

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

**ROSUVASTATİN KALSIYUMUN ELEKTROKİMYASAL
DAVRANIŞLARININ İNCELENMESİ VE FARMASÖTİK
PREPARATLARDAN MİKTAR TAYİNİ**

Ecz. Banu UYAR

**Analitik Kimya Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ANKARA
2009**

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

**ROSUVASTATİN KALSIYUMUN ELEKTROKİMYASAL
DAVRANIŞLARININ İNCELENMESİ VE FARMASÖTİK
PREPARATLARDAN MİKTAR TAYİNİ**

Ecz. Banu UYAR

**Analitik Kimya Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Sacide ALTINÖZ**

**ANKARA
2009**

ONAY SAYFASI

Bu çalışma jürimiz tarafından Analitik Kimya Programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:

Danışman: Prof. Dr. Sacide Altınöz
Hacettepe Üniversitesi

Üye:

Üye:

Üye:

ONAY:

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Hakan S. ORER
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tez danışmanım olarak bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren, sabırla çalışmalarına desteğini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Sacide Altınöz'e,

Yüksek lisans eğitimim boyunca öğrettikleri değerli bilgiler için Analitik Kimya Anabilim Dalımızın saygıdeğer hocalarına,

Yardımları ve gösterdikleri samimiyet için beraber çalışma şansını yakaladığım başta öğretim görevlisi İncilay Süslü ve araştırma görevlisi arkadaşlarıma,

Yüksek lisans eğitimime gösterdikleri destekten dolayı Eczacıbaşı ve Eczacıbaşı-Zentiva yöneticileri ve çalışma arkadaşlarıma,

Bu günlere gelmemi sağladıkları için sevgi ve desteklerini hep arkamda hissettiğim sevgili aileme teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Uyar, B. Rosuvastatin Kalsiyumun Elektrokimyasal Davranışlarının İncelenmesi ve Farmasötik Preparatlardan Miktar Tayini, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2009. Bu tez çalışmasında, primer hiperkolesterolemi ve kombine dislipidemi tedavisinde kullanılan, Hidroksi Metil Glutaril Ko-enzim A redüktaz (HMG-KoA) inhibitörü rosuvastatin kalsiyumun elektrokimyasal davranışları dönüşümlü voltametri (CV) ve kronoamperometri (CA) yöntemleri ile incelenmiştir. Rosuvastatin kalsiyumun indirgenmesi sonucu oluşan akımın difüzyon kontrollü olduğu bulunmuştur. Ayrıca tersinirlik testleri incelendiğinde elde edilen sonuçlara göre indirgenme tepkimesinin tersinmez olduğu düşünülmektedir. CV ve CA yöntemleri ile yapılan çalışmalarda rosuvastatin kalsiyumun difüzyon katsayısı $5.79 \times 10^{-5} \pm 2.231 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ sn}^{-1}$, olası mekanizma önerisine göre aktarılan elektron sayısı ise 2 olarak hesaplanmıştır. Farmasötik preparatlardaki rosuvastatin kalsiyumun tayini için diğer voltametrik yöntemlerden çok daha hızlı tarama olanağı sağlaması ve duyarlılığının yüksek olması nedeniyle kare dalga voltametri yöntemi seçilmiş ve geliştirilmiştir. Rosuvastatin kalsiyumun pH 5 asetat tamponu destek elektroliti içerisinde çalışma elektrotu olarak asılı duran civa elektrotu (HMDE), referans elektrot olarak Ag/AgCl ve karşıt elektrot olarak platin elektrot sistemi kullanılarak -1184 mV'da indirgenme piki gözlenmiştir. Bu yöntemde optimum cihaz parametreleri olarak frekans 70 Hz, adım yüksekliği 4 mV ve puls genliği 25 mV seçilmiştir. Geliştirilen bu yöntem ICH analitik yöntem validasyon parametrelerine göre değerlendirilerek tamamen valide edilmiştir. Rosuvastatin kalsiyum için doğrusallık aralığı $0.2-10.00 \mu\text{g mL}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Gözlenebilme sınırı ve alt tayin sınırı sırası ile 0.07 ve $0.20 \mu\text{g mL}^{-1}$ olarak saptanmıştır. Bu validasyon çalışmalarının sonucunda hızlı, duyarlı ve tekrarlanabilir sonuçlar veren, doğru, kesin, seçici, tutarlı kare dalga voltametrisi yöntemi rosuvastatin kalsiyum etkin maddesini içeren farmasötik preparatlara uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar kaynaklardaki spektrofotometrik ve kapiller elektroforez yöntemlerinin verileri ile karşılaştırılmış aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Anahtar Kelimeler: Rosuvastatin kalsiyum, kare dalga voltametrisi, dönüşümlü voltametri, kronoamperometri, tablet

ABSTRACT

Uyar, B. Investigation of Electrochemical Behaviour of Rosuvastatin Calcium and Its Determination in Pharmaceutical Preparations. Hacettepe University, Health Sciences Institute, Analytical Chemistry Program, Master of Sciences Thesis, Ankara, 2009. In this thesis, electrochemical behaviour of rosuvastatin calcium which is a hydroxyl methyl glutaryl Co-A inhibitor (a member of statin group) used for the treatment of hypercholesterolemia and dyslipidemia was investigated with cyclic voltammetry (CV) and chronoamperometry (CA) methods. According to these studies it is assumed that the reduction current is a diffusion-controlled and the process is irreversible. The results from the CV and CA were calculated and diffusion coefficient was found as $5.79 \times 10^{-5} \pm 2.231 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ sn}^{-1}$. According to proposed reaction mechanism it is assumed that 2 electrons were transferred. For the determination of rosuvastatin calcium from the pharmaceutical preparations, square wave voltammetry (OSVV) method is selected and developed because it is more sensitive and faster than the other voltammetric methods. Rosuvastatin calcium's reduction peak was seen at -1184 mV in pH 5 acetate buffer while hanging mercury drop electrode (HMDE) used as working electrode, an Ag/AgCl electrode used as reference electrode and a platinum wire used as counter electrode. 70 Hz frequency, 4 mV scan increment and 25 mV pulse amplitude were chosen as optimum parameters. This method was validated according to the ICH guideline on analytical method validation parameters. Linearity for rosuvastatin calcium was found between 0.20 and 10.00 $\mu\text{g mL}^{-1}$. While the limit of detection for rosuvastatin calcium was 0.07 $\mu\text{g mL}^{-1}$, the limit of quantification was 0.20 $\mu\text{g mL}^{-1}$. As a result of these validation studies, robust, accurate and precise square wave voltammetric method which gives rapid, sensitive and repeatable results, was applied to the determination of rosuvastatin calcium in pharmaceutical preparations. The results obtained from developed methods were compared with a spectrophotometric method and a capillary electrophoresis method reported in the literature and no significant difference was found statistically.

Key words: Rosuvastatin calcium, square wave voltammetry, cyclic voltammetry, chronoamperometry, tablet

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
TABLolar DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Dislipidemi ve Hiperkolesterolemi	3
2.1.1 Hiperkolesterolemi Tedavisinde Kullanılan İlaçların Sınıflandırılması	11
2.2. Rosuvastatin Kalsiyum	13
2.2.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	14
2.2.2. Farmakodinamik Özellikleri	15
2.2.3. Farmakokinetik Özellikleri	15
2.2.4. Klinik Kullanım Şekli ve Dozu	16
2.2.5. Yan Etkileri ve İlaç Etkileşimleri	16
2.2.6. Kullanım Alanı (endikasyonları)	17
2.2.7. Kullanılmaması Gerekli Durumlar	17
2.3. Rosuvastatin Kalsiyumun Analiz Yöntemleri	18
2.3.1 Kromotagrofik Yöntem	18
2.3.2 Spektrofotometrik Yöntem	22
2.3.3 Kapiller Elektroforez Yöntemi	23
2.4. Elektroanalitik Yöntemler	23

2.4.1.	Voltametri	26
2.4.2.	Polarografi	32
2.4.3.	Dönüşümlü Voltametri ve Doğrusal Taramalı Voltametri	45
2.4.4.	Kronoamperometri (CA)	47
2.4.5.	Sıyırma Voltametrisi	49
2.4.6.	Kare Dalga Voltametrisi (SWV-OSWV)	53
3.	GEREÇ VE YÖNTEM	58
3.1.	Tez Çalışmasında Kullanılan Gereçler	58
3.1.1.	Cihazlar	58
3.1.2.	Kimyasal Maddeler	58
3.1.3.	Cam Malzemeler ve Diğer Sarf Malzemeleri	59
3.1.4.	Analizi Yapılan Farmasötik Preparatlar	59
3.2.	Deneyler İçin Gerekli Hazırlıklar	59
3.2.1.	Etkin Maddelerin Saflığı	59
3.2.2.	Çözeltilerin Hazırlanması	60
3.2.3.	Farmasötik Preparatların Analize Hazırlanması	61
3.2.4.	Sentetik Preparatların Hazırlanması	62
3.2.5.	Malzemelerin Temizliği	62
3.3.	Analiz Yöntemlerinin Geliştirilmesi	64
3.3.1.	Voltametrik Yöntemler	64
3.3.2.	Geliştirilen Yöntemin Validasyonu	65
3.3.3.	Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması	68
4.	BULGULAR	69
4.1.	Saflık Kontrolü Bulguları	69
4.1.1.	Erime Noktası	69

4.1.2.	Rosuvastatin Kalsiyumun IR Spektrumu	69
4.1.3.	Rosuvastatin Kalsiyumun UV Spektrumu	71
4.2.	Voltametrik Yönteme Ait Analiz Bulguları	71
4.2.1.	Destek Elektrolit Seçimi	71
4.2.2.	Optimum Cihaz Parametrelerinin Belirlenmesi	72
4.3.	Yöntemin Validasyonu	75
4.4.	Farmasötik Preparatların Analiz Bulguları	83
4.5.	Dönüşümlü Voltametri Bulguları	84
4.6.	Kronoamperometri Bulguları	86
5.	TARTIŞMA	87
5.1.	Çözücü ve Destek Elektrolit Seçimi	87
5.2.	Elektroanalitik Yöntemin Seçimi	90
5.3.	Optimizasyon Sonuçları	92
5.4.	OSWV Yönteminin Validasyon Sonuçları	93
5.4.1.	Kararlılık	93
5.4.2.	Doğrusallık	93
5.4.3.	Duyarlılık	94
5.4.4.	Doğruluk ve Kesinlik	94
5.4.5.	Sağlamlık	96
5.4.6.	Tutarlılık	97
5.4.7.	Özgünlük (Seçicilik)	97
5.4.8.	Geri Kazanım	99
5.5.	OSWV Yönteminin Farmasötik Preparatlara Uygulanması	99
5.5.1.	OSWV Yönteminin Kaynaktaki Başka Bir Yöntemle Karşılaştırılması	99
5.6.	Dönüşümlü Voltametri (CV) ve Kronoamperometri (CA)	100
5.6.1.	CV ile Akımın Karakterinin Bulunması	100
5.6.2.	CV ile Elektrot Tepkimesinin Tersinirliğinin Bulunması	102

5.6.3. CV ile α n Değerinin Bulunması	103
5.6.4. CA ile Difüzyon Katsayısının Bulunması	103
5.7. Olası Mekanizma Önerisi	104
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	105
KAYNAKLAR	107
EKLER	113
ÖZGEÇMİŞ	123

SİMGELER VE KISALTMALAR

UV	Ultraviyole
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
OSWV	Kare Dalga Voltametrisi
CV	Dönüşümlü Voltametri
CE	Kapiller Elektroforez
CA	Kronoamperometri
IR	İnfrared
α_n	Hız belirliyen basamakta aktarılan elektron sayısı
α	Elektrot reaksiyonunun yük transfer katsayısı
E_p	Pik potansiyeli
$E_{p/2}$	Yarı pik potansiyeli
$E_{1/2}$	Yarı dalga potansiyeli
MeOH	Metanol
NaOH	Sodyum Hidroksit
μL	Mikrolitre
dk.	Dakika
LOD	Gözlenebilirlik sınırı
LOQ	Alt tayin sınırı
M	Molar
N	Normal
mL	Mililitre
mg	Miligram
ng	Nanogram
$\bar{X}$	Aritmetik ortalama
BH	% Bağlı Hata
r	Korelasyon katsayısı
R, r^2	Tanımlayıcılık katsayısı
SH	Standart Hata
SS	Standart Sapma

BSS	Bağıl Standart Sapma
LDL	Düşük Dansiteli Lipoprotein
VLDL	Çok Düşük Dansiteli Lipoprotein
HDL	Yüksek Dansiteli Lipoprotein

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1. Kolesterol'den D vitamini ve hormonların sentezlenmesi.....	5
Şekil 2. 2. Kolesterol sentezi	5
Şekil 2. 3. Vücutta Kolesterolün Taşınması	7
Şekil 2. 4. Kolesterol biyosentezinin düzenlenmesi	13
Şekil 2. 5. Rosuvastatin kalsiyumun kimyasal yapısı.....	14
Şekil 2. 6. Elektroanalitik yöntemlerin sınıflandırılması.....	25
Şekil 2. 7. Elektrokimyasal işlemlerin gerçekleştirildiği düzenek.....	26
Şekil 2. 8. İki elektrotlu polarografik sistem	28
Şekil 2. 9. İşlemci katlandırıcılı, potansiyoslatlı, 3 elektrotlu sistem.....	29
Şekil 2. 10. Bilgisayar kontrolü elektrokimyasal ölçüm bileşenleri	30
Şekil 2. 11. Voltametrde kullanılan potansiyel uyarma sinyalleri.....	32
Şekil 2. 12. Polarografide gözlenen akım-potansiyel ilişkisi	33
Şekil 2. 13. Puls ömrü içinde faradaik ve kapasitif akımların zamanla değişimi (i_f = faradaik akım, i_k = kapasitif akım)	45
Şekil 2. 14. CV'de a) Döngüsel (üçgensel) potansiyel tarama profili b) Elde edilen akım potansiyel eğrileri	46
Şekil 2. 15. CA'de a) çalışma elektrotuna uygulanan potansiyel programı, b) elde edilen akım-zaman eğrisi	47
Şekil 2. 16. CA'de E_1 ve E_2 potansiyellerinin seçimi.....	48
Şekil 2. 17. Sıyırma tekniklerinde potansiyel-zaman profili.....	51
Şekil 2. 18. Bir kare dalga voltametrisinde uyarma sinyalinin oluşumu.	55
Şekil 2. 19. OSWV'de tersinir bir tepkime için net akım.....	56
 Şekil 4. 1. Rosuvastatin kalsiyumun IR spektrumu.....	 70
Şekil 4. 2. $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ rosuvastatin kalsiyum çözeltisinin UV spektrumu	71
Şekil 4. 3. OSWV yönteminde frekans değişiminin etkisi (adım yüksekliği: 5 mV, puls genliği: 25 mV)	73
Şekil 4. 4. OSWV yönteminde adım yüksekliği değişiminin etkisi (f : 50 Hz, puls genliği : 25 mV)	73

Şekil 4. 5. OSWV yönteminde puls genliği değişiminin etkisi (f : 50 Hz,.....	74
Şekil 4. 6. Rosuvastatin kalsiyumun kare dalga voltamogramları a) Destek elektrolit, b) 5.26 $\mu\text{g mL}^{-1}$ rosuvastatin kalsiyum	75
Şekil 4. 7. Rosuvastatin kalsiyumun OSWV yöntemi ile analizinde elde edilen kalibrasyon eğrisi	76
Şekil 4. 8. Rosuvastatin kalsiyumun OSWV yöntemine ait yöntem doğrusallığı kontrol grafiği.....	78
Şekil 4. 9. Destek elektrolitin ve 10.00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ rosuvastatin kalsiyum çözeltisinin pH 5 asetat tamponunda çekilen dönüşümlü voltamogramları ..	85
Şekil 4. 10. Artan tarama hızlarında rosuvastatin kalsiyumun dönüşümlü voltamogramları	85
Şekil 4. 11. Destek Elektrolitin kronoamperometrik voltamogramı.....	86
Şekil 4. 12. pH 5 asetat tamponunda rosuvastatin kalsiyumun kronoamperometrik voltamogramı	86
Şekil 5. 1. Destek elektrolit ve artan rosuvastatin kalsiyum derişimi.....	89
Şekil 5. 2. 3.22 $\mu\text{g mL}^{-1}$ derişimde rosuvastatin kalsiyumun pH 5 asetat tamponu içindeki a. Destek elektrolit b. DPP polarogramı c. OSWV voltamogramı	92
Şekil 5. 3. a) Plasebo çözeltisi b) Standart c) Crestor® tablet d) Sentetik tablete ait voltamogramlar.....	98
Şekil 5. 4. Tarama hızının kareköküne karşı pik akımı grafiği	101
Şekil 5. 5. Tarama hızının logaritmasına (log v) karşı pik akımının logaritması (log i_p) grafiği.....	101

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 2. 1. Kan toplam kolesterol LDL ve HDL düzeyleri	11
Tablo 2. 2. Sınır akımı çeşitleri ve farklı parametreler ile değişimi.....	38
Tablo 4. 1. Rosuvastatin çözeltisinin pH 5.00 ve pH 6.00'da farklı destek elektrolitlerde OSWV pik akımı değerleri	72
Tablo 4. 2. Rosuvastatinin OSWV yöntemi ile analizinden elde edilen kalibrasyon eğrisinin korrelasyon katsayısı ile doğrusallıktan ayrılış önem kontrolü için yapılan istatistiksel hesaplamalar*	77
Tablo 4. 3. OSWV yöntemine ait kalibrasyon eğrilerinin özellikleri.....	77
Tablo 4. 4. OSWV yönteminin, gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk analiz bulguları	79
Tablo 4. 5. OSWV yönteminin tekrarlanabilirliğine ait analiz bulguları.....	80
Tablo 4. 6. OSWV yönteminin sağlamlığına ait analiz bulguları	81
Tablo 4. 7. Farklı iki analizciye ait tutarlılık sonuçları.....	82
Tablo 4. 8. Sentetik tablet preparatlarının analiz bulguları.....	83
Tablo 4. 9. Crestor® tablete ait analiz bulguları.....	84
Tablo 5. 1. Analiz sırasında denenen tuzlar ve derişimleri.....	90

1. GİRİŞ

Kalp ve damar (kardiyovasküler) hastalıkları, günümüzde gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde başta gelen mortalite (ölüm) ve morbidite (iş görmezlik) nedenlerindendir. Dislipidemi ise kardiyovasküler hastalıklar için en önemli risk faktörleri arasında yer almaktadır. Dislipidemi, kandaki yağların oranlarındaki ve düzeylerdeki bozukluklardır. Kolesterol, kanda dolaşan bir yağ maddesidir. Yüksek kan kolesterol düzeyleri ateroskleroz (damar sertliği) ve arter duvarlarında kolesterol lezyonları toplanmakta ve tıkaçıcı vasküler hastalık gelişimine zemin hazırlamaktadır. Kolesterol metabolizması bozuklukları, kalıtsal kaynaklı (primer) veya diyabet, obezite, hipotiroidizm, nefrotik sendrom, karaciğer hastalıkları veya alkol kötü kullanımında olduğu gibi diğer hastalıklara (sekonder) bağlı olarak görülmektedir (1,2).

Rosuvastatin kalsiyum, primer hiperkolesterolemi ve kombine dislipidemili hastaların tedavisinde kullanılan bir ilaçtır. Diğer statin grubu ilaçlara göre LDL seviyesinde çok daha belirgin bir düşüş sağlamaktadır. Etkisini, kolesterol biyosentezinde yer alan HMG-KoA redüktaz enzimini inhibe ederek göstermektedir (3-5).

Kaynaklarda rosuvastatin kalsiyumun farmasötik preparatlardan tayini için yüksek performanslı sıvı kromatografisi (6), yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi (7), spektrofotometri (8) ve kapiller elektroforez yöntemi (9) geliştirilmiştir. Ayrıca plazmadan da yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile analizleri (10-20) yapılmıştır. Rosuvastatin kalsiyumun bozunma ürünlerinin analizi için yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi (21) geliştirilmiştir.

Rosuvastatin kalsiyumun kaynaklarda elektrokimyasal yöntem ile tayinine rastlanmamıştır. Kaynaklardaki bu boşluk göz önüne alınarak farmasötik preparatlardan rosuvastatin kalsiyumun analizi için kare dalga voltametrisi yöntemi geliştirilmesi ve valide edilmesi planlanmıştır.

Rosuvastatin kalsiyumun analizinde çeşitli deneysel ve cihaz parametreleri için optimum koşullar saptanacaktır. Yöntem geliştirildikten

sonra doğruluk, kesinlik, özgünlük, duyarlılık, sağlamlık ve tutarlılık gibi validasyon parametreleri değerlendirilecektir. Valide edilmiş yöntem, Türkiye ilaç piyasasında bulunan, rosuvastatin kalsiyum içeren farmasötik preparatlara uygulanacaktır. Geliştirilen bu yöntemden elde edilen sonuçlar kaynaktaki spektrofotometrik analiz yöntemi (8) ve kapiller elektroforez yöntemi (9) ile karşılaştırılıp sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilecektir.

Ayrıca rosuvastatin kalsiyumun elektrokimyasal davranışları dönüşümlü voltametri ve kronoamperometri yöntemleri ile incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Dislipidemi ve Hiperkolesterolemi

Dislipidemi, kandaki yağların oranlarındaki ve düzeylerindeki bozukluklardır. Bir tanı değil, bir laboratuvar bulgusudur. Hiperkolesterolemi, hipertrigliseridemi, şilomikronemi vs şeklinde sınıflandırılır. Ailesel olabildiği gibi başka bir hastalığa bağlı olarak veya kişinin diyetinden kaynaklanan sebeplerden dolayı ortaya çıkar. Trigliserid ise kanda dolaşan bir yağ maddesi olup, yüksekliği kalp krizi ve inme riskini artırmaktadır (1,2)

Kolesterol kanda dolaşan diğer bir yağ maddesidir ve vücudumuzu oluşturan hücrelerin önemli bir yapı taşıdır. Kolesterol suda çok az çözüldüğünden kanın sulu kısmında taşınamaz. Kolesterolün kanda taşınması, suda çözünebilen, kolesterol ve diğer yağ türevlerini taşıyabilen lipoproteinler aracılığıyla olur. Bu lipoproteinlerin yüzeyinde yer alan proteinler, kolesterolün hangi hücrelerden alınıp hangi hücrelere taşınacağını belirler.

Kolesterol iki yoldan oluşmaktadır. Birincisi karaciğer yoluyla olup bu vücudumuzdaki kolesterolün %75'ini oluşturur. İkincisi; kolesterolün geri kalan %25'lik kısmı ise yediğimiz yiyecekler yoluyla meydana gelir.

Kolesterolü kabaca iyi ve kötü kolesterol diye ikiye ayırabiliriz. Kötü kolesterol ya da düşük yoğunluklu lipoproteinler (LDL), kalp krizi ve inme sıklığını artırırken, iyi kolesterol ya da yüksek yoğunluklu lipoproteinler (HDL) ise kalp krizi ve inmeyi azaltmaktadır.

Vücuttaki kolesterolün çoğu vücut tarafından üretilir. Günlük üretimin %20-25'i karaciğerde gerçekleşir, ayrıca, ince bağırsak, adrenal bezler ve üreme organlarındaki sentezlenme miktarı diğer dokulara kıyasla daha yüksektir. Yaklaşık 70 kg ağırlığındaki bir kişinin vücudunda toplam 35 g kolesterol vardır. Günlük dahili üretim miktarı 1 g, besin yoluyla alınan miktar ise 200-300 mg'dır. Bağırsaklara (safra ve besin yoluyla) giren 1.200-1.300 mg'ın yarısı kana geçer.

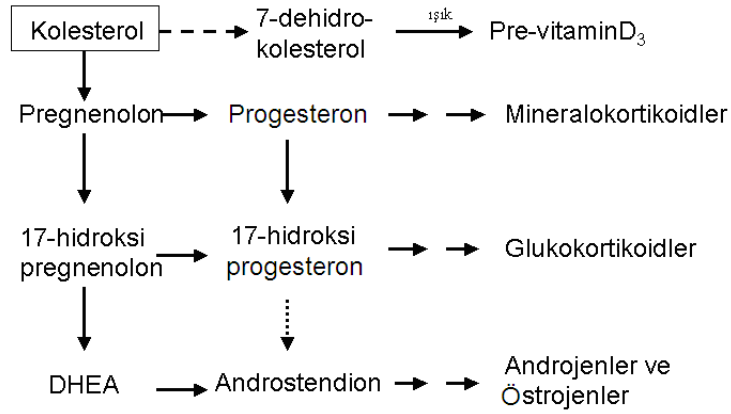
Vücudumuzdaki hücrelerin fonksiyonlarını yerine getirebilmesi için kolesterole ihtiyacı vardır. Fakat bu kolesterol gereğinden fazla olursa

damarların duvarlarında birikerek 'aterosklerotik plak' denilen yapıları oluşturur. Bu plaklar zamanla büyüyerek damar boşluğunu daraltır. Bu daralma bazen yavaş, bazen de plağın yırtılıp kanla temasa geçmesi halinde hızlı olabilmektedir. Damar boşluğunun hızlı ya da yavaş daralması sonucu bu damar yapılarının beslemiş olduğu organlara yeterli kan gitmemekte, bunun sonucunda kalp krizi ya da inme gibi hayatı tehdit edici durumlar oluşmaktadır (1,2).

Kan kolesterol düzeyinin yüksek olması kalp damar hastalığı riskini artırır. Kişinin kolesterol düzeyi ne kadar yüksekse, kalp hastalığı olma ihtimali de o kadar yükselir. Türkiye'de erkek ve kadında birinci sırada gelen ölüm nedeni kalp damar hastalığıdır.

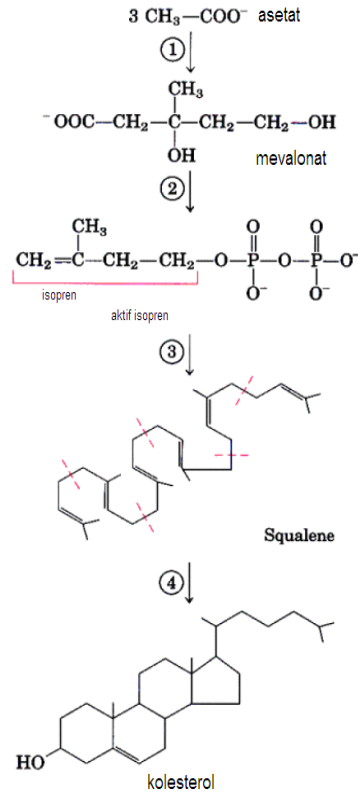
Kolesterol Sentezi

Kolesterol, beyin, sinirler, kalp, bağırsaklar, kaslar, karaciğer başta olmak üzere tüm vücutta yaygın olarak bulunan ve yaşam için gerekli olan bir çeşit yağdır. Kolesterol hücre zarlarının (membranlarının) yapımı ve bakımı için gereklidir. Kolesterol içeren membranlar daha geniş sıcaklık aralığında akışkanlıklarını korurlar. Kolesterol vücutta hormon (kortizon, seks hormonu), D vitamini ve yağları sindiren safra asitlerinin sentezlenmesinde kullanılır (Şekil 2. 1). Ayrıca yağda çözünen vitaminlerin (A, D, E ve K vitaminleri gibi) metabolizmasında rolü önemlidir. Aldosteron, testosteron, östrojen ve progesteron gibi steroid hormonlarının ve kortizolun sentezlerinde yer alır. Başka araştırmalar kolesterolün sinir hücreleri arasındaki sinapslarda ve bağışıklık sistemi hücrelerinin işlevlerinde rol oynadığını gösterir. Hücre membranının yapısına etkisi sonucunda hücre sinyal iletimine ve membranlardaki iyon ve proton geçirgenliğine de etki eder.



Şekil 2. 1. Kolesterol'den D vitamini ve hormonların sentezlenmesi

Kolesterol çoğu hücre ve dokuda HMG-KoA redüktaz enziminin başlattığı mevalonat yolu adlı reaksiyon zinciri ile sentezlenir (Şekil 2.2)



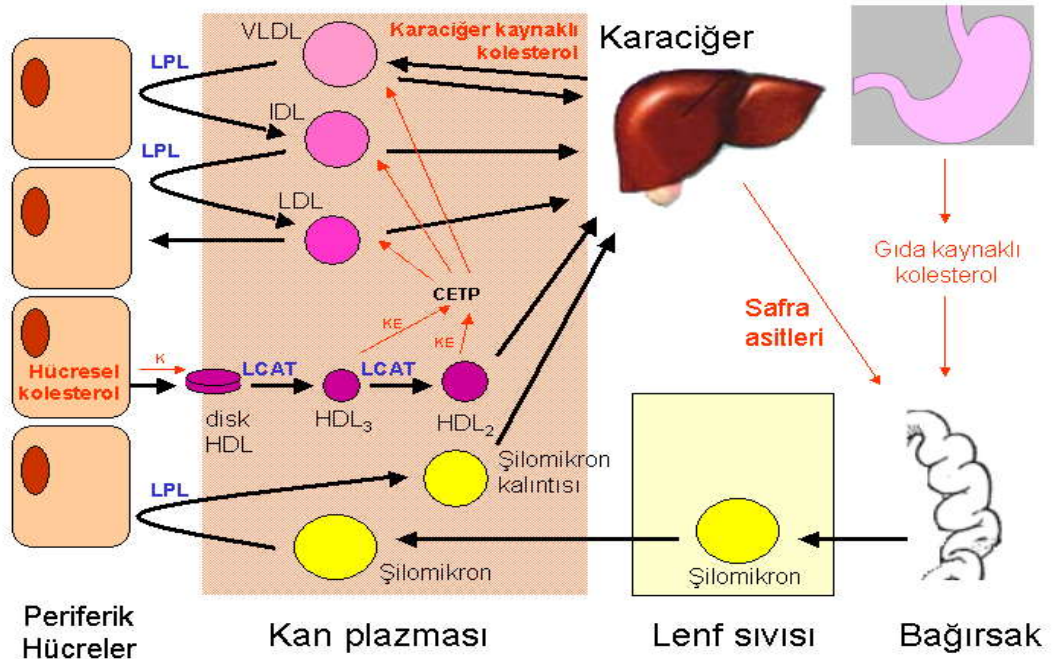
Şekil 2. 2. Kolesterol sentezi

* **Squalene** bütün yaşayan canlılarda bulunan doymamış yağ oranı yüksek hidrokarbondur.

Vücut İçinde Taşınması

Kolesterol kan dolaşımında serbest olarak dolaşmaz. Bunlar proteinlere bağlı olarak kan içinde taşınırlar (Şekil 2. 3).

Şilomikronlar kolesterol ve trigliseritleri ince bağırsaktan karaciğere taşır. Bu kolesterolün bir kısmı besin yoluyla edinilmiştir, bir kısmı ise vücudun sentezleyip karaciğerden salgıladığı safradan kaynaklanır. Şilomikronlar taşıdıkları lipidlerin bir kısmını vücuttaki dokulara bırakıp sonra karaciğer tarafından alınırlar. Şilomikronların kalmadığı yemek arası zamanlarda ise kolesterolün başlıca kaynağı karaciğerdir. Karaciğerde üretilen kolesterol ve diğer lipidlerin vücuttaki diğer dokulara ulaştırılması için çok düşük yoğunluklu lipoproteinlerin (VLDL) içinde kana salgılanır. VLDL'de bulunan trigliserit ve kolesterol hücrelere aktarıldıkça VLDL'in yapısı ve yoğunluğu değişir; önce orta yoğunlukta lipoproteine (IDL), sonra da düşük yoğunluklu lipoproteinlere (LDL) dönüşür. LDL, kan kolesterolünün yaklaşık olarak %70'ini taşımaktadırlar. Kan damarları duvarlarına girebilmek için yeterince küçüktürler ve damarlara zarar verirler. Kötü kolesterol olarak da adlandırılırlar. Bu sürecin sonunda arta kalan kolesterolü içeren LDL karaciğer tarafından geri alınır. Kandaki LDL miktarının yüksek olması bu lipoproteinlerin arter damarlarının çeperlerinde birikmesine yol açar, bu da aterosklerozun ilk aşamasıdır. Yüksek yoğunluklu lipoproteinler (HDL) ise vücut hücrelerinde sentezlenen kolesterolü vücuttan atılması için karaciğere taşır. Kolesterolün bir cins ters naklini yaptığı için iyi kolesterol olarak adlandırılır.



Şekil 2. 3. Vücutta Kolesterolün Taşınması

(Kalın siyah oklar, kolesterol ve diğer lipidleri taşıyan lipoproteinlerin oluşumlarını, dönüşümlerini ve kan dolaşımından çıkışlarını, kırmızı ince oklar, kolesterol veya kolesterol türevlerinin (kolesterol esterler ve safra asitleri) hareketlerini, K, kolesterol; KE, kolesterol ester; LPL, lipoprotein lipaz; LCAT, lesitin kolesterol asiltransferaz; CETP, kolesterol ester transfer proteini göstermektedir).

Hiperkolesterolün Vücuttaki Etkileri

Kanda kolesterol ve LDL'nin yüksek olması hastalar için yüksek risk oluşturmaktadır. Ayrıca HDL'nin düşük olması da bir risktir. Bu riske sahip hastalarda, kalp krizi, felç, damar tıkanıklığı, böbrek yetersizliği gibi hastalıkların ortaya çıkma olasılığı artmaktadır.

Kanda kolesterolün yüksek olması, yağ metabolizması bozukluğunun olduğunu gösterir. Yağ metabolizması bozukluğundan şüphe edilen bir hastada yapılması gereken işlem, kan alınarak öncelikle toplam kolesterol, LDL, HDL ve trigliserid düzeylerinin ölçülmesidir.

Kanda fazla miktarda kolesterol varsa, kolesterol akyuvarlar, kan

pıhtısı, kalsiyum gibi maddelerle beraber kan damarlarının duvarlarında birikir ve kan damarlarının sertleşmesine, daralmasına (ateroskleroz) yol açar. Halk arasında bu olay, damar sertliği ya da damar kireçlenmesi olarak bilinmektedir.

Kandaki kolesterollerin etkilerine bakıldığında, bunun cevabı kolaylıkla bulunabilir. LDL karaciğerde üretilmekte ve kana verilmektedir. Kana verildikten sonra bu LDL kan damarlarının duvarlarında birikmektedir. Damarlardaki bu birikintiler “aterosklerotik plak” olarak adlandırılmakta ve bunların büyümesi halinde damar boşluğu daralmaktadır. HDL, LDL’nin tam tersi etkiye sahiptir. Kanda dolaşan kolesterolü toplayıp, vücuttan atılmasını sağlamak üzere karaciğere getirmektedir. Böylece kan damarlarının kolesterolün zararlı etkilerine maruz kalmasını azaltmaktadır. Kolesterol karaciğerden hücrelere ve hücrelerden tekrar karaciğere kan yoluyla taşınır. Kolesterol ve diğer yağlar kanda erimedikleri için lipoprotein denen paketler halinde taşınırlar. Bunlardan kolesterolü taşıyanlar iki cinstir: Kötü kolesterol olarak bilinen LDL ve iyi kolesterol olarak bilinen HDL. LDL kanda kolesterolü taşıyan başlıca pakettir. Kanda yüksek olduğu zaman damarların iç yüzüne yapışıp buralarda plaklar oluşturur. Kolesterol dışındaki bazı maddelerin de eklenmesiyle bu plaklar büyür ve bunlar üzerinde oluşan çatlaklarda oluşan pıhtılar damarları tıkar. Çağımızda çok yaygın olan bu hastalık “damar sertliği” olarak bilinir. Damar tıkanıklığı kalp damarlarında olmuştaysa kalp krizine, beyin damarlarında olmuştaysa felce neden olur.

Kandaki kolesterolün bir bölümü de HDL adı verilen paketlerin içinde taşınır. HDL damarlarda kolesterolün birikimini önler. Yapılan araştırmalar HDL’yi yüksek olan kişilerde kalp hastalığının daha az olduğunu göstermiştir. Türk Kardiyoloji Derneğinin yapmış olduğu araştırmalarda Türk toplumunda HDL-K değerinin düşük olduğu gözlenmiştir. Sigara içme ve şişmanlık iyi kolesterolü düşürür, düzenli egzersiz yükseltir.

HDL düşüklüğü için erkek ve kadınlarda farklı değerler vardır. Kadınlarda 50 mg dL^{-1} , erkeklerde 40 mg dL^{-1} ’nin altında olması durumunda HDL düşüklüğünden bahsedilmektedir. Türk toplumunda genel olarak HDL değerleri daha düşük bulunmaktadır.

Hiperkolesterol Kontrol Altına Alınması ve Tedavisi

Yüksek kolesterolün kontrol altına alınması ile yaşam süresinin uzadığı, kalp ve damar hastalıklarına bağlı ölümlerin azaldığı ve kalıcı sakatlıkların önlendiği kesin olarak gösterilmiştir. Kolesterol yüksekliğine ilaveten şişmanlık, yüksek tansiyon, şeker hastalığı, sigara gibi diğer kardiyovasküler risk faktörlerinin tedavisi de planlanmalıdır. Tedavi 2 aşamada gerçekleştirilir (1,2).

1.İlaç dışı tedavi.

2.İlaç tedavisi.

İlaçsız tedavilerin başında, beslenme alışkanlığının değiştirilmesi gelir. Bu durum yüksek kolesterol tedavisinin olmazsa olmaz koşuludur. Vücut, gereksinimi olan kolesterolü kendisi üretebildiği için, diyetle kolesterol almaya gerek yoktur. Beslenme konusunda tedavi planı, beslenme uzmanı ile birlikte yapılmalıdır. Doymuş yağlardan ve kolesterolden fakir diyet seçilmelidir. Sıvı yağlarda doymamış yağ daha fazladır, bu nedenle sıvı yağlar tercih edilmelidir. Genel olarak sebze, meyve ve hububat tercih edilmelidir. Kızartmalardan kaçınılmalı ve tercihen kırmızı et yerine beyaz et tüketilmelidir. Karaciğer, böbrek ve beyin gibi kolesterolü fazla olan etlerden uzak durulmalıdır. Yüksek tansiyonu bulunan hastaların tuzu azaltmaları gereklidir. Gıdaların yağ ve kalori içeriklerine de dikkat edilmelidir. Yağı azaltılmış peynir, süt tercih edilmelidir. Diyet peynir, diyet süt kullanılsa bile bunların sınırlı miktarda tüketilmesi gerekmektedir.

Sigara kesinlikle bırakılmalıdır. Sigara da kolesterol yüksekliği gibi bir kardiyovasküler risk faktörüdür. Sigara ayrıca, akciğer kanseri, akciğer hastalığı, beyin kanaması ve birçok kansere de zemin hazırlar (22).

Hastada yüksek tansiyon varsa, yüksek tansiyon tedavisinde geçerli olan ilaç dışı tedaviler ihmal edilmemelidir. Yüksek tansiyon ve kolesterol yüksekliğinde uygulanan ilaç dışı tedaviler birbirine benzerlik gösterir. Yüksek tansiyonlu hastalarda, beslenme ile alınan tuzun da azaltılması gerekir.

Kolesterolü yüksek olan kişilerde şeker hastalığı kontrol altına

alınmalıdır. İnsülin kullanmak gerekiyorsa kaçınılmamalıdır. Şişmanlık kesinlikle kontrol altına alınmalıdır.

Düzenli egzersiz HDL (iyi kolesterol) yükseltir, LDL (kötü kolesterol) düşürür. Hastalar düzenli egzersiz yapmayı alışkanlık haline getirmelidirler. Haftada en az 3 tercihen 5 kez, 30-45 dk. süre ile yürüyüş, koşu, yüzme, bisiklete binme gibi sporlar yapılmalıdır (23).

Alkol, HDL-kolesterolü yükseltir, ancak alkolün insan sağlığı ve sosyal yaşantı üzerine çok sayıda olumsuz etkisi olduğu unutulmamalıdır. Bu nedenle, alkol alımı kesinlikle sınırlandırılmalıdır. İzin verilen alkol miktarı, erkeklerde günde 30 mL, kadınlarda günde 15 mL'dir.

İlaç tedavisinde kullanılan ilaçlar, yağ metabolizmasındaki bozuklukların düzenlenmesi amacıyla geliştirilmişlerdir.

Hiperkolesterolemi tedavisinde kullanılan bu ilaçlara ne zaman başlanacağı, ne kadar süre kullanılacağı ve hedef kolesterol, LDL, trigliserid düzeyleri, kesinlikle doktor denetiminde olmalıdır.

Her hasta için tedavi farklılıklar taşır. İlaç dışı tedaviler kesinlikle ihmal edilmemelidir. Tedavide hedef belirlenirken LDL düzeyinin esas alınması tercih edilir. Hedef LDL düzeyi hastada kalp ve damar hastalığının olup olmadığına göre üç şekilde değerlendirilir.

A. Kişide kalp ve damar hastalığı yoksa LDL düzeyinin 130 mg dL^{-1} 'nin altına düşürülmesi yeterlidir.

B. Kişide kalp ve damar hastalığı varsa hedef LDL düzeyi 100 mg dL^{-1} 'nin altı olmalıdır.

C. Kalp krizi geçirmişse, koroner arter daralmasına bağlı göğüs ağrısı varsa, koroner damar ameliyatı geçirmişse, koroner arterler balon ile genişletilmişse, beyine, böbreğe, bacaklara giden damarlarda kolesterol birikimi varsa hedef LDL düzeyi 100 mg dL^{-1} 'nin altına düşürülmelidir.

En iyi değer kolesterollerin kanda 'lipoprotein profili' olarak belirlenmesidir. Bu testin ideal sonuç verebilmesi için 9–12 saat önceden açlık sonrası yapılması gerekmektedir.

- Total kolesterol
- LDL (kötü) kolesterol
- HDL (iyi) kolesterol
- Trigliseritler

Aslında lipoprotein profiline bakıldığında total kolesterolün 200 mg dL^{-1} ve LDL kolesterolün 130 mg dL^{-1} 'in altında, HDL kolesterolün ise en az 40 mg dL^{-1} ve üzerinde olması önerilen değerler arasındadır (Tablo 2.1).

Tablo 2. 1. Kan toplam kolesterol LDL ve HDL düzeyleri

Düzeyleri	Toplam Kolesterol (mg/dL)	LDL (mg/dL)	HDL (mg/dL)
Normal	≤ 200	≤ 130	≥ 40
Sınırdan-Yüksek	200-240	130-159	-
Yüksek	≥ 240	≥ 160	≤ 60

2.1.1 Hiperkolesterolemi Tedavisinde Kullanılan İlaçların Sınıflandırılması

2.1.1.1 Lipoprotein Sentezini Azaltan İlaçlar ve Özellikleri

a) Hidroksi Metil Glutaril Ko-Enzim A Redüktaz (HMG-KoA) İnhibitörleri (Statinler)

HMG-Ko A redüktaz enzimi insanda kolesterol sentezinde hız kısıtlar. Kolesterol düşürücü tedavide uzun yıllar boyunca yapılmış çalışmalarla etkinlik ve güvenilirliklerini kanıtlamış statinler çok yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Kötü kolesterolü düşürmenin ve iyi kolesterolü artırmanın yanı sıra bu ilaçlar, yüksek kolesterol düzeyleri ile ilişkili kardiyovasküler olayları da azaltmaktadırlar (4).

Statinler jenerik adlarına göre aşağıda listelenmiştir.

— Atorvastatin, simvastatin, serivastatin, lovastatin, fluvastatin, mevastatin, pravastatin, pitavastatin ve rosuvastatindir.

b) Fibrik Asit Türevleri

Dallanmış yağ asidi esterleridir. Lipoprotein lipaz aktivasyonu ile etki gösterirler. Triglicerid ve VLDL'yi düşürürler (1,2).

c) Nikotinik Asid (Niasin) Ve Türevleri

Geniş spektrumlu antilipidemik etkilidir. Karaciğerde VLDL sentezini azaltır. Lipid salıverilmesinde görevli samp antagonistidir. Adipoz dokuda lipoliz inhibisyonu yapar. Trigliceridlerin karaciğerde esterifikasyonu azaltır ve lipoprotein lipaz aktivitesi artar. Yüksek dozda damar gevşetici (vazodilatör) etkisi vardır. Miyokart insidansını azaltırlar.

d) Probukol

Çok hidrofobik hidroksitoluen bileşiğidir. Yağ dokusunda aylarca kalır. Kolesterol sentezini, LDL ve VLDL miktarını azaltırlar.

2.1.1.2 Lipoprotein Katabolizmasını Artıran İlaçlar ve Özellikleri

a) Safra asidini bağlayan reçineler

Kolestiramin, kolestipol gibi ilaçlardır. Safra asidinin enterohepatik dolanımını engeller (HMG-KoA enziminin aktivasyonuna sebep olur = kolesterol sentezi) LDL reseptör sayısı artırır.

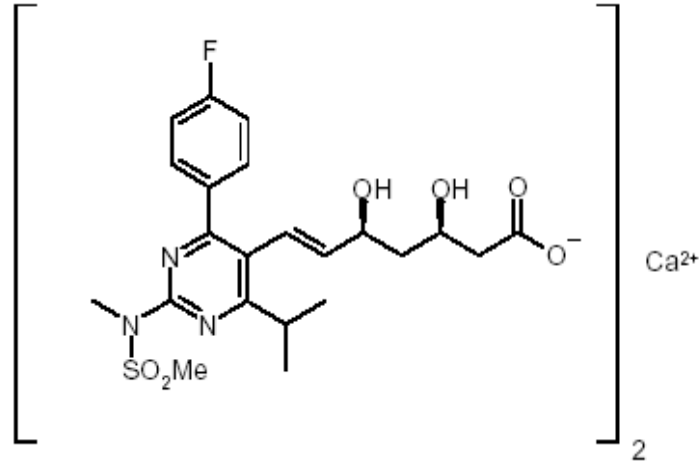
b) Neomisin

Absorbe olmayan (% 2 – 3) aminoglikozid yapısındadır. Yüksek dozda barsak antiseptiği olarak kullanılır. Düşük dozda (0.5 mg/kg) kolesterolü azaltır (% 20 – 30). Safra asidlerinin yaptığı "miseller" ile kompleks yapar.

Rosuvastatin kalsiyum etkisini, kolesterol biyosentezinde yer alan 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A'nın kolesterol prekürsörü olan mevalonat'a dönüşmesini sağlayan hız-kısıtlayıcı enzim olan HMG-KoA redüktaz'ın, selektif ve kompetitif olarak inhibe ederek göstermektedir (Şekil 2. 4) (3,5,24,25).

2.2.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Rosuvastatin kalsiyum, bis [(E)-7-[4-(4-florofenil)-6-izopropil-2-[metil (metilsülfonil) amino] primidin-5-il] (3R,5S)-3,5-dihidroxihept-6-enoik asit] kalsiyum tuzudur. Moleküler formülü $(C_{22}H_{27}FN_3O_6S)_2Ca$ şeklindedir. Açık formülü ise Şekil 2.5'de gösterilmiştir.



Şekil 2. 5. Rosuvastatin kalsiyumun kimyasal yapısı

Rosuvastatin kalsiyum beyaz renkte, kokusuz bir tozdur. Molekül ağırlığı 1001.14'dür ve erime noktası 122⁰C'dir. Suda ve etanolde çok az çözünür, metanolde çok çözünür. Rosuvastatin kalsiyumun, pH 7'de partiyon katsayısı (oktanol/su) 0.13 olan hidrofilik bir bileşiktir. Rosuvastatin kalsiyumun pK_a değeri 4.6'dır (26).

2.2.2. Farmakodinamik Özellikleri

Rosuvastatin kalsiyum 3-hidroksi 3-metilglutaril koenzim A'nın (HMG-KoA redüktaz), selektif ve kompetitif bir inhibitörüdür.

Rosuvastatin kalsiyumun temel olarak etki gösterdiği yer, kolesterolün düşürülmesinde hedef organ olan karaciğerdir.

Rosuvastatin kalsiyum, LDL'nin karaciğere girişi ve katabolizmasını artırmak suretiyle hücre yüzeyindeki hepatik LDL reseptörlerinin sayısını artırır ve VLDL'nin hepatik sentezini inhibe ederek VLDL ve LDL partiküllerinin sayısını azaltır.

İrk, cinsiyet ve yaşlarına bakılmaksızın hipertrigliseridemili veya hipertrigliseridemili olmayan hiperkolesterolemili yetişkin hasta gruplarında ve diyabet hastaları veya ailesel hiperkolesterolemili hastalar gibi özel hasta gruplarında etkilidir (3,5,24).

2.2.3. Farmakokinetik Özellikleri

Rosuvastatin kalsiyumun sistemik yararlanımı doz ile orantılı olarak artar. Günlük kullanılan dozlardan sonra farmakokinetik parametrelerde değişiklik yoktur (5,24,25,27-29).

2.2.3.1. Emilim

Oral alımdan yaklaşık 5 saat sonra doruk plazma konsantrasyonuna ulaşır. Mutlak biyoyararlanımı yaklaşık % 20'dir.

2.2.3.2. Dağılım

Kolesterol sentezi ve LDL klerensinin temel olarak yer aldığı karaciğere büyük oranda geçer. Rosuvastatin kalsiyumun dağılım hacmi yaklaşık 134 L'dir. Başta albumin olmak üzere plazma proteinlerine % 90 oranında bağlanır.

2.2.3.3. Metabolizma

Rosuvastatin kalsiyumun metabolizması sınırlıdır (yaklaşık %10). Belirlenen temel metabolitler N-desmetil ve lakton metabolitleridir. N-desmetil metaboliti, rosuvastatin kalsiyumdan % 50 daha az aktif iken lakton formu

linik olarak inaktiftir. HMG-KoA redüktaz inhibitör aktivitenin % 90'ından fazlası rosuvastatin kalsiyum tarafından gerçekleştirilir.

2.2.3.4. Eliminasyon

Rosuvastatin kalsiyumun yaklaşık % 90'ı değişmemiş olarak feçes ile (absorbe edilmiş ve edilmemiş maddeden oluşur), geri kalanı idrar ile atılır. Yaklaşık % 5'i idrarla değişmemiş olarak atılır. Plazma eliminasyon yarı ömrü yaklaşık 19 saattir. Eliminasyon yarı ömrü, yüksek dozlar ile artmaz.

2.2.4. Klinik Kullanım Şekli ve Dozu

Rosuvastatin kalsiyumun tavsiye edilen başlangıç dozu statine yeni başlayan hastalarda oral olarak, günde tek doz 5 mg'dır. Başka bir HMG-CoA redüktaz inhibitöründen geçilen hastalarda tavsiye edilen başlangıç dozu 5-10 mg'dır. 20 mg'lık dozun üstündeki dozlarda uzman kontrolü gereklidir. 40 mg doz ile advers etkilerin bildirilme sıklığında artış nedeniyle, sadece 20 mg doz ile yeterli yanıt alınamayan, kardiyovasküler hastalık riski yüksek olan ağır hiperkolesterolemili hastalarda düşünülmelidir. Rosuvastatin kalsiyum, yemekle birlikte veya ayrı olarak alınabilir.

2.2.5. Yan Etkileri ve İlaç Etkileşimleri

Baş ağrısı, sersemlik, kabızlık, bulantı, karın ağrısı, miyalji, asteni, döküntü, ürtiker. Anjiyoödem dahil hipersensitivite reaksiyonları, kaslarda görülen miyopati, rabdomiyoliz belirtilen yan etkilerdir. Dozun artırılması ile yan etki sıklığı artar. Diğer HMG-KoA redüktaz inhibitörlerinde olduğu gibi, rosuvastatin kalsiyum kullanan hastaların az bir kısmında doza bağlı olarak transaminaz düzeylerinde artış gözlenmiştir.

Rosuvastatin kalsiyum ve siklosporin birlikte kullanıldığında, rosuvastatin kalsiyumun EAA (Eğri altındaki alan) değerleri, sağlıklı gönüllülere göre 7 kat daha yüksek bulunmuştur. Siklosporinin plazma konsantrasyonunda bir değişikliğe neden olmamıştır.

Vitamin K antagonistleri (örneğin varfarin) kullanan hastalarda rosuvastatin kalsiyum tedavisine başlanırken veya dozu yükseltilirken INR (International Normalised Ratio) düzeyi yükselebilir. Tedavinin kesilmesi veya

dozun azaltılması INR düzeyini düşürür.

Gemfibrozil, fenofibrat, diğer fibratlar ve niasinin lipid düşürücü dozları, HMG-KoA redüktaz inhibitörleri ile birlikte kullanıldığında miyopati riskini artırır, bunun nedeni, muhtemelen bu ilaçların tek başına kullanıldığında da miyopatiye neden olmalarıdır. Rosuvastatin kalsiyum ve gemfibrozilin birlikte kullanılması, rosuvastatin kalsiyumun Cmaks. ve EAA değerlerinin 2 kat artması ile sonuçlanmıştır.

Rosuvastatin kalsiyumun 40 mg dozunun bir fibrat ile birlikte kullanılması kontrendikedir.

Alüminyum ve magnezyum hidroksit içeren bir antasit süspansiyon ile aynı anda kullanılması, rosuvastatin kalsiyumun plazma konsantrasyonunu yaklaşık % 50 azaltmıştır. Antasid, rosuvastatin kalsiyum verilmesinden 2 saat sonra verildiğinde bu etki azalmaktadır.

Eritromisin ile birlikte kullanılması, rosuvastatin kalsiyumun EAA (0-t) değerinde % 20, Cmax değerinde ise % 30 azalmasına neden olmuştur. Bu etkileşim, eritromisinin barsak motilitesini artırmasına bağlı olabilir.

Oral kontraseptifler ile birlikte kullanılması, etinil östradiol ve norgestrel'in eğri altında kalan alanında, sırasıyla % 26 ve % 34 oranında yükselmeye neden olmuştur.

2.2.6 Kullanım Alanı (Endikasyonları)

Diyet ve diğer farmakolojik olmayan tedaviler (örneğin egzersiz, kilo verme) ile yeterli yanıt alınamayan durumlarda primer hiperkolesterolemi (tip IIa heterozigot ailesel hiperkolesterolemi) ve kombine dislipidemili (tip IIb) hastalarda diyet yardımcı olmak üzere kullanılır. Homozigot ailesel hiperkolesterolemide diyet ve diğer lipid düşürücü tedavilerle (örn. LDL aferezi) kombine edilerek ya da bu tür tedavilerin uygun olmadığı durumlarda kullanılır.

2.2.7 Kullanılmaması Gerekli Durumlar (Kontrentikasyonları)

Rosuvastatin kalsiyum ya da ilacın içerdiği herhangi bir maddeye karşı aşırı duyarlılığı olanlarda, serum transaminaz düzeylerinde açıklanamayan inatçı

yükselmeler ve herhangi bir serum transaminaz düzeyinde normal düzeyin üst limitinin 3 katı oranında (3xULN) yükselme görülen aktif karaciğer hastalığı olanlarda, ağır böbrek yetmezliği olan hastalarda (kreatinin klerensi < 30 ml/dk.), miyopatisi olan hastalarda, birlikte siklosporin kullanan hastalarda, gebelik ve laktasyon döneminde ve doğurganlık çağında olup uygun doğum kontrol yöntemi uygulamayan kadınlarda 40 mg doz, miyopati/rabdomiyolize karşı hastayı duyarlı hale getirebilecek faktörlerin bulunduğu hastalarda kontrendikedir. Bu faktörler aşağıda verilmiştir.

- Orta derecede böbrek yetmezliği (kreatinin klerensi < 60 mL/dak)
- Hipotiroidizm
- Kişisel ya da ailesel herediter kas bozukluğu hikayesi
- Diğer HMG-KoA redüktaz inhibitörleri ya da fibrat kullanımına bağlı kas toksisitesi hikayesi
- Vücuda zarar verecek ölçüde devamlı alkol kullanımı
- Plazma düzeylerinin artmasına neden olabilecek durumlar
- Asya kökenli hastalar
- Birlikte fibrat kullanımı.

2.3. Rosuvastatin Kalsiyumun Analiz Yöntemleri

2.3.1. Kromatografik Yöntemleri:

Hull ve arkadaşları, plazmadan rosuvastatin kalsiyumun analizi için katı faz ekstraksiyonunu takip eden kütle spektrometrik (MS) dedektörlü yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemini geliştirmişlerdir. Geliştirilen yöntem valide edilmiş ve plazmadan rosuvastatin kalsiyumun tayini için doğrusallık aralığı 0.1-30 ng mL⁻¹ olarak bulunmuştur. Alt tayin sınırı da 0.1 ng mL⁻¹'dir. Analizler sonucunda bir girişim olmadığı gösterilmiş. Analitin plazmada 3 kez dondurulup çözünme işleminde ve -20°C ve -70°C'de 6 aya kadar kararlı olduğu bulunmuştur (12).

Hull ve arkadaşları, rosuvastatin kalsiyumun N-desmetil metabolitinin plazmadan tayini için katı faz ekstraksiyonunu takip eden kütle spektroskopisi dedektörlü yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemini geliştirmişlerdir.

Geliştirilen yöntem valide edilmiş ve plazmadan N-desmetil rosuvastatinin tayini için doğrusallık aralığı $0.5\text{--}30\text{ ng mL}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Alt tayin sınırı da 0.5 ng mL^{-1} 'dir. Plazma örnekleri 1:1 oranında sodyum asetat tamponu (pH 4; 0.01M) ile karıştırılmıştır. N-desmetil rosuvastatinin plazma/tampon içerisinde oda sıcaklığında 24 saat, -70°C 'de 12 ay kararlı olduğu bulunmuştur (11).

Mehta ve arkadaşları, rosuvastatin kalsiyumun bozunma ürünleri varlığında tayini için sıvı kromatografisi yöntemi geliştirmişlerdir. Bozunma ürünlerinin oluşması farklı pH değerlerinde gerçekleştirilmiştir. Buna ek olarak, rosuvastatin kalsiyum oksidatif, fotolitik ve termal strese maruz bırakılmıştır. Bu ortamlarda oluşturulan bozunma ürünleri ile normal uzun dönem kararlılık çalışmalarında oluşan bozunma ürünlerinin aynı olduğu gösterilmiştir (21).

Triverdi ve arkadaşları, rosuvastatin kalsiyum ve fenofibrik asitin insan plazmasından tayini için MS dedektörlü yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi geliştirmişlerdir. İç standart olarak karbamazepin kullanılmış ve plazmadan etil asetat ile tüketilmiştir. Organik tabakanın uzaklaştırılmasında 40°C azot buharı geçirilmiştir. Analizler için X-Terra MS C-18 ($4,6\times 50\text{mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$) kolon, 0.05 M formik asit: asetonitril (45:55 h/h) hareketli faz ve 0.40 mL/dk akış hızı kullanılmıştır. Alıkonma zamanları rosuvastatin kalsiyum için 2.35, fenofibrik asit için 4.70 ve iç standart için 2.32 dk. olarak bulunmuştur. Alt tayin sınırı rosuvastatin kalsiyum için 1.0 ng mL^{-1} , fenofibrik asit için $0.5\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Doğrusallık aralığında sırasıyla $1.0\text{--}50\text{ ng mL}^{-1}$ ve $0.5\text{--}20\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ 'dir. Kararlılık çalışmaları sonucunda da -80°C 'de 1 ay boyunca kararlı olduğu gösterilmiştir (18).

Xu ve arkadaşları, rosuvastatin kalsiyumun plazmadan analizi için MS dedektörlü yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yöntemi geliştirmişlerdir. Bu yöntemde iç standart olarak silostazol kullanılmıştır. Analit ve iç standart plazmadan eter ile tüketilmiştir. Analizlerde Atlantis C18 ($2.1\text{ mm}\times 150\text{mm}$, $5.0\text{ }\mu\text{m}$) kolon, $\%0.2$ formik asit:metanol (30:70 h/h) hareketli faz kullanılmış ve akış hızı 0.2 mL/dk olarak seçilmiştir. Yöntem FDA'nın biyoanalitik yöntem validasyonu klavuzuna göre valide edilmiştir. Çalışmalar sonucunda alt tayin

sınırı 0.2 ng mL^{-1} , doğrusallık aralığı $0.2\text{-}50 \text{ ng mL}^{-1}$ ve korelasyon katsayısı 0.9991 olarak bulunmuştur. Yöntemin farmakokinetik ve biyoeşdeğerlik çalışmalarında kullanılabilir bir yöntem olduğu gösterilmiştir (20).

Kumar ve arkadaşları, rosuvastatin kalsiyumun farmasötik preparatlardan ve fare plazmasından analizi için yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi geliştirilmiştir. İç standart olarak ketoprofen seçilmiştir. Plazmadan asetonitril ile tüketilmiştir. Analiz için Kromasil KR 100-5 C18 ($4.6 \times 250 \text{ mm}, 5 \mu\text{m}$) kolon, 0.05 M formik asit:asetonitril ($55:45 \text{ v/v}$) hareketli faz olarak belirlenmiş ve akış hızı olarak 1.0 mL dk^{-1} seçilmiştir. Ölçümler UV dedektörle 240 nm dalga boyunda yapılmıştır. Alıkonma zamanları rosuvastatin kalsiyum için 8.6 dk ., iç standart için 12.5 dk olarak bulunmuştur. Doğrusallık aralığı $0.02\text{-}10 \mu\text{g mL}^{-1}$ 'dir. Alt tayin sınırı $0.02 \mu\text{g mL}^{-1}$ 'dir. Geliştirilen yöntem oral tek doz verilmiş fare plazmalarında farmakokinetik çalışmalarda uygulanmıştır (14).

Pasha ve arkadaşları, 5 statininin (atorvastatin, lovastatin, pravastatin, simvastatin ve rosuvastatin) farmasötik preparatlardan analizlerinde ve in vitro metabolizasyon çalışmalarında kullanılmak üzere yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi geliştirilmiştir. 1 mL dk^{-1} akış hızında ternari gradient elüsyon uygulanmış ve Intertisl ODS 3V kolon ($4.6 \times 250 \text{ mm}, 5 \mu\text{m}$) kullanılmıştır. Analizler oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Hareketli faz 0.01 M amonyum asetat ($\text{pH } 5$), asetonitril ve metanol'den oluşmaktadır. İç standart olarak teofilin kullanılmıştır. Ölçümler 237 nm dalga boyunda UV dedektör kullanılarak yapılmıştır. Alıkonma zamanları iç standart, atorvastatin, lovastatin, pravastatin, rosuvastatin and simvastatin için sırasıyla $7.5, 17.2, 21.6, 28.5, 33.5$ ve 35.5 dk olarak bulunmuştur. Yöntem tablet analizlerine uygulanmıştır. In vitro metabolizasyon çalışmalarında ise plazmadan etil asetat ile tüketme işlemini yapmışlardır (6).

Vittal ve arkadaşları, insan plazmasından rosuvastatin kalsiyum ve gemfibrozilin tayini için yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi geliştirmişlerdir. Plazmadan analitler asetonitril ile tüketilmiştir. İç standart olarak selekoksib kullanılmıştır. Analizlerde X-Terra C18 kolon ($4.6 \times 150 \text{ mm}, 5 \mu\text{m}$) kullanılmıştır. Akış hızı olarak 20 dk boyunca $0.0\text{-}1.60 \text{ mL dk}^{-1}$ gradient

akış hızı belirlenmiştir. Hareketli faz 0.01M amonyum asetat: asetonitril:metanol'dür (50:40:10 h/h). Ölçümler 275 nm dalga boyunda UV dedektörle gerçekleştirilmiştir. Alıkonma zamanları rosuvastatin kalsiyum, gemfibrozil ve iç standart için sırasıyla 6.7, 13.9 ve 16.4 dk.dır. Doğrusallık aralığı rosuvastatin kalsiyum için 0.03-10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ gemfibrozil için 0.3-100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ bulunmuştur. Yöntem ayrıca farelerde farmakokinetik çalışmalara da uygulanmıştır (19).

Lan ve arkadaşları, insan plazmasından rosuvastatin kalsiyumun analizi için MS dedektörlü sıvı kromatografisi yöntemi geliştirmişlerdir. Plazmaya asetik asit ve tetra butil amonyum hidroksit eklendikten sonra analit ve iç standart sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi ile plazmadan ayrılmıştır. İç standart olarak estron, kolon olarak Phenomenex Luna C18 kullanılmıştır. Hareketli faz, %2 formik asit : metanol'dür (20:90 h/h). Akış hızı 1 mL dk⁻¹'dir. Alıkonma zamanları rosuvastatin kalsiyum için 2.3 dk. ve iç standart için 3.4 dk.dır. Alt tayin sınırı 0.1 ng mL⁻¹, doğrusallık aralığı 0.1-20 ng mL⁻¹'dir. Rosuvastatin kalsiyum plazmada 3 kez dondurup çözünme işlemlerinde ve -20°C'de 8 hafta boyunca kararlı bulunmuştur (15).

Gao ve arkadaşları, plazmadan rosuvastatin kalsiyumun tayini için MS dedektörlü yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (LC-MS/MS) yöntemi geliştirmişlerdir. Plazmadan tüketme işlemi etil eter ile yapılmıştır. Kolon olarak Zorbax XDB-C18 (150 mm x 4.6 mm, 5 μm) hareketli faz olarak ise metanol-su (75:25 h/h pH 6) kullanılmıştır. LOQ 0.02 ng mL⁻¹, doğrusallık aralığı 0.02-60 ng mL⁻¹ olarak bulunmuştur. Yöntem oral tek doz 5, 10 ve 20 mg rosuvastatin kalsiyum uygulanmış 10 gönüllünün farmakokinetik çalışmaları başarı ile uygulanmıştır (10).

Kallem ve arkadaşları, rosuvastatin kalsiyumun küçük hacimlerdeki plazma örneklerinden tayini için MS dedektörlü yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (LC-MS/MS) yöntemi geliştirmişlerdir. İç standart olarak atorvastatin kullanılmıştır. Plazmadan tüketme işlemi asetonitril ile yapılmıştır. Alıkonma zamanları rosuvastatin kalsiyum için 2.5 dk. ve iç standart için 3.1 dk.'dır. Kolon olarak Inertsil ODS-3 (4.6 x 100mm, 3 μm), hareketli faz olarak ise 0.05 M formik asit-asetonitril (20:80, h/h)

kullanılmıştır. LOQ 0.05 ng mL^{-1} ve doğrusallık aralığı $0.05-50 \text{ ng mL}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Yöntem klinik çalışmalara başarı ile uygulanmıştır (13).

Sultana ve arkadaşları, atenolol, rosuvastatin, spironolakton, glibenklamid ve naproksen sodyumun plazmadan ve farmasötik preparatlardan analizi için yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yöntemi geliştirilmiştir. İç standart olarak flurbiprofen kullanılmıştır. Analizler Purospher start, C18 kolonla metanol-su ($80:20 \text{ h/h}$ pH 3.4) hareketli fazıyla 0.9 mL dk^{-1} akış hızında gerçekleştirilmiştir. Doğrusallık aralığı $0.25 - 30 \text{ µg mL}^{-1}$ olarak bulunmuştur (17).

Sane ve arkadaşları, rosuvastatin kalsiyumun farmasötik preparatlardan analizi için yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi yöntemi geliştirmişlerdir. Slikajel 60F244 HPTLC plakları kullanılmıştır. İç standart olarak aseklofenak seçilmiştir. Hareketli faz toluen-metanol-etilasetat-formik asittir ($6:1:3:0.1 \text{ h/h}$). Standart ve tablet çözeltileri metanolde çözülerek hazırlanmıştır. Ölçümler 265 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. Doğrusallık aralığı $1-15 \text{ µg mL}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Yöntem valide edildikten sonra tablet preparatlarına uygulanmıştır (7).

Robledo ve Smyth, atazanavir, indinavir, emtrisitabin, gemifloksasin ve rosuvastatinin serumdan analizi için MS dedektörlü yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (LC-ESI-MS2) yöntemi geliştirmişlerdir. Geliştirilen yöntem valide edilerek serumdan tayinleri gerçekleştirilmiştir. Bu moleküller için ayrıca diferansiyel puls polarografisi yöntemi de denenmiş fakat matriksle girişim yapması nedeni ile rosuvastatin kalsiyumun serumdan tayinine uygun bir yöntem olmadığı sonucuna varılmış ve yöntem geliştirilmemiştir (16).

2.3.2 Spektrofotometrik Yöntem:

Uyar B ve arkadaşları rosuvastatin kalsiyumun farmasötik preparatlardan analizi için spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir. Standart ve tablet çözeltilerinin hazırlanmasında çözücü olarak metanol kullanılmıştır. Ölçümler rosuvastatin kalsiyumun maksimum absorpsiyon gösterdiği 243 nm dalga boyunda yapılmıştır. Doğrusallık aralığı $1.0-60 \text{ µg mL}^{-1}$ arasındadır. Gözlenebilirlik sınırı 0.33 µg mL^{-1} 'dir. Valide edilen yöntem daha sonra

farmasötk preparatlara uygulanmıştır (8).

2.3.3 Kapiller Elektforez Yöntemi:

Süslü İ ve arkadaşları, rosuvastatin kalsiyumun farmasötik preparatlardan analizi için kapiller elektforez yöntemi geliştirmişlerdir. Yöntemde optimizasyon çalışmaları sonucunda 50 mM pH 9.5 Borat tamponu, 30 °C kapiller sıcaklığı, 25 kV uygulanan voltaj olarak seçilmiştir. Çözeltiler 5 mbar basınçla 5 saniye boyunca enjekte edilmiştir. Ölçümler 243 nm dalga boyunda yapılmıştır. İç standart olarak diflunisal kullanılmıştır. Göç süresi rosuvastatin kalsiyum ve iç standart için sırasıyla 3.20 ± 0.01 dk. ve 4.20 ± 0.02 dk.'dır. Doğrusallık aralığı $3.0-200 \mu\text{g mL}^{-1}$ arasındadır. Gözlenebilme sınırı $1.00 \mu\text{g mL}^{-1}$ ve alt tayin sınırı $3.00 \mu\text{g mL}^{-1}$ 'dir. Geliştirilen yöntem farmasötik preparatlara uygulanmıştır (9).

2.4. Elektroanalitik Yöntemler (30-42)

Maddelerin elektriksel davranışlarını ve elektrik enerjisi ile kimyasal tepkimeler arasında ilişkileri inceleyen bilim dalına elektrokimya, maddelerin elektrokimyasal özelliklerini analiz amacı ile kullanan yöntemlere de elektroanalitik yöntemler denir.

Elektroanalitik Kimya, bir elektrokimyasal hücredeki analit çözeltisinin elektrokimyasal özelliklerine dayanan bir grup yöntemi kapsar. Eğer dışardan pilin sıfır akım altındaki potansiyelinden daha büyük bir potansiyel uygulanırsa pilden bir akım geçer. Anot ve katotta maddesel değişimler oluşur. Voltametri, kulometri, kronopotansiyometri, amperometri, kondüktometri gibi elektroanalitik yöntemler bu tür elektrolitik pillere dayanır. Elektroanalitik yöntemler çok düşük tayin sınırlarına ulaşabilirler. Maddelerin, ara yüzeylerdeki yük aktarımının stokiyometrisi ve hızı, kütle aktarım hızı, adsorpsiyon ve kemisorpsiyon derecesi, kimyasal tepkimelerin hızı ve denge sabitleri gibi bilgiler verir.

Elektroanalitik yöntemler, diğer yöntemlere göre bazı üstünlüklere sahiptir.

- Elektrokimyasal ölçümler çoğu kez bir elementin bir yükseltgenme basamağı için spesifiktir. Yani, elektroanalitik yöntemler ile değişik yükseltgenme basamağına sahip türler saptanabilir. Örneğin, bir örnekteki Fe^{3+} ve Fe^{2+} derişimleri kolayca saptanabilir.
- Elektrokimyasal yöntemlerin uygulanmasını sağlayan ticari gereçlerin diğerlerine göre daha ucuz olmalarıdır. Üstelik, birçok elektroanalitik yöntemin aynı cihazda uygulanabilirliğini sağlayan çok amaçlı olanları da vardır.
- Elektrokimyasal yöntemler, kimyasal türlerin derişimlerinden çok aktiflikleri hakkında bilgi verir. Fakat çoğu zaman bu sakınca iyon şiddeti sabit tutularak giderilebildiğinden önemli olmadığı gibi aktifliğin (etkinlik) önemli olduğu olaylarda bir üstünlük de sağlayabilir.

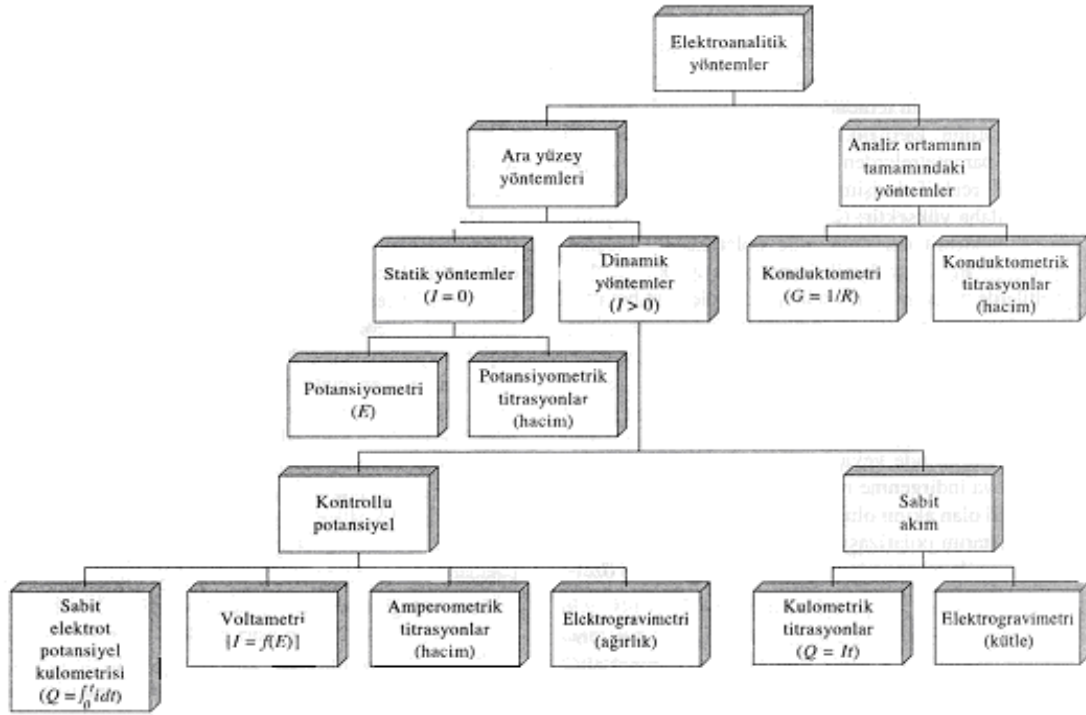
Çok çeşitli elektroanalitik yöntemler önerilmektedir. Bunlardan en yaygın kullanılanlar Aşağıdaki Şekil 2. 6'da gösterilmiştir (38). Bu yöntemler, ara yüzeyde gerçekleşen yöntemler ve tüm analiz ortamında gerçekleşen yöntemler olarak ikiye ayrılırlar. Ara yüzeylerde gerçekleştirilen yöntemlerin daha genel bir kullanım alanı vardır. Ara yüzey yöntemleri, elektrot yüzeyleri ve bu yüzeylere hemen bitişik olan ince çözelti tabakası, arasındaki ara yüzeyde oluşan olaylara dayanmaktadır. Tüm analiz ortamı yöntemleri çözeltinin tamamında oluşan olanlara dayalıdır ve ara yüzey etkilerinden kaçınmak için her yola başvurulur.

Ara yüzey yöntemleri, elektrokimyasal hücrelerin akımın varlığında veya yokluğunda işleyişine göre statik ve dinamik olmak üzere iki ana sınıfa ayrılırlar. Potansiyometrik ölçümleri içeren statik yöntemlerin hızları ve seçicilikleri nedeniyle ayrı bir önemi vardır.

Elektrokimyasal hücrelerdeki akımların hayati bir rol oynadığı dinamik ara yüzey yöntemlerinin çeşitli tipleri vardır. Bu yöntemlerden Şeklin solunda görülen üç tanesinde diğer değişkenlerin ölçümleri yapılırken hücrenin potansiyeli kontrol edilmektedir. Genellikle bu yöntemler duyarlıdırlar, oldukça geniş çalışma aralığı vardır (10^{-3} - 10^{-8} M), Ayrıca bu analizlerin çoğu μ L, hatta

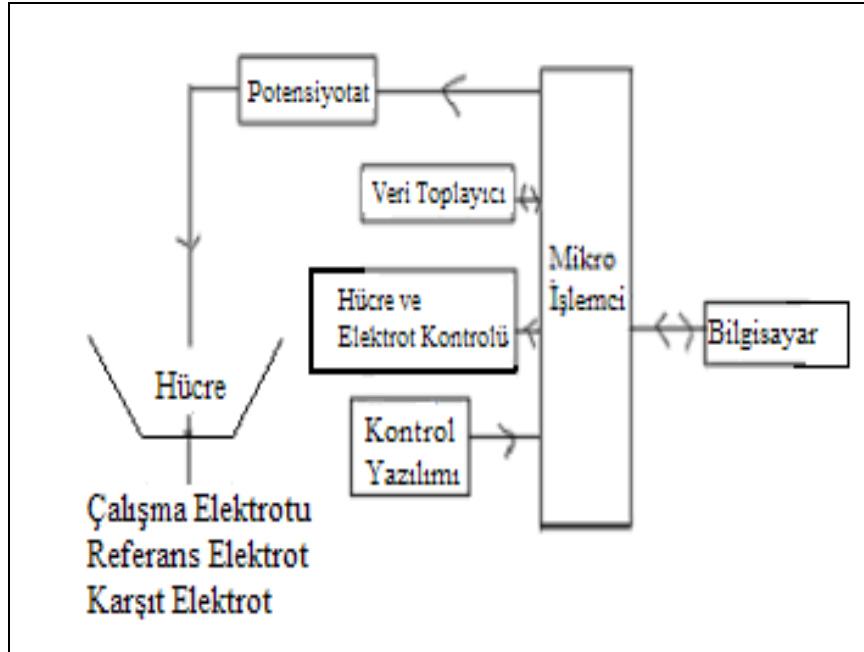
nL seviyesindeki numune miktarlarıyla gerçekleştirilebilir. Gözlenebilir sınırları pikomol seviyesinde olabilir.

Elektroanalitik yöntemlerin sınıflandırması Şekil 2. 6'da verilmiştir (38).



Şekil 2. 6. Elektroanalitik yöntemlerin sınıflandırılması

Elektrokimyasal yöntemlerin gerçekleştirildiği düzenek şematik olarak Şekil 2. 7’de verilmiştir.



Şekil 2. 7. Elektrokimyasal işlemlerin gerçekleştirildiği düzenek

2.4.1. Voltametri

Voltametri, bir indikatör veya çalışma elektrodunun polarize olduğu şartlar altında, uygulanan potansiyelin bir fonksiyonu olarak akımın ölçülmesinden yararlanarak analit hakkında bilgi edinilen bir grup analitik yöntemi kapsar. Genel olarak voltametrinde kullanılan çalışma elektrotları, polarizasyonu artırmak için, yüzey alanları birkaç mm^2 ve bazı uygulamalarda ise birkaç μm^2 veya daha küçük olan mikroelettrotlardır.

Voltametri, tam derişim polarizasyonu şartları altında bir elektrokimyasal hücrede oluşan bir akımın ölçülmesine dayanır. Çok az analit tüketimi söz konusudur.

Voltametri, çeşitli ortamlarda meydana gelen yükseltgenme - indirgenme olaylarının, yüzeydeki adsorbsiyon olaylarının ve kimyasal olarak

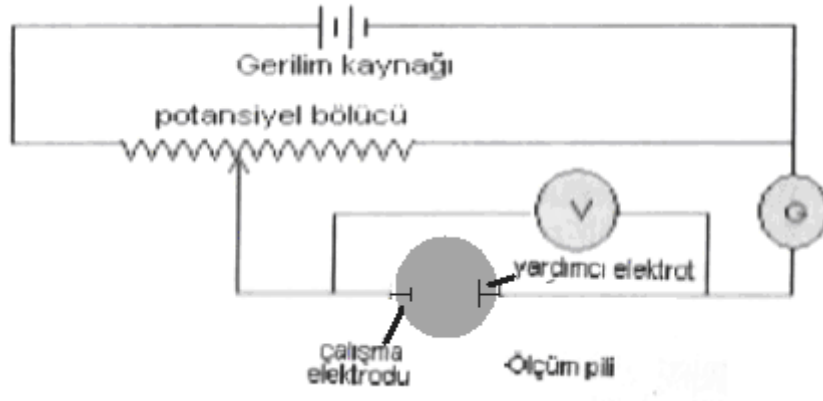
modifiye edilmiş elektrot yüzeylerindeki elektron aktarım mekanizmalarının temel çalışmalarını kapsayan, analitik olmayan amaçlarla yaygın olarak kullanılmaktadır.

2.4.1.1. Voltametrik Ölçüm Düzenekleri

Voltametrik cihazların görevleri istenilen türde bir potansiyel üretmek, bu potansiyeli kontrol etmek, zamana bağlı derişimini sağlamak, elektrokimyasal pile uygulandıktan sonra da devreden geçen akımı sürekli ya da belli zaman aralıklarında saptamaktır.

2.4.1.1.1 İki Elektrotlu Sistemler

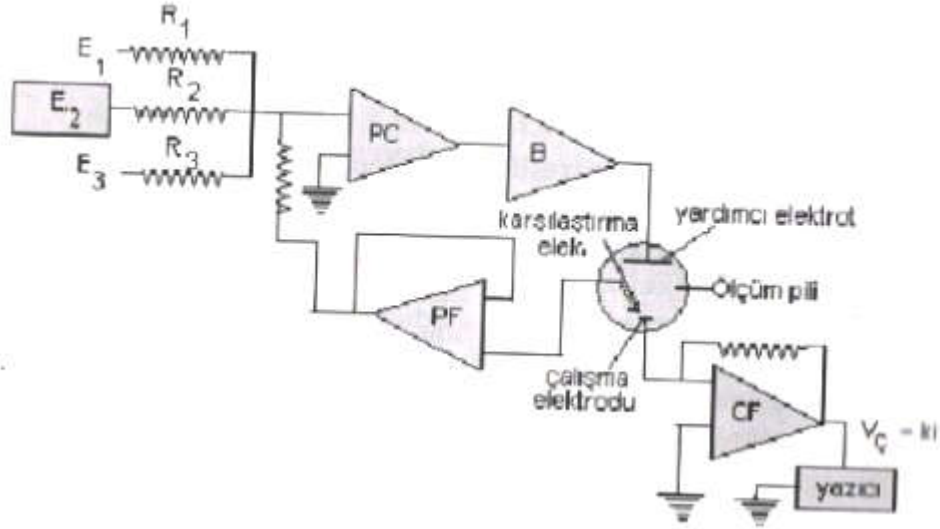
Bu sistemler çalışma elektroduyla karşılaştırma (referans) elektrodundan oluşur (Şekil 2.8). İki elektrot arasına uygulanan potansiyel yüksek empedanslı elektronik voltametre ile akım ise bir ampermetre ya da galvanometreyle ölçülür. Bu sistem ancak düşük dirençli çözeltilerde çalışır. Yüksek dirençli ortamda ohmik düşme (IR) önemli düzeye çıkacağından, işlev göremezler. Bu yüzden IR düşmesinin büyüklüğü ile sınırlıdır.



Şekil 2. 8. İki elektrotlu polarografik sistem
(V potansiyel, G akım ölçer sistemler)

2.4.1.1.2 Üç Elektrotlu Sistemler

Günümüzde IR potansiyel düşmesinden kaynaklanan sıkıntılardan kurtulmak için üç elektrotlu sistemler kullanılmaktadır. Akım çalışma elektroduyla yardımcı (karşıt) elektrot arasından geçer. Çalışma ve karşılaştırma (referans) elektrotları arasındaki potansiyel farkı sıfır akım altında saptanır. Diğer cihazlarda olduğu gibi burada da işlemci katlandırıncılar (operational amplifier) kullanılır (Şekil 2.9).



Şekil 2. 9. İşlemci katlandırıcılı, potansiyoslatlı, 3 elektrotlu sistem.

Şekil 2.9' daki E_2 doğru akım kaynağıdır. Bu gerilim işlemci katlandırıcılarla oluşturulur. Doğrusal artan, doğru akım üreten, integral devre Şekil 2.9' da verilmiştir. Bu devrede; E_g giriş (besleme) potansiyeli, R_g giriş direnci ve S_f geri besleme sahası (kapasitörü) olmak üzere çıkış potansiyeli olan E_c

$$E_c = \frac{E_g}{R_g S_f} t \quad 2.1$$

eşitiliği ile değişir. Bu potansiyel polarograf giriş devresine yani E direnç ucuna bağlanır. Geri besleme devresinde değişken sığa kullanılırken potansiyel kontrol edilir. E , E_2 ve E_3 giriş dirençlerine değişik gerilimler ayrı ayrı uygulanabildiği gibi, her bir uca farklı gerilimler uygulanarak da üst üste bindirilmiş gerilimler sağlanabilir. Örneğin R_2 direncine doğru gerilim, R_1 direncine sinusoidal gerilim uygulanırsa alternatif akım; eğer kare dalga

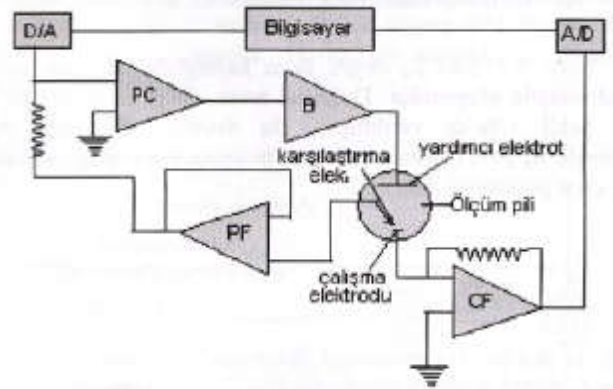
uygulanırsa, kara dalga, pulsar uygulanırsa puls ya da diferansiyel puls voltametreleri oluşturulur.

PC işlemcisi potansiyel kontrol eder, B işlemcisi (Booster) potansiyel arttırma görevini yapar. PF işlemcisi potansiyel izleyici olduğu için devreden akım çekmeden çalışma elektrodunun potansiyelini saptar.

CF akım izleyici katlandırıcıdır. Çalışma elektrodu ile yardımcı elektrot üzerinden geçen akımı, devreden akım çekmeden katlandırarak saptar. Çıkış potansiyeli bir yazıcı ya da bilgisayara bağlanarak kaydedilebilir. Akımın potansiyel ile doğru orantılı olması nedeniyle akım kaydedilmiş gibi olur.

2.4.1.1.3 Bilgisayar Kontrollü Sistemler

Günümüzde bilgisayar kontrolü ile çalışan elektrometrik ölçüm sistemleri daha kolay kullanılmaktadır. Sistemde kullanılan potansiyelin üretimi, kontrollü, deneyden elde edilen verilerin toplanması ve depolanması bu sayede daha kolay ve güvenilir hale gelmiştir. Şekil 2.10'da bilgisayar kontrollü bir elektrometrik sistem verilmiştir. Bu sistemdeki A/D dönüştürücüleriyle analog sinyal, sayısal sinyale, ve D/A dönüştürücüsüyle sayısal sinyal de analog sinyale dönüştürülerek kontroller yapılır.



Şekil 2. 10. Bilgisayar kontrolü elektrokimyasal ölçüm bileşenleri

Bilgisayar sayesinde, belli zaman aralıklarıyla akımı saptamak ve bunlara depolamak olası olduğundan, farklı ölçüm yöntemleri de

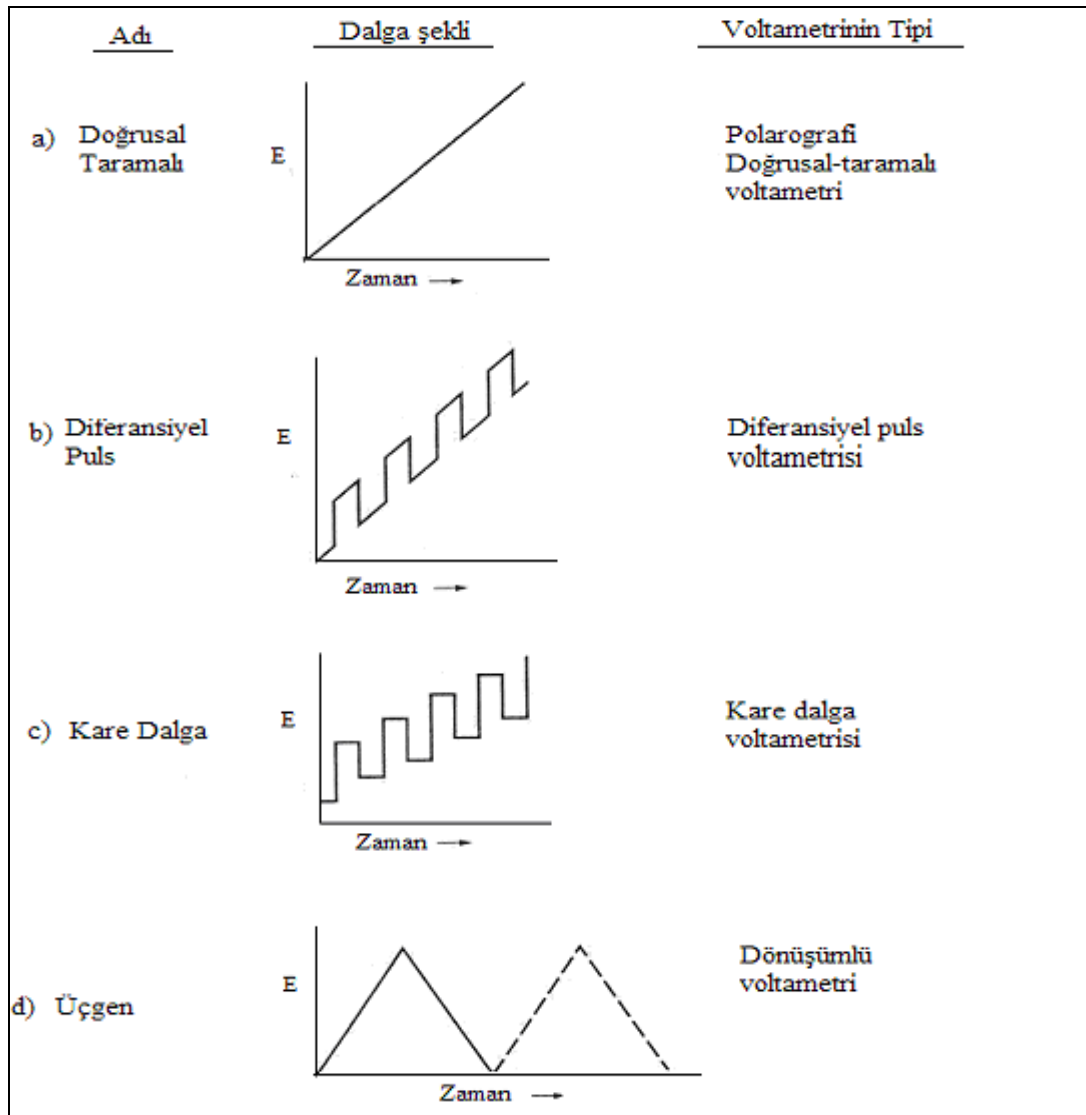
geliştirilmiştir. Örneğin damlayan civa elektrodunda, yalnızca damlaların düşmesine yakın, seçilmiş bir anda akımı saptayıp, belleğinde depolar ve potansiyel taramasını tamamladıktan sonra tüm verileri bir voltamogram şeklinde verebilir (tast polarografi). Benzer şekilde puls ya da diferansiyel puls teknikleri de anlık akımların farklarını kolayca alma olanaklarını sağlar.

Bilgisayar potansiyositatı kontrol ettiğinden, uygun bir bilgisayar programıyla matematiksel yolla tanımlanan herhangi bir dalga biçimi belirlenip çalışma elektrotuna uygulanabilir (39).

2.4.1.2. Voltametrde Uyarma Sinyalleri

Voltametrde, bir mikroelettrot içeren elektrokimyasal hücreye değiştirilebilir bir potansiyel uyarma sinyali uygulanır. Bu uyarma sinyali yöntemin dayandığı karakteristik bir akım cevabı oluşturur. Voltametrde en çok kullanılan uyarma sinyallerinin dördünün dalga şekli Şekil 2.11'de verilmiştir. Klasik voltametrik uyarma sinyali, hücreye uygulanan doğru akım potansiyelinin zamanın bir fonksiyonu olarak (genellikle 2-3 V arasında), Şekil 2.11.a'da gösterilen doğrusal bir taramadır. Sonra hücrede oluşan akım, zamanın bir fonksiyonu olarak ve böylece uygulanan potansiyelin bir fonksiyonu olarak kaydedilir.

Şekil 2.11b ve 2.11.c'de iki puls tipi uyarma sinyali görölmektedir. Akımlar bu pulsların ömrü süresince çeşitli zamanlarda ölçölür. Potansiyel 2.11.d'de görölen üçgen şeklindeki dalga ile iki değer arasında devreder. Önce bir maksimuma kadar doğrusal olarak artar ve sonra aynı eğimle orijinal değerine doğrusal olarak azalır. Bu işlem, akımın zamanın bir fonksiyonu olarak kaydedilirken defalarca tekrarlanabilir.



Şekil 2. 11. Voltametrizde kullanılan potansiyel uyarma sinyalleri

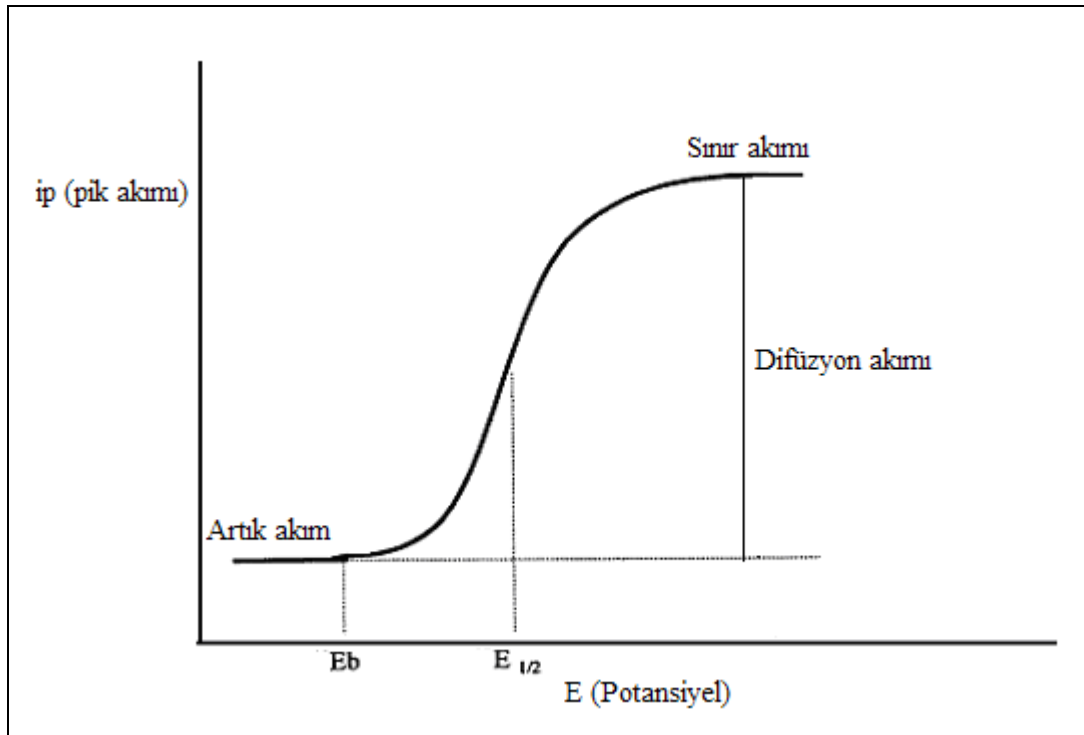
2.4.2. Polarografi

Polarografi, 1927 yılında Çek bilim adamı J. Heyrovsky tarafından geliştirilmiş ilk elektrokimyasal yöntemdir.

Polarografi, eser elementlerin analizlerinde kullanılan önemli bir yöntemdir. Periyodik cetvelde yer alan elementlerin büyük bir kısmı ile indirgenebilen veya yükseltgenebilen fonksiyonel gruba sahip elektroaktif olan organik moleküllerin doğrudan analizi yapılabilmektedir. Elektroaktif olmayan organik moleküller ise kompleks oluşturma, nitrolama, nitrozolama,

N veya S oksitleme, kondenzasyon ve katılma tepkimeleri ile dolaylı yolla analiz edilebilirler (36).

Polarografide çalışma elektrodu olarak damlayan cıva elektrodu (DCE) kullanılır. Bu elektrot 0.05 – 0.08 mm iç çaplı bir kılcal cam borudur. Bu kılcalın bir ucu 1 – 50 mL kadar çözelti bulundurulmuş bir hücreye daldırılır. Diğer ucu 30 – 80 cm yüksekliğindeki bir boru yardımıyla cıva haznesine bağlanır. Kılcalın yukarısında bulunan cıva sütununun hidrostatik basıncıyla cıva, çözelti içerisine damlalar halinde düşer. Son geliştirilen bir sistemle damla ömrü mekanik damla düşürücüsü yardımıyla istenilen şekilde ayarlanabilmektedir. DCE'un potansiyeli, bir referans elektrota karşı değiştirilir. Referans elektrot genellikle Ag/AgCl veya doymuş kalomel elektrottur (DKE). DCE ile referans elektrot arasına bir potansiyometre yardımıyla bir potansiyel uygulanır. Akım, çalışma elektrotu ile karşıt elektrot arasında akar. Karşıt elektrot olarak platin kullanılır. Hücreden geçen akım bir galvanometre ile ölçülür. Ölçülen akımın uygulanan potansiyele karşı grafiği polarogram adını alır (35,36). Şekil 2.13'de normal polarografide gözlenen akım - potansiyel eğrisi görülmektedir.



Şekil 2. 12. Polarografide gözlenen akım-potansiyel ilişkisi

Polarografide akım, çalışma elektrodu üzerinde maddelerin indirgenmesi veya yükseltgenmesi sonucu oluşur. İndirgenmeden dolayı oluşan akıma katodik akım, yükseltgemedan dolayı oluşan akıma ise anodik akım denir. Katodik akımın işareti pozitif, anodik akımın işareti ise negatif olarak kabul edilmiştir. Şekil 2.13'de verilen polarogramdan görüldüğü gibi yükseltgenmenin veya indirgenmenin başladığı potansiyele *bozunma potansiyeli* (E_b) denir. Bozunma potansiyelinden sonra çok az bir potansiyel değişmesine karşılık oluşan akımda hızlı bir artış gözlenir. Belli bir potansiyelden sonra akımın sabit kaldığı bir plato bölgesine ulaşılmaktadır. Bu akıma *sınır akım* denir. Elektrot üzerinde henüz tepkime olmadığı zaman küçük de olsa bir akım gözlenir. Bu akıma *artık akım* denir. Bu akımın iki nedeni vardır:

1. Çözelti içinde analiz edilecek maddeden daha elektroaktif safsızlıkların indirgenmesi veya yükseltgenmesi ile oluşan faradaik akım,
2. Elektrot yüzeyine adsorbe olan maddenin elektrot-elektrolit ara yüzeyindeki (cıva damlasının yüklenmesi) elektriksel çift tabakanın kapasitansına etki etmesi sonucu oluşan kapasitif akımdır.

Sınır akım ile artık akım arasındaki akım farkı dalga yüksekliğidir. Bu dalga yüksekliği, elektroaktif maddenin derişimi ile doğrusal olarak artar. Polarografide akımın artmaya başladığı ilk potansiyel bozunma potansiyelidir. İndirgenme bozunma potansiyelinden sonra başlar. İlk önce elektrot yüzeyindeki maddeler indirgenir ve akım artmaya başlar. Çözeltideki maddeler derişimin "0" olduğu elektrot yüzeyine difüzyonla gelmeye başlar, indirgenir ve akım artar. Elektrot tepkimesinin hızı çözeltideki maddenin difüzyon hızına eşit oluncaya kadar akım artar. Elektrot tepkimesinin hızını maddenin difüzyon hızı sınırlar. Buna difüzyon sınır akımı denir. Bu özelliği nedeniyle polarografi nicel analizlerde kullanılabilir. Akımın sınır akımı değerinin yarısına eşit olduğu potansiyel *yarı dalga potansiyelidir*. Yarı dalga potansiyeli $E_{1/2}$ ile gösterilmektedir. $E_{1/2}$ değeri genellikle elektroaktif maddenin derişimine bağlı değildir ve standart yarı hücre potansiyeli ile

yakından ilişkilidir. Yarı dalga potansiyelinin her madde için karakteristik olması özelliğinden dolayı polarografi nitel analizlerde kullanılabilmektedir (35).

DCE'un avantajları yanında bazı dezavantajları da vardır. Bu avantajlar ve dezavantajlar aşağıda kısaca özetlenmiştir.

Avantajları:

1. Cıvanın kimyasal açıdan inert oluşu ve cıva üzerinde hidrojen aşırı geriliminin çok büyük olması nedeniyle, bu elektrotla bir çok indirgenme tepkimesi incelenebilir. Örneğin, Cd^{2+} , Zn^{2+} gibi normalde H^+ 'den daha zor indirgenen katyonlar, cıva üzerinde H^+ indirgenmesinden daha pozitif potansiyellerde indirgenirler.

2. DCE'da her damla yeni ve temiz bir yüzey oluşturduğundan elde edilen akım önceki damlalardaki elektroliz olaylarının etkisinde kalmaz. Elektrot yüzeyinin kirlenmesi söz konusu değildir.

3. Damlayan cıva yeterli karışmayı sağladığından belirli bir potansiyelde görülen akım değişimleri olmamaktadır.

4. Çözelti içerisinde damlayan cıva, her damlada aynı büyüklüğe erişmekte ve dolayısı ile bir önceki damladan bağımsız olarak aynı akım üretilebilmektedir.

5. Boyutları düşük olduğundan mikro hücreler ile düşük hacimlerde çalışılabilmekte ve yüzey alanı hesaplanabildiğinden matematiksel işlemler yapılabilmektedir.

6. Yüzeyin küçük olması nedeniyle elektrokimyasal değişmeye uğrayan madde miktarı çok az olduğundan tekrarlanabilirlik yüksektir.

Dezavantajları:

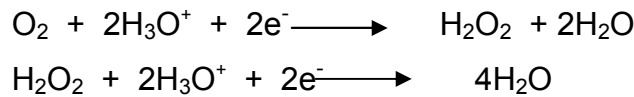
1. Cıvanın en büyük dezavantajı, anot olarak kullanıldığı potansiyel aralığının çok dar olmasıdır. DKE'a göre +0.4 V'dan daha pozitif potansiyel değerlerinde metalik cıva çözünmektedir.

2. DCE'nun başka bir önemli dezavantajı ise, klasik yöntemin duyarlılığını yaklaşık 10^{-5} M'a sınırlayan faradaik olmayan artık akım veya yükleme akımıdır. Daha düşük derişimlerde artık akım difüzyon akımını

aşabilir ki bu da difüzyon akımının doğru ölçümünü engeller. Bu sınırlama, puls yöntemlerinin geliştirilmesi ile büyük ölçüde aşılmıştır.

3. Cıvanın diğer bir dezavantajı da toksik oluşudur. Polarografide çok saf cıva kullanılması gerekir. Bu nedenle damıtma ile temizlenmesi esnasında buharlaşır. Cıva buharları ise çok zararlıdır.

Polarografik deneyler oksijensiz ortamlarda gerçekleştirilmelidir. Çünkü bütün çözücülerde oksijen az veya çok çözünür. 25 °C'de suda çözülmüş oksijenin derişimi 10^{-3} M'dır. Çözülmüş oksijen molekülü DCE üzerinde indirgenir. Bu indirgenme iki basamaklıdır. Birincisi -0.05 V'da peroksida indirgenmesi, ikincisi ise -0.9 V'da gözlenen peroksidin suya indirgenme tepkimesidir. Bu potansiyeller ortamın pH'sı ile değişir. Asidik ortam için bu tepkimeler aşağıdaki gibidir.



Bu tepkimelerin oluşumu ile polarografide 0.0 ve -1.0 V arası gibi bir çok indirgenme tepkimesinin gözleendiği bölge kapatılmış olur. Bunu önlemek için deney öncesinde çözeltiden N_2 veya argon gazı gibi bir inert gaz geçirilerek çözülmüş oksijen ortamdan uzaklaştırılır.

Tersinir elektrot tepkimelerinde polarogramın yükselen kısmında akım-potansiyel ilişkisi için kullanılan geçerli eşitlik (tepkime ürünü çözünebilir veya amalgam oluşturabilirse), Nerst eşitliğidir ve bu eşitlik aşağıda verilmiştir.

$$E = E_{1/2} - (RT / nF) \cdot \ln [(i - i_{\text{da}}) / (i_{\text{dk}} - i)] \quad 2.2$$

E = Uygulanan potansiyel (volt)

$E_{1/2}$ = Yarı dalga potansiyeli (volt)

R = Gaz sabiti ($8.315 \text{ joule mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$)

T = Mutlak sıcaklık ($^{\circ}\text{K}$)

n = Aktarılan elektron sayısı

F = Faraday sabiti (96500 coulomb)

i = Uygulanan potansiyeldeki akım (μA)

i_{da} = Anodik sınır akımı (μA)

i_{dk} = Katodik sınır akımı (μA)

Bir maddenin elektroda göçü üç şekilde olabilir (40):

1. *Konveksiyon (mekanik karıştırma) ve ısısal karıştırma*: Karıştırma veya elektrodun yüzeyinden geçen çözeltinin akışı sonucunda mekanik hareketi kapsamaktadır. Çözeltinin sabit hız ve sıcaklıkta homojen olarak karıştırılmasıdır.

2. *Elektrostatik çekim (iyonik göç)*: Uygulanan potansiyelin elektrotları yüklemesi sonucu, elektrotların çözeltideki iyonları elektrostatik kuvvet uygulayarak çekmesi veya itmesidir.

3. *Difüzyon*: Maddenin derişik olduğu bölgeden (ana çözeltiden), seyreltik olduğu bölgeye (elektrot yüzeyine) hareketidir.

Analiz durgun bir ortamda yapılırsa konveksiyon, sabit sıcaklıkta yapılırsa ısısal karışım önlenabilir. İyonik göçü önlemek için ise elektroaktif maddenin aktarım sayısını azaltmak gerekir. Çözeltiye incelenecek madde derişiminin en az yüz katı fazla ve eşdeğer iletkenliği yüksek olan bir tuz çözeltisi eklenirse, elektroaktif maddenin aktarım sayısı sıfıra yaklaşır (36). Eklenen bu tuz çözeltisine *destek elektrolit* adı verilir. Bunlar tuz, asit veya bazların uygun çözeltileri olabilir. Destek elektrolit eklenmesinin bir diğer yararı da çözeltinin direncini düşürerek IR potansiyelini azaltmaktır.

Polarografide konveksiyon ve iyonik göç yok edilerek veya etkileri en aza indirilerek maddenin elektrota difüzyonla ulaşması sağlanır.

Polarografik Akımlar

Sınır akımının oluşmasına neden olan olaylara göre polarografik akımlar difüzyon, adsorpsiyon, kinetik ve katalitik kontrollü sınır akımı olmak üzere çeşitlere ayrılır (Tablo 2.2) (37) .

Tablo 2. 2. Sınır akımı çeşitleri ve farklı parametreler ile değişimi

Akım (i)	Cıva sütun yüksekliği (h)	Derişim (C)	Tampon bileşimi	pH	Sıcaklık katsayısı (1/i) (d_i/d_t)
Difüzyon (i_d)	$K. h^{1/2}$	k. C	Bağımsız	Bağımsız	% 1.6
Kinetik (i_k)	$K. h^0$	k. C	Bağımlı	Bağımlı	% 5–20
Adsorpsiyon (i_a)	$K. h^1$	Sınırlı	Bağımsız	Bağımsız	Değişken
Katalitik (i_{kata})	Değişken	Sınırlı	Bağımlı	Bağımlı	-

*k = sabit bir terim

1. Difüzyon Kontrollü Sınır Akımı (31) :

Elektroliz, karıştırılmayan durgun ortamda ve destek elektrolit eklenerek yapılırsa, konveksiyon ve iyonik göç önleneneğinden akım yalnız difüzyonla gelen madde miktarına bağlı olur. DCE'ye uygulanan potansiyel, polarogramın sınır akımı bölgesinde ise ve elektron aktarım hızı elektrot yüzeyine gelen elektroaktif maddeyi hemen indirgeyecek veya yükseltgeyecek kadar büyük ise, akım elektrot yüzeyine difüzyonla gelen madde miktarı ile belirlenir. Bu durumda akım difüzyon kontrollüdür denir. Sınır akımı bölgesinde potansiyel uygulanır uygulanmaz elektrot yüzeyindeki iyon veya moleküller hemen elektrolizleneceğinden elektrot yüzeyine çok yakın bir bölgede elektroaktif madde derişimi sıfır olacaktır. Ana çözelti elektrot yüzeyindeki bu derişim farkı ile madde elektrot yüzeyine doğru

difüzlenecektir.

Maddeler daha derişik oldukları bölgeden daha seyreltik oldukları bölgeye Fick kanunları ile difüzlendirler. Fick'in 1. kanuna göre birim yüzeye difüzllenen madde miktarı aşağıdaki diferansiyel eşitlikle ifade edilir.

$$q(x,t) = D [\partial C(x,t) / \partial x] \quad 2.3$$

x = Elektrot yüzeyinden olan uzaklık

t = zaman

ve Fick'in 2. kanunu ise:

$$\partial C(x,t) / \partial t = D [\partial^2 C(x,t) / \partial x^2] \quad 2.4$$

şeklindedir. Elektrot yüzeyinde oluşan akım, birim yüzeye gelen madde miktarı ile orantılıdır. Akım aşağıdaki eşitlikle ifade edilebilir:

$$i = nFA q(0,t) \quad 2.5$$

$q(0,t)$, elektrotun birim yüzeyine t anında gelen madde miktarıdır. Fick kanunları olarak ifade edilen diferansiyel denklemlerin genişleyen küresel elektrot için çözölüp q değerin yarıdaki eşitlikte yerine konmasıyla aşağıdaki eşitlik elde edilir.

$$i = 0.732 n F (C - C_{(x=0)}) D^{1/2} m^{2/3} t^{1/6} \quad 2.6$$

Bu eşitlikteki terimlerin açıklamaları aşağıdaki gibidir.

i = Damla ömrü sonundaki akım (A)

n = Aktarılan elektron sayısı

F = Faraday sabiti

C = Ana çözeltideki elektroaktif madde derişimi (mol/cm^3)

$C_{(x=0)}$ = Elektrot yüzeyindeki elektroaktif madde derişimi (mol/cm^3)

D = Difüzyon katsayısı (cm^2/s)

m = Cıvanın akış hızı (g/s)

t = Damlama süresi (damla/s)

Bu eşitlik, polarogramın her bölgesinde geçerlidir. Sınır akımı bölgesinde elektron transfer tepkimesi çok hızlı olacağından $C_{(x=0)} = 0$ 'dır. Bu değer eşitlikte yerine konursa aşağıdaki eşitlik elde edilir.

$$i_d = 0.732 n F C D^{1/2} m^{2/3} t^{1/6} \quad 2.7$$

Bu eşitlik, İlkoviç eşitliği olarak bilinir. Bu eşitlikteki akım (i_d) damla ömrünün sonundaki difüzyon kontrollü sınır akımdır. Damla ömrü (t) sabit bir değere sahiptir. Damlanın oluşmaya başlama ve kopma zamanı arasında akım artar. Bu artış $t^{1/6}$ ile orantılıdır. Ortalama akım damla ömrü sonundaki maksimum akımın 6/7'si kadardır. İlkoviç eşitliği ortalama akım için yazılırsa katsayı 0.627 olarak değişir.

$$i_d = 0.627 n F C D^{1/2} m^{2/3} t^{1/6} \quad 2.8$$

Bir polarografik deneyde cıva sütun yüksekliği (h) sabit tutulursa cıvanın akış hızı (m) ve damla ömrü (t) de sabit kalır. Deney sabit sıcaklıkta yapılırsa difüzyon katsayısı da sabit olacağından İlkoviç eşitliği aşağıdaki gibi yazılabilir.

$$i_d = k C \quad 2.9$$

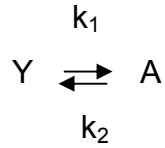
Bu eşitlikte C ana çözelti derişimi olduğu için polarografi nicel analizlerde kullanılabilir. Yukarıda verilen eşitlik, koordinat sisteminin sıfır noktasından geçen bir doğru denklemdir.

Polarografide kullanılan DCE çok küçük yüzeyli bir elektrottur. Bu tür elektrotlara mikroelettrot adı verilir. Mikroelettrot üzerinde çok az miktarda madde elektrokimyasal değişikliğe uğradığı için aynı çözelti ile deney

istenildiği kadar tekrarlanabilir.

2. Kinetik Kontrollü Sınır Akımı:

Elektron aktarım basamağından önce kimyasal tepkime söz konusu ise ve elektroaktif A maddesi, elektroinaktif Y maddesinden oluşuyorsa aşağıdaki dengeler söz konusudur.

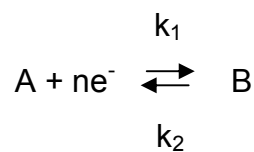


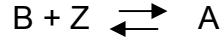
Eğer indirgenen madde (A) derişimi Y ile sınırlı ise, oluşan akım da Y derişimi ile sınırlıdır ve akım kinetik kontrollüdür. Bu durumda difüzyon ne kadar hızlı olursa olsun elektrot yüzeyindeki A derişimi, Y'nin derişimi ve k_1 (veya K denge sabiti) ile kontrol edilir.

Bu akım Y derişimi ile doğrusal olarak değişir ve k_1 ile k_2 'ye bağlı olduğu için sıcaklık, pH ve iyonik şiddet gibi faktörlerden çok etkilenir.

3. Katalitik Kontrollü Akım:

Bazı durumlarda elektrokimyasal değişikliğe uğrayan B maddesi ortamdaki elektroinaktif Z ile tepkimeye girerek yeniden A maddesini oluşturabilir. Katalitik mekanizma adı verilen bu mekanizma aşağıdaki gibi yazılabilir.





B ürünü Z ile tepkimeye girip A'yı yeniden oluşturur. Elektroaktif A maddesi tekrar indirgeneceği için difüzyon kontrollü akımdan çok daha büyük akım gözlenecektir (37).

Katalitik akım ortam şartlarından çok etkilenir. Çünkü Z' nin katalitik etkisi ile k hız sabitleri ortam şartlarından çok etkilenen iki parametredir.

Normal olarak tersinmez olan ve oldukça negatif potansiyellerde gözlenen hidrojen iyonunun indirgenme dalgası bazı maddelerin katalitik etkisi ile pozitif potansiyellere kaydırılır. Katalitik hidrojen dalgası adı verilen bu dalganın akımı, katalitik akım ile aynı özellikleri gösterir. Örneğin piridin molekülleri H^+ ile birleşerek piridinyum iyonuna dönüşür. Piridinyum iyonundaki proton, serbest protondan daha kolay indirgenir ve katalitik hidrojen dalgasına yol açar. Elektrotta meydana gelen tepkime her ne kadar piridinyum iyonunun indirgenmesi gibi görünüyorsa da aslında H^+ iyonunun indirgenmesidir. Piridin sadece katalizör etkisi göstermektedir. Bu nedenle oluşan dalgaya katalitik hidrojen dalgası adı verilmiştir. Akımın büyüklüğü piridin derişimine bağlıdır.

4. Adsorpsiyon Akımı:

Çözeltide bulunan maddeler elektrot yüzeyine adsorbe olunca hem kapasitif akım, hem de faradaik akım etkilenir. Faradaik akımının etkilenmesi iki farklı şekilde olabilir (31):

a) Elektroaktif madde veya ürün adsorbe olabilir. Böyle bir durumda normal dalganın yanında ikinci bir dalga gözlenir. Adsorpsiyon dalgası adı verilen bu dalga reaktif ve ürünün adsorplanmasına bağlı olarak normal dalgadan sırasıyla daha negatif veya daha pozitif potansiyelde gözlenebilir.

Ayrıca sınır akımı bölgesinde maksimum, minimum ve başka düzensizliklere yol açabilir.

b) Çözeltilerde reaktif ve ürünün dışında bir maddenin adsorplanması halinde dalgada kayma, bölünme ve deformasyon gibi düzensizlikler meydana gelebilir.

Adsorpsiyon akımı madde derişiminden bağımsızdır. Düşük derişimlerde elektrot yüzeyini kaplayacak kadar madde olmadığından akım difüzyon kontrollüdür. Belli bir derişimden sonra iki dalga gözlenir. Adsorpsiyon kontrollü akımlarda sıcaklık arttıkça akım azalır.

Faradaik ve Kapasitif (Yük) Akımlar

Elektroliz, elektrot yüzeyindeki tepkimeleri içerir. Her bir tepkimenin hızı ve dolayısıyla akım, kısmen elektron taşıma tepkimeleri, kısmen de çözeltinin elektrot yüzeyine taşıma hızı ile kontrol edilir. Elektron taşıma hızının, kütle taşıma hızından çok az olduğu durumlarda çözelti homojen bir görünümde olup ana çözelti ile elektrot yüzeyindeki elektroaktif madde derişimi aynıdır. Elektron aktarım hızı, elektroaktif maddenin tipine, derişimine, elektrotun tipine ve potansiyeline bağlıdır. Analizi istenilen elektroaktif maddenin elektrot-elektrolit ara yüzeyinde, taşınan elektron tarafından oluşturulan akıma “faradaik akım” denir. Ortalama faradaik akım İlkoviç eşitliği ile ifade edilebilir.

Elektrot yüzeyinde net bir faradaik akımın yanı sıra, faradaik olmayan akımlar da bulunmaktadır. Elektrot yüzeyine adsorbe olan maddenin elektrot-elektrolit ara yüzeyindeki elektriksel çift tabakanın kapasitansına etki etmesi sonucu oluşan akıma “kapasitif akım” denir. Kapasitif akım, elektrot potansiyeli veya elektrotun büyüklüğünün değişmesi sonucu oluşur. Bir damla süresince potansiyelde görülen değişim çok az olduğu için polarografide görülen kapasitif akımın nedeni elektrot yüzey alanındaki değişmedir.

$$i_c = 0.00569 \kappa (\varphi - E) m^{2/3} t^{-1/3} \quad 2.10$$

i_c = Kapasitif akım

κ = Çift tabakanın birim yüzey için kapasitansı (sığası)

φ = Sıfır yük potansiyeli (sıfır yük noktası)

E = Elektrot potansiyeli

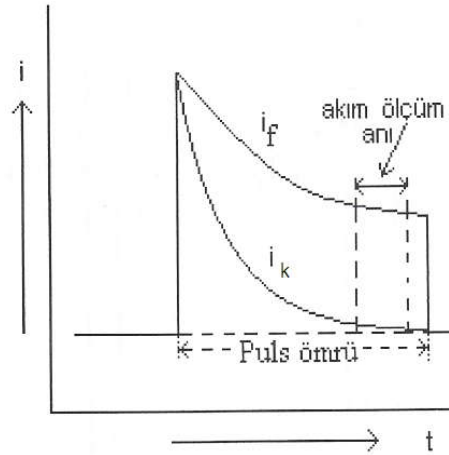
m = Cıvanın akış hızı (mg/s)

t = Damlama süresi (damla/s)

Elektroanalitik yöntemlerde, analizin duyarlılığını sınırlayan kapasitif akım etkisinin en aza indirilmesi gerekir.

Voltametrde duyarlılığı belirleyen artık akım olduğundan duyarlılık artışı sağlayabilmek amacıyla artık akımı giderici değişik teknikler geliştirilmiştir. Bunlardan biri puls şeklindeki potansiyellerin kullanıldığı normal puls polarografisidir. Artık akım kapasitif ve faradayik olmak üzere iki bileşenden oluşur. Bu akımların zamana bağlı değişimleri farklıdır. Eğer puls şeklindeki ani bir potansiyel çalışma elektrotuna uygulanırsa devreden geçen akım kapasitif ve faradaik akımlar Şekil 2.12'deki gibi zamana bağlı değişim gösterir. Pulsun sonunda her bir akım türünün toplam akım içindeki payı farklıdır. Bu andaki kapasitif bileşen hemen hemen sıfır gibidir. Akım şiddeti puls ömrünün sonunda ölçülürse kapasitif akımdan arınmış hemen hemen tümü faradaik olan akım elde edilmiş olur. Böylece ölçülen akım kapasitif bileşen içermediğinden ayrıca pulsun faradaik akıma sağladığı artış nedeni ile yöntemin duyarlılığı $10^{-6} - 10^{-7}$ M düzeyine çıkar. Şekil 2.9'da verilen sistemin R_3 giriş direncine puls üretici bir kaynaktan pulslar uygulanırsa R_2 direncine uygulanmakta olan çizgisel taramalı akıma bu pulslar bindirilmiş ve çalışma elektroduna uygulanmış olur. Pulsların uygulanması ya sabit bir doğru akım potansiyeline giderek artan genliklerdeki pulsların uygulanması ya da giderek artan tarama hızı $1-5 \text{ mV sn.}^{-1}$ olan bir doğru akım potansiyeline sabit genlikli pulsların bindirilmesi şeklinde olabilir. Bu tarzda oluşturulan sisteme normal puls polarografi, yöntemde de normal puls polarografisi denir. Bu yöntemde potansiyel tarama programı ve akım ölçümü

bilgisayar sistemi ile kontrol edilir (39).



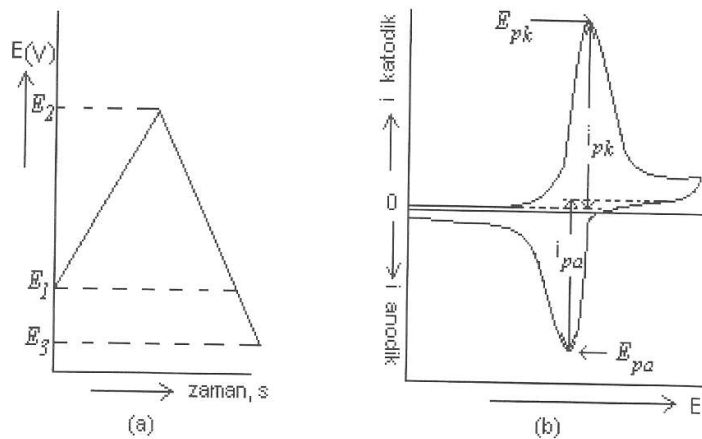
Şekil 2. 13. Puls ömrü içinde faradaik ve kapasitif akımların zamanla değişimi (i_f = faradaik akım, i_k = kapasitif akım)

Polarografide pulsler genelde damlama zamanının sonuna doğru damlamanın düşmesine yaklaşık 60 msn. kala uygulanır. Akım ölçümü ise puls bitimine yakın yapılır. Puls ömrü genellikle 5-10 msn. aralığında olup bir pulstan diğerine geçme zamanı ise 4 sn.'ye varabilmektedir. ΔE puls genliğindeki değişim çoğunlukla 2 mV olarak uygulanmaktadır. 2 -20 mV aralığında herhangi bir değer tercih edilebilir.

2.4.3. Dönüşümlü Voltametri (CV) ve Doğrusal Taramalı Voltametri (LSV) (34,43)

Bu yöntemlerde kullanılan sistem polarografide olduğu gibidir. Tek fark mikroelettrot yüzeyinin sabit olmasıdır. Normal polarografide, potansiyel tarama hızı (v), damla ömrüne göre çok yavaştır. Örneğin 5 mV/sn. tarama hızında damla süresi 1 sn. ise bir damla ömrü esnasında potansiyeldeki değişim 5 mV kadardır. Tarama hızı bir damla ömrü için 100-200 mV/s civarında tutulursa ve belli bir potansiyelden sonra ilk tarama yönünde tarama yapılırsa bu voltametrik yöntem *dönüşümlü voltametri (CV)* adını alır.

CV'de uygulanan potansiyelin zamanla değişim grafiği Şekil 2.14a'da gösterilmiştir. Potansiyel taraması E_1 ve E_2 arasında yapılırsa yöntem *doğrusal taramalı voltametri (LSV)* adını alır. Eğer E_2 potansiyeline ulaşıldıktan sonra aynı tarama yönüne göre ters yönden tarama yapılırsa yöntemin adı dönüşümlü voltametridir. Ters taramada potansiyel E_1 'de sonuçlanabileceği gibi farklı bir E_3 potansiyeline de götürülebilir.



Şekil 2. 14. CV'de a) Döngüsel (üçgensel) potansiyel tarama profili
b) Elde edilen akım potansiyel eğrileri

CV'de akım, potansiyele karşı grafiğe geçirildiğinde elde edilen eğriye dönüşümlü voltamogram denir (Şekil 2.14.b).

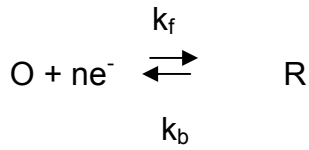
Tarama hızı pratikte 100 mV/s'den birkaç yüz V/s'ye kadar değiştirilebilir. Çok yüksek tarama hızlarında (birkaç bin V/s) çift tabaka yüklenmesi ve IR düşmesi problemleri ortaya çıkar. Ancak mikroelettrot kullanıldığı zaman bu tür problemler en aza iner.

CV'de tarama hızları değiştirilerek pik akımlarının tarama hızı ile değişmesinden akımın karakteri (adsorpsiyon, difüzyon) ve elektron aktarım tepkimesinden önce veya sonra kimyasal tepkimelerin olup olmadığı belirlenebilir. Ayrıca ileri ve geri tarama piklerinden tepkimenin mekanizması hakkında fikir edinebildiği gibi ileri taramadan kinetik veriler de bulunabilir. CV verileri ile bir elektrot tepkimesinin tersinirlik testi yapılabilir.

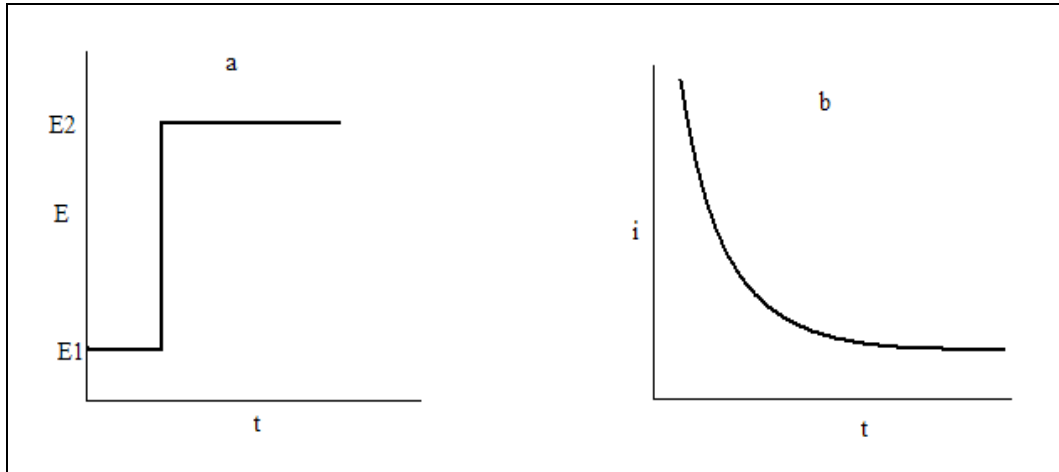
2.4.4. Kronoamperometri (CA)

Bir potansiyel basamak tekniği olan CA'de, çalışma elektrotunun potansiyeli ani olarak değiştirilir ve durgun ortamda akım - zaman ilişkisi incelenir. Zamanın karekökü ile azalan bir akım oluşur.

Bir elektrot yüzeyinde,



reaksiyonunun yürüdüğünü ve başlangıçta çözeltide yalnız O maddesinin bulunduğunu varsayalım. CA'de çözeltiye daldırılan çalışma elektrotuna uygulanan potansiyel - zaman grafiği Şekil II.9.a'da gösterildiği gibidir. Önce çalışma elektrotuna herhangi bir indirgenmenin olmadığı E_1 potansiyeli uygulanır. Sonra potansiyel ani olarak E_2 'ye değiştirilir. E_2 potansiyeli, indirgenme difüzyon kontrollü olacak şekilde seçilir. E_2 ; difüzyon sınır akımının plato bölgesinden, E_1 ; elektroaktif maddenin indirgenmediği ve artık akımın olduğu herhangi bir potansiyel seçilir.



Şekil 2. 15. CA'de a) çalışma elektrotuna uygulanan potansiyel programı, b) elde edilen akım-zaman eğrisi

E_1 potansiyelinde reaksiyon olmaz, E_2 potansiyelinde ise akım difüzyon kontrollüdür. Şekil 2.15.b'de CA'de elde edilen akım-zaman eğrisi görülmektedir.

E_1 ve E_2 potansiyeli seçilirken önce maddenin DC polarogramı veya CV'si alınır. Akımın henüz gözlenmediği artık akım bölgesindeki potansiyel başlangıç potansiyeli (E_1) olarak seçilir. Normal polarogramın plato bölgesinde veya CV'nin pik potansiyelinin daha ötesinde bir potansiyelde E_2 potansiyeli olarak alınır. E_1 ve E_2 potansiyellerinin seçimi Şekil 2.16'de gösterilmiştir. Potansiyel E_2 değerinde belirli bir süre sabit tutulur. Bu potansiyelde oluşan akımın zamanla değişimi aşağıdaki Cottrell eşitliğinde verildiği gibidir.

$$i = (n F A D^{1/2} A C_0) / (\pi^{1/2} t^{1/2}) \quad 2.11$$

i = Akım (A)

n = Aktarılan elektron sayısı

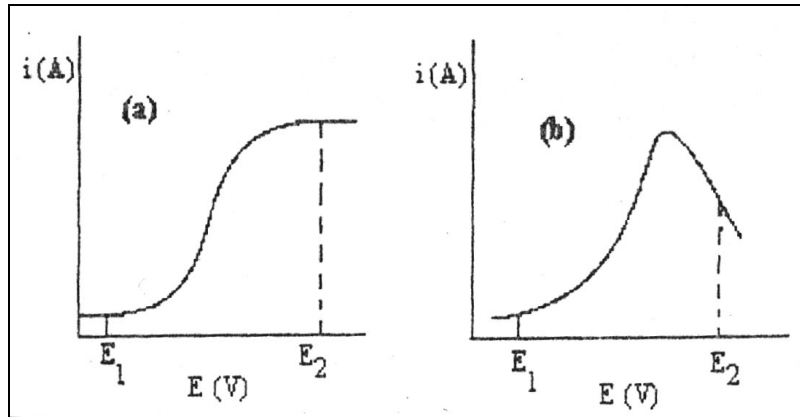
F = Faraday sabiti (99.485 C/eq)

A = Elektrot alanı (cm^2)

D = Difüzyon katsayısı (cm^2/s)

C_0 = Maddenin konsantrasyonu (mol/cm^3)

t = zaman (s)



Şekil 2. 16. CA'de E_1 ve E_2 potansiyellerinin seçimi

a) DC polarogramından, b) CV voltamogramından

Cottrell eşitliğine göre akım, $t^{-1/2}$ 'ye göre grafiğe geçirildiği zaman orijinden geçen bir doğru elde edilir. Bu grafik yardımıyla bir elektrot reaksiyonunun difüzyon kontrollü olup olmadığı test edildiği gibi elektroaktif maddenin difüzyon katsayısı ve aktarılan elektron sayısı da bulunabilir. Ancak deneyin güvenilir olması için zaman aralığının geniş tutulması gerekir. 100-300 ms'lik zaman aralığı bu deney için yeterlidir. Pratikte 1 ms - 10 s arasındaki zaman aralığında tarama yapılır.

2.4.5. Sıyırma Voltametrisi

Sıyırma yöntemleri başlangıç basamağı yaygın ve karakteristik olan çok sayıdaki elektrokimyasal yöntemi kapsar. Elektroanalitik yöntemler içinde en duyarlı yöntemdir. Bütün bu işlemlerde, analit genellikle karıştırılan bir çözeltide önce bir mikroelettrot üzerine biriktirilir. Hassas bir şekilde ölçülen bir süre sonunda, elektroliz ve karıştırma durdurulur ve birikmiş analit voltametrik yöntemlerden biri ile tayin edilir. Analizin bu ikinci basamağında analit mikroelettrot üzerinden çözülür veya sıyrılır; bu nedenle bunlara sıyırma yöntemleri denir. *Anodik sıyırma yöntemlerinde (ASV)*, mikroelettrot, biriktirme basamağı sırasında bir katot olarak; analitin ilk haline tekrar yükselttiği sıyırma basamağında ise, anot olarak davranır. *Katodik sıyırma yönteminde (KSV)*, mikroelettrot, biriktirme basamağı sırasında bir anot olarak; sıyırma basamağında da katot gibi davranır. Biriktirme basamağında, analit elektrokimyasal olarak bir önderiştirilme işlemine uğrar; yani mikroelettrot yüzeyindeki analit derişimi çözeltideki derişiminden çok daha fazladır.

Sıyırma yöntemleri eser element tayininde önemli bir yer tutar, çünkü elektrolizdeki önderiştirme basamağı sayesinde eser miktardaki bir element tayin edilebilir. Bu yöntemlerle 10^{-6} - 10^{-9} M arasında analiz yapılabilir.

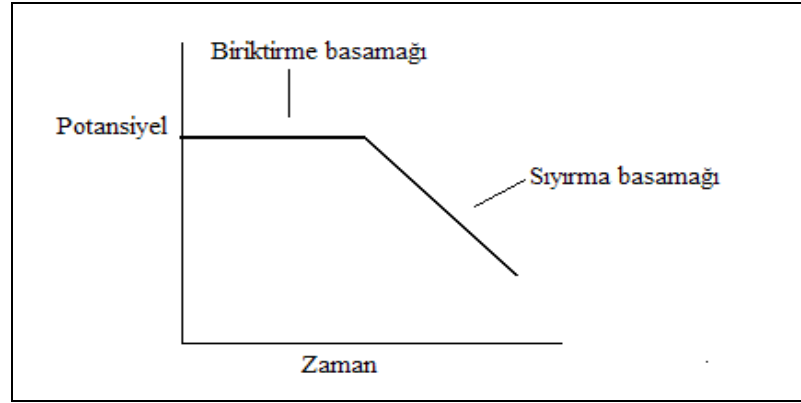
Elektrot yüzeyine herhangi bir şekilde biriktirilen maddenin analizi için sıyırma analiz yöntemi kullanılabilir. Yöntem iki ayrı bölümden oluşmaktadır. İlk adımda analiz çözeltisi içindeki organik maddelerin çalışma elektrotu üzerine elektrokimyasal yolla veya adsorbe edilerek birikmesi sağlanır. Analizi yapılacak maddenin çözeltiden indirgenmesi ya da yükseltgenmesi

sonucu biriktirilir (elektrokimyasal yol) veya çözeltide bulunan madde sabit potansiyelde herhangi bir kimyasal değişikliğe uğratılmadan doğrudan doğruya elektrot yüzeyine fiziksel adsorpsiyonla biriktirilir (*Adsorptif Sıyırma Voltametrisi* (AdSV)). İkinci adım olan sıyırma adımında ise elektrot üzerinde biriktirilmiş olan organik madde voltametrik yöntemlerden biri ile sıyırılır. Sıyırma adımında sinüs dalga, puls, diferansiyel puls veya kare dalga gibi potansiyel-zaman dalga şekilleri kullanılmaktadır (31,32,44).

Elektrot üzerine biriken maddelerin miktarı, maddelerin ve çözeltinin özelliğine, elektrot materyaline ve boyutuna, potansiyele, zamana, pH'ya, iyonik güce, maddenin elektroda taşınmasına, sıcaklığa, biriktirme süresi ve çözeltinin karıştırılma hızı gibi faktörlere bağlıdır. Adsorpsiyon katsayısı 10^5 cm'den büyük olan maddeler için AdSV yöntemi kullanılır. Maksimum biriktirme için en uygun koşullar pik büyüklüğü denenerek saptanır. Maddenin elektrot üzerine adsorbe edilerek biriktirilmesi adımında, elektrot potansiyeli, analizi yapılacak organik maddenin indirgenme potansiyelinden daha pozitif potansiyelde belli bir süre sabit tutulur. Bu süre boyunca analiz edilecek organik maddeler elektrot yüzeyine adsorbe olarak birikir. Bu süre boyunca çözelti karıştırılır. Elektrot alanı küçük ve biriktirme süresi kısa olduğu için elektrot yüzeyine adsorbe edilerek biriktirme adımında akımın değişmediği varsayılır. Biriken organik maddelerin elektrot yüzeyine ulaşma hızları, organik maddelerin derişimine, elektrot çözeltisinin difüzyon özelliklerine ve kullanılan elektrotun alanına bağlı olarak değişir. Tekrarlanabilir, doğru sonuçlar alabilmek için organik maddelerin elektrot yüzeyine adsorbe olarak biriktirilmelerinde şartlar (elektrot yüzeyi, alanı, karıştırma hızı, biriktirme süresi ve sıcaklık) analiz boyunca değişmeyip aynı kalmalıdır (31,43,45,46).

Biriktirme adımından sonra karıştırma durdurularak bir süre çözeltinin durulması beklenir. Sıyırma adımında elektrot potansiyeli düzgün değişirken elektrotta adsorbe olarak birikmiş organik maddeler tepkime potansiyellerine ulaştıklarından akım oluştururlar, sıyırma akımı elektrot potansiyelinin fonksiyonu olarak okunmaktadır. Bu akım organik maddenin elektrottaki ve çözeltideki derişimi ile doğru orantılıdır. AdSV ile analizde, maddeyi elektrot yüzeyine adsorbe ederek biriktirme, dinlenme ve sıyırma adımları izlenir.

Sıyırma adımıinda indirgenme, yükseltgenme veya desorpsiyon oluşması söz konusudur (Şekil 2.17).



Şekil 2. 17. Sıyırma tekniklerinde potansiyel-zaman profili

Biriktirme basamağı sırasında çözeltiyi karıştırmak, analiz edilecek maddenin elektrot yüzeyine ulaşma hızını artırır. Ancak karıştırmanın kontrol edilen bir hızda olması gerekir. Çözeltide ve elektrot yüzeyinde tepkimeler tersinir olduğundan elektrot yüzeyinde biriktirilen maddenin sıyırma işleminden sonra tekrar çözeltiye geçmesi gerekir. Bu ise karıştırma hızı ve biriktirme süresi ile doğrudan orantılıdır. Karıştırma, çok yavaş olursa daha az madde birikir ve ürünün geri kazanılma verimi artar. Ancak bu durum duyarlılığın azalmasına ve daha uzun bir zaman harcanmasına yol açar. Sıyırma voltametrisinde bazen çözeltiyi hiç karıştırmadan, yalnız difüzyonla madde göçü sağlanarak ta biriktirme yapılabilir. Çok hızlı bir karıştırma geri kazanma verimini düşürebilir. Ayrıca karıştırma işleminin homojenliğini bozar, çözeltinin saçılmasına neden olabilir. Karıştırma, çözeltide boşluk oluşturmayacak ve asılı duran cıva elektrotunu yerinden oynatmayacak biçimde sabit hızda tutulmalıdır. Biriktirme basamağında karıştırma hızının ve süresinin ayarlanması hem maddenin geri kazanılması hem de duyarlılıkla ilgili parametreler olduğundan bu iki parametrenin optimum değerlerinin belirlenmesi gerekir. Elektrot yüzey alanının büyütülmesi de akımı dolayısıyla duyarlılığı da artıracaktır (31,46).

Biriktirme süresinin belirlenmesi de sıyırma voltametrisinde en önemli

parametrelerden biridir. Analizin duyarlılığı biriktirme süresi ile doğru orantılıdır. Teorik olarak, elektrot yüzeyinde ne kadar çok madde biriktirilirse duyarlılık da o kadar yüksektir. Çözeltideki maddenin tamamının elektrot yüzeyine toplanması durumunda maksimum duyarlılık elde edilir. Ancak uzun süre madde biriktirilmesinin sakıncaları da olabilir. Elektrot yüzeyinde çok madde birikmesi sonra maddenin geri kazanılmasına engel olabilir. Uzun bekleme sonucunda elektrot yüzeyine istenmeyen tepkimelerin meydana gelmesine neden olabilir. Ürün kararsız olabilir ve elektroinaktif bir hale dönüşebilir.

Biriktirme esnasında elektrota uygulanan potansiyel, pik yüksekliğini etkiler. Bunun için normal sıyırma voltametrisi ile analizi yapılacak maddenin yarı dalga potansiyelinden birkaç yüz milivolt daha yüksek potansiyelin uygulanması gerekir. Çünkü normal sıyırma voltametrisinde maddeler elektrot yüzeyine bir kimyasal tepkime ile biriktirilirler. AdSV'de ise uygulanacak potansiyelin herhangi bir kimyasal tepkimeye yol açmayacak değerde tutulması gerekir. Bu nedenle AdSV'de bu potansiyel artık akım bölgesinden seçilmelidir.

Sıyırma voltametrisinde karışımdaki maddelerin aynı anda analizi mümkündür. Biriktirme potansiyeli özellikle karışım analizlerinde önemlidir. Birkaç tane metal iyonu içeren bir çözeltiden biriktirme yapılırken sıyırma esnasında tayin edilecek maddenin pikini kapatacak maddenin biriktirilmesinin engellenmesi gerekir. Girişim yapabilecek bileşenler bilinmeli ve biriktirme potansiyeli buna göre seçilmelidir. Çok sayıda maddenin bulunduğu bir çözeltide ne kadar negatif bir biriktirme potansiyeli uygulanırsa girişim yapma ihtimali de o kadar artırılmış olur.

Sıyırma voltametrisi yöntemlerinde damlayan cıva elektrot kullanılmaz. Çünkü cıvayla amalgam halindeki metal ürün damla kopması ile çözeltiye geri taşınmış olur. Bunun için sıyırma yöntemlerinde asılı duran cıva damlası veya bir katı elektrot kullanılır.

AdSV yönteminde, asılı duran cıva elektrotu (ADCE) en çok kullanılan çalışma elektrotudur. Ayrıca camı karbon, mum emdirilmiş grafit ve platin gibi katı elektrotlarda kullanılmaktadır.

Cıva film elektrotu (CFE) yüzey alan/hacim oranı büyük ve yüksek duyarlılıkta bir elektrottur. Aynı zamanda cıva filminden yüzeye doğru difüzyon çok hızlı olduğundan iyi bir ayırım sağlar. Cıva filmine destek olarak en çok karbon elektrotlar kullanılır.

Bir maddenin sıyırma voltametrisi ile analiz edilebilmesi için aşağıdaki özellikleri taşıması gerekir:

1. Biriktirme basamağında ürünün cıva elektrotta eğer çözünürse çözeltiye geri difüzenir.
2. Çözünmeyen bir ürün oluşuyorsa çok fazla seyrelmelerde bile çözünmemelidir. Ama yüksek dirençli bir tabaka oluşturmamalıdır.
3. Biriken madde tekrar oksitlenme kabiliyetinde olmalıdır. Böylece bir sıyırma piki oluşabilir. Yani elektrot tepkimesinin tersinir olması gerekir.
4. Biriktirilen maddenin kararlı olması ve çözelti tarafından tutulması gereklidir.

AdSV voltametrisi yöntemi ve ASV yöntemi ile DP özelliklerinin bir araya geldiği diferansiyel puls anodik sıyırma voltametrisi (DPASV) ve diferansiyel puls adsorptif sıyırma voltametrisi (DPAdSV), biriktirme yapıldıktan sonra sıyırma adımıyla diferansiyel puls sinyali kullanılır (46,47).

Diferansiyel puls adsorptif sıyırma voltametrisi (DPAdSV) yönteminde sinyal kolaylıkla yorumlanabilecek “Gauss Eğrisi” şeklinde piklerden oluşmaktadır.

2.4.6. Kare Dalga Voltametrisi (SWV-OSWV)

SWV, ilk defa 1930 yılında Kemula tarafından adsorpsiyon olaylarının incelenmesi için düşünülmüş, ancak analitik kullanımı 1952 yılında Fujinaga ve arkadaşları tarafından fark edilmiştir. Kare dalga voltametrisine hem teorik hem de cihaz geliştirilmesi bakımından en büyük katkı Barker tarafından yapılmıştır.

SWV’de sabit elektrotlarda teorik ve uygulama bakımından gelişimi 1985 yılında Osteryoung tarafından gerçekleştirilmiştir (OSWV).

Şekil 2.9’da ki R_2 direncine merdiven basamakları şeklinde doğru potansiyel (Şekil 2.18 a), R_1 direncine de kare dalga şeklindeki değişken bir

potansiyel (Şekil 2.18 b) yüklenirse sisteme, bu gerilimlerin toplamı olan Şekil 2.18. c deki kare dalga uygulanmış olur. Bu tarzda oluşan sistemle gerçekleştirilen elektrometrik yöntemle kare dalga voltametrisi denir. Uygulanan potansiyel şekil olarak pulslara benziyor olsa da bu yöntem bir puls tekniği değildir. Sinüsoidal akım gibi değişken bir akım olup zamanla değişimi kare şeklindedir. Akım potansiyel eğrileri pik şeklindedir (Şekil 2.19).

Pik potansiyeli tersinir tepkimelerde $E_{1/2}$ değerine eşittir. Pik akımının büyüklüğünde derişimle orantılıdır ve

$$I_p = [n F D^{1/2} C / (t \pi)^{1/2}] \times \psi (\Delta E_s, \Delta E_{kd}) \quad 2.12$$

eşitliği ile verilir. ψ birimsiz basamak ve kare dalga genliğine bağlı olan bir fonksiyondur.

i = Akım (A)

ψ = Birimsiz sabit ($\Delta E_s, \Delta E_{kd}$ = Basamaklı ve kare dalga potansiyel genliği)

F = Faraday sabiti (99.485 C/eq)

D = Difüzyon katsayısı (cm^2/s)

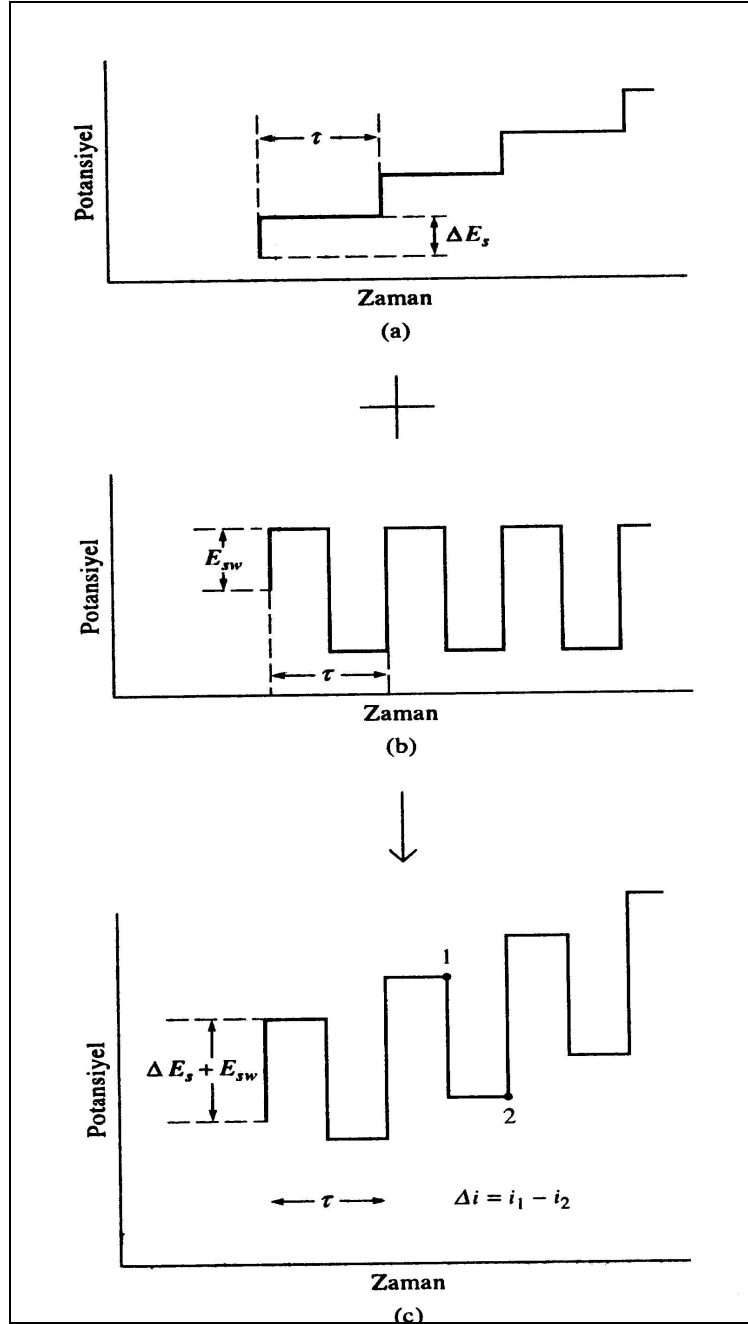
C = Maddenin konsantrasyonu (mol/cm^3)

t = zaman (s)

Kare dalga voltametrisinde, Şekil 2.18.b'deki pulsun Şekil 2.18.a'daki basamak sinyali üzerine bindirilmesiyle elde edilen uyarma sinyali Şekil 2.18.c'de görülmektedir. Dalga şekli, simetrik kare dalgalardan oluşan merdiven görünüşündedir.

Bir kare dalganın tamamlanma süresi (her basamağın boyu) *periyod* adını alır ve τ ile gösterilir. Yaklaşık 5 ms civarındadır. Birbirini takip eden kare dalgalar arasındaki yükseklik farkına *adım yüksekliği* (sinyalin potansiyel basamağı) denir ve ΔE_s ile gösterilir. Genelde ΔE_s 10 mV'dur. Her bir dalganın alt ve üst noktaları arasındaki farkın yarısı *kare dalga yüksekliği* olarak bilinir ve E_{sw} şeklinde gösterilir. Pulsun büyüklüğü $2 E_{sw}$ ise, genelde 50 mV'dur. Sistemin bu şartlar altında çalıştırılması 200 Hz' lik puls

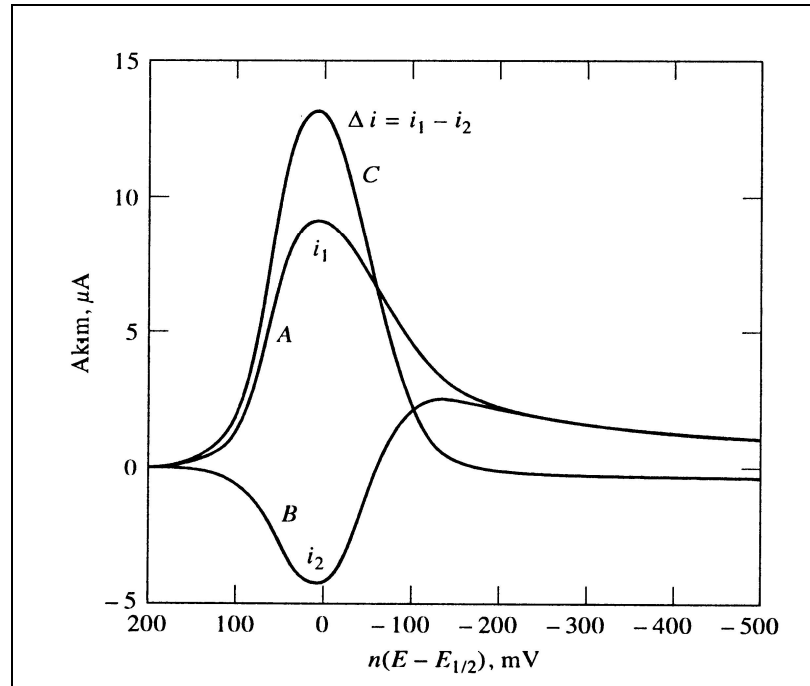
frekansına karşılık gelir ve bu durumda 1 V' luk bir tarama 0.5 s'de yapılır. Çoğu zaman τ yerine $1/\tau$ 'a eşit olan *frekans* kullanılır ve f ile gösterilir.



Şekil 2. 18. Bir kare dalga voltametrisinde uyarma sinyalinin oluşumu.

Şekil 2. 18. a'daki uyarma sinyali, b'deki puls taraması ile c'deki kare dalga uyarma sinyalini verecek şekilde toplanmaktadır. Akım cevabı Δi , 1 potansiyelindeki akımdan 2 potansiyelindeki akım çıkarılarak bulunur.

Tersinir bir indirgenme tepkimesinde bir pulsun boyutu, ileri tarama sırasında oluşan ürünün, geri tarama sırasında yükseltgenmesini sağlamaya yetecek kadar büyüktür. OSWV'de akım ölçümleri ileri ve geri pulsların sonuna doğru t_s kadar bir zaman aralığında yapılır. İleri puls için ölçülen akım i_1 , geri puls için ölçülen akım i_2 olmak üzere her bir kare dalganın *net akımı* $\Delta i = i_1 - i_2$ 'ye eşittir ve *ileri fark akımı* olarak adlandırılır (Şekil 2.19). Genelde voltamogramları elde etmek için bu akımların farkı (Δi) grafiğe geçirilir. Bu fark derişimle doğru orantılıdır, pik potansiyeli de polarografik yarı dalga potansiyeline karşılık gelir. Ölçüm son derece hızlı yapıldığından birkaç voltametrik taramanın sinyal ortalaması alınarak analizin kesinliğini artırmak mümkündür. Kare dalga voltametrisinin tayin sınırları $10^{-7} - 10^{-8}$ M arasındadır.



Şekil 2. 19. OSWV'de tersinir bir tepkime için net akım

OSWV'de deneysel parametreler belirli aralıklarda seçilir. Frekansın artması ile veya buna bağlı olarak periyodun azalması ile kare dalga pik akımı ve dolayısıyla duyarlılığı artar. 1000 Hz'den daha yüksek frekansla yapılan çalışmalar çok büyük dikkat ve hassasiyet gerektirir. 200 Hz duyarlılık

ve kararlılık açısından analitik amaçlı çalışmalar için problemsiz bir frekans olarak gözlenmiştir. Sonuç olarak frekans genellikle $10 \leq f \leq 1000$ Hz veya periyod $1 \leq \tau \leq 100$ ms aralığında seçilir. Adım yüksekliği ise aktarılan elektron sayısına (n) bağlı olarak $\Delta E_s = 10/n$ mV eşitliğinden seçilir. OSWV'de tarama hızı, frekans ve periyod ile adım yüksekliğine bağlı olarak belirlenir ve *etkin tarama hızı (ETH)* olarak adlandırılır. ETH aşağıdaki eşitlikle belirlenir.

$$ETH = f \times \Delta E_s = 1/\tau \times \Delta E_s \quad 2.13$$

ΔE kadar bir potansiyel aralığında tarama yapmak için sadece τ ($\Delta E / \Delta E_s$) kadar bir zaman gereklidir. Uygun frekansların seçimi ile deney süreleri çok azaltılabilir. Örneğin $n=1$ iken $\Delta E_s = 10$ mV ve $f = 200$ Hz ($\tau = 1/200$) ise $ETH = 2$ V/s'dir. 500 mV'luk (ΔE_s) bir potansiyel aralığını tarayabilmek için gerekli olan süre sadece 0.25 s'dir. Bundan dolayı SWV hızlı taramalı teknik olarak tanımlanır.

Oksijenin indirgenmesi tamamıyla tersinmez olduğu için kare dalga şekli bu indirgenmeye cevap vermez. Bundan dolayı analiz çözeltiden oksijen uzaklaştırılmadan yapılabilir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Tez Çalışmasında Kullanılan Gereçler

3.1.1. Cihazlar

- Voltametrik Analiz Cihazı (BAS 100 B/W)
- UV Spektrofotometre (Agilent 8453)
- pH metre (Metler Toledo MA 235)
- pH metre Kombine Elektrot (Orion)
- Hassas Terazî (Mettler Toledo AG 285)
- Terazî (Shimadzu Libror EB-330 H)
- Ultrasonik Banyo (Bandelin, Sonorex, RK 514 BH)
- Vorteks karıştırıcı (Nüve, NM 110)
- Santrifüj (Nüve, NF 1215)
- Otomatik mikropipet (Biohit 10-100 µl ve 100-1000 µl)
- Etüv (Nüve, FN 400)

3.1.2. Kimyasal Maddeler

- Rosuvastatin kalsiyum ($C_{22}H_{28}FN_3O_6S$, Dr. Reddy's Lab.)
- Sodyum asetat (CH_3COONa , Merck)
- Glasiyel asetik asit ($Glacial\ CH_3COOH$)
- Borik asit (H_3BO_4 , Merck)
- Sodyum hidroksit ($NaOH$, Merck)
- Hidroklorik asit (HCl , Merck)
- Fosforik asit (H_3PO_4 , Merck)
- Nitrik asit (HNO_3 , Merck)
- Etanol (C_2H_5OH , Merck)
- Metanol (CH_3OH , Merck)
- Aseton (CH_3COCH_3 , Merck)
- Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4 , Merck)
- Disodyum hidrojen fosfat ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$, Merck)
- Tetrametilamonyum klorür ($((CH_3)_4NCl$, BDH)

- Tetrametilamonyum iyodür ((CH₃)₄NI, Sigma)
- Tetrametilamonyum bromür ((CH₃)₄NBr, BDH)
- Tetraetilamonyum iyodür ((C₂H₅)₄NI, BDH)
- Potasyum klorür (KCl, Merck)
- Civa (Hg, BDH, Analar)
- Azot gazı (N₂, Habaş)
- Mili-Q su (Bütün analizlerde bu su kullanılmıştır)

3.1.3. Cam Malzemeler ve Diğer Sarf Malzemeleri

- Cam pipet (1-10 mL'lik, Pyreks)
- Balon joje (5-1000 mL'lik, Pyreks)
- Beher (Çeşitli hacimlerde, Pyreks)
- Santrifüj Tüpü (Borasilikat cam)
- Havan (Cam)
- Enjektör (50 µL, Hamilton)
- Vial (Cam)
- Eppendorf tüp (Plastik)
- Spatül (Metal)

3.1.4. Analizi Yapılan Farmasötik Preparatlar

Bu çalışmada kullanılan Crestor[®] Tablet Astra Zeneca A.Ş.'den temin edilmiştir.

3.2. Deneyler İçin Gerekli Hazırlıklar

3.2.1. Etkin Maddelerin Saflığı

Rosuvastatinin saflığı, erime noktası tayini, IR ve UV spektrumu alınarak Ek 5'da sunulan sertifika ve kaynaklarda verilen değerlerle ile kontrol edilmiştir (Sertifika no: ADBK0018).

3.2.2. Çözeltilerin Hazırlanması

Çözeltilerin hazırlanmasında kullanılan su, Milli-Q su saflaştırma cihazından elde edilen, 0.45 µm filtreden geçmiş saf sudur. Suyun saflık kontrolü cihazdaki entegre iletkenlik kontrolü ile yapılmaktadır.

Stok Rosuvastatin Kalsiyum Çözeltisi ($1000 \mu\text{g mL}^{-1}$): 25 mg standart rosuvastatin kalsiyum tartılıp 10 mL metanol ile çözdükten sonra yine aynı çözücü ile 25 mL'ye tamamlanmış ve +4°C'de buzdolabında saklanmıştır. Standart rosuvastatin çözeltileri, bu stok çözeltinin istenen derişime voltametrik yöntemler için destek elektolit ile seyreltilerek hazırlanmıştır.

0.1 F HCl Çözeltisi: Balon joje içersine bir miktar su konulduktan sonra üzerine 8.44 mL derişik % 37.5'lik HCl çözeltisi eklenmiş ve su ile bir litreye tamamlanmıştır.

1 F NaOH Çözeltisi: 40.0 g NaOH tartılarak su ile çözdükten sonra hacim bir litreye tamamlanmıştır. Daha seyreltik NaOH çözeltileri 1 M NaOH çözeltisinin seyreltilmesi ile hazırlanmıştır.

0.2 F Na_2HPO_4 Çözeltisi: 35.6 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ tartılıp su ile çözdükten sonra hacim bir litreye tamamlanmıştır.

0.05 F $(\text{CH}_3)_4\text{NBr}$ Çözeltisi: 7.70 g tetrametilamonyumbromür tartılıp su ile çözdükten sonra hacim bir litreye tamamlanmıştır.

0.05 F $(\text{CH}_3)_4\text{NCl}$ Çözeltisi: 5.48 g tetrametilamonyumklorür tartılıp su ile çözdükten sonra hacim bir litreye tamamlanmıştır.

0.01 F Asetat Tamponu: 0.205 g NaAc tartılıp su ile çözdükten sonra hacim 250 mL'ye tamamlanmıştır.

2 F HNO_3 Çözeltisi: Balon joje içine bir miktar su konulduktan sonra

üzerine 138.9 mL derişik HNO_3 çözeltisi eklenmiş ve su ile bir litreye tamamlanmıştır.

0.05 F $(\text{CH}_3)_4\text{NI}$ Çözeltisi: 10.06 g tetrametilamonyumiyodür tartılıp su ile çözdükten sonra hacim bir litreye tamamlanmıştır.

0.05 F $(\text{C}_2\text{H}_5)_4\text{NI}$ Çözeltisi: 12.86 g tetraetilamonyumiyodür tartılıp su ile çözdükten sonra hacim bir litreye tamamlanmıştır.

0.5 F KCl Çözeltisi: 37.28 g KCl tartılıp su ile çözdükten sonra hacim bir litreye tamamlanmıştır.

Borat Tamponu: 12.4 g borik asit, 100 mL 1 M NaOH çözeltisinde çözdükten sonra su ile bir litreye tamamlanmış ve 0.1 M HCl veya 0.1 M NaOH çözeltisi kullanılarak istenilen pH'ya ayarlanmıştır.

Mcllvaine Sitrat Tamponu: 21.0 g sitrik asit, 200 mL 1.0 M NaOH çözeltisinde çözdükten sonra su ile bir litreye tamamlanmış ve 0.2 M Na_2HPO_4 çözeltisi kullanılarak istenilen pH'ya ayarlanmıştır.

Britton Robinson Tamponu (BR): 2.47 g borik asit, 2.7 mL fosforik asit ve 2.3 mL glasiyel asetik asit karıştırılıp su ile çözüldükten sonra bir litreye tamamlanmış ve 0.1 M NaOH çözeltisi kullanılarak istenilen pH'ya ayarlanmıştır.

Fosfat Tamponu: 9.08 g KH_2PO_4 ve 11.87 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ayrı ayrı tartılıp su ile çözdükten sonra su ile bir litreye tamamlanmış ve uygun miktarlarda karıştırılarak istenilen pH'ya ayarlanmıştır.

3.2.3. Farmasötik Preparatların Analize Hazırlanması

10 adet tablet tartılıp bir havanda toz haline getirilmiştir. İyice karıştırıldıktan sonra bir tablete eşdeğer miktarda tartılan toz, 50 mL'lik balon

jojeye alınarak 25 mL metanol eklenmiş ve ultrasonik banyoda 15 dk. bekletilerek çözünmesi sağlanarak hacim metanol ile 50 mL'ye tamamlanmıştır. Bu çözeltiden belli bir miktar tüpe alınıp santrifüj edilmiştir. Santrifüगत ayrı bir balona alındıktan sonra stok tablet çözeltisi olarak kullanılmıştır.

3.2.4. Sentetik Preparatların Hazırlanması

10 adet tablet ağırlığı kadar mikrokristalin selüloz, laktoz, tribazik kalsiyum fosfat, krospovidon, magnezyum stearat, hipromeloz, triasetin, titanyum dioksit sarı ve kırmızı demir oksitten belirli miktarlarda tartılıp, bu karışıma 100 mg rosuvastatin (bir tablet 10 mg rosuvastatin içermektedir) eklenerek sentetik tablet oluşturulmuştur. Bir tablete eşdeğer miktarda tartılan toz, 50 mL'lik balon jojeye alınarak 25 mL metanol eklenmiş ve ultrasonik banyoda 15 dk. bekletilerek çözünmesi sağlandıktan sonra hacim metanol ile 50 mL'ye tamamlanmıştır. Bu çözeltiden belli bir miktar tüpe alınarak santrifüj edilmiştir.

3.2.5. Malzemelerin Temizliği

3.2.5.1. Cam Malzemelerin Temizlenmesi

Kullanılan cam malzemeler çeşme suyu, deterjanlı su ile yıkandıktan sonra çeşme suyu ile durulanmıştır. Daha sonra 2 F HNO₃ çözeltisi içinde en az bir gece bekletilmiş ve tekrar distile su ile yıkanarak oda sıcaklığında kurutulmuştur.

3.2.5.2. Cıvanın Temizlenmesi

Cıva içerisindeki kirliliklerin elektrot tepkimesini engellemesi ve hidrojen aşırı gerilimini azaltması gibi sakıncaları olduğundan temizlenmesi gereklidir. Bu nedenle cıva alt tarafında iğne deliği bulunan ve huniye yerleştirilmiş olan Whatman 41 nicel süzgeç kağıdı içerisinde temiz bir erlene geçirilerek, üzerindeki kaba kirler uzaklaştırılmıştır. Daha sonra yıkama şişesine aktarılan cıva üzerine önce su, daha sonra 2 F HNO₃ çözeltisi konulup, ikişer gün aralıksız emdirilen hava akımı ile çalkalanmıştır.

Buradan alınan cıva mikron çapında delikleri bulunan küçük bir platin elek ve bir metre uzunluğunda 4 cm çapında boru içerisinde geçirilmiştir. Cam boru içine önce 2 F HNO_3 , daha sonra su konulmuştur. Cıva cam borunun üstüne yerleştirilen elekten çok küçük parçalara ayrılarak geçer. Cam boruda ilerlerken bu küçük cıva parçalarının yüzeyi önce asit, sonra su ile temizlenmiştir. Cıva, borunun altındaki musluktan, iğne deliği bulunan ve huniye yerleştirilmiş olan süzgeç kağıdına ve oradan da temiz bir erlene alınmıştır.

Cıvanın yeterince temizlenip temizlenmediğini anlamak için cıva şiddetle çalkalanıp bırakılır ve çalkalama ile oluşan kabarcıkların 10-15 s kararlı kalması gerekir. Cıvanın, temizliğinin başlangıcından bu aşamaya kadar hava ile temas ederek buharlaşmasını ve oksit tabakası oluşturmasını önlemek için yüzeyinin su ile kaplı olmasına dikkat edilmiştir. Temizlenen cıva, su ile iyice yıkanıp içerisinde asit kalmaması sağlandıktan sonra, nicel huniye yerleştirilen ve dibinde iğne deliği bulunan süzgeç kağıdından beş kez geçirilerek kurutulmuştur. Temiz ve kuru cıvanın üzerinden azot gazı geçirilerek oksijeni uzaklaştırılmış ve teflon kaplarda ağzı kapalı olarak saklanmıştır (48) .

3.2.5.3. Elektrokimyasal Hücrenin Temizlenmesi

Elektrokimyasal hücre de cam malzemeler gibi temizlenmiştir. Analizler sırasında ise hücrede sırasıyla distile su, asetonitril:su (2:1, h/h) ve distile su ile yıkamalar yapılmıştır.

3.2.5.4. Azot Gazı

Polarografik deneylerde hücre içindeki çözünmüş oksijenin damlayan cıva üzerinde indirgeneceğinden ortamdaki oksijenin uzaklaştırılması gerekmektedir. Bu nedenle hücreye ince, uzun, küçük bir teflon boru daldırılıp hücreden azot gazı geçirilmiştir. Nicel analizlerde hücre içerisindeki çözeltinin buharlaşmasını önlemek için azot gazının hücreye gelmeden önce içerisinde destek elektrolit çözeltisi bulunan yıkama şişesinden geçirilerek nemlenmesi sağlanmıştır. Deney süresince de çözelti üzerinden sürekli azot

gazı geçirilerek oksijenin yeniden çözelti içerisinde çözünmesi engellenmiştir.

3.3. Analiz Yöntemlerinin Geliştirilmesi

3.3.1. Voltametrik Yöntemler

3.3.1.1. Elektrokimyasal Hücre Düzeneği

Voltametrik çalışmalar BAS model 100B/W Model cihaz ile yapılmıştır. Referans elektrot olarak Ag/AgCl elektrot, çalışma elektrodu olarak, damlayan civa elektrodu (DCE) veya asılı duran civa elektrodu (HMDE), karşıt elektrot olarak platin elektrot kullanılmıştır.

3.3.1.2. Deneyin Yapılışı

Destek elektrolit olarak seçilen pH 5.00 asetat tamponundan 2 mL alınarak elektrokimyasal hücreye konulmuş ve 12 dk. süre ile azot gazı geçirilmiştir. Bu süre sonunda azot gazı çözelti üzerine gönderilmiştir. Kare dalga voltametrisi (OSWV) yöntemi için 1000 mV'luk potansiyel uygulanarak destek elektrolitin voltamogramı alınmıştır. Hücreye mikropipet yardımıyla μL düzeyinde standart rosuvastatin kalsiyum çözeltilerinden eklenerek destek elektrolitte olduğu gibi OSWV voltamogramları alınmıştır.

3.3.1.3. Geliştirilen Yöntemin Optimizasyonu

Rosuvastatin kalsiyumun voltametrik yöntemlerle analizi için Kare Dalga Voltametrisi (OSWV) yöntemi uygulanmıştır. Bu yöntemlerde deneysel ve cihaza ait parametreler değiştirilerek uygun şartlar araştırılmıştır. Bu amaçla ilk önce uygun tampon tipi, pH'sı ve derişimi denenmiştir. Cihaza ait optimum parametreler araştırılırken, OSWV yönteminde, frekans, adım yüksekliği ve puls genliği değiştirilmiştir. Bu cihaza ait parametrelerin denenmesinde rosuvastatin kalsiyum derişimi, OSWV yöntemi için $2.91 \mu\text{g mL}^{-1}$ olarak alınmıştır.

3.3.1.4. Dönüşümlü Voltametri (CV) Deneyleri

Bu yöntemde çalışma elektrotu olarak asılı duran civa elektrotu,

referans elektrot olarak Ag/AgCl, karşıit elektrot olarak platin tel kullanılmıştır. Elektrokimyasal hücreye 3 mL pH 5 asetat tamponu konup çözeltiden 15 dk. azot gazı geçirilmiştir. Bu sürenin sonunda azot gazı çözeltinin üzerine gönderilmeye başlanmıştır. 10 - 1000 mV/s tarama hızlarında $10.00 \mu\text{g mL}^{-1}$ derişiminde rosuvastatin çözeltisinin dönüşümlü voltamogramları alınmıştır. Her tarama öncesinde cıva damlası yenilenmiştir. Çizilen pik akımlarının logaritmasına karşı tarama hızlarının logaritması grafiğe geçirilerek akımın karakteri bulunmuştur.

3.3.1.5. Krontoamperometri Deneyleri

Bu yöntemde çalışma elektrotu olarak asılı duran cıva elektrotu, referans elektrotu Ag/AgCl, karşıit elektrot olarak platin tel kullanılmıştır. Elektrokimyasal hücreye 3 mL pH 5 asetat tamponu ve $9.91 \mu\text{g mL}^{-1}$ derişimde rosuvastatin kalsiyum konup çözeltiden 15 dk. azot gazı geçirilmiştir. Bu sürenin sonunda azot gazı çözeltinin üzerine gönderilmeye başlanmıştır. 1000-1350 mV'luk potansiyel aralığında rosuvastatin kalsiyumun krontoamperometrik voltamogramları çizilmiştir. Cottrell eşitliğinden faydalanılarak difüzyon katsayısı bulunmuştur.

3.3.2. Geliştirilen Yöntemin Validasyonu (49-55)

Yöntem validasyonu için kararlılık, doğrusallık, duyarlılık, kesinlik, doğruluk, sağlamlık, tutarlılık, yöntem ve cihaz tekrarlanabilirliği, özgünlük ve geri kazanım parametreleri değerlendirilmiştir.

Rosuvastatin kalsiyumun metanoldeki çözeltisindeki ($1000 \mu\text{g mL}^{-1}$) kararlılığını belirlemek amacıyla oda sıcaklığında ve buzdolabında saklanan rosuvastatin kalsiyum çözeltilerinden hazırlanan $10.00 \mu\text{g mL}^{-1}$ 'lik standart rosuvastatin çözeltileri ile taze hazırlanan çözeltiler iki ay boyunca karşılaştırılmıştır.

Doğrusallık

OSWV yönteminin doğrusallık aralığını saptamak için $0.15 - 10.15 \mu\text{g mL}^{-1}$, aralığında olacak şekilde belirli derişimde standart rosuvastatin

kalsiyum çözeltisinden artan hacimlerde eklenerek hazırlanmıştır. İçinde destek elektrolit bulunan elektrokimyasal hücreye artan miktarlarda standart çözeltilerden eklenmiş ve her bir eklemekten sonra voltamogramları kaydedilmiştir. Derişime karşı pik akımları grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrileri çizilmiştir. Kalibrasyon çözeltileri günlük hazırlanmış ve analiz sırasında 12 ayrı kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Kalibrasyon eğrilerine ait regresyon denklemleri ve korrelasyon katsayıları hesaplanmıştır. Korrelasyon katsayısının önem kontrolü ve elde edilen doğruların doğrusallıktan ayrılışın önem kontrolü testleri yapılmıştır (56).

Duyarlılık

Gözlenebilirlik sınırı (LOD), ICH tanımına göre hesaplanmıştır. LOD' nin hesaplanması için aşağıda verilen formül kullanılmıştır.

$$LOD = 3.3 (S/SS)$$

Bu eşitlikte, SS, oluşturulan kalibrasyon eğrilerinin y eksenini kestiği noktanın standart sapması, S ise oluşturulan kalibrasyon eğrilerinin eğimlerinin ortalamasıdır.

Alt tayin sınırı (LOQ), tayin edilebilen en düşük derişim değeri olarak tanımlanmaktadır. Kalibrasyon eğrilerindeki en düşük derişimler için, bağıl standart sapma (BSS), % 10'dan küçük bulunduğundan, kalibrasyon eğrisindeki en düşük derişim değeri LOQ olarak kabul edilmiştir (49,50).

Kesinlik ve Doğruluk

Kesinlik ve doğruluk çalışmaları için gün içi ve günler arası olmak üzere ayrı ayrı çalışılmıştır. Bu amaçla doğrusallık aralığına giren üç farklı derişim seviyesinde tekrarlı analizleri yapılmıştır. OSWV yönteminde 0.96, 2.91, 4.45 $\mu\text{g mL}^{-1}$ derişiminde çözeltilerin analizleri yapılmıştır. Gün içi çalışmalarda; üç derişim seviyesinde ve her derişim için 6'şar çözelti hazırlanmış, hazırlanan bu çözeltiler aynı gün içinde analiz edilmiştir. Günler arası çalışmalarda; ard arda altı ayrı günde ve üç derişimde yeni hazırlanan çözeltilerin analizleri yapılmıştır. Kesinlik, bulunan değerlerin ortalaması, standart hatası (SH), standart sapması (SS) ve BSS ile verilmiştir. Doğruluk ise, eklenen rosuvastatin kalsiyum miktarı ile bulunan rosuvastatin kalsiyum miktarının karşılaştırılması ve bulunan BH ile verilmiştir (Ek 2).

Tekrarlanabilirlik

Yöntemin tekrarlanabilirlik çalışmaları için doğrusallık aralığına giren bir derişim seviyesinde ($2.91 \mu\text{g mL}^{-1}$) on ayrı çözelti hazırlanmış ve bunların aynı gün içinde analizleri yapılmıştır. Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Rosuvastatin kalsiyumun OSWV yönteminde cihaz tekrarlanabilirliği, $2.91 \mu\text{g mL}^{-1}$ rosuvastatin kalsiyum içeren aynı çözeltinin 6 kez voltamogramlarının alınmasıyla elde edilen rosuvastatin kalsiyuma ait pik akımları ve pik potansiyellerinin ortalama değerleri hesaplanarak bulunmuştur.

Sağlamlık ve Tutarlılık

Yöntemlerin sağlamlık çalışmaları için belirlenen optimum deney koşullarında küçük değişiklikler yapılarak analizler yapılmıştır. Bu amaçla OSWV yönteminde destek elektrolitin pH'sı ve ilk potansiyelinde değişiklikler yapılmıştır.

Tutarlılık çalışmalarında ise farklı analizci tarafından çözeltilerin analizleri yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Bunun için geliştirilen yöntemlerde doğrusallık aralığına giren bir derişim seviyesinde ($2.91 \mu\text{g mL}^{-1}$) altı ayrı çözelti hazırlanmış ve bunların aynı gün içinde analizleri yapılmıştır.

Özgünlük

Bölüm 3.2.4'de anlatıldığı gibi hazırlanan 10 mg rosuvastatin kalsiyum içeren sentetik tablet çözeltilerinden destek elektrolitle seyreltilerek hazırlanmış ($2.91 \mu\text{g mL}^{-1}$) 6 ayrı çözeltinin analizleri yapılmıştır ve geri kazanım değerleri hesaplanmıştır (Ek 3).

Ayrıca yöntemin özgünlüğünü göstermek amacıyla standart ekleme yöntemi de yapılmıştır. Bunun için destek elektrolit çözeltisine, bölüm 3.2.3'de anlatıldığı gibi hazırlanan tablet çözeltilerinden belli bir miktar eklenmiş voltamogramlar kaydedilmiştir. Sonra $50.00 \mu\text{g mL}^{-1}$ 'lik standart rosuvastatin kalsiyum çözeltisinden doğrusallık sınırları içerisinde olacak şekilde artan derişimlerde eklemeler yapılarak voltamogramlar kaydedilmiştir. Ölçülen pik akımları değerleri eklenen rosuvastatin kalsiyum derişimlerine karşı grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi çizilmiş ve regresyon denklemi ile

korrelasyon katsayısı hesaplanmıştır.

3.3.3. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması

Geliştirilen voltametrik yöntem, Türkiye piyasasındaki Crestor® tabletlere uygulanmıştır. Bölüm 3.2.3'te anlatıldığı gibi metanolde hazırlanmış tablet çözeltilerinden doğrusallık sınırları içinde olacak şekilde ($2.91 \mu\text{g mL}^{-1}$ derişiminde) destek elektrolit ile uygun seyreltmeler yapılmıştır. Elektrokimyasal hücre içerisindeki destek elektrolit üzerine μL düzeyinde eklemeler yapılmış ve voltamogramlar kaydedilmiştir. Ölçülen pik akımları değerlerinden kalibrasyon yöntemi ile bulunan regresyon denklemi kullanılarak tablet içindeki rosuvastatin kalsiyum miktarı bulunmuştur.

Geliştirilen OSWV yöntemi ile karşılaştırma yöntemlerinin farmasötik preparatlara uygulanması sonucu elde edilen değerlerin istatistiksel olarak karşılaştırılması 3 yöntem için tekrarlı ölçümlerde varyans analizi testi ile yapılmıştır (Ek 4). Ayrıca OSWV yöntemi her iki yöntemle ayrı ayrı Wilcoxon Eşleştirilmiş İki Örnek Testi uygulanmıştır (Ek 3). Elde edilen analiz sonuçları arasında fark olup olmadığı araştırılmıştır.

4. BULGULAR

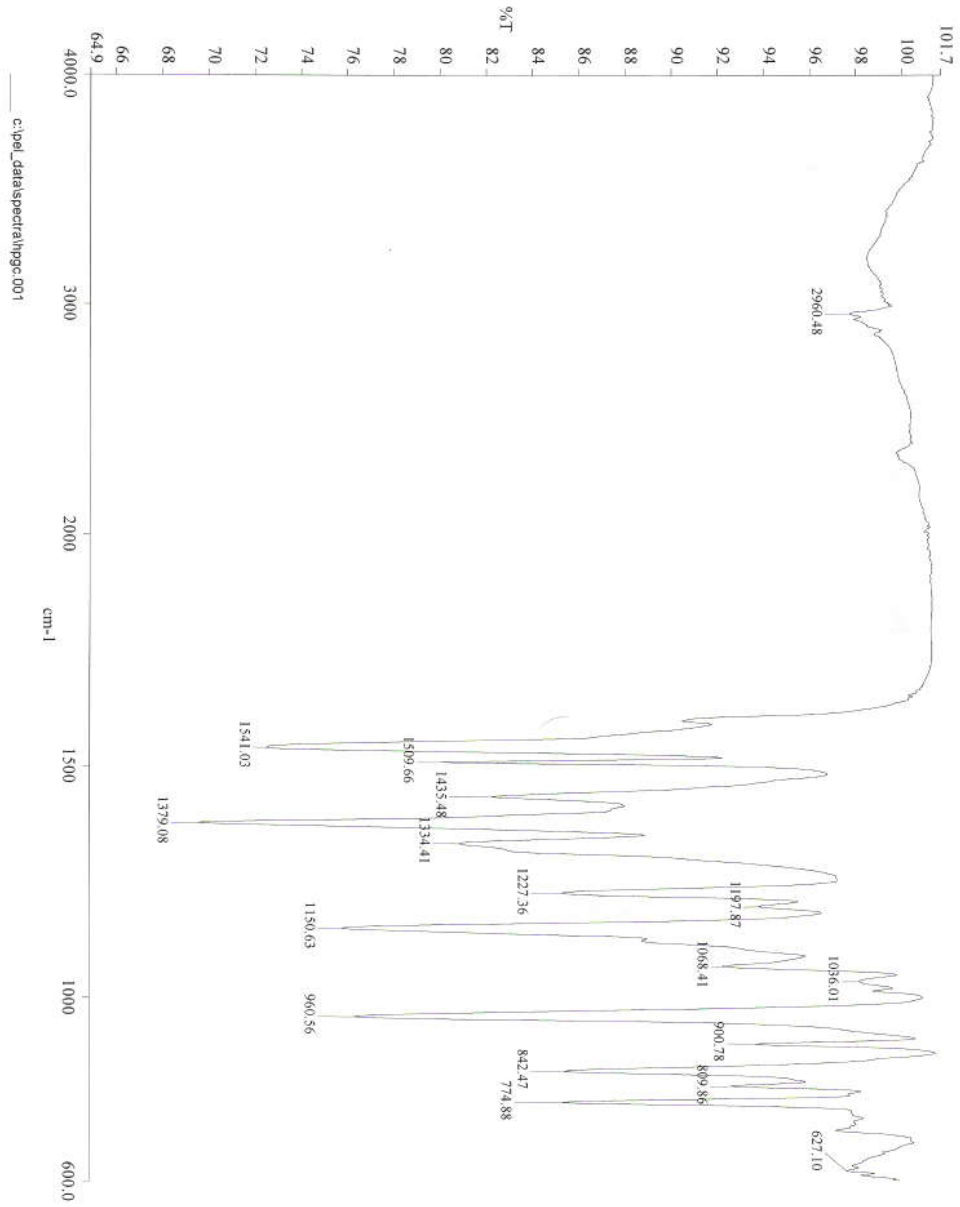
4.1. Saflık Kontrolü Bulguları

4.1.1. Erime Noktası

Yapılan tayin sonucu rosuvastatin kalsiyumun erime noktasının 122 °C olduğu gözlenmiştir. Kaynaklarda ulaşılan değerlerle (122 °C) uyumlu olduğu bulunmuştur (26).

4.1.2. Rosuvastatin Kalsiyumun IR Spektrumu

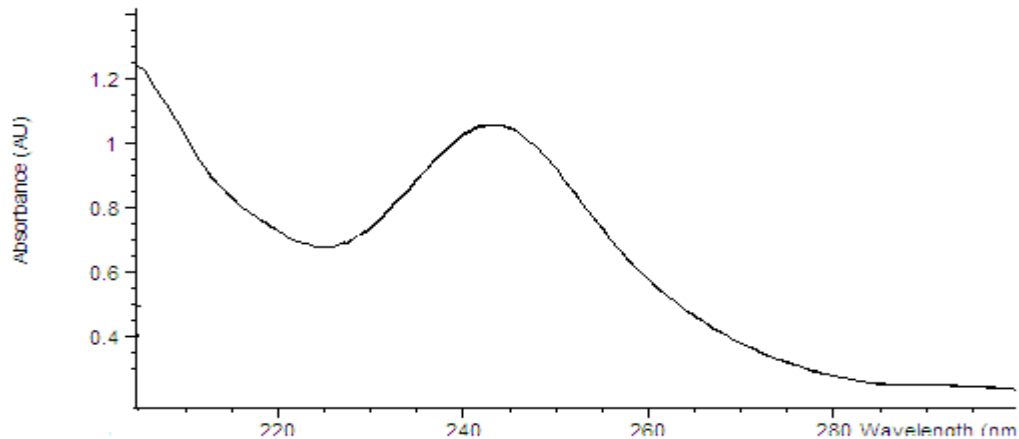
Rosuvastatin kalsiyumun KBr ile hazırlanan diskinin 4000 cm⁻¹ ile 600 cm⁻¹ arasındaki IR spektrumu Şekil 4.1’de görülmektedir.



Şekil 4. 1. Rosuvastatin kalsiyumun IR spektrumu

4.1.3. Rosuvastatin Kalsiyumun UV Spektrumu

Metanol içinde hazırlanan $25.00 \mu\text{g mL}^{-1}$ rosuvastatin kalsiyum çözeltisinin 190 nm ile 300 nm dalga boyları arasındaki UV spektrumu alınmış ve 243 nm'de maksimum pik gözlenmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4. 2. $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ rosuvastatin kalsiyum çözeltisinin UV spektrumu

4.2. Voltametrik Yönteme Ait Analiz Bulguları

Rosuvastatin kalsiyumun su, metanol, asetonitril gibi çeşitli çözücülerdeki çözünürlüğü incelenmiş ve en uygun çözücü olarak metanol seçilmiştir. Bu nedenle stok rosuvastatin kalsiyum çözeltisi metanol ile hazırlanmış ve gerekli seyreltmeler değişik pH'lardaki tampon sistemleri ile yapılmıştır.

4.2.1. Destek Elektrolit Seçimi

OSWV yöntemi ile yapılan çalışmalarda, ilk olarak en uygun destek elektrolit araştırılmıştır. Bunun için rosuvastatin kalsiyum için belirli bir derişim aralığında ($0.25 - 10 \mu\text{g mL}^{-1}$) destek elektrolite eklemeler yapılarak fosfat (pH 5-9), asetat (pH 5-7), McIlvaine sitrat (pH 5-9), Britton Robinson (BR, pH 5-12) ve borat (pH 7-10) tamponları denenmiş ve pik akımı değerleri

ölçülmüştür. pH 5.00 ve pH 6.00'da denenen tampon sistemleri ve elde edilen akımlar Tablo 4.1'de verilmiştir.

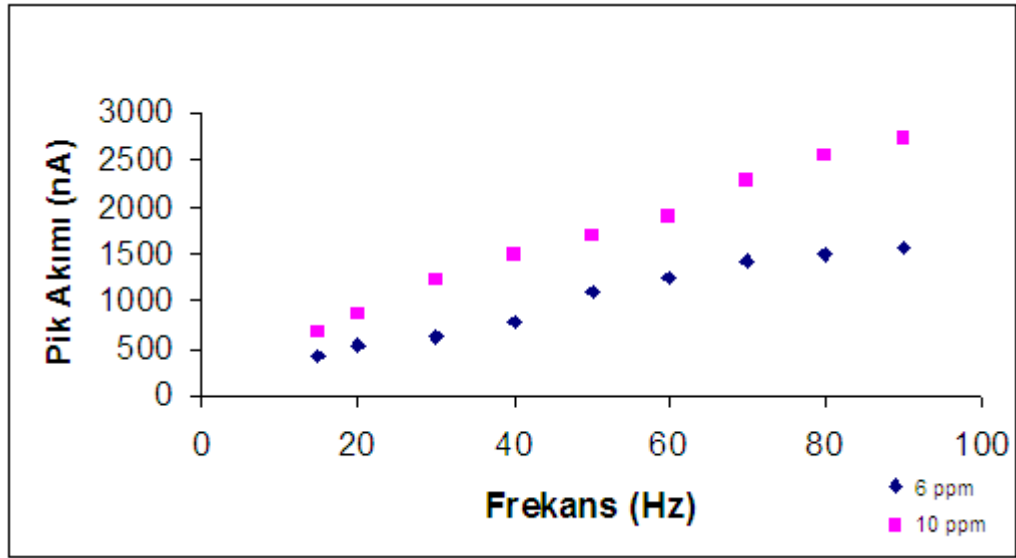
Tablo 4. 1. Rosuvastatin kalsiyum çözeltisinin pH 5.00 ve pH 6.00'da farklı destek elektrolitlerde OSWV pik akımı değerleri

Rosuvastatin Derişimi($\mu\text{g mL}^{-1}$)	BR pH 5.00	BR pH 6.00	Asetat pH 5.00	Asetat pH 6.00
0.25	127.6	183.7	110.28	108.3
0.49	258.3	312.2	155.9	185.4
0.96	427.1	931.1	318.5	425.5
1.41	837.4	1309.1	470.3	689.2
2.06	935.1	1720.7	701.4	974.1
2.91	1234.5	2834.2	965	1027.5
3.57	1826.6	3203.1	1270	1256.8
4.45	2217.3	4889.5	1560	1432.7
5.26	2840.8	5263	1750	1744.2

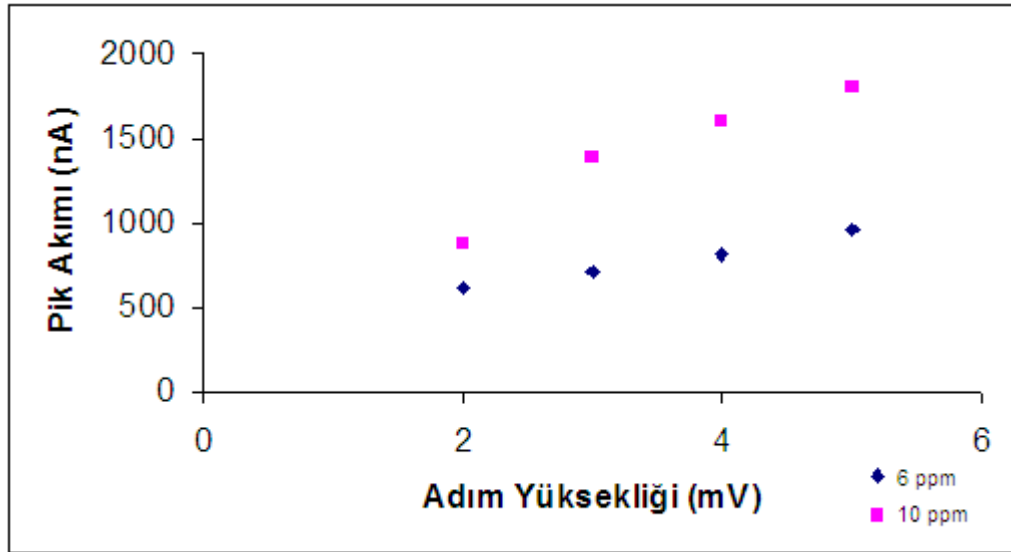
Pik akımı ve pik simetrisi de değerlendirildiğinde 0.01M pH 5 asetat tamponu en uygun tampon olarak belirlenmiştir.

4.2.2. Optimum Cihaz Parametrelerinin Belirlenmesi

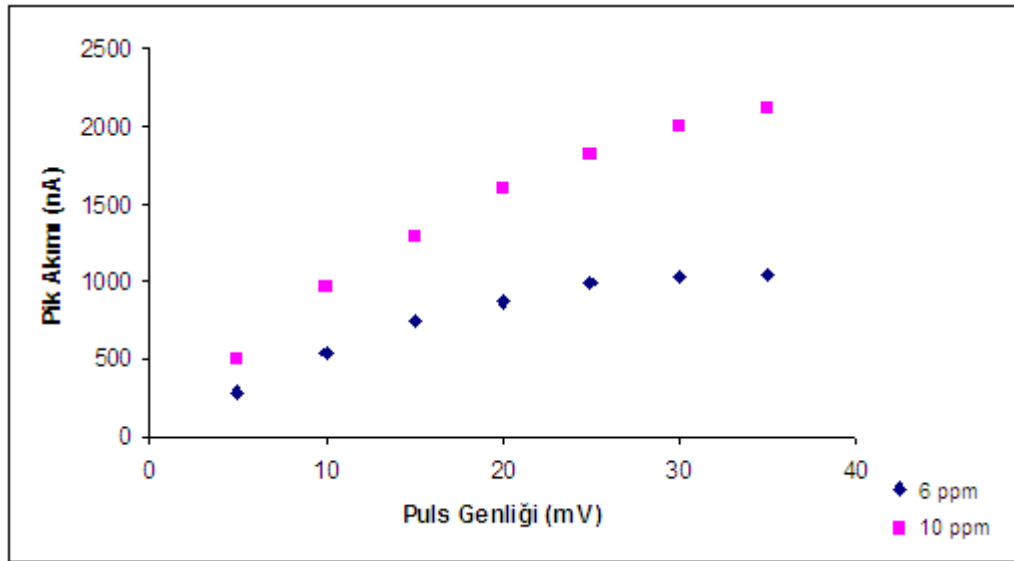
Bu yöntemde optimum cihaz parametrelerinin bulunması için pH 5 asetat tamponu içerisinde iki farklı derişimde (6 ve $10 \mu\text{g mL}^{-1}$); frekans ($15 - 90 \text{ Hz}$), adım yüksekliği ($2-5 \text{ mV}$) ve puls genliği ($5-35 \text{ mV}$) değişiminin rosuvastatin kalsiyuma ait pik akımı üzerindeki etkileri incelenmiştir (Şekil 4.3 - Şekil 4.5).



Şekil 4. 3. OSWV yönteminde frekans değişiminin etkisi (adım yüksekliği: 5 mV, puls genliği: 25 mV)



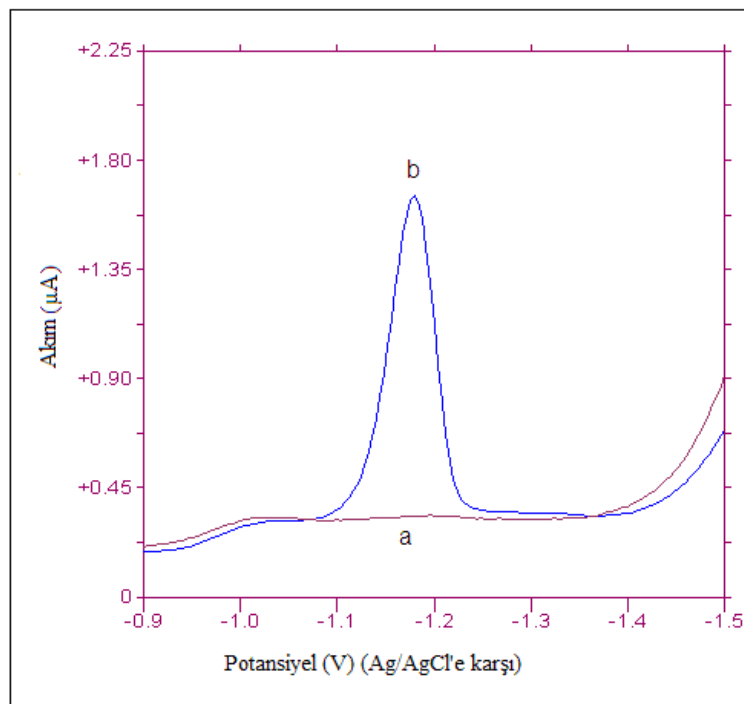
Şekil 4. 4. OSWV yönteminde adım yüksekliği değişiminin etkisi (f : 50 Hz, puls genliği : 25 mV)



Şekil 4. 5. OSWV yönteminde puls genliği değişiminin etkisi (f : 50 Hz, adım yüksekliği : 4 mV)

Bu yöntemde optimum cihaz parametreleri olarak frekans 70 Hz, adım yüksekliği 4 mV ve puls genliği 25 mV seçilmiştir.

pH 5 asetat tamponunda rosuvastatin kalsiyuma ait kare dalga voltamogramları Şekil 4.6'da gösterilmiştir.



Şekil 4. 6. Rosuvastatin kalsiyumun kare dalga voltamogramları
a) Destek elektrolit, b) $5.26 \mu\text{g mL}^{-1}$ rosuvastatin kalsiyum
(Cihaz parametreleri; f: 70 Hz, adım yüksekliği: 4 mV, puls genliği: 25 mV)

4.3. Yöntemin Validasyonu

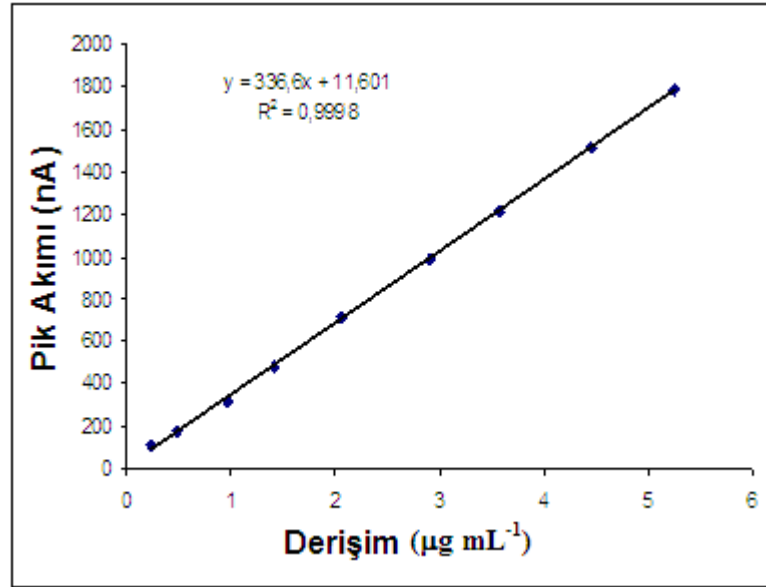
Kararlılık

Kararlılık çalışması için 2 ay boyunca yeni hazırlanan $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ 'lik standart rosuvastatin kalsiyumun çözeltisinin UV spektrumları alınmıştır. Bu süre içinde dalga boyunda bir kayma (243 nm) veya absorpsiyon şiddetinde ($1.15 \pm 0.013 \text{ AU}$) önem bir azalma gözlenmemiştir ayrıca $2.91 \mu\text{g mL}^{-1}$ derişimdeki rosuvastatin kalsiyumun pik potansiyelinde ($-1184.2 \pm 0.46 \text{ mV}$) ve pik akımında (981.57 ± 0.842) önemli bir değişiklik olmadığı görölmüştür. Böylece rosuvastatin kalsiyumun metanoldeki çözeltisinin en az iki ay kararlı olduğunu söyleyebiliriz. Kısa süreli stabilite çalışmalarında (2'şer saatlik aralarla 8 saat ve 3 gün analiz süresince) OSWV yönteminde $2.91 \mu\text{g mL}^{-1}$

derişimdeki rosuvastatin kalsiyumun pik potansiyelinde (-1183.9 ± 0.37 mV) ve pik akımında (984.21 ± 0.923) önemli bir değişiklik olmadığı görülmüştür.

Kalibrasyon Eğrileri ve Doğrusallık Aralıkları

Rosuvastatin kalsiyum derişimine karşı pik akımları grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrileri elde edilmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4. 7. Rosuvastatin kalsiyumun OSWV yöntemi ile analizinde elde edilen kalibrasyon eğrisi

Bu eğrilerin doğrusallıktan ayrılış ve korrelasyon katsayılarının önem kontrolüne ait istatistiksel değerlendirme sonuçları Tablo 4.2 kalibrasyon eğrilerinin özellikleri ise Tablo 4.3'de gösterilmiştir.

Tablo 4. 2. Rosuvastatin kalsiyumun OSWV yöntemi ile analizinden elde edilen kalibrasyon eğrisinin korrelasyon katsayısı ile doğrusallıktan ayrılış önem kontrolü için yapılan istatistiksel hesaplamalar*

Korrelasyon katsayısının önem kontrolü						
N	r	Sr	t_H	t_T		
9	0.9997	0.006	152.72	2.36		
$t_H > t_T$: H_0 hipotezi reddedilir: korelasyon katsayısı tesadüfe bağlı bir değer değildir.						
Doğrusallıktan ayrılış önem kontrolü						
RKT	YOAKT	RAKT	RAKO	RKO	F_H	F_T
2887756	2888605	849	121.29	2887756	2380	5.59
$F_H > F_T$ H_0 hipotezi reddedilir: Derişim ile pik akımı arasındaki ilişki doğrusaldır.						

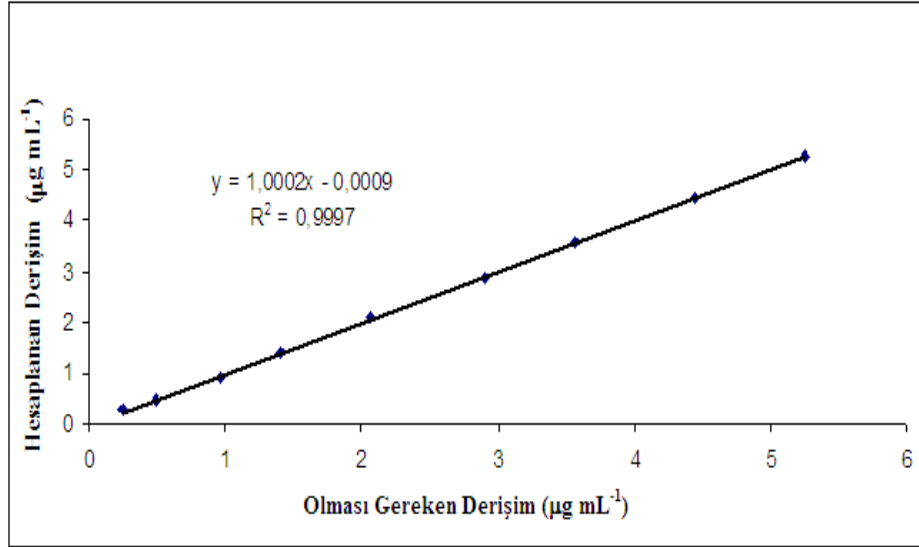
* Terimler Ek 1'de açıklanmıştır.

Tablo 4. 3. OSWV yöntemine ait kalibrasyon eğrisinin özellikleri (n = 6)

Regresyon denklemi*	$y = 336.6x + 11.601$
Eğimin standart hatası	0.091
Kesişimin standart hatası	0.117
Korrelasyon katsayısı (r)	0.9997
Tanımlayıcılık katsayısı (R^2)	0.9998
Doğrusallık Aralığı ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0.2-10
LOD-Gözlenebilme Sınırı ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0.07
LOQ-Alt Tayin Sınırı ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0.2

* $y = bx + a$; x : $\mu\text{g mL}^{-1}$ biriminde derişim, y : pik akımı değerleri (nA), a : kesişim, b : eğim.

Yöntemlerin doğrusallığının kontrolü için kalibrasyon eğrisini oluşturan derişimlerde hazırlanan standart çözeltilerin analizleri yapıp kalibrasyon eğrileri denklemleri ile sonuçlar hesaplanmış ve olması gereken (nominal) derişimlere karşı grafiğe geçirilmiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4. 8. Rosuvastatin kalsiyumun OSWV yöntemine ait yöntem doğrusallığı kontrol grafiği

Doğruluk ve Kesinlik

Rosuvastatin kalsiyumun OSWV yöntemi ile analizinde doğruluk ve kesinlik çalışmalarına ait gün içi ve günler arası değerlendirme sonuçları Tablo 4. 4'de verilmiştir. Önerilen yöntemlerin tekrarlanabilirliğine ait analiz bulguları Tablo 4. 5'de verilmiştir.

Tablo 4. 4. OSWV yönteminin, gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk analiz bulguları (n = 6)

Rosuvastatin kalsiyum miktarı ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Günler Arası ¹		Gün İçi ²	
	Bulunan miktar	% Bağlı Hata	Bulunan Miktar	% Bağlı Hata
0.96	0.961	0.10	0.962	0.21
	0.963	0.31	0.957	-0.31
	0.967	0.73	0.968	0.83
	0.970	1.04	0.971	1.15
	0.958	-0.21	0.955	-0.52
	0.961	0.10	0.963	0.31
$\bar{X}$	0.9633 $\pm$ 0.0018		0.9627 $\pm$ 0.0025	
SS	0.0044		0.0062	
BSS (%)	0.4580		0.6392	
2.91	2.914	0.14	2.912	0.07
	2.904	-0.21	2.906	-0.14
	2.893	-0.58	2.908	-0.07
	2.908	-0.07	2.916	0.21
	2.917	0.24	2.911	0.03
	2.922	0.41	2.909	-0.03
$\bar{X}$	2.9097 $\pm$ 0.0042		2.9103 $\pm$ 0.0014	
SS	0.0104		0.0035	
BSS (%)	0.3563		0.1203	
4.45	4.443	-0.16	4.451	0.02
	4.462	0.27	4.454	0.09
	4.452	0.05	4.448	-0.05
	4.448	-0.05	4.462	0.27
	4.457	0.16	4.452	0.05
	4.452	0.05	4.455	0.11
$\bar{X}$	4.4523 $\pm$ 0.0027		4.4537 $\pm$ 0.0019	
SS	0.0067		0.0048	
BSS (%)	0.1494		0.1069	

$\bar{X}$: Ortalama $\pm$ standart hata. SS : Standart sapma BSS : % Bağlı standart sapma. (EK 2)

¹: Gün içi çalışmalar; 3 derişim seviyesinde 6 ayrı çözelti kullanılarak aynı günde yapılmıştır.

²: Günler arası çalışmalar; üç derişim seviyesinde altı ayrı çözelti kullanılarak 6 ayrı günde yapılmıştır.

Tablo 4. 5. OSWV yönteminin tekrarlanabilirliğine ait analiz bulguları
(Eklenen rosuvastatin kalsiyum derişimi OSWV yöntemi
için 2. 91 $\mu\text{g mL}^{-1}$, n = 10)

OSWV yöntemi	
Bulunan ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	% Geri Kazanım
2.899	99.62
2.906	99.86
2.898	99.59
2.916	100.21
2.917	100.24
2.912	100.07
2.908	99.93
2.913	100.10
2.909	99.97
2.921	100.38
$\bar{x}$: 2.9099 $\pm$ 0.0024 SS: 0.0075 BSS: 0.2574 GA: 2.90462–2.9158	$\bar{x}$: 99.997 $\pm$ 0.08 SS: 0.258 BSS: 0.2574 GA: 99.79–100.21

x : Ortalama $\pm$ standart hata. SS : Standart Sapma

BSS : % Bağlı standart sapma. GA : Güven Aralığı

Sağlamlık ve Tutarlılık

Sağlamlık ve tutarlılık çalışmalarına ait sonuçlar ve istatistiksel olarak karşılaştırma sonuçları Tablo 4.6 - Tablo 4.7’de verilmiştir. Standartla yapılan çalışmalar pH 5 asetat tamponunda belirlenen optimum şartlarda gerçekleştirilmiştir.

Tablo 4. 6. OSWV yönteminin sağlamlığına ait analiz bulguları (n = 6)

	Bulunan ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	BSS	Karşılaştırma Sonuçları
Standart ($2.91 \mu\text{g mL}^{-1}$)	2.9103 ± 0.0014	0.120	
pH 4.90	2.907 ± 0.006	0.549	$t_H = 9$
pH 5.10	2.909 ± 0.004	0.358	$t_H = 10$
İlk Potansiyel (1.100mV)	2.901 ± 0.009	0.759	$t_H = 5.5$
İlk Potansiyel(900mV)	2.911 ± 0.006	0.517	$t_H = 10$

$\bar{x}$: Ortalama $\pm$ standart hata. BSS : Bağıl standart sapma. (n:6 serbestlik derecesinde t_t değeri 2’dir) (t_H : hesapla bulunan t değeri, t_T : tablodan bulunan t değeri) (Ek 2).

Özgünlük (Seçicilik)

Yöntemin özgünlüğü, bölüm 3.2.4’de anlatıldığı gibi hazırlanan ve 10 mg rosuvastatin kalsiyum içeren sentetik preparatların geliştirilen voltametrik yöntemle analizi yapılarak değerlendirilmiş ve elde edilen veriler Tablo 4.8’de verilmiştir. Bu analizlerde standart rosuvastatin kalsiyum çözeltisinde olduğu gibi OSWV yönteminde -1184 mV’da, rosuvastatin kalsiyuma ait pikler elde edilmiş ve herhangi bir girişimin olmadığı gözlenmiştir.

Tablo 4. 7. Farklı iki analizciye ait tutarlılık analiz sonuçları (n = 6)
(Eklenen rosuvastatin kalsiyum derişimi OSWV yöntemi için 2.91 $\mu\text{g mL}^{-1}$)

OSWV yöntemi	
1. Analizci ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	2. Analizci ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
2.920	2.906
2.913	2.918
2.897	2.924
2.915	2.901
2.908	2.917
2.916	2.913
$\bar{X} : 2.912 \pm 0.0033$ SS: 0.0081 BSS: 0.279 GA: 2.903-2.920	$\bar{X} : 2.913 \pm 0.0034$ SS: 0.0084 BSS: 0.289 GA: 2.904-2.922
Farklı iki analizci bulguları için Wilcoxon Eşleştirilmiş İki Örnek Testi : $T_H = 10 > T_T = 0$, $p < 0.05$	

$\bar{x}$: Ortalama $\pm$ standart hata. SS: Standart Sapma BSS : Bağlı standart sapma.

GA : Güven Aralığı (Ek 3)

Geri Kazanım

10 mg rosuvastatin kalsiyum içeren sentetik tablet çözeltisine ait geri kazanım değerleri sırasıyla Tablo 4. 8'de verilmiştir.

Tablo 4. 8. Sentetik tablet preparatlarının analiz bulguları
(Eklenen rosuvastatin kalsiyum miktarı: 10 mg, n = 6)

Bulunan (mg)	Geri Kazanım %
10.01	100.1
10.12	101.2
9.97	99,7
10.05	100.5
10.02	100.2
9.98	99.8
$\bar{X} : 10.025 \pm 0.0223$ SS: 0.055 BSS: 0.545 GA: 9.968-10.08	$\bar{X} : 100.25 \pm 0.223$ SS: 0.55 BSS: 0.545 GA: 99.68-100.82

$\bar{x}$: Ortalama $\pm$ standart hata. SS: Standart Sapma BSS : % Bağıl standart sapma.

GA : Güven Aralığı

4.4. Farmasötik Preparatların Analiz Bulguları

10 mg rosuvastatin kalsiyum içeren Crestor® tabletlerin analizleri geliştirilen voltametrik yöntemle ve karşılaştırma yöntemleri (8,9) ile yapılmış olup veriler Tablo 4.9'da gösterilmiştir.

Tablo 4. 9. Crestor® tablete ait analiz bulguları (10 mg rosuvastatin kalsiyum/tablet) (n=6)

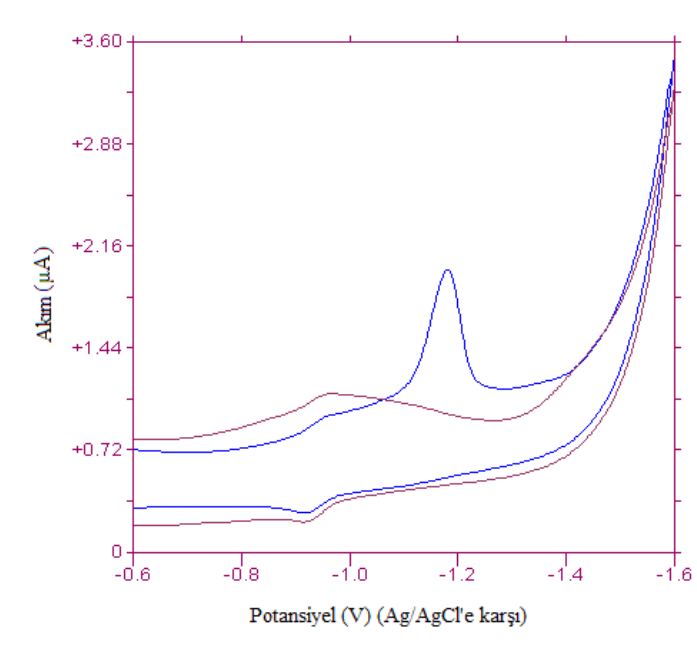
OSWV yöntemi	Karşılaştırma yöntemi UV Spektrofotometri (8)	Karşılaştırma yöntemi CE (9)
Bulunan (mg)	Bulunan (mg)	Bulunan (mg)
10.02	10.12	10,24
9.95	10.06	10,18
9.92	10.11	10,04
10.14	9.97	10,01
10.07	10.03	9,99
10.04	9.89	10,00
$\bar{X}$: 10.023±0.0327 SS: 0.0802 BSS: 0.799 GA: 9.939-10.107	$\bar{X}$: 10.03±0.0359 SS: 0.0879 BSS: 0.876 GA: 9.937-10.122	$\bar{X}$: 10.077±0.0434 SS: 0.1063 BSS: 1.055 GA: 9.965-10.188
Farklı iki yöntem bulguları (OSWV ile UV yönteminin karşılaştırılması) için Wilcoxon Eşleştirilmiş İki Örnek Testi : $T_H=10>T_T=0$, $p<0.05$		
Farklı iki yöntem bulguları (OSWV ile CE yönteminin karşılaştırılması) için Wilcoxon Eşleştirilmiş İki Örnek Testi : $T_H=7>T_T=0$, $p<0.05$		
3 yöntemin aynı anda karşılaştırılması için tek yönlü varyans analizi kullanılmıştır: $F_H=0.597<F_T=19.43$ $p<0.05$		

$\bar{x}$: Ortalama $\pm$ standart hata. SS: Standart Sapma BSS : % Bağıl standart sapma.

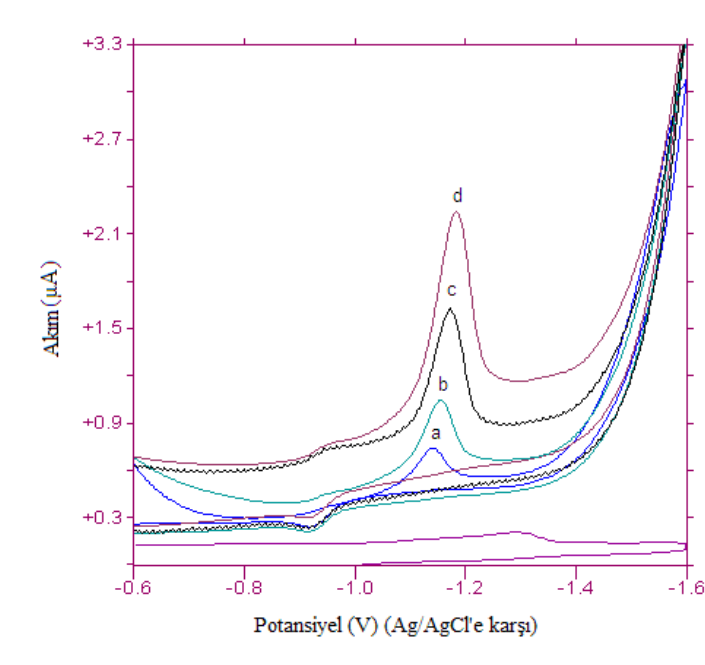
GA : Güven Aralığı

4.5. Dönüşümlü Voltametri Bulguları

Rosuvastatin kalsiyumun çözeltisinin pH 5 asetat tamponunda kaydedilen dönüşümlü voltamogramı Şekil 4.9'da ve artan tarama hızlarında çekilen dönüşümlü voltamogramları Şekil 4.10'da verilmiştir.



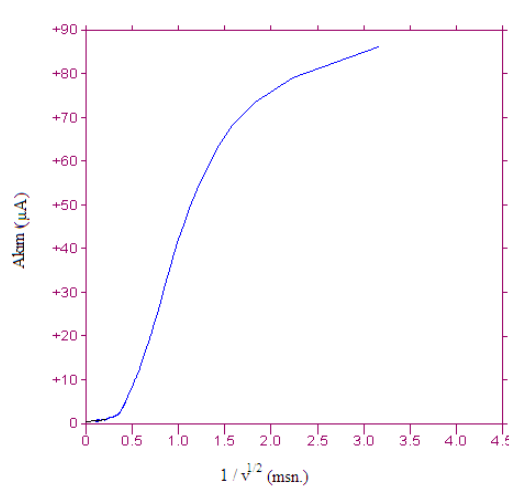
Şekil 4. 9. Destek elektrolitin ve $10.00 \mu\text{g mL}^{-1}$ rosuvastatin kalsiyum çözeltisinin pH 5 asetat tamponunda çekilen dönüşümlü voltamogramları (Tarama hızı: 100 mV/sn)



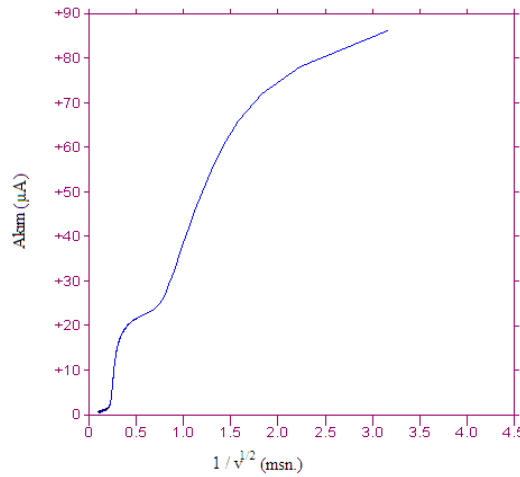
Şekil 4. 10. Artan tarama hızlarında rosuvastatin kalsiyumun ($9.91 \mu\text{g mL}^{-1}$) dönüşümlü voltamogramları a) 10 mV/sn b) 25 mV/sn c) 75 mV/sn d) 100 mV/sn

4.6. Kronoamperometri Bulguları

Rosuvastatin kalsiyum çözeltisinin kronoamperometri çalışmaları da gerçekleştirilmiştir. Destek elektrolitin voltamogramı ve destek elektrolitte rosuvastatin kalsiyuma ait voltamogram Şekil 4. 11 ve Şekil 4. 12’de verilmiştir.



Şekil 4. 11. Destek Elektrolitin (pH 5 asetat tamponu) kronoamperometrik voltamogramı (E_1 : 950 mV E_2 : 1350 mV)



Şekil 4. 12. pH 5 asetat tamponunda rosuvastatin kalsiyumun kronoamperometrik voltamogramı (Eklenen rosuvastatin kalsiyum derişimi $9.91 \mu\text{g mL}^{-1}$ E_1 :950 mV E_2 :1350 mV)

5. TARTIŞMA

Bu tez kapsamında diyet ve diğer farmakolojik olmayan tedaviler (örn. egzersiz, kilo verme) ile yeterli yanıt alınamayan durumlarda primer hiperkolesterolemi ve kombine dislipidemili hastaların tedavisinde diyet yardımcı olmak üzere kullanılan statin grubundan yeni bir ilaç olan rosuvastatin kalsiyumun elektrokimyasal davranışları incelenmiş ve farmasötik preparatlardan analizi için voltametrik yöntemlerden kare dalga voltametrik miktar tayini yöntemi geliştirilmiştir.

Hiperkolesterolemi tedavisinde kullanılan statin grubu yeni bir ilaç olan rosuvastatin kalsiyumun kaynaklarda elektrokimyasal davranışları incelenmesi ile ilgili bir çalışmaya ve farmasötik preparatlardan analizi için geliştirilmiş elektroanalitik bir yöneme rastlanmamıştır. Bunun için farmasötik preparatlardan rosuvastatin kalsiyumun miktar tayini için OSWV yöntemi tez çalışması kapsamında geliştirilmiştir.

Dr. Reddy Laboratuvarı'ndan temin edilen rosuvastatin kalsiyum'un saflığının araştırılması amacıyla erime noktası tayini yapılmış (122 °C), UV spektrumu (243 nm maksimum pik) (Şekil 4. 1) ve IR spektrumu (Şekil 4. 2) alınmıştır. Rosuvastatin kalsiyum'un çekilen IR spekturumunda madde yapısına uygun titreşim pikleri gözlenmiştir. UV spektrumu verilen sertifika ile ve erime noktası kaynaklardaki değerlerle uyumlu olduğu bulunmuştur (Ek 6). Elde edilen verilere göre standart rosuvastatin kalsiyum'un bu çalışmayı yürütebilecek saflıkta bir madde olduğu sonucuna varılmıştır.

5.1. Çözücü ve Destek Elektrolit Seçimi

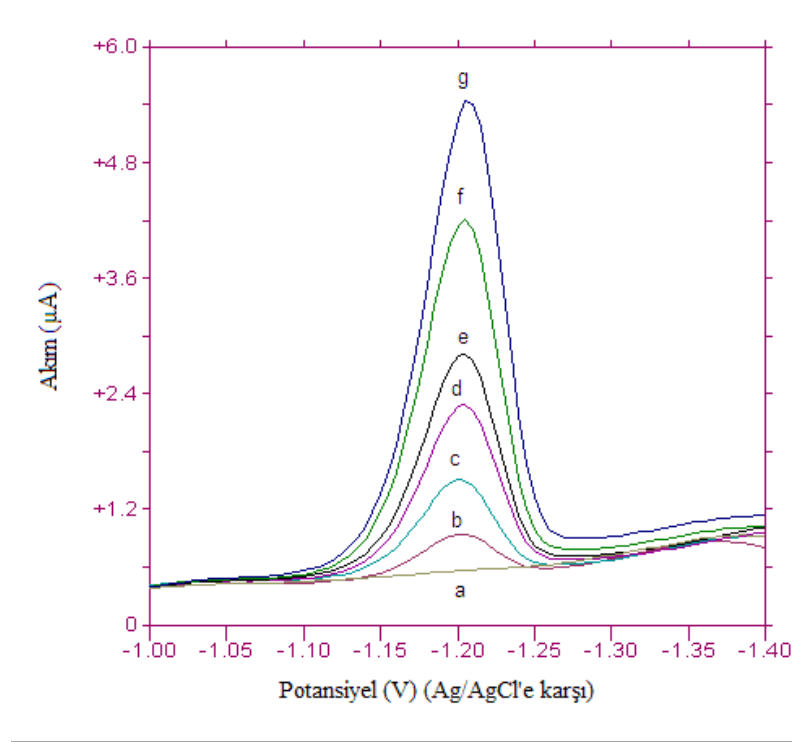
Elektroanalitik çalışmalarda çözücü ve destek elektroliti seçimi çok önemlidir. Özellikle ilaç analizlerinde sabit pH'larda çalışmanın avantajları ve organik çözücü ile çalışmanın dezavantajları vardır. Bunlar, özel referans elektrot gerektirmesi, çalışma sırasında azot gazı geçirilmesi ve sistemin tamamen kapalı olmaması nedeni ile uzun çalışma süresinde organik çözücünün buharlaşması, derişiminin değişmesi vb. nedenlerden dolayı

tampon çözeltilerde çalışmanın uygun olduğu düşünülmüştür.

Rosuvastatin kalsiyum'un çeşitli çözeltilerdeki çözünürlükleri incelenmiştir.

Rosuvastatin kalsiyum suda az, metanolde, dimetilformamidde iyi çözünmektedir. Sonuçta suda çözünürlüğünün az olması nedeni ile çözücü olarak metanol seçilmiş ve stok rosuvastatin kalsiyum çözeltisi metanolde hazırlanmıştır. Gerekli seyreltmeler ise destek elektrolit ile yapılmıştır. (pH 5 0.01 M asetat tamponu)

Çalışmalarda ilk olarak en uygun destek elektrolitin seçimi yapılmıştır. Bu amaçla çeşitli tampon sistemleri denenmiş ve pik akım değerleri ölçülmüştür (Tablo 4.1). Rosuvastatin kalsiyuma ait pik akımının en yüksek olduğu ve pik şeklinin en düzgün olduğu tampon sistemi seçilmiştir. Değerlendirilebilir pikler BR ve asetat tamponunda olduğu görülmüştür. Diğer tampon sistemlerinde çok geniş ve simetrik olmayan pikler gözlenmiştir. Farklı pH değerlerinde tamponlar denenmiş ve pH 5'in altında ve pH 6'nın üzerindeki tampon sistemlerinde piklerin bozuk ve simetrik olmadığı tespit edilmiştir. Bu çalışmaların sonunda sadece pH 5 asetat tamponunda piklerin simetrik olduğu ve artan rosuvastatin kalsiyum derişimi ile piklerin şeklinin bozulmadığı gözlenmiştir (Şekil 5. 1). Bu nedenle pik akımının en yüksek olduğu ve en iyi değerlendirilebilir piklerin gözleendiği tampon çözeltisi olduğundan destek elektrolit olarak pH 5 asetat tamponu seçilmiştir. (Tablo 4.1)



Şekil 5. 1 Destek elektrolit ve artan rosuvastatin kalsiyum derişimi ile elde edilen OSWV voltamogramları a) destek elektrolit b) $0.49 \mu\text{g mL}^{-1}$ c) $0.96 \mu\text{g mL}^{-1}$ d) $2.06 \mu\text{g mL}^{-1}$ e) $2.91 \mu\text{g mL}^{-1}$ f) $3.57 \mu\text{g mL}^{-1}$ g) $4.41 \mu\text{g mL}^{-1}$ rosuvastatin kalsiyum çözeltisi

Rosuvastatin kalsiyum molekülünün büyük olması (molekül ağırlığı: 1001.14) ve yapısında flor atomu içermesi nedeniyle olası adsorbsiyonu azaltmak, potansiyel sınırını arttırmak ve iyonik şiddeti azaltmak amacıyla pH 5 asetat tamponuna farklı miktarlarda çeşitli tetra alkil amonyum tuzları ve potasyum klorür eklenmiştir.

Asetat tamponuna eklenen tetraalkilamonyum tuzlarının, rosuvastatin kalsiyumun pik akımı üzerindeki etkileri incelenmiştir. Denenen tuzlar ve derişimleri Tablo 5. 1'de verilmiştir.

Tablo 5. 1. Analiz sırasında denenen tuzlar ve derişimleri

Tuzlar	Destek elektrolit içindeki derişimi (M)
1 M KCl	5.00×10^{-2} , 2.50×10^{-2} , 1.25×10^{-2}
0.05 M Tetra butil amonyum iyodür	2.50×10^{-3} , 1.25×10^{-3} , 0.63×10^{-3}
0.05 M Tetra butil amonyum iyodür	2.50×10^{-3} , 1.25×10^{-3} , 0.63×10^{-3}
0.1 M Tetra etil amonyum iyodür	2.50×10^{-3} , 1.25×10^{-3} , 0.50×10^{-3}
0.1 M Tetra metil amonyum iyodür	2.50×10^{-3} , 1.25×10^{-3} , 0.50×10^{-3}
0.1 M Tetra metil amonyum bromür	2.50×10^{-3} , 1.25×10^{-3} , 0.50×10^{-3}

Denemeler sonucunda tetra alkil amonyum tuzları eklendiğinde doğrusallık aralığının değişmediği, KCl eklendiğinde rosuvastatin kalsiyuma ait pik akımları ile sadece pH 5 asetat tamponu içeren ortamda elde edilen pik akımları arasında fark gözlenmemiştir. Bu nedenle destek elektrolite herhangi bir tuz eklenmemesine karar verilmiştir.

Yapılan bu ön çalışmalar pH 5 asetat tamponunda yapılmıştır. Bundan sonraki çalışmalarda asetat tamponunun derişiminin pik akımı üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Denenen farklı derişimlerdeki asetat tamponlarında rosuvastatin kalsiyuma ait pik akımlarında çok fazla bir farklılık olmadığı gözlenmiştir. Bundan sonraki çalışmalarda destek elektrolit olarak kullanılan asetat tamponunun derişimi 0.01 M olarak seçilmiştir.

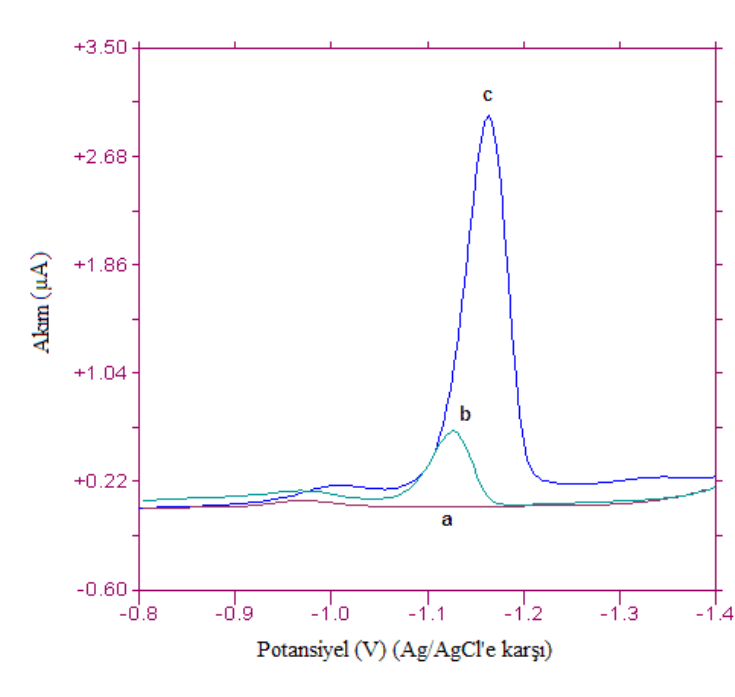
5.2. Elektroanalitik Yöntemin Seçimi

Akım – potansiyel ve derişim ilişkilerinin çalışma elektrodu denilen küçük alanlı (genellikle 1 cm^2 'den küçük) polarize bir elektrotla incelendiği 3 elektrotun da kullanıldığı elektroanalitik yöntemlere genel olarak voltametri denmektedir. Uygulanan gerilim pulslara benziyor olsa da, puls tekniği olmayan sinüzoidal akım gibi değişken ve zamanla derişimi kare şeklinde olan kare dalga voltammetrisi yöntemi diğer voltametrik yöntemlerden çok daha hızlı tarama olanağı sağlar. Şöyle ki kullanılan kare dalganın çoğunlukla periyodu 5 ms, genliği 25 mV'dur. Basamaklı gerilim genliği ise 10 mV'dur.

Böyle bir koşulda 1V'luk tarama için gerekli süre eğer pulsun frekansı 100 Hz ise 1.0 s olur. Bunun sonucu olarak bir voltamogram 1-2 s içinde elde edilir. Başka bir deyişle bir damla ömrü içinde bir voltamogram tamamlanabilir. Kare dalga voltametrisinde potansiyel periyotun bir yarısında pozitif değer alırken diğer yarısında negatif değer alır. Kare dalganın anodik ve katodik bölgesindeki iki noktaya ait akım değerlerinin farkları alınarak akım saptanır. Yani elektrot tepkimelerinde yükseltgenme ve indirgenmede oluşan akım farkları alınır. Akımlardan biri negatif olduğu için fark akımların toplamını verir. Bu nedenle de duyarlık yüksektir.

Robledo ve Smyth isimli araştırmacılar tarafından serumda rosuvastatin kalsiyumun analizi için kromatografik yöntemler geliştirilerek valide edilmiş, bunun yanında polarografik ve sıyırma voltametrik çalışmaları da denenmiştir. Fakat serumda matriks etkisinin girişim yapması nedeni ile rosuvastatin kalsiyumun serumdan analizleri için diferansiyel puls polarografisi (DPP) yönteminin valide edilemediği ve uygulanamadığı gözlenmiştir (16).

Yapılan bu polarografik çalışma üzerine rosuvastatin kalsiyumun destek elektrolit olarak seçilen pH 5 asetat tamponunda (kaynakta destek elektrolit olarak pH 4.46 asetat tamponu kullanılmıştır.) DPP yöntemi ile $3.22 \mu\text{g mL}^{-1}$ derişimde kaydedilen polarogramı Şekil 5. 2.b'de verilmiştir. Aynı derişimdeki rosuvastatin kalsiyumun OSWV yöntemi ile elde edilen voltamogramı da aynı şekilde gösterilmiştir (Şekil 5.2).



Şekil 5. 2. $3.22 \mu\text{g mL}^{-1}$ derişimde rosuvastatin kalsiyumun 0.01 M pH 5 asetat tamponu içindeki a. Destek elektrolit b. DPP polarogramı c. OSWV voltamogramı

Şekilden de görüldüğü gibi hızlı ve yüksek duyarlıklı oluşu nedeniyle bu tez çalışmasında rosuvastatin kalsiyumun farmasötik preparatlardan analizi için voltametrik yöntemlerden kare dalga voltametrik yöntem seçilmiştir.

5.3. Optimizasyon Sonuçları

Optimizasyon çalışmaları seçilen 0.01 M pH 5 asetat tamponunda yapılmıştır.

Cihaz parametrelerinin optimizasyonu amacıyla OSWV yönteminde 2 farklı derişimde (6 ve $10 \mu\text{g mL}^{-1}$), frekans 15 - 300 Hz, adım yüksekliği 2-10 mV ve puls genliği 5 - 45 mV arasında değişiminin rosuvastatin kalsiyuma ait pik akımı üzerindeki etkileri incelenmiştir (Şekil 4. 3 - Şekil 4. 5). Pik akımı ile birlikte pik şeklinin düzgünlüğü de göz önüne alınarak optimum cihaz parametreleri frekans için 70 Hz, adım yüksekliği 4 mV ve puls genliği 25 mV olarak seçilmiştir.

Belirlenen optimum şartlarda rosuvastatin kalsiyumun kare dalga voltametrisi ile elde edilen piki -1184 mV'da gözlenmiştir (Şekil 4.6).

5.4. OSWV Yönteminin Validasyon Sonuçları (52-56)

Geliştirilen OSWV yönteminin geçerliliğinin kanıtlanması için validasyon parametrelerine göre test edilmesinde kaynaklarda bildirilen parametreler ve geçerlilik kriterleri kullanılmıştır. Bu amaçla kararlılık, doğrusallık, duyarlılık, doğruluk, kesinlik, sağlamlık, tutarlılık, özgünlük parametrelerine göre valide edilmiştir (52).

5.4.1 Kararlılık

Kararlılık çalışması için 2 ay boyunca buzdolabında bekleyen stok Rosuvastatin kalsiyumun çözeltisinden ($1000 \mu\text{g mL}^{-1}$) yeni hazırlanan $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ 'lik standart rosuvastatin kalsiyumun çözeltisinin UV spektrumları alınmıştır. Bu süre içinde rosuvastatin kalsiyumun maksimum absorpsiyon gösterdiği 243 nm dalga boyunda bir kayma veya absorpsiyon şiddetinde bir azalma gözlenmemiştir. Böylece rosuvastatin kalsiyumun metanoldeki çözeltisinin en az iki ay kararlı olduğunu söyleyebiliriz. Kısa süreli stabilite çalışmalarında (2'şer saatlik aralarla 8 saat ve 3 gün analiz süresince) OSWV yönteminde rosuvastatin kalsiyum'un pik potansiyelinde ve pik akımında, hiçbir değişiklik olmadığı görülmüştür.

5.4.2. Doğrusallık

Geliştirilen OSWV yönteminde kalibrasyon eğrisinin oluşturulması ve doğrusallık aralıklarının belirlenmesi için rosuvastatin kalsiyumun derişimine karşı gözlenen pik akımları grafiğe geçirilmiştir. OSWV yöntemi ile $0.20\text{-}10.00 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($2.497 \times 10^{-7} - 9.988 \times 10^{-6} \text{ M}$) aralığında doğrusal olan kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir (Şekil 4.7). OSWV yöntemi için doğrusallıktan ayrılışın önem kontrolü yapılmıştır (Tablo 4.3). OSWV

yöntemi için $F_H = 2380 > F_T = 5.59$ değerleri elde edilmiş ve bu sonuçlara göre doğrusallıktan ayrılışın önemsiz olduğu bulunmuştur. Ayrıca korelasyon katsayılarının önem kontrolü yapılarak bu katsayıların istatistiksel olarak önemli değerler olduğu bulunmuştur (56) (OSWV yöntemi için $t_H = 152.72 > t_T = 2.36$ ($p < 0.05$)).

Önerilen voltametrik yöntemle ait kalibrasyon eğrisinin özellikleri Tablo 4.4'de verilmiştir.

Yöntemin doğrusallığı, grafik yöntemi ve istatistiksel olarak saptanmıştır. Grafik yönteminde standart çözeltilerin olması gereken derişimlerine karşı kalibrasyon denkleminde bulunan derişimleri grafiğe geçirilmiştir. (Şekil 4.8). Bu grafiklerde korelasyon katsayısı (r), 0.9997 olarak bulunmuştur. Ayrıca eğimi 1.0002 olarak bulunmuştur. Eğiminin ve korelasyon katsayısının yaklaşık olarak 1 bulunması, çizilen kalibrasyon eğrilerinin bir doğru olduğunu göstermektedir.

5.4.3. Duyarlılık

Rosuvastatin kalsiyum'un OSWV yöntemi ile LOD değerini belirlemek için ICH'de belirtilen formülden yararlanılmıştır ($LOD = 3(S/SS)$) (52). Buna göre Rosuvastatin kalsiyumun LOD değerleri OSWV yönteminde $0.07 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($BSS = \% 0.968$) olarak bulunmuştur ($n = 6$).

Alt tayin sınırı, tayin edilebilen en düşük derişim değeri olarak tanımlanmaktadır. Kalibrasyon eğrilerindeki en düşük derişimler için, bağıl standart sapma (BSS), % 10'dan küçük bulunduğundan, kalibrasyon eğrisindeki en düşük derişim değeri LOQ olarak kabul edilmiştir (49,50). LOQ değeri OSWV yöntemi için $0.2 \mu\text{g mL}^{-1}$ olarak bulunmuştur ($BSS \% 0.9534$).

Bulunan LOD ve LOQ değerlerinin düşük olması rosuvastatin kalsiyum'un farmasötik preparatlardan analizi için geliştirilen OSWV voltametrik yöntemin oldukça duyarlı olduğunu göstermektedir.

5.4.4 Doğruluk ve Kesinlik

Bir yöntemin doğruluğu; test sonuçları ile kabul edilen referans değer arasındaki uyumlu yakınlıktır ve % bağıl hatanın hesaplanması ile belirlenir.

Bir yöntemin kesinliği, sonuçların tekrarlanabilirliğinin göstergesidir. Hazırlanan standart numunelerin yapılan tekrarlı analizleri sonucunda saptanan BSS terimi ile tanımlanır (52). BSS, standart sapmanın ortalamaya göre yüzde kaçılık bir değişim gösterdiğini belirtir (56).

Tekrarlanabilirlik (kesinlik), cihaz ve yöntem tekrarlanabilirliği olmak üzere iki şekilde incelenir.

Geliştirilen yöntemin tekrarlanabilirliğinin tespiti için; OSWV yöntemi için $2.91 \mu\text{g mL}^{-1}$ 'de, 10 ayrı çözeltinin tekrarlı analizleri yapılmış ve sonuçlar Tablo 4.6'da verilmiştir. Kesinlik için BSS değerinin % 1'in altında olması kriterine uygun olarak BSS değerlerinin % 0.2574'den düşük olması OSWV yönteminin tekrarlanabilir olduğunu göstermektedir.

SS, dağılımdaki her bir değer ortalamaya uzaklığını, diğer bir deyişle dağılımın ne yaygınlıkta olduğunu gösteren bir ölçüdür. SS büyüdükçe dağılım yaygınlaşır (56). Bu tanım dikkate alınırsa OSWV yöntemi için elde edilen gün içi ve günler arası çalışma sonuçları, tekrarlanabilirliğin yüksek olduğunu göstermektedir (Tablo 4. 5).

Geliştirilen sistemin (cihaz) tekrarlanabilirliğinin tespiti için; OSWV yöntemi için doğrusallık aralığı içindeki bir derişim olan $2.91 \mu\text{g mL}^{-1}$ 'den, 12 ayrı çözeltinin tekrarlı analizleri yapılmış ve voltamogramları kaydedilmiş, pik alanları ve pik potansiyellerine göre değerlendirilmiştir. Rosuvastatin kalsiyum'un OSWV yöntemi için pik akımı 981.63 ± 0.965 pik potansiyeli ise -1183.6 ± 0.47 olarak hesaplanmıştır. Kesinlik için BSS değerinin % 1 'in altında olması kriterine uygun olarak BSS değerlerinin % 0.2408'den düşük olması cihaz tekrarlanabilirliğinin OSWV yöntemi için tekrarlanabilir olduğunu göstermektedir.

Rosuvastatin kalsiyumun OSWV yöntemi ile kesinlik ve doğruluk çalışmaları için 0.96, 2.91 ve $4.45 \mu\text{g mL}^{-1}$ derişimlerde gün içi ve günler arası tekrarlı analizler yapılmıştır. OSWV yöntemi için gün içi çalışmalarda 3 farklı

derişim seviyesinde 6 tane hazırlanan standart çözeltilerin analizleri aynı günde 3'lü tekrar ile yapılmıştır, elde edilen bulguların BSS değerleri % 0.1069 - 0.6392 olarak bulunmuştur. Günler arası çalışmalar ise; üç farklı derişim seviyesinde ardışık altı ayrı günde hazırlanan çözeltilerin analizi ile yapılmış ve elde edilen bulguların BSS değerleri OSWV yöntemi için % 0.1494 -0.4580 olarak bulunmuştur (Tablo 4.5)

Geliştirilen OSWV yönteminde gün içi ve günler arası için % 0.6392'in altında kalan BSS değerlerinin elde edilmiş olması yöntemlerin kesinliğini, % bağıl hata değerlerinin 1.15'den az olması ise yöntemin doğruluğunu göstermektedir. Kesinlik ve doğruluk için kaynaklarda bildirilen kabul edilebilirlik ölçütlerinden çok daha düşük değerler elde edilmiştir.

Doğruluk, deneysel değerin gerçek değere yakınlığının göstergesidir. Geliştirilen OSWV yönteminin gün içi ve günler arası doğruluk çalışmaları ile doğruluğunun yüksek olmasının gösterilmesinden sonra geliştirilen OSWV yönteminin kaynaklarda bulunan valide edilmiş ve farmasötik preparatlara uygulanmış iki yöntemle de karşılaştırılarak yöntemin doğruluğu test edilmiştir.

Plasebo (etken maddesiz yardımcı maddeleri (matriks) içeren preparat) üzerine bilinen miktarlarda eklenen standartla (sentetik tablet) yapılan geri kazanım çalışmaları ile de doğruluk test edilmiştir.

5.4.5. Sağlamlık

Bir yöntemin sağlamlığı yöntem parametrelerinde yapılan küçük kasıtlı ve planlı değişikliklerden etkilenmeden optimum koşullardaki değerlere çok yakın olabilme durumudur ve bu durumda yöntemin güvenilir olduğunu gösterir. Sağlamlık çalışmaları için optimum koşullarda planlı ve kasıtlı olarak küçük değişiklikler yapılarak analiz sonuçlarına etkisi incelenmiştir (52). Bu çalışmalar OSWV yöntemi için $2.91 \mu\text{g mL}^{-1}$ derişimde gerçekleştirilmiştir. Her bir değişiklik, optimum koşullardaki $2.91 \mu\text{g mL}^{-1}$ derişimdeki standart rosuvastatin kalsiyum çözeltilerinin sonuçları ile istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Tüm karşılaştırmalarda t_H değeri t_T değerinden büyük olduğu için analizler arasında fark olmadığı sonucuna varılmıştır (Tablo 4.7)

5.4.6. Tutarlılık

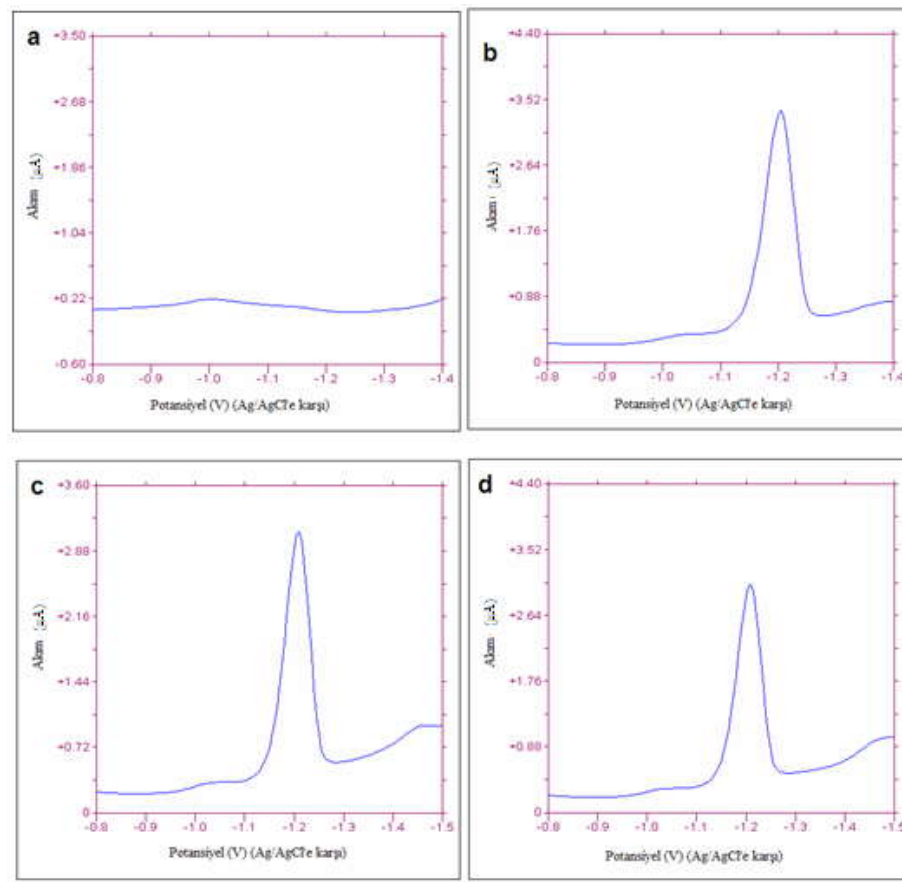
Tutarlılık analiz koşullarında yapılan farklı analizci, farklı cihaz gibi değişikliklerde analiz sonuçlarının yeniden uygulanabilirliğinin gösterilmesidir (55).

Geliştirilen OSWV yöntemi ile rosuvastatin kalsiyum'un analizinde tutarlık çalışmaları için farklı analizci etkisi araştırılmış ve bulunan değerler istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır (56). Bu çalışmalar OSWV yöntemi için doğrusallık aralığı içindeki bir derişim olan $2.91 \mu\text{g mL}^{-1}$ 'de gerçekleştirilmiştir. Elde edilen her iki analizci bulguları arasında istatistiksel olarak yapılan t testi sonucunda fark bulunmaması yöntemin tutarlı olduğunu göstermektedir ($t_H = 10.00 > t_T = 0.00$ ($p > 0.05$)) (Tablo 4.8).

5.4.7. Özgünlük (Seçicilik)

Özgünlük (seçicilik) analizi yapılan etkin maddenin analiz cevabının tüm diğer yardımcı maddeler varlığında doğru olarak ölçülebilmesidir. Ölçülen cevabın sadece analizi yapılan maddeye ait olduğunun göstergesidir.

Geliştirilen OSWV yönteminin özgünlüğü aynı derişimde hazırlanan plasebo, standart, tablet ve sentetik preparat çözeltilerinin voltamogramlarının karşılaştırılması ile gösterilmiştir (Şekil 5. 3.a-d). Voltamogramlar incelendiğinde seçilen koşullarda girişim olmadığı saptanmıştır. Böylece yöntemin seçiciliği kanıtlanmıştır.



Şekil 5. 3. a) Plasebo çözeltisi b) Standart c) Crestor® tablet d) Sentetik tablet çözeltisine ait voltamogramlar
(Rosuvastatin kalsiyum derişimleri $2.91 \mu\text{g mL}^{-1}$ 'dir)

Yöntemlerin özgünlüğü, bölüm 3.2.4'de anlatıldığı gibi hazırlanan 10 mg rosuvastatin kalsiyum içeren sentetik preparatların, geliştirilen OSWV yöntemi ile analizi yapılarak değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler Tablo 4.9'da verilmiştir. Bu analizlerde standart rosuvastatin kalsiyum çözeltisinde olduğu gibi OSWV yönteminde -1184 mV 'da, rosuvastatin kalsiyum ait pikler elde edilmiştir. Başka bir pike rastlanmamıştır. Farmasötik preparatlarda bulunan yardımcı maddelerle herhangi bir etkileşim olmadığı gözlenmiştir.

OSWV yönteminin özgünlüğü, yani farmasötik preparattaki yardımcı maddelerin (matriks etkisi) rosuvastatin kalsiyumun analizini etkileyip, etkilemediği standart ekleme yöntemi ile de test edilmiştir. Bu, standart ekleme yönteminin tablet çözeltilerine uygulanması ile gösterilmiştir. OSWV yöntemi için standart ekleme yöntemi ile elde edilen kalibrasyon eğrisinin

denklemin $y = 337.82x + 996.05$ olarak bulunmuştur. Bu denklemin eğiminin, oluşturulan kalibrasyon eğrilerinin eğimine (336.6) çok yakın bir değer olması matriks bileşenlerinin girişim yapmadığını göstermiştir.

5.4.8. Geri Kazanım

OSWV yönteminin doğruluğunun kanıtlanması amacıyla geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. Bunun için 10 mg rosuvastatin kalsiyum içeren sentetik tablet preparatından geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. Kaynaklarda geri kazanım kriteri $\%100 \pm 2$ olarak belirtilmiştir. Tablo 4.9'da görüldüğü gibi geri kazanım değeri; OSWV yöntemi için $\% 100.25$ olarak hesaplanmıştır ($n = 6$). Bu sonuç verilen kriter aralığına girmektedir. Ayrıca tekrarlar arasındaki BSS değeri de düşüktür. Bu sonuçlar geliştirilen OSWV yönteminin doğruluğunun diğer bir kanıtıdır.

5.5. OSWV Yönteminin Farmasötik Preparatlara Uygulanması

Geliştirilen voltametrik yöntemin, geçerli (valide) olduğu tüm validasyon parametrelerinin kabul edilebilir sınırlarda bulunması rosuvastatin kalsiyumun farmasötik preparatlardan analizi için uygulanabilir olduğunu göstermektedir.

Bunun için, OSWV yöntemi rosuvastatin kalsiyum içeren Crestor® ticari isimli farmasötik preparatlara (tablet) uygulanmıştır (Tablo 4.10).

Kalibrasyon doğrusunun eğimi 336.6 ve standart ekleme yönteminin eğimi ise 337.82'dir. Kalibrasyon eğrisi yöntemi ve standart ekleme yöntemi ile elde edilen eğrilerin eğimlerinin birbirine çok yakın olması nedeniyle analizler kalibrasyon eğrisi yöntemi ile yapılmıştır.

5.5.1. OSWV Yönteminin Kaynaktaki Başka Bir Yöntemle

Karşılaştırılması

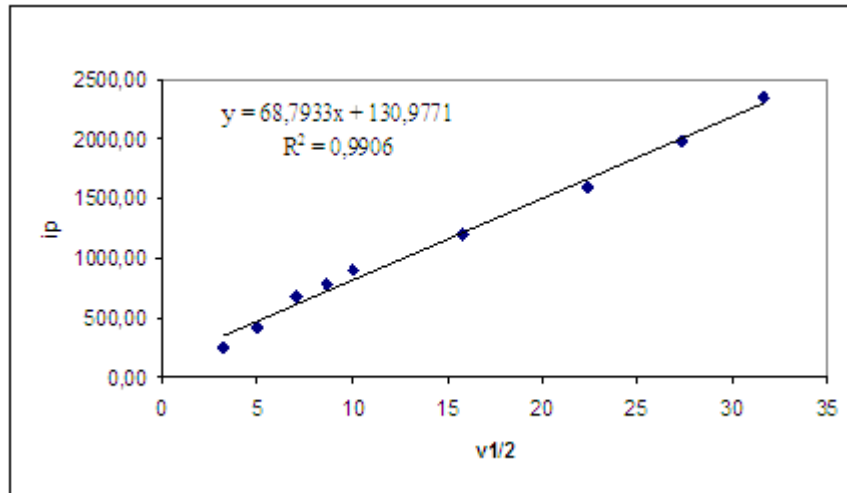
Geliştirilen OSWV yönteminin doğru ve geçerli olabilmesi için diğer bir yol da yöntemin prepatlara uygulanması ile elde edilen sonuçların kaynaklarda geçerli olan başka bir yöntem ile karşılaştırılarak aralarında istatistiksel olarak fark bulunmadığının gösterilmesidir. Bu nedenle geliştirilen

yöntemler Türkiye piyasalarında bulunan ve 10 mg rosuvastatin kalsiyum / tablet içeren Astra Zeneca firmasına ait Crestor® tabletdeki rosuvastatin kalsiyum miktar tayini için uygulanmıştır (Tablo 4.10) Elde edilen sonuçlar, karşılaştırma yöntemlerinden (8,9) elde edilen analiz sonuçları ile Wilcoxon Eşleştirilmiş İki Örnek Testi kullanılarak istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır (56). Sonuçta geliştirilen OSWV yöntemi için karşılaştırma yöntemi olarak kullanılan spektrofotometrik yöntem (8) ve kapiller elektroforez yöntemi (9) ile arasında fark olmadığı bulunmuştur. (UV için $t_H = 10 > t_T = 0$, CE için $t_H = 7 > t_T = 0$). Ayrıca her üç yöntem de kendi aralarında tek yönlü varyans analizi uygulanarak birbirleriyle karşılaştırılmış ve aralarında fark olmadığı bulunmuştur ($F_H = 0.597 < F_T = 19.43$, $p < 0.05$) (Tablo 4.10).

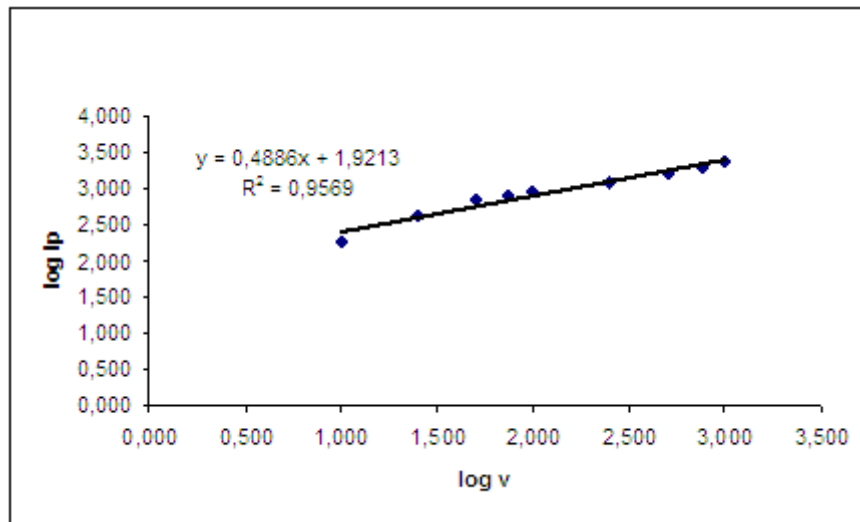
5.6. Dönüşümlü Voltametri (CV) ve Kronoamperometri (CA)

5.6.1. CV ile Akımın Karakterinin Bulunması

Akımının karakterini belirlemek amacıyla dönüşümlü voltametri deneylerinde elde edilen sonuçlar, tarama hızının kareköküne karşı pik akımı değerleri grafiğe geçirilmiştir (Şekil 5. 4). Şekil 5. 4'de de görüldüğü gibi doğrusal bir grafik elde edilmiştir. Bu da gerçekleşen reaksiyonun difüzyon kontrollü olduğunu göstermektedir. Aynı şekilde tarama hızının logaritmasına ($\log v$) karşı pik akımının logaritması ($\log i_p$) grafiğe geçirildiğinde (Şekil 5. 5) elde edilen doğrunun eğimi 0.5'e çok yakın bir değer bulunmuştur. Bu da gerçekleşen tepkimenin difüzyon kontrollü olduğunu göstermektedir.



Şekil 5. 4. Tarama hızının kareköküne karşı pik akımı grafiği



Şekil 5. 5. Tarama hızının logaritmasına ($\log v$) karşı pik akımının logaritması ($\log i_p$) grafiği

Sınır akımının CV ile incelenmesinde daha ayrıntılı bilgiler edinilebilir. $10.00 \mu\text{g mL}^{-1}$ derişiminde rosuvastatin kalsiyum dönüşümlü voltamogramı Şekil 4. 9'da verilmiştir. Tarama hızı arttıkça rosuvastatin kalsiyumun pik akımı da artmaktadır (Şekil 4. 10). Tarama hızı artışı ile rosuvastatin kalsiyumun pik potansiyelinin değiştiği gözlenmiştir.

Dönüşümlü voltamogramda bir ön pik gözlenmesi indirgenme

ürünün elektrot yüzeyinde adsorblandığını, arka pik gözlenmesi ise analiz edilen maddenin adsorblandığını gösterir (57). Buna göre dönüşümlü voltamogramda 100 mV/sn tarama hızında kaydedilen voltamogramda ön pik gözlenmediğinden elektrot yüzeyinde indirgenme ürününün adsorblanmadığını söyleyebiliriz.

5.6.2. CV ile Elektrot Tepkimesinin Tersinirliğinin Bulunması

Elektrot yüzeyinde maddenin indirgen veya yükseltgen formları arasında denge hızlı oluşuyorsa sistem tersinir demektir. Tersinirlik genellikle kullanılan voltametrik tekniğin zaman aralığına bağlı olarak tanımlanır.

Potansiyometri 10 s-dak, polarografi 0.1-1.0 s, dönüşümlü voltametri 10^{-4} - 10^{-2} s gibi değişik teknikler için farklı zaman aralıkları olduğundan tersinirlik uygulanan tekniğe göre değişir (58). Tersinir elektrot tepkimelerinde, pik potansiyeli damlama süresi ile değişmemesine karşın tersinir olmayan tepkimelerde damlama süresi arttıkça pik potansiyeli negatif değerlere kayar. Dönüşümlü voltametri ile yapılan tersinirlik testlerinde aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir.

Tersinir sistemlerde bütün potansiyellerde elektron aktarım hızı kütle aktarım hızından büyüktür ve Nerst eşitliği elektrot yüzeyinde geçerlidir. Tersinmez sistemlerde ise elektron aktarım hızı yeteri kadar büyük olmadığından Nerst eşitliği geçerli değildir.

Tamamen tersinmez bir sistemin en önemli belirtisi ters tarama pikinin (anodik pik) gözlenmemesidir.

Tersinmez bir reaksiyonun kriterleri

1. Anodik pik gözlenmez (ters tarama piki gözlenmez).
2. $I_p^k \propto v^{1/2}$
3. E_p^k kayması 25°C 'de tarama hızındaki 10 birimlik artmada $30/\alpha_c n_\alpha$ dir.
4. $|E_p - E_{p/2}| = 48 / (\alpha_c n_\alpha)$ mV'dur.

Ters taramada anodik pikin gözlenmemesi de tersinmez bir sistemin en önemli göstergesi olduğundan rosuvastatin kalsiyumun indirgenme tepkimesinin tersinir olmadığına karar verilmiştir.

Pik akımının tarama hızının kare kökü ile değişim grafiği (Şekil 5. 4) tersinmez tepkimenin grafiğine benzemektedir ve orjinden geçmemektedir.

CV çalışmalarında (Şekil 4. 10) pik potansiyelinin tarama hızı arttıkça negatif potansiyele kayması da tersinmezlik göstergesidir.

Elde edilen bu sonuçlara göre indirgenme tepkimesinin tersinmez olduğu düşünülmektedir.

5.6.3. CV ile αn Değerinin Bulunması

Elektron tepkimelerinde aktarılan elektron sayısı CV yöntemi ile 6 kez tekrar edilmiş ve her bir sonucun ortalaması alınarak rosuvastatin kalsiyum için αn değeri hesaplanmıştır.

$$E_p - E_p/2 = 0.048/\alpha n \quad (V)$$

α : Elektrot reaksiyonunun yük transfer katsayısı

n : Aktarılan elektron sayısı

$\alpha n = 1.16$ olarak bulunmuştur. Bulunan değerlerin ortalaması alınarak olası mekanizmaya göre aktarılan elektron sayısı 2 alınırsa $\alpha = 0.6$ (tersinmez reaksiyonlar için $\alpha < 1$ 'dir) olarak hesaplanmıştır (31).

5.6.4. CA ile Difüzyon Katsayısının Bulunması

Rosuvastatin kalsiyumun difüzyon katsayısı kronoamperometrik yöntem ile 6 kez tekrar edilmiş ve her bir sonucun ortalaması alınarak Cottrell tarafından türetilen aşağıdaki eşitlikten faydalanılarak hesaplanmıştır.

$$i = (n F A D^{1/2} C_0) / (\pi^{1/2} t^{1/2})$$

i = Akım (A)

n = Aktarılan elektron sayısı

F = Faraday sabiti (99.485 C/eq)

A = Elektrot alanı (cm²)

D = Difüzyon katsayısı (cm²/s)

C_0 = Maddenin konsantrasyonu (mol/cm³)

t = zaman (s)

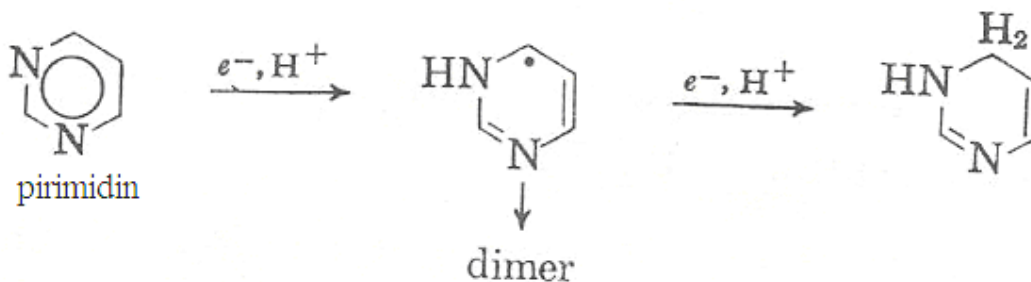
Bulunan değerlerin ortalaması alındığında rosuvastatin kalsiyum için difüzyon katsayısı $5.79 \times 10^{-5} \pm 2.231 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ olarak hesaplanmıştır (33).

5.7. Olası Mekanizma Önerisi

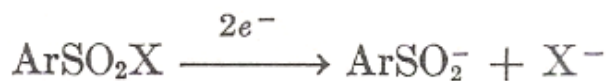
Rosuvastatin kalsiyumun elektrokimyasal olarak indirgenmesi ile ilgili kaynaklarda bir bulguya rastlanmamıştır. Aktarılan elektron sayısı CV yöntemi ile 2 bulunmuştur.

Rosuvastatin kalsiyumun pH 4.47 asetat tamponunda DPP yöntemi ile yapılan polarografik çalışmada indirgenme basamağının büyük olasılıkla heterosiklik halkadan veya alternatif olarak tekli bağı kırılmasından oluştuğu ifade edilmektedir (16).

Rosuvastatin kalsiyum molekülü pirimidin halkası içermektedir. 2 elektron transferi ile -1184 mV'da indirgenmeye ait pikin (Şekil 4.6.) aşağıda verilen pirimidin halkasındaki azot karbon çifte bağı üzerinden



veya metil sülfonil amino grubu şeklindeki sülfonil (SO_2) grubuna bağlı metil arasındaki tekli bağı kopması tepkimesine göre olduğu düşünülmektedir (42).



X= -OR veya -R

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tezde, yüksek kolesterol ve lipit düzeylerinin, diyet, egzersiz, kilo verme gibi farmakolojik olmayan tedavilerle düşürülemediği, primer hiperkolesterolemi ve kombine dislipidemili hastalarda diyete yardımcı olmak üzere kullanılan rosuvastatin kalsiyumun elektrokimyasal yöntemlerden OSWV yöntemi ile farmasötik preparatlardan analizi gerçekleştirilmiş ve rosuvastatin kalsiyumun elektrokimyasal davranışları incelenmiştir.

Rosuvastatin kalsiyumun indirgenmesi sonucu oluşan akımın difüzyon kontrollü olduğu bulunmuştur. Ayrıca tersinirlik testleri incelendiğinde elde edilen sonuçlara göre indirgenme tepkimesinin tersinmez olduğu düşünülmektedir.

CV ve kronoamperometri yöntemleri ile yapılan çalışmalarda rosuvastatin kalsiyumun difüzyon katsayısı $5.79 \times 10^{-5} \pm 2.231 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ olarak, aktarılan elektron sayısı ise 2 olarak hesaplanmıştır.

Geliştirilen OSWV yönteminde, optimize edilmiş en uygun koşullar 0.01 M pH 5 asetat tamponu, frekans 70 Hz, adım yüksekliği 4 mV ve puls genliği 25 mV olarak belirlenmiştir. Rosuvastatin kalsiyuma ait pik potansiyel değeri -1184 mV' gözlenmiştir.

Geliştirilen OSWV yönteminin validasyon parametreleri değerlendirilmiş ve geçerlilikleri kanıtlanmıştır.

Valide edilen OSWV yöntemi Türkiye piyasalarında bulunan rosuvastatin kalsiyum içeren Crestor® ticari isimli farmasotik preparatların analizine başarı ile uygulanmıştır.

Tez kapsamında geliştirilen bu OSWV yöntemi, kararlılık, doğruluk, duyarlık, kesinlik, sağlamlık, tutarlılık ve özgünlük gibi validasyon parametreleri açısından iyi sonuçlar vermesi yanı sıra, rosuvastatin kalsiyumun analizi için şimdiye kadar kaynaklarda voltametrik yöntemler ile analizinin yapılmamış olması, basit ve hızlı bir yöntem olması nedeniyle kaynaklardaki rosuvastatin kalsiyumun analizi için geliştirilmiş yöntemlere alternatif bir yöntem olarak sunulmuştur.

Geliştirilen OSWV voltametrik yöntem ve karşılaştırma yöntemi olarak kullanılan spektrofotometrik (8) ve kapiler elektroforez yöntemleri (9) ile elde edilen sonuçların istatistiksel değerlendirilmeleri neticesinde validasyon parametrelerinin uygun değerde bulunması, kaynaklardaki karşılaştırma yöntemleri ile arasında istatistiksel fark olmaması; bu yöntemin valide yöntem olduğunu bir kere daha ispat etmektedir.

Bir yöntemin duyarlılığı birim derişim artışına karşılık gözlenen sinyalin büyüklüğüne bağlıdır. Bu değer kalibrasyon eğrisinin eğimi ile verilmektedir. Eğim ne kadar büyükse yöntemin duyarlılığı da o kadar yüksektir. Alt tayin sınırının küçük olması da yöntemin duyarlılığının büyük olduğunu göstergesidir. OSWV, yöntemine ait kalibrasyon doğrusunun eğimi 336.6'dır. Ayrıca alt tayin sınırı $0.20 \mu\text{g mL}^{-1}$ 'dir. Karşılaştırma yöntemlerinde spektrofotometrik ve CE yönteminin kalibrasyon eğrisinin eğimleri sırası ile 0.0447 ve 0.0310 olarak bulunmuştur. LOQ değerleri ise sırasıyla 1.00 ve $3.00 \mu\text{g mL}^{-1}$ 'dir. Doğrusallık aralığı $1.00 - 60.00 \mu\text{g mL}^{-1}$ ve $3.00 - 200.00 \mu\text{g mL}^{-1}$ olarak bulunmuştur.

Bu sonuçlara göre OSWV yöntemi her iki yöntemle de karşılaştırıldığında, spektrofotometrik ve kapiller elektroforez yöntemine göre daha duyarlı ve hızlı bulunmuştur.

Elektrokimyasal yöntemlerle duyarlığın yüksek olması nedeniyle çok düşük tayin sınırlarına ulaşılabilme imkanı sağlayan, rosuvastatin kalsiyumun farmasötik preparatlardan analizi için geliştirilen OSWV yönteminin, daha sonra biyolojik materyallerden analizlerinin yapılmasında da kullanılabilecek bir yöntem olabileceği düşünülmektedir.

OSWV yöntemi, rosuvastatin kalsiyumun farmasötik preparatlardan tayini için doğru, kesin, duyarlı, seçici, tekrarlanabilir, sağlam ve tutarlı bir yöntem olup rutin analiz laboratuvarlarında kalite kontrol amacıyla kullanılması önerilebilir.

KAYNAKLAR

- 1.Schultheis, A. (1990) Hypercholesterolemia: prevention, detection and management. *Nurse Practice*, 15 (1), 51-56.
- 2.Stein, E. (1989) Management of hypercholesterolemia. Approach to diet and drug therapy. *Am J Med*, 87 (4A), 20S-27S.
- 3.Davidson, M. (2002) Rosuvastatin: a highly efficacious statin for the treatment of dyslipidaemia. *eid*, 11 (1), 125-141.
- 4.Endo, A. (1992) The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors. *The Journal of Lipid Research*, 33 (11), 1569-1582.
- 5.White, C. (2002) A review of the pharmacologic and pharmacokinetic aspects of rosuvastatin. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 42 (9), 963-970.
- 6.Pasha, M.K., Muzeeb, S., Basha, S.J., Shashikumar, D., Mullangi, R.,Srinivas, N.R. (2006) Analysis of five HMG-CoA reductase inhibitors-- atorvastatin, lovastatin, pravastatin, rosuvastatin and simvastatin: pharmacological, pharmacokinetic and analytical overview and development of a new method for use in pharmaceutical formulations analysis and in vitro metabolism studies. *Biomed Chromatography*, 20 (3), 282-293.
- 7.Sane, R., Kamat, S., Menon, S., Inamdar, S.,Mote, M. (2005) Determination of rosuvastatin calcium in its bulk drug and pharmaceutical preparations by high-performance thin-layer chromatography. *JPC-Journal of Planar Chromatography-Modern TLC*, 18 (103), 194-198.
- 8.Uyar, B., Celebier, M.,Altinoz, S. (2007) Spectrophotometric determination of rosuvastatin calcium in tablets. *Pharmazie*, 62 (6), 411-413.
- 9.Süslü, İ., Çelebier, M.,Altınöz, S. (2007) Determination of Rosuvastatin in Pharmaceutical Formulations by Capillary Zone Electrophoresis. *Chromatographia*, 66, 65-72.
- 10.Gao, J., Zhong, D., Duan, X.,Chen, X. (2007) Liquid chromatography/negative ion electrospray tandem mass spectrometry method for the quantification of rosuvastatin in human plasma: Application

- to a pharmacokinetic study. *Journal of Chromatography B*, 856 (1-2), 35-40.
- 11.Hull, C., Martin, P., Warwick, M.,Thomas, E. (2004) Quantification of the N-desmethyl metabolite of rosuvastatin in human plasma by automated SPE followed by HPLC with tandem MS detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 35 (3), 609-614.
 - 12.Hull, C., Penman, A., Smith, C.,Martin, P. (2002) Quantification of rosuvastatin in human plasma by automated solid-phase extraction using tandem mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography B*, 772 (2), 219-228.
 - 13.Kallem, R., Karthik, A., Chakradhar, L., Mullangi, R.,Srinivas, N. (2007) Development and validation of a highly sensitive and robust LC-MS/MS with electrospray ionization method for quantification of rosuvastatin in small volume human plasma samples and its application to a clinical study. *Arzneimittelforschung*, 57 (11), 705-711.
 - 14.Kumar, T., Shitut, N., Kumar, P., Vinu, M., Kumar, V., Mullangi, R. ve diğ erleri. (2006) Determination of rosuvastatin in rat plasma by HPLC: validation and its application to pharmacokinetic studies. *Biomedical Chromatography*, 20 (9), 881.
 - 15.Lan, K., Jiang, X., Li, Y., Wang, L., Zhou, J., Jiang, Q. ve diğ erleri. (2007) Quantitative determination of rosuvastatin in human plasma by ion pair liquid?liquid extraction using liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 44 (2), 540-546.
 - 16.Robledo, V.,Smyth, W. (2008) A study of the analytical behaviour of selected new molecular entities using electrospray ionisation ion trap mass spectrometry, liquid chromatography, gas chromatography and polarography and their determination in serum at therapeutic concentrations. *Analytica Chimica Acta*, 623 (2), 221-230.
 - 17.Sultana, N., Arayne, M.,Iftikhar, B. (2008) Simultaneous Determination of Atenolol, Rosuvastatin, Spironolactone, Glibenclamide and Naproxen Sodium in Pharmaceutical Formulations and Human Plasma by RP-HPLC.

- Journal of the Chinese Chemical Society*, 55 (5), 1022-1029.
- 18.Trivedi, R., Kallem, R., Mullangi, R.,Srinivas, N. (2005) Simultaneous determination of rosuvastatin and fenofibric acid in human plasma by LC/MS/MS with electrospray ionization: Assay development, validation and application to a clinical study. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 39 (3-4), 661-669.
 - 19.Vittal, S., Shitut, N., Kumar, T., Vinu, M., Mullangi, R.,Srinivas, N. (2006) Simultaneous quantitation of rosuvastatin and gemfibrozil in human plasma by high-performance liquid chromatography and its application to a pharmacokinetic study. *Biomedical Chromatography*, 20 (11), 1252.
 - 20.Xu, D., Ruan, Z., Zhou, Q., Yuan, H.,Jiang, B. (2006) Quantitative determination of rosuvastatin in human plasma by liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 20 (16), 2369.
 - 21.Mehta, T., Patel, A., Kulkarni, G.,Suubbaiah, G. (2005) Determination of Rosuvastatin in the Presence of Its Degradation Products by a Stability-Indicating LC Method. *Journal of AOAC International*, 88 (4), 1142-1147.
 - 22.Wendelhag, I., Wiklund, O.,Wikstrand, J. (1992) Arterial wall thickness in familial hypercholesterolemia. Ultrasound measurement of intima-media thickness in the common carotid artery. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 12 (1), 70-77.
 - 23.Ramires, J., Sposito, A., Mansur, A., Coelho, O., Maranhao, M.,Cesar, L. (2001) Cholesterol lowering with statins reduces exercise-induced myocardial ischemia in hypercholesterolemic patients with coronary artery disease. *The American journal of cardiology*, 88 (10), 1134-1138.
 - 24.Martin, P., Mitchell, P.,Schneck, D. (2002) Pharmacodynamic effects and pharmacokinetics of a new HMG-CoA reductase inhibitor, rosuvastatin, after morning or evening administration in healthy volunteers. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 54 (5), 472.
 - 25.Martin, P., Warwick, M., Dane, A., Hill, S., Giles, P., Phillips, P. ve diğ erleri. (2003) Metabolism, excretion, and pharmacokinetics of rosuvastatin in healthy adult male volunteers. *Clinical Therapeutics*, 25

(11), 2822-2835.

26. Ağ Sitesi: **www.rxlist.com**

27. Chasman, D.I., Posada, D., Subrahmanyam, L., Cook, N.R., Stanton, V.P., Ridker, P.M., (2004) Pharmacogenetic study of statin therapy and cholesterol reduction. *JAMA*, 291, 2821-7

28. Martin, P., Warwick, M., Dane, A., Brindley, C., Short, T. (2003) Absolute oral bioavailability of rosuvastatin in healthy white adult male volunteers. *Clinical Therapeutics*, 25 (10), 2553-2563.

29. Martin, P., Warwick, M., Dane, A., Cantarini, M. (2003) A double-blind, randomized, incomplete crossover trial to assess the dose proportionality of rosuvastatin in healthy volunteers. *Clinical Therapeutics*, 25 (8), 2215-2224.

30. Bard, Faulkner. (1980). *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*: Wiley.

31. Bond, A.M. (1980). *Modern Polarographic Methods in Analytical Chemistry*. USA: Marcel Dekker, Inc.

32. Brainina, K.Z. (1974). *Stripping Voltammetry in Chemical Analysis*. New York: John Wiley and Sons.

33. Gosser, D. (1993). *Cyclic Voltammetry: Simulation and Analysis of Reaction Mechanisms*: Wiley-VCH.

34. Greef, R., Peat, R., Peter, L.M., Pletcher, D., Robinson, J. (1990). *Instrumental Methods in Electrochemistry*. New York: Ellis Harwood Ltd.

35. Hampel, C.A. (1964). *The Encyclopedia of Electrochemistry*. New York, Reinhold Publishing Co.

36. Heyrovsky, J., Kuta, J. (1966). *Principles of Polarography*. New York: Academic Press.

37. Meites, L. (1965). *Polarographic Techniques (Second ed.)*. USA: Wiley & Sons, Inc.

38. Skoog, D., Holler, F.J., Neuman, T.A. (1998). *Enstrümantal Analiz İlkeleri (1. bs.)*. Ankara: Bilim Yayıncılık.

39. Tural, H., Gökçe, İ., Ertuş, N. (2003). *Enstrümantal Analiz Elektroanalitik Yöntemler (c. 1)*. Bornova, İzmir: Ege Üniversitesi Basımevi.

- 40.Wang, J. (1994). Analytical Electrochemistry. USA: VCH Publishers, Inc.
- 41.Zuman, P. (1969). The Elucidation of Organic Electrode Processes. USA: Academic Press, Inc.
- 42.Zuman, P.,Perrin, C. (1969). Organic Polarography: Interscience Publishers.
- 43.Brown, E.R.,Sandifer, J.R. (1986) Cyclic Voltammetry, AC Polarography and Related Techniques in Electrochemical Techniques. 1.
- 44.Florence, T. (1984) Recent advances in stripping analysis. *J. Electroanal. Chem*, 168, 207-218.
- 45.KALVODA, R. (1984) Adsorptive stripping voltammetry of electroactive organic compounds. *Analytica chimica acta.*, 162, 197-205.
- 46.Wang, J. (1985) Adsorptive stripping voltammetry. *Am. Lab.* (17), 41-50.
- 47.Copeland, T.,Skogerboe, R. (1974) Anodic stripping voltammetry. *Analytical Chemistry*, 46 (14), 1257-1268.
- 48.Gordon, C.L.,Wickers, E. (1956) Purification of mercury and its physical properties. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 65, 369-387.
- 49.Ermer, J. (2001) Validation in pharmaceutical analysis. Part I: An integrated approach. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 24 (5-6), 755-767.
- 50.Green, J. (1996) A practical guide to analytical method validation. *Anal. Chem*, 68, 305A-309A.
- 51.Hibbert, D. (1999) Method validation of modern analytical techniques. *Accreditation and Quality Assurance: Journal for Quality, Comparability and Reliability in Chemical Measurement*, 4 (8), 352-356.
- 52.ICH,Commitee, S. (2005). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1) Harmonized Tripartite Guideline.
- 53.Shabir, G. (2007) Evaluation and Application of Best Practice in Analytical Method Validation. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 30 (3), 311-333.
- 54.Shah, V., Midha, K., Dighe, S., McGilveray, I., Skelly, J., Yacobi, A. ve diğ erleri. (1991) Analytical methods validation: bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies. Conference report. *Eur J*

Drug Metab Pharmacokinet, 16 (4), 249-255.

- 55.Vander Heyden, Y., Nijhuis, A., Smeyers-Verbeke, J., Vandeginste, B.,Massart, D. (2001) Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 24 (5-6), 723-753.
- 56.Alpar, R. (2001). Spor Bilimlerinde Uygulamalı İstatistik (2 bs.). Ankara: Nobel Yayın Dağıtım.
- 57.Wopschall, R.H.,Shain, I. (1967) Effects of adsorption of electroactive species in stationary electrode polarography. *Anal. Chem.* , 39, 1514-1527.
- 58.Zuman, P. (1999) Scientific papers of university of pardubice, series A. *Faculty of Chemical Technology*, 5.

EKLER

Ek 1. Korrelasyon Katsayısı ve Doğrusallıktan Ayrılış Önem Kontrolü

Bulunan korrelasyon katsayısının önemli bir katsayı mı yoksa tesadüfe bağlı bir katsayı mı olduğu test edilmiştir.

Testin yapımında işlemler:

1. H_0 : Korrelasyon katsayısı tesadüfe bağlı bir değerdir ($r = 0$).
2. Test istatistiğinin hesaplanması:

$$T = \frac{r}{S_r}$$

$$S_r = \left[\frac{1 - r^2}{n - 2} \right]^{1/2} \quad (\text{Korrelasyon katsayısının standart hatası})$$

3. Yanılma olasılığı olarak $\alpha = 0.05$ seçilmiştir.
4. Serbestlik derecesi = $n - 2$
5. $\alpha = 0.05$ düzeyinde ve 4. Madde de bulunan serbestlik derecesinde tablo t değerine bakılır.
6. Karşılaştırma: Hesapla bulunan t değeri tablo t değerinden büyükse H_0 hipotezi reddedilir, küçükse kabul edilir.
7. Karar: Korrelasyon katsayısı önemli bir değerdir, tesadüfen bulunmuş bir değer değildir ($t = \text{Hesapla bulunan değer}$, $p < 0.05$) veya korrelasyon katsayısı önemli bir değer değildir, tesadüfen bulunmuş bir değerdir ($t = \text{Hesapla bulunan değer}$, $p > 0.05$).

Doğrusallıktan Ayrılış Önem Kontrolü

1. Kareler toplamları bulunur:

a) Regresyon Kareler Toplamı (RKT):

$$RKT = \frac{\left[\sum xy - \frac{(\sum x)(\sum y)}{n} \right]^2}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}$$

b) Y Ortalamadan Ayrılış Kareler Toplamı (YOAKT):

$$YOAKT = \sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n}$$

c) Regresyondan Ayrılış Kareler Toplamı $\Rightarrow$ RAKT = YOAKT - RKT

2. Serbestlik dereceleri bulunur:

a) Regresyon Serbestlik Derecesi (RSD) = 1

b) Y Ortalamadan Ayrılış Serbestlik Derecesi $\Rightarrow$ YOASD = n-1

c) Regresyondan Ayrılış Serbestlik Derecesi $\Rightarrow$ RASD = YOASD – RSD

3. Kareler ortalamaları bulunur:

a) Regresyon Kareler Ortalaması $\Rightarrow$ RKT / RSD

b) Regresyondan Ayrılış Kareler Ortalaması $\Rightarrow$ RAKO = RAKT / RASD

4. H_0 = Derişim ile detektör cevabı arasındaki ilişki doğrusal değildir.

5. Yanılma olasılığı $\alpha = 0.05$ seçilmiştir.

6. $F = RKO / RAKO$

7. $p = 0.05$ düzeyinde RSD ve RASD serbestlik derecelerindeki tablo F değerleri bulunur.

8. Karşılaştırma: Hesapla bulunan F değeri tablo F değerinden büyükse H_0 hipotezi reddedilir, küçükse kabul edilir.

9. Karar: Derişim ile detektör cevabı arasındaki ilişki doğrusaldır (F = Hesapla bulunan, $p < 0.05$) veya doğrusal değildir (F = Hesapla bulunan, $p > 0.05$).

Kesişimin sıfırdan ayrılışının önem kontrolü

1.

$$S_{yx} = \frac{\Sigma y^2 - (\Sigma x)^2 / n}{n - 1} \left[\frac{(1 - r)^2 (n-1)}{n - 2} \right]^{1/2}$$

2. $S_{H(a)} = (S_{yx})^2 [(1 / n) + \bar{x} / (\Sigma x^2 - (\Sigma x)^2 / n)]$
3. H_0 = Kesişim değeri (a) sıfıra eşittir.
4. Yanılma olasılığı $p = 0.05$ seçilmiştir.
5. $t_H = a / S_{H(a)}$
6. $\alpha = 0.05$ düzeyinde t_T değerleri bulunur.
3. Karşılaştırma: Hesapla bulunan t değeri tablo t değerinden büyükse H_0 hipotezi reddedilir, küçükse kabul edilir.
4. Karar: Kesişim değeri sıfıra eşittir (t_H = Hesapla bulunan, $p > 0.05$) veya Kesişim değeri sıfırdan farklıdır (t_H = Hesapla bulunan, $p < 0.05$).

Ek 2. İstatistiksel Katsayıların Hesaplanması

Bağıl Standart Sapma Hesaplanması

$$\text{Bağıl Standart Sapma (BSS)} = \frac{SS}{\bar{X}} \times 100$$

SS: Standart Sapma

$\bar{X}$: Aritmetik ortalama

% Bağıl Hata Hesaplanması

$$\% \text{ Bağıl Hata (\%BH)} = \frac{|\text{Olması gereken miktar} - \text{Bulunan miktar}|}{\text{Olması gereken miktar}} \times 100$$

Standart Hata Hesaplanması

$$\text{Standart Hata (SH)} = \frac{SS}{\sqrt{n}}$$

SS: Standart sapma

n: Ölçüm sayısı

%Geri Kazanım Hesaplanması

$$\% \text{ Geri Kazanım} = \frac{\text{Bulunan miktar}}{\text{Olması gereken miktar}} \times 100$$

Evren Ortalaması Güven Aralığının Hesaplanması

$$\mu = \bar{X} \pm S_{\bar{X}} t \quad \text{veya} \quad \bar{X} - S_{\bar{X}} < \mu < \bar{X} + S_{\bar{X}}$$

μ : Evren ortalaması

$\bar{X}$: Örneklem ortalaması

$S_{\bar{X}}$: Standart hata

t : Seçilen yanılma düzeyi (α) ve n-1 serbestlik derecesindeki t tablosundaki değer.

Ek 3. Wilcoxon Eşleştirilmiş İki Örnek Testi

Aynı örneklerin değişik iki durumdaki ölçüm sonuçları arasında fark olup olmadığının belirlenmesinde $n < 25$ ise uygulanan önemlilik testidir.

H_0 = İki yöntemle elde edilen sonuçlar arasında fark yoktur.

$\alpha = 0,05$ yanılma düzeyi seçilmiştir.

Test istatistiğinin hesaplanması:

İki yöntemden elde edilen sonuçlar iki sütun şeklinde yanyana yazılır. Sağda yeni bir sütuna satırlar arasındaki farklar $\pm$ işaretleriyle birlikte yazılır. Ardından farklar küçükten büyüğe doğru sıralanır ve sıra no. verilir. Sıra no.ların önüne farklardaki $\pm$ işaretleri yazılır. + ve - işaretli sıra no. grupları arasında işareti sayıca fazla olan grup toplanır. Elde edilen değer, hesapla bulunan T değeridir (T_H).

Ölçüm sayısı (n) serbestlik derecesindeki tablo T değerine bakılır.

Karar:

- a) $T_H > T_t$ ise iki yöntemle elde edilen sonuçlar arasında fark yoktur (T_H = Hesaplanan T değeri, $p < 0,05$)
- b) $T_H < T_t$ ise iki yöntemle elde edilen sonuçlar arasında fark vardır (T_H = Hesaplanan T değeri, $p > 0,05$)

EK 4. Tekrarlı Ölçümlerde Varyans Analizi

Yöntemlerin karşılaştırılmasında, yöntemler arasında fark bulunup bulunmadığını kontrol etmek için Tekrarlı Ölçümlerde Varyans Analiz testi uygulanır.

1. Kareler toplamaları bulunur

a) Genel kareler toplamı (GnKT)

$$GnKT = \sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}$$

b) Gruplar arası kareler toplamı (GAKT)

$$GAKT = \sum \left[\frac{(\sum x_j)^2}{n_j} \right] - \frac{(\sum x)^2}{n}$$

c) Denekler arası kareler toplamı (DAKT)

$$DAKT = \sum \left[\frac{(\text{Her bir satır toplamı})^2}{\text{Her bir satırdaki ölçüm sayısı}} \right] - \frac{(\sum x)^2}{n}$$

e) Etkileşim (hata) kareler toplamı $\Rightarrow HKT = GnKT - GAKT - DAKT$

2. Serbestlik derecelerinin bulunması

a) Genel serbestlik derecesi $\Rightarrow GnSD = n_j \times k - 1$

b) Gruplar arası serbestlik derecesi $\Rightarrow GASD = k - 1$

c) Denekler arası serbestlik derecesi $\Rightarrow DASD = n_j - 1$

d) Hata serbestlik derecesi $\Rightarrow HSD = (n_j - 1) \times (k - 1)$

3. Kareler ortalamasının bulunması

a) Gruplar arası kareler ortalaması $\Rightarrow GAKO = GAKT / GASD$

b) Denekler arası serbestlik derecesi $\Rightarrow DAKO = DAKT / DASD$

c) Hata kareler ortalaması $\Rightarrow HKO = HKT / HSD$

4. H_0 = Yöntemler arasında fark yoktur.

H_1 = En az bir ölçüm diğerlerinden farklıdır.

5. Yanılma olasılığı $p = 0.05$ seçilmiştir.

6. $F = GAKO / HKO$

7. $\alpha = 0.05$ düzeyinde GASD ve HSD serbestlik derecelerindeki tablo F değerleri bulunur.

8. Karşılaştırma: Hesapla bulunan F değeri tablo F değerinden büyükse H_0 hipotezi reddedilir, küçükse kabul edilir.

9. Karar: Yöntemler arasında fark yoktur ($F =$ Hesapla bulunan, $p < 0.05$) veya yöntemlerden en az biri farklıdır ($F =$ Hesapla bulunan, $p < 0.05$).

EK. 5

 DR. REDDY'S

UNIT - III
 Factory : Plot No. 116, I.D.A., Bollaram,
 Narsapur Tq, Medak Dt., A.P., INDIA, Ph. : 08458-279485

CERTIFICATE OF ANALYSIS OF REFERENCE STANDARD
 Page 1 of 2

Product	Rosuvastatin calcium	Source Batch No	ROS/B690/XIA/13
Batch No.	RCWS0301	A.R. No.	ADBK0018
Date of evaluation	21/01/2003	Valid up to	December, 2003

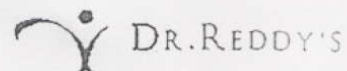
S. No.	TEST	RESULT	SPECIFICATION
01	Description	Off-white colored powder	White to off white colored powder
02	Identification a) UV b) Test for calcium	Maximum found at 243 nm Positive	----- Positive
03	Water by KF	3.84 %	Not more than 6.0%.
04	Calcium content	4.0 %	Should be between 3.5% to 4.5%
05	Heavy metals	Less than 20 ppm.	Not more than 20 ppm.
06	Related substances by HPLC	0.61%	Not more than 1.0%
07	Assay (on mass balance)	99.3 %	Not less than 98.0%

REMARKS : THE SUBSTANCE WAS PREPARED AS REFERENCE STANDARD, IT CAN BE USED AS WORKING STANDARD FOR REGULAR ANALYSIS.

Compiled by :
 Date : 21/01/2003

Checked by : *Sully*
 Date : 21/01/2003

Head-Quality Control : *CE*
 Date : 21.01.2003



UNIT - III

Factory : Plot No. 116, I.D.A., Bollaram,
Narsapur Tq, Medak Dt., A.P., INDIA, Ph. : 08458-279485

CERTIFICATE OF ANALYSIS OF REFERENCE STANDARD

Page 2 of 2

Product : Rosuvastatin calcium Source Batch No : ROS/B690/XIA/13
Batch No : RCWS0301 A.R. No. : ADBK0018
Date of evaluation : 21/01/2003 Valid up to : December, 2003

S No	TEST	RESULT	SPECIFICATION
08	Residual solvents/Organic volatile impurities		
	a) Methanol	367ppm	For information *
	b) Isopropyl alcohol	27ppm	
	c) Acetonitrile	Not detected	
	d) Tetrahydrofuran	Not detected	
	e) Cyclohexane	Not detected	
	f) Toluene	31ppm	

REMARKS : THE SUBSTANCE WAS PREPARED AS REFERENCE STANDARD, IT CAN BE USED AS WORKING STANDARD FOR REGULAR ANALYSIS.

*To calculate the Mass balance assay

Compiled by : *[Signature]*

Checked by : *[Signature]*

Head-Quality Control : *[Signature]*

Date : 21/01/2003

Date : 21/01/2003

Date : 21-01-2003



Unit-3

Factory : Plot No. 116, I.D.A., Bollaram,
Narsapur Tq, Medak Dt., A.P., INDIA, Ph. : 08458-279485.

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Product	: Rosuvastatin Calcium		
Batch No.	: ROS/C140/XIA/27	Reference	: 380-08TSRC-001/03
Batch Quantity	: 0.38 Kg	Date of Manufacture	: 21/04/2003
A.R.No.	: ADFK0063	Re - Test Date	: March , 2004
Customer name :		Date Analyzed	: 2710/2003
S.No	TEST	RESULT	SPECIFICATIONS
01	Description	Light yellow coloured powder	White to light yellow coloured powder.
02	Solubility	Soluble in N,N-dimethylformamide	Soluble in N,N-dimethylformamide
03	Identification a) UV b) Test for calcium	Similar to working standard. Positive	Should match with working standard. Positive
04	Water by KF	3.53 %	Not more than 6.0%.
05	Calcium content	3.98 %	Should be between 3.5 % to 4.5 %.
06	Specific optical rotation At 25°C(0.5% solution in 50% methanol)	+15.53°	Between +14° and +19°
07	Heavy metals	Less than 20 ppm.	Not more than 20 ppm.
08	Related substances by HPLC a. Rosuvastatin Ester b. Rosuvastatin Lactone c. Any unknown impurity d. Total impurities	0.01 % 0.15 % 0.11 % 0.45 %	Not more than 0.3 % Not more than 0.3 % Not more than 0.3 % Not more than 1.0 %
09	Assay (on anhydrous basis)	100.1 %	Not less than 98.0% and not more than 102.0%

The product CONFORMS to the specifications.

Compiled by : *[Signature]*
Date : 4/11/03

Checked by : *[Signature]*
Date : 4/11/03

Head-AR&D : *[Signature]*
Date : 04-11-03

ÖZGEÇMİŞ

1979 yılında Mersin’de doğdum. 1997 yılında Silifke Lisesinden mezun oldum. Aynı yıl Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesine girdim ve 2001 yılında mezun oldum. 2002-2004 yılları arasında eczane eczacılığı yaptıktan sonra 2005 yılında Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı’nda yüksek lisans programına başladım. Halen 2006 yılında girdiğim Eczacıbaşı Zentiva Sağlık Ürünleri San. Tic. A.Ş.’de Farmakovijilans ve Medikal Hizmetler Uzmanı olarak görev yapmaktayım.