

Olopatadin HCl' in İlaçlarda Tayini İçin Kapiler Elektroforez Kullanarak
Yeni Yöntem Geliştirilmesi

Tuğba Turan

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimya Anabilim Dalı

Aralık 2015

Development of New Method for The Determination of Olopatadine HCl in
Pharmaceutical Product Using Capillary Electrophoresis

Tuğba Turan

MASTER OF SCIENCE THESIS

Department of Chemistry

December 2015

Olopatadin HCl' in İlaçlarda Tayini İçin Kapiler Elektroforez Kullanarak
Yeni Yöntem Geliştirilmesi

Tuğba Turan

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca
Kimya Anabilim Dalı
Analitik Kimya Bilim Dalında
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Doç. Dr. Tufan Güray

Aralık 2015

ONAY

Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Tuğba Turan' ın YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı “Olopatadin HCl’ in İlaçlarda Tayini İçin Kapiler Elektroforez Kullanarak Yeni Yöntem Geliştirilmesi” başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek oy birliği ile kabul edilmiştir.

Danışman: Doç. Dr. Tufan Güray

Yüksek Lisans Tez Savunma Jürisi

Üye: Doç. Dr. Tufan Güray

Üye: Prof. Dr. Ülkü Dilek Uysal

Üye: Prof. Dr. Sibel Akar

Üye: Prof. Dr. Ebru Birlik Özkütük

Üye: Doç. Dr. Duygu Yeniceli Uğur

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun tarih ve
..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Hürriyet ERŞAHAN

Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım klavuzuna göre, Doç. Dr. Tufan Güray danışmanlığında hazırlamış olduğum “Olopatadin HCl’ in İlaçlarda Tayini İçin Kapiler Elektroforez Kullanarak Yeni Yöntem Geliştirilmesi ” başlıklı YÜKSEK LİSANS tezimin özgün bir çalışma olduğunu; tez çalışmamın tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; tezimde verdiğim bilgileri, verileri akademik ve bilimsel etik ilke ve kurallara uygun olarak elde ettiğimi; tez çalışmamda yararlandığım eserlerin tümüne atıf yaptığımı ve kaynak gösterdiğimi ve bilgi, belge ve sonuçları bilimsel etik ilke ve kurallara göre sunduğumu beyan ederim.
15/12/2015

.....

Tuğba Turan
İmza

ÖZET

Bu çalışmada, göz damlası olarak kullanılan bazı ilaçların etken maddesi olan Olopatadin HCl (OLO) 'nin kapiler zon elektroforez (CZE) ile tayini için hassas ve seçici ayırma koşulları araştırılmıştır.

Tampon derişimi, tampona eklenen organik çözücülerin miktarı, pH, tamponun viskozitesi, kolon sıcaklığı, enjeksiyon hacmi, enjeksiyon süresi optimize edilmiştir. Analizler 20 mM, %15 (h/h) asetonitril içeren pH= 9,5 sodyum tetraborat tamponu kullanılarak, 50mbar'da 10 s enjeksiyon ile, 205 nm dalgaboyunda, 30 °C'da ve 25 kV potansiyel uygulanarak yapılmıştır. Uygun koşullar belirlendikten sonra yöntemin hassasiyetini ve tekrarlanabilirliğini arttırmak için uygun bir iç standart (IS) belirlenmiştir. Sistem için uygun olan metil paraben IS olarak kullanılmıştır. Geliştirilen yöntemin doğruluk, kesinlik, doğrusallık, geri kazanım, tayin sınırı (LOQ) ve gözlenebilme sınırı (LOD) gibi validasyon parametreleri araştırılmıştır. Bu yöntem OLO'nun tayini için göz damlası ilacına başarıyla uygulanmıştır. Bu çalışma OLO'nun CZE ile tayini açısından özgün bir çalışmadır.

Anahtar Kelimeler: Kapiler zon elektroforez, olopatadin, farmasötik

SUMMARY

In this study, sensitive and selective separation conditions were investigated with the capillary electrophoresis for the determination of Olopatadine HCl (OLO) which is an active ingredient of some medicines used as an eye drops.

Buffer concentration, the quantity of the organic solvents added to buffer, pH the viscosity of the buffer, column temperature injection volume, injection time were optimized. Analyses were made using a run buffer consisting of 20 mM sodium tetraborate buffer of 15% ACN (acetonitrile) with pH 9.5, applying 50 mbar of pressure s at 10 s, at 205 nm and at 30 °C of fixed temperature. Certain parameters were used to find a suitable IS increases the repeatability and sensitivity of the developed method. Methyl paraben was suitable IS for this system. Validation parameters such as precision, accuracy, linearity, recovery, detection and quantification limits (LOD and LOQ) of the developed method were investigated. This method was applied for the determination of OLO in the pharmaceutical preparation of an eye drop. To the best of our knowledge, this study is the first application for the determination of OLO by CZE.

Keywords: Capillary zone electrophoresis, Olopatadine, Pharmaceutical

TEŞEKKÜR

“Olopatadin HCl’ nin İlaçlarda Tayini İçin Kapiler Elektroforez Kullanılarak Yeni Yöntem Geliştirilmesi” adlı bu tez çalışması Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü’nde, Doç. Dr. Tufan GÜRAY danışmanlığında yapılmıştır.

Bu tez çalışmasının yapılması aşamasında bilgi ve birikimlerinden cömertçe yararlandığım, her anlamda desteğini hissettiğim değerli danışmanım Sayın Doç. Dr. Tufan GÜRAY’ a çok teşekkür ederim.

Tez çalışmam esnasında Fen Edebiyat Fakültesi olanaklarından yararlanmamı sağlayan Fen Fakültesi Dekanlığına, Kimya Bölümü imkanlarından yararlanmamı sağlayan Kimya Bölümü Başkanlığına ve Bölüm Başkanı Prof. Dr. İsmail KIRAN’ a teşekkür ederim.

Bu süreçte yardımlarını ve bilgilerini esirgemeyen, desteğini her zaman hissettiğim Sayın Prof. Dr. Muzaffer TUNÇEL’ e teşekkür ederim.

Maddi ve manevi desteklerini hep hissettiğim, bu çalışmanın arkasındaki gizli kahramanlarım olan Aileme ve sevgili nişanlım Ahmet Şahin’e sonsuz teşekkürlerimi iletirim.

Tuğba TURAN

Aralık 2015

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	vi
SUMMARY	vii
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ..	xiii
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. OLOPATADİN HCl	2
3. LİTERATÜR TARAMASI	4
4. KROMATOGRAFI	11
4.1. Elektroforez	12
4.1.1. Elektroforez tipleri	13
4.1.1.1. <u>Tabaka (slab) elektroforez</u>	13
4.1.1.2. <u>Kapiler elektroforez</u>	13
4.1.1.3. <u>Kapilerin özellikleri</u>	20
4.1.1.4. <u>Kapiler elektroforezde karşılaşılan sorunlar</u>	21
4.1.1.5. <u>Cihaz ve yöntem parametrelerinin validasyon parametreleri ile ilişkisi</u> ..	22
4.1.1.6. <u>Kapiler elektroforezin uygulamaları</u>	23
4.1.1.7. <u>Kapiler elektroforez cihazının kısımları</u>	25
5. MATERYAL VE YÖNTEM	29
5.1. Kimyasallar ve Örnekler	29
5.2. Kullanılan Cihazlar	29
5.3. Çözeltilerin Hazırlanması	30
5.4. Katı Faz Ekstraksiyonu (SPE) Yöntemi ve Örneklerin Hazırlanması	30
5.5. Kapiler Elektroforetik Yöntemler	30
5.6. Sistem Uygunluğu	31
5.7. Analiz Validasyonu	31

İÇİNDEKİLER (devam)

5.7.1. Kesinlik	31
5.7.2. Kalibrasyon testleri	31
5.7.3. Yöntemin doğruluğu	32
5.7.4. Özgünlük	32
5.7.5. Sağlamlık	33
5.8. Göz damlasındaki OLO' nun tayini	33
5.9. Yöntemin değerlendirilmesi	33
6. BULGULAR VE TARTIŞMA	34
6.1. OLO İçin Yöntem Optimizasyonu	34
6.1.1. Tampon türü	34
6.1.2. Tampon pH'sı	34
6.1.3. Tampon derişimi	35
6.1.4. Organik çözücü yüzdesi	36
6.1.5. Uygulanan voltajın optimizasyonu	37
6.1.6. Kolon sıcaklığı	39
6.1.7. Enjeksiyon süresi	39
6.1.8. Çalışılacak dalgaboyu	40
6.1.9. İç standartın belirlenmesi	41
6.2. OLO İçin Yöntemin Validasyonu	43
6.2.1. Yöntemin tekrarlanabilirliği ve doğrusallığı	43
6.2.2. Geri kazanım	45
6.2.3. Özgünlük	46
6.2.4. Yöntemin sağlamlığı	46
6.3. Yöntemin OLO Göz Damlasına Uygulanması	47
SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	49
KAYNAKLAR	51

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. OLO'nun kimyasal yapısı	2
4.1. Kapiler elektroforez sistemi	14
4.2. Elektriksel çift tabaka	16
4.3. Akış profilleri tabaka	17
4.4. Elektroferogram örneği	18
4.5. Elektroosmotik akış varlığında molekül hızları	19
4.6. Eritilmiş silika kapilerin boyuta kesiti	20
4.7. Elektroforez ile ayırmada kullanılan modlardan üçü	24
4.8. Cihazın şekli	26
4.9. Kapiler elektroforezde enjeksiyon sistemleri	27
4.10. Kapiler elektroforezde dedeksiyon yöntemleri	28
6.1. Standart OLO pik (normalize edilmiş) alanına tampon pH' sının etkisi	35
6.2. OLO ($3,39 \times 10^{-5}$ M) çözeltisi ve metil paraben ($3,04 \times 10^{-5}$ M) karışım, 205 nm' de pH 9,5' de çeşitli $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ derişimleri ile OLO' nun pik (normalize edilmiş) alanının değişimi	36
6.3. OLO ($3,39 \times 10^{-5}$ M) çözeltisi ve metil paraben ($3,04 \times 10^{-5}$ M) karışım, 205 nm' de pH 9,5' de çeşitli $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ derişiminde değişen ACN yüzdeleri ile OLO' nun pik (normalize edilmiş) alanının değişimi	37
6.4. Standart OLO pik (normalize edilmiş) alanına uygulanan potansiyelin etkisi	38
6.5. Standart OLO pik (normalize edilmiş) alanına uygulanan sıcaklığın etkisi	39
6.6. Standart OLO pik (normalize edilmiş) alanına enjeksiyon süresinin etkisi	40
6.7. pH=9,5' da, 20 mM sodyum tetraborat tamponu, % 15' lik asetonitril kullanılmak üzere 50 mbar' da enjeksiyon süresinin 10 s, dalgaboyunun 205 nm, sabit sıcaklığın 30°C ve uygulanan potansiyelin 25 kV olduğu koşullar altındaki $3,39 \times 10^{-5}$ M OLO.....	41
6.8. pH=9,5' da, 20 mM sodyum tetraborat tamponu, % 15' lik asetonitril kullanılmak üzere 50 mbar' da enjeksiyon süresinin 10 s, dalgaboyunun 205 nm, sabit sıcaklığın 30°C ve uygulanan potansiyelin 25 kV olduğu koşullar altındaki $3,39 \times 10^{-5}$ M OLO, $3,04 \times 10^{-5}$ M IS ve 10 mM NaCl' e ait elektroferogram	42
6.9. Beş farklı derişimde standart OLO' nun, optimum koşullardaki gün içi ve günler arası normalize edilmiş pik alanı ($\text{PN}_{\text{OLO}} / \text{PN}_{\text{IS}}$) sonuçlarına göre kalibrasyon verileri	45
6.10. İlave edilen OLO' nun bulunan OLO' ya karşı çizilen grafiği	46

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
6.1. Standart OLO pik (normalize edilmiş) alanına tampon pH' sınır etkisi	35
6.2. OLO ($3,39 \times 10^{-5}$ M) çözeltisi ve metil paraben ($3,04 \times 10^{-5}$ M) karışım, 205 nm' de pH 9,5' de çeşitli $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ derişimleri ile OLO' nun pik (normalize edilmiş) alanları	36
6.3. OLO ($3,39 \times 10^{-5}$ M) çözeltisi ve metil paraben ($3,04 \times 10^{-5}$ M) karışım, 205 nm' de pH 9,5' de çeşitli $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ derişiminde değişen ACN yüzdeleri ile OLO' nun pik (normalize edilmiş) alanları.....	37
6.4. Standart OLO pik (normalize edilmiş) alanına uygulanan potansiyelin etkisi	38
6.5. Standart OLO pik (normalize edilmiş) alanına uygulanan sıcaklığın etkisi	39
6.6. Standart OLO pik (normalize edilmiş) alanına enjeksiyon süresinin etkisi	40
6.7. Optimum koşullardaki OLO' nun sistem uygunluk parametreleri	42
6.8. OLO' nun gün içi ve günler arası sonuçlarının hassasiyeti ($3,21 \times 10^{-5}$ M OLO ve $3,04 \times 10^{-5}$ M IS derişimleri kullanılarak)	43
6.9. Optimum koşullar altında OLO için kalibrasyon unsurları	44
6.10. OLO için geri kazanım verileri	45
6.11. Sağlıkllık deneylerinin sonuçları	47
6.12. Patanol göz damlasındaki OLO sonuçları	48

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
ACN	Asetonitril
°C	Sıcaklık birimi (Celcius)
cm	Santimetre
CZE	Kapiler Zon Elektroforez
dk	Dakika
HCl	Hidroklorik asit
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
HPTLC	Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi
H ₃ PO ₄	Fosforik Asit
kV	Kilovolt
L	Litre
LC-MS/MS	Çift Kütle Spektrometrelili Sıvı Kromatografisi
M	Molarite
mbar	Milibar
mg	Miligram
mm	Milimetre
mM	Milimolar
Na ₂ B ₄ O ₇	Sodyum Tetraborat
NaOH	Sodyum Hidroksit
ng	Nanogram
nL	Nanolitre
OLO	Olopatadin HCl
SS	Standart sapma
nm	Nanometre
RP-HPLC	Ters Fazlı Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
UV-Vis	Mor Ötesi Görünür Bölge Spektroskopisi
v	Hacim

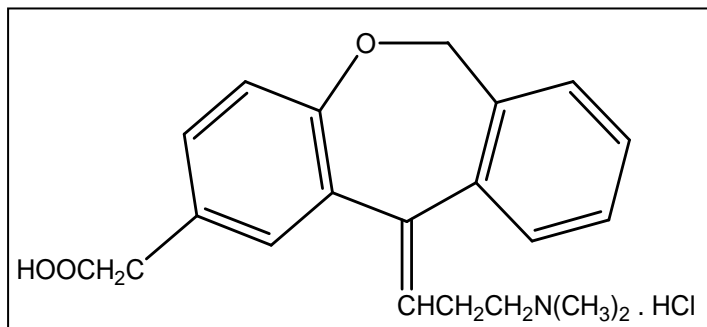
1. GİRİŞ VE AMAÇ

Histamin vücutta doğal olarak bulunan bir kimyasal olup gözlerde kızarıklık, kaşıntı, sulanma gibi alerjik etki yaratabilmektedir. Alerjik belirtilerin tedavisi için histaminin etkilerine tersi yönde bir etki gösteren Olopatadin HCl (OLO) kullanılmaktadır. Antihistaminik özellikte olan OLO vücuttaki histamin salımını engelleyerek histaminin sebep olduğu belirtileri azaltmaktadır (Sharif vd., 1996).

Günümüzde basit, kısa süreli, tekrar edilebilir, kesin sonuç veren ve ekonomik olan analiz yöntemleri geliştirmek amacıyla sürekli yeni yöntemler sunulmaktadır. Özellikle ilaç ve ilaç etken maddesi analizlerinde yeni yöntemler geliştirmek oldukça ihtiyaç duyulan bir konudur. Tayini yapılacak olan OLO bir göz damlasının ilaç etken maddesi olup seçici, hassas, kısa sürede sonuç veren, rutin analizlerde kullanılacak ekonomik bir yöntem geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Yapılan tez çalışmasının amacı, ilaç etken maddesi olan OLO'nun tayini için kısa sürede analiz edilecek ve güvenilir bir yöntem geliştirmektir. Bu yöntem sayesinde çözücü kullanımı da mikrolitre düzeyine indirilecektir. Kapiler zon elektroforez (CZE) kullanılarak OLO tayini için kolay, kesin, doğru ve ekonomik bir yöntem geliştirilmiştir. Literatürde ilaç etken maddesi olan OLO'nun CZE'de tayinine ait herhangi bir çalışmaya rastlanamamıştır. Bu tez kapsamında; OLO'nun CZE'de ayırma koşulları ve bunun yanı sıra ilaç ortamından ve sentetik karışımdan geri kazanımını sağlamak amacıyla uygun ekstraksiyon koşulları belirlenmiştir. Elektroforetik şartları belirlemek için tamponun pH'ı ve tamponun derişimi, tampona ilave edilen organik çözücü miktarı, ortam sıcaklığı, tampon viskozitesi, enjeksiyon hacmi, enjeksiyon süresi incelenmiş, validasyon parametreleri kullanılarak deneysel veriler değerlendirilmiştir. En uygun deneysel koşullar belirlendikten sonra yöntemin hassasiyeti ve tekrarlanabilirliğini arttırmak amacıyla çözeltiye iç standart eklenmiştir.

2. OLOPATADİN HCl

Olopatadin hidroklorür (OLO) (11-[(Z)-3-(dimetilamino)propylidene]-6,11-dihydrodibenz [b,e]oxepin-2-asetik asit mono hidroklorür)(X) antialerjik histamin H1 reseptör antagonist olan yeni bir ilaçtır (Ohshima vd., 1992). Kimyasal yapısı Şekil 2.1’de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. OLO’ nun kimyasal yapısı

Histamin reseptörünü bağlayıcı etkisi olan OLO, seçici histamin M1 karşıtıdır. Endojen histaminin etkisini bloke etmesi ile histaminin sebep olduğu negatif semptomlarda geçici bir rahatlama sağlar. Genellikle OLO günlük olarak 2 ile 20 mg doz aralığında alınır ve histaminin sebep olduğu egzama, gözlerde kaşıntı veya sulanma, kızarıklık gibi alerjik semptomları azaltıcı etki gösterir (Ohmori vd., 1996; Ohmori vd., 2002).

OLO’ nun oftalmik %0,1 ya da %0,2’ lik çözeltisi, alerjik konjonktivitlerin tedavisinde kullanılır (Ohmori vd., 2002; Dey vd., 2010).

Literatür taraması OLO için yapılan analitik çalışmaların sınırlı sayıda kaldığı ve spektrofotometrik (Dey vd., 2010), HPLC (Wen-Fang vd., 2010; Rao vd., 2012), LC-MS (Fujita vd., 1999; Zhu vd., 2011; Fujimaki vd., 2006; Zhu vd., 2011; Liang vd., 2006) ve HPTLC (Anand vd., 2010) gibi yöntemlerdir. Yapılan çalışmalarda kapiler elektroforez yönteminin daha önce hiç kullanılmadığı tespit edilmiştir.

Bu çalışmanın amacı, OLO’nun tayini için elektroforezin bir modu olan kapiler zon elektroforez yöntemi geliştirmektir. Bu yöntemin kesinlik, doğruluk, doğrusallık,

gözlemlenebilme sınırı (LOD), tayin sınırı (LOQ) gibi parametrelerle valide edilmiştir. Valide edilen bu yöntem göz damlası ilacındaki OLO tayinine başarıyla uygulanabilmiştir.

3. LİTERATÜR TARAMASI

Biyojenik bir amin olan histamin, bitki, hayvan ve insanların yaşamsal süreçlerinde vücut tarafından üretilir ve L-histidinin enzimatik dekarboksilasyonu ile sentezlenmektedir (Collado vd., 2000). Histamin, sinir taşıyıcısı (neurotransmitter) olarak merkezi sinir sisteminde etkin bir role sahiptir (Schwartz vd., 1991). Alerjik reaksiyonlarla doğrudan ilişkisi vardır (Bachert, 1998). İnsan vücudunda düz kasların kasılması, ter bezlerinin uyarılması, midede sindirim salgılarının salgılanması, küçük dolaşımın, vücut ısısının, atardamar kan basıncının ve uyku düzeninin ayarlanması gibi önemli biyolojik fonksiyonlara sahiptir (Schwartz vd., 1991; Collado vd., 1999).

Alerjik hastalıkların tedavisinde H₁ histamin reseptör antagonisti olan antihistaminik ilaçlar kullanılmaktadır. Bu ilaçlar ayrıca soğuk algınlığı semptomlarının giderilmesi amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır (Simons, 2003; Parsons vd., 2006).

OLO da vücuttaki histaminin salınımını engelleyerek kızarıklık, kaşıntı, vb. semptomları azaltan bir kimyasal olup ilaç etken maddesi olarak kullanılmaktadır.

Bu tez kapsamında mast hücre mediatör salınımını önleyen ve histamin H₁ reseptör blokajı yaparak etki gösteren etken madde olarak OLO içeren ilaçlarda miktar tayininin yapılması için ekonomik, duyarlı, doğru ve basit bir kapiler zone elektroforez yönteminin önerilmesi ve bu yöntemin ilaçlarda uygulanması amaçlanmıştır.

Mahajan ve arkadaşları (2013) tarafından, LC (Sıvı Kromatografisi) ve LC-MS/TOF (Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometrelili Sıvı Kromatografisi) kullanılarak OLO'nun ICH (Uluslararası Uyum Konferansı) tarafından önerilen bozulma ürünlerinin yapısal aydınlatılması yapılmıştır. Yapılan çalışma, antialerjik ilaç olan OLO'nun farklı gerilme koşullarında bozulma ürünlerini belirlemek ve karakterize etmeyi amaçlamıştır. Bu şartlar altında ilaç kararlı iken; asidik, bazik ve fotolitik gerilme altında yapısal değişimlerin olduğunu gözlemişlerdir. Sabit faz olarak, Inertsil ODS 3 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) kolon kullanılarak gradient elüsyonu programı kullanılarak toplam beş bozunma ürününün tespiti

gerçekleştirilmiştir. Geliştirilmiş yöntem formülasyon analizi için kullanılmıştır (Mahajan, 2013).

Tablet dozaj formlarında OLO rutin kalite kontrol analizi için Nageswara ve ark. (2012), ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografi (RP/HPLC) metodu geliştirilmiştir. Yöntemde C18 kolon kullanılarak, 30:70 h/h oranında su ve metanol karışımından oluşan hareketli faz sisteminden yararlanılmıştır. OLO için çalışılan dalga boyu 246 nm ve optimum akış hızı 1,0 mL/dk olarak verilmiştir. OLO'nun alıkonma süresi 2,745 dk olarak belirlenmiştir. Çalışma aralığı 5,0-50,0 µg/mL ve korelasyon katsayısı ise 0,999 olarak gözlenmiştir. Önerilen yöntem doğrusal, doğruluk, kesinlik ve sağlamlık için ICH kurallarına göre doğrulanmıştır (Nageswara vd., 2012).

Tablet dozaj formundaki ilaçlarda OLO'nun tayini için Varghese ve ark. (2011) tarafından kararlılık gösteren, yüksek performanslı sıvı kromatografisi ve yüksek performanslı ince tabaka kromatografik yöntemleri geliştirilmiştir. Bu araştırmada tablet dozaj formunda OLO miktar tayini için iki basit, yeni yöntem geliştirilmiştir. İlk yöntem, kararlılık gösteren izokratik yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemidir. Analiz % 0,1 o-H₃PO₄ (triethylamin ile pH 4,5'e ayarlanmış)-asetonitril (75:25, h/h) 1 mL/dk'lık bir akış hızında hareketli faz kullanılarak ters faz C18 kolon üzerinden yapılmıştır. Parasetamol iç standart olarak bu yöntemde kullanılmıştır. OLO ve parasetamol alıkonma süreleri 11,30 ve 4,70 dakikadır. İkinci yöntemde yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi kullanılmış olup, önceden kaplanmış silika jel 60 F254 alüminyum levha üzerinde sabit faz olarak uygulanmıştır; bu yöntemin hareketli fazı kloroform-metanol-amonyak (8:2:0,1, h/h/h)'dir. Analit bandının belirlenmesi için için seçilen dalga boyu 301,0 nm'de olup ve referans değeri 0,46 olarak verilmiştir. Kalibrasyon grafikleri için doğrusal regresyon analizi verileri cevabı ve 0,1-1,0 µg/mL ve 0,1-0,9 µg/mL band derişim aralığında HPLC ve HPTLC (High Performance Thin Layer Chromatography) yöntem için doğrusal ilişki olduğunu göstermiştir (Varghese vd., 2011).

HPLC kullanılarak yapılan bir başka çalışmada Rele ve Warkar (2011) tarafından OLO içeren oftalmik çözelti içindeki safsızlığının tayini yapılmıştır. OLO ve safsızlıkların ayrılması için Kromasil 100 C18 (150 × 4,6 mm i.d., 3,5 µm) kolonu sabit faz olarak kullanılmıştır. Yöntemde kullanılan hareketli faz, tampon ve asetonitril (80:20, h/h)

karişımından olup, akış hızı 1,5 mL/dk, çalışma dalga boyu olarak 220 nm belirlenmiş ve kolon sıcaklığı 25°C'de sabitlenmiştir. Yöntemim OLO için alt tayin sınırı 0,08924 mg/mL olarak bulunmuştur. Gözlenebilme sınırı 0,2704 µg/mL olarak bulunmuştur. OLO için çalışma aralığı 0,27-3,75 µg/mL olarak bulunmuştur. Yöntem eser düzeyde safsızlıkların tayinleri ile OLO içeren oftalmik çözeltilerde etken madde tayini için başarıyla uygulanmıştır (Rele vd., 2011).

Bhatt ve Akhtar (2011) tarafından OLO içeren ilaç etken madde miktar tayini için HPLC yöntemi geliştirilmiş ve ilaçlara uygulaması yapılmıştır. Kolay, seçici, kesin ve sağlam olan bu yöntemde Inertsil-ODS-3V kolon sabit faz olarak kullanılmış ve hareketli faz olarak pH 3,0'a o-H₃PO₄ ile ayarlanmış tampon:metanol:triethylamin (55:45:0,1, h/h/h) oluşan bir karışım kullanılmıştır. OLO için alıkonma süresi 6,3 dakika olarak tespit edilmiştir. Yöntemin çalışma aralığı 35,0-65,0 µg/mL olarak belirlenmiştir. OLO için geri kazanımın % 98,7-100,4 aralığında olduğu bulunmuştur (Bhatt vd., 2011).

2011 yılında sunulan bir başka çalışmada, Zhu ve ark. (2011) tarafından insan plazmasındaki OLO derişiminin belirlenmesi için hızlı ve hassas LC-MS/MS yöntemi geliştirilmiştir. Numunelerin her biri, etilasetat/diklorometan ile sıvı-sıvı ekstre edilerek proteinleri çöktürüldükten sonra asetonitril ve iç standart (IS, amitriptilin) ilavesi yapıp kurutulduktan sonra elde edilen tortu hareketli fazda çözülmüştür. Bu numuneler, C18 kolonlu LC-MS/MS de analizlenerek OLO ve IS belirlenmiştir. Yöntemde 0,2-100,0 ng/mL aralığında bir doğrusallık tespit edilmiş ve yöntem için toplam 3,5 dakika gibi bir çalışma süresinin olduğu bildirilmiştir. Bu yöntemi farmakokinetik değerlendirmek amacıyla 5 mg oral dozda OLO verilmesinden sonra insan plazmasında OLO miktarının ölçümü için başarılı bir şekilde uygulanmıştır (Zhu vd., 2011).

Han ve arkadaşları, (2010) OLO içeren göz damlasının içinde benzalkonyum klorür miktarının belirlenmesi için HPLC kullanmışlardır. Sabit faz olarak siyano kolonu ve hareketli faz olarak ise asetonitril-su-triethylamin (440:560:1, h/h/h) karışımı kullanılmıştır. pH'ı 3,4'e ayarlamak için H₃PO₄ kullanılmışlardır. Akış hızı 1,0 mL/dk'dır. Bu yöntemde çalışılan dalga boyu 210,0 nm'dir. Çalışmanın tayin aralığı 0,05-0,15 mg/mL (r= 0,9998) olarak belirlemişlerdir. Ortalama geri kazanım benzalkonyum klorür için % 99,7 (n= 9,

RSD= % 0,69)'dir. Bu yöntem OLO göz damlası içinde benzalkonyum klorür belirlenmesi için tekrar edilebilir, basit ve hassastır (Han vd., 2010 a).

Han ve ark. (2010) tarafından sunulan bir başka çalışmada OLO içeren göz damlasında etken madde miktar tayini için yeni bir HPLC yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntemde C18 kolonu 0,05 mol/L potasyum dihidrojen fosfat-asetonitril-trietilamin (240:2:760, h/h/h) hareketli fazı ile birlikte kullanılmıştır. Yöntemde seçilen dalga boyu 254,0 nm olarak verilmiştir. Akış hızı 1,0 mL/dk'dir. Kalibrasyon grafiğinin OLO için 0,05-0,15 mg/mL ($r= 0,9997$) arasında doğrusal olduğunu bildirmişlerdir. Ortalama geri kazanım OLO için % 100,2'dir. Bu yöntemin OLO göz damlasının kalite kontrolü için iyi tekrarlanabilirlikte basit, hassas bir yöntem olduğundan bahsedilmiştir (Han vd., 2010 b).

Mahajan ve ark. (2010) tarafından OLO içeren oftalmik çözeltilerde etken maddenin miktar tayini için HPTLC yöntemi önerilmiştir. Yöntem, silika jel 60 F254 ile önceden kaplanmış alüminyum plakalar üzerinde metanol:su:buzlu asetik asit (8:2:0,2, h/h/h) hareketli faz olarak kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İlacın referans değeri $0,37 \pm 0,01$ olduğu bulunmuştur. Yöntemi doğrusalılık, doğruluk, kesinlik ve sağlamlık açısından incelemişlerdir. Kalibrasyon eğrisi 200-1200 ng/grup arasında bir aralık içinde doğrusal olduğu bulunmuştur. Bu yöntem oftalmik çözeltiler içinde etken maddenin miktar tayini için başarılı bir şekilde uygulanmıştır. Analiz sonucu (ortalama \pm SS) OLO için $100,51 \pm 1,01$ olarak bulunmuştur. Böylece, önerilen yöntemin, etken maddeyi içeren oftalmik çözeltilerin rutin analizlerine daha hızlı ve uygun maliyetli bir kantitatif kontrolü sağlamak için uygun olacağından bahsedilmiştir (Mahajan vd., 2010).

İnsan plazmasında OLO'nun miktar tayini için Chen ve ark. (2009) tarafından LC-MS ile bir tayin yöntemi önerilmiştir. Plazma numuneleri üzerine asetonitril ve iç standart olarak desloratadin ilave edilerek protein çökeltmesi yapılmış ve çökelek kurulmuştur. Yöntemde hareketli faz olarak asetonitril-metanol-% 0,1 formik asit, (25:5:70, h/h/h) karışımı C18 kolonundan yürütülmüştür. Çalışma aralığı 1,0-200,0 $\mu\text{g/L}$ olup gözlenebilme sınırı insan plazması içinde 1,0 $\mu\text{g/L}$ dir. Yöntemde geri kazanımın % 85-115 arasında ve bağıl standart sapmanın % 10'dan daha az olduğu hesaplanmıştır. Yöntemin OLO farmakokinetik değerlendirmesi için seçici, hassas ve hızlı olduğu belirtilmiştir (Chen vd., 2009).

Xu ve Niu (2007) tarafından farmasötik preparatlar içerisindeki OLO'nun miktar tayini için HPLC yöntemi önerilmiştir. Yöntemde sabit faz olarak ODS kolonu (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) ve hareketli faz olarak ise asetonyitril-0,02 mol/L NaH₂PO₄ çözeltisi (35:65) ve % 0,2 sodyum oktan sülfonat içeren pH'ı H₃PO₄ ile 3,0'a ayarlanmış karışım kullanılmıştır. Dalga boyu olarak 210,0 nm'de seçilmiştir (Xu vd., 2007).

HPLC-MS ile diğer bir çalışmada insan plazmasında OLO'nun kantitatif miktar tayinini Liang ve ark. (2006) yapmışlardır. Plazma numuneleri SPE kullanılarak hazırlanmış ve C18 kolonu üzerinden metanol:% 0,05 formik asit (50:50, h/h) hareketli fazı kullanılarak ayırım gerçekleştirmişlerdir. OLO'nun miktar tayini için alt tayin sınırını 0,1 ng/mL olarak hesaplamışlardır. Yöntemin çalışma aralığını 0.1-100 ng/mL olarak belirlemişlerdir. Bu yöntemin insan plazmasında OLO tayini için uygulanmış seçici, hassas ve doğru olduğunu belirtmişlerdir (Liang vd., 2006).

Fujimaki ve ark. (2006), insan plazmasında anti-alerjik ilaçlardan ketotifen, OLO, setirizin ve ibudilast'in miktar tayinlerini HPLC-MS kullanarak gerçekleştirmişlerdir. İlaç numuneleri ön ayırma işlemlerinden sonra gradient sistem kullanılarak asetonyitril esaslı hareketli faz içinde ayırımı gerçekleştirilmiştir. Dört anti-alerjik ilaç için regresyon denkleminin plazmada 1,0-100,0 ng/mL aralığında doğrusal olduğu bildirilmiştir. Yöntemde alt tayin sınırı tüm bileşikler için 0,5 ng/mL olarak hesaplanmıştır. Plazmadaki ilaç gün içi ve günler arası kesinliğinin % 9,5'den büyük olmadığını hesaplamışlardır. Bunların oral uygulamasından sonra insan plazmasında anti-alerjik ilaçların gerçek tayini elde edilen veriler olup aynı zamanda yöntemi doğrulamak için de sunulmuştur (Fujimaki vd., 2006).

HPLC kullanarak Fujita ve arkadaşlarının (1999) OLO ve OLO'nun insan plazmasındaki metabolitlerini tayin etmek için bir yöntem önermişlerdir. OLO'yu, C18 dolgulu SPE kolonundan geçirerek plazmadan ayırmışlardır. Eluatı kurutarak, yeniden yapılandırmışlar ve LC-ESI-MS-MS sistemi içine enjekte etmişlerdir. OLO'nun kalibrasyon eğrilerinin 1,0-200,0 ng/mL aralığında iyi doğrusallık gösterdiğinden bahsetmişlerdir. Yöntemi insan kan plazma örneklerindeki OLO ve metabolitlerinin belirlenmesi için kullanmışlardır (Fujita vd., 1999).

OLO'nun farmasötik dozaj formundaki miktar tayini için Mathrusri Annapurna ve arkadaşları (2012) iki adet spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntemlerden ilkinde etken maddenin NaOH içerisindeki çözeltisinden yararlanılmıştır. İkinci yöntemde ise çözücü olarak amonyum format kullanılmıştır. Beer yasası birinci yöntem ve ikinci yöntemin sırasıyla korelasyon katsayıları $R^2 = 0,999$ ve $0,9998$ olan ve çalışma aralıkları ise $0,5 - 25,0 \mu\text{g/mL}$ ve $1,0 - 25,0 \mu\text{g/mL}$ olarak hesaplanmıştır. Gün içi ve günler arası kesinlik çalışmaları için % BSS değerleri sırasıyla $0,31-0,42$ ve $0,65-0,69$ birinci yöntem için ve ikinci yöntem için $0,48 - 0,51$ ve $0,54 - 0,58$ olarak bulunmuştur. Önerilen yöntem farmasötik dozaj biçiminde OLO'nun belirlenmesi için kullanılmıştır (Mathrusri vd., 2012).

Bir başka çalışmada Saifulla Khan ve arkadaşları (2012) tarafından tablet dozaj formlarındaki OLO miktar tayini için asit boyar maddeleri kullanarak spektrofotometrik yöntem önerilmiştir. Üç farklı boyar madde kullanılarak, brom timol mavisi, brom krezol yeşili ve brom moru boyar maddeleri ile basit doğru, hızlı ve hassas spektrofotometrik yöntemlerden yararlanılmışlardır. Asit boyalarla OLO'nun meydana getirdiği iyon çifti komplekslerinin maksimum dalga boylarını $415,0 \text{ nm}$, $420,0 \text{ nm}$ ve $417,0 \text{ nm}$ olarak belirlemişlerdir. Beer Kanuna göre OLO'nun çalışma aralığı brom timol mavisi için $5,0 - 55,0 \mu\text{g/mL}$, brom krezol yeşili için $5,0 - 50,0 \mu\text{g/mL}$ ve brom moru için $5,0 - 45,0 \mu\text{g/mL}$ olarak hesaplanmıştır. Tüm bu seçilen boyar maddeler için analiz sonuçları istatistiksel ve geri kazanım çalışmaları ile doğrulanmıştır. Önerilen yöntem duyarlı, ekonomiktir ve OLO içeren farmasötik preparatlarda etken madde miktar tayini için rutin analizlerde kullanılabileceğini göstermişlerdir (Saifulla vd., 2012).

Seçici H1-reseptör antagonisti etkinliğine sahip bir antihistaminik olan OLO miktar tayini için Dey ve arkadaşları (2010), OLO içeren ilaç tabletlerinde, basit, doğru, hassas ve ekonomik UV-VIS spektrofotometrik yöntem önermişlerdir. Yöntemde çözücü olarak metanol ve $0,1 \text{ N HCl}$ ($50:50, \text{ h/h}$) karışımı kullanılmış ve çalışma dalga boyu olarak $206,0 \text{ nm}$ kullanılmıştır. Yöntemlerde çalışma aralığı $2,0 - 10,0 \mu\text{g/mL}$ aralığında gözlemişlerdir. Bu yöntem matriks girişimi olmaksızın OLO'nun kalite kontrol formülasyonunun belirlenmesi için kullanılabileceğinden bahsedilmiştir (Dey vd., 2010).

Sreedhar ve arkadaşları (2012) OLO içeren ilaçlarda tayini için asılı cıva damla elektrodu kullanılarak döngüsel voltametri ve diferansiyel puls polografi yöntemlerini kullanmışlardır. Gözlenebilme sınırı ve tayin sınırını sırasıyla 1,92 ng/mL ve 6,34 ng/mL olarak bulmuşlardır. Önerilen yöntem başarılı bir şekilde matriks etkisi olmaksızın ilaçlarda OLO miktar tayini için uygulanmıştır (Sreedhar vd., 2012).

4. KROMATOGRAFI

Kromatografi, yirminci yüzyılın ilk yarısında Rus botanikçi Mikhail Tswett (Tswett, 1910) tarafından bitki pigmentlerinin ayırımında kullanılarak bulunmuştur. Tswett, içerisine toz kalsiyum doldurulan cam kolondan bitki pigmentleri çözeltisini geçirmiş; klorofil ve ksantrofil gibi birçok bitki pigmentinin kolonda renkli bantlar şeklinde ayrıldığını gözlemiştir (Ettre, 1980). Tswett deneyinde, sıvı-katı kromatografisinin basit bir şeklini kullanmıştır (Tswett, 1910). Bu sebeple Tswett bu yönteme kromatografi (Yunancada chroma "renk", graphein "yazma") adını vermiştir. Son yıllarda karmaşık karışımların ayrılmasında yeni yöntemlere ihtiyaç duyulduğu için, kromatografik yöntemler hızla gelişme göstermiştir (Ettre, 1980).

Kromatografi, kompleks karışım halinde bulunan ve özellikleri bakımından birbirine benzeyen bileşenlerin ayrılması, tanınması ve tayini için kullanılan yöntemlerin genel adıdır. Modern analiz yöntemleri içerisinde en güçlü ve çok yönlü olarak kullanılabilen bir tekniktir. Tek aşamalı işlemlerde, karışım içerisindeki bağımsız bileşenleri birbirinden ayırabilir ve aynı anda her bileşen için miktar tayini yapabilmektedir. Kromatografik ayrılma, numune içerisindeki bileşenlerin hareketli ve sabit (durgun) faz arasındaki dağılım oranlarına göre gerçekleşmektedir. Gaz, sıvı veya süperkritik akışkan özellikte bulunan hareketli faz, kendisi ile karışmayan kolonda ya da katı yüzeyde sabitleştirilmiş durgun faz içinden geçirilir. Numune bileşenlerinden durgun faz ile kuvvetli tutulanlar, hareketli faz akışıyla yavaş hareket ederken, durgun faz ile zayıf tutunanlar hareketli faz akışıyla hızlıca hareket ederler. Böylece numune bileşenleri, hızlarının farklılığına bağlı olarak birbirinden kalitatif ve/veya kantitatif olarak farklı bantlar veya bölgeler şeklinde ayrılırlar (Skoog vd., 1998).

Kromatografik yöntemleri farklı şekillerde sınıflandırmak mümkündür.

İlk olarak “hareketli ve durgun fazın fiziksel olarak temas etmelerine” ve “durgun ve hareketli fazların tipleri ve fazlar arasında madde aktarımını sağlayan dengelerin cinsine” göre sınıflandırıldığında;

1. Hareketli ve durgun fazın fiziksel olarak temas etmelerine göre;

- Kolon Kromatografisi: Hareketli faz, basınç altında ince kolonda tutulan durgun fazdan geçirilir.

- Düzlemsel Kromatografi: Hareketli faz, kapiler veya yerçekimi etkisiyle düz bir plaka üzerine veya bir kâğıdın gözenekleri arasına tutturulan durgun fazdan geçirilir.

2. Durgun ve hareketli fazların tipleri ve fazlar arasında madde aktarımını sağlayan dengelerin cinsine göre;

- Sıvı Kromatografisi: Hareketli fazın sıvı olduğu kromatografik yöntemdir. Kolonlarla ve düz yüzeyler üzerinde gerçekleştirilmektedir.

- Gaz Kromatografisi: Hareketli fazın gaz olduğu kromatografik yöntemdir. Sadece kolonlarda gerçekleştirilmektedir.

- Süperkritik Akışkan Kromatografisi: Hareketli fazın süperkritik akışkan olduğu kromatografik yöntemdir. Sadece kolonlarda gerçekleştirilmektedir (Skoog vd., 1998).

İkinci olarak “ayırılma mekanizması”, “uygulama biçimleri” ve “faz tipleri” sınıflandırıldığında;

- Ayırılma mekanizması: Adsorpsiyon, partiyon, iyon değiştirme, iyon çifti, moleküler eleme ve afinite kromatografisi

- Uygulama biçimleri: Kağıt, ince tabaka (İTK), kolon kromatografisi, gaz kromatografisi (GC), sıvı kromatografi (LC) ve iyon değiştirme kromatografisi şeklindedir (Skoog vd., 1998).

- Faz tipleri: Sıvı-sıvı, sıvı-katı, gaz-sıvı ve gaz-katı kromatografisi

4.1. Elektroferez

Tampon çözeltiye doğru akım uygulanmasıyla yüklü taneciklerin diferansiyel göç hızlarına dayanarak gerçekleştirilen bir ayırma yöntemidir (Skoog vd., 1998). Elektroferez, elektriksel alan varlığında iletken bir çözeltideki yüklü yüksüz parçacıkların veya moleküllerin göçüne dayanan ayırma ve tayin yöntemi olarak da ifade edilebilmektedir (Lima vd. , 2007). Elektroferez ilk olarak İsveçli Kimyager Arne Tiselius tarafından serum proteinleri üzerinde çalışırken bulunmuştur. Arne Tiselius bu çalışması ile 1948’te Nobel Ödülü kazanmıştır.

Elektroforez, inorganik anyon ve katyonlar, amino asitler, ilaçlar, vitaminler, karbohidratlar, peptitler, proteinler, nükleik asitler, nükleotidler, polinükleotidler ve başka türlerdeki analitik ayırmalarda kullanılmaktadır (Skoog vd., 1998).

Elektroforez, yüklü makromolekülleri ayırması ile önemli bir özelliğe sahiptir. Bu sebeple biyoteknoloji alanında yapılan araştırmalarda elektroforez tercih edilmektedir (Skoog vd., 1998).

4.1.1. Elektroforez tipleri

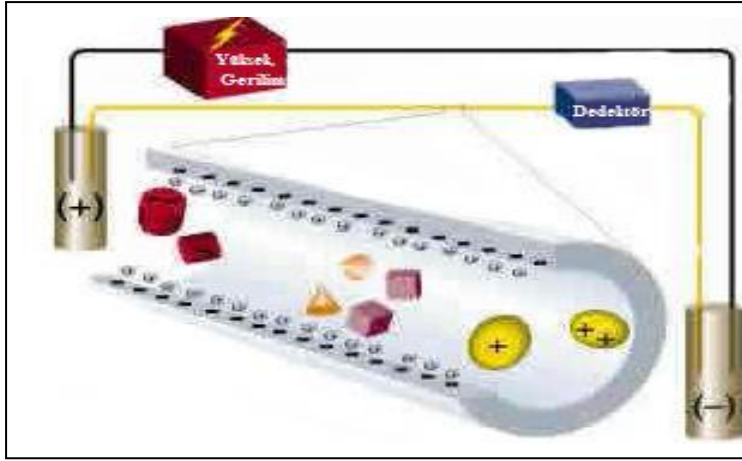
Elektroforez yöntemi tabaka (slab) elektroforez ve kapiler elektroforez olmak üzere iki türde gerçekleştirilir.

4.1.1.1. Tabaka (slab) elektroforez

Elektroforez destek ortamında gerçekleşiyorsa tabaka elektroforezi adını alır (Baker, 1998). Gözeneklerinde sulu tampon çözelti bulunan yarı-katı gözenekli ince jel tabakası kullanılarak ayırma yapılmaktadır. Numune tabakaya damla veya bant şeklinde eklenir ve doğru akım potansiyeli uygulanır. Ayrılan moleküller boyama tekniği ile gözlenmektedir. Aynı anda birden fazla numune ile çalışılabilmektedir ve karmaşık, yüksek molekül ağırlığına sahip biyolojik ve biyokimyasal moleküllerin ayrılmasında kullanılmaktadır (Skoog vd., 1998).

4.1.1.2. Kapiler elektroforez

Elektroforez kapiler tüp içerisinde gerçekleşiyorsa kapiler elektroforez olarak adlandırılır. Kapiler elektroforez (CE), büyük ve küçük moleküllerin analizlerinde kullanılabilen bir ayırma yöntemidir (Baker, 1998).



Şekil 4.1. Kapiler elektroforez sistemi (Holland vd., 1997)

Elektroforetik ayırmada kapiler tüp içerisindeki sulu tampon çözeltiye numune az miktarda enjekte edilir. Sonrasında, tampon çözeltiye Şekil 4.1’de de görüldüğü gibi kapiler elektroforezin her iki ucunda bulunan elektrotlar aracılığı ile yüksek bir doğru akım potansiyeli uygulanır ve bunun sonucu olarak ortamdaki iyonlar elektrotlardan birine doğru göç etmektedir (Skoog vd., 1998). Pozitif yüklü katyonlar, negatif yüke sahip olan katod elektroduna, negatif yüklü anyonlar ise pozitif yüke sahip anod elektroduna doğru hareket ederler (Baker, 1998). Kapiler elektroforezde voltajın uygulanması ile numunedeki yüklü tanecikler elektroforetik hareketliliklerine göre ayrılmaktadır (Skoog vd., 1998).

Kapiler elektroforez, oldukça hızlı bir yöntem olmasının yanısıra 0,1 ile 10nL arasındaki çok küçük hacimli numunelerde yüksek ayırma gücüne sahip bir ayırma yöntemidir. Ayrılan maddeler HPLC’de olduğu gibi kantitatif dedektör ile saptanabilir. Tabaka elektroforezde kullanılan zorlayıcı boyama tekniğinin yerine bu özelliğin kullanılabilir olması kapiler elektroforeze üstünlük kazandırmaktadır (Jorgenson, 1986; Ewing vd., 1989; Lauer vd., 1991; Baker, 1998; Weinberger, 1994; Li, 1992; Camileri vd., 1993; Foret vd., 1993).

Elektroforetik ayırmanın temeli, iyonların elektriksel alandaki farklı göç hızlarına sahip olmasına dayanır. Bir iyonun alan şiddeti E ($V\ cm^{-1}$) ile elektroforetik hareketliliğinin μ_e ($cm^2\ V^{-1}\ s^{-1}$) çarpımı elektriksel alandaki göç hızını v ($cm\ s^{-1}$) verir.

$$v = \mu_e E$$

v : Göç hızı

E : Elektriksel alan

μ_e : Elektroforetik hareketlilik

Bu eşitliğe bağlı olarak, elektroforetik hareketlilik analitin iyonik yükü ile doğru orantılı, sürtünmeli geciktirme katsayısı ile ters orantılıdır. Elektroforetik ayırmada nötral türler ayrılamaz çünkü elektrik alan iyonlar üzerinde etkili olmaktadır. Birbirinden farklı iki türün iyon yükü ve tampondan geçerken sahip olduğu sürtünme kuvveti birbirinden farklı olduğu takdirde bu iki maddenin ayrılması söz konusudur. Analit iyonunun sahip olduğu sürtünmeli geciktirme kuvveti, iyonun şekline, boyutuna ve içinde göç ettiği ortamın viskozitesine bağlıdır. Aynı boyuta sahip iyonlarda, yükü büyük olan iyonun yürütücü kuvveti ve göç hızı diğer iyonlardan daha büyüktür. Eğer iyonlar aynı yüke sahip ise, küçük olan iyonun sürtünme kuvveti daha küçük, göç hızı daha fazladır. İyonun sahip olduğu yük/boyut oranı bu iki etkiyi birleştirmektedir (Skoog vd., 1998). Yük/boyut oranı büyük olan iyon, elektriksel alanda daha hızlı bir şekilde hareket etmektedir (Skoog vd., 1998). Aynı yükte olan iki iyondan küçük olan iyon, büyük olan iyona göre daha hızlı bir şekilde göç etmektedir. Aynı boyuttaki iki iyondan yükü büyük olan iyon, yükü küçük iyona göre daha hızlı göç etmektedir. Aynı boyuta sahip tek ve çift yüklü iyonlarda ise çift yüklü iyonlar tek yüklü olanlara göre daha hızlı hareket ederler (Baker, 1998).

Bir iyonun göç hızı, elektrik alanın şiddeti ile ilişkilidir. Elektrik alanı, uygulanan potansiyelin büyüklüğüne ve uygulandığı kapilerin boyutuna bağlıdır (Skoog vd., 1998).

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

v : Göç hızı

μ_e : Elektroforetik hareketlilik

V : Potansiyelin büyüklüğü (volt)

L : Kapiler uzunluğu

Bu ifade ile anlaşılıyor ki potansiyelin büyük olması ile hızlı iyonik göç ve hızlı ayırım sağlanır. Yapılan analizlerde hızlı ayırımın yanı sıra öncelikli olarak istenen yüksek

ayırım gücüdür. Bu nedenle ayırma gücünü etkileyen faktörler oldukça önemlidir (Skoog vd., 1998).

Kapiler elektroforezde tabaka yükseklikleri

Kromatografide, hem boyuna hem de kütle aktarımına karşı olan direnç bant genişlemesine sebep olurken elektroforezde, tek bir faz olaya etki eder ve böylece sadece boyuna difüzyon dikkate alınır.

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

N: Tabaka sayısı

μ_e : Elektroforetik hareketlilik

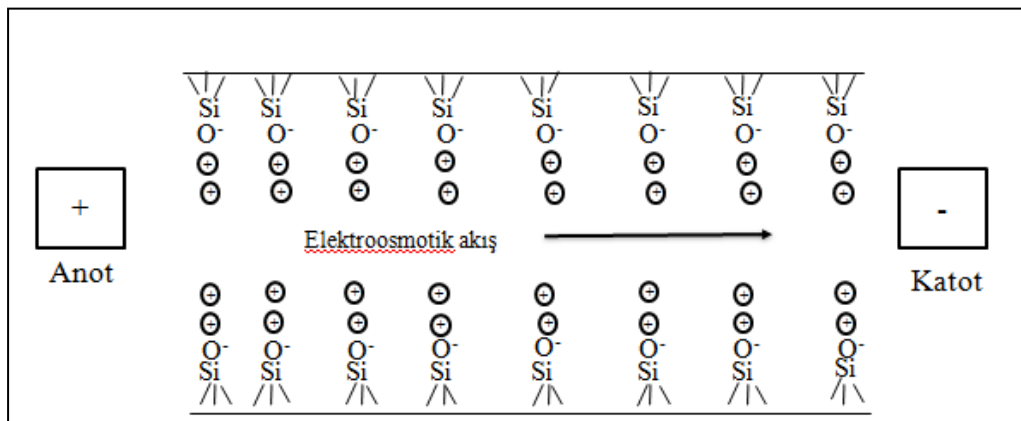
V: Potansiyelin büyüklüğü (volt)

D: Çözünen maddenin difüzyon katsayısı (cm^2s^{-1})

Tabaka sayısı arttıkça ayırma gücü artacağından yüksek potansiyel uygulanarak ayırma verimi artırılabilir. Kromatografide tabaka sayısı kolonun uzunluğu ile artar ancak elektroforezde kolon uzunluğunun bir etkisi bulunmamaktadır (Skoog vd., 1998).

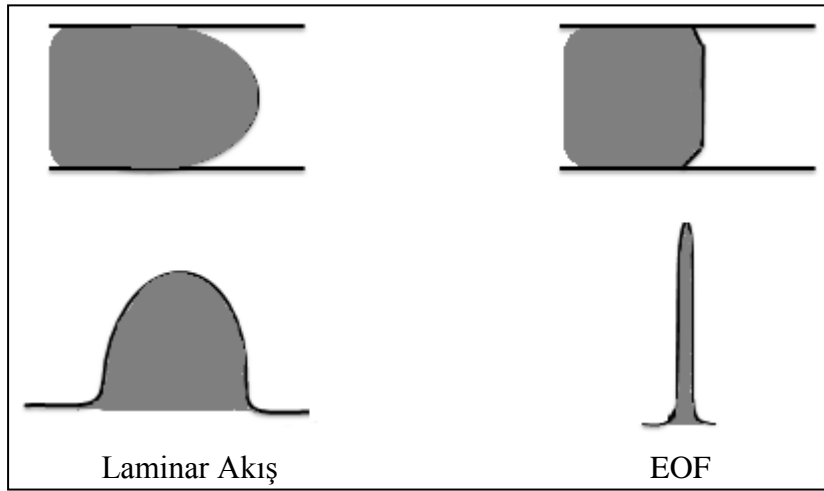
Elektroosmotik akış

Kapiler elektroforezde bileşenler, elektroforetik akışın yanısıra hızlı ayırımı sağlayan elektroosmotik akışın etkisinde sürüklenir. İçerisinde tampon çözelti bulunan kapiler tüpe yüksek bir potansiyel uygulandığında elektroosmotik akış meydana gelir ve çözücü katot veya anoda doğru hareket eder (Skoog vd., 1998).



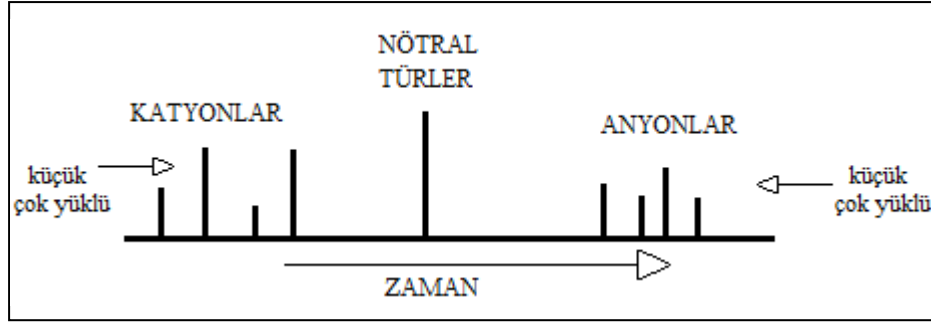
Şekil 4.2. Elektriksel çift tabaka

Elektroosmotik akışın nedeni, silika ile çözelti arayüzeyinde elektriksel çift tabakanın meydana gelmesidir. pH 3'ün üzerinde silika kapilerinin iç yüzeyindeki silanol grupları ayrışır ve negatif yüklü SiO^- grupları oluşur. Tampondaki katyonlar kapiler çeperine tutunur ve Şekil 4.2'de gösterilen elektriksel çift tabaka oluşur. Çift tabakanın dışındaki pozitif yüklü iyonlar arasındaki elektrostatik çekim azalır ve kapilere uygulanan elektriksel alanın iyonlar üzerindeki etkisi baskın gelerek pozitif iyonlar negatif elektroda (katoda) doğru hızlıca hareket ederler ve beraberinde negatif yükleri de sürüklerler. Böylece negatif yüklü iyonların da katoda doğru ilerlemesi sağlanır. Şekil 4.3'de de görüldüğü gibi HPLC'de basınç ile birlikte çözelti akışı parabolik kesitli iken elektroosmoz tüp içerisinde parabolik olmayan düz kesitli çözelti akışına sebep olur. Akış profilinin düz sebebiyle elektroosmotik akış (EOF) HPLC'deki gibi bant genişlemesine önemli ölçüde etki etmez (Skoog vd., 1998).



Şekil 4.3. Akış profilleri

İyonların elektroforetik göç hızı elektroosmotik akış hızına göre daha zayıf olduğu için hareketli faz elektroosmotik akışın etkisinde hareket etmektedir. Böylelikle pozitif, negatif ve nötral yüklü iyonlar elektroosmotik akış ile kapiler boyunca sürüklenir ve herbiri aynı noktadan geçerek tayin edilmektedir. Şekil 4.4'de örneği verilen elektroferogram kromatograma benzer şekilde elde edilmektedir (Skoog vd., 1998).



Şekil 4.4. Elektroferogram örneği

Elektroosmotik akış hızı, elektroforetik hareketliliğin formülü ile benzer şekildedir;

$$v = \mu_{eo} E$$

v : Elektroosmotik akış hızı

μ_{eo} : Elektroosmotik hareketlilik

E : Elektriksel Alan

Elektroosmoz olan iyonun hızı, elektroforetik ve elektroosmotik akış hızının toplamı şeklinde verilmektedir.

$$V = (\mu_e + \mu_{eo})E$$

V : İyon hızı

μ_e : Elektroforetik hareketlilik

μ_{eo} : Elektroosmotik hareketlilik

μ_e , anyonlar için negatif olacağından anyon iyonun sahip olduğu hız, katyonun hızına göre daha azdır. Bunun sonucu olarak elektroforetik ayırmada kolondan sırasıyla hızlı katyonlar, yavaş katyonlar, nötral tanecikler, yavaş anyonlar ve hızlı anyonlar şeklinde çıkarlar (Skoog vd., 1998). Şekil 4.5'de moleküllerin elektroosmotik akış varlığında hızlarının ne şekilde olacağına ayrıntılı şekilde yer verilmiştir.

	Yük	Molekül Cinsi	Göreceli göç etme sırası
$q_{\text{elektroosmotik}}$			
$q_{\text{elektroforetik}}$			
$q_{\text{toplam}} = q_{\text{elektroosmotik}} + q_{\text{elektroforetik}}$			
\oplus	• ++	• Küçük çift yüklü	• 1
\oplus	• ++	• Büyük çift yüklü	• 2
\circ	• +	• Küçük tek yüklü	• 3
\ominus	• +	• Büyük tek yüklü	• 4
\ominus	• 0	• Küçük nötral	• 5
\ominus	• 0	• Büyük nötral	• 6
\ominus	• -	• Büyük tek yüklü	• 7
\ominus	• -	• Küçük tek yüklü	• 8
\ominus	• --	• Büyük çift yüklü	• 9
\ominus	• --	• Küçük çift yüklü	• 10

Şekil 4.5. Elektroosmotik akış varlığında molekül hızları. (İyonların yanlarında bulunan okun uzunluğu iyon hızının büyüklüğünü, okun yönü ise hareketin yönünü ifade eder. Çözeltinin bu bölgesinde negatif elektrot sağ tarafta, pozitif elektrot sol tarafta bulunmaktadır.)

EOF'nin ölçülmesi için numuneye iyonize olmayan, dedektörde saptanabilen, saf, kapiler çeperiyle etkileşmeyen ve tamponda çözünen madde ilave edilebilir. Genelde en çok metanol tercih edilir ancak bazı durumlarda aseton ve dimetilsülfoksit de tercih edilebilir (Poppe, 1997).

Elektroforetik hız, kapilerin başlangıçtan dedektöre kadar olan uzunluğu ve maddenin göç zamanı kullanılarak bulunur.

$$v_a = v_e + v_{eo} = \frac{I_{\text{etkin}}}{t_g}$$

v_a : Gözlenen elektroforetik hız

v_e : Maddenin elektroforetik hızı

v_{eo} : Elektroosmotik akış hızı

I_{etkin} : Kapilerin etkin uzunluğu

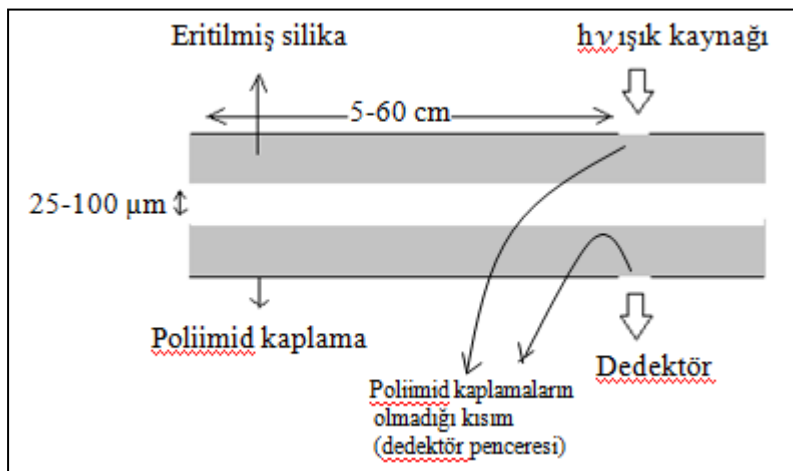
t_g : Göç hızı

EOF kapilerin iç yüzeyi farklı maddeler ile yıkanarak isteğe göre hızlandırılır, yavaşlatılır, durdurulur veya tersine çevrilebilir. EOF'nin yavaşlatılmak istenildiği durumlarda tampona katyonik bir yüzey aktif madde eklenir. Katyonik yüzey aktif maddenin derişimi arttırıldığında EOF durur, derişim daha fazla arttırılırsa EOF ters yöne döner. Yüksek pH' larda kapilerin iç yüzeyindeki SiO^- artar ve böylece EOF de artar (Poppe, 1997).

4.1.1.3. Kapilerin özellikleri

Kapilerde en önemli özellik kısa analiz süresinde yüksek ayırım gücünün sağlanmış olmasıdır. Kapilerin türü ve boyutları, hangi yöntemin uygulanacağına, analiz edilecek numuneye, istenen ayırıcılığa ve uygun analiz süresine göre seçilmektedir. Kapilerin üretildiği materyal, elektrik iletkenliğine sahip olmamalı, kimyasal olarak inert olmalı, dedektörle uyumlu olmalı ve kolay kırılmayan bir materyal olmalıdır.

Şekil 4.6'da boyuna kesiti gösterilen ve en çok kullanılan kapiler olan eritilmiş silika, 30-100 cm uzunluğunda, 50-70 μm iç çapında ve 375 μm dış çapındadır. Kapiler çapı büyük ise kapilerin iç duvarıyla merkezi arasındaki sıcaklık farkı çok büyük olur. Kapiler çapı küçük ise UV dedektörlerde ışık yolu azaltılmış olur ve absorbands düşer ve duyarlılık azalır. Küçük çaplı kapilerlerde karşılaşılan diğer sorun ise partiküllerle tıkanma olasılığının yüksek oluşudur (Poppe, 1997).



Şekil 4.6. Eritilmiş silika kapilerin boyuta kesiti

Analizin tekrar edilebilir olması için kapiler ilk kullanımda ve her kullanımdan önce şartlandırılır. Böylece kapilerin iç çeperindeki silanol grupları her analizde aynı oranda iyonlaşır ve EOF'nin her analizde aynı olması sağlanmış olur. Tekraredilebilirlik için kapiler sıcaklığının kontrolü de önemlidir. Sıcaklığın değişmesi etkinliğin, göç zamanının, enjeksiyon hacminin ve dedektör cevabının değişmesine sebep olur. Sıcaklık kontrolü, kapilerin içerisinde olduğu kasete termostatlı sistem konularak istenilen sıcaklıkta çalışma sağlanabilir (Poppe, 1997; Heiger, 1997).

4.1.1.4. Kapiler elektroforezde karşılaşılan sorunlar

Düz profile sahip olduğu için EOF' de genel olarak bant genişlemesi gibi bir sorun ile karşılaşmaz. Ancak CE' de iki sebeple bant genişlemesi oluşabilir. Numunedeki iyonlar kapiler çeperinde adsorbe olursa bant geriye doğru kuyruklanır. Joule ısınması bölgesel mikro konveksiyonlar oluşturur ve bant gerilemesi meydana gelir. Voltaj arttırıldığında EOF artar ve göç zamanı azalır. Bu etki analiz süresinin kısalmasına sebep olur. Ancak yüksek voltaj Joule ısınmasına sebep olacağından genel olarak uygulanmamaktadır (Poppe, 1997).

Kapiler sıcaklığı arttırıldığında tamponun viskozitesi azalır ve akım akışının artmasına olanak sağlar. Kapilerin sıcaklığının artması pik genişlemesine, tekrarı olmayan göç zamanlarına, örneğin bozulmasına, tamponun kaynatarak yalıtkan bölgeler oluşmasına ve elektroforetik sistemin kapanmasına sebep olur. Termostatlı sistem ile sıcaklığın sabit tutulması sağlanır ve böylece sonuçların tekrarlanabilirliği sağlanmış olur.

Kapilerin sıcaklığı kontrol altında iken tamponun gücünde veya derişiminde artış meydana gelir ve zeta potansiyeli düşerek EOF' de azalma olur.

Tampon derişimi düşük tutulduğu zaman analiz süresi kısalır. Ancak çok küçük derişimler, piklerin genişlemesine ve simetrik olmayan piklere sebep olur. Tampon derişimi numune derişiminden düşük ise pik genişlemesi ve kuyruklanma meydana gelir.

Çalışma elektrolitine organik çözücü eklendiğinde viskozite, dielektrik sabiti ve zeta potansiyeli değişkenleri ve sonuçların saptanması zorlaşır. Pik simetrisi ve ayırıcılığın

iyileştirebilmesi için elektrolite MeOH eklenmelidir. ACN eklenmesi ise analiz süresinin kısılmasını sağlar (Nemutlu, 2003; Nemutlu, 2004).

Çalışma elektrolitinin pH'ı CZE'de önemli bir parametredir. Yüksek pH'da negatif yüklü formlar olduğu için anyonik çözünen maddelerin hareketliliği pH'ın artışı ile artar. pH'ın düşürülmesi ile negatif yükler genel olarak nötralize olur ve hareketlilikleri azalır (Altria, 1998).

4.1.1.5. Cihaz ve yöntem parametrelerinin validasyon parametreleri ile ilişkisi

CE'de ayırma ve miktar tayini, kısa analiz süresinde, etkinlik, seçicilik ve ayırıcılığın yüksek olması durumunda başarılı olarak kabul edilmektedir.

Ön işlemlerin ve kapilerin şartlandırılmasının süresinin kısa olması ve cihazdan alınan verilerle sonucun kısa zamanda elde edilmesi ile kısa analiz süresi sağlanmış olur. Numunedeki bileşenlerin tamamı dedektöre ulaştığında analiz sonuçlanacağı için numune bileşenlerinin göç zamanlarının kısa olması analiz için kısa sürede tamamlanmasını sağlar. Aşağıdaki denkleme göre yüksek voltaj, kısa kapiler ve yüksek EOF ile analiz için kısa zamanda gerçekleşmesi elde edilebilir.

$$t_g = \frac{I_{\text{etkin}} L_{\text{toplam}}}{\mu_g \cdot V}$$

t_g : Göç zamanı

V: Uygulanan voltaj

I_{etkin} : Kapilerin etkin uzunluğu

L_{toplam} : Kapilerin toplam uzunluğu

μ_g : Gözlenen elektroforetik hız

CE'de tabaka sayısı etkinliği belirleyen bir parametredir. Göç zamanı ve pik genişliği ile teorik tabaka sayısı bulunabilir. Göç zamanı sabit iken pik genişliğinin küçülmesi etkinliği artırır.

$$N = 16 \left(\frac{t_g}{w} \right)^2$$

N : Teorik tabaka sayısı

t_g : Göç zamanı

w : Pik genişliği

Seçicilik katsayısının hesaplanması aşağıdaki eşitlikte verilmektedir. CZE’de çalışma elektrolitinin pH’ı ve organik çözücüler seçiciliği etkiler.

$$\alpha = \frac{(t_2 - t_0)}{(t_1 - t_0)}$$

α : Seçicilik katsayısı

t_1 : Göç zamanı kısa olan maddenin göç zamanı

t_2 : Göç zamanı uzun olan maddenin göç zamanı

t_0 : Sadece EOF ile sürüklenen maddenin göç zamanı

Ayırım (rezolüsyon) ise iki komşu pik arasındaki uzaklığa bağlıdır. Eşitlik elektroferogramdan yararlanılarak aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmaktadır.

$$R = \frac{2(t_2 - t_1)}{w_1 + w_1}$$

R: Ayırım (rezolüsyon)

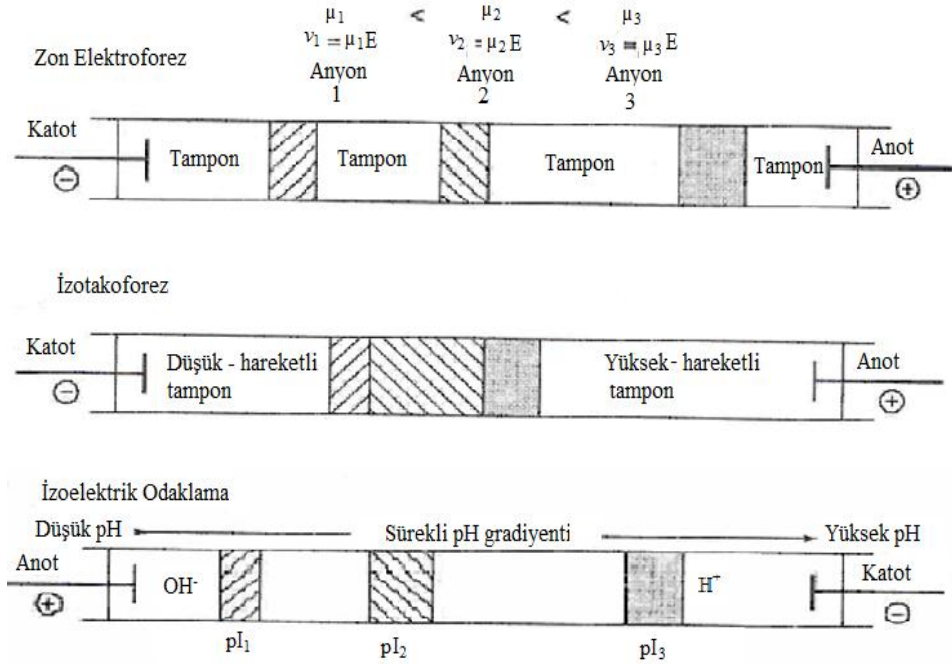
t_1 : Göç zamanı kısa olan maddenin göç zamanı

t_2 : Göç zamanı uzun olan maddenin göç zamanı

w_1, w_2 : Komşu piklerin pik genişliği

4.1.1.6. Kapiler elektroforezin uygulamaları

Kapiler elektroforetik ayırma kapiler zon elektroforez (CZE), kapiler jel elektroforez (CGE), kapiler izoelektrik odaklama (CIEF) ve kapiler izotakoforez (CITP) modlarında yapılmaktadır (Skoog vd., 1998). Şekil 4.7’de elektroferotik ayırmalarda kullanılan uygulamalardan bazıları gösterilmektedir.



Şekil 4.7. Elektroforez ile ayırmada kullanılan modlardan üçü (Skoog vd., 1998).

Kapiler zon elektroforez (CZE)

CZE, kapiler elektroforezin uygulanmış ilk türüdür. Tampon çözeltinin bileşimi ayırma bölgesinin her yerinde aynıdır. Potansiyelin uygulanması ile karışımdaki parçacıklar kendi iyonik hareketliliklerine göre zonlara ayrılırlar. Zonlar tamamen ayrılabilir ya da kısmen örtüşebilir (Skoog vd., 1998).

Kapiler jel elektroforez (CGE)

CGE, genellikle gözenekli polimer matris içinde yapılır. Aynı yükte olup hacimce büyüklükleri farklı olan proteinler, DNA parçaları ve oligomerler gibi makromoleküllerin ayrılmasında kullanılmıştır. Günümüzde de makromoleküllerin elektroforetik ayrılması genelde jel tabaka yöntemiyle yapılır (Skoog vd., 1998).

Kapiler izotakoforez (CITP)

Kapiler izotakoforezde bütün analit bantları aynı hızda geçer, bu sebeple izotakoforez ismi izo (aynı) ve tach (hız) kelimelerinden oluşur. Bu teknik ile anyonlar ve katyonlar aynı anda ayırlamaz (Skoog vd., 1998).

Kapiler izoelektrik odaklama (CIEF)

Bir zayıf karboksilik asit grubu ve bir zayıf amino grubu içeren protein ve aminoasitler gibi amfiprotik türlerin ayrılmasında kullanılır. Amfiprotik türler, tampon boyunca değişen bir pH ortamında ayrılır (Skoog vd., 1998).

Kapiler elektrokromatografi (CEC)

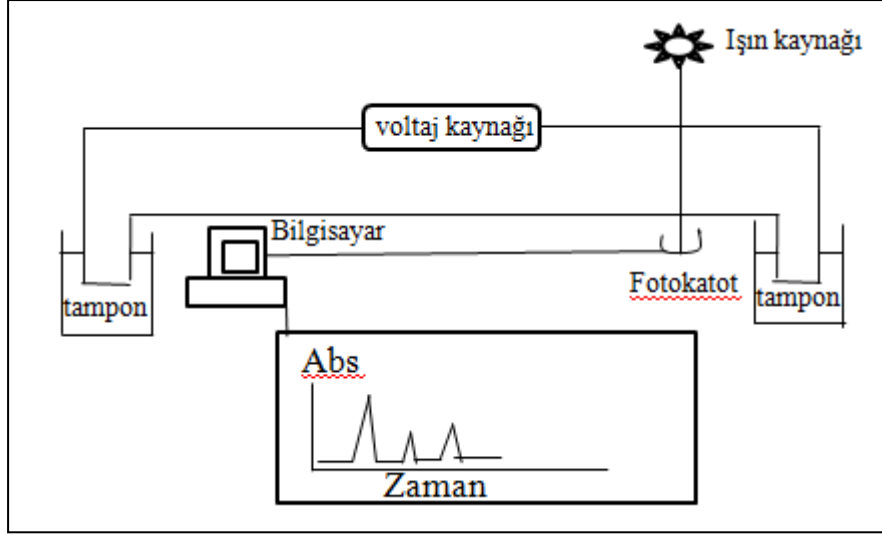
Kapiler elektroforez gibi basınçlı pompa sistemine ihtiyaç duymaksızın minimum düzeydeki çözelti miktarının ayrılması sağlar ve HPLC yöntemi gibi yüksüz taneciklerin ayrılmasına olanak sağlamaktadır (Skoog vd., 1998).

Miselsi elektrokinetik kromatografi (MEKC)

Nötral türlerin ayrılmasına imkan sağlayan ve gelecek vadede bu yöntem düşük molekül ağırlıklı aromatik fenol ve nitro bileşiklerinin ayrılmasında kullanılmaktadır (Skoog vd., 1998).

4.1.1.7. Kapiler elektroforez cihazının kısımları

CE cihazının başlıca bileşenleri Şekil 4.8'de de görüldüğü gibi; örnek vial, kaynak ve hedef vialleri, kapiler, dedektör, yüksek gerilim destekleyicisi ve bilgisayardan oluşmaktadır (Heiger, 1997).



Şekil 4.8. Cihazın şekli

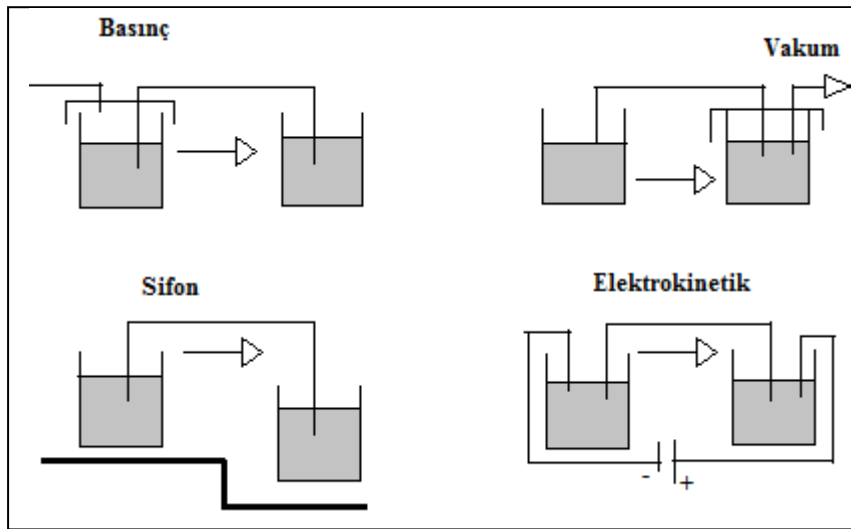
Erimiş silika kapiler, 10-100 μm çapında ve 40-100 cm uzunluğunda olup içerisine tampon doldurulur ve içerisinde platin elektrotlar bulunan iki tampon haznesinin arasına yerleştirilir. Kaynak ve hedef vialeri arasında elektriksel alan uygulanır. Bir uçtan verilen numune, diğer uca ayrılarak ulaşır ve burada tayin edilir. Yüksek potansiyele sahip güç kaynağının kutupları ayrımı istenen iyonların türüne göre değiştirilir ya da ters çevrilebilir. Ayrılan iyonlar dedektör tarafından tespit edilir. Dedektör yanıtı zamana karşı ve pikler halinde elektroferogram olarak verilir (Heiger, 1997).

Numune enjeksiyonu

Numune, elektrokinetik enjeksiyon veya hidrodinamik enjeksiyon şeklinde verilir. Elektrokinetik enjeksiyonda kapilerin bir ucu ve buna bağlı elektrot tamponun bulunduğu küçük vial içerisine konur ve belli bir süre potansiyel uygulanır. Numune elektroosmotik akış ve iyon göçü ile kapilerin içerisine alınmış olur. Kapiler ve elektrot yeniden tampon çözeltiye yerleştirilir ve analiz süresi boyunca potansiyel uygulanır. Elektrokinetik enjeksiyon ile hızlı olan iyonlar, yavaş iyonlara göre daha fazla oranda kapilere alınır.

Hidrodinamik enjeksiyon vakum enjeksiyonu, basınç enjeksiyonu veya sifonlama ile sağlanmaktadır. Vakum enjeksiyonunda, istenilen miktarda numune vakum yardımı ile kapilere alınır ve vakum kesilir. Numune vial çıkarılarak yerine çalışma tamponu vial getirilir ve analize voltaj uygulanarak devam edilir. Sifon enjeksiyonunda numune kapilerin içerisindeki sifona yerleştirilecek şekilde numune vialini kaldırmakla yapılır.

Basınç enjeksiyonunda ise kapilerin numune verilen ucu, numune bulunan vialin içerisine geçici olarak konur. Kapilerin dedektör ucuna vakum, numune ucuna basınç uygulayarak ya da numune ucunun yükseltilmesi ile basınç farkı oluşması sağlanır. Basınç farkı ile numune kapiler içerisine enjekte edilir (Skoog vd., 1998; Altria, 1999).



Şekil 4.9. Kapiler elektroforezde enjeksiyon sistemleri

Güç kaynağı

Kapiler üzerinde elektrik alanı oluşturmak amacıyla kullanılmaktadır. Analiz boyunca voltajı sabit tutmak amacıyla cihaz kesintisiz güç kaynağına bağlanmalıdır (Heiger, 1997).

Kullanılan dedektörler

Kapiler elektroforezdeki dedektörlerin tasarımı ve fonksiyonları HPLC'de kullanılan dedektörler ile benzer özelliktedir. HPLC ve CE'de ayrılan analitler aynı noktadan geçer ve bu özellikleri ile iki yöntem birbirine benzer. Ancak CE'de her iyonun elektroforetik hareketliliğine göre belli bir göç hızı vardır. Bu nedenle analit bantları dedektörden farklı hızlarla geçer yani pik alanları kısmen alıkonma zamanına bağlıdır. HPLC'de ise her bir tür hareketli faz eşliğinde dedektörden geçer yani alıkonma zamanı ile pik alanları birbirinden bağımsızdır (Skoog vd., 1998). Kullanılan dedeksiyon yöntemleri Şekil 4.10'da gösterilmiştir.

Dedeksiyon Yöntemi	Gözlenebilme Sınırı^a (Belirlenen Mol)
Spektrometri	
Absorpsiyon ^b	$10^{-15} - 10^{-13}$
Floresans	
Kolondan önce türevlendirme	$10^{-17} - 10^{-20}$
Kolon 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}

Şekil 4.10. Kapiler elektroforezde dedeksiyon yöntemleri

^aBurada verilen gözlenebilme sınırları 18 pL ile 10 nL' lik enjeksiyon aralığında çıkarılmıştır.

^bKütle gözlenebilme sınırı 1 nL enjeksiyon hacmi kullanılarak derişim gözlenebilme sınırından geçmiştir (Skoog vd., 1998).

5. MATERYAL VE YÖNTEM

5.1. Kimyasallar ve Örnekler

OLO (lot no: 01195901 saflık %99,2) Jialin Pharmaceutical (Beijing, China) tarafından sağlanmıştır. Metilparaben (IS), metanol (MeOH) ve asetonitril (ACN) Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) firmasından temin edilmiştir. Sodyum tetraborat (STB) ve sodyum fosfat Merck GmbH (Darmstadt, Germany) firmasından satın alınmıştır.

Bütün kimyasallar analitik saflıktadır ve saflaştırılmadan kullanılmıştır. Patanol® (Alcon İlaçları Beykoz İstanbul) farmasötik preparat (%0,1 OLO içeren, mg/mL) Türkiye’de yerel bir eczaneden satın alınmıştır. Patanolün her bir mL’si aktif bileşik olarak 1,11 mg OLO, benzalkonyum klorür % 0,01 inaktif çift bazlı sodyum (koruyucu olarak); sodyum klorür; hidroklorik asit / sodyum hidroksit (pH ayarı için) ve su içermektedir.

5.2. Kullanılan Cihazlar

Tayinler için 75µm iç çaplı ve tamamı 57 cm ve etkin boyu 50 cm uzunluğunda silika kapiler kolonu (Agilent, Oregon USA) olan diyot dizinli UV dedektörlü (model G1600 A) kapiler elektroforez cihazı (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) kullanılmıştır.

Çözeltilerin pH ölçümlerini yapmak için, Orion 71-03 marka cam elektrotlu, ThermoOrion 720A model pH/Ion metre (Beverly, MA 01915-6199, USA) kullanılmıştır. Çözeltileri degaze ederek içerisindeki çözünmüş gazları uzaklaştırmak için Sonorex Ultrasonic Banyo (Bandelin, Berlin, Germany) kullanılmıştır. Ultra-saf su ($18,2 \mu\text{S cm}^{-1}$) Milli-Q su arıtma sistemi Millipore’ dan (Molsheim, Fransa) elde edilmiştir. Göz damlası olarak kullanılan patanol çözeltisi içerisindeki pozitif yüklerin uzaklaştırılması için DSC-C18 katı faz kolonu (Supelco Bellefonte, PA, USA) kullanılmıştır.

5.3. Çözeltilerin Hazırlanması

İlk olarak, stok sodyum tetraborat tampon çözeltisi (100 mM) hazırlanmış (2,0 g tetraborat tartılarak 100 mL' ye tamamlandı) ve ilgili çalışma tamponları bu çözeltilerden seyreltme yoluyla hazırlanmıştır. Çözelti pH' ını ayarlamak için 0,1 M HCl ya da 0,1 M NaOH çözeltileri kullanılmıştır. İstenilen pH değerlerinin ayarlanması için, stok tampon çözeltiler, su, MeOH / ACN uygun hacimlerde günlük olarak hazırlanmıştır.

15,2 mg metil paraben (IS) tartılıp ve 100 mL'lik deney tüpüne aktarılmıştır. 30 mL'lik MeOH'de çözülüp saf su ile 100 mL'ye seyreltilmiştir.

5.4. Katı Faz Ekstraksiyonu (SPE) Yöntemi ve Örneklerin Hazırlanması

Katı faz ekstraksiyon kolonlarının tümü için genel olarak kolonun yıkanması ya da aktivasyonu, kolonun şartlandırılması, kolona örneğin uygulanması, örneğin temizlenmesi ve analitlerin elüsyonu gibi beş farklı adım bulunmaktadır. Bu çalışmada üç farklı SPE kolonu (Katı Anyon Değiştirici (SAX) ve ters faz kolonları (C8 ve C18 SPE)) denenmiştir. Geri kazanım için en iyi sonuçlar C18 kolonu kullanıldığında sağlanmıştır. Patanol[®]'ün 1 mL'si su ile 10 mL'ye seyreltilmiş bu çözeltinin 3 mL'si 0,1 M sodyum hidroksit ve formik asit ile pH 2,5'a ayarlanıp, 3 mL MeOH ile aktive edilen C18 kolonu boyunca yavaşça geçirilmiştir. Numune içerisindeki OLO'nun tüpte kalması sağlanmıştır. Kolon bir miktar distile su ile yıkanarak temizlenmiştir. Tutulan OLO, MeOH'ün 10 mL'si ile elüe edilmiştir. 0,1M NaOH çözeltisinin 1 mL'si, elüatın 3 mL'lik kısmına eklendi. 0,3 mL IS ilavesinden (son derişim $3,02 \times 10^{-5}$ M) sonra çözelti su ile 10 mL'ye seyreltilmiş ve bu çözelti CE kolonu boyunca enjekte edilmiştir.

5.5. Kapiler Elektroforetik Yöntemler

Kolon sıcaklığı 30 °C ve yıkama 935 mbar'da olacak şekilde sistem şartlandırılmıştır ve her bir enjeksiyon öncesinde 2 dk distile su, 1 dk 0,1 N NaOH, 3 dk distile su ve son olarak 5 dk tampon çözeltisi ile kolon yıkanmıştır. Analiz öncesi, tüm tamponlar ve örnek çözeltiler La-Pha-Pack (Rockwood, TN, USA)'den 0,45 µm' lik Profill model membran filtre boyunca süzölmüştür. Bütün çözeltiler ve örnekler kapiler kolona

enjekte edilmeden önce 5 dk boyunca degaze edilmiştir. Standartlar ve örnek çözeltiler hidrodinamik enjeksiyon ile anodik taraftan, 10 s ve 50 mbar'lık düşük basınç ile enjekte edilmiştir. Ölçümler 205 nm'de yapılmıştır ve toplam analiz süresi 10 dk'dır. Bazı parabenler (metil, etil, propil ve bütil) uygun IS'ı (iç standart) belirlemek için incelenmiştir.

5.6. Sistem Uygunluğu

Önerilen yöntem için sistem uygunluğu Agilent Software kullanılarak değerlendirilmiştir. Kapasite faktörü, kuyruklanma faktörü, teorik tabaka sayısı, göç süresi ayırım ve seçicilik faktörü gibi temel analitik parametreler test edilmiştir.

5.7. Analiz Validasyonu

5.7.1. Kesinlik

Analitik yöntemlerin validasyonu için ICH kurallarına göre metod valide edilmiştir. Yöntemin hassasiyetini incelemek için tekraredilebilirlik (gün içi) ve kesinlik (günler arası) deneyleri yapılmıştır. Tekraredilebilirlik deneyleri için, numuneler her gün (l=3), beş kez (n=5) analiz edilerek değerlendirilmiştir. Farklı günlerde (3gün) yapılan deneyler karşılaştırıldığında orta hassasiyette olduğu bulunmuştur. Standart OLO çözeltisi ($3,21 \times 10^{-5}$ M) ve sabit IS derişimi ($3,02 \times 10^{-5}$ M) kullanılmıştır. 3 gün yapılan deneyler karşılaştırılarak kesinliğin orta hassasiyette olduğu belirlenmiştir.

5.7.2. Kalibrasyon testleri

Kalibrasyon çalışmaları, üç set halinde (l=3) ve her bir sette $1,13 \times 10^{-5}$ M ve $5,65 \times 10^{-5}$ M aralığında olacak şekilde beş seyreltme (n=5) yapılarak gerçekleştirilmiştir. Bu çözeltiler üç gün (gün içi) ard arda kolona enjekte edilmiştir. Kalibrasyon eğrileri en küçük kareler yöntemine dayanan lineer regresyon analizi ile saptanmıştır. Bunun yanında diğer istatistiksel yöntemler de kullanılmıştır. Kalibrasyon eğrileri için; eğim, kesim, korelasyon katsayısı, regrasyon denkleminin standart sapması ve güven sınırları gün içi ve günler arası deneyler için belirlenmiştir. Kapiler elektroforez elektroferogramından elde edilen

piklerden LOD ve LOQ gibi bazı analitik parametreler hesaplanmıştır. LOD ve LOQ değerleri [(regresyon denkleminin standart sapması) / (regresyon denkleminin eğimi)] sırasıyla 3,3 ve 10 ile çarpılarak hesaplanmıştır.

5.7.3. Yöntemin doğruluğu

Yöntemin doğruluğu aşağıda belirtildiği gibi farmasötik olarak hazırlanan Patanol®'ün bileşenleri göz önünde bulundurularak test edilmiştir:

Yöntemin doğruluğu aşağıda belirtilen sentetik karışım hazırlanarak incelenmiştir: Belli miktarda standart OLO ($1,19 \times 10^{-4}$ M'ın 1,87; 2,80; ve 3,73 mL'si), sentetik inaktif bileşenlerden oluşan % 0,1 benzalkonyum klorür ($2,79 \times 10^{-4}$ M, mol/L), çift bazlı sodyum fosfat, sodyum klorür ve hidroklorik asit / sodyum hidroksit içeren matriks çözeltisine tutturuldu. Sentetik karışımın pH'ı yaklaşık olarak 7'ye ayarlandı. Karışımın 1 mL'si su ile 10 mL'ye seyreltildi. 'Katı faz ekstraksiyonu ve yöntemi ve örneklerin hazırlanması' kısmında uygulanan yöntemin aynısı uygulandı ve sonra kapiler elektroforeze enjekte edildi.

5.7.4. Özgünlük

Özgünlük, numune matriksi içerisinde bulunması beklenen bileşenlerin varlığında ilgili analiti spesifik olarak ve doğru bir şekilde ölçülme kabiliyetidir. Normalde göz damlası çözeltisi boş çözeltilde herhangi bir etkileşimin olup olmadığını yanı sıra göz damlası içinde OLO pikinin yardımcı madde pikleri ile girişim olup olmadığını kontrol etmek için enjekte edilir. Göz damlası çözeltisi pozitif yüklü benzalkonyum klorür ilavesi ile hazırlanmıştır. Silika kolonun yüzeyi oldukça negatif yüklü olduğu için analizden önce negatif yükler giderilmelidir. SPE uygulaması ile göz damlası çözeltisinden yardımcı maddeler uzaklaştırıldığında elektroferogramda yalnızca OLO piki görülmektedir. Bu çalışmada spesifiklik testine gerek duyulmadı.

5.7.5. Sağlamlık

pH (9,4; 9,5 ve 9,6), tetraborat derişimi (19,9; 20 ve 20,1 mM), hazırlanan tampon çözeltideki ACN yüzdesi (19,9 (v); 20 (v) ve 20,1 (v) %), uygulanan potansiyel (24,8; 25 ve 25,2), dalga boyu (204; 205 ve 206 nm), kolon sıcaklığı (29; 30 ve 31 °C) ve enjeksiyon süresi (9,9; 10 ve 10,1 s) gibi optimize edilmiş parametrelerde küçük değişiklikler yapılarak geliştirilen yöntemin değişmeden kalma kabiliyeti incelendi.

5.8. Göz damlasındaki OLO tayini

Farmasötik Patanol® göz damlasındaki OLO geliştirilen CE yöntemi ile belirlendi. Göz damlasının 1 mL'si su ile 10 mL'ye seyreltildi. Katı faz ekstraksiyonu yöntemi örneklerin hazırlanması kısmındaki aynı yöntem uygulandı.

5.9. Yöntemin değerlendirilmesi

Sonuçlar pik normalizasyon oranı (rPN) ya da pik normalizasyon kullanılarak değerlendirilmiştir. Pik normalizasyon oranı, IS'nin PN değerinin OLO'nun PN değerine bölünmesi ile hesaplanmıştır ($rPN = \frac{PN_{OLO}}{PN_{IS}}$). OLO ve IS için pik normalizasyon değerleri alıkonma sürelerinin pik alanlarına bölünmesi ile ($PN_{OLO} = \frac{\text{Pik alanı}_{OLO}}{\text{Alıkonma süresi}_{OLO}}$) ve ($PN_{IS} = \frac{\text{Pik alanı}_{IS}}{\text{Alıkonma süresi}_{IS}}$) hesaplanmıştır. İlgili parametreler deneysel değerlendirmeler boyunca PN ya da rPN değerlerine bağlı olarak incelenmiştir.

6. BULGULAR VE TARTIŞMA

OLO yapısı, söz konusu ilacın analizi için alkali (bazik) koşullarda CZE yönteminin kullanılabilirliğini göstermektedir. OLO'nun sahip olduğu pKa değeri 4,18'dir (Mahajan, 2013). pH 6,5'un üstünde iken ilaç tamamıyla iyonik formda bulunmaktadır. Bu yüzden çalışma pH' ı bu pH değerinin üzerinde olmalıdır. Böylece OLO iyonlaşabilir ve CZE kullanılarak analiz edilebilir. Bunun yanı sıra bazik tampon güçlü bir elektroosmotik akış oluşturur ve analiz süresi daha kısa olur.

6.1. OLO için Yöntem Optimizasyonu

Tampon Çözeltinin Bileşenlerinin Optimizasyonu ve Enstrümental Parametreler

Bu sistem için çalışma tamponu, ACN ya da MeOH eklenmiş sodyum tetraborat olarak seçilmiştir. OLO çözeltisi üzerine MeOH eklenmesi ile çözelti bulanıklaştığı için çalışma boyunca ACN kullanılmıştır.

Optimum koşulların sağlanması için, sodyum tetraboratın derişimi (10-30 mM), organik çözücü ACN'in yüzdesi (5 – 25 v/v) ve pH (8 – 10,5), uygulanan potansiyel (20-30 kV), enjeksiyon süresi (5 - 10 s, 50 mbar'da) ve dalga boyunun etkisi incelenmiştir.

6.1.1. Tampon türü

Öncelikle çalışmada kullanılan tamponun türü belirlenmiştir. Sodyum tetraborat ve sodyum fosfat tamponu kullanılarak denemeler yapılmıştır. Sodyum fosfat tamponu kullanıldığında pik genişlemesi olduğu için sodyum tetraborat ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$) tamponu ile çalışılmıştır.

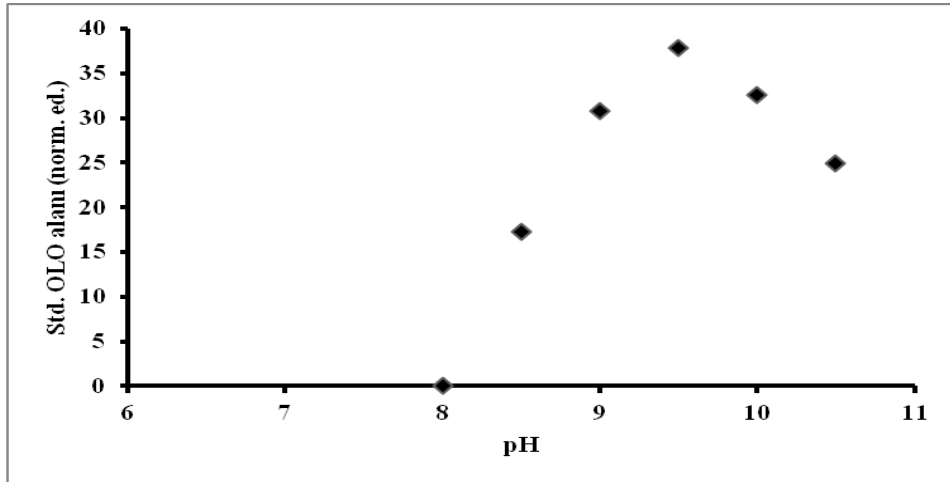
6.1.2. Tampon pH'sı

Tampon çözeltinin türü belirlendikten sonra pH'sı optimize edildi. OLO ($3,39 \times 10^{-5}$ M) çözeltisi ve metil paraben ($3,04 \times 10^{-5}$ M) karışımından oluşan çözelti Çizelge 6.1'de belirtilen pH' larda enjeksiyonlar yapıldı. Şekil 6.1'den anlaşılacağı gibi çalışma için pik

alanı göz önünde bulundurulduğunda en uygun pH pik alanının en büyük olduğu pH 9,5'dur.

Çizelge 6.1. Standart OLO pik (normalize edilmiş) alanına tampon pH' nın etkisi

Tampon pH'sı	Standart OLO Pik (Normalize edilmiş) Alanı
8,0	0,00
8,5	17,22
9,0	30,74
9,5	37,88
10,0	32,54
10,5	24,93



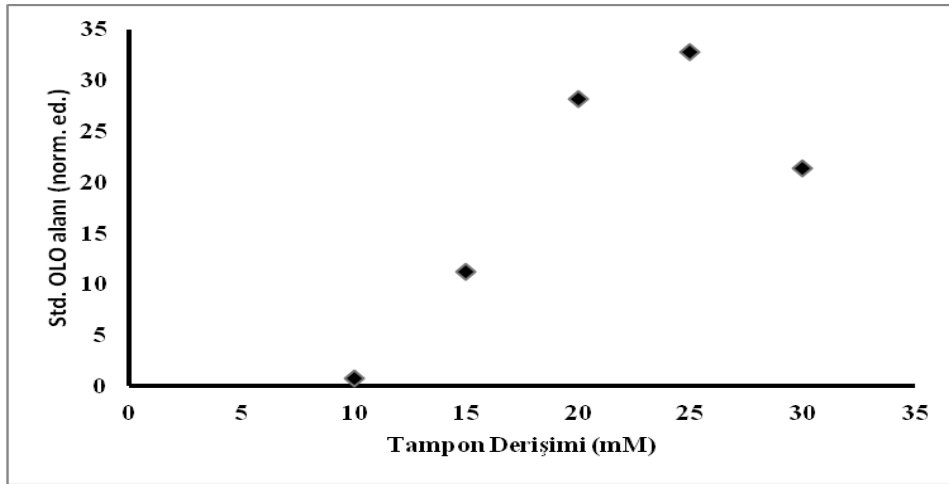
Şekil 6.1. Standart OLO pik (normalize edilmiş) alanına tampon pH'sının etkisi

6.1.3. Tampon derişimi

Standart OLO ($3,39 \times 10^{-5}$ M) çözeltisi ve metil paraben ($3,04 \times 10^{-5}$ M) karışımından oluşan çözelti, pH'sı 9,5 olacak şekilde çeşitli $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ derişimlerinde hazırlanan tampon çözelti ile enjeksiyon yapılmıştır. Elde edilen sonuçlardan (Çizelge 6.2 ve Şekil 6.2), en iyi sonucun pik alanı en büyük olan $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ derişiminin 25 mM olduğu gözükmemektedir. Ancak 25 mM'lık tampon kullanıldığında kısa aralıklar ile tıkanmalar olduğundan $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ derişimi, 20 mM olarak seçilmiştir.

Çizelge 6.2. OLO ($3,39 \times 10^{-5}$ M) çözeltisi ve metil paraben ($3,04 \times 10^{-5}$ M) karışımı, 205 nm'de pH 9,5'de çeşitli $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ derişimleri ile OLO'nun pik (normalize edilmiş) alanları

$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ Derişimi (mM)	Standart OLO Pik (Normalize edilmiş) Alanı
10	0,82
15	11,23
20	28,16
25	32,81
30	21,41



Şekil 6.2. OLO ($3,39 \times 10^{-5}$ M) çözeltisi ve metil paraben ($3,04 \times 10^{-5}$ M) karışımı, 205 nm'de pH 9,5'de çeşitli $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ derişimleri ile OLO'nun pik (normalize edilmiş) alanının değışimi

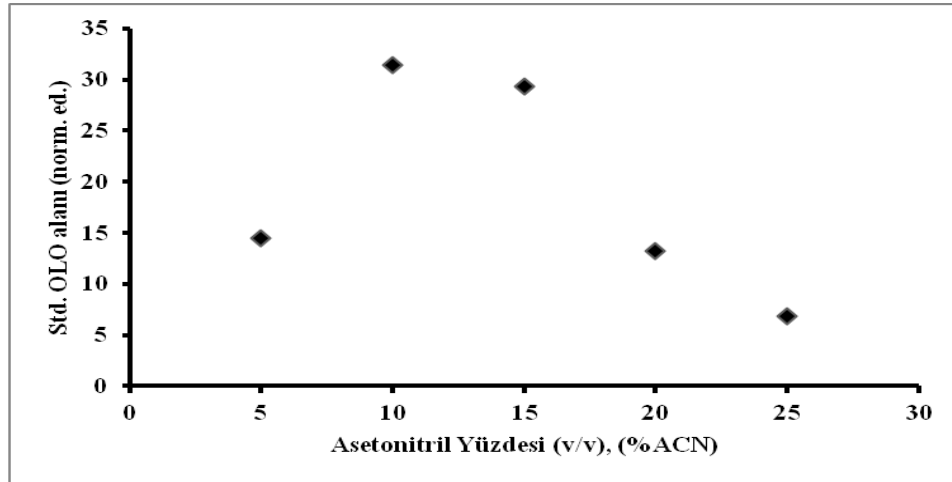
6.1.4. Organik çözücü yüzdesi

Elektroferogramda gözlenen piklerin ayırımını sağlamak için özellikle tayini yapılacak maddenin numunelerden gelebilecek matriks piklerinden daha iyi ayrılması amacıyla tampon çözeltinin viskozitesini arttırmak için tampon çözeltiliye akışkanlığı az olan organik çözücüler ilave edilir. Bunun içinde en yaygın kullanılan çözücü olarak ACN seçilmiştir. Sabit derişimlerde hazırlanan standart OLO çözeltisi, pH'sı 9,5 olan ve 20 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ derişimi olan, çeşitli yüzdelerdeki (v/v) ACN ilavesi ile hazırlanan tampon çözeltilerde analiz edilmiştir. Standart OLO alanının (normalize edilmiş) en iyi olduğu yüzde belirlenmeye çalışılmıştır. Bu sonuçlar Çizelge 6.3 ve Şekil 6.3'de verilmiştir. %10

(v/v)'lik ACN bulunduran ortamda OLO pik alanı büyüktür. Fakat bu pik yanında bir omuz pikin oluşması tayinde sorun oluşturacağından tampon çözeltideki asetonitril yüzdesi % 15 (v/v) seçilmiştir.

Çizelge 6.3. OLO ($3,39 \times 10^{-5}$ M) çözeltisi ve metil paraben ($3,04 \times 10^{-5}$ M) karışımı, 205 nm'de pH 9,5'de çeşitli $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ derişiminde değişen ACN yüzdeleri ile OLO'nun pik (normalize edilmiş) alanları

ACN (%)(v/v)	Standart OLO Pik (Normalize edilmiş) Alanı
5	14,53
10	31,47
15	29,31
20	13,22
25	6,89



Şekil 6.3. OLO ($3,39 \times 10^{-5}$ M) çözeltisi ve metil paraben ($3,04 \times 10^{-5}$ M) karışımı, 205 nm'de pH 9,5'de çeşitli $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ derişiminde değişen ACN yüzdeleri ile OLO'nun pik (normalize edilmiş) alanının değişimi

6.1.5. Uygulanan voltajın optimizasyonu

Potansiyelin büyüklüğünün artması sonucu iyonik göç daha hızlı hale gelir ve bunun sonucu olarak hızlı bir ayırım sağlanmış olur.

$$v = \mu_{eo} \frac{V}{L}$$

v: Göç hızı

μ_{eo} : Elektroosmotik akış hızı

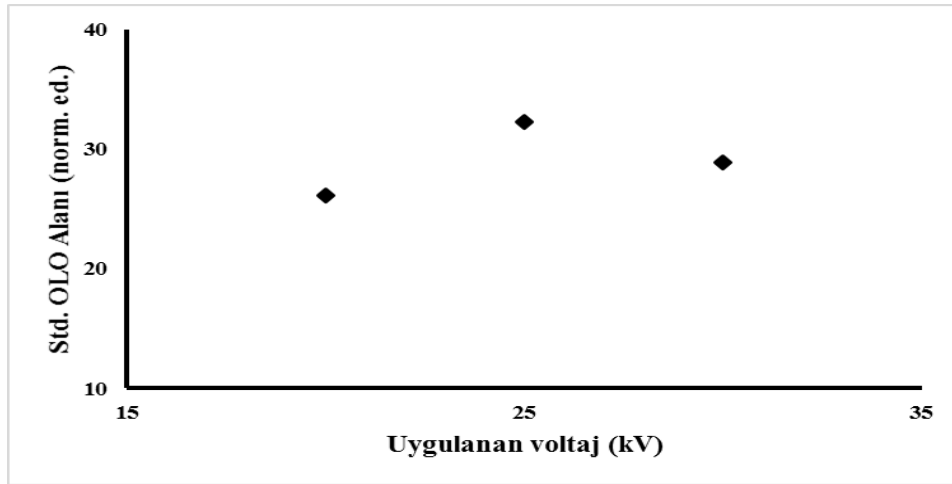
V: Potansiyelin büyüklüğü (volt)

L: Kapilerin uzunluğu

Potansiyelin büyüklüğünün artması sonucu iyonik göç daha hızlı hale gelir ve bunun sonucu olarak hızlı bir ayırım sağlanmış olur. Ancak hızlı ayırımdan daha önemli bir nokta olan yüksek ayırım gücü, en iyi 25 kV sonucunda görülmektedir. Bu nedenle optimum potansiyel 25 kV olarak belirlenmiştir.

Çizelge 6.4. Standart OLO pik (normalize edilmiş) alanına uygulanan potansiyelin etkisi

Uygulanan Potansiyel (kV)	Standart OLO Pik (Normalize edilmiş) Alanı
20	26,13
25	32,31
30	28,89



Şekil 6.4. Standart OLO pik (normalize edilmiş) alanına uygulanan potansiyelin etkisi

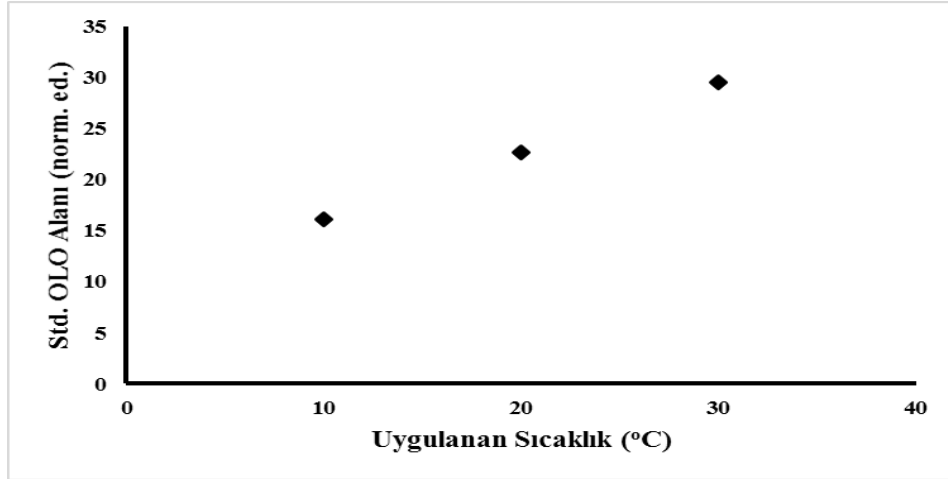
6.1.6 Kolon sıcaklığı

Sıcaklığın artması ile viskozite azalır. Viskozitenin azalması ile birlikte elektroosmotik akış hızında artış meydana gelir ve böylece alıkonma zamanının azalmasına sebep olur.

10, 20 ve 30 °C'lik sıcaklık taraması sonucu Çizelge 6.5 ve Şekil 6.5'den görüldüğü gibi pik alanı en yüksek olan elektroferogram 30 °C'a aittir.

Çizelge 6.5. Standart OLO pik (normalize edilmiş) alanına uygulanan sıcaklığın etkisi

Uygulanan Sıcaklık (°C)	Standart OLO Pik (Normalize edilmiş) Alanı
10	16,13
20	22,69
30	29,49



Şekil 6.5. Standart OLO pik (normalize edilmiş) alanına uygulanan sıcaklığın etkisi

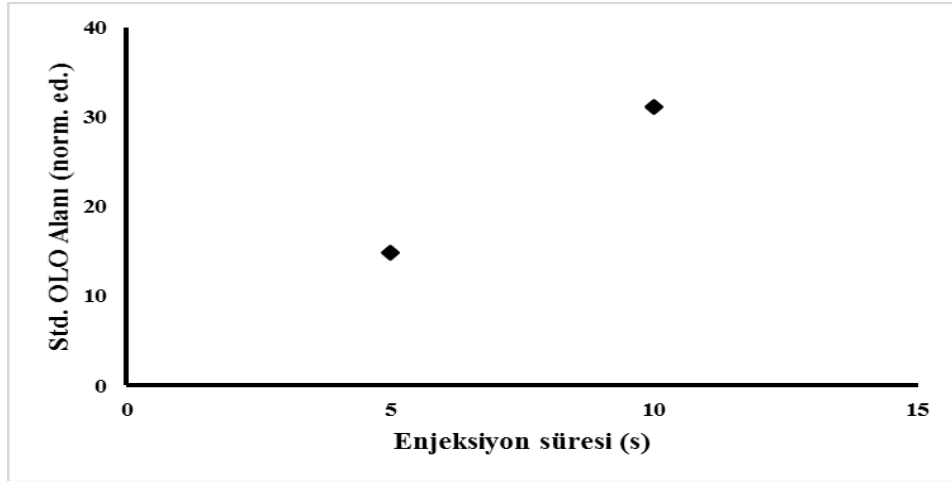
6.1.7. Enjeksiyon süresi

Ayrıma etki eden parametrelerden birisi de enjeksiyon süresidir. Yapılan çalışmada uygun pik morfolojisi ve pik alanının daha iyi bir şekilde gözlenebilmesi için 5 ve 10 s'lik süreler için alan incelenmiş ve sonuçlar Çizelge 6.6 ve Şekil 6.6'da verilmiştir. Sonuçlar

enjeksiyon süresinin artması ile alanın büyüdüğünü göstermektedir. 10 saniyenin üzerindeki enjeksiyonlarda pik alanı büyümüştür. Fakat pik morfolojisi aşırı derecede bozulmuştur. Ayrıca 5 s'den küçük enjeksiyonlarda da pik alanı gözlenememiştir. Bu nedenle enjeksiyon süresi 10 s olarak belirlenmiştir.

Çizelge 6.6. Standart OLO pik (normalize edilmiş) alanına enjeksiyon süresinin etkisi

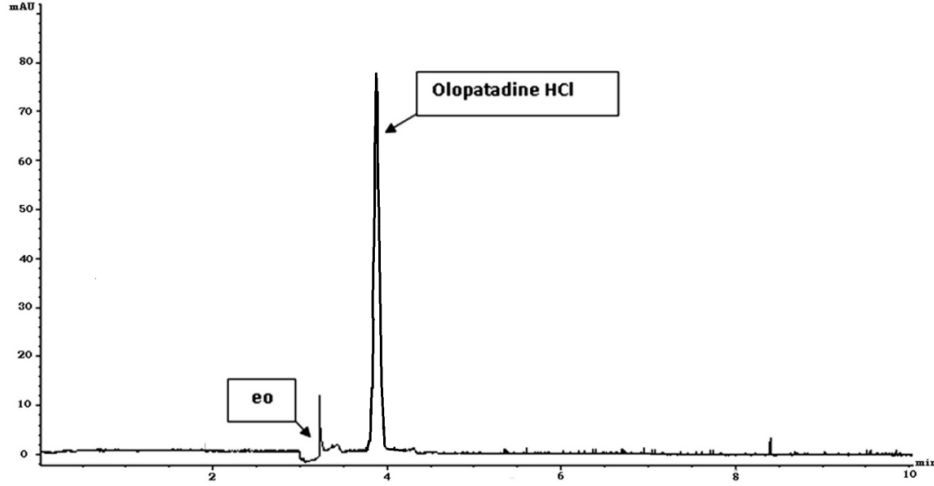
Enjeksiyon süresi (s)	Standart OLO Pik (Normalize edilmiş) Alanı
5	14,91
10	31,12



Şekil 6.6. Standart OLO pik (normalize edilmiş) alanına enjeksiyon süresinin etkisi

6.1.8. Çalışılacak dalga boyu

Pik morfolojisi açısından en uygun pik, 20 mM' ık $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, % 15'lik (v/v) ACN ve pH'sı 9,5 olan tampon çözelti kullanılarak gözlenmiştir. Bu işlemler sırasında uygulanan potansiyel 25 kV, enjeksiyon basıncı 50 mbar ve süresi 10 s, kolon sıcaklığı 30°C ve dalga boyu 205 nm olarak ayarlanmıştır. Şekil 6.7'de bu değerler için ayarlanan ortamda yapılan analiz sonucu ile elde edilen elektroferogram gösterilmiştir.

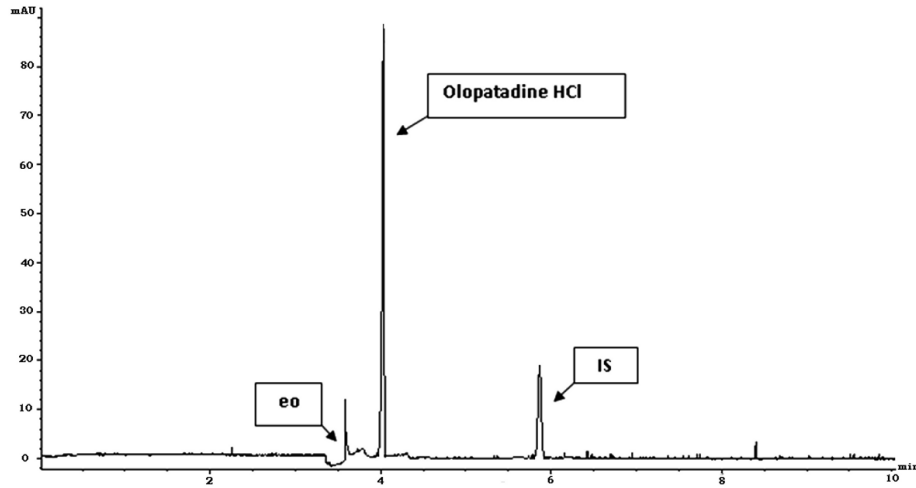


Şekil.6.7. pH=9,5'da, 20 mM sodyum tetraborat tamponu, % 15'lik (v/v) ACN kullanılmak üzere 50 mbar'da enjeksiyon süresinin 10 s, dalgaboyunun 205 nm, sabit sıcaklığın 30°C ve uygulanan potansiyelin 25 kV olduğu koşullar altındaki $3,39 \times 10^{-5}$ M OLO

6.1.9. İç standartın belirlenmesi

Uygulanan metodun hassasiyeti ve tekraredilebilirliğinin artması için uygun IS kullanılarak parametrelerin kesinliğinin belirtilmesi gerekir. Bu sistem için fenobarbital, metil paraben, etil paraben, propil paraben, nikotin amid gibi kimyasallar denenmiş ve bunların içinde gözlenebilen ve en uygun pik morfolojisine sahip IS metil paraben olarak belirlenmiştir.

$3,39 \times 10^{-5}$ M OLO, $3,04 \times 10^{-5}$ M IS ve 10 mM NaCl maddelerinin optimum koşullardaki elektroferogramı Şekil 6.8'de gösterilmiştir. NaCl; elektriksel iletkenliğin sağlanabilmesi için kullanılmıştır.



Şekil.6.8. pH=9,5' da, 20 mM sodyum tetraborat tamponu, % 15'lik (v/v) ACN kullanılmak üzere 50 mbar'da enjeksiyon süresinin 10 s, dalga boyunun 205 nm, sabit sıcaklığın 30 °C ve uygulanan potansiyelin 25 kV olduğu koşullar altındaki $3,39 \times 10^{-5}$ M OLO, $3,04 \times 10^{-5}$ M IS ve 10 mM NaCl' e ait elektroferogram.

Optimum koşullarda OLO ve IS' nin göç zamanları sırasıyla 4,03 (RSD %1,44) ve 5,86 (% 2,596) dakikadır. Ayrıca OLO ve IS'nin anoda doğru elektroforetik hareketliliği sırasıyla $5,80 \times 10^{-8}$ (RSD % 1,9) ve $1,07 \times 10^{-8}$ (RSD % 2,37) olarak üç deney yapılarak hesaplanmıştır.

Mevcut koşullar altında elde edilen sistem uygunluk parametreleri Çizelge 6.7'de verilmiştir.

Çizelge 6.7. Optimum koşullardaki OLO' nun sistem uygunluk parametreleri

Parametreler	Gözlenen sonuçlar (OLO)	Gözlenen sonuçlar (IS)
Göç süresi (t, dk)	4,031	5,864
Kapasite Faktörü (K)	0,123	0,633
Kuyruklanma Faktörü (T)	1,177	1,488
Teorik Tabaka Sayısı (N)	447622,1	304600,1
Ayrım (Rs)	55,045	
Seçicilik Faktörü (α)	1,455	

6.2. OLO İçin Yöntemin Validasyonu

6.2.1. Yöntemin tekrarlanabilirliği ve doğrusallığı

Yöntemin tekrarlanabilirliği ve doğrusallığı gün içi ve günler arası olarak incelenmiştir. Optimum koşullarda $1,13 \times 10^{-5}$ M ($4,22 \mu\text{g mL}^{-1}$) ve $5,65 \times 10^{-5}$ M ($21,12 \mu\text{g mL}^{-1}$) arasında beş farklı derişimde OLO olacak şekilde, üç paralel çözelti hazırlanmıştır. Her biri 5 kez farklı günlerde enjekte edilmiştir. Tekrarlanabilirlik sonuçları çizelge 6.8’de ve doğrusallık sonuçları çizelge 6.9’de verilmiştir. Hesaplamalar Microsoft Office 2007 Excel programı kullanılarak yapılmıştır.

Çizelge 6.8. OLO’ nun gün içi ve günler arası sonuçlarının hassasiyeti ($3,21 \times 10^{-5}$ M OLO ve $3,04 \times 10^{-5}$ M IS derişimleri kullanılarak)

	I. Gün (n=5)	II. Gün (n=5)	III. Gün (n=5)	Günler arası (n=15)
$\bar{X}_{(rPN = PN_{OLO} / PN_{IS})}$	17,61	17,54	17,44	17,53
S	0,194	0,193	0,345	0,247
RSD%	1,10	1,10	1,97	1,41
CL	0,139	0,379	0,210	0,243

n yapılan deney sayısı,

\bar{X} pik normalizasyonun ortalama oranı,

s ortalama cevabın standart sapması, $s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N-1}}$

RSD yüzde olarak bağıl standart sapma, $RSD = 100 \cdot \frac{s}{\bar{x}}$

CL güven sınırı $CL = \pm \frac{ts}{\sqrt{N}}$ (t seçilen güvenilirlik derecesine ve ölçüm sayısına bağıl sabit, s standart sapma) (Say., 2009)

Çizelge 6.8.’de görüldüğü gibi derişim ve dedektörün tepkisi arasındaki ilişki belirtilen derişim aralığında hesaplanmıştır. Elde edilen doğrunun denklemi Şekil 6.9’da çizilen grafikten de görüldüğü gibi $rPN = 2,88 \times 10^5 C_{OLO} - 0,36$ şeklindedir. İyi bir korelasyon sabitine ($r = 0,9995$) ve sıfıra oldukça yakın bir kesim değerine ($-0,36$) sahiptir.

Çizelge 6.9. Optimum koşullar altında OLO için kalibrasyon unsurları

Parametreler	I. Gün n=5	II. Gün n=5	III. Gün n=5	Günler arası n=15
a	2,89x10 ⁵	2,88x10 ⁵	2,88x10 ⁵	2,88x10 ⁵
b	-0,38	-0,32	-0,36	-0,36
R	0,9997	0,9996	0,9994	0,9995
s _r	0,142	0,126	0,148	0,138
CL	±4406	±3923	±4597	±4286
LOD ^α (M)	1,62x10 ⁻⁶	1,44 x10 ⁻⁶	1,69x10 ⁻⁶	1,58x10 ⁻⁶
LOQ ^β (M)	4,90x10 ⁻⁶	4,38x10 ⁻⁶	5,12x10 ⁻⁶	4,78x10 ⁻⁶

a eğim,

b kesim,

R korelasyon katsayısı,

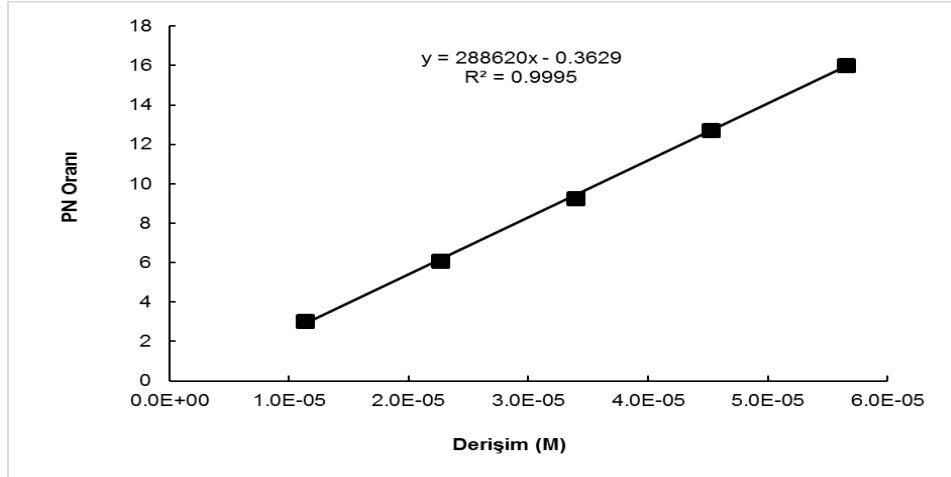
s_r kalibrasyon eğrisinin standart sapması,

CL güven sınırı,

LOD gözlenebilme sınırı,

LOQ tayin sınırı.

Yöntemin gözlenebilme sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ), tekrarlanabilirliğin standart sapmasının, lineerliğinin eğimine bölündükten sonra 3,3 ve 10,0 ile çarpılmasıyla elde edilmiştir. Günler arası tekrarlanabilirlik verilerine göre LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 1,58x10⁻⁶ M ve 4,78x10⁻⁶ M olarak hesaplanmıştır.



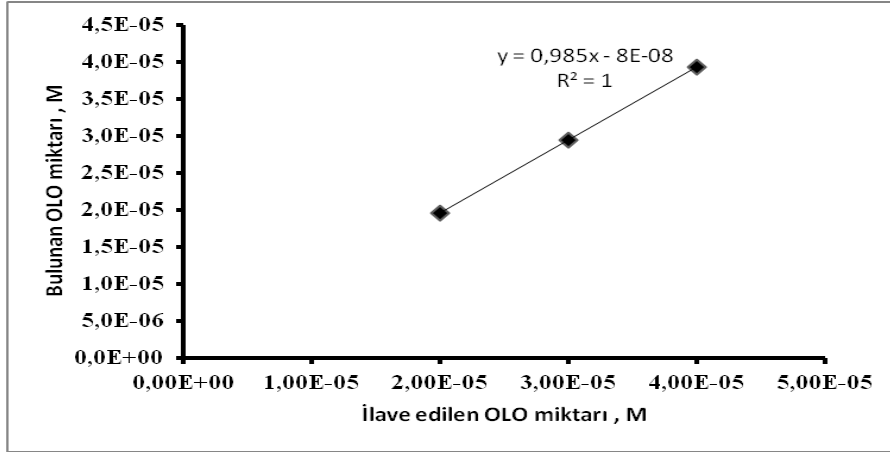
Şekil 6.9. Beş farklı derişimde standart OLO'nun, optimum koşullardaki günler arası normalize edilmiş pik alanı (PN_{OLO} / PN_{IS}) sonuçlarına göre kalibrasyon verileri

6.2.2. Geri kazanım

OLO'nun geri kazanımı standart ilave etme yöntemi kullanılarak belirlendi. Üç farklı derişimde OLO standardı, içinde OLO olmayan ilaca eklenerek SPE kolonunun üç türünden (SAX, C8 ve C18) geçirilmiş ve seçilen en uygun olan kolon ile CE için analize hazır hale getirilmiştir. SAX ve C8 kolonları düşük geri kazanım değerleri nedeniyle sentetik çözeltiden pozitif yüklü partikülleri (benzalkonyum klorür) uzaklaştırmada yetersiz kalmıştır. C18 kolonu (yaklaşık % 100 geri kazanım sağlayarak) SPE kolonun 3 türü arasında en iyi sonucu vermiştir. Sonuçlar kalibrasyon eşitliği kullanılarak hesaplanmıştır. % RSD değerleri çizelge 6.10'da ve ilave edilen OLO'ya karşı elde edilen OLO'nun grafiği Şekil 6.10'da verilmiştir.

Çizelge 6.10. OLO için geri kazanım verileri

Eklenen OLO, M	Bulunan OLO, M	Geri kazanılan % (RSD%)
$2,00 \times 10^{-5}$ M	$1,96 \times 10^{-5}$ M	98,09 (0,65)
$3,00 \times 10^{-5}$ M	$2,95 \times 10^{-5}$ M	98,26 (0,42)
$4,00 \times 10^{-5}$ M	$3,93 \times 10^{-5}$ M	98,36 (0,53)



Şekil 6.10. İlave edilen OLO'nun bulunan OLO'ya karşı çizilen grafiği

6.2.3. Özgünlük

SPE uygulaması ile göz damlasından yardımcı maddeler uzaklaştırılabilmüş ve elektroferogramda sadece saf bir OLO piki gözlenmiştir.

6.2.4. Yöntemin sağlamlığı

Sağlamlık voltaj, dalga boyu, kolon sıcaklığı ve enjeksiyon süresi gibi aletsel parametrelerde ve pH, mobil faz bileşimi ve sıcaklık gibi deneysel optimizasyon parametrelerindeki küçük ama önemli değişikliklere karşı etkilenmeden kalma yeteneğinin ölçüsüdür.

Sağlamlık, kullanım boyunca yöntemin güvenilirliğinin göstergesidir. Sağlamlık ile ilgili parametreler Çizelge 6.11'de verilmiştir. Sağlamlık parametreleri için RSD değerlerinin 2'den küçük olması geliştirilen yöntemin son derece güvenilir bir yöntem olduğunu göstermektedir.

Çizelge 6.11. Sağlık deneylerinin sonuçları

Parametreler	SD	RSD (%)
pH (9,4, 9,5, 9,6)	0,18	0,99
Tetraborat derişimi (19,9, 20, 20,1 mM)	0,22	1,18
ACN (19,9, 20, 20,1 %)	0,23	1,26
Uygulanan potansiyel (24,8, 25, 25,2)	0,19	1,01
Dalgaboyu (204, 205, 206 nm)	0,21	1,16
Kolon sıcaklığı (29, 30, 31 °C)	0,19	1,04
Enjeksiyon süresi (9,9, 10, 10,1 s)	0,17	0,92

% RSD 2'nin altında olan ($\% \text{RSD} < 2$) değerlere ilişkin olan küçük değışikliklerin tümü kabul edilebilir orandadır ve söz konusu yöntemin son derece sağlam olduğu söylenebilir.

6.3. Yöntemin OLO Göz Damlasına Uygulanması

Pozitif iyonlar, elektroosmozdan ve deney sırasındaki ilgili olan parçacıkların hareketliliğinden etkilendiği için analiz edilecek olan çözeltiden uzaklaştırılması gerekmektedir. Uzaklaştırmak için 3 prosedür denenmiştir. SAX SPE kolonu benzalkonyum klorürün tamamını taşıyamamaktadır.

Bu yüzden C18 SPE kolonu kullanılarak deneysel kısımda da anlatıldığı gibi neredeyse tüm aktif OLO'nun tutunması sağlanmıştır.

Göz damlası ilacında OLO'nun analizi deneysel kısımda belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir. Deneysel sonuçlar değerlendirilip rPN değerleri hesaplanmıştır. Aktif madde OLO miktarı, kalibrasyon denkleminde hesaplanmıştır.

Sonuçlar ve değerlendirmeler çizelge 6.12'de gösterilmiştir.

Çizelge 6.12. Patanol Göz damlasındaki OLO sonuçları

Değişkenler	İstatistiksel veriler (mg mL⁻¹)
\bar{X}	1,094 (98,2%)
S	0,009
RSD%	0,009
CL	0,012

Çizelge 6.12.' de görüldüğü gibi göz damlası (Patanol) 1,11 mg/mL OLO çözeltisine sahiptir ve çözeltide %98,2 doğrulukta 1,09 mg/mL olarak tespit edilmiştir. OLO yeni bir göz damlası olduğu için henüz farmakopede herhangi bir monografi bildirilmemiştir. OLO göz damlası için uygulanan kabul kriteri USP (ABD pharmacopeia sözleşmesi)' nin Genel Bildirimler' de % 15'lik sapmaya izin olduğu belirtilmiştir. Bu önerilere göre bu tür analizler için etiketteki yazılandan % 85-115 oranı ile sınırlandırılır. OLO için elde edilen sonucun sapması (%1,80) bu sınırlar içerisindedir. İlacın bağıl standart (%RSD) son dozaj birimleri farmakope de ki ağırlık varyasyon testine göre % 2'den fazla olmamalıdır. % RSD değeri, bizim çalışmamızdaki bu değerlerden (0.009) daha küçüktür (Çizelge 6.12). Sonuç olarak % RSD ve sapma (mutlak hata) değerleri etikette yazan değerlerle ile uyum içerisindedir. Bu değerlendirmeler uygulanan yöntemin geçerli ve güvenilir olduğunu göstermektedir.

SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Vücutta doğal olarak bulunan histaminin alerjik etkilerine tersi yönde etki gösteren OLO, antihistaminik özellikte olup vücuttaki histamin salınımını engeller ve alerjik etkilerin azalmasını sağlar. Göz damlasının ilaç etken maddesi olan OLO tayini için seçici, hassas, kısa sürede sonuç veren bir yöntem ihtiyacı duyulmaktadır. Yapılan literatür incelemelerinde daha önce HPLC, LC-MS ve HPTLC yöntemlerinin kullanıldığı, OLO için yapılan analitik çalışmaların yetersiz kaldığı görülmektedir.

Yapılan bu çalışmada kolay, kesin, doğru ve ekonomik bir yöntem olan ve çözücü kullanımını mikrolitre düzeyine indirgeyen CZE kullanılmıştır. CZE' nin OLO tayini için yöntem optimizasyonu ve cihaz optimizasyonu deneyleri yapılarak ayırma koşulları belirlenmiştir. Aynı zamanda ilaç ortamından ve yapay ortamdan geri kazanımı sağlamak için uygun koşullar araştırılmıştır.

Deneysel çalışmalarda öncelikle iyi bir görünümü ve elektroferogram elde etmek için yöntem optimizasyonu yapılmıştır. Belirlenen tampon çözeltisi farklı pH' larda denenmiştir ve en uygun pH'ın alan değeri en yüksek olan 9,5 olduğu belirlenmiştir. Çalışılan $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ çözeltisi farklı derişimlerdeki alan değerleri incelenmiş ve 20 mM'daki pik şeklinin en iyi olduğu ve numune ile yapılan ön denemelerde iyi ayırma sağladığı gözlenmiştir. Çözeltiye ACN eklenerek daha iyi bir ayırma sağlanmıştır ve farklı değerlerde ACN yüzdesi eklenerek pik alanı değişimi incelenmiştir. ACN için kullanılan en iyi sonucun %15'lik (v/v) ACN olduğu belirlenmiştir.

OLO için yöntem optimizasyonu yapıldıktan sonra cihaz optimizasyonu deneyleri yapılmıştır. Standart OLO çözeltisi farklı basınç ve potansiyellerde ayırma yapılmış ve alıkonma süresi, pik morfolojisi ve pik alanları açısından en uygun şartların 30°C'deki kolon sıcaklığında, 25 kV voltaj uygulanarak, 10 s, 50 mbar basınç enjeksiyonu ile 205 nm'de elektroferogramda gözlenmiştir.

OLO tayini için çizilen kalibrasyon eğrisi için doğru denklemi

$$r_{PN} = 2,88 \times 10^{-5} C_{OLO} - 0,36 \text{ ve korelasyon sabiti } r = 0,9995$$

olarak bulunmuştur. Yöntemin gözlenebilme sınırı (LOD) ve tayin edilebilme sınırı (LOQ) günler arası verilerine göre bu değerler sırasıyla $1,58 \times 10^{-6}$ M ve $4,78 \times 10^{-6}$ M olarak hesaplanmıştır.

İlaç örneğinden OLO' nun geri kazanımı gerçekleştirilmiştir. Geri kazanım için SPE kolonunun üç türü (SAX, C8 ve C18) denenmiş ve en uygun kolonun C18 kolonu (%RSD= %98,2) belirlenmiştir. ABD Farmakope Sözleşmesine göre kabul kriteri en fazla %15'lik bir sapma olarak belirlenmiştir. Bu önerilere göre 85-115 aralığında sınırlandırılmaktadır. Bulunan %98,2'lik RSD değeri, uygulanan yöntemin geçerli ve güvenilir olduğunu göstermektedir. Literatür taraması sonucunda HPLC (0,27-3,75 µg/mL (Rele, vd., 2011), 35,0-65 µg/mL (Bhatt vd., 2011), 0,05-0,15 mg/mL (Han, vd., 2010)), HPTLC (0,1-1,0 µg/mL (Varghese, vd., 2011), 200-1200 ng/grup (Mahajan, vd., 2010)), LC-MS (1,0-200,0 µg/mL (Chen, vd., 2009)) ve UV-VIS (2,0-10,0 µg/mL (Dey, vd., 2010) cihazları kullanıldığında elde edilen veriler ile CZE (4,22-21,12 µg/mL) ile geliştirmiş olduğumuz bu yöntem karşılaştırıldığında; çalışma aralığının diğer yöntemlere alternatif olarak kullanılabilir olduğu ve diğer yöntemlere göre daha hızlı ve çözücü sarfiyatının daha az olması sebebi ile tercih edilebilir bir yöntem olduğu görülmüştür.

Uygun ekstraksiyon koşulları sağlanarak OLO' nun CZE' de ayırma koşulları ve ilaç ortamından ve yapay ortamdan geri kazanımı sağlanmıştır. Tamponun pH'ı, tamponun derişimi, tampona eklenen organik çözücünün miktarı, ortam sıcaklığı, tampon viskozitesi, enjeksiyon hacmi ve enjeksiyon zamanı incelenmiş ve validasyon basamakları kullanılarak deneysel veriler değerlendirilmiştir. İlaç etken maddesi olan OLO'nun tayini CZE'de yapılarak literatürde bir ilk gerçekleştirilmiştir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Altria K.D., 1998, Current applications in the analysis of pharmaceuticals by capillary electrophoresis, *Trends in Analytical Chemistry*, **17**, p 204-214.
- Altria K.D., 1999, Overview of capillary electrophoresis and capillary electrochromatography, *Journal of Chromatography. A.*, **856**: 443-463.
- Anand, M., Purvi, G., Nancy, P., Santosh, G., Padmanabh, D., 2010, Validated high performance thin layer chromatographic method for estimation of Olopatadine hydrochloride as bulk drug and in ophthalmic solutions, *International Journal of ChemTech Research*, **2**(3), 1372-1375.
- Bachert C., 1998, Histamine—A major role in allergy?, *Clinical and Experimental Allergy*, **28**, 15-19.
- Baker, D.R., 1998, Capillary Electrophoresis, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **71**, 4, 37.
- Bhatt P.D., Akhtar J., 2011, Development and validation of stability indicating RP-HPLC method for estimation of olopatadine hydrochloride in bulk drug and its formulations, *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, **9**(2): 153-158.
- Camileri, P., 1993, *Capillary electrophoresis: theory and practice*, CRC Press: Boca Raton.
- Collado J.A., Ramírez, F.J., 1999, Infrared and Raman Spectra of Histamine-NH₄ and Histamine-Nd₄ Monohydrochlorides, *Journal of Raman Spectroscopy*, **30**, 391-397.
- Collado J.A., Tuñon I, Silla E., Ramírez F.J., 2000, Vibrational Dynamics of Histamine Monocation in Solution: an Experimental (FT-IR, FT-Raman) and Theoretical (SCRF-DFT) Study, *Journal of Physical Chemistry A*, **104**, 2120-2131.
- Chen, W., Dai, P., Wang, H., Chu, N., Xu, H., Li, X., 2009, Determination of olopatadine in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chinese Clinical Pharmacy*, **18**(6): 338- 341.
- Dey, S., Reddy, Y.V., Swetha, B., Sandeep, K.D., Murthy, P.N., Sahoo, S.K., Kumar, D., Patro, S.S., Mohapatra, S., 2010, Method development and validation for the estimation of Olopatadine in bulk and pharmaceutical dosage forms and its stress degradation studies using UV-VIS spectrophotometric method, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, **2**: 212-218.
- Ettre, L.S., Horvath, C., 1980, *High-Performance Liquid chromatography; advances and perspectives*, Academic Press, **1**, p 4.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ewing, A.G., Wallingford, R.A., Olefirowicz, T.M., 1989, Capillary electrophoresis, American Chemical Society, **61**, 292A.
- Foret, F., Krivankova, L., Bocek, K., 1993, Capillary zone electrophoresis, VCH, Weinheim, p346.
- Fujimaki, K., Lee, X.P., Kumazawa, T., Sato, J., Sato, K., 2006, Determination of some antiallergic drugs in human plasma by direct- injection high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Forensic Toxicology*, **24**(1): 8-16.
- Fujita, K., Magara, H., Kobayashi, H., 1999, Determination of olopatadine, a new antiallergic agent, and its metabolites in human plasma by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography. B, Biomedical Sciences and Applications*, **731**(2): 345-52.
- Han, W., Han, B., Wu, L., 2010, Determination of olopatadine hydrochloride in olopatadine hydrochloride eye drops by HPLC, *Shipin Yu Yaopin*, **12**(3): 108-109.
- Han, W., Han, B., Zhu, Q., Li, X., Xing, Z., 2010, Determination of benzalkonium chloride in olopatadine hydrochloride eye drops by HPLC, *Shipin Yu Yaopin*, **12**(11): 425-427.
- Heiger D.N., HP CE Partner, 3DCE- Basics, Hewlett Packard (CDROM) 1997; 176.
- Holland L.A, Chetwyn N.P, Perkins M.D, 1997, Capillary electrophoresis in pharmaceutical analysis, *Pharmaceutical Research*, **14**, 4.
- Jorgenson, J.W., 1986, Electrophoresis, *Analytical Chemistry*, **58**, 743A
- Lauer, H.H., Ooms, J.B., 1991, Advances in capillary electrophoresis: the challenge to liquid chromatography and conventional electrophoresis, *Analytica Chimica Acta*, **250**, (1), 45.
- Li, S.F.Y., 1992, Capillary electrophoresis - principles, practice and applications, *Journal of Chromatography*, **52**.
- Liang, W., Zhou, H., Liu, D.Y., Hu, P., Jiang, J., 2006, Quantitative determination of olopatadine in human plasma by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Journal of Chinese Mass Spectrometry Society*, **27**(4): 193-197.
- Lima, L.D.L., Duarte, A.C., Esteves V.I., 2007, Optimization of phenolic compounds analysis by capillary electrophoresis, *Talanta*, **72**, 1404-1409.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Mahajan, A., Gandhi, P.S., Pandita, N., Gandhi, S.V., Deshpande, P.B., 2010, Validated high performance thin layer chromatographic method for estimation of olopatadine hydrochloride as bulk drug and in ophthalmic solutions, *International Journal of Chemical Technology Research*, **2**(3), 1372-1375.
- Mahajan A.A., Mohanraj K., Kale S., Thaker A.K., 2013, Study of olopatadine hydrochloride under ICH recommended stress conditions by LC, LC-MS/TOF for identification and characterization of degradation products, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, **36**(3), 1881-1898.
- Mahajan, A., Gandhi, P.S., Pandita, N., Gandhi, S.V., Deshpande, P.B., 2010, Validated high performance thin layer chromatographic method for estimation of olopatadine hydrochloride as bulk drug and in ophthalmic solutions, *International Journal of Chemical Technology Research*, **2**(3), 1372-1375.
- Mathrusri, A.M., Hima, B.G., Divya, I., 2012, Derivative spectrophotometric methods for the determination of Olopatadine in pharmaceutical dosage form, *Drug Invention Today*, **4**(10), 540-542.
- Nageswara R.K., Ganapaty S., Lakshmana Rao, A., 2012, Validated RP-HPLC method for the determination of olopatadine in bulk drug and in pharmaceutical dosage form, *International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences*, **2**(4), 712- 717.
- Nemutlu E., Kır S., 2003, Method development and validation for analysis of meloxicam in tablets by CZE, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **31** (2), p 393-400.
- Nemutlu E., Ozaltın N., Altınöz S., 2004, Determination of rofecoxib, in the presence of its photodegradation product, in pharmaceutical preparations by micellar electrokinetic capillary chromatography, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **378**, p 504-509.
- Ohshima, E., Otaki, S., Sato, H., Kumazawa, T., Obase, H., Ishii, A., Ishii, H., Ohmori, K., Hirayama, N., 1992, Synthesis and antiallergic activity of 11-(aminoalkylidene)-6,11-dihydrodibenz[b,e]oxepin derivatives, *Journal of Medicinal Chemistry*, **35**(11), 2074-2084.
- Ohmori, K., Hayashi, K., Kaise, T., Ohshima, E., Kobayashi, S., Yamazaki, T., Mukoyama, A., 1996, Pharmacological, pharmacokinetic and clinical properties of olopatadine hydrochloride, a new antiallergic drug, *The Japanese Journal of Pharmacology*, **12**(4), 389-400.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ohmori, K., Hayashi, K., Kaise, T., Ohshima, E., Kobayashi, S., Yamazaki, T., Mukouyama, A., 2002, Pharmacological, pharmacokinetic and clinical properties of olopatadine hydrochloride, a new antiallergic drug, *The Japanese Journal of Pharmacology*, **88**(4), 379-97.
- Say, R., 2009, Analitik Kimyada Temel Bilgiler, Anadolu Üniversitesi Yayınları, s.28-30
- Parsons M.E., Ganellin C.R., 2006, Histamine and its receptors, *British Journal of Pharmacology*, **147**, 127–135.
- Poppe, H., 1997, Some reflection on speed and efficiency of modern chromatographic methods, *Journal of Chromatography A.*, **778**, p 3-21.
- Rele R.V., Warkar C.B., 2011, Application of high performance liquid chromatographic technique for olopatadine hydrochloride and its impurity in ophthalmic solution. *International Journal of Chemical Science*, **9**(2): 601-614.
- Rao, K., Ganapaty, S., Rao, L., 2012, Validated RP-HPLC method for the determination of olopatadine in bulk drug and in pharmaceutical dosage form, *International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences*, **2**(4), 712-717.
- Schwartz J.C., Arrang J.M., Garbarg M., Pollard H., Ruat M., 1991, Histaminergic Transmission in the Mammalian Brain, *Physiological Reviews*, **71**, 1-52.
- Saifulla, K.P., Janaki, P.P., Raveendra, R.P., Krishana, R.V., Appalaraju, N., 2012, Extractive spectrophotometric estimation of olopatadine using acid dyes in tablet dosage forms, *Journal of Pharmacy Research*, **5**(4): 2104-2106.
- Sharif, N., Xu, S., Miller, S., Gamache, D., Yanni, J., 1996, Characterization of the ocular antiallergic and antihistaminic effects of olopatadine (AL-4943A), a novel drug for treating ocular allergic diseases, *Journal Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **278**(3):1251-61.
- Simons F.E.R., 2003, Antihistamins. In: *Allergy Principles and Practice*, Mosby, Inc., Philadelphia, 834-870 p.,
- Skoog, D.A., Holler, F.J., Nieman T.A., 1998, *Enstrumantal Analiz İlkeleri*, Çeviri Editorleri: Kılıc E, Koseoğlu F, Yılmaz H. 1. Baskı, Bilim Yayıncılık, Ankara.
- Sreedhar, H.Y., Sreenivasulu, A., Sunil, K.M., Nagaraju, M., 2012, Voltammetric determination of olopatadine hydrochloride in bulk drug form and pharmaceutical formulations. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, **3**(8): 2517-2521.
- Tswett, M.S., 1910, *Khromfilli v Rastitel'nom i Zhivotnom Mire'* Izd. Karbasnikov, Warsaw, p 380.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Varghese S.J., Kumar A.M., Ravi T.K., 2011, Stability-indicating high- performance column liquid chromatography and high-performance thin- layer chromatography methods for the determination of olopatadine hydrochloride in tablet dosage form. *Journal of AOAC International*, **94**(6): 1815-20.
- Weinberger, R., 1994, Practical Capillary Electrophoresis, *Journal of Liquid Chromatography*, **17**, 4, p312.
- Wen-Fang, H., Bao-Ping, H., Li-Fen, W., 2010, Determination of Olopatadine hydrochloride in Olopatadine hydrochloride eye drops by HPLC, *Food and Drug*, **3**, 108-109.
- Xu, W., Niu, C., 2007, Determination of related substances in olopatadine hydrochloride by HPLC. *Zhongguo Yiyao Gongye Zazhi*, **38**(12): 870- 871.
- Zhu P., Wen Y.G., Fan X.P., Zhou Z.L., Fan R.X., Chen J.M., Huang K.L., Zhu X.L., Chen Y.F., Zhuang J., 2011, A rapid and sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for determination of olopatadine concentration in human plasma. *Journal of Analytical Toxicology*, **35**(2): 113-8.