

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI

**KAPİLER ELEKTROFOREZ YÖNTEMİ ile TABLETLERDE
PARASETAMOL, DEKSTROMETORFAN, PSÖDOEFEDRİN,
EFEDRİN, KLORFENİRAMİN VE 4- AMİNOFENOL MİKTAR TAYİNİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ecz. Beytül YENER

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Nilgün GÜNDEN GÖĞER

ANKARA
Şubat 2013

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI

**KAPİLER ELEKTROFOREZ YÖNTEMİ İLE TABLETLERDE
PARASETAMOL, DEKSTROMETORFAN, PSÖDOEFEDRİN,
EFEDRİN, KLORFENİRAMİN VE 4- AMİNOFENOL MİKTAR TAYİNİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ecz. Beytül YENER

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Nilgün GÜNDEN GÖĞER

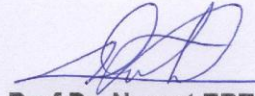
Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
02/2010-32 no'lu proje ile desteklenmiştir.

ANKARA
Şubat 2013

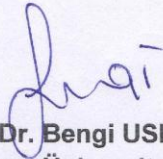
**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü**

**Analitik Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Programı
çerçevesinde yürütölmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.**

Tez Savunma Tarihi: 19/03/2013



**Prof.Dr. Nusret ERTAŞ
Gazi Üniversitesi
Jüri Başkanı**



**Prof.Dr. Bengi USLU
Ankara Üniversitesi**



**Prof.Dr. Nilgün GÜNDEN GÖĞER
Gazi Üniversitesi**

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
Kabul ve Onay	I
İçindekiler	II
Şekiller	VI
Tablolar	VIII
Simgeler ve Kısaltmalar	X
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Soğuk Algınlığı İlaçlarının Sınıflandırılması	3
2.2. Parasetamol ile İlgili Genel Bilgiler	5
2.2.1. Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri	5
2.2.2. Farmakolojik Özellikleri	6
2.3. Klorfeniramin Maleat ile İlgili Genel Bilgiler	8
2.3.1. Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri	8
2.3.2. Farmakolojik Özellikleri	8
2.4. Psödoefedrin HCl ile İlgili Genel Bilgiler	10
2.4.1. Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri	10
2.4.2. Farmakolojik Özellikleri	10
2.5. Dekstrometorfan HBr ile İlgili Genel Bilgiler	12
2.5.1. Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri	12
2.5.2. Farmakolojik Özellikleri	13
2.6. Efedrin HCl ile İlgili Genel Bilgiler	14
2.6.1. Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri	14

2.6.2.	Farmakolojik Özellikleri	15
2.7.	4-Aminofenol ile İlgili Genel Bilgiler	16
2.7.1	Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri	16
2.7.2.	Farmakolojik Özellikleri	16
2.8.	N,N- Dimetilanilin ile İlgili Genel Bilgiler	17
2.8.1.	Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri	17
2.8.2.	Farmakolojik Özellikleri	17
2.9.	Analiz Yöntemleri	18
2.10.	Kapiler Elektroforez	27
2.10.1.	Teorik Bilgiler	27
2.10.2.	Kapiler Elektroforez Cihazının Kısımları	33
2.10.3.	Kapiler Özellikleri	34
2.10.4.	Numune Enjeksiyonu	36
2.10.5.	Güç Kaynağı	37
2.10.6.	Kullanılan Dedektörler	37
2.10.7.	Cihaz ve Yöntem Parametrelerinin Validasyon Parametreleri ile İlişkisi	39
3.	GEREÇ ve YÖNTEM	42
3.1.	Kullanılan Gereçler	42
3.1.1.	Kullanılan Cihazlar	42
3.1.2.	Kullanılan Kimyasal Maddeler	42
3.1.3.	Kullanılan Farmasötik Preparatlar	43
3.2.	Deney İçin Gerekli Hazırlıklar	43
3.2.1.	Çözeltilerin Hazırlanması	43

3.2.2.	Farmasötik Preparatın Analize Hazırlanması	45
3.3.	Yöntem Geliştirme ve Optimizasyon Çalışmaları	46
3.3.1.	Kapilerin Şartlandırılması	46
3.3.2.	Numunenin Cihaza Verilmesi	46
3.3.3.	Yöntemin Optimizasyonu	47
3.3.4.	Kalibrasyon Doğrularının Çizimi	47
3.4.	Validasyon Çalışmaları	48
4.	BULGULAR	45
4.1.	Optimum Yöntem Parametrelerinin Seçimi	49
4.1.1.	Çalışma Tamponunun Seçimi	49
4.1.2.	BGE Çözeltilisinin Derişiminin Seçimi	50
4.1.3	BGE Çözeltilisindeki Organik Solvan Derişimi	51
4.1.4.	Kapiler Çapının Etkisi	53
4.1.5.	Kaset Sıcaklığının Etkisi	54
4.1.6.	Numune pH 'sının Etkisi	57
4.1.7.	Uygulanan Voltajın Etkisi	59
4.1.8.	Dalga Boyu Seçimi	59
4.1.9.	Enjeksiyon Süresinin Etkisi	61
4.2.	Geliştirilen Yöntem ile Elde Edilen Bulgular	63
4.2.1.	Kalibrasyon Bulguları	63
4.2.2.	Tekrarlanabilirlik Çalışması Sonuçları	70
4.2.3.	Farmasötik Preparatın Analiz Bulguları	79
4.2.4.	Geri Kazanım Çalışması Bulguları	84
5.	TARTIŞMA	88

6.	SONUÇ	92
7.	ÖZET	93
8.	SUMMARY	94
9.	KAYNAKLAR	95
10.	TEŞEKKÜR	100
11.	ÖZGEÇMİŞ	101

ŞEKİLLER

SAYFA

Şekil 1.	Parasetamol molekülü	5
----------	----------------------	---

Şekil 2.	Klorfeniramin molekülü	8
Şekil 3.	Psödoefedrin molekülü	10
Şekil 4.	Dekstrometorfan molekülü	12
Şekil 5.	Efedrin molekülü	14
Şekil 6.	4-Aminofenol molekülü	16
Şekil 7.	N,N Dimetilanilin molekülü	17
Şekil 8.	Kapiler zon elektroforezde iyonların elüsyon sırası	30
Şekil 9.	Örnek bir elektroferogram	30
Şekil 10.	HPLC'deki laminer ve pompa akışı ile bir elektroosmotik akışın karşılaştırılması	31
Şekil 11.	Kapiler elektroforez cihazının şeması	33
Şekil 12.	Eritilmiş silika kapilerin boyuta kesiti	35
Şekil 13.	Kapiler elektroforezde enjeksiyon sistemleri	36
Şekil 14.	Tampon derişiminin analiz üzerindeki etkisi	51
Şekil 15.	Organik solvan derişiminin analiz üzerindeki etkisi	52
Şekil 16.	Kapiler çapının analiz üzerindeki etkisi	53
Şekil 17.	Kaset sıcaklığının analiz üzerindeki etkisi	55
Şekil 18.	Kaset sıcaklığının pik alanı üzerine etkisi	56
Şekil 19.	Kaset sıcaklığının alıkonma zamanı üzerine etkisi	56
Şekil 20.	Numune pH'sının analiz üzerindeki etkisi	58
Şekil 21.	Farklı dalga boylarında analitlerin pik karakteristikleri	60

Şekil 22.	Elektroferogramın üç boyutlu görüntüsü	60
Şekil 23.	Enjeksiyon süresinin analiz üzerindeki etkisi, $\lambda=192$ nm	61
Şekil 24.	Enjeksiyon süresinin analiz üzerindeki etkisi, $\lambda=258$ nm	62
Şekil 25.	Parasetamol kalibrasyon doğrusu	64
Şekil 26.	4-Aminofenol kalibrasyon doğrusu	65
Şekil 27.	Psödoefedrin kalibrasyon doğrusu	66
Şekil 28.	Klorfeniramin kalibrasyon doğrusu	67
Şekil 29.	Efedrin kalibrasyon doğrusu	68
Şekil 30.	Dekstrometorfan kalibrasyon doğrusu	68
Şekil 31.	Geliştirilen kapiler elektroforez yöntemi ile elde edilen elektroferogramlar, $\lambda=192$ nm	80

TABLÖLER

	SAYFA
Tablo 1.	Kapiler elektroforezde kullanılan dedektörler
	38

Tablo 2.	Cihaz parametrelerinin validasyon parametreleri ile ilişkisi	39
Tablo 3.	Yöntem optimizasyonunda kullanılan tampon çözeltiler	49
Tablo 4.	Yöntem optimizasyon parametreleri	63
Tablo 5.	Geliştirilen yöntemin performans verileri	70
Tablo 6.	Parasetamol için tekrarlanabilirlik çalışması sonuçları	71
Tablo 7.	Klorfeniramin için tekrarlanabilirlik çalışması sonuçları	72
Tablo 8.	Psödoefedrin için tekrarlanabilirlik çalışması sonuçları	72
Tablo 9.	Dekstrometorfan için tekrarlanabilirlik çalışması sonuçları	73
Tablo 10.	4-Aminofenol için tekrarlanabilirlik çalışması sonuçları	73
Tablo 11.	Efedrin için tekrarlanabilirlik çalışması sonuçları	74
Tablo 12.	Parasetamol için gün içi ve günler arası analiz sonuçları	75
Tablo 13.	Klorfeniramin için gün içi ve günler arası analiz sonuçları	75
Tablo 14.	Psödoefedrin için gün içi ve günler arası analiz sonuçları	76
Tablo 15.	Dekstrometorfan için gün içi ve günler arası analiz sonuçları	76
Tablo 16.	4-Aminofenol için gün içi ve günler arası analiz sonuçları	77
Tablo 17.	Efedrin için gün içi ve günler arası analiz sonuçları	77
Tablo 18.	Sistem uygunluk testleri	78
Tablo 19.	Parasetamol için miktar tayini sonuçları	81
Tablo 20.	Psödoefedrin için miktar tayini sonuçları	81
Tablo 21.	Klorfeniramin için miktar tayini sonuçları	82

Tablo 22.	Dekstrometorfan için miktar tayini sonuçları	82
Tablo 23.	4-Aminofenol için miktar tayini sonuçları	83
Tablo 24.	Efedrin için miktar tayini sonuçları	83
Tablo 25.	Parasetamol için geri kazanım sonuçları	84
Tablo 26.	Psödoefedrin için geri kazanım sonuçları	85
Tablo 27.	Klorfeniramin için geri kazanım sonuçları	85
Tablo 28.	Dekstrometorfan için geri kazanım sonuçları	86
Tablo 29.	4-Aminofenol için geri kazanım sonuçları	86
Tablo 30.	Efedrin için geri kazanım sonuçları	87

SİMGELER VE KISALTMALAR

4-AF	4-Aminofenol
X_{ort}	Aritmetik ortalama

ACE	Afinite kapiler elektroforezi
ACN	Asetonitril
CCE	Kiral kapiler elektroforez
CE	Kapiler elektroforez
CEC	Kapiler elektrokromatografi (Dolgulu kolon elektrokromatografi)
CGE	Kapiler jel elektroforez
CIEF	Kapiler izoelektrik odaklama
CITP	Kapiler izotakoforez
COX	Siklooksijenaz
CZE	Kapiler zon elektroforez
DEK	Dekstrometorfan
dak	Dakika
EFN	Efedrin
EOF	Elektroosmotik akış
GIS	Gastrointestinal sistem
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
KAF	Kafein
KLO	Klorfeniramin
kV	Kilovolt
LOD	Gözlenebilirlik sınırı
LOL	Doğrusallık limiti, Üst tayin sınırı
LOQ	Tayin alt sınırı

N	Etkinlik (Teorik tabaka sayısı); Normal (Derişim birimi olarak)
NSAI	Nonsteroidal antienflamatuvar
PAR	Parasetamol
PRO	Propifenazon
PSO	Psödoefedrin
r	Korelasyon katsayısı
R^2, r^2	Determinasyon katsayısı
RSD	Bağıl standart sapma
s	Saniye
SH	Standart Hata
SD	Standart Sapma
t_{enj}	Enjeksiyon süresi
P_{enj}	Enjeksiyon basıncı
PG	Prostaglandin
UV-VIS	Ultraviyole – Görünür Bölge

1.GİRİŞ

Klorfeniramin (KLO), *Parasetamol* (PAR), *Psödoefedrin* (PSO), *Dekstrometorfan* (DEK)'in bulunduğu farmasötik formlar grip ve soğuk algınlığı gibi durumlarda ortaya çıkan; ateş, baş ağrısı, titreme, burun tıkanıklığı (konjesyon), sekresyon, öksürük, kırıklık hali ve genizde kaşıntı gibi semptomların giderilmesi amacıyla kullanılır. Bunun için de sıklıkla, nonsteroidal antienflamatuvar (NSAI) ağrı kesici, ateş düşürücü ilaçlar, antihistaminik ilaçlar, dekonjestan ilaçlar, antitüssif ilaçlar ve mukolitik ilaçlar tercih edilmektedir.

Bu etken maddeleri içeren farmasötik preparatların analizi için valide edilmiş, doğru, kesin, kolay uygulanabilen, özellikle de düşük maliyetli analiz yöntemine ihtiyaç duyulmaktadır. Kapiler elektroforez, bu özelliklere uyan ve ilaç analizlerinde sıkça uygulanan bir yöntemdir. Türkiye piyasasında bu dört etken maddenin bir arada bulunduğu farmasötik preparat Gripamol®'un kombinasyonundaki maddelerin ve bu maddelerden *parasetamol* ve *psödoefedrinin* safsızlıkları *4-aminofenol* (4-AF) ve *efedrinin* (EFN) de bu etken maddelerle aynı anda analizi için valide edilmiş bir kapiler elektroforez yöntemine literatürde rastlanmamış olması, bizi bu çalışmaya yönlendirmiştir.

Piyasada bulunan bir ilacın etkin, kaliteli ve güvenilir olabilmesi için ambalajı üzerinde yazılı olan etken maddeyi veya maddeleri yine üzerinde yazılı olan miktarlarda içermesi gerekmektedir. Etken madde safsızlıklarının tablet içerisinde bulunabilme sınırı da yapılan stabilite testleri sonucu otoritelerce belirlenmiştir. Çalışmamızda adı geçen analitler için yöntem geliştirilmesinin yanı sıra, Gripamol® tabletin üzerinde yazılı olan etken maddeleri yine üzerinde yazılı olan miktarlarda ihtiva edip etmediğine; ayrıca adı geçen safsızlıkların otoritelerce belirlenen sınırdan olup olmadığına da bakılmıştır.

Kapiler elektroforez, diğ er analitik yöntemlere göre yöntem geliştirme süresi daha kısa, sarf malzeme tüketimi ve maliyeti daha az, ayırım etkinliği daha yüksek, hızlı, doğru, tutarlı ve kolay uygulanabilen bir y ontemdir¹. Bu nedenle kapiler elektroforez yöntemiyle PAR, KLO, PSO, DEK, 4-AF ve EFN içeren karışımlarda her bir maddenin aynı anda miktar tayini için optimum yöntem parametreleri araştırılmış, optimize edilen yöntemin geçerliliğinin kanıtlanması amacıyla gözlenebilirlik sınırı, alt ve üst tayin sınırları, doğrusallık aralığı, kesinlik, doğruluk, seçicilik, sağlamlık ve tutarlılık gibi parametreler değerlendirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

Parasetamol (PAR), *Klorfeniramin* (KLO), *Psödoefedrin* (PSO), *Dekstrometorfan* (DEK)'un kombinasyonları farmasötik tabletlerde analjezik, antipiretik, antihistaminik, dekonjestan ve antitussif olarak kullanılmaktadır. Semptomatik tedaviye yönelik olan Gripamol® tablet grip ve soğuk algınlığı gibi durumlarda ortaya çıkan; ateş, burun tıkanıklığı, öksürük, kırıklık hali ve kas ağrıları, genizde kaşıntı gibi semptomların giderilmesi amacıyla kullanılır².

Soğuk algınlığının temel belirtileri arasında hapşırma, burun tıkanıklığı (konjesyon), sekresyon, kaşıntının eşlik ettiği boğaz ağrısı, öksürük, ses kısıklığı ve hafif olmakla birlikte gelişen baş ağrısı, ateş, titreme ve genel olarak kendini iyi hissetmeme durumu gelmektedir. Hastalardaki soğuk algınlığı belirtilerinin iyileşmesi ortalama 2-3 günden sonra başlar ve bazı hastalarda da 2 haftaya kadar sürebilir.

2.1. Soğuk Algınlığı İlaçlarının Sınıflandırılması

Non Steroidal Antienflamatuvar İlaçlar

1. Salisilik asit ve türevleri
2. Anilin ve p-aminofenol türevleri
3. 5-Pirazolon ve 3,5-pirazolidinon türevleri
4. N-Arılantranilik asit türevleri
5. Aril, heteroarilasetik ve propiyonik asit türevleri

Antitüssif İlaçlar

1. Opioid türevi antitüssif ilaçlar
2. Değişik yapıdaki antitüssif ilaçlar

α 1-Adrenerjik Reseptör Agonistleri (Dekonjestanlar)

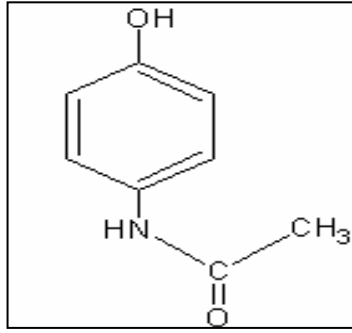
1. Katekolaminler
2. İmidazolin türevleri
3. Alifatik aminler
4. Asetamit türevleri

Antihistaminik İlaçlar

1. Etanolaminler
2. Etilendiamin türevleri
3. Arilalkilamin türevleri
4. Piperazin türevleri
5. Fenotiazinler
6. Piperidin türevleri
7. Trisiklik antihistaminikler

2.2. *Parasetamol* ile İlgili Genel Bilgiler

2.2.1. Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri



Şekil 1. PAR molekülü

Kapalı Formül : $C_8H_9NO_2$

Kimyasal formül:

- 4'- Hidroksiasetanilid (IUPAC)
- N-(4-Hidroksifenil)asetamid
- N-Asetil-p-aminofenol

PAR'ın diğer adları (sinonimleri):

- Asetaminofen
- p-Hidroksiasetanilid
- p-Asetamidofenol
- p-Asetaminofenol
- N-Asetil-p-aminofenol

Molekül Ağırlığı: 151,17 g/mol

Fiziksel Özellikleri: *Parasetamol* beyaz, kokusuz kristalize bir tozudur. Suda sınırlı ölçüde çözünür; 1 kısım asetaminofen 20 kısım su ve 10 kısım alkolde çözünür. Eter ve metilen klorürdeki çözünürlüğü çok azdır.

2.2.2. Farmakolojik özellikleri

Parasetamol dünya üzerinde çok geniş bir coğrafyada kullanımı olan ve en çok bilinen analjezik, antipiretik bileşiktir. İlk olarak 1878 yılında keşfedilen *parasetamol* ulaşılması kolay ve düşük maliyetli bir bileşik olması nedeniyle çok tercih edilmektedir.

Parasetamol'ün etki mekanizması halen tam olarak aydınlatılamamıştır. Ancak yine de in vivo çalışmalarda *parasetamol* prostaglandin sentez inhibitörü ve siklooksijenaz enzim olan COX-2 selektif inhibitörü olduğu bilinmektedir.

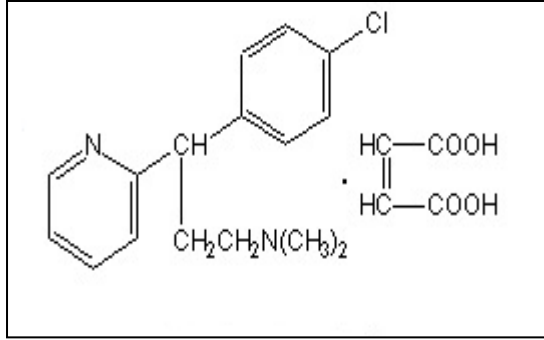
Parasetamol, *p*-aminofenol grubu bir nonsteroidal antienflamatuvar (NSAİ) ilaçtır³. Bu grup NSAİ ilaçlardan tedaviye ilk sokulan asetanilit, hastaya verildikten kısa bir süre sonra anilin ve *parasetamol*'ün oluştuğu görülmüş, etken şeklin *parasetamol* olduğu anlaşıncaya tedaviye bununla devam edilmiştir.

Parasetamol, diğer NSAİ ilaçlara kıyasla düşük antiplatelet aktivite ve düşük gastrointestinal sistem (GİS) hasarına neden olur. Bu iki özellik klinik tedavi bakımından çok önem taşımaktadır. Gastrointestinal yan etki oluşturmaması çocuklarda anajezik, antipiretik amaçla kullanıldığında aspirin gibi Reye sendromuna neden olmaması ve gebelerde kullanılabilmesi *parasetamol*'ü güvenli ve kullanışlı bir ilaç yapmaktadır.

PAR, mutad dozda oral alımının ardından tamamına yakını gastrointestinal kanaldan emilerek 30 dakika içinde analjezik etki göstermeye başlar ve 90 dakikada en yüksek plazma derişimine ulaşır. Analjezik etkisi 3-4 saat sürer. Oral biyoyararlanımı % 63-89 olup karaciğerden ilk geçiş etkisine maruz kalma oranı düşüktür. Eliminasyon yarılanma ömrü 3,3 saattir^{2,3}.

2.3. Klorfeniramin ile İlgili Genel Bilgiler

2.3.1. Kimyasal ve Fiziksel Özellikler



Şekil 2. KLO molekülü

Kapalı Formül : $C_{16}H_{19}ClN_2.C_4H_4O_4$

Kimyasal Formül:

(+/-)-3-(4-Klorofenil) -NN-dimetil-3-(2-piridil)propilamin hidrojen maleat

Molekül Ağırlığı: 390,9 g/mol

Fiziksel Özellikleri: *Klorfeniramin* maleat; beyaz kokusuz kristal yapıda tozdur. Suda serbestçe çözünür; alkol ve kloroformda çözünür; eterde az çözünür^{2,3,4}.

2.3.2.Farmakolojik Özellikleri

Klorfeniramin oral yoldan kullanılan propilamin türevi bir H₁-reseptör blokörüdür. *Klorfeniramin* allerjik rinit ve allerjik dermatozların tedavisinde kullanılır. Serbest histamin ile kompetisyona girerek histamin H₁-reseptörlerine bağlanır. Bu grup ilaçlar gastrointestinal kanal, geniş kan damarları ve bronş düz kasında H₁-reseptörleri düzeyinde

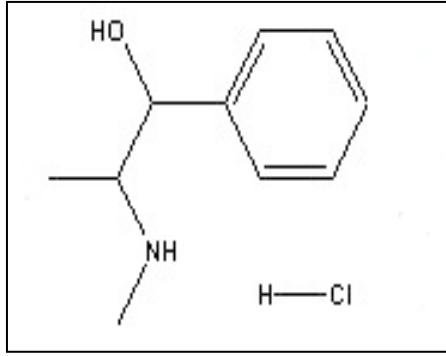
histaminin etkilerini bloke ederler. H₁-reseptörlerinin blokajı etkilenen bölgede histamine bağı olarak ortaya çıkan ödem, kızarıklık ve pruritusu baskılar.

H₁-reseptör blokörlerinin orta derecede antikolinerjik etkileri de vardır. Antikolinerjik aktiviteleri santral muskarinik etkilerinden kaynaklanır. Klofeniramin'in sedatif etkileri santral histaminik reseptörleri antagonize etmesine bağıdır. *Klorfeniramin* kronik olarak kullanıldığında ekilerine karşı belirli ölçüde tolerans gelişebilir, fakat bu arada sedatif etkisi de azalır.

Klorfeniramin'in etkisinin başlama süresi 30-60 dakika arası olup, maksimum konsantrasyona 6 saatte ulaşır. *Klorfeniramin* kanda proteinlere % 72 oranında bağılanır. Önce gastrointestinal mukozada metabolize olur, ardından karaciğerde ilk geçiş metabolizmasına uğrar^{2,3}.

2.4. *Psödoefedrin* ile İlgili Genel Bilgiler

2.4.1. Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri



Şekil 3. PSO molekülü

Kapalı Formül : $C_{10}H_{15}NO.HCl$

Kimyasal Formül:

(+)-(1S,2S) –2–Metilamino–1–fenil–propan–1–ol

Molekül Ağırlığı: 201,7g/mol

Fiziksel Özellikleri: *Psödoefedrin* hidroklorür beyaz veya sarımsı beyaz renkte kristaller veya kristalize toz halinde bulunur. Kokusuz veya çok hafif kokuludur. Suda 1:0,5; alkolde 1:3; kloroformda 1:91 ve eterde 1:7000 oranında çözünür^{2,3,4}.

2.4.2. Farmakolojik Özellikleri

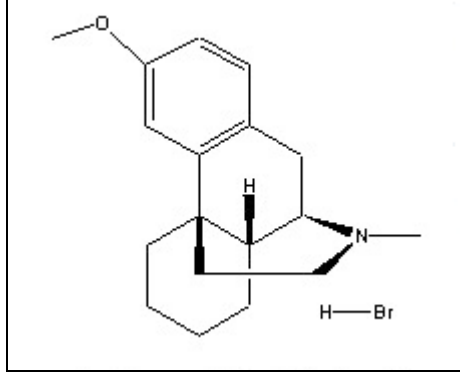
Psödoefedrin, *efedrinin* S stereoizomeri olup, *efedrinin* kuvvetli ve illegal bir santral sinir sistemi stimulanı olan amfetamine kimyasal benzerliğinden dolayı suistimalini engellemek amacıyla piyasada bulunan *efedrin* türevidir.

Psödoefedrin semptomimetik bir ilaçtır. *Psödoefedrin* hem α hem de β reseptör üzerinde etkili olmakla birlikte β reseptörler

zerindeki etkileri daha zayıftır. Solunum yolu mukozasındaki α adrenerjik reseptör üzerindeki direkt etkisiyle vazokonstrüksiyon yaparak ŐiŐmiŐ durumdaki nazal mukozanın büzülmesini, dokulardaki hiperemi, dem ve nazal konjesyonun azalmasını ve nazal hava yolu açıklığının artmasını sağlar. Tıkalı durumdaki staki borusunun açılmasını saęlayabilir².

2.5. Dekstrometorfan ile İlgili Genel Bilgiler

2.5.1. Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri



Şekil 4. DEK molekülü

Kapalı Formül : $C_{18}H_{26}BrNO$

Kimyasal Formül:

- (+) –3–Metoksi–9a–metilmorfinan hidrobromür monohidrat
- (9S,13S,14S) –6,18–Dideoksi–7,8–dihidro–3–O–metilmorfin hidrobromür monohidrat
- (+) –3–Metoksi–17–metilmorfinan hidrobromür

Molekül Ağırlığı : 352,32 g/mol

Fiziksel Özellikleri: *Dekstrometorfan* beyaz veya beyaza yakın renkte, hafif kokulu kristal bir tozdur. Suda 1:65 oranında çözünür; alkol ve kloroformda serbestçe çözünür. Eterde pratik olarak hiç çözünmez. Kloroformdaki çözeltisi su damlacıkları oluşumu nedeniyle berrak olmayabilir^{2,3,4}.

2.5.2. Farmakolojik Özellikleri

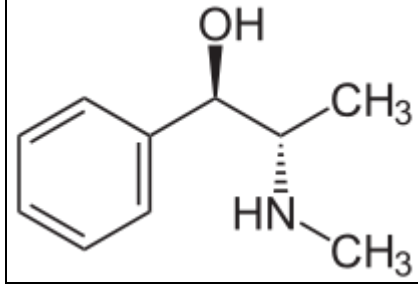
Levorfanol'un kodein analogunun *d*-izomeri olan *dekstrometorfan* (DEK), öksürük spazmlarını medulladaki öksürük merkezini baskılama yoluyla kontrol ederek bir öksürük giderici ajan olarak kullanılmaktadır⁴.

Dekstrometorfan oral yoldan kullanılan antitussif bir ilaçtır. Opiyat agonistlerine benzerse de onlarla aynı özellikleri taşımaz. *Dekstrometorfan*'ın morfin benzeri tek özelliği antitussif etki göstermesidir. Kronik kuru öksürüğün tedavisinde kullanılır; ekspektoran aktivitesi yoktur. Çoğunlukla öksürük ve soğuk algınlığına karşı kullanılan preparatların bileşimine girer. *Dekstrometorfan* öksürüğü baskılamak üzere medulladaki öksürük merkezini doğrudan etkileyebilir. Terapötik dozlarda siliyer aktivite üzerine herhangi bir etkisi yoktur.

Yetişkin bir insana 30 mg oral yoldan verildiğinde öksürük giderici etkinliğini 8 – 12 saat aralığında göstermektedir. Yan etkileri baş dönmesi ve sindirim sistemi rahatsızlıklarıdır. Fakat bu yan etkiler kodeinden daha az sıklıkta gözlenir. Monoamin oksidaz inhibitörü kullanan hastalara verilmemelidir. DEK'in ilaç suistimalinde kullanıldığını belirten raporlar bulunmaktadır⁴.

2.6.Efedrin ile İlgili Genel Bilgiler

2.6.1. Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri



Şekil 5. EFN molekülü

Kapalı Formül: $C_{10}H_{15}NO$

Kimyasal Formül:

(1R,2S)-2-(metilamino)-1-fenilpropan-1-ol (IUPAC)

Molekül Ağırlığı: 165,23 g/mol

Fiziksel Özellikleri: *Efedrin* beyaz yada beyaza yakın renkte kristal toz halde veya renksiz kristaller halinde bulunur. Suda çözünürlüğü iyidir^{2,3,4}.

2.6.2. Farmakolojik Özellikleri

Efedrin, Ephedraceae familyasından Ephedra adlı bir cins bitkinin çeşitli türlerinden elde edilen bir alkaloiddir⁵. Günümüzde sentetik olarak sentezlenmektedir.

Efedrin karma etkili bir adrenerjik agonisttir. Sinir uçlarında depolanmış noradrenalinin salıverilmesi ile beraber α ve β reseptörleri doğrudan da uyarılabilmektedir. Oral emilimi iyidir, santral sinir sistemine kolaylıkla geçebilmektedir. Bronkodilatasyon yapabilmesi sebebiyle

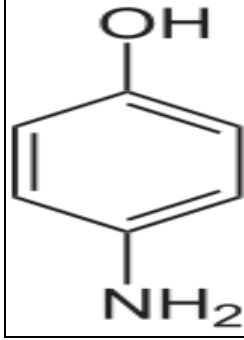
bazen kronik astım tedavisinde profilaktik olarak atakları önlemede kullanılmasına rağmen akut astım atağının tedavisinde kullanılmaz.

Efedrin, santral sinir sisteminde hafif bir uyarı oluşturur bu sayede uyanıklığı artırır, yorgunluğu azaltır ve uykuyu engeller. Aynı zamanda atletik performansı da iyileştirir.

Efedrin astım tedavisinde nazal dekonjestan olarak ve kan basıncını artırmak amacıyla kullanılır. Günümüzde yan etkisi daha az ve etkisi daha fazla olan ilaçlar ortaya çıktığından klinikte kullanımı giderek azalmıştır⁴.

2.7. 4-Aminofenol ile İlgili Genel Bilgiler

2.7.1. Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri



Şekil 6. 4-Aminofenol molekülü

Kapalı Formül : C_6H_7NO

Kimyasal Formül: 4-Aminofenol

Molekül Ağırlığı : 109,13 g/mol

Fiziksel Özellikleri: 4-Aminofenol beyaz toz halinde bulunur. Suda çözünürlüğü zayıftır sıcak suda daha iyi çözünür alkolde çözünürlüğü iyidir. 25°C'de suda 1,5 g/100 mL çözünür^{4,5,6}.

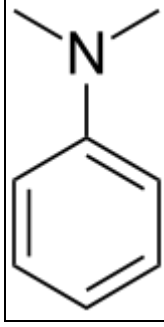
2.7.2. Farmakolojik Özellikleri

4-Aminofenol asetik asitle birlikte *parasetamol*ün sentez yolağında rol alır. Elde edilen *parasetamol* uygun şartlarda saklanmadığında 4-Aminofenol ve asetik aside dönüşür.

4-Aminofenol teratojenik ve nörotoksik etki gösterir. Bu nedenle 4-AF, *Parasetamol* içerisinde tayin edilmesi gereken safsızlıklardan birisidir. Nitekim Avrupa Farmakopesi bu sınırı %0,005 a/a olarak belirlemiştir².

2.8. N,N- Dimetilanilin ile İlgili Genel Bilgiler

2.8.1. Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri



Şekil 7. N,N- Dimetil anilin molekülü

Kapalı Formül : $C_8H_{11}N$

Kimyasal Formül:

- N,N-Dimetilanilin (IUPAC)
- Dimetilaminobenzen

Molekül Ağırlığı: 121,18 g/ mol

Fiziksel Özellikleri: N,N- Dimetil anilin, açık sarı renkli, keskin kendine has kokulu ve sıvı halde bulunur. Suda çözünmez lipofilik yapıdadır².

2.8.2. Farmakolojik Özellikleri

N,N-Dimetil anilin, DEK'in safsızlıkları arasında yer alır⁶. Avrupa Farmakopesi'nde maksimum 10 ppm'e kadar bulunmasına izin verilmiştir⁶.

N,N-Dimetil anilin toksik bir maddedir. N,N- Dimetil anilinin toksik özelliklere sahip olması ve çalışmamızdaki diğer altı analit ile geçimsiz olması sebebiyle analizi yapılmamıştır.

2.9. Analiz yöntemleri

Chen ve arkadaşları *parasetamol*, *psödoefedrin*, *dekstometorfan* ve *klorfeniramin*i birlikte içeren tabletlerde kapiler zon elektroforez ile tayin yapmışlardır. Tayinde 75mm x 75µm x 375µm boyutlarında, etkin uzunluğu 45 mm olan silika kapiler kullanılmış, dedeksiyon dalgaboyu 214 nm, uygulanan voltaj 1,0 kV olarak ayarlanmıştır. Tampon çözeltisi olarak 75 mM sodyum borat-%15 asetonitril (pH 9,3) kullanılmıştır. LOD değerleri *parasetamol* için 0,22 µg/mL, *psödoefedrin* için 0,29 µg/mL, *dekstometorfan* için 0,42 µg/mL, *klorfeniramin* için 0,70 µg/mL olarak bulunmuştur⁷.

Gomez ve arkadaşları kodein, difenhidramin, *efedrin* ve noscapin içeren farmasötik formlarda kapiler zon elektroforez yöntemi ile ayırım yapmışlardır. Tampon çözeltisi olarak 20 mM tetraborat tamponu (pH 8,5) kullanılmış ve ayırım 10 dakikadan daha az sürmüştür. Dedeksiyon dalga boyu olarak 205 nm ve 250 nm kullanılmıştır⁸.

Romero ve arkadaşları *parasetamol* ve kodein içeren farmasötik formulasyonlarda ayırım yapmak için kapiler zon elektroforez kullanmışlardır. Tampon çözeltisi olarak 20 mM fosfat tamponu (pH 6,8) kullanılmış ve 15 kV voltaj uygulanmıştır. Optimize koşullar ile 3 dakikadan daha az sürede ayırım gerçekleşmiştir. Kalibrasyon doğrusunun oluşturulması ile $R>0,999$ ve kodein için LOD (Yöntemin gözlenebilme sınırı) 13,5 ng/mL *parasetamol* için de LOD 340 ng/mL ve RSD <3 değerleri elde edilmiştir⁹.

Palabıyık ve arkadaşları HPLC yöntemini kullanarak fenilefrin hidroklorür, *parasetamol*, *klorfeniramin* ve *dekstometorfan* hidrobromürün bir farmasötik müstahzardaki teşhisleri ve miktar tayinleri için geliştirdikleri yöntemde C_{18} kolon ve *psödoefedrin* internal

standardını kullanmışlardır. Mobil faz bileşeni olarak asetonitril ve sodyum perklorat (pH 3, 0,01 M) kullanılmış, mobil faz akış hızı 1,4 mL/dak olarak ayarlanmış ve UV dedektörü ile 204 nm dalga boyunda çalışılmıştır¹⁰.

Chen ve arkadaşları *psödoefedrin*, *dekstrometorfan*, difenhidramin ve *klorfeniramin* içeren ilaçlarda susuz kapiler elektroforez yöntemi ile analiz yapmışlardır. Tampon çözeltisi olarak %10 asetonitril içeren 40mM amonyum asetat çözeltisi kullanılmış, ayırım 25°C sıcaklıkta 25 kV voltaj ile 47 cm x 75 µm boyutlarında kapiler kullanılarak yapılmıştır. Derişim ve pik alanları grafiğe geçirilince *Psödoefedrin* için $R^2=0,9993$, *Dekstrometorfan* için $R^2=0,9971$, Difenhidamin için $R^2=0,9991$, *Klorfeniramin* için $R^2=0,9995$ değerleri elde edilmiştir. Alıkonma zamanı ve pik alanları için % RSD sırasıyla 0,37; 3,90; 0,73 ve 0,68 ve 2,80; 3,50; 1,60 ve 3,70 elde edilmiştir¹¹.

Hadad ve Mahmoud kafein, parasetamol, *psödoefedrin*, aspirin, *dekstrometorfan* ve *klorfeniramin* içeren farmasötik tabletlerde yüksek basınçlı sıvı kromatografi kullanarak ayırım yapmışlardır. Ayırım için C₁₈ silika kolon ve 214 nm dedeksiyon dalga boyu kullanılmıştır. Hareketli faz olarak 50:50 h/h, 40:60 h/h metanol içeren 10 mM NaH₂PO₄, 3mM heptan sülfonik asidin sodyum tuzu, %0,1 trietilamin karışımı (pH 2,5) kullanılmıştır¹².

Heydari R, HPLC yöntemi ile bir farmasötik müstahzardaki *parasetamol*, fenilefrin, *dekstrometorfan* ve *klorfeniraminin* eşzamanlı teşhisini ve miktar tayinini yapmıştır. Analizde PerfectSil Target, 250 x 4,6 mm, 5 µm kolon ile metanol/su (1 litrede 6,0 g amonyum asetat ve 10 mL trietilamin içeren, pH 5,0 ortofosforik asitle ayarlı) mobil fazı (95:5, h/h) kullanılmıştır. *Parasetamol* için 254 nm, fenilefrin için 220 nm, *klorfeniramin* ve *dekstrometorfan* için de 227 nm de çalışılmıştır.

Sırasıyla 162,6-650 µg/mL, 2,5-10 µg/mL, 7,5-30 µg/mL, 1-4 µg/mL derişim aralıklarında doğrusallık görölmüştür¹³.

Makino, d-metamfetamin içerisinde *efedrin* ve *psödoefedrin* tayinini yüksek basınçlı sıvı kromatografi yöntemini Capcellpack C₁₈ MGII (250 x 4,6mm) kolonu kullanarak analiz yapmıştır. Tampon çözelti olarak 50 mM KH₂PO₄ –asetonitril (94:6 h/h) kullanılmış ayrıca isokratik pompa sistemi ile 20 dakika içerisinde iki analit de ayrılmıştır. Dedeksiyon dalga boyu 210 nm'dir. LOD değeri iki analit için de 3 ppm bulunmuştur¹⁴.

Qi ve arkadaşları *parasetamol*, *dekstrometorfan* ve *psödoefedrin* içeren formülasyonlarda yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile analiz yapmışlardır. Ayrımda Hypersil CN kolonu (150x5,0 mm, 5 µm), tampon çözeltisi olarak dakikada 1,0 mL akış hızına ayarlı metanol asetonitril (25:57:18 h/h) çözeltisi kullanılmış, dalga boyu 220 nm ye ayarlanmıştır. Ayrım 10 dakikadan daha az sürmüştür. *Parasetamol* için 2,06–20,6 mg/mL, *psödoefedrin* için 0,202–2,02 mg/mL ve *dekstrometorfan* için 0,042–1,06 mg/mL derişim aralıklarında çalışılmıştır¹⁵.

Özaltın ve arkadaşları, propifenazon (PRO), *parasetamol* (PAR) ve kafeinin (KAF) üçlü kombinasyonunu içeren farmasötik preparatlardan bu maddelerin kapiler elektroforez ile aynı anda analizi için yeni bir miseller elektrokinetik kapiler kromatografi yöntemi geliştirmişlerdir. En iyi sonuçlar, BGE çözeltisi elektroliti olarak 30 mM sodyum dodesilsülfat içeren 20 mM pH 9,0 borat tamponu kullanılmasıyla elde edilmiştir. İç standart olarak diflunisal kullanılmıştır. Ayrım, eritilmiş silika kapilerde (50 µm iç çap, 44 cm toplam uzunluk, 35,5 cm etkin uzunluk) 25°C 'de, 50 mbar basınçla 3 s süreli hidrodinamik enjeksiyon ve 29 kV potansiyel uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Dedektör dalgaboyu 200 nm'dir. Bu şartlardaki göç zamanları PAR 5,17 dak, KAF 5,51 dak,

DİF 7,20 dak ve PRO 9,37 dak olarak bulunmuştur. Yöntemin doğrusallık aralığı PAR ve KAF için 2-200 µg/mL, PRO için 3-200 µg/mL olarak saptanmıştır. LOD değerleri, PAR ve KAF için 0,6 µg/mL, PRO için 0,8 µg/mL olarak bulunmuştur. Validasyon çalışmaları sonucunda geliştirilen yöntemin doğru, kesin, duyarlı, seçici, sağlam ve tutarlı olduğu ispatlanmıştır¹⁶.

Sekar ve arkadaşları, *parasetamol*, setrizin ve fenilpropanolamin içeren tabletlerde kapiler zon elektroforez ile basit ve seçici bir ayırım gerçekleştirmişlerdir. Tampon çözeltisi olarak 10 mM sodyum tetraborat (pH 9,0) iyi bir ayırım için yeterli olmuştur. Kullanılan kapiler 76 cm uzunluğunda (etkin uzunluğu 64,5 cm) silika kapilerdir. Bütün analitler 20 kV voltaj uygulanarak ayrılmış ve 195 nm de UV dedektör ile tayin edilmiştir. Ibuprofen iç standart olarak kullanılmıştır. *Parasetamol* için 10-1000 µg/mL, ($r^2=0,9978$); Setrizin için 2-50 µg/mL, ($r^2=0,9982$); Fenilpropanolamin için 10-100 µg/mL, ($r^2=0,9986$) derişim aralıklarında çalışılmış ve herbiri için uygun doğrusallık elde edilmiştir¹⁷.

Ye ve arkadaşları, *parasetamol* ve *p*-aminofenol içeren dozaj formlarında karbon disk elektrot kullanarak amperometik dedektör ile çalışılmıştır. Kapiler boyu 8,5 cm kullanılarak ve 2000 V voltaj uygulanarak 150 saniyede ayırım gerçekleşmiştir. Tampon çözeltisi olarak $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7\text{-KH}_2\text{PO}_4$ (pH 7,2) kullanılmıştır. *Parasetamol* için LOD $1,4 \times 10^{-6}$ mol/L ve *p*-aminofenol için LOD değeri $5,9 \times 10^{-7}$ mol/L olarak bulunmuştur. Günler arası pik yüksekliği (RSD $\leq 2,3$) ile alıkonma zamanı (RSD $\leq 1,3$) tekrarlanabilir sonuçlar vermiştir¹⁸.

Ravisankar ve arkadaşları, HPLC yöntemi ile bir farmasötik müstahzardaki *parasetamol*, ibuprofen ve klorzoksazonu tayin etmişlerdir. İnternal standart olarak ketoprofen kullanılmıştır. Analiz için Kromasil C8 (250x4,6 mm, 5 µm) kolonu, mobil faz olarak asetonitril ve

trietilamin (%0,2'lik çözeltisi, ortofosforik asitle pH 3,2'ye ayarlı) kullanılmıştır. UV dedektör ile 215 nm'de çalışılmıştır. Doğrusallık 2-10 µg/mL derişim aralığında elde edilmiş ve LOQ değerleri *parasetamol* için 10 ng/mL, ibuprofen için 50 ng/mL ve klorzoksazon için de 20 ng/mL bulunmuştur¹⁹.

Liu ve arkadaşları, diastereoisomer alkaloidler olan *efedrin* ve *psödoefedrin*i insan idrarında elektrokemilüminesans dedektör kullanılan basit kapiler elektroforez yöntemi ile ayırmışlardır. *Efedrin* için LOD değeri 45 ng/L ve *psödoefedrin* için ise LOD değeri 52 ng/L olarak bulunmuştur. Alıkonma zamanı ve pik alanı için tekrarlanabilirlik beş numune üzerinden hesaplanmış ve alıkonma zamanları için RSD değerleri 1,3'den küçük, pik alanları için RSD değerleri 2,5'den küçük bulunmuştur²⁰.

Fijalek ve arkadaşları, *parasetamol* ve ana safsızlık maddesi *4-aminofenol* için amperometrik dedektörlü yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yöntemini geliştirmişlerdir. Kolon olarak Luna 5µm C-18 (100x4,6 mm) kullanılmıştır. Tampon çözelti olarak %18 metanol içeren ve ortofosforik asit ile pH 4 e ayarlanmış LiCl kullanılarak ayırım 250 saniyede tamamlanmıştır²¹.

Suntornsuk ve arkadaşları, *parasetamol* ve *klorfeniramin* içeren tabletlerde miseller elektrokinetik kapiler kromatografi ile tayin yapmışlardır. Ayırım, 10 mM pH 9,0 sodyum dihidrojenfosfat –sodyum tetraborat tamponuna 50 mM sodyum dodesil sülfat (SDS) ve %26 h/h asetonitril ilave edilmesi ile 25,5 dakikada tamamlanmıştır. Kapiler etkin uzunluğu 50 cm olup, ayırım için 15 kV voltaj uygulanmıştır. Dedektör dalga boyu 214 nm ye ayarlanmış ve sıcaklık 30°C olarak belirlenmiştir. Doğrusallık, 10-250 µg/mL derişim aralığında çalışılarak $r^2 > 0,999$ bulunmuştur. *Parasetamol* için LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0,4

$\mu\text{g/mL}$, 2 $\mu\text{g/mL}$ (RSD=3,1); *klorfeniramin* için LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0,5 $\mu\text{g/mL}$, 4 $\mu\text{g/mL}$ (RSD =2,4) bulunmuştur²².

Nemeth ve arkadaşları, *Parasetamol* içeren farmasötik preparatlarda *parasetamol* safsızlığı *4-aminofenol* miktarını elektrokinetik kapiler kromatografi yöntemi ile tayin etmişlerdir. Tampon olarak 75 mM sodyum dodesil sülfat içeren fosfat tamponu (pH 9,0) kullanılmıştır. Uygulanan voltaj 25 kV olup, analiz süresi 10 dakikada tamamlanmıştır. Derişim aralığı *parasetamol* için 20-260 $\mu\text{g/L}$, *4-aminofenol* için 20-150 $\mu\text{g/L}$ olarak belirlenmiş ve bu bilgilere göre de *4-aminofenol* için LOQ değeri 6 $\mu\text{g/L}$ bulunmuştur²³.

Ruan ve arkadaşları *parasetamol*, *psödoefedrin*, *dekstrometorfan* ve *klorfeniramin*i insan plazmasından kütle spektrometrelili sıvı kromatografisi yöntemi ile ayırmışlardır. Ayırım için YMC-ODS-AQ C₁₈ (100 mmx2,0mmx3 μm) kolon ve iç standart olarak difenhidramin kullanılmıştır. Tampon çözelti olarak %0,3 h/h asetik asit ve metanol içeren ve dakikada 0,3 mL akış hızına sahip çözelti kullanılmıştır. Çalışılan derişim aralıkları *parasetamol* için 10-5000 ng/mL, *psödoefedrin* için 2-1000 ng/mL, *dekstrometorfan* için 0,05-25 ng/mL ve *klorfeniramin* için de 0,1-50 ng/mL'dir²⁴.

Chen ve arkadaşları, *dekstrometorfan*, *klorfeniramin*, *psödoefedrin* ve *parasetamol* içeren farmasötik formlarda akış enjeksiyonlu kapiler elektroforez ile numune istifleme yöntemi kullanarak analiz yapmışlardır. Tampon çözelti olarak 55 mM %15 ACN içeren pH 9,3 ayarlı borat tamponu kullanılmıştır. *Dekstrometorfan* için LOD değeri $1,94 \times 10^{-5}$ mg/ml, *klorfeniramin* için LOD değeri $0,64 \times 10^{-5}$ mg/mL, *psödoefedrin* için LOD değeri $1,16 \times 10^{-5}$ mg/mL, *parasetamol* için LOD $2,84 \times 10^{-5}$ mg/mL değerleri bulunmuştur. Tekrarlanabilirlik için RSD

değerleri *dekstrometorfan* için %1,01, *klorfeniramin* için %1,91, *psödoefedrin* için %0,89 ve *parasetamol* için de %0,92 bulunmuştur²⁵.

Fang ve arkadaşları, *psödoefedrin*, *parasetamol* ve *dekstrometorfan* içeren tabletlerde UV dedektör kullanılan kapiler elektroforez yöntemini kullanarak ayırım gerçekleştirmişlerdir. Tampon çözeltisi olarak pH 7,0'ye ayarlı 20 mM fosfat tamponu kullanılmıştır. UV dedektör dalga boyu 200 nm ye ayarlanmış ve ayırım 5 dakikada tamamlanmıştır. *Psödoefedrin* için LOD değeri 0,75 µg/mL, *parasetamol* için LOD 1,2 µg/mL, *dekstrometorfan* için 2,5 µg/mL bulunmuştur²⁶.

Barbas ve arkadaşları, izokratik bir HPLC yöntemi ile farmasötik kapsül formlarında *parasetamol*, fenilefrin ve *klorfeniramin* tayin etmişlerdir. Kolon olarak Supelco Discovery[®] HS PEG (5 µm, 15 cm x 0,46 cm) kullanılmıştır. Tampon çözelti olarak akış hızı 1 mL/dakika olan 20 mM fosfat tamponu (pH 7) kullanılmıştır. Fenilefrin ve *klorfeniramin* için 210 nm *parasetamol* için 305 nm dalga boyunda dedeksiyon yapılmıştır. Aynı maddeler için bir kapiler elektroforez yöntemi de geliştirilmiştir. Tampon çözelti olarak 6,2 pH da 0,5 mM SDS ilaveli fosfat tamponu kullanılmıştır. Voltaj 30 kV olarak uygulanmış ve analiz 4,5 dakikada sona ermiştir. Sonuçlar HPLC yöntemi ile paralellik göstermektedir²⁷.

Zhi ve arkadaşları, *parasetamol*, vitamin C, kafeik asit ve klorojenik asit içeren tabletlerde bu dört etken maddenin kapiler zon elektroforez yöntemi ile amperometrik dedektör kullanarak ayırımını gerçekleştirmişlerdir. Çalışma elektrodu olarak karbon disk elektrodu kullanılmış ve 0,95 V, ayırım potansiyeli olarak seçilmiştir. Kapiler zon elektroforez için tampon çözelti olarak 30 mM pH 9,5 borat tamponu kullanılmıştır. Ayırım 22 dakika sürmüştür. LOD değerleri 5×10^{-7} mg/mL ile 10^{-6} mg/mL arasında değişmektedir²⁸.

Zhao ve arkadaşları, difenhidramin ve *efedrin* arasında yapısal etkileşimi incelemek amacıyla elektrokemilüminesans yöntemini geliştirmişlerdir. Optimum şartlar sağlandığında difenhidramin için 2,00 ve 40,00 µg/L derişim aralıklarında doğrusallık sağlanmıştır. R= 0,9995 ve LOD değeri 1,20 µg/L dir.Geri kazanım % 98-106 arasındadır²⁹.

Xiao ve arkadaşları, *parasetamol* tayininde kapiler elektroforez ve kemilüminesans yöntemlerini birlikte kullanmışlardır. Yöntem, *parasetamol* ile luminol-potasyum hekzasiyanoferrat arasında meydana gelen luminesansın ölçümü esasına dayanır. *Parasetamol* kapiler ile taşınmış ve dedektör penceresinde meydana gelen luminesans ile tayin edilmiştir. Maksimum kemilüminesans sinyali 30 mM sodyum borat tamponuna (pH 9,4) 0,5 mM luminol ve 0,8 mM K₃[Fe(CN)₆] un 100 mM NaOH içerisindeki çözeltisi ilave edilince elde edilmiştir. Doğrusal aralık $6,6 \times 10^{-10}$ mg/mL ile $6,6 \times 10^{-10}$ mg/ml arasında elde edilmiş ve R=0,9999, LOD değeri ise $5,6 \times 10^{-10}$ mg/mL bulunmuştur³⁰.

Amini ve arkadaşları, kafein, *efedrin* ve *psödoefedrin* içeren tabletlerde kapiler elektroforez yöntemini kullanmışlardır. Çözeltiler tabletlerin 0,2 M HCl ile ekstre edilmesi ilehazırlanmıştır. Tampon çözelti olarak % 7,5 β-siklodekstrin içeren pH 2,5 trietanolamin çözeltisi kullanılmıştır³¹.

Chen ve arkadaşları *parasetamol*ün hidrolizi ile oluşan p-aminofenol ve hidroliz olmayan *parasetamol* tayini için kapiler elektroforez ve elektrokimyasal yöntemleri kullanmışlardır. Çalışma elektrodu olarak 300 µm karbon disk elektrod kullanılmış ve +0,80 V potansiyel uygulanmıştır. Kapiler elektroforez yönteminde iki analit 6 dakikada 50 cm'lik silika kapiler kullanılarak ayrılmışlardır. Tampon çözelti olarak pH'sı 6,5 olan 25 mM fosfat tamponu kullanılmış ve ayırım

için ise 18 kV voltaj uygulanmıştır. *Parasetamol* 0,5 M HCl ile değişik sıcaklıklarda hidroliz olmuştur. 70°C'de $5,027 \times 10^{-3}$, 80°C'de $8,522 \times 10^{-3}$, 90°C'de $18,60 \times 10^{-3}$ ve 100°C'de $32,76 \times 10^{-3}$ mM p-aminofenol tayin edilmiştir³².

Zhang ve arkadaşları kodein, *efedrin*, guanefesin ve *klorfeniramin* tayini için sıvı kromatografi yöntemini kullanmışlardır. Kolon olarak C₁₈ (150 mm x 2,0 mm x 3 µm), tampon çözelti olarak 10 mM amonyum asetat, formik asit ve metanol 62:0,2:38 h/h/h 0.2 mL/dakika akış hızında kullanılmıştır. Kodein için 0,08 -16 ng/mL, *efedrin* için 0,8-160 ng/mL, guanefesin için 80-16000 ng/mL *klorfeniramin* için 0,2-40 ng/mL derişim aralıklarında doğrusallık sağlanmıştır³³.

2.10. Kapiler Elektroforez

2.10.1. Teorik Bilgiler

Elektroforez, doğru akımın uygulandığı bir tampon çözeltide yüklü taneciklerin diferansiyel göç hızlarına dayanan bir ayırma yöntemidir. Bu ayırma yöntemini bulan İsviçreli kimyacı Arna Tiselius bu buluşu ile 1948'de Nobel Ödülü almıştır. Bu teknikle inorganik anyon ve katyonlar, katekolaminler, amino asitler, ilaçlar, vitaminler, peptitler, karbonhidratlar, proteinler, nükleik asitler, nükleotitler ve polinükleotitler gibi pek çok madde ayrılabilir.

Elektroforez, bir düzlemde bulunan destek ortamında gerçekleşiyorsa “tabaka elektroforezi”, kapiler tüp içinde gerçekleşiyorsa “kapiler elektroforez” adını alır.

Elektroforetik ayırmanın temeli ince bir tüp içerisindeki sulu bir tampon çözeltiye numunenin küçük bir miktarının enjeksiyonu sonrası tampon çözeltiye iki ucundaki elektrotlar yardımıyla yüksek bir doğru akım potansiyeli uygulanması sonucu ortamdaki iyonların elektrotlardan birine göç etmesidir. Numunede bulunan taneciklerin göç hızları taneciklerin yüküne ve büyüklüklerine bağlıdır. Elektroforetik olaylarda numune içerisindeki analizi yapılan maddelerin ayrımı, maddenin yük/boyut oranlarının farklı olması esasına dayanır. Bu oranın büyük olması durumunda elektrik alanında iyon daha hızlı hareket eder.

Kapiler elektroforezde uygulanan yöntemlerin sınıflandırılması ve İngilizce kısaltmaları şöyledir^{34,35,36}.

- 1)Kapiler zon elektroforez (CZE)
- 2)Kapiler jel elektroforez (CGE)
- 3)Kapiler izotakofrez (CITP)
- 4)Kapiler izoelektrik odaklama (CIEF)
- 5)Kapiler elektromatografi
 - a) Dolgulu kolon elektromatografi (CEC)
 - b) Miseller elektrokinetik kapiler kromatografi (MECC)
 - c) Mikroemülsiyon elektrokinetik kapiler kromatografi (MEECC)
 - d) Kiral kapiler elektroforez (CCE)
 - e) Afinite kapiler elektroforez (ACE)
- 6)Mikroçip kapiler elektroforez ve elektrokromatografi (MCE veya MCEC)

CZE, kapiler elektroforezin ilk uygulanmış olan temel türüdür. CZE’de, kapiler içindeki iyonlara iki kuvvet etki eder. Birincisi, uygulanan voltajdan kaynaklanan elektriksel alanın iyon üzerinde oluşturduğu kuvvet (elektroforetik kuvvet), ikincisi de iyonun bulunduğu tampon çözeltinin akışıdır (elektroosmotik akış). Elektriksel alan, pozitif yüklü iyonlar (katyonlar) üzerinde negatif yüklü elektrot (katot) yönüne doğru bir kuvvet oluştururken, negatif yüklü iyonlar (anyonlar) üzerinde de pozitif yüklü elektrot (anot) yönünde bir kuvvet oluşturur. Çözeltideki nötr moleküller elektriksel alandan etkilenmezler. Elektriksel alanın oluşturduğu kuvvet, iyonlarda elektroforetik göç denen harekete neden olur. İyonların elektroforetik göç hızları yük/çap oranına bağlıdır. Yük/çap oranı büyük olan iyonlar daha hızlı göç ederken, küçük olan iyonlar daha

yavaş göç ederler. İyonların göçünü etkileyen diğer kuvvet elektroosmotik akıştır. Bu akışın nedeni, kapilerin iç çeperinde elektrolit çözeltisi ile SiO^- grupları arasında çift tabaka oluşmasıdır. Kapilerin iç çeperinde pH 3'ün üzerinde silanol gruplarının deprotone olması ile negatif yüklü SiO^- grupları oluşur. BGE çözeltisindeki pozitif yüklü iyonlar, kapiler çeperine yaklaşır. Çepere çok yakın pozitif yüklü iyonlar hareketsizdir. Ancak çeperden uzaklaştıkça, çeperle pozitif yüklü iyonlar arasında elektrostatik çekim zayıflar, kapilere uygulanan elektrikselsel alanın iyonlar üzerindeki kuvveti baskın gelir ve pozitif yüklü iyonlar topluca negatif yüklü elektrota (katot) doğru göç ederler. Bu toplu göç, kapiler içindeki tamponun katoda doğru akmasına neden olur. Bu akışa elektroosmotik akış (EOF) denir.

Elektroosmotik akış hızı (V_{EOF}), eşitlik 2.1 ile gösterilir.

$$V_{\text{EOF}} = E \cdot \mu_{\text{EOF}} \quad (2.1.)$$

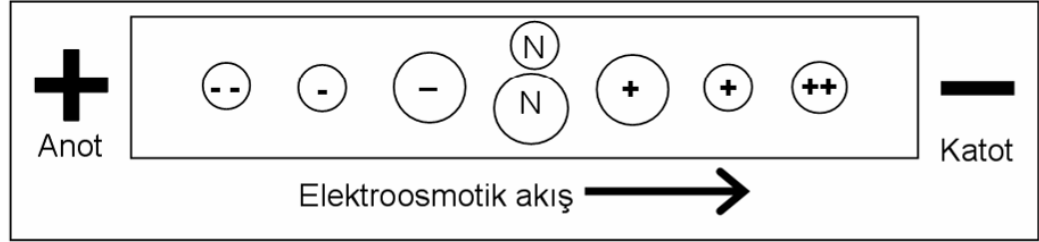
V_{EOF} : Elektroosmotik akış hızı

E: Elektrikselsel alan (V cm^{-1})

μ_{EOF} : Elektroosmotik hareketlilik

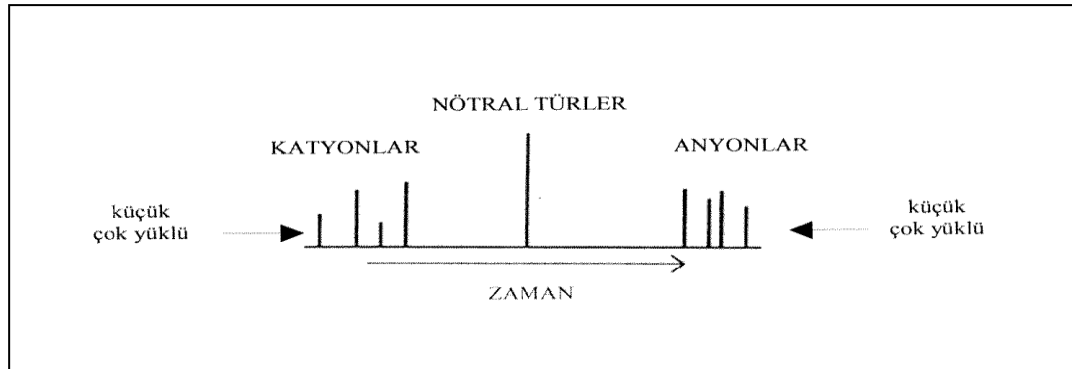
Kapiler çeperine yakın olan hareketli katman ile merkeze yakın olan hareketli katmanın medya getirdiği çift tabaka arasında oluşan potansiyele zeta potansiyeli (ξ) adı verilir. BGE çözeltisinin dielektrik sabiti arttıkça zeta potansiyeli düşer. Zeta potansiyeli arttıkça, BGE çözeltisinin elektroosmotik hareketliliği artar.

Elektroforezde, elektroosmotik akış baskın olduğundan katyonlar, nötral türler ve anyonlar katoda doğru hareket ederler. Elektroosmotik ve elektroforetik etkiler sonucunda CZE’de elüsyon sırası Şekil 8’de gösterilmiştir.



Şekil 8. Kapiler zon elektroforez’de iyonların elüsyon sırası

Yüklü çözünen maddeler, farklı elektroforetik hareketliliklere sahip oldukları için birbirlerinden ayrılırlar. Nötral çözünen maddeler birbirlerinden değil yüklü çözünen maddelerden ayrılırlar. Yüksek hareketliliğe sahip, daha fazla yüklü ve boyut olarak daha küçük katyonlar kapilerden ilk olarak geçerler. Kapilerden en son fazla yüklü küçük anyonlar geçerler. Şekil 9’da tipik bir elektroferogram görülmektedir. Nötral çözünen maddeler birbirlerinden farklı tip kapiler elektroforez ve miseller elektrokinetik kapiler kromatografi kullanılarak ayrılırlar.



Şekil 9. Örnek bir elektroferogram

Elektroforetik hız, kapillerin etkin uzunluğu (başlangıçtan dedektöre kadar olan uzunluğu) ve maddenin göç zamanından hesaplanır (Eşitlik 2.2).

$$v_a = v_{ep} + v_{EOF} = l_{etkin} / t_g \quad (2.2.)$$

v_a : Gözlenen elektroforetik hız

v_{ep} : Maddenin elektroforetik hızı

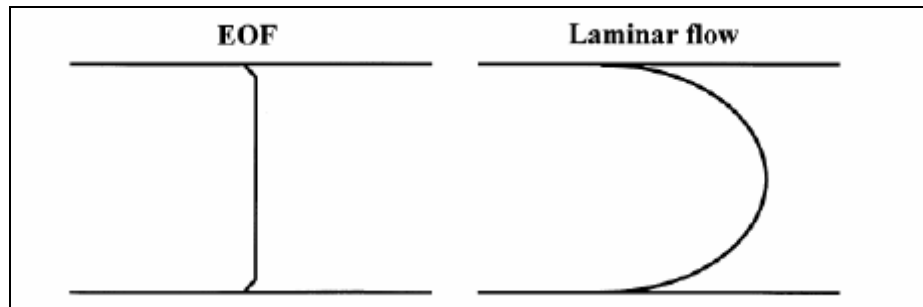
v_{EOF} : EOF hızı

l_{etkin} : Kapillerin etkin uzunluğu

t_g : Göç zamanı

EOF'yi hızlandırmak, yavaşlatmak, durdurmak veya tersine çevirmek için kapillerin iç yüzeyi değişik maddelerle kaplanabilir veya tampona değişik maddeler eklenebilir. Katyonik yüzey aktif maddeler tampona az miktarda eklenince EOF yavaşlamakta, katyonik yüzey aktif madde derişimi arttırılınca EOF durmakta, daha fazla eklenince de EOF ters yöne dönmektedir. Genelde pH'nın artmasıyla EOF artmaktadır. Çünkü yüksek pH'da kapiler iç çeperindeki SiO^- artar bu da EOF'de artışa neden olur.

Elektroosmotik akış göreceli olarak düz bir profile sahiptir. Şekil 10'da HPLC'deki laminar ve pompa akışı ile bir elektroosmotik akışın karşılaştırılması görölmektedir.



Şekil 10. a) Elektroosmotik akış

b) Basınç altındaki akış

Akış profilinin düz olması nedeniyle EOF, kolon kromatografisinde olduğu gibi bant genişlemesini önemli ölçüde etki etmez. Kapiler elektroforezde bant genişlemesi iki nedenle meydana gelir. Numune iyonlarının kapiler çeperinde adsorbsiyonu bantın geriye doğru kuyruklanmasına neden olurken Joule ısınması da bölgesel mikro konveksiyonlar oluşturarak bantın genişlemesine neden olur.

Ayırma için en uygun voltaj deneysel olarak bulunur. Voltajdaki artış elektroosmotik akışı artırır ve göç zamanını azaltır bu da kısa analiz süresine neden olur. Buna rağmen yüksek voltaj normal koşullarda uygulanmaz. Yüksek voltaj daha yüksek akım demektir ve Joule ısınısını artırır. Genelde 5-30 kV arası voltaj uygulanmaktadır. 40 kV üzeri voltaj normal koşullarda uygulanmaz çünkü kıvılcımlarla elektrik boşalması ve kapilerin kırılması söz konusudur.

Kapiler sıcaklığındaki değişim tamponun viskozitesinde azalma meydana getirecek ve daha fazla akımın akışına imkan tanıyacaktır. Kapiler içindeki ısının artışı geniş piklere, tekrar edilemeyen göç zamanlarına, numunenin bozulmasına veya denature olmasına ve hatta kapilerden elektriksel devamsızlık sonucu elektroforetik sistemin kapanışı sonucuna kadar varabilecek şekilde tamponun kaynamasına neden olur. Sonuçların tekrarlanabilirliği için sıcaklık termostatlı sistem sayesinde sabit tutulur.

Kapiler sıcaklığı kontrol edildiği zaman, tamponun iyonik gücündeki veya derişimindeki artış, zeta potansiyelini düşürdüğü için, elektroosmotik akışta azalma meydana gelecektir. Düşük tampon derişimi daha kısa analiz zamanı verirken, çok düşük tampon derişimlerine de engel olunmalıdır. Çünkü bu durum geniş ve simetrik olmayan pikler meydana getirir. Eğer tampon derişimi numune derişiminden az ise pik genişlemesi ve kuyruklanma gözlenir. Genel bir kural olarak, tampon

derişimi numunenin derişiminin 100 katı kadar olmalıdır. Tipik tampon derişimi 10-100 mM arasındadır.

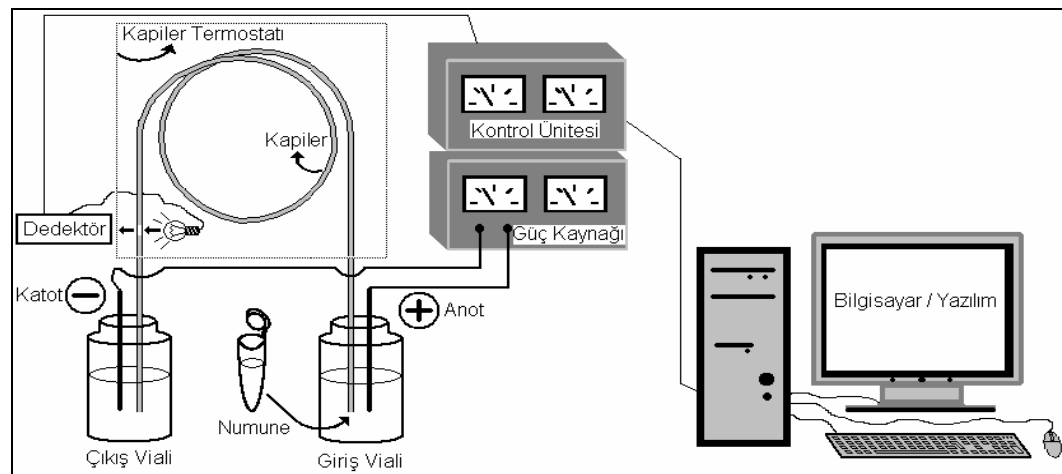
BGE çözültisi eklenen organik çözücüler viskozite, dielektrik sabiti ve zeta potansiyeli gibi bir takım değişkenleri etkilediğinden sonuçları tahmin etmek zordur. Elektrolite metanol eklenmesi pik simetrisini ve ayırıcılığı iyileştirirken, asetonitril eklenmesi analiz süresini kısaltmaktadır.

CZE'deki en önemli değişkenlerden biri BGE çözültisi elektrolitinin pH'sıdır. Anyonik çözünen maddelerin hareketliliği, yüksek pH' da baskın olarak negatif yüklü formlar olduğu için, pH arttıkça artar. Düşük pH'da negatif yüklerin çoğu, nötralize olurlar ve hareketlilikleri azalır.

2.10.2. Kapiler Elektforez Cihazının Kısımları

Bir kapiler elektforez cihazının başlıca bileşenleri, bir numune viali, kaynak ve hedef vialleri, kapiler, dedektör, yüksek gerilim destekleyicisi ve tanımlayıcı veya bilgisayardan ibarettir.

Şekil 11'de bir kapiler elektforez cihazının şeması görülmektedir.



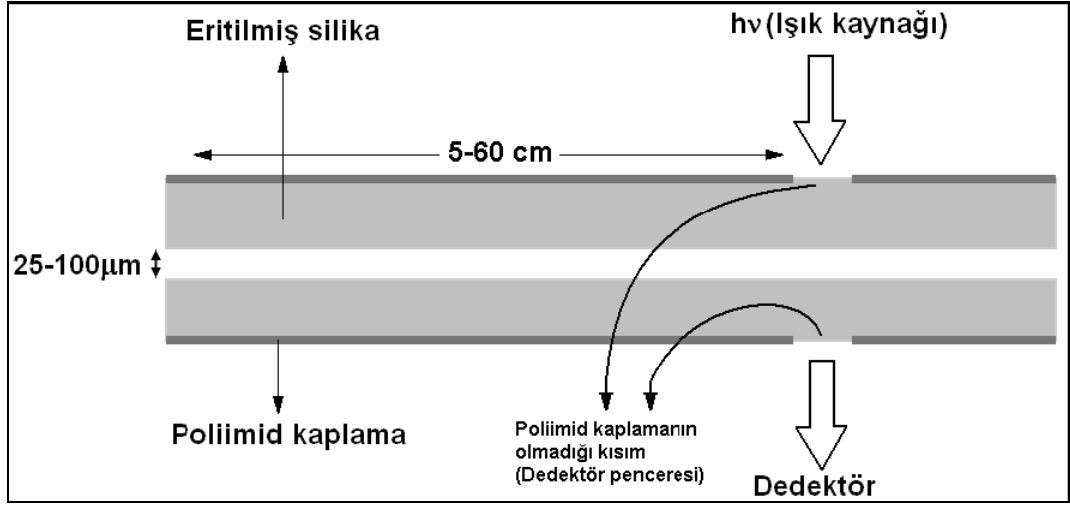
Şekil 11. Kapiler elektforez cihazının şeması

Elektroforez, giriş vialı, kapiler ve çıkış vialinin genellikle bir sulu tampon çözeltisi gibi bir elektrolitle doldurulmasıyla başlar. Kapiler başlangıcı, numune vialinin içersine konulur, numune içeri verilir, daha sonra kapiler girişi giriş vialine yerleştirilir, giriş ve çıkış vialeri arasına bir elektriksel alan uygulanır. Çözünen maddeler kapilerden göç ettiği için, bunlar dedektör tarafından belirlenir. Çıktı, dedektör yanıtının zamana karşı belirtildiği ve pikler halinde görüldüğü elektroferogram olarak verilir.

2.10.3. Kapiler Özellikleri

Kapiler elektroforezde kullanılacak kapilerin boyutları uygulanacak yöntem, analiz edilecek numune, istenen ayırıcılık ve uygun analiz süresine göre seçilir. Kapilerden beklenen, kısa analiz süresinde yeterli ayırımı sağlayabilmesidir. Kapilerin üretildiği materyalin elektrik iletkenliğinin olmaması, kimyasal olarak inert olması, dedektörle uyumlu olması (örneğin UV dedektör için kapilerin ışığı absorblamaması), ayrıca kapilerin kolay kırılmaması gerekir.

Eritilmiş silika, günümüzde en çok kullanılan kapiler materyalidir. Genellikle 30-100 cm uzunluğunda ve 25-100 µm iç çapında ve 375 µm dış çapındadır. Büyük çaplı kapilerlerde yüksek ısı açığa çıkar ve kapilerin iç duvarıyla merkezi arasındaki sıcaklık farkı çok büyük olur. Küçük çaplı kapiler kullanılması ile UV dedektörlerde ışık yolunun küçültülmesinden dolayı absorbans düşer ve pik yüksekliği azalır. Ayrıca çok küçük çaplı kapilerin partiküllerle tıkanma olasılığı yüksektir. Kolay kırıldığı için dış kısmı poliimit ile kaplanıp sağlamlaştırılmıştır. UV dedektör kullanılacaksa, ışık yolunu kapatmaması için poliimit kaplama bu bölgeden kaldırılır. Bu durum Şekil 12'de görülmektedir. Böylece çözünen maddeler kapiler içerisinde de dedekte edilebilir. Bu da off-column dedeksiyonuna karşı on-column dedeksiyonu olarak adlandırılır ki bunun içerisinde kapiler ve dedektörün arasında bir tüp kısmı bulunur.



Şekil 12. Eritilmiş silika kapilerin boyuta kesiti

Kapilerin tekrarlanabilir sonuçlar vermesi için ilk kullanımda ve her analizden önce şartlandırma işlemlerinden geçirilmesi gerekir. Şartlandırmayla kapilerin iç çeperindeki silanol gruplarının iyonlaşma oranı, dolayısıyla EOF, her analizde aynı olur. Eritilmiş silika kapilerin içinden ilk kullanımdan önce 1,0 M NaOH 15 dakika süre ile geçirilir. Bundan sonra yapılacak her analizden önce sırasıyla 0,1 M NaOH, su, ardından BGE çözeltisi elektroliti geçirilir. Şartlandırma için gereken zaman kapiler uzunluğuyla ilgili olup deneysel olarak tespit edilir.

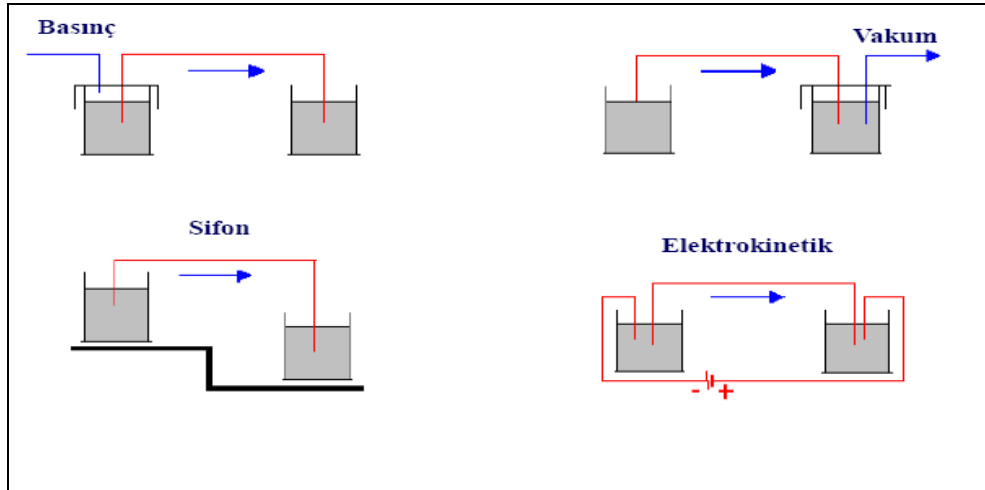
Kapiler elektroforezde tekrarlanabilir sonuçlar almak için kapiler sıcaklığının kontrolü önemlidir. Sıcaklığın değişmesiyle etkinlik, göç zamanı, enjeksiyon hacmi ve dedektör cevabı değişir. Ayrıca numune bozulmasına da neden olabilir. Kapiler sıcaklığının kontrolü, kapilerin içinde bulunduğu kasetin içine, istenen sıcaklığa termostatlı sistem ile ayarlanmış havanın fan ile üflenmesi ile sağlanır.

2.10.4. Numune Enjeksiyonu

Numune enjeksiyonu numuneyi kapiler içerisine almak anlamına gelir. Numuneler genellikle birkaç μL 'den birkaç mL 'ye kadar hacme sahip numune viallerine doldurulur. Kapilere yalnızca birkaç nL enjekte edildiği için küçük hacimde bir numune yeterlidir.

Kapiler içine numune enjeksiyonu hidrodinamik veya elektrokinetik olarak yapılabilir. Hidrodinamik enjeksiyon basınç ve sifonlama ile yapılır. Sifon enjeksiyonu diğer bir tanımlama ile yer çekimi enjeksiyonu numune vialini numuneyi kapiler içindeki sifona yerleştirecek şekilde kaldırmakla yapılır. Basınç enjeksiyonu ise, ya numune vialini basınca tabi tutmakla ya da hedef vialine vakum uygulamakla gerçekleştirilir. Uygulanan vakumla istenen miktarda numune kapilere girince vakum kesilir, numune viali çıkartılıp BGE çözeltisi viali takılır ve voltaj uygulanarak analize devam edilir.

Elektrokinetik enjeksiyonda ise kapilerin giriş kısmına yerleştirilen numune vialine numune bileşenlerinin kapiler içerisinde göç etmelerini sağlayacak bir elektriksel alan uygulanır. Şekil 13'de kapiler elektroforezde enjeksiyon sistemleri görülmektedir.



Şekil 13. Kapiler elektroforezde enjeksiyon sistemleri

2.10.5. Güç Kaynağı

Güç kaynağının amacı kapiler üzerinde bir elektrik alanı oluşturmaktır. Genelde 30 kV'a kadar voltaj sağlayabilen, voltajı 0,01 kV duyarlılıkta ayarlanabilen doğru akım kaynakları kullanılır. Voltajın analiz süresince sabit kalması için cihaz kesintisiz güç kaynağına bağlanmalıdır. Kapilerden geçen akımın 50 μ A'den az olması istenir. 100 μ A'e kadar akım kabul edilebilirken 125 μ A'den fazla akım Joule ısınmasına neden olur.

.

40 kV üstündeki voltajlar normal koşullarda uygulanamaz, çünkü kıvılcımlarla elektrik boşalması ve kapilerin kırılması söz konusudur. Genelde 5-30 kV arası voltaj uygulanmaktadır. Ancak özel elektrik kanalları kullanılarak 120 kV'a kadar voltaj uygulanmıştır.

2.10.6. Kullanılan Dedektörler

Kapiler elektroforezin birçok tipinde ayrılan analitlerin hepsi ortak bir noktadan geçtikleri için dedektörlerin tasarımı ve fonksiyonları HPLC'de kullanılanlara benzer. Tablo 1'de Kapiler elektroforezde kullanılan dedektör tipleri ve LOD (gözlenebilme sınırları) verilmiştir.

Tablo 1. Kapiler elektroforezde kullanılan dedektörler

Dedektör tipi	Gözlenebilme sınırı ^a (mol)
Spektrofotometri	
Absorbsiyon ^b	10^{-15} - 10^{-16}
Floresans	
Kapilerden önce türevlendirme	10^{-17} - 10^{-20}
Kapilerde türevlendirme	8×10^{-16}
Kapilerden sonra türevlendirme	2×10^{-17}
Dolaylı floresans	5×10^{-17}
Termal mercekle ^b	4×10^{-17}
Raman ^b	2×10^{-17}
Kütle spektrometri	
Elektrokimyasal	10^{-17}
İletkenlik ^b	10^{-16}
Potansiyometri	Belirtilmemiştir.
Amperimetri	7×10^{-17}
Radyometri ^b	10^{-19}

^aBurada verilen gözlenebilme sınırları 18 pL ile 10 nL'lik geniş bir enjeksiyon hacmi aralığından çıkarılmıştır.

^bKütle gözlenebilme sınırı 1 nL enjeksiyon hacmi kullanılarak derişim gözlenebilme sınırından çevrilmiştir.

2.10.7. Cihaz ve Yöntem Parametrelerinin Validasyon Parametreleri ile İlişkisi

Yöntemde kullanılan cihaz parametreleri ile validasyon parametreleri arasındaki ilişkiler Tablo 2’ de verilmiştir.

Tablo 2. Cihaz parametrelerinin validasyon parametreleri ile ilişkisi

Cihaz Parametresi	Etkilediği Validasyon Parametresi
• Voltaj • Sıcaklık • Kapiler durumu/şartlandırma	Göç zamanları kesinliği
• Enjeksiyon yöntemi • Sıcaklık • Cihaz yazılımının integrasyon yöntemi	Pik alanlarının kesinliği
• Dedektörün doğrusal cevap aralığı	Çalışma aralığı (alt ve üst tayin sınırları)
• Dedektörün gürültü miktarı • Kapiler boyutları • Kapilerin sisteme düzgün takılması	Gözlenebilme sınırı
• Cihaz yazılımının pik saflığı hesaplama yöntemi ve spektral analiz yöntemi	Seçicilik

Kapiler elektroforezde ayırma ve miktar tayininde geliştirilen yöntemin başarılı sayılması için analiz süresinin kısa, etkinliğin, seçiciliğin ve ayırıcılığın yüksek olması gerekmektedir³⁴.

Analiz süresinin kısa olması için yapılması gereken ön işlemlerin ve kapiler şartlandırılmasının az zaman alması, ayrıca cihazdan elde edilen verilerle sonuca kısa zamanda ulaşılabilmesi gerekir. Kapiler elektroforezde ön işlemlerin basit olması, analiz süresini kısaltmaktadır. Analizin tamamlanması için tüm numune bileşenlerinin dedektöre ulaşması gerektiğinden, bileşenlerin göç zamanlarının kısa olması önemlidir.

Eşitlik 2.3' e göre, yüksek voltaj, kısa kapiler ve yüksek EOF ile kısa analiz süresi elde edilebilir.

$$t_g = l_{etken} \cdot L_{toplam} / \mu_g \cdot V \quad (2.3.)$$

t_g : Göç zamanı

V : Uygulanan voltaj

l_{etken} : Kapilerin etken uzunluğu

L_{toplam} : Kapilerin toplam uzunluğu

μ_g : Gözlenen elektroforetik hız

Kapiler elektroforezde etkinlik, teorik tabaka sayısı (N) ile belirlenir. Teorik tabaka sayısı (N) göç zamanı ve pik genişliğine bağlıdır. Kapiler uzunluğu teorik tabaka sayısına bölünerek teorik tabaka sayısına eşdeğer yükseklik bulunabilir.

$$N = 16 (t_g/w)^2 \quad (2.4.)$$

N : Teorik tabaka sayısı

t_g : Göç zamanı

w : Pik genişliği

Eşitlik 2.4'e göre, sabit göç zamanında pik genişliği küçüldükçe etkinlik artar.

Eşitlik 2.5'e göre, kapiler elektroforezde uygulanan voltaj arttıkça etkinlik artmaktadır³⁴.

$$N = \mu_e \cdot V / 2D \quad (2.5.)$$

N : Teorik tabaka sayısı

μ_e : Maddenin elektroforetik hareketliliği

V : Uygulanan voltaj

D : Maddenin difüzyon katsayısı

Eşitlik 2.6'da seçicilik katsayısının hesaplanması görülmektedir.

$$\alpha = (t_2 - t_0) / (t_1 - t_0) \quad (2.6.)$$

α : Seçicilik katsayısı

t_1 : Göç zamanı kısa olan maddenin göç zamanı

t_2 : Göç zamanı uzun olan maddenin göç zamanı

t_0 : Sadece EOF ile sürüklenen maddenin göç zamanı

CZE'de BGE çözeltisi elektrolitinin pH'sı ve organik çözücüler seçiciliği etkiler.

Ayırıcılık (rezolüsyon), komşu iki pikin birbirine olan uzaklığı ile ilgilidir ve eşitlik 2.7'ye göre elektroferogramlardan hesaplanır.

$$R = 2 \cdot (t_2 - t_1) / (w_1 + w_2) \quad (2.7.)$$

R : Ayırıcılık (Rezolüsyon)

t_1 : Göç zamanı kısa olan maddenin göç zamanı

t_2 : Göç zamanı uzun olan maddenin göç zamanı

w_1, w_2 : Komşu piklerin pik genişlikleri³⁴

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Gereçler

3.1.1. Kullanılan Cihazlar

- Kapiler Elektroforez (Hewlett Packard Agilent 3D-CE, UV diyot array dedektörlü, bilgisayar kontrollü)
- pH metre (Mettler- Toledo, 0,01 pH hassasiyetli)
- Hassas terazi (Shimadzu xx200, 0,1 mg hassasiyetli)
- Bilgisayar (Microsoft Windows® işletim sistemi yüklü)
- Santrifüj (Nüve Fuge CN 090)
- Ultrasonik Banyo
- Vorteks
- Manyetik karıştırıcı
- Otomatik pipet

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- | | |
|---------------------------|---------------|
| • <i>Parasetamol</i> | (Koçak Farma) |
| • <i>Klorfeniramin</i> | (Koçak Farma) |
| • <i>Psödoefedrin</i> | (Koçak Farma) |
| • <i>Dekstrometorfan</i> | (Koçak Farma) |
| • <i>4-Aminofenol</i> | (Merck) |
| • <i>Efedrin</i> | (Merck) |
| • Sodyum borat | (Merck) |
| • Sodyum Hidroksit (NaOH) | (Merck) |
| • Hidroklorik Asit (HCl) | (Merck) |
| • Asetonitril (ACN) | (Merck) |

3.1.3. Kullanılan Farmasötik Preparatlar

Geliştirilen analiz yöntemi, Gripamol® tablet (Koçak Farma, Türkiye) isimli farmasötik preparat üzerinde uygulanmıştır.

Beher tablet etken madde olarak 325 mg *Parasetamol*, 2 mg *Klorfeniramin Maleat*, 30 mg *Psödoefedrin*, 15 mg *Dekstrometorfan* içermektedir.

3.2. Deney İçin Gerekli Hazırlıklar

3.2.1. Çözeltilerin Hazırlanması

Çözeltilerin hazırlanmasında kullanılan su, Milli-Q su saflaştırma cihazından elde edilen, 0,45 µm filtreden geçirilmiş deiyonizesudur.

Stok Sodyum Borat tampon çözeltisinin hazırlanması (150 mM):

Toz haldeki NaBorat 5,64 g hassas olarak tartılarak 100 mL lik balon jojeye konulmuş ve yaklaşık 80 mL deiyonize su ile 45°C'de manyetik karıştırıcı ile çözünmesi sağlandıktan sonra 100,0 mL ye deiyonize su ile tamamlanmıştır. 4°C'de buzdolabında saklanmıştır.

Stok sodyum borat tampon çözeltisinden hareketle 75 mM borat tamponu çözeltisi hazırlanmış, pH 8'e ayarlanmıştır. BGE (çalışma tamponu) çözeltisi 75mM borat tamponu çözeltisine (pH 8) %15 asetonitril eklenerek hazırlanmıştır.

Stok *Parasetamol* çözeltisinin hazırlanması (1000 µg/mL):

Toz haldeki saf *parasetamol* 10,0 mg hassas olarak tartılıp 10,0 mL lik balon jojeye konulmuş ve yaklaşık 8 mL deiyonize su ile tam çözünmenin sağlanması için ultrasonik banyoda 40°C de yaklaşık 5 dakika bekletilmiş ve sonra 10,0 mL ye deiyonize su ile tamamlanmıştır. 4°C'de buzdolabında saklanmıştır.

Standart *Parasetamol* çözeltileri, bu stok çözeltiliden istenen derişime BGE çözeltilisi ile seyreltilerek hazırlanmıştır.

Stok *Klorfeniramin* çözeltilisinin hazırlanması (1000 µg/mL):

Toz haldeki *klorfeniramin*'den 10,0 mg hassas olarak tartılıp 10 ml lik balon jojeye konulmuş ve yaklaşık 8 ml deiyonize su ile çözüldükten sonra 10 mL ye deiyonize su ile tamamlanmıştır. 4°C'de buzdolabında saklanmıştır.

Standart *klorfeniramin* çözeltileri, bu stok çözeltiliden istenen derişime BGE çözeltilisi ile seyreltilerek hazırlanmıştır.

Stok *Psödoefedrin* çözeltilisinin hazırlanması (1000 µg/mL):

Toz haldeki *psödoefedrin*'den 10,0 mg hassas olarak tartılıp 10,0 mL lik balon jojeye konulmuş ve yaklaşık 8 mL deiyonize su ile çözüldükten sonra 10,0 mL ye deiyonize su ile tamamlanmıştır. 4°C'de buzdolabında saklanmıştır.

Standart *psödoefedrin* çözeltileri, bu stok çözeltiliden istenen derişime BGE çözeltilisi ile seyreltilerek hazırlanmıştır.

Stok *Dekstrometorfan* çözeltilisinin hazırlanması (1000 µg/mL) :

Toz haldeki *dekstrometorfan*'dan 10,0 mg hassas olarak tartılıp 10,0 mL lik balon jojeye konulmuş ve yaklaşık 8 mL deiyonize su ile çözüldükten sonra 10,0 mL ye deiyonize su ile tamamlanmıştır. 4°C'de buzdolabında saklanmıştır.

Standart *dekstrometorfan* çözeltileri, bu stok çözeltiliden istenen derişime BGE çözeltilisi ile seyreltilerek hazırlanmıştır.

Stok 4-aminofenol çözeltisinin hazırlanması (1000 µg/mL):

Toz haldeki 4-aminofenol'den 10,0 mg hassas olarak tartılıp 10 mL lik balon jofeye konulmuş ve yaklaşık 8 mL deiyonize su ile tam çözünmenin sağlanması için ultrasonik banyoda 40°C de yaklaşık 5 dakika bekletilmiş tam çözünme sağlandıktan sonra da 10,0 mL ye tamamlanmıştır.

Standart 4-aminofenol çözeltileri, bu stok çözeltilerden istenen derişime BGE çözeltisi ile seyreltilerek hazırlanmıştır. Stok çözelti 4-aminofenolün çabuk bozulup renk değıştirmesinden dolayı her çalışma öncesinde taze olarak hazırlanmıştır.

Stok Efedrin çözeltisinin hazırlanması (1000 µg/mL) :

Toz haldeki efedrin'den 10,0 mg hassas olarak tartılıp 10 mL lik balon jofeye konulmuş ve yaklaşık 8 mL deiyonize su ile çözüldükten sonra 10,0 mL ye deiyonize su ile tamamlanmıştır. 4°C'de buzdolabında saklanmıştır.

Standart efedrin çözeltileri, bu stok çözeltilerden istenen derişime BGE çözeltisi ile seyreltilerek hazırlanmıştır.

3.2.2. Farmasötik Preparatların Analize Hazırlanması

Parasetamol, Klorfeniramin, Psödoefedrin, Dekstrometorfan etken maddelerini içeren 20 adet tablet hassas olarak tartılmış ve havanda iyice toz edilmiştir. Sonra bir tablet ağırlığına eşit tablet tozu hassas olarak tartılarak 100 mL lik balon jofeye alınmış, üzerine 6,0 mg efedrin ve 6,0 mg 4-aminofenol eklenmiştir. Yaklaşık 80 mL su ilave edilip, manyetik karıştırıcı ile karıştırıldıktan sonra ultrasonik banyoda 20 dakika bekletilmiştir. Çözünme sağlandıktan sonra deiyonize su ile hacim

100,0 mL ye tamamlanmıştır. Bu çözeltinin 10 mL'si 5000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Berrak çözeltiden 2,5 mL otomatik pipetle alınmış ve bu çözelti 10 mL ye elektrolit çözeltisi ile tamamlandığında; 812.5 µg/mL *parasetamol*, 5 µg/mL *klorfeniramin*, 75 µg/mL *psödoefedrin*, 37,5 µg/mL *dekstrometorfan* ve 15 µg/mL *efedrin* ve 15 µg/mL *4-aminofenol* içeren bir çözelti elde edilmiştir. Bu çözelti, kapiler elektroforez cihazının vialine konularak geliştirilen analiz yöntemi etken maddelerin ve safsızlıkların tayini için uygulanmıştır.

3.3. Yöntem Geliştirme ve Optimizasyon Çalışmaları

3.3.1. Kapilerin Şartlandırılması

Analizler, 75 µm iç çaplı eritilmiş silika kapiler kullanılarak yapılmıştır. Kapilerin toplam uzunluğu 50 cm, etkin uzunluğu 41 cm'dir.

İlk kullanımda, kapilerden 15 dakika 1,0 M NaOH, 15 dakika deiyonize su ve 10 dakika BGE çözeltisi elektroliti geçirilmiştir. Her numune enjeksiyonundan önce sırasıyla 1,0 M NaOH, deiyonize su ve BGE çözeltisi (75 mM pH 8,0 borat tamponu-%15 asetonitril) 2'şer dakika süreyle kapilerden geçirilerek şartlandırma yapılmıştır. Analiz sonrası cihaz kapatılmadan önce kapilerden 10 dakika 1,0 M NaOH ve deiyonize su geçirilerek kapiler içerisindeki tampon çözeltinin temizlenmesi sağlanmıştır. Analize uzun süre ara verileceği zaman kapiler kaseti kutusunda saklanmıştır.

3.3.2. Numunenin Cihaza Verilmesi

Miktar tayini yapılacak her numune, kapiler elektroforez cihazı vialine konularak cihaza yerleştirilmiştir. Kapiler şartlandırılması yapıldıktan sonra, 10 saniye süreyle 50 mbar basınçla hidrodinamik olarak numune enjeksiyonu yapılmıştır. Daha sonra, kapiler BGE

çözeltisi elektrolitine daldırılarak 30°C'de 30 kV potansiyel uygulanıp elektroforez başlatılmıştır. Dizi diyot dedektör kullanılarak yapılan 192 nm dalga boyundaki dedeksiyonla elektroferogram elde edilmiştir.

3.3.3. Yöntemin Optimizasyonu

Parasetamol, *Klorfeniramin*, *Psödoefedrin*, *Dekstrometorfan*, *4-Aminofenol* ve *Efedrin*'in için aynı anda analizi için planlanan kapiler elektroforez yönteminde BGE çözeltisi (BGE çözeltisinin türü, pH'ı, derişimi ve organik çözücü etkisi) ve cihaza (kapiler çapı, enjeksiyon süresi, uygulanan voltaj, analiz sıcaklığı ve dedektör dalga boyu) ait parametrelerin değıştirilmesi ile uygun şartlar araştırılmıştır.

3.3.4. Kalibrasyon Doğrularının Çizimi

Stok çözeltilerden hareketle 50, 100, 200, 400, 800, 900 µg/mL *parasetamol*, 5, 7.5, 10, 15, 20 µg/mL *4-aminofenol*, 25, 50, 75, 100, 120 µg/mL *psödoefedrin*, 2, 3, 5, 7.5, 10 µg/mL *klorfeniramin*, 5, 7.5, 10, 15, 20 µg/mL *efedrin* ve 25, 37.5, 50, 75, 100 µg/mL *dekstrometorfan* çözeltileri BGE çözeltisi kullanılarak hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltiler ile elde edilen elektroferogramlardan ayrılan analitlerin göç zamanları ve pik alanları, bilgisayar yazılımı ile tespit edilmiştir.

Elektroferogram verileri Microsoft Excel® programına aktararak analit derişimlerine karşı pik alanları grafiğı çizilerek doğrusal regresyon analizi ile kalibrasyon doğruları ve doğru denklemleri elde edilmiş, korelasyon (r) ve determinasyon (R ve r^2) katsayıları hesaplanmıştır.

3.4. Validasyon Çalışmaları

LOD (Gözlenebilme sınırı) değeri, S/G (sinyal/gürültü) oranının 3 olduğu derişim dikkate alınarak bulunmuştur³⁷.

Doğrusal aralık, LOQ ve LOL (tayin alt ve üst sınırları) değeri ile belirlenmiştir. LOQ değeri, S/G oranının 10 olduğu değer ölçülerek bulunmuştur. LOL değeri, kalibrasyon doğrusunda doğrusallığın bozulduğu noktadır.

Gün içi kesinlik ve doğruluk çalışmaları, üç paralel çözelti kullanılarak aynı gün içerisinde, günler arası çalışmalar ise üç paralel çözelti yeniden hazırlanarak üç ayrı günde yapılmıştır.

Yöntem tekrarlanabilirliği için, aynı derişimde standart maddeleri içeren karışım, geliştirilen yöntemle 7 kez analiz edilmiş ve sonuçlar arasındaki RSD (bağıl standart sapma) değeri hesaplanmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Optimum Yöntem Parametrelerinin Seçimi

4.1.1. Çalışma Tamponunun Seçimi

Fosfat, asetat ve borat tamponları ile çeşitli pH larda çalışılmış, en iyi ayırım çeşitli literatürlerde de karşımıza çıkan borat tamponu (pH 8) ile yapılan denemeler sonucunda elde edilmiştir. Yöntem optimizasyonunda kullanılan tampon çözeltiler Tablo 3’de gösterilmiştir.

Tablo 3. Yöntem optimizasyonunda kullanılan tampon çözeltiler.

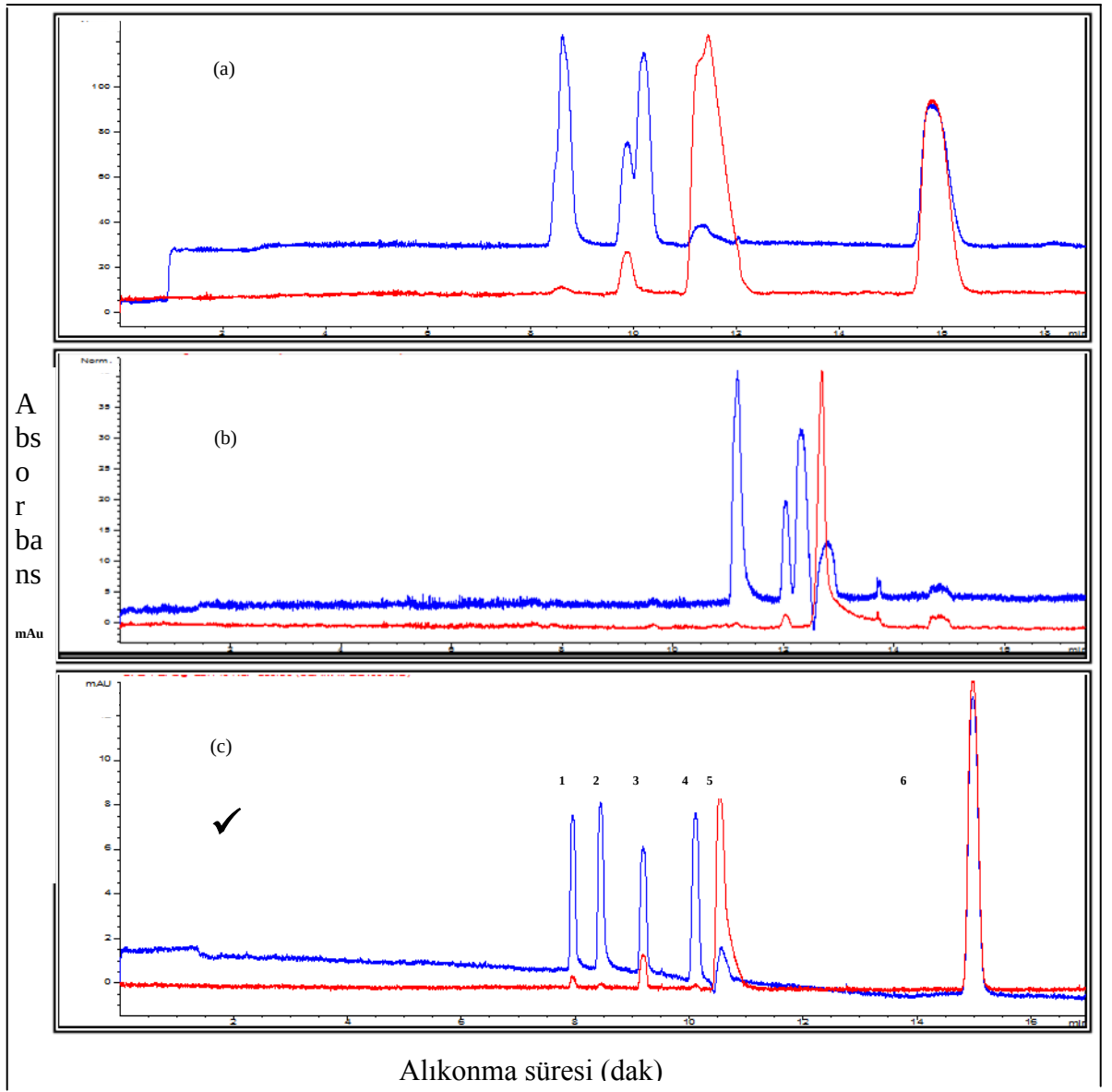
Tampon adı	pKa değeri	Hazırlanan tamponun pH’sı
Fosfat	2,12 (pK _{a1})	3,0
Asetat	4,74	4,0
Asetat	4,74	5,0
Asetat	4,74	6,0
Fosfat	7,2 (pK _{a2})	7,0
✓ Borat	9,2	8,0

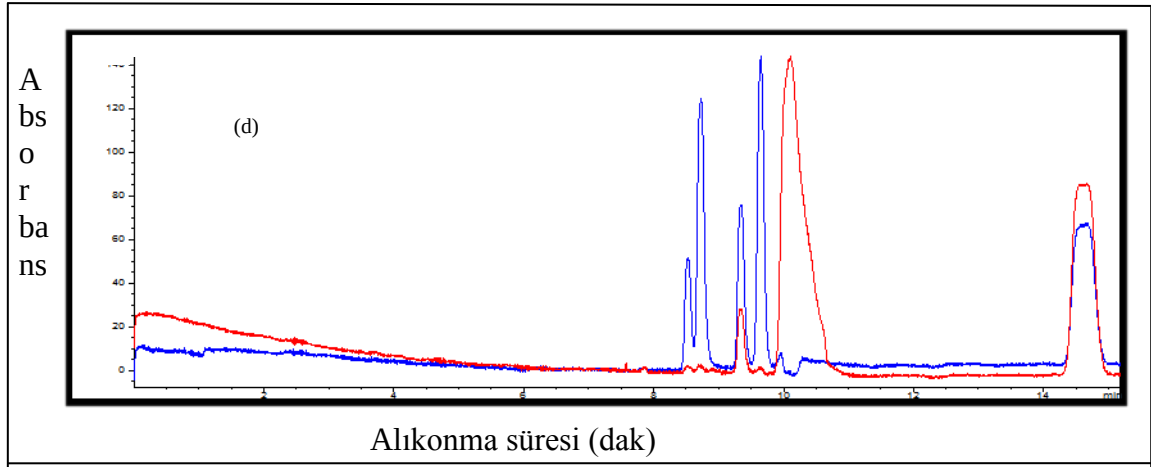


: Seçilen optimum parametre

4.1.2.BGE Çözeltisinin Derişiminin Seçimi

Kullanılan borat tamponunun derişimi 25-100 mM aralığında denenmiş, en iyi ayırım 75 mM ile elde edilmiştir. pH 8 borat tamponunun farklı derişimleri ile elde edilen elektroferogramlar, iki farklı dalga boyunda olmak üzere, Şekil 14'de gösterilmiştir. İki farklı dalga boyundaki elektroferogramlar, üst üste çizilmiştir.





Şekil 14. Tampon derişiminin analiz üzerindeki etkisi $\lambda = 214 \text{ nm}$, 257 nm

Tampon : pH 8 borat, Tampon derişimleri: a) 25 mM b) 50 mM c) 75 mM d) 100 mM

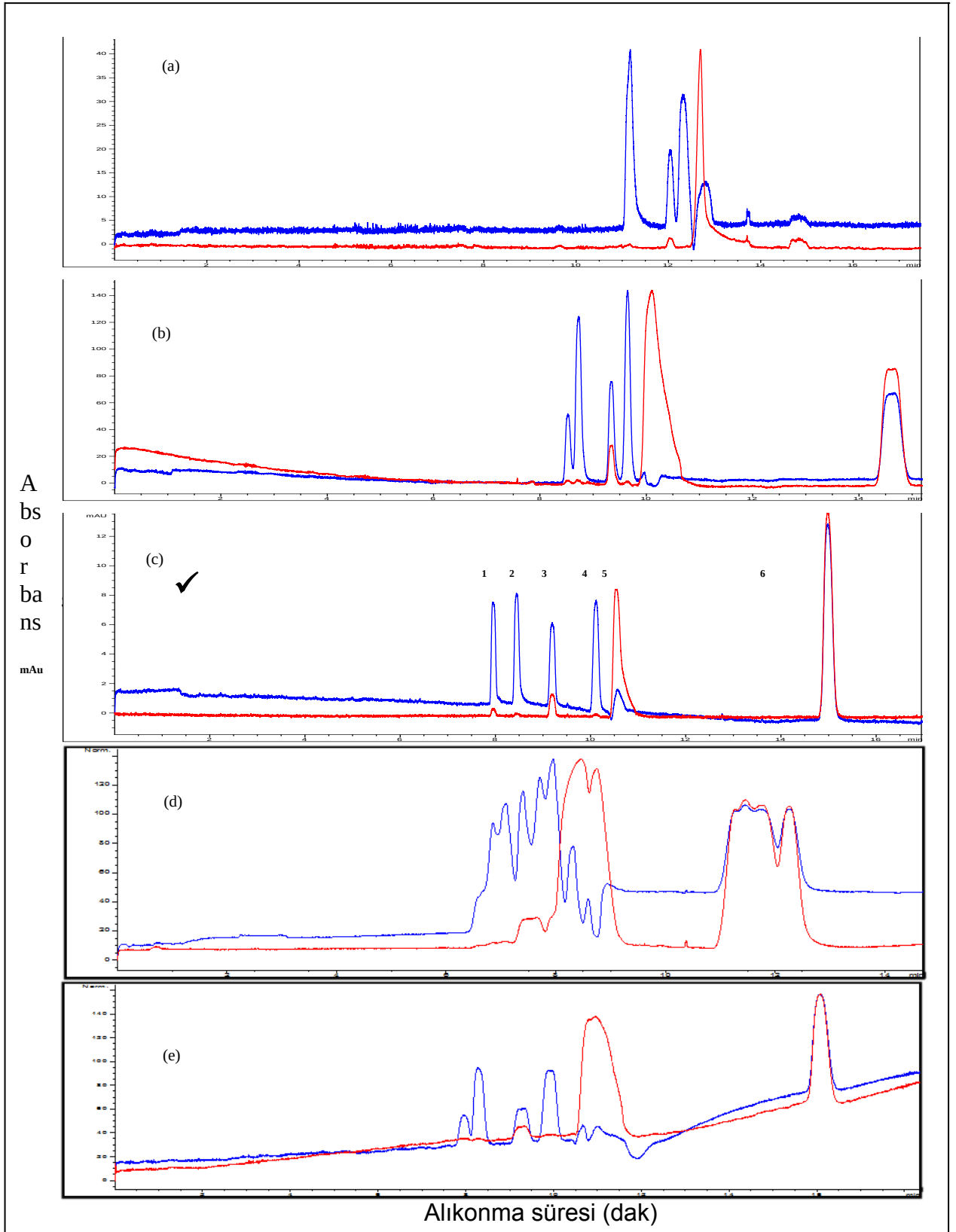
Koşullar: Kapiler çapı 50 μm , Hidrodinamik enjeksiyon $P_{\text{enj}} = 50 \text{ mbar}$, Ayırma Voltajı = 30 kV, T: 20°C

Parasetamol: 50 $\mu\text{g/mL}$, Dekstometofan, Klorfeniramin, Psödoefedrin, 4-aminofenol ve Efedrin: 15 $\mu\text{g/mL}$

Pikler: 1) DEK 2) EFN 3) KLO 4) PSO 5) 4-AF 6) PAR

4.1.3. BGE Çözeltisindeki Organik Solvan Derişimi

Kullanılan 75 mM borat tamponuna (pH 8) asetonitril % 0-30 arasında eklenmiş ve en iyi ayırım % 15 asetonitril ilavesiyle elde edilmiştir. Organik solvan derişiminin elektroferogram üzerindeki etkisi Şekil 15’de gösterilmiştir.



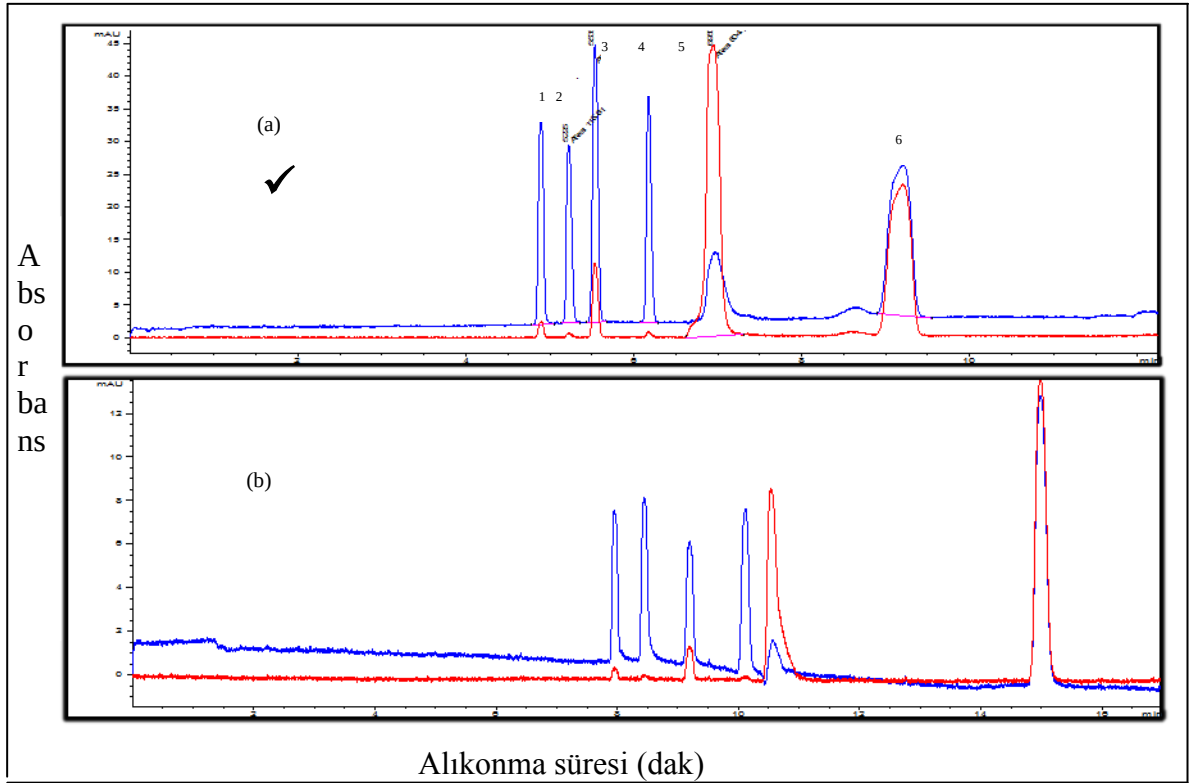
Şekil 15. Organik solvan derişiminin analiz üzerindeki etkisi $\lambda = 214$ nm, 257 nm

Asetonitril derişimleri: a)%30 b)%20 c)%15 d)%10 e)%0

**Koşullar: Kapiler çapı 50 μ m, Hidrodinamik enjeksiyon $P_{enj} = 50$ mbar, Ayırma Voltajı=30 kV, T: 20°C, BGE: 75mM pH8 borat tamponu *Parasetamol*: 50 μ g/mL, *Dekstrometofan*, *Klorfeniramin*, *Psödoefedrin*, *4-aminofenol* ve *Efedrin*:15 μ g/mL
Pikler: 1)DEK 2)EFN 3)KLO 4)PSO 5)4-AF 6)PAR**

4.1.4. Kapiler Çapının Etkisi

Çalışma sırasında kapiler çapının etkisi incelenmiş bunun için 50 μm ve 75 μm çaplı iki kapiler kullanılmış ve 75 μm çaplı kapilerde, duyarlılığın, pik simetrisi ve çözünürlüğün daha iyi olduğu gözlenmiştir. Tüm diğer koşullar sabitken, kapiler çapının etkisine ait elektroferogramlar, Şekil 16 da gösterilmiştir.



Şekil 16. Kapiler çapının analiz üzerindeki etkisi $\lambda = 214 \text{ nm}$, 257 nm

Kapiler çapları: a) 75 μm b) 50 μm

Koşullar: Hidrodinamik enjeksiyon $P_{\text{enj}} = 50 \text{ mbar}$, Ayırma Voltajı = 30 kV, T: 20°C,

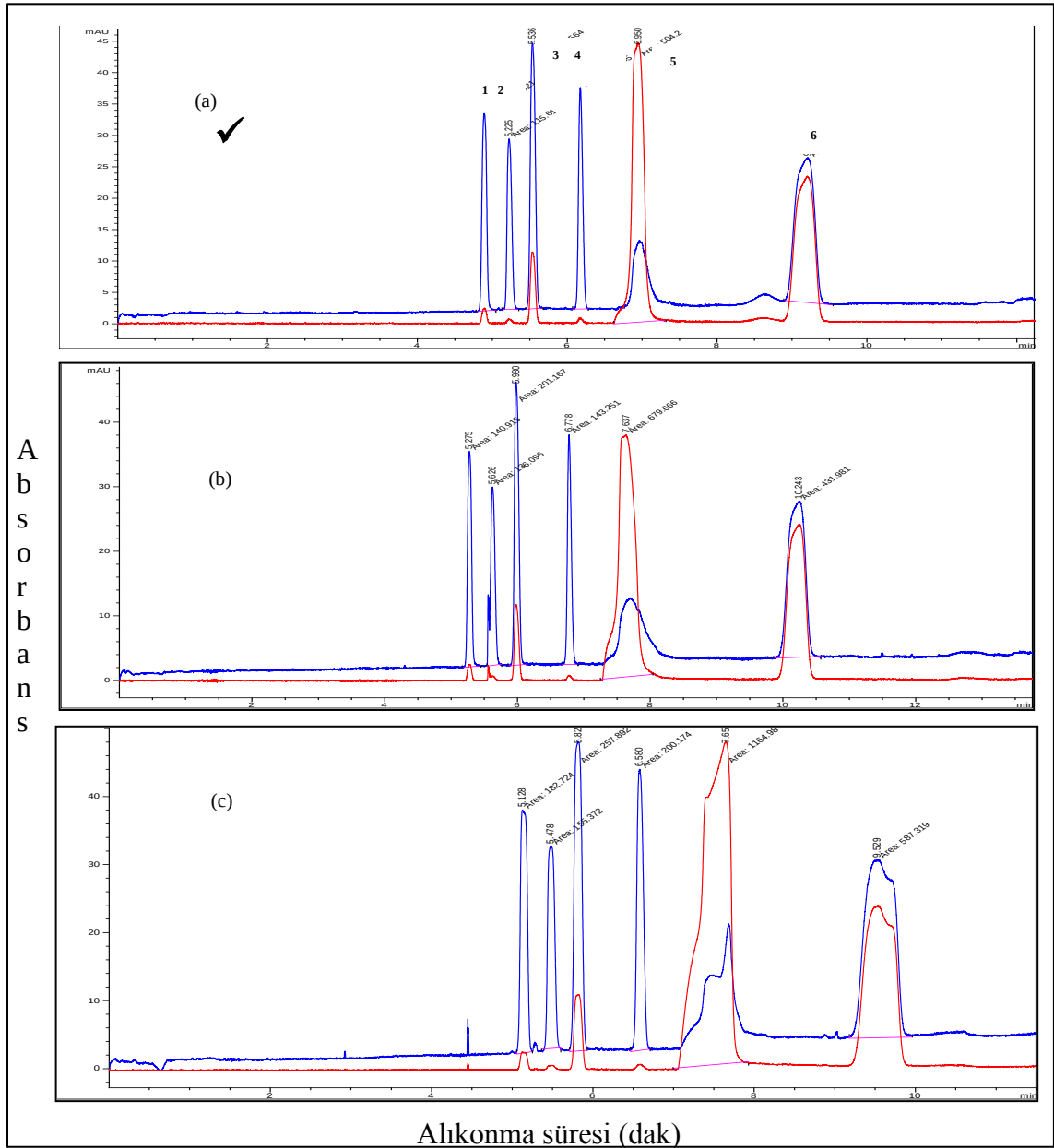
BGE: 75mM pH8 borat tamponu-%15 ACN

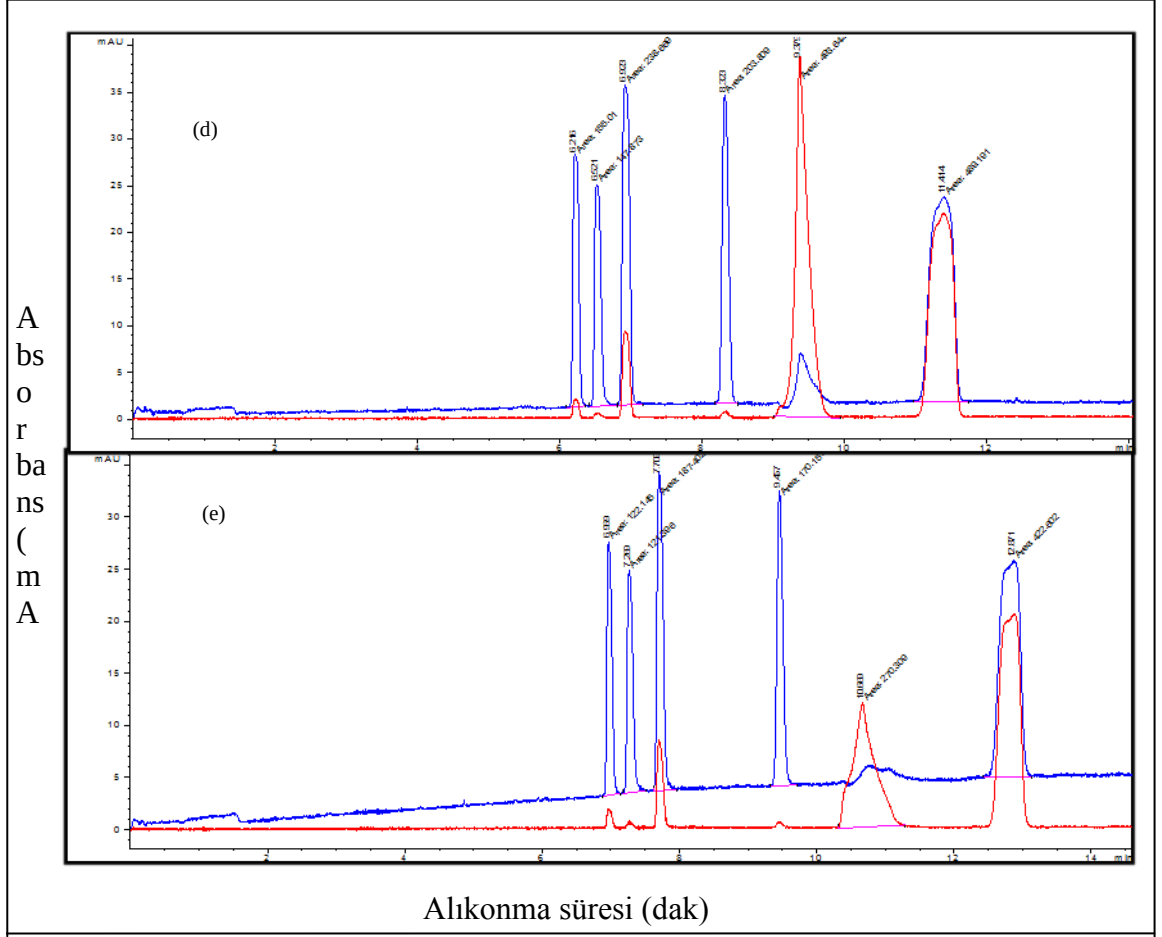
Parasetamol: 50 $\mu\text{g/mL}$, Dekstrometofan, Klorfeniramin, Psödoefedrin, 4-aminofenol ve Efedrin: 15 $\mu\text{g/mL}$

Pikler: 1) DEK 2) EFN 3) KLO 4) PSO 5) 4-AF 6) PAR

4.1.5. Kaset Sıcaklığının Etkisi

Kaset sıcaklığının elektroferogram üzerindeki etkisini incelemek amacıyla 15°C-35°C arasında çalışmalar yapılmıştır. Safsızlık olan 4-aminofenol 35°C'de kararlı davranmadığı için iyi bir ayırım elde edilememiştir. Bu nedenle bu sıcaklıkta çalışılmaktan vazgeçilmiş ve diğer sıcaklıklarda elde edilen veriler Microsoft Excel® programına aktarıldığında en uygun değer 30°C olarak belirlenmiştir. Kaset sıcaklığının analize etkisi, Şekil 17'de gösterilmiştir.





Şekil 17. Kaset sıcaklığının analiz üzerindeki etkisi $\lambda = 214 \text{ nm}$, 257 nm

Kaset sıcaklıkları: a)30°C b)25°C c)20°C d)15°C e)10°C

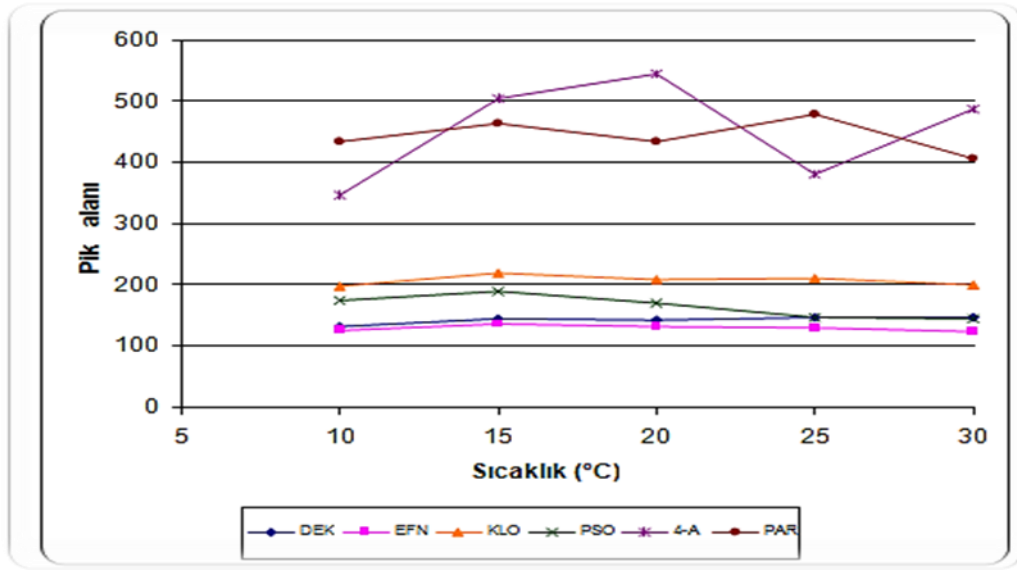
Koşullar: Hidrodinamik enjeksiyon $P_{enj} = 50 \text{ mbar}$, Ayırma Voltajı=30 kV, Kapiler çapı:75 μm , BGE: 75mM pH8 borat tamponu -%15 ACN

Parasetamol: 50 $\mu\text{g/mL}$, Dekstrometorfan, Klorfeniramin, Psödoefedrin

4-aminofenol ve Efedrin: 15 $\mu\text{g/mL}$

Pikler: 1)DEK 2)EFN 3)KLO 4)PSO 5)4-AF 6)PAR

Kaset sıcaklığının analitlerin pik alanları ve alıkonma zamanları üzerine etkileri Şekil 18 ve 19'da gösterilmiştir.

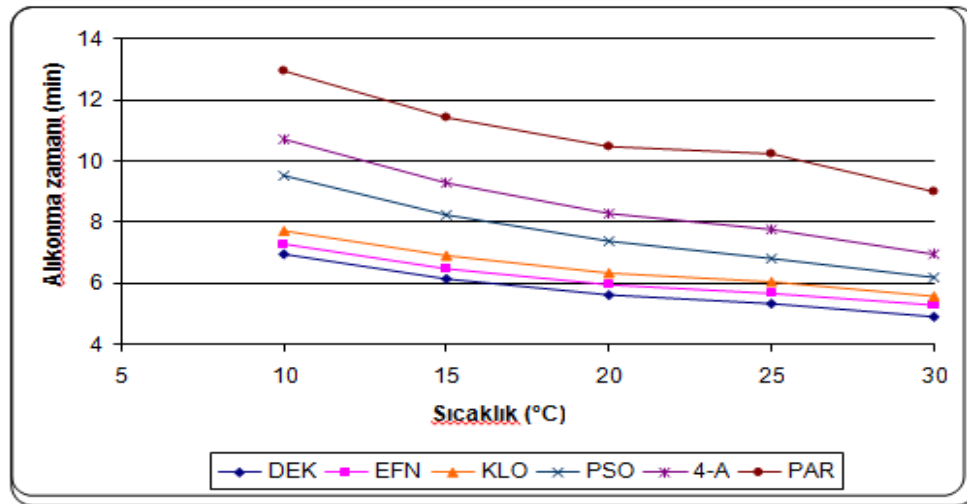


Şekil 18.Kaset sıcaklığının pik alanı üzerine etkisi

Koşullar: Hidrodinamik enjeksiyon P_{enj} = 50mbar, Ayırma Voltajı=30 kV, Kapiler çapı:75 μ m, BGE: 75mM pH8 borat tamponu -%15 ACN

Parasetamol: 50 μ g/mL, Dekstrometofan, Klorfeniramin, Psödoefedrin

4-aminofenol ve Efedrin:15 μ g/mL



Şekil 19.Kaset sıcaklığının alıkonma zamanı üzerine etkisi

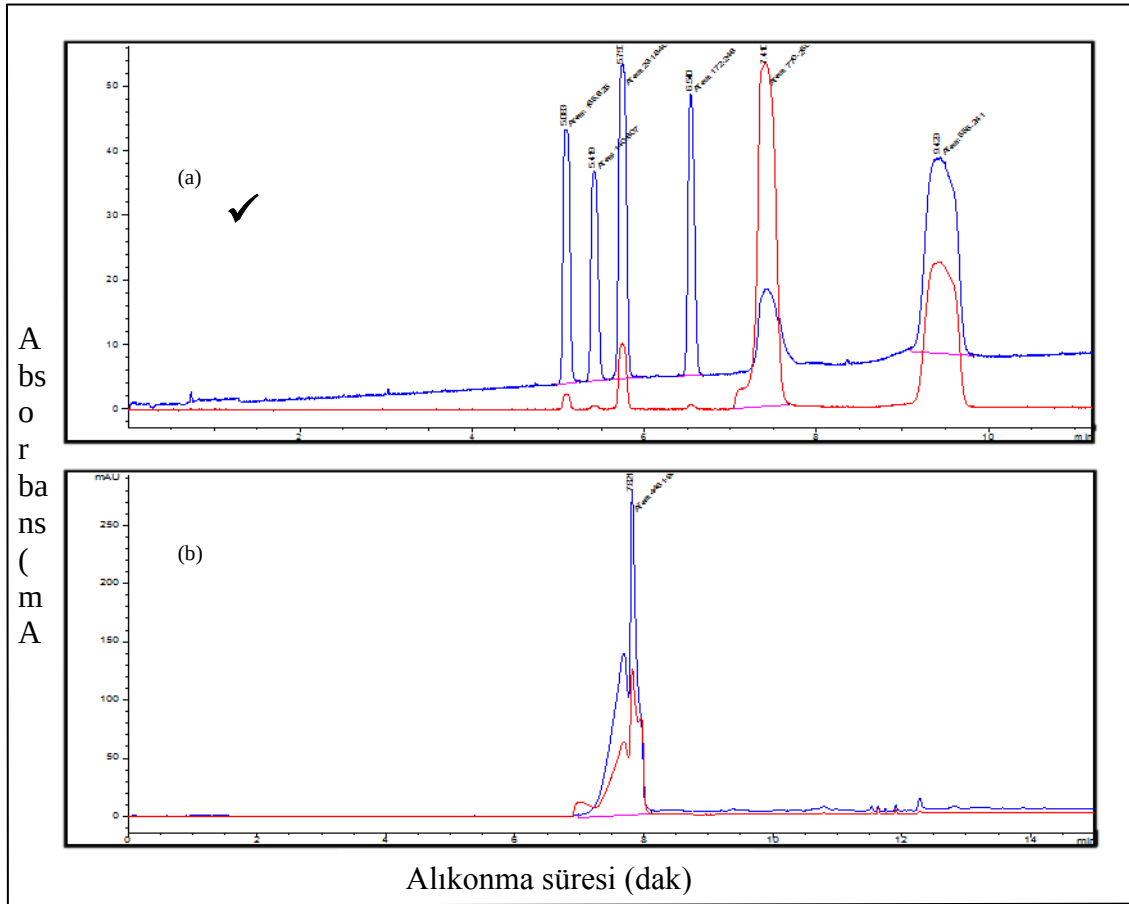
Koşullar: Hidrodinamik enjeksiyon P_{enj} = 50mbar, Ayırma Voltajı=30 kV, Kapiler çapı:75 μ m, BGE: 75mM-%15 ACN pH8 borat tamponu

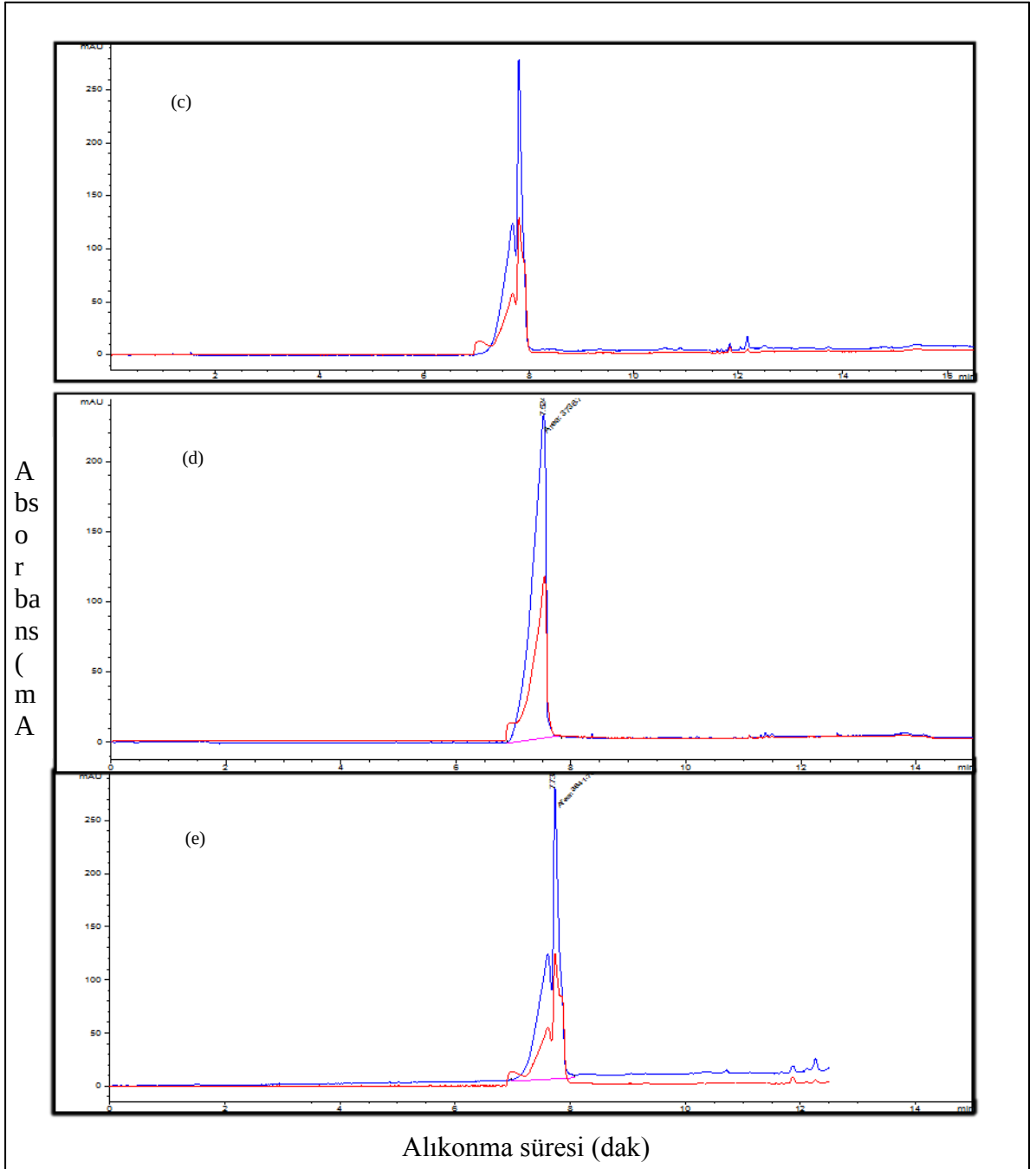
Parasetamol: 50 μ g/mL, Dekstrometofan, Klorfeniramin, Psödoefedrin

4-aminofenol ve Efedrin:15 μ g/mL

4.1.6. Numune pH'sının Etkisi

Numune pH'sının etkisini incelemek amacıyla pH 3-11 arasında çalışmalar yapılmış ve pH 7 haricindeki pH larda ayırım gözlenememiş, pikler birleşik bir hal almıştır. Çalışmalar defalarca tekrarlanmış, çözeltilerden kaynaklı bir hata olmaması adına stok çözeltiler yeniden hazırlanmış, BGE çözeltisi derişimi, pH sı ve organik solvan oranı dikkate alınarak yeniden hazırlanmıştır. Kapiler, yeni olarak takılmış ve uygun şartlandırılması sağlanmıştır. Deneysel kaynaklı hatalar minumuma indirilmiştir. Numune pH'sının analize etkisi, Şekil 20 deki elektroferogramlarda gösterilmiştir.





Şekil 20.Numune pH sının analiz üzerindeki etkisi

a)pH 7 b)pH 9 c)pH 11 d)pH 5 e)pH 3

Koşullar: Hidrodinamik enjeksiyon $P_{enj} = 50\text{mbar}$, Ayırma Voltajı=30 kV, Kapiler çapı:75 μm , BGE: 75mM pH8 borat tamponu-%15 ACN

Parasetamol: 50 $\mu\text{g/mL}$, Dekstretometofan, Klorfeniramin, Psödoefedrin

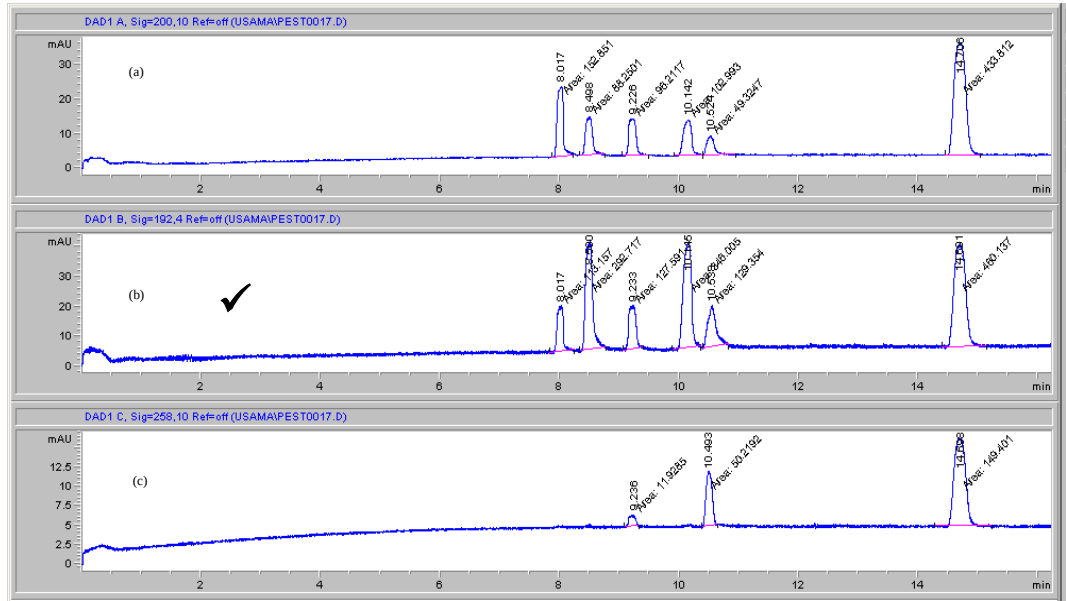
4-aminofenol ve Efedrin: 15 $\mu\text{g/mL}$

4.1.7.Uygulanan Voltajın Etkisi

Çalışma boyunca optimum şartlar belirlenirken her numune ölçümünde +30 kV voltaj uygulanmış ve iyi ayrımlar elde edilmiştir. Optimizasyon amacıyla 10 kV, 20kV voltaj uygulanmış ancak uygun ayırım elde edilememiştir. Uygun voltaj olarak 30 kV ile çalışmaya devam etmeye karar verilmiştir.

4.1.8. Dalga Boyu Seçimi

Numunede bulunan *4-aminofenol* bileşiğinin ayırımının gözlenebilmesi için iki farklı dalga boyunda ($\lambda_1=214$ nm, $\lambda_2=257$ nm) çalışılmıştır. Ancak daha sonra kullanılan bilgisayar programının üç boyutlu özelliği ile bütün bileşiklerin 192 nm de absorbans yaptığı ve ayrıldığı gözlenmiş ve bu dalga boyunda çalışılmaya karar verilmiştir. Şekil 21’de analitlerin farklı dalga boylarında pik karakteristikleri görülmektedir. Şekil 22’de ise optimum dalga boyu seçilmesinde kullanılan 3D elektroferogram görülmektedir.

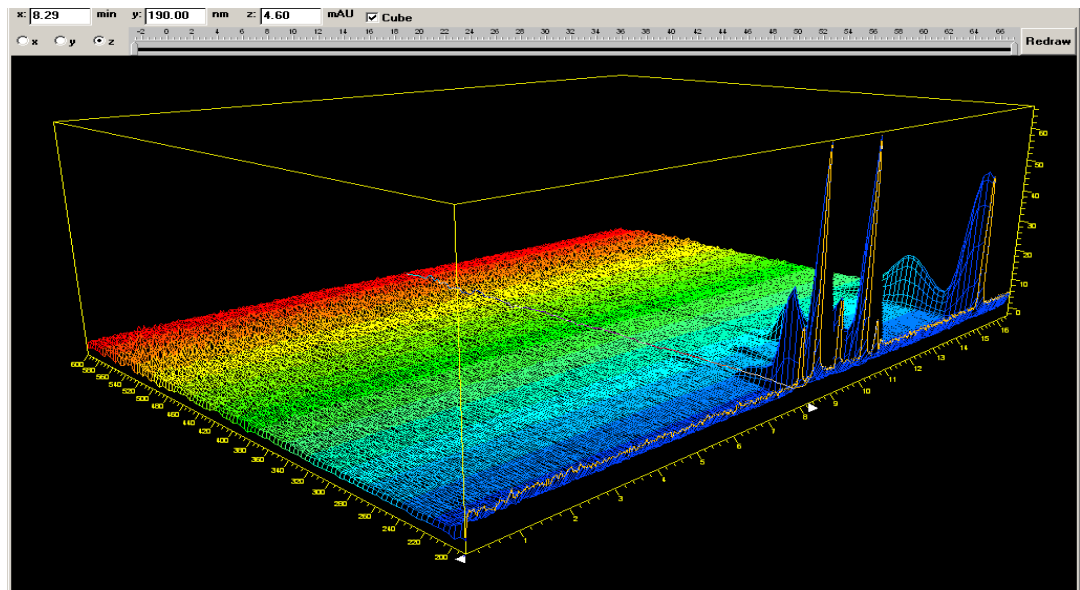


Şekil 21. Farklı dalga boylarında analitlerin pik karakteristikleri

a)200 nm b)192 nm c)258 nm

Koşullar: Hidrodinamik enjeksiyon P_{enj} = 50 mbar, Ayırma Voltajı=30 kV, Kapiler çapı:75 μ m, BGE: 75mM pH8 borat tamponu -%15 ACN

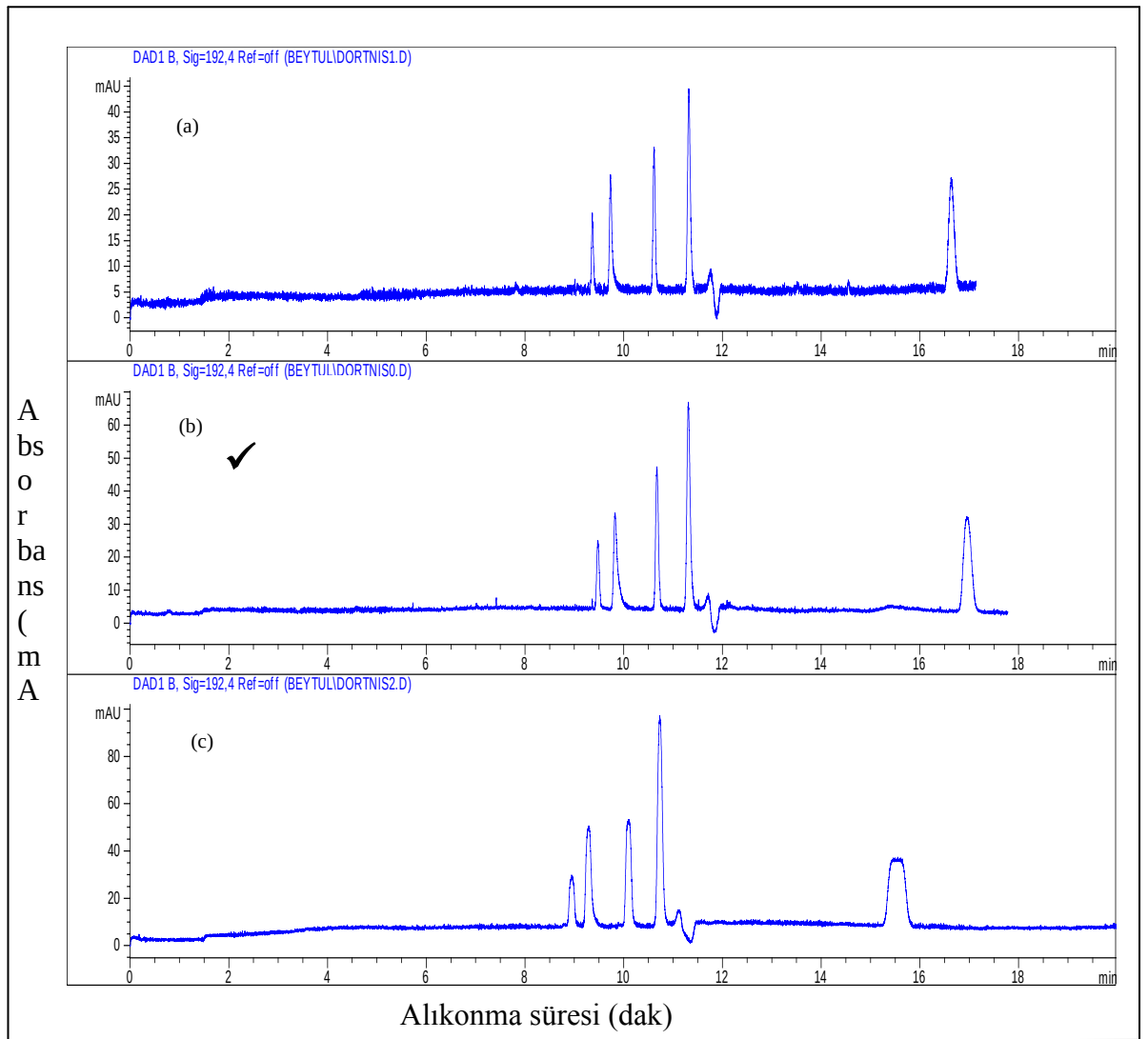
Parasetamol: 50 μ g/mL, Dekstretometofan, Klorfeniramin, Psödoefedrin, 4-aminofenol ve Efedrin:15 μ g/mL



Şekil 22. Elektroferogramın 3D görüntüsü

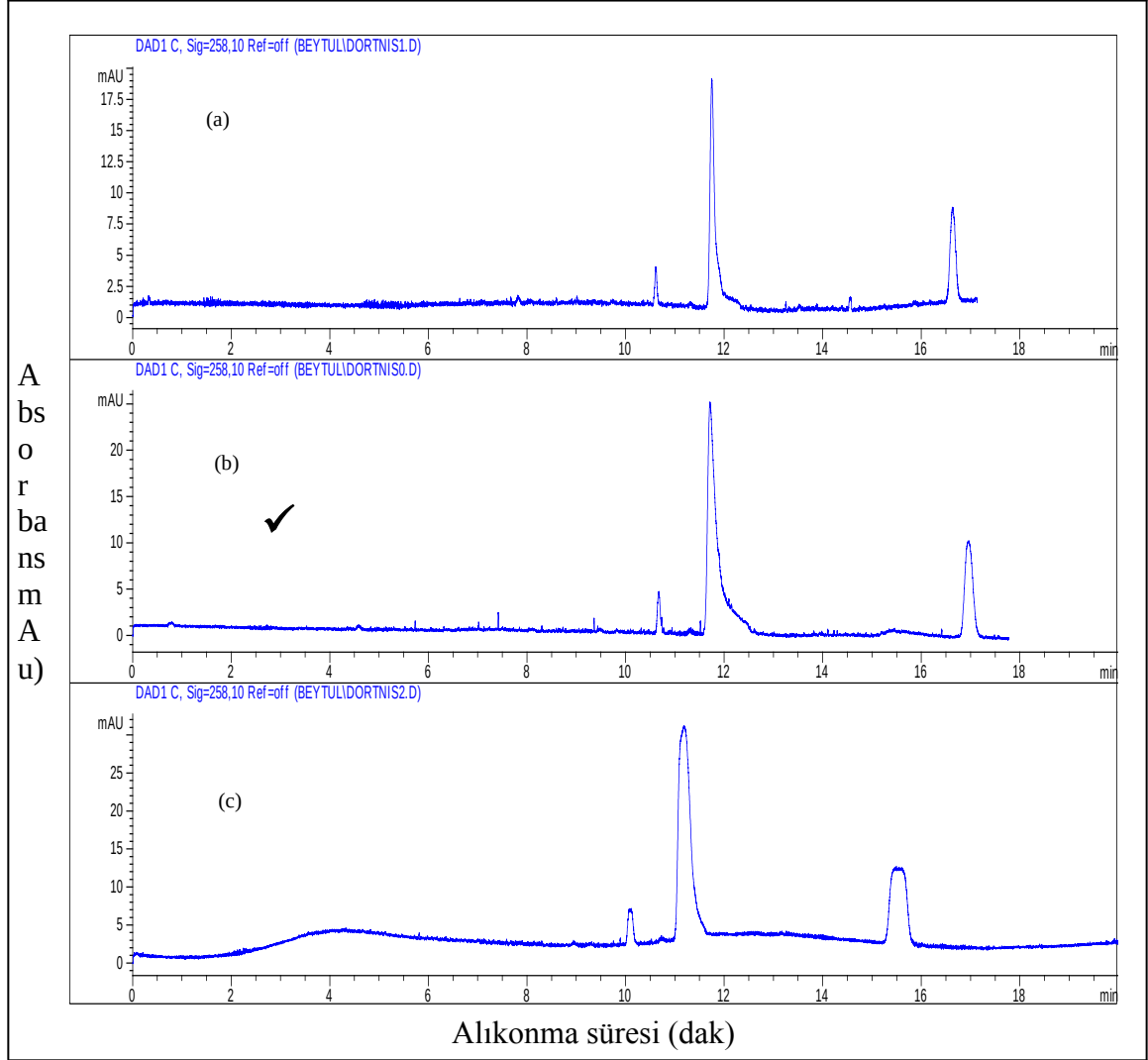
4.1.9. Enjeksiyon Süresinin Etkisi

Numune enjeksiyonunda sürenin etkisini gözlemek amacıyla 5 s, 10 s ve 20 s enjeksiyon uygulanmış en uygun enjeksiyon süresi olarak 10 s seçilmiştir. Enjeksiyon süresinin analize etkisi iki farklı dalga boyunda Şekil 23 ve 24’de gösterilmiştir. 4-aminofenol 258 nm’de çalışıldığı için iki farklı dalga boyu kullanılmıştır.



Şekil 23. Enjeksiyon süresinin analiz üzerindeki etkisi $\lambda=192$ nm

a)5 b)10 c)20 Koşullar: Hidrodinamik enjeksiyon $P_{enj}= 50$ mbar, Ayırma Voltajı=30 kV, Kapiler çapı:75 μ m, BGE: 75mM pH8 borat tamponu-%15 ACN T=30°C
Parasetamol: 50 μ g/mL, Dekstrometorfan, Klorfeniramin, Psödoefedrin ve Efedrin: 15 μ g/mL



Şekil 24. Enjeksiyon süresinin analiz üzerindeki etkisi, $\lambda=258$ nm

a)5s b)10s c)20s

Koşullar: Hidrodinamik enjeksiyon $P_{enj}= 50\text{mbar}$, Ayırma Voltajı= 30 kV, Kapiler

çapı: $75\text{ }\mu\text{m}$, BGE: 75mM pH8 borat tamponu - $\%15$ ACN $t=30^{\circ}\text{C}$

Parasetamol: $50\text{ }\mu\text{g/mL}$, Dekstrometorfan, Klorfeniramin, Psödoefedrin

4-aminofenol ve Efedrin: $15\text{ }\mu\text{g/mL}$

Tüm optimizasyon parametreleri, Tablo 4’de gösterilmiştir.

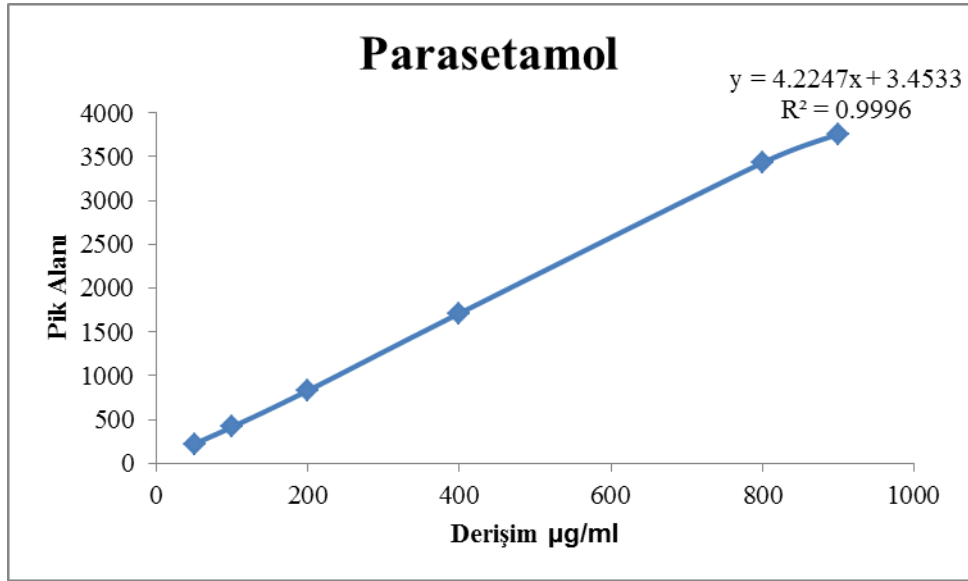
Tablo 4. Optimizasyon parametreleri

Araştırılan parametreler	Seçilen Parametreler
Tampon bileşimi ve pH’sı	Borat tamponu, pH 8
Tamponunun derişimi	75 mM
Organik çözücü % si	%15 asetonitril
Dedektör dalga boyu	192 nm
Uygulanan voltaj	30 kV
Kapiler sıcaklığı	30 °C
Numune pH’sı	pH 7
Enjeksiyon süresi	10 s
Kapiler çapı	75 µm

4.2.Geliştirilen Yöntem ile Elde Edilen Bulgular

4.2.1. Kalibrasyon Bulguları

Tablet içerisindeki etken maddelerin miktarının hesaplanması için standart çözelti derişimlerine karşı pik alanı değerleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon doğruları çizilmiştir. Şekil 25, 26, 27, 28, 29 ve 30’da her bir etken madde için hazırlanan kalibrasyon doğruları görölmektedir.



Şekil 25. Parasetamol kalibrasyon doğrusu

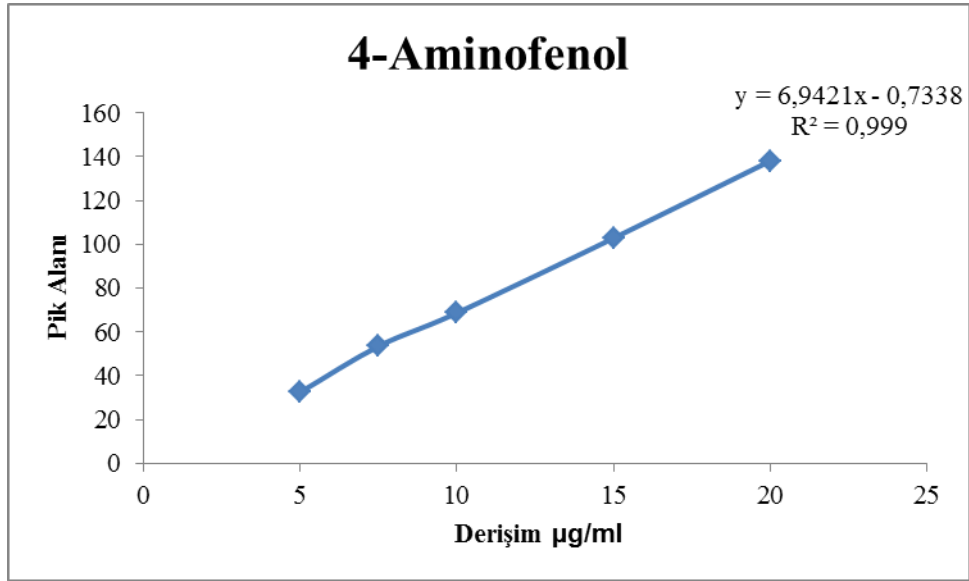
Kalibrasyon Doğrusunun denklemi: $y = 4,2247x + 3,4533$

Kalibrasyon aralığı: 50– 900 $\mu\text{g/mL}$

$r = 0,9998$, $r^2 = 0,9996$

LOD: 12,4 $\mu\text{g/mL}$

LOQ: 37,5 $\mu\text{g/mL}$



Şekil 26. 4-Aminofenol kalibrasyon doğrusu

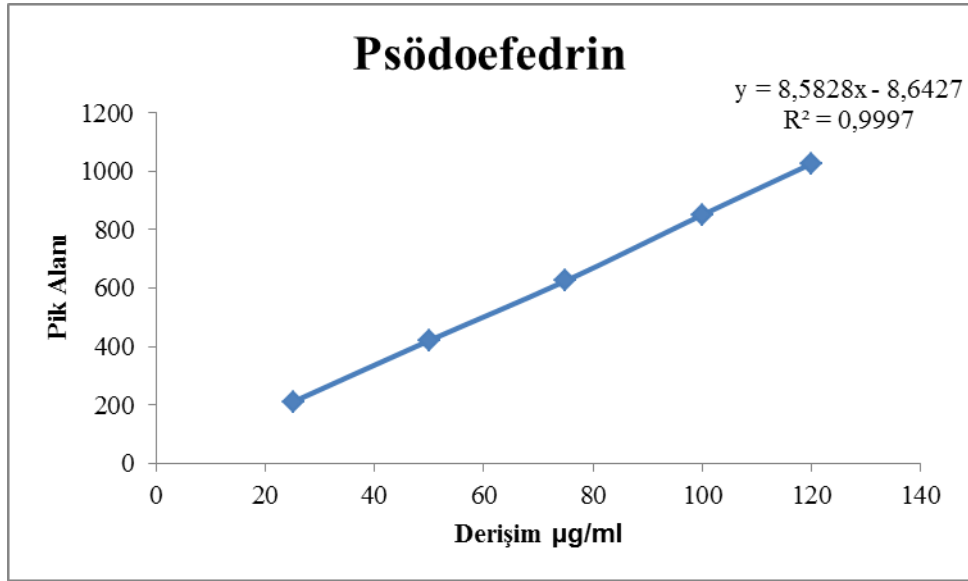
Kalibrasyon Doğrusunun denklemi: $y = 6,9421x - 0,7338$

Kalibrasyon aralığı: 5– 20 $\mu\text{g/mL}$

$r = 0,9995$, $r^2 = 0,999$

LOD: 1,0 $\mu\text{g/mL}$

LOQ: 2,9 $\mu\text{g/mL}$



Şekil 27. *Psödoefedrin* kalibrasyon doğrusu

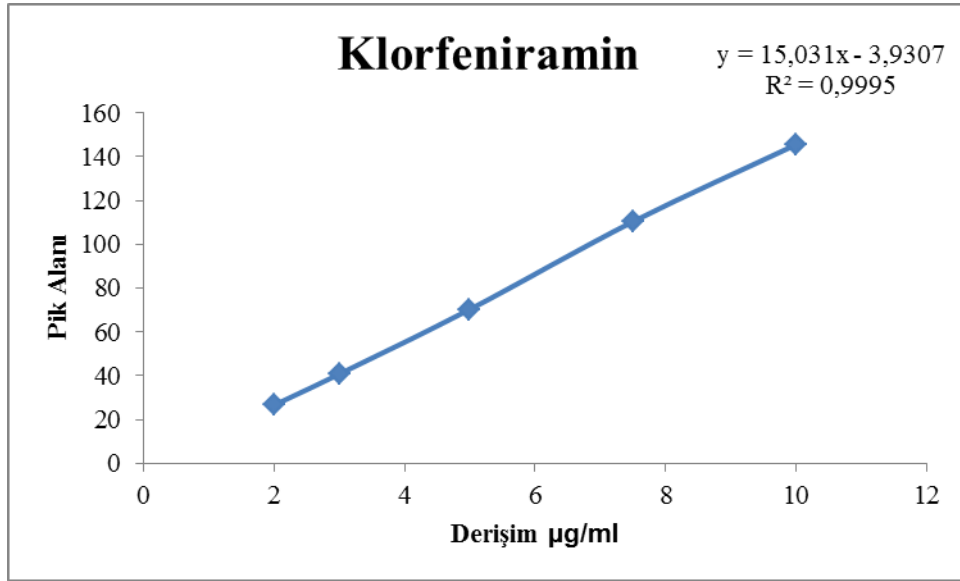
Kalibrasyon Doğrusunun denklemi: $y = 8,5828x - 8,6427$

Kalibrasyon aralığı: 25– 120 $\mu\text{g/mL}$

$r = 0,9998$, $r^2 = 0,9997$

LOD: 5,1 $\mu\text{g/mL}$

LOQ: 15,6 $\mu\text{g/mL}$



Şekil 28. Klorfeniramin kalibrasyon doğrusu

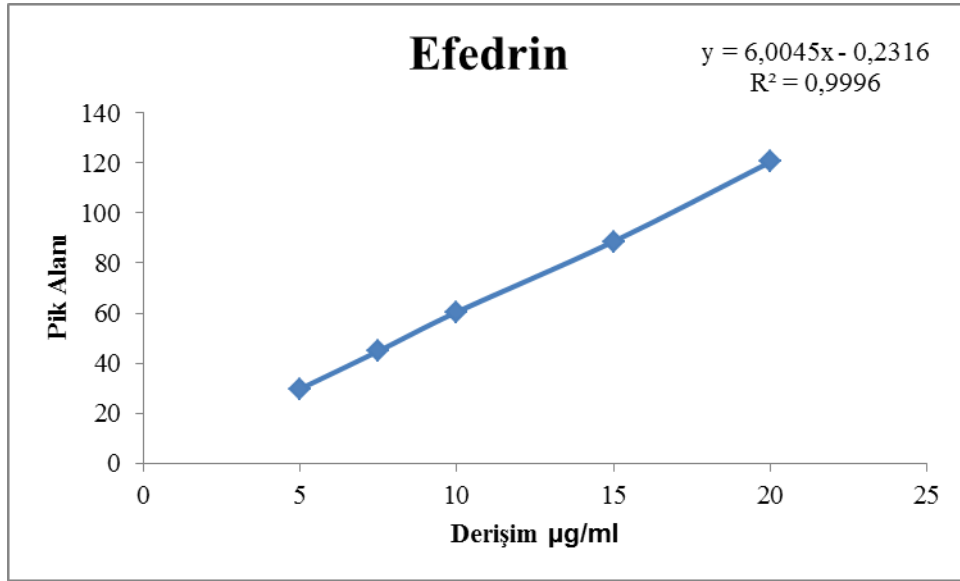
Kalibrasyon Doğrusunun denklemi: $y = 15,031x - 3,9307$

Kalibrasyon aralığı: 2– 10 µg/mL

$r = 0,9997$, $r^2 = 0,9995$

LOD: 0,4 µg/mL

LOQ: 1,2 µg/mL



Şekil 29. *Efedrin* kalibrasyon doğrusu

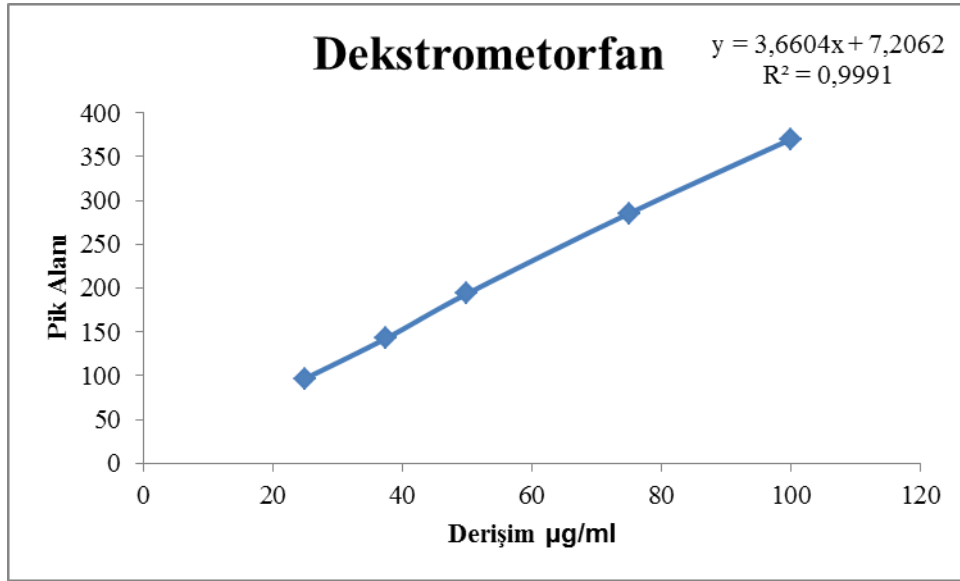
Kalibrasyon Doğrusunun denklemi: $y = 6,0045x - 0,2316$

Kalibrasyon aralığı: 5– 20 $\mu\text{g/mL}$

$r = 0,9998$, $r^2 = 0,9996$

LOD: 1,1 $\mu\text{g/mL}$

LOQ: 3,4 $\mu\text{g/mL}$



Şekil 30. Dekstrometorfan kalibrasyon doğrusu

Kalibrasyon Doğrusunun denklemi: $y = 3,6604x + 7,2062$

Kalibrasyon aralığı: 25– 100 $\mu\text{g/mL}$

$r = 0,9995$, $r^2 = 0,9991$

LOD: 4,5 $\mu\text{g/mL}$

LOQ: 13,6 $\mu\text{g/mL}$

Geliştirilen yöntemin analitik performans verileri Tablo 5’de sunulmuştur.

Tablo 5. Geliştirilen yöntemin analitik performans verileri

	PAR	4-AF	PSO	KLO	EFN	DEK
Regresyon denklemleri	$y=4,2247x+3,4533$	$y=6,9421x-0,7338$	$y=8,5828x-8,6427$	$y=15,031x-3,9307$	$y=6,0045x-0,2316$	$y=3,6604x+7,2062$
Determinasyon katsayısı (r^2)	0,9996	0,999	0,9997	0,9995	0,9996	0,9991
Kalibrasyon aralığı ($\mu\text{g/mL}$)	50-900 $\mu\text{g/mL}$	5-20 $\mu\text{g/mL}$	25-120 $\mu\text{g/mL}$	2-10 $\mu\text{g/mL}$	5-20 $\mu\text{g/mL}$	25-100 $\mu\text{g/mL}$
LOD ($\mu\text{g/mL}$)	12,4 $\mu\text{g/mL}$	1,0 $\mu\text{g/mL}$	5,1 $\mu\text{g/mL}$	0,4 $\mu\text{g/mL}$	1,1 $\mu\text{g/mL}$	4,5 $\mu\text{g/mL}$
LOQ($\mu\text{g/mL}$)	37,5 $\mu\text{g/mL}$	2,9 $\mu\text{g/mL}$	15,6 $\mu\text{g/mL}$	1,2 $\mu\text{g/mL}$	3,4 $\mu\text{g/mL}$	13,6 $\mu\text{g/mL}$

4.2.2. Tekrarlanabilirlik Çalışması Sonuçları

Geliştirilen yöntemin enjeksiyon tekrarlanabilirliğinin belirlenmesi için tabletlerdeki oranları da göz önünde bulundurularak *parasetamol* 812,5 µg/mL, *4-aminofenol* 15 µg/mL, *psödoefedrin* 75 µg/mL, *klorfeniramin* 5 µg/mL, *efedrin* 15 µg/mL ve *dekstrometorfan* 37,5 µg/mL çözeltisi yedi kez enjekte edilmiş ve her bir enjeksiyonun pik alanı, pik yüksekliği ve göç zamanı değerleri okunarak bu verilerin SD (Standart Sapma) değerleri ve RSD (Bağıl Standart Sapma) değerleri hesaplanmıştır. Her bir etken madde için elde edilen %RSD değerlerinin %2'den küçük olduğu görülmektedir. Bu sonuçlar yapılan enjeksiyonların tekrarlanabilir olduğunu göstermektedir.

Her bir etken madde için enjeksiyon tekrarlanabilirliği sonuçları Tablo 6,7,8,9,10 ve 11'de gösterilmiştir.

Tablo 6. *Parasetamol* için tekrarlanabilirlik çalışması sonuçları

Numune no	<i>Parasetamol</i>		
	Pik alanı	Pik yüksekliği	Göç zamanı
1	3436,02	404,38	10,885
2	3440,78	406,64	10,857
3	3430,45	402,45	10,728
4	3445,54	408,67	10,697
5	3426,65	398,89	10,768
6	3437,06	408,45	10,869
7	3439,76	405,51	10,756
X_{ort}	3436,60	404,99	10,794
SD	6,38	3,47	0,075
RSD	0,18	0,85	0,69

Tablo 7. Klorfeniramin için tekrarlanabilirlik çalışması sonuçları

Numune no	<i>Klorfeniramin</i>		
	Pik alanı	Pik yüksekliği	Göç zamanı
1	71,22	36,5	6,523
2	70,39	35,8	6,624
3	71,39	37,3	6,512
4	72,84	36,9	6,528
5	71,67	36,03	6,458
6	72,67	37,02	6,534
7	70,67	36,65	6,518
X_{ort}	71,55	36,6	6,528
SD	0,92	0,537	0,049
RSD	1,29	1,46	0,75

Tablo 8. Psödoefedrin için tekrarlanabilirlik çalışması sonuçları

Numune no	<i>Psödoefedrin</i>		
	Pik alanı	Pik yüksekliği	Göç zamanı
1	635,06	254,1	7,214
2	634,09	253,83	7,187
3	631,89	252,36	7,221
4	634,48	253,4	7,184
5	636,42	254,31	7,231
6	635,74	255,01	7,218
7	634,85	254,56	7,198
X_{ort}	634,64	253,93	7,207
SD	1,44	0,86	0,01
RSD	0,22	0,33	0,25

Tablo 9. Dekstrometorfan için tekrarlanabilirlik çalışması sonuçları

Numune no	<i>Dekstrometorfan</i>		
	Pik alanı	Pik yüksekliği	Göç zamanı
1	144,47	66,3	5,845
2	143,84	66,04	5,876
3	144,94	66,61	5,798
4	144,31	66,8	5,856
5	143,78	65,83	5,784
6	142,45	65,6	5,813
7	143,65	66,4	5,839
X_{ort}	143,92	66,22	5,83
SD	0,79	0,427	0,032
RSD	0,54	0,64	0,56

Tablo 10. 4-Aminofenol için tekrarlanabilirlik çalışması sonuçları

Numune no	<i>4-Aminofenol</i>		
	Pik alanı	Pik yüksekliği	Göç zamanı
1	103,39	50,02	9,273
2	104,12	51,22	9,293
3	103,67	50,24	9,128
4	104,09	50,49	9,243
5	103,93	51,34	9,209
6	102,87	50,27	9,263
7	103,49	50,21	9,219
X_{ort}	103,65	50,54	9,232
SD	0,44	0,52	0,054
RSD	0,43	1,03	0,59

Tablo 11. *Efedrin* için tekrarlanabilirlik çalışması sonuçları

Numune no	<i>Efedrin</i>		
	Pik alanı	Pik yüksekliği	Göç zamanı
1	89,83	30,11	6,017
2	88,96	29,97	6,032
3	89,02	30,03	6,124
4	89,72	30,98	6,201
5	89,18	29,79	6,021
6	89,43	30,67	6,002
7	89,12	30,87	6,01
X _{ort}	89,32	30,34	6,05
SD	0,34	0,48	0,075
RSD	0,38	1,58	1,24

Yöntemin kesinliğinin belirlenebilmesi için gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik çalışmaları yapılmıştır. Bunun için *parasetamol* 812,5 µg/mL, *4-aminofenol* 15 µg/mL, *psödoefedrin* 75 µg/mL, *klorfeniramin* 5 µg/mL, *efedrin* 15 µg/mL ve *dekstrometorfan* 37,5 µg/mL çözeltileri hazırlanarak gün içerisindeki ve günler arasındaki tekrarlanabilirlik test edilmiştir. Çalışmalarda elektroferogramlardan elde edilen veriler doğrultusunda %RSD değerleri 2'den küçüktür. Bu veriler geliştirilen yöntemin kesinliğinin bir ölçüsüdür.

Gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik çalışması sonuçları, her bir analit için Tablo 12, 13, 14, 15, 16 ve 17'de gösterilmiştir.

Tablo 12. Parasetamol için gün içi ve günler arası analiz sonuçları

<i>Parasetamol</i>		1.Gün	2.Gün	3.Gün
		3436,02	3430,45	3437,06
		3440,78	3445,54	3439,76
		3430,45	3426,65	3436,60
Gün içi	X_{ort}	3435,75	3434,21	3437,80
	SD	5,17	9,99	1,70
	%RSD	0,15	0,29	0,04
Günler arası	X_{ort}	3435,92		
	SD	5,89		
	%RSD	0,17		

Tablo 13. Klorfeniramin için gün içi ve günler arası analiz sonuçları

<i>Klorfeniramin</i>		1.Gün	2.Gün	3.Gün
		70,39	71,67	72,67
		71,39	72,67	70,67
		72,84	70,67	71,55
Gün içi	X_{ort}	71,54	71,67	71,63
	SD	1,23	1,00	1,00
	%RSD	1,72	1,39	1,39
Günler arası	X_{ort}	71,61		
	SD	0,94		
	%RSD	1,31		

Tablo 14. *Psödoefedrin* için gün içi ve günler arası analiz sonuçları

<i>Psödoefedrin</i>		1.Gün	2.Gün	3.Gün
		636,42	635,45	634,64
		635,74	634,53	635,48
		634,85	634,56	633,98
Gün içi	X_{ort}	635,67	634,84	634,7
	SD	0,78	0,52	0,75
	%RSD	0,12	0,08	0,12
Günler arası	X_{ort}	635,07		
	SD	0,75		
	%RSD	0,11		

Tablo 15. *Dekstrometorfan* için gün içi ve günler arası analiz sonuçları

<i>Dekstrometorfan</i>		1.Gün	2.Gün	3.Gün
		143,92	143,05	144,32
		144,05	142,32	143,87
		144,65	143,34	143,98
Gün içi	X_{ort}	144,20	142,90	144,05
	SD	0,38	0,52	0,23
	%RSD	0,27	0,36	0,16
Günler arası	X_{ort}	143,71		
	SD	0,71		
	%RSD	0,49		

Tablo 16. 4-Aminofenol için gün içi ve günler arası analiz sonuçları

4-Aminofenol		1.Gün	2.Gün	3.Gün
		103,65	103,52	103,78
		102,69	102,34	102,14
		102,98	102,54	103,78
Gün içi	X_{ort}	103,10	102,8	103,23
	SD	0,49	0,63	0,94
	%RSD	0,47	0,61	0,91
Günler arası	X_{ort}	103,04		
	SD	0,64		
	%RSD	0,63		

Tablo 17. Efedrin için gün içi ve günler arası analiz sonuçları

Efedrin		1.Gün	2.Gün	3.Gün
		89,82	88,69	89,36
		88,65	88,34	90,34
		89,62	90,52	87,89
Gün içi	X_{ort}	89,36	89,18	89,19
	SD	0,62	1,17	1,23
	%RSD	0,7	1,31	1,38
Günler arası	X_{ort}	89,24		
	SD	0,91		
	%RSD	1,01		

Geliştirilen yöntem için sistem uygunluk testleri yapılmış, elde edilen sonuçlar Tablo 18’de gösterilmiştir.

Tablo 18. Sistem uygunluk testleri

	DEK	EFN	KLO	PSO	4-AF	PAR
Ortalama göç zamanı (dak)	5,83	6,05	6,528	7,207	9,232	10,794
Teorik Tabaka Sayısı (N)	9886	10164	11642	8766	9884	12692
Asimetri Faktörü	0,98	1,01	0,97	1,02	1,07	1,03
Pik Alanı	143,92	89,32	71,55	634,64	103,65	3436,60
Kapasite faktörü	3,85	4,04	4,43	5,01	6,69	8,04
Ayırıcılık (R)	3,44	3,21	5,22	10,2	8,75	
Seçicilik (α)	1,05	1,10	1,14	1,33	1,21	

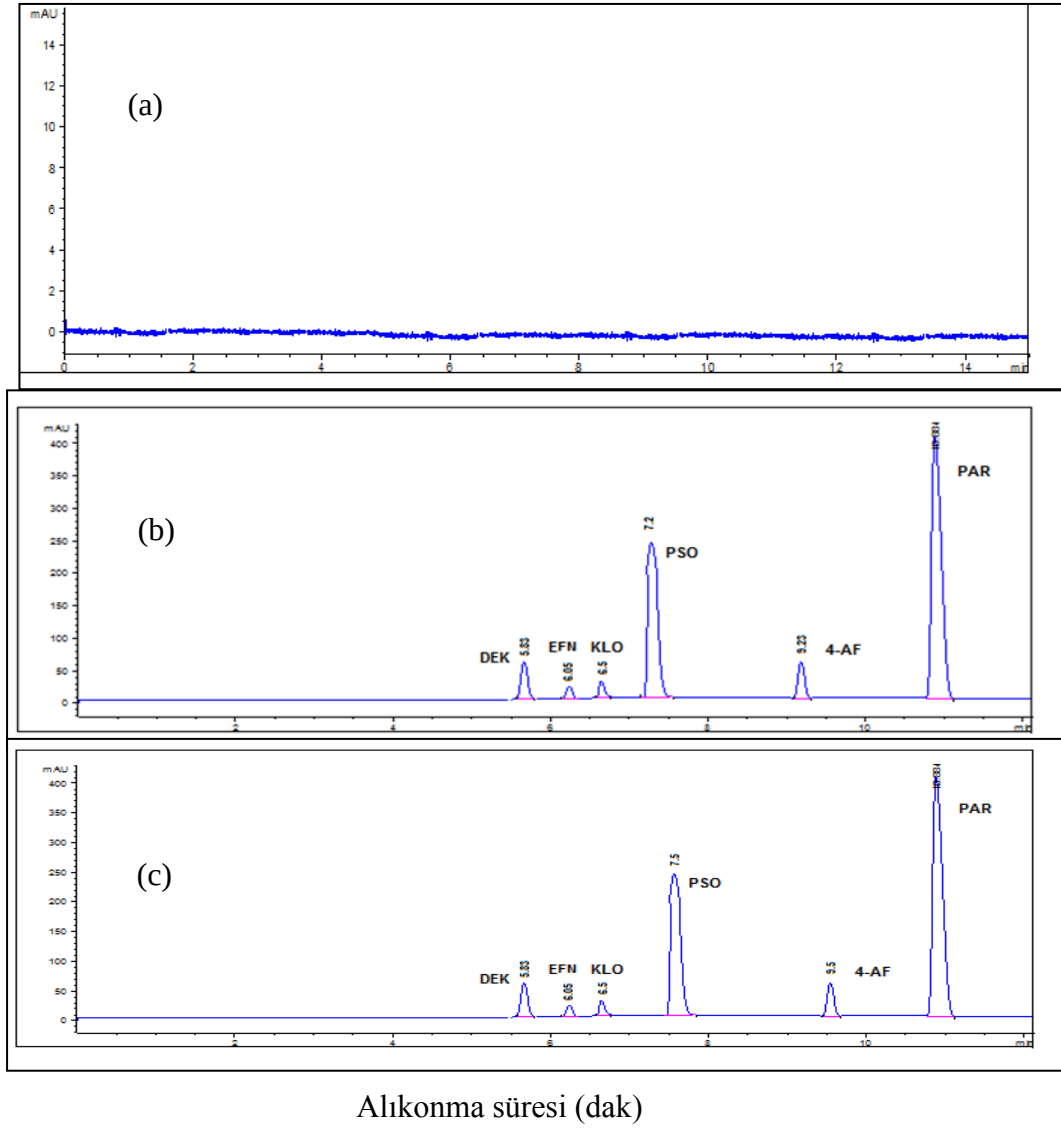
4.2.3. Farmasötik Preparatın Analiz Bulguları

Bir adet tablet içerisinde 325 mg *Parasetamol*, 30 mg *Psödoefedrin*, 2 mg *Klorfeniramin*, 15 mg *Dekstrometorfan* mevcuttur. Bir adet tablet içeriği üzerine safsızlık 6 mg *4-aminofenol*, 6 mg *efedrin* eklenmiştir.

Kapiler elektroforez yöntemi ile yapılan miktar tayininde Bölüm 3.2.2.'de anlatılan yol izlenerek elektroferogramlar elde edilmiş ve kalibrasyon doğrularından hareketle her bir analit için miktar tayinleri gerçekleştirilmiştir.

Şekil 31'de önerilen yöntemle elde edilen elektroferogramlar görülmektedir.

Tablo 19, 20, 21, 22, 23 ve 24'de farmasötik tabletlerde gerçekleştirilen miktar tayini sonuçları yer almaktadır.



Şekil 31. Geliştirilen Kapiler elektroforez yöntemi ile elde edilen elektroferogramlar, $\lambda=192\text{nm}$

a)BGE çözeltisi

b)Standart parasetamol, klorfeniramin, dekstrometorfan, psödoefedrin, 4-aminofenol ve efedrin karışımı çözeltisi

c)Farmasötik preparat (Gripamol tablet) ve safsızlıklar içeren çözelti

Koşullar: $t_{\text{enj}}= 10\text{s}$, Hidrodinamik enjeksiyon $P_{\text{enj}}= 50\text{mbar}$, Ayırma Voltajı= 30 kV ,

Kapiler çapı: $75\text{ }\mu\text{m}$, BGE: 75mM pH8 borat tamponu- $\%15\text{ ACN}$ $T=30^\circ\text{C}$

Tablo19. Parasetamol miktar tayini sonuçları

Numune no.	Bulunan miktar mg / tablet	Belirtilen miktar 325 mg/tb
1	323,80	$X_{ort}=325,16$
2	324,35	SD=0,83
3	325,78	%RSD=0,09
4	326,15	$t.SD/\sqrt{n}=0,76$
5	325,07	GA*=324,4 - 325,92
6	325,65	p=0,05
7	325,34	

*GA: Güven Aralığı

Tablo 20. Psödoefedrin miktar tayini sonuçları

Numune no.	Bulunan miktar mg / tb	Belirtilen miktar 30 mg/tb
1	29,62	$X_{ort}=29,77$
2	28,92	SD=0,74
3	30,24	%RSD=0,09
4	31,02	$t.SD/\sqrt{n}=0,68$
5	29,82	GA=29,09 – 30,45
6	28,91	P=0,05
7	29,91	

Tablo 21. Klorfeniramin miktar tayini sonuçları

Numune no.	Bulunan miktar mg / tb	Belirtilen miktar 2 mg/tb
1	1,98	$X_{ort}=2,02$
2	1,87	$SD=0,13$
3	2,23	$\%RSD=0,09$
4	2,01	$t.SD/\sqrt{n}=0,12$
5	2,21	$GA=1,9 - 2,14$
6	1,94	$p=0,05$
7	1,96	

Tablo 22. Dekstrometorfan miktar tayini sonuçları

Numune no.	Bulunan miktar mg / tb	Belirtilen miktar 15 mg/tb
1	14,82	$X_{ort}=14,82$
2	15,34	$SD=0,82$
3	14,23	$\%RSD=0,09$
4	13,41	$t.SD/\sqrt{n}=0,76$
5	15,82	$GA=14,06 - 15,68$
6	14,63	$P=0,05$
7	15,52	

Tablo 23. 4-aminofenol miktar tayini sonuçları

Numune no.	Bulunan miktar mg / tb	Eklenen miktar 6mg/tb
1	6,01	$X_{ort}=6,00$
2	5,98	$SD=0,019$
3	6,02	$\%RSD=0,31$
4	6,00	$t.SD/\sqrt{n}=0,02$
5	5,97	$GA=5,98 - 6,02$
6	5,98	$P=0,05$
7	6,01	

Tablo 24. Efedrin miktar tayini sonuçları

Numune no.	Bulunan miktar mg / tb	Eklenen miktar 6 mg/tb
1	5,99	$X_{ort}=5,99$
2	5,97	$SD=0,05$
3	6,03	$\%RSD=0,83$
4	6,1	$t.SD/\sqrt{n}=0,05$
5	6,1	$GA=5,94 - 6,04$
6	5,96	$p=0,05$
7	6,01	

4.2.4. Geri Kazanım Çalışması Bulguları

Geliştirilen yöntemin doğruluğunun belirlenebilmesi için geri kazanım çalışması yapılmıştır. Bu amaçla, daha önce tayini yapılmış olan tablet ve safsızlıklar çözeltisi üzerine bilinen miktarlarda standart etken madde çözeltileri eklenmiştir. Bu çözeltilerin enjeksiyonu sonucu elde edilen elektroferogramlardan hareketle standart çözeltiler ile hazırlanan kalibrasyon doğruları kullanılarak geri kazanım değerleri hesaplanmıştır. Geri kazanım çalışmasına ait sonuçlar Tablo 25-30 arasında gösterilmiştir. Tablolarda görüldüğü gibi her bir etken madde için elde edilen geri kazanım değerlerinin %100'e yakın olması geliştirilen yöntemin doğruluğunu göstermektedir.

Tablo 25. Parasetamol geri kazanım sonuçları

Numune no.	% Parasetamol	
1	101,2	$X_{ort}=99,92$ $SD=1,38$ $\%RSD=1,49$ $t.SD/\sqrt{n}=1,71$ $GA=98,27-101,63$ $p=0,05$
2	97,8	
3	100,9	
4	99,3	
5	100,4	

Tablo 26. *Psödoefedrin* geri kazanım sonuçları

Numune no.	% <i>Psödoefedrin</i>	
1	100,8	$X_{ort}=99,62$ $SD=1,49$ $\%RSD=1,49$ $t.SD/\sqrt{n}=1,85$ $GA=97,77-101,47$ $p=0,05$
2	101,2	
3	99,2	
4	97,4	
5	99,7	

Tablo 27. *Klorfeniramin* geri kazanım sonuçları

Numune no.	% <i>Klorfeniramin</i>	
1	101,9	$X_{ort}=100,57$ $SD=1,40$ $\%RSD=1,39$ $t.SD/\sqrt{n}=1,74$ $GA=98,83-102,31$ $p=0,05$
2	100,2	
3	102,1	
4	98,8	
5	99,8	

Tablo 28. Dekstrometorfan geri kazanım sonuçları

Numune no.	% Dekstrometorfan	
1	102,1	$X_{ort}=100,14$ $SD=1,91$ $\%RSD=1,9$ $t.SD/\sqrt{n}=2,37$ $GA=97,77-102,51$ $p=0,05$
2	102,3	
3	98,3	
4	98,7	
5	99,3	

Tablo 29. 4-aminofenol geri kazanım sonuçları

Numune no.	% 4-Aminofenol	
1	101,2	$X_{ort}=99,76$ $SD=1,09$ $\%RSD=1,09$ $t.SD/\sqrt{n}=1,35$ $GA=98,41 - 101,11$ $p=0,05$
2	100,5	
3	99,3	
4	98,4	
5	99,4	

Tablo 30. *Efedrin* geri kazanım sonuçları

Numune no.	% <i>Efedrin</i>	$X_{\text{ort}}=100,1$ $SD=1,15$ $\%RSD=1,14$ $t.SD/\sqrt{n}=1,42$ $GA=98,68-101,52$ $p=0,05$
1	101,4	
2	100,6	
3	99,8	
4	98,3	
5	100,4	

5. TARTIŞMA

Parasetamol, *Psödoefedrin*, *Klorfeniramin* ve *Dekstrometorfan*'ın bulunduğu farmasötik formlar grip ve soğuk algınlığı gibi durumlarda ortaya çıkan; ateş, baş ağrısı, titreme, burun tıkanıklığı (konjesyon), sekresyon, öksürük, kırıklık hali ve genizde kaşıntı gibi semptomların giderilmesi amacıyla kullanılır. Bunun için de sıklıkla, nonsteroidal antienflamatuvar (NSAI) ağrı kesici, ateş düşürücü ilaçlar, antihistaminik ilaçlar, dekonjestan ilaçlar, antitüssif ilaçlar ve mukolitik ilaçlar tercih edilmektedir.

Bu etken maddeleri içeren farmasötik preparatların analizi için valide edilmiş, doğru, kesin, kolay uygulanabilen, özellikle de düşük maliyetli analiz yöntemine ihtiyaç duyulmaktadır. Kapiler elektroforez, bu özelliklere uyan ve ilaç analizlerinde sıkça uygulanan bir yöntemdir. Türkiye piyasasında bu dört etken maddenin bir arada bulunduğu farmasötik preparat Gripamol®'un kombinasyonundaki maddelerin ve bu maddelerden *parasetamol* ve *psödoefedrinin* safsızlıkları *4-aminofenol* (4-AF) ve *efedrinin* (EFN) de bu etken maddelerle aynı anda analizi için valide edilmiş bir kapiler elektroforez yöntemine kaynaklarda rastlanmamış olması, bizi bu çalışmaya yönlendirmiştir.

Elektroforez, doğru akımın uygulandığı bir tampon çözeltide yüklü taneciklerin diferansiyel göç hızlarına dayanan bir ayırma yöntemidir. Elektrolit çözeltilerinin pH sı ve derişiminin ayırım üzerine etkisi büyüktür. Analiz sırasında pH değişimlerinden etkilenmemek adına tampon çözeltiler ile çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Çalışmamız sırasında çeşitli pH larda fosfat, asetat ve borat tamponları ile çalışılmıştır. Ancak asetat ve fosfat tamponları ile ayırım elde edilememiştir. En uygun ayırımın borat tamponu (pH 8) ile sağlandığı görüldükten sonra 25 mM-100 mM derişimler aralığında borat tamponun

hazırlanmış ve uygun ayırımın gerçekleştiği ve düzgün zemin sinyalinin olduğu 75 mM borat tampon derişiminde karar kılınmıştır.

İncelenen bilimsel çalışmaların ışığında tampon çözeltisine organik solvan eklemenin etkisi incelenmiş; solvan eklemekten ve ekledikten sonra ayırlar incelenmiş ve tampon çözeltisine %10-30 derişim aralıklarında asetonitril eklenmiş ve %15 derişimde asetonitril ilavesinde ayırım diğer derişimlere göre daha iyi olmuş ve alıkonma süresi iyileştirilmiştir.

Çalışmalar boyunca 50 µm ve 75 µm çaplı kapiler kullanılmış ve 75 µm çaplı kapilerde daha iyi bir ayırım gözlenmiş ve 50 cm uzunluğunda (41 cm efektif uzunluk) kapiler ile çalışılmış iyi bir rezolüsyon ve kısa analiz süresi elde edilmiştir.

Kapiler çalışma sıcaklığı 15°C ile 35°C arasında çalışılmış, en uygun sıcaklığın 30°C olduğu kanısına varılmıştır.

Numune pH sınırın ayırım üzerine etkisini incelemek için numuneler pH 3-11 aralığında hazırlanmış ve sadece pH 7’de iyi bir ayırım elde edilmiştir. Diğer pH larda deneyler birkaç kez tekrarlanmış ve diğer koşullardan gelebilecek etkiler minimuma indirilmiştir.

Elektroforez sırasında uygulanacak voltajın belirlenmesi için, uygulanan voltaja karşı akım değerleri incelenmiş, voltaj değeri artıka akım değerinin de doğrusal olarak arttığı ve yüksek voltajda doğrusallığın bozulmadığı gözlenmiştir. Uygulanacak voltaj 30 kV olarak belirlenmiştir.

Çalışmalar boyunca değişik dalga boylarında çalışılmış ancak iki farklı dalga boyunda çalışmanın zorluğu nedeniyle kromatogramlar üç boyutlu hale getirilmiş ve buradan elde edilen veriler ile daha önce çalışılmamış ancak numunede yer alan altı analitin de en yüksek absorpsiyon yaptığı 192 nm de karar kılınmıştır.

Enjeksiyon süresi optimizasyonu için etken maddeleri belirtilen oranlarda içeren bir çözelti hazırlanmış ve 5, 10 ve 20 saniye enjeksiyon sürelerinde analizler yapılmıştır. Enjeksiyon süresi 10 saniye olduğunda elektroferogramda pik şekillerinin keskin ve simetrik oldukları görülmüştür.

Tüm çalışmalarda Hidrodinamik enjeksiyon kullanılmıştır. ve enjeksiyon basıncı 50mbar'dır. Geliştirilen yöntemin tekrarlanabilirliğini belirlemek amacıyla, hazırlanan karışım çözeltisinin belirtilen çalışma koşullarında 7 kez enjeksiyonu yapılmıştır. Her bir analit için elde edilen pik alanı, pik yüksekliği ve migrasyon zamanı verilerinin ortalama, standart sapma ve bağıl standart sapma değerleri hesaplanmıştır. Her altı analit için elde edilen bağıl standart sapma değerleri, yöntemin tekrarlanabilir olduğunun göstergesidir. Miktar tayini hesaplamalarında pik alanı değerleri kullanılmıştır.

Kalibrasyon çalışmalarında, analitler için konsantrasyonlarına karşılık pik alanları kullanılarak çizilen kalibrasyon doğrularının korelasyon katsayısı değerleri 0,999'dan büyüktür. Bu da, çalışılan konsantrasyon aralıklarında, pik alanı ile konsantrasyon arasındaki ilişkinin doğrusal olduğunu göstermektedir.

Geliştirilen yöntem ile yapılan miktar tayini sonucunda elde edilen ortalama değerler tablet içerisinde bulunması gereken ve dışarıdan ilave edilen miktarlar ile uyumlu sonuçlar vermiştir. Bu sonuçlarının bağıl standart sapma değerleri ise yöntemin kesinliğinin bir göstergesidir.

Geri kazanım çalışmaları sonucunda elde edilen ortalama geri kazanım ve %95 olasılık düzeyine göre hesaplanan güven aralığı değerleri sırasıyla, *parasetamol* için %99,92 ve %99,92±1,71, *psödoefedrin* için %99,62 ve %99,62±1,85, *klorfeniramin* için %100,57 ve %100,57±1,74, *dekstrometorfan* için %100,14 ve %100,14±2,37, *4-aminofenol* için %99,76 ve %99,76±1,35 ve *efedrin* için %100,10 ve %100,10±1,42'dir. Geri

kazanım çalışması sonuçları, kabul edilebilir değerler içindedir ve yöntemin doğruluğunun bir göstergesidir.

Önerilen yöntemin doğru ve tekrarlanabilir olduğu, analit piklerinin ayırım için yeterli rezolüsyonu sağladığı ve analiz süresinin kısa olduğu bulunmuştur. Sonuç olarak bu çalışmada önerilen ve optimize edilen kapiler elektroforez yönteminin *parasetamol*, *dekstrometorfan*, *psödoefedrin*, *klorfeniramin*, *efedrin* ve *4-aminofenol*'ün aynı anda analizi için uygun olduğu görülmüştür.

6. SONUÇ

Parasetamol, *psödoefedrin*, *klorfeniramin*, *dekstrometorfan*'ın dörtlü kombinasyonunu içeren farmasötik formlardan ayrıca yine bu maddelerden *parasetamol* ve *psödoefedrin*in safsızlıklarından olan *efedrin* ve *4-aminofenol* ün de bulunduğu altılı kombinasyonun aynı anda analizi için kapiler elektroforez yöntemi geliştirilmiştir.

En iyi sonuçlar, BGE çözeltisi elektroliti olarak 75 mM borat tamponu-% 15 ACN kullanılmasıyla elde edilmiştir. Ayrım eritilmiş silika kapilerde (75 µm iç çap, 50 cm toplam uzunluk, 41 cm etken uzunluk) 30°C'de, 50 mbar basınçla 10 sn süreli hidrodinamik enjeksiyon ve 30 kV potansiyel uygulanarak gerçekleşmiştir. Dedektör dalga boyu 192 nm'dir. Bu şartlardaki göç zamanları PAR için 10,885 dakika, PSO için 7,514 dakika, KLO için 6,523 dakika DEK için 5,845 dakika, 4-AF için 9,273 dakika ve EFN için 6,017 dakika olarak bulunmuştur. Yöntemin doğrusal aralığı PAR için 50- 900 µg/mL, PSO için 25- 120 µg/mL, KLO için 2- 10 µg/mL, DEK için 25-100 µg/mL, 4-AF için 5-20 µg/mL ve EFN için 5-20 µg/mL olarak saptanmıştır. LOD değerleri, PAR için 12,4 µg/mL, PSO için 5,1 µg/mL, KLO için 0,4 µg/mL, DEK için 4,5 µg/mL, 4-AF için 1,0 µg/mL ve EFN için 1,1 µg/mL olarak bulunmuştur.

Validasyon çalışmaları sonucunda geliştirilen yöntemin doğru, kesin, duyarlı, spesifik ve tekrarlanabilir olduğu gösterilmiştir.

7. ÖZET

Kapiler elektroforez yöntemi ile tabletlerde parasetamol, psödoefedrin, klorfeniramin, dekstrometorfan, 4-aminofenol ve efedrin miktar tayini

Parasetamol, psödoefedrin, klorfeniramin, dekstrometorfan, ve parasetamol ve psödoefedrinin safsızlıkları olan efedrin ve 4-aminofenol aynı anda analizi için bir kapiler elektroforez yöntemi geliştirilmiştir. En iyi sonuçlar, BGE çözeltisi olarak %15 ACN içeren 75 mM borat tamponu kullanılmasıyla elde edilmiştir. Ayrım eritilmiş silika kapilerde (75 µm iç çap, 50 cm toplam uzunluk, 41 cm etken uzunluk) 30°C'de, 50 mbar basınçla 10 sn süreli hidrodinamik enjeksiyon ve 30 kV potansiyel uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Dedektör dalga boyu 192 nm'dir. Bu şartlardaki göç zamanları PAR için 10,885 dakika, PSO için 7,514 dakika, KLO için 6,523 dakika DEK için 5,845 dakika, 4-AF için 9,273 dakika ve EFN için 6,017 dakika olarak bulunmuştur. Yöntemin doğrusal aralığı PAR için 50- 900 µg/mL, PSO için 25- 120 µg/mL, KLO için 2- 10 µg/mL, DEK için 25-100 µg/mL, 4-AF için 5-20 µg/mL ve EFN için 5-20 µg/mL olarak saptanmıştır. LOD değerleri PAR için 12,4 µg/mL, PSO için 5,1 µg/mL, KLO için 0,4 µg/mL, DEK için 4,5 µg/mL, 4-AF için 1,0 µg/mL ve EFN için 1,1 µg/mL olarak bulunmuştur. Validasyon çalışmaları sonucunda geliştirilen yöntemin doğru, kesin, duyarlı, spesifik ve tekrarlanabilir olduğu gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Parasetamol, dekstrometorfan, psödoefedrin, klorfeniramin, efedrin, 4-aminofenol, kapiler elektroforez.*

8. SUMMARY

Simultaneous determination of paracetamol, pseudoephedrine, chlorpheniramine, dextromethorphan, 4-aminophenol and ephedrine in tablets by capillary electrophoresis.

A new capillary electrophoresis method was developed for the analysis of pharmaceutical preparations containing paracetamol, pseudoephedrine, chlorpheniramine, dextromethorphan and the impurity 4-aminophenol and ephedrine simultaneously. Best results were obtained by the use of 75 mM 0.15% ACN borate buffer as the background electrolyte. The separation was performed through a fused-silica capillary (75 μ m internal diameter, 50 cm total length, 41 cm effective length) at 30°C with 10 s hydrodynamic injection at 50 mbar pressure and potential of 30 kV. Detection wavelength was 192 nm. Under these conditions, the migration times were found to be 10.885 min for paracetamol, 7.514 min for pseudoephedrine, 6.523 min for chlorpheniramine, 5.845 min for dextromethorphan, 9.273 min for 4-aminophenol and 6.017 min for ephedrine. Linearity ranges for the method were 50- 900 μ g/mL for PAR, 25- 120 μ g/mL for PSO, 2- 10 μ g/mL for KLO, 25-100 μ g/mL for DEK, 5- 20 μ g/mL for 4-AF, 5-20 μ g/mL for EFN. Limit of detection values were found as 12.4 μ g/mL for PAR, 5.1 μ g/mL for PSO, 0.4 μ g/mL for KLO, 4.5 μ g/mL for DEK, 1.0 μ g/mL for 4-AF and 1.1 μ g/mL for EFN. According to the validation study, it was proved that the developed method was accurate, precise, sensitive, specific and repeatable.

Keywords: Paracetamol, pseudoephedrine, dextromethorphan, chlorpheniramine, ephedrine, 4-aminophenol, capillary electrophoresis.

9. KAYNAKLAR

- 1.**Altria KD. Overview of capillary electrophoresis and capillary electrochromatography. J Chrom A 1999, 856: 443-463.
- 2.**Rx Media Pharma. İnteraktif İlaç Bilgi kaynağı. Üstünes L., Gemaş Yayıncılık; 2012
- 3.**Kayaalp SO, Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, 10. baskı. Ankara: Hacettepe-Taş Kitapçılık Ltd. Şti.; 2002.
- 4.**Remington, The Science and Practice of Pharmacy (2000) 20th Edition, University of the Science in Philadelphia.
- 5.**British Pharmacopoeia 2009, Volume 1-2, Her Majesty's Stationary Office, London, 2009.
- 6.**European Pharmacopeia 5th edition. Council of Europe, Strasbourg: 2005.
- 7.**Chen X, Chen H, Liu L, Liu X, Separation and determination of four active components in medicinal preparations by flow injection-capillary electrophoresis. J Pharm Biomed Anal 2007; 43: 1700-1705.
- 8.**Gomez MR, Sombra L, Olsina RA, Martinez LD, Silva MF. Development and validation of capillary electrophoresis method for the determination of codein, diphenhydramine, ephedrine and noscaphine in pharmaceuticals. IL pharmaco 2005; 60: 85-90.
- 9.**Romero JE, Rubert MF, Bose D, Capella-Peiro M. Optimization of a capillary zone electrophoresis method by using a central composite factorial design for the determination of codeine and paracetamol in pharmaceuticals. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2006; 839: 95-101

- 10.**Onur F, Palabıyık İM. The simultaneous determination of phenylephrine hydrochloride, paracetamol, chlorpheniramine and dextromethorphan hydrobromide in pharmaceutical preparations. *Chromatographia* 2007; 66: 93-96
- 11.**Chen X, Dong Y, Chen X, Chen Y, Hu Z. Separation and determination of pseudoephedrine, dextromethorphan, diphenhydramine and chlorpheniramine in cold medicines by nonaqueous capillary electrophoresis. *J Pharm Biomed Anal* 2005; 39: 285-289.
- 12.**Mahmoud WMM, Hadad GM. The use of a monolithic column to improve the simultaneous determination of caffeine, paracetamol, pseudoephedrine, aspirin, dextromethorphan, chlorpheniramine in pharmaceutical formulations by HPLC-A comparison with a conventional reversed phase silica based column. *J Liq Chrom* 2011; 34: 2516-2532.
- 13.**Heydari R. A new HPLC method for the simultaneous determination of acetaminophen, phenylephrine, dextromethorphan and chlorpheniramine in pharmaceutical formulations. *Analytical letters* 2008; 41: 965-976.
- 14.**Makino Y. Simple Hplc method for detection of trace ephedrine and pseudoephedrine in high purity methamphetamine. *Biomed Chromatogr* 2012; 26: 327-330.
- 15.**Qi ML, Wang P, Zhou L, Gu JL, Fu RN. Simultaneous determination of acetaminophen, dextromethorphan hydrobromide and pseudoephedrine hydrochloride in a new drug formulation for cold treatment by HPLC. *Chromatographia* 2003; 57: 139-142.
- 16.**Özaltın N, Emre D. Simultaneous determination of paracetamol, caffeine and propyphenazone in ternary mixtures by micellar electrokinetic capillary chromatography. *J Chromatogr B* 2007; 847(2): 126-132.

- 17.** Sekar R, Azhagvuel S. Method development and validation for the simultaneous determination of cetirizine dihydrochloride, paracetamol, and phenylpropanolamine hydrochloride in tablets by capillary zone electrophoresis. *J Pharm Biomed Anal* 2007; 43: 873-878.
- 18.** Ye j, Tian X, Jiang L, Chu Q. Rapid determination of acetaminophen and p-aminophenol in pharmaceutical formulations using miniaturized capillary electrophoresis with amperometric detection. *Anal Chim Acta* 2008; 606: 246-251.
- 19.** Ravisankar S, Vasudevan M, Gandhimathi M, Suresh B. Reversed-phase HPLC method for the estimation of acetaminophen, ibuprofen and chlorzoxazone in formulations. *Talanta* 1998; 46: 1577-1581.
- 20.** Liu MY, Peng FL, Mei L, Liu JL. Determination of diastereisomeric alkaloids in urine by capillary electrophoresis with electrochemiluminescence detection. *Chinese Chemical Letters* 2011; 22: 197-200.
- 21.** Fijalek Z, Warowna-Grzeskiewicz M, Wyszeccka-Kaszuba E. Determination of 4-aminophenol impurities in multicomponent analgesic preparations by HPLC with amperometric detection. *J Pharm Biomed Anal* 2003; 32: 1081-1086.
- 22.** Suntornsuk L, Pipitharome O, Wilairat P. Simultaneous determination of paracetamol and chlorpheniramine maleate by micellar electrokinetic chromatography. *J Pharm Biomed Anal* 2003; 33: 441-449.
- 23.** Nemeth T, Jankovics P, Palotas Nemeth J, Kőszegi-Szalai H. Determination of paracetamol and main impurity 4-aminophenol in analgesic preparations by micellar electrokinetic chromatography. *J Pharm Biomed Anal* 2008; 47: 746-749.

- 24.**Ruan Z, Lou H, Yan H, Jiang B. Simultaneous determination of paracetamol, pseudoephedrine, dextrophan and chlorpheniramine in human plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B* 2010; 878: 682-688.
- 25.**Chen X, Zhang J, Liu X. Online concentration by head -column field amplified with large volume sample stacking using flow injection capillary electrophoresis for the analysis of four active components in cold medicines. *Anal Sci* 2008; 24: 1031-1037.
- 26.**Fang Y, Chen G, Hu Q, Zhang L. Simultaneous determination of the active ingredients in composite pseudoephedrine hydrochloride tablets by capillary electrophoresis. *Anal Chim Acta* 2000; 424: 257-262.
- 27.**Barbas C, Marin A. CE versus HPLC for the dissolution test in a pharmaceutical formulation containing acetaminophen, phenylephrine and chlorpheniramine. *J Pharm Biomed Anal* 2004; 35: 769-777.
- 28.**Lu J, Liu H, Wang Q, Cheng Xi, He P, Fang Y. Determination of four active ingredients in Vc-Yinqiao tablets by capillary zone electrophoresis with amperometric detection. *Chi J Chem* 2006; 24: 1117-1121.
- 29.**Zhao C, Chai X, Tao S, Li M, Jiao K. Selective determination of diphenhydramine in compound pharmaceutical containing ephedrine by flow injection electrochemiluminescence. *Anal Sci* 2008; 24: 535-538.
- 30.**Xiao D, Zhao S, Bai W, Yuan H. Detection of paracetamol by capillary electrophoresis with chemiluminescence detection. *Anal Chim Acta* 2006; 559: 195-199.
- 31.**Amini A, Barclay V, Rundlöf T, Jönsson S, Karlsson A, Arvidsson T. Determination of ephedrine and caffeine in a dietary product by capillary electrophoresis. *Chromatographia* 2006; 63: 143-148.

- 32.**Chen G,Ye J,Bao H,Yang P. Determination of the rate constants and activation enegy of acetaminophen hydrolysis by capillary electrophoresis. J Pharm Biomed Anal 2002; 29: 843-850.
- 33.**Zhang Z, Sun L,Tian J, Zou Q, Hu Z. Simultaneous determination of codeine, ephedrine, guaiphenesin and chlorpheniramine in beagle dog plasma using high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometric detection: Application to a bioequivalence study. J Chromatogr B 2011; 879: 3937-3942.
- 34.**Skoog D, Holler FJ, Nieman TA, Enstrümantal Analiz İlkeleri, Çeviri Editörleri: Kılıç E, Yılmaz H, Bilim Yayıncılık, Ankara, 1998; 778-795.
- 35.**Belder D, Ludwing M. Surface modification in microchip electrophoresis. Electrophoresis 2003; 24: 3595-3606.
- 36.**Stachowiak TB, Svec F, Frachet MJJ. Chip electrochromatography. J Chromatogr A 2004; 1044: 97-111.
- 37.**Taverniers I, Loose MD, Bockstaele EV. Trend in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. Trends Analyt Chem 2004; 23: 535-552.

10.TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın oluşturulmasında ve yürütülmesinde bilgi ve tecrübesiyle bana yön veren ayrıca bildiği her konuda beni de bilgilendiren, çoğu zaman yüreklendiren değerli hocam, danışmanım Sayın Prof. Dr. Nilgün GÜNDEN GÖĞER'e

Çalışmalarım boyunca bilimsel katkılarını ve desteğini esirgemediği, bilgi ve tecrübelerinden yararlanmamı sağladığı için, Sayın Prof. Dr. Nusret ERTAŞ'a

Teorik ve pratik derslerde öğrettikleri değerli bilgiler için, Analitik Kimya Ana Bilim Dalımızın saygı değer öğretim üyelerine,

Çalışmalarım boyunca bana her zaman moral veren, desteğini benden hiçbir zaman esirgemeyen değerli hocam Sayın Doç.Dr. H.Eda ŞATANA KARA'ya

Laboratuvar çalışmalarım sırasında karşılaştığım zorluklarda teknik desteğini esirgemeyen Dr. Usama ALSHANA'ya

Çalışmalarımız için gerekli olan etken madde desteğini sağladığı için Koçak Farma A.Ş.'ye

Eğitim ve özel hayatım boyunca benden maddi ve özellikle de manevi desteklerini esirgemeyen, beni her zaman cesaretlendiren sevgili annem, babam ve kardeşime,

Çalışmalarım sırasında her zaman olduğu gibi fedakârlık göstererek bana karşı desteğini ve bilgisini esirgemeyen biricik eşime

en içten duygularımla teşekkür ederim.

11. ÖZGEÇMİŞ

Adı : Beytül

Soyadı : YENER

Doğum Tarihi : 09.06.1985

Doğum yeri : Kırıkkale-Merkez

Eğitim : Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
(2004-2008)

Kırıkkale Fen Lisesi
(2000-2003)

Kırıkkale Anadolu Lisesi
(1996-2000)

Atatürk ilköğretim Okulu

Yabancı Dil : İngilizce

İş Deneyimleri : Beytül Eczanesi /Kırıkkale Sahibi ve Mesul
müdürlüğü