



**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA
TEZİ**

**FARMASÖTİK POMADLARDA EFEDRİN,
NAFAZOLİN, ANTAZOLİN VE KLORETON AYRIMI
VE MİKTAR TAYİNİ İÇİN YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ**

ÇİĞDEM KANBEŞ DİNDAR

ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI

ARALIK 2019



**FARMASÖTİK POMADLARDA EFEDRİN, NAFAZOLİN, ANTAZOLİN
VE KLORETON AYRIMI VE MİKTAR TAYİNİ İÇİN YÖNTEM
GELİŞTİRİLMESİ**

Çiğdem KANBEŞ DİNDAR

**DOKTORA TEZİ
ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

ARALIK 2019

Çiğdem KANBEŞ DİNDAR tarafından hazırlanan “FARMASÖTİK POMADLARDA EFEDRİN, NFAZOLİN, ANTAZOLİN VE KLORETON AYIRIMI VE MİKTAR TAYİNİ İÇİN YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ / ~~OY ÇOKLUĞU~~ ile Gazi Üniversitesi Analitik Kimya Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Nilgün GÜNDEN GÖĞER

Analitik Kimya Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~



Başkan: Prof. Dr. Sibel A. ÖZKAN

Analitik Kimya Anabilim Dalı, Ankara Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~



Üye: Prof. Dr. Bengi USLU

Analitik Kimya Anabilim Dalı, Ankara Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~



Üye: Prof. Dr. Dilek DOĞRUKOL AK

Analitik Kimya Anabilim Dalı, Anadolu Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~



Üye: Prof. Dr. Hasan BASAN

Analitik Kimya Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~



Üye: Prof. Dr. H.Eda ŞATANA KARA

Analitik Kimya Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~



Tez Savunma Tarihi: 18/12/2019

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

Prof. Dr. Mustafa ASLAN
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.



Çiğdem Kanbeş Dindar

(18/12/2019)

FARMASÖTİK POMADLARDA EFEDRİN, NAFAZOLİN, ANTAZOLİN VE
KLORETON AYRIMI VE MİKTAR TAYİNİ İÇİN YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ

(Doktora Tezi)

Çiğdem KANBEŞ DİNDAR

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Aralık 2019

ÖZET

Bu çalışma, bir farmasötik pomadda bulunan *Efedrin HCl (EFD)*, *Nafazolin HCl (NFZ)*, *Antazolin HCl (ANT)* ve *Kloreton (Klorbutanol) (KLO)* etken maddelerinin tayini için spektrofotometrik ve kromatografik yöntem geliştirilmesini içermektedir. Spektrofotometrik yöntemde, *EFD* için 3.türev n=5 de 218 nm.de, *NFZ* için 2.türev n=21 de 234 nm.de, *ANT* için 1.türev n=13 de 254 nm.de miktar tayinleri yapılmıştır. *KLO* tayini, piridin reaktifi ile renklendirme yapıldıktan sonra 540 nm.de spektrofotometrik olarak gerçekleştirilmiştir. Doğrusal çalışma aralığı *EFD*, *NFZ*, *ANT* ve *KLO* için sırasıyla 20-70, 1-3, 10-30 ve 10-200 µg/mL olarak alınmıştır. Validasyon çalışmalarında bulunan LOD değerleri, spektrofotometrik yöntemde *EFD*, *NFZ*, *ANT* ve *KLO* için sırasıyla 3,95; 0,92; 0,19 ve 0,96 µg/mL olarak bulunmuştur. Kromatografik yöntem olarak bir RP-HPLC yöntemi geliştirilmiş ve optimize edilmiştir. RP-HPLC yönteminde Agilent Zorbax Eclipse XDB, C 18 (3.0x75mm, 3.5µm) kolon kullanılmış, mobil faz olarak metanol ve 15 mM fosfat tamponundan oluşan ikili gradiyent elüsyon uygulanmıştır, mobil faz akış hızı 0,6 mL/dk.dır ve 210 nm.de UV dedektör ile dedeksiyon yapılmıştır. RP-HPLC yöntemindeki doğrusal çalışma aralığı *EFD*, *NFZ*, *ANT* ve *KLO* için sırasıyla, 8,33-24,36 µg/mL; 0,25- 0,75 µg/mL; 2,5-7,5 µg/mL ve 8,33- 24,4 µg/mL dir. Validasyon çalışmalarında bulunan LOD değerleri, RP-HPLC yönteminde *EFD*, *NFZ*, *ANT* ve *KLO* için sırasıyla 2,7; 0,025; 0,10 ve 0,86 µg/mL bulunmuştur. Geliştirilen kromatografik ve spektrofotometrik yöntemlerin sonuçları istatistiksel olarak doğruluk ve kesinlik açısından birbirleri ile karşılaştırılmış ve iki yöntem arasında anlamlı bir fark olmadığı bulunmuştur.

Bilim Kodu : 10103

Anahtar Kelimeler : *Efedrin*, *Nafazolin*, *Antazolin*, *Kloreton*, HPLC, UV Türev spektrofotometrisi

Sayfa Adedi : 119

Danışman : Prof. Dr. Nilgün GÜNDEN GÖĞER

METHOD DEVELOPMENT FOR SEPARATION AND QUANTITATIVE
DETERMINATION OF EPHEDRINE, NAPHAZOLINE, ANTHAZOLINE AND
CHLORETON IN PHARMACEUTICAL POMADES

(Ph. D. Thesis)

Çiğdem KANBEŞ DİNDAR

GAZİ UNIVERSITY
INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

December 2019

ABSTRACT

This study includes the development of spectrophotometric and chromatographic methods for determination of *Ephedrine HCl (EPD)*, *Naphazoline HCl (NPZ)*, and *Anthazoline HCl (ANT)* and *Chloreton (Chlorobutanol) (CLO)* active agents in a pharmaceutical pomad. In spectrophotometric method, third order derivative of the amplitudes at 218 nm $n=5$ and the first order derivative of the amplitudes 254 nm $n=13$ was selected for the determination of *EPD*, *ANT*, respectively while *NPZ* was determined by the second derivative at 234 nm and $n=21$ and colorimetric detection was applied for assay analysis of *CLO* at 540 nm. Linear operating range was obtained as 20-70, 1-3, 10-30 and 10-200 $\mu\text{g/mL}$ for *EPD*, *NPZ*, *ANT*, and *CLO* respectively. The LOD values were found to be 3.95, 0.19, 0.92 and 0,96 $\mu\text{g/mL}$ for *EPD*, *NPZ*, *ANT*, and *CLO* in spectrophotometric method, respectively. As chromatographic method, the reverse phase high performance liquid chromatographic (RP-HPLC) method has been developed and optimized by using column Agilent Zorbax Eclipse XDB C18 (3.0x75mm, 3.5 μm) .The column temperature was 40 $^{\circ}\text{C}$, binary gradient elution was used and the mobil phase consisted of 15 mM phosphate buffer in distilled water (pH 3.0) and methanol, and the flow rate was 0.6 ml/min and the UV detector was detected at 210 nm. The linear ranges in the RP-HPLC method were 8.33-24.36 $\mu\text{g/mL}$, 0.25 - 0.75 $\mu\text{g/mL}$, 2.5-7.5 $\mu\text{g/mL}$ and 8.33 - 24.4 $\mu\text{g/mL}$ for *EPD*, *NPZ*, *ANT*, and *CLO*, respectively. The LOD values in the validation studies were 2.7, 0.025, 0.66 and 0.86 $\mu\text{g/mL}$ for *EPD*, *NPZ*, *ANT*, and *CLO* 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 : 10103

Key Words : *Ephedrine*, *Antazoline*, *Naphazoline*, *Chloreton*, HPLC, derivative UV spectrophotometry

Page Number : 119

Advisor : Prof. Dr. Nilgün GÜNDEN GÖĞER

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca, bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren, ilgi ve desteğini esirgemeyen değerli hocam *Sayın Prof. Dr. Nilgün GÜNDEN GÖĞER'e*,

Çalışmalarım boyunca bana her konuda yardımcı olan ve desteğini esirgemeyen, deneysel çalışmalarımı yürütürken fikir alışverişinde bulunduğum *Sayın Prof. Dr. H. Eda ŞATANA KARA, Sayın Prof. Dr. Hasan BASAN, Doç. Dr. Aysel BERKKAN ve Sayın Prof. Dr. Bengi USLU'ya*,

Tez çalışmam boyunca her konuda yardımcı olan ve moral desteğini esirgemeyen arkadaşlarım *Cem ERKMEN, Dr. Mehmet ÇALIKOĞLU, Hüma YILMAZ ve Merve ERYILMAZ'a*,

Tez çalışmasını, G.Ü. BAP 02/2018-10 no.lu proje ile destekleyen *Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri* birimine,

Etken madde standartlarını temin etmem konusundaki yardımlarından dolayı *Santa Farma İlaç Sanayii A.Ş.'ye*,

Doktora süresince birçok tecrübe edinmeme vesile olan *Analitik Kimya Anabilim Dalı* ailesine,

Tüm eğitim hayatım boyunca sevgi ve desteklerini hep arkamda hissettiğim *sevgili aileme* ve hayatımın anlamı kızım *Bilge* ve oğlum *Ali Kaan'a* en içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xix
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Sempatomimetik İlaçlar	3
2.2. <i>Efedrin Hidroklorür</i>	4
2.2.1. <i>Efedrin Hidroklorür</i> 'ün kimyasal ve fiziksel özellikleri	4
2.2.2. <i>Efedrin Hidroklorür</i> 'ün farmakolojik özellikleri.....	4
2.2.3. <i>Efedrin</i> içeren müstahzarlar	7
2.3. <i>Nafazolin Hidroklorür</i>	7
2.3.1. <i>Nafazolin Hidroklorür</i> 'ün kimyasal ve fiziksel özellikleri.....	7
2.3.2. <i>Nafazolin Hidroklorür</i> 'ün farmakolojik özellikleri	8
2.4 <i>Antazolin Hidroklorür</i>	9
2.4.1. <i>Antazolin Hidroklorür</i> 'ün kimyasal ve fiziksel özellikleri	9
2.4.2 <i>Antazolin Hidroklorür</i> 'ün farmakolojik özellikleri	9
2.4.3. <i>Antazolin</i> içeren müstahzarlar.....	10
2.5. <i>Kloreton</i>	10
2.5.1. <i>Kloreton</i> 'un kimyasal ve fiziksel özellikleri.....	10
2.5.2. <i>Kloreton</i> 'un farmakolojik özellikleri	11

	Sayfa
2.5.3. <i>Kloreton</i> içeren müstahzarlar	11
2.6. Analiz Yöntemleri	12
2.6.1. <i>Efedrin</i>	12
2.6.2. <i>Nafazolin</i>	15
2.6.3. <i>Antazolin</i>	17
2.6.4. <i>Nafazolin ve Antazolin</i>	18
2.6.5. <i>Kloreton</i>	19
2.7. Yarı Katı Farmasötik Preparatlar	20
2.7.1. Deriye uygulanan yarı katı preparatlar	20
2.8. UV Spektrofotometrisi	22
2.8.1. UV Türev spektrofotometrisi	23
2.9. Kromatografi	25
2.9.1. Kromatografinin Sınıflandırılması.....	25
2.9.2. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC).....	29
2.9.3 HPLC’de temel parametreler	29
2.10. Analitik Yöntem Validasyonu.....	31
2.10.1. Doğruluk	32
2.10.2. Kesinlik	33
2.10.3. Seçicilik.....	34
2.10.4. LOD (Tespit limiti)	35
2.10.5. LOQ (Tayin limiti).....	35
2.10.6. Doğrusallık ve çalışma aralığı	36
2.10.7. Sağlamlık (Robustness)	36
2.10.8. Stabilité	36
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	39
3.1. Gereç	39

	Sayfa
3.1.1. Kimyasal malzemeler.....	39
3.1.2. Kullanılan araç ve gereçler	39
3.1.3. Kullanılan farmasötik pomad.....	39
3.2. UV Türev Spektrofotometrisi Yöntemi için Ön Çalışmalar	40
3.2.1. <i>Efedrin HCl</i> 'in UV spektrumunun alınması	40
3.2.2. <i>Nafazolin HCl</i> 'in UV spektrumunun alınması.....	40
3.2.3. <i>Antazolin HCl</i> 'in UV spektrumunun alınması.....	40
3.2.4. <i>Kloreton</i> 'un UV spektrumunun alınması.....	40
3.2.5. <i>Efedrin HCl</i> , <i>Nafazolin HCl</i> , <i>Antazolin HCl</i> ve <i>Kloreton</i> içeren standartlar karışımının UV spektrumunun alınması	40
3.2.6. <i>Efedrin HCl</i> , <i>Nafazolin HCl</i> , <i>Antazolin HCl</i> ve <i>Kloreton</i> içeren farmasötik pomadın UV spektrumunun alınması	41
3.2.7. <i>Efedrin HCl</i> , <i>Nafazolin HCl</i> ve <i>Antazolin HCl</i> 'in çalışma dalga boylarının seçilmesi	41
3.2.8. UV Türev spektrofotometrisi yöntemi ile <i>Efedrin HCl</i> , <i>Nafazolin HCl</i> ve <i>Antazolin HCl</i> kalibrasyon grafikleri.....	42
3.2.9. UV Türev spektrofotometrisi yöntemi ile farmasötik pomadlarda <i>Efedrin HCl</i> , <i>Nafazolin HCl</i> ve <i>Antazolin HCl</i> miktar tayini	43
3.2.10. Farmasötik pomadlarda UV Türev spektrofotometrisi yöntemi ile <i>Efedrin HCl</i> , <i>Nafazolin HCl</i> ve <i>Antazolin HCl</i> geri kazanımı	43
3.2.11. UV Türev spektrofotometrisi yönteminde validasyon.....	44
3.2.12. Farmasötik pomadlarda Kolorimetrik yöntemle <i>Kloreton</i> miktar tayini	44
3.3. RP- HPLC Yöntemi ile Farmasötik Pomadlarda <i>Efedrin HCl</i> , <i>Nafazolin HCl</i> , <i>Antazolin HCl</i> ve <i>Kloreton</i> Tayini	45
3.3.1. Çözeltilerin hazırlanması	45
3.3.2. RP - HPLC yöntemi ile <i>Efedrin HCl</i> , <i>Nafazolin HCl</i> , <i>Antazolin HCl</i> ve <i>Kloreton</i> tayini optimizasyonu.....	46
3.3.3. RP - HPLC yöntemi ile <i>Efedrin HCl</i> , <i>Nafazolin HCl</i> , <i>Antazolin HCl</i> ve <i>Kloreton</i> kalibrasyon grafikleri.....	47
3.3.4. RP- HPLC yöntemi ile farmasötik pomadlarda <i>Efedrin HCl</i> , <i>Nafazolin HCl</i> , <i>Antazolin HCl</i> ve <i>Kloreton</i> miktar tayini	47

Sayfa

3.3.5. RP- HPLC yöntemi ile Efedrin HCl, Nafazolin HCl, Antazolin HCl ve Kloreton geri kazanımı.....	48
3.3.6. RP- HPLC yönteminde validasyon.....	48
4. BULGULAR	51
4.1. <i>Efedrin HCl, Nafazolin HCl, Antazolin HCl ve Kloreton'un</i> UV Spektrumları.....	51
4.2. Standartlar Karışımı Çözeltisi ve Farmasötik Pomad Çözeltisinin UV Spektrumları	51
4.3. UV-Türev Spektrofotometrisi Yöntemi Sonuçları.....	52
4.3.1. UV Türev spektrofotometrisi yöntemi ile miktar tayini için uygun dalga boyunun belirlenmesi.....	52
4.3.2. UV Türev spektrofotometrisi yöntemi ile miktar tayini için seçilen dalga boyları	70
4.3.3. UV Türev spektrofotometrisi yöntemi kalibrasyon grafikleri	72
4.3.4. UV Türev spektrofotometrik yöntemde tekrarlanabilirlik.....	73
4.3.5. UV Türev spektrofotometrik yöntem ile farmasötik pomadda etken madde miktar tayini sonuçları.....	74
4.3.6. UV Türev spektrofotometrik yöntem ile geri kazanım sonuçları	75
4.4. Kloreton tayini için renklendirme reaktifi seçimi çalışmaları.....	76
4.4.1. Kolorimetrik tayinde piridin miktarının etkisi.....	77
4.4.2. Kolorimetrik tayinde NaOH miktarının etkisi	78
4.4.3. Kolorimetrik yöntemle <i>Kloreton</i> Kalibrasyon grafiği	78
4.4.4. Kolorimetrik yöntemde analitik parametreler.....	78
4.4.5. Kolorimetrik yöntemde miktar tayini sonuçları.....	79
4.4.6. Kolorimetrik yöntemde tekrarlanabilirlik çalışması sonuçları	79
4.4.7. Kolorimetrik yöntemde geri kazanım çalışması sonuçları.....	80
4.5. RP- HPLC ile <i>Efedrin HCl, Nafazolin HCl, Antazolin HCl ve Kloreton</i> Tayini	81
4.5.1. Yöntemin optimizasyonu.....	81
4.5. Yöntem Validasyonu.....	87
4.5.1. Kalibrasyon grafikleri	87

Sayfa

4.5.2. RP - HPLC yönteminin farmasötik pomada uygulanması ve geri kazanım çalışması sonuçları.....	90
4.5.3. RP - HPLC yöntemi Sistem Uygunluk Testleri (SUT).....	92
4.5.4. Sağlamlık çalışmaları.....	92
4.5.5. Çözeltilerin kararlılığı.....	94
4.5.6. RF - HPLC yöntemi hızlı bozundurma testleri	94
4.6. 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 Bulgularıyla Karşılaştırma	105
5.3. Validasyon ve SUT	106
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	109
KAYNAKLAR.....	111
ÖZGEÇMİŞ	119

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Sempatomimetik ilaç grubuna dahil olan etken maddeleri	3
Çizelge 2.2. <i>Efedrin Hidroklorür</i> 'ün kimyasal ve fiziksel özellikleri	4
Çizelge 2.3. <i>Efedrin</i> içeren müstahzarlar	7
Çizelge 2.4. <i>Nafazolin Hidroklorür</i> 'ün kimyasal ve fiziksel özellikleri	7
Çizelge 2.5. <i>Nafazolin</i> içeren müstahzarlar	8
Çizelge 2.6. <i>Antazolin Hidroklorür</i> 'ün kimyasal ve fiziksel özellikleri	9
Çizelge 2.7. <i>Antazolin</i> içeren müstahzarlar	10
Çizelge 2.8. <i>Kloreton</i> 'un kimyasal ve fiziksel özellikleri	10
Çizelge 2.9. <i>Kloreton</i> içeren müstahzarlar.....	11
Çizelge 2.10. <i>Efedrin</i> analiz yöntemleri	12
Çizelge 2.11. <i>Nafazolin</i> analiz yöntemleri.....	15
Çizelge 2.12. <i>Antazolin</i> analiz yöntemleri	17
Çizelge 2.13. <i>Nafazolin ve Antazolin</i> analiz yöntemleri.....	18
Çizelge 2.14. <i>Kloreton</i> analiz yöntemleri	19
Çizelge 2.15. Ters-faz sıvı kromatografisi sabit faz dolgu materyalleri	27
Çizelge 2.16. Normal faz ve ters faz sıvı kromatografisinin karşılaştırılması.....	27
Çizelge 2.17. Hızlandırılmış Bozunma Çalışması	37
Çizelge 4.1. Etken Maddelerin miktar tayini yapılabilecek UV Türev derecesi, n ve dalga boyu (λ) değerleri.....	69
Çizelge 4.2. UV Türev spektrofotometrik yöntemin analitik parametreleri.....	73
Çizelge 4.3. Günler arası tekrarlanabilirlik çalışması sonuçları	74
Çizelge 4.4. Gün içi tekrarlanabilirlik çalışması sonuçları	74
Çizelge 4.5. Farmasötik pomada <i>Efedrin HCl</i> miktar tayini sonuçları.....	75
Çizelge 4.6. Farmasötik pomada <i>Nafazolin HCl</i> miktar tayini sonuçları	75
Çizelge 4.7. Farmasötik pomada <i>Antazolin HCl</i> miktar tayini sonuçları	75

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.8. Farmasötik pomadda UV türev spektrofotometrik yöntemle geri kazanım sonuçları.....	76
Çizelge 4.9. Renklendirme reaktifi ön çalışma sonuçları.....	77
Çizelge 4.10. Kolorimetrik tayine Piridin miktarının etkisi	77
Çizelge 4.11. Kolorimetrik tayinde NaOH miktarının etkisi	78
Çizelge 4.12. Kolorimetrik tayinin analitik parametreleri.....	79
Çizelge 4.13. Farmasötik pomadda <i>Kloreton</i> miktar tayini sonuçları.....	79
Çizelge 4.14. Günler arası tekrarlanabilirlik çalışması sonuçları.....	80
Çizelge 4.15. Gün içi tekrarlanabilirlik çalışması sonuçları.....	80
Çizelge 4.16. <i>Kloreton</i> geri kazanım sonuçları	80
Çizelge 4.17. Gradyent elüsyon sistemi	82
Çizelge 4.18. <i>Efedrin HCl</i> , <i>Nafazolin HCl</i> , <i>Antazolin HCl</i> ve <i>Kloreton</i> Tayininde mobil faz bileşeni fosfat tamponunun pH'sının kromatografik parametrelere etkisi	83
Çizelge 4.19. <i>Efedrin HCl</i> , <i>Nafazolin HCl</i> , <i>Antazolin HCl</i> , <i>Kloreton</i> tayininde mobil faz bileşeni fosfat tamponu derişiminin kromatografik parametrelere etkisi	84
Çizelge 4.20. Kolon sıcaklığının kromatografik parametrelere etkisi	84
Çizelge 4.21. Enjeksiyon hacminin kromatografik parametrelere etkisi.....	85
Çizelge 4.22. Mobil faz akış hızının kromatografik parametrelere etkisi	86
Çizelge 4.23. Optimizasyon çalışmaları sonucunda belirlenen kromatografik koşullar	86
Çizelge 4.24. RP-HPLC yönteminin analitik performans verileri	89
Çizelge 4.25. RP- HPLC Yöntemi Gün İçi Tekrarlanabilirlik Çalışması Sonuçları.....	89
Çizelge 4.26. RP- HPLC yöntemi günler arası tekrarlanabilirlik çalışması.....	89
Çizelge 4.27. Farmasötik pomadlarda <i>Efedrin HCl</i> miktar tayini sonuçları.....	90
Çizelge 4.28. Farmasötik pomadlarda <i>Nafazolin HCl</i> miktar tayini sonuçları	90
Çizelge 4.29. Farmasötik pomadlarda <i>Antazolin HCl</i> miktar tayini sonuçları	90
Çizelge 4.30. Farmasötik pomadlarda <i>Kloreton</i> miktar tayini sonuçları.....	91

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.31. RP - HPLC ile geri kazanım çalışması sonuçları	91
Çizelge 4.32. RP - HPLC yönteminde elde edilen SUT sonuçları	92
Çizelge 4.33. RP – HPLC yönteminde tampon pH'sının sağlamlığa etkisi	92
Çizelge 4.34. RP-HPLC yönteminde mobil faz akış hızının sağlamlığa etkisi	93
Çizelge 4.35. RP-HPLC yönteminde UV dedektör dalga boyunun sağlamlığa etkisi ..	93
Çizelge 4.36. Çözeltilerin kararlılığı	94
Çizelge 4.37. Stres koşulları altında <i>Efedrin HCl</i> , <i>Nafazolin HCl</i> , <i>Antazolin HCl</i> ve <i>Kloreton</i> bozunma miktarları	98
Çizelge 4. 38. UV Türev ve HPLC Yöntemlerinin Student t Testi ve Fisher Testi ile karşılaştırılması	99
Çizelge 5.1. Farklı örneklerde <i>Efedrin</i> , <i>Antazolin</i> , <i>Nafazolin</i> ve <i>Kloreton</i> tayini	105

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. <i>Efedrin Hidroklorür</i> 'ün açık formülü	4
Şekil 2.2. <i>Nafazolin Hidroklorür</i> 'ün açık formülü	7
Şekil 2.3. <i>Antazolin Hidroklorür</i> 'ün açık formülü.....	9
Şekil 2.4. <i>Kloreton</i> 'un açık formülü	11
Şekil 2.5. Basit bir Gauss pikinin 1-4. Türev spektrumları.....	24
Şekil 2.6. Örtüşen iki Gauss pikinin 1-4. türev spektrumları.....	24
Şekil 2.7. Kromatografinin sınıflandırılması	25
Şekil 2.8. HPLC cihazının şematik gösterimi	29
Şekil 2.9. Analite ait kromatogram	30
Şekil 4.1. <i>Efedrin HCl</i> , <i>Nafazolin HCl</i> , <i>Antazolin HCl</i> ve <i>Kloreton</i> 'un UV spektrumları	51
Şekil 4.2. Farmasötik pomad (çözücü: metanol-su, 30: 20) ve standartlar karışımı (çözücü: metanol-su, 30: 20) çözeltilerinin UV spektrumları.....	52
Şekil 4.3. 40,4 µg/mL <i>EFD</i> , 1,66 µg/mL <i>NFZ</i> , 16,6 µg/mL <i>ANT</i> ve eşit miktarda <i>EFD</i> , <i>NFZ</i> ve <i>ANT</i> içeren Farmasötik Pomad'a ait üst üste çekilmiş 1.türev (n=5) UV spektrumları	53
Şekil 4.4. 40,4 µg/mL <i>EFD</i> , 1,66 µg/mL <i>NFZ</i> , 16,6 µg/mL <i>ANT</i> ve eşit miktarda <i>EFD</i> , <i>NFZ</i> ve <i>ANT</i> içeren Farmasötik Pomad'a ait üst üste çekilmiş 1.türev (n=7) UV spektrumları	53
Şekil 4.5. 40,4 µg/mL <i>EFD</i> , 1,66 µg/mL <i>NFZ</i> , 16,6 µg/mL <i>ANT</i> ve eşit miktarda <i>EFD</i> , <i>NFZ</i> ve <i>ANT</i> içeren Farmasötik Pomad'a ait üst üste çekilmiş 1.türev (n=9) UV spektrumları	54
Şekil 4.6. 40,4 µg/mL <i>EFD</i> , 1,66 µg/mL <i>NFZ</i> , 16,6 µg/mL <i>ANT</i> ve eşit miktarda <i>EFD</i> , <i>NFZ</i> ve <i>ANT</i> içeren Farmasötik Pomad'a ait üst üste çekilmiş 1.türev (n=11) UV spektrumları	54
Şekil 4.7. 40,4 µg/mL <i>EFD</i> , 1,66 µg/mL <i>NFZ</i> , 16,6 µg/mL <i>ANT</i> ve eşit miktarda <i>EFD</i> , <i>NFZ</i> ve <i>ANT</i> içeren Farmasötik Pomad'a ait üst üste çekilmiş 1.türev (n=13) UV spektrumları	55

Şekil	Sayfa
Şekil 4.8. 40,4 µg/mL <i>EFD</i> , 1,66 µg/mL <i>NFZ</i> , 16,6 µg/mL <i>ANT</i> ve eşit miktarda <i>EFD</i> , <i>NFZ</i> ve <i>ANT</i> içeren Farmasötik Pomad'a ait üst üste çekilmiş 1.türev (n=17) UV spektrumları	55
Şekil 4.9. 40,4 µg/mL <i>EFD</i> , 1,66 µg/mL <i>NFZ</i> , 16,6 µg/mL <i>ANT</i> ve eşit miktarda <i>EFD</i> , <i>NFZ</i> ve <i>ANT</i> içeren Farmasötik Pomad'a ait üst üste çekilmiş 1.türev (n=21) UV spektrumları	56
Şekil 4.10. 40,4 µg/mL <i>EFD</i> , 1,66 µg/mL <i>NFZ</i> , 16,6 µg/mL <i>ANT</i> ve eşit miktarda <i>EFD</i> , <i>NFZ</i> ve <i>ANT</i> içeren Farmasötik Pomad'a ait üst üste çekilmiş 1.türev (n=25) UV spektrumları	56
Şekil 4.11. 40,4 µg/mL <i>EFD</i> , 1,66 µg/mL <i>NFZ</i> , 16,6 µg/mL <i>ANT</i> ve eşit miktarda <i>EFD</i> , <i>NFZ</i> ve <i>ANT</i> içeren Farmasötik Pomad'a ait üst üste çekilmiş 2.türev (n=5) UV spektrumları	57
Şekil 4.12. 40,4 µg/mL <i>EFD</i> , 1,66 µg/mL <i>NFZ</i> , 16,6 µg/mL <i>ANT</i> ve eşit miktarda <i>EFD</i> , <i>NFZ</i> ve <i>ANT</i> içeren Farmasötik Pomad'a ait üst üste çekilmiş 2.türev (n=7) UV spektrumları	58
Şekil 4.13. 40,4 µg/mL <i>EFD</i> , 1,66 µg/mL <i>NFZ</i> , 16,6 µg/mL <i>ANT</i> ve eşit miktarda <i>EFD</i> , <i>NFZ</i> ve <i>ANT</i> içeren Farmasötik Pomad'a ait üst üste çekilmiş 2.türev (n=9) UV spektrumları	58
Şekil 4.14. 40,4 µg/mL <i>EFD</i> , 1,66 µg/mL <i>NFZ</i> , 16,6 µg/mL <i>ANT</i> ve eşit miktarda <i>EFD</i> , <i>NFZ</i> ve <i>ANT</i> içeren Farmasötik Pomad'a ait üst üste çekilmiş 2.türev (n=11) UV spektrumları.....	59
Şekil 4.15. 40,4 µg/mL <i>EFD</i> , 1,66 µg/mL <i>NFZ</i> , 16,6 µg/mL <i>ANT</i> ve eşit miktarda <i>EFD</i> , <i>NFZ</i> ve <i>ANT</i> içeren Farmasötik Pomad'a ait üst üste çekilmiş 2.türev (n=13) UV spektrumları	59
Şekil 4.16. 40,4 µg/mL <i>EFD</i> , 1,66 µg/mL <i>NFZ</i> , 16,6 µg/mL <i>ANT</i> ve eşit miktarda <i>EFD</i> , <i>NFZ</i> ve <i>ANT</i> içeren Farmasötik Pomad'a ait üst üste çekilmiş 2.türev (n=17) UV spektrumları	60
Şekil 4.17. 40,4 µg/mL <i>EFD</i> , 1,66 µg/mL <i>NFZ</i> , 16,6 µg/mL <i>ANT</i> ve eşit miktarda <i>EFD</i> , <i>NFZ</i> ve <i>ANT</i> içeren Farmasötik Pomad'a ait üst üste çekilmiş 2.türev (n=21) UV spektrumları	60
Şekil 4.18. 40,4 µg/mL <i>EFD</i> , 1,66 µg/mL <i>NFZ</i> , 16,6 µg/mL <i>ANT</i> ve eşit miktarda <i>EFD</i> , <i>NFZ</i> ve <i>ANT</i> içeren Farmasötik Pomad'a ait üst üste çekilmiş 2.türev (n=25) UV spektrumları	61
Şekil 4.19. 40,4 µg/mL <i>EFD</i> , 1,66 µg/mL <i>NFZ</i> , 16,6 µg/mL <i>ANT</i> ve eşit miktarda <i>EFD</i> , <i>NFZ</i> ve <i>ANT</i> içeren Farmasötik Pomad'a ait üst üste çekilmiş 3.türev (n=5) UV spektrumları	62

Şekil	Sayfa
Şekil 4.20. 40,4 µg/mL <i>EFD</i> , 1,66 µg/mL <i>NFZ</i> , 16,6 µg/mL <i>ANT</i> ve eşit miktarda <i>EFD</i> , <i>NFZ</i> ve <i>ANT</i> içeren Farmasötik Pomad'a ait üst üste çekilmiş 3.türev (n=7) UV spektrumları	62
Şekil 4.21. 40,4 µg/mL <i>EFD</i> , 1,66 µg/mL <i>NFZ</i> , 16,6 µg/mL <i>ANT</i> ve eşit miktarda <i>EFD</i> , <i>NFZ</i> ve <i>ANT</i> içeren Farmasötik Pomad'a ait üst üste çekilmiş 3.türev (n=9) UV spektrumları	63
Şekil 4.22. 40,4 µg/mL <i>EFD</i> , 1,66 µg/mL <i>NFZ</i> , 16,6 µg/mL <i>ANT</i> ve eşit miktarda <i>EFD</i> , <i>NFZ</i> ve <i>ANT</i> içeren Farmasötik Pomad'a ait üst üste çekilmiş 3.türev (n=17) UV spektrumları	63
Şekil 4.23. 40,4 µg/mL <i>EFD</i> , 1,66 µg/mL <i>NFZ</i> , 16,6 µg/mL <i>ANT</i> ve eşit miktarda <i>EFD</i> , <i>NFZ</i> ve <i>ANT</i> içeren Farmasötik Pomad'a ait üst üste çekilmiş 3.türev (n=21) UV spektrumları	64
Şekil 4.24. 40,4 µg/mL <i>EFD</i> , 1,66 µg/mL <i>NFZ</i> , 16,6 µg/mL <i>ANT</i> ve eşit miktarda <i>EFD</i> , <i>NFZ</i> ve <i>ANT</i> içeren Farmasötik Pomad'a ait üst üste çekilmiş 3.türev (n=25) UV spektrumları	64
Şekil 4.25. 40,4 µg/mL <i>EFD</i> , 1,66 µg/mL <i>NFZ</i> , 16,6 µg/mL <i>ANT</i> ve eşit miktarda <i>EFD</i> , <i>NFZ</i> ve <i>ANT</i> içeren Farmasötik Pomad'a ait üst üste çekilmiş 4.türev (n=5) UV spektrumları	65
Şekil 4.26. 40,4 µg/mL <i>EFD</i> , 1,66 µg/mL <i>NFZ</i> , 16,6 µg/mL <i>ANT</i> ve eşit miktarda <i>EFD</i> , <i>NFZ</i> ve <i>ANT</i> içeren Farmasötik Pomad'a ait üst üste çekilmiş 4.türev (n=7) UV spektrumları	66
Şekil 4.27. 40,4 µg/mL <i>EFD</i> , 1,66 µg/mL <i>NFZ</i> , 16,6 µg/mL <i>ANT</i> ve eşit miktarda <i>EFD</i> , <i>NFZ</i> ve <i>ANT</i> içeren Farmasötik Pomad'a ait üst üste çekilmiş 4.türev (n=9) UV spektrumları	66
Şekil 4.28. 40,4 µg/mL <i>EFD</i> , 1,66 µg/mL <i>NFZ</i> , 16,6 µg/mL <i>ANT</i> ve eşit miktarda <i>EFD</i> , <i>NFZ</i> ve <i>ANT</i> içeren Farmasötik Pomad'a ait üst üste çekilmiş 4.türev (n=11) UV spektrumları	67
Şekil 4.29. 40,4 µg/mL <i>EFD</i> , 1,66 µg/mL <i>NFZ</i> , 16,6 µg/mL <i>ANT</i> ve eşit miktarda <i>EFD</i> , <i>NFZ</i> ve <i>ANT</i> içeren Farmasötik Pomad'a ait üst üste çekilmiş 4.türev (n=13) UV spektrumları	67
Şekil 4.30. 40,4 µg/mL <i>EFD</i> , 1,66 µg/mL <i>NFZ</i> , 16,6 µg/mL <i>ANT</i> ve eşit miktarda <i>EFD</i> , <i>NFZ</i> ve <i>ANT</i> içeren Farmasötik Pomad'a ait üst üste çekilmiş 4.türev (n=17) UV spektrumları	68
Şekil 4.31. 40,4 µg/mL <i>EFD</i> , 1,66 µg/mL <i>NFZ</i> , 16,6 µg/mL <i>ANT</i> ve eşit miktarda <i>EFD</i> , <i>NFZ</i> ve <i>ANT</i> içeren Farmasötik Pomad'a ait üst üste çekilmiş 4.türev (n=21) UV spektrumları	68

Şekil	Sayfa
Şekil 4.32. 40,4 µg/mL <i>EFD</i> , 1,66 µg/mL <i>NFZ</i> , 16,6 µg/mL <i>ANT</i> ve eşit miktarda <i>EFD</i> , <i>NFZ</i> ve <i>ANT</i> içeren Farmasötik Pomad'a ait üst üste çekilmiş 4.türev (n=25) UV spektrumları	69
Şekil 4.33. UV Türev Spektrofotometrisi yöntemiyle (2.türev, n=21, 234 nm) <i>NFZ</i> tayininde kullanılan kalibrasyon grafiği, Derişim aralığı = 1,0-3,0 µg/mL	72
Şekil 4.34. UV Türev Spektrofotometrisi yöntemi ile (1. Türev, n=13, 254 nm) <i>ANT</i> tayininde kullanılan kalibrasyon grafiği, Derişim aralığı = 10,0-30,0 µg/mL.....	73
Şekil 4.35. 100 µg/mL <i>Kloreton</i> 'un kolorimetrik spektrumu (Renklendirme ajanı: Piridin)	77
Şekil 4.36. Kolorimetrik yöntemle <i>Kloreton</i> Kalibrasyon grafiği, Derişim aralığı = 10,0-200,0 µg/mL	78
Şekil 4.37. <i>Efedrin HCl</i> , <i>Nafazolin HCl</i> , <i>Antazolin HCl</i> ve <i>Kloreton</i> içeren karışıma ait kromatogram.....	82
Şekil 4.38. RP - HPLC yöntemi ile <i>EFD</i> kalibrasyon grafiği, Derişim aralığı = 8,33-24,36 µg/mL.....	87
Şekil 4.39. RP - HPLC yöntemi ile <i>NFZ</i> kalibrasyon grafiği, Derişim aralığı = 0,25-0,75 µg/mL.....	87
Şekil 4.40. RP - HPLC yöntemi ile <i>ANT</i> kalibrasyon grafiği, Derişim aralığı =2,5-7,5 µg/mL.....	88
Şekil 4.41. RP - HPLC yöntemi ile <i>KLO</i> kalibrasyon grafiği, Derişim aralığı =8,33-24,4 µg/mL.....	88
Şekil 4.42. Stres koşullarında 50 µg/mL <i>EFD</i> kromatogramları. a) 0,1 M HCl b) 1,0 M HCl c) 0,1M NaOH d) 1,0 M NaOH e) Oksidasyon f) 6 saat UV ışık altında bekletme	95
Şekil 4.43. Stres koşullarında 50 µg/mL <i>NFZ</i> kromatogramları. a) 0,1 M HCl b) 1,0 M HCl c) 0,1M NaOH d) 1,0 M NaOH e) Oksidasyon f) 6 saat UV ışık altında bekletme	96
Şekil 4.44. Stres koşullarında 50 µg/mL <i>ANT</i> kromatogramları. a) 0,1 M HCl b) 1,0 M HCl c) 0,1M NaOH d) 1,0 M NaOH e) Oksidasyon f) 6 saat UV ışık altında bekletme	97
Şekil 4.45. Stres koşullarında 50 µg/mL <i>KLO</i> kromatogramları. a) 0,1 M HCl b) 1,0 M HCl c) 0,1M NaOH d) 1,0 M NaOH e) Oksidasyon f) 6 saat UV ışık altında bekletme	98

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
P_{As}	Pik asimetri oranı
R	Kromatografide Rezolüsyon, Ayırma Gücü
t_R	Kromatografide Alıkonma zamanı
α	Kromatografide Seçicilik Faktörü

Kısaltmalar	Açıklamalar
ANT	<i>Antazolin</i>
BH	Bağlı Hata
BSS	Bağlı standart Sapma
CE	Capillary Electrophoresis (Kapiler Elektroforez)
EFD	<i>Efedrin</i>
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations (Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü)
GC	Gaz Kromatografisi
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography (Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi)
KLO	<i>Kloreton</i>
LOD	Limit of Dedection (Teşhis Sınırı)
LOQ	Limit of Quantification (Tayin Sınırı)
MS	Kütle Spektrometri
NFZ	<i>Nafazolin</i>

Kısaltmalar**SS****SUT****WHO****Açıklamalar**

Standart Sapma

Sistem Uygunluk Testleri

World Health Organization
(Dünya Sağlık Örgütü)

1. GİRİŞ

Farmasötik analizlerde en çok kullanılan yöntemler, UV spektrofotometri ve HPLC'dir. Özellikle, aynı dalga boyu aralığında spesifik pikleri olan maddelerin karışımları, UV-VIS spektrofotometrisi ile analiz edildiğinde oluşan spektral girişim nedeniyle analizin güçleştiği bilinmektedir. Bu soruna UV türev spektrofotometresi yöntemi bir çözüm olabilir. Yöntem uygulanabilirlik bakımından birçok üstünlüğe sahiptir. Zaman alıcı ve pahalı işlemlere başvurmaksızın analize imkan tanınması sebebiyle güncelliğini korumaktadır. Farmasötik analizlerde HPLC yöntemi ise basit, hızlı, kesin ve doğru olması nedeniyle sıklıkla rutin analizlerde kullanılmaktadır. Genellikle, HPLC yöntemi UV spektrofotometrik yöntemlerden daha duyarlı olması ve daha az numune kullanılması gibi özellikleri ile ön plana çıkmaktadır [1].

Efedrin Hidroklorür gerek alfa ve gerekse beta-reseptörleri uyarması nedeniyle adrenaline benzeyen; fakat ona oranla sempatomimetik etkileri zayıf olan bir ilaç etken maddesidir ve Ephedra bitkisi türlerinden elde edilen bir alkaloiddir. Günümüzde sentez yoluyla elde edilir, levo izomeri veya rasemik karışım şeklinde hidroklorür ya da sülfat tuzu halinde kullanılır. Bronkodilatör etkisinden başka, vazokonstriktör etkisi de vardır. *Efedrin Hidroklorür*, bronşlardaki beta reseptörlerinin stimülasyonu sonucu astım, bronşit, amfizem ve bronşektazi gibi hastalıklarda bronş düz kas adalesini gevşetmek suretiyle gösterdiği bronkodilatör etkiyle hastaların daha rahat nefes almasını sağlar. Ayrıca solunum yolu konjestiyonunu giderir [2].

Nafazolin Hidroklorür, alfa adrenerjik aktivite gösteren sempatomimetik bir ajandır. Mukoza zarı üzerine uygulandığında şişmeyi azaltmada hızlı bir etki gösteren bir vazokonstriktördür. Konjunktiva arteriollerinde alfa-reseptörlere etki ederek konstruksiyon oluşturur ve tıkanıklığı azaltır. *Nafazolin Hidroklorür*, soğuk algınlığı, alerji veya göz tahrişlerinden dolayı kızarıklık, şişkinlik giderici bir dekonjestandır [2].

Antazolin Hidroklorür, seçici H1-antagonistleri olan etilendiamin sınıfından bir antihistaminiktir. Alerjik konjunktivit semptomlarını azaltmak için burun tıkanıklığını azaltmasında kullanılan antikolinerjik özelliklere sahip bu birinci nesil antihistaminik madde göz damlalarında, genellikle *Nafazolin* ve / veya Tetrahidrozolin ile kombine halde

kullanılır. Antihistamin ve vazokonstriktörü birleştiren ürünler, alerjik göz hastalıklarının semptomatik iyileşmesinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır [2].

Kloreton günümüzde hiptonik olarak değil, antiseptik etkisi nedeniyle sıvı farmasötik ilaç şekilleri içinde koruyucu olarak kullanılır [2].

Türk ilaç pazarında *Efedrin Hidroklorür*, *Nafazolin Hidroklorür*, *Antazolin Hidroklorür* ve *Kloreton* etken maddelerini içeren farmasötik bir pomad bulunmaktadır. Ayrıca, piyasa bulunan çeşitli farmasötik formlarda *Antazolin Hidroklorür* ve *Nafazolin Hidroklorür* içeren preparatlar olduğu gibi *Efedrin* ve *Kloreton*'u da ayrı ayrı içeren çeşitli preparatlar mevcuttur. Bu etken maddeler tayin edilirken ayrı ayrı yöntemler uygulanmaktadır. Bu nedenle, bu maddeleri içeren karışımların ayrımı ve miktar tayini yapılabilmesi için ekonomik, çevreci ve kolay yöntemlerin geliştirilmesi gerekmektedir.

Bu çalışmada farmasötik pomatta *Efedrin Hidroklorür*, *Nafazolin Hidroklorür*, *Antazolin Hidroklorür* ve *Kloreton* 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. Bu maddelerden *Efedrin Hidroklorür*, *Nafazolin Hidroklorür* ve *Antazolin Hidroklorür* birbirine benzer spektroskopik özelliklere sahip olduklarından aynı anda UV spektrofotometrik yöntemle tayinleri mümkün değildir. Bu nedenle, *Efedrin Hidroklorür*, *Nafazolin Hidroklorür*, *Antazolin Hidroklorür*'ün eş zamanlı tayini için UV-Türev spektrofotometresi kullanılmıştır. Ancak, *Kloreton* UV spektrofotometrisi ile tayin edilememektedir. Bu nedenle, *Kloreton* seçici bir renklendirme ajanı ile muamele edilerek kolorimetrik olarak tayin edilmiştir. Daha sonra, *Efedrin Hidroklorür*, *Nafazolin Hidroklorür*, *Antazolin Hidroklorür* ve *Kloreton*'un aynı anda analizi için RP-HPLC yöntemi geliştirilmiş ve yöntemler kıyaslanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Sempatomimetik İlaçlar

Sempatomimetik ilaçlar, efektör organları, adrenerjik reseptörler üzerinden direkt ve/veya indirekt olarak etkileyen ve sempatik sinir stimülasyonunun bu organlardaki etkilerini taklit eden ilaçlardır. Genellikle hem alfa ve hem de beta-adrenerjik reseptörleri aktive ederler. Bu ilaçların efektör hücre veya organlarda oluşturdıkları etkinin türü ve derecesi başlıca iki faktöre bağlıdır: i) ilacın α_1 , α_2 , β_1 , β_2 ve β_3 reseptörlere karşı afinitesi ve ii) etkilenen yapının reseptör bileşimi. Ayrıca ilacın farmakokinetik özellikleri de etki kalıbını, etki gücünü ve süresini değiştirir.

Bu ilaçların tamamına yakını feniletılamin türevidir. 3,4-dihidroksifeniletılamin türevleri veya diğer adıyla katekolaminler sadece doğrudan etki gösterirler. Diğerlerinin bir bölümü direkt etki gösterir. Geri kalanlar ise adrenerjik reseptörleri hem doğrudan ve hem de dolaylı yani karma bir şekilde etkilerler.

Sempatomimetik ilaçlar: i) Katekolaminler ve ii) Sempatomimetik aminler (Katekolamin-olmayanlar) diye iki ana bölüme ayrılırlar. Çizelge 2.1’de Sempatomimetrik ilaç etken maddeleri verilmiştir [2].

Çizelge 2.1. Sempatomimetik ilaç grubuna dahil olan etken maddeleri [2]

Katekolaminler	Katekolamin olmayanlar						
	Alfa Mimetik İlaçlar			Beta Mimetik ilaçlar			
	Antihipotansif	Dekonjestan		Bronkodilatör	Vazodilatör	Tokolitik	Myokard Stimülanı
		Lokal	Sistemik				
Adrenalin	Efedrin	Nafazolin	Fenilpropanolamin	Terbutalin	İzoksuprin	Ritodrin	Dopeksamin
Noradrenalin	FenilEfedrin	Ksilometazolin	Psödofedrin	Salbutamol	Nilidrin	İzoksuprin	
Etilnoradrenalin	Metaraminol	Tetrahidrozolin		Salmeterol			
Dopamin	Metoksamin	Oksimetazolin		Formoterol		Salbutamol	
Dobutamin	EtilEfedrin	İndanazolin		Fenoterol			
Dopeksamin	Norfenefedrin	Fenilefrin		Kalbuterol			
Dipivefrin	Oksedrin	Efedrin		Klenbuterol			
İzoproterenol	Nordefedrin	Tuaminoheptan		Tulobuterol			
	Oktopamin	Metilheksamin					
	Heptaminol	Propilheksedrin					

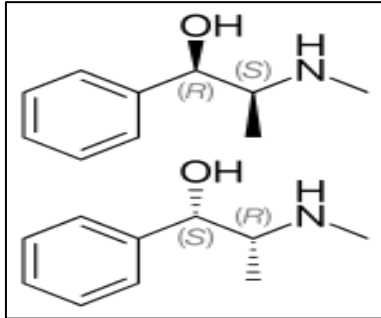
2.2. *Efedrin Hidroklorür*

2.2.1. *Efedrin Hidroklorür*'ün kimyasal ve fiziksel özellikleri

Efedrin Hidroklorür'ün kimyasal ve fiziksel özellikleri, Çizelge 2.2.'de, açık formülü Şekil 2.1.'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.2. *Efedrin Hidroklorür*'ün kimyasal ve fiziksel özellikleri [3]

Kimyasal Adı	(1R,2S)-2-(metilamino)-1-fenilpropan-1-ol; hidroklorür
Kapalı Formülü	C ₁₀ H ₁₆ ClNO
Molekül Ağırlığı	201,694 g/mol
Erime Noktası	182-186°C
Çözünürlüğü	Suda, alkolde, kloroformda, eterde
Rengi, formu	Beyaz katı, kristal toz
Saklama Koşulları	30°C altındaki oda sıcaklığında ve sıkıca kapalı hava geçirmeyen kaplarda saklanmalıdır



Şekil 2.1. *Efedrin Hidroklorür*'ün açık formülü

2.2.2. *Efedrin Hidroklorür*'ün farmakolojik özellikleri

Efedrin, Çin'de iki bin yıldan beri halk ilacı olarak kullanılan *Ephedra* türü bir bitkiden ilk olarak 1920'lerde elde edilmiş olan bir alkaloiddir. Daha sonra sentezle yapılmaya başlanmıştır [4]. Periferik etkinliğinin niteliği bakımından adrenaline benzer; ancak gravimetrik etki gücü adrenaline göre düşüktür; fakat etki süresi daha uzundur. Esas itibarıyla adrenerjik sinir uçlarından noradrenalin salıvererek indirekt etki yapar.

Sempatomimetik etkisi, dozlar tekrarlanırsa giderek azalır. Kalp üzerindeki stimulan etkisi nedeniyle kalp debisini artırarak ve ayrıca damar yataklarının çoğunda vazokonstriksiyon yaparak diyastolik ve özellikle sistolik kan basıncını yükseltir. Bronkodilatör etkisi vardır; ancak astım tedavisinde kullanılan beta 2 agonisti ilaçlara göre bu etki zayıftır.

Spinal anesteziye veya epidural anesteziye bağlı *hipotansiyonun düzelmesi* için kullanılır. *Nazal dekonjestan* olarak sprej veya burun damlası şeklinde solüsyon kullanılır. *Enurezis nokturna*'yı (gece alt ıslatma) önlemek için gece yatarken ağızdan verilebilir. Akut bronşit olgularında kullanılan antitusif majistral formülasyonlara katılabilir. İlaç olarak sülfat veya hidroklorür tuzu kullanılır. Psikomotor stimulan etkisi nedeniyle keyif verici olarak kötüye kullanılabilir; ayrıca kaçak olarak metamfetamin yapımında prekürsör olarak kullanılır.

Diğer sempatomimetik ajanlar gibi *Efedrin*'in fizyolojik etkileri de oldukça değişkendir ve genelde kullanılan doza bağlıdır. *Efedrin*, β_2 adrenerjik reseptörleri stimule ederek bronş düz kaslarını gevşetir; bronkospazmı çözer; solunumu olumlu yönde etkiler ve vital kapasiteyi artırır. Bazı hastalarda kalp atım hızı değişmez. Yüksek dozlarda ise aritmiler görülür [2,3].

Efedrin'in koroner kan akımı üzerindeki etkileri doza bağımlı olmasına rağmen, genellikle koroner kan akımını artırır. Kan akımında yaptığı bu artış koroner arterlerin dilatasyonuna veya kan basıncındaki artışa bağlı olabilir. Periferde hem vazodilatasyon hem de vazokonstriksiyon yapabilir; vazodilatasyon β_2 reseptörlerinin stimülasyonuna, vazokonstriksiyon ise α_1 reseptörlerinin stimülasyonuna bağlıdır. *Efedrin* deri, mukoza membranları ve preferik arteriyollerde konstriksiyon, iskelet kaslarında ise vazodilatasyon yapar. Sistolik ve diyastolik basıncı artırır. *Efedrin* etkisiyle ortaya çıkan presör cevaplar adrenalin ve noradrenalin ile karşılaştırıldığında daha yavaş gelişir, fakat daha uzun sürer.

Parenteral *Efedrin* böbrek kan damarlarını büzerek böbrek kan akımını azaltır. Hipovolemisi olmayan hipotansif hastalarda başlangıçta böbrek kan ve idrar akımını azaltır; kan basıncı normale ulaşırken idrar akışı da normale döner [3].

Efedrin topikal olarak uygulandığında nazal mukozada konjestiyon nedeniyle dilate halde bulunan kan damarlarını büzerek konjestiyonu azaltır. Oral yoldan verildiğinde bu etkisi görülmez, fakat rebound konjestiyona neden olabilir. Santral sinir sisteminde stimulan etki gösterir; bu etki amfetaminlerle karşılaştırıldığında daha zayıftır. Genellikle gastrointestinal

sistemdeki düz kasları gevşetir. Mesane düz kası üzerinde de etkilidir. Bir yandan idrar kesesindeki trigon ve sfinkter kaslarını kasarken, diğer yandan detrusor kasını gevşeterek idrar retansiyonuna neden olur. Uterus üzerine etkileri ise değişkendir; doğum esnasında spinal anesteziyle bağlı hipotansiyonun tedavisi için kullanıldığında uterus kan akımını artırır. *Efedrin* glikojenoliz yapar, ancak bu etkisi adrenalin kadar güçlü değildir ve hiperglisemiye neden olmaz. Yaptığı santral stimülasyonla oksijen tüketimini ve metabolizma hızını artırır. Miyastenia gravis’li hastalarda kas gücünü artırır; bu etki mekanizması bilinmemektedir [3].

Efedrin oral, topikal veya parenteral yoldan verilir. Oral, subkütan veya intramüsküler uygulamadan sonra hızla ve tamamen absorbe olur. Bronkodilatör etkisi oral yoldan 15-60 dakika içinde görülür ve 2-4 saat devam eder. İntramüsküler (IM) yoldan absorpsiyonu subkütan yoldan verilmesine göre biraz daha hızlıdır (10-20 dakika). Presör etkisi parenteral uygulama sonrası yaklaşık 1 saat devam eder; bu süre oral yoldan 4 saate kadar çıkabilmektedir. Dağılımı hakkında çok fazla bilgi yoktur; plasentayı aştığı ve anne sütüne geçtiği düşünülmektedir. Çok az bir kısmı karaciğerde oksidatif deaminasyon, demetilasyon, aromatik hidroksilasyon ve konjugasyonla metabolize olur. Başlıca metabolitleri p-hidroksiefedrin, p-hidroksinorefedrin, norefedrin ve bu metabolitlerin konjugatlarıdır. Ana ilaç ve metabolitleri esas olarak idrarla atılırlar; büyük kısmı idrarda değişmemiş halde bulunur. Gerek kendisinin gerekse metabolitlerinin eliminasyonu idrar pH’sının asitleşmesine paralel olarak artar. İdrar pH’sı 5 olduğunda eliminasyon yarı ömrü yaklaşık 3 saattir; pH 6,5’a yükseldiğinde bu süre 6 saate kadar uzar [3].

Efedrin, dünya dopingle mücadele kurallarına göre düzenlenen Yasaklı Maddeler Listesi’nde Uyarıcılar grubunda yer almaktadır. *Efedrin*’in idrarda 10 µg/mL’den daha yüksek konsantrasyonda bulunması yasaktır [2].

2.2.3. Efedrin içeren müstahzarlar

Efedrin içeren müstahzarlar, Çizelge 2,3’de gösterilmiştir.

Çizelge 2.3. Efedrin içeren müstahzarlar [3].

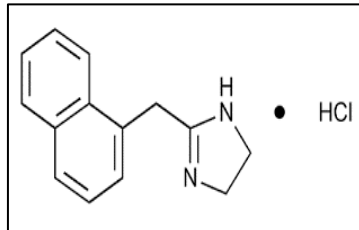
Müstahzar İsmi	Farmasötik Form	Efedrin derişimi	Müstahzardaki Diğer Maddeler
<i>Efedrin hidroklorür Ampül</i>	Enjektabl Preparat	50 mg/1 mL	--
<i>Sulfarhin Burun Pomadı</i>	Nazal pomad	%0,833	<i>Nafazolin HCl</i> <i>Antazolin HCl</i> <i>Kloreton</i> <i>Mentol</i> <i>Ökaliptol</i>
<i>Antibeksin Şurup</i>	Solüsyon	5 mg/5 mL	<i>Feniramin Maleat</i> <i>Potasyum Sülfogayakolat</i> <i>Sodyum Sitrat</i>
<i>Broksin Şurup</i>	Solüsyon	6,66 mg/5 mL	<i>Guaifenesin</i>
<i>Defeks Şurup</i>	Solüsyon	20 mg/10 mL	<i>Dekstrometorfan HBr</i> <i>Difenhidramin HCl</i>
<i>Eupnase Şurup</i>	Solüsyon	8,3 mg/5 mL	<i>Gliseril Gayakolat</i>

2.3. Nafazolin Hidroklorür

2.3.1. Nafazolin Hidroklorür’ün kimyasal ve fiziksel özellikleri

Çizelge 2.4. Nafazolin Hidroklorür’ün kimyasal ve fiziksel özellikleri [3]

Kimyasal Adı	2-(naftalen-1-ylmetil)-4,5-dihidro-1H-imidazole; hidroklorür
Kapalı Formülü	C ₁₄ H ₁₅ ClN ₂
Molekül Ağırlığı	246.092 g/mol
Erime Noktası	255-260°C
Çözünürlüğü	Suda alkolde çözünür, kloroformda az çözünür, benzende ve eterde çözünmez
Rengi, formu	Beyaz kristal toz
Saklama Koşulları	15-30°C arasındaki kontrollü oda sıcaklığında ve sıkıca kapalı hava geçirmeyen kaplarda saklanmalıdır. Işıktan korunmalıdır. Çözeltileri dondurulmamalıdır.



Şekil 2.2. Nafazolin Hidroklorür’ün açık formülü

2.3.2. Nafazolin Hidroklorür'ün farmakolojik özellikleri

Nafazolin imidazolin türevi vazokonstriktör etkili bir lokal dekonjestandır. Burun mukozası veya konjunktivaya uygulanır. α - adrenerjik reseptörleri stimule eder ve intranazal olarak kullanıldığında akut ve kronik rinit, sinüzit, soğuk algınlığı, saman nezlesi ve diğer alerjilere bağlı nazal konjestiyonu ortadan kaldırır. Aşırı miktarda ya da uzun süreli kullanımı nazal mukozada iritasyona neden olabilir. Polen alerjisi, toz, soğuk, sigara dumanı, yüzme ve kontakt lens takmaya bağlı hafif iritasyon oluşturan maddelerin neden olduğu göz kızarıklıklarını gidermek üzere oftalmik preparatları şeklinde de kullanılır.

Nafazolin, direkt etkili sempatomimetrik bir amindir. Dekonjestan etkisini nazal mukoza veya konjunktivada bulunan arteriyollerdeki α adrenerjik reseptörleri etkilemesine bağlı vazokonstriksiyon yaparak gösterir [3].

Nafazolin oftalmik ve intranazal olarak kullanılır. Göze topikal olarak uygulandığında etkisi 10 dakika içerisinde görülür. Etki süresi 2-6 saattir. Sistemik dolaşıma absorbe olabilir. Anne sütüne geçip geçmediği bilinmemektedir [2].

2.3.3. Nafazolin içeren müstahzarlar

Nafazolin içeren müstahzarlar, Çizelge 2,5'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.5. *Nafazolin* içeren müstahzarlar [3]

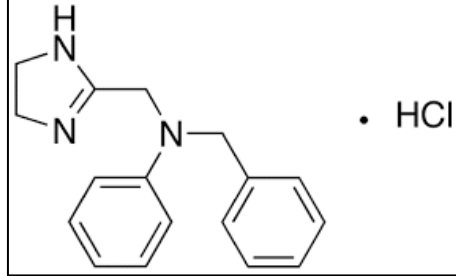
Müstahzar İsmi	Farmasötik Form	<i>Nafazolin</i> Derişimi	Müstahzardaki Diğer Maddeler
<i>Sulfarhin Burun Pomadı</i>	Nazal pomad	%0,025	<i>Efedrin</i> <i>Antazolin HCl</i> <i>Kloreton Mentol</i> <i>Ökalyptol</i>

2.4 Antazolin Hidroklorür

2.4.1. Antazolin Hidroklorür'ün kimyasal ve fiziksel özellikleri

Çizelge 2.6. *Antazolin Hidroklorür*'ün kimyasal ve fiziksel özellikleri [3]

Kimyasal Adı	N-benzil-N-(4,5-dihidro-1H-imidazol-2-ylmetil)anilin; hidroklorür
Kapalı Formülü	$C_{17}H_{20}ClN_3$
Molekül Ağırlığı	301.818 g/mol
Erime Noktası	235-240°C
Çözünürlüğü	Suda alkolde çözünür.
Rengi, formu	Beyaz Kristal toz
Saklama Koşulları	30°C'nin altındaki oda sıcaklığında ve hava geçirmeyen kaplarda saklanmalıdır.



Şekil 2.3. *Antazolin Hidroklorür*'ün açık formülü

2.4.2 *Antazolin Hidroklorür*'ün farmakolojik özellikleri

Antazolin, seçici H₁-antagonistleri olan etilendiamin sınıfından bir antihistaminiktir. Alerjik rinit ve konjunktivit tedavisinde kullanılır. Burun ve göz damlalarında hidroklorür, fosfat, sülfat veya melazit tuzu halindedir. Genellikle *Nafazolin* ve / veya *Tetrahidrozolin* ile kombine halde kullanılır. *Antazolin hidroklorür*'ün %1,8'lik kremleri ciltteki hafif iritasyonların tedavisinde de kullanılır. *Antazolin hidroklorür* oral yoldan sistemik antihistaminik olarak da kullanılır [3].

Bu grup ilaçlar gastrointestinal kanal, geniş kan damarları ve bronş düz kasında H₁-reseptörleri düzeyinde histamin'in etkilerini bloke ederler. H₁-reseptörlerinin blokajı etkilenen bölgede histamine bağlı ortaya çıkan ödem oluşumu, kızarıklık ve pruritusu da baskırlar. H₁-antagonistleri değişen derecede antikolinerjik etki gösterirler. Antikolinerjik etki santral antimuskarinik etkiye bağlıdır. Topikal olarak uygulanan *Antazolin* böcek ısırıklarında, küçük yanıklarda veya zedelenmelerde lokal iyileşme sağlayabilir [3].

2.4.3. *Antazolin* içeren müstahzarlar

Antazolin içeren müstahzarlar, Çizelge 2.7'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.7. *Antazolin* içeren müstahzarlar [3]

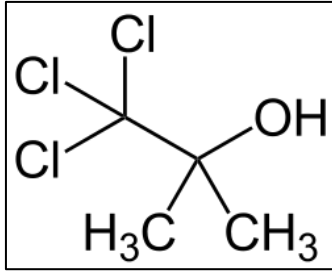
Müstahzar İsmi	Farmasötik Form	<i>Antazolin</i> Derişimi	Müstahzardaki Diğer Maddeler
<i>Sulfarhin Burun Pomadı</i>	Nazal Pomad	%0,025	<i>Efedrin HCl</i> <i>Nafazolin HCl</i> <i>Kloreton</i> Mentol Ökalyptol

2.5. *Kloreton*

2.5.1. *Kloreton*'un kimyasal ve fiziksel özellikleri

Çizelge 2.8. *Kloreton*'un kimyasal ve fiziksel özellikleri [3]

Kimyasal Adı	1,1,1-trikloro-2-metilpropan-2-ol
Kapalı Formülü	C ₄ H ₇ Cl ₃ O
Molekül Ağırlığı	177,449 g/mol
Erime Noktası	97°C
Çözünürlüğü	Soğuk suda az çözünürden sıcak suda çözünür, alkolde, kloroformda, eterde ve uçucu yağlarda çözünür
Rengi, formu	Renksiz Kristal toz
Saklanması	Hava geçirmeyen kaplarda ve serin bir yerde saklanmalıdır



Şekil 2.4. *Kloreton*'un açık formülü

2.5.2. *Kloreton*'un farmakolojik özellikleri

Renksiz beyaz kristal şeklinde ve hızlı süblime olan *Kloreton* (*Klorbutanol*) antiseptik ve lokal anestezik olarak kullanılır. Ayrıca, sedatif ve hipnotik etkisi de vardır. Antibakteriyel ve antifungal etki de gösterir. Seyreltik çözeltileri dişeti ve boğaz enfeksiyonlarında gargara şeklinde kullanılabilir. Ayrıca enfekte olmuş diş pulpasındaki enfeksiyon ve ağrıya karşı da kullanılır. Enjektabl çözelti ve göz damlalarında koruyucu olarak %0,5 derişimde kullanılır. Hafif sedatif etki gösterir, fakat bu amaçla kullanılmaz [2,3]

2.5.3. *Kloreton* içeren müstahzarlar

Kloreton içeren müstahzarlar, Çizelge 2.9'da gösterilmiştir.

Çizelge 2.9. *Kloreton* içeren müstahzarlar [3]

Müstahzar İsmi	Farmasötik Form	<i>Kloreton</i> Derişimi	Müstahzardaki Diğer Maddeler
<i>Sulfarhin Burun Pomadı</i>	Nazal Pomad	%0,833	<i>Efedrin</i> <i>Nafazolin HCl</i> <i>Antazolin HCl</i> <i>Mentol</i> <i>Ökalyptol</i>
<i>Narivent Burun Merhemi</i>	Nazal pomad	-	<i>Mannitol</i> <i>Petrolatum</i> <i>Mineral Yağ</i> <i>Süt Albümini</i> <i>Dipotasyum Glisirizat</i> <i>Tokoteril Asetat</i>
<i>Dişinol Çözelti</i>	Solüsyon	2 g/10 cc	<i>Fenol</i> <i>Esans Girofle</i> <i>(karanfil esansı)</i>

2.6. Analiz Yöntemleri

2.6.1. Efedrin

Çeşitli matrislerde *Efedrin* analiz yöntemleri Çizelge 2.10'da özetlenmiştir.

Çizelge 2.10. *Efedrin* analiz yöntemleri

Numune/ Diğer Maddeler	Yöntem	Koşullar	Çalışma Aralığı	LOD	Ref.
<i>Zayıflatıcı Gıda ve Bitkisel Ürünler/ Fenolftalein, Sibutramin, Fenfluramin, Klopamid, Norseferofedrin, Kafein, Fenformin</i>	HPLC -MS	Kolon: C ₁₈ (4,6 mm id.x150 mm, 5µm) Mobil faz: Asetonitril- formik asit- su, gradient Akış hızı: 500 µL/dk Dedektör: MS	2,5-500 µg/mL	0,17 µg/mL	[5]
<i>Saç Numunesi/ Epinastin, Feksofenadin, Dihidrokodein, Klorfeniramin Klorfeniramin Metaboliti, Dismetilklorofenilamin, Metilefedrin</i>	LC-MS	Kolon: CD-C ₁₈ HT (150mmx2 mm id. 3 µm) Mobil faz: Asetonitril - %0,5 formik asit Dedektör: MS-MS	20-500 µg/mg	10,0 µg/mg	[6]
<i>İdrar/ Metamfetamin</i>	HPLC	Kolon: C ₁₈ (25cmx 4,6 mm id., 10 µm) Mobil faz: Asetonitril - 10 mM fosfat tamponu Akış hızı: 1,5 mL/dk Dedektör: UV	100- 2000 ng/mL	52,80 ng/mL	[7]
<i>Farmasötik Tablet/Teofilin</i>	1)UV Spek 2)HPLC	1) Dalga boyu: 250,3 nm 2)Kolon: Dimetil oktadesil bağlı C ₁₈ (300 mmx3.9 mm id.10µm) Mobil faz: Metanol-su (40: 60h/h) pH 3 kış hızı: 1,2 ml/dk Dedektör: 217 nm	1)10-50 µg/mL 2)15-75 µg/mL	1)0,92 µg/mL 2)0,86 µg/mL	[8]
<i>Farmasötik Tablet/ Fenilefrin, Parasetamol, Guaifenesin, Doksilamin Süksinat, Dekstrometorfan Hidrobromür</i>	HPLC- UV	Kolon: Kinetix C ₁₈ Mobil Faz: Asetonitril - pH 5 fosfat tamponu, gradient Akış hızı: 2 mL/dk Dedektör: UV	5-200 µg/mL	1,46 µg/mL	[9]
<i>İdrar/ Fenilpropanolamin, Katin, Psödoefedrin, Metilefedrin</i>	1)RP- UPLC 2)HILIC- UPLC	1)Kolon: C ₁₈ (2,1mm x 50mm, 1,7µm) Mobil faz: 10 mM Amonyum bikarbonat tamponu - metanol, gradient Akış hızı: 0,6 mL/dk Dedektör: MS 2)Kolon: HILIC (2,1mm x 100mm, 1,7 µm) Mobil faz: Asetonitril-su (95:5 h/h) Akış hızı: 0,5 mL/dk	1)2,5-20 µg/mL 2)2,5-20 µg/mL	-	[10]
<i>Farmasötik Dozaj Form, İdrar/ Bromheksin Hidroklorür</i>	Kolori- metri	Renklendirici, dalga boyu: Pikrik Asit, 410 nm Klorofenil bakır trisodyum, 410 nm Alizerin kırmızısı, 435 nm Amonyum reineckat, 530 nm	(µg/mL) 1,4-13 15,30- 121 12,42- 120 13,66- 160	(µg/mL) 0,177 1,53 1,25 1,07	[11]

Çizelge 2.10. (devam) *Efedrin* analiz yöntemleri

<i>Öksürük Şurubu/ Kodein Fosfat, Klorfeniramin</i>	HPLC	Kolon: C ₈ Mobil faz: Metanol- asetik asit- trietilamin (980:15:6 h/h/h) gradient Akış hızı: 1,5 mL/dk Dedektör: UV 254 nm	150-360 µg/mL	-	[12]
<i>Farmasötik Şurup/ Norefedrin, Guaifenezin</i>	1)CE-MEEKC 2)CE-MEKC	1)Elektrolit: pH 9,5, 5 mM borat tamponu Enjeksiyon süresi: 20 s Kaset sıcaklığı: 30°C 2)Elektrolit: pH 11, 10 mM Borat tamponu %96,7, %1,4 SDS, %1,2 1-butanol %0,7 etil asetat Enjeksiyon süresi: 20 s Kaset sıcaklığı: 40°C	1)2,5-22,5 µg/mL 2)2,5-22,5 µg/mL	1)0,25 µg/mL 2)0,46 µg/mL	[13]
<i>Bitkisel İlaç Formülasyonu/ Psödoefedin, Fenilefedrin, Sinefrin</i>	HPLC	Kolon: Kinetex HILIC (100 mm x 4,5 mm; 2,6 mm) Mobil faz: Asetonitril- pH 4,5 asetat tamponu (91: 9 h/h) Akış hızı: 1 mL/dk Dedektör: UV 215 nm	-	-	[14]
<i>Köpek Plazması/ Metilefedrin, Amigdalın, Glisirizik Asit</i>	UPLC	Kolon: C ₁₈ (2.1mm×100mm; 1,7µm) Mobil faz: %0,1 Formik asit-asetonitril, gradient Akış hızı: 0,4 mL/dk Dedektör: MS	0,01-5 µg/mL	3 ng/mL	[15]
<i>Bitkisel İlaç Formülasyonu/ Norefedrin, Norpsödoefedin, Metilefedrin, Psödoefedin</i>	UPLC	Kolon: C ₁₈ (2.1mm×100mm; 3,5µm) Mobil faz: % 0,1 formik asit-asetonitril, gradient Akış hızı: 0,3 mL/dk Dedektör: MS	-	2 ng/mL	[16]
<i>Kan, İdrar/ Amfetamin, Metamfetamin, Metilendioksiamfe-tamin, , MetoksimetofetaminMetilefedrin, Katinon, Merkatinon Ketamin</i>	UPLC	Kolon: ACQUITY UPLC BEH Phenyl (100 mm x 2,1 mm; 1,7 µm) Mobil faz: %0,3 formik asit-asetonitril, gradient Akış hızı: 0,4 mL/dk Dedektör: MS	0,1-10 ng/mL	-	[17]
1)Fare Plazması 2)Beyin Dokusu Homojenatı/Morfin	LC-MS-MS	Kolon: C ₈ (100x2,1 mm; 1,8 µm) Mobil faz: Metanol- 2 mM amonyum asetat Akış hızı: 0,2 mL/dk Dedektör: MS-MS	1)0,51-51,0 ng/mL 2)0,255-25,5 ng/mL	1)0,51 ng/mL 2)0,255 ng/mL	[18]
<i>Farmasötik Şurup/Guaifenesin</i>	RP-HPLC	Kolon: Inertsil ODS-2 C ₁₈ (4,6 x 250 mm, 5 µm) Mobil faz: pH 3 fosfat tamponu-metanol (60: 40 h/h) Akış hızı: 1,0 mL/dk Dedektör: UV 212 nm	15-50 µg/mL	0,97 µg/mL	[19]

Çizelge 2.10. (devam) *Efedrin* analiz yöntemleri

<i>Bitkisel Farmasötik Preparat/ Norefedrin, Norpsödoefedrin, Psödoefedrin, Metilefedrin</i>	HPLC	Kolon: HS F5 (150 mmx4,6 mm; 5 µm) Mobil faz: pH 6,9 Asetat tamponu-asetonitril (90: 10 h/h) Akış hızı: 1,0 mL/dk Dedektör: UV 215 nm	1,0-1000,0 µg/mL	0,3 µg/mL	[20]
<i>Farmasötik Şurup/ Bromheksin Hidroklorür, Klorfeniramin Maleat, Kodein Fosfat, Dekstrometorfan Hidrobromür, Difenhidramin Hidroklorür, Papaverin Hidroklorür, Fenilefrin Hidroklorür</i>	HPLC	Kolon: CN (250 mmx4,6 mm, 5 µm) Mobil faz: Su-asetonitril-etanol (38:60:2 h/h/h) Akış hızı: 1,0 mL/dk Dedektör: İletkenlik	0-500 µg/mL	-	[21]
<i>Oral kapsül, Nazal sprey, kan, idrar/ Norefedrin</i>	RP-HPLC	Kolon: C ₁₈ Mobil faz: Asetonitril-su (52: 48 h/h) Akış hızı: 1,0 mL/dk Dedektör: Floresans, Eksitasyon 264 nm, Emisyon 313 nm	0-300 ng/mL	2 ng/mL	[22]
<i>İdrar / Metamfetamin</i>	GC-MS	Kolon: Karbon Nanotüp/İyonik Sıvı Kaplı Silika Kapiler Başlangıç kolon sıcaklığı: 80°C Enjeksiyon Sıcaklığı: 275°C Akış hızı: 1,0 mL/dk Dedektör: MS	0,5-250 µg/mL	0,07 µg/mL	[23]
<i>Kan, idrar/ Psödoefedrin</i>	CE	Kolon: 45 cm Fused silica kapiler, 45 cm, etkin uzunluk 37 cm, 75 µm id. Elektrolit: pH 9,2 25 mM borat tamponu Dedektör: UV 214 nm	0,005-0,5 µg/mL	0,00096 µg/mL	[24]
<i>Farmasötik Tablet/ Askorbik Asit, Glikoz, Glisin</i>	Dönüşümlü Voltametri	Karbon pasta elektrot Elektrolit: pH 9 Bristton-Robinson tamponu	6x10 ⁻⁵ -1x10 ⁻³ M	3,5x10 ⁻⁷ M	[25]
<i>Bitkisel Numune/ Psödoefedrin</i>	CE	Kolon: 50,2 cm fused silica kapiler, 40 cm etkin uzunluk, 75 m id. Elektrolit: pH 9,7 25 mM borat tamponu Dedektör: Lazer Induced Floresans	0,04-4,00 ng/mL	4,8 ng/mL	[26]
<i>Bitkisel İlaç/ Psödoefedrin</i>	CE	Kolon: 50,2 cm fused silica kapiler, 40 cm etkin uzunluk, 75 m id. Elektrolit: 80 mM NaH ₂ PO ₄ (pH 3), 15 mM β-siklodekstrin ve %0,3 hidroksipropil metilselüloz tamponu Dedektör: UV	1 -100 µg/mL	0,7 µg/mL	[27]
FARMAKOPE YÖNTEMLERİ					
<i>Standart Etken Madde</i>	Potansiyometri	Titrant: 0,1 M NaOH	-	-	[28, 29]
<i>Standart Etken Madde</i>	HPLC	Kolon: C ₁₈ (15 mm x 4,6 mm, 3µm) Mobil faz: Metanol- pH 4 asetat tamponu (6: 94 h/h) Akış hızı: 0,9 mL/dk Dedektör: UV 220 nm	-	-	[30]

2.6.2. Nafazolin

Çeşitli matrislerde *Nafazolin* analiz yöntemleri Çizelge 2.11’de özetlenmiştir.

Çizelge 2.11. *Nafazolin* analiz yöntemleri

Numune/ Diğer maddeler	Yöntem	Koşullar	Çalışma Aralığı	LOD	Ref.
<i>İnsan idrarı ve serumu, Nazal ve Oftalmik Damla / -</i>	Kemilüminesans	Eksitasyon dalga boyu: 320 nm Emisyon dalga boyu: 425 nm	0,5-200 nmol/L	0,19 nmol/L	[31]
<i>Oftalmik Damla/ Feniramin Maleat</i>	HPLC	Kolon: XDB C ₁₈ (150 mm x4,6 mm 5 µm) Mobil faz: %0,5 trietilamin, pH 2,8 10 mM fosfat tamponu-metanol (68: 32 h/h) Akış hızı: 1,0 mL/dk Dedektör: UV 280 nm	12,5-100 µg/mL	0,02 µg/mL	[32]
<i>Oftalmik/ Nazal Damla/ Klorofenra- min Maleat</i>	Potansi- yometri	1)İyon Seçici Yüzeyi Baskılanmış Elektrot 2)Karbon pasta elektrot	-	1)5,6x10 ⁻⁷ M 2)5,9x10 ⁻⁷ M	[33]
<i>Oftalmik Damla/-</i>	1)Floresans Spektrometri 2)Siklo desktrin destekli Floresans Spektrometri	Eksitasyon dalga boyu: 281 nm Emisyon dalga boyu: 330 nm	-	1)25 ng/mL 2)15 ng/mL	[34]
<i>Farmasötik Preparat/ Çinko</i>	CE	Kolon: 50 cm silika kapiler, 10cm etkin uzunluk, 50µm id. Elektrolit: 20 mM 2-(morfolin-4-il) etan- 1-sulfonik asit, 20 mmol/L histidin (pH 6) Dedektör: İletkenlik Kolon Sıcaklığı: 25°C Voltaj: 25 kV Numune Enjeksiyonu: Hidrodinamik	100-500 µmol/L	20 µmol/L	[35]
<i>Oftalmik Damla/ Çinko</i>	Kare Dalga Sıyırma Voltametri	Boron-doped diamond elektrot, pH 4,7 asetat tamponu	3,0 -21,0 µmol/L	0,04 µmol/L	[36]
<i>Oftalmik Damla/ Fenilefedrin</i>	RP-HPLC	Kolon: C ₁₈ (250 mm x 4,6 mm id. 5µm) Mobil faz: pH 3 fosfat tamponu - asetonitril (80: 20 h/h) Akış hızı: 1 mL/dk Dedektör: UV 276 nm	10-60 µg/mL	0,28 µg/mL	[37]

Çizelge 2.11. (devam) *Nafazolin* analiz yöntemleri

<i>Oftalmik Damla/ Klorfeniramin</i>	1)UV Türev 2)HPLC	1) UV 4. türev, dalga boyu 302 nm 2)Kolon: C ₁₈ Mobil faz: Metanol- pH 7 fosfat tamponu (55: 45 h/h) Akış hızı: 1,5 mL/dk Dedektör: UV 265 nm	1)5-40 µg/mL 2)5-37 µg/mL	1)1,46 µg/mL 2)0,14 µg/mL	[38]
<i>Oftalmik Damla/ Tolazolin, Ksilometa-zolin</i>	AES	NFZ ile Co (NO ₂) ₆] ³⁻ ile çöktürülüp geriye kalan kobalt miktarı ölçülür.	0.98-14.76 µg/mL		[39]
<i>Oftalmik Damla/-</i>	Floresans Spektrometri	Eksitasyon dalga boyu: 294 nm Emisyon dalga boyu: 306 nm	2,6-225,0 ng/mL	2,6 ng/mL	[40]
<i>Nazal Damla/ Metilparaben</i>	HPLC	Kolon: C ₁₈ (250 mm x 4,6 mm) Mobil faz: Metanol-su (40: 65 h/h) Akış hızı: 0,9 mL/dak Dedektör: UV 220 nm	0,065- 12,50 µg/mL	0,02 µg/mL	[41]
<i>Nazal Çözelti/ Difenilhidramin Fenilefrin</i>	CE	Kolon: 70 cm silika kapiler, 62 cm etkin uzunluk, 75 µm i.d. Elektrolit: pH 3,72 fosfat tamponu Dedektör: UV	40,0-60,0 µg/mL	4,7 µg/mL	[42]
<i>Nazal Sprey/ Difenhidramin, Feniramin</i>	CE	Kolon: 50 cm fused silika kapiler, 10 cm etkin uzunluk, 50 µm id. Ayırma voltajı: 25 kV Enjeksiyon süresi: 1,25 s Enjeksiyon: Hidrodinamik Kaset Sıcaklığı: 25°C Dedektör: UV	100-1600 µmol/L	25 µmol/L	[43]
<i>Oftalmik Damla/ Feniramin, Klorfeniramin</i>	Amperometri	Çalışma Elektrodu: Boron-doped diamond elektrot Referans, yardımcı elektrot: Ag/AgCl Elektrolit: pH 10 Briston- Robinson	2-15 µmol/L	0.1 µmol/L	[44]
<i>Oftalmik Damla/ Piridoksin</i>	Floresans Spektrometri	Eksitasyon dalga boyu: 200-380 nm Emisyon dalga boyu: 280-550 nm	-	0,004 µg/mL	[45]
<i>Oftalmik Damla/ Kloramfenikol, Deksametazon</i>	RP-HPLC	Kolon: C ₁₈ Mobil faz: Asetonitril-pH 3 25 mM fosfat tamponu (27: 73 h/h) Akış hızı: 0,9 mL/dak Dedektör: UV 220 nm	3-8 mg/L	-	[46]
<i>Oftalmik Damla/ Oksimetazolin Hidroklörür</i>	Kemilüminesans	%3 formaldehit içeren ve 1 M H ₂ SO ₄ içinde çözünmüş 0,1 mmol KMnO ₄ çözeltisi ile reaksiyon sonrası 634 nm.de ölçüm	0,01-7,0 mg/L	8,69 µg/L	[47]
<i>Oftalmik Damla/-</i>	Akışa Enjeksiyon Kemilüminesans	Reaktif: KIO ₄ ve H ₂ O ₂	5x10 ⁻⁶ - 7x10 ⁻⁶ M	1x10 ⁻⁶ M	[48]
<i>Oftalmik Damla/ Prednizolon, Fenilefrin</i>	MEKC	Kolon: Fused silika kapiller (57 cm, etkin uzunluk 50 cm, 675 µm id) Ayırma voltajı: 30 kV Elektrolit: pH 8,2 5 mM fosfat-5 mM borat tamponu Enjeksiyon: Hidrodinamik Kaset Sıcaklığı: 25°C Dedektör: UV 205 nm	0,2-39,9 µg /L	0,03 µg/L	[49]

Çizelge 2.11. (devam) *Nafazolin* analiz yöntemleri

<i>Oftalmik Damla/ Neostigmin Metilsülfat, Klorfenamin Maleat, Piridoksi Dipotasyum Glikirhizinat</i>	CE	Kolon: Fused-Silika Kapiller (60 cm, etkin uzunluk 50 cm, 75 µm id) Ayırma voltajı: 25 kV Elektrolit: pH 10 5 mM borat tamponu Kaset Sıcaklığı: 25°C Dedektör: 205 nm	5-30 µg/L	0,02 µg/L	[50]
		FARMAKOPE YÖNTEMLERİ			
<i>Standart Etken Madde</i>	Potensiyometrik	Titrant: 0,1 M NaOH	-	-	[28, 29]
<i>Standart Etken Madde</i>	HPLC	Kolon: C ₁₈ (4,0 mm x 25 cm, 5 µm) Mobil faz: Asetonitril-pH 3 fosfat tamponu (20:80 h/h) Akış hızı: 1,5 mL/dak Dedektör: UV 280 nm	-	-	[30]

2.6.3. Antazolin

Çeşitli matrislerde *Antazolin* analiz yöntemleri Çizelge 2.12’de özetlenmiştir.

Çizelge 2.12. *Antazolin* analiz yöntemleri

Numune/ Diğer maddeler	Yöntem	Koşullar	Çalışma Aralığı	LOD	Ref.
<i>İnsan Plazması/-</i>	LC-MS/MS	Kolon: C ₁₈ (100 mm x 4,6 mm, 5 µm) Mobil faz: Metanol- %0,1 Formik asit Dedektör: MS-MS	5-3000 ng/mL	-	[51]
<i>Oftalmik Damla/ Tetryzolin Hidroklorür</i>	UV Türev	1.türev 250 nm, çözücü: 0.1 M metanolik NaOH	3-30 µg/mL	-	[52]
<i>Köpek Plazması/-</i>	HPLC	Kolon: C ₁₈ Mobil Faz: Metanol-5 mM Tetrabutil amonyum bromür (45: 55 h/h) Akış hızı: 1 mL/dak Dedektör: UV	20-1600 ng/mL	20 ng/mL	[53]
<i>Oftalmik Damla/ Tetryzolin Hidroklorür</i>	HPLC	Kolon: C ₁₈ (250 x 4,6 mm, 5 µm) Akış hızı: 1,8 mL/dk Mobil Faz: Asetonitril-tetrahidrofuran- %1 fosforik asit (18:5:77 h/h) Dedektör: UV 230 nm	20-80 µg/mL	2,66 µg/mL	[54]
<i>İnsan Plazması/-</i>	LC-ESI-MS/MS	Kolon: C ₁₈ (100 mm x 4,6mm,5µm) Akış hızı: 0,75 mL/dk Mobil faz: Su-metanol, gradient Dedektör: MS	5-3000 ng/mL	-	[55]

Çizelge 2.12. (devamı) *Antazolin* analiz yöntemleri

<i>Sıçan Plazması/-</i>	RP-HPLC (İyon çifti)	Kolon: C ₁₈ (5 µm, 150 x 4,6 mm id.) Mobil Faz: Metanol-5 mM tetra bütül amonyum bromür(45: 55 h/h) Akış hızı: 1 mL/dak Dedektör: UV 241 nm	25-2000 ng/mL	100 ng/mL	[56]
<i>Oftalmik Çözelti/ Tetryzolin Hidroklorür</i>	1)CE 2)HPLC	1)Kolon: Fused-Silika Kapiller 64,5 cm,75 µm Ayrırma voltajı: 22 kV Elektrolit: pH 7,0 20 mM fosfat tamponu Kaset Sıcaklığı: 25°C Dedektör: UV-DAD 205 nm 2)Kolon: Kinetex C ₁₈ (150×4.6mm×5µm) Mobil Faz: Asetonitril-fosfat tamponu (63: 37, h/h) Akış Hızı: 1 mL/dak Dedektör: UV 215 nm	1)5,3-100 µg/mL 2)0,5-200 µg/mL	1)1,6 µg/mL 2)0,068 µg/mL	[57]
<i>Farmasötik Tablet/-</i>	HPLC	Kolon: C ₁₈ Mobil Faz: Metanol-5 mM asetat tamponu, (50: 50 h/h) Akış hızı: 1 mL/dak Dedektör: UV 241 nm	20,22-202,2 µg/mL	-	[58]
		FARMAKOPE YÖNTEMLERİ			
<i>Standart Etken Madde</i>	Titrasyon	Titrant: 0,1 M KOH İndikatör: Fenolftalein	-	-	[28, 29]

2.6.4. Nafazolin ve antazolin

Nafazolin ve Antazolin'i birlikte içeren matrislerde analiz yöntemleri Çizelge 2.13'de özetlenmiştir.

Çizelge 2.13. *Nafazolin ve Antazolin* analiz yöntemleri

Numune/	Yöntem	Koşullar	Çalışma Aralığı	LOD	Ref.
<i>Oftalmik Damla/</i>	UV Türev Spektrofotometri	1)NFZ 225 nm 1. Türev, n=6 Çözücü: Metanol 2)ANT 252 nm 1. türev, n=6 Çözücü: Metanol	1)0,2-1,1 µg/mL 2)1-10 µg/mL	1)0,2 µg/mL 2)1 µg/mL	[59]
<i>Oftalmik Damla/</i>	UHPLC	Kolon: ACE C18 2 µm, 2,1 x 100 mm Mobil Faz: Asetonitril- pH 3 fosfat tamponu %0,5 trietilamin Akış hızı: 0,6 mL/dak Dedektör: 285 nm	0,500-100 µg/mL	NFZ: 0,029 µg/mL ANT: 0,052 µg/mL	[60]

Çizelge 2.13. (devam) *Nafazolin ve Antazolin* analiz yöntemleri

<i>Oftalmik Damla/</i>	HPLC	Kolon: C ₈ (150 mmx4.6 mm id, 5 µm) Mobil faz: Asetonitril- su- trietilamin (40: 59.75: 0.25) Akış hızı: 2 mL/dak Dedektör: UV 285 nm	NFZ 0,0025-0,0180 mg/mL ANT 0,05-0,3 mg/mL	-	[61]
<i>Nazal ve Oftalmik Damla/</i>	UV Spektrofotometri	NFZ: 281 nm ANT: 271 nm	-	-	[62]
<i>Oftalmik Damla/</i>	HPLC	Kolon: C ₁₈ (250 x 4,6 mm, 5 µm) Mobil faz: Metanol/Su (57:43 h/h) Akış hızı: 1 mL/dak Dedektör: UV 280 nm	NFZ 10-100 µg/mL ANT 100-1000 µg/mL	-	[63]
<i>Oftalmik Damla/</i>	UV Türev Spektrofotometri	NFZ: 227,2 nm ANT: 235 nm	NFZ 10-150 µmol/mL ANT 10-150 µmol/mL	-	[64]

2.6.5. Kloreton

Kloreton içeren matrikslerde analiz yöntemleri Çizelge 2.14’de özetlenmiştir.

Çizelge 2.14. *Kloreton* analiz yöntemleri

Numune/ Diğer maddeler	Yöntem	Koşullar	Çalışma Aralığı	LOD	Re f.
<i>Serum, İdrar/-</i>	GC	Kolon: Fused silika kapiler (30 mx0.25 mm id. 0.25 µm) Taşıyıcı gaz: Helyum Akış hızı: 1 mL/dak Dedektör: ECD	1-10 µg/mL	-	[65]
<i>Oftalmik Merhem/-</i>	RP-HPLC	Kolon: 10-µm oktadesilsilan Mobil Faz: Metanol/su (50:50) Dedektör: UV 210 nm	-	-	[66]
<i>Nazal Damla/ Dermopressin</i>	CE	Kolon: 60 cm, etkin uzunluk 52 cm 75 µm id. Elektrolit: 20 mM SDS içeren pH 9 50 mM borat tamponu Enjeksiyon: Hidrodinamik Dedektör: UV 214 nm	1000 - 10.000 µg/mL	350 µg/mL	[67]
FARMAKOPE YÖNTEMLERİ					
<i>Standart Etken Madde</i>	Potansiyometrik titrasyon	Titrant: 0,1 M AgNO ₃	-	-	[28, 29]
<i>Standart Etken Madde</i>	GC	Kolon: Fused silika kapiler (0,32 mmx30 m; 0,25 µm) Taşıyıcı gaz: Helyum Akış hızı: 1 mL/dak Dedektör: FID	-	-	[30]

2.7. Yarı Katı Farmasötik Preparatlar

2.7.1. Deriye uygulanan yarı katı preparatlar

Bu grup preparatlar merhemler (pomadlar), patlar, kremler, seralar, sabunlar, yakılar, pastalar, macunlar, lapalar ve bazı jel şeklindeki farmasötik formülleri kapsar. Uygulandıkları cilt üzerinde yıkanınca veya silininceye kadar kadar geçen süre içinde kalırlar. Bu yapışıcı (adhesif) karakter, formülün plastik ve reolojik özelliğine dayanır [68]. Yarı katı preparatlardan bazıları cilde uygulanan etken maddeler için sıvağ olarak kullanılır. Ayrıca yumuşatıcı, koruyucu, örtücü amaçla da sıvağ olarak verilmektedir. Bu preparatların rektal, vajinal, üretral mukozalara, zarlara, kornea, kulak ve burun mukozalarına uygulanan formüllerinin özelliklerinde bazı farklılıklar bulunmaktadır [68].

Pomadlar (Merhemler), deri üzerine sürülmek üzere hazırlanmış, haricen kullanılan yarı katı preparatlardır. Genellikle sıvı, katı ve yüksek erime noktasına sahip katı hidrokarbonlar, mineral yağlar, polietilen glikoller veya bunların belirli oranlardaki karışımları ile hazırlanan yardımcı maddeler ile sıvı veya katı halde etken maddeler içerirler. Bir pomad formülasyonu etken madde ve taşıyıcı (sıvağ) kısımlarından oluşur. Pomad içinde etken madde çözünmüş halde veya süspansiyon/katı halde bulunabilir [68]. Yağlı sıvağ ile hazırlanmış preparatlardır. Pomad sıvağı tek fazlı olabileceği gibi, emülsiyon halinde de olabilir. Etken maddenin çözünürlük problemi varsa, daha fazla çözündüğü fazda çözülerek emülsiyon şeklinde bir pomad sıvağı içinde de hastaya sunulabilir. Sürülebilir ve yumuşaktırlar, uygulandıkları zaman erimeleri gerekmez. Terapötik etkili pomadların deriyi yumuşatıcı ve koruyucu özellikleri de vardır. Derine nüfuz etme yetenekleri vardır. Deri gözeneklerini tıkamazlar. Pomat, aslında Fransızca merhem demektir [68].

Merhem Sıvağları

Sıvağ merhemin ya da yarı katı preparatın taşıyıcı kısmıdır. İdeal bir merhem sıvağının taşınması gereken özellikler şöyle sıralanabilir:

- Deriye veya sürüldüğü bölgeye zararlı etkileri olmamalıdır.
- Stabil olmalı ve kullanım süresince bozunmamalıdır.
- Göze uygulanan ve koruyucu merhemler hariç penetrasyon kabiliyeti fazla olmalıdır.

- Su tutma yeteneği olmalıdır.
- Etken maddeyi uygulama sonrasında kolayca salmalıdır.
- Koruyucu merhemler ve güneşten koruyucu ürünler hariç, kolay yıkanır olmalıdır.
- Etken madde ile geçimli olmalıdır.
- Ucuz olmalıdır.

Göz merhemlerinde sıvağların steril olması, zararlı boyutta iri partikül içermemesi, yumuşatıcı etkisinin olması, oluşturduğu film tabakasının gözü rahatsız etmeyecek boyutta olması, uygun viskozlukta ve gözyaşı ile karışabilir olması gibi özelliklerin de olması istenir [68].

Merhem Sıvağlarının Sınıflandırılması

- 1- Hidrokarbon sıvağları
- 2- Absorpsiyon sıvağları
 - a) Anhidr olup su tutabilen sıvağlar
 - b) Su/Yağ ile yıkanabilen sıvağlar
- 3- Su ile yıkanabilen sıvağlar
- 4- Suda çözünebilen sıvağlar.

Patlar, temel yapıları merhemlere benzeyen ancak yüksek oranda (%50 ve daha fazla) katı madde içeren, deri üzerinde koruyucu tabaka oluşturan kütlelerdir [69].

Kremler, opak görünüşlü yarı katı emülsiyon sistemleridir. Kıvam ve viskoziteleri, emülsiyon tipine (su/yağ veya yağ/su olduğuına göre) ayrıca iç fazdaki katı maddenin türüne göre değişir [69].

Jel şeklindeki preparatlar, doğal ve sentetik zamlardan meydana gelen üç boyutlu polimer yapılı esas kütle içinde, katı veya sıvı bir fazın dağılımı ile oluşan yarı katı preparatlardır. Doğal zamlardan kitre zankı, pektin, karragen, agar ve aljinik asit; sentetik ve yarı sentetik materyallerden de metil selüloz, hidroksi etil selüloz, karboksi metil selüloz ve karbopoller ile hazırlanır. Esas kütle jelleştirme veya ergitme suretiyle hazırlanır [68].

Sabunlar cilt temizliği ve deri ile saç vb. organların tedavisinde kullanılır [69].

2.8. 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 [70].

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 [71].

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 [72].

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 [72].

$$A= \epsilon.l.C \quad (Eş. 2.2)$$

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:

$$A = a.C \quad (\text{Eş. 2.3})$$

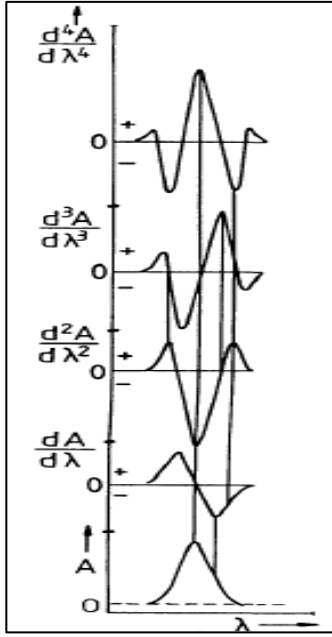
Absorbans, çözelti derişimi ile orantılı olup absorbansın derişimle değişimini veren grafik, orijinden geçen ve eğimi a 'ya eşit olan bir doğru şeklindedir.

Bilinen artan derişimlerdeki çözeltilerin absorbansları ölçölüp, derişim absorbans grafiğı çizerek bir kalibrasyon doğrusu elde edilir. Bilinmeyen derişimdeki maddenin aynı şartlarda absorbansı okunarak kalibrasyon doğrusu yardımıyla derişimi bulunabilir [70].

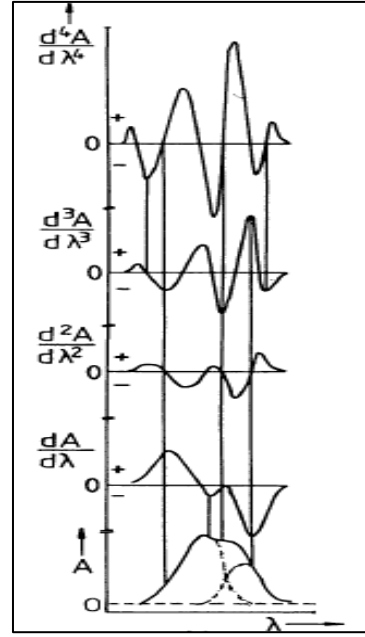
Kolorimetrik analiz, bir renk reaktifinin yardımıyla bir çözeltildeki bileşiğın derişimini belirleme yöntemidir. Hem organik bileşiklere hem de inorganik bileşiklere uygulanabilir [72].

2.8.1. UV Türev spektrofotometrisi

UV spektrofotometrisi, ilaç analizlerinde kullanım kolaylığı ve düşük maliyeti nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır [73]. Ancak, aynı dalga boyu aralığında spesifik pikleri olan maddelerin karışımları UV-VIS spektroskopisi ile analiz edildiğinde spektral girişim nedeniyle analizin güçleştii 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 grafiğı 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 [71].



Şekil 2.5. Basit bir Gauss pikinin 1-4. türev spektrumları [74]



Şekil 2.6. Örtüşen iki Gauss pikinin 1-4. türev spektrumları [74]

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 [75].

UV Türev Spektrofotometrisi Yönteminin Dezavantajları:

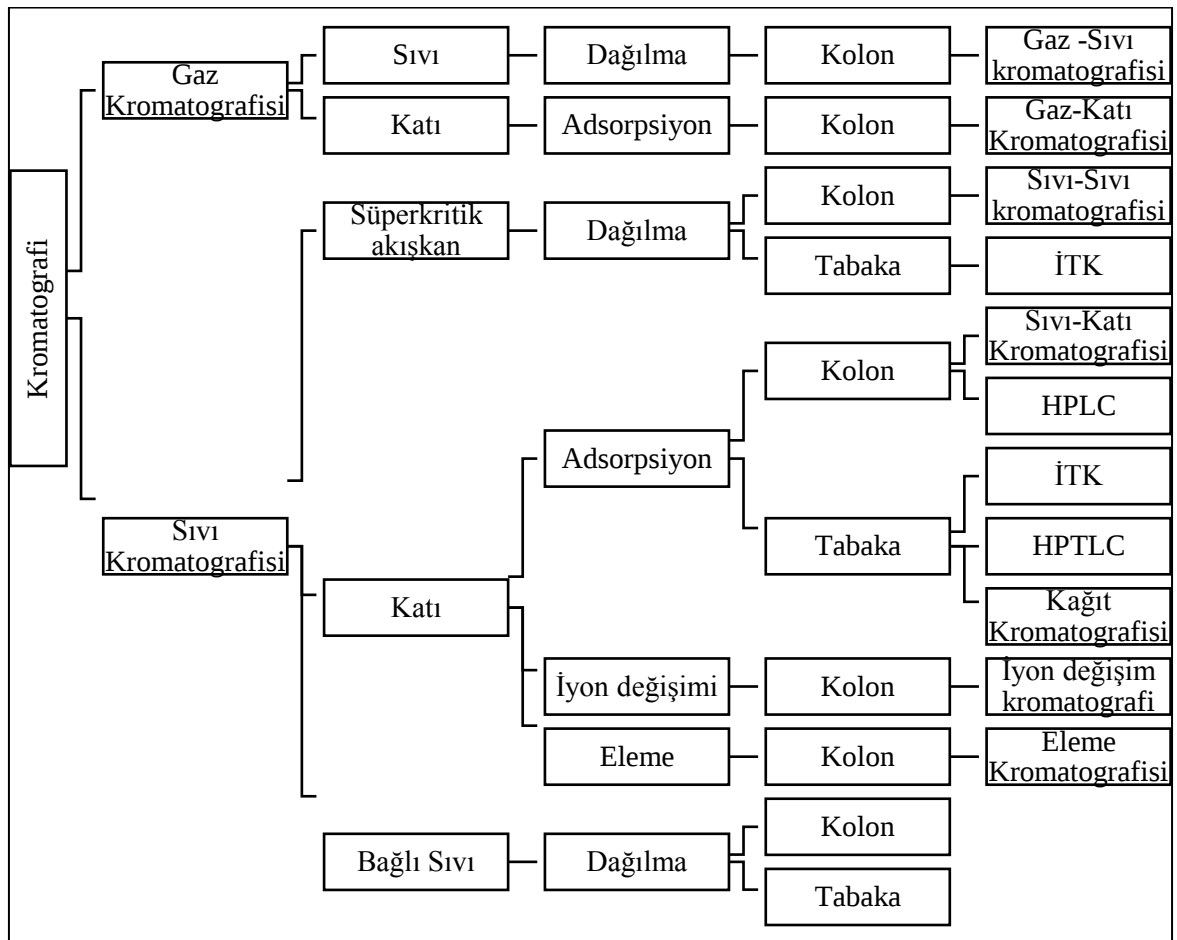
- Bir temel spektrumdaki küçük değişiklikler türev spektrumunu güçlü bir şekilde değiştirebilir. Sıfır merteye spektrumları için farklı spektrofotometreler kullanıldığında sonuçları benzer şekilde değiştirebilir, ancak bunların türevlendirilmesi farklı görünebilir. Bunun sonucunda da zayıf tekrarlanabilirlik elde edilir [76].

2.9. Kromatografi

Kromatografi, bir karışımda bulunan maddelerin, biri sabit diğeri mobil faz olmak üzere birbirleriyle karışmayan iki fazlı bir sistemde ayrılması ve saflaştırılması yöntemidir. İlk kez 1903 yılında Rus botanikçi Mikhail Tswett tarafından geliştirilmiştir. Tswett bu yöntemi bitki pigmentlerinin renkli bileşenlerini ayırmakta kullanmış ve kolonda renkli bantlar oluştuğu için, bu ayırma yöntemine kromatografi adını vermiştir [77]. Kolondan çıkan bileşenlerin pik alanları veya yüksekliklerinin uygun bir yöntemle ölçülerek zamana veya mobil fazın hacmine karşı çizilen grafiğine kromatogram adı verilir [72].

2.9.1. Kromatografinin sınıflandırılması

Kromatografik sınıflama, Şekil 2.7’de görülmektedir.



Şekil 2.7. Kromatografinin sınıflandırılması [78]

Kromatografik yöntemler ayrılma mekanizmalarına göre i)Dağılma, ii)Adsorpsiyon, iii)İyon (İyon değişirme ve İyon çifti) ve iv)Moleküler eleme olmak üzere 4 başlıkta sınıflandırılır.

i) Dağılma kromatografisi

En çok kullanılan kromatografik ayırma yöntemidir. Bu yöntemde, karışım halindeki maddeler sıvı sabit faz ile sıvı mobil faz arasında dağılarak ayrılır. Birbiriyle karışmayan iki sıvıdan, yani iki fazdan oluşan bu faz sistemde analit, bu sıvılardaki çözünürlüğüne bağlı olarak iki faz arasında dağılır ve dengeye ulaşır. Böyle bir sistemde maddelerin dağılması sabit olup dağılma katsayısı ile ifade edilir ve K_d ile gösterilir. Böylece K_d değerleri birbirinden farklı olan maddeler kromatografik sistem içerisinde farklı hızlarda ilerleyerek birbirlerinden ayrılırlar.

$$K_d = C_1/C_2 \quad (\text{Eş. 2.4})$$

C_1 : Maddenin 1. fazdaki derişimi C_2 : Maddenin 2. fazdaki derişimi

Sabit faz katı yüzey üzerinde tutturulmuş ince bir sıvı film tabakasıyken, diğer sıvı mobil fazdır. Sabit faz ile mobil faz farklı polariteye sahip olduklarında analitler de farklı çözünürlüklere sahip olabilirler. Bu iki fazın polarite farklılıklarına göre dağılma kromatografisi iki kısımda incelenebilir. Bunlar, Ters Faz Sıvı Kromatografisi ve Normal Faz Sıvı Kromatografisidir.

Ters Faz (RP) sıvı dağılma kromatografisi

Ters faz kromatografisinde sabit faz nispeten apolar, mobil faz polardır. İlaç etken maddeleri genellikle apolar yapıda olduklarından ilaç analizlerinde ters faz sıvı kromatografisi yaygın kullanılır. Ayrıca, ters faz sıvı kromatografisinde mobil faz olarak su gibi daha ucuz ve çevreci çözücülerin kullanılması ve uygulamanın kolaylığı bu yöntemin en önemli avantajıdır.

Ters faz sıvı kromatografi yönteminde, sabit faz dolgusu, silanize edilmiş yüzeye polar olmayan uzun zincirli hidrokarbon zincirlerinin eklenmesi ile oluşur. Ters faz kromatografide en çok kullanılan kolon dolgu materyalleri Çizelge 2.15’de verilmiştir. Uzun

zincirli sabit fazlar (C_{18}) daha apolar maddelerin, kısa zincirli sabit fazlar (C_8 , C_6 , C_4) polar maddelerin ayrımında kullanılır [79].

Çizelge 2.15. Ters-faz sıvı kromatografisi sabit faz dolgu materyalleri [80]

Materyal	Kimyasal Adı	Kısaltması
Oktil	$Si-(CH_2)_8-CH_3$	C_8
Oktadesil	$Si-(CH_2)_{17}-CH_3$	C_{18}
Fenil	$Si-(CH_2)_3-C_6H_5$	C_6H_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	$Si-(CH_2)_3-CF_3$	PFP

Normal faz sıvı dağılıma kromatografisi

Normal faz 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 $-CN$, $-NO_2$ ve $-NH_2$ gibi gruplar bağlanarak, farklı sabit fazlar elde edilebilir. Normal faz sıvı kromatografisi ile polarlığı en az olan madde kolondan en önce sürüklenir.

Çizelge 2.16. Normal faz ve ters faz sıvı kromatografisinin karşılaştırılması [80]

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.

ii) Adsorpsiyon kromatografisi

Adsorbsiyon, katı bir madde ile sıvıda çözünen bir bileşik arasındaki yüzeysel etkileşmedir. Ya da; bir karışımda bulunan sıvı veya gaz halindeki maddelerin katı faz üzerine tutunmasıdır. Adsorpsiyon kromatografisi ise örnek bileşenlerinin dolgu maddesinin yüzeyinde farklı olarak tutunmaları sonucu meydana gelen bir ayırma işlemidir. Adsorpsiyon kromatografisinde; maddeler katı olan sabit faz ile sıvı veya gaz olan mobil faz arasında etkileşirler. Ayrılacak karışımdaki maddelerin, adsorban maddeye karşı farklı adsorbsiyon katsayılarına sahip olmaları gerekmektedir. Adsorpsiyon kromatografisinde sabit faz olarak adsorplama yapabilecek bir katı kullanılır. En çok kullanılan polar sabit

fazlar, Alümina ve silikajeldir. Sabit faz olarak genellikle polar katılar kullanıldığından, mobil faz olarak apolar veya çok az polar olan benzen, oktan, kloroform gibi sıvılar kullanılır.

iii)İyon değıştirme kromatografisi

Sabit fazdaki iyonlarla numunedeki aynı yükteki iyonların karşılıklı yer değıştirmesi esasına dayanır. Maddenin mutlaka iyonik halde olması veya iyonlaşması gerekir. İyon değıştirme kromatografisinde iyonik yapılar (K^+ , Na^+ , SO_4^{2-}) ya da belirli pH değerlerinde iyonlaşabilen moleküller (organik asit veya organik bazlar) ayrılır. Ayrılacak madde ile sabit faz arasında ne kadar kuvvetli iyonik bağ oluşursa alıkonma o kadar güçlüdür. Yüğü, mobil fazın zıt iyonları ile aynı olan iyonik yapıdaki numune bileşenleri katıya bağlanmak için zıt iyonlarla yarışır. Zıt iyonu yerinden ederek katıya kuvvetle bağlanan uygun yükte bileşenler kolonda uzun süre kalırken, katıya zayıfça bağlanan, uygun yükte olmayan veya yüksüz olan bileşenler kolonu çabuk terk eder.

İyon çifti kromatografisi

Bu yöntemde dağılma kromatografisi ile ayrılamayan moleküllerin ayrılması sağlanır. İyon çifti oluşturma kromatografisinde iyonlaşabilen ve iyonik moleküllere, mobil faza eklenen uygun bir karşıt iyon ile iyon çifti oluşturularak lipofilik karakter kazandırılır ve sabit faza olan ilgi artar.

iv)Moleküler eleme kromatografisi

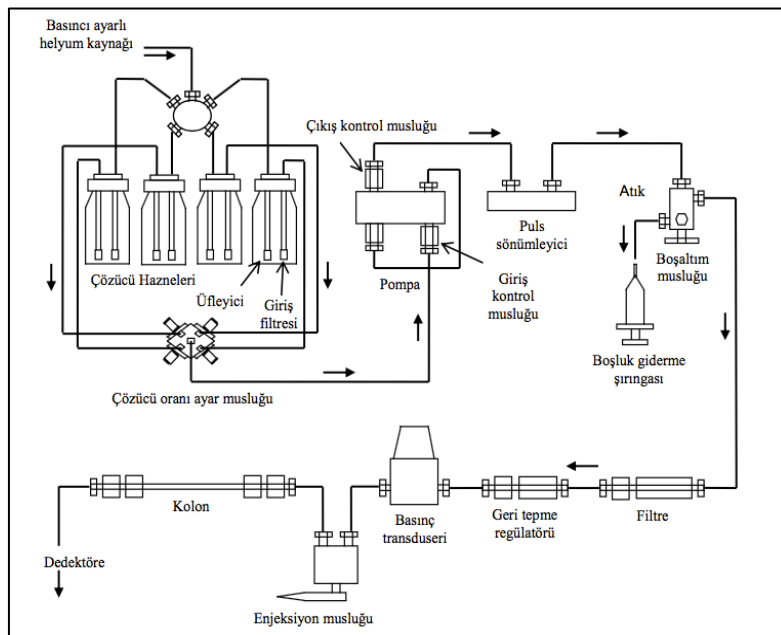
Makromoleküllerin ayrılmasında kullanılır. Bu yöntemde sabit faz için destek görevi yapan poröz bir yapıya ihtiyaç vardır. Hidrofilik ve hidrofobik jeller kullanılır. Hidrofilik jeller, sulu çözeltiler ile kullanılır ve sulu ortamda şişerler (Jel filtrasyon Kromatografisi). Hidrofobik jeller, organik çözücülerde çözünebilen polimerlerin ayrılmasında kullanılır. (Jel permasyon kromatografisi). Kimyasal olarak inert olması gereken katı faz, bir jel ya da gözenekli bir organik bileşiktir. Mobil faz katı gözeneklerini doldurmuştur. Ayırma, numune bileşenlerinin molekül büyüklüklerine göre olur. En içteki gözeneklere ulaşabilen küçük moleüllü bileşenler, kolonda uzun süre kalırken, büyük moleüllüler daha kısa süre kalırlar.

Değişik türde sabit fazlar kullanılabilir ve bu sayede aynı anda farklı büyüklükteki partiküller de birbirinden ayrılabilir.

2.9.2. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC)

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi duyarlılığı, doğru kantitatif tayinlere kolaylıkla uygulanabilir olması, otomasyon kolaylığı uçucu olmayan veya sıcaklıkla kolay bozulmayan türlerin ayrılmasına uygun olması nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır [80].

HPLC, bir karışımda bulunan maddelerin birbirleri ile karışmayan iki faz arasındaki dağılım dengeleri, iyonlaşma özellikleri ya da adsorbsiyonlarından yararlanarak yapılan ayırma işlemidir. Bir HPLC cihazı, pompa, enjektör, kolon, dedektör ve kaydedici olmak üzere beş ana bölümden oluşur, Şekil 2.8’de bir HPLC cihazı şematik gösterimi verilmiştir [80].



Şekil 2.8. HPLC cihazının şematik gösterimi

2.9.3 HPLC’de temel parametreler

Teorik tabaka sayısı (N)

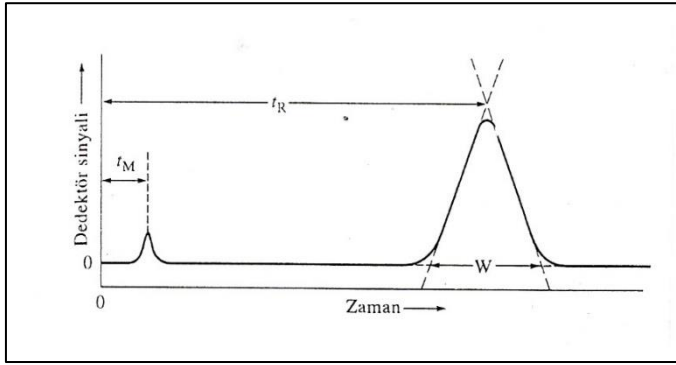
Kolonda tabakaların olduğu varsayılır ve bunlar teorik tabaka olarak adlandırılır. Teorik tabaka sayısı ‘N’ kolon verimliliğinin göstergesidir [81].

$$N = 16 \left[\frac{t_R}{W} \right]^2 \quad (\text{Eş. 2.5})$$

Ayrıca, mobil fazın akış hızı ve analitin katı faz tanecikleri arasındaki yolculuğu da pik şekline etki etmektedir. Bu etkileşim Van Deemter eşitliği ile gösterilir [81].

$$H = A + \frac{B}{V} + CV \quad (\text{Eş. 2.6})$$

H: Teorik tabaka yüksekliği, V: Mobil fazın akış hızı, A: Eddy difüzyona bağlı kolon sabiti,
B: Difüzyona bağlı kolon sabiti C: Kütle aktarımı ile ilgili bir sabit



Şekil 2.9. Analite ait kromatogram, t_M : Ölü zaman, t_R : Alınma zamanı, W: Pik taban genişliği [80]

Kapasite faktörü (k')

Analitin alınma zamanı ve ölü zaman ile hesaplanır. k' : 1-5 arasında olmalıdır [81].

$$k' = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad t_R: \text{alınma zamanı}, \quad t_M: \text{Ölü zaman} \quad (\text{Eş. 2.7})$$

Seçicilik faktörü (α)

İki pikin kapasite faktörlerini birbirine oranıdır. İyi bir ayırım için $\alpha > 1$ olması gerekir [81].

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t_{R2} - t_M}{t_{R1} - t_M} \quad (\text{Eş. 2.8})$$

Rezolüsyon

Rezolüsyon, art arda gelen iki pikin birbirinden ayrılma derecesini gösterir. $R > 1,5$ olmalıdır [81].

$$R = \frac{2 [(t_R)_B - (t_R)_A]}{W_A + W_B} \quad (\text{Eş. 2.9})$$

2.10. Analitik Yöntem Validasyonu

Validasyon, bir yöntemin ilgili performans kriterlerine uygunluğunun saptanması için, yöntem parametrelerinin belirlenip incelendiği bir geçerlilik çalışmasıdır. Bir analitik prosedüre validasyon uygulanmasının nedeni, önerilen yöntemin uygulanabilirliğini göstermektir [82]. Analitik yöntem validasyonu, belirli bir analizde kullanılmak amacıyla geliştirilen yöntemin kesinliğinin, güvenilirliğinin ve kalitesinin belirtilen koşullara uygunluğunu kanıtlamak için gerçekleştirilmektedir. Ayrıca valide edilmiş yöntemin analiz koşullarında herhangi bir değişiklik yapılmış ise yöntem rutin analizlerde kullanılmadan önce tekrar valide edilmelidir [83].

Analitik yöntem validasyonu belirli validasyon parametrelerinin değerlendirilmesi ile gerçekleştirilir. Bu parametrelerin değerlendirilmesi için Farmakopeler veya Uluslararası Harmonizasyon Konferansı (ICH), Amerika Bileşik Devletleri Gıda ve İlaç Uygulamaları Kurumu (US FDA) ve Avrupa İlaç Ajansı (EMA) gibi yasal kuruluşların hazırladığı kılavuzlar kullanılmaktadır [84].

ICH'e göre uyulması gereken validasyon parametreleri şunlardır [83]:

- Doğruluk (geri kazanım)
- Kesinlik (tekrarlanabilirlik-tekrar edilebilirlik)
- Seçicilik
- LOD (Limit of Dedection, Tespit Limiti)
- LOQ (Limit of Quantification, Tayin Limiti)
- Doğrusallık ve Çalışma aralığı

ICH göre bu validasyon parametrelerine ek olarak *sağlamlık* ve *stabilite* çalışmalarının yapılması da tavsiye edilir [83].

Ayrıca, ilaç analizlerinde aşağıda belirtilen koşullarda tekrar validasyon gerekir [83].

- İlaç maddelerinin sentezinde değişiklik olması,
- Son ürün bileşiminde değişiklik olması,
- Analitik prosedürde değişiklik olması

2.10.1. Doğruluk

Doğruluk, analiz sonucu elde edilen değer ile doğru olduğu kabul edilen referans değerinin birbirine yakınlığının ölçüsüdür [83]. Etken maddeler ve bitmiş ürünler ile yapılan birçok deneysel çalışma sonucu doğruluğun belirlenmesi mümkündür. Bunlar;

İlaç etken maddeleri ile yapılan deneysel çalışmalar

- Analitik prosedürün safsızlığı bilinen referans maddelere uygulanmasından,
- Önerilen analitik prosedürün geçerliliği kanıtlanmış bir yöntem ile kıyaslanmasından,
- Kesinlikten, doğrusalıktan ve seçicilikten, çıkarılabilir [85].

Ürünlerle yapılan deneysel çalışmalar

- İlaç etken maddelerinin bilinen miktarlarında hazırlanan sentetik bir karışıma önerilen analitik prosedürün uygulanmasından,
- İlacın içindeki tüm bileşenlere ulaşılabilmesi durumunda, ilaç ürününe bilinen miktarda eklenmiş analit içeren karışıma önerilen analitik prosedürün uygulanması veya sonuçların bir başka iyi tanımlanmış bir yöntem ile kıyaslanmasından,
- Kesinlikten, doğrusalıktan ve seçicilikten,
- Safsızlık miktar tayinlerinde, safsızlıkların ilaç numunesine veya ilaç etken maddesine dışarıdan ilave edilip geri kazanım değerinin hesaplanmasından, bulunabilir [85].

ICH bu testler için en az 3 farklı derişimde 3 tekrar deney yapılmasını önermektedir. Bu derişimler çalışma aralığında yer alan düşük, orta ve üst bölgelerden birer derişim değeri seçilmesi ile yapılır [85]. Ayrıca, geri kazanım çalışmaları üç şekilde yapılabilir. Bunlar;

- Referans bir yöntem ile kıyaslamak: Geliştirilen analiz yöntemi ile 3 farklı derişimde en az 3'er ölçüm alınır. Elde edilen deney sonuçlarından % geri kazanım değerleri hesaplanır. Daha sonra geçerliliği kanıtlanmış başka bir yöntem ile istatistiksel olarak Student-t ve Fisher testleri kullanılarak kıyaslanır [82]. Student-t testi iki yöntemin ortalamaları arasındaki, Fisher test ise standart sapmaları arasındaki farklılıkları kıyaslar. Bulunan değerler t ve F tablolarındaki teorik değerler ile kıyaslanır. Eğer bulunan değer, teorik değerden daha düşük ise yöntemler arasında anlamlı bir fark olmadığı belirtilir ve yöntemin doğruluğu ispatlanmış olur [85]. Ayrıca, elde edilen sonuçlar % Bağlı Standart Sapma (%BSS) ve/veya %BH ile beraber verilir.
- Kör Matriks ortamına analizi yapılan maddeyi ilave etmek: Bu yöntem, matriks etkisi olduğu durumda kullanılır. Tayini yapılacak madde, sadece matrikse değişik derişimlerde eklenir. Bu matriks ilaç preparatları için etken maddelerin dışındaki etkenlerden oluşur [85]. Genellikle %50, 75, 100, 125 ve 150 oranında analit ilavesi yapılır ve her seviyede en az 3'er ölçüm alınır. Sonuçlar % geri kazanım olarak ifade edilir ve %BSS ve/veya %BH ile beraber verilir [82].
- Standart ekleme yöntemi ile saf madde ilavesi: Analizi yapılacak maddenin bilinen ve farklı miktarları matriks içerisinde yer alan ve miktarı bilinmeyen veya daha önceden tayin edilmiş numunenin üzerine ilave edilir [85]. Genellikle %25, 50, 100 oranında madde ilave edilerek en az 3'er defa ölçüm alınarak analiz yapılır. Sonuçlar ilave edilen ve ölçülen madde miktarı verilerek ifade edilir [82]. Bu teknik, katkı maddelerinin ve yardımcı maddelerin bilinmediği durumda biyolojik sıvılardan ilaç etken maddeleri ve metabolitleri analiz edilirken kullanılır. Sonuçların ortalamaları, % BSS ve/veya % BH ile beraber verilir.

2.10.2. Kesinlik

Geliştirilen yöntemin çalışılan koşullarda tekrarlanabilirliğinin ölçüsüdür. Sonuçlar % BSS veya % CV (varyasyon katsayısı) olarak ifade edilir. Ölçüm yapılan değer her derişim için en az 5-6 kez ölçüm yapılmalıdır. Bunlardan en az 5 deney sonucunun % BSS'sini teorik olarak %15'in altında olması gerekir. Kesinlik, tekrarlanabilirlik(repeatability), orta kesinlik ve tekrar edilebilirlik(reproducibility) olarak üçe ayrılır [83].

Tekrarlanabilirlik

Kısa zaman içerisindeki aynı koşullarda, tartım, seyreltme, homojenizasyon gibi numune hazırlamadan gelebilecek hataları gösteren ve bir kesinlik parametresidir. Genellikle analizi yapılacak maddenin çalışma ortamındaki çözeltisi hazırlanır ve bu çözeltiden en az 10 ölçüm alınır [82]. Elde edilen sonuçlar gün içi Tekrarlanabilirlik olarak da tanımlanmaktadır ve %BSS değeri verilerek ifade edilir. %BSS değeri $\leq 1,0$ olmalıdır.

Orta Kesinlik

Laboratuvar içi deneysel farklılıkları belirten bir kesinlik ölçüsüdür. Farklı günler, farklı analizciler veya farklı cihazlar kullanarak yapılan kesinlik olarak tanımlanmaktadır. Analit içeren numune çözeltileri ayrı ayrı hazırlanır. Farklı günlerde ve/veya farklı analizciler tarafından ve/veya farklı cihazlar kullanılarak her numuneden en az 3'er ölçüm yapılır [82]. Elde edilen değerler %BSS olarak ifade edilir. İlaç etken maddelerinin analizlerinde %BSS değeri $\leq 2,0$ olmalıdır. Ancak, biyolojik numunelerde %BSS değeri %10-15'e kadar çıkabilmektedir.

Tekrar edilebilirlik

Farklı laboratuvarların aynı yöntemi uygulamaları sonucu elde ettikleri değerlerin kesinliğinin ölçüsüdür. Analit, ayrı ayrı laboratuvarlarda, farklı analizciler tarafından en az bir gün ara ile farklı günlerde tayin edilir [85]. Bu çözeltilerden en az 3'er kez ölçüm alınır. Elde edilen değerler %BSS olarak ifade edilir. %BSS değeri $\leq 2,0$ olmalıdır. Ancak, biyolojik numunelerde %BSS değeri %10-15'e kadar çıkabilmektedir [82].

2.10.3. Seçicilik

Yöntemin seçiciliği, analizi yapılacak maddenin numunede bulunan, girişim yapabilecek diğer yardımcı ve etken maddelerin yanında miktarının tam ve doğru olarak tayin edilebileceğini gösteren bir parametredir [85]. Seçicilik, yöntem geliştirmenin başında ve analiz ile matriks ortamından tayin edilmelidir. Özellikle stabilite tayini çalışmalarında yapılması gerekmektedir. Teşhis testleri, safsızlık tayini ve miktar tayini için gerekli validasyon işlemlerine geçmeden önce Seçicilik yapılmalıdır [85].

Ayrırma yöntemleri ile yapılan analizlerde seçicilik belirlenirken, tayini yapılan bileşik ile girişim yapma olasılığı bulunan maddelerin Rezolüsyon (R) değerlerine veya diğer yöntemlerde girişim yapma oranına bakılır. $R \geq 2,0$ olmalıdır. Bunun için aşağıda belirtilen beş ayrı işlem yapılabilir. Bunlar;

- Bütün girişim yapabilecek maddeler aynı anda geliştirilen yöntem ile analiz edilir ve cevap üzerindeki etkileri ve cevaptaki değişim incelenir. $R \geq 2,0$ olmalıdır.
- İlaç preparatlarının yardımcı maddeleri, etken madde ile birlikte geliştirilen yöntemle tayin edilir. $R \geq 2,0$ olmalıdır.
- Etken madde %10-30'unu kadar bozacak sürede; 0,1 M HCl; 0,1 M NaOH; 50°C sıcaklık; UV ışığı veya %3'lük H_2O_2 çözeltisi ile muamele edilir. Bozunma ürünlerini de içeren numunenin analizi yapılarak herhangi bir girişim olup olmadığına bakılır. Ayrırma yöntemlerinde kromatogramdaki piklerin R değerine bakılır. $R \geq 2,0$ olmalıdır.
- Geliştirilen yöntemin deney koşullarındaki ufak değişimlere karşı verdiği cevap incelenir. Yani sağlamlık çalışması yapılır. Kromatografik yöntemlerde madde pikine etkisi incelenir. Pik şeklinde kuyruklanma, omuzlanma ve yarıma gibi durumlar veya ilave pik olmamalıdır.
- Kromatografik yöntemler ile çalışılırken duyarlı ve seçici dedektörler seçilir [85].

2.10.4. LOD (Tespit limiti)

LOD, tespit edilebilen, fakat kesin olarak miktarı belirlenemeyen ve analit sinyalinin, gürültüden ayrılabilmesi için gerekli olan en düşük derişimdir. LOD değeri hesaplanırken farklı yöntemler kullanılabilir [82]. Yaygın kullanılan yöntemlerden biri,

$LOD = 3 \times \text{Standart Sapma (SS)} / m$ (Kalibrasyon doğrusunun eğimi)'dir [83].

2.10.5. LOQ (Tayin limiti)

LOQ, kabul edilebilir doğrulukta ve kesinlikte ölçülebilen en düşük derişimdir. LOQ hesaplamasında pek çok yaklaşım mevcuttur. Yaygın kullanılan yöntemlerden biri,

$LOQ = 10 \times \text{Standart Sapma (SS)} / m$ (Kalibrasyon doğrusunun eğimi)'dir [83].

2.10.6. Doğrusallık ve çalışma aralığı

Doğrusallık, analit derişimine karşılık yöntemin verdiği cevabın grafiksel olarak ifadesidir. Doğrusallığın kabul edilebilir olduğunu gösteren parametreler korelasyon katsayısı (r) veya regresyon (R^2) katsayısıdır. Analit derişimi ve ölçülen değerler kullanılarak regresyon analizi yapılır. R^2 ve r değeri 1'e ne kadar yakınsa doğrusallık o kadar kabul edilebilir seviyededir [83].

Doğrusallığı belirlemek için ana stok çözeltiden en az 5 farklı derişim hazırlanır. Derişimler genellikle hedef seviyenin %50 ile %150 si arasında olmalıdır. Her derişim en az 3 defa tekrarlanmalıdır. Doğrusallığın tam validasyonu için eğim (m) ve kesişim (n) değerlerinin %BSS değerleri veya standart hataları da hesaplanmalıdır [82].

2.10.7. Sağlamlık (Robustness)

Geliştirilen yöntemin analiz parametrelerindeki ufak değişikliklerden etkilenmeden kalabilme kapasitedir. Sıvı kromatografisinde, mobil faz pH'sı, sıcaklık, akış hızı, dalga boyu gibi parametrelerdir [82].

2.10.8. Stabilité

ICH'e göre stabilité zorunlu değildir, ancak yapılması tavsiye edilmektedir. Analitin farklı koşullar altında ne kadar kararlı kalabildiğinin gösterilmesi amacıyla yapılır. Ayrıca, bozulma koşullarında elde edilen bozunma ürünlerinin yanında etken maddelerin kabul edilebilir doğruluk ve kesinlikle tayin edilebilirliğini de gösterir [83].

Stabilité çalışmaları; kısa süreli stabilité, uzun süreli stabilité, dondurma-çözme stabilitesi ve hızlandırılmış stabilité olmak üzere 4 farklı şekilde yapılabilmektedir. Tüm stabilité çalışmaları analiti tek başına içeren çözücü ve biyolojik sıvı içerisindeki çözeltiler kullanılarak yapılır [82].

Kısa süreli stabilité çalışmalarında düşük ve yüksek derişimdeki numuneler oda sıcaklığında çözüldükten sonra 4-24 saat oda sıcaklığında tutulur. Elde edilen çözeltiler taze hazırlanan analit çözeltileri ile kıyaslanır [82].

Dondurma-çözme stabilite çalışmalarında üç kez dondurma-çözme döngüsü uygulanır. Analit içeren çözelti 24 saat dondurulur ve tamamen çözündükten sonra aynı şartlarda 12-24 saat tekrar dondurulur. Üçüncü döngüden sonra, elde edilen çözeltinin oda sıcaklığına gelmesi beklenir. Geliştirilen yöntemde analiz edilen bu çözelti ile taze hazırlanan analit çözelti ile karşılaştırma yapılır [82].

Uzun süreli stabilite etken maddenin ilk toplandığı tarihten itibaren, son numune analizine kadar geçen süreyi kapsar. Bu işlem, farklı derişimlerde 3 çözeltinin, en az 3 defa analiz yapmaya yetecek miktarlarının saklanması ile yapılır. Bu çözeltilerden genellikle 3, 6 ve 12 aylık zaman dilimlerinde ölçüm alınır ve taze çözeltiye ait analiz sonuçları ile kıyaslanır [82].

Hızlandırılmış bozunurma çalışması

Hızlandırılmış bozunma çalışmalarında etken maddenin hızlı bozunmasını sağlayacak çeşitli stres koşulları uygulanır. Daha sonra elde edilen çözeltilerin analiz sonuçları taze çözeltiye ait analiz sonuçları ile kıyaslanır [82]. Bu çalışmada da uygulanan stres koşulları aşağıdaki Çizelge 2.17’de verilmiştir.

Çizelge 2.17. Hızlandırılmış Bozunma Çalışması

Stres Koşulu	Uygulama Biçimi
UV	1 g katı etken madde saat camı içerisinde 1 gün UV ışık altında bekletilir ve daha sonra geliştirilen yöntem ile analiz edilir.
Asit Hidrolizi	0,1 M ve 0,01 M HCl içerisinde hazırlanan etken madde 12-24 saat sonra analiz edilir.
Baz hidrolizi	0,1 M ve 0,01 M NaOH içerisinde hazırlanan etken madde 12-24 saat sonra analiz edilir.
Yükseltgenme	0,1 M ve 0,01 M H ₂ O ₂ içerisinde hazırlanan etken madde 12-24 saat sonra 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-Sigma
- Etanol-Sigma
- Asetonitril-Merck
- Sodyum Hidroksit-Merck
- Piridin-Riedel de Haen
- Fosforik asit-Merck
- Sodyum dihidrojen fosfat-Merck

3.1.2. Kullanılan araç ve gereçler

- UV-Visible Spektrofotometre: Specord 50 Plus, Analytik Jena., 1 cm kuvartz hücre
- Saf Su Cihazı: Millipore direct-Q 3UV System A10 ultra saf su sistemi
- Manyetik Karıştırıcı: Heidolph marka manyetik karıştırıcı
- Analitik Terazî: Mettler Toledo XSE104 model,
- Çeşitli hacimlerde balon joje, hacmi belirli deney tüpleri, beherler, çeşitli ölçülerde mikropipetler kullanılmıştır.

3.1.3. Kullanılan farmasötik pomad

Sulfarhin® burun pomadı; 1 tüp (12 g), 100 mg *Efedrin HCl*, 3 mg *Nafazolin HCl*, 30 mg *Antazolin HCl*, 100 mg *Kloreton*, 100 mg mentol ve 100 mg ökaliptol içerir.

3.2. UV Türev Spektrofotometrisi Yöntemi için Ön Çalışmalar

3.2.1. *Efedrin HCl*'in UV spektrumunun alınması

10,0 mg standart *Efedrin HCl* hassas terazi ile tartılıp, distile suda çözüldükten sonra 10,0 mL ye tamamlandı. Bu çözeltiden 1,60 mL alınıp distile su ile 10,0 mL ye seyreltilti. Böylece elde edilen 160 µg/mL *Efedrin HCl* çözeltisinin 200-400 nm dalga boyu aralığında UV spektrumu alındı.

3.2.2. *Nafazolin HCl*'in UV spektrumunun alınması

5,0 mg standart *Nafazolin HCl* hassas terazi ile tartılıp, distile suda çözüldükten sonra 50,0 mL ye tamamlandı. Bu çözeltiden 0,050 mL alınıp distile su ile 10,0 mL ye seyreltilti. Böylece elde edilen 5 µg/mL *Nafazolin HCl* çözeltisinin 200-400 nm dalga boyu aralığında UV spektrumu alındı.

3.2.3. *Antazolin HCl*'in UV spektrumunun alınması

10,0 mg standart *Antazolin HCl* hassas terazi ile tartılıp, distile suda çözüldükten sonra 10,0 mL ye tamamlandı. Bu çözeltiden 0,050 mL alınıp distile su ile 10,0 mL ye seyreltilti. Böylece elde edilen 50 µg/mL *Antazolin HCl* çözeltisinin 200-400 nm dalga boyu aralığında UV spektrumu alındı.

3.2.4. *Kloreton*'un UV spektrumunun alınması

10,0 mg standart *Kloreton* hassas terazi ile tartılıp, distile suda çözüldükten sonra 10,0 mL ye tamamlandı. Bu çözeltiden 1,6 mL alınıp distile su ile 10,0 mL ye seyreltilti. Böylece elde edilen 160 µg/mL *Kloreton* çözeltisinin 200-400 nm dalga boyu aralığında UV spektrumu alındı. Daha sonra *Kloreton* tayini için bir kolorimetrik yöntem geliştirildi.

3.2.5. *Efedrin HCl*, *Nafazolin HCl*, *Antazolin HCl* ve *Kloreton* içeren standartlar karışımının hazırlanması ve UV spektrumunun alınması

Standartlar karışımı, 160 µg/mL *Efedrin HCl*, 5 µg/mL *Nafazolin HCl*, 50 µg/mL *Antazolin HCl* ve 160 µg/mL *Kloreton* içerecek şekilde hazırlandı. Hazırlanan çözeltinin 210-400 nm

dalga boyu aralığında UV spektrumu alındı. Çözücü olarak metanol-su (30: 20, h/ h) karışımı kullanıldı.

3.2.6. *Efedrin HCl, Nafazolin HCL, Antazolin HCl ve Kloreton* içeren farmasötik pomadın UV spektrumunun alınması

Farmasötik pomad çözeltisinin spektrumu çözücü ve diğer koşullar değiştirilerek aşağıda anlatılan üç şekilde alınmıştır:

1 tüp pomadın tamamı 11,975 g olarak tartılıp bir behere alındı ve bir baget yardımıyla karıştırıldı. Bu karışımdan 1,000 g pomad hassas olarak tartıldı ve metanol-su (30: 20, h/ h) karışımı ile 50,0 mL ye tamamlandı. Bu karışım, 500 rpm karıştırma hızında ve 50°C’de ısıtılarak 4 saat karıştırıldı. Karışım oda sıcaklığına geldikten sonra 1,0 mL alınıp 3,0 mL ye metanol-su (30: 20, h/h) ile seyreltildikten sonra UV spektrumu alındı. Kör olarak metanol-su (30: 20, h/h) kullanıldı.

1,000 g pomad hassas olarak tartıldı ve asetonitril-su (40: 10, h/ h) karışımı 50,0 mL ye tamamlandı. Bu karışım, 500 rpm karıştırma hızında ve 50°C’de ısıtılarak 4 saat karıştırıldı. Karışım oda sıcaklığına geldikten sonra 1,0 mL alınıp 3,0 mL ye asetonitril-su (40: 10, h/h) ile seyreltildikten sonra UV spektrumu alındı. Kör olarak asetonitril-su (40: 10, h/h) kullanıldı.

1,000 g pomad hassas olarak tartıldı ve distile su ile 50,0 mL ye tamamlandı. Bu karışım, 500 rpm hızda ve 50°C de ısıtarak 4 saat karıştırıldı. Bu karışım oda sıcaklığına geldikten sonra 1,0 mL alınıp, 3,0 mL ye distile su ile seyreltildikten sonra UV spektrumu alındı. Kör olarak distile su kullanıldı. Sonuçta çözücü olarak metanol-su (30: 20, h/ h) karışımı kullanılmasına karar verildi.

3.2.7. *Efedrin HCl, Nafazolin HCL ve Antazolin HCl*’in çalışma dalga boylarının seçilmesi

Hazırlanan her bir standart etken madde çözeltisinin her bir türev derecesinde 9 *n* değeri kullanılarak 1., 2., 3. ve 4. Türev spektrumları alındı. Aynı koşullarda standartlar karışımı çözeltisinin ve pomad çözeltisinin de türev spektrumları alındı. Çözeltiler, standartlar karışım çözeltisindeki ve pomad çözeltisindeki etken madde içerikleri birbirine eşit olacak şekilde hazırlandı. Çözücü olarak metanol-su (30: 20, h/ h) karışımı kullanıldı.

Pomadda *Efedrin HCl* tayini için *Antazolin HCl* ve *Nafazolin HCl* çözeltilerine ait türev absorbands değerlerinin sıfır olduğu ve pomad çözeltisinin türev absorbands değerinin *Efedrin HCl* çözeltisinin türev absorbands değerine tam olarak eşit olduğu dalga boyu, *Nafazolin HCl* tayini için *Antazolin HCl* ve *Efedrin HCl* çözeltilerine ait türev absorbands değerlerinin sıfır olduğu ve pomad çözeltisinin türev absorbands değerinin *Nafazolin HCl* çözeltisinin türev absorbands değerine tam olarak eşit olduğu dalga boyu, *Antazolin HCl* tayini için *Nafazolin HCl* ve *Efedrin HCl* çözeltilerine ait türev absorbands değerlerinin sıfır olduğu ve pomad çözeltisinin türev absorbands değerinin *Antazolin HCl* çözeltisinin türev absorbands değerine tam olarak eşit olduğu dalga boyu, araştırıldı. Çözücü olarak metanol-su (30: 20, h/ h) karışımı kullanıldı.

3.2.8. UV Türev spektrofotometrisi yöntemi ile *Efedrin HCl*, *Nafazolin HCl* ve *Antazolin HCl* kalibrasyon grafikleri

10,0 mg standart *Efedrin HCl* hassas terazi ile tartılıp metanolde çözüldü ve 10,0 mL ye tamamlandı. Bu çözeltiden belirli hacimler alınıp son derişimler 20,0; 40,4; 55,3; 66,4; 70,0 $\mu\text{g/mL}$ olacak şekilde metanol-su (30: 20, h/h) karışımı ile 10,0 mL ye seyreltildi. Bu çözeltilerin UV türev absorbands değerleri (218 nm, 3.türev n=5) okunarak *Efedrin HCl* için kalibrasyon grafiğı çizildi.

10,0 mg standart *Nafazolin HCl* hassas terazi ile tartılıp metanolde çözüldü ve 10,0 mL ye tamamlandı. Bu çözeltiden belirli hacimler alınıp son derişimler 1,0; 1,66; 2,04; 2,55; 3,0 $\mu\text{g/mL}$ olacak şekilde metanol-su (30: 20, h/h) karışımı ile 10,0 mL'ye seyreltildi. Bu çözeltilerin UV türev absorbands değerleri (234 nm, 2.türev n=21) okunarak *Nafazolin HCl* için kalibrasyon grafiğı çizildi.

10,0 mg standart *Antazolin HCl* hassas terazi ile tartılıp metanolde çözüldü ve 10,0 mL ye tamamlandı. Bu çözeltiden belirli hacimler alınıp son derişimler 10,0; 16,6; 19,36; 24,2; 30,0 $\mu\text{g/mL}$ olacak şekilde metanol-su (30: 20, h/h) karışımı ile 10,0 mL ye seyreltildi. Bu çözeltilerin UV türev absorbands değerleri (254 nm, 1.türev n=13) okunarak kalibrasyon grafiğı çizildi.

3.2.9. UV Türev spektrofotometrisi yöntemi ile farmasötik pomadlarda *Efedrin HCl*, *Nafazolin HCl* ve *Antazolin HCl* miktar tayini

1,000 g pomad hassas olarak tartıldı ve 50,0 mL metanol-su (30: 20, h/h) karışımında 500 rpm hız ve 50°C’de ısıtarak 4 saat karıştırıldı. Bu karışım oda sıcaklığına geldikten sonra 1,0 mL alınıp, 3,0 mL ye metanol-su (30: 20, h/h) karışımı ile seyreltildikten sonra UV spektrumu alındı. Daha sonra her bir etken madde için belirlenen türev derecesi, dalga boyu ve n değeri koşullarında, türev absorbans değerleri ölçüldü. Her bir etken maddenin aynı koşullarda çizilen kalibrasyon doğrularından hareketle pomadın içerdiği etken madde miktarları hesaplandı. Miktar tayini amacıyla beş adet pomad çözeltisi hazırlanarak paralel tayinler gerçekleştirildi.

3.2.10. Farmasötik pomadlarda UV Türev spektrofotometrisi yöntemi ile *Efedrin HCl*, *Nafazolin HCl* ve *Antazolin HCl* geri kazanımı

Belirtilen koşullarda hazırlanmış, 166 µg/mL *Efedrin HCl* içeren pomad çözeltisinden 5,0 mL alınıp son derişim 132; 166; 199 µg/mL olacak şekilde stok *Efedrin HCl* çözeltisinden eklendi ve metanol-su (30: 20, h/h) karışımı ile 10,0 mL hacme tamamlandı. Bu karışım oda sıcaklığına geldikten sonra 1,0 mL alınıp, 3,0 mL ye metanol-su (30: 20, h/h) karışımı ile seyreltildikten sonra UV spektrumu alındı. 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, 5 µg/mL *Nafazolin HCl* içeren pomad çözeltisinden 5,0 mL alınıp son derişim 4; 5; 6 µg/mL olacak şekilde stok *Nafazolin HCl* çözeltisinden eklendi ve metanol-su (30: 20, h/h) karışımı ile 10,0 mL hacme tamamlandı. Bu karışım oda sıcaklığına geldikten sonra 1,0 mL alınıp, 3,0 mL ye metanol-su (30: 20, h/h) karışımı ile seyreltildikten sonra UV spektrumu alındı. 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 50,0 µg/mL *Antazolin HCl* içeren pomad çözeltisinden 5,0 mL alınıp son derişim 40,0; 50,0; 60,0 µg/mL olacak şekilde stok *Antazolin HCl* çözeltisinden eklendi ve metanol-su (30: 20, h/h) karışımı ile 10,0 mL hacme tamamlandı. Bu karışım oda sıcaklığına geldikten sonra 1,0 mL alınıp, 3,0 mL ye metanol-su (30: 20, h/h)

karışımı ile seyreltildikten sonra UV spektrumu alındı. Bu çözeltinin belirlenen türev derecesi, dalga boyu ve n değeri koşullarında türev absorbands 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, 3.2.9. anlatıldığı gibi hazırlanan aynı derişimde pomad çözeltileri 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.

3.2.12. Farmasötik pomadlarda Kolorimetrik yöntemle *Kloreton* miktar tayini

Optimizasyon çalışmalarında, 10,0 mg standart *Kloreton* hassas terazi ile tartıldı, metanolde çözülüp 10,0 mL ye tamamlandı. Farklı derişimlerde *Kloreton* çözeltileri hazırlanırken kullanılan çözücünün etkisini araştırmak için dilüsyon çözücüsü olarak asetonitril-su (30: 20, h/h), metanol-su (30: 20, h/h) ve sadece su kullanıldı. Sonuçta ilk seyreltme metanolla yapıldıktan sonra asetonitril-su (30: 20, h/h) kullanılmasına karar verildi. Bir tüp içerisine 1,0 mL asetonitril-su (30: 20, h/h) içinde hazırlanmış *Kloreton* çözeltisi kondu (100 µg/mL) üzerine 1,0 mL piridin ve 1,0 mL 5 M NaOH çözeltisi eklendikten 30 dakika sonra 540 nm de ölçüm yapıldı.

Kolorimetrik yöntem ile *Kloreton* kalibrasyon grafiklerinin eldesi için 10,0 mg standart *Kloreton* hassas terazi ile tartıldı. Metanol içerisinde çözülüp 10,0 mL ye tamamlandı. Bu

çözeltiden belirli hacimler alınıp son derişim 10,0; 50,0; 100,0; 150,0 ve 200,0 µg/mL olacak şekilde asetonitril-su (30: 20, h/h) ile 10,0 mL ye seyreltildi. Her bir derişimden 1,0 mL *Kloreton* içeren çözelti alındı ve 1,0 mL piridin ve 1,0 mL 5 M NaOH çözeltisi eklendikten 30 dakika sonra 540 nm de ölçüm yapıldı. Çözeltilerin absorbans değerleri okunarak *Kloreton* için kalibrasyon grafiğı çizildi.

1,000 g pomad hassas olarak tartıldı ve 50,0 mL asetonitril-su (30: 20, h/h) karışımında 500 rpm ve 50°C’de ısıtarak 4 saat karıştırıldı. Bu karışım oda sıcaklığına geldikten sonra bir tüp içerisine 1,0 mL alındı, daha sonra 1,0 mL piridin ve 1,0 mL 5 M NaOH çözeltisi eklendikten 30 dakika sonra 540 nm de ölçüm yapıldı. Miktar tayini yapılması için beş adet pomad çözeltisi hazırlandı.

Geri kazanım çalışmasında belirtilen koşullarda hazırlanmış 166 µg/mL *Kloreton* içeren pomad çözeltisinden 5,0 mL alınıp son derişim 132; 166; 199 µg/mL olacak şekilde stok *Kloreton* çözeltisinden eklenerek asetonitril-su (30: 20, h/h) ile 10,0 mL hacme tamamlandı. Bir tüp içerisine 1,0 mL *Kloreton* içeren çözelti eklendi daha sonra 1,0 mL piridin ve 1,0 mL 5 M NaOH çözeltisi eklendikten 30 dakika sonra 540 nm de ölçüm yapıldı. Çözeltinin absorbans değerleri okundu ve ilgili kalibrasyon grafiğı kullanılarak derişim değeri ve % geri kazanım değerleri hesaplandı.

Gün içi ve Günler arası tekrarlanabilirlik çalışması için, 3.2.9. anlatıldığı gibi hazırlanan aynı derişimde pomad 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 Farmasötik Pomadlarda *Efedrin HCl*, *Nafazolin HCl*, *Antazolin HCl* ve *Kloreton* Tayini

3.3.1 . Çözeltilerin hazırlanması

Efedrin HCl, *Nafazolin HCl*, *Antazolin HCl* ve *Kloreton* ’un stok çözeltilerinin hazırlanması için, her bir maddeden 10,0 mg hassas olarak tartıldı ve 5,0 mL metanol eklenerek, ultrasonik banyoda tamamen çözüldükten sonra metanol ile 10,0 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 (metanol-su, 30: 20 h/h) ile yapıldı.

Kullanılan fosfat tampon çözeltileri, %85 h/h lik fosforik asit (H_3PO_4) çözeltisi ve sodyum dihidrojen fosfat (NaH_2PO_4) kullanılarak hazırlandı. Optimizasyonda kullanılan tampon çözeltilerin pH değerleri, 1 M NaOH çözeltisi kullanılarak ayarlandı.

pH 3 Fosfat Tamponu Hazırlanması: 0,78 g $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ (sodyum dihidrojenfosfat) bir miktar saf su içerisinde çözüldü. Üzerine derişik % 85'lik H_3PO_4 'den 0,68 mL eklenerek son hacim 1 L.'ye tamamlandı. Bu pH değeri optimize edilen ve deneylerde kullanılan tampon çözeltinin pH değeridir.

3.3.2. RP - HPLC yöntemi ile Efedrin HCl, Nafazolin HCl, Antazolin HCl ve Kloreton tayini optimizasyonu

Geliştirilecek yöntem için en iyi ayrımın sağlanması amacıyla optimum kromatografik koşullar belirlendi. Bu amaçla, *Efedrin HCl*, *Nafazolin HCl*, *Antazolin HCl* ve *Kloreton*'un RP- sıvı kromatografisiyle ayırımında; sabit faz seçimi, mobil faz organik düzenleyici seçimi (metanol veya asetonitril), mobil faz tampon çözelti seçimi, kolon sıcaklığı seçimi, enjeksiyon hacmi seçimi ve gradient sistem seçimi yapıldı.

Optimizasyon çalışmalarında ilk olarak kolon etkisini incelemek için C_{18} Phenomenex (250x4,6 mm, 5 μ m) ve Agilent Zorbax Eclipse XDB C_{18} (3,0x75mm, 3,5 μ m) kolonlar kullanıldı. En iyi ayırım Agilent Zorbax Eclipse XDB C_{18} (3,0x75mm, 3,5 μ m) ile elde edildikten sonra mobil faz bileşiminin etkisi araştırıldı ve Çizelge 4.1.'de gösterilen gradiyent elüsyon sistemi kullanıldı.

Daha sonra, mobil faz bileşeni fosfat tamponu pH değerinin kromatografik ayırma etkisinin araştırılması amacıyla 10 mM fosfat tamponunun pH değeri 2,5; 3,0; 4,0 ve 5,0'e ayarlanarak analiz yapıldı. Mobil faz bileşeni fosfat tamponu derişiminin etkisinin araştırmak için tampon derişimi 5 mM, 10 mM, 15 mM ve 20 mM olarak değıştirilerek çalışıldı.

Mobil faz optimizasyonu tamamlandıktan sonra cihaz parametreleri optimizasyonu yapıldı. Bunun için ilk olarak, 0,5; 0,6; 0,7 ve 0,8 mL/dk mobil faz akış hızlarında çalışıldı. Daha sonra, mobil faz akış hızı optimum değerinin 0.6 mL/dk olduğu koşulda 1, 5, 10, 15, 20, 25 μ L enjeksiyon hacimleri incelendi. En uygun enjeksiyon hacmi 10 μ L olarak seçildikten sonra kolon sıcaklığının etkisi araştırıldı. Bu amaçla, kolon sıcaklığı 25, 30, 35, 40, 45°C olarak değıştirildi ve kromatografik parametrelerdeki değışim incelendiğinde en uygun sıcaklık değerinin 40°C olduğuna karar verildi.

Standartlar karışımı, 16,6 µg/mL *Efedrin HCl*, 0,25 µg/mL *Nafazolin HCl*, 2,5 µg/mL 5 *Antazolin HCl* ve 16,6 µg/mL *Kloreton* içerecek şekilde hazırlandı.

3.3.3. RP - HPLC yöntemi ile *Efedrin HCl*, *Nafazolin HCl*, *Antazolin HCl* ve *Kloreton* kalibrasyon grafikleri

10,0 mg standart *Efedrin HCl* hassas terazi ile tartıldı ve metanolde çözülerek 10,0 mL ye tamamlandı. Bu çözeltiden belirli hacimler alınıp son derişimler 8,3; 12,4; 16,6; 20,75; 25,00 µg/mL olacak şekilde mobil faz (metanol-su, 30: 20 h/h) ile 10,0 mL ye seyreltildi. Bu çözeltilerin 210 nm'deki pik alanı değerleri okunarak *Efedrin HCl* için kalibrasyon grafiğı çizildi.

10,0 mg standart *Nafazolin HCl* hassas terazi ile tartıldı ve metanolde çözülerek 10,0 mL ye tamamlandı. Bu çözeltiden belirli hacimler alınıp son derişimler 0,25; 0,375; 0,5; 0,625; 0,750 µg/mL olacak şekilde mobil faz (metanol-su, 30: 20 h/h) ile 10,0 mL'ye seyreltildi. Bu çözeltilerin 210 nm'deki pik alanı değerleri okunarak *Nafazolin HCl* için kalibrasyon grafiğı çizildi.

10,0 mg standart *Antazolin HCl* hassas terazi ile tartıldı ve metanolde çözülerek 10,0 mL ye tamamlandı. Bu çözeltiden belirli hacimler alınıp son derişim 2,5; 3,75; 5,0; 6,25; 7,50 µg/mL olacak şekilde mobil faz (metanol-su, 30: 20 h/h) ile 10,0 mL ye seyreltildi. Bu çözeltilerin 210 nm'deki pik alanı değerleri okunarak *Antazolin HCl* için kalibrasyon grafiğı çizildi.

10,0 mg standart *Kloreton* hassas terazi ile tartıldı ve metanolde çözülerek 10,0 mL ye tamamlandı. Bu çözeltiden belirli hacimler alınıp son derişim 8,3; 12,4; 16,6; 20,75; 25,0 µg/mL olacak şekilde mobil faz (metanol-su, 30: 20 h/h) ile 10,0 mL ye seyreltildi. Bu çözeltilerin 210 nm'deki pik alanı değerleri okunarak *Kloreton* için kalibrasyon grafiğı çizildi.

3.3.4. RP- HPLC yöntemi ile farmasötik pomadlarda *Efedrin HCl*, *Nafazolin HCl*, *Antazolin HCl* ve *Kloreton* miktar tayini

1 tüp pomadın tamamı 11,975 g olarak tartılıp bir behere alındı ve baget yardımıyla karıştırıldı. Karışımdan 1,000 g hassas olarak tartıldı ve 50,0 mL metanol-su (30: 20, h/h) karışımında 500 rpm hız ve 50°C'de ısıtarak 4 saat karıştırıldı. Daha sonra, optimize edilen RP-HPLC koşullarında elde edilen pik alanı değerleri kullanılarak, kalibrasyon grafiklerinden hareketle pomaddaki her bir etken maddenin miktarları hesaplandı. Miktar tayini amacıyla beş adet pomad çözeltisi hazırlandı.

3.3.5. RP- HPLC yöntemi ile Efedrin HCl, Nafazolin HCl, Antazolin HCl ve Kloreton geri kazanımı

Belirtilen koşullarda hazırlanmış 16,6 µg/mL *Efedrin HCl* içeren pomad çözeltisinden 5,0 mL alınıp son derişim 13,2; 16,6; 19,9 µg/mL olacak şekilde stok *Efedrin HCl* çözeltisinden eklendi ve mobil faz (metanol-su, 30: 20 h/h) 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 5,0 µg/mL *Antazolin HCl* içeren pomad çözeltisinden 5,0 mL alınıp son derişim 4,0; 5,0; 6,0 µg/mL olacak şekilde stok *Antazolin HCl* 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 0,5 µg/mL *Nafazolin HCl* içeren pomad çözeltisinden 5,0 mL alınıp son derişim 0,4; 0,5; 0,6 µg/mL olacak şekilde stok *Nafazolin HCl* 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 16,6 µg/mL *Kloreton* içeren pomad çözeltisinden 5,0 mL alınıp son derişim 13,2; 16,6; 19,9 µg/mL olacak şekilde stok *Kloreton* 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

1 tüp pomadın tamamı tartılıp bir behere alındı ve baget yardımıyla karıştırıldı. Karışımdan 1,000 g hassas olarak tartıldı ve 50,0 mL metanol-su (30: 20, h/h) karışımında 500 rpm hızda ve 50°C’de ısıtarak 4 saat karıştırıldı. Bu çözeltinin RP- HPLC ile analizinde, optimize edilen yöntem koşullarından kromatografik parametrelere etkisi olan pH, kolon sıcaklığı ve akış hızındaki değişimlerin etkileri ayrı ayrı incelendi.

Çözelti stabilite testleri

10,0 mg/mL derişimde hazırlanmış olan ve 4°C’de saklanan ana stok çözeltilerden hareketle, son derişimler 2,5 µg/mL *Efedrin HCl*, 0,5 µg/mL *Nafazolin HCl*, 16,6 µg/mL *Antazolin HCl*, 16,6 µg/mL *Kloreton* olacak şekilde çözeltiler hazırlandı. Bu çözeltilerden, 48 saatlik süre içerisinde 6 saatte bir ölçüm alınarak çözeltilerin bozulma yüzdesi bulundu.

Hızlı bozundurma testleri

Fotoliz

Efedrin HCl, *Nafazolin HCl*, *Antazolin HCl*, *Kloreton* ayrı ayrı 1,000’er g hassas olarak tartıldıktan sonra, 24 saat boyunca UV ışığa maruz bırakıldı. Bu süre 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 166 µg/mL *Efedrin HCl*, 0,25 µg/mL *Nafazolin HCl*, 2,5 µg/mL *Antazolin HCl*, 166 µg/mL *Kloreton* olacak şekilde, çözeltiler hazırlandı. Bu çözeltiler, RP-HPLC ile analiz edilip bozunma miktarları hesaplandı.

Asit hidrolizi

Efedrin HCl, *Nafazolin HCl*, *Antazolin HCl*, *Kloreton* etken maddelerinden ayrı ayrı 10,0’ar mg iki ayrı beher içine alındı. Beherlerden birine 10,0 mL 1,0 M HCl ve diğerine 10,0 mL 0,1 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 166 µg/mL *Efedrin HCl*, 0,25 µg/mL *Nafazolin HCl*, 2,5 µg/mL *Antazolin HCl*, 166 µg/mL *Kloreton* olacak şekilde mobil fazla hacme tamamlandı. RP-HPLC ile analiz edilip bozunma miktarı hesaplandı.

Baz hidrolizi

Efedrin HCl, *Nafazolin HCl*, *Antazolin HCl*, *Kloreton* etken maddelerinden ayrı ayrı 10,0'ar mg iki ayrı beher içine alındı. Beherlerden birine 10,0 mL 1,0 M NaOH ve diğerine 10,0 mL 0,1 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 166 µg/mL *Efedrin HCl*, 0,25 µg/mL *Nafazolin HCl*, 2,5 µg/mL *Antazolin HCl*, 166 µg/mL *Kloreton* olacak şekilde mobil fazla hacme tamamlandı. RP-HPLC ile analiz edilip bozunma miktarı hesaplandı.

Yükseltgenme

Efedrin HCl, *Nafazolin HCl*, *Antazolin HCl*, *Kloreton* etken maddelerinden ayrı ayrı 10,0'ar mg iki ayrı beher içine alındı. Herbirine 10,0 mL %30 H₂O₂ ilave edildi. 24 saat sonra, her bir çözeltiden belirli miktarda alınıp son derişim 166 µg/mL *Efedrin HCl*, 0,25 µg/mL *Nafazolin HCl*, 2,5 µg/mL *Antazolin HCl*, 166 µg/mL *Kloreton* olacak şekilde mobil fazla hacme tamamlandı. RP-HPLC ile analiz edilip bozunma miktarı hesaplandı.

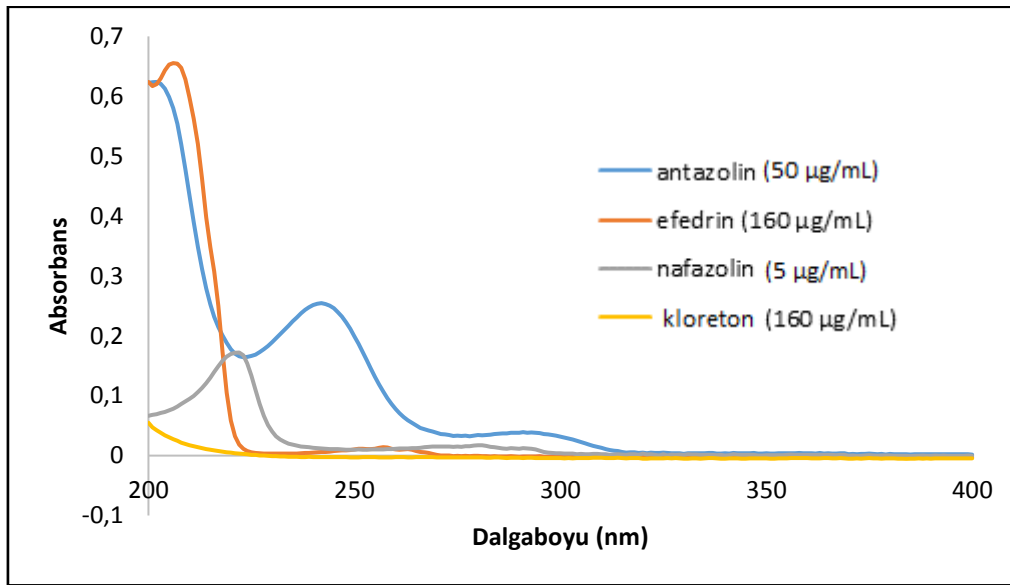
Sistem Uygunluk Testleri

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. *Efedrin HCl*, *Nafazolin HCl*, *Antazolin HCl* ve *Kloreton*’un UV Spektrumları

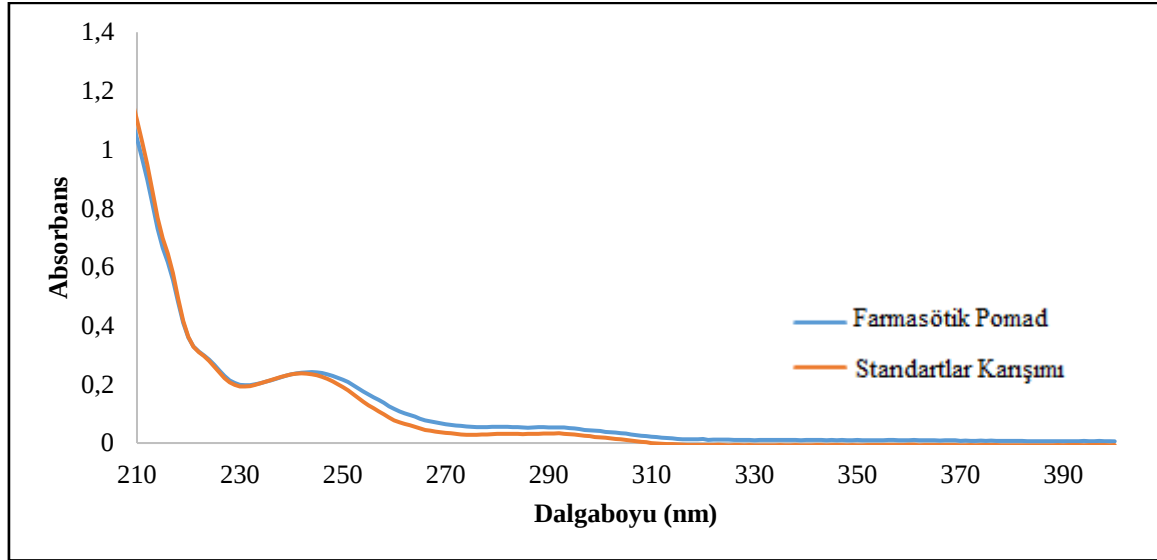
Efedrin HCl, *Nafazolin HCl*, *Antazolin HCl* ve *Kloreton* çözeltileri, Bölüm 3.2.1., 3.2.2., 3.2.3 ve 3.2.4.’de anlatıldığı gibi hazırlanmış ve her bir çözeltinin UV spektrumu, Şekil 4.1.’de üst üste gösterilmiştir.



Şekil 4.1. *Efedrin HCl*, *Nafazolin HCl*, *Antazolin HCl* ve *Kloreton*’un UV spektrumları

4.2. Standartlar Karışımı Çözeltisi ve Farmasötik Pomad Çözeltisinin UV Spektrumları

Standartlar karışımı çözeltisi ve Farmasötik pomad çözeltisi, Bölüm 3.2.5 ve 3.2.6’da anlatıldığı gibi hazırlanmış ve herbir çözeltinin UV spektrumu, Şekil 4.2.’de üst üste gösterilmiştir.

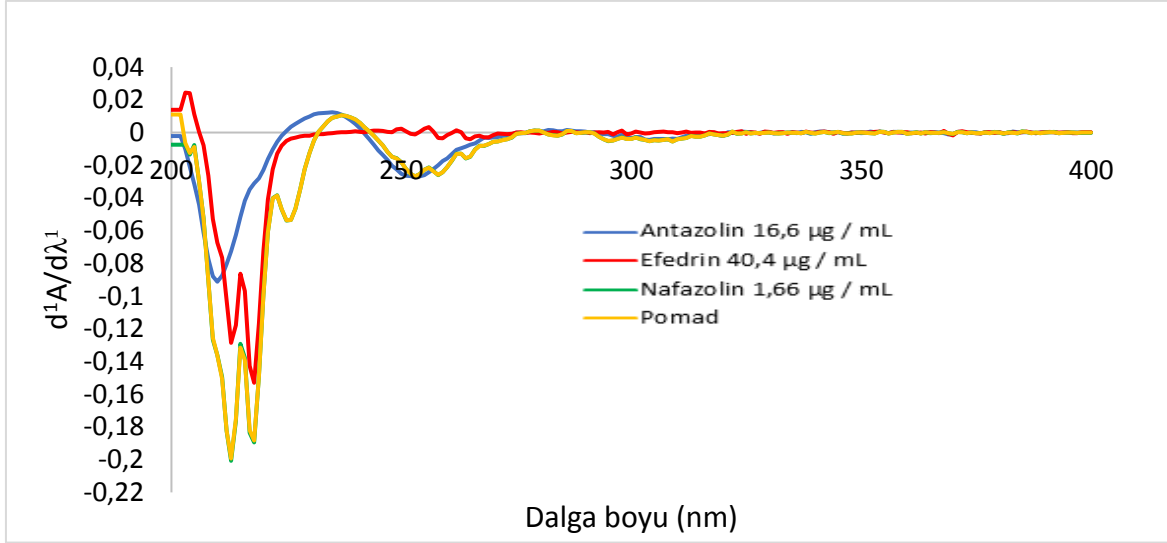


Şekil 4.2. Farmasötik pomad (çözücü: metanol-su, 30: 20) ve Standartlar karışımı (çözücü: metanol-su, 30: 20) çözeltilerinin UV spektrumları

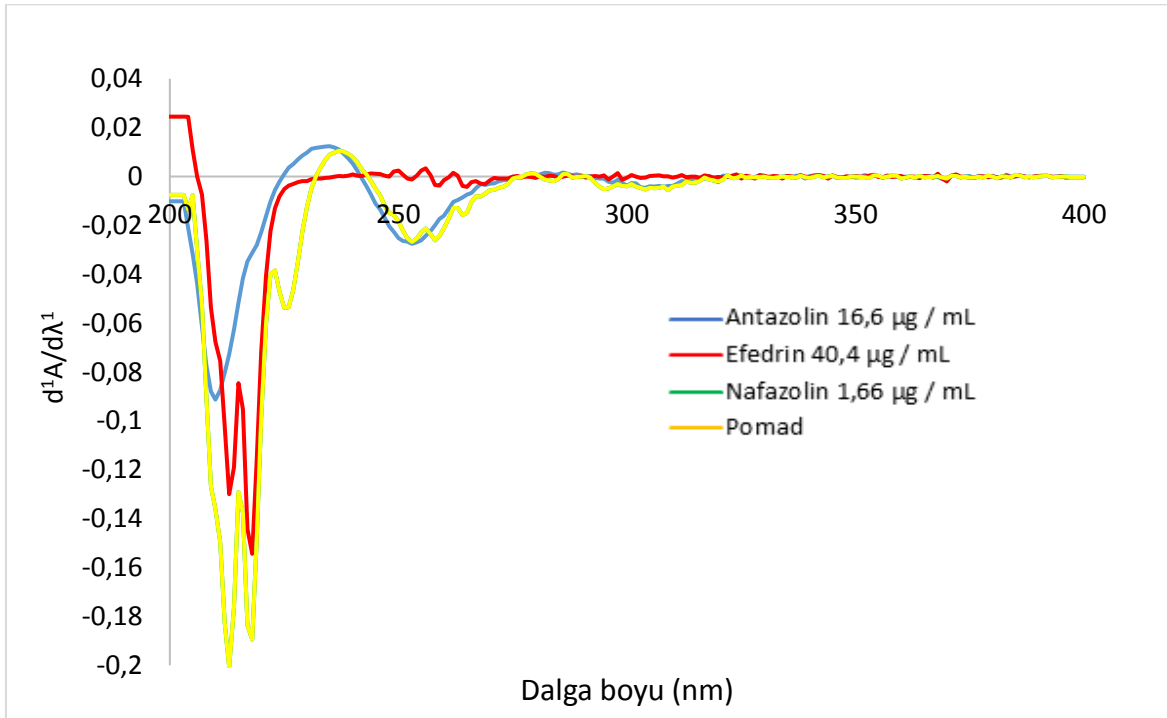
4.3. UV-Türev Spektrofotometrisi Yöntemi Sonuçları

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

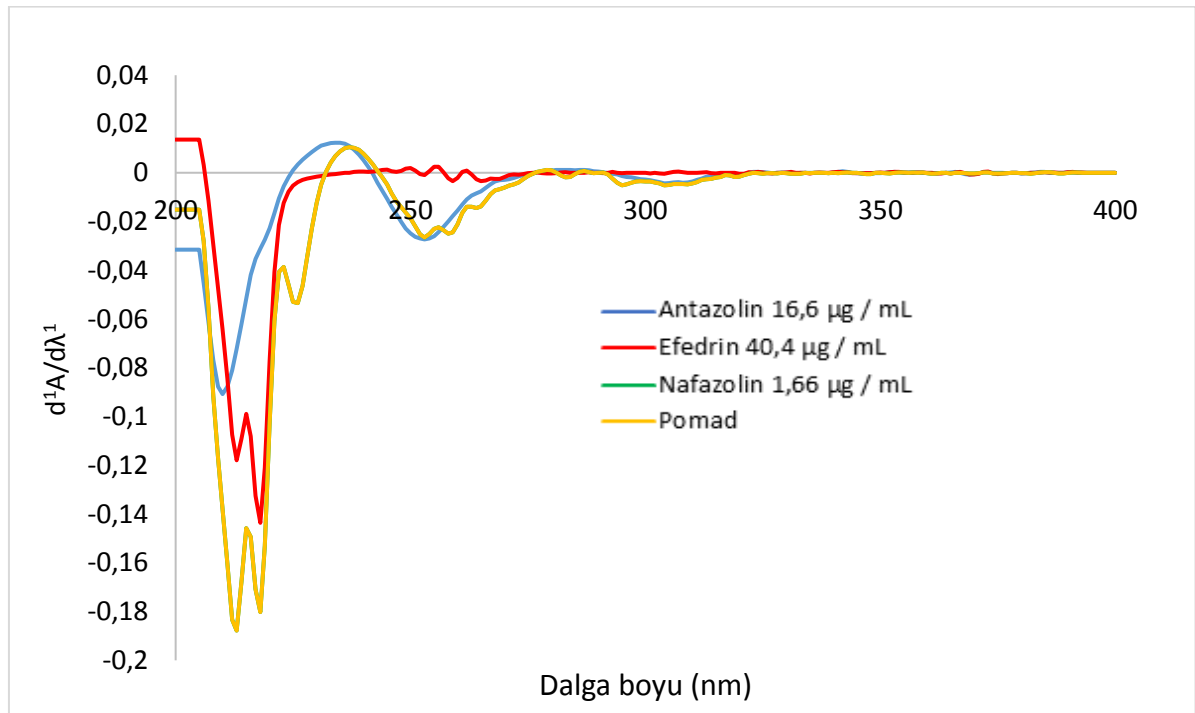
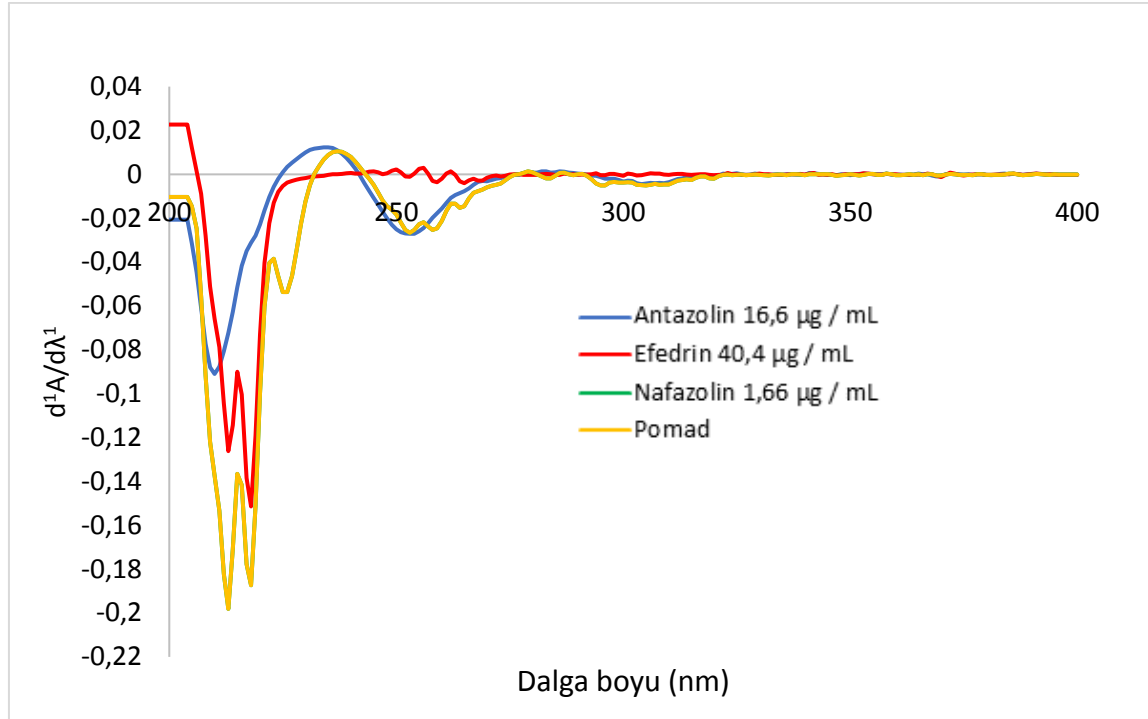
UV-Türev Spektrofotometrik yöntemde, miktar tayini için en uygun dalga boyunun belirlenmesi amacıyla *Efedrin HCl*, *Nafazolin HCl*, *Antazolin HCl* standart çözeltilerinin ve ve eşit miktarda *Efedrin HCl*, *Nafazolin HCl* ve *Antazolin HCl* içeren farmasötik pomad çözeltilisinin, n değerleri ($\Delta\lambda$) 5, 7, 9, 11, 13, 17, 21, 27 olacak şekilde 1. türev spektrumları alınmıştır. Elde edilen spektrumlar Şekil 4.3., Şekil 4.4., Şekil 4.5., Şekil 4.6., Şekil 4.7., Şekil 4.8., Şekil 4.9. ve Şekil 4.10'da üst üste gösterilmiştir. Bu çalışma, matriksden gelebilen bir etkinin varlığını kontrol amacıyla yapılmıştır.

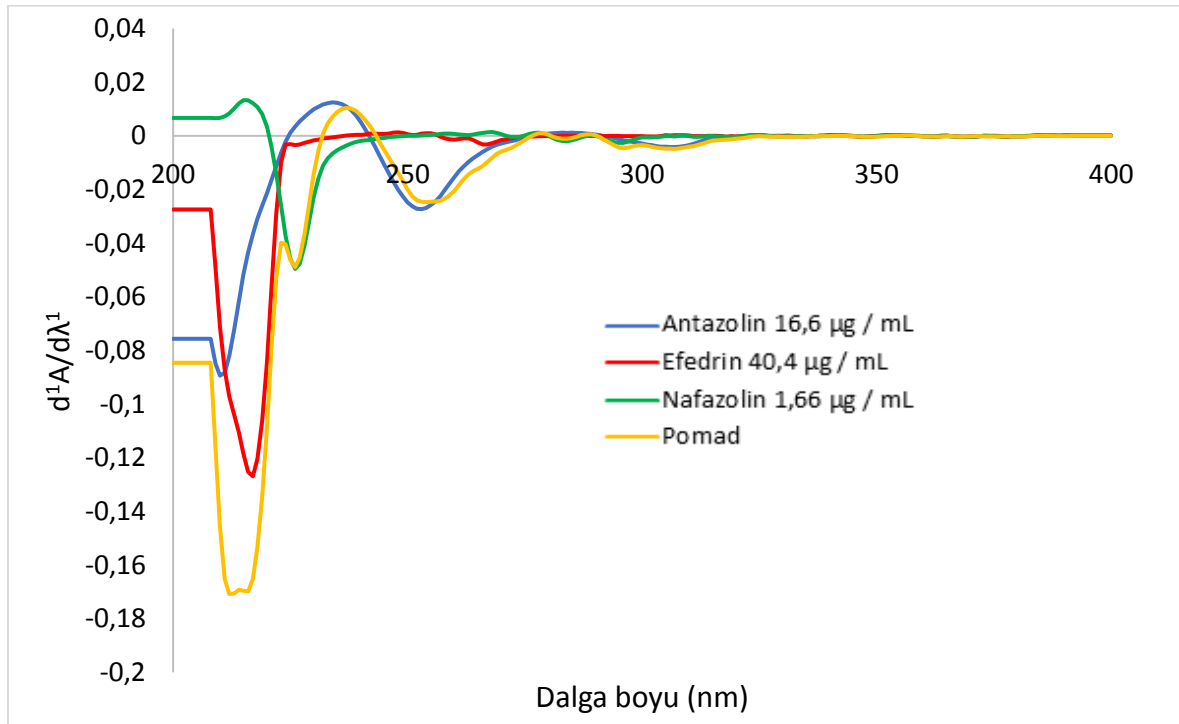
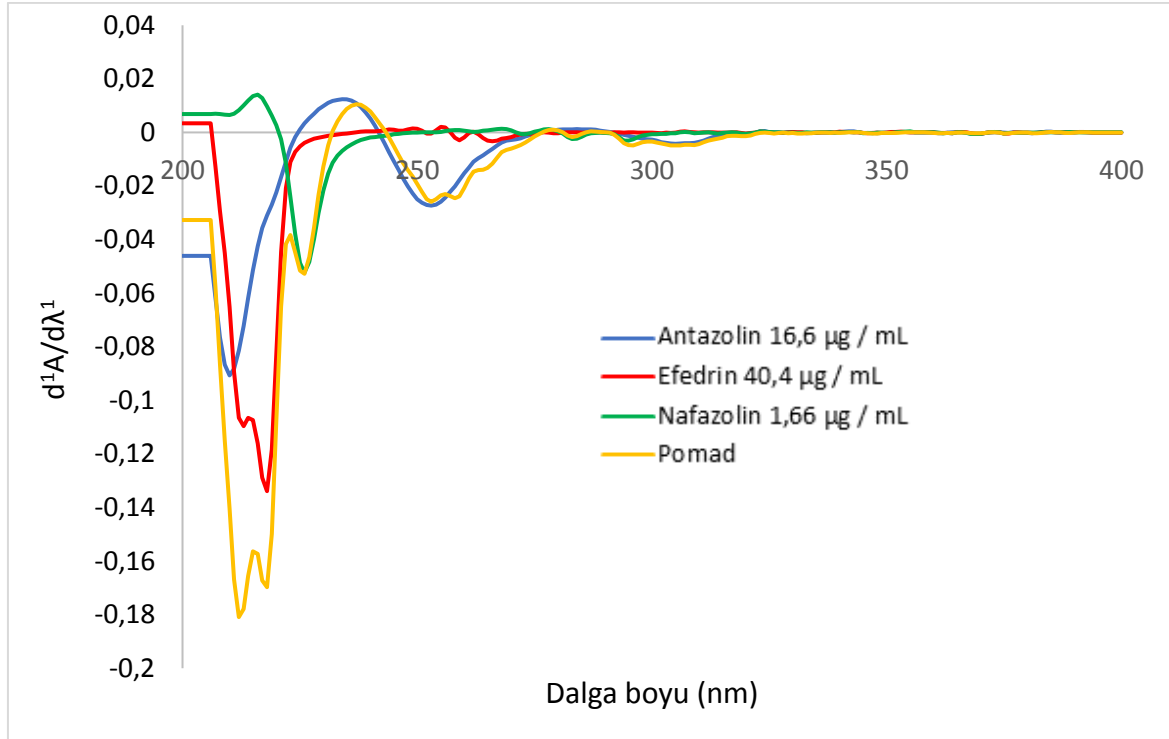


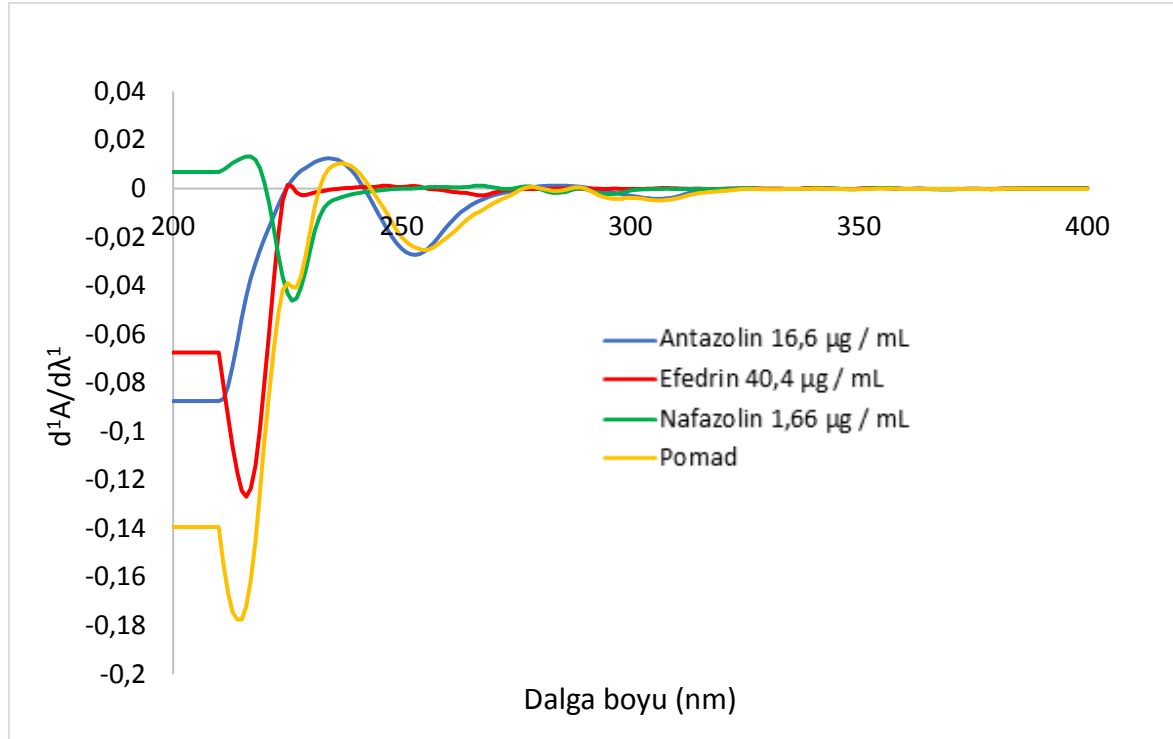
Şekil 4.3. 40,4 µg/mL *EFD*, 1,66 µg/mL *NFZ*, 16,6 µg/mL *ANT* ve eşit miktarda *EFD*, *NFZ* ve *ANT* içeren Farmasötik Pomad'a ait üst üste çekilmiş 1.türev (n=5) UV spektrumları



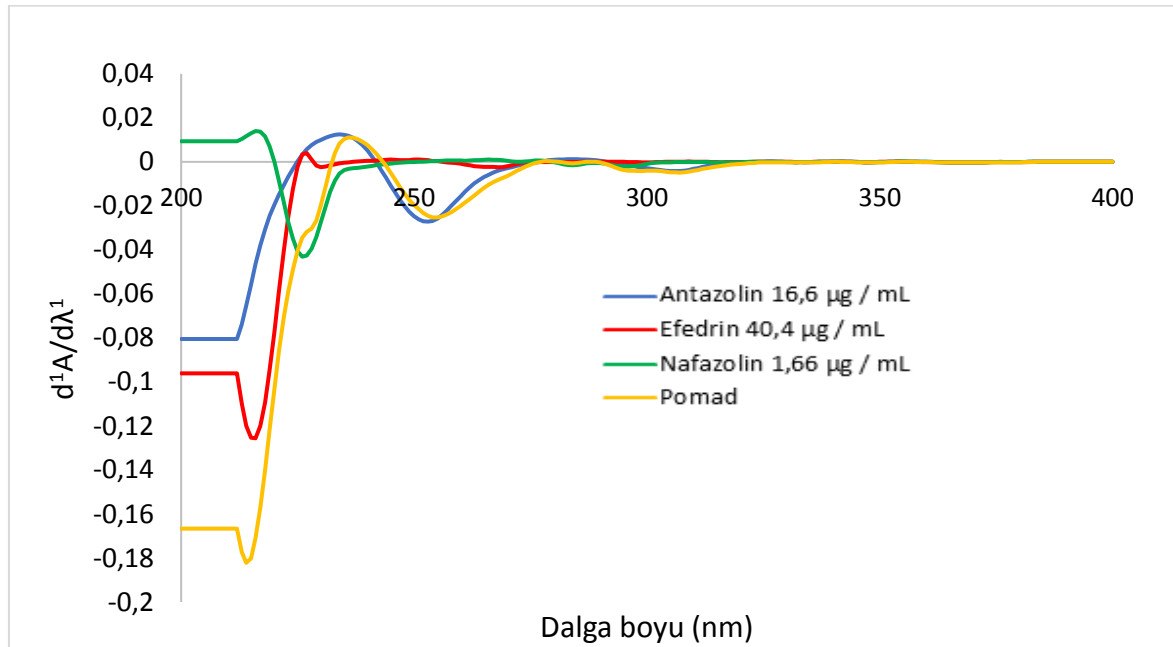
Şekil 4.4. 40,4 µg/mL *EFD*, 1,66 µg/mL *NFZ*, 16,6 µg/mL *ANT* ve eşit miktarda *EFD*, *NFZ* ve *ANT* içeren Farmasötik Pomad'a ait üst üste çekilmiş 1.türev (n=7) UV spektrumları





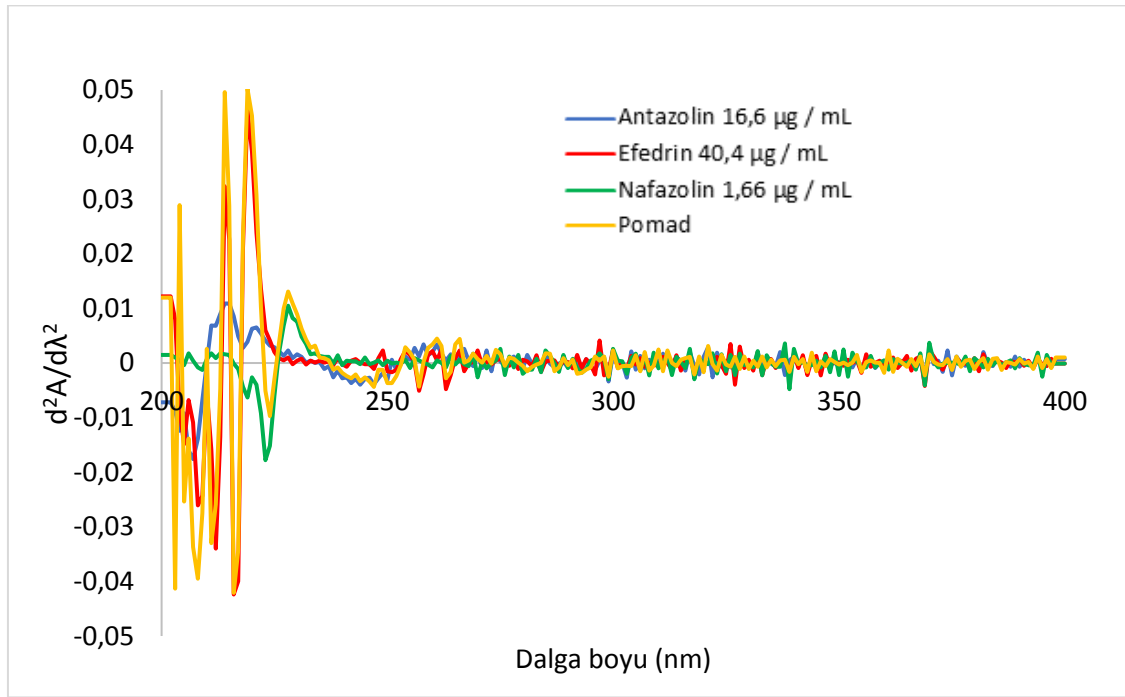


Şekil 4.9. 40,4 µg/mL *EFD*, 1,66 µg/mL *NFZ*, 16,6 µg/mL *ANT* ve eşit miktarda *EFD*, *NFZ* ve *ANT* içeren Farmasötik Pomad'a ait üst üste çekilmiş 1.türev (n=21) UV spektrumları

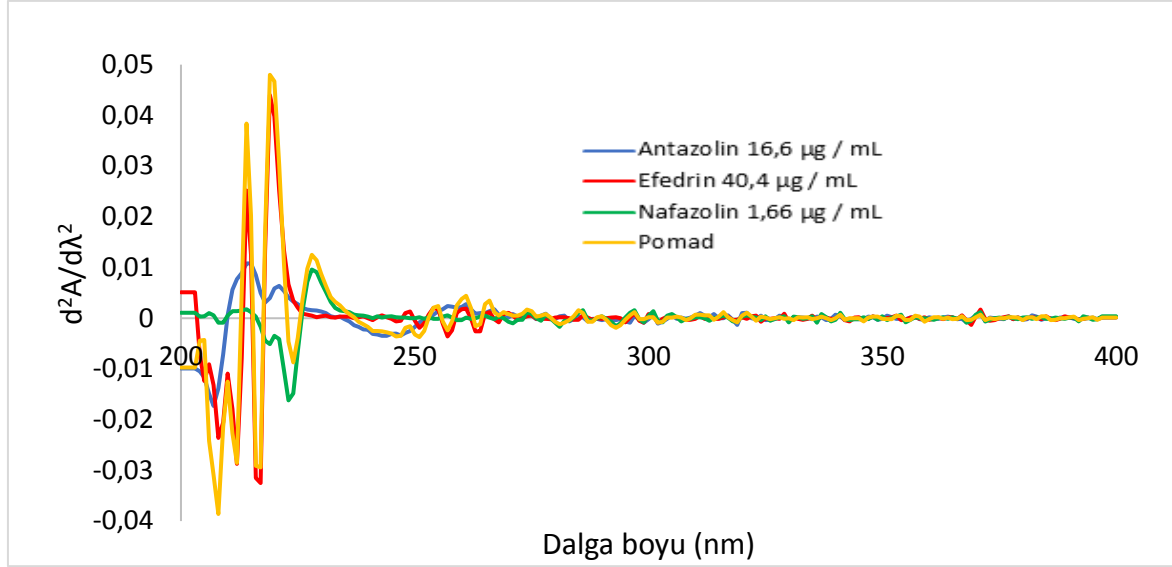


Şekil 4.10. 40,4 µg/mL *EFD*, 1,66 µg/mL *NFZ*, 16,6 µg/mL *ANT* ve eşit miktarda *EFD*, *NFZ* ve *ANT* içeren Farmasötik Pomad'a ait üst üste çekilmiş 1.türev (n=25) UV spektrumları

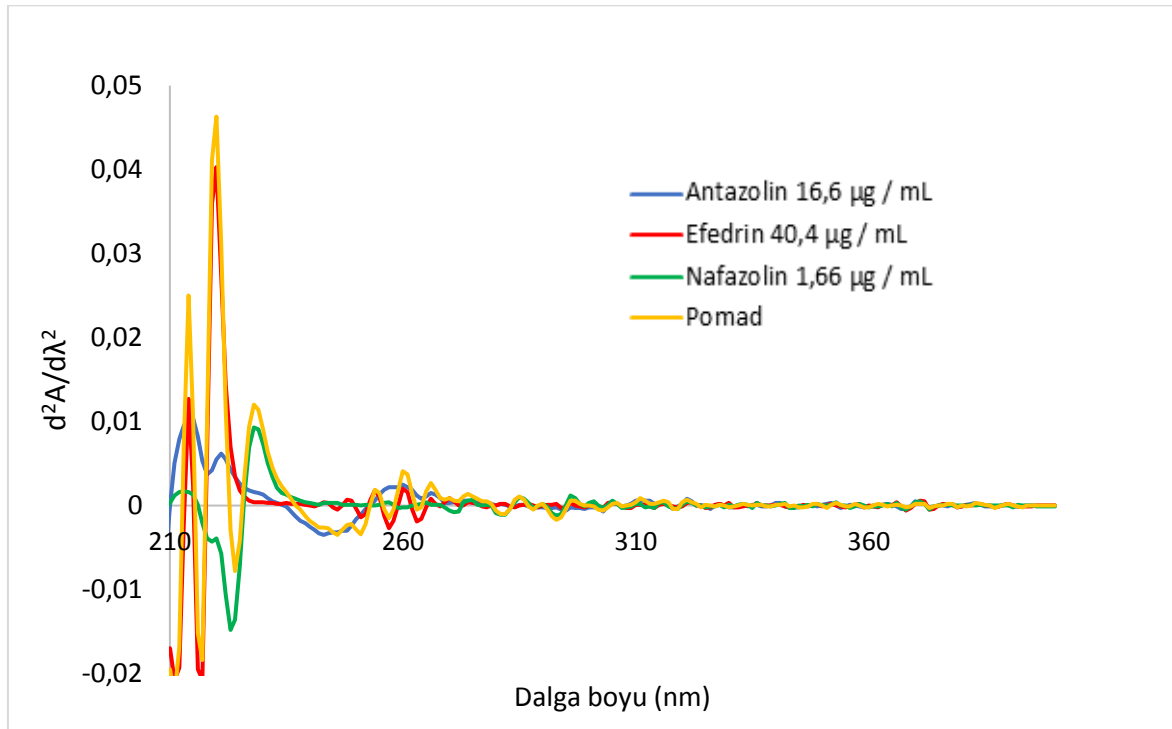
UV-Türev Spektrofotometrik yöntemde, miktar tayini için en uygun dalga boyunun belirlenmesi amacıyla *Efedrin HCl*, *Nafazolin HCl*, *Antazolin HCl* standart çözeltilerinin ve eşit miktarda *Efedrin HCl*, *Nafazolin HCl* ve *Antazolin HCl* içeren farmasötik pomad çözeltilisinin n değerleri ($\Delta\lambda$) 5, 7, 9, 11, 13, 17, 21, 27 olacak şekilde 2. türev spektrumları alınmıştır. Elde edilen spektrumlar Şekil 4.11., Şekil 4.12., Şekil 4.13., Şekil 4.14., Şekil 4.15., Şekil 4.16., Şekil 4.17. ve Şekil 4.18’de üst üste gösterilmiştir.



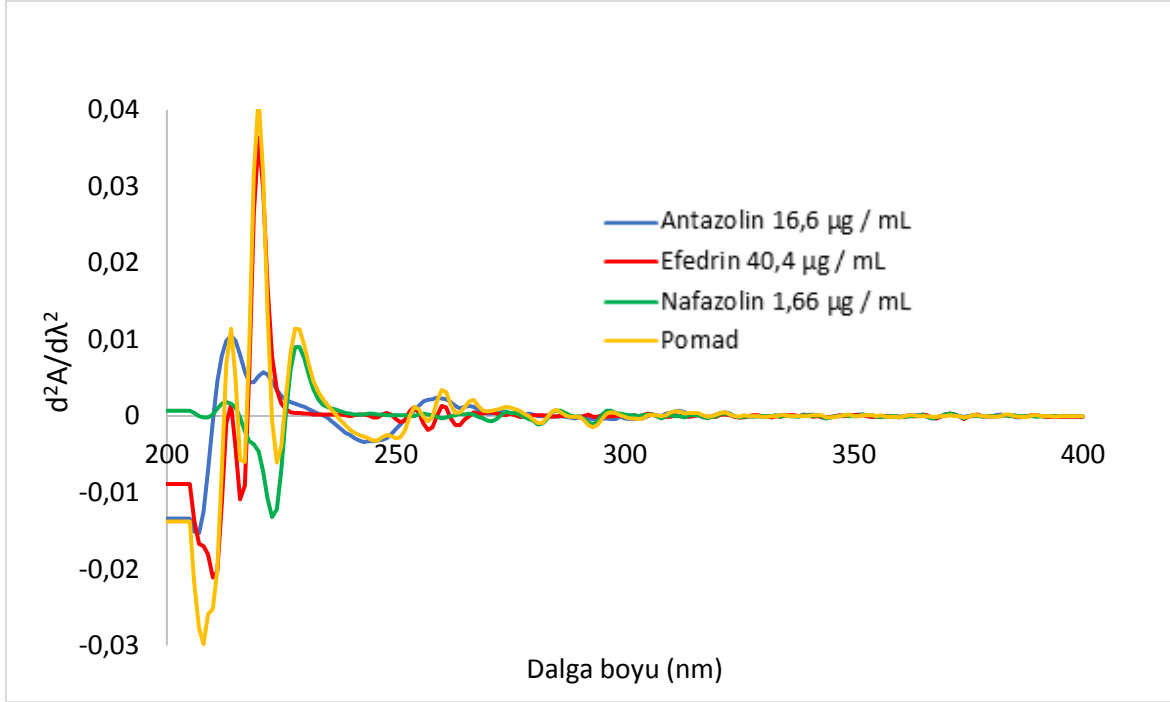
Şekil 4.11. 40,4 µg/mL *EFD*, 1,66 µg/mL *NFZ*, 16,6 µg/mL *ANT* ve eşit miktarda *EFD*, *NFZ* ve *ANT* içeren Farmasötik Pomad’a ait üst üste çekilmiş 2.türev ($n=5$) UV spektrumları



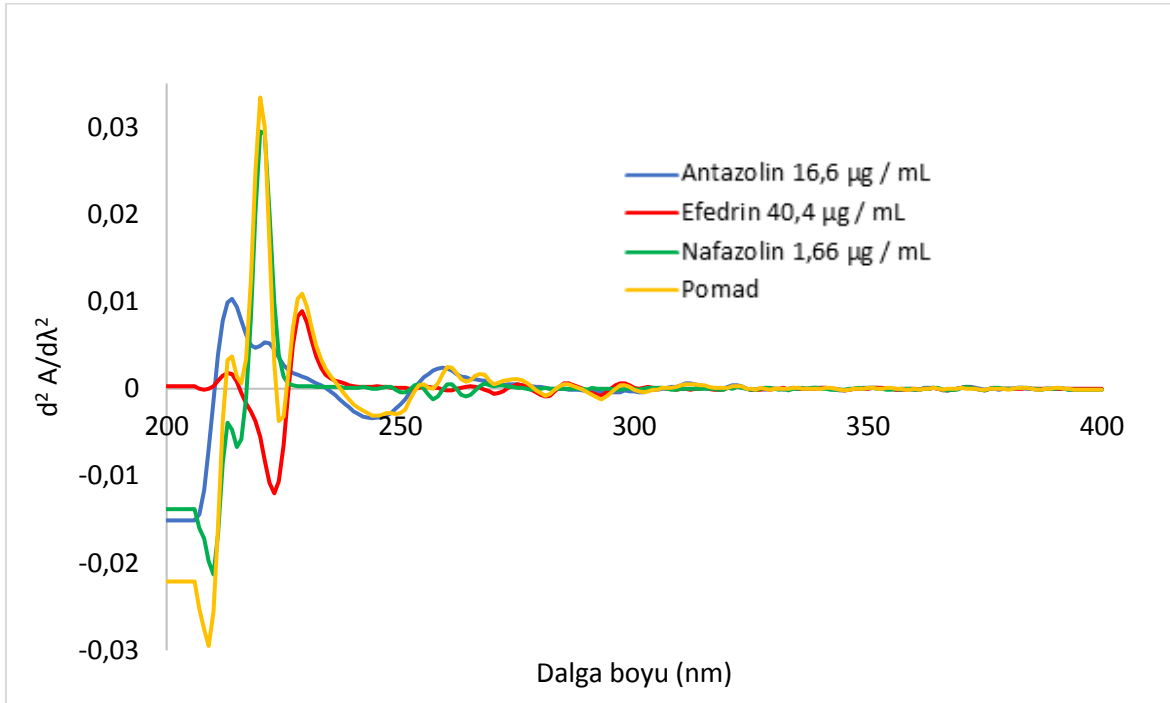
Şekil 4.12. 40,4 µg/mL *EFD*, 1,66 µg/mL *NFZ*, 16,6 µg/mL *ANT* ve eşit miktarda *EFD*, *NFZ* ve *ANT* içeren Farmasötik Pomad'a ait üst üste çekilmiş 2.türev (n=7) UV spektrumları



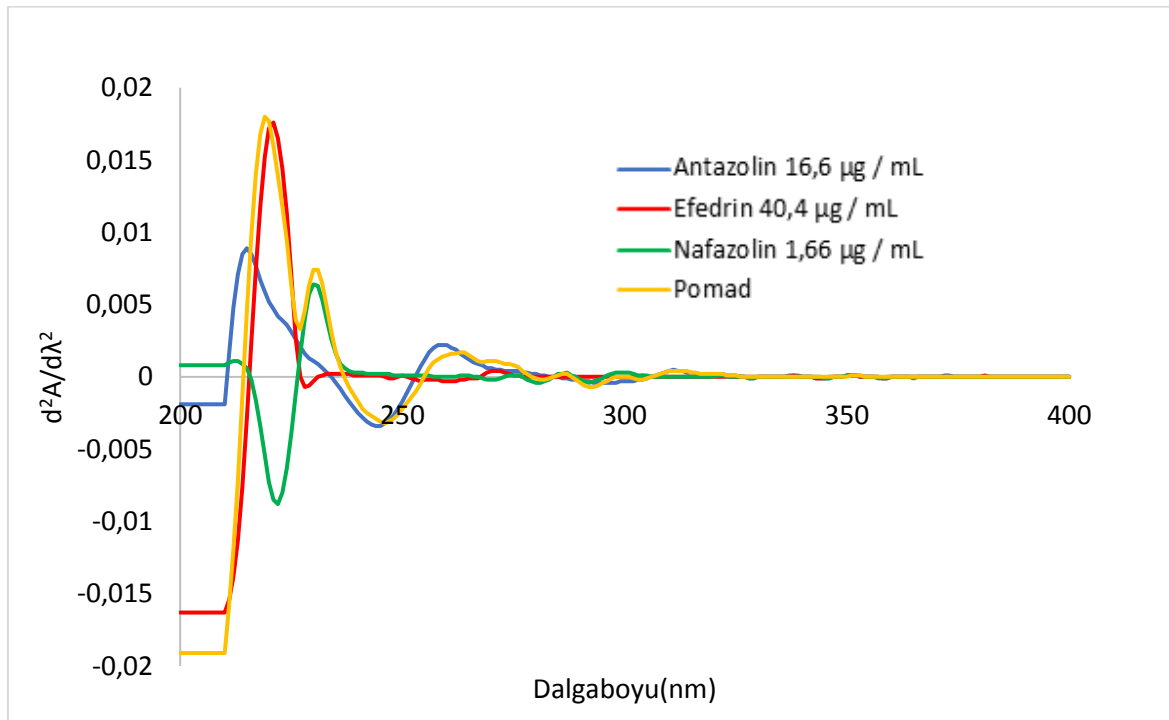
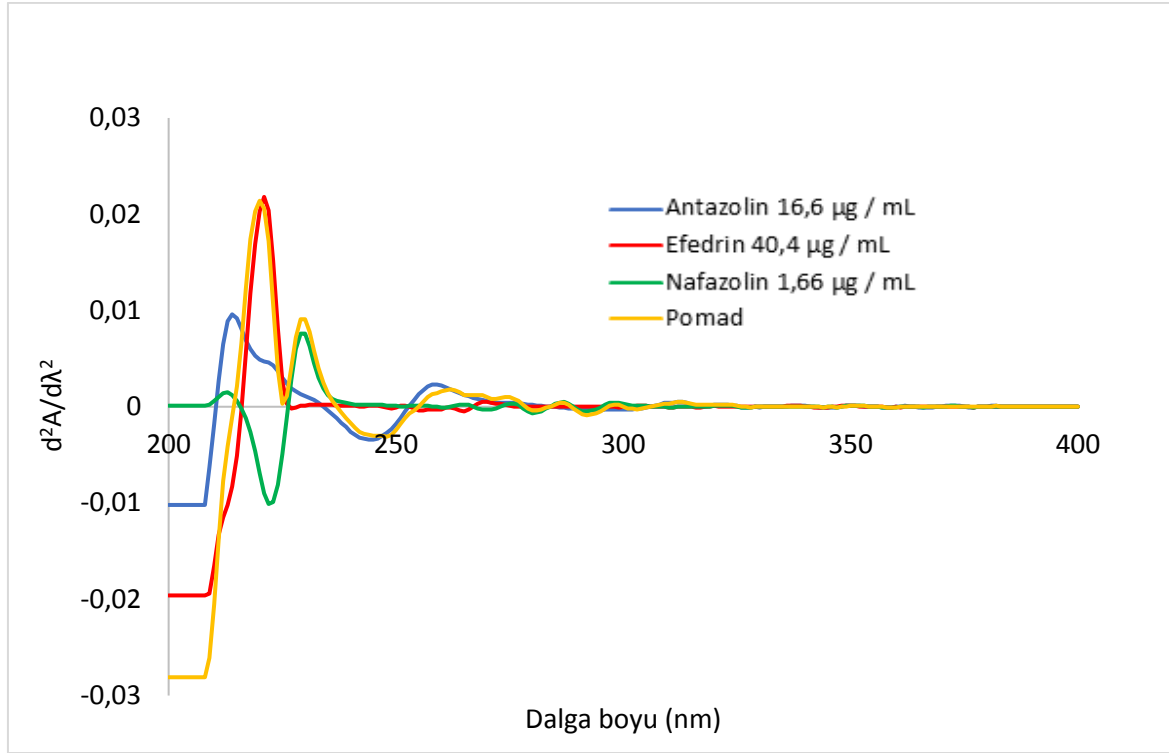
Şekil 4.13. 40,4 µg/mL *EFD*, 1,66 µg/mL *NFZ*, 16,6 µg/mL *ANT* ve eşit miktarda *EFD*, *NFZ* ve *ANT* içeren Farmasötik Pomad'a ait üst üste çekilmiş 2.türev (n=9) UV spektrumları

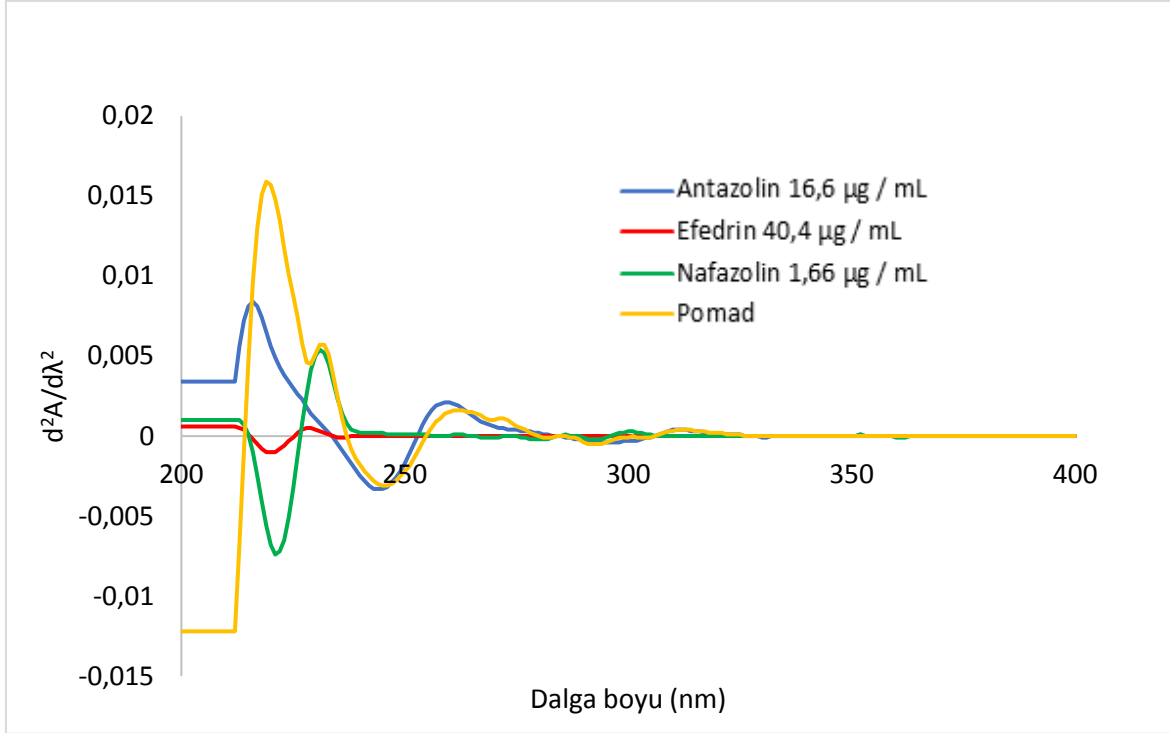


Şekil 4.14. 40,4 µg/mL *EFD*, 1,66 µg/mL *NFZ*, 16,6 µg/mL *ANT* ve eşit miktarda *EFD*, *NFZ* ve *ANT* içeren Farmasötik Pomad'a ait üst üste çekilmiş 2.türev (n=11) UV spektrumları



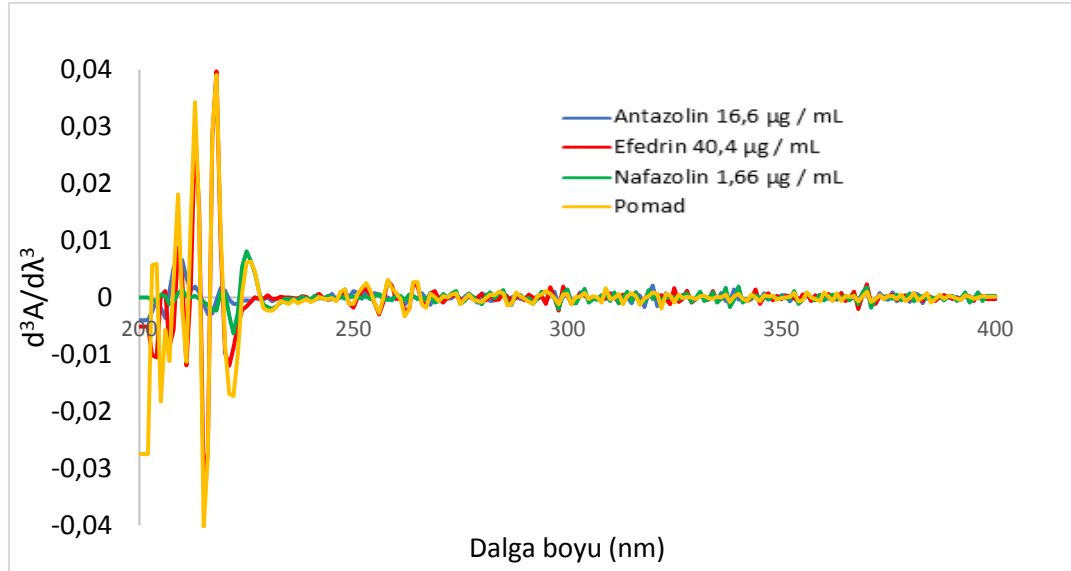
Şekil 4.15. 40,4 µg/mL *EFD*, 1,66 µg/mL *NFZ*, 16,6 µg/mL *ANT* ve eşit miktarda *EFD*, *NFZ* ve *ANT* içeren Farmasötik Pomad'a ait üst üste çekilmiş 2.türev (n=13) UV spektrumları



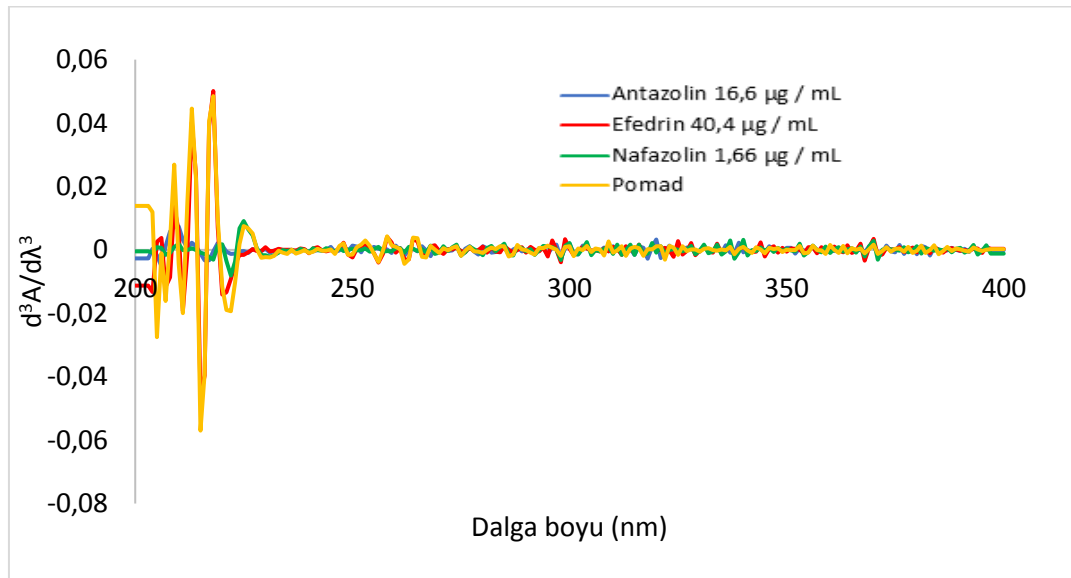


Şekil 4.18. 40,4 µg/mL *EFD*, 1,66 µg/mL *NFZ*, 16,6 µg/mL *ANT* ve eşit miktarda *EFD*, *NFZ* ve *ANT* içeren Farmasötik Pomad'a ait üst üste çekilmiş 2.türev (n=25) UV spektrumları

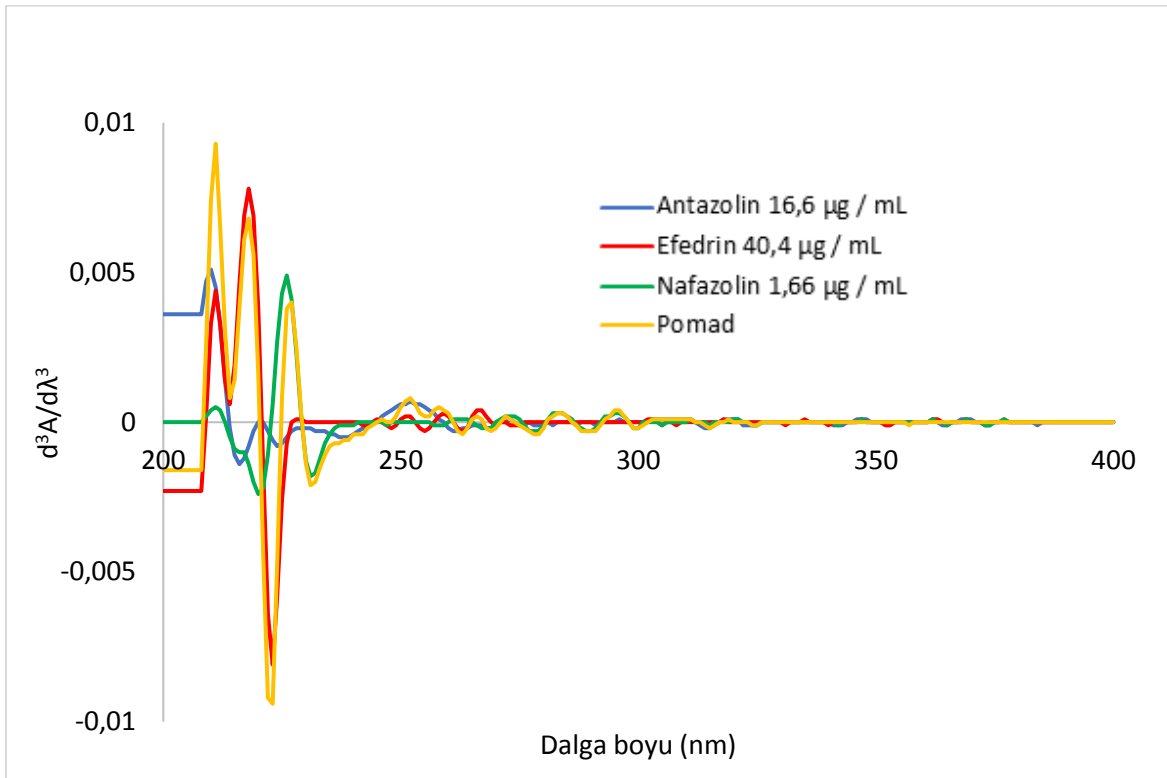
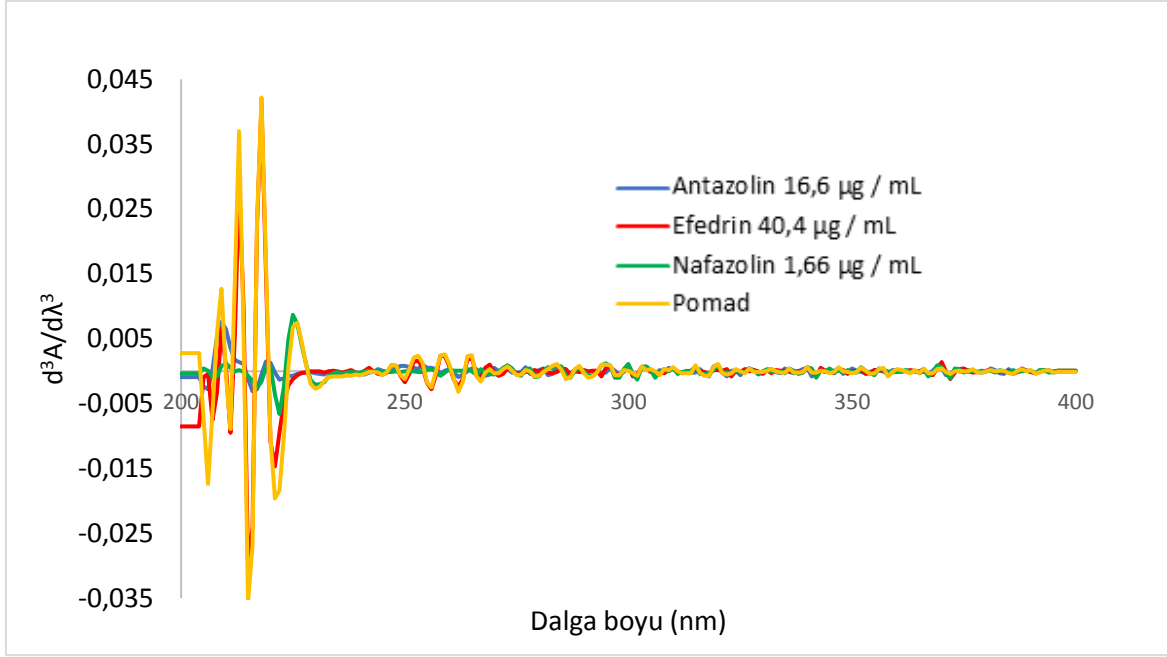
UV-Türev Spektrofotometrik yöntemde, miktar tayini için en uygun dalga boyunun belirlenmesi amacıyla *Efedrin HCl*, *Nafazolin HCl*, *Antazolin HCl* standart çözeltilerinin ve eşit miktarda *Efedrin HCl*, *Nafazolin HCl* ve *Antazolin HCl* içeren farmasötik pomad çözeltilisinin *n değerleri* ($\Delta\lambda$) 5, 7, 9, 11, 13, 17, 21, 27 olacak şekilde 3. türev spektrumları alınmıştır. Elde edilen spektrumlar Şekil 4.19., Şekil 4.20., Şekil 4.21., Şekil 4.22., Şekil 4.23., Şekil 4.24., Şekil 4.25. ve Şekil 4.26'da üst üste gösterilmiştir.

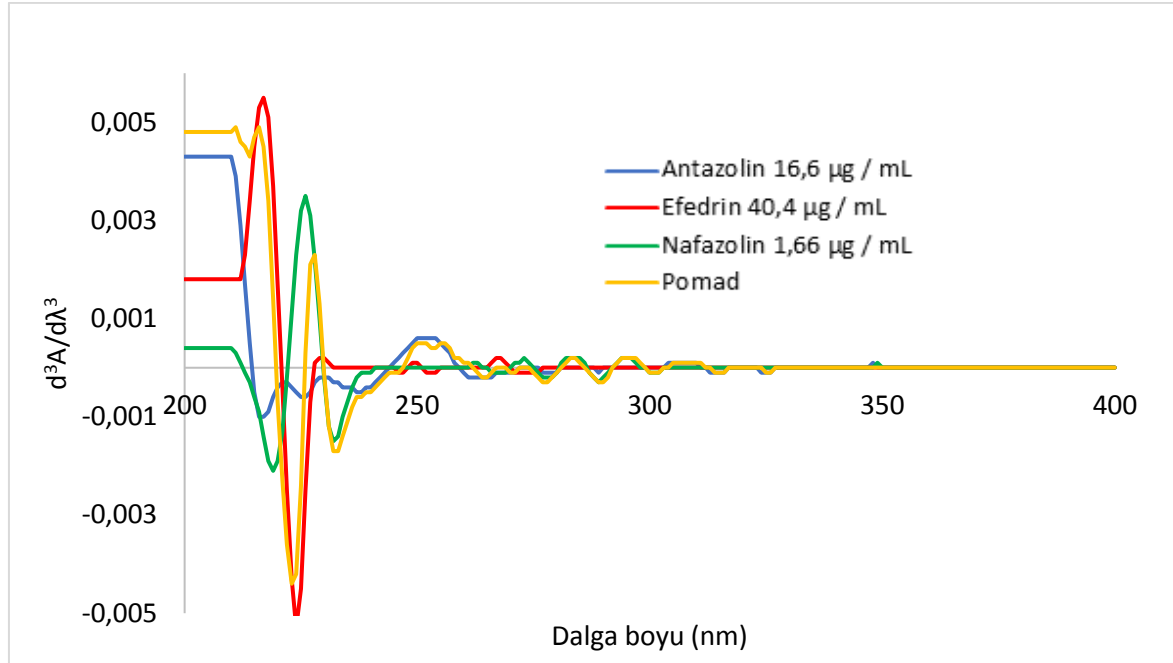


Şekil 4.19. 40,4 µg/mL *EFD*, 1,66 µg/mL *NFZ*, 16,6 µg/mL *ANT* ve eşit miktarda *EFD*, *NFZ* ve *ANT* içeren Farmasötik Pomad'a ait üst üste çekilmiş 3.türev (n=5) UV spektrumları

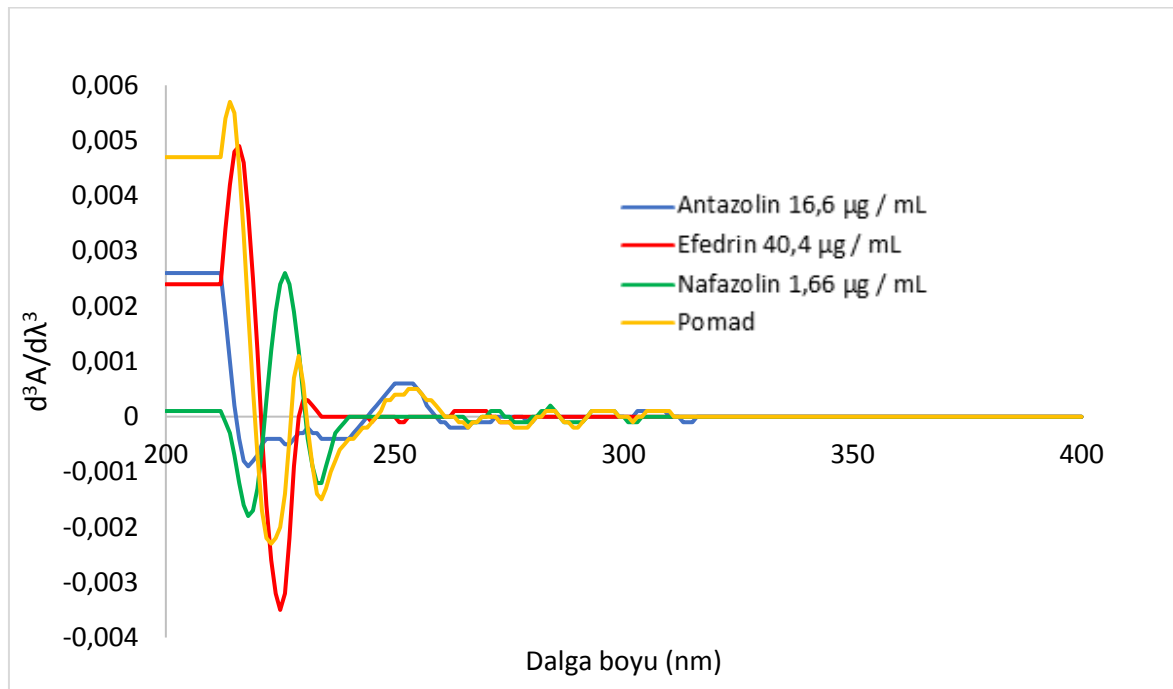


Şekil 4.20. 40,4 µg/mL *EFD*, 1,66 µg/mL *NFZ*, 16,6 µg/mL *ANT* ve eşit miktarda *EFD*, *NFZ* ve *ANT* içeren Farmasötik Pomad'a ait üst üste çekilmiş 3.türev (n=7) UV spektrumları



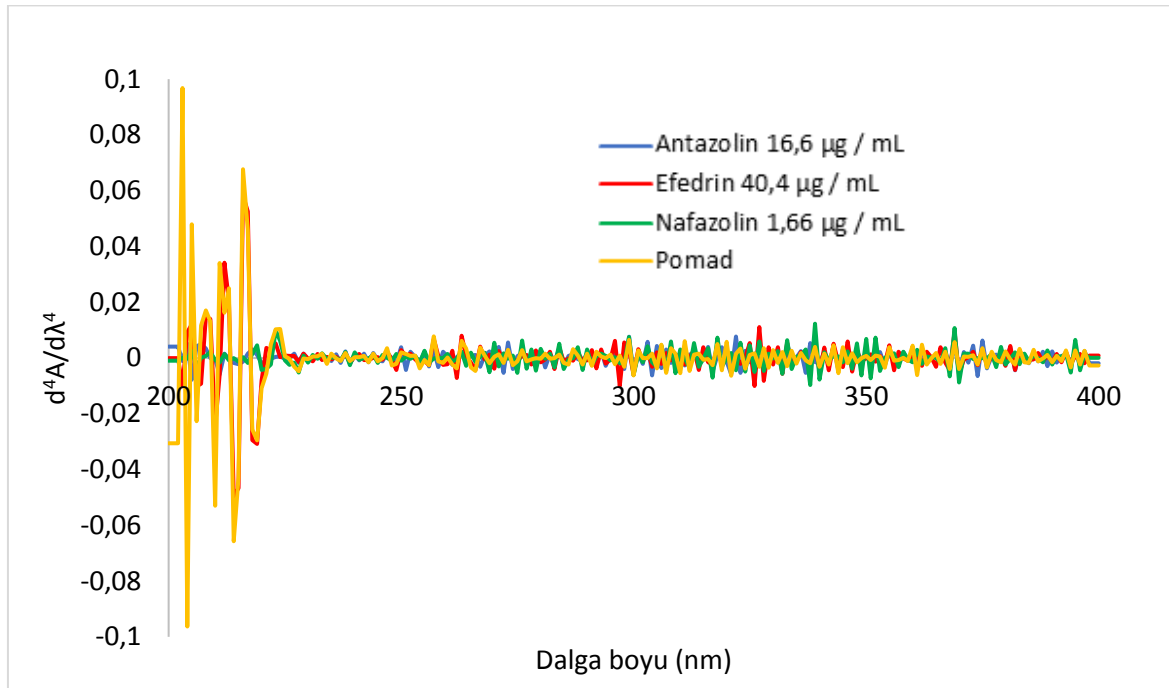


Şekil 4.23. 40,4 µg/mL *EFD*, 1,66 µg/mL *NFZ*, 16,6 µg/mL *ANT* ve eşit miktarda *EFD*, *NFZ* ve *ANT* içeren Farmasötik Pomad'a ait üst üste çekilmiş 3.türev (n=21) UV spektrumları

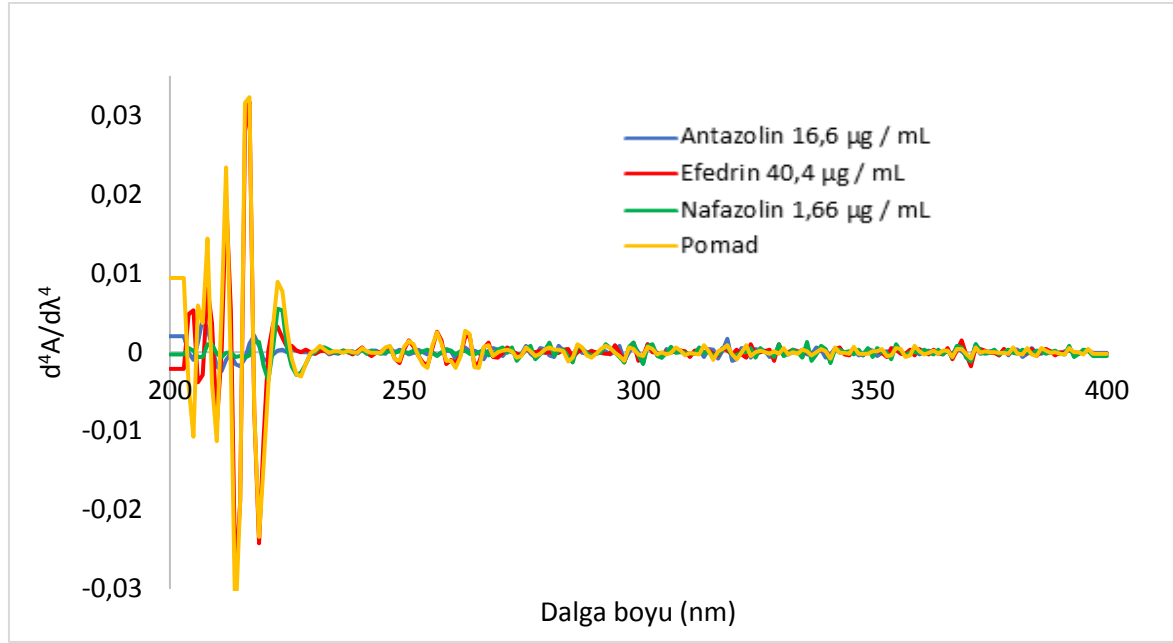


Şekil 4.24. 40,4 µg/mL *EFD*, 1,66 µg/mL *NFZ*, 16,6 µg/mL *ANT* ve eşit miktarda *EFD*, *NFZ* ve *ANT* içeren Farmasötik Pomad'a ait üst üste çekilmiş 3.türev (n=25) UV spektrumları

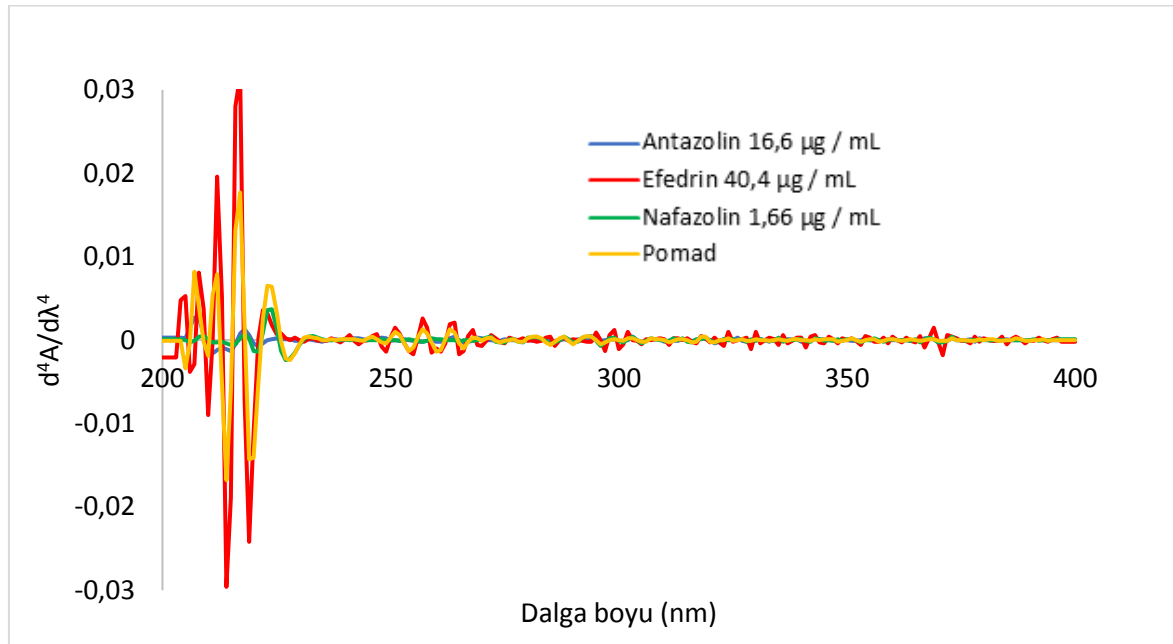
UV-Türev Spektrofotometrik yöntemde, miktar tayini için en uygun dalga boyunun belirlenmesi amacıyla *Efedrin HCl*, *Nafazolin HCl*, *Antazolin HCl* standart çözeltilerinin ve eşit miktarda *Efedrin HCl*, *Nafazolin HCl* ve *Antazolin HCl* içeren farmasötik pomad çözeltisinin n değerleri ($\Delta\lambda$) 5, 7, 9, 11, 13, 17, 21, 27 olacak şekilde 4. türev spektrumları alınmıştır. Elde edilen spektrumlar Şekil 4.24., Şekil 4.25., Şekil 4.26., Şekil 4.27., Şekil 4.28., Şekil 4.29., Şekil 4.30. ve Şekil 4.31’de üst üste gösterilmiştir.



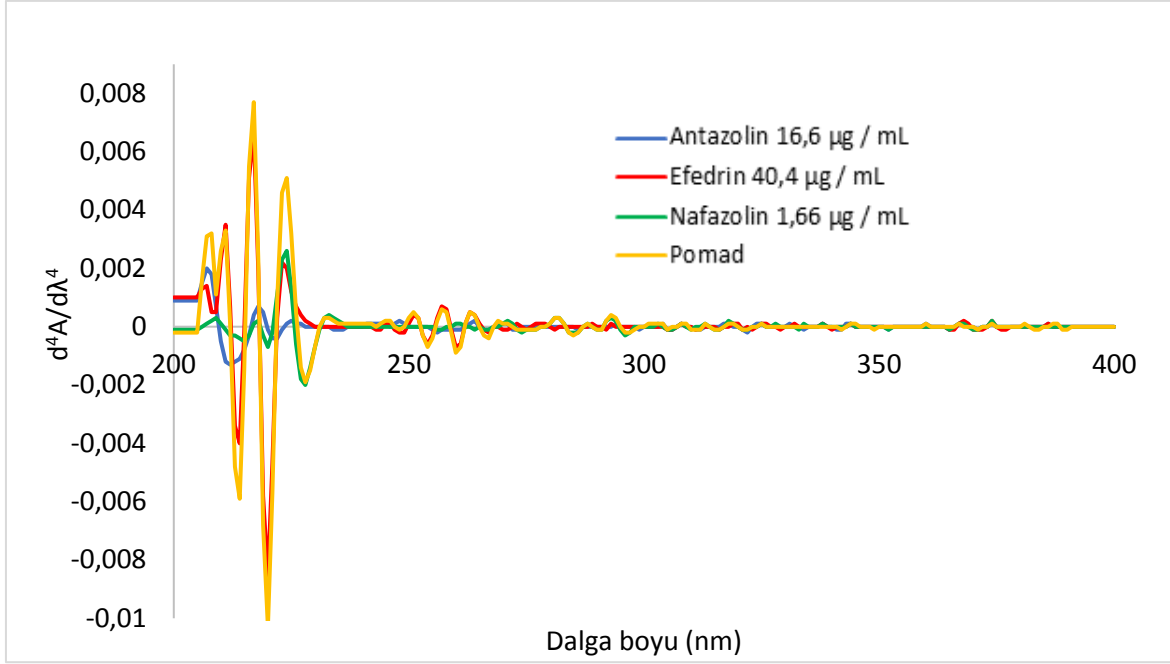
Şekil 4.25. 40,4 µg/mL *EFD*, 1,66 µg/mL *NFZ*, 16,6 µg/mL *ANT* ve eşit miktarda *EFD*, *NFZ* ve *ANT* içeren Farmasötik Pomad’a ait üst üste çekilmiş 4.türev ($n=5$) UV spektrumları



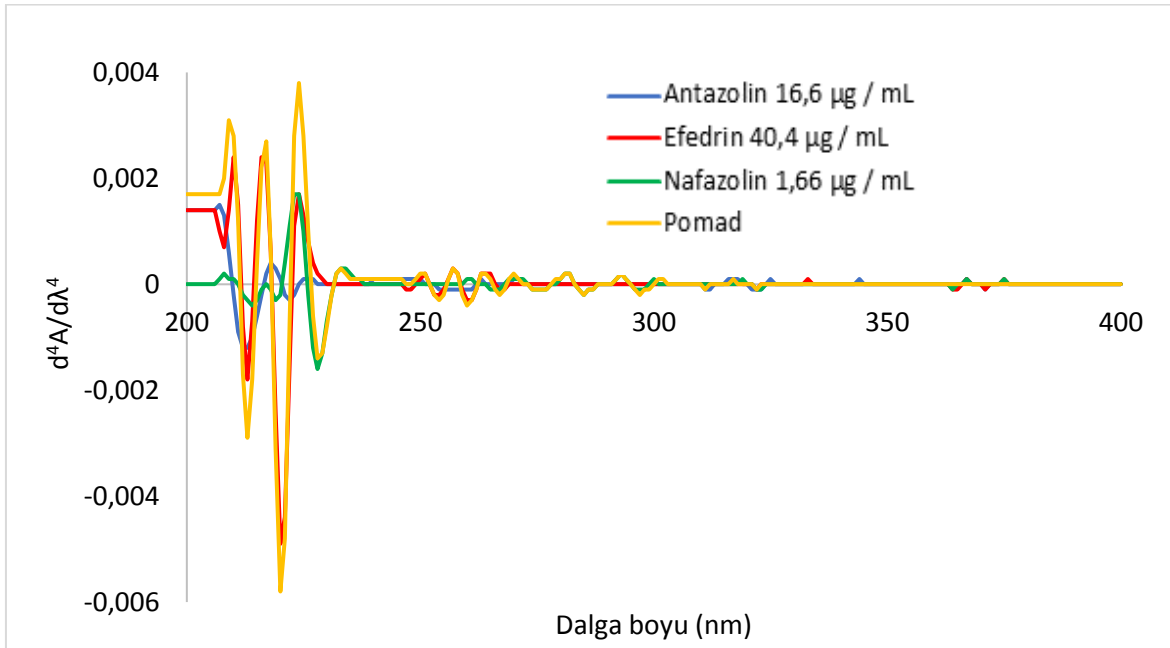
Şekil 4.26. 40,4 µg/mL *EFD*, 1,66 µg/mL *NFZ*, 16,6 µg/mL *ANT* ve eşit miktarda *EFD*, *NFZ* ve *ANT* içeren Farmasötik Pomad'a ait üst üste çekilmiş 4.türev (n=7) UV spektrumları



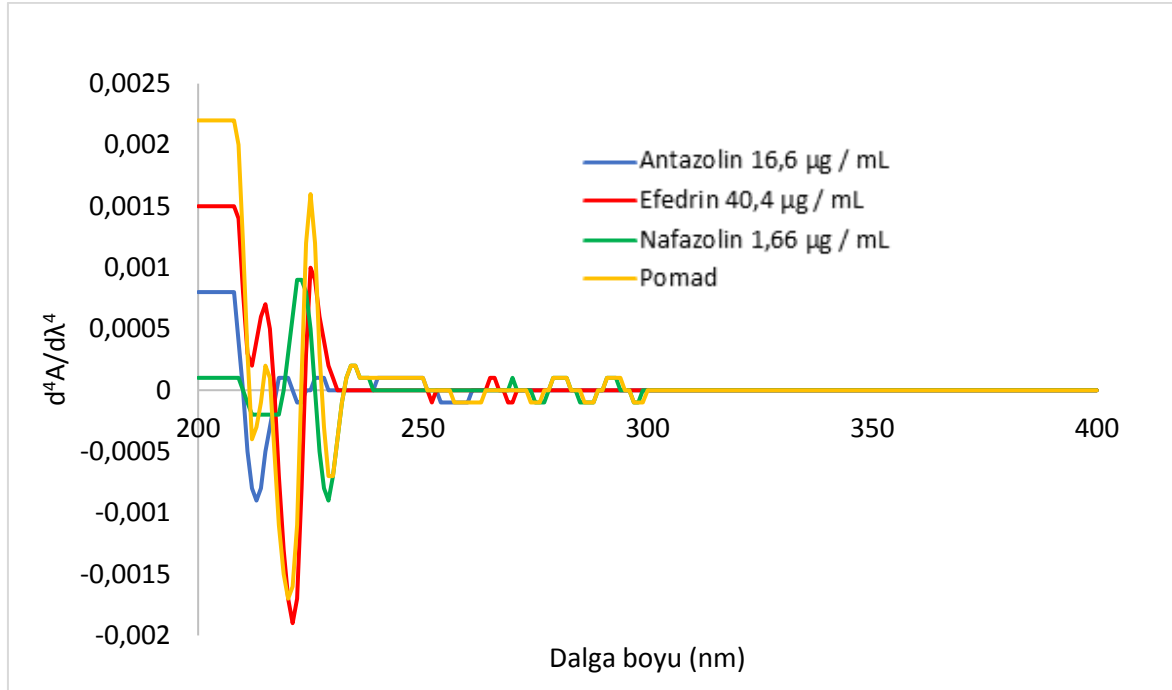
Şekil 4.27. 40,4 µg/mL *EFD*, 1,66 µg/mL *NFZ*, 16,6 µg/mL *ANT* ve eşit miktarda *EFD*, *NFZ* ve *ANT* içeren Farmasötik Pomad'a ait üst üste çekilmiş 4.türev (n=9) UV spektrumları



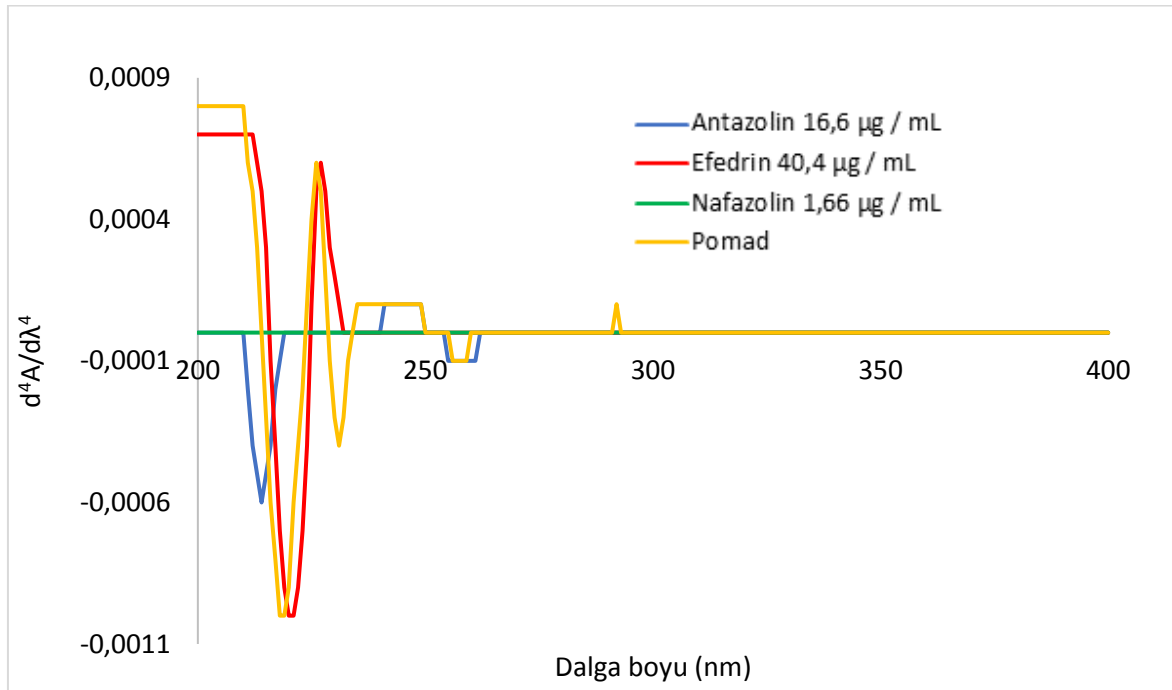
Şekil 4.28. 40,4 µg/mL *EFD*, 1,66 µg/mL *NFZ*, 16,6 µg/mL *ANT* ve eşit miktarda *EFD*, *NFZ* ve *ANT* içeren Farmasötik Pomad'a ait üst üste çekilmiş 4.türev (n=11) UV spektrumları



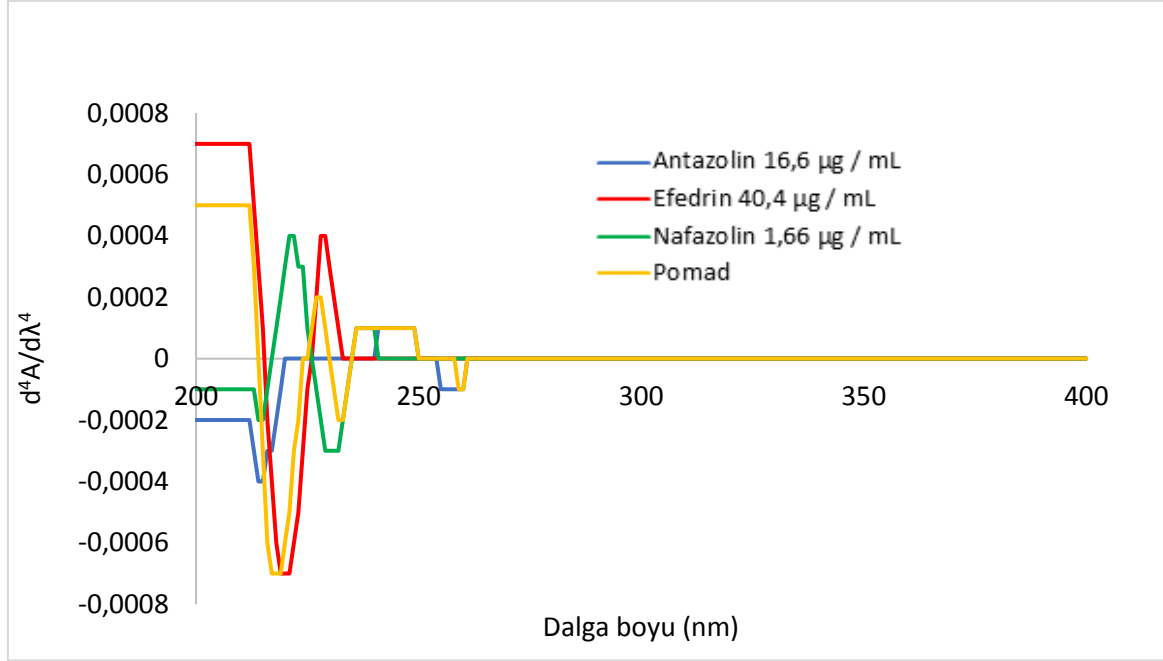
Şekil 4.29. 40,4 µg/mL *EFD*, 1,66 µg/mL *NFZ*, 16,6 µg/mL *ANT* ve eşit miktarda *EFD*, *NFZ* ve *ANT* içeren Farmasötik Pomad'a ait üst üste çekilmiş 4.türev (n=13) UV spektrumları



Şekil 4.30. 40,4 µg/mL *EFD*, 1,66 µg/mL *NFZ*, 16,6 µg/mL *ANT* ve eşit miktarda *EFD*, *NFZ* ve *ANT* içeren Farmasötik Pomad'a ait üst üste çekilmiş 4.türev (n=17) UV spektrumları



Şekil 4.31. 40,4 µg/mL *EFD*, 1,66 µg/mL *NFZ*, 16,6 µg/mL *ANT* ve eşit miktarda *EFD*, *NFZ* ve *ANT* içeren Farmasötik Pomad'a ait üst üste çekilmiş 4.türev (n=21) UV spektrumları



Şekil 4.32. 40,4 µg/mL *EFD*, 1,66 µg/mL *NFZ*, 16,6 µg/mL *ANT* ve eşit miktarda *EFD*, *NFZ* ve *ANT* içeren Farmasötik Pomad'a ait üst üste çekilmiş 4.türev (n=25) UV spektrumları

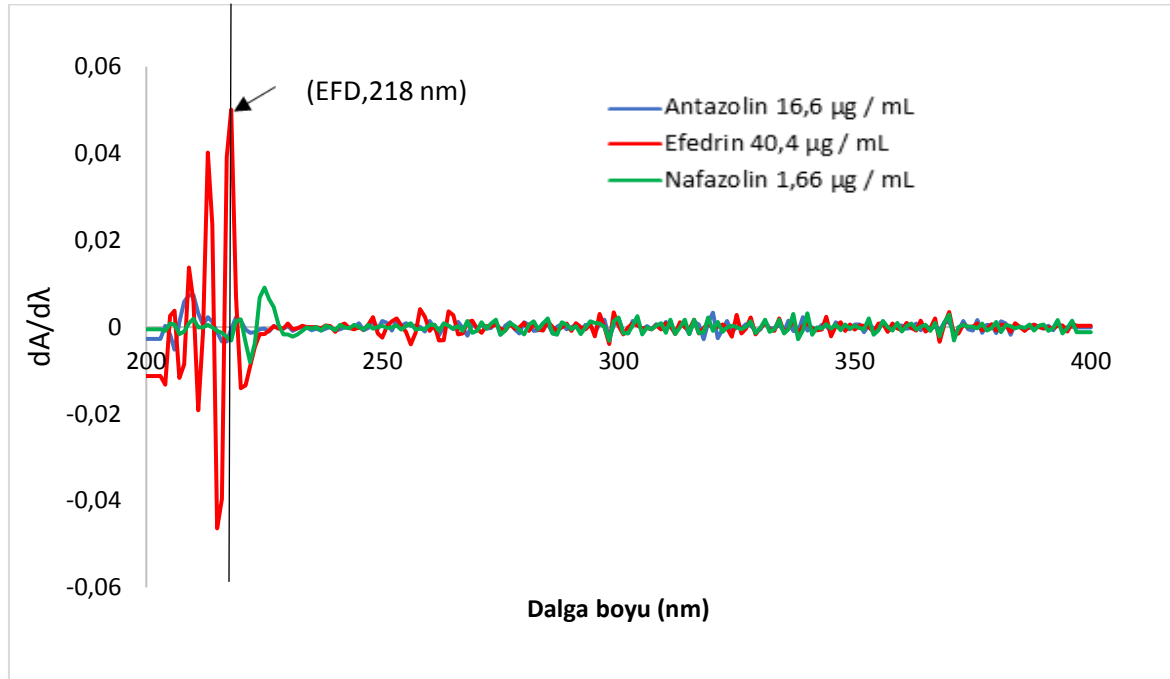
Elde edilen spektrumlardan *Efedrin HCl*, *Nafazolin HCl* ve *Antazolin HCl* için miktar tayini yapılabilecek dalga boyları Çizelge 4.1'de gösterilmiştir.

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

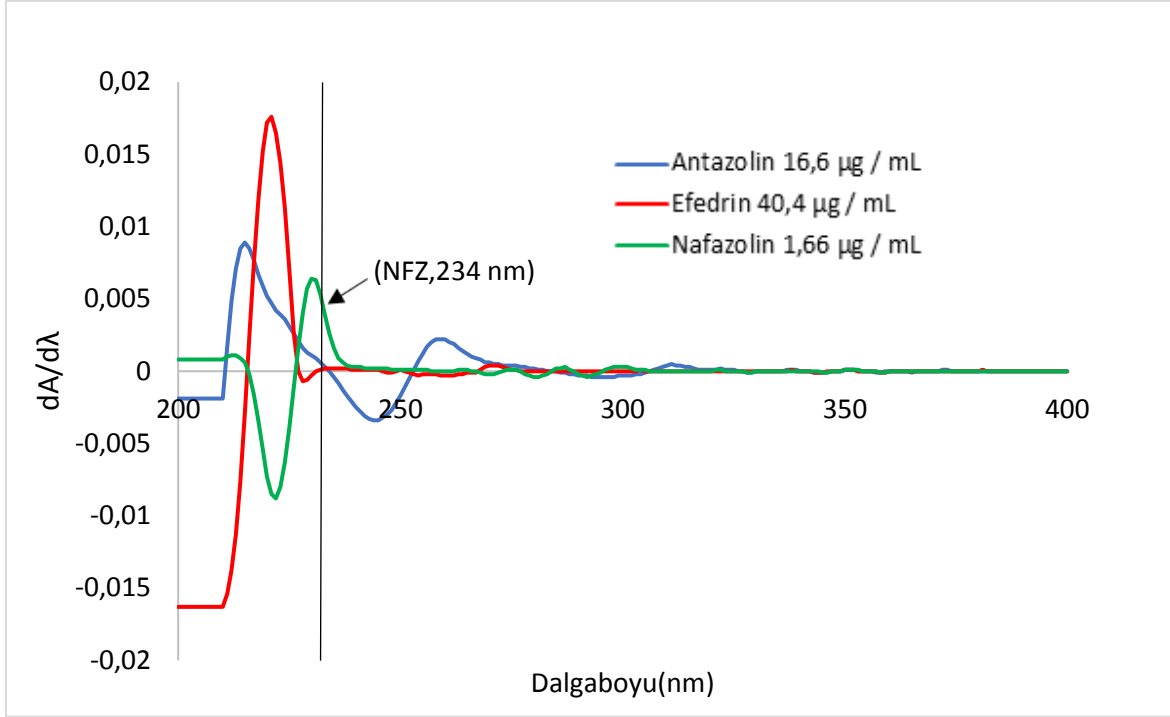
Etken Madde	UV Türev derecesi, <i>n</i>	Dalga boyu (λ), nm
<i>Efedrin HCl</i>	3.Türev, n =5 3. Türev, n =13 4. Türev, n =9 4.Türev, n =13	218, 223 247 217, 258, 259, 260, 244 217
<i>Nafazolin HCl</i>	2. Türev, n =21 2. Türev, n =13 3. Türev, n =21 3. Türev, n =13 4. Türev, n =9 4. Türev, n =13 4. Türev, n =21	234 285 284 296, 287, 281 232, 230 232, 235, 247, 249 232, 237
<i>Antazolin HCl</i>	1. Türev, n =5 1. Türev, n =13 2. Türev, n =21 3. Türev, n =21	248, 252 288, 254, 239 277, 296, 308-311, 315 256, 252, 249, 239, 243

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

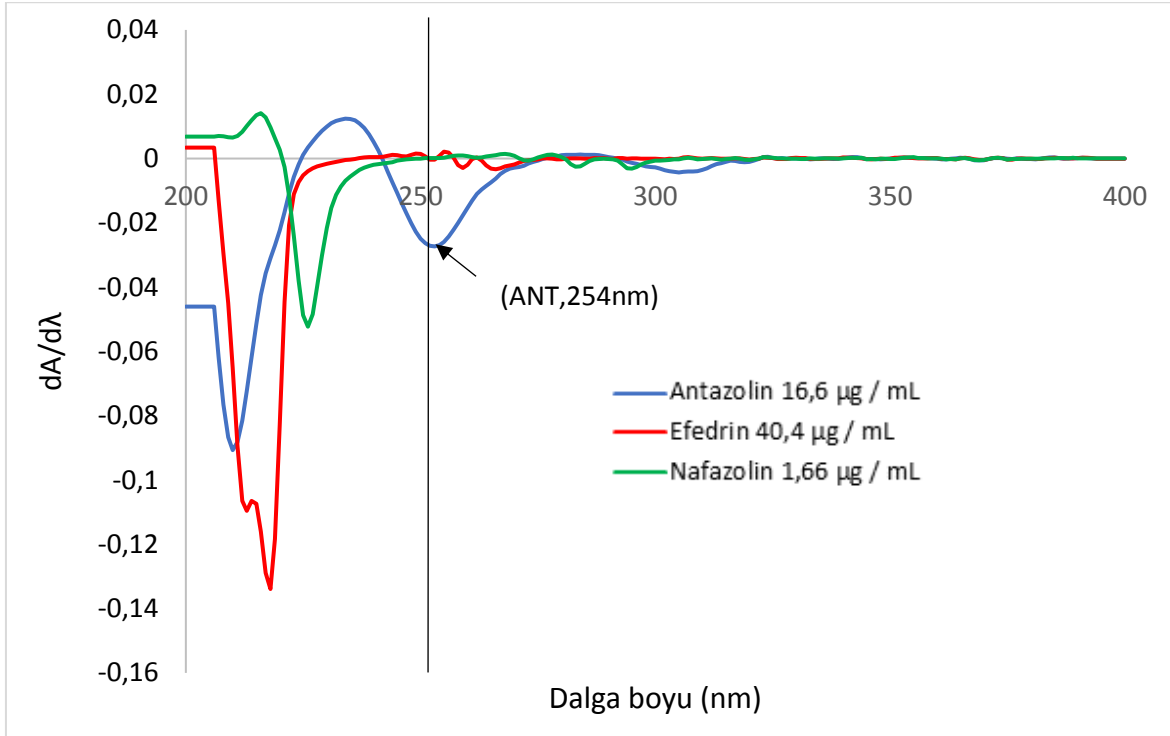
Bölüm 4.3.1’de anlatıldığı gibi taranan dalga boyları arasından *Efedrin HCl* tayini için 3.türev (n=5) 218 nm, *Nafazolin HCl* tayini için 2.türev (n=21) 234 nm, *Antazolin HCl* tayini için 1.türev (n=13) 254 nm dalga boyları seçilmiş ve bu dalga boylarında diğer etken maddelerin türev absorbans değerlerinin sıfır olduğu Şekil 4.34., Şekil 4.35 ve Şekil 4.36’da işaretlenerek gösterilmiştir.



Şekil 4.35. UV Türev Spektrofotometrisi yöntemi ile *EFD* tayini için seçilen türev derecesi ve dalga boyu (3. Türev, n=5, 218 nm)



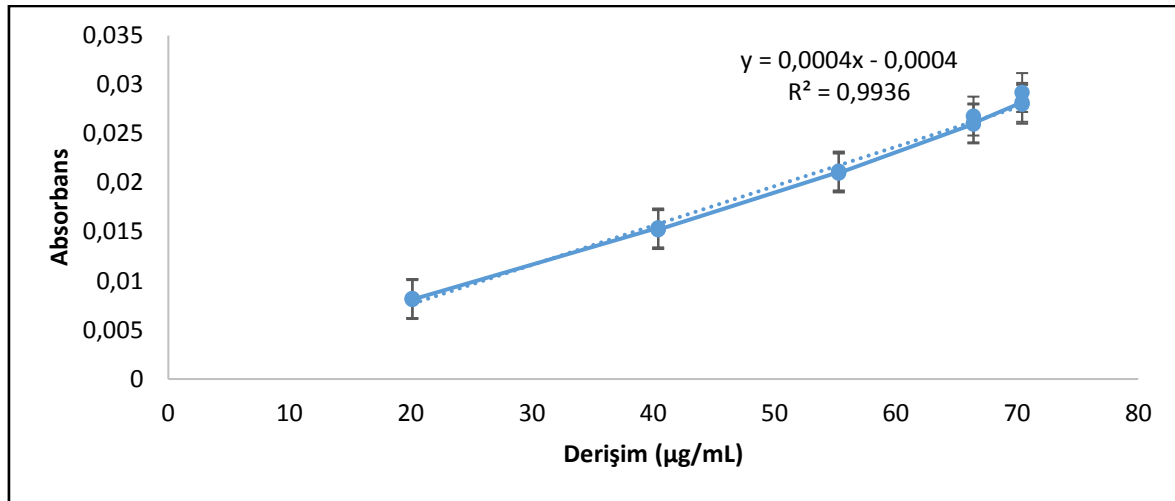
Şekil 4.36. UV Türev Spektrofotometrisi yöntemi ile *NFZ* tayini için seçilen türev derecesi ve dalga boyu (2.türev, $n=21$, 234 nm)



Şekil 4.37. UV Türev Spektrofotometrisi yöntemi ile *ANT* tayini için seçilen türev derecesi ve dalga boyu (1. Türev, $n=13$, 254 nm)

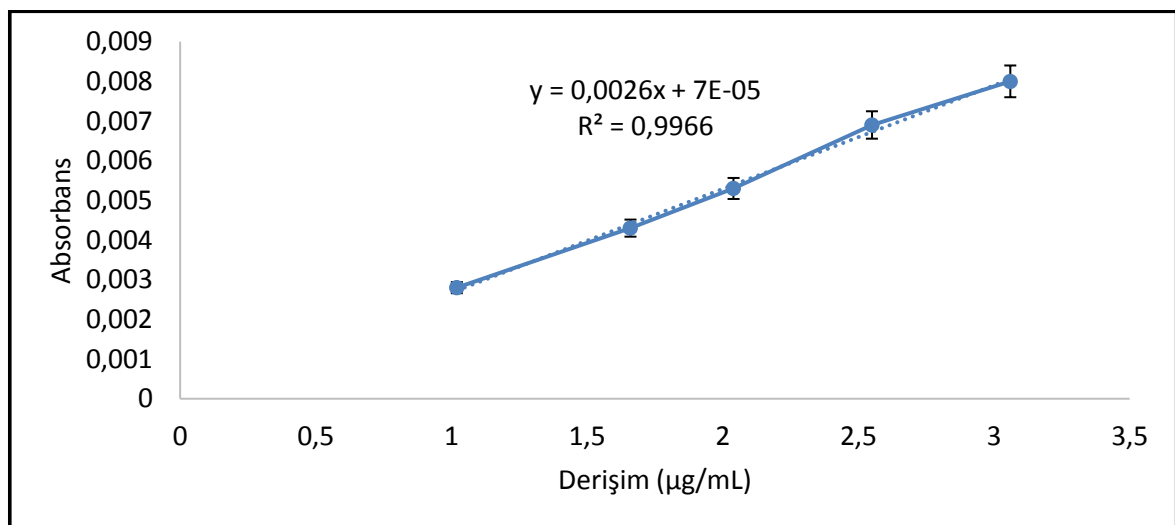
4.3.3. UV Türev spektrofotometrisi yöntemi kalibrasyon grafikleri

Kalibrasyon grafikleri Bölüm 3.2.8.'de anlatıldığı şekilde çizildi. UV Türev spektrofotometrisi yöntemi ile *Efedrin HCl* tayini için 3.türev (n=5) 218 nm'de çizilen kalibrasyon grafiği şekil 4.34'de gösterilmiştir.



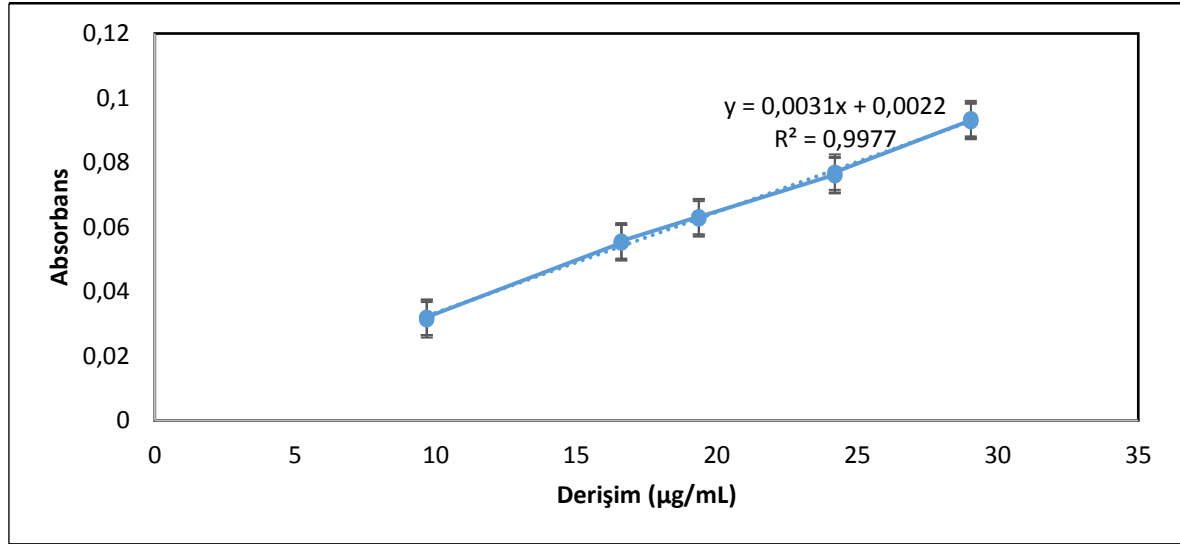
Şekil 4.32. UV Türev Spektrofotometrisi yöntemi ile (3. Türev, n=5, 218 nm) *EFD* tayininde kullanılan kalibrasyon grafiği, Derişim aralığı = 20,0-70,0 µg/mL

UV Türev spektrofotometrisi yöntemi ile *Nafazolin HCl* tayini için 2.türev (n=21) 234 nm'de çizilen kalibrasyon grafiği şekil 4.35'de gösterilmiştir.



Şekil 4.33. UV Türev Spektrofotometrisi yöntemiyle (2.türev, n=21, 234 nm) *NFZ* tayininde kullanılan kalibrasyon grafiği, Derişim aralığı = 1,0-3,0 µg/mL

UV Türev spektrofotometrisi yöntemi ile *Antazolin HCl* tayini için 1.türev (n=13) 254 nm’de çizilen kalibrasyon grafiği şekil 4.36’de gösterilmiştir.



Şekil 4.34. UV Türev Spektrofotometrisi yöntemi ile (1. Türev, n=13, 254 nm) *ANT* tayininde kullanılan kalibrasyon grafiği, Derişim aralığı = 10,0-30,0 µg/mL

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

Çizelge 4.2. UV Türev spektrofotometrik yöntemin analitik parametreleri

	<i>Efedrin HCl</i>	<i>Nafazolin HCl</i>	<i>Antazolin HCl</i>
Doğrusal Aralık	20,0-70,0 (µg/mL)	1,0-3,0 (µg/mL)	10,0-30,0 (µg/mL)
Regresyon Denklemi	$y = 0.0004x - 0,0004$	$y = 0.0026x + 7 \times 10^{-5}$	$0.0031x + 0.0022$
Determinasyon katsayısı (R^2)	$R^2 = 0.9936$	$R^2 = 0.9966$	0.9977
LOD (µg/mL)	3.95	0.19	0.92
LOQ (µg/mL)	11.97	0.59	2.79

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) <i>Efedrin HCl</i> : 55,33 µg/mL <i>Nafazolin HCl</i> : 1,66 µg/mL <i>Antazolin HCl</i> : 16,66 µg/mL	<i>Efedrin HCl</i>	BULUNAN (µg/mL) <i>Nafazolin HCl</i>	<i>Antazolin HCl</i>
	55,37	1,67	16,87
	55,56	1,70	16,97
	55,40	1,73	17,00
	55,27	1,72	16,63
	55,53	1,63	16,73
	55,37	1,73	16,72
Ortalama	55,41	1,69	16,82
Ortalamanın Standart Hatası	0,13	0,05	0,18
SS	0,32	0,12	0,44
%BSS	0,19	2,37	0,87
%BH	-0,14	-1,8	-0,92
GA* (p=0,05)	55,30-55,53	1,59-1,8	16,66-16, 97

*GA: Güven Aralığı

Çizelge 4.4. Gün içi tekrarlanabilirlik çalışması sonuçları

EKLENEN (µg/mL) <i>Efedrin HCl</i> : 55,33 µg/mL <i>Nafazolin HCl</i> : 1,66 µg/mL <i>Antazolin HCl</i> : 16,66 µg/mL	<i>Efedrin HCl</i>	BULUNAN (µg/mL) <i>Nafazolin HCl</i>	<i>Antazolin HCl</i>
	55,30	1,77	17,00
	55,43	1,93	16,96
	55,46	1,63	16,83
	55,73	1,66	16,76
	55,60	1,67	16,93
	55,50	1,70	16,73
Ortalama	55,51	1,71	16,87
Ortalamanın Standart Hatası	0,18	0,17	0,13
SS	0,44	0,19	0,33
%BSS	0,27	3,77	0,65
%BH	-0,31	-2,4	-1,24
GA (p=0,05)	55,35-55,66	1,63-1,77	16,75-16,98

4.3.5. UV Türev spektrofotometrik yöntem ile farmasötik pomadda etken madde miktar tayini sonuçları

UV türev spektrofotometrik yöntem ile farmasötik pomadda 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. Farmasötik pomadda *Efedrin HCl* miktar tayini sonuçları

Numune No.	<i>Efedrin HCl</i>	
	Bulunan miktar (mg/g)	Belirtilen miktar (8,33 mg/g)
1	8,13	$X_{ort} = 8,32$ $SS = 0,18$ $\%BSS = 2,11$ $\%BH = -0,12$ $GA = 8,10-8,54$ (p=0,05)
2	8,56	
3	8,43	
4	8,17	
5	8,29	

Çizelge 4.6. Farmasötik pomadda *Nafazolin HCl* miktar tayini sonuçları

Numune No	<i>Nafazolin HCl</i>	
	Bulunan miktar (mg/g)	Belirtilen miktar (0,25 mg/g)
1	0,245	$X_{ort} = 0,2476$ $SS = 0,003$ $\%BSS = 1,5$ $\%BH = -1,2$ $GA = 0,24-0,25$ (p=0,05)
2	0,251	
3	0,243	
4	0,247	
5	0,252	

Çizelge 4.7. Farmasötik pomadda *Antazolin HCl* miktar tayini sonuçları

Numune No	<i>Antazolin HCl</i>	
	Bulunan miktar (mg/g)	Belirtilen miktar (2,5 mg/g)
1	2,53	$X_{ort} = 2,51$ $SS = 0,0665$ $\%BSS = 2,6$ $\%BH = 0,4$ $GA = 2,42-2,59$ (p=0,05)
2	2,46	
3	2,58	
4	2,43	
5	2,57	

4.3.6. UV Türev spektrofotometrik yöntem ile geri kazanım sonuçları

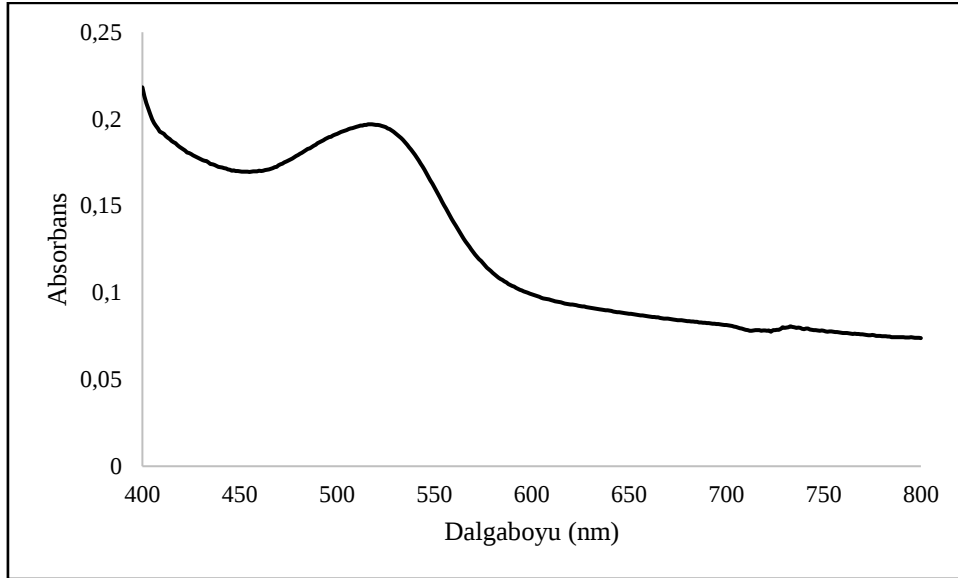
UV türev spektrofotometrik yöntem ile geri kazanım çalışması, Bölüm 3.2.10'da anlatıldığı şekilde, her bir etken madde için 3 farklı derişimde yapılmış ve sonuçlar Çizelge 4.8'de verilmiştir.

Çizelge 4.8. Farmasötik pomadda UV türev spektrofotometrik yöntemle geri kazanım sonuçları

	Gerçek Değer (µg/mL)	Bulunan Değer (µg/mL)	% Geri Kazanım	%BSS	%BH
<i>Efedrin HCl</i>	44,0	45,00	102,27	2,4	-0,86
		43,30	98,40		
		45,30	102,95		
	55,0	54,30	98,72	1,94	-0,83
		54,66	99,38		
		56,30	102,3		
	66,0	64,33	97,46	1,56	-0,80
		65,00	98,48		
		66,30	100,45		
<i>Nafazolin HCl</i>	1,33	1,34	100,75	1,5	-0,083
		1,30	97,74		
		1,33	99,35		
	1,67	1,63	97,60	1,2	-0,067
		1,62	97,00		
		1,66	99,40		
	2,00	2,017	100,89	1,0	-0,056
		2,028	101,40		
		1,98	99,00		
<i>Antazolin HCl</i>	13,30	13,40	100,78	3,95	0,033
		13,50	101,5		
		13,06	98,20		
	16,67	17,00	101,97	3,46	0,0013
		16,00	95,98		
		16,84	101,02		
	20,00	19,89	99,47	2,88	-0,016
		20,66	103,30		
		19,65	98,25		

4.4. Kloreton tayini için renklendirme reaktifi seçimi çalışmaları

Efedrin HCl, *Nafazolin HCl* ve *Antazolin HCl* varlığında, renklendirme reaktifi olarak piridin kullanarak kolorimetrik yöntemle *Kloreton* tayini, Bölüm 3.2.12’de anlatıldığı gibi yapılmış, ön çalışmalar çizelge 4.9.’da verilmiştir. *Kloreton*’un kolorimetrik spektrumu Şekil 4.35’de görülmektedir.



Şekil 4.35. 100 µg/mL *Kloreton*'un kolorimetrik spektrumu (Renklendirme ajanı: Piridin)

Çizelge 4.9. Renklendirme reaktifi ön çalışma sonuçları

Reaktif (Piridin) ile Muamele Edilen Madde	Çözücü: Metanol/Su	Çözücü: Asetonitril/Su	Çözücü: Su
<i>Kloreton</i>	-	Pembe renk elde edildi	-
<i>Efedrin HCl</i>	-	-	-
<i>Antazolin HCl</i>	-	-	-
<i>Nafazolin HCl</i>	-	-	-
Standartlar karışımı	-	Pembe renk elde edildi	-
Farmasötik Pomad	-	Pembe renk elde edildi	-

4.4.1. Kolorimetrik tayinde piridin miktarının etkisi

Kolorimetik yöntem ile *Kloreton* tayinine piridin miktarının etkisi, Bölüm 3.2.12.'de anlatıldığı gibi araştırılmış, sonuçlar, Çizelge 4.10'da verilmiştir.

Çizelge 4.10. Kolorimetrik tayine Piridin miktarının etkisi

Aynı miktar numuneye eklenen piridin miktarı, mL	Ölçülen absorbans
0,5	0,150
1,0	0,240
1,5	0,239
2,0	0,241

4.4.2. Kolorimetrik tayinde NaOH miktarının etkisi

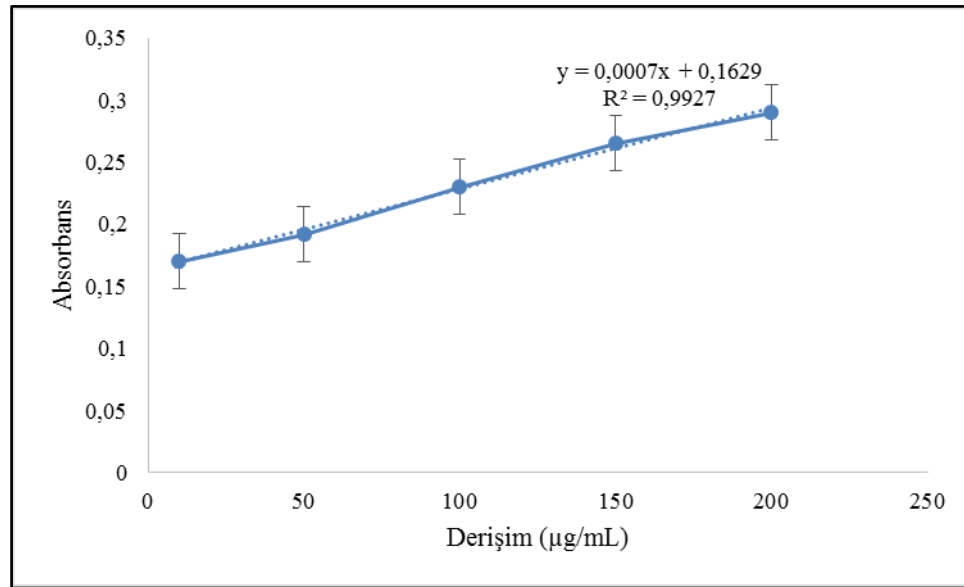
Kolorimetrik yöntem ile *Kloreton* tayinine NaOH miktarının etkisi, Bölüm 3.2.12.'de anlatıldığı gibi araştırılmış, sonuçlar, Çizelge 4.11'de verilmiştir.

Çizelge 4.11. Kolorimetrik tayinde NaOH miktarının etkisi

Aynı miktar numuneye eklenen NaOH miktarı, mL	Ölçülen absorbans
0,5	0,240
1,0	0,240
1,5	0,240
2,0	0,240

4.4.3. Kolorimetrik yöntemle *Kloreton* Kalibrasyon grafiği

Kolorimetrik yöntemle *Kloreton* Kalibrasyon grafiği Şekil 4.34'de gösterilmiştir.



Şekil 4.36. Kolorimetrik yöntemle *Kloreton* kalibrasyon grafiği, Derişim aralığı=10,0-200,0 µg/mL

4.4.4. Kolorimetrik yöntemde analitik parametreler

Kolorimetrik yöntem ile *Kloreton* tayininde analitik parametreleri belirlemek için 5 farklı derişimde piridin ile renklendirme yapıldıktan sonra 540 nm de absorbans değeri ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar çizelge 4.12 de verilmiştir.

Çizelge 4.12. Kolorimetrik tayinin analitik parametreleri

Numune No.	Derişim µg/mL	Absorbans
1	10,0	0,17
2	50,0	0,19
3	100,0	0,24
4	150,0	0,27
5	200,0	0,29
Doğrusal Aralık µg/mL	10,0-200,0	
Regresyon Denklemi	$y = 0,0007x + 0,1629$	
Regresyon katsayısı (R)	0,9927	
LOD µg/mL	0,96	
LOQ µg/mL	2,92	

4.4.5. Kolorimetrik yöntemde miktar tayini sonuçları

Kolorimetrik yöntem ile farmasötik pomadda *Kloreton* miktar tayini Bölüm 3.2.12.'de anlatıldığı şekilde yapılmış, sonuçlar çizelge 4.13 de verilmiştir.

Çizelge 4.13. Farmasötik pomadda *Kloreton* miktar tayini sonuçları

Numune No	<i>Kloreton</i>	
	Bulunan miktar (mg/g)	Belirtilen miktar = 8,33 (mg/g)
1	8,21	$X_{ort} = 8,19$ $SS = 0,1863$ $\%BSS = 2,27$ $\%BH = -1,68$ $GA = 7,95 - 8,42$ ($p = 0.05$)
2	8,11	
3	8,13	
4	8,5	
5	8,01	

4.4.6. Kolorimetrik yöntemde tekrarlanabilirlik çalışması sonuçları

Kolorimetrik yöntem ile *Kloreton* tayininde günler arası ve gün içi tekrarlanabilirlik çalışmaları, Bölüm 3.2.12'de anlatıldığı gibi yapılmış, sonuçlar Çizelge 4.14 ve Çizelge 4.15' de verilmiştir.

Çizelge 4.14. Günler arası tekrarlanabilirlik çalışması sonuçları

EKLENEN <i>Kloreton</i> : 166,00 µg/mL	BULUNAN <i>Kloreton</i> (µg/mL)
	165,70
	163,00
	169,80
	165,40
	165,80
	166,20
	Ortalama
Ortalama	165,90
Ortalamanın Standart Hatası	0,0089
SS	0,0022
%BSS	1,31
GA (p=0,05)	-167,90-168,80

Çizelge 4.15. Gün içi tekrarlanabilirlik çalışması sonuçları

EKLENEN <i>Kloreton</i> : 166,00 µg/mL	BULUNAN <i>Kloreton</i> (µg/mL)
	165,7
	165,3
	168,4
	165,5
	164,9
	166,3
	Ortalama
Ortalama	166,0
Ortalamanın Standart Hatası	0,0005
SS	0,0013
%BSS	0,75
GA (p=0,05)	164,6-167,3

4.4.7. Kolorimetrik yöntemde geri kazanım çalışması sonuçları

Kolorimetrik yöntem ile *Kloreton* tayininde geri kazanım çalışmaları, Bölüm 3.2.12’de anlatıldığı gibi yapılmış, sonuçlar Çizelge 4.16’da verilmiştir.

Çizelge 4.16. *Kloreton* geri kazanım sonuçları

	Spike Yüzdesi	Gerçek Değer µg/mL	Bulunan Değer µg/mL	% Geri Kazanım	%BSS	%BH
<i>Kloreton</i>	%25	132	128,4	97,34	0,85	-2,6
			127,4	96,56		
			129,6	98,23		
	%75	166	165,4	99,63	0,87	2,0
			165,6	99,78		
			168,0	101,25		
	%100	199	201,4	99,22	1,63	0,063
			196,5	98,77		
			195,3	98,19		

4.5. RP- HPLC ile *Efedrin HCl*, *Nafazolin HCl*, *Antazolin HCl* ve *Kloreton* Tayini

4.5.1. Yöntemin optimizasyonu

RP - HPLC yönteminde, *Efedrin HCl*, *Nafazolin HCl*, *Antazolin HCl* ve *Kloreton* miktar tayinlerinde uygun koşulların belirlenmesi amacıyla mobil faz bileşimi, tampon pH'sı ve derişimi, akış hızı, enjeksiyon hacmi, kolon sıcaklığı gibi parametreler incelendi. Kromatografik sistemde optimize edilen koşullarda t_0 değerinin bulunması için sisteme metanol enjekte edildi ve metanolün alıkonma zamanı t_0 olarak alındı.

Dedektör seçimi

Farmasötik pomadda aynı yöntemle tayin edilmek istenen *Efedrin HCl*, *Nafazolin HCl*, *Antazolin HCl* ve *Kloreton* 'un absorpsiyon verdiği 210 nm dedeksiyon dalga boyu olarak seçildi ve UV dedektör kullanıldı.

Sabit fazın belirlenmesi

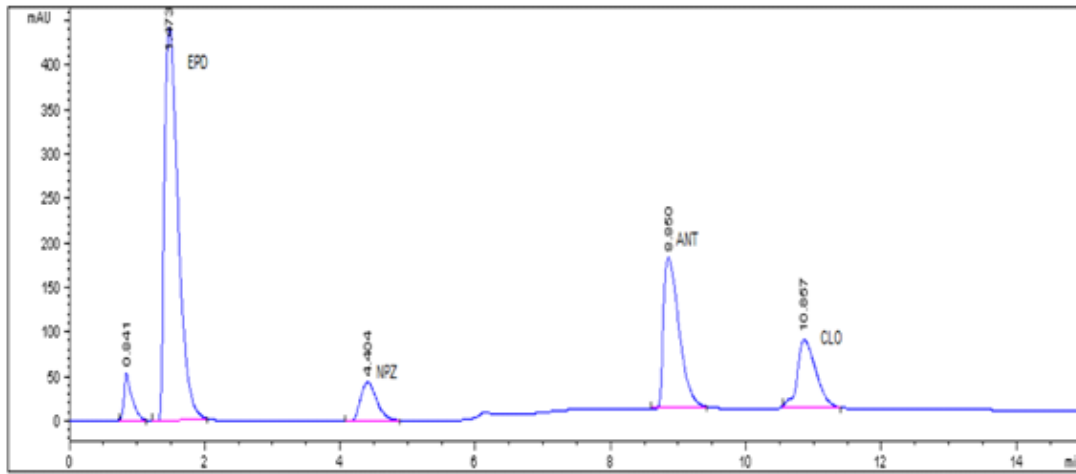
Efedrin HCl, *Nafazolin HCl*, *Antazolin HCl* ve *Kloreton* apolar yapıda moleküller olduğundan ters faz sıvı kromatografide kullanılan C18 HPLC kolonu kullanıldı.

Mobil fazın belirlenmesi

pH'sı 3 olan fosfat tamponu çözeltisi ile metanol sırasıyla 80: 20 oranında sisteme mobil faz olarak verildi ve bu koşullarda *Efedrin HCl*, *Nafazolin HCl*, *Antazolin HCl* ve *Kloreton* için analiz süresi 30 dakika oldu. Bu şartlarda, *Efedrin HCl* ve *Nafazolin HCl* ilk 5 dakikada kolondan çıkarken *Antazolin HCl* ve *Kloreton* 25 dakikada, nispeten daha geç çıktı. Bu nedenle, mobil faz A: pH 3 fosfat tamponu ve mobil faz B: metanol olan gradiyent elüsyon sistemi denendi ve Çizelge 4.17 de belirtilen gradiyent elüsyon koşullarında en iyi ayırım elde edildi. Bu şartlarda analiz süresi de 13 dakikaya indirilmiş oldu. Elde edilen kromatogram, Şekil 4.37'de görülmektedir.

Çizelge 4.17. Gradyent elüsyon sistemi

Zaman(dak)	Mobil faz %A	Mobil faz %B
0	80,0	20,0
3	80,0	20,0
3,1	75,0	25,0
3,5	70,0	30,0
4,0	65,0	35,0
4,5	65,0	35,0
5,0	60,0	40,0
12,0	60,0	40,0
13,0	80,0	20,0

Şekil 4.37. *Efedrin HCl*, *Nafazolin HCl*, *Antazolin HCl* ve *Kloreton* içeren karışıma ait kromatogramTampon pH'sının belirlenmesi

Mobil faz pH'sının en uygun olduğu değerin saptanması amacıyla fosfat tamponunun pH değeri 2,0; 3,0; 4,0 ve 5,0 olarak değiştirildi. pH değişiminin kromatografik parametrelere etkisi Çizelge 4.18'de verilmiştir.

Çizelge 4.18. *Efedrin HCl*, *Nafazolin HCl*, *Antazolin HCl* ve *Kloreton* tayininde mobil faz bileşeni fosfat tamponunun pH'sının kromatografik parametrelere etkisi

pH		2	3	4	5
<i>Efedrin HCl</i>	t_R (dak)	1,40	1,47	1,64	1,51
	$R_{EFD-NFZ}$	2,22 _{EFD-NFZ}	2,25 _{EFD-NFZ}	1,93 _{EFD-NFZ}	1,64 _{EFD-NFZ}
	N	2310	2590	2660	1470
	P_{As}	0,61	1,02	1,20	1,23
<i>Nafazolin HCl</i>	t_R (dak)	4,22	4,40	4,65	4,72
	$R_{NFZ-ANT}$	10,00 _{NFZ-ANT}	10,55 _{NFZ-ANT}	11,28 _{NFZ-ANT}	8,2 _{NFZ-ANT}
	N	1669	2720	2213	1364
	P_{As}	0,91	1,13	1,19	1,12
<i>Antazolin HCl</i>	t_R (dak)	8,55	8,84	8,85	9,04
	$R_{ANT-KLO}$	7,20 _{ANT-KLO}	7,41 _{ANT-KLO}	6,93 _{ANT-KLO}	6,34 _{ANT-KLO}
	N	6360	7219	12452	4517
	P_{As}	0,54	1,15	1,4	0,97
<i>Kloreton</i>	t_R (dak)	10,63	10,84	11,03	11,35
	N	5839	8096	7871	3831
	P_{As}	0,60	1,11	1,70	1,66

Kromatografik koşullar: Mobil faz: 10 mM fosfat tamponu / Metanol, akış hızı: 0,6 mL/dk, 16,6 µg/mL EFD, 0,25 µg/mL NFZ, 2,5 µg/mL ANT, 16,6 µg/mL KLO içeren standart çözelti

Buna göre en iyi ayırımın sağlandığı mobil faz pH 3,0 10,0 mM fosfat tamponu/metanol, (gradyent elüsyon) olarak belirlendi.

Tampon derişiminin belirlenmesi

Fosfat tamponu derişiminin analize etkisinin araştırılması için pH'sı 3,0 olan 5,0 mM, 10,0 mM, 15,0 mM ve 20,0 mM fosfat tamponu ve metanol Çizelge 4.19 da belirtilen gradiyent elüsyon sistemi uygulanarak, mobil faz olarak denendi. Bu koşullarda elde edilen kromatografik bulgular Çizelge 4.19'da verilmiştir.

Çizelge 4.19. *Efedrin HCl*, *Nafazolin HCl*, *Antazolin HCl*, *Kloreton* tayininde mobil faz bileşeni fosfat tamponu derişiminin kromatografik parametrelere etkisi

Tampon Derişimi		5,0 mM	10,0 mM	15,0 mM	20,0 mM
<i>Efedrin HCl</i>	t_R (dak)	1,34	1,47	1,53	1,54
	$R_{EFD-NFZ}$	1,86 _{EFD-NFZ}	2,25 _{EFD-NFZ}	2,33 _{EFD-NFZ}	2,45 _{EFD-NFZ}
	N	1800	2590	2880	2930
	P_{As}	0,61	1,02	1,01	1,20
<i>Nafazolin HCl</i>	t_R (dak)	3,99	4,40	4,74	4,66
	$R_{NFZ-ANT}$	6,42 _{NFZ-ANT}	10,55 _{NFZ-ANT}	10,81 _{NFZ-ANT}	11,21 _{NFZ-ANT}
	N	1389	2720	2884	2017
	P_{As}	8,13	1,13	1,02	0,6
<i>Antazolin HCl</i>	t_R (dak)	8,58	8,84	9,14	9,10
	$R_{ANT-KLO}$	6,42 _{ANT-KLO}	7,41 _{ANT-KLO}	8,06 _{ANT-KLO}	8,17 _{ANT-KLO}
	N	4896	7219	9498	9017
	P_{As}	0,49	1,15	1,2	2,08
<i>Kloreton</i>	t_R (dak)	10,55	10,84	11,44	11,31
	N	3458	8096	8145	8501
	P_{As}	0,81	1,11	1,05	1,92

Kromatografik koşullar: Mobil faz: pH 3,0 fosfat tamponu/Metanol, akış hızı: 0,6 mL/dk, 16,6 µg/mL EFD, 0,25 µg/mL NFZ, 2,5 µg/mL ANT, 16,6 µg/mL KLO içeren standart çözelti

Kolon sıcaklığının belirlenmesi

HPLC sisteminde 25, 30, 35, 40 ve 45°C kolon sıcaklıklarında analiz yapılmış ve elde edilen kromatografik parametreler Çizelge 4.20’de verilmiştir.

Çizelge 4.20. Kolon sıcaklığının kromatografik parametrelere etkisi

Kolon Sıcaklığı (°C)		25	30	35	40	45
<i>Efedrin HCl</i>	t_R (dak)	1,73	1,67	1,50	1,40	1,47
	$R_{EFD-NFZ}$	3,08 _{EFD-NFZ}	3,00 _{EFD-NFZ}	2,62 _{EFD-NFZ}	2,25 _{EFD-NFZ}	2,23 _{EFD-NFZ}
	N	3470	3400	3140	2590	3010
	P_{As}	1,60	1,70	1,40	1,20	1,69
<i>Nafazolin HCl</i>	t_R (dak)	6,17	5,79	5,24	4,40	4,20
	$R_{NFZ-ANT}$	12,97 _{NFZ-ANT}	10,97 _{NFZ-ANT}	9,04 _{NFZ-ANT}	7,41 _{NFZ-ANT}	7,32 _{NFZ-ANT}
	N	6215	3501	2182	2720	1691
	P_{As}	1,66	1,28	1,20	1,02	1,25
<i>Antazolin HCl</i>	t_R (dak)	10,86	10,20	9,68	9,14	8,70
	$R_{ANT-KLO}$	11,75 _{ANT-KLO}	10,62 _{ANT-KLO}	10,37 _{ANT-KLO}	10,55 _{ANT-KLO}	11,85 _{ANT-KLO}
	N	8108	8715	9185	9498	10378
	P_{As}	1,49	1,60	1,50	1,50	2,01
<i>Kloreton</i>	t_R (dak)	14,56	13,29	12,33	10,85	10,62
	N	6742	7196	7977	8096	8772
	P_{As}	1,49	1,60	1,70	1,50	1,50

Kromatografik koşullar: Mobil faz: 15 mM pH 3,0 fosfat tamponu/Metanol, akış hızı: 0,6 mL/dk, 16,6 µg/mL EFD, 0,25 µg/mL NFZ, 2,5 µg/mL ANT, 16,6 µg/mL KLO 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 4.21 de verilmiştir.

Çizelge 4.21. Enjeksiyon hacminin kromatografik parametrelere etkisi

Enjeksiyon Hacmi (µL)		1	5	10	15	20
<i>Efedrin HCl</i>	t_R (dak)	1,58	1,56	1,48	1,44	1,56
	$R_{EFD-NFZ}$	3,34 _{EFD-NFZ}	2,92 _{EFD-NFZ}	2,25 _{EFD-NFZ}	0,97 _{EFD-NFZ}	1,83 _{EFD-NFZ}
	N	2893	2514	2590	1220	1380
	P_{As}	2,3	2,0	1,2	1,56	1,13
<i>Nafazolin HCl</i>	t_R (dak)	4,730	4,775	4,610	4,162	4,810
	$R_{NFZ-ANT}$	14,44 _{NFZ-ANT}	13,01 _{NFZ-ANT}	10,55 _{NFZ-ANT}	9,08 _{NFZ-ANT}	7,78 _{NFZ-ANT}
	N	3373	2900	2720	765	790
	P_{As}	0,76	0,69	1,02	1,05	1,03
<i>Antazolin HCl</i>	t_R (dak)	9,23	9,21	9,14	9,09	0,19
	$R_{ANT-KLO}$	11,70 _{ANT-KLO}	10,20 _{ANT-KLO}	8,18 _{ANT-KLO}	4,82 _{ANT-KLO}	5,33 _{ANT-KLO}
	N	15476	12781	9498	11042	6928
	P_{As}	1,88	1,93	1,50	1,40	1,40
<i>Kloreton</i>	t_R (dak)	11,56	11,51	10,85	11,41	11,57
	N	14242	11521	8096	7474	5703
	P_{As}	0,68	0,60	1,50	1,40	1,56

Kromatografik koşullar: Mobil faz: 15 mM pH 3,0 fosfat tamponu/Metanol, akış hızı: 0,6 mL/dk, 16,6 µg/mL EFD, 0,25 µg/mL NFZ, 2,5 µg/mL ANT, 16,6 µg/mL KLO içeren standart çözelti

Mobil faz akış hızının belirlenmesi

HPLC sisteminde 0,5; 0,6; 0,7 ve 0,8 mL/dk mobil faz akış hızlarında analizler yapılmış ve elde edilen kromatografik parametreler Çizelge 4.22 de verilmiştir.

Çizelge 4.22. Mobil faz akış hızının kromatografik parametrelere etkisi

Akış Hızı (mL/dk)		0,5	0,6	0,7	0,8
<i>Efedrin HCl</i>	t_R (dak)	1,8	1,4	1,34	1,14
	$R_{EFD-NFZ}$	2,52 _{EFD-NFZ}	2,25 _{EFD-NFZ}	2,60 _{EFD-NFZ}	2,61 _{EFD-NFZ}
	N	2310	2590	2660	1470
	P_{As}	1,23	1,20	1,60	1,63
<i>Nafazolin HCl</i>	t_R (dak)	5,50	4,40	4,13	3,60
	$R_{NFZ-ANT}$	9,36 _{NFZ-ANT}	10,55 _{NFZ-ANT}	12,58 _{NFZ-ANT}	13,88 _{NFZ-ANT}
	N	1669	2720	2104	1960
	P_{As}	1,05	1,16	1,02	1,04
<i>Antazolin HCl</i>	t_R (dak)	10,10	9,01	8,35	7,80
	$R_{ANT-KLO}$	7,20 _{ANT-KLO}	7,41 _{ANT-KLO}	6,93 _{ANT-KLO}	6,34 _{ANT-KLO}
	N	8549	7219	11353	12523
	P_{As}	1,7	1,5	1,2	1,5
<i>Kloreton</i>	t_R (dak)	12,52	11,41	10,30	9,6
	N	8465	8086	9727	11459
	P_{As}	1,6	1,3	1,2	1,2

Kromatografik koşullar: Mobil faz: 15 mM pH 3,0 fosfat tamponu/Metanol, akış hızı: 0,6 mL/dk, 16,6 µg/mL EFD, 0,25 µg/mL NFZ, 2,5 µg/mL ANT, 16,6 µg/mL KLO içeren standart çözelti

Çizelge 4.23. Optimizasyon çalışmaları sonucunda belirlenen kromatografik koşullar

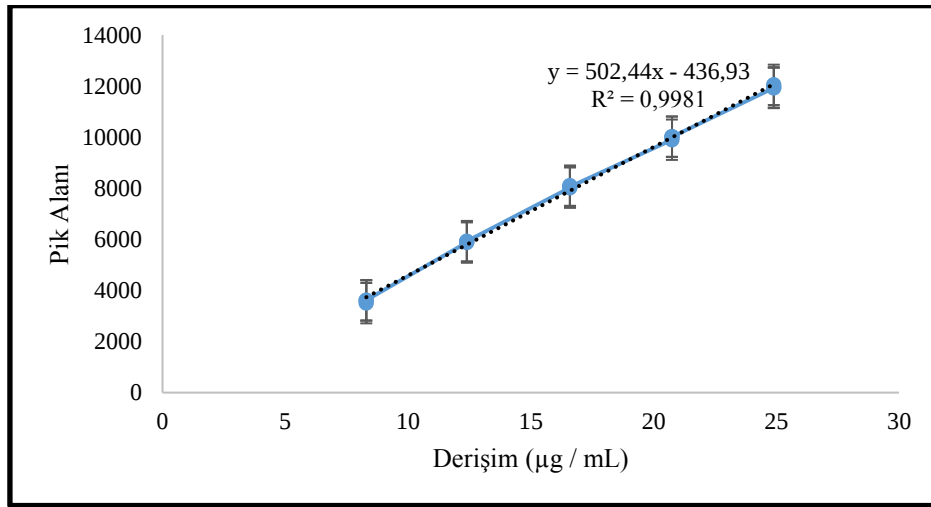
Kolon	Agilent Zorbax Eclipse XDB C18 (3,0 x75mm, 3,5µm)
Kolon sıcaklığı	40°C
Dedektör	UV, 210 nm.
Mobil Faz	pH 3, 15 mM fosfat tamponu/metanol, gradiyent elüsyon
Mobil faz bileşeni fosfat tamponunun pH'sı ve derişimi	pH 3, 15 mM
Mobil faz akış hızı	0,6 mL/dk
Enjeksiyon hacmi	10 µL

RP-HPLC sisteminde optimum koşullarda *Efedrin HCl*, *Nafazolin HCl*, *Antazolin HCl* ve *Kloreton* tayini 13 dakikada gerçekleştirildi.

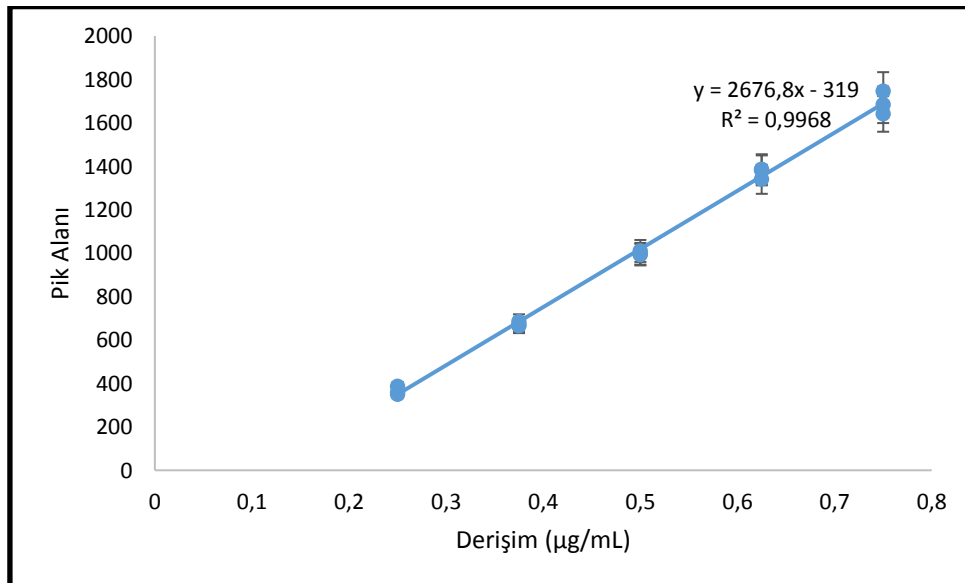
4.5. Yöntem Validasyonu

4.5.1. Kalibrasyon grafikleri

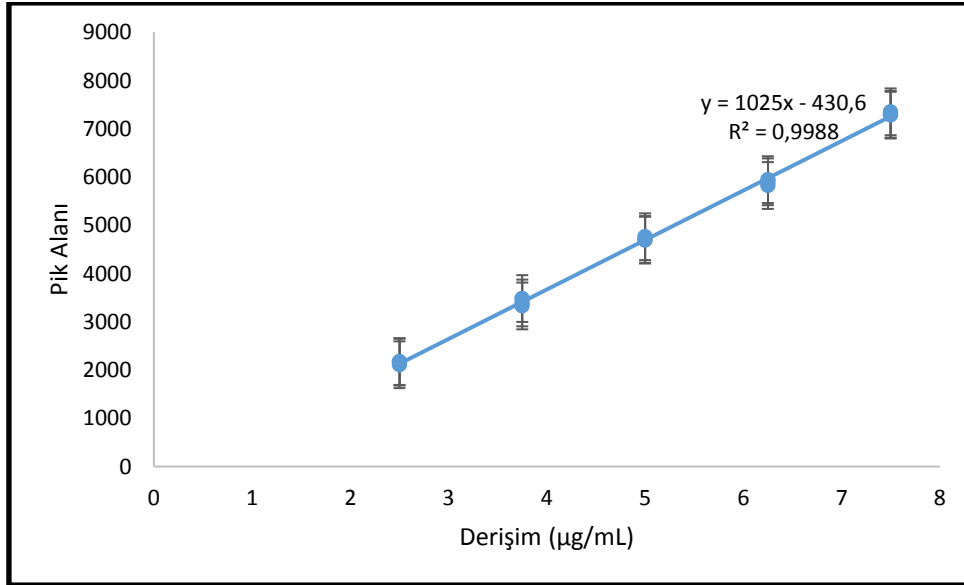
Optimize edilen koşullarda, analitlerin kalibrasyon grafikleri çizilmiş ve kalibrasyon denklemleri elde edilmiştir. Buna göre, *Efedrin HCl*, *Nazfazolin HCl*, *Antazolin HCl* ve *Kloreton* için elde edilen kalibrasyon grafikleri, denklemleri ve regresyon katsayıları ile birlikte, sırasıyla Şekil 4.36, Şekil 4.37, Şekil 4.38, Şekil 4.39 ve Şekil 4.40 da gösterilmiştir.



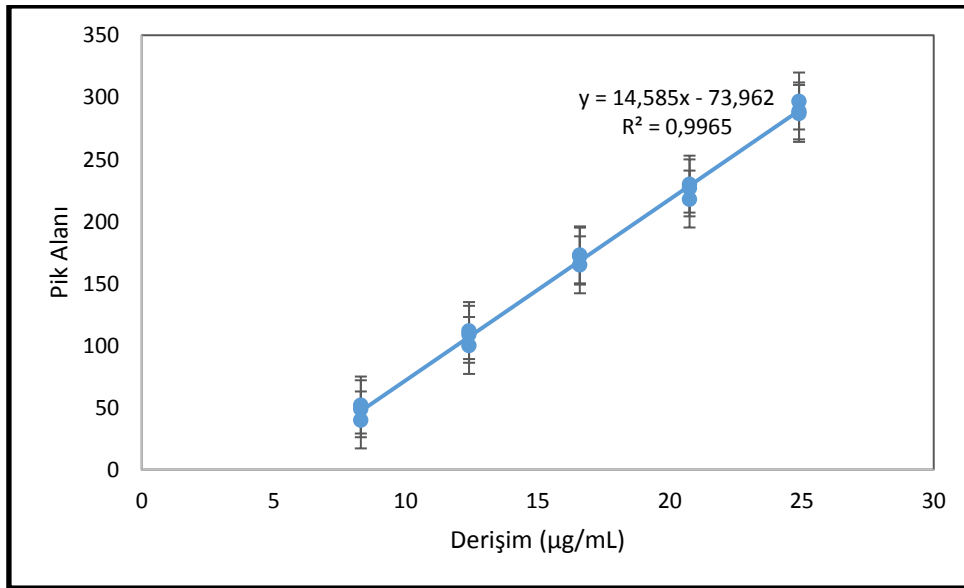
Şekil 4.38. RP - HPLC yöntemi ile *EFD* kalibrasyon grafiği, Derişim aralığı=8,33-24,36 µg/mL



Şekil 4.39. RP - HPLC yöntemi ile *NFZ* kalibrasyon grafiği, Derişim aralığı=0,25- 0,75 µg/mL



Şekil 4.40. RP - HPLC yöntemi ile *ANT* kalibrasyon grafiği, Derişim aralığı =2,5-7,5 µg/mL



Şekil 4.41. RP - HPLC yöntemi ile *KLO* kalibrasyon grafiği, Derişim aralığı =8,33-24,4 µg/mL

Geliştirilen RP-HPLC yönteminde optimize edilen koşullarda elde edilen analitik performans verileri Çizelge 4.24 de verilmiştir.

RP-HPLC yöntemi ile yapılan gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik çalışması sonuçları Çizelge 4.25 ve Çizelge 4.26.'da verilmiştir.

Çizelge 4.24. RP-HPLC yönteminin analitik performans verileri

Analitik performans verileri				
	<i>Efedrin HCl</i>	<i>Nafazolin HCl</i>	<i>Antazolin HCl</i>	<i>Kloreton</i>
Regresyon Denklemi	$y=502,44x-432,69$	$y=2676,8x-319$	$y=1025x-430,6$	$y=14,585x-73,962$
Çalışma Aralığı (µg/mL)	8,33-24,36	0,25- 0,75	2,5-7,5	8,33-24,4
Korelasyon katsayısı(R)	0,9981	0,9968	0,9988	0,9965
LOD (µg/mL)	2,7	0,025	0,66	0,86
LOQ (µg/mL)	8,2	0,083	2,01	2,89

Çizelge 4.25. RP- HPLC yöntemi gün içi tekrarlanabilirlik çalışması sonuçları

Pik Alanı (mAU)	<i>Efedrin HCl</i>	<i>Nafazolin HCl</i>	<i>Antazolin HCl</i>	<i>Kloreton</i>
	8123	1007	4720	170
	8055	988	4702	177
	8067	995	4690	176
	8045	1003	4766	175
	8077	1020	4712	163
	8026	1002	4769	172
Ortalama	8065,5	1004,167	4726,5	172,2
Ortalamanın Standart Hatası	5,53	3,58	13,56	1,93
SS	13,57	8,79	30,41	4,74
%BSS	0,163	0,875	0,644	2,75

Kromatografik koşullar: Mobil faz: 15 mM pH 3,0 fosfat tamponu/Metanol, akış hızı: 0,6 mL/dk, 16,6 µg/mL EFD, 0,25 µg/mL NFZ, 2,5 µg/mL ANT, 16,6 µg/mL KLO içeren standart çözelti

Çizelge 4.26. RP- HPLC yöntemi günler arası tekrarlanabilirlik çalışması

Pik Alanı (mAU)	<i>Efedrin HCl</i>	<i>Nafazolin HCl</i>	<i>Antazolin HCl</i>	<i>Kloreton</i>
	8063	1012	4753	172
	8056	1002	4760	169
	8069	1022	4757	180
	8048	1001	4698	174
	8090	1010	4730	168
	8026	1003	4793	172
Ortalama	8058,67	1008,33	4748,5	172,66
Ortalamanın Standart Hatası	5,53	3,22	13,03	1,59
SS	13,57	8,06	31,93	3,90
%BSS	0,16	0,80	0,67	2,25

Kromatografik koşullar: Mobil faz: 15 mM pH 3,0 fosfat tamponu/Metanol, akış hızı: 0,6 mL/dk, 16,6 µg/mL EFD, 0,25 µg/mL NFZ, 2,5 µg/mL ANT, 16,6 µg/mL KLO içeren standart çözelti

4.5.2. RP - HPLC yönteminin farmasötik pomada uygulanması ve geri kazanım çalışması sonuçları

Pomad numunesinden yapılan ölçümle, pomad 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 pomaddan geri kazanım çalışması yapılmıştır. Geri kazanım çalışma sonuçları Çizelge 4.31’de gösterilmiştir. Her bir analit için pomaddan elde edilen miktar tayini sonuçları, *Efedrin HCl* için Çizelge 4.27, *Nafazolin HCl* için çizelge 4.28, *Antazolin HCl* için Çizelge 4.29 ve *Kloreton* için Çizelge 4.30’da gösterilmiştir.

Çizelge 4.27. Farmasötik pomadlarda *Efedrin HCl* miktar tayini sonuçları

Numune No.	<i>Efedrin HCl</i>	
	Bulunan miktar (mg/g)	Belirtilen miktar 8.33 mg/g
1	8,21	$X_{Ort} = 8,40$ $SS = 0,21$ $\%BSS = 2,39$ $\%BH = 0,86$ $GA = 8,16-8,64$ (p=0,05)
2	8,56	
3	8,67	
4	8,30	
5	8,27	

Çizelge 4.28. Farmasötik pomadlarda *Nafazolin HCl* miktar tayini sonuçları

Numune No.	<i>Nafazolin HCl</i>	
	Bulunan miktar (mg/g)	Belirtilen miktar 0,25 mg/g
1	0,240	$X_{Ort} = 0,25$ $SS = 0,009$ $\%BSS = 3,9$ $\%BH = -0,4$ $GA = 0,23-0,26$ (p=0,05)
2	0,256	
3	0,233	
4	0,249	
5	0,260	

Çizelge 4.29. Farmasötik pomadlarda *Antazolin HCl* miktar tayini sonuçları

Numune No.	<i>Antazolin HCl</i>	
	Bulunan miktar (mg/g)	Belirtilen miktar 2,5 mg/g
1	2,56	$X_{Ort} = 2,45$ $SS = 0,043$ $\%BSS = 1,7$ $\%BH = -1,92$ $GA = 2,39-2,50$ (p=0,05)
2	2,49	
3	2,60	
4	2,51	
5	2,55	

Çizelge 4.30. Farmasötik pomadlarda *Kloreton* miktar tayini sonuçları

Numune No	<i>Kloreton</i>	
	Bulunan miktar (mg/g)	Belirtilen miktar 8.33 mg/g
1	8,42	$X_{Ort} = 8,55$ $SS = 0,1022$ $\%BSS = 1,19$ $\%BH = 2,64$ $GA = 8,42-8,68 (p=0,05)$
2	8,65	
3	8,54	
4	8,61	
5	8,39	

RP - HPLC ile geri kazanım çalışmaları Bölüm 3.3.5’de anlatıldığı şekilde yapılmış ve sonuçlar, Çizelge 4.31.’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.31. RP - HPLC ile geri kazanım çalışması sonuçları

	Gerçek Değer (mg/g)	Bulunan Değer (mg/g)	% Geri Kazanım	% BSS	% BH
<i>Efedrin HCl</i>	0,132	0,1309 0,1302 0,1319	99,24 98,68 99,94	0,62	-0,75
	0,166	0,1669 0,1647 0,1671	100,56 99,23 100,70	0,8	0,14
	0,199	0,1986 0,1975 0,1997	99,81 99,23 100,39	0,58	-0,20
<i>Nafazolin HCl</i>	0,004	0,00402 0,00399 0,003974	100,59 99,82 99,35	0,62	-0,125
	0,005	0,004922 0,004978 0,005037	98,45 99,56 100,74	1,14	-0,42
	0,006	0,006053 0,006084 0,005949	100,89 101,40 99,16	1,16	0,48
<i>Antazolin HCl</i>	0,04	0,0403 0,03896 0,03928	100,78 97,4 98,2	1,78	-1,21
	0,05	0,05025 0,04980 0,05051	100,5 99,61 101,02	0,71	0,374
	0,06	0,05968 0,05952 0,05896	99,47 99,21 98,27	0,63	-1,02
<i>Kloreton</i>	0,132	0,1284 0,1274 0,1296	97,34 96,56 98,23	0,85	-2,67
	0,166	0,1654 0,1656 0,1680	99,63 99,78 101,25	0,88	0,2
	0,199	0,2014 0,1965 0,1953	99,22 98,77 98,19	0,52	-0,63

Kromatografik koşullar: Mobil faz: 15 mM pH 3,0 fosfat tamponu/Metanol, akış hızı: 0,6 mL/dk

4.5.3. 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 4.32’de verilmiştir. 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 gösterildi (Çizelge 4.32).

Çizelge 4.32. RP - HPLC yönteminde elde edilen SUT sonuçları

	t_R (dk)	R	N	P_{As}	Pik Alanı	Pik Yüksekliği
<i>Efedrin HCl</i>	1,47	2,33 _{EFD-NFZ}	2590	1,02	8061	411
<i>Nafazolin HCl</i>	4,40	8,06 _{NFZ-ANT}	2720	1,13	1000	40
<i>Antazolin HCl</i>	8,55	10,81 _{ANT-KLO}	7219	1,15	4720	328
<i>Kloreton</i>	10,84		8096	1,11	170	14

4.5.4. Sağlamlık çalışmaları

Geliştirilen yöntemin sağlamlık çalışmalarında tampon pH’sı, akış hızı ve dedektör dalga boyunda yapılan küçük değişiklikler sonucunda *Efedrin HCl*, *Nafazolin HCl*, *Antazolin HCl* ve *Kloreton*’un analizi Bölüm 3.3.6’da anlatıldığı şekilde yapılmıştır. Bu değişikliklerinin sistem uygunluk parametrelerine etkisi Çizelge 4.33, Çizelge 4.34 ve Çizelge 4.35 de gösterilmiştir.

Çizelge 4.33. RP - HPLC yönteminde tampon pH’sının sağlamlığa etkisi

Etken Madde	Kromatografik Parametreler	Tampon pH’sı		
		2,9	3	3,1
<i>Efedrin HCl</i>	t_R (dk)	1,38	1,4	1,46
	$R_{EFD-NFZ}$	2,45	2,25	2,35
	N	2550	2590	2490
	P_{As}	1,2	1,2	1,22
<i>Nafazolin HCl</i>	t_R (dk)	4,39	4,4	4,44
	$R_{NFZ-ANT}$	7,05	7,41	7,6
	N	2850	2720	2789
	P_{As}	1,2	1,16	1,18
<i>Antazolin HCl</i>	t_R (dk)	8,93	9,01	9,00
	$R_{ANT-KLO}$	10,89	10,55	10,66
	N	7289	7219	7300
	P_{As}	1,4	1,5	1,5
<i>Kloreton</i>	t_R (dk)	11,20	11,41	11,38
	N	8122	8086	8190
	P_{As}	1,2	1,3	1,3

Kromatografik koşullar: Mobil faz: 15 mM pH 3,0 fosfat tamponu/Metanol, akış hızı: 0,6 mL/dk, 16,6 µg/mL EFD, 0,25 µg/mL NFZ, 2,5 µg/mL ANT, 16,6 µg/mL KLO içeren standart çözelti

Çizelge 4.34. RP-HPLC yönteminde mobil faz akış hızının sağlamlığa etkisi

Etken Madde	Kromatografik Parametreler	Mobil faz akış hızı (mL/dk)		
		0,58	0,6	0,62
<i>Efedrin HCl</i>	t_R (dk)	1,48	1,44	1,45
	$R_{EFD-NFZ}$	2,38	2,25	2,46
	N	2678	2590	2817
	P_{As}	1,2	1,2	1,2
<i>Nafazolin HCl</i>	t_R (dk)	4,2	4,4	4,47
	$R_{NFZ-ANT}$	7,01	7,41	7,35
	N	2734	2720	2889
	P_{As}	1,2	1,16	1,18
<i>Antazolin HCl</i>	t_R (dk)	8,96	9,01	9,20
	$R_{ANT-KLO}$	10,43	10,55	10,34
	N	7890	7219	7248
	P_{As}	1,4	1,5	1,5
<i>Kloreton</i>	t_R (dk)	11,51	11,41	11,26
	N	8094	8086	8079
	P_{As}	1,3	1,3	1,3

Kromatografik koşullar: Mobil faz: 15 mM pH 3,0 fosfat tamponu/Metanol, akış hızı: 0,6 mL/dk, 16,6 µg/mL EFD, 0,25 µg/mL NFZ, 2,5 µg/mL ANT, 16,6 µg/mL KLO içeren standart çözelti

Çizelge 4.35. RP-HPLC yönteminde UV dedektör dalga boyunun sağlamlığa etkisi

Etken Madde	Kromatografik Parametreler	Dalga boyu (nm)		
		209	210	211
<i>Efedrin HCl</i>	t_R (dk)	1,48	1,44	1,5
	$R_{EFD-NFZ}$	2,05	2,25	2,30
	N	2570	2590	2610
	P_{As}	1,2	1,2	1,2
<i>Nafazolin HCl</i>	t_R (dk)	4,3	4,4	4,56
	$R_{NFZ-ANT}$	7,34	7,41	7,48
	N	2789	2720	2692
	P_{As}	1,1	1,16	1,2
<i>Antazolin HCl</i>	t_R (dk)	9,3	9,01	9,4
	$R_{ANT-KLO}$	10,12	10,55	10,67
	N	7227	7219	7236
	P_{As}	1,5	1,5	1,4
<i>Kloreton</i>	t_R (dk)	11,502	11,409	11,301
	N	8010	8086	8104
	P_{As}	1,3	1,3	1,3

Kromatografik koşullar: Mobil faz: 15 mM pH 3,0 fosfat tamponu/Metanol, akış hızı: 0,6 mL/dk, 16,6 µg/mL EFD, 0,25 µg/mL NFZ, 2,5 µg/mL ANT, 16,6 µg/mL KLO içeren standart çözelti

4.5.5. Çözeltilerin kararlılığı

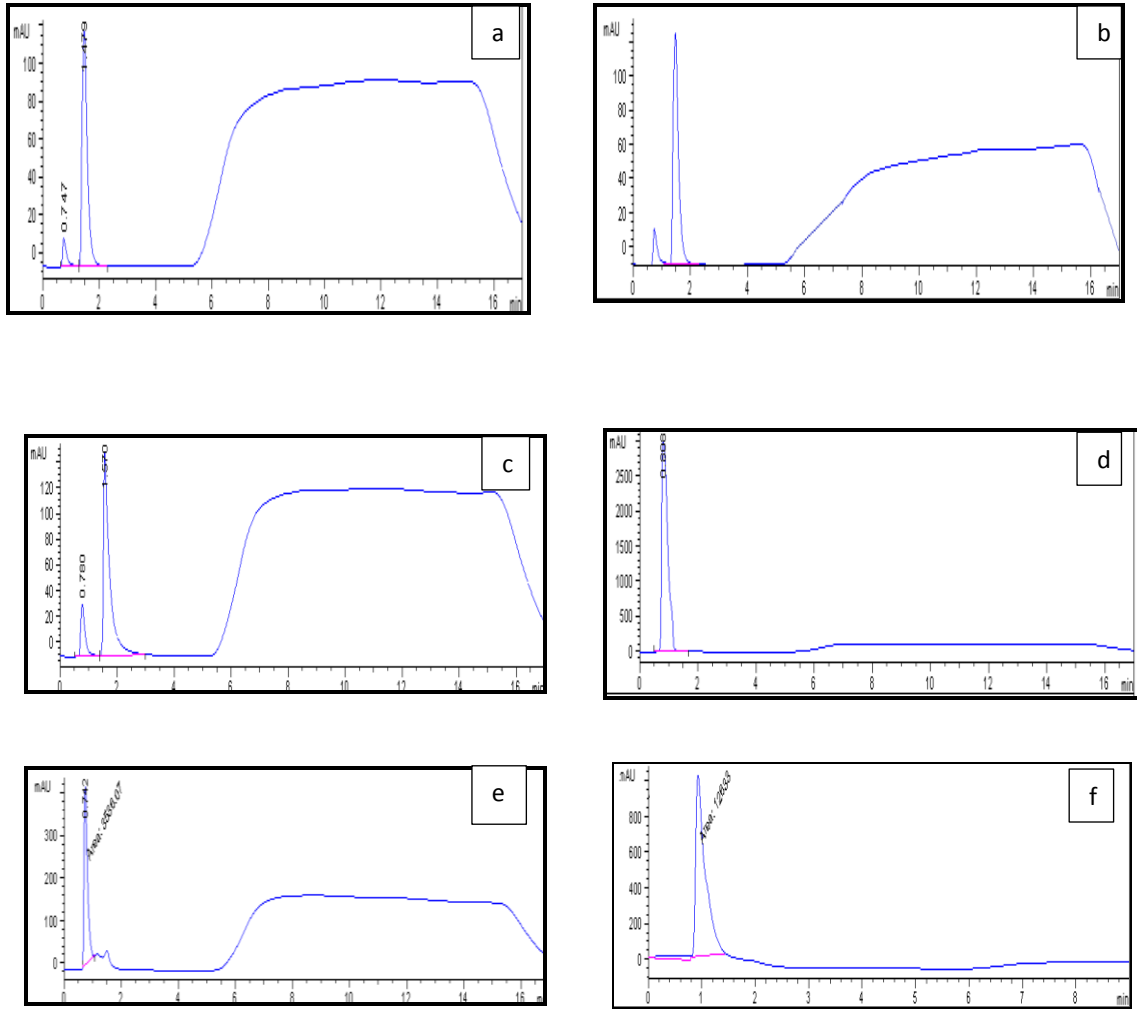
Çözeltilerin kararlılığı Bölüm 3.3.6.2’da anlatıldığı şekilde kontrol edilmiş ve sonuçlar Çizelge 4.36’da verilmiştir.

Çizelge 4.36. Çözeltilerin kararlılığı

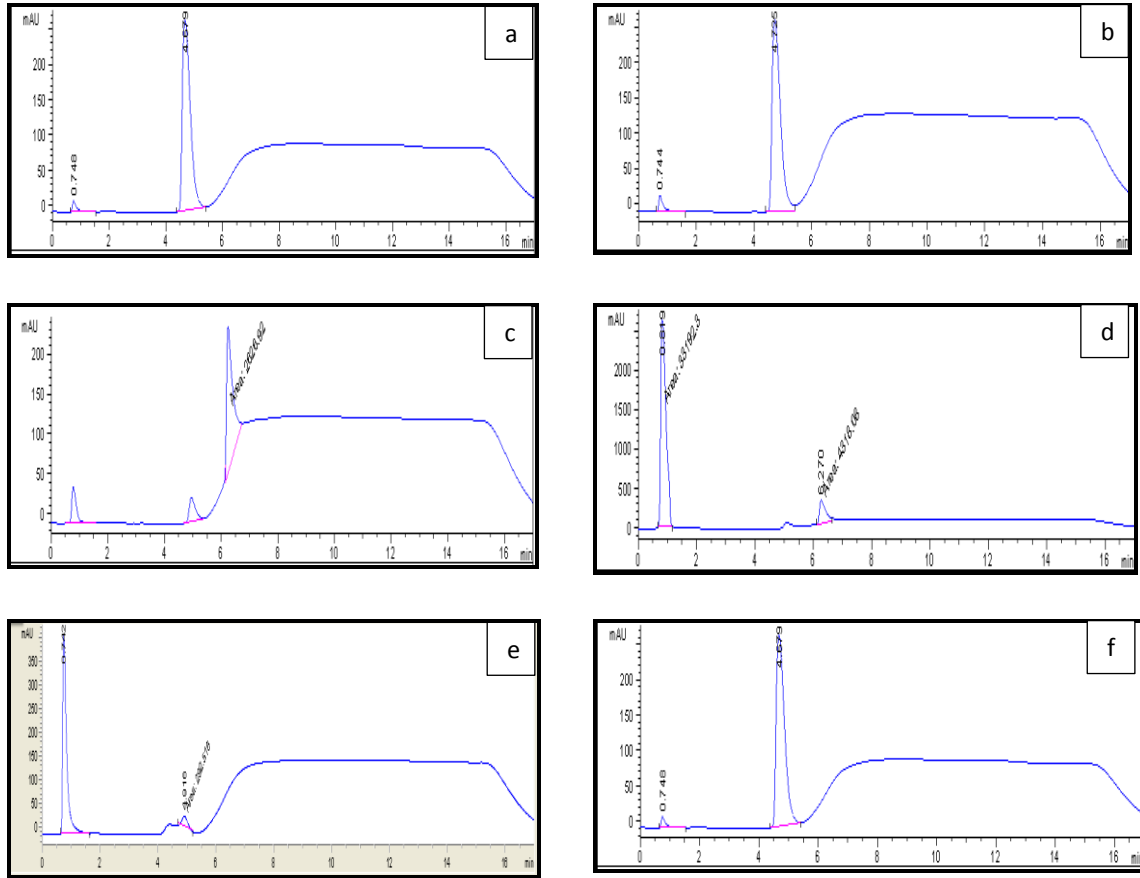
% Derişim				
Saat	<i>Efedrin HCl</i>	<i>Nafazolin HCl</i>	<i>Antazolin HCl</i>	<i>Kloreton</i>
0	100,00	100,00	100,00	100,00
6	100,56	100,03	100,01	100,70
12	100,78	99,98	100,56	100,04
18	100,54	100,78	100,79	98,90
24	101,02	100,12	100,45	99,97
36	101,04	99,23	99,78	99,78
42	100,30	99,45	99,15	98,89
48	101,10	99,90	100,01	97,43

4.5.6. RF - HPLC yöntemi hızlı bozundurma testleri

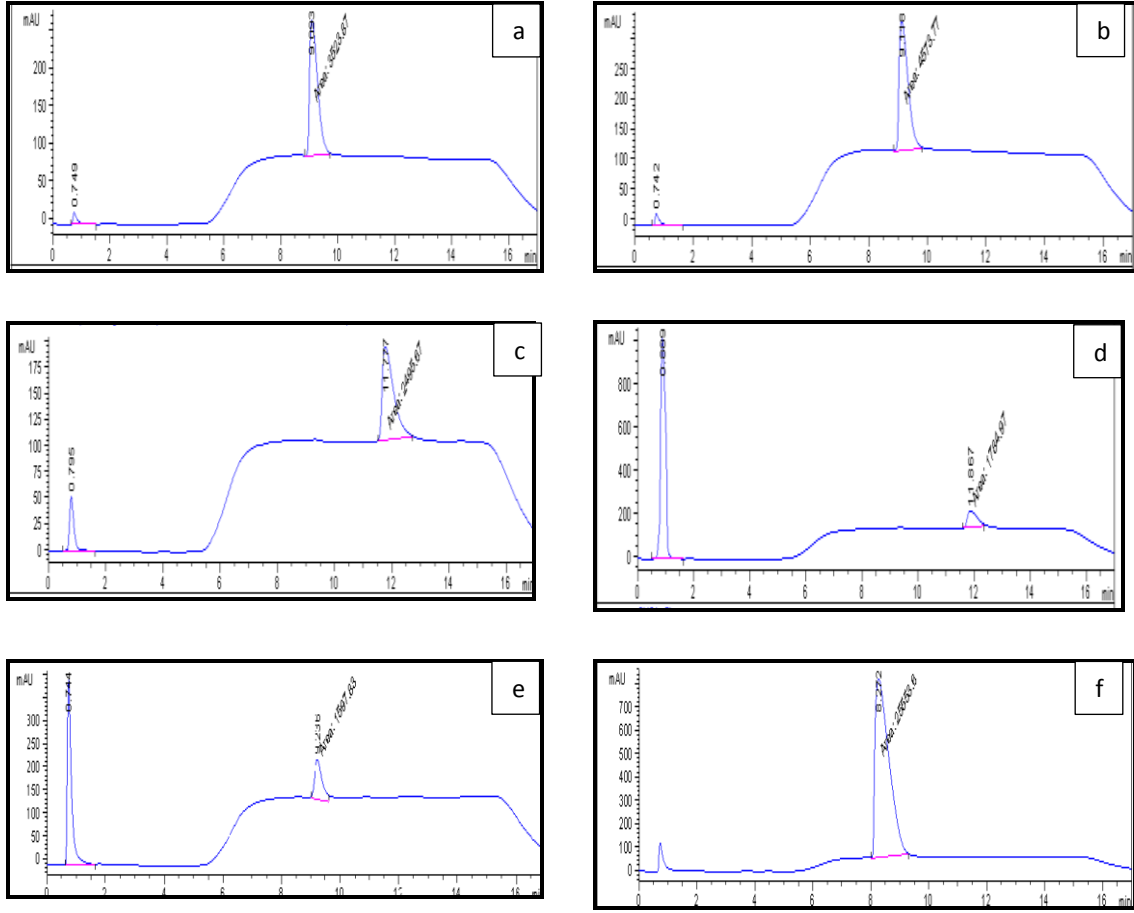
Önerilen yöntemin, etken maddelerin bozunma ürünleri varlığında uygulanabilirliğinin gösterilmesi için UV ışığına maruz bırakma, 0,1 M ve 1,0 M HCl ile asidik ve 0,1 M ve 1,0 M NaOH ile bazik hidroliz ve %30’luk H₂O₂ ile oksidasyon uygulanmıştır. (Bölüm 3.3.6.3.) Elde edilen kromatogramlar Şekil 4.41, Şekil 4.42, Şekil 4.43 ve Şekil 4.44’de verilmiştir. Etken maddelerinin stres koşulları altındaki bozunma miktarları Çizelge 4.37 de verilmiştir.



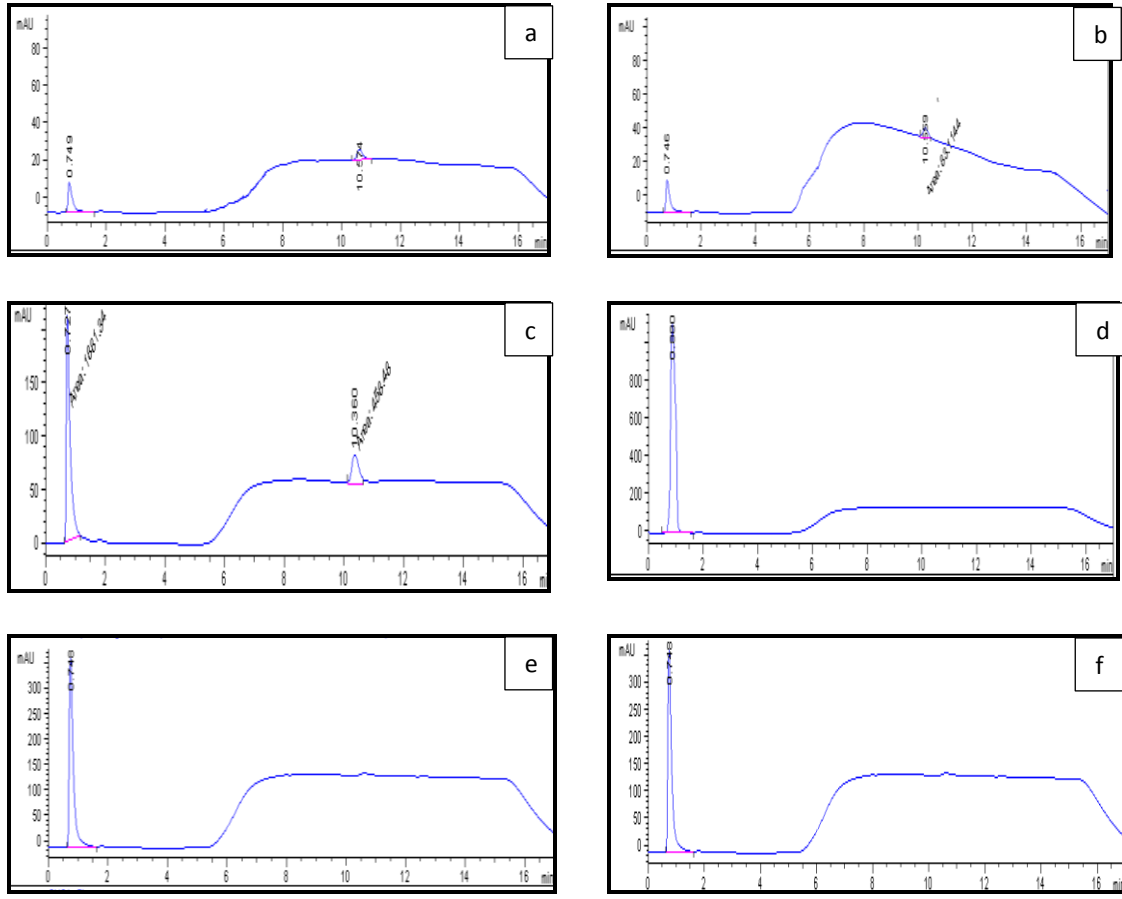
Şekil 4.42. Stres koşullarında 50 µg/mL EFD kromatogramları. **a)**0,1 M HCl **b)**1,0 M HCl **c)**0,1M NaOH **d)**1,0 M NaOH **e)**Oksidasyon **f)**6 saat UV ışık altında bekletme



Şekil 4.43. Stres koşullarında 50 µg/mL NFZ kromatogramları. **a)**0,1 M HCl **b)**1,0 M HCl **c)**0,1M NaOH **d)**1,0 M NaOH **e)**Oksidasyon **f)**6 saat UV ışık altında bekletme



Şekil 4.44. Stres koşullarında 50 µg/mL ANT kromatogramları. **a)**0,1 M HCl **b)**1,0 M HCl **c)**0,1M NaOH **d)**1,0 M NaOH **e)**Oksidasyon **f)**6 saat UV ışık altında bekletme



Şekil 4.45. Stres koşullarında 50 µg/mL KLO kromatogramları. **a)**0,1 M HCl **b)**1,0 M HCl **c)**0,1M NaOH **d)**1,0 M NaOH **e)**Oksidasyon **f)**6 saat UV ışık altında bekletme

Çizelge 4.37. Stres koşulları altında *Efedrin HCl*, *Nafazolin HCl*, *Antazolin HCl* ve *Kloreton* bozunma miktarları

Stres Koşulu	Bozunma Miktarı (%)			
	<i>Efedrin HCl</i>	<i>Nafazolin HCl</i>	<i>Antazolin HCl</i>	<i>Kloreton</i>
UV	2,0	20,03	15,23	100,0
0,1 M HCl	-	-	-	67,0
0,1 M NaOH	-	71,20	45,89	100,0
1,0 M HCl	-	1,50	1,03	100,0
1,0 M NaOH	-	87,45	81,20	100,0
H ₂ O ₂ (%30)	5,36	10,84	7,02	100,0

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

UV türev spektrofotometrisi ve HPLC yöntemleri ile elde edilen *Efedrin HCl*, *Nafazolin HCl*, *Antazolin HCl* ve *Kloreton* miktar tayini sonuçları, kesinlik açısından Fisher testi ve doğruluk açısından student t testi ile kıyaslanmıştır. Elde edilen bulgular Çizelge 4.38 de verilmiştir.

Çizelge 4. 38. 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>Efedrin HCl</i>	$t_{\text{Hesaplanan}} 0,4638 < t_{\text{Tablo}} 2,31$	$F_{\text{Hesaplanan}} 0,8075 < F_{\text{Tablo}} 5,5$
<i>Nafazolin HCl</i>	$t_{\text{Hesaplanan}} 1,41 < t_{\text{Tablo}} 2,31$	$F_{\text{Hesaplanan}} 2,376 < F_{\text{Tablo}} 5,5$
<i>Antazolin HCl</i>	$t_{\text{Hesaplanan}} 0,045 < t_{\text{Tablo}} 2,31$	$F_{\text{Hesaplanan}} 0,11 < F_{\text{Tablo}} 5,5$
<i>Kloreton</i>	$t_{\text{Hesaplanan}} 2,30 < t_{\text{Tablo}} 2,31$	$F_{\text{Hesaplanan}} 3,33 < F_{\text{Tablo}} 5,5$

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda, *Efedrin HCl*, *Nafazolin HCl*, *Antazolin HCl* ve *Kloreton* içeren farmasötik pomadlarda 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 farmasötik pomad içeriğini oluşturan etken maddeler, *Efedrin HCl*, *Nafazolin HCl*, *Antazolin HCl* ve *Kloreton*, metanolde çözülmüş ve 200-400 nm dalga boyu aralığında UV spektrumları alınmıştır. Spektrumlarda, dört etken maddenin birbirlerine spektral girişim yaptığı görülmektedir. 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, 27 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 farmasötik pomad içeriğinde etken maddelerin miktar tayinlerinde kullanılabilmesi için, farmasötik pomad çözeltisinin etiketinde belirtilen etken maddeler dışında spektral girişime neden olabilecek pomad katkı maddeleri içerip içermediğinin de kontrol edilmesi gerekir. Bu amaçla farmasötik pomad çözeltisinin etken madde içeriğine eşdeğer miktarda standart etken maddeleri içeren bir standartlar karışımı çözeltisi hazırlanmış ve farmasötik pomad çözeltisi ile aynı miktar etken maddeler içeren standartlar karışımı çözeltisinin UV spektrumları çakıştırma yoluyla karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırmada her iki spektrumun eşit olduğu görülmüştür. Dolayısıyla, farmasötik pomad içinde bulunan katkı maddelerinden kaynaklanabilecek herhangi bir spektral girişim olmadığı kabul edilmiştir. Pomad katkı maddelerinden kaynaklanabilecek bir girişim olmadığı anlaşıncaya, elde edilen 24 spektrum taranarak, her bir analit için uygun dalga

boyları seçilmiştir. *Efedrin HCl*, *Nafazolin HCl* ve *Antazolin HCl* için seçilen türev dereceleri o türev derecesindeki n değerleri ve dalga boyları Çizelge 4.1.'de gösterilmiştir. *Efedrin HCl* için mevcut 4 seçenekten 3.türev n=5 218 nm, *Nafazolin HCl* için mevcut 8 seçenekten 2.türev n=21 234 nm ve *Antazolin HCl* için mevcut 4 seçenekten 1.türev n=13 254 nm seçilmiştir. Bu koşullarda, *Efedrin HCl*, *Nafazolin HCl* ve *Antazolin HCl* kalibrasyon grafikleri çizilmiş ve farmasötik pomadda etken madde miktar tayinleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçların doğruluğu ve kesinliği test edilmiştir. Önerilen UV türev spektrofotometrik yöntemde numune hazırlama işlemi basittir, farmasötik pomad metanol: su karışımı içerisinde çözündükten sonra süzülüp analiz edilmektedir. Böylece, herhangi bir numune ön hazırlık ve ayırma işlemi gerekmeksizin etken maddelerin birarada olduğu çözeltiden aynı anda tayin edilebilmeleri mümkün olmuştur.

UV türev spektrofotometrisi yöntemiyle tayin amacıyla taranan 24 türev spektrumunda, *Kloreton* tayini için uygun bir türev derecesi ve dalga boyu değeri bulunamamıştır. Bu nedenle, *Kloreton* tayininin bir renklendirme ajanı ilavesiyle kolorimetrik olarak yapılması düşünülmüştür. Renklendirme ajanı olarak piridin seçilmiş ve oluşan renkli bileşiğin 540 nm dalga boyunda ölçülen absorbans değerinin *Kloreton* miktarıyla orantılı olarak değiştiği belirlenmiştir. Kolorimetrik yöntemde, diğer üç etken maddenin varlığında *Kloreton* 'un tayini mümkündür. Sonuçta farmasötik pomadın içerdiği *Kloreton* miktar tayini, 540 nm.de çizilen kalibrasyon grafiğinden hareketle gerçekleştirilmiştir. Bu teknik de herhangi bir numune ön hazırlık ve ayırma işlemi gerektirmeksizin miktar tayinine imkan vermektedir. Elde edilen sonuçlar doğruluk ve kesinlik açısından istatistiksel olarak test edilmiştir

Çalışmamızda, karşılaştırma yöntemi olarak, *Efedrin HCl*, *Nafazolin HCl*, *Antazolin HCl* ve *Kloreton* 'un aynı anda tayini için bir RP - HPLC yöntemi geliştirilmiştir. Etken maddelerin özellikleri dikkate alınarak 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 ve derişiminin etkisi 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 metanol- pH 3,0 15 mM fosfat tamponu karışımı, gradient elüsyon kullanılmış ve UV dedektör dalga boyu 210 nm. ye ayarlanmıştır. Kromatografik parametrelerin hesabında, t_0 olarak belirtilen ölü zamanının belirlenmesi için metanol kullanılmıştır ve t_0 değeri 0,8 dakikadır.

Mobil faz, bir tampon çözelti ile organik çözücünün farklı oranlarda karıştırılması ile hazırlanmıştır. Dört etken maddenin aynı anda analizi için gradient elüsyon kullanılması gerekmiştir. Gradient elüsyon, alıkonma zamanları aynı olan *Antazolin HCl* ve *Kloreton* 'un ayrılmasını sağlamıştır. Ayrıca, normal elüsyon uygulandığında *Antazolin HCl* ve *Kloreton* 25. dakikada çıkmaktadır. Analiz süresini kısaltmak için de gradient elüsyon uygulanmıştır. Analizin ilk başından itibaren organik faz oranının yüksek kullanılamamasının sebebi *Efedrin HCl*'e ait pikin erken çıkması ve organik faz miktarı artırıldığında mobil faz piki ile çakışma ihtimalidir. Mobil faz bileşiminde kullanılan fosfat tamponun derişimi 15 mM ve pH sı 3,0 olarak optimize edilmiştir. Fosfat tamponu ve metanolun kullanıldığı optimize kromatografik sistemde herhangi bir pik kuyruklanması ve girişim gözlenmemiştir. Bu nedenle, pik kuyruklanmasının önlenmesi amacıyla organik düzenleyici eklenmesine gerek kalmamıştır. Sonuç olarak, teorik tabaka sayısı, pik asimetri oranı ve en iyi rezolüsyonunun elde edildiği mobil faz bileşimi ve gradient elüsyon oranları belirlenmiş ve Çizelge 4.17 de gösterilmiştir.

Mobil faz bileşeni fosfat tamponunun pH değerinin kromatografik ayırma etkisinin araştırılması amacıyla pH 2,5; 3; 4 ve 5'de çalışılmış ve teorik tabaka sayısının, pik asimetrisinin ve rezolüsyonun en iyi olduğu pH'nın 3 olduğu gözlenmiştir. Ters faz kromatografide pH artırıldıkça alıkonma zamanı asidik bileşenler için azalırken, bazik bileşenler için artar. *Efedrin HCl*, diğer etken maddelere göre daha asidik olduğundan ters faz kolondan ilk önce çıkmaktadır. pH optimizasyonunda pH 2,5'dan başlanmasının nedeni pH 2 ve altında C18 kolon dolgu materyalinin bozulma ihtimalidir. pH üst değeri olarak 5 seçilmesi ise etken maddelerin asidik olmalarının dikkate alınması ve tampon kapasitesinin korunması nedeniyledir.

Mobil faz bileşeni fosfat tamponunun derişiminin etkisini araştırmak için tampon derişimi 5 mM, 10 mM, 15 mM ve 20 mM olarak değiştirilmiş ve kromatografik parametrelere etkisi

incelenmiştir. Çizelge 4.19’da görüldüğü gibi tampon derişimi pik asimetrisine etki etmektedir. Sonuçta optimum fosfat tamponu derişiminin 15 mM olduğuna karar verilmiştir.

Mobil fazın akış hızının kromatografik parametrelere etkisinin araştırılması amacıyla 0,5; 0,6; 0,7; 0,8 mL/dk akış hızlarında çalışılmış ve en uygun akış hızı olarak 0,6 mL/dk belirlenmiştir. HPLC sistemlerinde genellikle en iyi ayrımın elde edildiği akış hızı aralığı 1-3 mL/dk.dır. Bu çalışmada, 0,6 mL/dk akış hızında istenen ayrımın elde edilmesinin sebebi, kolon dolgu materyali yarıçapının 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, 45°C olarak değiştirilmiş ve kromatografik parametrelerdeki değişim incelendiğinde 40°C en uygun kolon sıcaklığı olarak belirlenmiştir. Ayrıca, sıcaklık azaldıkça analiz süresi uzamıştır. Hem analiz süresinin kısa hem de kromatografik parametrelerin en uygun olduğu durum 40°C olarak belirlenmiştir.

RP- HPLC sisteminde enjeksiyon hacmi 1, 5, 10, 15, 20, 25 µL olarak değiştirilmiş ve kromatografik parametrelerdeki değişim incelendiğinde 10 µL nin en uygun enjeksiyon hacmi olduğu gözlenmiştir. Tüm koşullar optimize edildiğinde, *Efedrin HCl* 1,8 dakika, *Nafazolin HCl* 3,5 dakika, *Antazolin HCl*, 5,2 dakika ve *Kloreton* 10 dakika alıkonma zamanına sahip olup toplam analiz süresi 12 dakikadır.

5.2. Literatür Bulgularıyla Karşılaştırma

Çizelge 5.1. Farklı örneklerde *Efedrin HCl*, *Nafazolin HCl*, *Antazolin HCl* ve *Kloreton* tayini

Analit	Numune	Yöntem	Çalışma Aralığı	LOD	Kaynak
<i>EFD</i>	Zayıflatıcı gıda ve bitkisel ürünler	HPLC-MS	2,5-500 µg/mL	0,17 µg/mL	5
<i>EFD</i>	İdrar	HPLC	100–2000 ng/mL	52,8 ng/mL	7
<i>EFD</i>	Tablet	1)UV Spektrofotometri 2)HPLC	1)10-50 µg/mL 2)15-75 µg/mL	1)0.92 µg/mL 2)0.86 µg/mL	8
<i>NFZ</i>	<i>Oftalmik Damla</i>	HPLC	12,5-100 µg/mL	0,02 µg/mL	32
<i>NFZ</i>	<i>Oftalmik Damla</i>	HPLC	10-60 µg/mL	0,28 µg/mL	37
<i>NFZ</i>	<i>Nazal Damla</i>	HPLC	0,065-12,50 µg/mL	0,02 µg/mL	41
<i>NFZ</i>	Nazal sprey	CE	100-1600 µmol/L	25 µmol/L	43
<i>ANT</i>	Köpek plazması	HPLC	20-1600 ng/mL	20 ng/mL	53
<i>ANT</i>	<i>Oftalmik Damla</i>	HPLC	20-80 µg/mL	2.66 µg/mL	54
<i>ANT</i> <i>NFZ</i>	<i>Oftalmik Damla</i>	UV Türev Spektrofotometri	1-10 µg/mL 0,2-1,1 µg/mL	1 µg/mL 0,2 µg/mL	59
<i>EFD</i>	Farmasötik Pomad	1)UV Türev 2)RP-HPLC	1)20-70 µg/mL 2)8,33-24,36 µg/mL	1)3,95 µg/mL 2)2,7 µg/mL	BU
<i>NFZ</i>			1)1-3 µg/mL 2)0,25-0,75 µg/mL	1)0,19 µg/mL 2)0,083 µg/mL	ÇALIŞ
<i>ANT</i>			1)10-30 µg/mL 2)2,5-7,5 µg/mL	1)0,92 µg/mL 2)0,66 µg/mL	MA
<i>KLO</i>			1)10-200 µg/mL 2)8,33-24,36 µg/mL	1)0,96 µg/mL 2)0,86 µg/mL	

Çizelge 5.1.'de *Efedrin HCl*, *Nafazolin HCl*, *Antazolin HCl* ve *Kloreton*'ın farklı numunelerde tayin edildiği rastgele seçilen HPLC ve UV yöntemleri görülmektedir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar ile literatür verileri kıyaslandığında UV türev spektrofotometrisi yöntemi *Efedrin HCl*, *Nafazolin HCl*, *Antazolin HCl* için hızlı ve kolay bir yöntem olması ile dikkat çekmektedir. Ayrıca, literatürde bu üç etken maddenin aynı anda analiz edildiği bir türev spektrofotometrisi çalışması mevcut değildir. Ancak, hem bu

çalışmada geliştirilen hem de literatürde yer alan HPLC çalışmalarının duyarlılığı, spektrofotometrik yöntemlerden daha iyidir [5, 7, 8, 32, 37, 41, 53, 54, 59].

Kromatografik yöntem uygulama açısından hem pratiklik sağlamış hem de literatürdeki çalışmalara kıyasla daha hızlı ayırım elde edilmiştir [5, 7, 8, 32, 37, 41, 53, 54]. Duyarlılık açısından kıyaslandığında literatürde yer alan spektrofotometrik yöntemlerden ve bazı HPLC çalışmalarından ise daha iyi duyarlılığa sahip olduğu görülmektedir [8, 59]. Ayrıca, *Efedrin HCl* yasaklı doping maddesi olduğu için, AB (Avrupa Birliği) mevzuatına göre bulunması yasak olan sınırın altında bir duyarlılıkla tayin edilmiştir [86].

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 *Efedrin HCl*, *Nafazolin HCl*, *Antazolin HCl* ve *Kloreton* için sırasıyla 20-70, 1-3, 10-30, 10-200 µg/mL iken kromatografik yöntemde çalışma aralığı *Efedrin HCl*, *Nafazolin HCl*, *Antazolin HCl* ve *Kloreton* için sırasıyla 8,33-24,36; 0,25-0,75; 2,5-7,5; 8,33-24,36 µg/mL dir. Her iki yöntemde de derişimi bilinen standart çözeltilere karşı alınan türev absorbands ve pik alanı değerlerinden hareketle kalibrasyon grafikleri çizilmiştir. Regresyon analizi sonucu elde edilen regresyon katsayı değerleri, *Efedrin HCl*, *Nafazolin HCl*, *Antazolin HCl* ve *Kloreton* için, UV türev spektrofotometrik yöntemde sırasıyla 0,9936; 0,9966; 0,9977; 0,9927, RP-HPLC yönteminde ise sırasıyla 0,9981; 0,9968; 0,9988; 0,996 bulunmuştur. Geliştirilen yöntemlerden spektrofotometrik yöntemde *Efedrin HCl*, *Nafazolin HCl*, *Antazolin HCl* ve *Kloreton* için LOD değeri sırayısla, 3,95; 0,19; 0,92; 0,96 iken kromatografik yöntemde ise 2,7; 0,025; 0,66; 0,86 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 *Efedrin HCl*, *Nafazolin HCl*, *Antazolin HCl* ve *Kloreton* için geri kazanım değerlerinin spektrofotometrik yöntemde %97,46-102,95; 101,40-97,0; 95,98-101,40; 97,89-99,84 ve kromatografik yöntemde %99,28-100,16; 99,92-

100,48; 98,79-100,37; 97,37-100,22 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 *Efedrin HCl*, *Nafazolin HCl*, *Antazolin HCl* ve *Kloreton* için spektrofotometrik yöntemde %BSS değerleri sırasıyla 0,19; 2,38; 0,88; 0,75 ve kromatografik yöntemde 0,163; 0,875; 0,644; 1,75 bulunmuştur. Günlerarası tekrarlanabilirlik çalışmasında ise *Efedrin HCl*, *Nafazolin HCl*, *Antazolin HCl* ve *Kloreton* için spektrofotometrik yöntemde %BSS değerleri sırasıyla 0,27; 3,76; 0,65; 1,31 ve kromatografik yöntemde 0,16; 0,8; 0,67; 1,25 bulunmuştur. Elde edilen tüm sonuçların %2'den küçük olması geliştirilen yöntemlerin tekrarlanabilir olduğunu göstermektedir.

Optimize koşullarda standartlara, standartlar karışımına ve farmasötik pomada ait kromatogramlarda ve spektrumlarda herhangi bir girişim olmaması, geliştirilen yöntemlerin *Efedrin HCl*, *Nafazolin HCl*, *Antazolin HCl* ve *Kloreton* analizi için seçici olduğunu 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

Efedrin HCl, *Nafazolin HCl*, *Antazolin HCl* ve *Kloreton* içeren farmasötik pomad çözeltisinde eş zamanlı miktar tayini için spektrofotometrik ve kromatografik yöntem geliştirildi ve valide edildi. Spektrofotometrik yöntemde, *Efedrin HCl*, *Nafazolin HCl* ve *Antazolin HCl* için UV türev spektrofotometrisi kullanılırken *Kloreton* için kolorimetrik tayin yöntemi kullanıldı. Bu amaçla, türev yönteminde *Efedrin HCl*, *Antazolin HCl* ve *Nafazolin HCl*'in girişimlerden etkilenmediği türev dereceleri ve dalga boyları seçilerek miktar tayinleri yapıldı. Kolorimetrik yöntemde ise sıcaklık, renklendirme ajanı miktarı ve NaOH miktarı optimizasyonu yapıldı. Geliştirilen kromatografik yöntemde ise akış hızı, kolon sıcaklığı, mobil faz tampon pH'sı ve derişimi optimize edildi. Yapılan validasyon çalışmalarına göre, yöntemlerin doğruluğu 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 stabilite çalışmaları yapılarak bozulma ürünlerinin varlığında da bu yöntemin dört etken maddenin miktar tayinlerinin yapılmasında kullanılabileceği gösterildi.

Literatür araştırmalarına göre *Efedrin HCl*, *Nafazolin HCl*, *Antazolin HCl* ve *Kloreton*'un eş zamanlı analizinin gerçekleştirildiği bir çalışma bulunmamaktadır. Ayrıca bu etken maddelerden bir veya ikisini birlikte içeren ve farmasötik pomadlarda yapılan miktar tayini çalışması da literatürde yer almamaktadır. Çalışılan dört etken maddenin farmasötik pomaddan 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 tekrarlanabilirdir. *Kloreton* için geliştirilen kolorimetrik yöntem de yine diğer 3 etken maddenin numunede bulunduğu halde tayinin gerçekleştirilmesine imkan verdiği için özgündür. 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 12 dakikadır.

Sonuç olarak, elde edilen veriler doğrultusunda, *Efedrin HCl*, *Nafazolin HCl*, *Antazolin HCl* ve *Kloreton* 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 farmasötik pomadlarda etken maddelerin miktar tayinleri yapılarak geliştirilen yöntemlerin uygulanabilirliği gösterilmiştir. Geliştirilen her iki yöntem de kalite kontrol laboratuvarlarında kullanılabilir.

KAYNAKLAR

1. Siddiqui, M.R., AlOthman, Z.A., and Rahman, N. (2017). Analytical techniques in pharmaceutical analysis: A review. *Arabian Journal of Chemistry*, 10, S1409-S1421.
2. Kayaalp, S.O. (1994). *Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji* (Vol. 1.Cilt). Ankara: Feryal Matbaası.
3. RX Media Pharma(R). (2018). *İnteraktif İlaç Bilgi Kaynağı*. Ankara: Gemaş Yayıncılık, 12.
4. Lee, M. (2011). The history of Ephedra (ma-huang). *JR Coll Physicians Edinb*, 41(1), 78-84.
5. Shi, Y., Zhong, Y., Sun, A., Gao, B., Sun, C., and Xiong, J. (2018). Validation of a rapid and simple high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry method for simultaneous analysis of 15 key chemicals in slimming foods and herbal products. *Journal of Chromatographic Science*, 56(10), 912-919.
6. Kuwayama, K., Miyaguchi, H., Iwata, Y.T., Kanamori, T., Tsujikawa, K., Yamamuro, T., Segawa, H., and Inoue, H. (2018). Different localizations of drugs simultaneously administered in a strand of hair by micro-segmental analysis. *Drug Testing and Analysis*, 10(4), 750-760.
7. Taghvimi, A., and Hamishehkar, H. (2017). Carbon coated magnetic nanoparticles as a novel magnetic solid phase extraction adsorbent for simultaneous extraction of methamphetamine and ephedrine from urine samples. *Journal of Chromatography B*, 1041, 113-119.
8. Senturk, Z., Erk, N., Ozkan, S.A., Akay, C., and Cevheroglu, S. (2002). Determination of theophylline and ephedrine HCl in tablets by ratio-spectra derivative spectrophotometry and LC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 29(1-2), 291-298.
9. Yehia, A.M., and Essam, H.M. (2016). Development and validation of a generic high-performance liquid chromatography for the simultaneous separation and determination of six cough ingredients: Robustness study on core-shell particles. *Journal of Separation Science*, 39(17), 3357-3367.
10. Heaton, J., Gray, N., Musenga, A., Cowan, D.A., Plumb, R.S., and Smith, N.W. (2012). Comparison of reversed-phase and hydrophilic interaction liquid chromatography for the quantification of ephedrine HCl in tablets by ratio-spectra derivative spectrophotometry and LC. *Journal of Chromatography A*, 1289, 37-46.
11. Abdel-Ghani, N., Rizk, M., and Mostafa, M. (2013). Extractive determination of ephedrine hydrochloride and bromhexine hydrochloride in pure solutions, pharmaceutical dosage form and urine samples. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 111, 131-141.
12. Hood, D.J., and Cheung, H.Y. (2003). A chromatographic method for rapid and simultaneous analysis of codeine phosphate, ephedrine HCl and chlorpheniramine maleate in cough-cold syrup formulation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 30(5), 1595-1601.

13. Baş, S.Y. (2014) *Farmasötik Şuruplarda Kapiler Elektroforez Yöntemi ile Efedrin, Norefedrin ve Guaifenezin Miktar Tayini*. Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 26.
14. Jovanović, M., Rakić, T., Ivanović, D., and Jančić–Stojanović, B. (2015). Optimization of the separation of ephedrine, pseudoephedrine, phenylephrine, and synephrine by hydrophilic interaction liquid chromatography employing experimental design methodology. *Instrumentation Science & Technology*, 43(2), 156-169.
15. Yan, T., Fu, Q., Wang, J., and Ma, S. (2015). UPLC-MS/MS determination of ephedrine, methylephedrine, amygdalin and glycyrrhizic acid in Beagle plasma and its application to a pharmacokinetic study after oral administration of Ma Huang Tang. *Drug Testing and Analysis*, 7(2), 158-163.
16. Song, S., Chen, F., Xing, X., Ren, M., Ma, Q., Xie, Y., Tang, Q., and Luo, J. (2015). Concurrent quantification and comparative pharmacokinetic analysis of bioactive compounds in the Herba Ephedrae-Semen Armeniacae Amarum herb pair. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 109, 67-73.
17. Zhang, L., Wang, Z.H., Li, H., Liu, Y., Zhao, M., Jiang, Y., and Zhao, W.S. (2014). Simultaneous determination of 12 illicit drugs in whole blood and urine by solid phase extraction and UPLC-MS/MS. *Journal of Chromatography B*, 955-956, 10-19.
18. Song, Y., Su, D., Lu, T., Mao, C., Ji, D., Liu, Y., Wei, B., and Fan, R. (2014). Differential pharmacokinetics and the brain distribution of morphine and ephedrine constitutional isomers in rats after oral administration with Keke capsule using rapid-resolution LC-MS/MS. *Journal of Separation Science*, 37(4), 352-359.
19. Imamoglu, E., and Tunca, A.K. (2014). Simultaneous determination of guaifenesin and ephedrine HCl binary mixture in syrup dosage forms and human plasma by using RP-HPLC-DAD. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 37(7), 1039-1051.
20. Pellati, F., and Benvenuti, S. (2008). Determination of ephedrine alkaloids in Ephedra natural products using HPLC on a pentafluorophenylpropyl stationary phase. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 48(2), 254-263.
21. Lau, I.-W., and Mok, C.-S. (1995). High-performance liquid chromatographic determination of active ingredients in cough-cold syrups with indirect conductometric detection. *Journal of Chromatography A*, 693(1), 45-54.
22. Aymard, G., Labarthe, B., Warot, D., Berlin, I., and Diquet, B. (2000). Sensitive determination of ephedrine and norephedrine in human plasma samples using derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate and liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 744(1), 25-31.
23. Narimani, O., Dalali, N., and Rostamizadeh, K. (2014). Functionalized carbon nanotube/ionic liquid-coated wire as a new fiber assembly for determination of methamphetamine and ephedrine by gas chromatography-mass spectrometry. *Analytical Methods*, 6(21), 8645-8653.
24. Deng, D.L., Zhang, J.Y., Chen, C., Hou, X.L., Su, Y.Y., and Wu, L. (2012). Monolithic molecular imprinted polymer fiber for recognition and solid phase microextraction of

- ephedrine and pseudoephedrine in biological samples prior to capillary electrophoresis analysis. *Journal of Chromatography A*, 1219, 195-200.
25. Mersal, G.A. (2012). Electrochemical applications and computational studies on ephedrine drug. *Journal of Solid State Electrochemistry*, 16(6), 2031-2039.
 26. Zhou, L., Zhou, X., Luo, Z., Wang, W., Yan, N., and Hu, Z. (2008). In-capillary derivatization and analysis of ephedrine and pseudoephedrine by micellar electrokinetic chromatography with laser-induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1190(1-2), 383-389.
 27. Deng, D., Deng, H., Zhang, L., and Su, Y. (2013). Determination of ephedrine and pseudoephedrine by field-amplified sample injection capillary electrophoresis. *Journal of Chromatographic Science*, 52(4), 357-362.
 28. B. Pharmacopoeia, (2019). *Her Majesty's Stationery Office*. London,6.
 29. E. Pharmacopoeia, (2019). Council of Europe: Strasbourg,9.
 30. US. Pharmacopoeia, (2019), *The United States Pharmacopeial Convention*. Rockville, MD,12.
 31. Imani-Nabiyyi, A., and Sorouraddin, M.H. (2014). Determination of naphazoline hydrochloride in biological and pharmaceutical samples by a quantum dot-assisted chemiluminescence system using response-surface methodology. *Luminescence*, 29(8), 994-1002.
 32. Huang, T., Chen, N., Wang, D., Lai, Y., and Cao, Z. (2014). A validated stability-indicating HPLC method for the simultaneous determination of pheniramine maleate and naphazoline hydrochloride in pharmaceutical formulations. *Chemistry Central Journal*, 8(1), 7.
 33. Mohamed, G.G., El-Dien, F.N., Frag, E.Y., and Mohamed, M.E.-B. (2013). In situ modified screen printed and carbon paste ion selective electrodes for potentiometric determination of naphazoline hydrochloride in its formulation. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 3(5), 367-375.
 34. Manzoori, J.L. and Amjadi, M. (2003). *Spectrofluorimetric and cyclodextrin-enhanced spectrofluorimetric methods for the determination of naphazoline in nasal and eye drops*. Hindistan: NISCAIR-CSIR, 2988-2992.
 35. Ribeiro, M.M., Oliveira, T.C., Batista, A.D., Muñoz, R.A., and Richter, E.M. (2016). A sub-minute electrophoretic method for simultaneous determination of naphazoline and zinc. *Journal of Chromatography A*, 1472, 134-137.
 36. Da Costa Oliveira, T., Freitas, J.M., Munoz, R.A.A., and Richter, E.M. (2016). A batch injection analysis system with square-wave voltammetric detection for fast and simultaneous determination of naphazoline and zinc. *Talanta*, 152, 308-313.
 37. Joshi, B., Pradhan, P.K., Upadhyay, U., and Pajput, P. (2015). Simultaneous estimation of Naphazoline HCl and Phenylephrine HCl by HPLC method in Eye Drops. *The Pharma Innovation*, 4(7, Part B), 77.

38. El Deen Sayed, N., Hegazy, M., Abdelkawy, M., and Abdelfatah, R. (2013). Spectrophotometric, chemometric and chromatographic determination of naphazoline hydrochloride and chlorpheniramine maleate in the presence of naphazoline hydrochloride alkaline degradation product. *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University*, 51(1), 57-68.
39. Khalil, S. (1999). Analytical application of atomic emission and atomic absorption spectrometry for the determination of imidazoline derivatives based on formation of ion-associates with sodium cobaltinitrite and potassium ferricyanide. *Microchimica Acta*, 130(3), 181-184.
40. Casado-Terrones, S., Fernández-Sánchez, J., Diaz, B.C., Carretero, A.S., and Fernández-Gutiérrez, A. (2005). A fluorescence optosensor for analyzing naphazoline in pharmaceutical preparations: Comparison with other sensors. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 38(4), 785-789.
41. Chocholouš, P., Šatinský, D., and Solich, P. (2006). Fast simultaneous spectrophotometric determination of naphazoline nitrate and methylparaben by sequential injection chromatography. *Talanta*, 70(2), 408-413.
42. Marchesini, A., Williner, M., Mantovani, V., Robles, J., and Goicoechea, H. (2003). Simultaneous determination of naphazoline, diphenhydramine and phenylephrine in nasal solutions by capillary electrophoresis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 31(1), 39-46.
43. Ribeiro, M.M., Marra, M.C., Costa, B., Oliveira, T.C., Batista, A.D., Muñoz, R.A., and Richter, E.M. (2018). Sub-Minute Method for Determination of Naphazoline in the Presence of Diphenhydramine, Pheniramine or Chlorpheniramine by Capillary Electrophoresis. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 29(9), 1959-1964.
44. Oliveira, T.d.C., Freitas, J.M., Muñoz, R.A.A., and Richter, E.M. (2018). Development of a Novel Versatile Method for Determination of two Antihistamines in Association with Naphazoline Using Cathodically Pretreated Boron-doped Diamond Electrode. *Electroanalysis*, 30(5), 868-876.
45. Xia, H., Wu, H.-L., Gu, H.-W., Yin, X.-L., Fang, H., and Yu, R.-Q. (2015). Simultaneous determination of naphazoline and pyridoxine in eye drops using excitation-emission matrix fluorescence coupled with second-order calibration method based on alternating trilinear decomposition algorithm. *Chinese Chemical Letters*, 26(12), 1446-1449.
46. Hoang, V.D., Hue, N.T., Tho, N.H., and Nguyen, H.M.T. (2015). Simultaneous determination of chloramphenicol, dexamethasone and naphazoline in ternary and quaternary mixtures by RP-HPLC, derivative and wavelet transforms of UV ratio spectra. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 139, 20-27.
47. Wang, N.N., Shao, Y.Q., Tang, Y.H., Yin, H.P., and Wu, X.Z. (2009). Flow-injection chemiluminescence method for the determination of naphazoline hydrochloride and oxymetazoline hydrochloride. *Luminescence: The journal of Biological and Chemical Luminescence*, 24(3), 178-182.
48. Iranifam, M., and Sorouraddin, M.H. (2014). Flow injection chemiluminescence determination of naphazoline hydrochloride in pharmaceuticals. *Luminescence*, 29(1), 48-51.

49. Gallego, J.M.L., and Pérez Arroyo, J. (2003). Determination of prednisolone, naphazoline, and phenylephrine in local pharmaceutical preparations by micellar electrokinetic chromatography. *Journal of Separation Science*, 26(9-10), 947-952.
50. Mu, G., Luan, F., Xu, L., Liu, H., and Gao, Y. (2013). Separation and determination of five active components in eye drops by capillary electrophoresis in comparison with HPLC. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 36(5), 549-560.
51. Giebułtowicz, J., Piotrowski, R., Baran, J., Kułakowski, P., and Wroczyński, P. (2016). Application of a novel liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the determination of antazoline in human plasma: Result of ELEPHANT-I [ELEctrophysiological, pharmacokinetic and hemodynamic effects of PHenazolinum (ANTazoline mesylate)] human pharmacokinetic study. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 123, 113-119.
52. Abdel-Halim, L.M., Abd-El Rahman, M.K., Ramadan, N.K., Sanabary, H.F.E., and Salem, M.Y. (2016). Comparative study between recent methods manipulating ratio spectra and classical methods based on two-wavelength selection for the determination of binary mixture of antazoline hydrochloride and tetrazyline hydrochloride. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 159, 98-105.
53. Li, X., Chu, Y., Ke, Y., Wang, L., Yu, T., and Hao, L. (2013). Determination of antazoline hydrochloride in Beagle dog plasma by HPLC–UV and its application to pharmacokinetics. *Journal of Chromatography B*, 929, 97-101.
54. Shadoul, W.A., Kariem, E.A.G., Ibrahim, K.E.E., and Ebied, M. (2011). Simultaneous determination of tetrahydrozoline hydrochloride and antazoline hydrochloride in ophthalmic solutions using HPLC. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 1, 29-38.
55. Giebułtowicz, J., Kojro, G., Piotrowski, R., Kułakowski, P., and Wroczyński, P. (2016). Cloud-point extraction is compatible with liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry for the determination of antazoline in human plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 128, 294-301.
56. Wang, R., Chu, Y., Li, X., Wan, B., Yu, T., Wang, L., Hao, L., and Guo, M. (2013). Determination of antazoline hydrochloride in rat plasma and excreta by reversed-phase ion-pair chromatography and its application to pharmacokinetics. *Biomedical Chromatography*, 27(12), 1595-1602.
57. Gumustas, M., Alshana, U., Ertas, N., Goger, N.G., Ozkan, S.A., and Uslu, B. (2016). Determination of antazoline and tetrahydrozoline in ophthalmic solutions by capillary electrophoresis and stability-indicating HPLC methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 124, 390-398.
58. Yingheng, Q., Minxian, Z., and Yulan, L. (2009). Determination of Antazoline Hydrochloride Tablets by HPLC [J]. *China Pharmaceuticals*, 1.
59. Souri, E., Amanlou, M., Farsam, H., and Afshari, A. (2006). A rapid derivative spectrophotometric method for simultaneous determination of naphazoline and antazoline in eye drops. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 54(1), 119-122.

60. Ali, A., Farooq, U., Ahmed, M., Athar, M.M., Nadeem, K., and Murtaza, G. (2017). Stability Indicating UHPLC-PDA Assay for Simultaneous Determination of Antazoline Hydrochloride and Naphazoline Hydrochloride in Ophthalmic Formulations. *Acta Chimica Slovenica*, 64(2).
61. Sa 'sa', S., Al-Momani, I., and Jalal, I. (1990). Determination of naphazoline nitrate and antazoline sulphate in pharmaceutical combinations by reversed-phase HPLC. *Analytical Letters*, 23(6), 953-971.
62. Hman, S. (1987). Direct determination of antazoline and naphazoline in mixtures. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 13(7), 1257-1265.
63. Ruckmick, S.C., Marsh, D.F., and Duong, S.T. (1995). Synthesis and identification of the primary degradation product in a commercial ophthalmic formulation using NMR, MS, and a stability-indicating HPLC method for antazoline and naphazoline. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 84(4), 502-507.
64. Hajian, R., Shams, N., and Kaedi, I. (2010). Application of ratio derivative spectrophotometry for simultaneous determination of naphazoline and antazoline in eye drops. *Journal of Chemistry*, 7(4), 1530-1538
65. Amiss, T.J., and Smoak, I.W. (1995). Determination of chlorobutanol in mouse serum, urine and embryos by capillary gas chromatography with electron capture detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 673(1), 59-66.
66. Jones, W.J., and Dorsey, E.D. (1983). Analysis of Chlorobutanol in Ophthalmic Ointments and Aqueous Solutions by Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 72(3), 277-280.
67. Jaworska, M., Szulińska, Z., and Wilk, M. (2005). Application of a capillary electrophoresis method for simultaneous determination of preservatives in pharmaceutical formulations. *Journal of Separation Science*, 28(2), 137-143.
68. Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Eczacılık Teknolojisi Bölümü (2007). *Farmasötik Teknoloji Laboratuvar Kitabı*. Ankara: Şafak Matbaacılık;
69. Geçgil Ş. (1991). *Farmasötik Teknolojiye Başlangıç*. İstanbul: Cihan Matbaacılık, 23.
70. Owen, T. (1996). *Fundamentals of UV-visible spectroscopy: a primer*. Hewlett-Packard
71. Türkalp, A. (1999). *Türev Spektroskopisi Yöntemi ile Çeşitli Farmasötik Formlarda Flukonazol Miktar Tayini*. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 33.
72. Skoog DA, H.F., Cruch S.R. (2013). *Enstrümantal analiz ilkeleri* (Vol. 6. Baskı): Bilim Yayıncılık, 23-56.
73. 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.

74. Talsky, G., L. Mayring, and Kreuzer, H. (1978). High-resolution, higher-order UV/VIS derivative spectrophotometry. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 17(11), 785-799.
75. Kus, S., Marczenko, Z., and Obarski, N. (1996). Derivative UV–VIS spectrophotometry in analytical chemistry. *Chem. Anal*, 41(6), 899-927.
76. 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: 25.11.2019.
77. Yıldız, A. and Genç, Ö. (1993). *Enstrümantal analiz*. Ankara: Hacettepe Üniversitesi Yayınları, 56.
78. Sewel PA, Clarke B, and D, K. (1987). *Chromatographic Seperations*. London UK:John Wiley and Sons Inc, 89.
79. Hamilton, R.J., Sewel, P.A. (1982). *Introduction to HPLC*. New York: Chapman and Hall, 6.,250-600.
80. SkoogG DA, H.F., Cruch SR. (1998). *Enstrümantal Analiz İlkeleri* (Vol. 5. Baskı): Bilim Yayıncılık, 11,300-550.
81. Fanali S, Haddad Pr., Poole C, Schoenmakers P ve Lloyd Dk. (2013). *Liquid Chromatography: Fundamentals and Instrumentation*. Elsevier, USA.
82. Özkan, S.A. (2011). *İlaçların analiz ve kalite kontrollerinde kullanılan analitik yöntemlerin geçerliliği (Validasyon)*. Ankara: Gülhane Askeri Tıp Akademisi Basımevi, 17-22.
83. Guideline, I.H.T. (2005). *Validation of analytical procedures: test and methodology Q2A (R1)*. International conference on harmonization, Geneva, Switzerland,1-15.
84. FDA. (2013). *Guidance for industry, bioanalytical method validation*. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM),30.
85. Guideline, I.H.T. (2005). *Validation of analytical procedures: test and methodology Q2B (R1)*. International conference on harmonization, Geneva, Switzerland,1-10.
86. İnternet: European Commission Federal Institute for Risk Assessment, Scientific assessment of Ephedra Species, (2010). Web:https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/labelling_nutrition-vitamins_minerals-sa_ephedra_supp_en.pdf. Son Erişim Tarihi: 26.12.2019.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : Kanbeş Dindar, Çiğdem
 Uyuğu : TC
 Doğum tarihi ve yeri : 08.04.1982
 Medeni hali : Evli
 Telefon : 0505 049 13 55
 e-mail : ckanbes@gmail.com



Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Doktora	Gazi Üniversitesi/ Eczacılık Fakültesi /Analitik Kimya Anabilim Dalı	Devam ediyor
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi/ Eczacılık Fakültesi /Analitik Kimya Anabilim Dalı	2009
Lisans	ODTÜ Fen Ed. Fak. Kimya Bölümü	2006
Lise	Özel Yüce Fen Lisesi	1999

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2010-2017	Anadolu Plazma Teknoloji Enerji Merkezi	Genel Müdür Yrd.
2007-2009	Gazi Üniversitesi	Araştırmacı

Yabancı Dil İngilizce

Yayınlar

Bildiriler

1. Kanbeş Dindar, Ç., Günden Göğeri N.: Determination of Antazoline, Naphazoline, Ephedrine, Chlorbutanol in Pharmaceutical Pomade Using RP- HPLC, 12th Int. Symp. on Pharm. Sciences, Ankara Univ. Fac. Pharm., June 26-29, 2018, Ankara, Turkey. (Poster Bildiri)
2. Kanbeş Dindar, Ç., Günden Göğeri N.: Comparison of Derivative Spectrophotometric and Validated Stability-Indicating RF-HPLC Methods for Simultaneous Determination of Ephedrine HCl, Naphazoline HCl, Antazoline HCl in Pharmaceutical Pomade, 11th Aegean Analytical Chemistry Days (AACD2018), Sept 25-29, 2018, Chania, Crete, Greece. (Sözlü Bildiri).



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..

