

758327

T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ASTIM TEDAVİSİNDE KULLANILAN ZAFİRLUKASTIN  
ELEKTROKİMYASAL VE KROMATOĞRAFİK YÖNTEMLER İLE  
FARMASÖTİK PREPARATLARDAN VE BİYOLOJİK  
MATERYALLERDEN ANALİZİ**

**Uzm. Ecz. İncilay SÜSLÜ**

**Hacettepe Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin  
Analitik Kimya Programı İçin Öngördüğü  
DOKTORA TEZİ  
Olarak Hazırlanmıştır.**

**TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. Sacide Altınöz**

**ANKARA**

**2004**

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne:

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

Tez Danışmanı:

Prof. Dr. Sacide Altınöz  
(Hacettepe Üniversitesi)

Üye :

Prof. Dr. Sedef Kır  
(Hacettepe Üniversitesi)

Üye :

Prof. Dr. Nuran Özaltın  
(Hacettepe Üniversitesi)

Üye :

Prof. Dr. Nursabah E. Başçı  
(Hacettepe Üniversitesi)

Üye :

Prof. Dr. Ali Osman Solak  
(Ankara Üniversitesi)

ONAY:

Bu tez, sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Yönetim Kurulu'nun kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Hakan Orer  
Enstitü Müdürü

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın yürütülmesinde bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren ve desteğini esirgemeyen değerli danışman hocam, Sayın Prof. Dr. Sacide Altınöz'e teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen tüm hocalarıma teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Tüm tez çalışmam boyunca danıştığım sevgili arkadaşlarım Uzm. Ecz. Şeyda Demircan'a, Uzm. Ecz. Emirhan Nemutlu'ya ve Yük. Kim. Ceren Yardımcı'ya teşekkürlerimi sunarım.

Standart zafırlukastın temininde yardımlarından dolayı Sayın Dr. Ecz. Cenk Tolungüç'e teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca aileme tez çalışmam boyunca verdikleri destekten ötürü ve gösterdikleri sabırdan dolayı en içten şükranlarımı sunarım.

## ÖZET

**Süslü, İ., Astım Tedavisinde Kullanılan Zafirlukastın Elektrokimyasal ve Kromatografik Yöntemler ile Farmasötik Preparatlardan ve Biyolojik Materyallerden Analizi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Programı, Doktora Tezi, Ankara, 2004.** Zafirlukast, kronik astımın önlenmesinde ve tedavisinde kullanılmaktadır. Bu çalışmada, farmasötik preparatlardaki zafirlukastın tayini için basit, hızlı, güvenilir ve tamamen valide edilmiş kare dalga (OSWV), kare dalga adsorptif sıyırma (OSWAdSV) ve diferansiyel puls adsorptif sıyırma voltametri (DPAdSV) gibi voltametrik yöntemler ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi geliştirilmiştir. Zafirlukastın elektrokimyasal davranışları dönüşümlü voltametri, kronoamperometri ve doğrusal taramalı voltametri ile araştırılmıştır. Bu yöntemlerde deneysel ve cihaz parametrelerinin etkisi değerlendirilmiştir. Zafirlukastın analizi için en iyi destek elektrolit olarak pH'sı 8.00 olan 0.10 M borat tamponu bulunmuştur. HPLC yönteminde, zafirlukastın ayırımının optimizasyonu için hareketli fazı içeriği, pH'sı ve akış hızının etkisi araştırılmıştır. Analiz, Nucleosil C<sub>18</sub> (5 µm, 250 x 4.6 mm, i.ç.) kolonda, oda sıcaklığında ve asetonitril:asetat tamponu (pH 3.00; 10 mM) (70:30, h/h) içeren hareketli fazda, 0.8 mL/dk akış hızında yapılmıştır. UV dedektör dalga boyu 240 nm'ye ayarlanmıştır. OSWV, OSWAdSV, DPAdSV ve HPLC yöntemleri için gözlenebilme sınırları sırasıyla 50.00 ng mL<sup>-1</sup>, 5.00 ng mL<sup>-1</sup>, 15.00 ng mL<sup>-1</sup> ve 25.00 ng mL<sup>-1</sup> olarak bulunmuştur. Geliştirilen yöntemler validasyon parametrelerinin değerlendirilmesiyle valide edilmiştir. Yöntemler farmasötik preparatlardaki zafirlukastın tayinine uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar kaynaklardaki spektrofotometrik yöntem verileri ile karşılaştırılmış ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Önerilen HPLC yöntemi ayrıca zafirlukast eklenmiş insan plazmasına da uygulanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Zafirlukast, kare dalga voltametri, kare dalga adsorptif sıyırma voltametri, diferansiyel puls adsorptif sıyırma voltametri, yüksek performanslı sıvı kromatografisi, farmasötik preparat, biyolojik materyal.

## ABSTRACT

Süslü, İ., Analysis of Zafirlukast, Using in the Treatment of Asthma in Pharmaceutical Preparations and Biological Materials by Electrochemical and Chromatographic Methods, Hacettepe University Health Sciences Institute, Ph. D. Thesis in Analytical Chemistry, Ankara, 2004. Zafirlukast is used to prophylaxis and treatment of chronic asthma. In this study a simple, rapid, reliable and fully validated voltammetric methods such as square wave (OSWV), square wave adsorptive stripping (OSWAdSV) and diferansiyel puls adsorptive stripping voltammetry (DPAdSV) and high performance liquid chromatographic method (HPLC) were developed for the determination of zafirlukast in pharmaceutical preparations. The electrochemical behaviour of zafirlukast was investigated using cyclic voltammetry, chronoamperometry and linear sweep voltammetry. The effect of experimental and operational parameters were evaluated in these methods. The 0.10 M borate buffer of pH 8.00 was found to be best as a supporting electrolyte for assay of zafirlukast. In HPLC method, the effects of the composition, pH and flow rate of mobile phase were investigated for the optimization of zafirlukast separation. The analysis was performed on a Nucleosil C<sub>18</sub> (5 µm, 250 x 4.6 mm, i.d.) column at room temperature and mobile phase containing acetonitrile:acetate buffer (pH 3.00; 10 mM) (70:30, v/v), at flow rate of 0.8 mL/min. The UV dedector was set at wavelength of 240 nm. Piribedil was used as an internal standard. The retention time of piribedil and zafirlukast were 3.9 and 5.7 min, respectively. These conditions were used for analysis of zafirlukast in pharmaceutical and biological materials. The detection limits of OSWV, OSWAdSV, DPAdSV and HPLC methods were found as 50.00 ng mL<sup>-1</sup>, 5.00 ng mL<sup>-1</sup>, 15.00 ng mL<sup>-1</sup> and 25.00 ng mL<sup>-1</sup>, respectively. The developed methods were validated by evaluation of validation parameters. The methods were applied to the determination of zafirlukast in pharmaceutical preparations. The results obtained were compared with a spectrophotometric method reported in literature and no significant difference was found statistically. The proposed HPLC method also was applied to zafirlukast spiked human plasma.

**Keywords:** Zafirlukast, square wave voltammetry, square wave adsorptive stripping voltammetry, differential puls adsorptive stripping voltammetry, high performance liquid chromatography, pharmaceutical preparation, biological material.

## İÇİNDEKİLER

|                                                              | Sayfa     |
|--------------------------------------------------------------|-----------|
| ONAY SAYFASI                                                 | i         |
| TEŞEKKÜR                                                     | ii        |
| ÖZET                                                         | iii       |
| ABSTRACT                                                     | iv        |
| İÇİNDEKİLER                                                  | v         |
| SİMGELER ve KISALTMALAR                                      | x         |
| ŞEKİLLER DİZİNİ                                              | xi        |
| TABLolar DİZİNİ                                              | xvi       |
| <b>I. GİRİŞ VE AMAÇ</b>                                      | <b>1</b>  |
| <b>II. GENEL BİLGİLER</b>                                    | <b>3</b>  |
| II.1. Astım ve Tedavisinde Kullanılan İlaçlar                | 3         |
| II.1.1. Astımda Kullanılan Lökotrien Reseptör Antagonistleri | 6         |
| II.1.1.1. Lökotrien Astımdaki Rolü                           | 7         |
| II.2. Zafirlukast                                            | 8         |
| II.2.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri                     | 8         |
| II.2.2. Farmakolojik Özellikleri                             | 9         |
| II.2.2.1 Farmakodinamik Özellikleri                          | 9         |
| II.2.2.2. Farmakokinetik Özellikleri                         | 12        |
| II.2.2.2.1. Absorpsiyon                                      | 13        |
| II.2.2.2.2. Dağılıma                                         | 13        |
| II.2.2.2.3. Metabolizma                                      | 13        |
| II.2.2.2.4. Eliminasyon                                      | 14        |
| II.2.2.3. Klinik Kullanımı ve Dozu                           | 14        |
| II.2.2.4. Yan Etkileri ve İlaç Etkileşimleri                 | 14        |
| II.3. Zafirlukastın Analiz Yöntemleri                        | 16        |
| <b>II.4. Elektroanalitik Yöntemler</b>                       | <b>18</b> |
| II.4.1. Voltametri                                           | 21        |

|                                                                          |    |
|--------------------------------------------------------------------------|----|
| II.4.1.a Voltametri Uyarma Sinyalleri                                    | 22 |
| II.4.1.1. Polarografi                                                    | 23 |
| II.4.1.2. Dönüşümlü Voltametri ve Doğrusal Taramalı Voltametri (CV, LSV) | 35 |
| II.4.2. Kronoamperometri (CA)                                            | 37 |
| II.4.3. Sıyırma Voltametrisi                                             | 39 |
| II.4.4. Kare Dalga Voltametrisi (SWV)                                    | 43 |
| <b>II.5. Kromatografi</b>                                                | 47 |
| II.5.1. Sıvı Kromatografisi                                              | 51 |
| II.5.1.1. Kromatografide Temel Parametreler                              | 54 |
| II.5.1.1.a Alıkonma Zamanı ve Kapasite Faktörü                           | 54 |
| II.5.1.1.b. Seçicilik                                                    | 57 |
| II.5.1.1.c. Kolon Etkinliği                                              | 57 |
| II.5.1.1.d. Ayırıcılık                                                   | 57 |
| II.5.1.1.e. Pik Simetrisi                                                | 60 |
| II.5.1.1.f. Hareketli Faz Bileşiminin Ayırma Etkisi                      | 62 |
| II.5.1.1.g. Madde Çözücü Etkileşimleri                                   | 63 |
| II.5.1.2. HPLC Cihazı Bölümleri                                          | 64 |
| II.5.1.2.a. Pompalar                                                     | 65 |
| II.5.1.2.b. Hareketli Faz Hazneleri                                      | 66 |
| II.5.1.2.c. Enjektörler                                                  | 67 |
| II.5.1.2.d. Analitik Kolonlar                                            | 68 |
| II.5.1.2.e. Dedektörler                                                  | 70 |
| <b>III. DENEYSEL KISIM</b>                                               | 75 |
| III.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler                                      | 75 |
| III.2. Kullanılan Cihazlar                                               | 76 |
| III.3. Kullanılan Cam Malzemeler                                         | 76 |
| III.4. Farmasötik Preparatlar                                            | 77 |
| III.5. Kullanılan Standart Maddenin Saflığının Araştırılması             | 77 |
| III.6. Çözeltilerin Hazırlanması                                         | 77 |
| III.7. Farmasötik Preparat Çözeltilerinin Hazırlanması                   | 79 |
| III.8. Sentetik Preparat Çözeltilerinin Hazırlanması                     | 79 |

|                                                                |           |
|----------------------------------------------------------------|-----------|
| III.9. Kullanılan Malzeme ve Maddelerin Temizliği              | 80        |
| III.9.1. Cıvanın Temizlenmesi                                  | 80        |
| III.9.2. Cam Malzemelerin Temizlenmesi                         | 81        |
| III.9.3. Elektrokimyasal Hücrenin Temizlenmesi                 | 81        |
| III.9.4. HPLC Kolonunun Temizlenmesi                           | 81        |
| III. 9.5. Azot Gazı                                            | 81        |
| III.10. Analiz Yöntemlerinin Geliştirilmesi                    | 82        |
| III.10.1. Voltametrik Yöntemler                                | 82        |
| III.10.1.1. Elektrokimyasal Hücre Düzenegi                     | 82        |
| III.10.1.2. Deneyin Yapılışı                                   | 82        |
| III.10.1.3. Yöntemlerin Optimizasyonu                          | 82        |
| III.10.1.4. Dönüşümlü Voltametri Deneyleri                     | 83        |
| III.10.1.5. Kronoamperometri Deneyleri                         | 83        |
| III.10.1.6. Doğrusal Taramalı Voltametri Deneyleri             | 83        |
| III.10.2. Kromatografik Yöntem                                 | 84        |
| III.10.2.1. Kromatografik Çalışma Şartları                     | 84        |
| III.10.2.2. Deneyin Yapılışı                                   | 84        |
| III.10.2.3. Yöntemin Optimizasyonu                             | 84        |
| III.11. Geliştirilen Yöntemlerin Validasyonu                   | 85        |
| III.12. Yöntemlerin Farmasötik Preparatlara Uygulanması        | 89        |
| III.13. Biyolojik Materyal Analizi                             | 90        |
| III.13.1. Tüketme Yöntemi ve Çözücü Seçimi                     | 90        |
| III.13.2. Biyolojik Materyalden Analiz Yöntemi                 | 90        |
| III.13.3. Biyolojik Materyalden Analiz Yönteminin Validasyonu  | 91        |
| <b>IV. BULGULAR</b>                                            | <b>93</b> |
| IV.1. Saflık Kontrolü Bulguları                                | 93        |
| IV.1. 1. Erime Noktası                                         | 93        |
| IV.1. 2. IR Spektrumu                                          | 93        |
| IV.2. UV Spektrumu                                             | 93        |
| IV.3. Geliştirilen Voltametrik Yöntemlere Ait Analiz Bulguları | 95        |
| IV.3.1. Destek Elektrolitin Belirlenmesi                       | 95        |



|                                                                                        |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| IV.3.2. Optimum Cihaz Parametrelerinin Belirlenmesi                                    | 97  |
| IV.3.2.1. OSWV yöntemi                                                                 | 97  |
| IV.3.2.2. OSWAdSV Yöntemi                                                              | 99  |
| IV.3.2.3. DPAdSV Yöntemi                                                               | 103 |
| IV.3.3. Voltametrik Yöntemlerin Validasyonu                                            | 106 |
| IV.3.4. Farmasötik Preparatların Analiz Bulguları                                      | 119 |
| IV.4. Dönüşümlü Voltametri Bulguları                                                   | 121 |
| IV.5. Doğrusal Taramalı Voltametri Bulguları                                           | 121 |
| IV.6. Geliştirilen Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi Yöntemine Ait Analiz Bulguları | 123 |
| IV.6.1. Kromatografik Koşulların Optimizasyonu                                         | 123 |
| IV.6.1.1. Tampon Seçimi                                                                | 123 |
| IV.6.1.2. Organik Çözücü Etkisi                                                        | 123 |
| IV.6.1.3. Hareketli Faz pH'sının Zafirlukastın Ayırımına Etkisi                        | 125 |
| IV.6.1.4. Asetat Tamponu Derişiminin Zafirlukastın Ayırımına Etkisi                    | 126 |
| IV.6.1.5. Hareketli Faz Akış Hızının Zafirlukastın Ayırımına Etkisi                    | 126 |
| IV.6.2. İç Standart Seçimi                                                             | 127 |
| IV.6.3. HPLC Yönteminin Validasyonu                                                    | 128 |
| IV.6.4. Farmasötik Preparatların Analiz Bulguları                                      | 136 |
| IV.7. Biyolojik Materyalden Analiz Yönteminin Bulguları                                | 137 |
| IV.7.1. Tüketme Yönteminin Seçimi                                                      | 138 |
| IV.7.2. Biyolojik Materyalden Analiz Yönteminin Validasyonu                            | 139 |
| <b>V. SONUÇ ve TARTIŞMA</b>                                                            | 145 |
| V.1. Voltametrik Yöntemlerin Optimizasyon ve Validasyon Sonuçları                      | 145 |
| V.1.1. Voltametrik Yöntemlerin Optimizasyon Sonuçları                                  | 145 |
| V.1.2. Voltametrik Yöntemlerin Validasyon Sonuçları                                    | 148 |
| V.2. Dönüşümlü Voltametri (CV) Sonuçları                                               | 155 |
| V.3. Doğrusal Taramalı Voltametri ve Kronoamperometri Sonuçları                        | 156 |
| V.4. HPLC Yönteminin Optimizasyon ve Validasyon Sonuçları                              | 159 |
| V.4.1. Farmasötik Preparattan Analiz Yönteminin Optimizasyon Sonuçları                 | 159 |
| V.4.2. Farmasötik Preparattan Analiz Yönteminin Validasyon Sonuçları                   | 162 |

|                                                                      |     |
|----------------------------------------------------------------------|-----|
| V.5.1.Biyolojik Materyalden Analiz Yönteminin Optimizasyon Sonuçları | 168 |
| V.5.2. Biyolojik Materyalden Analiz Yönteminin Validasyon Sonuçları  | 169 |
| <b>KAYNAKLAR</b>                                                     | 175 |
| <b>EKLER</b>                                                         | 190 |
| Ek 1                                                                 | 190 |
| Ek 2                                                                 | 192 |
| Ek 3                                                                 | 192 |
| Ek 4                                                                 | 193 |
| Ek 5                                                                 | 195 |
| <b>ÖZGEÇMİŞ</b>                                                      | 196 |

**SİMGELER ve KISALTMALAR**

|          |                                                  |
|----------|--------------------------------------------------|
| OSWV     | Kare dalga voltametrisi                          |
| OSWAdSV  | Kare dalga adsorptif sıyırma voltametrisi        |
| DPAdSV   | Diferansiyel puls adsorptif sıyırma voltametrisi |
| CV       | Dönüşümlü voltametri                             |
| LSV      | Doğrusal taramalı voltametri                     |
| CA       | Kronoamperometri                                 |
| HPLC     | Yüksek performanslı sıvı kromatografisi          |
| UV/GB    | Ultraviyole / görünür bölge                      |
| PSO      | Pik simetri oranı                                |
| $t_R$    | Alıkonma zamanı                                  |
| $k'$     | Kapasite faktörü                                 |
| $\alpha$ | Seçicilik                                        |
| R        | Ayrıcılık                                        |
| Z        | Zafırlukast                                      |
| P        | Piribedil                                        |
| LOD      | Gözlenebilme sınırı                              |
| LOQ      | Alt tayin sınırı                                 |
| BSS      | Bağıl standart sapma                             |
| SS       | Standart sapma                                   |
| SH       | Standart hata                                    |
| r        | Korrelasyon katsayısı                            |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

| Şekil                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Sayfa |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| II.1. Lökotrien biyosentezi                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 7     |
| II.2. Zafirlukastın kimyasal yapısı                                                                                                                                                                                                                                                                            | 9     |
| II.3. Zafirlukastın etki mekanizması                                                                                                                                                                                                                                                                           | 10    |
| II.4. Yaygın olarak kullanılan elektroanalitik yöntemlerin sınıflandırılması. Ölçülen büyüklükler parantez içinde verilmiştir. (I = akım, E= potansiyel, R = direnç, G = iletkenlik, Q = yük miktarı, t = zaman, Hacim = standart çözelti hacmi, ağırlık = elektrokimyasal olarak biriktirilen türün ağırlığı) | 19    |
| II.5. Elektrokimyasal işlemlerin gerçekleştirildiği düzenek                                                                                                                                                                                                                                                    | 21    |
| II.6. Voltametrizde kullanılan potansiyel uyarma sinyalleri                                                                                                                                                                                                                                                    | 23    |
| II.7. Polarografide gözlenen akım-potansiyel ilişkisi                                                                                                                                                                                                                                                          | 25    |
| II.8. CV’de uygulanan potansiyelin zamanla değişmesi                                                                                                                                                                                                                                                           | 36    |
| II.9. a) CA’de çalışma elektrotuna uygulanan potansiyel programı, b) elde edilen akım-zaman eğrisi                                                                                                                                                                                                             | 37    |
| II.10. CA’de E <sub>1</sub> ve E <sub>2</sub> potansiyellerinin seçimi a) DC polarogramından, b) CV voltamogramından                                                                                                                                                                                           | 38    |
| II.11. Sıyırma tekniklerinde potansiyel-zaman profili                                                                                                                                                                                                                                                          | 41    |
| II.12. Bir kare dalga voltametrisinde uyarma sinyalinin oluşumu. (a)’daki uyarma sinyali (b)’deki puls taraması ile (c)’deki kare dalga uyarma sinyalini verecek şekilde toplanmaktadır. Akım cevabı $\Delta_i$ , 1 potansiyelindeki akımdan 2 potansiyelindeki akım çıkarılarak bulunur                       | 45    |
| II.13. OSWV’de tersinir bir tepkime için net akım                                                                                                                                                                                                                                                              | 46    |
| II.14. Normal-faz ve ters-faz kromatografisinde polarlık ve elüsyon süreleri arasındaki ilişki                                                                                                                                                                                                                 | 52    |
| II.15. HPLC elde edilen kromatogram ve kapasite faktörünün hesaplanması                                                                                                                                                                                                                                        | 56    |
| II.16. Ayırıcılığın seçicilikle değişimi                                                                                                                                                                                                                                                                       | 59    |

|               |                                                                                                                                                                                                                                                         |     |
|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>II.17.</b> | Ayırıcılığın kapasite faktörü ile değişimi                                                                                                                                                                                                              | 60  |
| <b>II.18.</b> | Elüsyon izotermeleri ve pik şekilleri                                                                                                                                                                                                                   | 61  |
| <b>II.19.</b> | Pik simetri oranının hesaplanması                                                                                                                                                                                                                       | 62  |
| <b>II.20.</b> | HPLC cihazı kısımlarının şematik gösterimi                                                                                                                                                                                                              | 65  |
| <b>II.21.</b> | Normal-faz ve ters-faz kolonlarının yapısı                                                                                                                                                                                                              | 70  |
| <b>IV.1.</b>  | 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ zafirlukast çözeltisinin UV spektrumu                                                                                                                                                                                          | 93  |
| <b>IV.2.</b>  | Zafirlukastın IR spektrumu                                                                                                                                                                                                                              | 94  |
| <b>IV.3.</b>  | OSWV yönteminde frekans değişiminin etkisi (adım yüksekliği : 5 mV, Puls Genliği : 25 mV)                                                                                                                                                               | 97  |
| <b>IV.4.</b>  | OSWV yönteminde 6.00 ve 10.00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 'de adım yüksekliği değişiminin etkisi (f : 50 Hz, puls genliği : 25 mV)                                                                                                                            | 98  |
| <b>IV.5.</b>  | OSWV yönteminde puls genliği değişiminin etkisi (f : 50 Hz, adım yüksekliği : 4 mV)                                                                                                                                                                     | 98  |
| <b>IV.6.</b>  | Zafirlukastın kare dalga voltamogramları a) Destek elektrolit, b) 1.00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ , c) 1.20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ , d) 1.39 $\mu\text{g mL}^{-1}$ , e) 1.58 $\mu\text{g mL}^{-1}$ zafirlukast                                                | 99  |
| <b>IV.7.</b>  | OSWAdSV yönteminde biriktirme potansiyelinin etkisi (biriktirme süresi : 20 s, f : 50 Hz, adım yüksekliği : 4 mV, puls genliği : 25 mV)                                                                                                                 | 100 |
| <b>IV.8.</b>  | OSWAdSV yönteminde frekans değişimi etkisi (biriktirme süresi : 20 s, biriktirme potansiyeli : -1000 mV, adım yüksekliği : 4 mV, puls genliği : 25 mV)                                                                                                  | 100 |
| <b>IV.9.</b>  | OSWAdSV yönteminde adım yüksekliği değişiminin etkisi (biriktirme süresi : 20 s, biriktirme potansiyeli : -1000 mV, f : 70 Hz, puls genliği : 25 mV)                                                                                                    | 101 |
| <b>IV.10.</b> | OSWAdSV yönteminde puls genliği değişiminin etkisi (biriktirme süresi : 20 s, biriktirme potansiyeli : -1000 mV, f : 70 Hz, adım yüksekliği : 4 mV)                                                                                                     | 101 |
| <b>IV.11.</b> | Zafirlukastın kare dalga adsorptif sıyırma voltamogramları a) Destek elektrolit, b) 52.00 ng $\text{mL}^{-1}$ , c) 70.00 ng $\text{mL}^{-1}$ , d) 83.00 ng $\text{mL}^{-1}$ , e) 130.00 ng $\text{mL}^{-1}$ , f) 167.00 ng $\text{mL}^{-1}$ zafirlukast | 102 |
| <b>IV.12.</b> | DPAAdSV yönteminde biriktirme potansiyelinin etkisi (biriktirme süresi : 20 s, tarama hızı : 30 mV/s, puls genliği : 25 mV)                                                                                                                             | 103 |

|               |                                                                                                                                                                                                                                                                      |     |
|---------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>IV.13.</b> | DPAdSV yönteminde tarama hızı değişiminin etkisi (biriktirme süresi : 20 s, biriktirme potansiyeli : - 950 mV, puls genliği : 25 mV)                                                                                                                                 | 103 |
| <b>IV.14.</b> | DPAdSV yönteminde puls genliği değişimi (biriktirme süresi : 20 s, biriktirme potansiyeli : - 950 mV, tarama hızı : 30 mV/s)                                                                                                                                         | 104 |
| <b>IV.15.</b> | Zafirlukastın diferansiyel puls adsorptif sıyırma voltamogramları<br>a) Destek elektrolit, b) 130.00 ng mL <sup>-1</sup> , c) 231.00 ng mL <sup>-1</sup> , d) 310.00 ng mL <sup>-1</sup> , e) 375.00 ng mL <sup>-1</sup> , f) 394.00 ng mL <sup>-1</sup> zafirlukast | 105 |
| <b>IV.16.</b> | Zafirlukastın OSWV yöntemi ile analizinde elde edilen kalibrasyon eğrisi                                                                                                                                                                                             | 106 |
| <b>IV.17.</b> | Zafirlukastın OSWAdSV yöntemi ile analizinde elde edilen kalibrasyon eğrisi                                                                                                                                                                                          | 107 |
| <b>IV.18.</b> | Zafirlukastın DPAdSV yöntemi ile analizinde elde edilen kalibrasyon eğrisi                                                                                                                                                                                           | 107 |
| <b>IV.19.</b> | Zafirlukastın OSWV yöntemine ait yöntem doğrusallığı kontrol grafiği                                                                                                                                                                                                 | 110 |
| <b>IV.20.</b> | Zafirlukastın OSWAdSV yöntemine ait yöntem doğrusallığı kontrol grafiği                                                                                                                                                                                              | 110 |
| <b>IV.21.</b> | Zafirlukastın DPAdSV yöntemine ait yöntem doğrusallığı kontrol grafiği                                                                                                                                                                                               | 111 |
| <b>IV.22.</b> | 10.00 µg mL <sup>-1</sup> zafirlukast çözeltisinin pH 8.00 borat tamponunda 100, 200, c) 300 ve d) 400 mV/s tarama hızlarında çekilen dönüşümlü voltamogramları                                                                                                      | 121 |
| <b>IV.23.</b> | 5 mV/s tarama hızında ve ultramikro elektrotta 1 x 10 <sup>-3</sup> M derişimindeki zafirlukastın doğrusal taramalı voltamogramı                                                                                                                                     | 122 |
| <b>IV.24.</b> | 5 mV/s tarama hızında ve ultramikro elektrotta 1 x 10 <sup>-3</sup> M derişimindeki potasyum ferrosiyanürün doğrusal taramalı voltamogramı                                                                                                                           | 122 |
| <b>IV.25.</b> | Hareketli fazdaki asetonitril oranının zafirlukastın ayırımına etkisi                                                                                                                                                                                                | 124 |
| <b>IV.26.</b> | Hareketli fazdaki asetonitril oranının zafirlukastın PSO'na etkisi                                                                                                                                                                                                   | 124 |
| <b>IV.27.</b> | Hareketli faz pH'sının zafirlukastın ayırımına etkisi                                                                                                                                                                                                                | 125 |
| <b>IV.28.</b> | Hareketli faz pH'sının zafirlukastın PSO'na etkisi                                                                                                                                                                                                                   | 125 |

|        |                                                                                                                           |     |
|--------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| IV.29. | Hareketli faz akış hızının zafirlukastın ayırımına etkisi                                                                 | 126 |
| IV.30. | Hareketli faz akış hızının zafirlukastın PSO'na etkisi                                                                    | 127 |
| IV.31. | 400 ng mL <sup>-1</sup> 'e zafirlukast çözeltisine ait kromatogram (P; Piribedil, Z; Zafirlukast)                         | 128 |
| IV.32. | Zafirlukastın HPLC yöntemi ile analizinde elde edilen kalibrasyon eğrisi (Piribedil çözeltisi 200 ng mL <sup>-1</sup> )   | 129 |
| IV.33. | Zafirlukastın HPLC yöntemine ait yöntem doğrusalılığı kontrol grafiği                                                     | 131 |
| IV.34. | 254.78 ng mL <sup>-1</sup> derişiminde eklenmiş plazma çözeltisine ait kromatogram (P; Piribedil, Z; Zafirlukast)         | 139 |
| IV.35. | Zafirlukastın HPLC yöntemi ile plazmadan analizinde elde edilen kalibrasyon eğrisi (Piribedil : 200 ng mL <sup>-1</sup> ) | 140 |
| IV.36. | Zafirlukastın HPLC yöntemi ile plazmadan analizinde yöntem doğrusalılığı kontrol grafiği                                  | 142 |
| V.1.   | 6.25 µg mL <sup>-1</sup> derişiminde standart, tablet ve sentetik çözeltisine ait OSWV voltamogramları                    | 153 |
| V.2.   | 130.00 ng mL <sup>-1</sup> derişiminde standart, tablet ve sentetik çözeltisine ait OSWAdSV voltamogramları               | 154 |
| V.3.   | 130.00 ng mL <sup>-1</sup> derişiminde standart, tablet ve sentetik çözeltisine ait DPAdSV voltamogramları                | 154 |
| V.4.   | Katodik pik için elde edilen log i <sub>p</sub> 'ye karşı log v grafiği                                                   | 156 |
| V.5.   | Hareketli faz enjeksiyonuna ait kromatogram                                                                               | 165 |
| V.6.   | 400 ng mL <sup>-1</sup> zafirlukast çözeltisine ait kromatogram (P; Piribedil, Z; Zafirlukast)                            | 165 |
| V.7.   | Zafirlukast içermeyen sentetik preparata ait kromatogram                                                                  | 166 |
| V.8.   | 400 ng mL <sup>-1</sup> zafirlukast içeren sentetik preparat çözeltisine ait kromatogram (P; Piribedil, Z; Zafirlukast)   | 166 |
| V.9.   | 400 ng mL <sup>-1</sup> zafirlukast içeren tablet çözeltisine ait kromatogram (P; Piribedil, Z; Zafirlukast)              | 167 |
| V.10.  | Boş plazmanın tüketilmesiyle elde edilen kromatogram                                                                      | 171 |

|       |                                                                                                                                                         |     |
|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| V.11. | Plazmaya eklenerek tüketme işlemi sonucu elde edilen 254.78 ng mL <sup>-1</sup> derişiminde zafirlukasta ait kromatogram (P; Piribedil, Z; Zafirlukast) | 171 |
| V.12. | Suya eklenerek tüketme işlemi sonucu elde edilen 254.78 ng mL <sup>-1</sup> derişiminde zafirlukasta ait kromatogram (P; Piribedil, Z; Zafirlukast)     | 172 |





## TABLOLAR DİZİNİ

| Tablo                                                                                                                                                                                                | Sayfa |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| <b>II.1.</b> Astımda rol oynayan hücreler ve mediatörler                                                                                                                                             | 4     |
| <b>II.2.</b> Sınır akımı çeşitleri ve farklı parametreler ile değişimi                                                                                                                               | 29    |
| <b>II.3.</b> Normal-faz ve ters-faz sıvı kromatografilerinin karşılaştırılması                                                                                                                       | 52    |
| <b>IV.1.</b> Zafirlukast çözeltisinin pH 8.00 ve pH 9.00'da farklı destek elektrolitlerde OSWV pik akımı değerleri                                                                                   | 95    |
| <b>IV.2.</b> Analiz sırasında denenen tuzlar ve derişimleri                                                                                                                                          | 96    |
| <b>IV.3.</b> Değişik derişimlerde pH 8.00 borat tamponları ile elde edilen pik akımları                                                                                                              | 96    |
| <b>IV.4.</b> Değişik biriktirme sürelerinde OSWAdSV ve DPAdSV yöntemlerine ait kalibrasyon eğrileri ve doğrusallık sınırları                                                                         | 105   |
| <b>IV.5.</b> Zafirlukastın OSWV yöntemi ile analizinden elde edilen kalibrasyon eğrisinin korrelasyon katsayısı ile doğrusallıktan ayrılış önem kontrolü için yapılan istatistiksel hesaplamalar*    | 108   |
| <b>IV.6.</b> Zafirlukastın OSWAdSV yöntemi ile analizinden elde edilen kalibrasyon eğrisinin korrelasyon katsayısı ile doğrusallıktan ayrılış önem kontrolü için yapılan istatistiksel hesaplamalar* | 108   |
| <b>IV.7.</b> Zafirlukastın DPAdSV yöntemi ile analizinden elde edilen kalibrasyon eğrisinin korrelasyon katsayısı ile doğrusallıktan ayrılış önem kontrolü için yapılan istatistiksel hesaplamalar*  | 109   |
| <b>IV.8.</b> Önerilen voltametrik yöntemlere ait kalibrasyon eğrilerinin özellikleri (n = 12)                                                                                                        | 109   |
| <b>IV.9.</b> OSWV yönteminin, gün içi <sup>a</sup> ve günler arası <sup>b</sup> kesinlik ve doğruluk analiz bulguları (n = 6)                                                                        | 112   |
| <b>IV.10</b> OSWAdSV yönteminin, gün içi <sup>a</sup> ve günler arası <sup>b</sup> kesinlik ve doğruluk analiz bulguları (n = 6)                                                                     | 113   |
| <b>IV.11</b> DPAdSV yönteminin, gün içi <sup>a</sup> ve günler arası <sup>b</sup> kesinlik ve doğruluk analiz bulguları (n = 6)                                                                      | 114   |

|               |                                                                                                                                                                                                                       |     |
|---------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>IV.12</b>  | Önerilen yöntemlerin tekrarlanabilirliğine ait analiz bulguları (Eklenen zafirlukast derişimi OSWV yöntemi için $6.25 \mu\text{g mL}^{-1}$ , OSWAdSV ve DPAdSV yöntemleri için $130.00 \text{ ng mL}^{-1}$ ) (n = 12) | 115 |
| <b>IV.13.</b> | OSWV yönteminin sağlamlığına ait analiz bulguları (n = 7)                                                                                                                                                             | 116 |
| <b>IV.14.</b> | OSWAdSV yönteminin sağlamlığına ait analiz bulguları (n = 7)                                                                                                                                                          | 116 |
| <b>IV.15</b>  | DPAdSV yönteminin sağlamlığına ait analiz bulguları (n = 7)                                                                                                                                                           | 117 |
| <b>IV.16</b>  | Farklı analizciye ait analiz sonuçları (Eklenen zafirlukast derişimi OSWV yöntemi için $6.25 \mu\text{g mL}^{-1}$ , OSWAdSV ve DPAdSV yöntemleri için $130.00 \text{ ng mL}^{-1}$ ) (n = 7)                           | 118 |
| <b>IV.17</b>  | Sentetik tablet preparatlarının analiz bulguları (Eklenen zafirlukast miktarı: 20 mg) (n = 7)                                                                                                                         | 119 |
| <b>IV.18.</b> | Accolate® tablete ait analiz bulguları (20 mg zafirlukast / tablet) (n = 7)                                                                                                                                           | 120 |
| <b>IV.19.</b> | Zafirlukastın HPLC yöntemi ile analizinden elde edilen kalibrasyon eğrisinin korrelasyon katsayısı ile doğrusallıktan ayrılış önem kontrolü için yapılan istatistiksel hesaplamalar*                                  | 129 |
| <b>IV.20.</b> | Önerilen HPLC yöntemine ait kalibrasyon eğrisinin özellikleri (n = 8)                                                                                                                                                 | 130 |
| <b>IV.21.</b> | HPLC yönteminin, gün içi <sup>a</sup> ve günler arası <sup>b</sup> kesinlik ve doğruluk analiz bulguları (n = 7)                                                                                                      | 132 |
| <b>IV.22.</b> | Önerilen HPLC yönteminin tekrarlanabilirliğine ait analiz bulguları (Eklenen zafirlukast derişimi $400.00 \text{ ng mL}^{-1}$ ) (n = 12)                                                                              | 133 |
| <b>IV.23.</b> | HPLC yönteminin sağlamlığına ait analiz bulguları (n = 7)                                                                                                                                                             | 134 |
| <b>IV.24.</b> | Farklı analizciye ait analiz sonuçları (Eklenen zafirlukast derişimi $400.00 \text{ ng mL}^{-1}$ ) (n = 7)                                                                                                            | 135 |
| <b>IV.25.</b> | Sentetik tablet preparatlarının analiz bulguları (Eklenen zafirlukast miktarı : 20 mg) (n = 7)                                                                                                                        | 136 |
| <b>IV.26.</b> | Accolate® tablete ait analiz bulguları (20 mg zafirlukast / tablet) (n = 7)                                                                                                                                           | 137 |
| <b>IV.27.</b> | Zafirlukastın plazmadan analizi için denenen tüketme işlemleri                                                                                                                                                        | 138 |
| <b>IV.28</b>  | Zafirlukastın HPLC yöntemi ile plazmadan analizinde elde edilen kalibrasyon eğrisinin korrelasyon katsayısı ile doğrusallıktan ayrılış önem kontrolü için yapılan istatistiksel hesaplamalar*                         | 140 |

|                                                                                                                                                                     |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>IV.29.</b> Zafirlukastın plazmadan HPLC ile analiz yöntemine ait kalibrasyon eğrisinin özellikleri (n=8)                                                         | 141 |
| <b>IV.30.</b> Zafirlukastın plazmadan HPLC ile analiz yöntemine ait gün içi <sup>a</sup> ve günler arası <sup>b</sup> kesinlik ve doğruluk analiz bulguları (n = 7) | 143 |
| <b>IV.31.</b> Zafirlukastın plazmadan analizinde tüketme verimi (n = 6)                                                                                             | 144 |
| <b>V.1.</b> Zafirlukast için hesaplanan elektron sayısı ve difüzyon katsayıları (n = 6)                                                                             | 158 |



## I. GİRİŞ ve AMAÇ

Zafirlukast, astım ataklarını önlemek amacıyla kullanılan, özellikle lökotrien D<sub>4</sub> olmak üzere lökotrien C<sub>4</sub> ve E<sub>4</sub> reseptörlerinin de etkisini inhibe eden lökotrien reseptör antagonistidir (1-3). Zafirlukast, gündüz ve gece görülen astım semptomlarını azaltır, astım alevlenme dönemlerinin sıklığını azaltır. Çeşitli alerjenlerin, ekzersizin, soğuk havanın, aspirinin ve kükürt dioksitin bronşları daraltıcı etkilerine karşı koruma sağlar. (4-7).

Kaynaklarda zafirlukastın farmasötik preparatlardan ve biyolojik materyalden analizi, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (8-10) ve türev spektrofotometrisi (10) ile yapılmış olduğu bulunmuştur.

Zafirlukastın kaynaklarda herhangi bir elektroanalitik yöntem ile tayinine rastlanmamıştır.

Zafirlukastla yapılması planlanan çalışmaların ilk aşamasında biyolojik materyalde bulunabilecek en düşük miktarı tayin edebilecek olan yöntemlerin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bunun için basitliği, yüksek duyarlılığı, seçiciliği ve uygulamada değişikliğe açık olması nedenleri ile özel bir yeri olan elektrokimyasal yöntemlerden kare dalga voltametrisi, kare dalga adsorptif sıyırma voltametrisi ve diferansiyel puls adsorptif sıyırma voltametrisi ve son zamanlarda yüksek performans, yüksek hız ve yüksek ayırıcılıklı analizler için kullanılan yüksek performanslı sıvı kromatografisi kullanılmıştır. Bu amaçla geliştirilecek olan yöntemlerle zafirlukastın farmasötik preparatlardan analizinin yapılması planlanmıştır.

Geliştirilen yöntemlerde zafirlukastın analizi için çeşitli deneysel ve cihaz parametreleri araştırılarak optimum koşullar saptanacaktır. Geliştirilen yöntemlerin geçerliliği doğruluk, kesinlik, seçicilik, duyarlılık, sağlamlık ve tutarlılık gibi validasyon parametreleri ile değerlendirilecektir. Validasyon parametrelerinin uygun değerler arasında olduğunu saptadıktan sonra kaynaklardaki valide olmuş bir

spektrofotometrik analiz yöntemi (10) ile karşılaştırılıp sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilecektir.

Ayrıca zafirlukastın dönüşümlü voltametri, kronoamperometri ve doğrusal taramalı voltametri ile akım karakteri, difüzyon katsayısı ve olası indirgenme mekanizması gibi özelliklerinin de incelenmesi planlanmıştır.

Çalışmalarımızın ikinci aşamasında biyolojik materyalden zafirlukastın tüketilmesi ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi kullanılarak zafirlukastın  $\text{ng mL}^{-1}$  düzeyinde analizinin gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır.



## II. GENEL BİLGİLER

### II.1. Astım ve Tedavisinde Kullanılan İlaçlar

Astım, birçok hücrenin ve özellikle de mast hücrelerinin, eozinofillerin ve T-lenfositlerinin rol oynadığı, kronik bir inflamatuvar hastalıktır. Bu enflamasyon, duyarlı kimselerde, özellikle geceleri ve / veya sabahın erken saatlerinde olmak üzere tekrarlayan hırıltılı solunum, nefes darlığı, göğüste sıkışma hissi ve öksürük ataklarına neden olur (11). Astım, alerjenlerle ve kirlilik yapan maddelerle temasın artmasının da yer aldığı, çevre faktörleri ile bağlantılı olarak sıklıkla görülmektedir.

Astım nöbetlerini tetikleyen faktörlerin alerjen niteliğinde olup olmamasına göre astım ikiye ayrılır (12):

- \* Alerjik (ekstrinsik) astım
- \* İdiyosenkratik (intrinsik) astım

Alerjik astımda hastanın özgeçmişinde ve / veya soygeçmişinde rinit, ürtiker, ekzema gibi alerjik hastalık öyküsü bulunur. İdiyosenkratik astımda ise hastanın özgeçmişinde alerji öyküsü kural olarak yoktur, hastalık genelde orta yaşlarda başlar. Bunların % 10 kadarında aspirin ve diğer bazı antiinflamatuvar analjezik ilaçlar alerjik olmayan bir mekanizma ile astım krizini tetikler. Ancak bütün hastalar bu iki tipten birine uymayabilir ve hastaların bir bölümü kısmen bir tipin ve kısmen de diğer tipin özelliğini gösterir. Genel bir kural olarak, hastalığın erken yaşta başladığı hastalarda genelde alerjik astım, geç başlayan astımda ise nonalerjik veya bu iki tipin bir karması egemendir.

Astım, başka bir hastalığa bağlı olmayan (primer), tersinir bronkospazmın neden olduğu hava yolları tıkanması halidir. Hava yollarının tıkanmasına katkıda bulunan 3 mekanizma vardır (13-15):

1. Bronş duvarındaki düz kasların kasılması sonucu gelişen bronkokonstrüksiyon,
2. Damar dışına protein ve su sızmasına bağlı olarak gelişen mukoza ödemi,
3. Mukus salgısının artması.

Hava yollarının tıkanması, hastaların yaklaşık 1/3'ünde alerjiye bağlı spazmdan ileri gelir. Geri kalanlarda ise bronş düz kasları hiperreaktif durumdadır ve alerjenik olmayan çeşitli nonspesifik etkenler bronkospazmı artırarak solunum güçlüğüne neden olurlar. Alerjen niteliğindeki etkenler arasında, solunum yolu enfeksiyonları (özellikle viral enfeksiyonlar), hava kirliliği ve havadaki diğer çevresel iritanlar, meslek nedeniyle maruz kalınan kimyasal madde tozları, buharları ve gazlar, egzersiz, soğuk hava, sistemik alınan ilaçlar ve kimyasallar (aspirin ve bazı antiinflamatuvar ilaçlar,  $\beta$ -blokörler, sülfat tuzları ve kükürt dioksit) sayılabilir (12).

Astımda rol oynayan enflamasyon hücreleri ve enflamasyon mediatörleri Tablo II.1'de verilmiştir (16-20).

**Tablo II.1.** Astımda rol oynayan hücreler ve mediatörler

| Enflamasyon hücreleri | Enflamasyon mediatörleri          |
|-----------------------|-----------------------------------|
| Mast hücreleri        | Histamin                          |
| Eozinofiller          | Lökotrienler                      |
| Makrofajlar           | Prostaglandinler                  |
| T-lenfositleri        | Trombositleri aktive edici faktör |
| Epitel hücreleri      | Bradikinin                        |
| Nötrofiller           | Adenozin                          |
| Trombositler          | Sitokinler                        |
| Fibroblastlar         | Anafilatoksinler                  |
| Bazofiller            | Taşikininler                      |
| Nöronlar              | Endotelinler                      |
| Monositler            | Büyüme faktörü                    |
| B-lenfositleri        | Serbest oksijen radikalleri       |
| Endotel hücreleri     |                                   |

Günümüzde astım tedavisinde başlıca iki yaklaşım vardır (12):

- \* Astım ataklarını gidermek için gerektiğinde kullanılan ilaçlar
- \* Astım ataklarını önlemek için devamlı kullanılan ilaçlar

Birinci grup inhalasyon veya ağızdan verilen  $\beta$ -mimetik ilaçlar, sadece inhalasyonla verilen ipratropium gibi bronkodilatörler ve sistemik verilen glukokortikoidleri kapsar. Şiddetli nöbetlerin geçirilmesi için intravenöz teofilin verilebilir.

İkinci grupta ise ağız yolundan verilen ve  $\beta$ -mimetik ilaçlara göre zayıf bronkodilatör etkinlik gösteren teofilin ve türevleri ile mast hücreleri stabilizatörü olan kromoglikat ve benzerleri, güçlü önleyici ilaçlar olan glukokortikoidler bulunur.

Astım tedavisinde kullanılan ilaçlar beş gruba ayrılırlar (15, 21-23):

### **1. $\beta$ - adrenerjik reseptörleri aktive eden ilaçlar ( $\beta$ - mimetikler)**

Bronş düz kaslarının  $\beta$  reseptörlerini uyararak bronş ve bronşiyalleri gevşetirler ve iki gruba ayrılırlar.

- a) Selektif etkili olmayanlar: Adrenalin, İzoproterenol (İzoprenalin), Efedrin
- b) Selektif etkili olanlar: Orsiprenalin sülfat (Metaproterenol), Terbutalin, Salbutamol (Albuterol), Salmeterol Ksinofat, Formoterol, Fenoterol.

### **2. Metilksantinler ( Fosfodiesteraz inhibitörleri)**

Ksantin türevi diüretik bir ilaç olarak ilk kez çıkarılan teofilin, bronkodilatör etkisi nedeni ile bronşiyal astımda, astım ataklarını önlemek amacıyla kullanılmaktadır.

### **3. Antimuskarinik ilaçlar**

Bronş düz kaslarının ve mukoza salgı bezlerinin kolinerjik reseptörlerini bloke ederler ve bronkodilatasyon yaparlar. Bu amaçla İpratropium bromür kullanılmaktadır.



#### **4. Mast hücreleri stabilizatörleri (non spesifik antiinflamatuvar bileşikler)**

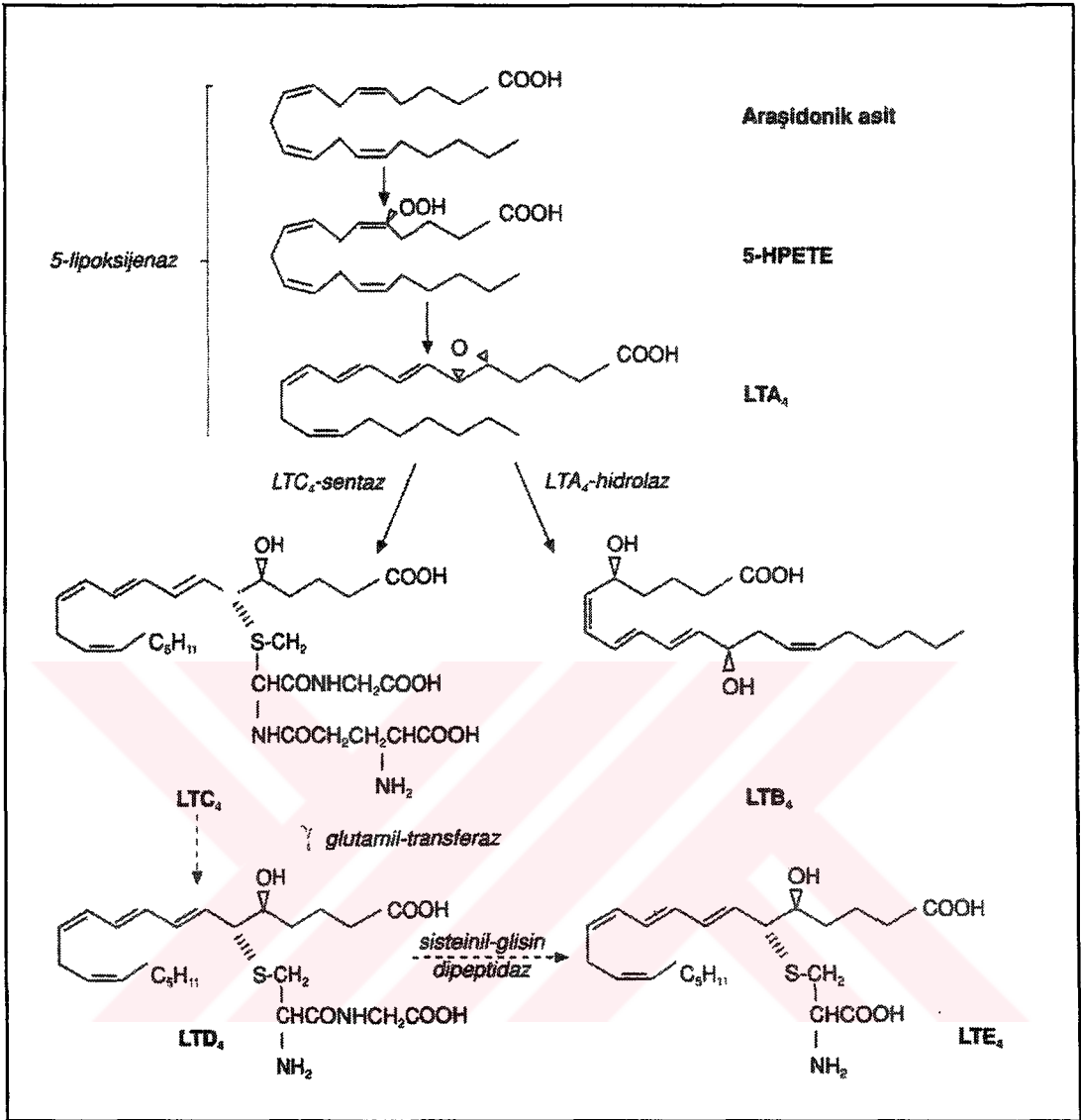
Trakea ve bronş mukozası ile üst solunum yolu mukozasındaki mast hücrelerinin membranını stabilize ederler. Hücre içinde siklik AMP düzeyini yükselterek  $Ca^{+2}$ 'un içeri girişini ve hücre içinden mobilizasyonunu inhibe ederler. Bu grupta Kromolin sodyum (Disodyum kromoglikat), Ketotifen, Nedokromil sodyum, Metotreksat, Siklosporin yer alır.

#### **5. Glukokortikoidler (Kortikosteroidler)**

Antikor oluşumunu inhibe ederek mukozadaki ödemi azaltırlar, akut astım ataklarının oluşumunu önlerler. Bu amaçla Beklometazon dipropionat, Triamsinolon asetonid, Flunisolid, Flutikazon, Budesonid, Prednisol ve Metil prednisolon yer almaktadır.

#### **II.1.1. Astımda Kullanılan Lökotrien Reseptör Antagonistleri**

Sistenil lökotrienler (LT) ( $LTC_4$ ,  $LTD_4$ , ve  $LTE_4$ ), astımda önemli enflamasyon mediatörleridir (21). LT, hücre aktivasyonu sırasında 5-lipoksijenaz enziminin ve membrana bağlı bir 5-lipoksijenaz proteininin etkisiyle, hücre membranındaki araşidonik asitten sentezlenmektedir (15, 21, 22, 24-27) (Şekil II.1).  $LTA_4$ , stabil değildir, ya hidrolize uğrayarak  $LTB_4$ 'e yada glutatyonla konjügasyon sonucu  $LTC_4$ 'e dönüşür.  $LTC_4$ , hücre dışına aktarılacak  $\gamma$  glutamil-transferaz enziminin etkisiyle  $LTD_4$ 'e metabolize edilir.  $LTD_4$  ise sistenil-glisin dipeptidaz enzimi tarafından  $LTE_4$ 'e metabolize olur. Lökotrien sentezi oldukça hızlıdır ve sonunda insan akciğerinde artık metabolize edilemeyen  $LTE_4$ , bu organda birikir. Akciğer dışında ise  $LTE_4$  dolaşımdan, hiç değişikliğe uğramayarak % 85'i safrayla ve % 15'i idrarla uzaklaştırılır (28-30).



**Şekil II.1.** Lökotrien biyosentezi

#### II.1.1.1. Lökotrienlerin Astımdaki Rolü

Yaklaşık 50 yıl kadar önce antijene karşı duyarlı duruma geçmiş kobay akciğerinin uyarıldığı zaman, düz kasları kasan bir madde salıverildiği gösterilmiştir (31, 32). Bu madde önceleri, 1938’de Feldberg ve Kellaway tarafından “yavaş reaksiyona giren madde”, daha sonra da “anafilaksinin yavaş reaksiyona giren maddesi” (SRS-A) olarak adlandırılmıştır (25, 26, 31, 32). SRS-A’nın insan bronşiyollerini aktif bir şekilde daralttığı gösterilmiş, sonra bu maddenin astımlıların akciğerinden bol miktarda salındığının ortaya konulması sonucu SRS-A’nın astımda

rol oynadığı düşünülmüştür. SRS-A'nın yapısı uzun yıllar aydınlatılamamış ve 1970 yıllarında araşidonik asit metabolitlerinin bir karışımı olduğu bulunmuştur. Bugün gerçekte SRS-A'nın aynı zamanda peptit lökotrienler veya sülfidopeptit lökotrien adlarıyla bilinen 3 sisteinil lökotrienin karışımı ( $LTC_4$ ,  $LTD_4$ ,  $LTCE_4$ ) olduğu bilinmektedir (22).

Sisteinil lökotrienler, değişik enflamasyon süreçlerinde rol oynamakta ve hava yollarının tıkanmasına (daralmaya) neden olan 3 mekanizmanın her birinde rol oynamaktadır (5, 20, 21, 24, 33, 34). Astım hastalarının vücut sıvılarındaki sisteinil lökotrien düzeylerinin, astım hastası olmayanlara göre yüksek olduğu bulunmuştur (15, 35).

Cys  $LT_1$  ve Cys  $LT_2$  olmak üzere başlıca 2 sisteinil lökotrien reseptörü mevcuttur.

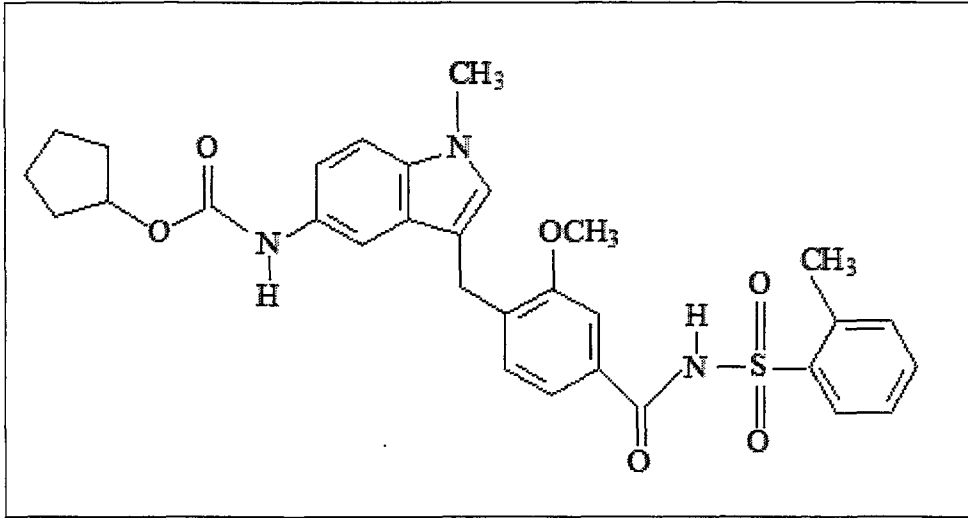
Astımda lökotrien reseptör antagonisti olarak zafirlukast, montelukast ve zileuton kullanılmaktadır. Tez çalışması için bu ilaçlardan zafirlukast seçilmiştir.

## **II.2. Zafirlukast**

Zafirlukast, oral yoldan kullanılan ve  $LTD_4$ 'ün etkisini inhibe eden lökotrien reseptör antagonistidir ( $LTRA_s$ ). Zafirlukast, Cys  $LT_1$  reseptörlerine kompetitif olarak bağlanır (3, 4, 20, 24, 33, 34, 36-39).

### **II.2.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri**

Zafirlukast, 4 - (5 - siklopentiloksikarbonilamino - 1-metilindol - 3 - ilmetil) 3 - metoksi -o- toylsülfonilbenzamid yapısındadır. Moleküler formülü  $C_{31}H_{33}N_3O_6S$  şeklindedir. Açık formülü ise Şekil II.2'de gösterilmiştir.



**Şekil II.2.** Zafirlukastın kimyasal yapısı

Zafirlukast sarı renkte, kokusuz bir tozdur. Molekül ağırlığı 575.2'dir ve ergime noktası 220 °C'dir. Suda çözünmez, metanolde az çözünür, tetrahidrofur, dimetil sülfoksit ve asetonda çözünür.

Zafirlukastın  $pK_b$  değeri 9.7'dir (26).

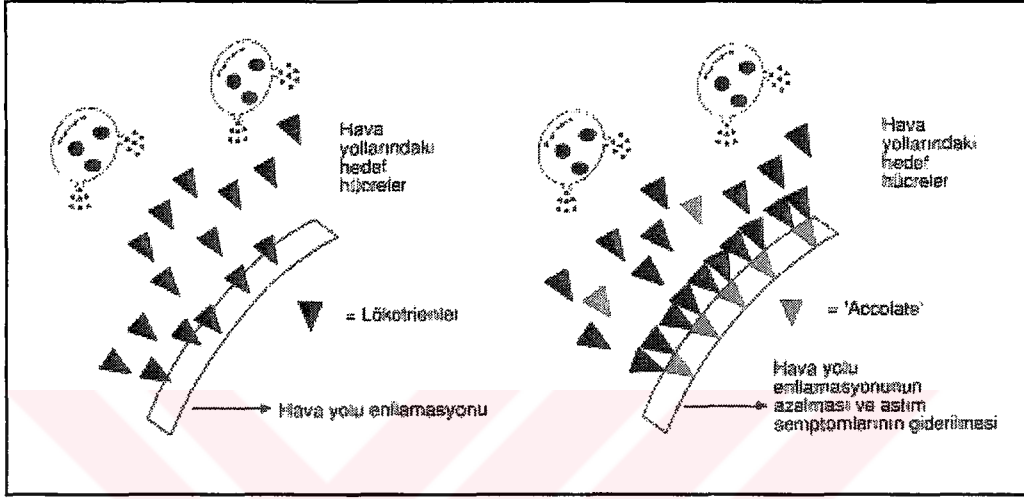
20 mg zafirlukast içeren "Accolate®" preparatı, üzerinde dozu yazılı olan film kaplı beyaz tabletler şeklinde satılmaktadır. Her tablet kroscarmeloz sodyum, laktoz, mikrokristalin selüloz, povidon, magnezyum stearat, metil hidroksipropilmetilsellüloz ve titanyum dioksit içerir.

## **II.2.2. Farmakolojik Özellikleri**

### **II.2.2.1 Farmakodinamik Özellikleri**

Zafirlukast, oral yoldan kullanılan ve anafilaksinin yavaş reaksiyona giren maddesinin (SRS - A) bileşenleri olan LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> ve LTE<sub>4</sub> reseptörlerinin antagonisti olup seçici ve güçlü bir peptiddir. Zafirlukast, spesifik olarak lökotrien reseptörlerine etkilidir (1, 2, 4, 12).

$\beta$ -agonist tedavisiyle yeterince kontrol altına alınamayan astım hastalarında zafirlukast, bir ilk basamak koruyucu tedavi ilacıdır. Akciğerlerde çok sayıda proenflamatuvar hücrenin ve enflamasyon bileşenlerinin etkilerini azaltır (Şekil II.3) (24, 25, 40, 41).



**Şekil II.3.** Zafirlukastın etki mekanizması

Zafirlukast,  $LTD_4$  etkisiyle oluşan bronkokonstriksiyon etkiyi inhibe eder (38, 42 - 44). Alerjenlerin (bitki polenleri, kedi / köpek tüyü gibi) etkisiyle oluşan bronko konstriksiyon etkisine karşı koruma sağlar (5, 20, 21, 25, 37, 45-49). Antijenle karşılaştıktan sonra akciğer fonksiyonunun başlangıç değerlerine dönmesi için geçen süre, zafirlukast kullanan hastalarda plasebo verilenlere kıyasla çok daha kısadır (46, 48). Ayrıca zafirlukast, ekzersizin, soğuk havanın, aspirinin, kükürt dioksitin ve trombositleri aktive edici faktörün (PAF) bronkokonstriksiyon etkisini engeller (4 - 6, 20, 25, 27, 37, 38, 50-56).

Zafirlukast, semptomatik hastalarda semptomları düzeltir, gündüz ve gece görülen astım krizlerini azaltır, akciğer fonksiyonlarını düzeltir,  $\beta$ -agonistlere duyulan ihtiyacı doza bağlı olarak azaltır ve astım alevlenme dönemlerinin azalmasını sağlar (4, 20, 25, 34, 40, 57-59).

Zafirlukastın polen mevsimi boyunca alerjik nezlesi (alerjik rinit) ve bronşiyal astımı olan hastalarda nezle ve astım belirtilerini azalttığı görülmüştür (3, 21).

Şiddetli nefes darlığı olan kronik obstrüktif akciğer hastalarında 2 saat içinde akciğer fonksiyonlarını düzelttiği gözlenmiştir (25, 33, 60).

Yetişkin sistik fibrozisi olup zafirlukast kullanan hastalarda klinik olarak iyileşme görülmüş ve hastalar tarafından iyi tolere edildiği belirtilmiştir (34).

Ayrıca şiddetli sistemik ürtikerde de kullanılmaktadır (61, 62).

Accolate® tabletin alımı ile zafirlukastın etkileri çabuk başlar ve uzun sürer. Astım krizlerindeki düzelme, zafirlukast tedavisinin ilk haftasında ve çoğu zaman da ilk 3 - 4 gün içerisinde ortaya çıkar (20, 25, 63-68).

Düşük doz inhale kortikosteroidlere ve koruyucu tedaviye ihtiyaç duyulan hastalarda inhale steroidlere alternatif bir ilaçtır (2, 23, 40, 57, 65, 69-73).

Zafirlukast, günde iki defa ağızdan alınan bir ilaç olduğundan, inhalasyon şeklinde idame tedavisi bakımından uyum ve uygulama sorunlarının söz konusu olduğu hastalarda özellikle tercih edilmektedir (62, 74-76).

Astım ilaçlarının ne derece etkili oldukları rutin olarak ekspirasyon akım hızı doruğu testi (PEFR, peak expiratory flow rate) değerleri gibi klinik parametreler üzerindeki etkileri ölçülerek değerlendirilmektedir. Daha geliştirilmiş testlerle ölçülen bir saniyedeki zorlu ekspirasyon hacmi (FEV, forced expiratory volume in one secoond) ve zorlu vital kapasite (FVC, forced vital capacity) değerleri de bu amaçla kullanılmaktadır. Ancak bu değerler hastalığın yol açmış olabileceği fiziksel, duygusal ve sosyal zararları herhangi bir şekilde temsil etmemektedir. Sağlıkla ilgili yaşam kalitesi değerlendirilmeleri, hastanın sağlık durumunun tam olarak yorumlanmasını sağlar. Günümüzde bu nedenle klinik çalışmalarda ve

uygulamalarda, astıma özgü çeşitli yaşam kalitesi değerlendirilmelerine (aktiviteler, semptomlar, duygular ve çevre) yer verilmektedir. Yapılan iki çalışmada, zafirlukast kullanan hastalarda başlangıca kıyasla elde edilen ortalama düzelmeler, her dört yaşam kalitesi alanında da plasebodan anlamlı şekilde daha fazla olduğu görülmüştür (77, 78).

#### **II.2.2.2. Farmakokinetik Özellikleri**

Zafirlukastın farmakokinetiğinin, doza veya kullanım süresine bağlı olarak değişmediği gözlenmiştir. Tedaviye günde 2 defa 20 mg ile başlanması ve daha sonra dozun, terapötik cevaba göre ayarlanması önerilmektedir.

Zafirlukastın farmakokinetiği genç ve astımı olmayan sağlıklı erkekler, yaşlı ve astımlı hastalar, karaciğer ve böbrek fonksiyonu bozuk olanlar ve bebeğini emziren anneler de dahil olmak üzere çok çeşitli denek ve hasta gruplarında değerlendirilmiştir (39). Astımlı erişkinlerdeki ve adolesan çağındaki gençlerde farmakokinetiği, sağlıklı erişkin erkeklerdekine benzer bulunmuştur (39). Adolesan çağındaki hastalarda ve hafif dereceli böbrek fonksiyonu bozuk olan hastalarda doz ayarlanmasına gerek yoktur (39). Geçmişinde orta veya ciddi böbrek bozukluğu olan ve karaciğer sirozu dahil karaciğer bozukluğu olan hastalarda önerilmemektedir (38). Hafif böbrek bozukluğu olan hastalar ile normal hastalar arasında zafirlukastın farmakokinetiği bakımından önemli farklılıklar yoktur. Anne sütüne geçtiği için bebeğini emziren annelere verilmemelidir (39). Zafirlukastın gebe kadınlardaki ilaç emniyeti henüz belirlenmemiştir. Gebelik sırasında tedaviye devam edilmesinden kaynaklanabilecek riskler, elde edilebilecek faydalar karşısında değerlendirilmeli ve zafirlukast, gebelik sırasında yalnız açıkça ihtiyaç duyulduğu takdirde kullanılmalıdır. Zafirlukastın 12 yaşından küçük çocuklardaki ilaç emniyeti ve etkinliği henüz saptanamamıştır.

Vücut ağırlığına göre gereken düzeltme yapıldığında, zafirlukastın farmakokinetiği bakımından kadınlarla erkekler arasında anlamlı fark belirlenmemiştir.

### II.2.2.2.1. Absorpsiyon

Zafirlukast, oral kullanımı sonrasında hızla ve tamamen emilir (28). Maksimum plazma derişimi ( $C_{max}$ ) ilacın alınmasından yaklaşık 3 saat sonra elde edilir. Yarılanma ömrü ( $t_{1/2}$ ) 10 saattir. Plazmadaki kararlı plazma derişimleri, günde 2 dozla tedavi sırasında 3. günde ulaşılır. Zafirlukastın plazma derişimi/zaman eğrisi altındaki alan (AUC) değeri 20-80 mg arasındaki dozlarda doza bağımlıdır ve tek - doz farmakokinetiği verilerinden tahmin edilebilir (21, 26, 39).

Yaşlılarda, karaciğer yetmezliği olan veya alkole bağıli siroz hastalarında zafirlukast kullanılması, ortalama  $C_{max}$  ve AUC değeriierinin aynı zafirlukast dozu verilen sağılıklı insanlardakinin yaklaşık 2 katına çıktığı görülmüştür (26, 39).

Zafirlukastın besinlerle birlikte alınması, AUC değeriierıyla izlenen biyoyararlanım oranındaki değışiklikleri artırmış ve hastaların büyük bölümünde (% 75'inde) bu oranı % 40 dolayında azaltmıştır. Bu nedenle besinlerle birlikte alınmaması önerilmektedir (21, 39).

### II.2.2.2.2. Dağılma

Zafirlukastın yaklaşık % 99'u, 0.25 - 4.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  arasında değışen konsantrasyonlarda, plazma proteinlerine ve özellikle de albumine bağıli durumdadır. Dağılım hacmi yaklaşık 70 litredir. Farelerde yapılan bir çalışmada kan-beyin engelini minumum düzeyde geçtiğı bildirilmektedir (39).

### II.2.2.2.3. Metabolizma

Zafirlukast, geniş kapsamlı olarak metabolize edilir. Zafirlukast, Sitokrom P450 2C9 (CYPC9) yoluyla hidroksil metaboliti şeklinde metabolize olur. İnsan plazmasındaki zafirlukast metabolitlerinin, zafirlukastın 90'da biri kadar aktiviteye sahip olduğı bulunmuştur. Verilen dozun % 10'u zafirlukastın metabolitleri olarak idrarla vücuttan atılır (21,39).



#### **II.2.2.2.4. Eliminasyon**

Zafirlukastın oral klirensi yaklaşık 20 L/h'dir. Vücuttan başlıca uzaklaştırma yolu dışkıdır. İdrarda değişikliğe uğramamış zafirlukast bulunmaz. Metabolitler vücuttan idrarla ve dışkıyla uzaklaştırılır (39).

#### **II.2.2.3. Klinik Kullanımı ve Dozu**

Zafirlukast, yetişkin ve 12 yaşın üzerindeki çocuklarda astımın önlenmesinde ve kronik tedavisinde kullanılmaktadır. Astım ataklarının önlenmesi amacıyla kullanıldığından sürekli olarak kullanılmalıdır (24).

Önerilen doz günde 2 defa 20 mg'dır. Hepatotoksisite gelişebileceğinden bu dozun üzerine çıkılmamalıdır.

Yaşlılarda (> 65 yaş) zafirlukast klirensi azalır ve  $C_{max}$  değerleriyle AUC değeri genç erişkinlerdekine hemen hemen 2 katıdır. Bununla birlikte bu yaş grubundaki birikim, astımlı yetişkin hastalarda yapılan çoklu çalışmalarla görüldenden fazla değildir.

#### **II.2.2.4. Yan Etkileri ve İlaç Etkileşimleri**

Zafirlukast iyi tolere edilir (2, 20, 24, 26, 59, 79). Farenjit, baş ağrısı, gastrointestinal bozukluklar (bulantı, kusma ve ishal) ve astımın şiddetlenmesi en çok bildirilmiş olan yan etkilerdir (20, 21, 24). Bu belirtiler genellikle hafif olup zafirlukast kullanan deneklerle plasebo verilen denekler arasında istatistiksel olarak fark bulunmamıştır. Baş ağrısı ve farenjit, genellikle hafif olmuş ve tedavinin yarıda bırakılmasını gerektirmemiştir.

Diğer yan etkiler ise enfeksiyon, rinit, grip sendromu, öksürük, bronşit, sırt ağrısı, karın ağrısı ve gastroenterittir (20).

Nadiren  rtiker ve angioödem içeren a ıru duyarlılık reaksiyonları ve kabarcıklar dahil deri döküntüleri de bildirilmiştir (21, 24).

Zafirlukastın kullanıldığı klinik çalışmalar sırasında ender olarak serum alanin transaminaz düzeylerinin % 1 oranında yükseldiği gözlemlenmiştir. Bu yükselme, tedaviye devam edilmesi sırasında ya da tedavinin durdurulmasından sonra ortadan kalkmıştır (21).

Kontrol gruplarına plasebo verilen klinik çalışmalarda, zafirlukast kullanan ileri yaştaki hastalarda enfeksiyon görülme oranının arttığı görülmüştür. Öncelikle solunum sisteminde görülen bu enfeksiyonlar, genellikle hafif olmuş ve zafirlukast tedavisinin durdurulmasını gerektirmemi tir.

Zafirlukast, astım ve alerji tedavisinde rutin olarak uygulanan diğer ilaçlarla birlikte verilebilir.  nhale veya oral kortikosteroidler, inhale veya oral bronkodilatörler, antibiyotikler ve antihistaminikler, olumsuz bir etkileşime yol açmaksızın zafirlukast ile birlikte kullanılabilir.

Zafirlukast herhangi bir etkileşim olmaksızın doğum kontrol ilaçlarıyla birlikte kullanılabilmektedir. Serumdaki etinil estradiol ve endojen hormonların (follikül stimüle edici hormon ve progesteron) konsantrasyonlarına etki gözlenmemiştir.

Asetil salisilik asitle (aspirin) birlikte kullanılması, plazmadaki zafirlukast düzeylerinin yaklaşık % 45 oranında artmasıyla sonuçlanabilir. Böyle bir etkileşimin klinik önem taşıma olasılığı uzaktır (39).

Eritromisin ile birlikte kullanılması, zafirlukast plazma düzeylerinin % 40 kadar azalmasıyla sonuçlanmıştır (21, 39).

Teofilin ile birlikte kullanılması, zafirlukast plazma düzeylerinin yaklaşık % 30 azalmasıyla sonuçlanabilir ama plazma terfanadin düzeylerinde değişme görülmemiştir (21, 39).

Warfarin ile birlikte zafirlukast kullanılması, R-warfarinin farmakokinetiğini etkilememiş, buna karşılık S-warfarinin biyoyararlanımı artmış, klirensi azalmıştır. Ayrıca maksimum protrombin zamanının % 35 kadar uzamasına neden olmuştur. Bu nedenle zafirlukastın warfarin ile birlikte kullanılacağı hastalarda protrombin zamanının izlenmesi önerilir (39, 80, 81).

Zafirlukastın terfanadin ile birlikte güvenle kullanılabileceği bildirilmiştir (39, 82).

### **II.3. Zafirlukastın Analiz Yöntemleri**

Kaynaklarda zafirlukastın kromatografik ve spektrofotometrik olmak üzere 4 tane analiz yöntemi bulunmaktadır.

Ficarra ve arkadaşları tarafından zafirlukastın analizi için ters faz HPLC yöntemi geliştirilmiş ve valide edilmiştir. Analiz iki ayrı laboratuvarda gerçekleştirilmiştir. Laboratuvar A'da Vydac ters faz C<sub>18</sub> kolonda (25 cm x 4.6 mm i.ç., partikül büyüklüğü 10 µm), 24, 26 ve 28°C' de ve dizi diyot dedektörle gerçekleştirilmiştir. Laboratuvar B' de ise Vydac ters faz C<sub>18</sub> Sil X-10 kolonda (25 cm x 4.6 mm i.ç., partikül büyüklüğü 10 µm), 24°C'de ve UV dedektörle gerçekleştirilmiştir. Standart zafirlukast, Accoleit® tabletten tüketme işlemi ile elde edilmiştir. Bunun için 10 tablet toz edilmiş ve 30°C 'de 3 kez 50 mL asetonitril ile 30 dakika magnetik karıştırıcıda tüketilmiştir. Çözetiler toplanmış ve vakum altında uçurulmuştur. Artık metanol ile işleme tabi tutulmuş ve beyaz bir çökelti elde edilmiştir ve maddenin saflığı erime noktası, ince tabaka kromatografisi ve HPLC yöntemi ile kontrol edilmiştir. Stok zafirlukast ve iç standart olarak kullanılan flavon asetonitrilde hazırlanmıştır. Analiz, asetonitril:su (80:20, h/h) hareketli faz kullanılarak 1 ml/dakika akış hızında ve UV dedektörle 245 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. Sıcaklık 24°C' ye ayarlanmıştır. Analiz sonucunda 3.22

dakikada zafirlukast, 3.78 dakikada flavon elde edilmiştir. Yöntem 0.02-0.12 mg mL<sup>-1</sup> aralığında doğrusaldır, geri kazanım değerleri % 99.02 - 100.25 arasında bulunmuştur. Analizde tutarlılık testi için deneysel planlama yöntemi kullanılmış ve organik çözücü yüzdesi, dalga boyu, sıcaklık ve akış hızı çalışılmıştır. Ara kesinlik testi, tekrarlanabilirlik ve üretilebilirlik ölçümleri ile yapılmıştır. Bunun için analizler farklı analizci tarafından, farklı cihazda ve farklı günde yapılmıştır (8).

Bui ve arkadaşları tarafından plazmadan zafirlukastın tayini için normal faz HPLC yöntemi geliştirilmiştir. Tüketme işlemi için C<sub>18</sub> (Large reservoir Bond Elute) kolon kullanılmıştır. Analiz, (5 µm, 150 x 4.6 mm i.ç.) Zorbax CN analitik kolonda, (5 µm, 12.5 x 4.6 mm i.ç.) Zorbax CN ön kolonda ve oda sıcaklığında yapılmıştır. Hareketli faz olarak tetrahidrofuran:hekzan:suda % 90 glasiyel asetik asit (300:700:1, h/h/h) ve iç standart olarak da ICI 198 707 kullanılmıştır. Akış hızı 0.9 mL/dakikadır. Floresans dedektör 250 nm uyarma ve 452 nm emisyon dalga boyuna ayarlanmıştır. Stok zafirlukast çözeltisi asetonitrilde, iç standart ise tetrahidrofuranda hazırlanmıştır. Tüketme işlemi için, 1 mL iç standart eklenmiş plazma örneği 1 mL asetonitril ile karıştırılmış ve 1000 g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Berrak santrifüat alınmış ve 5 mL 0.01 M trietil amonyum fosfat eklenmiştir. C<sub>18</sub> kartuş, metanol (2 x 1 mL) ve su (2 x 1 mL) ile şartlandırılmıştır. Dilüe süpernatant kolondan geçirilmiş ve atılmıştır. Zafirlukast, 0.5 mL ile 3 kez tetrahidrofuran:asetonitril:trietyl amin (10:90:0.2, h/h/h) kullanılarak polipropilen tüpe elüe edilmiştir. Çözücü azot atmosferi altında 40 °C'de uçurulmuş ve artık, hareketli faz ile çözülerek 0.45 µm filtreden süzölmüş ve HPLC sistemine enjekte edilmiştir. Analiz sonucu zafirlukast 9 - 10 dakikada, iç standart ise 10 - 11 dakikada elüe olmuşlardır. Yöntemin doğrusallık aralığı 0.75 - 200 ng mL<sup>-1</sup>'dir. Plazmadan geri kazanım değeri % 92 olarak bulunmuştur. Yöntem daha sonra 20 mg tek doz zafirlukast kullanan sağlıklı gönüllünün plazmasına da uygulanmış ve 24 saat boyunca plazma konsantrasyonları izlenmiştir (9).

Radhakrishna ve arkadaşları da zafirlukastın tabletten tayini için HPLC ve türev spektrofotometrisi yöntemi geliştirmişlerdir. Stok zafirlukast çözeltisi asetonitril:su (80:20, h/h) karışımında hazırlanmıştır. HPLC analizleri Symmetry

Shield RP18 (5  $\mu\text{m}$ , 250 x 4.6 mm i.ç.,) kolonda, 300 mL 0.01 M potasyum dihidrojen fosfat:700 mL asetonitril karışımının o-fosforik asitle pH'sı 3.5'a ayarlanarak hazırlanmış hareketli faz ile 1.0 mL/dk akış hızında ve 223 nm'lik dalga boyunda dizi diyot dedektör kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İç standart olarak 5-metil 2-nitrofenol kullanılmıştır. Zafirlukast örnekleri ayrı ayrı  $60 \pm 1$  °C'de 12 saat, 0.1 N NaOH ve 0.1 N HCl ile muamele edilmiştir. Asitle muamelede birçok bozunma ürünü, bazla muamelede ise sadece bir tane bozunma ürünü oluşmuştur. Her iki durumda da bozunma pikleri zafirlukast pikinden ayrılmıştır. Ayrıca hareketli fazda iki zafirlukast çözeltisi hazırlanmış, biri 24 saat UV ışığa (254 nm) diğeri de 12 saat boyunca 60 °C'de bırakılmıştır. Bu çözeltilerde herhangi bir bozunma ürününe rastlanmamıştır. Zafirlukastın bu yöntemle analizinde doğrusallık aralığı 30 - 175  $\mu\text{g mL}^{-1}$ 'dir. Yöntemin ayrıca kesinlik, doğruluk, tekrarlanabilirlik ve geri kazanım gibi validasyon parametreleri değerlendirilmiş ve yöntem farmasötik preparata da uygulanmıştır. Geri kazanım değerleri % 99.1 -100.8 olarak bulunmuştur (10).

Türev spektrofotometrisi yönteminde 3. türev kullanılmıştır ve dalga boyu olarak 251.1 nm seçilmiştir. Yöntem 3.2 - 16  $\mu\text{g mL}^{-1}$  aralığında doğrusaldır ve farmasötik preparata uygulandığında ve geri kazanım değerleri % 98.23 - 101.64 arasında bulunmuştur (10).

#### II.4. Elektroanalitik Yöntemler

Elektroanalitik kimya, analit çözeltisi bir elektrokimyasal hücrenin parçası olduğunda çözeltinin elektrokimyasal özelliklerine dayanan bir grup kantitatif analitik yöntemi kapsar. Elektroanalitik yöntemler, çok düşük tayin sınırlarına ulaşabilirler ve elektrokimyasal yöntemlerin uygulanabildiği sistemler hakkında, ara yüzeylerdeki yük aktarımının stokiyometrisi ve hızı, kütle aktarım hızı, adsorpsiyon ve kemisorpsiyonun derecesi, kimyasal reaksiyonların hız ve denge sabitleri gibi bilgileri de verir (83).

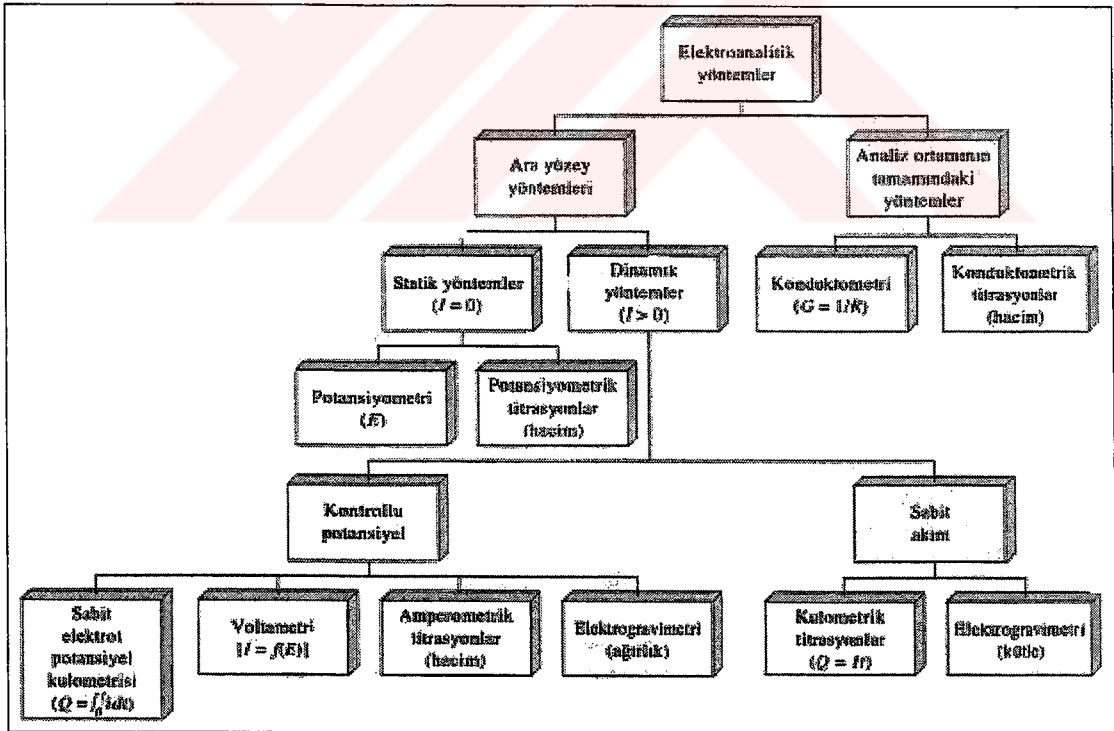
Elektroanalitik yöntemler üç ana grupta toplanabilir:

1. Potansiyel, akım, direnç, iletkenlik, sığa (kapasitans) ve elektrik miktarı gibi değişkenler ile derişim arasındaki ilişkilerin incelenmesine dayanan voltametrik yöntemler, örneğin, kulometri ve polarografi.

2. Elektriksel ölçümler ile volumetrik analizde dönüm noktası tayinine dayanan voltametrik yöntemler, örneğin, potansiyometrik, amperometrik ve kondüktometrik titrasyonlar.

3. Elektrolitin bileşenlerinin elektrik akımı ile faz değiştirmesine dayanan yöntemler, örneğin, elektrogravimetri, elektroliz.

Elektroanalitik yöntemlerin başka bir sınıflandırma şekli Şekil II.4'de verilmiştir (83).



Şekil II.4. Yaygın olarak kullanılan elektroanalitik yöntemlerin sınıflandırılması.

Ölçülen büyüklükler parantez içinde verilmiştir. (I = akım, E= potansiyel, R = direnç, G = iletkenlik, Q = yük miktarı, t = zaman, Hacim = standart çözelti hacmi, ağırlık = elektrokimyasal olarak biriktirilen türün ağırlığı)

Elektroanalitik yöntemler bu sınıflandırma sistemine göre, ara yüzeyde gerçekleşen yöntemler ve tüm analiz ortamında gerçekleşen yöntemler olarak ikiye ayrılırlar. Ara yüzeylerde gerçekleştirilen yöntemlerin daha genel bir kullanım alanı vardır. Ara yüzey yöntemleri, elektrot yüzeyleri ve bu yüzeylere hemen bitişik olan ince çözelti tabakası arasındaki ara yüzeyde oluşan olaylara dayanmaktadır. Tüm analiz ortamı yöntemleri, aksine çözeltinin tamamında oluşan olaylara dayalıdır ve ara yüzey etkilerinden kaçınmak için her yola başvurulur.

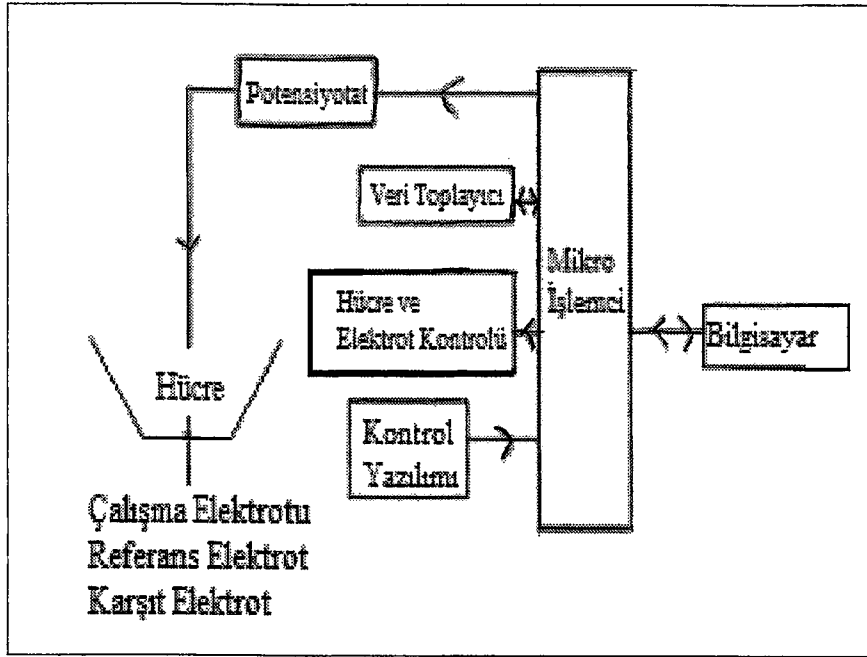
Ara yüzey yöntemleri, elektrokimyasal hücrelerin akımın varlığında veya yokluğunda işleyişine göre statik ve dinamik olmak üzere iki ana sınıfa ayrılırlar. Potansiyometrik ölçümleri içeren statik yöntemlerin hızları ve seçicilikleri nedeniyle ayrı bir önemleri vardır.

Elektrokimyasal hücrelerdeki akımların önemli bir rol oynadığı dinamik ara yüzey ölçümlerinin çeşitli tipleri vardır. Bu yöntemlerden hücrenin potansiyeli kontrol edilen yöntemlerde diğer değişkenlerin ölçümleri yapılmaktadır. Genellikle bu yöntemler duyarlıdır, oldukça geniş çalışma aralıkları vardır ( $10^{-3}$ - $10^{-8}$  M). Ayrıca bu analizlerin çoğu mikrolitre, hatta nanolitre seviyesindeki numune miktarlarıyla gerçekleştirilebilir. Gözlenebilme sınırları pikomol seviyesinde olabilir.

Sabit akımlı dinamik yöntemlerde veriler toplanırken hücredeki akım sabit tutulur.

Elektrokimyasal yöntemlerin gerçekleştirildiği cihaz şematik olarak II.5'de verilmiştir.





**Şekil II.5.** Elektrokimyasal işlemlerin gerçekleştirildiği düzenek

#### II.4.1. Voltametri

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

Voltametri, çeşitli ortamlarda meydana gelen yükseltgenme - indirgenme olaylarının, yüzeydeki adsorbsiyon olaylarının ve kimyasal olarak modifiye edilmiş elektrot yüzeylerindeki elektron aktarım mekanizmalarının aydınlatılmasında yaygın olarak kullanılmaktadır.

Voltametride kullanılan elektrotlar iki grupta incelenir:



1. Polarize edilemeyen (referans) elektrotlar; potansiyeli dış etkilerle değişmeyen elektrotlar (doymuş kalomel elektrot (DKE) ve gümüş/gümüş klorür (Ag/AgCl) elektrot gibi).

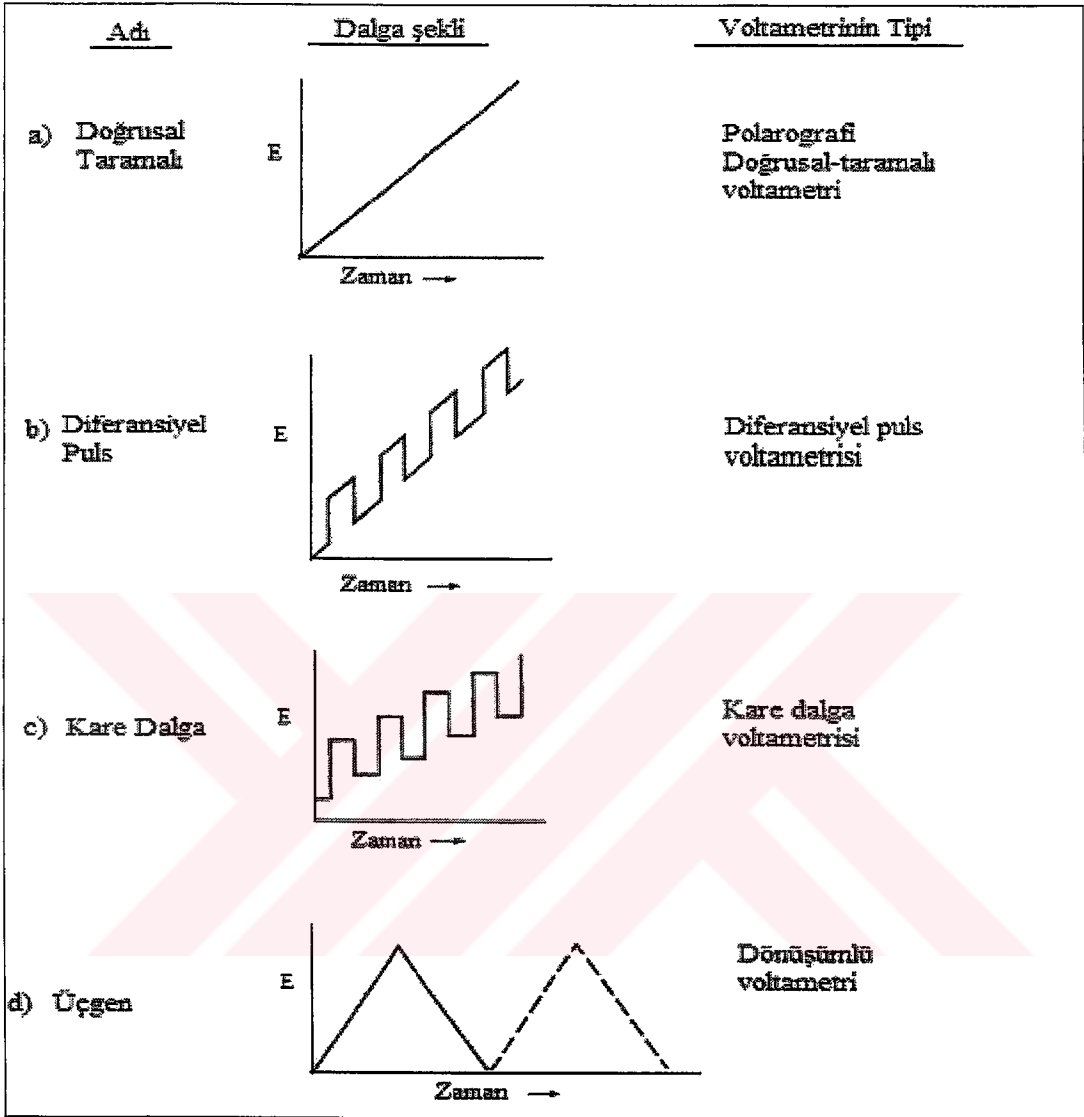
2. Polarize edilebilen (çalışma) elektrotlar; potansiyeli dış etkilerle değiştirilebilen elektrotlar (cıva, platin, altın, grafit elektrotlar) (84).

Kullanılan elektrotların cinsine, uygulanan akım ve potansiyelin şiddetine, sabitliğine ve dengenin bozulma hızına bağlı olarak çeşitli voltametrik yöntemler geliştirilmiştir. Eğer çalışma elektrotu damlayan cıva elektrotu ise yöntem polarografi adını alır. Asılı duran cıva damlası veya bir katı elektrot kullanılırsa sabit elektrot voltametrisidir. Dönüşümlü voltametrinde (CV) asılı duran cıva elektrotu veya başka bir katı elektrota uygulanan potansiyel kontrol edilir ve hücreden küçük bir akım geçer. Bu nedenle dönüşümlü voltametri, bir potansiyel kontrollü voltametrik yöntemdir.

#### **II.4.1.a Voltametrinde Uyarma Sinyalleri (83)**

Voltametrinde, bir mikroelettrot içeren elektrokimyasal hücreye değiştirilebilir bir potansiyel uyarma sinyali uygulanır. Bu uyarma sinyali yöntemin dayandığı karakteristik bir akım cevabı oluşturur. Voltametrinde en çok kullanılan uyarma sinyallerinin dördünün dalga şekli Şekil II.6'da verilmiştir. Klasik voltametrik uyarma sinyali, hücreye uygulanan doğru akım potansiyelinin zamanın bir fonksiyonu olarak (genellikle 2-3 V arasında), Şekil II.6.a'da gösterilen doğrusal bir taramadır. Sonra hücrede oluşan akım, zamanın bir fonksiyonu olarak ve böylece uygulanan potansiyelin bir fonksiyonu olarak kaydedilir.

Şekil II.6.b ve II.6.c'de iki puls tipi uyarma sinyali görülmektedir. Akımlar bu pulsların ömrü süresince çeşitli zamanlarda ölçülür. Potansiyel II.6.d'de görülen üçgen şeklindeki dalga ile iki değer arasında devreder. Önce bir maksimuma kadar doğrusal olarak artar ve sonra aynı eğimle orijinal değerine doğrusal olarak azalır. Bu işlem, akımın zamanın bir fonksiyonu olarak kaydedilirken defalarca tekrarlanabilir.



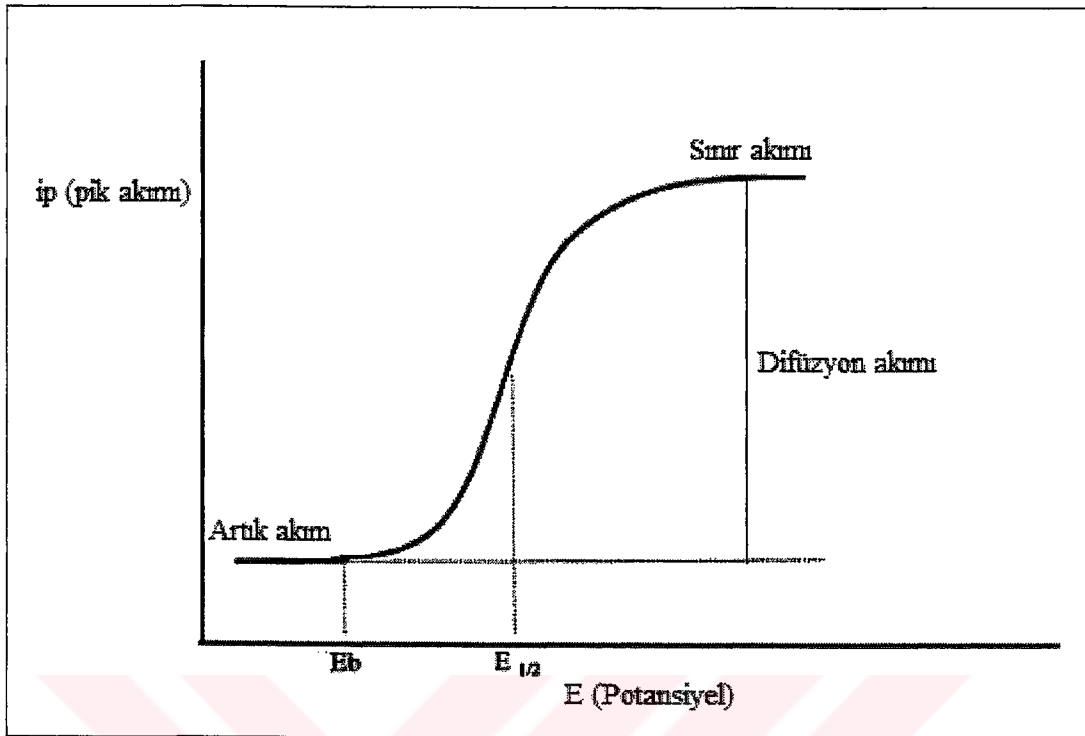
Şekil II.6. Voltametrde kullanılan potansiyel uyarma sinyalleri

#### II.4.1.1. Polarografi

Polarografi, 1927 yılında Çek bilim adamı J. Heyrovsky tarafından geliştirilmiş ilk voltametrik yöntemdir. Bundan 40 yıl öncesine kadar doğru akım polarografisi (DC, normal polarografi) ile sınırlı kalan bu yöntem, son gelişmelerle çok başvurulan duyarlı ve güvenilir bir duruma gelmiştir. Önemli bir eser analiz yöntemi olan polarografi ile periyodik cetvelde yer alan elementlerin büyük bir kısmı ile indirgenebilen veya yükseltgenebilen fonksiyonel gruba sahip elektroaktif olan

organik moleküllerin doğrudan analizi yapılabilmektedir. Elektroaktif olmayan organik moleküller ise kompleks oluşturma, nitrolama, nitrozolama, N veya S oksitleme, kondenzasyon ve katılma tepkimeleri ile dolaylı yolla analiz edilebilirler (85).

Polarografide çalışma elektrodu olarak damlayan cıva elektrodu (DCE) kullanılır. Bu elektrot 0.05 - 0.08 mm iç çaplı bir kılcal cam borudur. Bu kılcalın bir ucu 1 - 50 mL kadar çözelti bulundurulmuş bir hücreye daldırılır. Diğer ucu 30 - 80 cm yüksekliğindeki bir boru yardımıyla cıva haznesine bağlanır. Kılcalın yukarısında bulunan cıva sütununun hidrostatik basıncıyla cıva, çözelti içerisine damlalar halinde düşer. Son geliştirilen bir sistemle damla ömrü mekanik damla düşürücüsü yardımıyla istenilen şekilde ayarlanabilmektedir. DCE'un potansiyeli, bir referans elektrota karşı değiştirilir. Referans elektrot genellikle Ag/AgCl veya doymuş kalomel elektrottur (DKE). DCE ile referans elektrot arasına bir potansiyometre yardımıyla bir potansiyel uygulanır. Akım, çalışma elektrotu ile karşıt elektrot arasında akar. Karşıt elektrot olarak platin kullanılır. Hücreden geçen akım bir galvanometre ile ölçülür. Ölçülen akımın uygulanan potansiyele karşı grafiği polarogram adını alır (85, 86). Şekil II.7'de normal polarografide gözlenen akım - potansiyel eğrisi görülmektedir.



Şekil II.7. Polarografide gözlenen akım-potansiyel ilişkisi

Polarografide akım, çalışma elektrodu üzerinde maddelerin indirgenmesi veya yükseltgenmesi sonucu oluşur. İndirgenmeden dolayı oluşan akıma katodik akım, yükseltgemediğinden dolayı oluşan akıma ise anodik akım denir. Katodik akımın işareti pozitif, anodik akımın işareti ise negatif olarak kabul edilmiştir. Şekil II.6.'da verilen polarogramdan görüldüğü gibi yükseltgenmenin veya indirgenmenin başladığı potansiyele *bozunma potansiyeli* ( $E_b$ ) denir. Bozunma potansiyelinden sonra çok az bir potansiyel değişmesine karşılık oluşan akımda hızlı bir artış gözlenir. Belli bir potansiyelden sonra akımın sabit kaldığı bir plato bölgesine ulaşılmaktadır. Bu akıma *sınır akım* denir. Elektrot üzerinde henüz tepkime olmadığı zaman küçük de olsa bir akım gözlenir. Bu akıma *artık akım* denir. Bu akımın iki nedeni vardır:

1. Çözelti içinde analiz edilecek maddeden daha elektroaktif safsızlıkların indirgenmesi veya yükseltgenmesi ile oluşan faradaik akım,

2. Elektrot yüzeyine adsorbe olan maddenin elektrot-elektrolit ara yüzeyindeki (cıva damlasının yüklenmesi) elektriksel çift tabakanın kapasitansına etki etmesi sonucu oluşan kapasitif akımdır.

Sınır akım ile artık akım arasındaki akım farkı dalga yüksekliğidir. Bu dalga yüksekliği, elektroaktif maddenin derişimi ile doğrusal olarak artar. Polarografide akımın artmaya başladığı ilk potansiyel bozunma potansiyelidir. İndirgenme bozunma potansiyelinden sonra başlar. İlk önce elektrot yüzeyindeki maddeler indirgenir ve akım artmaya başlar. Çözeltideki maddeler derişimin “0” olduğu elektrot yüzeyine difüzyonla gelmeye başlar, indirgenir ve akım artar. Elektrot tepkimesinin hızı çözeltideki maddenin difüzyon hızına eşit oluncaya kadar akım artar. Elektrot tepkimesinin hızını maddenin difüzyon hızı sınırlar. Buna difüzyon sınır akımı denir. Bu özelliği nedeniyle polarografi nicel analizlerde kullanılabilir. Akımın sınır akımı değerinin yarısına eşit olduğu potansiyel *yarı dalga potansiyelidir*. Yarı dalga potansiyeli  $E_{1/2}$  ile gösterilmektedir.  $E_{1/2}$  değeri genellikle elektroaktif maddenin derişimine bağlı değildir ve standart yarı hücre potansiyeli ile yakından ilişkilidir. Yarı dalga potansiyelinin her madde için karakteristik olması özelliğinden dolayı polarografi nitel analizlerde kullanılabilir (87).

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

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

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

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

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

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

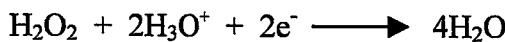
6. Yüzeyin küçük olması nedeniyle elektrokimyasal değişmeye uğrayan madde miktarı çok az olduğundan tekrarlanabilirlik yüksektir.

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

8. DCE'nun başka bir önemli dezavantajı ise, klasik yöntemin duyarlılığını yaklaşık  $10^{-5}$  M'a sınırlayan faradaik olmayan artık akım veya yükleme akımıdır. Daha düşük derişimlerde artık akım difüzyon akımını aşabilir ki bu da difüzyon akımının doğru ölçümünü engeller. Bu sınırlama, puls yöntemlerinin geliştirilmesi ile büyük ölçüde aşılmıştır.

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

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



Bu tepkimelerin oluşumu ile polarografide 0.0 ve -1.0 V arası gibi bir çok indirgenme tepkimesinin gözlemlendiği bölge kapatılmış olur. Bunu önlemek için deney öncesinde çözeltiden N<sub>2</sub> veya argon gazı gibi bir inert gaz geçirilerek çözünmüş oksijen ortamdan uzaklaştırılır.

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

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

$E$  = Uygulanan potansiyel (volt)

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

$R$  = Gaz sabiti (8.315 joule mol<sup>-1</sup> . K<sup>-1</sup>)

$T$  = Mutlak sıcaklık (°K)

$n$  = Aktarılan elektron sayısı

$F$  = Faraday sabiti (96500 coulomb)

$i$  = Uygulanan potansiyeldeki akım (μA)

$i_{da}$  = Anodik sınır akımı (μA)

$i_{dk}$  = Katodik sınır akımı (μA)

Bir maddenin elektroda göçü üç şekilde olabilir (88):

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

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

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

Analiz durgun bir ortamda yapılırsa konveksiyon, sabit sıcaklıkta yapılırsa ısısal karışım önlenir. İyonik göçü önlemek için ise elektroaktif maddenin aktarım sayısını azaltmak gerekir. Çözeltiye incelenecek madde derişiminin en az yüz katı fazla ve eşdeğer iletkenliği yüksek olan bir tuz çözeltisi eklenirse, elektroaktif maddenin aktarım sayısı sıfıra yaklaşır (85). Eklenen bu tuz çözeltisine *destek elektrolit* adı verilir. Bunlar tuz, asit veya bazların uygun çözeltileri olabilir. Destek elektrolit eklenmesinin bir diğer yararı da çözeltinin direncini düşürerek IR potansiyelini azaltmaktır.

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

### Polarografik Akımlar

Sınır akımının oluşmasına neden olan olaylara göre polarografik akımlar difüzyon, adsorpsiyon, kinetik ve katalitik kontrollü sınır akımı olmak üzere çeşitlere ayrılır (Tablo II.2) (87).

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

| Akım<br>(i)                    | Cıva sütun<br>yüksekliği<br>(h) | Derişim<br>(C) | Tampon<br>bileşimi | pH       | Sıcaklık<br>katsayısı<br>(1/i)(d <sub>i</sub> /d <sub>t</sub> ) |
|--------------------------------|---------------------------------|----------------|--------------------|----------|-----------------------------------------------------------------|
| Difüzyon (i <sub>d</sub> )     | $K \cdot h^{1/2}$               | $k \cdot C$    | Bağımsız           | Bağımsız | % 1.6                                                           |
| Kinetik (i <sub>k</sub> )      | $K \cdot h^0$                   | $k \cdot C$    | Bağımlı            | Bağımlı  | % 5-20                                                          |
| Adsorpsiyon (i <sub>a</sub> )  | $K \cdot h^1$                   | Sınırlı        | Bağımsız           | Bağımsız | Değişken                                                        |
| Katalitik (i <sub>kata</sub> ) | Değişken                        | Sınırlı        | Bağımlı            | Bağımlı  | -                                                               |

\*k = sabit bir terim



### 1. Difüzyon Kontrollü Sınır Akımı : (89)

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

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

$$Q(x,t) = D [\partial C(x,t) / \partial x]$$

Eşitlik II.2

$x$  = Elektrot yüzeyinden olan uzaklık

$t$  = zaman

ve Fick'in 2. kanunu ise:

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

Eşitlik II.3

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

$$i = nFA q(0,t)$$

Eşitlik II.4

$q(0,t)$ , elektrotun birim yüzeyine  $t$  anında gelen madde miktarıdır. Fick kanunları olarak ifade edilen diferansiyel denklemlerin genişleyen küresel elektrot için çözülüp  $q$  değerinin eşitlik 2.4'de yerine konmasıyla aşağıdaki eşitlik elde edilir.

$$i = 0.732 n F (C - C_{(x=0)}) D^{1/2} m^{2/3} t^{1/6} \quad \text{Eşitlik II.5}$$

Bu eşitlikteki terimlerin açıklamaları aşağıdaki gibidir.

$i$  = Damla ömrü sonundaki akım (A)

$n$  = Aktarılan elektron sayısı

$F$  = Faraday sabiti

$C$  = Ana çözeltideki elektroaktif madde derişimi ( $\text{mol}/\text{cm}^3$ )

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

$D$  = Difüzyon katsayısı ( $\text{cm}^2/\text{s}$ )

$m$  = Cıvanın akış hızı ( $\text{g}/\text{s}$ )

$t$  = damla ömrü (s)

Eşitlik II.5, polarogramın her bölgesinde geçerlidir. Sınır akımı bölgesinde elektron transfer tepkimesi çok hızlı olacağından  $C_{(x=0)} = 0$ 'dır. Bu değer Eşitlik II.5'de yerine konursa aşağıdaki eşitlik elde edilir.

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

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

$$i_d = 0.627 n F C D^{1/2} m^{2/3} t^{1/6} \quad \text{Eşitlik II.7}$$

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

$$i_d = k C$$

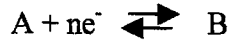
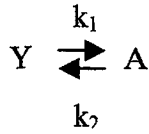
Eşitlik II.8

Bu eşitlikte C ana çözelti derişimi olduğu için polarografi nicel analizlerde kullanılabilir. Yukarıda verilen Eşitlik II.8, koordinat sisteminin sıfır noktasından geçen bir doğru denklemdir.

Polarografide kullanılan DCE çok küçük yüzeyli bir elektrottur. Bu tür elektrotlara mikroelektrot adı verilir. Mikroelektrot üzerinde çok az miktarda madde elektrokimyasal değişikliğe uğradığı için aynı çözelti ile deney istenildiği kadar tekrarlanabilir.

## 2. Kinetik Kontrollü Sınır Akımı:

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

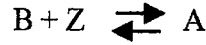
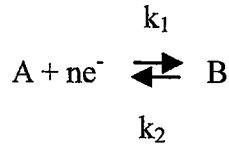


Eğer indirgenen madde (A) derişimi Y ile sınırlı ise, oluşan akım da Y derişimi ile sınırlıdır ve akım kinetik kontrollüdür. Bu durumda difüzyon ne kadar hızlı olursa olsun elektrot yüzeyindeki A derişimi, Y'nin derişimi ve  $k_1$  (veya K denge sabiti) ile kontrol edilir.

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

### 3. Katalitik Kontrollü Akım:

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



B ürünü Z ile tepkimeye girip A'yı yeniden oluşturur. Elektroaktif A maddesi tekrar indirgeneceği için difüzyon kontrollü akımdan çok daha büyük akım gözlenecektir (84).

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

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

#### 4. Adsorpsiyon Akımı:

Çözeltide bulunan maddeler elektrot yüzeyine adsorbe olunca hem kapasitif akım, hem de faradaik akım etkilenir. Faradaik akımının etkilenmesi iki farklı şekilde olabilir (89):

a) Elektroaktif madde veya ürün adsorbe olabilir. Böyle bir durumda normal dalganın yanında ikinci bir dalga gözlenir. Adsorpsiyon dalgası adı verilen bu dalga reaktif ve ürünün adsorplanmasına bağlı olarak normal dalgadan sırasıyla daha negatif veya daha pozitif potansiyelde gözlenebilir. Ayrıca sınır akımı bölgesinde maksimum, minimum ve başka düzensizliklere yol açabilir.

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

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

#### Faradaik ve Kapasitif (Yük) Akımlar

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

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

$$i_c = 0.00569 \kappa (\phi - E) m^{2/3} t^{-1/3} \quad \text{Eşitlik II.9}$$

$i_c$  = Kapasitif akım

$\kappa$  = Çift tabakanın birim yüzey için kapasitansı (sığası)

$\phi$  = Sıfır yük potansiyeli (sıfır yük noktası)

$E$  = Elektrot potansiyeli

$m$  = Cıvanın akış hızı (mg/s)

$t$  = Damlama süresi (damla/s)

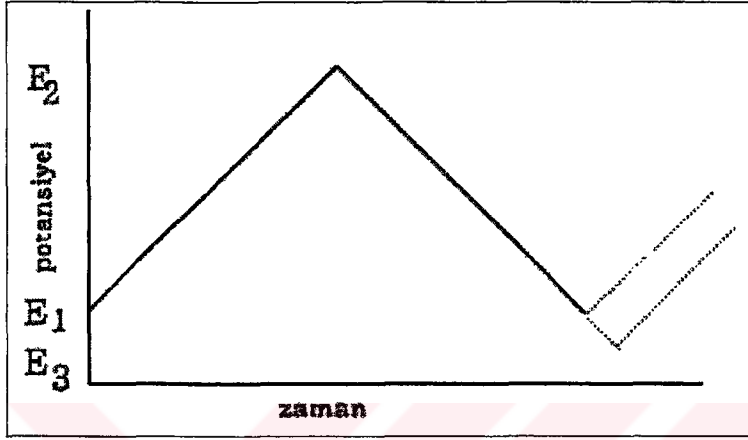
Elektroanalitik yöntemlerde, analizin duyarlılığını sınırlayan kapasitif akım etkisinin en aza indirilmesi gerekir.

#### II.4.1.2. Dönüşümlü Voltametri ve Doğrusal Taramalı Voltametri (CV, LSV) (90, 91)

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

CV’de uygulanan potansiyelin zamanla değişim grafiği Şekil II.8’de gösterilmiştir. Potansiyel taraması  $E_1$  ve  $E_2$  arasında yapılırsa yöntem *doğrusal*

*taramalı voltametri (LSV)* adını alır. Eğer  $E_2$  potansiyeline ulaşıldıktan sonra aynı tarama yönüne göre ters yönden tarama yapılırsa yöntemin adı dönüşümlü voltametridir. Ters taramada potansiyel  $E_1$ 'de sonuçlanabileceği gibi farklı bir  $E_3$  potansiyeline de götürülebilir.



**Şekil II.8.** CV'de uygulanan potansiyelin zamanla değişmesi

CV'de akım, potansiyele karşı grafiğe geçirildiğinde elde edilen eğriye dönüşümlü voltamogram denir.

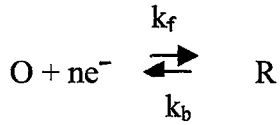
Tarama hızı pratikte 100 mV/s'den birkaç yüz V/s'ye kadar değiştirilebilir. Çok yüksek tarama hızlarında (birkaç bin V/s) çift tabaka yüklenmesi ve IR düşmesi problemleri ortaya çıkar. Ancak mikroelettrot kullanıldığı zaman bu tür problemler en aza iner.

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

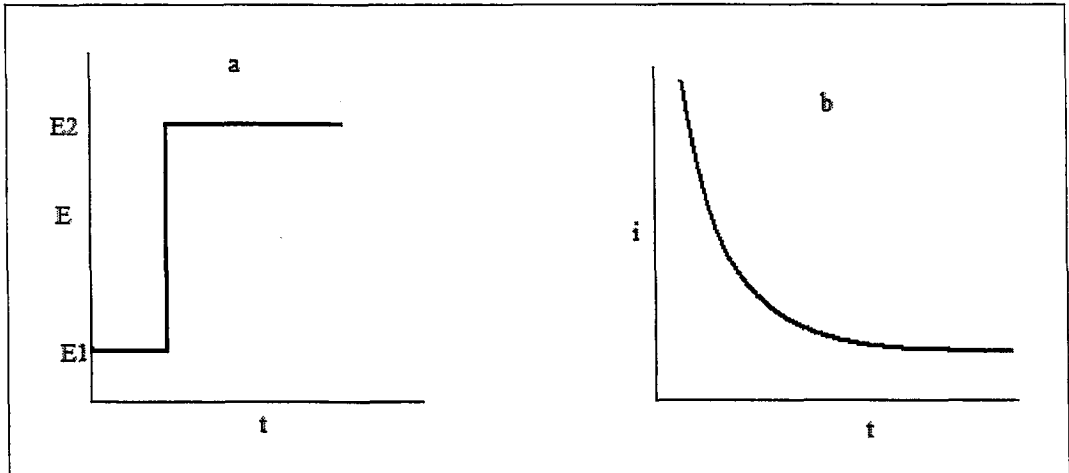
### II.4.2. Kronoamperometri (CA)

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

Bir elektrot yüzeyinde,



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



**Şekil II.9.** CA'de a) çalışma elektrotuna uygulanan potansiyel programı, b) elde edilen akım-zaman eğrisi



$E_1$  potansiyelinde reaksiyon olmaz,  $E_2$  potansiyelinde ise akım difüzyon kontrollüdür. Şekil II.9.b'de CA'de elde edilen akım-zaman eğrisi görülmektedir.

$E_1$  ve  $E_2$  potansiyeli seçilirken önce maddenin DC polarogramı veya CV'si alınır. Akımın henüz gözlenmediği artık akım bölgesindeki potansiyel başlangıç potansiyeli ( $E_1$ ) olarak seçilir. Normal polarogramın plato bölgesinde veya CV'nin pik potansiyelinin daha ötesinde bir potansiyelde  $E_2$  potansiyeli olarak alınır.  $E_1$  ve  $E_2$  potansiyellerinin seçimi Şekil II.10'da gösterilmiştir. Potansiyel  $E_2$  değerinde belirli bir süre sabit tutulur. Bu potansiyelde oluşan akımın zamanla değişimi aşağıdaki Cottrell eşitliğinde verildiği gibidir.

$$i = (n F A D^{1/2} A C_0) / (\pi^{1/2} t^{1/2}) \quad \text{Eşitlik II.10}$$

$i$  = Akım (A)

$n$  = Aktarılan elektron sayısı

$F$  = Faraday sabiti (99.485 C/eq)

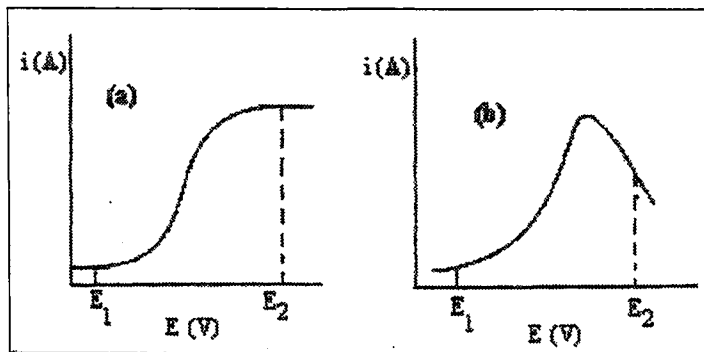
$A$  = Elektrot alanı ( $\text{cm}^2$ )

$D^{1/2}$  = Difüzyon katsayısı ( $\text{cm}^2/\text{s}$ )

$C_0$  = Maddenin konsantrasyonu ( $\text{mol}/\text{cm}^3$ )

$t$  = zaman (s)

Bu eşitliğe göre akım,  $t^{1/2}$  ile ters orantılı olarak değişir (Şekil II.10).



**Şekil II.10.** CA'de  $E_1$  ve  $E_2$  potansiyellerinin seçimi

a) DC polarogramından, b) CV voltamogramından

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

### II.4.3. Sıyırma Voltametrisi

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

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

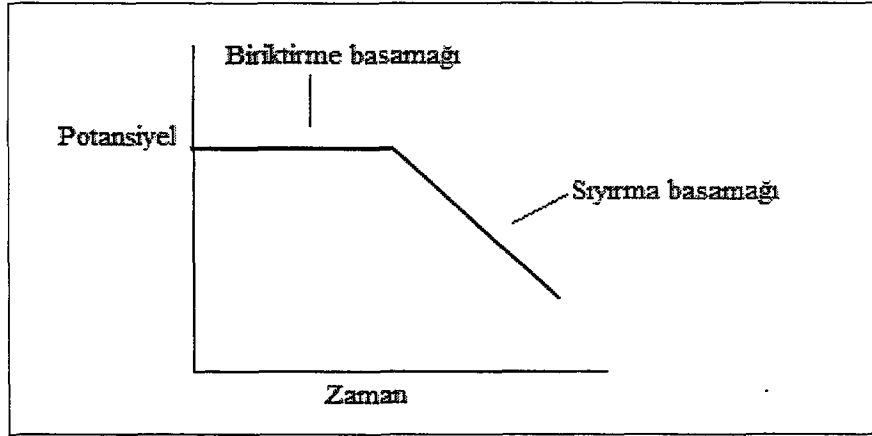
Elektrot yüzeyine herhangi bir şekilde biriktirilen maddenin analizi için sıyırma analiz yöntemi kullanılabilir. Yöntem iki ayrı bölümden oluşmaktadır. İlk adımda analiz çözeltisi içindeki organik maddelerin çalışma elektrotu üzerine elektrokimyasal yolla veya adsorbe edilerek birikmesi sağlanır. Analizi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

maddenin çözeltilerden indirgenmesi ya da yükseltgenmesi sonucu biriktirilir (elektrokimyasal yol) veya çözeltilerde bulunan madde sabit potansiyelde herhangi bir kimyasal değişikliğe uğratılmadan doğrudan doğruya elektrot yüzeyine fiziksel adsorpsiyonla biriktirilir (*Adsorptif Sıyırma Voltametrisi* (AdSV)). İkinci adım olan sıyırma adımında ise elektrot üzerinde biriktirilmiş olan organik madde voltametrik yöntemlerden biri ile sıyırılır. Sıyırma adımında sinüs dalga, puls, diferansiyel puls veya kare dalga gibi potansiyel-zaman dalga şekilleri kullanılmaktadır (89, 92, 93).

Elektrot üzerine biriken maddelerin miktarı, maddelerin ve çözeltinin özelliğine, elektrot materyaline ve boyutuna, potansiyele, zamana, pH'ya, iyonik güce, maddenin elektrodta taşınmasına, sıcaklığa, biriktirme süresi ve çözeltinin karıştırılma hızı gibi faktörlere bağlıdır. Adsorpsiyon katsayısı  $10^5$  cm'den büyük olan maddeler için AdSV yöntemi kullanılır. Maksimum biriktirme için en uygun koşullar pik büyüklüğü denenerek saptanır. Maddenin elektrot üzerine adsorbe edilerek biriktirilmesi adımında, elektrot potansiyeli, analizi yapılacak organik maddenin indirgenme potansiyelinden daha pozitif potansiyelde belli bir süre sabit tutulur. Bu süre boyunca analiz edilecek organik maddeler elektrot yüzeyine adsorbe olarak birikir. Bu süre boyunca çözelti karıştırılır. Elektrot alanı küçük ve biriktirme süresi kısa olduğu için elektrot yüzeyine adsorbe edilerek biriktirme adımında akımın değişmediği varsayılır. Biriken organik maddelerin elektrot yüzeyine ulaşma hızları, organik maddelerin derişimine, elektrot çözeltisinin difüzyon özelliklerine ve kullanılan elektrotun alanına bağlı olarak değişir. Tekrarlanabilir, doğru sonuçlar alabilmek için organik maddelerin elektrot yüzeyine adsorbe olarak biriktirilmelerinde şartlar (elektrot yüzeyi, alanı, karıştırma hızı, biriktirme süresi ve sıcaklık) analiz boyunca değişmeyip aynı kalmalıdır (89, 94-96).

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

biriktirme, dinlenme ve sıyırma adımları izlenir. Sıyırma adımında indirgenme, yükseltgenme veya desorpsiyon oluşması söz konusudur (Şekil II.11).



**Şekil II.11.** Sıyırma tekniklerinde potansiyel-zaman profili

Biriktirme basamağı sırasında çözeltiyi karıştırmak, analiz edilecek maddenin elektrot yüzeyine ulaşma hızını artırır. Ancak karıştırmanın kontrol edilen bir hızda olması gerekir. Çözeltide ve elektrot yüzeyinde tepkimeler tersinir olduğundan dolayı elektrot yüzeyinde biriktirilen maddenin sıyırma işleminden sonra tekrar çözeltiye geçmesi gerekir. Bu ise karıştırma hızı ve biriktirme süresi ile doğrudan orantılıdır. Karıştırma, çok yavaş olursa daha az madde birikir ve ürünün geri kazanılma verimi artar. Ancak bu durum duyarlılığın azalmasına ve daha uzun bir zaman harcanmasına yol açar. Sıyırma voltametrisinde bazen çözeltiyi hiç karıştırmadan, yalnız difüzyonla madde göçü sağlanarak ta biriktirme yapılabilir. Çok hızlı bir karıştırma geri kazanma verimini düşürebilir. Ayrıca karıştırma işleminin homojenliğini bozar, çözeltinin saçılmasına neden olabilir. Karıştırma, çözeltide boşluk oluşturmayacak ve asılı duran cıva elektrotunu yerinden oynatmayacak biçimde sabit hızda tutulmalıdır. Biriktirme basamağında karıştırma hızının ve süresinin ayarlanması hem maddenin geri kazanılması hem de duyarlılıkla ilgili parametreler olduğundan bu iki parametrenin optimum değerlerinin belirlenmesi gerekir. Elektrot yüzey alanının büyütülmesi de akımı dolayısıyla duyarlılığı da artıracaktır (89, 95).

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

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

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

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

AdSV yönteminde, asılı duran cıva elektrotu (ADCE) en çok kullanılan çalışma elektrotudur. Ayrıca camı karbon, mum emdirilmiş grafit ve platin gibi katı elektrotlarda kullanılmaktadır (89, 95).

Cıva film elektrotu (CFE) yüzey alan/hacim oranı büyük ve yüksek duyarlılıkta bir elektrottur. Aynı zamanda cıva filminden yüzeye doğru difüzyon çok hızlı olduğundan iyi bir ayırım sağlar. Cıva filmine destek olarak en çok karbon elektrotlar kullanılır (89).

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

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

AdSV voltametrisi yönteminde ve DP ile ASV özelliklerinin bir araya geldiği diferansiyel puls anodik sıyırma voltametrisinde (DPASV), biriktirme yapıldıktan sonra sıyırma adımıyla diferansiyel puls sinyali kullanılır (95, 97).

Diferansiyel puls adsorptif sıyırma voltametrisi (DPAdSV) yönteminde sinyal kolaylıkla yorumlanabilecek “Gauss Eğrisi” şeklinde piklerden oluşmaktadır (89).

#### **II.4.4. Kare Dalga Voltametrisi (SWV)**

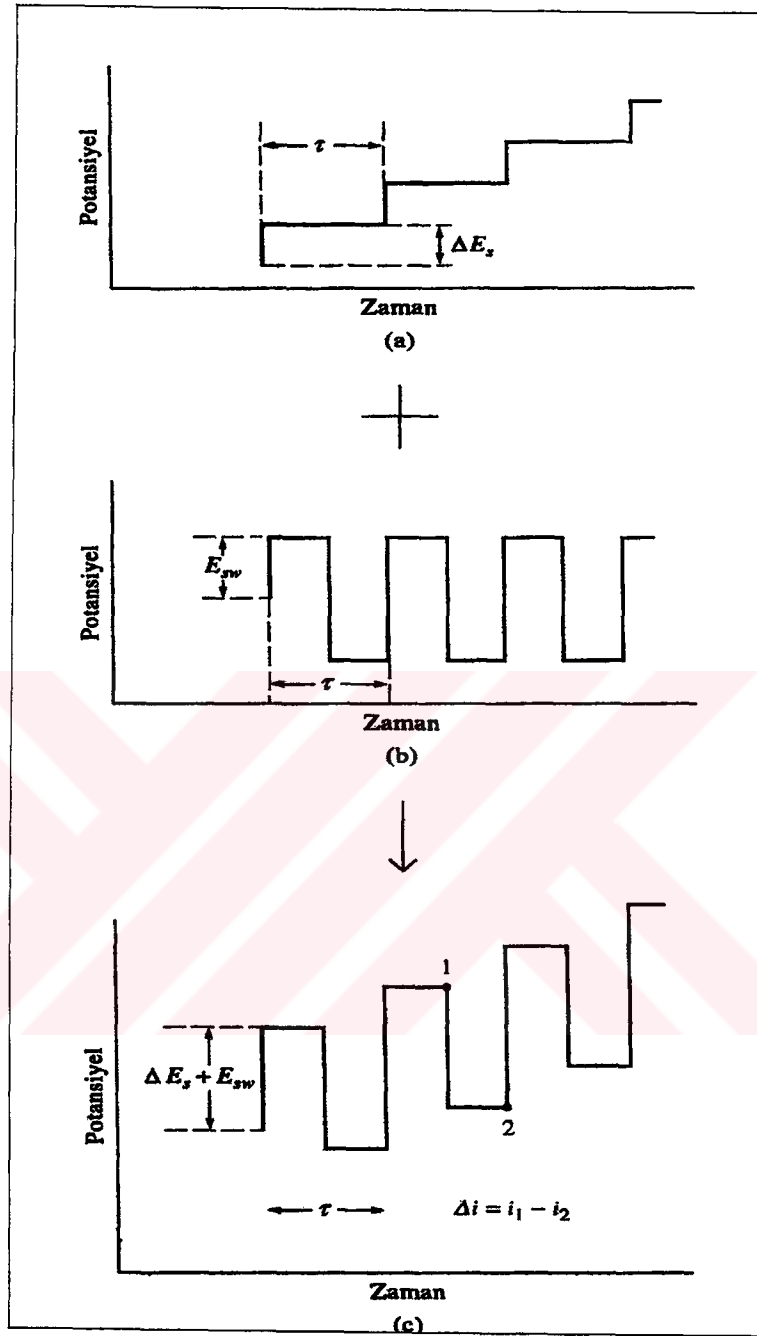
Kare dalga polarografisi, ilk defa 1930 yılında Kemula tarafından adsorpsiyon olaylarının incelenmesi için düşünülmüş, ancak analitik kullanımı 1952 yılında Fujinaga ve arkadaşları tarafından fark edilmiştir. Kare dalga voltametrisine

hem teorik hem de cihaz geliştirilmesi bakımından en büyük katkı Barker tarafından yapılmıştır.

SWV’de sabit elektrotlarda teorik ve uygulama bakımından gelişimi 1985 yılında Osteryoung (OSWV) tarafından gerçekleştirilmiştir. OSWV’nin sabit elektrotlarda potansiyel-zaman dalga şekli Şekil II.12’de görülmektedir.

Kare dalga voltametrisinde, Şekil II.12.b’deki pulsun Şekil II.12.a’daki basamak sinyali üzerine bindirilmesiyle elde edilen uyarma sinyali görülmektedir. Dalga şekli, simetrik kare dalgalardan oluşan merdiven görünüşündedir.

Bir kare dalganın tamamlanma süresi (her basamağın boyu) *periyod* adını alır ve  $\tau$  ile gösterilir. Yaklaşık 5 ms civarındadır. Birbirini takip eden kare dalgalar arasındaki yükseklik farkına *adım yüksekliği* (sinyalin potansiyel basamağı) denir ve  $\Delta E_s$  ile gösterilir. Genelde  $\Delta E_s$  10 mV’dur. Her bir dalganın alt ve üst noktaları arasındaki farkın yarısı *kare dalga yüksekliği* olarak bilinir ve  $E_{sw}$  şeklinde gösterilir. Pulsun büyüklüğü  $2 E_{sw}$  ise, genelde 50 mV’dur. Sistemin bu şartlar altında çalıştırılması 200 Hz’ lik puls frekansına karşılık gelir ve bu durumda 1 V’ luk bir tarama 0.5 s’de yapılır. Çoğu zaman  $\tau$  yerine  $1/\tau$ ’a eşit olan *frekans* kullanılır ve  $f$  ile gösterilir.

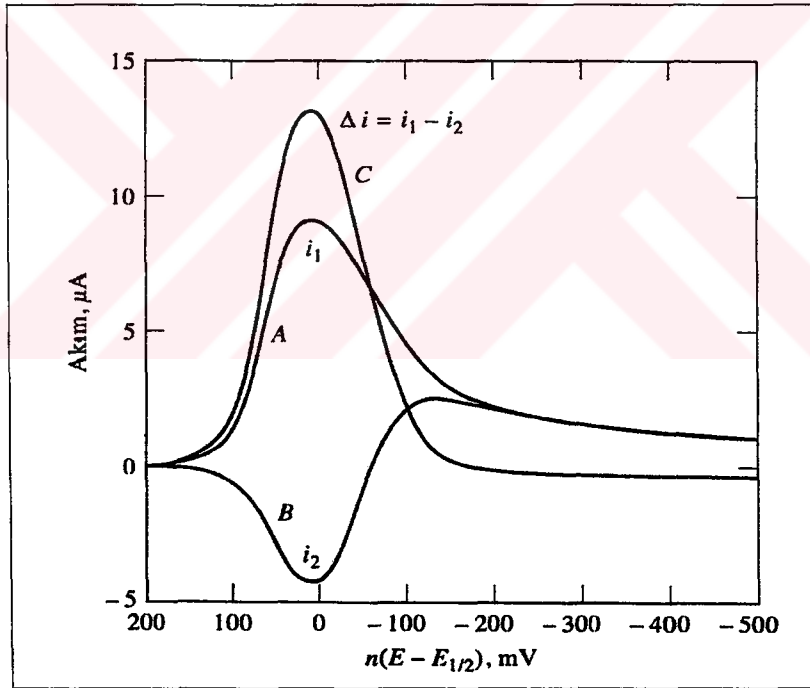


**Şekil II.12.** Bir kare dalga voltametrisinde uyarma sinyalinin oluşumu.

(a)'daki uyarma sinyali (b)'deki puls taraması ile (c)'deki kare dalga uyarma sinyalinin verecek şekilde toplanmaktadır. Akım cevabı  $\Delta i$ , 1 potansiyelindeki akımdan 2 potansiyelindeki akım çıkarılarak bulunur



Tersinir bir indirgenme tepkimesinde bir pulsun boyutu, ileri tarama sırasında oluşan ürünün, geri tarama sırasında yükseltgenmesini sağlamaya yetecek kadar büyüktür. OSWV’de akım ölçümleri ileri ve geri pulsların sonuna doğru  $t_s$  kadar bir zaman aralığında yapılır. İleri puls için ölçülen akım  $i_1$ , geri puls için ölçülen akım  $i_2$  olmak üzere her bir kare dalganın *net akımı*  $\Delta i = i_1 - i_2$ ’ye eşittir ve *ileri fark akımı* olarak adlandırılır (Şekil II.13). Genelde voltamogramları elde etmek için bu akımların farkı ( $\Delta i$ ) grafiğe geçirilir. Bu fark derişimle doğru orantılıdır, pik potansiyeli de polarografik yarı dalga potansiyeline karşılık gelir. Ölçüm son derece hızlı yapıldığından birkaç voltametrik taramanın sinyal ortalaması alınarak analizin kesinliğini artırmak mümkündür. Kare dalga voltametrisinin tayin sınırları  $10^{-7}$ -  $10^{-8}$  M arasındadır.



**Şekil II.13.** OSWV’de tersinir bir tepkime için net akım

OSWV’de deneysel parametreler belirli aralıklarda seçilir. Frekansın artması ile veya buna bağlı olarak periyodun azalması ile kare dalga pik akımı ve dolayısıyla duyarlılığı artar. 1000 Hz’den daha yüksek frekansla yapılan çalışmalar çok büyük dikkat ve hassasiyet gerektirir. 200 Hz duyarlılık ve kararlılık açısından analitik amaçlı çalışmalar için problemsiz bir frekans olarak gözlenmiştir. Sonuç olarak

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

$$ETH = f \times \Delta E_s = 1 / \tau \times \Delta E_s \quad \text{Eşitlik II.11}$$

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

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

## II.5. Kromatografi

Kromatografi, birbirine yapı olarak benzeyen maddeleri ayırmak için kullanılan bir çok farklı yöntemi içerir. Bütün kromatografik ayırmalarda numune, gaz veya sıvı olan hareketli faz ile taşınır. Bu hareketli faz bir kolonda veya katı bir yüzeyde sabitleştirilmiş kendisi ile karışmayan bir sabit faz içinden geçmeye zorlanır. Karışımındaki bileşenler, hareketli faz yardımıyla sabit faz üzerinde değişik hızlarda hareket etmeleri veya sürüklenmeleri sonucu birbirlerinden ayrılırlar. Sabit faz tarafından kuvvetli tutulan numune bileşenleri, hareketli fazın akışıyla çok yavaş hareket ederler. Buna karşılık, sabit faz tarafından zayıf tutulan numune bileşenleri hızlı hareket ederler. Bu hareket hızlarının farklılığı sonucu, numune bileşenleri birbirlerinden nitel ve/veya nicel olarak analiz edilebilen farklı bantlar veya bölgeler şeklinde ayrılırlar (83).

Kromatografik yöntemler iki şekilde sınıflandırılabilir. Birincisinde, hareketli ve sabit fazların fiziksel olarak teması esas alınır. Kolon kromatografisinde, sabit faz ince bir kolonda tutturulur ve hareketli faz bu sabit faz içinde geçer. Düzlemsel kromatografide ise, sabit faz düz bir plaka üzerine veya kağıdın gözenekleri arasına tutturulur ve bu durumda hareketli faz sabit faz arasından yerçekimi etkisiyle hareket eder (83).

Kromatografinin daha temel bir sınıflandırması kullanılan hareketli faz tipine göre, sıvı ve gaz kromatografisi şeklinde yapılabilir. Sıvı kromatografisinde hareketli faz sıvı, gaz kromatografisinde ise gazdır. Sıvı kromatografisi, kolonlarda ve düz yüzeylerde, gaz kromatografisi sadece kolonlarda gerçekleştirilir.

Kromatografik yöntemlerde sabit faz, hareketli faz ve numune arasındaki etkileşimlere bağlı olarak çeşitli mekanizmalar kullanılır. Bu mekanizmalara dayanarak kromatografi, adsorpsiyon, dağılma, iyon değişirme ve moleküler eleme kromatografisi şeklinde sınıflandırılır (98).

#### ***Adsorbsiyon (Tutunma) Kromatografisi***

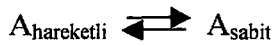
Organik çözücülerde çözünen farklı polaritedeki maddelerin ayrılması esasına dayanır. Silikajel ve alumina gibi adsorban maddelerin yüzeyleri polar olduğundan, maddeleri dipol-dipol, dipol indirgenmiş dipol ve hidrojen bağı gibi etkileşimlerle tutmaktadır. Bir maddenin tutunma gücü, molekülündeki fonksiyonel grup türüne ve sayısına bağlıdır (99).

#### ***Dağılma (Partisyon) Kromatografisi***

Numunedeki madde veya maddelerin, sabit ve hareketli faz arasında dağılması esasına dayanır. Bu kromatografi türünde uygun bir analiz yapabilmek için maddenin belli bir çözücüde çözünmüş olması gerekir. Maddenin apolar veya polar olmasına göre maddenin polaritesine yakın bir sabit faz seçilir. Örneği oluşturan

bileşenlerin iyi ayrılabilmesi için sabit faz ile hareketli faz polaritesi farklı olmalıdır. Dağılma kromatografisinde sistemin ayırım gücü, sabit faz, hareketli faz ve maddenin polaritesine bağlı olarak değişir. HPLC ile ilaç analizi yapabilmek için yaygın olarak dağılım kromatografisi uygulanır (83, 100).

Karışımındaki bileşenlerin sabit ve hareketli faz arasındaki dağılımlarının farklı olması esasına dayanarak ayırım gerçekleşir. Bir A bileşeni için sabit ve hareketli faz arasındaki dağılımı,



dengesine göre oluşur. Tepkimenin K denge sabiti dağılma katsayısı olarak adlandırılır ve A bileşenin iki fazdaki derişim oranına eşittir.

$$K = C_S / C_M$$

Eşitlik II.12

Bu eşitlikte  $C_S$ , A bileşeninin sabit fazdaki molar derişimi,  $C_M$  ise A bileşeninin hareketli fazdaki molar derişimidir. K değerinin büyük oluşu, bileşenin sabit fazda iyi tutulduğunu ve bu yüzden kolon boyunca yavaş ilerlediğini gösterir. K değerinin küçük olması ise bileşeninin hareketli faza olan ilgisinin fazla olduğunu veya A bileşeninin kolon boyunca hızlı ilerlediğini gösterir. Bir karışımda bulunan bileşenlerin K değerlerinin farklı oluşu, bunların kolon boyunca birbirlerine göre farklı hızlarda ilerlemelerine neden olur. Böylece bileşenler kolonun sonlarına doğru birbirlerinden ayrılarak kolondan farklı zamanlarda çıkarlar ve ayırımları gerçekleşmiş olur.

Dağılım kromatografisinin bir türü olan iyon çifti kromatografisinde ise hareketli faza iyon çifti reaktifi ilave edilerek, iyonlaşan maddelerin alıkonma süreleri arttırılır. Hareketli faza ilave edilen iyon çiftleri polaritesi düşük olan sabit faz tarafından adsorplanır. İyonize olmuş maddeler bu iyon çiftleri ile iyonik etkileşime girerek kolonda tutunurlar. Maddelerin alıkonmaları ilave edilen iyon çifti reaktifinin derişimi ile değişir. İyon çifti reaktiflerinin  $C_8$  ve  $C_{18}$  sabit fazları ile etkileşimi güçlü olduğundan bu teknikle en çok kullanılan sabit fazlardır (101).

### ***İyon Değiştirme Kromatografisi***

Sabit fazdaki iyonlarla numunedeki aynı yükteki iyonların karşılıklı yer değiştirmesi esasına dayanır. Maddenin mutlaka iyonik halde olması veya iyonlaşması gerekir. Örnekteki iyonik bileşenlerin reçinelere olan ilgileri ve kolonun seçimliliği, ortamın pH değerine, iyon şiddetine, iyonları yüküne ve büyüklüğüne, kullanılan reçinenin gözenekli yapısına, çözücünün cinsine, çözücü derişimine ve sıcaklığa bağlıdır. Kullanılan iyon değiştiriciler katı reçineler olduğu gibi bir katı yüzeyine film halinde tutturulmuş sıvı halindeki reçinelerde olabilir. İyon değiştirme kromatografisinde kullanılacak hareketli faz, diğer kromatografi türlerinde kullanılanlarla aynı genel özelliklere sahip olmalıdır. Yani hareketli faz, örnek maddesini çözmeli, uygun alıkonma sürelerini sağlamalı ve örnekte bulunan bileşenlerle seçimli olarak etkileşmelidir. Genelde kullanılan hareketli faz, belirli bir pH değerine tamponlanmış sulu çözeltidir (102).

Bu yöntem özellikle metal iyonlarının, inorganik iyonların, proteinlerin, peptidlerin ve aminoasitlerin ayrılmasında kullanılır. İyon değiştirme mekanizmasında hareketli fazın pH'sı ve iyonik gücü alıkonma süresi üzerinde, hareketli fazın organik çözücü içeriğine oranla daha fazla etkilidir.

### ***Eleme Kromatografisi***

Eleme kromatografisi, molekül ağırlık farkı çok büyük olan bileşenleri içeren karışımları ayırmak için kullanılır. Eleme kromatografisinde sabit faz yüzeyi ile etkileşim olmamaktadır. Dolgu maddesinin gözenek büyüklüğü ve numune de bulunan moleküllerin boyutu alıkonma süresini etkiler. Büyük moleküller porlara sığmayarak hareketli faz ile birlikte hızla sürüklenir ve kolonu önce terkederler. Küçük moleküller porları dolduran hareketli faza difüze olurlar. Bunların ortalama hızları porlarda geçirdikleri zamana bağlıdır. Orta büyüklükteki moleküller ise sadece bazı porlara difüze olurlar, bu nedenle ortalama bir hızla hareket ederler. Bu yöntem özellikle kromatografik ayırma sırasında bozunması veya değişikliğe

uğraması istenmeyen polimerleri, yada protein ve enzim gibi biyolojik moleküllerin birbirinden ayrılması için kullanılır (103).

### **II.5.1. Sıvı Kromatografisi**

Sıvı kromatografisi düzlemsel yüzeylere ve kolonlara uygulanabilen bir kromatografi türüdür. Sıvı kromatografisi normal-faz sıvı ve ters-faz sıvı olmak üzere iki farklı teknikle uygulanabilir.

#### ***Normal-Faz Sıvı Kromatografisi***

Normal-faz ayırma tekniğinde polar sabit faz (silika veya alümina) ve non-polar veya düşük polariteye sahip hareketli faz (n-hekzan, etil eter, kloroform) kullanılmaktadır. Farklı polaritelerdeki maddelerden oluşan karışımları normal faz tekniğine göre ayırmak mümkündür. Polaritesi yüksek olan maddeler, polar olan sabit faz ile daha fazla etkileşmekte, buna bağlı olarak kolonu daha geç terk ederler. Non-polar bileşenler ise hareketli faz ile daha çok etkileştikleri için polar bileşenlere göre daha az tutunurlar ve kolonu daha önce terk ederler (Şekil II.14). Hareketli fazın polaritesindeki artış elüsyon zamanının azalması ile sonuçlanır (83).

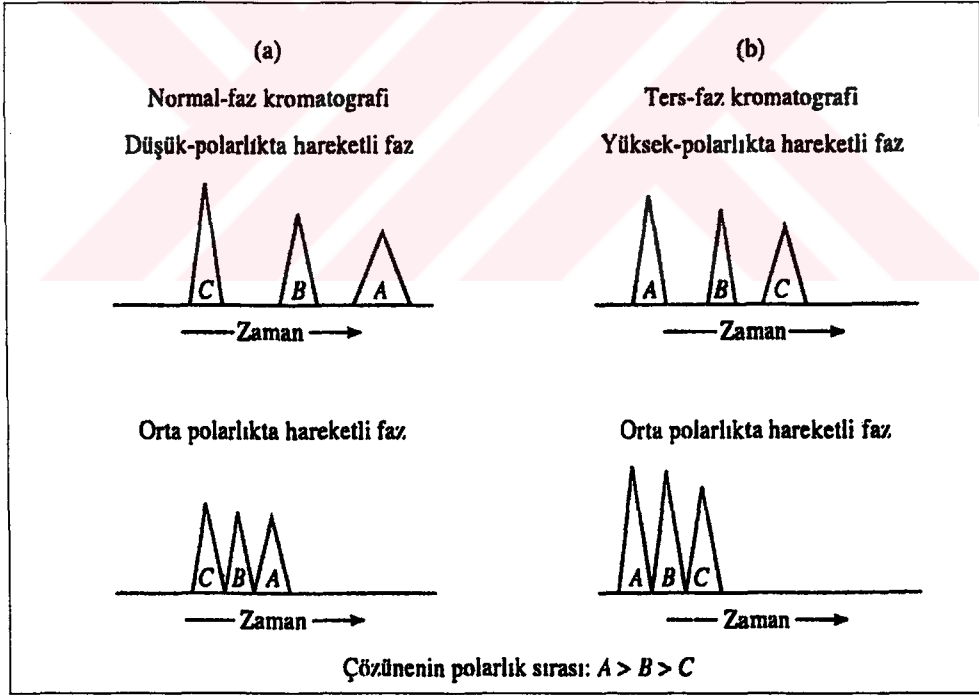
#### ***Ters-Faz Sıvı Kromatografisi***

Ters-faz tekniğinde sabit faz non-polar (Çoğu zaman bir hidrokarbondur), hareketli faz ise polardır (su, metanol veya asetonitril). En polar bileşenler kolonu daha önce terk ederler, hareketli fazın polaritesindeki artış elüsyon zamanının artmasına neden olur (Şekil II.14). Farklı sayıda, tipte veya yerleşimde alkil fonksiyonel gruplu karışımların ayırımı için en uygun tekniktir. En büyük avantajı geniş uygulama alanına sahip olmasıdır. İyonik maddeler de iyonizasyonları engellenerek bu teknik ile ayrılabilir. İyonlaşmayı engellemek amacıyla tamponlar kullanılır (83).

Ters-faz sıvı ve normal-faz sıvı kromatografisinde, madde polaritesinin sabit faz polaritesine yakınlığına göre kolonda alıkonulur ve hareketli faz polaritesine yakın olan maddeler kolonu önce terk eder (Şekil II.14) (Tablo II.3).

**Tablo II.3.** Normal-faz ve ters-faz sıvı kromatografilerinin karşılaştırılması

| Kolon                                 | Normal-faz                                | Ters-faz                                  |
|---------------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------|
| Sabit Faz Polaritesi                  | Yüksekten ortaya                          | Ortadan yükseğe                           |
| Çözücü Polaritesi                     | Ortadan düşüğe                            | Yüksekten ortaya                          |
| Örnek Çıkış Yeri                      | Az polar önce                             | Polar önce                                |
| Hareketli Fazın Polaritesindeki Artış | Elüsyon zamanı azalır<br>Ayrım gücü artar | Elüsyon zamanı artar<br>Ayrım gücü azalır |



**Şekil II.14.** Normal-faz ve ters-faz kromatografisinde polarlık ve elüsyon süreleri arasındaki ilişki

İlaç analizlerinde, ters-faz sıvı kromatografisi, normal-faz sıvı kromatografiye tercih edilir. Bunun nedenleri aşağıda belirtilmiştir:

1. Normal faz kromatografide, sıvı fazın kontrolü çok önemli ve kritiktir. Hareketli faz bileşimindeki küçük değişiklikler kromatogramda belirgin farklılıklara neden olabilir.
2. Dengeye ulaşma normal faz kromatografide çok yavaştır.
3. Normal faz kromatografide polar maddelerin elüsyonu çok yavaştır ve yayvan piklere sebep olur.
4. Apolar çözücüler çok pahalıdır, ayrıca nemden uzak tutmak zordur.

Ters-faz sıvı kromatografisinin birçok uygulamalarında, değişik oranlarda metanol, asetonitril ve tetrahidrofuran gibi sıvılar içeren sulu çözeltiler gibi oldukça polar hareketli fazlarla elüsyon yapılır. Bu durumda, kolon dolgusunun bozulması ve parçalanmasına sebep olan siloksanın hidrolizinden dolayı, pH değerinin yaklaşık 7.5'dan daha büyük değerlere çıkmamasına dikkat edilmelidir (83).

### **Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)**

Yüksek performans; yüksek hız ve yüksek ayırıcılığı ifade eder. Sıvı kromatografisi yönteminin özel bir uygulaması olan *yüksek performanslı sıvı kromatografisi* (HPLC) yönteminde, sabit faz olarak kullanılan parçacık boyutlarının (< 20 mikron) önemli ölçüde küçültülmesi sonucu hareketli faz ile etkileşen sabit faz yüzey alanı büyür ve böylece kolonun etkinliği artırılmış olur. Çok sıkı olarak doldurulmuş kolondan hareketli fazın belirli bir hızla geçebilmesi için bir basınç uygulanması gerekir. Bu yüksek verimdeki kolonların ve oldukça yüksek basınçların (6000 psi'a kadar) kullanıldığı HPLC en yaygın biçimde uygulanan kromatografi türüdür (104).



HPLC'nin diğer sıvı kromatografi türlerinden üstünlükleri şunlardır:

1. HPLC kolonu, rejenerasyon olmaksızın pek çok kez kullanılabilir.
2. Böyle kolonlarda gerçekleştirilen ayırma, eski yöntemlerle elde edilenden çok daha çeşitlidir.
3. Bu teknik kullanıcının becerisine daha az bağımlıdır ve tekrarlanabilirlik daha yüksektir.
4. Nicel analiz amaçları için de kullanılabilir.
5. Analiz süresi çok kısadır.
6. Duyarlık çok yüksektir, 10 µg lık bir örnek bile, floresans veya elektrokimyasal dedektörler kullanılarak tayin edilebilir.

HPLC günümüzde kimya, biyokimya, biyoteknoloji, farmakoloji, tıp kimyası, bitki kimyası, tarım ve kimya mühendisliğini içeren alanlarda ayırma ve analiz için vazgeçilmez bir araç olarak kabul edilmektedir. Bilhassa diğer kromatografik tekniklere uygun olmayan bileşiklerin ayrılması ve analizi için uygundur. Çevre sıcaklığında ısısal olarak kararsız bileşikleri ve yüksek polarlıktaki bileşikleri herhangi bir türevlendirme olmaksızın ayırabilir ve analiz edebilir.

### **II.5.1.1. Kromatografide Temel Parametreler**

#### **II.5.1.1.a Alıkonma Zamanı ve Kapasite Faktörü**

Numunedeki bileşenlerin sabit ve hareketi fazla etkileşimlerine göre kolonda farklı hızlarda hareket ederler ve bunun sonucunda kolonu farklı zamanlarda terk ederler. Kolondan çıkan bileşenlerin derişimlerinin uygun bir yöntemle ölçülerek zamana veya hareketli fazın hacmine karşı çizilen grafiğe *kromatogram* denir (Şekil II.15).

Numunenin enjeksiyonundan sonra dedektöre ulaşması için geçen zamana *alıkonma zamanı* denir ( $t_R$ ). Alıkonma zamanı terimi yerine *alıkonma hacmi* de kullanılır (Şekil II.15). Bir maddenin alıkonma hacmi ( $V_R$ ) bir bileşenin sabit fazdan

elüe olması için gerekli olan hareketli faz hacmi olup alıkonma zamanı ve hacimsel akış hızı (F)'ndan hesaplanabilir.

$$V_R = t_R F \quad \text{Eşitlik II.13}$$

Alıkonma hacmi, temel kromatografik parametre olan dağılım katsayısı K ile aşağıdaki eşitlik gereği doğrudan ilişkilidir.

$$V_R = V_m + K V_s \quad \text{Eşitlik II.14}$$

Bu eşitlikte  $V_m$  kolondaki hareketli faz hacmi,  $V_s$  kolondaki sabit faz hacmidir.

Dağılım katsayısı (K) ise;

$$K = C_s / C_m \quad \text{Eşitlik II.15}$$

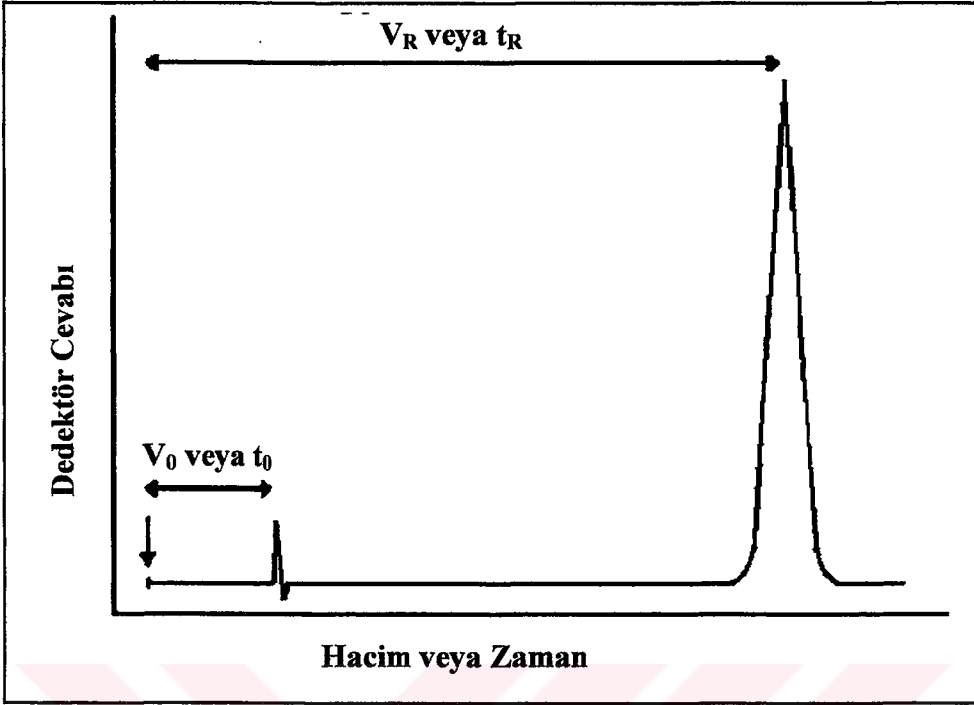
olarak tanımlanır. Bir maddenin alıkonma hacmi, ölü hacim ( $V_0$ ) terimini içerecek biçimde de tanımlanabilir. Kapasite faktörü ( $k'$ ) olarak bilinen bu kavram eşitlik II.16'da verilmiştir (Şekil II.15).

$$k' = (V_R - V_0) / V_0 \quad \text{Eşitlik II.16}$$

Elüsyon sırasında hacimsel akış hızı (F) sabitse eşitlik;

$$k' = (t_R - t_0) / t_0 \quad \text{Eşitlik II.17}$$

biçiminde yazılabilir. Kolon ile herhangi bir etkileşmeye girmeyen maddeler ölü hacim veya boş hacim ( $V_0$ )' de elüe edilirler. Eşitlik II.16 ve II.17'de  $V_0$  ve  $t_0$  sırası ile ölü hacim ve ölü zaman olarak tanımlanmıştır.



**Şekil II.15.** HPLC elde edilen kromatogram ve kapasite faktörünün hesaplanması

Kapasite faktörü dağılımdaki derişimlere bağı olup dağılım katsayısı ile ilişkilidir.

$$k' = \text{Sabit fazdaki madde kütlesi/hareketli fazdaki madde kütlesi} \quad \text{Eşitlik II.18}$$

$$k' = \text{Sabit fazdaki madde derişimi/hareketli fazdaki madde derişimi} \times V_s/V_m \quad \text{Eşitlik II.19}$$

$$k' = K \times V_s/V_m \quad \text{Eşitlik II.20}$$

Bu son eşitlikten görüleceği gibi; bir maddenin alıkonma derecesi her iki fazın kimyasal yapıları, sıcaklıkları ve hacimlerindeki değişikliklere bağıdır.

Kapasite faktörü her maddenin kendine özğüdür ve bir karışımı oluşturan bileşikleri seçici olarak ayıran kromatografik sistemin seçiminde göz önünde tutulan en önemli parametredir. Uygun bir hareketli faz-sabit faz çifti seçildiğinde belirli bir karışımındaki her bir bileşen için farklı kapasite faktörü değerleri elde edilir ve bu değerler ayrılan maddelerin nitel tayinleri için kullanılır.

#### II.5.1.1.b. Seçicilik

İki maddeye ait kapasite faktörü oranı seçicilik ( $\alpha$ ) veya ayırım faktörü olarak adlandırılır ve aşağıdaki eşitlikle verilir.

$$\alpha = k'_2/k'_1 \quad \text{Eşitlik II.21}$$

Bu eşitlikte,  $k'_1$  kısa alıkonma zamanlı maddenin,  $k'_2$  ise daha uzun alıkonma zamanlı maddenin kapasite faktörü olarak tanımlanmıştır. Seçicilik, esas olarak sabit faz özelliklerine bağlıdır ancak hareketli faz bileşimi de seçiciliği etkiler (57).

#### II.5.1.1.c. Kolon Etkinliği

Kolon etkinliği, pik genişliği ile ilgilidir. Etkinliği yüksek olan kolonlar, dar pikler verirler ve bu kolonlarla maddeleri ayırmak daha kolaydır. Başarılı bir kromatografinin asıl amacı verimli bir ayırım ve dar bir kromatografik bant elde etmektir. Kolon etkinliğinin ölçüsü kolonun eşdeğer teorik tabaka sayısı (N)'dir ve aşağıdaki eşitlikle verilir;

$$N = 16 (t_R / w)^2 \quad \text{Eşitlik II.22}$$

Bu eşitlikte w, elüsyon pikinin yüksekliğinin % 10'undaki genişliğidir.

Etkinlik; kolon uzunluğunun, partikül boyutunun ve akış hızının bir fonksiyonudur. Bu parametrelerin değişimi kolonun basıncını da etkiler. Bunun yanında kolon uzunluğu ve akış hızının değişimi alıkonma zamanını da değiştirir.

#### II.5.1.1.d. Ayırıcılık

Kromatografik işlemlerde kolon etkinliği ve çözücü etkinliğinin ortak etkisi ayırıcılık kavramıyla ifade edilir. Ayırıcılık (R: Rezolüsyon), genel olarak aşağıdaki eşitlikle verilmektedir:

$$R = 2 (t_{R2} - t_{R1}) / (w_1 + w_2) \quad \text{Eşitlik II.23}$$

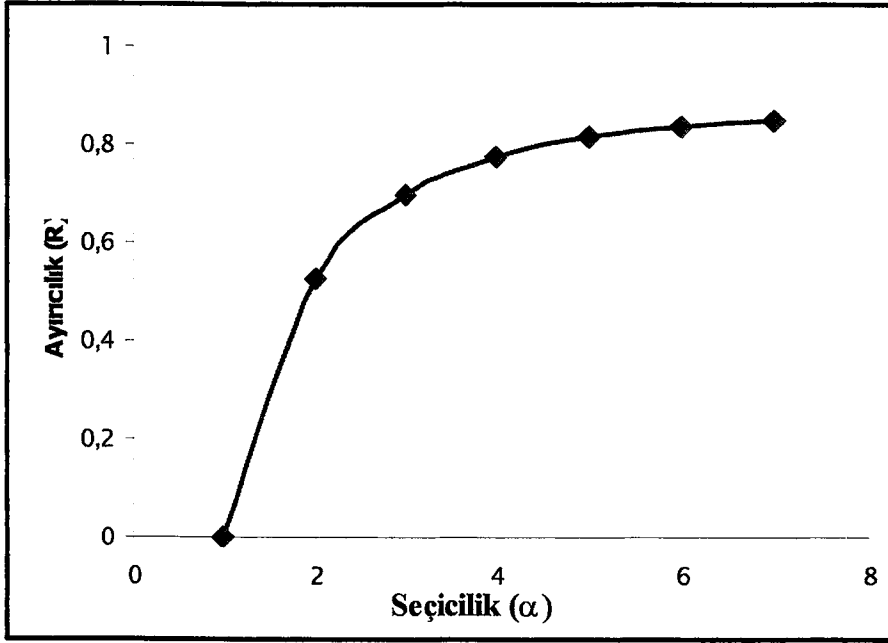
Ayırıcılığın; kapasite faktörü ( $k'$ ), seçicilik ( $\alpha$ ) ve kolon etkinliği ( $N$ ) terimleriyle ilişkisi aşağıdaki eşitlikle ifade edilebilir.

$$R = (1/4) [(\alpha-1) / \alpha] [k' / (k'+1)] N^{1/2} \quad \text{Eşitlik II.24}$$

Kromatografide iki pikin nicel anlamda birbirinden ayrıldığını kabul etmek için  $R \geq 1$  olması gerekir.  $R = 1.5$  olması halinde iki pik birbirinden tamamen ayrılmış sayılır.

#### **Ayırıcılık kontrolü:**

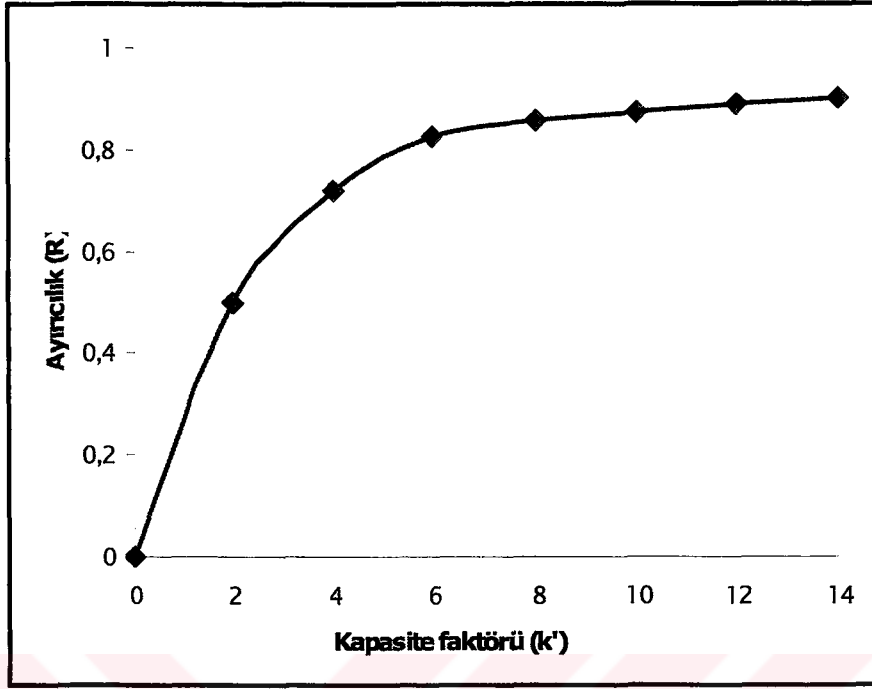
**Seçicilik faktörü ( $\alpha$ ) :** Genel olarak seçicilik arttıkça ayırıcılığın da artması beklenir. Fakat belli bir seçicilik değerinden sonra toplam ayırıcılıkta gerçek bir iyileşme olmadan farklı alıkonma sürelerine sahip madde pikleri elde edilebilir. Seçicilik dışında kalan terimler sabit kabul edilerek seçiciliğe karşı ayırıcılık grafiğe işaretlendiğinde bu davranış açıkça görülmektedir (Şekil II.16). Kromatografik ayırımın başarı ile gerçekleşmesi için  $\alpha > 1$  olmalıdır,  $\alpha = 1$  olduğunda iki bileşik ayıramaz. Seçicilik, hareketli ve sabit fazın bileşimi ile değişir. Birbirine yakın piklerde seçicilik 1'e yakındır.



**Şekil II.16.** Ayrıcılığın seçicilikle değişimi

**Etkinlik Faktörü ( $N$ ) :** Etkinlik faktörü; akış hızı, kolon uzunluğu veya dolgu maddesinin tanecik boyutu ile değişir. Etkinlik faktörü, pik genişliği ile ilgilidir. Ayrıcılık arttıkça pik genişliği düşer. Ayrıcılık,  $N$ 'in karekökünün bir fonksiyonu olduğu için  $N$ 'deki büyük artışlar ayrıcılıkta küçük değişiklikler meydana getirir.

**Kapasite Faktörü ( $k'$ ) :** Kapasite faktörünün ayrıcılık üzerine etkisi bu kavramdan türetilmiş olan seçiciliğin etkisine benzer. Kapasite faktörü dışındaki bütün terimler sabit kabul edildiğinde kapasite faktörünün toplam ayrıcılığa etkisi Şekil II.17'de görülmektedir.  $k' = 0$  olduğunda herhangi bir ayırma işlemi gerçekleşmez. Ayrıca  $k'$  değeri arttıkça  $k'/(k'+1)$  değeri bire yaklaşır ve kapasite faktöründeki artışın toplam ayrıcılığa etkisi kalmaz. Kapasite faktörü için en uygun değerler 1 ile 10 arasındadır ve daha çok hareketli faz özelliklerine göre değişir (104).

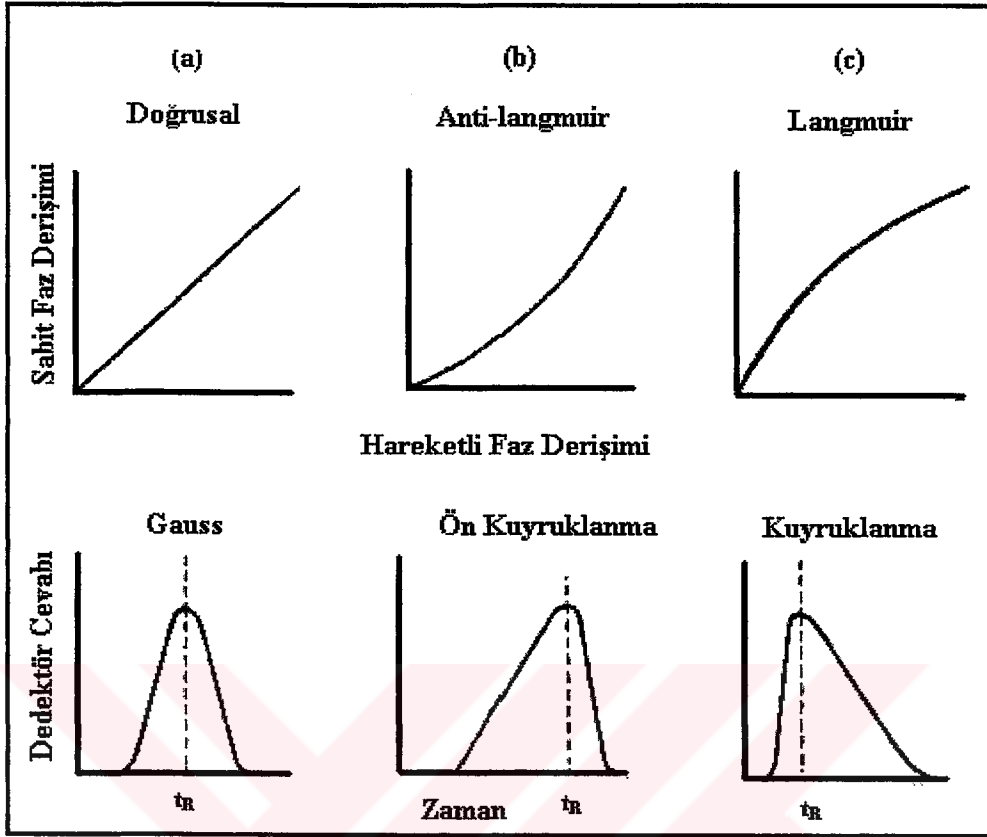


Şekil II.17. Ayırcılığın kapasite faktörü ile değişimi

#### II.5.1.1.e. Pik Simetrisi

Bir bileşen kolondan ne kadar erken çıkarsa o bileşene ait kromatografi piki o kadar keskin olarak elde edilmektedir. Kolondan geç çıkan maddenin piki ise genişlemektedir. Kromatografik bant genişlemesinin nedenleri olarak, numunenin kolona yeterince hızlı verilmemesi, kolon içinde derişimi yüksek bölgelerden derişimi düşük bölgelere difüzyonla madde aktarılması, kolon içinde moleküllerin farklı yollar izlemesi ve bileşenlerin hareketli ve sabit faz arasında dağılımlarının dengeye ulaşamaması sayılabilir.

Analitin hareketli fazdaki denge derişimi ( $C_m$ ) sabit fazdaki denge derişimine ( $C_s$ ) karşı grafiğe geçirildiğinde bir dizi izoterm elde edilir. Şekil II.18.a'daki izoterm doğrusal olup eğimi dağılım katsayısını verir. Bütün  $C_m$  değerlerinde  $K$  sabit olduğu için kromatografik bant bütün derişimlerde aynı hızda hareket eder ve simetrik bir elüsyon piki elde edilir.



Şekil II.18. Elüsyon izotermi ve pik şekilleri

Dışbükey izoterm (Şekil II.18.b), kolonda fazla miktarda madde olduğunu gösterir. Bu durumda sabit fazdaki madde-madde etkileşimleri madde-çözücü etkileşimlerinden daha baskındır. Bu durum K değerinin artmasına ve doğrusal olmayan izoterm elde edilmesine neden olur. Elüsyon eğrisinin önünde bir alan oluşur. Bu duruma ön kuyruklanma denir ve ayrılan maddenin alıkonma süresi derişimle artar.

Eğer moleküller arası kuvvetler maddeyi sabit faz yüzeyinde bir katman oluşturacak biçimde tutuyorsa izoterm içbükey olur (Şekil II.18.c) ve elüsyon eğrisinde pik kuyruklanması görülür, böylece artan madde derişimiyle alıkonma zamanı azalır. Doğrusallıktan sapma nicel analizi güçleştirdiği ve alıkonma sürelerinin nitel analizde kullanımını engellediği için kromatografik koşullar simetrik elüsyon piki sağlanacak şekilde düzenlenir. Pik simetri oranı (PSO)'nın

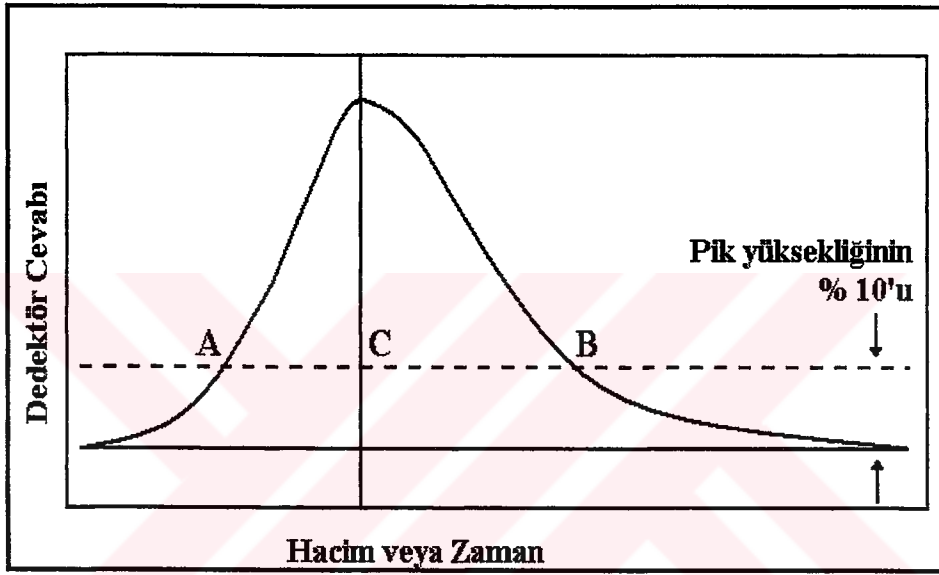


hesaplanması, madde elüsyon pikinin Gauss eğrisi olup olmadığının denetlenmesi açısından önemlidir. Pik simetri oranı,

$$PSO = (CB / AC) \times 100$$

Eşitlik II.25

olarak verilir. CB ve AC uzunlukları Şekil II.19.'da tanımlanmıştır. İyi bir ayırma işleminde, pik simetri oranının % 70 ile % 100 arasında olması istenir (105).



Şekil II.19. Pik simetri oranının hesaplanması

#### II.5.1.1.f. Hareketli Faz Bileşiminin Ayırma Etkisi

Sıvı kromatografisinde iyi bir ayırma için uygun çözücü çifti seçilerek ayrılan maddenin kapasite faktörü 1 ile 10 aralığında değiştirilebilir. İki veya daha fazla sayıda madde aynı kapasite faktörü ile elüe edilirse hareketli faz seçiciliği yeterli değildir ve değiştirilmesi gerekir. Seçiciliğin iyileştirilmesi için kullanılabilecek çözücü sayısı sınırlı olmasına rağmen bazı koşullarda organik düzenleyici tipi değiştirilerek yeterli seçicilik elde edilebilir. Hareketli faz çözeltilerine ayırma kalitesini arttırmak amacıyla ilave edilen maddeler, düzenleyici olarak adlandırılır. Ters-faz tekniğinde genellikle düzenleyici olarak organik çözücüler, tamponlar ve iyon çifti oluşturucular gibi maddeler kullanılır. Hareketli fazın pH'sı dikkatlice ayarlanarak zayıf asit ve bazların seçiciliği optimize edilebilir. Bazı numunelerde

piklerdeki kuyruklanmayı azaltmak amacıyla hareketli faza trietilamin, protein ayırımlarında trifloroasetik asit ilave edilir. İzomer ve aromatik maddelerin ayırımında seçiciliği değiştirmek amacıyla hareketli faza siklodekstrin ilave edilir. İyonlaşmayı ve piklerdeki kuyruklanmayı engellemek için hareketli fazlara fosforik asit de ilave edilebilir (106).

#### II.5.1.1.g. Madde Çözücü Etkileşmeleri

Madde ve çözücü arasındaki moleküler etkileşme beş ana mekanizma aracılığıyla oluşabilir. Bu etkileşmeler;

1. Dağılma: Dağılma kuvvetleri molekülde geçici ve ani bir dipol oluşumuyla başlar, bunu komşu moleküllerin polarize olmaları ve moleküller arası etkileşmeye neden olan dipol oluşumu izler.

2. Dipol-dipol etkileşmeleri: Devamlı dipol özellik gösteren maddeler arasında görülür. Bağın elektronlarını bir atom daha fazla kullanır ve bu bağ polardır (C-Cl). Eğer molekülde simetri varsa bağ polar değildir (CCl<sub>4</sub>). Dipol momentine sahip olan moleküllerde yük dağılımı homojen değildir.

3. Hidrojen bağı oluşumu: Hidrojen bağı etkisi bir proton vericiyle bir proton alıcı arasında oluşur ve etkileşmenin büyüklüğü moleküllerin bulunduğu ortamın asitliğine ve bazlığına bağlıdır.

4. Dielektrik değişimler: Dielektrik etkileşmeler madde molekülleriyle yüksek dielektrik sabitli sıvı arasındaki elektrostatik çekimden kaynaklanır.

5. Coulomb elektrostatik etkileşmeler: Coulomb kuvvetleri aynı yüklü maddeler arasındaki çekme ve farklı yüklü maddeler arasındaki itme kuvvetlerinden oluşmaktadır.

Ayrılan madde ile çözücü molekülleri arasındaki toplam etkileşme beş mekanizmanın bir birleşimidir. Ayrılan madde ve çözücü için bu etkilerin tamamı polarite kavramıyla özetlenir. Polar sabit fazlarda alıkonmayı belirleyen temel faktör ayrılan madde ile sabit faz arasındaki etkileşme, apolar sabit fazlarda ise çözücü etkileridir. Çözücünün, diğer bir deyişle hareketli fazın kromatografik ayırma gücü polaritesiyle ilişkilidir. Ters-faz sıvı kromatografisinde polaritenin ( $P'$ ) kapasite faktörü ( $k'$ )'ne etkisi aşağıdaki eşitlikle verilir.

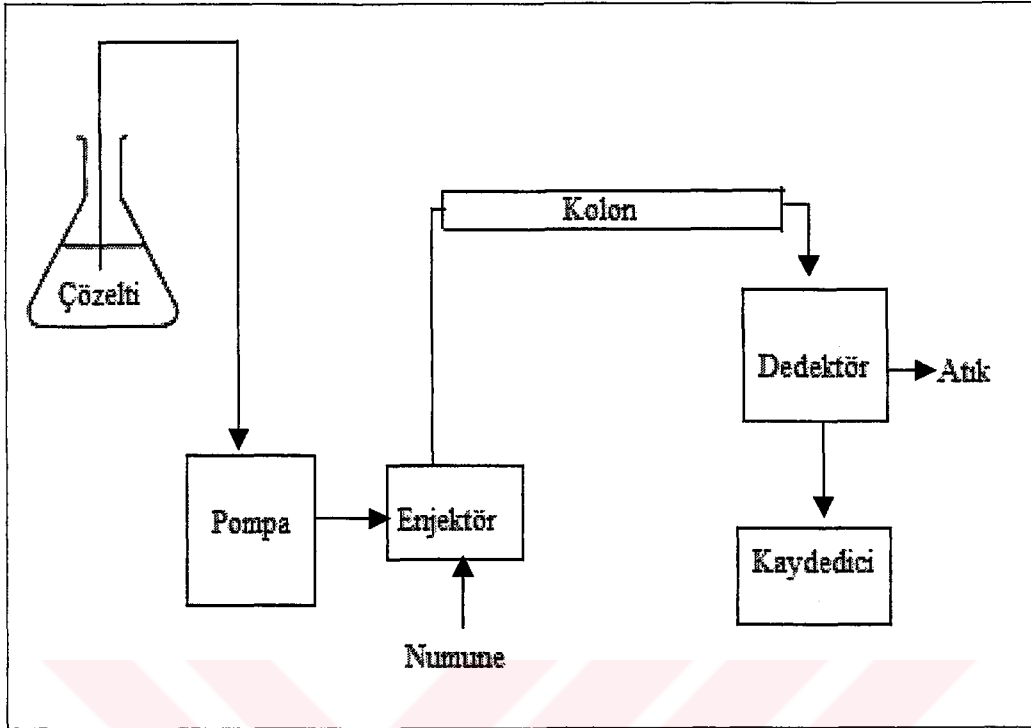
$$k'_2 / k'_1 = 10^{(P'_2 - P'_1)} \quad \text{Eşitlik II.26}$$

Bu eşitlikle 1 ve 2 alt indisleri sırası ile ilk ve ikinci durumu belirlemek amacıyla kullanılmıştır. Genel olarak polaritede bir birimlik değişme kapasite faktöründe yaklaşık 10 kat değişim yaratır (104, 105).

#### II.5.1.2. HPLC Cihazı Bölümleri

Şekil II.20'de şematik olarak gösterilen HPLC cihazı başlıca üç bölümden oluşur:

1. Çözücü dağıtma bölümü
2. Ayırma kolonu
3. Dedektör ve kaydedici sistem



**Şekil II.20.** HPLC cihazı kısımlarının şematik gösterimi

#### II.5.1.2.a. Pompalar

HPLC cihazında, kolon giriş ve çıkışı arasında yüksek basınç oluşturmaları gerekir. Bu basınç kolon girişine bir pompa yoluyla uygulanan basınç ile sağlanır. Çözücü pompalama sistemi belki de HPLC sisteminin en önemli kısmıdır. Pompanın performansı, analitik sonuçlardaki tekrarlanabilirliği, nicel değeri, gözlenebilme sınırı vb. değerleri büyük ölçüde etkiler. Hareketli fazın kolon boyunca akışını sağlamak için kullanılırlar. Akışın sabit ve deneylerin tekrarlanabilir olması için hareketli fazın pompalanma hızı sabit olmalıdır.

Bir HPLC pompalama sistemi şu özellikleri taşımalıdır (83):

1. 400 atm'e kadar basınç üretimi,
2. Puls içermeyen basınç çıkışı,
3. 0.1 - 10 mL/dakika aralığında akış hızları,
4. % 0.5 veya daha iyi bir bağıl tekrarlanabilirlikle akış kontrolü,

5. Korozyona dayanıklı parçalar (paslanmaz çelik veya teflondan yapılmış sızdırmazlık).

Pompalar iki tiptir :

- a. Sabit basınç pompaları
- b. Sabit hacim pompaları

#### II.5.1.2.b. Hareketli Faz Hazneleri

Bir HPLC cihazı, bir veya daha fazla, her biri 200-1000 mL çözücü içeren camdan veya çelikten yapılmış hareketli faz hazneleri içerir. Bu hazneler çoğu zaman kolonda veya dedektör sisteminde bozucu etkilere neden olan çözünmüş gazların (özellikle oksijen ve azot) giderilmesi için bir bölüm ile donatılmıştır.

Hareketli fazın bileşimi, alıkonmayı ve seçiciliği en çok etkileyen faktördür. Hareketli fazın kromatografik özelliklerini etkileyen faktörler aşağıda verilmiştir.

1. Ayrımı etkileyen çözücü özellikleri: Elüsyon gücü ve seçicilik
2. İşleme bağlı özellikler: Viskozite, bastırılabilirlik, dedektörle geçimlilik, kolon ile geçimlilik, numune ile etkileşimler, saflık ve içinde çözünmüş gaz oranı.
3. Güvenirlik özellikleri: Buharlaşılabilmek özelliği.

Sabit bileşimde tek bir çözücü kullanılarak yapılan bir ayırma *izokratik elüsyon* olarak adlandırılır. Sıklıkla ayırma etkinliği *gradient elüsyon* ile büyük ölçüde artırılır. Burada polariteleri birbirinden farklı iki veya üç çözücü sistemi kullanılır. Elüsyon başladıktan sonra belli bir programa göre bazen sürekli olarak bazen de bir seri basamaklar şeklinde çözücülerin oranı değiştirilir. Modern HPLC cihazları, iki veya daha fazla hazneden aldığı çözücülerini bir karıştırma odasında sürekli olarak değişen hızlarda bir araya getiren sistemlerle donatılmıştır (83).

Bütün çözücüler az veya çok oksijen taşırlar ve hava kabarcığı oluşumuna neden olurlar. Bu durum ise pompada düzensiz hareketlere ve zemin bozukluklarına,

dedektörde girişimlere ve yanlış okumalara neden olur. Bu hava kabarcıkların giderilmesi amacıyla ultrasonik banyoda bekletme, vakumla süzme (0.45-0.6  $\mu\text{m}$  çapında membran veya teflon filtreler kullanılır) ve çözücünden inert gaz ( $\text{He}$ ,  $\text{N}_2$ ) geçirme işlemleri uygulanır (105).

Hareketli faz sulu ve/veya tamponlu ise kimyasal bozunmanın yanı sıra mikrobiyolojik üreme sonucunda kolonu tıkayabilir. Bu nedenle, HPLC analizleri sırasında taze hazırlanmış hareketli faz kullanılır.

### II.5.1.2.c. Enjektörler

HPLC analizlerinde ölçümlerin kesinliğini belirleyen faktör, numunenin kolon dolgu maddesine uygulanmasının tekrarlanabilirliğidir. Aşırı numune yüklenmiş kolonlarda görülen bant genişlemesi de kesinliği etkiler. Bu yüzden kullanılan hacim çok küçük olmalıdır ve sistemin basıncını düşürmeden numunenin sisteme girişinin sağlanması gereklidir.

*Manuel enjeksiyon valfleri:* Enjeksiyon valfleri yüksek basınçlı bir ortama numune aktarmak amacıyla kullanılan sistemlerdir. Enjeksiyon valfinin numune yükleme ve enjeksiyon olmak üzere iki konumu vardır. Yükleme konumunda loop basınçlı ortamdan izole edilir ve bir Hamilton ejektör yardımı ile istenilen numune miktarı “loop”a doldurulur. Enjeksiyon konumunda loop tekrar yüksek basınçlı ortama dönerek numuneyi sisteme aktarır.

*Programlanabilen otomatik enjeksiyon sistemleri :* Numune “loop”unu doldurmak için hassas motor ile hareket ettirilen şırıngalar kullanılır. Enjektörle çekilen hacim kontrol edilerek istenilen miktarda numune loopa doldurulur. Küçük miktarlardaki numune enjeksiyonları gerçekleştirilebilmekte ve numune kayıpları minimum olmaktadır. İstenilen sayıda enjeksiyon yapmak mümkündür.

#### II.5.1.2.d. Analitik Kolonlar

HPLC cihazında kullanılan kolonlar, yüksek basıncı korumak için paslanmaz çelikten yapılmışlardır. Bunlar baştan başa düzgün bir iç çapa sahiptirler ve ticari olarak değişik büyüklüklerde mevcuttur.

Bir kromatografik sistemin performansı, kolonda gerçekleştirilen ayırma ile yani, kolon dolgu maddesinin seçilmesi ve kullanılmasıyla tayin edilir. İyi bir kolon dolgu maddesi kararlı olmalıdır ve hem hareketli faz çözücülerine hem de örnek çözeltilere karşı inert olmalıdır. Geniş yüzey alanına, düzgün olarak dağılmış ve hareketli faza kolay erişebilir açık yapısal yüzeye sahip olmalıdır. Yüksek basınç ve yüksek akış hızlarından etkilenmemelidir.

Kolon verimi; kolon dolgu maddesi, ortalama parçacık çapı, kolonu doldurmak için kullanılan teknikler, kolonun iç çapı ve kolonun iç yüzeyinin geometrisi gibi pek çok faktör tarafından tayin edilir. Paslanmaz çelik kolonların, malzeme özellikleri açısından en uygun kolonlar olduğu ortaya çıkmıştır.

Dolgu maddesini yani sabit fazı taşıyan kolonlar genellikle paslanmaz çeliktir, 4-10 mm iç çapında ve 10-30 cm boyunda olabilirler. Dolgu maddesi taneciklerinin çapı 5-10 µm kadardır ve sistemin performansını büyük ölçüde belirleyen niteliklerdir. Tanecikler, gözenekli veya peliküler yapıda olabilir. Gözenekli yapılar preparatif amaçla, peliküler olanlar analitik amaçla kullanılır. Tanecik çapı küçük ve gözenekli yapılar hem analitik hem de preparatif amaçlı kullanılır. Preparatif ayırmada kullanılan, tamamen gözenekli yapıya sahip dolgu maddesi yüksek kapasite gösterir. Analitik amaçla kullanılan dolgu maddesinde kütle aktarımı daha hızlı, etkinlik daha yüksek, kolonun yeniden dengelenmesi ise çok hızlıdır.

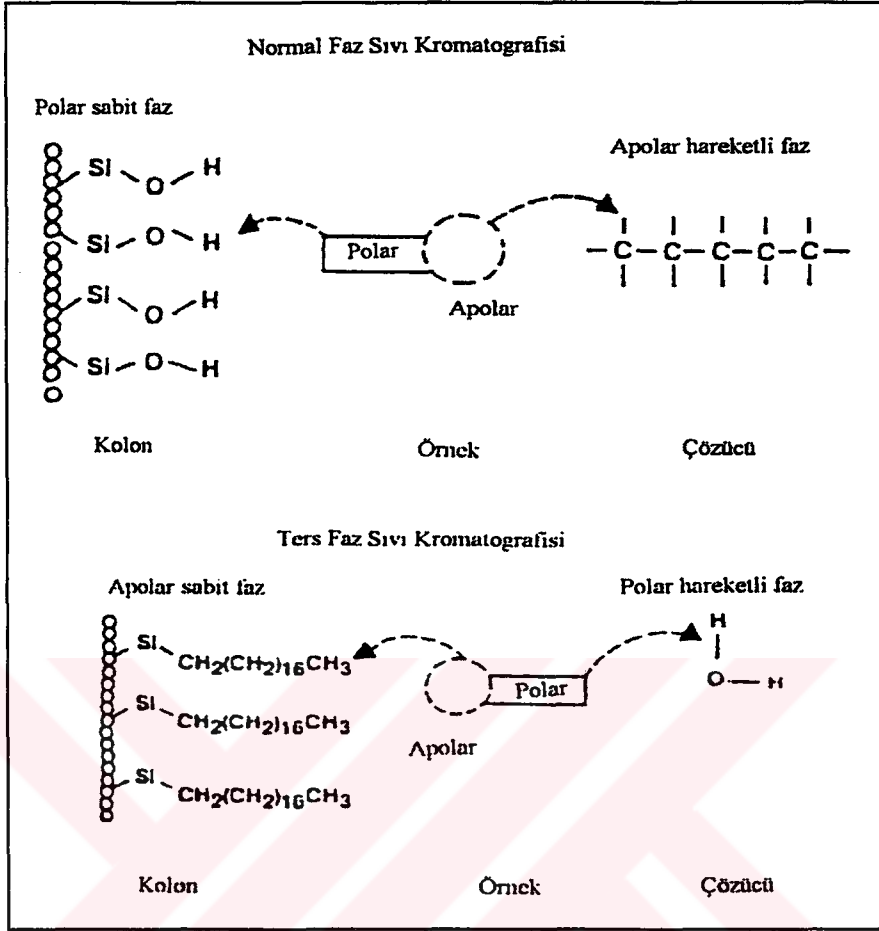
Enjeksiyon sistemi-kolon ve kolon-dedektör arasındaki bağlantı borularının uzunluğunun mümkün olduğu kadar küçük tutulması istenir. Kolon çıkışına ve dedektör sistemine bağlanmış boruların en iyisi, hareketli fazla önemsiz ölçüde seyrelmeye izin veren minimum ölü hacme sahip olanıdır. Bu örnek seyrelmesini

engelleyen, 0.025-0.05 cm iç çapa sahip (çelik ve teflon) bağlantı borularının kullanılmasıyla başılır.

Maddenin polar veya apolar olmasına göre maddenin polaritesine yakın bir sabit faz seçilmelidir. Örneği oluşturan bileşenlerin iyi ayrılabilmesi için sabit faz ile hareketli faz polaritesi farklı olmalıdır. Silika, alümina gibi katılar sahip oldukları - OH grupları nedeniyle polar bileşenlerdir ve normal-faz sıvı kromatografisinde kullanılır (Şekil II.21). İçerdiği SiOH grupları nedeniyle zayıf asidik özellik gösteren silikajel, bazik özellik gösteren bileşikler bazlık kuvvetlerine göre tutar. Yani kuvvetli bazlar, silikajel kolonlarda zayıf bazlara oranla daha kuvvetli tutulurlar. Silikajel doğrudan dolgu maddesi olarak kullanıldığı gibi bir katı yüzeyine film halinde kaplanabilir. - OH grubu yerine - C<sub>18</sub>H<sub>35</sub> gibi bir hidrokarbon bağlanırsa katı yüzey apolar özellik kazanır (Şekil II.21). Asidik özellik gösteren bileşiklerin ayrılmasını sağlayan, yani bazik özellik taşıyan bir kolon dolgu maddesi de aluminadır. Bu dolgu maddesi de katı bir yüzeye film halinde kaplanarak kullanılır (104, 105).

Kolonların ömrü kullanıma göre değişir. Kolon ömrünü uzatmak için bu kolonlardan önce ön kolon kullanılabilir. Bu ön kolonun görevi, sadece partikül haldeki maddeleri ve çözücü içindeki yabancı maddeleri tutmak değil, aynı zamanda numune içinde bulunan ve sabit faza tersinmez olarak bağlanan bileşenleri de tutmaktır. Ön kolondaki dolgu maddesinin bileşimi, analitik kolondakine çok benzer olmalıdır. Bununla birlikte, basınç düşüşünü en aza indirmek için tanecik boyutu genelde daha büyüktür. Ön kolon kirlendiği zaman ya tekrar yeni dolgu maddesi ile doldurulmalı ya da aynı tipte bir yenisi ile değiştirilmelidir.





**Şekil II.21. Normal-faz ve ters-faz kolonlarının yapısı**

#### II.5.1.2.e. Dedektörler

Dedektörün görevi hareketli faz ile gelen numunenin cinsine göre ve bileşenlerin derişimi ile orantılı olarak elektriksel bir cevap üretmektir. HPLC sisteminin en önemli parçalarından biridir. İdeal bir dedektör aşağıdaki özelliklere sahip olmalıdır (83):

1. Yeterli duyarlılık,
2. İyi bir kararlılık ve tekrarlanabilirlik,
3. Geniş bir doğrusal çalışma aralığı,
4. Yüksek güvenirlik ve kullanım kolaylığı,
5. Hızlı ayrılan pikleri kaydetmek için hızlı cevap zamanı,
6. Dedektör sinyali madde derişimi ile doğrusal olarak değişmeli
7. Bant genişlemesini önlemek amacıyla minimum iç hacim,

8. Çözeltilere karşı inert olmalı,
9. Puls'suz veya puls düşürücü ile birlikte kullanılmalıdır. Çünkü puls oluşumu sisteme zemin gürültüsü olarak yansır ve bu da sinyal/gürültü oranı ve alt tayin sınırının düşmesine neden olur.
10. Bakımı ve tamiri kolay olmalı,
11. Hareketli fazdaki akış hızı, sıcaklık ve fazın bileşimindeki değişimlere karşı bir dereceye kadar duyarsız olmalıdır.

HPLC' de kullanılan dedektörler iki grup altında toplanırlar (104):

*a. Maddeye Yönelik Dedektörler*

Hareketli faz içindeki maddenin özelliklerini tayin ederler ve en yaygın kullanılan türleri aşağıda verilmiştir:

1. Fotometrik dedektörler (UV, GB, IR fotometreleri)
2. Floresans dedektörler
3. Elektrokimyasal dedektörler
4. Ayırım sonrası tepkime dedektörleri
5. Radyoaktivite dedektörleri
6. Elektron yakalayıcı dedektörler
7. Kütle spektrometreleri

*b. Tüm Çözeltiye Yönelik Dedektörler*

Çözeltinin içindeki maddeye değil, maddenin içinde bulunduğu çözeltiye spesifik dedektörlerdir ve aşağıdaki şekilde sınıflandırılabilir:

1. Refraktif indeks dedektörleri
2. Dielektrik sabiti dedektörleri
3. Kondüktivite dedektörleri
4. Yoğunluk dedektörleri

### Ultraviyole ve Görünür Bölge (UV/GB) Dedektörü

UV-GB absorpsiyon dedektörü, kolondan ayrılarak dedektöre ulaşan bileşenlerin ultraviyole bölgede yaptığı absorpsiyonun ölçümüne dayanır. Tek bir dalga boyunda çalışan dedektörler kullanılabildiği gibi bir monokromatör ile çeşitli dalgaboylarını seçerek çalışan dedektörler de vardır. Tek dalga boyunda çalışan dedektörlerde ışık kaynağı olarak genellikle 254 nm'de ışıma yapan Hg lambası, çeşitli dalga boylarını ölçebilen dedektörlerde ise döteryum lambası kullanılır.

En çok kullanılan dedektör tipi UV/GB dedektörlerdir. Birçok organik bileşiğin absorpsiyonu yüksek olduğundan yüksek duyarlılıkta ölçüm yapılabilir, böylece duyarlılık ve seçicilik artırılır. Sıcaklık ve akış hızı değişikliklerine fazla duyarlı değildir, bu nedenle gradient elüsyon için idealdir. Bant genişletme etkisi küçüktür.

Dizi diyot dedektör (DAD) bir tür UV/GB dedektörüdür. Optik sistemi, döteryum lambasından gelen polikromatik ışığı, akış hücresinin üzerine yollar. Bu ışık daha sonra optik ağ üzerinde dağılır ve çok sayıda diyottan oluşan foto diyot dizisi üzerine düşer. DAD 200-700 nm dalga boyu aralığını 0.1 s aralıklarla tespit edebilmektedir. Analiz edilecek maddelerin maksimum dalga boyları farklı olduğunda DAD'ler birden fazla dalga boyunda ölçüm alabilir. Kromatografik piklerin saflık kontrolünde veya birden fazla pikten oluşup oluşmadıklarının tayininde oldukça sık kullanılır. Bu amaçla, piklerin elüsyonu sırasında birkaç spektrum kayıt edilerek, spektrumlar üst üste konup karşılaştırılabilir. Bütün dalga boylarında spektrumlar üst üste çakışıyorsa madde piki saftır. Eğer enjekte edilen piklerin sayısından daha az pik elde edilmişse saflık kontrolleri yararlı ipuçları verir. DAD'ın özellikleri aşağıdaki şekilde sıralanabilir (104):

1. Aynı anda spektrumun bütün dalga boylarında piklerin ölçümü yapılabilir.
2. Tek bir enjeksiyonla maksimum dalga boyları saptanabilir.
3. Birden fazla dalga boyunda kromatogramların ve kromatogramlardaki piklerin UV/GB spektrumları alınabilir.

4. Kromatografik olarak ayıramamış piklerin nicel analizi yapılabilir (Referans dalga boyu kullanılarak maddelerin ayrılması sağlanır).
5. Spektrumların çakıştırılması yöntemi ile pik saflığının tespiti yapılabilir.
6. Pik kimliğinin doğrulanması yapılabilir (Madde pikinin daha önce belirlenen spektrumu, o madde olduğundan şüphelenilen pikin spektrumu ile karşılaştırılarak nitel analiz yapılır).

### **Floresans Dedektör**

Floresans, madde tarafından absorbe edilen ışığın daha uzun bir dalga boyunda geri yayılmasıdır. Absorbsiyon daha uzun dalga boyunda geri emisyonu uğratan moleküllerin, UV/GB ışınımını absorbe eden moleküllere oranı daha küçüktür ve bu nedenle floresans absorpsiyondan çok daha seçici bir tayin aracıdır. Floresans özellikleri taşıyan bileşiklerin analizinde ise spektrofotometrik dedektörlere oranla duyarlılığı daha fazla olan floresans dedektörlerin kullanılması mümkündür. Bu dedektör ile  $10^{-11}$  g/mL gibi çok düşük gözlenebilme sınırlarına inilebilmektedir. Luminesans özelliğine sahip olan ilaçların, aminoasitlerin tayini yapılabilir yada bazı biyokimyasal bileşikler floresans bir madde ile tepkimeye sokulup, yeni bir floresans ürün oluşturulur.

Floresans dedektörde bileşikler, hücreden hareketli faz içerisinde çözünmüş halde geçerken üzerine uygun dalga boyunda monokromatik ışın gönderilir. Bileşik tarafından absorbe olan bu ışın daha sonra başka bir dalga boyunda geri verilir. Floresans ölçümde bu emisyon analiz için değerlendirilir. Dalga boyu seçicileri filtreler veya monokromatörler olabilir. Monokromatörler genellikle saptama amacı için uygun ayırıcılığı verirler. Floresans dedektörlerde hem eksitasyon hem de emisyon dalga boyları istenildiği gibi ayarlanabilmektedir (104).

### **Elektrokimyasal Dedektör**

Elektroaktif bileşiklerin tayininde kullanılan,  $10^{-11}$ -  $10^{-12}$  g/mL değerinde gözlenebilme sınırına ulaşılan çok hassas bir dedektördür. Fenoller, aminler,

merkaptanlar, peroksitler, pürinler ve heterosiklik bileşikler elektrokimyasal olarak okside olabilirler. Aldehitler, ketonlar ve nitro bileşikleri ise elektrokimyasal olarak indirgenebilirler. İndirgeme modu sistemden oksijenin uzaklaştırılmasını gerektirdiği için daha az kullanılır. İndirgenme veya yükseltgenme ile oluşturulan akım bileşiğin derişimine karşılık gelir. Dedektör iletken bir hareketli faz gerektirdiğinden ayırmalar tampon içeren hareketli faz ile ters faz kolonlarında gerçekleştirilir (104).

### **Diğer Dedektörler**

İletkenlik dedektörleri kolondan çıkan iyonik haldeki bileşenlerin ölçümünde kullanılır. Bu dedektör organik sistemler için pek uygulanabilir değildir. Daha çok sulu sistemlere uygundur.

Tüm bileşenleri ölçebilen, yani seçimli olmayan kırılma indisi dedektörü ile yapılan ölçümlerde, kırılma indisi sıcaklıkla değiştiğinden, çok iyi bir sıcaklık kontrolü yapılmalıdır. Çok yönlülüğü mükemmeldir, fakat duyarlılığı az olduğundan eser analizler için ideal değildir.

Kolondan çıkan sıvı, iki metal levha elektrot arasından geçirilerek ve bu levhalar arasındaki sığa ölçülerek de ölçüm yapılabilir. Bu tür dedektörlere dielektrik dedektörleri denir.

### III. DENEYSEL KISIM

#### III.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

|                              |                                                                                             |
|------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|
| • Zafirlukast                | (C <sub>31</sub> H <sub>33</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> S, Dr. Reddy's Laboratuvarı) |
| • Piribedil                  | (C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> , Servier)                   |
| • Asetonitril                | (CH <sub>3</sub> CN, Merck)                                                                 |
| • Sodyum asetat              | (CH <sub>3</sub> COONa, Merck)                                                              |
| • Glasiyel asetik asit       | (Glacial CH <sub>3</sub> COOH)                                                              |
| • Borik asit                 | (H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub> , Merck)                                                    |
| • Sodyum hidroksit           | (NaOH, Merck)                                                                               |
| • Hidroklorik asit           | (HCl, Merck)                                                                                |
| • Fosforik asit              | (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , Merck)                                                    |
| • Nitrik asit                | (HNO <sub>3</sub> , Merck)                                                                  |
| • Etanol                     | (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH, Merck)                                                   |
| • Metanol                    | (CH <sub>3</sub> OH, Merck)                                                                 |
| • Aseton                     | (CH <sub>3</sub> COCH <sub>3</sub> , Merck)                                                 |
| • n - hegzan                 | (C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> , Merck)                                                     |
| • Etil asetat                | (CH <sub>3</sub> COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub> , Merck)                                  |
| • Diklorometan               | (CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , Merck)                                                   |
| • Dietil eter                | (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub> , Merck)                      |
| • Potasyum dihidrojen fosfat | (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , Merck)                                                   |
| • Disodyum hidrojen fosfat   | (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O, Merck)                                |
| • Tetrametilamonyum klorür   | ((CH <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> NCl, BDH)                                                  |
| • Tetrametilamonyum iyodür   | ((CH <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> NI, Sigma)                                                 |
| • Tetrametilamonyum bromür   | ((CH <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> NBr, BDH)                                                  |
| • Tetraetilamonyum iyodür    | ((C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>4</sub> NI, BDH)                                     |
| • Potasyum klorür            | (KCl, Merck)                                                                                |
| • Civa                       | (Hg, BDH, Analar)                                                                           |
| • Azot gazı                  | (N <sub>2</sub> , Habaş)                                                                    |
| • Mili-Q su                  | (Bütün analizlerde bu su kullanılmıştır)                                                    |

### III.2. Kullanılan Cihazlar

- Voltametrik Analiz Cihazı (BAS 100 B/W)
- HPLC Cihazı (Thermo Separation Products System)
- UV Dedektör (UV 2000)
- UV Spektrofotometre (Agilent 8453)
- Erime Noktası Tayin Cihazı (Büchi 535)
- IR Spektrofotometre (Bruker Vector 22)
- HPLC Kolonu (Nucleosil C<sub>18</sub> 100A (150 x 4.6 mm i.d, 5 µm)
- pH metre (Metler Toledo MA 235)
- pH metre Kombine Elektrot (Orion)
- Hassas Terazı (Mettler Toledo AG 285)
- Terazı (Shimadzu Libror EB-330 H)
- Ultrasonik Banyo (Bandelin, Sonorex, RK 514 BH)
- Vorteks karıştırıcı (Nüve, NM 110)
- Santrifüj (Nüve, NF 1215)
- Otomatik mikropipet (Biohit 10-100 µl ve 100-1000 µl)
- Etüv (Nüve, FN 400)
- HPLC saflıkta su cihazı (Barnstead NanoPure Diamond)

### III.3. Kullanılan Cam Malzemeler

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

### III.4. Farmasötik Preparatlar

Bu çalışmada kullanılan Accolate® Tablet Astra Zeneca A.Ş.'den temin edilmiştir.

### III.5. Kullanılan Standart Maddenin Saflığının Araştırılması

Zafirlukastın saflığı, erime noktası tayin edilerek, UV ve IR spektrumları alınarak kontrol edilmiştir.

### III.6. Çözeltilerin Hazırlanması

*Stok Zafirlukast Çözeltisi ( $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ ):* 25 mg standart zafirlukast tartılıp 10 mL asetonitril ile çözdükten sonra yine aynı çözücü ile 25 mL'ye tamamlanmıştır ve 4°C'de buzdolabında saklanmıştır. Standart zafirlukast çözeltileri, bu stok çözeltinin istenen derişime voltametrik yöntemler için destek elektolit ile, HPLC yöntemi için ise hareketli faz ile seyreltilerek hazırlanmıştır.

*Stok Piribedil Çözeltisi ( $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ ):* 25 mg standart piribedil tartılıp 10 mL metanol ile çözdükten sonra yine aynı çözücü ile 25 mL'ye tamamlanmıştır ve 4°C'de buzdolabında saklanmıştır. Standart piribedil çözeltileri, bu stok çözeltinin istenen derişime hareketli faz ile seyreltilerek hazırlanmıştır.

İç standart seçimi için kullanılan maddelere ait stok çözeltiler 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  derişiminde ve metanol içinde hazırlanmıştır ve istenen derişime hareketli faz ile seyreltilmiştir.

*Michaelis Borat Tamponu:* 12.4 g borik asit, 100 mL 1 M NaOH çözeltisinde çözdükten sonra su ile bir litreye tamamlanmış ve 0.1 M HCl veya 0.1 M NaOH çözeltisi kullanılarak istenilen pH'ya ayarlanmıştır (107).



*Britton Robinson Tamponu (BR):* 2.47 g borik asit, 2.7 mL fosforik asit ve 2.3 mL glasiyel asetik asit karıştırılıp su ile çözüldükten sonra bir litreye tamamlanmış ve 0.1 M NaOH çözeltisi kullanılarak istenilen pH'ya ayarlanmıştır (107).

*Michaelis Fosfat Tamponu:* 9.08 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ve 11.87 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ayrı ayrı tartılıp su ile çözüldükten sonra su ile bir litreye tamamlanmış ve uygun miktarlarda karıştırılarak istenilen pH'ya ayarlanmıştır (107).

*McIlvaine Sitrat Tamponu:* 21.0 g sitrik asit, 200 mL 1.0 M NaOH çözeltisinde çözüldükten sonra su ile bir litreye tamamlanmış ve 0.2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  çözeltisi kullanılarak istenilen pH'ya ayarlanmıştır (107).

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

*0.01 M Sodyum Asetat Tamponu:* 0.205 g NaAc tartılıp su ile çözüldükten sonra hacim 250 mL'ye tamamlanmıştır.

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

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

*2 F  $\text{HNO}_3$  Çözeltisi:* Balon joje içine bir miktar su konulduktan sonra üzerine 138.9 mL derişik  $\text{HNO}_3$  çözeltisi eklenmiş ve su ile bir litreye tamamlanmıştır.

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

*0.05 F (CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>NCI Çözeltisi:* 5.48 g tetrametilamonyumklorür çözeltisi tartılıp su ile çözdükten sonra hacim bir litreye tamamlanmıştır.

*0.05 F (CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>NI Çözeltisi:* 10.06 g tetrametilamonyumiyodür çözeltisi tartılıp su ile çözdükten sonra hacim bir litreye tamamlanmıştır.

*0.05 F (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>4</sub>NI Çözeltisi:* 12.86 g tetraetilamonyumiyodür çözeltisi tartılıp su ile çözdükten sonra hacim bir litreye tamamlanmıştır.

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

*HPLC Yöntemi için Hareketli Fazın Hazırlanması:* Hareketli faz, asetonitril ve pH 3.00, 0.01 M sodyum asetat tamponundan oluşmaktadır (70 : 30, h/h). Asetat tamponunun hazırlanması için; 0.205 g sodyum asetat tartılmış, balon jojede bir miktar su ile çözülmüş ve 250 mL'ye su ile tamamlanmıştır. Çözeltinin pH'sı glasiyel asetik asit ile 3.00'e ayarlanmış ve asetonitril ile karıştırılmıştır. Hareketli faz, 0.45 µm filtreden süzöldükten sonra 15 dakika ultrasonik banyoda tutulmuş ve HPLC sisteminde kullanılmıştır.

### **III.7. Farmasötik Preparat Çözeltilerinin Hazırlanması**

10 adet tablet tartılıp bir havanda toz haline getirilmiştir. İyice karıştırıldıktan sonra bir tablete eşdeğer miktarda tartılan toz, 50 mL'lik balon jojeye alınarak 25 mL asetonitril eklenmiş ve ultrasonik banyoda 15 dakika bekletilerek çözünmesi sağlanarak hacim asetonitril ile 50 mL'ye tamamlanmıştır. Bu çözeltiden belli bir miktar tüpe alınıp santrifüj edilmiştir.

### **III.8. Sentetik Preparat Çözeltilerinin Hazırlanması:**

10 adet tablet ağırlığı kadar kroskarmeloz, mikrokristalin selüloz, laktoz, mısır nişastası, magnezyum stearat ve titanyum dioksitten belirli miktarlarda tartılıp,

bu karışıma 200 mg zafirlukast (bir tablet 20 mg zafirlukast içermektedir) eklenerek sentetik tablet oluşturulmuştur. Bir tablete eşdeğer miktarda tartılan toz, 50 mL'lik balon jojeye alınarak 25 mL asetonitril eklenmiş ve ultrasonik banyoda 15 dakika bekletilerek çözünmesi sağlandıktan sonra hacim asetonitril ile 50 mL'ye tamamlanmıştır. Bu çözeltiden belli bir miktar tüpe alınarak santrifüj edilmiştir.

### **III.9. Kullanılan Malzeme ve Maddelerin Temizliği**

#### **III.9.1. Cıvanın Temizlenmesi**

Cıva içerisindeki kirliliklerin elektrot tepkimesini engellemesi ve hidrojen aşırı gerilimini azaltması gibi sakıncaları olduğundan temizlenmesi gereklidir. Bu nedenle cıva alt tarafında iğne deliği bulunan ve huniye yerleştirilmiş olan Whatman 41 nicel süzgeç kağıdı içerisinde temiz bir erlene geçirilerek, üzerindeki kaba kirler uzaklaştırılmıştır. Daha sonra yıkama şişesine aktarılan cıva üzerine önce su, daha sonra 2 F  $\text{HNO}_3$  çözeltisi konulup, ikişer gün aralıksız emdirilen hava akımı ile çalkalanmıştır. Buradan alınan cıva mikron çapında delikleri bulunan küçük bir platin elek ve bir metre uzunluğunda 4 cm çapında boru içerisinde geçirilmiştir. Cam boru içine önce 2 F  $\text{HNO}_3$ , daha sonra su konulmuştur. Cıva cam borunun üstüne yerleştirilen elekten çok küçük parçalara ayrılarak geçer. Cam boruda ilerlerken bu küçük cıva parçalarının yüzeyi önce asit, sonra su ile temizlenmiştir. Cıva, borunun altındaki musluktan, iğne deliği bulunan ve huniye yerleştirilmiş olan süzgeç kağıdına ve oradan da temiz bir erlene alınmıştır.

Cıvanın yeterince temizlenip temizlenmediğini anlamak için cıva şiddetle çalkalanıp bırakılır ve çalkalama ile oluşan kabarcıkların 10-15 s kararlı kalması gerekir. Cıvanın, temizliğinin başlangıcından bu aşamaya kadar hava ile temas ederek buharlaşmasını ve oksit tabakası oluşturmasını önlemek için yüzeyinin su ile kaplı olmasına dikkat edilmiştir. Temizlenen cıva, su ile iyice yıkanıp içerisinde asit kalmaması sağlandıktan sonra, nicel huniye yerleştirilen ve dibinde iğne deliği bulunan süzgeç kağıdından beş kez geçirilerek kurutulmuştur. Temiz ve kuru cıvanın üzerinden azot gazı geçirilerek oksijeni uzaklaştırılmış ve teflon kaplarda ağzı kapalı olarak saklanmıştır (108).

### III.9.2. Cam Malzemelerin Temizlenmesi

Kullanılan cam malzemeler çeşme suyu, deterjanlı su ile yıkandıktan sonra çeşme suyu ile durulanmıştır. Daha sonra 2 F HNO<sub>3</sub> çözeltisi içinde en az bir gece bekletilmiş ve tekrar distile su ile yıkanarak oda sıcaklığında kurutulmuştur.

### III.9.3. Elektrokimyasal Hücrenin Temizlenmesi

Elektrokimyasal hücre de cam malzemeler gibi (Bölüm III.9.2.) temizlenmiştir. Analizler sırasında ise sırasıyla distile su, asetonitril:su (2:1, h/h) ve distile su ile yıkamalar yapılmıştır.

### III.9.4. HPLC Kolonunun Temizlenmesi

HPLC sisteminde kullanılan kolon, çalışma öncesi deiyonize su ve 20 dk hareketli faz, çalışma sonrasında ise 20 dk su ve 20 dk metanol geçirilmesi ile temizlenmiştir. Kolonun yıkama aşamalarında akış hızı 1mL/dk'dır.

### III. 9.5. Azot Gazı

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

### **III. 10. Analiz Yöntemlerinin Geliştirilmesi**

#### **III.10.1. Voltametrik Yöntemler**

##### **III.10.1.1. Elektrokimyasal Hücre Düzenegi**

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

##### **III.10.1.2. Deneyin Yapılışı**

Destek elektrolit olarak seçilen pH 8.00 borat tamponundan 2 mL alınarak elektrokimyasal hücreye konulmuş ve 12 dakika süre ile azot gazı geçirilmiştir. Bu süre sonunda azot gazı çözelti üzerine gönderilmiştir. Kare dalga voltametrisi (OSWV) yöntemi için 1000 mV'luk potansiyel uygulanarak destek elektrolitin voltamogramı alınmıştır. Kare dalga adsorptif sıyırma voltametrisi (OSWAdSV) ve diferansiyel puls adsorptif sıyırma (DPAdSV) için sırasıyla 1000 mV ve 950 mV'luk biriktirme potansiyelleri uygulanmış ve her iki yöntem için 20 s süre boyunca çözelti devamlı karıştırılarak civa damlası üzerinde maddenin birikmesi sağlanmıştır. Daha sonra karıştırma işlemi durdurulup 10 s beklenecek çözeltinin dengeye gelmesi sağlanmış ve OSWAdSV ve DPAdSV yöntemi için destek elektrolitin voltamogramları alınmıştır. Hücreye mikropipet yardımıyla  $\mu\text{L}$  düzeyinde standart zafirlukast çözeltisinden eklenmiş ve zafirlukastın destek elektrolitte olduğu gibi OSWV, OSWAdSV ve DPAdSV voltamogramları alınmıştır.

##### **III.10.1.3. Yöntemlerin Optimizasyonu**

Zafirlukast'ın voltametrik yöntemlerle analizi için OSWV, OSWAdSV ve DPAdSV yöntemleri uygulanmıştır. Bu yöntemlerde deneysel ve cihaza ait parametreler değiştirilerek uygun şartlar araştırılmıştır. Bu amaçla ilk önce uygun tampon tipi, pH'sı ve derişimi denenmiştir. Cihaza ait optimum parametreler araştırılırken, OSWV yönteminde, frekans, adım yüksekliği ve puls genliği,

OSWAdSV yönteminde biriktirme potansiyeli ve süresi, frekans, adım yüksekliği ve puls genliği, DPAdSV yönteminde ise biriktirme potansiyeli ve süresi, tarama hızı ve puls genliği değiştirilmiştir. Bu cihaza ait parametrelerin denenmesinde zafirlukast derişimi, OSWV yöntemi için 6 ve 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , OSWAdSV yöntemi için 100 ve 200  $\text{ng mL}^{-1}$  ve DPAdSV yöntemi için ise 100 ve 300  $\text{ng mL}^{-1}$  olarak alınmıştır.

#### **III.10.1.4. Dönüşümlü Voltametri Deneyleri**

Bu yöntemde çalışma elektrotu olarak asılı duran cıva elektrotu, referans elektrotu Ag/AgCl, karşıt elektrot olarak platin tel kullanılmıştır. Elektrokimyasal hücreye 2 mL pH 8.00 borat tamponu konup çözeltiden 15 dk azot gazı geçirilmiştir. Bu sürenin sonunda azot gazı çözeltinin üzerine gönderilmeye başlanmıştır. 10 - 1000 mV/s tarama hızlarında 10.00  $\mu\text{g mL}^{-1}$  derişiminde zafirlukast çözeltisinin dönüşümlü voltamogramları alınmıştır. Her tarama öncesinde cıva damlası yenilenmiştir. Çizilen log (pik akımı)na karşı log (tarama hızı) grafiğinden akımın karakteri bulunmuştur.

#### **III.10.1.5. Kronoamperometri Deneyleri**

Bu yöntemde çalışma elektrotu olarak asılı duran cıva elektrotu, referans elektrotu Ag/AgCl, karşıt elektrot olarak platin tel kullanılmıştır. Elektrokimyasal hücreye 2 mL pH 8.00 borat tamponu konup çözeltiden 15 dk azot gazı geçirilmiştir. Bu sürenin sonunda azot gazı çözeltinin üzerine gönderilmeye başlanmıştır. 1200-1400 mV'luk potansiyel aralığında standart olarak kullanılan  $1 \times 10^{-3}$  M derişiminde potasyum ferrosiyanür ve zafirlukastın ayrı ayrı kronoamperometrik voltamogramları çizilmiştir. Zamanın kareköküne karşı pik akımı grafiklerinin eğimlerinden aktarılan elektron sayısı ve difüzyon katsayısı bulunmuştur.

#### **III.10.1.6. Doğrusal Taramalı Voltametri Deneyleri**

Bu yöntemde çalışma elektrotu olarak ultramikro elektrot (camsı karbon), referans elektrotu Ag/AgCl, karşıt elektrot olarak platin tel kullanılmıştır.

Elektrokimyasal hücreye 4 mL pH 8.00 borat tamponu konup çözeltiden 15 dk azot gazı geçirilmiştir. Bu sürenin sonunda azot gazı çözeltinin üzerine gönderilmeye başlanmıştır. 1200 - 1400 mV'luk potansiyel aralığında standart olarak kullanılan  $1 \times 10^{-3}$  M derişiminde potasyum ferrosiyanür ve zafirlukastın ayrı ayrı doğrusal taramalı voltamogramları alınmıştır. Zafirlukast ve potasyum ferrosiyanürün sınır akımları bulunmuştur.

### **III.10.2. Kromatografik Yöntem**

#### **III.10.2.1. Kromatografik Çalışma Şartları**

Kromatografik çalışmalar Termo Separation Products model HPLC cihazı ile yapılmıştır. Analiz, Nucleosil C<sub>18</sub> 100A (5 µm, 150 x 4.6 mm i.ç.,) kolonda asetronitril : pH 3.00, 0.01 M sodyum asetat tamponu (70:30, h/h) kullanılarak 0.8 mL/dak akış hızında ve 240 nm'de gerçekleştirilmiştir.

#### **III.10.2.2. Deneyin Yapılışı**

Analiz öncesi kolondan sırasıyla su ve hareketli faz geçirilerek kolonun dengelenmesi sağlanmıştır. Bunun için gürültünün en aza indiği zemin değeri elde edilinceye kadar hareketli faz geçirilmiş ve analizlere başlanmıştır. Enjeksiyon hacmi 20 µL'dir.

Çalışma sonunda kolon, bölüm III.9.4'de anlatıldığı gibi temizlenmiştir.

#### **III.10.2.3. Yöntemin Optimizasyonu**

En iyi ayırımın sağlanması amacıyla kromatografik koşullar optimize edilmiştir. Bu amaçla zafirlukastın ters-faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile ayırımında; hareketli faz tipi (asetat, fosfat ve sitrat tamponu), hareketli fazın içerdiği organik çözücü oranı (% 25, 30, 35 ve 40 oranında asetronitril), pH'sı (3.00, 3.50, 4.00 ve 4.50) ve akış hızının (0.5, 0.8 ve 1.0 mL/dk) etkileri incelenmiştir. Bu çalışmalar sırasında zafirlukast derişimi 500.00 ng mL<sup>-1</sup>'dir.



### III.11. Geliştirilen Yöntemlerin Validasyonu

Yöntem validasyonu için stabilite, doğrusallık, duyarlılık, kesinlik, doğruluk, tekrarlanabilirlik, sağlamlık, tutarlılık, cihaz tekrarlanabilirliği, özgünlük ve geri kazanım parametreleri değerlendirilmiştir (109 - 124).

#### Stabilite

Zafirlukastın asetonitrildeki çözeltisinin ( $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) stabilite çalışması yapılmıştır. Bunun için oda sıcaklığında ve buzdolabında saklanan zafirlukast çözeltilerinden taze olarak hazırlanan  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ 'lik standart zafirlukast çözeltisinin iki ay boyunca UV spektrumları alınmıştır.

#### Doğrusallık

OSWV, OSWAdSV ve DPAdSV yöntemleri için sırasıyla  $0.15 - 10.16 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $30.00 - 394.00 \text{ ng mL}^{-1}$  ve  $38.00 - 412.00 \text{ ng mL}^{-1}$  aralığında olacak şekilde standart zafirlukast çözeltileri, stok çözeltiden ( $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) uygun miktarlarda alınıp pH 8.00 borat tamponu ile seyrelmesiyle hazırlanmıştır. Doğrusallık aralığını saptamak için içinde destek elektrolit bulunan elektrokimyasal hücreye artan miktarlarda standart çözeltilerden eklenmiş ve her bir eklemekten sonra voltamogramları kaydedilmiştir. Derişime karşı pik akımları grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrileri çizilmiştir. Kalibrasyon çözeltileri günlük hazırlanmış ve analiz sırasında 12 ayrı kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Kalibrasyon eğrilerine ait regresyon denklemleri ve korrelasyon katsayıları hesaplanmıştır. Korrelasyon katsayısının önem kontrolü ve elde edilen doğruların doğrusallıktan ayrılışın önem kontrolü testleri yapılmıştır (Ek 1).

HPLC yöntemi için  $25.00 - 900.00 \text{ ng mL}^{-1}$  aralığında olacak şekilde standart zafirlukast çözeltileri, stok çözeltiden ( $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) uygun miktarlarda alınarak ve her bir çözeltinin içine iç standart olarak  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  standart piribedil çözeltisinden  $20 \mu\text{L}$  eklendikten sonra hareketli faz ile  $1000 \mu\text{L}$ 'ye tamamlanarak hazırlanmıştır. Bu çözeltilerin HPLC sistemine enjekte edilerek kromatogramları alınmıştır.



Kalibrasyon eğrisi, zafirlukast derişimine karşı zafirlukast pik alanının ( $A_z$ ) piribedil pik alanına oranı ( $A_p$ ) grafiğe geçirilerek oluşturulmuştur. Kalibrasyon çözeltileri günlük hazırlanmış ve analiz sırasında sekiz ayrı kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Kalibrasyon eğrisine ait regresyon denklemi ve korrelasyon katsayısı hesaplanmıştır. Korrelasyon katsayısının önem kontrolü ve elde edilen doğruların doğrusallıktan ayrılışın önem kontrolü testleri yapılmıştır.

Geliştirilen her bir yöntemin doğrusallığı; nominal (olması gereken) derişimlere karşı, kalibrasyon verileri kullanılarak bulunan derişimlerin grafiğe geçirilmesiyle ve ayrıca istatistiksel olarak korrelasyon katsayısının önem kontrolü ve elde edilen doğruların doğrusallıktan ayrılışın önem kontrolü testleri yapılarak kontrol edilmiştir (Ek 1).

### **Duyarlılık**

Gözlenebilme sınırı (LOD), sinyal/gürültü (S/G) oranı 3 olduğunda saptanabilen en küçük zafirlukast derişimi olarak alınmıştır (114, 115).

Alt tayin sınırı (LOQ), belirlenen kabul ölçütlerinde olmak üzere kalibrasyon eğrisinde yer alan en düşük derişim değeri olarak tanımlanmaktadır. Kalibrasyon eğrilerindeki en düşük derişimler için, % bağıl standart sapma (BSS), % 15 ve % bağıl hata % 20'nin altında bulunduğundan, kalibrasyon eğrisindeki en düşük derişim değeri LOQ olarak kabul edilmiştir (109 - 113).

### **Kesinlik ve Doğruluk**

Kesinlik ve doğruluk çalışmaları için gün içi ve günler arası olmak üzere ayrı ayrı çalışılmıştır. Bu amaçla doğrusallık aralığına giren üç farklı derişim seviyesinde (alt tayin sınırına yakın, orta ve üst tayin sınırına yakın) tekrarlı analizleri yapılmıştır. OSWV yönteminde 3.77, 5.46, 9.84  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , OSWAdSV yönteminde 48.00, 167.00 375.00 ng  $\text{mL}^{-1}$ , DPAdSV yönteminde 48.00, 167.00 375.00 ng  $\text{mL}^{-1}$  ve HPLC yönteminde ise 40.00, 400.00 ve 800.00 ng  $\text{mL}^{-1}$  derişiminde çözeltilerin analizleri

yapılmıştır. Gün içi çalışmalarda; üç derişim seviyesinde ve her derişim için yedi ayrı çözelti hazırlanmış, hazırlanan bu çözeltiler aynı gün içinde analiz edilmiştir. Günler arası çalışmalarda; ard arda yedi ayrı günde ve üç derişimde yeni hazırlanan çözeltilerin analizleri yapılmıştır. Kesinlik, bulunan değerlerin ortalaması, standart hatası (SH), standart sapması (SS) ve % bağıl standart sapması (BSS) ile verilmiştir. Doğruluk ise, eklenen zafirlukast miktarı ile bulunan zafirlukast miktarının karşılaştırılması ve bulunan % bağıl hatası ile verilmiştir (EK 2).

### **Tekrarlanabilirlik**

Yöntemlerin tekrarlanabilirlik çalışmaları için geliştirilen yöntemlerde doğrusallık aralığına giren bir derişim seviyesinde (OSWV için  $6.25 \mu\text{g mL}^{-1}$ , OSWAdSV ve DPAdSV için  $130.00 \text{ ng mL}^{-1}$  ve HPLC için  $400.00 \text{ ng mL}^{-1}$ ) on iki ayrı çözelti hazırlanmış ve bunların aynı gün içinde tekrarlı analizleri yapılmıştır. Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

### **Sağlamlık ve Tutarlılık**

Yöntemlerin sağlamlık çalışmaları için belirlenen optimum deney koşullarında küçük değişiklikler yapılarak analizler yapılmıştır. Bu amaçla OSW yönteminde destek elektrolitin pH'sı ve ilk potansiyel; OSWAdSV ve DPAdSV yöntemlerinde destek elektrolitin pH'sı, biriktirme potansiyeli ve süresi; HPLC yönteminde ise hareketli fazın pH'sı, akış hızı, asetonitril oranı ve çalışılan dalga boyunda değişiklikler yapılmıştır. Tutarlılık çalışmalarında ise farklı analizci tarafından çözeltilerin analizleri yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilerek analiz sonuçlarına etkisi araştırılmıştır. Bunun için geliştirilen yöntemlerde doğrusallık aralığına giren bir derişim seviyesinde (OSWV için  $6.25 \mu\text{g mL}^{-1}$ , OSWAdSV ve DPAdSV için  $130.00 \text{ ng mL}^{-1}$  ve HPLC için  $400.00 \text{ ng mL}^{-1}$ ) yedi ayrı çözelti hazırlanmış ve bunların aynı gün içinde analizleri yapılmıştır.

### **Cihaz Tekrarlanabilirliği**

Zafirlukastın voltametrik yöntemlerle analizinde cihaz tekrarlanabilirliği, OSWV için  $6.25 \mu\text{g mL}^{-1}$ , OSWAdSV ve DPAdSV için  $130.00 \text{ ng mL}^{-1}$  zafirlukast içeren çözeltinin 7 ayrı kez voltamogramlarının alınmasıyla elde edilen zafirlukasta ait pik akımları ve pik potansiyellerinin ortalama değerleri hesaplanarak bulunmuştur. HPLC yönteminde ise  $400.00 \text{ ng mL}^{-1}$  zafirlukast ve  $200.00 \text{ ng mL}^{-1}$  piribedil içeren çözeltinin 7 kez tekrarlı enjeksiyonu ile elde edilen pik alanlarının ve alıkonma zamanlarının ortalama değerleri alınarak bulunmuştur.

### **Özgünlük ve Geri Kazanım**

Bölüm III.8’de anlatıldığı şekilde hazırlanan 20 mg zafirlukast içeren sentetik tablet çözeltilerinden voltametrik yöntem için destek elektrolitle, HPLC yöntemi için hareketli faz ile seyreltilerek hazırlanmış (OSWV için  $6.25 \mu\text{g mL}^{-1}$ , OSWAdSV ve DPAdSV için  $130.00 \text{ ng mL}^{-1}$  ve HPLC için  $400.00 \text{ ng mL}^{-1}$  olacak şekilde) 7 ayrı çözeltinin analizleri yapılmıştır ve geri kazanım değerleri hesaplanmıştır (Ek 3).

Ayrıca yöntemin özgünlüğünü göstermek amacıyla standart ekleme yöntemleri yapılmıştır. Bunun için voltametrik yöntemlerde destek elektrolit çözeltisine, bölüm III.7’de anlatıldığı şekilde hazırlanan tablet çözeltilerinden belli bir miktar eklenmiş voltamogramlar kaydedilmiştir. Sonra OSWV yöntemi için  $50.00 \mu\text{g mL}^{-1}$  ve OSWAdSV ve DPAdSV yöntemleri için  $1.00 \mu\text{g mL}^{-1}$ ’lik standart zafirlukast çözeltisinden doğrusallık sınırları içerisinde olacak şekilde artan derişimlerde eklemeler yapılarak voltamogramlar kaydedilmiştir. Ölçülen pik akımları değerleri eklenen zafirlukast derişimlerine karşı grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi çizilmiş ve regresyon denklemi ile korrelasyon katsayısı hesaplanmıştır.

HPLC yönteminde ise viallere bölüm III.7’de anlatıldığı şekilde hazırlanan tablet çözeltilerinden belli bir miktar eklenmiş ve üzerlerine  $10.00 \mu\text{g mL}^{-1}$  standart zafirlukast çözeltisinden doğrusallık sınırları içerisinde olacak şekilde artan

derişimlerde eklemeler yapılmıştır. Daha sonra bu çözeltiler hareketli faz ile 1000 µL'ye seyreltilmiş ve kromatogramları alınmıştır. Hesaplanan alan oranı değerleri eklenen zafirlukast derişimlerine karşı grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi çizilmiş ve regresyon denklemi ile korrelasyon katsayısı hesaplanmıştır.

### III.12. Yöntemlerin Farmasötik Preparatlara Uygulanması

Geliştirilen voltametrik ve kromatografik yöntemler, Türkiye piyasasındaki Accolate® tabletlere uygulanmıştır. Voltametrik yöntemler için, bölüm III.7.'de anlatıldığı gibi asetonitrilde hazırlanmış tablet çözeltilerinden doğrusallık sınırları içinde olacak şekilde (OSWV için 6.25 µg mL<sup>-1</sup>, OSWAdSV ve DPAdSV için 130.00 ng mL<sup>-1</sup> derişiminde) destek elektrolit ile uygun seyreltmeler yapılmıştır. Elektrokimyasal hücre içerisindeki destek elektrolit üzerine µL düzeyinde eklemeler yapılmış ve voltamogramlar kaydedilmiştir. Ölçülen pik akımları değerlerinden kalibrasyon yöntemi ile tablet içindeki zafirlukast miktarı bulunmuştur

HPLC yönteminde de bölüm III.7.'de anlatıldığı gibi asetonitrilde hazırlanmış tablet çözeltilerinden doğrusallık sınırları içinde olacak şekilde (400.00 ng mL<sup>-1</sup> derişiminde) alınmış ve 200 ng mL<sup>-1</sup> olacak şekilde iç standart eklenerek, hareketli faz ile seyreltmeler yapılmış ve hazırlanan çözeltiler HPLC sistemine enjekte edilmiştir. Hesaplanan alan oranları değerlerinden tablet içindeki kalibrasyon yöntemi ile zafirlukast miktarı bulunmuştur

Geliştirilen OSWV, OSWAdSV, DPAdSV ve HPLC yöntemleri ile karşılaştırma yönteminin (3. türev spektrofotometri yöntemi) (10) farmasötik preparatlara uygulanması sonucu elde edilen değerlerin istatistiksel olarak karşılaştırılması tekrarlı ölçümlerde varyans analizi testi ile yapılmıştır (Ek 4). Bu beş yöntem ile elde edilen analiz sonuçları arasında fark olup olmadığı araştırılmıştır.

### III.13. Biyolojik Materyal Analizi

#### III.13.1. Tüketme Yöntemi ve Çözücü Seçimi

Zafirlukastın plazmadan analizi HPLC yöntemi ile yapılmıştır. Bu amaçla;

- Değişik organik çözücüler (hegzan, diklorometan, etil asetat, dietil eter, kloroform) kullanılarak sıvı-sıvı tüketme işlemi,
- Proteinlerin çöktürülmesine (etanol, metanol, asetonitril, aseton ve trikloroasetik asit (TCA)) dayanan sıvı-sıvı tüketme işlemi,
- Çeşitli tipte kartuşlar ( $C_{18}$  ekstra ayırma kartuşu,  $C_8$  oktil modifiye silika ve  $C_{18}$  oktadesil modifiye silika) kullanılarak katı-sıvı tüketme işlemi denenmiştir.

#### III.13.2. Biyolojik Materyalden Analiz Yöntemi

Hacettepe Üniversitesi kan bankasından alınan boş (zafirlukast içermeyen) plazma üzerine standart zafirlukast ve piribedil çözeltilerinden uygun miktarlarda eklenerek plazma örnekleri hazırlanmıştır ve bu çözeltilerin HPLC ile analizleri yapılmıştır.

Plazmadan zafirlukast ve piribedilin analizi, plazma proteinlerinin çöktürülmesine dayanan sıvı-sıvı tüketme yöntemi ile yapılmıştır. Bu amaçla, 500  $\mu$ L plazmaya artan miktarlarda zafirlukast standart çözeltisinden ve 30  $\mu$ L piribedil ( $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) çözeltisinden eklenmiş ve bu karışım 10 s vortekslenmiştir. Üzerine 1000  $\mu$ L etanol eklenerek 1 dakika vortekslenmiş ve daha sonra 15 dakika 5000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Berrak kısımdan 10  $\mu$ L alınıp 1000  $\mu$ L'ye hareketli faz ile seyreltilmiş ve HPLC'ye 20  $\mu$ L enjekte edilmiştir.

### III.13.3. Biyolojik Materyalden Analiz Yönteminin Validasyonu

Yöntem validasyonu için doğrusallık, duyarlılık, kesinlik, doğruluk, ve geri kazanım parametreleri değerlendirilmiştir (109 - 124).

#### Doğrusallık

Plazmaya artan derişimlerde standart zafirlukast çözeltisinden ve 30 µL piribedil ( $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) çözeltisinden eklenerek, 49.69 - 477.50 ng mL<sup>-1</sup> derişim aralığında kalibrasyon çözeltileri hazırlanmıştır. Bu çözeltiler HPLC sistemine enjekte edilerek kromatogramları alınmıştır. Zafirlukast derişimine karşı zafirlukast pik alanının ( $A_z$ ) piribedil pik alanına oranı ( $A_p$ ) grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrileri çizilmiştir. Kalibrasyon çözeltileri günlük hazırlanmış ve analiz sırasında yedi ayrı kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Kalibrasyon eğrisine ait regresyon denklemi ve korrelasyon katsayısı hesaplanmıştır. Korrelasyon katsayısının önem kontrolü ve elde edilen doğrunun doğrusallıktan ayrılışın önem kontrolü testleri yapılmıştır.

Yöntemin doğrusallığı; plazmaya eklenen kalibrasyon çözeltilerinin nominal (olması gereken) derişimlerine karşı, kalibrasyon verileri kullanılarak bulunan derişimlerinin grafiğe geçirilmesiyle ve ayrıca istatistiksel olarak korrelasyon katsayısının önem kontrolü ve elde edilen doğruların doğrusallıktan ayrılışın önem kontrolü testleri yapılarak kontrol edilmiştir (Ek 1).

#### Duyarlılık

LOD, sinyal/gürültü (S/G) oranı 3 olduğunda saptanabilen en küçük zafirlukast derişimi, LOQ ise, belirlenen kabul ölçütlerinde olmak üzere kalibrasyon eğrisinde yer alan en düşük derişim değeri olarak alınmıştır.

#### Kesinlik ve Doğruluk

Kesinlik ve doğruluk çalışmaları için gün içi ve günler arası olmak üzere ayrı ayrı çalışılmıştır. Bu amaçla doğrusallık aralığına giren üç farklı derişim seviyesinde

(alt tayin sınırına yakın, orta ve üst tayin sınırına yakın) plazmaya eklenen standartların (72.73, 254.78 ve 407.52 ng mL<sup>-1</sup>) tekrarlı analizleri yapılmıştır. Gün içi çalışmalarda; üç derişim seviyesinde ve her derişim için yedi ayrı eklenmiş plazma çözeltileri hazırlanmış, hazırlanan bu çözeltiler aynı gün içinde analiz edilmiştir. Günler arası çalışmalarda; ard arda yedi ayrı günde ve üç derişimde yeni hazırlanan eklenmiş plazma çözeltilerinin analizleri yapılmıştır. Kesinlik, bulunan değerlerin ortalaması, SH'sı, SS'sı ve % BSS'sı ile verilmiştir. Doğruluk ise, eklenen zafirlukast miktarı ile bulunan zafirlukast miktarının karşılaştırılması ve bulunan % bağıl hata ile verilmiştir (EK 2).

### **Geri Kazanım**

Yöntemin % geri kazanımı (tüketme verimi), üç ayrı derişim seviyesinde (72.73, 254.78 ve 407.52 ng mL<sup>-1</sup>) plazmaya eklenmiş zafirlukastın pik alanı aynı derişimde hareketli fazda hazırlanan zafirlukast standardının pik alanına oranı olarak hesaplanmıştır. Ayrıca plazmaya eklenmiş zafirlukastın pik alanı aynı derişimde plazmaya uygulandığı şekilde suda tüketme işlemi yapılarak elde edilen zafirlukastın pik alanına oranı olarak hesaplanmıştır (Ek 3).

## IV. BULGULAR

### IV. 1. Saflık Kontrolü Bulguları

#### IV. 1. 1. Erime Noktası

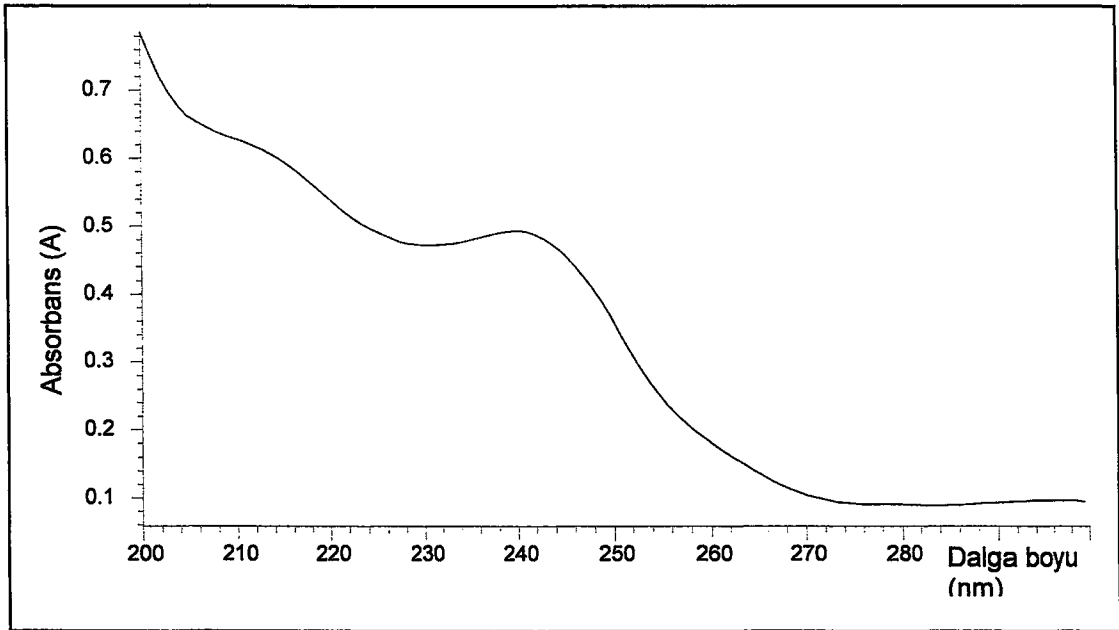
Yapılan tayin sonucu zafirlukastın erime noktasının 220 °C olduğu gözlenmiştir.

#### IV. 1. 2. IR Spektrumu

Zafirlukastın KBr ile hazırlanan diskinin 4000  $\text{cm}^{-1}$  ile 400  $\text{cm}^{-1}$  arasındaki IR spektrumu Şekil IV.1'de görülmektedir.

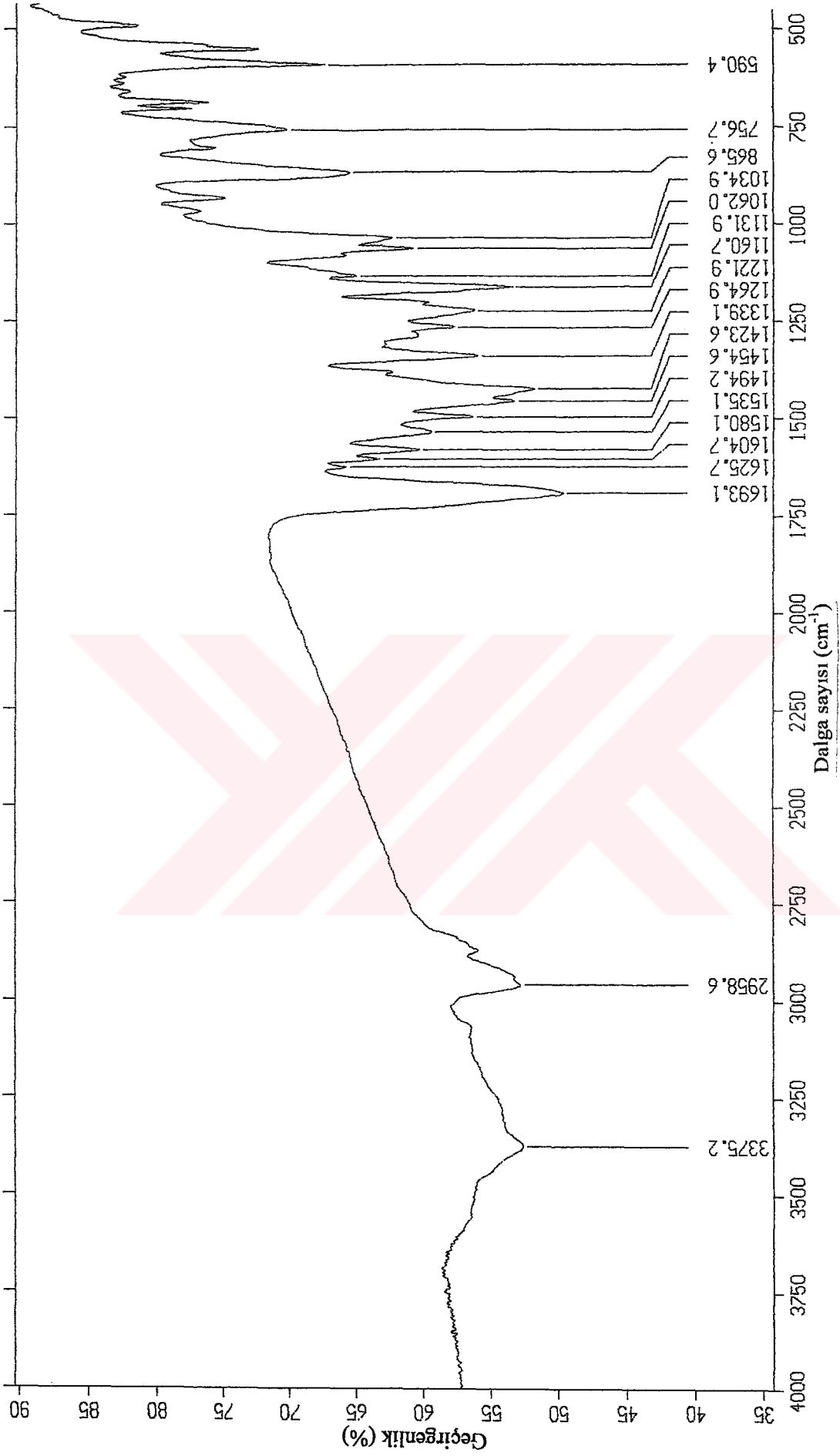
### IV. 2. Zafirlukastın UV Spektrumu

Asetonitril:su (80:20, h/h) içinde hazırlanan 10.00  $\mu\text{g mL}^{-1}$  zafirlukast çözeltisinin 200 nm ile 350 nm dalga boyları arasındaki UV spektrumu alınmış ve 240 nm'de maksimum pik gözlenmiştir (Şekil IV.2)



Şekil IV.2. 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  zafirlukast çözeltisinin UV spektrumu





Şekil IV.1. Zafirlukastın IR spektrumu

### IV. 3. Geliştirilen Voltametrik Yöntemlere Ait Analiz Bulguları

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

#### IV. 3. 1. Destek Elektrolitin Belirlenmesi

OSWV yöntemi ile yapılan çalışmalarda, ilk olarak en uygun destek elektrolit araştırılmıştır. Bunun için zafirlukast için belirli bir derişim aralığında (0.25 - 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) destek elektrolite eklemeler yapılarak fosfat (pH 5-9), asetat (pH 5-7), Mc-ilvaine sitrat (pH 5-9), Britton Robinson (BR, pH 5-12) ve borat (pH 7-10) tamponları denenmiş ve pik akımı değerleri ölçülmüştür. pH 8.00 ve pH 9.00'da denenilen tampon sistemleri ve elde edilen akımlar Tablo IV.1'de verilmiştir.

**Tablo IV.1.** Zafirlukast çözeltisinin pH 8.00 ve pH 9.00'da farklı destek elektrolitlerde OSWV pik akımı değerleri

| Zafirlukast<br>Derişimi<br>( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) | BR<br>pH 8.00 | BR<br>pH 9.00 | Mc-ilvaine<br>Sitrata<br>pH 8.00 | Mc-ilvaine<br>sitrata<br>pH 9.00 | Borata<br>pH 8.00 | Borata<br>pH 9.00 |
|------------------------------------------------------|---------------|---------------|----------------------------------|----------------------------------|-------------------|-------------------|
| 0.25                                                 | 42.60         | 21.17         | 44.46                            | 19.83                            | 29.08             | 32.49             |
| 0.50                                                 | 95.24         | 64.30         | 116.73                           | 39.51                            | 79.94             | 66.88             |
| 0.74                                                 | 150.13        | 111.87        | 134.07                           | 66.55                            | 118.03            | 103.25            |
| 0.98                                                 | 190.80        | 153.67        | 180.50                           | 96.90                            | 161.17            | 131.55            |
| 1.46                                                 | 279.23        | 238.07        | 239.13                           | 147.01                           | 220.15            | 201.13            |
| 1.92                                                 | 348.45        | 309.17        | 338.45                           | 199.00                           | 315.27            | 254.25            |
| 2.38                                                 | 424.35        | 364.80        | 453.53                           | 240.24                           | 376.63            | 318.00            |
| 3.49                                                 | 576.97        | 497.75        | 497.17                           | 404.90                           | 542.83            | 499.03            |
| 4.55                                                 | 742.03        | 672.17        | 595.43                           | 521.35                           | 726.97            | 649.65            |
| 5.56                                                 | 841.13        | 790.47        | 735.13                           | 640.50                           | 788.55            | 835.70            |
| 6.52                                                 | 1097.50       | 874.40        | 1031.50                          | 733.73                           | 1081.00           | 1120.33           |
| 8.33                                                 | 1258.60       | 1189.50       | 1255.33                          | 931.75                           | 1240.00           | 1430.00           |
| 10.00                                                | 1595.50       | 1469.50       | 1503.50                          | 1157.00                          | 1615.67           | 1730.00           |

Borat tamponuna eklenen tetraalkilamonyum tuzlarının, zafirlukastın pik akımı üzerindeki etkileri incelenmiştir. Denenen tuzlar ve derişimleri Tablo IV.2'de verilmiştir.

**Tablo IV.2.** Analiz sırasında denenen tuzlar ve derişimleri

| <b>Tuzlar</b>                       | <b>Destek elektrolit içindeki derişimi (M)</b>                        |
|-------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| 1 M KCl                             | $5.00 \times 10^{-2}$ , $2.50 \times 10^{-2}$ , $1.25 \times 10^{-2}$ |
| 0.05 M Tetra butil amonyum iyodür   | $2.50 \times 10^{-3}$ , $1.25 \times 10^{-3}$ , $0.63 \times 10^{-3}$ |
| 0.05 M Tetra n-butil amonyum iyodür | $2.50 \times 10^{-3}$ , $1.25 \times 10^{-3}$ , $0.63 \times 10^{-3}$ |
| 0.1 M Tetra etil amonyum iyodür     | $2.50 \times 10^{-3}$ , $1.25 \times 10^{-3}$ , $0.50 \times 10^{-3}$ |
| 0.1 M Tetra metil amonyum iyodür    | $2.50 \times 10^{-3}$ , $1.25 \times 10^{-3}$ , $0.50 \times 10^{-3}$ |
| 0.1 M Tetra metil amonyum bromür    | $2.50 \times 10^{-3}$ , $1.25 \times 10^{-3}$ , $0.50 \times 10^{-3}$ |

Seçilen pH 8.00 borat tamponu derişiminin pik akımına etkisinin incelenmesi için çeşitli derişimlerde borat tamponları kullanılarak  $0.25 - 5.56 \mu\text{g mL}^{-1}$  derişim aralığında zafirlukastın pik akımları ölçülmüş ve sonuçlar Tablo IV. 3'de verilmiştir.

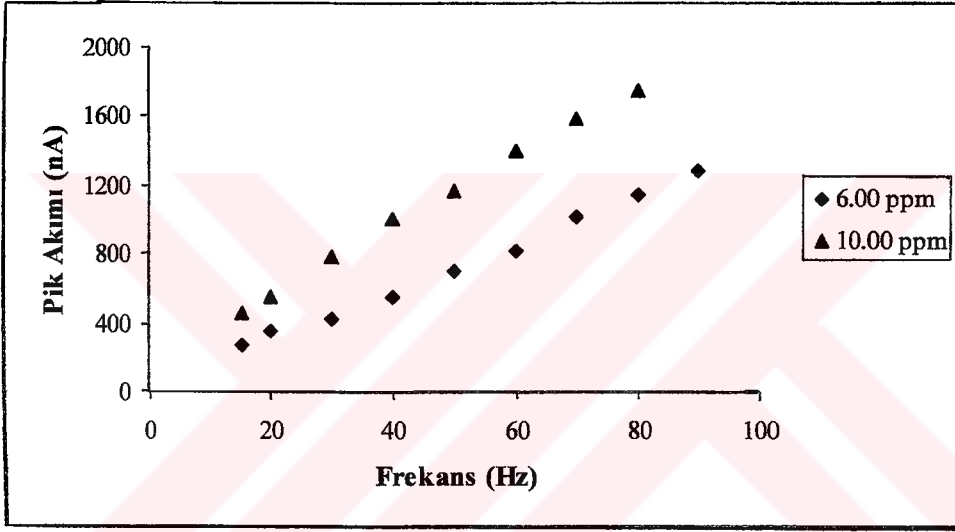
**Tablo IV.3.** Değişik derişimlerde pH 8.00 borat tamponları ile elde edilen pik akımları

| <b>Zafirlukast Derişimi</b><br><b>(<math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>)</b> | <b>0.05 M</b><br><b>Borat</b> | <b>0.025 M</b><br><b>Borat</b> | <b>0.05 M</b><br><b>Borat</b> | <b>0.10 M</b><br><b>Borat</b> | <b>0.20 M</b><br><b>Borat</b> |
|--------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 0.25                                                                     | 25.56                         | 30.36                          | 36.56                         | 33.25                         | 35.07                         |
| 0.50                                                                     | 47.35                         | 76.41                          | 76.60                         | 67.82                         | 66.58                         |
| 0.74                                                                     | 84.58                         | 121.30                         | 118.00                        | 121.95                        | 107.10                        |
| 0.98                                                                     | 105.90                        | 148.10                         | 139.75                        | 162.00                        | 130.80                        |
| 1.46                                                                     | 137.10                        | 193.55                         | 193.20                        | 202.85                        | 170.70                        |
| 1.92                                                                     | 184.75                        | 239.10                         | 242.65                        | 251.20                        | 217.20                        |
| 2.38                                                                     | 239.15                        | 300.70                         | 295.10                        | 312.10                        | 260.40                        |
| 3.49                                                                     | 385.50                        | 430.45                         | 423.25                        | 431.30                        | 393.30                        |
| 4.55                                                                     | 520.30                        | 572.50                         | 487.80                        | 563.10                        | 481.20                        |
| 5.56                                                                     | 589.55                        | 663.50                         | 667.85                        | 662.65                        | 550.40                        |

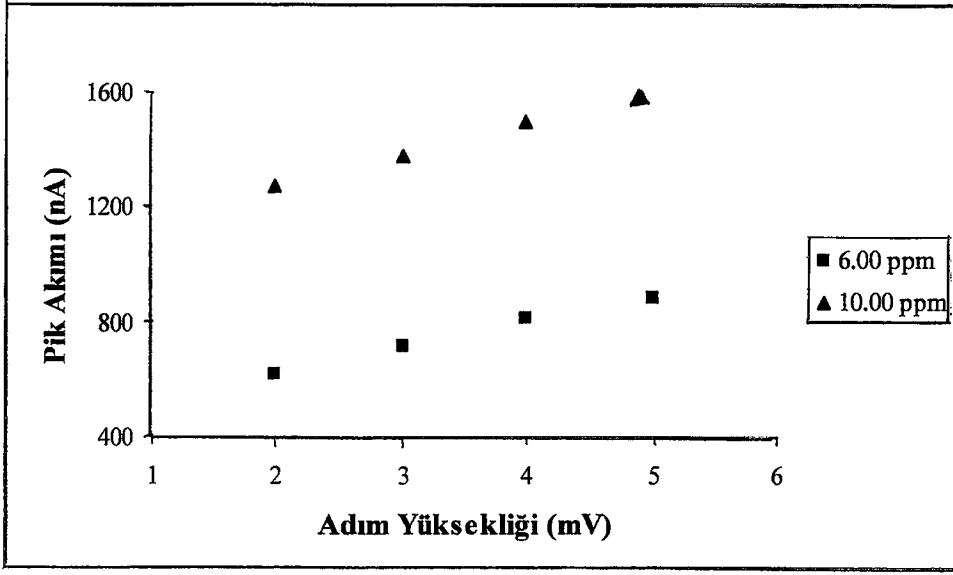
### IV. 3. 2. Optimum Cihaz Parametrelerinin Belirlenmesi

#### IV.3.2.1. OSWV Yöntemi

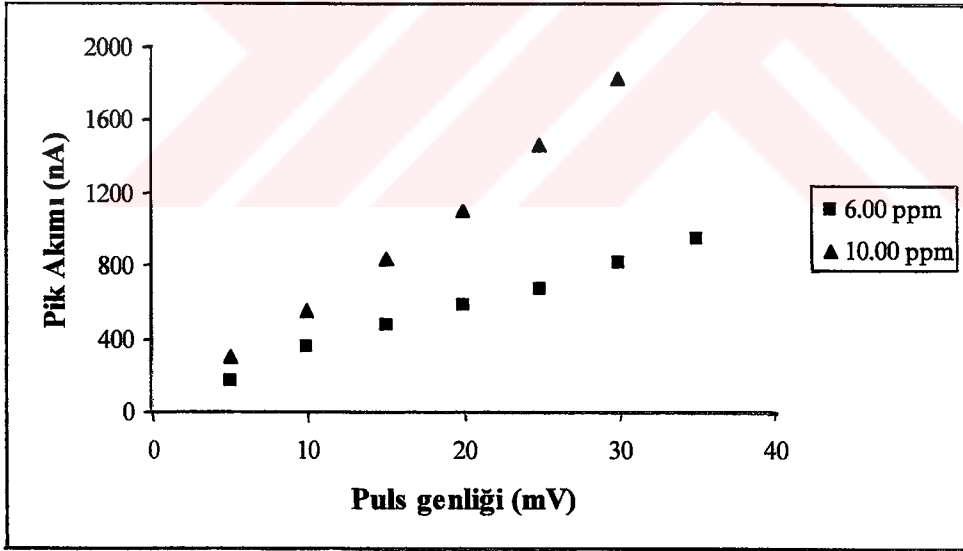
Bu yöntemde optimum cihaz parametrelerinin bulunması için iki farklı derişimde frekans (15 - 300 Hz), adım yüksekliği (2 - 12 mV) ve puls genliği (5 - 45 mV) değişiminin zafırlukasta ait pik akımı üzerindeki etkileri incelenmiştir (Şekil IV.3 - Şekil IV.5).



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



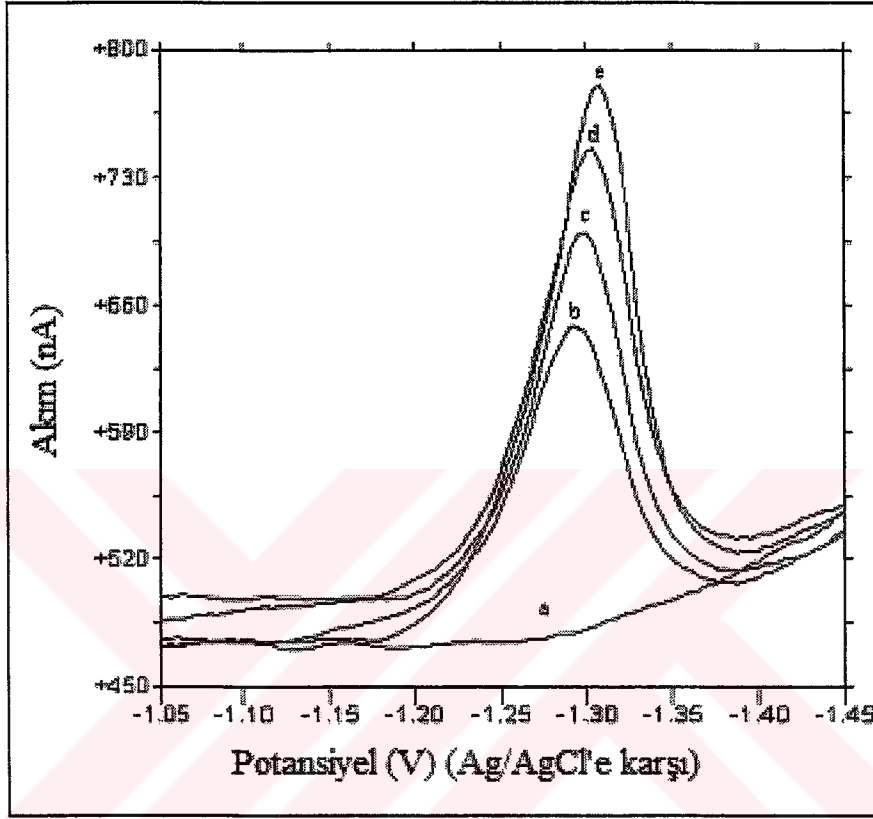
**Şekil IV. 4.** OSWV yönteminde adım yüksekliği değişiminin etkisi (f : 50 Hz, puls genliği : 25 mV)



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

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

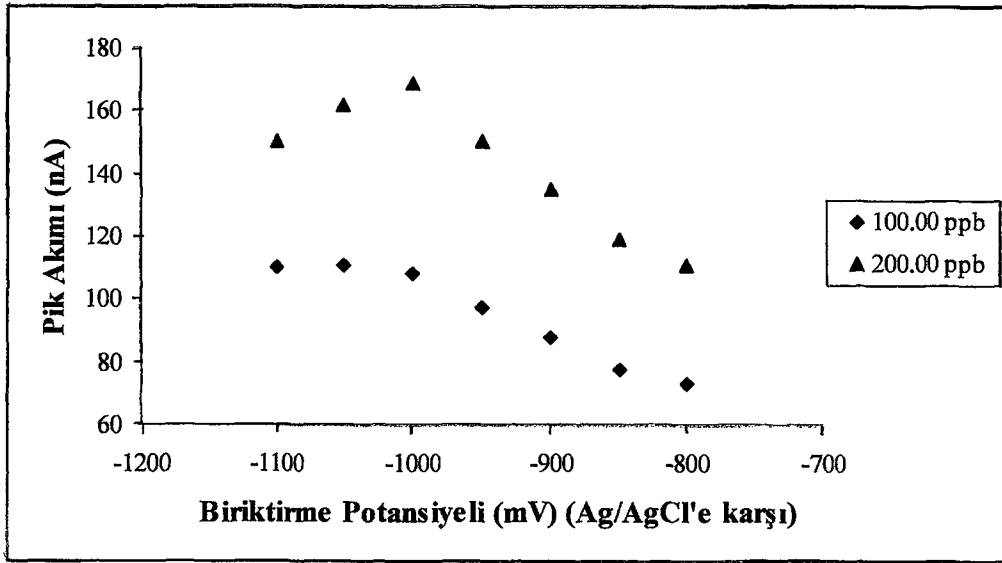
Belirlenen ve 0.10 M, pH 8.00 borat tamponunda zafirlukasta ait kare dalga voltamogramları Şekil IV.6'da gösterilmiştir.



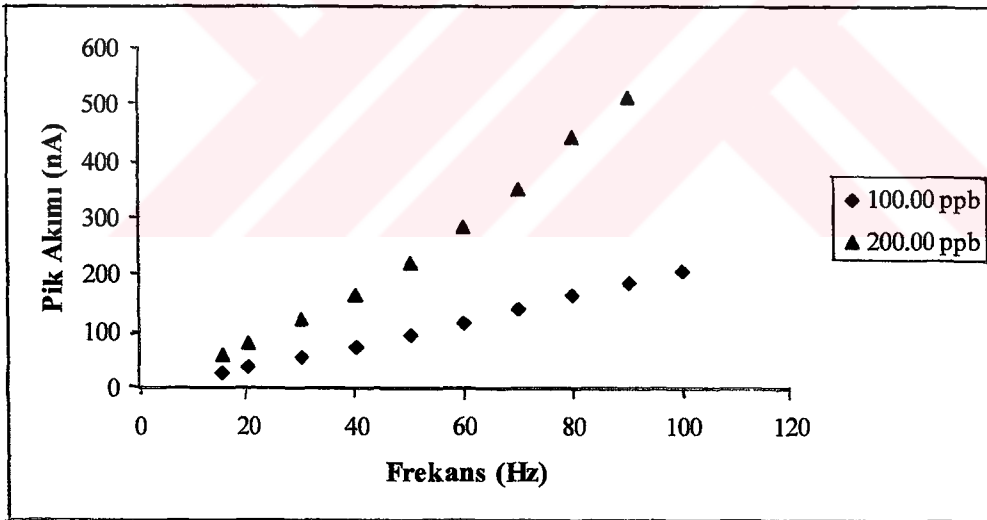
**Şekil IV. 6.** Zafirlukastın kare dalga voltamogramları a) Destek elektrolit, b)  $1.00 \mu\text{g mL}^{-1}$ , c)  $1.20 \mu\text{g mL}^{-1}$ , d)  $1.39 \mu\text{g mL}^{-1}$ , e)  $1.58 \mu\text{g mL}^{-1}$  zafirlukast

#### IV.3.2.2. OSWAdSV Yöntemi

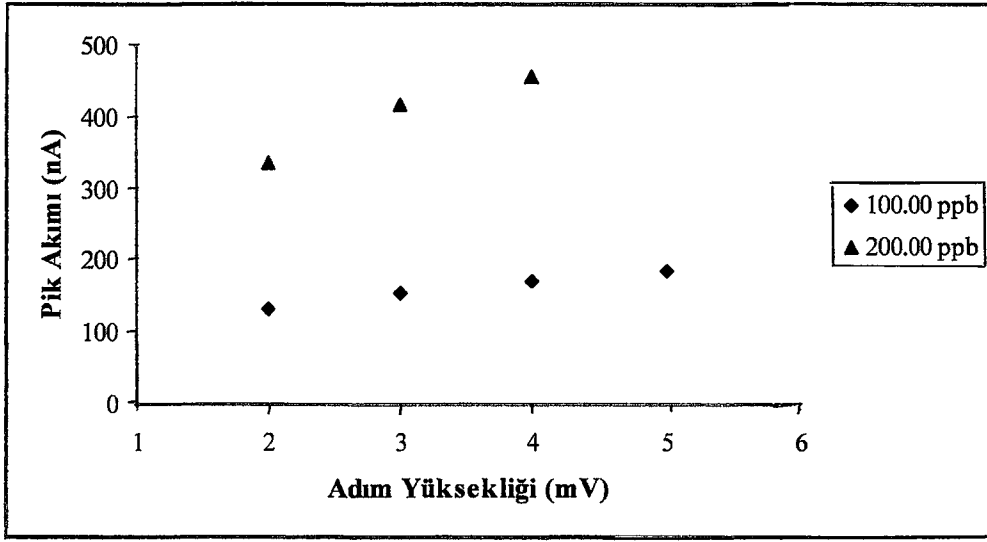
Bu yöntemde optimum cihaz parametrelerinin bulunması için iki farklı derişimde biriktirme potansiyeli (-600 - (-1100 mV)), frekans (15 - 300 Hz), adım yüksekliği (2 - 12 mV) ve puls genliği (5 - 45 mV) değişiminin zafirlukasta ait pik akımları üzerindeki etkileri izlenmiştir (Şekil IV.7 - Şekil IV.10).



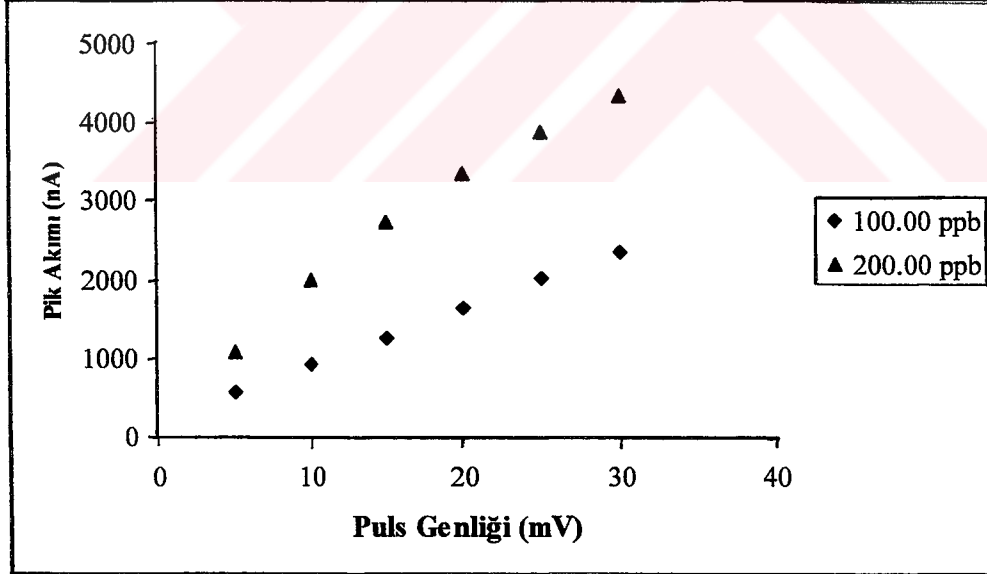
**Şekil IV.7.** OSWAdSV yönteminde biriktirme potansiyelinin etkisi (biriktirme süresi : 20 s,  $f$  : 50 Hz, adım yüksekliği : 4 mV, puls genliği : 25 mV)



**Şekil IV.8.** OSWAdSV yönteminde frekans değişimi etkisi (biriktirme süresi : 20 s, biriktirme potansiyeli : -1000 mV, adım yüksekliği : 4 mV, puls genliği : 25 mV)



**Şekil IV. 9.** OSWAdSV yönteminde adım yüksekliği değişiminin etkisi (biriktirme süresi : 20 s, biriktirme potansiyeli : -1000 mV, f : 70 Hz, puls genliği : 25 mV)

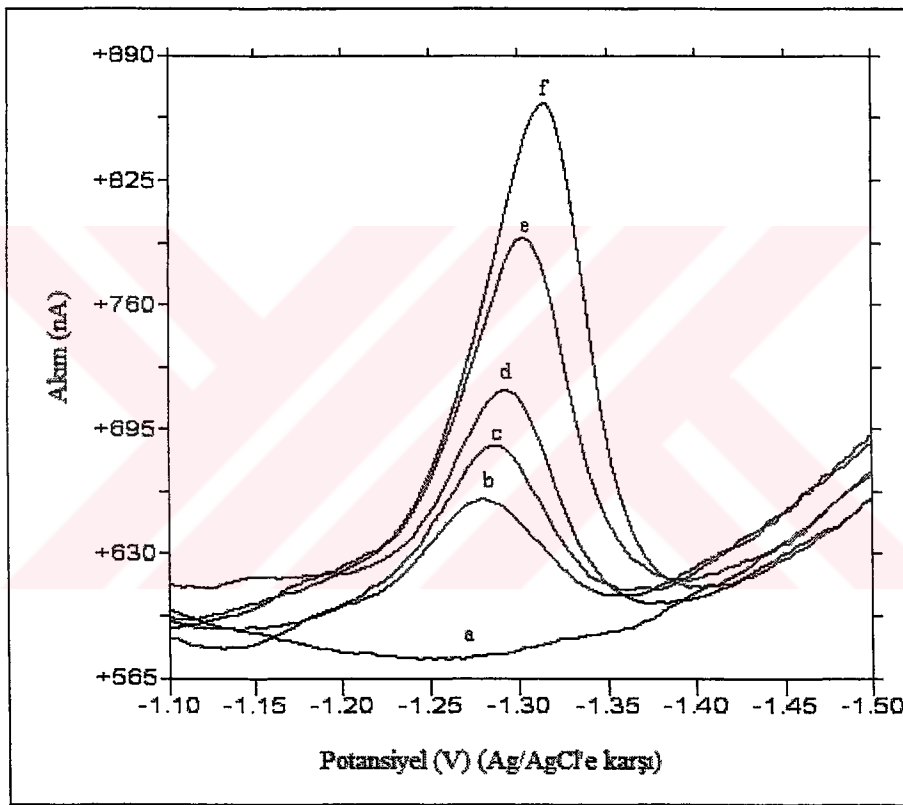


**Şekil IV.10.** OSWAdSV yönteminde puls genliği değişiminin etkisi (biriktirme süresi : 20 s, biriktirme potansiyeli : -1000 mV, f : 70 Hz, adım yüksekliği : 4 mV)



Bu yöntemde optimum cihaz parametreleri olarak -1000 mV'luk biriktirme potansiyelinde, frekans 70 Hz, adım yüksekliği 4 mV ve puls genliği 25 mV seçilmiştir.

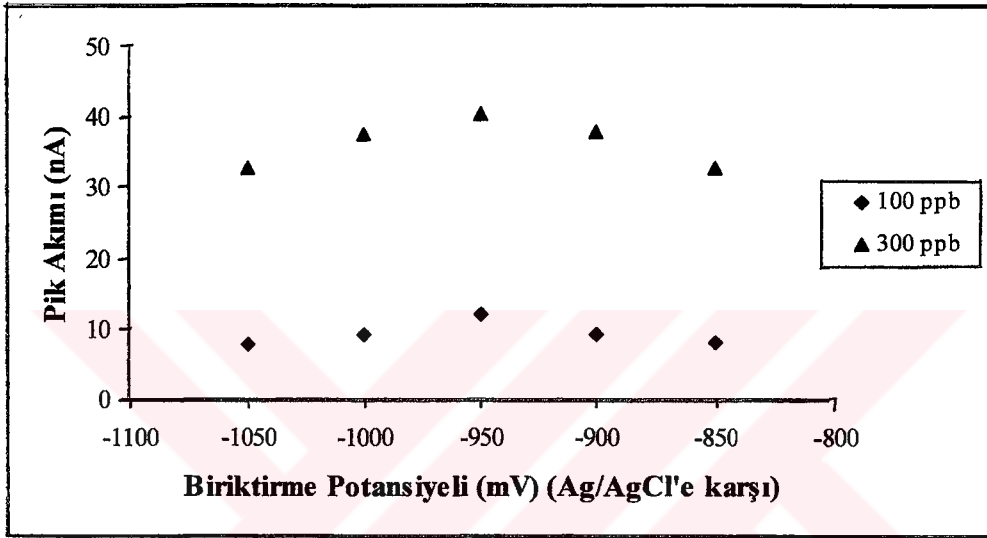
Belirlenen optimum cihaz parametrelerinde ve 0.10 M, pH 8.00 borat tamponunda zafirlukasta ait kare dalga adsorptif sıyırma voltamogramları Şekil IV.11'de gösterilmiştir.



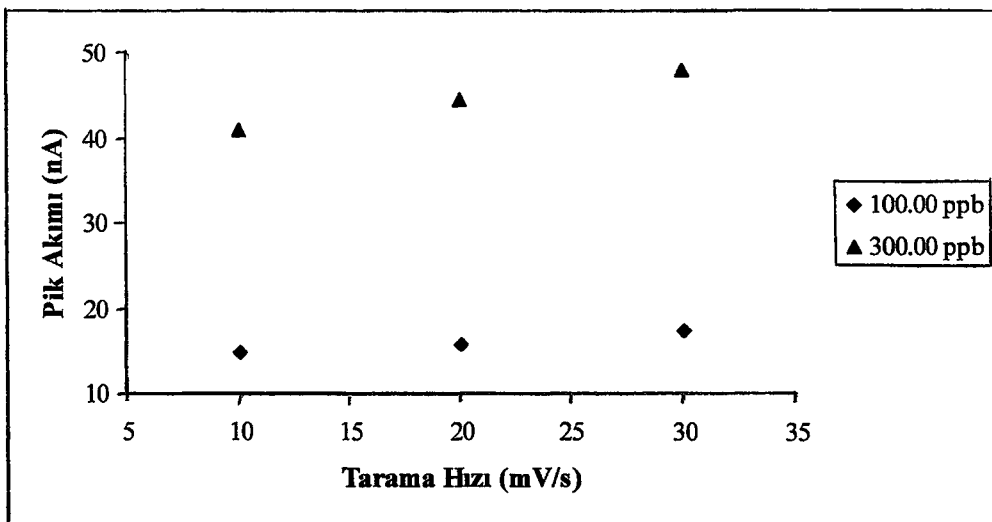
**Şekil IV. 11.** Zafirlukastın kare dalga adsorptif sıyırma voltamogramları a) Destek elektrolit, b) 52.00 ng mL<sup>-1</sup>, c) 70.00 ng mL<sup>-1</sup>, d) 83.00 ng mL<sup>-1</sup>, e) 130.00 ng mL<sup>-1</sup>, f) 167.00 ng mL<sup>-1</sup> zafirlukast

### IV.3.2.3. DPAdSV Yöntemi

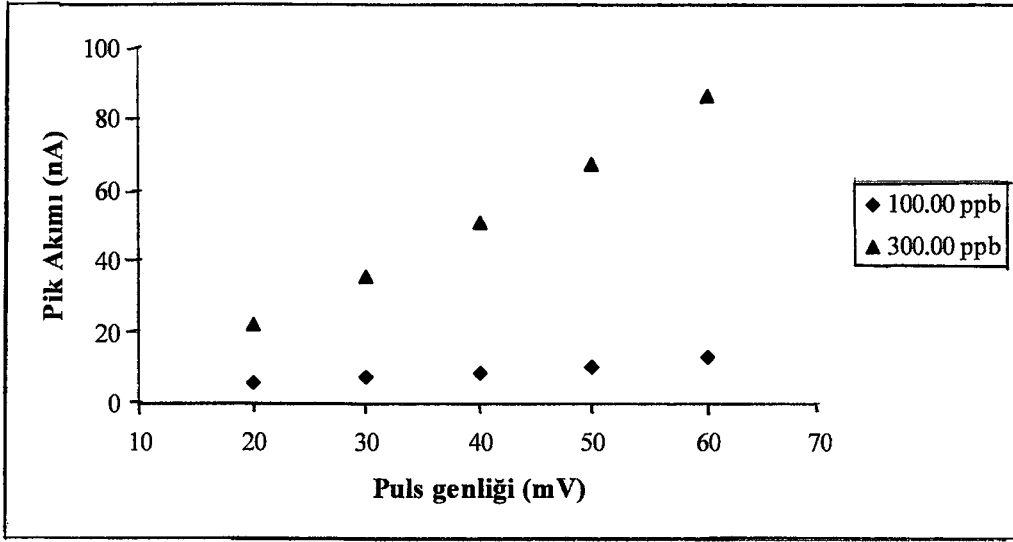
Bu yöntemde optimum cihaz parametrelerinin bulunması için iki farklı derişimde, biriktirme potansiyelinin (-850 - (-1100) mV), tarama hızı (10 - 60 mV/s) ve puls genliği (20 - 100 mV) değişiminin zafırlukasta ait pik akımları üzerindeki etkileri incelenmiştir (Şekil IV.12 - Şekil IV.14).



**Şekil IV.12.** DPAdSV yönteminde biriktirme potansiyelinin etkisi (biriktirme süresi : 20 s, tarama hızı : 30 mV/s, puls genliği : 25 mV)



**Şekil IV.13.** DPAdSV yönteminde tarama hızı değişiminin etkisi (biriktirme süresi : 20 s, biriktirme potansiyeli : - 950 mV, puls genliği : 25 mV)

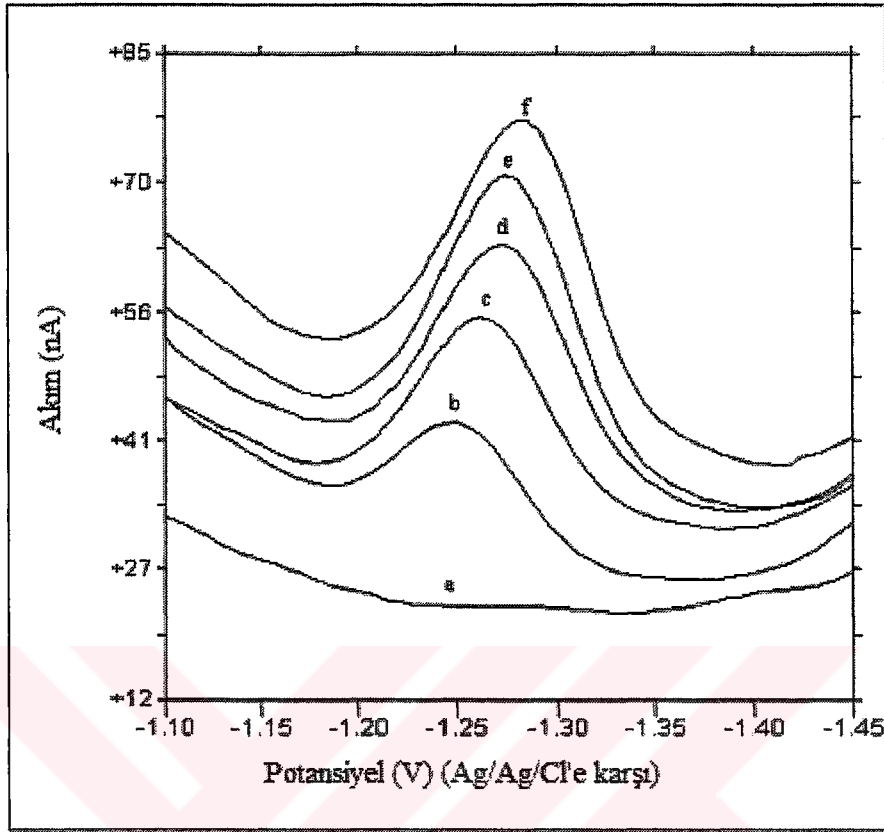


**Şekil IV.14.** DPAdSV yönteminde puls genliği değişimi (biriktirme süresi : 20 s, biriktirme potansiyeli : - 950 mV, tarama hızı : 30 mV/s)

Bu yöntemde optimum cihaz parametreleri olarak -950 mV'luk biriktirme potansiyelinde, tarama hızı için 30 mV/s ve puls genliği için 60 mV seçilmiştir.

Belirlenen optimum cihaz parametrelerinde ve 0.10 M, pH 8.00 borat tamponunda zafırlukasta ait diferansiyel puls adsorptif sıyrma voltamogramları Şekil IV. 15'de gösterilmiştir.

Zafırlukastın pik akımına biriktirme süresinin etkisi araştırılmıştır. OSWAdSV ve DPAdSV yöntemleri için biriktirme sürelerine ait çalışma sonucu Tablo IV.4'de gösterilen kalibrasyon eğrileri elde edilmiştir.



**Şekil IV. 15.** Zafirlukastın diferansiyel puls adsorptif sıyırma voltamogramları

a) Destek elektrolit, b)  $130.00 \text{ ng mL}^{-1}$ , c)  $231.00 \text{ ng mL}^{-1}$ , d)  $310.00 \text{ ng mL}^{-1}$ , e)  $375.00 \text{ ng mL}^{-1}$ , f)  $394.00 \text{ ng mL}^{-1}$  zafirlukast

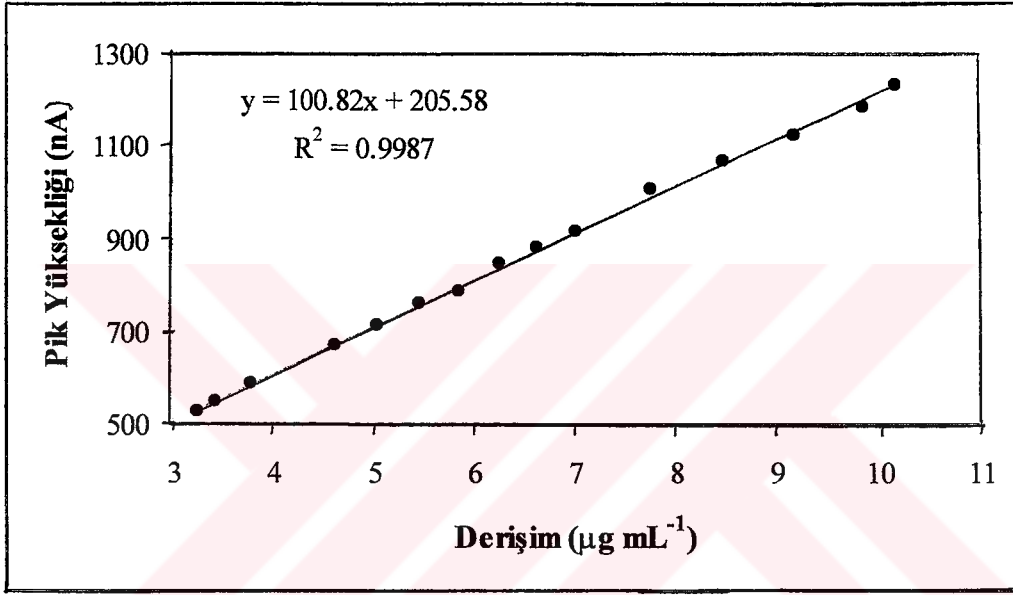
**Tablo IV.4.** Değişik biriktirme sürelerinde OSWAdSV ve DPAdSV yöntemlerine ait kalibrasyon eğrileri ve doğrusallık sınırları

| Biriktirme Süresi | OSWAdSV yöntemi                                                                | DPAdSV yöntemi                                                                |
|-------------------|--------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| 10 s              | $y = 1.2822x - 40.154, r = 0.9969$<br>( $130.00 - 394.00 \text{ ng mL}^{-1}$ ) | $y = 0.0484x - 1.8166, r = 0.9970$<br>( $70.00 - 433.00 \text{ ng mL}^{-1}$ ) |
| 20 s              | $y = 1.2616x - 31.975, r = 0.9992$<br>( $30.00 - 375.00 \text{ ng mL}^{-1}$ )  | $y = 0.1630x - 5.5761, r = 0.9999$<br>( $38.00 - 412.00 \text{ ng mL}^{-1}$ ) |
| 30 s              | $y = 1.2839x - 109.78, r = 0.9986$<br>( $74.00 - 333.00 \text{ ng mL}^{-1}$ )  | $y = 0.2517x - 5.9666, r = 0.9987$<br>( $34.00 - 412.00 \text{ ng mL}^{-1}$ ) |

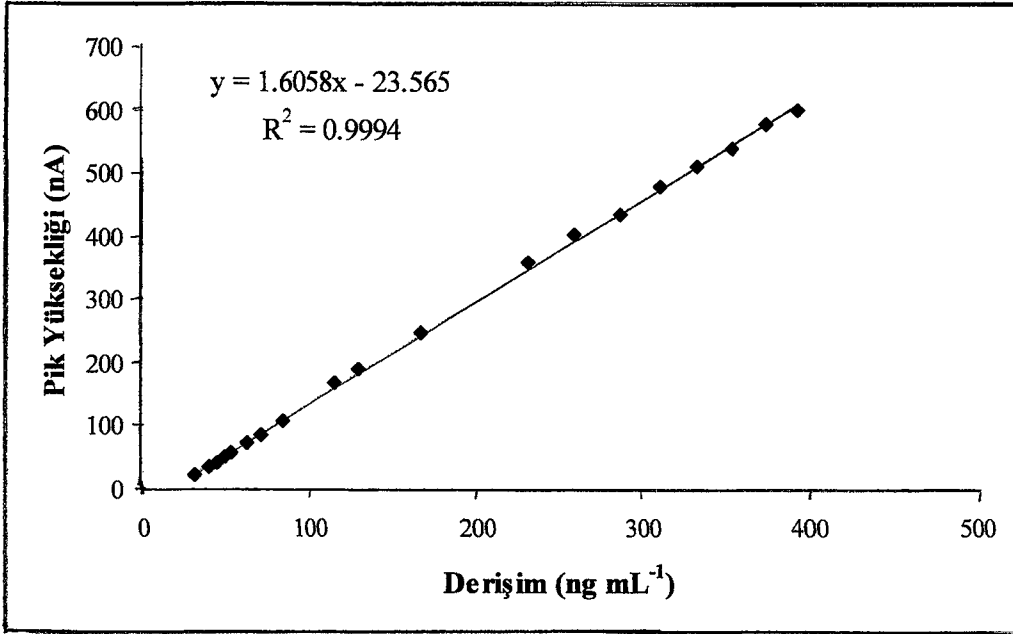
### IV. 3. 3. Voltametrik Yöntemlerin Validasyonu

#### Kalibrasyon Eğrileri ve Doğrusallık Aralıkları

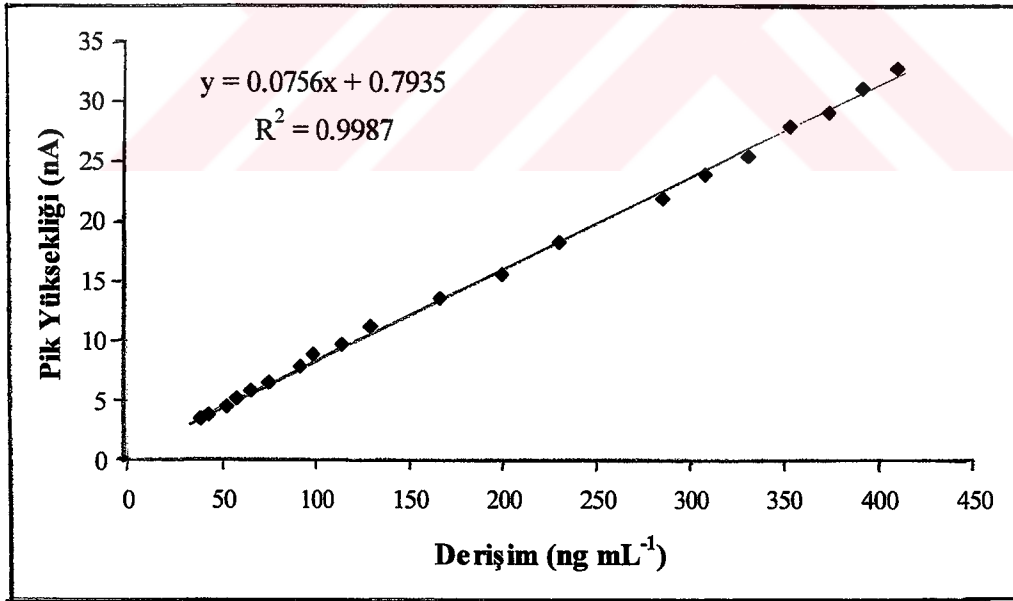
Her üç yöntemde zafirlukast derişimine karşı pik akımları grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrileri elde edilmiştir (Şekil IV. 16 - Şekil IV. 18).



Şekil IV.16. Zafirlukastın OSWV yöntemi ile analizinde elde edilen kalibrasyon eğrisi



Şekil IV.17. Zafirlukastın OSWAdSV yöntemi ile analizinde elde edilen kalibrasyon eğrisi



Şekil IV.18. Zafirlukastın DPAdSV yöntemi ile analizinde elde edilen kalibrasyon eğrisi

Bu eğrilerin doğrusallıktan ayrılış ve korrelasyon katsayılarının önem kontrolüne ait istatistiksel değerlendirme sonuçları ise Tablo IV. 5 - Tablo IV.7’de gösterilmiştir.

**Tablo IV.5.** Zafirlukastın OSWV yöntemi ile analizinden elde edilen kalibrasyon eğrisinin korrelasyon katsayısı ile doğrusallıktan ayrılış önem kontrolü için yapılan istatistiksel hesaplamalar\*

| Korelasyon katsayısının önem kontrolü |           |        |                |                |                |                |
|---------------------------------------|-----------|--------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| n                                     | r         | Sr     | t <sub>H</sub> | t <sub>T</sub> |                |                |
| 15                                    | 0.9993    | 0.01   | 96.09          | 2.16           |                |                |
| Doğrusallıktan ayrılış önem kontrolü  |           |        |                |                |                |                |
| RKT                                   | YOAKT     | RAKT   | RAKO           | RKO            | F <sub>H</sub> | F <sub>T</sub> |
| 733748.83                             | 734710.64 | 961.81 | 73.99          | 733748.83      | 9917.50        | 4.67           |

\* Terimler Ek 1’de açıklanmıştır.

**Tablo IV.6.** Zafirlukastın OSWAdSV yöntemi ile analizinden elde edilen kalibrasyon eğrisinin korrelasyon katsayısı ile doğrusallıktan ayrılış önem kontrolü için yapılan istatistiksel hesaplamalar\*

| Korelasyon katsayısının önem kontrolü |           |                        |                |                |                |                |
|---------------------------------------|-----------|------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| n                                     | r         | Sr                     | t <sub>H</sub> | t <sub>T</sub> |                |                |
| 19                                    | 0.9997    | $3.430 \times 10^{-3}$ | 291.46         | 2.11           |                |                |
| Doğrusallıktan ayrılış önem kontrolü  |           |                        |                |                |                |                |
| RKT                                   | YOAKT     | RAKT                   | RAKO           | RKO            | F <sub>H</sub> | F <sub>T</sub> |
| 8054403.17                            | 805789.33 | 386.17                 | 22.72          | 805403.17      | 35455.33       | 4.45           |

\* Terimler Ek 1’de açıklanmıştır.

**Tablo IV.7.** Zafirlukastın DPAdSV yöntemi ile analizinden elde edilen kalibrasyon eğrisinin korrelasyon katsayısı ile doğrusallıktan ayrılış önem kontrolü için yapılan istatistiksel hesaplamalar\*

| Korelasyon katsayısının önem kontrolü |         |                          |                |                |                |                |
|---------------------------------------|---------|--------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| n                                     | r       | Sr                       | t <sub>H</sub> | t <sub>T</sub> |                |                |
| 20                                    | 0.9993  | 8.819 x 10 <sup>-3</sup> | 113.31         | 2.10           |                |                |
| Doğrusallıktan ayrılış önem kontrolü  |         |                          |                |                |                |                |
| RKT                                   | YOAKT   | RAKT                     | RAKO           | RKO            | F <sub>H</sub> | F <sub>T</sub> |
| 1924.31                               | 1926.71 | 2.41                     | 0.13           | 1924.31        | 14403.51       | 4.41           |

\* Terimler Ek 1’de açıklanmıştır.

Her üç yönteme ait kalibrasyon eğrisinin özellikleri Tablo IV. 8.’de verilmiştir.

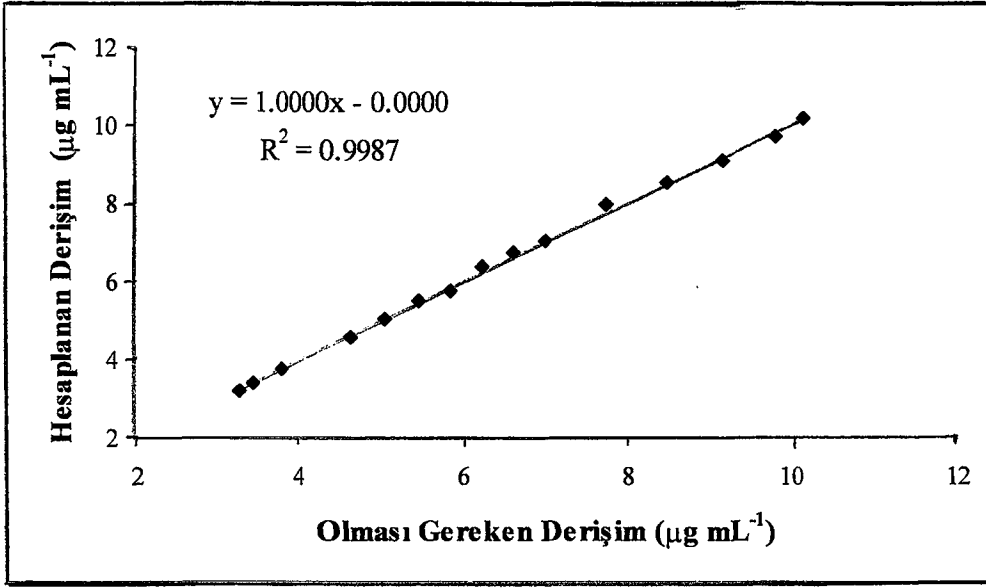
**Tablo IV.8.** Önerilen voltametrik yöntemlere ait kalibrasyon eğrilerinin özellikleri  
(n = 12)

|                                            | OSWV yöntemi           | OSWAdSV yöntemi        | DPAdSV yöntemi         |
|--------------------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| Regresyon denklemi*                        | $y = 100.82x + 205.58$ | $y = 1.6058x - 23.565$ | $y = 0.0756x + 0.7935$ |
| Eğimin standart hatası                     | 0.45                   | 3.91                   | 0.32                   |
| Kesişimin standart hatası                  | 1.81                   | 0.44                   | 0.03                   |
| Korrelasyon katsayısı (r)                  | 0.9993                 | 0.9997                 | 0.9993                 |
| Tanımlayıcılık katsayısı (r <sup>2</sup> ) | 0.9986                 | 0.9994                 | 0.9986                 |
| Doğrusallık Aralığı (ng mL <sup>-1</sup> ) | 324.00 - 1016.00       | 30.00 - 394.00         | 38.00 - 412.00         |
| Gözlenebilme Sınırı (ng mL <sup>-1</sup> ) | 50.00                  | 5.00                   | 15.00                  |
| Alt Tayin Sınırı (ng mL <sup>-1</sup> )    | 146.00                 | 30.00                  | 38.00                  |

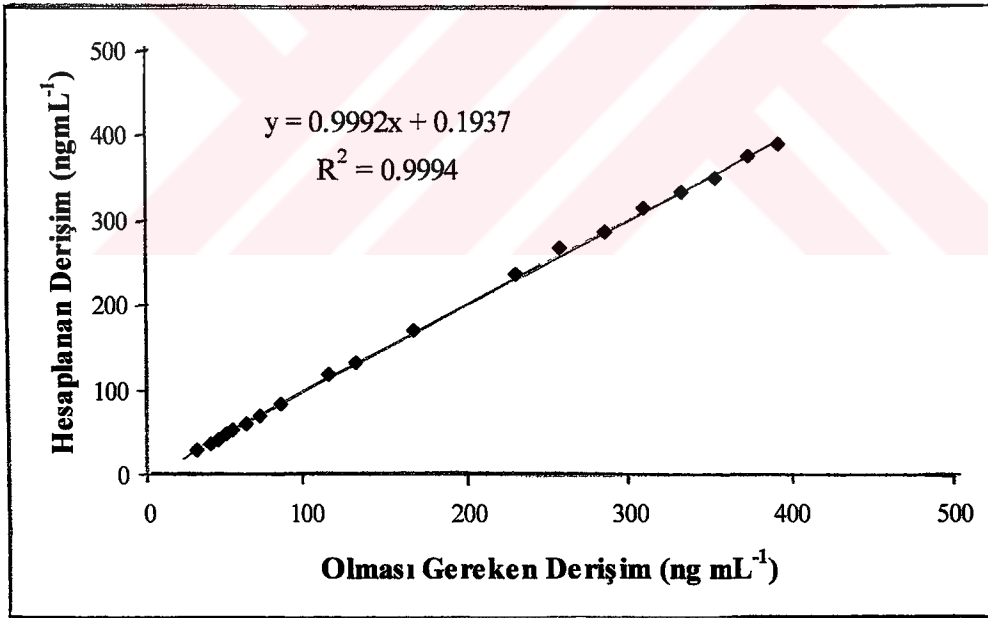
\* $y = bx + a$ ; x : ng mL<sup>-1</sup> biriminde derişim, y : pik akımı değerleri (nA), a : kesişim, b : eğim.

Yöntemlerin doğrusallığının kontrolü için kalibrasyon eğrilerini oluşturan derişimlerde hazırlanan standart çözeltilerin analizleri yapıp kalibrasyon eğrileri denklemleri ile sonuçlar hesaplanmış ve olması gereken (nominal) derişimlere karşı grafiğe geçirilmiştir (Şekil IV. 19 - Şekil IV.21).

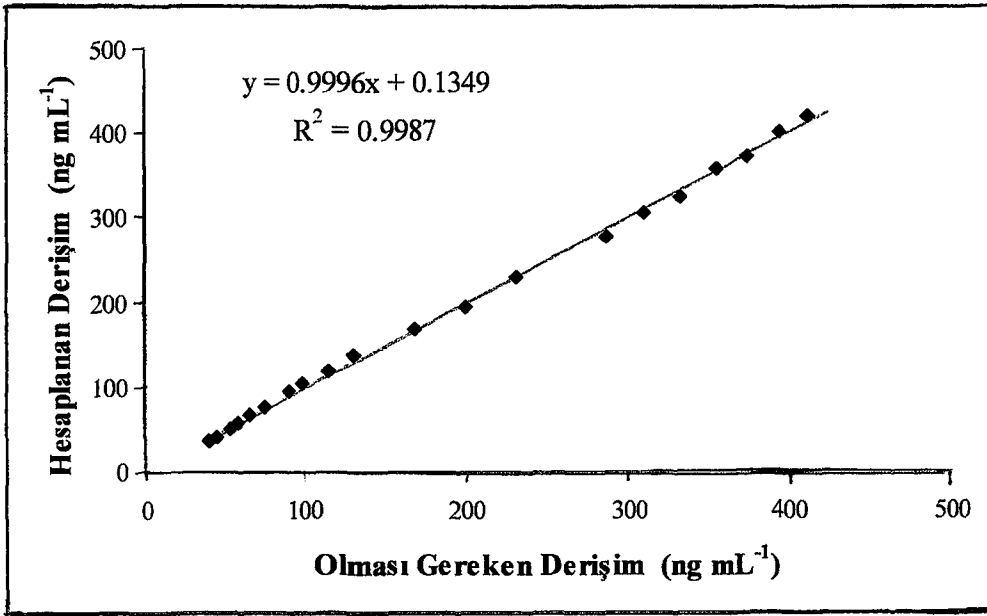




Şekil IV. 19. Zafirlukastın OSWV yöntemine ait yöntem doğrusallığı kontrol grafiği



Şekil IV. 20. Zafirlukastın OSWAdSV yöntemine ait yöntem doğrusallığı kontrol grafiği



**Şekil IV. 21.** Zafirlukastın DPAdSV yöntemine ait yöntem doğrusallığı kontrol grafiği

### Duyarlılık

Zafirlukastın her üç voltametrik yöntemde gözlenebilme sınırı (LOD) ve alt tayin sınırı (LOQ) değerleri Tablo IV.8’de verilmiştir.

### Doğruluk ve Kesinlik

Zafirlukastın voltametrik yöntemlerle analizinde doğruluk ve kesinlik çalışmalarına ait gün içi ve günler arası değerlendirme sonuçları Tablo IV.9 - Tablo IV.11’de verilmiştir.

### Tekrarlanabilirlik

Önerilen her üç yöntem için tekrarlanabilirlik sonuçları Tablo IV.12’de verilmiştir.

**Tablo IV.9.** OSWV yönteminin, gün içi<sup>a</sup> ve günler arası<sup>b</sup> kesinlik ve doğruluk analiz bulguları (n = 6)

| Zafirlukast miktarı ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) | Gün içi <sup>a</sup>                                   |              | Günler arası <sup>b</sup>                              |              |
|-----------------------------------------------|--------------------------------------------------------|--------------|--------------------------------------------------------|--------------|
|                                               | Bulunan miktar ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )               | % Bağıl hata | Bulunan miktar ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )               | % Bağıl hata |
| 3.77                                          | 3.78                                                   | 0.27         | 3.83                                                   | 1.59         |
|                                               | 3.74                                                   | -0.80        | 3.72                                                   | -1.33        |
|                                               | 3.80                                                   | 0.80         | 3.70                                                   | -1.86        |
|                                               | 3.76                                                   | -0.27        | 3.84                                                   | 1.86         |
|                                               | 3.67                                                   | -2.65        | 3.78                                                   | 0.27         |
|                                               | 3.67                                                   | -2.65        | 3.85                                                   | 2.12         |
|                                               | $\bar{x} : 3.73 \pm 0.02$<br>SS : 0.06<br>BSS : % 1.61 |              | $\bar{x} : 3.79 \pm 0.03$<br>SS : 0.07<br>BSS : % 1.85 |              |
| 5.46                                          | 5.50                                                   | 0.73         | 5.49                                                   | 2.51         |
|                                               | 5.54                                                   | 1.47         | 5.45                                                   | -2.46        |
|                                               | 5.40                                                   | -1.10        | 5.55                                                   | 1.55         |
|                                               | 5.40                                                   | -1.10        | 5.56                                                   | 1.62         |
|                                               | 5.43                                                   | -0.55        | 5.40                                                   | -0.66        |
|                                               | 5.43                                                   | -0.55        | 5.42                                                   | -1.34        |
|                                               | $\bar{x} : 5.45 \pm 0.02$<br>SS : 0.05<br>BSS : % 0.92 |              | $\bar{x} : 5.48 \pm 0.03$<br>SS : 0.07<br>BSS : % 1.28 |              |
| 9.84                                          | 9.76                                                   | -0.81        | 9.69                                                   | -1.52        |
|                                               | 9.71                                                   | -1.32        | 9.68                                                   | -1.63        |
|                                               | 9.86                                                   | 0.20         | 9.80                                                   | -0.41        |
|                                               | 9.82                                                   | -0.20        | 9.65                                                   | -1.93        |
|                                               | 9.84                                                   | 0.00         | 9.72                                                   | -1.22        |
|                                               | 9.79                                                   | -0.51        | 9.80                                                   | -0.41        |
|                                               | $\bar{x} : 9.80 \pm 0.02$<br>SS : 0.05<br>BSS : % 0.51 |              | $\bar{x} : 9.72 \pm 0.02$<br>SS : 0.06<br>BSS : % 0.62 |              |

$\bar{x}$  : Ortalama  $\pm$  standart hata, SS : Standart sapma, BSS : Bağıl standart sapma ve % bağıl hata hesaplamaları Ek 2’de verilmiştir.

<sup>a</sup> : Gün içi çalışmalar; üç derişim seviyesinde altı ayrı çözelti kullanılarak aynı günde yapılmıştır.

<sup>b</sup> : Günler arası çalışmalar; üç derişim seviyesinde altı ayrı çözelti kullanılarak 6 ayrı günde yapılmıştır.

**Tablo IV.10.** OSWAdSV yönteminin, gün içi<sup>a</sup> ve günler arası<sup>b</sup> kesinlik ve doğruluk analiz bulguları (n = 6)

| Zafirlukast miktarı (ng mL <sup>-1</sup> ) | Gün içi                                                  |              | Günler arası                                             |              |
|--------------------------------------------|----------------------------------------------------------|--------------|----------------------------------------------------------|--------------|
|                                            | Bulunan miktar (ng mL <sup>-1</sup> )                    | % Bağlı hata | Bulunan miktar (ng mL <sup>-1</sup> )                    | % Bağlı hata |
| 48.00                                      | 45.73                                                    | -4.73        | 46.30                                                    | -3.54        |
|                                            | 47.13                                                    | -1.81        | 47.44                                                    | -1.17        |
|                                            | 48.48                                                    | 1.00         | 46.56                                                    | -3.00        |
|                                            | 46.80                                                    | -2.50        | 47.51                                                    | -1.02        |
|                                            | 46.74                                                    | -2.63        | 49.19                                                    | 2.48         |
|                                            | 47.98                                                    | -0.04        | 46.79                                                    | -2.52        |
|                                            | $\bar{x} : 47.14 \pm 0.40$<br>SS : 0.97<br>BSS : % 2.07  |              | $\bar{x} : 47.30 \pm 0.42$<br>SS : 1.04<br>BSS : % 2.21  |              |
| 167.00                                     | 170.24                                                   | 1.94         | 169.20                                                   | 1.32         |
|                                            | 166.22                                                   | -0.47        | 170.70                                                   | 2.22         |
|                                            | 167.17                                                   | 0.10         | 165.49                                                   | -0.90        |
|                                            | 165.63                                                   | -0.82        | 170.82                                                   | 2.29         |
|                                            | 168.11                                                   | 0.67         | 167.70                                                   | 0.42         |
|                                            | 168.82                                                   | 1.09         | 169.90                                                   | 1.74         |
|                                            | $\bar{x} : 167.70 \pm 0.70$<br>SS : 1.71<br>BSS : % 1.02 |              | $\bar{x} : 168.97 \pm 0.84$<br>SS : 2.05<br>BSS : % 1.21 |              |
| 375.00                                     | 372.75                                                   | -0.60        | 366.14                                                   | -2.36        |
|                                            | 373.95                                                   | -0.28        | 371.90                                                   | -0.83        |
|                                            | 376.71                                                   | 0.46         | 369.62                                                   | -1.43        |
|                                            | 375.85                                                   | 0.23         | 373.72                                                   | -0.34        |
|                                            | 379.04                                                   | 1.08         | 375.35                                                   | 0.09         |
|                                            | 373.80                                                   | -0.32        | 374.91                                                   | -0.02        |
|                                            | $\bar{x} : 375.35 \pm 0.95$<br>SS : 2.32<br>BSS : % 0.62 |              | $\bar{x} : 371.94 \pm 1.44$<br>SS : 3.54<br>BSS : % 0.95 |              |

$\bar{x}$  : Ortalama  $\pm$  standart hata, SS : Standart sapma, BSS : Bağlı standart sapma ve % bağlı hata hesaplamaları Ek 2'de verilmiştir.

<sup>a</sup> : Gün içi çalışmalar; üç derişim seviyesinde altı ayrı çözelti kullanılarak aynı günde yapılmıştır.

<sup>b</sup> : Günler arası çalışmalar; üç derişim seviyesinde altı ayrı çözelti kullanılarak 6 ayrı günde yapılmıştır.

**Tablo IV.11.** DPAdSV yönteminin, gün içi<sup>a</sup> ve günler arası<sup>b</sup> kesinlik ve doğruluk analiz bulguları (n = 6)

| Zafirlukast<br>Miktarı (ng mL <sup>-1</sup> ) | Gün içi                                                  |                 | Günler arası                                             |                 |
|-----------------------------------------------|----------------------------------------------------------|-----------------|----------------------------------------------------------|-----------------|
|                                               | Bulunan miktar<br>(ng mL <sup>-1</sup> )                 | % Bağlı<br>hata | Bulunan miktar<br>(ng mL <sup>-1</sup> )                 | % Bağlı<br>hata |
| 57.00                                         | 57.90                                                    | 1.58            | 57.34                                                    | 0.60            |
|                                               | 59.25                                                    | 3.95            | 57.72                                                    | 1.26            |
|                                               | 56.68                                                    | -0.56           | 58.54                                                    | 2.70            |
|                                               | 57.58                                                    | 1.02            | 57.67                                                    | 1.18            |
|                                               | 56.13                                                    | -1.53           | 60.02                                                    | 5.30            |
|                                               | 58.65                                                    | 2.89            | 59.99                                                    | 5.25            |
|                                               | $\bar{x} : 57.70 \pm 0.48$<br>SS : 1.17<br>BSS : % 2.03  |                 | $\bar{x} : 58.40 \pm 0.64$<br>SS : 1.58<br>BSS : % 2.70  |                 |
| 167.00                                        | 166.53                                                   | -0.28           | 168.84                                                   | 1.10            |
|                                               | 168.42                                                   | 0.85            | 169.20                                                   | 1.32            |
|                                               | 169.97                                                   | 1.78            | 164.28                                                   | -1.63           |
|                                               | 165.34                                                   | -0.99           | 170.93                                                   | 2.35            |
|                                               | 170.67                                                   | 2.20            | 168.22                                                   | 0.73            |
|                                               | 168.42                                                   | 0.85            | 166.86                                                   | -0.08           |
|                                               | $\bar{x} : 168.22 \pm 0.82$<br>SS : 2.01<br>BSS : % 1.20 |                 | $\bar{x} : 168.06 \pm 0.93$<br>SS : 2.28<br>BSS : % 1.35 |                 |
| 375.00                                        | 377.26                                                   | 0.60            | 375.84                                                   | 0.22            |
|                                               | 373.30                                                   | -0.45           | 371.92                                                   | -0.82           |
|                                               | 374.62                                                   | -0.10           | 372.59                                                   | -0.64           |
|                                               | 376.20                                                   | 0.32            | 383.10                                                   | 2.16            |
|                                               | 378.58                                                   | 0.96            | 376.69                                                   | 0.45            |
|                                               | 369.59                                                   | -1.44           | 374.32                                                   | -0.18           |
|                                               | $\bar{x} : 374.93 \pm 1.31$<br>SS : 3.21<br>BSS : % 0.86 |                 | $\bar{x} : 375.74 \pm 1.65$<br>SS : 4.04<br>BSS : % 1.08 |                 |

$\bar{x}$  : Ortalama  $\pm$  standart hata, SS : Standart sapma, BSS : Bağlı standart sapma ve % bağlı hata hesaplamaları Ek 2'de verilmiştir.

<sup>a</sup> : Gün içi çalışmalar; üç derişim seviyesinde altı ayrı çözelti kullanılarak aynı günde yapılmıştır.

<sup>b</sup> : Günler arası çalışmalar; üç derişim seviyesinde altı ayrı çözelti kullanılarak 6 ayrı günde yapılmıştır.

**Tablo IV.12.** Önerilen yöntemlerin tekrarlanabilirliğine ait analiz bulguları  
(Eklenen zafirlukast derişimi OSWV yöntemi için 6. 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ,  
OSWAdSV ve DPAdSV yöntemleri için 130.00  $\text{ng mL}^{-1}$ ) (n = 12)

| OSWV yöntemi                         |                   | OSWAdSV yöntemi                      |                   | DPAdSV yöntemi                       |                   |
|--------------------------------------|-------------------|--------------------------------------|-------------------|--------------------------------------|-------------------|
| Bulunan<br>( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) | % Geri<br>Kazanım | Bulunan<br>( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) | % Geri<br>Kazanım | Bulunan<br>( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) | % Geri<br>Kazanım |
| 6.29                                 | 100.64            | 128.33                               | 98.72             | 131.10                               | 100.85            |
| 6.43                                 | 102.88            | 129.14                               | 99.34             | 129.78                               | 99.83             |
| 6.34                                 | 101.44            | 132.81                               | 102.16            | 132.42                               | 101.86            |
| 6.43                                 | 102.88            | 130.79                               | 100.61            | 132.55                               | 101.96            |
| 6.21                                 | 99.36             | 133.68                               | 102.83            | 134.89                               | 103.76            |
| 6.33                                 | 101.28            | 131.00                               | 100.77            | 127.15                               | 97.81             |
| 6.32                                 | 101.12            | 132.68                               | 102.06            | 133.20                               | 102.46            |
| 6.36                                 | 101.76            | 131.75                               | 101.35            | 132.45                               | 101.88            |
| 6.37                                 | 101.92            | 129.35                               | 99.50             | 129.99                               | 99.99             |
| 6.44                                 | 103.04            | 130.19                               | 100.15            | 133.32                               | 102.55            |
| 6.35                                 | 101.60            | 129.54                               | 99.65             | 130.41                               | 100.32            |
| 6.30                                 | 100.80            | 129.54                               | 99.65             | 128.12                               | 98.55             |
| $\bar{x} : 6.35 \pm 0.02$            |                   | $\bar{x} : 130.73 \pm 0.49$          |                   | $\bar{x} : 131.28 \pm 0.66$          |                   |
| SS : 0.07                            |                   | SS : 1.69                            |                   | SS : 2.28                            |                   |
| BSS : % 1.10                         |                   | BSS : % 1.29                         |                   | BSS : % 1.74                         |                   |
| GA : 6.31 - 6.39                     |                   | GA : 129.65 - 131.81                 |                   | GA : 129.83 - 132.73                 |                   |

$\bar{x}$  : Ortalama  $\pm$  standart hata. SS : Standart sapma. BSS : % Bağıl standart sapma.  
GA : Güven Aralığı ( $\alpha : 0.05$ ) (Ek 2 ve 3).

### Sağlamlık ve Tutarlılık

Sağlamlık ve tutarlılık çalışmalarına ait sonuçlar ve istatistiksel olarak karşılaştırma sonuçları Tablo IV.13 - Tablo IV.16'da verilmiştir.

**Tablo IV.13.** OSWV yönteminin sağlamlığına ait analiz bulguları (n = 7)

|                                         | <b>Bulunan</b><br><b>(<math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>)</b> | <b>BSS</b><br><b>(%)</b> | <b>Karşılaştırma</b><br><b>Sonuçları</b> |
|-----------------------------------------|-------------------------------------------------------------|--------------------------|------------------------------------------|
| Standart ( $6.25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) | $6.20 \pm 0.03$                                             | 1.13                     |                                          |
| pH 7.90                                 | $6.28 \pm 0.03$                                             | 1.27                     | $t_H = 4.00$                             |
| pH 8.10                                 | $6.26 \pm 0.03$                                             | 1.28                     | $t_H = 3.00$                             |
| İlk potansiyel (-1100 mV)               | $6.24 \pm 0.03$                                             | 1.28                     | $t_H = 9.50$                             |
| İlk potansiyel (-900 mV)                | $6.31 \pm 0.03$                                             | 1.27                     | $t_H = 6.00$                             |

$\bar{x}$  : Ortalama  $\pm$  standart hata. BSS : % Bağıl standart sapma. (n:7 serbestlik derecesinde  $t_t$  değeri 2'dir) ( $t_H$  : hesapla bulunan t değeri,  $t_T$  : tablodan bulunan t değeri) (Ek 2 ve 5).

**Tablo IV.14.** OSWAdSV yönteminin sağlamlığına ait analiz bulguları (n=7)

|                                          | <b>Bulunan</b><br><b>(<math>\text{ng mL}^{-1}</math>)</b> | <b>BSS</b><br><b>(%)</b> | <b>Karşılaştırma</b><br><b>Sonuçları</b> |
|------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|--------------------------|------------------------------------------|
| Standart ( $130.00 \text{ ng mL}^{-1}$ ) | $131.24 \pm 0.49$                                         | 0.99                     |                                          |
| pH 7.90                                  | $129.10 \pm 0.54$                                         | 1.10                     | $t_H = 4.00$                             |
| pH 8.10                                  | $130.23 \pm 0.55$                                         | 1.11                     | $t_H = 3.00$                             |
| Biriktirme potansiyeli (-1100 mV)        | $129.95 \pm 0.58$                                         | 1.19                     | $t_H = 7.00$                             |
| Biriktirme potansiyeli (-900 mV)         | $130.32 \pm 0.61$                                         | 1.24                     | $t_H = 4.00$                             |
| Biriktirme süresi (15 s)                 | $130.49 \pm 0.57$                                         | 1.16                     | $t_H = 8.00$                             |
| Biriktirme süresi (25 s)                 | $130.51 \pm 0.60$                                         | 1.21                     | $t_H = 9.00$                             |

$\bar{x}$  : Ortalama  $\pm$  standart hata. BSS : % Bağıl standart sapma (n:7 serbestlik derecesinde  $t_t$  değeri 2'dir) ( $t_H$  : hesapla bulunan t değeri,  $t_T$  : tablodan bulunan t değeri) (Ek 2 ve 5).

**Tablo IV.15.** DPAdSV yönteminin sağlamlığına ait analiz bulguları (n=7)

|                                        | <b>Bulunan<br/>(ng mL<sup>-1</sup>)</b> | <b>BSS<br/>(%)</b> | <b>Karşılaştırma<br/>Sonuçları</b> |
|----------------------------------------|-----------------------------------------|--------------------|------------------------------------|
| Standart (130.00 ng mL <sup>-1</sup> ) | 130.30 ± 0.55                           | 1.12               |                                    |
| pH 7.90                                | 130.70 ± 0.60                           | 1.21               | t <sub>H</sub> = 18.00             |
| pH 8.10                                | 129.64 ± 0.57                           | 1.16               | t <sub>H</sub> = 7.50              |
| Biriktirme potansiyeli (-1050 mV)      | 131.92 ± 0.60                           | 1.21               | t <sub>H</sub> = 5.00              |
| Biriktirme potansiyeli (-850 mV)       | 129.74 ± 0.57                           | 1.16               | t <sub>H</sub> = 10.00             |
| Biriktirme süresi (15 s)               | 130.14 ± 0.62                           | 1.25               | t <sub>H</sub> = 11.00             |
| Biriktirme süresi (25 s)               | 130.83 ± 0.63                           | 1.27               | t <sub>H</sub> = 7.00              |

$\bar{x}$  : Ortalama ± standart hata. BSS : % Bağıl standart sapma (n:7 serbestlik derecesinde t<sub>t</sub> değeri 2’dir) (t<sub>H</sub> : hesapla bulunan t değeri, t<sub>T</sub> : tablodan bulunan t değeri) (Ek 2 ve 5).

### Özgünlük

Yöntemlerin özgünlüğü, bölüm III.8.’de anlatıldığı gibi hazırlanan ve 20 mg zafirlukast içeren sentetik preparatların geliştirilen her üç voltametrik yöntemle analizi yapılarak değerlendirilmiş ve elde edilen veriler Tablo IV.17’de verilmiştir. Bu analizlerde standart zafirlukast çözeltisinde olduğu gibi OSWV yönteminde -1326 mV’da, OSWAdSV yönteminde -1312 mV’da ve DPAdSV yöntemi için -1232 mV’da zafirlukasta ait pikler elde edilmiş ve herhangi bir girişimin olmadığı gözlenmiştir.



**Tablo IV.16.** Farklı analizciye ait analiz sonuçları (Eklenen zafırlukast derişimi OSW yöntemi için 6.25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , OSWAdSV ve DPAdSV yöntemleri için 130.00  $\text{ng mL}^{-1}$ ) (n = 7)

| OSWV yöntemi                                                                                                          |                                               | OSWAdSV yöntemi                                                                                                             |                                             | DPAdSV yöntemi                                                                                                              |                                             |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|
| 1. Analizci Bulunan ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )                                                                         | 2. Analizci Bulunan ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) | 1. Analizci Bulunan ( $\text{ng mL}^{-1}$ )                                                                                 | 2. Analizci Bulunan ( $\text{ng mL}^{-1}$ ) | 1. Analizci Bulunan ( $\text{ng mL}^{-1}$ )                                                                                 | 2. Analizci Bulunan ( $\text{ng mL}^{-1}$ ) |
| 6.25                                                                                                                  | 6.31                                          | 132.12                                                                                                                      | 130.07                                      | 128.45                                                                                                                      | 127.86                                      |
| 6.21                                                                                                                  | 6.20                                          | 132.96                                                                                                                      | 129.73                                      | 131.63                                                                                                                      | 128.92                                      |
| 6.18                                                                                                                  | 6.25                                          | 130.88                                                                                                                      | 131.13                                      | 132.29                                                                                                                      | 131.65                                      |
| 6.31                                                                                                                  | 6.17                                          | 131.88                                                                                                                      | 130.54                                      | 131.30                                                                                                                      | 129.67                                      |
| 6.10                                                                                                                  | 6.32                                          | 131.69                                                                                                                      | 131.50                                      | 130.11                                                                                                                      | 127.28                                      |
| 6.19                                                                                                                  | 6.25                                          | 130.04                                                                                                                      | 131.66                                      | 129.05                                                                                                                      | 130.97                                      |
| 6.13                                                                                                                  | 6.20                                          | 129.17                                                                                                                      | 127.27                                      | 129.25                                                                                                                      | 129.53                                      |
| $\bar{x} : 6.24 \pm 0.02$<br>SS : 0.06<br>BSS : % 0.96<br>GA : 6.19 - 6.29<br>$t_H = 7.00 > t_T = 2.00$<br>$p > 0.05$ |                                               | $\bar{x} : 130.27 \pm 0.57$<br>SS : 1.51<br>BSS : % 1.16<br>GA : 128.87 - 131.67<br>$t_H = 6.00 > t_T = 2.00$<br>$p > 0.05$ |                                             | $\bar{x} : 129.41 \pm 0.59$<br>SS : 1.57<br>BSS : % 1.21<br>GA : 127.96 - 130.86<br>$t_H = 6.00 > t_T = 2.00$<br>$p > 0.05$ |                                             |

$\bar{x}$  : Ortalama  $\pm$  standart hata. SS : Standart sapma. BSS : % Bağıl standart sapma. GA : Güven Aralığı ( $\alpha : 0.05$ ) (n:7 serbestlik derecesinde  $t_t$  değeri 2'dir) (Ek 2 ve 5) (İstatistiksel değerlendirmeler 2 analizciye aittir)

**Tablo IV.17.** Sentetik tablet preparatlarının analiz bulguları  
(Eklenen zafirlukast miktarı: 20 mg) (n = 7)

| OSWV Yöntemi               |                | OSWAdSV Yöntemi            |                | DPAdSV Yöntemi             |                |
|----------------------------|----------------|----------------------------|----------------|----------------------------|----------------|
| Bulunan                    | % Geri Kazanım | Bulunan                    | % Geri Kazanım | Bulunan                    | % Geri Kazanım |
| 20.03                      | 100.15         | 20.28                      | 101.40         | 20.20                      | 101.00         |
| 20.20                      | 101.00         | 19.96                      | 99.80          | 20.17                      | 100.85         |
| 19.89                      | 99.45          | 20.04                      | 100.20         | 20.03                      | 100.15         |
| 20.12                      | 100.60         | 19.92                      | 99.60          | 19.72                      | 98.60          |
| 20.01                      | 100.05         | 20.36                      | 101.80         | 19.97                      | 99.85          |
| 19.94                      | 99.70          | 20.08                      | 100.40         | 19.90                      | 99.50          |
| 19.92                      | 99.60          | 20.12                      | 100.60         | 19.83                      | 99.15          |
| $\bar{x} : 20.02 \pm 0.04$ |                | $\bar{x} : 20.11 \pm 0.06$ |                | $\bar{x} : 19.97 \pm 0.06$ |                |
| SS : 0.11                  |                | SS : 0.16                  |                | SS : 0.17                  |                |
| BSS : % 0.55               |                | BSS : % 0.80               |                | BSS : % 0.85               |                |
| GA : 19.92 - 20.12         |                | GA : 19.96 - 20.26         |                | GA : 19.82 - 20.12         |                |

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

GA : Güven Aralığı ( $\alpha$  : 0.05) (Ek 2 ve 3).

### **Geri Kazanım**

20 mg zafirlukast içeren sentetik tablet çözeltisine ait geri kazanım değerleri sırasıyla Tablo IV.17’de verilmiştir.

### **IV.3.4. Farmasötik Preparatların Analiz Bulguları**

20 mg zafirlukast içeren Accolate® tabletlerin analizleri geliştirilen üç voltametrik yöntemle ve karşılaştırma yöntemi (10) ile yapılmış olup veriler Tablo IV.18’de gösterilmiştir.

**Tablo IV.18.** Accolate® tablete ait analiz bulguları (20 mg zafirlukast / tablet) (n=7)

| <b>OSWV yöntemi</b>                                                                                                      | <b>OSWAdSV yöntemi</b>                                                                                                    | <b>DPAdSV Yöntemi</b>                                                                                                    | <b>Karşılaştırma yöntemi (10)</b>                                             |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| Bulunan (mg)                                                                                                             | Bulunan (mg)                                                                                                              | Bulunan (mg)                                                                                                             | Bulunan (mg)                                                                  |
| 20.14                                                                                                                    | 20.08                                                                                                                     | 19.93                                                                                                                    | 19.83                                                                         |
| 20.06                                                                                                                    | 20.32                                                                                                                     | 19.90                                                                                                                    | 20.30                                                                         |
| 20.22                                                                                                                    | 19.96                                                                                                                     | 20.20                                                                                                                    | 19.81                                                                         |
| 19.99                                                                                                                    | 19.98                                                                                                                     | 20.03                                                                                                                    | 20.03                                                                         |
| 20.00                                                                                                                    | 20.12                                                                                                                     | 20.00                                                                                                                    | 20.51                                                                         |
| 19.94                                                                                                                    | 20.32                                                                                                                     | 19.60                                                                                                                    | 21.10                                                                         |
| 20.03                                                                                                                    | 20.36                                                                                                                     | 20.07                                                                                                                    | 20.18                                                                         |
| $\bar{x} : 20.03 \pm 0.04$<br>SS : 0.10<br>BSS : % 0.50<br>GA : 19.93 - 20.13<br>$t_H : 9.00 > t_T : 2.00$<br>$p > 0.05$ | $\bar{x} : 20.16 \pm 0.06$<br>SS : 0.17<br>BSS : % 0.84<br>GA : 20.01 - 20.31<br>$t_H : 15.00 > t_T : 2.00$<br>$p > 0.05$ | $\bar{x} : 19.84 \pm 0.07$<br>SS : 0.19<br>BSS : % 0.96<br>GA : 19.67 - 20.01<br>$t_H : 7.00 > t_T : 2.00$<br>$p > 0.05$ | $\bar{x} : 20.25 \pm 0.17$<br>SS : 0.45<br>BSS : % 2.22<br>GA : 19.83 - 20.67 |

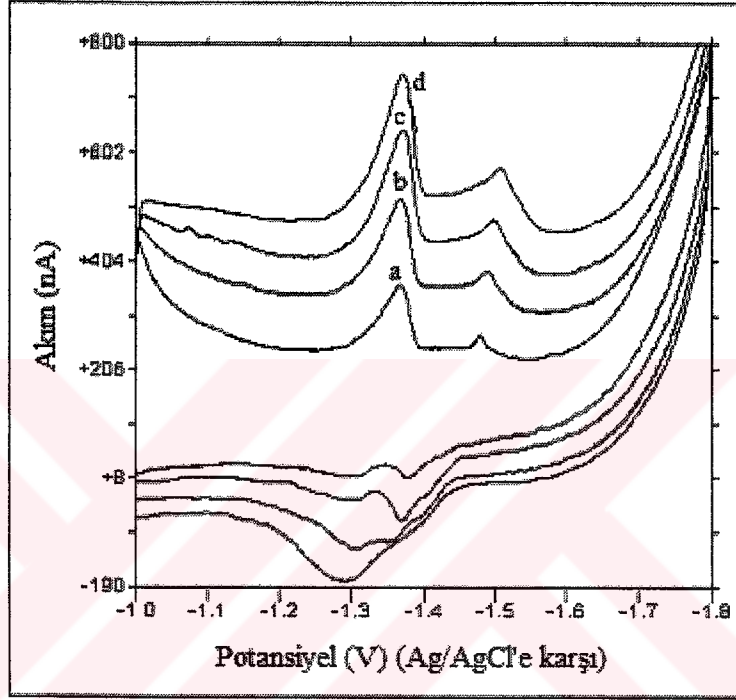
$\bar{x}$  : Ortalama  $\pm$  standart hata. SS : Standart sapma. BSS: % Bağıl standart sapma.

GA : Güven Aralığı ( $\alpha : 0.05$ )

$t_H$  : Hesapla bulunan t değeri.  $t_T$  : Teorik t değeri. p : Yanılma düzeyi (Ek 2, 3 ve 5).

#### IV.4. Dönüşümlü Voltametri Bulguları

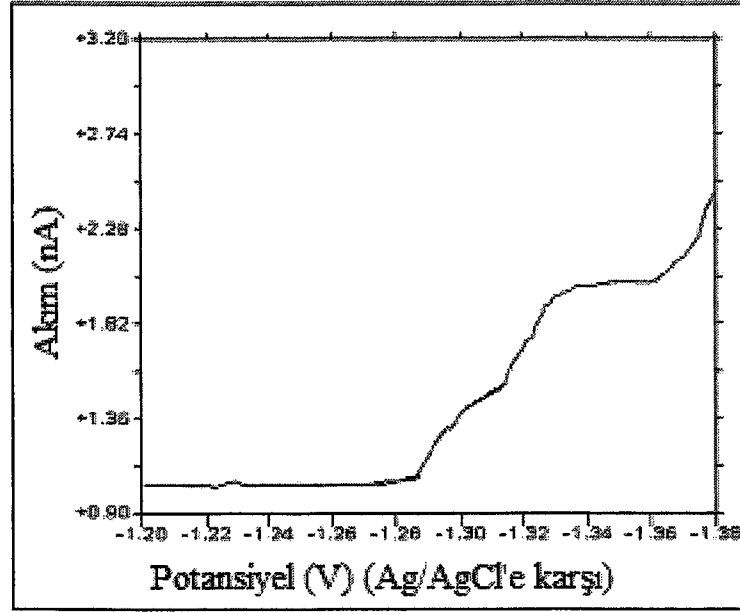
Zafirlukast çözeltisinin artan tarama hızlarında çekilen dönüşümlü voltamogramları Şekil IV.22’de verilmiştir.



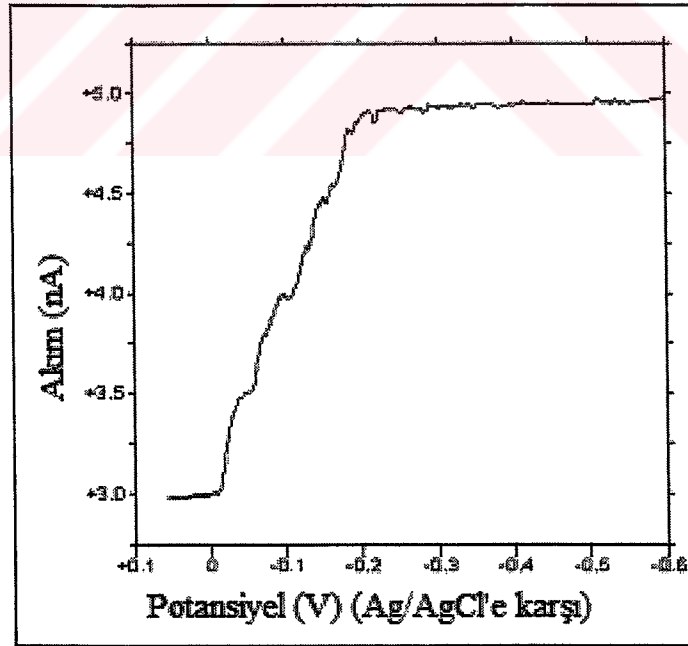
**Şekil IV.22.**  $10.00 \mu\text{g mL}^{-1}$  zafirlukast çözeltisinin pH 8.00 borat tamponunda  
a) 100, b) 200, c) 300 ve d) 400 mV/s tarama hızlarında çekilen  
dönüşümlü voltamogramları

#### IV.5. Doğrusal Taramalı Voltametri Bulguları

$1 \times 10^{-3}$  M derişiminde zafirlukast ve potasyum ferrosiyanür çözeltisinin ultramikro elektrotta (camsı karbon) doğrusal taramalı voltamogramları Şekil IV.23 ve Şekil IV.24’de verilmiştir.



Şekil IV.23. 5 mV/s tarama hızında ve ultramikro elektrotta  $1 \times 10^{-3}$  M derişimindeki zafirlucastın doğrusal taramalı voltamogramı



Şekil IV.24. 5 mV/s tarama hızında ve ultramikro elektrotta  $1 \times 10^{-3}$  M derişimindeki potasyum ferrosiyanürün doğrusal taramalı voltamogramı

## IV.6. Geliştirilen Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi Yöntemine Ait Analiz Bulguları

Şekil IV.2’de zafirlukastın UV spektrumu görülmektedir. Zafirlukastın maksimum dalga boyu 240 nm’de gözlemlendiği için HPLC analizlerinde UV dedektörde bu dalga boyu kullanılmıştır.

### IV.6.1. Kromatografik Koşulların Optimizasyonu

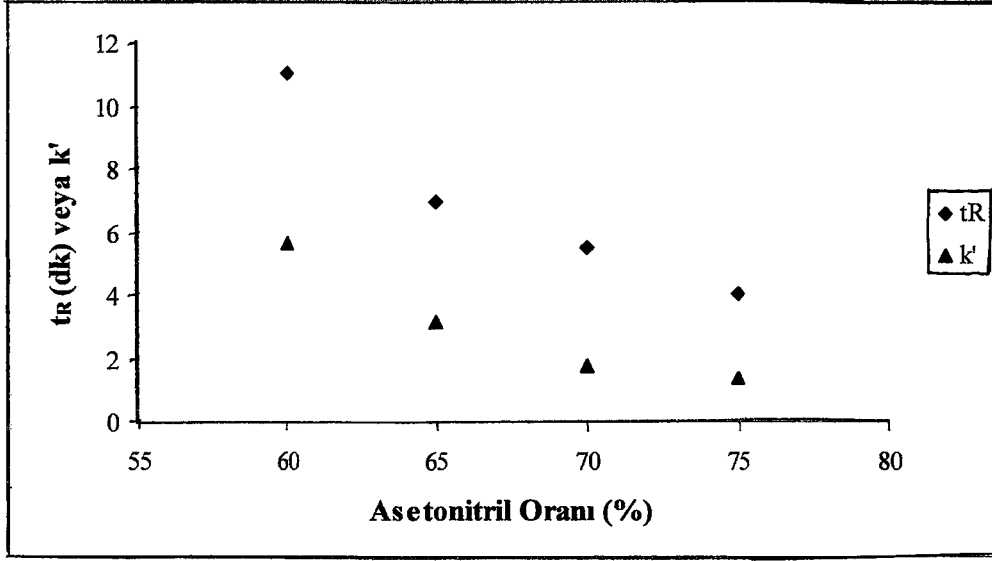
Zafirlukast, apolar yapıda bir bileşik olup analizi ters-faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi ile yapılmıştır. Yöntemin optimizasyonu için hareketli fazın bileşimi, organik çözücü oranı, pH’sı ve akış hızının zafirlukastın kromatografik davranışı üzerindeki etkileri incelenmiştir. Her bir parametrenin etkisi incelenirken diğer koşullar sabit tutulmuştur. Zafirlukastın HPLC ile analizinde, Nucleosil C<sub>18</sub> (5 µm, 250 x 4.6 mm, i.ç.) kolon kullanılmıştır.

#### IV.6.1.1. Tampon Seçimi

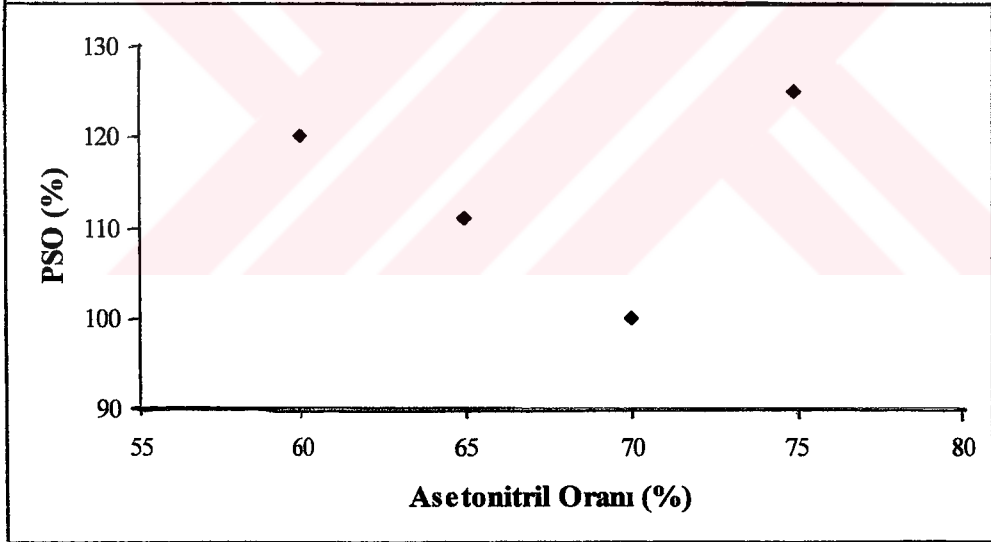
Zafirlukastın ters-faz HPLC yöntemi ile analizinde ilk olarak uygun tampon seçilmiştir. Bunun için pH’sı 3.00 olan 0.01 M, asetat, fosfat, sitrat tamponları ve asetonitril karışımından (30:70, h/h) oluşan hareketli fazlar denenmiştir. Sonuçta, asetonitril içeren ve pH’sı 3.00 olan 0.01 M asetat tamponundan (30:70, h/h) oluşan hareketli faz sistemi seçilmiştir.

#### IV.6.1.2. Organik Çözücü Etkisi

Organik çözücü etkisinin incelenmesi için metanol : asetat tamponu ve asetonitril : asetat tamponu ikili sistemleri kullanılmıştır. Bu amaçla pH’sı 3.00 olan 0.01 M asetat tamponu ve değişik oranlarda metanol veya asetonitril eklenerek hareketli fazlar hazırlanmıştır. Eklenen asetonitril hacmine göre kapasite faktörü, alıkonma zamanı ve PSO oranının değişimi Şekil IV.25 ve Şekil IV.26’da gösterilmiştir.



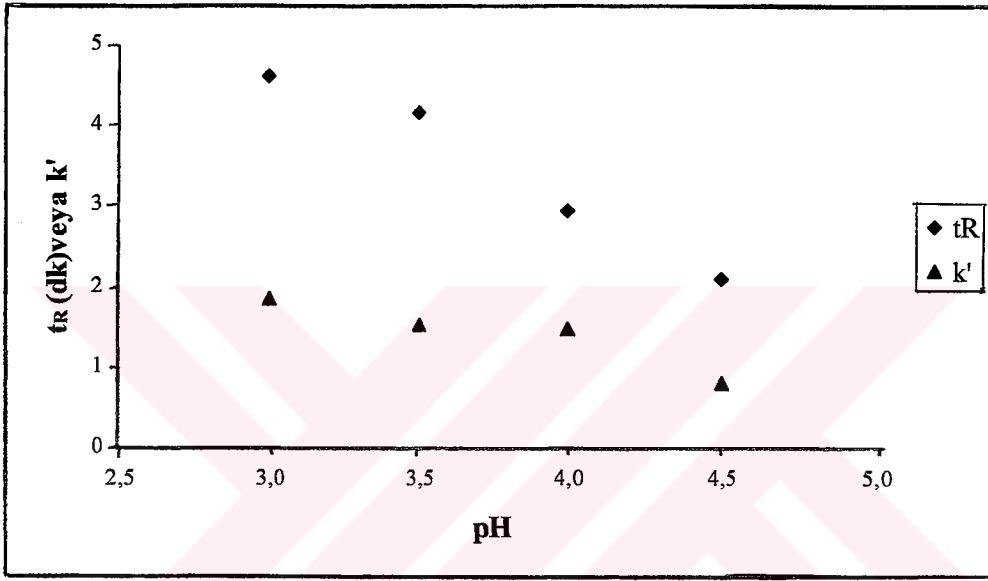
Şekil IV.25. Hareketli fazdaki asetonitril oranının zafirlukastın ayırımına etkisi



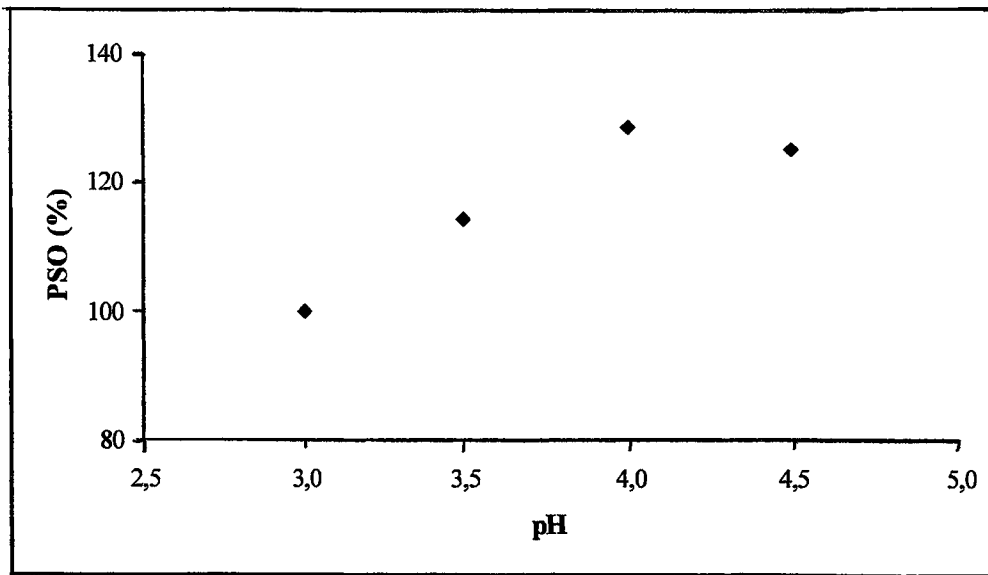
Şekil IV.26. Hareketli fazdaki asetonitril oranının zafirlukastın PSO'na etkisi

#### IV.6.1.3. Hareketli Faz pH'sının Zafirlukastın Ayırımına Etkisi

Bu çalışma için asetonitril:0.01 M asetat tamponu (70:30, h/h) içeren çözelti hareketli faz kullanılmıştır. Hareketli faz akış hızı ise 0.8 mL/dk'dır. Asetat tamponunun pH'sı 3.0 - 4.5 aralığında değiştirilmiş ve buna bağlı olarak kapasite faktörü, alıkonma zamanı ve PSO'na etkisi incelenmiştir (Şekil IV.27 - Şekil IV.28).



Şekil IV.27. Hareketli faz pH'sının zafirlukastın ayırımına etkisi



Şekil IV.28. Hareketli faz pH'sının zafirlukastın PSO'na etkisi

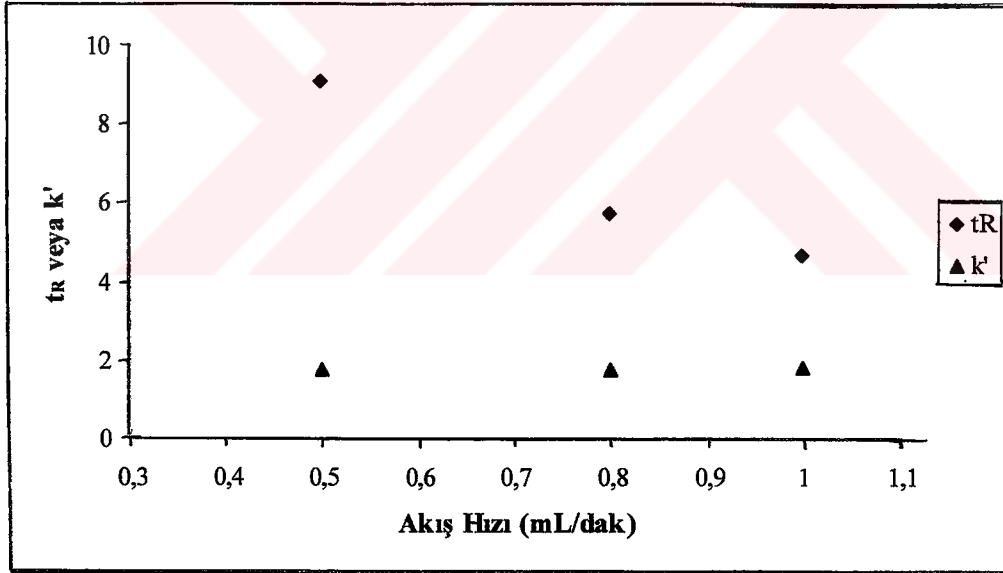


#### IV.6.1.4. Asetat Tamponu Derişiminin Zafirlukastın Ayırımına Etkisi

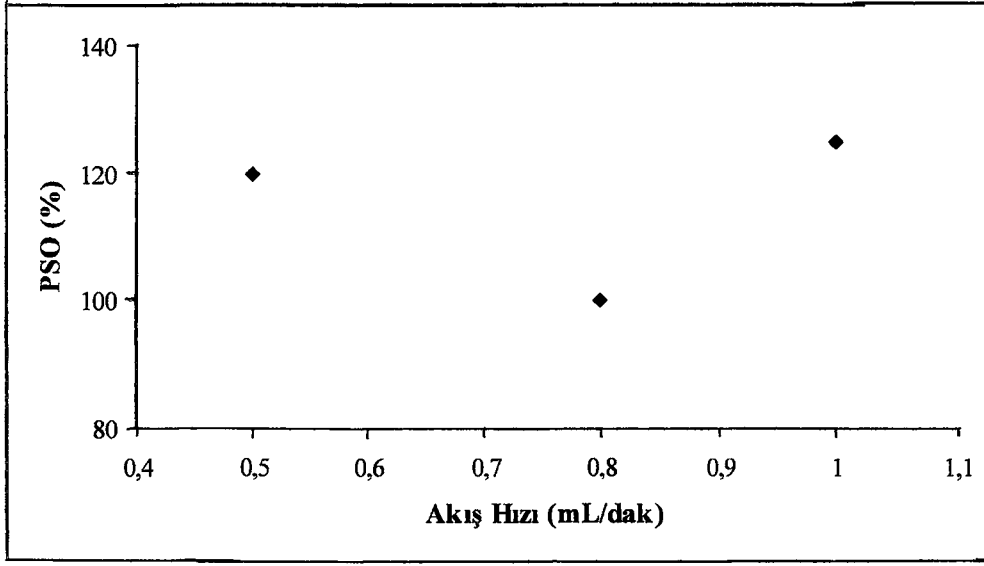
Bu çalışma için pH'sı 3.00 olan 0.01 M, 0.05 M ve 0.10 M asetat tamponu : asetonitril (30:70, h/h) çözeltileri hareketli faz olarak denenmiştir. Sonuçta kapasite faktörü ve alıkonma zamanı arasında fark bulunmamıştır. Bundan sonraki çalışmalarda da 0.01 M asetat tamponu kullanılmıştır.

#### IV.6.1.5. Hareketli Faz Akış Hızının Zafirlukastın Ayırımına Etkisi

Hareketli faz akış hızının zafirlukast ayırımına etkisinin incelenmesinde asetonitril:0.01 M asetat tamponu (pH 3.00) (70:30, h/h) karışımı hareketli faz olarak kullanılmıştır ve kapasite faktörü, alıkonma zamanı ve PSO değişimi incelenmiştir. (Şekil IV.29 - Şekil IV.30).



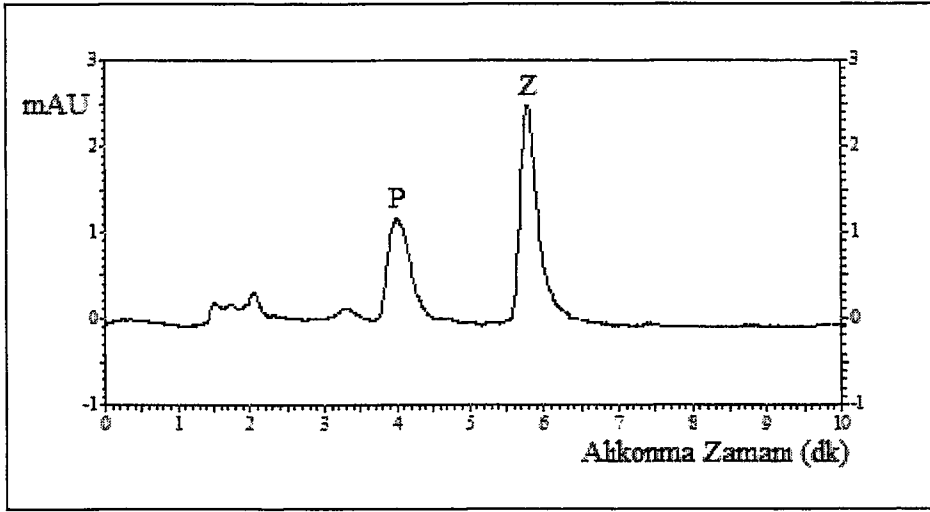
Şekil IV.29. Hareketli faz akış hızının zafirlukastın ayırımına etkisi



**Şekil IV.30.** Hareketli faz akış hızının zafirlukastın PSO'na etkisi

#### IV.6.2. İç Standart Seçimi

Zafirlukastın HPLC yöntemi ile analizinde kullanılacak iç standardın seçimi için diflunisal, ketorolak, diklofenak sodyum, lidokain, piribedil, sertakanazol, kinin ve verapamil hidroklorür denenmiştir. Bulunan optimum kromatografik koşullarda zafirlukasta ve piribedile ait kromatogram Şekil IV.31'de verilmiştir. Zafirlukastın plazmadan analizleri yapılırken diğer denenilen iç standartlar ile plazmadan gelen pikler arasında pik örtüşmeleri meydana geldiğinden dolayı ve diğer iç standartlara göre alıkonma zamanının daha uzun olması nedeniyle piribedil iç standart olarak seçilmiştir.

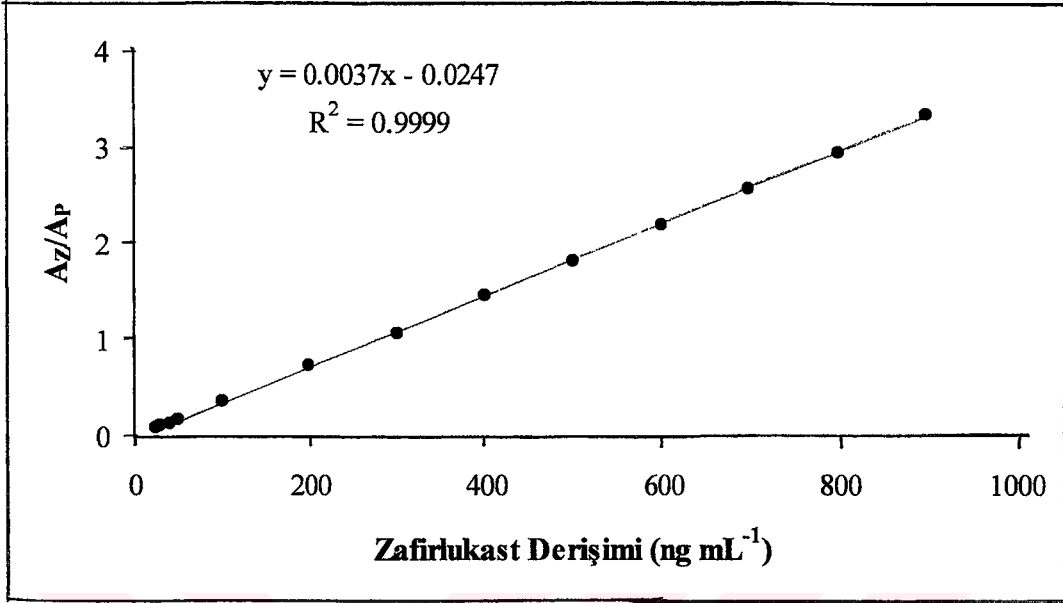


**Şekil IV.31.**  $400 \text{ ng mL}^{-1}$  zafirlukast çözeltisine ait kromatogram  
(P; Piribedil, Z; Zafirlukast)

#### IV.6.3. HPLC Yönteminin Validasyonu

##### Kalibrasyon Eğrisi ve Doğrusallık Aralığı

Kalibrasyon eğrisi, zafirlukastın derişimine karşı zafirlukast pik alanının ( $A_Z$ ) piribedil (iç standart) pik alanına ( $A_P$ ) oranı grafiğe geçirilerek elde edilmiştir (Şekil IV.32).



**Şekil IV.32.** Zafirlukastın HPLC yöntemi ile analizinde elde edilen kalibrasyon eğrisi (Piribedil çözeltisi 200 ng mL<sup>-1</sup>)

Bu eğrinin doğrusallıktan ayrılış ve korrelasyon katsayısının önem kontrolüne ait istatistiksel değerlendirme sonuçları ise Tablo IV. 19’da gösterilmiştir.

**Tablo IV.19.** Zafirlukastın HPLC yöntemi ile analizinden elde edilen kalibrasyon eğrisinin korrelasyon katsayısı ile doğrusallıktan ayrılış önem kontrolü için yapılan istatistiksel hesaplamalar\*

| Korrelasyon katsayısının önem kontrolü |        |       |                |                |                |                |
|----------------------------------------|--------|-------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| n                                      | r      | Sr    | t <sub>H</sub> | t <sub>T</sub> |                |                |
| 13                                     | 0.9999 | 0.003 | 331.64         | 2.20           |                |                |
| Doğrusallıktan ayrılış önem kontrolü   |        |       |                |                |                |                |
| RKT                                    | YOAKT  | RAKT  | RAKO           | RKO            | F <sub>H</sub> | F <sub>T</sub> |
| 16.46                                  | 16.47  | 0.002 | 0.00018        | 16.46          | 90465.38       | 4.84           |

\* Terimler Ek 1’de açıklanmıştır.

Zafirlukastın HPLC yöntemi ile analizine ait kalibrasyon eğrisinin özellikleri Tablo IV.20’de verilmiştir.

**Tablo IV. 20.** Önerilen HPLC yöntemine ait kalibrasyon eğrisinin özellikleri (n=8)

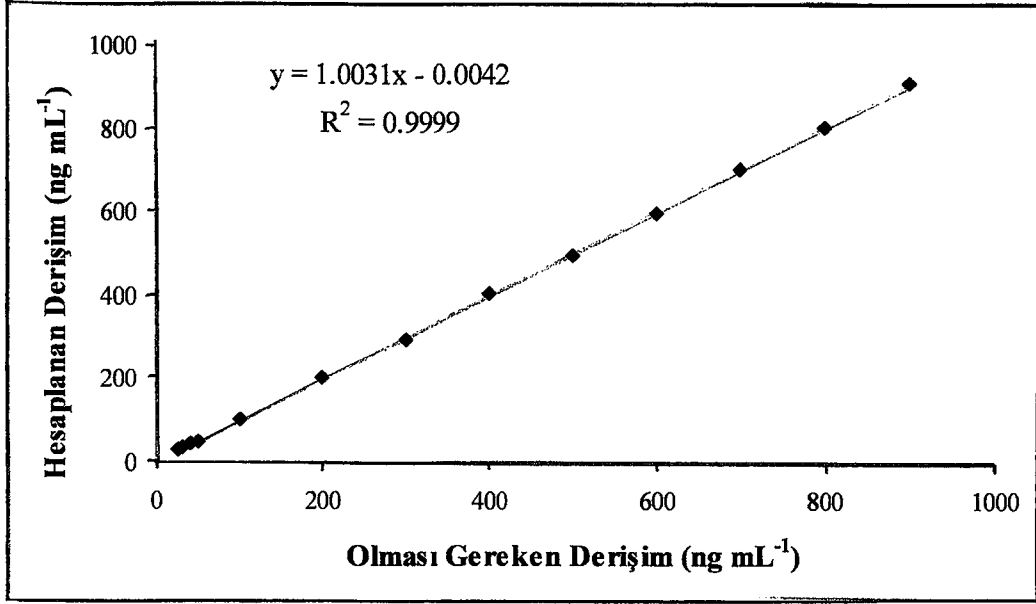
|                                            | HPLC Yöntemi            |
|--------------------------------------------|-------------------------|
| Regresyon denklemi*                        | $y = 0.0037 x - 0.0247$ |
| Eğimin standart hatası                     | $2.27 \times 10^{-5}$   |
| Kesişimin standart hatası                  | $3.53 \times 10^{-3}$   |
| Korrelasyon katsayısı (r)                  | 0.9999                  |
| Tanımlayıcılık katsayısı ( $r^2$ )         | 0.9999                  |
| Doğrusallık Aralığı (ng mL <sup>-1</sup> ) | 25.00 - 900.00          |
| Gözlenebilme Sınırı (ng mL <sup>-1</sup> ) | 10.00                   |
| Alt Tayin Sınırı (ng mL <sup>-1</sup> )    | 25.00                   |

\* $y = bx + a$ ; x : ng mL<sup>-1</sup> biriminde derişim, y : alan oranı değerleri, a : kesişim, b : eğim.

Yöntemin doğrusallığının kontrolü için kalibrasyon eğrisini oluşturan derişimlerde hazırlanan standart çözeltilerin analizleri yapıp kalibrasyon eğrisi denklemi ile sonuçlar hesaplanmış ve olması gereken (nominal) derişimlere karşı grafiğe geçirilmiştir (Şekil IV. 33).

### Duyarlılık

Zafirlukastın HPLC yönteminin LOD ve LOQ değerleri Tablo IV.20’de verilmiştir.



Şekil IV. 33. Zafirlukastın HPLC yöntemine ait yöntem doğrusallığı kontrol grafiği

#### Doğruluk ve Kesinlik

Bu yöntemde de doğruluk ve kesinlik çalışmalarına ait gün içi ve günler arası değerlendirme sonuçları Tablo IV.21’de verilmiştir. Gün içi yapılan çalışmalar aynı gün, günler arası yapılan çalışmalar ise farklı günlerde yapılmıştır.

**Tablo IV.21.**HPLC yönteminin, gün içi<sup>a</sup> ve günler arası<sup>b</sup> kesinlik ve doğruluk analiz bulguları (n = 7)

| Zafirlukast<br>Miktarı (ng mL <sup>-1</sup> ) | Gün içi                                  |                 | Günler arası                             |                 |
|-----------------------------------------------|------------------------------------------|-----------------|------------------------------------------|-----------------|
|                                               | Bulunan miktar<br>(ng mL <sup>-1</sup> ) | % Bağlı<br>hata | Bulunan miktar<br>(ng mL <sup>-1</sup> ) | % Bağlı<br>hata |
| 40.00                                         | 40.77                                    | 1.93            | 41.81                                    | 4.53            |
|                                               | 39.45                                    | -1.38           | 41.81                                    | 4.53            |
|                                               | 41.34                                    | 3.35            | 39.11                                    | -2.23           |
|                                               | 41.62                                    | 4.05            | 39.11                                    | -2.23           |
|                                               | 39.88                                    | -0.30           | 39.11                                    | -2.23           |
|                                               | 39.54                                    | -1.15           | 39.11                                    | -2.23           |
|                                               | 39.07                                    | -2.33           | 41.81                                    | 4.53            |
|                                               | $\bar{x} : 40.24 \pm 0.38$               |                 | $\bar{x} : 40.27 \pm 0.54$               |                 |
|                                               | SS : 1.00                                |                 | SS : 1.44                                |                 |
|                                               | BSS : % 2.49                             |                 | BSS : % 3.58                             |                 |
| 400.00                                        | 400.69                                   | 0.17            | 401.27                                   | 0.32            |
|                                               | 399.73                                   | -0.07           | 401.27                                   | 0.32            |
|                                               | 401.09                                   | 0.27            | 403.97                                   | 0.99            |
|                                               | 401.33                                   | 0.33            | 398.57                                   | -0.36           |
|                                               | 400.37                                   | 0.09            | 400.65                                   | 0.16            |
|                                               | 399.34                                   | -0.17           | 400.66                                   | 0.17            |
|                                               | 401.97                                   | 0.49            | 400.73                                   | 0.18            |
|                                               | $\bar{x} : 400.65 \pm 0.35$              |                 | $\bar{x} : 401.02 \pm 0.60$              |                 |
|                                               | SS : 0.92                                |                 | SS : 1.59                                |                 |
|                                               | BSS : % 0.23                             |                 | BSS : % 0.40                             |                 |
| 800.00                                        | 799.65                                   | -0.04           | 803.97                                   | 0.50            |
|                                               | 801.44                                   | 0.18            | 801.27                                   | 0.16            |
|                                               | 800.86                                   | 0.11            | 801.27                                   | 0.16            |
|                                               | 801.15                                   | 0.14            | 798.57                                   | -0.18           |
|                                               | 799.19                                   | -0.10           | 801.27                                   | 0.16            |
|                                               | 800.40                                   | 0.05            | 801.27                                   | 0.16            |
|                                               | 801.99                                   | 0.25            | 798.57                                   | 0.18            |
|                                               | $\bar{x} : 800.67 \pm 0.37$              |                 | $\bar{x} : 800.88 \pm 0.70$              |                 |
|                                               | SS : 0.99                                |                 | SS : 1.86                                |                 |
|                                               | BSS : % 0.12                             |                 | BSS : % 0.23                             |                 |

$\bar{x}$  : Ortalama  $\pm$  standart hata, SS : Standart sapma, BSS : Bağlı standart sapma ve % bağlı hata hesaplamaları Ek 2’de verilmiştir.

<sup>a</sup> Gün içi çalışmalar; üç derişim seviyesinde yedi ayrı çözelti kullanılarak aynı günde yapılmıştır.

<sup>b</sup> Günler arası çalışmalar; üç derişim seviyesinde yedi ayrı çözelti kullanılarak 7 ayrı günde yapılmıştır.

### Tekrarlanabilirlik

Tablo IV.22’de tekrarlanabilirlik çalışmalarından elde edilen sonuçlar verilmiştir.

**Tablo IV.22.** Önerilen HPLC yönteminin tekrarlanabilirliğine ait analiz bulguları  
(Eklenen zafirlukast derişimi 400.00 ng mL<sup>-1</sup>) (n = 12)

| Bulunan                                                                          | % Geri Kazanım |
|----------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| 399.11                                                                           | 99.78          |
| 401.35                                                                           | 100.34         |
| 397.61                                                                           | 99.40          |
| 397.89                                                                           | 99.47          |
| 402.60                                                                           | 100.65         |
| 399.21                                                                           | 99.80          |
| 403.81                                                                           | 100.95         |
| 401.23                                                                           | 100.31         |
| 400.22                                                                           | 100.06         |
| 401.37                                                                           | 100.34         |
| 401.35                                                                           | 100.34         |
| 402.15                                                                           | 100.54         |
| $\bar{x} : 400.66 \pm 0.55$<br>SS : 1.89<br>BSS : % 0.47<br>GA : 399.45 - 401.87 |                |

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

GA : Güven Aralığı ( $\alpha : 0.05$ ) (Ek 2).



### Sağlamlık ve Tutarlılık

Sağlamlık çalışmaları için optimum koşullarda küçük değişiklikler yapılarak, tutarlılık çalışmaları için ise farklı analizci tarafından çözeltilerin analizleri yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo IV.23 ve. Tablo IV.24’de verilmiştir.

**Tablo IV. 23.** HPLC yönteminin sağlamlığına ait analiz bulguları (n = 7)

|                                        | <b>Bulunan<br/>(ng ml<sup>-1</sup>)</b> | <b>BSS<br/>(%)</b> | <b>Karşılaştırma<br/>Sonuçları</b> |
|----------------------------------------|-----------------------------------------|--------------------|------------------------------------|
| Standart (400.00 ng mL <sup>-1</sup> ) | 401.08 ± 0.65                           | 0.43               |                                    |
| pH 2.90                                | 401.21 ± 1.23                           | 0.81               | t <sub>H</sub> = 10.00             |
| pH 3.10                                | 401.02 ± 0.86                           | 0.57               | t <sub>H</sub> = 10.00             |
| Akış Hızı (0.7 mL/dk)                  | 401.05 ± 0.98                           | 0.65               | t <sub>H</sub> = 10.00             |
| Akış Hızı (0.9 mL/dk)                  | 400.33 ± 0.86                           | 0.57               | t <sub>H</sub> = 13.00             |
| Asetonitril Oranı (% 68)               | 400.58 ± 0.55                           | 0.36               | t <sub>H</sub> = 15.00             |
| Asetonitril Oranı (% 72)               | 401.03 ± 0.61                           | 0.40               | t <sub>H</sub> = 6.00              |
| Dalga Boyu (237 nm)                    | 400.31 ± 0.95                           | 0.63               | t <sub>H</sub> = 13.00             |
| Dalga Boyu (243 nm)                    | 400.60 ± 1.03                           | 0.68               | t <sub>H</sub> = 10.00             |

$\bar{x}$  : Ortalama ± standart hata. BSS : % Bağlı standart sapma (n:7 serbestlik derecesinde t<sub>t</sub> değeri 2’dir) (t<sub>H</sub> : hesapla bulunan t değeri, t<sub>T</sub> : tablodan bulunan t değeri) (Ek 2 ve 5).

**Tablo IV.24.** Farklı analizciye ait analiz sonuçları (Eklenen zafirlukast derişimi  
400.00 ng mL<sup>-1</sup>) (n = 7)

| 1. Analizci                       | 2. Analizci                       | İstatistiksel Değerlendirme                                                                                               |
|-----------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Bulunan<br>(ng mL <sup>-1</sup> ) | Bulunan<br>(ng mL <sup>-1</sup> ) | Sonuçları                                                                                                                 |
| 399.11                            | 404.15                            | $\bar{x} : 400.73 \pm 0.98$<br>SS : 2.59<br>BSS : % 0.65<br>GA : 398.33 - 403.13<br>$t_H = 12.00 > t_T = 2.00$ (p > 0.05) |
| 401.35                            | 398.53                            |                                                                                                                           |
| 397.61                            | 397.56                            |                                                                                                                           |
| 397.89                            | 399.85                            |                                                                                                                           |
| 402.60                            | 404.19                            |                                                                                                                           |
| 399.21                            | 399.82                            |                                                                                                                           |
| 403.81                            | 401.03                            |                                                                                                                           |

$\bar{x}$  : Ortalama  $\pm$  standart hata. SS : Standart sapma. BSS : % Bağıl standart sapma.  
GA : Güven Aralığı ( $\alpha$  : 0.05) (n:7 serbestlik derecesinde  $t_t$  değeri 2'dir) (Ek 2 ve 5)  
(İstatistiksel değerlendirmeler 2.analizciye aittir)

### Özgünlük

Yöntemin özgünlüğü için 20 mg zafirlukast içeren sentetik preparatların geliştirilen HPLC yöntemi ile analizi yapılarak değerlendirilmiş ve elde edilen veriler Tablo IV. 25'de verilmiştir. Bu analizlerde standart zafirlukast çözeltisinde olduğu gibi 3.9 dk'da piribedil ve 5.7 dk'da ise zafirlukasta ait pikler elde edilmiştir.

### Geri Kazanım

20 mg zafirlukast içeren sentetik tablet çözeltisine ait geri kazanım değerleri Tablo IV. 25'de verilmiştir.

**Tablo IV.25.** Sentetik tablet preparatlarının analiz bulguları  
(Eklenen zafirlukast miktarı : 20 mg) (n = 7)

| Bulunan                                                                       | % Geri Kazanım |
|-------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| 19.80                                                                         | 99.00          |
| 20.15                                                                         | 100.74         |
| 20.36                                                                         | 101.80         |
| 19.84                                                                         | 99.19          |
| 20.14                                                                         | 100.72         |
| 20.29                                                                         | 101.45         |
| 20.00                                                                         | 100.00         |
| $\bar{x} : 20.08 \pm 0.08$<br>SS : 0.21<br>BSS : % 1.05<br>GA : 19.88 - 20.28 |                |

$\bar{x}$  : Ortalama  $\pm$  standart hata. SS : Standart sapma. BSS : % Bağıl standart sapma.  
GA : Güven Aralığı ( $\alpha$  : 0.05) (Ek 2, 3).

#### IV.6.4. Farmasötik Preparatların Analiz Bulguları

20 mg zafirlukast içeren Accolate® tabletlerin analizleri geliştirilen HPLC ve karşılaştırma yöntemi (10) ile yapılmış olup veriler Tablo IV.26'da gösterilmiştir.

**Tablo IV.26.** Accolate® tablete ait analiz bulguları (20 mg zafirlukast / tablet) (n = 7)

| HPLC yöntemi                                                                  | Karşılaştırma yöntemi (10)                                                    |
|-------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| Bulunan (mg)                                                                  | Bulunan (mg)                                                                  |
| 20.09                                                                         | 19.83                                                                         |
| 20.04                                                                         | 20.30                                                                         |
| 19.99                                                                         | 19.81                                                                         |
| 20.02                                                                         | 20.03                                                                         |
| 20.10                                                                         | 20.51                                                                         |
| 20.06                                                                         | 21.10                                                                         |
| 19.97                                                                         | 20.18                                                                         |
| $\bar{x} : 20.04 \pm 0.02$<br>SS : 0.05<br>BSS : % 0.25<br>GA : 19.99 - 20.09 | $\bar{x} : 20.25 \pm 0.17$<br>SS : 0.45<br>BSS : % 2.22<br>GA : 19.83 - 20.67 |
| $t_H = 6.50 > t_T = 2.00, p > 0.05$                                           |                                                                               |

$\bar{x}$  : Ortalama  $\pm$  standart hata. SS : Standart sapma. BSS: % Bağıl standart sapma. GA : Güven Aralığı ( $\alpha$  : 0.05) (Ek 2,3,5).  $t_H$  : Hesapla bulunan t değeri.  $t_T$  : Teorik t değeri. p : Yanılma düzeyi.

#### IV.7. Biyolojik Materyalden Analiz Yönteminin Bulguları

Zafirlukastın biyolojik materyalden Nucleosil C<sub>18</sub> 100A (5  $\mu$ m, 150 x 4.6 mm i.ç.,) kolonda, asetonitril : pH 3.00, 0.01 M sodyum asetat tamponu (70:30, h/h) kullanılarak 0.8 ml/dak akış hızında ve 240 nm'de gerçekleştirilmiştir.

#### IV.7.1. Tüketme Yönteminin Seçimi

Plazmadan zafirlukastın tüketilmesi amacıyla boş plazma, suya ve plazmaya eklenmiş zafirlukast çözeltilerine değişik tüketme işlemleri uygulanarak en uygun tüketme yöntemi bulunmuştur. Tablo IV.27’de değişik tüketme çözücülerini ile yapılan zafirlukast ve iç standardın alıkonma zamanları, su ile plazmadan elde edilen sonuçlar karşılaştırılarak elde edilen % geri kazanım sonuçları, boş plazmadan gelen örtücü pik oluşumu ve denenen tüketme işlemleri verilmiştir.

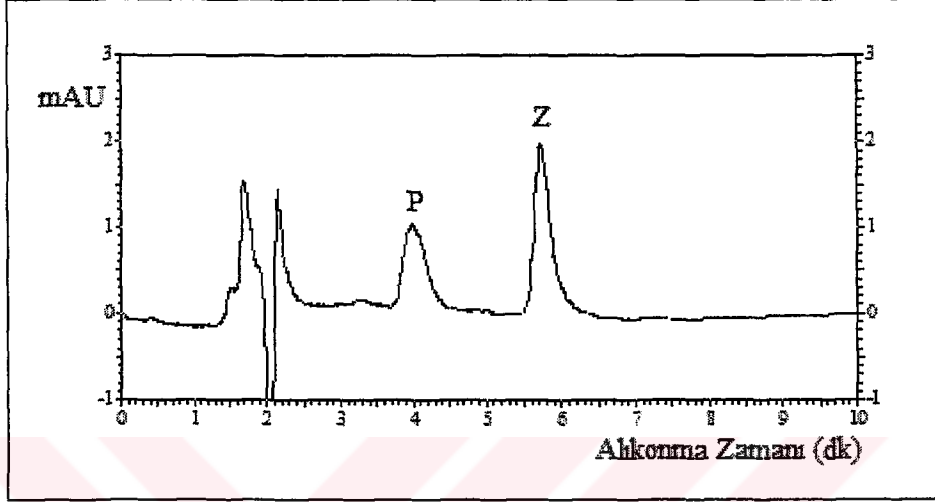
**Tablo IV.27.** Zafirlukastın plazmadan analizi için denenen tüketme işlemleri

| Tüketme İşlemi                                                     | Zafirlukast<br>Piki** | % Geri<br>Kazanım | Örtücü*<br>Pik |
|--------------------------------------------------------------------|-----------------------|-------------------|----------------|
| Etanol                                                             | +                     | 99.72             | -              |
| Metanol                                                            | +                     | 99.19             | -              |
| Asetonitril                                                        | +                     | 96.89             | -              |
| Aseton                                                             | +                     | 67.33             | +              |
| TCA                                                                | -                     | -                 | -              |
| n-Hegzan                                                           | -                     | -                 | +              |
| Diklorometan                                                       | -                     | -                 | +              |
| n-Hegzan: Diklorometan (7:3, h/h)                                  | -                     | -                 | +              |
| Etil Asetat                                                        | -                     | -                 | +              |
| Kloroform                                                          | -                     | -                 | +              |
| Dietil eter                                                        | -                     | -                 | +              |
| C <sub>18</sub> ekstra ayırım kartuşu<br>(100 mg/mL) (M&W)         | -                     | -                 | -              |
| C <sub>8</sub> oktil modifiye silika<br>(100 mg/mL) (730 021)      | +                     | -                 | +              |
| C <sub>18</sub> oktadesil modifiye silika<br>(100 mg/mL) (730 001) | +                     | -                 | +              |

\* Zafirlukastın alıkonma zamanındaki örtücü pik dikkate alınmıştır

\*\* (+) pik var, (-) pik yok.

Belirlenen optimum şartlarda zafirlukastın plazmadan tüketilmesi sonucu elde edilen kromatogram Şekil IV. 34'de gösterilmiştir.

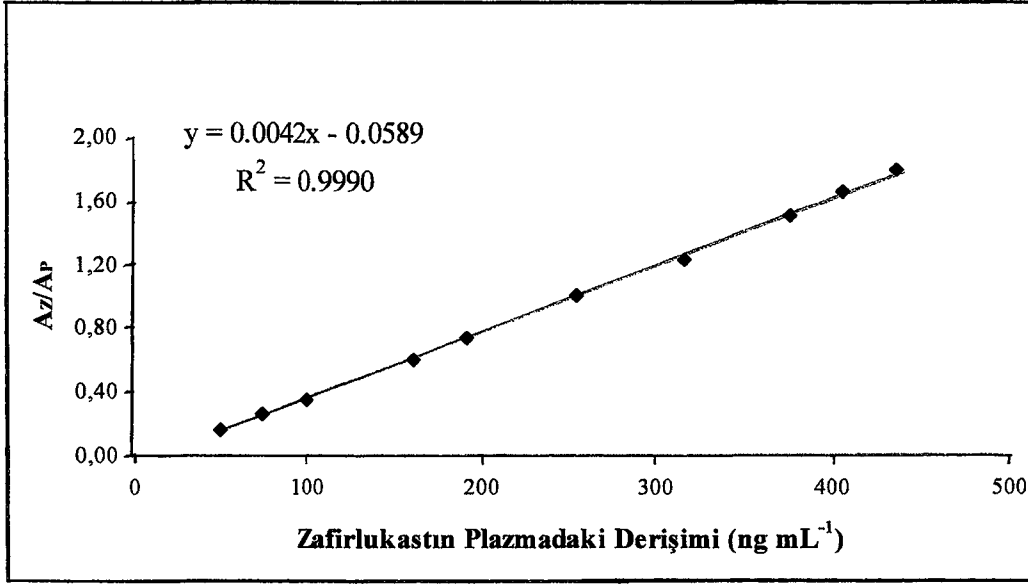


Şekil IV. 34.  $254.78 \text{ ng mL}^{-1}$  derişiminde zafirlukast eklenmiş plazma çözeltilisine ait kromatogram (P; Piribedil, Z; Zafirlukast)

#### IV.7.2. Biyolojik Materyalden Analiz Yönteminin Validasyonu

##### Kalibrasyon Eğrisi ve Doğrusallık Aralığı

Kalibrasyon eğrisi, plazmadaki zafirlukastın derişimine karşı zafirlukast pik alanının ( $A_Z$ ) piribedil (iç standart) pik alanına ( $A_P$ ) oranı grafiğe geçirilerek elde edilmiştir. (Şekil IV. 35).



**Şekil IV.35.** Zafirlukastın HPLC yöntemi ile plazmadan analizinde elde edilen kalibrasyon eğrisi (Piribedil : 200 ng mL<sup>-1</sup>)

Bu eğrinin doğrusallıktan ayrılış ve korrelasyon katsayısının önem kontrolüne ait istatistiksel değerlendirme sonuçları ise Tablo IV. 28’de gösterilmiştir.

**Tablo IV.28.** Zafirlukastın HPLC yöntemi ile plazmadan analizinde elde edilen kalibrasyon eğrisinin korrelasyon katsayısı ile doğrusallıktan ayrılış önem kontrolü için yapılan istatistiksel hesaplamalar\*

| Korrelasyon katsayısının önem kontrolü |        |        |                |                |                |                |
|----------------------------------------|--------|--------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| n                                      | r      | Sr     | t <sub>H</sub> | t <sub>T</sub> |                |                |
| 13                                     | 0.9995 | 0.0112 | 89.24          | 2.31           |                |                |
| Doğrusallıktan ayrılış önem kontrolü   |        |        |                |                |                |                |
| RKT                                    | YOAKT  | RAKT   | RAKO           | RKO            | F <sub>H</sub> | F <sub>T</sub> |
| 3.23                                   | 3.24   | 0.01   | 0.0013         | 3.23           | 2584.00        | 5.32           |

\* Terimler Ek 1’de açıklanmıştır.

Zafirlukastın HPLC yöntemi ile plazmadan analizine ait kalibrasyon eğrisinin özellikleri Tablo IV. 29'da verilmiştir.

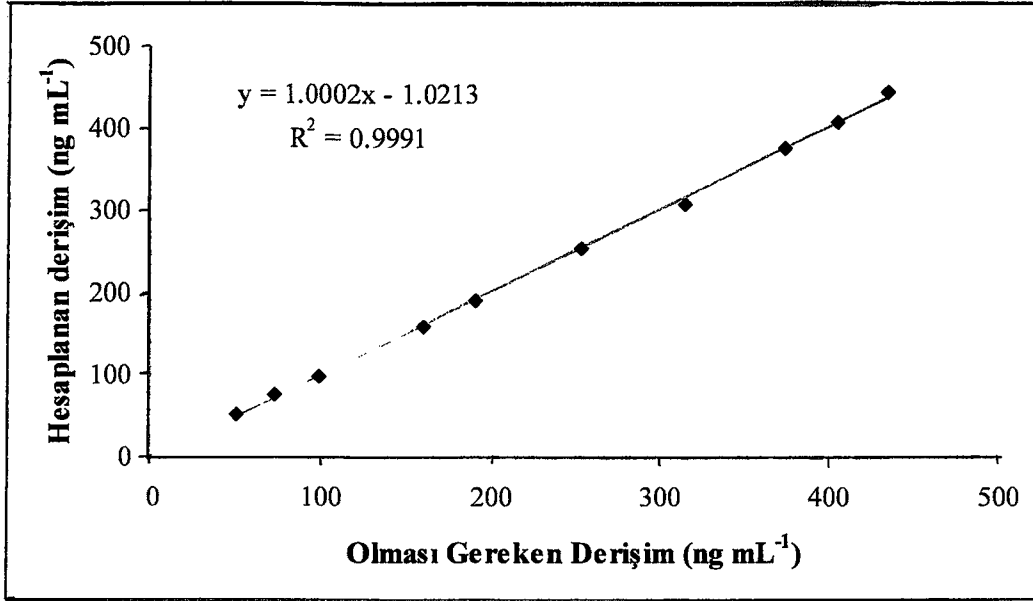
**Tablo IV. 29.** Zafirlukastın plazmadan HPLC ile analiz yöntemine ait kalibrasyon eğrisinin özellikleri (n=8)

|                                             | HPLC Yöntemi            |
|---------------------------------------------|-------------------------|
| Regresyon denklemi*                         | $y = 0.0042 x - 0.0589$ |
| Eğimin standart hatası                      | $1.22 \times 10^{-4}$   |
| Kesişimin standart hatası                   | 0.01                    |
| Korrelasyon katsayısı (r)                   | 0.9995                  |
| Tanımlayıcılık katsayısı ( $r^2$ )          | 0.9990                  |
| Doğrusallık Aralığı ( $\text{ng mL}^{-1}$ ) | 49.69 - 437.50          |
| Gözlenebilme Sınırı ( $\text{ng mL}^{-1}$ ) | 19.23                   |
| Alt Tayin Sınırı ( $\text{ng mL}^{-1}$ )    | 49.69                   |

\* $y = bx + a$ ; x :  $\text{ng mL}^{-1}$  biriminde derişim, y : alan oranı değerleri, a : kesişim, b : eğim.

Yöntemin doğrusallığının kontrolü için kalibrasyon eğrisini oluşturan derişimlerde hazırlanan standart çözeltilerin analizleri yapıp kalibrasyon eğrisi denklemi ile sonuçlar hesaplanmış ve olması gereken (nominal) derişimlere karşı grafiğe geçirilmiştir (Şekil IV. 36).





**Şekil IV.36.** Zafirlukastın HPLC yöntemi ile plazmadan analizinde yöntem doğrusallığı kontrol grafiği

### Duyarlılık

Zafirlukastın biyolojik materyalden HPLC yöntemi ile analizi ile elde edilen LOD ve LOQ değerleri Tablo IV.29'da verilmiştir.

### Doğruluk ve Kesinlik

Bu yöntemde de doğruluk ve kesinlik çalışmaları için üç farklı derişimde yapılan kesinlik ve doğruluk çalışmalarına ait gün içi ve günler arası değerlendirme sonuçları Tablo IV.30.'da verilmiştir.

**Tablo IV.30.** Zafirlukastın plazmadan HPLC ile analiz yöntemine ait gün içi<sup>a</sup> ve günler arası<sup>b</sup> kesinlik ve doğruluk analiz bulguları (n = 7)

| Zafirlukast<br>Miktarı (ng mL <sup>-1</sup> ) | Gün içi                                  |                 | Günler arası                             |                 |
|-----------------------------------------------|------------------------------------------|-----------------|------------------------------------------|-----------------|
|                                               | Bulunan miktar<br>(ng mL <sup>-1</sup> ) | % Bağlı<br>hata | Bulunan miktar<br>(ng mL <sup>-1</sup> ) | % Bağlı<br>hata |
| 72.73                                         | 74.33                                    | 2.20            | 74.53                                    | 2.47            |
|                                               | 74.25                                    | 2.09            | 74.48                                    | 2.41            |
|                                               | 73.50                                    | 1.06            | 74.05                                    | 1.81            |
|                                               | 71.55                                    | -1.62           | 71.07                                    | -2.28           |
|                                               | 72.16                                    | -0.78           | 71.48                                    | -1.72           |
|                                               | 72.83                                    | 0.14            | 71.09                                    | -2.25           |
|                                               | 74.59                                    | 2.56            | 72.53                                    | -0.27           |
|                                               | $\bar{x} : 73.32 \pm 0.44$               |                 | $\bar{x} : 72.75 \pm 0.60$               |                 |
|                                               | SS : 1.17                                |                 | SS : 1.59                                |                 |
|                                               | BSS : % 1.60                             |                 | BSS : % 2.19                             |                 |
| 254.78                                        | 256.01                                   | 0.48            | 252.02                                   | -1.08           |
|                                               | 255.52                                   | 0.29            | 255.09                                   | 0.12            |
|                                               | 254.57                                   | -0.08           | 253.43                                   | -0.53           |
|                                               | 255.55                                   | 0.30            | 255.46                                   | 0.27            |
|                                               | 254.79                                   | 0.003           | 258.16                                   | 1.33            |
|                                               | 254.17                                   | -0.24           | 250.25                                   | -1.79           |
|                                               | 256.39                                   | 0.63            | 256.03                                   | 0.49            |
|                                               | $\bar{x} : 255.29 \pm 0.30$              |                 | $\bar{x} : 254.35 \pm 1.00$              |                 |
|                                               | SS : 0.80                                |                 | SS : 2.65                                |                 |
|                                               | BSS : % 0.31                             |                 | BSS : % 1.04                             |                 |
| 407.52                                        | 408.94                                   | 0.35            | 404.10                                   | -0.84           |
|                                               | 407.99                                   | 0.12            | 405.55                                   | -0.48           |
|                                               | 408.60                                   | 0.27            | 407.67                                   | 0.04            |
|                                               | 407.13                                   | -0.10           | 410.03                                   | 0.62            |
|                                               | 407.29                                   | -0.07           | 407.08                                   | -0.11           |
|                                               | 409.99                                   | 0.61            | 408.03                                   | 0.13            |
|                                               | 409.19                                   | 0.41            | 407.34                                   | -0.04           |
|                                               | $\bar{x} : 408.45 \pm 0.39$              |                 | $\bar{x} : 407.11 \pm 0.71$              |                 |
|                                               | SS : 1.04                                |                 | SS : 1.88                                |                 |
|                                               | BSS : % 0.25                             |                 | BSS : % 0.46                             |                 |

$\bar{x}$  : Ortalama  $\pm$  standart hata, SS : Standart sapma, BSS : Bağlı standart sapma ve % bağlı hata hesaplamaları Ek 2’de verilmiştir.

<sup>a</sup> Gün içi çalışmalar; üç derişim seviyesinde yedi ayrı çözelti kullanılarak aynı günde yapılmıştır.

<sup>b</sup> Günler arası çalışmalar; üç derişim seviyesinde yedi ayrı çözelti kullanılarak 7 ayrı günde yapılmıştır.

### Geri Kazanım

Zafirlukastın plazmadan analizinde geri kazanım çalışmaları üç ayrı derişimde iki şekilde yapılmıştır. Birincisinde plazmaya eklenmiş zafirlukastın pik alanının aynı derişimde hareketli fazda hazırlanan zafirlukast standardının pik alanına oranından tüketme verimi hesaplanmıştır. İkincisinde ise plazmaya eklenmiş zafirlukastın pik alanının, aynı derişimlerde plazma yerine suda tüketme işlemi uygulanarak elde edilen zafirlukastın pik alanına oranından tüketme verimi hesaplanmış ve her iki çalışmaya ait sonuçlar Tablo IV.31’de verilmiştir.

**Tablo IV.31.** Zafirlukastın plazmadan analizinde tüketme verimi (n = 6)

| <b>Eklenen<br/>Zafirlukast<br/>Derişimi<br/>(ng mL<sup>-1</sup>)</b> | <b>Standartla Karşılaştırma<br/>Sonucu Bulunan<br/>(%) Geri Kazanım</b>                      | <b>Suya Eklenerek<br/>Yapılan Tüketme<br/>Sonucu Bulunan<br/>(%) Geri Kazanım</b> |
|----------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| 72.73                                                                | $\bar{x} : 95.01 \pm 0.69$<br>SS : 1.69<br>BSS : % 1.78<br>$t_H = 9.00 > t_T = 0$ (p > 0.05) | $\bar{x} : 94.85 \pm 0.59$<br>SS : 1.45<br>BSS : % 1.53                           |
| 254.78                                                               | $\bar{x} : 98.73 \pm 0.42$<br>SS : 1.04<br>BSS : % 1.05<br>$t_H = 6.00 > t_T = 0$ (p > 0.05) | $\bar{x} : 98.42 \pm 0.53$<br>SS : 1.31<br>BSS : % 1.33                           |
| 407.52                                                               | $\bar{x} : 99.91 \pm 0.52$<br>SS : 1.28<br>BSS : % 1.28<br>$t_H = 7.00 > t_T = 0$ (p > 0.05) | $\bar{x} : 99.28 \pm 0.63$<br>SS : 1.54<br>BSS : % 1.55                           |

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

(n:6 serbestlik derecesinde  $t_t$  değeri 0’dır) ( $t_H$  : hesapla bulunan t değeri,  $t_T$  : tablodan bulunan t değeri) (Ek 2, 3 ve 5).

## V. SONUÇ ve TARTIŞMA

Bu tezde astım tedavisinde kullanılmak üzere geliştirilen ve yeni bir lökotrien reseptör anatgonisti olan zafirlukastın farmasötik preparattan ve biyolojik materyalden analizi için voltametrik yöntemlerden OSWV, OSWAdSV ve DPAdSV yöntemleri, kromatografik yöntemlerden de HPLC yöntemi geliştirilmiştir. Zafirlukastın elektrokimyasal davranışları incelenerek, geliştirilen voltametrik yöntemlerin validasyon çalışmaları yapılmış ve farmasötik preparatlara uygulanmıştır. Geliştirilip valide edilen HPLC yöntemi ise farmasötik preparatlara ve biyolojik materyale uygulanmıştır.

Tez çalışmasında kullanılan zafirlukastın saflığının araştırılması amacıyla erime noktası tayini yapılmış ve ölçülen ( $220^{\circ}\text{C}$ ) değer kaynakta bildirilen değerle ( $220^{\circ}\text{C}$ ) uyumlu bulunmuştur. Zafirlukastın çekilen IR spektrumunda (Şekil IV.1) madde yapısına uygun titreşim pikleri gözlenmiştir. Elde edilen verilere göre çalışılan standart maddenin yeterli saflıkta olduğu sonucuna varılmıştır.

Zafirlukastın çeşitli çözücülerdeki çözünürlükleri incelenmiş, su ve metanol gibi organik çözücülerde kısmen çözündüğü, asetonitril, aseton, kloroform ve tetrahidrofuranda tamamen çözündüğü görülmüştür. Sonuçta çözücü olarak asetonitril seçilmiştir. Stok zafirlukast çözeltisi asetonitrilde hazırlanmış, gerekli seyreltmeler voltametrik yöntemlerde destek elektrolit ile, HPLC yönteminde ise hareketli faz ile yapılmıştır.

### V.1. Voltametrik Yöntemlerin Optimizasyon ve Validasyon Sonuçları

#### V.1.1. Voltametrik Yöntemlerin Optimizasyon Sonuçları

Zafirlukastın voltametrik yöntemler ile analizinde daha duyarlı ve hızlı yöntemler oldukları için OSWV, OSWAdSV ve DPAdSV yöntemleri kullanılmıştır.

Zafirlukastın sıyırma analizi yöntemlerinde, 20 s'lik biriktirme süresinde maddenin elektrot yüzeyine adsorbe olduğu düşünüldüğünden bu sıyırma yöntemleri OSWAdSV ve DPAdSV yöntemleri olarak isimlendirilmiştir.

Çalışmalarda ilk olarak en uygun destek elektrolitin belirlenebilmesi amacıyla zafirlukastın belirli bir derişim aralığında ( $0.25 - 10.00 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) çeşitli tampon sistemleri denenmiş ve pik akımı değerleri ölçülmüştür. Bu çalışmalar daha hızlı bir yöntem olduğu için OSWV yöntemi ile yapılmış ve zafirlukasta ait pik akımının en yüksek olduğu ve pik şeklinin en düzgün olduğu destek elektrolit seçilmiştir (Tablo IV.1).

pH 5.00 ve 6.00'larda denenilen tampon sistemlerinde zafirlukast'a ait piklerin çok geniş olduğu ve simetrik olmadığı gözlenmiş ve küçük derişimlerde pik görülmemiştir. pH 7.00'deki tampon sistemlerinde ise pH 5.00 ve pH 6.00'ya göre küçük derişimlerin gözlenebildiği fakat piklerin çok simetrik olmadığı tespit edilmiştir. pH'sı 8.00 olan fosfat, Mc-ilvaine sitrat, BR tamponlarında zafirlukast'a ait pikin yüksek derişimlerde destek elektrolitten gelen pik ile birleştiği, bu nedenle maddeye ait pikin çok simetrik olmadığı görülmüştür. Sadece pH 8.00 borat tamponunda piklerin simetrik olduğu bulunmuştur. pH 9.00 fosfat, Mc-ilvaine sitrat, BR ve borat tamponlarında madde pikinin destek elektrolitten gelen pik ile birleştiği ve bu pH'daki tamponların analiz için uygun olmadığına karar verilmiştir. pH 10.00 Borat ve pH 11.00, pH 12.00 olan BR tamponları da denenmiş, fakat yüksek pH'ların referans elektroda zarar verebileceği göz önüne alınarak bu pH'lar analiz işlemleri için seçilmemiştir.

pH 8.00 ve pH 9.00'da denenilen tampon sistemleri ve elde edilen akımlar Tablo IV.1'de verilmiştir. Elde edilen verilere pH 8.00 ortamında elde edilen zafirlukast'a ait pik akımlarının pH 9.00 ortamındakine göre daha yüksek olduğu ve pH 8.00 borat tamponunda maddeye ait piklerin daha simetrik olduğu görülmüştür. Bu nedenle destek elektrolit olarak pH 8.00 borat tamponu seçilmiştir.

Olası adsorpsiyonu azaltmak, negatif potansiyel sınırını artırmak ve iyonik şiddeti azaltmak amacıyla pH 8.00 borat tamponuna farklı miktarlarda çeşitli tetraalkilamonyum tuzları ve KCl eklenerek, pik akımında değişiklik olup olmadığı incelenmiştir (Tablo IV.2). Sonuçta tetra tuzları eklendiğinde doğrusallık aralığının daraldığı, KCl eklendiği zaman ise zafirlukasta ait pik akımlarında, sadece pH 8.00 borat tamponu içeren ortamda elde edilen pik akımları arasında fark gözlenmemiştir. Bundan dolayı destek elektrolite herhangi bir tuz eklenmemesine karar verilmiştir.

Bu aşamaya kadar yapılan ön çalışmalar 0.20 M pH 8.00 borat tamponu ile yapılmıştır. Bundan sonraki aşamada ise borat tamponu derişiminin pik akımı üzerine etkisi araştırılmıştır (Tablo IV. 3). Elde edilen sonuçlara göre denenen farklı derişimlerdeki tamponlarda zafirlukasta ait pik akımlarında çok fazla bir farklılık olmadığı, ancak 0.10 M borat tamponunda pik akımlarının diğerlerine göre biraz daha yüksek olduğu görülmüş ve bundan sonraki çalışmalarda destek elektrolit olarak 0.10 M pH 8.00 borat tamponu kullanılmasına karar verilmiştir.

Optimum cihaz parametrelerinin belirlenebilmesi amacıyla:

OSWV yönteminde iki farklı derişimde frekans (15 - 300 Hz), adım yüksekliği (2 - 12 mV) ve puls genliği (5 - 45 mV) derişiminin zafirlukasta ait pik akımları üzerindeki etkileri araştırılmıştır (Şekil IV.3 - Şekil IV.5). Frekansın 15 - 90 Hz, adım yüksekliğinin 2 - 5 mV ve puls genliğinin 5 - 35 mV arasında pik akımı ile doğru orantılı olduğu görülmüştür. Bu nedenle pik akımı ile birlikte pik şeklinin düzgünlüğü de göz önüne alınarak optimum cihaz parametreleri olarak; frekans için 70 Hz, adım yüksekliği için 4 mV ve puls genliği için 25 mV seçilmiştir. Bu şartlarda zafirlukastın kare dalga voltamogramlarından OSWV piki -1326 mV'da gözlenmiştir (Şekil IV.6).

OSWAdSV yöntemi için ise iki farklı derişimde ve 20 s biriktirme süresinde, frekans (15 - 300 Hz), adım yüksekliği (2 - 12 mV) ve puls genliği (5 - 45 mV) derişiminin zafirlukasta ait pik akımları üzerindeki etkileri izlenmiştir (Şekil IV.7 - Şekil IV.10). Biriktirme potansiyelinin -800 ile -1000 mV arasında, frekansın

15 - 100 Hz, adım yüksekliğinin  $100.00 \text{ ng mL}^{-1}$ 'de 2 - 4 mV,  $200.00 \text{ ng mL}^{-1}$ 'de 2 - 5 mV arasında, puls genliğinin 5 - 30 mV arasında pik akımı ile doğru orantılı olduğu görülmüştür. Pik akımı ile birlikte pik şeklinin düzgünlüğü de göz önüne alınarak optimum cihaz parametreleri olarak -1000 mV'luk biriktirme potansiyelinde, frekans için 70 Hz, adım yüksekliği için 4 mV ve puls genliği için 25 mV seçilmiştir. Bu şartlarda zafirlukastın kare dalga adsorptif sıyırma voltamogramlarından OSWAdSV piki -1312 mV'da görülmüştür (Şekil IV.11).

DPAAdSV yöntemi için ise iki farklı derişimde ve 20 s biriktirme süresinde, tarama hızı (10 - 60 mV/s), ve puls genliği (20 - 100 mV) değişiminin zafirlukasta ait pik akımları üzerindeki etkileri gösterilmiştir (Şekil IV.12 - Şekil IV.14). Biriktirme potansiyelinin -850 ile -950 mV arasında, tarama hızının 10 - 30 mV/s, puls genliğinin 20 - 60 mV arasında zafirlukastın pik akımı ile doğru orantılıdır. Pik akımı ile birlikte pik şeklinin düzgünlüğü de göz önüne alınarak optimum cihaz parametreleri olarak -950 mV'luk biriktirme potansiyelinde, tarama hızı için 30 mV/s ve puls genliği için 60 mV seçilmiştir. Bu şartlarda zafirlukastın diferansiyel puls adsorptif sıyırma voltamogramlarından DPAAdSV piki -1232 mV'da gözlenmiştir (Şekil IV.15).

OSWAdSV ve DPAAdSV yöntemleri için 10, 20 ve 30 s biriktirme sürelerinde zafirlukastın kalibrasyon eğrileri çizilmiştir (Tablo IV.4). Biriktirme sürelerine bağlı olarak 20 s'de her iki yöntemin de LOQ değerlerinin daha düşük olduğu görülmüş ve bu nedenle biriktirme süresi olarak 20 s seçilmiştir.

### V.1.2. Voltametrik Yöntemlerin Validasyon Sonuçları

Stabilite çalışması için 2 ay boyunca stok zafirlukast çözeltisinden ( $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) hazırlanan  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ 'lik standart zafirlukast çözeltisinin UV spektrumları alınmıştır. Bu süre içinde zafirlukastın maksimum absorpsiyon gösterdiği 240 nm dalga boyunda bir kayma veya absorpsiyon şiddetinde bir azalma gözlenmemiştir. Böylece zafirlukastın asetonitrildeki çözeltisinin en az iki ay kararlı olduğunu söyleyebiliriz. Aynı zamanda 6 saatlik analiz süresince OSWV yönteminde



zafirlukastın pik potansiyelinde ve pik akımında, HPLC yönteminde ise zafirlukastın pik alanında ve alıkonma zamanında hiçbir değişiklik olmadığı görülmüştür.

Her üç yöntemde de kalibrasyon eğrilerinin oluşturulması ve doğrusallık aralıklarının belirlenmesi için zafirlukastın derişimine karşı gözlenen pik akımları grafiğe geçirilmiştir. OSWV yöntemi ile  $0.15 - 3.07$  ve  $3.24 - 10.16 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $2.61 \times 10^{-7} - 5.34 \times 10^{-6} \text{ M}$ ) ve ( $5.63 \times 10^{-6} - 1.77 \times 10^{-5} \text{ M}$ ), OSWAdSV yöntemi ile  $30.00 - 394.00 \text{ ng mL}^{-1}$  ( $5.22 \times 10^{-8} - 6.85 \times 10^{-7} \text{ M}$ ) ve DPAdSV yöntemi ile  $38.00 - 412.00 \text{ ng mL}^{-1}$  ( $6.61 \times 10^{-8} - 7.16 \times 10^{-7} \text{ M}$ ) aralığında doğrusal olan kalibrasyon eğrileri elde edilmiştir (Şekil IV. 16 - Şekil IV.18). Her üç yöntem için doğrusallıktan ayrılışın önem kontrolü yapılmıştır (125) (Tablo IV.5 - Tablo IV.7). OSWV yöntemi için  $F_H = 9917.50 > F_T = 4.67$ ; OSWAdSV yöntemi için  $F_H = 35455.33 > F_T = 4.45$  ve DPAdSV yöntemi için ise  $F_H = 14403.51 > F_T = 4.41$  ( $p < 0.05$ ) değerleri elde edilmiş ve bu sonuçlara göre doğrusallıktan ayrılışın önemsiz olduğu bulunmuştur. Ayrıca korrelasyon katsayılarının önem kontrolü yapılarak bu katsayıların istatistiksel olarak önemli değerler olduğu bulunmuştur (125) (OSWV yöntemi için  $t_H = 96.09 > t_T = 2.16$ , OSWAdSV yöntemi için  $t_H = 291.46 > t_T = 2.11$  ve DPAdSV yöntemi için ise  $t_H = 113.31 > t_T = 2.20$ ,  $p < 0.05$ ).

Önerilen voltametrik yöntemlere ait kalibrasyon eğrilerinin özellikleri Tablo IV.8’de verilmiştir.

Yöntemlerin doğrusallığı grafik yöntemi ve istatistiksel olarak saptanmıştır. Grafik yönteminde standart çözeltilerin olması gereken derişimlerine karşı kalibrasyon denkleminde bulunan derişimleri grafiğe geçirilmiştir. (Şekil IV.19 - Şekil IV.21). Bu grafiklerde korrelasyon katsayıları ( $r$ ), OSWV, OSWAdSV ve DPAdSV yöntemleri için sırasıyla  $0.9993$ ,  $0.9997$  ve  $0.9993$  olarak bulunmuştur. Ayrıca eğimler  $1.0000$ ,  $0.9992$ ,  $0.9996$  olarak bulunmuştur. Eğimlerin ve korrelasyon katsayılarının yaklaşık olarak  $1$  bulunması, çizilen kalibrasyon eğrilerinin bir doğru olduğunu göstermektedir (111).



Zafirlukastın her üç voltametrik yöntemde LOD değerini belirlemek için S/G oranının 3 olduğu değer seçilmiştir (114, 115). Buna göre zafirlukastın LOD değerleri OSWV yönteminde  $50.00 \text{ ng mL}^{-1}$  (BSS=% 8.44), OSWAdSV yönteminde  $5.00 \text{ ng mL}^{-1}$  (BSS=% 9.51) ve DPAdSV yönteminde  $15.00 \text{ ng mL}^{-1}$  (BSS=% 10.01) olarak bulunmuştur (n=7).

LOQ değeri, BSS için % 15 ve % bağıl hata için 20 sınırlarını geçmemek şartıyla kalibrasyon eğrisindeki en düşük derişim değeridir (109-113). LOQ değerleri sırasıyla OSWV, OSWAdSV ve DPAdSV yöntemleri için  $146.00 \text{ ng mL}^{-1}$  (BSS= % 4.57),  $30.00 \text{ ng mL}^{-1}$  (BSS = % 2.55) ve  $38.00 \text{ ng mL}^{-1}$  (BSS= % 3.35) olarak bulunmuştur (n=7).

Bulunan LOD ve LOQ değerlerinin düşük olması geliştirilen her üç voltamerik yöntemin oldukça duyarlı olduğunu göstermektedir.

Bir yöntemin kesinliği, sonuçların tekrarlanabilirliğinin göstergesidir. Hazırlanan standart numunelerin yapılan tekrarlı analizleri sonucunda saptanan BSS terimi ile tanımlanır (112, 114-116). Bir yöntemin doğruluğu; test sonuçları ile kabul edilen referans değer arasındaki uyumlu yakınlıktır. Doğruluk, ölçülen ortalama derişimler ve karşılık gelen olması gereken derişimler arasındaki % bağıl hatanın hesaplanması ile belirlenir. Kesinlik ve doğruluk için kaynaklarda kabul edilebilirlik ölçütü olarak BSS için % 15, % bağıl hata için % 20 önerilmektedir (109-113).

Zafirlukastın voltametrik yöntemlerle tayininde OSWV yöntemi için 3.77, 5.46 ve  $9.84 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ , OSWAdSV yöntemi için 48.00, 167.00 ve  $375.00 \text{ ng mL}^{-1}$  ve DPAdSV yöntemi için 57.00, 167.00 ve  $375.00 \text{ ng mL}^{-1}$  derişimlerde gün içi ve günler arası tekrarlı analizler yapılmıştır (122, 123). Gün içi çalışmalarda 3 farklı derişim seviyesinde altı tane hazırlanan standart çözeltilerin analizleri aynı gün yapılmış, elde edilen bulguların % BSS değerleri OSWV yöntemi için % 0.51-1.61, OSWAdSV yöntemi için % 0.62-2.07 ve DPAdSV yöntemi için % 0.86-2.03 olarak bulunmuştur. Günler arası çalışmalar ise; üç farklı derişim seviyesinde ardışık altı

ayrı günde hazırlanan çözeltilerin analizi ile yapılmış ve elde edilen bulguların % BSS değerleri OSWV yöntemi için % 0.62-1.85, OSWAdSV yöntemi için % 0.95-2.21 ve DPAdSV yöntemi için % 1.08-2.70 olarak bulunmuştur (Tablo IV.9 - Tablo IV.11).

Geliştirilen her üç yöntemde de gün içi ve günler arası için % 2.70'in altında kalan BSS değerlerinin elde edilmiş olması yöntemlerin kesinliğini, % bağıl hata değerlerinin 4.73'den az olması ise yöntemlerin doğruluğunu göstermektedir. Kesinlik ve doğruluk için kaynaklarda bildirilen kabul edilebilirlik ölçütlerinden çok daha düşük değerler elde edilmiştir.

SS, dağılımdaki her bir değerın ortalamaya uzaklığını, diğer bir deyişle dağılımın ne yaygınlıkta olduğunu gösteren bir ölçüdür. SS büyüdükçe dağılım yaygınlaşır (125). Bu tanım dikkate alınırsa her üç yöntem için de elde edilen gün içi ve günler arası çalışma sonuçları, tekrarlanabilirliğin yüksek olduğunu göstermektedir (Tablo IV.9 - Tablo IV.11).

Geliştirilen yöntemlerin tekrarlanabilirliğinin tespiti için; OSWV yöntemi için  $6.25 \mu\text{g mL}^{-1}$ 'de, OSWAdSV ve DPAdSV yöntemleri için  $130.00 \text{ ng mL}^{-1}$ 'de hazırlanan 12 ayrı çözeltinin tekrarlı analizleri yapılmış ve sonuçlar Tablo IV.12'de verilmiştir (118-124). % BSS değerlerinin % 1.74'den düşük olması üç yöntemde tekrarlanabilir olduğunu göstermektedir.

Sağlamlık çalışmaları için optimum koşullarda planlı ve kasıtlı olarak küçük değişiklikler yapılarak analiz sonuçlarına etkisi incelenmiştir (118-124). Bu çalışmalar OSWV yöntemi için  $6.25 \mu\text{g mL}^{-1}$ 'de, OSWAdSV ve DPAdSV yöntemleri için  $130.00 \text{ ng mL}^{-1}$ 'de gerçekleştirilmiştir. Her bir değişiklikte yapılan analiz sonuçları optimum koşullarda bulunan analiz sonuçları ile istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Tüm karşılaştırmalarda  $t_H$  değeri  $t_T$  değerinden büyük olduğu için analizler arasında fark olmadığı sonucuna varılmıştır (Tablo IV.13 - Tablo IV.15).

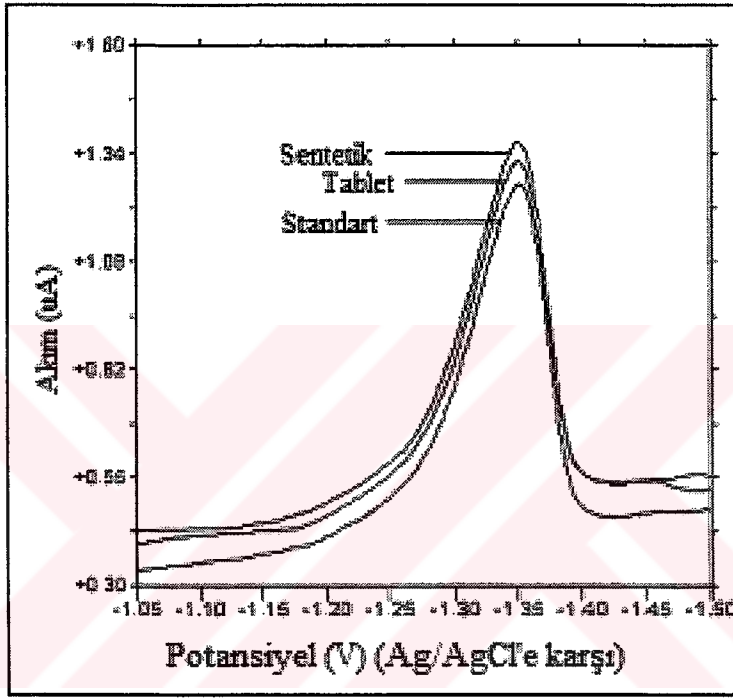
Her üç yöntemde zafirlukastın analizinde farklı analizci etkisi araştırılmış ve bulunan değerler istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır (118-124) Bu çalışmalar OSWV yöntemi için  $6.25 \mu\text{g mL}^{-1}$ 'de, OSWAdSV ve DPAdSV yöntemleri için  $130.00 \text{ ng mL}^{-1}$ 'de gerçekleştirilmiştir. Elde edilen bulgular arasında istatistiksel olarak fark bulunmaması yöntemlerin tutarlı olduğunu göstermektedir (OSWV yöntemi için  $t_H = 7.00 > t_T = 2.00$ , OSWAdSV yöntemi için  $t_H = 6.00 > t_T = 2.00$  ve DPAdSV yöntemi için ise  $t_H = 6.00 > t_T = 2.00$ ;  $p > 0.05$ ) (Tablo IV.16).

Cihaz tekrarlanabilirliği ise OSWV yönteminde  $6.25 \mu\text{g mL}^{-1}$ , OSWAdSV ve DPAdSV yöntemlerinde  $130.00 \text{ ng mL}^{-1}$  zafirlukast içeren çözeltinin tekrarlı analizleri ile gerçekleştirilmiştir (118-124). Zafirlukastın OSWV, OSWAdSV ve DPAdSV yöntemleri için pik akımları sırasıyla  $843.44 \pm 0.54$ ,  $183.66 \pm 0.29$ ,  $10.62 \pm 0.03$  pik potansiyelleri ise sırasıyla  $-1327.43 \pm 0.57$ ,  $-1311.43 \pm 0.57$  ve  $-1233.71 \pm 1.11$  olarak hesaplanmıştır.

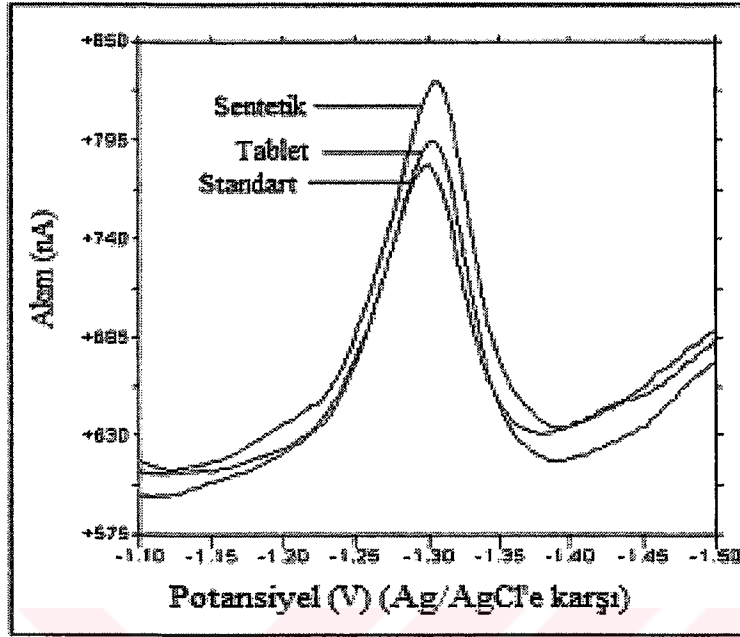
Yöntemlerin özgünlüğü, bölüm III.8'de anlatıldığı gibi hazırlanan ve 20 mg zafirlukast içeren sentetik preparatların geliştirilen her üç voltametrik yöntemle analizi yapılarak değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler Tablo IV.17'de verilmiştir. Bu analizlerde standart zafirlukast çözeltisinde olduğu gibi OSWV yönteminde  $-1326 \text{ mV}$ 'da, OSWAdSV yönteminde  $-1312 \text{ mV}$ 'da ve DPAdSV yöntemi için  $-1232 \text{ mV}$ 'da zafirlukasta ait pikler elde edilmiştir.

Ayrıca her üç yöntem için yöntemin özgünlüğü, standart ekleme yönteminin tablet çözeltilerine uygulanması ile gösterilmiştir. Standart ekleme yöntemi ile elde edilen kalibrasyon eğrileri, OSWV yöntemi için  $y = 100.92 x + 1081.20$ , OSWAdSV yöntemi için  $y = 1606.4 x + 220.33$  ve DPAdSV yöntemi için  $y = 0.0758 x + 13.204$  şeklindedir. Bu denklemlerin eğimlerinin oluşturulan kalibrasyon eğrilerinin eğimleri ile aynı olması matriks bileşenlerinin girişim yapmadığını göstermiştir. Aynı derişimlerde zafirlukast içeren standart, sentetik ve farmasötik preparata ait voltamogramlar (Şekil V.1 - Şekil V.3) incelendiğinde seçilen koşullarda girişim olmadığı saptanmıştır. Böylece yöntemlerin seçiciliği kanıtlanmıştır.

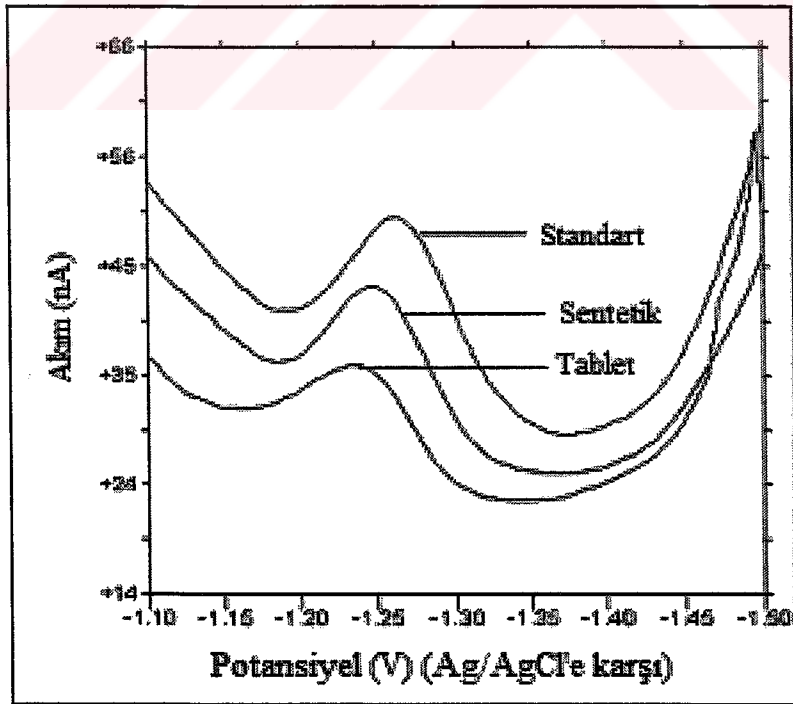
Geri kazanırlılık için yapılan diğer bir çalışmada 20 mg zafirlukast içeren sentetik tablet preparatından geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. Geri kazanım değerleri; OSWV, OSWAdSV ve DPAdSV yöntemleri için sırasıyla % 99.45 - 101.00, % 99.60 - 101.80 ve % 98.60 - 101.00 olarak hesaplanmıştır (Tablo IV.17) (n=7).



**Şekil V.1.**  $6.25 \mu\text{g mL}^{-1}$  derişiminde standart, tablet ve sentetik çözeltisine ait OSWV voltamogramları



Şekil V.2.  $130.00 \text{ ng mL}^{-1}$  derişiminde standart, tablet ve sentetik çözeltilisine ait OSWAdSV voltamogramları



Şekil V.3.  $130.00 \text{ ng mL}^{-1}$  derişiminde standart, tablet ve sentetik çözeltilisine ait DPAdSV voltamogramları

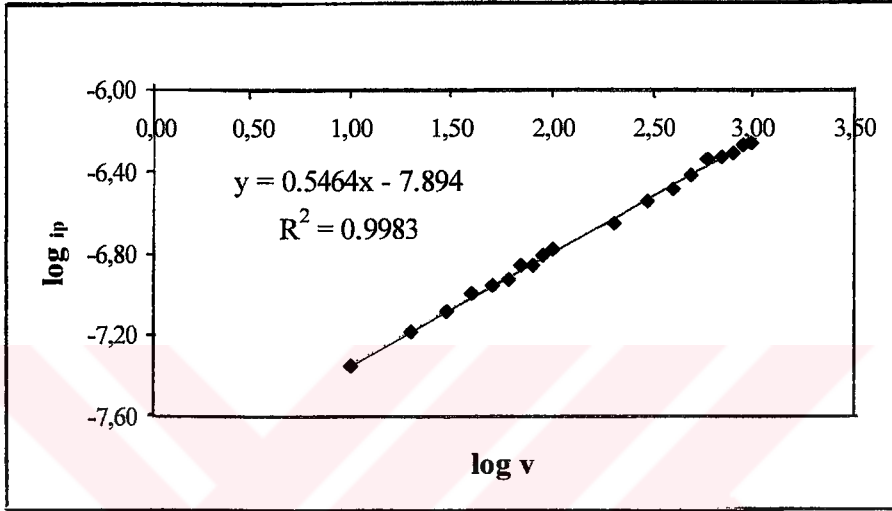
Geliştirilen voltametrik yöntemlerin, geçerli (valide) olduğu tüm validasyon parametrelerinin kabul edilebilir sınırlarda bulunması zafirlukastın farmasötik preparatlardan analizi için uygulanabilir olduğunu göstermektedir. Geliştirilen yöntemin geçerli olabilmesi için diğer bir yol da yöntemin prepatlara uygulanması ile elde edilen sonuçların kaynaklarda geçerli olan başka bir yöntem ile karşılaştırılarak aralarında istatistiksel olarak fark bulunmadığının gösterilmesidir. Bu nedenle geliştirilen yöntemler Türkiye piyasalarında bulunan ve 20 mg zafirlukast/tablet içeren Astra Zeneca firmasına ait Accolate® tabletletdeki zafirlukastın miktar tayini için uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar karşılaştırma yöntemi (10) ile elde edilen analiz sonuçları ile Wilcoxon Eşleştirilmiş İki Örnek Testi kullanılarak istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır (125). Sonuçta geliştirilen her bir yöntem ile karşılaştırma yöntemi arasında fark olmadığı bulunmuştur. (OSWV yöntemi için  $t_H = 9.00 > t_T = 2.00$ , OSWAdSV yöntemi için  $t_H = 15.00 > t_T = 2.00$  ve DPAdSV yöntemi için ise  $t_H = 7.00 > t_T = 2.00$ ,  $p > 0.05$ ). Ayrıca her üç voltametrik yöntem de kendi aralarında tek yönlü varyans analizi uygulanarak birbirleriyle karşılaştırılmış ve aralarında fark olmadığı bulunmuştur ( $F_H = 2.67 < F_T = 3.89$ ,  $p > 0.05$ ) (Tablo IV.18).

## V.2. Dönüşümlü Voltametri (CV) Sonuçları

$10.00 \mu\text{g mL}^{-1}$  derişiminde zafirlukastın dönüşümlü voltamogramları Şekil IV.22'de verilmiştir. Tarama hızı arttıkça zafirlukastın pik akımı da artmaktadır. Yaklaşık -1450 mV civarında görülen ikinci pikin akımının ise derişimle artmadığı görülmüştür. Bu nedenle bu pikin destek elektrolit içindeki safsızlıktan geldiği düşünülmektedir. Tarama hızı artışı ile zafirlukastın pik potansiyelinde değişiklik olmamıştır.

Akımın karakterini belirlemek amacıyla tarama hızının logaritmasına ( $\log v$ ) karşı pik akımının logaritması ( $\log i_p$ ) grafikleri çizilmiştir. (Şekil V.4). Bu grafiğin eğiminin 0.5'e yakın olması akımın difüzyon kontrollü olduğunu göstermektedir (126). Ancak zafirlukastın sıyırma analizi yöntemlerinde (OSWAdSV ve DPAdSV) 20 s'lik biriktirme süresinde madde elektrot yüzeyine adsorbe olmaktadır. Ancak

çeşitli tarama hızlarında zafirlukastın dönüşümlü voltamogramları alınırken maddenin elektrot yüzeyine adsorbe olamadığı ve adsorbsiyon hızının çok düşük olduğu düşünülmektedir. Çünkü analiz çok kısa sürede gerçekleştirilmekte ve bu sürenin, maddenin elektrot yüzeyine adsorbe olması için yeterli olmamaktadır.



Şekil V.4. Katodik pik için elde edilen  $\log i_p$ 'ye karşı  $\log v$  grafiği

Tersinirlik testleri CV verileri ile yapılmıştır ve aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir.

1.  $i_p$ ,  $v^{1/2}$  ile orantılıdır ve  $i_p - v^{1/2}$  grafiği orijinden geçmektedir.
2.  $E_p^k - E_p^a = 59 / n$  koşulu sağlanmaktadır.
3.  $E_p$ , tarama hızı ile değişmemektedir.
4. Tarama hızı arttıkça pik şekli değişmemektedir.
5.  $i_p / v^{1/2}$ , tarama hızı ile değişmemektedir.

Elde edilen bu sonuçlara göre zafirlukastın indirgenme tepkimesinin tersinirliğe yakın olduğu sonucuna varılmıştır.

### V.3. Doğrusal Taramalı Voltametri ve Kronoamperometri Sonuçları

Camsı karbon elektrot kullanılarak  $1 \times 10^{-3}$  M derişiminde zafirlukast ve potasyum ferrosiyandırın doğrusal taramalı voltamogramları alınmıştır.

Voltamogramlardan standart olarak kullanılan potasyum ferrosiyanür ve zafirlukastın sınır akımları bulunmuştur (Şekil IV.23, Şekil IV.24).

$1 \times 10^{-3}$  M derişiminde zafirlukastın ve potasyum ferrosiyanürün asılı duran cıva elektrotta kronoamperometrik voltamogramları alınarak Cottrell eğimleri bulunmuştur. Potasyum ferrosiyanürün difüzyon katsayısı ve aktarılan elektron sayısı bellidir, bu nedenle zafirlukastın difüzyon katsayısı ve elektron sayısını bulmak için standart madde olarak kullanılmıştır.

Ayrıca elektrot tepkimelerinde aktarılan elektron sayısı Baranski ve arkadaşlarının geliştirdiği bir yöntemle göre de hesaplanmıştır (127). Bu yöntemde zafirlukastın ve potasyum ferrosiyanürün ultramikro elektrotta sınır akımları ölçülerek aşağıdaki eşitlikler yardımıyla zafirlukastın aktarılan elektron sayısı ve difüzyon katsayısı bulunmuştur.

$$n = \frac{n_s S_A^2 i_s C_s}{S_s^2 i_A C_A}$$

$$D_A = \frac{D_s S_s^2 i_A^2}{S_A^2 i_s^2}$$

$D_A$  = Çalışılan maddenin difüzyon katsayısı ( $\text{cm}^2/\text{s}$ )

$n$  = Çalışılan maddenin aktarılan elektron sayısı

$n_s$  = Standart maddenin elektron sayısı (potasyum ferrosiyanür için 1)

$S_A$  = Çalışılan maddenin Cottrell eğimi

$S_s$  = Standart maddenin Cottrell eğimi

$i_A$  = Çalışılan maddenin sınır akımı (A)

$i_s$  = Standart maddenin sınır akımı (A)

$C_A$  = Çalışılan maddenin konsantrasyonu ( $\text{mol}/\text{cm}^3$ )

$C_s$  = Standart maddenin konsantrasyonu ( $\text{mol}/\text{cm}^3$ )



Kronoamperometrik ve doğrusal taramalı voltametri deneyleri 6 kez tekrar edilmiş ve her bir sonucun ortalaması alınarak zafirlukast için aktarılan elektron sayısı ve difüzyon katsayısı hesaplanmıştır. Sonuçlar hesaplanırken potasyum ferrosiyanür için aktarılan elektron sayısı olarak 1 ve difüzyon katsayısı  $0.65 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$  (sulu ortamda) olarak alınmıştır (128). Zafirlukast için aktarılan elektron sayısı 2 olarak bulunmuştur. Difüzyon katsayısı ise Cottrell eşitliğinden (Eşitlik II.10) ve Baranski yöntemi ile hesaplanmıştır (Tablo V.1).

**Tablo V.1.** Zafirlukast için hesaplanan elektron sayısı ve difüzyon katsayıları ( $n = 6$ )

|                                                                                |                                                |
|--------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| Hesapla Bulunan Aktarılan Elektron Sayısı                                      | $1.84 \pm 0.15$                                |
| Cottrell Eşitliği ile Hesaplanan Difüzyon Katsayısı ( $\text{cm}^2/\text{s}$ ) | $1.85 \times 10^{-6} \pm 1.51 \times 10^{-8}$  |
| Potasyum Ferrosiyanürün Sınır Akımları                                         | $4.91 \times 10^{-9} \pm 3.40 \times 10^{-12}$ |
| Zafirlukastın Sınır Akımları                                                   | $2.01 \times 10^{-9} \pm 3.02 \times 10^{-12}$ |
| Baranski Yöntemi ile Hesaplanan Difüzyon Katsayısı ( $\text{cm}^2/\text{s}$ )  | $1.75 \times 10^{-6} \pm 5.75 \times 10^{-8}$  |

### Olası Mekanizma Önerisi

Zafirlukastın elektrokimyasal olarak indirgenmesiyle ilgili kaynaklarda bir bulguya rastlanmamıştır. Zafirlukast molekülü sülfonil ( $\text{SO}_2$ ) grubu içermektedir. Muhtemelen indirgenme mekanizmasının, 2 elektron transferi ile benzen molekülüne bağlı sülfonil grubundan olabileceği düşünülmektedir. Aktarılan elektron sayısı doğrusal taramalı voltametri yöntemi ile ultramikro elektrot kullanılarak 2 olarak bulunmuştur (129 - 132).

#### **V.4. HPLC Yönteminin Optimizasyon ve Validasyon Sonuçları**

##### **V.4.1. Farmasötik Preparattan Analiz Yönteminin Optimizasyon Sonuçları**

Zafirlukastın HPLC ile analizinde UV dedektör kullanılmıştır. Çalışma dalga boyunun belirlenmesi amacıyla zafirlukastın UV spektrumu çekilmiştir. Zafirlukastın maksimum dalga boyu 240 nm’de gözlemlendiği için HPLC analizlerinde de bu dalga boyu kullanılmıştır (Şekil IV.2).

Ters-faz sıvı kromatografi tekniğinde sabit faz apolar, hareketli faz ise polardır. Bu kromatografi, normal fazın tam tersi bir uygulama olduğu için ters faz olarak adlandırılır. Ters-faz ayırım tekniği günümüzde en çok kullanılan ayırım tekniği olup farklı sayıda, tipte veya yerleşimde alkil fonksiyonel gruplu karışımların ayırımı için tercih edilmektedir. HPLC’de ayırımların gerçekleştirilmesi için en önemli parametre uygun hareketli fazın saptanmasıdır. Bu yüzden uygun çözücü seçimi, içeriği (hareketli fazın polaritesi) ve hazırlanması önem kazanır. Ters-faz hareketli fazları genellikle su ve organik çözücü karışımlarından oluşmaktadır. Ters-faz kromatografisinde kullanılan zayıf çözücü sudur ve en polar çözücüdür. Kuvvetli çözücü olarak da en çok metanol, asetonitril ve tetrahidrofuran kullanılmaktadır. Seçiciliği değiştirmek için çözücü türünü değiştirirken, çözücünün gücüne de dikkat edilmelidir. Hareketli faz çözeltilerine, ayırım kalitesini artırmak amacı ile ilave edilen maddeler modifier olarak adlandırılır. Ters-faz tekniğinde genellikle modifier olarak tamponlar kullanılmaktadır. Bu tamponlar iyonik maddelerin bulunduğu ortamda iyonlaşmayı engellemek için kullanılır.

Zafirlukast, apolar yapıda bir bileşik olması kolonda uzun süre alıkonacağı ve kromatografik piklerinde kuyruklanma olabileceği nedeni ile ters-faz yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile analizi yapılmıştır (133,134).

Zafirlukastın ters-faz HPLC yöntemi ile analizinde optimizasyon çalışmalarında zafirlukast derişimi 500.00 ng mL<sup>-1</sup>’dir. İlk olarak uygun tampon

seçilmiştir. Bunun için pH'sı 3.00 olan 0.01 M, asetat, fosfat sitrat tamponları ve asetonitril karışımından (30:70, h/h) oluşan hareketli fazlar denenmiştir. Sonuçta zafirlukastın pik alanı, asetat tamponu ile daha yüksek bulunmuştur ve asetat tamponu ile çalışılmasına karar verilmiştir.

Hareketli faz bileşimindeki organik çözücü tipi ve oranının, zafirlukast ayırımına etkisi hareketli faz bileşimine değişik oranlarda asetonitril veya metanol organik çözücüleri ilave edilmesi ile incelenmiştir. Asetonitril (polarite indeksi 5.1) metanolden (polarite indeksi 5.8) daha apolar bir çözücüdür. Kuvvetli çözücü olarak kullanılan metanol ve asetonitril polarite indeksleri arasında her ne kadar küçük bir fark olsa da çözücülerin birbirlerine göre güçleri ayırcılıkta önemlidir. Ters-faz sıvı kromatografisinin ayırım gücü, hareketli fazın polaritesinin azalmasına bağlı olarak artar. Bunun için metanol:asetat tamponu ve asetonitril:asetat tamponu ikili sistemleri kullanılmıştır. Bu amaçla pH'sı 3.00 olan 0.01 M asetat tamponu ve değişik oranlarda metanol veya asetonitril eklenerek hareketli fazlar hazırlamıştır. Metanol ve asetat tamponundan oluşan hareketli faz sisteminin kullanıldığı analizlerde alıkonma zamanının arttığı ve pik simetri oranının kabul edilebilir sınırlar dışında olduğu görülmüştür. Bu nedenlerle, düşük polariteli asetonitril zafirlukastın kromatografik ayırımındaki hareketli fazda kullanılacak organik çözücü olarak seçilmiştir.

Hareketli fazdaki asetonitril oranının zafirlukastın ayırımına etkisinin incelenmesi için pH'sı 3.00 olan asetat tamponuna hacimce % 60, 65, 70 ve 75 oranlarında asetonitril eklenmiştir. Asetonitril oranı arttıkça zafirlukastın kapasite faktörü değeri ve alıkonma zamanı azaldığı (Şekil IV.24), pik simetri oranının ise önce azaldığı ve sonra arttığı gözlenmiştir (Şekil IV.25). İyi bir ayırım için PSO'nun % 70 ile % 100 arasında olması istendiğinden (104 - 106) hareketli fazda hacimce % 70 oranında asetonitril olması durumunda kapasite faktörü değeri 1.76 ve PSO % 100 olarak bulunmuş ve bu oran kullanılmıştır.

Hareketli faz pH'sının zafirlukastın ayırımına etkisi olacağından hareketli fazın pH'sı da önemlidir. Düşük pH'larda protonlanmış olan formlar, sabit faz ile

etkileşmekte, alıkonma artmakta, yüksek pH'larda tamamen iyonlaşma olduğu için kolon içindeki sabit faz tarafından tutulamamaktadır. Hareketli fazın pH'sının belirlenmesi için asetat tamponunun pH'sı 3.0, 3.5, 4.0 ve 4.5 olarak değiştirilmiştir. Zafirlukastın kapasite faktörü değeri ve alıkonma zamanı pH'nın artması ile azalmış, buna karşılık PSO % 100 - 128.57 arasında değişmiştir (Şekil IV.26 - Şekil IV.27). Kolondaki açık silanol uçlarının önemli kısmı, pH'sı 3.00 olan hareketli fazda non-iyonize formdadır, böylece zafirlukastın silanol uçları ile etkileşmesi engellenmiş ve PSO en yüksek değere ulaşmıştır (135, 136). Buna göre hareketli fazın pH'sı (kapasite faktörü değeri 1.84 ve PSO % 100) pH 3.00 olarak seçilmiştir.

Hareketli fazın tampon derişiminin etkisinin incelenmesi için pH'sı 3.00 olan 0.01 M, 0.05 M ve 0.10 M asetat tamponu:asetonitril (30:70, h/h) çözeltileri hareketli faz olarak denemiştir. Sonuçta kapasite faktörü ve alıkonma zamanı arasında fark bulunmamıştır. Bundan sonraki çalışmalarda da 0.01 M asetat tamponu kullanılmıştır.

Hareketli faz akış hızının zafirlukast ayırımına etkisinin incelenmesinde akış hızı 0.5, 0.8 ve 1.0 ml/dk olarak değiştirilmiştir. Akış hızının artmasıyla zafirlukastın kapasite faktörünün arttığı, alıkonma zamanının azaldığı ve PSO oranının azaldığı gözlenmiştir (Şekil IV.28 - Şekil IV.29). Akış hızı 0.8 mL/dk olduğunda kapasite faktörü değeri 1.76 ve PSO'nun % 100 olduğu bulunmuştur. Bu nedenle çalışmalarda 0.8 ml/dk akış hızında çalışılmıştır.

Kolonlarda kullanılan sabit fazlar, dolgu maddesine bağlı farklı fonksiyonel gruplardan oluşmaktadır. Aynı fonksiyonel gruplara sahip olmasına rağmen üreticileri farklı olan dolgu maddelerinin seçicilikleri de farklı olmaktadır. Bu farklılık dolgu maddelerinin yüzeylerine, bağ tiplerine, dolgu maddelerinin farklı olması gibi özelliklere bağlıdır. Dolgu maddesi olarak ters-faz sıvı kromatografisinde çoğunlukla silikajel kullanılmaktadır. Bu dolgu maddeleri değişik şekil, partikül ve por çapına sahiptirler. Silika bazlı dolgu maddesi içeren kolonlarda kullanılan hareketli fazın pH'sı 7.5'u aşmamalıdır. Aksi takdirde silika bazlı dolgu maddesi çözünmektedir. Zafirlukastın HPLC ile analizinde Nucleosil C<sub>18</sub> (5 µm, 250 x 4.6

mm, i.ç.) çelik kolon kullanılmıştır. Bu kolon, silikajel üzerine bağlanmış ( $-C_{18}H_{17}$ ) gruplarına sahip ve  $C_{18}$  olarak isimlendirilen dolgu maddesi içermektedir.

Zafirlukastın farmasötik preparattan tayini için HPLC-UV dedektörü kullanılarak Nucleosil  $C_{18}$  (5  $\mu$ m, 250 x 4.6 mm, i.ç.) kolonda, % 70 oranında asetonitril içeren ve pH'sı 3.00 olan 0.01 M asetat tamponundan oluşan hareketli faz sistemi ile 0.8 ml/dk akış hızında ve 240 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. Çalışmalar oda sıcaklığında (25 °C) yapılmıştır.

Kromatografik çalışmalarda doğruluk ve kesinliğin sağlanabilmesi için iç standart kullanımı gerekmektedir. Bu nedenle piribedil, atenolol, labetolol, nadolol, ketorolak ve diflunisalin belirlenen kromatografik koşullardaki davranışları ve alıkonma zamanları incelenmiştir. Piribedil, zafirlukastın piki ile girişim yapmayacak uygun alıkonma zamanına sahip olduğu için ve daha sonraki analizlerde boş plazmadan gelen pikler ile örtüşmediği için iç standart olarak seçilmiştir.

Zafirlukastın analizi için belirlenen bu şartlarda; zafirlukastın alıkonma zamanı 5.70 dk olarak bulunmuştur. İç standart olarak kullanılan piribedilin alıkonma zamanı ise 3.90 dk'dır (Şekil IV.30).

#### **V.4.2. Farmasötik Preparattan Analiz Yönteminin Validasyon Sonuçları**

Zafirlukastın HPLC yöntemi ile analizinde zafirlukast derişimi, zafirlukast pik alanının piribedil alanına oranının grafiğe geçirilmesi sonucu 25.00 - 900.00 ng mL<sup>-1</sup> aralığında doğrusal kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir (Piribedil derişimi 200.00 ng mL<sup>-1</sup>'dir) (Şekil IV. 31). Bu yöntem için doğrusallıktan ayrılışın önem kontrolü yapılmıştır (125) (Tablo IV.19). Sonuçta  $F_H = 90465.38 > F_T = 4.84$ ,  $p < 0.05$ ) değerleri elde edilmiş ve bu sonuçlara göre doğrusallıktan ayrılışın önemsiz olduğuna karar verilmiştir. Ayrıca korrelasyon katsayısının önem kontrolü yapılarak bu katsayının istatistiksel olarak önemli bir değer olduğu bulunmuştur (125) ( $t_H = 331.64 > t_T = 2.20$ ,  $p < 0.05$ ).

Yöntemin doğrusalılığı grafik yöntemi ve istatistiksel olarak saptanmıştır. Grafik yönteminde standart çözeltilerin olması gereken derişimlerine karşı kalibrasyon denkleminde bulunan derişimleri grafiğe geçirilmiştir. (Şekil IV.32). Tanımlayıcılık katsayısı ( $r^2$ ), 0.9999 olarak bulunmuştur. Bu değer, çizilen kalibrasyon eğrisinin bir doğru olduğunu göstermektedir.

Zafirlukastın HPLC yöntemi ile analizinde LOD değeri, ( $S/G = 3$ ) 10.00 ng mL<sup>-1</sup> (BSS = % 9.50) olarak bulunmuştur (n = 7).

LOQ değeri, kalibrasyon eğrisindeki en düşük derişim değeri olarak alınmıştır ve bu değer 25.00 ng mL<sup>-1</sup> (BSS= % 8.50) olarak bulunmuştur (n = 7).

Zafirlukastın HPLC yöntemi ile tayininde kesinlik ve doğruluğun bulunması için 40.00, 400.00 ve 800.00 ng mL<sup>-1</sup> derişimlerde gün içi ve günler arası tekrarlı analizler yapılmıştır. Gün içi çalışmalarda 3 farklı derişim seviyesinde yedi tane hazırlanan standart çözeltilerin analizleri aynı gün yapılmış, elde edilen bulguların % BSS değerleri % 0.12 - 2.49 olarak bulunmuştur. Günler arası çalışmalar ise; üç farklı derişim seviyesinde ardışık yedi ayrı günde hazırlanan çözeltilerin analiz edilmesi ile yapılmış ve elde edilen bulguların % BSS değerleri % 0.23 - 3.58 olarak bulunmuştur (Tablo IV.21).

Gün içi ve günler arası için % 3.58'in altında kalan % BSS değerlerinin elde edilmiş olması yöntemin kesinliğini, % bağıl hata değerlerinin 4.53'den az olması ise yöntemin doğruluğunu göstermektedir. Kesinlik ve doğruluk için kaynaklarda bildirilen kabul edilebilirlik ölçütlerinden çok daha düşük değerler elde edilmiştir.

Bu yöntemde elde edilen gün içi ve günler arası çalışma sonuçlarına göre standart sapma değerinin 1.86'dan düşük olması bu yöntemin tekrarlanabilirliğinin yüksek olduğunu göstermektedir (Tablo IV.21).

Geliştirilen yöntemin tekrarlanabilirliğinin tespiti için; 400.00 ng mL<sup>-1</sup>'de hazırlanan 12 ayrı çözeltinin tekrarlı analizleri yapılmıştır. % bağıl standart sapma

değerinin % 0.47 olarak bulunması bu yöntemin tekrarlanabilir olduğunu göstermektedir (Tablo IV.22)

Sağlamlık çalışmaları için optimum koşullarda hareketli fazın pH'sı, akış hızı ve içeriğinde planlı ve kasıtlı küçük değişiklikler yapılarak analiz sonuçlarına etkisi incelenmiştir. Bu çalışmalar  $400.00 \text{ ng mL}^{-1}$ 'de gerçekleştirilmiştir. Her bir değişiklikte yapılan analiz sonuçları optimum koşullarda bulunan analiz sonuçları ile istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Tüm karşılaştırmalarda  $t_H$  değeri  $t_T$  değerinden büyük olduğu için analizler arasında fark olmadığı sonucuna varılmıştır (Tablo IV.23).

Zafirlukastın HPLC yöntemi ile analizinde farklı analizci etkisi araştırılmış ve bulunan değerler istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır (118-125). Bu çalışmalarda  $400.00 \text{ ng mL}^{-1}$ 'de gerçekleştirilmiştir. Elde edilen bulgular arasında istatistiksel olarak fark bulunmaması yöntemlerin tutarlı olduğunu göstermektedir ( $t_H = 12.00 > t_T = 2.00$ ;  $p > 0.05$ ) (Tablo IV.24).

Enjeksiyon tekrarlanabilirliği,  $400.00 \text{ ng mL}^{-1}$  zafirlukast ve  $200.00 \text{ ng mL}^{-1}$  piribedil içeren çözeltinin tekrarlı analizleri ile gerçekleştirilmiştir. Zafirlukastın ve iç standart için pik alanları sırasıyla  $40247.33 \pm 3.62$  ve  $27611.42 \pm 3.80$ , alıkonma zamanları ise  $5.72 \pm 0.40$  ve  $3.93 \pm 0.70$  olarak hesaplanmıştır.

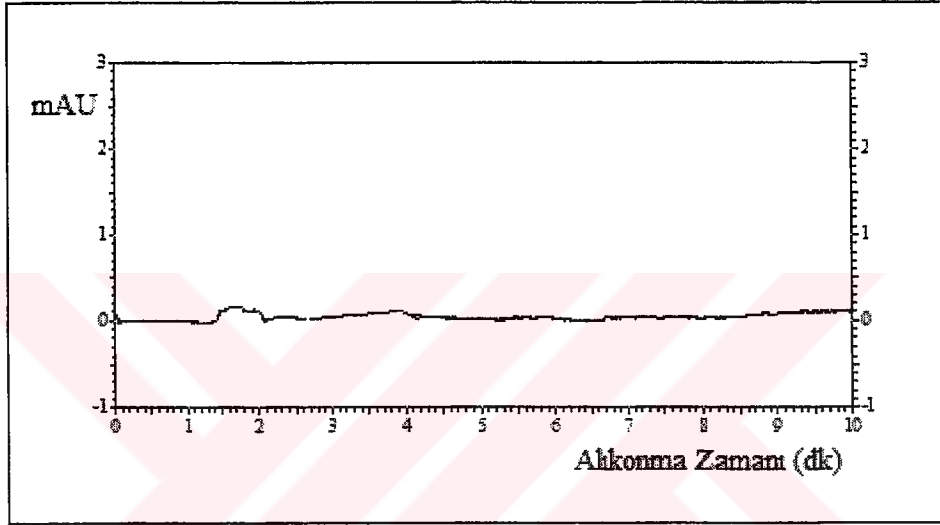
Yöntemin özgünlüğü çalışmaları, bölüm III.8'de anlatıldığı gibi hazırlanan ve 20 mg zafirlukast içeren sentetik preparatların analizi ile yapılmıştır (Tablo IV.25). Bu analizlerde standart zafirlukast çözeltisinde olduğu gibi 3.9 dk'da piribedil ve 5.7 dk'da ise zafirlukasta ait pikler elde edilmiştir.

Ayrıca yöntemin özgünlüğü, standart ekleme yönteminin tablet çözeltilerine uygulanması ile gösterilmiştir. Standart ekleme yöntemi ile elde edilen kalibrasyon eğrisi,  $y = 0.0037 x + 0.3798$  şeklindedir. Bu denklemin eğiminin oluşturulan kalibrasyon eğrisinin eğimi ile aynı olması ve zafirlukast ve iç standartdan başka pik gözlenmemesi, matriks bileşenlerinin girişim yapmadığını göstermiştir. Hareketli faz, standart, zafirlukast içermeyen sentetik, zafirlukast içeren sentetik, ve zafirlukast

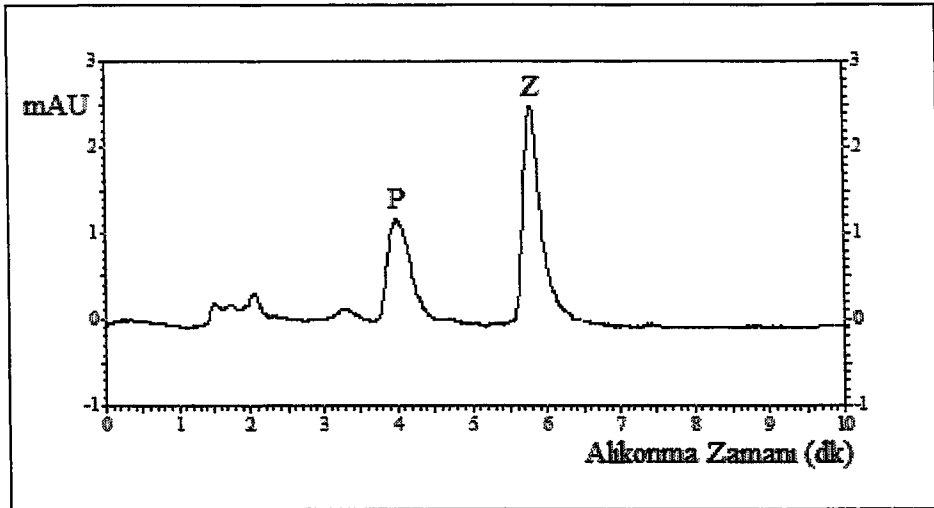


içeren farmasötik preparata ait kromatogramlar (Şekil V.5 - Şekil V.9) incelendiğinde seçilen koşullarda girişim olmadığı saptanmıştır.

Böylece seçiciliği kanıtlanmış olan HPLC yöntemi ile ayrıca 20 mg zafirlukast içeren sentetik tablet preparatından geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. % geri kazanım değerleri % 99.84 - 100.49 olarak hesaplanmıştır (Tablo IV. 25).

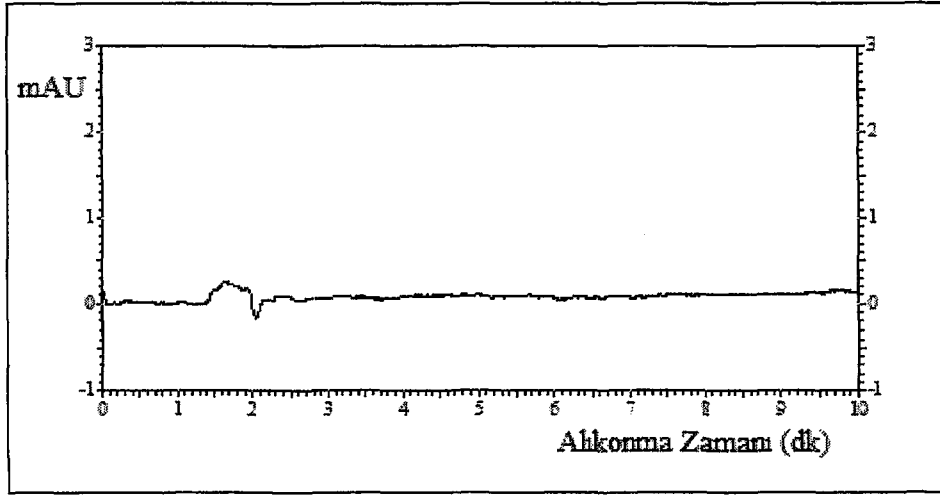


Şekil V.5. Hareketli faz enjeksiyonuna ait kromatogram

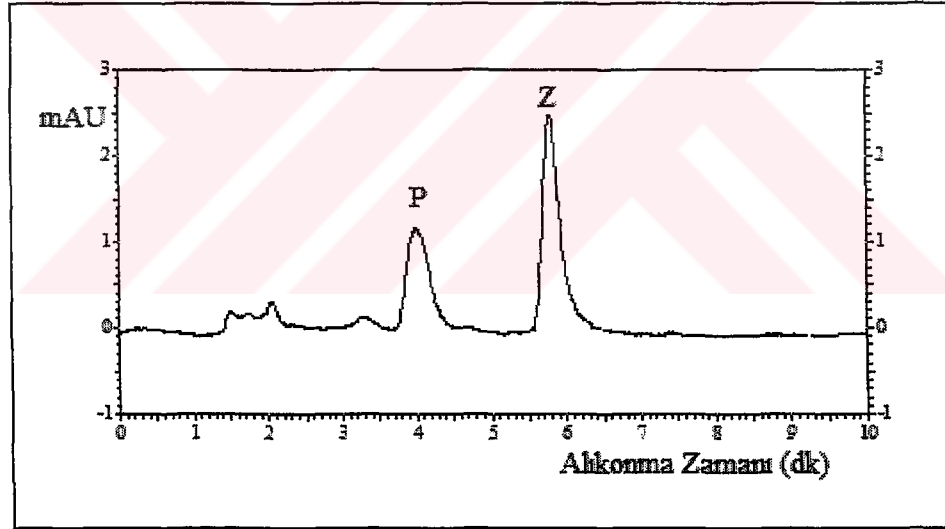


Şekil V.6. 400 ng mL<sup>-1</sup> zafirlukast çözeltisine ait kromatogram  
(P; Piribedil, Z; Zafirlukast)

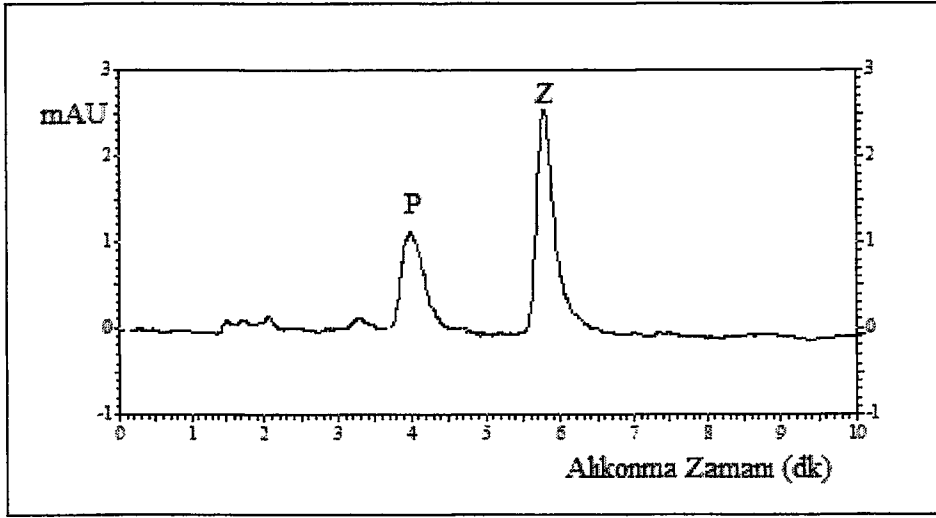




Şekil V.7. Zafirlukast içermeyen sentetik preparata ait kromatogram



Şekil V.8. 400 ng mL<sup>-1</sup> zafirlukast içeren sentetik preparat çözeltisine ait kromatogram (P; Piribedil, Z; Zafirlukast)



**Şekil V.9.** 400 ng mL<sup>-1</sup> zafirlukast içeren tablet çözeltisine ait kromatogram  
(P; Piribedil, Z; Zafirlukast)

Geliştirilen HPLC yönteminin, geçerli (valide) olduğu, tüm validasyon parametrelerinin kabul edilebilir sınırlarda bulunması zafirlukastın farmasötik preparatlardan ve biyolojik materyallerden analizi için uygulanabilir olduğunu göstermektedir. Geliştirilen yöntemin geçerli olabilmesi için diğer bir yol da yöntemin prepatlara uygulanması ile elde edilen sonuçların kaynaklarda geçerli olan başka bir yöntem ile karşılaştırılarak aralarında istatistiksel olarak fark bulunmadığının gösterilmesidir. Bu amaçla Astra Zeneca firmasına ait 20 mg zafirlukast etken maddesini içeren Accolate® prepatından zafirlukastın miktar tayini, hem HPLC-UV hem de kaynaklardaki 3. türev spektrofotometrik (10) yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Bunun için Wilcoxon Eşleştirilmiş İki Örnek Testi kullanılmıştır (125). Sonuçta geliştirilen HPLC yöntemi ile karşılaştırma yöntemi arasında istatistiksel fark olmadığı bulunmuştur ( $t_H = 6.50 > t_T = 2.00$ ,  $p > 0.05$ ) (Tablo IV.26).

Geliştirilen üç voltametrik yöntem, HPLC yöntemi ve karşılaştırma yöntemi (10) ile elde edilen sonuçlar Tekrarlı Ölçümlerde Varyans Analizi Testi ile karşılaştırılmış ve bu beş yöntem arasında fark olmadığı bulunmuştur (125) ( $F_H = 1.43 < F_T = 2.78$ ,  $p > 0.05$ ).

### V.5.1.Biyolojik Materyalden Analiz Yönteminin Optimizasyon Sonuçları

Zafirlukastın biyolojik materyalden analizinde de, Nucleosil C<sub>18</sub> 100A (5 µm, 150 x 4.6 mm i.ç.,) kolonda, asetonitril : pH 3.00, 0.01 M sodyum asetat tamponu (70:30, h/h) kullanılarak 0.8 mL/dak akış hızında ve 240 nm’de gerçekleştirilmiştir. Çalışmalar oda sıcaklığında (25 °C) yapılmıştır.

Plazmadan zafirlukastın tüketilmesi amacıyla boş plazma, suya ve plazmaya eklenmiş zafirlukast çözeltilerine değişik tüketme işlemleri uygulanarak en uygun tüketme yöntemi bulunmuştur. Uygun tüketme çözücüsü, zafirlukast ve iç standardın alıkonma zamanlarında örtücü pik oluşumu ve su ile plazma sonuçları karşılaştırılarak % geri kazanım değerlerinin hesaplanmasına göre belirlenmiştir (Tablo IV.27)

Zafirlukastın plazmadan tüketilmesi amacıyla etanol, metanol, asetonitril, aseton, trikloroasetik asit, n-hegzan, diklorometan, n-hegzan:diklorometan (7:3, h/h), etil asetat, kloroform ve dietil eter denenmiştir. Ayrıca çeşitli kartuşlarda katı-faz tüketme işlemleri uygulanmıştır. Organik çözücülerle yapılan sıvı-sıvı tüketme işlemlerinde zafirlukast elde edilememiştir. Katı faz tüketme işlemlerinde ise zafirlukast elde edilmiş, fakat boş plazmadan gelen pikle aynı yerde pik vermiştir.

Uygun tüketme çözücüsü, zafirlukast ve iç standardın alıkonma zamanlarında örtücü pik oluşumu, su ile plazma sonuçları karşılaştırılarak % geri kazanım değerlerinin hesaplanmasına göre belirlenmiştir. Etanol, metanol ve asetonitrilde geri kazanım değerleri yüksek bulunmuştur (etanol ile % 99.72, metanol ile % 99.19 ve asetonitril ile % 96.89). Pik şeklinin düzgünlüğü de göz önüne alınarak zafirlukastın plazmadan tüketilmesinde proteinlerin çöktürülmesine dayanan tüketme işleminde etanol tüketme çözücüsü olarak seçilmiştir.

Etanol ile tüketme işlemleri 1 M NaOH, 1 M HCl, 1 M asetik asit ve % 20 sodyum meta bisülfid içeren ortamlarda ayrı ayrı denenmiştir. NaOH’li ortamda hareketli faz ile seyreltme işleminde yeniden çökme olduğu için analiz

yapılamamıştır. HCl, asetik asit ve sodyum meta bisülfid içeren ortamlarda ise sırasıyla % 83.58, 97.22 ve 93.54 geri kazanım değerleri elde edilmiştir. Geri kazanım değerleri azaldığı için bu maddeler tüketme ortamına konulmamıştır.

Zafirlukastın geliştirilen voltametrik yöntemlerle biyolojik materyalden analizi yapılamamıştır. HPLC ile plazmadan zafirlukastın analizinde denenen tüketme işlemleri ile elde edilen plazma ve aynı şekilde tüketilen boş plazma örnekleri OSWSV yöntemi ile analiz edilmiştir. Zafirlukastın indirgenme potansiyelinde boş plazmadan gelen büyük pik olduğu için plazmada zafirlukast pikleri görülememiştir.

Belirlenen optimum şartlarda zafirlukastın plazmadan tüketilmesi sonucu 3.90 dk'da piribedil ve 5.70 dk'da zafirlukasta ait pikler gözlenmiştir (Şekil IV. 33).

#### **V.5.2. Biyolojik Materyalden Analiz Yönteminin Validasyon Sonuçları**

Zafirlukastın biyolojik materyalden HPLC yöntemi ile analizinde zafirlukast derişimi, zafirlukast pik alanının piribedil alanına oranının grafiğe geçirilmesi sonucu 49.69 - 437.50 ng mL<sup>-1</sup> aralığında doğrusal kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir (Şekil IV. 34). Bu yöntem için de doğrusallıktan ayrılışın önem kontrolü yapılmıştır (125) (Tablo IV.29). Sonuçta  $F_H = 2584.00 > F_T = 5.32$ ,  $p < 0.05$  değerleri elde edilmiş ve bu sonuçlara göre doğrusallıktan ayrılışın önemsiz olduğuna karar verilmiştir. Ayrıca korrelasyon katsayısının önem kontrolü yapılarak bu katsayının istatistiksel olarak önemli bir değer olduğu bulunmuştur (125) ( $t_H = 89.24 > t_T = 2.31$ ,  $p < 0.05$ ).

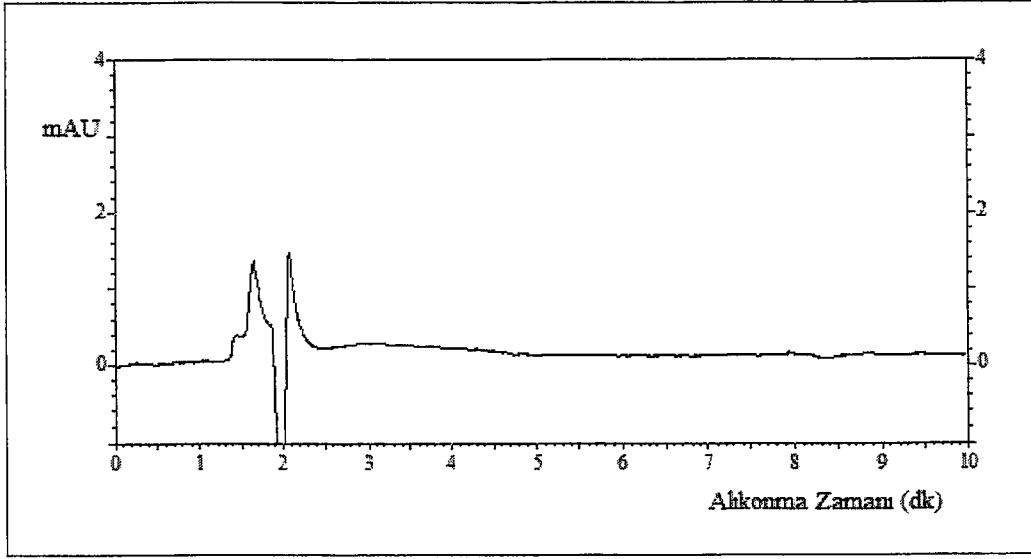
Yöntemin doğrusallığı grafik yöntemi ve istatistiksel olarak saptanmıştır. Grafik yönteminde standart çözeltilerin olması gereken derişimlerine karşı kalibrasyon denkleminde bulunan derişimleri grafiğe geçirilmiştir. (Şekil IV.35). Tanımlayıcılık katsayısı ( $r^2$ ), 0.9990 olarak bulunmuştur. Tablo IV.29'da gözlenen sonuçlar, zafirlukast için belirlenen aralıklarda çizilen kalibrasyon eğrisinin bir doğru olduğunu göstermektedir.

Zafirlukastın plazmadan HPLC yöntemi ile analizinde LOD ( $S/G = 3$ )  $19.23 \text{ ng mL}^{-1}$  (BSS = % 11.11), LOQ, kalibrasyon eğrisindeki en düşük derişim değeri olarak alınmıştır ve bu değeri  $49.69 \text{ ng mL}^{-1}$  (BSS = % 9.25) olarak bulunmuştur ( $n = 7$ ).

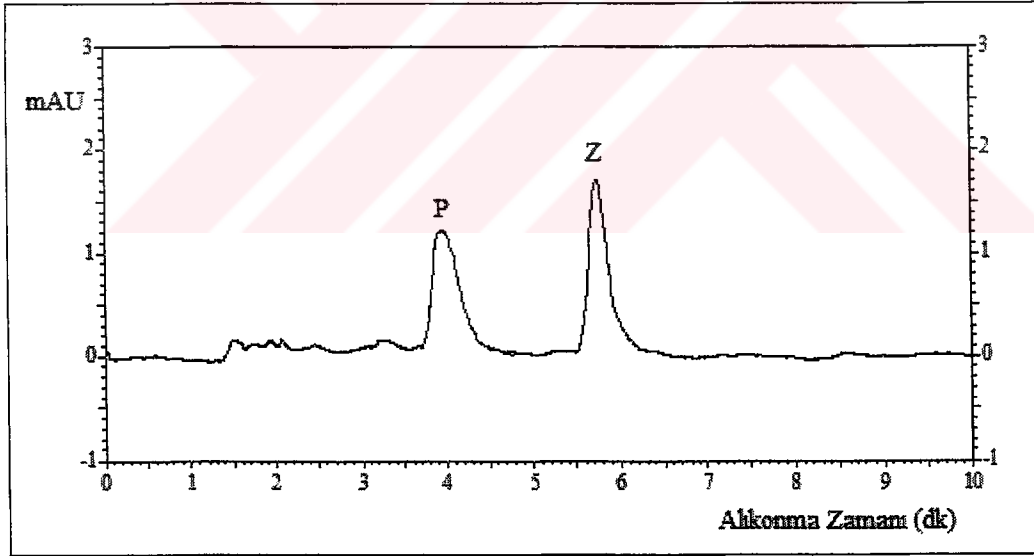
Zafirlukastın HPLC yöntemi ile plazmadan tayininde kesinlik ve doğruluğun bulunması için  $72.73$ ,  $254.78$  ve  $407.52 \text{ ng mL}^{-1}$  derişimlerde gün içi ve günler arası tekrarlı analizler yapılmıştır. Gün içi çalışmalarda 3 farklı derişim seviyesinde yedi tane hazırlanan standart çözeltilerin analizleri aynı gün yapılmış, elde edilen bulguların BSS değerleri %  $0.25 - 1.60$  olarak bulunmuştur (Tablo IV.30). Günler arası çalışmalar ise; üç farklı derişim seviyesinde ardışık yedi ayrı günde hazırlanan çözeltilerin analiz edilmesi ile yapılmış ve elde edilen bulguların bağıl standart sapma değerleri %  $0.46 - 2.19$  olarak bulunmuştur (Tablo IV.30).

Geliştirilen HPLC yönteminde gün içi ve günler arası için %  $2.19$ 'un altında kalan BSS değerlerinin elde edilmiş olması yöntemin kesinliğini, % bağıl hata değerlerinin  $2.56$ 'dan az olması ise yöntemin doğruluğunu göstermektedir. Bu değerler, yöntemin kesinliğinin ölçütü olarak maksimum kabul edilebilen %  $15$  BSS ve yöntemlerin doğruluğu için kabul edilebilen üst sınır değeri %  $20$ 'nin altında olduğu görülmüştür. Ayrıca gün içi ve günler arası çalışma sonuçlarına göre SS değerinin  $2.65$ 'den düşük olması bu yöntemin de tekrarlanabilirliğin yüksek olduğunu göstermektedir (Tablo IV.30).

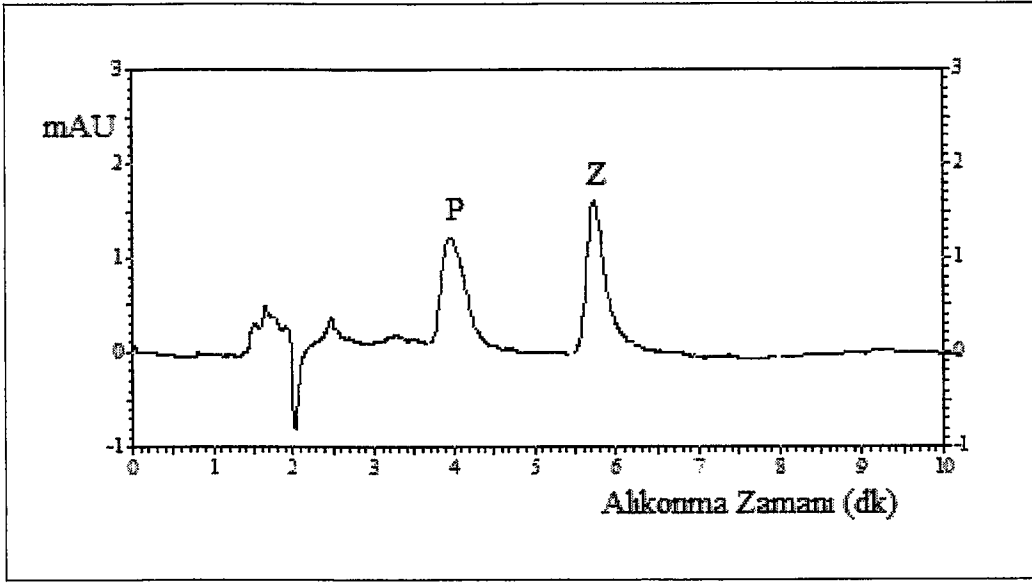
Şekil V.10 - Şekil V.12'de boş plazma, plazmaya eklenmiş zafirlukast ve suya eklenmiş zafirlukast çözeltilerine ait kromatogramlar verilmiştir.



Şekil V.10. Boş plazmanın tüketilmesiyle elde edilen kromatogram



Şekil IV.11. Plazmaya eklenerek tüketme işlemi sonucu elde edilen  $254.78 \text{ ng mL}^{-1}$  derişiminde zafirlukasta ait kromatogram (P; Piribedil, Z; Zafirlukast)



**Şekil V.12.** Suya eklenerek tüketme işlemi sonucu elde edilen  $254.78 \text{ ng mL}^{-1}$  derişiminde zafirlukasta ait kromatogram (P; Piribedil, Z; Zafirlukast)

Zafirlukastın plazmadan analizinde boş plazmada zafirlukastın ve piribedilin alıkonma zamanlarında herhangi bir pik gözlenmemiştir. Bu da geliştirilen yöntemin özgün olduğunu göstermektedir.

Plazmaya,  $72.73$ ,  $254.78$  ve  $407.52 \text{ ng mL}^{-1}$  gibi üç farklı derişimde eklenen zafirlukastın % geri kazanım çalışmaları yapılarak uygulanan tüketme işleminin verimi incelenmiştir. Çalışmalar iki şekilde yapılmıştır. Birincisinde plazmaya eklenmiş zafirlukastın pik alanının aynı derişimde hareketli fazda hazırlanan zafirlukast standardının pik alanına oranları karşılaştırılarak tüketme verimi hesaplanmıştır. İkincisinde ise plazmaya eklenmiş zafirlukastın pik alanının, aynı derişimlerde plazma yerine suda tüketme işlemi uygulanarak elde edilen zafirlukastın pik alanına oranından tüketme verimi hesaplanmış ve her iki çalışmaya ait sonuçlar Tablo IV.31’de verilmiştir. Sonuçta her iki çalışma sonucu tüketme verimi % 94.85 - 99.91 arasında bulunmuş ve plazmadan gelen herhangi bir girişim olmadığı görülmüştür. Her iki çalışma sonucu elde edilen % geri kazanım değerleri, Wilcoxon Eşleştirilmiş İki Örnek Testi ile karşılaştırılmış ve  $t_H$  değerleri  $t_T$  değerlerinden büyük olduğu için çalışmalar arasında fark olmadığı sonucuna varılmıştır (Tablo IV.31). Ayrıca üç farklı derişime ait geri kazanım değerlerinin % BSS değerlerinin % 1.78’i

geçmemesi, yöntemlerin kesinliğini göstermektedir. Ayrıca aynı geri kazanım SS değerlerinin 1.69'dan düşük olması yöntemin tekrarlanabilirliğinin yüksek olduğunu göstermektedir.

Bu tezde, astım tedavisinde kullanılan zafirlukastın, elektrokimyasal yöntemlerden OSWV, OSWAdSV ve DPAdSV yöntemleri ve kromatografik yöntemlerden HPLC yöntemi ile farmasötik preparatlardan ve ayrıca HPLC yöntemi ile de biyolojik materyallerden analizi gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen üç voltametrik yöntem, HPLC yöntemi ve karşılaştırma yöntemi (10) ile elde edilen sonuçların istatistiksel değerlendirilmeleri neticesinde validasyon parametrelerinin uygun değerde bulunması, kaynaklardaki karşılaştırma yöntemi ile arasında istatistiksel fark olmaması; bu yöntemlerin valide yöntemler olduğunu göstermektedir. Bu yöntemler, zafirlukastın farmasötik preparatlardan tayini için doğru, kesin, duyarlı, seçici, tekrarlanabilir yöntemler olup rutin analiz laboratuvarlarında kalite kontrol amacıyla kullanılması önerilebilir.

Bir yöntemin duyarlılığı birim derişim artışına karşılık gözlenen sinyalin büyüklüğüne bağlıdır. Bu değer kalibrasyon eğrisinin eğimi ile verilmektedir. Eğim ne kadar büyükse yöntemin duyarlılığı da o kadar yüksektir. Alt tayin sınırının küçük olması da yöntemin duyarlılığının büyük olduğunu göstergesidir. OSWV, OSWAdSV ve DPAdSV yöntemlerine ait kalibrasyon doğrusunun eğimleri sırasıyla 100.82, 1.6058, 0.0756'dır. Ayrıca alt tayin sınırları OSWV, OSWAdSV ve DPAdSV yöntemi için 146.00 ng mL<sup>-1</sup>, 30.00 ve 38.00 ng mL<sup>-1</sup> ve karşılaştırma yöntemi (10) için ise 3.6 µg mL<sup>-1</sup>'dir. Bu sonuçlara göre OSWAdSV yöntemi diğer voltametrik yöntemlere göre ve her üç voltametrik yöntem de karşılaştırma yöntemine göre daha duyarlı bulunmuştur.

HPLC yönteminin duyarlılığının bir göstergesi olarak da kalibrasyon eğrisinin eğimi 0.0037 olarak bulunmuştur. LOQ değeri ise 25.00 ng mL<sup>-1</sup>'dir. Karşılaştırma yönteminde doğrusallık aralığı 3.2 - 16.00 µg mL<sup>-1</sup> olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre HPLC yöntemi geliştirilen üç voltametrik yöntemden ve karşılaştırma yönteminden (10) daha duyarlı olmasına rağmen



kromatografik yöntemlerin pahalı cihaz ve kolon, kromatografik saflıkta çözücü gibi kimyasal maddeler ve çeşitli tüketme işlemleri gerektirebilmeleri nedeni ile daha ucuz yöntemler olmalarından dolayı voltametrik yöntemler tercih edilebilir.

Kaynaklarda verilen biyolojik materyal ile zafirlukastın HPLC yöntemi ile analizinde (9) doğrusallık aralığı  $0.75 - 200 \text{ ng mL}^{-1}$  olup alıkonma zamanları zafirlukast için 9 dk, iç standart olarak kullanılan flavon için ise 10 dk'dır. Plazmadan geri kazanım değeri ise % 92 olarak bulunmuştur. Tez çalışmamızda geliştirilen HPLC yönteminde zafirlukastın ve piribedilin plazmadan tüketilmesi sonucu alıkonma zamanları 3.90 dk ve 5.70 dk'dır. Plazmadan geri kazanım değerleri ise % 94.85 - 99.91 arasında bulunmuştur. Zafirlukast, geliştirilen HPLC yöntemi ile plazmadan daha kolay ve daha kısa sürede tüketilmektedir. Tüketme verimi daha yüksek ve analiz süresi de daha kısadır.

Ayrıca bu tezde boş plazmaya ilave edilen zafirlukast düzeylerinin, zafirlukast kullanan hastaların plazma düzeyleri (maksimum plazma konsantrasyonu  $300.00 \text{ ng mL}^{-1}$ ) (21, 26, 39) ile uyumlu olması, bu yöntemin astım hastalarının plazma düzeylerinin saptanmasında da kullanılabileceğini göstermektedir. Sonuçta, geliştirilen HPLC yönteminin, zafirlukastın plazmadan tayini için doğru, kesin, duyarlı, seçici ve tekrarlanabilir bir yöntem olduğu da görülmektedir.

## KAYNAKLAR

- (1) Adkins, J.C., Brogden, R.N., Zafirlukast. A review of its pharmacology and therapeutics potential in the management of asthma. *Drugs*. 55 (1), 121-144, 1998.
- (2) Dunn, C.J., Goa, K.L., Zafirlukast: an update of its pharmacology and therapeutics efficacy in asthma. *Drugs*. 61 (2), 285-315, 2001.
- (3) Piatti, G., Ceriotti, L., Cavallaro, G., Ambrosetti, U., Mantovani, M., Pistone, A., Centanni, S., Effects of zafirlukast on bronchial asthma and allergic rhinitis. *Pharm. Res.*, 47 (6), 541-547, 2003.
- (4) Calhoun, W.J., Summary of clinical trials with zafirlukast. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 157 (6), 238-245, 1998.
- (5) Spector, S.L., Management of asthma with zafirlukast. Clinical experience and tolerability profile. *Drugs*. 52 (6), 36-46, 1996.
- (6) Orea, S.M., Flores, S.G., Machado, C.F., Romero, H., Santos, A.L., Aspirin induced asthma, urinary leukotriene E<sub>4</sub> and zafirlukast. *Rev. Alerg Mex.*, 49 (2), 52-56, 2002.
- (7) Coreno, A., Skowronski, M., Kotaru, C., McFadden, E.R. , Comparative effects of long-acting  $\beta$ -agonists, leukotriene receptor antagonists and a 5-lipoxygenase inhibitor on exercise-induced asthma. *J. Allergy Clin Immunol.*, 106 (3), 500-506, 2000.
- (8) Ficarra, R., Ficarra, P., Tommasini, S., Melardi, S., Calabro, M.L., Furlanetto, S., Semreen, M., Validation of a LC method for the analysis of zafirlukast in a pharmaceutical formulation. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 23 (1), 169-174, 2000.
- (9) Bui, K.H., Coleen, M. K., Connie, T. A., Bruce, K.B., Determination of zafirlukast, a selective leukotriene antagonist, human plasma by normal-phase high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. B.*, 696 (1), 131-136, 1997.

- (10) Radhakrishna, T., Satyanarayana, J. Satyanarayana, A., Determination of zafirlukast by stability indicating LC and derivative spectrophotometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 30 (3), 695-703, 2002.
- (11) Global Initiative for Asthma 1995. Global strategy for asthma management and prevention. NHLBI/WHO Workshop report, March 1993 National Institutes of Health, National Heart, Lung and Blood Institute publication number 95-3659, 1995.
- (12) Kayaalp, S.O., *Tıbbi Farmakoloji Cilt 2, VIII. Baskı Hacettepe-Taş Kitapçılık Ltd. Şti., Ankara, 1998.*
- (13) Dahlen, B., In Leukotrienes as mediators of asthma induced by aspirin and allergen (Thesis). 1-68, 1993.
- (14) Kaliner, M., Eggleston, P.A., Mathews K.P., Rhinitis and asthma. *J. Am. Med. Assoc.*, 258, 2851-2873, 1987.
- (15) Brabson, J.H., Clifford, D., Kerwin, E., Raphael, G., Pepsin, J.P., Edwards, L.D., Srebro, S., Rickard, K., Efficacy and safety of low-dose fluticasone propionate compared with zafirlukast in patients with persistent asthma. *Am. J. Med.*, 113 (1), 15-21 2002.
- (16) Weller, P.K., Lee, C.W., Foster, D.W., Generation and metabolism of 5-lipoxygenase pathway leukotrienes by human eosinophils : predominant production of leukotriene C<sub>4</sub>. *Proceedings of the National Academy Science of The USA.* 80, 7626-7630, 1983.
- (17) Schleimer, R.P., MacGlashan, D.W., Peters, S.P., Characterisation of inflammatory mediator release from purified human lung mast cells. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 133, 614-617, 1986.
- (18) Samuelsson, B., Leukotriene : mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science*, 220, 568-575, 1983.

- (19) Nagy, L., Lee, T.H., Goetzel, E.J., Complement receptor enhancement and chemotaxis of human neutrophils and eosinophils by leukotrienes and other lipoxygenase products. *Clin. Exper. Immunol.*, 47, 541-547, 1982.
- (20) Fish, J.E., Kemp, J.P., Lockey, R.F., Glass, M., Hanby, L.A., Bonuccelli, M., ve the Zafirlukast Trialists Group. Zafirlukast for symptomatic mild-to-moderate asthma: A 13-week multicenter study. *Clin. Ther.*, 19 (4), 675-690. 1997.
- (21) Lipworth, B.J., Leukotriene-receptor antagonists. *Lancet*, 353 (2), 57-62, 1999.
- (22) Wenzel, S. E., New approaches to anti-inflammatory therapy for asthma. *Am. J. Med.*, 104 (3), 287-300, 1998.
- (23) Riccioni, G., Castronuovo, M., De Benedictis, M., Pace-Palitti, V., Di Gioacchino, M., Della, V. R., Schiavone, C., Sensi, S., Guagnano, M.T., Zafirlukast versus budesonide on bronchial reactivity in subjects with mild-persistent asthma. *Int. Immunopathol Pharmacol.*, 14 (2), 87-92, 2001.
- (24) Pearlman, D.S., Lampl, K.L., Dowling, P.J., Miller, C.J., Bonuccelli, C.M., Effectiveness and tolerability of zafirlukast for the treatment of asthma in children. *Clin. Ther.*, 22 (6), 732-747, 2000.
- (25) Mc Millan, R.M., Leukotrienes in respiratory disease. *Paediatric Respiratory Reviews*. 2, 238-244, 2001.
- (26) Buccellati, C., Fumagalli, F., Viappiani, S., Folco, G., Leukotriene modifiers : novel therapeutics opportunities in asthma. *Il Farmaco*. 57, 235-242, 2002.
- (27) O'Byrne, P.M., Asthma treatment : antileukotriene drugs. *Can. Respir. J.*, 5 (A), 64-70, 1998.
- (28) Kumlin, M., Dahlen, S.E., Characteristics of formation and further metabolism of leukotrienes in the chopped human lung. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1044, 201-210, 1990.

- (29) Keppler, D., Guhlmann, A., Huber, M., Leukotrienes in shock syndromes : metabolism and detection in vivo. *Advances in Prostaglandin, Thromboxane and Leukotriene Research*. 20, 179-186, 1990.
- (30) Maltby, N.H., Taylor, G.W., Ritter, J.M., Leukotriene C<sub>4</sub> elimination and metabolism in man. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 85, 3-9, 1990.
- (31) Hay, D.W.P., Torphy, T.J., Undem, B.J., Cysteinyl leukotrienes in asthma : old mediators up to new tricks. *Trends in Pharmacological Science*. 16, 304-309, 1995.
- (32) Kellaway, C.H., Trethewie, E.R., The liberation of a slow-reacting smooth muscle-stimulating substance in anaphylaxis. *Quarterly Journal of Experimental and Physiological Cogn. Medical sciences*. 30, 121-145, 1940.
- (33) Nannini, L.J., Flores, D.M., Bronchodilator effect of zafirlukast in subjects with chronic obstructive pulmonary disease. *Pulm. Pharm. Ther.*, 16 (5), 307-311, 2003.
- (34) Conway, S.P., Etherington, C., Peckham, D.G., Whitehead, A., A pilot study of zafirlukast as an anti-inflammatory agent in the treatment of adults with cystic fibrosis. *J. Cystic Fibrosis*. 2, 25-28, 2003.
- (35) Arm, J.P., Lee, T.H., Sphingolipid leukotrienes in asthma. *Clin. Sci.*, 84, 501-510, 1993.
- (36) Nathan, R. A., Bleecker, E.R., Kalberg, C., ve the Fluticasone Propionate Study Group. A comparison of short-term treatment with inhaled fluticasone propionate and zafirlukast for patients with persistent asthma. *Am. J. Med.*, 111, 195-202, 2001.
- (37) Phipatanakul, W., Eggleston, P.A., Conover-Walker, M.K., Kesavanathan, J., Sweitzer, D., Wood, R., A randomized, double-blind, placebo controlled trial of the effect of zafirlukast on upper and lower respiratory responses to cat challenge. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 105 (4), 704-710, 2000.

- (38) Finnerty, J.P., Wood-Baker, R., Thomson, H., Holgate, S.T., Role of leukotrienes in exercise-induced asthma. Inhibitory effect of ICI 204219, a potent leukotriene D<sub>4</sub> receptor antagonist. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 145 (4), 749-749, 1992.
- (39) Dekhuijzen, P.N., Koopmans P.P., Pharmacokinetic profile of zafirlukast. *Clin. Pharmacokinet.*, 41 (2), 105-114, 2002.
- (40) Balzano, G., Fuschillo, S., Gaudiosi, C., Leukotriene receptor antagonists in the treatment of asthma : an update. *Allergy*. 57 (72), 16-19, 2002.
- (41) Nathan, R.A., Minkwitz, M.C., Bonuccelli, C.M., Two first-line therapies in the treatment of mild asthma: use of peak flow variability as a predictor of effectiveness. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 82 (5), 497-503, 1999.
- (42) Smith, L.J., Geller, S., Ebright, L., Inhibition of leukotriene D<sub>4</sub> - induced bronchoconstriction in normal subjects by the oral LTD<sub>4</sub> receptor antagonist ICI 204,219. *Am. J. Respir. Med.*, 141, 988-992, 1990.
- (43) Smith, L.J., Glass, M., Minkwitz, M.C., Dose response for “Accolate” (zafirlukast) versus LTD<sub>4</sub> induced bronchoconstriction in patients with asthma. *Am. J. Respir. Med. And Crit. Care Med.*, 151, A378, 1995.
- (44) Smith, L.J., Glass, M., Miller, C.J., Effect oral “Accolate” (zafirlukast) on leukotriene D<sub>4</sub> (LTD<sub>4</sub>) - induced bronchoconstriction in patients with asthma. *Am. J. Respir. Med. And Crit. Care Med.*, 151, A378, 1995.
- (45) Dahlen, S.E., Dahlen, B., Eliasson, E., Inhibition of allergic bronchoconstriction in asthmatic by the leukotriene - antagonist ICI-204,219. *Advances in Prostaglandin in Thromboxane and Leukotriene Research*. 21, 461-464, 1991.
- (46) Dahlen, B., Zetterström, O., Björck, T. , The leukotriene - antagonist ICI-204,219 inhibits the early airway reaction to cumulative bronchial challenge with allergen in atopic asthmatics. *Eur. Respir. J.*, 7, 324-331, 1994.

- (47) Taylor, I.K., O'Shaughnessy, K.M., Fuller, R.W., Effect of cysteinyl - leukotriene receptor antagonist ICI 204,219 on allergen - induced bronchoconstriction and airway hyperreactivity in atopic subjects. *Lancet*. 37, 690-694, 1991.
- (48) Findlay, S.R., Barden, J.M., Easley, C.B., Effect of oral leukotriene antagonist, ICI 204,219, on antigen - induced bronchoconstriction in subjects with asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 89, 1040 - 1045, 1992.
- (49) Nathan, R.A., Glass, M., Minkwitz, M.C., Inhaled ICI 204,219 blocks antigen-induced bronchoconstriction in subjects with bronchial asthma. *Chest.*, 105 (2), 483-488, 1994.
- (50) Lockhart, A., The protective effect of zafirlukast against exercise-induced asthma. *Euro. Res. J.*, 10 (25), Abs 2712, 1997.
- (51) Hofstra, W.B., Two weeks treatment with zafirlukast (Accolate), sodium cromoglycate or placebo on exercise - induced bronchoconstriction in asthmatic adolescents. *Am. Rev. J. Respir. Crit. Care Med.*, 155, A665, 1997.
- (52) Israel, E., Effect of zafirlukast (20 and 40 mg) on cold air - induced bronchoconstriction in patients with bronchial asthma. *Euro. Res. J.*, 9, 51-53, 1996.
- (53) Boulet, L.P., Effect of zafirlukast ) on cold air - induced bronchoconstriction in patients with bronchial asthma. *Euro. Res. J.*, 9, 273-275, 1996.
- (54) Lazarus, S.C., Lavins, B.J., Wong, H.H., Effect of "Accolate" (zafirlukast) on sulphur dioxide (SO<sub>2</sub>) - induced bronchoconstriction in patients with bronchial asthma. . *Am. Rev. J. Respir. Crit. Care Med.*, 151, A41-43, 1995.
- (55) Richter, K., Jorres, R.A., Magnussen, H., Efficacy and duration of action of the antileukotriene zafirlukast on cold air-induced bronchoconstriction. *Eur. Respir. J.*, 15 (4), 693-699, 2000.

- (56) Kidney, J.C., Ridge, S.M., Chung, K.F., Inhibition of platelet-activating factor - induced bronchoconstriction by the leukotriene D<sub>4</sub> receptor antagonist ICI 204,219. *Am. Rev. J. Respir. Dis.*, 147, 215-217, 1993.
- (57) Valacer, D.J., New treatments for asthma : the role of leukotriene modifier agents. *J. Natl. Med. Assoc.* 91 (8), 26-39, 1999.
- (58) Kemp, J.P., Recent advances in the management of asthma using leukotriene modifiers. *Am. J. Respir. Med.*, 2 (2), 139-156, 2003.
- (59) Kemp, J.P., Korenblat, P.E., Scherger, J.E., Minkwitz, M., Zafirlukast in clinical practice: results of the Accolate Clinical Experience and Pharmacoepidemiology Trial (ACCEPT) in patients with asthma. *J. Fam. Pract.*, 48 (6), 423-424, 1999.
- (60) Bu, X., Wang, C., Pang, B., Effects of leukotriene receptor antagonists on chronic obstructive [correction of obstructive] pulmonary disease induced pulmonary hypertension. *Chin. Med. J.*, 116 (3), 459-461, 2003.
- (61) Bonadonna, P., Lombardi, C., Senna, G., Canonica, G.W., Passalacqua, G., Treatment of acquired cold urticaria with cetirizine and zafirlukast in combination. *J. American Academy of Dermatology.* 49 (4), 714-716, 2003.
- (62) Asero, R., Leukotriene receptor antagonists may prevent NSAID-induced exacerbations in patients with chronic urticaria. *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, 85 (2), 156-157, 2000.
- (63) Nathan, R.A., Long - term treatment of asthma with zafirlukast "Accolate" : Results of a 13 week multicenter trial in patients with moderate airflow obstruction. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 155, A663, 1997.
- (64) Kemp, J.P., Glass, M., Minkwitz, M.C., Onset of action of the leukotriene antagonist, zafirlukast "Accolate" in patients with mild to moderate asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 95, Abs 839, 1995.



- (65) Bateman, E.D., The early onset of action of zafirlukast "Accolate" in patients with asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 155, A663, 1997.
- (66) Spector, S.L., Smith, L.J., Glass, M., Effects of 6 weeks of therapy with oral doses of ICI 204,219, a leukotriene D<sub>4</sub> receptor antagonist, in subjects with bronchial asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 150, 618-623, 1994.
- (67) Howland, W., Segal, A., Glass, M., 6-week therapy with oral leukotriene - receptor antagonist, ICI 204,219, in the treatment of asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 93, 259, Abs 581, 1994.
- (68) Rosenthal, R.R., Lavins, B.J., Hanby, L.A., Effect of treatment with zafirlukast "Accolate" on bronchial hyperresponsiveness in patients with mild to moderate asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 97, 250, 1996.
- (69) Laitinen, L.A., Naya, I.P., Binks, S., Comparative efficacy of oral zafirlukast and low - dose steroids in asthmatics on prn beta 2-agonists. *Eur. Respir. J.*, 10 (25), 419-420, 1997.
- (70) Nayak, A.S., Anderson, P., Charous, B.Z., Equivalence of adding zafirlukast versus double - dose inhaled corticosteroids in asthmatic patients symptomatic on low - dose inhale corticosteroids. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 101 (2), 233, 1998.
- (71) Virchow, C.J., Prasse, A., Naya, I., Summerton, L., Harris, A., Zafirlukast improves asthma control in patients receiving high-dose inhaled corticosteroids. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 162 (2), 578-585, 2000.
- (72) Huang, C.J., Wang, C.H., Liu, W.T., Yang, M.C., Lin, H.C., Yu, C.T., Shiao, C.J., Tan, C.C., Yang, C.K., Kuo, H.P., Zafirlukast improves pulmonary function in patients with moderate persistent asthma receiving regular inhaled steroids: a prospective randomized control study. *Chang Gung Med. J.*, 26 (8), 554-560, 2003.

- (73) Suissa, S., Dennis, R., Ernst, P., Sheehy, O., Wood-Dauphinee, S., Effectiveness of the leukotriene receptor antagonist zafirlukast for mild-to-moderate asthma. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann. Intern. Med.*, 126 (3), 177-183, 1997.
- (74) Ringdal, N., A comparison of patient preference for treatment with oral zafirlukast or inhaled beclomethasone. *Eur. Respir. J.*, 10 (25), Abs P2806, 1997.
- (75) Bosley, C.M., Patient compliance with inhaled medication : does combining beta - agonists with corticosteroids improve compliance. *Eur. Respir. J.*, 7, 5t04-509, 1997.
- (76) Braunstein, G.L., Trinquet, G., Harper, A.E., Compliance with nedocromil sodium and a nedocromil sodium / salbutal combination. *Eur. Respir. J.*, 9, 893-898, 1996.
- (77) Juniper, E.F., Guyyatt, G.H., Epstein, R.S., Evaluation of impairment of health – related QOL in asthma : development of a questionnaire for use in clinical trials. *Thorax*. 47, 76-83, 1992.
- (78) Nathan, R.A., Bernstein, J.A., Bielory, L., Bonuccelli, C.M., Calhoun, W.J., Galant, S.P., Hanby, L.A., Kemp, J.P., Kylstra, J.W., Nayak, A.S., O'Connor, J.P., Schwartz, H.J., Southern, D.L., Spector, S.L., Williams, P.V., Zafirlukast improves asthma symptoms and quality of life in patients with moderate reversible airflow obstruction. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 102 (6), 935-942, 1998.
- (79) Spector, S.L., Antileukotriene Working Group, Safety on antileukotriene agents in asthma management. *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, 86 (6), 18-23, 2001.
- (80) Suttle, A.B., Vargo, D.L., Wilkinson, L.A., Effect of zafirlukast on the pharmacokinetics of R - and S - warfarin in healthy men. *Allergy*. 52, 184 Abs 584, 1997.
- (81) Vargo, D.L., Yeh. C. , Kane, C.D., Effect of zafirlukast on prothrombin time and area under the curve of warfarin. *Allergy*. 52, 184 Abs 585, 1997.

- (82) Suttle, A.B., Birmingham, B.L., Vargo, D.L., The pharmacodynamics of zafirlukast and terfenadine after co - administration to healthy men. *Allergy*. 52, 184 Abs 582, 1997.
- (83) Skoog, D.A., Holler, F.J., Nieman, T.A., *Analitik Kimya Temelleri*, 2. Cilt, Çeviri Editörleri; Kılıç, E., Köseoğlu, F., Yılmaz, H., I. Baskı, Bilim Yayıncılık Ltd. Şti., Ankara, 2000.
- (84) Meites, L., "Polarographic Techniques", Second Edition, Wiley & Sons, Inc., USA, 1965.
- (85) Heyrovsky, J., Kuta, J., "Principles of Polarography", Academic Press, New York, 1966.
- (86) Hampel, C.A., "The Encyclopedia of Electrochemistry", Publishing Co., New York, Reinhold 1964.
- (87) Zuman, P., "The Elucidation of Organic Electrode Processes" Academic Press, Inc., USA, 1969.
- (88) Wang, J., "Analytical Electrochemistry ", VCH Publishers, Inc., USA, 1994.
- (89) Bond, A.M., "Modern Polarographic Methods in Analytical Chemistry" Marcel Dekker, Inc., USA, 1980.
- (90) Brown, E.R., Sandifer, J.R., "Cyclic Voltammetry, AC Polarography and Related Techniques in Electrochemical Techniques" Vol I.
- (91) Greef, R., Peat, R., Peter, L.M., Pletcher, D., Robinson, J., "Instrumental Methods in Electrochemistry" , Ellis Harwood Ltd., New York, 1990.
- (92) Brainina, K.Z., "Stripping Voltammetry in Chemical Analysis", John Wiley and Sons, New York, 1974.
- (93) Fulorance, T.M., Recent advances in stripping analysis. *J. Electroanal. Chem.*, 1984, 168, 207-218.

- (94) Bard, A.J., Faulkner, L.R., "Electrochemical Methods Fundamentals and Applications" John Wiley and Sons, New York, 1980.
- (95) Wang, J., Adsorptive stripping voltammetry. *Am. Lab.*, 17, 41-50, 1985
- (96) Kalvoda, R., Adsorptive stripping voltammetry of electroactive organic compounds. *Anal. Chim. Acta.* 162, 197-205, 1984.
- (97) Copeland, T.R., Skogerboe, R.K., Anodic stripping voltammetry. *Anal. Chem.*, 46, 1257-1263, 1974.
- (98) Adamovics, J.A., *Chromatographic Analysis of Pharmaceuticals*, 2nd Edition, Mercel Dekker Inc., New Jersey, 1997.
- (99) Trathnigg, B., Fraydl, S., Veronik, M., Thermodynamic study of retention in liquid exclusion-adsorption chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1038, 43-52, 2004.
- (100) Smith. R.M., *Gas and Liquid Chromatography in Analytical Chemistry*. UK, 1988.
- (101) Aburuz, S., Millership, J., McElnay, J., Determination of metformin in plasma using a new ion pair solid phase extraction technique and ion pair liquid chromatography. *J. Chromatogr. B*, 798, 203-209, 2003.
- (102) Kato, Y., Nakamura, K., Kitamura, T., Tsuda, T., Hasegawa, M., Sasaki, H., Effect of chromatographic conditions on resolution in high-performance ion-exchange chromatography of proteins on macroporous anion-exchange resin. *J. Chromatogr. A*, 1031, 101-105, 2004.
- (103) Netopilik, M., Relation between the kinetic and equilibrium quantities in size-exclusion chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1038, 67-75, 2004.
- (104) Krstulovic, A.M., Brown, P.R., *Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography Theory, Practice and Biomedical Applications*, John Wiley & Sons. Inc., USA, 1982.

- (105) Sadek, P.C., Troubleshooting HPLC systems, John Wiley & Sons. Inc., USA, 2000.
- (106) Kaiser, R.E., Oelrich, E., Optimization in HPLC, Dr. Alfred Hüthig Verlag GmbH Heidelberg, Germany, 1981.
- (107) Dean, J., "Lange's Handbook of Chemistry". McGraw Hill, New York, 1979.
- (108) Gordon, C.L., Wickers, E., Purification of mercury and its physical properties. Ann. N. Y. Acad. Sci., 65, 369-387, 1956.
- (109) Buick, A.R., Doig, M.V., Jeal, S.C., Land, G.S., McDowall, R.D., Method validation in the bioanalytical laboratory. J. Pharm. Biomed. Anal., 8 (8-12), 629-637, 1990.
- (110) Shah, V.P., Midha, K.K., Dighe, S., McGilveray, I.J., Skelly, J.P., Yacobi, A., Layloff, T., Viswanathan, C.T., Cokk, C.E., McDowall, R.D., Pittman, K.A., Spector, S., Analytical methods validation : Bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies, Eur. J. Drug Metab. Pharmacokin., 16, 249-255, 1991.
- (111) Hartman, C., Massart, D.L., McDowall, R.D., An analysis of the Washington Conference Report on bioanalytical method validation, J. Pharm. Biomed. Anal., 12 (11), 1337-1343, 1994.
- (112) Braggio, S., Barnaby, R.J., Grossi, P., Cugola, M., A strategy for validation of bioanalytical methods. J. Pharm. Biomed. Anal., 14, 375-388, 1996.
- (113) Causey, A.G., Hill, H.M., Phillips, L.J., Evaluation of criteria for the acceptance of bioanalytical data, J. Pharm. Biomed. Anal., 8 (8-12), 625-628, 1990.
- (114) Hibbert, B., Method validation of modern analytical techniques. Accred Qual Assur., 4, 352-356, 1999.
- (115) Causon, R., Validation of chromatographic methods in biomedical analysis. J. Chromatogr. B., 689, 175-180, 1997.

- (116) Validation of analytical procedures: Methodology. ICH Harmonised Tripartite Guideline, ICH Steering Committee, 1996.
- (117) Green, J.M., A practical guide to analytical method validation. *Analytical Chemistry*, 68, 305A-309A, 1996.
- (118) Ghoneim, M.M., Beltagi, A.M., Adsorptive stripping voltammetric determination of the anti - inflammatory drug celecoxib in pharmaceutical formulation and human serum. *Talanta*, 60, 911-921, 2003.
- (119) El-Hefnawey, G.B., El-Hallag, I.S., Ghoneim, E.M., Ghoneim, M.M., Voltammetric behaviour and quantification of the sedative - hypnotic drug chlordiazepoxide in bulk form, pharmaceutical formulation and serum at a mercury electrode. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 34, 75-86, 2004.
- (120) Ghoneim, M.M., El-Baradie, K.Y., Tawfik, A., Electrochemical behavior of the antituberculosis drug isoniazid and its square - wave adsorptive stripping voltammetric estimation in bulk form, tablets and biological fluids at a mercury electrode. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 33, 673-685, 2003.
- (121) Beltagi, A.M., Determination of the antibiotic drug pefloxacin in bulk form, tablets and human serum using square wave cathodic adsorptive stripping voltammetry. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 31, 1079-1088, 2003.
- (122) Hamam, E., Determination of nitrofurantoin drug in pharmaceutical formulation and biological fluids by square - wave cathodic adsorptive stripping voltammetry. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 30, 651-659, 2002.
- (123) Özkan, S. A., Uslu, B., Aboul-Enein, H.Y., Voltammetric investigation of tamsulosin. *Talanta*, 61, 147-156, 2003.

- (124) Abdel Razak, O., Electrochemical study of hydrochlorothiazide and its determination in urine and tablets. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 34, 433-440, 2004
- (125) Sümbüloğlu, K., Sümbüloğlu, V., Biyoistatistik, Hatipoğlu Yayınevi, 7. Baskı, Ankara, 1997.
- (126) Gosser D.K., "Cyclic Voltammetry", VCH Publishers, Inc., 1994.
- (127) Baranski, A.S., Fawcett, W.R., Gilbert, C.M., Use of microelectrodes for the rapid determination of the number of electrons involved in an electrode reaction. *Anal. Chem.*, 57 (1), 166-170, 1985.
- (128) Bard, A.J., Faulkner, L.R., "Electrochemical Methods Fundamentals and Applications" John Wiley and Sons, New York, Second Edition, 2001.
- (129) Zuman, P., Perin, C.I., Organic Polarography, Wiley & Sons, Inc., New York, 1969.
- (130) Özaltın, N., Differential pulse polarographic determination of tenoxicam in pharmaceuticals and added to blood, *Anal. Chim. Acta*, 406 (2), 183-189, 2000.
- (131) Rodríguez, J., Berzas, J.J., Castaneda, G., Rodríguez N., Determination of sildenafil citrate (viagra) and its metabolite (UK-103,320) by square-wave and adsorptive stripping square-wave voltammetry. Total determination in biological samples, *Talanta*, 62 (2), 427-432, 2004.
- (132) Altınöz, S., Nemutlu, E., Kır, S., Polarographic behaviour of meloxicam and its determination in tablet preparations and spiked plasma, *Il Farmaco*, 57 (6), 463-468, 2002.
- (133) Gritti, F., Guiochon, G., Physical origin of peak tailing on C18-bonded silica in reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1028, 75-88, 2004.

- (134) Baeza-Baeza, J.J., Garcia-Alvarez-Coque, M.C., Prediction of peak shape as a function of retention in reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1022, 17-24, 2004.
- (135) Gritti, F., Guiochon, G., Effect of the pH, the concentration and the nature of the buffer on the adsorption mechanism of an ionic compound in reversed-phase liquid chromatography, II. Analytical and overloaded band profiles on Symmetry - C<sub>18</sub> and Xterra - C<sub>18</sub>. *J. Chromatogr. A*, 1041, 63-75, 2004.
- (136) Law, B., The effect of eluent pH and acid-base character on the design of generic-gradient reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) methods for use in drug discovery. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 34, 215-219, 2004.



## EKLER

### EK 1. Korrelasyon Katsayısı Önem Kontrolü (125)

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

Testin yapımında işlemler:

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

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

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

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

### Doğrusallıktan Ayrılış Önem Kontrolü (125)

1. Kareler toplamaları bulunur:

a) Regresyon Kareler Toplamı (RKT):

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

b) Y Ortalamadan Ayrılış Kareler Toplamı (YOAKT):

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

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

2. Serbestlik dereceleri bulunur:

a) Regresyon Serbestlik Derecesi (RSD) = 1

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

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

3. Kareler ortalamaları bulunur:

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

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

4.  $H_0$  = Derişim ile pik akımı değerleri veya detektör cevabı arasındaki ilişki doğrusal değildir.

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

6.  $F_H = RKO / RAKO$

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

8. Karşılaştırma: Hesapla bulunan F ( $F_H$ ) değeri tablo F ( $F_T$ ) değerinden büyükse  $H_0$  hipotezi reddedilir, küçükse kabul edilir.

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

**EK 2. Bağlı Standart Sapma ve % Bağlı Hata Hesaplama Yöntemi (125)**

$$\text{Bağlı Standart Sapma (BSS)} = \frac{\text{Standart sapma}}{\text{Aritmetik ortalama}} \times 100$$

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

**EK 3. % Geri Kazanım Hesaplama Yöntemi**

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

#### EK 4. Tekrarlı Ölçümlerde Varyans Analizi (125)

Yöntemlerin karşılaştırılmasında, yöntemler arasında fark bulunup bulunmadığını kontrol etmek için Tekrarlı Ölçümlerde Varyans Analiz testi uygulanır. Zafirlukastın tabletlerinden OSW, OSWSV, DPSV, HPLC ve karşılaştırma yöntemiyle elde edilen sonuçların karşılaştırılması bu test ile yapılmıştır.

1. Kareler toplamaları bulunur

a) Genel kareler toplamı (GnKT)

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

b) Gruplar arası kareler toplamı (GAKT)

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

c) Denekler arası kareler toplamı (DAKT)

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

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

2. Serbestlik derecelerinin bulunması

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

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

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

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

3. Kareler ortalamasının bulunması

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

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

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

4.  $H_0$  = Yöntemler arasında fark yoktur.

$H_1$  = En az bir ölçüm diğerlerinden farklıdır.

5. Yanılma olasılığı  $p = 0.05$  seçilmiştir.

6.  $F = GAKO / HKO$

7.  $\alpha = 0.05$  düzeyinde GAKO ve HKO serbestlik derecelerindeki tablo F değerleri bulunur.

8. Karşılaştırma: Hesapla bulunan F ( $F_H$ ) değeri tablo F ( $F_T$ ) değerinden büyükse  $H_0$  hipotezi reddedilir, küçükse kabul edilir.

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

**EK 5. Wilcoxon Eşleştirilmiş İki Örnek Testi (125)**

Yöntemlerin karşılaştırılmasında, iki yöntemle elde edilen sonuçlar arasında fark bulunup bulunmadığını kontrol etmek için Wilcoxon Eşleştirilmiş İki Örnek testi uygulanır.

Her grup için “İki yöntem arasında fark yoktur” şeklinde kurulan  $H_0$  hipotezini denemek için, ilk önce iki yöntemle bulunan sonuçlar arasındaki farklar alınır ve farklar küçükten büyüğe doğru mutlak değer olarak sıralanır. Fark işareti sıra numaralarının önüne konur. Sonuçta artı ve eksi işaretlerin hangisi daha az ise onların sıra numaraları toplanarak  $T_H$  değeri hesaplanır. 0.05 yanılma olasılığı düzeyinde ve  $n$  serbestlik derecesinde  $T_T$  değeri bulunur.  $T_H > T_T$  ise  $H_0$  kabul edilir,  $T_H < T_T$  ise  $H_0$  reddedilir ve iki yöntem arasında fark olup olmadığı gösterilir.

## ÖZGEÇMİŞ

1973 yılında Beyşehir/Konya’da doğdum. Ankara Başkent Lisesi’ni bitirdikten sonra 1991 yılında girdiğim Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi’nden 1995 yılında mezun oldum. 1996 yılında Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı’nda yüksek lisans programına başladım. 1997 yılında araştırma görevlisi olarak göreve başladım. 1999 yılında “Antibakteriyel Florokinolonların Analizleri” adlı tezimi vererek yüksek lisans derecesi aldım. Halen aynı bölümde araştırma görevlisi olarak çalışmaktayım.