodyum*, 0,14 µg/mL *Betametazon* ve 0,084 µg/mL *Metil Paraben- Propil Paraben* içerecek şekilde hazırlandı. Hazırlanan çözeltinin 200-400 nm dalga boyu aralığında UV spektrumu alındı. Çözücü olarak metanol kullanıldı.

Oftalmik damlada bulunan *Sülfasetamid sodyum* miktarının diğer analitlere kıyasla çok yüksek olması nedeniyle miktar tayini için uygun dalga boyu seçiminde standart katma yöntemi kullanılmıştır.

3.2.6. *Metil Paraben ve Propil Paraben*'in spektrumunun alınması

10,0 mg standart *Metil paraben* hassas terazi ile tartılıp metanolde çözüldükten sonra 10,0 mL ye tamamlandı. Bu çözeltiden 140 µL alınıp metanol ile 10,0 mL ye seyreltildi. Böylece elde edilen 14 µg/mL *Metil paraben* çözeltisinin 200-400 nm dalga boyu aralığında UV spektrumu alındı.

10,0 mg standart *Propil paraben* hassas terazi ile tartılıp metanolde çözüldükten sonra 10,0 mL ye tamamlandı. Bu çözeltiden 150 µL alınıp metanol ile 10,0 mL ye seyreltildi. Böylece elde edilen 15 µg/mL *Propil paraben* çözeltisinin 200-400 nm dalga boyu aralığında UV spektrumu alındı.

3.2.7. *Sülfasetamid Sodyum, Betametazon ve Metil Paraben-Propil Paraben*'in çalışma dalga boylarının seçilmesi

Hazırlanan her bir standart etken madde çözeltisinin her bir türev derecesinde 5n,7n,9n,11n,13n,17n,21n,25n değerleri kullanılarak 1., 2., 3. ve 4. Türev spektrumları alındı. Türev absorbans değerlerinin çok düşük olmasından dolayı dalga boyları 'Faktör 100' ile çarpıldı. Oftalmik damla ve sentetik karışımdaki etken madde içerikleri birbirine eşit olacak şekilde hazırlandı. Çözücü olarak metanol kullanıldı.

Oftalmik damlada *Sülfasetamid sodyum* tayini için *Betametazon* ve *Metil paraben-Propil paraben* çözeltilerine ait türev absorbans değerlerinin sıfır olduğu ve oftalmik damla çözeltisinin türev absorbans değerinin *Sülfasetamid sodyum* çözeltisinin türev absorbans değerine tam olarak eşit olduğu dalga boyu, *Betametazon* tayini için *Sülfasetmid Sodyum* ve *Metil paraben-Propil paraben* karışım çözeltilerine ait türev absorbans değerlerinin sıfır olduğu ve oftalmik damla çözeltisinin türev absorbans değerinin *Betametazon* çözeltisinin türev absorbans değerine tam olarak eşit olduğu dalga boyu, *Metil paraben-Propil paraben*(*Toplam Paraben*) tayini için *Sülfasetamid sodyum* ve *Betametazon* çözeltilerine ait türev absorbans değerlerinin sıfır olduğu ve oftalmik damla çözeltinin türev absorbans değerinin *Metil paraben-Propil paraben* karışım çözeltisinin türev absorbans değerine tam olarak eşit olduğu dalga boyu, araştırıldı. Çözücü olarak metanol kullanıldı.

3.2.8. UV Türev spektrofotometrisi yöntemi ile *Sülfasetamid Sodyum*, *Betametazon* ve *Metil Paraben-Propil Paraben* kalibrasyon grafikleri

100,0 mg standart *Sülfasetamid sodyum* hassas terazi ile tartılıp metanolde çözöldü ve 100,0 mL ye tamamlandı. Bu çözeltiden belirli hacimler alınıp son derişimler 6,0; 8,0; 10; 12,0; 140 µg/mL olacak şekilde metanol ile 10,0 mL'ye seyreltildi. Bu çözeltilerin UV türev absorbans değerleri (268 nm, 4.türev n=17) okunarak *Sülfasetamid sodyum* için kalibrasyon grafiğı çizildi.

100,0 mg standart *Betametazon* hassas terazi ile tartılıp metanolde çözöldü ve 100,0 mL ye tamamlandı. Bu çözeltiden belirli hacimler alınıp son derişimler 5,0; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0; 30,0 µg/mL olacak şekilde metanol ile 10,0 mL'ye seyreltildi. Bu çözeltilerin UV türev absorbans değerleri (236 nm, 3.türev n=21) okunarak *Betametazon* için kalibrasyon grafiğı çizildi.

83,4 mg standart *Metil paraben* ve 16,6 mg *Propil paraben* hassas terazi ile tartılıp, metanolde çözöldükten sonra 100,0 mL ye tamamlandı. Bu çözeltiden belirli hacimler alınıp son derişimler 4,0; 6,0; 8,0;10,0; 12,0 µg/mL olacak şekilde metanol ile 10,0 mL'ye seyreltildi. Bu çözeltilerin UV türev absorbans değerleri (283 nm, 3.türev n=11) okunarak kalibrasyon grafiğı çizildi.

3.2.9. UV Türev spektrofotometrisi yöntemi ile oftalmik damlalarda *Sülfasetamid Sodyum, Betametazon ve Metil Paraben-Propil Paraben* miktar tayini

250 µL oftalmik damla numunesi alındı ve metanol ile 100,0 mL'ye tamamlandı. Bu karışımdan 480 µL alınarak metanol ile 10,0 mL'ye tamamlandı. Böylece 12 µg/mL *Sülfasetamid sodyum* çözeltisi elde edilmiş oldu. *Sülfasetamid sodyum* miktarının çok yüksek olmasından dolayı *Betametazon* ve *Metil paraben-Propil paraben* karışım çözeltileri için standart katma yöntemi uygulandı. 250 µL oftalmik damla damla ile hazırlanan çözeltiden 400 µL alındı ve metanol ile 10,0 mL'ye tamamlandı. Bu karışımdan 500 µL alınarak üzerine 200 µL *Betametazon* stok çözeltisinden ilave edildi ve metanol ile mL'ye tamamlandı. Böylece 20 µg/mL *Betametazon* çözeltisi elde edilmiş oldu. 250 µL oftalmik damla ile hazırlanan çözeltiden 400 µL alındı ve metanol ile 10,0 mL'ye tamamlandı. Bu karışımdan 500 µL alınarak üzerine 80 µL *Metil paraben-Propil paraben* stok çözeltisinden ilave edildi ve metanol ile 10,0 mL'ye tamamlandı. Böylece 8 µg/mL *Metil paraben-Propil paraben* çözeltisi elde edilmiş oldu. Daha sonra her bir etken madde için belirlenen türev derecesi, dalga boyu ve n değeri koşullarında, çözeltilerin türev absorbans değerleri ölçüldü. Her bir etken maddenin aynı koşullarda çizilen kalibrasyon doğrularından hareketle oftalmik damlanın içerdiği etken madde miktarları hesaplandı. Miktar tayini amacıyla beş oftalmik damla çözeltisi hazırlanarak paralel tayinler gerçekleştirildi.

3.2.10. Oftalmik damlalarda UV Türev spektrofotometrisi yöntemi ile *Sülfasetamid Sodyum, Betametazon ve Metil Paraben- Propil Paraben* geri kazanımı

Belirtilen koşullarda hazırlanmış, 250 µg/mL *Sülfasetamid Sodyum* içeren oftalmik damla çözeltisinden 200 µL alınıp son derişim 8;10;12 µg/mL olacak şekilde stok *Sülfasetamid sodyum* çözeltisinden eklendi ve metanol ile 10,0 mL hacme tamamlandı. Bu çözeltinin belirlenen türev derecesi, dalga boyu ve n değeri koşullarında türev absorbans değerleri okundu ve ilgili kalibrasyon grafiğinden hareketle % geri kazanım değerleri hesaplandı.

Belirtilen koşullarda hazırlanmış 2,5 µg/mL *Betametazon* içeren oftalmik damla çözeltisinden 20 µL alınıp son derişim 16; 20; 24 µg/mL olacak şekilde stok *Betametazon* çözeltisinden eklendi ve metanol ile 10,0 mL hacme tamamlandı. Bu çözeltinin belirlenen türev derecesi, dalga boyu ve n değeri koşullarında türev absorbans değerleri okundu ve ilgili kalibrasyon grafiğinden hareketle % geri kazanım değerleri hesaplandı.

Belirtilen koşullarda hazırlanmış 1,5 µg/mL *Metil paraben- Propil paraben* içeren oftalmik damla çözeltisinden 20 µL alınıp son derişim 6,4; 8,0; 9,6 µg/mL olacak şekilde stok *Metil paraben- Propil paraben* çözeltisinden eklendi. Bu çözeltinin belirlenen türev derecesi, dalga boyu ve n değeri koşullarında türev absorbans değerleri okundu ve ilgili kalibrasyon grafiğinden hareketle % geri kazanım değerleri hesaplandı.

3.2.11. UV Türev spektrofotometrisi yönteminde validasyon

Kullanılan analiz yönteminin güvenilir bir şekilde analiz edilebildiği en düşük derişimleri saptayabilmek amacıyla, LOD ve LOQ değerleri hesaplandı. Hesaplama, en küçük kareler yöntemine göre çizilen kalibrasyon grafiğinin eğim ve kesişim değerleri kullanılarak yapıldı. Elde edilen kalibrasyon grafiğinin kesişim noktasının standart sapması kullanılarak aşağıdaki formüller ile hesaplama yapıldı.

$$\text{LOD} = 3 \times \text{SS}/m$$

$$\text{LOQ} = 10 \times \text{SS}/m$$

SS: Kesişim noktasının standart sapması, m: Kalibrasyon grafiğinin eğimi

Gün içi ve Günler arası Tekrarlanabilirlik çalışması için, 3.2.7.'de anlatıldığı gibi hazırlanan aynı derişimde oftalmik damla çözeltilerinin aynı gün içerisinde 6 kez ve farklı 6 günde ölçümleri yapıldı. Ölçümler sonucu elde edilen verilerden ortalama, ortalamanın standart hatası, standart sapma, %BSS ve güven aralığı değerleri hesaplandı.

3.3. RP- HPLC Yöntemi ile Oftalmik Damlalarda *Sülfasetamid Sodyum, Betametazon, Metil Paraben ve Propil Paraben* Tayini

3.3.1. Çözeltilerin hazırlanması

Sülfasetamid sodyum, Betametazon, Metil paraben ve Propil paraben stok çözeltilerinin hazırlanması için, her bir maddeden 100,0 mg hassas olarak tartıldı ve 50,0 mL metanol eklenerek, ultrasonik banyoda tamamen çözüldükten sonra metanol ile 100,0 mL hacme tamamlandı. Stok çözeltinin son derişimi her bir madde için 1000 µg/mL dir. Kullanılacak standart çözeltiler için, hazırlanan stok çözeltiden gerekli seyreltmeler mobil faz ile yapıldı.

3.3.2. RP - HPLC yöntemi ile Sülfasetamid Sodyum, Betametazon, Metil Paraben ve Propil Paraben tayini optimizasyonu

Geliştirilecek yöntemde en iyi ayırımın sağlanması amacıyla optimum kromatografik koşullar belirlendi. Bu amaçla, *Sülfasetamid sodyum*, *Betametazon*, *Metil paraben* ve *Propil paraben*'i RP-HPLC sıvı kromatografisiyle ayırımında; sabit faz, mobil faz organik düzenleyici (metanol veya asetonitril), kolon sıcaklığı ve enjeksiyon hacmi seçimi yapıldı.

Optimizasyon çalışmalarında ilk olarak kolon etkisini incelemek için C₁₈ Phenomenex (250x4,6 mm, 5 µm) ve Agilent Zorbax Eclipse XDB C₁₈ (3,0x75mm, 3,5µm) kolonlar kullanıldı. En iyi ayırım Agilent Zorbax Eclipse XDB C₁₈ (3,0x75mm, 3,5µm) ile elde edildikten sonra mobil faz bileşiminin etkisi araştırıldı.

Mobil faz bileşeni fosfat tamponu pH değerinin kromatografik ayırma etkisinin araştırılması amacıyla 10 mM fosfat tamponunun pH değeri 3,0 ve 4,0'e ayarlanarak analiz yapıldı. Metanol ve su etkisi araştırıldı ancak bu koşullarda *Betamatazon* pikinin çıkış süresi uzadı. Daha sonra asetonitril ve su etkisi araştırıldı. Tampon ve metanol çözeltisi parametreleri incelendiğinde en uygun mobil faz bileşiminin su ve asetonitril (55:45 h/h) olduğuna karar verildi.

Mobil faz optimizasyonu tamamlandıktan sonra cihaz parametreleri optimizasyonu yapıldı. Bunun için ilk olarak, 0,4; 0,5; 0,6 ve 0,7 mL/dak mobil faz akış hızlarında çalışıldı. Daha sonra, mobil faz akış hızı optimum değerinin 0.5 mL/dak olduğu koşulda 1, 5, 10, 15, 20 µL enjeksiyon hacimleri incelendi. En uygun enjeksiyon hacmi 5 µL olarak seçildikten sonra kolon sıcaklığının etkisi araştırıldı. Bu amaçla, kolon sıcaklığı 25, 30, 35, 40°C olarak değiştirildi ve kromatografik parametrelerdeki değişim incelendiğinde en uygun sıcaklık değerinin 25 °C olduğuna karar verildi.

Sentetik karışım, 5,0 µg/mL *Sülfasetamid sodyum*, 2,5 µg/mL *Betametazon*, 1,0 µg/mL *Metil paraben* ve 1,0 µg/mL *Propil paraben* içerecek şekilde hazırlandı.

3.3.3. RP - HPLC yöntemi ile *Sülfasetamid Sodyum, Betametazon, Metil Paraben ve Propil Paraben* kalibrasyon grafikleri

10,0 mg standart *Sülfasetamid sodyum* hassas terazi ile tartıldı ve metanolde çözülerek 10,0 mL'ye tamamlandı. Bu çözeltiden belirli hacimler alınıp son derişimler 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0 µg/mL olacak şekilde mobil faz ile 10,0 mL'ye seyreltilti.

10,0 mg standart *Betametazon* hassas terazi ile tartıldı ve metanolde çözülerek 10,0 mL'ye tamamlandı. Bu çözeltiden belirli hacimler alınıp son derişimler 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5 µg/mL olacak şekilde mobil faz ile 10,0 mL'ye seyreltilti.

10,0 mg standart *Metil paraben* hassas terazi ile tartıldı ve metanolde çözülerek 10,0 mL'ye tamamlandı. Bu çözeltiden belirli hacimler alınıp son derişim 0,6; 0,8; 1,0; 1,2; 1,4 µg/mL olacak şekilde mobil faz ile 10,0 mL'ye seyreltilti.

10,0 mg standart *Propil paraben* hassas terazi ile tartıldı ve metanolde çözülerek 10,0 mL'ye tamamlandı. Bu çözeltiden belirli hacimler alınıp son derişim 0,6; 0,8; 1,0; 1,2; 1,4 µg/mL olacak şekilde mobil faz ile 10,0 mL'ye seyreltilti.

Her bir kalibrasyon çözeltisi, etken madde çözeltilerinin karışımı şeklinde hazırlandı ve 250 nm'deki pik alanı değerleri okunarak her bir etken madde için ayrı ayrı kalibrasyon grafikleri çizildi.

3.3.4. RP- HPLC yöntemi ile Oftalmik Damlalarda *Sülfasetamid Sodyum, Betametazon, Metil Paraben ve Propil Paraben* miktar tayini

Oftalmik damlalarda *Betametazon, Metil paraben ve Propil paraben* miktarlarının *Sülfasetamid sodyum* yanında çok düşük olmasından dolayı standart katma yöntemi uygulanmıştır. Oftalmik damladan 50,0 µL hassas olarak alındı ve metanol ile 10,0 mL'ye seyreltilti. Bu çözeltiden (5,0 µg/mL *Sülfasetamid sodyum*, 0,05 µg/mL *Betamazone*, 0,025 µg/mL *Metil paraben* ve 0,005 µg/mL *Propil paraben* içeren çözelti) 100 µL alınıp üzerine 2,5 µg/mL *Betametazon*, 1,0 µg/mL *Metil paraben* ve 1,0 µg/mL *Propil paraben* standartları ilave edilerek mobil faz ile 10,0 mL'ye seyreltilti. Optimize edilen RP-HPLC koşullarında elde edilen pik alanı değerleri kullanılarak, kalibrasyon grafiklerinden hareketle oftalmik damladaki her bir etken maddenin miktarı hesaplandı. Miktar tayini amacıyla beş oftalmik damla çözeltisi hazırlandı.

3.3.5. RP- HPLC yöntemi ile *Sülfasetamid Sodyum, Betametazon, Metil Paraben ve Propil Paraben* geri kazanımı

Belirtilen koşullarda hazırlanmış 5,0 µg/mL *Sülfasetamid sodyum* içeren oftalmik damla çözeltisinden 5,0 mL alınıp son derişim 4,0; 5,0; 6,0 µg/mL olacak şekilde stok *Sülfasetamid sodyum* çözeltisinden eklendi ve mobil faz ile 10,0 mL hacme tamamlandı. Bu çözeltinin pik alan değerleri okundu ve ilgili kalibrasyon grafiğinden hareketle derişim ve % geri kazanım değerleri hesaplandı.

Belirtilen koşullarda hazırlanmış 0,05 µg/mL *Betametazon* içeren oftalmik damla çözeltisinden 5,0 mL alınıp son derişim 2,0; 2,5; 3,0 µg/mL olacak şekilde stok *Betametazon* çözeltisinden eklendi ve mobil faz ile 10,0 mL hacme tamamlandı. Bu çözeltinin pik alan değerleri okundu ve ilgili kalibrasyon grafiğinden hareketle derişim ve % geri kazanım değerleri hesaplandı.

Belirtilen koşullarda hazırlanmış, 0,025 µg/mL *Metil paraben* içeren oftalmik damla çözeltisinden 5,0 mL alınıp son derişim 0,8; 1,0; 1,2 µg/mL olacak şekilde stok *Metil paraben* çözeltisinden eklendi ve mobil faz ile 10,0 mL hacme tamamlandı. Bu çözeltinin pik alan değerleri okundu ve ilgili kalibrasyon grafiğinden hareketle derişim ve % geri kazanım değerleri hesaplandı.

Belirtilen koşullarda hazırlanmış, 0,005 µg/mL *Propil paraben* içeren oftalmik damla çözeltisinden 5,0 mL alınıp son derişim 0,8; 1,0; 1,2 µg/mL olacak şekilde stok *Propil paraben* çözeltisinden eklenerek mobil faz ile 10,0 mL hacme tamamlandı. Bu çözeltinin pik alan değerleri okundu ve ilgili kalibrasyon grafiğinden hareketle derişim ve % geri kazanım değerleri hesaplandı.

3.3.6. RP- HPLC yönteminde validasyon

RP-HPLC yöntemi ile güvenilir bir şekilde analiz yapılabilen en düşük derişimleri saptayabilmek amacıyla, LOD ve LOQ değerleri hesaplandı. Hesaplama, en küçük kareler yöntemine göre çizilen kalibrasyon grafiğinin denklemindeki eğim(m) ve kesişim(n) değerleri ve kesişim noktasının standart sapması kullanılarak yapıldı.

Gün içi ve Günler arası Tekrarlanabilirlik çalışması için, aynı derişimde hazırlanan standart çözeltilerin aynı gün içerisinde 6 kez ve farklı 6 günde ölçümleri yapıldı. Ölçümler sonucu

elde edilen verilerden ortalama, ortalamanın standart hatası, standart sapma, %BSS ve güven aralığı değerleri hesaplandı.

Sağlamlık

5,0 µg/mL *Sülfasetamid sodyum*, 2,5 µg/mL *Betametazon*, 1,0 µg/mL *Metil paraben* ve 1,0 µg/mL *Propil paraben* içeren çözelti hazırlandı. Bu çözeltinin RP- HPLC ile analizinde, optimize edilen yöntem koşullarından kromatografik parametrelere etkisi olan, dalga boyu, kolon sıcaklığı ve mobil faz akış hızındaki değişimlerin etkileri ayrı ayrı incelendi.

Hızlı bozundurma testleri

Fotoliz

Sülfasetamid sodyum, *Betametazon*, *Metil paraben* ve *Propil paraben* ayrı ayrı 100,0 'er mg hassas olarak tartıldıktan sonra, 24 saat boyunca UV ışık altında bekletildi. 24 saat sonunda her bir etken maddeden 10,0'ar mg alınarak, 10,0'ar mL metanolde çözüldü. Daha sonra, bu çözeltilerden hareketle ve çözücü olarak mobil faz kullanılarak, son derişim değerleri 3,0 µg/mL *Sülfasetamid sodyum*, 2,5 µg/mL *Betametazon*, 1,0 µg/mL *Metil paraben* ve 1,0 µg/mL *Propil paraben* olacak şekilde, çözeltiler hazırlandı. RP-HPLC ile analiz edilip bozunma miktarları hesaplandı.

Asit hidrolizi

Sülfasetamid sodyum, *Metil paraben* ve *Propil paraben* etken maddelerinden ayrı ayrı 10,0'ar mg iki ayrı beher içine alındı. *Betametazon* çözeltisi suda kısmi olarak çözüldüğü için 200 µg/mL içerecek şekilde stok çözelti olarak hazırlandı. Beherlerden birine 10,0 mL 1,0 M HCl ve diğerine 10,0 mL 0,01 M HCl ilave edildi. Bu işlem her bir etken madde için iki ayrı beherde yapıldı. 24 saat sonra, her bir çözeltiden belirli miktarda alınıp son derişim 2,5 µg/mL *Betametazon*, 1,0 µg/mL *Metil paraben* ve 1,0 µg/mL *Propil paraben*, 5,0 µg/mL *Sülfasetamid sodyum* için 0,01 M HCl, HCl çözeltisinden gelen pikin girişimini azaltmak için 3,0 µg/mL *Sülfasetamid sodium* için 1,0 M HCl olacak şekilde mobil fazla hacme tamamlandı. RP-HPLC ile analiz edilip bozunma miktarı hesaplandı.

Baz hidrolizi

Sülfasetamid sodyum, Betametazon, Metil paraben ve Propil paraben etken maddelerinden ayrı ayrı 10,0'ar mg iki ayrı beher içine alındı. *Betametazon* çözeltisi suda kısmi olarak çözündüğü için 0,01 M NaOH çözeltisi içerisinde çökelme meydana geldi. *Betametazon* 25 µg/mL içerecek şekilde stok çözelti olarak hazırlandı. Beherlerden birine 10,0 mL 1,0 M NaOH ve diğerine 10,0 mL 0,01 M NaOH ilave edildi. Bu işlem her bir etken madde için iki ayrı beherde yapıldı. 24 saat sonra, her bir çözeltiden belirli miktarda alınıp son derişim 2,5 µg/mL *Betametazon*, 1,0 µg/mL *Metil paraben*, 1,0 µg/mL *Propil paraben*, 5,0 µg/mL *Sülfasetamid sodyum* için 0,01 M NaOH, NaoH çözeltisinden gelen pikin girişimini azaltmak için 3,0 µg/mL *Sülfasetamid sodium* için 1,0 M NaOH olacak şekilde mobil fazla hacme tamamlandı. RP-HPLC ile analiz edilip bozunma miktarı hesaplandı.

Yükseltgenme

Kromatogramda iyi bir rezolüsyon elde edilemediği için yükseltgenme çalışması yapılamamıştır.

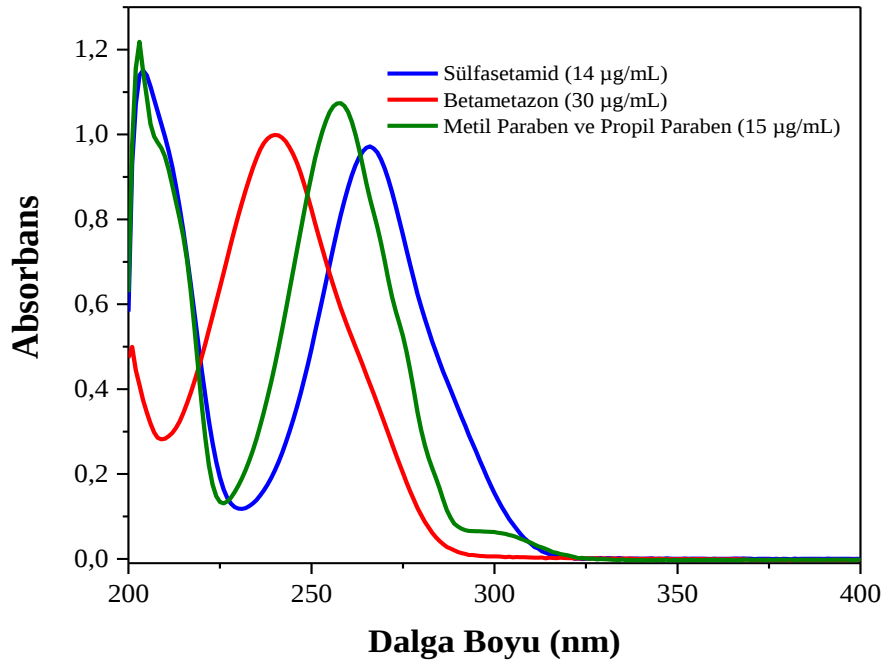
Sistem Uygunluk Testleri

Geliştirilen yöntemin kromatografik standartları sağlayıp sağlamadığını değerlendirmek amacıyla, elde edilen kromatogram üzerinden, her bir analit için, rezolüsyon (R), pik alanı (PA), pik asimetrisi (As) ve tabaka sayısı (N) değerleri hesaplandı.

4. BULGULAR

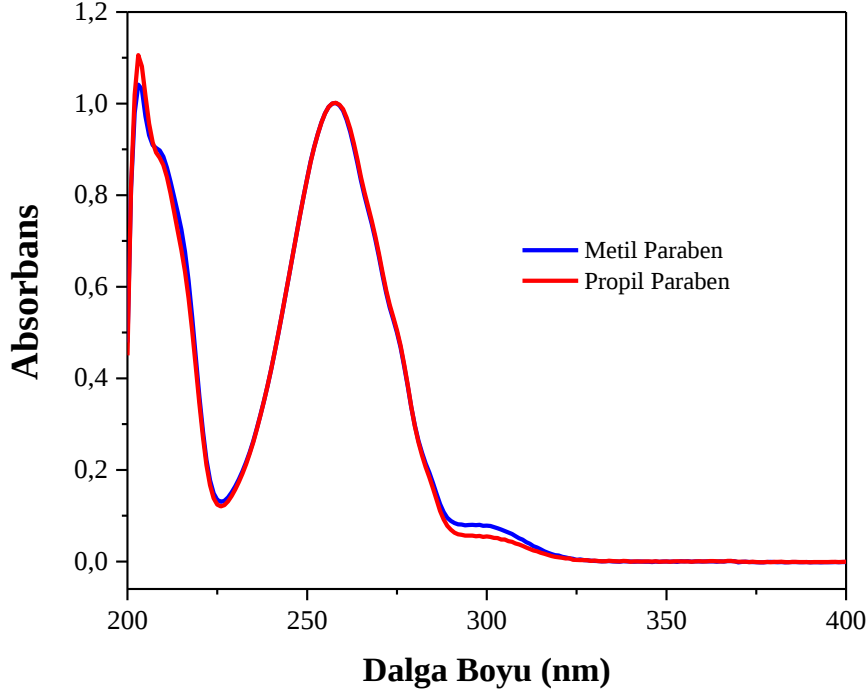
4.1. Sülfasetamid Sodyum, Betametazon ve Metil Paraben-Propil Paraben UV Spektrumları

Sülfasetamid sodyum, Betametazon ve Metil paraben-Propil paraben çözeltileri, Bölüm 3.2.1., 3.2.2. ve 3.2.3.'de anlatıldığı gibi hazırlanmış ve her bir çözeltinin UV spektrumu, Şekil 4.1.'de üst üste gösterilmiştir.



Şekil 4.1. 14 µg/mL Sülfasetamid Sodyum, 30 µg/mL Betametazon ve 15 µg/mL Metil Paraben-Propil Paraben UV spektrumları

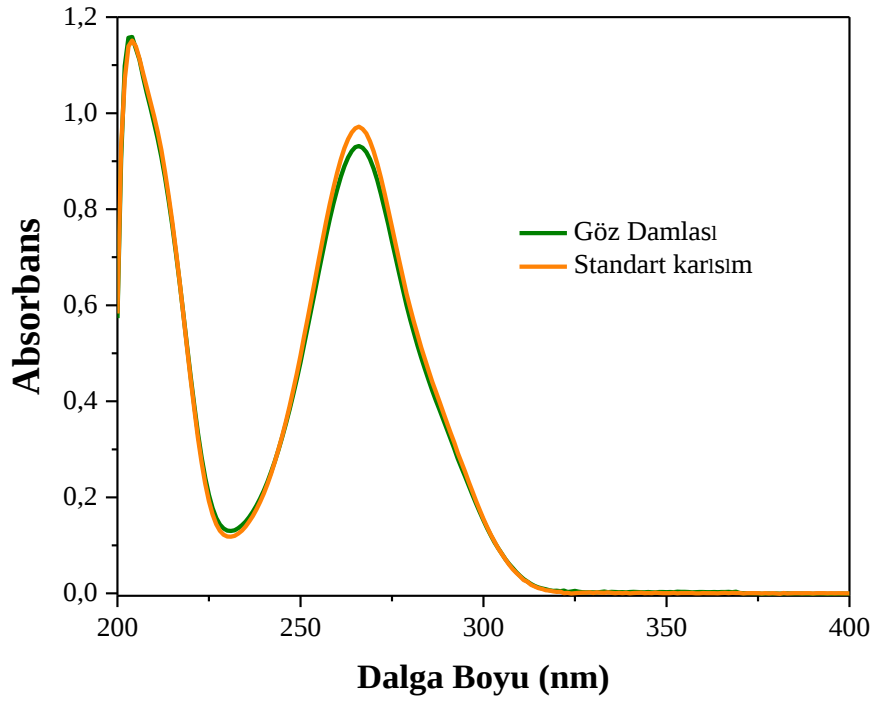
Metil paraben ve Propil paraben çözeltileri, Bölüm 3.2.6.'da anlatıldığı gibi hazırlanmış ve UV spektrumu, Şekil 4.2.'de üst üste gösterilmiştir.



Şekil 4.2. 14 µg/mL *Metil Paraben* ve 15 µg/mL *Propil Paraben* UV spektrumları

4.2. Sentetik Karışımı Çözeltisi ve Oftalmik Damla Çözeltisinin UV Spektrumları

Sentetik karışım çözeltisi ve oftalmik damla çözeltisi, Bölüm 3.2.4.'te ve Bölüm 3.2.5'de anlatıldığı gibi hazırlanmış ve herbir çözeltinin UV spektrumu, Şekil 4.3.'de üst üste gösterilmiştir.

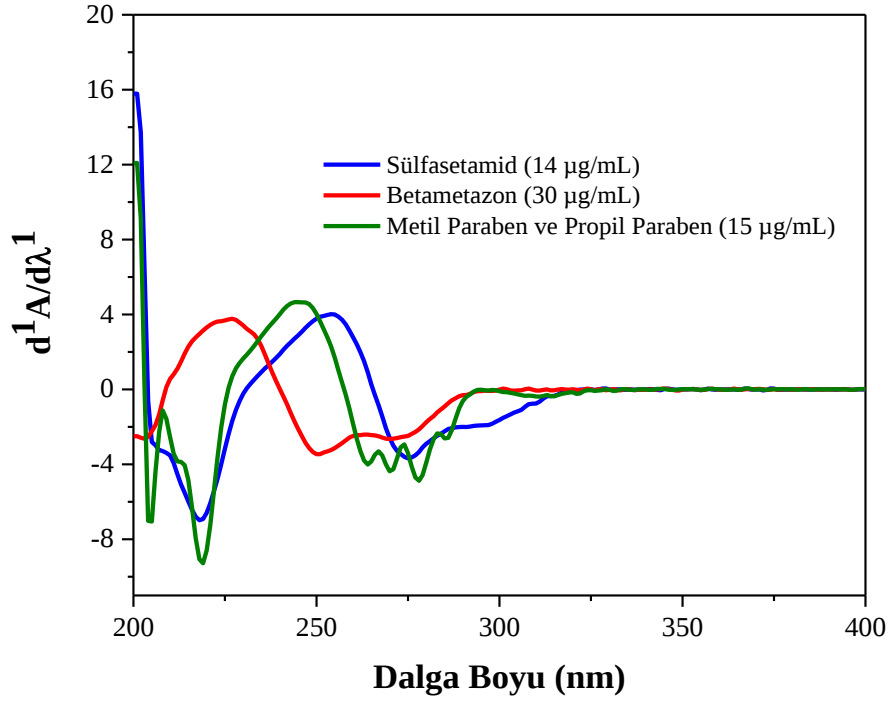


Şekil 4.3. Oftalmik damla ve sentetik karışım çözeltilerinin UV spektrumları

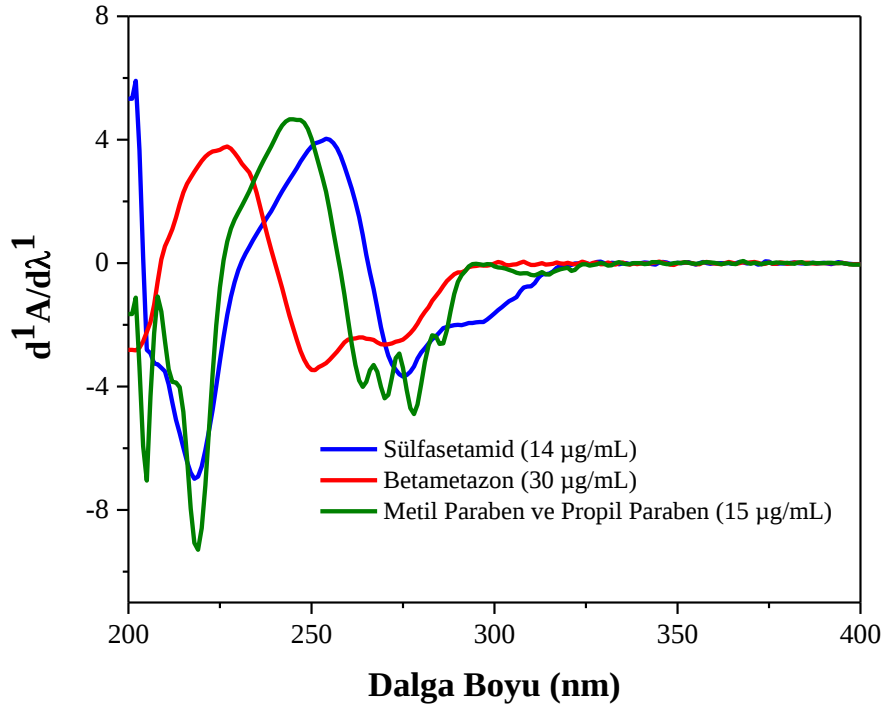
4.3. UV-Türev Spektrofotometrisi Yöntemi Sonuçları

4.3.1. UV Türev spektrofotometrisi yöntemi ile miktar tayini için uygun dalga boyunun belirlenmesi

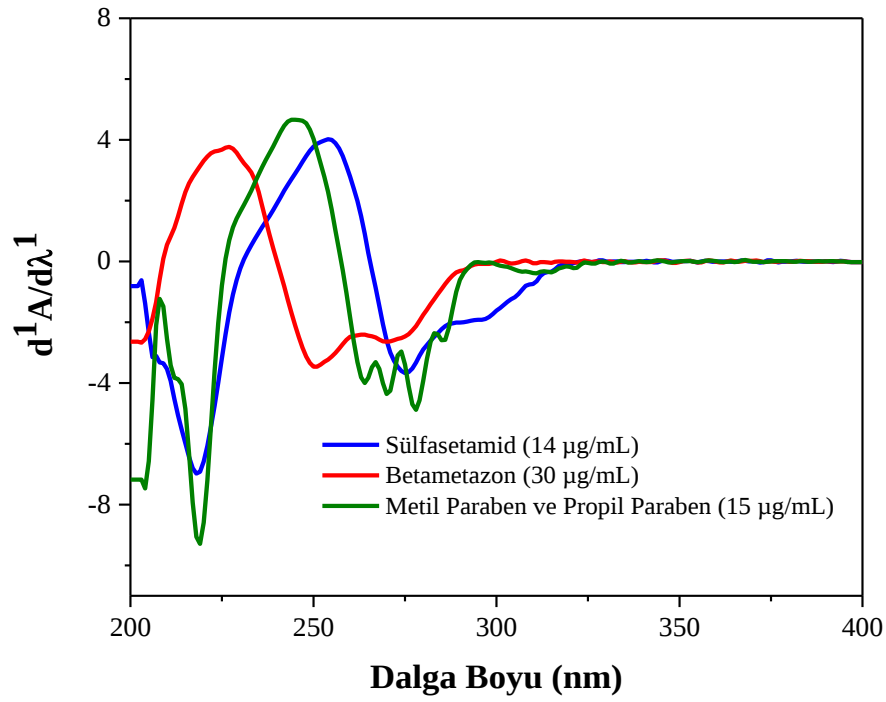
UV-Türev Spektrofotometrik yöntemde, miktar tayini için en uygun dalga boyunun belirlenmesi amacıyla *Sülfasetamid Sodyum*, *Betametazon* ve *Metil paraben-Propil paraben* standart çözeltilerinin ve eşit miktarda *Sülfasetamid sodyum*, *Betametazon* ve *Metil paraben-Propil paraben* içeren oftalmik damla çözeltisinin, *n değerleri* ($\Delta\lambda$) 5, 7, 9, 11, 13, 17, 21, 25 olacak şekilde 1. türev spektrumları alınmıştır. Elde edilen spektrumlar Şekil 4.4., Şekil 4.5., Şekil 4.6., Şekil 4.7., Şekil 4.8., Şekil 4.9., Şekil 4.10. ve Şekil 4.10.'da üst üste gösterilmiştir. Bu çalışma, matriksden gelebilene bir etkinin varlığını kontrol amacıyla yapılmıştır.



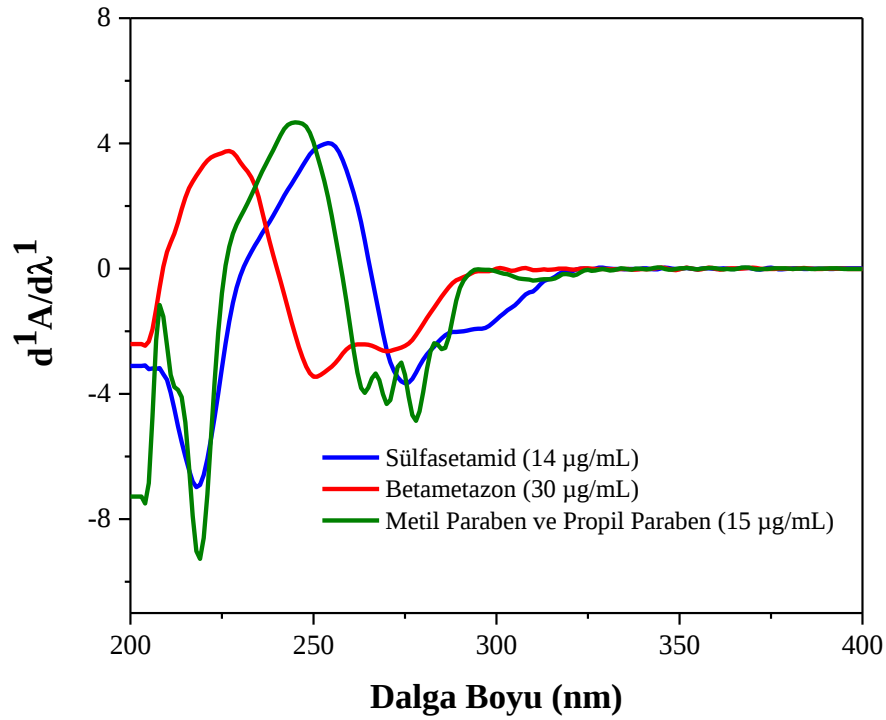
Şekil 4.4. 14 $\mu\text{g/mL}$ Sulfasetamid Sodyum, 30 $\mu\text{g/mL}$ Betametazon ve 15 $\mu\text{g/mL}$ Metil Paraben-Propil Paraben'e ait üst üste çekilmiş 1.türev ($n=5$) UV spektrumları



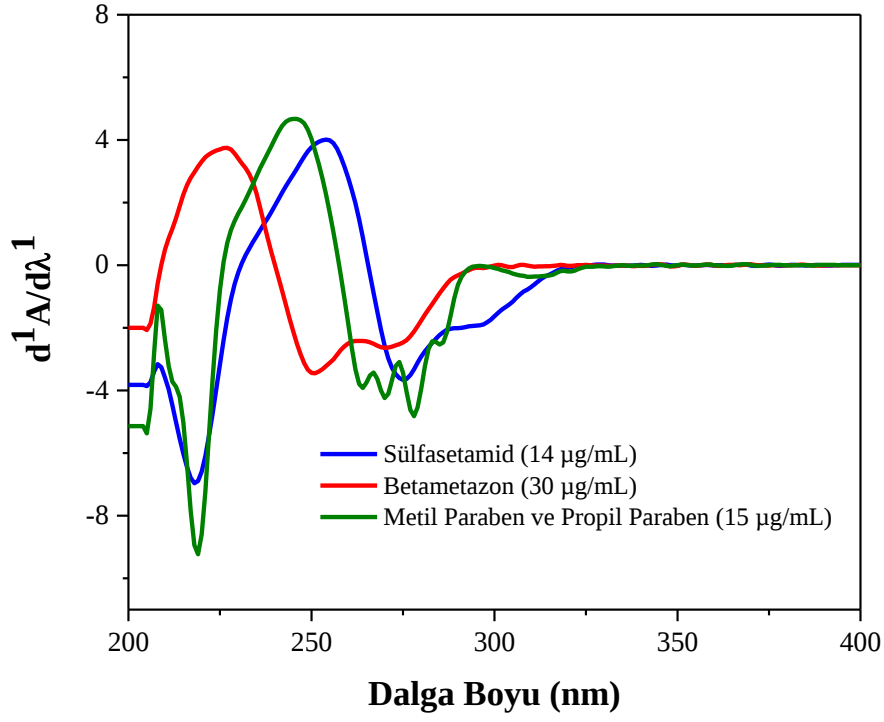
Şekil 4.5. 14 $\mu\text{g/mL}$ Sulfasetamid Sodyum, 30 $\mu\text{g/mL}$ Betametazon ve 15 $\mu\text{g/mL}$ Metil Paraben-Propil Paraben'e ait üst üste çekilmiş 1.türev ($n=7$) UV spektrumları



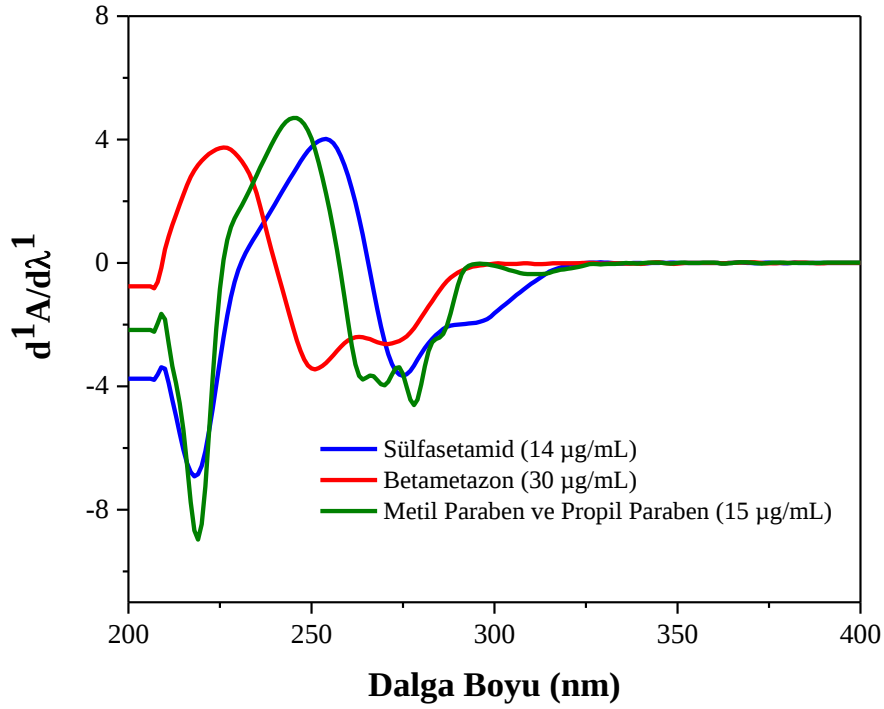
Şekil 4.6. 14 $\mu\text{g/mL}$ Sulfasetamid Sodyum, 30 $\mu\text{g/mL}$ Betametazon ve 15 $\mu\text{g/mL}$ Metil Paraben-Propil Paraben'e ait üst üste çekilmiş 1.türev ($n=9$) UV spektrumları



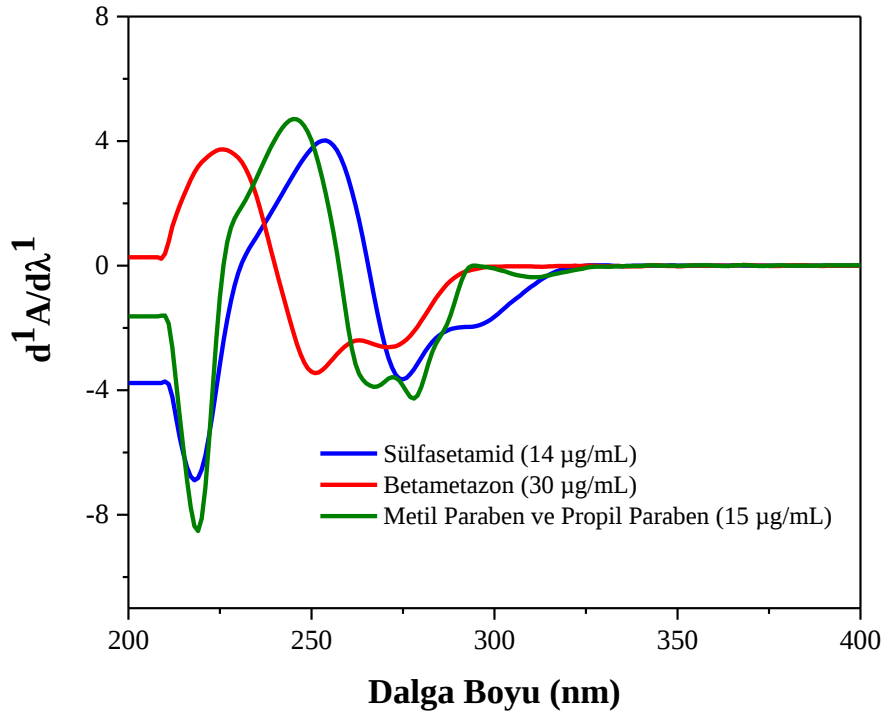
Şekil 4.7. 14 $\mu\text{g/mL}$ Sulfasetamid Sodyum, 30 $\mu\text{g/mL}$ Betametazon ve 15 $\mu\text{g/mL}$ Metil Paraben-Propil Paraben'e ait üst üste çekilmiş 1.türev ($n=11$) UV spektrumları



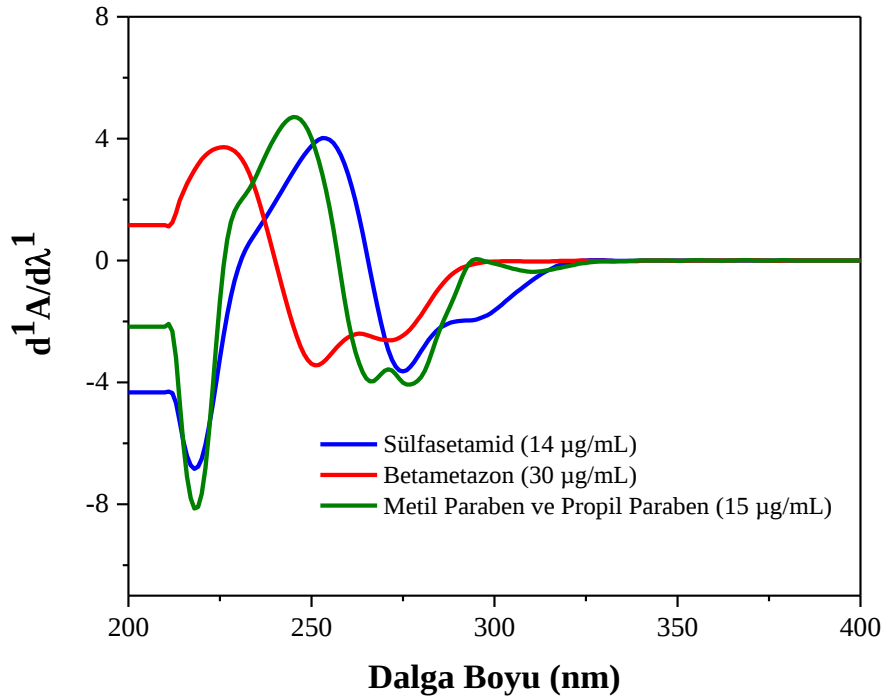
Şekil 4.8. 14 $\mu\text{g/mL}$ Sulfasetamid Sodyum, 30 $\mu\text{g/mL}$ Betametazon ve 15 $\mu\text{g/mL}$ Metil Paraben-Propil Paraben'e ait üst üste çekilmiş 1.türev (n=13) UV spektrumları



Şekil 4.9. 14 $\mu\text{g/mL}$ Sulfasetamid Sodyum, 30 $\mu\text{g/mL}$ Betametazon ve 15 $\mu\text{g/mL}$ Metil Paraben-Propil Paraben'e ait üst üste çekilmiş 1.türev (n=17) UV spektrumları

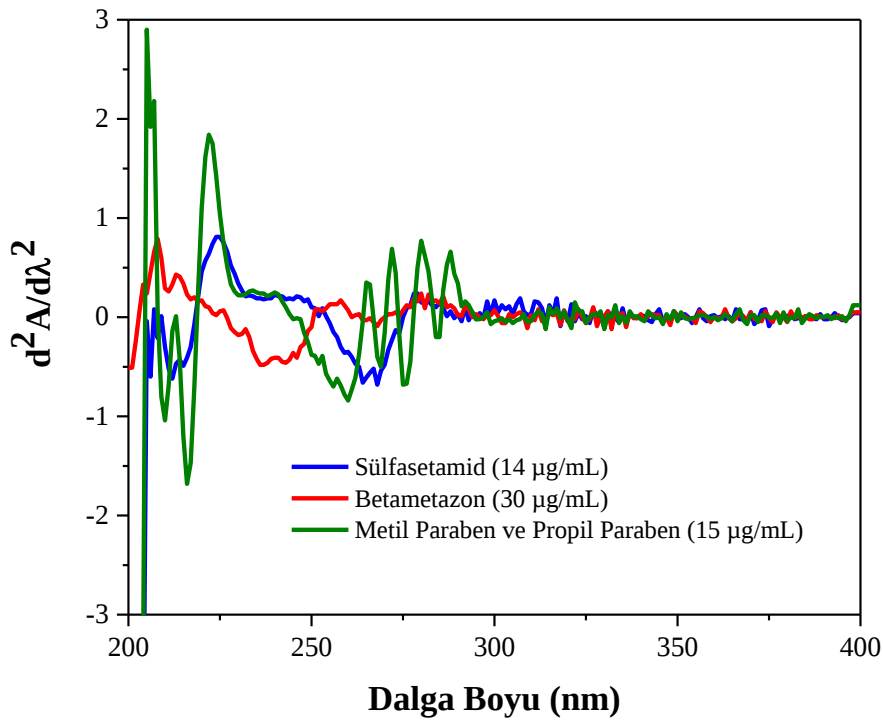


Şekil 4.10. 14 $\mu\text{g/mL}$ Sulfasetamid Sodyum, 30 $\mu\text{g/mL}$ Betametazon ve 15 $\mu\text{g/mL}$ Metil Paraben-Propil Paraben'e ait üst üste çekilmiş 1.türev ($n=21$) UV spektrumları

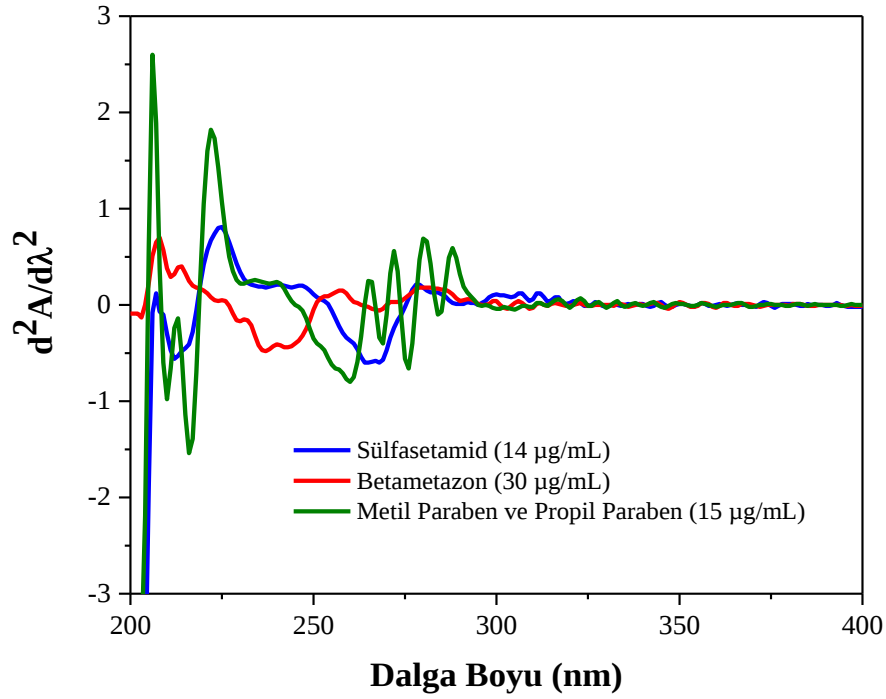
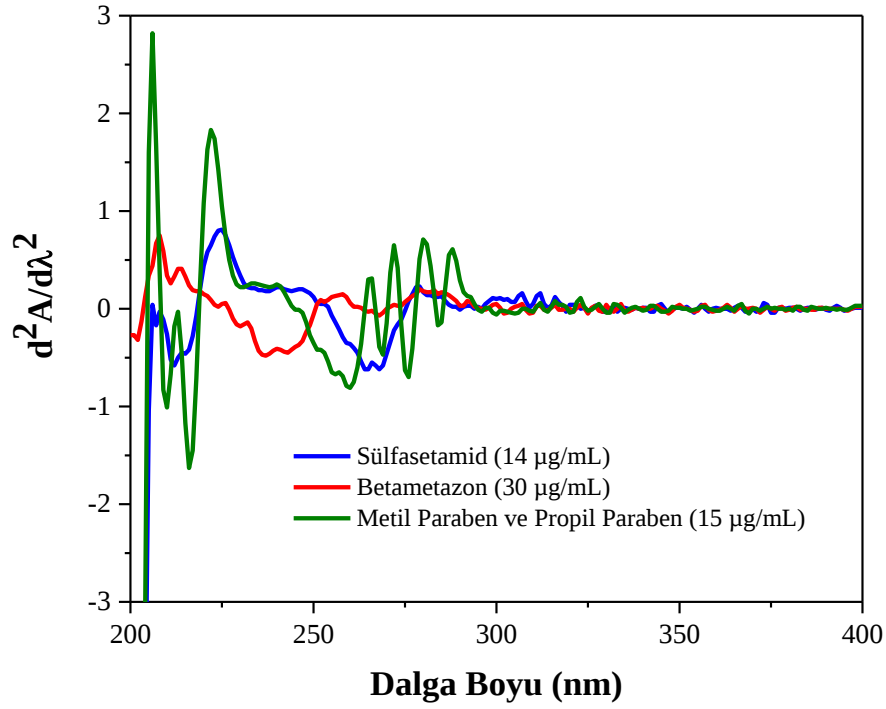


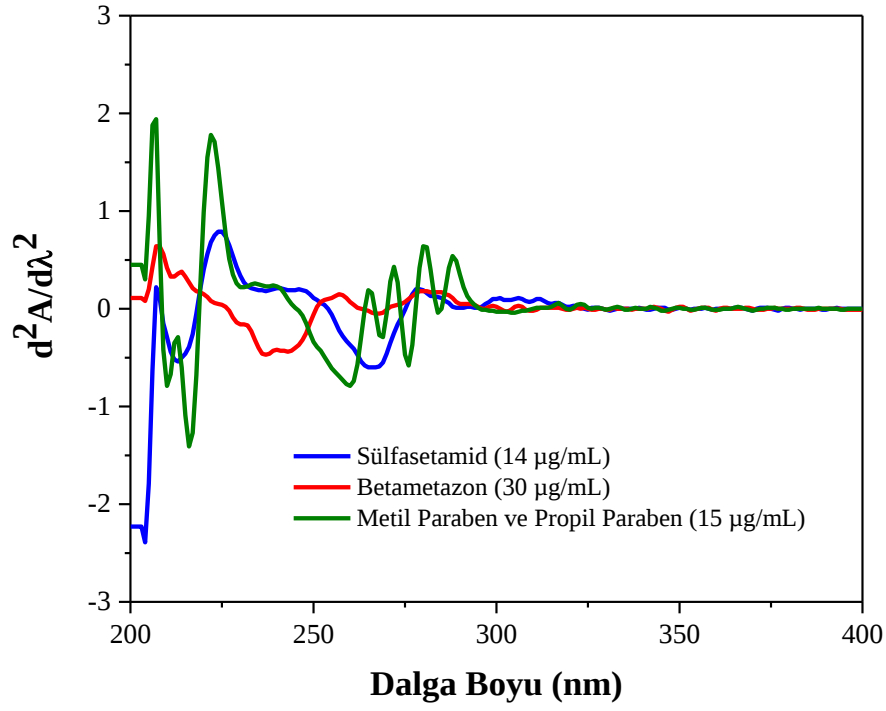
Şekil 4.11. 14 $\mu\text{g/mL}$ Sulfasetamid Sodyum, 30 $\mu\text{g/mL}$ Betametazon ve 15 $\mu\text{g/mL}$ Metil Paraben-Propil Paraben'e ait üst üste çekilmiş 1.türev ($n=25$) UV spektrumları

UV-Türev Spektrofotometrik yöntemde, miktar tayini için en uygun dalga boyunun belirlenmesi amacıyla *Sülfasetamid sodyum*, *Betametazon* ve *Metil paraben-Propil paraben* standart çözeltilerinin ve eşit miktarda *Sülfasetamid sodyum*, *Betametazon* ve *Metil paraben-Propil paraben* içeren oftalmik damla çözeltisinin, n değerleri ($\Delta\lambda$) 5, 7, 9, 11, 13, 17, 21, 25 olacak şekilde 2. türev spektrumları alınmıştır. Elde edilen spektrumlar Şekil 4.12., Şekil 4.13., Şekil 4.14., Şekil 4.15., Şekil 4.16., Şekil 4.17., Şekil 4.18. ve Şekil 4.19.'da üst üste gösterilmiştir.

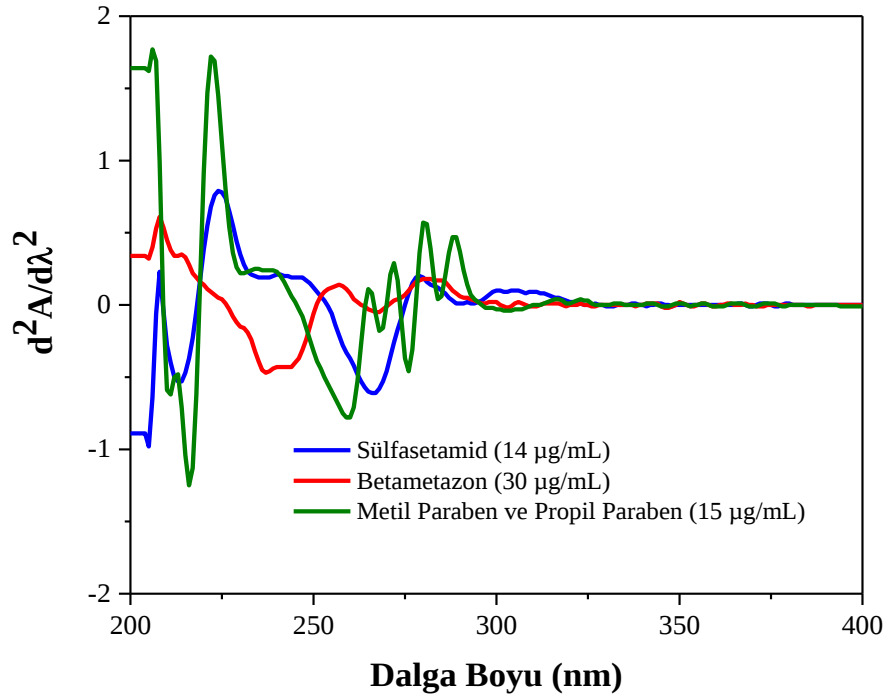


Şekil 4.12. 14 µg/mL *Sülfasetamid Sodyum*, 30 µg/mL *Betametazon* ve 15 µg/mL *Metil Paraben-Propil Paraben*’e ait üst üste çekilmiş 2.türev ($n=5$) UV spektrumları

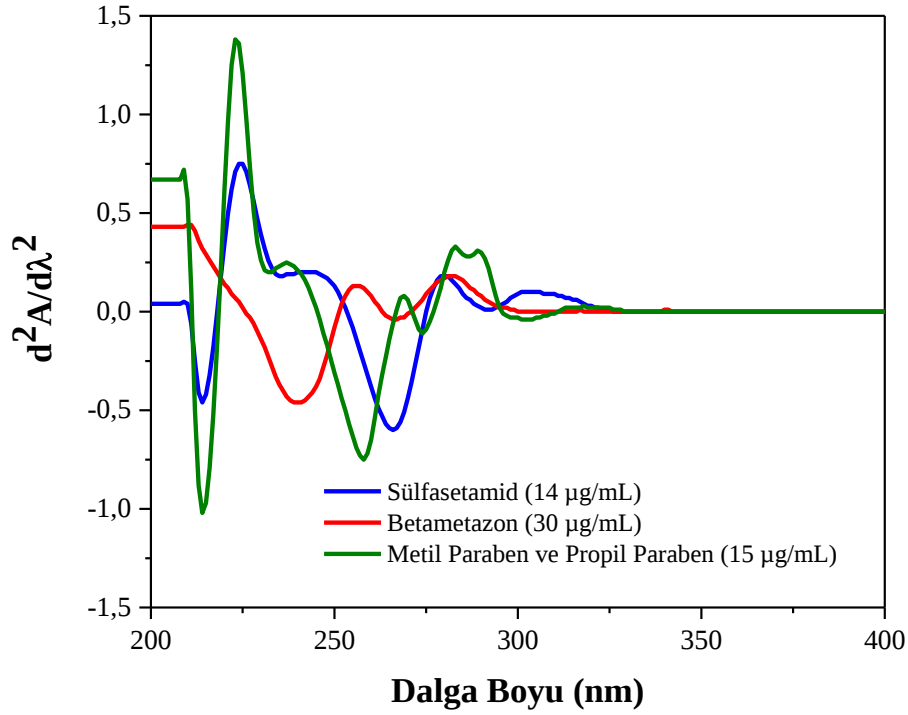
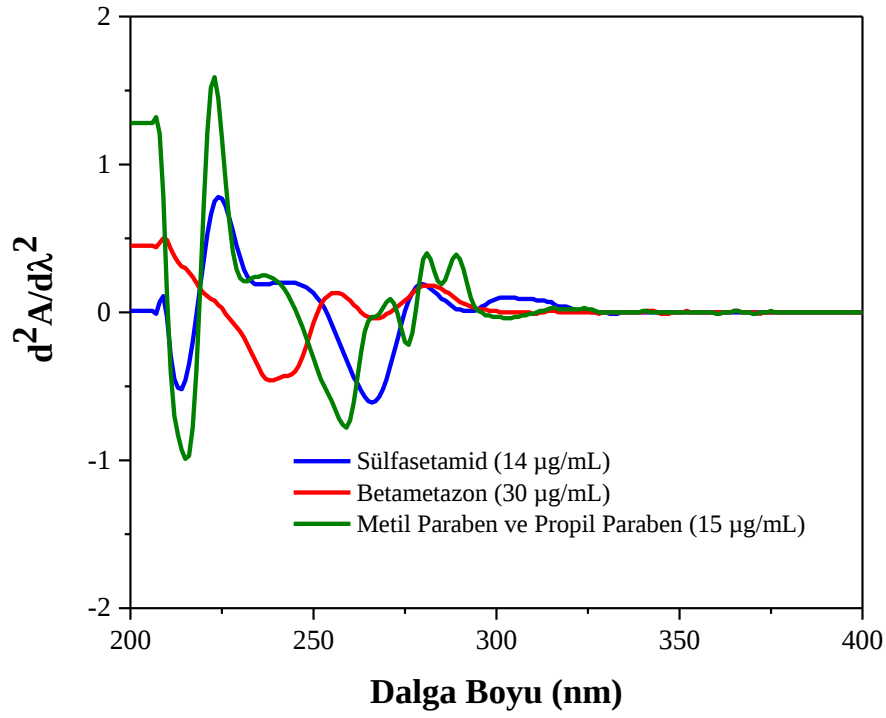


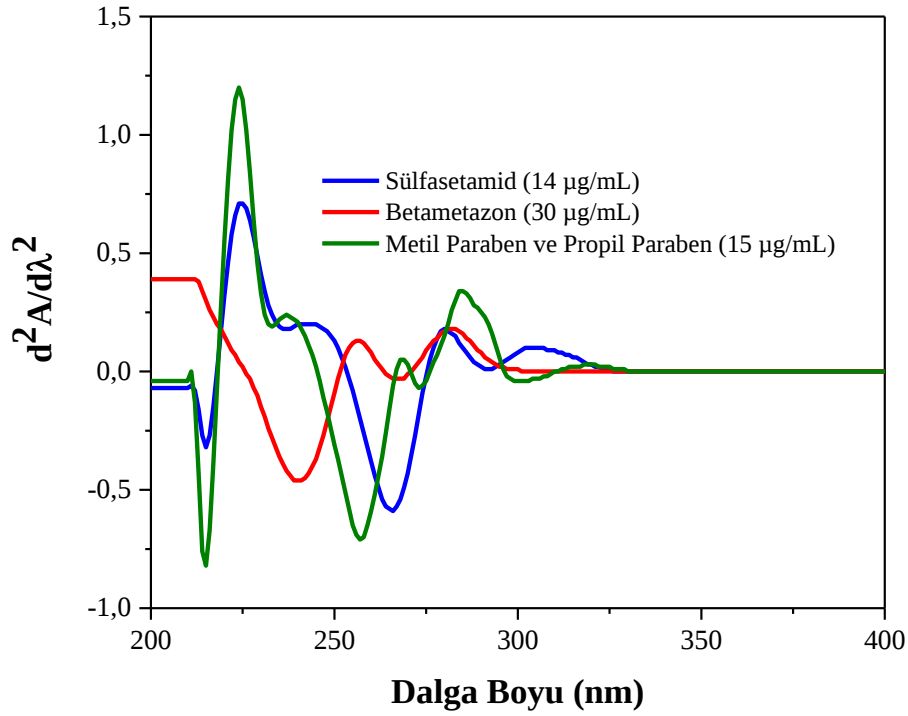


Şekil 4.15. 14 µg/mL Sulfasetamid Sodyum, 30 µg/mL Betametazon ve 15 µg/mL Metil Paraben-Propil Paraben'e ait üst üste çekilmiş 2.türev (n=11) UV spektrumları



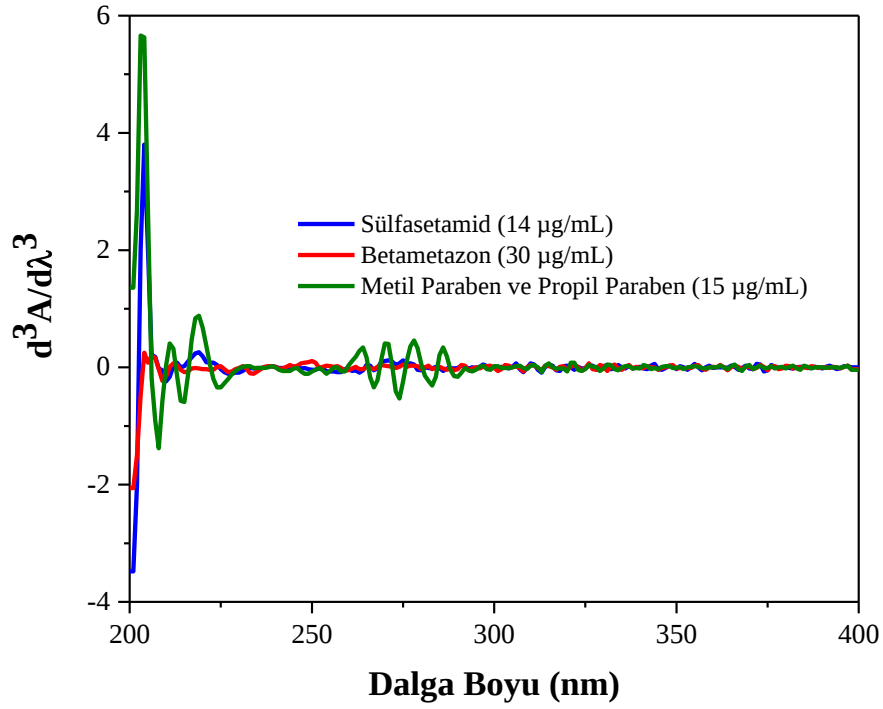
Şekil 4.16. 14 µg/mL Sulfasetamid Sodyum, 30 µg/mL Betametazon ve 15 µg/mL Metil Paraben-Propil Paraben'e ait üst üste çekilmiş 2.türev (n=13) UV spektrumları



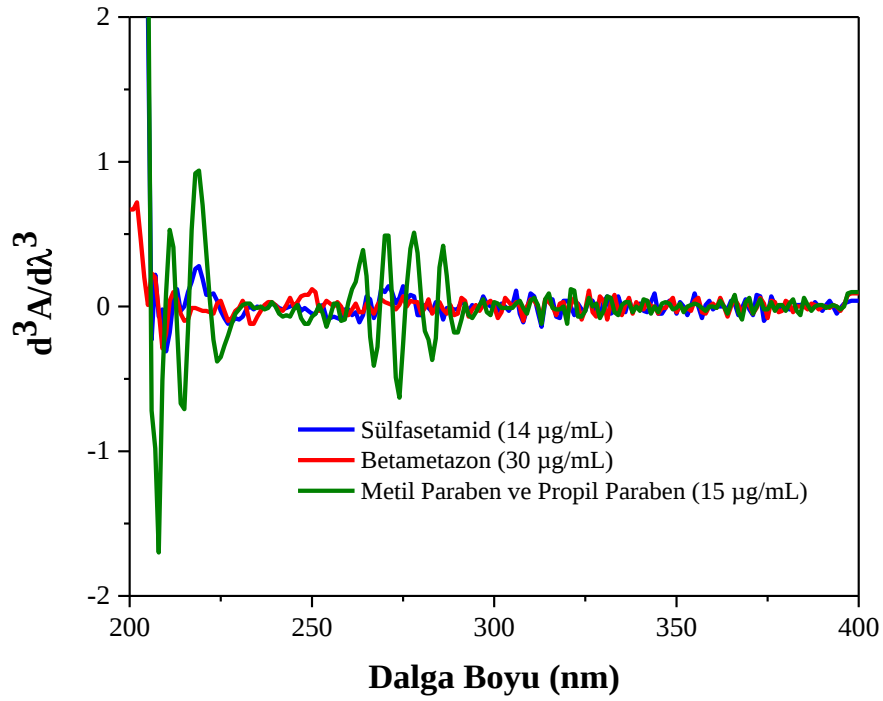


Şekil 4.19. 14 µg/mL Sülfasetamid Sodyum, 30 µg/mL Betametazon ve 15 µg/mL Metil Paraben-Propil Paraben'e ait üst üste çekilmiş 2.türev (n=25) UV spektrumları

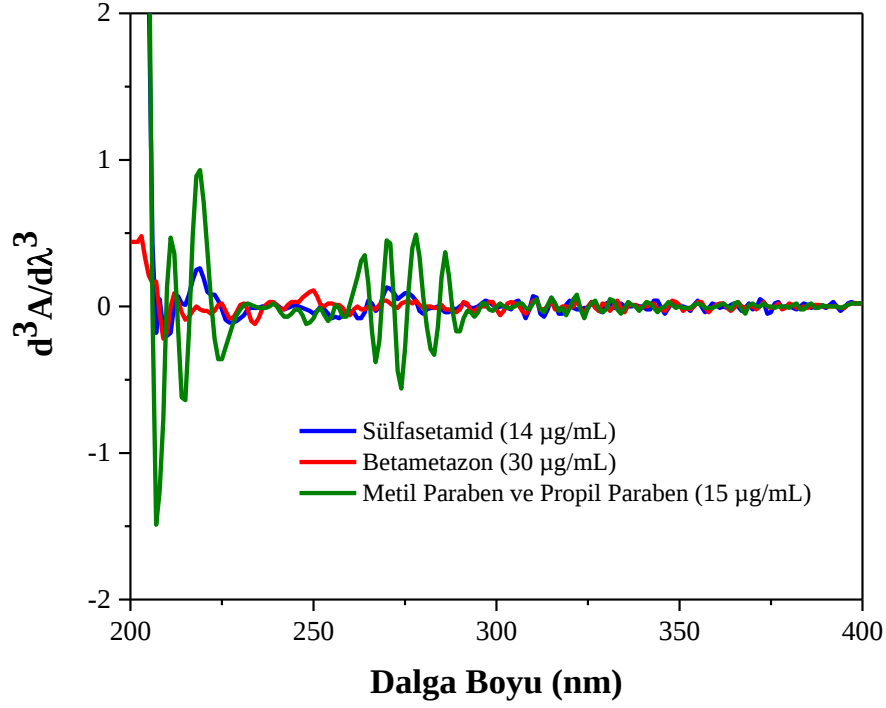
UV-Türev Spektrofotometrik yöntemde, miktar tayini için en uygun dalga boyunun belirlenmesi amacıyla Sülfasetamid sodyum, Betametazon ve Metil paraben-Propil paraben standart çözeltilerinin ve eşit miktarda Sülfasetamid sodyum, Betametazon ve Metil paraben-Propil paraben içeren oftalmik damla çözeltisinin, n değerleri ($\Delta\lambda$) 5, 7, 9, 11, 13, 17, 21, 25 olacak şekilde 3. türev spektrumları alınmıştır. Elde edilen spektrumlar Şekil 4.20., Şekil 4.21., Şekil 4.22., Şekil 4.23., Şekil 4.24., Şekil 4.25., Şekil 4.26. ve Şekil 4.27.'de üst üste gösterilmiştir.



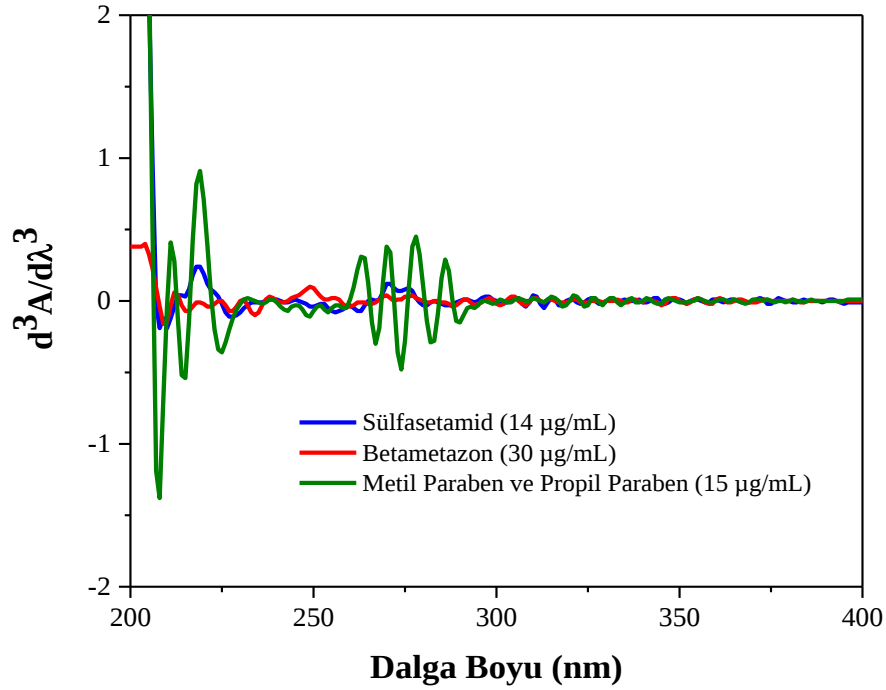
Şekil 4.20. 14 µg/mL Sulfasetamid Sodyum, 30 µg/mL Betametazon ve 15 µg/mL Metil Paraben-Propil Paraben'e ait üst üste çekilmiş 3.türev (n=5) UV spektrumları



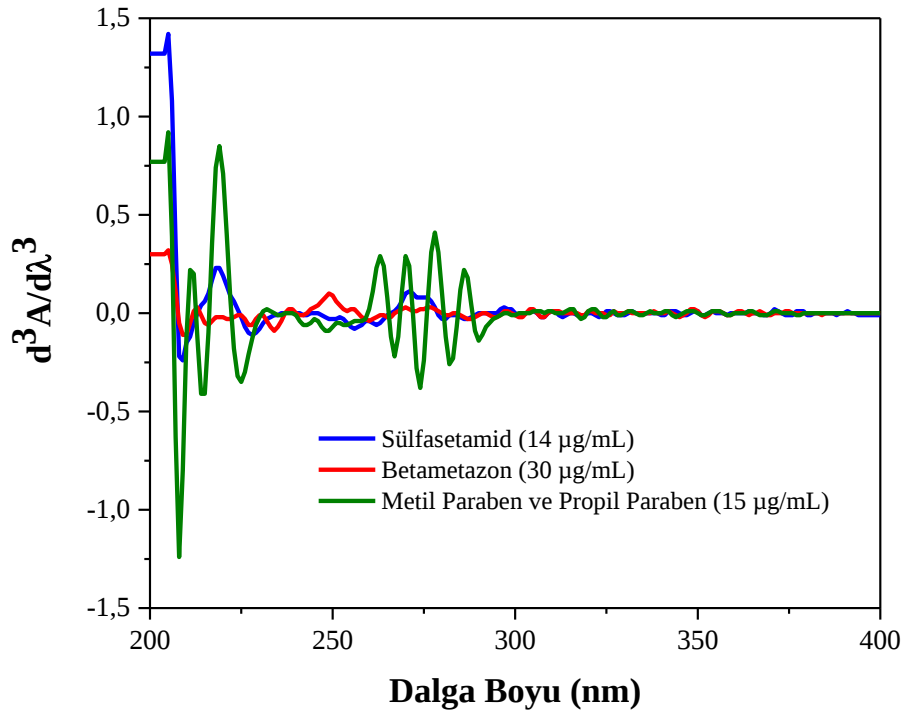
Şekil 4.21. 14 µg/mL Sulfasetamid Sodyum, 30 µg/mL Betametazon ve 15 µg/mL Metil Paraben-Propil Paraben'e ait üst üste çekilmiş 3.türev (n=7) UV spektrumları



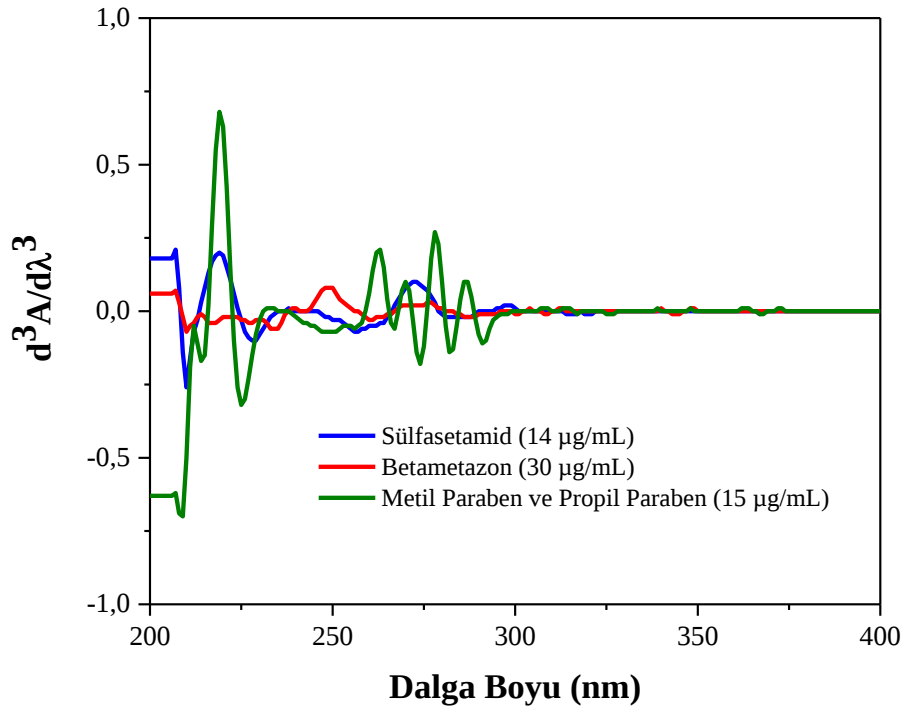
Şekil 4.22. 14 $\mu\text{g/mL}$ Sülfasetamid Sodyum, 30 $\mu\text{g/mL}$ Betametazon ve 15 $\mu\text{g/mL}$ Metil Paraben-Propil Paraben'e ait üst üste çekilmiş 3.türev ($n=9$) UV spektrumları



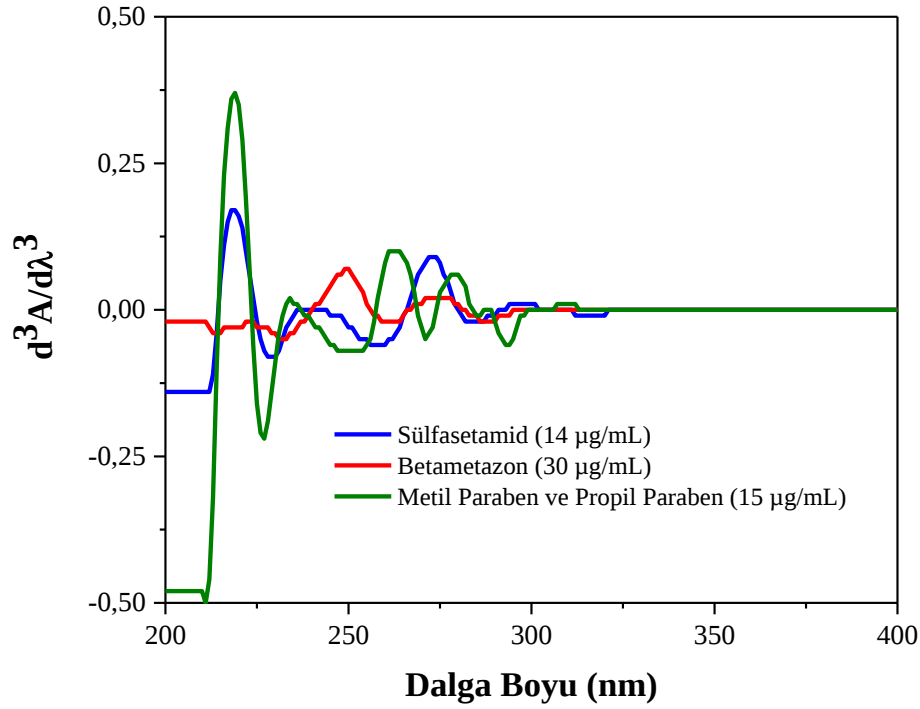
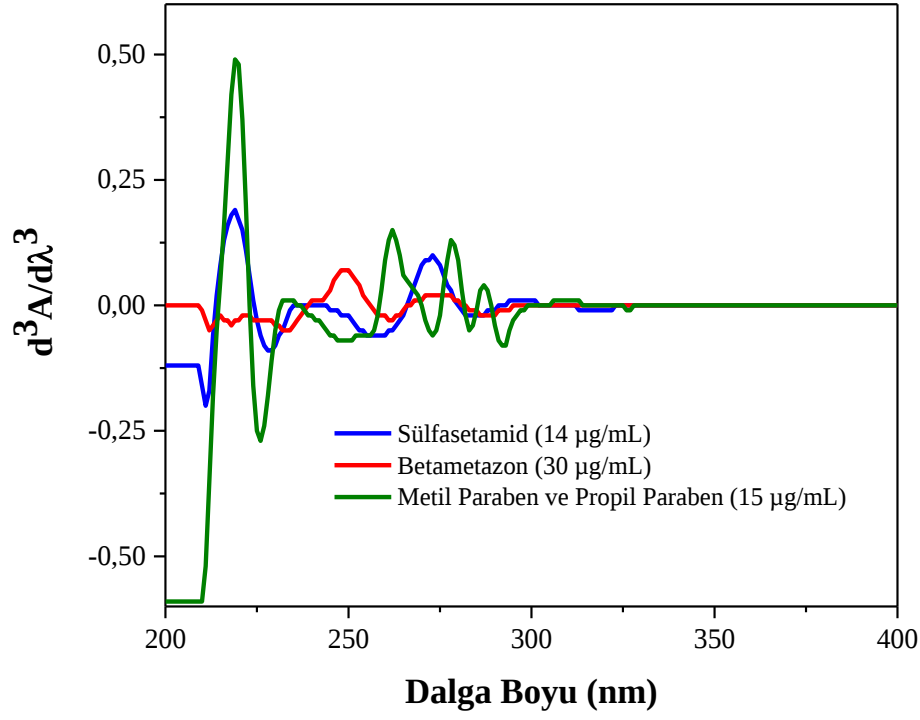
Şekil 4.23. 14 $\mu\text{g/mL}$ Sülfasetamid Sodyum, 30 $\mu\text{g/mL}$ Betametazon ve 15 $\mu\text{g/mL}$ Metil Paraben-Propil Paraben'e ait üst üste çekilmiş 3.türev ($n=11$) UV spektrumları



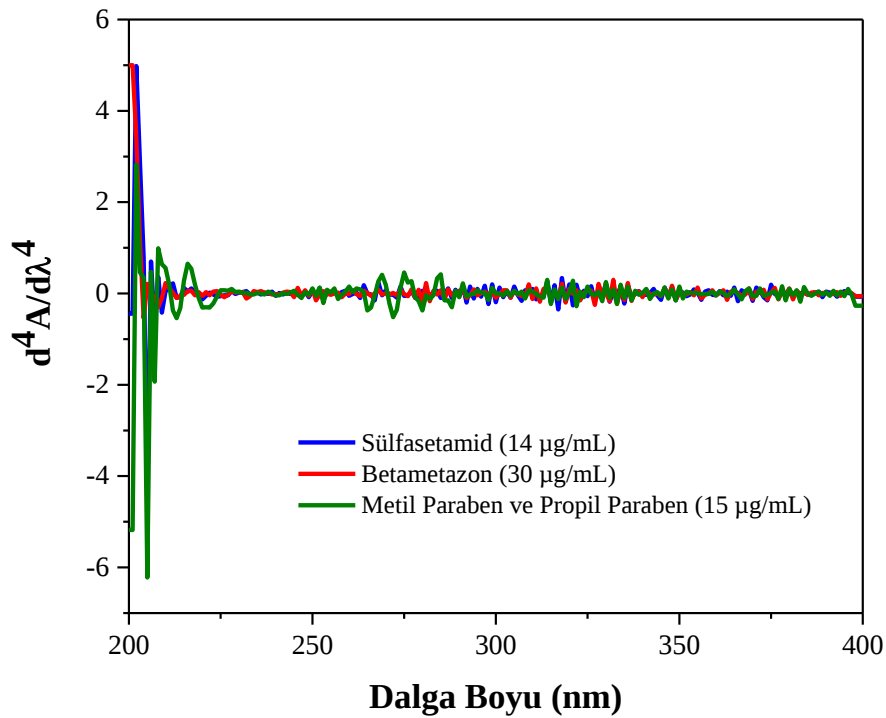
Şekil 4.24. 14 µg/mL Sülfasetamid Sodyum, 30 µg/mL Betametazon ve 15 µg/mL Metil Paraben-Propil Paraben'e ait üst üste çekilmiş 3.türev (n=13) UV spektrumları



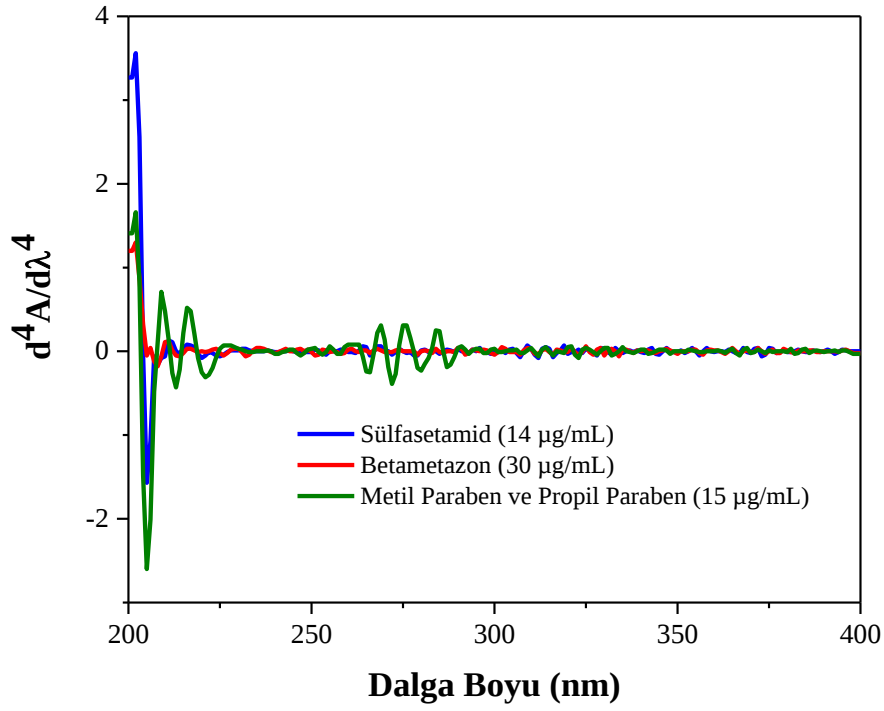
Şekil 4.25. 14 µg/mL Sülfasetamid Sodyum, 30 µg/mL Betametazon ve 15 µg/mL Metil Paraben-Propil Paraben'e ait üst üste çekilmiş 3.türev (n=17) UV spektrumları



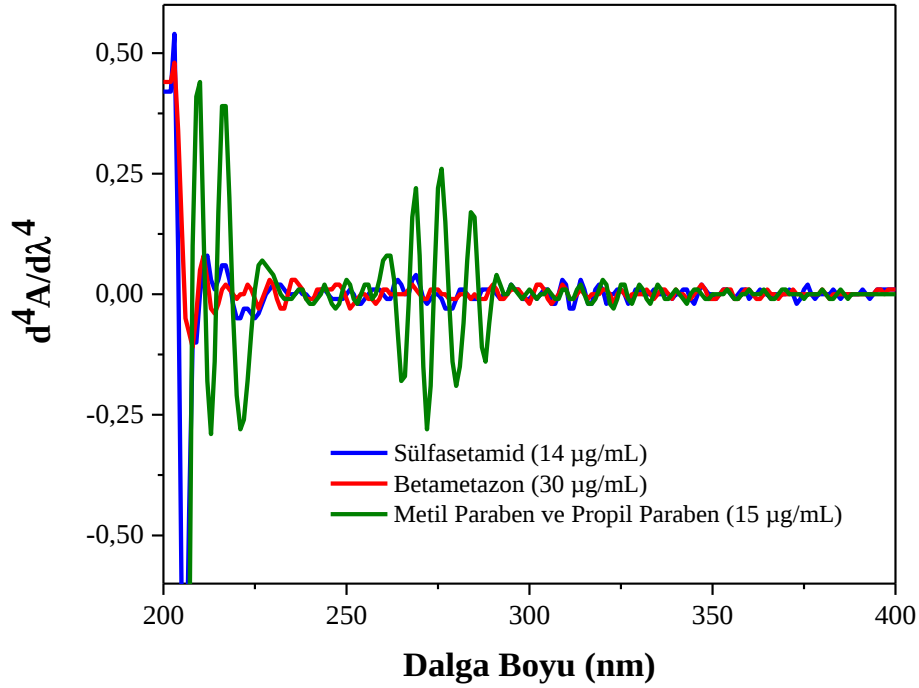
UV-Türev Spektrofotometrik yöntemde, miktar tayini için en uygun dalga boyunun belirlenmesi amacıyla *Sülfasetamid sodyum*, *Betametazon* ve *Metil paraben-Propil paraben* standart çözeltilerinin ve eşit miktarda *Sülfasetamid sodyum*, *Betametazon* ve *Metil paraben-Propil paraben* içeren oftalmik damla çözeltisinin, n değerleri ($\Delta\lambda$) 5, 7, 9, 11, 13, 17, 21, 25 olacak şekilde 4. türev spektrumları alınmıştır. Elde edilen spektrumlar Şekil 4.28., Şekil 4.29., Şekil 4.30., Şekil 4.31., Şekil 4.32., Şekil 4.33., Şekil 4.34. ve Şekil 4.35'te üst üste gösterilmiştir.



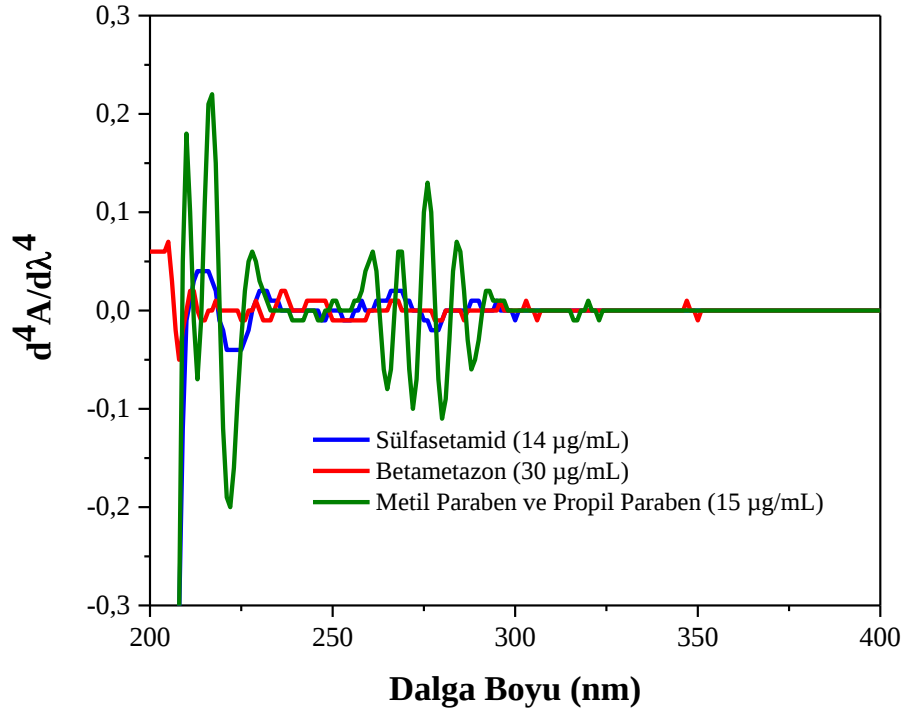
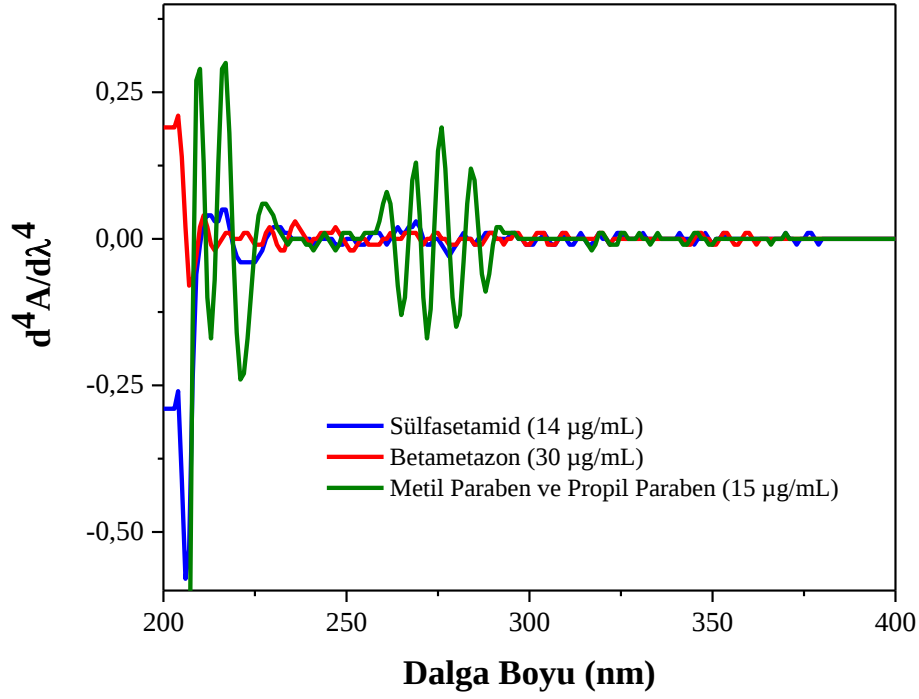
Şekil 4.28. 14 µg/mL *Sülfasetamid Sodyum*, 30 µg/mL *Betametazon* ve 15 µg/mL *Metil Paraben-Propil Paraben*'e ait üst üste çekilmiş 4.türev ($n=5$) UV spektrumları

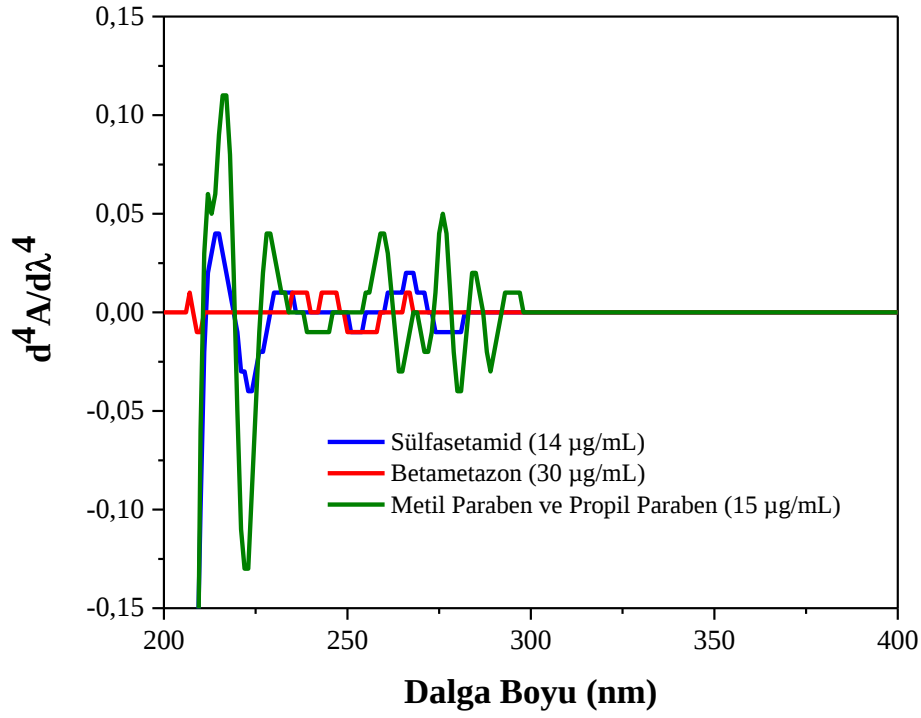


Şekil 4.29. 14 µg/mL Sülfasetamid Sodyum, 30 µg/mL Betametazon ve 15 µg/mL Metil Paraben-Propil Paraben'e ait üst üste çekilmiş 4.türev (n=7) UV spektrumları

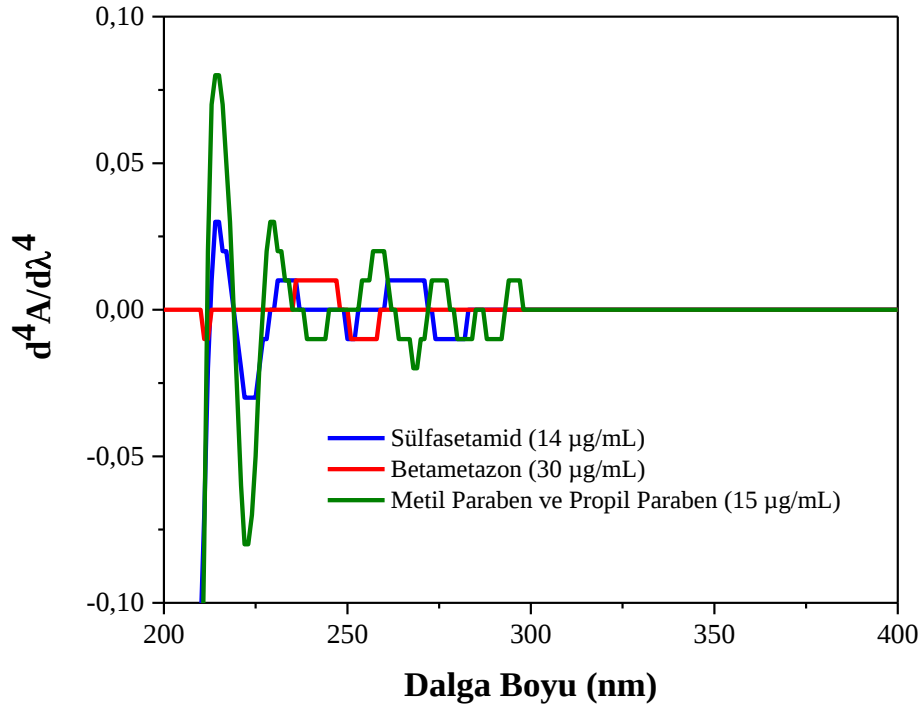


Şekil 4.30. 14 µg/mL Sülfasetamid Sodyum, 30 µg/mL Betametazon ve 15 µg/mL Metil Paraben-Propil Paraben'e ait üst üste çekilmiş 4.türev (n=9) UV spektrumları

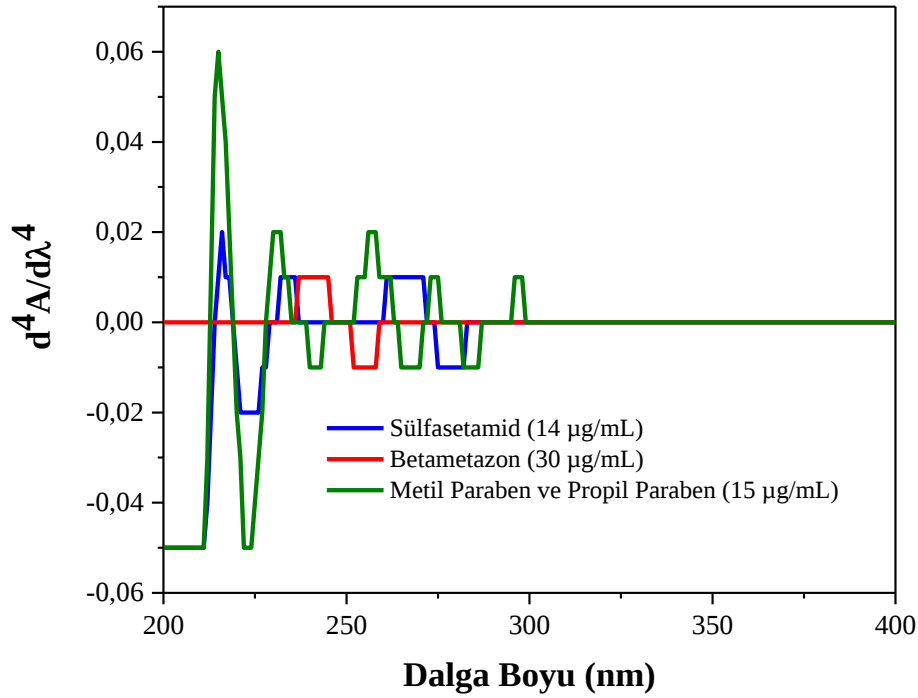




Şekil 4.33. 14 µg/mL Sülfasetamid Sodyum, 30 µg/mL Betametazon ve 15 µg/mL Metil Paraben-Propil Paraben'e ait üst üste çekilmiş 4.türev (n=17) UV spektrumları



Şekil 4.34. 14 µg/mL Sülfasetamid Sodyum, 30 µg/mL Betametazon ve 15 µg/mL Metil Paraben-Propil Paraben'e ait üst üste çekilmiş 4.türev (n=21) UV spektrumları



Şekil 4.35. 14 µg/mL Sülfasetamid Sodyum, 30 µg/mL Betametazon ve 15 µg/mL Metil Paraben-Propil Paraben'e ait üst üste çekilmiş 4.türev (n=25) UV spektrumları

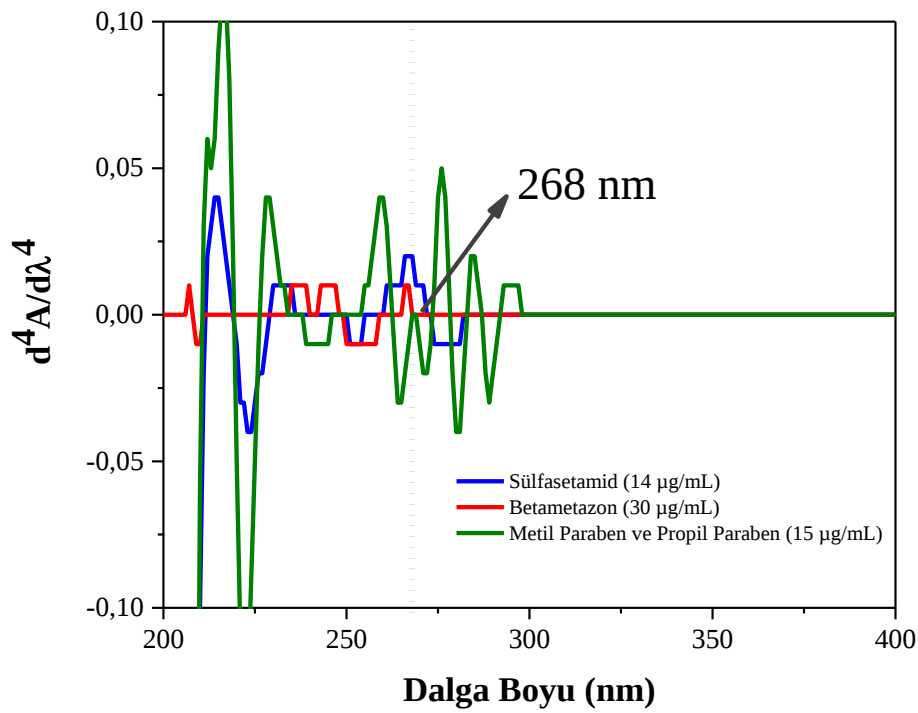
Elde edilen spektrumlardan Sülfasetamid sodyum, Betametazon ve Metil paraben-Propil paraben için miktar tayini yapılabilecek dalga boyları Çizelge 4.1.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Etken Maddelerin miktar tayini yapılabilecek UV Türev derecesi, n ve dalga boyu (λ) değerleri

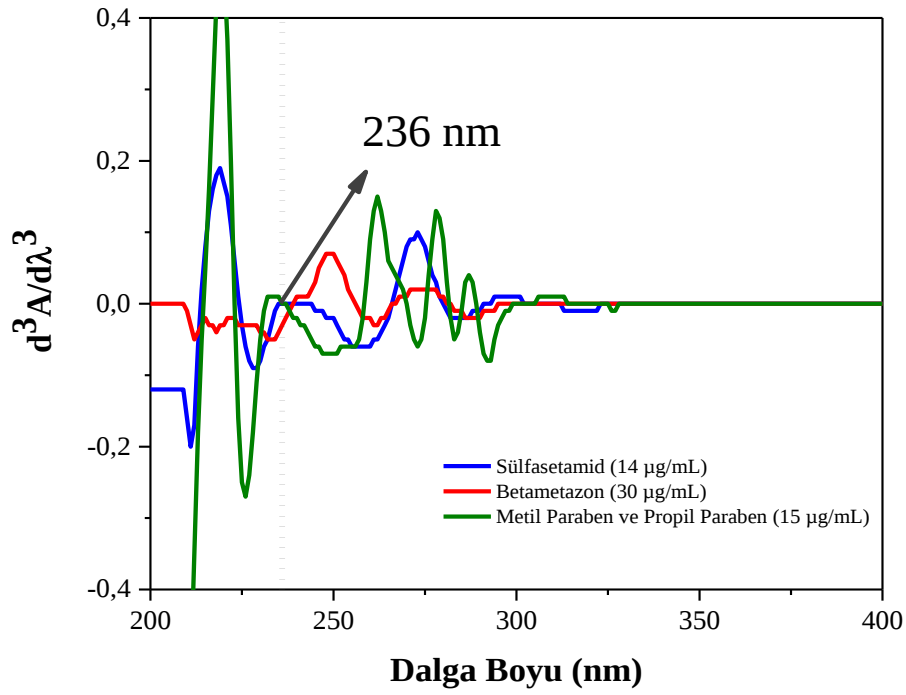
Etken Madde	UV Türev derecesi, n	Dalga boyu (λ), nm
Sülfasetamid Sodyum	2.Türev, $n = 25$	310
	3.Türev, $n = 7$	344
	4.Türev, $n = 9$	254
	4.Türev, $n = 17$	268
Betametazon	2.Türev, $n = 5$	332
	3.Türev, $n = 21$	236
	4.Türev, $n = 7$	286
	4.Türev, $n = 11$	235
Metil Paraben ve Propil Paraben	3. Türev, $n = 11$	283
	4.Türev, $n = 7$	275
	4.Türev, $n = 9$	266
	4.Türev, $n = 11$	284

4.3.2. UV Türev spektrofotometrisi yöntemi ile miktar tayini için seçilen dalga boyları

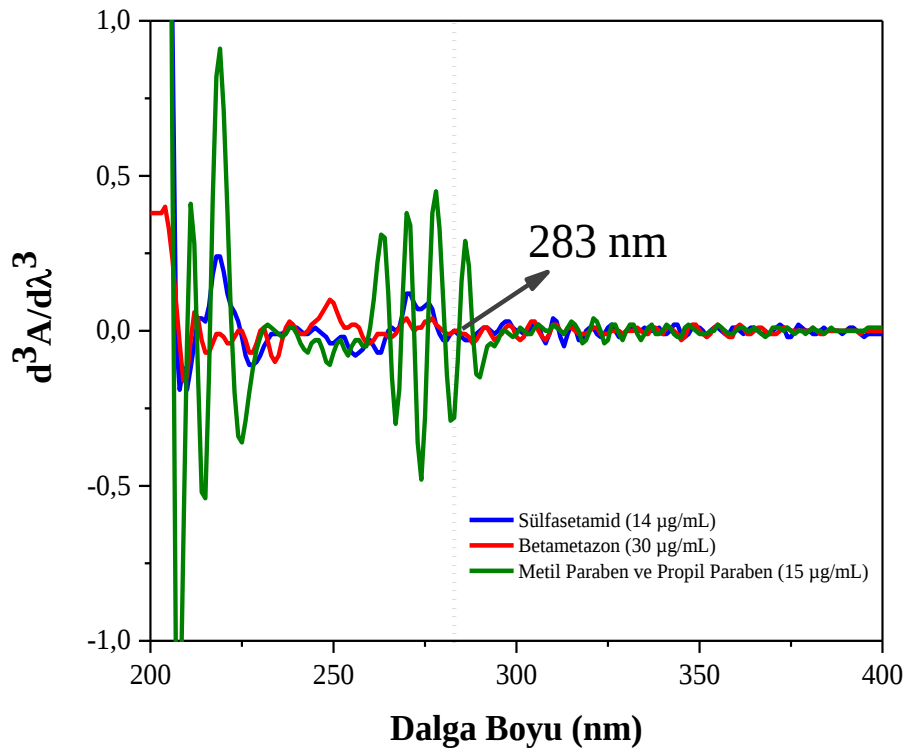
Bölüm 4.3.1’de anlatıldığı gibi taranan dalga boyları arasından *Sülfasetamid sodyum* tayini için 4.türev (n=17) 268 nm, *Betametazon* tayini için 3.türev (n=21) 236 nm, *Metil paraben-Propil paraben* tayini için 3.türev (n=11) 283 nm dalga boyları seçilmiş ve bu dalga boylarında diğer etken maddelerin türev absorbans değerlerinin sıfır olduğu Şekil 4.36., Şekil 4.37. ve Şekil 4.38.’de işaretlenerek gösterilmiştir.



Şekil 4.36. 14 µg/mL *Sülfasetamid Sodyum* 4.türev (n=17) UV spektrumu



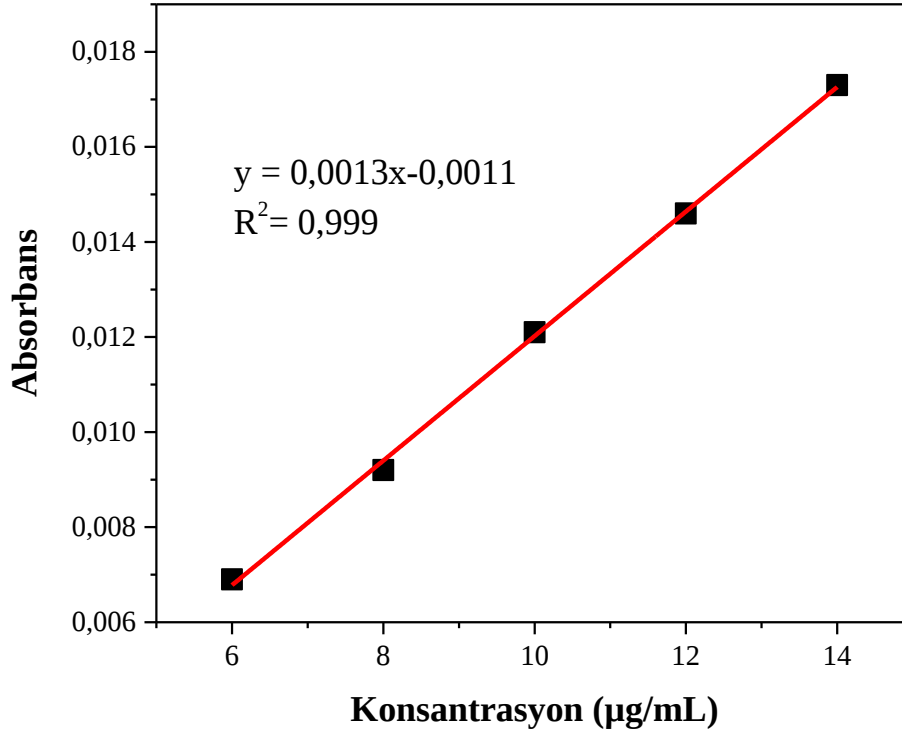
Şekil 4.37. 30 µg/mL *Betametazon* 3. türev (n=21) UV spektrumu



Şekil 4.38. 15 µg/mL *Metil paraben-Propil paraben* 3. türev (n=11) UV spektrumu

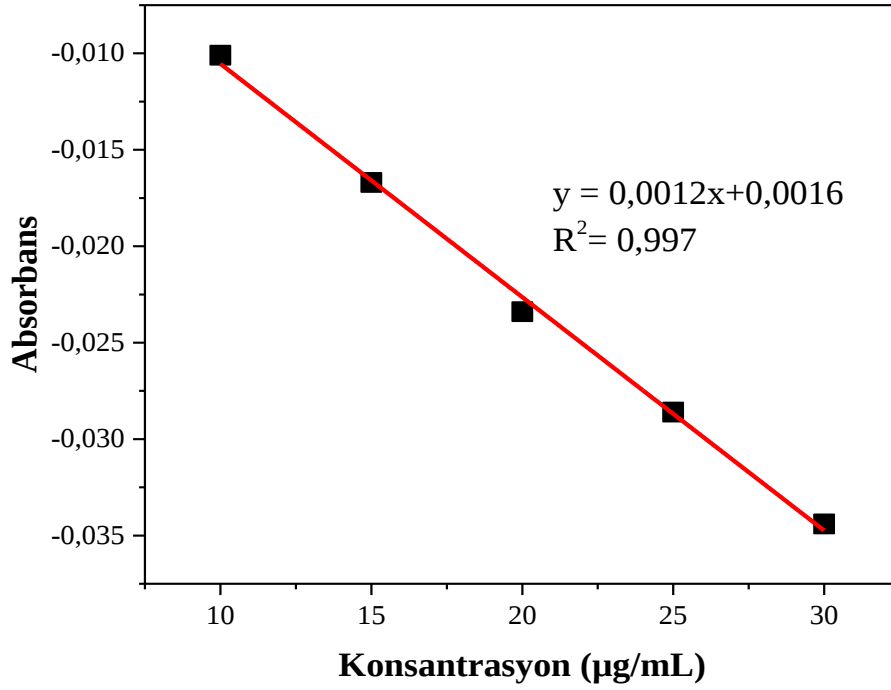
4.3.3. UV Türev spektrofotometrisi yöntemi kalibrasyon grafikleri

Kalibrasyon grafikleri Bölüm 3.2.8.'de anlatıldığı şekilde çizildi. UV Türev spektrofotometrisi yöntemi ile *Sülfasetamid sodyum* tayini için 4.türev (n=17) 268 nm'de çizilen kalibrasyon grafiği şekil 4.39.'da gösterilmiştir.



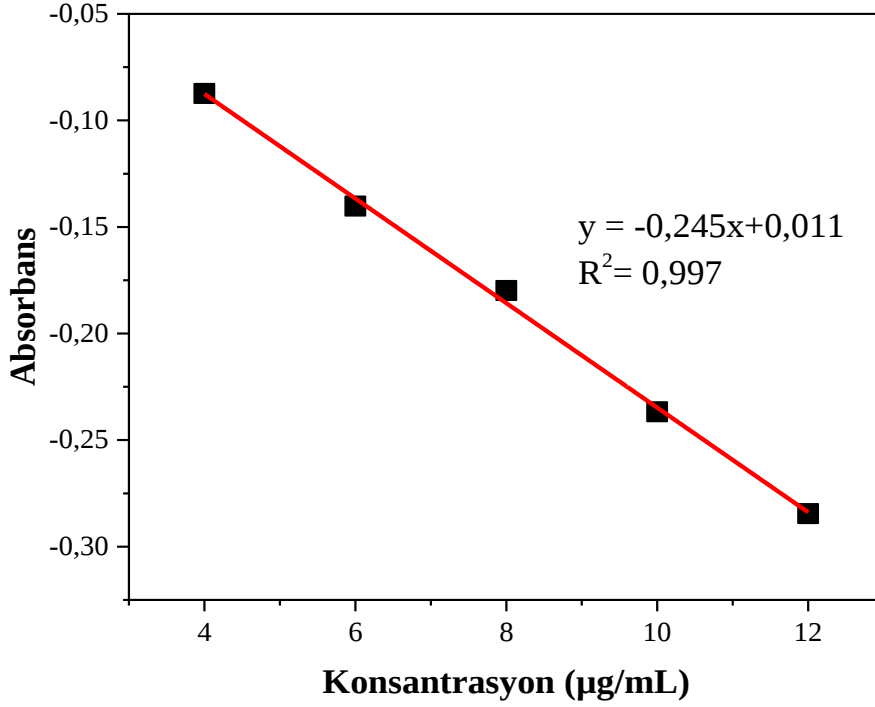
Şekil 4.39. UV Türev Spektrofotometrisi yöntemi ile (4. Türev, n=17, 268 nm) *Sülfasetamid Sodyum* tayininde kullanılan kalibrasyon grafiği, Derişim aralığı: 6,0-14,0 µg/mL

UV Türev Spektrofotometrisi yöntemi ile *Betametazon* tayini için 3.türev (n=21) 236 nm’de çizilen kalibrasyon grafiği şekil 4.40.’da gösterilmiştir.



Şekil 4.40. UV Türev Spektrofotometrisi yöntemiyle (3.türev, n=21, 236 nm) *Betametazon* tayininde kullanılan kalibrasyon grafiği, Derişim aralığı: 10-30 µg/mL

UV Türev spektrofotometrisi yöntemi ile *Metil paraben- Propil paraben* tayini için 3.türev (n=11) 283 nm’de çizilen kalibrasyon grafiği şekil 4.41.’de gösterilmiştir.



Şekil 4.41. UV Türev Spektrofotometrisi yöntemiyle (3.türev, n=11, 283 nm) *Metil Paraben- Propil Paraben* tayininde kullanılan kalibrasyon grafiği, Derişim aralığı: 4,0-12,0 µg/mL

UV-Türev Spektrofotometrik yöntemin analitik parametreleri Çizelge 4.2.’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. UV türev spektrofotometrik yöntemin analitik parametreleri

	<i>Sülfasetamid Sodyum</i>	<i>Betametazon</i>	<i>Metil Paraben- Propil Paraben</i>
Doğrusal Aralık (µg/mL)	6,0-14,0	10,0-30,0	4,0-12,0
Regresyon Denklemi	$y = 0,0013x - 0,0011$	$y = -0,0012x + 0,0016$	$y = -0,0245x + 0,0106$
Determinasyon katsayısı (R ²)	R ² = 0,9991	R ² = 0,9975	R ² = 0,9979
LOD (µg/mL)	0,58	0,89	1,14
LOQ (µg/mL)	1,93	2,96	3,82

4.3.4. UV Türev spektrofotometrik yöntemde tekrarlanabilirlik

UV Türev Spektrofotometrik yöntemde tekrarlanabilirlik çalışması, Bölüm 3.2.11.'de anlatıldığı gibi yapılmış ve elde edilen günler arası tekrarlanabilirlik çalışması sonuçları çizelge 4.3.'de, gün içi tekrarlanabilirlik çalışması sonuçları çizelge 4.4.'de verilmiştir.

Çizelge 4.3. Günler arası tekrarlanabilirlik çalışması sonuçları

Eklenen (µg/mL) Sülfasetamid Sodyum: 12,0 µg/mL Betametazon: 20,0 µg/mL Metil Paraben-Propil Paraben: 8,0 µg/mL	Bulunan(µg/mL)		
	Sülfasetamid Sodyum	Betametazon	Metil Paraben-Propil Paraben
	11,42	19,57	7,77
	11,67	19,66	8,05
	12,08	20,60	8,00
	11,50	19,49	8,00
	11,50	19,74	7,64
	12,00	19,57	7,97
	Ortalama	11,69	19,77
Ortalamanın Standart Hatası	0,11	0,17	0,06
SS	0,28	0,41	0,16
%BSS	2,39	2,09	2,05
%BH	2,54	1,14	1,18
GA* (p=0,05)	11,40- 11,99	19,33-20,21	7,73- 8,08

SS: Standart Sapma, BSS: Bağıl Standart Sapma, BH: Bağıl Hata, GA: Güven Aralığı

Çizelge 4.4. Gün içi tekrarlanabilirlik çalışması sonuçları

Eklenen (µg/mL) <i>Sülfasetamid Sodyum</i> : 12,0 µg/mL <i>Betametazon</i> : 20,0 µg/mL <i>Metil Paraben-Propil Paraben</i> : 8,0 µg/mL	Bulunan(µg/mL)		
	<i>Sülfasetamid Sodyum</i>	<i>Betametazon</i>	<i>Metil Paraben-Propil Paraben</i>
	12,49	19,40	7,83
	12,33	20,17	8,29
	11,75	20,43	8,07
	12,33	20,0	8,37
	11,92	20,34	8,20
	12,33	20,17	8,34
	Ortalama	12,19	20,08
Ortalamanın Standart Hatası	0,11	0,14	0,08
SS	0,29	0,36	0,20
%BSS	2,36	1,83	2,49
%BH	1,59	0,42	2,29
GA (p=0,05)	11,89 -12,49	19,69-20,47	7,97- 8,39

SS: Standart Sapma, BSS: Bağıl Standart Sapma, BH: Bağıl Hata, GA: Güven Aralığı

4.3.5. UV Türev spektrofotometrik yöntem ile oftalmik damlalarda etken madde miktar tayini sonuçları

UV türev spektrofotometrik yöntem ile oftalmik damlalarda bulunan etken madde miktar tayinleri Bölüm 3.2.9.'da anlatıldığı şekilde yapılmış, sonuçlar Çizelge 4.5., Çizelge 4.6. ve Çizelge 4.7.'de verilmiştir.

Çizelge 4.5. Oftalmik damlalarda *Sülfasetamid Sodyum* miktar tayini sonuçları

Numune No.	<i>Sülfasetamid Sodyum</i>	
	Bulunan miktar (mg/mL)	Belirtilen miktar (100,0 mg/mL)
1	99,31	Xort = 99,69 SS = 0,93 %BSS = 0,93 %BH = 0,31 GA = 98,53-100,85 (p=0,05)
2	98,58	
3	100,66	
4	100,67	
5	99,25	

Çizelge 4.6. Oftalmik damlalarda *Betametazon* miktar tayini sonuçları

Numune No.	<i>Betametazon</i>	
	Bulunan miktar (mg/mL)	Belirtilen miktar (1,0 mg/mL)
1	0,97	Xort = 0,98 SS = 0,19 %BSS = 1,96 %BH = 2,2 GA = 0,95- 1,00 (p=0,05)
2	1,01	
3	0,96	
4	0,97	
5	0,98	

Çizelge 4.7. Oftalmik damlalarda *Metil Paraben- Propil Paraben* miktar tayini sonuçları

Numune No.	<i>Metil Paraben-Propil Paraben</i>	
	Bulunan miktar (mg/mL)	Belirtilen miktar (0,6 mg/mL)
1	0,60	Xort = 0,60 SS = 0,011 %BSS = 1,91 %BH = 0,66 GA = 0,58-0,61 (p=0,05)
2	0,60	
3	0,58	
4	0,59	
5	0,61	

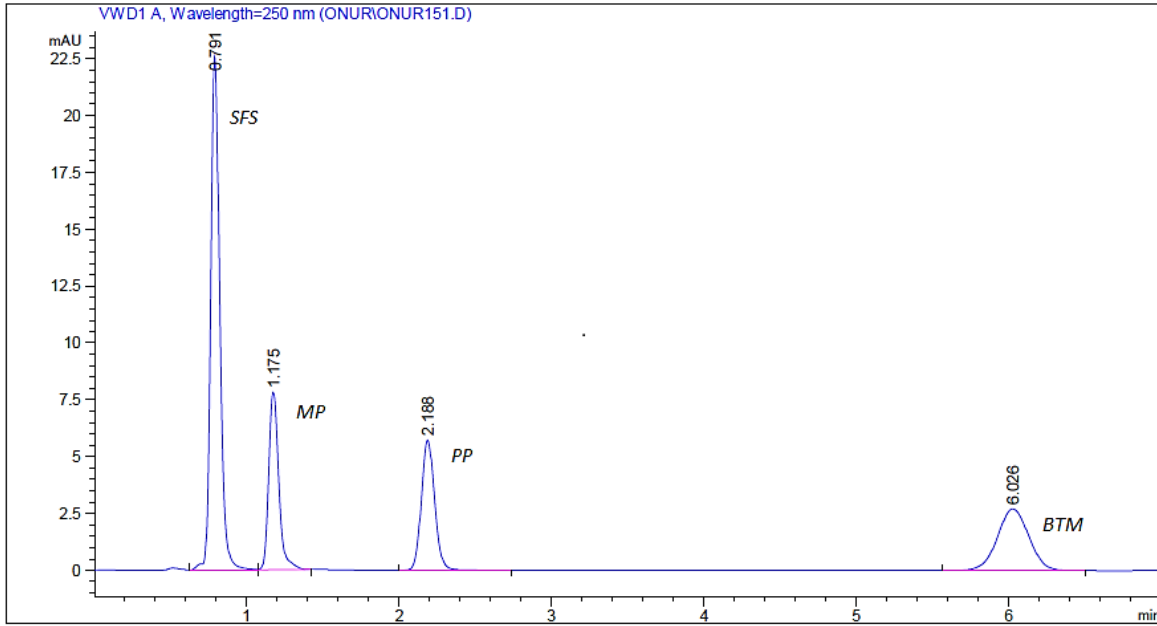
4.3.6. UV Türev spektrofotometrik yöntem ile geri kazanım sonuçları

UV türev spektrofotometrik yöntem ile geri kazanım çalışması, Bölüm 3.2.10.'da anlatıldığı şekilde, her bir etken madde için 3 farklı derişimde yapılmış ve sonuçlar Çizelge 4.8.'de verilmiştir.

Çizelge 4.8. UV türev spektrofotometrik yöntem ile geri kazanım sonuçları

	Gerçek Değer (µg/mL)	Bulunan Değer (µg/mL)	% Geri Kazanım	% Ortalama Geri Kazanım	%BSS	%BH
<i>Sülfasetamid Sodyum</i>	8,0	8,08	101,08	102,17	2,70	2,87
		8,17	102,17			
		8,26	103,26			
	10,0	9,83	98,34	98,61	2,14	1,43
		10,08	100,82			
		9,66	96,69			
<i>Betametazon</i>	16,0	11,42	95,20	96,34	1,09	3,69
		11,67	97,26			
		11,58	96,57			
	20,0	16,07	100,48	100,29	1,41	0,25
		15,80	98,80			
		16,25	101,60			
	24,0	20,17	100,85	100,85	2,95	0,83
		19,57	97,86			
		20,76	103,84			
<i>Metil Paraben-Propil Paraben</i>	6,4	25,17	104,89	104,4	0,52	4,38
		25,08	104,53			
		24,91	103,80			
	8,0	6,50	101,5	100,1	3,13	0,15
		6,18	96,5			
		6,55	102,3			
	9,6	7,69	96,2	97,26	1,23	2,79
		7,76	97,1			
		7,88	98,5			
	9,6	9,18	95,6	98,3	3,50	1,70
		9,81	102,2			
		9,32	97,1			

4.4. RP- HPLC ile Sülfasetamid Sodyum, Betametazon, Metil Paraben ve Propil Paraben Tayini



Şekil 4.42. Sülfasetamid Sodyum, Betametazon, Metil Paraben ve Propil Paraben içeren karışıma ait kromatogram

4.4.1. Yöntemin optimizasyonu

RP- HPLC yönteminde, Sülfasetamid sodyum, Betametazon, Metil paraben ve Propil paraben miktar tayinlerinde uygun koşulların belirlenmesi amacıyla mobil faz bileşimi, derişimi, akış hızı, enjeksiyon hacmi, kolon sıcaklığı gibi parametreler incelendi. Kromatografik sistemde optimize edilen koşullarda t_0 değerinin bulunması için sisteme asetonitril enjekte edildi ve asetonitrilin alıkonma zamanı t_0 olarak alındı.

Dedektör seçimi

Oftalmik damlalarda aynı yöntemle tayin edilmek istenen Sülfasetamid sodyum, Betametazon, Metil paraben ve Propil paraben'in absorpsiyon verdiği 250 nm dedeksiyon dalga boyu olarak seçildi ve UV dedektör kullanıldı.

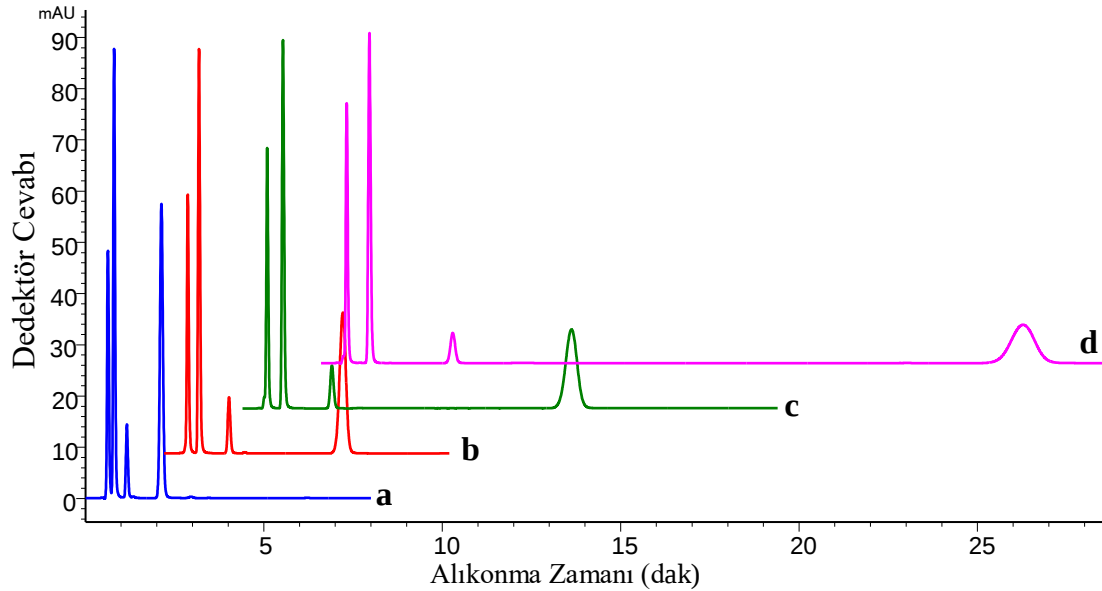
Sabit fazın belirlenmesi

Sülfasetamid sodyum, Betametazon, Metil paraben ve Propil paraben molekülleri için ters faz sıvı kromatografide kullanılan C₁₈ HPLC kolonu kullanıldı.

Mobil fazın belirlenmesi

Mobil faz sisteme su ve asetonitril olarak sırasıyla 60:40 olarak verildi. Analiz süresi 14 dakika olarak belirlendi. Bu şartlarda, *Sülfasetamid sodyum, Metil paraben ve Propil paraben* ilk 3 dakikada kolondan çıkarken *Betametazon* 14 dakikada, nispeten daha geç çıktı. Bu nedenle, mobil faz oranı (55:45 h/h) olarak seçilerek en iyi ayırım elde edildi. Bu şartlarda analiz süresi de 7 dakikaya indirilmiş oldu. Elde edilen kromatogram, Şekil 4.43.'de görülmektedir.

Sülfasetamid Sodyum, Betametazon, Metil Paraben ve Propil Paraben içeren karışıma ait kromatogram



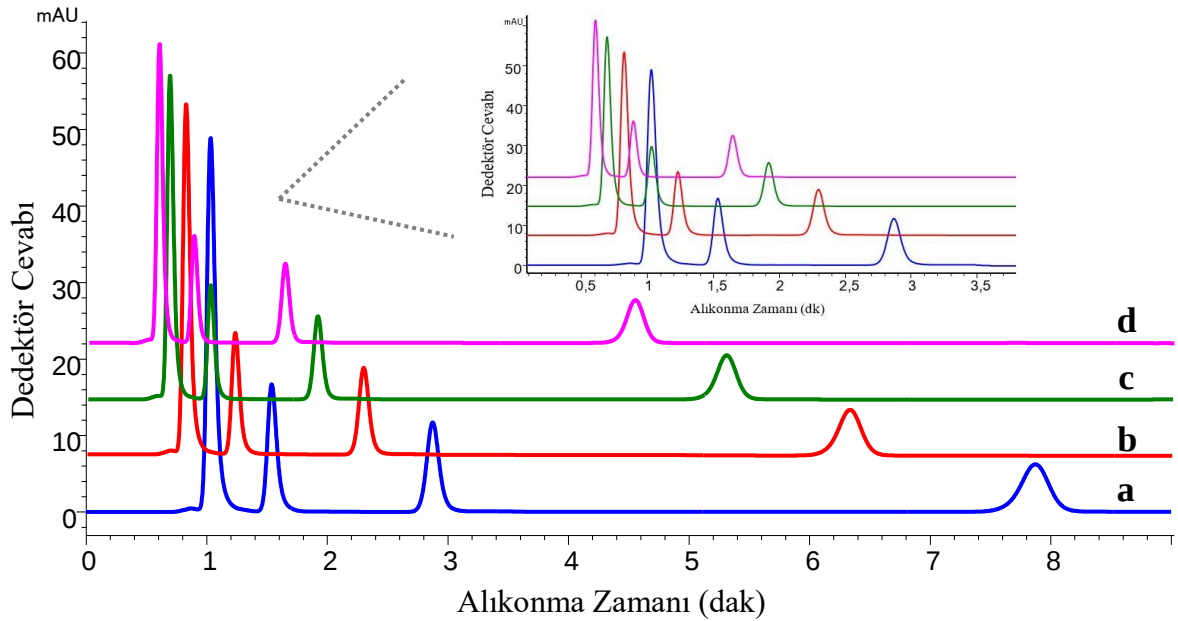
Şekil 4.43. Kromatografik koşullar: Mobil Faz: Su/Asetonitril (55:45 h/h), akış hızı: 0,6 mL/dak., kolon sıcaklığı 25°C, mobil faz oranı: (a) 45:55 (b) 55:45 (c) 60:40 (d) 65:35

Mobil faz akış hızının belirlenmesi

HPLC sisteminde 0,4;0,5; 0,6 ve 0,7 mL/dak mobil faz akış hızlarında analizler yapılmış ve elde edilen kromatografik parametreler Çizelge 4.9.'da verilmiştir.

Çizelge 4.9. Mobil faz akış hızının kromatografik parametrelere etkisi

Akış Hızı (mL/dak)		0,4	0,5	0,6	0,7
<i>Sülfasetamid</i>	t_R (dak)	1,035	0,821	0,681	0,583
	R_{SFS-MP}	3,675	3,478	3,226	2,79
	N	2338,04	2271	1954,8	1627,7
	P_{As}	1,402	1,347	1,31	1,238
<i>Betametazon</i>	t_R (dak)	7,874	6,328	5,298	4,53
	N	14389,1	13774	13042,0	11989,2
	P_{As}	0,928	0,926	0,935	0,944
<i>Metil Paraben</i>	t_R (dak)	1,541	1,229	1,019	0,871
	R_{MP-PP}	7,889	7,559	7,168	6,685
	N	4951,1	3920,2	3879,9	3334,8
	P_{As}	1,32	1,264	1,258	1,225
<i>Propil Paraben</i>	t_R (dak)	2,875	2,294	1,908	1,626
	R_{PP-BTM}	15,68	15,503	15,014	14,44
	N	9868,8	9356,0	8452,2	7631,0
	P_{As}	1,134	1,118	1,119	1,113



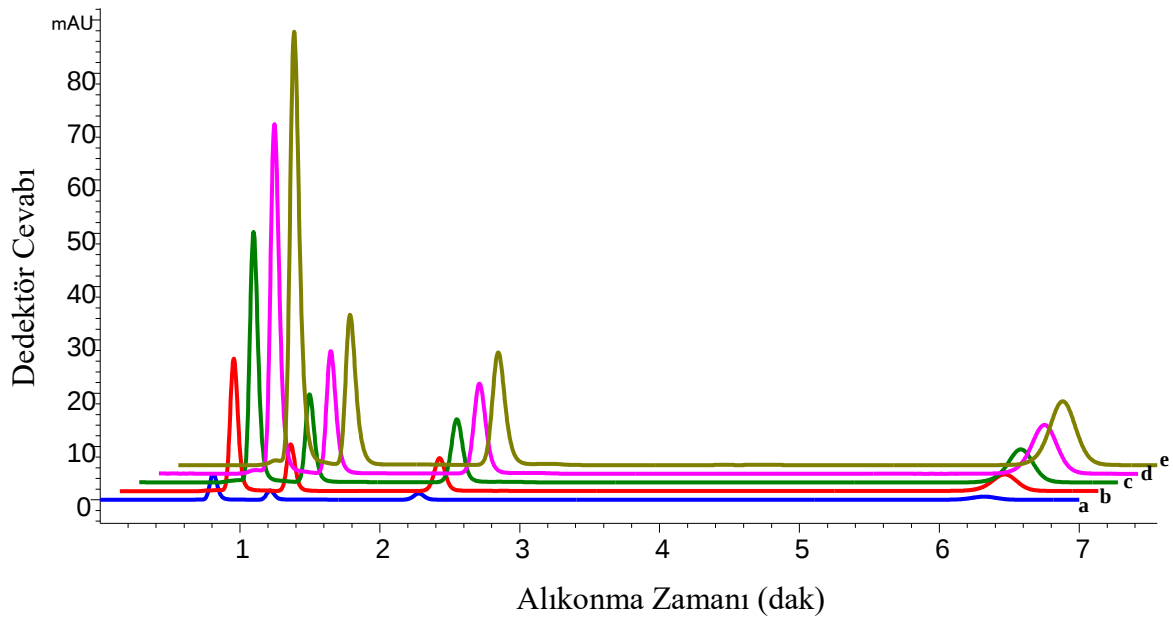
Şekil 4.44. Kromatografik koşullar: Mobil faz: Su/Asetonitril (55:45 h/h), enjeksiyon hacmi 10,0 μ L, kolon sıcaklığı 25°C, akış hızı: (a) 0,4 (b) 0,5 (c) 0,6 (d) 0,7, 5,0 μ g/mL SFS, 2,5 μ g/mL BTM, 1,0 μ g/mL MP, 1,0 μ g/mL PP içeren standart çözelti

Enjeksiyon hacminin belirlenmesi

HPLC sisteminde 1, 5, 10, 15 ve 20 µL enjeksiyon hacimlerinde analiz yapılmış ve elde edilen kromatografik parametreler Çizelge 4.10.'da verilmiştir.

Çizelge 4.10. Enjeksiyon hacminin kromatografik parametrelere etkisi

Enjeksiyon Hacmi (µL)		1	5	10	15	20
<i>Sülfasetamid</i>	tR (dak)	0,809	0,816	0,818	0,826	0,830
	R _{SFS-MP}	3,834	3,726	3,469	3,273	3,025
	N	2786	2317,5	2271,73	1894,5	1631,2
	P _{As}	1,178	1,182	1,242	1,270	1,341
<i>Betametazon</i>	tR (dak)	6,321	6,327	6,303	6,31	6,325
	N	12904,4	15199,5	14904,9	14510,1	13885,7
	P _{As}	0,932	0,922	0,937	0,954	0,969
<i>Metil Paraben</i>	tR (dak)	1,216	1,223	1,218	1,229	1,230
	R _{MP-PP}	8,404	8,166	7,669	7,339	6,84
	N	5895,3	5425,4	4689,7	4194,5	3608,0
	P _{As}	1,168	1,15	1,209	1,265	1,336
<i>Propil Paraben</i>	tR (dak)	2,278	2,287	2,271	2,292	2,289
	R _{PP-BTM}	16,701	16,239	16,078	15,705	15,149
	N	10168,8	10986,6	9864,7	9101,2	8121
	P _{As}	1,036	1,051	1,091	1,140	1,197



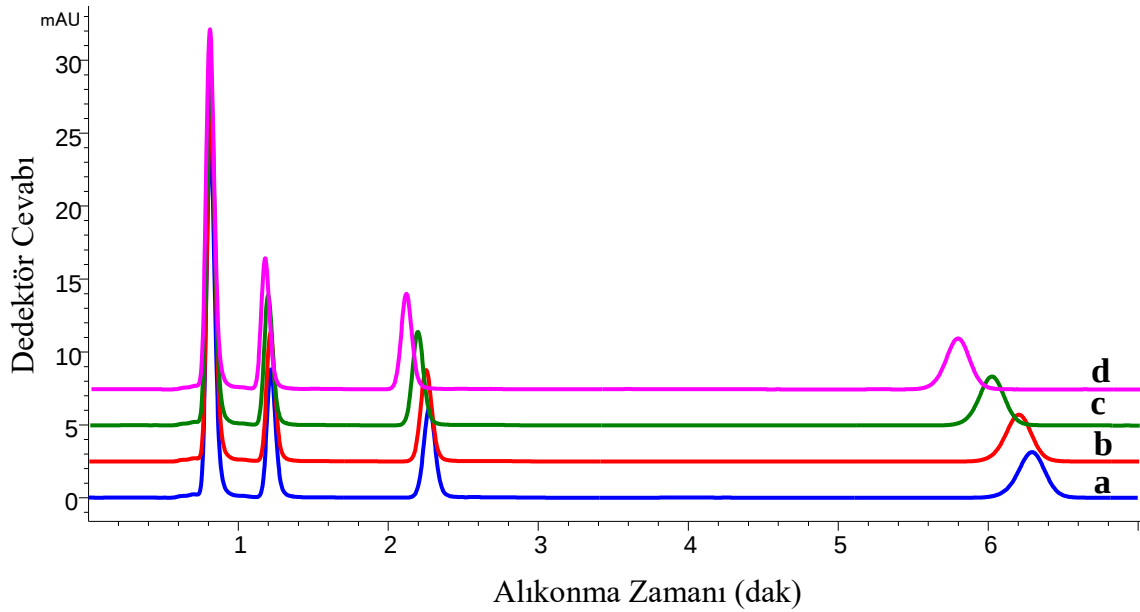
Şekil 4.45. Kromatografik koşullar: Mobil faz: Su/Asetonitril (55:45 h/h), akış hızı: 0,5 mL/dak, kolon sıcaklığı 25°C, enjeksiyon hacmi: (a) 1,0 (b) 5,0 (c) 10,0 (d) 15,0 (e) 20,0, 5,0 µg/mL SFS, 2,5 µg/mL BTM, 1,0 µg/mL MP, 1,0 µg/mL PP içeren standart çözelti

Kolon sıcaklığının belirlenmesi

HPLC sisteminde 25, 30, 35, 40°C derecede analiz yapılmış ve elde edilen kromatografik parametreler Çizelge 4.11.'de verilmiştir.

Çizelge 4.11. Kolon sıcaklığının kromatografik parametrelere etkisi

Kolon Sıcaklığı (°C)		25	30	35	40
<i>Sülfasetamid</i>	tR (dak)	0,813	0,81	0,802	0,790
	R _{SFS-MP}	3,723	3,685	3,563	3,449
	N	2637	2619,8	2428,2	2468,3
	P _{As}	1,192	1,191	1,195	1,188
<i>Betametazon</i>	tR (dak)	6,291	6,197	6,014	5,779
	N	15235,6	15641,2	15962,8	16202,6
	P _{As}	0,931	0,947	0,956	0,962
<i>Metil Paraben</i>	tR (dak)	1,217	1,208	1,188	1,159
	R _{MP-PP}	8,211	8,145	7,907	7,646
	N	5430,7	5408,9	5230,8	5100,3
	P _{As}	1,156	1,140	1,169	1,165
<i>Propil Paraben</i>	tR (dak)	2,273	2,244	2,186	2,100
	R _{PP-BTM}	16,509	16,649	16,541	16,554
	N	10989,2	10928,6	10607,3	10489,7
	P _{As}	1,057	1,069	1,083	1,087



Şekil 4.46. Kromatografik koşullar: Mobil faz: Su/Asetonitril (55:45 h/h), akış hızı: 0,5 mL/dak, enjeksiyon hacmi 5,0 µL, kolon sıcaklığı: (a) 25,0 (b) 30,0 (c) 35,0 (d) 40,0, 5,0 µg/mL SFS, 2,5 µg/mL BTM, 1,0 µg/mL MP, 1,0 µg/mL PP içeren standart çözelti

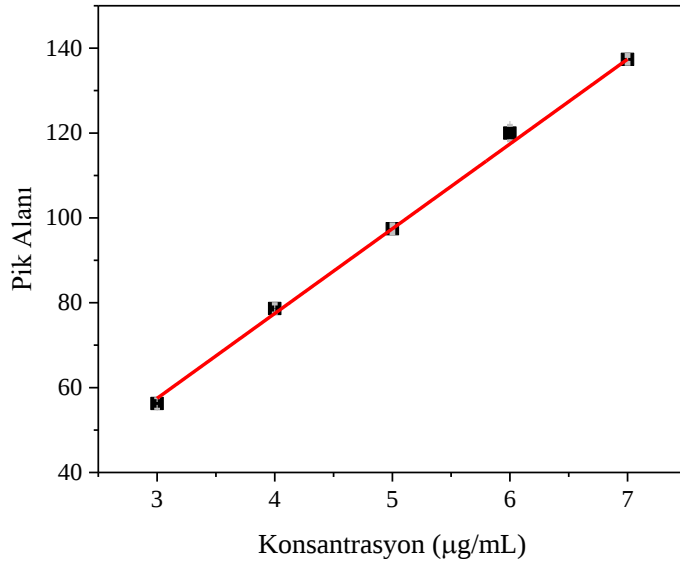
Çizelge 4.12. Optimizasyon çalışmaları sonucunda belirlenen kromatografik koşullar

Kolon	Agilent Zorbax Eclipse XDB C ₁₈ (3,0 x75mm, 3,5µm)
Kolon sıcaklığı	25°C
Dedektör	UV, 250 nm.
Mobil Faz	Su, Asetonitril (55:45 h/h)
Mobil faz akış hızı	0,5 mL/dak
Enjeksiyon hacmi	5,0 µL

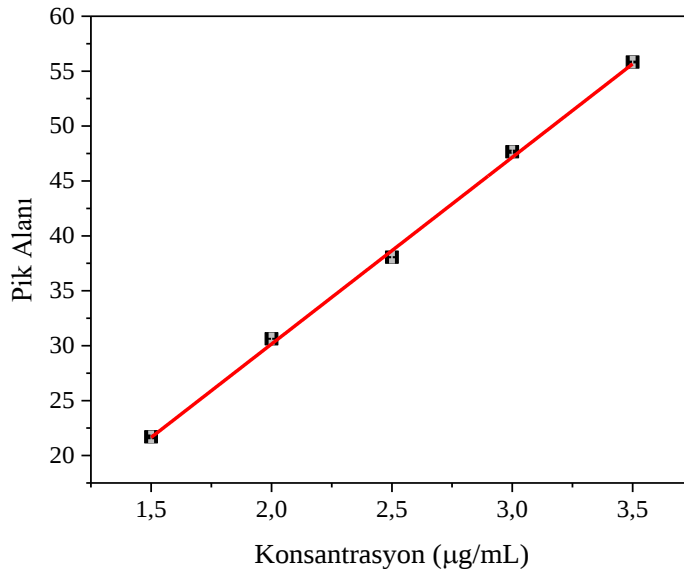
RP-HPLC sisteminde optimum koşullarda *Sülfasetamid sodyum*, *Betametazon*, *Metil paraben* ve *Propil paraben* tayini 7 dakikada gerçekleştirildi.

4.4.2. Kalibrasyon grafikleri

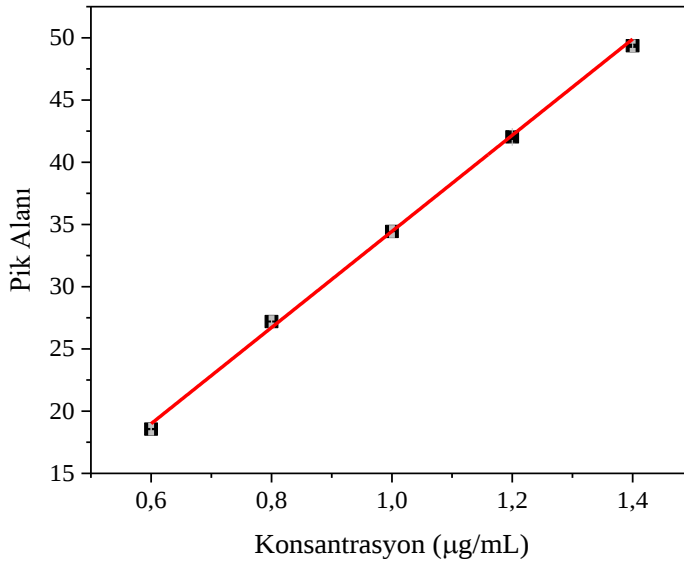
Optimize edilen koşullarda, analitlerin kalibrasyon grafikleri çizilmiş ve kalibrasyon denklemleri elde edilmiştir. Buna göre, *Sülfasetamid sodyum*, *Betametazon*, *Metil paraben* ve *Propil paraben* için elde edilen kalibrasyon grafikleri, denklemleri ve regresyon katsayıları ile birlikte, sırasıyla Şekil 4.47., Şekil 4.48., Şekil 4.49. ve Şekil 4.50’de gösterilmiştir.



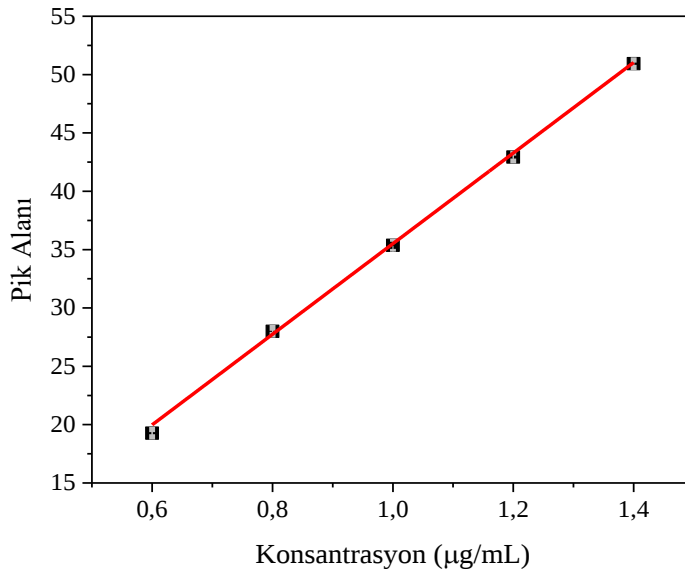
Şekil 4.47. RP- HPLC yöntemi ile SFS kalibrasyon grafiği, Derişim aralığı: 3,0- 7,0 µg/mL



Şekil 4.48. RP- HPLC yöntemi ile *BTM* kalibrasyon grafiği, Derişim aralığı: 1,5- 3,5 µg/mL



Şekil 4.49. RP- HPLC yöntemi ile *MP* kalibrasyon grafiği, Derişim aralığı: 0,6- 1,4 µg/mL

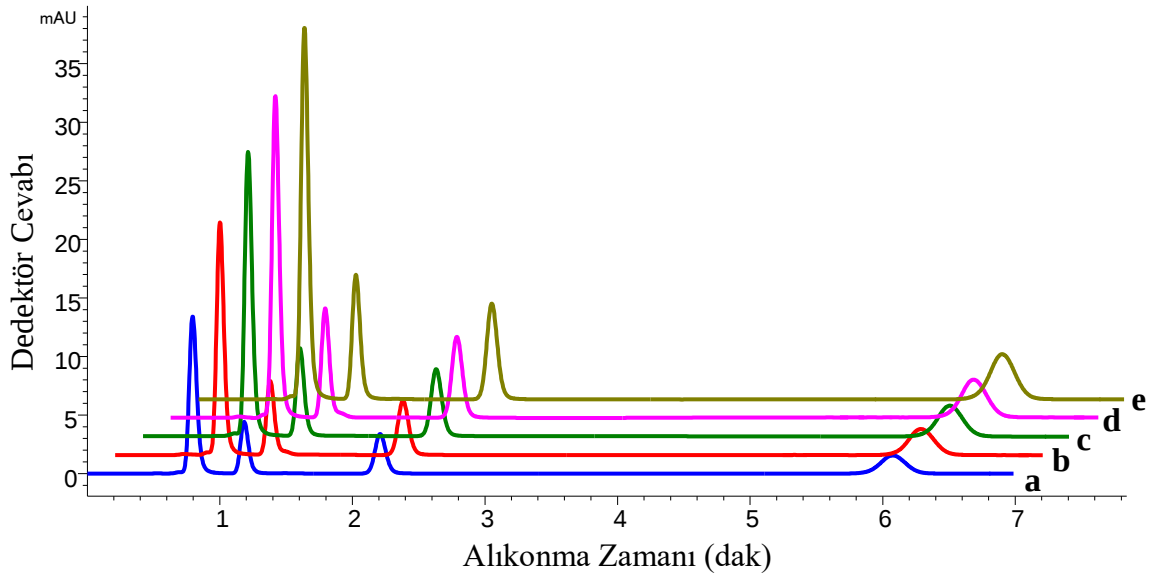


Şekil 4.50. RP- HPLC yöntemi ile *PP* kalibrasyon grafiği, Derişim aralığı: 0,6- 1,4 µg/mL

Geliştirilen RP-HPLC yönteminde optimize edilen koşullarda elde edilen analitik performans verileri Çizelge 4.13.'de verilmiştir.

Çizelge 4.13. RP-HPLC yönteminin analitik performans verileri

Analitik performans verileri				
	<i>Sülfasetamid Sodyum</i>	<i>Betametazon</i>	<i>Metil Paraben</i>	<i>Propil Paraben</i>
Regresyon Denklemi	$y= 20,357x- 3,843$	$y= 17,06x- 3,87$	$y= 38,217x- 3,89$	$y= 39,133x- 3,793$
Çalışma Aralığı (µg/mL)	3,0-7,0	1,5-3,5	0,6-1,4	0,6-1,4
Korelasyon katsayısı (R)	0,9984	0,9989	0,999	0,9991
LOD (µg/mL)	0,37	0,052	0,021	0,012
LOQ (µg/mL)	1,126	0,157	0,064	0,035



Şekil 4.51. Kromatografik koşullar: Mobil faz: Su/Asetonitril (55:45 h/h), akış hızı: 0,5 mL/dak, kolon sıcaklığı 25°C, Enjeksiyon Hacmi 5,0 µL, 5,0 µg/mL SFS, 2,5 µg/mL BTM, 1,0 µg/mL MP, 1,0 µg/mL PP içeren standart çözelti

- (a) SFS 3,0 µg/mL, BTM 1,5 µg/mL MP 0,6 µg/mL, PP 0,6 µg/mL
- (b) SFS 4,0 µg/mL, BTM 2,0 µg/mL MP 0,8 µg/mL, PP 0,8 µg/mL
- (c) SFS 5,0 µg/mL, BTM 2,5 µg/mL MP 1,0 µg/mL, PP 1,0 µg/mL
- (d) SFS 6,0 µg/mL, BTM 3,0 µg/mL MP 1,2 µg/mL, PP 1,2 µg/mL
- (e) SFS 7,0 µg/mL, BTM 3,5 µg/mL MP 1,4 µg/mL, PP 1,4 µg/mL

RP-HPLC yöntemi ile yapılan gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik çalışması sonuçları Çizelge 4.14. ve Çizelge 4.15.'de verilmiştir.

Çizelge 4.14. RP- HPLC yöntemi gün içi tekrarlanabilirlik çalışması sonuçları

	<i>Sülfasetamid Sodyum</i>	<i>Betametazon</i>	<i>Metil Paraben</i>	<i>Propil Paraben</i>
Pik Alanı (mAU)	94,1	38,9	35,7	34,7
	93,3	38,8	35,6	34,7
	94,0	39,0	35,8	34,6
	93,4	39,4	36,2	35,0
	94,9	38,9	36,1	35,3
	95,0	39,0	36,1	35,1
Ortalama	94,11	39,0	35,92	34,9
Ortalamanın Standart Hatası	0,29	0,86	0,10	0,11
SS	0,72	0,21	0,25	0,28
%BSS	0,76	0,54	0,69	0,79

Kromatografik koşullar: Mobil faz: Su/Asetonitril, akış hızı: 0,5 mL/dak, 5,0 µg/mL SFS, 2,5 µg/mL BTM, 1,0 µg/mL MP, 1,0 µg/mL PP içeren standart çözelti

Çizelge 4.15. RP- HPLC yöntemi günler arası tekrarlanabilirlik çalışması

	<i>Sülfasetamid Sodyum</i>	<i>Betametazon</i>	<i>Metil Paraben</i>	<i>Propil Paraben</i>
Pik Alanı (mAU)	97,5	38,0	34,4	35,8
	94,0	39,0	35,8	34,6
	94,1	38,9	35,7	34,7
	97,4	39,6	35,8	34,7
	94,9	38,9	36,1	35,3
	95,1	39,8	34,7	35,3
Ortalama	95,5	39,03	35,4	35,06
Ortalamanın Standart Hatası	0,64	0,26	0,28	0,19
SS	1,57	0,63	0,69	0,47
%BSS	1,64	1,63	1,95	1,35

Kromatografik koşullar: Mobil faz: Su/Asetonitril (55:45 h/h), akış hızı: 0,5 mL/dak, 5,0 µg/mL SFS, 2,5 µg/mL BTM, 1,0 µg/mL MP, 1,0 µg/mL PP içeren standart çözelti

4.4.3. RP - HPLC yönteminin oftalmik damlalarda uygulanması ve geri kazanım çalışması sonuçları

Oftalmik damla numunesinden yapılan ölçümle, oftalmik damla içeriğinde bulunan etken madde miktarlarının gerçek değere yakınlığına bakılmış ve aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığı hesaplanmıştır. Ayrıca, dört analit için standart çözelti ekleme yoluyla Oftalmik damla geri kazanım çalışması yapılmıştır. Geri kazanım çalışma sonuçları Çizelge 4.20.'de gösterilmiştir. Her bir analit için oftalmik damladan elde edilen miktar tayini sonuçları, *Sülfasetamid sodyum* için Çizelge 4.16., *Betametazon* için çizelge 4.17., *Metil paraben* için Çizelge 4.18. ve *Propil paraben* için Çizelge 4.19.'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.16. Oftalmik damlalarda *Sülfasetamid Sodyum* miktar tayini sonuçları

Numune No.	<i>Sülfasetamid Sodyum</i>	
	Bulunan miktar (mg/mL)	Belirtilen miktar 100,0 mg/mL
1	96,6	$X_{Ort} = 96,36$ SS= 0,59 %BSS= 0,61 %BH= 3,64 GA= 95,62- 97,09 (p=0,05)
2	95,8	
3	96,4	
4	95,8	
5	97,2	

Çizelge 4.17. Oftalmik damlalarda *Betametazon* miktar tayini sonuçları

Numune No.	<i>Betametazon</i>	
	Bulunan miktar (mg/mL)	Belirtilen miktar 1,0 mg/mL
1	1,02	$X_{Ort} = 1,02$ $SS = 0,009$ $\%BSS = 0,87$ $\%BH = 2,4$ $GA = 1,01 - 1,04$ ($p=0,05$)
2	1,02	
3	1,02	
4	1,04	
5	1,02	

Çizelge 4.18. Oftalmik damlalarda *Metil Paraben* miktar tayini sonuçları

Numune No.	<i>Metil Paraben</i>	
	Bulunan miktar (mg/mL)	Belirtilen miktar 0,5 mg/mL
1	0,52	$X_{Ort} = 0,52$ $SS = 0,0045$ $\% BSS = 0,86$ $\%BH = 3,6$ $GA = 0,51 - 0,52$ ($p=0,05$)
2	0,51	
3	0,52	
4	0,52	
5	0,52	

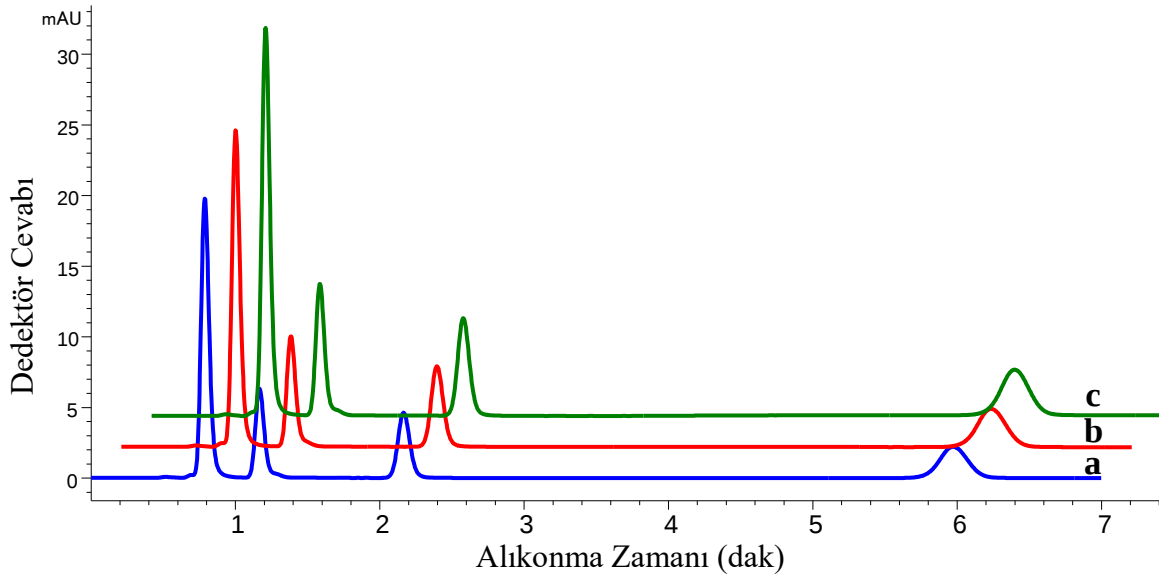
Çizelge 4.19. Oftalmik damlalarda *Propil Paraben* miktar tayini sonuçları

Numune No.	<i>Propil Paraben</i>	
	Bulunan miktar (mg/mL)	Belirtilen miktar 0,1 mg/mL
1	0,098	$X_{Ort} = 0,982$ $SS = 0,008$ $\%BSS = 0,85$ $\%BH = 1,8$ $GA = 0,097 - 0,099$ ($p=0,05$)
2	0,098	
3	0,097	
4	0,099	
5	0,099	

RP - HPLC ile geri kazanım çalışmaları Bölüm 3.3.5’de anlatıldığı şekilde yapılmış ve sonuçlar, Çizelge 4.20.’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.20. RP - HPLC ile geri kazanım çalışması sonuçları

	Gerçek Değer (µg/mL)	Bulunan Değer (µg/mL)	% Geri Kazanım	% Ortalama Geri Kazanım	% BSS	% BH
<i>Sülfasetamid Sodyum</i>	4,0	4,1926	104,82	104,64	0,18	4,64
		4,1874	104,68			
		4,1772	104,43			
	5,0	4,8289	96,57	96,26	0,46	3,73
		4,7878	95,75			
		4,8238	96,47			
	6,0	5,8142	96,9	96,99	0,08	3,01
		5,8244	97,07			
		5,8193	97,0			
<i>Betametazon</i>	2,0	2,0556	102,78	102,45	0,32	2,45
		2,0490	102,45			
		2,0424	102,12			
	2,5	2,5547	102,19	102,19	0,06	2,19
		2,5481	101,93			
		2,5612	102,45			
	3,0	2,9816	99,39	99,17	0,22	0,83
		2,9684	98,95			
		2,9750	99,17			
<i>Metil Paraben</i>	0,8	0,8276	103,46	103,33	0,20	3,33
		0,8247	103,09			
		0,8276	103,46			
	1,0	1,0367	103,67	103,67	0,28	3,67
		1,0338	103,38			
		1,0396	103,96			
	1,2	1,2342	102,85	102,61	0,24	2,60
		1,2313	102,61			
		1,2284	102,37			
<i>Propil Paraben</i>	0,8	0,7775	97,19	96,83	0,36	3,17
		0,7747	96,84			
		0,7719	96,48			
	1,0	0,9811	98,11	98,02	0,17	1,98
		0,9812	98,12			
		0,9783	97,83			
	1,2	1,1564	96,37	96,36	0,24	3,63
		1,1592	96,60			
		1,1536	96,13			



Şekil 4.52. Kromatografik koşullar: Mobil faz: Su/Asetonitril (55:45 h/h), akış hızı: 0,5 mL/dak, kolon sıcaklığı 25°C, enjeksiyon hacmi 5,0 µL

(a) SFS 4,0 µg/mL, BTM 2,0 µg/mL MP 0,8 µg/mL, PP 0,8 µg/mL

(b) SFS 5,0 µg/mL, BTM 2,5 µg/mL MP 1,0 µg/mL, PP 1,0 µg/mL

(c) SFS 6,0 µg/mL, BTM 3,0 µg/mL MP 1,2 µg/mL, PP 1,2 µg/mL

4.4.4. RP - HPLC yöntemi Sistem Uygunluk Testleri (SUT)

Analitler için, optimum koşullarda, sistem uygunluk testlerinin gereği olarak pik asimetrisi (P_{As}), tabaka sayısı (N), pikler arası rezolüsyon (R) hesaplanmıştır. Elde edilen veriler Çizelge 4.21.'de gösterilmiştir. N değerinin tüm analitler için 2000'den yüksek elde edilmesi ve R değerlerinin 2'nin üzerinde olması ve P_{As} değerlerinin de 2'nin altında olması ile geliştirilen yöntemin SUT açısından uygun sonuçlar verdiği gösterilmiştir.

Çizelge 4.21. RP - HPLC yönteminde elde edilen SUT sonuçları

	t_R (dak)	R	N	P_{As}	Pik Alanı	Pik Yüksekliği
<i>Sülfasetamid Sodyum</i>	0,81	3,723 _{SFS-MP}	2637,0	1,184	102,8	24,8
<i>Betametazon</i>	6,29	-	15235,6	0,931	41,5	3,1
<i>Metil Paraben</i>	1,22	8,211 _{MP-PP}	5430,7	1,156	37,7	6,2
<i>Propil Paraben</i>	2,27	16,509 _{PP-BTM}	10989,2	1,057	34,9	14

4.4.5. Sağlamlık çalışmaları

Geliştirilen yöntemin sağlamlık çalışmalarında akış hızı ve dedektör dalga boyu ve kolon sıcaklığında yapılan küçük değişiklikler sonucunda *Sülfasetamid sodyum*, *Betametazon*, *Metil paraben* ve *Propil paraben* 'in analizi Bölüm 3.3.6.'da anlatıldığı şekilde yapılmıştır. Bu değişikliklerinin sistem uygunluk parametrelerine etkisi Çizelge 4.22., Çizelge 4.23. ve Çizelge 4.24.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.22. RP-HPLC yönteminde mobil faz akış hızının sağlamlığa etkisi

Etken Madde	Kromatografik Parametreler	Mobil faz akış hızı (mL/dak)				
		0,48	%Fark	0,5	0,52	%Fark
<i>Sülfasetamid Sodyum</i>	t_R (dak)	0,825	4,43	0,79	0,763	3,41
	R_{SFS-MP}	3,562	1,13	3,522	3,449	2,07
	N	2490,9	6,98	2678	2339,4	12,64
	P_{As}	1,24	3,33	1,20	1,23	3,00
<i>Betametazon</i>	t_R (dak)	6,312	3,61	6,092	5,796	4,85
	N	12425,6	2,01	12179,8	12321,1	1,16
	P_{As}	0,989	0,71	0,982	0,989	0,71
<i>Metil Paraben</i>	t_R (dak)	1,23	3,79	1,185	1,137	4,05
	R_{MP-PP}	7,634	1,80	7,499	7,45	0,65
	N	4901,9	1,60	4824,5	4685,6	2,87
	P_{As}	1,18	0,00	1,18	1,182	0,16
<i>Propil Paraben</i>	t_R (dak)	2,302	4,16	2,21	2,117	4,20
	R_{PP-BTM}	14,886	1,62	14,648	14,657	1,30
	N	9086,0	0,47	9043,3	8912,0	13,91
	P_{As}	1,10	0,91	1,09	1,106	1,46

Kromatografik koşullar: Mobil faz: Su/Asetonitril (55:45 h/h), kolon sıcaklığı 25°C, enjeksiyon hacmi 5,0 µL, 5,0 µg/mL SFS, 2,5 µg/mL BTM, 1,0 µg/mL MP, 1,0 µg/mL PP içeren standart çözelti

Çizelge 4.23. RP-HPLC yönteminde dalga boyunun sağlamlığa etkisi

Etken Madde	Kromatografik Parametreler	Dalga Boyu(nm)				
		249	%Fark	250	251	%Fark
<i>Sülfasetamid Sodyum</i>	t_R (dak)	0,795	0,63	0,79	0,794	0,50
	R_{SFS-MP}	3,53	0,22	3,522	3,518	0,11
	N	2057,9	23,15	2678	2515,8	6,05
	P_{As}	1,23	2,50	1,20	1,23	2,50
<i>Betametazon</i>	t_R (dak)	6,09	13,26	6,092	6,087	12,77
	N	12613,5	3,56	12179,8	12745,9	4,64
	P_{As}	0,991	0,91	0,982	0,989	0,71
<i>Metil Paraben</i>	t_R (dak)	1,186	0,08	1,185	1,185	0,00
	R_{MP-PP}	7,65	2,01	7,499	7,603	1,38
	N	4762,6	1,28	4824,5	4954,2	2,68
	P_{As}	1,184	0,33	1,18	1,18	0,00
<i>Propil Paraben</i>	t_R (dak)	2,215	0,22	2,21	2,21	0,00
	R_{PP-BTM}	14,986	2,30	14,648	15,019	2,53
	N	9314,9	3,00	9043,3	9338,8	3,26
	P_{As}	1,10	0,91	1,09	1,101	1,00

Kromatografik koşullar: Mobil faz: Su/Asetonitril (55:45 h/h), akış hızı: 0,5 mL/dak, kolon sıcaklığı 25°C, enjeksiyon hacmi 5,0 µL, 5,0 µg/mL SFS, 2,5 µg/mL BTM, 1,0 µg/mL MP, 1,0 µg/mL PP içeren standart çözelti

Çizelge 4.24. RP-HPLC yönteminde kolon sıcaklığının sağlamlığa etkisi

Etken Madde	Kromatografik Parametreler	Kolon Sıcaklığı °C				
		25	26	%Fark	27	%Fark
<i>Sülfasetamid Sodyum</i>	t_R (dak)	0,79	0,794	0,50	0,793	0,37
	R_{SFS-MP}	3,522	3,514	0,22	3,495	0,76
	N	2678	2430,7	9,23	2509,4	6,29
	P_{As}	1,20	1,232	2,66	1,23	2,50
<i>Betametazon</i>	t_R (dak)	6,092	6,067	0,41	6,032	0,98
	N	12179,8	12650,5	3,86	12392,9	1,74
	P_{As}	0,982	0,991	0,91	0,989	0,71
<i>Metil Paraben</i>	t_R (dak)	1,185	1,183	0,16	1,179	0,50
	R_{MP-PP}	7,499	7,627	1,70	7,592	1,24
	N	4824,5	4766,2	1,20	4739,9	1,75
	P_{As}	1,18	1,184	0,33	1,185	0,42
<i>Propil Paraben</i>	t_R (dak)	2,21	2,207	0,13	2,193	0,76
	R_{PP-BTM}	14,648	14,981	3,54	15,02	2,53
	N	9043,3	9357,9	3,47	9362,2	3,52
	P_{As}	1,09	1,099	0,82	1,101	1,00

Kromatografik koşullar: Mobil faz: Su/Asetonitril (55:45 h/h), akış hızı: 0,5 mL/dak, enjeksiyon hacmi 5,0 µL, 5,0 µg/mL SFS, 2,5 µg/mL BTM, 1,0 µg/mL MP, 1,0 µg/mL PP içeren standart çözelti

4.4.6. RP- HPLC yöntemi hızlı bozundurma testleri

Önerilen yöntemin, etken maddelerin bozunma ürünleri varlığında uygulanabilirliğinin gösterilmesi için UV ışığına maruz bırakma, 0,01 M ve 1,0 M HCl ile asidik ve 0,01 M ve 1,0 M NaOH ile bazik hidroliz uygulanmıştır. Etken maddelerinin stres koşulları altındaki bozunma miktarları Çizelge 4.25'te verilmiştir.

Çizelge 4.25. Stres koşulları altında *Sülfasetamid sodyum*, *Betametazon*, *Metil paraben* ve *Propil paraben* bozunma miktarları

Stres Koşulu	Bozunma Miktarı (%)			
	<i>Sülfasetamid Sodyum</i>	<i>Betametazon</i>	<i>Metil Paraben</i>	<i>Propil Paraben</i>
UV	9,8	1,48	3,87	3,00
0,01 M HCl	5,78	-	2,2	1,87
0,01 M NaOH	-	100	-	1,59
1,0 M HCl	7,22	24,86	-	41,7
1,0 M NaOH	1,89	100	100	100

4.4.7. UV Türev Spektrofotometrisi ve HPLC yöntemleri ile elde edilen sonuçların istatistiksel olarak karşılaştırılması

UV türev spektrofotometrisi ve HPLC yöntemleri ile elde edilen *Sülfasetamid sodyum*, *Betametazon*, *Toplam paraben* miktar tayini sonuçları, kesinlik açısından Fisher testi ve doğruluk açısından *Student t* testi ile kıyaslanmıştır. Elde edilen bulgular Çizelge 4.26 da verilmiştir.

Çizelge 4.26. UV Türev ve HPLC Yöntemlerinin *Student t* Testi ve Fisher Testi ile karşılaştırılması

Spektrofotometri/HPLC	Student t test (p=0.05)	Fisher Test (p=0.05)
<i>Sülfasetamid Sodyum</i>	$t_{\text{Hesaplanan}} 0,88 < t_{\text{Tablo}} 2,31$	$F_{\text{Hesaplanan}} 2,49 < F_{\text{Tablo}} 6,39$
<i>Betametazon</i>	$t_{\text{Hesaplanan}} 0,69 < t_{\text{Tablo}} 2,31$	$F_{\text{Hesaplanan}} 4,62 < F_{\text{Tablo}} 6,39$
<i>Toplam Paraben</i>	$t_{\text{Hesaplanan}} 0,75 < t_{\text{Tablo}} 2,31$	$F_{\text{Hesaplanan}} 5,99 < F_{\text{Tablo}} 6,39$

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda, *SFS*, *BTM*, *MP* ve *PP* içeren oftalmik damlada analitlerin miktar tayininin yapılabildiği spektrofotometrik ve kromatografik iki yöntem geliştirilmiştir. Geliştirilen yöntemler, istatistiksel olarak ortalamalar açısından student t testi ve kesinlik açısından Fisher testi ile kıyaslanmıştır.

5.1. Optimizasyon Çalışmaları

Bu çalışmada, seçilen oftalmik damla içeriğini oluşturan etken maddeler, *SFS*, *BTM*, *MP-PP* metanolde çözülmüş ve 200-400 nm dalga boyu aralığında UV spektrumları alınmıştır. Spektrumlarda, dört etken maddenin birbirlerine spektral girişim yaptığı gözlemlenmiştir. Dolayısıyla, UV spektrofotometrisi yöntemiyle aynı anda miktar tayinlerinin yapılması mümkün değildir. Bu nedenle, türev spektrofotometrisi yönteminin çözüm olabileceği düşünülmüş ve her bir analit çözeltisinin, n değerleri ($\Delta\lambda$) 5, 7, 9, 11, 13, 17, 21, 25 olacak şekilde, 1. 2. 3. ve 4. türev UV spektrumları alınarak toplam 24 türev spektrumu elde edilmiştir. Türev spektrumlarında, girişim yapan diğer etken maddelerin türev absorbans değerlerinin sıfır olduğu ve aynı zamanda tayin edilecek etken maddenin bir türev absorbans değerinin olduğu dalga boyunun seçilmesi gerekmektedir. Böylece karışım çözeltide bulunan ancak türev absorbans değerleri sıfır olan analitler bir spektral girişime neden olamayacaklardır. Bunun için elde edilen 24 türev spektrumu taranarak, her bir etken madde için diğerlerinin spektral girişim yapmadığı dalga boylarının belirlenmesi gerekir. Bu yaklaşımın oftalmik damlaların içeriğinde etken maddelerin miktar tayinlerinde kullanılabilmesi için, oftalmik damla çözeltisinin etiketinde belirtilen etken maddeler dışında spektral girişime neden olabilecek oftalmik damla katkı maddeleri içerip içermediğinin de kontrol edilmesi gerekir. Bu amaçla oftalmik damla çözeltisinin etken madde içeriğine eşdeğer miktarda standart etken maddeleri içeren bir standartlar karışımı çözeltisi hazırlanmış ve oftalmik damla çözeltisi ile aynı miktar etken maddeler içeren standartlar karışımı çözeltisinin UV spektrumları çakıştırma yoluyla karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırmada her iki spektrumun eşit olduğu görülmüştür. Dolayısıyla, oftalmik damla içinde bulunan katkı maddelerinden kaynaklanabilecek herhangi bir spektral girişim olmadığı kabul edilmiştir. Oftalmik damla katkı maddelerinden kaynaklanabilecek bir girişim olmadığı anlaşıncaya, elde edilen 24 spektrum taranarak, her bir analit için uygun

dalga boyları seçilmiştir. *SFS*, *BTM*, *MP- PP* toplamı için seçilen türev dereceleri o türev derecesindeki n değerleri ve dalga boyları Çizelge 4.1.'de gösterilmiştir. *SFS* için mevcut 24 seçenekten 4.türev $n=17$ 268 nm, *BTM* için mevcut 24 seçenekten 3.türev $n=21$ 236 nm ve *MP- PP* için mevcut 24 seçenekten 3. türev $n=11$ 283 nm seçilmiştir. Bu koşullarda, *SFS*, *BTM*, *MP- PP* kalibrasyon grafikleri çizilmiş ve oftalmik damla etken madde miktar tayinleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçların doğruluğu ve kesinliği test edilmiştir. Önerilen UV türev spektrofotometrik yöntemde numune hazırlama işlemi basittir, oftalmik damla metanol içerisinde çözüldükten sonra analiz edilmektedir. Böylece, herhangi bir numune ön hazırlık ve ayırma işlemi gerekmesizin etken maddelerin bir arada olduğu çözeltiden aynı anda tayin edilebilmeleri mümkün olmuştur.

Çalışmamızda, *SFS*, *BTM*, *MP* ve *PP*'in aynı anda tayini için UV türev spektrofotometrisi ve RP- HPLC yöntemi geliştirilmiştir. UV türev spektrofotometrisi için etken maddelerin özellikleri dikkate alınarak her bir türev derecesinde $5n, 7n, 9n, 11n, 13n, 17n, 21n, 25n$ değerleri kullanılarak 1., 2., 3. ve 4. türev spektrumları alındı. RP - HPLC yönteminde ise mobil fazın sabit fazdan daha polar olduğu ters faz yüksek basınçlı sıvı kromatografi yöntemi seçilmiştir. En iyi kromatografik ayırımın, seçiciliğin ve duyarlılığın elde edilebilmesi için kromatografik parametreler optimize edilmiştir. Bu parametrelerden akış hızı, enjeksiyon hacmi, kolon sıcaklığı, mobil faz bileşeni fosfat tamponu pH'sı araştırılmış ve en uygun koşullar belirlenmiştir. Bu koşulların belirlenebilmesi için sistem uygunluk parametreleri incelenmiştir. İncelenen sistem uygunluk parametreleri alıkonma zamanı, rezolüsyon, teorik tabaka sayısı ve pik asimetri oranıdır.

Çalışmamızda Agilent Zorbax Eclipse XDB C₁₈ (3,0x75mm, 3,5µm) kolon, mobil faz olarak su: asetonitril (55:45 h/h) karışımı kullanılmış ve UV dedektör dalga boyu 250 nm'ye ayarlanmıştır. Kromatografik parametrelerin hesabında, t_0 olarak belirtilen ölü zamanının belirlenmesi için asetonitril kullanılmıştır ve t_0 değeri 0,4 dakikadır.

Mobil faz bileşeni fosfat tamponu pH değerinin kromatografik ayırma etkisinin araştırılması amacıyla 10 mM fosfat tamponunun pH değeri 3,0 ve 4,0 ayarlanarak analiz yapıldı. Metanol ve su etkisi araştırıldı, ancak *BTM* pikinin çıkış süresi uzadı. Daha sonra asetonitril ve su etkisi araştırıldı. Tampon ve metanol çözeltisi parametreleri incelendiğinde en uygun mobil faz değerinin asetonitril ve su olduğuna karar verildi. Teorik tabaka sayısı, pik asimetri oranı ve en iyi

rezolüsyonunun elde edildiği mobil faz bileşim oranları belirlenmiş (55:45 h/h) ve Çizelge 4.9., Çizelge 4.10. ve Çizelge 4.11.'de gösterilmiştir.

Mobil fazın akış hızının kromatografik parametrelere etkisinin araştırılması amacıyla 0,4; 0,5; 0,6; 0,7 mL/dak akış hızlarında çalışılmış ve en uygun akış hızı olarak 0,5 mL/dak belirlenmiştir. HPLC sistemlerinde genellikle en iyi ayrımın elde edildiği akış hızı aralığı 1-3 mL/dak.'dır. Bu çalışmada, 0,5 mL/dak akış hızında istenen ayrımın elde edilmesinin sebebi, kolon dolgu materyali yarıçapının nispeten küçük olmasıdır. Bu sayede, UPLC sistemlerindeki gibi daha az solvent kullanarak iyi bir kromatografik ayrım elde edilmiştir. RP-HPLC sisteminde kolon sıcaklığını 25, 30, 35, 40°C olarak değiştirilmiş ve kromatografik parametrelerdeki değişim incelendiğinde 25°C en uygun kolon sıcaklığı olarak belirlenmiştir.

RP- HPLC sisteminde enjeksiyon hacmi 1, 5, 10, 15, 20 µL olarak değiştirilmiş ve kromatografik parametrelerdeki değişim incelendiğinde 5 µL'nin en uygun enjeksiyon hacmi olduğu gözlenmiştir. Tüm koşullar optimize edildiğinde, *SFS* 0,81 dakika, *BTM* 6,29 dakika, *MP*, 1,22 dakika ve *PP* 2,27 dakika alıkonma zamanına sahip olup toplam analiz süresi 7 dakikadır.

5.2. Literatür Bulgularıyla Karşılaştırma

Çizelge 5.1. Farklı numunelerde Sülfasetamid sodyum, Betametazon, Metil paraben ve Propil paraben tayini

Analit	Numune	Yöntem	Çalışma Aralığı	LOD	Kaynak
<i>SFS</i>	Su	UHPLC	25-1000 µg/mL	6,87 µg/mL	[12]
<i>SFS</i>	Su	UHPLC	0.05–5 µg/L	9,3 ng/L	[14]
<i>BTM</i>	Farmasötik Krem	LC	2-30 µg/mL	0,46 µg/mL	[21]
<i>BTM</i>	Farmasötik Krem	HPLC	2,5- 25 µg/mL	0,46 µg/mL	[25]
<i>BTM</i>	Farmasötik Şurup	HPLC	6,0-15,9 µg/mL	0,10 µg/mL	[26]
<i>BTM</i>	Farmasötik Merhem	HPLC	2-100 µg/mL	0,33 µg/mL	[28]
<i>BTM</i>	Farmasötik Tablet	UPLC-MS/MS	10-1500 ng/mL	1,0 ng/mL	[29]
<i>MP</i>	Vajinal Jel	HPLC	5-40 µg/mL	0,1 µg/mL	[46]

Analit	Numune	Yöntem	Çalışma Aralığı	LOD	Kaynak
<i>MP</i>	Farmasötik Dozaj Formu	HPLC-DAD	1-250 µg/mL	0,21 µg/mL	[29]
<i>MP</i>	Oral ve Enjektabl Formülasyon	HPLC	0,02-0,2 mg/mL	1,50 µg/mL	[31]
<i>PP</i>	Oral ve Enjektabl Formülasyon	HPLC	0,01-0,14 mg/mL	0,60 µg/mL	[31]
<i>MP</i>	Farmasötik Şurup	GC-MS	1,625- 13,0 µg/mL	0,071 µg/mL	[32]
<i>MP</i>	Farmasötik Preperatlar	TLC	0,46-2,47 µg/spot	0,37 µg/mL	[35]
<i>MP</i>	Farmasötik Formülasyon	HPLC	4-100 µg/mL	0,09 µg/mL	[37]
<i>MP</i>	Oral Farmasötik Preperatlar	HPLC	40-120 µg/mL	1,24 µg/mL	[38]
<i>MP</i>	Merhem	HPLC	100-500 µg/mL	0,87 µg/mL	[39]
<i>MP</i>	Süspansiyon	UPLC	8-16 µg/mL	0,07 µg/mL	[40]
<i>MP</i>	Lubrikant Formülasyonu	HPLC	43,5- 217,5 µg/mL	24,0 µg/mL	[41]
<i>MP</i>	Pedikulozis İlacı	HPLC	0,08-0,64 mg/mL	0,03 mg/mL	[43]
<i>MP</i>	Atık Su	UPLC-MS	13,0-800,0 ng/g	4,0 ng/g	[45]
<i>PP</i>	Vajinal Jel	HPLC	2,5-20 µg/mL	0,05 µg/mL	[46]
<i>PP</i>	Diş Jeli	HPLC	4,0-6,0 µg/mL	0,09 µg/mL	[49]
<i>PP</i>	Oral ve Enjektabl Formülasyon	HPLC	0,004-0,04 mg/mL	0,50 µg/mL	[31]
<i>PP</i>	Oral ve Enjektabl Formülasyon	HPLC	0,002-0,03 mg/mL	0,18 µg/mL	[31]
<i>PP</i>	Farmasötik Şurup	HPLC	0,25-2,0 µg/mL	0,04 µg/mL	[32]
<i>PP</i>	Farmasötik Dozaj Formları	HPLC	0,05-0,52 µg/mL	0,0259 µg/mL	[47]
<i>PP</i>	Farmasötik Preperatlar	HP-TLC	0,54-3,24 µg/spot	0,13 µg/spot	[48]
<i>PP</i>	Farmasötik Şurup	HPLC	0,1-10 µg/mL	0,03 µg/mL	[36]
<i>PP</i>	Farmasötik Formülasyon	HPLC	7-50 µg/mL	0,85 µg/mL	[37]
<i>PP</i>	Oral Farmasötik Preperatlar	HPLC	10-30 µg/mL	0,671 µg/mL	[38]
<i>PP</i>	Pedikulozis İlacı	HPLC	0,05-0,40 mg/mL	0,02 mg/mL	[43]
<i>PP</i>	Lubrikant Formülasyonu	HPLC	5,4-27,0 µg/mL	3,5 µg/mL	[41]
<i>PP</i>	Atık Su	UPLC-MS	5,0-480,0 ng/g	2,0 ng/g	[45]

Çizelge 5.2. Bu çalışmada Sülfasetamid sodyum, Betametazon, Metil paraben ve Propil paraben tayini

Analit	Numune	UV Türev		HPLC		BU ÇALIŞMA
		Çalışma Aralığı	LOD	Çalışma Aralığı	LOD	
<i>SFS</i>	Oftalmik damla	6,0-14,0 µg/mL	0,58 µg/mL	3,0-7,0 µg/mL	0,37 µg/mL	
<i>BTM</i>		10,0-30,0 µg/mL	0,89 µg/mL	1,5-3,5 µg/mL	0,052 µg/mL	
<i>MP</i>		4,0-12,0 µg/mL	1,14 µg/mL	0,6-1,4 µg/mL	0,021 µg/mL	
<i>PP</i>				0,6-1,4 µg/mL	0,012 µg/mL	

Çizelge 5.1.'de *SFS*, *BTM*, *MP* ve *PP*'in farklı numunelerde tayin edildiği rastgele seçilen kromatografik yöntemler görülmektedir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar ile literatür verileri kıyaslandığında UV türev spektrofotometrisi yöntemi *SFS*, *BTM* ve *MP-PP* toplamı tayini için hızlı ve kolay bir yöntem olması ile dikkat çekmektedir. Ayrıca, literatürde bu 4 etken maddenin aynı anda analiz edildiği bir türev spektrofotometrisi çalışması ve HPLC çalışması mevcut değildir.

5.3. Validasyon ve SUT

Çalışmamızda hem spektrofotometrik hem de kromatografik yöntem için validasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmalar, her iki yöntem için belirlenen optimum koşullarda gerçekleştirilmiştir.

Spektrofotometrik yöntemde, çalışma aralığı *SFS*, *BTM* ve *MP-PP* için sırasıyla 6,0-14,0, 10,0-30,0, 4,0-12,0 µg/mL iken kromatografik yöntem için sırasıyla 3,0- 7,0- 1,5- 3,5; 0,6- 1,4; 0,6- 1,4 µg/mL dir. Her iki yöntemde de derişimi bilinen standart çözeltilere karşı alınan türev absorbans ve pik alanı değerlerinden hareketle kalibrasyon grafikleri çizilmiştir. Regresyon analizi sonucu elde edilen regresyon katsayı değerleri, *SFS*, *BTM*, *MP-PP* için, UV türev spektrofotometrik yöntemde sırasıyla 0,9991; 0,9975; 0,9979 kromatografik

yönteminde ise sırasıyla 0,9984; 0,9989; 0,9990; 0,9991, UV türev spektrofotometrik yöntemde LOD değeri sırayısla, 0,58; 0,89; 1,14 kromatografik yöntemde ise 0,37; 0,052; 0,021; 0,012 µg/mL olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçlara göre, tüm etken maddeler için kromatografik yöntemin daha duyarlı olduğu bulunmuştur.

Geliştirilen yöntemlerin doğruluğunun gösterilmesi amacıyla geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre *SFS*, *BTM*, *MP* ve *PP* için geri kazanım değerlerinin spektrofotometrik yöntemde %98,34-103,26; 97,86-104,89; 95,6-102,30 ve kromatografik yöntemde %95,57-104,68; 98,95- 102,78; 102,37-103,96; 96,13-98,12 arasında olması geliştirilen yöntemlerin doğruluğunu ve seçiciliğini göstermektedir. Çalışılan koşullar altında, geliştirilen yöntemlerin kesinliğinin gösterilmesi amacıyla gün içi ve günler arasında tekrarlanabilirlik çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla, %80, %100 ve %120 derişimlerde standart çözeltiler eklenen 3 er çözelti analiz edilmiş ve %BSS değerleri hesaplanmıştır. Gün içi tekrarlanabilirlik çalışmalarında *SFS*, *BTM*, *MP* ve *PP* için spektrofotometrik yöntemde %BSS değerleri sırasıyla 2,36; 1,83; 2,49 ve kromatografik yöntemde 0,76; 0,54; 0,69; 0,79 bulunmuştur. Günlerarası tekrarlanabilirlik çalışmasında ise spektrofotometrik yöntemde %BSS değerleri sırasıyla 2,39; 2,09; 2,05 ve kromatografik yöntemde 1,64; 1,63; 1,95; 1,35 bulunmuştur.

Optimize koşullarda standartlara, standartlar karışımına ve oftalmik damlaya ait kromatogramlarda herhangi bir girişim olmaması ve türev spektrofotometrik yöntemde girişimlerin ortadan kaldırılmasının yanı sıra, elde edilen geri kazanım çalışması sonuçları da önerilen yöntemlerin *SFS*, *BTM*, *MP* ve *PP* analizi için seçici olduklarını göstermiştir.

RP-HPLC yöntemi için Sistem Uygunluk Testleri (SUT), ICH parametrelerine göre yapılmıştır. Tabaka sayısı (N) değerleri dört etken madde için de 2000'den yüksek bulunmuştur. Pik Asimetrisi (P_{AS}) ise tüm pikler için 2'nin altındadır. Ayrıca, analit pikleri arası rezolüsyon (R) değerleri de 2'nin üzerinde bulunmuştur. Tüm bu sonuçlar, kromatografik yöntemin SUT parametrelerine uygunluğunun göstergesidir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

SFS, *BTM*, *MP* ve *PP* içeren oftalmik damla çözeltisinde eş zamanlı miktar tayini için spektrofotometrik ve kromatografik yöntem geliştirildi ve valide edildi. Türev yönteminde *SFS*, *BTM*, *MP* ve *PP*'in girişimlerden etkilenmediği türev dereceleri ve dalga boyları seçilerek miktar tayinleri yapıldı. Geliştirilen kromatografik yöntemde ise akış hızı, kolon sıcaklığı, mobil faz derişimi optimize edildi. Yapılan validasyon çalışmalarına göre, yöntemlerin doğruluğu ve tekrarlanabilirliği gösterildi. Duyarlılık açısından yöntemler kıyaslandığı zaman RP-HPLC'nin daha duyarlı olduğu bulundu. Ayrıca, her iki yöntemi kıyaslamak amacıyla *Student t testi* ve *Fisher testi* uygulandı. Sonuçlar, her iki yöntem arasında ortalamalar ve standart sapmalar açısından anlamlı bir fark bulunmadığını göstermektedir. Ayrıca, RP-HPLC yönteminde bozulma ürünlerinin varlığında da bu yöntemin dört etken maddenin miktar tayinlerinin yapılmasında kullanılabileceği gösterildi.

Literatür araştırmalarına göre *SFS*, *BTM*, *MP* ve *PP*'in eş zamanlı analizinin gerçekleştirildiği bir çalışma bulunmamaktadır. Ayrıca bu etken maddelerden bir veya ikisini birlikte içeren ve oftalmik damlada yapılan miktar tayini çalışması da literatürde yer almamaktadır. Çalışılan dört etken maddenin oftalmik damlada herhangi bir numune ön hazırlık işlemine tabi tutulmadan aynı anda tayinlerinin yapılması için geliştirilen her iki yöntem de özgündür. UV türev spektrofotometrik yöntem, birbirlerine spektral girişim yapan 3 etken maddenin uygun türev dalga boyu bulunarak, ayırma gerektirmeksizin aynı anda tayinlerini mümkün kılmıştır. Ayrıca önerilen UV türev spektrofotometrisi yöntemi, doğru, seçici, duyarlı ve tekrarlanabilir. Bir kıyaslama yöntemi olarak geliştirilen kromatografik yöntemin doğru, seçici, kesin ve duyarlı olması yanında en önemli üstünlüğü kısa alıkonma zamanlarıyla, literatürdeki diğer yöntemlere göre toplam analiz süresinin kısalığı ve dolayısıyla daha az solvan harcandığı için ekonomikliğidir. Ayrıca toplam analiz süresi 7 dakikadır.

Sonuç olarak, elde edilen veriler doğrultusunda, *SFS*, *BTM*, *MP* ve *PP* içeren karışımların aynı anda miktar tayini için herhangi bir ön ayırma yöntemi uygulamadan doğru, duyarlı, kesin, hızlı ve ekonomik yöntemler geliştirilmesi ile literatüre katkı sağlanmıştır. Piyasada bulunan oftalmik damlalarda etken maddelerin miktar tayinleri yapılarak geliştirilen yöntemlerin uygulanabilirliği gösterilmiştir. Geliştirilen her iki yöntem de kalite kontrol laboratuvarlarında kullanılabilir.

KAYNAKLAR

1. Katzung, B.G., Masters, S. B., and Trevor, A.J. (2016). *Temel ve Klinik Farmakoloji* (Çev. Akkan, A.G., Büyükuysal, R. L., Erol, K., Gidener, S., İnan, E.A., Kalkan, Ş., Karadağ, Ç.H., Şahin, A. S., Ulugöl, A., Ulak, G. ve Üresin, A.Y.). Nobel Tıp Kitapevi, 833.
2. Sweetman, S.C. (2009). *Martindale The Complete Drug Reference*. Pharmaceutical Press, London, 1490.
3. Rowe, R.C., Sheskey, P.J and Quinn, M.E. (2009). *Handbook of Pharmaceutical Excipients* (6th Edition). Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association, 441-445.
4. Kayaalp, O. (2002). *Rasyonel Tedavi Yönünde Tıbbi Farmakoloji*. Hacettepe Taş Kitabevi, 294-300.
5. European Pharmacopoeia (2013). European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (Eighth Edition), 3330-3331.
6. British Pharmacopoeia. (2021). Her Majesty's Stationery Office. London, 10.3.
7. Ahmad, I., Ahmad, T., and Florey, K. (1998). *Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients*. New York: Academic Press, 472-510.
8. RX Media Pharma(R). (2018). *İnteraktif İlaç Bilgi Kaynağı*. Ankara: Gemaş Yayıncılık, 12.
9. İzgü, E. (1983). *Genel - Endüstriyel Farmasötik Teknoloji II*, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, 55, 142-144.
10. Acartürk, F., Ağabeyoğlu, İ., Çelebi, N., Değim, T., Değim, Z., Doğanay, T., Takka, S., Teksin, Z. Ş., Tırnaksız, F., Akkuş, Ş., Dokak, C., İlbasmış, S. T., İnceçayır, T., Mutlu, B., Odabaşioğlu, E., ve Demiröz, F. T. (2007). *Farmasötik Teknoloji Laboratuvar Kitabı*, Ankara: Şafak Matbacılık, 56.
11. The United States Pharmacopeia. (2013). United Book Press, Inc., Baltimore, MD. Vol. 3.
12. Herrera-Herrera, A.V., Borges, J. H., Afonso, M.M., Palenzuela, J.A and Delgado, M. A. R. (2013). Comparison between magnetic and non magnetic multi-walled carbon nanotubes-dispersive solid phase extraction combined with Ultra High Performance Liquid Chromatography for the determination of sulfonamide antibiotics in water samples. *Talanta*, 116, 695-703.
13. El-Ragehy, N.A., Hegazy, M.A., AbdelHamid, G. and Tawfik, S.A. (2017). Validated chromatographic methods for the simultaneous determination of sulfacetamide sodium and prednisolone acetate in their ophthalmic suspension. *Journal of Chromatographic Science*, 55(10), 1000-1005.
14. Yang, L., Yang, S., Jinjin, L and Tiangang, L. (2017). In situ derivatization and hollow-fiber liquid-phase microextraction to determine sulfonamides in water using UHPLC with fluorescence detection. *Journal of Separation Science*, 41(7) 1507-1710.

15. Salami, F. H., and Queiroz, M. E. C. (2014). Microextraction in packed sorbent for analysis of sulfonamides in poultry litter wastewater samples by liquid chromatography and spectrophotometric detection. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 37, 2377-2388.
16. Yazdanfar, N., Shamsipur, M., and Ghambarian, M. (2021). Determination of sulfonamide residues in animal foodstuffs by magnetic dispersive solid-phase extraction using magnetic carbon nanocomposites coupled with ion pair-dispersive liquid-liquid micro extraction combined with HPLC-DAD. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 18, 1433-1442.
17. Salami, F. H., and Queiroz, M. E. C. (2011). Microextraction in packed sorbent for determination of sulfonamides in egg samples by liquid chromatography and spectrophotometric detection. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 22(9), 1656-1661.
18. Cruz, M. N. S., Soares, R. F., Marques, A. S. F., and Aquino-Neto, F. R. (2011). Development and validation of analytical method for sulfonamide residues in eggs by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 22(3), 454-461.
19. Naa, M. S. N., Safdarb, M., Luac, X., Maa, L., Hec, L., and Ouyanga, J. (2013). Rapid trace level determination of sulfonamide residues in honey with online extraction using short C-18 column by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1314, 173-179.
20. Kechagia, M., Samanidou, V., Kabir, A., and Furton, K. G. (2017). One-pot synthesis of a multi-template molecularly imprinted polymer for the extraction of six sulfonamide residues from milk before high performance liquid chromatography with diode array detection. *Journal of Separation Science*, 41(3), 603-808.
21. Belal, F., Mohie, K., El-Din, S., El Enany, N., and Saad, S. (2013). A validated liquid chromatographic method for the simultaneous determination of betamethasone valerate and clioquinol in creams using time programmed UV detection. *Analytical Methods*, 5, 6767-6773.
22. Solon, L. G. S., Lima, I. P. B., Nogueira, F. H. A., Araújo, J. P., Vivacqua, C. A. and Aragão, C. F. S. (2016). Development and validation of an UHPLC method for the determination of betamethasone valerate in cream, gel, ointment and lotion. *Steroids*, 106, 70-77.
23. Li, L., Zhang, M., Ma, P., and Qian, K. (2019). Development of a simple method for simultaneous determination of tazarotene and betamethasone dipropionate and their metabolites using LC-MS method and its application to dermatopharmacokinetic study. *Biomedical Chromatography*, 33, 45-57.
24. Chena, M.Y., Tanga, Y.J., Wanga, Y. C., Wang, C. Z., Yuanc, C. S., Chena, Y., Tana, Z. R., Huang, W. H., and Zhoua, H. H. (2016). Quantitative determination of betamethasone sodium phosphate and betamethasone dipropionate in human plasma by UPLC-MS/MS and a bioequivalence study. *Analytical Methods*, 3550-3563.
25. Bhosale, S. D., and Rajput, S. J. (2011). RP-HPLC method for simultaneous determination of butenafine hydrochloride and betamethasone dipropionate in a cream formulation. *Journal of AOAC International*, 94(1), 106-109.
26. Le, D. C., Ngo, T. D., and Le, T. H. H. (2019). Simultaneous assay of dexchlorpheniramine maleate, betamethasone, and sodium benzoate in syrup by a reliable and robust HPLC method. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 1-10.

27. Hassib, S. T., Mahrouse, M. A., Elkady, E. F. and Sayed, R. M. (2018). Simultaneous HPLC determination of betamethasone esters-containing mixtures: Analysis of their topical preparations. *Journal of Chromatographic Science*, 56(8), 716-723.
28. Merey, H. A., El-Mosallamy, S. S., Hassan, N. Y., and El-Zeany, B. (2019). Validated chromatographic methods for simultaneous determination of calcipotriol monohydrate and betamethasone dipropionate in the presence of two dosage form additives. *Journal of Chromatographic Science*, 57(4), 305-311.
29. Jamal, M., Shammout, A., and Elif Başçı, N. E. (2018). Validated ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometric method for determination of betamethasone or dexamethasone in pharmaceuticals. *Current Pharmaceutical Analysis*, 14, 68-75.
30. Baker, M. M., El-Kafrawy, D. S., Abdel-Khalek, M. M., and Belal, T. S. (2020). A highly selective stability indicating HPLC method for simultaneous estimation of sertaconazole with two coformulated preservatives in pharmaceutical dosage forms. *Chromatographia*, 83, 191-203.
31. Antakli, S., Kabani, R., and Shawa, D., (2013). Determination of preservative parabens in oral and injection formulations by HPLC. *Asian Journal of Chemistry*, 25(2), 1123-1128.
32. Weshahy, S. A., Yaaqob, M. S., Morcos, M. N., Hassan, D. W., and Youssef, N. F. (2015). Simultaneous determination of levodropropizine, methylparaben, and propylparaben in oral co-formulated syrup by RP-HPLC Method. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 60(4).
33. Debbih, M., Guermouche, M. H., and Guermouche, S. (2017). Microemulsion high performance liquid chromatography method for the determination of ibuprofen in the presence of preservatives and impurities in oral pediatric suspension. *Chemical Papers*, 71, 1693-1703.
34. Louhaichi, M. R., Jebali, S., Kallel, M., Adhoum, N., Benhamida, N., and Monser, L. (2014). Development and validation of a stability-indicating HPLC method for the determination of pizotifen, methyl paraben, and propyl paraben in syrup. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 37(7), 988-1003.
35. Casoni, D., Tuhutiu, I. A. and Sârbu, C. (2011). Simultaneous determination of parabens in pharmaceutical preparations using high-performance thin-layer chromatography and image analysis. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 34, 805-816.
36. El-Gindy, A., Attia, K. A. S., Nassar, M. W., Seada, H. A., and Shoeib, M. A. (2013). HPLC method for determination of paracetamol, pseudoephedrine, triprolidine, methyl paraben, propyl paraben, sodium benzoate, and their related substances in pharmaceutical syrup. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 36, 1251-1263.
37. Farid, N. F., Naguib, I. A., Radwa, R. S., and El Ghobashy, M. R. (2017). TLC-densitometric and RP-HPLC methods for simultaneous determination of dexamethasone and chlorpheniramine maleate in the presence of methylparaben and propylparaben. *Journal of AOAC International*, 100(1).
38. Hewala, I., El-Fatratry, H., Emam, E., and Mabrouk, M. (2011). Development and application of a validated stability-indicating high-performance liquid chromatographic method using photodiode array detection for simultaneous determination of granisetron, methyl paraben, propyl paraben, sodium benzoate, and their main degradation products in oral pharmaceutical preparations. *Journal of AOAC International*, 94(5).

39. Manoharan, G., and Mohamed, R. A. W. (2019). Method development and validation of high performance liquid chromatography method for methyl paraben and butyl paraben in ointment form. *Journal of Biochemical Technology*, 10(1), 33-38.
40. Qadir, M. A., Ahmed, M., Tahir, M. S., Shakoor, A., Shafiq, M. I., Shahzad, S., and Ali, A. (2016). Sensitive and selective UPLC method for simultaneous determination of methyl paraben, propyl paraben and loratadine in antihistamine suspension and biological samples. *Latin American Journal of Pharmacy*, 35 (5), 869-76.
41. Shabir, G. A. (2011). Simultaneous determination of p-hydroxybenzoic acid, 2-phenoxyethanol, methyl-p-hydroxybenzoate, ethyl-p-hydroxybenzoate, propyl-p-hydroxybenzoate, iso-butyl-p-hydroxybenzoate, and N-butyl-p-hydroxybenzoate in senselle lubricant formulation by HPLC. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 34, 679-689.
42. Baranowska, I., Wojciechowska, I., Solarz, N., and Krutysza, E. (2013). Determination of preservatives in cosmetics, cleaning agents and pharmaceuticals using fast liquid chromatography. *Journal of Chromatographic Science*, 52, 88-94.
43. Shabir, G. A. (2011). Simultaneous analysis of phenothrin, methyl-4-hydroxybenzoate and propyl-4-hydroxybenzoate in human head lice medicine by HPLC. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 34, 1743-1753.
44. Balireddi, V., Tatikonda, K. M., Tirukkavalluri, S. R., Teja, S. B., and Manne, S. (2015). Simultaneous determination of multiple preservatives and antioxidants in topical products by ultra-pressure liquid chromatography with Photo Diode Array Detector. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 38, 1361-1370.
45. Luque-Muñoz, A., Vilchez, J. L., and Zafra-Gómez, A. (2017). Multiclass method for the determination of pharmaceuticals and personal care products in compost from sewage sludge using ultrasound and salt-assisted liquid-liquid extraction followed by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis. *Journal of Chromatography A*, 1507, 72-83.
46. Maslarska, V., Tsvetkova, B., Peikova, L., and Bozhanov, S. (2016). HPLC method for simultaneous determination of metronidazole and preservatives in vaginal gel formulation. *Acta Chromatographica*, 127-130.
47. Narasimha, L., Katakam, R., Ettaboina, S.K., and Dongala, T. (2021). A simple and rapid HPLC method for determination of Parabens and their degradation products in pharmaceutical dosage forms. *Biomedical Chromatography*, 1-10.
48. Casoni, D., Tuhutiu, I. A. and Sârbu, C. (2011). Simultaneous determination of parabens in pharmaceutical preparations using high performance thin-layer chromatography and image analysis. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 34, 805-816.
49. Maslii, Y., Bezruk, I., Materiienk, A., Ruban, O., Ivanauskas, L. and Velia, M. (2021). Development of the simultaneous analysis of choline salicylate, lidocaine hydrochloride and preservatives in a new dental gel by HPLC method. *Chemija*, 32(2), 57-62.
50. Talsky, G., Mayring, L. and Kreuzer, H. (1978). High resolution, higher order UV/VIS derivative spectrophotometry. *Angewandte Chemie International*, 17(11), 785-799.

51. Aboul-Enein, H. Y., Göğer, N. G., and Türkalp, A. (2002). Quantitative Determination of fluconazole in syrups by first order derivative spectrophotometry. *Analytical Letters*, 35(7), 1193-1204.
52. Kus, S., Marczenko, Z., and Obarski, N. (1996). Derivative UV-Vis spectrophotometry in analytical chemistry. *Chemia Analityczna*, 41(6), 899-927.
53. İnternet: Karpinska, J. (2012). Basic Principles and Analytical Application of Derivative Spectrophotometry. Edited by Jamal Uddin, 253. Web: https://books.google.com.tr/books?hl=tr&lr=&id=zd2dDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA253&dq=Basic+principles+and+analytical+application+of+derivative+spectrophotometry.&ots=3r0Cd3Cqqv&sig=TuimKbAp7PPeDceO2fCmPVzyCIw&redir_esc=y#v=onepage&q=Basic%20principles%20and%20analytical%20application%20of%20derivative%20spectrophotometry.&f=false, Son Erişim Tarihi: 20.08.2021.
54. Dong, M. W. (2006). *Modern HPLC for Practicing Scientists*. John Wiley and Sons. 47-111.
55. Fanali, S., Haddad, P., Poole, C., Schoenmakers, P., and Lloyd, D. (2013). *Liquid Chromatography: Fundamentals and Instrumentation*. Elsevier, USA.
56. İnternet: [Uluslararası Uyum Konseyi]. [URL:<https://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/qualityguidelines.html>] adresinden 19.08.2021'de alınmıştır.
57. İnternet: [Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği]. [URL:<http://publications.iupac.org/pac/2002/pdf/7405x0835.pdf>.] adresinden 19.08.2021'de alınmıştır.
58. İnternet: [URL: [www.baskent.edu.tr](http://www.baskent.edu.tr/~tkorkmaz) > ~tkorkmaz > ISLE244 > ikiortalama fark testleri] adresinden 19.08.2021'de alınmıştır.
59. Özkan, S.A. (2011). *İlaçların Analiz ve Kalite Kontrollerinde Kullanılan Analitik Yöntemlerin Geçerliliği*. Ankara. Gülhane Askeri Tıp Akademisi Basımevi, 17-22.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı, Soyadı : Onur DEMİR
 Uyuğu : TC
 Doğum tarihi ve yeri : 31.01.1990
 Medeni Hali : Evli
 Telefon : 0554 580 32 58
 e-mail : onur.dmir@gmail.com



Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi/ Eczacılık Fakültesi /Analitik Kimya Anabilim Dalı	Devam Ediyor
Lise	Pursaklar Lisesi	2007
Lisans	Selçuk Üniversitesi Fen Fak. Kimya Bölümü	2013
Lisans	Anadolu Üniversitesi- Yönetim Bilişim Sistemleri	Devam Ediyor

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
07.2014- 11.2014	Segal Çevre Ölçüm Lab.	Analiz Laboratuvarı
12.2014- 09.2016	Vilsan Veteriner (MSD) İlaçları	Üretim Sorumlusu
09.2016- 06.2018	Türktıpsan A.Ş	Üretim Sorumlusu
25.06.2018- Halen	Drogsan İlaçları San.ve Tic. A.Ş	Üretim Yöneticisi

Yabancı Dil İngilizce



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..

