**T.C.**

**YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

# DENEYSEL TASARIM UYGULANARAK YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOGRAFİSİ İLE İLAÇ ANALİZİ VE VALİDASYONU

**Evridiki PİNGO**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimya Anabilim Dalı

Analitik Kimya Programı

Danışman

Prof. Dr. Bürge AŞÇI

Şubat, 2020

**T.C.**

**YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

# DENEYSEL TASARIM UYGULANARAK YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOGRAFİSİ İLE İLAÇ ANALİZİ VE VALİDASYONU

Evridiki PİNGO tarafından hazırlanan tez çalışması 11.02.2020 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Analitik Kimya Programı **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Bürge AŞÇI
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

**Jüri Üyeleri**

Prof. Dr. Bürge AŞÇI, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Prof. Dr. Güzin ALPDOĞAN, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Prof. Dr. Sıdıka SUNGUR, Üye
Yeni Yüzyıl Üniversitesi _____

Danışmanım Prof. Dr. Bürge AŞÇI sorumluluğunda tarafımca hazırlanan Deneysel Tasarım Uygulanarak Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi İle İlaç Analizi Ve Validasyonu başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Evridiki PİNGO

İmza

*Aileme*

# TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmam süresince kıymetli bilgi, birikim ve tecrübeleri ile bana yol gösterip destek olan değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. Bürge AŞÇI'ya ve ilgisini, yardımlarını ve önerilerini eksik etmeyen Araş. Gör. Doç. Dr. Şule DİNÇ ZOR'a sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Ayrıca ders ve çalışmalarım boyunca yardımlarını hiç esirgemeyen değerli arkadaşlarım Nilüfer KOÇYİĞİT ve Esra Buğçe KARATAŞ'a çok teşekkür ederim.

Son olarak desteğini hiçbir zaman esirgemeyen ve daima yanımda olan aileme özellikle de bugünlere gelmemde büyük emek sahibi olan, çalışmalarımı her zaman sabırla destekleyen anneme sonsuz teşekkür ederim.

Evridiki PİNGO

**SİMGE LİSTESİ** **vii**

**KISALTMA LİSTESİ** **viii**

**ŞEKİL LİSTESİ** **ix**

**ÇİZELGE LİSTESİ** **xi**

**ÖZET** **xiii**

**ABSTRACT** **xiv**

**1 GİRİŞ** **1**

1.1 Literatür Özeti. . . . . ...1

1.2 Tezin Amacı. . . . . ...3

1.3 Hipotez. . . . . ..... 4

**2 GENEL BİLGİLER** **5**

2.1 İlaç Etken Maddeleri . . . . . .. 5

2.1.1 Çalışılan İlaç Etken Maddeleri. . . . . 5

2.2 İlaç Katkı Maddeleri. . . . .. . . . . ..... 26

2.2.1 Çalışılan İlaç Katkı Maddeleri. . . . .. . . . . 26

2.3 Deneysel Tasarım. . . . .. . . . . ... 42

2.3.1 Tanımı. . . . . 42

2.3.2 Önemi. . . . . .. . . . . 43

2.2.3 Tarama Tasarımları. . . . . 44

2.2.4 Optimizasyon Tasarımları. . . . . 48

2.2.5 Varyans Analizi. . . . . .51

2.2.6 Deneysel Tasarımın Analitik Kimyada Uygulamaları. . .. . 51

2.4 Validasyon. . . . . 52

2.4.1 Validasyonun Tanımı ve Önemi. . . . . 52

2.4.2 Endüstride Validasyon Çeşitleri. . . . . .52

2.4.3 Analitik Yöntem Validasyonu. . . . . .....53

**3 DENEYSEL ÇALIŞMALAR 59**

3.1 Kullanılan Maddeler. . . . . ..59

3.2 Kullanılan Çözeltiler. . . . . .59

3.3 Kullanılan Cihazlar. . . . . ...60

3.4 HPLC ile Analiz. . . . . ... 61

3.4.1 Kromatografik Şartların Belirlenmesi. . . . . .61

3.4.2 Validasyon. . . . . .....62

3.4.3 Örnek Analizi. . . . . ..... 65

**4 SONUÇ VE ÖNERİLER 66**

4.1 Kromatografik Şartların Belirlenmesi ve Optimizasyonu. . . . . .66

4.1.1 Klasik Yöntem ile Şartların Belirlenmesi. . .. . . . . . .. . . .66

4.1.2 Deneysel Tasarım ile Optimizasyon. .. . . . . ... .66

4.2 Validasyon. . . . . ...72

4.2.1 Doğrusallık. . . . . .. . . . . 72

4.2.2 Gün İçi ve Günler Arası Tekrarlanabilirlik. . . . . 80

4.2.3 Doğruluk. . . . . 80

4.2.4 Tanıma ve Tayin Sınırı (LOD ve LOQ) . . . . .. . . . . .84

4.2.5 Çözelti Dayanıklılığı. . . . . 84

4.3 Örnek Analizi. . . . . 84

4.4 Tartışma. . . . . ...86

**KAYNAKLAR** **88**

# SİMGE LİSTESİ

| | |
|---|---|
| %RSD | Bağıl Standart Sapma |
| N | Deney sayısı |
| x | Faktör |
| k | Faktör sayısı |
| α | Farklı tasarımlardaki seviye |
| S | Standart Sapma |
| Xort | Ortalama |

# KISALTMA LİSTESİ

| | |
|---|---|
| CE | Kapiler Elektroforez |
| CL | Kemilüminesans |
| ECD | Elektron-Yakalama İyonizasyon Dedektörü |
| FAAS | Alevli Atomik Absorpsiyon Spektrofotometrisi |
| FTIR | Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi |
| GF-AAS | Grafit Fırınlı Atomik Absorpsiyon Spektrofotometrisi |
| GC | Gaz Kromatografisi |
| GC-HPLC | Gaz Kromatografisi- Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi |
| GC-MS | Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi |
| GC-MS/MS | Gaz Kromatografisi-Tandem Kütle Spektrometrisi |
| HPLC | Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi |
| HPTLC | Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi |
| HPLC-UV | UV Dedektörlü Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi |
| ICP-OES | İndüktif Eşleşmiş Plazma-Optik Emisyon Spektrometrisi |
| LC | Sıvı Kromatografisi |
| MS | Kütle Spektrometrisi |
| MS/MS | Tandem Kütle Spektrometrisi |
| ODS | Oktadesilsilan |
| PDA | Fotodiyot Array Dedektörü |
| R | Korelasyon Katsayısı |
| RID | Refraktif Indeks |
| Rs | Ayırma Gücü Değeri |
| SDS | Sodyum Dodesil Sülfat |

| | |
|---|---|
| SFS | Sıvı Faz Organik Sentez |
| SPE | Katı Faz Ekstraksiyon |
| THF | Tetrahidrofuran |
| TLC | İnce Tabaka Kromatografisi |
| UHPLC | Ultra Hızlı Sıvı Kromatografisi |
| UV | Ultraviyole |
| UV-DAD | Ultraviyole-Fotodiyot Dizili Dedektör |
| Q-TOF-MS | Kuadrupol Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi |

# ŞEKİL LİSTESİ

**Şekil 2.1** Parasetamolün yapısal formülü……..……..6
**Şekil 2.2** Dekstrometorfan hidrobromürün yapısal formülü……..17
**Şekil 2.3** Psödoefedrin hidroklörürün yapısal formülü ……..20
**Şekil 2.4** Doksilamin süksinatın yapısal formülü. ……..27
**Şekil 2.5** Allura kırmızısının yapısal formülü……..23
**Şekil 2.6** Sakkarinin yapısal formülü……..34
**Şekil 2.7** Birillant mavisinin yapısal formülü……..38
**Şekil 2.8** 11 Faktör için Plackett Burman Tasarımı……..38
**Şekil 4.1** Merkezi Kompozit Tasarımı ile elde edilen Pareto grafiği……71
**Şekil 4.2** Merkezi Kompozit Tasarımı ile elde edilen faktörleri arasındaki tahmini cevap yüzeyleri grafikleri
**Şekil 4.3** Optimum koşullarda elde edilen HPLC kromatogramı……..71
**Şekil 4.4** Dekstrometorfan hidrobromür doğrusallık grafiği……..73
**Şekil 4.5** Sakkarin doğrusallık grafiği……..74
**Şekil 4.6** Parasetamol doğrusallık grafiği……..75
**Şekil 4.7** Psödoefedrin hidroklorür doğrusallık grafiği……..76
**Şekil 4.8** Allura kırmızısı doğrusallık grafiği……..77
**Şekil 4.9** Doksilamin süksinat doğrusallık grafiği……..78
**Şekil 4.10** Birillant mavisi doğrusallık grafiği……..79

# TABLO LİSTESİ

**Tablo 2.1** Parasetamolün HPLC ile analizi……7
**Tablo 2.2** Parasetamolün diğer yöntemler ile analizi……12
**Tablo 2.3** Dekstrometorfan hidrobromürün HPLC ile analizi……17
**Tablo 2.4** Dektrometorfan hidrobromürün diğer yöntemler ile analizi……18
**Tablo 2.5** Psödoefedrin hidroklörürün HPLC ile analizi……21
**Tablo 2.6** Psödoefedrin hidroklörürün diğer yöntemler ile analizi……23
**Tablo 2.7** Doksilamin süksinatın HPLC ile analizi……25
**Tablo 2.8** Doksilamin süksinatın diğer yöntemler ile analizi……26
**Tablo 2.9** Allura Kırmızısının HPLC ile analizi……28
**Tablo 2.10** Allura Kırmızısının diğer yöntemler ile analizi……33
**Tablo 2.11** Sakkarinin HPLC ile analizi……35
**Tablo 2.12** Sakkarinin diğer yöntemler ile analizi……36
**Tablo 2.13** Birillant Mavisinin HPLC ile analizi……39
**Tablo 2.14** Birillant Mavisinin diğer yöntemler ile analizi……42
**Tablo 2.15** 3 Faktör için Tam Faktöriyel Tasarım……47
**Tablo 2.16** 5 Faktör için Kısmi Faktöriyel Tasarım……48
**Tablo 2.17** Plackett-Burman Tasarımı için Üreticiler……49
**Tablo 2.18** 3 Faktör için Merkezi Kompozit Tasarımı……51
**Tablo 2.19** 3 Faktör için Box-Behnken Tasarımı……52
**Tablo 2.20** Analiz amacına göre değişen parametreler……56
**Tablo 3.1** Merkezi Kompozit Tasarımda seçilen faktörler ve seviyeleri……64
**Tablo 4.1** Merkezi Kompozit Tasarımı ve çalışılan şartlarda ayırma gücü değerler……67
**Tablo 4.2** ANOVA testi ve regresyon katsayı değerleri……69
**Tablo 4.3** Faktörlerin optimum değerleri……71
**Tablo 4.4** Dekstrometorfan hidrobromür doğrusallık değerleri……73

**Tablo 4.5** Dekstrometorfan hidrobromür regresyon analizine ait parametreler73
**Tablo 4.6** Sakkarin doğrusallık değerleri……74
**Tablo 4.7** Sakkarin regresyon analizine ait parametreler……74
**Tablo 4.8** Parasetamol doğrusallık değerleri……75
**Tablo 4.9** Parasetamol regresyon analizine ait parametreler……75
**Tablo 4.10** Psödoefedrin hidroklorür doğrusallık değerleri……76
**Tablo 4.11** Psödoefedrin hidroklorür regresyon analizine ait parametreler……76
**Tablo 4.12** Allura kırmızısı doğrusallık değerleri……77
**Tablo 4.13** Allura kırmızısı regresyon analizine ait parametreler……77
**Tablo 4.14** Doksilamin süksinat doğrusallık grafiği……78
**Tablo 4.15** Doksilamin süksinat regresyon analizine ait parametreler……78
**Tablo 4.16** Birillant mavisi doğrusallık değerleri ……79
**Tablo 4.17** Birillant mavisi regresyon analizine ait parametreler……79
**Tablo 4.18** Gün içi tekrarlanabilirlik……81
**Tablo 4.19** Günler arası tekrarlanabilirlik……82
**Tablo 4.20** Doğruluk ……83
**Tablo 4.21** Tanınma ve tayin Sınırı ……84
**Tablo 4.22** Örnek analizi ……85
**Tablo 4.23** Analiz sonuçlarının etiket değerleri ile karşılaştırılması……85

# ÖZET

## Deneysel Tasarım Uygulanarak Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ile İlaç Analizi ve Validasyonu

Evridiki PİNGO

Kimya Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Bürge AŞÇI

Bu çalışmada şurup preparatlarında etken madde olarak bulunan dekstrometorfan hidrobromür, psödoefedrin hidroklorür, parasetamol, doksilamin süksinat ile katkı maddesi olarak bulunan allura kırmızısı, birillant mavisi ve sakkarinin bir arada tayini için HPLC yöntemi geliştirildi. Sözü edilen maddelerin kromatografik olarak birbirinden ayrılması için C18 kolonda, gradient ve izokratik elüsyon teknikleri kullanılarak farklı akış hızında çeşitli çözücü sistemleri denendi. Spektrofotometrik dedektör kullanılarak 210 nm dalga boyunda maddelerin kromatogramları kaydedildi. Klasik yöntemle bulunan analiz şartları merkezi kompozit tasarımı kullanılarak optimize edildi. Bu tasarımda her bir faktörün hem bireysel hem de birbirleri ile etkileşimleri sonucunda ayırma gücüne etkileri 5 seviyede , 3 faktör ile incelendi. İncelenen seviyeler , akış hızı (FR) için 0.9, 1.0, 1.2, 1.4, 1.5 mL/dak, gradient 1 (GR1) oranı için % 67, 70, 75, 80, 83 fosfat tamponu (0.025 M), gradient 2 (GR2) oranı için % 27, 30, 35, 40, 43 fosfat tamponudur (0.025 M). Toplamda 19 deney yapıldı. Deney sonuçlarına regresyon analizi yapılarak ayırma gücüne etki eden faktörler saptandı. Sonuç güvenilirliğini sağlamak için ANOVA testi uygulandı. Elde edilen veriler ile bir model oluşturuldu. Bu modele göre en iyi ayırmanın 1,4

mL/dak akış hızında hareketli faz bileşimindeki pH 6.0 fosfat tamponu oranın gradient 1 için %75 ; gradient 2 için %40 olduğunda gerçekleştiği görüldü.

Geliştirilen yöntemin doğrusallık, tekrarlanabilirlik, doğruluk, tanınma ve tayin sınırı gibi parametreleri incelenerek analitik yöntem validasyonu yapıldı.

Çözeltilerin dayanıklılığı analiz edilerek oda sıcaklığında 1 gün, 4C$^{o}$'de 1 hafta dayanıklı olduğu görüldü. Geliştirilen yöntem kullanılarak bu maddeleri içeren şurup örneği analiz edildiğinde içeriği, 1,16-1,92 aralığında % RSD değerleri ile 0,989 mg/mL dekstrometorfan hidrobromür, 0,681 mg/mL sakkarin, 34,316 mg/mL parasetamol, 2,002mg/mL psödoefedrin, 0,402 mg/mL allura kırmızısı, 0.405 mg /mL doksilamin süksinat ve 1,101x10$^{-3}$mg/mL birillant mavisi olarak bulundu. Analiz sonucunda bulunan madde miktarları ile etiket değerleri karşılaştırıldı. Dekstrometorfan hidrobromür, sakkarin, parasetamol, psödoefedrin hidroklorür ve doksilamin süksinat için sırası ile 98,90; 97,29; 102,96; 100,10; 97,12 geri kaz kazaanım değerleri elde edildi.

**Anahtar Kelimeler:** Parasetamol, psödoefedrin hidroklörür, dekstrometorfan hidrobromür , doksilamin süksinat.

# ABSTRACT

## Drug Analysis and Validation by High Pressure Liquid Chromatography Using Experimental Design

Evridiki PİNGO

Department of Chemistry

Master of Science Thesis

Advisor: Prof. Dr. Bürge AŞÇI

In this thesis, a gradient HPLC method is developed for analysis of paracetamol, pseudoephedrine hydrochloride, dextromethorphan hydrobromide and doxylamine succinate along allura red and brilliant blue as colorants and saccharine as sweetener in syrup samples. Different flowrates are tested for separation of the above components with classical method. Gradient elution, 1.4 ml/min flowrate, pH 6.0 phosphate/methanol mobile phase are optimum conditions for this analysis. Chromatograms are obtained with spectrophotometric dedector at 210 nm wavelength. Analytical conditions are optimized with Central Composite Design. In this optimization 3 different factors are specified. These factors are flowrate, Gradient 1 ratio and Gradient 2 ratio. Effects to resolution are obtained frominteractions of factors. Central Composite Design used for examination of 3 factors. Examined levels are for flowrate (FR) 0.9-1.0-1.2-1.4-1.5 ml/min, gradient 1 (GR1) ratio 67-70-75-80-83, gradient 2 (GR2) ratio 27-30-35-40-43 phosphate buffer ratio. Totally 19 experiments are done. At the end of experiments regression analysis is done with results and factors that affect to resolution are obtained. ANOVA test is performed to show the reliability.

According to obtained data, a model is created and resolutions are calculated. Optimum conditions are found as flowrate is 1.4 ml/min, gradient 1 ratio is 75 and gradient 2 ratio is 40 with experimental design.

Analytical method validation is performed with optimum conditions obtained from experimental design by examining the parameters of the developed method such as linearity, repeatability, accuracy, recognition and determination limit. The solutios was stable for 1 day at room temperature and 1 week at 4˚C in mobile phase and water.

0,989 mg/mL dextromethorphan hydrobromide, 0,681 mg/mL saccharine, 2,002 mg /mL pseudoephedrine hydrochloride, 34,316 mg/mL paracetamol, 0,402 mg/mL allura red, 0.405 mg /mL doxylamine succinate and 1,286 mg/mL brilliant blue are obtained from the analysis of syrup sample with optimum conditions under of 2 of RSD% . Results that obtained from analysis are compared with label claim. There is % recovery in the interval of 95%-105%.

**Keywords:** Paracetamol, pseudoephedrine hydrochloride, dextromethorphan hydrobromide, doxylamine succinate.

# 1
# GİRİŞ

## 1.1 Literatür Özeti

İlaç üretiminde ilaç etken maddelerinin yanısıra, dayanıklılık, koku, renk ve tat vermek, koruma sağlamak, görünüşü düzeltmek gibi amaçlarla çeşitli katkı maddeleri kullanılmaktadır. Bu maddelerin kullanım miktarına bağlı olarak insan sağlığına olumsuz etki gösterebildikleri bilinmektedir. Bu nedenle ilaç etken maddelerinin ve katkı maddelerinin birarada analizi ilaç kalitesinin ve insan sağlığının kontrolü açısından oldukça önem taşımaktadır. Bu da hızlı ve performansı yüksek analiz tekniklerinin geliştirilmesini gerektirmektedir.

Birden fazla etken madde ve çeşitli katkı maddelerini (boya, tatlandırıcı, koruyucu vb) içeren şurup örneklerinin analizinde HPLC .yüksek performansı, ön işlem yapılmadan karışımları ayırma ve tespit edebilme kabiliyeti, hızı ve duyarlılığı nedeni en çok tercih edilen ve kullanılan yöntem olmuştur.

Bu çalışmada, etken madde olarak parasetamol, dekstrometorfan hidrobromür, psödoefedrin hidroklorür, doksilamin süksinat ile katkı maddesi olarak allura kırmızısı, brillant mavisi ve sakkarin içeren 'Vicks Medinait' isimli şurup preparatı kullanılmıştır. Çalışılan etken ve katkı maddelerinin tek başına ya da farklı maddelerle bir arada analiz yöntemleri literatürde bulunmaktadır. Parasetamol, analjezik ve antipiretik amaçlı en sık kullanılan ilaçlardan biridir. İlaç örneklerindeki parasetamolün HPLC ile analizlerinde [6-47], DAD, UV, PDA, UV/VIS, MS, MS/MS, dedektörleri kullanılmıştır. HPLC dışında spektrofotometri [60], [64], [80], [83], [94], [95], [101], [102], [104], [110], [111] voltametri [61], [65], [66], [70], [73], [74-79], [81], [82], [85], [88], [89], [91], [97], [98], [103], [105], [107], [108], [112] kemometri [87], TLC [62], CL [92], [99], CE [93], GC [84], [96], amperometri [90] yöntemleri ile yapılmış çalışmalar da vardır. Dekstrometorfan, soğuk algınlığı ya da gribin yol açtığı öksürüğün tedavisinde kullanılan ve antitusif sınıfında olan ilaç etken maddesidir. İlaç örneklerindeki dekstrometorfanın HPLC ile analizlerinde [115-123], UV, PDA dedektörleri kullanılmıştır. HPLC dışında GC-MS [127], [132], [136], [137], LC-MS/MS [128], [131], [133], [134], [138], [142], [143], UPLC [129], [141] ile yapılmış çalışmalar da vardır. Psödoefedrin hidroklorür, solunum

sistemi hastalıklarında veya alerjiler ile ilişkili doku hiperemi ve burun tıkanıklığını azaltmada kullanılır. Ayrıca sinüs salgı drenajının kolaylaştırılması ve arttırılmasında ve tıkalı olan östaki borularının açılmasında yararlı bir etkisi vardır [145]. Psödoefedrin tayini için HPLC ile yapılan analizlerde [147-168], UV, CL, DAD, MS dedektörleri kullanılmıştır. HPLC dışında elektromembran ekstrasyonu [170], voltametri [171], [172], CE [173], spektrofotometri [174-176] gibi yöntemlerle çalışılmıştır. Doksilamin süksinat, belirgin sedatif özelliklere sahip bir piridin türevi histamin H1 antagonistidir. Alerjik ve anafilaktik tepkileri sınırlayarak histamin kaynaklı ağrıları ve cilt ile mukoza zarlarının kaşınmasını önler. Doksilamin süksinat tayini için HPLC ile analizlerde [177-179] UV dedektörü kullanılmıştır. HPLC dışında densitometri [180], kemometri [181], spektrofotometri [182] gibi yöntemlerle çalışılmıştır. Allura Kırmızısı AC (E129), birçok ürünün renklendirilmesinde yaygın olarak kullanılan bir azo boyasıdır. Analizleri için HPLC [183-208], Voltametri [210], TLC [211], [225], Florometri [215], FTIR [218] gibi farklı metotlarla çalışılmıştır. Sakkarin, çay şekerinden 200 – 300 kat daha tatlı, enerji değeri olmayan bir tatlandırıcıdır. Analizleri için HPLC [226-232], Potansiyometri [234], [236], Spektrofotometri [235], CE [240], [241] gibi farklı yöntemlerle çalışılmıştır. Brillant mavisi genellikle yiyecek, meşrubat, hijyen ürünleri ve ilaçlara mavi renk vermek için kullanılır. Analizleri HPLC ile [247-266], spektrofotometri [267], [268], [276], [277], TLC [270], [273], CE [271], [275] gibi farklı yöntemlerle yapılmıştır.

Literatür araştırmasında, parasetamol, dekstrometorfan hidrobromür, psödoefedrin hidroklorür, doksilamin süksinat , allura kırmızısı, brillant mavisi ve sakkarinin bir arada analize yönelik bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bir deneysel çalışmada o deneyin performansını etkileyecek parametrelerin belirlenmesi ve kontrolü, doğru ve güvenilir sonuçların eldesinde oldukça önemlidir. Deney sonuçlarını etkileyebilecek herhangi bir deneysel parametre faktör olarak isimlendirilir. Faktörlerin en uygun değerleri ile yapılan bir çalışma ise cevap sinyalini büyülterek maddelerin çok küçük miktarlarının analizine imkan vermektedir. Bu en uygun faktör değerinin belirlendiği aşamaya optimizasyon adı verilir. Son yıllarda deneysel tasarımlar, analitik kimyada optimum analiz koşullarının saptanmasında sıklıkla kullanılmaktadır. Bu tasarımlar ile optimizasyonda deney sayısı, süre ve maliyet azalmaktadır. Bu tasarımlarla faktörlerin bireysel etkilerinin dışında birbirleri ile etkileşimleri ve bu etkileşimlerin sonuca etkisi de incelenmektedir. Bu nedenle deneysel

tasarımlar kullanılarak yapılan çalışmalarda klasik yöntemlere göre daha güvenilir sonuçlar elde edilmektedir. [279, 280]

### 1.2 Tezin Amacı

Bu çalışmada deneysel tasarım kullanılarak, parasetamol ,dekstrometorfan hidrobromür, psödoefedrin hidroklorür, doksilamin süksinat ,allura kırmızısı, brillant mavisi ve sakkarinin bir arada analizi için HPLC yöntemi geliştirilmesi, yöntemin geçerliliğinin kanıtlanması ve şurup örneğine uygulanması amaçlanmıştır.

### 1.3 Hipotez

Parasetamol, Dekstrometorfan hidrobromür, Psödoefedrin hidroklorür, Doksilamin süksinat ile katkı maddeleri allura kırmızısı, brillant mavisi ve sakkarinin bir arada HPLC yöntemi ile analiz edilmesi için gerekli optimum koşullar deneysel tasarım yöntemi kullanılarak tespit edildiğinde klasik yönteme kıyasla daha az sayıda deney yapılacağı ve çalışma süresi azaltılacağı için maliyetin azalması beklenmektedir. Ayrıca hem bireysel etkileri hem de faktörlerin birbirleri ile etkileşimleri ve bu etkileşimlerin sonuca etkisi inceleneceğinden daha güvenilir sonuçlar elde edilmesi öngörülmektedir.. Bu çalışmada tasarım sonucu geliştirilen ve geçerliliği kanıtlanan yöntemin, ilaç sanayisinde bu maddeleri bir arada içeren ilaç örneklerinin analizlerinde kullanılabilecek güvenilir bir yöntem olacağı düşünülmektedir.

# 2
# GENEL BİLGİLER

## 2.1 İlaç Etken Maddeleri

Bir ilacın içeriğinde kullanılan ve ilacın aktif bir bileşeni olan herhangi bir kimyasal madde veya madde bileşime ilaç etken maddesi denir. Kimyasal sentez yolu ile ya da doğal kaynaklardan kazanılan, insan ve hayvan organizmasındaki hastalıkların engellenmesinde, geriletilmesinde, iyileştirilmesinde ve tanısında kullanılan, kimyasal yapısı ve özellikleri saptanmış olan maddelerdir. Vücudun işleyişini olumlu yönde etkilemeyi hedefler.

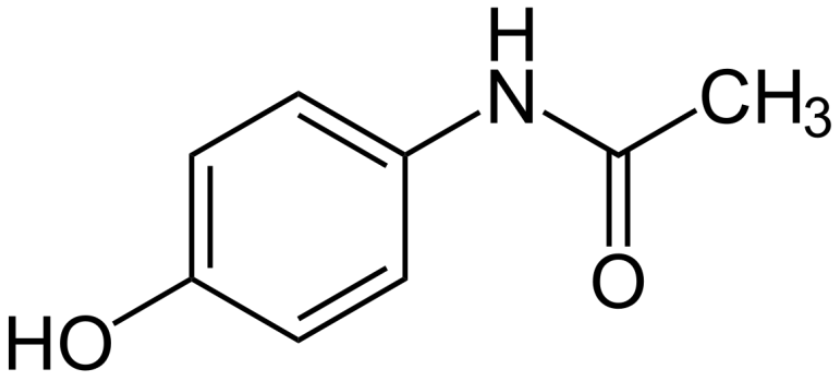
### 2.1.1 Çalışılan İlaç Etken Maddeleri

#### 2.1.1.1 Parasetamol

**- Özellikleri**

Kapalı formülü: $C_8H_9NO_2$

Yapısal formülü:




**Şekil 2.1** Parasetamolün yapısal formülü

Kimyasal Adı: N-(4-hidroksifenil)asetamid

Molekül ağırlığı: 151.17 g/mol

Renk ve görünüş: Beyaz, kristalize toz.

Erime noktası: 169 °C

Çözünürlüğü: Suda ve alkolde iyi çözünür.

**- Farmakolojik Etkisi**

Parasetamol günümüzde analjezik ve antipiretik amaçlı en sık kullanılan ilaçlardan biridir. PG sentezini inhibe ederek etkisini gösteren ağrı kesici ateş düşürücü özellikleri olan bir ilaçtır. Ağız ya da rektum yoluyla uygulanan tek başına ya da başka ilaçlarla birlikte olan farmasötik şekilleri vardır. [1] Mide ve incebağırsaktan hızlı bir şekilde emilen parasetamol büyük ölçüde karaciğerde glukuronik asit veya sülfat ile konjuge edilerek metabolize edilir. Kalan %2-4'lük kısmı da mikrozomal enzimlerle toksik metaboliti olan N-asetil p-benzokinomine (NAPQI) çevrilir. NAPQI karaciğerdeki glutatyonla bağlanarak detoksifiye edilir ve idrarla atılır [2].

**- Zararları**

Toksik dozda parasetamol alındığında oluşan NAPQI glutatyonun bağlama kapasitesini aşarak karaciğer ve böbrek hasarına neden olur [2].

**- Miktar Tayin Yöntemleri**

Parasetamol ile yapılan çalışmalar çoğunlukla kromatografik, spektrofotometrik ve voltametrik yöntemler ile yapılmıştır. Parasetamolün HPLC ile analizleri Tablo 2.1'de, diğer analitik yöntemlerle analizleri Tablo 2.2'de verilmiştir.

**Tablo 2.1** Parasetamolün HPLC ile analizi

| Örnek | Diğer madde | Kolon | Hareketli Faz | Dedektör | Kaynak |
|---|---|---|---|---|---|
| İlaç Preparatları | Tiamin piridoksal fosfat | C18 | Fosfat tamponu (pH 3.0), asetonitril, metanol (86: 7:7) | DAD | [3] |
| Nehir suyu | Diklofenak | C18 | Asetik asit, asetonitril (65:35) | UV | [4] |
| İlaç preparatları | Parasetamol glukuronid, parasetamol sülfat | C18 | Sodyum sülfat: Asetonitril (93:7) | UV | [5] |
| İdrar ve atık su | Kafein | C18 | Metanol:su | DAD | [6] |

**Tablo 2.1** Parasetamolün HPLC ile analizi (devamı)

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Sıçan kansıvısı | Talidonit, deksametazon | C18 | Etanol:su (70:30) | UV | [7] |
| İlaç Preparatları | İbuprofen | C18 | Fosfat tamponu:metanol | UV | [8] |
| İlaç Preparatları | Askorbik asit, guaifenesin | CN | Ortofosforik asit: metanol (85.9:14.1) | UV | [9] |
| İlaç Preparatları | Kloroksazon | C8 | Formik asit:asetonitril (40:60) | nano-UV | [10] |
| İlaç preparatları | Parasetamol glukuronid, parasetamol sülfat | C18 | Sodyum sülfat: asetonitril (93:7) | UV | [11] |
| Atık su | Asesülfam potasyum, kafein, karbamazepin, siklamat, ibuprofen, metil paraben, sakkarin | C18 | Metanol:su | Q-TOF-MS | [12] |
| İnsan kan plazması | Klorzoksazon, aseklofenak | C18 | Asetonitril:amonyum format | MS | [13] |
| İlaç preparatları | Amoksisilin, diklofenak | C18 | Metanol:asetonitril: su:ortofosforik asit (60:30:9:1) | UV | [14] |
| İlaç preparatları | Flupirtin | C18 | Ortofosforik asit: Metanol (50:50) | DAD | [15] |

**Tablo 2.1** Parasetamolün HPLC ile analizi (devamı)

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| İlaç preparatlar, kan plazması | Tizanidin, nimesulid, aseklofenak | Siyano | Sodyum dihidrojen fofat tamponu:SDS: Butanol (60:30:10) | UV/VIS | [16] |
| İlaç tabletleri | Asetilsalisilik asit, kafein | C18 | Asetonitril:su (25:75) | DAD | [17] |
| Mikrozom | Kumarin,midazolam, tolbutamit, dekstrorfan, klorzoksazon | C18 | Su:formik asit:metanol:formik asit (90:10, 70:30, 60:40, 50:50) | MS | [18] |
| İlaç preparatları | Kafein | C18 | Su:metanol:asetik asit (69:28:3) | Voltametri | [19] |
| İlaç preparatları | Flutamid | Siyano | Asetonitril: su (40:60) | DAD | [20] |
| Süt | Teofilin | C18 | Amonyum asetat tamponu:asetonitril :methanol (90:5:5) | UV/VIS | [21] |
| Hastane katı atıkları | Naproksen, diklofenak, ibuprofen, amlodipin, rosuvastatin | C18 | Asetonitril: amonyum asetat (50:50) | UV | [22] |
| Tavşan kanı plazması | Parasetamol glukuronid | C18 | Sodyum sülfat: asetonitril (93:7) | UV/VIS | [23] |

**Tablo 2.1** Parasetamolün HPLC ile analizi (devamı)

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Titanyum dioksit filmleri | Hidrokinon, benzokinon, p-nitrofenol, 1,2,4-trihidroksbenze | RPC18 | Asetonitril: su:fosforik asit (70:30:0.3) | UV/VIS | [24] |
| İkili karışım | Hiyozin N-bütilbromür | C18 | Su: metanol (50:50) | UV | [25] |
| Kan plazması | Floroglukinol | C18 | Metanol:su (80: 20) | MS/MS | [26] |
| İlaç endüstrisi atık suları | Naproksin, diklofenak, ibuprofen, amlodipin, rosuvastatin | C18 | Asetonitril:amonyum asetat (50:50) Metanol:fosfat tamponu(40:60) | UV | [27] |
| İlaç preparatları | İbuprofen | C18 | Tampon çözeltisi: metanol (95:5 tampon çözeltisi | DAD | [28] |
| İlaç preparatları | Kafein | C18 | Fosfat tamponu: asetonitril: trietilamin (84.5:15:02) | UV | [29] |
| İlaç preparatları | Fenilefrin, ambroksol, levosetirizin | C18 | Asetonitril:fosfat tamponu (2:98) | DAD | [30] |
| İlaç preparatları | Fenilefedrin, efedrin, guaifenesin, doksilamin süksinat, dekstrometorf | C18 | Asetonitril:fosfat tamponu (95:5) (80:20) (50:50) | DAD | [31] |

**Tablo 2.1** Parasetamolün HPLC ile analizi (devamı)

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Metamfetamin haciz örnekleri | Metamfetamin, psödoefedrin, cafein, aspirin , prokain | PFP C18 | Su:asetonitril (5:95) (30:70) | DAD | [32] |
| İlaç preparatları | Kafein | EC-ImHA-APS | Asetonitril:su (40:60), (60:40), (20:80) | DAD | [33] |
| İnsan kanı plazaması | Naproksin, ibuprofen | C18 | Fosforik asit (pH 2.8): asetonitril | UV | [34] |
| Nano boyuttaki ince filmler | - | C18 | Asetik asit:asetonitril (90:10), (85:15),(75:25), | PDA | [35] |
| İlaç preparatları | Klorfeniramin maleik asit, kafein | C18 | Metanol:fosfat tamponu(pH 4.0) | UV | [36] |
| İlaç preparatları | Alprazolam, kodein | C18 | Asetik asit: metanol | UV | [37] |
| İlaç preparatları | Kafein | C18 | Metanol:su (40:60) | UV | [38] |
| Kan plazması | Kafein | C18 | Asetonitril: potasyum fosfat tamponu(5:95) | UV | [39] |
| İdrar | Dopamin, epinefrin, metamizol, furosemit, sefazolin, flukonazol | C18 | Asetat tamponu (pH 4.66): metanol | Floresans | [40] |
| Sıçan kanı plazması | Temozolomit | C18 | Asetik asit: metanol (20:80) | PDA | [41] |

**Tablo 2.1** Parasetamolün HPLC ile analizi (devamı)

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Tavşan kanı plazması | Sefiksim | C18 | Fosfat tamponu (pH 6.4):asetonitril (80:20) | UV | [42] |
| Fare kanı plazması | Ropinirol | C18 | Metanol: sodyum dihidrojen fosfat (pH 4.5) (10:90) | ECD | [43] |
| İlaç preparatları | - | C18 | Potasyum hidroksit fosfat:metanol (40:60) | UV | [44] |
| İlaç preparatları | Pamabrom, disiklomin, hidroklorit | C18 | Metanol:su (83: 17) | PDA | [45] |
| İnsan kanı plazması ve idrarı | - | C18 | Amonyium asetat:methanol (97:3), (65:35), (5:95) | MS/MS | [46] |
| İlaç preparatları | - | C18 | Amonyum asetat, pH 3.5:metanol (97:3),(65:35) | MS | [47] |
| İlaç preparatları | Fenilefrin, kafein, levosetirizin | C18 | Metanol:fosfat tamponu (2:98),(80:20) | DAD | [48] |
| Sıçan kanı plazması | Kurkumin, krisin | C18 | Metanol: su (60:40) | UV | [49] |
| İlaç preparatları | Orfenadrin, kafein | C18 | Asetonitril:su (20:80) | UV | [50] |
| İlaç preparatları | Pamabrom | C8 | Metanol:asetonitril (85:10:5), (70:20:10) | UV | [51] |

**Tablo 2.1** Parasetamolün HPLC ile analizi (devamı)

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| İlaç preparatları | Askorbik asit | C18 | Metanol: fosfat tamponu (35:65) | UV | [52] |
| İlaç preparatları | Fenilefrin hidrokorit, kafein, setirizin, nimesulit | C18 | Asetonitril:fosfat tamponu (pH 3.3) (2:98), (20:80) | DAD | [53] |
| İlaç preparatları | Kafein, ibuprofen | C18 | Asetonitril fosfat tamponu (20-100:80-0) | UV | [54] |
| Yapay kan beyin bariyeri | - | XTerra RP18150 | Format tamponu | DAD | [55] |
| Fare kanı plazması | Eperison hidroklorit | C18 | Amonyum asetat tamponu:asetonitril:metanol (79:9:12), (35:25:40) (79:9:12), (79:9:12) | PDA | [56] |
| İlaç preparatları | Flupirtin maleik asit | C18 | Fosfat tamponu: ascetonitril (60:40) | UV | [57] |
| İlaç preparatları | Drotaverin, hidroklorit, kafein, dipiron | C18 | Metanol:sodyum dihidrojen fosfat | UV | [58] |

**Tablo 2.2** Parasetamolün diğer yöntemlerle analizleri

| Örnek | Diğer Maddeler | Analiz Yöntemi | Kaynak |
|---|---|---|---|
| İlaç preparatları | - | X-ışını difraksiyonu | [59] |
| Farklı kaynaklardan su örnekleri | Ketoprofen, naproksin, kafein | Spektrofotometri | [60] |
| Biyopolimer | Dopamin | Voltametri | [61] |
| İlaç preparatları | Psödoefedrin, klorfeniramin maleate | TLC | [62] |
| İlaç preparatları | Kafein, askorbik ascit | Voltametri | [63] |
| İlaç preparatları | İbuprofen, fenilefrine | Spektroflorometri | [64] |
| İlaç preparatları | Askorbik asit, guaifenesin | Voltametri | [65] |
| Gümüş nanoparçacık | Dopamin, folik asit | Voltametri | [66] |
| İdrar | - | Puls voltametrisi | [67] |
| İlaç preparatları | - | Spektroskopi | [68] |
| Doğal sular | - | Kare dalga voltametrisi | [69] |
| İlaç preparatları | - | Voltametri | [70] |
| Kan plazması | - | LC-MS/MS Voltametri | [71] |
| Kan plazması | - | Florometri | [72] |
| Boyar madde | - | Voltametri | [73] |

**Tablo 2.2** Parasetamolün diğer yöntemlerle analizleri (devamı)

| | | | |
|---|---|---|---|
| İlaç preparatları | - | Voltametri | [74] |
| Üçlü karışım | Dopamin. diklofenak | Dönüşümlü voltametri | [75] |
| İlaç preparatları | - | Dönüşümlü voltametri | [76] |
| İlaç preparatları | - | Voltametri | [77] |
| Biyolojik sıvılar | Norefinefrin, tirosin, askorbik asit | Voltametri | [78] |
| İlaç preparatları | Norefinefrin | Voltametri | [79] |
| İlaç preparatları | - | UV Spektrofotometri | [80] |
| Yüzey suları | - | Voltametri | [81] |
| İlaç preparatları | - | Kare dalga voltametrisi | [82] |
| İlaç preparatları | - | Spektroskopi | [83] |
| Nehir suyu | Kafein | GC | [84] |
| İlaç preparatları | - | Kare dalga voltametrisi | [85] |
| Karışım | Folik Asit | Dönüşümlü voltametri | [86] |
| İlaç preparatları | Asetilsalisilik asit, parasetamol, askorbik asit | Kemometri | [87] |
| İlaç preparatları | Mefenamik Asit | Voltametri | [88] |
| Biyolojik sıvılar | Siprofloksasin | Voltametri | [89] |

**Tablo 2.2** Parasetamolün diğer yöntemlerle analizleri (devamı)

| | | | |
|---|---|---|---|
| İlaç preparatları | Propifenazon, kafein | Amperometri | [90] |
| İdrar | Dopamin | Voltametri | [91] |
| İlaç preparatları | - | Kemilüminesans | [92] |
| İlaç preparatları | Kodein, orfenadrin, prometazin, tramadol | Kapiler Elektroforez | [93] |
| Canlı sıvısı, ilaç preparatları | Pamabrom, pirilamin, maleik asit | Spektrofotometri | [94] |
| İlaç preparatları | Tolperison Hidroklorid | Spektrofotometri | [95] |
| İlaç preparatları | Tramadol | GC | [96] |
| İlaç, kan, idrar | Setirizin, fenilefrin | Voltametri | [97] |
| İdar, kan | Dopamin | Voltametri | [98] |
| İlaç preparatları | Kodein | Kemilüminesans | [99] |
| İnsan kanı | Psödoefedrin, loratidin | HPTLC | [100] |
| İnsan idrarı | İmipenem, siprofloksasin hidroklorit, deksametason sodyum fosfat, silastatin sodyum | Spektrofotometri | [101] |
| İlaç preparatları | Tramadol | Spektrofotometri | [102] |
| Morfin | - | Voltametri | [103] |

**Tablo 2.2** Parasetamolün diğer yöntemlerle analizleri (devamı)

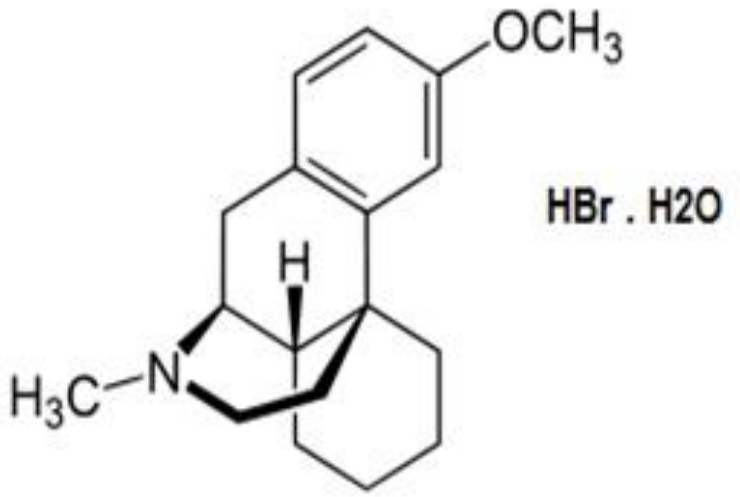
| | | | |
|---|---|---|---|
| İlaç preparatları | Dantrolen Sodyum | Spektrofotometri | [104] |
| İlaç preparatları, idrar | Metildopa | Voltametri | [105] |
| İnsan idrarı | - | Camsı Karbon Elektrot | [106] |
| İlaç preparatları | Nörotransmitter | Voltametri | [107] |
| İlaç preparatları | Kodein | Kare dalga voltametrisi | [108] |
| İlaç preparatları, insan kanı | Kodein | Camsı Karbon Elektrot | [109] |
| İlaç preparatları | p-aminofenol | Spektrofotometri | [110] |
| İlaç preparatları | - | Spektrofotometri | [111] |
| İlaç preparatları | Kafein | Voltametri | [112] |

### 2.1.1.2 Dekstrometorfan Hidrobromür

**- Özellikleri**

Kapalı formülü: $C_{18}H_{26}BrNO$

Yapısal formülü:




**Şekil 2.2** Dekstrometorfan hidrobromürün yapısal formülü

Kimyasal Adı: (1S,9S,10R)-4-methoxy-17-methyl-17-azatetracyclo[7.5.3.01,10.02,7]heptadeca-2(7),3,5-triene;hydrobromide

Molekül ağırlığı: 352.316 g/mol

Renk ve görünüş: Renksiz-beyaz, kristalize toz.

Erime noktası: 122-124 °C

Çözünürlüğü: Suda iyi çözünür.

**- Farmakolojik Etkisi**

Dekstrometorfan hidrobromür, dekstrometorfanın hidrobromür tuzu formundadır. Dekstrometorfan soğuk algınlığı ya da gribin yol açtığı öksürüğün tedavisinde kullanılan ve antitusif sınıfında olan ilaç etken maddesidir. Sentetik bir morfin türevidir. Bağımlılık özelliği göstermez. Öksürük merkezi üzerine morfine eşdeğer etki gösterir fakat solunumu baskı altına alan etkisi morfinden azdır. Sindirim kanalı hareketleri ve bağırsak mukozasının sıvı salgılamasını engeller [113]. Kan-beyin bariyerini geçerek merkezi sinir sistemindeki öksürük merkezindeki reseptörleri aktive eder, böylece öksürük refleksini baskılar. Ağrı kesici etkisi yoktur. Vücuttan yavaş atıldığı için uzun süreli etki sağlar [114].

**- Zararları**

Yüksek dozları solunumu baskılar. Karaciğer hastalıklarında dikkatli kullanılmalıdır. Astım rahatsızlığı olan hastalarda ise kullanılmamalıdır [113].

**- Miktar Tayin Yöntemleri**

Dekstrometorfan hidrobromür ile yapılan çalışmalar çoğunlukla kromatografik yöntemler ile yapılmıştır. Dekstrometorfan hidrobromürün HPLC ile analizleri Tablo 2.3'de, diğer analitik yöntemlerle analizleri **Tablo 2.4'de** verilmiştir.

**Tablo 2.3** Dekstrometorfan hidrobromürün HPLC ile analizleri

| Örnek | Diğer madde | Kolon | Hareketli Faz | Dedektör | Kaynak |
|---|---|---|---|---|---|
| İlaç Şurup | - | C18 | Asetonitril:metanol (70:30) | UV | [115] |
| İlaç Preparatları | Klorfeniramin maleat, ibuprofen | C8 | Metanol:asitonitril:su (80:10:10) | UV | [116] |
| İlaç Preparatları | Klorfeniramin maleik asit | C18 | Su:asetonitril (60:40) | PDA | [117] |
| İlaç Preparatları | Kinidin | C8 | Metanol:fosfat tamponu (60:40) | UV | [118] |
| Doğrudan | Metorfan, levometorfan | Chirobiotic V2 | Metanol:amonyum hidroksit:asetik asit (100:0.02:0.1) | DAD | [119] |
| Çekirdek-kabuk | Fenilefrin hidroklorit, parasetamol, efedrin hidroklorit, doksilamin süksinat | C18 | Tampon ve Asetonitril | UV | [120] |
| İlaç preparatları | Bromheksin, klorfenilamin maleik asit | C18 | Metanol: asetonitril: fosfat tamponu (50:25:25) | UV | [121] |

**Tablo 2.3** Dekstrometorfan hidrobromürün HPLC ile analizleri (devamı)

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| İlaç preparatları Sitokrom P450 | Fenasetin, diklofenak, S-mefenitoin, nifedipin, testosteron | C18 | Amonyum asetat: asetontril (90:10) (5:95) amonyum asetat tamponu:metanol (5:95) | UV | [122] |
| Ölü ve canlı sıçan kanı plazması | Fenasetin, tolbutamit, testosteron | C18 | Metanol: su: fosfat: trietilamin (42:58:0.15:0.3) | UV | [123] |
| Şurup | Fenilpropanol-amin, klorfeniramin maleik asit | C18 | Su: asetonitril (77 : 23) | UV | [124] |

**Tablo 2.4** Dekstrometorfan hidrobromürün diğer yöntemlerle analizleri

| **Örnek** | **Diğer Maddeler** | **Analiz Yöntemi** | **Kaynak** |
|---|---|---|---|
| İnsan kanı plazması | Tramadol, klorfeniramin | MS/MS | [125] |
| Atık sular | Fentanil, metadon, tramadol, propoksifen | LC/QTOF-MS | [126] |
| Yasadışı tabletler | Kafein, hidromorfon, asetilkodein, eroin | GC-MS | [127] |
| Kan plazması | Midazola, omeprazol, losartan | LC-MS/MS | [128] |
| İskelet dokuları | Tramadol | UPLC | [129] |
| Kan plazması | Narkotin, kodein | SPE-LC-MS-MS | [130] |

**Tablo 2.4** Dekstrometorfan hidrobromürün diğer yöntemlerle analizleri (devamı)

| | | | |
|---|---|---|---|
| İdrar | Levorfanol | LC-MS/MS | [131] |
| İskelet kalıntıları | - | GC-MS | [132] |
| At idrarı | - | LC-MS/MS | [133] |
| Kan plazması ve idar | Kafein, bupropion, tolbutamit, omeprazol, midazolam | LC-MS/MS | [134] |
| Ekstazi hapları | Kafein, metorfan klobenzoreks | FT-Raman Spektroskopi | [135] |
| Fare iskelet kalıntıları | Dekstrorfan | GC/MS | [136] |
| Kan plazması | Klorfeniramin, diazepam, doksilamin | GC-MS | [137] |
| Madde karışımı | Fenasetin , kumarin, bupropiyon , diklofenak, testosteron | LC/MS/MS | [138] |
| İlaç preparatı | Sığır serum albumin | SPE | [139] |
| İnsan kanı | İmipramin, buspiron, midazolam, etoksiresorufin, diklofenak | LC/HRMS | [140] |
| İlaç preparatları | - | UHPLC | [141] |
| İlaç preparatları | Tolbutamit, S-mefenitoin, testosteron, nifedipin, midazolam, kumarin, bupropion , diklofenak fenasetin , klorzoksazon, omeprazol, paklitaksel | LC/MS/MS | [142] |

**Tablo 2.4** Dekstrometorfan hidrobromürün diğer yöntemlerle analizleri (devamı)

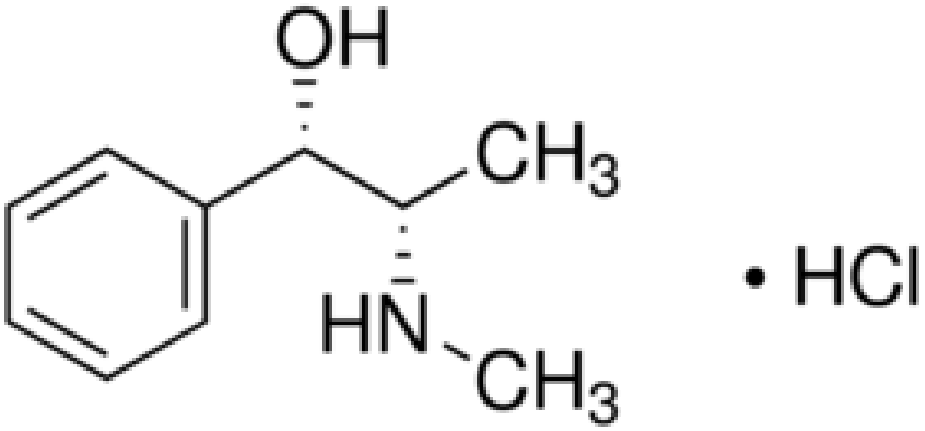
| | | | |
|---|---|---|---|
| Kan plazması | Karisoprodol, meprobamat, fluoksetin, doksilamin, orfenadrin, hidroksizin | LC-MS/MS | [143] |

### 2.1.1.3 Psödoefedrin Hidroklorür

**- Özellikleri**

Kapalı Formülü: $C_{10}H_{15}NO$

Yapısal Formülü:




**Şekil 2.3** Psödoefedrinin yapısal formülü

Kimyasal Adı: (1S,2S)-2-(metilamino)-1-fenilpropan-1-ol

Molekül Ağırlığı: 201,7 g/mol

Renk ve Görünüş: Şeffaf-beyaz kristalize toz

Erime Noktası: 119 °C [144]

**- Farmakolojik Etkisi**

Psödoefedrin solunum sistemi hastalıklarında veya alerjiler ile ilişkili doku hiperemi ve burun tıkanıklığını azaltmada kullanılır. Ayrıca sinüs salgı drenajının kolaylaştırılması ve arttırılmasında ve tıkalı olan östaki borularının açılmasında yararlı bir etkisi vardır. Psödoefedrin; ağızdan veya topikal dekonjestan olarak da kullanılabilir. Psödoefedrin,

bir çalışmaya göre öksürüğü tedavi edici bir ilaç olarak da kullanılabilir (öksürük baskılanması) [145].

**- Zararları**

Psödoefedrinin en belirgin yan etkisi hipertansiyona sebep olmasıdır. Bununla birlikte, uyarıcı olarak kullanılabilmesi nedeniyle, özellikle oral preparatının, olumsuz etkilere neden olma olasılığı yüksektir [145]. İçerdiği amfetamin etken maddesi sebebiyle doz aşımı olması durumunda hastalarda oldukça ciddi manada uyku bozuklukları ve halüsinasyonlara sebebiyet vermektedir. Amfetaminin etkisi beyin zarından geçmesiyle oluşur ve bu genellikle 180 miligram ve üzerinde alındığında ortaya çıkmaktadır. Oldukça tehlikeli olan bu durum, beyin kanaması gibi birçok hayati riski de bulunmaktadır [146].

**- Miktar Tayin Yöntemleri**

Psödoefedrin ile yapılan çalışmalar çoğunlukla kromatografik ve spektrofotometrik yöntemler ile yapılmıştır. Psödoefedrinin HPLC ile analizleri Tablo 2.5'te, diğer analitik yöntemlerle analizleri ise Tablo 2.6'da gösterilmiştir.

**Tablo 2.5** Psödoefedrinin HPLC ile analizleri

| Örnek | Diğer Madde | Kolon | Hareketli Faz | Dedektör | Kaynak |
|---|---|---|---|---|---|
| İlaç preparatları | Klorfeniramin maleat, ibuprofen | C8 | Etil asetat: metanol: amonyak (8:2:0.8) | UV | [147] |
| İlaç preparatları | Efedrin, aloe-emodin, krizofanol, palmatum | C18 | Su: asetonitril (60:40), (40:60), (20:80) | UV | [148] |

**Tablo 2.5** Psödoefedrinin HPLC ile analizleri (devamı)

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Atık sular, anne sütü | Lidokain, propranolol | ODS-3 MZ | Fosfat tamponu, (pH 3.0): asetonitril (10:90), (75:25), (10:90) | UV | [149] |
| Şurup | Guaifenesin, sodium benzoat, günbatımı sarısı, paraben | C18 | Fosfat tamponu: asetonitril (85:15) | PDA | [150] |
| Şurup | Gliserol guaiakolat | C18 | Su | UV | [151] |
| İlaç preparatları | Akrivastin | C18 | Sodyum dihidrojen fosfat, metanol | PDA | [152] |
| İnsan serumu örneği | Efedrin | C18 | Sodyum Dodesil Sülfat, Sodyum dihidrojen fosfat | DAD | [153] |
| Şurup | Bromheksin, Gliserol guaiakolat, Ambroksol, Salbutamol/Terbutalin, Triprolidin, Klorfeniramin | C18 | Asetonitril, Sodyum Heksasülfonat, Amonyum Asetat, Su pH:3 (35:4:10:51) | UV | [154] |

**Tablo 2.5** Psödoefedrinin HPLC ile analizleri (devamı)

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Kimyasal örneği | Metamfetamin, parasetamol, prokain, aspirin | C18 | Asetonitril | MS | [155] |
| İlaç preparatları | Parasetamol, loratadin, | CN | Metanol–Asetonitril–Su–THF (50:40:10:2.5) | UV | [156] |
| İdrar numuneleri | - | C8 | Metanol - fosfat tamponu (10:90) | UV | [157] |
| İlaç preparatları | Fluoksetin, Tiratrikol | C18 | Fosfat tamponu | UV | [158] |
| İlaç preparatları | Feksofenadin, Setirizin | Difenil | Asetonitril, fosfat tamponu (30:70) | CL | [159] |
| İlaç preparatları | Feksofenadin hidroklorür | C18 | Dioktil sodyum sülfosüksinat tamponu | UV | [160] |
| Bitki örneği | Metilefedrin, efedrin, | Siyano | Asetonitril, amonyun asetat (95:5) | UV | [161] |
| İlaç preparatları | Askorbik asit, parasetamol | C18 | Metanol, fotfat tamponu (35:65) | UV | [162] |
| Bitki örneği | Efedrin | C18 | Asetonitril, fosforik asit (90:10) | UV,MS | [163] |
| Bitki örneği | Efedrin, metilefedrin | C18 | Sosyum dodesil sülfat, potasyum hidrojen fosfat (90:10) | DAD | [164] |

**Tablo 2.5** Psödoefedrinin HPLC ile analizleri (devamı)

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| İlaç preparatları | Rasajilin mesilat | C18 | Asetonitril, su, perklorik asit (250:750: 5) | UV | [165] |
| Su örnekleri | Metamfetamin | C18 | Fosfat tamponu, asetonitril (65:35) | DAD | [166] |
| İlaç preparatları | Askorbik asit, ibuprofen | C18 | Sodyum dodesil sülfat, 1-propanol, trietilamin, fosforik asit | UV | [167] |
| Köpek idrarı | 14-tiyenil metilen matrin, matrin | C18 | Asetonitril, formik asit (65:35) | MS | [168] |

**Tablo 2.6** Psödoefedrinin diğer yöntemlerle analizleri

| **Örnek** | **Diğer Maddeler** | **Analiz Yöntemi** | **Kaynak** |
|---|---|---|---|
| İnsan kanı plazması | Klorfeniramin Maleik asit | Potansiyometri | [169] |
| İlaç preparatları | Klorfeniramin | Voltametri | [170] |
| İlaç preparatları | - | Voltametri | [171] |
| İdrar örneği | Tramadol | Elektromembran ekstraksiyonu | [172] |
| İlaç preparatları | Efedrin, metilefedrin, norefedrin | CE | [173] |
| İlaç preparatları | Parasetamol, metil 4-hidroksibenzoat, propil 4-hidroksibenzoat, klorofeniramin, maleik asit | Spektrofotometri | [174] |

**Tablo 2.6** Psödoefedrinin diğer yöntemlerle analizleri (devamı)

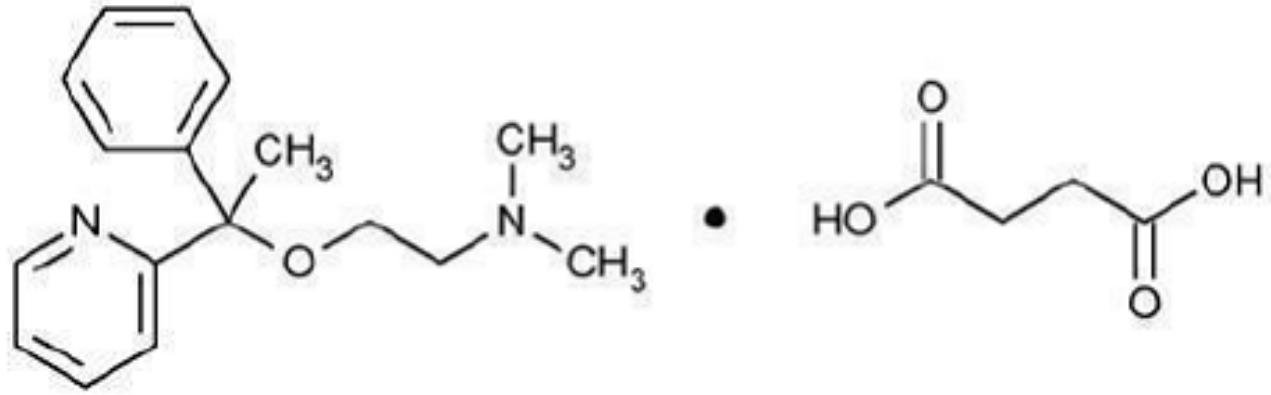
| | | | |
|---|---|---|---|
| Zayıflama hapı örneği | Floksetin, tiratrikol, benfloreks | Spektrofotometri | [175] |
| İlaç preparatları | Asetaminofen, difenilhidramin | Spektrofotometri | [176] |

### 2.1.1.4 Doksilamin Süksinat

**- Özellikleri**

Kapalı Formül: $C_{21}H_{28}N_2O_5$

Yapısal Formül:




**Şekil 2.4** Doksilamin Süksinatın yapısal formülü

Molar Kütle: 388.464 g/mol

Renk ve Görünüş:Beyaz ya da Kremsi beyaz toz

Kimyasal Adı: N, N-dimetil-2- (1-fenil-1-(2-piridinil) etoksi) -bütandioat

Erime Noktası: 217 - 226 ° F

Kaynama Noktası: 364.9 °C

Yoğunluk: 1.043 g/$cm^3$

Çözünürlük:Suda iyi derecede çözünür.

**- Farmakolojik Etkisi**

Doksilamin Süksinat, belirgin sedatif özelliklere sahip bir piridin türevi histamin H1 antagonistidir. Doksilamin süksinat, histamin H1 reseptörünü rekabetçi bir şekilde bloke eder ve bronşiyal ve mide bağırsak kasları üzerindeki düz kasların histamininin, bronşiyal ve mide bağırsak kasları üzerindeki histamininin, bronş ve gastrointestinal düz kaslar üzerindeki hareketlerinin neden olduğu, bronkokonstriksiyon, vazodilatasyon, artan kapiller geçirgenliği ve spazmodik kasılması dahil, tipik alerjik ve anafilaktik tepkileri sınırlar. Bu ilaç aynı zamanda histamin kaynaklı ağrıları ve cilt ile mukoza zarlarının kaşınmasını önler.

**- Zararları**

Bu bileşiğe maruz kalma belirtileri uyuşukluk, uyarılabilirlik, sinirlilik, baş dönmesi,uyku hali veya tam tersine uykusuzluk, taşikardi, zihinsel bozulma, bulantı, kusma, baş dönmesi ve midriyazis gibi antikolinerjik semptomlar içerebilir.

**- Miktar Tayini Yöntemleri**

**Tablo 2.7** Doksilamin Süksinatın HPLC ile analizleri

| **Örnek** | **Diğer Maddeler** | **Kolon** | **Hareketli Faz** | **Dedektör** | **Kaynak** |
|---|---|---|---|---|---|
| İlaç preparatı | Piridoksin hidroklorür | C18 | Fosfat tamponu: Metanol (40:60) | UV | [177] |
| İlaç preparatı | Fenilefrin Parasetamol | C18 | pH 5.0 tamponu:Asetonitril | UV | [178] |
| İlaç preparatı | Fenilefrin hidroklorür Parasetamol Efedrin hidroklorür Guaifenesin | C18 | pH 5.0 tamponu:Asetonitril | UV | [179] |

Doksillamin Süksinat ile yapılan çalışmalar çoğunlukla spektrofotometrik ve kromatografik yöntemler ile yapılmıştır. Dosilamin Süksinat HPLC ile analizleri Tablo 2.7'de, diğer analitik yöntemlerle analizleri ise Tablo 2. 8'te gösterilmiştir.

**Tablo 2.8** Doksilamin Süksinatın Diğer Yöntemlerle Analizi

| **Örnek** | **Diğer Maddeler** | **Analiz Yöntemi** | **Kaynak** |
|---|---|---|---|
| İlaç preparatı | Salisilamid<br>Magnezyum salisilat<br>Metoprolol süksinat<br>Nebivolol hidroklorür<br>Amiodoran hidroklorik asit | Densitometri | [180] |
| Kimyasal karışım | Piridoksin hidroklorür | Kemometri | [181] |
| İlaç preparatı | Piridoksin hidroklorür | Spekrofotometri | [182] |

## 2.2 İlaç Katkı Maddeleri

İlaç katkı maddeleri; ilaçların yapımında ya da uygulanmasında, ilaçlara biçim, yutulabilirlik ve dayanıklılık vermek için kullanılan maddelerdir. Farmakolojik açıdan etkisizdirler ancak ilaç emilimini ve etki mekanızmasını göstermesini sağlayan uygun bir ortam yaratırlar. Bu nedenle ilaç içersinde etken maddelerin yanısıra fizikokimyasal özelliklerine göre seçilen katkı maddeleri bulunur.

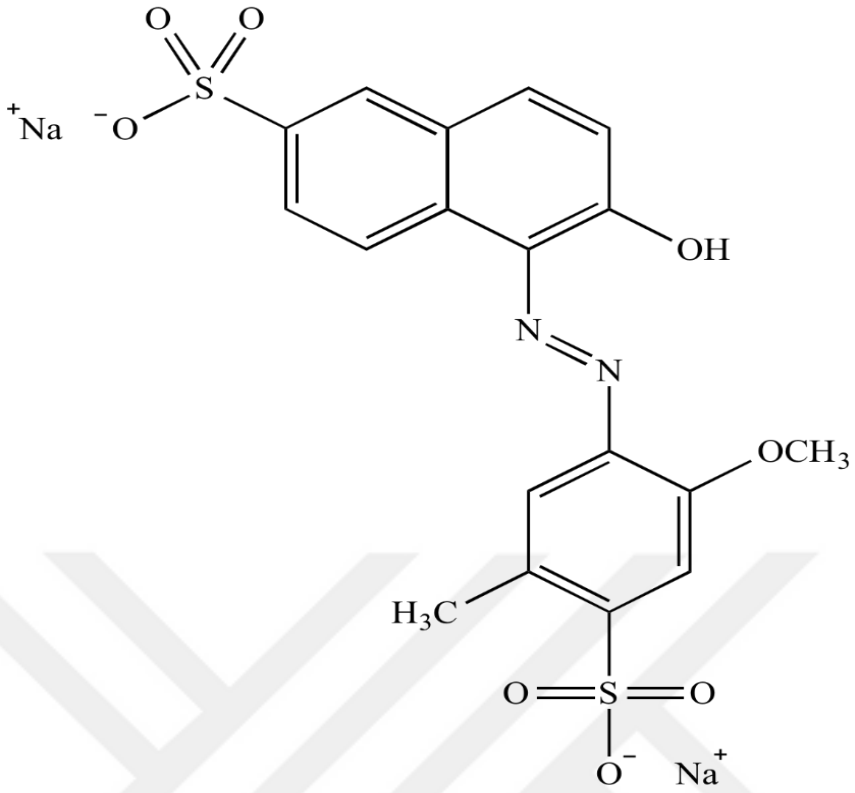
### 2.2.1 Çalışılan Katkı Maddeleri

#### 2.2.1.1 Allura Kırmızısı

**- Özellikleri**

Kapalı Formül: : C18H14N2Na2O8S2

Yapısal Formül:




**Şekil 2.5** Allura Kırmızısının yapısal formülü

Kimyasal Adı: disodyum 6-hidroksi-5-((2-metoksi-5-metil-4-sülfofenil)azo)-2-naftalinsulfonat

Moleküler Ağırlık: 496,42 g/mol

Renk ve Görünüş: Kırmızı toz veya granül

Çözünürlüğü:Suda çok,alkolde az çözünür.

E numarası: 129

**- Etkileri**

Allura Kırmızısı AC (E129), İnsanla temas eden gıda, ilaç, kozmetik, temizlik ürünleri, renkli taş, oyun hamuru vb birçok ürünün renklendirilmesinde yaygın olarak kullanılan bir azo boyasıdır.

**- Zararları**

Allura Kırmızısı özellikle diğer sentetik renklerle karıştırıldığında, ürtiker gibi alerjik reaksiyonlara,yetişkinlerde ve çocuklarda astıma ve gelişmekte olan çocuklarda

hiperaktiviteye neden olabilir. Birçok araştırmacının insanlar üzerinde toksik ve kanserojen etkisi olduğuna dair çalışmaları mevcuttur. Vücut ağırlığı üzerinden, kabul edilebilir maksimum günlük alım miktarı 7 mg/kg'dır.

**- Miktar Tayin Yöntemleri**

Allura kırmızı daha çok gıda örneklerinde analiz edilmiştir. HPLC'nin yanısıra tercih edilen teknikler spektrofotometrik ve elektroanalitiktir. Allura kırmızı 'in HPLC ile analizleri Tablo 2.9'da, diğer analitik yöntemlerle analizleri Tablo 2.10'da verilmiştir.

**Tablo 2.9** Allura Kırmızısı'nın HPLC ile analizleri

| Örnek | Diğer Maddeler | Kolon | Hareketli Faz | Dedektör | Kaynak |
|---|---|---|---|---|---|
| Gıda Ürünleri | Amarant<br>Ponso 4R<br>Karmine<br>Ponso 4X<br>Ponso 3R<br>Karmosin<br>Turuncu(1-2-3-4) | C18 | Asetonitril, Asetat Tamponu | UV-DAD | [183] |
| Gıda Ürünleri | Günbatımı sarısı<br>Kuinolin sarısı<br>Tartrazin | C18 | Asetonitril, Asetat Tamponu | UV-DAD | [184] |
| Silika Nanosferleri | Tartrazin<br>Amarant<br>Günbatımı sarısı<br>Turuncu 2 | C18 | Metanol, Asetat Tamponu | UV-DAD | [185] |

**Tablo 2.9** Allura Kırmızısı'nın HPLC ile analizleri (devamı)

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Spor İçecekleri | Brillant mavisi<br>Kuinolin sarısı<br>Karmosin<br>Indigotin<br>Günbatımı sarısı<br>Kafein<br>Sodyum benzoat | C18 | Asetonitril, Fosfat Tamponu | UV | [186] |
| Yumuşak İçecek Örnekleri | Potasyum sorbat<br>Sodyum benzoat<br>Karmosine<br>Ponso 4R<br>Kafein | C18 | Asetonitril, Sodyum Asetat Tamponu | ODS | [187] |
| Gıda Boyaları | Tartrazin, Amarant, Indigo karmin, Ponso 4R, Günbatımı sarısı, Brilliant siyahı BN, Asit kırmızısı | C18 | Asetonitril, Amonyum Asetat Tamponu | DAD | [188] |

**Tablo 2.9** Allura Kırmızısı'nın HPLC ile analizleri (devamı)

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Hazır Gıda Ürünleri | Ponso 4R, Indigo karmin, Eritrosin, Tartrazin, Günbatımı sarısı, Deniz yeşili, Brilliant mavisi, Allura kırmızısı, Amarant, Dimetil sarı, Fast Garnet GBC,Turuncu I, Turuncu II, Turuncu III, Turuncu IV, Turuncu kırmızı 7B, Turuncu kırmızı B, Turuncu kırmızı | C18 | Asetat, Asetik Asit Tamponu | MS | [189] |
| Hazır Gıda Ürünleri | Amarant Ponso 4R Ponso 3R Ponso SX Karmin Karmoisin Eritrosin Turuncu I, Turuncu II, Turuncu III, Turuncu IV | C18 | Asetonitril, Asetat Tamponu | UV-DAD | [190] |

**Tablo 2.9** Allura Kırmızısı'nın HPLC ile analizleri (devamı)

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| İçecek | Tartrazin<br>Günbatımı sarısı<br>Ponso 4R<br>Amarant<br>Deniz yeşili<br>Eritrosin B<br>Brillant mavisi | C18 | Asetonitril,<br>Amonyum Asetat,<br>Metanol | DAD | [191] |
| Un ve Et örneği | Amarant, Azo rubin, Brilliant mavisi, Eritrosin, Indigotin, 30<br>Ponso 4R, Asit kırmızısı,<br>Günbatımı sarısı,<br>Kinolin sarısı<br>Tartrazin | C18 | Asetonitril<br>Amonyum Asetat tamponu | DAD-MS | [192] |
| Gıda ürünleri | Amarant<br>Ponso 4R<br>Günbatımı sarısı<br>Karmoisin<br>Eritrosin | C18 | Metanol<br>Amonyak<br>(80:20) | DAD | [193] |
| Kek Örneği | Tartrazin<br>Indigotin<br>Brillant mavisi<br>Günbatımı sarısı<br>Karmoisin<br>Kuinolin sarısı<br>Ponso 4R | C18 | Fosfat tamponu | UV-VIS | [194] |

**Tablo 2.9** Allura Kırmızısı'nın HPLC ile analizleri (devamı)

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Pirinç Örneği | Tartrazin<br>Indigotin<br>Brillant mavisi<br>Günbatımı sarısı<br>Karmoisin<br>Kuinolin sarısı<br>Ponso 4R | C18 | Fosfat tamponu | UV-VIS | [195] |
| Organik Çözücü | Amarant<br>Günbatımı sarısı<br>Eritrosin | C18 | Metanol<br>Su<br>(50:50) | UV-VIS | [196] |
| Meyve suyu | Tartrazin<br>Indigotin<br>Brillant mavisi<br>Günbatımı sarısı<br>Karmoisin<br>Kuinolin sarısı | C18 | Fosfat Tamponu | UV-VIS | [197] |
| Sentetik Yiyecek Boyaları | Günbatımı sarısı<br>Kuinolin sarısı<br>Tartrazin | C18 | Asetonitril<br>Asetat tamponu | UV | [198] |
| Şarap | Tartrazin<br>Amarant<br>Karmin<br>Günbatımı sarısı<br>Brillant mavisi<br>Eritrosin | C18 | Metanol<br>Su | UV | [199] |
| Elektronik Sigara Likiti | Tartrazin<br>Brillant mavisi | C18 | Diamonyum Fosfat tamponu | UV-VIS DAD | [200] |
| Yiyecek Örneği | Tartrazin<br>Günabatımı sarısı | C18 | Metanol<br>Amonyum Asetat çözeltisi | UV | [201] |

**Tablo 2.9** Allura Kırmızısı'nın HPLC ile analizleri (devamı)

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Kimschi (Kore Yemeği) | Ponso 4R, Allura kırmızısı, Amarant, 4-hidroksimetil benzoik asit, etil-4-hidroksibenzoat, butil-4-hidroksibenzoat eSakkarin sodyum | C18 | Asetonitril Metanol | UV | [202] |
| Farklı Besin Maddeleri | Tartrazin Amarant Karmin | C18 | Amonyum Asetat Metanol | FTIR | [203] |
| Gıda Ürünleri | Günbatımı sarısı Kuinolin sarısı Tartrazin | C18 | Asetonitril metanol | UV | [204] |
| Yiyecek ve İçecek Örnekleri | ---- | C18 | Amonyum Asetat Metanol | UV | [205] |
| Şekerli Tüketim Ürünleri (Dondurma ,Sakız,Çikolata | Amarant Günbatımı Sarısı | C18 | Amonyum Asetat çözeltisi | UV | [206] |
| Meyve Suyu | Amarant Ponso 4R Karmoisin | ODS3 | Asetonitril Amonyum Asetat | UV | [207] |

**Tablo 2.9** Allura Kırmızısı'nın HPLC ile analizleri (devamı)

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Şarap Örneği | Tartrazin Amarant Karmin, Brillant mavisi, Eritrosin | C18 | Amonyum Asetat Metanol | UV | [208] |

**Tablo 2.10** Allura Kırmızısı'nın Diğer Yöntemlerle Analizi

| **Örnek** | **Diğer Maddeler** | **Analiz Yöntemi** | **Kaynak** |
|---|---|---|---|
| Jelatin | Amarant Ponso 4R | Voltametri | [210] |
| Şeker | Amarant Eritrosin Deniz yeşili İndigo karmin Kuinolin sarısı Günbatımı sarısı Tartrazin | TLC | [211] |
| İçecek Örneği | Brillant mavisi | Katı Faz Kromotografisi | [212] |
| İçecek Örneği | Günbatımı sarısı | Yüzey Geliştirilmiş Raman Spektroskopisi | [213] |
| Şeker Örneği | İndigo karmin | Amperometri | [214] |
| Alkolsüz İçecek Örneği | ------- | Florimetri | [215] |
| Yemek Örneği | Günbatımı sarısı Amarant Tartrazin Deniz yeşili | Gravimetri | [216] |

**Tablo 2.10** Allura Kırmızısı'nın Diğer Yöntemlerle Analizi (devamı)

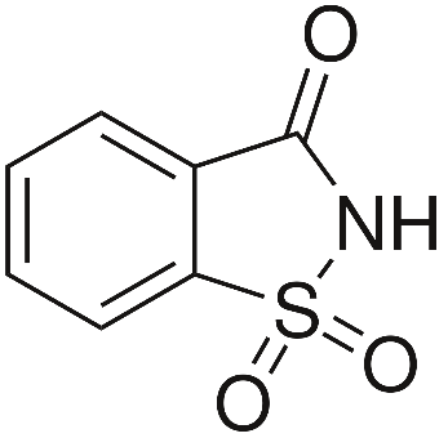
| | | | |
|---|---|---|---|
| Yemek Örneği | Günbatımı sarısı<br>Amarant<br>Tartrazin | Potansiyometri | [217] |
| Toprak Örneği | Tartrazin | FTIR | [218] |
| İnsan Serumu Albumini | - | Floresans | [219] |
| Bisküvi Örneği | - | UHPLC-MS | [220] |
| İçecek Örneği | - | Voltametri | [221] |
| Jelatin Bazlı Şekerlemeler | - | LC | [222] |
| Şarap | Polipropilen | LC | [223] |
| İçecek Örneği | - | Elektroforez | [224] |
| Yiyecek Örneği | Asetonitril<br>Metanol | TLC | [225] |

### 2.2.1.2 Sakkarin

**- Özellikleri**

Kapalı Formül: $C_7H_5NO_3S$

Yapısal Formül:




**Şekil 2.6** Sakkarinin yapısal formülü

Molekül Ağırlığı: 183,18 g/mol

Renk ve Görünüş: Beyaz, kristal katı

Kimyasal Adı: 1,1-diokso-1,2-benzotiazol-3-on

Erime Noktası: 228,8 °C

Yoğunluk: 828 kg/$m^3$

Çözünürlük: Suda iyi çözünür.

**- Etkileri**

Diyabetli hastalar genelde antidiabetik ilaçlar ve tatlandırıcılar kullanırlar. Bu hastalığa sahip bireyler tatlandırıcıları hayatlarında şeker yerine kullanırlar. Sakarin, çay şekerinden 200 – 300 kat daha tatlıdır. Enerji değerleri yoktur, ağızda metalik bir tad bırakır. Uzun süre kaynatmalarda tatlandırıcı özelliği kaybolur.

**- Zararları**

Sakarin kullanan kişilerde ender olarak kusma gibi alerjik reaksiyonlar, ışığa karşı hassasiyet, dışkı kıvamında değişme, adet periyodunda farklılık gibi etkiler görülebilir. Çocukların yüksek dozda alması sonucunda kramp, taşikardi, hallusinasyon gibi etkiler yapar. Ticari satışı yaklaşık tek başına 12,5 miligramlık tabletler halinde veya Sakarin Sodyum 12,5 mg ve Sodyum Siklamat 125 mg karışımı şeklinde yapılmaktadır. Bazı ürünlerde sakarin ile ilgili kanser uyarısı olduğundan bunu belirtmek zorunludur. Günde en fazla 5 mg / kg (vücut ağırlığı) kullanılmalıdır.

**- Miktar Tayin Yöntemleri**

Sakarin, içecek başta olmak üzere birçok örnekte çok çeşitli yöntemlerle tayin edilmiştir. Sakarinin HPLC ile analizleri Tablo 2.11'da, diğer yöntemlerle analizleri Tablo 2.12'de verilmiştir.

**Tablo 2.11** Sakkarin'in HPLC ile analizi

| Örnek | Diğer Madde | Kolon | Hareketli Faz | Dedektör | Kaynak |
|---|---|---|---|---|---|
| Karbonik İçecek | Benzoik asit, Sorbik asit sodyum, Sodyum siklamat | C18 | Metanol-amonyum asetat | RID | [226] |
| Meyve | Tartrazin | C18 | Metanol | DAD | [227] |

**Tablo 2.11** Sakkarin'in HPLC ile analizi (devamı)

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Gıda numuneleri, kozmetik ürünleri | Hidroksibenzoat, asesülfam, propil galat, butil hidroksi anisol | C18 | Asetonitril, fosfat tamponu pH 6,0 | UV | [228] |
| Tuz | Kafein, Salisik Asit, Benzoik Asit | C18 | Asidik su (asetik asit ile pH 3) ve asetonitril | UV-VIS | [229] |
| Alkolsüz diyet içecekler | Aspartam, fenilalanin | LiChrosorb RP18 | Metanol,asetonitril, fosfat tamponu (2:17:81) | Spektrofluorimetrik ve Spektrofotometrik | [230] |
| İçecekler ve reçeller | Asesülfam-K, benzoik ve sorbik asit | RP-C 18 | | UV | [231] |
| Gıda Ürünleri | Aspartam, benzoik asit, sorbik asit, vanilin, kafein, karmin, gün batımı sarısı | Shim-pack CLC-ODS | metanol-20 mmol/L NH4Ac (44:56, pH 7.0) | UV | [232] |

**Tablo 2.12** Sakkarin'in diğer yöntemler ile tayini

| **Örnek** | **Maddeler** | **Analiz yöntemi** | **Kaynak** |
|---|---|---|---|
| İçkiler | Sodyum benzoat, Kafein | Kromatografi | [233] |
| Diyet Ürünleri | _ | Potansiyometri | [234] |

**Tablo 2.12** Sakkarin'in diğer yöntemler ile tayini (devamı)

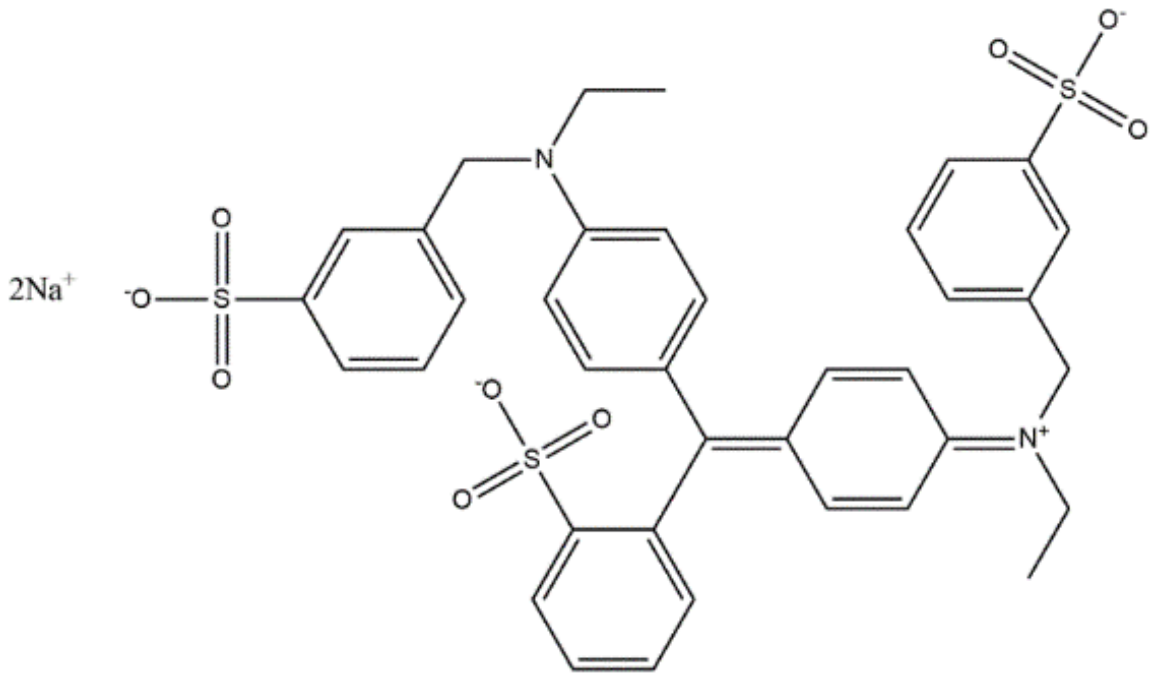
| | | | |
|---|---|---|---|
| Alkolsüz İçecekler ve İlaçlar | _ | Spektrofotometri | [235] |
| Tatlandırıcılar ve meyve suyu tozları | Asesülfam-K (AC-K) | UV-VIS | [236] |
| Gıda Ürünleri | _ | UV Spektrofotometrisi | [237] |
| Tatlandırıcılar | _ | Potansiyometri | [236] |
| İçecekler ve tatlılar | Sodyum sakkarin | Kromatografi | [237] |
| Kininli içecekler | Kinin, hidrokinin, sodyum benzoat | Kromatografi | [238] |
| Biyolojik sıvılar | _ | GLC-Kütle Fragmentografi | [239] |
| Alkolsüz İçecekler ve Tatlandırıcılar | Aspartam, siklamat, asesülfam-K | CE | [240] |
| Kalorisiz Tatlandırıcılar | Aspartam | CE | [241] |

### 2.2.1.3 Birillant Mavisi

**- Özellikleri**

Kapalı Formül: $C_{37}H_{34}N_2Na_2O_9S_3$

Yapısal Formül:




**Şekil 2.7:** Birillant mavisinin yapısal formülü

Kimyasal Adı: disodium;2-[[4-[ethyl-[(3-sulfonatophenyl)methyl]amino]phenyl]-[4-[ethyl-[(3-sulfonatophenyl)methyl]azaniumylidene]cyclohexa-2,5-dien-1-ylidene]methyl]benzenesulfonate

Molekül Ağırlığı: 792.85 g/mol

Renk ve Görünüş: Mavi, kristalize toz

Çözünürlüğü: Suda çok, alkolde az çözünür.

E Numarası: E133

**- Etkileri**

Birillant mavisi genellikle pamuk şeker, dondurma, paket çorbalar, şişelenmiş gıda boyaları, yaban mersini aromalı ürünler, süt ürünleri, tatlılar ve meşrubatlarda mavi renk vermek için kullanılır [242]. Ayrıca sabunlarda, şampuanlarda, gargaralarda ve diğer hijyen ve kozmetik ürünlerinde de kullanılır [243]. Özellikle ilaç sektöründe çocuklar için yapılan ilaçlarda renklendirici olarak birillant mavisi tek başına bulunabildiği gibi diğer renklendiriciler ile kombine olarak da eklenmektedir.

**- Zararları**

Birilyant mavisi, gastrointestinal sistemden zayıf bir şekilde emilir ve alınan boyanın % 95'i dışkıda bulunur. Dil veya traş edilmiş cilde uygulandığında, Birillant mavisi doğrudan kan dolaşımına absorbe edilebilir [244, 245]. Birillant mavisi, Avrupa Birliği

ve Amerika Birleşik Devletleri'ndeki ilaç formülasyonları için onaylanmış bir gıda renklendirici ve farmakolojik olarak inaktif bir maddedir. Yiyecekler ve ilaçlar için güvenlik sınırı; kg vücut ağırlığı başına 0.1 mg/gündür. Astımlı hastaların orta derece olanlarında alerjik reaksiyonlara sebep olabilmektedir [246].

**- Miktar Tayin Yöntemleri**

Birillant mavisi, yiyecek ve içecek başta olmak üzere birçok örnekte çok çeşitli yöntemlerle tayin edilmiştir. Birillant mavisinin HPLC ile analizleri Tablo 2.13'de, diğer yöntemlerle analizleri Tablo 2.14'te verilmiştir.

**Tablo 2.13** Birillant Mavisinin HPLC ile analizi

| Örnek | Diğer Madde | Kolon | Hareketli Faz | Dedektör | Kaynak |
|---|---|---|---|---|---|
| Gıda Ürünleri | Çivit | C18 | Metanol ve Amonyum Asetat Çözeltisi | DAD | [247] |
| Gıda Matrisleri | Tartrazin | - | - | UV-VIS | [248] |
| Gıda Ürünleri | Tartrazin, günbatımı sarısı, Karmoisin, Amarant, Ponceau 4R, Allura kırmızı | C18 | - | UV-DAD | [249] |

**Tablo 2.13** Birillant Mavisinin HPLC ile analizi (devamı)

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Meyve Suyu Tozları, Jöle Tozları ve Alkolsüz İçecekler | Günbatımı sarısı, Tartrazin, Amarant, Kırmızı-40 | ODS Zorbax | - | UV-DAD | [250] |
| Şekerleme ve Tatlılar | Yeşil S, eritrosin B, allura kırmızı, çivit mavisi, günbatımı sarısı, azorubin, amarant, ponceau ve tartrazin | Erimiş-silika kapiler | 15% asetonitril and 85% 0.05 M sodium deoksikolat/ 0.005 M potasyum dihidrojenortofosfat/0.005 M sodyum borat | UV | [251] |
| Yiyecek ve İçecekler | Günbatımı sarısı, sarı no 5, bordo S, kırmızı no 40, kırmızı no 17, kırmızı no 3, çivit mavisi | ODS-2 | - | - | [252] |
| Gıda numunesi | Amaranti, günbatımısarı, allura kırmızı, eritrosin, indigotin, tartrazin, kinolin sarı, azorubin, asit kırmızısı | C18 | Amonyum asetat, metanol | DAD MS | [253] |

**Tablo 2.13** Birillant Mavisinin HPLC ile analizi (devamı)

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Gıda numunesi | Tartrazin, günbatımısarı, amarant, asit kırmızısı | C18 | Asetat tamponu, metanol (15:85-50:50) | UV | [254] |
| Kırmızı şarap | Asesülfam K sodyum siklamat, sodyum sakarin, tartrazin, amarant, günbatımı sarısı, asit kırmızı | C18 | Amonyum asetat, metanol, asetonitril | MS | [255] |
| Jöle,sakızlı şeker | Tartrazin, amaran, günbatımı, asit kırmızısı, eritrosin, patent mavisi, indigo, karmin | C18 | Amonyum asetat, metanol, asetonitril | DAD | [256] |
| Kozmetik ürünleri | Tartrazin, amarant, günbatımı sarısı, allura kırmızısı, asit kırmızısı, turuncu I | C18 | Asetonitril, su | MS | [257] |

**Tablo 2.13** Birillant Mavisinin HPLC ile analizi (devamı)

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Gıda numunesi | Tartrazin, indigotin, günbatımı, allura kırmızı, karmosin, kinolin sarısı | C8 | Triton X100-fosfat tamponu | UV | [258] |
| Gıda numunesi | Tartrazin, günbatımısarısı, kinolin sarı, asit kırmızısı, allura kırmızısı, indigo karmin, karmosin | C8 | Fosfat tamponu | UV | [259] |
| Gıda numunesi | Tartrazin, günbatımı, amaranti, asit kırmızısı | C18 | Metanol, su, asetat tamponu | _ | [260] |
| Gıda numunesi | Tartrazin, günbatımı, asit kırmızısı, amarant, allura kırmızısı, turuncu I, II | C18 | Trietilamin, metanol | DAD MS | [261] |

**Tablo 2.13** Birillant Mavisinin HPLC ile analizi (devamı)

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Meyve suyu | Tartrazin, amarant kırmızısı, sakarin, benzoik - sorbik asit, günbatımı sarı, asit kırmızısı | C18 | Metanol, amonyum asetat | DAD | [262] |
| Gıda maddeleri | Günbatımı sarısı, tartrazin | C18 | Amonyum asetat tampon, metanol | UV-DAD | [263] |
| Gıda ürünleri | Amarant, gün batımı sarısı, tartrazin | C18 | Metanol, sodyum fosfat tamponu | UV | [264] |
| Gıda maddeleri ve Alkolsüz içecekler | Amarant, ponceau 4R, sudan kırmızı 1, tartrazin, günbatımı sarısı, yeşil FCF | C18 | asetat tamponunda metanol-su | - | [265] |
| Gıda numunesi | Tartrazin, günbatımı, allura kırmızı, asit kırmızısı | C18 | Amonyum asetat, asetonitril (95:5-35:65) | DAD | [266] |

**Tablo 2.14** Birillant Mavisinin diğer yöntemler ile tayini

| Örnek | Maddeler | Analiz yöntemi | Kaynak |
|---|---|---|---|
| Gıda Maddeleri | Allura kırmızı | Katı Faz Spektrofotometrisi | [267] |
| Gıda Maddeleri | Günbatımı sarısı | UV-Vis Spektrofotometrisi | [268] |
| Karbon Nanotüp | Tartrazin | Voltametri | [269] |
| Gıda numunesi | Azorubin, günbatımı sarısı, tartrazin | TLC | [270] |
| Gıda ürünleri | Günbatımı sarısı, allura kırmızısı, tartrazin | CE | [271] |
| Gıda numunesi | Amarant,tartrazin, günbatımı sarısı, | Spektrofotometri, kemometri | [272] |
| Gıda numunesi | Azorubin, asit kırmızı, günbatımı sarısı, tartrazin | TLC | [273] |
| Gıda ürünleri | Günbatımı sarısı, tartrazin | Türev spektrofotometrisi | [274] |
| Gıda ürünleri | Günbatımı sarısı, allura kırmızısı, tartrazin | CE | [275] |

**Tablo 2.14** Birillant Mavisinin diğer yöntemler ile tayini (devamı)

| | | | |
|---|---|---|---|
| Gıda ürünleri | Günbatımı sarısı, tartrazin | Spektrofotometri | [276] |
| Gıda ürünleri | Günbatımı sarısı, tartrazin | Spektrofotometri | [277] |
| Gıda ürünleri | Günbatımı sarısı, tartrazin | Türev spektrofotometrisi | [278] |

## 2.2 Deneysel Tasarım

### 2.2.1 Tanımı

Bir deneyden elde edilen sonuçları etkileyen herhangi bir deneysel koşul değişken ya da faktör olarak adlandırılır. Değişkenler araştırmacı tarafından kontrol edilebilen ve kontrol edilemeyen olarak iki türde olabilir. Örneğin; çözeltinin saklama koşulları araştırmacı tarafından değiştirilebildiği için bu tür bir faktör kontrol edilebilirken, rastgele örnekleme içeren bir faktör kontrol edilemeyen faktördür. Sayısal bir değer verilmediğinden bu faktörlerin her ikisine de nitel faktörler denir. Sayısal olarak düzenlenebilen sıcaklık , pH ve derişim gibi faktörlerde nicel faktörler olarak isimlendirilir. Bir faktörün aldığı farklı değerler ise farklı seviyeler olarak ifade edilir .

Bir deneyden doğru sonuç elde edebilmek için sonucu etkileyecek faktörlerin belirlenmesi ve mümkünse kontol edilmesi gerekir. Analitik teknikler çoğu zaman maddelerin çok küçük miktarlarının analizi ile ilgilendiğinden cevabın bağlı olduğu faktörlerin sayısal değerleri elde edilecek cevabı en üst değerde olmasını sağlayacak şekilde seçilmesi gerekir. Bu değerlere optimum değerler denir.

Deneysel tasarım, deney koşullarını etkileyecek faktörlerin seviyelerinin sistematik bir şekilde değiştirilmesi ile ölçülen cevapdaki değişimin gözlenmesi ve yorumlanması için kullanılan istatiksel bir tekniktir. Deneysel tasarım; tarama, optimizasyon ve modelleme olmak üzere 3 aşamadan oluşur.

1.Tarama: Deneysel çalışmalarda sonucu etkileyen önemli faktörleri belirlemek amacı ile yapılır. Tarama tasarımları ile tepkimenin verimine etki eden pH, derişim, sıcaklık gibi birçok değişkenin hangilerinin önemli olduğu, hangilerinin elimine edilebileceğine ve hangilerinin ayrıntılı olarak incelenmesi gerektiğine karar verilir.

2. Optimizasyon: Elde edilen veriler neticesinde önemli etkenlerin optimum değerlerinin belirlenmesi için yapılır.

3. Modelleme: İlk iki aşamanın sonuçları ile her değişkenin ne kadar etkili olduğu bir formül ile gösterilir. Böylece deney sonucunda elde edilen sonuçlar formülle bulunan neticeler ile kıyaslanır[279, 280].

### 2.2.2 Önemi

Klasik yöntemlerle faktörlerin optimum değerleri, tüm değerler durağanken sadece tek bir etkenin değişimi ile belirlenir. Birden fazla etken aynı anda araştırıldığında çok fazla deney yapılması gerekmekte bu nedenle de zaman alıcı ve maliyetli olmaktadır. Deneysel tasarımda ise istatiksel bir yaklaşımla öncelikle az sayıda seviye ile bütün faktörler sistematik olarak aynı anda değiştirilir ve etkili faktörler bulunur. Daha sonra sadece etkili faktörler, farklı seviyelerde yine aynı anda sistematik olarak değiştirilerek incelenir ve optimum değerler bulunur. Bu nedenle klasik yönteme göre daha az sayıda deney yapılarak daha kısa sürede ve daha az maliyetle sonuca ulaşılmaktadır. Deneysel tasarımın en önemli avantajı ise klasik yöntemlerde sadece faktörlerin bireysel olarak etkileri incelenirken deneysel tasarımda hem bireysel etkileri hem de faktörlerin birbirleri ile etkileşimleri ve bu etkileşimlerin sonuca etkisi de incelenmektedir. Böylelikle optimizasyon basamağında daha güvenilir sonuçlar elde edilmektedir.

### 2.2.3 Tarama Tasarımları

Araştırmelarda neticeye tesir eden etkenleri tespit etmekte tercih edilen bir yöntemdir. Tarama tasarımlarında, istatiksel bir yaklaşımla öncelikle az sayıda seviye ile bütün faktörler sistematik olarak aynı anda değiştirilir . Bu değişimlerin deney sonuçlarına etkisi incelenir. Her bir faktörün etkisi için sayısal değerler elde edilir. Bu değerler doğrultusunda deney sonuçlarına gerçekten etki eden faktörler bulunur. Tarama aşamasında en çok Faktöriyel Tasarım ve Plackett-Burman tasarımları kullanılanır.

#### 2.2.3.1 Faktöriyel Tasarım

Deneysel tasarımın en çok uygulanan şeklidir. Bu tasarımla deneyi etkileyen faktörlerin iki ya da daha fazla seviyesinde cevap üzerindeki etkileri incelenir.

Faktöriyel tasarım tam faktöriyel ve kısmi faktöriyel tasarım olarak 2'ye ayrılır.

**- Tam Faktöriyel Tasarım**

Hangi etkenlerin neticeyi hangi düzeyde etkilediğini tespit etmekte başvurulan 2 düzeyden oluşan bir tasarım yöntemidir. Bu tasarımda deney sayısı $2^k$ formülü ile hesaplanır. Seviyeler (-1 ve +1 ile gösterilir), k etken sayısıdır. 4 etken varsa 16 deney yapılır, 5 etken varsa 15 deney yapılmalı. Tablo aşağıdaki şekilde oluşturulur.

1. Her etkenin güçlü ve zayıf düzeyleri tespit edilir. Örneğin pH için 4 ve 6 seçilebilir.

2. Güçlü ( +1 ) ve zayıf ( -1 ) düzeyler için tasarım tablosu oluşturulur.

3. Daha sonra kullanılan kısaltmalar kaldırılarak asıl sayılar konarak deneyler yapılır.

4. Elde edilen cevaplar ile tasarım matrisi analiz edilir.

Örnek olarak 3 faktörlü ($x_1$, $x_2$, $x_3$) bir deneyde faktör seviyelerinin 2x2x2=8 adet mümkün kombinasyonları Tablo 2.15 de gösterilmiştir. Her sütundaki (+) işareti faktörün yüksek seviyedeki değerini (-) işareti ise faktörün düşük değerini gösterir.

**Tablo 2.15** 3 Faktör için Tam Faktöriyel Tasarım

| Deney sayısı | $X_1$ | $X_2$ | $X_3$ | Cevap |
|---|---|---|---|---|
| 1 | - | - | - | $y_1$ |
| 2 | + | - | - | $y_2$ |
| 3 | - | + | - | $y_3$ |
| 4 | + | + | - | $y_4$ |
| 5 | - | - | + | $y_5$ |
| 6 | + | - | + | $y_6$ |
| 7 | - | + | + | $y_7$ |
| 8 | + | + | + | $y_8$ |

Faktörlerin etkisini belirlemek için aşağıda verilen doğrusal denklemdeki *a* katsayıları hesaplanır. Burada *a* katsayısı;

$y=a\,X \qquad a=(X'X)^{-1}X'y$ (2.1)

formülünden hesaplanır. *a* katsayıları doğru denkleminde yerine konulur ve sayısal değerlerine göre faktörlerin etkili olup olmadıkları belirlenir.

$y = a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + a_3x_3 + a_{12}x_1x_2 + a_{13}x_1x_3 + a_{23}x_2x_3 + a_{123}x_1x_2x_3$ (2.2)

**- Kısmi Faktöriyel Tasarım**

Tam faktöriyel tasarımda her etkenin neticeyi ne kadar değiştirdiği gözlemlernir. $2^k$ y göre 5 etken varsa $2^5$=32 deney gerçekleştirilmelidir. Buradan da anlaşıldığı üzere etkenler artıkça deney sayısı da artmakta bu sebeple bu yöntem kullanışlı bulunmamaktadır. Gereğinden fazla olan bu deney sayısı tam faktöriyel tasarımın 1/2 si, 1/4 ü, 1/8 i vs. şeklinde alınarak azaltılabilir. Bu tasarımlar kısmi faktöriyel tasarım olarak adlandırılmaktadır. Kısmi faktöriyel tasarımda deney sayısı $2^{k-p}$ formülünden hesaplanır. Deney sayısı p sayısı kadar bir azalma gösterir. Örneğin p=1 için tasarım yarı kısmi faktöriyel tasarım adını alır. Tablo 2.16'da 2 seviyeli 5 faktörlü kısmi faktöriyel tasarım ($2^{5-1}$) görülmektedir.

**Tablo 2.16** 5 Faktör için Kısmi Faktöriyel Tasarım

| **Deney sayısı** | **$X_1$** | **$X_2$** | **Faktörler $X_3$** | **$X_4$** | **$X_5$** | **Cevap** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | - | - | - | - | + | $y_1$ |
| 2 | + | - | - | - | - | $y_2$ |
| 3 | - | + | - | - | - | $y_3$ |
| 4 | + | + | - | - | + | $y_4$ |
| 5 | - | - | + | - | - | $y_5$ |
| 6 | + | - | + | - | + | $y_6$ |
| 7 | - | + | + | - | + | $y_7$ |
| 8 | + | + | + | - | - | $y_8$ |
| 9 | - | - | - | + | - | $y_9$ |
| 10 | + | - | - | + | + | $y_{10}$ |
| 11 | - | + | - | + | + | $y_{11}$ |
| 12 | + | + | - | + | - | $y_{12}$ |
| 13 | - | - | + | + | + | $y_{13}$ |
| 14 | + | - | + | + | - | $y_{14}$ |
| 15 | - | + | + | + | - | $y_{15}$ |
| 16 | + | + | + | + | + | $y_{16}$ |

Kısmi faktöriyel tasarımın üstünlükleri olmasına karşın bazı dezavantajları da mevcut.

1. İki düzeyden oluştuğundan parabolik faktörler incelenememektedir.
2. Deney tekrarı yapılmadığından yanlışlar hesaplanamamaktadır.
3. Sonuçlar hep iki sayısının katlarından oluşmaktadır.

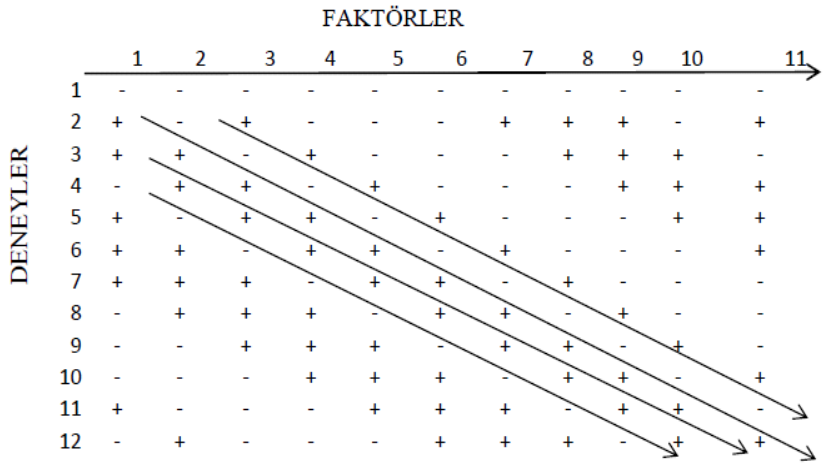
### 2.2.3.2 Plackett-Burman Tasarımı

Aynı anda birçok etkenin etki değeri arandığında yukarıda belirtilen yöntemler kullanılamamaktadır. Sadece faktörlerin kendi etkileri incelendiğinde , yani etkenlerin kendi aralarında etkileşimlerinin önemsiz olduğu zamanlarda Plackett-Burman tasarımı kullanışlı olmaktadır. Bu durumda deney sayısı, faktörler sayısı ve üreticiler Tablo2.17'de mevcuttur.

**Tablo 2.17** Plackett-Burman Tasarımı için Üreticiler

| Deney Sayısı | Faktörler | Üretici |
|---|---|---|
| 8 | 7 | + + + - + - - |
| 12 | 11 | + + - + + + - - - + - |
| 16 | 15 | + + + + - +- ++- - + - - - |
| 20 | 19 | + + - + + + + - + - + - - - - + + - |
| 24 | 23 | + + + + + - + - + + - - + + - - + - + - - - - |

11 faktör ve 12 deneyi içeren Plackett Burman tasarımı Tablo 2.18'de gösterilmektedir.




**Şekil 2.8** 11 Faktör için Plackett Burman Tasarımı

Bu tasarımın bazı özellikleri vardır.

- İlk sıra eşit düzeydedir
- 2. sırada üreticiler bulunmaktadır
- 3. sıra 2. Sıra sağa kaydırılarak oluşturulur (Şekil 2.8).
- Plackett Burman tasarımında 9 etken mevcutsa 10 deney yapılmalıdır. Fakat bunun yerine etkisiz bir eleman bulunup Dummy Faktörü ismiyle eklenir. Tabloda kesim noktası ($a_0$) eklendiğinde a katsayıları aşağıdaki gibi hesaplanabilir.

$$a = D^{-1}y$$

Tasarım tablosunda kodlanmış değerler kullanıldığında a katsayıları her bir kolon ölçülen değerlerle (y) çarpıldıktan sonra deney sayısına bölünerek de hesaplanabilir.

### 2.2.4 Optimizasyon Tasarımları

Tarama tasarımları 2 seviye ile her etkenin etkilerini analiz eden metodlardır. Tekrarlanan deney sayısı ve parabolik etkileri incelemez. Bazı durumlarda faktörler arasındaki etkileşimleri incelemek mümkün değildir. Bu nedenle bu tasarımlar ile önemli faktörler belirlendikten sonra detaylı inceleme yani optimizasyon gerçekleştirilir. Bunun yapılmasında 2 sebep vardır. İlki, deney sonucunu etkileyebilecek etmenleri saptamaktır. Diğer sebepse, her etkenin neticeyi hangi düzeyde etkilediğini açıklayan formülün oluşturulmasıdır. Optimizayon tasarımlarında sadece, tarama

tasarımı ile bulunan etkili faktörlerin sonuca etkisi incelenir. Bu aşamada daha fazla seviye ile çalışılır. Tekrarlanan deney sayısı, parabolik etkiler ve faktörler arasındaki etkileşimler hesaplanır. En yaygın kullanılan optimizasyon tasarımları Merkezi Kompozit Tasarım ve Box-Behnken Tasarımıdır [281, 282].

### 2.2.4.1 Merkezi Kompozit Tasarım

Deney sayısı $=2^k+2k+1$ ( k: faktör sayısı)

Formülde k faktör sayısını, $2^k$ deney sayısını, 2k yıldız tasarım deney sayısını, 1 orta düzey deney sayısıdır. $2^k$ 'daki düzeyler -1 ile +1'dir, 2k'da ±α bulunur , 1'de 0 bulunmaktadır. 3 faktör için 5 seviyeli, merkezde tekrar sayısı 5 olan toplam 19 deney içeren Merkezi Kompozit tasarımı örneği Tablo 2.19'da verilmiştir.

**Tablo 2.18** 3 Faktör için Merkezi Kompozit Tasarımı

| Deney Sayısı | Faktörler | | |
|---|---|---|---|
| | $X_1$ | $X_2$ | $X_3$ |
| **1** | +1 | +1 | +1 |
| **2** | +1 | +1 | -1 |
| **3** | +1 | -1 | +1 |
| **4** | +1 | -1 | -1 |
| **5** | -1 | +1 | +1 |
| **6** | -1 | +1 | -1 |
| **7** | -1 | -1 | +1 |
| **8** | -1 | +1 | -1 |
| **9** | +1.682 | 0 | 0 |
| **10** | -1.682 | 0 | 0 |
| **11** | 0 | +1.682 | 0 |
| **12** | 0 | -1.682 | 0 |
| **13** | 0 | 0 | +1.682 |
| **14** | 0 | 0 | -1.682 |
| **15** | 0 | 0 | 0 |
| **16** | 0 | 0 | 0 |

**Tablo 2.18** 3 Faktör için Merkezi Kompozit Tasarımı devamı

| | | | |
|---|---|---|---|
| **17** | 0 | 0 | 0 |
| **18** | 0 | 0 | 0 |
| **19** | 0 | 0 | 0 |

### 2.2.4.2 Box–Behnken Tasarımı

Box–Behnken tasarımı üç ya da daha fazla seviyeye sahiptir ve üç ya da daha fazla faktöre sahip problemlere uygulanabilir. Faktöriyel veya ekstremum noktaları yoktur ve bu tasarım (2k(k-1) + nc sayıda noktadan oluşur. Bu sayı merkez kompozit tasarıma göre daha az olduğu için daha çok tercih edilmesine sebep olmaktadır. Box–Behnken tasarımı, optimum değerin faktör aralığı ortasında olduğu bilinen, ikiden daha fazla faktörün bulunduğu sistemlerde önerilir. 3 faktör için Box–Behnken tasarımı örneği Tablo 2.20'de verilmiştir.

**Tablo 2.19** 3 Faktör için Box-Behnken Tasarımı

| Deney Sayısı | Faktör A | Faktör B | Faktör C |
|---|---|---|---|
| **1** | -1 | -1 | 0 |
| **2** | +1 | -1 | 0 |
| **3** | -1 | +1 | 0 |
| **4** | +1 | +1 | 0 |
| **5** | -1 | 0 | -1 |
| **6** | +1 | 0 | -1 |
| **7** | -1 | 0 | +1 |
| **8** | +1 | 0 | +1 |
| **9** | 0 | -1 | -1 |
| **10** | 0 | +1 | -1 |
| **11** | 0 | -1 | +1 |
| **12** | 0 | +1 | +1 |
| **13** | 0 | 0 | 0 |
| **14** | 0 | 0 | 0 |
| **15** | 0 | 0 | 0 |

### 2.2.5 Varyans Analizi

Varyans analizi yöntemi ilk kez İngiliz istatistikçi ve genetikçi Ronald Fisher tarafından ortaya atılmıştır ve diğer bir adıyla "Analysis Of Variance" kelimelerinin kısaltılması olan ANOVA olarak da bilinir. Grup ortalamaları ve bunlara bağlı olarak yapılacak olan işlemleri analiz etmekte kullanılan istatistikel hipotez sınaması olarak tarif edilir. ANOVA'nın deneysel tasarım ile bağlantısı ise şu şekildedir:

Öncelikle tarama tasarımları ile deneye etki eden faktörlerin etkileri saptanır. Daha sonra bu etkilerin anlamlı olup olmadığı ANOVA ile belirlenir. ANOVA ile yapılan analiz için genellikle iki hipotez oluşturulur.

$H_0$: Faktörlerin etkileri deney üzerinde anlamlıdır.

$H_1$: Faktörlerin etkileri deney üzerinde anlamlı değildir.

Bu hipotezlerin doğruluğuna yapılan analiz sonucunda karar verilir. Yapılan analizler sonucunca $H_0$ hipotezinin doğruluğu kanıtlanırsa, faktörlerin etkilerinin deney üzerinde anlamlı olması, faktörlerin deney sonucuna etki ettiğini gösterir.

### 2.2.6 Deneysel Tasarımın Analitik Kimyada Uygulamaları

Deneysel tasarım yöntemleri pek çok farklı çalışma alanında sistemlerin yapısını anlamak, etkin faktör veya parametreleri belirlemek ve performansın iyileştirmesini gerçekleştirebilmek için kullanılmaktadır. Analitik Kimyada ise sıklıkla uygulanacak bir işlemin optimizasyonunu sağlamak veya analiz yönteminin geliştirilmesi aşamasında en uygun çalışma koşullarını belirlemek için deneysel tasarımlardan faydalanılır. Örneğin bir katı faz ekstraksiyonu işleminde, kullanılacak adsorbanın miktarı, uygun elüent çözeltisinin hacmi ve akış hızı gibi pek çok faktörün işlem üzerindeki etkileri belirlenip bunların optimizasyonu deneysel tasarım yöntemleri ile yapılabilir. Analitik yöntemlerin geliştirilmesi esnasında ise örneğin bir HPLC analiz metodunda etkin analitik ayırmanın sağlanabilmesi için uygun hareketli faz oranları, uygun akış hızı ve uygun pH değerlerinin belirlenmesi deneysel tasarım yöntemleri ile daha kısa sürede ve daha az maliyetle mümkün olabilmektedir.

## 2.3 Validasyon

### 2.3.1 Validasyonun Tanımı ve Önemi

Validasyon, ürün kalitesini etkileyebilecek bir takım değişikliklerin, belirli olan spesifikasyon limitlerini aşmayacak şekilde kalmasını ve işlediğini garantilemek amacıyla yapılan çalışmalardır. Validasyon çalışmasıyla aynı şartlarda her zaman aynı kalitede ve üretim yaparak, tüm üretilen ürünlerin kalitesinin aynı olmasını sağlamak amaçtır.

GMP kurallarının gerekliliklerinden biri de validasyondur. Validasyon; değişkenliği mimimuma indirir, iyi kontrol edilmiş, güvenilir prosesler oluşmasını sağlar,prosesler hakkında farkındalık yaratarak bilgi birikimi olmasını sağlar, kaliteyi güvence altına alır. Ayrıca verimliliği arttırır, tekrar analizden kaynaklı maliyet kayıplarını azaltır, organizasyon içinde iletişim ve bilgi akışını sağlayarak koordine eder.

### 2.3.2 Endüstride Validasyon Çeşitleri

Endüstride yapılan validasyonlar 4 ana başlık altında toplanır.

**Analitik yöntem validasyonu,** analitik prosedürün kalitatif ve kantitatif olarak doğru sonuçlar verdiğini belirleyen çalışmalardır.

**Temizlik validasyonu,** üretim alanında üretim ekipmanlarının temizliği için yapılan çalışmalardır.

**Proses validasyonu**, bir ürünün final ürün haline gelene kadar yapılan çalışmalardır.

**Ekipman validasyonu**, ekipman işleyişini, çalışma doğruluğunu gözlemlemek ve sürdürülebilirliğini sağlamak için yapılan çalışmalardır.

### 2.3.3 Analitik Yöntem Validasyonu

#### 2.3.3.1.Amaç

Analitik yöntem validasyonu,bir veya bir seri analitin tayini için tasarlanmış analitik yöntemin kabul edilebilirliğini kanıtlamak ve analitik prosedürün kantitatif ve kalitatif olarak doğru sonuçlar verdiğini belirlemek amacıyla yapılan tüm işlemlere verilen addır.

#### 2.3.3.2.Analitik Yöntem Validasyon Parametreleri

Uluslararası komitelerce yöntem validasyonu için parametreler, ulusların farklı kuruluşları tarafından ve literatürde tanımlanmıştır. Bazı tanımlar kurumlara göre farklılık gösterebilir. Validasyon parametrelerinin deney sırası hakkında resmi bir

yönerge yoktur. Yöntemin özelliğine göre en uygun sıra oluşturulur. En çok kabul gören validasyon parametreleri ve sırası aşağıda verilmiştir.

1. Seçicilik – Spesifiklik
2. Stabilite
3. Doğrusallık
4. Çalışma Aralığı
5. Doğruluk ve geri kazanabilirlik
6. Kesinlik (tekrarlanabilirlik)
    - Gün içi tekrarlanabilirlik
    - Günler arası tekrarlanabilirlik
    - Laboratuvarlar arası tekrarlanabilirlik
7. Tutarlılık
8. Tanıma Limiti (LOD)
9. Miktar Tayini Limiti (LOQ)
10. Güvenilirlik

Validasyon parametreleri genellikle yapılacak olan analizin amacına göre farklılaşabilir. Analizlerin yapılması genellikle 3 amaçla yapılır;

1. Hammadde veya bir ürünün içinde bulunabilecek safsızlık ürünlerinin tayini
2. Aktif etkenin bileşen içindeki veya tek başına olan tayini
3. Ürünün performans özelliklerinin tayini

**Tablo 2.20** Analiz amacına göre değişen parametreler

| **Parametreler** | **1** | **2** | **3** |
|---|---|---|---|
| Seçicilik | + | + + | - |
| Doğrusallık | + | + - | + |
| Çalışma aralığı | + | + * | * |
| Doğruluk ve geri kazanım | + | + - | * |
| Kesinlik | + | + * | + |
| Tutarlılık | + | + + | + |
| Tanıma limiti | + | + + | * |

**Tablo 2.20** Analiz amacına göre değişen parametreler (devamı)

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Miktar tayin limiti | + | + | + | * |
| Güvenirlilik | + | + | + | + |

4. (*): Spesifik testlere bağlı olarak gerekirse yapılır.

**- Seçicilik/Spesifiklik**

Spesifiklik, tek bir analit için yapılan yöntemdir. Seçicilik ise birbirinden ayırt edilen ya da edilemeyen kimyasal içerikler için kullanılmıştır. Kısacası; girişim yapan maddeler varlığında analitin doğru olarak ölçebilirliğini ifade eder. Likit kromatografisinde seçicilik, optimum ayırma ve kolon koşullarının seçimiyle elde edilmiştir.

**- Stabilite**

Analit ile eksepiyanların kimyasal parçalanmasından sonra ortaya çıkan parçalanma ürünlerinin ve miktar tayinlerinin birbirinden bağımsız olarak ayrı ayrı tespit edebilme özelliğidir.

**- Doğrusallık**

Doğrusallık, metodun verilen bir aralığı içindeki analit konsantrasyonuna cihazın verdiği sinyaldir. Analit konsantrasyonun %25-150'si olacak şekilde en az 5 farklı konsantrasyonda çözeltiler hazırlanır ve cihaza verilir. Analit konsantrasyonu ile cihazın verdiği sinyal verileri ile grafik çizilir ve regresyon analizi yapılır. Regresyoın analizi çıktısı olan korelasyon katsayısı değeri 0,997'den büyük veya eşit olmalıdır.

**- Çalışma Aralığı**

Doğrusallık, doğruluk ve kesinlik belirlenirken kullanılan bir analitik metodun çalışma aralığıdır. Numunenin analizdeki konsantrasyonu metodun çalışma alt ve üst limitlerini belirler. ICH'e göre numune konsantrasyonu kimyasal analizlerde %80 ile %120 arasında, safsızlık analizlerinde %50 ile %120 aralığında olmalıdır.

**- Doğruluk**

Doğruluk; analitik metot sonuçlarının gerçek değere yakınlığının ve uygunluğunun ölçüsüdür. Doğruluk değerlendirmesi;

- Referans metod ile geliştirilen metod karşılaştırılarak yapılabilir.
- Numunenin bilinen konsantrasyonları analizlenerek yapılabilir. Onaylı sertifikalı numune ve ölçülen değer karşılaştırılır.

- Bulunan değerlerin gerçek değere yakınlığı % geri kazanım ile değerlendirilir.

Elimizde sertifikalı örnek bulunmuyorsa boş deneme çözeltisine konsantrasyonu bilinen hacimde ve ağırlıkta analit eklenir. Sonra matriksten, analitin ekstraksiyonu sonucu elde edilen analitin standart çözeltilere göre % geri kazanımları hesaplanır. Normal koşullarda geri kazanım değeri %100 ±3 olmalıdır. Bu koşul analitin konsantrasyonu çok düşük ise değişebilir. Bu durumda belirtilen sınır genişletilebilir.

**- Kesinlik (Tekrarlanabilirlik)**

Bir yöntemin kesinliği birkaç kez enjeksiyon yapıldığında sonuçların birbirine uygunluk derecesidir. Yani homojen bir karışımdan, birden fazla örnek alındığında elde edilen sonuçların birbiriyle uyumlu olmasıdır. Bir yöntemin kesinliği genellikle test sonuçlarının % RSD (bağıl standart sapma) değeri ile ölçülür.

- **Gün İçi Tekrarlanabilirlik**

Bir analistin tek laboratuvarda tek ekipman ile yaptığı analizin sonuçlarının tutarlılığıdır. Aynı gün içerisinde, aynı ekipmanla, aynı standartlar ile analist değişmeden 2 veya 3 farklı konsantrasyonda birçok kez analiz edilir ve % RSD hesaplanır.

- **Günler Arası Tekrarlanabilirlik**

Farklı günlerde tek laboratuvarda yapılan analiz sonuçlarının birbiri ile tutarlı olmasıdır. 2 veya 3 farklı konsantrasyonda standartlarla hazırlanan çözeltiler aynı cihaz ve analistle 3 veya 4 defa kez analiz edilir ve % RSD hesaplanır.

- **Laboratuvarlar Arası Tekrarlanabilirlik**

Farklı laboratuvardaki analiz sonuçlarının birbiri ile tutarlılığı, laboratuvarlar arası tekrarlanabilirliğini gösterir. Analiz tekrarı farklı laboratuvar, analist, işlev ve çevresel şartlarda aynı metot ile yapılır. Yöntem farklı laboratuarlarda kullanılacaksa bu validasyon parametresi önemlidir. Bir yöntemin laboratuvarlar arası tekrarlanabilirliğini, oda içindeki sıcaklık ve nem farklılıkları, farklı tecrübe ve farklı gayretteki analistler, farklı özellikteki donanım, malzeme ve aletlerdeki koşulların varyasyonları, farklı şirketlerin kolonları, çözücüler, belirteçler ve farklı kalitedeki aletler etkiler.

**- Tutarlılık**

Analizi farklı koşullarda, uzun zaman aralığında oluşan değişikliklerden etkilenip etkilenmediği, bir analiz metodunun tutarlılığını gösterir. Farklı analist veya farklı laboratuvar analiz sonuçlarının ölçülmesi olarak da açıklanabilir.

**- Tanıma ve Miktar Tayini Limiti**

- **Tanıma Limiti (LOD)**

%95 veya %99 güvenilirlik limitleri içinde görülebilen minumum madde miktarıdır. Bu seviyelerde çalışıldığında güvenilir kantitatif sonuçlar alınamaz.

- **Miktar Tayin Limiti (LOQ)**

%95 veya %99 güvenilirlik limitleri içinde ölçülebilen minumum madde miktarıdır. Minimum konsantrasyonda kabul edilebilir kesinlik ve doğruluk sonuçlarına sahip ölçülebilen miktardır. Bu parametre özellikle hammadde veya bitmiş üründeki safsızlık, parçalanma ürünü gibi düşük miktardaki maddelerin analizinde önem taşımaktadır.

**- Güvenilirlik**

Analitik metotta yapılan küçük değişikliler neticesinde de yine uygun sonuçlar alındığını göstermek için güvenilirlik testleri yapılmaktadır. Bir analitik metot şartlarının tolere edilebildiği sınırlardaki değişimleri neticesinde, analiz sonucunun bu sapmalardan etkilenip etkilenmediği tespit edilir.

# 3
# DENEYSEL ÇALIŞMALAR

## 3.1 Kullanılan Maddeler

Dekstrometorfan hidrobromür, Sakkarin, Parasetamol, Psödoefedrin hidroklorür, Doksilamin süksinat, Allura kırmızısı, Birillant mavisi standartları, metanol HPLC saflıktadır. Çalışmalar süresince ultra saf su kullanılmıştır.

## 3.2 Kullanılan Çözeltiler

**Parasetamol çözeltisi (10000 µg/ml):** 1g Parasetamol tartılıp, bir miktar metanol ile çözüldü. 100ml'lik balon jojede hacmine tamamlandı.

**Dekstrometorfan hidrobromür çözeltisi (500 µg/ml):** 0,05g Dekstrometorfan hidrobromür katısı tartılarak bir miktar metanol ile çözüldü. 100ml'lik balon jojede hacmine tamamlandı.

**Psödoefedrin hidroklorür (500 µg/mL):** 0,05g Psödoefedrin hidroklorür katısı bir miktar metanolde çözülerek 100 mL' lik balon jojede hacmine tamamlandı.

**Sakkarin çözeltisi (250 µg/ml):** 0,025g Sakkarin katısı tartılıp, bir miktar metanol ile çözüldü. 100ml'lik balon jojede hacmine tamamlandı.

**Doksilamin süksinat çözeltisi (100 µg/ml):** 0,01g Doksilamin süksinat katısı tartılarak bir miktar metanol ile çözüldü. 100ml'lik balon jojede hacmine tamamlandı.

**Allura kırmızısı (100 µg/mL):** 0,01g Allura kırmızısı katısı bir miktar metanolde çözülerek 100 mL' lik balon jojede hacmine tamamlandı.

**Birillant mavisi (BB) çözeltisi (30 µg/mL):** 0,003 g birillant mavisi tartılarak bir miktar saf su ile çözüldü. 100 mL'lik balon jojede hacmine tamamlandı.

**Dipotasyum hidrojen fosfat (0,025 M):** 4,35 gr dipotasyum hidrojen fosfat tartılıp bir miktar saf su ile çözüldü.1000 mL'lik balon jojede hacmine saf su ile tamamlandı.

**Dihidrojen potasyum fosfat (0,025 M):** 3,4 gr dihidrojen potasyum fosfat tartılıp bir miktar saf su ile çözüldü.1000 mL'lik balon jojede hacmine saf su ile tamamlandı.

**Asetik Asit (0,025 M):** 1,4 mL asetik asit 1000 mL'lik balon jojeye konuldu ve hacmine saf su ile ile tamamlandı.

**Amonyum Asetat (0,025 M):** 1,92 gr amonyum asetat tartılıp bir miktar saf su ile çözüldü.1000 mL'lik balon jojede hacmine saf su ile tamamlandı.

**Fosfat tamponu (pH:5,5 – pH:6,0 - pH:6,5 - pH: 7,0)** 0,025 M dipotasyum hidrojen fosfat üzerine 0,025 M dihidrojen potasyum fosfat eklenerek pH metre ile ilgili pH' a ayarlandı.

**Amonyum asetat tamponu (pH:6):** 0,025 M Amonyum asetat üzerine 0,025 M asetik asit eklenerek pH metre ile ilgili pH' a ayarlandı.

## 3.3 Kullanılan Cihazlar

620 InoLab pH metre ve cam elektrodu, Chiltern magnetik karıştırıcı, Sartorius analitik terazi (0,1 mg'a kadar duyarlı), Anzak ultrasonik banyo, hamilton enjektör, 4,6mmx 150mmx5 µm intersil ODS-3V $C_{18}$ kolon, LC-20 AT pompa, SPD-20A DAD dedektör, 7725 (20 µL) enjeksiyon ve bilgisayar sisteminden oluşan Shimadzu HPLC.

## 3.4 HPLC ile Analiz

### 3.4.1 Kromatografik Şartların Belirlenmesi

#### 3.4.1.1 Klasik Yöntem ile Şartların Belirlenmesi

Dekstrometorfan hidrobromür, Sakkarin, Parasetamol, Psödoefedrin hidroklorür, Allura kırmızısı, Doksilamin süksinat ve Birillant mavisinin HPLC yöntemi ile bir arada analizi için uygun şartların belirlenmesi amacı ile 10 mL' lik balon joje içerisine 500 µg $mL^{-1}$ Dekstrometorfan hidrobromür, 250 µg $mL^{-1}$ Sakkarin, 10000 µg $mL^{-1}$ Parasetamol çözeltilerinden 0,6'şar , 500 µg $mL^{-1}$ Psödoefedrin hidroklorür, 100 µg $mL^{-1}$ Allura kırmızısı ve 100 µg $mL^{-1}$ Doksilamin süksinat çözeltilerinden 0,9'ar, 30 µg $mL^{-1}$ birillant mavisi çözeltisinden 0,3 mL konulduktan sonra hacmine tamamlandı. Hazırlanan çözelti C18 kolon içeren kromatografa enjekte edildi. Dedeksiyon dalga boyu 210 nm olarak seçildi. Kromatografi işlemi izokratik ve gradient teknikler uygulanarak çeşitli hareketli faz karışımlarında, farklı pH ve akış hızlarında tekrar edildi. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.1.1'de verilmiştir.

#### 3.4.1.2 Deneysel Tasarım ile Optimizasyon

Dekstrometorfan hidrobromür, Sakkarin, Parasetamol, Psödoefedrin hidroklorür, Allura kırmızısı, Doksilamin süksinat ve Birillant mavisinin HPLC ile birarada analizi için optimum koşulların bulunması amacıyla faktörlerin ve birbirleri ile etkileşimlerinin

ayırma gücüne etkisi incelendi. İncelemede 3 faktörlü 5 seviyeli merkezi kompozit tasarımı kullanıldı. Tasarım için seçilen faktörler ve seviyeleri Çizelge 3.1 de verilmiştir. Hareketli fazın diğer bileşeni metanoldür. Optimizasyon için 10 mL' lik balon joje içerisine 500 µg $mL^{-1}$ Dekstrometorfan hidrobromür, 250 µg $mL^{-1}$ Sakkarin, 10000 µg $mL^{-1}$ Parasetamol çözeltilerinden 0,6'şar , 500 µg $mL^{-1}$ Psödoefedrin hidroklorür, 100 µg $mL^{-1}$ Allura kırmızısı ve 100 µg $mL^{-1}$ Doksilamin süksinat çözeltilerinden 0,9'ar, 30 µg $mL^{-1}$ Birillant mavisi çözeltisinden 0,3 mL konulduktan sonra hacmine tamamlandı. Bu çözeltinin hazırlanan tasarıma göre 19 kez 210 nm de kromotogramı alındı.. Her bir kromotogramdaki Sakkarin, Parasetamol, Psödoefedrin hidroklorür, Allura kırmızısı ve Birillant mavisi arasındaki ardaşık piklere ait ayırma gücü (Rs) değerleri tek tek hesaplandı. Hesaplanan değerlere regresyon analizi yapıldı. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda model oluşturuldu ve faktörlerin optimum değerleri hesaplandı. Modelin güvenilirliğini test etmek için ANOVA testi yapıldı. Sonuçlar Bölüm 4.1.2'de verilmiştir.

**Tablo 3.1** Merkezi kompozit tasarımda seçilen faktörler ve seviyeleri

| **Faktör** | **Kodu** | **Seviye** | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | **(-1.68179)** | **(-1)** | **(0)** | **(+1)** | **(+1.68179)** |
| Akış hızı (mL/dak) | FR | 0,9 | 1,0 | 1,2 | 1,4 | 1,5 |
| Fosfat tampon oranı (%) (Gradient 1.basamak) | G1 | 67 | 70 | 75 | 80 | 83 |
| Fosfat tampon oranı (%) (Gradient 2.basamak) | G2 | 27 | 30 | 35 | 40 | 43 |

### 3.4.2 Validasyon

#### 3.4.2.1 Doğrusallık

Dekstrometorfan hidrobromür, Sakkarin, Parasetamol, Psödoefedrin hidroklorür, Allura kırmızısı, Doksilamin süksinat ve Birillant mavisinin bir arada analizi için geliştirilen HPLC yönteminin doğrusallığını incelemek amacı ile 10 mL' lik balon joje içerisine 500 µg $mL^{-1}$ Dekstrometorfan hidrobromür, 250 µg $mL^{-1}$ Sakkarin, 10000 µg $mL^{-1}$ Parasetamol çözeltilerinden 0,2-1,0'er mL, 500 µg $mL^{-1}$ Psödoefedrin hidroklorür, 100 µg $mL^{-1}$ Allura

kırmızısı ve 100 µg $mL^{-1}$ Doksilamin süksinat çözeltilerinden 0,3-1,5' ar, 30 µg $mL^{-1}$ Birillant mavisi çözeltisinden 0,1-0,5 mL alındıktan sonra hacmine tamamlandı. Hazırlanan çözeltilerin 210 nm' de C18 kolonda gradient elüsyon tekniği kullanılarak pH 6,0 fosfat tamponu/metanol (75/25-40/60-10/90) hareketli fazı ile 1,4 mL/dakika akış hızında kromotogramları alınarak pik alanları hesaplandı.İşlem üç kez tekrarlandı. Pik alanları ile konsantrasyon arasında ölçü eğrileri çizilerek regresyon analizi yapıldı. Sonuçlar Bölüm 4.2.1'de verilmiştir.

### 3.4.2.2 Gün İçi ve Günler Arası Tekrarlanabilirlik

Dekstrometorfan hidrobromür, Sakkarin, Parasetamol, Psödoefedrin hidroklorür, Allura kırmızısı, Doksilamin süksinat ve Birillant mavisinin bir arada analizi için geliştirilen HPLC yönteminin gün içi ve günler arası tekrarlanabilirliği incelemek amacı ile doğrusal alan içinde olacak şekilde 3 ayrı konsantrasyon seçildi. Seçilen konsantrasyondaki çözeltileri hazırlamak amacı ile 10 mL' lik balon jojeye 500 µg $mL^{-1}$ Dekstrometorfan hidrobromür, 250 µg $mL^{-1}$ Sakkarin, 10000 µg $mL^{-1}$ Parasetamol çözeltilerinden I. için seviye 0,4 mL; II. seviye için 0,6 mL; III. seviye için 0,8 mL , 500 µg $mL^{-1}$ Psödoefedrin hidroklorür, 100 µg $mL^{-1}$ Allura kırmızısı ve 100 µg $mL^{-1}$ Doksilamin süksinat çözeltilerinden I. için seviye 0,6 mL; II. seviye için 0,9 mL; III. seviye için 1,2 mL, 30 µg $mL^{-1}$ Birillant mavisi çözeltisinden I. için seviye 0,2 mL; II. seviye için 0,3 mL; III. seviye için 0,4 mL alınarak hacmine tamamlandı. Hazırlanan çözeltilerin, gün içi tekrarlanabilirlik için aynı gün içerisinde 3 kez, günler arası tekrarlanabilirlik için 4 farklı günde bir kez 210 nm' de C18 kolonda gradient elüsyon tekniği kullanılarak pH 6,0 fosfat tamponu/metanol (75/25-40/60-10/90) hareketli fazı ile 1,4 mL/dakika akış hızında kromotogramları alınarak pik alanları belirlendi. Bölüm 3.4.2.1'de anlatıldığı gibi hazırlanan ilgili ölçü eğrileri yardımı ile maddelerin konsantrasyonları bulundu. Geri kazanım yüzdeleri ve bağıl standart sapmaları hesaplandı. Sonuçlar Bölüm 4.2.2'de verilmiştir.

### 3.4.2.3 Doğruluk

Dekstrometorfan hidrobromür, Sakkarin, Parasetamol, Psödoefedrin hidroklorür, Allura kırmızısı, Doksilamin süksinat ve Birillant mavisinin bir arada analizi için geliştirilen HPLC yönteminin doğruluğunu incelemek amacı ile 10 mL' lik balon jojeye bu maddeleri içeren şurup örneğinden 0,1 ml konularak üzerine 500 µg $mL^{-1}$ Dekstrometorfan hidrobromür, 250 µg $mL^{-1}$ Sakkarin çözeltilerinden, I. için seviye 0,2 mL; II. seviye için 0,4 mL; III. seviye için 0,6 mL , 10000 µg $mL^{-1}$ Parasetamol çözeltisinden I. için seviye 0,1 mL;

II. seviye için 0,3 mL; III. seviye için 0,5 mL, 500 µg $mL^{-1}$ Psödoefedrin hidroklorür, 100 µg $mL^{-1}$ Allura kırmızısı ve 100 µg $mL^{-1}$ Doksilamin süksinat çözeltilerinden I. için seviye 0,2 mL; II. seviye için 0,5 mL; III. seviye için 0,8 mL, 30 µg $mL^{-1}$ Birillant mavisi çözeltisinden I. için seviye 0,2 mL; II. seviye için 0,3 mL; III. seviye için 0,4 mL eklenip hacmine tamamlandı. Hazırlanan çözeltilerin 210 nm' de C18 kolonda gradient elüsyon tekniği kullanılarak pH 6,0 fosfat tamponu/metanol (75/25-40/60-10/90) hareketli fazı ile 1,4 mL/dakika akış hızında kromotogramları alınarak pik alanları belirlendi. İşlem üç kez tekrarlandı. Bölüm 3.4.2.1'de anlatıldığı gibi hazırlanan ilgili ölçü eğrileri yardımı ile maddelerin konsantrasyonları bulundu. Geri kazanım yüzdeleri ve bağıl standart sapmaları hesaplandı. Sonuçlar Bölüm 4.2.3'de verilmiştir.

### 3.4.2.4 Tanıma ve Tayin Sınırı (LOD, LOQ)

Dekstrometorfan hidrobromür, Sakkarin, Parasetamol, Psödoefedrin hidroklorür, Allura kırmızısı, Doksilamin süksinat ve Birillant mavisinin bir arada analizi için geliştirilen HPLC yöntemin tanıma ve tayin sınırının hesaplanması için sinyal alınabilen en düşük konsantasyondaki çözelti karışımının, 210 nm' de C18 kolonda gradient elüsyon tekniği kullanılarak pH 6,0 fosfat tamponu/metanol (75/25-40/60-10/90) hareketli fazı ile 1,4 mL/dakika akış hızında kromatogramı alındı. Her bir pikin alıkonma zamanındaki pik alanı ölçüldü. Bu işlem 10 defa tekrar edildi ve standart sapma hesaplandı. Tanıma sınırı için standart sapmasının 3 katı, tayin sınırı için standart sapmasının 10 katı pik alanına karşılık gelen madde konsantrasyonları ölçü eğrileri yardımıyla hesaplandı. Sonuçlar Bölüm 4.2.4'te verilmiştir.

### 3.4.2.5 Çözelti Dayanıklılığı

Dekstrometorfan hidrobromür, Sakkarin, Parasetamol, Psödoefedrin hidroklorür, Allura kırmızısı, Doksilamin süksinat ve Birillant mavisinin çözücü içerisindeki dayanılıklığını tespit etmek için hazırlanan çözeltiler oda sıcaklığında ve 4°C'de belirli zaman aralıklarıyla bekletildikten sonra 210 nm' de C18 kolonda gradient elüsyon tekniği kullanılarak pH 6,0 fosfat tamponu/metanol (75/25-40/60-10/90) hareketli fazı ile 1,4 mL/dakika akış hızında kromatografiye edildi. Sonuçlar Bölüm 4.2.5'te verilmiştir.

### 3.4.3 Örnek Analizi

Dekstrometorfan hidrobromür, Sakkarin, Parasetamol, Psödoefedrin hidroklorür, Allura kırmızısı, Birillant mavisi ve Doksilamin süksinat'ın ilaç örneklerinde HPLC yöntemi ile

birarada analizi için bu maddeleri içeren şurup örneğinden 0,2 ml alınarak 10 mL'ye seyreltildi ve membran filtreden geçirildi.  7 ayrı örnek, işlem tekrarlanarak hazırlandı. Hazırlanan örneklerin C18 kolonda gradient elüsyon tekniği kullanılarak pH 6,0 fosfat tamponu/metanol (75/25-40/60-10/90) hareketli fazı ile 1,4 mL/dakika akış hızında kromatogramları alındı.. Birillant mavisinin analizi için herhangibir seyreltme işlemi yapılmaksızın şurup örneği memran filtreden geçirildikten sonra aynı şartlarda enjekte edildi. İşlem 7 kez tekrarlandı. 210 nm de spektrofotometrik dedektör kullanılarak pik alanları belirlendi. Bölüm 3.4.2.1'de anlatıldığı gibi hazırlanan ilgili ölçü eğrileri yardımı ile şuruptaki madde konsantrasyonları saptandı. Sonuçlar Bölüm 4.3'te verilmiştir.

# 4
# SONUÇ VE ÖNERİLER

## 4.1 Kromatografik Şartların Belirlenmesi ve Optimizasyonu

### 4.1.1 Klasik Yöntem ile Şartların Belirlenmesi

Dekstrometorfan hidrobromür, Sakkarin, Parasetamol, Psödoefedrin hidroklorür, Allura kırmızısı, Doksilamin süksinat ve Birillant mavisinin HPLC ile bir arada analizi için kromatografik şartların belirlenmesi amacı ile Bölüm 3.4.1.1de anlatıldığı şekilde çalışıldı. En iyi ayırmanın 1,2 mL/dak akış hızında gradient elüsyon kullanılarak (0–6,5 dk, 75/25; 6,5-8,5 dakika 35/65; 8,5-12 dakika 10/90 ) pH 6,0 fosfat tamponu /metanol hareketli faz bileşimi ile olduğu görüldü.

### 4.1.2 Deneysel Tasarım ile Optimizasyon

#### 4.1.2.1 Merkezi Kompozit Tasarımı

Dekstrometorfan hidrobromür, Sakkarin, Parasetamol, Psödoefedrin hidroklorür, Allura kırmızısı, Doksilamin süksinat ve Birillant mavisinin HPLC ile bir arada analizi için kromatografik ayırmayı etkileyen faktörlerin optimum değerlerini belirlemek, faktör ve etkileşimlerinin etkilerini incelemek amacıyla Bölüm 3.4.1.2 de anlatıldığı şekilde çalışıldı. 3 faktörlü 5 seviyeli merkezi kompozit tasarımı ve çalışılan şartlarda elde edilen ayırma gücü değerleri (Rs) Tablo 4.1'de görülmektedir.

**Tablo 4.1** Merkezi Kompozit tasarımı ve çalışılan şartlarda elde edilen ayırma gücü (Rs) değerleri

| Deney | FR | GR1 | GR2 | Rs* |
|---|---|---|---|---|
| **1** | -1 | -1 | -1 | **6,5** |
| **2** | +1 | -1 | -1 | **5,6** |
| **3** | +1 | +1 | -1 | **34** |
| **4** | -1 | +1 | -1 | **36** |
| **5** | -1 | +1 | +1 | **8** |

**Tablo 4.1** Merkezi Kompozit tasarımı ve çalışılan şartlarda elde edilen ayırma gücü (Rs) değerleri (devamı)

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| **6** | +1 | +1 | +1 | **6** |
| **7** | +1 | 0 | +1 | **32** |
| **8** | -1 | 0 | +1 | **33** |
| **9** | 0 | -1 | -1 | **0** |
| **10** | 0 | -1 | -1.6817 | **0** |
| **11** | 0 | -1.6817 | +1.6817 | **5** |
| **12** | 0 | +1.6817 | 0 | **25** |
| **13** | −1.6817 | 0 | 0 | **36** |
| **14** | +1.6817 | 0 | 0 | **39** |
| **15** | 0 | 0 | 0 | **33** |
| **16** | 0 | 0 | 0 | **37** |
| **17** | 0 | 0 | 0 | **36** |
| **18** | 0 | 0 | 0 | **35** |
| **19** | 0 | 0 | 0 | **34** |

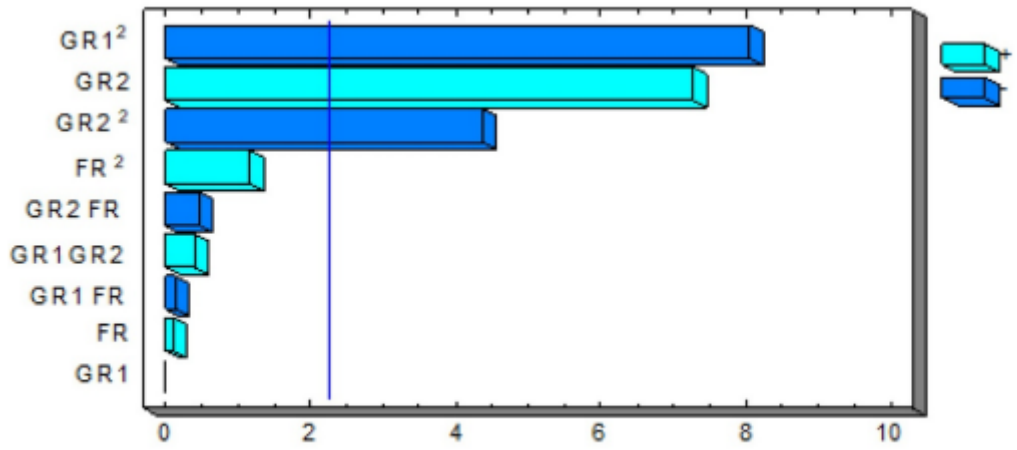
*SAC, PAR, PSE ile AR ve BB arasındaki ayırma gücü değerlerinin çarpımı

#### 4.1.2.2 Veri Değerlendirme

Merkezi Kompozit Tasarımı uygulanarak elde edilen ayırma gücü değerlerine regresyon analizi yapıldı. Her bir faktörün tek tek ve birbirleri ile etkileşimine ait etki değerleri hesaplandı. Bu sonuçlar doğrultusunda elde edilen Pareto grafiği Şekil 4.1'de verilmiştir. Sonuçların doğruluğunu test etmek için ANOVA testi yapıldı. Regresyon analizi ve ANOVA testi ile elde edilen veriler Tablo 4.2 de verilmiştir.

ANOVA testi ve Pareto grafiğinden ayırma gücü üzerinde tüm faktörlerin etkili olmadığı anlaşılmaktadır. Pareto grafiğinden, gradient 2. basamağındaki fosfat tampon oranı (GR2) arttırılırsa, ayırma gücünün arttırılabileceği, Gradient 1. Basamağındaki fosfat tampon oranı (GR1) ve akış hızının (FR) seçilen çalışma aralığında ayırma gücünü büyük ölçüde etki etmediği anlaşılmaktadır. ANOVA sonuçlarından $^{0,05}F_{9,9}$=3,18 çizelge değerinden büyük ve kritik p değeri 0,05'ten küçük olan olan GR2 faktörü ilk GR1GR1 ve GR2GR2 etkileşimin ayırıma gücünü önemli ölçüde etkiledikleri , $^{0,05}F_{9,9}$=3,18 çizelge değerinden küçük ve kritik p değeri 0,05'ten büyük olan G1 ve FR faktörleri ile GR2FR,

GR1GR2 ve GR1FR arasındaki etkileşimlerin ise anlamlı bir etkiye sahip olmadığı görülmüştür.




**Şekil 4.1** Merkezi Kompozit Tasarımı ile elde edilen Pareto grafiği

**Tablo 4.2** ANOVA testi ve regresyon katsayısı değerleri

| **Faktör** | **Kareler Toplam** | **SD*** | **Kareler Ortalaması** | **F-Testi** | **P-Değeri** | **Regresyon Katsayısı** | **Etki Değeri** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Model | 3846.26 | 9 | 427.36 | 15.14 | 0.0022 | 34.86 | 34.86 |
| GR1 | 0.00 | 1 | 0.00 | 0.00 | 0.9960 | 0.00 | 0.01 |
| GR2 | 1487.64 | 1 | 1487.64 | 52.74 | 0.0000 | 10.44 | 20.87 |
| FR | 0.28 | 1 | 0.28 | 0.01 | 0.9232 | 0.14 | 0.28 |
| $GR1^2$ | 1832.23 | 1 | 1832.23 | 64.95 | 0.0000 | -11.58 | -23.17 |
| GR1GR2 | 538.74 | 1 | 538.74 | 19.10 | 0.0018 | 0.74 | 1.48 |
| GR1FR | 38.19 | 1 | 38.19 | 1.35 | 0.2745 | -0.26 | -0.52 |
| $GR2^2$ | 4.35 | 1 | 4.35 | 0.15 | 0.7036 | -6.28 | -12.56 |
| GR2FR | 0.55 | 1 | 0.55 | 0.02 | 0.8919 | -0.86 | -1.72 |
| $FR^2$ | 5.95 | 1 | 5.95 | 0.21 | 0.6569 | 1.67 | 3.34 |
| Toplam Hata | 253.87 | 9 | 28.21 | | | | |
| Toplam | 4100.13 | 18 | 427.36 | | | | |

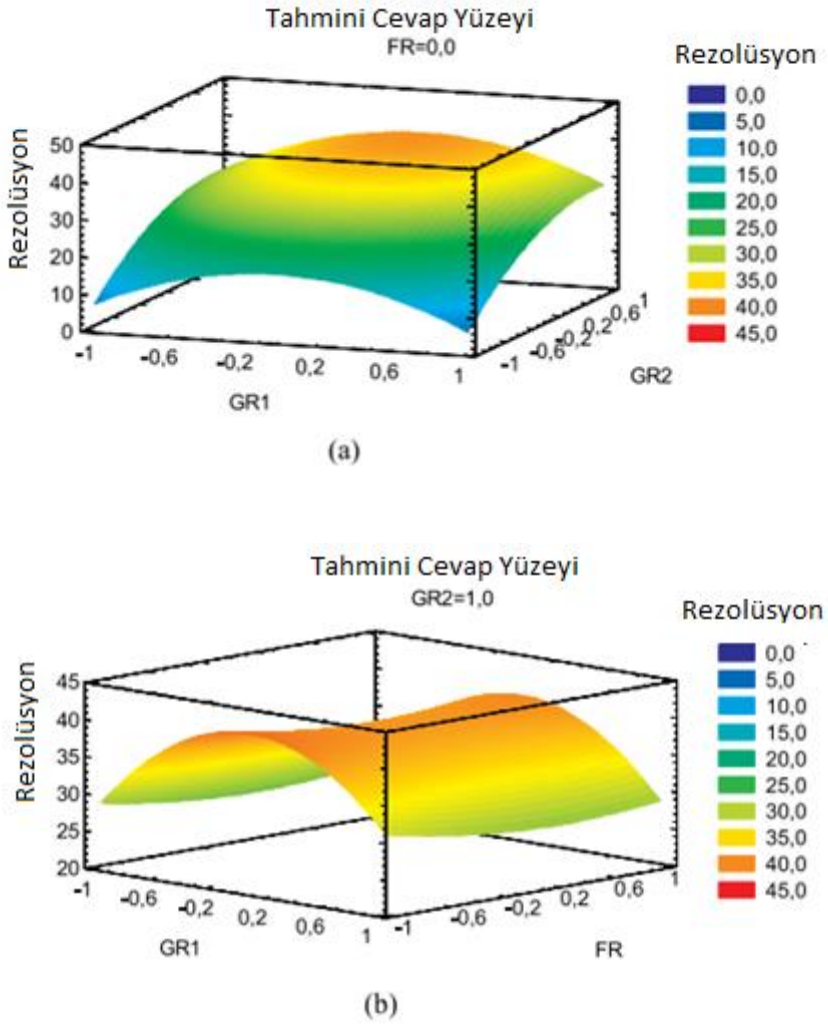
α: Serbestlik Derecesi

#### 4.1.2.3 Modelleme

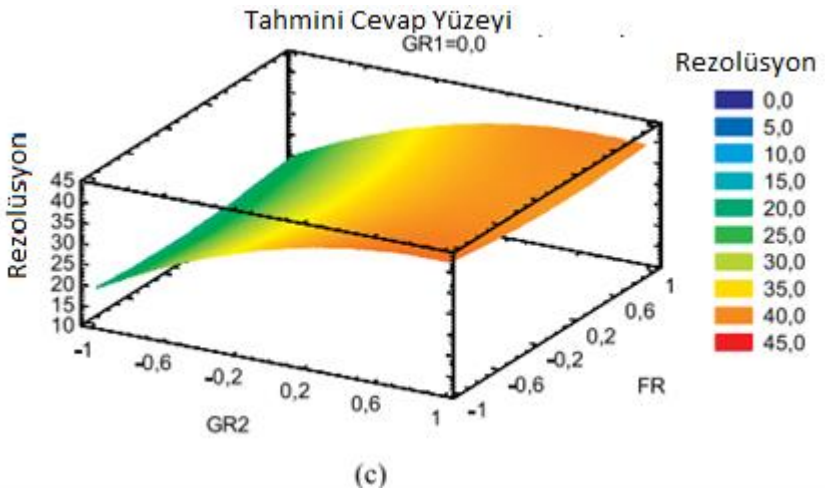
ANOVA ve regresyon analizi ile bulunan ana faktörler ve etkileşimlerin regresyon katsayıları kullanılarak oluşturulan model şu şekildedir.

$$Rs = 34.86 + 10.44GR2 + 0.14FR - 11.58GR1^2 + 0.74GR1GR2 - 0.26GR1FR - 6.28GR^2 - 0.86GR2FR + 1.67FR^2 \quad (4.1)$$

Elde edilen regresyon modelinden her bir faktör için çizilen yüzey cevapları Şekil 4.2'de verilmiştir. Bu modelde bulunan faktörler ve etkileşimlerin arasındaki ilişkiyi gösteren tayin katsayısı ($R^2$) 0,9381 olarak bulunmuştur. Oluşturulan model ile deneysel olarak bulunan ayırma gücü değerlerinin % 87.62 si açıklanabilmektedir. Bu da ayarlı $R^2$ değerinin 0,8762 olduğunu göstermektedir.




**Şekil 4.2** Merkezi Kompozit Tasarımı ile elde edilen faktörleri arasındaki tahmini cevap yüzeyleri grafikleri




(c)

**Şekil 4.2** Merkezi Kompozit Tasarımı ile elde edilen faktörleri arasındaki tahmini cevap yüzeyleri grafikleri

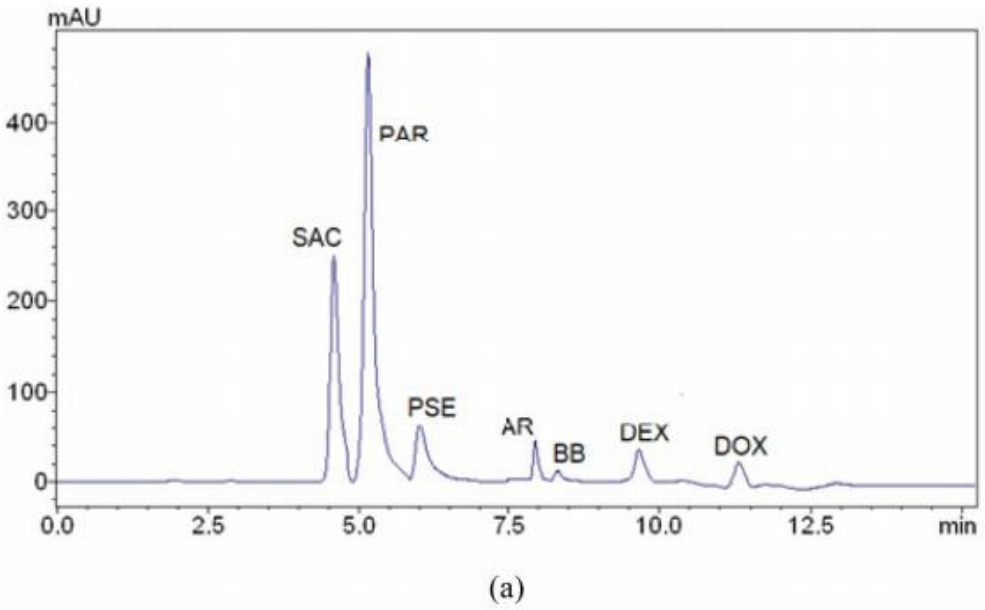
#### 4.1.2.4 Optimizasyon

Ayırma gücü değerini en yüksek yapacak kodlu ve gerçek faktör seviyeleri oluşturulan model kullanılarak hesaplandı.Sonuçlar Tablo 4.3'de verilmiştir. Bu kodlu optimum değerler modelde yerine koyulduğunda ayırma gücü değeri 39 olmaktadır.

**Tablo 4.3** Faktörlerin optimum değerleri

| Faktör | Optimum değer (kodlu) | Optimum değer (gerçek) |
|---|---|---|
| FR | +1 | 1,4 |
| GR1 | 0 | 75 |
| GR2 | +1 | 40 |

Klasik yöntem ve deneysel tasarım ile yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda kromatografik koşullar ;1,4 mL/dak akış hızında gradient elüsyon kullanılarak (0–6.5 dk, 75/25; 6.5-8.5 dakika 40/60; 8.5-12 dakika 10/90 ) pH 6,0 fosfat tamponu /metanol hareketli faz bileşimi olarak belirlenmiştir. Bölüm 3.4.1.2 de anlatıldığı şekilde hazırlanan etken ve katkı maddeleri karışımının, belirlenen kromatografik koşullarda, 210 nm de spektrofotometrik dedektör ile elde edilen kromatogramı Şekil 4.3'da verilmiştir.




**Şekil 4.3** Optimum koşullarda elde edilen HPLC kromatogramı

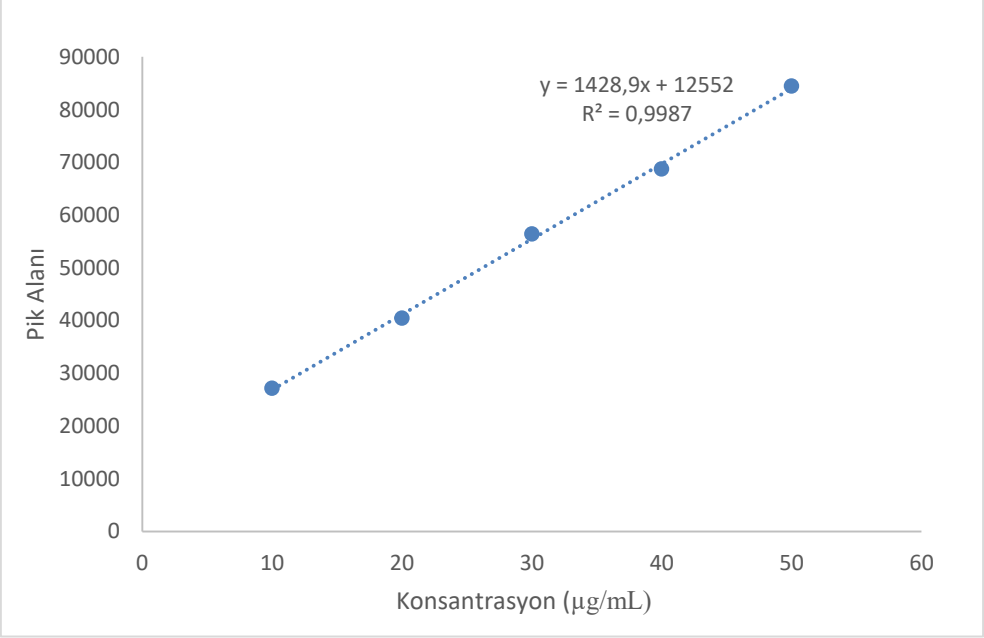
## 4.2 Validasyon

### 4.2.1 Doğrusallık

Dekstrometorfan hidrobromür, Sakkarin, Parasetamol, Psödoefedrin hidroklorür, Allura kırmızısı, Doksilamin süksinat ve Birillant mavisinin bir arada analizi için geliştirilen HPLC yönteminin doğrusallığını incelemek amacıyla Bölüm 3.4.2.1'de anlatıldığı şekilde çalışıldı. Çalışmalar sonucunda hesaplanan pik alanları ortalaması, standard sapma ve bağıl standard sapma değerleri Dekstrometorfan hidrobromür için Tablo 4.4'de, Sakkarin için Tablo 4.6'de, Paresatamol için Tablo 4.8'de, Psödoefedrin hidroklorür için Tablo 4.10'de, alura kırmızı için Tablo 4.12'de, Doksilamin süksinat için Tablo 4.14'de ve Birillant mavisi için Tablo 4.16'de verilmiştir. Tablo 4.5'de Dekstrometorfan hidrobromür, Tablo 4.7'da Sakkarin, Tablo 4.9'de Paresatamol, Tablo 4.11'de, Psödoefedrin hidroklorür, Tablo 4.13'de alura kırmızı, Tablo 4.15'de Doksilamin süksinat Tablo 4.17'de Birillant mavisi için oluşturulan her bir ölçü eğrisinin regresyon analizine ait parametreler yer almaktadır. Pik alanlarının ortalama değerleri kullanılarak edilen ölçü eğrileri, doğru denklemleri ve tayin katsayısı ile birlikte Şekil 4.4'de Dekstrometorfan hidrobromür, Şekil 4.5'de Sakkarin Şekil 4.6'de Parasetamol, Şekil 4.7'te Psödoefedrin hidroklorür, Şekil 4.8'te allura kırmızısı, Şekil 4.9'de Doksilamin süksinat ve Şekil 4.10'de Birillant mavisi için verilmiştir

**Tablo 4.4** Dekstrometorfan hidrobromür doğrusallık değerleri

| NO | C(µg/mL) | A1 | A2 | A3 | ORT | S | %RSD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 10 | 28012 | 28019 | 25367 | 27133 | 1529 | 5,63 |
| 2 | 20 | 41780 | 39384 | 40125 | 40430 | 1226 | 3,03 |
| 3 | 30 | 59340 | 56008 | 53823 | 56390 | 2778 | 4,92 |
| 4 | 40 | 72067 | 67761 | 66290 | 68706 | 3002 | 4,36 |
| 5 | 50 | 89816 | 82450 | 81056 | 84441 | 4707 | 5,57 |



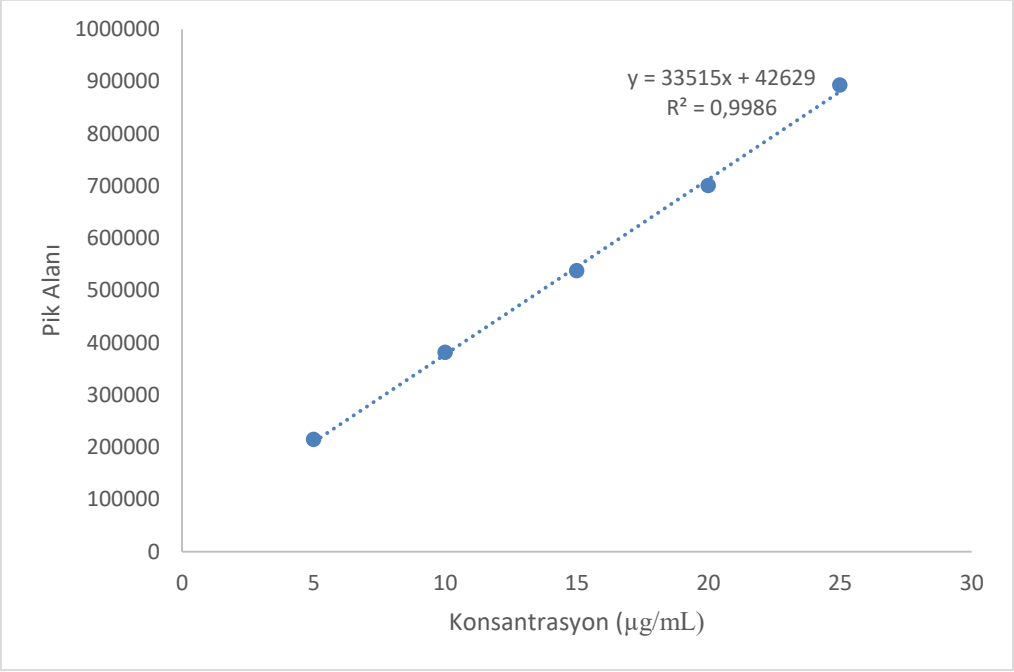

**Şekil 4.4** Dekstrometorfan hidrobromür doğrusallık grafiği

**Tablo 4.5** Dekstrometorfan hidrobromür regresyon analizine ait parametreler

| A | B | $R^2$ | Sa | Sb |
|---|---|---|---|---|
| 12552 | 1428,9 | 0,9987 | 998 | 30 |

**Tablo 4.6** Sakkarin doğrusallık değerleri

| NO | C(µg/mL) | A1 | A2 | A3 | ORT | S | %RSD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 5 | 214923 | 215080 | 214047 | 214683 | 556 | 0,25 |
| 2 | 10 | 397967 | 387204 | 358077 | 381083 | 20637 | 5,41 |
| 3 | 15 | 542631 | 538116 | 532220 | 537656 | 5221 | 0,97 |
| 4 | 20 | 706626 | 736600 | 658151 | 700459 | 39586 | 5,65 |
| 5 | 25 | 885443 | 920726 | 872409 | 892859 | 24997 | 2,79 |



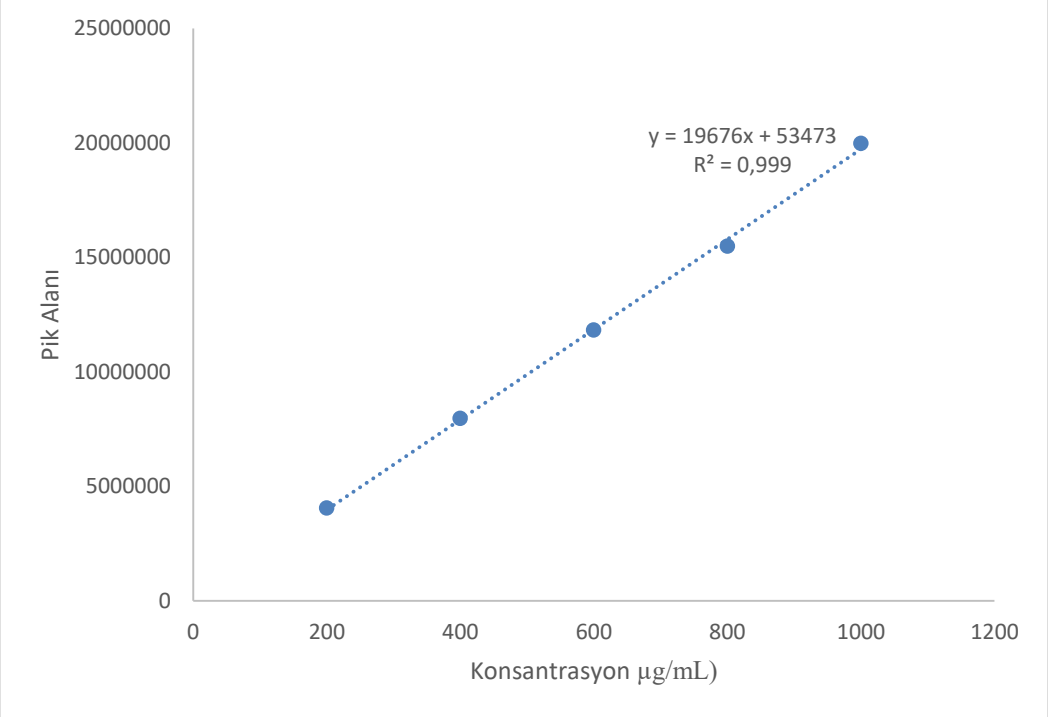

**Şekil 4.5** Sakkarin doğrusallık grafiği

**Tablo 4.7** Sakkarin regresyon analizine ait parametreler

| A | B | $R^2$ | Sa | Sb |
|---|---|---|---|---|
| 42629 | 33515 | 0,9986 | 12086 | 728 |

**Tablo 4.8** Paresatamol doğrusallık değerleri

| NO | C(µg/mL) | A1 | A2 | A3 | ORT | S | %RSD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 200 | 4085966 | 4040166 | 4031829 | 4052654 | 29149 | 0,72 |
| 2 | 400 | 8200043 | 8022597 | 7676493 | 7966378 | 266264 | 3,34 |
| 3 | 600 | 11779437 | 11856558 | 11834180 | 11823392 | 39676 | 0,33 |
| 4 | 800 | 15356583 | 15708404 | 15387427 | 15484138 | 194831 | 1,25 |
| 5 | 1000 | 19896667 | 19663832 | 20350276 | 19970258 | 349089 | 1,74 |



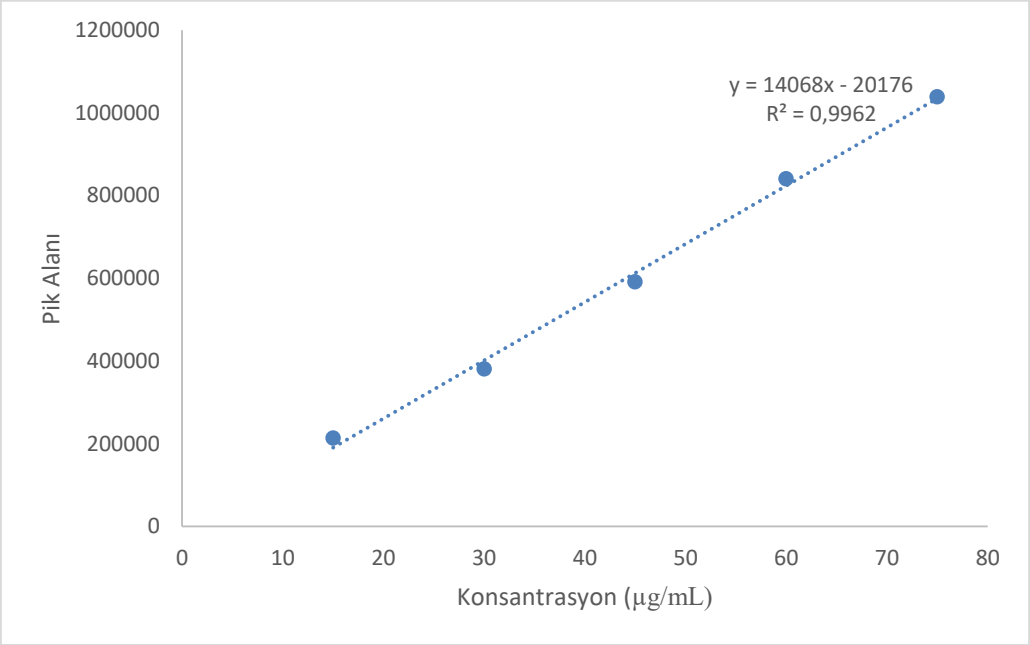

**Şekil 4.6** Parasetamol doğrusallık grafiği

**Tablo 4.9** Paresatamol regresyon analizine ait parametreler

| A | B | $R^2$ | Sa | Sb |
|---|---|---|---|---|
| 53473 | 19676 | 0,999 | 243219 | 367 |

**Tablo 4.10** Psödoefedrin hidroklorür doğrusallık değerleri

| NO | C(µg/mL) | A1 | A2 | A3 | ORT | S | %RSD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 15 | 220288 | 220081 | 199821 | 213397 | 11757 | 5,50 |
| 2 | 30 | 371547 | 405658 | 365208 | 380804 | 21756 | 5,71 |
| 3 | 45 | 628653 | 581996 | 562931 | 591193 | 33812 | 5,72 |
| 4 | 60 | 882696 | 836370 | 801610 | 840225 | 40680 | 4,84 |
| 5 | 75 | 1055337 | 1052957 | 1008041 | 1038778 | 26646 | 2,56 |



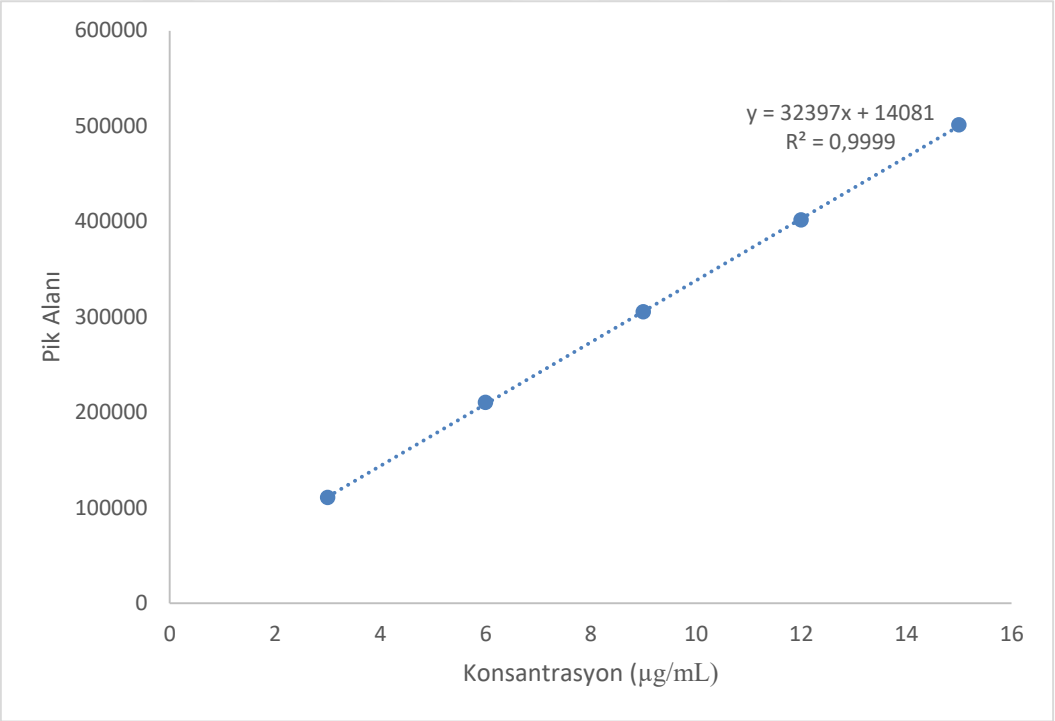

**Şekil 4.7** Psödoefedrin hidroklorür doğrusallık grafiği

**Tablo 4.11** Psödoefedrin hidroklorür regresyon analizine ait parametreler

| A | B | $R^2$ | Sa | Sb |
|---|---|---|---|---|
| -20176 | 14068 | 0,9962 | 24995 | 502 |

**Tablo 4.12** Allura kırmızısı doğrusallık değerleri

| NO | C(µg/mL) | A1 | A2 | A3 | ORT | S | %RSD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 3 | 116287 | 111205 | 103963 | 110485 | 6193 | 5,60 |
| 2 | 6 | 220563 | 210777 | 199661 | 210333 | 10458 | 4,97 |
| 3 | 9 | 300812 | 310496 | 304256 | 305188 | 4909 | 1,60 |
| 4 | 12 | 382759 | 423170 | 398090 | 401339 | 20400 | 5,08 |
| 5 | 15 | 490248 | 508812 | 503770 | 500943 | 9599 | 1,91 |



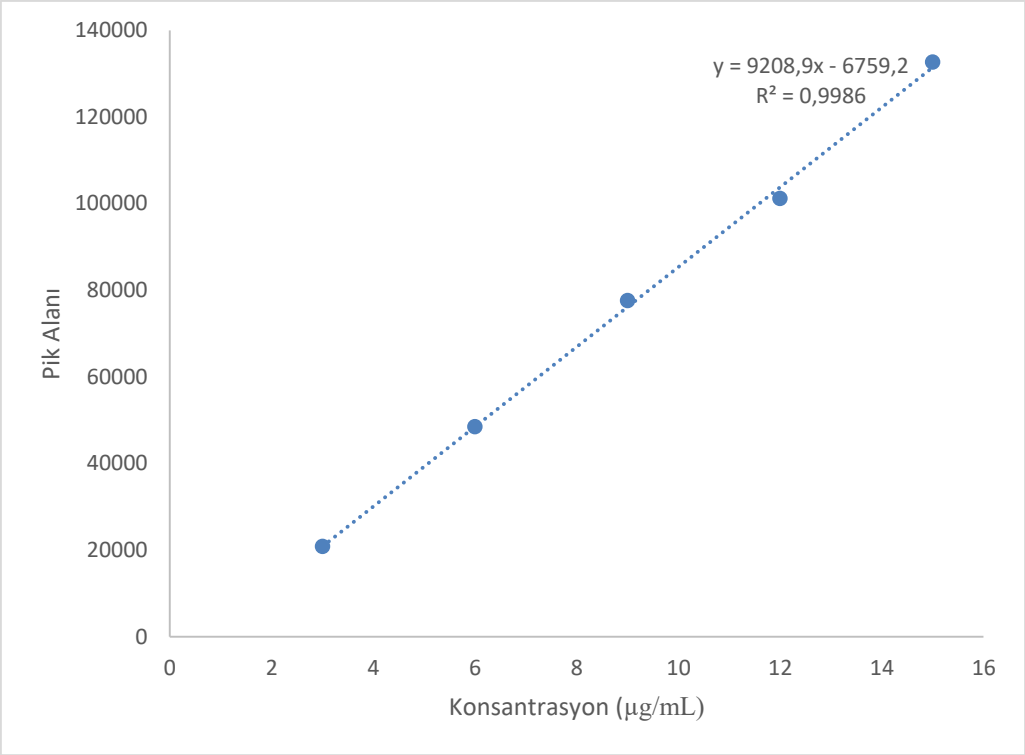

**Şekil 4.8** Allura kırmızısı doğrusallık grafiği

**Tablo 4.13** Allura kırmızısı regresyon analizine ait parametreler

| A | B | $R^2$ | Sa | Sb |
|---|---|---|---|---|
| 14081 | 32397 | 0,9999 | 1650 | 166 |

**Tablo 4.14** Doksilamin süksinat doğrusallık değerleri

| NO | C(µg/mL) | A1 | A2 | A3 | ORT | S | %RSD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 3 | 20125 | 20901 | 21503 | 20843 | 690 | 3,31 |
| 2 | 6 | 50058 | 48707 | 46555 | 48440 | 1766 | 3,64 |
| 3 | 9 | 80583 | 77608 | 74522 | 77571 | 3030 | 3,90 |
| 4 | 12 | 104017 | 96641 | 102667 | 101108 | 3927 | 3,88 |
| 5 | 15 | 135890 | 130000 | 132037 | 132642 | 2991 | 2,25 |



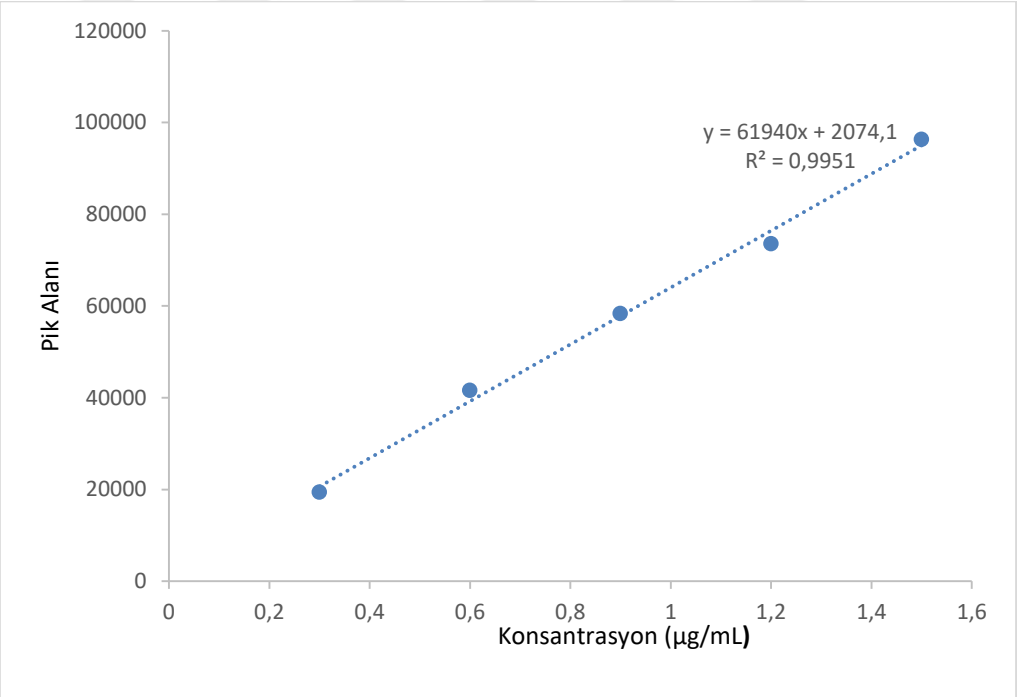

**Şekil 4.9** Doksilamin süksinat doğrusallık grafiği

**Çizelge 4.15** Doksilamin süksinat regresyon analizine ait parametreler

| A | B | $R^2$ | Sa | Sb |
|---|---|---|---|---|
| -6759,2 | 9208,9 | 0,9986 | 1979 | 199 |

**Tablo 4.16** Birillant mavisi doğrusallık değerleri

| NO | C(µg/mL) | A1 | A2 | A3 | ORT | S | %RSD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 0,3 | 20456 | 18545 | 19178 | 19393 | 973 | 5,02 |
| 2 | 0,6 | 42879 | 41123 | 40642 | 41548 | 1177 | 2,83 |
| 3 | 0,9 | 59645 | 58032 | 57271 | 58316 | 1212 | 2,08 |
| 4 | 1,2 | 74922 | 72987 | 72696 | 73535 | 1209 | 1,65 |
| 5 | 1,5 | 98026 | 97128 | 93776 | 96310 | 2239 | 2,33 |




**Şekil 4.10** Birillant mavisi doğrusallık grafiği

**Tablo 4.17** Birillant mavisi regresyon analizine ait parametreler

| A | B | $R^2$ | Sa | Sb |
|---|---|---|---|---|
| 2074,1 | 61940 | 0,9951 | 2508 | 2520 |

### 4.2.2 Gün İçi ve Günler Arası Tekrarlanabilirlik

Dekstrometorfan hidrobromür, Sakkarin, Parasetamol, Psödoefedrin hidroklorür, Allura kırmızısı, Doksilamin süksinat ve Birillant mavisinin bir arada analizi için geliştirilen HPLC yönteminin, gün içi ve günler arası tekrarlanabilirliğini incelemek amacı ile Bölüm 3.4.2.2'de anlatıldığı şekilde yapılan çalışmalar sonucu elde edilen değerler gün içi tekrarlanabilirlik için Tablo 4.18' de, günler arası tekrarlanabilirlik için Tablo 4.19' da verilmiştir.

### 4.2.3 Doğruluk

Dekstrometorfan hidrobromür, Sakkarin, Parasetamol, Psödoefedrin hidroklorür, Allura kırmızısı, Doksilamin süksinat ve Birillant mavisinin bir arada analizi için geliştirilen HPLC yönteminin doğruluğunu incelemek amacı ile Bölüm 3.4.2.3'de anlatıldığı şekilde yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen değerler Tablo 4.20'de verilmiştir.

**Tablo 4.18** Gün içi tekrarlanabilirlik

| **Madde** | **Dekstrometorfan hidrobromür (µg/mL)** | | | **Sakkarin (µg/mL)** | | | **Parasetamol (µg/mL)** | | | **Psödoefedrin hidroklorür (µg/mL)** | | | **Allura kırmızısı (µg/mL)** | | | **Doksilamin süksinat (µg/mL)** | | | **Birillant mavisi (µg/mL)** | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Seviye | 20 | 30 | 40 | 10 | 15 | 20 | 400 | 600 | 800 | 30 | 45 | 60 | 6 | 9 | 12 | 6 | 9 | 12 | 0,6 | 0,9 | 1,2 |
| 1 | 20,35 | 30,87 | 40,20 | 9,99 | 15,02 | 20,39 | 390,74 | 598,74 | 781,27 | 29,52 | 44,46 | 60,84 | 5,85 | 8,99 | 12,14 | 5,86 | 9,22 | 11,89 | 0,6 | 0,93 | 1,16 |
| 2 | 19,67 | 31,12 | 39,81 | 9,65 | 15,08 | 20,15 | 390,30 | 600,76 | 781,91 | 29,57 | 44,61 | 62,87 | 5,89 | 8,98 | 11,93 | 6,01 | 9,11 | 12,16 | 0,6 | 0,91 | 1,18 |
| 3 | 20,33 | 30,90 | 40,13 | 9,99 | 14,91 | 20,25 | 391,05 | 601,91 | 781,40 | 29,71 | 45,09 | 62,90 | 5,90 | 9,02 | 12,03 | 6,08 | 8,95 | 12,11 | 0,62 | 0,91 | 1,2 |
| Xort | 20,12 | 30,96 | 40,05 | 9,88 | 15,00 | 20,27 | 390,70 | 600,47 | 781,53 | 29,60 | 44,82 | 62,20 | 5,88 | 9,00 | 12,03 | 5,99 | 9,09 | 12,05 | 0,61 | 0,92 | 1,18 |
| S | 0,3863 | 0,138 | 0,210 | 0,196 | 0,088 | 0,123 | 0,374 | 1,601 | 0,336 | 0,096 | 0,322 | 1,181 | 0,024 | 0,023 | 0,102 | 0,112 | 0,135 | 0,142 | 0,012 | 0,011 | 0,02 |
| %RSD | 1,92 | 0,45 | 0,52 | 1,98 | 0,59 | 0,60 | 0,10 | 0,27 | 0,04 | 0,32 | 0,72 | 1,90 | 0,41 | 0,26 | 0,85 | 1,87 | 1,48 | 1,18 | 1,97 | 1,2 | 1,69 |
| % Geri Kazanım | 100,60 | 103,20 | 100,13 | 98,80 | 100,00 | 101,35 | 97,67 | 100,08 | 97,69 | 98,66 | 99,60 | 103,67 | 98,00 | 100,00 | 100,25 | 99,83 | 101,00 | 100,42 | 101,67 | 102,22 | 98,33 |

**Tablo 4.19** Günler arası tekrarlanabilirlik

| Madde | Dekstrometorfan hidrobromür (µg/mL) | | | Sakkarin (µg/mL) | | | Parasetamol (µg/mL) | | | Psödoefedrin hidroklorür (µg/mL) | | | Allura kırmızısı (µg/mL) | | | Doksilamin süksinat (µg/mL) | | | Birrillant mavisi (µg/mL) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Seviye | 20 | 30 | 40 | 10 | 15 | 20 | 6 | 9 | 12 | 400 | 600 | 800 | 30 | 45 | 60 | 6 | 9 | 12 | 0,6 | 0,9 | 1,2 |
| 1 | 20,13 | 31,46 | 41,88 | 10,10 | 15,49 | 20,14 | 5,76 | 8,77 | 11,58 | 402,17 | 607,46 | 810,00 | 30,19 | 46,61 | 62,60 | 6,06 | 9,13 | 12,08 | 0,62 | 0.94 | 1,18 |
| 2 | 19,96 | 30,68 | 41,89 | 10,32 | 15,66 | 20,40 | 5,78 | 8,70 | 12,03 | 403,17 | 610,22 | 815,32 | 30,98 | 46,52 | 62,32 | 6,14 | 9,11 | 12,28 | 0,62 | 0,91 | 1,15 |
| 3 | 20,84 | 31,89 | 41,61 | 10,26 | 15,30 | 20,50 | 5,76 | 8,83 | 11,87 | 403,03 | 611,06 | 814,50 | 30,65 | 46,63 | 62,09 | 6,12 | 9,30 | 12,29 | 0,63 | 0,93 | 1,15 |
| 4 | 20,12 | 30,96 | 40,19 | 9,88 | 15,00 | 20,27 | 5,99 | 9,10 | 12,06 | 390,70 | 600,47 | 781,53 | 29,61 | 44,82 | 62,20 | 5,88 | 9,00 | 12,03 | 0,61 | 0,92 | 1,13 |
| Xort | 20,26 | 31,25 | 41,39 | 10,14 | 15,36 | 20,33 | 5,82 | 8,85 | 11,88 | 399,76 | 607,30 | 805,34 | 30,36 | 46,14 | 62,30 | 6,05 | 9,14 | 12,17 | 0,62 | 0,93 | 1,15 |
| S | 0,393 | 0,535 | 0,812 | 0,196 | 0,286 | 0,156 | 0,110 | 0,171 | 0,215 | 6,061 | 4,809 | 16,044 | 0,597 | 0,887 | 0,218 | 0,118 | 0,123 | 0,132 | 0,008 | 0,013 | 0,021 |
| %RSD | 1,94 | 1,71 | 1,96 | 1,93 | 1,86 | 0,77 | 1,89 | 1,93 | 1,81 | 1,52 | 0,79 | 1,99 | 1,97 | 1,92 | 0,35 | 1,95 | 1,35 | 1,08 | 1,29 | 1,40 | 1,83 |
| % Geri Kazanım | 101,30 | 104,17 | 103,47 | 101,43 | 102,40 | 101,65 | 97,00 | 98,33 | 99,00 | 99,94 | 101,22 | 100,67 | 101,20 | 102,53 | 103,83 | 100,83 | 101,56 | 101,42 | 103,33 | 103,33 | 95,83 |

**Tablo 4.20** Doğruluk

| **Madde** | **Dekstrometorfan hidrobromür (µg/mL)** | | | **Sakkarin (µg/mL)** | | | **Parasetamol (µg/mL)** | | | **Psödoefedrin hidroklorür (µg/mL)** | | | **Allura Kırmızısı (µg/mL)** | | | **Doksilamin süksinat (µg/mL)** | | | **Birrillant mavisi (µg/mL)** | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Seviye | 10 | 20 | 30 | 5 | 10 | 15 | 100 | 300 | 500 | 10 | 25 | 40 | 2 | 5 | 8 | 2 | 5 | 8 | 0,6 | 0,9 | 1,2 |
| 1 | 9,97 | 20,46 | 31,17 | 4,79 | 10,48 | 15,38 | 98,73 | 314,84 | 521,04 | 10,08 | 25,49 | 42,06 | 1,92 | 5,14 | 8,35 | 1,87 | 4,98 | 7,85 | 0,64 | 0,91 | 1,21 |
| 2 | 9,71 | 20,62 | 32,04 | 4,96 | 10,10 | 15,70 | 100,01 | 316,14 | 526,44 | 10,24 | 26,36 | 40,80 | 1,95 | 5,28 | 8,16 | 1,92 | 5,02 | 7,78 | 0,63 | 0,91 | 1,2 |
| 3 | 10,08 | 21,03 | 31,16 | 4,81 | 10,33 | 15,75 | 102,26 | 311,78 | 526,96 | 10,29 | 26,03 | 41,85 | 1,99 | 5,29 | 8,18 | 1,93 | 5,17 | 7,98 | 0,62 | 0,92 | 1,23 |
| Xort | 9,92 | 20,70 | 31,46 | 4,85 | 10,30 | 15,61 | 100,33 | 314,25 | 524,81 | 10,20 | 25,96 | 41,57 | 1,95 | 5,23 | 8,23 | 1,91 | 5,06 | 7,87 | 0,63 | 0,91 | 1,21 |
| S | 0,190 | 0,296 | 0,506 | 0,093 | 0,191 | 0,199 | 1,790 | 2,240 | 3,278 | 0,111 | 0,443 | 0,678 | 0,034 | 0,082 | 0,103 | 0,031 | 0,100 | 0,103 | 0,01 | 0,006 | 0,015 |
| % RSD | 1,91 | 1,43 | 1,61 | 1,92 | 1,85 | 1,27 | 1,78 | 0,71 | 0,62 | 1,09 | 1,70 | 1,63 | 1,74 | 1,57 | 1,25 | 1,62 | 1,98 | 1,31 | 1,59 | 0,66 | 1,24 |
| % Geri kazanım | 99,20 | 103,50 | 104,87 | 97,00 | 103,00 | 104,07 | 100,33 | 104,75 | 104,96 | 102,00 | 103,84 | 103,94 | 97,50 | 104,60 | 102,92 | 95,50 | 101,20 | 98,37 | 105 | 101,11 | 100,83 |

### 4.2.4 Tanıma ve Tayin Sınırı (LOD-LOQ)

Dekstrometorfan hidrobromür, Sakkarin, Parasetamol, Psödoefedrin hidroklorür, Allura kırmızısı, Doksilamin süksinat ve Birillant mavisinin bir arada analizi için geliştirilen HPLC yönteminin tanınma ve tayin sınırlarının belirlenmesi için Bölüm 3.4.2.4'de anlatıldığı gibi yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen değerler Tablo 4.21' da verilmiştir.

**Tablo 4.21** Tanınma ve Tayin Limiti

| | **Dekstrometorfan hidrobromür** | **Sakkarin** | **Parasetamol** | **Psödoefedrin hidroklorür** | **Allura kırmızısı** | **Doksilamin süksinat** | **Birillant mavisi** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **LOD ( µg/mL )** | 0,58 | 0,03 | 0,05 | 0,08 | 0,03 | 0,09 | 0,02 |
| **LOQ ( µg/mL )** | 1,93 | 0,10 | 0,17 | 0,27 | 0,10 | 0,30 | 0,07 |

### 4.2.5 Çözelti Dayanılıklığı

Dekstrometorfan hidrobromür, Sakkarin, Parasetamol, Psödoefedrin hidroklorür, Allura kırmızısı, Doksilamin süksinat ve Birillant mavisinin çözücü içerisindeki dayanıklılığını incelemek için Bölüm 3.4.2.5'de anlatıldığı şekilde çalışıldığında oda sıcaklığında 1 gün, 4C$^{o}$ de 1 hafta dayanıklı olduğu görüldü.

## 4.3 Örnek Analizi

Dekstrometorfan hidrobromür, Sakkarin, Parasetamol, Psödoefedrin hidroklorür, Allura kırmızısı, Doksilamin süksinat ve Birillant mavisinin bir arada analizi için Bölüm 3.4.3'de anlatıldığı gibi yapılan çalışmalar ile şuruptaki madde konsantrasyonları saptandı. Sonuçlar Tablo 4.22'de verilmiştir. Elde edilen sonuçların ilaç etiket değerleri ile karşılaştırılması Tablo 4.23'te görülmektedir.

**Tablo 4.22** Örnek analizi

| **Deneme Sayısı** | **Dekstrometorfan hidrobromür (mg/mL)** | **Sakkarin (mg/mL)** | **Parasetamol (mg/mL)** | **Psödoefedrihidroklorür (mg/5mL)** | **Allura Kırmızısı (mg/mL)** | **Doksilamin süksinat (mg/mL)** | **Birillant mavisi (mg/mL)** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 0,979 | 0,692 | 34,701 | 1,994 | 0,41 | 0,413 | $1,104x10^{-3}$ |
| 2 | 1,015 | 0,687 | 34,193 | 2,014 | 0,403 | 0,402 | $1,071x10^{-3}$ |
| 3 | 0,985 | 0,68 | 33,738 | 2,043 | 0,394 | 0,408 | $1,102x10^{-3}$ |
| 4 | 0,957 | 0,662 | 34,759 | 1,934 | 0,41 | 0,398 | $1,111x10^{-3}$ |
| 5 | 0,981 | 0,684 | 34,524 | 1,999 | 0,396 | 0,401 | $1,111x10^{-3}$ |
| 6 | 1,008 | 0,678 | 33,874 | 2,018 | 0,398 | 0,412 | $1,105x10^{-3}$ |
| 7 | 0,999 | 0,682 | 34,425 | 2,018 | 0,402 | 0,398 | $1,107x10^{-3}$ |
| ORT | 0,989 | 0,681 | 34,316 | 2,002 | 0,402 | 0,405 | $1,101x10^{-3}$ |
| STD | 0,019 | 0,009 | 0,397 | 0,034 | 0,006 | 0,005 | $0,014 x10^{-3}$ |
| %RSD | 1,921 | 1,321 | 1,156 | 1,698 | 1,492 | 1,234 | 1,273 |

**Tablo 4.23** Analiz sonuçlarının etiket değerleri ile karşılaştırılması

| | **Etiket (mg/mL)** | **Bulunan (mg/mL)** | **% Geri Kazanım** |
|---|---|---|---|
| **Dekstrometorfan hidrobromür** | 1,000 | 0,989 | 98,90 |
| **Sakkarin** | 0,700 | 0,681 | 97,29 |
| **Parasetamol** | 33,333 | 34,316 | 102,95 |
| **Psödoefedrin hidroklorür** | 2,000 | 2,002 | 100,10 |
| **Allura Kırmızısı** | - | 0,402 | - |
| **Doksilamin süksinat** | 0,417 | 0,405 | 97,12 |
| **Birillant mavisi** | - | $1{,}101 \times 10^{-3}$ | - |

## 4.4 Tartışma

Bu çalışmada dekstrometorfan hidrobromür, sakkarin, parasetamol, psödoefedrin hidroklorür, allura kırmızısı, doksilamin süksinat ve birillant mavisinin birarada analizi için geliştirilen HPLC analiz yönteminde, maddeler spektrofotometrik dedektörle 210 nm dalga boyunda saptanmıştır. Hareketli faz oranları, pH ve akış hızı parametreleri yaklaşık olarak klasik yöntem ile bulunmuştur. Gradient birinci basamağı ve ikinci basamağı tampon oranı ile akış hızı için optimum koşullar deneysel tasarım ile belirlenmiştir. Klasik yöntemle yapılan çalışmalarda mobil faz pH'ının ve gradient üçüncü basamak tampon oranının maddelerin alıkonma zamanını değiştirdiği ancak ayırma gücünü etkilemediği görüldüğünden bu faktörler denaysel tasarımda incelenmemiştir. Deneysel tasarım için geliştirilen modelin uygunluğunu ifade eden ayarlı tayin katsayısı alt limit olan 0,8'in üstünde bulunmuştur. Maddelerin analizi gradient elüsyon tekniği kullanılarak 12 dakikada gerçekleştirilmiştir.

Geliştirilen yöntemin doğrusallığını kanıtlamak için, maddelerin örnekler içindeki miktarları göz önüne alınarak belirlenen konsantrasyon aralığında, 3 ayrı ölçü eğrisi hazırlanmış ve regresyon analizleri yapılmıştır. Sonuçların birbirleri ile tutarlı olduğu ve tayin katsayılarının uygun olduğu görülmüştür.

Geliştirilen yöntemin kesinliğini kanıtlamak için belirlenen konsantrasyon aralığı içinde olacak şekilde 3 farklı konsantrasyonda sentetik karışımlar hazırlanmış ve farklı zamanlarda analiz edilmiştir. Kabul edilebilirlik için üst limit olan % 2'nin altında RSD değerleri elde edilmiştir.

Çalışılan yöntemin doğruluğunu kanıtlamak için yapılan çalışmalarda, şurup numunesi üzerine 3 farklı konsantrasyonda maddelerin belirlenen ve bilinen miktarları ilave edilmiş, yapılan analizlerde elde edilen % geri kazanım değerleri kabul edilebilir sınırlar içinde (95-105) olduğu görülmüştür.

Geliştirilen HPLC yöntemi piyasada bulunan vıcks medinait adlı şurup örneğine uygulanmıştır. Şurup örneği uygun oranda seyretilerek sisteme enjekte edilmiştir. Ancak birillant mavisinin şurup örneği içindeki miktarı çok düşük olduğundan gözlemlenememiş ve bu nedenle şurup örneği seyreltilmeksizin yapılan ayrı bir enjeksiyon ile tayin edilmiştir. Örneklerin tekrarlanan analizlerinde kabul

edilebilir sınırlar içinde % RSD değerleri elde edilmiştir. Bulunan miktarlar etiket değerleriyle karşılaştırılmış ve kabul edilebilir sınırları içinde % geri kazanım değerleri bulunmuştur.

Şurup numunesinde analizi yapılan katkı madde miktarlarının da belirlenen sınırlara uygun olduğu görülmüştür. (alura kırmızı < 7mg/kg ADI; sakkarin<5 mg/kg ADI; birillant mavisi < 0,1mg/kg ADI)

Bu tez kapsamında, yapılan çalışmalarda geliştirilen HPLC analiz yönteminin geçerliliği kanıtlanmış olup kalite kontrol laboratuvarlarındaki rutin analizlerde ve içerik olarak benzer örneklerin analizlerinde güvenilir bir yöntem olarak kullanılacağı düşünülmektedir.

# KAYNAKLAR


[1] Pubchem https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/#query=active%20pharmaceutical%20ingredients&tab=pubmed, 4 Eylül 2018.

[2] Kocaeli Üniversitesi, Parasetamol, http://tip.kocaeli.edu.tr/docs/cocuksagligihastaliklarianabilimdali/parasetamolzehırlenmesı2.ppsx

[3] Ali, A., Athar, M. M., Ahmed, M., Nadeem, K., Murtaza, G., Farooq, U., & Salman, M. (2019). "Stability-indicating HPLC-PDA assay for simultaneous determination of paracetamol, thiamine and pyridoxal phosphate in tablet formulations". Acta Pharmaceutica, 69, 249-259.

[4] Veras, T. B., Ribeiro de Paiva, A. L., Menezes Bezerra Duarte, M. M., Napoleao, D. C., & da Silva Pereira Cabral, J. J. (2019). "Analysis of the presence of anti-inflammatories drugs in surface water: A case study in Beberibe river - PE, Brazil". Chemosphere, 222, 961-969.

[5] Stachowiak, A., Szalek, E., Karbownik, A., Lojko, A., Porazka, J., Przewozna, I., Grabowski, T., Wolc, A., Grzeskowiak, E., (2019). "The Influence of Diabetes Mellitus on Glucuronidation and Sulphation of Paracetamol in Patients with Febrile Neutropenia". European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, 44, 289-294.

[6] Ulusoy, HI., Yilmaz, E., Soylak, M., (2019). "Magnetic solid phase extraction of trace paracetamol and caffeine in synthetic urine and wastewater samples by a using core shell hybrid material consisting of graphene oxide/multiwalled carbon nanotube/Fe3O4/SiO2". Mirochemical Journal, 145, 843-851.

[7] Abdelwahab, NS., Ali, NW., Zaki, MM., Sharkawi, SMZ., Abdelkawy, MM., (2019). "Simultaneous Determination of Thalidomide and Dexamethasone in Rat Plasma by Validated HPLC and HPTLC With Pharmacokinetic Study". Journal of Chormatographic Science, 57, 130-138.

[8] Borahan, T., Unutkan, T., Sahin, A., Bakirdere, S., (2019). "A rapid and sensitive reversed phase-HPLC method for simultaneous determination of ibuprofen and paracetamol in drug samples and their behaviors in simulated gastric conditions". Journal of Separation Science, 42, 678-683.

[9] Ibrahim, AM., Hendawy, HAM., Hassan, WS., Shalaby, A., El-sayed, HM., (2019). "Six Sigma quality approach for HPLC-UV method optimization". Microchemical Journal, 144, 303-308.

[10] Salih, ME., Aqel, A., Abdulkhair, BY., Alothman, ZA., Abdulaziz, MA., Badjah-Hadj-Ahmed, AY., (2018). "Simultaneous Determination of Paracetamol and Chlorzoxazone in Their Combined Pharmaceutical Formulations by Reversed-phase Capillary Liquid Chromatography Using a Polymethacrylate Monolithic Column". Journal of Chromatographic Science, 56, 819-827.

[11] Karbownik, A., Szalek, E., Sobanska, K., Grabowski, T., Klupczynska, A., Plewa, S., Wolc, A., Magiera, M., Porazka, J., Kokot, ZJ., Grzeskowiak, E., (2018). "The concomitant use of lapatinib and paracetamol - the risk of interaction". Investigational New Drugs, 36, 819-827.

[12] Kempinska, D., Kot-Wasik, A., (2018). "The use of RP-HPLC-Q-TOF-MS as a powerful tool for wastewater composition profiling and selection of water pollution marker specific to wastewater contamination". Monatshefte Fur Chemie, 149, 1595-1604.

[13] Mohamed, D., Hegazy, MA., Elshahed, MS., Toubar, SS., Helmy, MI., (2018). "Liquid chromatography-tandem MS/MS method for simultaneous quantification of paracetamol, chlorzoxazone and aceclofenac in human plasma: An application to a clinical pharmacokinetic study". Biomedical Chromatography, 32.

[14] Salama, FM., Attia, KA., Abouserie, AA., El-Olemy, A., Abolmagd, E., (2018). "Application of HPLC-DAD and spectrophotometric continuous wavelet transform methods for simultaneous determination of amoxicillin and diclofenac in their pure and capsule dosage forms". Analytical Methods, 10, 2588-2594.

[15] Bhulakshmi, P., Devi, MG., (2018). "Analytical Method Development and Validation for the Simultaneous Estimation of Flupiritine Maleate and

Paracetamol by Usıng RP-HPLC". Indo American Journal of Pharmaceutical Sciences, 5, 2829-2835.

[16] Belal, F., Omar, MA., Derayea, S., Hammad, MA., Zayed, S., Saleh, SF., (2018). "Simultaneous Determination of Tizanidine, Nimesulide, Aceclofenac and Paracetamol in Tablets and Biological Fluids Using Micellar Liquid Chromatography". Journal of Chromatographic Science, 56, 233-241.

[17] Alencar, LM., dos Santos, RB., Guedes, TD., dos Santos, WTP., de Souza, JBG., Ferreira, VS., da Silva, RAB., (2018). "Fast and Selective Simultaneous Determination of Acetaminophen, Aspirin and Caffeine in Pharmaceutical Products by Batch Injection Analysis with Multiple Pulse Amperometric Detection". Electroanalysis, 30, 296-303.

[18] Schelstraete, W., Devreese, M., Croubels, S., (2018) "Storage stability study of porcine hepatic and intestinal cytochrome P450 isoenzymes by use of a newly developed and fully validated highly sensitive HPLC-MS/MS method". Analytical and Bioanalytical Chemistry, 410, 1833-1843.

[19] Minh, TT., Phong, NH., Duc, HV., Khieu, DQ., (2018) "Microwave synthesis and voltammetric simultaneous determination of paracetamol and caffeine using an MOF-199-based electrode". Journal of Materials Science, 53, 2453-2471.

[20] Abdelwahab, NS., Elshemy, HAH., Farid, NF., (2018) "Determination of flutamide and two major metabolites using HPLC-DAD and HPTLC methods". Chemıstry Central Journal, 12.

[21] Fernandes, TAP., Aguiar, JP., Fernandes, AI., Pinto, JF., (2017) "Quantification of theophylline or paracetamol in milk matrices by high-performance liquid chromatography". Journal of Pharmaceutical Analysis, 7, 401-405.

[22] Ashfaq, M., Noor, N., Saif-Ur-Rehman, M., Sun, Q., Mustafa, G., Nazar, MF., Yu, CP., (2017) "Determination of Commonly Used Pharmaceuticals in Hospital Waste of Pakistan and Evaluation of Their Ecological Risk Assessment". Clean-Soil Air Water, 45.

[23] Karbownik, A., Bienert, A., Plotek, W., Grabowski, T., Cerbin-Koczorowska, M., Wolc, A., Grzeskowiak, E., (2017) "Influence of the Time of Intravenous Administration of Paracetamol on its Pharmacokinetics and Ocular

Disposition in Rabbits". European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, 42, 489-498.

[24] Jallouli, N., Elghniji, K., Trabelsi, H., Ksibi, M., (2017) "Photocatalytic degradation of paracetamol on TiO2 nanoparticles and TiO2/cellulosic fiber under UV and sunlight irradiation". Arabian Journal of Chemistry, 10, 3640-3645.

[25] Ali, N. W., Gamal, M., & Abdelkawy, M. (2017). "Simultaneous determination of hyoscine N-butyl bromide and paracetamol in their binary mixture by RP-HPLC method". Arabian Journal of Chemistry, 10, 1868-1874.

[26] Li, X.-Q., Wang, R.-T., Wang, Q.-H., Tang, X.-L., Lu, C.-T., Gong, H.-G., & Wen, A.-D. (2017). "Determination of phloroglucinol by HPLC-MS/MS and its application to a bioequivalence study in healthy volunteers". European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 21, 1990-1998.

[27] Ashfaq, M., Khan, K. N., Rehman, M. S. U., Mustafa, G., Nazar, M. F., Sun, Q., Yu, C.-P. (2017). "Ecological risk assessment of pharmaceuticals in the receiving environment of pharmaceutical wastewater in Pakistan". Ecotoxicology and Environmental Safety, 136, 31-39.

[28] Kumar, P. A., Thirupathi, D., Kumar, Y. R., & Jayashree, A. (2017). "Simultanious Determination of Related Organic Impurities of Ibuprofen and Paracetamol in Combination Solid Dosage Form by Rp-hplc With Qbd Approach". Oriental Journal of Chemistry, 33, 1461-1468.

[29] Stone, C., (2018), "Bivariate Analysis for the Determination of Paracetamol and Caffeine in Drug Formulations", Jordan Journal of Chemistry, 11, 217-225.

[30] Dewani, AP., Bakal, RL., Shelke, PG., Chandak, M., Patra, S., Farooqui, S., Chandewar, AV.,(2016), "An gradient HPLC-DAD determination of phenylepherine, paracetamol, ambroxol and levocetrizine in pharmaceutical formulation", INDIAN JOURNAL OF CHEMICAL TECHNOLOGY, 23, 419-424.

[31] Yehia, AM., Essam, HM., Imamoglu, E.,Tunca, AK.,(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, 3357-3367.

[32] Andrighetto, L. M., Burns, N. K., Stevenson, P. G., Pearson, J. R., Henderson, L. C., Bowen, C. J., & Conlan, X. A. (2016). "In-silico optimisation of two-dimensional high performance liquid chromatography for the determination of Australian methamphetamine seizure samples". Forensic Science International, 266, 511-516.

[33] Topkafa, M., Ayyildiz, H. F., Memon, F. N., & Kara, H. (2016). "New potential humic acid stationary phase toward drug components: Development of a chemometric-assisted RP-HPLC method for the determination of paracetamol and caffeine in tablet formulations". Journal of Separation Science, 39(13), 2451-2458.

[34] Filist, M., Szlaska, I., Kaza, M., & Pawinski, T. (2016). "Validated HPLC-UV method for determination of naproxen in human plasma with proven selectivity against ibuprofen and paracetamol". Biomedical Chromatography, 30(6), 953-961.

[35] Cifci, D. I., Tuncal, T., Pala, A., & Uslu, O. (2016). "Determination of optimum extinction wavelength for paracetamol removal through energy efficient thin film reactor". Journal of Photochemistry and Photobiology A-Chemistry, 322, 102-109.

[36] Acheampong, A., Gyasi, W. O., Darko, G., Apau, J., & Addai-Arhin, S. (2016). "Validated RP-HPLC method for simultaneous determination and quantification of chlorpheniramine maleate, paracetamol and caffeine in tablet formulation". Springerplus, 5, 625.

[37] Ciegis, P., Zevzikovas, A., Zevzikoviene, A., Nenortiene, P., & Kazlauskiene, D. (2016). "Investigation of a Mixture Containing Alprazolam, Codeine and Paracetamol Using Thin-Layer and High Performance Liquid Chromatography Methods". Acta Poloniae Pharmaceutica, 73(3), 613-619.

[38] Akgeyik, E., Kaynak, M. S., Celebier, M., Altinoz, S., & Sahin, S. (2016). "Evaluation of Pharmaceutical Quality of Conventional Dosage Forms Containing Paracetamol and Caffeine Available in the Turkish Drug Market". Dissolution Technologies, 23(2), 36-41.

[39] El-Lakkany, N. M., Hendawy, A. S., el-Din, S. H. S., Ashour, A. A., Atta, R., Abdel-Aziz, A.-A. H., … Botros, S. S. (2016). "Bioavailability of paracetamol with/without caffeine in Egyptian patients with hepatitis C virus". European Journal of Clinical Pharmacology, 72(5), 573-582.

[40] Baranowska, I., & Plonka, J. (2016). "Monitoring of biogenic amines and drugs of various therapeutic groups in urine samples with use of HPLC". Biomedical Chromatography, 30(4), 652-657.

[41] Pallerla, S., & Prabhakar, B. (2016). "Bio Analytical Method Development and Validation of Temozolomide in Rat Plasma Using Rp-Hplc Method". International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, 7(3), 1298-1301.

[42] Babu, G. R., Rao, A. L., & Rao, J. V. (2016). "Bioanalytical Method Development and Validation for Simultaneous Estimation of Paracetamol and Cefixime by using RP-HPLC in Rabbit Plasma". Oriental Journal of Chemistry, 32(1), 701-707.

[43] Hefnawy, M., Al-Majed, A., Mohammed, M., Attia, S., Rizk, M., & El-Eryan, R. T. (2016). "Development of a Monolithic HPLC-ECD Method for the Determination of Ropinirole HCl in Mouse Sera and Dosage Forms". British Journal of Pharmaceutical Research, 13(3), UNSP 28757.

[44] Curran, C. (2016). "Degradation of paracetamol and other constituents in Perfalgan". Southern African Journal of Anaesthesia and Analgesia, 22(4), 114-120.

[45] Sharma, H., Vishakha, K., Kumar, K. V., & Bhatta, H. P. (2016). "Validated Rp-Hplc Method for Simultaneous Estimation of Paracetamol, Pamabrom and Dicyclomine, Hydrochloride in Bulk and Pharmaceutical Dosage Form". International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, 7(1), 316-324.

[46] Cook, S. F., King, A. D., van den Anker, J. N., & Wilkins, D. G. (2015). "Simultaneous quantification of acetaminophen and five acetaminophen metabolites in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry: Method validation and application to a neonatal pharmacokinetic study".

Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 1007, 30-42.

[47] Cook, SF., King, AD., van den Anker, JN., Wilkins, DG., (2015), "Simultaneous quantification of acetaminophen and five acetaminophen metabolites in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry: Method validation and application to a neonatal pharmacokinetic study", Journal Of Chromatography B-Analytical Technologies In The Biomedical And Life Sciences, 1007, 30-42.

[48] Dewani, AP., Patra, S., (2015), "A Single Hplc-Dad Method For Simultaneous Analysis Of Paracetamol, Phenylephrine, Caffeine And Levocetirizine In Bulk Powder And Tablet Formulation: Application To In-Vitro Dissolution Studies", 60, 2734-2739.

[49] Pingili, RB., Pawar, AK., Challa, SR., (2015), "Systemic exposure of Paracetamol (acetaminophen) was enhanced by quercetin and chrysin co-administration in Wistar rats and in vitro model: risk of liver toxicity", Drug Development And Industrial Pharmacy, 41, 1793-1800.

[50] Clausen, DN., Oliveira, FM., Casarin, J., Sartori, ER., Tarley, CRT., (2015), "Development of HPLC Method for Quantification of Orphenadrine, Paracetamol, and Caffeine in Pharmaceutical Formulations", 7, 2066-2079.

[51] Abdelaleem, EA., Naguib, IA., Hassan, ES., Ali, NW., (2015), "HPTLC and RP-HPLC methods for simultaneous determination of Paracetamol and Pamabrom in presence of their potential impurities", Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis, 114, 22-27.

[52] [10]Ibrahim, F., El-Enany, N., El-Shaheny, RN., Mikhail, IE., (2015), "Development and Validation of a New HPLC Method for the Simultaneous Determination of Paracetamol, Ascorbic Acid, and Pseudoephedrine HCl in their Co-formulated Tablets. Application to in vitro Dissolution Testing", Analytical Sciences, 31, 943-947.

[53] Dewani, A. P., Dabhade, S. M., Bakal, R. L., Gadewar, C. K., Chandewar, A. V., & Patra, S. (2015). "Development and validation of a novel RP-HPLC method for simultaneous determination of paracetamol, phenylephrine

hydrochloride, caffeine, cetirizine and nimesulide in tablet formulation". Arabian Journal of Chemistry, 8(4), 591-598.

[54] Cunha, R. R., Chaves, S. C., Ribeiro, M. M. A. C., Torres, L. M. F. C., Munoz, R. A. A., Dos Santos, W. T. P., & Richter, E. M. (2015). "Simultaneous determination of caffeine, paracetamol, and ibuprofen in pharmaceutical formulations by high-performance liquid chromatography with UV detection and by capillary electrophoresis with conductivity detection". Journal of Separation Science, 38(10), 1657-1662.

[55] Langlois, M.-H., Vekris, A., Bousses, C., Mordelet, E., Buhannic, N., Seguard, C., … Gaudin, K. (2015). "Development of a solvent-free analytical method for paracetamol quantitative determination in Blood Brain Barrier in vitro model". Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 988, 20-24.

[56] Locatelli, M., Cifelli, R., Di Legge, C., Barbacane, R. C., Costa, N., Fresta, M., … Di Marzio, L. (2015). "Simultaneous determination of eperisone hydrochloride and paracetamol in mouse plasma by high performance liquid chromatography-photodiode array detector". Journal of Chromatography A, 1388, 79-86.

[57] Nagasarapu, M., & Dananna, G. (2015). "Development and Validation of Stability Indicating RP-HPLC Method for Simultaneous Estimation of Paracetamol and Flupirtine maleate in Pure and Pharmaceutical Dosage Forms". Journal of Young Pharmacists, 7(2), 81-88.

[58] Belal, F. F., El-Din, M. K. S., Tolba, M. M., & Elmansi, H. (2015). "Determination of Two Ternary Mixtures for Migraine Treatment Using HPLC Method with Ultra Violet Detection". Separation Science and Technology, 50(4), 592-603.

[59] Zappi, A., Maini, L., Galimberti, G., Caliandro, R., & Melucci, D. (2019). "Quantifying API polymorphs in formulations using X-ray powder diffraction and multivariate standard addition method combined with net analyte signal analysis". European Journal of Pharmaceutical Sciences, 130, 36-43.

[60] Mostafa, A., & Shaaban, H. (2019). “Quantitative analysis and resolution of pharmaceuticals in the environment using multivariate curve resolution-alternating least squares (MCR-ALS) ”. Acta Pharmaceutica, 69, 217-231.

[61] Pires Eisele, A. P., Valezi, C. F., Mazziero, T., Dekker, R. F. H., Barbosa-Dekker, A. M., & Sartori, E. R. (2019). “Layering of a film of carboxymethyl-botryosphaeran onto carbon black as a novel sensitive electrochemical platform on glassy carbon electrodes for the improvement in the simultaneous determination of phenolic compounds”. Sensors and Actuators B-Chemical, 287, 18-26.

[62] Fouad, M. M., & El-Maraghy, C. M. (2019). “Rapid Validated Thin-Layer Chromatography-Densitometry for the Simultaneous Determination of Three Co-formulated Drugs Used for Common Cold Treatment”. Jpc-Journal of Planar Chromatography-Modern Tlc, 32, 127-131.

[63] de Oliveira, T. R., Fonseca, W. T., Setti, G. de O., & Faria, R. C. (2019). “Fast and flexible strategy to produce electrochemical paper-based analytical devices using a craft cutter printer to create wax barrier and screen-printed electrodes”. Talanta, 195, 480-489.

[64] Salem, Y. A., Hammouda, M. E. A., Abu El-Enin, M. A., & El-Ashry, S. M. (2019). “Application of derivative emission fluorescence spectroscopy for determination of ibuprofen and phenylephrine simultaneously in tablets and biological fluids”. Spectrochimica Acta Part A-Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 210, 387-397.

[65] Hendawy, H. A. M., Ibrahim, A. M., Hassan, W. S., Shalaby, A., & El-sayed, H. M. (2019). “Voltammetric method for simultaneous determination of ascorbic acid, paracetamol and guaifenesin using a sequential experimentation strategy”. Microchemical Journal, 145, 428-434.

[66] Kumar, M., Swamy, B. E. K., Reddy, S., Zhao, W., Chetana, S., & Kumar, V. G. (2019). “ZnO/functionalized MWCNT and Ag/functionalized MWCNT modified carbon paste electrodes for the determination of dopamine, paracetamol and folic acid”. Journal of Electroanalytical Chemistry, 835, 96-105.

[67] Niedzialkowski, P., Cebula, Z., Malinowska, N., Bialobrzeska, W., Sobaszek, M., Ficek, M., … Ossowski, T. (2019). “Comparison of the paracetamol

electrochemical determination using boron-doped diamond electrode and boron-doped carbon nanowalls". Biosensors & Bioelectronics, 126, 308-314.

[68] Arancibia, V., Penagos-Llanos, J., Nagles, E., Garcia-Beltran, O., & Hurtado, J. J. (2019). "Development of a microcomposite with single-walled carbon nanotubes and Nd2O3 for determination of paracetamol in pharmaceutical dosage by adsorptive voltammetry". Journal of Pharmaceutical Analysis, 9, 62-69.

[69] Almeida, S., Gouveia, M. E. M. B., Leite, L. F., Santos, K. M. M. G., Felsner, M. L., & Galli, A. (2019). "In-House Validation of Voltammetric Determination of Paracetamol in Natural Waters". Revista Virtual De Quimica, 11, 326-338.

[70] Amare, M., & Teklay, W. (2019). "Voltammetric determination of paracetamol in pharmaceutical tablet samples using anthraquinone modified carbon paste electrode". Cogent Chemistry, 5, 1576349.

[71] Delahaye, L., Dhont, E., De Cock, P., De Paepe, P., & Stove, C. P. (2019). "Volumetric absorptive microsampling as an alternative sampling strategy for the determination of paracetamol in blood and cerebrospinal fluid". Analytical and Bioanalytical Chemistry, 411(1), 181-191.

[72] Perera, G. W. C. S., de Costa, M. D. P., & Mahanama, K. R. R. (2019). "Development of a fluorimetric method for assessing paracetamol in pharmaceuticals tablets". Journal of Photochemistry and Photobiology A-Chemistry, 368, 248-253.

[73] Harisha, S., Keshavayya, J., Swamy, B. E. K., Prasanna, S. M., Viswanath, C. C., & Ravi, B. N. (2018). "Catalytic approach green synthesis, characterization and electrochemical studies of heterocyclic azo dye derived from 5-amino-1,3,4-thiadiazole-2-thiol". Journal of Molecular Liquids, 271, 976-983.

[74] Keskin, E., & Erturk, A. S. (2018). "Electrochemical determination of paracetamol in pharmaceutical tablet by a novel oxidative pretreated pencil graphite electrode". Ionics, 24, 4043-4054.

[75] Sathisha, A., & Swamy, B. E. K. (2018). "Simultaneous Electrochemical Determination of Paracetamol, Dopamine and Diclofenac at Diacerein Modified Carbon paste Electrode: A Voltammetric Study". Analytical & Bioanalytical Electrochemistry, 10, 1437-1448.

[76] Koyun, O., Gorduk, S., Arvas, M. B., & Sahin, Y. (2018). "Electrochemically Treated Pencil Graphite Electrodes Prepared in One Step for the Electrochemical Determination of Paracetamol". Russian Journal of Electrochemistry, 54, 796-808.

[77] Thomaz, D. V., de Oliveira, M. T., Lobon, G. S., Peixoto da Cunha, C. E., Machado, F. B., Goncalves Moreno, E. K., … Avila, L. F. (2018). "Development of Laccase-TiO2@Carbon Paste Biosensor for Voltammetric Determination of Paracetamol". International Journal of Electrochemical Science, 13, 10884-10893.

[78] Atta, N. F., Ahmed, Y. M., & Galal, A. (2018). "Layered-designed composite sensor based on crown ether/Nafion (R)/polymer/carbon nanotubes for determination of norepinephrine, paracetamol, tyrosine and ascorbic acid in biological fluids". Journal of Electroanalytical Chemistry, 828, 11-23.

[79] Kuskur, C. M., Swamy, B. E. K., Jayadevappa, H., & Ganesh, P. S. (2018). "Poly (rhodamine B) sensor for norepinephrine and paracetamol: a voltammetric study. Ionics, 24(11), 3631-3640.

[80] Alves Goes Junior, E. J., Roeder, J. S., Lima Oliveira, K. B., Gois, L. de C., Ferreira, M. P., & da Silva, J. G. (2018). "UV Spectrophotometry Method Validation for Quantification of Paracetamol in Tablet Formulations: A Proposal of Experimental Activity for Instrumental Analysis". Orbital-the Electronic Journal of Chemistry, 10, 561-567.

[81] Berto, S., Carena, L., Valmacco, F., Barolo, C., Conca, E., Vione, D., … Malandrino, M. (2018). "Application of an electro-activated glassy-carbon electrode to the determination of acetaminophen (paracetamol) in surface waters". Electrochimica Acta, 284, 279-286.

[82] Ahmad, M. S., Isa, I. M., Hashim, N., Si, S. M., & Saidin, M. I. (2018). "A highly sensitive sensor of paracetamol based on zinc-layered hydroxide-L-phenylalanate-modified multiwalled carbon nanotube paste electrode". Journal of Solid State Electrochemistry, 22, 2691-2701.

[83] Lawson, G., Ogwu, J., & Tanna, S. (2018). "Quantitative screening of the pharmaceutical ingredient for the rapid identification of substandard and falsified medicines using reflectance infrared spectroscopy". Plos One, 13, e0202059.

[84] de Noronha, B. V., Bergamini, M. F., Marcolino Junior, L. H., & Goncalves da Silva, B. J. (2018). "Cellulose membrane modified with polypyrrole as an extraction device for the determination of emerging contaminants in river water with gas chromatography-mass spectrometry". Journal of Separation Science, 41, 2790-2798.

[85] Gomes, R. N., Sousa, C. P., Casciano, P. N. S., Ribeiro, F. W. P., Morais, S., de Lima-Neto, P., & Correia, A. N. (2018). "Dispersion of multi-walled carbon nanotubes in [BMIM]PF6 for electrochemical sensing of acetaminophen". Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications, 88, 148-156.

[86] Kuskur, C. M., Swamy, B. E. K., & Jayadevappa, H. (2018). "Electrochemical Behaviour of Norepinephrine in the Presence of Paracetamol and Folic Acid at Poly (Congo red) Modified Carbon Paste Electrode". Analytical & Bioanalytical Electrochemistry, 10, 658-674.

[87] Nejem, R.M., Issa, M.M., Shanab, A.A., Shaat, N.T., (2017). "Double divisor mean centering of ratio spectra as a developed spectrophotometric method for the analysis of five-component mixture in drug analysis". Journal of Saudi Chemical Society, 21, 283-292.

[88] Naeemy, A., Gholam-Shahbazi, R., & Mohammadi, A. (2017). "Simultaneous Voltammetric Determination of Mefenamic Acid and Paracetamol using Graphene Nanosheets/Nickel Oxide Nanoparticles Modified Carbon Paste Electrode". Journal of Electrochemical Science and Technology, 8, 282-293.

[89] Santos, A. M., Wong, A., Almeida, A. A., & Fatibello-Filho, O. (2017). "Simultaneous determination of paracetamol and ciprofloxacin in biological fluid samples using a glassy carbon electrode modified with graphene oxide and nickel oxide nanoparticles". Talanta, 174, 610-618.

[90] Silva, W. P., Juvencio Silva, L. A., Abarza Munoz, R. A., & Richter, E. M. (2017). "Fast Simultaneous Determination of Propifenazone, Paracetamol and Caffeine Using Batch Injection Analysis with Amperometric Detection". Quimica Nova, 40(10), 1180-1185.

[91] Baccarin, M., Santos, F. A., Vicentini, F. C., Zucolotto, V., Janegitz, B. C., & Fatibello-Filho, O. (2017). "Electrochemical sensor based on reduced graphene oxide/carbon black/chitosan composite for the simultaneous

determination of dopamine and paracetamol concentrations in urine samples". Journal of Electroanalytical Chemistry, 799, 436-443.

[92] Lahuerta-Zamora, L., & Mellado-Romero, A. M. (2017). "Video approach to chemiluminescence detection using a low-cost complementary metal oxide semiconductor (CMOS)-based camera: determination of paracetamol in pharmaceutical formulations". Analytical and Bioanalytical Chemistry, 409, 3891-3898.

[93] Cunha, R. R., Ribeiro, M. M. A. C., Munoz, R. A. A., & Richter, E. M. (2017). "Fast determination of codeine, orphenadrine, promethazine, scopolamine, tramadol, and paracetamol in pharmaceutical formulations by capillary electrophoresis". Journal of Separation Science, 40, 1815-1823.

[94] Habib, F. I., Fouad, M. M., Rashed, N. S., & Mahmoud, E. S. (2017). "Development and Validation of Green Spectrophotometric Methods for Simultaneous Determination of Paracetamol, Pamabrom and Pyrilamine Maleate in Bulk and Pharmaceutical Dosage Form". British Journal of Pharmaceutical Research, 20, 38353.

[95] Shah, U. H., & Jasani, A. H. (2017). "Chemometric Assisted Spectrophotometric Methods for Simultaneous Determination of Paracetamol and Tolperisone Hydrochloride in Pharmaceutical Dosage Form". Eurasian Journal of Analytical Chemistry, 12, 211-222.

[96] Manokaran, J., Narendranath, J., Muruganantham, R., & Balasubramanian, N. (2017). "Nitrogen doped graphene supported Pt-Pd nanoparticle modified GC electrode for electrochemical determination of tramadol and paracetamol". Indian Journal of Chemistry Section A-Inorganic Bio-Inorganic Physical Theoretical & Analytical Chemistry, 56, 63-68.

[97] Kalambate, P. K., & Srivastava, A. K. (2016). "Simultaneous voltammetric determination of paracetamol, cetirizine and phenylephrine using a multiwalled carbon nanotube-platinum nanoparticles nanocomposite modified carbon paste electrode". Sensors and Actuators B-Chemical, 233, 237-248.

[98] Tyszczuk-Rotko, K., & Sadok, I. (2016). "The New Application of Boron Doped Diamond Electrode Modified with Nafion and Lead Films for

Simultaneous Voltammetric Determination of Dopamine and Paracetamol". Electroanalysis, 28, 2178-2187.

[99] Mokhtari, A., Delouei, N. J., Keyvanfard, M., & Abdolhosseini, M. (2016). "Multiway analysis applied to time-resolved chemiluminescence for simultaneous determination of paracetamol and codeine in pharmaceuticals". Luminescence, 31, 1267-1276.

[100] Farid, N. F., & Abdelaleem, E. A. (2016). "HPTLC Method for the Determination of Paracetamol, Pseudoephedrine and Loratidine in Tablets and Human Plasma". Journal of Chromatographic Science, 54, 647-652.

[101] El-Kosasy, A. M., Abdel-Aziz, O., Magdy, N., & El Zahar, N. M. (2016). "Spectrophotometric and chemometric methods for determination of imipenem, ciprofloxacin hydrochloride, dexamethasone sodium phosphate, paracetamol and cilastatin sodium in human urine". Spectrochimica Acta Part A-Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 157, 26-33.

[102] Glavanovic, S., Glavanovic, M., & Tomisic, V. (2016). "Simultaneous quantitative determination of paracetamol and tramadol in tablet formulation using UV spectrophotometry and chemometric methods". Spectrochimica Acta Part A-Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 157, 258-264.

[103] Cheraghi, S., Taher, M. A., & Karimi-Maleh, H. (2016). "A Novel Strategy for Determination of Paracetamol in the Presence of Morphine Using a Carbon Paste Electrode Modified with CdO Nanoparticles and Ionic Liquids". Electroanalysis, 28, 366-371.

[104] Rizk, M. S., Sultan, M., Habib, I. H., Mohamed, D., & Tony, R. M. (2016). "Simultaneous Spectrophotometric Determination of Paracetamol and Dantrolene Sodium by Chemometric Methods". British Journal of Pharmaceutical Research, 13, UNSP 29078.

[105] Baytak, A. K., Duzmen, S., Teker, T., & Aslanoglu, M. (2016). "A novel modified electrode based on terbium oxide and carbon nanotubes for the simultaneous determination of methyldopa and paracetamol". Analytical Methods, 8, 4711-4719.

[106] Kesavan, S., & John, S. A. (2016). "Stable determination of paracetamol in the presence of uric acid in human urine sample using melamine grafted

graphene modified electrode". Journal of Electroanalytical Chemistry, 760, 6-14.

[107] Atta, N. F., Ibrahim, A. H., & Galal, A. (2016). "Nickel oxide nanoparticles/ionic liquid crystal modified carbon composite electrode for determination of neurotransmitters and paracetamol". New Journal of Chemistry, 40, 662-673.

[108] Santos, A. M., Vicentini, F. C., Deroco, P. B., Rocha-Filho, R. C., & Fatibello-Filho, O. (2015). "Square-Wave Voltammetric Determination of Paracetamol and Codeine in Pharmaceutical and Human Body Fluid Samples Using a Cathodically Pretreated Boron-Doped Diamond Electrode". Journal of the Brazilian Chemical Society, 26, 2159-2168.

[109] Deroco, P. B., Vicentini, F. C., & Fatibello-Filho, O. (2015). "An Electrochemical Sensor for the Simultaneous Determination of Paracetamol and Codeine Using a Glassy Carbon Electrode Modified with Nickel Oxide Nanoparticles and Carbon Black". Electroanalysis, 27, 2214-2220.

[110] Khodaveisi, J., Dadfarnia, S., Shabani, A. M. H., Moghadam, M. R., & Hormozi-Nezhad, M. R. (2015). "Artificial neural network assisted kinetic spectrophotometric technique for simultaneous determination of paracetamol and p-aminophenol in pharmaceutical samples using localized surface plasmon resonance band of silver nanoparticles". Spectrochimica Acta Part A-Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 138, 474-480.

[111] Tu, C., & Wen, X. (2015). "Determination of the content of paracetamol in pharmaceutical sample by Prussian blue spectrophotometry (S. Zhou, A. Patty, & S. Chen, Ed.) ". Boca Raton: Crc Press-Taylor & Francis Group.

[112] Rajalakshmi, K., & John, S. A. (2015). "Selective determination of mefenamic acid in the presence of 1000-fold excess paracetamol and caffeine using a multiwalled carbon nanotube-polymer composite electrode". Analytical Methods, 7, 3506-3511.

[113] Pubchem, Dekstrometorfan, https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5464025, 5 Nisan 2019.

[114] Ankara Üniversitesi, Dekstrometorfan, https://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile.php/9390/mod_resource/content/0/Hafta3_FIISolunum_eyarsan.pdf, 5 Nisan 2019.

[115] Avram, N., Heghes, SC., Rus, LL., Juncan, AM., Rus, LM., Filip, L., Filip, CR., (2019). "HPLC-UV Determination of Dextromethorphan in Syrup Method validation". Revista de Chimie, 70, 487-490.

[116] Moustafa, AA., Hegazy, MA., Mohamed, D., Ali, O., (2018). "Simultaneous Quantification of Chlorpheniramine, Pseudoephedrine, and Ibuprofen in Antitussive Preparation by High-Performance Liquid Chromatography and Thin-Layer Chromatography-Densitometric Methods". JPC-Journal of Planar Chromatography-Modern TLC, 31, 272-279.

[117] Sirigiri, B., Chengalva, P., Parameswari, SA., Aruna, G., (2018). "A Novel HPLC Method for the Simultaneous Determination of Chlorpheniramine Maleate and Dextromethorphan in Bulk and Pharmaceutical Formulation". International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, 9, 1147-1151.

[118] Poornima, K., Madhusudan, Y., Channabasavaraj, KP., (2017). "Development and Validation of Analytical Methods for Simultaneous Estimation of Dextromethorphan and Quinidine by RP-HPLC and UV-Spectrometry". International Journal of Pharmaceutical Sciences and research, 8, 1301-1313.

[119] Li, L., (2016). "Direct enantiomer determination of methorphan by HPLC-MS and SFC-MS". Forensic Chemistry, 2, 82-85.

[120] Yehia, AM., Essam, HM., (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, 3357-3367.

[121] Jian, V., Sharma, MC., (2016), "Validated RP-HPLC method for determining the levels of bromhexine HCl, chlorpheniramine maleate, dextromethorphan HBr and guaiphenesin in their pharmaceutical dosage forms". Journal of Taibah University for Science, 10, 38-45.

[122] Shaik, AN., Vishwakarma, SK., Khan, AA., (2016) "Metabolism of six CYP probe substrates in fetal hepatocytes". Admet and DMPK, 4, 84-90.

[123] Yu, Y., Liu, Y., Li, Q., Sun, JH., Lin, HO., Liu, GF., (2015). "Effects of Guanxinning injection on rat cytochrome P450 isoforms activities in vivo and in vitro". Xenobiotica, 45, 481-487.

[124] Shivashankar, M., Dee, MK., Venkateshwarlu., (2015). “Development and validation of a RP-HPLC method for the determination of dextromethorphan HBr, chlorophenirarnine maleate and phenyl propanolamine HCl in pharmaceutical preparations”. Journal Of The Indian Chemical Society, 92, 525-528.

[125] Heneedak, HM., Salama, I., Mostafa, S., EL-Kady, E., El-Sadek, M., (2015) “Development and validation of a sensitive UHPLC-MS/MS method for the simultaneous analysis of tramadol, dextromethorphan chlorpheniramine and their major metabolites in human plasma in forensic context: application to pharmacokinetics”. Biomedical Chromatography, 29, 998-1007.

[126] Campos-Manas, MC., Ferrer, I., Thurman, EM., Perez, JAS., Aguera, A., (2019). “Identification of opioids in surface and wastewaters by LC/QTOF-MS using retrospective data analysis”, Scıence Of The Total Envıronment, 664, 874-884.

[127] Usman, M., Jamshaid, T ., Naseer, A., Baig, Y., Mehmood, Z., Shahwar, M., Akhtar, S., Chaudhary, MT., Sarwar, M., Tahir, MA., (2018). “Component analysis of illicit morphia tablets (clandestine laboratory preparation) using gas chromatography mass spectrometry: a case study”, Egyptian Journal Of Forensıc Sciences, 8.

[128] Adiraju, SKS., Shekar, K., Fraser, JF., Smith, MT., Ghassabian, S., (2018). “An improved LC-MS/MS method for simultaneous evaluation of CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 and CYP3A4 activity”, Bioanalysis, 10, 1577-1590.

[129] Cornthwaite, H. M., Labine, L., & Watterson, J. H. (2018). Semi-quantitative analysis of tramadol, dextromethorphan, and metabolites in decomposed skeletal tissues by ultra performance liquid chromatography quadrupole time of flight mass spectrometry. Drug Testing and Analysis, 10(6), 961-967.

[130] Soichot, M., Julliand, S., Filatriau, J., Hurbain, A., Bourgogne, E., Mihoubi, A., Delhotal-Landes, B. (2018). “Diagnosis of Heroin Overdose in an 8-Year-Old Boy: Reliable Contribution of Toxicological Investigations”, Journal of Analytical Toxicology, 42, 255-264.

[131] Watson, A. R., & Roberts, A. (2018). “Identifying Levorphanol Ingestion Using Urine Biomarkers in Health Care Patients. Pain Physician, 21, 167-171.

[132] Morrison, L. M., Unger, K. A., & Watterson, J. H. (2017). “Analysis of Dextromethorphan and Dextrorphan in Skeletal Remains Following Differential Microclimate Exposure: Comparison of Acute vs. Repeated Drug Exposure”, Journal of Analytical Toxicology, 41, 566-572.

[133] Corado, C. R., McKemie, D. S., & Knych, H. K. (2017). “Pharmacokinetics of dextromethorphan and its metabolites in horses following a single oral administration”, Drug Testing and Analysis, 9, 880-887.

[134] Poklis, J. L., Mulder, H. A., & Peace, M. R. (2019). “The unexpected identification of the cannabimimetic, 5F-ADB, and dextromethorphan in commercially available cannabidiol e-liquids”, Forensic Science International, 294, 25-27.

[135] Moreira, R. V., da Costa, J. L., Menezes, M. R., & de Faria, D. L. A. (2016). “Accessing the chemical profile of ecstasy tablets seized in Sao Paulo (Brazil) by FT-Raman Spectroscopy”, Vibrational Spectroscopy, 87, 104-110.

[136] Unger, K. A., & Watterson, J. H. (2016). “Analysis of Dextromethorphan and Dextrorphan in Skeletal Remains Following Decomposition in Different Microclimate Conditions”, Journal of Analytical Toxicology, 40, 669-676.

[137] Kim, E., Choe, S., Lee, J., Jang, M., Choi, H., & Chung, H. (2016). “Detection of drugs in 275 alcohol-positive blood samples of Korean drivers”, Forensic Science International, 265, 186-192.

[138] Chen, Z., Zhang, S., Long, N., Lin, L., Chen, T., Zhang, F., … Zhang, K. (2016). “An improved substrate cocktail for assessing direct inhibition and time-dependent inhibition of multiple cytochrome P450s”, Acta Pharmacologica Sinica, 37, 708-718.

[139] Durgannavar, A. K., Patgar, M. B., Nandibewoor, S. T., & Chimatadar, S. A. (2016). “Fluorescent bovine serum albumin interacting with the antitussive quencher dextromethorphan: a spectroscopic insight”, Luminescence, 31, 843-850.

[140] Nurten Cece-Esencan, E., Fontaine, F., Plasencia, G., Teppner, M., Brink, A., Paehler, A., & Zamora, I. (2016). "Software-aided cytochrome P450 reaction phenotyping and kinetic analysis in early drug discovery", Rapid Communications in Mass Spectrometry, 30, 301-310.

[141] Bousses, C., Ferey, L., Vedrines, E., & Gaudin, K. (2015). "Using an innovative combination of quality-by-design and green analytical chemistry approaches for the development of a stability indicating UHPLC method in pharmaceutical products", Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 115, 114-122.

[142] Peng, Y., Wu, H., Zhang, X., Zhang, F., Qi, H., Zhong, Y., … Sun, J. (2015). "A comprehensive assay for nine major cytochrome P450 enzymes activities with 16 probe reactions on human liver microsomes by a single LC/MS/MS run to support reliable in vitro inhibitory drug-drug interaction evaluation", Xenobiotica, 45, 961-977.

[143] Knittel, J. L., Vorce, S. P., Levine, B., Hughes, R. L., & Bosy, T. Z. (2015). "Multidrug Toxicity Involving Sumatriptan", Journal of Analytical Toxicology, 39, 75-79.

[144] Pubchem,Pseudoephedrine, https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/pseudoephedrine#section=Molecular-Formula, 05.04.2019

[145] Wikipedia,Pseudoephedrine, https://en.wikipedia.org/wiki/Pseudoephedrine, 5 Nisan 2019

[146] Bakım Sitesi, Psödoefedrin Nedir, Kullanımı ve Yan Etkileri, https://www.bakimsitesi.com/psodoefedrin-nedir-kullanimi-yan-etkileri/, 5 Nisan 2018

[147] Moustafa, AA., Hegazy, MA., Mohamed, D., Ali, O., (2018). "Simultaneous Quantification of Chlorpheniramine, Pseudoephedrine, and Ibuprofen in Antitussive Preparation by High-Performance Liquid Chromatography and Thin-Layer Chromatography-Densitometric Methods", Jpc-Journal of Planar Chromatography-Modern TLC, 31, 272-279.

[148] Jeong, B., Roh, JS., Yoon, M., Yoon, Y., Shin, SS., Cho, HJ., Kwon, YS., Yang, H., (2018). "Determination of Five Chemical Markers in DF Formula, the Herbal Composition of Ephedra intermedia, Rheum palmatum, and Lithospermum

erythrorhizon, Using High-performance Liquid Chromatography-ultraviolet Detection", Pharmacognosy Magazıne, 14, 162-166.

[149] Asadi, S., Tabani, H., Nojavan, S., (2018). "Application of polyacrylamide gel as a new membrane in electromembrane extraction for the quantification of basic drugs in breast milk and wastewater samples", Journal Of Pharmaceutıcal And Bıomedıcal Analysıs, 151, 178-185.

[150] Dinc-Zor, S., (2018). "Simultaneous Determination of Two Active Pharmaceuticals along with Synthetic Additives in Syrup Formulations Using RP-HPLC-PDA Method", Latın Amerıcan Journal Of Pharmacy, 37, 2274-2283 .

[151] Abdelwahab, N.S., Abdelaleem, A.E., (2017). "Stability indicating RP-HPLC method for simultaneous determination of guaifenesin and pseudoephedrine hydrochloride in the presence of syrup excepients", Arabian Journal of Chemistry, 10, 2896-2901

[152] Kumar, A., Devineni, S.R., Dubey, S.K., Kumar, P., Srivastava, V., Ambulgekar, G., Jain, M., Gupta, D.K., Singh, G., Kumar, R., Hiriyanna, S.G., Kumar, P., (2017). "Identification, synthesis and structural characterization of processrelated and degradation impurities of acrivastine and validation ofHPLC method", Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 133, 15-26.

[153] An, Q., Dong, Y., Lu, N., Li, N., (2017). "Micellar liquid chromatographic method for the determination of ephedrine and pseudoephedrine in human serum by direct inject of the sample with simple dilution", Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 40(4), 177-183.

[154] Njaria, P.M., Abuga, K.O., Kamau, F.N., Chepkwony, H.K., (2016). "A Versatile HPLC Method for the Simultaneous Determination of Bromhexine, Guaifenesin, Ambroxol, Salbutamol/Terbutaline, Pseudoephedrine, Triprolidine, and Chlorpheniramine Maleate in Cough–Cold Syrups", Chromatographia, 79, 1507-1514.

[155] Andrighetto, L.M., Burns, N.K., Stevenson, P.G., Pearson, J.R., Henderson, L.C., Bowen, C.J., Conlan, X.A., (2016). "In-silico optimisation of two-dimensional high performance liquid chromatography for the determination of

Australian methamphetamine seizure samples", Forensic Science International, 266, 511-516.

[156] Farid, N.F., Abdelaleem, E.A., (2016). "HPTLC Method for the Determination of Paracetamol, Pseudoephedrine and Loratidine in Tablets and Human Plasma", Journal of Chromatographic Science, 54(4), 647-652.

[157] Taghvimi, A., Hamishehkar H., Ebrahimi M., (2016). "Magnetic nano graphene oxide as solid phase extraction adsorbentcoupled with liquid chromatography to determine pseudoephedrinein urine samples", Journal of Chromatography B, 1009-1010, 66-72.

[158] Russo G., Barbato, F., Grumetto, L., (2016). "A validated LC/UV method for the determination of four adulteratingdrugs in herbal slimming capsules", Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 117, 436-445.

[159] Kadavilpparampu, A.M., Al-Lawati, H.A.J., Suliman, F.O., Kindy, S.M.Z., (2015). "Determination of the pseudoephedrine content in pharmaceutical formulations and in biological fluids using a microbore HPLC system interfaced to a microfluidic chemiluminescence detector", The Journal Of Biological and Chemical Luminescence, 30, 1242-1249.

[160] Sharma, E.A., Shah, N. J., (2015)."Stability Indicating Rp-Hplc Method Development And Validation For Pseudoephedrine Hydrochloride And Fexofenadine Hydrochloride In Tablet Dosage Form", International Journal Of Pharmaceutical Sciences And Research, 6(12), 5245-5252.

[161] Lu, N., Li, N., Dong, Y., (2015). "A Rapid Hydrophilic Interaction Liquid Chromatographic Method for Simultaneous Determination of Three Ephedrine Alkaloids in Ephedra Herb and Its Preparations", Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 38(15), 1507-1514.

[162] Ibrahim, F., El-Enany, N., El-Shaheny, R., Mikhail, I.E., (2015). "Development and Validation of a New HPLC Method for the Simultaneous Determination of Paracetamol, Ascorbic Acid, and Pseudoephedrine HCl in their Co-formulated Tablets. Application to in vitro Dissolution Testing", Analytical Sciences, 31, 943-947.

[163] Chen, X., Tang, Y., Wang, S., Song, Y., Tang, F., Wu, X., (2015). "Field-amplified sample injection in capillary electrophoresis with amperometric detection

for the ultratrace analysis of diastereomeric ephedrine alkaloids", Electrophoresis, 36, 1953–1961.

[164] Dong, Y.M.,An, Q., Lu, N.W., Li, N., (2015). "Development Micellar HPLC Method for Simultaneous Determination of Ephedrine, Pseudoephedrine, and Methylephedrine in Ephedra Herb and Traditional Chinese Medicinal Preparations", Acta Chromatographica, 27(2), 355-372.

[165] Sevim, S., Erk, N., (2015). "Applications of High Performance Liquid Chromatographic and Spectrophotometric Techniques for Determination of Rasagiline Mesylate in Dosage Forms", Journal of Analytical Chemistry, 70(5), 600-607.

[166] Vosough, M., Mohamedian, H., Salemi, A., Baheri, T., (2015). "Multivariate Curve Resolution-Assisted Determination of Pseudoephedrine and Methamphetamine by HPLC-DAD in Water Samples", Journal of Chromatographic Science, 53, 233-239.

[167] WAHBA, M.E.K., (2015). "Simultaneous Determination of Ascorbic Acid, Pseudoephedrine Hydrochloride and Ibuprofen in their Combined Tablets Using Micellar Liquid Chromatography", Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 38, 54-61.

[168] Jiang, M., Wang, L., Jiang, W., Huang, S., (2015). "Simultaneous determination of 14-thienyl methylene matrine and matrine in rat plasma by high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry and its application in apharmacokinetic study", Journal of Chromatography B, 974, 126-130.

[169] Perez-Ortiz, M., Pizarro, P., & Alvarez-Lueje, A. (2019). "Carbon Nanotubes- Ionic Liquid Gel. Characterization and Application to Pseudoephedrine and Chlorpheniramine Determination in Pharmaceuticals. Journal of the Chilean Chemical Society, 64, 4324-4331.

[170] Moustafa, A. A., Hegazy, M. A., Mohamed, D., & Ali, O. (2019). "Functionalized Fe3O4 Magnetic Nanoparticle Potentiometric Detection Strategy versus Classical Potentiometric Strategy for Determination of Chlorpheniramine Maleate and Pseudoephedrine HCl. Journal of Analytical Methods in Chemistry", 6947042.

[171] Hameed, R.M.A., (2018). "A core–shell structured Ni–Co@Pt/C nanocomposite-modified sensor for the voltammetric determination of pseudoephedrine HCl", Royal Society of Chemistry, 42, 2658—2668.

[172] Aladaghlo, Z., Fakhari, A.Z., Hasheminasab, K.S., (2017). "Carrier assisted electromembrane extraction based on nonionic lipophilic surfactants for the determination of basic drugs in urine samples", Royal Society of Chemistry, 9, 5659–5667.

[173] Wahl, J., Furuishi, T., Yonemochi, E., Meinel, L., Holzgrabe, U., (2017). "Characterization of complexes between phenethylamine enantiomers and β -cyclodextrin derivatives by capillary electrophoresis—Determination of binding constants and complex mobilities", Electrophoresis, 38, 1188–1200.

[174] Nejem, R.M., Issa, M.M., Shanab, A.A., Shaat, N.T., (2017). "Double divisor mean centering of ratio spectra as a developed spectrophotometric method for the analysis of five-component mixture in drug analysis", Journal of Saudi Chemical Society, 21, 283-292.

[175] Russo, G., Barbato, F., Grumetto, L., (2016). "A validated LC/UV method for the determination of four adulteratingdrugs in herbal slimming capsules", Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 117, 436-445.

[176] Souri, E., Rahimi, A., Ravari, N.S., Tehrani, M.B., (2015). "Development of a Rapid Derivative Spectrophotometric Method for Simultaneous Determination of Acetaminophen, Diphenhydramine and Pseudoephedrine in Tablets", Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 14, 435-442.

[177] Pires, R.P.C., Jardim, I.C.S.F., (2012) "Simultaneous determination of clobutinol hydrochloride and doxylamine succinate from syrups by RP HPLC using a new stationary phase containing embedded urea polar groups". Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 48, 315-23.

[178] Gideon, K., Clark, S., Hankins, G., Caritis, S.N., Umans, J.G., Miodovnik, M., Mattison, D.R., Matok, I., (2015). "Maternal Safety of the Delayed-Release Doxylamine and Pyridoxine Combination for Nausea and Vomiting of Pregnancy; a Randomized Placebo Controlled Trial". BMC Pregnancy and Childbirth 15, 59.

[179] Kumar, B. P., Vidyadhara, S., Murthy, T. E. G. K., Sasidhar, R. L. C., Krishna, V. S., (2017). "Development and Validation of RP-HPLC Method for

Simultaneous Estimation of Doxylamine Succinate and Pyridoxine Hydrochloride in Bulk and Pharmaceutical Dosage Forms". Eurasian Journal of Analytical Chemistry 12, 459-68.

[180] Katsarov, P., Gergov, G., Alin, A., Pilicheva, B., Al-Degs, Y., Simeonov, V., Kassarova, M., (01 Mart 2018). "Advanced Spectrophotometric Chemometric Methods for Resolving the Binary Mixture of Doxylamine Succinate and Pyridoxine Hydrochloride", Acta Pharmaceutica, 68, 61-73.

[181] Koren, G., Clark, S., Hankins, G.D.V., Caritis, S.N., Umans, J.G., Miodovnik, M., Mattison, D.R., Matok, I., (2015). "Maternal Safety of the Delayed-Release Doxylamine and Pyridoxine Combination for Nausea and Vomiting of Pregnancy; a Randomized Placebo Controlled Trial", BMC Pregnancy and Childbirth, 15, 59.

[182] Katsarov, P., Gergov, G., Alin, A., Pilicheva, B., Al-Degs, Y., Simeonov, V., Kassarova, M., (2018). "Advanced Spectrophotometric Chemometric Methods for Resolving the Binary Mixture of Doxylamine Succinate and Pyridoxine Hydrochloride", Acta Pharmaceutica, 68, 61-73.

[183]Shin, J.Y., Jung, M.Y. (2017). "Ultra-High-Throughput Analytical Strategy Based on UHPLC-DAD in Combination with Syringe Filtration for the Quantitation of Nine Synthetic Colorants in Beverages: Impacts of Syringe Membrane Types and Sample PH on Recovery", Journal of Agricultural and Food Chemistry, 65, 9917-23.

[184] Korzun, T., Munhenzva, Escobedo, I.J.O., Strongin, R.M., (2019). "Synthetic food dyes in electronic cigarettes". Dyes and Pigments, 160, 509-13.

[185] Asfaram, A., Ghaedi, M., Abidi, H., Javadian, H., Zoladl, M., Sadeghfar, F., (2018). "Synthesis of Fe3O4@CuS@Ni2P-CNTs Magnetic Nanocomposite for Sonochemical-Assisted Sorption and Pre-Concentration of Trace Allura Red from Aqueous Samples Prior to HPLC-UV Detection: CCD-RSM Design", Ultrasonics Sonochemistry, 44, 240-50.

[186] Feng, Y. S., Gui-Bin, L.Y.J., Xiao-Gang, C., (2011), "Simultaneous Screening of 14 Illegal Food Additives in Wines Using Ultra Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry", Chinese Journal of Analytical Chemistry, 39, 1732-37.

[187] Asci, B, Zor, S.D., Donmez, O.A.,( 2016) "Development and Validation of HPLC Method for the Simultaneous Determination of Five Food Additives and Caffeine in Soft Drinks", International Journal of Analytical Chemistry, 28, 406.

[188] Majidi, M.R., Baj, R.F.B., Naseri, A., (2013). "Carbon Nanotube-Ionic Liquid (CNT-IL) Nanocamposite Modified Sol-Gel Derived Carbon-Ceramic Electrode for Simultaneous Determination of Sunset Yellow and Tartrazine in Food Samples", Food Analytical Methods, 6, 1388-97.

[189] Lopez-de-Alba, P. L., Lopez-Martinez, L., Cerda, V., Rodriguez, V., (2001). "Simultaneous Determination of Tartrazine, Sunset Yellow and Allura Red in Commercial Soft Drinks by Multivariate Spectral Analysis", Quimica Analitica, 20, 63-72.

[190] Dinc, E., Aktas, A. H., Baleanu, D., Ustundag, O., (2006). "Simultaneous Determination of Tartrazine and Allura Red in Commercial Preparation by Chemometric HPLC Method", Journal of Food and Drug Analysis, 14, 284-91.

[191] Kim, H.J., Lee, M. J., Park, H. J., Kim, H.J., Cho, S.K., Jeong, M.H., (2018). "Simultaneous Determination of Synthetic Food Additives in Kimchi by Liquid Chromatography-Electrospray Tandem Mass Spectrometry", Food Science and Biotechnology, 27, 877-82.

[192] Bonan, S., Fedrizzi, G., Menotta, S., Elisabetta, C., (2013). "Simultaneous Determination of Synthetic Dyes in Foodstuffs and Beverages by High-Performance Liquid Chromatography Coupled with Diode-Array Detector", Dyes and Pigments, 99, 36-40.

[193] Mazdeh, F.Z., Moradi, Z., Moghaddam, G., Moradi-Khatoonabadi, Z., Aftabdari, F.E., Badaei, P., Hajimahmoodi, M., (2016). "Determination of Synthetic Food Colors, Caffeine, Sodium Benzoate and Potassium Sorbate in Sports Drinks", Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 15, 183-88.

[194] Yao, P., Shu-Bai L., Liu, Y., Zhang, Q.M., 2015. "Simultaneous Determination of Synthetic Colorants in Pickles and Sauerkrauts by HPLC-MS". Proceedings of the 3rd International Conference on Material, Mechanical and Manufacturing Engineering, editör P. Yarlagad, 27:239-43. Paris: Atlantis Press,.

[195] Alp, H., Başkan, D., Yaşar, A., Yaylı, N., Ocak, Ü., Miraç O., (2018). "Simultaneous Determination of Sunset Yellow FCF, Allura Red AC, Quinoline Yellow WS, and Tartrazine in Food Samples by RP-HPLC", Journal of Chemistry 1-6.

[196] Zhang, Y., Zhou, H., Wang, Y., Wu, X., Zhao, Y., (2015). "Simultaneous Determination of Seven Synthetic Colorants in Wine by Dispersive Micro-Solid-Phase Extraction Coupled with Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography". Journal of Chromatographic Science 53, 210-18.

[197] Argekar, A.P., Sawant, J.G., (1999). "Simultaneous Determination of Pyridoxine Hydrochloride and Doxylamine Succinate from Tablets by Ion Pair Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC)", Drug Development and Industrial Pharmacy 25, 945-50.

[198] Vidotti, E.C., Cancino, J.C., Oliveira, C.C., Rollemberg, M.D.C., (2005). "Simultaneous Determination of Food Dyes by First Derivative Spectrophotometry with Sorption onto Polyurethane Foam", Analytical Sciences 21, 149-53.

[199] Yang, Y., Yin, J., Shao, B., (2011). "Simultaneous Determination of Five Aluminum Lake Dyes in Chewing Gum by HPLC with Photodiode Array Detection", Food Additives and Contaminants Part A-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment 28, 1159-67.

[200] Vidal, M., Garcia-Arrona, R., Bordagaray, A., Ostra, M., Albizu, G., (2018). "Simultaneous Determination of Color Additives Tartrazine and Allura Red in Food Products by Digital Image Analysis", Talanta 184 58-64.

[201] Turak, F., Ustun-Ozgur, M., (2013). "Simultaneous Determination of Allura Red and Ponceau 4R in Drinks with the Use of Four Derivative Spectrophotometric Methods and Comparison with High-Performance Liquid Chromatography", Journal of Aoac International 96, 1377-86.

[202] Ma, K., Yang, Y.N., Jiang, X.X., Zhao, M., Cai, Y.Q., (2012). "Simultaneous Determination of 20 Food Additives by High Performance Liquid Chromatography with Photo-Diode Array Detector", Chinese Chemical Letters 23, 492-95.

[203] Zalacain, A., Ordoudi, S. A., Blazquez, I., Diaz-Plaza, E. M., Carmona, M., Tsimidou, M. Z., Alonso, G. L., (2005). "Screening Method for the Detection of

Artificial Colours in Saffron Using Derivative UV-Vis Spectrometry after Precipitation of Crocetin", Food Additives and Contaminants Part A-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment 22, 607-15.

[204] Tsuji, S., Umino, Y., Amakura, Y., Tonogai, Y., (2001). "Preparation of HPLC test solutions for organic impurities in aluminum lakes of Food Red No. 40 (Allura Red AC) and Food Yellow No. 5 (Sunset Yellow FCF)", Journal of the Food Hygienic Society of Japan 42, 379-84.

[205] Salem, M.A., Al-Ghonemiy, A.F., Zaki. A.B., (2009). "Photocatalytic degradation of Allura red and Quinoline yellow with Polyaniline/TiO2 nanocomposite", Applied Catalysis B: Environmental 91, 59-66.

[206] Chen, J., Zhou, G., Qin, H., Gao, Yi., Peng, G., (2015). "Organic Solvent-Free Matrix Solid Phase Dispersion (MSPD) for Determination of Synthetic Colorants in Chilli Powder by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC-UV)", Analytical Methods 7, 6537-44.

[207] Gosetti, F., Chiuminatto, U., Mazzucco, E., Calabrese, G., Gennaro, M.C., Marengo, E., (2013). "Non-Target Screening of Allura Red AC Photodegradation Products in a Beverage through Ultra High Performance Liquid Chromatography Coupled with Hybrid Triple Quadrupole/Linear Ion Trap Mass Spectrometry", Food Chemistry 136, 617-23.

[208] Issaq, H. J., Chan, K. C., Liu, C. S., Li, Q.B., (2001). "Multidimensional High Performance Liquid Chromatography - Capillary Electrophoresis Separation of a Protein Digest: An Update", Electrophoresis 22, 1133-35.

[209] Adam, M., Bajer, T., Bajerova, P., Ventura, K., (2018). "Modified QuEChERS Approach for Analysis of Synthetic Food Dyes in Jellies and Smarties", Food Analytical Methods 11, 1619-26.

[210] Chen, Y., Zhao, Y., Wang, H., Wang, Q., Chen, X., Xu, D., Li, T., Yu, F., Wang, X., Liu, J., (2018). "Measurement Uncertainty Assessment for Determination of Allura Red in Puffed Food by HPLC", Current Medical Science 38, 324-28.

[211] Yu, Y., Fan, Z., (2016). "Magnetic Solid-Phase Extraction Coupled with HPLC for the Determination of Allura Red in Food and Beverage Samples", Food Additives and Contaminants Part A-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment 33, 1527-34.

[212] Zhang, X., Zhang, J., Li, W., Yang, Y., Qin, P., Zhang, X., Lu, M., (2018). "Magnetic Graphene Oxide Nanocomposites as the Adsorbent for Extraction and Pre-Concentration of Azo Dyes in Different Food Samples Followed by High-Performance Liquid Chromatography Analysis", Food Additives & Contaminants: Part A 35, 2099-2110.

[213] Ates, E., Mittendorf, H., Senyuva, K., (2011). "LC/MS Method Using Cloud Point Extraction for the Determination of Permitted and Illegal Food Colors in Liquid, Semiliquid, and Solid Food Matrixes: Single-Laboratory Validation", Journal of Aoac International 94, 1853-62.

[214] Bazregar, M., Rajabi, M., Yamini, Y., Asghari, A., Asl. Y.A., (2015). "In-Tube Electro-Membrane Extraction with a Sub-Microliter Organic Solvent Consumption as an Efficient Technique for Synthetic Food Dyes Determination in Foodstuff Samples", Journal of Chromatography A 1410, 35-43.

[215] Gosetti, F., Chiuminatto, U., Mazzucco, E., Calabrese, G., Gennaro, M.C., Marengo, E., (2012). "Identification of Photodegradation Products of Allura Red AC (E129) in a Beverage by Ultra High Performance Liquid Chromatography–Quadrupole-Time-of-Flight Mass Spectrometry", Analytica Chimica Acta 746, 84-89.

[216] Combeau, S., Chatelut, M., Vittori, O., (2002). "Identification and simultaneous determination of Azorubin, Allura red and Ponceau 4R by differential pulse polarography: application to soft drinks", Talanta 56, 115-22.

[217] Majidi, M.R., Pournaghi-Azar, M.H., Baj, R.F.B., Naseri, A., (2015). "Formation of Graphene Nanoplatelet-like Structures on Carbon–Ceramic Electrode Surface: Application for Simultaneous Determination of Sunset Yellow and Tartrazine in Some Food Samples", Ionics 21, 863-75.

[218] Chen, X.H., Zhao, Y.G., Shen, H.Y., Zhou, L.X., Pan, S.D., Jin, M.C., (2014). "Fast Determination of Seven Synthetic Pigments from Wine and Soft Drinks Using Magnetic Dispersive Solid-Phase Extraction Followed by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry", Journal of Chromatography A 1346, 123-28.

[219] Qi, P., Lin, Z., Chen, G., Xiao, J., Liang, Z., Luo, L., Zhou, J., Zhang, X., (2015). "Fast and Simultaneous Determination of Eleven Synthetic Color Additives in Flour and Meat Products by Liquid Chromatography Coupled with Diode-Array Detector and Tandem Mass Spectrometry", Food Chemistry 181, 101-10.

[220] Chen, Q.C., Mou, S.F., Hou, X.P., Riviello, J.M., Ni, Z.M. (1998). "Determination of Eight Synthetic Food Colorants in Drinks by High-Performance Ion Chromatography", Journal of Chromatography A 827, 73-81.

[221] Moraes, P.B., Hudari, F.F., Silva, J,P., Zanoni, M.V.B., (2018). "Enhanced Detection of Ponceau 4R Food Dye by Glassy Carbon Electrode Modified with Reduced Graphene Oxide", Journal of the Brazilian Chemical Society 29, 1237-44.

[222] Jurcovan, Maria Madalina, ve Elena Diacu. "Development of a Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatographic Method for Simultaneous Determination of Allura Red AC and Ponceau 4R in Soft Drinks". Revista De Chimie 65, sy 2 (Şubat 2014): 137-41.

[223] Takeda, Y., T. Yamada, ve M. Takeda. "Determination of Unsulfonated Primary Aromatic-Amines in Food Red No 40". Journal of the Food Hygienic Society of Japan 34, sy 5 (Ekim 1993): 420-25.

[224] Lancaster, F., Lawrence, J., (1991). "Determination of Total Non-Sulfonated Aromatic-Amines in Tartrazine, Sunset Yellow Fcf and Allura Red by Reduction and Derivatization Followed by High-Performance Liquid-Chromatography", Food Additives and Contaminants 8,249-64.

[225] Diacu, E., Ungureanu, E.M., Ene, C.P., Ivanov, A.A., (2011). "Voltammetric Studies for Detection and Pegradation Assessment of Some Synthetic Food Dyestuffs I. Tartrazine - E 102", Revista De Chimie 62, 1085-89.

[226] "HPLC Determination of Saccharine Sodium,Benzoic Acid,Sorbic Acid and Sodium Cyclamate in Carbonic Drink--《Food Science》

[227] Zou, JH., Chen, WD., Shao, JD., (2001). ''Simultaneous determination of 8 food additives in fruit juices by reversed phase high performance liquid chromatography''. Chinese Journal Of Analytical Chemistry, 29, 1192-1195.

[228] Kulikov, AU, Verushkin, AG, (2008). “Simultaneous determination of paracetamol, caffeine, guaifenesin and preservatives in syrups by micellar LC”, Chromatographia, 67, 347-355.

[229] Rouhollah, H., Masoumeh M. (2016) “Simultaneous Determination of Saccharine, Caffeine, Salicylic Acid And Benzoic Acid in Different Matrixes by Salt and Air-Assisted Homogeneous Liquid-Liquid Extraction and High-Performance Liquid Chromatography”.

[230] Wróbel, K., Wróbel. K., (1997). “Determination of aspartame and phenylalanine in diet soft drinks by high-performance liquid chromatography with direct spectrofluorimetric detection”, Journal of Chromatography A 773, 163-68.

[231] Hannisdal, A. (1992). “Analysis of Acesulfame-K, Saccharin and Preservatives in Beverages and Jams by HPLC”, Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und -Forschung 194, 517-19.

[232] Zhang, X. Y. (2000). “[Simultaneous rapid determination of eight food additives in foods by reversed-phase high performance liquid chromatography]”, Se Pu = Chinese Journal of Chromatography 18, 539-42.

[233] Smyly, D. S., Woodward, B. B., Conrad, E. C., (1976). “Determination of Saccharin, Sodium Benzoate, and Caffeine in Beverages by Reverse Phase High-Pressure Liquid Chromatography”, Journal - Association of Official Analytical Chemists 59, 14-19.

[234] Fatibello-Filho, O., Nóbrega, J., A., Guaritá-Santos., A.J.M., (1994), “Flow injection potentiometric determination of saccharin in dietary products with relocation of filtration unit”, Talanta 41, 731-34.

[235] Fatibello-Filho, Orlando, Joaquim Araújo Nóbrega, ve Antonio José Moraes Guaritá-Santos. (1994). “Flow injection potentiometric determination of saccharin in dietary products with relocation of filtration unit”. Talanta 41, sy 5 731-34.

[236] Ramappa, P. G., Nayak. A.N., (1983). “Rapid Spectrophotometric Determination of Saccharin in Soft Drinks and Pharmaceuticals Using Azure B as Reagent”, Analyst 108, 966-70.

[237] Llamas, N.E., Nezio, M.S.D., Palomeque, M.E., Band, B.S.F. (2008). “Direct Determination of Saccharin and Acesulfame-K in Sweeteners and Fruit Juices Powders”, Food Analytical Methods 1, 43-48.

[238] Hussein, M.M., Jacin, H., Rodriguez, F.B., (1976). “Quantitative determination of saccharin in food products by ultraviolet spectrophotometry”, Journal of Agricultural and Food Chemistry 24, 36-40.

[239] Alfaya, R.V.S., Alfaya, A.A.S., Gushikem, Y., Rath, S.,(2000). “Ion Selective Electrode for Potentiometric Determination of Saccharin Using a Thin Film of Silsesquioxane 3-n-Propylpyridinium Chloride Polymer Coated-Graphite Rod”, Analytical Letters 33, 2859-71.

[240] Sjoberg, A. M., Alanko, T. A., (1987). “Liquid Chromatographic Determination of Saccharin in Beverages and Sweets: NMKL Collaborative Study”, Journal - Association of Official Analytical Chemists 70, 58-60.

[241] Valenti, L. P. (1985). “Liquid Chromatographic Determination of Quinine, Hydroquinine, Saccharin, and Sodium Benzoate in Quinine Beverages”, Journal-Association of Official Analytical Chemists 68, 782-84.

[242] Nestle Aero packet ingredients listing barcode: 7613031579334

[243] "Listerine Antiseptic Mouthwash, Smart Rinse, Whitenıng, Advanced, Fluoride Rinse, and Tartar Protection Products". Archived from the original on 2011-01-02. Retrieved 2009-07-31.

[244] Lucová, M., Hojerová, J., Pažoureková, S., Klimová, Z., (2013). "Absorption of triphenylmethane dyes Brilliant Blue and Patent Blue through intact skin, shaven skin and lingual mucosa from daily life products". Food and Chemical Toxicology. 52: 19–27.

[245] “Brilliant Blue FCF - Wikipedia”.

[246] J. Allergy Clin. Immunol.; VOL 64 ISS Jul 1979, P32-37, (REF 25)

[247] Li, J., Huang, C., Liang, G., Xiao, Y., Ge, L., Gong, J., He, D., (2017). “Determination of indigo and brilliant blue in different types of food products by high performance liquid chromatography with solid phase extraction”, Wei Sheng Yan Jiu = Journal of Hygiene Research 46, 318-23.

[248] Mathiyalagan, S., Badal K. M., Ling, Y.C., (2019). “Determination of synthetic and natural colorants in selected green colored foodstuffs through reverse

phase-high performance liquid chromatography", Food Chemistry 278 381-87.

[249] Mithat Dinç ve Muhammet Arıcı "Gıdalara Katılan Suda Çözünen Bazı Sentetik Boyaların Belirlenmesi". TKİB Tekirdağ İl Kontrol Laboratuarı, Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Tekirdağ

[250] Alves, S.P., Brum, D.M., Andrade, É.C.B., Netto, A.D.P., (2008). "Determination of synthetic dyes in selected foodstuffs by high performance liquid chromatography with UV-DAD detection" Food Chemistry 107, 489-96.

[251] Thompson, C.O., Trenerry, V.C., (1995). "Determination of synthetic colours in confectionery and cordials by micellar electrokinetic capillary chromatography", Journal of Chromatography A 704, 195-201.

[252] Prado, M.A., Godoy. H.T., (2002). "Validation of the Methodology to Determine Synthetic Dyes in Foods and Beverages by Hplc", Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies 25, 2455-72.

[253] Qi, P., Lin, ZH.,Chen, GY., Xiao, J., Liang, ZA.,Luo, LN ., Zhou, J., Zhang, XW., (2015). ''Fast and simultaneous determination of eleven synthetic color additives in flour and meat products by liquid chromatography coupled with diode-array detector and tandem mass spectrometry''. Food Chemistry, 181, 101-110.

[254] Sha, O., Zhu, XS .,Feng, YL .,Ma, WX.,(2015). '' Aqueous two-phase based on ionic liquid liquid-liquid microextraction for simultaneousdetermination of five synthetic food colourants in different food samples by high-performance liquid chromatography''. Food Chemistry, 174, 380-386.

[255] Ma, K.,Li, XJ., Wang, HF., Zhao, M.,(2015). ''Rapid and Sensitive Method for the Determination of Eight Food Additives in Red Wine by Ultra-performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry''. Food Analytical Methods, 8, 203-212.

[256] Yang, Y., Zhang, J., Shao, B.,(2014). ''Quantitative analysis of fourteen synthetic dyes in jelly and gummy candy by ultra performance liquid chromatography''. Analytical Methods, 6, 5872-5878.

[257] Xian, YP., Wu, YL.,Guo, XD., Lu, YJ., Luo, HY., Luo, DH., Chen, YG.,(2013). ''Simultaneous determination of 11 restricted dyes in cosmetics by ultra high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry''. Analytical Methods, 5, 1965-1974.

[258] Hajimahmoodi, M., Afsharimanesh, M., Moghaddam, G.,Sadeghi, N., Oveisi, MR.,Jannat, B.,Pirhadi, E., Mazdeh, FZ.,Kanan, H.,(2013). ''Determination of eight synthetic dyes in foodstuffs by green liquid chromatography''. Food Additives and Contaminants Part A-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assesment, 30, 780-785.

[259] Khanavi, M., Hajimahmoodi, M., Ranjbar, AM., Oveisi, MR.,Ardekani, MRS., Mogaddam, G.,(2012).''Development of a Green Chromatographic Method for Simultaneous Determination of Food Colorants''. Food Analytical Methods, 5, 408-415.

[260] Vachirapatama, N., Mahajaroensiri, J.,Visessanguan, W.,(2008). ''Identification and Determination of Seven Synthetic Dyes in Foodstuffs and Soft Drinks on Monolithic C18 Column by High Performance Liquid Chromatography''. Journal of Food and Drug Analysis, 16, 77-82.

[261] Fuh, MR., Chia, KJ.,(2002). '' Determination of sulphonated azo dyes in food by ion-pair liquid chromatography with photodiode array and electrospray mass spectrometry detection''. Talanta, 56, 663-671.

[262] Zou, JH., Chen, WD., Shao, JD.,(2001). ''Simultaneous determination of 8 food additives in fruit juices by reversed phase high performance liquid chromatography''. Chinese Journal Of Analytical Chemistry, 29, 1192-1195.

[263] Alves, S.P., Brum D.M., Branco De Andrade E.C. ve Netto A.P.P., (2008). Determination of synthetic dyes in selected foodstuffs by high performance liquid chromatography with UV-DAD detection. Food Chemistry,107,489-496.

[264] Vidotti E.C., Cancino J.C., Oliveira C.C. ve Rollemberg M.C.E., (2005). "Simultaneous determination of food dyes by first derivative spectrophotometry with sorption onto polyurethane foam", Analytical Sciences, 21: 149-153.

[265] “EBSCOhost | 37284185 | Identification and Determination of Seven Synthetic Dyes in Foodstuffs and Soft Drinks on Monolithic C18 Column by High Performance Liquid Chromatography.”

[266] Yang, Y.,Yin, J.,Shao, B., (2011). ‘‘Simultaneous determination of five aluminum lake dyes in chewing gum by HPLC with photodiode array detection’’. Food Additives and Contaminants Part A-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assesment, 28, 1157-1167.

[267] Bişgin, A.T., (2018) “Simultaneous Extraction and Determination of Allura Red (E129) and Brilliant Blue FCF (E133) in Foodstuffs by Column Solid-Phase Spectrophotometry”, Journal of AOAC International.

[268] Bişgin, A.T., (2018). “Simultaneous Preconcentration and Determination of Brilliant Blue and Sunset Yellow in Foodstuffs by Solid-Phase Extraction Combined UV-Vis Spectrophotometry”, Journal of AOAC International 101,1850-56.

[269] Ghoreishi, S.M., Behpour, M., Golestanehi, M., (2011). “Simultaneous Voltammetric Determination of Brilliant Blue and Tartrazine in Real Samples at the Surface of a Multi-Walled Carbon Nanotube Paste Electrode”, Analytical Methods 3, 2842-47.

[270] Gerasimov, AV., (2000). ‘‘Qualitative and quantitative treatment of thin-layer chromatograms of incompletely separated synthetic food colors’’. Journal of Analytical Chemistry, 55, 1161-1165.

[271] Ishikawa F., Oishi M. ve Kimura K., (2004). “Determination of synthetic food dyes in food by capillary electrophoresis”, Journal of the Food Hygienic Society of Japan, 45: 150-155.

[272] Ni, YN., Wang, Y.,Kokot, S.,(2009). ‘’ Simultaneous kinetic spectrophotometric analysis of five synthetic food colorants with the aid of chemometrics’’. Talanta, 78, 432-441.

[273] Gerasimov, AV., (2000). ‘‘Qualitative and quantitative treatment of thin-layer chromatograms of incompletely separated synthetic food colors’’. Journal of Analytical Chemistry, 55, 1161-1165.

[274] Coelho T. M., Vidotti E.C. ve Rollemberg M.C., (2010). “Photoacoustic spectroscopy as a tool for determination of food dyes: comparison with first derivative spectrophotometry”, Talanta, 81: 202-207.

[275] Ishikawa F., Oishi M. ve Kimura K., (2004). "Determination of synthetic food dyes in food by capillary electrophoresis", Journal of the Food Hygienic Society of Japan, 45: 150-155.

[276] Capitanvallvey L.F., Iglesias N.N. ve Paya I.D., (1997). "Simultaneous determination of tartrazine and sunset yellow in cosmetic products by first-derivative spectrophotometry", Mikrochimica Acta, 126: 153-157 .

[277] Nevado J.J.B., Flores J.R. ve Llerena M.J.V., (1993). "Resolution of ternary mixture of tartrazine, quinoline yellow and sunset yellow by derivative spectrophotometry and ratio spectra derivative", Bulletin Des Societes Chimıques Belges, 102: 527-538.

[278] Rizova V. ve Stafilov T., (1995). "XAD-2 HPTLC method of identification and determination of some synthetic food colorings", Analytical Letters, 28: 1305-1316.

[279] Acıtaş, Ş., Şenoğlu, B., (2014). İstatistiksel Deneysel Tasarım, 3. Baskı, Nobel Akademik Yayıncılık, Ankara

[280] Habip TAYLAN. "Deney tasarımı (rapor)". Education, 15:22:24 UTC. https://www.slideshare.net/HabipTaylan/deney-tasarm-rapor.

[281] Mıller Irvin, John E. Freund, Richard A. Johnson (1990). Probability and Statistics for Engineers, Fourth Edition, Prentice –Hall International, Inc.

[282] Hasgül, Ö., (2010). "Ürün ve Süreçlerin Geliştirilmesinde Deney Tasarımı: Gıda Sektöründe Bir Uygulama", Akademik Fener, 44.

# Tezden Üretilmiş Yayınlar

**İletişim Bilgisi:** evridiki_rula@hotmail.com

**Makaleler**

1. Dinc Zor, S., Ascı, B., Aksu Dönmez, O., Pingo, E., (2020). "Chemometric Optimization of an HPLC Method fort he Simultaneous of a Multi Component Drug Product by the Help of Central Composite Design", Microchemical Journal, 152.