

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

**KAPİLER ELEKTROFOREZ YÖNTEMİYLE FARMASÖTİK
TABLETLERDE PARASETAMOL, KAFEİN ve KODEİN MİKTAR TAYİNİ**

Yüksek Lisans Tezi

Kimyager Koray ÇAKIR

Tez Danışmanı

Doç.Dr.Nilgün GÜNDEN GÖĞER

**ANKARA
Ekim 2007**

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

**KAPİLER ELEKTROFOREZ YÖNTEMİYLE FARMASÖTİK
TABLETLERDE PARASETAMOL, KAFEİN ve KODEİN MİKTAR TAYİNİ**

Yüksek Lisans Tezi

Kimyager Koray ÇAKIR

Tez Danışmanı

Doç.Dr.Nilgün GÜNDEN GÖĞER

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından BAP 02/2007-14 proje numarası ile desteklenmiştir.

**ANKARA
Ekim 2007**

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

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

Tez Savunma Tarihi: 22/10/2007

**Prof.Dr. Tevfik ORBEY
Gazi Üniversitesi
Jüri Başkanı**

**Prof.Dr. Sibel ÖZKAN
Ankara Üniversitesi**

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

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	I
İçindekiler	II
Şekillerin Listesi	VI
Tabloların Listesi	IX
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Kodein	2
2.1.1. Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri	2
2.1.2. Farmakolojik Özellikleri	3
2.1.3. Analiz Yöntemleri	6
2.2. Kafein	10
2.2.1. Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri	10
2.2.2. Farmakolojik Özellikleri	11
2.2.2.1. Santral Sinir Sistemi Üzerindeki Etkileri	11
2.2.2.2. Periferik Etkileri	14
2.2.2.3. Kullanılışı	16
2.2.2.4. Yan Etkileri	17
2.2.3. Analiz Yöntemleri	17
2.3. Parasetamol (Asetaminofen)	22
2.3.1. Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri	22
2.3.2. Farmakolojik Özellikleri	23
2.3.3. Analiz Yöntemleri	26

2.4.	Parasetamol, Kafein ve Kodein İçeren İkili ve Üçlü Karışımlarda Uygulanan Analiz Yöntemleri	34
2.5.	Kullanılan Yöntemle İlgili Genel Bilgiler	42
2.5.1.	Elektroforetik Ayırmaların Temeli	44
2.5.2.	Elektroforez Tipleri	45
2.5.2.1.	Tabaka (Slab) Elektroforez	45
2.5.2.2.	Kapiler Elektroforez	45
2.5.2.2.1.	Kapiler Elektroforezde Göç Hızları	47
2.5.2.2.2.	Kapiler Elektroforezde Tabaka Yükseklikleri	47
2.5.2.2.3.	Elektroozmotik Akış	49
2.5.2.3.	Kapiler Elektroforez İçin Cihaz	52
2.5.2.3.1.	Numune Verme	52
2.5.2.3.2.	Kapiler Elektroforezde Kullanılan Dedeksiyon Yöntemleri	54
2.5.2.4.	Kapiler Elektroforez Uygulamaları	58
2.5.2.4.1.	Kapiler Zon Elektroforez	59
2.5.2.4.2.	Kapiler Jel Elektroforez	60
2.5.2.4.3.	Kapiler İzotakoforez	60
2.5.2.4.4.	Kapiler İzoelektrik Odaklama	61
3.	MATERYAL ve YÖNTEM	62
3.1.	Kullanılan Araç ve Gereçler	62
3.2.	Kullanılan Kimyasallar	62
3.3.	Kullanılan Farmasötik Preparat	62
3.4.	Ön Çalışmalar	63
3.4.1.	Tampon Çözelti, pH ve Konsantrasyon Seçimi	63

3.4.2.	Enjeksiyon için Basınç ve Süre Seçilmesi	63
3.4.3.	Optimum Çalışma Koşulları	63
3.4.4.	Tekrarlanabilirlik Çalışmaları	64
3.5.	Kalibrasyon Çalışmaları	65
3.5.1.	Stok Çözelti ve Dilüsyonların Hazırlanması	65
3.6.	Farmasötik Tabletlerde Parasetamol, Kafein ve Kodein Fosfat Miktar Tayini	66
3.7.	Geri Kazanım Çalışmaları	67
4.	BULGULAR	68
4.1.	Ön Çalışma Sonuçları	68
4.1.1.	Tampon Çözelti, Tampon Çözelti pH'ı ve Konsantrasyonu Seçimi Çalışması Sonuçları	68
4.1.2.	Enjeksiyon Süresi Optimizasyonu Sonuçları	70
4.1.3.	Tekrarlanabilirlik Çalışması Sonuçları	72
4.2.	Kalibrasyon Çalışması Sonuçları	74
4.3.	Tabletlerde Etken Madde Miktar Tayini Sonuçları	80
4.3.1.	Tabletlerde Parasetamol Miktar Tayini Sonuçları	80
4.3.2.	Tabletlerde Kafein Miktar Tayini Sonuçları	81
4.3.3.	Tabletlerde Kodein Miktar Tayini Sonuçları	82
4.4.	Geri Kazanım Çalışmaları	82
4.4.1.	Parasetamol Geri Kazanım Sonuçları	82
4.4.2.	Kafein Geri Kazanım Sonuçları	83
4.4.3.	Kodein Geri Kazanım Sonuçları	84

5.	TARTIŞMA VE SONUÇ	85
6.	ÖZET	91
7.	SUMMARY	92
8.	KAYNAKLAR	93
9.	EKLER	99
10.	ÖZGEÇMİŞ	100

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil No.		Sayfa No.
1	Kapiler Elektroferez Sistemi	46
2	Silika/ kapiler arayüzeyinde yük dağılımı ve oluşan elektroosmotik akış	49
3	Elektroosmotik basınç ve hidrodinamik basınç altında sıvılar için akış profilleri	50
4	Kapiler Elektroferezde numune enjeksiyon şekilleri	54
5	Elektroferez ile Ayırmada Kullanılan Modlar	59
6	<i>Parasetamol, kafein ve kodein fosfat</i> karışımının elektroferogramı; Parasetamol (570 µg/mL), kafein (34,2 µg/mL), kodein fosfat (11,4 µg/mL), Elektrolit Çözelti: % 10 metanol içeren 20 mM fosfat tamponu	68
7	<i>Parasetamol, kafein ve kodein fosfat</i> karışımının elektroferogramı; Parasetamol (1050 µg/mL), kafein (63 µg/mL), kodein fosfat (21 µg/mL), Elektrolit Çözelti: % 10 metanol içeren 25 mM fosfat tamponu	69
8	<i>Parasetamol, kafein ve kodein fosfat</i> karışımının elektroferogramı; Parasetamol (741 µg/mL), kafein (44 µg/mL), kodein fosfat (14,8 µg/mL); Elektrolit Çözelti: % 10 metanol içeren 25 mM fosfat tamponu; Enjeksiyon süresi: 5 saniye	70

- 9 *Parasetamol, kafein ve kodein fosfat* karışımının elektroferogramı; Parasetamol (741 µg/mL), kafein (44 µg/mL), kodein fosfat (14,8 µg/mL); Elektrolit Çözelti: % 10 metanol içeren 25 mM fosfat tamponu; Enjeksiyon süresi: 10 saniye 70
- 10 *Parasetamol, kafein ve kodein fosfat* karışımının elektroferogramı; Parasetamol (741 µg/mL), kafein (44 µg/mL), kodein fosfat (14,8 µg/mL); Elektrolit Çözelti: % 10 metanol içeren 25 mM fosfat tamponu; Enjeksiyon süresi: 15 saniye 71
- 11 *Parasetamol, kafein ve kodein fosfat* içeren sentetik karışımın elektroferogramı; Parasetamol (1998,0 µg/mL), kafein (99,6 µg/mL), kodein fosfat (62,0 µg/mL); Elektrolit Çözelti: % 10 metanol içeren 25 mM fosfat tamponu; Enjeksiyon süresi: 10 saniye 72
- 12 99,72 µg/mL parasetamol, 5,752 µg/mL kafein ve 1,84 µg/mL Kodein fosfat içeren çözeltinin elektroferogramı (Dilüsyon 1) 74
- 13 249,30 µg/mL parasetamol, 14,38 µg/mL kafein ve 4,60 µg/mL Kodein fosfat içeren çözeltinin elektroferogramı (Dilüsyon 2) 74
- 14 498,60 µg/mL parasetamol, 28,76 µg/mL kafein ve 9,20 µg/mL Kodein fosfat içeren çözeltinin elektroferogramı (Dilüsyon 3) 75

15	1246,50 µg/mL parasetamol, 71,90 µg/mL kafein ve 23,00 µg/mL Kodein fosfat içeren çözeltinin elektroferogramı (Dilüsyon 4)	75
16	1994,40 µg/mL parasetamol, 115,04 µg/mL kafein ve 36,40 µg/mL Kodein fosfat içeren çözeltinin elektroferogramı (Dilüsyon 5)	75
17	<i>Kodein Fosfat</i> kalibrasyon doğrusu	77
18	<i>Kafein</i> kalibrasyon doğrusu	78
19	<i>Parasetamol</i> kalibrasyon doğrusu	79
20	<i>Parasetamol, kafein ve kodein fosfat</i> içeren tablet çözeltisinin elektroferogramı; Parasetamol (794,07 µg/mL), kafein (99,6 µg/mL), kodein fosfat (15,88 µg/mL); Elektrolit Çözelti: % 10 metanol içeren 25 mM fosfat tamponu; Enjeksiyon süresi: 10 saniye	80

TABLULARIN LİSTESİ

Tablo No.		Sayfa No.
1	Kapiler Elektroforezde Dedeksiyon Yöntemleri	55
2	Kalibrasyon Çözeltilerinin Konsantrasyonları	66
3	Tekrarlanabilirlik çalışması sonuçları	73
4	Kalibrasyon çözeltilerinin konsantrasyon-pik alanı değerleri	76
5	Tabletlerde <i>Parasetamol</i> Miktar Tayini Sonuçları	81
6	Tabletlerde <i>Kafein</i> Miktar Tayini Sonuçları	81
7	Tabletlerde <i>Kodein fosfat</i> Miktar Tayini Sonuçları	82
8	Parasetamol için geri kazanım çalışması sonuçları	83
9	Kafein için geri kazanım çalışması sonuçları	83
10	Kodein fosfat için geri kazanım çalışması sonuçları	84

GİRİŞ

Kapiler elektroforez, hem büyük hem de küçük molekül gruplarında yüksek ayırım etkinliği için dar çaplı kapilerlerin kullanıldığı bir tekniktir.

Kapiler elektroforez, göreceli olarak yeni ve düşük hacimlerde numuneler için ideal, güçlü bir ayırma tekniğidir. Biyoanalitik araştırmalarda, biyoteknoloji ve çeşitli klinik, diagnostik, genetik ve adli uygulamalarda kapiler elektroforez yönteminin kullanımı yaygınlaşmaktadır.

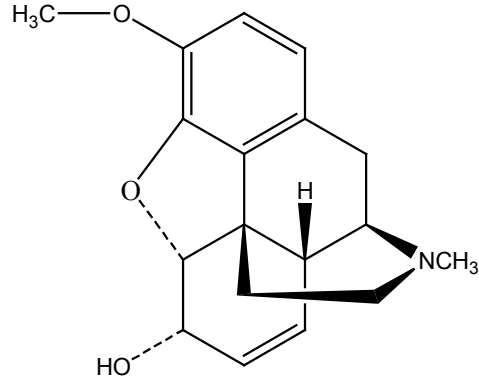
Farmasötik analizlerde de kapiler elektroforez giderek artan bir ilgi görmekte ve rutin analitik yöntemler arasında yerini almaktadır.

Bu çalışmada, *parasetamol* (asetaminofen), *kafein* ve *kodein fosfatı* birlikte içeren tablet şeklindeki farmasötik formlar için daha az ön işlem gerektiren, tekrarlanabilir, duyarlı ve rutin olarak uygulanabilen bir kapiler elektroforez ayırma ve miktar tayini yöntemi geliştirilmesi amaçlanmıştır.

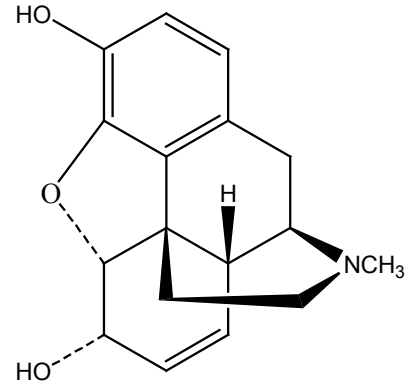
GENEL BİLGİLER

2.1. Kodein

2.1.1. Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri



Kodein



Morfin

Metilmorfin

(5 α ,6 α)-7,8-Didehidro-4,5-epoksi-3-metoksi-17-metilmorfinan-6-ol

Morfin 3-metil eter

Kapalı Formülü : C₁₈H₂₁NO₃

Molekül Ağırlığı : 299,37 g/mol

Erime Noktası : 154 – 156°C

Çözünürlüğü : 1 gr *kodein*, 120 mL suda, 2 mL alkolde, 13 mL benzende, 18 mL eterde, 0,5 mL kloroformda çözünür.

LD₅₀ (s.c. farelerde): 300 mg/kg (HCl tuzu için)¹.

2.1.2. Farmakolojik Özellikleri

Bir morfin türevi olan *kodein* (morfin 3-metil eter), morfinin fenolik OH grubunun metillenmesiyle oluşur. Morfinin bu şekilde metillenmesi onun analjezik etkisini ve bağımlılık yapıcı etkinliğini önemli ölçüde azaltır, fakat antitussif etkinliğini fazla zayıflatmaz.

Kodein, afyon (opium) içinde yaklaşık % 0,5 oranında doğal olarak bulunur, afyondan veya haşhaş kapsülünden ekstraksiyonla elde edilir veya morfinin metillenmesi ile yarı-sentez suretiyle yapılır. *Kodein* kullanımı kontrole tabidir, fakat Türkiye'deki mevzuata göre *kodein* içeren bazı müstahzarlar “uyuşturucu” sayılmaz.

Kodein'in hem levo hem de dekstro izomeri antitussif etkinlik gösterir; ancak levo şeklinin gravimetrik etki gücü, dekstro şekline göre yaklaşık 6 kez daha fazladır. Diğer opioid ilaçlar gibi analjezik etkisi de vardır. Analjezik etkisi μ reseptörleri üzerinden olur; öksürük kesici etkisinde ise μ reseptörler yanında, öksürük-kesici reseptörler de rol oynarlar. *Kodein*

μ reseptörlerine düşük afinite gösterir. Analjezik etkisi, esas olarak karaciğerde demetilasyonu sonucu oluşan morfine bağlıdır. Ağızdan 32 mg dozunda verilen *kodein*'in terminal kanser ağrısı olan hastalardaki ağrı kesici etkisi, 650 mg aspirininkine aşağı yukarı eşit bulunmuştur. *Kodeinin* analjezik ilaç olarak etkinliği, morfininkinden düşüktür. *Kodeinin*, parenteral yolla verilen 10 mg morfininkine eşit analjezik etkinliği, aynı yoldan 100-120 mg dozunda verildiğinde görülür; fakat sakıncaları nedeniyle bu dozda kullanılmaz.

Kodein'in antitussif etkisi analjezi yapmak için gereken dozdan daha düşük dozlarda ortaya çıkar. Dekstro izomerinin analjezik etkinliği yoktur. *Kodein*'in aspirin ile veya aspirin benzeri ilaçlarla kombinasyonu aditif bir analjezik etki oluşturur. Toksik dozlarda *kodein* solunum merkezini deprese edebilir; bu olay akut *kodein* intoksikasyonunda ölüm nedenini teşkil eder. Nalokson enjeksiyonu *kodein*'in öksürük kesici etkisi dışında, bütün spesifik etkilerini tam olarak antagonize eder. *Kodein* gastrointestinal motiliteyi ve intestinal mukozanın sıvı salgılamasını inhibe ederek konstipasyon yapar. Bu nedenle *kodein* antidiyareik ilaç olarak kullanılabilir ve bu amaçla kullanılan difenoksilat ve loperamid gibi ilaçların ucuz bir alternatifi sayılabilir. *Kodein*'in öforizan etkisi ve bağımlılık yapma potansiyeli morfininkine göre düşüktür, ancak morfin ve eroin bağımlıları bu ilaçları bulamadıkları zaman onların yerine *kodein*'i ağızdan veya enjeksiyonla kullanabilirler.

Ağız yolundan alındığında *kodein'in* sistemik biyoyararlanımı yaklaşık % 65'tir. Karaciğerde O- ve N- demetilasyona uğrar, böylece, kısmen morfin ve norkodeine dönüşür. Bu metabolitler ve değişmemiş *kodein*, glukuronik asid konjugatı şeklinde idrarla atılır. Eliminasyon yarılanma ömrü 3-4 saattir.

Konstipasyon, sedasyon ve uyuşukluk hali *kodein* alanlarda nispeten sık görülen yan tesirlerdir. *Kodein*, diğer opiyatlar gibi, solunum yolları mukozasındaki bezlerin salgısını azaltır ve mukozada kuruluk yapar. Ayrıca epitel hücrelerinin siliyumlarının hareketini (mukosilyer transportu) inhibe eder. Aşırı mukus salgılanması halinde kurutucu etkisinin yararı olabilir, bronkospazm hallerinde ise zararlı olabilir. Bronşiyal astma ve amfizem olgularında kullanılmamalıdır, balgamın atılmasını zorlaştırarak infeksiyon ve atelektazi tehlikesi yaratabilir.

Kodein (baz şeklinde) antitussif olarak ağızdan bir kezde 10 - 20 mg dozunda verilir. Analjezik olarak 30-60 mg dozunda kullanılır, 15 mg'ın altında analjezik etki yapmaz. *Kodein* fosfat suda çözünen şeklini teşkil eder ve antitussif dozu 15-30 mg'dır. *Kodein* fosfatın yaklaşık % 70'i *kodeindir*, şurup, eliksir vb. sıvı farmasötik şekiller *kodein* fosfatla hazırlanır. Bazı ülkelerde *kodein* fosfatın analjezik olarak kullanılan enjeksiyonluk solüsyonu da vardır, cilt altına enjekte edilir².

2.1.3. Analiz Yöntemleri

Proksa, morfin, *kodein*, tebain, psödomorfin ve 2,2'-biskodeinin N-oksiti epimerlerinin kapiler elektroforez ile ayrımını yapmıştır. Ayrım, siklodekstrinler varlığında, silika veya poli(vinil alkol) kaplı kapilerlerde, pH 2,8 tris-fosfat tamponu kullanılarak sağlanmıştır. Tebain N-oksidin diastereomerleri, siklodekstrinler olmadan da ayrılmışlardır. Ancak γ -siklodekstrin kullanımı morfin ve *kodein* N-oksitleri epimerlerinin ayrımında yüksek çözünürlük sağlanmasına sebep olmuştur³.

Pascual ve Sanagustin, insan plasmasında *kodein* analizi için basit, duyarlı ve tamamıyla otomatik bir sıvı kromatografik analitik yöntem önermişlerdir. Numunelere iç standart olarak oksikodon ilave edilmiş ve direkt olarak otoörnekleyiciye yüklenmişlerdir. Katı faz ekstraksiyonu kartuşları (Bond-Elut C₂, 20 mg) kullanılmış, isokratik elüsyon, tekrarlanabilirliği geliştirmiş ve resirkülasyonu sağlamıştır. Hypersil BDS C₁₈, 3 μ m, 10x0,46 cm kolon kullanılmış ve tayinler 212 nm dalga boyunda yapılmıştır. Norkodein (*kodein* metaboliti), *kodein* ve oksikodonun alıkonma zamanları sırasıyla 5,5, 6,4 ve 9,1 dakikadır. *Kodein* için LOD* 0,5 μ g/L ve 2 μ g/L'deki günler arası kesinlik (RSD** olarak) ve doğruluk (bağıl hata olarak) sırasıyla % 5,03 ve % 1,82'dir. Kalibrasyon aralığı 2-140 μ g/L'dir⁴.

*LOD:Gözlenebilme Sınırı, **RSD: Bağıl Standart Sapma (BSS)

Değim ve arkadaşları, antitussif analjezik tabletlerdeki *kodein* ve dioninin eş zamanlı tayini için bir ters faz Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC) yöntemi geliştirmişlerdir. Bir C₁₈ kolon ve mobil faz olarak metanol:su (1:2) karışımı (pH 3,0) kullanılmıştır. Spektrofotometrik tayin, 210 nm'de yapılmıştır. Toplam elüsyon zamanı 7 dakikadan daha kısadır. Önerilen bu yöntem, Türk Askeri İlaç Fabrikasında üretilen tabletlerde *kodein* ve dionin tayininde başarıyla uygulanmıştır⁵.

USP 26 (The United States Pharmacopoeia 2003), *kodein* miktar tayini için çözücü olarak distile suyun kullanıldığı ve 284 nm'de absorbans ölçümüne dayanan bir UV spektroskopik yöntem önermiştir⁶.

Hood ve Cheung, *kodein* fosfat, efedrin HCl ve klorfeniramin maleatin şurup formülasyonlarında eşzamanlı miktar tayinleri için basit, kesin ve doğru bir ters faz yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yöntemi önermişlerdir. Ayrım, 5 µm parçacık boyutundaki C8 kolonda (150 x 4,6 mm i.ç.) yapılmıştır. İki mobil fazın, metanol-glasiyel asetik asit-trietilamin (980:15:6) ve su-glasiyel asetik asit-trietilamin (980:15:6 h/h), farklı yüzdelerdeki karışımlarından oluşan bir gradient elüsyon sistemi geliştirilmiştir. Analitlerin ayrımı, dakikada 1,5 mL akış hızında 7 dakikadan daha az bir zamanda sağlanmıştır. Dedeksiyon 254 nm'de UV absorbans değerleri ölçülerek yapılmıştır. Şurup içindeki bileşenlerin miktar tayinleri, taze hazırlanmış standart çözeltilerinin cevaplarına göre hesaplanmıştır⁷.

BP 2004, *kodein* miktar tayini için yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yöntemi önermiştir. Yöntemde, kolon C₁₈ (4,6 mm x 25 cm, 5 µm)dir, mobil faz 1,08 gr sodyum oktansülfonat, 20 mL glasiyel asetik asit ve 250 mL asetonitril içinde çözülür ve 1000 mL'ye su ile seyreltilir, akış hızı 2 mL/dakika ve enjeksiyon hacmi 10 µL'dir⁸.

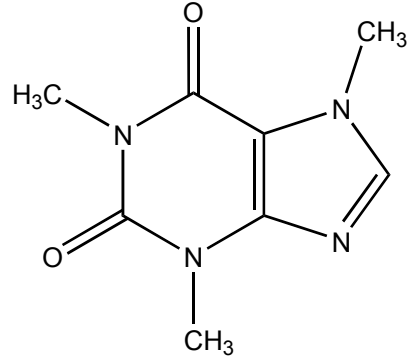
Gomez ve arkadaşları, şurup formülasyonlarındaki *kodein*, difenhidramin, efedrin ve noskapinin kapiler elektroforez ile eş zamanlı tayini için, basit, doğru ve hızlı bir ayırma yöntemi önermişlerdir. Ayırımı etkileyen parametreler, tampon pH'ı ve konsantrasyonu, uygulanan voltaj ve mevcut katkı maddelerinin etkileridir. Ayrımlar, pH 8,5'te 20 mM sodyum tetraborat tamponu kullanılarak 10 dakikadan daha kısa bir sürede tamamlanmıştır. Kullanılan taşıyıcı elektrolit ile iyi bir rezolüsyon, yüksek bir kesinlik ve doğruluk sağlanmıştır. LOD değerleri 0,42–1,33 µg/mL aralığındadır. Dedeksiyon, 205 ve 250 nm'de UV absorban değerlerinin ölçümü ile yapılmıştır. Şurup numunelerindeki analitlerin miktar tayinleri, günlük hazırlanan standart çözeltilerinin cevabına karşı hesaplanmıştır. Yöntem hızlı ve güvenilirdir, ayrıca ticari farmasötik preparatların analizinde ön işlem gerektirmez⁹.

Lin ve arkadaşları, bağımlılardan alınan saç numunelerinde metamfetamin, ketamin, morfin ve *kodeinin* yüksek bir duyarlılık ve seçicilikle tayini için bir kapiler elektroforez yöntemi önermişlerdir. Bu etken maddeleri içeren saç örneği, bir ön işlemde geçirildikten sonra, katyon

seçici enjeksiyon ve misel süpürmeli elektrokinetik kromatografi (CSEI-Sweep-MEKC) yöntemi uygulanmıştır. İlk olarak kaplanmamış kapiler (40 cm, 50 µm iç çap) % 30 metanol içeren fosfat tamponu (50 mM, pH 2,5) ile daha sonra yüksek iletkenlikteki (100 mM fosfat) tampon ile doldurulmuş, duyarlılığı artırmak için elektrokinetik enjeksiyon uygulanmıştır. Stacking (yığma) basamağı ve ayırım, % 20 metanol ve 100 mM sodyum dodesil sülfat içeren fosfat tamponu (25 mM, pH 2,5) ile –20 kV uygulanarak sağlanmış ve tayin 200 nm’de yapılmıştır. CSEI-Sweep-MEKC kullanılarak analitlerin eşzamanlı tayinleri yapılmış ve saçta pg/mg düzeylerinde LOD değerleri elde edilmiştir. Saç numuneleri ile yapılan validasyon çalışmalarında, metamfetamin ve ketamin için sırasıyla 0,15 – 80 ng/mg_{saç}, 0,3 – 30 ng/mg_{saç}, *kodein* için 0,5 – 50 ng/mg_{saç} konsantrasyon aralıklarında doğrusallık ($r \geq 0,999$) sağlanmıştır. Metamfetamin ve ketamin için 50 pg/mg, *kodein* için 100 pg/mg ve morfin için 200 pg/mg LOD değerleri elde edilmiştir. Önerilen yöntem, bağımlılardan alınan gerçek saç numunelerine uygulanmıştır. Bağımlılardan alınan örnekler aynı zamanda LC-MS ile analiz edilmiş ve her iki yöntemde elde edilen sonuçların birbirleriyle uyumlu olduğu görülmüştür. Yöntemin forensik analizler için uygulanabilir olduğu belirtilmiştir¹⁰.

2.2. Kafein

2.2.1. Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri



1,3,7-trimetilksantin

3,7-Dihidro-1,3,7-trimetil-1H-purin-1,6-dion

1,3,7-trimetil-2,6-di-oksopürin

metil teobromin

Kapalı Formülü : C₈H₁₀N₄O₂

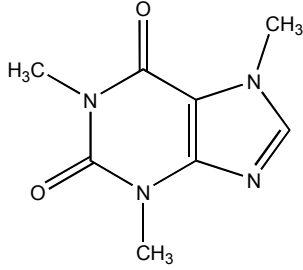
Molekül Ağırlığı : 194,19 g/mol

Erime Noktası : 238°C

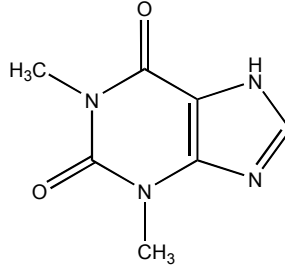
Çözünürlüğü : 1 gr *kafein*, 46 mL suda, 66 mL alkolde, 100 mL benzende,
530 mL eterde, 5,5 mL kloroformda çözünür.

LD₅₀ (erkek farelerde): 127 mg/kg (oral yoldan)¹.

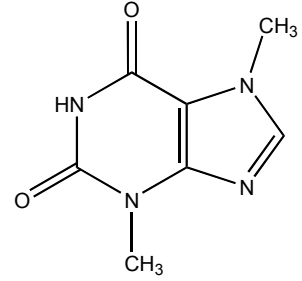
2.2.2. Farmakolojik Özellikleri



Kafein



Teofilin



Teobromin

Kafein ve teofilin metilksantin türevi alkaloidlerdir, sentezle elde edilebilirler. *Kafein*, trimetilksantin ve teofilin, dimetilksantin türevidir. Diğer bir metilksantin alkaloidi olan teobromin'in Santral Sinir Sistemi (SSS) üzerinde belirgin etkisi yoktur. Analeptik olarak *kafein* kullanılır, yenidoğan hariç teofilin bu amaçla kullanılmaz. *Kafein* sadece ilaç olarak değil, kahve ve çay ile de alınır. Bir çay fincanı "instant" kahve 90 mg, perkole edilmiş kahve 120 mg ve çay 50 mg kadar *kafein* içerir. Kolalı içkiler de *kafein* içerirler ve içtikleri miktar kutuları üzerinde genellikle yazılıdır².

2.2.2.1. Santral Sinir Sistemi Üzerindeki Etkileri

Metilksantinlerin SSS'ni stimüle etmelerinin nöronların fosfodiesteraz enzimini bloke etmelerine bağlı olduğu ileri sürülmüştür. Ancak, bu enzimin *kafeinden* daha güçlü inhibitörü olan ve SSS'ne girebilen

bazı maddelerin stimulan etki yapmaması bu sava uygun düşmez. Bugün kabul edildiğine göre metilksantinlerin stimulan etkisi, SSS'deki adenozerjik nöromodülatör sistemin sinir uçlarından saliverilen veya diğer tür sinirlerin uçlarından bir nöromodülatör olarak sızan adenozin'i antagonize etmelerine bağlıdır.

Kafein bazı analjezik ilaç müstahzarlarına katılır. Ancak kendisinin analjezik etkisi yoktur ve analjezik ilaçların deney hayvanlarındaki antinosiseptif etkisini ve insanda analjezik etkisini artırmaz. İnsanda i.v. veya oral yolla 250 mg dozunda verilen *kafeinin* beyin kan akımını azalttığı bulunmuştur; bazı baş ağrısı tiplerinde beyin damarlarının vazodilatasyonunun katkısı olduğundan başağrısına karşı kullanılan analjezik müstahzarlar içindeki *kafeinin* analjeziye bu şekilde katkısı olabilir. Öte yandan *kafein* ve diğer bazı ksantinlerin deney hayvanlarında morfin analjezisini azaltabildikleri ve ayrıca morfine bağımlı kılınmış deneklerde yoksunluk sendromuna çok benzeyen bir durum oluşturduğu bulunmuştur.

Kafein ve teofilin beyin sapındaki solunum merkezini güçlü şekilde uyarırlar. İkisi de yüksek dozda konvülsiyon oluştururlar. Yüksek dozda, diğer stimulan ilaçlar gibi, santral etkileriyle bulantı ve kusma yaparlar. *Kafeinin* terapötik indeksi teofilininkinden daha yüksektir; toksik tesirlerini genellikle 50 mg/L plazma düzeyinin üstünde gösterir.

Bu ilaçlar solunum merkezinin karbondioksite duyarlılığını artırır. Buna bağlı olarak karbondioksite cevap eğrisini sola kaydırırlar. İnsanda solunumu stimüle etmeleri nispeten yüksek dozda olur. Normal deneklerde yaklaşık 3 mg/kg *kafein* solunumu uyarmadığı saptanmıştır; fakat barbitüratların, diğer uyku ilaçlarının, morfin ve opioid ilaçların uygulanması sonucu solunum deprese edilmişse daha ufak dozdaki *kafein* bile uyarıcı etki yapabilir. Alkol sarhoşluğunu gidermez. Morfin (10 mg, i.m.) verilen hastalarda deprese edilmiş solunumu *kafein* yaklaşık 1 mg/kg dozunda bile belirgin şekilde uyarabilir. Teofilin'in etki gücünün *kafein*inkinden biraz daha düşük olduğu sanılmaktadır.

Kafein oral yolla 200-400 mg dozunda alındığında psikostimulan etkinlik gösterir; vijilansı ve dikkati artırır, yorgunluğu azaltır. *Kafeinin* amfetaminlerin aksine, bellek fonksiyonları üzerinde genellikle bir etkisi yoktur; amfetaminlerin aksine psikofarmakolojik hayvan deneylerinde şartlandırılmış cevabın kazanılmasını ve izlenimlerin retansiyonunu kolaylaştırır. *Kafein* uykusuzluk yapma, yorgunluğa karşı direnci artırma ve fiziksel, psikomotor ve entellektüel performansı artırma gibi diğer psikotrop etkileri yönünden amfetamin ve efedrine benzer; fakat *kafeinin* bu etkileri amfetamininkilere, hatta efedrininkilere göre oldukça zayıf kalır. *Kafeinin* yaptığı uykusuzluk, bazı kimselerde belirgin olduğu halde diğerlerinde belirgin değildir. Gece kahve içtiği zaman uykusuzluktan şikayet edenlerde *kafeinin* vücuttaki inaktivasyonunun, böyle bir şikayeti olmayanlardakinden daha yavaş olduğu saptanmıştır. Uykusuzluktan

şikayet edenlerde eliminasyon yarılanma ömrü 7,4 saat, şikayet etmeyenlerde ise 4,2 saat bulunmuştur; bu durumun genetik farklılığa bağlı olması muhtemeldir. *Kafein* genellikle bağımlılık oluşturmaz. Ancak fazla kahve içenlerde (günde 12-15 fincan amerikan kahvesi gibi) ilaç bağımlılığının temel öğeleri ortaya çıkar. Dozu artırmak suretiyle yapılan çift-kör denemelerde *kafeinin* insanda pekiştirici olduğu ve tolerans ve fiziksel bağımlılık oluşturabildiği bulunmuştur. Bu olgularda *kafeinin* kesilmesi disfori, baş ağrısı, irritabilite, zihinsel konsantrasyonun azalması ve anksiyete ile kendini belli eden hafif bir yoksunluk sendromuna neden olur.

Kafein yüksek dozda enjekte edildiğinde insanda anksiyete oluşturur. Bunun beyinde adenosin reseptörlerinin bloke edilmesine bağlı olduğu ileri sürülmüştür. Panik bozukluğu olan hastalar, *kafeinin* anksiyojenik etkisine özellikle duyarlıdır; *kafein* manik-depresif ve şizofrenik belirtileri de artırabilir. Ayrıca 100-200 mg dozunda ağızdan alındığında, benzodiazepinlerin anksiyolitik etkisini ve diğer bazı depresif etkilerini azaltır. Kahve içme benzodiazepinlerin terapötik etkinliğini düşürür; fenotiazin türevi nöroleptiklerin absorpsiyonunu azaltır².

2.2.2.2. Periferik Etkileri

Teofilin ve *kafeinin* kardiyovasküler sistemde belirgin etkileri vardır. Bu etkiler esas olarak semptomimetik ilaçların yaptıklarına benzer.

Ayrıca adrenal medullasından katekolamin salıverilmesini artırır; plazmada renin etkinliğini yükseltirler. Söz konusu ilaçların kardiyovasküler etkileri genellikle 230 mg dozundan itibaren belirgin duruma gelir. Kardiyovasküler etkileri yönünden teofilin, *kafein*den biraz daha güçlüdür. Kalpte orta ve yüksek dozlarda belirgin pozitif inotrop ve pozitif kronotrop etki yaparlar. Kalbin debisini, yaptığı işi ve oksijen tüketimini fazlalaştırırlar. Koroner kan akımını artırır. Aritmi oluşturabilirler. Damarlarda genellikle genişleme yaparlar; periferik damar rezistansını düşürürler. Ancak beyin damarlarını büzerler; serebrospinal sıvı oluşumunu, bu vasküler etkilerine bağlı olarak azaltırlar ve basıncını düşürürler.

Teofilin ve *kafein* midede asit ve pepsin salgısını artırır. Kahvenin asid salgısını artırıcı etkisi, içindeki *kafein*den başka ve aşağı yukarı onun kadar, içindeki bitkisel maddelere de bağlıdır.

Kafein muhtemel katekolaminler aracılığı ile lipolizi artırır ve plazma serbest yağ asidi düzeyini yükseltir. Kronik olarak kaynatılmış kahveyi (fakat filtre edilene değil) fazla içme, plazmada düşük dansiteli lipoprotein (DDL) kolesterol düzeyini artırır; bunun safra asidi salgılanmasının azaltılmasına bağlı olması muhtemeldir².

2.2.2.3. Kullanılışı

Kafein, analeptik olarak parenteral (i.m. veya s.c.) uygulanır. Bir defalık dozu 250-500 mg'dır. Günlük maksimum doz 2 g'dır. *Kafein* suda çözünmediği için enjeksiyonluk solüsyonu *kafein* sodyum benzoat kompleksi ile hazırlanır. Ampullerinde bu kompleks 500 mg miktarında bulunur ve bu, 250 mg *kafeine* eşdeğerdir. Gerçekte ampullerde *kafein* oranı % 35-52 arasında değişir. *Kafein* sitrat tuzu da yaklaşık yarısı kadar *kafeine* eşdeğerdir ve hastane eczanelerinde kolayca enjeksiyonluk solüsyon halinde (20 mg *kafein* eşdeğeri/mL konsantrasyonunda) hazırlanabilir; müstahzar şekilde bulunmaz.

Kafein ve teofilin prematüre yenidoğandaki solunum depresyonuna bağlı periyodik solunum ve apneyi düzeltmek için kullanılır. Bu iki ilacın eliminasyon yarılanma ömrü, yenidoğanda erişkindekinin beş katıdır (yaklaşık 30 saat). Bu nedenle söz konusu durumlarda yükleme suretiyle uygulanmaları gerekir. *Kafeinin* yükleme dozu 10 mg/kg'dır; 24-48 saat sonra günde 2,5 mg/kg'lık idame dozunda uygulanır. Bu endikasyonda *kafein* sitrat şeklinde i.v. enjekte edilir veya nazogastrik boru ile mideye uygulanır; *kafein* sitrat solüsyonu (20 mg *kafein*/mL) fazla asidik olduğu için i.m. uygulanmaz. Aynı amaçla *kafein* sodyum benzoat solüsyonu kullanılmamalıdır; çünkü vücutta bundan ayrılan benzoat plazmadaki bağlı bilirubini serbest hale getirir ve neonatal sarılık oluşmasını teşvik eder.

Teofilinin yükleme dozu 5,6-6,2 mg/kg'dır; idame dozu ise 12 saatte bir 3,6 mg'dır. Teofilin yenidoğan dışında analeptik olarak kullanılmaz².

2.2.2.4. Yan Etkileri

Kafein ve teofilinin yan etkileri birbirine benzer. Teofilin'in en sık görülen yan etkisi bulantı ve kusmadır. Ayrıca baş ağrısı, sinirlilik, uykusuzluk ve baş dönmesi yapabilir. Aşırı dozda veya i.v. enjeksiyonla hızlı verildiğinde aritmi, postüral hipotansiyon, ajitasyon ve konvülsiyon yapar ve ölüme neden olabilir. Konvülsiyonların tedavisi için 0,1-0,3 mg/kg (maksimum 10 mg) i.v. diazepam uygulanır. Teofilinin şiddetli kusmaya ve hematemeze neden olabildiği bildirilmiştir. Teofilin (i.v. veya oral), mide asidi salgısını artırdığından, peptik ülserli hastalarda kontrendikedir².

2.2.3. Analiz Yöntemleri

Horie ve arkadaşları demlenmiş yeşil çaydaki major bileşenlerin tayini için bir kapiler zone elektroforez (CZE) yöntemi önermişlerdir. Ayrım, erimiş silika kapiler kullanılarak pH 8 borat tamponu ile 200 nm'de UV dedeksiyon ile yapılmıştır. Analizi yapılan bileşenler (-)-kateşin, (-)-epigallokateşin, (-)-epikateşin gallat, (-)-epigallokateşin gallat, (+)-kateşin, *kafein*, teanin ve askorbik asittir. Bu bileşenlerin konsantrasyonları farklı çay türlerinde anlamlı derecede farklıdır¹¹.

Walker ve arkadaşları, karbonatlı içeceklerdeki aspartam, benzoik asit ve *kafein*in aynı anda analizleri için bir kapiler elektroforez yöntemi geliştirmişlerdir. Yöntem, pH 9,0'da 20 mM glisin tamponu kullanarak 215 nm'de direkt dedeksiyonla 2 dakika içinde tamamlanmaktadır. Bu bileşiklerin minimum numune hazırlama ile hızlı olarak tayin edilmeleri, ticari ürünlerin stabilitelerinin değerlendirilmesi ve raf ömürleri açısından mükemmel bir yöntemdir¹².

Lee ve Ong, yeşil ve siyah çaylardaki kateşinler ve flavinlerin aynı anda tayininde, ters faz yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ve kapiller elektroforez yöntemi geliştirmişlerdir. (+)-kateşin, kateşin gallat, (-)-epikateşin, epikateşin-3-gallat, epigallokateşin, epigallokateşin-3-gallat, teaflavin, teaflavin-3-monogallat, teaflavin-3'-monogallat and teaflavin-3,3'-gallat'dan oluşan çay polifenollerinin tayinleri yapılmıştır. Bu polifenollerle birlikte *kafein*, adenin, teofilin, kuersetin, gallik asit ve kafeik asit gibi çayda bulunan diğer 6 bileşenin yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile 27 dakika içinde, kapiler elektroforez ile ise 10 dakikadan daha az bir zamanda ayrımı yapılmıştır. Kapiller elektroforez analiz zamanı, yüksek basınçlı sıvı kromatografisinden üç kez daha hızlıdır, fakat duyarlılığı beş kez daha kötüdür¹³.

Wang ve arkadaşları, *kafein*, teofilin ve teobromin alkaloidlerinin ayrımı ve tayini için amperometrik dedeksiyon sistemi içeren bir Miseller Elektrokinetik Kapiller Kromatografi (MECC) yöntemi

kullanmışlardır. Alkaloidlerin +1175 mV'ta iyi bir cevap gösterebilmeleri için çalışma elektrodu olarak bir karbon disk elektrot kullanılmıştır. 70 cm uzunluğunda 25 µm iç çapta kapiler ve 35 mmol/L sodyum dodesil sülfat (SDS) içeren 20 mmol/L pH 8,5 fosfat tamponu kullanılarak baseline ayrımı sağlanmıştır. Optimum şartlar altında üç alkaloidin ayrımı 13 dakika içinde tamamlanmıştır. Her üç analit için korelasyon katsayısı 0,9979-0,9993 aralığında ve geri kazanım değerleri % 95,34-104,91 aralığındadır. Yöntem, *kafein* ve teofilin içeren tabletlere başarıyla uygulanmıştır¹⁴.

Ferreyra ve Ortiz, fenilpropanolamin hidroklorür(I), *kafein*(II) ve diazepam(III) içeren tablet formundaki farmasötik preparatlarda bu analitlerin miktar tayinleri için hızlı, güvenilir ve spesifik bir UV spektrofotometrik yöntem önermişlerdir. Yöntem valide edilmiş ve bu analitlerin aynı anda miktar tayinleri için kullanılan bir sıvı kromatografik yöntem ile kıyaslanmıştır. Her iki yöntemde de doğrusallık fenilpropanolamin hidroklorür için 0,36 – 0,88, *kafein* için 0,012 – 0,028 ve diazepam için 0,036 – 0,084 mg/mL konsantrasyon aralıklarında sağlanmıştır. Korelasyon katsayıları HPLC için $r_1^2= 0,997$, $r_{II}^2= 0,999$, $r_{III}^2= 0,999$ ve UV spektrofotometrik yöntem için $r_1^2= 0,998$, $r_{II}^2= 0,996$, $r_{III}^2= 0,999$ olarak elde edilmiştir. Kesinliğin göstergesi olarak varyasyon katsayısı değerleri, HPLC yönteminde 0,2 – 0,9 ve UV yönteminde ise 0,15 – 0,72 elde edilmiştir. Tüm analitler için doğrusal aralıkta % 98,04'ün üzerinde bir geri kazanım elde edilmiştir. Önerilen her iki yöntem, söz

konusu analitleri içeren ve farklı kaynaklardan elde edilen tabletlerdeki miktar tayini için başarıyla uygulanmıştır¹⁵.

USP 26, *kafein* miktar tayini için yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yöntemi önermiştir. Yöntemde, kolon C₁₈ (4.6 mm x 15 cm, 5 µm), mobil faz 0,01 M sodyum asetat: asetonitril: tetrahidrofur (1910:50:40, pH 4,5), akış hızı 1 mL/dak, dedektör 275 nm ve enjeksiyon hacmi 10 µl'dir⁶.

Zhang ve arkadaşları, poli(dimetilsiloksan) (PDMS) mikrokanal elektroforeze entegre edilmiş elektrokimyasal dedektör ile *kafein* ve teofilinin hızlı ve duyarlı tayini için bir yöntem sunmuşlardır. Metanol kullanılarak pik şekli ve çözünürlüğü düzeltilmiştir. Analitler, % 10 metanol içeren 5,0 mM borat (pH 9,2) çalışma tamponunda yalnızca 40 s içinde ayrılmışlardır. *Kafein* ve teofilin için sırasıyla doğrusal aralık 6 µM ile 0,6 mM arasındadır ve *kafein* ve teofilin için dedeksiyon limiti 0,4 µM'dır. Önerilen yöntem farelerin serum ve idrarlarında *kafein* ve teofilin tayini için başarıyla uygulanmıştır¹⁶.

Regan ve Shakalisava, *kafein*, difilin, teofilin teobromin ve enprofilin içeren karışımın analizini yapmışlardır. Yaptıkları çalışma bu grup ksantinlerin kapiler zone elektroforez ile ayrımının basit olduğunu göstermiştir. pH 9,4'te 20 mM borat tamponu kullanılarak numunedeki toplam ayırım 2 dakika içinde tamamlanmıştır. LOD değerleri % 0,06-0,22

(n=5) RSD ile 1,9-2,5 mg/mL aralığındadır. Teknik, analitleri içeren farmasötik tabletlere ve çukulatalara uygulanmıştır. Çukulataların kapiler zone elektroforez ile analizlerinde tekraredilebilirlik (% RSD) % 4,5'ten düşüktür¹⁷.

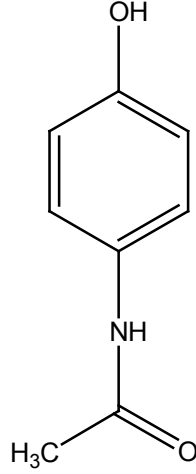
Singh ve Sahu *kafein* ve teofilinin saf halde veya farmasötik formülasyonlarda spektrofotometrik tayini için yeni bir reaktif kullanmışlardır. Yöntem *kafein* ve teofilinin asetik asit varlığında sodyum metaperiyodat ile oksidasyonuna ve devamında 3-metil 2-benzo tiazolinon ile $\lambda_{\max}=630$ nm'de absorpsiyonu olan mavi renkli bir ürün oluşturmak üzere reaksiyona sokulması temeline dayanmaktadır. Yöntem tekrarlanabilir ve *kafein* ve teofilinin tabletlerde miktar tayini amacıyla uygulanmıştır. Sonuçlar BP'de önerilen yöntemlerin sonuçlarıyla uyumludur. Farmasötik preparatlarda kullanılan genel katkı maddeleri önerilen yöntemde girişim yapmamaktadır¹⁸.

Tzanavaras ve Themelis, gıda numunelerinde *kafein* tayini için bir yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yöntemi önermişler ve yöntemi valide etmişlerdir. Kısa bir monolitik kolon kullanılarak (50 mm x 4,6 mm iç çap) *kafeinin* ayrımı hızlı bir şekilde sağlanmıştır. Mobil faz olarak asetonitril: su (10 : 90 h/h) karışımı kullanılmış ve akış hızı 3,0 mL/dak olarak uygulanmıştır. *Kafein* 274 nm'de dedekt edilmiştir. 0 – 200 mg/mL konsantrasyon aralığında doğrusallık elde edilmiş ve LOD =0,10 mg/L (S/N=3) ve LOQ* = 0,33 mg/L (S/N=10) bulunmuştur Önerilen yöntem içeceklere ve kahve örneklerine uygulanmıştır¹⁹.

*LOQ:Tayin Alt Sınırı

2.3. Parasetamol (Asetaminofen)

2.3.1. Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri



Asetaminofen

N-(4-Hidroksifenil)asetamid

N,N-dietil-2-[2-metoksi-4-(2-propenil)fenoksi] asetamit

2-(4-allil-2-metoksi fenoksi)-N,N-dietil asetamit

Kapalı Formülü : C₈H₉NO₂

Molekül Ağırlığı : 151,17 g/mol

Erime Noktası : 169-170,5 °C

Çözünürlüğü : Soğuk suda çok az çözünür. Metanol, etanol, aseton, etil asetat'ta çözünür. Petrol eteri, pentan ve benzende pratik olarak çözünmez.

LD₅₀ (farelerde) : 338 mg/kg (oral yoldan)¹.

2.3.2. Farmakolojik Özellikleri

Parasetamol, aspirininkine yaklaşık olarak eşit derecede analjezik etki yapar. Antipiretik etkisi de onunkine yakın güçtedir, fakat aspirinden farklı olarak, antienflamatuvar etkinliği oldukça düşüktür ve bu tür etkinlik gerektiren endikasyonlarda kullanılmaz. Ancak antienflamatuvar ilaçların analjezik etkisini artırmak için onlarla birlikte kullanılabilir. Antitrombotik etkinliği zayıftır, kanama süresini değiştirmez. *Parasetamol*, benzeri diğer analjezik ilaçlardan farklı olarak hipotalamus ve omurilik gibi peroksidlerden fakir ortamda prostaglandin sentezini inhibe edebilir; antipiretik ve analjezik etkilerinin, sırasıyla, hipotalamus ve omurilik arka boynuzunda prostaglandin sentez ve salıverilmesini inhibe etmesi ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür. Periferdeki iltihabi dokular gibi peroksid açısından zengin ortamda, siklooksijenazı inhibe edememesi antienflamatuvar etkisinin olmamasını açıklayabilir.

Ağız yolundan alındığında parasetamol, çabuk absorbe edilir ve etkisi erken başlar; plazma düzeyi 1/2-1 saat içinde maksimuma erişir. Absorpsiyonu besinler tarafından azaltılır. İlk dozdan sonra analjezik etkisi

3-4 saat kadar devam eder. Parasetamol'ün büyük kısmı karaciğerde glukuronik asitle ve sülfatla konjüge edilir ve böbreklerden bu şekilde itrah edilir. Mutad dozda eliminasyon yarılanma ömrü 2,4 saattir, non-lineer eliminasyon kinetiği göstermesi nedeniyle aşırı dozda 7,3 saate kadar çıkabilir.

*Parasetamol*ün solunum, kardiyovasküler sistem ve asid-baz dengesi üzerinde belirgin bir etkisi yoktur. Midede irritasyon yapmaz. Protrombin sentezini pek etkilemez. Plazma proteinlerine fazla bağlanmaz. Aspirinin aksine oral antikoagülanlarla belirgin bir etkileşme göstermez. Aspirinden farklı olarak ürik asid itrahını etkilemez ve ürikozürik ilaçların etkinliğini azaltmaz.

Parasetamolü sıvı farmasötik şekiller içinde vermek mümkündür. Bundan dolayı, *parasetamol* özellikle bebek ve çocuklar için hazırlanan eliksir, süspansiyon vb. şekillerdeki sıvı analjezik müstahzarların yapımında kullanılır.

Parasetamol oral yoldan 500-1000 mg dozunda verilir. Gerekirse bu doz 4-6 saatte bir tekrarlanır. Günlük maksimal dozu genellikle 4 g olarak kabul edilir, bazı kaynaklarda 3 g hatta 2,6 g olarak belirtilmiştir. Böbrek yetmezliği olanlarda ve alkoliklerde doz azaltılmalıdır. Yukarıda belirtilen dozda 5-10 günden fazla kullanılması tavsiye edilmez. Çocuklarda, hepatoksisite potansiyeli daha düşük olduğu için kg başına verilen doz daha yüksektir; bir defada 10 mg/kg dozunda verilir.

6-12 yaşlar arasında bir defalık dozun 20-30 mg/kg'a çıkartılabileceği bildirilmiştir. *Parasetamol* yemek sırasında veya yemekten sonra alınırsa, biyoyararlanımı belirgin şekilde azalır; onun için aç karnına alınması tercih edilir. *Parasetamol* oral dozuna eşit dozlarda rektal yoldan da verilebilir.

Parasetamol kronik kullanılış halinde fenasetine oranla daha az toksik gibi gözükmekte ise de akut toksisitesi fenasetininkinden daha ciddidir. Bu ilaç aşırı dozda alındığında, öldürücü akut karaciğer nekrozu yaptığı bilinen az sayıdaki ilaçlardan biridir. İlaça bağlı fatal akut karaciğer nekrozu olgularının en başta gelen nedenidir. Hepatotoksik etkenin, parasetamolün karaciğerde oluşan N-oksidasyon ürünü olan N-hidroksil türevi ve ilacın fenolik hidroksilinin oksitlenmesi ile oluşan N-asetil-p-benzokinonimin olduğu sanılmaktadır. Akut intoksikasyon sırasında ilk 24 saat zarfında bulantı, kusma ve karın ağrısı gibi belirtiler oluşur. Sarılık ve diğer karaciğer yetmezliği belirtileri 2-3 gün sonra ortaya çıkmaya başlarlar. Bunlarla birlikte hepatik ensefalopati ve akut böbrek yetmezliği oluşabilir. Bir defada 10 g veya daha yüksek miktarlarda vücuda girdiğinde belirgin akut karaciğer nekrozu sıklıkla oluşur. Bir defada 20 g'ın üstünde alınmışsa ölümlü sonuçlanma olasılığı artar. Günde 5-8 g dozunda birkaç hafta alınması ile de karaciğer nekrozu ve ona bağlı ölüm yapabilir. 0-6 yaş grubundaki çocuklar *parasetamol*ün hepatotoksik etkisine dayanıklıdırlar. Tedavisi için destekleyici önlemler yanında karaciğer hücrelerinde glutatyon ve sistein düzeyini yükselten sülfidril grubu donörü (glutatyon prekürörü) ilaçlar (N-asetil sistein, L-metiyonin ve sisteamin gibi) uygulanır.

N-asetilsistein, *parasetamol* zehirlenmesinin tedavisinde en tercih edilen ilaçtır. İlk 8-10 saat içinde i.v. infüzyonla uygulanırsa yeterli derecede etkilidir. İlacın alınışından itibaren 16 saat geçmişse yararlı olma ihtimali çok azdır. Buna rağmen 24 saate kadar verilmesini tavsiye edenler vardır. N-asetil sistein antidot olarak oral yoldan da verilir. İntravenöz olarak 20 saat boyunca toplam 300 mg/kg dozunda uygulanır. Oral yoldan başlangıçta 140 mg/kg yükleme dozunda verildikten sonra 4 saatte bir 17 kez 70 mg/kg uygulanır ve böylece tedavi 72 saatte tamamlanır. Oral uygulamanın i.v. uygulama kadar etkili olduğu bulunmuştur ve tedaviye geç (10 saatten sonra) başlanan olgularda i.v. uygulamadan daha üstün olabilir.

Parasetamol, fenasetin'in metaboliti olmasına rağmen methemoglobinemi ve hemolitik anemi nadiren oluşturur. Uzun süre kullanıldığında analjezik nefropati riskini artırır, yılda 366 tablet (0,5 g'lık) veya daha fazla kullananlarda riskin 2,1 kez arttığı kestirilmiş ve bir incelemede son dönem böbrek hastalığı olgularının % 8-10'unun kronik *parasetamol* kullanımı ile ilgili olduğu bildirilmiştir. *Parasetamol* seyrek olarak ciltte ürtiker ve diğer alerjik döküntülere neden olabilir, nadiren larenks ödemi ve bronkospazm yapabilir².

2.3.3. Analiz Yöntemleri

Ramos ve arkadaşları, *parasetamolün*, on-line reaksiyon yoluyla tayini için yeni bir Akış Enjeksiyonlu/ Fourier Transform Infrared

Spektroskopisi (FI/FTIR) yöntemi önermişlerdir. Önerilen yöntem, analitin p-aminofenol oluşturmak üzere alkali hidrolizine ve p-aminofenolün de p-benzokinon-monoimin oluşturmak üzere potasyum ferrisiyanür ile oksidasyon reaksiyonuna ve sonunda p-benzokinon formuna oksidasyonu temeline dayanır. Reaksiyonun kimyası, spektrumun hem görünür hem de IR bölgesinde çalışılmış ve yöntem akış enjeksiyon uygulanmasıyla geliştirilmiştir. Reaksiyon oda sıcaklığında sulu ortamda gerçekleşmiştir. Sulu çözeltilere uygun CIRCLE® IR aksesuarının mikro-akış versiyonu kullanılmıştır. Ölçümler fenolik OH deformasyon ($1274,1 \text{ cm}^{-1}$) ve hidroliz ürünü p-aminofenolün aromatik halka ($1498,2 \text{ cm}^{-1}$) titreşimleri kullanılarak yapılmıştır. Yöntem ticari tabletlerdeki *parasetamol* tayininde kullanılmıştır²⁰.

Nagajara ve arkadaşları, alkali ortamda *parasetamol* ve fenasetin'in, sodyum 1,2-naftakinon-4-sulfonat ve setiltrimetilamonyum bromür ile hidroliz ürünlerinin tayininde hızlı, duyarlı ve basit bir spektrofotometrik yöntem önermektedir. *Parasetamol* ve fenasetin için sırasıyla 570 ve 500 nm'lerde absorpsiyon ölçümü yapılmış ve molar absorbtiviteyi $1,118 \times 10^4$ ve $4,54 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Renkli türler *parasetamol* için 1-20 $\mu\text{g/mL}$ ve fenasetin için 2-24 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyon aralığında Beer yasasına uymuşlardır. Setiltrimetilamonyum bromür ilavesi ile duyarlılık artırılmıştır. Yöntem *parasetamol* ve fenasetinin çeşitli farmasötik preparatlarda ve laboratuvar yapımı tabletlerde tayini için

kullanılmış ve istatistik olarak elde edilen sonuçlar resmi yöntem sonuçlarıyla karşılaştırılmıştır²¹.

Medina ve arkadaşları salisilamid ve *parasetamolün* katı faz UV spektrofotometre ile tayini için sürekli ve çok parametrelili bir sensör tanımlamışlardır. Bu bileşenleri içeren numune, anyonik değiştirici dolgulu bir flow-through hücreye enjekte edilerek on-line konsantre edilmiş ve 300 nm'de sürekli absorban ölçümü yapılmıştır. 300 nm'deki kalibrasyon grafikleri *parasetamol* için 2,5-40 µg/mL aralığında, salisilamid için ise 5-80 µg/mL aralığında birbirlerinin varlığında doğrusaldır; RSD değerleri *parasetamol* için % 0,60 ve salisilamid için % 0,36 ve örnekleme hızı 36/saat'dir. Salisilamid ve *parasetamolün* 1:5 ve 5:1 oranlarındaki karışımları oldukça iyi derecede ayrılmışlardır. Önerilen bu yöntem, bir ayırma basamağı gerektirmemektedir ve bu bileşenlerin farmasötik preparatlardan tayininde kullanılmıştır²².

Shervington ve Sakhini, *parasetamol* ve p-süstitüe türevlerinin tablet dozaj formlarında miktar tayini için isokratik ters faz sistemi kullanan bir yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yöntemi geliştirmişlerdir. Kolon, 10 µm oktadesilsilan sabit fazından oluşmaktadır. Mobil faz, asetonitril ve su (7:3) karışımıdır. *Parasetamol*, O-asetilasetaminofen, O-etilasetaminofen, O-(2-nitrobenzenosülfonil)asetaminofen, O-benzilasetaminofen ve O-(3,5-dinitrobenzoil)asetaminofen

için alıkonma zamanları sırasıyla 2,83; 3,25; 3,56; 3,78; 4,37 ve 6,03 dakikadır²³.

Canada ve arkadaşları *parasetamol* tayini için, basit bir flow-through UV optik duyarlı bir sistem geliştirmişlerdir. Sistem *parasetamolün* uygun bir aktif katı destek doldurulmuş (anyon değiştirici reçine) akış hücreindeki alıkonma ve konsantrasyonuna ve katı faz üzerindeki 264 nm'deki doğal absorbansının sürekli izlenmesine dayanmaktadır. Numune, basit bir tek kanallı FIA (akış enjeksiyon) manifoldu kullanılarak pH 11'de 0,08 M NaCl akışına enjekte edilmiştir. Analitik sinyal oluştuğunda *parasetamol* katı destek üzerinden taşıyıcı çözelti yardımıyla kendiliğinden desorbe olmuştur. 0,5-8,0 µg/mL konsantrasyon aralığında, %1,24 RSD ve 0,022 µg/mL dedeksiyon limiti ve 40/saat örnekleme hızı ile doğrusal bir cevap alınmıştır. Mevcut akış enjeksiyon sistemleri ile karşılaştırıldığında duyarlılıkta ve seçicilikte dikkate değer bir iyileşme elde edilmiştir. Önerilen yöntemin farmasötik tabletler içindeki *parasetamol* tayinine de başarıyla uygulandığı belirtilmiştir²⁴.

Monser ve Darghouth, *parasetamol* ve bozunma ürünleri 4-aminofenol ve 4-klorasetanilitin eşzamanlı tayinine olanak sağlayan, basit, hızlı ve kullanışlı bir yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yöntemi geliştirmişlerdir. Kromatografik ayırım, poroz grafit karbon kolonda (PGC), asetonitril/0,05 M potasyum fosfat tamponu (pH 5,5) 80/20 (h/h) isokratik karışımı kullanılarak 244 nm'de UV dedeksiyonu ile yapılmıştır. 1-50 µg/mL

parasetamol ve 5-40 µg/mL 4-aminofenol ve 4-klorasetanilit konsantrasyon aralıklarında hazırlanan kalibrasyon doğrularının korelasyon katsayıları 0,99'dan büyüktür. LOD değerleri, *parasetamol* için 0,1 µg/mL, 4-aminofenol ve 4-klorasetanilit için ise 0,5 µg/mL'dir. Önerilen sıvı kromatografik yöntem, ticari olarak kullanılan *parasetamol* dozaj formlarının analizlerinde % 98-103 geri kazanımla başarıyla uygulanmıştır²⁵.

USP 26, *parasetamol* miktar tayini için bir yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yöntemi önermiştir. Yöntemde, kolon C₁₈ (3,9 mm x 30 cm), mobil faz distile su:metanol (3:1), akış hızı 1,5 mL/dak, dedektör 243 nm ve enjeksiyon hacmi 10 µL'dir⁶.

BP 2004, *parasetamol* miktar tayini için bir yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yöntemi önermiştir. Yöntemde, kolon C₁₈ (4,6 mm x 25 cm, 5µm), mobil faz 17,9 g/L disodyum hidrojen fosfat, 7,8 g/L sodyum dihidrojen fosfat, 4,6 g/L tetrabütülamonyum hidroksit içeren metanol (375:375:250), akış hızı 1,5 mL/dak, dedektör 245 nm ve enjeksiyon hacmi 20 µL'dir⁸.

Oliva ve arkadaşları, *parasetamolün* tabletlerdeki tayini için seçici bir spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir. Bu teknik, geçerli resmi yöntemlerden duyarlılık, basitlik, hız ve daha düşük maliyet açısından üstündür. Kullanılan yöntem sülfürik asit katalizörlüğünde, *parasetamol* ile etil asetoasetat arasındaki reaksiyon ile kumarinik bileşen oluşumuna

dayanır. 446 nm'de uyarılan reaksiyon ürünü 478 nm'de yüksek floresans özellik gösterir. Çalışmada doğrusal konsantrasyon aralığı 0,1-0,4 µg/mL ve dedeksiyon limiti 57 ng/mL'dir. Farklı değişkenlerin etkisi incelenmiş, kemometrik teknikler aracılığıyla optimize edilmiştir²⁶.

Katı formdaki *parasetamol*'ün doğal floresansı, farmasötik preparatlardaki *parasetamol*'ün direkt analizleri için hızlı, güçlü ve basit yöntemlerin geliştirilmesine imkan vermektedir. Moeira ve arkadaşlarının önerdikleri yöntem her türlü spektrofotometreye kolayca uygulanabilmekte ve kimyasal bir ön işlem gerektirmemektedir. Floresans ölçümleri (λ_{ex} = 333 nm; λ_{em} =382 nm), laktoz, nişasta, poli(vinilpirolidon), pudra ve stearik asit ile seyreltilmiş toz örneklerden direkt olarak alınabilmektedir. Farmasötik preparatlardaki *parasetamol* haricindeki diğer bileşenlerin etkileri tartışılmıştır. Floresans şiddeti, 100 – 400 mg/g *parasetamol* konsantrasyon aralığında doğrusaldır. Ölçüm hızı, 200/saat'tir. Farklı konsantrasyonlardaki örneklerin analizlerinden LOD 13,0 – 16,7 ve LOQ 43,1 – 55,7 mg/g aralıklarında bulunmuştur. Önerilen yöntem farmasötik preparatlara uygulanmış ve RSD (n=20) % 2,7'den küçük bulunmuştur. Bu yöntemle elde edilen sonuçlar BP'de önerilen yöntemle elde edilen sonuçlarla karşılaştırılmış ve % 95 güven aralığında istatistiksel olarak bir farklılık görülmemiştir²⁷.

Zhao ve arkadaşları, *parasetamol*'ün indirekt tayini için, luminol-potasyum hekzasiyanoferrat(III) ($K_3[Fe(CN)_6]$) kemilüminesans

reaksiyonuna *parasetamol*ün inhibe edici etkisine dayalı bir kapiler elektroforez-kemilüminesans tayin yöntemi önermişlerdir. *Parasetamol* ayırma kapilerinde, luminol içeren çalışma tamponu ile birlikte göç etmektedir. Ayırma kapilerinin çıkışı, dedeksiyon penceresine ulaşmak üzere reaksiyon kapilerine girmiştir. $K_3[Fe(CN)_6]$ tayin penceresine sifon etkisi ile verilir. Kemilüminesans ayırma kapilerinin çıkışından gözlenir. *Parasetamol*, kemilüminesans reaksiyonunu inhibe ettiği sürece dedekt edilmekte ve kemilüminesans sinyalinin bastırılması, *parasetamol* konsantrasyonu ile orantılı olmaktadır. Maksimum kemilüminesans sinyali, 0,5 mM luminol içeren 30 mM sodyum borat tamponu (pH 9,4) ve okside edici çözelti olarak 0,8 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ içeren 100 mM sodyum hidroksit çözeltisi kullanılarak elde edilmiştir. Optimim koşullar altında, doğrusal aralık $6,6 \times 10^{-10}$ - $6,6 \times 10^{-8}$ M ($r=0,9999$) ve tayin limiti $5,6 \times 10^{-10}$ M ($S/N=3$) *parasetamol* olarak elde edilmiştir. $5,0 \times 10^{-9}$ M *parasetamol* çözeltilerinin pik alanlarının RSD değerleri ($n=11$) % 2,9 olarak bulunmuştur. Yöntem farmasötik preparatlar ve biyolojik numunelerde *parasetamol* tayinine başarıyla uygulanmıştır²⁸.

Azhagvuel ve Sekar, tabletlerde, setirizin dihidroklorür, *parasetamol* ve fenilpropanolamin hidroklorürün ayırımı ve miktar tayini için basit, seçici ve ekonomik bir kapiler zone elektroforez yöntemi önermişlerdir. Analitlerin ayırımı için 10 mM sodyum tetraborat (pH 9,0) çözeltisi elektrolit çözelti olarak uygun bulunmuştur. Ayırım için 76 cm uzunluğunda (etkin uzunluk 64,5 cm) erimiş silika kapiler kullanılmıştır.

Analitler, 20 kV (akım 21 μ A) voltaj uygulanmasıyla 10 dakika içinde tamamen ayrılmışlar ve dedeksiyon 195 nm'de UV dedektör ile yapılmıştır. Analitlerin miktar tayinlerinde iç standart olarak ibuprofen kullanılmıştır. Yöntem valide edilmiştir. Setirizin dihidroklorür, *parasetamol* ve fenilpropanolamin hidroklorür için doğrusallık sırasıyla 2 – 50 μ g/mL ($r^2= 0,9982$), 10 – 1000 μ g/mL ($r^2= 0,9978$) ve 10 – 100 μ g/mL ($r^2= 0,9986$) konsantrasyon aralıklarında sağlanmıştır. Önerilen yöntem, analitleri içeren tablet halindeki preparatlara uygulanmıştır ve geri kazanım değerleri % 98,60'tan büyüktür. Setirizin dihidroklorür, *parasetamol* ve fenilpropanolamin hidroklorür için LOQ değerleri sırasıyla 2,0, 2,0 ve 4,0 μ g/mL olarak bulunmuştur. Farmasötik tabletlerde katkı maddelerinden gelebilecek bir girişime rastlanmamıştır. Önerilen yöntem, bu analitleri içeren tablet dozaj formundaki preparatlar için basit ve uygulanabilir²⁹.

Felix ve arkadaşları, *parasetamol*'ün farmasötik formülasyonlarda miktar tayini için karbon film resistör elektrot kullanarak amperometrik dedeksiyonlu bir akışa enjeksiyon analiz yöntemi geliştirmişlerdir. Bu sensör, yüzeyinde kimyasal bir modifikasyona gerek kalmadan, *parasetamol* için keskin ve tekrarlanabilir akım pikleri oluşumu sağlamıştır. Çalışmada fosfat tamponu kullanılarak geniş bir doğrusal çalışma aralığında ($8,0 \times 10^{-7}$ - $5,0 \times 10^{-4}$ mol/L) oldukça yüksek duyarlılık ($0,143 \text{ A mol}^{-1} \text{ L cm}^{-2}$) ve düşük bir dedeksiyon limiti değerine ($1,36 \times 10^{-7}$ mol/L) ulaşılmıştır. Tekrarlanabilirlik ($5,0 \times 10^{-6}$ ve $5,0 \times 10^{-5}$ mol/L)

parasetamol çözeltilerinin 10 enjeksiyonundan elde edilen RSD) enjeksiyon için sırasıyla % 3,1 ve % 1,3 olarak elde edilmiştir. Önerilen yeni yöntem ticari farmasötik ürünlere uygulanmış ve spektrofotometrik yöntemlerle elde edilen sonuçlarla uyumlu olduğu görülmüştür³⁰.

2.4. Parasetamol, Kafein ve Kodein İçeren İkili ve Üçlü Karışımlarda Uygulanan Analiz Yöntemleri

Hanaee, *parasetamol* ve *kodein*in eşzamanlı tayini için birinci türev UV spektrofotometresi yöntemi kullanmıştır. *Parasetamol*, 263,4 nm'deki birinci türev absorbanı değeri ölçülerek tayin edilmiştir. *Kodein* için ise 251,2 nm'deki birinci türev absorbanı değeri kullanılmıştır. Önerilen yöntemle *kodein* ve *parasetamol*ün konsantrasyonları birbirlerine girişim etkileri olmadan hesaplanabilmiştir. İşlem basit ve hızlıdır, doğru ve kesin sonuçlar sunmaktadır³¹.

Zen ve Ting, kimyasal olarak modifiye edilmiş Nafion®/rutenyum oksit piroklor elektrot kullanarak kare-dalga voltametri ile farmasötik formülasyonlardaki *parasetamol* ve *kafein*in aynı anda tayinini gerçekleştirmişlerdir. Camı karbon elektrotla kıyaslandığında, kimyasal olarak modifiye edilmiş elektrot ile oksidasyon potansiyellerinde katodik yönde belirgin bir kayma gözlenmiştir ve hem *kafein* hem de *parasetamol*ün akım cevaplarında belirgin bir artış olmuştur. 0,05 M perklorik asit içinde elde edilen kalibrasyon eğrileri, *kafein* ve *parasetamol* için sırasıyla

10-250 ve 5-250 μM arasında doğrusaldır. *Kafein* ve *parasetamol* için LOD (3σ) değerleri sırasıyla 2,2 ve 1,2 μM 'dir. Yöntemin *kafein* ve *parasetamol*ün mevcut farmasötik formlardaki seçici ölçümleri için hiçbir ön işleme gerek duymayan pratik analitik bir yöntem olduğu gösterilmiştir³².

Medina ve arkadaşları *kafein*, asetilsalisilik asit ve *parasetamol*ün farmasötik preparatlarda aynı anda tayini için katı destek üzerindeki analitlerin alıkonma ve UV dedeksiyonunun integrasyonuna dayalı ve akış için multisensör PLS (kısmi en küçük kareler) tekniği kullanılan basit ve hızlı bir analitik prosedür önermişlerdir. Akış hücresi içindeki C_{18} tanecikleri üzerinde alıkonulan analitlerin spektrumlarını (240-350 nm) almak için diyot serili UV spektrofotometre dedektör olarak kullanılmıştır. pH 1'de %0,5'lik HClO_4 çözeltisinin taşıyıcı olarak kullanılmasıyla, multisensör, ilave bir reaktif veya türevleme işlemine gerek duyulmadan ölçüm aralığında doğrusal cevaplar vermiştir. İstatistiksel parametreler PLS yönteminin analizlerdeki farklı reaksiyon zamanlarına uygulanmasıyla elde edilmiş ve analitlerin eş zamanlı tayini için optimum reaksiyon süresi seçilmiştir. Gerçek ve sentetik numunelerin analizlerinde doğru ve kesin değerler elde edilmiştir³³.

Diñç, tablet halindeki formülasyonlarda *kafein* ve *parasetamol*ün eş zamanlı analizleri için iki spektrofotometrik yöntem ve bir yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yöntemi önermiştir. Oransal türev spektrofotometrisi yöntemi *kafein* için 267,9 ve 291,0 nm ve *parasetamol*

için birinci türev spektrumlarında 237,0 ve 251,8 nm'de ölçülen analitik sinyallerin oranlarına dayanmaktadır. Kalibrasyon grafiği *kafein* için 4-40 µg/mL ve *parasetamol* için 8-48 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanmıştır. Vierordot yönteminde ise *parasetamol* ve *kafeinin* A_1^1 (%1, 1 cm) değerleri sıfırıncı derece spektrumlarında 242,9 ve 273,0 nm'lerde tayin edilmiştir. A_1^1 (%1, 1 cm) değerleri için bir matriks yazılmış ve her iki etken maddenin miktarları, Matlab yazılımı yardımıyla hesaplanmıştır. Bu spektrofotometrik yöntemlerle elde edilen sonuçlar, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yöntemi sonuçlarıyla karşılaştırılmıştır³⁴.

Abu-Qare ve Donia, fare plazma ve idrarında, piridostgimin, *parasetamol* ve *kafeinin* ayrımı ve miktar tayini için bir yöntem geliştirmişlerdir. Bileşenler C₁₈ Sep-Pak® kartuşu kullanılarak ekstre edilmiş ve daha sonra ters faz C₁₈ kolonu kullanılarak ve 280 nm'de UV dedeksiyonu ile yüksek basınçlı sıvı kromatografik analizleri yapılmıştır. Bileşenler, % 85 asetonitril-su (pH 3,0) mobil fazı kullanılarak, gradient elüsyonla 1-1,5 mL/dakika akış hızında, 14 dakika içinde ayrılmışlardır. Alıkonma zamanları 8,8-11,5 aralığındadır. Dedeksiyon limiti değerleri 100-200 ng/mL ve tayin limiti değerleri 150-200 ng/mL aralığındadır. Piridostgimin bromür, *parasetamol*, asetilsalisilik asit ve *kafein* ilave edilmiş 5 plazma numunesinin ortalama yüzde geri kazanım değerleri 70,9±9,5, 73,7±9,8, 88,6±9,3, 83,9±7,8 ve idrar için 69,1±8,5, 74,5±8,7, 85,9±9,8, 83,2±9,3 olarak elde edilmiştir. Pik alanı ile konsantrasyon arasındaki ilişki 100-1000ng/mL konsantrasyon aralığında doğrusaldır. Elde edilen

kromatogramlar, endojen plazma ve idrar bileşenlerinden kaynaklanan girişim yapabilecek piklerin olmadığını göstermiştir³⁵.

Kartal, *parasetamol*, *kafein* ve *kodein* fosfatın tayini için doğru, basit, tekraredilebilir ve duyarlı bir yöntem geliştirmiş ve valide etmiştir. *Parasetamol*, *kafein* ve *kodein* fosfat, μ Bondapak C₈ kolon ile 1,0 mL/dak akış hızında isokratik elüsyonla ayrılmışlardır. Mobil faz 0,01 M KH₂PO₄, metanol, asetonitril ve isopropil alkolün 420/20/30/30 (h/h/h/h) oranındaki karışımıdır ve spektrofotometrik dedeksiyon 215 nm'de yapılmıştır. *Parasetamol*, *kafein* ve *kodein* fosfatın tayini için doğrusal aralık sırasıyla 0,400-1500 μ g/mL, 0,075-90 μ g/mL ve 0,300-30 μ g/mL'dir. Yöntemin, doğrusal, tekraredilebilir, spesifik, duyarlı ve güçlü olduğu gösterilmiştir³⁶.

Altun ve arkadaşları, asetilsalisilik asit, *kafein* ve *kodein* fosfatın analizleri için doğru, basit, tekrarlanabilir ve duyarlı bir yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yöntemi geliştirmişler ve yöntemi valide etmişlerdir. Asetilsalisilik asit, *kafein* ve *kodein* fosfatın ayrımı, C₈ μ Bondapak kolonda 1,0 mL/dakika akış hızında izokratik elüsyonla gerçekleştirilmiştir.. Mobil faz izopropil alkol, asetonitril, su ve o-fosforik asitin 125/125/250/0,5 (h/h) oranındaki karışımından oluşmaktadır. Numuneler, fotodiyot array dedektör kullanılarak 215 nm'de tayin edilmişlerdir. Asetil salisilik asit, *kafein* ve *kodein* fosfatın tayini için doğrusal aralık sırasıyla 0,40 - 1000, 0,25 - 250 ve 0,48 - 96 μ g/mL'dir. Asetilsalisilik asit, *kafein* ve *kodein* fosfat için doğrusal aralık, seçicilik, sistem performans

parametreleri, kesinlik, doğruluk ve sağlamlık değerlerinin kabul edilebilir değerler olduğu gösterilmiştir³⁷.

Dinç ve Baleanu, tabletlerdeki *parasetamol* ve *kafeinin* eşzamanlı analizi için kimyasal bir ayırım prosedürü kullanmadan CLS (Klasik En küçük Kareler) ve PCR (Temel Bileşen Regresyonu) teknikleri önermişlerdir. Kemometrik kalibrasyon, 0,1 M HCl içinde hazırlanan ve her iki analiti de içeren bir numune setinin 215-285 nm aralığındaki spektral bölgede 15 farklı dalgaboyunda absorbanları ölçülerek yapılmıştır. Elde edilen kemometrik kalibrasyon, numunelerdeki *kafein* ve *parasetamol* tayini için kullanılmıştır. Rakamsal hesaplamalar "MAPLE V" yazılımı kullanılarak yapılmıştır. Bu iki tekniğin sentetik karışımlara uygulanmasıyla CLS ve PCR tekniklerinde elde edilen ortalama geri kazanım ve RSD değerleri *parasetamol* için 99,5 ve % 1,29, 99,7 ve %1, *kafein* için 99,9 ve 1,92, 100,0 ve 1,178% olarak bulunmuştur. Sonuçlar, referans bir yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yöntemi ile karşılaştırılmış ve iki yöntemin farmasötik tabletlere başarıyla uygulanabileceği belirtilmiştir³⁸.

Franeta ve arkadaşları, asetilsalisilik asit, *parasetamol*, *kafein* ve fenobarbitalin tabletlerde aynı anda tayini için bir yüksek basınçlı sıvı kromatografisi sistemi ile tayin önermişlerdir. Ayırım, Bio Sil HL C₁₈, 5 µm, 250x4,6 mm kolon ile yapılmıştır. Asetonitril-su (25:75 h/h) karışımının pH'ı fosforik asit ile 2,5'e ayarlanarak mobil faz olarak 2,0 mL/dk akış hızında kullanılmış ve 207 nm'de UV dedeksiyon yapılmıştır. Alıkonma zamanı,

kapasite faktörü, pik asimetrisi, seçicilik faktörü ve rezolüsyon gibi kromatografik parametreler tayin edilmiştir. Validasyon parametreleri: Doğrusallık ($r > 0,998$), gün içi kesinlik (RSD: %0,36-1,89), günler arası kesinlik (RSD: %0,58-2,18), duyarlılık (LOD: 9×10^{-5} - $1,7 \times 10^{-4}$ mg/mL) ve LOQ: $2,5 \times 10^{-4}$ - $5,6 \times 10^{-4}$ mg/mL, doğruluk (geri kazanım: %98,35-99,14) ve tekraredilebilirlik (geri kazanım) değerleri: asetilsalisilik asit için % 98,74-102,08, *parasetamol* için % 99,93-102,11, *kafein* için % 98,25-102,12 ve fenobarbital için % 98,15-102,3 olarak elde edilmiştir. Önerilen yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yöntemi asetilsalisilik asit, *parasetamol*, *kafein* ve fenobarbitalin farmasötik tabletlerde tayini için uygulanmıştır. RSD değerleri % 0,99-1,21 arasında elde edilmiştir. Geliştirilen yöntem hızlı ve duyarlıdır ve bu etken maddelerin farmasötik formlarda rutin tayinleri için uygundur³⁹.

USP 26, *parasetamol-kafein* karışımı için yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yöntemi önermiştir. Yöntemde, kolon C₁₈ (4,6 mm x 10 cm), mobil faz distile su: metanol: glasiyel asetik asit (69:28:3), akış hızı 2 mL/dak, dedektör 275 nm ve enjeksiyon hacmi 10 µL'dir⁶.

USP 26, *parasetamol-kodein* karışımı için bir yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yöntemi önermiştir. Yöntemde, kolon C₁₈ (4,6 mm x 25 cm), mobil faz pH 2,35 fosfat tamponu:metanol (92:8), akış hızı 1,5 mL/dak, dedektör 214 nm ve enjeksiyon hacmi 10 µL'dir⁶.

Poppi ve Sena, farmasötik formülasyonlardaki asetil salisilik asit, *parasetamol* ve *kafein* tayini için çoklu kalibrasyon ve UV spektrofotometrik ölçümlere (210-300 nm) dayalı basit ve hızlı bir analitik yöntem önermişlerdir. Kalibrasyon seti, asetil salisilik asit ve *parasetamol* için 10,0-15,0 µg/mL ve *kafein* için 2,0-6,0 µg/mL konsantrasyon aralığında dokuz farklı konsantrasyonda hazırlanmıştır. İşlem, dört farklı pH değerinde (2,0, 3,0, 4,0 ve 5,0) tekrar edilmiştir. Her bir pH değeri için PLS modeli oluşturulmuş ve sentetik karışım setinin tayininde kullanılmıştır. En iyi model pH 5,0'te elde edilmiştir. Ticari tabletler içindeki bu etken maddelerin tayininde elde edilen sonuçlar üretici tarafından belirtilen değerlerle uyumludur ve geri kazanım değerleri % 94,7 ve % 104,5 arasındadır⁴⁰.

Pistos ve Stewart, serumda *parasetamol*, *kafein* ve butalbital'in aynı anda miktar tayini için hızlı ve duyarlı bir yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yöntemi önermişlerdir. Serum örnekleri katı faz ekstraksiyon işleminden geçirilmişlerdir. Analitlerin ayrımı, 0,1 M monobazik potasyum fosfat (pH 2,41) ve asetonitril karışımı (95:5 h/h) mobil faz kullanılarak sağlanmış ve dedeksiyon 220 nm'de yapılmıştır. İç standart olarak benzoik asit kullanılmıştır. Yöntem tüm analitler için 1,25–100 µg/mL konsantrasyon aralığında valide edilmiş ve %8,3'ten küçük RSD ile doğrusal ($r > 0,995$, $n = 12$) bulunmuştur. Serumdan ortalama yüzde geri kazanım, *parasetamol* için $89,7 \pm 3,6$, *kafein* için $95,5 \pm 4,5$, butalbital için $99 \pm 5,2$ ve iç standart için $83,4 \pm 3,9$ olarak bulunmuştur⁴¹.

Peiro ve arkadaşları, *kodein* ve *parasetamol*ün kantitatif tayini için kapiler zone elektroforez yöntemi önermişlerdir. Kritik parametrelerin (konsantrasyon, tampon, pH, voltaj) analiz zamanı, ve rezolüsyon üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Optimum ayırma, 20 mM fosfat tamponu (pH 6,8) ve 15 kV kullanılarak ulaşılmıştır. Optimize edilmiş şartlarda *kodein* ve *parasetamol* 3 dakikadan daha az bir zamanda tayin edilmişlerdir. *Kodein* ve *parasetamol* için LOD değerleri sırasıyla 13,5 ve 340 ng/mL'dir ve RSD % 3'ten küçüktür⁴².

Algaba ve arkadaşları, antihistaminik etken maddeleri içeren farmasötik preparatların analitik kalite kontrolleri için hızlı bir kromatografik yöntem önermişlerdir. Çalışmada C₁₈ sabit faz ve misel oluşturucu setiltrimetil amonyum bromür ve organik değiştirici olarak 1-propanol veya 1-butanol'den oluşan mobil faz kullanılmıştır. Yöntem, farklı farmasötik formlardaki (tablet, kapsül, supositivar, şurup ve merhem) bromfeniramin, klorsiklizin, klorfeniramin, difenhidramin, doksilamin, flunarizin, hidrosizin, prometazin, terfenadin, tripelenamin ve triprolidin gibi antihistaminik ilaçların yanısıra *kafein*, dekstrometorfan, guafenezin, *parasetamol* ve piridoksin'in tayininde kullanılır. Yöntem, minimum numune ön işlemi gerektirir ve hızlı (1 mL/dakika akış hızında, 3-12 dakika) ve tekraredilebilirdir (% RSD değerleri <%5). LOD değerleri, 1 µg/mL'den düşüktür ve farmasötik preparatlardaki analitlerin geri kazanım aralığı % 100±10'dur⁴³.

Emre ve Özaltın, *parasetamol*, *kafein* ve propifenazon üçlü karışımlarını içeren farmasötik preparatlarda bu etken maddelerin analizi için yeni bir Miceller Elektrokinetik Kapiler Kromatografi yöntemi geliştirmişlerdir. En iyi sonuçlar, 30 mM sodyum dodesil sülfat içeren 20 mM pH 9,0 borat tamponu kullanılarak elde edilmiştir. Çalışmada diflunisal iç standart olarak kullanılmıştır. Ayrım, erimiş silika kapilerde (50 µm iç çap, 44 cm toplam uzunluk, 35,5 cm efektif uzunluk), 25°C'de ve 50 mbar basınç altında 3 saniye hidrodinamik enjeksiyon ile 29 kV potansiyel uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Dedeksiyon dalgaboyu 200 nm'dir. Bu koşullar altında göç zamanları *parasetamol* için 5,174, *kafein* için 5,513, diflunisal için 7,195 ve propifenazon için 9,366 dakika olarak bulunmuştur. Doğrusal konsantrasyon aralığı *parasetamol* ve *kafein* için 2-200 µg/mL ve propifenazon için 3-200 µg/mL'dir. LOD değerleri *parasetamol* ve *kafein* için 0,6 µg/mL ve propifenazon için 0,8 µg/mL olarak bulunmuştur. Validasyon çalışması sonuçlarına göre yöntem doğru, kesin, sağlam, duyarlı ve spesifiktir. Türkiye'de farklı firmalar tarafından üretilen üç farmasötik form, önerilen yöntemle analiz edilmiştir⁴⁴.

2.5. Kullanılan Yöntemle İlgili Genel Bilgiler

Elektroforez, doğru akımın uygulandığı bir tampon çözeltide yüklü taneciklerin farklı göç hızlarına dayanan bir ayırma yöntemidir. Bu ayırma yöntemi ilk olarak İsveçli kimyacı Arne Tiselius tarafından serum

proteinleri üzerinde çalışırken bulunmuş ve bu çalışmasından dolayı kendisi 1948'de Nobel Ödülü ile ödüllendirilmiştir.

Elektroforez birçok zor analitik ayırma yöntemine uygulanmaktadır, inorganik anyon ve katyonlar, amino asitler, kateşolaminler, ilaçlar, vitaminler, karbonhidratlar, peptitler, proteinler, nükleik asitler, nükleotidler, polinükleotidler ve çeşitli başka türler.

Elektroforezin en önemli özelliği, özellikle biyoteknoloji endüstrisinde biyolojik ve biyokimyasal araştırmalarda yüklü makromolekülleri ayırmasıdır. Elektroforez yıllarca proteinler (enzimler, hormonlar, antikolar) ve nükleik asitler (DNA, RNA) için vazgeçilmez bir ayırma yöntemi olmuştur. Bunlar için elektroforez yöntemi eşsiz bir ayırma gücüne sahiptir.

Elektroforetik ayırma, ince bir tüp içindeki veya düz gözenekli bir destek ortamındaki (örneğin kâğıt veya yarı katı jel) sulu bir tampon çözeltiye numunenin küçük bir bant halinde enjeksiyonu ile gerçekleştirilmektedir. Tampon çözeltiye, her iki ucundaki elektrotlar vasıtası ile yüksek bir doğru akım potansiyeli uygulanır. Uygulanan bu potansiyel, numunedeki iyonların elektrotlardan birine veya diğerine göç etmesini sağlar. Numunedeki taneciklerin göç hızları, taneciklerin yüküne ve büyüklüklerine bağlıdır. Böylece, numunedeki çeşitli analitlerin ayrılması

yük/boyut oranlarındaki farklara dayanır. Bu oranın büyük olması, elektriksel alanda ilgili iyonun daha hızlı hareket etmesini sağlar⁴⁵.

2.5.1. Elektroforetik Ayırmaların Temeli

Bir iyonun bir elektriksel alandaki cm/saniye cinsinden göç hızı v , alan şiddeti E ($V\ cm^{-1}$) ile elektroforetik hareketlilik, μ_e ($cm^2V^{-1}s^{-1}$)'in çarpımına eşittir. Yani,

$$v = \mu_e E$$

Buna bağlı olarak elektroforetik hareketlilik, analitin iyon yükü ile doğru ve sürtünmeli geciktirme katsayısı ile ters orantılıdır. Elektrik alan sadece iyonlar üzerinde etkilidir. Eğer iki farklı tür hem farklı iyon yüküne ve hem de tampondan geçerken farklı sürtünme kuvvetine sahipse, bu iki madde birbirlerinden ayrılabilir. Nötral türler ayrılmazlar. Analit iyonun sürtünmeli geciktirme kuvveti, o iyonun boyutuna, şekline ve içinde göç ettiği ortamın viskozitesine bağlıdır. Aynı boyuttaki iyonlar için, yük ne kadar büyükse, yürütücü kuvvet ve göç hızı o kadar büyük olur. Aynı yükteki iyonlar için ise, iyon küçüldükçe sürtünme kuvveti küçülür ve göç hızı artar. İyonun iyon/yük oranı bu iki etkiyi birleştirmektedir⁴⁵.

2.5.2. Elektroforez Tipleri

Elektroforetik ayırma oldukça farklı iki formatta gerçekleştirilir: birincisi *tabaka (slab) elektroforez* ve ikincisi *kapiler elektroforez*.

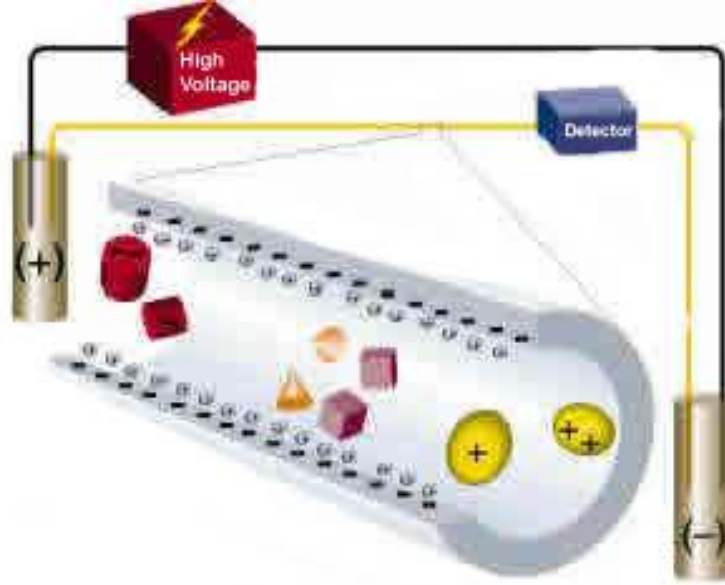
2.5.2.1. Tabaka (Slab) Elektroforez

Tabaka elektroforez, klasik yöntem olup, yıllarca karmaşık, yüksek molekül ağırlıklı biyolojik ve biyokimyasal moleküllerin ayrılmasında kullanılmıştır. Tabaka yönteminde ayırma, gözeneklerinde sulu tampon çözelti bulunan yarı-katı gözenekli bir ince jel tabakası (veya slab) kullanılarak yapılmaktadır. Bu tabaka genellikle birkaç cm genişliğinde olup aynı anda birden fazla numune ile çalışılabilmektedir. Analiz edilecek numune, bir damla veya bant şeklinde tabaka üzerine ilave edilir, doğru akım potansiyeli belli bir süre uygulanır. Ayırma işleminin tamamlandığına karar verildikten sonra, uygulanan potansiyel kesilir ve gerekli olduğu hallerde ayrılan moleküller çeşitli boyama teknikleri ile renklendirilir. Tabaka elektroforezi, günümüzde biyolog ve biyokimyacılar tarafından oldukça fazla kullanılan bir yöntemdir⁴⁵.

2.5.2.2. Kapiler Elektroforez

Geleneksel *tabaka elektroforez* çok kullanılmış olmasına ve halen de çok kullanılmasına rağmen, bu tip elektroforetik ayırma yavaş, işçiliği fazla, otomasyonu zor ve çok kesin kantitatif bilgi vermemektedir.

1980'lerin ortalarından sonlarına kadar, kapiler tüplerde yapılan elektroforez araştırma ve uygulamalarında hızlı bir artış olmuş ve aynı zamanda birkaç ticari elektroforez cihazı da piyasaya sunulmuştur.



Şekil 1. Kapiler Elektroforez Sistemi

Kapiler elektroforez oldukça hızlı ve çok küçük hacimdeki (0,1 ile 10 nL) numunelerde yüksek ayırma gücüne sahiptir. Tabaka elektroforezinde ise μL mertebesinde numune gereklidir. Buna ilave olarak ayrılan maddeler kapilerin bir ucundan çıktığı için *tabaka elektroforezde* kullanılan uğraştırıcı boyama yerine HPLC'de olduğu gibi kantitatif bir dedektör kullanılabilir⁴⁵.

2.5.2.2.1. Kapiler Elektroforezde Göç Hızları

Daha önce belirtildiği gibi bir iyonun göç hızı (v), elektrik alanının şiddetine bağlıdır. Elektrik alanı ise, uygulanan potansiyelin büyüklüğüne (V , volt) ve uygulandığı kapilerin uzunluğu L 'ye bağlıdır.

$$v = \mu_e \cdot \frac{V}{L}$$

Bu ilişki, arzu edilen hızlı iyonik göçü ve hızlı ayırmayı sağlamak için yüksek bir potansiyelin uygulanmasının gerekli olduğunu gösterir. Hızlı ayırma arzu edilmekle birlikte, daha önemlisi daha yüksek bir ayırma gücü elde etmektir. Bu yüzden, elektroforezde ayırma gücünü etkileyen faktörlerin incelenmesi gerekir⁴⁵.

2.5.2.2.2. Kapiler Elektroforezde Tabaka Yükseklikleri

Kromatografide, hem boyuna difüzyon ve hem de kütle aktarımına karşı olan direnç, bant genişlemesine neden olur. Buna karşılık, elektroforezde sadece tek bir faz olaya etki ettiği için sadece boyuna difüzyon dikkate alınmalıdır. Elektroforezde tabaka sayısı (N) şöyle verilir:

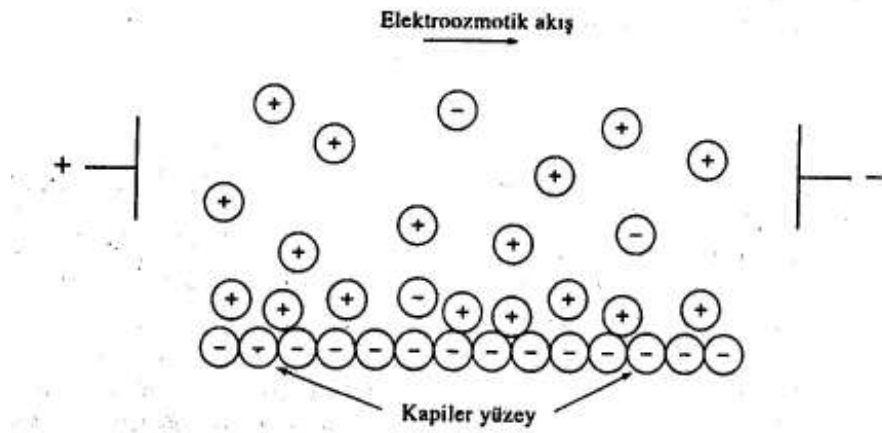
$$N = \frac{\mu_e V}{2D}$$

Burada D , cm^2s^{-1} cinsinden çözünen maddenin difüzyon katsayısıdır. Tabaka sayısının artmasıyla ayırma gücü arttığından istenen yüksek verimli ayırmaları başarmak için yüksek bir potansiyel uygulanması gereklidir. Elektroforezde tabaka sayısı, kromatografinin aksine kolonun uzunluğu ile artmamaktadır.

Jel tabaka elektroforez yönteminde joule ısıtması, uygulanan potansiyelin büyüklüğünü yaklaşık 500 V ile kısıtlar. Burada kapiler teknik ile tabaka tekniği arasında bir fark görülür. Kapilerin kolon kesit alanının küçüklüğü ve kolonun uzun olması, kapiler kolon içindeki çözeltinin elektriksel direncinin oldukça yüksek olması demektir. Elektriksel güç kaybı, direnç ile ters orantılı olduğu için, çok yüksek potansiyel uygulanabilir. Ayrıca, kapilerin yüksek yüzey/hacim oranı etkili bir soğutma sağlar. Bu iki faktörün sonucu ısınmadan kaynaklanan konveksiyonel karışma nedeniyle oluşan bant genişlemesi dikkate değer bir büyüklüğe sahip değildir. Genellikle, kapiler elektroforezde 20.000 ile 60.000 V'luk bir potansiyel kullanılmakta olup buna bağlı olarak tabaka tekniğine göre hız ve ayırma gücünde iyileşme sağlanmaktadır. Kapiler elektroforez yönteminde pik genişliği, boyuna difüzyon etkisi ile genellikle teorik sınır değere yaklaşır. Kapiler elektroforez, normalde 1×10^5 ile 2×10^5 aralığında bir tabaka sayısına sahipken HPLC'de ise bu sayı 5×10^3 ile 2×10^4 arasındadır. Amino asitler için kapiler zon elektroforez yöntemi ile 3×10^6 tabaka sayısına ulaşılırken polinükleotidlerin kapiler jel elektroforez yöntemi için 1×10^7 tabaka sayısına ulaşıldığı literatürlerde yer almaktadır.

2.5.2.2.3. Elektroosmotik Akış

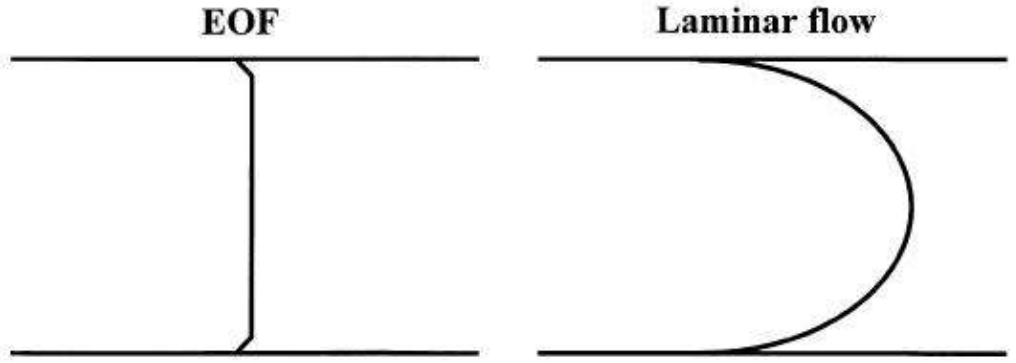
Tampon çözelti içeren bir kapiler tüpe yüksek bir potansiyel uygulandığında genellikle bir *elektroosmotik akış* oluşur, bu akış nedeniyle çözücü katot veya anoda doğru göç eder.



Şekil 2. Silika/ kapiler arayüzeyinde yük dağılımı ve oluşan elektroosmotik akış

Şekil 2’de görüldüğü gibi elektroosmotik akışın sebebi, silika/çözelti arayüzeyinde meydana gelen elektriksel çift tabakadır. pH 3’ün üzerinde, silika kapillerlerin iç yüzeyi, yüzeydeki silanol grubunun (Si-OH) iyonlaşması nedeniyle negatif yüklüdür. Tamponun katyonları, elektriksel çift silika kapillerinin negatif yüzeyine bitişik olan tabakada birikir. Çift tabakanın difüze dış bölümündeki katyonlar, katot veya negatif elektrot tarafından çekilirler, katyonlar solvatize oldukları için çözücü de beraberinde sürüklerler. Şekil 3’de görüldüğü gibi, elektroosmoz, tüp içinde parabolik olmayan düz kesitli bir yığın çözelti akışına yol açar. Halbuki, sıvı kromatografide basıncın etkisi ile oluşan akış parabolik kesitlidir. Akış

profilinin düz olması nedeniyle, elektroosmotik akış sıvı kromatografide olduğu gibi bant genişlemesine önemli ölçüde etki etmez.



Şekil 3. Elektroosmotik basınç ve hidrodinamik basınç altında sıvılar için akış profilleri

Elektroosmotik akış hızı, genellikle iyonların tek başlarına elektroforetik göç hızından daha büyüktür ve kapiler elektroforezde hareketli fazı idare eden kaynaktır. Kapilerde analitler kendi yüklerine göre göçseler bile, elektroosmotik akış hızı genelde bütün pozitif, nötral ve hatta negatif tanecikleri kapilerin aynı tarafına sürüklemeye yetecek kadar büyüktür. Böylece bütün tanecikler aynı noktadan geçtiği için bunlar tayin edilebilirler. Sonuçta elde edilen elektroferogram kromatograma benzer.

Elektroosmotik akış hızı (v), $v = \mu_{eo}E$ şeklinde verilir. Elektroosmoz olması durumunda, bir iyonun hızı, onun göç hızı ve elektroosmoz akış hızının toplamıdır. Böylece,

$v = (\mu_e + \mu_{eo})E$ olur. Bir anyon için μ_e 'nin negatif olacağına dikkat edilmelidir.

Elektroosmozun sonucu olarak, tipik bir elektroforetik ayırmada kolondan, ilk önce hızlı katyonlar, takiben yavaş katyonlar, sonra nötral tanecikler, daha sonra da yavaş anyonlar ve nihayet hızlı anyonlar çıkarlar. Bazı durumlarda elektroosmotik akış hızı, bazı anyonların anoda doğru yaptıkları hızlardan büyük olamaz, bu durumda bu tür tanecikler elektroosmoz sırasında anoda doğru hareket ederler.

Tampon çözelti içine bir katyonik yüzey aktif madde eklenerek normal elektroosmotik akış yönünü ters çevirmek mümkündür. Bu durumda yüzey aktif madde kapilerin iç yüzeyinde adsorplanır ve kapilerin yüzeyini pozitif yüklerle yükler. Böylece, tamponun anyonları kapilerin iç yüzeyine yakın yerlerde birikir ve katoda doğru hareket ederler. Bu işlem anyonların ayrılmasını hızlandırmak için sıkça kullanılır.

Elektroosmoz bazı kapiler elektroforez tiplerinde istenir, fakat bir kısmında istenmez. Elektroosmotik akış, yüzey silanol gruplarını yok etmek için, kapilerin iç kısmı trimetilklorosilan gibi bir reaktifle kaplanarak ortadan kaldırılabılır.

2.5.2.3. Kapiler Elektroforez İçin Cihaz

Şekil 1'de grldėđđ gibi kapiler elektroforez cihazı basittir. 10-100 μm çap ve 40-100 cm uzunluğında, tamponla doldurulmuş erimiş silika kapiler, içinde platin elektrotlar bulunan iki tampon haznesi arasına yerleŐtirilmiŐtir. Numune bir uçtan verilirken ayrılan maddeler diğer uçta tayin edilir. Yüksek potansiyelli g kaynağının kutupları ayırım yapılacak iyonların türüne göre deėiŐtirilebilir, ters çevrilebilir.

Cihaz ilk bakıŐta basit olmasına rağmen, çok kk numunelerle çalıŐıldıėından numunenin verilmesi ve ayrıŐan maddelerin tayinleriyle ilgili çok ciddi deneysel zorluklar vardır. Normal bir kapilerin hacmi 4 ile 5 μL olduğundan, enjeksiyon ve dedeksiyon hacimleri birkaç nanolitre veya daha az olmalıdır.

2.5.2.3.1. Numune Verme

En yaygın numune verme yöntemleri, *elektrokinetik enjeksiyon* ve *basınç enjeksiyonudur*. Elektrokinetik enjeksiyonda kapilerin bir ucu ve buna bağlı elektrot, tamponun bulunduğu kk bir kap içerisine konur. Belirli bir süre potansiyel uygulanır, böylece elektroosmotik akış ve iyon g etkisi ile kapiler içine numunenin alınması sağlanmış olur. Daha sonra kapiler ve elektrot tekrar önceki tampon çözelti içine yerleŐtirilir ve ayrılma süresince potansiyel uygulanır. Bu enjeksiyon tekniği ile hızlı hareket eden

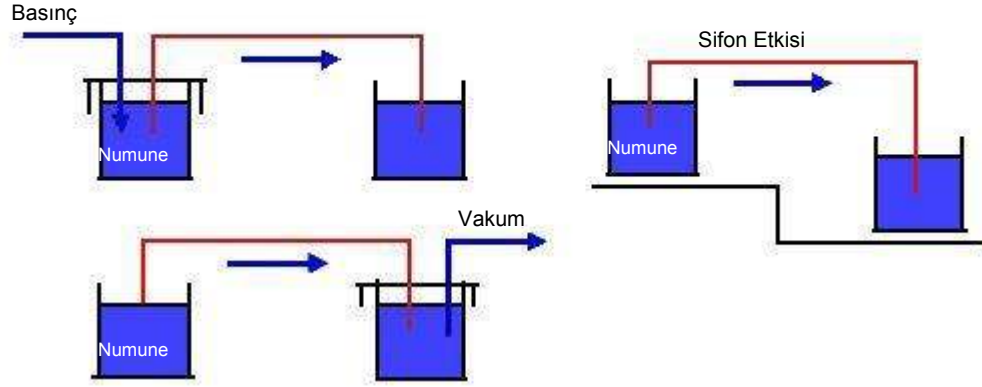
iyonlar, yavaş hareket eden iyonlara göre daha fazla oranda kapilere alınmaktadır.

Basınç enjeksiyonunda, kapilerin numunenin verildiği ucu, numunenin içinde bulunduğu küçük bir kap içine geçici olarak konur ve basınç farkı numuneyi kapiler içine enjekte eder. Basınç farkı, kapilerin dedektör ucuna vakum, numune ucuna basınç uygulayarak veya numune ucunun yükseltilmesi ile meydana getirilir. Basınç enjeksiyonunda, iyon yükünden dolayı hareketlilikte herhangi bir fark meydana gelmez, fakat jelle doldurulmuş kapilerde bu yöntem kullanılamaz (Şekil 4).

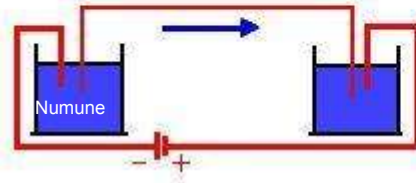
Elektrokinetik enjeksiyon ve basınç enjeksiyonunun her ikisinde de enjekte edilen hacim, enjeksiyon zamanı ile kontrol edilir. Genellikle 5 ile 10 nL'lik numune enjeksiyonu uygulanmakta fakat 100 pL'nin altında numunenin de enjekte edilebildiği bilinmektedir.

Mikroenjeksiyon başlıkları kapilerin çekilerek küçültülmesiyle yapılır ve bu sayede pikolitre mertebesindeki tek bir hücre veya hücre içindeki maddeler gibi numunelerle çalışma imkanı doğar. Bu teknik, tek bir hücre içindeki aminoasitleri ve nörotransmitterleri incelemek için kullanılmaktadır⁴⁵.

Hidrokinamik Enjeksiyon



Elektrokinetik Enjeksiyon



Şekil 4. Kapiler Elektroforezde numune enjeksiyon şekilleri

2.5.2.3.2. Kapiler Elektroforezde Kullanılan Dedeksiyon Yöntemleri

Kapiler elektroforezin birçok tipinde ayrılan analitlerin hepsi ortak bir noktadan geçtikleri için dedektörlerin tasarımı ve fonksiyonları Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisine benzer. Bununla birlikte, kapiler elektroforezde her bir iyon, kendisinin elektroforetik hareketliliği ile belirlenen bir hızla göçtüğünden dedektörlerin davranışlarında bir fark gözlenir. Analit bantları dedektörden farklı hızlarla geçerler, bundan dolayı pik alanları kısmen alıkonma zamanlarına bağlıdır. Buna karşılık, HPLC'de

bütün türler dedektörden hareketli fazın hızında geçer ve pik alanları alıkonma zamanlarına bağlı olmaz. Zaten bu zamana bağımlılık önemli de değildir. Tablo 1’de kapiler elektroforez için 1988’den bu yana verilen türleri tayin etme yöntemleri ve gözlenebilme sınır değerleri görülmektedir.

Tablo 1. Kapiler Elektroforezde Dedeksiyon Yöntemleri

Dedeksiyon Yöntemi	Gözlenebilme Sınırı^a (Belirlenen Mol)
Spektrometri	
Absorpsiyon ^b	$10^{-15} - 10^{-13}$
Floresans	
Kolondan önce türevlendirme	$10^{-17} - 10^{-20}$
Kolonda türevlendirme	8×10^{-13}
Kolondan sonra türevlendirme	2×10^{-17}
Dolaylı Floresans	5×10^{-17}
Termal Mercekler ^b	4×10^{-17}
Raman ^b	2×10^{-15}
Kütle Spektrometri	1×10^{-17}
Elektrokimyasal	
İletkenlik ^b	1×10^{-16}
Potansiyometri	Verilmemiştir
Amperometri	7×10^{-19}
Radyometri ^b	1×10^{-19}

^aBurada verilen gözlemebilme sınırları 18 pL ile 10 nL’lik enjeksiyon aralığında çıkarılmıştır.

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

Absorbans Yöntemleri

Kapiler elektroforezde absorbans ve floresans dedektörleri fazlaca kullanılmasına rağmen, absorbans yönteminin daha fazla uygulanabilir olmasından dolayı, genelde absorbans dedektörleri daha fazla kullanılmaktadır. Dedeksiyon hacmini nL veya daha az tutabilmek için dedeksiyon kolon üzerinde yapılmalıdır. Bunun için kapilerin iç kısmındaki poliimid koruyucu kaplamanın bir kısmı yakma, çözme veya kazıma ile uzaklaştırılır. Kapilerin bu kısmı daha sonra dedektör hücresi olarak görev yapar. Ne yazık ki bu durumda ışın yolunun uzunluğu 50 ile 100 μm 'den fazla olmaz ve bu da derişim cinsinden gözlenebilme sınırını sınırlar. Bununla birlikte, hacmin çok küçük olması nedeniyle kütle gözlenebilme sınırları HPLC'dekine eşit veya ondan daha iyi olur.

Absorbans ölçümlerinin duyarlılığını artırmak için, ölçüm yapılan ışın yolunun artırılması gibi bazı teknikler ileri sürülmüştür. Örneğin kapilerin ucunun 'z' şeklinde bükülmesi ile ışın yolu uzatılabilmektedir. Ancak, bu teknikle duyarlıktaki iyileşme beklenenden çok daha az olmaktadır. Bunun sebebi belki de ışının odaklanmasının yetersiz olmasıdır. Işın yolunu uzatmak için ikinci teknikte, kapilerin sonuna doğru bir baloncuk oluşturulmuş ve böylece ışın yolu uzunluğu yaklaşık üç kat artırılabilmiştir. Işın yolunu artırmanın üçüncü yolu, ışının yansıtılmasıdır. Bu teknikte kapilerin sonuna yansıtıcı bir gümüş kaplama yapılır. Bu durumda ışın demeti kapilerden çıkıncaya kadar bir seri yansıma yapar.

Absorbans Yöntemleri ile Dolaylı Tayin: Dolaylı absorbans tayini, molar absorptivitenin küçük olması nedeniyle tayini zor olan maddeler için kullanılmaktadır. Elektroforez tamponu içine iyonik bir kromofor konur ve bu kromofor nedeniyle dedektör sürekli bir sinyal verir. İyon değiştirme kromatografide olduğu gibi, analit bu iyonların bir kısmı ile yer değiştirir, böylece analit bandının dedektörden geçtiği sürece dedektörden alınan sinyalde bir azalma olur. Analit miktarı daha sonra absorbansdaki azalmadan hesaplanır.

Floresans Yöntemleri

Yüksek basınçlı sıvı kromatografisinde olduğu gibi, floresans ile tayin, floresans yapan analitlerin veya türevlerinin duyarlık ve seçiciliğinin artmasına yol açar. Yoğun ışık kaynağından yararlanarak gözlenebilme sınırlarını düşürmek amacıyla, küçük kapilerde uyarıcı ışını odaklamak için lazerli cihazlar tercih edilmektedir. Lazerli floresans tayin yöntemi kullanılarak 10 zeptomol düzeyinde tayin yapılabilmektedir.

Elektrokimyasal Yöntemler

Kapiler elektroforezde iki çeşit elektrokimyasal dedektör kullanılmaktadır. İletkenlik dedektörü ve amperometrik dedektör.

Elektrokimyasal dedektörlerle ilgili problemlerden biri, ayırmada kullanılan yüksek potansiyelden dedektör elektrot'ların izole edilmesidir. İzolasyon için kullanılan yöntemlerden biri, dedektör kısmının bulunduğu kapiler ile diğer kapiler arasına gözenekli cam veya gibi gözenekli bir bağlantının eklenmesidir.

Kütle Spektrometrik Yöntemler

Elektroforez kapilerlerinden 1 μL /dakikanın altındaki çok küçük volumetrik akış hızları, bir elektroforetik cihazın çıkan maddenin doğrudan kütle spektrometrenin iyonlaşma odasına bağlanmasını mümkün kılar. Günümüzde kullanılan en genel numune enjeksiyon/iyonlaşma arabirimi elektrosprey olmasına rağmen, hızlı atom bombardımanı da kullanılmaktadır. Kapiler elektroforez/kütle spektrofotometri (CE/MS) sisteminin tipik tayin sınırları molekül ağırlığı 100000 ve daha büyük moleküller için femtomolün 10 katı kadardır.

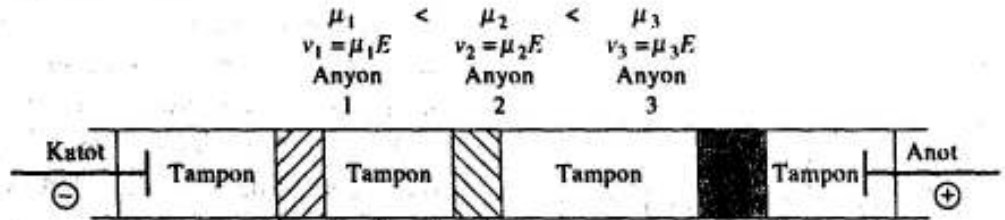
2.5.2.4. Kapiler Elektroforez Uygulamaları

Kapiler elektroforetik ayırma, mod ile isimlendirilen birkaç değişik şekilde yapılır. Bu modlar önce tabaka elektroforezde kullanılmış ve daha sonra kapiler elektroforetik ayırmaya uygulanmıştır.

2.5.2.4.1. Kapiler Zon Elektroforez

Kapiler zon elektroforezde (CZE) tampon çözeltinin bileşimi ayırma bölgesinin her yerinde aynıdır. Uygulanan potansiyel ile, karışımı oluşturan parçacıklar kendi iyonik hareketliliklerine göre zonlara ayrılırlar. Burada zonlar tamamen ayrılabilirler gibi, kısmen örtüşebilirler de. Tamamen ayrılmış zonlar arasında tampon vardır (Şekil 5.a). Bu durum, hareketli faz bölgelerinin ayrılan analiti içeren zonlar arasında bulunduğu elüsyon kolon kromatografiye benzer.

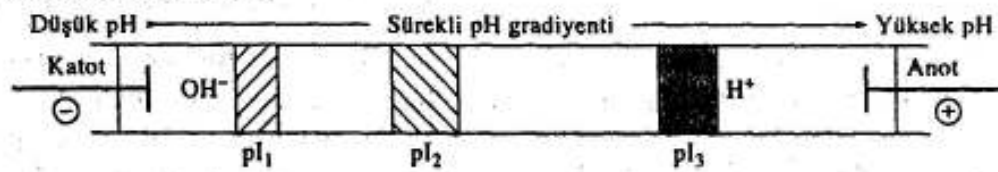
(a) Zon elektroforez:



(b) İzotakoforez:



(c) İzoelektrik odaklama:



Şekil 5. Elektroforez ile Ayırmada Kullanılan Modlar

2.5.2.4.2. Kapiler Jel Elektroforez

Kapiler jel elektroforez (CGE), genellikle gözenekli polimer matrisinde yapılır. Gözenekler içinde ayrılmanın meydana geldiği bir tampon karışımı bulunur. İlk tabaka elektroforez çalışmalarında, polimerik maddenin asıl amacı, konveksiyon ve difüzyonla analitin dispersiyonunun azaltılarak görüntülenmesi ve tayin için uygun bir ortam sağlanmasıydı. Sonraları görüldü ki bu tür bir ortam moleküler elek etkisi yapmakta ve buna bağlı olarak polimerin gözenek büyüklüğü ve analitin iyon büyüklüğüne bağlı olarak analitin iyon göçünü geciktirmektedir. Bu tip bir eleme etkisi, yaklaşık olarak aynı yüke sahip olan fakat büyüklükleri hacimce farklı olan proteinler, DNA parçaları ve oligomerler gibi makromoleküllerin ayrılmasında önemli ölçüde faydalı olmuştur. Günümüzde makromoleküllerin elektroforetik ayrılması genellikle jel tabaka yöntemiyle yapılmaktadır.

2.5.2.4.3. Kapiler izotakoforez

Kapiler izotakoforezde (CITP) tüm analitlerin bantları aynı hızda göçer, bu yüzden yöntemin adı izo (aynı) ve tach (hız) kelimelerinden meydana gelmektedir. Bu tekniğin kullanıldığı herhangi bir özel uygulamada ya anyonlar ya da katyonlar ayrılabilir, fakat her ikisi aynı anda

yapılamaz. Bu ayırma işleminde numune iki tampon arasına enjekte edilir, öndeki tampon hareketliliği numune içindeki en hızlı iyondan daha hızlı iyonlar ve sonraki tampon (ikinci tampon) ise hareketliliği numune iyonlarından daha düşük iyonlar içerir.

2.5.2.3.4. Kapiler İzoelektrik Odaklama

Kapiler izoelektrik odaklama (CIEF) yöntemi, bir zayıf karboksilik asit grubu ve bir zayıf baz amino grubu içeren protein ve amino asitler gibi amfiprotik türlerin ayrılmasında kullanılır. Amfiprotik türlerin izoelektrik ayrılması, tampon boyunca değişen bir pH ortamında yapılır. Bu pH gradienti birkaç farklı amfolitin sulu çözeltisinin karışımından hazırlanır⁴⁵.

MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler

Kapiler Elektroforez Sistemi : Agilent Kapiler Elektroforez Sistemi

Dijital pH-Metre : Orion 720 A+

Analitik Terazi : SHIMADZU AW320

Ultrasonik Banyo : Sonorex Bandelin

3.2. Kullanılan Kimyasallar

Tayini yapılacak analitlerin (*Parasetamol*, *Kafein* Sitrat ve *Kodein* Fosfat) standartları Münir ŞAHİN İlaç Sanayi ve Ticaret A.Ş. firmasından temin edilmiştir.

Disodyum hidrojen fosfat dihidrat (Merck)

Metanol (Sigma-Aldrich)

3.3. Kullanılan Farmasötik Preparat

Geralgine K : Her tablet 10 mg *Kodein Fosfat*, 30 mg *Kafein* ve 500 mg *Parasetamol* içermektedir.

3.4. Ön Çalışmalar

3.4.1. Tampon Çözelti, pH ve Konsantrasyon Seçimi

Yapılan literatür taramasında tayin etmek istediğimiz analitler için genellikle fosfat tamponu kullanıldığı görüldü ve çalışmaya fosfat tamponu ile başlandı.

Çalışılan tabletteki analitlerin (*kodein* fosfat, *kafein* ve *parasetamol*) sulu çözeltileri zayıf bazik özellik göstermektedir. Bu yüzden bazik bir tamponla çalışıldı.

Bu amaçla 20 mM ve 25 mM Na₂HPO₄ çözeltileri hazırlandı.

3.4.2. Enjeksiyon için Basınç ve Süre Seçilmesi

Çalışılan analitlerin standartlarından, 14,8 µg/mL *kodein* fosfat, 44,4 µg/mL *kafein* ve 741 µg/mL *parasetamol* içeren bir çözelti çalışma tamponu içerisinde hazırlanarak 5, 10, ve 15 saniye enjeksiyon sürelerinde analizleri yapıldı. Bu sırada enjeksiyon basıncı 40 mBar'da sabit tutuldu.

3.4.3. Optimum Çalışma Koşulları

Kolon Uzunluğu ve Çapı: 56 cm uzunluk (47,5 cm efektif uzunluk) ve 50 µm iç çap

Elektrolit Çözelti (Çalışma Tamponu): % 10 Metanol içeren 25 mM Na₂HPO₄ tamponu, pH = 8,5

Enjeksiyon basıncı ve süresi: 40 mBar, 10 saniye

Voltaj: 27 kV

Dedektör: UV Dedektör (210 nm, 214 nm, 220 nm)

3.4.4. Tekrarlanabilirlik Çalışmaları

Önerilen yöntemin tekrarlanabilirliğini belirlemek amacıyla tablettekine benzer oranlarda standart maddeler içeren bir sentetik karışım hazırlandı.

3,1 mg *Kodein* fosfat, 9,9 mg *kafein* sitrat (4,98 mg *kafein*) ve 99,9 mg *parasetamol* hassas olarak tartılarak 25 mL'lik balonjoje içinde % 10 metanol içeren 25 mM Na₂HPO₄ tampon çözeltisi (pH 8,5) içinde çözüldü. 15 dakika ultrasonik banyoda karıştırıldı ve 25,0 mL'ye tamamlandı. Bu stok çözeltilerden 5,0 mL alınarak çalışma tamponu ile 10,0 mL'ye seyreltildi. Analitlerin son konsantrasyonları;

Kodein fosfat : 62 µg/mL,

Kafein : 99,6 µg/mL,

Parasetamol : 1998 µg/mL'dir.

Elde edilen bu çözeltinin optimum koşullarda 7 kez ölçümü yapıldı. Her bir analit için, pik alanı, pik yüksekliği ve göç zamanına göre ortalama, standart sapma ve bağıl standart sapma (RSD) değerleri hesaplandı.

3.5. Kalibrasyon Çalışmaları

3.5.1. Stok Çözeltinin ve Dilüsyonların Hazırlanması

4,6 mg *kodein* fosfat, 28,6 mg *kafein* sitrat (14,38 mg *kafein*) ve 249,3 mg *parasetamol* hassas olarak tartıldı ve 50 mL'lik bir balon jøjeye konuldu. Üzerine 25 mL hacimce % 10 metanol içeren 25 mM Na₂HPO₄ tampon çözeltisi (pH 8,5) eklendi ve 15 dakika ultrasonik banyoda karıştırıldı ve aynı çözelti ile 50,0 mL'ye tamamlandı.

Hazırlanan bu stok çözeltisindeki analit konsantrasyonları:

92 µg/mL *Kodein* fosfat,

287,6 µg/mL *kafein* ve

4986 µg/mL *parasetamol*dür.

Bu stok çözeltiden 0,2; 0,5; 1,0; 2,5 ve 4,0 mL'ler alınarak % 10 metanol içeren tampon çözelti ile 10.0 mL'ye tamamlandı. Elde edilen

çözeltilerin analit derişimleri Tablo 2’de görölmektedir. Bu çözeltilerin optimize edilen koşullarda üçer kez ölçümleri yapıldı ve elde edilen elektroferogramlardaki pik alanlarının ortalamaları alınarak her bir analit için ayrı ayrı kalibrasyon doğruları çizildi.

Tablo 2. Kalibrasyon Çözeltilerinin Konsantrasyonları

Dilüsyon No.	Alınan Stok Hacmi (mL)	Eklene Tampon Miktarı (mL)	Son Hacim (mL)	<i>Kodein fosfat.</i> (µg/mL)	<i>Kafein</i> (µg/mL)	<i>Parasetamol</i> (µg/mL)
1	0,2	9,8	10,0	1,84	5,75	99,72
2	0,5	9,5	10,0	4,60	14,38	249,30
3	1,0	9,0	10,0	9,20	28,76	498,60
4	2,5	7,5	10,0	23,00	71,90	1246,50
5	4,0	6,0	10,0	36,80	115,04	1994,40

Hazırlanan dilüsyonların ölçümleri yapıldı ve elektroferogramdaki pik alanı değerleri alınarak her bir analit için ayrı ayrı kalibrasyon doğruları çizildi.

3.6. Farmasötik Tabletlerde *Parasetamol*, *Kafein* ve *Kodein Fosfat* Miktar Tayini

Toplam 10 adet tablet hassas olarak tartıldı ve toz edildi. Yaklaşık 39,7 mg *parasetamol*, 2,4 mg *kafein* ve 0,8 mg *kodein fosfata*

eşdeğer yaklaşık 53,6 mg tablet tozu tartıldı. Üzerine 20 mL % 10 metanol içeren 25 mM Na₂HPO₄ tampon çözeltisi (pH 8,5) eklendi. Ultrasonik banyoda 15 dakika karıştırıldı ve aynı çözelti ile 50,0 mL'ye tamamlandı. Elde edilen çözeltinin belirtilen koşullarda pik alanı değerleri alındı ve aynı koşullarda her bir analit için çizilen kalibrasyon doğruları yardımı ile tabletlerin içerdiği *parasetamol*, *kafein* ve *kodein* fosfat miktarı hesaplandı.

3.7. Geri Kazanım Çalışmaları

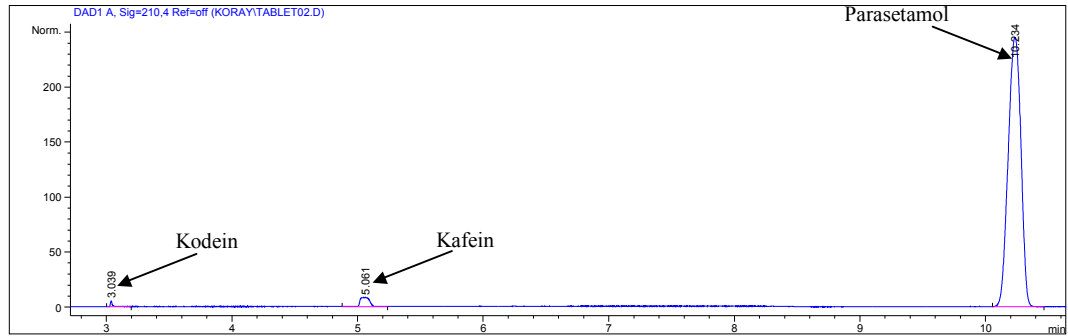
Bölüm 3.6'daki koşullarda hazırlanmış yaklaşık 794 µg/mL *parasetamol*, 48 µg/mL *kafein* ve 16 µg/mL *kodein fosfat* içeren tablet çözeltisinden 9 mL alındı ve 5007 µg/mL *parasetamol*, 309 µg/mL *kafein* 104 µg/mL *kodein* fosfat içeren stok standart çözeltisinden 240 µL, 250 µL ve 260 µL'ler alınarak tablet çözeltisi üzerine eklendi. Son hacim 10,0 mL'ye çalışma tamponu ile tamamlandı. Elde edilen çözeltilerin optimize edilen koşullarda ölçümleri yapıldı ve ilgili kalibrasyon doğrularından hareketle % geri kazanım değerleri hesaplandı.

BULGULAR

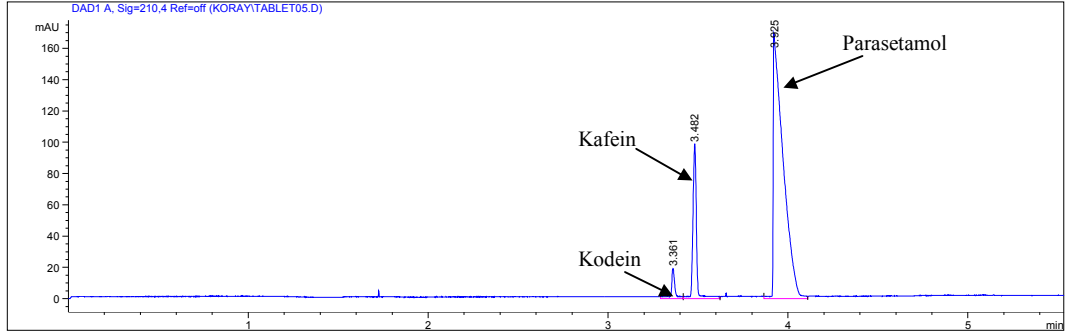
4.1. Ön Çalışma Sonuçları

4.1.1. Tampon Çözelti, Tampon Çözelti pH'ı ve Konsantrasyonu Seçimi Çalışması Sonuçları

Tampon çözelti optimizasyonu için Bölüm 3.1.1.'de anlatılan yol izlenmiş ve elde edilen elektroferogramlar Şekil 6 ve Şekil 7'da gösterilmiştir.



Şekil 6. Parasetamol, kafein ve kodein fosfat karışımının elektroferogramı; Parasetamol (570 µg/mL), kafein (34,2 µg/mL), kodein fosfat (11,4 µg/mL), Elektrolit Çözelti: % 10 metanol içeren 20 mM fosfat tamponu



Şekil 7. *Parasetamol*, *kafein* ve *kodein fosfat* karışımının elektroferogramı; *Parasetamol* (1050 µg/mL), *kafein* (63 µg/mL), *kodein fosfat* (21 µg/mL), Elektrolit Çözelti: % 10 metanol içeren 25 mM fosfat tamponu

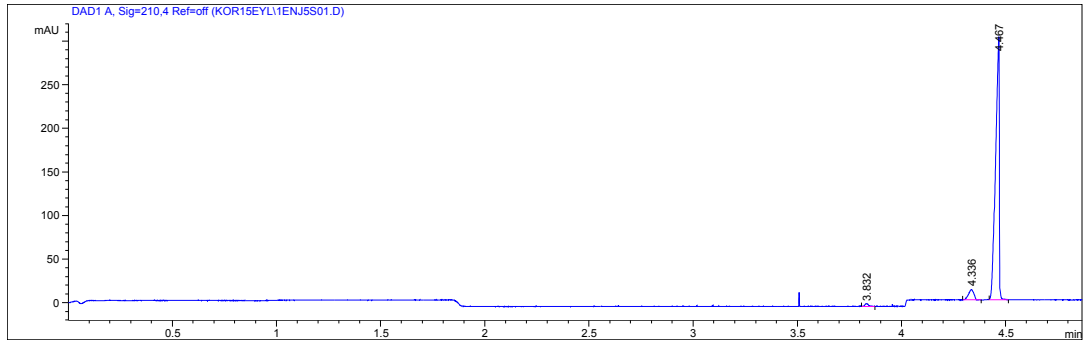
Elektroferogramlardan da görüldüğü gibi Na_2HPO_4 tamponu tayini yapılacak analitlerin ayrımı için uygundur. Tüm pikler ayırım için yeterli çözünürlüktedir. Ancak 20 mM Na_2HPO_4 tamponu kullanıldığında EOF (Elektroosmotik Akış) daha yavaş olduğu için piklerin çözünürlüğü yüksektir. Fakat *kodein* ve *kafeinin* pikleri yavaş elektroosmotik akıştan dolayı genişleşmişlerdir. *Parasetamol* ise en son ve 8. dakikadan sonra çıkmıştır.

25 mM Na_2HPO_4 tamponu kullanıldığında elektroosmotik akışın daha hızlı olmasından dolayı hem analiz süresi kısalmış, hem de pik şekilleri düzelmiştir. Bu şartlarda elde edilen analitlerin pikleri, ayırım için yeterli çözünürlüktedir.

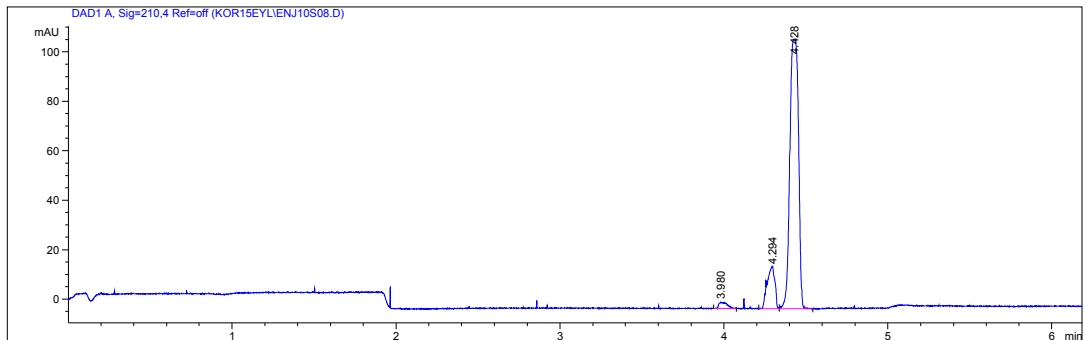
Parasetamolün çözünmesi için % 10 metanol içeren fosfat tamponu kullanılmıştır (pH 8,5).

4.1.2. Enjeksiyon Süresi Optimizasyonu Sonuçları

Bölüm 3.4.2.'de anlatıldığı gibi basınç literatür bulgularına dayanarak 40 mBar'da ve voltaj 27 kV iken enjeksiyon süreleri 5, 10, ve 15 saniyelere ayarlanmıştır. Bu koşullarda elde edilen elektroferogramlar Şekil 8, Şekil 9 ve Şekil 10'da görülmektedir.

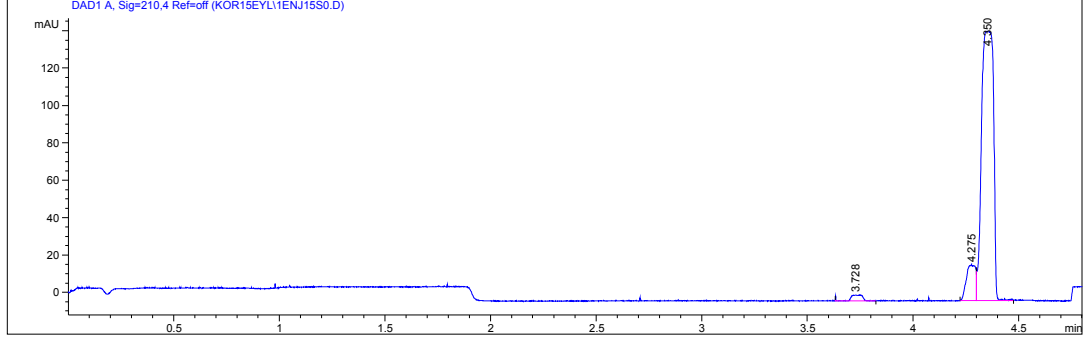


Şekil 8. Parasetamol, kafein ve kodein fosfat karışımının elektroferogramı; Parasetamol (741 µg/mL), kafein (44 µg/mL), kodein fosfat (14,8 µg/mL); Elektrolit Çözelti: % 10 metanol içeren 25 mM fosfat tamponu; Enjeksiyon süresi: 5 saniye



Şekil 9. Parasetamol, kafein ve kodein fosfat karışımının elektroferogramı; Parasetamol (741 µg/mL), kafein (44 µg/mL), kodein fosfat (14,8 µg/mL); Elektrolit Çözelti: % 10 metanol içeren 25 mM fosfat tamponu; Enjeksiyon süresi: 10 saniye, R*=2.312

$$*R=2[t_{R\ PAR} - t_{R\ KAF}]/(W_{PAR} + W_{KAF})$$



Şekil 10. *Parasetamol*, *kafein* ve *kodein fosfat* karışımının elektroferogramı; *Parasetamol* (741 µg/mL), *kafein* (44 µg/mL), *kodein fosfat* (14,8 µg/mL); Elektrolit Çözelti: % 10 metanol içeren 25 mM fosfat tamponu; Enjeksiyon süresi: 15 saniye

Enjeksiyon süresinin 15 saniye olduğu elektroferogramda piklerin genişlediği, pik simetrisinin bozulduğu ve *kafein* ile *parasetamol* piklerinin analiz için yeterli çözünürlükte ayırım sağlamadıkları görülmektedir.

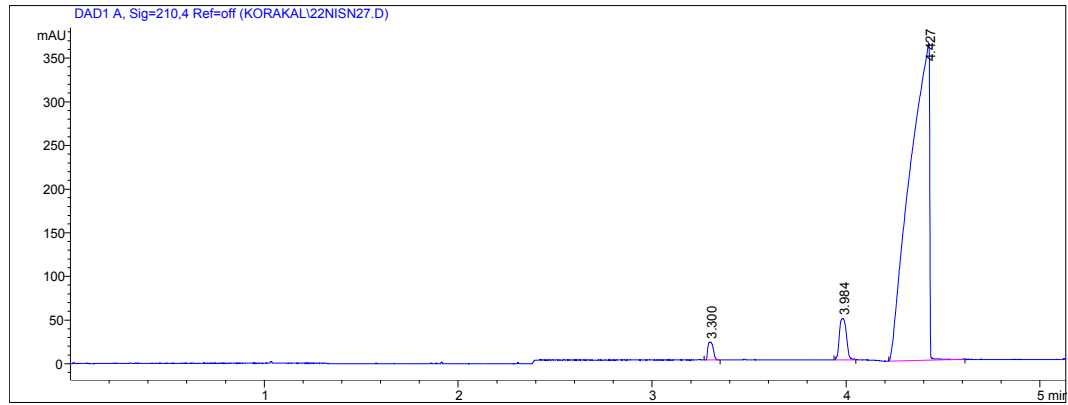
Enjeksiyon süresi 5 saniye olan elektroferogramda piklerin şeklinin keskin ve simetrik olduğu görülmektedir. Fakat konsantrasyonu çok düşük olan *kodeinin*, daha düşük konsantrasyonlarda bu enjeksiyon zamanında belirgin bir sinyal veremeyeceği anlaşılmaktadır.

Enjeksiyon süresi 10 saniye olan elektroferogramda da piklerin şeklinin keskin ve simetrik olduğu görülmektedir. Bu enjeksiyon

süresinde *kodeinin* de düşük konsantrasyonlarda belirgin bir sinyal verebileceği göz önüne alınarak, yapılacak çalışmalarda enjeksiyon süresinin 10 saniye ve enjeksiyon basıncının 40 mbar olarak uygulanmasına karar verildi.

4.1.3. Tekrarlanabilirlik Çalışması Sonuçları

Bölüm 3.4.4.'te anlatıldığı şekilde hazırlanan sentetik karışımın elektroferogramı şekil 11'de gösterilmiştir.



Şekil 11. *Parasetamol, kafein ve kodein fosfat* içeren sentetik karışımın elektroferogramı; Parasetamol (1998,0 µg/mL), kafein (99,6 µg/mL), kodein fosfat (62,0 µg/mL); Elektrolit Çözelti: % 10 metanol içeren 25 mM fosfat tamponu; Enjeksiyon süresi: 10 saniye

Hazırlanan sentetik karışım çözeltisinin 7 kez tekrarlanan ölçüm sonuçlarından elde edilen pik alanı, pik yüksekliği ve göç zamanı

değerleri ile hesaplanan ortalama, standart sapma (SD) ve bağıl standart sapma (RSD) değerleri Tablo 3’de gösterilmiştir.

Tablo 3. Tekrarlanabilirlik çalışması sonuçları

	<i>Parasetamol</i>			<i>Kafein</i>			<i>Kodein fosfat</i>		
	Pik Alanı	Pik Yüksekliği	Göç Zamanı	Pik Alanı	Pik Yüksekliği	Göç Zamanı	Pik Alanı	Pik Yüksekliği	Göç Zamanı
	2526,54834	362,48895	4,427	119,53727	47,38323	3,984	39,33578	20,45057	3,300
	2531,11768	351,04480	4,416	120,75073	47,73225	3,940	39,96278	20,34912	3,280
	2518,95020	347,04407	4,431	119,67509	47,43959	3,951	39,50307	20,16232	3,273
	2577,76270	364,55423	4,377	126,00547	47,51655	3,948	40,34583	20,17558	3,243
	2575,78052	376,59982	4,364	123,50389	47,56366	3,952	40,62750	20,14774	3,232
	2569,53882	375,66199	4,362	123,55623	47,42900	3,949	41,46445	20,50787	3,227
	2559,93140	378,20035	4,346	124,54987	47,38305	3,943	40,40873	20,18512	3,215
Ortalama	2551,37567	365,08489	4,389	122,51122	47,49248	3,952	40,23545	20,28262	3,253
SD*	25,077	12,557	0,035	2,531	0,125	0,015	0,722	0,151	0,032
RSD**	0,983	3,440	0,794	2,066	0,263	0,369	1,794	0,745	0,972

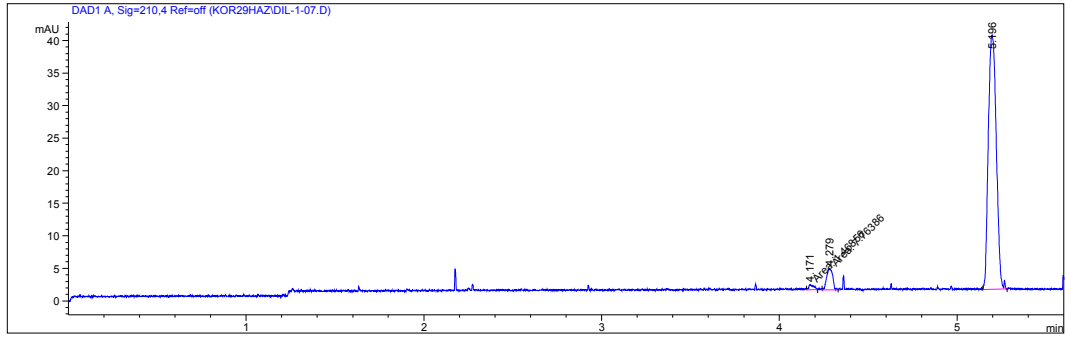
Tablo’dan görüldüğü gibi *parasetamole* ilişkin pik yüksekliği (RSD= 3,44) hariç tüm ölçümler için RSD değerleri 2,6’dan küçüktür. Bu da yöntemin tekrarlanabilirliğini gösterir.

*SD: Standart Sapma (SS)

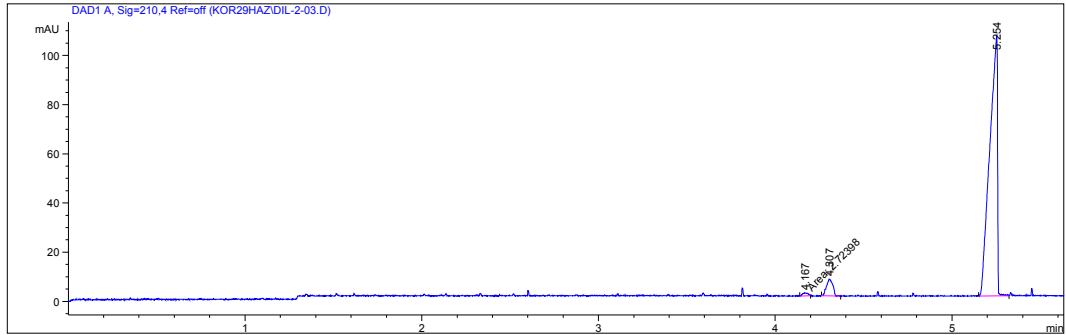
**RSD: Bağıl Standart Sapma (BSS)

4.2. Kalibrasyon Çalışması Sonuçları

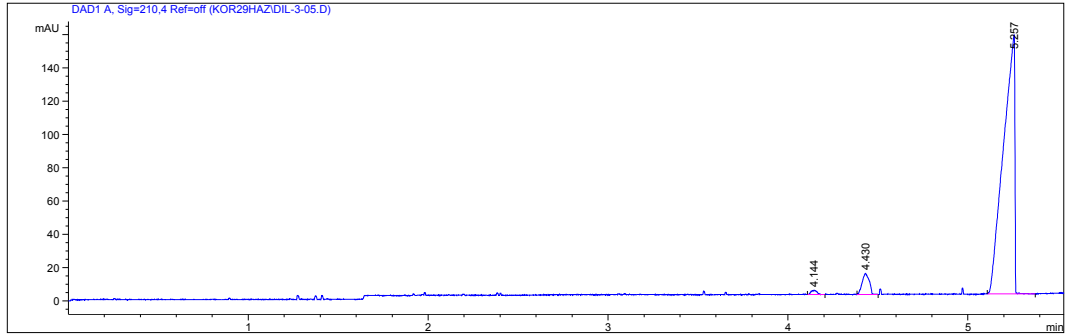
Kalibrasyon doğrusunu oluşturacak dilüsyonlar Bölüm 3.5.1.'de anlatıldığı şekilde hazırlanmış ve her bir dilüsyondan elde edilen elektroferogramlar Şekil 12-16'da gösterilmiştir.



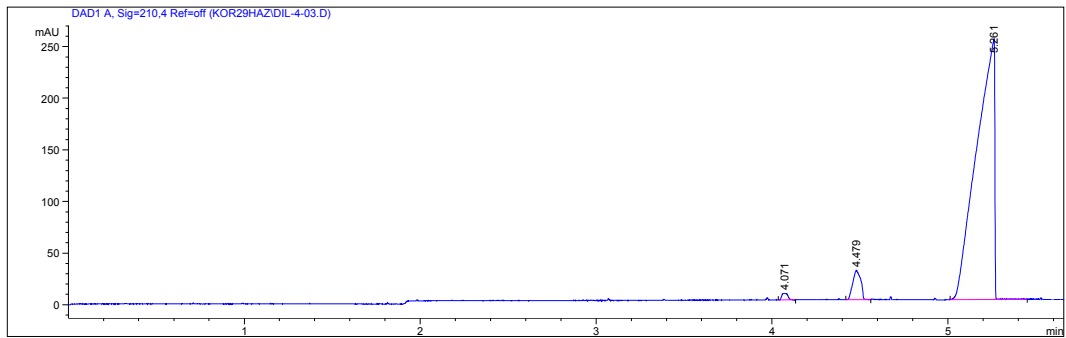
Şekil 12. 99,72 $\mu\text{g/mL}$ *parasetamol*, 5,752 $\mu\text{g/mL}$ *kafein* ve 1,84 $\mu\text{g/mL}$ *kodein fosfat* içeren çözeltinin elektroferogramı (Dilüsyon 1)



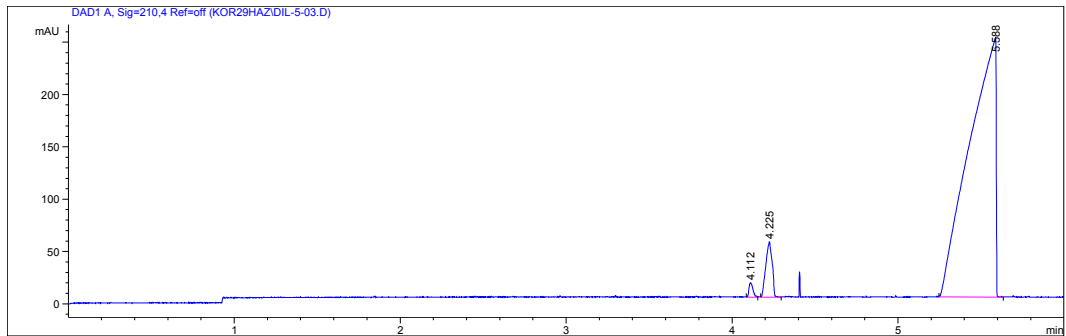
Şekil 13. 249,30 $\mu\text{g/mL}$ *parasetamol*, 14,38 $\mu\text{g/mL}$ *kafein* ve 4,60 $\mu\text{g/mL}$ *kodein fosfat* içeren çözeltinin elektroferogramı (Dilüsyon 2).



Şekil 14. 498,60 µg/mL *parasetamol*, 28,76 µg/mL *kafein* ve 9,20 µg/mL *kodein fosfat* içeren çözeltinin elektroferogramı (Dilüsyon 3).



Şekil 15. 1246,50 µg/mL *parasetamol*, 71,90 µg/mL *kafein* ve 23,00 µg/mL *kodein fosfat* içeren çözeltinin elektroferogramı (Dilüsyon 4).



Şekil 16. 1994,40 µg/mL *parasetamol*, 115,04 µg/mL *kafein* ve 36,40 µg/mL *kodein fosfat* içeren çözeltinin elektroferogramı (Dilüsyon 5).

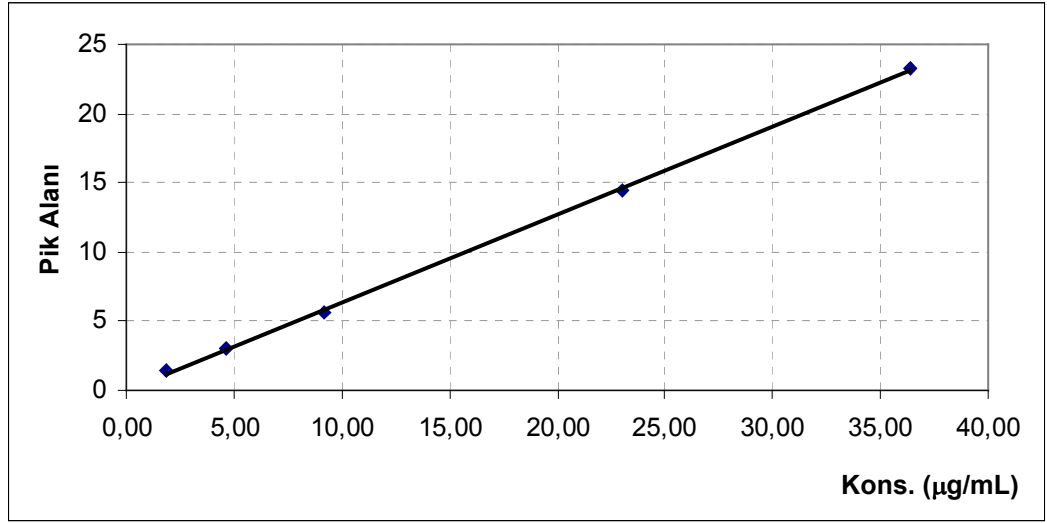
Bu elektroferogramlardan elde edilen her üç ölçüm sonucu pik alanı ortalama ve SD değerleri Tablo 4'te gösterilmiştir.

Tablo 4. Kalibrasyon Çözeltilerinin Konsantrasyon-Pik Alanı değerleri

Dil. No	Kodein Fosfat		Kafein		Parasetamol	
	Konsantrasyon (µg/mL)	Pik Alanı	Konsantrasyon (µg/mL)	Pik Alanı	Konsantrasyon (µg/mL)	Pik Alanı
1	1,84	1,3304	5,75	8,1930	99,72	122,8238
		1,4097		7,8062		122,4939
		1,4375		7,8104		122,1227
	Ortalama	1,3925	7,9365	122,4801		
	SD*	0,0556	0,2221	0,3508		
	RSD**	3,99	2,80	0,29		
2	4,60	3,0662	14,38	16,8477	249,30	318,9410
		3,1969		17,2979		319,3032
		2,9871		16,7985		319,3854
	Ortalama	3,0834	16,9814	319,2099		
	SD	0,1060	0,2752	0,2364		
	RSD	3,43	1,62	0,07		
3	9,20	5,4726	28,76	35,0396	498,60	643,3229
		5,5202		34,1138		674,9089
		5,7706		36,4043		680,1950
	Ortalama	5,5878	35,1859	666,1423		
	SD	0,1601	1,1523	19,9381		
	RSD	2,86	3,27	2,99		
4	23,00	14,5286	71,90	89,2020	1246,50	1791,8639
		14,6075		89,6712		1825,6472
		14,3447		88,2630		1791,9457
	Ortalama	14,4936	89,0454	1803,1523		
	SD	0,1349	0,7170	19,4812		
	RSD	0,93	0,81	1,08		
5	36,40	23,2513	115,04	143,7244	1994,40	2841,9597
		23,6066		147,7698		2957,1133
		22,9403		140,3822		2750,6126
	Ortalama	23,2661	143,9588	2849,8952		
	SD	0,3334	3,6994	103,4788		
	RSD	1,43	2,57	3,63		

*SD: Standart Sapma (SS) **RSD: Bağıl Standart Sapma (BSS)

Herbir analit için (*parasetamol, kafein ve kodein fosfat*) konsantrasyona ($\mu\text{g/mL}$) karşı ortalama pik alanı değerleri kullanılarak çizilen kalibrasyon doğruları Şekil 17, Şekil 18 ve Şekil 19'da görölmektedir.



Şekil 17. Kodein Fosfat kalibrasyon doğrusu

Doğrusal Konsantrasyon Aralığı: 1,84 – 36,40 $\mu\text{g/mL}$

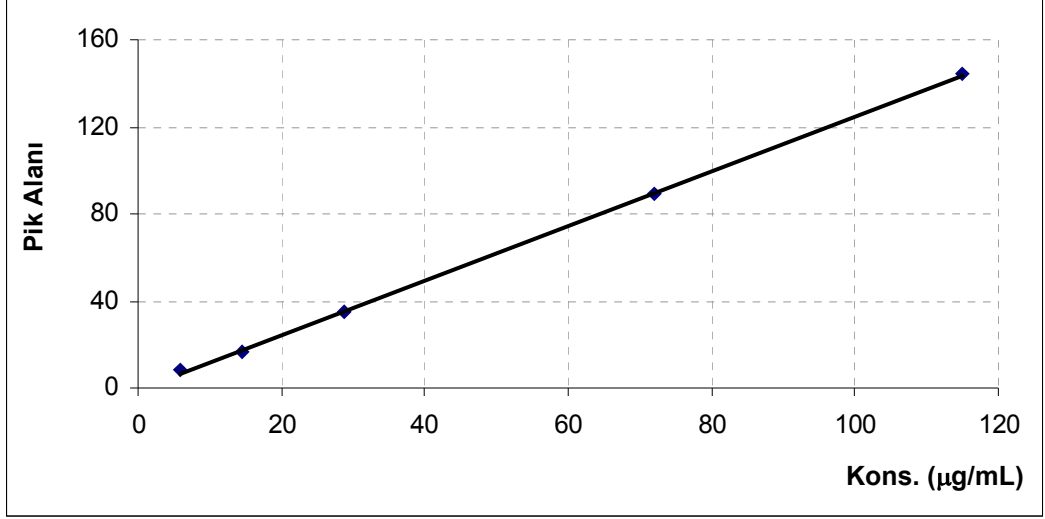
Kalibrasyon Doğrusunun Denklemini: $y = 0,634x + 0,049$

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

$\text{LOD}^{**} = 3 \cdot \text{SD} / m = 0,263 \mu\text{g/mL}$

$\text{LOQ}^{***} = 10 \cdot \text{SD} / m = 0,877 \mu\text{g/mL}$

*r: Regresyon Katsayısı **LOD: Gözlenebilme Sınırı ***LOQ: Tayin Alt Sınırı



Şekil 18. *Kafein* kalibrasyon doğrusu

Doğrusal Konsantrasyon Aralığı: 5,75 – 115,04 µg/mL

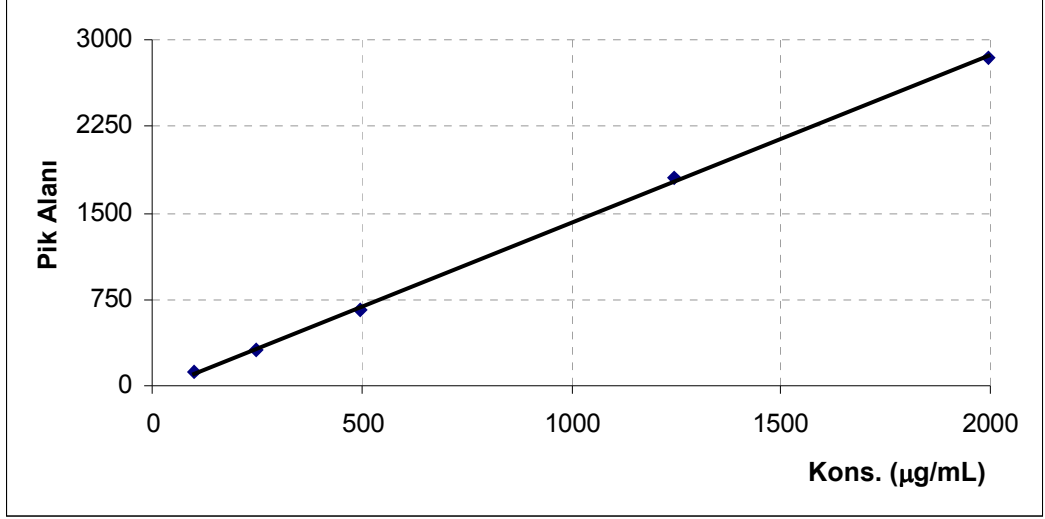
Kalibrasyon doğrusunun denklemi: $y = 1,2507 x - 0,3702$

$r = 0,9999$, $R^2 = 0,9998$

LOD = 0,533 µg/mL

LOQ = 1,776 µg/mL

r: Regresyon Katsayısı LOD: Gözlenebilme Sınırı LOQ: Tayin Alt Sınırı



Şekil 19. *Parasetamol* kalibrasyon doğrusu

Doğrusal Konsantrasyon Aralığı: 99,72 – 1994,40

Kalibrasyon doğrusunun denklemi: $y = 1,4527 x - 35,713$

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

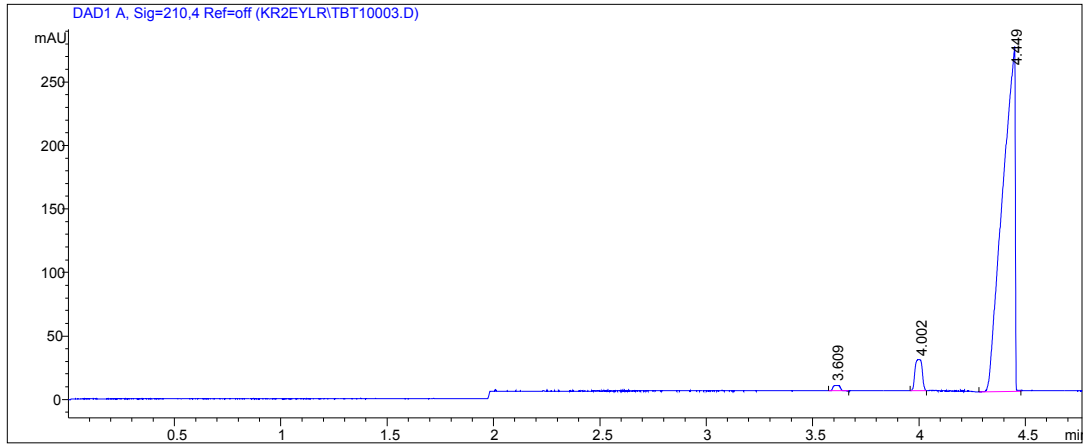
LOD = 0,724 µg/mL

LOQ = 2,415 µg/mL

r: Regresyon Katsayısı LOD: Gözlenebilme Sınırı LOQ: Tayin Alt Sınırı

4.3. Tabletlerde Etken Madde Miktar Tayini Sonuçları

Kapiler elektroforez yöntemi ile tabletlerden *parasetamol*, *kafein* ve *kodein fosfat* tayini için Bölüm 3.6.'da anlatılan yol izlenmiş ve bu yolla elde edilen bir tablet tozu çözeltisi elektroferogramı Şekil 20'de gösterilmiştir.



Şekil 20. *Parasetamol*, *kafein* ve *kodein fosfat* içeren tablet çözeltisinin elektroferogramı; *Parasetamol* (794,07 $\mu\text{g/mL}$), *kafein* (99,6 $\mu\text{g/mL}$), *kodein fosfat* (15,88 $\mu\text{g/mL}$); Elektrolit Çözelti: % 10 metanol içeren 25 mM fosfat tamponu; Enjeksiyon süresi: 10 saniye

4.3.1. Tabletlerde *Parasetamol* Miktar Tayini Sonuçları

Tabletlerde *parasetamol* miktar tayini için Bölüm 3.6.'da anlatılan yol izlenmiş ve sonuçlar Tablo 5'te gösterilmiştir.

Tablo 5. Tabletlerde *Parasetamol* Miktar Tayini Sonuçları

Tablet No.	Bulunan Miktar (mg/tablet)	Belirtilen Miktar (500 mg/tablet)
1	500,14	$\bar{X} = 500,35$ SD*= 1,00 %RSD**= 0,20 $t.SD/\sqrt{n} = 1,25$ Güven Aralığı = 499,10 - 501,60 p= 0,05
2	500,34	
3	499,42	
4	502,03	
5	499,81	

SD: SS, RSD*: BSS

4.3.2. Tabletlerde *Kafein* Miktar Tayini Sonuçları

Tabletlerde *kafein* miktar tayini için Bölüm 3.6.'da anlatılan yol izlenmiş ve sonuçlar Tablo 6'da gösterilmiştir.

Tablo 6. Tabletlerde *Kafein* Miktar Tayini Sonuçları

Tablet No.	Bulunan Miktar (mg/tablet)	Belirtilen Miktar (30 mg/tablet)
1	29,51	$\bar{X} = 29,43$ SD= 0,55 %RSD= 1,88 $t.SD/\sqrt{n} = 0,68$ Güven Aralığı = 28,75 - 30,11 p= 0,05
2	29,12	
3	29,01	
4	29,14	
5	30,36	

*SD:SS RSD:BSS

4.3.3. Tabletlerde Kodein Fosfat Miktar Tayini Sonuçları

Tabletlerde *kodein* fosfat miktar tayini için Bölüm 3.6.'da anlatılan yol izlenmiş ve sonuçlar Tablo 7'de gösterilmiştir.

Tablo 7. Tabletlerde *Kodein Fosfat* Miktar Tayini Sonuçları

Tablet No.	Bulunan Miktar (mg/tablet)	Belirtilen Miktar (10 mg/tablet)
1	9,84	$\bar{X} = 9,92$ SD= 0,09 %RSD= 0,90 $t.SD/\sqrt{n} = 0,11$ Güven Aralığı = 9,81-10,03 p= 0,05
2	9,99	
3	10,02	
4	9,82	
5	9,90	

*SD:SS RSD:BSS

4.4. Geri Kazanım Çalışmaları

4.4.1. Parasetamol Geri Kazanım Sonuçları

Parasetamol geri kazanım çalışması için Bölüm 3.7.'de anlatılan yol izlenmiş ve sonuçlar Tablo 8'de gösterilmiştir.

Tablo 8. Parasetamol için Geri Kazanım Çalışması Sonuçları

No.	Eklene Konsantrasyon (µg/mL)	Bulunan Konsantrasyon (µg/mL)	% Geri Kazanım	$\bar{X} = 102,4$ SD = 1,39 % RSD = 1,36 $t.SD / \sqrt{n} = 3,5$ Güven Aralığı = 98,9 – 105,9 p= 0,05
1	120,17	121,33	101,0	
2	125,17	129,85	103,7	
3	130,18	133,53	102,6	

*SD:SS RSD:BSS

4.4.1. Kafein Geri Kazanım Sonuçları

Kafein geri kazanım çalışması için Bölüm 3.7.'de anlatılan yol izlenmiş ve sonuçlar Tablo 9'da gösterilmiştir.

Tablo 9. Kafein için Geri Kazanım Çalışması Sonuçları

No.	Eklene Konsantrasyon (µg/mL)	Bulunan Konsantrasyon (µg/mL)	% Geri Kazanım	$\bar{X} = 98,0$ SD = 0,84 % RSD = 0,86 $t.SD / \sqrt{n} = 2,1$ Güven Aralığı= 95,9 – 100,1 p= 0,05
1	7,42	7,20	97,00	
2	7,72	7,61	98,60	
3	8,03	7,90	98,40	

*SD:SS RSD:BSS

4.4.1. Kodein Fosfat Geri Kazanım Sonuçları

Kodein fosfat geri kazanım çalışması için Bölüm 3.7.'de anlatılan yol izlenmiş ve sonuçlar Tablo 10'da gösterilmiştir.

Tablo 10. *Kodein* fosfat için Geri Kazanım Çalışması Sonuçları

No.	Eklenen Konsantrasyon (µg/mL)	Bulunan Konsantrasyon (µg/mL)	% Geri Kazanım	$\bar{X} = 96,9$ SD = 1,03 % RSD = 1,07 $t.SD / \sqrt{n} = 2,6$ Güven Aralığı= 94,3 – 99,5 p= 0,05
1	2,49	2,42	97,2	
2	2,60	2,49	95,8	
3	2,70	2,64	97,8	

*SD:SS RSD:BSS

TARTIŞMA VE SONUÇ

Çalışmamızda, *parasetamol*, *kafein* ve *kodein fosfat* etken maddelerini içeren farmasötik tabletlerde herbir etken maddenin aynı anda miktar tayinine imkan veren duyarlı bir yöntem geliştirilmesi planlanmıştır.

Parasetamol, analjezik ve antipiretik etki gösteren, günümüzde aspirinden sonra en çok kullanılan ve birçok ülkede aspirin ve fenasetine alternatif bir ilaç etken maddesidir. *Parasetamol*, genellikle 500 mg etken madde içeren tablet formunda bulunmakla beraber, kapsül, damla, eliksir, süspansiyon ve supozituar formları da bulunmaktadır.

Kodein, bir morfin türevidir. Morfinin çok güçlü analjezik ve antitussif etkisi de olmasına rağmen, metillenmiş türevi olan *kodein* kayda değer bir analjezik etki göstermez, ancak antitussif etkisi vardır. Bu yüzden *kodein*, farmasötik preparatlarda genellikle antitusif ve sedatif olarak kullanılır. Fakat *kodeinin* diğer analjezik maddelerle birlikte kullanımı onların analjezik etkinliğini artırır. Kodein, farmasötik formlarda genellikle suda çözünen fosfat tuzu halinde bulunur.

Kafein, çayda ve kahvede doğal olarak bulunan ve diğer içeceklere katılan stimülan bir maddedir. Bazı analjezik ilaç formülasyonlarına stimulan etkisi nedeniyle katılır, fakat analjezik etkisi yoktur.

Parasetamol, kafein ve kodein fosfat'ı bir arada içeren ikili ve üçlü karışım halinde farmasötik preparatlar bulunmaktadır. Bu preparatlarda *kodein, parasetamol*ün analjezik etkisini artırmakta ve hafif sedatif etki göstermektedir, *kodein*den kaynaklanan sedatif etkiyi azaltmak için de *kafein* kullanılmaktadır.

Literatürlerde, adı geçen etken maddeleri ikili veya üçlü olarak içeren karışımların analizleri genellikle kromatografik yöntemlerde özellikle de yüksek basınçlı sıvı kromatografisinde yoğunlaşmıştır. *Parasetamol, kafein* ve *kodein fosfat*ı bir arada içeren tabletlerde miktar tayini için bir yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yöntemi geliştirilmiş ve valide edilmiştir³⁷. Kapiler Elektroforez yöntemi ile farmasötik tabletlerde *parasetamol, kafein* ve *kodein fosfat* miktar tayinine yönelik bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Kapiler elektroforez, elektriksel ortamda iyonların hareketine dayalı bir yöntem olduğu için kullanılan elektrolit çözeltinin pH değeri ve konsantrasyonu ayrımı büyük ölçüde etkilemektedir. Bu yüzden analizlerde küçük pH değişimlerini tolere edebilmek için tampon çözeltilerle çalışılır.

Çalışmamızda seçilen analitlerin sulu çözeltileri zayıf bazik özellik gösterdikleri için bazik bir tampon çözelti ile çalışılması düşünülmüştür. Literatürde *kodein* ve *parasetamol*ün kapiler elektroforez ile miktar tayinlerinde genellikle pH 6,8 fosfat tamponu kullanılmıştır. Bu nedenle çalışmalara fosfat tamponu ile başlanmıştır. Ancak pH 6,8 fosfat

tamponu ile üçlü karışımın ayrımı gerçekleştirilememiş ve pH'ın 8,5 civarına çekilmesi ile iyi bir rezolüsyon (ayırma gücü) sağlanabilmiştir. Çalışma tamponunun konsantrasyonunu belirlemek için 20 mM ve 25 mM fosfat tamponu çözeltileri hazırlanmış ve bu çözeltilere *parasetamol*ün çözünürlüğünü sağlamak üzere % 10'u kadar metanol eklenmiştir. 20 mM fosfat tamponu ile yapılan çalışmalarda herbir analit için elde edilen pikler arasındaki rezolüsyon yüksektir. Ancak ayırım süresi uzundur. *Parasetamol* en son ve 8. dakikadan sonra çıkmıştır. Oysa 25 mM fosfat tamponu ile yapılan çalışma yaklaşık 5 dakikada tamamlanmış ve pikler arasında yeterli rezolüsyon ($R=2,312$) elde edilmiştir. Her iki konsantrasyondaki tampon çözeltilerle de 27 kV voltaj uygulanarak çalışılmıştır. 20 mM tampon çözelti ile akım 34 μA iken, 25 mM tampon çözelti ile akım 42 μA 'e yükselmiştir. Bu durum, 25 mM'da ortamın iyon şiddetindeki artışa paralel olarak elektro osmotik akışın artması ve dolayısıyla migrasyon sürelerinin değişmesini açıklamaktadır.

Çalışılan tabletteki analitlerin miktarları (50:3:1) birbirlerinden oldukça farklıdır. Herbir tabletin 500 mg *parasetamol*, 30 mg *kafein* ve 10 mg *kodein fosfat* içerdiği belirtilmiştir. Miktarı çok yüksek olan *parasetamol*ün suda az çözündüğü dikkate alınarak daha önce bahsedildiği gibi çalışma tamponuna % 10'u kadar metanol ilave edilmiştir.

Daha sonraki analizlerde çalışma tamponu (elektrolit çözelti) olarak, % 10 metanol içeren 25 mM fosfat tamponu kullanılmıştır. Kullanılan

Çalışma tamponunun pH'ı 8,5 olarak ölçülmüş ve pH ayarlamasına gerek kalmamıştır.

alışmalar sırasında numune verme yöntemi olarak hidrodinamik enjeksiyon kullanılmış ve enjeksiyon basıncı 40 mBar'a ayarlanmıştır.

Enjeksiyon süresi optimizasyonu için, etken maddeleri belirtilen oranlarda içeren bir çözelti hazırlanmış ve 5, 10 ve 15 saniye enjeksiyon sürelerinde analizler yapılmıştır. Bu sırada enjeksiyon basıncı 40 mBar'da sabit tutulmuştur ve uygulanan voltaj 27 kV'dur.

Enjeksiyon süresinin 15 saniye olduğu elektroferogramda piklerin genişlediği, pik simetrisinin bozulduğu ve *kafein* ile *parasetamol* piklerinin analiz için yeterli rezolüsyonda ayırım sağlamadıkları görölmüştür.

Enjeksiyon süresinin 5 saniye olduğu elektroferogramda ise piklerin şeklinin keskin ve simetrik olduğu görölmüştür. Ancak konsantrasyonu çok düşük olan *kodein* tayini için duyarlılığın yeterli olmayacağı anlaşılmıştır.

Enjeksiyon süresinin 10 saniye olduğu elektroferogramda da piklerin şeklinin keskin ve simetrik olduğu görölmüştür. Bu enjeksiyon süresinde *kodeinin* de duyarlılığının daha yüksek olması nedeniyle 10 saniyelik sürenin uygun olduğuna karar verilmiştir.

Tüm çalışma boyunca 56 cm uzunlukta (47,5 cm efektif uzunluk) ve 50 µm iç çapta kapiler kullanılmış ve iyi bir rezolüsyon ve kısa analiz süresi elde edildiği için farklı çap ve uzunlukta kapiler denenmesine gerek kalmamıştır.

Geliştirilen yöntemin tekrarlanabilirliğini belirlemek amacıyla, hazırlanan sentetik karışım çözeltisinin belirtilen çalışma koşullarında 7 kez enjeksiyonu yapılmıştır. Herbir analit için elde edilen pik alanı, pik yüksekliği ve migrasyon zamanı verilerinin ortalama, standart sapma ve bağıl standart sapma değerleri hesaplanmıştır. Her üç analit için de elde edilen bağıl standart sapma değerleri, yöntemin tekrarlanabilirliğinin iyi olduğunun göstergesidir. Miktar tayini hesaplamalarında pik alanı değerleri kullanılmıştır.

Kalibrasyon çalışmasında, üçlü kalibrasyon yapılmıştır. Yani herbir dilüsyon, analitlerin üçünü de birlikte içermektedir. Böylece kalibrasyona ortamdan gelebilecek etkiler minimuma indirilmiştir. Herbir analit 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. Üçlü karışım halinde kalibrasyon yapıldığı için tablette miktarı diğer etken maddelere oranla oldukça yüksek olan *parasetamol*'ün standart sapma değeri yüksek

çıkmiştir. Bu da *parasetamol* için hesaplanan LOD ve LOQ değerlerinin bu çalışma için yükselmesine neden olmuştur.

Tabletlerde önerilen yöntemle *parasetamol*, *kafein* ve *kodein fosfat* miktar tayini çalışmalarında elde edilen ortalama değerler, tablet üzerinde belirtilen değerlerle uyumludur. Tablet 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, *Parasetamol* için % 102,4 ve % 102,4±3,5; *kafein* için % 98 ve % 98±2,1; *kodein fosfat* için % 96,9 ve % 96,9±2,6 dır. Her üç analit için de 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 (5 dakika) olduğu bulunmuştur. Sonuç olarak, geliştirilen yöntemin *parasetamol*, *kafein* ve *kodein fosfatın* miktar tayinleri için uygun olduğu görülmüştür.

ÖZET**Kapiler Elektroforez Yöntemiyle Farmasötik Tabletlerde *Parasetamol*,
Kafein ve *Kodein* Miktar Tayini**

Parasetamol, *kafein* ve *kodein* fosfat üçlü karışımlarını içeren farmasötik preparatlarda bu etken maddelerin analizi için yeni bir kapiler elektroforez yöntemi geliştirilmiştir. En iyi sonuçlar, % 10 metanol içeren 25 mM pH 8,5 fosfat tamponu kullanılarak elde edilmiştir. Ayrım, erimiş silika kapilerde (50 µm iç çap, 56 cm toplam uzunluk, 47,5 cm efektif uzunluk), 25°C'de ve 40 mbar basınç altında 10 s hidrodinamik enjeksiyon ile 27 kV potansiyel uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Dedeksiyon dalgaboyu 210 nm'dir. Bu koşullar altında göç zamanları *parasetamol* için 4,427, *kafein* için 3,952 ve *kodein* için 3,253 dakika olarak bulunmuştur. Doğrusal konsantrasyon aralığı *parasetamol* için 99,72 – 1994,40 µg/mL, *kafein* için 5,75 – 115,04 µg/mL ve *kodein* fosfat için 1,84 – 36,40 µg/mL'dir. LOD değerleri *parasetamol* için 0,724 µg/mL, *kafein* için 0,533 µg/mL ve *kodein* fosfat için 0,263 µg/mL olarak bulunmuştur. LOQ değerleri *parasetamol* için 2,415 µg/mL, *kafein* için 1,776 µg/mL ve *kodein* fosfat için 0,877 µg/mL olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçlara göre yöntem duyarlı, spesifik ve tekrarlanabilirdir.

Anahtar Kelimeler: *Parasetamol*; *Asetaminofen*; *Kafein*; *Kodein*; Kapiler Elektroforez

SUMMARY

Quantitative determination of paracetamol, caffeine and codeine in pharmaceutical tablets by capillary electrophoresis

A new capillary electrophoresis method has been developed to analyze the pharmaceutical preparations containing ternary combination of paracetamol, caffeine and codeine phosphate. Best results were obtained by using a background electrolyte solution consist of 25 mM pH 8,5 phosphate buffer containing % 10 methanol. The separation was performed through a fused silica capillary (50 μm internal diameter, 56 cm total length, 47,5 cm effective length) at 25 °C with the application of 10 s of hydrodynamic injection at 40 mbar pressure and a potential of 27 kV. Detection wavelength was 210 nm. Under these conditions, the migration times were found to be 4,427 min for paracetamol, 3,952 min for caffeine, and 3,253 min for codeine phosphate. Linearity ranges for the method were determined as 99,72 – 1994,40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for paracetamol, 5,75 – 115,04 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for caffeine and 1,84 – 36,80 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for codeine phosphate. Limit of detections were found as 0,724 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for paracetamol, 0,533 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for caffeine and 0,263 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for codeine phosphate. Limit of quantitations were found as 2,415 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for paracetamol, 1,776 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for caffeine and 0,877 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for codeine phosphate. According to the obtained results, the method is sensitive, specific and repeatable.

Keywords: Paracetamol; Acetaminophen; Caffeine; Codeine; Capillary Electrophoresis.

KAYNAKLAR

- 1) The Merck Index, An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals, 13th Ed. Whitehouse Station, NJ 2001
- 2) Kayaalp O. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, Yedinci Baskı, 2. Cilt, Feryal Matbaacılık, Ankara, 1995
- 3) Proksa B. Capillary zone electrophoretic separation of epimeric n-oxides of morphinan alkaloids. J.Chromatogr A 1998; 818: 251-256.
- 4) Pascual JA, Sanagustin J. Fully automated analytical method for codeine quantification in human plasma using on-line solip-phase extraction and high-performarce liquid chromatography with ultraviolet dedection. J. Chromatogr. B 1999; 724: 295-302.
- 5) Değim T, Akay C, Büyükafşar K, Cevheroğlu Ş. Simultaneous determination of codeine and ethyl morphine HCl in tablet formulations using LC. J. Pharm.Biomed. Anal. 2001; 26: 15-21.
- 6) The United States Pharmacopoeia 26, US Pharmacopoeial Convention, Inc., Rockville, 2003
- 7) Hood DJ, Cheung HY. A chromatographic method for rapid and simultaneous analysis of codeine phosphate, ephedrine hcl and chlorpheniramine maleate in cough-cold syrup formulation. J. Pharm.Biomed. Anal. 2003; 30: 1595-1601.
- 8) British Pharmacopoeia 2004, Volume 1-2, Her Majesty's Stationary Office, London, 2004.
- 9) Gomez MR, Sombra L, Olsina RA, Martinez DL, Silva MF. Development and validation of a capillary electrophoresis method for the determination of codeine, diphenhydramine, ephedrine and noscapine in pharmaceuticals. Il Farmaco 2005; 60: 85-90.

- 10) Lin YH, Lee MR, Lee RJ, Ko WK, Wu SH. Hair analysis for methamphetamine, ketamine, morphine and codeine by cation-selective exhaustive injection and sweeping micellar electrokinetic chromatography. *J. Chromatogr. A* 2006; 1145: 234-240.
- 11) Horie H, Mukai T, Kohata K. Simultaneous determination of qualitatively important components in green tea infusions using capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* 1997; 758: 332-335.
- 12) Walker JC, Saugg SE, Walker EB. Analysis of beverages by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* 1997; 781: 481-485.
- 13) Lee BL, Ong CN. Comperative analysis of tea catechins and theaflavins by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* 2000; 881: 439-447.
- 14) Wang A, Li L, Zang F, Fang Y. Amperometric detection of three purine alkaloids following their separation by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Anal. Chim. Acta* 2000; 419: 235-242.
- 15) Ferreyra CF, Ortiz CS. Simultaneous spectrophotometric determination of phenilpropanolamine HCl, caffeine and diazepam in tablets. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2002; 29: 811-818.
- 16) Zhang QL, Lian HZ, Wang WH, Chen HY. Separation of caffeine and theophylline in poly(dimethylsiloxane) microchannel electrophoresis with electrochemical detection. *J. Chromatogr A* 2005; 1098: 172-176.
- 17) Regan F, Shakalisava Y. Rapid simultaneous determination of alkylxanthines by CZE and its application in analysis of pharmaceuticals and food samples. *Anal. Chim. Acta* 2005; 540: 103-110.
- 18) Singh DK, Sahu A. Spectrophotometric determination of caffeine and theophylline in pure alkaloids and its application in pharmaceutical formulations. *Anal. Biochem.* 2006; 349: 176-180.

- 19) Tzanavaras PD, Themelis DG. Development and validation of a high-throughput high-performance liquid chromatographic assay for the determination of caffeine in food samples using a monolithic column. *Anal. Chim. Acta* 2007; 581: 89–94.
- 20) Ramos ML, Tyson JF, Curran DJ. Determination of acetaminophen by flow injection with on-line chemical derivatization: investigations using visible and FTIR spectrophotometry. *Anal. Chim. Acta* 1998; 364: 107-116.
- 21) Nagaraja P, Murthy KCS, Rangappa KS. Spectrophotometric method for the determination of paracetamol and phenacetin. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1998; 17: 501-506.
- 22) Medina AR, Cordova MLF, Diaz AM. A very simple resolution of the mixture paracetamol and salicylamide by flow injection-solid phase spectrophotometry. *Anal. Chim. Acta* 1999; 394: 149-158.
- 23) Shervington LA, Sakhnini N. A quantitative and qualitative high performance liquid chromatographic determination of acetaminophen and five of its para-substituted derivatives. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2000; 24: 43-49.
- 24) Canada MJA, Reguera MIP, Medina AR, Cordova MLF, Diaz AM. Fast determination of paracetamol by using a very simple photometric flow-through sensing device. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2000; 22:, 59-66.
- 25) Monser L, Darghouth F. Simultaneous LC determination of paracetamol and related compounds in pharmaceutical formulations using a carbon-based column. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2002; 27: 851-860.
- 26) Oliva MA, Olsina RA, Masi AN. Selective spectrofluorimetric method for paracetamol determination through coumarinic compound formation. *Talanta* 2005; 66: 229-235.

- 27) Moreira AB, Oliveira HPM, Atvars TDZ, Dias ILT, Neto GO, Zagatto EAG, Kubota LT. Direct determination of paracetamol in powdered pharmaceutical samples by fluorescence spectroscopy. *Anal. Chim. Acta* 2005; 539: 257–261.
- 28) Zhao S, Bai W, Yuan H, Xiao D. Dedection of paracetamol by capillary electrophoresis with chemiluminescence dedection. *Anal. Chim. Acta* 2006; 559: 195-199.
- 29) Azhagvuel S, Sekar R. 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.
- 30) Felix FS, Brett CMA, Angnes L. Carbon film resistor electrode for amperometric determination of acetaminophen in pharmaceutical formulations. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2007; 43: 1622-1627.
- 31) Hanaee J. Simultaneous determination of acetaminophen and codeine in pharmaceutical preparations by derivative spectrophotometry. *Pharm. Acta Helvetiae* 1997; 72: 239-241.
- 32) Zen JM, Ting YS. Simultaneous determination of caffeine and acetaminophen in drug formulations by square-wave voltammetry using a chemically modified electrode. *Anal. Chim. Acta* 1997; 342: 175-180.
- 33) Medina AR, Cordova MLF, Diaz AM. Simultaneous determination of paracetamol, caffeine and acetylsalicylic acid by means of a FI ultraviolet PLS multiptosensing device. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1999; 21: 983-992.
- 34) Dinç E. A comperative study of the ratio spectra derivative spectrophotometry, Vierordt's method and high-performance liquid chromatography applied to the simultaneous analysis of caffeine and paracetamol in tablets. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1999; 21: 723-730.

- 35) Qare AWA, Donia MBA. A validated HPLC method for the determination of pyridostigmine bromide, acetaminophen, acetylsalicylic acid and caffeine in rat plasma and urine. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2001; 26: 939-947.
- 36) Kartal M. LC method for the analysis of paracetamol, caffeine and codeine phosphate in pharmaceutical preparations. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2001; 26: 857-864.
- 37) Altun ML, Ceyhan T, Kartal M, Atay T, Özdemir N, Cevheroğlu Ş. LC method for the analysis of ecetylsalicylic acid, caffeine and codeine phosphate in pharmaceutical preparations. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2001; 25: 93-101.
- 38) Dinç E, Baleanu D. Two new spectrophotometric approaches to the multicomponent analysis of the acetaminophen and caffeine in tablets by classical least-squares and principal component regression techniques. *Il Farmaco* 2002; 57: 33-37.
- 39) Franeta JT, Agbaba D, Eric S, Pavkov S, Aleksic M, Vladimirov S. HPLC assay of acetylsalicylic acid, paracetamol, caffeine and phenobarbital in tablets. *Il Farmaco* 2002; 57: 709-713.
- 40) Sena MM, Poppi RJ. N-ways PLS applied to simultaneous spectrophotometric determination of acetylsalicylic acid, paracetamol and caffeine. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2004; 34: 27-34.
- 41) Pistos C, Stewart JT. Assay for the simultaneous determination of acetaminophen–caffeine–butalbital in human serum using a monolithic column. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2004; 36: 737–741.
- 42) Peiro MEC, Bose D, Rubert MF, Romero JE. Optimization of a capillary electrophoresis method by using a central composite factorial design for the determination of codeine and paracetamol in pharmaceuticals. *J. Chromatogr. B* 2006; 839: 95-101.

- 43) Algaba CM, Saldana JMB, Camanas RMV, Sagrado S, Hernandez, MJM. Analysis of pharmaceutical preparations containing antihistamine drugs by micellar liquid chromatography. J. Pharm. Biomed. Anal. 2006; 40: 312-321.
- 44) Emre D, Özaltın N. Simultaneous determination of paracetamol, caffeine and propylphazone in ternary mixtures by micellar electrokinetic capillary chromatography. J. Chromatogr B 2006.
- 45) Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA: Enstrümantal Analiz İlkeleri, Çeviri Editörleri: Kılıç E, Köseoğlu F, Yılmaz H. 1. Baskı, Bilim Yayıncılık, Ankara, (1998).

EK

Tez çalışmalarım sırasında çalışmalarına yön veren ve yardımlarını esirgemeyen hocam Sayın Doç.Dr.Nilgün GÜNDEN GÖĞER'e saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamın her aşamasında karşılaştığım her türlü sorunda ilgi, tecrübe ve yardımlarıyla destek olan Sayın Doç.Dr.Nusret ERTAŞ'a teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Tez çalışmama verdiği desteklerden dolayı Sayın Prof.Dr. M. Tefik ORBEY'e teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarımnda benden yardımlarını esirgemeyen ve destek olan meslektaşım Sayın Özlem BARAN'a teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Laboratuar çalışmalarımnda beni yalnız bırakmayan Sayın Selma KARAKAYA'ya teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Çalışmalarımnda teşvik ve desteklerini esirgemeyen Jandarma Kriminal Daire Başkanlığına teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Her zaman bana destek olan, tez çalışmalarım sırasında büyük bir sabır gösteren aileme saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

ÖZGEÇMİŞ

Adı : Koray

Soyadı : ÇAKIR

Doğum Yeri ve Tarihi: ISPARTA 09.01.1973

Eğitimi: Yüksek Lisans Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Anabilim Dalı /ANKARA (2004 - 2007)

Lisans:Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü/İZMİR (1990 - 1995)

Ağlasun Lisesi / BURDUR (1986 - 1989)

50. Yıl İlk Okulu Ağlasun/BURDUR

Yabancı Dili: İngilizce

Çalıştığı İşyeri: Jandarma Kriminal Daire Başkanlığı (Kasım 2002 -)

(Narkotik Madde Analiz Uzmanı)