



Düzce Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi

Araştırma Makalesi

HPLC ile Oral Çözeltilerde Vitamin K3-Amprolyum HCl- Metilparaben-Propilparaben Miktar Tayini

Akın OSANMAZ^a, Esen BAYRAKTAR^b, Ümit ERGUN^{a,*}

^a Kimya Bölümü, Fen-Edebiyat Fakültesi, Düzce Üniversitesi, Düzce, TÜRKİYE

^b Kimya Bölümü, Fen-Edebiyat Fakültesi, Selçuk Üniversitesi, Konya, TÜRKİYE

* Sorumlu yazarın e-posta adresi: umitergun@duzce.edu.tr

DOI : 10.29130/dubited.540905

ÖZET

Bu çalışmada antiprotozoal etkili amprolyum HCl, kanın pıhtılaşmasını önleme açısından etkili vitamin K3, antimikrobiyal koruyucu etkili metilparaben ve propilparabeni bir arada içeren oral çözeltisinin zaman açısından avantajı nedeniyle eşzamanlı bir HPLC yöntemi ile miktar tayini ve validasyon çalışmaları yapılmıştır. Analizlerde 25°C'de İnertsil C8-3 4,6 x 250 mm, 5 µm kolon, 254nm'de dalga boyunda heptan-1-sülfonik asit sodyum tuzu, glasiyel asetik asit, trietilamin tampon çözeltisi ve asetonitril ve metanol kullanılmıştır. Seçicilik, sistem uygunluk, doğrusallık ve doğruluk parametreleri çalışılmış ve kabul edilebilir sonuçlar elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Vitamin K3, Amprolyum HCl, Metilparaben, Propilparaben, HPLC

Quantitative HPLC Analysis of Vitamin K3-Amprolium HCl- Methylparaben-Propylparaben in Oral Solutions

ABSTRACT

In this study, quantitative analysis and validation studies of oral solutions including antiprotozoal effective amprolium HCl, preventing blood clotting effective vitamin K3 and antimicrobial preservative effective methylparaben and propylparaben were performed in a simultaneous HPLC method due to its advantage in terms of time. Analysis were carried out at 25°C by using Inertsil C8-3 4.6 x 250 mm, 5 µm column, PDA dedector set at 254 nm, mobile phase formed of a mixture of heptane-1-sulfonic acid sodium salt, glacial acetic acid, triethylamine and acetonitrile and methanol. Selectivity, system suitability, linearity and accuracy parameters were studied and acceptable results were achieved.

Keywords: Vitamin K3, Amprolium HCl, Methylparaben, Propylparaben, HPLC

I. GİRİŞ

Amprolyum hidroklorür, Coccidia parazitleri üzerinde etkili olan bir antiprotozoal faktör olan bir koksidiyostattır [1,2]. Bazı yaygın koksidus suşlarının ookistlerinin sporlanmasını inhibe eder [3]. Amprolyum, tiamin metabolizmasına müdahale eden ve karbonhidrat sentezini önleyen bir tiamin analogudur [4]. Amprolyum hidroklorür su, metanol, etanol ve dimetil-formamid içinde çözünür. İzopropanol, butanol, etil asetat ve asetonyitril içinde pratik olarak çözünmez [4].

K vitamininin en çok bilinen görevi, pıhtılaşma faktörleri yapımında, sağlıklı kemik yapımında ve osteoporozun önlenmesi ve tedavisinde rolü olduğunu göstermiştir [5]. K3 vitamini sentetik bir türevidir. K vitamininin çeşitli tümör hücre hatlarının büyümesini engellediği de gösterilmiştir [6-9]. Suda çözünür, kloroform, metanol ve etil asetat az çözünür [10-12].

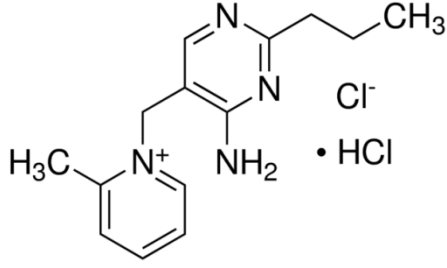
Metilparaben ve propilparaben genellikle antimikrobiyal koruyucu olarak kullanılır [13]. Metilparaben antimikrobiyal aktivitesini pH 4-8 aralığında gösterir. Bakterilerde daha etkilidirler ve gram pozitif bakterilerde gram negatiflere göre daha etkilidirler. Metilparaben suda az çözünür, trifluoroasetik asitte çözünür, etanol, eter ve aseton içinde çok çözünür. Propilparaben ise su, etanol ve etil eterde çözünür, kloroformda az çözünür [14].

Literatürde AmprolyumHCl, sulfakuinoksalin sodyum ve Vitamin K3 sodyum bisülfid (menadion sodyum bisülfid olarak) içeren tozların (A.S.K tozları) tayini için HPLC metodu ve ZIC-HILIC kolonu kullanılarak Amprolyum HCl ve Vitamin K'nın bir arada analizinin yapıldığı görülmektedir [15]. Bir başka çalışmada ise HPLC metodu kullanılarak gıda maddelerinde koruyucu maddelerin (metilparaben ve propilparaben) tayinleri bir arada yapılmıştır [16]. Ancak literatürde 4 etken maddenin bir arada çalışılmış miktar tayini metodu yoktur. Bu çalışmada, antiprotozoal etkili amprolyum HCl, kanın pıhtılaşmasını önleme açısından etkili vitamin K3, antimikrobiyal koruyucu etkili metilparaben ve propilparabeni bir arada içeren, sıtma hastalığı, kala-azar hastalığı ve uyku hastalığını ortadan kaldırmaya yardımcı olarak kullanılan bu oral çözeltinin zaman açısından avantajı nedeniyle eşzamanlı kantitatif analiz için bir HPLC yöntemi geliştirilmiştir. Son zamanlarda ilaç sektöründe artık birbiri ile kombine ürünler çalışıldığından yaptığımız çalışmanın farklı projelere de yararlı olacağını düşünmekteyiz.

II. MALZEME ve YÖNTEM

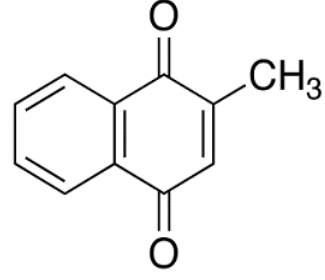
A. REAKTİF VE STANDARTLAR

Reaktif/Standart Adı	Firma	Seri Numarası
Amprolyum HCl	USP	H0K314
Metilparaben	EP	4
Propilparaben	EP	4
Vitamin K3	EP	1
Heptan-1-sülfonik asit sodyum tuzu	Merck	K48578106 704
Glasiyel asetik asit	PanReac AppliChem	0001069344
Trietilamin	Merck	S7047452 528
Metanol	Merck	I837707 626
Asetonyitril	Merck	I820030 608



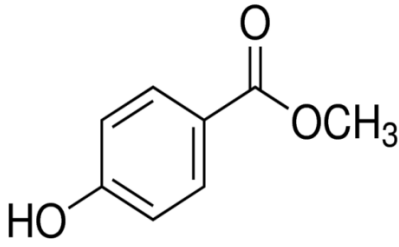
Amprolyum Hidroklorür

MA:315.24 g/mol



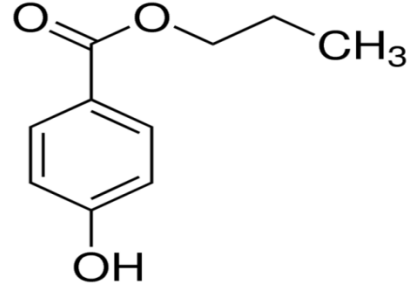
Vitamin K3

MA:172.18 g/mol



Metilparaben

MA:152.15 g/mol



Propilparaben

MA:180.20 g/mol

Şekil 1. Oral çözeltilerde bulunan dört etken maddenin kimyasal yapıları

B. ANALİTİK YÖNTEM VE ÇÖZELTİLERİN HAZIRLANMASI

Yöntem	: HPLC
Cihaz	: SHIMADZU Prominence, Shimadzu LC-20AT pompa, DGU-20A5 degazer, SIL-20A HT otosampler, CTO-10AS VP kolon fırını, SPD-M20A PDA dedektör
Kolon	: GL Sciences Inertsil C8-3, 5µm, 4.6 X 250 mm
Akış Hızı	: 0.6 mL/dk
Dalga Boyu	: 254 nm

Enjeksiyon Hacmi	: 10 µL
Kolon Sıcaklığı	: 25°C
Numune Sıcaklığı	: 25°C
Analiz Süresi	: 50 dakika
Tampon Çözelti	: 6 g heptan-1-sülfonik asit sodyum tuzu tartıldı ve 500 mL deiyonize suda çözüldü. Üzerine 12 mL glasiyel asetik asit ve 2 mL trietilamin eklendi.
Mobil Faz	: Tampon çözelti: Metanol: Asetonitril (50:45:5, v/v/v) oranında karıştırıldıktan sonra degaze edildi.
Seyreltme Çözeltisi	: Su: Metanol: Asetonitril (50:45:5, v/v/v)

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

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

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

Stok Propilparaben Çözeltisi: 100 mL'lik balon jofeye 20 mg propilparaben standardı tartıldı. Seyreltme çözeltisi ile çözümlü hacmi 100 mL'ye tamamlandı. Bu çözeltiden 1 mL alındı, 100 mL'lik balon jofeye aktarıldı ve seyreltme çözeltisi ile seyreltilti. (c= 0,002 mg/mL)

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

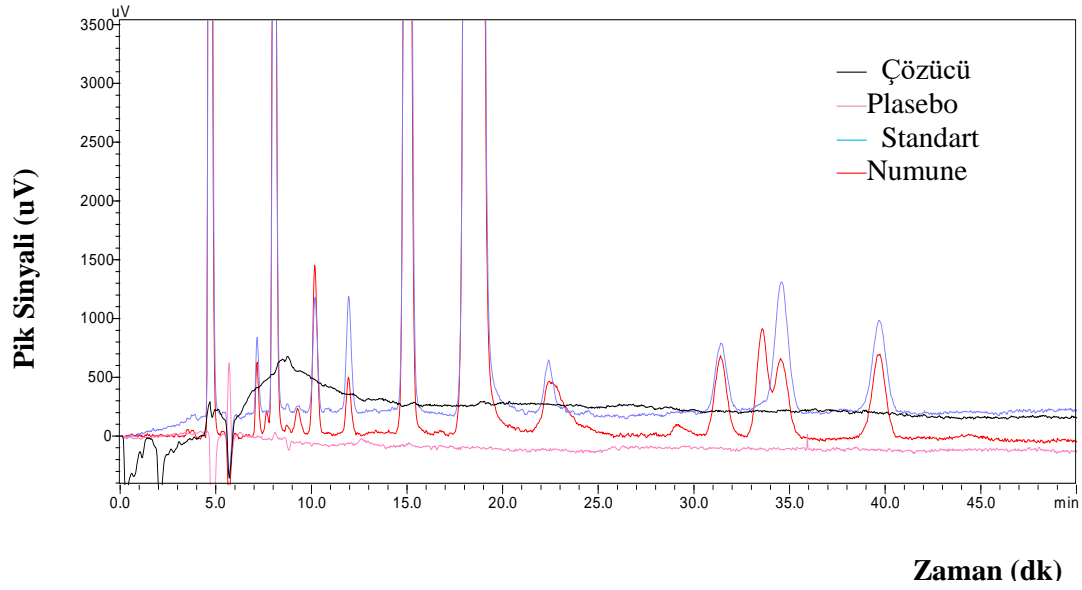
Test Çözeltisi: 50 mL'lik balon jofeye 0,5 mL numune alınıp seyreltme çözeltisi ile çözüldü. Daha sonra bu çözeltiden 4,0 mL alındı, 20 mL'lik balon jofeye aktarıldı ve seyreltme çözeltisi ile seyreltilti. Bu çözelti 2-3 mL ile doyurulmuş 0,45 mm PTFE filtreden süzöldü ve viallendi. ($C_{\text{Amprolyum HCl}} = 0,5 \text{ mg/mL}$, $C_{\text{Vitamin K3}} = 0,004 \text{ mg/mL}$, $C_{\text{Metilparaben}} = 0,0036 \text{ mg/mL}$, $C_{\text{Propilparaben}} = 0,0004 \text{ mg/mL}$)

III. BULGULAR ve TARTIŞMA

A. SEÇİCİLİK/SPESİFİKLİK

%100'lük çalışma konsantrasyonuna sahip standart çözeltisi, plasebo çözeltisi, amprolyum HCl, vitamin K3, metilparaben ve propilparaben çözeltisi, numune çözeltisi ve çözücü sisteme enjekte

edilir. Etken maddelerin alıkonma zamanında çözücü veya plasebodan kaynaklanan herhangi bir pik olmamalıdır. Birbirine yakın iki pik arasındaki rezolüsyon minimum 2,0 olmalıdır. Ayrıca amprolyum standart kromatogramında amprolyum HCl ve 2-pikolin pikleri arasındaki rezolüsyon minimum 7,0 olmalıdır. Numune içeriğinde etken maddelerin değerleri şöyledir; AmprolyumHCl: 250 mg/mL, Vitamin K3: 2 mg/mL, Metilparaben: 1.8 mg/mL, Propilparaben: 0.2 mg/mL. Etken maddeler için elde edilen miktar tayini sonuçlarının yüzde bağıl hataları $\pm\%2,0$ arasında olmalıdır. Geliştirdiğimiz yöntem ile elde ettiğimiz miktar tayini sonuçları ise; AmprolyumHCl: 248,2 mg/mL, Vitamin K3: 2,021 mg/mL, Metilparaben: 1,811 mg/mL, Propilparaben: 0,2012 mg/mL şeklindedir. Sonuçlarımızın gerçek numune gerçek numundeki değerlere göre yüzde bağıl hatasının $\pm\%2$ arasında olduğu görülmektedir.



Şekil 2. Seçicilik Çözeltilerinin Kromatogramı

Tablo 1. Etken Maddelerin Rezolüsyon Değerleri

Standart	R.T.	Alan	Rezolüsyon
Vitamin K3	4,678	191520	0
2-pikolin	8,039	109543	18,0
Metilparaben	15,006	373386	5,4
Amprolyum HCl	18,438	13100609	5,0
Propilparaben	39,675	37605	3,8

B. SİSTEM UYGUNLUK ŞARTLARI

Hazırlanan standart (%100) çözeltisinden ardışık olarak 6 enjeksiyon yapılarak pik alanları ve piklerin alıkonma zamanı (RT) arasındaki bağıl standart sapma (RSD) değerleri incelendi. Aynı konsantrasyonda ikinci bir standart çözeltisi hazırlanıp ardışık 3 kez sisteme enjekte edilip iki standart arasındaki uyuma bakıldı. Uyum % 98,0- % 102,0 arasında olmalıdır. Standart çözeltisinin enjeksiyonundan elde edilen etken maddelere ait piklerin teorik plaka sayısı 2000'den az olmamalıdır, kuyruklanma faktörü 0,8 – 1,2 arasında olmalıdır. Etken maddelerin (Amprolyum HCl, Vitamin K3, Metilparaben, Propilparaben) ardışık 6 enjeksiyonuna ait pik alanları arasındaki RSD < %2,0 olmalıdır.

Tablo 2. Sistem Uygunluk Parametrenin Sonuçları

Standart No	Vitamin K3	Amprolyum HCl	Metilparaben	Propilparaben
	Ortalama Pik Alanı			
1	189954	13068550	373348	40705
2	188125	13012236	364749	39670
	% Uyum			
	99,28	100,27	100,19	101,62
	% RSD			
	0,09	0,06	0,27	1,55
	Teorik Plaka Sayısı (N)			
	3878	9276	9988	15080
	Kuyruklanma Faktörü (Tf)			
	1,127	1,154	1,121	1,101

C. DOĞRUSALLIK

Doğrusallık çalışması etkin maddelerin farklı konsantrasyonlarda doğrusal cevap verdiğini kanıtlamak amacıyla yapılmaktadır. Etkin maddenin %50, %75, %100, %125 ve %150 çalışma konsantrasyonlarında standart çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan doğrusallık çözeltilerinin her birinden 3'er kez enjeksiyon yapıldı.

Konsantrasyon ve elde edilen alanlara karşılık çizilen grafikten yararlanılarak eğriye ait eğim, kesişim değeri ve korelasyon katsayısı hesaplandı. R^2 değerleri sınırlar ($>0,995$) içerisinde olup yöntem doğrusallık parametresine göre uygundur.

Tablo 3, tablo 4, tablo 5 ve tablo 6'da konsantrasyonlara karşı bulunan ve lineerlik denkleminde hesaplanan sonuçlar görülmektedir. Şekil 3, şekil 4, şekil 5 ve şekil 6'da vitamin K3, amprolyum HCl, metilparaben ve propilparaben doğrusallık grafikleri görülmektedir.

$$Y = mX + n$$

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

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

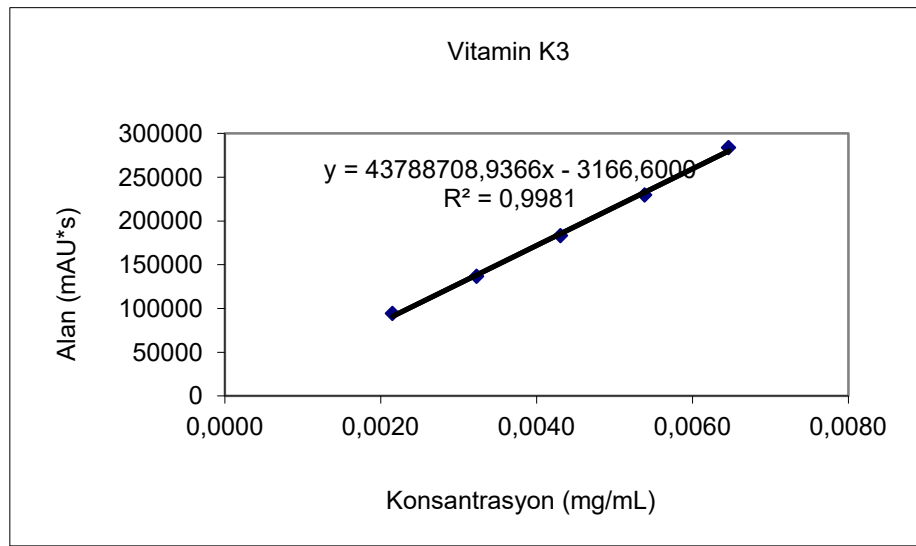
$$m = \text{Regresyon doğrusunun eğimi}$$

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

$$R^2 = \text{Korelasyon katsayısı}$$

Tablo 3. Vitamin K3 konsantrasyona bağlı kromatogram sonuçları

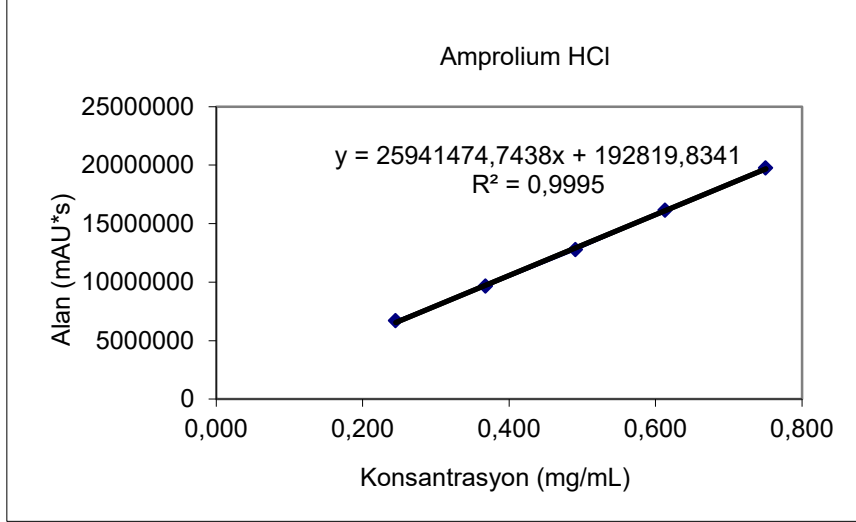
Çözelti Seviyesi (%)	Teorik Kons. (mg/mL)	Çalışılan Kons. (mg/mL)	Ort. Alan (mAU*s)	RSD (%)
50	0,0020	0,0022	94346	0,12
75	0,0030	0,0032	136796	0,19
100	0,0040	0,0043	183288	0,07
125	0,0050	0,0054	229790	0,08
150	0,0060	0,0065	283817	0,07
m	43788708,94			
n	-3166,6			
R²	0,9981			
y = mx + n	43788708,9366x - 3166,6000			



Şekil 3. Vitamin K3 doğrusallık grafiği

Tablo 4. Amprolyum HCl konsantrasyona bağlı kromatogram sonuçları

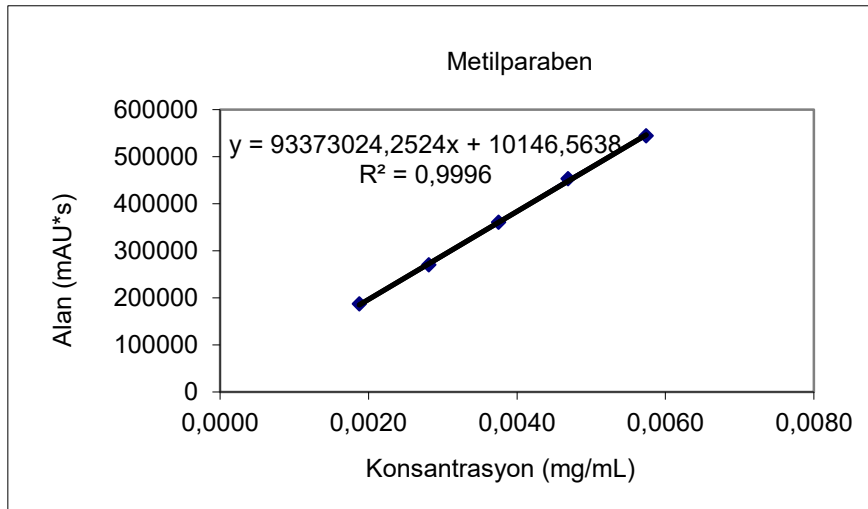
Çözelti Seviyesi (%)	Teorik Kons. (mg/mL)	Çalışılan Kons. (mg/mL)	Ort. Alan (mAU*s)	RSD (%)
50	0,25	0,245	6688408	0,01
75	0,38	0,368	9664416	0,03
100	0,50	0,491	12761506	0,04
125	0,63	0,613	16133446	0,03
150	0,75	0,751	19742328	0,02
m	25941474,74			
n	192819,8341			
R²	0,9995			
y = mx + n	25941474,7438x + 192819,8341			



Şekil 4. Amprolyum HCl doğrusallık grafiği

Tablo 5. Metilparaben konsantrasyona bağlı kromatogram sonuçları

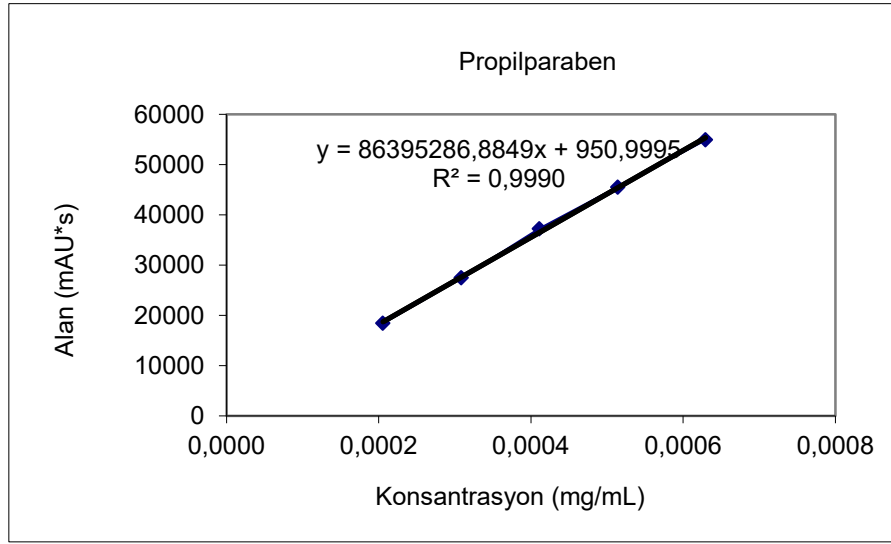
Çözelti Seviyesi (%)	Teorik Kons. (mg/mL)	Çalışılan Kons. (mg/mL)	Ort. Alan (mAU*s)	RSD (%)
50	0,0018	0,0019	186584	0,28
75	0,0027	0,0028	269993	0,48
100	0,0036	0,0038	359966	0,29
125	0,0045	0,0047	452532	0,24
150	0,0054	0,0057	543894	0,14
m	93373024,25			
n	10146,5638			
R²	0,9996			
y = mx + n	$93373024,2524x + 10146,5638$			



Şekil 5. Metilparaben doğrusallık grafiği

Tablo 6. Propilparaben konsantrasyona bağlı kromatogram sonuçları

Çözelti Seviyesi (%)	Teorik Kons. (mg/mL)	Çalışılan Kons. (mg/mL)	Ort. Alan (mAU*s)	RSD (%)
50	0,0002	0,0002	18432	1,72
75	0,0003	0,0003	27436	0,73
100	0,0004	0,0004	37231	1,80
125	0,0005	0,0005	45495	0,31
150	0,0006	0,0006	54916	0,92
m	86395286,88			
n	950,9995			
R²	0,999			
y = mx + n	86395286,8849x + 950,9995			



Şekil 6. Propilparaben doğrusallık grafiği

D. DOĞRULUK

Yöntemin doğruluğu, numune içindeki analiz edilecek maddenin hazırlanan konsantrasyonu (teorik konsantrasyon) ile tayin sonucu bulunan konsantrasyonun (deneysel konsantrasyon) birbiri ile yakınlığı şeklinde ifade edilir.

Her bir konsantrasyonda 3 doğruluk çözeltisi hazırlanıp her biri sisteme 3 kez enjekte edilecektir. Analiz sonuçları % geri kazanım olarak ifade edilir ve aşığıdaki formüle göre hesaplanır. Her bir geri kazanım sonucu %98,0- %102,0 arasında olmalıdır. % geri kazanım sonuçlarının ortalaması %95 güvenilirlik sınırları içinde olmalıdır.

$$\% \text{ Geri kazanım} = \frac{\text{Bulunan Konsantrasyon (mg / mL)}}{\text{Hazırlanan Konsantrasyon (mg / mL)}} \times 100$$

Tablo 7. Vitamin K3 geri kazanım sonuçları

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

Tablo 8. Amprolyum HCl geri kazanım sonuçları

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

Tablo 9. Metilparaben geri kazanım sonuçları

% Doğruluk Çöz.		<i>Eklenen konsantrasyon (mg/mL)</i>	<i>Hesaplanan konsantrasyon (mg/mL)</i>	<i>% Geri kazanım</i>
50	1	0,002	0,002	98,82
	2	0,002	0,002	99,01
	3	0,002	0,002	98,61
100	1	0,004	0,004	101,37
	2	0,004	0,004	101,50
	3	0,004	0,004	101,44
150	1	0,006	0,006	100,95
	2	0,006	0,006	101,76
	3	0,006	0,006	101,86
Ortalama % Geri Kazanım				100,59
Geri Kazanım %'in 95% Güven Aralığı Sınırları				99,56 – 101,62

Tablo 10. Propilparaben geri kazanım sonuçları

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

IV. SONUÇ

Yapılan çalışmalar sonucu, 50 dakikalık enjeksiyon süresinde 4 etken maddenin de çıkartıldığı eşzamanlı bir HPLC yöntemi geliştirilmiş ve valide edilebilmiştir. Etken maddelerin alıkonma zamanları, vitamin K3 için yaklaşık 4,5 dakika; metilparaben için yaklaşık 15,0 dakika; amprolyum HCl 18,5 dakika ve propilparaben için ise 39,5 dakika olarak görülmüştür. Sistemimizin seçici olduğunu göstermek için, 4 etken maddenin alıkonma zamanında çözücü veya plasebodan kaynaklanan herhangi bir pik gözlenmemiştir. Amprolyum HCl ve 2-pikolin pikleri arasındaki rezolüsyon 7,0'den büyük bulunmuştur. Birbirine yakın iki pik arasındaki rezolüsyon 2,0'den büyük bulunmuştur.

Sistem uygunluk şartlarının tespiti için tablo 2'den aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir ve buna göre sistemimiz sistem uygunluk parametrelerini sağlamaktadır.

- Alanların bağıl standart sapması %2,0'den küçük bulunmuştur.
- Aynı konsantrasyonda iki standart arasındaki uyum %99,2-%101,7 arasında bulunmuştur.
- Kuyruklanma faktörü vitamin K3, amprolyum HCl ve metilparaben için 1,1-1,2 arasında, propilparaben için ise 0,8-1,2 arasında bulunmuştur.
- Teorik plaka sayıları 3000'den büyük bulunmuştur.

Doğrusallık parametresi için elde edilen değerler her 4 etken madde için elde edilen y-kesişim değerleri %2'den küçük olduğundan yöntemimiz doğrusallık parametresi açısından uygundur. Elde edilen korelasyon katsayısı ve R² değerleri de bunu desteklemektedir. Doğruluk parametresinin belirlenmesinde vitamin K3 için %100,77; amprolyum HCl için %100,41; metilparaben için %100,59 ve propilparaben için %99,68 geri kazanım değerleri elde edilmiştir. Bu sonuçlar kabul kriteri olan %98-%102 aralığı içerisinde olduğundan yöntemimiz doğruluk parametresine göre de uygundur. Ayrıca yöntemin doğruluğunu desteklemek için gerçek numune analizi de yapılmış ve ilaç farmakopisinin kabul ettiği şekilde % bağıl hatanın \pm %2 arasında olduğu görülmüştür.

V. KAYNAKLAR

- [1] W. Song, M. Huang, W. Rumbelha, H. Li, "Determination of Amprolium, Carbadox, Monensin, and Tylosin in Surface Water by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry," *Rapid Commun Mass Spectrom*, vol. 21, pp. 1944–1950, 2007.
- [2] F. Belal, S.A.El-Razeq, M. Fouad, S. Zayed and F. Fouad, "Simultaneous Determination of Five Coccidiostates in Veterinary Powders, Feed Premixes, and Baby Food by Micellar Electrokinetic Chromatography: Application to Chicken Tissues and Liver," *Food Analytical Methods*, vol. 11, pp. 3531-3541, 2018.
- [3] E. Yarsan, S. Yazar, İ. Kutlu, H. Saltaş, "Amprolyumun Tavşanlarda İmmun Sistemin Bazı Parametreleri Üzerine Etkileri," *Türk Hij Den Biyol Derg*, c. 60, No; 2, ss. 49-54, 2003.
- [4] L. P. Joyner And C. C. Norton, "The Anticoccidial Effects Of Amprolium, Dinitolmide And Monensin Against Eimeria Maxima, E. brunetti and E. acervulina with Particular Reference to Oocyst Sporulation," *Parasitology*, vol. 75, pp. 155-164, 1977.
- [5] E. S. Namiduru, M. Tarakçioğlu, "K Vitamini ve Osteoporoz," *Gaziantep Tıp Derg*, vol. 17, no.1, pp. 1-7, 2011.
- [6] K. N. Prasad, J. Edwards-Prasad, A. Sakamoto, "Vitamin K₃ (Menadione) Inhibits the Growth of Mammalian Tumour Cells in Culture," *Life Sci.*, vol. 29, no.13, pp. 1387-1392, 1981.
- [7] E. O. Ngo, T. P. Sun, J. Y. Chang, C. C. Wang, K. H. Chi, A. L. Cheng, L. M. Nutter, "Menadione-Induced DNA Damage in a human Tumor Cell Line," *Biochem Pharmacol*, vol. 42, pp. 1961-1968, 1991.
- [8] R. Ni, Y. Nishikawa, B. I. Carr, "Cell Growth Inhibition by a Novel Vitamin K is Associated with Induction of Protein Tyrosine Phosphorylation," *J. Biol. Chem.*, vol. 273, pp. 9906-9911, 1998.
- [9] A. M. Daines, R. J. Payne, M. E. Humphries and A. D. Abell, "The Synthesis of Naturally Occurring Vitamin K and Vitamin K Analogues," *Current Organic Chemistry*, vol. 7, pp. 1-15, 2003.
- [10] S. Sakamoto, F. Taura, B. Pongkitwitoon, W. Putalun, R. Tsuchicashi, J. Kinjo, H. Tanaka, S. Morimoto, "Development of Sensitivity-Improved Fluorescence-Linked Immunosorbent Assay Using a fluorescent Single-Domain Antibody Against the Bioactive Naphthoquinone, Plumbagin," *Anal Bioanal Chem.*, vol. 396, pp. 2955-2963, 2010.
- [11] V. M. Gohil, S. A. Sheth, R. Nilsson, A. P. Wojtovich, J. H. Lee, F. Perocchi, W. Chen, C. B. Clish, P. S. Brookes ve V. K. Mootha, "Nutrient-Sensitized Screening for Drugs That Shift Energy Metabolism from Mitochondrial Respiration to Glycolysis," *Nature Biotechnology*, vol. 28, pp. 249-255, 2010.
- [12] W. Hu, S. Tedesco, B. McDonagh, J. A. Barcena, C. Keane, D. Sheehan, "Selection of Thiol- and Disulfide-Containing Proteins of Escherichia Coli on Activated Thiol-Sepharose," *Anal. Biochem.*, vol. 398, no2, pp. 245-253, 2010.

- [13] F. Kalyoncu, "Gıda Sanayinde Sıklıkla Kullanılan Antifungal Katkı Maddeleri," *New World Sciences Academy Natural and Applied Sciences*, vol. 3, no. A0087, pp. 465-473, 2008.
- [14] Haynes, W.M. (ed.), "CRC Handbook of Chemistry and Physics," *CRC Press LLC, Boca Raton*, 95th Edition, pp. 3-470, 2014-2015.
- [15] M. Ghanem, S. Abu-Lafi, R. Karaman, H. Hallak, "Validated HPLC Method to Simultaneously Determine Amprolium Hydrochloride, Sulfaquinoxaline Sodium and Vitamin K₃ in A.S.K Powder on ZIC-HILIC Column," *Pharmaceutica Analytica Acta*, vol. 168, no.3, pp. 2153-2435, 2012.
- [16] B. Saad, Md. F. Bari, M. I. Saleh, K. Ahmad, M. K. M. Talib, "Simultaneous Determination of Preservatives (benzoic acid, sorbic acid, methylparaben and propylparaben) in Foodstuffs Using High-Performance Liquid Chromatography," *Journal of Chromatography A*, vol. 1073, pp. 393-397, 2005.