



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**OLOPATADİN. HCl İÇEREN FARMASÖTİK
PREPARATLARDA ANALİZ YÖNTEMLERİ**

Berk TOKER

**ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Nevin ERK**

2014 – ANKARA

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**OLOPATADİN. HCl İÇEREN FARMASÖTİK
PREPARATLARDA ANALİZ YÖNTEMLERİ**

Berk TOKER

**ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Nevin ERK**

2014 – ANKARA

**Ankara Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü**

Analitik Kimya Yüksek Lisans Programı çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri üyeleri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 23/01/2014

Prof. Dr. Elmas GÖKOĞLU
Hacettepe Üniversitesi
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Göksel ARLI
Anadolu Üniversitesi

Prof. Dr. S. Gül ÖZTAŞ
Ankara Üniversitesi

Prof. Dr. Nevin ERK
Ankara Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr. Saadet DERİMİŞ GÜNGÖR
Ankara Üniversitesi

İÇİNDEKİLER

Kabul ve onay	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	vii
Şekiller	viii
Çizelgeler	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Giriş ve Amaç	1
1.2. Kullanılan Etken Maddelerin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	5
1.2.1. Olopatadin HCl	5
1.2.1.1. Kimyasal Yapısı	5
1.2.1.2. Farmakodinamik, Farmakokinetik ve Farmakolojik Özellikleri	6
1.2.1.3. Endikasyonları	7
1.2.1.4. Kontrendikasyonları	7
1.2.1.5. Uyarılar	7
1.2.1.6. Yan Etkiler	8
1.3. Olopatadin HCl İçin Uygulanmış Analiz Yöntemleri	11
1.3.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi	11
1.3.2. Spektrofotometri	17
1.3.3. Voltametri	18
1.4. Kullanılan Yöntemler	20
1.4.1. Spektrofotometri	20
1.4.1.1. Spektrofotometre	23
1.4.1.2. Türev Spektrofotometri	25
1.4.1.2.1. Yöntemin Avantajları	27
1.4.1.2.2. Yöntemin Dezavantajları	27
1.4.2. Kromatografi	29
1.4.2.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi	30
1.4.2.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Cihazı	39

1.4.2.3. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Yönteminin Avantajları	42
1.4.2.4. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Yönteminin Dezavantajları	42
1.4.3. Voltametri	43
1.4.3.1. Voltametri Yöntemleri	43
1.4.3.1.1. Doğrusal Taramalı Voltametri	43
1.4.3.1.2. Diferansiyel Puls Voltametri	44
1.4.3.1.3. Kare Dalga Voltametri	45
1.4.3.1.4. Üçken (dönüşümlü, sıklık) Voltametri	46
1.4.3.1.4.1. Tersinir Reaksiyonlar	49
1.4.3.1.4.2. Tersinmez ve Yarı-tersinir Reaksiyonlar	50
1.4.3.1.4.3. Adsorpsiyon İçeren Reaksiyonlar	52
1.4.3.2. Destek Elektrolit	53
1.4.3.3. Çalışma Elektrodu (İndikatör Elektrot)	53
1.4.3.4. Referans Elektrot	54
1.4.3.5. Karşı Elektrot	54
1.4.3.6. Polarografik Akımlar	54
2. GEREÇ VE YÖNTEM	58
2.1. Kullanılan Cihazlar ve Gereçler	58
2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	58
2.3. Kullanılan Standartlar	59
2.4. Farmasötik Preparatlar	59
2.5. Ortam Şartları ve Hesaplamalar	59
2.6. Olopatadin HCl İçin Geliştirilmiş Analiz Yöntemleri	61
2.6.1. Spektrofotometri	61
2.6.1.1. Doğrudan UV Spektrofotometri	61
2.6.1.1.1. Deneyin Yapılışı	61
2.6.1.1.1.1. Çalışma Grafiklerinin Hazırlanması	61
2.6.1.1.1.2 Tekrar Edilebilirliğin Araştırılması (Güniçi ve Günlerarası Çalışmalar)	61
2.6.1.1.1.2.1. Güniçi Çalışmalar	61

2.6.1.1.1.2.2. Günlerarası Çalışmalar	62
2.6.1.1.1.3. % Geri Kazanım Çalışmaları	62
2.6.1.1.1.4. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması	62
2.6.1.2. Birinci Türev Spektrofotometri	63
2.6.1.2.1. Deneyin Yapılışı	63
2.6.1.2.1.1. Çalışma Grafiklerinin Hazırlanması	63
2.6.1.2.1.2 Tekrar Edilebilirliğin Araştırılması (Güniçi ve Günlerarası Çalışmalar)	63
2.6.1.2.1.2.1. Güniçi Çalışmalar	63
2.6.1.1.1.2.2. Günler arası Çalışmalar	64
2.6.1.1.1.3. % Geri Kazanım Çalışmaları	64
2.6.1.2.1.4. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması	64
2.6.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi	65
2.6.2.1. Deneyin Yapılışı	65
2.6.2.1.1. Ortam Koşullarının Ayarlanması	65
2.6.2.1.2. Kromatografik Koşullar	65
2.6.2.1.3. Çalışma Grafiklerinin Hazırlanması	66
2.6.2.1.4. Tekrar Edilebilirliğin Araştırılması (Güniçi ve Günlerarası Çalışmalar)	67
2.6.2.1.4.1. Güniçi Çalışmalar	67
2.6.2.1.4.2. Günlerarası Çalışmalar	67
2.6.2.1.5. % Geri Kazanım Çalışmaları	67
2.6.2.1.6. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması	67
2.6.3. Voltametri	69
2.6.3.1. Deneyin Yapılışı	69
2.6.3.1.1. Çalışma Grafiklerinin Hazırlanması	69
2.6.3.1.2. Dönüşümlü Voltametri	69
2.6.3.1.3. Diferansiyel Puls Voltametri	69
2.6.3.1.4. Kare Dalga Voltametri	70
2.6.3.2. % Geri Kazanım Çalışmaları	70
2.6.3.3. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması	71

3. BULGULAR	72
3.1. Olopatadin HCl İçin Yöntemlerin Uygulanması ve Analiz Sonuçları	72
3.1.1. Spektrofotometri	72
3.1.1.1. Doğrudan UV Spektrofotometri	72
3.1.1.2. Birinci Türev UV Spektrofotometri	78
3.1.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi	87
3.1.3. Voltametri	93
3.1.3.1 Dönüşümlü Voltametri	93
3.1.3.2. Diferansiyel Puls Voltametri	95
3.1.3.3. Kare Dalga Voltametri	97
3.1.3.4. Geri Kazanım Çalışmaları	98
3.1.3.5. Yöntemin Farmasötik Preparata Uygulanması	100
4. TARTIŞMA	101
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	107
ÖZET	108
SUMMARY	110
KAYNAKLAR	112
ÖZGEÇMİŞ	119

ÖNSÖZ

Tezimizde olopatadin HCl içeren farmasötik preparatta etken maddenin miktar tayini için doğrudan spektrofotometri, birinci türev spektrofotometri, yüksek performanslı sıvı kromatografi ve voltametri yöntemlerinin önerilmesi ve uygulanması amaçlanmıştır. Elde edilen sonuçlar tezimiz kapsamında sunulmuştur.

Bu çalışmanın hazırlanması ve tamamlanmasında desteğini, bilgi ve tecrübesini, eğitimlik başarısı ile sevgisini birleştirerek bana önder olup yol gösteren sayın hocam Prof. Dr. Nevin ERK'e saygılarımı sunarım.

Çalışmalarında her zaman desteklerini gördüğüm değerli bölüm hocalarıma ve yardımlarını esirgemeyen bölüm asistanı arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

ŞEKİLLER

Şekil 1.1.1.	Numune hücresi	20
Şekil 1.1.2.	Çift Işın yollu Spektrofotometre	24
Şekil 1.1.3.	A. basit bir orijinal spektrum D ₁ . Orijinal spektrumun 1. dereceden türevi D ₂ . Orijinal spektrumun 2. dereceden türevi D ₃ . Orijinal spektrumun 3. dereceden türevi D ₄ . Orijinal spektrumun 4. dereceden türevi	26
Şekil 1.2.1.	(a) İki maddeli bir karışımın elüsyon kromatografik yöntemiyle ayrılmasını gösteren şematik diyagram. (b) elüsyonun farklı zamanlardaki dedektör sinyali	32
Şekil 1.2.2.	A ve B maddeleri kolondan aşağı ilerlerken iki ayrı göç noktasında alınan konsantrasyon profilleri	32
Şekil 1.2.3.	Kromatografik pikten standart sapma τ 'nın tayini	34
Şekil 1.2.4.	$H = A + B/u + Cu$ denklemin'deki değişkenlerin tepsi yüksekliğine etkisi	38
Şekil 1.2.5.	Bir Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi cihazının şeması	39
Şekil 1.3.1.	Doğrusal taramada puls lar	44
Şekil 1.3.2.	Voltametri de kullanılan potansiyel uyarma sinyalleri	45
Şekil 1.3.3.	Doğrusal Taramalı Voltametri ve Dönüşümlü Voltametri'ye uygulanan voltaj	47

Şekil 1.3.4.	Eğri 1: $\text{Yük} + \text{ne}^- \leftrightarrow \text{İnd}$ reaksiyonuna ait tersinir Eğri 2: tersinmez ($\alpha = 0.5$) Eğri 3: tersinir fakat İnd türünün elektroinaktif bir türe dönüştüğü bir sistem için dönüşümlü voltamogramlar	48
Şekil 1.3.5.	Tersinmez (A) ve yarı-tersinir (B) dönüşümlü voltametri	51
Şekil 1.3.6.	Damla büyümesinin polarografik akıma etkisi, i_{ort} için $a \text{ alanı} = b \text{ alanı}$ ve $i_{\text{ort}} \approx 6/7 i_{\text{maks}}$	55
Şekil 1.3.7.	A eğrisi, Cd^{2+} yönünden $5.0 \times 10^{-4} \text{ M}$ olan 1M HCl çözeltisi ve B eğrisi, sadece 1M HCl çözeltisi için polarogramlar.	55
Şekil 3.1.1.1.	Olopatadin HCl'ün ultra saf suda a) 20.0 $\mu\text{g/mL}$, b) 40.0 $\mu\text{g/mL}$, c) 80.0 $\mu\text{g/mL}$, d) 100.0 $\mu\text{g/mL}$ ve e) 140.0 $\mu\text{g/mL}$ 'lık çözeltilerine ait doğrudan UV spektrumu	72
Şekil 3.1.1.2.	Olopatadin HCl'ün ultra saf suda a) 20.0 $\mu\text{g/mL}$, b) 40.0 $\mu\text{g/mL}$, c) 80.0 $\mu\text{g/mL}$, d) 100.0 $\mu\text{g/mL}$ ve e) 140.0 $\mu\text{g/mL}$ 'lık çözeltilerine ait birinci türev UV spektrumu	78
Şekil 3.1.2.1.	Olopatadin HCl a) 10.0 $\mu\text{g/mL}$, b) 30.0 $\mu\text{g/mL}$, c) 50.0 $\mu\text{g/mL}$, d) 70.0 $\mu\text{g/mL}$ ve e) 90.0 $\mu\text{g/mL}$ ve 20.0 $\mu\text{g/mL}$ kafein çözeltisine ait kromatogramlar	87
Şekil 3.1.3.1.	Olopatadin HCl'ün H_2SO_4 destek elektrolitli ortamında a) 37.40 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonu ve b) destek elektrolit (0.5 M H_2SO_4) voltamogramları, tarama hızı 50 mV/sn.	93
Şekil 3.1.3.2.	Dönüşümlü voltametrde 0.5 M H_2SO_4 destek elektrolit içerisinde 37.40 $\mu\text{g/mL}$ olopatadin HCl içeren çözeltinin camı karbon elektrottaki voltamogramı, tarama hızı 50 mV/sn.	94

- Şekil 3.1.3.3.** 37.40 µg/mL olopatadin HCl'ün camısı karbon elektrot 95
kullanılarak dönüşümlü voltametrik uygulamadaki log
 I_a 'nın log v' a karşı grafiği
- Şekil 3.1.3.4.** Olopatadin HCl'ün H₂SO₄ destek elektrolitli ortamında 96
camısı karbon elektrot kullanılarak a) destek elektrolit,
b) 14.96 µg/mL, c) 37.40 µg/mL, d) 149.60 µg/mL, e)
224.40 µg/mL, f) 374.00 µg/mL konsantrasyonlarındaki
diferansiyel puls voltamogramları (Tarama hızı: 20.0
mV/s; pulse genliği : 50.0 mV; pulse genişliği, 50.0 ms.)
- Şekil 3.1.3.5.** Olopatadin HCl'ün H₂SO₄ destek elektrolitli ortamında 97
camısı karbon elektrot kullanılarak a) destek elektrolit,
b) 14.96 µg/mL, c) 37.40 µg/mL, d) 149.60 µg/mL, e)
224.40 µg/mL, f) 374.00 µg/mL konsantrasyonlarındaki
kare dalga voltamogramları (frekans: 15 Hz, kare dalga
genliği: 25 mV)

ÇİZELGELER

Çizelge 3.1.1.1.1.	Olopatadin HCl için doğrudan UV spektrofotometrik yöntem ile elde edilen çalışma grafik verileri (n=7)	73
Çizelge 3.1.1.1.2.	Doğrudan UV spektrofotometrik yöntemiyle yapılan olopatadin HCl için günüçi çalışma sonuçları (297.4 nm için).	74
Çizelge 3.1.1.1.3.	Doğrudan UV spektrofotometrik yöntem ile elde edilen günler arası çalışmaların bulguları (n=3) (297.4 nm için)	75
Çizelge 3.1.1.1.4.	Doğrudan UV spektrofotometrik yöntemde % geri kazanım çalışmaları ile elde edilen analiz bulguları (n=6) (297.4 nm için)	76
Çizelge 3.1.1.1.5.	Doğrudan UV spektrofotometrik yöntemin farmasötik preparata uygulanması sonucunda elde edilen sonuçlar (n=5) (Preparatın üzerinde yazılı olan miktar 1.11 mg/mL; 297.4 nm)	77
Çizelge 3.1.1.2.1.	Olopatadin HCl için birinci türev UV spektrofotometrik yöntemi ile elde edilen çalışma grafik verileri (n=7)	79
Çizelge 3.1.1.2.2.	Birinci Türev UV spektrofotometrik yöntem kullanılarak yapılan olopatadin HCl için günüçi çalışma bulguları (288.8 nm için)	80
Çizelge 3.1.1.2.3.	Birinci Türev UV spektrofotometrik yöntem kullanılarak yapılan olopatadin HCl için günüçi çalışma bulguları (308.4 nm için)	81

Çizelge 3.1.1.2.4.	Birinci türev UV spektrofotometrik yöntem ile elde edilen günler arası çalışmaların bulguları (n=3) (288.8 nm için)	82
Çizelge 3.1.1.2.5.	Birinci türev UV spektrofotometrik yöntem ile elde edilen günler arası çalışmaların bulguları (n=3) (308.4 nm için)	83
Çizelge 3.1.1.2.6.	Birinci türev UV spektrofotometrik yöntemde % geri kazanım çalışmaları ile elde edilen analiz bulguları (n=6) (288.8 nm için)	84
Çizelge 3.1.1.2.7.	Birinci türev UV spektrofotometrik yöntemde % geri kazanım çalışmaları ile elde edilen analiz bulguları (n=6) (308.4 nm için)	85
Çizelge 3.1.1.2.8.	Birinci türev UV spektrofotometrik yöntemin farmasötik preparata uygulanması sonucunda elde edilen sonuçlar (n=5) (Preparatın üzerinde yazılı olan miktar 1.11 mg/mL)	86
Çizelge 3.1.2.1.	Olopatadin HCl için yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntem ile elde edilen çalışma grafik verileri (n=12)	88
Çizelge 3.1.2.2.	Yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntem kullanılarak yapılan olopatadin HCl için günüçi çalışma bulguları	89
Çizelge 3.1.2.3.	Yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntem kullanılarak yapılan olopatadin HCl için günler arası çalışma bulguları	90
Çizelge 3.1.2.4.	Yüksek performanslı sıvı kromatografi yönteminde % geri kazanım çalışmaları ile elde edilen analiz bulguları (n=6) (255.0 nm için)	91

Çizelge 3.1.2.5.	Yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntemin farmasötik preparata uygulanması sonucunda elde edilen sonuçlar (n=5) (Preparatın üzerinde yazılı olan miktar 1.11 mg/mL)	92
Çizelge 3.1.3.1.	Olopatadin HCl'ün H ₂ SO ₄ destek elektroliti ve camı karbon elektrot kullanılarak yapılan Diferansiyel puls voltametri ile elde edilen kalibrasyon verileri	96
Çizelge 3.1.3.2.	Olopatadin HCl'ün H ₂ SO ₄ destek elektroliti kullanılarak Kare Dalga Voltametri ile elde edilen kalibrasyon verileri	98
Çizelge 3.1.3.3.	Diferansiyel pulse voltametri'de % geri kazanım değerleri ile elde edilen analiz sonuçları	99
Çizelge 3.1.3.4.	Kare dalga voltametri'de % geri kazanım değerleri ile elde edilen analiz sonuçları	99
Çizelge 3.1.3.5.	Diferansiyel pulse ve kare dalga voltametrik yöntemlerin farmasötik preparata uygulanması sonucunda elde edilen sonuçlar (n=5) (Preparatın üzerinde yazılı olan miktar 1.11 mg/mL)	100
Çizelge 4.1.	Olopatadin HCl için kullanılan yöntemlerin sonuçları	103

1.GİRİŞ

1.1. Giriş ve Amaç

Gözün beyaz kısmını ince zar gibi kaplayan ve göz yüzeyini nemlendirmeye yarayan maddeler salgılayan tabakaya konjonktivita tabakası adı verilmektedir. Konjonktivita tabakası basit bir doku olduğu için en sık mikroplar, virüsler, alerji ve çevredeki iritan maddeler, örneğin sigara dumanı ve hava kirliliği gibi nedenlerden dolayı iltihaplanma özelliği gösterebilmektedir. Konjonktivit adı ile bilinen göz hastalığı bu tabakanın iltihaplanması veya reaksiyonu sonucu oluşur. Gözde genel olarak akıntı, kızarıklık, kaşıntı, bulanık görme, ışığa karşı aşırı hassasiyet, yaşarma, çapaklanma, gözde yabancı bir madde varmış hissi oluşması ve ağrı vb.... belirtiler veren bu hastalığın başlıca üç türü bulunmaktadır. Bunlar:

a. Alerjik konjonktivit: Tekrarlayıcı bir durum olan ve her iki gözü de etkileyen havadaki alerjiye neden olan (polen, hayvan tüyü, toz ve küf) alerjenlere karşı gözün verdiği tepkimedir.

b. Bakteriyel konjonktivit: Genellikle soğuk algınlığı ile alakalı olan bulaşıcı sadece tek bir gözü etkileyebileceği gibi iki gözü birden de etkileyebilen gözü koruyan zarın bakteriler nedeniyle iltihaplanmasıdır.

c. Viral konjonktivit: Sıklıkla bulaşıcı olan konjonktivit türüdür. Yaygınlığı dönemsel olarak değişmektedir. Koruyucu faktörlerin önemli olduğu konjonktivit türüdür. Okul vb. yaşam merkezleri bulaşıcılık açısından risk teşkil eder. Özellikle etkilenen çocukların okul ve evlerinde halı vb. ortak eşya kullanımından kaçınmaları gerekmektedir. Sıklıkla keratit dediğimiz korneanın etkilendiği durumun görüldüğü konjonktivit tipidir.

(<http://www.avrupagoz.com.tr>)

Başlıca konjonktivit tedavisinde kullanılan ilaçları yedi grupta toplayabiliriz (Pelit ve Akova, 2006):

a. Antihistaminikler ve dekonjestanlar:

Antihistaminikler konjonktiva tabakası epiteli hücrelerden proinflamatuvar sitokin sentez ve salınımını uyarak allerjik hastalıkların ilaçla tedavisinde yeni bir hedef oluşturmuştur. Antihistaminik ilaçlar iki tip jenerasyonda etki göstermektedirler. Birinci jenerasyon sistemik antihistaminikler üriner retansiyon, sedasyon, kuru göz ve ağız kuruluğuna neden olurken, ikinci jenerasyon sistemik antihistaminikler (setirizin, loratadin ve desloratadin) sedatif özellikleri ve antikolinergik etki meydana getirmemektedir. İkinci jenerasyon antihistaminikler birinci jenerasyona kıyasla periferik H_1 reseptörlerine daha selektif olarak bağlanmaktadır.

Oral antihistaminikler göz, burun ve soluk borusundaki allerjik semptomların erken kontrolünde kullanılırlar (Bielory ve ark., 2002; Bielory ve ark., 2005). Topikal antihistaminikler genellikle H_1 reseptör antagonisti olarak etki ederler. Histamin reseptörleri reversibl olarak bloke edilir (Yanni ve ark., 1999). Uzun süreli antihistaminik tedavinin gerekmediği durumlarda topikal antihistaminik preparatlar kullanılmaktadır.

b. Topikal mast hücre stabilizatörler

Bu grup ilaçların etki mekanizmaları siklik adenosin monofosfat (cAMP) fosfodiesteraz enzimini inhibe ederek hücre içi cAMP seviyesini artırıp mast hücre membranından kalsiyum transportunu engelleyerek mast hücre degranilasyonunu inhibe etmektir (Buckly, 1988).

c. Topikal kombine etkili olan ilaçlar

Topikal kombine etkili formulasyonlarda etki erken dönemde histamin salınımının azalmasına ve fonksiyonel H₁ reseptör antagonizmasına, geç dönemde ise mast hücre stabilizasyonu ile azalmış inflamatuvar mediatör salınımına bağlıdır (Cook ve ark., 2000).

d. Topikal nonsteroid anti-inflamatuvar ilaçlar

Nonsteroid anti-inflamatuvar preparatlar (NSAID) etkilerini direkt olarak siklooksijenaz enzimini inhibe ederek konjonktiva düzeyinde prostaglandin sentezini inhibe ederek ve indirekt olarak lökotrienlerin oluşumunu azaltarak yapmaktadır. Yapılan çalışmalarda NSAID'ların primer etkisinin kaşıntıyı gidermek olduğu, fakat kızarıklık, ödem, fotofobi ve yabancı cisim hissini giderdiği bildirilmiştir (Leonardi ve ark., 2000). Nonsteroid anti-inflamatuvar damlalar mevsimsel allerjik konjonktivit tedavisinde kaşıntı ve semptomları azaltmada etkili ancak bu etki antihistaminik ve mast hücre stabilizatörlerine göre çok sınırlıdır.

e. Topikal steroidler

Topikal steroidler inflamasyonu kapiller geçirgenlik ve hücresel eksüdasyonu azaltarak etyolojik faktörleri ortadan kaldırmadan etkili şekilde giderilmesini sağlarlar. Bu etkileri temel olarak polimorfonükleer lökositlerin geçişi ile, inflamatuvar hücrelerden hidrolitik enzim salınımı ve fibroblast çoğalmasını önlemelerine bağlıdır (Meyer ve ark., 1987). Topikal steroidli damlalar yan etkilerinden dolayı, vernal konjonktivitli genç hastalarda düşük dozda ve kısa süreli kullanılmalıdır.

f. Topikal siklosporin

Siklosporin-A (Restasis, Abdi İbrahim) spesifik olarak CD4 + T lenfosit hücre proliferasyonunu ve IL-2 üretimini inhibe eden bir immunomodülatördür (Dursun ve Akova, 2003). Eozinofil ve mast hücre aktivasyonu üzerinde direkt etkileri mevcut olup, allerjik inflamasyonda rol oynayan mediatörler üzerinde etkilidir.

g. Diğer ilaçlar

Bu başlık altındaki preparatlardan olan FK506 (Tacrolimus) T hücrelerinden sitokin salınımını güçlü bir şekilde inhibe ederek etki göstermektedir (Bielory, 2002). FK506 gözde topikal pomad ve damla şeklinde kullanılmaktadır. Ayrıca normal tedaviye yanıtızsız ciddi oküler inflamasyonu olan olgularda ve vertebra kompresyon kırıkları (VKK)'de de etkili olduğu bildirilmiştir (Vichyanond ve ark., 2004; Joseph ve ark., 2005). Preparatın topikal kullanımında herpes simpleks keratit reaksiyon riski olduğundan bahsedilmiştir.

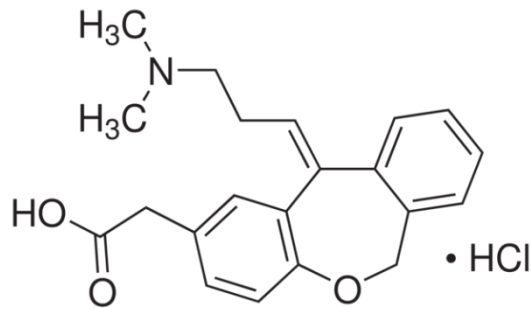
Yüksek lisans tez içeriğinde mast hücre mediatör salınımını önleyen ve histamin H₁ reseptör blokajı yaparak etki gösteren olopatadin HCl içeren farmasötik preparatlarda etken madde miktar tayininin yapılması için ekonomik, duyarlı, doğru ve basit bir spektrofotometrik, yüksek performanslı sıvı kromatografi ve voltammetrik yöntemlerin önerilmesi ve bu yöntemin farmasötik preparatlara uygulanması amaçlanmıştır.

1.2. Kullanılan Etken Maddelerin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

1.2.1. Olopatadin HCl

1.2.1.1. Kimyasal Yapısı (<http://en.wikipedia.org/wiki/Olopatadine>)

Maddenin molekül yapısı:



Olopatadin HCl

Kapalı Formülü : $C_{21}H_{23}NO_3 \cdot HCl$

Açık Formülü : (Z)-11-[3-(Dimetilamino)propiliden]-6,11-dihidrodibenz[b,e]okzapin-2-asetikasit hidroklorür

Elemental Analizi : % 67.46 C, % 6.47 H, % 3.75 N, % 12.84 O, % 9.48 Cl

Molekül Ağırlığı : 373.88 g

Erime Noktası : 242-245 °C

Görünüş : Beyaz renkte kristal yapıda bir tozdur.

Çözünürlük : Suda, methanol, etanol ve 0.1mol/LHCl içerisinde kolay çözünür.

1.2.1.2. Farmakodinamik, Farmakokinetik ve Farmakolojik Özellikleri

Farmakodinamik özellikler: Olopatadin hareketin multi ayrı mekanizmasını etkileyen kuvvetli, seçici bir antialerjik/antihistaminik ajandır. Bir histamin antagonistidir (insanlarda alerjik tepkilerin ana ara bulucusu) ve histaminin insan konjonktival epitel hücreleri yardımıyla inflamatuvar sitokin üretimine sebep olmasını engeller. In vitro çalışmalardan elde edilen veriler, pro-inflamatuvar ara bulucuların salınımını engellemek için insan konjonktival mast hücreleri üzerinde hareket edebileceğini önermektedir. Açık nasolakrimal kanalları olan hastalarda, PATANOL® % 0.1 Steril Oftalmik Solüsyonu'nun topikal oküler uygulaması, çoğunlukla mevsimsel alerjik konjonktivitinin nasal belirti ve semptomlarını azaltmak amacıyla önerilmiştir. Gözbebeği çapında önemli bir değişiklik oluşturmamaktadır.

Farmakokinetik özellikler: Oral farmakokinetik çalışmalara göre, plazmada olopatadinin yarılanma ömrü yaklaşık 8 ile 12 saattir ve eliminasyonu başlıca renal yolla olmaktadır. Yaklaşık dozun % 60-70'i etken madde olarak idrarda tespit edilmiştir. İdrarda düşük konsantrasyonlarda iki metaboliti, mono-desmetil ve N-oksit metabolitleri de saptanabilmektedir.

Değişmeyen etken maddeler gibi, olopatadin de idrardan öncelikli olarak atıldığı için, böbrek fonksiyonlarının eksikliği, ciddi böbrek yetmezliği (keratinin temizliği ortalaması 13.0 mL/dak.dır) olan hastalar sağlıklı yetişkinlere göre 2.3 kat daha fazla pik plazma konsantrasyonları ile olopatadinin farmakokinetiğini değiştirirler. Hemodiyalize (ürenari çıkış olmadan) uğrayan hastalarda 10 mg oral dozun takibinde, plazma olopatadin konsantrasyonlarının hemodiyaliz gününde hemodiyaliz olmayan güne göre daha düşük olması sebebiyle, olopatadin hemodiyaliz ile ortadan kaldırılabilir.

Gençler (ortalama 21 yaş) ve yaşlılar (ortalama 74 yaş) üzerinde olopatadinin 10 mg oral dozunun farmakokinetiğini karşılaştıran çalışmalar,

plazma konsantrasyonları (AUC), protein bağı, değişmeyen ana ilacın ürenari salınımı ve metabolitler içinde önemli bir farklılık olmadığını gösterir.

Olopatadinin oral alımından sonra böbrek yetmezliği çalışması, ciddi böbrek yetmezliği hastaları üzerinde yapılmıştır. Sonuçlar, bu popülasyonda PATANOL® % 0.1 Steril Oftalmik Solüsyonu ile oldukça yüksek plazma konsantrasyonlarının beklenebileceğini göstermektedir. Olopatadinin topikal oküler alınmasını takiben, plazma konsantrasyonları iyi tolere edilmiş oral dozlardan sonra 50-200 kat daha düşük olduğu zaman, doz ayarlamasının yaşlılarda veya böbrek yetmezliği çeken popülasyonda gerekli olması beklenmez. Akciğer metabolizması, eliminasyonun minör bir yoldur. Doz ayarlamasının, karaciğer yetmezliği için gerekli olması beklenmez.

1.2.1.3. Endikasyonları:

Mevsimsel alerjik konjonktivit sonucu ortaya çıkan belirti ve semptomların tedavisinde endikedir.

1.2.1.4. Kontrendikasyonlar:

Olopatadin ya da ilacın içerdiği diğer maddelere aşırı duyarlılığı olduğu bilinen vakalarda kontrendikedir.

1.2.1.5. Uyarılar:

PATANOL® % 0.1 Steril Oftalmik Solüsyonu, antialerjik/antihistaminik bir ajandır ve topik olarak uygulanmasına rağmen, sistemik olarak absorplanır. Eğer ciddi reaksiyonlar veya aşırı duyarlılık oluşursa, bu tedavinin uygulamasına devam edilmez.

Kontakt Lensler: PATANOL® % 0.1 Steril Oftalmik Solüsyonu damlatma sonrası kontakt lenslerin takılmasından önce 10-15 dakika beklenmesi uygundur.

Gebelik ve Emzirme Dönemlerinde Uygulama:

Gebelik kategori: C

Olopatadin için gebe hastalardan elde edilen klinik veriler mevcut değildir.

Araba Kullanma veya Herhangi Bir Makineyi İşletme Becerisi Üzerine Etkiler:

Diğer göz damlalarında da olduğu gibi, geçici görme bulanıklığı veya diğer görsel rahatsızlıklar araç ya da makine kullanımını etkileyebilir. Uygulamadan sonra görmeye bulanıklık meydana gelmesi durumunda, araç veya makine kullanılmadan önce bulanıklık geçinceye kadar beklenmelidir.

1.2.1.6. Yan Etkiler:

Yaklaşık 950 hastanın yer aldığı klinik çalışmalarda, PATANOL® % 0.1 Steril Oftalmik Solüsyonu monotreapi ya da loratadin 10 mg'a adjanktif tedavi olarak 4 aya kadar iki göze de günde 4 kez 1 damla olarak uygulanmıştır.

Yaklaşık hastaların % 5.0'inin istenmeyen etkiler maruz kalabileceği beklenmiştir, ancak yalnızca bu hastaların % 1.4'ü PATANOL® % 0.1 Steril Oftalmik Solüsyonu ile ilgili olan yan etkilerden dolayı klinik çalışmaya devam edemediler. Klinik çalışmalarda PATANOL® % 0.1 Steril Oftalmik Solüsyonu ile ilgili olarak ciddi oftalmik ya da sistemik yan etkilere rastlanmamıştır. En sık rapor edilen tedavi ile ilgili yan etki % 0.9 sıklığında oküler rahatsızlıktır.

Aşağıdaki tedavi ile kesinlikle, olası ve olabilir olarak belirlenen istenmeyen etkiler, PATANOL® % 0.1 Steril Oftalmik Solüsyonu ile ilgili klinik

alışmalar sırasında rapor edilmiştir. Bütün yan etkilerin görülme sıklığı çok nadirdir (% 0.1-1).

İnfeksiyonlar ve infestasyonlar:

Yaygın olmayan: Rinit

Deri ve deri altı doku hastalıkları:

Yaygın olmayan: Temas dermatiti, deride sıcaklık duygusu, kuru deri

Genel bozukluklar ve uygulama bölgesine ilişkin hastalıklar:

Yaygın: Halsizlik

Sinir sistemi bozuklukları:

Yaygın: baş ağrısı, tat alma bozukluğu

Göz bozuklukları:

Yaygın: gözde ağrı, göz iritasyonu, kuru göz, gözde anormal hassasiyet

Yaygın olmayan: korneada aşınma, korneada epitel kusur, korneada epitel bozukluk, noktasal keratit, keratit, kornea lekesi, göz akıntısı, fotofobi, bulanık görme, görüş netliğinde azalma, göz kapağı spazmı, gözde rahatsızlık, gözde kaşınma, konjunktival kesecikler, konjunktival bozukluk, gözde yabancı cisim hissi, gözyaşı artışı, göz kapağında kaşıntı, göz kapağında kızarıklık, göz kapağında dem, göz kapağı bozukluğu, konjunktival kanlanma, oküler kanlanma.

Solunum, göğüs bozuklukları ve mediastinal hastalıklar:

Yaygın: Burun kuruluğu

Bilinmeyen (uygun verilerden tahmin edilemeyen):

Pazarlama sonrası deneyimlerden elde edilen aşağıda detayları ile verilen istenmeyen etkiler (reaksiyonlar) PATANOL ile yürütülen klinik çalışmalar esnasında daha önce rapor edilmemiştir. Pazarlama sonrası araştırmanın doğası gereği klinik çalışmalardan farklı veriler, bu vakaların görülme sıklığı bilinmez ve uygun verilere dayanarak tahmin edilemez.

Oküler:

Korneal dem, konjunktivit, göz demi, göz şişmesi, midriyazis, görmede rahatsızlık, göz kapağı kenarında çapaklanma

Sistemik:

Aşırı hassasiyet, nefes darlığı, uyuklama, şişkin yüz, dermatit, eritem, bulantı, kusma, sinüzit, halsizlik, keyifsizlik.

PATANOL %0.1 Steril Oftalmik Solüsyonu ile pazarlama tecrübelerinden elde edilen sonuçlara göre ek olarak diğer yan etkiler çok nadir olarak raporlanmıştır (<%0.01).

Etkin maddeye ait özelliklerin tümü <http://www.ilacpedia.com> ve <http://www.ieg.gov.tr> adreslerinden alınmıştır.

1.3. Olopatadin HCl İçin Uygulanmış Analiz Yöntemleri

1.3.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi

Nageswara ve ark. (2012) toplu ilaç ve farmasötik dozaj biçiminde olopatadin miktar tayini için ters fazlı yüksek performanslı sıvı kromatografi metodunu geliştirmişlerdir. Yöntemde hareketli faz olarak 30:70 hacim/hacim oranında su ve metanol oluşan karışım kullanılmış ve sabit faz olarak ise Symmetry C₁₈ kolonundan yararlanılmıştır. Olopatadinin akış hızı 1.0 mL/dk ve saptama dalga boyu 246 nm'dir. Çalışma aralığı 5.0-50.0 µg/mL ve korelasyon katsayısı ise 0.999 olarak gözlenmiştir. Olopatadinin alıkonma süresi 2.745 dakika olarak belirlenmiştir. Önerilen yöntem doğrusalılık, doğruluk, kesinlik ve sağlamlık için ICH(The International Conference on Harmonisation) kurallarına göre doğrulanmıştır. Bu yöntem tablet dozaj formlarında olopatadinin rutin kalite kontrol analizi için kullanılabilirliği açıklanmıştır.

Mahajan ve ark. (2012) tarafından olopatadin HCl'ün ICH tarafından önerilen bozulma ürünlerinin karakterizasyonu ve tanımlanması sıvı kromatografik (LC) ve LC-MS/TOF (Time-of-flight) yapılmıştır. Bu araştırmanın amacı Uluslararası Uyum Konferansı (ICH)'nın Q1A (R2) kuralları ile üretilen bir antialerjik ilaç olan olopatadin HCl'ün farklı gerilme koşullarında bozulma ürünlerini belirlemek ve karakterize edilmesidir. Bu oksidatif ve termal gerilme koşullarında kararlı iken ilaç; asidik, bazik ve fotolitik gerilme altında dönüşüm geçirmiştir. Toplam beş bozunma ürünün tespiti sabit faz olarak Inertsil ODS 3 (250 mm x 4.6 mm, 5 µm) kolon kullanılarak gradyan elüsyonu programı vasıtasıyla gerçekleştirilmiştir. İlacın tam kütle parçalanması yolu LC-MS/TOF doğru kütle çalışmalarının yardımıyla kurulmuştur. Gerilme örnekleri LC-MS/TOF çalışmalarına tabi tutulmuştur. Elde edilen kütle spektral verileri dört bozunma ürünlerini karakterize etmek için kullanılmıştır. Degradasyon çalışması kapsamında oluşan ürünler 11-[(E)-3-(dimetilamino) propiliden]-6, 11-dihydrodibenz [b, e] oksepin -2- asetik

asit, 2-((Z)-9-(3-(dimetilamino) propiliden ne)-9H-fluoren-7-yl) acetic acid, 11-[(E)-3-(dimetilamino) propiliden]-6, 11-dihydrodibenz [b, e] oxepin-2- asetik asit Me ester, 11-[(Z)-3-(dimetilamino) propiliden]-6, 11-dihydrodibenz [b, e] oksepin -2-acetic acid Me ester olarak tespit edilmiştir. Geliştirilmiş yöntem başarılı bir şekilde formülasyon analizi için kullanılmıştır.

Varghese ve ark. (2011) tarafından stabilite gösteren, yüksek performanslı kolonlu sıvı kromatografik ve yüksek performanslı ince tabaka kromatografik yöntemleri tablet dozaj formunda olopatadin HCl'ün belirlenmesi için geliştirilmiştir. Bu araştırmada tablet dozaj formunda olopatadin HCl miktar tayini için iki basit, özel, doğru ve hassas yöntem geliştirilmiştir. 1. yöntem bir stabilite gösteren izokratik yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntemidir. Analiz % 0.1 ortofosforik asit (trietylamin ile pH 4.5'e ayarlanmış)-asetonitril (75:25, h/h) 1 mL/dk' lık bir akış hızında hareketli faz kullanılarak RP-18 kolonu üzerinden yapılmıştır. Parasetamol iç standart olarak seçilmiştir. Olopatadin ve parasetamol alıkonma süreleri 11.30 ve 4.70 dakikadır. Yüksek performanslı ince tabaka kromatografik yöntem için, önceden kaplanmış silika jel 60 F254 alüminyum levha üzerinde sabit faz olarak kullanılmıştır; hareketli faz kloroform-metanol-amonyak (8:2:0.1, h/h/h)'dir. Analit bandının belirlenmesi 301.0 nm'de gerçekleştirilmiştir ve referans değeri 0.46 olarak verilmiştir. Analiz yöntemleri Uluslararası Uyum Konferansı kurallarına göre valide edilmiştir. Kalibrasyon grafikleri için doğrusal regresyon analizi verileri cevabı ve 0.1-1.0 µg/mL ve 0.1-0.9 µg/band konsantrasyon aralığında yüksek performanslı sıvı kromatografik ve yüksek performanslı ince tabaka kromatografik yöntem için doğrusal ilişki olduğunu göstermiştir.

Han ve ark. (2010) tarafından olopatadin HCl içeren göz damlasının içinde benzalkonyum klorür miktarının belirlenmesi için yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntem önerilmiştir. Sabit faz olarak syano kolonu ve hareketli faz olarak ise asetonitril-su-trietylamin (440:560:1, h/h/h) karışımı kullanılmıştır. Fosforik asit 3.4 pH değerini ayarlamak için kullanılmıştır. Akış

hızı 1.0 mL/dk'dır. Çalışma dalga boyu 210.0 nm'dir. Çalışma konsantrasyon aralığı 0.05-0.15 mg/mL ($r= 0.9998$) olarak belirlemişlerdir. Ortalama geri kazanım benzalkonyum klorür için % 99.7 ($n= 9$, BSS= % 0.69)'dir. Bu yöntem olopatadin HCl göz damlası içinde benzalkonyum klorür belirlenmesi için iyi tekrarlanabilirlikde basit, hassas ve doğruluğa sahiptir.

Rele ve Warkar (2011) tarafından olopatadin HCl içeren oftalmik çözelti içindeki safsızlığının tayini için yüksek performanslı sıvı kromatografik metodun uygulanması yapılmıştır. Olopatadin HCl ve safsızlıkların ayrılması için Kromasil 100 C₁₈ (150 × 4.6 mm i.d.), 3.5 µm kolonu sabit faz olarak kullanılmıştır. Hareketli faz ise tampon ve asetonitril (80:20, h/h) karışımından oluşmuştur. Akış hızı 1.5 mL/dk olup çalışma dalga boyu olarak 220.0 nm saptanmış ve 25 °C kolon sıcaklığı ile muhafaza edilmiştir. E-izomeri ve olopatadin HCl için alt tayin sınırı 0.0891 mg/mL ve 0.08924 mg/mL olarak bulunmuştur. Yakalama sınırları 0.2701 µg/mL ve 0.2704 µg/mL olarak bulunmuştur. Olopatadin HCl için çalışma aralığı 0.27-3.75 µg/mL olarak bulunmasına karşın E-izomeri için ise 0.27-7.5 µg/mL olarak bulunmuştur. Yöntem eser düzeyde safsızlıkların tayinleri ile olopatadin HCl içeren oftalmik çözeltilerde etken madde tayini için başarıyla uygulanmıştır.

Bhatt ve Akhtar (2011) tarafından olopatadin HCl içeren farmasötik formülasyonlarda etken madde miktar tayini için yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntemi geliştirilmiş ve farmasötik formülasyonlara uygulanması başarılmıştır. Basit, spesifik, kesin ve kararlılık gösteren yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntemde Inertsil-ODS-3V kolon sabit faz olarak kullanılmış ve hareketli faz olarak pH 3.0 o-fosforik asit ile ayarlanmış tampon:metanol:triethylamin (55:45:0.1, h/h/h) oluşan bir karışım kullanılmıştır. Olopatadin HCl alıkonma süresi 6.3 dakika olarak tespit edilmiştir. Doğrusallık 35.0-65.0 µg/mL aralığında olopatadin HCl için bulunmuştur. Olopatadin HCl için geri kazanımın % 98.7-100.4 aralığında olduğu bulunmuştur.

Han ve ark. (2010) tarafından olopatadin HCl içeren göz damlasında etken madde miktar tayini için yeni bir yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntem geliştirmişlerdir. Yöntemde C_{18} kolonu 0.05 mol/L potasyum dihidrojen fosfat-asetonitril-trietilamin (240:2:760, h/h/h) hareketli fazı ile birlikte kullanılmıştır. Çalışma dalga boyu 254.0 nm olarak belirlenmiştir. Akış hızı 1.0 mL/dk'dir. Kalibrasyon grafiğinin olopatadin HCl için 0.05-0.15 mg/mL ($R= 0.9997$) aralığında lineer olduğunu bulmuşlardır. Ortalama geri kazanım olopatadin HCl için % 100.2'dir. Bu yöntem olopatadin HCl göz damlasının kalite kontrolü için iyi tekrarlanabilirlikte basit, hassas bir yöntem olduğundan bahsedilmiştir.

Zhu ve ark. (2011) tarafından insan plazmasındaki olopatadin konsantrasyonu belirlenmesi için hızlı ve hassas sıvı kromatografik-kütle spektrometre yöntemi geliştirilmiştir. Örnek preparatlarına asetonitril ve iç standart (IS, amitriptilin) ilavesinden sonra Et asetat/diklorometan ile sıvı-sıvı genişlemesi protein çöktürmesi ile gerçekleştirilmiştir. Kurutulduktan sonra elde edilen tortu hareketli fazda çözülmüştür. Olopatadin ayrılması ve etkilenmeyen IS C_{18} kolon üzerinde MS-MS tespiti ardından sağlanmıştır. Analitler bir Turbolonspray kaynağı ile iyonizasyon pozisyonu modunda izlenmiştir. M/z 338.165 ve m/z 278.91 geçiş kullanılarak çoklu reaksiyon takip işlemi olopatadini ölçmek için yapılmıştır. Yöntemde 0.2-100.0 ng/mL aralığında bir doğrusallık tespit edilmiş ve yöntem için toplam 3.5 dakika gibi bir çalışma süresinin olduğundan bahsedilmiştir. Kalite Kontrol konsantrasyon düzeyi için günüçi ve günlerarası kesinlik değerleri % 11.4'den azdır ve bağıl hataları % -6.40 ve % 9.26 arasında değişmektedir. Doğrulanmış yöntem farmakokinetik değerlendirmek amacıyla 5 mg oral dozda olopatadin verilmesinden sonra insan plazmasında olopatadin konsantrasyonunun ölçümü başarılı bir şekilde uygulanmıştır.

Mahajan ve ark. (2010) tarafından olopatadin HCl içeren oftalmik çözeltilerde etken maddenin miktar tayini için yüksek performanslı ince tabaka kromatografik yöntemi önerilmiştir. Kromatografik gelişmede önceden

kaplanmış silika jel 60 F254 üzerinde alüminyum plakalar üzerinde metanol:su:buzlu asetik asit (8:2:0.2, h/h/h) hareketli faz olarak kullanılarak gerçekleştirilmiş ve grubun densitometrik değerlendirmesi CAT 1.4.3 sürüm yazılım ile Camag TLC Tarayıcı-3 ile 247.0 nm de gerçekleştirilmiştir. İlacın referans değeri 0.37 ± 0.01 olduğu bulunmuştur. Yöntem doğrusallık, doğruluk, kesinlik ve sağlamlık açısından incelemiştir. Kalibrasyon eğrisi 200-1200 ng/grup arasında bir aralık içinde doğrusal olduğu bulunmuştur. Bu yöntem oftalmik çözeltiler içinde etken maddenin miktar tayini için başarılı bir şekilde uygulanmıştır. Analiz sonucu (ortalama $\pm$ SS) olopatadin HCl için 100.51 ± 1.01 olarak bulunmuştur. Böylece, önerilen yöntem, etken maddeyi içeren oftalmik çözeltilerin rutin analizleri için daha hızlı ve uygun maliyetli bir nicel kontrolü sağlamak için uygun olacağından bahsedilmiştir.

Chen ve ark. (2009) tarafından sıvı kromatografik kütle spektrometri ile insan plazmasında olopatadin miktar tayin yöntemi önerilmiştir. Plazma numuneleri üzerine asetonitril ve iç standart olarak desloratadinilave edilerek protein çökeltmesi yapılmış ve çökelek kurulmuştur. Yöntemde hareketli faz olarak (asetonitril-metanol-% 0.1 format, 25:5:70, h/h/h) ile sabit faz olarak CAPCELL PAK C₁₈ kolonundan yararlanılmıştır. Üçlü dört kutuplu sıralı kütle spektrometresi detektör olarak kullanılmıştır. Elektrosprey iyonizasyon kaynak iyon konumu modunda uygulanmış ve çalıştırılmıştır. Çoklu reaksiyon takip işlemi m/z 338.2/165.2 ve m/z 311.1/259.1 Q1/Q3 iyon geçişleri olopatadin ve desloratadin ölçmek için kullanılmıştır. Kalibre edilen doğrusal eğri 1.0-200.0 µg/L insan plazması içinde 1.0 µg/L tespit limiti ile değişmektedir. Geri kazanım yöntemi % 85-115 arasında olduğunu ve parti içinde ve parti arasında bağıl standart sapma % 10'dan daha az olmuştur. Yöntem olopatadinin farmakokinetik değerlendirmesi için belirli, hassas ve hızlı olduğunu kanıtlamıştır.

Xu ve Niu (2007) tarafından farmasötik preparatlar içerisindeki olopatadin HCl'ün miktar tayini için yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntem önerilmiştir. Yöntemde sabit faz olarak ODS kolonu (250 mm x 4.6

mm, 5 µm) ve hareketli faz olarak ise asetronitril-0.02 mol/L sodyum dihidrojen fosfat çözeltisi (35:65, % 0.2 sodyum oktan sülfonat içeren ve fosforik asit ile pH 3.0'a ayarlanmış h/h) karışım kullanılmıştır. Dalga boyu olarak 210.0 nm'de belirlenmiştir.

Liang ve ark. (2006) tarafından yüksek performanslı sıvı kromatografik-kütle spektrometri ile insan plazmasında olopatadinin kantitatif miktar tayini yapılmıştır. Plazma numuneleri Tomtec otomatik SPE cihaz tarafından hazırlanmış ve Alltima C₁₈ kolonu üzerinde metanol:% 0.05 formik asit (50:50, h/h) hareketli faz kullanılarak ayırım sağlanmıştır. Olopatadinin miktar tayini için alt tayin sınırını 0.1 ng/mL olarak hesaplamışlardır. Yöntemde lineer aralığı 0.1100 ng/mL olarak belirlemişlerdir. Tüm doğruluk ve kesinlik değerlerinin % 15 içinde yer aldığını bulmuşlardır. Bu yöntem insan plazmasında olopatadin tayini için uygulanmış belirli, hassas ve doğru olduğu kanıtlanmıştır.

Fujimaki ve ark. (2006) yüksek performanslı sıvı kromatografik kütle spektrometri ile insan plazmasında anti-alerjik ilaçlardan ketotifen, olopatadin, setirizin ve ibudilast'in miktar tayinlerini gerçekleştirmişlerdir. İlaç polimer sabit faz üzerinde kalırken protein ve/veya makromolekül matriks bileşikler ilk olarak kolondan elüt edilmiştir. Kolon üzerinde kalan analitler sonra gradyanı ayırma tekniği kullanılarak zengin-asetonitril hareketli faz içine elüt edilmiştir. Plazma içine artan dört antialerjik ilaçların geri kazanımları % 51.7-95.5'dir. Dört anti-alerjik ilaç için regresyon denklemi plazmada 1.0-100.0 ng/mL aralığında doğrusallık göstermişlerdir. Yöntemde alt tayin sınırı tüm bileşikler için 0.5 ng/mL olarak hesaplanmıştır. Plazmadaki ilaç günüçi ve günler arası kesinliği % 9.5'den büyük olmadığını hesaplamışlardır. Bunların oral uygulamasından sonra insan plazmasında anti-alerjik ilaçlar gerçek tayini elde edilen veriler olup aynı zamanda yöntemin doğrulama için sunulmuştur.

Fujita ve ark. (1999) Olopatadin ve olopatadinin insan plazmasındaki metabolitlerinin tayini için yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntem önermişlerdir. Olopatadin, metabolitler ve iç standart KF11796 Bond Elut C₁₈ kartuşları üzerinde katı-faz ekstraksiyon kullanarak plazmadan ayırmışlardır. Eluatı kurutarak, yeniden yapılandırmışlar ve LC-ESI-MS-MS sistemi içine enjekte etmişlerdir. Olopatadinin Kalibrasyon eğrileri 1.0-200.0 ng/mL aralığında iyi doğrusallık gösterdiğinden bahsetmişlerdir. Yöntemi insan kan plazma örneklerindeki olopatadin ve metabolitlerinin belirlenmesi için kullanmışlardır.

1.3.2. Spektrofotometri

Mathrusri Annapurna ve ark. (2012) olopatadinin farmasötik dozaj formundaki miktar tayini için iki adet spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntemlerde birincisinde etken maddenin NaOH (Yöntem A) içerisindeki çözeltisinden yararlanılmıştır. Diğer yöntemde ise çözücü olarak amonyum format (Yöntem B) kullanılmıştır. Beer yasası yöntem A ve yöntem B cevapları sırasıyla korelasyon katsayıları $R^2 = 0.999$ ve 0.9998 olan ve konsantrasyon aralıkları ise $0.5 - 25.0 \mu\text{g/mL}$ ve $1.0 - 25.0 \mu\text{g/mL}$ olarak hesaplanmıştır. Gün içi ve günler arası kesinlik çalışmaları için % BSS değerleri sırasıyla $0.31-0.42$ ve $0.65-0.69$ yöntem A için ve $0.48 - 0.51$ ve $0.54 - 0.58$ yöntem B için cevap olarak bulunmuştur. Önerilen yöntem farmasötik dozaj biçiminde olopatadinin belirlenmesi için kullanılmış ve ICH kurallarına göre değerlendirilmiştir.

Saifulla Khan ve ark. (2012) tarafından tablet dozaj formlarındaki olopatadin miktar tayini için asit boyalar kullanarak spektrofotometrik yöntem önerilmiştir. Üç basit, doğru, hızlı ve hassas bu yöntemlerde brom timol mavisi (yöntem A), brom krezol yeşili (yöntem B) ve brom moru (yöntem C) asit boyaları kullanmışlardır. Asit boylarla olopatadinin meydana getirdiği iyon çifti komplekslerinin maksimum dalga boylarını 415.0 nm , 420.0 nm ve

417.0 nm olarak belirlemişlerdir. Beer Kanuna göre olopatadin konsantrasyon aralığı yöntem A için 5.0 - 55.0 µg/mL, 5.0 - 50.0 µg/mL metod B için ve 5.0 - 45.0 µg/mL metod C için hesaplamışlardır. Tüm yöntemler için analiz sonuçları istatistiksel ve geri kazanım çalışmaları ile doğrulanmıştır. Önerilen yöntem duyarlı, ekonomiktir ve olopatadin içeren farmasötik preparatlarda etken madde miktar tayini için rutin analizlerde kullanılabilineceğini göstermişlerdir.

Dey ve ark. (2010) Olopatadin içeren farmasötik dozaj şekillerinde, selektif H₁-reseptör antagonisti etkinliğine sahip bir antihistaminik olan olopatadin miktar tayini için basit, doğru, hassas ve uygun maliyetli bir UV-VIS spektrofotometrik yöntem önermiştir. Yöntemde çözücü metanol ve 0.1 N HCl (50:50, h/h) karışımı kullanılmış ve $\lambda_{\max}$ değeri 206.0 nm olarak tespit edilmiştir. Yöntemlerde çalışma aralığı 2.0 - 10.0 µg/mL aralığında gözlemişlerdir. Bu yöntem daha sonra ICH (Uluslararası Uyum Konferansı) kurallarına göre farklı parametreler için doğrulanmıştır. Bu yöntem yardımcı maddelerin girişimi olmaksızın olopatadinin kalite kontrol formülasyonunun belirlenmesi için kullanılabilineceğinden bahsedilmiştir. Olopatadin HCl ICH tarafından farklı koşullar altında gerilme bozulmasına tabi tutulmuştur. Bu şekilde elde edilen örnekler geliştirilen yöntemi kullanılarak bozulma çalışmaları için kullanılmıştır.

1.3.3. Voltametri

Sreedhar ve ark. (2012) Olopatadin içeren farmasötik preparatlarda etken maddenin miktar tayini için asılı damla cıva elektrodu kullanılarak voltammetrik yöntemler yapılmıştır. Üzerinde çalışılan ilaç karbon-karbon çift bağının azaltılmasından dolayı tek, iyi tanımlanmış bir azalma nedeniyle pik göstermiştir. Maksimum pik akımı veren elektrot ve reaksiyon şartları diferansiyel puls voltametri kullanılarak oluşturulmuştur. Doğrusal bir ilişki pik akımı ve olopatadin konsantrasyon aralığı 1.0×10^{-8} M ile 4.0×10^{-7} M arasında

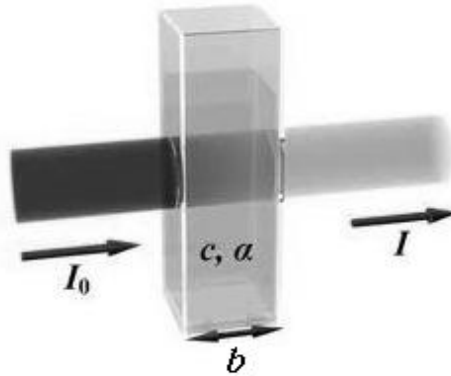
gözlenmiştir. Alt tayin sınırları ve yakalama sınırları 1.92 ng/mL ve 6.34 ng/mL olarak bulmuşlardır. Önerilen yöntem başarılı bir şekilde yardımcı maddelerin etkisi olmaksızın farmasötik formülasyonlarda olopatadinin miktar tayini için uygulanmıştır.

1.4. KULLANILAN YÖNTEMLER

1.4.1. Spektrofotometri

Çözelti içindeki madde miktarını çözeltiden geçen veya çözeltinin tuttuğu ışık miktarından faydalanarak ölçme işlemine fotometri, bu tip ölçümde kullanılan cihazlara da **fotometre** denir. Fotometrik ölçümde, renksiz çözeltilerin konsantrasyonu da ölçülebilir. Analiz edilen örnek üzerine ışık demetinin bir kısmını filtreler kullanarak ayıran ve gönderen aletler kolorimetre veya fotometre olarak adlandırılırken, yarıklar ya da prizmalar aracılığı ile bu seçiciliği yapan aletler **spektrofotometre** olarak adlandırılırlar. Maddenin ışığı absorplamasını incelemek için kullanılan düzeneğe **absorpsiyon spektrometresi** veya **absorpsiyon spektrofotometresi** adı verilir (Kılıç ve ark., 1998).

Monokromatik (tek dalga boyundaki ışın) ve I_0 şiddetindeki bir ışın demeti, kalınlığı b cm olan bir tüpte bulunan çözeltideki herhangi bir atom, molekül veya iyonların tarafından absorblandığında ışının şiddeti azalır ve tüpü I şiddetinde terk eder.



Şekil 1.1.1. Numune hücresi (<http://en.wikipedia.org>)

Molekül veya iyonların o dalga boyundaki ışını absorplaması sonucu ortaya çıkan azalma Lambert – Beer Kanunu ile verilir. Bu kanuna göre;

- Numuneye gelen ışık ile numuneden çıkan ışık arasında matematiksel bir ilişki vardır.
- Absorbans absorblayan maddenin konsantrasyonu ve numuneden geçen ışığın aldığı yolun uzunluğu ile doğru orantılıdır.
- Ölçülen maddenin konsantrasyonu ile absorbans değeri arasında doğrusal bir ilişki vardır. Konsantrasyon arttıkça absorbans artar.

Kanun matematiksel olarak ;

$$\log \frac{I_0}{I} = a \cdot b \cdot C = A \quad (\text{Lambert-Beer Eşitliği})$$

I = Numuneyi terkeden ışının şiddeti

I_0 = Numune üzerine gönderilen ışığın şiddeti

a = Absorpsiyon katsayısı veya absorptivite, verilen dalga boyunda, belli atom, iyon veya molekül için sabit bir değerdir

b = Işığın numune içerisinde aldığı yol (cm cinsinden)

C = Çözeltinin konsantrasyonu (g/mL)

A = Absorbans

şeklinde ifade edilmektedir.

Eğer Lambert – Beer kanunu ifadesi;

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot C$$

şeklinde kullanılırsa ışın yolu uzunluğu cm, numune konsantrasyonu mol/L olarak absorptivite ε ise molar absorptivite olarak alınmalıdır.

Lambert - Beer Kanunu'nun geçerli olabilmesi için aşağıdaki şartlar uygun olmalıdır (Yıldız ve Genç, 1993; Gündüz, 1998; Kılıç ve ark., 1998):

- 1) Analiz sırasında maddenin özelliklerini değiştiren disosiasyon, asosiasyon, polimerleşme, kompleks oluşumu gibi olaylar meydana gelmemelidir.
- 2) Kırılma, yansıma ve difüzyon gibi parazit olaylar meydana gelmemelidir.
- 3) Kullanılan ışık monokromatik (tek dalga boyunda) ışık olmalıdır.

Lambert-Beer kanunu 1.0 - 0.01 M'den küçük konsantrasyondaki çözeltiler için geçerlidir (Yıldız ve Genç, 1993; Gündüz, 1998). 0.01 M'dan daha konsantre çözeltilerde artan tanecik sayısı nedeniyle sapmalar görülür. Cihazın parçalarından kaynaklanan saçılmalar ve yansımalar da yanlış değerlere ulaşılmasına neden olabilir. Numune üzerine gönderilen ışının tek dalga boylu ışın olmaması ve ayrıca numune üzerine kaçak ışın gelmesi konumunda da çeşitli sapmalar meydana gelir. Numuneye iki ayrı dalga boyunda I_0 ve I'_0 şiddetlerindeki ışın gönderildiğinde ve numunenin bu ışınları absorpladığı durumda matematiksel olarak;

$$A = \log \frac{I_0 + I'_0}{I + I'}$$

eşitliği ile ifade edilebilir (Yıldız ve Genç, 1993). Bu matematiksel ifade incelenirse üç durum söz konusudur;

1. $\varepsilon = \varepsilon'$ ise eşitlik tek dalga boyundakine indirgenir ve bu nedenle doğrusallıktan sapma görülmez.
2. $\varepsilon > \varepsilon'$ ise ölçülen A tek dalga boyu için ölçülmesi gereken değerden çok daha küçük olur ve doğrusal ilişkiden negatif bir değer ortaya çıkar.
3. $\varepsilon < \varepsilon'$ ise sapma pozitifdir (Yıldız ve Genç, 1993).

Spektrofotometrik kantitatif analiz çalışmalarında etken maddenin bilinen farklı konsantrasyonlardaki çözeltileri hazırlanır ve spektrumları alınır. Çözeltilerin maksimum absorpsiyonun olduğu dalga boylarındaki absorbansları ölçülüp, konsantrasyonlarına karşılık çizilmesi ile çalışma grafikleri elde edilir. Bilinmeyen konsantrasyondaki etken maddenin, aynı şartlar altında absorbansı okunarak kalibrasyon denklemleri sayesinde bilinmeyen madde konsantrasyonları hesaplanır.

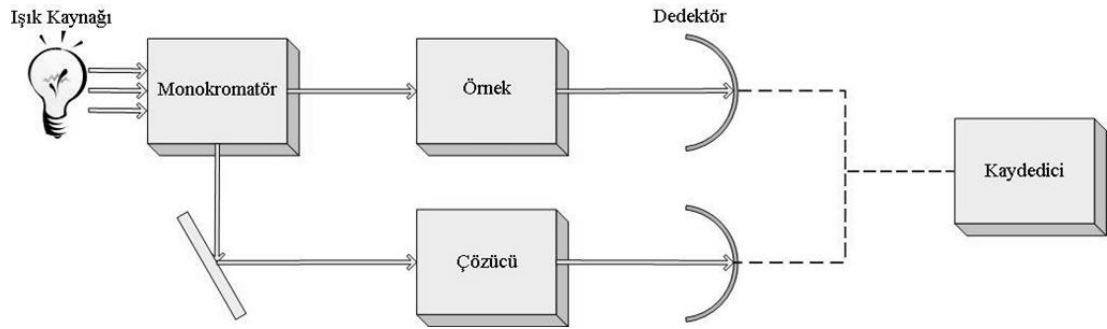
1.4.1.1. Spektrofotometre

Spektrofotometrik analizde kullanılan cihazlara spektrofotometre denir. Bir spektrofotometre düzeneği, başlıca ışık kaynağı, dalga boyu seçicisi (monokromatör), dedektörden oluşur; dedektörde elektrik sinyaline çevrilen optik sinyal bir kaydedici veya bir galvanometre ile ölçülür. Ana bileşenlere ek olarak spektrofotometrede ışığı toplamak, odaklamak, yansıtmak, iki demete bölmek ve örnek üzerine belli bir şiddette göndermek amacıyla mercekler, aynalar, ışık bölücüler, giriş ve çıkış aralıkları vardır. Örnek, kullanılan dalga boyu bölgesinde ışığı geçiren maddeden yapılmış örnek kaplarına (küvet) konularak ışık yoluna yerleştirilir.

Bir spektrofotometre beş kısımdan meydana gelmiştir;

1. **Işık kaynağı:** UV ve görünür bölgede döteryum, hidrojen, Xe ark, tungsten flaman lambası ve civa buhar lambası gibi sürekli ışık kaynakları kullanılır. Ultraviyole bölgede en çok kullanılan lambalar hidrojen ve döteryum elektriksel boşalım lambalarıdır. Xe ark ve civa buhar lambaları ise UV ve görünür bölgede kullanılabilen sürekli ışın kaynaklarıdır.
2. **Monokromatör (Dalga boyu seçici):** Işık kaynağından gelen beyaz ışıktan uygun dalgaboyunu seçip diğerlerini elimine eden sistemdir. Genel olarak monokromatör olarak prizmalar veya optik ağ adını alan parçalar kullanılmaktadır.

3. **Numune veya Çözücü kısmı:** Numune kabı veya hüceleri çalışılan spektrum bölgesinde ışını geçiren maddelerden yapılmaktadır. UV bölgesinde yani 200.0 - 400.0 nm arasında çalışılıyorsa kuartz veya erimiş silis küvetler, görünür bölge yani 400.0 - 800.0 nm arasında çalışılıyorsa cam ve kuartz küvetler kullanılır.
4. **Dedektör:** Elektrik sinyaline çevrilen optik sinyalin kaydediciye ulaşmasını sağlamaktadır.
5. **Kaydedici:** Dedektörden gelen elektrik sinyalini ölçen ve burada elde edilen değerleri rakamsal olarak ifade eden kısımdır.



Şekil 1.1.2. Çift Işın yollu Spektrofotometre (<http://biyokure.org>)

1.4.1.2. Türev Spektrofotometri

Spektrum, absorbans değerlerinin dalga boyuna karşı grafiği anlamına gelmektedir (Onur ve Yücesoy, 1983; Levillain ve Fompeydie, 1986). Bir spektrumun belli noktasındaki eğimi için başlıca değişkenler absorbans (A) ve dalga boyu (λ) değerleri olmaktadır. Bu değişkenler kullanılarak matematiksel olarak $y = f(x)$ fonksiyonu $A = f(\lambda)$ şeklinde yazılabilir. $A = f(\lambda)$ fonksiyonun her bir noktasındaki teğetinin eğimi yani türev ifadesi $dA/d\lambda$ şeklinde ifade edilmektedir. Lambert-Beer kanununa göre $A = \varepsilon \cdot b \cdot C$ eşitliğinin dalga boyuna göre birinci dereceden türevi matematiksel olarak 1.dereceden türev eğrisi:

$$\frac{dA}{d\lambda} = -C \cdot b \cdot \frac{d\varepsilon}{d\lambda}$$

Eşitliğin 2. dereceden türev eğrisi:

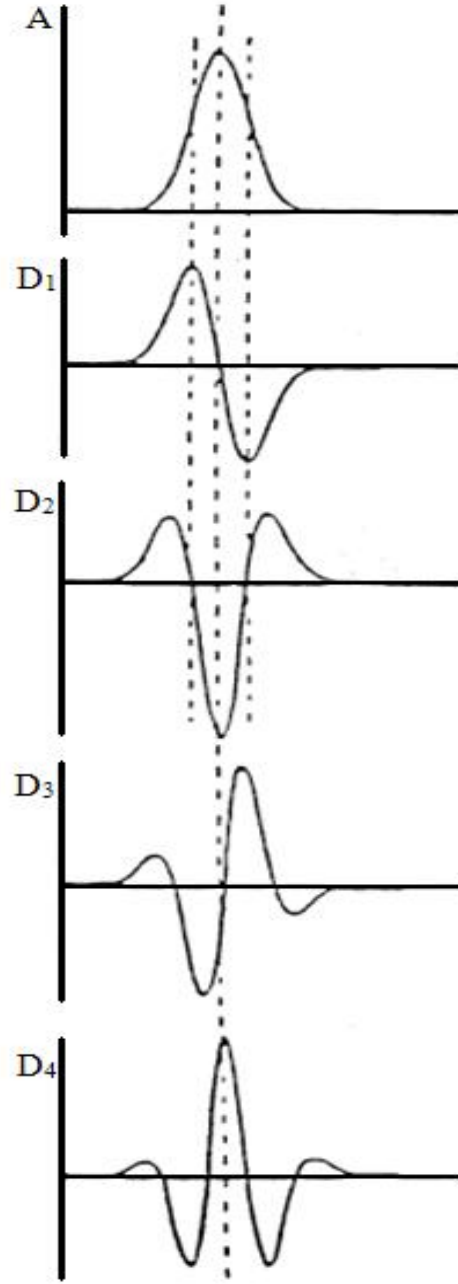
$$\frac{d^2A}{d\lambda^2} = -C^2 \cdot b^2 \cdot \left(\frac{d\varepsilon}{d\lambda}\right)^2 - C \cdot b \cdot \frac{d^2\varepsilon}{d\lambda^2}$$

Eşitliğin 3. dereceden türev eğrisi:

$$\frac{d^3A}{d\lambda^3} = -C \cdot b \cdot \frac{d^3\varepsilon}{d\lambda^3} + 3 \cdot C^2 \cdot b^2 \cdot \left(\frac{d\varepsilon}{d\lambda}\right) \cdot \left(\frac{d^2\varepsilon}{d\lambda^2}\right) - C^3 \cdot b^3 \cdot \left(\frac{d\varepsilon}{d\lambda}\right)^3$$

şeklinde ifade edilir.

İfade edildiği gibi türev eğrilerinin hazırlanması matematik işlemlerini gerektirmektedir. Bir spektrumun her bir noktasındaki türevinin hesaplanması ve sonra bunların grafiğe geçirilerek yeni türev eğrilerinin hazırlanması için bilgisayarlardan yararlanılır. Türev spektrumlarının kullanılmasına dayanan analiz yöntemine “Türev Spektrofotometri” adı verilir.



Şekil 1.1.3. A. basit bir orijinal spektrum

D₁. Orijinal spektrumun 1. dereceden türevi

D₂. Orijinal spektrumun 2. dereceden türevi

D₃. Orijinal spektrumun 3. dereceden türevi

D₄. Orijinal spektrumun 4. dereceden türevi

(Onur ve Yücesoy, 1983).

Şekil 1.1.3.'de basit bir orijinal spektrumun 1., 2., 3. ve 4. türev spektrumları verilmiştir. Şekil incelendiğinde görüldüğü gibi orijinal spektrumun birinci türevi alındığında bandın yükselen bölgesinde pozitif, inen bölgesinde ise negatif pikler oluşturmaktadır.

1.4.1.2.1. Yöntemin Avantajları (Onur ve Yücesoy 1983):

1. Türev çalışması orijinal spektrumunun eğimleri hakkında bilgi verir ve dönüm noktalarının daha belirgin hale gelmesini sağlar.
2. Genellikle orijinal spektrumda elde edilen eğriler birçok pikin üst üste gelmesi ile meydana gelmiştir. Türev alma yöntemi ile bu absorpsiyon eğrileri daha ayrıntılı şekle girer ve böylece bir arada bulunan piklerin tek tek görülmesi sağlanır.
3. Spektrofotometride bulanık çözeltiler ile çalışılırken çökme hızı, tanecik büyüklüğü gibi faktörlere bağlı olarak hata yapılabilir. Türev eğrilerinin hazırlanması ile bulanıklığın oluşturduğu bu olumsuz etki ortadan kaldırılır.
4. Birden fazla maddenin karışım halinde bulunduğu ortamlarda tek tek miktarları tayin edilebilir.
5. Etken maddelerin miktar tayini preparat içerisinde bulunan diğer matriks bileşenlerin varlığında da yapılabilir.
6. Etken maddenin bozulma ürününün yanında tayini yapılabilir.

1.4.1.2.2. Yöntemin Dezavantajları:

Türev dereceleri arttırıldıkça Sinyal/Gürültü (S/G) oranları bozulmakta ve bu değişim piklerin sayısının artmasına ve karışıklığa neden olmaktadır. Ayrıca ekonomik açıdan pahalı spektrofotometrelere gereksinim duyulmasıdır.

Spektrofotometri bölümü Onur ve Yücesoy, 1983; Levillain ve Fompeydie, 1986; Yıldız ve Genç, 1993; Gündüz, 1998; Kılıç ve ark., 1998 kaynakları kullanılarak hazırlanmıştır.

1.4.2. Kromatografi

Kromatografi, karışım halinde bulunan bir örnekteki bileşenlerin ayrılması, tanınması ve tayini için kullanılan yöntemlerin genel adıdır. Bu yöntemin uygulandığı sistemler ve teknikler çok çeşitli olmakla birlikte tümünün ortak özelliği, bir hareketli faz ile bir sabit faz kullanılmasıdır (Skoog ve ark., 1996; Kılıç ve ark., 1998). Bu yöntem ilk kez Rus botanikçi Mikhail Tsvett (1903) tarafından bitki pigmentlerinin renkli bileşenlerini ayırmakta kullanılarak geliştirilmiştir (<http://www.analitik.hacettepe.edu.tr>). Bir karışımın bileşenleri sabit faz üzerinde, sıvı veya gaz olabilen hareketli faz tarafından taşınır. Ayrımın temeli, bileşenlerin farklı göç oranına sahip olmasına dayanır; yani sabit faz tarafından daha kuvvetli tutulan bileşenler daha yavaş hareket ederken, sabit faz tarafından daha zayıf tutulan bileşenler ise daha hızlı hareket eder, böylece ayırım gerçekleşmiş olur (Skoog ve ark., 1996; Kılıç ve ark., 1998).

Kromatografik yöntemler genel olarak şu şekilde sınıflandırılır (<http://www.analitik.hacettepe>);

1. Ayrılma mekanizması: Adsorpsiyon, partiyon, iyon değiştirme, iyon çifti, moleküler eleme ve afinite kromatografisi şeklinde sınıflandırılmaktadır.
2. Uygulama biçimleri: Kağıt, ince tabaka, gaz ve yüksek performanslı sıvı kromatografi olarak çeşitlendirilmektedir.
3. Faz tipleri: Sıvı-sıvı, sıvı-katı, gaz-sıvı ve gaz-katı kromatografisi gruplarına ayrılmaktadır.

Çalışmalarımızda kullandığımız kromatografi çeşidi olduğu için yüksek performanslı sıvı kromatografi üzerinde durulacaktır.

1.4.2.1.Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi:

Sıvı kromatografide hareketli faz olarak daima sıvı kullanılmakta sabit faz ise çeşitlidir. Sabit faz olarak genellikle dolgu materyalleri ile doldurulmuş çelik kolonlar bulunmaktadır. Hareketli fazların kolon içerisinden ilerlemeleri oldukça çok yavaş olmaktadır. Dolgu maddesinin tanecik çaplarının küçültülmesi kolon boyunun uzatılması ayrılma süresini oldukça uzatacaktır. Daha küçük tanecikli daha küçük çaplı kolonlar kullanılarak sisteme basınç uygulandığı zaman ayrılma verimliliğinde artış gözlenmiştir. İşte yüksek basınç altında gerçekleştirilen sıvı-sıvı kromatografi türüne yüksek performanslı sıvı kromatografi adı verilmektedir. Eğer sistemde sabit faz polar hareketli faz apolar veya düşük polariteye sahip ise bu tür kromatografiye **normal faz (NP)** aksi durumda ise sabit faz apolar hareketli faz ise polar ise bu tür kromatografiye ise **ters faz (RP) sıvı kromatografisi** adı verilmektedir.

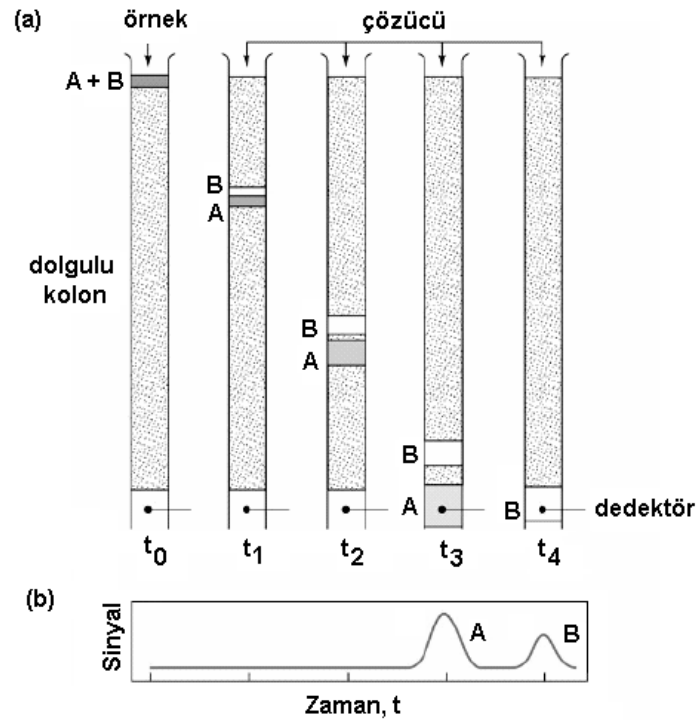
Ters faz kromatografik çalışmalar normal faz kromatografik çalışmalara oranla daha çok tercih edilmektedir. Çünkü normal faz kromatografisinde sıvı fazın kontrolü çok önemli ve kritiktir.Hareketli fazdaki ufak değişiklikler kromatogramda büyük değişikliklere neden olur. Normal faz kromatografisinde dengeye ulaşma oldukça yavaş iken ters fazda daha hızlıdır. Apolar çözücüler çok pahalı olup nemden uzak tutmak oldukça zor olup ters faz kromatografisinde böyle bir zorluktan bahsedilmemiştir (<http://www.analitik.hacettepe>).

Sabit bileşimde tek çözücü kullanılmasıyla gerçekleşen ayırma izokratik elüsyon, polariteleri birbirinden farklı iki veya üç çözücü sisteminin kullanıldığı ve ayırım sırasında bu çözücülerin oranlarının değiştirildiği ayırma ise gradiyent elüsyon denir.

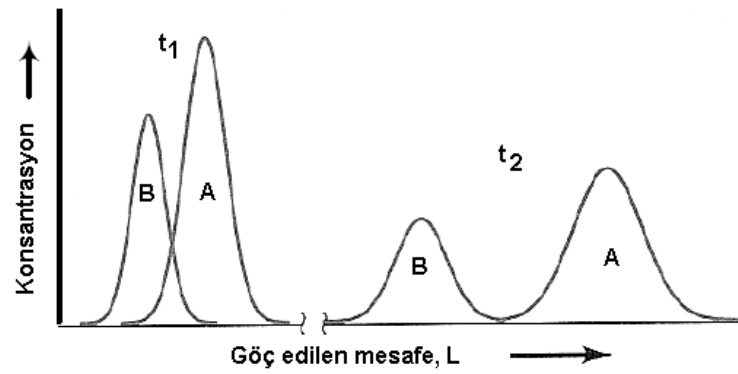
Analitik amaçla çalışmaya başlandığında örnek önce hareketli fazda çözülür ve hazırlanan çözelti kolona verilir (Şekil 1.2.1.); kolonda, örneğin içerdiği maddeler hareketli ve sabit faz arasında dağılır. Çözelti

enjeksiyonundan sonra kolona bir miktar saf halde hareketli faz verilir. Bu kısım, çözeltiyi kolonun alt kısımlarına doğru iter ve böylece içinde hala sabit faza geçecek kısımlar bulunduran hareketli faz ile aşağı kısımlardaki sabit faz arasında dağılma sağlanır. Aynı anda hareketli faz ile üst kısımlardaki içinde hareketli faza geçecek kısımlar bulunduran sabit faz arasında da yeniden dağılma olur. Sürekli olarak ilave edilerek örnekdeki moleküller, hareketli ve sabit fazlar arasındaki geçişlerle kolonun altına kadar taşınır. Maddedeki moleküller sadece hareketli faz eşliğinde ilerleyebildiklerinden, bir maddenin ortalama göçme hızı, onun hareketli fazda kalma süresine bağlıdır. Bu süre, maddelerin dağılma oranlarından anlaşılabilir; sabit fazdaki madde konsantrasyonu yüksek ise süre kısa, hareketli fazdaki konsantrasyon yüksek ise süre uzundur. En ideal hal, hızlar arasındaki farkların, bir karışımdaki maddeleri kolon uzunluğu boyunca ayrı bantlar halinde ayırabildiği durumdur (Şekil 1.2.1. ve Şekil 1.2.2.). Kolondan yeteri kadar hareketli faz geçirilerek bölgeler halinde toplanmış maddeler kolondan sıra ile çıkarılır ve kendilerini tanımlayan bandlar halinde kaydedilir. Kolona verilen örneğin hareketli faz ilavesiyle yıkanması işlemine elüsyon denir. Kolonun sonunda örnekteki madde konsantrasyonlarını algılayan bir detektörle alınan sinyaller zamanın fonksiyonu olarak simetrik eğriler verir (Şekil 1.2.1'nin alt kısmındaki eğriler). Böyle bir grafiğe kromatogram denir. Kalitatif ve kantitatif analizlerde kullanılır. Piklerin konumları maddenin cinsini, alanları ise konsantrasyonlarını tanımlar.

A ve B maddeleri karışımı bir kromatografik kolondaki elüsyon işleminin kısa ve uzun olması halinde verdiği konsantrasyon profilleri görülmektedir (Şekil 1.2.2.). Göç işlemi sırasında A'nın geride kalması ayrılma katsayısının B'ninkinden büyük olmasıdır. Kolonun buyu uzadıkça iki pik arasındaki uzaklık artar. Aynı zamanda iki bandda da genişleme olur; bu durum kolonun ayırma verimini düşürür. Şekil 1.2.2'de ikinci kısımdaki gibi iyi bir ayırım elde edebilmek için yeteri kadar uzun bir kolona ihtiyaç vardır.



Şekil 1.2.1. (a) İki maddeli bir karışımın elüsyon kromatografisi yöntemiyle ayrılmasını gösteren şematik diyagram.
(b) elüsyonun farklı zamanlardaki dedektör sinyali



Şekil 1.2.2. A ve B maddeleri kolondan aşağı ilerlerken iki ayrı göç noktasında alınan konsantrasyon profilleri

Tüm kromatografik ayırmalar hareketli ve sabit fazlar arasında dağılan maddelerin değişik yayılma (hareket) özelliklerine dayanır. Dağıtma katsayısı, K denilen ve sıcaklığa bağımlı bir sabit ile kantitatif bir denklem verilebilir.

$$K = \frac{c_s}{c_m}$$

Burada c_s maddenin sabit fazdaki analitik konsantrasyonu, c_m aynı maddenin hareketli fazdaki konsantrasyonudur. İdeal halde, geniş bir madde konsantrasyonu aralığında dağılma kat sayısı sabittir; yani c_s , c_m ile doğru orantılıdır.

İyi bir kromatografik ayırmada maddelerin göç etme hızı ve madde piklerinin genişlemeye başladığı bölgenin tanımlanması önemlidir. Kromatografinin orijinal teorisi Martin ve Syng'e'nin geliştirdikleri tepsi teorisi dir ve göç hızını kantitatif anlamda tarif eder. Ancak bu teori piklerin bölgesel genişlemelerine yol açan çok sayıdaki değişkeni açıklayamaz. Bu nedenle tepsi teorisinin yerini, bu değişkenleri de tanımlayan kinetik veya hız teorisi almıştır. Kinetik teoride kullanılan iki terim vardır: teorik tepsi sayısı ve teorik tepsinin eşdeğer yüksekliğidir. Buna göre bir kromatografik kolonun ayrı ayrı, fakat birbirine bitişik dar, yatay bir seri tabakalardan oluştuğu varsayılmakta ve her tepside maddenin hareketli ve sabit fazlar arasında dengeye ulaştığı kabul edilmektedir.

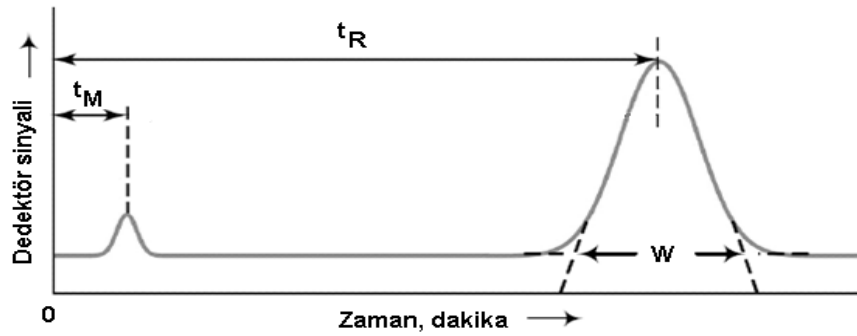
Kromatografik kolonun ayırma sistemi olarak verimi, denge sayısının artmasıyla yükselir, yani teorik tepsi sayısı arttıkça kolonun verimi de artar. Buna göre teorik tepsilerin sayısı, N kolon veriminin bir ölçüsüdür. Eşdeğer tepsi yüksekliği, H 'da yardımcı bir parametredir. Bu iki parametre arasında,

$$N = \frac{L}{H}$$

bağıntısı bulunur; L kolon dolgusunun yüksekliğini gösterir. Kolon verimi yükseldikçe H düşer, H' ın küçülmesi kolonun belirli bir uzunluğundaki denge sayısının büyümesine yol açar.

Kromatografik hız teorisi, bir bandın genişliğini etkileyen değişkeleri ve bu bandın kolondan çıkma zamanını tanımlayabilen başarılı bir teoridir.

Bir kromatogramın Gaussian şeklindeki eğrisi de, kromatografik banddaki veya bölgedeki sayısız madde taneciklerinin rasgele hareketlerinin birbirine eklenmesiyle oluşur. Böyle bir eğri, herhangi bir ölçümdeki hatanın, çok sayıda küçük, tayin edilemeyen ve rasgele pozitif veya negatif hataların bir toplamı olduğu kabul edilerek çizilir. Bir Gaussian eğrisinin genişliği standart sapmaya bağlıdır. Bir kromatogramdan çıkarılan standart sapma bölgesel genişlemenin kantitatif bir ölçüsüdür. Bir kromatografik pikin standart sapması, zaman birimi ile veya kolon uzunluğu boyunca olan mesafe ile tarif edilir. uzunluk birimi için σ , zaman birimi için de τ sembolü kullanılır. σ veya τ 'nin bir kromatogramdaki ifadesi, Şekil 1.2.3.'de gösterilmiştir. Eğrinin iki tarafından çizilen teğetler eksene doğru uzantıldığında ekseni kestikleri noktalar, maksimumdan eksene inilen dikten yaklaşık olarak $\pm 2\tau$ uzaktır; ve tabii $W = 4\tau'$ dir.



Şekil 1.2.3. Kromatografik pikten standart sapma τ 'nin tayini

Burada;

t_R : kolon dolgusu içinde maddenin alıkonma zamanı,

t_M : kolonda tutulmayan kısmın çıkma zamanı

Kromatografik bir bölgenin genişlemesi birim uzunluktaki kolon için standard sapmanın karesi olarak aşağıdaki eşitlikle verilir.

$$H = \frac{\sigma^2}{L}$$

Burada; H cm cinsinden tepsi yüksekliğini gösterir ve verimi ifade eder, L kolonun uzunluğunu (cm) gösterir, σ' nin birimi H ve L ile olan bağıntısı nedeniyle uzunluk birimidir (cm). $N = L/H$ denklemi ile beraber yeniden düzenlenirse;

$$N = \frac{L^2}{\sigma^2}$$

ifadesi elde edilir. N , L uzunluğundaki bir kolondaki tepsi sayısını verir; yani, tepsi sayısının artması ve tepsi yüksekliğin azalması kolon veriminin yükselmesini sağlar.

Band Genişlemesinin Kaynakları

Kromatografik pikler kinetik olarak kontrol edilen üç işlem nedeniyle genişler; bunlar:

- 1- girdap difüzyonu
- 2- boylamasına difüzyon
- 3- dengesiz kütle transferidir.

Bu etkilerin büyüklüklerini akış hızı, dolgu maddesinin tanecik büyüklüğü, difüzyon hızları ve sabit fazın kalınlığı gibi kontrol edilebilen değişkenler belirler. Bu üç işlemi de kapsayacak şekilde kromatografik kolonların verimini hesaplamada kullanılabilecek çeşitli denklemler geliştirilmiştir. Bunlardan ilk bulunanı ve en basit olanı van Deemter denklemdir. Denklem, akış hızı u ile tepsi yüksekliği H arasında yaklaşık bir

ilişki verir; burada A girdap difüzyonu ile, B boylamasına difüzyon ile ve C dengesiz kütle transferi ile ilgili terimlerdir.

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu$$

Girdap Difüzyonu; bir molekülün dolgulu bir kolondan geçerken karşılaştığı patikaların sayısı artıkça girdap difüzyonu etkisiyle bölge genişlemesi meydana gelir. Bu patikaların uzunlukları farklıdır; bunun sonucu olarak aynı maddeye ait moleküllerin kolonda alıkonma süreleri de farklı olur. Böylece tüm moleküllerin kolonun sonuna ulaşmaları bir zaman aralığında gerçekleşir ve çıkan band da geniş bir şekil alır. A 'nın akış hızına bağlı olmadığı varsayılır ve aşağıdaki ifade yazılabilir.

$$A = 2\lambda d_R$$

Burada d_R ortalama tanecik çapı, λ sıkışıklık faktörüdür. λ 'nın değerlerini, sabit fazın tanecik büyüklüğü aralığı ve doldurulma şekli belirler.

Boylamasına Difüzyon; bir bandın yoğun merkez kısmındaki moleküllerin, bandın iki tarafındaki daha seyreltik bölgelere doğru göç etme eğilimlerinden kaynaklanır. Hareketli ve sabit fazların her ikisinde de oluşabilmektedir. Boylamasına difüzyon hareketli fazın gaz olduğu bir ortamda çok önem kazanır, çünkü gaz fazındaki difüzyon hızlarının büyüklüğü sıvılara göre birkaç derece fazladır. Difüzyon miktarı zamanla artar; akış hızı azaldıkça band genişlemesi de artar. Akış hızıyla ters orantılıdır. B bir sabittir ve D_M ile,

$$B = 2\psi D_M$$

denklemini ile gösterilmektedir.

Burada, D_M hareketli fazda bulunan maddenin difüzyon katsayısı, ψ blokaj faktörüdür ve sabit fazdaki taneciklerin, serbest moleküler difüzyonu engellemelerinin bir ölçüsüdür; dolgu maddesinin tipine göre ψ değeri 0.5 - 0.9 aralığında değişebilir. Boylamasına difüzyonun neden olduğu band genişlemesi sıcaklığı düşürmek ve akış hızını artırmakla azaltılabilir.

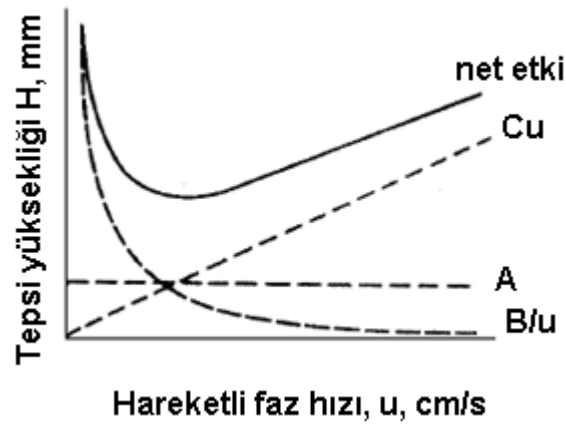
Dengesiz Kütle Transferi; kromatografik bandların genişlemesine yol açan bir diğer neden de hareketli faz akışının çok hızlı olması ve fazlar arasında gerçek bir dengenin kurulamamasıdır. Dengesiz kütle transferinin etkisi akış hızı düşürülerek küçültülebilir, çünkü dengeye ulaşılabilmesi için daha fazla zamana gereksinim vardır. Hareketli fazın aktığı kanalların dar olması halinde madde moleküllerinin sabit faza difüzlenmeleri daha kolay olacağından denge konumuna daha çabuk ulaşılır. C değeri iki terimden oluşur. Birincisi sabit fazdaki kütle transferi ile, diğeri hareketli fazdaki hızla ilişkilidir. Bu iki terimin C ye bağlılığı aşağıdaki denklemlerle verilir.

$$C = \frac{q R (1 - R) d_f^2}{D_S} + \frac{W d_R^2}{D_M}$$

Burada; df , filmin veya çapı d_R olan sabit faz taneciklerinin kalınlığını gösterir. R miktarı alıkonma oranıdır ve t_M/t_R 'ye eşittir. D_S ve D_M terimleri maddenin sabit ve hareketli fazlardaki difüzyon katsayılarıdır; q ve w dolgu maddesinin yapısı ve konfigrasyonuna bağlı sabitlerdir. W , 1.3 civarında bir değerdir. Katı bir destek üzerinde bulunan düzgün bir sıvı filmi için $q= 0.5$ 'dir. C 'yi etkileyen en önemli değişken d_f 'dir. Çok ince sıvı faz tabakaları kullanılarak kolon verimi önemli derecede artırılabilir. Yüksek sıcaklıklarda ve düşük solvent viskozitelerinde dengeye daha çabuk ulaşılabilir.

Bant Genişlemesi Yapan Proseslerin Net Sonuçları

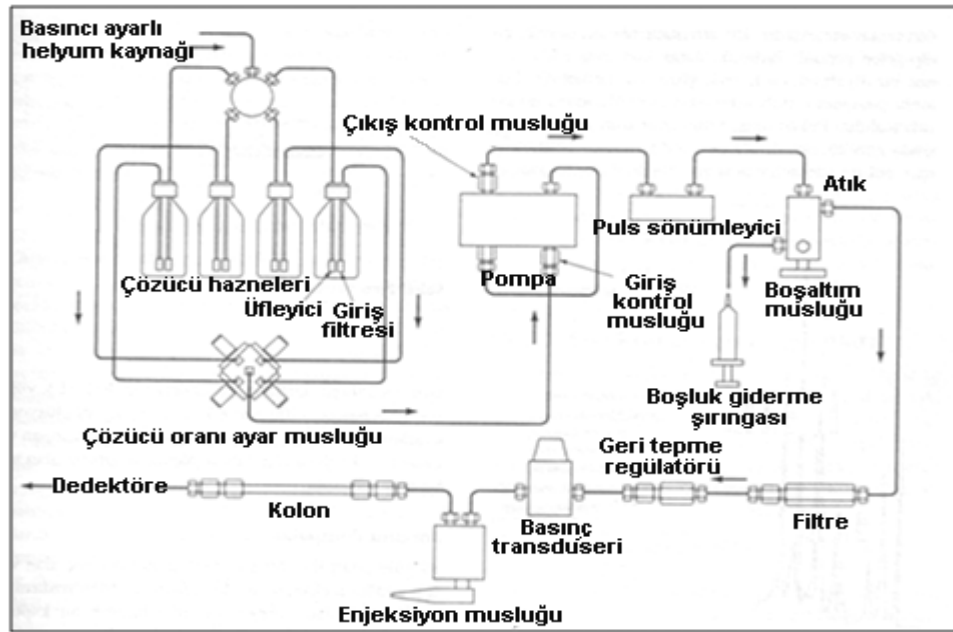
Şekil 1.2.4.'de van Deemter denklemindeki üç terimin eğrileri çizilmiştir (Kesikli çizgi); eğriler H değerinin hareketli faz hızı ile değişimini göstermektedir. Bu üç terimin net sonucu ise kesiksiz eğri ile verilmiştir. Görüldüğü gibi optimum verim kesiksiz eğrinin minimumunda elde edilir. Bu tip deneysel eğrilerden herhangi bir kolon için A , B , C değerleri bulunabilir. Bu gibi veriler bir dolgu maddesinin daha verimli koşullarda kullanılmasına yardımcı olur. van Deemter denklemi tepsi yüksekliğinin bulunmasında kullanılan ilk yaklaşıma yöntemidir.



Şekil 1.2.4. $H = A + B/u + Cu$ denklemin'deki değişkenlerin tepsi yüksekliğine etkisi

1.4.2.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Cihazı

Genelde 2-10 μm tanecik boyutuna sahip dolgu maddeleri modern sıvı kromatografi sistemlerinde kullanılmaktadır; bu boyuttaki dolgu maddeleri ile uygun olan sıvı akış hızlarının elde edilmesi için, yüzlerce atmosferlik pompa basıncı gereklidir (Skoog ve ark., 1996; Kılıç ve ark., 1998). Bunun sağlanması için gereken tipik bir Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi cihazı, Şekil 1.2.5'de görülmektedir.



Şekil 1.2.5. Bir Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi cihazının şeması (Skoog ve ark., 1996; Kılıç ve ark., 1998)

Bir Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi cihazındaki kısımlar şunlardır (Kılıç ve ark., 1998);

1. Hareketli faz hazneleri ve çözücü muamele sistemleri
2. Pompa sistemleri
 - a. Pistonlu pompalar
 - b. Sürgülü pompalar
 - c. Pnömatik pompalar
3. Numune enjeksiyon sistemleri

4. Sıvı kromatografi kolonları
 - a. Analitik kolonlar
 - b. Emniyet kolonları
 - c. Kolon termostatları
5. Dedektör
 - a. Absorbans dedektörleri
 - i. Filtreli ultraviyole absorbans dedektörleri
 - ii. Monokromatörlü ultraviyole absorbans dedektörleri
 - iii. İnfrared absorbans dedektörleri
 - b. Floresans dedektörler
 - c. Kırılma indisi dedektörü
 - d. Buharlaştırmalı ışık saçma dedektörleri
 - e. Elektrokimyasal dedektörler
 - f. Kütle spektrometrik dedektörler

Bir Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi cihazında bir veya daha çok çözücü haznesi bulunmaktadır. Bu çözücüler içinde bulunan, kolon ve dedektör sisteminde olumsuz etkilerin oluşmasına sebep olan gazların uzaklaştırılması için cihazlar bulunur. Bu gaz kabarcıkları bant genişlemesine sebep olmakta ve dedektörün performansını olumsuz etkilemektedir.

Sabit bileşimde tek çözücü kullanılmasıyla gerçekleşen ayırımı izokratik elüsyon, polariteleri birbirinden farklı iki veya üç çözücü sisteminin kullanıldığı ve ayırım sırasında bu çözücülerin oranlarının değiştirildiği ayırımı ise gradiyent elüsyon denir.

Bir pompa sistemi için gerekli şartlar;

- 400 atm'e kadar basınç üretebilmeli,
- puls içermeyen basınç çıkışı sağlamalı,
- 0.1-10.0 mL.dk⁻¹ akış hızlarında çalışmaya imkan vermeli,
- % 0.5 veya daha iyi bir bağıl tekrarlanabilirlikle akış kontrolü sağlamalı
- korozyona dayanıklı parçalardan oluşmalıdır.

Sıvı kromatografide ölçümlerin kesinliğinde, numunenin kolona verilmesinin tekrarlanabilirliği belirleyici faktördür. Kolona verilen hacim, bant genişlemesinin olmaması için son derece küçük olmalıdır.

Sıvı kromatografi kolonları genel olarak düzgün iç çapa sahip paslanmaz çelik borulardan yapılır; bazen kalın cidarlı cam borular da kullanılır. Kullanılan kolonlar genelde 10-30 cm uzunluğunda, 4-10 mm iç çapındadır ve kolon dolgu maddelerinin boyutları 5-10 μm büyüklüğündedir. Temelde iki tip kolon dolgu maddesi vardır; film ve gözenekli dolgular. Film dolgular; gözeneksiz, küresel, 30-40 μm çapında cam veya polimer tanelerinden oluşur. Bu tanelerin yüzeyine silis, alümina, polistiren-divinil benzen sentetik reçinesi veya bir iyon değiştirici reçineden oluşan ince bir gözenekli film kaplanmıştır. Gözenekli partiküller 3-10 μm çapındaki partiküllerdir ve silis, alümina, polistiren-divinil benzen sentetik reçinesi veya bir iyon değiştirici reçineden oluşur. Silis, sıvı kromatografide en çok kullanılan dolgu maddesidir. Emniyet kolonları kolonun ömrünü uzatmak amacıyla, analitik kolondan önce yer alan kısa kolondur. Kolon sıcaklığı, kromatogram kalitesini etkileyebilir; bu nedenle kolon sıcaklığını onda birkaç derece hata ile sabit tutabilen kolon termostatları vardır.

İdeal bir sıvı kromatografi dedektörü şu özelliklere sahip olmalıdır:

- yeterli duyarlılığa sahip olmalı,
- iyi bir kararlılık ve tekrarlanabilirlik,
- geniş bir doğrusal çalışma aralığı,
- akış hızından bağımsız küçük cevap zamanı,
- yüksek güvenilirlik ve kullanım kolaylığı sağlamalı,
- her türden analite benzer cevap alınmalı veya belirli sınıf maddelere karşı tahmini kolay ve seçici cevap verebilmeli,
- numuneyi parçalamamalı,
- bant genişlemesini azaltmak için minimum iç hacme sahip olmalıdır.

Dedektörler genel olarak iki tiptir; yığın özelliği dedektörleri (hareketli fazın kırılma indisi, dielektrik sabiti, yoğunluğuna, vb. cevap verir) ve analit özelliği dedektörleri (analitin UV absorbanı, floresans şiddeti, vb. cevap verir) (Skoog ve ark., 1996; Kılıç ve ark., 1998).

1.4.2.3. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Yönteminin Avantajları

1. Duyarlı bir yöntem olması.
2. Doğru, kantitatif tayinlere kolayca uygulanabilir olması.
3. Uçucu olmayan, sıcaklıkla kolayca bozunabilen türlerin ayrımı için uygun olması.
4. Pek çok maddeye geniş şekilde uygulanabilmesi.
5. Aynı sabit faz kullanılarak farklı hareketli faz sistemleriyle aynı anda birçok maddenin duyarlı olarak miktar tayininin yapılmasına olanak sağlaması.
6. Numunedeki maddelerin, bozulma ürünlerinin yanında miktar tayinlerine olanak sağlaması.
7. Biyolojik sıvılardan gerek ilaç etken maddelerinin, gerekse metabolitlerinin analizi için geniş bir kullanım alanına sahip olması (Kılıç ve ark., 1998).

1.4.2.4. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Yönteminin Dezavantajları

1. Ekonomik olarak pahalı sabit faz ve hareketli faz sistemlerine gereksinim göstermektedir.
2. Hareketli faz sistemlerinin mutlaka pahalı membran sistemlerinden süzülmesi gerekmektedir.

Bölüm Skoog ve ark., 1996; Kılıç ve ark., 1998 kaynaklarından yararlanılarak hazırlanmıştır.

1.4.3. Voltametri

Elektroanalitik kimya analiz edilecek çözeltinin elektrokimyasal özelliklerine dayanan bir grup kantitatif analitik yöntemleri kapsamaktadır. Voltametri ise elektroanalitik yöntemler topluluğunun bir üyesidir. Voltametri; çeşitli ortamlarda meydana gelen yükseltgenme ve indirgenme işlemlerinin incelenmesi, yüzeydeki adsorpsiyon işlemlerinin araştırılması ve elektrot yüzeylerinde gerçekleşen elektron aktarım mekanizmalarının aydınlatılması gibi temel çalışmalar için kullanılan bir analiz yöntemidir. Yöntemde ince bir mikroelettroda uygulanan potansiyelin fonksiyonu olarak akımın ölçülmesiyle kantitatif tayin gerçekleştirilmektedir.

1.4.3.1. Voltametri Yöntemleri

Voltametrde; elektroda, değiştirilebilir potansiyel uyarma sinyali uygulanır ve sinyale, akım cevapları alınır. 4 tip uyarma sinyali vardır:

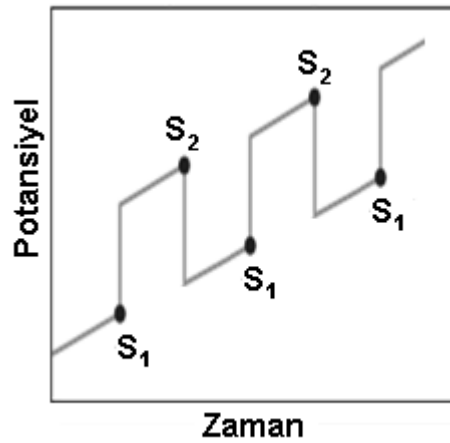
- 1- Doğrusal Taramalı
- 2- Diferansiyel puls
- 3- Kare dalga
- 4- Üçgen (dönüşümlü, sıklık).

1.4.3.1.1. Doğrusal Taramalı Voltametri

Elektroaktif bir madde içeren durgun bir çözeltide bir mikroelettrot ile karşılaştırma elektrodu arasına doğrusal olarak artan bir gerilim uygulanarak artan akımın ölçüldüğü bu yöntemde doğrusal taramalı voltammetri adı verilir. Şekil 1.3.1.'de görüldüğü gibi potansiyel zamanla doğrusal olarak değişmektedir. Elde edilen grafiğe voltammogram adı verilmektedir (Yıldız ve Genç,1993).

1.4.3.1.2. Diferansiyel Puls Voltametri

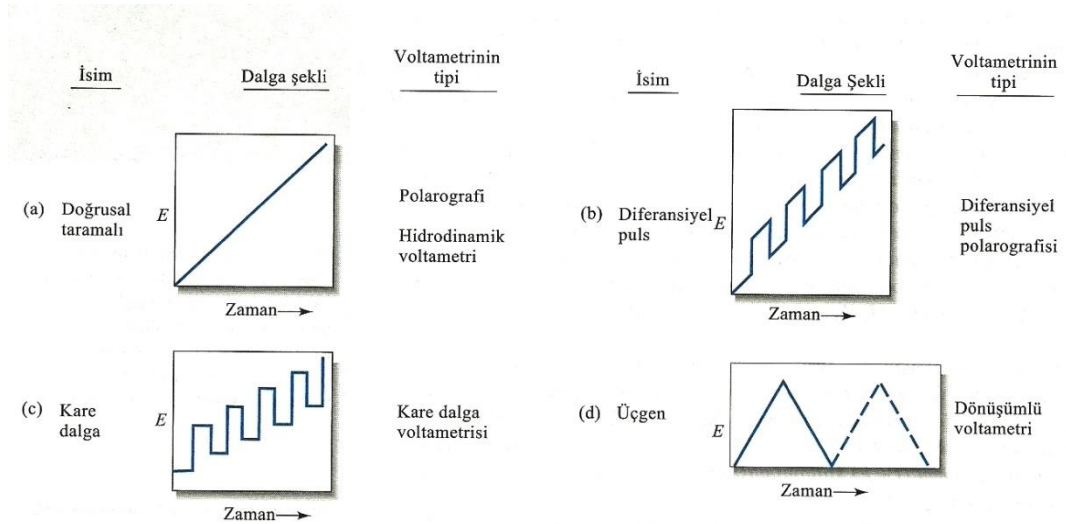
Doğrusal tarama sırasında periyodik olarak değişebilir potansiyel pulsu uygulanması ile elde edilen bir voltametri çeşididir. Yöntemde bir puls süresinin farklı zamanlarında akım ölçüm sonucu kullanılır, pulstan hemen önceki sonuç (S_1) ve puls bitiminden hemen önceki sonuç (S_2)'dir (Şekil 1.3.1.). Puls başına akımdaki fark ($\Delta i = i_{S_2} - i_{S_1}$), doğrusal olarak artan potansiyelin fonksiyonu olarak kaydedilir. Şekil 1.3.2'te b grafiği diferansiyel puls voltametrisinde kullanılır (Skoog ve ark., 1996; Kılıç ve ark., 1998). Genellikle diferansiyel puls voltammetrik yöntemde gözlenebilirme sınır değeri klasik voltammetrik yöntemlerine oranla daha düşük olmaktadır.



Şekil 1.3.1. Doğrusal taramada pulslar

1.4.3.1.3. Kare Dalga Voltametri

Kare dalga voltametri son derece hızlı ve duyarlı olma üstünlüğü olan bir puls tekniğidir. Diferansiyel puls voltametrisindeki gibi akım pulsun pozitif ve negatif kısmının sonuna doğru iki kez ölçülmekte ve bunların farkı alınmaktadır. Bu iki ölçümlerden birincisi, ileri yöndeki pulsun sonunda ikincisi ise geri yöndeki pulsun sonundadır. Bu iki akım arasındaki fark, uygulanan potansiyelin bir fonksiyonu olarak grafiğe geçirildiğinde kare dalga voltamogramı elde edilir. Şekil 1.3.2’te c grafiği kare dalga voltametrisinde kullanılır (Skoog ve ark., 1996; Kılıç ve ark., 1998). Kare Dalga Voltametrisi oldukça hızlı bir teknik olması onun büyük avantajıdır. Etkin tarama hızı kare dalga frekansı (f) ve basamak yüksekliği (ΔE_s) değiştirilerek belirlenir. Yaklaşık 2-3 dakikayı bulan diferansiyel puls voltamogramının tamamlanmasının aksine kare dalga voltametrisinde analiz süresi büyük ölçüde azaldığı için birkaç saniye içinde voltamogramlar kaydedilebilmektedir (Wang, 2000).



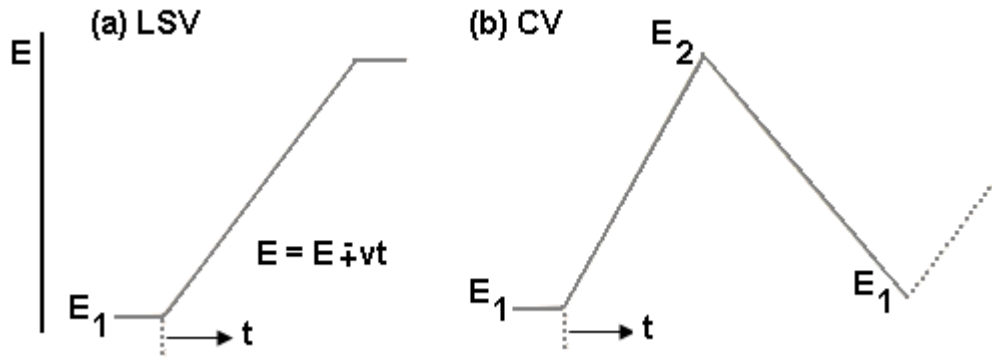
Şekil 1.3.2. Voltametrizde kullanılan potansiyel uyarma sinyalleri (Skoog ve ark., 1996; Kılıç ve ark., 1998)

1.4.3.1.4. Üçgen (dönüşümlü, siklik) Voltametri

Elektroaktif bir madde içeren durgun bir çözeltide bir mikroelettrot ile karşılaştırma elektrodu arasına doğrusal olarak artan bir gerilim uygulanarak akım gerilim eğrisinin bir pik şeklinde olduğu gözlenmektedir. Bu uygulamada gerilim taraması ileri yönde belli bir gerilim değerine ulaştıktan sonra yine doğrusal olarak azalacak biçimde terse çevrilirse bu yöneme üçgen dönüşümlü voltammetri adı verilir. Önemli ve yaygın olarak nitel amaçlı kullanılan bir voltametrik tekniktir. Bu teknikte yükseltgenme/indirgenme reaksiyonlarının incelenmesi, reaksiyon ara ürünlerinin gözlenmesi ve elektrotlarda oluşan ürünlerin oluşum sonrası reaksiyonlarını yakalamada çok yaygın olarak kullanılmaktadır. Potansiyel, üçgen şeklinde dalga oluştururken iki farklı değer arasındadır, çalışma elektrotunun potansiyeli zamanın fonksiyonu olarak E_1 potansiyelinden E_2 potansiyeline doğru sabit bir tarama hızında değiştirilir ve E_2 dönüşüm potansiyeline erişildikten sonra tarama yönü tersine çevrilerek aynı tarama hızında E_2 potansiyelinden E_1 potansiyeline doğru tarama yapılır. Ters yöndeki bu potansiyele çevirici potansiyeller denir. Elektrokimyasal reaksiyonlar hakkında nitel bilgiye ulaşmada kullanılan en yaygın teknik olmasının nedeni, redoks olaylarının termodinamiği, heterojen elektron-transfer reaksiyonlarının kinetiği ve birbirine bağlı kimyasal reaksiyonlar ve adsorpsiyon olaylarıyla ilgili hızlı bir şekilde bilgi sağlar. Genellikle elektroanalitik çalışmalardaki ilk deneysel basamaktır. Özellikle, elektroaktif türlerin redoks potansiyellerinin yerinin hızlı bir şekilde belirlenmesini ve redoks reaksiyonundaki ortamın etkisinin değerlendirilmesini sağlar (Skoog ve ark., 1996; Kılıç ve ark., 1998; Wang, 2000).

$\text{Yük} + ne^- \leftrightarrow \text{İnd}$ reaksiyonu tersinir olduğunda Eğri 1 Şekil 1.3.4'de elde edilir. İleri doğru taramada, doğrusal taramalı voltametrideki olduğu gibi Yük'ün İnd'e indirgenmesi ile katodik pik elde edilir. Geri doğru taramada, ileri doğru tarama esnasında meydana gelen İnd'in Yük'e tekrar yükseltgenmesinden kaynaklanan anodik pik gözlenir. Tersinir reaksiyonlar

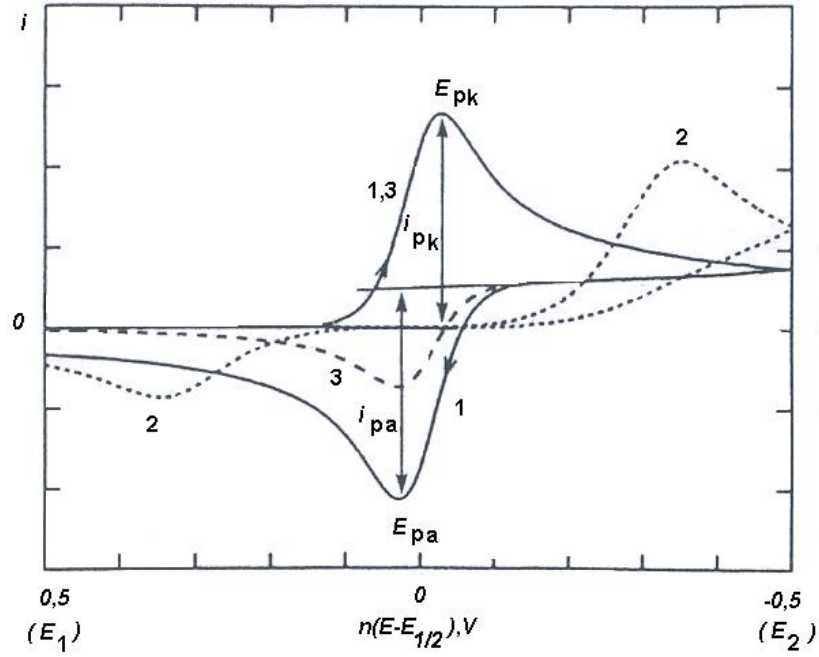
için katodik ve anodik pik akımlarının büyüklükleri ($|i_{pk}| = |i_{pa}|$) eşittir ve katodik pik potansiyeli (E_{pk}) anodik pik potansiyelinden (E_{pa}) $(58/n)$ mV daha negatifdir. Bunlar tersinirlik için önemli ölçütlerdir. Ayrıca formal redoks potansiyelini elde etmek için kullanılan yarı dalga potansiyeli $E_{1/2} = (E_{pk} + E_{pa})/2$ şeklinde elde edilir. Tersinirliğin azalması ile iki pik potansiyeli arasındaki fark artar.



Şekil 1.3.3. Doğrusal Taramalı Voltametri ve Dönüşümlü Voltametri'ye uygulanan voltaj

Eğri 2 tersinmez olan sistemler içindir. Eğri 1 ile karşılaştırıldığında katodik pik çok daha negatif potansiyelde görünürken anodik pik çok daha pozitif potansiyeldedir. Sistem tamamen tersinmez ise anodik pik ölçülebilen potansiyel aralığında görünmez. Tersinmez dönüşümlü voltametri eğrisinden genellikle simulasyon yöntemi ile elektrot reaksiyonu için hız sabiti ve transfer katsayısı gibi kinetik parametreler elde edilebilir.

Eğri 3'de ise İnd'in tersinir olarak Yük'e tekrar yükseltgenebildiği ancak; tekrar yükseltgenmeden önce ind'in bir kısmının elektroaktif olmayan A türüne dönüşebildiği bir durum içindir ($\text{Yük} \leftrightarrow \text{İnd} \xrightarrow{k} \text{A}$). Katodik pik akımı Eğri 1'deki gibi aynı şekilde görünürken anodik pik akımı ise Eğri 1'dekinden daha küçüktür. K hız sabiti anodik pik akımındaki azalmadan elde edilebilir. dönüşümlü voltametri'de, potansiyel tarama hızı geniş bir aralıkta değiştirilebilir ve en yüksek tarama hızı 10^6 V/s ve fazlasına ulaşabilmektedir. (Izutsu, 2002).



Şekil 1.3.4. Eğri 1: $\text{Yük} + \text{ne}^- \leftrightarrow \text{İnd}$ reaksiyonuna ait tersinir
 Eğri 2: tersinmez ($\alpha = 0.5$)
 Eğri 3: tersinir fakat İnd türünün elektroaktif bir türe
 dönüştüğü bir sistem için dönüşümlü voltamogramlar
 (Izutsu, 2002)

Dönüşümlü voltametri susuz çözeltilerdeki elektrokimyasal çalışmalarda kullanılan en kullanışlı yöntemlerden biridir. Özellikle kararsız bir ürün veya ara ürün içeren elektrot reaksiyonlarının incelenmesinde kullanışlıdır. Elde edilen voltamogramlar incelenerek reaksiyon mekanizmaları açıklanıp kararsız türlerin termodinamik ve kinetik özellikleri belirlenebilir (Izutsu, 2002).

1.4.3.1.4.1. Tersinir Reaksiyonlar

Tersinir bir elektrot reaksiyonunun pik akımı 25°C sıcaklıkta aşağıdaki eşitlikle gösterilir. Bu eşitliğe Randles – Sevcik eşitliği adı verilir.

$$i_p = (2.69 \times 10^5) n^{3/2} A D^{1/2} C v^{1/2}$$

Bu eşitlikteki terimlerin anlamları aşağıdaki gibidir;

i_p : Pik akımı, Amper

D : Difüzyon katsayısı, cm^2/s

v : Tarama hızı, V/s

C : Çözelti konsantrasyonu, mol/cm^3

Potansiyel eksenindeki piklerin konumu, redoks işleminin formal potansiyeline bağlıdır. Tersinir bir sistem için formal potansiyel, aşağıdaki gibi verilir:

$$E^0 = \frac{E_p^a + E_p^k}{2}$$

Tersinir bir sistemde, pik potansiyelleri arasındaki fark aşağıdaki eşitlikle verilir:

$$\Delta E_p = E_p^a - E_p^k = \frac{0.059}{n} V$$

Pik potansiyelleri farkı, aktarılan elektron sayısının belirlenmesinde ve Nernst' hareket kriteri olarak kullanılabilir. Buna göre, hızlı bir elektronun reaksiyonu 59 mV'luk bir ΔE_p gösterir. Katodik ve anodik piklerin her ikisi de tarama hızından bağımsızdır. Bir tersinir indirgenme reaksiyonunda E_p ile $E_{1/2}$ arasındaki ilişki şu şekildedir.

$$E_{p/2} = E_{1/2} + \frac{0.028}{n} V$$

$E_{p/2}$: yarı pik potansiyeli

$E_{1/2}$: yarı dalga potansiyeli

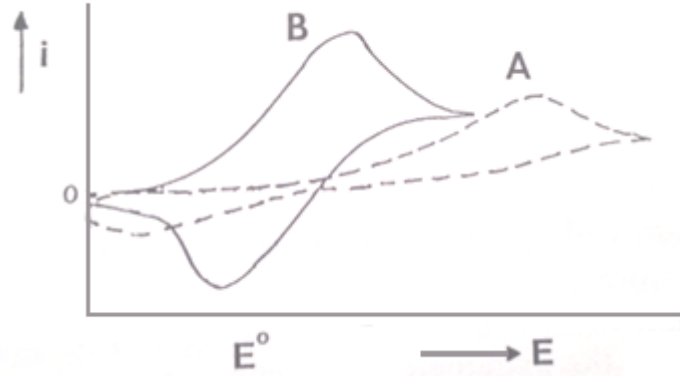
(İşaret indirgenme tepkimesinde pozitifdir).

Bir reaksiyonun tersinir olduğunun belirlenmesinde, dönüşümlü voltametri çalışmalarından yararlanılır ve elektrot reaksiyonunun tersinir olduğu aşağıdaki kriterlerin sağlanması ile sağlanır. Bu kriterler şunlardır:

1. $i_p - v^{1/2}$ grafiği doğrusal olmalıdır.
2. $E_p^k - E_p^a = \frac{59}{n} mV$
3. $E_p - E_{p/2} = \frac{59}{n} mV$
4. E_p tarama hızından bağımsızdır.
5. $\frac{i_p^a}{i_p^k} = 1$ olmalı ve bu oran tarama hızı ile değişmemelidir.
6. E_p 'den daha negatif potansiyellerde akım $t^{-1/2}$ ile orantılıdır.

1.4.3.1.4.2. Tersinmez ve Yarı-tersinir Reaksiyonlar

Elektron transferinin yavaş olduğu tersinmez sistemler için, piklerin büyüklüğü tersinir sistemlere göre daha azalır ve pikler birbirinden epeyce ayrılır (Şekil 1.3.5.) (Wang, 2000).



Şekil 1.3.5. Tersinmez (A) ve yarı-tersinir (B) dönüşümlü voltametri

Tamamen tersinmez sistemlerde tarama hızıyla pik potansiyelinde kayma olur.

$$E_p = E^0 - \frac{RT}{\alpha n_a F} \left[0.78 - \ln \frac{k^0}{D^{1/2}} + \ln \left(\frac{\alpha n_a F V}{RT} \right)^{1/2} \right]$$

Denklemden α , transfer katsayısıdır ve n_a yük-transfer basamağındaki elektron sayısıdır. E_p , E^0 'dan daha yüksek potansiyelerde oluşmaktadır. k^0 değeri bağımsızdır. Pik potansiyeli ve yarı-pik potansiyelinden $48/\alpha n$ mV değerde farklıdır.

Pik akımı, aşağıdaki eşitlikteki denklem, çözeltinin derişimiyle orantılıdır fakat α transfer katsayısına bağlı olarak pik yüksekliği daha düşüktür. Tersinir pik akımının tersinmez pik akımına oranı $\alpha = 0.5$ ile 1.27'dir.

$$i_p = (2.99 \times 10^5) n (\alpha n_a)^{1/2} A C D^{1/2} V^{1/2}$$

Standart hız sabitinin $10^{-1} > k^0 > 10^{-5}$ cm/s olduğu yarı-tersinir sistemler için akım, hem yük transferi hem de kütle aktarımıyla kontrol edilir. Dönüşümlü voltamogramın şekli, $k^0/\sqrt{\pi \alpha D}$ 'nin bir fonksiyonudur ($\alpha = nFv/RT$). $k^0/\sqrt{\pi \alpha D}$ arttıkça, sistem tersinirliğe yaklaşır. $k^0/\sqrt{\pi \alpha D}$ 'nin küçük değerleri için sistem tersinmez davranış gösterir. Yarı-tersinir sistemlerde pik

potansiyelleri, tersinir sistemlerle karşılaştırıldığında daha yayvandır ve daha büyük bir ayrılma gösterir (B eğrisi).

Dönüşümlü voltametri ile tersinmez bir reaksiyonun tanınma kriterleri, (Greef ve ark., 1990).

1. Anodik pik gözlenmez.
2. i_p^k , tarama hızının karekökü ile doğru orantılı olarak değişir.
3. E_p^k kayması tarama hızındaki 10 kat artmada $30/\alpha_c n_\alpha$ kadardır.
4. $|E_p - E_{p/2}| = 48/(\alpha_k n_\alpha)$ mV'dur.

Bir reaksiyonun yarı-tersinir olduğunun belirlenmesinde de dönüşümlü voltametri çalışmalarından elde edilen verilerden yararlanılır. Bu amaçla, aşağıdaki kriterler incelenir (Greef ve ark., 1990). Yarı tersinir bir sistem için:

1. i_p , $v^{1/2}$ ile artar ancak doğrusal değildir.
2. E_p^k , tarama hızı ile değişir bu değişme genellikle tarama hızının artması ile negatif değerlere kayma yönündedir.
3. $\frac{i_p^a}{i_p^k} = 1$ olmalıdır. ($\alpha_a = \alpha_k = 0.5$ ise)
4. $E_p^k - E_p^a$, farkı düşük tarama hızlarında $59/n$ 'e yaklaşmalıdır.

1.4.3.1.4.3. Adsorpsiyon İçeren Reaksiyonlar

Dönüşümlü voltametri aynı zamanda elektroaktif türlerin yüzeyler arası hareketlerin incelenmesinde de kullanılır. Reaktif ve ürün her ikisi de adsorpsiyon-desorpsiyon olayında yer alabilir. Organik bileşiklerde özellikle metal komplekslerde bu tarz yüzeyler arası hareketler oluşmaktadır. Katodik ve anodik pik akımlarının dereceli olarak artması, elektrot yüzeyinde adsorpsiyonun göstergesidir. Eğer reaktif veya üründen sadece biri elektrot yüzeyine kuvvetli adsorbe olursa;

- reaktif elektrot yüzeyine kuvvetli adsorbsiyonu varsa difüzyon pikinden daha negatif bir potansiyelde bir arka pik gözlenirken
- ürünün elektrot yüzeyine kuvvetli adsorbsiyonu varsa difüzyon pikinden daha pozitif bir potansiyelde bir ön pik gözlenir (Wang, 2000).

1.4.3.2. Destek Elektrolit

Analit çözeltisine fazla miktarda ilave edilen ve analit tayininde kullanılan potansiyelde, mikroelettrotta reaksiyona girmeyen alkali metal tuzlarıdır. En yaygın tuzlar, analit tayininde kullanılan potansiyelde mikroelettrotta reaksiyona girmeyen alkali metal tuzlarıdır. KCl, KNO₃ gibi inorganik bir tuz seçilebileceği gibi bir mineral asidi yada bir baz olabilir. Sitrik asit, sitrat asetik asit-asetat gibi tampon sistemleri pH kontrolünün gerektiği durumlarda destek elektrolit olarak kullanılabilir (dosya.sakarya.edu.tr; Skoog ve ark., 1996; Kılıç ve ark., 1998).

1.4.3.3. Çalışma Elektrodu (İndikatör Elektrot)

Zamanla analit derişimindeki değışimlerle potansiyeli doğrusal olarak değışen mikroelettrottur. Bu elektrotlar esas olarak 3 sınıfa ayrılır:

- Metalik (Pt, Au, ...)
- Membran (Cam elektrot, Sıvı, Kristalin, Gaz duyarlı...)
- ISFET (İyon Seçici Alan Etkili Transistörler).

Ayrıca hidrojen aşırı geriliminin civada büyük olmasından dolayı büyük negatif potansiyelerde civa elektrotlar kullanılır). Analit bu elektrot üzerinde yükseltgenir veya indirgenir. Potansiyometrik ölçümlerde her zaman katot olarak işlem görür (dosya.sakarya.edu.tr ve Skoog ve ark., 1996; Kılıç ve ark., 1998).

1.4.3.4. Referans Elektrot

Elektrot potansiyeli tam olarak bilinen bir yarı hücredir. Potansiyelin deney süresince sabit kaldığı elektrottur. Bu elektrodu içeren devrenin direnci çok yüksek olduğundan buradan hiç akım geçmez. Yani tüm akım karşı elektrottan mikroelevtroda doğru akar. Potansiyometrik ölçümlerde her zaman anot olarak işlem görür.

- Ag/ AgCl Elektrot: Ucu AgCl ile kaplanmış gümüş telin 1M AgCl (KCl ile doyurulmuş) çözeltisine daldırılması ile oluşmaktadır.
- Hg/Hg₂Cl₂ (Kalomel) Elektrot: Kalomel ve cıvadan oluşan bir karışımın metalik cıva ve KCl çözeltisine daldırılması ile oluşmaktadır.
- Standart Hidrojen Elektrot (SHE): Bir platin metal parçasının 1 atm basınçta hidrojen gazı ile doyurulmuş sulu çözeltisinin içine daldırılması ile oluşmaktadır.

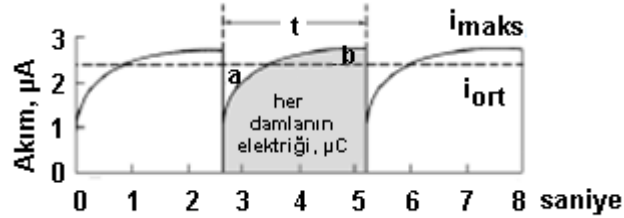
1.4.3.5. Karşı Elektrot

Helezon şeklinde sarılmış bir Pt tel ya da bir cıva havuzu şeklinde olan ve elektriğin kaynaktan gelerek çözelti içinden mikroelevtroda aktarılmasını sağlayan elektrottur. (Skoog ve ark., 1996; Kılıç ve ark., 1998).

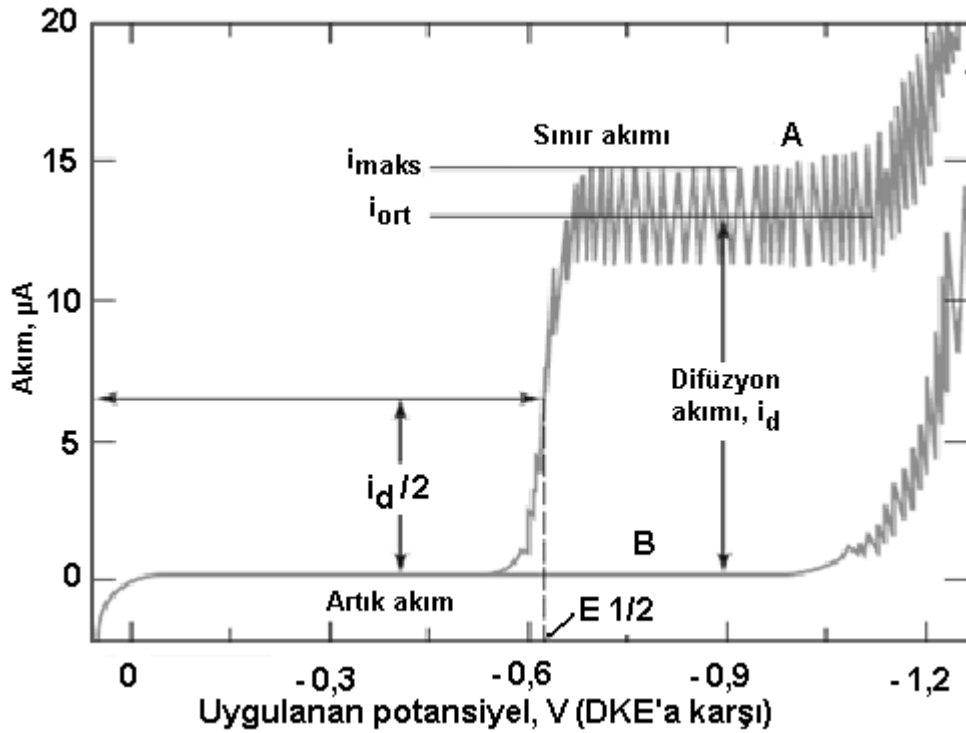
1.4.3.6. Polarografik Akımlar

Damlayan cıva elektrodu içeren bir hücredeki akımdaki periyodik iniş çıkışlar damlama hızına bağlı bir sıklıkta görülür. Akım sıfıra damlanın kapilerden kopması ile düşer (Şekil 1.3.6.). Yeni bir damlanın yüzey alanı büyüdükçe akımda hızlı bir artış gözlenir. Damladan damlaya değişen akım dalgalarının tepe noktasında difüzyon akımı okunur. Eski literatürde cihazların elektronik cevap sürelerinin uzun olmasından ve damlaların değişirken akımlarının birbirine karışması sonucu ortalama akım

ölçülmektedir. Şekil 1.3.7.'deki A eğrisinde görüldüğü üzere modern polarograflardaki elektronik filtreler maksimum yada ortalama akımının ölçülmesini sağlamaktadır. Damlama hızı (t) tekrarlanabildiği sürece her iki mod da kullanılabilir.



Şekil 1.3.6. Damla büyümesinin polarografik akıma etkisi, i_{ort} için
a alanı=b alanı ve $i_{ort} \approx 6/7 i_{maks}$



Şekil 1.3.7. A eğrisi, Cd^{2+} yönünden 5.0×10^{-4} M olan 1M HCl çözeltisi ve B eğrisi, sadece 1M HCl çözeltisi için polarogramlar.

Polarografide elektroaktif bir ürün bulunmadığı zaman gözlenen küçük yükleme akımları artık akımlardır.

Akımın büyüklüğü analitin elektrot yüzeyine taşınma hızı ile sınırlı olduğu zaman hidrodinamik voltametrde olduğu gibi sınır akımları gözlenir. Polarografide kütle difüzyon ile aktarılır. Polarografik sınır akımlarına difüzyon akımları denir ve i_d ile gösterilir. Difüzyon akımı sınır akımı ile artık akımlar arasındaki fark dalga yüksekliğidir ve analit derişimi ile doğru orantılır. Bu özellik ile polarografi kantitatif analizlerde kullanılabilir. Yarı dalga potansiyeli akımın, sınır akımının değerinin yarısına eşit olduğu potansiyeldir ve bu potansiyel her madde için karakteristik olduğundan kalitatif analizlerde kullanıma olanağı sağlamaktadır.

Fick kanunları olarak ifade edilen differansiyel denklemlerin genişleyen küresel elektrot ile çözülmesi sonucu ortalama akım için 25 °C'de İlkoviç eşitliği elde edilir.

$$i_d = 607nFCD^{1/2}m^{2/3}t^{1/6}$$

Bu eşitlikte terimlerin açıklamaları aşağıdaki gibidir.

i : damla ömrü sonundaki akım. A;

n : aktarılan elektron sayısı (mol e⁻ / mol);

F : Faraday sabiti (mol / mol e⁻);

C : ana çözeltideki elektroaktif madde konsantrasyonu, mol / cm³

D : difüzyon katsayısı, cm² / s

m : civanın akış hızı, g / s

t : damla ömrü, s

607 birkaç sabitin biraraya gelmesi ile bulunmuştur ve maksimum akım için bu sabit 709'dur.

Polagrafik deneylerde civa sutununun yüksekliği (h) sabit tutulursa civanın akış hızı (m) ve damla ömrü (t) de sabit kalır. Deney sabit sıcaklıkta yapılırsa difüzyon katsayısı (D) da sabit olacağından İlkoviç eşıtlığı;

$$i_d = kC$$

şeklinde yazılabilir. Bu eşıtlikte C ana çözeltinin konsantrasyonudur.

İlkoviç denklemindeki $m^{2/3}t^{1/6}$ “kapiler sabiti”dir ve damlalı elektrot özelliklerinin difüzyon akımına etkisini tanımlar; bu iki terim deneysel olarak bulunabildiğinden farklı kapilerlerden alınan difüzyon akımları kıyaslanabilir. Sıcaklık, çeşitli değışkenleri etkileyek difüzyon akımına hakim olur. Denklemden sıcaklığa en hassas faktör difüzyon katsayısıdır. 1 derece için % 2.5 kadar değışiklik gösterir (Skoog ve ark., 1996; Kılıç ve ark., 1998).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Kullanılan Cihazlar ve Gereçler

- Duyarlı Terazi: Ohaus Co. Adventurer Pro AV 264C
- Manyetik Karıştırıcı: Electro-Mag Type MS
- Spektrofotometre: Shimadzu UV 1601
- Ultra Saf Su Arıtma Cihazı: Millipore
- Voltametri: Bioanalytical Systems (BAS) Model 100B, Electrochemical Analyzer ve BAS Model C2 elektrot hücresi
- Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografik Cihaz: HP 1100 Series
- G1379 Degasser, G1311 Quat Pump, G1313A ALS, G1315BDAD, G1316A COLCOM
- pH metre: Mettler Toledo MP 220

2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Asetonitril (VWR International, UK)
- Borik asit (Merck, Darmstadt, Almanya)
- Fosforik asit (Merck, Darmstadt, Almanya)
- Glasiyel asetik asit (Merck, Darmstadt, Almanya)
- Metanol (VWR International, UK)
- Potasyum biftalat (Merck, Darmstadt, Almanya)
- Potasyum fosfat, monobasik (Merck, Darmstadt, Almanya)
- Potasyum klorür (Merck, Darmstadt, Almanya)
- Sodyum hidroksit (Merck, Darmstadt, Almanya)
- Sülfürik asit (Merck, Darmstadt, Almanya)

2.3. Kullanılan Standart

Olopatadin HCl (Alcon Laboratuvarları TIC. A.Ş.)

Kafein (Atabay İlaç Fabrikası A.Ş.)

2.4. Farmasötik Preparatlar

Patanol® Steril Oftalmik Solüsyon 5mL (Alcon Laboratuvarları TIC. A.Ş.)

2.5. Ortam Şartları ve Hesaplamalar

İlaç firmasından tüm spesifikasyon özellikleri ile temin edilen olopatadin HCl adlı etken madde kullanılarak spektrofotometrik çalışmalar için stok çözeltiler hazırlanmıştır. Hazırlanan bu çözeltilerden hareketle çalışma konsantrasyon aralığı belirlenerek spektrumları alınmıştır. Alınan bu spektrumların uygun olduğu dalga boyları belirlenerek ölçülen absorbans değerleri konsantrasyonlarına karşı grafiğe geçirilmiş ve kalibrasyon denklemleri hazırlanmıştır. Ayrıca spektrumların birinci türev eğrileri bilgisayarlar yardımıyla çizdirilmiştir.

Yüksek performanslı Sıvı Kromatografik çalışmalar için olopatadin HCl adlı etken madde metanol içerisinde çözülmüştür. Kromatografik sistem için iç standart olarak kafein kullanılmıştır. Analitik konsantrasyon aralığında hazırlanan standart çözeltilerin içerisine tüm konsantrasyonlarda aynı miktarda iç standart çözelti ilave edilmiştir. Olopatadin HCl/ Kafein pik alanları oranlanarak olopatadin HCl konsantrasyonuna karşı grafiklere geçirilerek çalışma grafikleri hazırlanmıştır.

Voltametrik çalışmalarda; dönüşümlü voltametri, diferansiyel puls voltametri ve Osteryoung kare dalga voltametri teknikleri kullanılmıştır. Elektrokimyasal ölçümler üçlü elektrot sistemi ile yapılmıştır. Karşı elektrot olarak platin tel; referans elektrot olarak gümüş klorürle kaplı gümüş bir

telden oluşan bir elektrot; çalışma elektrodu olarak ise camsı karbon elektrot kullanılmıştır. Voltametrik çalışmalardan önce elektrot yüzeyleri polishing pad ve çok ince alümina kullanılarak temizlenmiştir. Temizleme işlemi bittikten sonra elektrodun yüzeyinde kalan alumina tozlarını uzaklaştırmak için elektrot ultra saf su ile yıkanır. Pt ve destek elektrodun temizliğini için ultra saf su kullanılmıştır. Deneylerde kullanılan ultra saf su Millipore Ultra pure water system cihazından alınmıştır ve direnci 18.3 Ω 'dur.

2.6. Olopatadin HCl İçin Geliştirilmiş Analiz Yöntemleri

2.6.1. Spektrofotometri

2.6.1.1. Doğrudan UV Spektrofotometri

2.6.1.1.1. Deneyin Yapılışı

2.6.1.1.1.1. Çalışma Grafiklerinin Hazırlanması

Standart Olopatadin HCl ultra saf su içinde çözülerek hazırlanan stok çözeltisinden hareketle konsantrasyonları analitik aralıkta (20.0 – 140.0 µg/mL) olan standart çözeltileri kullanılarak 200.0 ile 330.0 nm arasındaki spektrumu Shimadzu UV 1601 spektrofotometre yardımıyla çizdirilmiştir. Elde edilen UV spektrumlarında maksimum absorpsiyonun gözlemlendiği 297.4 nm'deki absorbans sinyalleri okunarak bilgisayar yardımıyla kaydedilmiştir (Şekil 3.1.1.1.). Kaydedilen absorbans sinyalleri, konsantrasyona karşı grafiğe geçirilmiştir. En küçük kareler yöntemi kullanılarak bilgisayar yardımıyla doğru denklemleri elde edilmiştir. Elde edilen istatistiksel veriler Çizelge 3.1.1.1.1.'de verilmiştir.

2.6.1.1.1.2 Tekrar Edilebilirliğin Araştırılması (Güniçi ve Günlerarası Çalışmalar)

2.6.1.1.1.2.1. Güniçi Çalışmalar

Stok çözeltilerden hareketle, sadece olopatadin HCl içeren üç paralel olarak 100.0 µg/mL konsantrasyonda çözelti konsantrasyonda çözelti hazırlanmıştır. Bu çözeltilerin; 0.(hazırlanır hazırlanmaz), ½., 1., 1.5., 2., 3., ve 4. saatlerde; UV spektrumları alınmış ve bilgisayarlara kaydedilmiştir. Kaydedilen spektrumların 297.4 nm deki absorbans sinyal değerleri okunmuş

ve çalışma grafiklerinden elde edilen doğru denklemlerinde yerine konularak miktar tayinleri yapılmıştır. Elde edilen verileri 3.1.1.1.2.'de özetlenmiştir.

2.6.1.1.1.2.2. Günlerarası Çalışmalar

Stok çözeltilerden hareketle, sadece olopatadin HCl içeren üç farklı konsantrasyonda çözelti hazırlanmıştır. Bu çözeltilerin ; 0.(hazırlanır hazırlanmaz), 1., 2., 3., ve 4. günlerde; UV spektrumları alınmış ve bilgisayarlara kaydedilmiştir. Kaydedilen spektrumların 297.4 nm deki absorbans sinyal değerleri okunmuş ve çalışma grafiklerinden elde edilen doğru denklemlerinde yerine konularak miktar tayinleri yapılmıştır. Elde edilen verileri Çizelge 3.1.1.1.3.'de özetlenmiştir.

2.6.1.1.1.3. % Geri Kazanım Çalışmaları

Çalışma grafiklerinin hazırlanması sonucu hesaplanan kalibrasyon denklemleri kullanılarak % geri kazanım değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 3.1.1.1.4.'de verilmiştir.

2.6.1.1.1.4. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması

1.11 mg/mL olopatadin HCl içeren steril oftalmik solüsyondan üç farklı set için 1.0 mL alınarak ultra saf su ile 25.0 mL'ye tamamlanmıştır (olopatadin HCl konsantrasyonu 1.11 mg olopatadin HCl için 44.4 µg/mL). Maksimum absorbansın görüldüğü 297.4'deki absorbans sinyalleri kaydedilmiştir. Kaydedilen bu sinyaller Çizelge 3.1.1.1.1'de gösterilen çalışma grafiklerinin hazırlanması sonucu elde edilen kalibrasyon denklemlerinde absorbans sinyalleri yerine konularak steril oftalmik solüsyondaki olopatadin HCl miktarları hesaplanmıştır. Bulunan sonuçlar Çizelge 3.1.1.1.5'te verilmiştir.

2.6.1.2. Birinci Türev Spektrofotometri

2.6.1.2.1. Deneyin Yapılışı

2.6.1.2.1.1. Çalışma Grafiklerinin Hazırlanması

Bölüm 2.6.1.1.1.1.'de tanımlanan çözeltiler kullanılarak alınan UV spektrumlarının bilgisayar yardımıyla hesaplatılan birinci türev UV eğrileri alınmıştır (Şekil 3.1.1.2.). Alınan bu birinci türev eğrilerinde 288.8 ile 308.4 nm'lerdeki türev absorbans sinyalleri kaydedilmiştir. Bu değerler, bilinen konsantrasyona karşı grafiğe geçirilmiştir. En küçük kareler yöntemi kullanılarak bilgisayar yardımıyla doğru denklemleri hesaplanmıştır. Elde edilen istatistiksel verileri Çizelge 3.1.1.2.1.'de verilmiştir.

2.6.1.2.1.2 Tekrar Edilebilirliğin Araştırılması (Güniçi ve Günlerarası Çalışmalar)

2.6.1.2.1.2.1. Güniçi Çalışmalar

Stok çözeltilerden hareketle, sadece olopatadin HCl içeren üç paralel olarak 100.0 µg/mL konsantrasyonda çözelti hazırlanmıştır. Bu çözeltilerin; 0.(hazırlanır hazırlanmaz), ½., 1., 1.5., 2., 3., ve 4. saatlerde; UV spektrumları alınmış ve bilgisayarlara kaydedilmiştir. Kaydedilen spektrumların 288.8 ile 308.4 nm'ler deki absorbans sinyal değerleri okunmuş ve çalışma grafiklerinden elde edilen doğru denklemlerinde yerine konularak miktar tayinleri yapılmıştır. Elde edilen verileri Çizelge 3.1.1.2.2. ve 3.1.1.2.3'de özetlenmiştir.

2.6.1.1.1.2.2. Günler arası Çalışmalar

Stok çözeltilerden hareketle, sadece olopatadin HCl içeren üç farklı konsantrasyonda çözelti hazırlanmıştır. Bu çözeltilerin; 0.(hazırlanır hazırlanmaz), 1., 2., 3., ve 4. günlerde; UV spektrumları alınmış ve bilgisayarlara kaydedilmiştir. Yine bilgisayarlar yardımıyla kaydedilen spektrumların 288.8 ile 308.4 nm'lerdeki absorbans sinyal değerleri okunmuş ve çalışma grafiklerinden elde edilen doğru denklemlerinde yerine konularak miktar tayinleri yapılmıştır. Elde edilen verileri Çizelge 3.1.1.2.4. ve 3.1.1.2.5.'de özetlenmiştir.

2.6.1.1.1.3. % Geri Kazanım Çalışmaları

Çalışma grafiklerinin hazırlanması sonucu hesaplanan kalibrasyon denklemleri kullanılarak % geri kazanım değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 3.1.1.2.6 ve 3.1.1.2.7'de verilmiştir.

2.6.1.2.1.4. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması

Bölüm 2.6.1.1.1.4'de açıklandığı şekilde hazırlanan ve bilgisayar ortamında bulunan çözeltilerin UV spektrumlarının bilgisayarlara yardımıyla birinci türev eğrileri çizdirilmiştir. Çizdirilen bu eğrilerin 288.8 ile 308.4 nm'lerdeki türev absorbans sinyalleri okunmuş ve bilgisayara kaydedilmiştir. Kaydedilen bu değerler Çizelge 3.1.1.2.1.'de gösterilen çalışma grafiklerinin hazırlanması sonucu elde edilen doğru denklemlerinde türev absorbans değerleri yerine konularak steril oftalmik solüsyondaki olopatadin HCl miktarları hesaplanmıştır. Bulunan sonuçlar Çizelge 3.1.1.2.8.'te verilmiştir.

2.6.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi

2.6.2.1. Deneyin Yapılışı

2.6.2.1.1. Ortam Koşullarının Ayarlanması

Sabit faz olarak C₁₈ kolonu ve hareketli faz olarak ise asetronitril, su ve metanol'den oluşan karışım ile gradiyent ayırım yapılmasına karar verilmiştir. Hareketli faz seçiminde farklı oranlar ve farklı fazlar denenmiş olup en uygun olan hareketli fazın asetronitril:metanol:su (10:60:30, h/h/h) karışımının olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle bu karışım hareketli faz olarak seçilmiştir. Hazırlanan bu hareketli faz, kolon sıcaklığı 20 - 50°C arasında değiştirilerek farklı sıcaklıklarda denenmiş ve en uygun sıcaklığın 25°C olduğuna karar verilmiştir. Etken maddenin dedektör kullanılarak çeşitli dalga boylarındaki sinyalleri incelenmiş etken madde ve iç standardın en iyi ayrıldığı dalga boyu 255.0 nm olarak belirlenmiştir. İç standart olarak çalışmalarımızda pseudoefedrin, losartan, hidroklorotiazit, bisoprolol fumarat, indapamid vb çok çeşitli etken maddeler denenmiş iç standart olarak kafein belirlenmiştir. Tarafımızdan geliştirilen bu yöntemde gerek etken madde ve gerekse iç standardın birbirinden ayrılmasına ve kolon basıncının 200 bar'ı geçmemesine dikkat ederek, hareketli faz kolondan farklı akış hızlarında geçirilmiş ve en uygun akış hızının 0.75 mL/dak. olduğuna karar verilmiştir.

2.6.2.1.2. Kromatografik Koşullar

Cihaz	: Agilent 1001, yüksek performanslı sıvı kromatografi cihazı
Kolon	: Waters C ₁₈ , 150x4.6mm, 3.5µm
Hareketli Faz	: asetronitril/metanol/su (10:60:30 h/h/h)
Akış Hızı	: 0.75 mL/dk
Enjeksiyon Hacmi	: 5.0 µL
Kolon Sıcaklığı	: 25°C
Dalga Boyu	: 255.0 nm

Çalışmalarımızdan önce kromatografik koşullar ayarlandıktan sonra hareketli faz 0.75 mL/dk. akış hızıyla bir saat boyunca kolondan geçirilerek kolonun dengeye getirilmesi sağlanmıştır.

2.6.2.1.3. Çalışma Grafiklerinin Hazırlanması

İç standart olarak kafein'in sudaki 0.2 µg/mL konsantrasyondaki çözeltisi kullanılmıştır. Bu çözelti Whatman 42 süzgeç kağıdından süzölmüştür. 15.0 mg olopatadin HCl standartları tartılarak, 50 mL'lik balonjojeye konulmuştur. 10 mL ultra saf su konularak bir süre ultrasonik banyoda tutulmuştur. İşaret çizgisine kadar saf su ile tamamlanmıştır. Hazırlanan çözelti Whatman 42 süzgeç kağıdından süzölmüştür. Böylece stok olopatadin HCl stok çözeltisi hazırlanmıştır. Süzöntüden hareketle değişen bilinen konsantrasyonlarda olopatadin HCl (10.0 – 90.0 µg/mL) standart çözeltiler hazırlanarak içerisine iç standart stok çözeltisi ilave edilerek gerekli hacme tamamlanmıştır. Hazırlanan bu standart çözeltiler, daha önceden dengeye getirilmiş kromatografik sisteme enjekte edilmiş ve elde edilen kromatogramlar kaydedilmiştir (her bir çözeltiden arka arkaya üçer enjeksiyon yapılmıştır) (Şekil 3.1.2.1.). Alınan bu tüm kromatogramlarda aynı integrasyon parametreleri kullanılarak hesaplanan pik alanı/iç standardın pik alanı oranları konsantrasyonlara karşı grafiğe geçirilerek doğru denklemleri hazırlanmıştır. İstatistiksel veriler Çizelge 3.1.2.1.'de gösterilmiştir.

2.6.2.1.4. Tekrar Edilebilirliğin Araştırılması (Güniçi ve Günlerarası Çalışmalar)

2.6.2.1.4.1. Güniçi Çalışmalar

Stok çözeltilerden hareketle, sadece olopatadin HCl içeren üç farklı konsantrasyonda çözelti hazırlanmıştır. Bu çözeltilerin; 0.(hazırlanır hazırlanmaz), ½., 1., 1.5., 2., 3., ve 4. saatlerde; daha önceden dengeye gelmiş sisteme enjekte edilmiş ve elde edilen kromatogramlar kaydedilmiştir (her bir çözeltilerden arka arkaya üçer enjeksiyon yapılmıştır). Elde edilen istatistiksel verileri Çizelge 3.1.2.2.'de verilmiştir.

2.6.2.1.4.2. Günlerarası Çalışmalar

Stok çözeltilerden hareketle, sadece olopatadin HCl içeren üç farklı konsantrasyonda çözelti hazırlanmıştır. Bu çözeltilerin; 0.(hazırlanır hazırlanmaz), 1., 2., 3., ve 4. günlerde; dengeye gelmiş sisteme enjekte edilmiş ve elde edilen kromatogramlar kaydedilmiştir (her bir çözeltilerden arka arkaya üçer enjeksiyon yapılmıştır). Elde edilen istatistiksel verileri Çizelge 3.1.2.3.'de verilmiştir.

2.6.2.1.5. % Geri Kazanım Çalışmaları

Çalışma grafiklerinin hazırlanması sonucu hesaplanan kalibrasyon denklemleri kullanılarak % geri kazanım değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 3.1.2.4.'de verilmiştir.

2.6.2.1.6. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması

1.11 mg/mL olopatadin HCl içeren steril oftalmik solüsyondan üç farklı set için 0.50 mL alınarak üzerine 1.0 mL kafein (10 mg / 50 mL ultra saf suda çözünmüş) ultra saf su ile 10 mL'ye tamamlanmıştır. Karışım Whatman 42

süzgeç kağıdından süzölmüştür. Daha sonra dengelenmiş sisteme enjekte edilmiş ve elde edilen kromatogramlar kaydedilmiştir (her bir çözeltiden arka arkaya üçer enjeksiyon yapılmıştır). Tüm kromatogramlarda aynı integrasyon parametreleri kullanılarak hesaplanan etken maddenin pik alanı/iç standart alanı oran sonuçları hesaplanmıştır. Hesaplanan bu değerler Çizelge 3.1.2.1.'de gösterilen çalışma grafiklerinin hazırlanması sonucu elde edilen doğru denklemlerinde yerine konularak steril oftalmik solüsyondaki olopatadin HCl miktarları hesaplanmıştır. Bulunan sonuçlar Çizelge 3.1.2.5.'te verilmiştir.

2.6.3. Voltametri

2.6.3.1. Deneyin Yapılışı

2.6.3.1.1. Çalışma Grafiklerinin Hazırlanması

Saf olopatadin HCl metanolde çözülerek 1.0×10^{-2} M'lık stok çözeltisi hazırlanmıştır. Voltametrik çalışmalarda destek elektroliti olarak 0.5 M H_2SO_4 , pH: 2.0 – 11.0 arasında kullanılabilen Britton-Robinson (BR) ve pH: 2.0 - 8.6 arasında kullanılabilen fosfat tamponları denenmiştir. Ortam şartları için en iyi destek elektroliti 0.5 M H_2SO_4 tespit edilmiştir. Stok olopatadin HCl çözeltisinden hareketle gerekli hacimler alınarak analitik olarak 14.96 – 374.00 $\mu g/mL$ konsantrasyon aralığında olopatadin HCl içerecek şekilde destek elektrolit çözeltisi ilavesiyle standart çözeltiler hazırlanmıştır. Hazırlanan bu çözeltiler kullanılarak dönüşümlü voltametri, diferansiyel puls voltametrisi ve kare dalga voltametri çalışmaları yapılmıştır.

2.6.3.1.2. Dönüşümlü Voltametri

Elektrokimyasal hücrelere deneyde kullanılacak çalışma elektrodu, referans elektrot ve karşı elektrot yerleştirilerek üçlü elektrot sistemi kurulmuştur. Dönüşümlü voltametri sonuçlarında akımları ve pik potansiyelleri sabit derişimde (37.40 $\mu g/mL$) ve çeşitli tarama hızlarında ölçülmüştür. Dönüşümlü voltametri deneylerinden elde edilen sonuçlar Şekil 3.1.3.1., 3.1.3.2. ve 3.1.3.3.'de verilmiştir.

2.6.3.1.3. Diferansiyel Puls Voltametri

14.96 – 374.00 $\mu g/mL$ konsantrasyon aralığında olopatadin HCl içeren standart çözeltiler kullanılarak aynı elektrokimyasal hücrede, daha önceden belirlenen potansiyel aralığında, 20 mV/s'lik tarama hızında ve 50 mV'luk

puls genliği değerinde voltamogramlar alınmıştır. Elde edilen voltamogramlardaki pik akımı ve pik potansiyelleri kaydedilmiştir. Pik akımının konsantrasyon ile ilişkisini belirlemek amacıyla, standart çözeltilerin pik akım değerleri konsantrasyonlara karşı grafiğe geçirilerek en küçük kareler yöntemi kullanılarak bilgisayar yardımıyla doğru denklemleri hesaplanmıştır. Elde edilen istatiksel verileri Çizelge 3.1.3.1.'de verilmiştir.

2.6.3.1.4. Kare Dalga Voltametri

14.96 – 374.00 µg/mL konsantrasyon aralığında olopatadin HCl içeren standart çözeltiler kullanılarak aynı elektrokimyasal hücrede, daha önceden belirlenen potansiyel aralığında, kare dalga voltametri tekniğinin en önemli parametresi olan frekansı 15 Hz değerinde, kare dalga genliğini 25 mV değerinde ve basamaklı adım yüksekliğini 4 mV değerinde sabit tutarak voltamogramlar alınmıştır. Elde edilen voltamogramlardaki pik akımı ve pik potansiyelleri kaydedilmiştir. Standart çözeltilerin pik akım değerleri konsantrasyonlara karşı grafiğe geçirilerek en küçük kareler yöntemi kullanılarak bilgisayar yardımıyla doğru denklemleri hesaplanmıştır. Elde edilen istatiksel verileri Çizelge 3.1.3.2.'de verilmiştir.

2.6.3.2. % Geri Kazanım Çalışmaları

Kalibrasyon grafiklerinin hazırlanması sonucu hesaplanan kalibrasyon denklemleri kullanılarak % geri kazanım değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 3.1.3.3'de diferansiyel puls voltametrideki ve Çizelge 3.1.3.4'de kare dalga voltametri deki sonuçlar verilmiştir.

2.6.3.3. Yöntemin Farmasötik Preparata Uygulanması

Diferansiyel pulse ve kare dalga voltametrik yöntemlerin farmasötik preparata uygulanması sonucunda elde edilen sonuçlar Çizelge 3.1.3.5’de verilmiştir.

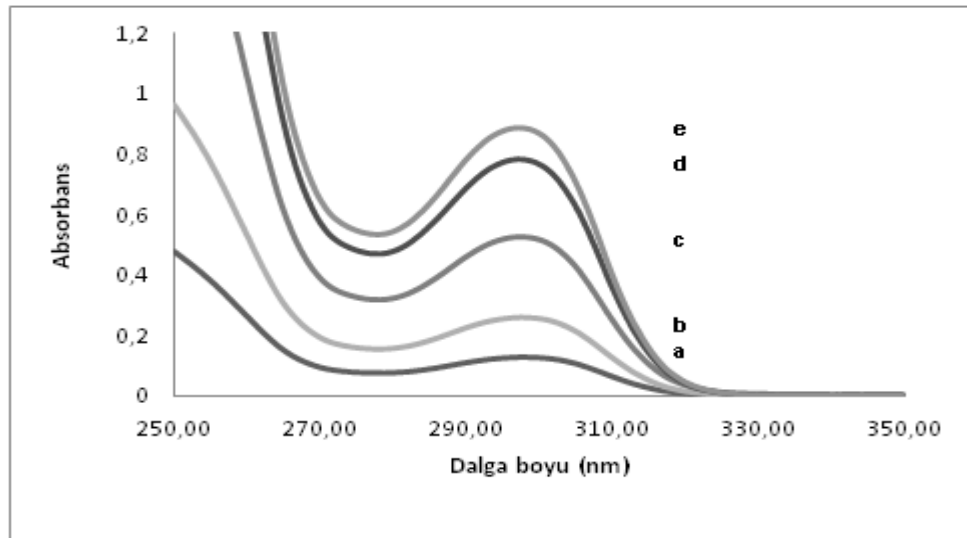
3. BULGULAR

3.1. Olopatadin HCl İçin Yöntemlerin Uygulanması ve Analiz Sonuçları

3.1.1. Spektrofotometri

3.1.1.1. Doğrudan UV Spektrofotometri

Şekil 3.1.1.1.'de değişen analitik konsantrasyon aralığında olopatadin HCl içeren UV spektrumları gösterilmiştir.



Şekil 3.1.1.1. Olopatadin HCl'ün ultra saf suda a) 20.0 µg/mL, b) 40.0 µg/mL, c) 80.0 µg/mL, d) 100.0 µg/mL ve e) 140.0 µg/mL'lık çözeltilerine ait doğrudan UV spektrumu

Olopatadin HCl'in yukarıdaki standart çözeltilerden elde edilen spektrumlarının maksimum absorpsiyon yaptığı 297.4 nm'deki absorbans sinyallerinin değişen konsantrasyonlara karşı grafiğe geçirilmesi ile elde edilen çalışma grafik verileri Çizelge 3.1.1.1.1.'de verilmiştir.

Yakalama sınırı ve tayin alt sınırları şu formüller ile hesaplanmıştır (Sarby ve ark., 2000);

$$\text{Yakalama Sınırı} = 3ss_n/m$$

$$\text{Tayin Alt Sınırı} = 10ss_n/m$$

Burada m, kalibrasyon denkleminin eğimi; ss_n , kesimin standart sapmasıdır.

Çizelge 3.1.1.1.1. Olopatadin HCl için doğrudan UV spektrofotometrik yöntem ile elde edilen çalışma grafik verileri (n=7)

λ (nm)	m	n	r	Çalışma Aralığı ($\mu\text{g/mL}$)	YS	TAS
297.4	0.0064	0.0052	0.9992	20.0 – 140.0	0.0811	0.271

λ : Dalga boyu

m : Çalışma grafiğinin eğimi

n : Çalışma grafiğinin y-eksenini kestiği nokta (kesim noktası)

r : Korelasyon katsayısı

YS : Yakalama sınırı

TAS : Tayin alt sınırı

Yöntemin kesinliğinin araştırılması için standart çözeltiden hareketle yapılan günüçi ve günlerarası çalışma bulguları Çizelge 3.1.1.1.2. ve 3.1.1.1.3.' de verilmiştir.

Çizelge 3.1.1.1.2. Doğrudan UV spektrofotometrik yöntemiyle yapılan olopatadin HCl için günüçi çalışma sonuçları (297.4 nm için).

Konulan Miktar ($\mu\text{g/mL}$)	Süre	Bulunan Miktar ($\mu\text{g/mL}$)	BH	SS	BSS
100.0	0.0 saat	101.35	0.013	0.055	0.054
	0.5 saat	101.41	0.014	0.022	0.022
	1.0 saat	101.47	0.014	0.044	0.043
	1.5 saat	101.57	0.015	0.011	0.011
	2.0 saat	101.66	0.016	0.011	0.011
	2.5 saat	101.77	0.017	0.000	0.000
	3.0 saat	101.83	0.018	0.000	0.000
	3.5 saat	101.85	0.018	0.011	0.011
	4.0 saat	101.97	0.019	0.000	0.000

BH : Bağıl hata

SS : Standart sapma

BSS : Bağıl standart sapma

Çizelge 3.1.1.1.3. Doğrudan UV spektrofotometrik yöntem ile elde edilen günler arası çalışmaların bulguları (n=3)
(297.4 nm için)

Konulan Miktar (µg/mL)	Süre	Bulunan Miktar (µg/mL)	BH	SS	BSS
100.0	0.0 saat	101.35	0.013	0.055	0.054
	0.5 saat	101.41	0.014	0.022	0.022
	1.0 saat	101.47	0.014	0.044	0.043
	1.5 saat	101.57	0.015	0.011	0.011
	2.0 saat	101.66	0.016	0.011	0.011
	2.5 saat	101.77	0.017	0.000	0.000
	3.0 saat	101.83	0.018	0.000	0.000
	3.5 saat	101.85	0.018	0.011	0.011
	4.0 saat	101.97	0.019	0.000	0.000

BH : Bağıl hata

SS : Standart sapma

BSS : Bağıl standart sapma

Yöntemin doğruluğunun belirlenmesi için % geri kazanım çalışma bulguları hesaplanmış ve elde edilen sonuçlar Çizelge 3.1.1.1.4.'de verilmiştir.

Çizelge 3.1.1.1.4. Doğrudan UV spektrofotometrik yöntemde % geri kazanım çalışmaları ile elde edilen analiz bulguları(n=6) (297.4 nm için)

Numune No	Konulan Konsantrasyon (µg/mL)	Bulunan Konsantrasyon (µg/mL)	Geri Kazanım (%)
1	40.0	39.78	99.5
2	60.0	60.08	100.1
3	80.0	80.86	101.1
4	100.0	100.95	101.0
5	120.0	121.34	101.1
6	140.0	137.80	98.4
X_{ort}			100.2
SS			1.095
BSS			1.093

BH : Bağıl hata

SS : Standart sapma

BSS : Bağıl standart sapma

Yöntem olopatadin HCl içeren farmasötik preparatlara uygulandığında elde edilen bulgular Çizelge 3.1.1.1.5. 'de özetlenmiştir.

Çizelge 3.1.1.1.5. Doğrudan UV spektrofotometrik yöntemin farmasötik preparata uygulanması sonucunda elde edilen sonuçlar (n=5) (Preparatın üzerinde yazılı olan miktar 1.11 mg/ mL; 297.4 nm)

Numune No	mg/mL
1	1.11
2	1.04
3	1.11
4	1.09
5	1.14
X_{ort}	1.09
SS	0.003
p: 0.05 için GA	1.09 ± 0.037

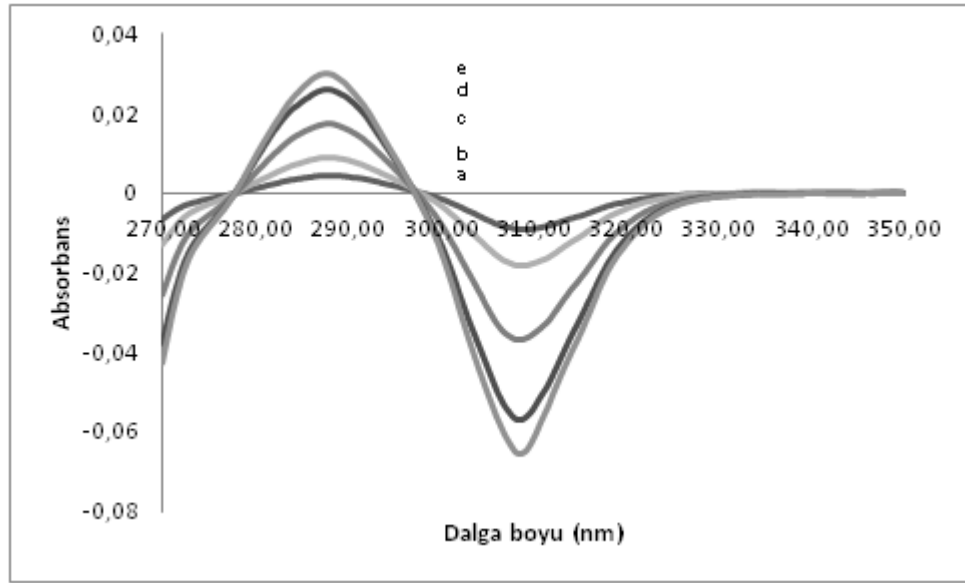
X_{ort} : 5 ölçüm sonucunda bulunan ortalama olopatadin HCl miktarı

SS : Standart sapma

p : 0.05 olasılık düzeyinde; Güven aralığı: $(X_{ort} \pm (t \cdot SS) / \sqrt{n})$;
t: tablodaki teorik t değeri; n: deney sayısı)

3.1.1.2. Birinci Türev UV Spektrofotometri

Olopatadin HCl içeren farmasötik preparattan tezimize konu olan etken maddenin birinci türev spektrofotometri ile miktar tayini için doğrudan UV spektrofotometrik yöntem sonucunda elde edilen orjinal spektrumların bilgisayar kullanılarak birinci türev eğrileri hesaplatılmıştır. Olopatadin HCl bilinen konsantrasyonlarına ait birinci türev UV spektrumları Şekil 3.1.1.2.'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1.1.2. Olopatadin HCl'ün ultra saf suda a) 20.0 µg/mL, b) 40.0 µg/mL, c) 80.0 µg/mL, d) 100.0 µg/mL ve e) 140.0 µg/mL'lık çözeltilerine ait birinci türev UV spektrumu

Şekil 3.1.1.2. incelendiğinde görüldüğü gibi etken maddenin birinci türev eğrilerinin 288.8 nm bir maksimum ve 308.4 nm de ise bir minimum nokta bulunmaktadır. Bu dalga boyları kullanılarak etken maddenin miktar tayini yapıla bilinmektedir. Türev eğrilerindeki 288.8 ve 308.4 nm'lerdeki türev absorbans sinyallerinin, bilinen etken madde konsantrasyonlarına karşı grafiğe geçirilmesi ile elde edilen çalışma grafik verileri Çizelge 3.1.1.2.1.'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1.1.2.1. Olopatadin HCl için birinci türev UV spektrofotometrik yöntemi ile elde edilen çalışma grafik verileri (n=7)

λ (nm)	m	n	r	Çalışma Aralığı ($\mu\text{g/mL}$)	YS	TAS
288.8	0.0002	0.00007	0.9996	20.0 – 140.0	0.346	1.155
308.4	0.0005	-0.0003	0.9997	20.0 – 140.0	0.600	2.000

λ : Dalga boyu

m : Çalışma grafiğinin eğimi

n : Çalışma grafiğinin y-eksenini kestiği nokta (kesim noktası)

r : Korelasyon katsayısı

YS : Yakalama sınırı

TAS : Tayin alt sınırı

Yöntemin kesinliğinin araştırılması için standart çözeltiden hareketle yapılan günüçi ve günlerarası çalışma bulguları Çizelge 3.1.1.2.2, 3.1.1.2.3, 3.1.1.2.4, ve 3.1.1.2.5.' de verilmiştir.

Çizelge 3.1.1.2.2. Birinci Türev UV spektrofotometrik yöntem kullanılarak yapılan olopatadin HCl için günüçi çalışma bulguları (288.8 nm için)

Konulan Miktar (µg/mL)	Süre	Bulunan Miktar (µg/mL)	BH	SS	BSS
100.0	0.0 saat	101.33	0.003	1.987	1.980
	0.5 saat	99.53	0.005	2.079	2.089
	1.0 saat	99.94	0.001	1.612	1.613
	1.5 dak.	100.57	0.006	1.655	1.645
	2.0 saat	99.40	0.006	0.000	0.000
	2.5 saat	100.09	0.001	1.683	1.681
	3.0 saat	100.58	0.006	0.997	0.991
	3.5 saat	99.88	0.001	1.987	1.989
	4.0 saat	101.04	0.010	0.99	0.980

BH : Bağlı hata

SS : Standart sapma

BSS : Bağlı standart sapma

Çizelge 3.1.1.2.3. Birinci Türev UV spektrofotometrik yöntem kullanılarak yapılan olopatadin HCl için günüçi çalışma bulguları (308.4 nm için)

Konulan Miktar (µg/mL)	Süre	Bulunan Miktar (µg/mL)	BH	SS	BSS
100.0	0.0 saat	100.30	0.003	0.151	0.150
	0.5 saat	100.7	0.007	0.130	0.129
	1.0 saat	101.14	0.011	0.148	0.147
	1.5 dak.	100.30	0.003	0.447	0.445
	2.0 saat	101.15	0.011	0.449	0.444
	2.5 saat	101.46	0.014	0.600	0.591
	3.0 saat	101.36	0.013	0.449	0.443
	3.5 saat	101.04	0.010	0.006	0.006
	4.0 saat	101.36	0.013	0.748	0.738

BH : Bağıl hata

SS : Standart sapma

BSS : Bağıl standart sapma

Çizelge 3.1.1.2.4. Birinci türev UV spektrofotometrik yöntem ile elde edilen günlerarası çalışmaların bulguları (n=3) (288.8 nm için)

SÜRE (Gün)	Konulan Miktar (µg/mL)	Bulunan Miktar (µg/mL)	BH	SS	BSS
1.	40.0	39.31	0.018	0.072	1.821
	80.0	79.57	0.005	0.539	0.678
	120.0	118.90	0.009	1.892	1.591
2.	40.0	39.47	0.013	0.469	1.188
	80.0	80.98	0.012	0.974	1.203
	120.0	119.68	0.027	1.351	1.130
3.	40.0	39.31	0.017	0.542	1.378
	80.0	80.67	0.008	0.469	0.582
	120.0	118.75	0.898	0.716	0.603
4.	40.0	38.69	0.034	0.270	0.697
	80.0	79.42	0.007	0.975	1.227
	120.0	117.50	0.021	0.714	0.608

BH : Bağıl hata

SS : Standart sapma

BSS : Bağıl standart sapma

Çizelge 3.1.1.2.5. Birinci türev UV spektrofotometrik yöntem ile elde edilen günlerarası çalışmaların bulguları (n=3) (308.4 nm için)

SÜRE (Gün)	Konulan Miktar (µg/mL)	Bulunan Miktar (µg/mL)	BH	SS	BSS
1.	40.0	39.61	0.010	0.888	2.241
	80.0	78.92	0.686	0.870	0.014
	120.0	121.55	0.224	0.184	0.520
2.	40.0	40.10	0.863	1.152	0.003
	80.0	79.56	0.431	0.542	0.006
	120.0	121.53	0.013	0.367	0.302
3.	40.0	39.73	0.007	0.734	1.847
	80.0	79.12	0.011	0.237	0.300
	120.0	121.83	0.015	0.265	0.322
4.	40.0	39.18	0.021	0.130	0.331
	80.0	79.42	0.007	0.496	0.625
	120.0	120.83	0.007	0.130	0.107

BH : Bağıl hata

SS : Standart sapma

BSS : Bağıl standart sapma

Yöntemin doğruluğunun belirlenmesi için % geri kazanım çalışma bulguları hesaplanmış ve elde edilen sonuçlar Çizelge 3.1.1.2.6. ve 3.1.1.2.7.'de verilmiştir.

Çizelge 3.1.1.2.6. Birinci türev UV spektrofotometrik yöntemde % geri kazanım çalışmaları ile elde edilen analiz bulguları(n=6) (288.8 nm için)

Numune No	Konulan Konsantrasyon (µg/mL)	Bulunan Konsantrasyon (µg/mL)	Geri Kazanım (%)
1	40.0	39.47	99.5
2	60.0	59.13	100.1
3	80.0	81.13	101.1
4	100.0	99.86	101.0
5	120.0	121.40	101.1
6	140.0	137.78	98.4
X_{ort}			100.2
SS			1.098
BSS			1.085

BH : Bağıl hata

SS : Standart sapma

BSS : Bağıl standart sapma

Çizelge 3.1.1.2.7. Birinci türev UV spektrofotometrik yöntemde % geri kazanım çalışmaları ile elde edilen analiz bulguları(n=6) (308.4 nm için)

Numune No	Konulan Konsantrasyon (µg/mL)	Bulunan Konsantrasyon (µg/mL)	Geri Kazanım (%)
1	40.0	40.16	100.4
2	60.0	59.61	99.4
3	80.0	79.48	99.4
4	100.0	100.83	100.8
5	120.0	122.81	102.3
6	140.0	137.82	98.5
X_{ort}			100.1
SS			1.380
BSS			1.905

BH : Bağıl hata

SS : Standart sapma

BSS : Bağıl standart sapma

Yöntem olopatadin HCl içeren farmasötik preparatlara uygulandığında elde edilen bulgular Çizelge 3.1.1.2.8. 'de özetlenmiştir.

Çizelge 3.1.1.2.8. Birinci türev UV spektrofotometrik yöntemin farmasötik preparata uygulanması sonucunda elde edilen sonuçlar (n=5) (Preparatın üzerinde yazılıolan miktar 1.11 mg/ mL)

Numune No	288.8 nm	308.0 nm
1	1.15	1.11
2	1.11	1.12
3	1.12	1.12
4	1.11	1.13
5	1.12	1.13
X_{ort}	1.12	1.12
SS	0.016	0.008
p: 0.05 için GA	1.12 ± 0.020	1.12 ± 0.010

X_{ort} : 5 ölçüm sonucunda bulunan ortalama olopatadin HCl miktarı

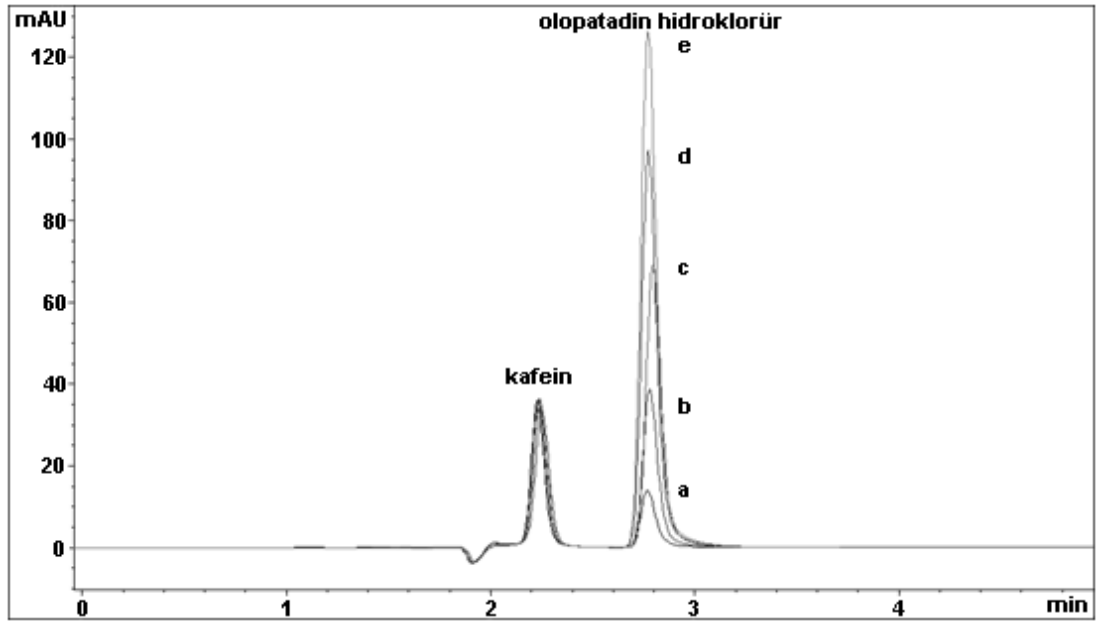
SS : Standart sapma

p : 0.05 olasılık düzeyinde; Güven aralığı: $(X_{ort} \mp (t \cdot SS)/\sqrt{n})$;

t: tablodaki teorik t değeri; n: deney sayısı)

3.1.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi

Stok olopatadin HCl çözeltisi kullanılarak hazırlanan konsantrasyonları bilinen olopatadin HCl ve iç standart olarak kullanılan kafein çözeltisini birlikte içeren karışımlar kullanılarak alınan kromatogram Şekil 3.1.2.1. gösterilmiştir.



Şekil 3.1.2.1. Olopatadin HCl a) 10.0 µg/mL, b) 30.0 µg/mL, c) 50.0 µg/mL, d) 70.0 µg/mL, ve e) 90.0 µg/mL ve 20.0 µg/mL kafein çözeltisine ait kromatogramlar

DAD dedektör kullanılarak 255.0 nm dalga boyunda kaydedilen kromatogramlarda olopatadin HCl' e ait pik alanları kafein' e ait pik alanlarına bölünmüş istatiksel olarak çalışma grafikleri çizdirilerek doğru denklem verileri Çizelge 3.1.2.1.' de verilmiştir.

Çizelge 3.1.2.1. Olopatadin HCl için yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntem ile elde edilen çalışma grafik verileri (n=12)

m	n	r	Çalışma Aralığı (µg/mL)	YS (µg/mL)	TAS (µg/mL)
0.0417	0.0624	0.998	10.0 – 80.0	0.173	0.577

m : Çalışma grafiğinin eğimi

n : Çalışma grafiğinin y-eksenini kestiği nokta (kesim noktası)

r : Korelasyon katsayısı

YS : Yakalama sınırı

TAS : Tayin alt sınırı

Yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntem için kesinliğin araştırılması için yapılan günüçi ve günlerarası çalışmaların sonuçları Çizelge 3.1.2.2. ve 3.1.2.3.' de verilmiştir.

Çizelge 3.1.2.2. Yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntem kullanılarak yapılan olopatadin HCl için günüçi çalışma bulguları

Konulan Miktar (µg/mL)	Süre	Bulunan Miktar (µg/mL)	BH	SS	BSS
40.0	0.0 saat	37.70	0.061	0.694	0.262
	0.5 saat	38.69	0.034	0.905	1.339
	1.0 saat	38.06	0.051	0.255	0.669
	1.5 dak.	36.87	0.085	0.276	0.748
	2.0 saat	37.08	0.079	0.290	0.782
	2.5 saat	38.34	0.043	0.057	0.148
	3.0 saat	37.54	0.065	0.106	0.283
	3.5 saat	38.18	0.048	1.054	2.060
	4.0 saat	37.84	0.057	0.544	1.439

BH : Bağıl hata

SS : Standart sapma

BSS : Bağıl standart sapma

Çizelge 3.1.2.3. Yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntem kullanılarak yapılan olopatadin HCl için günler arası çalışma bulguları

SÜRE (Gün)	Konulan Miktar (µg/mL)	Bulunan Miktar (µg/mL)	BH	SS	BSS
1.	10.0	10.21	0.021	0.014	0.139
	20.0	18.37	0.089	0.021	0.116
	60.0	58.02	0.034	0.587	1.011
2.	10.0	10.09	0.008	0.021	0.210
	20.0	19.06	0.049	0.035	0.186
	60.0	57.23	0.048	0.254	0.445
3.	10.0	10.06	0.005	0.021	0.211
	20.0	19.35	0.034	0.064	0.328
	60.0	57.64	0.041	0.445	0.772
4.	10.0	10.96	0.087	0.014	0.129
	20.0	20.17	0.008	1.125	2.117
	60.0	58.51	0.025	0.615	1.051

BH : Bağıl hata

SS : Standart sapma

BSS : Bağıl standart sapma

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografik yöntemin doğruluğunun belirlenmesi için hazırlanan çözeltilerden hareketle yapılan % geri kazanım çalışmaları sonuçları Çizelge 3.1.2.4. ' de verilmiştir.

Çizelge 3.1.2.4. Yüksek performanslı sıvı kromatografi yöntemde % geri kazanım çalışmaları ile elde edilen analiz bulguları (n=6) (255.0 nm için)

Numune No	Konulan Konsantrasyon (µg/mL)	Bulunan Konsantrasyon (µg/mL)	Geri Kazanım (%)
1	30.0	29.30	97.7
2	40.0	40.20	100.5
3	45.0	45.25	100.6
4	50.0	49.78	99.7
5	60.0	59.72	99.5
6	70.0	70.10	100.1
X_{ort}			99.7
SS			1.063
BSS			1.066

Yöntem olopatadin HCl içeren farmasötik preparatlara uygulandığında elde edilen bulgular Çizelge 3.1.2.5. 'de özetlenmiştir.

Çizelge 3.1.2.5. Yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntemin farmasötik preparata uygulanması sonucunda elde edilen sonuçlar (n=5) (Preparatın üzerinde yazılı olan miktar 1.11 mg/mL)

Numune No	mg/mL
1	1.10
2	1.18
3	1.20
4	1.10
5	1.09
$\bar{X}_{ort}$	1.13
SS	0.053
p: 0.05 için GA	1.13 ± 0.065

$\bar{X}_{ort}$: 5 ölçüm sonucunda bulunan ortalama olopatadin HCl miktarı

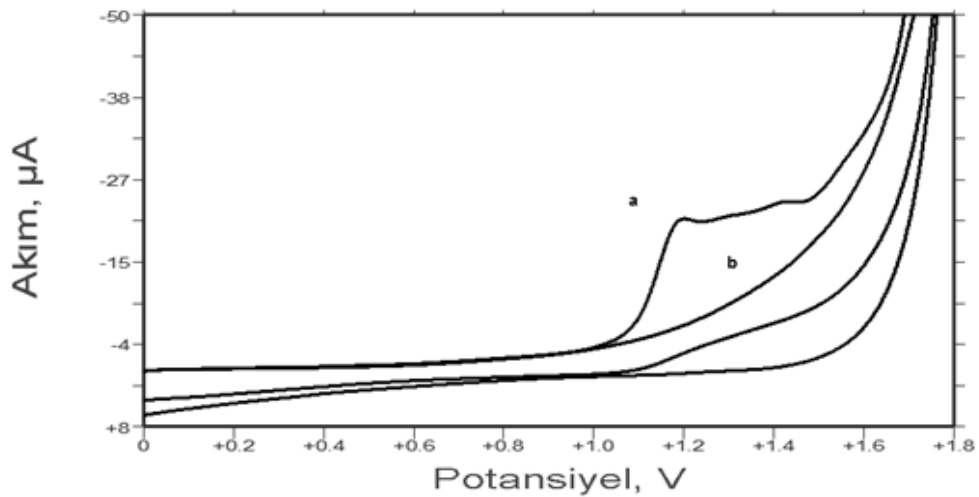
SS : Standart sapma

p : 0.05 olasılık düzeyinde; Güven aralığı: $(\bar{X}_{ort} \mp (t \cdot SS)/\sqrt{n})$; t: tablodaki teorik t değeri; n: deney sayısı)

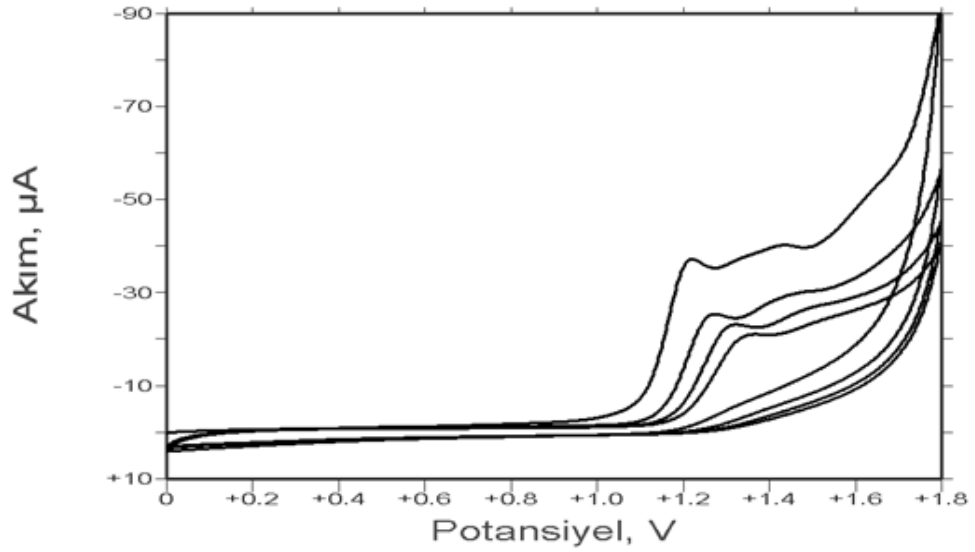
3.1.3. Voltametri

3.1.3.1 Dönüşümlü Voltametri

Dönüşümlü voltametri yöntemi kullanılarak olopatadin HCl'in 0.5 M H_2SO_4 , pH: 2.0 – 11.0 arasında kullanılabilen Britton-Robinson (BR) ve pH: 2.0 – 8.6 arasındaki fosfat tamponları içeren destek elektroliti içerisinde camı karbon elektrot kullanılarak pH taramaları ve hız tarama çalışmaları yapılmıştır. Analitik açıdan uygun olan destek elektrolitinin 0.5 M H_2SO_4 olduğuna karar verilmiştir. Şekil 3.1.3.1.' de 37.40 $\mu g/mL$ olopatadin HCl içeren standart çözelti ve destek elektrolit çözeltisinin camı karbon elektrot , 50.0 mV/s tarama hızında alınan dönüşümlü voltamogramı çizdirilmiştir. Dönüş taramasında pik gözlenmediği için olopatadin HCl'ün oksidasyonu tersinmez reaksiyona sahiptir. Şekil 3.1.3.2 'de ise dönüşümlü voltametri'de yapılan tekrarlı voltamogramda 1201 mV'da görülen anodik oksidasyon pikinin akım değerinin sayı artıka azaldığı görülmektedir. Pik akımının azalışı olopatadin HCl'ün elektrot yüzeyinde adsorpsiyonunu yada oksidasyon ürünün elektrot yüzeyinde elektroaktif olmadığını göstermektedir.

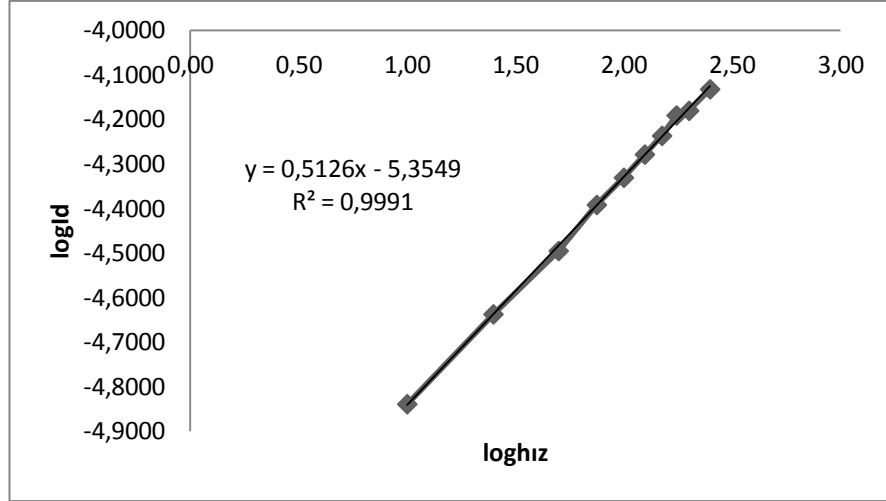


Şekil 3.1.3.1. Olopatadin HCl'ün H_2SO_4 destek elektrolitli ortamında a) 37.40 $\mu g/mL$ konsantrasyonu ve b) destek elektrolit (0.5 M H_2SO_4) voltamogramları, tarama hızı 50 mV/sn.



Şekil 3.1.3.2. Dönüşümlü voltametrde 0.5 M H_2SO_4 destek elektrolit içerisinde 37.40 $\mu g/mL$ olopatadin HCl içeren çözeltinin camı karbon elektrottaki voltamogramı, tarama hızı 50 mV/sn.

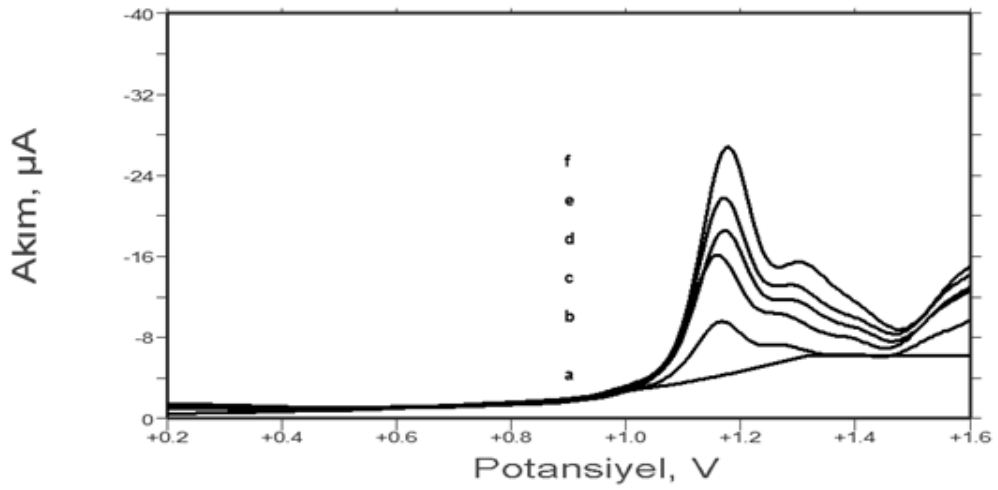
Dönüşümlü voltametrde gözlenen anodik pikin akımın logaritmik değerleri ile 10.0 - 300.0 mV/s tarama hızı arasında doğrusal bir ilişki bulunmaktadır (Şekil 3.1.3.3.). Logaritma akım değerlerinin logaritma tarama hızlarına karşı grafiğe geçirilmesi ile doğru elde edilmektedir ve bu doğrunun eğim değeri 0.512 olup r : 0.9991 olarak hesaplanmıştır. Eğim değerinin 0.512 olması oksidasyon olayının tamamen difüzyon kontrolün olduğunu ispatlamaktadır (Greef ve ark., 1990). Tarama hızı arttıkça anodik pik akımı daha pozitif olmaktadır ve reaksiyonun tersinmez olduğunu göstermektedir.



Şekil 3.1.3.3. 37.40 µg/mL olopatadin HCl'ün camısı karbon elektrot kullanılarak dönüşümlü voltametrik uygulamadaki log I_a 'nın log v ' a karşı grafiği

3.1.3.2. Diferansiyel Puls Voltametri

Diferansiyel Puls Voltametrik yöntem kullanılarak olopatadin HCl'in 0.5 M H_2SO_4 , pH: 2.0 – 11.0 arasında kullanılabilen Britton-Robinson (BR) ve pH: 2.0 – 8.6 arasındaki fosfat tamponları içeren destek elektroliti içerisinde camısı karbon elektrot kullanılarak voltamogramları alınmıştır. Analitik çalışmalar için uygun pikin varlığı 0.5 M H_2SO_4 destek elektrolitli ortamda farklı konsantrasyonlarda olopatadin HCl içeren standart çözeltiler ve 0.5 M H_2SO_4 destek elektrolitin camısı karbon elektrot ve 20 mV/s tarama hızında alınan diferansiyel puls voltamogramları çizdirilmiştir (Şekil 3.1.3.4.). Elde edilen voltamogramların incelenmesi sonucu +1160 mV'da anadok pik belirlenmiştir. Bu potansiyelde okunan akım değerleri konsantrasyonlara karşı grafiğe geçirilmesi ile çalışma grafikleri çizdirilmiş ve doğru denklemi elde edilmiştir ve verileri Çizelge 3.1.3.1' de özetlenmiştir.



Şekil 3.1.3.4. Olopatadin HCl'ün H_2SO_4 destek elektrolitli ortamında camı karbon elektrot kullanılarak **a)** destek elektrolit, **b)** 14.96 $\mu g/mL$, **c)** 37.40 $\mu g/mL$, **d)** 149.60 $\mu g/mL$, **e)** 224.40 $\mu g/mL$, **f)** 374.0 $\mu g/mL$ konsantrasyonlarındaki diferansiyel puls voltamogramları (Tarama hızı: 20.0 mV/s; pulse genliği: 50.0 mV; pulse genişliği, 50.0 ms.)

Çizelge 3.1.3.1. Olopatadin HCl'ün H_2SO_4 destek elektroliti ve camı karbon elektrot kullanılarak yapılan Diferansiyel puls voltametri ile elde edilen kalibrasyon verileri

m	n	R	Çalışma Aralığı ($\mu g/mL$)	YS ($\mu g/mL$)	TAS ($\mu g/mL$)
7.0×10^{-8}	4.0×10^{-8}	0.996	14.96 — 374.00	1.51	4.61

m : Çalışma grafiğinin eğimi

n : Çalışma grafiğinin y-eksenini kestiği nokta (kesim noktası)

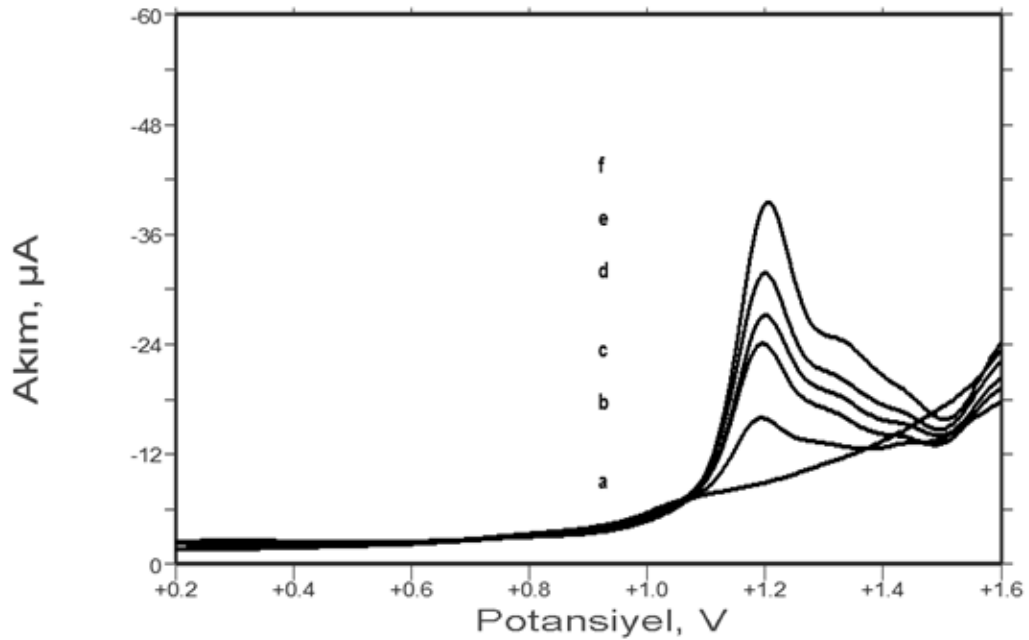
r : Korelasyon katsayısı

YS : Yakalama sınırı

TAS : Tayin alt sınırı

3.1.3.3. Kare Dalga Voltametri

Şekil 3.1.3.5.' de olopatadin HCl'ün H_2SO_4 destek elektrolit ortamındaki destek elektrolitli ve farklı konsantrasyonlarda olopatadin HCl içeren camsı karbon elektrot kullanılarak kare dalga voltametri'de frekansı 15 Hz değerinde, kare dalga genliğini 25 mV değerinde ve basamaklı adım yüksekliğini 4 mV değerinde sabit tutularak voltamogramları çizdirilmiştir. Elde edilen kalibrasyon verileri Çizelge 3.1.3.2.' de verilmiştir.



Şekil 3.1.3.5. Olopatadin HCl'ün H_2SO_4 destek elektrolitli ortamında camsı karbon elektrot kullanılarak **a)** destek elektrolit, **b)** 14.96 $\mu\text{g/mL}$, **c)** 37.40 $\mu\text{g/mL}$, **d)** 149.60 $\mu\text{g/mL}$, **e)** 224.40 $\mu\text{g/mL}$, **f)** 374.00 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarındaki kare dalga voltamogramları (frekans: 15 Hz, kare dalga genliği: 25 mV)

Çizelge 3.1.3.2. Olopatadin HCl'ün H₂SO₄ destek elektroliti kullanılarak Kare Dalga Voltametri ile elde edilen kalibrasyon verileri

m	n	R	Çalışma Aralığı (µg/mL)	YS (µg/mL)	TAS (µg/mL)
9.0x10 ⁻⁸	1.0x10 ⁻⁸	0.9940	14.96 – 374.00	1.67	5.51

m : Çalışma grafiğinin eğimi

n : Çalışma grafiğinin y-eksenini kestiği nokta (kesim noktası)

r : Korelasyon katsayısı

YS : Yakalama sınırı

TAS : Tayin alt sınırı

3.1.3.4. Geri Kazanım Çalışmaları

Yöntemin doğruluğunun belirlenmesi için % geri kazanım deneyleri sonuçları hesaplanmış ve elde edilen sonuçlar Çizelge 3.1.3.3. ve 3.1.3.4.'da verilmiştir.

Çizelge 3.1.3.3. Diferansiyel pulse voltametri'de % geri kazanım değerleri ile elde edilen analiz sonuçları

Numune No	Konulan Miktar ($\mu\text{g/mL}$)	Bulunan Miktar ($\mu\text{g/mL}$)	Geri Kazanım (%)
1	37.4	35.31	96.4
2	187.0	181.29	97.9
3	224.4	217.14	98.8
4	299.2	293.14	98.0
5	374.0	364.00	97.3
X_{ort}			97.7
SS			0.89
BSS			0.91

Çizelge 3.1.3.4. Kare dalga voltametri 'de % geri kazanım değerleri ile elde edilen analiz sonuçları

Numune No	Konulan Miktar ($\mu\text{g/mL}$)	Bulunan Miktar ($\mu\text{g/mL}$)	Geri Kazanım (%)
1	74.8	74.48	99.6
2	187.0	186.33	99.6
3	224.4	229.89	102.4
4	299.2	301.44	100.7
5	374.0	374.89	100.2
X_{ort}			100.5
SS			1.17
BSS			1.17

3.1.3.5. Yöntemin Farmasötik Preparata Uygulanması

Çizelge 3.1.3.5.'de yöntemin farmasötik preparata uygulanması sonucunda elde edilen sonuçlar verilmiştir.

Çizelge 3.1.3.5. Diferansiyel pulse ve kare dalga voltametik yöntemlerin farmasötik preparata uygulanması sonucunda elde edilen sonuçlar (n=5) (Preparatın üzerinde yazılı olan miktar 1.11 mg/mL)

Numune No	Diferansiyel Puls Vol. mg/mL	Kare Dalga Vol. mg/mL
1	1.09	1.08
2	1.02	1.09
3	1.03	1.12
4	1.10	1.07
5	1.16	1.10
X_{ort}	1.08	1.09
SS	0.06	0.02
p: 0.05 için GA	1.08 ± 0.074	1.09 ± 0.025

X_{ort} : 5 ölçüm sonucunda bulunan ortalama olopatadin HCl miktarı

SS : Standart sapma

p : 0.05 olasılık düzeyinde; Güven aralığı: $(X_{ort} \mp (t \cdot SS)/\sqrt{n})$; t: tablodaki teorik t değeri; n: deney sayısı)

4. TARTIŞMA

Yüksek lisans tezi kapsamında konjonktivit tedavisinde kullanılan olopatadin HCl içeren farmasötik preparatlar üzerinde rutin kullanıma uygun kantitatif analiz yöntemleri geliştirmeyi amaçladık. Bu amaç çerçevesinde spektrofotometri, yüksek performanslı sıvı kromatografik ve voltametrik yöntemler geliştirilmiştir. Tez çalışmalarına başlamadan önce yaptığımız kaynak taraması sırasında olopatadin HCl içeren farmasötik preparatlarda etken madde tayinine ait çalışmalar incelenmiştir.

Olopatadin HCl etken maddesi Alcon Laboratuvarları TIC. A.Ş.'den spesifikasyon belgeleri ile birlikte tedarik edilmiştir. Firmadan temin edilen bu etken maddenin öncelikle en uygun çözündüğü ortam belirlenmiş ve Infrared spektrumu alınmıştır. Etken maddenin hem metanol hem de ultra saf suda kolay çözündüğü belirlenmiştir. Bu nedenle spektrofotometrik ve yüksek performanslı sıvı kromatografik çalışmalar için ortam ultra saf su voltametrik çalışmalar için ise metanol seçilmiştir.

Tez kapsamında amacımıza yönelik ilk olarak olopatadin HCl adlı etken maddeyi içeren farmasötik preparatlarda etken madde miktar tayini için doğrudan UV yöntemi kullanılmıştır. Olopatadin HCl'ün ultra saf suda hazırlanan çözeltilerinin UV bölge olan 250.0 - 350.0 nm 'ler arasında alınan UV spektrumları incelenmiş (Şekil 3.1.1.1.) ve analitik çalışma aralığı ise 20.0 - 140.0 µg/mL olarak belirlenmiştir. UV spektrumlar incelendiğinde maksimum absorpsiyonun olduğu dalga boyu 297.4 nm olarak kaydedilmiştir. Stok olopatadin HCl çözeltisi kullanılarak hazırlanan standart çözeltilerinin konsantrasyon değerlerine karşı okunan maksimum absorbans değerleri x-y kalibrasyon gafiğine yerleştirilmiştir. Bu çalışma grafiklerinden yararlanılarak kalibrasyon denklemleri elde edilmiştir (Çizelge 3.1.1.1.1). 297.4 nm için hesaplanan yakalama sınırı 0.0811 µg/mL ve tayin alt sınırının 0.271 µg/mL olup kalibrasyon denklemlerinden elde edilen korelasyon katsayılarının da 1'e yakın olması geliştirilen yöntemin duyarlı olduğunu göstermektedir.

Yöntemin kesinliğinin belirlenmesi için gün içi ve günler arası çalışmalar yapılmış olup sonuçlar Çizelge 3.1.1.1.2. ve 3.1.1.1.3.'de verilmiştir. Tez kapsamında olopatadin HCl içeren preparatlarda etken madde miktar tayini için geliştirdiğimiz yöntemin % geri kazanım çalışması kapsamında ortalama % geri kazanım değeri % 100.2 standart sapma değeri ise 1.095 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 3.1.1.1.4.).

Çizelge 4.1. Olopatadin HCl için kullanılan yöntemlerin sonuçları

	Doğrudan UV Spekt.	Birinci Türev UV Spekt.	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi	Dönüşümlü ve Kare Dalga Voltametri
Çalışılan Dalga Boy (nm)	297.4	288.8 ve 308.4	255.0	—
Çalışma Denklemi ($y=mx+n$)	$y=0.0064x+0.0052$	$y=0.0002x+0.00007$ ve $y=0.0005x-0.0003$	$y=0.0417x+0.0624$	$y=7.0 \times 10^{-8}x+4.0 \times 10^{-8}$ ve $y=9.0 \times 10^{-8}x+1.0 \times 10^{-8}$
Çalışma Aralığı ($\mu\text{g/mL}$)	20.0 – 140.0	20.0 – 140.0	10.0 – 80.0	14.96 – 374.00
Yakalama Sınırı ($\mu\text{g/mL}$)	0.0811	0.346 ve 0.600	0.173	0.63 ve 0.47
Tayin Alt Sınırı ($\mu\text{g/mL}$)	0.271	1.155 ve 2.000	0.577	2.09 ve 1.57
%Geri Kazanım	100.2	100.2 ve 100.1	99.7	97.7 ve 100.5
R değeri	0.9992	0.9996 ve 0.9997	0.998	0.9960 ve 0.9940
Preparat ortalama (mg/mL)	1.09 ± 0.037	1.12 ± 0.020 ve 1.12 ± 0.020	1.13 ± 0.065	1.08 ± 0.065 Ve 1.02 ± 0.065

Bu tez kapsamında önerilen diğer yöntem ise birinci türev UV spektrofotometrik tekniktir. Standart olopatadin HCl çözeltileri kullanılarak elde edilen UV spektrumlarının bilgisayarlar yardımıyla birinci, ikinci, üçüncü ve dördüncü türev eğrileri çizdirilmiş analitik çalışma için birinci türev eğrilerinin kullanılmasının uygun olduğu saptanmıştır. Elde edilen birinci türev spektrumlarında 288.8 ve 308.4 nm'lerdeki türev absorbans ($dA/d\lambda$) değerleri standart olopatadin HCl konsantrasyonlarına karşı grafiğe geçirilerek kalibrasyon grafikleri elde edilmiş veriler kullanılarak kalibrasyon denklemleri elde edilmiştir. Elde edilen kalibrasyon denklem değerleri Çizelge 3.1.1.2.1. özetlenmiştir. Çizelge 3.1.1.2.1.'de görüldüğü gibi, yöntemde çalışma aralığı 20.0 – 140.0 $\mu\text{g/mL}$ olarak tespit edilmiştir. Çizelge 3.1.1.2.1. incelendiğinde hesaplanan yakalama sınırları ve tayin alt sınırları göz önüne alındığında kalibrasyon denklem verilerinden elde edilen korelasyon katsayısının 1'den küçük olması önerilen yöntemin duyarlı olduğunu göstermektedir. Yöntemde hesaplanan geri kazanım verileri incelendiğinde ortalama standart sapma değeri 288.8 nm için 1.098 ve 308.4 nm için 1.380 olarak belirlenmiştir.

Olopatadin HCl içeren preparatlarda etken madde tayini için önerilen üçüncü yöntem ise yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntemdir. Ortam koşullarının belirlenmesinde herhangi bir referans kaynaktan yararlanılmamıştır. Tamamıyla tarafımızdan geliştirilmiş olan orijinal bir yöntemdir.

C₁₈ kolonda asetronitril, metanol ve sudan oluşan hareketli faz kullanılarak, gradiyent ayırım yapılmasına karar verilmiştir. 220.0 - 255.0 nm aralıklarındaki dalga boylarında yapılan denemelerde etken maddelerin en iyi sonuç verdiği dalga boyu 255.0 nm olarak bulunmuştur. Bu dalga boyunda çalışılmaya karar verilmiştir. Asetronitril, metanol ve su değişik oranlarda karıştırılarak farklı hareketli fazlarda etken maddenin kromatogramları incelenmiş ve en uygun hareketli faz oranının asetronitril:metanol:su (10:60:30, h/h/h) olduğuna karar verilmiştir.

Hazırlanan bu hareketli faz, kolon sıcaklığı 20 - 50°C arasında değiştirilerek farklı sıcaklıklarda denenmiş ve; en uygun sıcaklığın 25°C ve hareketli faz kolondan farklı akış hızlarında geçirilmiş ve en uygun akış hızının 0.75 mL/dk. olduğuna karar verilmiştir. İç standart olarak çalışmalarımızda pseudoefedrin, losartan, hidroklorotiazit, bisoprolol fumarat, indapamid vb çeşitli etken maddeler kullanılmış olup kafein seçilmiştir. İç standart olarak, kafein'in ultra saf su içerisinde çözülerek hazırlanam çözeltisi kullanılmıştır. Bu çözelti çalışmaya başlanmadan önce Whatman 42 süzgeç kağıdı yardımıyla süzölmüştür.

Kromatografik şartların ayarlanması için yapılan çalışmalar kapsamında sabit faz olarak C₁₈ ve C₈ kolonları kullanılarak ön deneme çalışmaları yapılmıştır. Çalışma şartları için en uygun olan sabit fazın C₁₈ olduğuna karar verilmiştir.

Olopatadin HCl için çalışma aralığı 10.0 – 80.0 µg/mL olarak bulunmuştur. Belirlenen dalga boyunda alınan kromatogramlar kullanılarak etken madde pik alanı/iç standart pik alanı oranlarından korelasyon katsayılarının 1'e yakın olması, önerilen yöntemin doğrusal olduğunu göstermektedir. Yöntem için hesaplanan geri kazanım sonuçları incelendiğinde 255.0 nm'de için ortalama % 99.7 ve standart sapma değeri ise 1.063 olarak bulunmuştur. Yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntem için yakalama sınırı 0.173 µg/mL, tayin alt sınırı ise 0.577 µg/mL 'dir. Gerek yakalama sınırı gerek tayin alt sınırı değerlerinin düşük olması; tümüyle tarafımızca geliştirilen yöntemin duyarlı olduğunu göstermektedir. Yöntemde elde edilen korelasyon katsayısının 1'e yakın olması tarafımızca geliştirilen yöntemin hassasiyetinin çok yüksek olduğunu göstermektedir. Yöntemin kesinliği için yapılan gün içi ve günler arası deneylerin sonuçları Çizelge 3.1.2.2. ve 3.1.2.3.'te verilmiştir.

Tez çalışmamızın dördüncü aşamasında ise olopatadin HCl için voltametrik yöntem ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Yöntemde 0.5 M H₂SO₄, pH: 2.0 – 11.0 arasında kullanılabilen Britton-Robinson (BR) ve pH: 2.0 – 8.6 arasındaki fosfat tamponları içeren destek elektroliti içerisinde camı karbon elektrot kullanılarak pH taramaları yapılmıştır. Yapılan bu çalışmalar sonucunda ortam destek elektroliti olarak 0.5 M H₂SO₄ seçilmiştir.

Olopatadin HCl içeren farmasötik preparatlarda etken madde miktar tayini için voltametrik yöntem için çalışma aralığı 14.96 – 374.00 µg/mL olarak bulunmuştur. Dönüşümlü Voltametri, Diferansiyel Puls Voltametri ve Kare Dalga Voltametri yöntemleri kullanılarak voltamogramlar elde edilmiştir. Dönüşümlü Voltametri tekniği kullanılarak camı karbon elektrot varlığında reaksiyonun irreversibl ve difüzyon kontrollü olduğu tespit edilmiştir. Daha sonra etken madde miktar tayini için ise Diferansiyel Puls Voltametri ve kare dalga voltametri teknikleri kullanılarak çalışma grafikleri sonuçları elde edilen kalibrasyon denklemlerinin korelasyon katsayılarının 1'e yakın olması, geliştirilen yöntemin doğrusal olduğunu göstermektedir. Yöntemde geri kazanım verileri incelendiğinde diferansiyel puls voltametri için ortalama % 97.7 ve standart sapma değeri ise 0.89 ve kare dalga voltametri için ise ortalama % 100.5 ve standart sapma değeri 1.17 olarak hesaplanmıştır.

Geliştirdiğimiz tüm yöntemlerde yapılan geri kazanım deneylerinin sonuçlarının uygun olması, damla içerisinde bulunan yardımcı maddelerin (benzalkonyum klorür, dibazik sodyum fosfat vb.) yöntemleri etkilemediğini göstermektedir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Olopatadin HCl içeren farmasötik preparatdaki etken madde tayini için geliştirdiğimiz doğrudan UV spektrofotometri PATANOL® damla adlı farmasötik preparata uygulandığında 297.4 nm'de standart sapma değeri 0.003 olup p: 0.05 için ise güven aralığı 1.09 ± 0.037 mg/mL olarak saptanmıştır.

Ayrıca etken maddeyi içeren PATANOL® damla adlı preparata uygulanan bir diğer yöntem ise birinci türev UV spektrofotometri olup 288.8 nm için standart sapma değeri 0.016 olup p: 0.05 için ise güven aralığında 1.12 ± 0.020 mg/mL olarak belirlenmiş ve 308.4 nm için standart sapma değeri 0.008 olup p: 0.05 için ise güven aralığında 1.12 ± 0.020 mg/mL olarak belirlenmiştir.

Yüksek performanslı sıvı kromatografik yönteminde PATANOL® damla adlı farmasötik preparata uygulandığında 255.0 nm'de için standart sapma değeri 0.053 olup p: 0.05 için güven aralığı 1.13 ± 0.065 mg/mL olarak hesaplanmıştır .

Voltametri yöntemi PATANOL® damla adlı farmasötik preparata uygulandığında diferansiyel puls voltametri için standart sapma değeri 0.06 olup p:0.05 için güven aralığı 1.08 ± 0.065 mg/mL kare dalga voltametri için ise standart sapma değeri 0.02 olup p: 0.05 için güven aralığı 1.02 ± 0.065 mg/mL olarak hesaplanmıştır .

Yüksek lisans tezimiz kapsamında yaptığımız çalışmalar sonucunda elde ettiğimiz veriler göz önünde bulundurularak tüm yöntemlerin hızlı, doğru, basit, hiçbir ayırma işlemine gerek duyulmadan konu olan etken maddenin tayini için uygulanabilen ve fazla zaman kaybına gerek duyulmayan tüm araştırma ve geliştirme laboratuvarlarında kullanılabilecek yöntemler olduğunu düşünmekteyiz.

ÖZET

Olopatadin HCl içeren farmasötik preparatlarda analiz yöntemleri

Spektrofotometrik yöntemler, yüksek performanslı sıvı kromatografi yöntemi ve voltametri yöntemi yüksek lisans tezimiz kapsamında; olopatadin HCl içeren preparatlarda etken madde miktar tayinleri için önerilmiştir.

Olopatadin HCl içeren preparatlarda etken madde miktar tayini için doğrudan UV spektrofotometri, birinci türev UV spektrofotometri, yüksek performanslı sıvı kromatografi ve voltametri yöntemleri önerilmiştir.

Doğrudan UV spektrofotometri de 297.4 nm'deki absorbands değerleri ölçülmüştür. Doğrudan UV spektrofotometride, standart ve numunelerin ultra saf sudaki çözeltilerinin 297.4 nm'deki absorbands değerleri ölçülmüştür. Yöntemde doğrusal çalışma aralıkları olopatadin HCl için 20.0 - 140.0 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Korelasyon katsayısı 0.9992 olarak bulunmuştur. Yakalama sınırı ve tayin alt sınırı sırasıyla 0.0811 µg/mL ve 0.271 µg/mL olarak bulunmuştur. Doğrudan UV spektrofotometride yöntemin doğruluğunun belirlenmesi için 297.4 nm'deki BSS değeri % 1.093 ve geri kazanım değeri % 100.2 olarak bulunmuştur.

Birinci türev UV spektrofotometride standart ve numunelerin ultra saf sudaki çözeltilerinin 288.8 ve 308.4 nm'de türev absorbands ($dA/d\lambda$) sinyalleri ölçülmüştür. Birinci türev UV spektrofotometride doğrusal çalışma aralıkları olopatadin HCl için 20.0 - 140.0 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Korelasyon katsayısı 288.8 nm için 0.9996 ve 308.4 nm için 0.9997 olarak bulunmuştur. Yakalama sınırı ve tayin alt sınırı sırasıyla 288.8 nm için 0.346 µg/mL ve 1.155 µg/mL; 308.4 nm için ise 0.600 µg/mL ve 2.000 µg/mL olarak bulunmuştur. Birinci türev UV spektrofotometrik yöntemin doğruluğunun belirlenmesi için 288.8 ve 308.4 nm'deki BSS değeri sırasıyla % 1.085 ve %

1.905 olup geri kazanım değeri sırasıyla % 100.2 ve % 100.1 olarak bulunmuştur.

Önerilen üçüncü yöntem olan yüksek performanslı sıvı kromatografik yöntemde ise 255 nm 'de çalışılmış, çözücü olarak ultra saf su kullanılmıştır. Çalışma aralığı 10.0 - 80.0 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Korelasyon katsayısı 0.998 olarak bulunmuştur. Yakalama sınırı ve tayin alt sınırı sırasıyla 0.173 µg/mL ve 0.577 µg/mL olarak bulunmuştur. Yüksek performanslı sıvı kromatografi yöntemin doğruluğunun belirlenmesi için 255 nm'deki BSS değeri % 1.066 ve geri kazanım değeri % 99.7 olarak bulunmuştur.

Dördüncü yöntem olan voltametri yönteminde ise çalışma aralığı 14.96 – 374.00 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Korelasyon katsayısı diferansiyel puls voltametri için 0.9960, kare dalga voltametri için 0.9940 olarak bulunmuştur. Yakalama sınırı ve tayin alt sınırı sırasıyla diferansiyel puls voltametri için 0.63 µg/mL ve 2.09 µg/mL, kare dalga voltametri için 0.47 µg/mL ve 1.57 µg/mL olarak bulunmuştur. Voltametri yönteminin doğruluğunun belirlenmesi için % geri kazanım deneylerinden elde edilen diferansiyel puls voltametri yönteminde BSS değeri % 0.91 ve geri kazanım değeri % 97.7 ve kare dalga voltametri yönteminde BSS değeri % 1.17 ve geri kazanım değeri % 100.5 olarak bulunmuştur.

Tarafımızca geliştirilen tüm yöntemlerin Türkiye ilaç piyasasında bulunan olopatadin HCl içeren preparatlarda etken madde miktar tayini uygulanması başarı ile gerçekleştirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Birinci türev spektrofotometri; diferansiyel puls voltametri; dönüşümlü voltametri; farmasötik preparat; kare dalga voltametri; olopatadin HCl; doğrudan UV spektrofotometri; voltametri; yüksek performanslı sıvı kromatografi.

SUMMARY

Quantitative Determination Methods of the Pharmaceutical Preparations Containing Olopatadine HCl

In this study; spectrophotometric method, high performance liquid chromatographic method and voltammetry method for determination are suggested for the eye-drops including olopatadin HCl.

Direct UV spectrophotometry, first derivative UV spectrophotometry, high performance liquid chromatographic and voltammetric method have been proposed for olopatadin HCl including eye-drops.

The first suggested method is direct UV spectrophotometry. In this method , absorbance values of standart and sample solutions in ultra pure water measured at 297.4 nm. Linear working range of olopatadin HCl was 20.0 - 140.0 µg/mL. In the calibration graphs, coefficient of correlation was 0.9992. Limit of detection and limit of quantification for 297.4 nm was 0.0811 µg/mL and 0.271 µg/mL respectively. To determine the accuracy of method, "% recovery" study that used standart addition method were performed; in these studies RSD value at 297.4 nm's was found 1.093 % and mean recovery value was found 100.2 %.

In first derivative UV spectrophotometry, absorbance values of standart and sample solutions in ultra pure water measured at 288.8 and 308.4 nm. Linear working range of olopatadin HCl was 20.0 - 140.0 µg/mL. In the calibration graphs, coefficient of correlation was 0.9996 for 288.8 nm and 0.9997 for 308.4 nm. Limit of detection and limit of quantification for 288.8 nm was 0.346 µg/mL and 1.155 µg/mL; for 308.4 nm 0.600 µg/mL and 2.000 µg/mL respectively. To determine the accuracy of method , "% recovery" study that used standart addition method were performed; in these studies RSD value at 288.8 nm's was found 1.085 % and 1.905 % for 308.4 nm and

mean recovery value was found 100.2 % for 288.8 nm and 100.1% for 308.4 nm.

The third method suggested is high performance liquid chromatography. This method was applied to standart and samples containing olopatadin HCl area was measured 255 nm. Linear working range was 10.0 - 80.0 µg/mL. In the calibration graphs, coefficient of correlation was 0.998. Limit of detection for 255 nm's was 0.173 µg/mL and limit of quantification for this wavelenght was 0.577 µg/mL. In the "% recovery" study performed to investigate the accuracy of the method, for 255 nm's mean recovery value was found 99.7 % and RSD value was found 1.066 %.

The fourth method suggested is voltammetry. Linear working range was 14.96 – 374.00 µg/mL. In the calibration graphs, coefficient of correlation was 0.9960 for differential pulse voltammetry and 0.9940 for squarewave voltammetry. Limit of detection was 0.63 µg/mL for differential pulse voltammetry and 0.47 µg/mL for squarewave voltammetry. Limit of quantification was 2.09 µg/mL for differential pulse voltammetry and 1.57 µg/mL for squarewave voltammetry. To determine the accuracy of method, "% recovery" study that used standart addition method were performed; in these studies RSD value for differential pulse voltammetry was 0.91% and 1.17 % for squarewave voltammetry with the mean recovery value 97.7 % for differential pulse voltammetry and 100.5 % for squarewave voltammetry.

Key Words: Cyclic voltammetry; differential pulse voltammetry; direct UV spectrophotometry; first derivative spectrophotometry; high performance liquid chromatography; olopatadin HCl; pharmaceutical preparations; squarewave voltammetry; voltammetry.

KAYNAKLAR

- BARD, A.J., FAULKER, L.R. (2001). *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*. John Wiley and Sons. Inc. New York.
- BHATT, P.D., AKHTAR, J. (2011). Development and validation of stability indicating RP-HPLC method for estimation of olopatadine hydrochloride in bulk drug and it's formulations. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, **9**(2): 153-158.
- BIELORY, L., LIEN, K.W., BIGELSEN, S. (2005). Efficacy and tolerability of newer antihistamines in the treatment of allergic conjunctivities. *Drugs*, **65**(2): 215-228.
- BIELORY, L. (2002). Ocular allergy guideliness. A practical treatment algorithm. *Drugs*, **62**(11): 1611-1634.
- BUCKLY, R.J. (1988). Vernal keratokonjonctivities. *Int Ophthalmol Clin*, **28**: 303-308.
- CHEN, W., DAI, P., WANG, H., CHU, N., XU, H., LI, X. (2009). Determination of olopatadine in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Zhongguo Linchuang Yaoxue Zazhi*, **18**(6): 338-341.
- COOK, E.B., STAHL, J.L., BARNEY, N.P., GRAZIANO, F.M. (2000). Olopatadine inhibits TFN release from human conjunctival mast cells. *Ann Allergy Asthma Immunol*, **84**: 504-508.
- ÇEKİRDEK, P. (2005). *Voltametrik metotlarla ditiyofosfonat anyonlarının elektrokimyasal davranışlarının incelenmesi*. (Doktora tezi, Ankara Üniversitesi).

- DEMİREL ÖZEL, A. (2007). *Bazi hidrazonların elektrokimyasal davranışlarının incelenmesi ve analitik amaçlı kullanılması*. (Doktora tezi, Ankara Üniversitesi).
- DEY, S., REDDY, Y.V., SWETHA, B., SANDEEP, K.D., MURTHY, P.N., SAHOO, S.K., KUMAR, D., PATRO, S.S., MOHAPATRA, S. (2010). Method development and validation for the estimation of Olopatadine in bulk and pharmaceutical dosage forms and its stress degradation studies using UV-VIS spectrophotometric method. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, **2**: 212-218.
- DURSUN, D., AKOVA, Y.A. (2003). Antiallerjik tedavi. Oftalmik ilaçlar. Oto S, Yılmaz G, Aydın P. ed. Ankara, Güneş Kitabevi; 225-230.
- FUJIMAKI, K., LEE, X.P., KUMAZAWA, T., SATO, J., SATO, K. (2006). Determination of some antiallergic drugs in human plasma by direct-injection high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Forensic Toxicology*, **24**(1): 8-16.
- FUJITA, K., MAGARA, H., KOBAYASHI, H. (1999). Determination of olopatadine, a new antiallergic agent, and its metabolites in human plasma by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography. B, Biomedical sciences and applications*, **731**(2): 345-52.
- GÜNDÜZ T. (1998). Enstrümantel Analiz Kitabı. Ankara: Gazi Büro Kitabevi
- GREEF, R., PEAT, R., PETER, L.M., PLETCHER, D., Robinson, J. (1990). *Instrumental Methods In Electrochemistry*. Ellis Horwood Limited. England
- HAN, W., HAN, B., ZHU, Q., LI, X., XING, Z. (2010). Determination of benzalkonium chloride in olopatadine hydrochloride eye drops by HPLC. *Shipin Yu Yaopin*, **12**(11): 425-427.

HAN, W., HAN, B., WU, L. (2010). Determination of olopatadine hydrochloride in olopatadine hydrochloride eye drops by HPLC. *Shipin Yu Yaopin*, **12**(3): 108-109.

<http://biyokure.org/uv-gorunur-bolge-spektroskopisi/5276/>

https://dosya.sakarya.edu.tr/Dokumanlar/2013/202/548889939_bolum_23.ppt

<http://en.wikipedia.org/wiki/Olopatadine>

<http://en.wikipedia.org/wiki/Transmittance>

<http://library.cu.edu.tr/tezler/5889.pdf>

<http://www.analitik.hacettepe.edu.tr/Demolar/elektrokim.pdf>

<http://www.avrupagoz.com.tr/tr/Tedaviler/132/Konjonktivit.html>

http://www.ieg.gov.tr/Folders/KubKT/Patanol%20Steril%20Oftalmik%20Sol%C3%BCsyon%20K%C3%9CB_82c54f8_b3cd894.pdf

<http://www.ilacpedia.com/prospektus/patanol-steril-oftalmik-solusyon-01>

<http://www.kimyaturk.net/index.php?topic=16402.0>

<http://www.ofthalmoloji.org/sayilar/50/buyuk/2006-337-343.pdf>

IZUTSU, K. (2002). *Electrochemistry in nonaqueous solutions*. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim.

JOSEPH MA., KAUFMAN HE., INSLER M., (2005). Topical tacrolimus ointment for treatment of refractory anterior segment inflammatory disorders. *Cornea*, **24**(4): 417-20

- LEONARDI, A., BUSATO, F., FREONA, I., PLEBANI, M., SECCHI, A.G.. (2000). Anti-inflammatory and antiallergic effects of ketorolac tromethamine in the conjunctival provocation model. *Br J Ophthalmol*, **84**(11): 1228-1232.
- LEVEILLIAN P., FOMPEYDIE D. (1986). Spectrophotometric derivee. *Anal.* **14**: 1-8
- LIANG, W., ZHOU, H., LIU, D.Y., HU, P., JIANG, J. (2006). Quantitative determination of olopatadine in human plasma by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Zhipu Xuebao*, **27**(4): 193-197.
- MAHAJAN, A., GANDHI, P.S., PANDITA, N., GANDHI, S.V., DESHPANDE, P.B. (2010). Validated high performance thin layer chromatographic method for estimation of olopatadine hydrochloride as bulk drug and in ophthalmic solutions. *International Journal of ChemTech Research*, **2**(3): 1372-1375.
- MAHAJAN, A.A., MOHANRAJ, K., KALE, S., THAKER, A.K. (2013). Study of olopatadine hydrochloride under ICH recommended stress conditions by LC, LC-MS/TOF for idendification and characterization of degradation products. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, **36**: 1881-1898.
- MATHRUSRI, A.M., HIMA, B.G., DIVYA, I. (2012). Derivative spectrophotometric methods for the determination of Olopatadine in pharmaceutical dosage form. *Drug Invention Today*, **4**(10): 540-542.
- MEYER, E., KRAUS, E., TONIS, S. (1987). Efficiency of antiprostaglandin therapy in vernal conjunctivitis. *Br J Ophthalmol*, **71**: 497-499.

- NAGESWARA RAO, K., GANAPATY, S., LAKSHMANA RAO, A. (2012). Validated RP-HPLC method for the determination of olopatadine in bulk drug and in pharmaceutical dosage form. *International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences*, **2**(4): 712- 717.
- NICHOLSON, R.S., SHAIN, I. (1964). Theory of stationary electrode polarography: Single scan and cyclic methods applied to reversible, irreversible, and kinetic systems. *Anal. Chem.*, **36**(4): 706-724.
- ONUR F., YÜCESOY C. (1983). Türev Spektrofotometrisi. *Fabad J. Pharm. Sci.*, **13**: 462
- PELİT, A., AKOVA, Y.A. (2006). Allerjik Konjonktivitlerde Tedavi, *T.Oft.Gaz.*, **36**: 337-343.
- RELE, R.V., WARKAR, C.B. (2011). Application of high performance liquid chromatographic technique for olopatadine hydrochloride and its impurity in ophthalmic solution. *International Journal of Chemical Science*, **9**(2): 601-614.
- SAIFULLA, K.P., JANAKI, P.P., RAVEENDRA, R.P., KRISHANA, R.V., APPALARAJU, N. (2012). Extractive spectrophotometric estimation of olopatadine using acid dyes in tablet dosage forms. *Journal of Pharmacy Research*, **5**(4): 2104-2106.
- SARBY, S.M., ABDEL-HAY, M.H., BARARY, M.H., BELAL, T.S. (2000). Sensitive spectrofluorimetric and spectrophotometric methods for the determination of thonzylamine hydrochloride in pharmaceutical preparations based on coupling with dimethylbarbituric acid in presence of dicyclohexylcarbodiimide. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **22**: 257-264.
- SKOOG, D.A., HOLLER, F.J., NIEMAN, T.A. (1996). *Principles of Instrumental analysis*. Çevirenler KILIÇ E., KÖSEOĞLU F., YILMAZ, H. (1998) *Enstrümental Analiz İlkeleri*, Bilim Yayıncılık. Ankara

- SKOOG, D.A., WEST, D.M., HOLLER, F.J., CROUCH, S.R. (2004). *Fundamentals of Analytical Chemistry*. Çevirenler KILIÇ, E., YILMAZ, H. (2007) *Analitik Kimya Temel İlkeler 1-2 cilt*. Bilim Yayıncılık. Ankara.
- SREEDHAR, H.Y., SREENIVASULU, A., SUNIL, K.M., NAGARAJU, M. (2012). Voltammetric determination of olopatadine hydrochloride in bulk drug form and pharmaceutical formulations. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, **3**(8): 2517-2521.
- VARGHESE S.J., KUMAR A.M., RAVI T.K. (2011). Stability-indicating high-performance column liquid chromatography and high-performance thin-layer chromatography methods for the determination of olopatadine hydrochloride in tablet dosage form. *Journal of AOAC International*, **94**(6): 1815-20.
- VICHYANOND, P., TANTIMONGKOLSUK, C., DUMRONGKIGCHAIPORN, P., JIRAPONGSANANURUK, O., VISITSUNTHORN, N., KOSRIRUKVONGS P. (2004). Vernal keratoconjunctivitis: Result of a novel therapy with 0.1% topical ophthalmic FK-506 ointment. *J Allergy Clin Immunol*, **113**(2):355-8.
- WANG, J. (1988). *Electroanalytical Techniques in Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. VCH. USA
- WANG, J. (2000). *Analytical Electrochemistry. 2nd edition*. John Wiley and Sons. Inc. New York.
- XU, W., NIU, C. (2007). Determination of related substances in olopatadine hydrochloride by HPLC. *Zhongguo Yiyao Gongye Zazhi*, **38**(12): 870-871.

YANNI, J.M., WEIMER, L.K., SHARIF, N.A., XU, S.X., DANIEL, A., GAMACHE, D.A., SPELLMAN, J.M. (1999). Inhibition of histamine-induced human conjunctival epithelial cell responses by ocular allergy drugs. *Arch Ophthalmology*, **117**: 643-647.

YILDIZ, A., GENÇ, Ö. (1993). *Entrümantal Analiz*, Hacettepe üniversitesi Yayınları, Ankara.

ZHU, P., WEN, Y.G., FAN, X.P., ZHOU, Z.L., FAN, R.X., CHEN, J.M., HUANG, K.L., ZHU, X.L., CHEN, Y.F., ZHUANG, J. (2011). A rapid and sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for determination of olopatadine concentration in human plasma. *Journal of analytical toxicology*, **35**(2): 113-8.

ÖZGEÇMİŞ

I. Bireysel Bilgileri

Adı : Berk
Soyadı : TOKER
Doğum yeri ve tarihi : Ankara - 1985

II. Eğitimi

2010 Orta Doğu Teknik Üniversitesi Kimya Fakültesi, ANKARA
2003 Hacı Ömer Tarman Anadolu Lisesi, ANKARA
1996 Teğmen Kalmaz İlköğretim Okulu, ANKARA

III. Ünvanı

Kimyager