

**AMBROKSOL HCl ÜN AKIŞ-ENJEKSİYON VE
BAZI POLAROGRAFİK TEKNİKLERLE
MİKTAR TAYİNİ**

Ecz. Pınar BENLİ

**Anadolu Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Öğretim Yönetmeliği Uyarınca
Analitik Kimya Anabilim Dalında
DOKTORA TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.**

Danışman : Prof.Dr. Muzaffer TUNÇEL

Şubat 1998

*Tezimin bir kısmının yada tamamının
yayımlanmasına veya fotokopi çekilmesine
izn veriyorum.*

Ecz. Pınar BENLİ

Pınar Benli

**ANADOLU ÜNİVERSİTESİ
MERKEZ KÜTÜPHANESİ**

Ecz. Pınar BENLİ' nin DOKTORA TEZİ olarak hazırladığı "AMBROKSOL HCl ÜN AKIŞ-ENJEKSİYON VE BAZI POLAROGRAFİK TEKNİKLERLE MİKTAR TAYİNİ" başlıklı bu çalışma, jürimizce Lisansüstü Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

19.02.1998

Üye: Prof. Dr. Muzaffer TUNÇEL

Üye: Prof. Dr. Zühre SENTÜRK

Üye: Prof. Dr. Neşe KIRIMER

Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun

27.01.1998 gün ve 04 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

ÖZET

Bu çalışmada, akış-enjeksiyon ve polarografinin doğru akım (DC), diferansiyel puls (DP), artan amplitüdü puls (SIAP) ve sabit amplitüdü puls (SCAP) gibi teknikleri ile ilgili olarak ambroksol HCl ün tayinine dayalı yöntemler tanıtılmaktadır. Ek olarak, söylenen maddenin potansiyometrik davranışları da incelenmiştir.

Akış-enjeksiyon analizi deneyleri sırasında çözgen olarak su kullanılmıştır. 2 s lik enjeksiyon yapılmış, tayinler 209 nm de gerçekleştirilmiştir.

Polarografik çalışmalar için en iyi taşıyıcı elektrolit 0.2M KCl, 0.2M tampon ve %10 izopropil alkolden oluşmaktadır. Belirlenen taşıyıcı elektrolit sisteminin pH 7 deki çözeltisinde optimum polarografik parametreler, 4 mV.s^{-1} , 1000 din.cm^{-2} basınç ve 0.8 s damlama süresi olarak bulunmuştur. Bu koşullarda, sistem yarı-tersinir ve tekniklerin ilgili akımları ambroksol HCl derişimi ile lineerdir.

Farmasötik tabletlerdeki ambroksol HCl ün tayini akış-enjeksiyon ve polarografik yöntemin bazı teknikleri ile gerçekleştirilmiştir. İstatistiksel değerlendirmelere bağlı olarak memnun edici sonuçlar elde edilmiştir.

Sonuç olarak önerilen yöntemler umut vericidir. Bu yöntemler pratik ve seçici olup kalite kontrol laboratuvarlarına önerilebilecekleri düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Ambroksol HCl, Akış-enjeksiyon analizi, Polarografik analiz, Farmasötik tablet, Potansiyometri

SUMMARY

Flow-injection and polarography with its certain modes such as direct current (DC), differential pulse (DP), superimposed increasing amplitude pulse (SIAP) and superimposed constant amplitude pulse (SCAP) methods based on ambroxol HCl determination are described in this study. Additionally, potentiometric behaviour of mentioned compound was also investigated.

Water was used as a solvent during the experiments of flow-injection analysis. 2 s injection volume was used and detection was realised at 209 nm.

For polarographic studies, the supporting electrolyte consisting of 0.2M KCl, 0.2M buffer at pH 7 and 10 % isopropyl alcohol was the best electrolyte. The optimum parameters was found to be as rate of potential of $4 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, pressure of $1000 \text{ dyn}\cdot\text{cm}^{-2}$ and drop time of 0.8 s. In this conditions, the system was quasi-reversible and the related currents of the techniques are linear with ambroxol HCl concentrations.

The flow-injection method and the certain techniques of polarography were applied for the assays of ambroxol HCl in a pharmaceutical tablets. Satisfactory results were obtained depending on the statistical evaluations.

In conclusion, present studies are seem to be a promising methods, they are practical, sensitive and might be proposed for the quality control laboratories.

Key words: Ambroxol HCl, Flow-injection analysis, Polarography, Pharmaceutical tablets, Potentiometry

TEŞEKKÜR

Çalıőmalarım sürecinde değerli fikirleri, yardım ve ilgileri ile beni yönlendirip yüreklendiren saygıdeğer hocam Prof. Dr. Sayın Muzaffer TUNÇEL e,

Katkı, sabır ve desteklerinden dolayı sevgili arkadaşlarım Yard. Doç. Dr. Sayın Zeki ATKOŐAR, Yard. Doç. Dr. Sayın Dilek Ak, Yard. Doç. Dr. Sayın Göksel ALTIOKKA ve Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü elemanlarına ,

En içten teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	III
SUMMARY	IV
TEŞEKKÜR	V
İÇİNDEKİLER	VI
ŞEKİLLER	VIII
TABLolar	IX
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	2
2.1. Ambroksol HCl ün Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	2
2.2. Ambroksol HCl ün Etki Mekanizması	2
2.3. Ambroksol HCl ün Metabolitleri	4
2.4. Ambroksol HCl ün Tayin Yöntemleri	6
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	13
3.1. Kullanılan Aletler	13
3.2. Kullanılan Kimyasallar	13
3.3. İşlemler	14
3.3.1. Akış-enjeksiyon yönteminde yapılan işlemler	14
3.3.2. Potansiyometrik titrasyon için gerekli işlemler	15
3.3.3. Polarografik çalışmalar için gerekli işlemler	15
3.3.3.1. Taşıyıcı elektrolit	15
3.3.3.2. Polarografik işlemler	16
3.3.4. Geliştirilen yöntemlerin tabletlere uygulanmasındaki işlemler	16

	Sayfa
4. SONUÇ VE TARTIŞMA	17
4.1. Akış-enjeksiyon Yöntemi ile Ambroksol HCl ün Miktar Tayini	17
4.2. Potansiyometrik Yöntemle Ambroksol HCl ün Tayini	20
4.3. Polarografik Yöntemle Ambroksol HCl ün Tayini	22
4.3.1. Taşıyıcı elektrolit seçimi	22
4.3.2. pH nın sınır akımı üzerine etkisi	22
4.3.3. Civa rezervuarına uygulanan basıncın sınır akımı üzerine etkisi	25
4.3.4. Potansiyel tarama hızının etkisi	28
4.3.5. Damlama süresinin etkisi	29
4.3.6. Sıcaklığın etkisi	30
4.3.7. Elektrokapillerite	30
4.3.8. Tersinirliği (reversibilite)	31
4.3.9. Yinelenebilirlik	33
4.3.10. Organik faza çekilimi	34
4.3.11. Optimum koşulların belirlenmesi ve polarografik tekniklere uygulanışı	34
4.3.12. Derişimin akım üzerine etkisi	35
4.4. Ambroksol HCl Şuruplarının İncelenmesi	38
4.5. Geliştirilen Yöntemin Ambroksol HCl Tabletlerine Uygulanması	38
KAYNAKLAR	41
ÖZGEÇMİŞ	

ŞEKİLLER

	Sayfa
2.1 Ambroksol molekülünün kimyasal yapısı	2
2.2 Bromhekzin HCl ün kimyasal yapısı	2
2.3 Ambroksol HCl ün biyolojik sıvılardaki metabolizma ürünleri	5
4.1 1-5 saniye süreli hacımdaki sabit derişimli Ambroksol HCl ün pik yüksekliği ilişkisi (a) ve 1×10^{-4} - 5.15×10^{-4} M derişimdeki Ambroksol HCl çözeltilerinin özgün eğrileri (b)	18
4.2 158.3 mg Ambroksol HCl ün 0.0449N sodyum hidroksit ile elde edilen potansiyometrik eğrisi (a), bu eğrinin birinci (b) ve ikinci (c) türev eğrileri	21
4.3 1.89×10^{-4} M Ambroksol HCl içeren çözeltinin (pH 7) içerdii izopropil alkol miktarına göre elde edilen polarogramları	23
4.4 1.89×10^{-4} M Ambroksol HCl ün çeşitli pH larda %10 izopropanol, 0.2M KCl ve 0.2M fosfat tamponu içerisindeki DC (a) ve DP (b) polarogramları	24
4.5(a) 9.09×10^{-5} M Ambroksol HCl çözeltisinin -1500mV da 400-1400 din.cm^{-2} aralığındaki basınç değerlerinin sınır akımlarına karşı değişimleri ilişkisi	25
4.5(b) 9.09×10^{-5} M Ambroksol HCl çözeltisinin -1500mV da 400-1400 din.cm^{-2} aralığındaki basıncın kare kökü değerlerinin sınır akımlarına karşı değişimleri ilişkisi	26
4.6 Çeşitli derişimlerdeki ambroksol HCl çözeltilerinin sınır akımları ile basıncın kare kökü ilişkisi	27
4.7 Ambroksol HCl ün çeşitli potansiyel tarama hızlarında elde edilen DP polarogramları	28
4.8 1.87×10^{-4} M Ambroksol HCl ün polarografik davranışları üzerine damlama süresinin $t^{2/3}$ fonksiyonunun 0.4 ile 2.0 s aralığında değişimi	29
4.9 1.87×10^{-4} M Ambroksol HCl çözeltilerinin sınır akımı değerlerinin 27-39 °C arası değişimi	30
4.10 Ambroksol HCl ün elektrokapillerite eğrisi	31
4.11 Ambroksol HCl ün tersinirliği ile ilgili eğriler	32
4.12 9.36×10^{-5} M Ambroksol HCl çözeltisinin optimum koşullarda DC, DP, SCAP ve SIAP polarogramları	35
4.13 2.33×10^{-5} M Ambroksol HCl çözeltisinin UV-spektrumu	37

TABLÖLAR

	Sayfa
4.I Akış-enjeksiyon ve UV-spektrofotometrik yöntemlerle ticari bir Ambroksol HCl tabletindeki tayinler ve istatistiksel sonuçları	19
4.II Birke'ye göre tersinirlik ile ilgili kriterler	33
4.III DC, DP, SCAP ve SIAP teknikleri ile ilgili kalibrasyon eşitlikleri ile ilgili bilgiler	36
4.IV Ambroksol HCl ün UV-spektrumu karakteristikleri	37
4.V Ambroksol HCl tabletlerinde polarografik yöntemle DC, DP, SIAP ve SCAP teknikleri ile UV-spektrofotometrik tayinlerinin istatistiksel sonuçları	39

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Ambroksol HCl, 4-[[[(2-Amino-3,5-dibromofenil)-metil]amino]sikloheksanol; N-(trans-p-hidroksisikloheksil)-(2-amino-3,5-dibromobenzil)amin yapısında, hidroklorür (HCl) tuzu şeklinde bulunan bir ilaç olup, mukolitik etkisi nedeni ile akciğer hastalıklarında kullanılmaktadır. Madde ile ilgili yapılan çalışmalar daha çok farmakolojisine dayalı olarak yoğunlaşmıştır (1-9). Bununla beraber kalitatif organik analiz için ince tabaka sıvı kromatografisi (TLC) (10,11) yöntemiyle yapılan çalışmalar saptanmıştır. Miktar tayini ile ilgili olarak gaz-likit kromatografik (GLC) (12-13), spektrofotometrik (14,15), yüksek basınçlı sıvı kromatografik (HPLC) (16-21) ve akış-enjeksiyon (flow-injection) yöntemine (22) ilişkin çalışmalara rastlanmıştır.

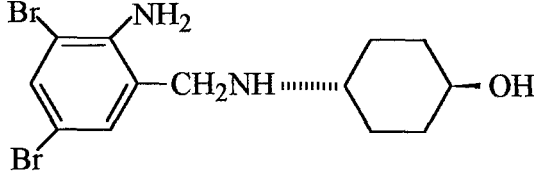
Bu çalışmada, laboratuvar koşullarımızda ambroksol HCl ün akış-enjeksiyon ve polarografik yöntemlerle miktar tayinine yönelik koşulların optimizasyonu ve potansiyometrik davranışlarının incelenmesi amaçlanmıştır.

Uygun koşulların belirlenmesinden sonra geliştirilen yöntemlerin, ambroksol HCl içeren tabletler için kullanılabilirliği ve yöntemlerin ne derece geçerli olduğu istatistiksel değerlendirmelerle ortaya konulmaya çalışılmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Ambroksol HCl ün Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Ambroksol HCl, [trans-4(2-Amino-3,5-dibromobenzilamino)sikloheksanol] kimyasal formülüne sahip bir madde olup hidroklorür tuzu şeklindedir. Kapalı formülü $C_{13}H_{18}Br_2N_2O.HCl$, molekül ağırlığı 414.57 dir. Açık formülü Şekil 2.1 deki gibidir.



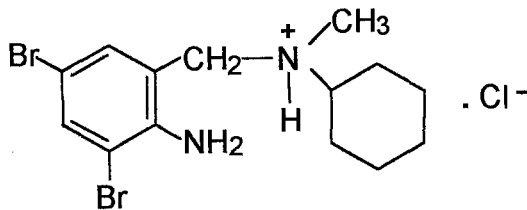
Şekil 2.1. Ambroksol molekülünün kimyasal yapısı.

Kokusuz, beyaz tozudur. Metanolde tümüyle, suda büyük ölçüde çözünür. Diethyl eter ve kloroformda çözünmez.

Elementel analiz verilerine göre; % 41.29 C, % 4.80 H, % 42.27 Br, % 7.41 N ve % 4.23 O içermektedir.

2.2. Ambroksol HCl ün Etki Mekanizması

Ambroksol HCl, bromhekzinin (N-Sikloheksil-N-metil-(2-amino-3,5-dibromo benzil)-amonyum klorür] metaboliti olarak benzer etki gösterir. Bromhekzinin kimyasal yapısı Şekil 2.2 de verilmiştir.



Şekil 2.2. Bromhekzin HCl ün kimyasal yapısı.

Yapılan klinik çalışmalar sonucunda ambroksol HCl ün oldukça iyi tolere edildiği gözlenmiş, istenmeyen yan etkileri olmadığı bildirilmiştir. Bu hastaların devam eden

tedavilerine rağmen (tedavide streptomisin, kortikosteroid preparatları ve insülin gibi ilaçlar olsa bile) sonucun etkilenmediği bildirilmektedir (1).

Bromhekzin metaboliti olan ambroksol HCl, bronşiyal sekresyonu artırıcı olarak bilinir ve ekspektoran olarak kullanılır. Bu etkisinin yanısıra, ürikozüriyi artırma yolu ile plazma ürik asit düzeyini tersinir olarak düşürdüğü bulunmuştur. Bu etkisi ambroksol HCl ün yüksek oral dozlarına bağlı olarak ortaya çıkarılmış ve bu dozlarda da iyi tolere edildiği saptanmıştır. Oral kullanımda süratle ve hemen tümüyle absorbe olup, yaklaşık % 90 ı plazma proteinlerine bağlanır. Eliminasyonun yaklaşık % 80 i renal yolla olur (2).

Kronik bronşit sendromunun en önemli özelliği, mukusun nicelik ve nitelik bakımından oluşturduğu sıkıntıdır. Bu durumda trakeobronşiyal sekresyonlara etkili birçok madde kullanılır (3). Bunların etki mekanizmaları değişik şekillerde olabilir :

- 1- Teofillin, β -mimetiklerin etkileri gibi seröz ve muköz trakeobronşiyal bezlerin stimülasyonu şeklinde,
- 2- Potasyum iyodür, amonyum klorür gibi mukus içindeki su içeriğini değiştirmek şeklinde,
- 3- Nervus vagus yolu ile stimüle edici etki göstererek (emetin, guaifenesin gibi),
- 4- N-asetil -L -sistein gibi mukus sülfür bağlarının ayrılması yoluyla etki ederek,
- 5- Mukus proteinleri, glikoproteinler ve DNA nın (tripsin, lizozim, DRNase ile) digesyonu yolu ile etki ederek,
- 6- Tiloksapol gibi direkt mukus solubilizasyonuna etki ederek,
- 7- Bromhekzin, sobrerol, farrerol, damiodol, s-karboksimetil-L-sistein gibi mukusun nicelik ve niteliğinde değişiklik oluşturacak şekilde, direkt trakeobronşiyal bezler üzerine etki ederek.

Trakeobronşiyal sekretolitik bromhekzinin metaboliti olan ambroksol HCl ise farklı bir mekanizma ile etkisini gösterir. En önemli etkisi, akciğerlerdeki surfaktan (yüzey gerilim maddesi) sistemi üzerindeki stimulan etkisidir. Tip II pnömositler tarafından yapılan (4) surfaktanın yapımı ve salgılanması, bir monosubstans olan ambroksol HCl

tarafından artırılır. Sürfaktan, akciğerler için hayati önemi olan bir maddedir ve özellikle alveollerin yüzey gerilimini azaltarak büzüşmesini önler. Bu etkisiyle, Bebek Respiratuvar Distres Sendromu (IRDS) ve Erişkin Respiratuvar Distres Sendrom (ARDS) larının tedavisinde faydalı bir ilaç olarak kullanılır.

Solunum sistemindeki biyokimyasal değışikliklerin aktif madde olan ambroksol HCl ile oluşturulduğu bildirilmektedir. Ambroksol HCl ün tavşan ve kobaylarda trakeo-bronşiyal sekresyonu artırdığı da ifade edilmektedir (5).

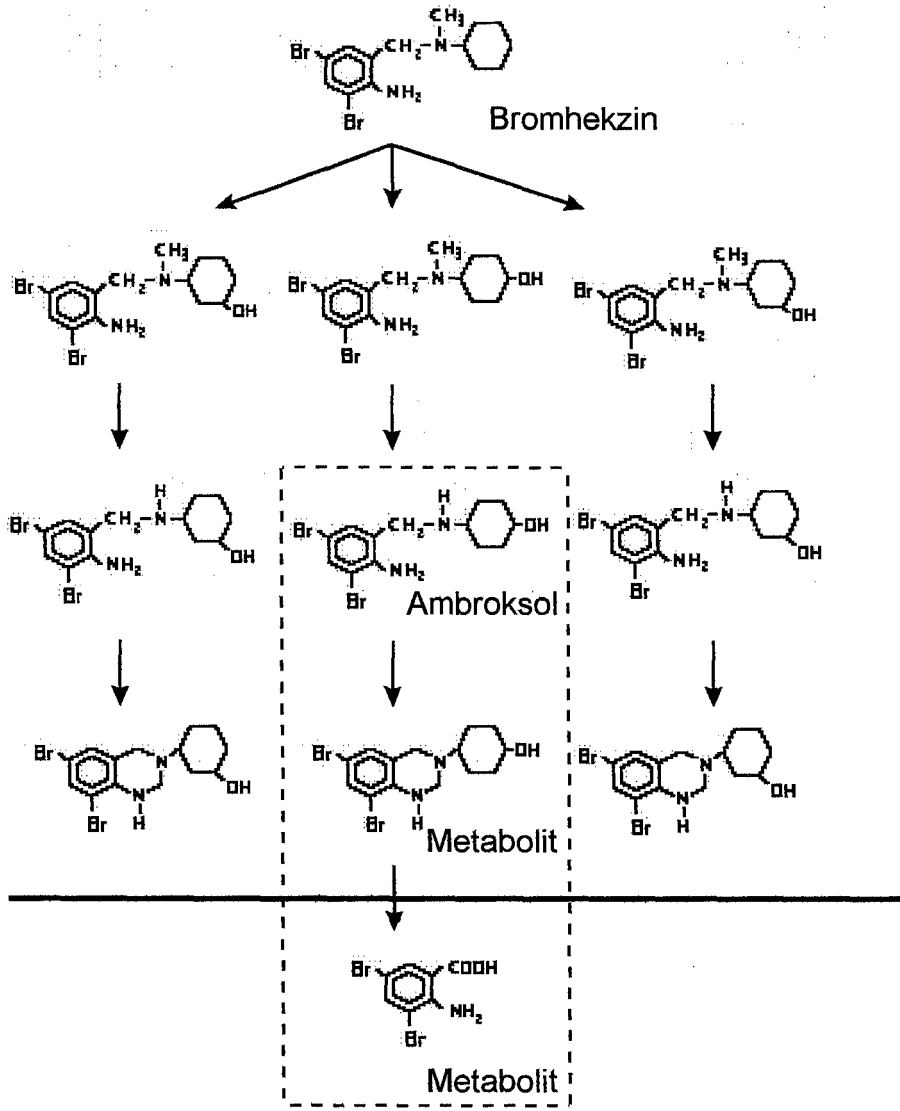
Ambroksol HCl ün mukokinetik aktivitesi de vardır. Böylelikle solunum yolları epitelindeki titrekle tüylerin hareketliliğini uyararak, mukosilyer transportu artırır (6).

Bu ilaç kronik bronşit üzerine etkilidir. Ama akut bronkodilatatör aktiviteye sahip değildir. Antibronşitik etki mekanizmasını açıklamanın oldukça güç olduğu ifade edilmektedir (3).

2.3. Ambroksol HCl ün Metabolitleri

15 mg Ambroksol HCl, IV ve oral yoldan verilerek idrar ve plazmadaki metabolik ürünler araştırılmıştır. IV ve oral yoldan kullanılışın metabolik ürünleri etkilemediği gözlenmiş ve biyotransformasyon reaksiyonları sonucunda iki major metabolit verdiği saptanmıştır. Bunlar 6,8-dibromo-3-(trans-4-hidroksisikloheksil) - 1, 2, 3, 4 - tetrahidro - kinazolin ve 3, 5-dibromo-antranilik asittir. Bu metabolitlerin daha ziyade glukoronidler gibi suda çözünen konjugatlar şeklinde atılan inaktif metabolitlere dönüştükleri bildirilmektedir (7).

Ambroksol HCl ün biyolojik sıvılardaki nicel saptanması, ¹⁴C ile işaretlenmiş formaldehit ile türetilmiş radyokimyasal ile başarılmıştır. Reaksiyonlar Şekil 2.3 de gösterilmiştir.



Şekil 2.3. Ambroksol HCl ün biyolojik sıvılardaki metabolizma ürünleri.

Ambroksol HCl ün rat, tavşan, köpek ve insanlardaki karşılaştırmalı farmakokinetik ve biyotransformasyon çalışmaları sonucunda bu dört türdeki biyotransformasyon yolunun birbirine benzer şekilde olduğu, sonuçta dibromoantranilik aside dönüştüğü ifade edilmektedir. Ana bileşikten konjugatların oluştuğu faz II reaksiyonlarının yalnızca insan ve tavşanlarda gözlemlendiği bildirilmektedir (8).

Farmakokinetik ve biyoeşdeğerlik olarak ambroksol HCl ün farklı formülasyonlarının, etki açısından birbirlerine eşdeğer olduğu ifade edilmiştir (9).

2.4. Ambroksol HCl ün Tayin Yöntemleri

Musumarra ve ark. (10) standardize edilmiş R_f değerli temel bileşenlerin analizi yolu ile ilaçların sınıflandırılmasını sağlayan, dört elüent sistemli, ince tabaka sıvı kromatografi yöntemi geliştirmişlerdir. Dörtlü ayırıcı sistem şu şekilde açıklanmaktadır: Etil asetat-metanol-% 30 amonyak (85:10:5), sikloheksan-toluen-dietilamin (65:25:10), etilasetat-kloroform (50:50) ve aseton. Plakların potasyum hidroksit ile doyurulmuş ve 362 ilacın denenmiş olduğu ifade edilmekte, sonuçlar tablolar şeklinde gösterilmektedir.

Ambroksol HCl için düzeltilmiş $R_{fc} \times 100$ değerleri; 7-15 μg miktarları arasındaki ilaç için yukarda açıklanan elüent sistem sırasına göre 72,13,5 ve 70 olarak bildirilmektedir. Standart sapma farkı 0.765 olarak verilmektedir.

Bu çalışmada, ilaçların sınıflandırılmasında kullanılmakta olan farklı çözücü sistemli TLC uygulamalarında PCA (Principal Component Analysis) nın istatistiksel yaklaşımlar için uygun bir yöntem olduğu açıklanmaktadır. Az sayıda değişkenli PCA uygulamalarının, tüm bileşiklerin iki boyutlu grafikte gösterilmesine olanak sağladığı ifade edilmektedir. Ancak dört elüent sistem içinde standardize edilmiş R_f değerlerinin sınıflandırma için yeterli olmadığı, daha farklı, örneğin gaz kromatografik, incelemelere gerek duyulduğu belirtilmektedir. Bundan dolayı sonraki çalışmada PCA ve gaz kromatografisi birlikte kullanılmıştır.

Musumarra ve ark. (11) tarafından yapılan diğer bir çalışmada, önceki yöntemde belirtilen ilaçların stasyonere faz olarak SE 30 kullanılarak gaz kromatografik davranışları incelenmiştir. 277 bileşiğin SE 30 fazındaki gaz kromatografik alıkonma (retention) indeksleri saptanmış ve bu 277 bileşiğin PCA sonuçları bildirilmiştir. Ambroksol HCl için, 280°C de alıkonma indeksinin 2670 olarak bulunduğu belirtilmektedir.

Dört çözücü sistemde standardize edilmiş R_f değerli TLC den türetilen PCA çalışmalarının ve 277 bileşik için SE 30 daki gaz kromatografik alıkonma indekslerinin özellikle analitik toksikoloji açısından önemli olduğu belirtilmektedir.

Schmid (12) tarafından gerçekleştirilmiş olan çalışmanın basit bir ekstraksiyon basamağı ve türevlendirme işleminden sonra seçici olarak elektron-yakalayıcı detektör (electron-capture detector - ECD) yardımı ile kapiller gaz-likit kromatografisi yöntemini

kullanarak biyolojik sıvılardaki ambroksol HCl ün duyarlı ve süratli bir şekilde tayini olarak tanımlandığı, plazmadaki saptama sınırının 3 ng/mL olduğu, yöntemin ambroksol HCl ün insanlarda kullanılan tüm farmasötik şekillerine uygulanabileceği açıklanmaktadır. Yöntemde internal standart olarak ambroksole çok benzeyen [trans-3-(2-amino-3,5-dibromobenzilamino) sikloheksanol] hidroklorür kullanıldığı, ekstraksiyon için en uygun çözücüler olarak dietil eter ve toluen arasından toluenin seçildiği belirtilmektedir. Türevlendirmenin iki aşamada yapıldığı; önce kinazolin formasyonu için formaldehitte muamele işleminden sonra alisiklik alkol fonksiyonu için heksametildisilazan ile sililasyon işlemi uygulandığı ifade edilmektedir. Kromatografik sistemde kapiller kolon ile birlikte duyarlı, seçici, güçlü ve kapiller kolon ile uyumlu elektron-yakalayıcı detektör kullanıldığı bildirilmektedir.

Colombo ve ark. (13) tarafından yapılan çalışmada da yine elektron-yakalayıcı detektör kullanıldığı ve gaz kromatografisi ile biyolojik materyaldeki ambroksol HCl tayininin gerçekleştirildiği, yapılmış olan araştırmanın amacının basit, seçici ve duyarlı GC-ECD yöntemi ile kan, akciğer dokusu, bronşiyal aspirat ve idrarda ambroksol HCl araştırması olduğu ifade edilmektedir. Çalışma esnasında sadece küçük miktarlarda biyolojik sıvı veya dokuya gereksinim olduğu, trifloroasetik asit anhidriti ile yapılmış olan türevlendirme işleminin ECD sinyallerini artırdığı belirtilmektedir. Yöntemde internal standart olarak pinazepam kullanıldığı, pinazepamın tek bir halojen atomu içeriyor iken, türevlendirilmiş molekülünün sekiz halojen atomu içerdiği, pinazepamın duyarlılıkla saptanabilmesinden dolayı internal standart olarak seçildiği açıklanmaktadır.

Ambroksol HCl, gaz kromatografisinde türevlendirilmeden analiz edilecek olursa serbest hidroksil ve amino guruplarından dolayı kolon absorpsiyonu olacağı ve kuyruklu pikler elde edileceği düşünüldüğünden, türevlendirilerek gaz kromatografisi için uygun analiz etme özelliğinin sağlandığı bildirilmektedir.

İlaç, plazma ile alyuvarlar arasında dağıldığı için, belirtilen gaz kromatografik çalışmanın total kanda yapıldığı, akciğer dokusunda kandakinden daha yüksek konsantrasyonda bulunuşu nedeni ile yöntemin farmakokinetik çalışmalarda emniyetle kullanılabilceği ifade edilmektedir (13).

Indrayanto ve Handayani (14) tarafından yapılmış olan çalışmanın amacının, özellikle tabletler halinde bulunan ambroksol HCl ün rutin analizler için basit kromatografik ve UV-spektrofotometrik kantitatif analiz yöntemlerinin geliştirilmesi olduğu söylenmektedir.

HPLC ve GLC yöntemleri ile çalışıldığı belirtilen araştırmada; HPLC için UV-VIS spektrofotometrik detektör, GLC için alev-iyonizasyon (flame-ionization) detektör kullanıldığı bildirilmektedir. HPLC de mobil faz olarak asetonitril-amonyum asetat (10 mM) ile pH sı 4.0 e ayarlanmış trietilamin (10 mM) kullanıldığı, akış hızının 2.0 mL/dak, dalga boyunun 245 nm olduğu açıklanmaktadır. GLC için izotermal olarak 260°C ye ısıtılmış kolon kullanıldığı, enjektör ve detektör ısısının 300°C, taşıyıcı gazın nitrojen ve akış hızının 60 mL/dak olduğu, internal standart olarak siproheptadin hidroklorür kullanıldığı ifade edilmektedir. UV-spektrofotometrik çalışmada maksimum dalga boyu olarak 244 nm seçildiği, katkı maddelerinin spektrumu etkilemediği belirtilmekte, her üç yöntem için hesaplanan saptama limitinin (limit of detection-LOD), miktar limitinin (limit of quantitation-LOQ), doğruluk ve geri kazanımlarının lineer oluşları ile yöntemlerin geçerlilikleri gösterilmektedir.

Indrayanto ve Handayani (15) tarafından yapılmış olan çalışmada ise şuruplardaki ambroksol HCl ün ters-faz (reverse-phase) HPLC ve UV-spektrofotometrik yöntemleri kullanarak kantitatif miktar tayini gerçekleştirilmiştir. Çok sayıda inaktif bileşenin bulunduğu sentetik şuruplardaki bu bileşenlerin, yöntemleri etkilemediği, ticari şuruplardaki geri kazanımın her iki yöntemde de oldukça iyi olmasına karşın, hangi yöntemin diğerine göre daha doğru olduğunun saptanmasının güç olduğu, bunun nedeninin de elde edilen orjinal konsantrasyonların göreceli olarak farklılığından kaynaklandığı belirtilmektedir.

Kromatografik koşulların açıklanmasında, mobil faz olarak sentetik şuruplar için asetonitril-amonyum asetat (10 mM), asetik asit ile pH 4.0 a ayarlanmış trietilamin (10 mM) (20:80, v/v) kullanıldığı, tüm ticari şuruplarda di-n-butilamin ilave edildiği (25:75, v/v) bildirilmektedir. Akış hızının 2.0 mL/dak olduğu, 245 nm dalga boyunun seçildiği söylenmektedir.

UV-spektroskopi için kalibrasyon eğrisinin, günlük olarak 0.02-0.10 mg/mL derişim aralığında, 0.1N hidroklorik asit içinde hazırlandığı ve absorbans değeri için maksimum dalga boyu olarak 307.4 nm seçildiği ifade edilmektedir (15).

Botterblom ve ark. (16) tarafından yapılan çalışmada insan plazma ve idrarındaki ambroksol HCl ün süratli ve duyarlı bir şekilde tayininin amaçlandığı açıklanmaktadır.

Biyolojik sıvılardaki ambroksol HCl ün tayini için UV detektör kullanılarak HPLC yöntemiyle (9) ve elektron-tutucu detektör kullanılarak kapiller gaz kromatografi yöntemiyle (12) çalışmalar yapıldığı daha önce belirtilmişti. Her iki yöntemde de basit bir ekstraksiyon basamağı ve formaldehit ile türevlendirme işlemi uygulanmakta, bu nedenle daha çok zamana ve düşük tayin limiti için göreceli olarak daha büyük miktarlarda numuneye gerek duyulacağı açıktır. Ayrıca ambroksol HCl ün (¹⁴C) formaldehit ile radyokimyasal derivatizasyonunun yapıldığı çalışmalarda (7,8) TLC ile tayinden dolayı çok sayıda numune analiz edilebilmesine karşılık, kinetik çalışmalar için uygun olmadığı da açıklanmaktadır.

Bu çalışmada, HPLC yöntemi ve UV detektör kullanarak, küçük miktarlarda plazma veya idrar örneklerinden, düşük saptama sınırı ile ambroksol HCl miktar tayininin mümkün olduğu bildirilmektedir (16).

Mobil fazın asetonitril-metanol-0.01M fosfat tamponu (pH 7.0)-tetrahidrofuran (35 :35:27.5:2.5, v/v) dan oluştuğu, akış hızının 2.0 mL/dak olduğu, kromatografinin oda sıcaklığında gerçekleştiği, tayinin 242 nm de yapıldığı açıklanmaktadır.

İdrar ve plazma numunelerinin, 75 mg ambroksol HCl içeren yavaş salınımlı kapsülleri kullanan gönüllülerden alındığı, plazma ve idrar örneklerinden analitik işlemler sonucu hesaplanan kalibrasyon eğrilerinin lineer olduğu bildirilmektedir. Yöntemde, 0.5 mL plazma ve 0.1 mL idrar örnekleri kullanılarak günde 50 - 60 numunenin işlenebileceği, 5 ng/mL den küçük saptama limiti ile biyolojik sıvılardaki ambroksol HCl ün incelenebileceği ve ayrıca kinetik çalışmalar için de kullanılabilceği ifade edilmektedir.

Nobilis ve ark. (17) yaptıkları çalışmada, insan plazmasında ambroksol HCl ün yüksek basınçlı sıvı kromatografik yöntemle tayinini gerçekleştirmişlerdir. Araştırmada, mobil fazı oluşturan asetonitrilin çok az tüketilmesi ile oda ısısında gerçekleştirilen

yarışmalı-iyon ters-faz kromatografisi ile ambroksol HCl ün s¼ratle tayininin yapıldığı açıklanmaktadır. Mobil fazın asetonitril - nonilamin (5:95, v/v) den oluştuğu, akış hızının 0.9 mL/dak, tayinin 242 nm de UV-VIS detekt¼r kullanılarak yapıldığı ve tayin limitinin 4 ng/mL olduğu ifade edilmektedir.

Ters-faz HPLC ile ger¼ekleřtirilen yarışmalı iyon kromatografisinin basit bileşiklerin ve onların metabolitlerinin ayırımında sık¼a kullanıldığı belirtilmektedir. Uzun alkil zincirli primer aminin (nonilamin) mobil faza ilavesi ile mobil fazın ayırım etkisinde kuvvetli artış olduğu, piklerin geniş ve simetrik belirdikleri ifade edilmektedir. Asit mobil fazda protonlanmış nonilamin, solid faz y¼zeyindeki silanol kalıntılarını maskeleydiğinden, silanol-alkil amonyum etkileşimi ile oluşan ikinci nonilamin molek¼l¼, hidrofobik etkileşimlere karşı stabil kalmaktadır. Silanol gruplarının dinamik blokajı ile polar silanol-ila¼ etkileşmesi azaldığından daha kısa alıkonma zamanı ile gelişmiş, d¼zg¼n şekilli ve simetrik pikler elde edildiği belirtilmektedir. ¼alıřmada 12 g¼n¼ll¼n¼n plazmadaki ila¼ derişimlerinin ¼l¼m¼ ile ¼eřitli farmakokinetik parametrelerin hesaplandığı bildirilmektedir.

Nieder ve Jaeger (18) tarafından ger¼ekleřtirilmiř olan ¼alıřmada, se¼ici olarak ambroksol HCl ün insan plazmasından HPLC y¼ntemi ile miktar tayininin yapıldığı bildirilmektedir. Belirtildiğine g¼re plazma alkali ile tamponlanıp eter ile ekstrakte edildikten sonra organik ¼¼z¼c¼ dil¼e asit ile yeniden ekstrakte edilip ters-faz HPLC y¼ntemi uygulanmıştır. Ayrıca bu ¼alıřmada, ambroksol HCl ün diğer y¼ntemlerden farklı olarak, kuvvetli bir şekilde etkilendiği diğer iki metabolitinden ¼ok iyi bir şekilde ayrıldığı ifade edilmektedir.

Asitlendirilmiş su/tetrahidrofuran karışımı ¼¼l¼ mobil faz, siyanopropil-silika bileşimli polar sabit faz ve iyon-¼ifti (ion-pairing) ile ambroksol HCl ün metabolitlerinden ayırımının sağlandığı açıklanmaktadır. Rutin analizler i¼in UV detekt¼r ¼nerilmekte, tayinin 230 nm de yapıldığı, tayin limitinin 5 ng/mL olduğu, internal standart olarak propranolol hidroklor¼r kullanıldığı, y¼ntemin s¼ratli, se¼ici ve duyarlı olduğu açıklanmaktadır.

Brizzi ve Pasetti (19) tarafından farmas¼tik preparatlardaki ambroksol HCl ün HPLC y¼ntemi ile tayini ger¼ekleřtirilmiřtir. Ambroksol HCl ün ampul şeklinde enjektabl

çözeltileri ile granüllerinin olduğu, ampullerin ambroksol hidroklorür ve sodyum fosfat içermekte iken, granüllerin ambroksol hidroklorüre ilaveten bir miktar katkı maddesi, stabilizatör ve tatlandırıcı içerdikleri, bunların sonucu etkilemediği bildirilmektedir. Farmasötik preparatlardaki ambroksol HCl ün kantitatif analizi için geliştirilmiş olan yöntem günümüzde biyolojik sıvılardaki ambroksol HCl tayini için kullanıldığı bildirilen ters-faz HPLC yöntemidir. HPLC yönteminde üçlü solvent karışımı, 5 µm stasyonier faz, göreceli olarak yüksek akış hızı ve iyon-çifti kullanıldığı açıklanmaktadır. % 80 (v/v) asetonitril ve amonyum asetat, sodyum dodesil sülfat ve trietilaminden oluşan mobil faz sisteminin kullanıldığı, akış hızınının 1.5 mL/dak, alıkonma zamanının (t_R) 4.0 dakika olduğu, düzgün şekilli piklerin elde edildiği, bunun da trietilaminin eluent karışımına ilavesinin stasyonier fazdaki silanol gurup artıklarını bloke etmek suretiyle sağlandığı belirtilmektedir. Ters-faz-HPLC yönteminin ambroksol HCl ün farmasötik şekillerinin kantitatif analizi için doğru ve güvenilir bir yöntem olduğu ifade edilmektedir.

German ve ark. (20) tarafından yapılmış olan çalışmada HPLC kullanılarak farklı çözücü hacimlerinin ergotamin tartarat, astemizol, terfenadin, bromhekzin hidroklorür, kafein, ambroksol HCl, fenilefrin hidroklorür, enalapril maleat ve betametazonun pik yükseklikleri ve alanları üzerine etkisinin araştırıldığı belirtilmektedir. Ters-faz kromatografik sistemde loopun farklı ebat ve çeşitli hacimlerde denendiği, mobil fazdan daha az kuvvetli enjeksiyon çözeltisi kullanıldığında astemizol, bromhekzin, ergotamin ve terfenadin için pik alanları bakımından değişik yanıtlar alındığı ifade edilmektedir.

HPLC de incelenebilir değişkenin enjeksiyon sistemi olduğu, hatalı olabileceği, aynı enjektör kullanılsa da arasına tekrarlanabilirliğin sağlanılamayabileceği belirtilmektedir. Ölçülebilen pik yüksekliği ve pik alanlarındaki kantitatif problemlerin numune-çözücü etkileşiminden veya enjeksiyon sistemindeki adsorbsiyondan olabileceği bilindiğinden, çalışmada bazı ilaçların HPLC enjektör loopunun iç yüzeyindeki adsorbsiyon etkilerinin araştırıldığı açıklanmaktadır. 20 µL loopun 60, 150 ve 300 µL sulu çözeltiler ile doldurulduğu, enjeksiyonda kullanılan hacimlere bağlı olarak alan yanıtlarının arttığı, elde edilen sonuçların basit bir adsorbsiyon mekanizması ile açıklanabileceği ifade edilmektedir. Mobil faz olarak kuvvetli bir çözücü kullanıldığında, çözücünün loopdan akarak alıkonacak maddeye desorbe olup ölçülecek alanın artmasına yol açtığı, metanolün mobil faz veya enjeksiyon solventi olarak kullanılması durumunda da enjeksiyon

çözültisinin ilaç adsorpsiyonunu kuvvetle engelliyor olması nedeni ile hacıma bağlı olmaksızın alan yanıtlarının değişmediği bildirilmektedir. Sonuç olarak HPLC çalışmalarındaki bu problemin sabit hacımlı enjektör loopu kullanılarak, ya da enjeksiyon çözeltisi olarak ilaçların en uygun çözücülerinin seçilmesinin çözüm olabileceği ifade edilmektedir.

Flores-Murrieta ve ark. (21) tarafından yapılmış olan çalışmada amperometrik tayin ile HPLC yöntemini kullanarak insan plazmasında ambroksol tayininin yapıldığı bildirilmektedir. Zamanımızda elektrokimyasal tayin yöntemi yardımı ile yapılan HPLC çalışmalarının, kolaylıkla oksitlenip indirgenebilen organik bileşiklerin araştırılmalarında yaygın biçimde kullanılıyor olmalarından hareketle, üzerinde birkaç oksitlenebilecek gurup taşınması nedeni ile ambroksol molekülüne uygulandığı açıklanmaktadır. Çalışmada, kinazolidion türevi olan pelanserinin internal standart olarak kullanıldığı, yöntem sayesinde plazma örneklerinden ambroksolün doğru ve süratli bir şekilde tayininin mümkün olduğu ifade edilmektedir.

Kromatografide mobil faz olarak 0.1M fosfat tamponlu metanolün kullanıldığı, kolon ısısının 40°C, akış hızının 1.5 mL/dak olduğu açıklanmaktadır. Ambroksol ün 850 mV da en yüksek pik değerinin elde edildiği belirtilmektedir. Kromatogramlarda alıkonma zamanlarının internal standart ve ambroksol için; 8.4 ve 11.4 dakika olarak saptandığı, saptama limitinin 5 ng/mL olduğu açıklanmaktadır.

Perez-Ruiz ve ark. (22) ambroksolün bromtimol ile oluşturduğu bileşiğin, sıvı-sıvı ekstraksiyon tekniği ile kazanılıp akış-enjeksiyon yöntemini kullanarak sinyalleri spektrofotometrik yolla değerlendirmek suretiyle tayinini gerçekleştirmişlerdir. Tayinin 8×10^{-6} - 4×10^{-4} M derişim aralığında gerçekleştiğini ve saatte 40 analizin yapılabileceğini savunmaktadırlar.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Kullanılan Aletler

Kapiller elektroforezin enjeksiyon bölümü enjeksiyon ve yıkamada, kapiller 0.75 µ iç çaplı (Phenomenex) çözeltinin içinden aktığı bölüm ve kapillerin açılmış penceresinden çözeltinin absorbansını okuyan tarayıcı bir detektör Spectra FOCUS UV-VIS (Therma Separation Products) kullanılmıştır. Detektör verileri bir Etacomp 486 DX 4-100 bilgisayarla yorumlanmaktadır. Toplanan veriler OS/2 Warp programı altında çalışan PC 1000 (Version 2.6) ile irdelenmiştir.

Polarografik çalışmalar, Polaropulse Model PRG-5 polarograf, üç elektrot sistemli EGMA tipi polarografik voltametrik stant; damlayan civa, platin tel ve Ag/AgCl referans elektrot (tümü Tacussel) kullanılmıştır. Polarogramlar BBC Goertz Metrawatt Model SE 790 x-y kaydedici ile kaydedilmiştir.

pH ölçümleri M 822 Model (Elektromag) pH metre ile cam elektrot kullanılarak yapılmıştır.

Spektrofotometrik ölçümler, UV-2401 Model PC çift ışık yollu spektrofotometre (Shimadzu) ile kuvartz küvetler (Sigma) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.2. Kullanılan Kimyasallar

Çalışmalarda kullanılan ambroksol HCl standardı Biofarma İlaç Sanayii Ltd. Şti. (İstanbul) den sağlanmıştır. %99.8 saflıkta olduğu belirtilmektedir. Deneylerde kullanılan diğer kimyasal maddeler E. Merck (Almanya) firmasının üretimi olup analitik saflıktadırlar. Bu nedenle kullanılan standart ve diğer kimyasal maddeler üzerinde daha fazla saflaştırmaya gerek duyulmadan kullanılmışlardır.

Deneylerde analitik saflıkta NaOH, K₂HPO₄, HCl, İzopropil alkol, KCl ve Potasyumbifitalat kullanılmıştır.

Bidistile su laboratuvarımızda elde edilip tüm deneysel çalışmalardaki çözeltiler bu su ile hazırlanmıştır.

Çalışmanın miktar tayini ile ilgili bölümünde kullanılan ambroksol HCl tabletleri ile şurup formülasyonları yerel eczanelerden sağlanmıştır.

3.3. İşlemler

3.3.1. Akış enjeksiyon yönteminde yapılan işlemler

Akış enjeksiyon tekniği ile yapılan çalışmalarda, kapiller elektroforezin güç kaynağı dışındaki bölümleri kullanılmıştır. Bilindiği gibi, bu sistemde elektrotlar arasında çok ince yarıçaplı ergitilmiş silikalı kılcal kullanılmaktadır. Kılcalın yüzeyinde negatif yük bulunması, çözeltinin geçişi sürecinde bazı maddelerin adsorbe edilmesine neden olmaktadır. Sonuçta, bir daralmanın oluşacağı, bunun da tekraredilebilirliğin ve analizin başarısının düşmesine neden olacağı açıktır. Sayılan bu nedenler yüzünden kapillerin belirli analiz aralıklarında yıkanması gerekmektedir. Yıkama işlemi, beş dakika 0.1M NaOH, beş dakika su geçirmekle yapılmaktadır.

Gerekli yıkama işlemleri yapıldıktan sonra kapillerden su geçirilerek temel (baseline) absorbans elde edilmiştir. Kullanılan sistemde temel absorbansın sıfırlanması mümkün olmaktadır. Böylece, ambroksol HCl çözeltisinin absorbansı sürekli sıfıra ayarlanmakta, okunan absorbans doğrudan aktif madde ile ilişkili bulunmaktadır.

Bu amaçla, standdaki yuvalardan (carousel) birine, içerisinde su bulunan vial, diğer yuvalara kapillere çözeltinin enjekte edildiği, içerisinde ilgili çözeltinin bulunduğu vialler konulmuştur. Bütün çözeltiler Phenex mikrofiltreden (25 mm, 0.45 µm) geçirildikten sonra kullanılmıştır.

Bu sistemde, kullanılan parametrelere göre enjeksiyonlar yapılarak çıktılar alınmış ve üzerinde değerlendirmeler yapılmıştır.

Tabletlerde yapılan tayinlerde ise aşağıdaki yol izlenmiştir: 10 adet ambroksol HCl tablet tartılmış, ortalama tablet ağırlığı hesaplanmıştır. Tabletler bir havanda toz haline getirilmiş ve koyu renkli küçük bir şişede desikatörde saklanmıştır. Tayin için bu toz numuneden yeterince alınmış; 100 mL lik bir balonjojeye konulmuş ve distile su ile hacmi tamamlanmıştır. 2 dakika ultrasonik banyoda tutulmuş ve sonra süzülerek viallere konulup

alete enjekte edilmiştir. Akış-enjeksiyon yöntemi ile tabletlerde miktar tayini gerçekleştirilmiştir.

Yöntemlerin geçerliliğinin araştırılabilmesi için karşılaştırma yöntemi olarak UV-spektrofotometrik yöntem seçilmiş, tabletlere uygulanan ön işlemlerle kazanılan aktif maddelerin analizleri her iki yöntemle yapılmıştır.

3.3.2. Potansiyometrik titrasyon için gerekli işlemler

Potansiyometrik titrasyon için tam tartımla 158.3 mg ambroksol HCl tartılmış, bu toz bir behere alınmıştır. Ambroksol HCl ün sudaki çözünürlüğünün fazla olması yüzünden 50 mL suda çözülmüştür. Sözü edilen beherin içerisine pH metrenin cam elektrodu ile 0.1 mL lik ilavelerin daha hassas yapılabileceği 25 mL lik büretin ucuna takılı dar plastik borunun ucu daldırılmıştır. Büretin içerisine konulan 0.0449N sodyum hidroksit çözeltisi ile titre edilmiştir. Her 0.1 mL çözelti ilavesinden sonra pH değerleri kaydedilmiştir. Sonuçta değerlendirmeler türev alma yöntemi ile gerçekleştirilmiştir.

3.3.3. Polarografik çalışmalar için gerekli işlemler

Polarografik çalışmalardaki işlemler iki bölüm halinde ele alınmıştır.

3.3.3.1. Taşıyıcı elektrolit

Taşıyıcı elektrolit olarak bir çok sistem denenmiş, sulu elektrolit sistemlerinin sağlayacağı üstünlükler gözönüne alınarak bir bileşim oluşturulmasına çalışılmıştır. Bu arada, çözünürlüğü artırabilmek için en az miktarda, organik çözücü olarak izopropil alkol bu bileşimde bulunacak şekilde taşıyıcı elektrolit oluşturulmuştur.

Sonuçta, % 10 izopropil alkol, 0.2M fosfat tamponu ve 0.2M KCl den oluşan bir elektrolit sistemi ile çalışılmıştır.

pH incelenmesi sürecinde 1M HCl ve NaOH çözeltileri kullanılmış, daha sonraki çalışmalarda ise pH 7 tampon sistemi içerisinde incelemeler gerçekleştirilmiştir.

3.3.3.2. Polarografik işlemler

Polarografik çalışmalarda kullanılan aletsel düzenek ile ilgili bilgiler yukarıda verilmişti. Karakteristikleri ve performansı çerçevesinde çalışmalar yapılmıştır. Aletsel düzeneğin en büyük üstünlüğü damlayan civa elektrotun her an çalışılabilecek şekilde hazırlanmış olmasıdır. Elektrot stantı iki bölümden oluşmaktadır; bunlardan biri polarografik, diğeri ise voltametrik çalışmaya olanak vermektedir.

Polarografik incelemelerde en iyi koşullarda çalışılmalıdır. Ayrıca, analitik ve polarografik koşullarda incelenmekte olan maddenin davranışlarının aydınlatılması gerekmektedir. Bunun için, incelenmekte olan polarografik parametrelerin tümü sabit tutulmakta, içlerinden biri değiştirilmektedir. Bu çalışmada, parametre olarak potansiyel değişim hızı, damlama süresi, civa rezervuarına uygulanan basınç ve sıcaklık incelenmiştir.

Kayıtlar; katodik yönde çeşitli potansiyellerden başlanılarak ve doymuş gümüş/gümüş klorür elektrota [Ag/AgCl (doymuş KCl)] göre taranarak yapılmıştır.

Polarografinin kullanılan teknikleri açısından DC (doğru akım), DP (diferansiyel puls), SIAP (aşırı yüklenmiş artan genlikli puls) ve SCAP (aşırı yüklenmiş sabit genlikli puls) polarografik teknikleri kullanılmıştır.

3.3.4. Geliştirilen yöntemlerin tabletlere uygulanmasındaki işlemler

Geliştirilen yöntemlerin tabletlere uygulanmasında, modern farmakopelerde belirtilen koşullara bağlı kalınmıştır. Bunun için, 10 adet ambroksol HCl tablet tartılmış ve ortalama bir tabletin ağırlığı hesaplanmıştır. Tabletler bir havana konulup toz edilmiş ve içeriği renkli bir şişeye aktarılmıştır. Deneyler için ortalama bir tablet ağırlığına denk miktar tartım alınarak bir balonjoje içerisine aktarılmış, üzerine yaklaşık 50 mL % 10 izopropil alkollü su konularak çalkalanmıştır ve on dakika ultrasonik çalkalanmaya tabi tutulmuştur. Çözelti filtre edilmiş, kalıntı aynı çözelti ile yıkanarak 100 mL ye tamamlanmıştır.

Spektrofotometrik çalışmalar için bu çözeltiler ayrıca on dakika 2500 devir/daklık santrifüj işlemine tabi tutulmuştur.

4. SONUÇ ve TARTIŞMA

4.1. Akış-Enjeksiyon Yöntemi ile Ambroksol HCl ün Miktar Tayini

Son yıllarda çok ilgi gören tekniklerden biri olan bu yöntem için de diğer yöntemlere benzer şekilde, çeşitli parametrelerin optimize edilme koşulu vardır. Optimizasyon parametrelerinin, pik yüksekliği ve pik genişliği üzerinde etkisi bulunmaktadır. Akış sisteminin dispersiyon üzerine etkisi bulunduğundan, bu parametrelerin en iyi uyduğu koşulların ortaya konulması gerekmektedir.

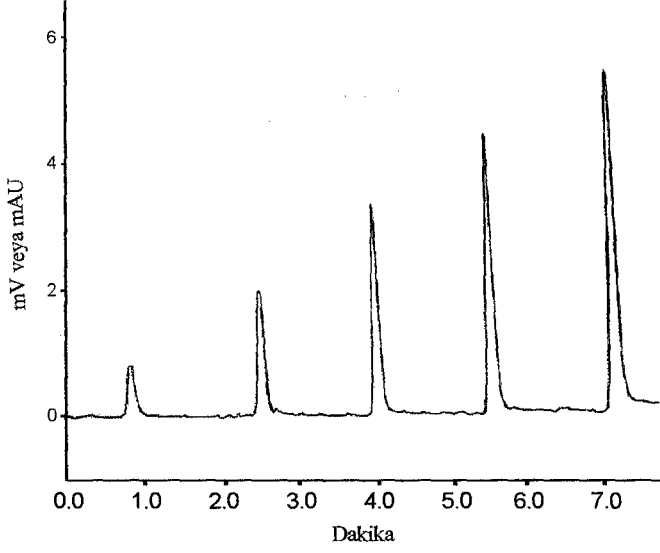
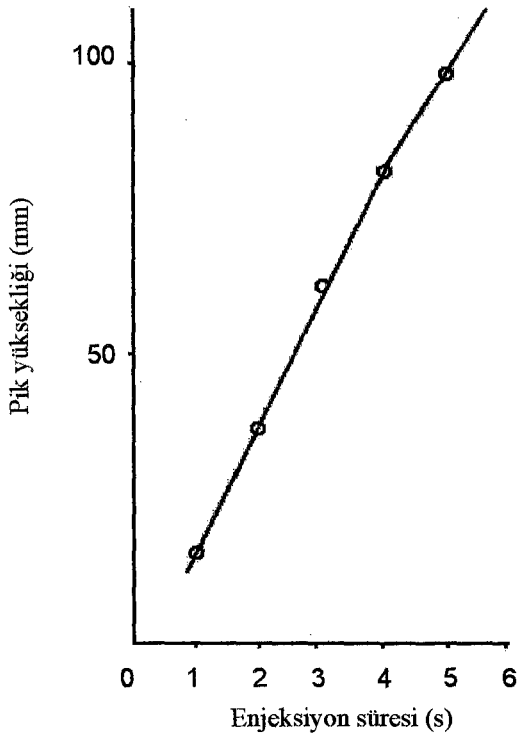
Akış enjeksiyon parametreleri olarak; çözücü cinsi, çözücü sistemin pH sı, enjeksiyon hacmi, akış hızı ve çözücünün içerisinde aktığı sistemin uzunluğu söylenebilir. Ambroksol HCl, suda yeterince iyi çözüldüğünden çözücü sistemi olarak su seçilmiştir. Bu sistemde çözeltinin pH sınırın incelenmesine gerek duyulmamıştır ve maksimum absorpsiyonun 209 nm olduğu saptanmıştır. Belirtilen bu koşullarda ardışık enjeksiyonlar yapıldığında, birbirine eşdeğer, iyi şekilli, hemen hemen simetrik pikler belirmiştir.

1-5 saniyelik enjeksiyon hacimlerine karşı elde edilen yanıtların ilişkisi, 1-4 saniyelik enjeksiyon süresi aralığında doğrusal ve orijinden geçen bir doğru oluşturmaktadır. 5 saniyelik süreye karşı gelen hacmin, bu doğrusallıktan saptığı gözlenmektedir.

Derişimin etkisi araştırılırken 2 saniyelik enjeksiyon süresi kullanılmıştır. 1×10^{-4} - 5.15×10^{-4} M derişimleri bu koşulda enjekte edildiğinde düzenli artan yanıtlar elde edilmiştir. Şekil 4.1. a ve b, 1-5 saniyelik enjeksiyon sürelerine karşı elde edilen yanıtların ilişkisiyle 1×10^{-4} - 5.15×10^{-4} M derişimleri arasında enjekte edilen ambroksol HCl çözeltilerinin özgün eğrilerini göstermektedir.

Derişimlere karşı elde edilen sinyallerin [Sinyal (mV veya mAU) = $0.01 + 10582.5 C (M)$]; $r = 0.9998$] eşitliğine uyduğu bulunmuştur.

Görüldüğü gibi ambroksol HCl ün bu tayin yöntemi ile başarılacağı anlaşılmaktadır. Tekraredilebilirlik % 1.5, tayin limiti ise $S/N = 3$ kriterine göre 2.5×10^{-5} M olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.1. 1-5 saniye süreli hacimdaki sabit derişimli ambroksol HCl ün pik yüksekliği ilişkisi (a) ve 1×10^{-4} - 5.15×10^{-4} M derişimdeki ambroksol HCl çözeltilerinin özđün eğrileri (b).

Tablo 4.I. Akış-enjeksiyon ve UV-spektrofotometrik yöntemlerle ticari bir ambroksol HCl tabletindeki tayinler ve istatistiksel sonuçları.

No	Akış-enjeksiyon yöntemi	UV-Spektrofotometri
1	30.1	30.2
2	29.9	30.2
3	30.7	29.9
4	30.0	30.4
5	29.9	30.2
6	29.8	30.2
7	29.8	30.4
8	30.3	30.4
\bar{x}	30.1	30.2
SD	0.3067	0.1685
RSD	1.020	0.557
CL	30.14 ± 0.26	30.2 ± 0.1
t-test	0.922	t-tablo: 2.365
F-test	3.31	F-tablo: 3.79

Materyel ve yöntemde verildiği şekilde ön işlemleri yapılan ambroksol HCl tabletlerinden kazanılan aktif maddeler, 209 nm de 2 saniyelik enjeksiyonla enjekte edilmiş ve elde edilen piklerin değerleri absorbansa çevrildikten sonra kalibrasyon denkleminde

yerlerine konularak madde miktarlarına geçilmiştir. Çözeltilerin geri kalanı UV-spektrofotometrik yöntemle 244.8 nm de $1.03 \times 10^{-5} - 5.15 \times 10^{-5} M$ aralığında lineer olan derişimlerde analiz edilmiş ve her iki yöntemle bulunan karşılaştırmalı sonuçlar Tablo 4.I de toplanmıştır. Sonuçların geçerliliği, olağan istatistiksel yöntemlerle değerlendirilmiştir.

Tablo 4.I deki değerlendirmeler gözönüne alındığında, bu çalışmada geliştirilen akış-enjeksiyon yöntemi ile karşılaştırma yöntemi olarak kabul edilen UV-spektrofotometri tayin sonuçları arasında önemsiz bir fark gözlenmektedir.

Yukarıdaki istatistiksel değerlendirmelerdeki üstünlüğünden başka, ön işlemlerden sonra analizin çok kısa bir sürede yapılabilme, buna ek olarak otomatik enjeksiyon yapabilen standlarla saatte 60 analizin yapılabilme şansı bulunmaktadır. Bu nedenle, çok sayıda ambroksol HCl analizinin yapıldığı rutin analiz laboratuvarlarında bu yöntemin kullanılması önerilebilir.

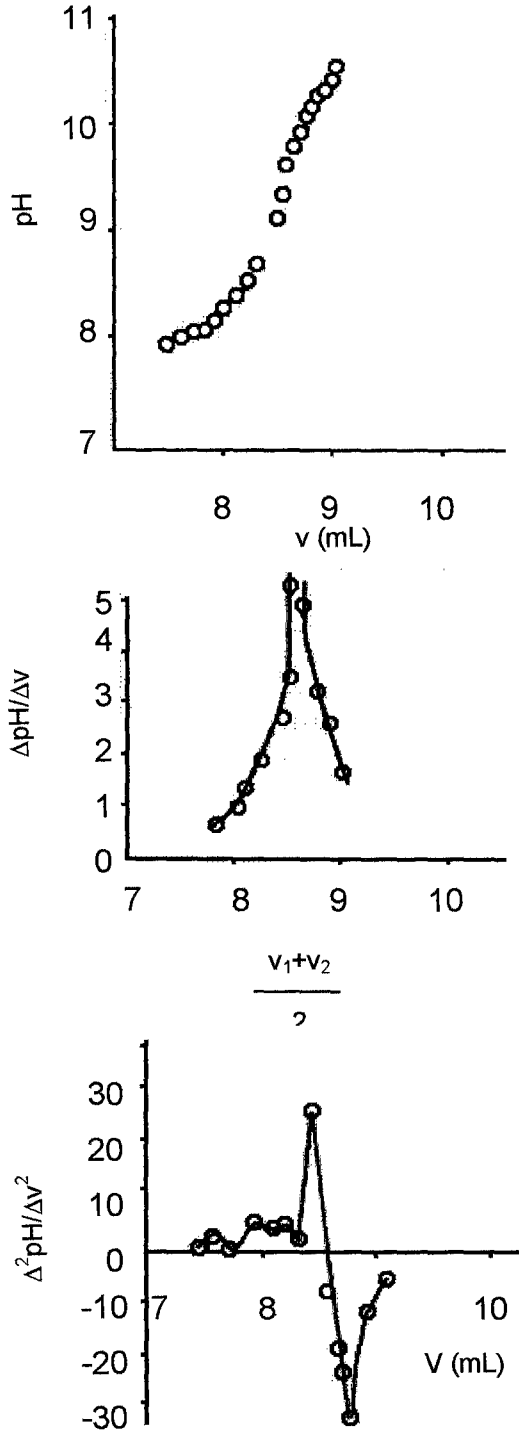
4. 2. Potansiyometrik Yöntemle Ambroksol HCl ün Tayini

Potansiyometri, standart maddeye sahip olunmadığı halde molekülün yapısı ve kütlesi biliniyorken miktar tayininde kullanılabilen bir yöntemdir.

Ambroksol HCl, üzerine HCl bağlanmış yalın ambroksolden oluşmuştur. Temin edilen maddenin saf olduğu gözönüne alındığına göre, kantitatif oranlarda molekülün eşdeğer miktarlarda asit ve ambroksol içerdiği ortaya çıkar. Bu savdan hareketle molekülün taşıdığı HCl ün titre edilebileceği açıkça görüleceğinden, ambroksol HCl ün sodyum hidroksitle titre edilebileceği düşünülmüştür.

Bununla ilgili deneyler aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmiştir:

158.3 mg ambroksol HCl tartılmış, 50 mL suda çözülmüş, 0.0449N sodyum hidroksit çözeltisi ilavelerine karşı pH metredeki pH değışikliklerine göre değerlendirilmiştir.



Şekil 4.2. 158.3 mg Ambroksol HCl ün 0.0449N sodyum hidroksit ile elde edilen potansiyometrik eğrisi (a), bu eğrinin birinci (b) ve ikinci (c) türev eğrileri.

Yapılan deneyde ilave edilen sodyum hidroksit miktarına göre okunan pH değerleri, $v_1+v_2/2$ değerlerine karşı $\Delta\text{pH}/\Delta v$ yani birinci türev, başlangıçtaki v değerlerine karşı $\Delta^2\text{pH}/\Delta v^2$ yani ikinci türev eğrisi grafikleri Şekil 4.2 de gösterilmiştir.

İkinci türev eğrisinden yararlanarak bulunan mL 8.6 dir. Hesaplamalar sonucunda bulunan miktar ise 160.2 mg olmuştur. Tartım miktarı ile bulunan sonuç arasındaki oran ise % 101.1 dir. Bu sonuçlara göre; % 1.1 hatanın analitik kimyasal hata düzeyinde olduğu söylenebilir.

4.3. Polarografik Yöntemle Ambroksol HCl Tayini

4.3.1. Taşıyıcı elektrolit seçimi

Polarografik çalışmalarda taşıyıcı elektrolit bileşiminin, eğrinin belirmesi, akımın yüksekliği ve polarografik davranışlarının sergilenmesinde çok önemli bir faktör olduğu bilinmektedir. Bu bileşimin belirlenmesinde öncelikle sulu sistemler tercih edilmektedir. Bu sistemlerin yanıt vermediği durumlarda diğer bileşim sistemlerine başvurulmaktadır. Bu çalışmada da olağan yol izlenmiştir.

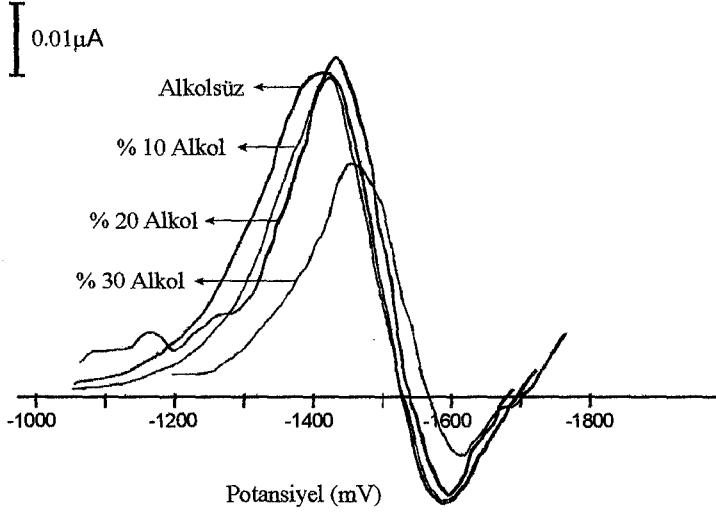
Sülfirik asit ve sodyum hidroksitten oluşan taşıyıcı elektrolit sistemlerinde ambroksol HCl ile ilgili herhangi bir eğri belirmemiştir.

4.3.2. pH'nın sınır akımı üzerine etkisi

Ambroksol HCl ün polarografisinin incelenebilmesi için en uygun taşıyıcı elektrolit çözeltisinin % 10 isopropil alkol, 0.2M KCl ve 0.2M fosfat olduğu bulunmuştur. Çözeltinin pH sınır ayarlanmasında 1M HCl ve 1M NaOH kullanılmıştır.

İzopropanol derişiminin polarogramlar üzerine etkisi % 10-30 aralığında incelenmiş, içerisinde % 30 ve üzerinde izopropil alkol bulunan taşıyıcı elektrolitli polarogramlarda bir deformasyon gözlenmiştir. pH 7.0 de DP tekniği ile ilgili kayıt Şekil 4.3 de verilmektedir.

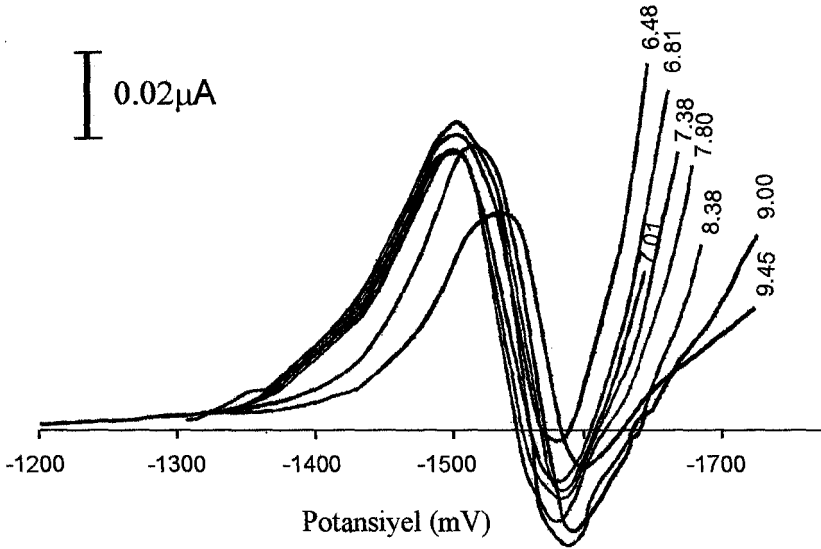
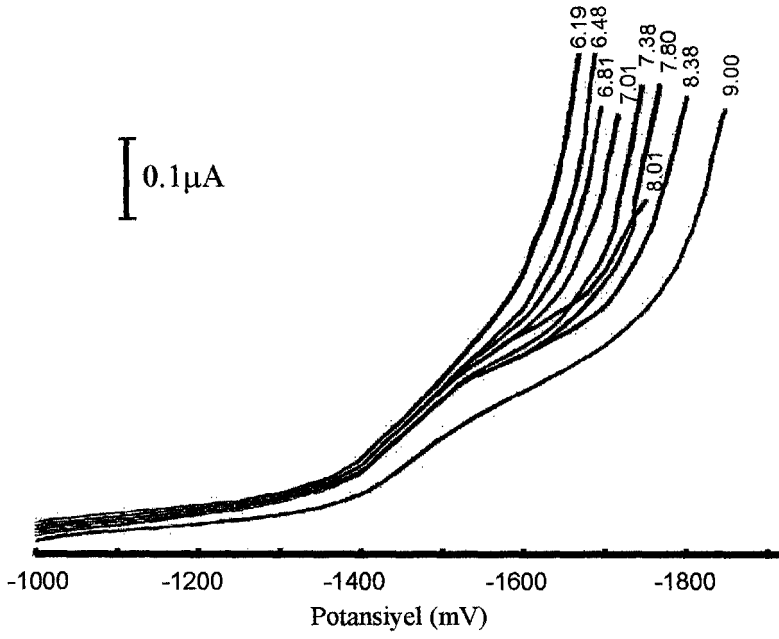
İzopropanol katılmadan alınan kayıtlarla % 10 izopropanollü çözeltilerin şekilleri arasında bir fark bulunmamasına karşın, çözünürlüğün artırılabilmesi, ileride doğabilecek problemlerin önlenmesi amacıyla bu derişimin kullanılmasına karar verilmiştir.



Şekil 4.3. 1.89×10^{-4} M Ambroksol HCl içeren çözeltinin (pH 7) içerdiği izopropil alkol miktarına göre elde edilen polarogramları.

Çeşitli pH lardaki bu taşıyıcı elektrolit sisteminde; 1 s damlama süreli ve civa rezervuarına 1000 din/cm² basınç uygulayarak -1000 mV potansiyelden başlayarak ve katodik yönde tarayarak çeşitli hızlarda doğru akım ve diferansiyel puls teknikleri ile kayıtlar yapılmıştır.

Verilen koşullarda ambroksol HCl ün 1.8×10^{-4} M derişimindeki çözeltisinin çeşitli pH larda DC ve DP polarogramları Şekil 4.4 a ve b de gösterilmiştir.



Şekil 4.4. $1.8 \times 10^{-4} \text{M}$ Ambroksol HCl ün çeşitli pH larda %10 izopropanol, 0.2M KCl ve 0.2M fosfat tamponu içerisindeki DC (a) ve DP (b) polarogramları.

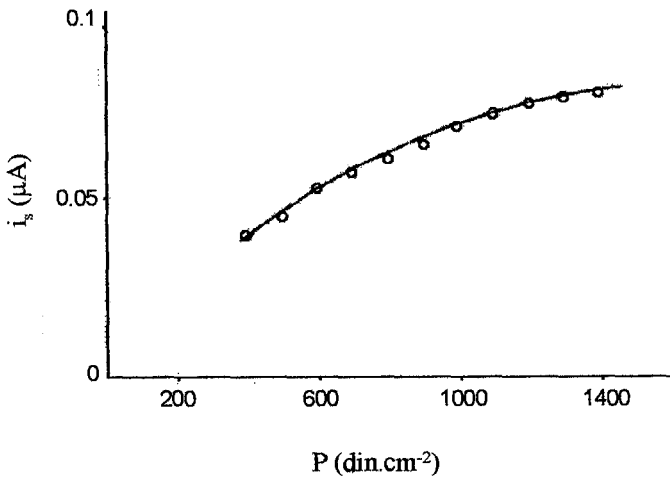
Şekillerden görüldüğü gibi, iyi beliren eğriler elde edilmiş olup DC polarogramlarında kullanılan çeşitli pH (6.19-9.00) larda eğrilerin hemen hemen çakışık olduğu gözlenmiştir. Bu gözlem doğaldır ki, eğrilerin DP polarogramları tarafından da doğrulanmaktadır. Böyle bir sonuç E_p (pik potansiyeli) ve i_p (pik akımı) değerlerinin sabit olması ile sonuçlanmaktadır. Bu da meydana gelen ilişkinin pH dan bağımsız olduğunu göstermektedir.

Geniş bir pH aralığında, pik potansiyelleri ve pik akımlarındaki kararlılığa göre çalışılabilmenin çok açık olmasına karşın, ara bir değer olan pH 7.0 in en uygun pH olacağı düşünülmüş ve bundan sonraki deneylerde pH 7 deki taşıyıcı elektrolit çözeltisi sistem kullanılmıştır.

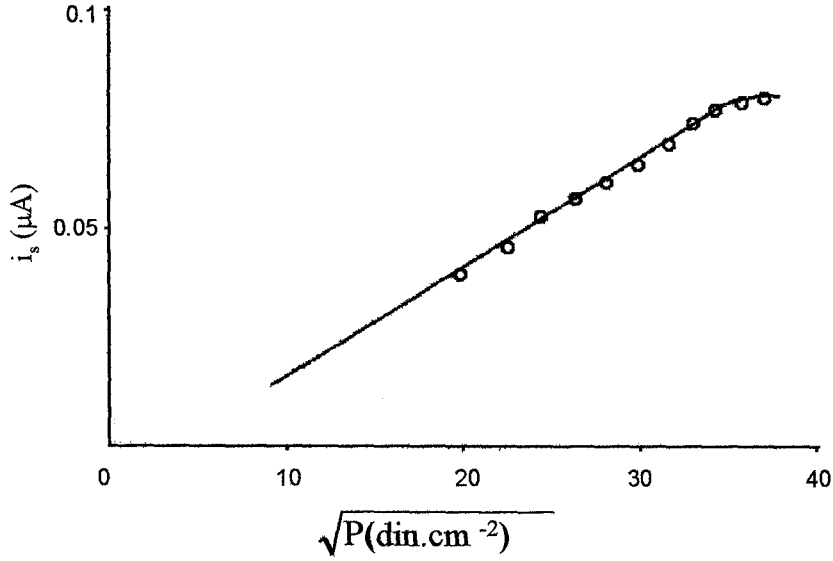
4.3.3. Civa rezervuarına uygulanan basıncın sınır akımı üzerine etkisi

$9.09 \times 10^{-5} M$ derişiminde, aynı analitik çözelti sisteminde hazırlanmış bir ambroksol HCl çözeltisinin -1500 mV da ki potansiyelde, basıncı 400-1400 din.cm^{-2} arasında değiştirerek elde edilen akımların sınır akımlarına karşı değişimleri incelenmiştir.

Basıncın sınır akım değerlerine göre ilişkisi Şekil 4.5a ve basıncın kare köküne karşı ilişkisi Şekil 4.5b de sunulmuştur.



Şekil 4.5a. $9.09 \times 10^{-5} M$ Ambroksol HCl çözeltisinin -1500 mV da 400-1400 din.cm^{-2} aralığındaki basınç değerlerinin sınır akımlarına karşı değişimleri ilişkisi.



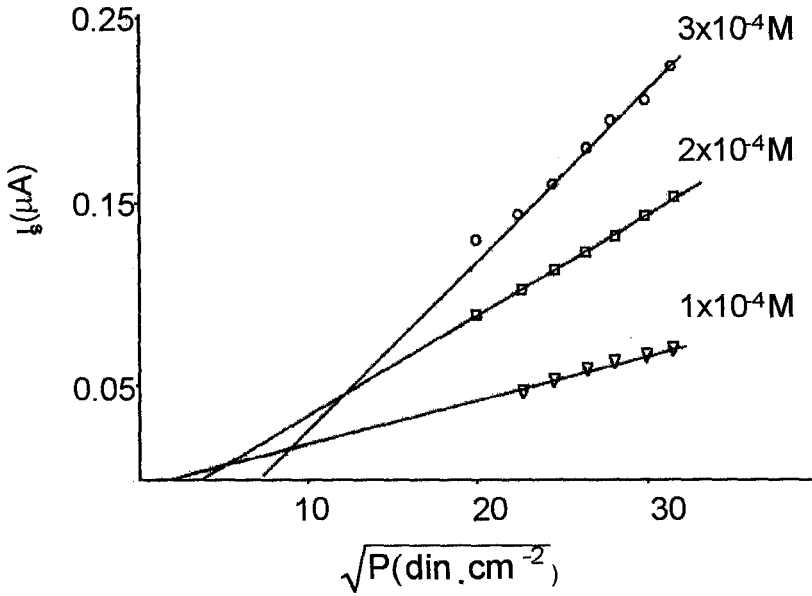
Şekil 4.5b. $9.09 \times 10^{-5} \text{ M}$ Ambroksol HCl çözeltisinin -1500 mV da $400\text{-}1400 \text{ din.cm}^{-2}$ aralığındaki basıncın kare kökü değerlerinin sınır akımlarına karşı değişimleri ilişkisi.

Polarografide basınç değişiminin sınır akımına karşı oluşturduğu değişim, o maddenin polarografik akımının cinsini belirlemede kullanılmaktadır (23).

Bilinen 4 tür polarografik akım vardır ve bunların belirlenmesi ile ortaya çıkarılan polarografik koşullarda, kantitatif çalışmaların mümkün olup olmayacağı aydınlatılabilmektedir. Bu akım cinsleri; difüzyonel, adsorpsiyonel, kinetik ve katalitik olarak açıklanmaktadır. Polarografideki miktar tayinleri için akımın cinsinin difüzyonel olması arzulanır. Sınırlı koşullarda adsorpsiyonel akımda da miktar tayinlerinin yapılabileceğinden söz etmek mümkündür. Genel bir bilimsel düşünce olarak, bir yöntem veya teknik için olumsuz kabul edilen bir nokta, başka biri için olmazsa olmaz koşulundadır. Örneğin; akımın adsorpsiyonel olması, sıyırma voltametrisinin temelini oluşturmaktadır.

Şekil 4.5 den görüldüğü gibi basıncın sınır akımına karşı değişimi ark tipi (a) basıncın kare kökü ise doğrusal (b) bir ilişki sergilemektedir. Bu tür ilişki, akımın cinsinin difüzyonel olması şeklinde yorumlanabilir. Görüldüğü gibi bu ilişki sağlanmaktadır. Buna göre polarografik akımın çoğunlukla difüzyonel olduğu sonucuna varılmaktadır.

Ancak, ambroksol HCl derişimlerinin basınç ilişkisi üzerine etkisi araştırıldığında, derişimin artışına bağlı olarak derişim-basıncın kare kökü ilişkisinin yine doğrusal bir ilişki sergilediği yalnız orijinden geçmediği görülmektedir. Böyle bir ilişki polarografik akımın çoğunlukla difüzyonel olduğuna fakat derişim arttıkça, adsorpsiyon derecesinin de artmakta olduğunu işaret etmektedir. Derişimlere bağlı olarak, sınır akımının basınçın kare kökü ile ilgili grafik Şekil 4.6 da verilmiştir.



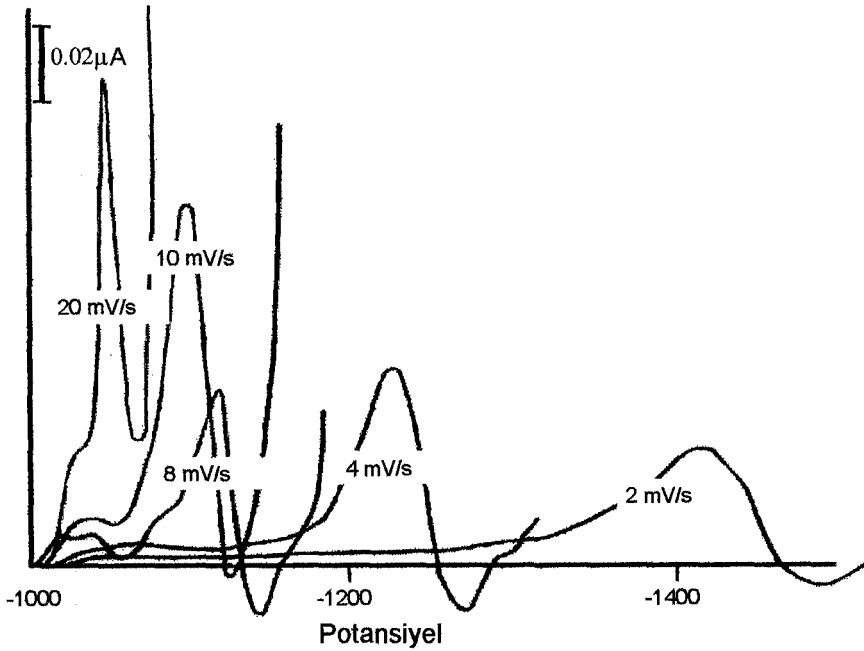
Şekil 4.6. Çeşitli derişimlerdeki ambroksol HCl çözeltilerinin sınır akımları ile basınçın kare kökü ilişkisi.

4.3.4. Potansiyel tarama hızının etkisi

Potansiyel tarama hızları 0.8 s damlama zamanı, 1000 din/cm^2 basınç kullanılarak, aynı analitik koşullarda, ancak potansiyel tarama hızını 2-20 mV/s arasında değiştirerek DC ve DP polarografik tekniklerle kayıtlar yapılmıştır.

DP tekniği ile yapılan kayıtlarda ilginç sonuçlar elde edilmiştir. Doğaldır ki düşük hızlarda pikler yayvanlaşmaktadır. Hız arttıkça meydana gelen pikler keskinleşmekte ve simetrisi artmaktadır. Yalnız yüksek hızlarda tekraredilebilirlik düşük olmaktadır. Bu olay polarograf ile kaydedicinin aynı anda başlatılamamasına bağlanmıştır. Bu yüzden, en uygun potansiyel tarama hızının 4 mV/s olduğuna karar verilmiştir.

Belirtilen koşullarda elde edilen DP polarogramları Şekil 4.7 de verilmiştir.

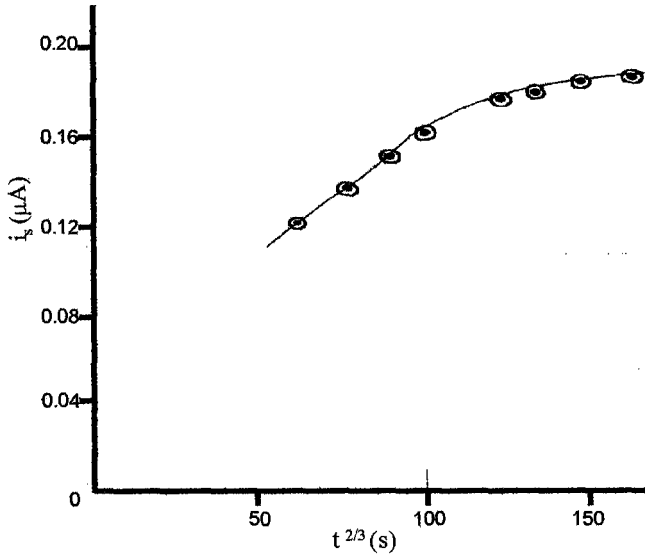


Şekil 4.7. Ambroksol HCl ün çeşitli potansiyel tarama hızlarında elde edilen DP polarogramları.

4.3.5. Damlama süresinin etkisi

$1.87 \times 10^{-4} \text{M}$ ambroksol HCl çözeltisinin, yukarıda verilen analitik koşullarda 4 mV/s potansiyel tarama hızında, 1000 din/cm^2 basınçta damlama süresini $0.4\text{-}2.0$ saniyeler arasında değiştirerek -1500 mV da sınır akımları kaydedilmiş ve elde edilen veriler çeşitli fonksiyonları gözönüne alınarak değerlendirilmiştir.

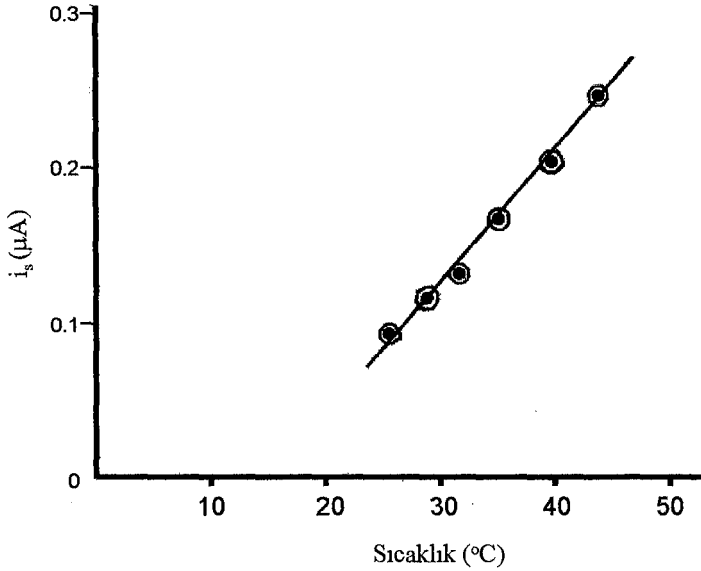
Teorik görüşe (23) göre; damlama süresinin $t^{2/3}$ fonksiyonunun doğrusallığı, polarografik akımın cinsinin difüzyonel olduğunu belirtir. Elde edilen grafikte damlama süresinin 0.4 ile 1.0 s aralığında Şekil 4.8 de olduğu gibi, bu doğrusallığın sağlandığı göze çarpmaktadır. Belirtilen nedenlerle en iyi damlama süresinin 0.8 s olarak belirlenmesine karar verilmiştir.



Şekil 4.8. $1.87 \times 10^{-4} \text{M}$ Ambroksol HCl ün polarografik davranışları üzerine damlama süresinin $t^{2/3}$ fonksiyonunun 0.4 ile 2.0 s aralığında değişimi.

4.3.6. Sıcaklığın etkisi

$1.87 \times 10^{-4} \text{ M}$ ambroksol HCl çözeltisinin aynı analitik koşullarda, 0.8 s damlama süresi, 4 mV/s tarama hızlı, 1000 din/cm^2 basınç uygulayarak 27-39 °C arası sıcaklığı değiştirerek sıcaklık-sınır akımı değişimi incelenerek Şekil 4.9 daki grafik elde edilmiştir.

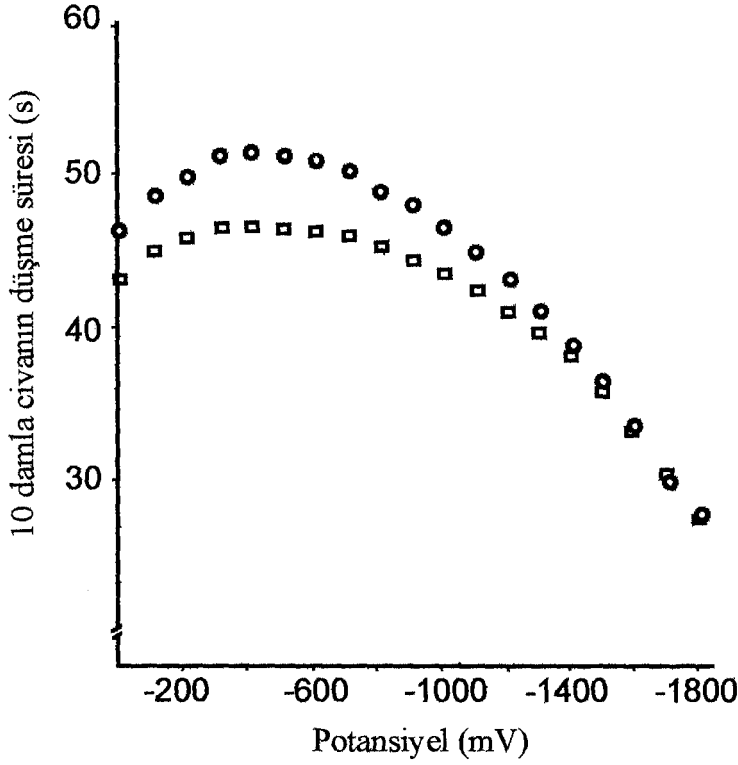


Şekil 4.9. $1.87 \times 10^{-4} \text{ M}$ Ambroksol HCl çözeltisinin sınır akımı değerlerinin 27-39 °C arası değişimi.

Grafikten de görüldüğü gibi, sıcaklığın artışına paralel olarak doğrusal bir ilişki elde edilmektedir. Bu sonuç da bundan önceki deneylerde elde edilen sonuçları doğrulamaktadır.

4.3.7. Elektrokapillerite

$1.87 \times 10^{-4} \text{ M}$ ambroksol HCl çözeltisi ve sadece taşıyıcı elektrolitinin içerisinde, her 100 mV da 10 civa damlasının civa rezervuarından serbestçe düşmesi için geçen süreye karşı uygulanan potansiyel grafiği Şekil 4.10 da verilmiştir.



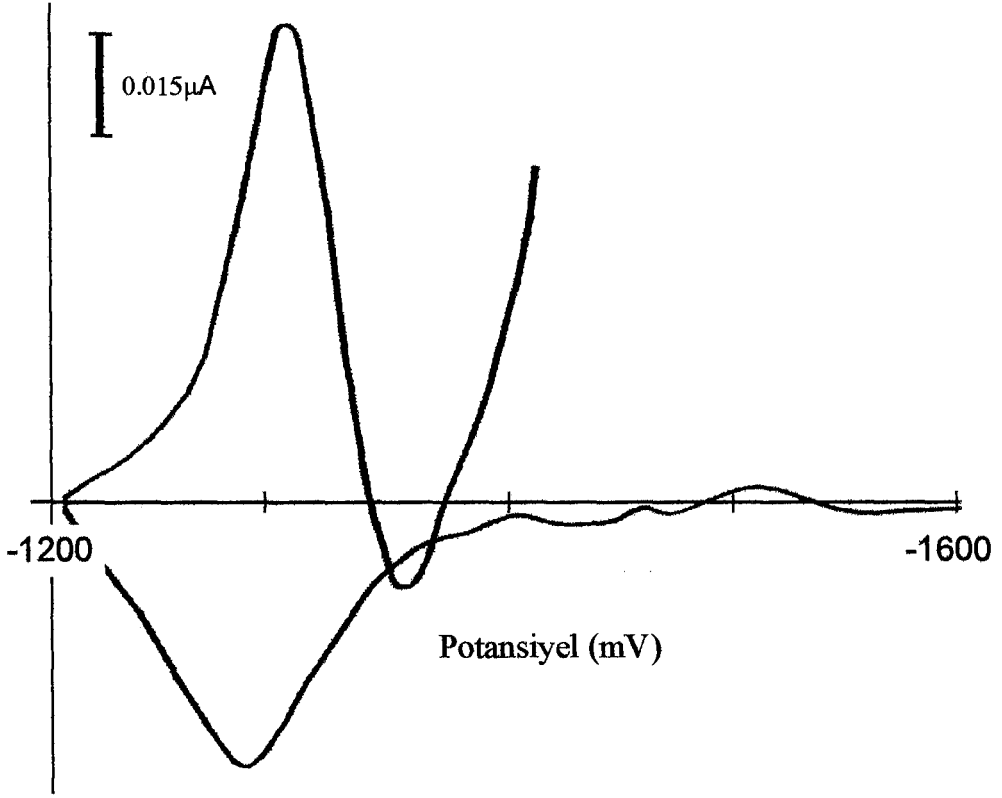
Şekil 4.10. Ambroksol HCl ün elektrokapillerite eğrisi.

Ambroksol HCl çözeltisinin oluşturduğu eğrinin, taşıyıcı elektrolit eğrisinin altından gittiği, yaklaşık -300 ile -500 mV lar arasında her iki eğrinin de bir maksimuma eriştiği gözlenmektedir. Bu sonuç, ambroksol HCl ün çözeltinin yüzey aktivitesine etkili olduğunu belirtmektedir.

4.3.8. Tersinirlik (reversibilite)

$1.4 \times 10^{-4} \text{M}$ ambroksol HCl çözeltisinin -1200 ile -1600 mV lar arasında DP polarogramları anodik ve katodik yönde kaydedilmiş ve elde edilen polarogramların

elementleri Birke'nin (24) vermiş olduğu değerlendirme şekline göre incelenmiştir. Kaydedilen polarogramlar şekil 4.11 de gösterilmiştir.



şekil 4.11. Ambroksol HCl n tersinirliği ile ilgili eğriler.

Tablo 4.II. Birke'ye göre tersinirlik ile ilgili kriterler.

Tersinir	$E_p^c - E_p^a = \Delta E $ $\left i_p^a / i_p^c \right = 1$
Yarı-tersinir	$E_p^c - E_p^a < \Delta E $ $\left i_p^a / i_p^c \right < 1$ $\left i_p^a / i_p^c \right \gg 1$
Tersinmez	$E_p^c - E_p^a = \Delta E $ $\left i_p^a / i_p^c \right < 1$

Tablo 4.II de verilmiş olan kriterlerin incelemesi ile tersinirlik konusunda karar verilebilmektedir.

Eğrilerin analizinden $E_p^c - E_p^a = |\Delta E|$ değerinin 60 mV, $\left| i_p^a / i_p^c \right|$ değerinin 0.55 olduğu bulunmuştur. Yukarıdaki kriterlerle karşılaştırıldığında, tersinirliğin tersinmezliğe (irreversibl) yakın yarı tersinir (quasi-reversibl) olduğu söylenebilir.

4.3.9. Yinelenebilirlik

$2.92 \times 10^{-4} \text{M}$ ambroksol HCl çözeltisinin aynı analitik koşullar ve 4 mV/s potansiyel tarama hızı, 0.8 s damlama süresi ve 1000 din/cm^2 uygulanan basınçta beş kez kayıt

yapılmış ve pik akımlarının göreceli standart sapmalarının % 2.3 olduğu bulunmuştur. Bu sonuca göre, optimum koşullarda yapılan tayinlerde iyi sonuçlar alınacağı söylenebilir.

4.3.10. Organik faza çekilimi

5 ml 9.4×10^{-4} M ambroksol HCl çözeltisi üzerine 1 mL 0.1M NaOH + 5 mL kloroform konulmuş, kloroform çözeltisinden 1 mL alınıp su banyosunda uçurulmuştur. Kalıntı, elektrolit çözeltisi ile seyreltilip optimum koşullarda DP polarogramları kaydedilmiştir.

Aynı işlemler, 1 er mL 9.4×10^{-4} M çözeltiler alınıp, taşıyıcı elektrolit çözeltileri ile seyreltikten sonra gerçekleştirilmiştir.

Her iki koşulda da elde edilen DP polarogramların pik amplitüdüleri karşılaştırılmış ve hemen hemen ambroksol HCl ün % 98 oranında kloroform içerisinde dağılmış olduğu bulunmuştur.

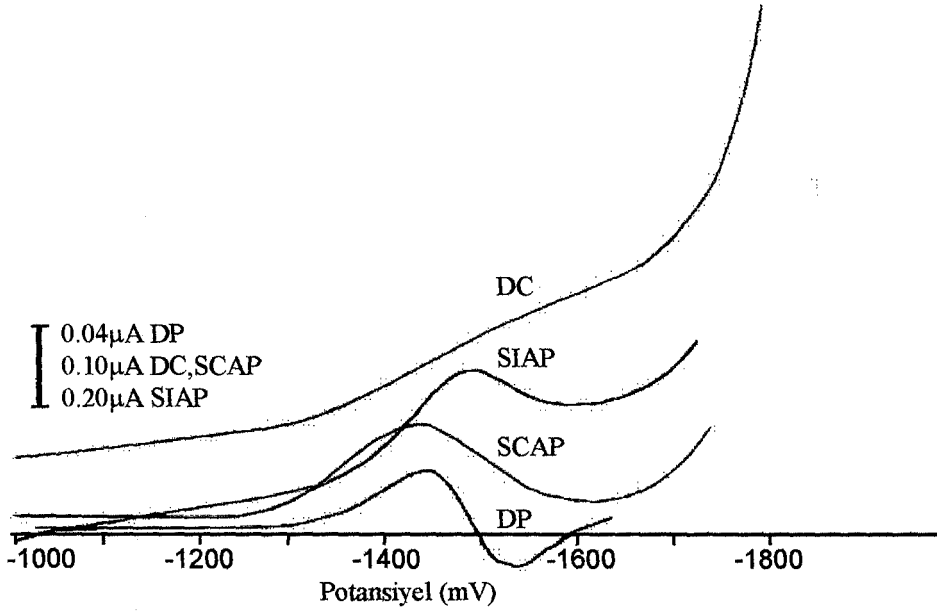
Bu sonuç, ambroksol HCl ün biyoyararlanım ve stabilite belirleyici çalışmalarında güvenle kullanılabilmesine işaret etmektedir.

4.3.11. Optimum koşulların belirlenmesi ve polarografik tekniklere uygulanışı

Bütün bu koşulların incelenmesinden sonra, en iyi taşıyıcı elektrolit çözeltisinin % 10 izopropanol, 0.2M KCl ve 0.2M pH 7 fosfat tamponu olduğu bulunmuştur. Optimum polarografik koşullar ise 4 mV/s potansiyel tarama hızı, 1000 din/cm^2 basınç ve 0.8 s damlama süresi olarak saptanmış, ancak büyük farklılık oluşturmadığı için sabit sıcaklık kullanılmamış, deneyler oda ısısında yapılmıştır.

Görüldüğü gibi, optimizasyon ile ilgili çalışmalar doğru akım polarografisi ile gerçekleştirilmiştir. Bu koşullarda, DC polarografisinde elde edilen her bir sonucun DP, SCAP ve SIAP polarogramlarına da yansıtacağı açıktır.

Bu noktadan hareketle, 9.36×10^{-5} M ambroksol HCl çözeltisinin DC, DP, SCAP ve SIAP polarogramları kaydedilmiş ve bu polarogramlar Şekil 4.12 de gösterilmiştir.



Şekil 4.12. $9.36 \times 10^{-5} M$ Ambroksol HCl çözeltisinin optimum koşullarda DC, DP, SCAP ve SIAP polarogramları.

4.3.12. Derişimin akım üzerine etkisi

İyi beliren, yinelenen eğrilerin elde edilmesinden sonra derişimin akım üzerine etkisi araştırılmıştır. Artan derişimlerde ambroksol HCl çözeltilerinin polarogramları alınmış, her dört teknik ile kaydedilen polarogramlarda doğrusal ilişkinin bulunduğu koşullar araştırılmış ve bu noktalarda kalibrasyon çalışmaları yapılmıştır. İlgili kalibrasyon eşitlikleri ve bunlarla ilişkin bilgiler Tablo 4.III de verilmektedir.

Tablo 4.III. DC, DP, SCAP ve SIAP teknikleri ile ilgili kalibrasyon eşitliklerine ilişkin bilgiler.

Polarografik teknik	Kalibrasyon eşitliği*	Korelasyon katsayısı
DC	$i_s(\mu A)=806.17 C(M)+0.02$ -1500 mV	0.9998
DP	$i_s(\mu A)=290.6 C(M)+1.8 \times 10^{-3}$ pik yüksekliği (-1488mV)	0.9988
SCAP	$i_s(\mu A)=1367.98 C(M)-2.03 \times 10^{-3}$ değişik pik yüksekliklerinde	0.9999
SIAP	$i_s(\mu A)=2911.42 C(M)+6.6 \times 10^{-3}$ değişik pik yüksekliklerinde	0.9999

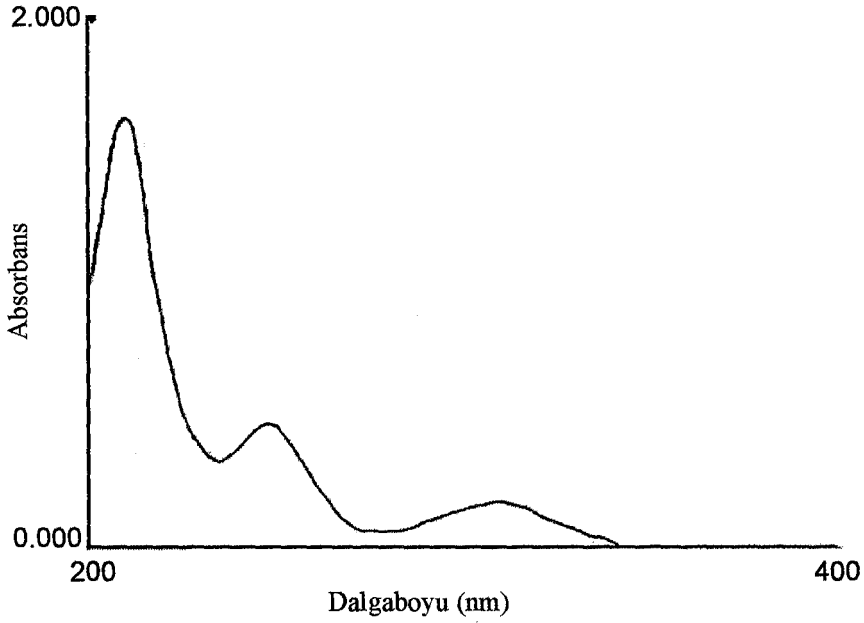
*DC için derişim aralığı: $8.99 \times 10^{-5} M - 4.5 \times 10^{-4} M$

DP, SCAP ve SIAP için derişim aralıkları $4.68 \times 10^{-5} M - 2.34 \times 10^{-4} M$

Tablo 4.III deki değerlendirmeler gözönüne alındığında her dört yöntemin de eşit ağırlıklı olarak kullanılabilceği ortaya çıkmaktadır.

Böyle bir sonuçtan sonra, geliştirilen polarografik yöntemin ilgili tekniklerinin, bir yöntemle karşılaştırılarak validasyonunun incelenmesi gerekmektedir.

Karşılaştırma yöntemi olarak, UV-spektrofotometrik yöntem seçilmiştir. Çözücü olarak %10 izopropil alkollü su kullanılmıştır. Bu çözgen içerisinde hazırlanan $2.33 \times 10^{-5} M$ ambroksol HCl çözeltisinin, kör olarak çözgen kullanılarak 200-400 nm lar arasındaki spektrumu kaydedilmiştir. Bu spektrum Şekil 4.13 de sunulmaktadır.



Şekil 4.13. $2.33 \times 10^{-5} M$ Ambroksol HCl çözeltisinin UV-spektrumu.

Aletten elde edilen çıktılardaki UV-spektrumu karakteristikleri Tablo 4.IV de toplanmıştır.

Tablo 4.IV. Ambroksol HCl ün UV-spektrumu karakteristikleri.

pik		vadi	
$\lambda(\text{nm})$	ABS	$\lambda(\text{nm})$	ABS
308.0	0.141	275.6	0.042
244.8	0.461	232.4	0.332
209.6	1.631		

Bu değerlerden görüldüğü gibi en yüksek absorbans 209.6 nm de meydana gelmektedir. Oysa bu dalgaboylarında bir çok maddenin absorpsiyonunun olabileceği gözönüne alınarak 244.8 nm de çalışılmasının daha yararlı olacağı düşünülmüştür.

244.8 nm deki kalibrasyon çalışmasında $2.33 \times 10^{-5} - 7.91 \times 10^{-5} \text{M}$ derişim aralığında $[A = 9655.9 C(M) + 0.002; r = 0.9998]$ doğrusuna uyan eşitlik elde edilmiştir.

4.4. Ambroksol HCl Şuruplarının İncelenmesi

Ambroksol HCl ün kloroform fazında dağıldığı saptandıktan sonra şuruplardaki tayini araştırılmıştır. Bu amaçla, 3 mL şurup alınmış, üzerine 2 mL 0.1M sodyum hidroksit konulduktan sonra, 7 mL kloroform katılıp ayırma hunisine transfer edilmiştir. 10 dakika çalkalandıktan sonra kloroform fazı ayrılmış, üzerine 1 damla derişik HCl ilavesi ile tuz haline çevrilmiş ve kloroform fazı su banyosunda uçurulmuştur. Kalıntı üzerine uygun miktar taşıyıcı elektrolit katıldıktan sonra, optimum koşullarda alınan DP polarogramları, aynı derişimde hazırlanan standart çözeltilerin benzer koşullarda alınan DP polarogramları ile karşılaştırılmıştır.

Şuruplarda, DP polarogramlarının pik amplitüd yükseklikleri karşılaştırılarak miktar tayinine gidilmiştir. Sonuçta şurup üzerinde yazılı olan teorik miktar ile deneysel olarak bulunan miktar arasında 5 deneyin ortalaması olarak % 102.4 değeri saptanmıştır.

4.5. Geliştirilen Yöntemin Ambroksol HCl Tabletlerine Uygulanması

Tabletler üzerindeki çalışmalar, deneysel bölümde verilen açıklamalar çerçevesinde yapıldıktan sonra, uygun seyreltmeleri takiben kalibrasyon çalışmalarına uyan koşullarda polarogramları alınarak değerlendirilmiştir. Aynı çözeltilerden yararlanılarak spektrofotometrik miktar tayinleri de yapılmıştır.

İstatistiksel değerlendirmeler, % 95 olasılık düzeyine göre hesaplanmıştır. Her bir deney grubu arasında standart sapma, tekraredilebilirliğin ölçüsü olan göreceli standart sapma, güven aralığı, F- testi değerleri hesaplanmıştır.

Ambroksol HCl ün DC, DP, SIAP ve SCAP polarografik teknikleri ile UV-spektrofotometrik miktar tayinleri ve sonuçların bazı istatistiksel yöntemlerle değerlendirilmesi ile ilgili veriler Tablo 4.V de toplanmıştır.

Tablo 4.V. Ambroksol HCl tabletlerinde polarografik yöntemle DC, DP, SIAP, SCAP teknikleri ile UV-spektrofotometrik tayinlerinin istatistiksel sonuçları.

No	DC	DP	SIAP	SCAP	UV-Spektrofotometrik
1	29.3	29.6	31.8	29.9	29.0
2	29.6	30.0	31.9	29.9	29.6
3	29.7	30.0	32.3	30.1	29.6
4	29.9	30.2	32.3	30.1	29.6
5	30.1	30.3	32.5	30.1	29.7
6	30.3	30.6	32.7	30.3	29.7
7	30.3	30.7	32.9	30.3	29.7
8	30.3	30.5	32.9	30.7	29.9
9	30.9	30.5	32.5	30.1	30.0
10	31.0	30.5	32.6	30.1	30.2
\bar{x}	30.14	30.29	32.44	30.16	29.7
SD	0.54	0.34	0.37	0.23	0.32
RSD	1.79	1.13	1.16	0.77	1.06
CL	± 0.38	± 0.24	± 0.26	± 0.16	± 0.23
F-testi	2.9	1.2	1.4	2	$F_{\text{tablo}} = 3.18$

Tablo 4.V deki değerlendirmelerin ışığı altında, F-testine göre polarografik tekniklerin tümü ile karşılaştırma yöntemi olarak seçilen UV-spektrofotometrik yöntemlerle yapılan miktar tayinleri arasında anlamsız bir fark olduğu gözlenmektedir. Bu

da her iki yöntemle yapılan analizler arasında, sonuç açısından bir fark olmadığını ortaya koymaktadır.

Yapılan bireysel analizlerin, analizi yapılan tablet kutusundaki miktarı baz kabul edilerek bulunan sonuçlar; DC % 100.4, DP % 101.0, SIAP % 108.1, SCAP % 100.5 ve UV-spektrofotometrik % 99.0 dur. Farmakopelerde 30 mg lık tabletlerde kabul edilebilir limitin ± 10 olduğu belirtilmektedir (25). Bu ilişkiye göre, tabletlerin dozaj açısından iyi hazırlanmış olduğu, kalite kontrol değerlendirilmesi olarak kabul edilebilir bulunduğu söylenebilir.

Çalışmamızda polarografik verilerin $S/N=3$ kriterine göre tayin limitinin $7.7 \times 10^{-6}M$ olduğu bulunmuştur. Gerçekte bu değer, çalışma duyarlılığı çok daha hassas değerlere çekilerek daha çok azaltılabilir. Yapılmış çalışmalarda (12-15,22) tayin limitleri daha düşük düzeylerde bulunmuş olmasına karşın, seçicilik açısından geliştirdiğimiz polarografik tekniklerin daha üstün olabileceğini söyleyebiliriz. Çünkü çok küçük hacimlerde ve çok düşük derişimlerde tayinlerin yapılabilmesi polarografinin yadsınamayacak avantajları arasındadır. Ayrıca majistral preparatlarda katkı materyalinin uzaklaştırılmasına gerek kalmaksızın çeşitli analizlerin yapılabilmesi de diğer bir üstünlüğüdür.

Sonuç olarak, bu çalışmada geliştirilen akış-enjeksiyon yönteminin daha çok farmasötik preparatlardaki tayinlerde, buna karşın polarografik tekniklerin ise belirtilen tayine ek olarak, biyoyararlanım ve farmakokinetik uygulamalar için seçicilik, duyarlılık ve çabukluk açısından kullanılabileceği savunulabilir.

KAYNAKLAR

1. V. Dr. F. Arch, Klinische und klinisch-experimentelle untersuchungen zur beurteilung des broncho-sekretolyticums N-cyclohexyl-N-methyl-(2-amino-3,5-dibromobenzyl)-ammonium-chlorid, *Arzneim.-Forsch. (Drug Res.)*, 13, 480-485 (1963).
2. B.Oosterhuis, G. Storm, P. J. G. Cornelissen, C. A. P. F. Su, F. A. E. Sollie, J. H. G. Jonkman, Dose-dependent uricosuric effect of ambroxol, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 44, 237-241 (1993).
3. Bernd G. Disse, The pharmacology of ambroxol review and new results, *Eur. J. Respir. Dis.*, 71, Suppl. 153, 255-262 (1987).
4. Von P. C. Curti, Therapeutische Untersuchungen mit Metabolit VIII von Bromhexin bei mangelhafter oberflächenaktiver Substanz der Alveolen, *Arzneim.-Forsch. (Drug Res.)*, 24(6), 847-849 (1974).
5. Von S. Püschmann, R. Engelhorn, Pharmakologische Untersuchungen des Bromhexin-Metaboliten Ambroxol, *Arzneim.-Forsch. (Drug Res.)*, 28(1), 889-898 (1978).
6. Von J. Iravani, G. N. Melville, Wirkung von Bromhexin-Metabolit VIII und einem neuen adrenergen Stoff auf die mukoziliare Funktion des Respirationstraktes, *Arzneim.-Forsch. (Drug Res.)*, 24(6), 849-855 (1974).
7. Von R. Jauch, G. Bozler, R. Hammer, F. W. Koss, Ambroxol, Untersuchungen zum Stoffwechsel beim Menschen und zum quantitativen Nachweis in biologischen Proben, *Arzneim.-Forsch. (Drug Res.)*, 28(1), 904-911 (1978).
8. Von R. Hammer, G. Bozler, R. Jauch, F. W. Koss, Speziesvergleich in Pharmakokinetik und Metobolismus von NA 872 Cl Ambroxol bei Ratte, Kaninchen, Hund und Mensch, *Arzneim.-Forsch. (Drug Res.)*, 28(1), 899-903 (1978).

9. Von H. Vergin, G. B. Bishop-Freudfling, M. Miczka, V. Nitsche, K. Strobel, F. Matzkies, Untersuchungen zur Pharmakokinetik und Bioäquivalenz unterschiedlicher Darreichungsformen von Ambroxol, *Arzneim.-Forsch. (Drug Res.)*, 35(II-10), 1591-1595 (1985).
10. G. Musumarra, G. Scarlata, G. Cirma, G. Romano, S. Palazzo, S. Clementi, G. Giuliotti, Qualitative Organic Analysis I. Identification of drugs by Principal Components Analysis of Standardized Thin-Layer Chromatographic Data in Four Eluent Systems, *J. Chromatogr.*, 350, 151-168 (1985).
11. G. Musumarra, G. Scarlata, G. Romano, G. Cappello, S. Clementi, G. Giuliotti, Qualitative Organic Analysis. Part 2. Identification of drugs by Principal Components Analysis of Standardized TLC Data in Four Eluent Systems and Retention Indices on SE 30*, *J. Anal. Toxicol.*, 11, 154-163 (1987).
12. J. Schmid, Assay of ambroxol in biological fluids by capillary Gas-Liquid Chromatography, *J. Chromatogr.*, 414, 65-75 (1987).
13. L. Colombo, F. Marcucci, M. G. Marini, P. Pierfederici, E. Mussini, Determination of ambroxol in biological materials by gas chromatography with electron-capture detection, *J. Chromatogr.*, 530, 141-147 (1990).
14. G. Indrayanto, R. Handayani, Quantitative determination of ambroxol hydrochloride in tablets, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 11(8), 781-784 (1993).
15. G. Indrayanto, R. Handajani, Quantitative determination of ambroxol hydrochloride in syrups by RP-HPLC and UV Spectroscopy, *Drug Dev. Ind. Phar.*, 20(9), 1639-1647 (1994).
16. M. H. A. Botterblom, T. J. Janssen, P. J. M. Guelen, Rapid and sensitive determination of ambroxol in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.*, 421, 211-215 (1987).
17. M. Nobilis, J. Pastera, D. Svoboda, J. Kvetina, High-performance liquid chromatographic determination of ambroxol in human plasma, *J. Chromatogr.*,

581, 251-255 (1992).

18. M. Nieder, H. Jaeger, Selective Quantification of Ambroxol in Human Plasma by HPLC, *J. High. Resolut. Chromat., Chromat. Commun.*, 9, 561-565 (1986).
19. V. Brizzi, U. Pasetti, High-performance liquid chromatographic determination of ambroxol in pharmaceuticals, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 8(1), 107-109 (1990).
20. G. C. F. Otero, S. E. Lucangioli, C. N. Carducci, Adsorption of drugs in high-performance liquid chromatography injector loops, *J. Chromatogr., A* 654, 87-91 (1993).
21. F. J. Flores-Murrieta, C. Hoyo-Vadillo, E. Hong, G. Castaneda-Hernandez, Assay of ambroxol in human plasma by high-performance liquid chromatography with amperometric detection, *J. Chromatogr.*, 490, 464-469 (1989).
22. T. Perez-Ruiz, C. Martinez-Lozano, A. Sanz, M. T. San Miguel, Automatic extraction-spectrophotometric method for the determination of ambroxol in pharmaceutical preparations, *Talanta*, 43, 1029-1034 (1996).
23. H. H Bauer, G. D. Christian, J. E. O'Reilly, *Instrumental Analysis*, Allyn and Bacon Inc. Boston, 1978. s 56
24. R. L. Birke, M. H. Kim, M. Strassfeld, Diagnosis of reversible, quasi-reversible and irreversible electrode processes with differential pulsed polarography, *Anal. Chem.*, 53, 852 (1981).
25. USP XXII, Pharmacopoeia convention. Inc., Rockville, 1990.