

1. GİRİŞ

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

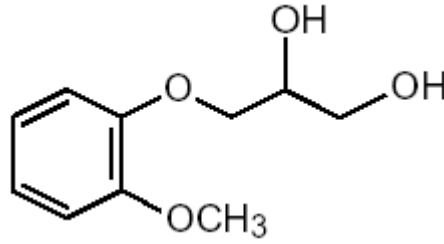
Farmasötik analizlerde de kapiler elektroforez sıklıkla kullanılmakta ve rutin analitik yöntemler arasında bulunmaktadır. Ayrıca, kapiler elektroforezin alt yöntemleri olan Misel Elektrokinetik Kromatografi (MEKC) ve Mikroemülsiyon Elektrokinetik Kromatografi (MEEKC) yöntemleri kapiler elektroforezin en önemli dezavantajı olan duyarlılık ve nötral türlerin ayırma problemini gidermek amacıyla, tercih edilen yöntemler haline gelmiştir.

Çalışmamızda, *Guafenezin*, *Efedrin* ve koruyucu olarak *Parabenleri* içeren farmasötik şurupta, *Guafenezin*, *Efedrin*, *Efedrin* metaboliti *Norefedrin* ve *Parabenlerin* kapiler elektroforez teknikleri ile ayırma ve tayinleri için yöntem geliştirilmesi amaçlanmıştır. *Efedrin*'in metaboliti *Norefedrin* ile birlikte tayini ve herbir analitin duyarlılık artırılarak tayin edilebilmeleri çalışmanın hedefleri arasındadır. Bu amaçlarla, ön işlemleri minimize eden, doğru, kesin ve daha duyarlı iki kapiler elektrokromatografik yöntem (MEKC ve MEEKC) geliştirilmiş ve bu yöntemler aracılığıyla tayinler gerçekleştirilmiştir. Çalışmalar, önerilen yöntemlerin farmasötik şuruplara uygulanması ile sınırlıdır. Elde edilen sonuçlar birbirleriyle istatistiksel olarak karşılaştırılmış ve herbir yöntem sonuçları valide edilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Guafenezin (Gliseril gayakolat)

2.1.1. Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri



Şekil 1. Guafenezin'in Kimyasal Yapısı

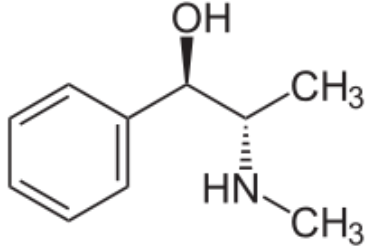
Kimyasal Adı:	(2RS)-3-(2-Metoksifenoksi)propan-1,2-diol (Şekil 1)
Kapalı Formülü:	C ₁₀ H ₁₄ O ₄
Molekül Ağırlığı:	198.2 g/mol
Erime Noktası:	78-83°C
pK _a :	15.56
Çözünürlüğü:	Suda ve alkolde
Rengi:	Beyaz veya beyaza yakın
Formu:	Kristal toz ¹

2.1.2. Farmakolojik Özellikleri

Guafenezin, gayakol'un gliserolle yaptığı esterdir. Bronş salgısını, bezler üzerindeki direkt etkisi ile stimüle eder. Ekspektoran olarak erişkinlerde günde dört kez 200 mg dozunda verilmesi tavsiye edilir. Yüksek dozda bulantı, kusma ve uyuşukluğa neden olabilir. Yüksek dozda santral kas gevşetici etkisi de vardır. Ekspektoran ilaçlar, genellikle ağız yolundan sistemik olarak uygulanan ve solunum yollarında birikmiş balgamı sulandırıp yapışkanlığını azaltmak suretiyle onun öksürükle dışarı atılmasını kolaylaştıran ilaçlardır¹.

2.2. Efedrin

2.2.1. Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri



Şekil 2. Efedrin'in Kimyasal Yapısı

Kimyasal Adı:	(1R,2S)-2-metilamino-1-fenilpropan-1-ol (Şekil 2)
Kapalı Formülü:	C ₁₀ H ₁₅ NO
Molekül Ağırlığı:	165.2 g/mol
Erime Noktası:	36-42°C
pK _a :	9.6
Çözünürlüğü:	1 g Efedrin 20 mL suda, alkolde, kloroformda, eterde, zeytinyağında ve sıvı parafinde çözünür.
Rengi:	Renksiz veya beyaz
Formu:	Katı kristal / Katı toz ¹

2.2.2. Farmakolojik Özellikleri

Efedrin, gerek alfa ve gerekse beta-reseptörleri uyarması nedeniyle adrenaline benzeyen; fakat ona oranla sempatomimetik etkileri zayıf olan bir ilaçtır. Ephedra bitkisi türlerinden elde edilen bir alkaloiddir. Günümüzde sentez yoluyla elde edilir, levo izomeri veya rasemik karışım şeklinde hidroklorür ya da sülfat tuzu halinde kullanılır. Bronkodilatör etkisinden başka, vazokonstrüktör etkisi de vardır. Ayrıca amfetamine benzer bir şekilde, fakat daha zayıf olarak Santral Sinir Sistemi (SSS)'ni stimüle eder.

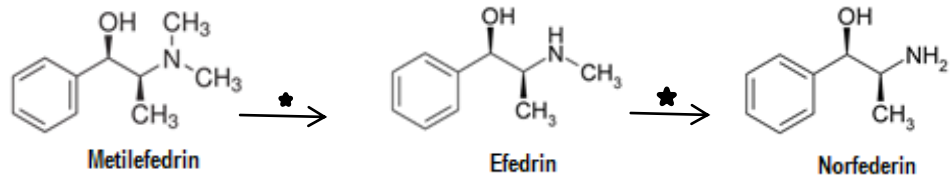
Efedrin'in yan etkileri sinirlilik, tremor, uykusuzluk ve iştah azalması gibi SSS stimölasyonuna bağlı olan etkiler, taşikardi ve kan basıncı yükselmesidir. Esansiyel hipertansiyon veya konjestif kalp yetmezliği bulunan hastalarda *Efedrin* kontrendikedir.

2.2.3. Efedrin'in Suistimali

Bazı spor dallarında, performans arttırmak amacıyla ilaçların amaç dışı kullanımı, yani doping kullanımı yaygın ve eski bir uygulamadır. Dünya Anti-Doping Ajansı tarafından yasaklanan maddeler listesinde *Efedrin* ve efedrin türevlerinin de dahil olduğu stimulanlar da yer almaktadır².

Stimulanlar, geçici olarak farkındalığı ve uyanıklığı artıran maddelerdir. Genellikle etkinlikleri arttıka yan etkileri de artar. Kafein ve nikotin en yaygın olarak kullanılan stimulanlardır. En çok bilinen stimulanlar arasında *Efedrin*, Amfetaminler, Kokain, Metilfenidat, Metilendioksimetamfetamin ve modafinil yer alır. Stimulanlar ya sempatik sinir sisteminde ya merkezi sinir sisteminde ya da her ikisinde birden etkinliği artırır. Özellikle merkezi sinir sistemini etkileyen bazı stimulanlar bir öfori hissi uyandırır. Stimulanlar terapi amaçlı olarak uyanık kalmayı sağlamak için kullanılırlar. Stimulanlar genellikle idrardan tayin edilirler. İdrar hem tayin açısından hem de numune toplama şekli açısından da tercih edilir bir vücut sıvısıdır. Genellikle aranan maddeler yüksek konsantrasyonlarda bulunur ve metabolitleri de idrarda gözlenebilir. Stimulanlar, karaciğerde, deaminasyon ve N-demetilasyon reaksiyonları sonucu, metabolize olurlar³. *Efedrin* de, N-demetilasyon reaksiyonu sonucu *Norefedrin*'e metabolize olurken⁴, kendisi de başka bir efedra alkaloiti olan Metilefedrin'in N-demetilasyon reaksiyonuna uğraması sonucu oluşur (şekil 3). Metabolik yollarına bakıldığında, *Norefedrin*'in çoğunlukla değişmeden idrarla atıldığı, *Efedrin*'in demetilasyona uğrayarak, *Norefedrin* oluşturduğu; fakat ilerinde en fazla Metilefedrin'in

diğerleriyle kıyaslandığında, *Efedrin*'e metabolize olduğu görülmüştür. Genel *Efedrin* metabolik yoluna bakıldığında ise, *Efedrin*'in %79.3'ünün değışmeden atıldığı, buna karşılık, %4.3'ünün *Norefedrin*'e dönüşerek atıldığı bilinmektedir^{5,6}.

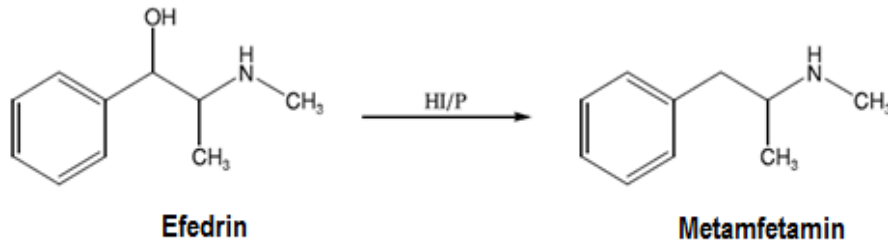


★ N-demetilasyon Reaksiyonu

Şekil 3. Metilefedrin, Efedrin ve Norefedrin için metabolik yolak

Efedrin'in idrarla atılımı ile ilgili yapılan çalışmalarda, pH'ın önemli bir parametre olduğu gözlenmiştir. İdrar pH'ı asidik olduğunda, atılan *Efedrin*'in %26.2'si ilk 16 saatte, % 27.6'sı ilk 24 saatte atılmıştır. Aynı gruba *Efedrin* ile birlikte, idrarın bazikleştirilmesi için sodyum bikarbonat verildiğinde, ilk 16 saatte %14.7, 24 saatte %16.6'lık bir atılım olmuştur. Yani atılımda bir yavaşlama söz konusudur. Bu durum, doping amacıyla *Efedrin* kullanımı olan sporcular tarafından bilinmekte, *Efedrin* bazik stimulanla alınarak etki süresi arttırılmakta, idrarla atılma miktarı gecikmiş olduğu için, kontrol sırasında maskelenmiş olmaktadır⁷.

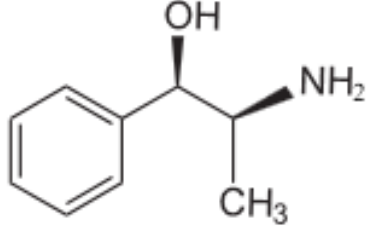
Efedrin'in kötüye kullanımı açısından başka bir durum da, amfetamin türevlerinin kimyasal olarak *Efedrin*'den kolaylıkla (Şekil 4), ucuz ve yüksek verimle sentezlenebilmesidir⁸.



Şekil 4. Metamfetamin'in Efedrin'den sentezi (HI/P: Hidriodik asit/fosfor indirgemesi)

2.3. Norefedrin (Fenilpropanolamin)

2.3.1. Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri



Şekil 5. Norefedrin'in Kimyasal Yapısı

Kimyasal adı:	(1R,2S)-2-amino-1-phenylpropan-1-ol (Şekil 5)
Kapalı Formülü:	C ₉ H ₁₃ NO
Molekül Ağırlığı:	151.2 g/mol
Erime Noktası:	101-101.5 °C
pK _a :	9.44
Çözünürlüğü:	Suda, metanolde çözünürlüğü yüksek, izopropanolde çözünürlüğü az
Rengi:	Beyaz
Formu:	Kristal toz ⁹

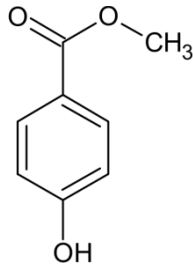
2.3.2. Farmakolojik Özellikleri

Norefedrin, solunum yolu mukozasında, çoğunlukla α -adrenerjik reseptörleri, daha az derecede de β -adrenerjik reseptörleri uyarır. α -adrenerjik reseptörlerin uyarılması, doku hiperemisini azaltarak, burun tıkanıklığını azaltır. İndirekt olarak stimüle ettiği β -adrenerjik reseptörler ile taşikardiye neden olur ve pozitif inotropik etki sağlar. *Efedrin*'in aktif metaboliti olan *Norefedrin*'in, idrardan büyük oranda değişmeden idrarla atılır ve yalnızca %4'lük kısmı biyotransformasyon sonucu, 4-hidroksinorefedrin ve hipürik aside dönüşür¹⁰.

2.4. Parabenler

Parabenler geniş pH aralıklarında antimikrobiyal aktivite gösteren koruyuculardır. Parabenlerin, alkil zinciri uzunluğu arttıkça antimikrobiyal aktiviteleri de artar. Koruyucu aktivite, farklı paraben kombinasyonlarının bir araya getirilmesiyle de arttırılabilir. Parabenler, küf ve mayalara karşı korumada da etkilidirler ve özellikle Gram-pozitif bakterilerde daha etkili oldukları belirtilmiştir *Metil paraben* ve *Propil paraben*, pH 4-8 aralığında antimikrobiyal aktivite gösterebilen paraben türleridir. pH arttıkça, antimikrobiyal koruyucu etkileri azalmaktadır. *Metil paraben*, parabenler içinde, antimikrobiyal aktivitesi en az olandır¹¹.

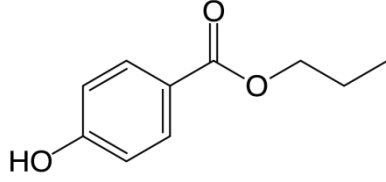
2.4.1. Metil Paraben



Şekil 6. Metil Paraben'in Kimyasal Yapısı

Kimyasal Adı:	Metil-4-hidroksibenzoat (Şekil 6)
Kapalı Formülü:	C ₈ H ₈ O ₃
Molekül Ağırlığı:	152.15 g/mol
Erime Noktası:	125-128°C
pK _a :	8.4
Çözünürlüğü:	1 gramı, 400 mL suda, yaklaşık 70 mL gliserolde, alkol, aseton ve eterde çözünür.
Rengi:	Renksiz veya beyaz
Formu:	Kristal ¹¹

2.4.2. Propil Paraben



Şekil 7. Propil Paraben'in Kimyasal Yapısı

Kimyasal Adı:	Propil-4-hidroksibenzoat (Şekil 7)
Kapalı Formülü:	C ₁₀ H ₁₂ O ₃
Molekül Ağırlığı:	180.2 g/mol
Erime Noktası:	95-98°C
pK _a :	8.4
Çözünürlüğü:	1 gramı, 2500 mL soğuk suda, 400 mL kaynar suda, 3.5 mL alkol, 4 mL kloroformda çözünür.
Rengi:	Renksiz veya beyaz
Formu:	Kristal ¹¹

Farmasötik şuruplarda metil ve propil paraben, birlikte yer aldıklarında eşit miktarlardadır¹¹.

2.5. Analiz Yöntemleri

2.5.1. Guafenezin

2.5.1.1. Kromatografik Yöntemler

Shabir, Guafenezin ve sodyum benzoatın ekspektoran şuruplardan tayini amacıyla bir izokratik HPLC-UV yöntemi geliştirmiştir¹². Dönmez ve grubu, basit ve hızlı bir HPLC-DAD yöntemi geliştirerek Guafenezin, Difenhidramin HCl ve Karbetapentan sitrat'ın şuruplardan tayinini gerçekleştirmişlerdir¹³. Psödoefedrin, Feniramin, Guafenezin, Pirilamin, Klorfeniramin ve Dekstrometorfan'ın soğuk algınlığı ilaçlarından tayini amacıyla, Louhaichia ve çalışma grubu basit ve hızlı bir HPLC-UV yöntemi geliştirmişlerdir¹⁴. Grosa ve arkadaşları, Guafenezin, Metil ve Propil parabenlerin ekspektoran şuruplardan tayini amacıyla bir HPLC-UV prosedürü geliştirmişlerdir¹⁵. Wilcox ve Stewart, Guafenezin'in farklı kombinasyonlarda bulunduğu kapsül ve şurup formülasyonlarından tayini amacıyla bir HPLC-UV yöntemi geliştirmişlerdir¹⁶. Maithani ve arkadaşları Salbutamol sülfat, Guafenezin ve Ambroksol'ün tablet formülasyonundan tayinini yapmak amacıyla bir ters faz HPLC-UV yöntemi geliştirerek valide etmişlerdir¹⁷.

Hatami ve çalışma grubu, Guafenezin enantiyomerlerinin, insan idrarından tayini amacıyla sıvı-sıvı ekstraksiyonu takiben floresans dedektörlü HPLC yöntemi geliştirmişlerdir¹⁸. Serumda Guafenezin'in tayini amacıyla, Guafenezin'in önzenginleştirildiği ve serumdaki protein ve polar bileşiklerin uzaklaştırıldığı, protein kaplı RP-8 silika ön kolonundan geçirildiği bir HPLC-UV yöntemi kullanılmıştır¹⁹. Dekstrometorfan, Dekstorfan ve Guafenezin'in plazmadan tayini amacıyla yarı otomatikleştirilmiş sıvı-sıvı ekstraksiyon tekniğini takiben kullanılan LC-MS/MS yöntemi geliştirilmiştir²⁰. Chen ve arkadaşları, plazmadan Parasetamol ve Guafenezin'in tayini amacıyla, ön ekstraksiyon basamağı içeren hassas bir LC-MS/MS yöntemi geliştirmişlerdir²¹. Wen ve çalışma

grubu plazmadan Guafenezin ve Pentoksiverin sitratın tayini amacıyla duyarlı ve spesifik bir Sıvı Kromatografi–Elektrosprey İyonizasyon–Kütle Spektrometrisi (LC-ESI-MS) yöntemi geliştirmişlerdir, ayırmadan önce etil asetat ile ekstraksiyon işlemi yapılmıştır²². Sheen ve grubu, geliştirdikleri LC/ESI-MS/MS yöntemi ile Guafenezin, Mefenezin, Simvastatin, Podofilotoksin ve İnositol'ün ayırım ve tayinini gerçekleştirmişler ve yöntemi, insan plazmasına da uygulamışlardır²³.

Guafenezin ve *Norefedrin*'in de dahil olduğu etken maddelerin şurup ve soğuk algınlığı preparatlarından tayini amacıyla, Harsono ve ekibi, basit ve hızlı bir GC-FID (Gaz Kromatografisi-Alev İyonizasyon Dedektörü) yöntemi geliştirerek, valide etmişlerdir²⁴. Sharaf ve Stiff, Guafenezin'in insan serumundan tayini amacıyla ECD (Elektron Yakalama Dedektörü) dedektörlü kapiler gaz kromatografi sistemi geliştirmişlerdir, yöntem bir ön ekstraksiyon basamağı ve türevlendirme içermektedir²⁵.

2.5.1.2. Elektroforetik Yöntemler

Denola ve çalışma grubu, Salbutamol, Guafenezin ve Difilin'in oral formülasyonlardan tayini amacıyla hassas bir MEKC yöntemi geliştirmişlerdir. 20 µm iç çaplı kapiler kullanmışlar, etken maddelerin duyarlı tayininin (0.5-60 µg ml⁻¹ aralığında), istifleme işlemiyle bağlantılı olduğunu belirtmişler ve büyük hacimli istifleme yöntemini tercih ederek, ortama asetonitril (ACN) eklemişlerdir. ACN miktarının, istifleme işlemini etkilediği belirtilmiştir. Önerilen yöntemde Difilin iç standart olarak kullanılmıştır. Standart ekleme yöntemi ile yapılan geri kazanım çalışmalarında, hem şuruplarda hem de kapsüllerde %95-100 aralığında sonuçlar elde etmişlerdir. Salbutamol ve Guafenezin için LOD değerleri, hesaplanmış ve sırasıyla 0.07 ve 0.21 µg.ml⁻¹ olarak bulunmuştur²⁶.

Ambroksol, Bromeksin, Karboksisistein, Gayakol ve Guafenezin'in ayrımı ve tayini amacıyla basit ve hızlı bir MEKC yöntemi geliştirilmiştir. Yöntemde, etken maddeler, fosfat tampon çözeltisi (35 mM, pH3.9) ile ACN oranları 75:25 (h/h) ve 120 mM SDS içerecek şekilde hazırlanan çalışma elektrolit çözeltisinde ayrılmış ve UV dedektör ile 200 nm'de tayin edilmişlerdir. İnternal standart kullanımı ile düzeltilmiş pik-alan oranları üzerinden sinyaller alınmış, LOD değerleri 3.0-5.0 mM aralığında bulunmuştur. Gün içi (n=3), günlerarası (n=5) %RSD değerleri %4 altında bulunmuştur. Analiz süresi beş analit için 6 dakikadır²⁷.

Pomponio ve arkadaşları, Guafenezin, Salbutamol ve Dekstrometorfan içeren ekspektoran şuruplarda MEKC ve GC yöntemlerini kıyaslamışlardır. MEKC'de kullanılan elektrolit çözelti (BGE), 0.04 M SDS içeren, sodyum tetraborat ve 3-(siklohegzilamino)-2-hidroksi-1-propan-sulfonik asit sodyum tuzu (CAPSO) çözeltisidir. Sonuçta, kalitatif ve kantitatif olarak, tüm şurup bileşenlerinin MEKC ile tayini gerçekleştirilmiş, yalnızca UV absorbanı olmayan uçucu analitler (aromalar) için GC-MS tercih edilmiştir. Şurubun içeriği nedeniyle CE yönteminin daha uygun olduğu; yalnızca aroma veren bileşikler için GC'nin kullanılabileceği belirtilmiştir²⁸.

Guafenezin, Psödoefedrin ve Dekstrometorfan, kapsül formülasyonundan, bir MEKC yöntemi ile tayin edilmiştir. Ayrım için, 50 mM SDS eklenmiş, pH 8.5 100 mM Tris tamponu kullanılmış ve 25 kV voltaj uygulanmıştır. UV dedeksiyon ile 220 nm'de tayin edilen bileşikler için elde edilen LOD değerleri, Guafenezin için 1000 ng.mL⁻¹, Psödoefedrin için 500 ng mL⁻¹ ve Dekstrometorfan için 500 ng.mL⁻¹'dir. Doğrusal aralıklar, sırasıyla, 100-1000 µg.mL⁻¹, 15-150 µg.mL⁻¹ ve 5-50 µg.mL⁻¹ bulunmuş, elde edilen regresyon katsayıları ise 0.9989'dan büyük olarak hesaplanmıştır. HPLC ile kıyaslandığında, önerilen yöntemin, daha basit, ekonomik ve az solvan harcanmasından dolayı çevreye zararı olmayan bir yöntem olduğu bildirilmiştir²⁹.

Okamoto ve arkadaşları, Guafenezin ve Psödoefedrin'in dahil olduğu 14 etken maddenin, soğuk algınlığı ilaçlarından tayini amacıyla, siklodekstrin (CD) ile modifiye edilmiş, yeni bir MEEKC yöntemi geliştirmişlerdir. Etken maddelerin ayrımı için, yöntemde kullanılan yüzey aktif madde SDS ve organik faz için kullanılan bileşiğin miktarları optimize edilmiştir. Ortama eklenen 2-propanol'ün de ayırmaya etkisi incelenmiştir. Tüm bileşikler, %0.81 pentan (a/a), %6.61 (a/a) 1-butanol, %2 (a/a) 2-propanol, %4.47 (a/a) SDS ve 3 mM 2,6-di-O-metil-β-CD içeren, %86.11 (a/a) 10 mM sodyum tetraborat çözeltisinin karışımıyla oluşturulan BGE çözeltisiyle ayrılmıştır. Yöntem valide edilidikten sonra, farmasötik formlara da uygulanmış ve herhangi bir girişim gözlenmemiştir. Her bir madde için yapılan doğrusalılık çalışmasında, korelasyon katsayısı (r) 0.999 üzerinde elde edilmiştir. Ayrıca geri kazanım çalışmasının sonuçları, %99.1-100.7, %RSD değerleri, %0.5-2.8 aralığındadır. LOD değerleri 0.6-4.2 µg.ml⁻¹ aralığında bulunmuştur. Yöntem, HPLC yöntemi ile karşılaştırılmış ve sonuçlar birbirleri ile uyumlu bulunmuştur³⁰.

2.5.2. Efedrin

2.5.2.1. Kromatografik Yöntemler

Okamura ve arkadaşları, farmasötik formlardaki Efedrin, Psödoefedrin, *Norefedrin* ve Metilefedrinin ayrım ve tayinini HPLC yöntemi ile gerçekleştirmişler, C18 kolon ve su:asetonitril:SDS (65:35:0.4) mobil faz sistemi ile izokratik elüsyon yapılmış ve 25 dk.da analiz tamamlanmıştır³¹. Ouyang ve arkadaşları, Efedrin, Psödoefedrin ve *Norefedrin*'in tayini amacıyla iletkenlik dedektörlü iyon kromatografi sistemi ile yöntem geliştirmiş ve farmasötik preparatlardan bu bileşiklerin tayinlerini yapmışlardır³².

Aymard ve arkadaşları, Efedrin ve Norefedrin'in plazmadan tayinini yapabilmek amacıyla, sıvı ekstraksiyonu takiben 9-florenilmetil kloroformat ile türevlendirme yapmışlar, ardından HPLC ile ayırım ve tayinini gerçekleştirmişlerdir³³. Chan ve arkadaşları, Efedrin, Norefedrin, Norpsödoefedrin, Psödoefedrin, Metilefedrin ve Metilpsödoefedrinin izokratik elüsyonunu, C18 kolon ve tetraetilamonyumfosfat-metanol mobil faz kullanımı ile HPLC yöntemiyle gerçekleştirmişler ve bu yöntemle idrardan tayin gerçekleştirmişlerdir³⁴. Apollonio ve arkadaşları, içerisinde Efedrin'in de bulunduğu amfetamin türevi dokuz bileşiğin ayırımını UPLC-MS sistemi ile çoklu ilaç karışımı ve kan numunesi ekstraktından analiz süresi 3 dk'dan daha kısa olacak şekilde gerçekleştirmişlerdir³⁵. Lee ve ekibi, LC-MS/MS yöntemi ile illegal yedi bileşiğin idrardan tayinini gerçekleştirmişlerdir, Efedrin'in de dahil olduğu analitleri içeren idrar numunesi asetonitril (ACN) ile seyreltilmiş ve santrifüjleme işleminden sonra, supernatantın doğrudan enjeksiyonu ile ayırım ve tayin gerçekleşmiştir³⁶. Cooper ve arkadaşları, Efedrin, Psödoefedrin ve Kafein'in plazmadan tayini amacıyla bir LC-MS/MS yöntemi geliştirmişlerdir, yöntemin basit bir ön ekstraksiyon basamağının olması ve çok az numune hacmiyle bile tayinin gerçekleştirilebilmesi gibi avantajlarıyla toksikolojik çalışmalarda kullanılabileceği belirtilmiştir³⁷. Wu ve arkadaşları, geliştirdikleri LC-ESI-MS/MS yöntemi ile, 17 alkaloidin insan kan ve gastrik sıvıdan tayinini gerçekleştirmişler, numuneler borik asitle karıştırılıp, ardından kloroform ile ekstraksiyon yapılmış, Efedrin'in de dahil olduğu analitler tayin edilmiştir³⁸.

Spyridaki ve arkadaşları, Efedrin, Psödoefedrin, Norefedrin, Norpsödoefedrin ve Metilefedrin'in idrardan ayırımı amacıyla, idrar numunelerinin ekstraksiyonunun bazik ortamda yapıldığı, GC-MS yöntemi geliştirmişlerdir³⁹. Wang ve arkadaşları, Efedrin türevi olan, yapısal olarak birbirine çok yakın sekiz bileşiğin ayırımını kiral türevlendirmeli gaz kromatografi-kütle spektrometrisi (GC-MS) ile gerçekleştirmişlerdir⁴⁰.

2.5.2.2. Elektroforetik Yöntemler

Efedrin, Metilefedrin ve Psödoefedrin'in ayırım ve tayini amacıyla, elektrokemilüminesans dedektörlü CE yöntemi geliştirilmiştir. Optimum koşullarda ayırım ve tayin, her üç alkaloid için de başarılmıştır. Efedrin, Metilefedrin ve Psödoefedrin için bulunan LOD değerleri sırasıyla 4.0×10^{-8} , 6.5×10^{-8} , 4.6×10^{-8} mol.L⁻¹ ve LOQ değerleri 5.3×10^{-7} , 9.1×10^{-7} , 6.9×10^{-7} mol .L⁻¹ 'dir. Yöntem, geleneksel ilaçlar ve insan idrarında başarılı bir şekilde uygulanmıştır⁴¹.

Biyolojik numunelerden Efedrin ve Psödoefedrin'in tayini amacıyla bir CE yöntemi kullanılmıştır. Numuneler enjeksiyon öncesi önce, monolitik moleküler imprint polimer fiberli ekstraksiyon işleminden geçirilmiştir. Moleküler imprint polimer için Efedrin şablon olarak kullanılmış, bu durum analitlere seçici ve duyarlı bir sistem olmasını sağlamıştır. LOD değerleri Efedrin için, 0.00096 g.mL⁻¹, Psödoefedrin için, 0.0011 g.mL⁻¹ dir⁴².

Efedrin tayini ve ilişkili olduğu proteinlerin bağlanma bölgelerini saptayabilmek amacıyla bir kolon sonu elektrokemilüminesans dedektörlü CE sistemi geliştirilmiştir. Tris(2,2-bipiridil)rutenyum(II) kullanılan dedektör sistemi Efedrin için bu çalışma ile ilk kez denenmiştir. Yöntem insan idrarına da başarılı bir şekilde uygulanmış ve LOD değeri 4.5×10^{-9} g.mL⁻¹ olarak bulunmuştur⁴³.

Liu ve ekibi, Efedrin ve Psödoefedrin için elektrokemilüminesans dedektörlü bir CE geliştirmiştir. LOD değerleri Efedrin için 4.5×10^{-8} mol.L⁻¹ ve Psödoefedrin için 5.2×10^{-8} mol.L⁻¹ olarak bulunmuştur. Yöntem insan idrarı ve nazal damlalarda başarılı bir şekilde uygulanmıştır⁴⁴.

Efedrin'i de içeren yedi stimulan ve narkotik bileşiğin tayini amacıyla basit, hızlı ve duyarlı bir CE-ESI-MS yöntemi geliştirilmiştir. Yöntemde, 20 mmol L, pH 9.0 amonyum asetat tamponu elektrolit çözeltisi olarak kullanılmış ve ayırma voltajı 22 kV olarak ayarlanmıştır. Yedi bileşik bu şartlar altında, 4.6 dakika içinde ayrılmıştır. Genel olarak 0.40-1.0 ng.mL⁻¹ aralığında LOD değerleri elde edilmiştir⁴⁵.

Alshana ve grubu, ön basamak olarak Ultrasonik Destekli Emülsiyon Mikro Ekstraksiyon (USAEME) kullanarak, Efedrin, Norefedrin ve Psödoefedrin'in tayin edildiği bir CE yöntemi geliştirmişlerdir. Herhangi bir ön işlem uygulanmamış kapiler zon elektroforez sonuçlarıyla kıyaslandığında, emülsiyon mikroekstraksiyon ile 1750, sıvı-sıvı mikroekstraksiyon ile 140 kat duyarlılık artışı gözlenmiştir⁴⁶.

Mateus-Avois ve çalışma grubu, Efedrin ve türevi alkaloidler için herhangi bir ön ekstraksiyon basamağı kullanmaksızın, optimizasyon basamağı deneysel dizayn ile kemometrik olarak yapılmış, bir Kapiler Zon Elektroforez (CZE)-UV yöntemi geliştirmişlerdir. En başarılı sonuçlar, 260 mM pH 3.5 Tris fosfat tamponu ile 13.3 mM dimetil-β-siklodekstrin varlığında elde edilmiştir. Sıcaklık olarak 25°C ve uygulanan voltaj olarak da 30 kV seçilmiştir. Optimum koşullarda, ayırım 6 dakika içerisinde başarılı bir şekilde sağlanmıştır⁴⁷.

Fang ve arkadaşları, Efedrin türevlerinin idrardan tayini için fiber headspace katı-faz mikroekstraksiyonunu takip eden bir CE yöntemi geliştirmişlerdir. Katı faz mikroekstraksiyonunda kullanılan fiber ekstraksiyonda sabit faz olarak kullanılmış ve diğer ticari poli(dimetil) ve poli(akrilat) kaplanmış liflerle karşılaştırıldığında Efedrin ve türevleri için oldukça yüksek bir ekstraksiyon verimi elde edilmiştir. Alan Güçlendirilmiş Numune Enjeksiyonu (FASI) ile de duyarlılıkta iki kat artış sağlanmış ve bunların sonucunda Efedrin için LOQ değeri 3 ng.mL⁻¹ bulunmuştur.⁴⁸

Dong ve arkadaşları, Psödoefedrin ve Efedrin tayini amacıyla ön türevlendirmeli susuz ortam CE yöntemi geliştirmişlerdir. Türevlendirme için 4-kloro-7-nitrobenzo-2-oksa-1, 3-Diazol kullanılmış ve türevlendirme offline moda yapılmıştır. Optimizasyonlar sonucunda türevlendirme tamponu olarak 40 mM amonyum asetat ve %20 asetonitril, çalışma tamponu olarak 80 mM amonyum asetat ve %3 asetik asitten oluşan sistemlerin uygun olduğu bulunmuştur. Efedrin için doğrusal aralık 1.23 mg.L^{-1} , korelasyon katsayısı 0.9970, LOD ise 0.014 mg.L^{-1} olarak bulunmuştur. Dört ayrı farmasötik preparattan yapılan geri kazanım çalışmasında ise geri kazanım %93.9 olarak bulunmuştur⁴⁹.

Zhang ve arkadaşları, Efedrin ve amfetamin türevi ilaçların tayini için kolon öncesi türevlendirme yapılan ve lazer kaynaklı floresans (LIF) dedektör kullanılan yeni bir CE yöntemi geliştirmişler ve Efedrin'in de dahil olduğu altı ilacın miktar tayinlerini gerçekleştirmişlerdir. Floresein izotiyosiyanat ile türevlendirme basamağını takiben altı bileşik ve internal standart kapiler elektroforez sisteminde kolaylıkla ayrılmıştır. Mobil faz olarak 20 mM Borat tamponu (pH 12) kullanılmış, enjeksiyon basınç modunda yapılmış ve 25 kV/ 25°C voltaj uygulanmıştır. Analiz süresi 20 dakikadır ve yöntem validasyonu yapılmıştır. İdrar ve kanda LOD değerleri 0.2 ng.mL^{-1} , doğrusal çalışma aralığı $0.5-100 \text{ ng.mL}^{-1}$ bulunmuştur⁵⁰.

Xie ve arkadaşları Efedrin ve Psödoefedrin için seçici ve duyarlı bir MEKC-LIF yöntemi geliştirmişler ve türevlendirme amacı ile 4-kloro-7-nitrobenzo-2-oksa-1,3-diazol kullanmışlardır. Ayrım, 16 mM SDS içeren 10mM sodyumborat kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Efedrin için korelasyon katsayısı 0.9943, LOD 0.70 ng.mL^{-1} bulunmuştur. Yöntem bu iki bileşiğin farmasötik preparatlarda analizi için kullanılmış ve %geri kazanım değerleri %98.3-107.1 aralığında bulunmuştur⁵¹.

2.5.3. Norefedrin

2.5.3.1. Kromatografik Yöntemler

Rind ve arkadaşları, 4-dimetilaminobenzaldehit ile ön türevlendirme yaparak, farklı farmasötik preparatlardan HPLC ile *Norefedrin* tayinini gerçekleştirmişlerdir⁵². Ch'afar-Peric'as ve grubu, *Norefedrin*'in de dahil olduğu primer amfetaminlerin analizini yapmak amacıyla, kiral türevlendirme ve katı-faz ekstraksiyonu kombinasyonlu bir sıvı kromatografi yöntemi geliştirmişlerdir⁵³. Abbasi ve çalışma arkadaşları, *Norefedrin*'in farmasötik preparatlardan tayini amacıyla, kapiler gaz kromatografi yöntemi geliştirmişlerdir. FID dedektörü kullanılan sisteme, trifloroasetilaseton ile türevlendirilmiş analit verilmiş ve tayin edilmiştir⁵⁴.

2.5.3.2. Elektroforetik Yöntemler

Kokiashvili ve arkadaşları, Deksamfetamin ve *Norefedrin*'in de dahil olduğu impüritelerin ayırım ve tayininde kiral ayırıcı olarak Heptakis-(2,3-di-O-asetil-6-O-sülfo)- β -siklodekstrin kullanıldığı bir CE yöntemi önermişlerdir. Ayırım 20°C'de, 25 kV voltaj uygulanarak yapılmış ve elektrolit çözeltisi olarak 10 mg.mL⁻¹ siklodekstrin içeren 0.1 M sodyum fosfat tampon çözeltisi kullanılmıştır⁵⁵.

Buiarelli ve çalışma arkadaşları, farmasötik preparatlarda bulunan etken maddelerin tayini amacıyla, hızlı ve doğru bir MEKC yöntemi geliştirmişlerdir. Asetaminofen, Salisilamid, Kafein, Fenilefrin, Psödoefedrin, *Norefedrin* ve Klorfeniramin'in ayırımı, 30 mM sodyum dodesil sülfat içeren Tris-borat (20 mM, pH 8.5) tampon çözeltisi ile gerçekleştirilmiştir. Tayin 214 nm dalga boyunda yapılmıştır ve voltaj 10 kV'dur. Yöntem, bu etken maddeleri içeren preparatlara da başarıyla uygulanmış ve validasyon çalışması yapılmıştır⁵⁶.

2.6. Kapiler Elektroforez

Elektroforez, doğru akımın uygulandığı bir tampon çözeltide yüklü taneciklerin farklı göç hızlarına dayanan bir ayırma yöntemidir. Kapiler elektroforez (CE) bir kapiler tüpte gerçekleştirilir ve hem büyük hem de küçük moleküllerin analizi için etkili bir ayırma tekniğidir. Kapiler elektroforez, uygulanan bir voltaj ile, iyonları elektroforetik mobilitelerine göre ayıran bir tekniktir. Elektroforetik mobilite, molekülün yüküne, viskoziteye ve molekülün büyüklüğüne bağlıdır. Analitin hareket hızı, uygulanan elektriksel alanla direkt olarak orantılıdır, elektriksel alan arttıkça mobilite de artar. Uygulanan bir elektriksel alanda, pozitif yüklü katyonlar, negatif elektroda (katod) doğru göç ederler. Negatif yüklü anyonlar ise aksi yönde ilerler ve pozitif elektroda (anod) doğru göç ederler. Göç hızı genel olarak yük-kütle oranına bağlı olarak farklılık gösterir. Aynı yüke sahip daha küçük iyon büyük olana oranla daha hızlı hareket ederken, aynı boyuta sahip daha yüksek yüke sahip iyon daha düşük yüke sahip olana göre daha hızlı göç edecektir. Bu durumda aynı boyutta olan tek ve çift yüklü iyonlar karşılaştırıldığında, çift yüklü iyon daha hızlı göç hızına sahip olacaktır. Nötr moleküller ise, elektrik alandan etkilenmezler. Elektrik alan altında, tampon çözelti elektroozmotik akış nedeniyle hareket kazanır. Tamponun kazandığı bu elektroozmotik akış nedeniyle, tamponda çözünen nötral türlerin de dahil olduğu tüm bileşikler negatif elektroda doğru taşınırlar. Kapiler elektroforezde, kapilerin ince olması, yüzey hacim oranını büyük oranda artırır, bu da yüksek voltalarda oluşabilecek aşırı ısınmayı önler⁵⁷.

2.6.1. Kapiler Elektroforez Modları

Kapiler elektroforez modları Tablo 1'de gösterilmiştir^{57,58}. Çalışmamızda bu modlardan, Tabloda son sırada yer alan *Miseller Elektrokinetik Kromatografi* ve *Mikroemülsiyon Elektrokinetik Kromatografi* kullanılmış ve bu yöntemlerle ilgili genel bilgilere yer verilmiştir.

Tablo 1. Kapiler Elektroforez modları

Kapiler elektroforez modu	İngilizcesi ve Kısaltılmış İsmi
Kapiler Zon Elektroforez	Capillary Zone Electrophoresis- CZE
Kapiler İzotakoforez	Capillary Isotachopheresis-CITP
Kapiler İzoelektrik Odaklama	Capillary Isoelectric Focusing-CIEF
Kapiler Jel Elektroforez	Capillary Gel Electrophoresis-CGE
Susuz Ortam Kapiler Elektroforez	Nanoqueous Capillary Electrophoresis-NACE
Afinite Kapiler Elektroforez	Affinity Capillary Electrophoresis-ACE
Kapiler Elektrokromatografi	Capillary Electrochromatography-CEC
Mikroçip Kapiler Elektroforez	Microchip-Based CE
Basıncılı Kapiler Elektrokromatografi	Pressurized Capillary Electrochromatography-pCEC
İmmunoafinite Kapiler Elektroforez	Immunoaffinity Capillary Electrophoresis-IACE
Nano Kapiler Elektroforez	Nano Capillary Electrophoresis-NCE
Mikrolitik Kapiler Elektroforez	Microfluidic Capillary Electrophoresis-MFCE
Kapiler Elektrokinetik Kromatografi 1) Miseller Elektrokinetik Kromatografi 2) Mikroemülsiyon Elektrokinetik Kromatografi	Capillary Electrokinetic Chromatography- CEKC 1) Micellar Electrokinetic Chromatography-MEKC 2) Microemulsion Electrokinetic Chromatography-MEEKC

2.6.1.1 Kapiler Elektrokinetik Kromatografi (CEKC)

Elektrokinetik kromatografi yöntemleri, teknik olarak CZE'in, kromatografi prensibi ile kombine edilmesi şeklinde tanımlanabilir. MEKC ve MEEKC olmak üzere iki alt başlıkta incelenir.

2.6.1.1.1. Misel Elektrokinetik Kromatografi (MEKC)

CE, maliyet, küçük örnek hacmi ve hızlı analiz süresi gibi avantajlara sahip, yüklü bileşiklerin, bir elektrik alan altında ayrımının sağlandığı bir yöntemdir. CE'nin yalnızca yüklü analitler için uygun olma dezavantajı, MEKC tekniğinin geliştirilmesi ile düzeltilmiştir. Analit molekülleri, misel oluşturucu maddelere nüfuz ederek, nötr haldeyken, net bir yüke sahip olmaya başlar ve bu sayede, elektrik alan etkisi ile hareket edebilir. Buradaki analitin göç hızı, ne kadarının misele nüfuz ettiğine bağlı olarak değişiklik gösterir. MEKC'in ayrılma ilkesinin kromatografiyle benzerliği burada ortaya çıkar ve sabit faz olarak kapiler iç yüzeyi değil, misel oluşturucu bileşikler kullanılır. Bu nedenle, misel oluşturucu yüzey aktif maddeler, MEKC yöntemlerinde psödo-sabit faz (PS) olarak adlandırılır⁵⁹. Mobil faz ise, misel yapısını çevreleyen sulu (tampon çözelti) fazdır.

Yüzey aktif maddeler (surfaktanlar), suda veya sulu bir çözeltide çözüldüğünde yüzey gerilimini etkileyen (çoğunlukla azaltan) kimyasal bileşiklerdir. Yüzey aktif maddeler aynı zamanda iki faz arasındaki yüzeylerarası gerilimi de etkiler. Yüzey aktif maddeler hem hidrofobik hem de hidrofilik karakterde olan moleküllerdir. Yüzey aktif maddeler, Şekil 8'de görüldüğü gibi, baş (hidrofilik) ve kuyruk bölümü (lipofilik) olmak üzere iki bölümden oluşur. Bu iki bölgenin kimyasal yapılarına bakılarak bu bileşiklerin sınıflandırması yapılır. Buna göre;

-Kuyruk kısmı; Hidrokarbon zinciri, Alkil eter zinciri, Florokarbon zinciri
Siloksan zinciri şeklinde olabilir.

-Baş kısmı, yük durumuna bağlı olarak sınıflandırılır;

İyonik yüzey aktif maddeler, net bir yüke sahip olan bileşiklerdir.

Anyonik: Negatif yüke sahip olan bileşiklerdir. Örnek: Sodyum dodesil sülfat (SDS)

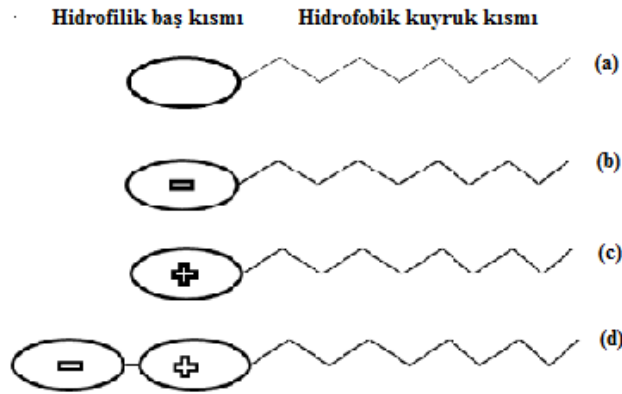
Katyonik: Pozitif yüke sahip bileşiklerdir. Örnek: Tetradesil trimetil amonyum bromür (TTAB)

Amfoterik(Zwitteriyonik): Biri anyon, diğeri katyon iki gruptan oluşur.
Örnek: Dodesil betain

Non-iyonik yüzey aktif maddeler: Yapılarında herhangi bir yüklü grup taşımayan türlerdir. Örnek: Dodesil eter (Brij 35)

Ayrıca, makromoleküler yüzey aktif maddeler de kullanılır.

Örnek: butil akrilat-butil metakrilat-metakrilik asit kopolimerleri (BMMA)⁵⁹.

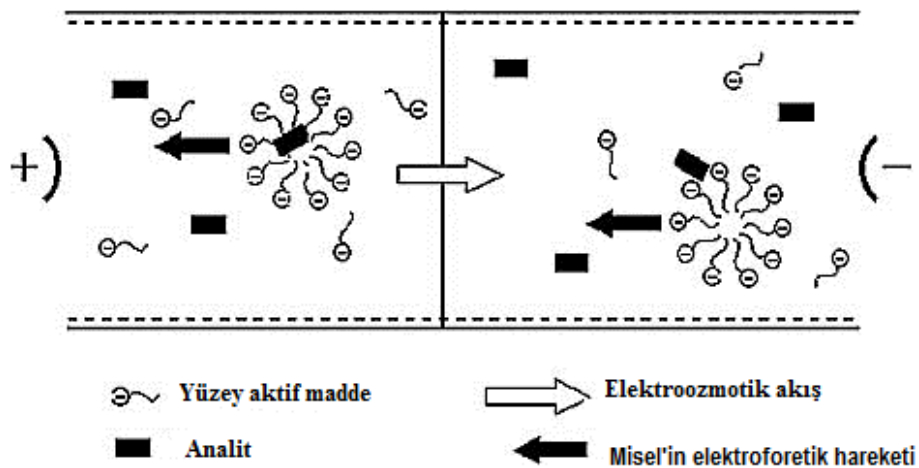


Şekil 8. Yüzey Aktif Maddelerin Genel Yapısı

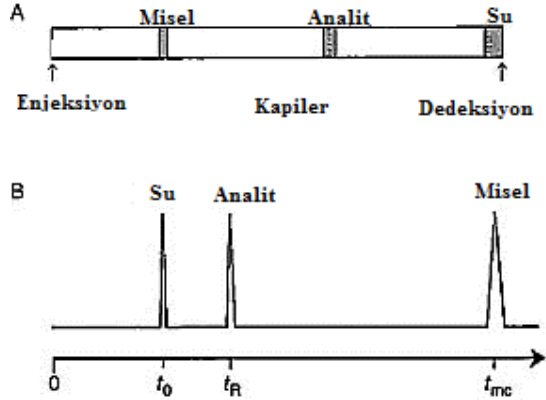
a)Non iyonik b)Anyonik c)Katyonik d)Amfoterik

Yüzey aktif maddelerin konsantrasyonları önemlidir. Bunun nedeni, kritik misel konsantrasyonu (CMC) olarak isimlendirilen konsantrasyon limitidir. Bu limitin üzerindeki konsantrasyonlarda, yüzey aktif moleküller biraraya gelerek misel oluşumunu sağlamaktadır. Miseller, monomerik halleri ve biraraya gelmiş halleri arasında çok hızlı bir denge kurdukları için, oldukça dinamik yapılar olarak tanımlanabilirler.

MEKC tekniğinin ayırma prensibi Şekil 9'da gösterilmektedir. Yöntemde iyonik yüzey aktif madde konsantrasyonu, kritik misel konsantrasyonundan (CMC) yüksek olacak şekilde hazırlanan bir BGE çözeltisi kullanılmaktadır. Yüzey aktif madde bu konsantrasyonda misel oluşturacak ve analit molekülleri, misel fazı ve tampon fazı (sulu faz) arasında bir dağılım gösterecektir. Elektrik akımı altında, iyonik misel, kendi yükünün aksi olan elektroda doğru göç eder. Bu durumu SDS üzerinden örneklersek, SDS'nin oluşturduğu misel anoda doğru elektroforetik etki ile göç ederken, EOF (Electroosmotic flow-EOF), misel göçünün yanında daha kuvvetli bir güç olduğu için, misel katoda doğru daha düşük bir hızda göç etmeye başlayacaktır. Su, çözünen analit ve misel göç hareketleri incelendiğinde, Şekil 10 A'da görüldüğü gibi kapilerden ilk olarak su, ikinci olarak analit, en son olarak da misel çıkar. Şekil 10 B'de ise elektroferogram verilmiştir. Buradaki migrasyon, ideal koşullarda misel ve sulu fazda dağılmış analit için gösterilmiştir. Suyun migrasyonu direkt olarak uygulanan voltaja bağlı oluşan EOF ile bağlantılıdır. Misel göç hızı, EOF ve kendi elektroforetik hızına bağlıdır, nötral bir analitin göç hızı ise, ikisinin arasında yer alır⁶⁰.



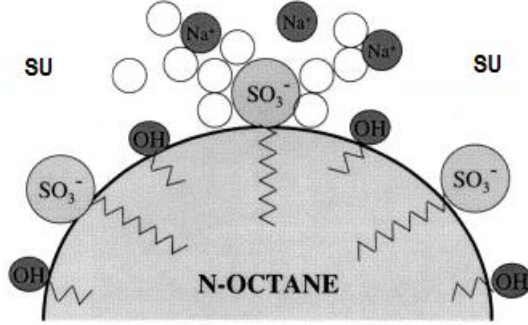
Şekil 9. MEKC Yönteminin Ayırma Prensibi



Şekil 10. MEKC'de Su, Analit ve Miselin Göç Sıralaması ve Şematik Elektroforegram

2.6.1.1.2. Mikroemülsiyon Elektrokinetik Kromatografi (MEEKC)

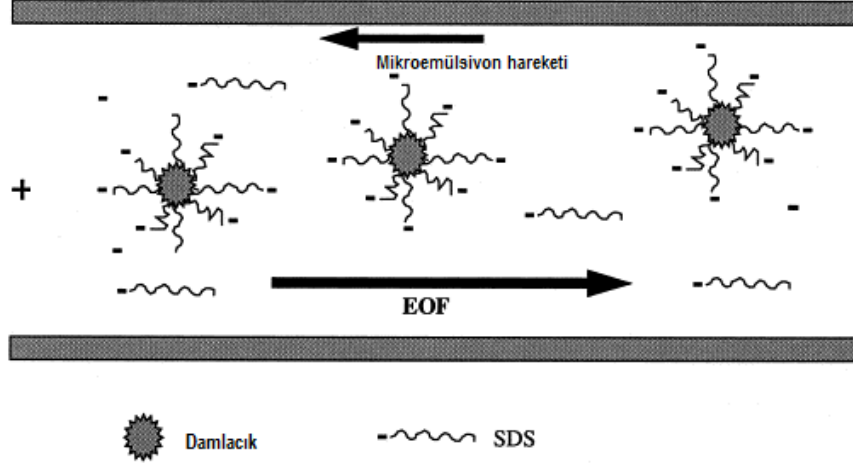
Mikroemülsiyon elektrokinetik kromatografi (MEEKC), elektroforetik ve kromatografik etkileşimleri biraraya getiren bir başka CE modudur. Bu etkileşimlerin biraraya gelmesi, hem yüklü hem de nötral bileşikler için, yüksek verimli ayırım ve çok geniş bir analit yelpazesi anlamındadır. Mikroemülsiyon yapılar bir ayırma ortamı olarak kullanılmakta, karışmadığı bir sıvı ortamda dağılarak nano boyutlu damlacıklar oluşturmaktadır. Mikroemülsiyonlar, su içinde organik (O/W) veya organik içinde su (W/O) fazı şeklinde oluşturulabilmektedir. Mikroemülsiyon damlacıkları, etraflarını saran yüzey aktif maddeler ile stabilize olup, O/W sistemlerde yapıya bakıldığında, yüzey aktif maddenin kuyruk bölgesinin organik damlacığının içerisinde olduğu, baş bölgesinin ise sulu fazda kaldığı görülmektedir. Yüzey aktif madde, burada iki faz arasındaki yüzey gerilimini azaltmak için kullanılmakta olup, en sıklıkla kullanılan yüzey aktif madde SDS (Sodyum Dodesil Sülfat)'dir. Ko-sürfaktan adı verilen ve yüzey geriliminin azaltılmasında yardımcı olan, çoğunlukla kısa zincirli alkol türevleri de mikroemülsiyon sistemini oluşturabilmek amacıyla eklenir. Ko-sürfaktanın bir diğer önemli görevi de, yüzey aktif maddenin yüklü baş kısımlarının arasına yerleşerek oluşabilecek inter-moleküler kuvvetleri de azaltmaktadır (Şekil 11). W/O sisteminde ise, su damlacıkları bir organik faz ile çevrelenmiş, mikroemülsiyon sisteminde yine aynı bileşenler kullanılmıştır. O/W sistemleri daha çok tercih edilen sistemlerdir.



Şekil 11. Yüzey Aktif Madde ile Çevrili Organik Damlacığın Şematik Gösterimi

Mikroemülsiyonlar, optik açıdan berrak sistemlerdir; çünkü damlacıkların boyutu 10 nm'den daha küçüktür. Bu durumda ışık saçılımı olmaz ve 190 nm gibi düşük dalga boylarında tayin gerçekleştirilebilir ve zayıf kromofor türü maddelerin tayini yapılabilir. Ayrıca, elektrolit çözeltisi olarak mikroemülsiyonların kullanımı, seçicilik açısından da, CZE'ye kıyasla çok daha iyidir. Hem hidrofobik hem de hidrofilik analitlerin çözünmesi açısından, numune hazırlama çok daha basittir. Sulu fazda ise, eklenen modifiye edici, asit veya tampon gibi çözeltiler ile pH ve EOF kontrol altına alınabilir. İyon çifti reaktifleri, siklodekstrinler ve diğer organik bileşiklerle de ayırma koşulları optimize edilebilir.

MEEKC'in ayırma mekanizması yine kromatografik etkileşimlerden yararlanarak gerçekleşir. Sistemde yine analitin iki ayrı fazda (su ve organik faz) dağılımı sağlanmıştır. Suda çözünmeyen türler, organik fazda çözünmeyi tercih ederken, çözünen türler su fazını tercih edeceklerdir. Nötral analitlerin dağılımı ise, çözelti ortamındaki dağılım katsayılarına göre değişiklik gösterir. Ayırım, analit molekülünün boyutu, yükü ve hidrofobikliğine göre değişiklik gösterir. Sulu fazın pH'ı da ayırım üzerine oldukça etkili olan bir parametredir. Borat tamponları gibi yüksek pH'lı tamponların kullanımı ile birlikte pozitif voltaj uygulanması, kapiler içerisinde, katoda doğru yüksek bir EOF oluşmasını sağlar. SDS gibi anyonik bir yüzey aktif maddenin varlığı ile oluşturulan mikroemülsiyon damlacıkları ise, anoda doğru göç etme eğilimindedir. EOF daha kuvvetli olduğu için, hepsini katoda doğru süpürecektir (Şekil 12).



Şekil 12. MEEKC Yönteminin Ayırma Prensi

Bu sistemde, suda çözünürlüğü yüksek olan ve nötral olan bir analit, neredeyse tamamen suda kalacak ve kapasite faktörü neredeyse sıfır olacaktır. Buna karşılık, suda neredeyse hiç çözünmeyen dodesilbenzen gibi bir bileşiğin çözünürlüğü organik fazında olacak ve çok yüksek bir kapasite faktörü ile sistemde tutulacaktır⁶¹.

Mikroemülsiyonu oluştururken kullanılan bileşenlerin özellikleri, sonuçta elde edilen sistem özelliklerini belirlemektedir. Hangi yüzey aktif maddenin kullanılacağı, organik damlacığının yükü ve büyüklüğünün belirlenmesi açısından önemlidir. Ayrıca EOF gücü ve yönü açısından da önemlidir. En önemlisi, hedef analit açısından, uygun yüzey aktif maddeye karar verilmesidir. Miktarca yüksek oranda yüzey aktif madde kullanımı, yüzey gerilimini azaltacağı için, daha stabil mikroemülsiyonların oluşmasına da olanak tanır.

Başka bir önemli parametre de pH'tır. pH analitin çözünmesini ve oluşacak EOF'yi etkileyeceği için, seçicilik açısından önemlidir. Çoğunlukla kullanılan tampon çözeltiler bazik pH aralığında seçilir. Bu aralıktaki pH EOF'un yüksek olmasını sağlar. Ayrıca iyonize olabilen türler bu aralıkta iyonlaşır, özellikle bazik karakterde olan ilaç bileşikler için bu aralık çok uygundur.

Organik faz olarak kullanılacak bileşimin seçimi tekrarlanabilir mikroemülsiyon oluşumlarına bağlı olarak yapılır. En çok tercih edilen bileşikler, heksan, heptan ve oktan gibi solvanlar olup, seçicilik ve migrasyon süresi açısından bir farklılık göstermezler. Etil asetat gibi düşük yüzey gerilimi gösteren bileşikler, analiz süresinin daha kısa olmasını sağlarlar ve daha az yüzey aktif maddenin varlığı ile su-organik fazlar arasında bir köprü oluşumunu mümkün kılarlar. Ayrıca hızlı ve etkili bir rezolüsyon sağlarlar. Konsantrasyonlarının ayırma üzerine direkt olarak bir etkileri yoktur⁶².

Butan-1-ol, ko-surfaktan olarak en çok tercih edilen bileşiktir. Ko-surfaktanlar, mikroemülsiyon oluşumlarının en önemli bileşenlerindedir. Ko-surfaktanın ortamdaki miktarının seçiciliğe bir etkisi yoktur; fakat yüksek miktarlardaki kullanımı suda çözünmeyen bileşiklerin göç zamanlarının azalmasını sağlar. Ayrıca, ko-surfaktan konsantrasyonu, çözeltinin viskozitesini ve EOF hızını etkiler. Oluşan karşı faz damlacıklarının boyutları ise, ko-surfaktan artışıyla artmakta, ayrıca, damlacık yüzeyinin yükü de, ko-surfaktan miktarı ile değişmektedir.

Tampon çözeltinin konsantrasyonu ve hangi tampon çözeltinin kullanılacağı ise, EOF oluşumunu ve hızını ayrıca kapiler içinde oluşacak akımı etkilemektedir. MEEKC yönteminde, çoğunlukla düşük iyonik şiddette (5-10 mM) borat ve fosfat tampon çözeltileri tercih edilmektedir. Bu tür çözeltilerin kullanımı, kapiler içinde düşük akım oluşmasını ve yüksek hızda EOF oluşmasını sağlamaktadır. Yüksek derişimdeki tampon çözeltiler, EOF'u baskılamakta, ayrıca uygulanan voltajı sınırlayabilecek kadar yüksek akımların oluşmasına neden olmaktadır. Tampon çözeltilerin derişimi maksimum, 100 mM olmalıdır.

Numune ve standartların hazırlanmasında da dikkat edilmesi gereken noktalar vardır. Numune çözeltileri hazırlanan mikroemülsiyon çözeltisi içerisinde; yani BGE içerisinde hazırlanmalıdır, aksi halde ayırma verimliliği düşecektir⁶¹. Örneğin, yapılan bir çalışmada, numune metanolde ve mikroemülsiyon çözeltisinde çözülerek sisteme verilmiş, özellikle uzun enjeksiyon sürelerinde, metanollü çözeltide çok zayıf ayırma gücü elde edilebilmiştir⁶³.

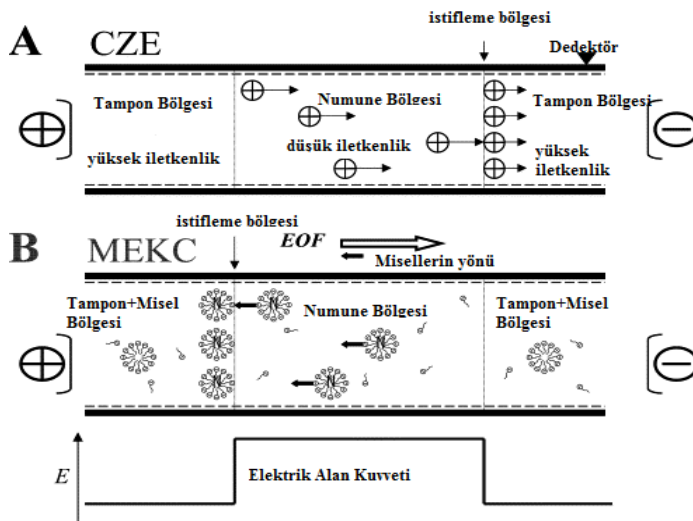
Sıcaklık ile ilgili yapılan çalışmalarda, sonuçların sıcaklıkla bağlantılı olarak değişmediği, yalnızca analit çözünürlüğün etkilendiği, bu durumun da elektroforetik mobilite üzerine etkili olduğu bulunmuştur. Sonuçta, MEEKC, çok geniş bir analit yelpazesine sahip olup, suda çözünen-çözünmeyen, yüklü ve nötral türler için oldukça etkin bir ayırma yöntemidir.

2.6.2. On-line (Hat üstü) Önzenginleştirme Teknikleri

CE yöntemlerinin birçok analit türü için yüksek ayırma gücüne sahip olmak gibi bir avantajının yanında, duyarlılık gibi çok önemli bir dezavantajı olduğu bilinmektedir. HPLC ile kıyaslandığında LOD değerleri 10-100 kat daha yüksektir ve bu durum enjeksiyon süresi, dolayısıyla enjeksiyon hacminin küçük olması ve optik yolun kısa olmasından kaynaklanır. On-line önzenginleştirme teknikleri olan, istifleme (stacking) ve süpürme (sweeping) teknikleri, benzer şekilde, BGE çözeltisi içerisinde yüzey aktif madde bulundurulmuş ve misel oluşumunu baz alan MEKC'de kullanıldığında, duyarlılık problemi büyük oranda azaltılmıştır. Daha önce de tanımlandığı gibi, burada oluşan misel, kromatografik bir sistemin sabit fazı gibi davranarak, psödo-sabit (PS) faz olarak adlandırılır.

2.6.2.1. İstifleme (Stacking) Yöntemi

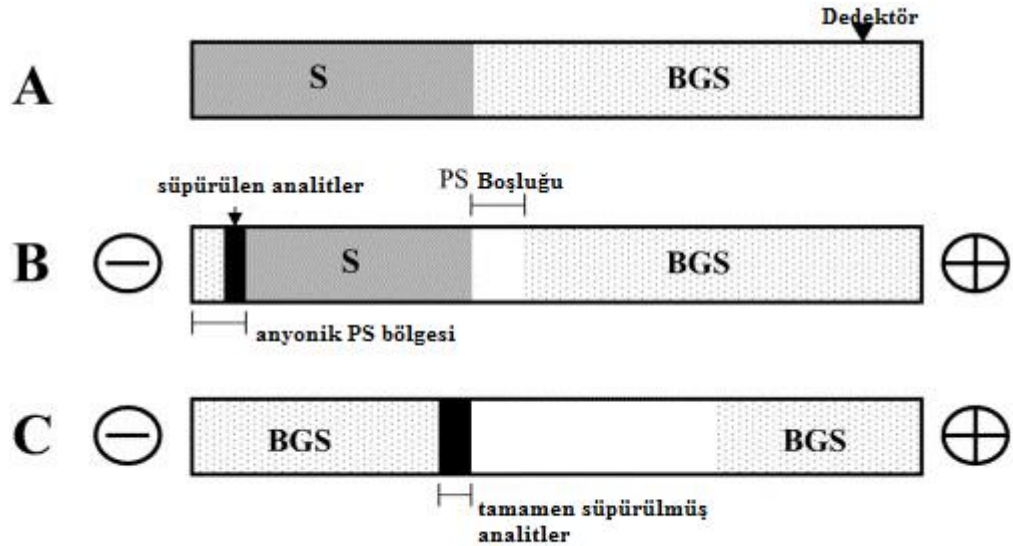
İstifleme yöntemi ilk olarak, yüklü bileşiklerin CZE'de ayrımı amacıyla kullanılmıştır. CZE'de, istifleme tekniği Şekil 13 a'da şematik olarak gösterilmiştir. Yöntem, daha sonraları MEKC'de kullanılmaya başlanmış ve yöntemin duyarlılık açısından daha iyi bir noktaya getirilmesini, ayrıca nötral türlerin de ayrımının yapılması sağlanmıştır. Şekil 13 b'de gösterildiği gibi, nötral türlere daha iyi bir elektroforetik mobilite vermek üzere ortamda yüklü bir PS faz oluşturulmuştur. Analit çözeltisi, ortamdan daha düşük bir iletkenliğe sahip olacak şekilde hazırlanmış ve kapilere enjekte edilmiştir. Miseller, katodik uçtan anodik uca doğru ilerleyerek, analitlerin taşınmasını sağlamış ve numune fazı ile PS fazı arasında, bir istifleme bölgesi oluşturmuşlardır. PS bölge, elektrik alan açısından düşük bir bölgedir. Analit moleküllerini taşıyan miseller yüksek elektrik alana sahip numune fazından PS fazına geçerken sabit kalırlar ve burada bir istifleme bölgesi oluştururlar. Misellerin dedektöre doğru taşınması EOF ile gerçekleşmiştir; çünkü EOF hızı, misellerin elektroforetik mobilitelerinden çok daha yüksektir. İstifleme ile önzenginleştirmenin oranı, kromatografide olduğu gibi dağılıma sabitine bağlı olarak artmakta veya azalmaktadır. Buna göre önzenginleştirme faktörü (γ), $\gamma = C_{BGE}/C_S$ ilişkisinden hesaplanabilir. Burada C_{BGE} , analitin BGE'deki konsantrasyonu, C_S , çözeltideki analit konsantrasyonudur.



Şekil 13. İstifleme Yönteminin Şematik Gösterimi (a) CZE (b) MEKC

2.6.2.2. Süpürme (Sweeping) Yöntemi

Süpürme tekniğinde analit, PS (Psödo sabit faz) tarafından alınır ve konsantre hale getirilir. Numune bölgesi PS'den yoksundur ve analiti yapısı içerisinde alan PS yapılar, numune bölgesine nüfuz ederler. Burada ortama eklenen organik çözücülerle veya değiştirilen ortam pH'ı ile göç hızı, EOF'den bağımsız olup, yöntem hem yüklü hem de yüksüz bileşikler için uygun bir tekniktir. Asidik ortamda yapılan süpürme işlemi, Şekil 14'de gösterilmiştir. Analitler, iletkenlik açısından BGE'ye benzeyen; fakat içeriğinde PS bulunmayan bir çözeltide hazırlanmış ve kapilare katodik uçtan olacak şekilde, basınç enjeksiyon yolu ile verilmiştir. İkinci basamakta görüldüğü gibi, giriş vialinde BGE varken, negatif polaritede voltaj uygulanmış ve PS'lerin kapilare girişi ve analitleri süpürmesi sağlanmıştır. Sonuncu basamakta ise, analitler PS ile tümüyle süpürülmüş, MEKC yönteminde ters migrasyon modu uygulanarak ayırma sağlanmıştır.⁵⁹



Şekil 14. Süpürme Yönteminin Şematik Gösterimi

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇ

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Guafenezin	(Sanovel İlaç San. ve Tic. A.Ş.)
Efedrin	(TMO Genel Müdürlüğü)
Norefedrin	(TMO Genel Müdürlüğü)
Metil paraben	(Abdi İbrahim İlaç Sanayii ve Tic. A.Ş.)
Propil paraben	(Abdi İbrahim İlaç Sanayii ve Tic. A.Ş.)
Sodyum tetraborat	(Riedel-de Haën)
Sodyum hidroksit (Pellet)	(Merck)
Sodyum dodesil sülfat	(JT Baker)
Asetonitril	(Sigma Aldrich)
Etil asetat	(Merck)
Butan-1-ol	(Carlo Erbo Reagent)
Metanol	(Sigma Aldrich)
Brodil® şurup*	(Sanovel İlaç San. ve Tic. A.Ş.)

*5 cc Şurup, 6.66 mg *Efedrin*, 100.0 mg *Guafenezin* ve gliserin, sorbitol, (%70), vanilin, metil paraben, propil paraben, sodyum sakkarin, sodyum siklamat, ponceau 4R, alkol, kiraz ve ahududu aromaları içerir.

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

Kapiler Elektroforez	(HP-3D Agilent Technologies, ABD)
UV Spektrofotomete	(Shimadzu, Japonya)
Dijital pH-Metre	(Thermo, ABD)
Hassas Terazi,	(Shimadzu, Japonya)
Ultrasonik Banyo	(JP Selecta, İspanya)
Deiyonize Su Cihazı	(Millipore Milli-Q Lab Water System, Almanya)
Santrifüj	(Nüve, Türkiye)
Manyetik Karıştırıcı	(Nüve, Türkiye)
Otomatik Pipet	(Socorex, İsviçre)

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Çözeltilerin Hazırlanması

Efedrin (EPH), *Norefedrin* (NE), *Guafenezin* (GUA) ve *Metil paraben* (MP)'in stok çözeltilerinin hazırlanması için, her bir maddeden 5.0 mg hassas olarak tartılmış ve 5.0 mL deiyonize su eklenerek, ultrasonik banyoda tamamen çözünme sağlanmış ve deiyonize su ile 10.0 mL hacme tamamlanmıştır. Stok çözeltinin son derişimi her bir madde için 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ olmuştur. Kullanılacak standart çözeltiler için, hazırlanan stok çözeltiden gerekli seyreltmeler MEKC için deiyonize su ile, MEEKC için elektrolit çözeltisi ile yapılmıştır.

NaOH çözeltisi 1 M ve 0.1 M olacak şekilde hazırlanmış, 1 M NaOH kapiler şartlandırılması için kullanıldığı için, membran filtreden (Econofilter, 0.2 μm PTFE) geçirilerek kullanılmıştır.

MEKC yöntemindeki BGE çözeltisinde kullanılan SDS stok çözeltisi, 100 mM olacak şekilde, deiyonize su ile hazırlanmıştır.

3.2.2. Kapilerin Şartlandırılması

Çalışmalar, 75 μm iç çaplı silika kapiler (FS Undeactivated) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kapiler uzunluğu 60 cm (efektif uzunluk 54 cm) ve 30 cm (efektif uzunluk 26 cm) olacak şekilde çalışılmıştır. MEKC için ilk kullanımda kapiler sırasıyla, 30 dk 1 M NaOH, 20 dk su ve 30 dk BGE ile yıkanmıştır. Enjeksiyonlar arası yıkama ise sırasıyla, 0.5 dk 1 M NaOH, 1 dk su ve 3 dk BGE çözeltisi ile yapılmıştır. MEEKC'de ise, ilk defa kullanılan kapilerin şartlandırılması için, 30 dk 1 M NaOH, 20 dk su ve 30 dk BGE ile yıkama yapılmış, enjeksiyonlar arasında yalnızca BGE ile 2 dk yıkama yapılmıştır.

3.2.3. MEKC Yöntemi

3.2.3.1. MEKC Yöntemi Optimizasyon Çalışmaları

MEKC için kullanılan BGE için, tampon çözelti olarak, sitrat tamponu ve borat tamponu çözeltileri denenmiş, başarılı sonuçlar borat tamponu ile alındığı için çalışmalar borat tampon ile yapılmıştır. Sodyum tetraborattan 100 mM olacak şekilde hazırlanan stok çözelti, istenen tampon derişimlerine göre seyreltilmiş, gerekli pH ayarlamaları 0.1 M NaOH eklenmesiyle yapılmıştır. MEKC yöntem optimizasyonlarında koşullar, 25 mM, pH 9.5 borat tamponu içinde 30 mM SDS ve %15 ACN ile hazırlanmış BGE kullanılmış ve 50 mBar basınç, 20 s enjeksiyon süresi uygulanmıştır. Kaset sıcaklığı 30°C ve ayırma için kullanılan voltaj +22 kV'dir.

Optimizasyon çalışmalarında öncelikle, tampon çözelti pH'sı ve derişimi incelenmiştir. Bunun için, pH değerleri 8.5; 9.5; 10 ve 11 olan 25 mM borat tampon çözeltileri ile çalışılmıştır. Borat tamponunun derişim optimizasyonu için, 25, 12.5 ve 5 mM ile çalışılmıştır. Tampon çözeltinin optimizasyonu tamamlandıktan sonra, BGE çözeltisinin bir diğer bileşeni olan SDS için 20; 30; 35; 50; 70 ve 80 mM derişimler çalışılmıştır. BGE içine eklenecek olan organik modifiye edici ajan olarak ACN kullanılmış ve ACN miktarı için de optimizasyon yapılmıştır. Bu çalışmada ACN miktarları %5, %10 ve %15 olacak şekilde taranmıştır. Cihaz parametreleri de (kapiler uzunluğu, kaset sıcaklığı, enjeksiyon süresi) sırasıyla değiştirilerek uygun koşullar araştırılmıştır. Analitler için en uygun dalga boyunun bulunabilmesi için dalga boyu taraması en başta yapılarak, tüm optimizasyon çalışmaları bulunan dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. Optimizasyon çalışmalarında her bir analitin derişimi 50 µg.mL⁻¹ olacak şekilde ayarlanmıştır.

3.2.3.2. MEKC Yöntemi Kalibrasyon Doğrularının Eldesi

Optimizasyon çalışmaları sonucu elde edilen optimum koşullarda analitlerin kalibrasyon doğruları oluşturulmuştur. Kalibrasyon için her bir maddenin derişimi, 2.5; 5.0; 10.0; 15.0 ve 20.0 µg.mL⁻¹ olacak şekilde hazırlanmış çözeltilerin ölçümü yapılmış, elde edilen pik alanı değerleri, derişim değerlerine karşı grafiğe alınarak kalibrasyon doğruları oluşturulmuştur. Doğrularının denklemleri ve doğrusallık için korelasyon katsayıları hesaplanmıştır.

3.2.3.3. MEKC Yöntemi Validasyon Çalışmaları

Kullanılan analiz yönteminin güvenilir bir şekilde analiz edilebildiği en düşük derişimleri saptayabilmek amacıyla, gözlenebilme sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ) değerleri hesaplandı. Hesaplama, en küçük kareler yöntemine göre çizilen kalibrasyon grafiğinin denklemindeki, eğim ve kesişim değerleri kullanılarak yapıldı. Elde edilen kalibrasyon denklemindeki kesişim noktasının standart sapması kullanılarak aşağıdaki formüller ile hesaplama yapıldı.

$$\text{LOD} = 3.3(\text{SD}/\text{S})$$

$$\text{LOQ} = 10(\text{SD}/\text{S})$$

SD: Kesişim noktasının standart sapması

S: Kalibrasyon denkleminin eğimi

Güniçi ve günlerarası tekrarlanabilirlik çalışması için, aynı derişimde hazırlanan standart çözeltilerin aynı gün içerisinde 6 kez ve farklı 6 günde ölçümleri yapıldı. Ölçümler sonucu elde edilen verilerden ortalama, ortalamanın standart hatası, standart sapma, % bağıl standart sapma (%RSD) ve güven aralığı değerleri hesaplandı.

3.2.3.4. MEKC Yönteminin Farmasötik Preparata Uygulanması ve Geri Kazanım Çalışmaları

Farmasötik şuruptan uygun hacimler alınarak, deiyonize su ile hacimce 1/500 oranında seyreltilmiştir. Bu seyreltmeler ile son çözelti içerisindeki EPH konsantrasyonu $13.3 \mu\text{g.mL}^{-1}$ GUA konsantrasyonu ise $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ olmuştur. Geri kazanım çalışması için, numune içerisinde bulunmayan NE dışarıdan çözeltiye eklenmiş ve diğer analitlerin standart çözeltileri belirli konsantrasyonlarda eklenerek ölçüm gerçekleştirilmiştir. % Geri kazanım değerleri hesaplanarak, gerçek değere olan yakınlık istatistiksel olarak test edilmiştir.

3.2.3.5. MEKC Yöntemi Sistem Uygunluk Testleri (SUT)

MEKC yönteminin kromatografik standartları sağlayıp sağlamadığını değerlendirmek amacıyla, elde edilen elektroferogram üzerinden, her bir analit için, rezolüsyon (R_s), pik genişliği, pik simetrisi (A_s), sinyal/gürültü (S/N) ve tabaka sayısı (N) değerleri hesaplanmıştır⁶⁴.

3.2.4. MEEKC Yöntemi

3.2.4.1. MEEKC Yöntemi Optimizasyon Çalışmaları

MEEKC için kullanılan BGE, tampon çözelti, SDS, etil asetat ve butan-1-ol ile hazırlanmıştır. Bileşenlerin miktarları, %(a/a) cinsinden ayarlanmıştır. Genel olarak optimizasyonlara başlanırken %97.5 borat tamponu, %0.8 SDS, %1.2 Butan-1-ol ve %5 Etil asetat olacak şekilde hazırlanmış BGE ile, 50 mBar basınç kullanılarak 20 s enjeksiyon süresi seçilmiştir. Ayrıca kaset sıcaklığı 40°C ve ayırma için kullanılan voltaj da +15 kV olarak ayarlanmıştır. Optimizasyon çalışmalarında, stok çözeltilerden gerekli seyreltme yapılarak, $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ standart çözelti ile çalışılmıştır.

Optimizasyon çalışmalarında öncelikle, tampon çözelti pH ve derişimi incelenmiştir. Bunun için, pH 9.6; 10; 10.5; 11; 12; 12.5 ve 13 değerlerindeki, 10 mM Borat tamponu ile çalışılmıştır. Borat tamponunun derişimi için ise, 5; 10; 15; 20 ve 25 mM ile çalışılmıştır. Tampon çözeltinin mikroemülsiyon içerisindeki toplam miktarı diğer bileşenlerden kalan kısım olarak düşünüldüğü için, yapılan diğer optimizasyon çalışmalarına göre miktarı şekillenmiştir. Tampon çözeltinin optimizasyonu tamamlandıktan sonra, BGE çözeltisinin bir diğer bileşeni olan SDS için %0.4; 0.8; 1.0; 1.4 ve 1.6 oranları çalışılmıştır. Butan-1-ol için yapılan optimizasyon çalışmasında ise %1.0; 1.2 ve 1.4 incelenmiş ve son olarak organik fazı oluşturacak olan etil asetat optimizasyonu için %0.3; 0.5; 0.7 ve 0.9 değerleri kullanılmıştır. Cihaz parametreleri de (kaset sıcaklığı, enjeksiyon süresi) sırasıyla değiştirilerek uygun koşullar araştırılmıştır. Analitler için en uygun dalga boyunun bulunabilmesi için dalga boyu taraması en başta yapılarak, tüm optimizasyon çalışmaları bulunan dalga boyunda yapılmıştır. Analizler esnasında her bir analitin derişimi 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ olacak şekilde ayarlanmıştır.

3.2.4.2. MEEKC Yöntemi Kalibrasyon Doğrularının Eldesi

Optimizasyon çalışmaları sonucu elde edilen optimum koşullarda analitlerin kalibrasyon doğruları oluşturulmuştur. Kalibrasyon için her bir maddenin derişimi, 2.5; 5.0; 10.0; 15.0 ve 20.0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ olacak şekilde hazırlanmış çözeltilerin absorbanları pik alanı cinsinden ölçülmüş, oluşturulan kalibrasyon doğrularının denklemleri ve doğrusallık için korelasyon katsayıları hesaplanmıştır.

3.2.4.3. MEEKC Yöntemi Validasyon Çalışmaları

Kullanılan analiz yönteminin güvenilir bir şekilde analiz edebildiği en düşük derişimleri saptayabilmek amacıyla, gözlenebilme sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ) değerleri hesaplandı.

Güniçi ve günlerarası tekrarlanabilirlik çalışması için, aynı derişimde hazırlanan standart çözeltilerin aynı gün içerisinde 6 kez ve farklı 6 günde ölçümleri yapıldı. Ölçümler sonucu elde edilen verilerden ortalama, ortalamanın standart hatası, standart sapma, %bağıl standart sapma (%RSD) ve güven aralığı değerleri hesaplandı.

3.2.4.4. MEEKC Yönteminin Farmasötik Preparata Uygulanması ve Geri Kazanım Çalışmaları

Farmasötik şuruptan uygun hacimler alınarak, deiyonize su ile 1/2000 olacak şekilde seyreltme yapılmıştır. Bu seyreltmeler ile, son çözelti içerisindeki EPH konsantrasyonu $3.33 \mu\text{g.mL}^{-1}$ GUA konsantrasyonu ise $50.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ olmuştur. Geri kazanım çalışması için, numunede bulunmayan NE dışarıdan çözeltiliye eklenmiştir. Aynı şekilde, yardımcı madde MP de numune çözeltisine eklenerek tayin edilmiştir. Standart çözelti eklenerek ölçüm gerçekleştirilmiş, %geri kazanım değerleri hesaplanarak, gerçek değere olan yakınlık istatistiksel olarak test edilmiştir.

3.2.4.5. MEEKC Yöntemi Sistem Uygunluk Testleri (SUT)

MEEKC yönteminin kromatografik standartları sağlayıp sağlamadığını değerlendirmek amacıyla, elde edilen elektroferogram üzerinden, her bir analit için, rezolüsyon (R_s), pik genişliği, pik simetrisi (A_s), sinyal/gürültü (S/N) ve tabaka sayısı (N) değerleri hesaplanmıştır⁶⁴.

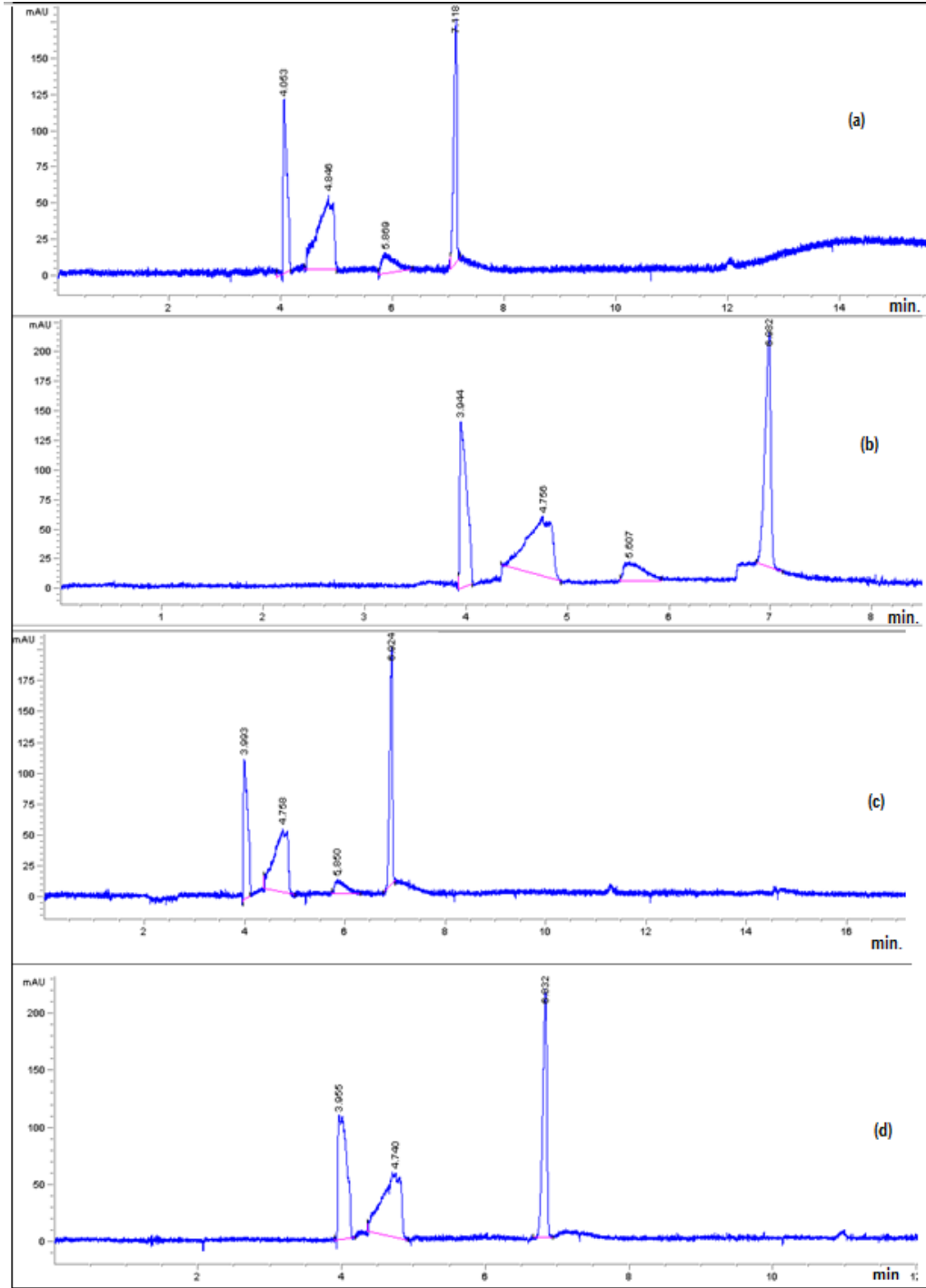
4.BULGULAR

4.1. MEKC Yöntemi

4.1.1. MEKC Yönteminde Çalışma Elektrolitinin Optimizasyonu

Çalışma elektroliti olarak belirli bir derişimde SDS ve organik modifiye edici içeren tampon çözelti için optimizasyonlar yapılmıştır. Asidik pH'da hazırlanan sitrik asit tamponu içeren elektrolit çözeltisi ile sonuç elde edilememiş, ayrıca MEKC yönteminde EOF oluşumunu sağlaması için de Borat tamponuna karar verilmiştir. Başlangıç koşulları olarak, 20 mM Borat tamponu içinde, 5 mM SDS ve %15 ACN olacak şekilde bir elektrolit çözeltisine karar verilmiştir. Koşullar optimize edilmediği için cihaz parametreleri olarak, enjeksiyon süresi 50 mBar basınç altında 20 s, kaset sıcaklığı 30°C, uygulanan voltaj +22 kV ile başlanmıştır. Ayrıca her bir analitin derişimi 50 µg.mL⁻¹ standart çözelti olacak şekilde optimizasyon deneyleri yapılmıştır. Deneylerde, 75 µm iç çapa sahip, 30 cm (etkin uzunluk 21.5 cm) uzunluğunda eriyik silika kapiler kullanılmıştır. Yapılan dalga boyu taramasına göre 192.4 nm en uygun dalga boyu olarak seçilmiştir.

Tampon pH'sı için yapılan optimizasyon çalışmalarında, bazik pH'lar incelenmiş, en iyi sonuç, piklerin ortaya çıkması ve pik alanlarının yüksek olması nedeniyle pH 9.5'ta elde edilmiştir(Şekil 15).



Şekil 15. BGE Çözeltisinin pH'ının Etkisi

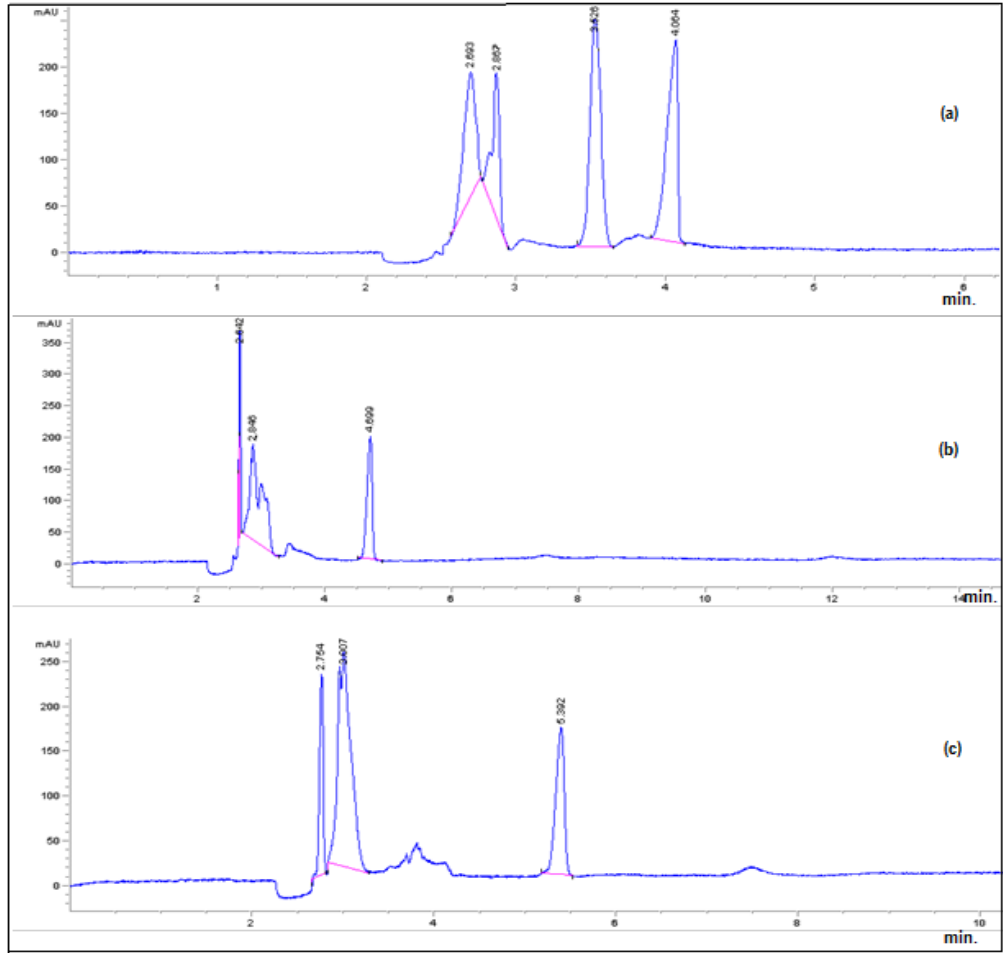
(a)pH=8.5 (b)pH=9.5 (c)pH=10 (d)pH=11

GUA($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$), MP($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$), NE($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$), EPH($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$)

Elektrolit Çözeltisi: 5 mM SDS içeren, 25 mM Borat tamponu,

Enjeksiyon süresi: 20 saniye, Voltaj: +22 kV

Tampon çözeltinin pH optimizasyonunda elde edilen pik şekillerinin düzgün olmaması nedeniyle, tampon derişimi optimizasyonunda, SDS derişimi optimize edilene kadar 35 mM olacak şekilde çalışılmış, daha düzgün pik şekilleri elde edilmiştir. Bu koşullar altında yapılan derişim optimizasyonunda, tam ayırım sağlanamasa da piklerin çıkması açısından en düzgün elektroferogram 5 mM tampon derişiminde sağlanmıştır (Şekil 16).



Şekil 16. BGE Çözeltisinin Derişiminin Etkisi

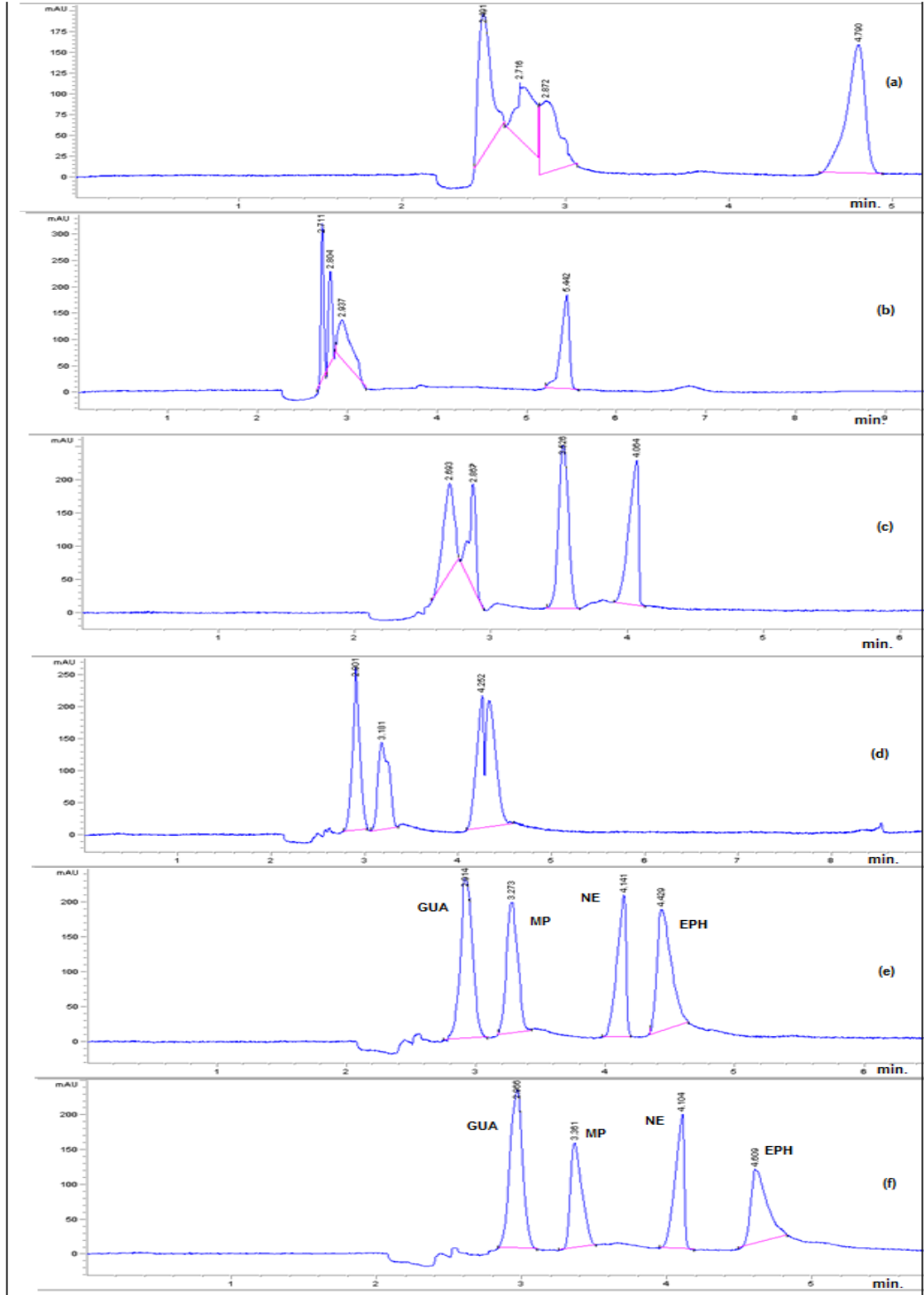
(a)5 mM (b)12.5mM (c)25 mM

GUA ($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$), MP ($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$), NE ($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$), EPH ($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$)

Elektrolit Çözeltisi: 35mM SDS içeren, pH 9.5 Borat tamponu,

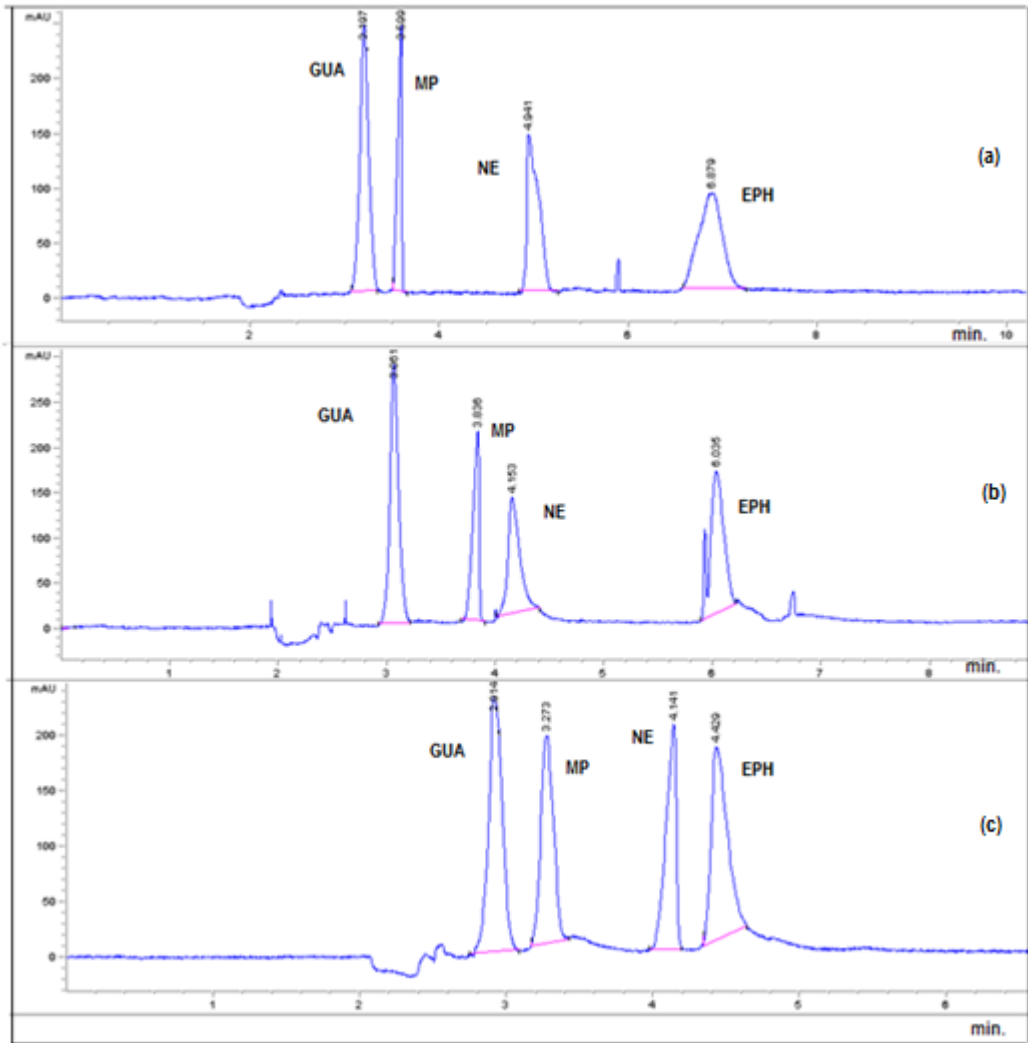
Enjeksiyon süresi: 20 saniye, Voltaj: +22 kV

Ortamdaki SDS derişimi için yapılan optimizasyon çalışmasında, tampon çözelti için optimize edilen değerlerle çalışılmış ve geniş bir aralıkta SDS derişimi incelenmiştir. SDS derişiminin artması ile rezolüsyonun arttığı, pik şekillerinin düzgünleştığı net bir şekilde görülmüştür. 70 mM SDS derişimine kadar durum böyle devam ederken, 70 mM'ın üzerine çıkılan derişimde, piklerdeki keskinliğin azaldığı, şekillerin bozulduğu, pik alanlarının azaldığı gözlemlenmiştir. Ayrıca, SDS optimizasyonunda, piklerin belirgin şekilde ortaya çıkması nedeniyle, piklerin hangi analitlere ait olduğu da belirlenmiştir. Buna göre birinci sırada çıkan pik GUA, ikincisi MP, üçüncüsü NE ve sonuncu pikin EPH'e ait olduğu gözlenmiştir (Şekil 17).



Şekil 17. BGE Çözeltisindeki SDS Derişiminin Etkisi
 (a)20 mM (b)30 mM (c)35 mM (d)50 mM (e)70mM (f)80 mM
 GUA(50 µg. mL⁻¹), MP(50 µg.mL⁻¹), NE(50 µg.mL⁻¹), EPH 50 µg. mL⁻¹)
 Elektrolit Çözeltisi: 5 mM, pH 9.5 Borat tamponu,
 Enjeksiyon süresi: 20 saniye, Voltaj: +22 kV

Elektrolit çözeltisinin son bileşeni olarak organik modifiye edici ajan ACN yüzdesi incelenmiştir. Alınan sonuçlardan pik şekillerinin ACN derişimine bağılı olarak değıştığı görülmüştür. %15 ACN'in düzgün pik şekillerine ek olarak, analiz süresi açısından da daha avantajlı olduğı gözlenmiştir. %15'in üzerinde eklenen ACN miktarının anlamlı bir farkının olmayışı, en ideal miktarın %15 olduğunu göstermiştir (Şekil 18).



Şekil 18. BGE Çözeltisindeki %ACN Miktarının Etkisi

(a)%5 (b)%10 (c)%15

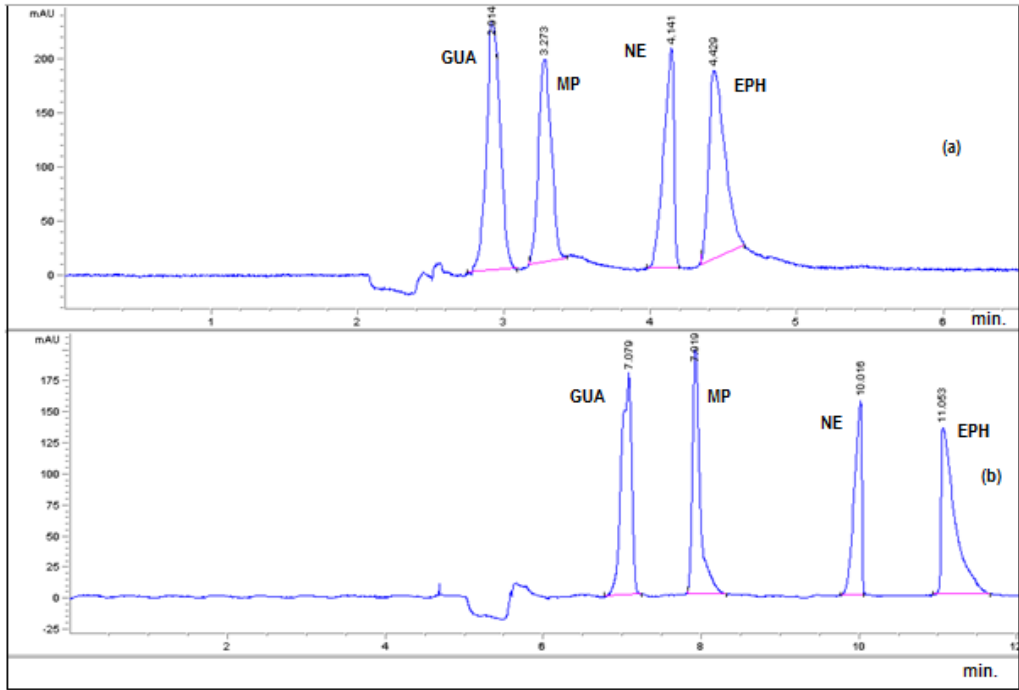
GUA($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$), MP($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$), NE($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$), EPH($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$)

Elektrolit Çözeltisi: 70 mM SDS içeren, 5 mM, pH 9.5 Borat tamponu,

Enjeksiyon süresi: 20 saniye, Voltaj: +22 kV

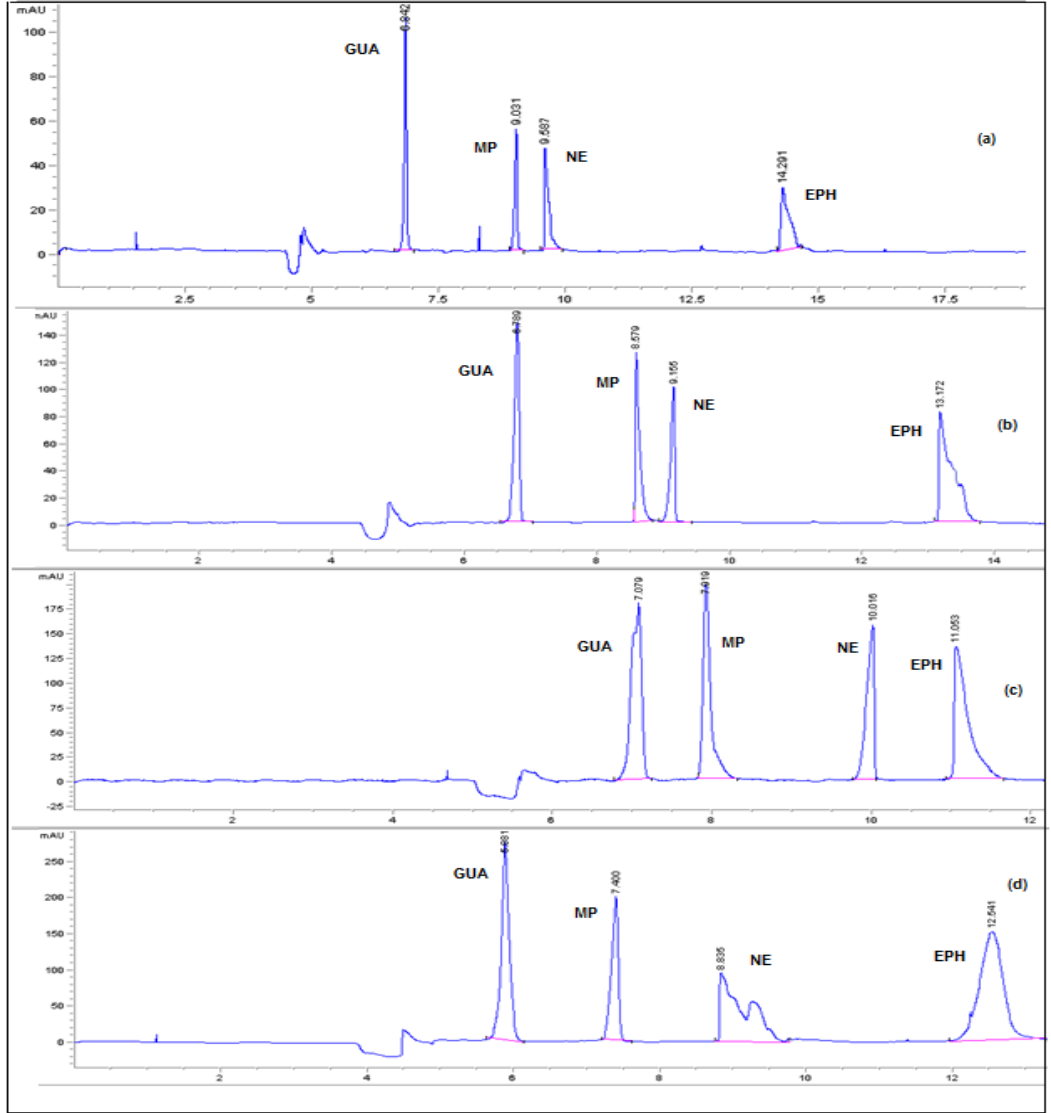
4.1.2. MEKC Yönteminde Cihaz Parametrelerinin Optimizasyonu

Cihaz parametreleri optimizasyon çalışmalarında, öncelikle daha uzun kapiler kullanımının sonuçlara etkisi incelenmiştir. Daha uzun kapiler kullanımı ile analiz süresi uzamış; ancak baseline düzelmiş, pikler de daha keskin ve simetrik hale gelmiştir. En önemlisi pik alanlarında artış sağlanmış bu sayede duyarlılık artırılmıştır. Bu nedenle 30 cm kapiler yerine 60 cm kapiler kullanımına karar verilmiştir (Şekil 19).



Şekil 19. Kapiler Uzunluğunun Etkisi (a)30 cm (b)60 cm
GUA($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$), MP($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$), NE($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$), EPH ($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$)
Elektrolit Çözeltisi: 70 mM SDS, %15 ACN içeren, 5 mM, pH 9.5 Borat
tamponu; Enjeksiyon süresi: 20 saniye, Voltaj : +22 kV

Enjeksiyon süresi optimizasyonunda, süre, pik alanlarının artışının doğrusal olarak devam ettiği noktaya kadar artırılmıştır. Bunun için her bir analitin, enjeksiyon sürelerine karşılık, pik alanları grafikleri çizilerek, determinasyon katsayıları (R^2) hesaplanmıştır. 30 s'de elde edilen pik alanları hariç diğer pik alanı değerleri ile çizilen grafiklerde, R^2 değerleri, 0.9999, 0.9822, 0.9973 ve 0.9763 olarak hesaplanmıştır. 30s'nin dahil edildiği R^2 değerleri ise, 1'den uzaktır. Pik şekilleri açısından da en uygun sonuçların 20s enjeksiyon süresinde elde edildiği görülmüştür (Şekil 20).



Şekil 20. Enjeksiyon Süresinin Etkisi

(a)5 s (b)10 s (c)20 s (d)30 s

GUA($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$), MP($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$), NE($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$), EPH ($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$)

Elektrolit Çözeltisi: 70 mM SDS, %15 ACN içeren, 5 mM, pH 9.5 Borat tamponu; Voltaj: +22 kV

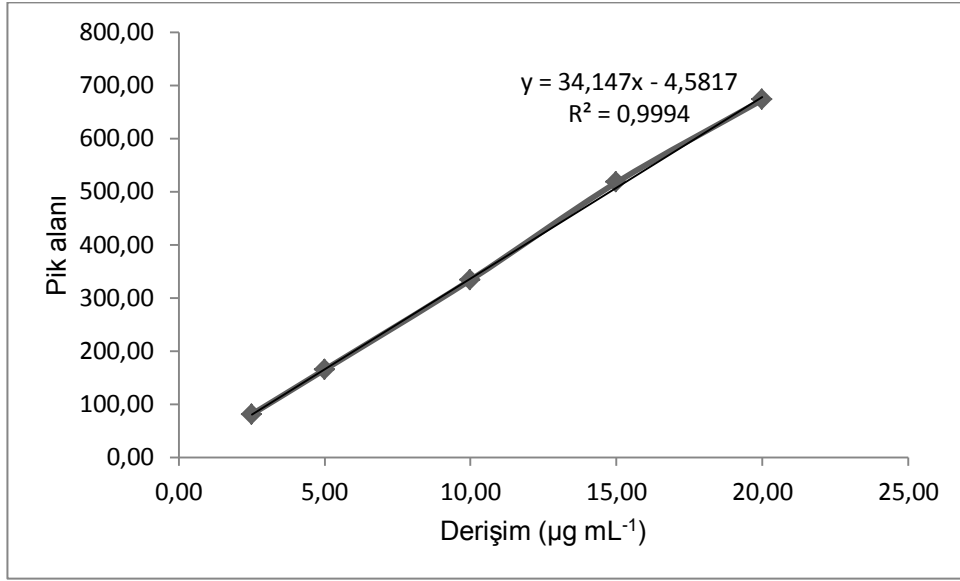
Sıcaklık optimizasyonlarında, incelenen sıcaklıklar arasında anlamlı bir fark gözlenmediği için, 30°C'nin kullanılmasına karar verilmiştir. Tablo 2'de yapılan optimizasyon çalışmalarında, incelenen parametreler ve optimum koşullar verilmiştir.

Tablo 2. MEKC Yöntemi Optimizasyon Parametreleri

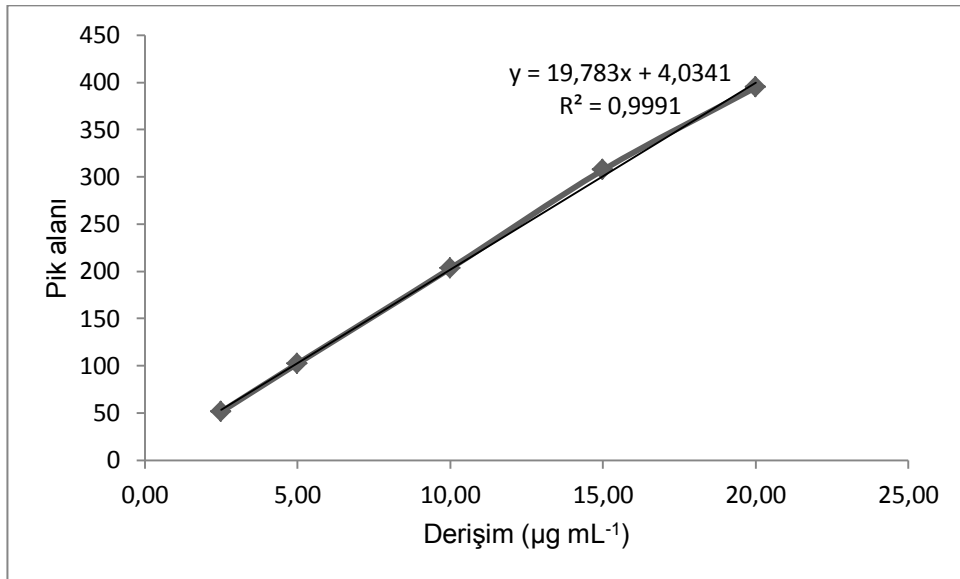
Parametreler	İncelenen	Karar verilen
Tampon pH'ı	8.5; 9.5; 10; 11	9.5
Tampon derişimi (mM)	5; 12.5; 25	5
SDS derişimi (mM)	20; 30; 35; 50; 70; 80	70
ACN miktarı (%)	5; 10; 15	15
Kapiler uzunluğu (cm)	30; 60	60
Enjeksiyon süresi (s) (50mBar)	5; 10; 20; 30	20

4.1.3. MEKC Yönteminde Kalibrasyon Grafikleri

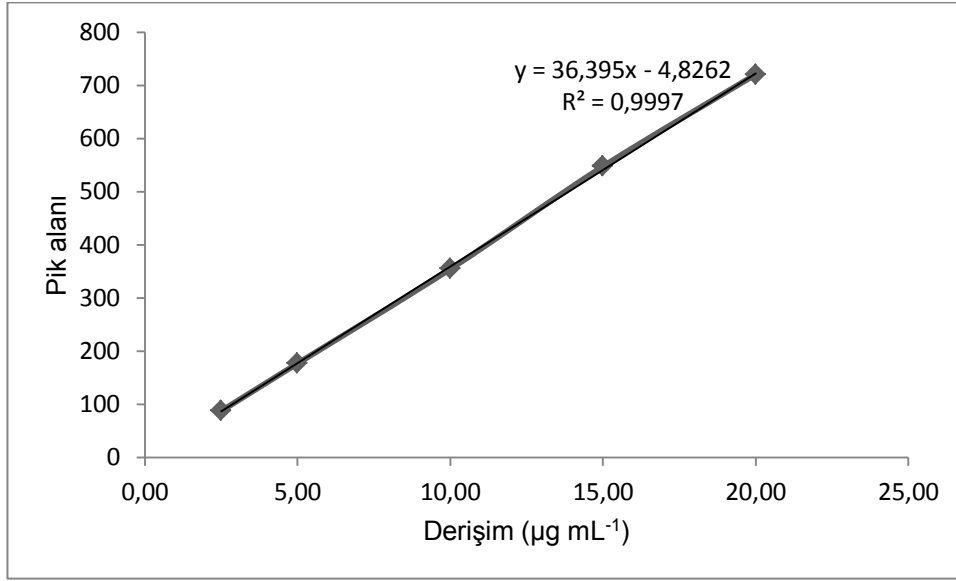
Optimize edilen koşullarda, analitlerin kalibrasyon grafikleri çizilmiş ve kalibrasyon denklemleri elde edilmiştir. Buna göre, GUA, MP, NE ve EPH için elde edilen kalibrasyon grafikleri, denklemleri ve regresyon katsayıları ile birlikte, sırasıyla Şekil 21, Şekil 22, Şekil 23 ve Şekil 24'de gösterilmiştir.



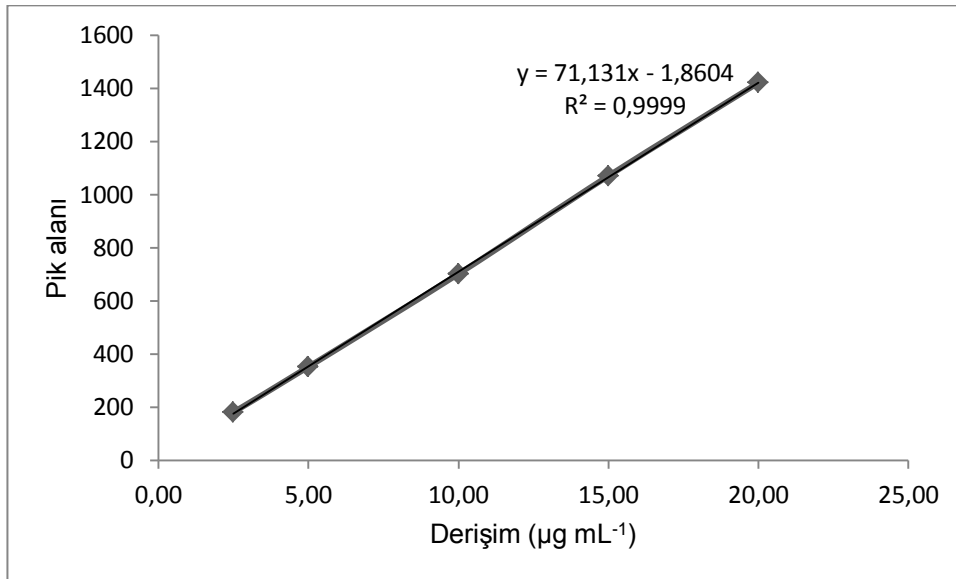
Şekil 21. MEKC Yöntemi ile GUA için Elde Edilen Kalibrasyon Grafiği



Şekil 22. MEKC Yöntemi ile MP için Elde Edilen Kalibrasyon Grafiği



Şekil 23. MEKC Yöntemi ile NE için Elde Edilen Kalibrasyon Grafiği



Şekil 24. MEKC Yöntemi ile EPH için Elde Edilen Kalibrasyon Grafiği

Her bir analit için iki kalibrasyon grafiği çizilmiş, bu grafikler kıyaslanmış ve eğimin sıfırdan farkı araştırılmıştır. İki kalibrasyonun eğim değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı farkının olup olmadığına bakılmıştır. Tablo 3, 4, 5 ve 6'de değerler ve istatistiksel sonuçlar verilmiştir.

Tablo 3. MEKC Yönteminde GUA Kalibrasyonu için Elde Edilen İstatistiksel Sonuçlar

	Denklem 1	Denklem 2
	$y=34.15x-4.582$	$y=33.03x+3.090$
Eğimin sıfırdan farkı	FA (p<0.0001)	FA (p<0.0001)
Eğimin GA* (%95)	32.66-35.63	29.53-36.53
Eğimler arası fark	FAD**(p=0.3864)	

GA*: Güven Aralığı FA: Fark anlamlı FAD: Fark anlamlı değil

Tablo 4. MEKC Yönteminde EPH Kalibrasyonu için Elde Edilen İstatistiksel Sonuçlar

	Denklem 1	Denklem 2
	$y=71.13X-1.860$	$y=69.52X+7.026$
Eğimin sıfırdan farkı	FA (p<0.0001)	FA (p<0.0001)
Eğimin GA (%95)	69.73-72.53	66.83-72.20
Eğimler arası fark	FAD (p=0.1407)	

Tablo 5. MEKC Yönteminde NE Kalibrasyonu için Elde Edilen İstatistiksel Sonuçlar

	Denklem 1	Denklem 2
	$y=36.39x-4.826$	$y=38.26x-12.31$
Eğimin sıfırdan farkı	FA (p<0.0001)	FA (p=0.0003)
Eğimin GA (%95)	35.33-37.46	32.13-44.39
Eğimler arası fark	FAD (p=0.3772)	

Tablo 6. MEKC Yönteminde MP Kalibrasyonu için Elde Edilen İstatistiksel Sonuçlar

	Denklem 1	Denklem 2
	$y=19.78x+4.034$	$y=18.79x+11.25$
Eğimin sıfırdan farkı	FA (p<0.0001)	FA (p=0.0005)
Eğimin GA (%95)	18.67-20.89	15.06-22.52
Eğimler arası fark	FAD(p=0.4465)	

4.1.4. MEKC Yöntemi Validasyon Çalışmaları

GUA, MP, NE ve EPH için LOD değerleri sırasıyla, 0.56; 0.72; 0.38 ve 0.25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. LOQ değerleri ise, 1.68; 2.17; 1.13 ve 0.76 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ olarak bulunmuştur.

Günlük ve günlerarası tekrarlanabilirlik çalışması için elde edilen pik alanları, ortalama, ortalamanın standart hatası, standart sapma, %RSD ve Güven Aralığı olarak Tablo 7 ve Tablo 8'de gösterilmiştir.

Tablo 7. MEKC Yöntemi Günlük Tekrarlanabilirlik Çalışması Sonuçları

	GUA	MP	NE	EPH
	161.3	99.6	178.2	324.7
	157.4	102.8	176.4	322.9
	156.1	99.9	174.9	322.3
	159.3	97.0	171.7	335.7
	160.0	99.2	176.0	333.9
	161.5	99.8	173.9	339.0
Ortalama	159.3	99.7	175.2	329.8
Ortalamanın Standart Hatası	0.879	0.757	0.915	2.978
S_D*	2.153	1.855	2.24	7.29
%RSD**	% 1.35	% 1.86	% 1.28	% 2.21
GA (%95)	157.0-161.5	97.7-101.7	172.8-177.5	322.1-337.4
	p>0.10	p>0.10	p>0.10	p>0.10

*S_D: Standart Hata

**%RSD: %Bağıl Standart Sapma

Tablo 8. MEKC Yöntemi Günlerarası Tekrarlanabilirlik Çalışması Sonuçları

	GUA	MP	NE	EPH
	160.0	91.1	178.2	351.5
	164.9	92.3	180.4	357.8
	163.6	90.8	190.2	351.8
	167.3	95.9	187.5	337.5
	168.9	89.9	185.3	348.9
	167.2	95.9	192.8	339.0
Ortalama	165.3	92.6	185.7	347.8
Ortalamanın Standart Hatası	1.313	1.083	2.298	3.237
S_D	3.22	2.65	5.62	7.93
%RSD	% 1.95	% 2.86	% 3.02	% 2.28
GA (%95)	161.9-168.7	89.8-95.4	179.8-191.6	339.4-356.1
	p>0.10	p>0.10	p>0.10	p>0.10

4.1.5. MEKC Yönteminin Farmasötik Preparatlara Uygulanması ve Geri Kazanım Çalışması Sonuçları

Şurup içeriğinde bulunan etken madde derişimleri, gerçek değerle kıyaslanmış ve aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığı hesaplanmıştır. Toplam Paraben (P) derişiminin şuruplarda bulunması gereken aralıkta olup olmadığı değerlendirilmiştir. Ayrıca şurup içeriğindeki GUA, EPH ve toplam Paraben'e (P) ilaveten NE de dahil edilerek, dört analit için standart ekleme yöntemiyle şuruptan geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. Şuruptan elde edilen sonuçların gerçek değerle kıyaslanması, Tablo 9'da, geri kazanım çalışma sonuçları Tablo 10'de gösterilmiştir. Her bir analit için şuruptan elde edilen sonuçlar, GUA (Tablo 11) ve EPH (Tablo 12) ve NE (Tablo 13) ve MP (Tablo 14)'de gösterilmiştir.

Tablo 9. Elde Edilen Sonuçların Gerçek Değerle Kıyaslanması

	Gerçek Değer	Bulunan Değer	Farkın Değerlendirilmesi
GUA	200 µg.mL ⁻¹	202.35 µg.mL ⁻¹	FAD (p>0.05)
EPH	13.3 µg.mL ⁻¹	12.3 µg.mL ⁻¹	FAD (p>0.05)
MP	%0.015-0.2	%0.095	Belirtilen Aralıkta

Tablo 10. MEKC Yönteminde Geri Kazanım Çalışmaları Sonuçları

	Gerçek Değer	Bulunan Değer	Farkın Değerlendirilmesi	% Geri Kazanım
GUA (%50)	300 µg.mL ⁻¹	301.6 µg.mL ⁻¹	FAD (p>0.05)	% 100.5
EPH (%50)	19.96 µg.mL ⁻¹	18.49 µg.mL ⁻¹	FA (p>0.05)	% 92.6
MP	13.3 µg.mL ⁻¹	13.8 µg.mL ⁻¹	FAD (p>0.05)	% 103.7
NE	13.3 µg.mL ⁻¹	14.9 µg.mL ⁻¹	FAD (p>0.05)	% 112.0

Tablo 11. MEKC Yöntemi ile Şuruptan GUA Tayini Sonuçları

Numune No.	Bulunan miktar µg.mL⁻¹	Belirtilen Miktar 200 µg.mL⁻¹
1	204.1	\bar{X} =201.6 S _D =2.44 %RSD=1.21 GA=198.6-204.6 (p=0.05)
2	203.5	
3	199.8	
4	198.4	
5	202.3	

Tablo 12. MEKC Yöntemi ile Şuruptan EPH Tayini Sonuçları

Numune No.	Bulunan miktar $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Belirtilen Miktar $13.3 \mu\text{g.mL}^{-1}$
1	11.9	$\bar{X}=11.9$ $S_D=0.94$ %RSD=7.9 GA=9.9-12.3 ($p=0.05$)
2	13.0	
3	11.8	
4	12.2	
5	10.4	

Tablo 13. MEKC Yöntemi ile Şuruptan NE Tayini Sonuçları

Numune No.	Bulunan miktar $\mu\text{g mL}^{-1}$	Eklene Miktar $13.3 \mu\text{g mL}^{-1}$
1	14.0	$\bar{X}=14.2$ $S_D=0.84$ %RSD=5.9 GA=13.1-15.3 ($p=0.05$)
2	13.7	
3	13.3	
4	14.9	
5	15.3	

Tablo 14. MEKC Yöntemi ile Şuruptan MP Tayini Sonuçları

Numune No.	Bulunan miktar Mol/L	Belirtilen Aralık 0.23-3.0 Mol/L
1	1.48	$\bar{X}=1.41$ $S_D=0.11$ %RSD=7.8 GA=1.3-1.6 ($p=0.05$)
2	1.43	
3	1.28	
4	1.31	
5	1.55	

4.1.6. MEKC Yöntemi için Sistem Uygunluk Testi (SUT) Sonuçları

Analitler için, optimum koşullarda, pik simetrisi (As), pik genişliği (W), tabaka sayısı (N), pikler arası rezolüsyon (Rs) ve S/N oranları hesaplanmıştır. Elde edilen veriler Tablo 15’de gösterilmiştir. N değerinin tüm analitler için 2000 üzerinde olması, Rs değerlerinin 2’den yüksek olması ve EPH dışındaki analitler için As değerlerinin 2’den düşük olması, geliştirilen MEKC yönteminin SUT açısından uygun olduğunu göstermektedir⁶⁵.

Tablo 15. MEKC Yönteminde Elde Edilen SUT Sonuçları

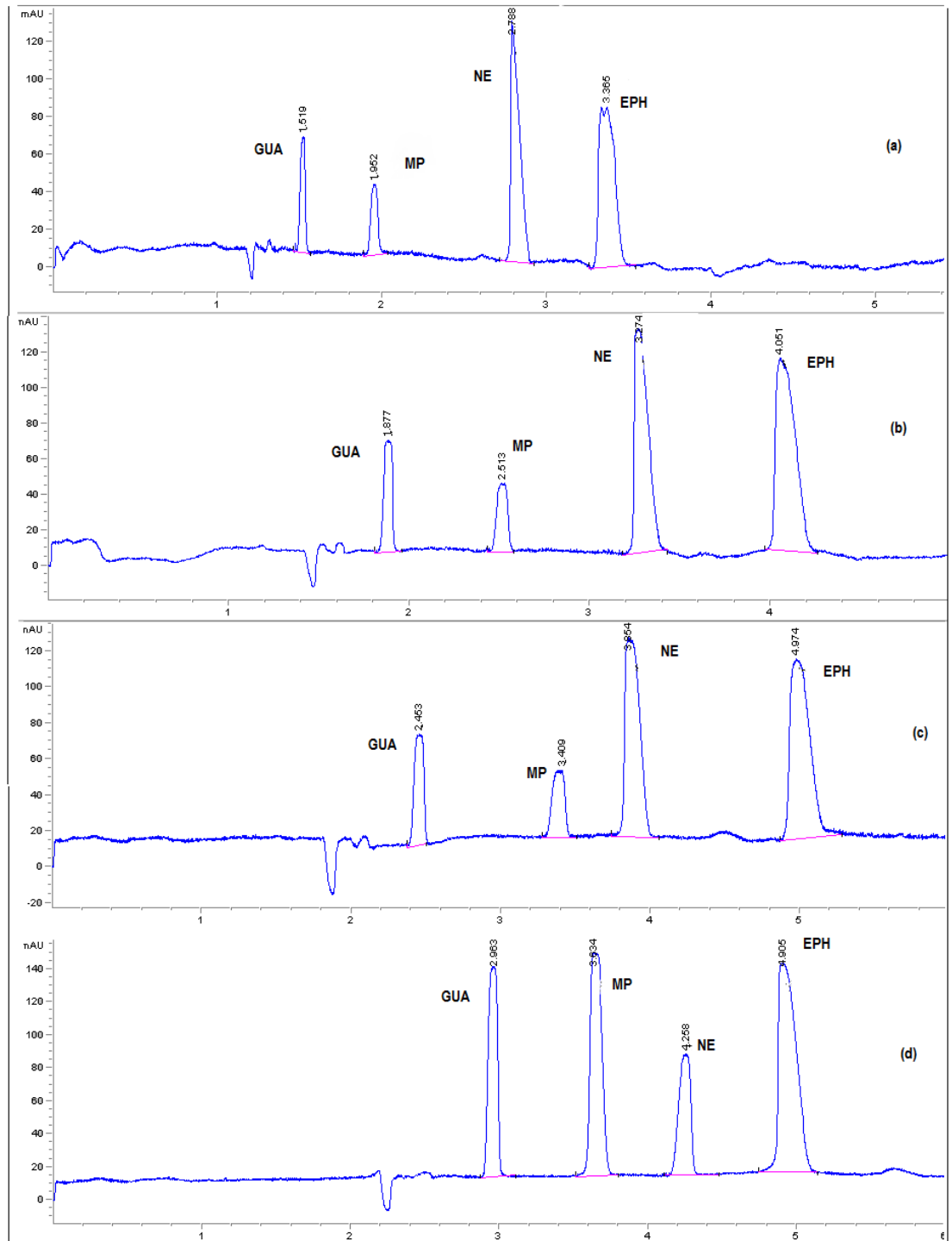
	Pik simetrisi (As)	Pik genişliği (W) (dk)	Tabaka sayısı (N)	S/N oranı	Rezolüsyon (Rs)
GUA	1.86	0.1350	14639	60.2	10.75
MP	1.79	0.0658	98478	59.4	
NE	0.18	0.1583	23499	53.0	8.04
EPH	2.47	0.2067	28877	67.1	14.84

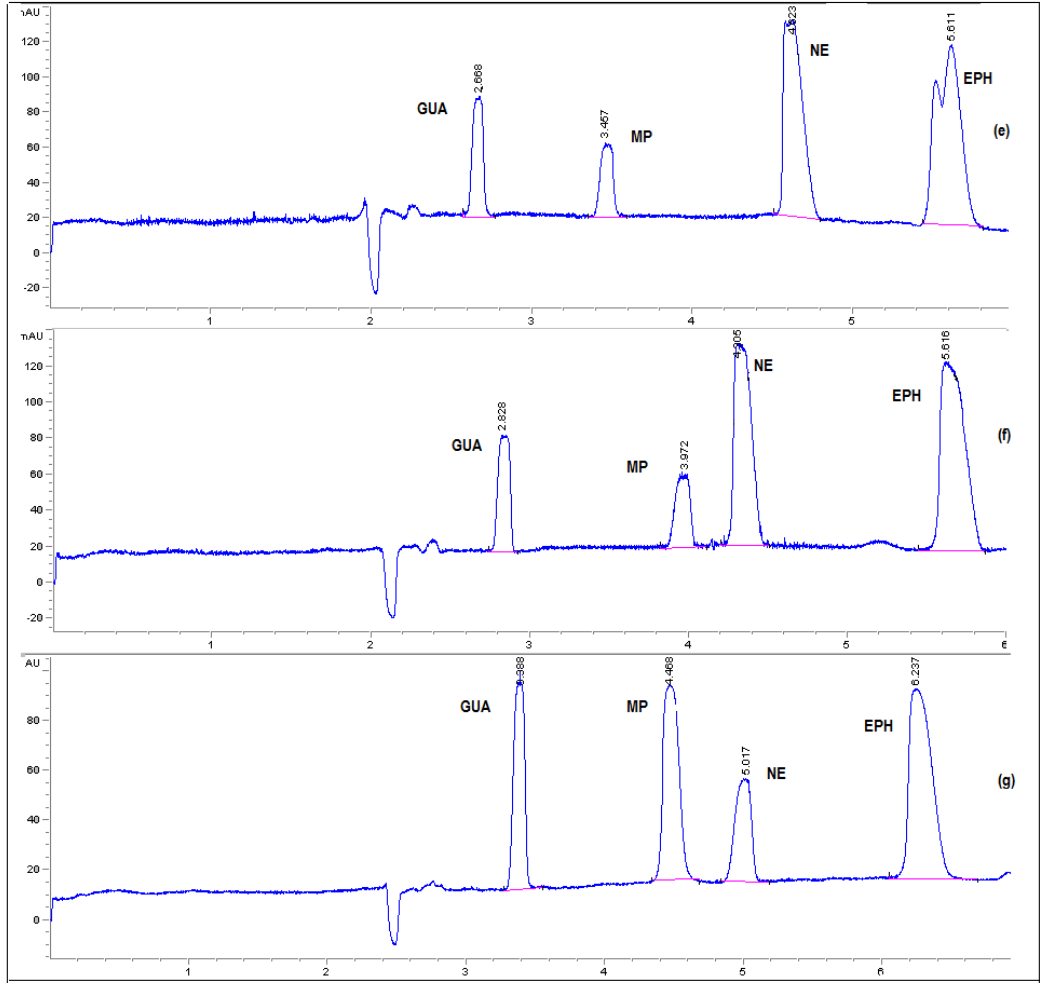
4.2. MEEKC Yöntemi

4.2.1. MEEKC Yönteminde Çalışma Elektrolitinin Optimizasyonu

MEEKC yönteminde, çalışma elektroliti olarak kullanılacak olan mikroemülsiyon bileşenleri için optimizasyon çalışması yapılmıştır. Genel olarak optimizasyonlara başlarken %97.5 Borat tamponu, %0.8 SDS, %1.2 Butan-1-ol ve %0.5 Etil asetat olacak şekilde hazırlanmış BGE kullanımı ile, 50 mBar basınç, 20 s enjeksiyon süresi seçilmiştir. Ayrıca kaset sıcaklığı 40°C, ayırma için kullanılan voltaj da +22 kV olarak ayarlanmıştır. Optimizasyon çalışmalarında, stok çözülden gerekli seyreltme yapılarak, 25 µg.mL⁻¹ standart çözelti ile çalışılmıştır. Deneylerde 30 cm (etkin uzunluk 21.5 cm) uzunluğunda fused silika, 75 µm iç çapa sahip kapiler kullanılmıştır. Dalga boyu taramasında 192.4 nm, tüm analitler için en uygun dalga boyu olarak seçilmiş ve çalışmalar bu dalgaboyunda yapılmıştır.

Optimizasyon çalışmasında ilk olarak incelenen Borat tamponu pH'sı için en uygun sonuçlar, pH 11'de elde edildi. pH 11 borat tamponunun kullanıldığı mikroemülsiyon BGE ile elde edilen sonuçlarda, daha düşük pH'lara göre, daha iyi duyarlılık elde edilmiştir. pH 12 ve pH 13'te, pH 11'e göre daha yüksek pik alanları elde edilmesine rağmen, tekrarlanabilirlik açısından en iyi sonuçlar pH 11'de elde edilmiştir. Şekil 25'de tüm pH'larda elde edilen elektroferogramlar gösterilmiştir.





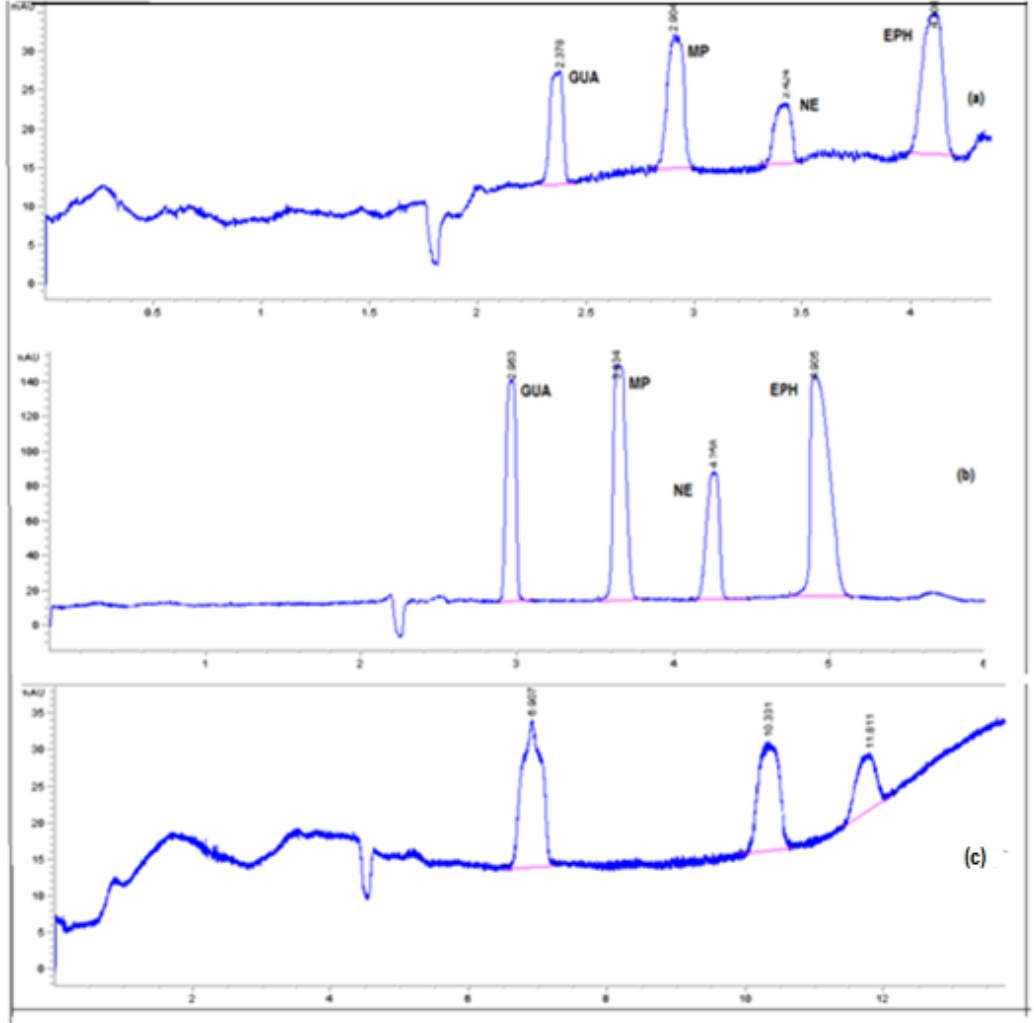
Şekil 25. BGE Çözeltisinin pH'ının Etkisi

(a)pH=9.6 (b)pH=10 (c)pH=10.5 (d)pH=11 (e)pH=12 (f)pH=12.5 (g)pH=13

GUA($25 \mu\text{g.mL}^{-1}$), MP($25 \mu\text{g.mL}^{-1}$), NE($25 \mu\text{g.mL}^{-1}$), EPH($25 \mu\text{g.mL}^{-1}$)

Elektrolit Çözeltisi: %0.8 SDS, %1.2 Butan-1-ol, %0.5 EA içeren, %97.5 10 mM Borat tamponu; Enjeksiyon süresi: 20 saniye, Voltaj: +22 kV, sıcaklık: 40°C

Elde edilen pik şekillerinin ve zemin sinyalinin düzgün olması nedeniyle 10 mM en uygun tampon çözelti derişimi olarak seçilmiştir. Şekil 26'da BGE çözeltisinin derişim optimizasyonu sonucu elde edilen elektroferogramlar gösterilmiştir.



Şekil 26. BGE Çözeltisinin Derişiminin Etkisi

(a)5.0 mM (b)10 mM (c)20 mM

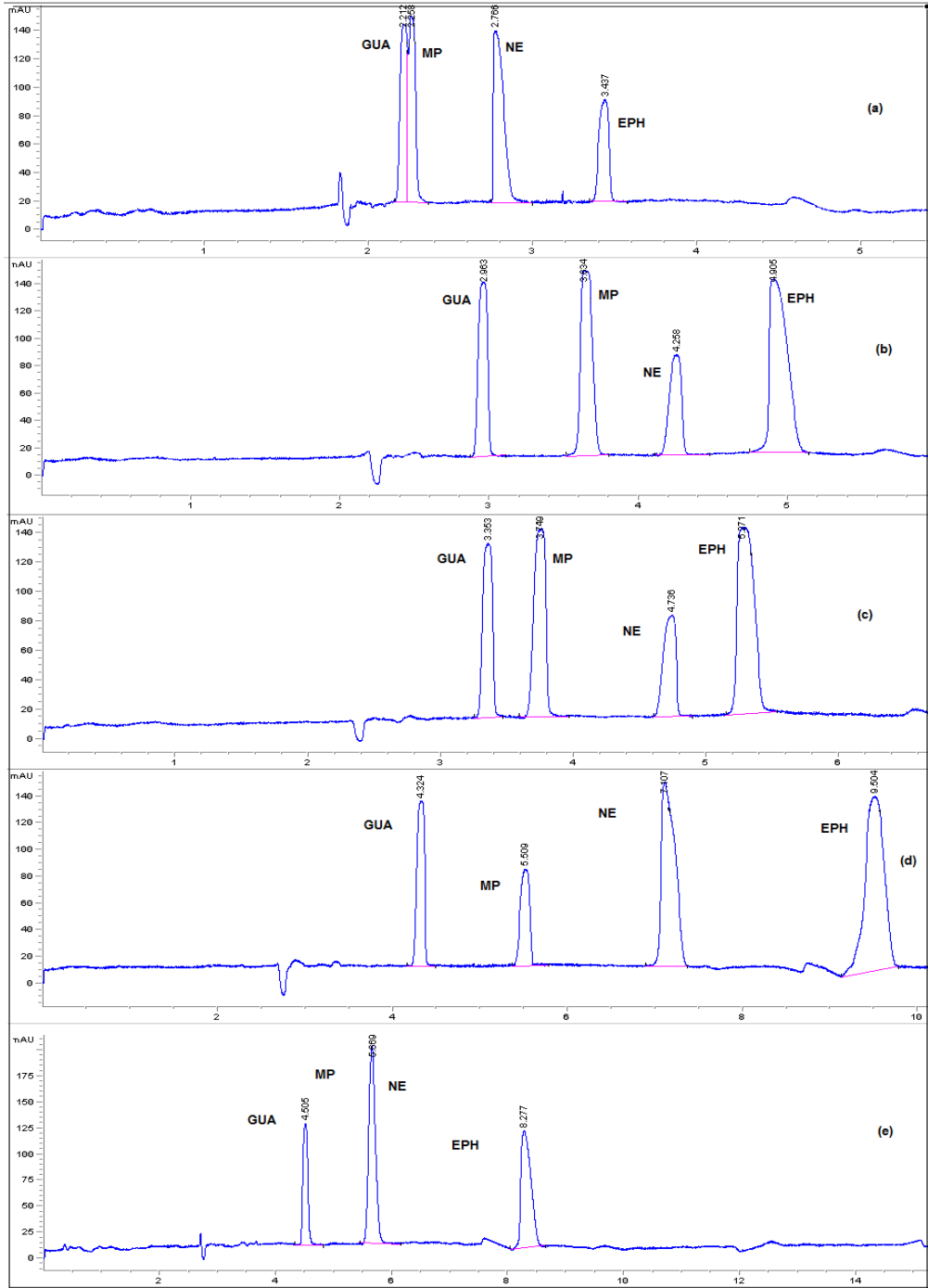
GUA($25 \mu\text{g.mL}^{-1}$), MP($25 \mu\text{g.mL}^{-1}$), NE($25 \mu\text{g.mL}^{-1}$), EPH($25 \mu\text{g.mL}^{-1}$)

Elektrolit Çözeltisi: %0.8 SDS, %1.2 Butan-1-ol, %0.5 EA içeren, %97.5 pH 11 Borat tamponu; Enjeksiyon süresi: 20 saniye, Voltaj:+22 kV, Sıcaklık: 40°C

BGE'ye eklenen SDS derişiminin etkisi incelendiğinde, konsantrasyon artışı ile rezolüsyonun arttığı görülmektedir. En yüksek derişimde MP ve NE piklerinin birleştiği, en düşük derişimde ise rezolüsyonun tam olarak sağlanamadığı görülmektedir. %0.8, %1.0 ve %1.4'lük SDS derişimlerinin tümünde rezolüsyon iyi olmakla birlikte %0.8 ve %1.0 SDS kullanımında analiz süresi daha kısadır. Ancak %1.4 SDS derişiminde pik alanlarının anlamlı bir farkla arttığı görüldüğü için, bu değer optimum SDS %'si olarak seçilmiştir (Şekil 27).

BGE'nin diğer bir bileşeni olan butanol miktarı için yapılan optimizasyon çalışmasında ise sonuçlara bakıldığında, 1-butanol'ün artması durumunda duyarlılığın da rezolüsyonun da arttığı görülmüştür. MP pikine odaklı bakıldığında %1.4 butan-1-ol miktarının daha ideal olduğu düşünülse de, diğer üç pik %1.2'de daha iyidir (Şekil 28).

BGE'nin organik fazını oluşturmak üzere eklenen etil asetat yüzdesi incelendiğinde, %0.9'da çok daha yüksek pik alanları elde edilirken, zemin sinyali açısından %0.7 daha tercih edilir bir elektroferogram vermiştir. Ayrıca %0.9 etil asetat kullanıldığında NE pikinde çatallanma varken, %0.7'de bu pik düzelmiştir (Şekil 29).

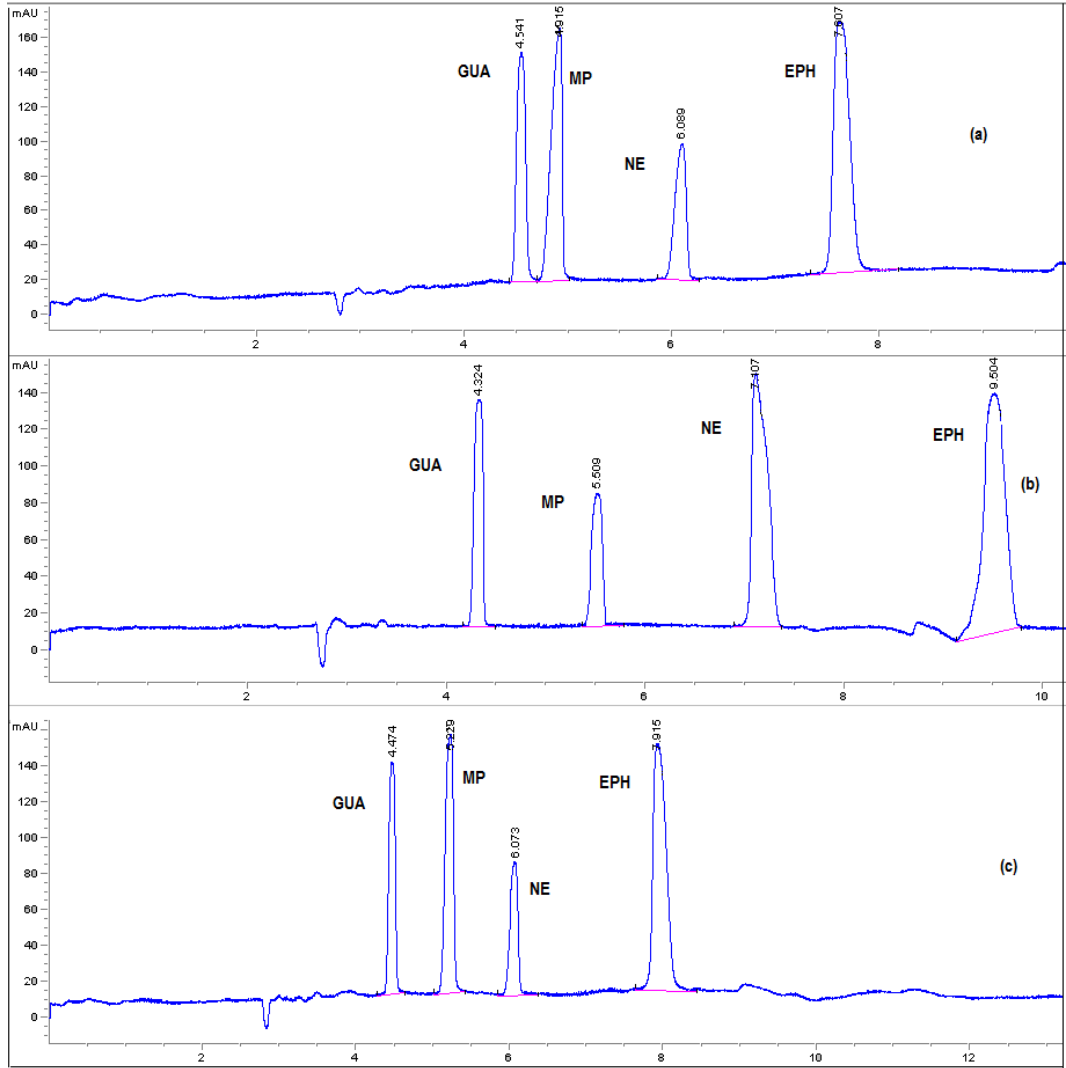


Şekil 27. BGE Çözeltisindeki SDS Derişimi Optimizasyonu

(a)%0.4 (b)%0.8 (c)%1.0 (d)%1.4 (e)%1.6

GUA(25 µg.mL⁻¹), MP(25 µg.mL⁻¹), NE(25 µg.mL⁻¹), EPH(25 µg.mL⁻¹)

Elektrolit Çözeltisi: %1.2 Butan-1-ol, %0.5 EA içeren, %97.5 pH 11, 10 mM Borat tamponu; Enjeksiyon süresi: 20 saniye, Voltaj:+22 kV, Sıcaklık: 40°C

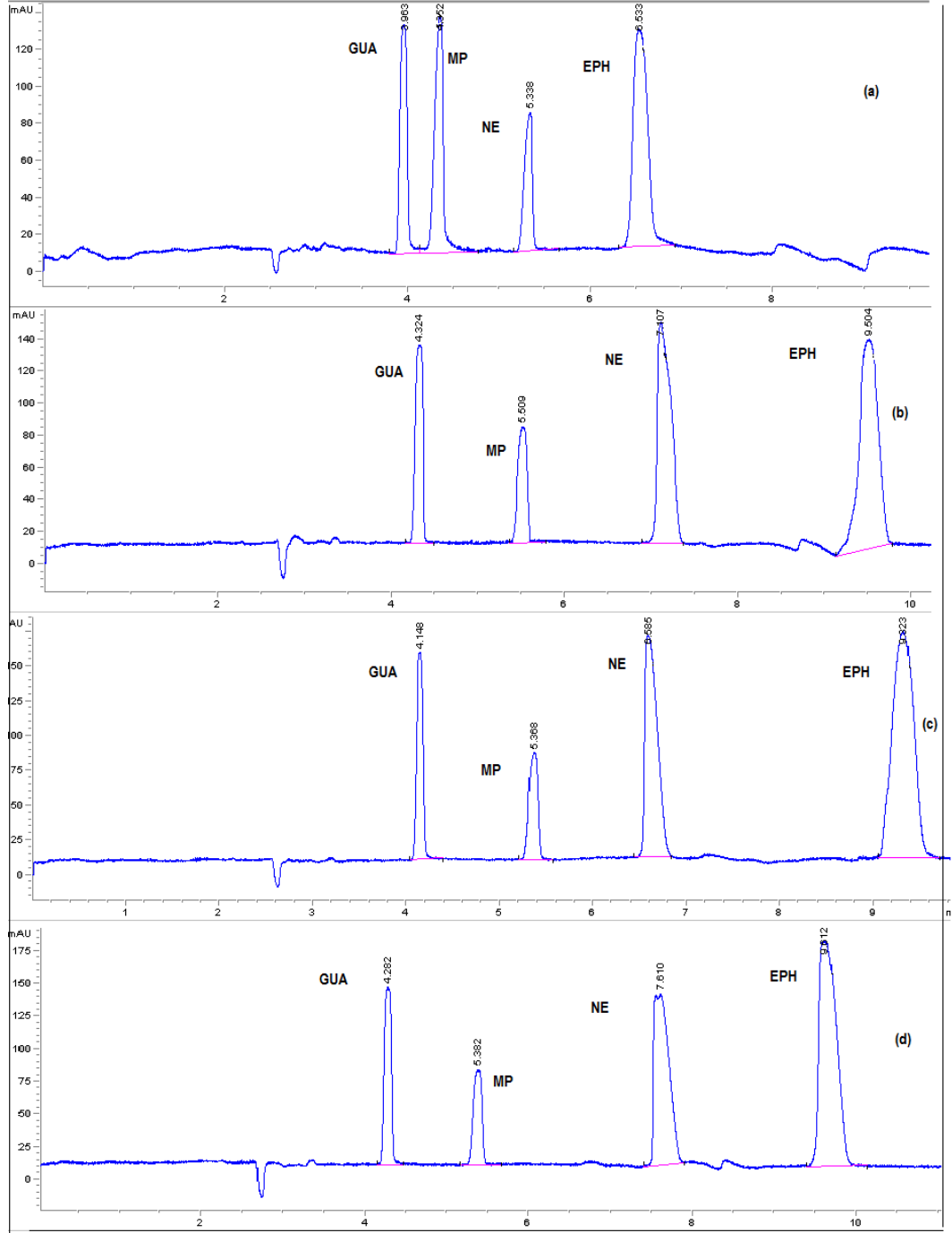


Şekil 28. Butanol Derişim Optimizasyonu

(a)%1.0 (b)%1.2 (c)%1.4

GUA($25 \mu\text{g.mL}^{-1}$), MP($25 \mu\text{g.mL}^{-1}$), NE($25 \mu\text{g.mL}^{-1}$), EPH($25 \mu\text{g.mL}^{-1}$)

Elektrolit Çözeltisi: %1.4 SDS, %0.5 EA içeren, %96.9 pH 11, 10 mM Borat tamponu; Enjeksiyon süresi: 20 saniye, Voltaj: +22 kV, Sıcaklık: 40°C



Şekil 29. Etil Asetat Derişim Optimizasyonu

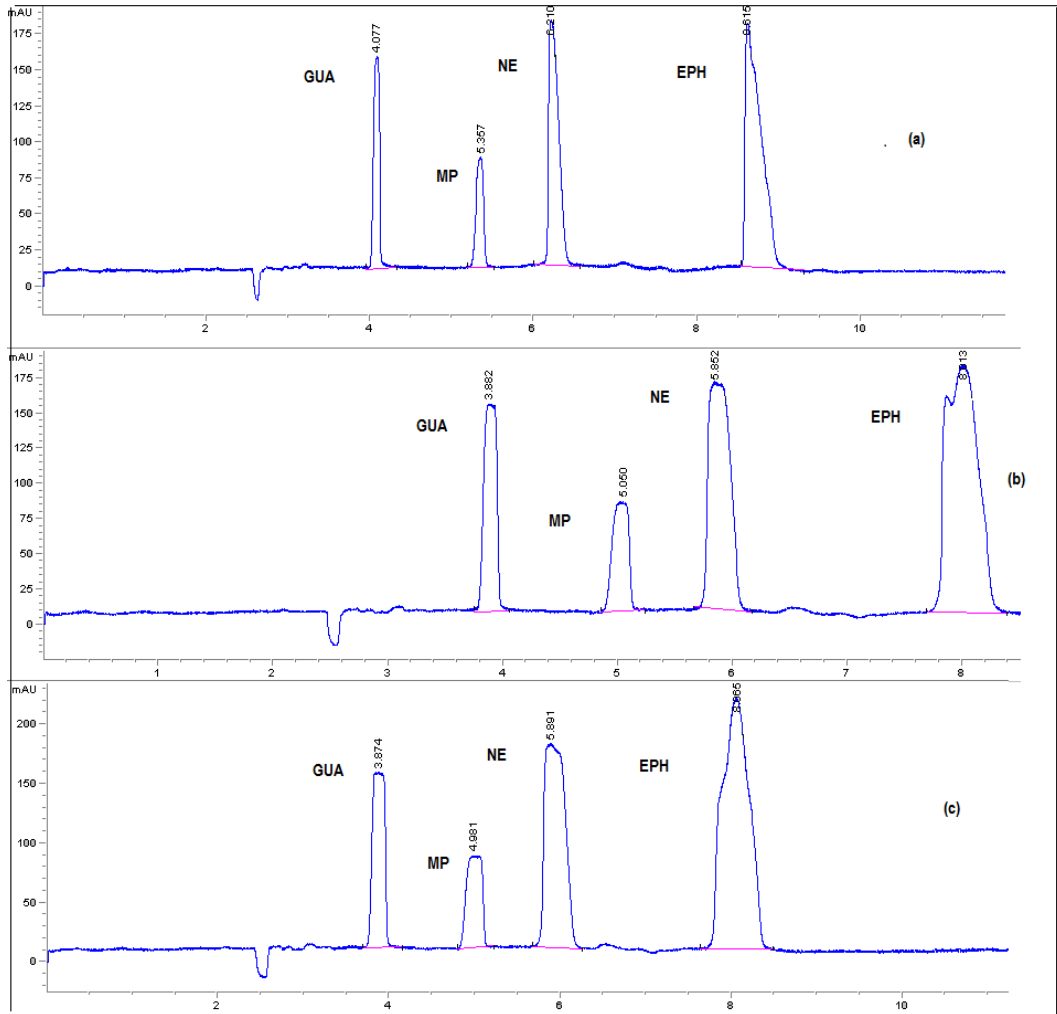
(a)%0.3 (b)%0.5 (c)%0.7 (d)%0.9

GUA(25 µg.mL⁻¹), MP(25 µg.mL⁻¹), NE(25 µg.mL⁻¹), EPH(25 µg.mL⁻¹)

Elektrolit Çözeltisi: %1.4 SDS, %1.2 Butan-1-ol içeren, %96.9 pH 11, 10 mM Borat tamponu; Enjeksiyon süresi: 20 saniye, Voltaj:+22 kV, Sıcaklık: 40°C

4.2.2. MEEKC Yönteminde Cihaz Parametrelerinin Optimizasyonu

Enjeksiyon süresi arttıkça pik alanları artmakta; fakat 20 s'nin üzerine çıktığında pikler birleşmektedir. Ayrıca iki yöntemin (MEKC ve MEEKC) aynı enjeksiyon sürelerinde kıyaslanabilmesi için, 20 s en ideal enjeksiyon süresi olarak seçilmiş ve enjeksiyon süresi optimizasyon sonuçları Şekil 30'da gösterilmiştir.



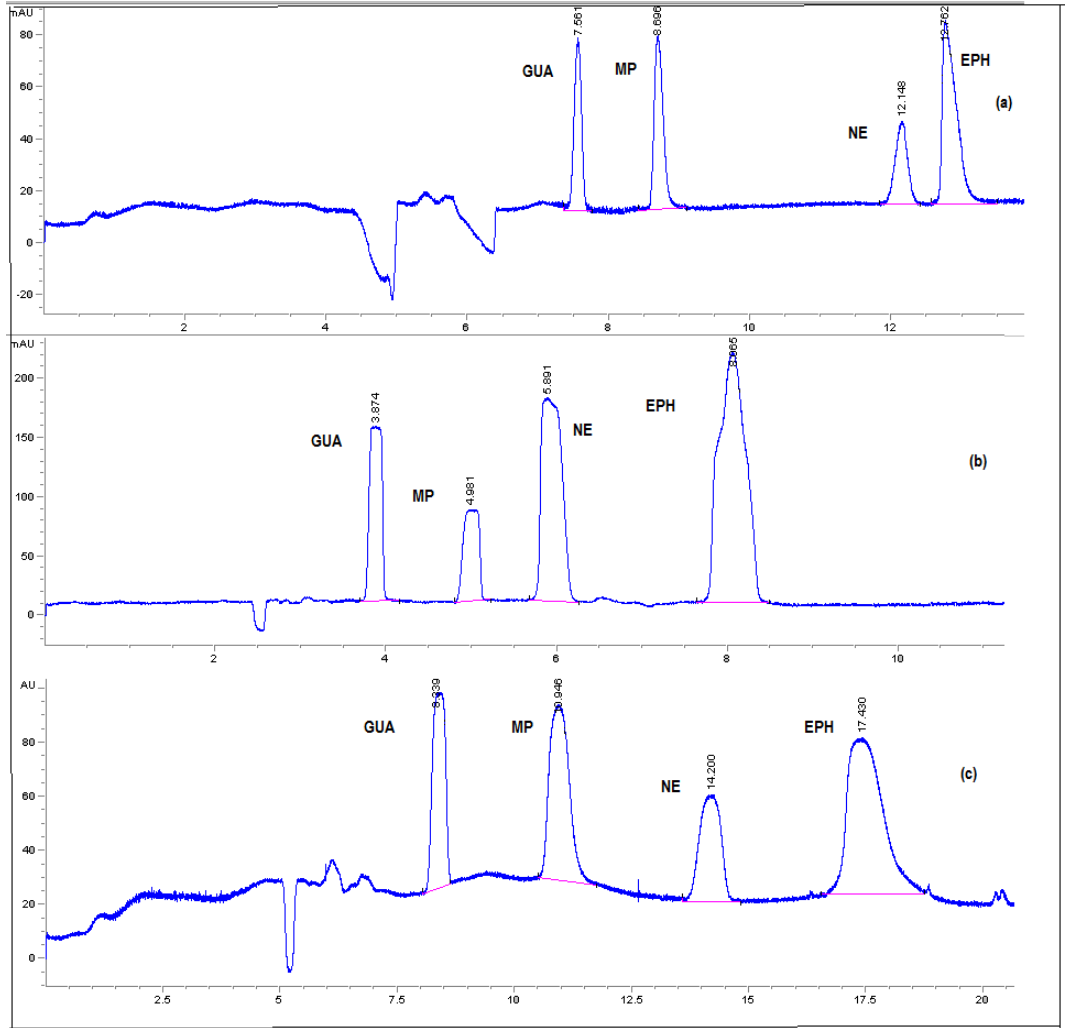
Şekil 30. Enjeksiyon Süresi Optimizasyonu

(a)10 s (b)15 s (c)20 s

GUA($25 \mu\text{g.mL}^{-1}$), MP($25 \mu\text{g.mL}^{-1}$), NE($25 \mu\text{g.mL}^{-1}$), EPH ($25 \mu\text{g mL}^{-1}$)

Elektrolit Çözeltisi: %1.4 SDS, %1.2 butan-1-ol, %0.7 EA içeren, %96.7 pH 11, 10 mM Borat tamponu; Voltaj: +22 kV, Sıcaklık: 40°C

MEEKC yöntemlerinde genel olarak yüksek kaset sıcaklıkların kullanıldığı, bu durumun da stabil mikroemülsiyonlar oluşturabilmek için yararlı olduğu bilinmektedir. Bu nedenle yüksek sıcaklıkların denendiği optimizasyon koşullarında 40°C optimum sıcaklık olarak seçilmiştir (Şekil 31).



Şekil 31. Sıcaklık Optimizasyonu

(a)30°C (b)40°C (c)50°C

GUA(25 µg.mL⁻¹), MP(25 µg.mL⁻¹), NE(25 µg.mL⁻¹), EPH(25 µg.mL⁻¹)

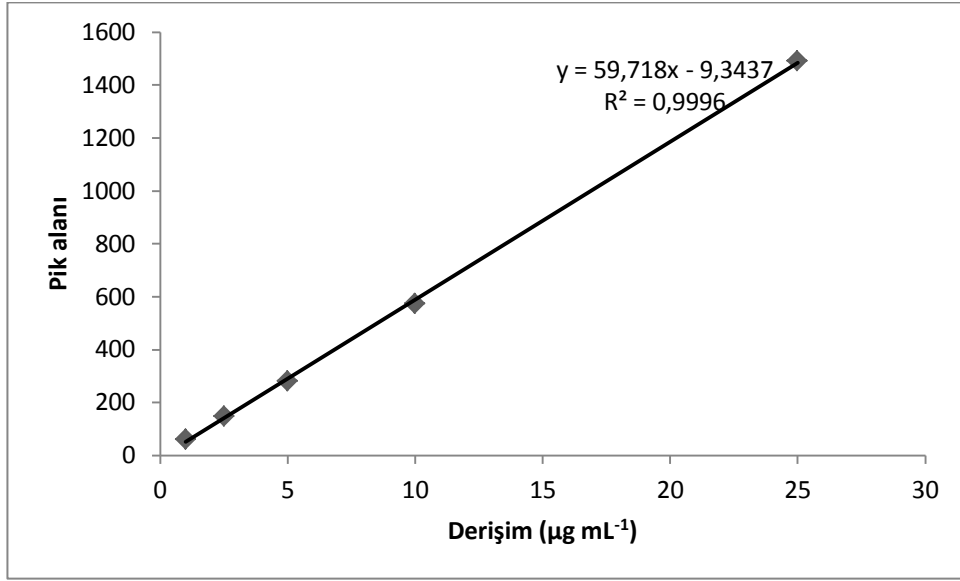
Elektrolit Çözeltisi: %1.4 SDS, %1.2 Butan-1-ol, %0.7 EA içeren, %96.7 pH 11, 10 mM Borat tamponu; Enjeksiyon süresi: 20 s, Voltaj: +22 kV

Tablo 16. MEEKC Yöntemi Optimizasyon Parametreleri

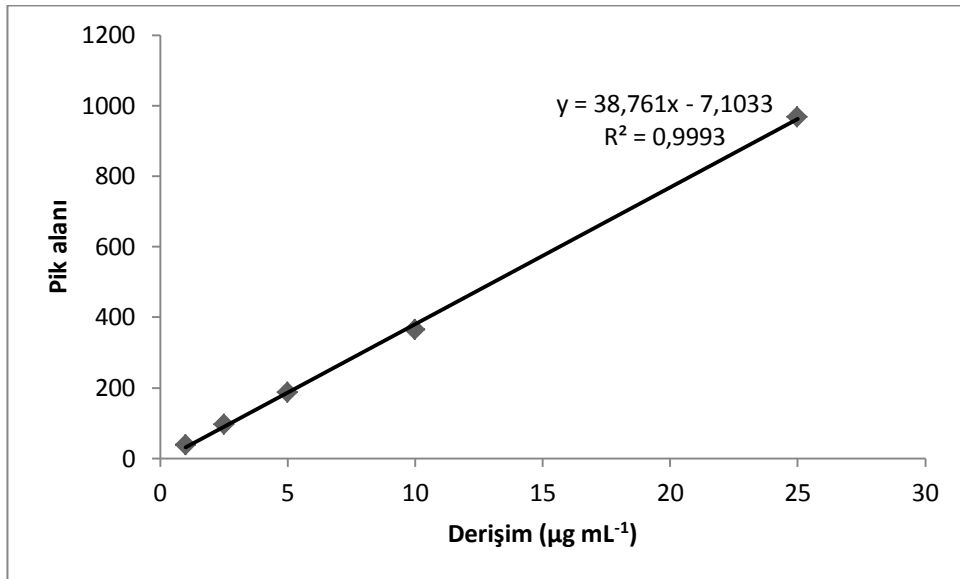
Parametreler	İncelenen	Karar verilen
Tampon pH	9.6; 10; 10.5; 11; 12; 12.5; 13	11
Tampon derişimi (mM)	5; 10; 20	10
SDS derişimi (%)	0.4; 0.8; 1.0; 1.4; 1.6	1.4
Butan-1-ol derişimi (%)	1.0; 1.2; 1.4	1.2
Etil asetat derişimi (%)	0.3; 0.5; 0.7; 0.9	0.7
Enjeksiyon süresi (s) (50mBar)	10; 15; 20	20
Kaset sıcaklığı (°C)	30; 40; 50	40

4.2.3. MEEKC Yönteminde Kalibrasyon Grafikleri

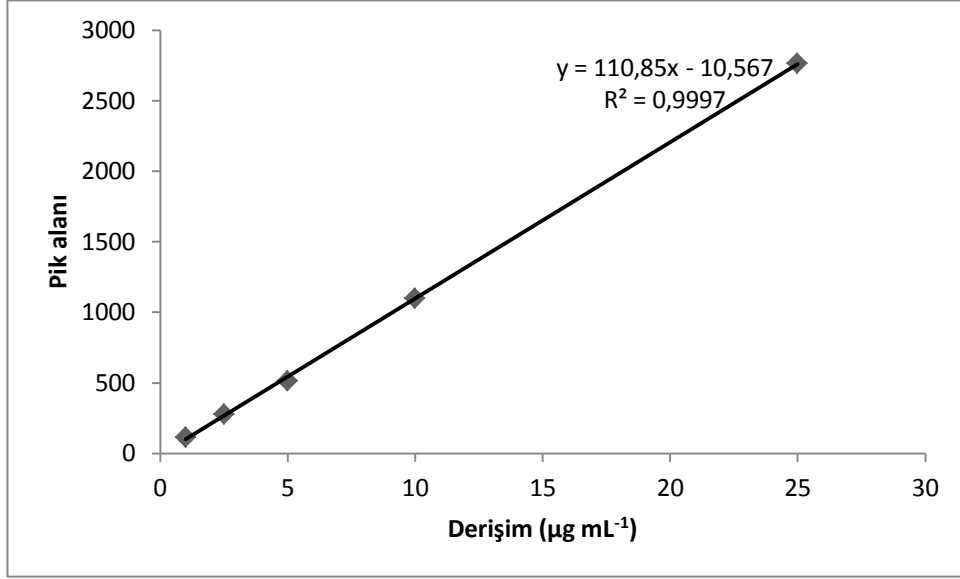
Optimize edilen koşullar altında, analitlerin kalibrasyon grafikleri çizilmiş ve kalibrasyon denklemleri elde edilmiştir. Buna göre, GUA, MP, NE ve EPH için elde edilen kalibrasyon grafikleri, denklemleri ve regresyon katsayıları ile birlikte, sırasıyla Şekil 32, Şekil 33, Şekil 34 ve Şekil 35'de gösterilmiştir.



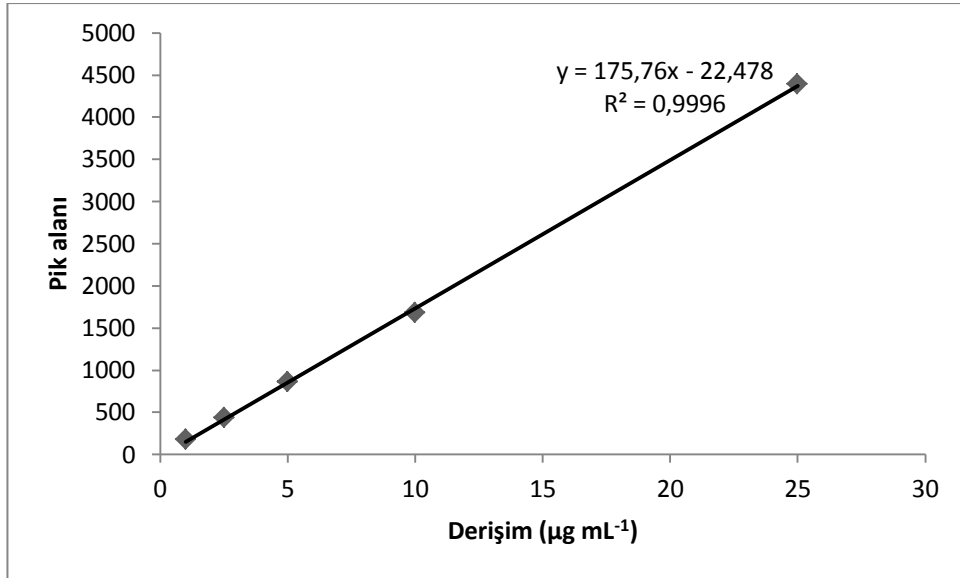
Şekil 32. MEEKC Yöntemi ile GUA için Elde Edilen Kalibrasyon Grafiği



Şekil 33. MEEKC Yöntemi ile MP için Elde Edilen Kalibrasyon Grafiği



Şekil 34. MEEKC Yöntemi ile NE için Elde Edilen Kalibrasyon Grafiği



Şekil 35. MEEKC Yöntemi ile EPH için Elde Edilen Kalibrasyon Grafiği

Her bir analit için elde edilen iki kalibrasyon denklemleri kıyaslanmış, eğimin sıfırdan farkı araştırılmış, ayrıca iki kalibrasyonun eğim değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı farkının olup olmadığına bakılmıştır. Tablo 17, Tablo 18, Tablo 19 ve Tablo 20'de değerler ve istatistiksel sonuçlar verilmiştir.

Tablo 17. MEEKC Yönteminde GUA Kalibrasyonu için Elde Edilen İstatistiksel Sonuçlar

	Denklem 1	Denklem 2
	$y=59.72x-9.344$	$y=62.30x-14.54$
Eğimin sıfırdan farkı	FA ($p<0.0001$)	FA ($p<0.0001$)
Eğimin GA (%95)	57.61-61.82	58.80-65.80
Eğimler arası fark	FAD ($p=0.09065$)	

Tablo 18. MEEKC Yönteminde MP Kalibrasyonu için Elde Edilen İstatistiksel Sonuçlar

	Denklem 1	Denklem 2
	$y=38.76x-7.103$	$y=41.12x-13.16$
Eğimin sıfırdan farkı	FA ($p<0.0001$)	FA ($p=0.0005$)
Eğimin GA (%95)	36.90-40.63	37.39-44.86
Eğimler arası fark	FAD($p=0.122$)	

Tablo 19. MEEKC Yönteminde NE Kalibrasyonu için Elde Edilen İstatistiksel Sonuçlar

	Denklem 1	Denklem 2
	$y=110.9x-10.57$	$y=116.5x-19.58$
Eğimin sıfırdan farkı	FA ($p<0.0001$)	FA ($p<0.0001$)
Eğimin GA (%95)	107.5-114.2	107.1-125.9
Eğimler arası fark	FAD($p=0.1217$)	

Tablo 20. MEEKC Yönteminde EPH Kalibrasyonu için Elde Edilen İstatistiksel Sonuçlar

	Denklem 1	Denklem 2
	$y=175.8x-22.48$	$y=186.8x-42.66$
Eğimin sıfırdan farkı	FA ($p<0.0001$)	FA ($p<0.0001$)
Eğimin GA (%95)	169.5-182.0	173.5-200.0
Eğimler arası fark	FAD($p=0.05452$)	

4.2.4. MEEKC Yöntemi Validasyon Çalışmaları

GUA, MP, NE ve EPH için LOD değerleri sırasıyla, 0.45; 0.61; 0.38 ve 0.46 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. LOQ değerleri ise, 1.36; 1.86; 1.15 ve 1.38 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ olarak bulunmuştur.

Günlük ve günlerarası tekrarlanabilirlik çalışmasında elde edilen pik alanları, ortalama, ortalamanın standart hatası, standart sapma, %RSD ve Güven Aralığı olarak Tablo 21 ve Tablo 22'de verilmiştir.

Tablo 21. MEEKC Yöntemi Günlük Tekrarlanabilirlik Çalışması Sonuçları

	GUA	MP	NE	EPH
	296.7	186	514	859
	304	186.1	524.4	858.4
	297	182.4	539	849.2
	296.6	189.5	523	850.5
	307.1	185.6	528.9	854
	297.3	182.2	526.8	852
Ortalama	299.8	185.3	526.0	853.9
Ortalamanın Standart Hatası	1.870	1.109	3.335	1.668
S_D	4.580	2.716	8.168	4.087
%RSD	%1.53	%1.47	%1.55	%0.48
GA (%95)	294.9-304.6	182.5-188.2	517.4-534.6	849.6-858.1
	p>0.10	p>0.10	p>0.10	p>0.10

Tablo 22. MEEKC Yöntemi Günlerarası Tekrarlanabilirlik Çalışması Sonuçları

	GUA	MP	NE	EPH
	281	196.8	545.9	857.4
	286.3	189.9	562.3	910.5
	301.3	195.8	583.0	933.5
	286.8	188.9	587.9	877.6
	296.5	179.9	524.0	910
	292.4	196.3	548.8	874.6
Ortalama	290.7	191.3	558.7	893.9
Ortalamanın Standart Hatası	3.042	2.666	9.869	11.652
S_D	7.450	6.530	24.174	28.542
%RSD	%2.56	%3.41	%4.32	%3.19
GA (%95)	282.9-298.5	184.4-198.1	533.3-584.0	863.9-923.9
	p>0.10	p>0.10	p>0.10	p>0.10

4.2.5.MEEKC Yönteminin Farmasötik Preparata Uygulanması ve Geri Kazanım Çalışması Sonuçları

Şurup numunesinden yapılan ölçümle, şurup içeriğinde bulunan etken madde miktarlarının gerçek değere yakınlığına bakılmış ve aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığı hesaplanmıştır. GUA ve EPH için bu şekilde yapılan çalışma, toplam Paraben'in (P) için şuruplarda bulunması gereken değer aralığı içinde olup olmadığı açısından incelenmiştir. Ayrıca NE de dahil edilerek, dört analit için standart çözelti ekleme yoluyla şuruptan geri kazanım çalışması yapılmıştır. Şuruptan elde edilen sonuçların gerçek değerle kıyaslanması, Tablo 23'de, geri kazanım çalışma sonuçları Tablo 24'de gösterilmiştir. Her bir analit için şuruptan elde edilen sonuçlar, GUA(Tablo 25) ve EPH(Tablo 26) ve NE(Tablo 27) ve MP(Tablo 28)'de gösterilmiştir.

Tablo 23. Elde Edilen Sonuçların Gerçek Değerle Kıyaslanması

	Gerçek Değer	Bulunan Değer	Farkın Değerlendirilmesi
GUA	50 µg.mL ⁻¹	49.1 µg.mL ⁻¹	FAD (p>0.05)
EPH	3.33 µg.mL ⁻¹	3.25 µg.mL ⁻¹	FAD (p>0.05)
MP	%0.015-0.2	%0.085	Belirtilen Aralıkta

Tablo 24. MEEKC Yönteminde Geri Kazanım Çalışması Sonuçları

	Gerçek Değer	Bulunan Değer	Farkın Değerlendirilmesi	% Geri Kazanım
GUA (%50)	75 µg.mL ⁻¹	69.8 µg.mL ⁻¹	FA (p=0.0002)	% 93.1
EPH (%50)	4.99 µg.mL ⁻¹	4.90 µg.mL ⁻¹	FAD (p>0.05)	% 98.2
MP	3.33 µg.mL ⁻¹	3.39 µg.mL ⁻¹	FAD (p>0.05)	% 101.8
NE	3.33 µg.mL ⁻¹	3.49 µg.mL ⁻¹	FAD (p>0.05)	% 104.8

Tablo 25. MEEKC Yöntemi ile Şuruptan GUA Tayini Sonuçları

Numune No.	Bulunan miktar µg.mL⁻¹	Belirtilen Miktar 50 µg.mL⁻¹
1	47.9	\bar{X} =49.6 S _D =1.15 %RSD=2.32 GA=48.17-51.03 (p=0.05)
2	50.9	
3	49.0	
4	49.8	
5	50.2	

Tablo 26. MEEKC Yöntemi ile Şuruptan EPH Tayini Sonuçları

Numune No.	Bulunan miktar $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Belirtilen Miktar $3.33 \mu\text{g.mL}^{-1}$
1	3.2	$\bar{X}=3.3$ $S_D=0.2$ $\%RSD=6.06$ $GA=3.05-3.55$ $(p=0.05)$
2	3.4	
3	3.5	
4	3.0	
5	3.4	

Tablo 27. MEEKC Yöntemi ile Şuruptan NE Tayini Sonuçları

Numune No.	Eklene miktar $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Belirtilen Miktar $3.33 \mu\text{g.mL}^{-1}$
1	3.5	$\bar{X}=3.38$ $S_D=0.13$ $\%RSD=3.85$ $GA=3.22-3.54$ $(p=0.05)$
2	3.2	
3	3.3	
4	3.4	
5	3.5	

Tablo 28. MEEKC Yöntemi ile Şuruptan MP Tayini Sonuçları

Numune No.	Bulunan miktar Mol.L^{-1}	Belirtilen Aralık $0.23-3.0 \text{mol.L}^{-1}$
1	1.17	$\bar{X}=1.26$ $S_D=0.07$ $\%RSD=5.5$ $GA=1.17-1.35$ $(p=0.05)$
2	1.23	
3	1.26	
4	1.35	
5	1.28	

4.2.6. MEEKC Yöntemi için Sistem Uygunluk Testi (SUT) Sonuçları

Analitler için, optimum koşullarda, sistem uygunluk testlerinin gereği olarak pik simetrisi (As), pik genişliği (W), tabaka sayısı (N), pikler arası rezolüsyon (Rs) ve S/N oranları hesaplanmıştır. Elde edilen veriler Tablo 30'da verilmiştir. N değerinin tüm analitler için 2000'den yüksek elde edilmesi ve Rs değerlerinin 2'nin üzerinde olması ve As değerlerinin de 2'nin altında olması ile geliştirilen MEEKC yöntemi SUT açısından uygun sonuçlar vermiştir⁶⁵ (Tablo 29).

Tablo 29. MEEKC Yönteminde Elde Edilen SUT Sonuçları

	Pik simetrisi (As)	Pik genişliği (W) (dk)	Tabaka sayısı (N)	S/N oranı	Rezolüsyon (Rs)
GUA	1.05	0.0850	25580	101.2	7.49
MP	1.40	0.1100	26248	52.7	
NE	0.38	0.1350	23492	117.4	4.14
EPH	0.20	0.2150	17798	117.3	8.06

4.3. MEKC ve MEEKC Yöntemleri ile Elde Edilen Şurup Sonuçlarının Karşılaştırılması

Şuruplardan GUA ve EPH, NE ve MP tayini için elde edilen sonuçlar, *Student t* testi ile ortalama değerler ve *Fisher* testi ile kesinlik açısından Elde edilen sonuçlar Tablo 30 ve Tablo 31’de gösterilmiştir.

Tablo 30. MEKC ve MEEKC Yöntemlerinin Student t Testi ile Karşılaştırılması

	MEKC/ MEEKC (p=0.05)
GUA	$t_{\text{deneysel}} (2.16) < t_{\text{teorik}} (2.23)$
EPH	$t_{\text{deneysel}} (1.78) < t_{\text{teorik}} (2.23)$
NE	$t_{\text{deneysel}} (6.57) > t_{\text{teorik}} (2.23)$
MP	$t_{\text{deneysel}} (0.19) < t_{\text{teorik}} (2.23)$

Tablo 31. MEKC ve MEEKC Yöntemlerinin Fisher Testi ile Karşılaştırılması

	MEKC/ MEEKC (p=0.05)
GUA	$F_{\text{deneysel}} (4.70) < F_{\text{teorik}} (5.50)$
EPH	$F_{\text{deneysel}} (3.00) < F_{\text{teorik}} (5.50)$
NE	$F_{\text{deneysel}} (2.22) < F_{\text{teorik}} (5.50)$
MP	$F_{\text{deneysel}} (1.5) < F_{\text{teorik}} (5.50)$

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda, *Efedrin (EPH)*, *Guafenezin (GUA)* ve *koruyucu olarak paraben (metil paraben(MP) ve propil paraben(PP))* içeren farmasötik şuruplarda analitlerin aynı anda miktar tayinine imkan veren duyarlı iki kapiler elektroforez yöntemi geliştirilmiştir. Ayrıca, numune çözeltisine *EPH*'ın metaboliti *Norefedrin(NE)* eklenerek *GUA*, *EPH*, *NE* ve *MP* içeren bir matriks çözeltisi oluşturulmuş ve tayinler bu çözeltide gerçekleştirilmiştir. Metil ve propil paraben, farmasötik şuruplarda birlikte kullanıldıklarında eşit miktarlarda bulunmaktadır¹¹. Metil ve propil parabenin eşit konsantrasyonlardaki çözeltilerinin UV spektrumları eşdeğer ve Molar Ekstinksiyon katsayıları da eşit olduğu için toplam paraben tayinleri, metil paraben üzerinden yapılmıştır. Geliştirilen iki yöntem, Misel Elektrokinetik Kapiler Kromatografi(MEKC) ve Mikroemülsiyon Elektrokinetik Kapiler Kromatografi(MEEKC) ile elde edilen bulgular, ortalamalar açısından Student t testi ve kesinlik açısından Fisher testi ile kıyaslanmıştır.

5.1. Optimizasyon Çalışmaları

Misel Elektrokinetik Kapiler Kromatografi (MEKC) yöntemi optimizasyon çalışmalarında elektrolit çözeltisinin bir bileşeni olan tampon çözelti için pH ve konsantrasyon optimizasyonu yapıldı. Tampon çözelti pH'sı optimizasyonunda, asidik pH'larda herhangi bir veri eldesi beklenmediği için bazik pH'lar tarandı. Bu taramada pH 9.5 ve pH 10.0 Borat tamponları ile dört ayrı pik gözlemlendi ve daha yüksek pik alanı değerleri elde edildiği için pH 9.5 tamponu seçildi. Tampon konsantrasyonu optimizasyonunda, düşük tampon konsantrasyonunda (5 mM) piklerin belirginleştiği, tam ayırım sağlanamasa da yüksek tampon konsantrasyonlarına oranla daha düzgün bir elektroferogram elde edildiği

görüldü ve 5 mM tampon konsantrasyonu optimum konsantrasyon olarak seçildi. Burada tam ayırım sağlanamamasının nedeni SDS derişiminin henüz optimize edilmemiş olmasıdır. Elektrolit çözeltisine eklenen SDS konsantrasyonu optimizasyonunda ise, SDS konsantrasyonları taranmış ve kritik misel konsantrasyonunun oluşabilmesi için gerekli yüksek konsantrasyonda (70 mM SDS) ayırımın gerçekleştiği ve pik şekillerinin simetrik ve keskin olduğu görülmüştür. Elektrolit çözeltisine eklenen organik modifiye ajan ACN ile pik şekillerinin daha keskin olduğu, yüksek ACN konsantrasyonlarında geniş piklerin daraldığı ve pik şekillerinin düzeldiği görülmüştür. Ayrıca, ACN konsantrasyonundaki artış ile analiz süresinin kısaldığı da görülmüştür. Literatürde MEKC çalışmasında kullanılan ACN ile de aynı etki sağlanmış, beklenildiği üzere ACN konsantrasyon artışı ile migrasyon süreleri kısalmıştır⁷¹. Optimize edilen MEKC yönteminde standart ve numune çözeltilerinin su içinde hazırlanması ile bir özenleştirme türü olan istifleme yöntemi kullanılmış olmaktadır.

MEKC yönteminde cihaz parametrelerinin optimizasyonları amacıyla 30 cm ve 60 cm.lik kapiler denenmiş, 60 cm.lik kapiler ile analiz süresi uzamasına rağmen zemin sinyalinin ve pik şekillerinin daha düzgün olduğu 60 cm. lik kapiler tercih edilmiştir. Enjeksiyon süresi optimizasyonu ile beklenildiği gibi artan süre ile paralel olarak sinyallerde artış sağlanmış, pik şekillerinin ve doğrusallığın bozulduğu 30 s enjeksiyon süresinin uygun olmadığına karar verilmiş ve 20 s enjeksiyon süresi seçilmiştir. Kaset sıcaklığının analiz süresi üzerine etkisi incelendiğinde ise, farklı sıcaklıklarda anlamlı farklar elde edilmediği için 30°C kaset sıcaklığının uygun olduğuna karar verilmiştir.

İkinci yöntem, Mikroemülsiyon Elektrokinetik Kapiler Kromatografi (MEEKC) için yapılan optimizasyon çalışmalarında öncelikle

mikroemülsiyon elektrolit çözeltinin bileşeni olan tampon çözelti pH'ı için optimizasyon çalışması yapılmıştır. pH 11'in altındaki tampon çözeltilerle elde edilen pik alanları küçüktür. pH 11'den büyük olan tamponlarla oluşturulan mikroemülsiyon elektrolit çözeltileriyle ise daha yüksek pik alanları elde edilmesine rağmen, tekrarlanabilir sonuçlar alınmamıştır. Yüksek pH'larda daha iyi sonuçların elde edilmesi, bazik ilaçların yüksek pH'larda nötr halde olması nedeniyledir. Bu koşullarda, bazik özellikteki ilaç etken maddelerinin ayırım verimliliği MEKC ve MEEKC yöntemlerinde artar. Çalışmamızda pK_a değerleri 8-10 aralığında olan EPH, NE ve MP, yüksek pH değerlerinde iyonlaşmadıkları için nötr halde kalmışlar ve organik fazdaki dağılım oranları artmıştır. Bu nedenle en iyi ayırım pH 11'de gerçekleşmiştir. Ancak pK_a 'sı 15,56 olan GUA⁷² bu koşullarda iyonize haldedir, o nedenle elektroferogramda ilk çıkan pik GUA pikidir. Bu durum MEKC yöntemi için de geçerlidir. Ayrıca kullanılan bu yüksek pH'daki BGE ile tüm CE yöntemlerinde olduğu gibi EOF hızı da artmıştır. Tampon derişimi optimizasyonunda, 10 mM tampon derişimi ile elde edilen sonuçlarda, zemin sinyalinin daha düzgün olmasından dolayı, bu derişim ile çalışmaya devam edilmiştir. Tampon çözeltiye eklenen surfaktanın (SDS) konsantrasyonu %0,8'den başlayarak artırılmış, beklendiği gibi rezolüsyonda iyileşme görülmüş, fakat yüksek konsantrasyonda MP piki ve NE pikinin birbirlerine yaklaştıkları gözlemlendiği için %1.4 SDS konsantrasyonu optimum değer olarak seçilmiştir. Mikroemülsiyon bileşiminde yer alan ko-surfaktan, 1-butanol konsantrasyonunun optimizasyonunda, konsantrasyonun artışı ile duyarlılığın ve rezolüsyonun arttığı görülmektedir. Mikroemülsiyon elektrolit çözeltisinin bileşiminde yer alan ve organik fazı oluşturan Etil asetat konsantrasyonu, yüksek derişimde, yüksek pik alanları beraberinde yüksek zemin sinyalleri görüldüğü ve ayrıca NE pikinde bozulma görüldüğü için, %0.7 olarak optimize edilmiştir.

MEEKC'de cihaz parametreleri optimizasyonunda optimum enjeksiyon süresi taranmış ve 20 s olarak seçilmiştir. 20 s'nin altında pik alanları düşüktür, 20 s'nin üzerinde pik alanları büyümektedir, ancak iki yöntemin kıyaslanabilmesi açısından MEKC'de kullanılan 20 s enjeksiyon süresine karar verilmiştir. MEEKC yöntemlerinde kullanılan yüksek kaset sıcaklıklarının mikroemülsiyon elektrolit çözeltilerinin stabilitelerini korumakta önemli olduğu bilinmektedir, bu nedenle yapılan optimizasyon çalışmasında yüksek sıcaklıklar da incelenmiştir. 50°C'de elde edilen elektroferogramda, pik alanlarının azaldığı görülmüş, bu nedenle 40°C çalışma için ideal bulunmuştur.

Sonuç olarak yöntemlerin avantaj ve dezavantajlarına bakıldığında, her iki yöntemin de duyarlılık açısından sınırlamaları olduğu görülmektedir. Dedektör seçiminde duyarlı bir dedektör olan MS dedektörünün MEKC ve MEEKC ile problem yarattığı bilinmektedir⁶⁷. Bunun nedeni yüksek konsantrasyonlarda kullanılan misel oluşturucu surfaktanlardır. Ayrıca MEKC için kullanılabilen istifleme yöntemi, MEEKC yönteminde mikroemülsiyonun yapısını bozması nedeniyle kullanılamamaktadır. MEEKC yönteminde analitin mikroemülsiyon elektrolit çözeltisi içinde hazırlanması gerekir. Aksi halde, yani analit su içinde enjekte edildiğinde, ayırma verimi düşer. Bunun nedeni, analitin enjeksiyon bölgesi ile mikroemülsiyonun kapiler içerisinde komşu halde bulunması ve kullanılan suyun mikroemülsiyonun yapısını organik ve su fazı olarak ayırarak bozmasıdır. Bu durum kapasite faktörünün azalması ve pik kuyruklanmasına neden olur. İki yöntemin prensiplerinin benzer oluşu yanında MEEKC sistemlerinin daha kompleks oluşu, MEEKC'in daha zahmetli; fakat aynı zamanda daha avantajlı olmasını sağlar. Bu avantajlar oluşan mikroemülsiyon yapısının, misel yapısına oranla daha az rijid olması ve kütle transferinin daha yüksek olmasıdır. MEKC'de daha rijid olan misel yapısına analitlerin adsorpsiyonu daha zor olacağı için, MEEKC daha fazla analit ile çalışabilme seçeneği sunabilmekte,

yapısındaki ko-surfaktan ile de daha yüksek verimlilikte kütle transferi sağlamaktadır. İki yöntemi ayırma yöntemlerinde sıklıkla kullanılan ve CZE'ye göre duyarlılığı daha iyi olan HPLC ile kıyasladığımızda ise, oluşan misel veya organik organik damlacığının yalancı sabit faz olduğunu düşünerek, her iki yöntemdeki sabit faz partiküllerinin HPLC'ye oranla daha küçük olduğu ve şekillerinin daha homojen olduğu söylenebilir. Ayrıca sistemde mobil fazın hareketi için basınca ihtiyaç yoktur⁶¹.

5.2. Literatür Bulgularıyla Karşılaştırma

Literatürde, GUA için geliştirilen MEKC yöntemiyle kapsül preparatından tayin gerçekleştirilmiştir. MEKC sisteminde kullanılan BGE 50 mM SDS içeren pH 8.5 100 mM Tris tamponudur ve GUA için bulunan LOD değeri (1000 ng mL^{-1}), çalışmamızda MEKC ve MEEKC ile elde edilen LOD değerlerinin (0.56 ve $0.45 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$) yaklaşık iki katı kadardır²⁹. Bir diğer çalışmada ise, farmasötik bir preparattan GUA'nin de dahil olduğu bileşenler için MEEKC yöntemi ile ayırma ve tayin gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada kullanılan BGE sistemi pentan, 1-butanol, 2-propanol, SDS ve 10 mM sodyum tetraborat ile oluşturulan mikroemülsiyona modifiye edici ajan 3 mM 2,6-di-O-metil- β -CD eklenmesi ile oluşturulmuştur. Çalışma sonucunda elde edilen LOD değerleri tüm aktif bileşenler için 0.6 - $4.2 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ aralığında olup, çalışmamızda her iki yöntemle elde edilen LOD değerleri bu aralığın alt sınırından düşüktür³⁰. NE tayini için, geliştirilen MEKC yönteminde BGE olarak 30 mM SDS içeren Tris-borat tamponu kullanmıştır. Geliştirdiğimiz yöntemlerle NE için elde edilen LOD değerleri her iki yöntemde $0.38 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ iken, araştırmacılar LOD değeri olarak $1.0 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ bulmuştur⁵⁶. NE için geliştirilen bir diğer CE yönteminde kullanılan CD içeren BGE çözeltisi ile, NE için LOD ve LOQ değerleri sırasıyla $0.4 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ ve $1.2 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ olarak elde edilmiştir⁵⁵. Bu değerler yanında bizim NE için elde ettiğimiz LOD değerleri daha düşüktür.

Literatür taramasında bazı kromatografik yöntemlerin de, duyarlılık açısından geliştirdiğimiz yöntemlere göre dezavantajlı olduğu görülmüştür. Şurup preparatından GUA tayini HPLC-UV yöntemi ile gerçekleştirilmiş ve GUA için LOD değeri $1.9 \mu\text{g.mL}^{-1}$, LOQ değeri ise $5.9 \mu\text{g.mL}^{-1}$ olarak bulunmuştur¹³. RPLC-UV yönteminde ise, GUA için elde edilen LOD ve LOQ verileri sırasıyla $3.95 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ve $11.98 \mu\text{g.mL}^{-1}$ dir. MEKC ve MEEKC yöntemleriyle GUA için elde ettiğimiz LOD ve LOQ değerleri bu çalışmalardaki değerlerden düşüktür⁶⁸. HPLC-UV ile yapılan bir çalışmada ise EPH ve NE için bulunan LOD değer aralıkları $0.34-51.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ve $0.40-0.50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ olarak verilmiştir⁶⁹. Başka bir HPLC-UV yönteminde ise EPH için bulunan LOD değeri $0.4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ olup, MEKC ile elde ettiğimiz EPH için LOD değeri bu değerlere göre daha düşüktür⁷⁰.

5.3. Validasyon ve SUT

Çalışmamızda MEKC ve MEEKC yöntemleri için optimizasyon çalışmaları sonrası ideal koşullar belirlenmiş ve yöntemler için validasyon ve Sistem Uygunluk Testleri (SUT) yapılmıştır. Her iki yöntemde de elde edilen kalibrasyon denklemleri istatistiksel olarak incelenmiştir. Buna göre eğimin sıfırdan farkı değerlendirilmiş ve her iki yöntemde de elde edilen eğim değerleri için farkın anlamlı olduğu sonucuna varılmıştır. Ayrıca elde edilen eğimlerin güven aralıkları saptanmış, aynı yöntemle yapılan iki çalışmadaki eğimler kıyaslanmıştır. Her bir analit için incelenen bu değerler tekrarlanabilirlik açısından önemlidir. Her iki yöntemde eğimlerin anlamlı farklara sahip olmadığı iki kalibrasyon denklemi elde edilmiştir. Bu da her iki yöntemin de, farklı çalışmalarda farklı kalibrasyon denklemleri ile elde edilen sonuçlarının güvenilirliğini göstermektedir.

Duyarlılık açısından, EPH dışındaki analitler için MEEKC ile elde edilen LOD sonuçları MEKC'e göre daha düşüktür. Ham veri olarak elektroferogram sonuçlarından sinyalleri incelediğimizde, MEEKC ile elde edilen pik alanları çok daha yüksekken, gürültü sinyalinin yüksekliğinden kaynaklı bir duyarlılık kaybı olduğu söylenebilir. Gün içi tekrarlanabilirlik sonuçlarına bakıldığında, %RSD değerleri, EPH haricindeki analitler için MEKC'de daha düşüktür. Genel olarak iki yöntem baktığımızda ise, %RSD değerleri 2'den küçüktür⁶⁵. EPH için bulunan günüçi %RSD değeri ise 2'den yüksektir. Günlerarası tekrarlanabilirlik açısından MEEKC ile elde edilen tüm % RSD değerleri MEKC'e göre yüksektir. İki yöntem sonuçları, ortalamalar açısından Student t testi ve kesinlik açısından Fisher testi ile kıyaslanmıştır. Student t testinde, yalnızca NE sonuçlarının iki yöntem açısından anlamlı farka sahip olduğu, diğer analitler için her iki yöntem sonuçları arasında anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür. Fisher testinde ise tüm analitler için her iki yöntem sonuçları arasında anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür.

Sistem Uygunluk Testleri açısından yöntemlerin değerlendirilmesi Avrupa Farmakopesi parametrelerine göre yapılmıştır⁶⁴. Pik simetrisi (As) için elde edilen değerler MEKC ile elde edilen EPH piki haricinde 2'nin altında bulunmuştur⁶⁶. Tabaka sayısının her iki yöntem için de 2000'den yüksek olması ve rezolüsyonun 2'nin üzerinde olması yöntemin geçerliliğinin göstergesidir⁶⁵.

6. SONUÇ

EPH, NE, GUA ve MP dörtlü karışımının ayrımı ve tayini amacıyla MEKC ve MEEKC yöntemleri geliştirildi ve optimize edildi. Her iki yöntem için BGE zeltisi, surfaktan, tampon pH ve konsantrasyonu ve ayrıca cihaz parametreleri optimizasyonları yapıldı. Optimizasyon çalışmalarında bir parametre incelenirken tüm diğer parametreler sabit tutuldu. Optimum koşullarda farmasötik şurup numunelerinde yapılan tayinler sonucu elde edilen LOD değerleri her iki yöntemin de duyarlı olduğunu gösterdi. Validasyon çalışmalarıyla yöntemlerin doğruluğu ve tekrarlanabilirliği gösterildi. İki yöntem kıyasladığında EPH dışındaki diğer analitler için MEEKC yönteminin daha duyarlı olduğu görüldü. Tekrarlanabilirlik ve geri kazanım açısından MEKC yöntemi ile daha iyi sonuçlar elde edildi. Sonuçta her iki yöntem de duyarlılık, doğruluk, tekrarlanabilirlik ve seçicilik açısından avantajlıdır.

7. ÖZET

Farmasötik Şuruplarda Kapiler Elektroforez Yöntemi ile Efedrin, Norefedrin ve Guafenezin Miktar Tayini

Efedrin, Norefedrin, Guafenezin ve Parabenler'in tayini amacıyla, iki yöntem geliştirilmesi ve karşılaştırılması amaçlanmıştır. Mikroemülsiyon elektrokinetik kromatografi (MEEKC) ve misel elektrokinetik kromatografi (MEKC) yöntemleri kullanılarak, tampon pH'ı, tampon konsantrasyonu, surfaktan konsantrasyonu, ko-surfaktan konsantrasyonu, organik fazı oluşturan çözücünün konsantrasyonu optimizasyonları ile, en uygun ayırma ve tayini gerçekleştirmek amaçlanmıştır. MEKC için en iyi sonuçlar elektrolit çözeltisinin 70 mM SDS içerdiği pH 9.5, 5 mM borat tamponu ile elde edilmiştir. Ayrıca çözeltiliye organik modifiye edici ACN, %15 oranında eklenmiştir. Kapiler koşulları da optimize edilerek, 20 s enjeksiyon süresi ve 30 °C kaset sıcaklığı optimum değer olarak seçilmiş, ayırma için +22 kV kullanılmıştır. MEEKC için yapılan optimizasyon çalışmalarında, pH 11, 10 mM Borat tamponu %96.7 (a/a) oranında olacak şekilde, buna ek olarak %1.4 SDS, %1.2 1-butanol ve % 0.7 etil asetat bulunan bir elektrolit çözeltisinin kullanılması ile ayırım sağlanmıştır. 20 s enjeksiyon süresi ve 40 °C kaset sıcaklığı kullanılmıştır. Kalibrasyon çalışmaları ile yöntemlerin doğrusalıkları incelenmiştir. Validasyon çalışmalarında bulunan LOD değerleri, GUA, MP, NE ve EPH için sırasıyla MEKC yönteminde 0.56; 0.72; 0.38 ve 0.25 µg.mL⁻¹ olarak hesaplanmış, MEEKC yönteminde ise 0.45; 0.61; 0.38 ve 0.46 µg.mL⁻¹ olarak hesaplanmıştır. LOQ değerleri ise, ilk yöntemde, 1.68; 2.17; 1.13 ve 0.76 µg.mL⁻¹ iken, ikinci yöntemde 1.36; 1.86; 1.15 ve 1.38 µg.mL⁻¹ olarak bulunmuştur. Son olarak şurup preparatının analizi ve geri kazanım çalışması yapılmış, bulunan sonuçlar istatistiksel olarak incelenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Kapiler Elektroforez, MEKC, MEEKC, Guafenezin, Efedrin, Norefedrin, Farmasötik şurup

8. SUMMARY

Determination of Ephedrine, Norephedrine and Guaifenesin in Syrup Preparations by Capillary Electrophoresis

The aim of the study was to develop and compare two capillary electrophoresis methods for the determination of Ephedrine, Norephedrine, Guaifenesin and Methylparaben. In MEEKC and MEKC methods, parameters were optimized according to the best separation and determination results. In MEKC method, the best results were obtained by using a pH 9.5, 5 mM borate buffer electrolyte solution including 70 mM SDS and 15% ACN. While optimizing the capillary conditions, the best separation was obtained by using 30°C cassette temperature and +22 kV separation voltage with an injection time of 20 s. In MEEKC, the optimum conditions were obtained by using a mixture of pH 11, 10 mM borate buffer 96.7% (w/w) and 1.4% SDS, 1.2% 1-butanol and 0.7% ethyl acetate in microemulsion solution. Injection time of 20 s and temperature of 40°C were chosen for the separation. The linearity of the methods were between 1-25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for both MEKC and MEEKC. In validation studies, the LOD and LOQ values for GUA, MP, NE and EPH were found to be 0.56; 0.72; 0.38 and 0.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and 0.45; 0.61; 0.38 and 0.46 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ respectively by MEKC. In MEEKC LOD and LOQ values for the analytes were found to be 1.68; 2.17; 1.13; 0.76 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and 1.36; 1.86; 1.15 and 1.38 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ respectively. Finally, the recovery studies were obtained by the analysis of the syrup preparation and the results were analyzed statistically.

Keywords: Capillary Electrophoresis, MEKC, MEEKC, Guaifenesin, Ephedrine, Norephedrine, Pharmaceutical syrup

9. KAYNAKLAR

1. British Pharmacopeia, Her Majesty's stationary Office: London; 2009.
2. World Anti-doping Agency (WADA). The 2007 Prohibited List, 2006.
3. Segura J., Ventura R., Marcos J., Gallego R.G. Forensic Science Handbook of Analytical Separation. 2nd Edt. Amsterdam: Elsevier; 2008.
4. Wooltorton E, Sibbald B. Ephedra/ephedrine: Cardiovascular and CNS Effects. CMAJ 2002;166(5):633.
5. Wilkinson G.R, Beckett A.H. Absorption, Metabolism and Excretion of the Ephedrine in Man. I. The Influence of Urinary pH and Urine Volume Output. JPET 1968; 162:139-147.
6. Csajka C, Haller C.A, Benowitz N.L, Verotta D. Mechanistic Pharmacokinetic Modelling of Ephedrine, Norephedrine and Caffeine in Healthy Subjects. Br J Clin Pharmacol 2005; 59:335-345.
7. Vural N, Saygı Ş. İnsanlarda Efedrin Atılımının İdrar pH'sına Bağlı Olarak Değişimi. JTPA 1988; 60(1):5-9.
8. Abourashed E.A, El-Alfy A.T, Khan I.A, Walker L. Ephedra in Perspective- Current Review. Phytother Res 2003; 17:703-712.
9. The Merck Index, An Encyclopedia of Chemical Drugs and Biologicals. 10th Edt. Rahway,NJ.USA:Merck and Co Inc; 1983.

- 10.** Haller C.A, Jacob P, Benowitz N.L. Pharmacology of Ephedra Alkaloids and Caffeine after Single-dose Dietary Supplement Use. *Clin Pharmacol Ther* 2002;71:421-432.
- 11.** Rowe R.C, Sheskey P.J, Owen S.C. Handbook of Pharmaceutical Excipients. 5th Edt. Londra-Chicago: AphA (Pharmaceutical Press-American Pharmacist Association); 2006.
- 12.** Shabir G.A. Determination of Guaiphenesin and Sodium benzoate in Liquifruta Garlic Medicine Cough Medicine by High Performance Liquid Chromatography. *J Anal Chem* 2011;66:963-968
- 13.** Dönmez Ö, As B, Bozdoğan A, Sungur S. Simultaneous Determination of Potassium Guaiacolsulfonate, Guaifenesin, Diphenhydramine HCl and Carbetapentane citrate in Syrups by Using HPLC-DAD. *Talanta* 2011;83:1601-1605.
- 14.** Louhaichia M.R, Jebali S, Loueslatia M.H, Adhoumb N, Monserb L. Simultaneous Determination of Pseudoephdrine, Pheniramine, Guaifenesin, Pyrilamine, Chlorpheniramine and Dextromethorphan in Cough and Cold Medicines by High Performance Liquid Chromatography. *Talanta* 2009;78:991-997.
- 15.** Grosa G, Grosso E.D, Russo R, Allegrone G. Simultaneous, Stability Indicating, HPLC-DAD Determination of Guaifenesin and Methyl and Propyl-parabens in Cough Syrup. *J Phar Biomed Anal* 2006;41:798-803.
- 16.** Wilcox M.L, Stewart J.T. HPLC Determination of Guaifenesin with Selected Medications on Underivatized Silica with an Aqueous-organic Mobile Phase. *J Phar Biomed Anal* 2000;23:909-916.

- 17.** Maithani M, Sahu S, Chaudhary A.K, Singh R. Development and Validation of a Novel RP-HPLC Method for Simultaneous Determination of Salbutamol sulfate, Guaifenesin and Ambroxol hydrochloride in Tablet Formulation. *J Liq Chromatogr R T* 2012; 35:1156-1170.
- 18.** Hatami M, Farhadi K, Abdollahpour A. Using Dispersive Liquid-liquid Microextraction and Liquid Chromatography for Determination of Guaifenesin Enantiomers in Human Urine. *J Sep Sci* 2011;34:2933-2939.
- 19.** Emara S, Kamal M, Hadad G, ZaaZaa H, Kawi M.A. Back-flush Column-switching Technique for on-line Sample Cleanup and Enrichment to Determine Guaiphenesin in Human Serum. *J Liq Chromatogr R T* 2012;35:15-27.
- 20.** Eichhold T.H, McCauley-Myers D.L, Khambea D.A, Thompsonb G.A, Hoke S.T. Simultaneous Determination of Dextromethorphan, Dextrophan, and Guaifenesin in Human Plasma using Semi-automated Liquid/liquid Extraction and Gradient Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *J Phar Biomed Anal* 2007;43:586-600.
- 21.** Chen X, Huang J, Kong Z, Zhong D. Sensitive Liquid Chromatography–tandem Mass Spectrometry method for the Simultaneous Determination of Paracetamol and Guaifenesin in Human Plasma. *J Chromatogr B* 2005;817:263-269.
- 22.** Wen J, Zhang H, Xia C, Hu X, Xu W, Cheng X, Gao J, et al. A Sensitive Liquid Chromatography–electrospray ionization–mass Spectrometry Method for the Simultaneous Determination of Pentoxyverine citrate and Guaifenesin in Human Plasma. *Biomed Chromatogr* 2010;24:351-35.

- 23.** Sheen J.F, Her G.R. Analysis of Neutral Drugs in Human Plasma by Fluoride Attachment in Liquid Chromatography/negative Ion Electrospray Tandem Mass Spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2004;18:1911-1918.
- 24.** Harsono T, Yuwono M, Indrayanto G. Simultaneous Determination of Some Active Ingredients in Cough and Cold Preparations by Gas Chromatography, and Method Validation. *J AOAC Int* 2005;88(4):1093-1098.
- 25.** Sharaf M.H.M, Stiff D.D. Determination of Guaifenesin in Human Serum by Capillary Gas Chromatography and Electron Capture Detection. *J Phar Biomed Anal* 2004;35:801-806.
- 26.** Denola N.L, Quiming N.S, Saito Y, Catabay A.P, Jinno K. Sensitive Micellar Electrokinetic Chromatographic Determination of Salbutamol, Guaifenesin, and Dyphylline in Oral Formulations. *J Liq Chromatogr R T* 2009;32:1407-1422.
- 27.** Lin Y-T, Kou H-S, Wu H-L. A Simple Micellar Electrokinetic Capillary Chromatographic Method for the Quantitative Analysis of Organic Expectorants. *Electrophoresis* 2008;29:3524-3530.
- 28.** Pomponio R, Gotti R, Hudaib M, Adrisano V, Cavrini V. Analysis of Guaifenesin-based Cough Syrups by Micellar Electrokinetic Chromatography and GC-MS. *J Sep Sci* 2001;24:258-264.
- 29.** Xu X, Stewart J.T. MEKC Determination of Guaifenesin, Pseudoephedrine and Dextrometorphan in a Capsule Dosage Form. *J Liq Chromatogr R T* 2000;23(1):1-13.

- 30.** Okamoto H, Nakajima T, Ito Y, Aketo T, Shimada K, Yamato S. Simultaneous Determination of Ingredients in a Cold Medicine by Cyclodextrin-modified Microemulsion Electrokinetic Chromatography. *J Phar Biomed Anal* 2005;37:517-528.
- 31.** Okamura N, Miki H, Harada T, Yamashita S, Masaoka Y, Nakamoto Y, Tsuguma M., Yoshitomi H, Yagi A. Simultaneous Determination of Ephedrine, Pseudoephedrine, Norephedrine and Methylephedrine by High-Performance Liquid Chromatography. *J Phar Biomed Anal* 1999; 20:363-372.
- 32.** Ouyang J., Gao X., Baeyens W.R.G., Delanghe J.R. Determination of Ephedrine and Related Compounds in Pharmaceutical Preparations by Ion Chromatography with Direct Conductivity Detection. *Biomed Chromatogr* 2005;19:266-271.
- 33.** Aymard G, Labarthe B, Warot D, Berlin I, Diquet B. Sensitive Determination of Ephedrine and Norephedrine in Human Plasma Samples Using Derivatization with 9-fluorenylmethyl Chloroformate and Liquid Chromatography. *J Chromatogr B* 2000;744:25-31.
- 34.** Chan K.H, Pan R-N, Hsu M-C. Simultaneous Quantification of six Ephedrines in Urine by High- Performance Liquid Chromatography. *Biomed Chromatogr* 2005;19:337-342.
- 35.** Apollonio L.G., Pianca D.J., Whittall I.R., Maher W.A., Kyd J.M. A Demonstration of the use of Ultra-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry [UPLC/MS] in the Determination of Amphetamine-type Substances and Ketamine for Forensic and Toxicological Analysis. *J Chromatogr B* 2006;836:111-115.

- 36.** Lee K.M, Kim H.J, Jeong E.S, Yoo H.H, Kwon O.S, Jin C et al. Simple and Accurate Quantitative Analysis of Seven Prohibited Threshold Substances in Human Urine by Liquid Chromatography/tandem Mass Spectrometry in Doping Control. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2011;25:2261-2267.
- 37.** Cooper S.D, Fletcher B.L, Silinski M.A.R, Brown S.S, Lodge J.W, Fernando R.A. Determination of L-Ephedrine, Pseudoephedrine, and Caffeine in Rat Plasma by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *J Anal Toxicol* 2011;35:341-348.
- 38.** Wu H, Xiong X, Huang X, Zhu Z, Huang F, Lin X. Simultaneous Determination of 17 Toxic Alkaloids in Human Fluids by Liquid Chromatography Coupled with Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *J Liq Chrom & Rel Technol* 2013; 36:1149-1162.
- 39.** M-H.E.Spyridaki, Tsitsimpikou C.J., Sisko P.A., Georgakopoulos C.G. Determination of Ephedrines in Urine by Gas Chromatography-mass Spectrometry. *J Chromatogr B* 2001;758:311-314.
- 40.** Wang S-M., Lewis R.J., Canfield D., Li T-L., Chen C-Y., Liu R.H. Enantiomeric Determination of Ephedrines and Norephedrines by Chiral Derivatization Gas Chromatography-mass Spectrometry Approaches. *J Chromatogr B* 2005;825:88-95.
- 41.** Liu Y-M, Li J, Yang Y, Du J, Mei L. Separation and Determination of Ephedra Alkaloids in Traditional Chinese Medicine and Human Urines by Capillary Electrophoresis Coupled with Electrochemiluminescence Detection. *Can J Chem* 2012;90:180-185.

- 42.** Deng D-L, Zhang J-Y, Chen C, Hou X-L, Su Y-Y, Wu L. Monolithic Molecular Imprinted Polymer Fiber for Recognition and Solid Phase Microextraction of Ephedrine and Pseudoephedrine in Biological Samples Prior to Capillary Electrophoresis Analysis. *J Chromatogr A* 2012; 1219:195-200.
- 43.** Yang R, Zeng H-J, Li J-J, Zhang Y, Li S-J, Qu L-B. Capillary Electrophoresis Coupled with End-column Electrochemiluminescence for the Determination of Ephedrine in Human Urine, and a Study of its Interactions with Three Proteins. *Luminescence* 2011; 26: 374–379.
- 44.** Liu Y.M, Peng L.F, Mei L, Liu L.M. Determination of Diastereoisomeric Alkaloids in Urine by Capillary Electrophoresis with Electrochemiluminescence Detection. *CCL* 2011;22:197-200.
- 45.** Lu M, Li Q, Lai Y, Zhang L, Qiu B, Chen G, et al. Determination of Stimulants and Narcotics as well as Their in vitro Metabolites by Online CE-ESI-MS. *Electrophoresis* 2011;32:472-478.
- 46.** Alshana U, Goger N, Ertas N. Ultrasound-assisted Emulsification Microextraction for the Determination of Ephedrines in Human Urine by Capillary Electrophoresis with Direct Injection. Comparison with dispersive liquid–liquid Microextraction. *J Sep Sci* 2012;35:2114-2121.
- 47.** Mateus-Avois L, Mangin P, Saugy M. Development and Validation of a Capillary Zone Electrophoresis Method for the Determination of Ephedrine and Related Compounds in Urine without Extraction. *J Chromatogr B* 2003; 791:203-216.

- 48.** Fang H, Liu M, Zeng Z. Solid-phase Microextraction Coupled with Capillary Electrophoresis to Determine Ephedrine Derivatives in Water and Urine Using a Sol-gel Derived butyl methacrylate/silicone Fiber. *Talanta* 2006;68:979-986.
- 49.** Dong Y, Chen Y, Chen X, Hu Z. Method for Derivatization of Ephedrine and Pseudoephedrine in Nonaqueous Media and Determination by Nonaqueous Capillary Electrophoresis with Laser Induced Fluorescence Detection. *Biomed Chromatogr* 2006;20:1150-1156
- 50.** Zhang L, Wang R, Yu Y, Zhang Y. Capillary Electrophoresis with Laser-induced Fluorescence and pre-column Derivatization for the Analysis of Illicit Drugs. *J Chromatogr B* 2007;857:130-135.
- 51.** Xie J, Zhang J, Liu J, Tian J, Chen X, Hu Z. Micellar Electrokinetic Chromatography with Laser-induced Fluorescence Detection for Sensitive Determination of Ephedrine and Pseudoephedrine. *J Sep Sci* 2004; 27:1211-1214.
- 52.** Rind F.M.A, Khuhawar M.Y, Rajper A.D. HPLC Determination of Phenylpropanolamine in Pharmaceutical Preparations using 4-dimethylaminobenzaldehyde as a Derivatizing Reagent. *J Phar Biomed Anal* 2001; 26:331-336.
- 53.** Cháfer-Pericás C, Campíns-Falcó P, Herráez-Hernández R. Application of Solid-phase Microextraction Combined with Derivatization to the Enantiomeric Determination of Amphetamines. *J Phar Biomed Anal* 2006 ; 40:1209-1217.

- 54.** Abbasi K, Bhanger M.I, Khuhawar M.Y. Capillary Gas Chromatographic Determination of Phenylpropanolamine in Pharmaceutical Preparation. *J Phar Biomed Anal* 2006;41:998-1001.
- 55.** Kokiashvili N.G, Wongwana S, Landgraf C, Michaelis K, Hammitzsch-Wiedemanna M, Scribaa G.K.E. Profiling of Levoamphetamine and Related Substances in Dexamphetamine sulfate by Capillary Electrophoresis. *J Phar Biomed Anal* 2009;50:1050-1053.
- 56.** Buiarelli F, Coccioli F, Josionowska R, Terracciano A. Development and Validation of an MEKC Method for Determination of Nitrogencontaining drugs in Pharmaceutical Preparations. *Electrophoresis* 2008;29:3519-3523.
- 57.** Baker D.R. *Capillary Electrophoresis*. 1st Edt. Canada: A Wiley-Interscience Publication;1995.
- 58.** Altria K.D. Overview of Capillary Electrophoresis and Capillary Electrochromatography. *J Chromatogr A* 1999;856:443-463.
- 59.** Kim J-B, Terabe S. On-line Sample Preconcentration Techniques in Micellar Electrokinetic Chromatography. *J Phar Biomed Anal* 2003; 30:1625-1643.
- 60.** Terabe S. Micellar Electrokinetic Chromatography for High-Performance Analytical Separation. *Chemical Record* 2008;8:291-301.
- 61.** Altria K.D. Background Theory and Applications of Microemulsion Electrokinetic Chromatography. *J Chromatogr A* 2000;892:171-186.

- 62.** Poole C.F, Wilson I.D, editors. Encyclopedia of Separation Science, Online Update. Oxford:Elsevier; 2007.
- 63.** Altria K.D. Application of Microemulsion electrokinetic Chromatography to the Analysis of a Wide Range of Pharmaceuticals and Excipients. J Chromatogr A 1999;844:371-386.
- 64.** European Pharmacopoeia: Supplement. 5th Edt. Council of Europe; 2005.
- 65.** USP32- NF 27. Rockville, MD: The United States Pharmacopeial Convention; 2008.
- 66.** Center for Drug Evaluation & Research, US Food and Drug Administration. Reviewer Guidance, Validation of Chromatographic Methods; FDA Rockville MD; 1994.
- 67.** Interactions 6-Volume Set.1st Edt. Alexander V. Lyubimov: John Wiley and Sons Inc; 2012.
- 68.** Elkady E.F. Simultaneous Determination of Diclofenac potassium and Methocarbamol in Ternary mixture with Guaifenesin by Reversed Phase Liquid Chromatography. Talanta 2010;82:1604-1607.
- 69.** Sheu S.J., Huang M.H. Determination of Ephedra Alkaloids by High-Performance Liquid Chromatography. Chromatographia 2001;54:117-119.
- 70.** Li H-X., M-Y., Lv K., Yu J-Y. Simultaneous Separation and Determination of Ephedrine Alkaloids and Tetramethyl-pyrazine in Ephedra sinica stapf by HPLC. J Liq Chrom & Rel Technol 2002 ; 25(2):313-320.

71. Hou J, Zheng J, Rizvi SA, Shamsi SA. Simultaneous chiral separation and determination of ephedrine alkaloids by MEKC-ESI-MS using polymeric surfactant I: method development. *Electrophoresis* 2007;28:1352-1363

72. Deepak S.N, Vedha Hari B.N. Optimization, Development and evaluation of Microemulsion for the release of combination of Guaifenesin and Phenylephrine. *JAPS* 2013;3:48-56

10. TEŞEKKÜR

Doktora tezimi planlayan ve yöneten, hoşgörü ve anlayışla her konuda yanımda olan sevgili tez hocam **Prof. Dr. Nilgün GÜNDEM GÖĞER**'e,

Çalışmalarımda yaşadığım her zorlukta danışabildiğim, bilimsel katkılarıyla yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen Sayın **Prof. Dr. Nusret ERTAŞ**'a,

Bilgi ve deneyimleriyle yanımda olan, tecrübeleriyle her zaman yol gösteren Sayın **Prof. Dr. M. Tevfik ORBEY**'e,

Yardımlarını esirgemeyen hocalarım **Prof. Dr. Hasan BASAN** ve **Doç. Dr. Uğur TAMER**'e,

Her zaman çekinmeden herşeyi sorabildiğim sevgili arkadaşım **Doç. Dr. H. Eda ŞATANA KARA**'ya,

İçtenliği, gülümseyen yüzü ile her zaman moral veren **Uzm. Şebnem YILMAZ**'a,

Oda arkadaşlarım, okuldaki ailem, her şeyi paylaştığımız ve sabırla hep yanımda olan çok sevgili arkadaşlarım **Yard. Doç. Dr. Aysel PEHLİVAN BERKKAN** ve **Uzm. Dr. Orkun ALP**'e,

Çok sevgili arkadaşlarım **Arş. Gör. Hilal TORUL**, **Arş. Gör. Merve ERYILMAZ**, **Arş. Gör. Hüma YILMAZ** ve **Arş. Gör. Üzeyir DOĞAN**'a,'a,

Her zaman, her konuda yanımda olan, moralini ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen çok sevdiğim canım dostum **Arş. Gör. Dr. N. Başaran MUTLU AĞARDAN**'a,

Hem iyi günde hem de kötü günde hep yanıbaşımdaya olan, yardım ve desteği ile bana güven veren çok sevgili dostum **Feriba TURHAN**'a,

Birçok konuda farklı bakış açıları kazanmamı sağlayan, bilgisine çok güvendiğim sevgili arkadaşım **Soner AĞARDAN**'a,

Uzakta olmalarına rağmen desteklerini her zaman hissettiren çok sevgili arkadaşlarım **Derya GÜVEN** ve **Kaan GÜVEN**'e,

Her zaman yanımda olan **Nurcan BAŞ**, **Hayri BAŞ**, **Evren BAŞ GÜNDOĞAN** ve **Tuğrul GÜNDOĞAN**'a,

Herşeyimi paylaştığım, her zorlukta yanımda olan ve çözümler bulan, hep yanımda olan kardeşim **Nazlı TOPBAŞI SİNANOĞLU**'na,

Herşeyden çok sevdiğim, bir tanecik kardeşim **Sinan YARIMKAYA**'ya,

Hayat boyu her kararına saygı gösteren, beni bugünlere getiren, her zaman yanımda olan, sevdiğimi her zaman hissettiren ve çok sevdiğim canım annem **Ferhan YARIMKAYA** ve canım babam **Kemal YARIMKAYA**'ya,

Her zaman sabırla bana destek veren, her konuda bana sonuna kadar inanan, iyi günde ve kötü günde hep yanımda olan, sevgili eşim **Erdem BAŞ**'a

En içten teşekkürlerimi sunarım...

11. ÖZGEÇMİŞ

Adı: Sezen

Soyadı: YARIMKAYA BAŞ

Doğum yeri ve tarihi: Ankara-16.01.1983

Eğitimi:

Doktora: Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı, (Şubat 2007-)

Yüksek Lisans: Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı, (2005-2007).

Yüksek Lisans Tezi

Akrilat Bazlı pH-Duyarlı Polimerler ile Sulu Ortamlardan Bakır(II)'nin Uzaklaştırılması ve Spektrofotometrik Yöntemle Tayini

Lisans: Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, 2004.

Yabancı Dili: İngilizce

YAYINLAR

Hasan BASAN Sezen YARIMKAYA (2013) A Novel Solid-Phase Extraction–Spectrofluorimetric Method for The Direct Determination of Atenolol in Human Urine. Luminescence, DOI: 10.1002/bio.2532

Sezen YARIMKAYA Hasan BASAN (2007) Synthesis and Swelling Behavior of Acrylate-Based Hydrogels. J Macromol Sci Pure 44 (7-9)(699-706).

Sezen YARIMKAYA Hasan BASAN (2007) Swelling Behavior of Poly(2-Hydroxyethyl Methacrylate-co-Acrylic Acid-co-Ammonium Acrylate) Hydrogels. J Macromol Sci Pure 44 (7-9)(939-946).

BİLDİRİLER

Yarımkaya, S., Ertaş,N., Göğer, N.G., 2012. Analysis of Antazolin and Naphazolin by Microemulsion Electrokinetic Chromatography, 10th Int. Symp. on Pharm. Sciences ANKARA

Yener,B., Yarımkaya,S., Ertaş,N., Göğer, N.G. , 2012. Separation and Determination of Paracetamol, Chlorpheniramin maleate, Pseudoephedrine HCl and Dextromethorphan HCl in Tablets using Capillary Zone Electrophoresis, 10th Int. Symp. on Pharm. Sciences ANKARA

Saçıntı,Ç., Yarımkaya Baş,S., Göğer,N.G. , 2012. Quantitative Determination of Lansoprazole and its Impurities by HPLC, 4th EuCheMS Chemistry Congress PRAG

Yarımkaya S., Alshana U., Ertaş N., Göğer N.G., 2011. Separation and determination of ephedrine, norephedrine and guaifenesin in pharmaceutical syrup and biological samples using micellar electrokinetic chromatography, 7th International Conference "IMA 2011-Instrumental Methods of Analysis-Modern Trends and Applications" Crete, Greece

Başmakçı, G., Şatana, H.E., Yarımkaya, S., Ertaş, N., Göğer, N.G., 2010. Simultaneous Determination of Dexphantenol, Mepyramine Maleate and Lidocaine Hydrochloride in Combined Pharmaceutical Gels by Capillary Electrophoresis, 28th International Symposium on Chromathography Valencia, Spain

Yarımkaya, S., Basan H., 2006. Piroxicam release from acrylate-based pH-sensitive hydrogels, 8th Int. Symp. on Pharm. Sciences ANKARA

PROJELER

Lansoprazol ve Safsızlıklarının HPLC ve CE ile tayini, Gazi Üniversitesi Araştırma Fonu Projesi No: 02/2012-13, **Nilgün Günden Göğer (Proje Yöneticisi), Sezen Yarımkaya Baş, Çağlar Saçını,** 2012- Proje devam etmekte.

Kapiler Elektroforez Yöntemiyle Efedrin, Pseudoefedrin ve Metabolitleri Norefedrin ve Norpseudoefedrin'in Tayini, Gazi Üniversitesi Araştırma Fonu Projesi No:02/2011-19 **Nilgün Günden Göğer (Proje Yöneticisi), Sezen Yarımkaya,** 2011-Proje tamamlandı.

Kapiler Elektroforez Yöntemiyle Farmasötik Formlarda Mepiramin Maleat, Lidokain HCl, Dekspantenol ve Benzalkonyum Klorür Miktar Tayini, Gazi Üniversitesi Araştırma Fonu Projesi No: 02/2009-13, **Nilgün Günden Göğer (Proje Yöneticisi), Eda ŞATANA, Şebnem YILMAZ, Sezen Yarımkaya,** 2009-Proje tamamlandı.