

TC.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ANALİTİK KİMYA ANA BİLİM DALI

**FARMASÖTİK FORMLARDA İLAÇ ETKEN MADDELERİNİN HPLC İLE
ENANTİYOMER TAYİNLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Hilal TORUL

Tez Danışmanı
Prof. Dr. M. Tefvik ORBEY

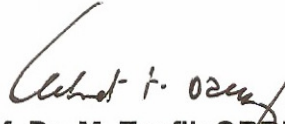
T.C.

GAZİ ÜNİVERSİTESİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

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

Tez Savunma Tarihi: 19/ 08/ 2009



Prof. Dr. M. Tefvik ORBEY
GAZİ Üniversitesi
Jüri Başkanı



Prof. Dr. Sibel ÖZKAN
ANKARA Üniversitesi



Doç. Dr. Uğur TAMER
GAZİ Üniversitesi

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa no</u>
Kabul Ve Onay	I
İçindekiler	II
Şekiller	X
Tablolar	XIII
Semboller ve Kısaltmalar	XV
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Hipertansiyon Hakkında Genel Bilgiler	3
2.2 Hipertansiyon Tedavisi ve Hipertansiyon İlaçlarının Sınıflandırılması	4
2.2.1 β -Adrenerjik Reseptör Blokerleri	5
2.3 Atenolol ile İlgili Genel Bilgiler	12
2.3.1 Kimyasal Yapısı Ve Fiziksel Özellikleri	12
2.3.2 Farmakokinetik Özellikleri	13
2.3.3 Yan Etkileri	13
2.4 Propranolol ile İlgili Genel Bilgiler	14
2.4.1 Farmakolojik Özellikleri	15

2.4.2	Farmakokinetik Özellikleri	15
2.4.3	Yan Etkileri	15
2.5	Kromatografi	16
2.5.1	Adsorbsiyon Kromatografisi	19
2.5.2	Dağılma Kromatografisi	19
2.5.2.1	Normal Faz Kromatografisi:	20
2.5.2.2	Ters Faz Kromatografisi	20
2.5.2.3	Polar Organik Faz	21
2.5.3	İyon Değişim Kromatografisi	21
2.5.4	Moleküler Eleme Kromatografisi	21
2.5.5	Afinite Kromatografisi	22
2.6	Kiral Ayırma İlkeleri	23
2.6.1	Kiral Ayırma İlkeleri Hakkında Ön bilgi	23
2.6.2	Dolaylı Ayırma	24
2.6.3	Direkt Ayırma	24
2.6.3.1	Çoklu Hidrojen Bağı Dizilişi	25
2.6.3.2	Kiral π -Donör, π- Akseptör Fazları	25
2.6.3.3	İyonik Etkileşimler	26
2.6.3.4	Kiral Yüzey Aktif Maddeler	27

2.6.3.5	Kiral Metal Kompleksler: Ligant Değişim	28
2.6.3.6	Siklodekstrinler (CD)	30
2.6.3.7	Karbonhidratlar	33
2.6.3.8	Makrosilik Antibiotikler	35
2.6.3.9	Kiral Taç Eterler	38
2.6.3.10	Kaliksarenler	40
2.6.3.11	Diğer Sentetik Makrosiklikler	40
2.6.3.12	Kiral Sentetik Polimerler	40
2.6.3.13	Moleküler Baskılanmış Polimerler	41
2.6.3.14	Kiral Selektör Olarak Proteinlerin Kullanımı	42
2.6.4	Farklı Yaklaşımlar	43
2.6.4.1	Susuz Kapiler Elektrophorez (CE)	43
2.6.4.2	İzotakoforez ve İzoelektrik Odaklanma	43
2.6.4.3	Enantiyomerik Akımı Ters Çevirme Düzeni	44
2.6.4.4	Biyolojik Numunelerde Bileşiklerin Kiral Analizi	44
2.6.4.5	Yeni Yaklaşımlar	45
2.6.4.6	Kiral Ayırma Metodu Seçimi	45
2.7	Kromatografi Ayırma Parametreleri	46
2.7.1	Alıkonma Zamanı (t_r)	47

2.7.2	Kapasite Faktörü (k')	48
2.7.3	Seçicilik Faktörü (α)	49
2.7.4	Kolon Ayırma Gücü (R_s)	50
2.7.5	Kolon Verimliliği	51
2.8	Analitik Yöntem Validasyonu	52
2.8.1	Yöntem Validasyonunun Basamakları	52
2.8.2	Analitik Yöntem Validasyon Parametreleri	53
2.8.2.1	Doğruluk	54
2.8.2.1.1	Referans Standart İle Karşılaştırmak	54
2.8.2.1.2	Kör Ortamına Analizi Yapılan Maddeyi İlave Etmek	54
2.8.2.1.3	Standart Ekleme Yöntemi İle Saf Madde İlavesi	54
2.8.2.2	Kesinlik	55
2.8.2.2.1	Tekrarlanabilirlik	55
2.8.2.2.2	Orta Kesinlik	56
2.8.2.2.3	Tekrar Elde Edilebilirlik	56
2.8.2.3	Gözlenebilme Sınırı (LOD)	57
2.8.2.4	Tayin Sınırı (LOQ)	57
2.8.2.5	Çalışma Aralığı	58
2.8.2.6	Doğrusallık	58

2.8.2.7	Kalibrasyon Grafiği	59
2.8.2.8	Seçicilik ve Özgünlük	59
2.8.2.9	Duyarlılık	60
2.8.2.10	Sağlamlık	61
2.8.2.11	Tutarlılık	62
2.9	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)	63
2.9.1	Sıvı Kromatografi Sistemleri	63
2.9.2	HPLC Cihazının Çalışma Prensibi	64
2.10.	Chirex 3022 Kolonunun Özellikleri	65
3. GEREÇ VE YÖNTEM		66
3.1	Kimyasal Maddeler ve Bileşikler	66
3.2	Kullanılan Cihazlar	66
3.3	Kullanılan Cam Malzemeler	67
3.4	Kullanılan Diğer Malzemeler	67
3.5	Kullanılan Farmasötik Preparatlar	67
3.6	Çözeltilerin Hazırlanması	68
3.6.1	Atenolol Stok Çözeltisi	68
3.6.2	Propranolol Stok Çözeltisi	68
3.6.3	Timolol Stok Çözeltisi	68

3.6.4	Standart Çözeltiler	68
3.6.5	Sistem Uygunluk Çözeltileri	69
3.6.5.1	Test Çözeltileri	69
3.6.5.2	Hareketli Faz Çözeltileri	69
3.7	Deneyin Yapılışı	70
3.8	HPLC Sistemi Optimizasyonu	71
3.8.1	Sabit Faz Seçimi	71
3.8.2	Hareketli Fazın Belirlenmesi	71
3.8.3	Akış Hızı ve Sıcaklığın Belirlenmesi	72
3.8.4	İç Standardın Belirlenmesi	73
3.9	Atenololün HPLC-UV Yöntemi ile Analizi için Sistem Uygunluk Testi Sonuçları	73
3.10	Propranololün HPLC-UV Yöntemi ile Analizi için Sistem Uygunluk Testi Sonuçları	73
3.11	Atenololün ve Propranololün Analizi için HPLC-UV Yönteminin Validasyonu	74
3.11.1	Atenolol ile Yapılan Çalışmada Doğrusallık ve Duyarlılık	74
3.11.2	Propranolol ile Yapılan Çalışmada Doğrusallık ve Duyarlılık	74

3.11.3	HPLC Yöntemiyle Yapılan Analizde Atenolol için Geri Kazanım	75
3.11.4	HPLC Yöntemiyle Yapılan Analizde Propranolol için Geri Kazanım	75
3.11.5	Atenolol ile Yapılan Çalışmada Doğruluk ve Kesinlik	76
3.11.6	Propranolol ile Yapılan Çalışmada Doğruluk ve Kesinlik	76
4. BULGULAR		77
4.1	HPLC-UV Yöntemi ile Yapılan Atenololün Analiz Sonucu	77
4.2	HPLC-UV Yöntemi ile Yapılan Propranololün Analiz Sonucu	77
4.3	Atenololün HPLC-UV Yöntemi ile Analizi için Sistem Uygunluk Testi Sonuçları	78
4.4	Propranololün HPLC-UV Yöntemi ile Analizi için Sistem Uygunluk Testi Sonuçları	78
4.5	Atenololün ve Propranololün Analizi için HPLC-UV Yönteminin Validasyonu	79
4.5.1	Atenolol ile Yapılan Çalışmada Doğrusallık ve Duyarlılık Analizi Sonuçları	79
4.5.2	Propranolol ile Yapılan Çalışmada Doğrusallık ve Duyarlılık Analizi Sonuçları	80

4.5.3	HPLC Yöntemiyle Yapılan Analizde Atenolol için Geri Kazanım Sonuçları	81
4.5.4	HPLC Yöntemiyle Yapılan Analizde Propranolol için Geri Kazanım Sonuçları	82
4.5.5	Atenolol ile Yapılan Çalışmada Doğruluk ve Kesinlik Sonuçları	83
4.5.6	Propranolol ile Yapılan Çalışmada Doğruluk ve Kesinlik Sonuçları	85
5. TARTIŞMA VE SONUÇ		87
6. ÖZET		91
7. SUMMARY		94
8. KAYNAKLAR		95
9. ÖZGEÇMİŞ		115
10. TEŞEKKÜR		116

ŞEKİLLER

	<u>Sayfa no</u>
Şekil 1. (S)-Propranolol ve (S)-Propafenonenin yapısı	8
Şekil 2. Atenololün Yapısı	12
Şekil 3. Propranololün Yapısı	14
Şekil 4. Kolonda Kromatografik Ayrımın Şematik Gösterimi	17
Şekil 5. Sıvı Kromatografi Uygulamaları	18
Şekil 6. Üç Nokta Etkileşim Modeli	24
Şekil 7. Pirkle-Tipi Kiral Sabit Fazları	26
Şekil 8. Mekk'in Ayırma İlkesinin Şematik Gösterimi	27
Şekil 9. Siklodekstrinlerin Yapıları	30
Şekil 10. Siklodekstrin Molekülünün Şematik Gösterimi	31
Şekil 11. Siklodekstrinin Kompleksi Kapsama Biçimi	33
Şekil 12. Selüloz ve Amilozun Sarmal Yapısı	34
Şekil 13. Polisakkaritlerin Yapısı	35
Şekil 14. Vankomisin Silika Sabit Fazın Sentez Planı	36

Şekil 15.	Glikopeptitlerin Silikaya Bağlanması Şematik Diyagramı	37
Şekil 16.	Glikopeptitlerin Yapısı	38
Şekil 17.	Bir Kiral Taç Eter İçindeki Aminin Steroselektif Yapısı	39
Şekil 18.	MIP Sentezindeki Basamaklar	41
Şekil 19.	Kolon Ayrım Gücünün Gösterildiği Bir Kromatogram	50
Şekil 20.	Bir Analitik Yöntemin Çalışma Aralığı, LOQ: Kantitatif Ölçüm Sınırı, LOD: Gözlenebilme Sınırı LOL: Doğrusal Cevap Sınırı	58
Şekil 21.	Chirex 3022 Kolon Dolgu Maddesi	65
Şekil 22.	Atenolol Enantiomerleri ile Yapılan Analiz Sonucunda Elde Edilen Kromatogram	77
Şekil 23.	Propranolol Enantiomerleri ile Yapılan Analiz Sonucunda Elde Edilen Kromatogram	77
Şekil 24.	(R)- ve (S)-Atenololün Kalibrasyon Grafiği	79
Şekil 25.	(R)- ve (S)-Propranololün Kalibrasyon Grafiği	80

Şekil 26.	Atenololün tablet formu ile yapılan analiz sonucunda elde edilen kromatogram	81
Şekil 27.	Propranololün tablet formu ile yapılan analiz sonucunda elde edilen kromatogram	82

TABLÖLAR

	<u>Sayfa no</u>
Tablo 1. Kiral Selektör Olarak Kullanılan Proteinler	42
Tablo 2. Atenolol ve Propranololün Tablet Formları	67
Tablo 3. Atenololün Sistem Uygunluk Parametreleri	78
Tablo 4. Propranololün Sistem Uygunluk Parametreleri	78
Tablo 5. Atenololün HPLC ile Tayininden Elde Edilen Kantitatif Parametreler	79
Tablo 6. Propranololün HPLC ile Tayininden Elde Edilen Kantitatif Parametreler	80
Tablo 7. (R)-Atenololün Geri Kazanım Sonuçları	81
Tablo 8. (S)-Atenololün Geri Kazanım Sonuçları	81
Tablo 9. (R)-Propranololün Geri Kazanım Sonuçları	82
Tablo 10. (S)-Propranololün Geri Kazanım Sonuçları	82
Tablo 11. Atenolol Enantiyomerlerinin Gün İçi Kesinlik Analiz Bulguları	83

Tablo 12.	Atenolol Enantiyomerlerinin Günler Arası Kesinlik	
	Analiz Bulguları	84
Tablo 13.	Propranolol Enantiyomerlerinin Gün İçi Kesinlik	
	Analiz Bulguları	85
Tablo 14.	Propranolol Enantiyomerlerinin Günler Arası	
	Kesinlik Analiz Bulguları	86
Tablo 15.	Atenolol ve propranololün enantiyomer ayrımı için	
	yapılan çalışmalar	90

SEMBOLLER ve KISALTMALAR

α	Alfa
β	Beta
π	Pi sayısı
$^{\circ}\text{C}$	Santigrad derece
μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre
mg	Milligram
ml	Millilitre
mm	Milimetre
ppm	Part of per million (milyonda kısım)
Hg	Cıva
Ca	Kalsiyum
K	Potasyum
P	Fosfat
SO_3^-	Sülfat
$\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$	Trimetilamin
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
UV	Ultra Violet (ultra viole ışın)
YKB	Yüksek Kan Basıncı
MVP	Mitral Kapak Prolapsusu
MI	Myocardial infarction (Kalp Krizi)
AV	Atrioventriküler
JNC	Amerikan Ulusal Birleşik Komitesi
TÇDD	Total Çevresel Damar Direnci
GC	Gaz kromatografi
SFC	Süper Kritik Akışkanlı Sıvı Kromatografisi
TLC	İnce Tabaka Kromatografisi
CE	Kapiler Elektroforez
CEC	Kapiler Elektrokromatografisi
CSP	Kısal Sabit Faz

LEC	Kiral Ligant Değişim Kromatografi
MEKC	Miseler Elektrokinetik Kapiler Kromatografi
CD	Siklodekstrinler
EOF	Elektro Ozmotik Akış
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
NMR	Nükleer Magnetik Rezonans
CTPC	Selüloz Trifenil Karbamat
MS	Kütle Spektrometresi
ITP	İzotakoforez
ITPCZE	İzotakoforez Kapiler Bölge Elektroforezi
EEO	Enantiyomerik Akımı Ters Çevirme Düzeni
EMO	Enantiyomerik Göç Düzeni
ELISA	Enzim-bağlı İmmüno-sorbent Assay
FIIA	Akış Enjekte İmmünoassay
t_R	Alıkonma Zamanı
k'	Kapasite Faktörü
t_M	Ölü Zaman
α	Seçicilik (Ayırma) Faktörü
R_s	Kolon Ayırma Gücü
W	Pik Genişliği
H	Tabaka Yüksekliği
N	Tabaka Sayısı
L	Kolon Uzunluğu
ISO/IEC	Uluslararası Standardizasyon Komitesi
VIM	Uluslararası Metroloji Sözlüğü
GLP	İyi Laboratuvar Uygulamaları
SOP	Standart Çalışma Yöntemi
LOD	Gözlenebilme Sınırı
LOQ	Tayin Sınırı
RSD	Bağıl Standart Sapma
SD	Standart sapma

m	Eğim
LOL	Doğrusal Cevap Sınırı
IUPAC	International Union Pure and Applied Chemists (Uluslar Arası Kuramsal Ve Uygulamalı Kimya Birliği)
WELAC	Western European Laboratory Accreditation Cooperation (Avrupa Test Laboratuvarları Birliği)
ICH	International Conference on Harmonization (Uluslararası Uyum Konferansı)
TFAA	Trifloroasetikasit
GA	Güven Aralığı

1. GİRİŞ

Tansiyon arteriyel *sistolik* ve *diastolik* olmak üzere iki bileşenden oluşur. Sistolik değer, kalp kasıldığında kalpten damarlara doğru atılan kanın damar duvarında yaptığı basınçtır. Diastolik değer ise kalp gevşediğinde hala damar duvarında mevcut olan basınçtır. Hipertansiyon, aşırı yüksek tansiyon demektir. Normal kan basıncı değerleri bireyden bireye değişkenlik göstermekle beraber, sırasıyla sistolik için en çok 130 mm Hg, diastolik için ise en çok 85 mm Hg olmalıdır. Bu değerler normal kan basıncı değerleri olarak kabul edilmektedir. Hipertansiyon sınırı ise sistolik kan basıncı için 140 mm Hg, diastolik kan basıncı için ise 90 mm Hg'dır.

Hipertansiyon tedavisinde başlıca altı sınıf ilaç kullanılır. β -bloker ilaçlar bu sınıflardan biridir. β -bloker ilaçların etki mekanizmaları tam olarak bilinmemesine rağmen hipertansiyon tedavisinde fazlaca kullanılırlar.

Bütün β -bloker ilaçlar bir amino alkol yan zinciri ve D-ve L-enantiyomerlerinin oluşmasını sağlayan asimetric bir karbon atoma sahiptir. Enantiyomerler aynı ortamda var olduklarında, eşit miktarlarda ancak zıt yönlerde düzlemsel polarize olmuş ışığı döndürmek hariç özdeş kimyasal ve fiziksel özelliklere sahiptirler. Rasemik karışımlar ise optik olarak etkin bir izomerin eşit parçalarının karışımına denir. β -bloker ilaçlar genellikle rasemik olarak üretilirler. Klinik uygulamalarda D- ve L-enantiyomerleri farklı farmakodinamik ve farklı farmakokinetik özellik gösterirler.

Yapılan çalışmalar sonucunda L-enantiyomerlerin β -reseptörlerini bloke etmede büyük oranda daha etkili olduğu bulunmuştur. Ayrıca D-enantiyomerlerin ilaç etkileşimlerini ve yan etkileri artırabileceği

bulunmuştur. Bu yüzden β -bloker etkisi olan L-enantiyomerleri saf olarak üretmek gerekir.

Atenolol ve propranolol, bu ilaçlardan ikisidir. Kiral özellik gösteren atenololun kalp üzerine selektif etkisi L-izomerinden ileri gelmektedir. Propranolol için ise L-propranolol, β -bloker olarak D-propranololden 100 kat daha etkilidir. Klinik çalışmalarda enantiyomerlerin önemli farklılıkları vardır. Bu yüzden vücut sıvıları ve dokulardan tayin edilmesinde kiral yöntemlerin kullanılması önerilmektedir.

Yapılan bu çalışmanın amacı yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) kullanılarak atenolol ve propranololün enantiyomerlerinin tayini için doğru, duyarlı, kesin, seçici ve tekrarlanabilir bir yöntem geliştirmek, ayrıca etken madde olarak atenolol ve propranololün kullanıldığı tablet formuna bu yöntemi uygulamaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hipertansiyon Hakkında Genel Bilgiler

Hipertansiyon (yüksek kan basıncı = YKB), sürekli yüksek arteriyel kan basıncı ile kendini gösteren sistemik bir hastalık olup, ciddi komplikasyonlara yol açması ve toplumda sık görülmesi nedeniyle önemli bir sağlık problemidir. Dünyada bir milyar kişiyi etkilediği düşünülmektedir.¹

Hipertansiyon ikiye gruba ayrılır.

1. Birincil (primer, idyopatik, esansiyel) hipertansiyon:

Birincil hipertansiyon, olguların yaklaşık %95'ini oluşturmaktadır. Uzun yıllar belirtisiz veya komplikasyonsuz olarak seyredebilir.

2. İkincil (sekonder) hipertansiyon:

Vakaların %5'lik bölümü ikincil hipertansiyondur ve bunun büyük çoğunluğu böbrek sebeplidir.

Etkin tedavi edilen YKB hastalarında inme, kalp yetersizliği, ve miyokard infarktüsü riskinde anlamlı azalmalar meydana gelmektedir.

Birincil hipertansiyonun nedeni bilinmemektedir; ancak katkıda bulunan mekanizmalar ve nedeni hakkında çeşitli görüşler mevcuttur. Arteriyel kan basıncını oluşturan faktörler, kalp debisi (kardiyak output) ve sistemik damar direncidir. YKB'den sorumlu mekanizma ne olursa olsun, bu iki faktörden biri ya da her ikisinde artış olmalıdır. Kalp debisini, atım hacmi ile kalp hızının çarpımı belirlerken, sistemik damar direncini, damar çapı, damar duvarının yapısı ve damar düz kaslarının tonüsü gibi faktörler belirler. Atım hacmini ön yük, art yük ve kalbin

kasılma gücü etkilerken, damar düz kaslarının tonüsünü nörojenik, humoral, miyojenik ve lokal damar faktörleri tayin eder.^{1,2}

2.2. Hipertansiyon Tedavisi ve Hipertansiyon İlaçlarının Sınıflandırılması

Halk sağlığı açısından bakıldığında hipertansiyon tedavisindeki temel hedef kalp damar morbidite ve ölüm oranını azaltmaktır. Birçok hastada, özellikle de 50 yaşın üzerindeki hipertansiflerde, sistolik kan basıncı hedefine ulaşıldığı zaman diyastolik kan basıncı hedefine de ulaşılmaktadır. Bu nedenle tedavideki temel hedef sistolik kan basıncını olması gereken noktaya çekmektir. Amerikan Birleşik Ulusal komitesinin 7. raporu hipertansiyon tedavisindeki yaklaşımları ve tedavi hedeflerini yeniden düzenlemiştir. Buna göre kan basıncını 140/90 mmHg'nın altına çekerek kalp damar hastalıklarına ait komplikasyonlarda azalma sağlandığı vurgulanmış ve şeker hastalığı ve böbrek yetersizliğindeki hedef 130/80mmHg olarak belirlenmiştir.

Komite raporunda bütün antihipertansif ilaçların kan basıncını düşürme üzerinde benzer etkileri olduğunu belirtmiştir. Ancak kalp damar ölüm oranı ve morbiditeyi önleme konusunda tiazid grubu diüretiklerin en iyi sonuçları verdiği belirtilmiş ve tiazid diüretiklerinin başlangıç tedavisinde tek veya kombine olarak kullanılması gerektiği vurgulanmıştır.

Hipertansiyon tedavisini iki ana başlıkta inceleyebiliriz:

1. İlaç dışı tedavi (yaşam tarzı düzenlemesi)
2. İlaç tedavisi

YKB'de ilaç tedavisine başlama kararını etkileyen temel faktörler; kan basıncı düzeyi, hedef organ hasarının varlığı ve klinik kalp damar hastalığı veya diğer risk faktörlerinin varlığıdır.^{1,2}

Tedavide kullanılan başlıca 6 antihipertansif ilaç sınıfı;

1. Diüretikler,
2. β blokerler,
3. Kalsiyum kanal blokerleri,
4. ADE inhibitörleri,
5. Anjiyotensin 2 reseptör antagonistleri
6. α adrenerjik blokerlerdir.

2.2.1. β -Adrenerjik reseptör blokerleri

β -adrenerjik reseptörleri bloke eden (β -bloker) ilaçlar, başlangıçta anjina pectoris ve aritmi tedavisinde kullanılmışlardır. Daha sonra kan basıncını düşürücü özellikleri saptanmıştır. Önceleri hiperdinamik durumlarda ve renin seviyesi yüksek olgularda kullanılırken, yapılan araştırmalarla özel bazı durumlar dışında tüm yüksek kan basınçlılarda kullanılabileceği görülmüştür. β blokerler 30 yıldan fazla süredir YKB tedavisi, MI sonrası ikincil korunma, hipertrofik kardiyomyopati, mitral kapak prolapsusu (MVP), sessiz MI, anjina pectoris ve aritmilerin tedavisi başta olmak üzere çok çeşitli amaçlar için klinik kullanımdadırlar. Portal hipertansiyon, esansiyel tremor, anksiyete, migren, hipertiroidizm ve glokom β blokerlerin kullanıldığı diğer klinik durumlardır.^{1,2}

Kalp yetersizliği tedavisinde β -blokerler başarıyla kullanılmaktadır, fakat bu konudaki bilinmeyenler için araştırmalar devam

etmektedir. Tüm β blokerlerin ortak özelliği arteriyel kan basıncını düşürmeleridir. Esansiyel yüksek kan basıncı olan bireylerde, bugüne kadar diüretikler dışında ölüm oranının azalmasına yol açtığı kanıtlanan diğer grup ilaç da β blokerlerdir. Ek olarak hem 5. hem de 6. Amerikan Ulusal Birleşik Komitesi (JNC) raporlarında birincil ilaç olarak önerilmektedir. β blokerler ayrıca idrar söktürücülerle beraber, diğer kan basıncı düşürücülere nazaran oldukça ucuzdurlar. Bu nedenle de tedavide öncelikli seçenekler arasında olmalıdır.^{1,2}

Özellikle genç ve orta yaşlı, stres düzeyi yüksek, iskemik kalp hastalığı olan hasta gruplarında tek ilaçlı tedavide ilk seçilecek ilaç olarak önerilmiştir. β -blokerler β_1 ve β_2 reseptörlerini uyarması bakımından seçici ve seçici olmayan olarak adlandırmaktadır. β blokerlerin kan basıncı düşürücü etkinliği β_1 reseptörleri üzerine olan etkinliği ile orantılıdır. β_1 reseptörler uyarıldığında kalp hızını, kasılabilirliğini ve atrioventriküler (A-V) iletimini artırır.

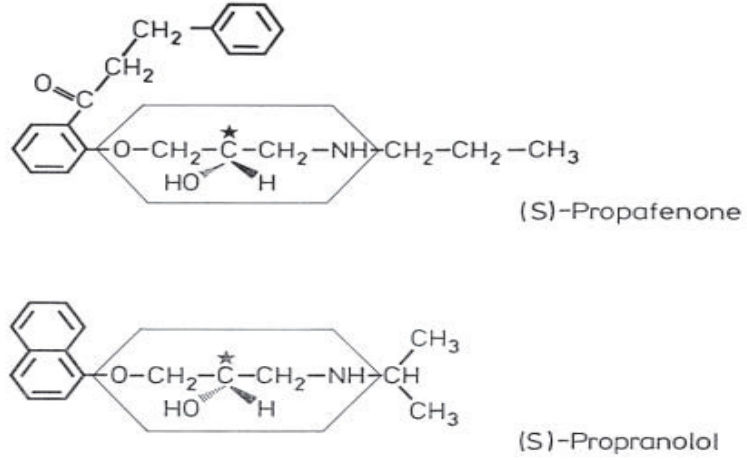
β -blokerlerin, kan basıncını düşüren etki mekanizmaları tam olarak bilinmemektedir. Muhtemelen, negatif inotropik etki, plazma renin aktivitesinin azalması, santral olarak sempatik çıkışın azalması, periferik direncin azalması ve sinir bileşkelerinde prejunctional bölgeye etkiyerek norepinefrin salınımının azaltılması, baroreseptör duyarlılığının artırılması gibi birçok etkinin sonucu olarak kan basıncı düşmektedir.

β -bloker ilaçlara başlandığı zaman akut etki olarak kabin atış hızı, atım hacmi ve kalp debisinde hemen azalma olur. Fakat total çevresel damar direnci (TÇDD) artar. TÇDD'nin artması β -blokerlerden umulan kan basıncı düşmesinin daha az olmasına neden olur.

Klinik kullanıma sunulmalarından beri 100'den fazla β -bloker sentezlenmiştir. Tüm dünyada çeşitli isimler altında 40 civarında β -blokerin kullanımda olduğu tahmin edilmektedir. β -bloker ilaçlar çok yoğun biçimde klinik araştırmalarda çalışılmış ve etkileri saptanmıştır. Son yıllarda damar genişletici özellikleri de olan yeni nesil β -blokerler, örneğin carvedilol ve bucindolol kullanıma sunulmuştur. Ancak bu ilaçlar henüz büyük çaplı klinik çalışmalarda denenmedikleri için sağlıklı önerilerde bulunmak için erkendir.

İlk klinik kullanıma sunulmalarından bu yana en önemli gelişme, seçicilik özelliğinin tanımlanmış olmasıdır. Böylece β_1 seçici ilaçlar kalp hastalıklarında daha yoğun kullanılmaya başlanılmıştır. β -blokerler çeşitli farmakolojik özelliklerine göre sınıflandırılır. Bu özellikler, reseptör seçiciliği, membran stabilize edici etki, α -bloke edici etki, kalsiyum kanal bloke edici etki, yağda eriyebilirlik olarak sayılabilir. Ülkemizde metoprolol, propranolol, asebutilol, atenolol, bisoprolol, labetalol, oxprenolol, pindolol ve sotalol gibi β -blokerler onay almış durumdadır. Carvedilol piyasaya yeni sunulmuştur.^{1,2}

β -blokerler yaygın olarak hipertansiyon, kalpte ritim bozukluğu, kan dolaşım problemi (iskemi) gibi kalp ve damar hastalıklarının tedavisinde kullanılırlar. Bütün β -bloker ilaçlar bir amino alkol yan zinciri ve D-ve L-enantiyomerlerinin oluşmasını sağlayan asimetric bir karbon atoma sahiptir. Enantiyomerler fizikokimyasal özelliklerine bağlı olarak polarize ışığı sağa ya da sola kırmalarına göre (+)- ve (-)- ya da diğer bir adlandırmayla (R) ve (S) olarak sınıflandırılırlar.^{3,4}



Şekil 1: (S)-Propranolol ve (S)-Propafenonenin yapısı

(S)-propranolol ve (S)-propafenonenin yapısal benzerliğini gösterir. Çerçeve içerisine alınmış zincir bütün β -blokerlerde ortak bir zincirdir (sotalol hariç). İşaretlenmiş karbon atomu asimetric karbon atomudur ve bütün β -adrenoseptör antagonistlerin ortak özelliğidir.

Ariloksipropanolamin türü bileşiklerde D-enantiyomerler (R) konfigürasyon ve L-enantiyomerler ise (S) konfigürasyon gösterirler. β -adrenerjik reseptörlerin bloke edilmesinde (S)-enantiyomerleri, (R)-formlarından daha etkilidir. Etenolamin türü yan zincirinde kiral karbon bulunduran satolol bir istisnadır. Burada L-satolol (R)-sotalole eşittir ve (S) formundan daha etkilidir.

1960'larda yapılan in vitro çalışmaları, L-enantiyomerlerinin D-formlarından daha etkili olduğunu göstermesine rağmen, birçok β -bloker hala araştırmalarda ve klinik uygulamalarda (ilaçlar) rasemik olarak kullanılmaktadır. Bu izomerlerin ayrı ayrı kullanılan ve bu kullanımından dolayı yan etkileri olmayan çalışmalar oldukça azdır. Bu çalışmalar hala tartışılmaktadır. Bazı izomerler pahalı ve elverişsiz ayırma koşulları yüzünden hala rasemik olarak kullanılmaktadır.^{3,4}

Aslında β -blokerlerin D- enantiyomerlerinin β -bloker etkileri dışında belli bir özelliği olduğu bilinmiyordu. Son yıllarda D- enantiyomerlerin belirli farklı etkilere de sahip olduğu yapılan araştırmalarla bulunmuştur. Örneğin; D-propranololün antiaritmik sınıf-1 etkisi, tiroksinin tirotrone dönüşmesini engellenmesi ya da D-stalolün antiaritmik sınıf-3 etkisi göstermesi gibi etkileri bulunmuştur. Bu ilaçların her birinin kiral merkezi ve β -adrenerjik reseptörlere bağlanmada doğal bir enantiyo seçicilikleri vardır.

Tek kiral merkezli β -blokerler için, (-) enantiyomerler β -adrenerjik reseptörlere daha iyi bağlanma eğilimi gösterirler. Bu ilaçlardan bazılarının enantiyomerleri, α -adrenerjik reseptörlerde antagonizm ve sınıf-III antiaritmik aktivite gibi bazı diğer etkilere de sahiptirler. Bu etkiler, β -bloke etkisinden daha düşük stereoselektivite gerektirir.

Timolol hariç bu ilaçların tamamı sistematik bir şekilde rasemik karışım halinde klinik olarak uygulandı. B-bloker ilaçlar, plazma proteini bağlayıcılığında ve metabolizma tarafından ilacın atılmasında değişiklik gösterdiği için farmakolojik açıdan oldukça farklılık gösterirler. Örneğin yarım doz L-atenolol kullanıldığı zaman elde edilen etki rasemik karışımın tam doz kullanımında elde edilen etkiye eşittir. Öte yandan D-atenolol ve plasebonun hiç etkisi olmadığı gözlenmiştir.

D- ve L-enantiyomerlerin beta bloke etme etkisi karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırma in vitro uygulamaları ve insan çalışmalarının her ikisinde de benzer şekilde sonuçlanmıştır. Bu çalışmalar sonucunda L-enantiyomerlerin büyük oranda daha etkili olduğu bulunmuştur. Bu özellik propranolol, atenolol, metopranolol, sotalol, carvediol, propafenon ve diğer beta blokerler için gözlenmiştir.

Klinik uygulamalarda D- ve L-enantiyomerleri farklı farmakodinamik ve farklı farmakokinetik özellik gösterirler. Bu yüzden optik olarak saf enantiyomerler tamamen farklı bir ilaç olarak tanımlanabilir, böylece rasemik karışımları iki farklı ilacın 1:1 oranında karıştırılmış iki farklı ilaç gibi görebiliriz.

Hastanın β -bloker tedavisinde, rasemik karışımların uzun süre kullanılması tercih edilmez. Olası ölümcül etkilerine ek olarak, D-enantiyomerler ilaç etkileşimlerini ve yan etkileri artırabilirler.

Bu yüzden β -bloker etkisi olan L-enantiyomerleri saf olarak üretmek gerekir. İlaç (doz oranı ya da enantiyomer enantiyomer etkileşimi) ya da hastayla (kalbe bağlı özellikleri, hasta metabolik fenotipi gibi) ilişkilendirilen çeşitli faktörler, beta-blokerlerin farmakodinamik ve farmakokinetik stereoselektifliğini etkileyebilir. B-blokerlerin farmakokinetik ve farmakodinamik stereoseçiciliğini anlamak, bu ilaçların hastalarda meydana getirdiği etkiler arasındaki farklılıkları anlamayı ve yorumlamayı kolaylaştırır.

β -blokerler, mide ve bağırsaklarda enerjiye gerek duymadan difüzyon yoluyla emilirler. Bu yüzden absorpsiyonları stereoselektif özellik taşımaz.

β -blokerler kanda α -asit gliko proteine ve albümine bağlanan bazik ilaçlardır. Proteinlerin asimetik yapısı yüzünden, proteinlere enantiyomerlerin bağlanması diastromerlerle benzerlik gösterir. Bağlanmada dağılma oranı stereoselektif olabilir.

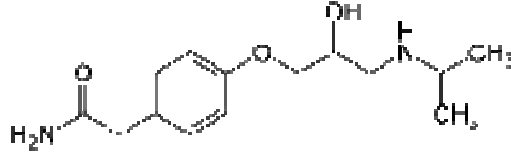
Propranolol gibi lipofilik β -blokerler genellikle metabolize olarak yok edilirler, atenolol ve nadolol gibi hidrofilik β -blokerler ürinede vücuttan atılırlar.^{3,4}

β -blokerlerin yan etkileri

β -bloker ilaçların yan etkileri çok iyi bilinmemektedir. Yan etkilere hastanın toleransı oldukça iyidir. Bu yan etkiler, ilacın tercih edilmesine engel teşkil edecek kadar ağır sorunlara, çoğunlukla yol açmamaktadır. Miyokardiyal depresyon, kalp bloğu ve bradikardi; β -1 seçicilerde daha az olmak üzere uykusuzluk, kabuslar, duygularda baskılanma görülebilir; Hipoglisemi semptomlarını ve glikojenolizi baskırlar, insülin direncini artırırklar, insülin salınımını baskırlar (hiperglisemi); İSA'sız β blokerler lipid metabolizmasını kötü yönde etkilerler; β -1 seçicilerde daha az olmak üzere bronkospazm yaparlar; Propranolol dışında altta yatan hafif böbrek yetersizliğinde bile böbrek fonksiyonlarında bozulma olmaz; Kronik kullanımda serum K^+ düzeyinde hafif yükselme olur; Serum Ca^{++} ve P düzeylerinde yükselme, idrar Ca^{++} düzeyinde azalma saptanır; Egzersiz kapasitesinde düşme görülür; İmpotans yaparlar; psöriazis, β bloker tedavisinde kötüleşir; birden bırakılmaları, ilaç kesilmesi semptomları ortaya çıkarır.^{3,4}

2.3. Atenolol İle İlgili Genel Bilgiler

2.3.1. Kimyasal Yapısı ve Fiziksel Özellikleri



Şekil 2: Atenololün yapısı (2-{4-[2-hidroksi-3-(propan-2-ylamino)propoksi]penil}asetamit)

Selektif β_1 bloker olan atenolol piyasada rasemik karışım halinde bulunmaktadır. Kiral özellik gösteren atenololün kalp üzerine selektif etkisi S(-)-izomerinden ileri gelmektedir. Bu nedenle atenololün vücut sıvıları ve dokulardan tayin edilmesinde kiral yöntemlerin kullanılması önerilmektedir.

Atenolol β -1 reseptör seçici bir antagonisttir. Kalp hastalıkları tedavisinde öncelikli olarak kullanılan ilaçların oluşturduğu β -blokerler sınıfında yer alır. 1976'da uygulamaya konan atenolol, hipertansiyon tedavisinde propranolol için yedek olarak geliştirilmiştir.

Hipertansiyon, kronik kalp rahatsızlıkları, ritim bozukluğu, anjina ve kalp krizi sonrası oluşabilecek komplikasyonları önlemek ve tedavi etmek amacıyla kullanılır. Ayrıca ciddi hastalıkların semptomlarının tedavisinde de kullanılır.

Propranololle karşılaştırıldığında migreni engellemede daha az etkilidir. Bunun nedeni atenololün hidrofilik özellikleridir. Çünkü migren tedavisi için atenololün beyindeki konsantrasyonu artmak zorundadır ama atenololün hidrofilik özellikleri buna izin vermez.

Atenololün bağımlılık yaptığını düşündüren herhangi bir kanıt yoktur. Propranololün tersine atenolol kan-beyin bariyerlerinden geçemezler bu yüzden çok fazla yan etkileri olmaz.

Diğer yaygın olarak kullanılan β -blokerlerin aksine, atenolol yalnızca böbrekler tarafından vücuttan atılır. Bu özelliği atenolol kullanımını cazip hala getirir.

2.3.2. Farmakokinetik Özellikleri

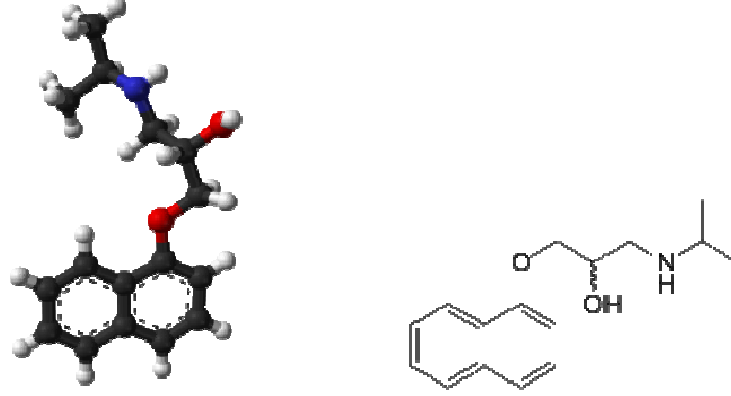
Oral yolla alınır ve kanda en yüksek seviyeye 2 ile 4 saat içerisinde ulaşır. Yarı ömrü 6 saattir. Kullanımı 24 saatlik periyotlarla, 25-100 mg arasında değişir. 100 mg üzerindeki kullanımlarda günde iki kez alınır.

Atenolol hidrofilik bir ilaçtır. Beyin dokusundaki derişimi kandaki konsantrasyonunun sadece %15'i kadardır. İlaç, plenta bariyerlerine kolaylıkla geçer.

2.3.3. Yan Etkileri

Atenololün az da olsa merkezi sinir sisteminde yan etkileri vardır. Az da olsa akciğerde broşların kasılmasına neden olur. Bu yan etkilerin her ikisi de atenololün farmakolojik özelliklerinden kaynaklanır.⁵⁻

2.4. Propranolol İle İlgili Genel Bilgiler



Şekil 3: Propranololün yapısı ([2-hidroksi- 3-(naftalin-1-yloksi) propil] (propan- 2-yl) amin)

Propranolol temel olarak hipertansiyon tedavisinde kullanılan selektif olmayan bir β -blokerdir. Başarılı bir şekilde geliştirilen ilk β -bloker olarak bilinir. Bu ilacın çocuklarda migren hastalığının önlenmesi için kullanılan tek ilaç olduğu kanıtlanmıştır. Propranolol, propranolol hidroklorid olarak kullanılır.

Propranolol, İskoç bilim adamı James W. Black tarafından 1950'lerin sonlarında başarılı bir şekilde geliştirilmiştir. James W. Black, bu keşfiyle 1988'de tıp dalında Nobel Ödülü kazanmıştır.

Propranolol dikloroizoprenalin ve pronetalol gibi β -adrenerjik antagonistlerden türetilmiştir. Sonraki β -blokerler için de önem taşıyan yapısal düzenleme, pronetalolün yapısına ariletanolamine köprü olarak oksimetilen ilave edilmesiyle gerçekleşir ve bu bileşiklerin etkisini artırır. Bu ayrıca, hayvan modellerde pronetalolle oluşan kanserojenik etkiyi de ortadan kaldırmıştır.

S(-)-propranolol, β -bloker olarak (R)-propranololden 100 kat daha etkilidir. Klinik çalışmalarda önemli farklılıkları vardır.

2.4.1. Farmakolojik Özellikleri

Propranolol selektif olmayan bir β -blokerdir. Yani hem β -1 hemde β -2-adrenerjik reseptörlerde epineparin etkisini engeller. Sadece L-propranolol güçlü bir adrenoseptör olarak etkilidir. Fakat her iki enantiyomer de bölgesel uyuşturma özelliği taşır.

2.4.2. Farmakokinetik Özellikleri

Propranolol hızlı bir şekilde ve tamamen emilir. Alımından yaklaşık 1-3 saat sonra kanda en yüksek seviyeye ulaşır. Tamamen emilmesine rağmen değişken biyoyararlanıma sahiptir. Temel metabolit 4-hidroksi propranolol en uzun yarı ömre (5-7 saat) sahip olmasıyla farmakolojik açıdan da etkilidir.

Propranolol beyinde yüksek derişimde bulunan yüksek oranda lipofilik bir ilaçtır. Tek dozun etki süresi yarı ömründen daha uzundur ve eğer tek dozun miktarı (örneğin, 80mg) yeteri kadar yüksekse yarı ömrü 12 saate çıkabilir. Etkili plazma konsantrasyonu 10-100 ng/ml arasında değişir. Plazmada 2000 ng/ml seviyesinde olması zehirleyici özellik kazanmasına neden olur.

2.4.3. Yan Etkileri

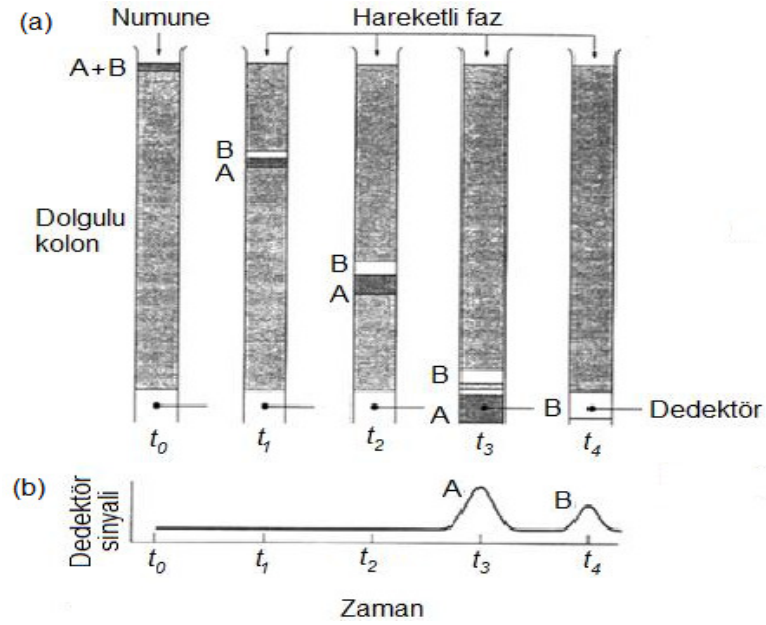
Propranololle kullanılan karşıt ilaç reaksiyonları diğer lipofilik β -bloker ilaçlarla benzer özellik gösterir.¹¹⁻²⁶

2.5. Kromatografi

Kromatografi, bir karışımdaki iki ya da daha fazla bileşenin, hareketli (taşıyıcı) bir faz yardımıyla, sabit (durgun) bir faz arasından değişik hızlarda hareket etmeleri esasına dayanan bir ayırma yöntemidir. Kromatografi esas olarak, durgun faz tarafından kuvvetle tutulan numune bileşenlerinin, hareketli fazın akışıyla çok yavaş hareket etmesi ve fakat durgun faz tarafından zayıfça tutulan numune bileşenlerinin hızlı hareket etmesiyle ayırmanın sağlanmasıdır. Böylece numune bileşenleri kalitatif ve/veya kantitatif tayin edilebilirler.

Kromatografik yöntemlerle, kimyasal ve fiziksel özellikleri birbirine çok yakın bileşenlerden oluşan karışımlar, kolayca ve kısa sürede analiz edilebilir.

Kromatografide hareketli faz sıvı ya da gaz bileşimi olabilir. Sabit faz ise, genellikle kolon dolgusu olarak kullanılan katı parçacıkların yüzeyine ya da kapiler tüpün içerisine kaplanan sıvıdan oluşur. Ya da katı parçacıkların kendisi sabit faz olarak davranır. Her iki durumda da çözünen maddelerin hareketli faz ve sabit faz arasındaki dağılımı, karşıt akım dağılımında olduğu gibi çözünen maddelerin ayrımıyla açıklanır. Karışımda bulunan maddelerin kolon boyunca ayrımı Şekil 4. de gösterilmiştir.^{28,29}



Şekil 4: Kolonda kromatografik ayırımın şematik gösterimi²⁸

Kromatografik yöntemler üç şekilde sınıflandırılabilir. Birincisi, hareketli ve sabit fazların fiziksel olarak nasıl temas ettirildiği esasına dayanır. *Kolon kromatografide*, durgun faz ince bir kolonda tutulur ve hareketli faz arasından geçmeye zorlanır. *Düzlemsel kromatografide ise*, durgun faz bir düz plaka üzerinde veya bir kağıdın gözenekleri arasına tutturulur ve bu durumda hareketli faz durgun faz arasından kapiler etkisiyle ya da yer çekimi etkisiyle hareket eder.

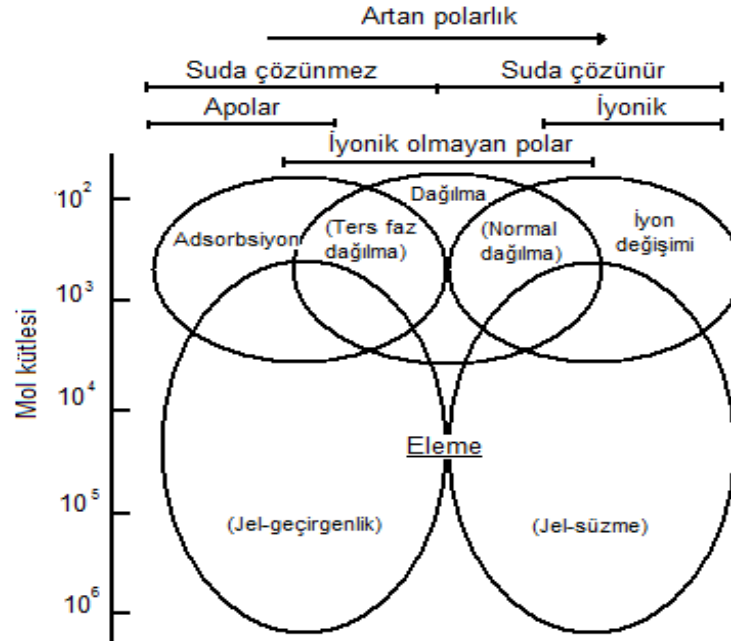
Kromatografik yöntemlerin ikinci ve daha temel sınıflandırması, kullanılan sabit ve hareketli faz tipleri ve fazlar arasında madde aktarımını sağlayan dengelerin cinslerine göre yapılır. Buna göre *sıvı kromatografi*, *gaz kromatografi* ve *süper kritik akışkanlı kromatografi* olmak üzere üçe ayrılır. Bu üç teknikte hareketli faz sırasıyla sıvı, gaz ve süperkritik akışkandır.

Sadece sıvı kromatografi, hem kolonlarla hem de düz yüzeyler üzerinde gerçekleştirilebilir; gaz kromatografi ve süperkritik

akışkanlı kromatografi yalnız kolonlarda gerçekleştirilir ve kolon iç yüzeyinde hareketi faz bulunur.²⁸

Sıvı kromatografisinin üçüncü sınıflandırması ise uygulama alanlarına göre yapılır. Adsorpsiyon kromatografisi, Dağılma kromatografisi, İyon değiştirme kromatografisi, Jel filtrasyon (Moleküler eleme) kromatografisi, Afinite kromatografisi olarak ayrılırlar.²⁹

Örneğin, mol kütlesi, 10.000 g'dan daha büyük maddeler için *eleme kromatografisi*; daha küçük mol kütleli iyonik türler için, *iyon değiştirme kromatografisi*; küçük, polar, ancak iyonik olmayan türler için ise en iyi yöntem, *dağılma kromatografisi*dir. Ayrıca, bu işlem, homolog serilerin ayrılması için çoğu zaman kullanışlıdır. *Adsorpsiyon kromatografisi*, çoğu zaman polar olmayan türlerin, yapısal izomerlerin ayrılması ve alifatik hidrokarbonlar gibi bileşik sınıflarının alifatik alkollerden ayrılması için seçilir.²⁸



Şekil 5: Sıvı kromatografi uygulamaları²⁸

2.5.1. Adsorbsiyon Kromatografisi

Kromatografinin en eski uygulaması olan adsorbsiyon kromatografi, moleküllerin polaritelerine ve yüzey aktif bölgelerdeki fonksiyonel grupların fiziksel adsorbsiyonuna bağlı olarak ayırım gerçekleştirmeyi sağlar.

Bu mekanizmada sabit faz katıdır, hareketli faz ise sıvı veya gaz olabilir. Çözünen madde katı partikül yüzeyine tutunur. Maddenin yüzeye tutunması olayına adsorbsiyon denir. Burada tutunma yüzeysel olarak gerçekleşir. Moleküllerin ayrımı, adsorbsiyon ve çözünme hızlarının dengede olma durumuna göre gerçekleşir. Eğer maddenin çözünme hızı ve adsorbsiyon hızı birbirine eşitse, madde sabit hızla ilerler. Madde katı yüzeye daha kuvvetle tutunursa kolondan daha geç ayrılır. Fakat hareketli faza ilgisi daha fazla ise kolonda tutunmadan kolondan ayrılır.²⁸⁻³¹

2.5.2. Dağılma Kromatografisi

Kromatografinin bu türü, birbiriyle karışmayan iki sıvı arasında maddelerin dağılması esasına dayanır. Bu teknikte, sabit faz katı kolon dolgu maddesinin yüzeyine tutturulmuş ince bir sıvı film tabakasından oluşur. Maddelerin ayrılması, bu sıvı sabit faz ve sıvı veya gaz olabilen hareketli faz arasında kurulan dengeye bağlı olarak gerçekleşir. Ayrımın sağlanabilmesi için analitin sabit fazdaki çözünürlüğünün hareketli fazdaki çözünürlüğünden fazla olması gerekir.

İyi bir dağılma kromatografik ayırmada ayırmanın makul sürede ve en iyi verimle gerçekleşmesi isteniyorsa çözünen madde, sabit faz ve hareketli fazın polaritelerinin özenle seçilmesine önem verilmelidir. Dağılma kromatografi, hareketli ve sabit fazların bağlı polarlığına bağlı

olarak ters faz, normal faz ve polar organik faz olmak üzere üçe ayrılır.^{28, 29, 31,109}

2.5.2.1. Normal Faz

Sıvı kromatografi ile yapılan ilk çalışmalar, silika ve alümina partiküller üzerine tutturulmuş su ve trietilen glikol gibi oldukça polar sabit faz ve hareketli faz olarak da heksan veya izopropil eter gibi nispeten daha az polar çözücülerini kullanmaktaydı. Kullanılan kolonlar silika jel, siyano, amino, diol veya nitro kolonlardır. Bu yüzden bu tip kromatografi normal faz kromatografi olarak adlandırılıyor.²⁸

Normal faz kromatografide en düşük polaritedeki bileşenler hareketli fazda nispeten çok çözündükleri için kolondan en erken ayrılan bileşikler olurlar. Hareketli fazın polaritesindeki artış, elüsyon zamanının azalmasıyla sonuçlanır.²⁸

2.5.2.2.Ters Faz

Ters faz kromatografide ise sabit faz polardır ve çoğu zaman bir hidrokarbondur. Hareketli faz ise nispeten polar su, metanol veya asetronitril gibi çözücülerden meydana gelmiştir.

Bu yöntemde polaritesi yüksek olan bileşenler kolondan erken ayrılır. Burada hareketli fazın polaritesindeki artış elüsyon zamanını artırır. En sık kullanılan teknik, kolon apolar, mobil faz polardır, kullanılan kolonlar C18, C8, C4, fenil, tetrametilsilan ve siyanodur.

2.5.2.3. Polar Organik Faz

Bu fazda polar olmayan çözücüler kullanılmaz. Hareketli faz olarak alkoller kullanılır. Analit ve sabit faz arasındaki baskın etkileşimler hidrojen bağı, elektrostatik, dipolar ve sterik etkilerdir. Bu hareketli faz için uygun analitlerin bazı şartları vardır. En az iki fonksiyonel grubu olmalı ve bu gruplar alkoller, halojenler, azot, karbonil, karboksil, kükürt ve fosforun okside hallerini içermelidir. Kiral ayrımlarda fonksiyonel grupların en az biri kiral merkezde ya da kiral merkezin yakınında olmalıdır.

2.5.3. İyon Değişim Kromatografisi

İyon değişim kromatografisi, iyonları ve bazı polar molekülleri ayırmak için kullanılan bir HPLC yöntemidir. Kromatografinin bu türünde, SO_3^- gibi anyonlar ya da $-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$ gibi katyonlar genellikle bir reçineye kovalent bağlanırlar ve sabit fazı oluştururlar. Hareketli faz ise belirli pH'a ayarlanmış tampon çözeltisi ve az miktarda alkol içeren çözeltilerdir.

Sabit faza bağlı olan bu iyonlar sabit faz tarafından kuvvetlice tutunmazlar. Hareketli fazda çözünmüş maddelerden reçine ile karşıt yükte olanları elektrostatik olarak çekilir ve sabit fazda tutunan iyonla yer değiştirir. Eğer reçine yani sabit faz belirli bir analit türü için seçiciliğe sahipse aynı yükteki analitlerden de ayrımı sağlanmış olur. Burada kullanılan hareketli faz sıvıdır.^{29,31,32}

2.5.4. Moleküler Eleme Kromatografisi

Diğer kromatografi türlerinin aksine ideal bir moleküler eleme kromatografide sabit faz ve çözünmüş madde arasında kimyasal bir etkileşimin olmaması arzu edilir. Ayırma fiziksel bir eleme sürecine

dayanır. Burada mobil faz sadece çözücü gibi davranır ve ayırmaya etkisi yoktur.

Moleküler eleme kromatografisinde, sabit fazın gözenek büyüklüğü numunede bulunan farklı molekül büyüklüğündeki analitler arasında seçicilik sağlayarak ayırma neden olur. Bu yüzden gözenekli jel boyunca sıvı veya gaz hareketli faz geçirilir. Sabit fazın gözenek büyüklüğü büyük molekülleri geçirmeyecek kadar küçük olmalıdır. Büyük moleküller jeldeki gözeneklere giremedikleri için direkt olarak kolondan çıkarlar. Küçük moleküllerin ise kolondan geçmeleri daha uzun zaman alır çünkü jeldeki gözeneklere girerler ve bu yüzden de kolondan ayrılmaları için daha fazla hacimde madde akışına gereksinim duyarlar.

Kolon dolgu maddesi olarak gözenekli jel kullanıldığı için bu kromatografi türüne jel filtrasyon kromatografi de denir. Bu teknikte, büyük moleküllerin kolondan daha çabuk geçmesiyle ayırma sağlanır.^{29,32}

2.5.5. Afinite Kromatografi

Bu en yeni ve en hassas kromatografi türüdür. Sabit faza kovalent bağlanmayla tutturulan molekül ve analizi yapılacak olan madde arasında yüksek seçicilikle etkileşim olması esasına dayanır.

Sabit faza tutturulacak olan molekül, belirli bir proteine seçimli antikor olabilir. Kolondan çok sayıda proteini içeren bir karışım geçirilirse, sadece belirlenen protein kolonda tutunur ve diğer proteinler kolonda tutunmadan çıkar. Sabit fazla etkileşmeden çıkan proteinlerin tamamı kolondan ayrılana kadar yıkama işlemi devam eder. Daha sonra ortamın pH'ı veya iyonik yapısı değiştirilerek kolonda tutunan proteinin sabit fazdan ayrılması ve kolondan çıkması sağlanır. Böylece istenilen madde ayrılmış olur.²⁹

2.6. Kiral Ayırma İlkeleri

2.6.1. Kiral Ayırma İlkeleri Hakkında Önbilgi

Analitik çalışmalarda ve tıbbi çalışmaların hazırlık aşamasında, kiral ayırma metotlarının geliştirilmesi son yirmi yılda çok daha önem kazandı. Gaz kromatografi (GC), yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC), süper kritik akışkanlı sıvı kromatografi (SFC) ve ince tabaka kromatografi (TLC) gibi kromatografik metotlar farklı kiral ayırma ilkeleri kullanarak geliştirildi. Kapiler elektroforez (CE) ve kapiler elektrokromatografi (CEC) yöntemleri de çok yakın geçmişten beri kromatografik metotlara güçlü alternatifler olarak görülmektedirler. HPLC’de yaygın olarak kullanılan ayırma ilkeleri CE ve CEC’de de kullanılmaktadır. Fakat numune hazırlık aşamasında yapılacak enantiyomer ayrımı için LC yüksek oranda daha caziptir.³³⁻³⁸

Kromatografi ve elektro göç tekniklerinin asıl kullanım alanları, sentezlerdeki enantiyomer saflığının kontrolü için yapılan analitik çalışmalar, rasemikleştirme işlemlerinin kontrolü, farmasötik kalite kontrolü ve farmakokinetik çalışmalardır.

Kromatografik enantiyomer ayrımları, diastromerik türev formları için kiral türevlendirme ayraçları kullanarak dolaylı olarak veya mobil faz ya da sabit fazın her ikisiyle de etkileştirilebilen kiral selektörler kullanılarak direkt olarak gerçekleştirilebilir. Benzer şekilde CE’de de dolaylı ve direkt yollar mümkündür. Dolayısıyla son yaklaşımlara göre, kiral selektör elektrolite basit bir şekilde eklenebilir. Bu yüzden, kiral selektör mobil fazda ya da sabit fazda bulunabilir.

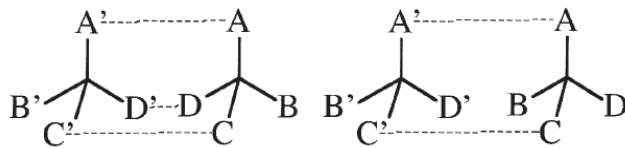
2.6.2. Dolaylı Ayırma

Kiral türevlendirme reaktifleri GC, HPLC ve CE için geliştirilmiştir. HPLC ve CE için, tayinde duyarlılığı artırması açısından floresans reaktörler daha çok tercih edilirler. Bu yaklaşımın dezavantajı ekleme basamağındaki olası hatalardır. Ayrıca, kiral türevlendirme ayracı optik olarak saf olmak zorundadır ve reaksiyon boyunca resemizasyon olmayacağını garanti etmek zorundadır. Öte yandan birçok problem direkt ayırma yaklaşımıyla çözülemeyebilir olduğu için dolaylı ayırma iyi bir alternatiftir.

2.6.3. Direkt Ayırma

HPLC, TLC ve CE metotlarının uygulandığı durumlarda direkt ayırma yapmanın en kolay yolu mobil faza kiral selektör eklemektir. Bu kolay yaklaşım birçok durumda iyi sonuç verir, fakat her zaman pratik değildir ve pahalı reaktiflerle çalışılacağı zaman maliyeti yüksek olabilir. Sabit faza kimyasal olarak bağlanan ya da adsorbe olan kiral selektörün bulunduğu kiral sabit fazların (CSPs) kullanımı daha üstün ve kullanışlı bir yöntemdir.

Kiral tanımayı açıklamak için yaygın modeller literatürde tartışılmıştır. En güvenilir modelin Dalglish tarafından ileri sürülen, üçlü etkileşim olan ve üç reaktiften en az birinin stereoselektif olması gerektiği düşünülen *üç nokta etkileşim* modelidir.³⁹



Şekil 6: Üç nokta etkileşim modeli¹⁰⁹

Bu model kiral ayırma ilkelerinin birçoğuna uygulanabilir. Aşağıda maddeler halinde çeşitli kiral ayırma ilkelerine genel bir bakış ve ilgili tanımlamalar verilmiştir.

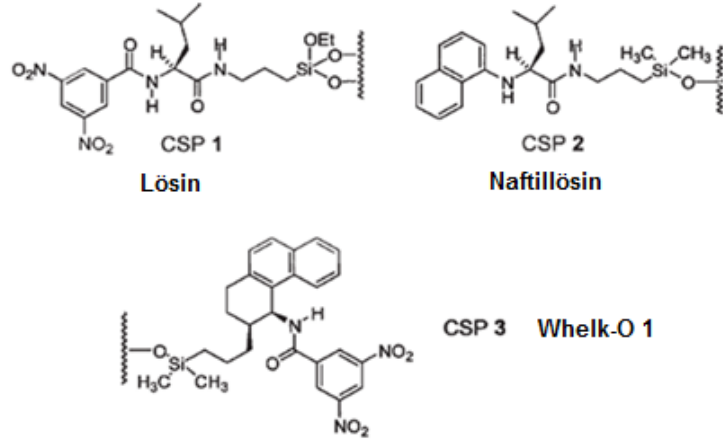
2.6.3.1. Çoklu Hidrojen Bağı Dizilişi

Gil-Av ve çalışma arkadaşları tarafından, kromatografik kiral ayırma alanına öncülük eden bir çalışma yapılmıştır.⁴⁰ Çalışmayı gerçekleştiren grup, N-trifloroasetil-L-amino asit esterleri ve çözünmüş N-trifloroasetil amino asitlerle oluşturulan kiral GC fazı geliştirmiştir. Burada ayırma hidrojen bağlarının dizilişine bağlıdır. Daha sonra Bayer'in grubu, Chirasil-Val adı verilen polisiloksanlara valin diamiit bağlı GC fazını hazırlamışlardır.⁴¹ Sonuç olarak, çeşitli kiral GC fazları geliştirilmiştir.

Dobashi ve Hara ise kiral selektör olarak davranan amino asit amitleri kullanarak HPLC fazlarını hazırlamışlardır.⁴²⁻⁴⁴ Bu sabit fazlarla hidrojen bağlarının dizilişine göre amino asit türevleri, hidroksi asitler ve amino alkollerinin ayrımı sağlanmıştır.

2.6.3.2. Kiral π -Donör, π - Akseptör Fazları

Bu ilke 1970'li yılların sonlarına doğru Pirkle'in grubu tarafından ortaya çıkarılmıştır. Bir π -akseptör özelliği taşıyan (R)-N-(3,5-dinitrobenzoil) fenilglisin fazı, geniş bir aralığı kapsayan bazı bileşiklerdeki π -donör grupları için kiral algılama yeteneği göstermiştir. Burada π - π -etkileşimlerine ek olarak, dipol etkileşimlerin ve hidrojen bağlarının da kiral tanımlamadan sorumlu olduğu düşünülmüştür. Welch tarafından hazırlanan bir makalede, Pirkle'in grubunun hazırladığı kiral π -donör, π -akseptör fazları hakkında genel bakış ve çeşitli bileşik sınıflarındaki uygulamaları anlatılmaktadır.⁴⁵ Bu fazlardan bazıları ticari olarak mevcuttur.



Şekil 7: Pirkle-Tipi Kiral Sabit Fazları¹⁰⁹

Sonuç olarak, farklı gruplar tarafından çeşitli kiral π -donör, π -akseptör fazları geliştirilmiştir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar bu tür fazların CEC'de de kullanılabileceğini göstermektedir.^{46,47}

2.6.3.3. İyonik Etkileşimler

İyonik etkileşimlerde, sadece üç noktalı etkileşim modeline göre chiral tanımayı açıklamak için yeterli değildir. Hidrojen bağları, dipol-dipol etkileşimler ya da π - π -etkileşimler gibi etkileşimler de kiral tanımda etkilidir.

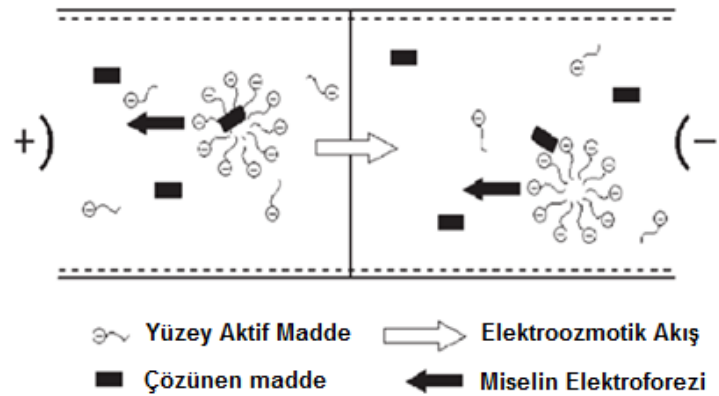
Lindner'in grubu, HPLC'de ve CEC'de kullanılan ve çinko alkaloidlerle oluşturulan katyon değiştirici kiral CSP'ları hazırlamışlardır. Bu durumda hidrojen bağları ve π - π -etkileşimler, ek olarak gerçekleşen etkileşimlerdir. Sırasıyla (+)-S-10-camphor sülfonik asit, N-benzoilkarbonil glisil-L-pirolin, (-)-2,3,4,6-di-O-izopropiliden-2-keto-L-gulonik asit ve quinin gibi kiral iyon merkezleri olan fazlar kullanarak oluşturulan iyon çifti dizilişinden, çeşitli asidik ve bazik ilaçların HPLC ile ayrımı için faydalanılır.

Ayrıca, bu yöntemle kiral tanıma yan bağlayıcı kuvvetlerle desteklenmek zorundadır.⁴⁸

CE'de iyon çifti reaktiflerinin kullanımı, sadece susuz ortamda başarılıdır. (+)-S-10-kamforik asit, susuz elektrolitler kullanarak bazların ve quinin ve quinin türevlerini kullanarak asidik bileşiklerin kiral ayrımını sağladı.⁴⁹⁻⁵¹

2.6.3.4. Kiral Yüzey Aktif Maddeler

Yüzey aktif maddeler, misel özelliği taşıyan baş kısmında polar bir grup ve hidrofilik bir kuyruk içeren moleküler bir yapıdır. CE'de yüzey aktif maddelerin kullanımı Terabe ve arkadaşları tarafından ortaya atılmıştır ve hidrofilik miseller sulu sabit faz gibi davrandığı için 'miseler elektrokinetik kapiler kromatografi (MEKC)' adını almıştır.⁵²



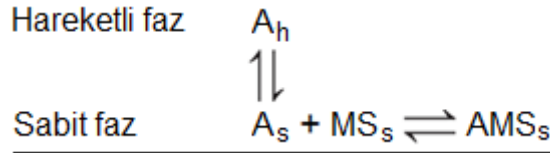
Şekil 8: MEKC'in ayırma ilkesinin şematik gösterimi¹⁰⁹

Burada ayırım analitin, kiral misel faz ve elektrolit faz arasında dağılmasıyla gerçekleşir. Tuzlar, saponinler, uzun zincirli N-alkil-L-amino asitler, N-alkanoil-L-amino asitler, alkilglükosidler ve polimerik

amino asitler, ve dipeptit türevleri kiral yüzey aktif maddeler olarak kullanılabilirler.

2.6.3.5. Kiral Metal Kompleksler: Ligant Değişim

Ligant değişim kromatografisi, son 70 yıl içerisinde Davankov ve Rogozhin tarafından ortaya çıkarılmıştır.⁵³ Kiral tanıma, analit ligantı ve bir kiral selektör ligant arasında metal komplekslerin üçerli olarak karışık dizilişine bağlıdır. Karışık komplekslerin D- ve L-enantiyomerleriyle farklı kompleks denge sabitleri oluşturması ayırım için belirleyicidir.



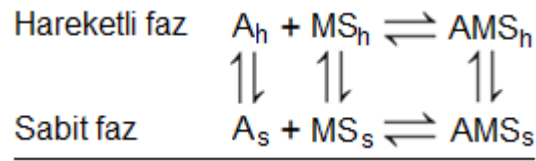
Burada A analit, M metal, S selektörü temsil eder.

Genel olarak, kiral selektör sabit faza karıştırılabilir ya da mobil faza eklenebilir. İlk olarak, kiral ligant değişim kromatografi fazları (LEC), Davankov tarafından klasik kolon kromatografi için metal iyonlarla aminoasit kalıntıları içeren polisitren-divinilbenzen polimerin kompleks oluşturmasıyla hazırlanmıştır. Bu temel ilke, Gübitz ve arkadaşları tarafından silika jel yüzeyine kimyasal olarak bağlanan fazları hazırlayarak HPLC'ye uyarlanmıştır. Bu fazlar, türevlendirilmemiş amino asitler, α -alkil ve N-alkil amino asitler, dipeptitler, hidroksi asitler ve tiroid hormonları için enantiyoseçicilik göstermiştir. Bu tür fazlar, Serva, Heidelberg, Germany (Chiral=Si-L-Pro, L-Hypro, L-Val) ve Daicel, Tokyo Japan (Chiralpak WH) tarafından ticarileştirilmiştir.⁵⁴⁻⁵⁷

Sonuç olarak, oldukça fazla sayıda LEC-fazları sunulmuştur. LEC-fazları, silika jele kimyasal olarak ligant bağlamak yerine, ters faza

hidrofilik zincirlerle ligant kaplayarak da hazırlanabilir. Bazı durumlarda, mobil faza selektör ligantın eklenmesi de başarılı bir alternatif olarak görülmüştür.

Bu yaklaşımda dikkat edilmesi gereken dengeler aşağıda verildiği gibidir:



Burada A analit, M metal, S selektörü temsil eder.

Günther ve arkadaşları tarafından, C-18 yüzeyine kaplı selektör gibi davranan (2S,4R,2,RS)-4-hidroksil-1-(2,-hidroksidodesil) pirolinin bakır(II) kompleksini içeren TLC plakaları geliştirilmiştir.⁵⁸ Bu tür plakalar, Macherey-Nagel (Düren, Germany) (Chiralplate®) ve Merck (Darmstadt, Germany) (HPTLC-CHIR®) tarafından ticarileştirilmiştir.

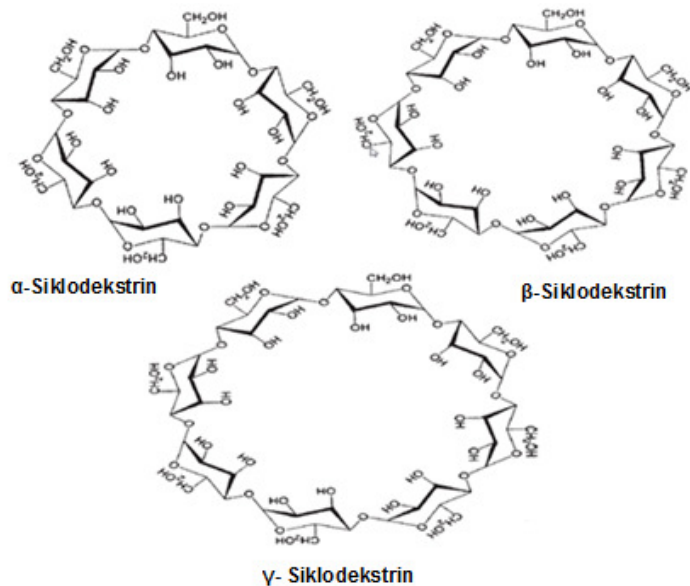
LE ilkesinin, CE'de uygulanabilir olduğu gösterilmiştir. Bu durumda, selektör kompleks basit bir şekilde elektrolite eklenir. Son inceleme, bu tekniğin uygulanabilirliği ve geliştirilmesi konusunda genel bir bakış vermiştir.

Daha yakın zamanlarda, LE, CEC'de de başarılı bir şekilde uygulanmıştır. Schmid ve arkadaşları yük sağlayan reaktif olarak vinilsülfonik asit, bir çapraz bağlayıcı gibi davranan piperazin diakrilamidin varlığında ve kiral selektör olarak da metakrilamit ve N-(2-hidroksi-3-alkoksipropil)-L-4-hidroksiprolinin in situ co-polimerleşmesiyle bir LE-devamli yatağı hazırlamıştır. Kiral ayırım için bu fazın uygulanabilirliği, hidroksi asitler ve amino asitlerin ayrılmasıyla ispatlanmıştır.^{59,60}

Chen ve Hobo tarafından monolitik fazları hazırlamak için alternatif bir yöntem ortaya konmuştur. Tetra metoksisilandan başlayarak bir sol-jel prosedürüyle, silika tabanlı monolitik faz hazırlanmıştır. Monolit daha sonra, 3-glisidoksipropiltrimetoksisilan yaraçılığıyla, kiral selektör olarak L-pirolinamite türevlendirilmiştir. Bu CSP, hidroksi asitler ve dansil amino asitlerin kiral ayrımında uygulanmıştır.⁶¹

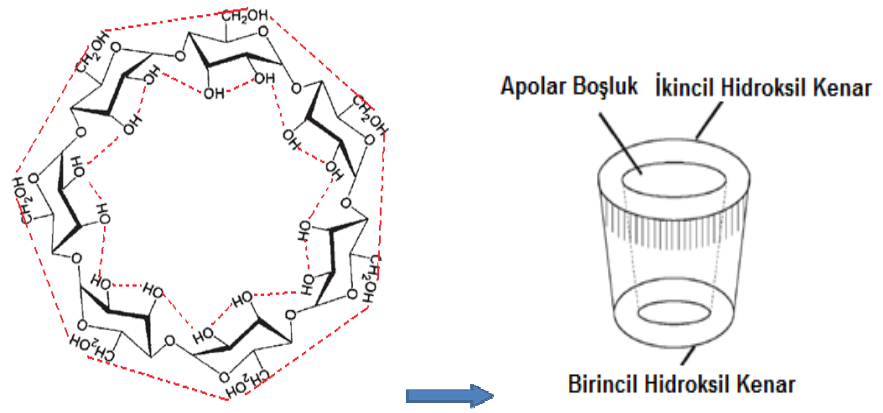
2.6.3.6. Siklodekstrinler (CD)

Siklodekstrinler, HPLC, GC, SFC, TLC, CE ve CEC'deki uygulamalarında kiral selektör olarak sıklıkla kullanılırlar. CD'ler, 6(α -CD), 7(β -CD) ya da 8(γ -CD) glukopiranoz birimlerinden oluşan siklik oligosakkaritlerdir. Bunlar hidrofilik boşluğa sahip kesilmiş koni şeklindedirler. Dış yüzeyi hidrofiliktir. CD'nin kenarlarında olan 2.,3. ve 6. pozisyonlarda bulunan hidroksil grupları türevlendirme için kullanılabilir. Böylece çözünürlük artırılabilir.



Şekil 9: Siklodekstrinlerin yapıları¹⁰⁹

Kiral tanıma mekanizması, aromatik gruplardan oluşan analitin büyük hidrofobik gruplarının, CD'lerin hidrofobik boşluğunda girmesiyle açıklanır. Kiral tanıma için ikinci bir yaklaşım, CD'lerin ağız kısmında bulunan hidroksil grupları ve analitin kiral merkezine yakın polar substituentler arasındaki hidrojen bağlarının dizilişi ya da dipol dipol etkileşimlerin olma olasılığıdır.



Şekil 10: Siklodekstrin molekülünün şematik gösterimi¹⁰⁹

HPLC'de CD'ler, CSP'da ya da kiral hareketli faza eklenerek kullanılabilirler. Silika jele kimyasal olarak bağlanmış olan CD'leri içeren ilk CSP'lar, Armstrong tarafından geliştirilmiştir.⁶² Son zamanlarda ise Bresolle ve arkadaşları CE ve HPLC'deki CD'lerin uygulamasıyla ilgili genel bir bakış açısı sunmuştur.⁶³

CD'ler GC için de CSP olarak kullanıldılar. Permethylated ya da perpentylated CD'ler ya da değişen polaritede diğer türevleri GC fazlarının hazırlanması için kiral selektör olarak kullanıldı. Bu CSP'ler SCF'de de uygulama alanı bulmuştur.

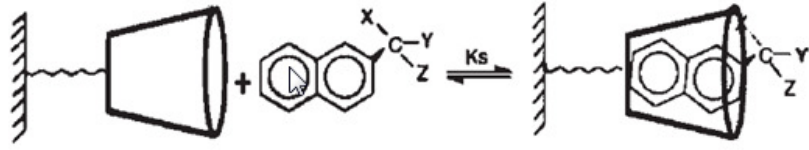
TLC'de CD'lerin kullanımı birkaç çalışmada özetlenmiştir.^{36,}
^{64, 65} CE'de de CD'ler geniş bir uygulama alanı bulmuştur.

Kullanılan CD'lere ek olarak, bazı nötr ve yüklü türevler kullanılmıştır. Nötr CD türevlerinin en sık kullanılanları, heptakis-O-metil-CD, heptakis (2,6-di-O-metil)-CD, heptakis (2,3,6-tri-O-metil)-CD, hidroksietil-CD ve hidroksipropil-CD'lerdir. Nötr CD'ler elektro ozmotik akış (EOF) gibi aynı hızla göç ettikleri için bunlar nötr analitlerde kullanılamazlar.

Ters akım hareketi gösterdikleri için, sülfatlanmış CD'ler, sulfobütil- ve sulfoetil- β -CD, karboksimetil- β -CD, ve succinil- β -CD gibi negatif yüklü CD'ler, nötr ve bazik bileşiklerde kiral ayırım için uygulanmıştır. Ayrıca amin ve quaterner amonyum fonksiyon grupları içeren pozitif yüklü CD'ler, nötral ve asidik analitlerin kiral ayırımı için uygulama alanı bulmuştur. Son zamanlarda amfoterik CD'ler de geliştirilmiştir. Nötral ve yüklü CD'lerin karışımlarının sıklıkla geliştirildiği ve ayırma daha da olanak sağladığı bulunmuştur.⁶⁶

Bunlara ek olarak diğer kiral ve kiral olmayan reaktiflerle oluşturulan CD karışımları tanımlanmıştır. Negatif yüklü misellerle oluşturulan sodyum dodesil sülfat (SDS) eklenmesi bu uygulamaya bir örnektir.⁶⁷ Nötral CD'ler EOF olarak aynı hızla göç ederken, bu miseller EOF'a ters yönde göç ederler. Analit parçaları, ana çözelti, CD ve misel arasında yeralır. Böylece nötral bir analit, yavaşlatılır ve nötral bir CD kullanarak ayrıştırılır. CD-aracılığında miseler elektrokinetik kapiler kromatografi (CD-MEKC) adlı bu yöntem, enantiyomer göç düzenini geri çevirmek için de kullanılabilir.

İyon çifti reaktifleri ve taç eterlerle karışım oluşturan CD'lerin, kiral ayırımı iyileştirdiği ve desteklediği bulunmuştur.^{68,69} Diol yapı içeren bileşikler, borat ve CD karışımı kullanılarak ayrıştırılabilirler. Bu uygulamada CD-borat-diol kompleks karışımının olduğu farz edilmiştir.



Şekil 11: Siklodekstrinin kompleksi kapsama biçimi¹⁰⁹

CD'leri kullanarak yapılan ilk CEC uygulaması Schurig'nin grubu tarafından açık bir kapiler tüp kullanılarak yapılmıştır. Kapiler duvarı, bir oktametilen ara yüzeyi ile dimetilpolisiloksana bağlanan permetilli-CD ile kaplanmıştır. Aynı kapiler nano-HPLC, GC, SFC ve CEC için kullanılmıştır. Daha sonra aynı grup, silika jele kimyasal olarak bağlı permetilat-β-CD ile doldurulan kapiler hazırlamışlardır.^{70,71}

Schurig ve Wistuba ise kiral CEC'lerde CD'lerin uygulamalarına genel bir bakış kazandırmışlardır.⁷² Kapilerde direkt olarak yerinde polimerizasyon yaparak hazırlanan sürekli yatak teknolojisine dayalı fazlar, Koide, Ueno, Végvári ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır.^{73,74}

Wistuba ve Schurig yüzeye permetilatlı β-CD bağlanarak ve 380 °C de kapilerin silika yatağına doldurularak, bir monolitik faz hazırlamışlardır.⁷⁵

2.6.3.7. Karbonhidratlar

Doğal polisakkaritler, zayıf kiral ayırım kabiliyeti göstermektedirler. Mikrokristalin selüloz triasetatın (CAT-I), büyütülerek düzenlenmiş ve aromatik grup içeren boşluklu yapıya sahip olan stero-selektif bileşikler içerebileceği bulunmuştur. Selüloz triasetat, farklı bir yolla hazırlanmıştır, makroporus silika jele kaplanmış ve açık bir şekilde

enantiyoseçilik göstermiştir. Bu uygulamada hidrojen bağları ve dipol dipol etkileşimler asıl etkileşim olarak kabul edilmiştir.⁷⁶⁻⁷⁸

Okamoto'nun grubu selüloz ester ve selüloz karbamat tabanlı ve geniş uygulama alanına sahip olan fazlar hazırlamıştır. Bu fazlar, Daicel (Tokyo, Japan) tarafından ticarileştirilmiştir. Bazı polisakkarit tabanlı fazlar normal faz, polar organik faz ve ters faz modlarına eklendiğinde kullanılabilirler.⁷⁹

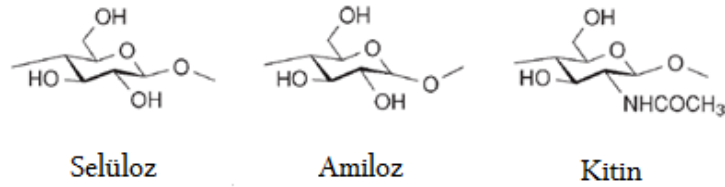


Şekil 12: Selüloz ve amilozun sarmal yapısı³³

Çeşitli polisakkarit tabanlı CSP'lerin uygulaması ve geliştirilmesi hakkında birçok çalışma gerçekleştirilmiştir. X-ışınları, nükleer magnetik rezonans (NMR) çalışmaları ve bilgisayar simülasyonları, selüloz trifenil karbamat tipi fazların (CTPC) kiral tanıma mekanizmalarına bazı tanımlamalar getirmiştir. İçerisinde polar karbamat grupları, dışında hidrofilik aromatik gruplarıyla kiral bir oluk oluşmuştur. Analitin polar grupları, kanal içerisindeki karbamat gruplarıyla hidrojen bağları oluşturarak etkileşebilir. Kiral tanımlama için ek olarak π - π -etkileşimlerinden de bahsedilebilir.⁸⁰ Selüloz, amilozla yer değiştirdiği zaman, farklı enantiyo seçicilikler gözlenebilir. CSP'lerin hazırlanması için kullanılan diğer polisakkaritler kitosan, kitin ve amilopektindir.

HPLC'de kullanılan bazı polisakkarit fazları, SFC'de de uygulama alanı bulmuştur. Doğal selüloz ve selüloz türevleri TLC için sabit faz olarak tanımlanmıştır. Maltodekstrin ve dekstranların CE'de kullanışlı birer kiral seçici oldukları bulunmuştur. Ayrıca burada, hidrojen bağları, dipol dipol etkileşimleri gibi ilave etkileşimlerle desteklenen sarmal yapı dizilişinin, kiral tanımadan sorumlu olduğu düşünülmüştür.^{81,82}

Amiloz, laminaran, pullulan, metilselüloz ve karboksimetil selüloz gibi polisakkaritler ve bazı monosakkaritlerin kiral ayırmada az miktarda etkili olduğu bulunmuştur. Heparin, sülfat bağlı glükoz amin glikanlar ve poligalakturonik asit gibi bazı negatif yüklü polisakkaritler, CE'de test edilmiştir ve bazik bileşiklerin kiral ayrımı için uygulama alanı bulmuştur. Bundan başka, dietilaminoetil dekstran, aminoglikozit antibiyotikler, streptomisin sülfat, kanamisin sülfat ve fraidomisin sülfat gibi bazı pozitif yüklü polisakkaritler incelenmiştir.⁸³



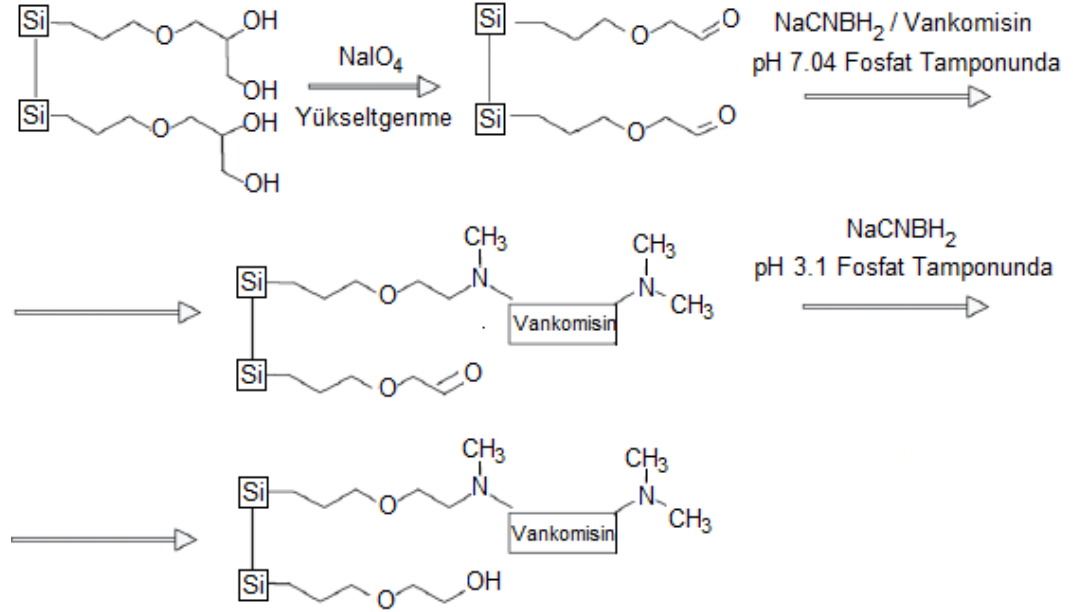
Şekil 13: Polisakkaritlerin yapısı¹⁰⁹

2.6.3.8. Makrosilik Antibiyotikler

Makrosilik antibiyotikler, Armstrong tarafından kiral seçici olarak tanımlanmıştır. Bu selektör HPLC'de, TLC'de, CE'de ve son zamanlarda CEC'de uygulama alanı bulmuştur.⁸⁴

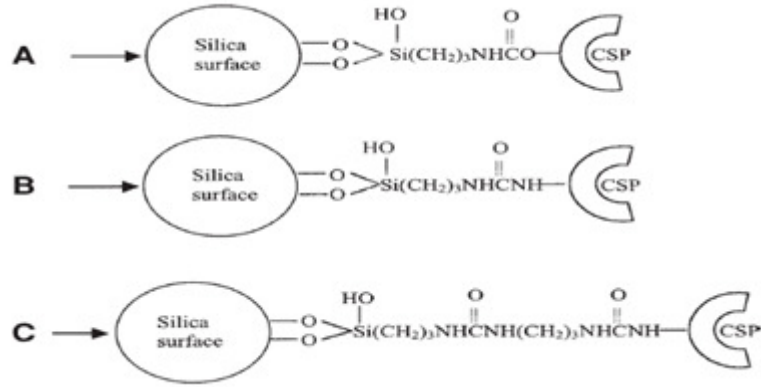
Makrosilik antibiyotiklerin iki temel grubu ansamisin rifamisin B, rifamisin SV ve avoparsin oldukça yaygın kullanılan selektörlerdir. Bu

temele dayanan CSP'ler Astec (Whippany, NJ, USA) tarafından ticarileştirilmiştir.



Şekil 14: Vankomisin silika sabit fazın sentez şeması¹⁰⁹

Diğer glikopeptit antibiyotiklerin serisi kiral ayırım yeteneği açısından incelenmiştir. Glikopeptitler makrosilik halkaların birleşmesiyle oluşan glikon parçalarını içerirler. Bu halkalar analitin hidrofilik parçalarını ve karbohidrat parçalarını tutabilen hidrofobik bir sepet şeklindedir. Analitin polar gruplarıyla hidrojen bağı oluşturan ve dipol dipol etkileşimi gerçekleştiren uzantılı polar kolları vardır. Bunun dışında, iyonik etkileşimler ve π - π -etkileşimleri ayırmada etkilidir.

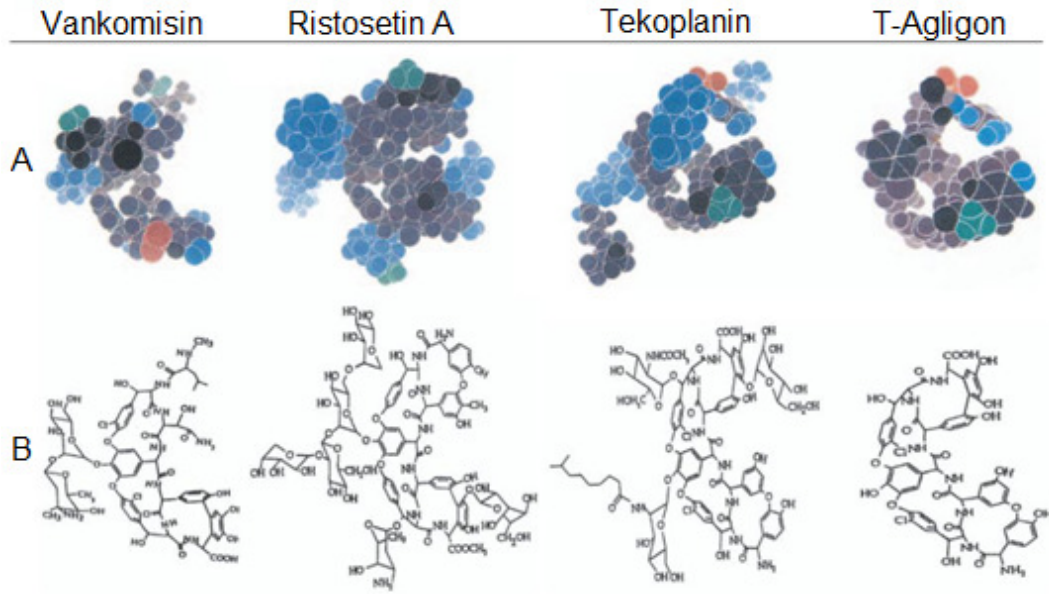


Şekil 15: Glikopeptitlerin silikaya bağlanmasının şematik diyagramı¹⁰⁹

Yukarıdaki şekilde A ve B şemaları, 3-izosiyanatpropiltrietoksisilan kullanılarak glikopeptitin silika yüzeye bağlanmasını gösterir. C ise bir alkil diizosiyanat parçasıyla γ-aminopropilsilanlanmış silika jele bağlı kiral merkezleri gösterir.

CE’de, bazık bileşikler için rifamisin B’nin üstün olduğu bulunurken, rifamisin SV ve glikopeptit antibiotiklerin asidik analitler için daha uygun olduğu bulunmuştur. CE’de bu selektörlerin kullanımında, UV-absorbsiyonu açısından tayin problemleri gözlemlendiği için, kısmi doldurma metodu ve karşıt akım prosesi bu problemleri çözmek için uygulanmıştır.⁸⁵

İlginç bir şekilde tekoplanin aglikon, büyük moleküllere kıyasla belirgin bir farkla stero seçicilik göstermiştir.

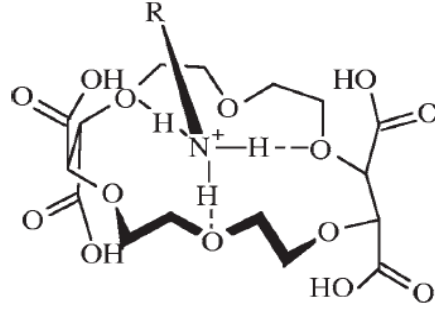


Şekil 16: Glikopeptitlerin yapısı¹⁰⁹

2.6.3.9. Kiral Taç Eterler

Taç eterler; alkali, toprak alkali metal iyonları ve amonyum katyonlarıyla kompleks oluşturan makrosilik polieterlerdir.

Sousa, Cram ve yardımcıları enantiyo seçici primer amin grupları içeren kiral taç eterleri bulmuşlardır ve ilk kiral taç eter fazlı LC'yi geliştirmişlerdir.⁸⁶ Kiral ayırım mekanizması olarak, amin azotla üç hidrojen arasında oluşturulan hidrojen bağları ve makrosilik eterlerin oksijenlerinin sağladığı dipol etki düşünülmüştür. Bu Şekil 2.17'de gösterilmiştir. Bunlardan başka, taç eterlerin yer değiştiricileri, bir çeşit kiral bariyer gibi makrosilik halkanın düzlemine yerleştirilmiştir. Böylece iki farklı diastromerik kompleks oluşturulmuştur.



Şekil 17: Bir kiral taç eter içindeki aminin stereoselektif yapısı¹⁰⁹

Shinbo ve arkadaşları; silika jel yüzeyinde adsorblanan polimerik taç eterden oluşan bir HPLC fazı geliştirmiştir ve amino asitlerle bu fazın kiral ayırımı için uygunluğunu ispatlamıştır.⁸⁷

Bu tür HPLC kolonları, Daicel tarafından Crownpack CR adı altında ticarileştirilmiştir.

Son zamanlarda taç eter fazlarına bazı kiral bağlanmalar ve onların amino asitlerin ve primer amino grubu içeren bileşiklerin kiral ayırımı için uygunluğu açıklanmıştır. Oticrown adı altında ticarileştirilen bir kolon daha yapılmıştır.⁸⁸

Daha yakın dönemde, Steffek ve arkadaşları sadece primer aminlerin değil bazı sekonder aminlerin de kiral taç eter faz oluşturabileceğini göstermiştir.⁸⁹ Kiral taç eterlerin CE'deki uygulamaları ilk defa Kuhn ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır.⁹⁰ Bu araştırmacılar amino asitlerin kiral ayırımı için düşük pH'da bir elektrolitte 18-crown tetracarboxilik asit ($18C_6H_4$) kullanmıştır. Burada kiral ayırmada, analit ve selektörün karboksilik grupları arasındaki taç eterlerin boşluklu yapısındaki etkileşimden başka hidrojen bağları, dipol dipol etkileşimler ve iyonik etkileşimler gibi yan etkileşimler de etkilidir. Bu kiral taç eterin sempatomimetikler, dipeptitler ve primer amino grupları içeren çeşitli ilaçların kiral ayırımı için uygunluğu bulunmuştur.

Mori ve arkadaşları taç eterlerle CE ayırmalarının susuz ortamda daha etkili olduğunu bulmuştur.⁹¹

2.6.3.10. Kaliksarenler

Kaliksarenler ilginç yeni bir tür kiral seçicilerdir. Kiral GC fazları son zamanlarda öne sürülen kaliksarenlerle oluşturulmuşlardır. Bu fazların uygulanabilirliği, bazı seçilmiş amino asitler, amino alkoller ve aminlerin kiral ayrımı sağlanarak ispatlanmıştır. Dipol dipol etkileşimleri ve hidrojen bağları tarafından desteklenen bir mekanizma kiral ayırmada etkilidir. Son zamanlarda, CE ve CEC'de kiral ayırım için kaliksarenlerin kullanımı gösterilmiştir. Bu güne kadar HPLC için hiçbir kaliksaren kiral ayrımı rapor edilmemiştir.⁹²

2.6.3.11. Diğer Sentetik Makrosiklikler

HPLC fazları için selektörler gibi bazı ilginç kiral reseptörler sentezlenmiştir. Uyarılama yapılan selektörlerin sentezi gelecekte şüphesiz önemli bir yaklaşım olacaktır.

2.6.3.12. Kiral Sentetik Polimerler

Blaschke ve asistanları L-fenilalanin grubu içeren poliakrilamitleri geliştirmişlerdir. Silika jele bağlı bu polimerleri içeren HPLC fazları, Chiraspher® adı altında ticarileştirilmiştir.⁹³

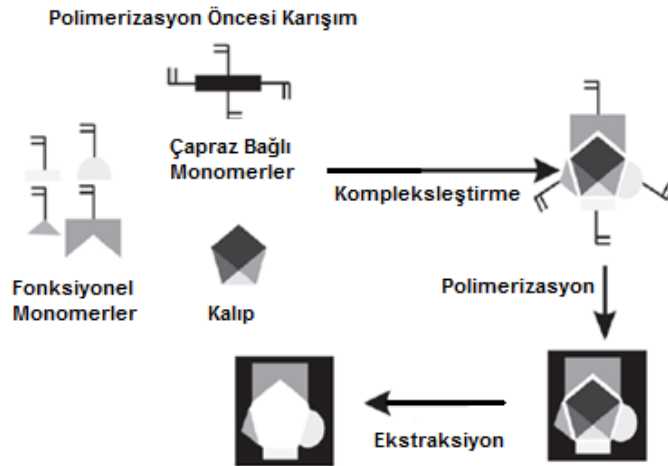
Okamoto'nun grubu, macroporous silika jelle desteklenen sarmal izotaktik polimetakrilamitleri sentezlemişlerdir. Daicel bu fazları Chiralpak OT adı altında ticarileştirmiştir.

Hjertén'in grubu, bir karşıtbağlayıcıyla kiral selektör içeren monomerlerin yerinde birlikte polimerleşmesiyle “devamlı yatak” teknolojisini geliştirmiştir. Bu basit adımla, monolitik fazlar hiçbir frite ihtiyaç duyulmadan oluşturulmuştur. Bu teknik kiral HPLC- ve CEC-fazlarının hazırlanması için uygulama alanı bulmuştur.⁹⁴

Kiral monomer olarak β -CD'nin norboren türevini kullanarak monolitik faz hazırlanması için bir halka açılmasıyla yerdeğiştirme polimerizasyonu ileri sürmüştür. Nakano kiral sentetik polimerlerin uygulamalarını ve sentezini genel olarak açıklamıştır.⁹⁵

2.6.3.13. Moleküler Baskılanmış Polimerler

Bu ilke Wulff tarafından tanıtılmıştır.⁹⁶ Bir monomer, kiral örnek molekülün varlığında çapraz bir bağlayıcıyla polimerleştirilmiştir. Örnek molekül ayrıldıktan sonra, moleküllerle yakından etkileşen ya da örneğe stereoseçici olan bir kiral baskılı boşluk oluşur. Bu teknik HPLC, TLC ve CEC'de uygulama alanı bulmuştur. Bazı gruplar, baskılama yaklaşımını kullanarak CEC için kiral monolitik faz hazırlamışlardır.



Şekil 18: MIP sentezindeki basamaklar¹⁰⁹

2.6.3.14. Kiral Selektör Olarak Proteinlerin Kullanımı

Proteinlerin stereoselektif olarak ilaçları tuttuğu biliniyor. Bu davranış ilaç enantiyomerlerinin kromatografik ve kapiler elektroforetik ayrımları için kullanılmıştır.

HPLC’de ve CE’de kiral selektör olarak kullanılan proteinler Tablo 1. de listelenmiştir.^{97,98}

Tablo 1: Kiral selektör olarak kullanılan proteinler¹⁰⁹

Protein	Trade name of CSP	Manufacturer
BSA	Chiral BSA	Shandon
	Resolvosil BSA-7	Nagel-Macherey
	Resolvosil BSA-7PX	Nagel-Macherey
	Ultron ES-BSA	Shinwa Chemical Ind.
HSA	Chiral-HSA	Chrom Tech AB
	Chiral HSA	Shandon
α 1-Acid glycoprotein	Chiral-AGP	Chrom Tech AB
Ovomucoid		
Ovoglycoprotein	Ultron ES-OVM	Shinwa Chemical Ind.
Avidin	Bioptic AV-1	GL Sciences/Ansys Techn.
Riboflavin binding protein		
Cellobiohydrolase I	Chiral-CBH	Chrom Tech AB
Lysozyme		
Pepsin	Ultron ES-Pepsin	Shinwa Chemical Ind.
Amyloglucosidase		
Ovotransferrin		
β -Lactoglobulin		

Kiral selektör olarak proteinlerin kullanılması rapor edilmiş ve TLC ve CEC’de bovin serum albümin, kiral selektör olarak bazı uygulama alanları bulmuştur.

Proteinlerin kiral tanınması üçboyutlu yapısının dizisiyle ilişkilendirilmiştir. Dipol dipol etkileşimler, hidrojen bağları ve hidrofobik etkileşimler, temel etkileşimler olarak düşünülmüştür. pH'a bağlı olarak negatif ya da pozitif yüklenebilirler. Organik düzenleyicilerin derişiminin, türünün, iyonik kuvvetinin ve pH'ının, alıkonma ve ayrımı kuvvetle etkilediği bulunmuştur. Proteinler geniş bir bileşik aralığına özgü enantioseçiciliğe sahiplerdir.

2.6.4. Farklı Yaklaşımlar

2.6.4.1. Susuz Kapiler Elektforez (CE)

CE'de kiral selektör ve analit sulu ortamda su molekülleri tarafından sarılacakları için çok az etkileşim gerçekleştirirler. Suyun bu engellemesinden kaçınmak ve kapiler duvarıyla etkileşimleri azaltmak için susuz ortamda çalışmak bazen avantajlıdır.^{99,100}

Kiral iyon çifti CE, sadece susuz ortamda uygulanabilir. Susuz solventlerde seçicilik sıklıkla geliştirilmiştir. Susuz solventlerde ısınma daha az olduğu için, göç süresini azaltmak için daha yüksek voltaj uygulanabilir. CE ve kütle spektrometresi (MS) eşleştiği zaman, susuz solventler daha az engelleme yaparlar. Sulu sistemlerde kullanılan birçok kiral ayırma ilkesi, susuz sistemlerde de başarılı bir şekilde uygulanmıştır.

2.6.4.2. İzotakoforez ve İzoelektrik Odaklanma

İzotakoforez (ITP)'le yapılan kiral ayırmalarla ilgili sadece birkaç tane makale vardır. Dankova ve arkadaşları,¹⁰¹ Fanali ve arkadaşları,¹⁰² ve Tousaint¹⁰³ temizleme ve önderiştirme izotakoforez kapiler bölge elektforez (ITPCZE) sistemlerini geliştirmişlerdir.

Kaniansky ve arkadaşları¹⁰⁴ ayrıca Hoffmann ve arkadaşları¹⁰⁵ tarafından enantiyomerlerin izolasyonu ve saflaştırılması için ITP sistemleri tasarlanmıştır.

Glukhovsky ve Vigh mg/h seviyesinde Dns-amino asitlerin kiral ayrımı için hazır olarak izoelektrik odaklanma (IEF) kullandılar.¹⁰⁶

2.6.4.3. Enantiyomerik Akımı Ters Çevirme Düzeni

Enantiyomerik akımı ters çevirme düzeni (EEO) ya da enantiyomerik göç düzeni (EMO), göreceli olarak ilaçların enantiyomerik saflığını kontrol etmek için gerekli görülebilir. Etkin olan enantiyomerin yüksek miktarının yanında miktarı az kabul edilen ve yan etkisi olabilecek etkin olmayan enantiyomerlerin tayini için önemli olabilir. Geniş pik alanına sahip etkin enantiyomerin kuyruklanmasıyla, etkin olmayan enantiyomerin piki örtüşebilir. Buna engel olmak için, etkin olmayan enantiyomer her zaman ilk pik olarak gözlenmelidir. Bunun en basit yolu, selektörün kiralitesini değiştirmek olacaktır.

CE'de EMO'yu ters çevirmeyi başarmanın diğer yolları, yüklü selektörü nötral hale getirmek, EOF'un yönünü ters çevirmek ya da pH'ı değiştirerek selektör ya da analitin hareketliliğini değiştirmek olabilir. Chankvetadze ve arkadaşları tarafından CE'de EMO'yu ters çevirmek için farklı olasılıkları içeren bir araştırma verilmiştir.¹⁰⁷

2.6.4.4. Biyolojik Numunelerde Bileşiklerin Kiral Analizi

Toksikolojik analizler, metabolizm çalışmaları, farmakodinamik çalışmalarla yapılan ayırmalarda olduğu gibi, biyolojik ya da farmakolojik özellik gösteren biyolojik numunelerdeki bileşiklerde kiral

ayırma gerek duyulur. Bu gereksinimler, numune ön hazırlık ve ön derişim aşamalarında yoğun olarak kullanılır.

2.6.4.5. Yeni Yaklaşımlar

Son çalışmalar sistemlerin küçültülmesi yönünde olmaktadır. Artan araştırmalar, CE ayrımı için mikrofibrilli çipler geliştirilmesi ya da nano-HPLC sistemleri kullanması yönünde olmaktadır. CEC daha popüler olma yönündedir. CEC'de monolitik faz kullanımı ve nano-HPLC kullanımı, bu teknikleri yakın gelecekte kesinlikle daha kullanışlı bir hale getirecektir.

Birkaç milyon tabakaya ulaşabilen ve eş zamanlı siklik CE'yi simgeleyen ilginç bir yaklaşım Zhao ve Jorgenson tarafından tanıtılmıştır.¹⁰⁸ CE ile akış-enjeksiyon analiz (FIA) sistemlerinin on-line kullanımı, numune verilerini iyileştirmek ve numune ön hazırlık aşamasına olanak sağlar.

Diğer bir ilginç yaklaşım enantiyoselektif enzim-bağlı imünosorbent assay (ELISA), imünosensörler ve akış enjekte imünoassay(FIIAs) için kullanılan stero-selektif antikorların uygulanması olacaktır.

2.6.4.6. Kiral Ayırma Metodu Seçimi

Stero seçiciliğin türüne göre, evrensel olarak geçerli bir kiral selektör ya da CSP bulunma olasılığı çok zayıftır. Ayırma ilkeleri her zaman analitin yapısına göre seçilmiş olmalıdır. Geniş aralıkta bileşiklerle çalışmaya olanak sağlayan bazı kiral selektörler vardır ancak birkaç durumda beklentileri karşılayabilir. Reaktif ve kolon uygulama kılavuzları oldukça yardımcı olabilmektedir.¹⁰⁹

2.7. Kromatografi Ayırma Parametreleri

Kromatografik yöntemlerde etkili bir ayırım gerçekleştirilebilmek için dikkat edilmesi gereken üç nokta vardır.

1. Numune bileşenleri kolonda tutunabilmelidir.
2. Numune bileşenleri diğerlerinden ayrılabilmelidir.
3. Numune bileşenlerinin bant genişlikleri nispeten dar olmalıdır.

Kimyasal ve fiziksel etkileşimler sonucu oluşan bu koşullar sağlanmazsa, uygun bir çalışma süresinde ayırım gerçekleşmez. Ayırımı iyileştirmek, uygun sabit faz ve hareketli faz seçimiyle doğrudan ilişkilidir. Koşulların uygunluğu ise kromatogramlar yorumlanarak kontrol edilir. Kromatogram; kromatografik bir yöntemde numune bileşenlerinin kolona verilmesinden dedektöre gelene kadar aldığı yol veya zamana karşı, dedektör tarafından elektronik olarak verilen sinyalle oluşturulan grafikdir. Bir kromatogramı yorumlamak için gerekli parametreler;

- Alıkonma zamanı, t_R
- Kapasite faktörü, k'
- Seçicilik faktörü, α
- Kolon ayırma gücü, R_s
- Kolon verimliliği, N ve L olarak verilmiştir.³¹

2.7.1. Alıkonma Zamanı, (t_R)

Alıkonma zamanı (t_R), numunenin kolona verilmesinden sonra dedektöre ulaşması için geçen süredir. Alıkonma davranışı numune bileşenlerinin hareketli faz ile sabit faz arasındaki dağılımını gösterir.

Alıkonmayı zaman olarak da hacim olarak da ifade edebiliriz. Alıkonma hacmi numune bileşenlerinin kolona verildikten sonra kolon boyunca ilerlemesi ve detektöre ulaşabilmesi gerekli olan mobil faz hacmidir. t_R alıkonma zamanı ve F_c volumetrik akış hızının çarpımı ile hesaplanır.

$$V_R = t_R F_c$$

Fakat GC ve HPLC gibi kromatografik sistemlerde hareketli fazın volumetrik akış hızını doğru olarak ölçmek mümkün olmayabilir. Bu nedenle alıkonma zamanı ifadesini kullanmak doğru olur.

Numune veya hareketli faz genellikle kolonda alıkonmayan bir madde içerir. Olmadığı durumlarda da pik tanımlanmasına yardımcı olması için kolonda tutulmayan bir madde analiz örneğine ilave edilebilir.

Kolonda tutunmayan maddenin dedektöre ulaşma süresi ölçü zaman (t_M) olarak ifade edilir ve kolonda ilerleme hızı hareketli faz moleküllerinin detektöre ulaşması için gereken süreye eşittir.^{28,30}

2.7.2. Kapasite Faktörü, (k')

Kapasite faktörü, kolonda çözünen numune bileşenlerinin göç hızlarını açıklamak için kullanılan bir ifadedir. Bir diğer adı ise alıkonma faktörüdür.

$$k_A' = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

eşitliği ile ifade edilir.

Burada k_A' numune bileşenlerinden herhangi birinin kapasite faktörüdür. t_M ölü zaman, t_R ise analitin alıkonma süresidir.

Bir analit için alıkonma faktörünün 1 den küçük olması, numunenin kolondan çıkış süresinin çok hızlı olduğunu gösterir ve bu durum alıkonma zamanının doğru tayinini zorlaştırır. Alıkonma faktörünün 20-30 birimden büyük olması, numunenin kolondan çıkış süresinin çok uzun olduğunu gösterir.

İdeal ayırmalar ise alıkonma faktörünün 2 ile 10 arasında olduğu koşullarda sağlanır.^{28,31}

2.7.3. Seçicilik Faktörü, (α)

İki bileşen arasında ayrımı sağlama yeteneği ve onların hassas olarak kolonda alıkoyulması kolon seçiciliği olarak adlandırılır. Bu seçicilik ayırma faktörü (α) olarak ifade edilir. A ve B gibi iki tür için bir kolonun seçicilik faktörü (α) eşitlikte görüldüğü gibi tanımlanır.

$$\alpha = \frac{k_2'}{k_1'}$$

k_2' kolonda daha kuvvetli tutulan analit için kapasite faktörüdür. k_1' ise kolondan hızla ayrılan analit için kapasite faktörüdür. Bu yüzden α daima 1 den büyüktür.

k' değerleri t_R ve t_M cinsinden yazılarak α 'nın deneysel kromatogramdan hesaplanabileceği bir bağıntı elde edilir.^{28,31}

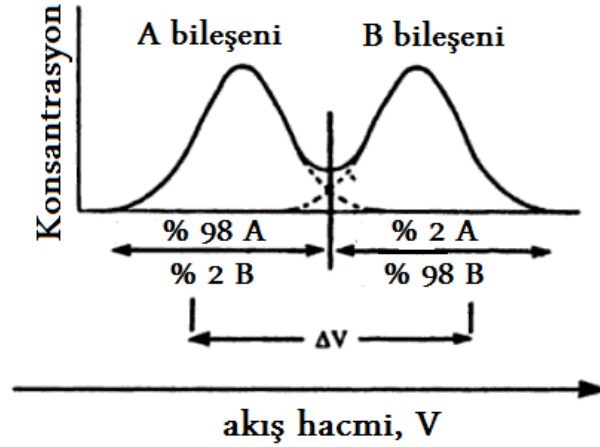
$$\alpha = \frac{(t_R)_2 - t_M}{(t_R)_1 - t_M}$$

2.7.4. Kolon Ayırma Gücü, (R_s)

Kolon ayırma gücü (R_s), kolonun iki analiti birbirinden ayırabilmesinin kantitatif bir ölçüsüdür. Kolon ayırma gücü, pik genişliklerinin orta noktaları açısından komşu iki pik arasındaki mesafeyi ifade eder. Ayırma gücü eşitlikte verildiği gibi hesaplanır.

$$R_s = \frac{2 [(t_R)_B - (t_R)_A]}{W_A + W_B}$$

Burada W , pik genişliğini ifade eder. $R_s = 1$ olduğu zaman neredeyse %2 lik çakışmayla ayırım sağlandığı anlamına gelir. Şekil 19'da bu kromatogram gösterilmiştir.



Şekil 19: Kolon ayırma gücünün gösterildiği bir kromatogram

Ayırma gücünün en az 1.5 olduğu durumlarda ideal ayırma gerçekleşir.^{28,31}

2.7.5. Kolon Verimliliği

Kromatografik analizlerde pik genişliği ölçülebilir ve bu kolon verimliliğine işaret eder. Pik genişliği ne kadar küçükse o kadar yüksek verimle çalışılmıştır. Kromatografik kolon verimliliğinin kantitatif bir ölçüsü olarak genellikle birbirleri ile ilgili iki terim kullanılmaktadır: Tabaka yüksekliği, H ve Tabaka sayısı, N. Bu iki terim arasındaki ilişki eşitlikte verilmiştir.

$$H = \frac{L}{N}$$

Bu ilişkide L, kolonun uzunluğudur (cm). Kromatografik kolonun verimliliği tabaka sayısı arttıkça ve tabaka yüksekliği azaldıkça artar.

Kromatografik kolon, teorik tabaka olarak adlandırılan, birbirini izleyen, fakat ayrı ince tabakalardan oluşmuş bir damıtma kolonuna benzemiş gibi düşünülür. Her bir tabakada, analitin sabit ve hareketli fazlar arasında dengeye ulaştığı kabul edilir.

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2$$

Bu eşitlik kullanılarak N, iki zaman ölçümü (t_R ve W) ile hesaplanabilir.^{28,31}

2.8. Analitik Yöntem Validasyonu

Validasyon; herhangi bir analitik yöntemde işlem, materyal, sistem ve faaliyetin beklenen sonuçları verdiğinin kanıtlaması işlemidir. Metot validasyonunun sonuçları, analitik sonuçların kalitesini, dayanıklılığını ve tutarlılığını değerlendirmek için kullanılabilir.

Geçerliliğin tanımlanmasında resmi kaynaklar arasında terminoloji farklılıkları bulunmaktadır. Geçerlilik çalışmalarının genel isimlendirilmesinde Uluslararası Standardizasyon Komitesi, ISO/IEC 17025 yöntem geçerliliği, Uluslararası Metroloji Sözlüğü (VIM) yöntem geçerliliği ve İyi Laboratuvar Uygulamaları (GLP) standart çalışma yöntemi (SOP) ifadelerini kullanır.

2.8.1. Yöntem Validasyonunun Basamakları

- Yöntemin uygulama şekli, amacının ve hedefinin tanımlanması
- Başarım göstergeleri ve kabul edilen değerlerin tanımlanması
- Geçerlilik deneylerinin tanımlanması
- Cihazın uygun başarım özelliklerinin değiştirilmesi
- Maddeler, standartlar ve belirteçlerin temini
- Ön geçerlilik işlemlerinin yapılması
- Yöntem göstergeleri ve kabul kriterlerinin ön deney sonucuna göre tekrar değerlendirilmesi
- Tam dahili ve harici geçerlilik deneylerinin yapılması
- Rutin çalışmalar için yöntemin çalışma esaslarının (SOP) geliştirilmesi
- Tekrar geçerlilik kriterlerinin belirlenmesi

- Kalite kontrol, sistem uygunluğu testleri ve uygulama döneminin belirlenmesi

- Geçerlilik deneylerinin yazılması ve sonuçların geçerlilik raporuna yazılması

2.8.2. Analitik Yöntem Validasyon Parametreleri

Validasyon parametreleri, validasyonu yapılacak yöntemin kullanım amacına ve kapsamına bağlı olarak değişebilir. Uluslararası Harmonizasyon Konferansı (ICH), insanlarda kullanılan ilaçların kayıdındaki teknik ihtiyaçları karşılamak için, analitik işlemlerin geçerliliği üzerine ortak bir döküman geliştirmiştir. Bu döküman birtakım geçerlilik göstergesinin tanımını içerir. Analitik bir yöntemin validasyonu için gerekli parametreler, ulusların farklı kuruluşlarında, uluslararası komitelerde ve literatürde belirtilmiştir. Genel olarak analitik bir yöntemin validasyon parametreleri aşağıda verildiği gibidir.^{110,111}

- Doğruluk
- Kesinlik
- Gözlenebilme sınırı (LOD), Tayin sınırı (LOQ)
- Çalışma Aralığı
- Doğrusallık
- Kalibrasyon Eğrisi
- Seçicilik ve Spesifiklik
- Duyarlılık
- Sağlamlık
- Tutarlılık

2.8.2.1. Doğruluk

Analitik yöntemin doğruluğu, yöntem ile elde edilen deney sonuçlarının gerçek değere yakınlığının bir ölçüsüdür. % geri kazanım olarak da ifade edilir. Farklı yollarla doğruluk değerlendirilebilir.

2.8.2.1.1. Referans Standart İle Karşılaştırmak

Yöntemin sonuçlarını, referans yöntemlerden birinin sonuçları ile karşılaştırmaktır. Karşılaştırma için bazı testler kullanılır. Karşılaştırılan referans yöntemin belirsizlikleri bilinmektedir.

2.8.2.1.2. Kör (matriks) ortamına analizi yapılan maddeyi ilave etmek

Bilinen konsantrasyonlara sahip bir numunenin analiziyle de doğruluk kontrol edilebilir. Analizi yapılacak madde, boş matrikslere farklı derişimlerde eklenir ve tayini yapılır.

Bu doğruluk kontrolü numunenin hazırlanışının etkisini ve matriks etkisini ölçer. Elde edilen değer mümkün olduğunca doğruya yakın olmalıdır. Doğruluk konsantrasyon başına kör hariç en az beş tayin ile belirlenir. Doğruluk için kabul edilebilir kriter, nominal değerden $\pm$ % 15 den fazla sapmanın olmamasıdır.

2.8.2.1.3. Standart ekleme yöntemi ile saf madde ilavesi

Analizi yapılacak numuneye, belirli miktarlarda konsantrasyonu bilinen analit ilave edilir ve bu işleme Standart Ekleme yöntemi adı verilir.

Numunedeki etken madde derişimi hazırlanan bu çözeltilerin kalibrasyon eğrisi (kalibrasyon eğrisi yönteminde örneğe muhtelif standart ilavesi ile oluşturulan eğride en düzgün doğru elde edilir. X-ekseni ilave edilen standardın konsantrasyonu ise (spike konsantrasyonu) Beer Kanununa göre eğrinin lineer olması gerekir) oluşturulmasıyla hesaplanır. Bu yöntem matriksin bilinmediği durumlarda kullanılır.

2.8.2.2. Kesinlik

Yöntemin kesinliği, herhangi bir değerin tekrarlanabilme kabiliyeti veya deney sonuçlarının birbirine yakınlığının bir derecesidir. Yani homojen bir karışımdan, kısa aralıklarla birden fazla numune alındığında elde edilen sonuçların birbiriyle uyumlu olmasıdır.

Kesinlik aynı zamanda rastgele ve belirsiz hataların bir ölçüsüdür. Kesinlik için kullanılan sayısal ölçütler mutlak standart sapma, bağıl standart sapma, varyasyon katsayısı ve varyans olarak verilir. Bir yöntemin kesinliği genellikle deney sonuçlarının RSD (bağıl standart sapma) 'si ile ölçülmüştür. Bu standart sapmalar 3 kategoride toplanmıştır. Tekrarlanabilirlik, orta-kesinlik ve tekrar elde edilebilirlik şeklinde açıklanabilir.¹¹²

2.8.2.2.1. Tekrarlanabilirlik

Tekrarlanabilirlik, aynı kişi tarafından aynı şartlarda kısa zaman zarfında sabit bir numunenin belli bir yöntem kullanılarak yapılan analiz için sonuçların tutarlılığıdır. Tekrarlanabilirlik, kesinliğin bir göstergesidir. En az 5 yada 6 ölçüm, 3 farklı matriks, 2 yada 3 farklı konsantrasyon ile analiz gerçekleştirilir ve % RSD hesaplanır.

Kesinlik için kabul edilebilir kriter, yapılan analizin türüne bağlı olarak değişir. Farmasötik analizlerde kalite kontrolde % 2 RSD başarılıdır. Biyolojik numunelerde duyarlılık konsantrasyon limitlerinde yaklaşık %15, ve diğer konsantrasyon düzeylerinde %10' dur. Çevresel ve gıda numunelerinde kesinlik matrikse, analit konsantrasyonuna göre değişim gösterir.¹¹²

2.8.2.2.2. Orta Kesinlik

Aynı laboratuardaki deneysel farklılıkları belirten bir kesinlik derecesidir. Haftalar boyunca bir laboratuarda aynı yöntemin farklı zamanlarda yapılan deney sonuçlarının karşılaştırılmasıyla verilir.

Bu yöntemle kesinliği sağlayan metotlar diğer kesinlik parametrelerini de sağlamış olurlar. Biyolojik numunelerle yapılan çalışmalarda %10-15 hata ile sonuçlar kesinliği sağlamış olur.

2.8.2.2.3. Tekrar Elde Edilebilirlik

Laboratuvarlar arasındaki kesinlik değerini temsil eder. Kesinliğin sağlanması, yöntemin farklı laboratuvarlarda da aynı sonuçları vermesine bağlıdır. Bir analitik yöntemin tekrar elde edilebilirliği; farklı analizcilerin farklı laboratuvarlarda homojen karışımlardan elde edilen numune analizlerine ve yöntemin özgüllük göstergeleri içinde olan, fakat yine de farklılık gösterebilen çevresel ve operasyonel durumların kullanılmasına bağlıdır.

Oda sıcaklığı ve nemindeki farklılıklar, farklı özelliklere sahip araç ve gereçler, farklı tecrübeye sahip analizciler, materyal ve kullanılan malzemenin durumundaki çeşitlilikler kesinliği etkileyen parametrelerdir.²⁸

2.8.2.3. Gözlenebilme Sınırı (LOD)

Zemin gürültüsünden farklı olarak %95 ya da % 99 güvenirlilik sınırı içinde tespit edilen fakat miktarı belirlenemeyen en düşük analit derişimidir. Gözlenebilme sınırı sinyal/gürültü oranı ile belirlenir. Genelde sinyal/gürültü oranı 2:1 veya 3:1 olarak kabul edilir.

Tayin sınırının hesaplanmasında diğer bir yöntem, kör veya tanık çözeltilerinin analizi yapılarak sonuçların standart sapması doğrunun eğimine bölünür. Bu değerin 3 katının alınmasıyla gözlenebilme sınırı hesaplanır.

$$\text{LOD} = 3 \times \text{SD} / m \quad \text{SD: Standart sapma}$$

m : eğim

2.8.2.4. Tayin Sınırı (LOQ)

Bir maddenin % 95 güven sınırı içinde tayin edilebilen en düşük miktarı olarak tanımlanmıştır. Bir başka ifadeyle analitik bir yöntemde, uygun doğruluk ve kesinlikte, analitin miktarı saptanabilen en düşük derişimdir. Tayin sınırı sinyal/gürültü olarak belirlendiğinde bu oran 10 olarak alınır.

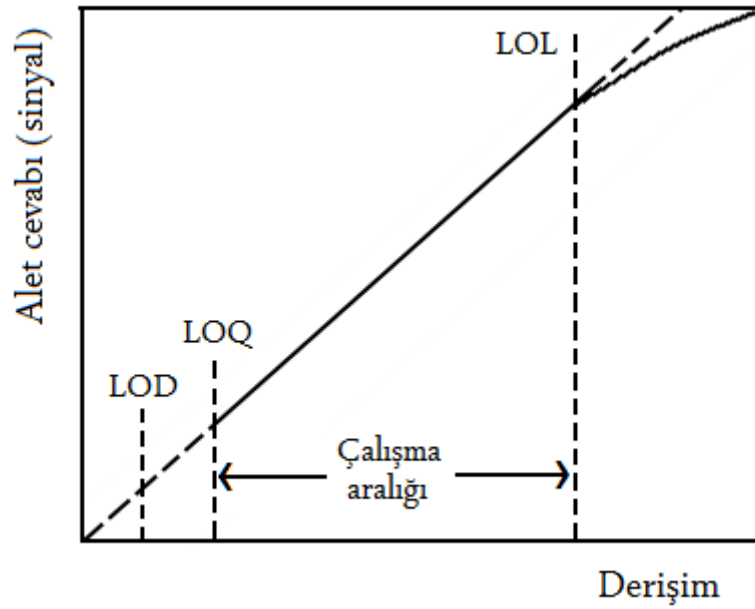
$$\text{LOQ} = 10 \times \text{SD} / m$$

Genellikle tayin sınırı gözlenebilme sınırının 3 katıdır. Bu yüzden bir diğer şekilde gösterildiği gibi hesaplanır.

$$\text{LOQ} = 3 \times \text{LOD}^{113-116}$$

2.8.2.5. Çalışma Aralığı

Analitik bir yöntemin çalışma aralığı; kesinlik, doğruluk ve doğrusallık belirlenirken, tayin edilebilen en düşük derişimden (LOQ), kalibrasyon eğrisinin doğrusallıktan sapma gösterdiği derişime (LOL) kadar olan aralığı kapsar.



Şekil 20: Bir analitik yöntemin çalışma aralığı, LOQ: Kantitatif ölçüm sınırı, LOD: Gözlenebilme sınırı LOL: Doğrusal cevap sınırı^{28,115,116}

2.8.2.6. Doğrusallık

Bir analitik yöntemin doğrusallığı, deney sonuçlarından doğrudan elde edilerek ya da matematiksel olarak iyi tanımlanmış derişimleri belli, belirli bir sırada verilen analitin değişik konsantrasyondaki örneklerinden elde edilir.

Doğrusallık % 80 - % 120 oranındaki konsantrasyon uzunluğuna sahip beş ya da beşten fazla standarttan üçten altıya kadar

uygulama serisiyle sağlanır. Cevap doğrudan veya çok iyi tanımlanan matematiksel hesaplara dayanmalıdır. Eğer sıfır olmayan bir değer elde edilirse bu yöntemin doğrusallığı üzerinde bir etki olmadığını kanıtlar.

Bir analitik yöntemin sınırları ise; bir yöntemin doğruluğu, doğrusallığı ve kesinliği kullanılarak kararlaştırılmış en düşük en yüksek değerler arasındaki süreçtir. Sınırlar, normalde bir analitik yöntemden elde edilen test sonuçları olarak aynı üniteler içinde açıklanır.^{110, 115, 116}

2.8.2.7. Kalibrasyon Grafiği

Analit derişimi kesin olarak bilinen ve farklı derişimlerde hazırlanmış en az 5 tane standart çözelti için analitik cevap alınır. Bu analitik cevap, analit derişimine göre grafiğe geçirilir. Elde edilen bu eğriye kalibrasyon grafiği adı verilir.

Kalibrasyon grafiğinin başarısı, standart çözeltilerin ortamının, analit çözeltisinin ortamına benzemesine bağlıdır. Ortam hatasını gidermek ya da azaltmak için girişim yapan maddenin veya analitin ortamdaki ayrılması gerekir.

2.8.2.8. Seçicilik ve Özgünlük

Seçicilik ve özgünlük aynı parametre olarak kabul edilse de, tanımları Vessmann farklı şekilde yapmış ve bu terimlerin özellikle IUPAC/WELAC ile ICH tarafından yapılan tanımları arasındaki farka değinmiştir.

Analitik bir yöntemin özgünlüğü; genellikle tek analite cevap üreten bir yöntem içindir. Fakat tek analite cevap veren yöntemlerin sayısı oldukça azdır.

Analitik bir yöntemin seçiciliği; analiti, numunede varlığı tespit edilmiş analit ile girişim yapabilen diğer bileşenlerden farklı olarak ölçme yeteneğidir. Numune matrisinde bulunması gereken bileşenlerin yanında analiz edilecek maddelerin doğru ve özgün belirlenebilmesi, analitik yöntemlerin seçiciliğini belirler. Analitik yöntemin verdiği cevap diğer tüm cevaplardan farklı ise yöntem seçicidir. Analite cevap veren oldukça az yöntem olduğu için seçicilik terimini kullanmak daha uygundur.

Özellikle sıvı kromatografi yönteminde seçiciliği artırmak için uygun kolon ve kromatografi koşulları (örneğin; mobil faz bileşimi, kolon sıcaklığı, dalga boyu) seçilmelidir.

Analitik yöntemlerde seçiciliği belirleyebilmek için ayırma gücü (R_s) değerlerine bakılır.

2.8.2.9. Duyarlılık

Analitik bir yöntemde, kullanılan cihazın analit derişimindeki küçük farkları ayırt edebilme yeteneğidir. Duyarlılığı sınırlayan iki faktör vardır. Birincisi; kalibrasyon eğrisinin eğimidir. İkincisi ise; ölçüm aracının kesinliği ve tekrarlanabilirliğidir.

Herhangi iki yöntemin kesinliği eşit ise, kalibrasyon eğrisi daha dik olan yöntem daha duyarlıdır. Uluslar Arası Kuramsal ve Uygulamalı Kimya Birliği (IUPAC) tarafından kabul edilen duyarlılığın kantitatif tanımı *kalibrasyon duyarlılığı* olarak yapılır.

$$\text{Kalibrasyon duyarlılığı} = \text{eğim (m)}$$

Kalibrasyon duyarlılığı her ölçümün kesinliğini dikkate alma yönünde yeterli olmayan bir sayısal ölçüttür. Bu yüzden Mandel ve

Stiehler, kesinliği duyarlılık için kullanılan matematiksel bir ifade içinde kullanmak gerektiğini düşünmüşlerdir. Ve *analitik duyarlılığı* geliştirmişlerdir.

$$\text{Analitik duyarlık} = m/SD$$

m : Kalibrasyon eğrisinin eğimi

SD: Kalibrasyon eğrisindeki bir noktadaki ardışık ölçümlerin standart sapması

Analitik duyarlılık çoğaltıcı etkilerden nispeten bağımsız olma özelliğine sahiptir. Ayrıca kullanılan birimlere bağlı değildir.^{28,115}

2.8.2.10. Sağlamlık

Sağlamlık testleri, analiz parametrelerinin analiz sonuçları üzerindeki etkilerini ölçer. Çeşitli şartlar altında yöntemin analitik sonuçlarının kabul edilebilir doğruluk ve kesinliğini saptama kabiliyeti olarak da tanımlanabilir.

Sağlamlık, yöntemin bir veya birden daha fazla parametresi değiştirildiğinde tekrar validasyona ihtiyacı olup olmadığına karar verilmesini sağlar. Uluslararası Uyum Konferansı (ICH: International Conference On Harmonization) dökümanları; gelişme fazı sırasında, bir yöntemin sağlamlık gelişimini dikkate almayı tavsiye eder. Farklı oda sıcaklığı ve farklı labarotuvarlardaki nem, farklı tecrübeye sahip analizciler, farklı firmaların aletleri, farklı kaynaklardan belirteçler sağlamlığa etki eden faktörler arasındadır.¹¹⁵

2.8.2.11. Tutarlılık

Analitik bir yöntemin tutarlılığı, aynı analiz numunesinin uzun zaman aralıklarında farklı koşullarda analizi yapıldığındaki tekrarlanabilirliğinin bir ölçüsü olarak tanımlanmıştır. Yani normal koşullarda farklı kişiler veya farklı laboratuarda elde edilen sonuçların değerlendirilmesiyle hesaplanır. % bağıl standart sapma ile ifade edilir.

Uluslararası Uyum Konferansı (ICH), analitik bir yöntemin validasyonunda bu parametreyi zorunlu kılmamıştır.^{28,115}

2.9. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Sıvı kromatografisi yönteminin özel bir uygulaması olan HPLC, son yıllarda kolon doldurma ve cihaz kullanımında yapılan yeniliklerle geliştirilmiştir. Tanecik boyutunun azaltılmasıyla kolon veriminin artacağı düşünülmüş ve 3-10 µm çapında taneciklerden oluşan dolgu maddeleri üretilmiştir. Bu teknolojinin uygulanması için ise yüksek basınçlı cihazlar kullanılmıştır. Bu yüzden yöntemin adı yüksek performanslı sıvı kromatografisi olmuştur.

HPLC, yüksek verimle çalışan, analiz süresi kısa olan, tekrarlanabilirliği yüksek, düşük sıcaklıklarda çalışma imkanı veren ve yüksek duyarlılıkla çalışan bir yöntemdir. Bu nedenlerden dolayı nicel analiz için uygun ve geniş çalışma aralığına sahip bir yöntemdir.

Kimya, biyokimya, biyoteknoloji, farmakoloji, tıp kimyası, bitki kimyası, tarım ve kimya mühendisliği gibi uygulama alanları vardır.

HPLC yöntemiyle, proteinler, nükleik asitler, hidrokarbonlar, karbonhidratlar, ilaçlar, terpenoidler, pestisitler, antibiyotikler, steroidler, metal-organik türler ve çeşitli inorganik bileşiklerin tayini yapılabilir.^{28,31}

2.9.1. Sıvı Kromatografi Sistemleri

Sıvı kromatografisi sistemini oluşturan parçalar aşağıda listelenmiştir.

1. Hareketli Faz Hazneleri
2. Pompalama Sistemleri
3. Akış Kontrolü ve Programlama Sistemleri
4. Numune Enjeksiyon Sistemleri

5. Sıvı Kromatografi Kolonları

Analitik Kolonlar

Emniyet Kolonları

Kolon Termostatları

6. Dedektörler

2.9.2. HPLC Cihazının Çalışma Prensibi

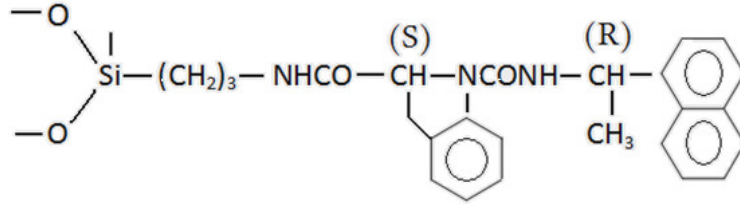
Yüksek performanslı sıvı kromatografisinin çalışma prensibi temel olarak numunenin uygun çözücü içinde çözülmesi ve bu çözeltinin yüksek basınç altında sabit faz içeren çelik kolondan geçirilmesi esasına dayanır.

Hareketli fazın sisteme verilmesi bir piston pompası aracılığıyla sağlanır. Pompalama bir rezervuardan yapılır. Numunenin kolona verilmesi pompa ile kolon arasında yer alan enjeksiyon valfı yardımıyla olur. Numune, yükleme durumunda enjekte edilir. Sonra valf, enjeksiyon pozisyonuna çevrilir. Böylece numune hareketli faz yardımıyla kolona verilmiş olur.

Numune bileşenleri kolonun ve hareketli fazın özelliklerine göre kolonda farklı hızlarda ilerler ve farklı zamanlarda kolonu terkederler. Kolondan ayrılan hareketli faz dedektöre gelir ve bir sinyal işlemci tarafından analitik sinyale dönüştürülür. Bu sinyal (pik) kromatogram halinde kaydedilir.

2.10. Chirex 3022 Kolonunun Özellikleri

Çeşitli kiral sabit fazlardan biri olan Pirkle Type makul bir şekilde daha kullanışlı ve daha seçicidir. Bu çalışmada kullanılan kolon Chirex(S)_ICA/(R)_NEA (00G_3022 _E0, 250_4.6 mm) kolonu da pirkle type bir kolondur. Chirex 3022 kolonu optik olarak aktif bir amino asit türevinin, γ -aminopropil silanlanmış silika jele kovalent olarak bağlanmasıyla oluşturulmuştur. Amino asit zincirinin asimetric merkezlerine bağlı amit veya ürenin π -elektron grupları, π -elektron etkileşiminin olmasına ve kiral tanımayla olanak sağlar. Burada ayırım π - π donör akseptör etkileşimine dayanır. Bunun için CSP π -asidik ya da π -bazik aromatik grup içermelidir. Ayırımı yapılacak rasemik analitler de π -asidik ya da π -bazik aromatik grup içermelidir ya da bunlarla türevlendirilmiş olmalıdır.



Şekil 21: Chirex 3022 Kolon Dolgu Maddesi

(S)-indolin-2-karboksilik asit ve (R)-1-(α -naftil)etilamin üre bağı, elektron veren gruplardır. Bu merkezler aminlerin, amino alkollerin ve alkollerin ayırımına olanak sağlarlar.

3.GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Kimyasal Maddeler ve Bileşikler

- Atenolol (Sigma–Aldrich, Germany)
- Propranolol (Sigma–Aldrich, Germany)
- Timolol (Bayer, Türkiye)
- Hekzan (Sigma–Aldrich, Germany ve Merck, Germany)
- Diklorometan (Sigma–Aldrich, Germany ve Merck, Germany)
- Metanol (CH₃OH Sigma–Aldrich, Germany ve Merck, Germany)
- Etanol (C₂H₅OH Sigma–Aldrich, Germany ve Merck, Germany)
- Trifloroasetikasit (Fluka, Switzerland ve Merck, Germany)
- Deiyonize su (18MΩ.cm)

3.2. Kullanılan Cihazlar

- HPLC pompası (Agilent technologies 1200 series)
- UV dedektörü (Agilent technologies 1200 series)
- CSP kolon cihazı (Chirex(S)_ICA/(R)_NEA (00G_3022 _E0, 250_4.6 mm))
- Ultrasonik banyo (BANDELIN SONOREX)
- Hassas terazi (SHIMADZU AW 320)
- Soğutucu
- Deiyonize su cihazı (MILLIPORE SIMPLICITY 185)

3.3. Kullanılan Cam Malzemeler

- Mezur (100mL)
- Balon joje (10, 25, 50 mL)
- Beher (25, 50 mL)
- Enjektör (20µL)

3.4. Kullanılan Diğer Malzemeler

- Filtre (0.45 µm, naylon)
 - Şırınga filtre (4 mm 0.45 µm naylon)
 - Mikrosantrifüj (1.5 mL)
- (Eppendorf) Tüpü

3.5. Kullanılan Farmasötik Preparatlar

Analizi yapılan etken maddeleri içeren Nortan ve Dideral tablet formları kullanılmıştır.

Tablo 2: Atenolol ve propranololün tablet formları

Etken Madde	Müstehzar adı	Farmasötik şekli	Birim doz içeriği
➤ Atenolol	Nortan	Tablet	50mg
➤ Propranolol	Dideral	Tablet	40mg

3.6. Çözeltilerin Hazırlanması

3.6.1. Atenolol Stok Çözeltisi

Analizi yapılacak olan atenolol çözeltisi için hem rasemik atenolol hem (R)-ve (S)-atenolol stok çözeltileri, derişimleri $1000 \mu\text{g ml}^{-1}$ olacak şekilde metanol içerisinde hazırlandı.

3.6.2. Propranolol Stok Çözeltisi

Analizi yapılacak olan propranolol çözeltisi için rasemik, (R)-ve (S)-propranolol stok çözeltileri $1000 \mu\text{g ml}^{-1}$ olacak şekilde etanol içerisinde hazırlandı.

3.6.3. Timolol Stok Çözeltisi

Analizi yapılacak olan timolol çözeltisi için stok çözelti $1000 \mu\text{g ml}^{-1}$ olacak şekilde metanol içerisinde hazırlandı.

3.6.4. Standart Çözeltiler

Rasemik atenolol stok ($1000 \mu\text{g, mL}^{-1}$) çözeltisinden, konsantrasyonu 50, 75, 100, 125, 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ olan atenolol standart çözeltileri metanol ile seyreltilerek hazırlandı. Bu çözeltilere iç standart olarak timolol stok ($1000 \mu\text{g, mL}^{-1}$) çözeltisinden son konsantrasyonu 2 $\mu\text{g, mL}^{-1}$ olacak şekilde çözelti ilave edildi.

Rasemik propranolol stok ($1000 \mu\text{g, mL}^{-1}$) çözeltisinden, konsantrasyonları 5, 15, 25, 35, 45, 55 $\mu\text{g mL}^{-1}$ olan propranolol standart çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilere iç standart olarak timolol stok (1000

$\mu\text{g},\text{mL}^{-1}$) çözeltisinden son konsantrasyonu $10 \mu\text{g},\text{mL}^{-1}$ olacak şekilde çözelti ilave edildi.

3.6.5. Sistem uygunluk çözeltileri

3.6.5.1. Test Çözeltileri

Ticari olarak satılan atenolol örneğinden ortalama değeri 214.3 ± 2 mg olan on tablet alınarak havanda toz haline getirildi. Bundan 428 mg madde hassas olarak tartıldı ve 100 ml metanolde çözüldü. $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ numune çözeltisi hazırlanmış oldu. Stok çözeltisi şırınga filtresiyle süzildükten sonra son konsantrasyonları 80, 100, 120 $\mu\text{g mL}^{-1}$ olan numuneler elde edildi.

Ticari olarak satılan propranolol örneğinden ortalama değeri 201.03 ± 3 mg olan on tablet alınarak havanda toz haline getirildi. Toz haline getirilen bu örnekten 503 mg madde hassas olarak tartıldı ve 100 ml etanolde çözüldü. $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ numune çözeltisi hazırlanmış oldu. $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ numune çözeltisi şırınga filtreyle süzildükten sonra son konsantrasyonları 20, 30, 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ olan numuneler, 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ timolol internal standardı içerecek şekilde hazırlandı.

3.6.5.2. Hareketli Faz Çözeltileri

Atenolol için uygun hareketli faz çözeltisinin bileşenleri heksan, diklorometan, metanol ve trifloroasetik asittir. Bütün hareketli faz bileşenleri ilk önce 0.45 μm naylon filtreden süzildükten sonra, hacimce yüzde bileşimleri % 60 hexan, % 35 diklorometan, % 5 metanol (20:1 trifloroasetikasit) içerecek şekilde karıştırıldı. Burada sadece metanol ve trifloroasetik asit 20:1 oranında karıştırıldıktan sonra süzüldü. Sonikatörde 15 dk bekletilerek çözünmüş gazlar uzaklaştırıldı.

Propranolol için de aynı hareketli faz bileşenleri kullanıldı. Yine hareketli faz bileşenlerinin tamamı 0.45 µm naylon filtreden süzüldü. Metanol ve trifloroasetik asit 20:1 oranında karıştırıldıktan sonra süzüldü. Hacimce yüzde bileşimleri % 55 hekzan, % 40 diklorometan, %5 metanol % 0.25 trifloroasetikasit olacak şekilde karıştırılmış ve sonikatörde 15 dk bekletilerek çözünmüş gazlar uzaklaştırıldı.

3.7. Deneyin Yapılışı

Sistem açıldıktan sonra uygun parametreler bilgisayarda ayarlandı. Dedektör lambasının ısınması, kolonun uygun sıcaklığa ve basınca gelmesi beklendi. Her iki etken madde için de HPLC yöntemini uygularken sisteme analizi yapılacak olan çözeltileri enjekte etmeden önce sistemin dengeye gelmesi sağlandı. İlk olarak 5 dk boyunca kolondan geçmeyecek şekilde, sistem kanalları hareketli faz ile yıkanarak sistemdeki kanallarda bulunan havanın uzaklaştırılması sağlandı. Daha sonra hareketli fazı 30 dk boyunca kullanılacak olan kolondan da geçirerek kolonun ve sistemin dengeye gelmesi, ayrıca sistemin ve kolonun temizlenmesi gerçekleştirildi. Sistem uygun hale geldikten sonra enjeksiyonlar yapıldı.

Sistem kapatılırken ise yine hareketli faz ile 20 dk boyunca hem sistem hem kolon yıkanır. Kullanılan hareketli faz çözeltisinde tuz oluşturarak sistemi ve kolonu tıkayabilecek maddeler bulunmadığı için hareketli fazla yıkama yapıldı.

3.8. HPLC Sistemi Optimizasyonu

Atenolol ve propranolol etken maddelerinin enantiyomer ayrımı için en iyi ayırma koşullarının belirlenmesi için sabit faz, hareketli faz, sıcaklık ve akış hızı parametreleri incelendi. Analizde deneysel hataları, enjeksiyon yapımından kaynaklanan hataları gidermek için iç standart seçimi yapıldı.

3.8.1. Sabit Faz Seçimi

Atenolol etken maddesinin kiral ayrımı için üç kolon denendi. Crownpak CR(+), Chiralcel OD ve Chirex 3022 kolonları denendi. Atenololün enantiyomer ayrımı için yapılan araştırma sonuçlarına ve diğer kolonlarla yaptığımız deneylere bakılarak Chirex(S)_ICA/(R)_NEA (00G_3022 _E0, 250_4.6 mm) kolonunun uygun olduğuna karar verildi.

3.8.2. Hareketli Fazın Belirlenmesi

Hareketli faz bileşimi belirlenirken seçilen kolonun özelliklerine bağlı olarak önerilen hareketli faz bileşenleri denendi. Chirex(S)_ICA/(R)_NEA (00G_3022 _E0, 250_4.6 mm) kolonu için önerilen hareketli faz bileşenleri hekzan, diklorometan veya dikloroetan, metanol veya etanol ve çok düşük bileşimde de trifloroasetik asittir. Burada ayrımı etkileyen asıl bileşenler hekzan, diklorometan veya dikloroetan, metanol veya etanoldür. Trifloroasetik asit ise daha düzgün pik şekilleri olmasını sağlayan bir bileşendir.

Atenololün enantiyomer ayrımı için yapılan analizde, hareketli fazda hekzanın % 80'in üzerinde kullanılması alıkonma süresini yüksek oranda artırdı. Metanolün ise % 10'dan fazla kullanılması ayrımı olumsuz yönde etkiledi. Bu yüzden yapılan çalışmalar sonucunda % 60

hexan, % 35 diklorometan, %5 metanol (20:1 trifoloroasetikasit) içeren hareketli fazın en uygun hareketli faz olduğu bulundu.

Propranololün enantiyomer ayrımı için yapılan analizde, hareketli fazda metanol kullanıldığı zaman piklerde yarıma gözlendi. Bu yüzden metanol yerine etanol denendi ve olumlu sonuç alındı. Etanol oranı %10 dan daha az kullanıldığı zaman ayrımın iyileştiği gözlendi. Hekzan oranı arttıkça ayrımın belirli oranda iyileştiği fakat alıkonma süresinin uzadığı gözlendi. Bu yüzden hekzan oranı çok yüksek değerlerde kullanılmadı. Bu kolon ile yapılan çalışmalar sonucunda % 55 hekzan, % 40 diklorometan, %5 etanol % 0.25 trifoloroasetikasit içeren hareketli fazın en uygun hareketli faz olduğu bulundu.

3.8.3. Akış Hızı Ve Sıcaklığın Belirlenmesi

Atenolol için yapılan çalışmada sıcaklık 20 °C ve 40 °C arasındaki sıcaklık değerleri 5 °C lik artışlarla taranmıştır. Sıcaklığın ayrımı büyük oranda etkilemediği gözlendi. Alıkonma hızını birkaç dakika öne aldığı için 35 °C de çalışılması uygun bulundu. Akış hızı ise 1,0; 1,5 ve 2,0 ml/dk olarak değiştirildi. Akış hızı ayrımı büyük ölçüde değiştirmemesine karşın alıkonma süresini fazlaca etkilediği gözlendi. Akış hızı arttıkça alıkonma süresi kısalır. Bu yüzden akış hızı 2 ml/dk olarak belirlendi.

Propranolol için yapılan çalışmada sıcaklığın etkisine 20 °C, 25 °C, 30 °C ve 35 °C lerde bakıldı. Sıcaklık ayrımı etkilemedi ve 20 °C de çalışılması uygun bulundu. Akış hızı 1,0; 1,5 ve 2,0 ml/dk olarak değiştirildi ve akış hızı 2 ml/dk olarak belirlendi.

3.8.4. İç Standardın Belirlenmesi

Atenolol ve propranolol için yapılan çalışmalarda hataları azaltmak için kullanılan bir yöntem olarak iç standart yöntemi kullanıldı. Bunun için bazı maddeler incelenmiş ve yapısal olarak atenolol ve propranolole en yakın madde timolol olarak bulundu. Timolol içeren standartların vermiş olduğu kromatogramlar incelenmiş alıkonma zamanının da uygunluğu tespit edildi. Bu yüzden her iki madde için de iç standart olarak timolol kullanıldı.

3.9. Atenololün HPLC-UV yöntemi ile analizi için sistem uygunluk testi

Optimizasyon çalışmaları tamamlandıktan sonra analize başlandı. Atenolol tayininde sistem uygunluk parametlerinin tespiti için en uygun internal standart timolol olarak belirlendi. Hareketli fazı % 60 hexan, % 35 diklorometan, % 5 metanol (20:1 trifloroasetikasit(TFAA)), akış hızı 2 ml,dk⁻¹, dalga boyu 280 nm ve sıcaklığı 35 °C olan koşullarda 10 µl enjeksiyon yaparak elde edilen deney sonuçlarıyla Tablo.1 deki parametreler belirlendi.

3.10. Propranololün HPLC-UV yöntemi ile analizi için sistem uygunluk testi

Optimizasyon çalışmaları tamamlandıktan sonra analize başlandı. Propranolol tayininde sistem uygunluk parametlerinin tespiti için en uygun internal standart timolol olarak belirlendi. Hareketli fazı % 55 hexan, % 40 diklorometan, % 5 etanol % 0.25 trifloroasetikasit, akış hızı 2 ml,dk⁻¹, dalga boyu 254 nm ve sıcaklığı 20 °C olan koşullarda 20 µl enjeksiyon yapılarak elde edilen deney sonuçlarıyla Tablo.2 deki parametreler belirlendi.

3.11. Atenololün ve Propranololün Analizi İçin HPLC-UV Yönteminin Validasyonu

Atenolol ve propranolol için geliştirilen yöntemlerin geçerliliğini kanıtlamak için çeşitli validasyon parametrelerine bakıldı. Bu amaçla doğruluk, kesinlik, doğrusallık ve duyarlılık parametreleri incelendi.

3.11.1. Atenolol ile yapılan çalışmada doğrusallık ve duyarlılık

Çalışma koşulları belirlendikten sonra kalibrasyon eğrisi çizildi. Rasemik atenolol stok ($1000 \mu\text{g},\text{mL}^{-1}$) çözeltisinden, son konsantrasyonları 50,75,100,125,150 $\mu\text{g},\text{mL}^{-1}$ olan atenolol standart çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilere iç standart olarak timolol stok ($1000 \mu\text{g},\text{mL}^{-1}$) çözeltisinden son konsantrasyonu 2 $\mu\text{g},\text{mL}^{-1}$ olacak şekilde çözelti ilave edildi. Her bir standarttan üçer kez, 10 μl lik enjeksiyonlar yapılarak kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. Tablo 5'de deneylerden elde edilen kantitatif parametreler verildi.

3.11.2. Propranolol ile yapılan çalışmada doğrusallık ve duyarlılık

Çalışma koşulları belirlendikten sonra kalibrasyon eğrisi çizildi. Rasemik propranolol stok ($1000 \mu\text{g},\text{mL}^{-1}$) çözeltisinden, son konsantrasyonları 5, 15, 25, 35, 45, 55 $\mu\text{g},\text{mL}^{-1}$ olan propranolol standart çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilere iç standart olarak timolol stok ($1000 \mu\text{g},\text{mL}^{-1}$) çözeltisinden son konsantrasyonu 10 $\mu\text{g},\text{mL}^{-1}$ olacak şekilde çözelti ilave edildi. Her bir standarttan üçer kez, 20 μl lik enjeksiyonlar yapılarak kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. Tablo 6'da deneylerden elde edilen kantitatif parametreler verildi.

3.11.3. HPLC yöntemiyle yapılan analizde atenolol için geri kazanım

Atenololün enantiyomer ayrımı için geliştirilen yöntem tablet formuna uygulandı. Tablet katkı maddelerinin yönteme etkisini belirlemek açısından geri kazanım çalışması yapıldı. Geri kazanım standart ekleme yöntemiyle gerçekleştirildi.

Standart ekleme yöntemini uygulamak için atenololün tablet formundan hazırlanan stoktan son derişimi 50 ppm olacak şekilde 5 numune hazırlandı. Bunlardan dördüne yine son derişimleri 10, 20, 30, 40 ppm olacak şekilde standartlar eklendi. Bu standartlarla oluşturulan kalibrasyon eğrisinden yararlanarak atenolol enantiyomerlerinin tablet formundaki derişimi hesaplandı. Sonuçlar % geri kazanım olarak verildi.

3.11.4. HPLC yöntemiyle yapılan analizde propranolol için geri kazanım

Propranololün enantiyomer ayrımı için geliştirilen yöntem tablet formuna uygulandı. Tablet katkı maddelerinin yönteme etkisini belirlemek açısından geri kazanım çalışması yapıldı. Geri kazanım standart ekleme yöntemiyle gerçekleştirildi.

Standart ekleme yöntemini uygulamak için atenololün tablet formundan hazırlanan stoktan son derişimi 20 ppm olacak şekilde 5 numune hazırlandı. Bunlardan dördüne yine son derişimleri 5, 10, 15, 20 ppm olacak şekilde standartlar eklendi. Bu standartlarla oluşturulan kalibrasyon eğrisinden yararlanarak propranolol enantiyomerlerinin tablet formundaki derişimi hesaplandı. Sonuçlar % geri kazanım olarak verildi.

3.11.5. Atenolol ile yapılan çalışmada kesinlik

Atenololün enantiyomer ayrımı için yapılan çalışmada yöntemin doğruluğunu ve kesinliğini belirleyebilmek için gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik sonuçları değerlendirildi.

Gün içi çalışmalarında iki farklı derişimde standart hazırlandı ve bu standartlar altışar kez analiz edildi. Ölçüm sonuçlarının standart sapması hesaplanarak tekrarlanabilirlikleri kontrol edildi. Günler arası yapılan çalışmada ise üç farklı derişimde standartla iki gün analiz edildi. Analiz sonuçlarının standart sapması verilerek tekrarlanabilirlik kontrol edildi.

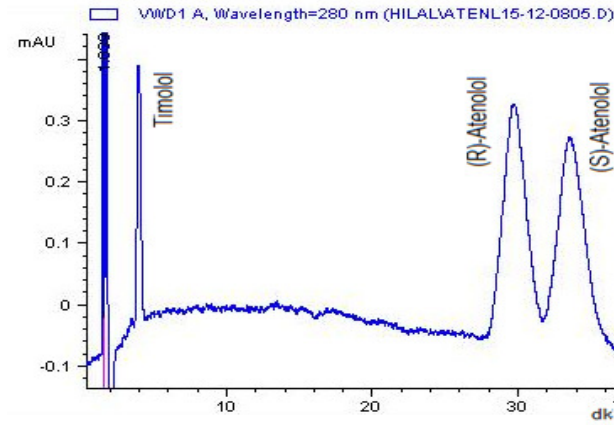
3.11.6. Propranolol ile yapılan çalışmada kesinlik

Propranololün enantiyomer ayrımı için yapılan çalışmada yöntemin doğruluğunu ve kesinliğini belirleyebilmek için gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik sonuçları değerlendirildi.

Gün içi çalışmalarında iki farklı derişimde standart hazırlandı ve bu standartlar altışar kez analiz edildi. Ölçüm sonuçlarının standart sapması hesaplanarak tekrarlanabilirlikleri kontrol edildi. Günler arası yapılan çalışmada ise üç farklı derişimde standartla üç gün analiz edildi. Analiz sonuçlarının standart sapması verilerek tekrarlanabilirlik kontrol edildi.

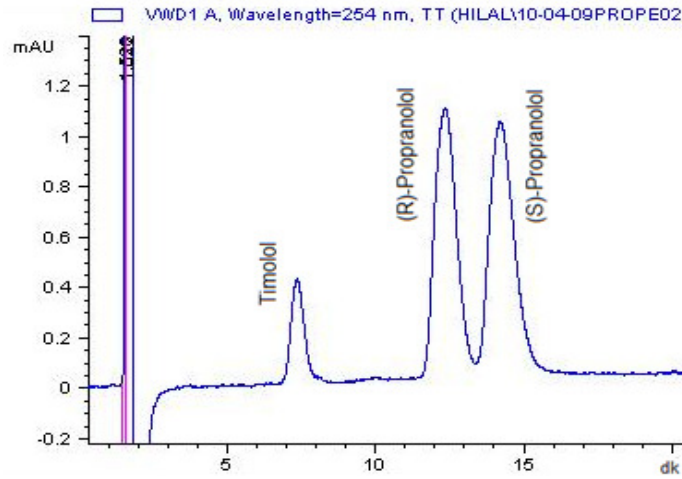
4. BULGULAR

4.1. HPLC-UV yöntemi ile yapılan atenololün analiz sonucu



Şekil 22: Atenolol enantiomerleri ile yapılan analiz sonucunda elde edilen kromatogram

4.2. HPLC-UV yöntemi ile yapılan propranololün analiz sonucu



Şekil 23: Propranolol enantiomerleri ile yapılan analiz sonucunda elde edilen kromatogram

4.3. Atenololün HPLC-UV yöntemi ile analizi için sistem uygunluk testi sonuçları

Tablo 3: Atenololün sistem uygunluk parametreleri

	Seçicilik faktörü (α)	Kapasite faktörü (k')	Ayırım gücü (R_s)	Teorik tabaka sayısı (N)
(R)-Atenolol	1.14	16.83	2.13	4791.9
(S)-Atenolol	1.14	19.14	2.13	4998.9

4.4. Propranololün HPLC-UV yöntemi ile analizi için sistem uygunluk testi sonuçları

Tablo 4: Propranololün Sistem uygunluk parametreleri

	Seçicilik faktörü (α)	Kapasite faktörü (k')	Ayırım gücü (R_s)	Teorik tabaka sayısı (N)
(R)-Propranolol	1.18	5.93	2.10	3565.80
(S)-Propranolol	1.18	6.98	2.10	3545.77

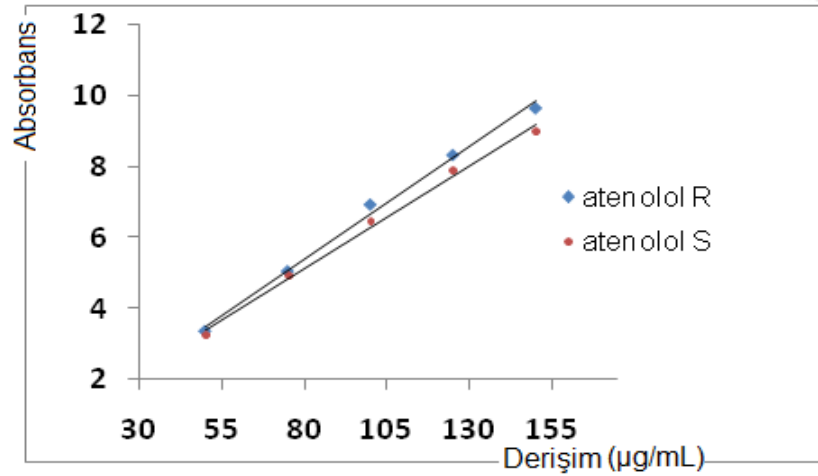
4.5. Atenololün ve Propranololün Analizi İçin HPLC-UV Yönteminin Validasyonu

4.5.1. Atenolol ile yapılan çalışmada doğrusallık ve duyarlılık analizi sonuçları

Tablo 5: Atenololün HPLC ile tayininden elde edilen kantitatif parametreler

	Doğrusallık ($\mu\text{g/mL}$)	LOD ($\mu\text{g/mL}$)	LOQ ($\mu\text{g/mL}$)	Eğim (m)	Kesişim (n)	Korelasyon katsayısı (r)
(R)-Atenolol	50-150	12.30	36.90	0.0634	0.310	0.9949
(S)-Atenolol	50-150	9.86	29.59	0.0578	0.518	0.9944

LOD:Teşhis sınırı ($\mu\text{g/mL}$);LOQ:Tayin alt sınırı($\mu\text{g/mL}$)



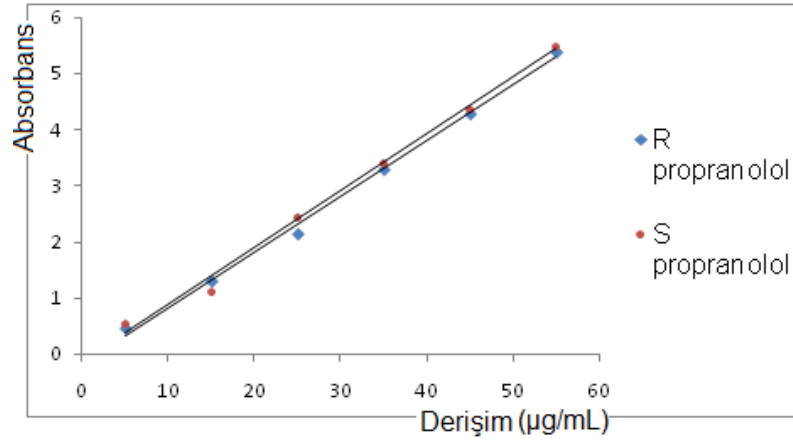
Şekil 24: (R)- ve (S)-Atenololün kalibrasyon grafiği

4.5.2. Propranolol ile yapılan çalışmada doğrusallık ve duyarlılık analizi sonuçları

Tablo 6: Propranololün HPLC ile tayininden elde edilen kantitatif parametreler

	Doğrusallık ($\mu\text{g/mL}$)	LOD ($\mu\text{g/mL}$)	LOQ ($\mu\text{g/mL}$)	Eğim (m)	Kesişim (n)	Korelasyon katsayısı (r)
(R)-Propranolol	5-100	0.61	1.83	0.0991	-0.1651	0.9967
(S)-Propranolol	5-100	0.89	2.67	0.1012	-0.1327	0.9942

LOD:Teşhis sınırı ($\mu\text{g/mL}$);LOQ:Tayin alt sınırı($\mu\text{g/mL}$)



Şekil 25: (R)- ve (S)-Propranololün kalibrasyon grafiği

4.5.3. HPLC yöntemiyle yapılan analizde atenolol için geri kazanım sonuçları

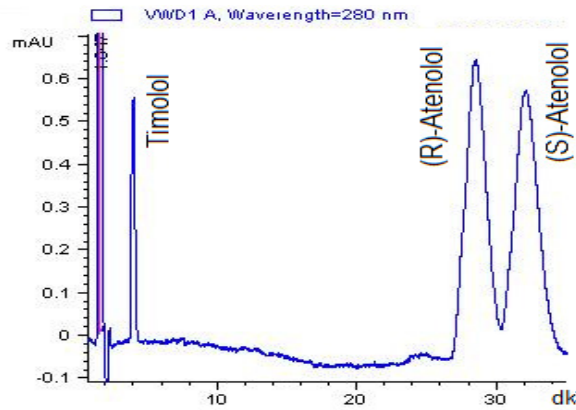
Tablo 7: (R)-Atenololün geri kazanım sonuçları

Numune no	% (R)-Atenolol	$X_{ort} = 98.95$ $SS = 2.24$ $\%BSS = 2.26$ $GA = 96.17-101.73$ (p= 0.05)
1	96.37	
2	100.02	
3	96.77	
4	101.41	
5	100.00	

X_{ort} : Aritmetik Ortalama, SS: Standart Sapma, BSS: Bağlı Standart Sapma

Tablo 8: (S)-Atenololün geri kazanım sonuçları

Numune no	% (S) Atenolol	$X_{ort} = 98.45$ $SS = 3.41$ $\%BSS = 3.46$ $GA = 94.22-102.68$ (p = 0.05)
1	92.86	
2	98.60	
3	99.75	
4	102.09	
5	98.96	



Şekil 26: Atenololün tablet formu ile yapılan analiz sonucunda elde edilen kromatogram

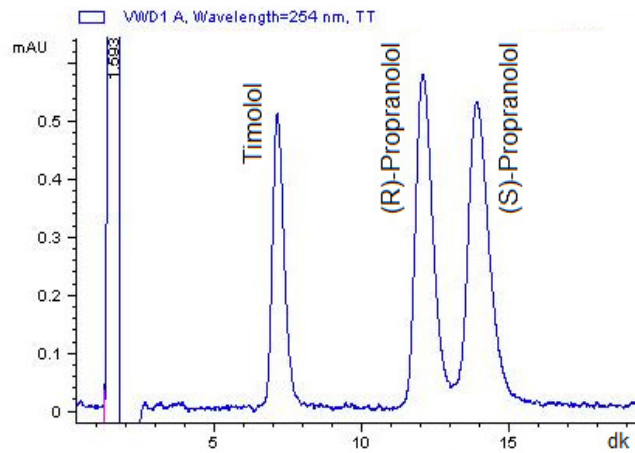
4.5.4. HPLC yöntemiyle yapılan analizde propranolol için geri kazanım sonuçları

Tablo 9: (R)-Propranololün geri kazanım sonuçları

Numune no	% (R)-Propranolol	$X_{ort} = 98.06$ $SS = 3.54$ $\%BSS = 3.61$ $GA = 93.67-102.45$ ($p = 0.05$)
1	93.84	
2	96.20	
3	101.90	
4	96.77	
5	101.58	

Tablo 10: (S)-Propranololün geri kazanım sonuçları

Numune no	% (S)-Propranolol	$X_{ort} = 98.12$ $SS = 4.04$ $\%BSS = 4.12$ $GA = 93.11-103.13$ ($p = 0.05$)
1	93.57	
2	95.97	
3	103.19	
4	96.39	
5	101.49	



Şekil 27: Propranololün tablet formu ile yapılan analiz sonucunda elde edilen kromatogram

4.5.5. Atenolol ile yapılan çalışmada kesinlik sonuçları

Tablo 11: Atenolol enantiyomerlerinin gün içi kesinlik analiz bulguları

(R)-Atenolol alanı/ İç standart (Timolol) alanı oranı		(S)-Atenolol/ İç standart (Timolol) alanı oranı	
50ppm	100ppm	50ppm	100ppm
3.45	6.91	3.05	6.72
3.39	6.89	3.23	6.59
3.41	6.86	3.15	6.61
3.43	6.78	3.12	6.71
3.47	6.85	3.09	6.63
3.46	6.87	3.21	6.65
$X_{ort} = 3.44$ $SS = 0.03$ $\%BSS = 0.90$	$X_{ort} = 6.86$ $SS = 0.05$ $\%BSS = 0.65$	$X_{ort} = 3.14$ $SS = 0.07$ $\%BSS = 2.21$	$X_{ort} = 6.65$ $SS = 0.05$ $\%BSS = 0.80$

Tablo 12: Atenolol enantiyomerlerinin günler arası kesinlik analiz bulguları

(R)-Atenolol alanı/ İç standart (Timolol) alanı oranı			(S)-Atenolol alanı/ İç standart (Timolol) alanı oranı		
50ppm	100ppm	150ppm	50ppm	100ppm	150ppm
3.54	6.88	9.79	3.41	6.49	9.21
3.46	6.93	9.59	3.15	6.36	8.84
3.06	6.94	9.53	3.16	6.49	8.90
3.45	6.91	9.71	3.05	6.72	9.11
3.39	6.89	9.75	3.23	6.59	9.02
3.41	6.86	9.82	3.15	6.61	8.97
$X_{ort} = 3.39$	$X_{ort} = 6.90$	$X_{ort} = 9.70$	$X_{ort} = 3.19$	$X_{ort} = 6.54$	$X_{ort} = 9.01$
SS = 0.17	SS = 0.03	SS = 0.12	SS = 0.12	SS = 0.12	SS = 0.14
%BSS=4.94	%BSS=0.44	%BSS=1.19	%BSS=3.81	%BSS=1.90	%BSS=1.51

4.5.6. Propranolol ile yapılan çalışmada kesinlik sonuçları

Tablo 13: Propranolol enantiyomerlerinin gün içi kesinlik analiz bulguları

(R)-Propranolol alanı/ İç standart (Timolol) alanı oranı		(S)-Propranolol alanı/ İç standart (Timolol) alanı oranı	
15ppm	35ppm	15ppm	35ppm
1.05	3.32	1.07	3.26
1.08	3.31	1.08	3.31
1.07	3.23	1.05	3.23
1.05	3.35	1.09	3.30
1.10	3.31	1.05	3.34
1.13	3.34	1.10	3.29
$X_{ort} = 1.08$ $SS = 0.03$ $\%BSS = 2.87$	$X_{ort} = 3.31$ $SS = 0.04$ $\%BSS = 1.28$	$X_{ort} = 1.07$ $SS = 0.02$ $\%BSS = 1.93$	$X_{ort} = 3.29$ $SS = 0.04$ $\%BSS = 1.18$

Tablo 14: Propranolol enantiyomerlerinin günler arası kesinlik analiz bulguları

(R)-Propranolol alanı/ İç standart (Timolol) alanı oranı			(S)-Propranolol alanı/ İç standart (Timolol) alanı oranı		
15ppm	35ppm	55ppm	15ppm	35ppm	55ppm
1.05	3.32	5.16	1.07	3.26	5.13
1.08	3.31	5.17	1.08	3.31	5.13
1.07	3.23	4.93	1.05	3.23	4.87
1.07	3.39	4.86	1.07	3.38	4.81
1.06	3.41	4.78	1.05	3.35	4.78
1.08	3.41	4.88	1.07	3.37	4.87
$X_{ort} = 1.07$	$X_{ort} = 3.35$	$X_{ort} = 4.99$	$X_{ort} = 1.07$	$X_{ort} = 3.32$	$X_{ort} = 4.93$
SS = 0.01	SS = 0.07	SS = 0.17	SS = 0.01	SS = 0.06	SS = 0.16
%BSS=1.09	%BSS=2.13	%BSS=3.34	%BSS=1.14	%BSS=1.84	%BSS=3.20

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kardiovasküler hastalıkların tedavisinde kullanılan β -bloker ilaçlarda bulunan etken maddeler yaygın olarak rasemik karışım halinde bulunmaktadır. Ancak yapılan çalışmalar sonucunda bu etken maddelerin enantiyomerlerinin farklı özellik gösterdiği bulunmuştur. Kalp hastalıklarının tedavisinde (S)-enantiyomerlerinin (R)-formlarından daha etkili olduğu bulunmuştur. Bu yüzden de enantiyomer ayrımı önem kazanmıştır. Günümüzde β -bloker ilaçların etken maddelerinin kiral ayrımı çeşitli yöntemlerle yapılabilmektedir. Literatürde bu yöntemler gaz kromatografi (GC), yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC), süper kritik akışkanlı sıvı kromatografi (SFC) ve ince tabaka kromatografi (TLC) gibi kromatografik metotlar olarak bulunmaktadır. Numune hazırlık aşamasındaki kolaylıklar ve yüksek duyarlılıkta çalışma olanağı sağladığı için HPLC yöntemini kullanmak uygun bulunmuştur.

Bu çalışmada atenolol ve propranolol etken maddeleriyle çalışıldı. Yapılan bu çalışmada ilaç etken maddelerinin izomerlerinin tedavide farklı davranışlar gösterdiği bilindiği için atenolol ve propranolol enantiyomerlerinin ayrılması amaçlandı. Kiral ayrımı gerçekleştirmek için farklı kiral sabit fazlardan oluşan ticari kolonlar denendi ve bu kolonlar içerisinde en iyi ayrımı sağladığı düşünülen chirex-3022 kolonudur. Yapılan çalışmalarda da denediğimiz diğer kolonlara göre en iyi sonuçlar bu kolonla sağlandı. Literatürde yer alan çalışmalardaki kolonların seçicilik faktörü ve kolon ayırma gücü Tablo 15'de verildi. Bu çalışmalarla karşılaştırıldığında chirex 3022 ile kolon ayırma gücü, ayrımın geçerli sayılabilmesi için gerekli olan değerin üzerindedir. Yapılan çalışmalarda Chiralcel OD kolonu ile çok iyi sonuçlar alınmıştır. Ancak diğer çalışmalarla, geliştirdiğimiz yöntem kıyaslandığında seçicilik faktörleri arasında anlamlı bir fark olmamasına rağmen ayırma gücü değerleri oldukça farklıdır. Bu fark da yöntemin üstünlüğünü göstermektedir.

Öncelikle atenolol ve propranolol etken maddeleri için uygun dalga boyu yapılan çalışmalara ve UV absorbanslarına bakılarak atenolol için 280 nm, propranolol için 254 nm olarak belirlendi. Yapılan çalışmalar ve kullanılacak olan kolonla ilgili araştırmalar göz önünde bulundurularak mobil faz olarak hekzan, dikloroetan veya diklorometan, etanol veya metanol kullanılması tercih edildi. Bu yüzden bu çözeltilerin farklı oranlardaki bileşimleri denendi. Bu çözeltilerin yanı sıra % 0.25 oranında trifloroasetik asit kullanılarak pik şekillerinin düzgün olması sağlandı. Her iki etken madde için farklı hareketli faz bileşimleri ve farklı sıcaklıklar denendi. Atenolol için en uygun koşullar mobil faz %60 hekzan, %35 diklorometan, %5 metanol (20:1 trifloroasetik asit), 2ml dk⁻¹ akış hızında ve 35 °C de sağlandı. Propranolol için ise mobil faz %55 hekzan, % 40 diklorometan, %5 etanol, % 0.25 trifloroasetik asit, 2ml dk⁻¹ akış hızında ve 20°C sıcaklıkta en iyi ayırım gerçekleşti.

Her iki madde için kalibrasyon grafiği oluşturulurken ve numune analizi yapılırken deneysel hataları elimine etmek için iç standart kullanıldı. Etken maddelerle olan benzer yapısı ve alıkonma süresi incelendiğinde en uygun iç standart olarak timolol seçilmiştir. Hesaplamalar yapılırken hataları gidermek amacıyla atenolol ve propranololün pik alanları iç standardın pik alanına bölünerek sonuca gidilmiştir.

Yöntem geliştirme çalışmalarında tekrarlanabilirlik değerleri çok iyi sonuçlar verdi. Ancak hareketli faz seçimi yapılırken piklerde yarıma gözlendi. Atenololün ayırımı esnasında karşılaşılan bu soruna hekzan oranını artırarak çözüm bulundu. Propranololde ise mobil faz bileşenlerinden metanol yerine etanol kullanarak çözüm bulundu. Kiral ayırım mekanizması tam olarak aydınlatılamamış bir mekanizmadır, bu yüzden pik yarılmalarının sebebi tam olarak anlaşılamadı. Fakat hareketli

faz bileşimi ve diğer koşullar optimize edildikten sonra bu sorun ortadan kalktı.

Atenolol ve propranolol için optimizasyon çalışmaları tamamlandıktan sonra kantitatif parametreler belirlenmiş ve atenolol için Tablo 5'te, propranolol için Tablo 6'da özetlendi. (R)-atenololün alıkonma zamanı 29.06 dk, (S)-atenololün alıkonma zamanı 32.71 dk ve (R)-propranololün alıkonma zamanı 12.4 dk, (S)-propranololün alıkonma zamanı 14.3 dk olarak bulundu. LOD değerleri; (R)-atenolol için 12.30 ppm, (S)-atenolol için 9.86 ppm ve (R)-propranolol için 0.61 ppm, (S)-propranolol için 0.89 ppm olarak hesaplandı. LOQ değerleri; (R)-atenolol için 36.90 ppm, (S)-atenolol için 29.59 ppm ve (R)-propranolol için 1.83 ppm, (S)-propranolol için 2.67 ppm olarak hesaplandı.

Yapılan çalışmada atenolol ve propranolol sistem uygunluk parametreleri incelendiğinde, Chirex 3022 kolonu ile sağlanan enantiyomer ayırımında literatürdeki çalışmaların birçoğundan daha iyi sonuçlar alındı. Atenolol için ayırma gücü 2.14, propranolol için ise 2.10 bulundu. Bu değerler iyi bir ayırım için geçerli değerlerdir. Atenolol için seçicilik faktörü 1.14 ve propranolol için de 1.18 bulundu. Seçicilik faktörü kapasite faktörlerinin oranı hesaplanarak bulunduğu için bu değer 1'den büyük olduğunda ancak ayırım sağlanır. Deney sonuçlarında da görüldüğü gibi her iki madde için de iyi bir ayırım gerçekleşti. Tablo 15.de literatürde yapılan çalışmalar karşılaştırıldı.

Bölüm 4.5.3. ve 4.5.4.de atenolol ve propranololün farmasötik tablet formlarına uygulanmasıyla elde edilen geri kazanım sonuçları verildi. Bu sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildiğinde beyan edilen değer ve deney sonucunda bulunan değerler arasında anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi.

Tablo 15: Atenolol ve propranololün enantiyomer ayrımı için yapılan çalışmalar

Uygulanan yöntem	atenolol		propranolol	
	α	R _s	α	R _s
HPLC-UV (Chiral AGP kolon) ¹⁷⁴	1.23	1.46	1.52	2.62
HPLC-UV (C-18 kolon) ¹⁷⁵	1.29	1.11	1.06	0.63
SFC-UV(Chiralcel OD) ¹⁷⁶	2.20	3.40	1.74	8.6
HPLC-UV (Chiralcel OD) ¹⁷⁶	1.54	3.40	1.87	5.40
SFC-UV(Chirex 3022) ¹⁷⁶	1.07	0.80	1.07	1.10
HPLC-UV(Chirex 3022) ¹⁷⁶	1.17	1.40	1.11	1.00
SFC-UV(Chirex 3022) ¹⁷⁷	-	-	1.00	0.00
HPLC-UV(Chirex 3022) ¹⁷⁷	-	-	1.09	0.85
HPLC-UV(Chirex 3022)bu çalışma	1.14	2.14	1.18	2.10

AGP: α_1 - asit glikoprotein, α : Seçicilik faktörü, R_s: Ayırım gücü

Sonuç olarak bu çalışmada atenolol ve propranolol enantiyomerlerinin tablet formunda ayrımını sağlamak için yeni bir HPLC yöntemi geliştirildi. Geliştirilen bu yöntem basit ve atenolol ve propranololün kantitatif tayini için oldukça uygundur. Çalışma hiçbir matriks etkisi ile karşılaşılmdan işleyen bir yöntemdir. Ayrıca numune hazırlama aşamasında ön hazırlık gerektirmeden kolaylıkla uygulanabilir ve bu rutin analizlerde kullanım kolaylığı sağlar. Yöntem farmasötik ve farmakokinetik çalışmalarda rahatlıkla kullanılabilir. Bu yüzden bu maddelerin enantiyomer ayrımı için alternatif bir yöntem olarak kullanılabileceğini düşünmekteyiz.

6. ÖZET

Farmasotik Formlarda İlaç Etken Maddelerinin HPLC ile Enantiyomer Tayinleri

Farmasötik formülasyonlardaki R(-),S(+)-atenolol ve R(-), S(+)-propranololün tayini için geçerli bir HPLC-UV yöntemi geliştirildi. Önerilen yöntem numune hazırlama aşamasında hiçbir ön işleme gerek duymaz ve yöntemin belirli aralıkta seçici, doğrusal ve tekrarlanabilir olduğu bulundu. Atenolol izomerleri, hareketli faz % 60 heksan, % 35 diklorometan, %5 metanol (20:1 trifloroasetik asit), 2 ml min⁻¹ akış hızında ve propranolol izomerleri, hareketli faz % 55 heksan, % 40 diklorometan, %5 etanol % 0.25 trifloroasetik asit, 2 ml min⁻¹ akış hızında Chirex(S)_ICA/(R)_NEA (00G_3022 _E0, 250_4.6 mm) kolonu kullanılarak ayrıldı. R(-) - atenolol ve S(+) – atenololün her ikisinin de kalibrasyon eğrisi 50-150 µg ml⁻¹ konsantrasyon aralığında doğrusaldır. R(-)-propranolol ve S(+)-propranololün her ikisinin de kalibrasyon eğrisi 5-100 µg ml⁻¹ konsantrasyon aralığında doğrusaldır. R(-)-atenololün ve S(+)-atenololün gözlenebilme sınırları sırasıyla 12.3 µg ml⁻¹ ve 9.86 µg ml⁻¹ dir. R(-)-propranolol ve S(+) – propranololün gözlenebilme sınırları sırasıyla 0.61 µg ml⁻¹ ve 0.89 µg ml⁻¹dir. R(-)-propranolol ve S(+)-propranololün alıkonma zamanları 12.4 dk ve 14.3 dk ve R(-)-atenolol ve S(+)-atenololün alıkonma zamanları 29.4 dk ve 33.2 dk'dır. Tayin, propranolol için 254 nm ve atenolol için 280 nm'deki UV absorbanlarının ölçülmesiyle gerçekleştirildi. Deneysel çalışma boyunca iç standart olarak timolol kullanıldı. Önerilen metot farmasötik formülasyonlardaki enantiyomerlerin tayininde uygulandı ve herhangi bir matriks girişimi bulunmadı.

Anahtar kelimeler: Propranolol, Atenolol, HPLC, Enantiyomer ayrımı

7. SUMMARY

Determination of Enantiomers of Active Ingredient in Pharmaceutical Forms by HPLC

A validated HPLC-UV method was developed for the determination of R(-),S(+)-atenolol and R(-),S(+)-propranolol in pharmaceutical formulation. The proposed method requires no elaborate sample preparation and found to be selective, linear and repeatable within the established ranges. Atenolol and propranolol isomers were separated using a Chirex(S)_ICA/(R)_NEA (00G_3022 _E0, 250_4.6 mm) with a mobile phase of % 60 hexan, % 35 dicloromethan, %5 methanol (20:1 trifluoroacetic acid) at a flow rate of 2 ml min⁻¹ and mobile phase of % 55 hexan, % 40 dicloromethan, %5 ethanol % 0.25 trifluoroacetic acid at a flow rate of 2ml min⁻¹, respectively. The calibration curves of both the R(-) - atenolol and S(+) - atenolol were linear over the concentration range of 50-150 µg ml⁻¹. The calibration curves of both the R(-)-propranolol and S(+)-propranolol were linear over the concentration range of 5-100 µg ml⁻¹. The detection limits of R(-) and S(+)-atenolol were found to be as 12.3 µg ml⁻¹ and 9.86 µg ml⁻¹, respectively. The detection limits of R(-) and S(+)-propranolol were found to be as 0.61 µg ml⁻¹ and 0.89 µg ml⁻¹, respectively. Retention times of R(-)-propranolol and S(+)-propranolol is 12.4 min and 14.3 min, respectively. Retention times of R(-)-atenolol and S(+)-atenolol 29.4 min and 33.2 min, respectively. Detection was performed by measurement of UV absorbance at 254 nm for propranolol and 280 nm for atenolol. Timolol was used as the internal standard throughout the experimental work. The proposed method was applied to the determination of enantiomers in pharmaceutical formulation and no interference of any excipients matrices was found.

Keywords: Propranolol, Atenolol, HPLC, Enantiomer separation

8. KAYNAKLAR

1. Sağlam K, editör. Primer Hipertansiyon (Birincil Yüksek Kan Basıncı) [internette]. URL adresi: <http://www.ilgisaglik.com.tr/files/files/hipertansiyon.doc>
2. Hipertansiyon tedavisi [internette]. URL adresi: <http://www.gata.edu.tr/dahilibilimler/ichastaliklari/files/Dersler/78.pdf>.
3. Stoschitzky K, Zernig G, Lindner W. Racemic beta-blockers – fixed combinations of different drugs. Journal of Clinical and Basic Cardiology 1998; 1 (Issue 1): 15-19.
4. Mehvar R, BrocksDR. Stereospecific pharmacokinetics and pharmacodynamics of beta-adrenergic blockers in humans. J Pharm Pharmaceut Sci 2001; 4(2): 185-200.
5. Wu A. Should beta-blockers still be used as initial antihypertensive agents in uncomplicated hypertension? [online]. Ann Acad Med Singap November 2007; 36 (11): 962–4. Available From: URL: <http://www.annals.edu.sg/pdf/36VolNo11Nov2007/V36N11p962.pdf>.
6. Agon P, Goethals P, Van Haver D, Kaufman JM. Permeability of the blood-brain barrier for atenolol studied by positron emission tomography. J Pharm Pharmacol 1991; 43 (8): 597–600.
7. Ladv S. Updated NICE guideline on the management of hypertension in adults in primary care [online]. National Institute for Health and Clinical Excellence. 2006-06-30. Available From: URL: <http://www.nelm.nhs.uk/en/NeLM-Area/Evidence/Guidelines/495514/>.
8. Carlberg B, Samuelsson O, Lindholm LH. Atenolol in hypertension: is it a wise choice? Lancet 2004; 364 (9446): 1684–9.
9. Clementi WA, Garvey TQ, Clifton GD, McCoy RA, Brandt S, Schwartz S. Single Dose Pharmacokinetics of (S)-Atenolol

Administered Orally as a Single Enantiomer Formulation and as a Racemic Mixture (Tenormin). *Chirality* 1994; 6: 169-174.

10. McCoy RA, Clifton GD, Clementi WA, Smith MD, Garvey TQ, DP Wermeling and SE Schwartz. Pharmacodynamics Of Racemic And S(-)-Atenolol in Humans. *J Clin Pharmacol* 1994; 34: 816.

11. Rossi S, editor. *Australian Medicines Handbook*. Adelaide: Australian Medicines Handbook; 2006.

12. Kornischka J, Cordes J, Agelink MW. 40 years beta-adrenoceptor blockers in psychiatry (in German). *Fortschr Neurol Psychiatr* April 2007;75 (4): 199–210.

13. Vieweg V, Pandurangi A, Levenson J, Silverman J. The consulting psychiatrist and the polydipsia-hyponatremia syndrome in schizophrenia. *Int J Psychiatry Med* 1994; 24 (4): 275–303.

14. Kishi Y, Kurosawa H, Endo S. Is propranolol effective in primary polydipsia? *Int J Psychiatry Med* 1998; 28 (3): 315–25.

15. Kramer MS, Gorkin R, DiJohnson C. Treatment of neuroleptic-induced akathisia with propranolol: a controlled replication study. *Hillside J Clin Psychiatry* 1989; 11 (2): 107–19.

16. Thibaut F, Colonna L. Anti-aggressive effect of beta-blockers in French. *Encephale* 1993; 19 (3): 263–7.

17. Ladv S. NICE And BHS Launch Updated Hypertension Guideline [online]. National Institute For Health And Clinical Excellence. 2006-09-30. Available From: URL: <http://www.nelm.nhs.uk/Record%20Viewing/viewRecord.aspx?id=56717>

18. Doctors test a drug to ease traumatic memories [online]. Mental Health - MSNBC.com. 2007-06-30. Available From: URL: <http://www.msnbc.msn.com/id/10806799/>.

19. Brunet A, Orr SP, Tremblay J, Robertson K, Nader K, Pitman RK. Effect of post-retrieval propranolol on psychophysiologic responding during subsequent script-driven traumatic imagery in post-traumatic stress disorder. 2007; pp. 503.

20. Effect of post-retrieval propranolol on psychophysiologic responding during subsequent script-driven traumatic imagery in post-traumatic stress disorder [online]. Available From: URL: <http://www.sciencedirect.com>

21. Van Harten J. Overview of the pharmacokinetics of fluvoxamine [online]. Clin Pharmacokinet 1995; 29 Suppl 1: 1–9. Available From:URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1686251?ordinalpos=16&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_DefaultReportPanel.Pubmed_RVDocSum

22. Joint Formulary Committee. British National Formulary, 47th edition. London: British Medical Association and Royal Pharmaceutical Society of Great Britain; 2004.

23. Ohnishi S, Sadanaga K, Katsuoka M, Weidanz W Effects of membrane acting-drugs on plasmodium species and sickle cell erythrocytes. Mol Cell Biochem 1990; 91 (1-2): 159–65.

24. Singh N, Puri S. Interaction between chloroquine and diverse pharmacological agents in chloroquine resistant Plasmodium yoelii nigeriensis. Acta Trop 2000; 77 (2): 185–93.

25. Murphy S, Harrison T, Hamm H, Lomasney J, Mohandas N, Haldar K. Erythrocyte G protein as a novel target for malarial chemotherapy. Plos Med 2006; 3 (12): e528.

26. Luan LJ, Shao Q, Ma JY, Zeng S. Stereoselective urinary excretion of S-(-)- and R-(+)-propranolol glucuronide following oral

administration of R-S-propranolol in Chinese Han subjects. *World J Gastroenterol* 2005; 11(12): 1822-1824.

27. Vural N, İnal Ö, Baykara T. Atenololün Biyolojik Ortamlardan Tayininde Kiral Hplc Metodunun Kullanılması Ve Yöntemin Validasyonu.

28. Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA. Enstrümantal Analiz. Kılıç E, Köseoğlu F, Yılmaz H (Çev), 1. Basım. Ankara: Bilim Yayıncılık; 1998.

29. Harris DC. Quantitative Chemical Analysis. 7 nd ed. New York: W. H. Freeman and Comp; 2006.

30. Hamilton RJ, Sewell PA. Introduction to High Performance Liquid Chromatography. 2 nd ed. New York: Chapman and Hall Ltd; 1982.

31. Bidlingmeyer BA. Practical HPLC Methodology and Applications. 1 nd ed. New York: Wiley-Interscience Publication; 1992.

32. Miller JM. Chromatography Concepts and Contrasts. 2 nd ed. New Jersey: John Wiley and Sons Inc; 2005.

33. Schurig V. Separation of enantiomers by gas chromatography. *J. Chromatogr. A* 2001; 906: 275–299.

34. Gübitz G. Separation of drug enantiomers by HPLC using chiral stationary phases—a selective review. *Chromatographia* 1990; 30: 555–564.

35. Terfloth G. Enantioseparations in super- and subcritical fluid chromatography. *J. Chromatogr. A* 2001; 906: 301–307.

36. Günther K, Möller K, editors. Handbook of Thin-Layer Chromatography. 2nd Ed. New York: Marcel Dekker; 1996

37. Nishi H, Terabe S. Optical resolution drugs by capillary electrophoretic techniques. *J. Chromatogr. A* 1995; 694: 245–276.
38. Gübitz G, Schmid MG. Chiral separation by capillary electrochromatography (minireview). *Enantiomer* 2000; 5: 5–11.
39. Dalgliesh CE. The optical resolution of aromatic amino-acids on paper chromatograms. *J. Chem. Soc.* 1952; 137: 3940–3942.
40. Gil-Av E, Feibush B, Charles-Sigler R. Separation of enantiomers by gas liquid chromatography with an optically active stationary phase. *Tetrahedron Lett.* 1966; 1009–1015.
41. Frank H, Nicholson GJ, Bayer E. Chiral polysiloxanes for resolution of optical antipodes. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1978; 17: 363–365.
42. Dobashi A, Dobashi Y, Hara S. Enantioselectivity of hydrogenbond association in liquid-solid chromatography. *J. Liq. Chromatogr.* 1986; 9: 243–267.
43. Dobashi Y, Hara S. Direct resolution of enantiomers by liquid-chromatography with the novel chiral stationary phase derived from (R,R)-tartramide. *Tetrahedron Lett.* 1985; 26: 4217–4220.
44. Dobashi Y, Hara S. A chiral stationary phase derived from (R,R)-tartramide with broadened scope of application to the liquid-chromatographic resolution of enantiomers. *J. Org. Chem.* 1987; 52: 2490–2496.
45. Welch CJ. Evolution of chiral stationary phase design in the Pirkle laboratories. *J. Chromatogr. A* 1994; 666: 3–26.
46. Wolf C, Spence PL, Pirkle WH, Derrico EM, Cavender DM, Rozing GP. Enantioseparations by electrochromatography with packed capillaries. *J. Chromatogr. A* 1997; 782: 175–179.

47. Wolf C, Spence PL, Pirkle WH, Cavender DM, Derrico EM. Investigation of capillary electrochromatography with brush-type chiral stationary phases. *Electrophoresis* 2000; 21: 917–924.
48. Lämmerhofer M, Lindner W. Quinine and quinidine derivatives as chiral selectors I. Brush type chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography based on cinchonan carbamates and their application as chiral anion exchangers. *J. Chromatogr. A* 1996; 741: 33–48.
49. Bjornsdottir I, Hansen SH, Terabe S. Chiral separation in nonaqueous media by capillary electrophoresis using the ion-pair principle. *J. Chromatogr. A* 1996; 745: 37–44.
50. Stalcup AM, Gahm KH. Quinine as a chiral additive in nonaqueous capillary zone electrophoresis. *J. Microcol. Separ.* 1996; 8: 145–150.
51. Piette V, Lämmerhofer M, Lindner W, Crommen J. Enantiomeric separation of N-protected amino acids by non-aqueous capillary electrophoresis using quinine or tert-butyl carbamoylated quinine as chiral additive. *Chirality* 1999; 11: 622–630.
52. Terabe S, Ichikawa KT, Otsuka K, Tsuchiya A. Electrokinetic separations with micellar solutions and open-tubular capillaries. *Anal. Chem.* 1984; 56: 111–113.
53. Davankov VA, Rogozhi SV. Ligand chromatography as a novel method for the investigation of mixed complexes: stereoselective effects in α -amino acid copper(II) complexes. *J. Chromatogr.* 1971; 60: 280–283.
54. Gübitz G, Jellenz W, Löffler G, Santi W. Chemically bonded chiral stationary phases for the separation of racemates by HPLC. *J. High Resol. Chromatogr. Chromatogr. Commun.* 1979; 2: 145–146.

55. Gübitz G, Jellenz W, Santi W. Separation of the optical isomers of amino acids by ligand-exchange chromatography using chemically bonded phases. *J. Chromatogr.* 1981; 203: 377–384.

56. Gübitz G, Juffmann W, Jellenz W. Direct separation of amino acid enantiomers by high performance ligand-exchange chromatography on chemically bonded chiral phases. *Chromatographia* 1982; 16: 103–106.

57. Gübitz G. Direct separation of enantiomers by high performance ligandexchange chromatography on chemically bonded chiral phases. *J. Liq. Chromatogr.* 1986; 9: 519–535.

58. Günther K, Martens J, Schickedanz M. Dünnschichtchromatographische Enantiomerentrennung mittels Ligandenaustausch. *Angew. Chem.* 1984; 96: 514–515.

59. Schmid MG, Grobuschek N, Tuscher C. Chiral separation of amino acids by ligand-exchange capillary electrochromatography using continuous beds. *Electrophoresis* 2000; 21: 3141–3144.

60. Schmid MG, Grobuschek N, Lecnik O, Gübitz G, Végvári Á, Hjerténs S. Enantioseparation of hydroxy acids on easy-to-prepare continuous beds for capillary electrochromatography. *Electrophoresis* 2001; 22: 2616–2619.

61. Chen Z, Hobo T. Chemically L-prolinamide-modified monolithic silica column for enantiomeric separation of dansyl amino acids and hydroxy acids by capillary electrochromatography and high-performance liquid chromatography. *Electrophoresis* 2001; 22: 3339–3346.

62. Armstrong DW, DeMond W. Cyclodextrin bonded phases for the liquid-chromatographic separation of optical, geometrical, and structural isomers. *J. Chromatogr. Science* 1984; 22: 411–415.

63. Bressolle F, Audran M, Pham TN, Vallon JJ. Cyclodextrins and enantiomeric separations of drugs by liquid chromatography and capillary electrophoresis: basic principles and new developments. *J. Chromatogr. B* 1996; 687: 303–336.
64. Lepri L. Enantiomer separation by thin-layer chromatography. *J. Planar. Chromatogr.-Modern TLC* 1997; 10: 320–331.
65. Aboul-Enein HY, El-Awady MI, Heard CM, Nicholls PJ. Application of thin-layer chromatography in enantiomeric chiral analysis—an overview. *Biomed. Chromatogr.* 1999; 13: 531–537.
66. Tanaka Y, Terabe S. Enantiomer separation of acidic racemates by capillary electrophoresis using cationic and amphoteric beta-cyclodextrins as chiral selectors. *J. Chromatogr. A* 1997; 781: 151–160.
67. Terabe S, Miyashita Y, Shibata O. Separation of highly hydrophobic compounds by cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography. *J. Chromatogr.* 1990; 516: 23–31.
68. Huang WX, Xu H, Fazio SD, Vivilecchia RV. Enhancement of chiral recognition by formation of a sandwiched complex in capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* 2000; 875: 361–369.
69. Bunke A, Jira T, Gübitz G. Chiral separation of cyclodrine by means of capillary electrophoresis. *Pharmazie* 1995; 50: 570–571.
70. Wistuba D, Czesla H, Roeder M, Schurig V. Enantiomer separation by pressure-supported electrochromatography using capillaries packed with a permethyl-beta-cyclodextrin stationary-phase. *J. Chromatogr. A* 1998; 815: 183–188.
71. Wistuba D, Schurig V. Enantiomer separation by pressure-supported electrochromatography using capillaries packed with Chirasil-Dex polymer-coated silica. *Electrophoresis* 1999; 20: 2779–2785.

72. Schurig V, Wistuba D. Recent innovations in enantiomer separation by electrochromatography utilizing modified cyclodextrins as stationary phases. *Electrophoresis* 1999; 20: 2313–2328.

73. Koide T, Ueno K. Enantiomeric separations of cationic and neutral compounds by capillary electrochromatography with charged polyacrylamide gels incorporating chiral selectors. *Anal. Sci.* 1998; 14: 1021–1023.

74. Végvári Á, Földesi A, Hetényi CS. A new easy-to-prepare homogeneous continuous electrochromatographic bed for enantiomer recognition. *Electrophoresis* 2000; 21: 3116–3125.

75. Wistuba D, Schurig V. Enantiomer separation by capillary electrochromatography on a cyclodextrin-modified monolith. *Electrophoresis* 2000; 1: 3152–3159.

76. Hesse G, Hagel R. A complete separation of a racemic mixture by elution chromatography on cellulose triacetate. *Chromatographia* 1973; 6: 277–280.

77. Okamoto Y, Hatada K, Kawashima M, Yamamoto K. Chromatographic resolution. 6. Useful chiral packing materials for high-performance liquidchromatographic resolution-cellulose triacetate and tribenzoate coated on macroporous silica-gel. *Chem. Lett.* 1984; 5: 739–742.

78. Wainer IW; Alembik MC. Resolution of enantiomeric amides on a cellulose-based chiral stationary phase—steric and electronic effects. *J. Chromatogr.* 1986; 358: 85–93.

79. Tachibana K, Ohnishi A. Reversed-phase liquid chromatographic separations of enantiomers on polysaccharide type chiral stationary phases. *J. Chromatogr. A* 2001; 906: 127–154.

80. Okamoto Y, Yashima E. Polysaccharide derivatives for chromatographic separation of enantiomers. *Angew. Chem. Int. Ed.* 1998; 37: 1020–1043.
81. Nishi H. Enantioselectivity in chiral capillary electrophoresis with polysaccharides. *J. Chromatogr. A* 1997; 792: 327–347.
82. Soini H, Stefansson M, Riekkola ML, Novotny MV. Maltooligosaccharides as chiral selectors for the separation of pharmaceuticals by capillary electrophoresis. *Anal. Chem.* 1994; 66: 3477–3484.
83. Nishi H, Nakamura K, Nakai H, Sato T. Enantiomer separation by capillary electrophoresis using DEAE-dextran and aminoglycosidic antibiotics. *Chromatographia* 1996; 43: 426–430.
84. Armstrong DW, Tang YB, Chen SS, Zhou YW, Bagwill C, Chen JR. Macrocyclic antibiotics as a new class of chiral selectors for liquid chromatography. *Anal. Chem.* 1994; 66: 1473–1484.
85. Desiderio C, Polcaro CM, Padiglioni P, Fanali S. Enantiomeric separation of acidic herbicides by capillary electrophoresis using vancomycin as chiral selector. *J. Chromatogr. A* 1997; 781: 503–513.
86. Sousa LR, Sogah GDY, Hoffmann DH, Cram DJ. Hostguest complexation. 12. Optical resolution of amine and amino ester salts by chromatography. *J. Am. Chem. Soc.* 1978; 100: 4569–4576.
87. Shinbo T, Nishimura K, Sugiura M, Yamaguchi T. Chromatographic separation of racemic amino-acids by use of chiral crown ether-coated reversed-phase packings. *J. Chromatogr.* 1987; 405: 145–153.

88. Machida Y, Nishi H, Nakamura K, Nakai H, Sato T. Enantiomer separation of amino compounds by a novel chiral stationary phase derived from crown ether. *J. Chromatogr. A* 1998; 805: 85–92.
89. Steffek RJ, Zelechonsky Y, Gahm KH. Enantioselective separation of racemic secondary amines on a chiral crown ether-based liquid chromatography stationary phase. *J. Chromatogr. A* 2002; 947: 301–305.
90. Kuhn R, Erni F, Bereuter T, Häusler J. Chiral recognition and enantiomeric resolution based on host guest complexation with crown ethers in capillary zone electrophoresis. *Anal. Chem.* 1992; 64: 2815–2820.
91. Mori Y, Ueno K., Umeda T. Enantiomeric separations of primary amino-compounds by nonaqueous capillary zone electrophoresis with a chiral crown ether. *J. Chromatogr. A* 1997; 757: 328–332.
92. Peña MS, Zhang YL, Warner IM. Enantiomeric separations by use of calixarene electrokinetic chromatography. *Anal. Chem.* 1997; 69: 3239–3242.
93. Blaschke G. Chromatographic resolution of chiral drugs on polyamides and cellulose triacetate. *J. Liq. Chromatogr.* 1986; 9: 341–368.
94. Hjertén S, Liao JL, Zhang R. High-performance liquid chromatography on continuous polymer beds. *J. Chromatogr. A* 1989; 473: 273–275.
95. Nakano T. Optically active synthetic polymers as chiral stationary phases in HPLC. *J. Chromatogr. A* 2001; 906: 205–225.
96. Wulff G, Vesper W. Preparation of chromatographic sorbents with chiral cavities for racemic resolution. *J. Chromatogr.* 1978; 167: 171–186.

97. Haginaka J. Protein based chiral stationary phases for HPLC enantioseparations. *J. Chromatogr. A* 2001; 906: 253–273.
98. Nilsson S, Schweitz L, Petersson M. Three approaches to enantiomer separation of beta-adrenergic antagonists by capillary electrochromatography. *Electrophoresis* 1997; 18: 884–890.
99. Bjornsdottir I, Hansen SH, Terabe S. Chiral separation in nonaqueous media by capillary electrophoresis using the ion-pair principle. *J. Chromatogr. A* 1996; 745: 37–44.
100. Stalcup AM, Gahm KH. Quinine as a chiral additive in nonaqueous capillary zone electrophoresis. *J. Microcol. Separ.* 1996; 8: 145–150.
101. Danková M, Kaniansky D, Fanali S, Iványi F. Capillary zone electrophoresis separations of enantiomers present in complex ionic matrices with on-line isotachophoretic sample pretreatment. *J. Chromatogr. A* 1999; 838: 31–43.
102. Fanali S, Desiderio C, Ölvecka E, Kaniansky D, Vojtek M, Ferancova A. Separation of enantiomers by on-line capillary isotachophoresis-capillary zone electrophoresis. *J. High Resolut. Chromatogr.* 2000; 23: 531–538.
103. Toussaint B, Hubert Ph., Tjaden UR, Van der Greef J, Crommen J. Enantiomeric separation of clenbuterol by transient isotachophoresis capillary zone electrophoresis-UV detection. New optimization technique for transient isotachophoresis. *J. Chromatogr. A* 2000; 871: 173–180.
104. Kaniansky D, Simunicova E, Ölvecka E, Ferancova A. Separations of enantiomers by preparative capillary isotachophoresis. *Electrophoresis* 1999; 20: 2786–2793.
105. Hoffmann P, Wagner H, Weber G, Lanz M, Caslavská J, Thormann W. Separation and purification of methadone enantiomers by

continuous and interval-flow electrophoresis. *Anal. Chem.* 1999; 71: 1840–1850.

106. Glukhovskiy P, Vigh GY. Analytical- and preparative-scale isoelectric focusing separation of enantiomers. *Anal. Chem.* 1999; 71: 3814–3820.

107. Chankvetadze B, Schulte G, Blaschke G. Nature and design of enantiomer migration order in chiral capillary electrophoresis. *Enantiomer* 1997; 2: 157–179.

108. Zhao J, Jorgenson JW. Application of synchronous cyclic capillary electrophoresis: isotopic and chiral separations. *J. Microcolumn Separations* 1999; 11: 439–449.

109. Gübitz G, Schmid MG, editors. *Chiral Separations Methods and Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press Inc; 2004.

110. Huber L. *Validation and Qualification in Analytical Laboratories*. 2nd ed. Informa Health Care; 2007.

111. Riley CM, Rosanske TW. *Development and Validation of Analytical Methods*. Elsevier; 1996.

112. Snyder LR, Kirkland JJ, Glajch JL. *Practical HPLC Method Development*. 2nd ed. Canada: John Wiley and Sons, Inc; 1997.

113. Gülhan S. Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Validasyon Konulu Seminer. 1999.

114. Hansen HA, Emborg C. Experimental design in the development and characterization of a HPLC method for amino acids. *Journal of Chromatography A* 1992; 626(2): 171-180.

115. Ertaş ÖS, Kayalı A. An Overview On Analytical Method Validation. *J Fac Pharm* 2005; 34 (1): 41 – 57.

116. Özkaya Ş. Metod Validasyonu Ve Laboratuvar Performansının İzlenmesi konulu seminer [internette]. Ankara İl Kontrol

Laboratuvar Müdürlüğü Analitik Kalite Güvence – Workshop 03 Mayıs 2004. URL adresi:

<http://www.atal.tubitak.gov.tr/ankara/SennurOzkaya.pdf>

117. Karacan MS. Aletli (Enstrümental) Analiz [internette].

Source: Thomas R. Choosing the Right Trace Element Technique. Today's Chemist at Work Oct 1999; 42. URL adresi:

<http://w3.gazi.edu.tr/~mkaracan/enstrumental/Giris.ppt>

118. Ariens EJ. Nonchiral, homochiral and composite chiral drugs. Trends Pharmacol Sci 1993; 14: 68–75.

119. Howe R, Shanks RG. Optical isomers of propranolol. Nature 1966; 210: 1336–8.

120. Rahn KH. Haemodynamic effects of the optical isomers of beta-receptor blocking drugs. Eur Heart J 1983; 4 (Suppl D): 27–30.

121. Stark G, Stark U, Lueger A, Bertuch H, Pilger E, Pietsch B, Tritthart HA, Lindner W. The effects of the propranolol enantiomers on the intracardiac electrophysiological activities of Langendorff perfused hearts. Basic Res Cardiol 1989; 84: 461–8.

122. Buchinger W, Lindner W, Lind P, Rath M, Langsteger W, Klima G, Költringer P, Eber O. Wirkung von R- versus S-Propranolol auf den peripheren Schilddrüsen-Hormon-Stoffwechsel hyperthyreoter Patienten. Acta Med Aust 1988; 15 (Sonderheft 1): 62–3.

123. Stoschitzky K, Lindner W, Egginger G, Brunner F, Obermayer-Pietsch B, Passath A, Klein W. Racemic (R,S)-propranolol versus half-dosed optically pure (S)-propranolol in man at steady state: Hemodynamic effects, plasma concentrations, and influence on thyroid hormone levels. Clin Pharmacol Ther 1992; 51: 445–53.

124. Stoschitzky K, Lindner W, Klein W. Stereoselective release of (S)- atenolol from adrenergic nerve endings at exercise. *Lancet* 1992; 340:696-97.
125. Bagwell EE, Webb JG, Walle T, Galkey TE. Stereoselective uptake of atenolol into storage granules isolated from PC12 cells. *J Pharmacol Exp Ther* 1989; 249:476-482.
126. Mehvar R, Gross ME, Kremer RN. Pharmacokinetics of atenolol enantiomers in humans and rats. *J Pharm Sci* 1990; 79: 881-85.
127. Stoschitzky K, Egginger G, Zerning G, Klein K, Linder W. Stereoselective Features of (R)- and (S)-Atenolol: Clinical Pharmacological, Pharmacokinetic, and Radioligand Studies. *Chirality* 1993; 5: 15-19.
128. Rahn K, Hawlina A, Kersting F, Planz G. Studies on the antihypertensive action of the optical isomer of propranolol in man. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1974; 286: 319-323.
129. Hoyer D, Engel G, Berthold R. Binding characteristics of (+)-, (+ , -)- and (-)-125 iodocyanopindolol to guinea pig left ventricle membranes. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1982; 318: 319-329.
130. Walle T, Webb JG, Walle UK, Bagwell EE. Stereoselective accumulation of the β -receptor blocking drug atenolol by human platelets. *Chirality* 1991; 3: 451-453.
131. Boyd RA, Chin SK, Don-Pedro O, Williams RL, Giacomini KM. The pharmacokinetics of the enantiomers of atenolol. *Clin Pharmacol Ther* 1989; 45: 403-410.
132. Shand DG. State-of-the-Art. Comparative pharmacology of the β -adrenoceptor blocking drugs. *Drugs* 1983; 25 (Supp1)2: 92-99.

133. Stoschitzky K, Lindner W, Rath M, Leitner C, Uray G, Zernig G, Moshhammer T, Klein W. Stereoselective hemodynamic effects of (R)- and (S)-propranolol in man. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 1989; 339:474-478.

134. Morris T, Kaumann A. Different steric characteristics of β_1 and β_2 -adrenoceptors. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 1984; 327: 176-179.

135. Walle T, Webb J, Bagwell E, Walle K, Daniell H, Gaffney T. Stereoselective delivery and actions of beta receptor antagonists. Biochem Pharmacol 1988; 37: 115-124.

136. Barrett A, Cullum C. The biological properties of the optical isomers of propranolol and their own cardiac arrhythmias. Br J Pharmacol. 1968; 34: 43-55.

137. Castro-Cels M, Gasco'n-Fora S, Pujol-Forn M, Sans-Roca JM, Vicente-Pla L. Barcelona: Validation of Analytical Methods, AEFI; 1989.

138. Karnes HT, March C. Calibration and validation of linearity in chromatographic biopharmaceutical analysis. Pharm J. Biomed. Anal. 1991; 9: 911–918.

139. Shah VP, Midha KK, Dighe S, et al. Analytical methods validation: bioavailability, bioequivalence, and pharmacokinetic studies. J. Pharm. Sci. 1992; 81: 309–312.

140. Roy T. Determination of analytical error function for β -blockers as a possible weighting method for the estimation of the regression parameters. J. Pharm. Biomed. Anal. 1994; 10: 1265–1269.

141. Harris DC. Quantitative Chemical Analysis. 6th Edition. New York: W.H. Freeman; 2003.

142. Peck CC, Beal SL, Sheiner LB, Nichols AI. Extended least squares nonlinear regression: a possible solution to the "choice of weights" problem in analysis of individual pharmacokinetic data. *J Pharmacokinet Biopharm.* 1984; 12: 545–558.
143. Van Houwelingen JC. Use and abuse of variance models in regression. *Biometrics* 1988; 44: 1073–1081.
144. Atkins GL. Weighting Functions and Data Truncation in the Fitting of Multi-Exponential Functions. *Biochem J* 1974; 138: 125–127.
145. Bailer AJ, Portier CJ. A note on fitting one-compartment models: non-linear least squares versus linear least squares using transformed data. *J Appl Toxicol* 1990; 10: 303-306.
146. Biopharm Sheiner LB, Beal SL. Pharmacokinetic parameter estimates from several least squares procedures: superiority of extended least squares. *J Pharmacokinet Biopharm.* 1985; 13: 185–201.
147. Modamio P, Lastra CF, Marín EL. Error structure for the HPLC analysis for atenolol, metoprolol and propranolol: a useful weighting method in parameter estimation. *J Pharm Biomed Anal* 1996; 4: 401–408.
148. Hampton JR. Choosing the right beta-blocker. A guide to selection. *Drugs* 1994; 48: 549–568.
149. Yedinak KC. Selection and use of beta-blockers for patients with cardiovascular disease. *Am Pharm* 1994; NS34: 28–36.
150. Green JM. A practical guide to analytical method validation. *Anal Chem News & Features*, May 1 1996; 305A-309A
151. Shah VP, Midha K, Dighe S. Analytical methods validation: bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies. *J Pharm Sci* 1992; 81(3): 309-312.

152. Hajicostas E. Validation of Analytical Methods. Berlin: Springer-Verlag; 2003.
153. Breaux J, Jones K, Boulos D. Understanding and implementing efficient analytical methods development and validation [online]. Pharm Tech Anal Chem& Testing. 2003. Available from: <http://www.pharmtec.com>.
154. Hibbert DB. Method validation of modern analytical techniques [online]. Analytical Insight UNSW. 1998. Available from: <http://www.chem.unsw.edu.au/research/groups/esc>.
155. Robouch P, Bulska E, Duta S, Lauwaars M, Leito I. et al. Belgium: Train Mic European communities; 2003.
156. Huber L. Good laboratory practice for HPLC, CE and UV Visible Spectroscopy. Hewlett Packard; 1993.
157. International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Text on validation of analytical procedures. Geneva: ICH-Q2A; 1994.
158. International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Validation of analytical procedures. Geneva: ICH-Q2A; 1995.
159. International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Validation of analytical procedures: Methodology Geneva: ICH-Q2B; 1996.
160. US EPA, Guidance for methods development and methods validation for the Resource Conservation and Recovery Act (RCRA) Program. Washington: 1995.

161. AOAC Peer Verified methods Program, Manual on policies and procedures, Arlington, VA, Nov: 1993.

162. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Biologics Evaluation and Research (CBER), Method validation [online]. August 2000. Available from: <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>.

163. US FDA, General principles of validation, Rockville, MD, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). May 1987.

164. Marin A, Lopez-Gonzalvez, Barbas C. Development and validation of extraction for determination of zinc and arsenic species in soils using focused ultrasound: Application to heavy metal study in mud and soils. Anal. Chim. Acta 2001; 442(2): 305-318.

165. Grdinic V, Vukovic J. Prevalidation in pharmaceutical analysis, part 1, Fundamentals and critical discussion. J. Pharm. Biomed. Anal. 2004; 35: 489-512.

166. Sarrio RV, Silvestri LJ. Validation of analytical assays and test models for pharmaceutical laboratory [online]. The Regulatory Forum. Biosearch Inc; 1996. Available from: <http://www.regulatory.com/forum/article>.

167. Hartmann C, Smeyers-Verbeke J, Massart DL, McDowall RD. Validation of bioanalytical chromatographic methods. J. Pharm.Biomed. Anal. 1998; 17(2): 193-218.

168. Renger B, Jehle H, Fischer M, Funk M. Validation of analytical procedures in pharmaceutical analytical chemistry: HPTLC assay of theophylline in an effervescent tablet. J.Planar Chrom. 1995; 8: 269-278.

169. Lang JR, Bolton S. A comprehensive method validation strategy for bioanalytical applications in the pharmaceutical industry- 1. Experimental consideration. J. Pharm. Biomed. Anal. 1991; 9(5): 357- 361.
170. Rodriguez LC, Campana AM, Linares CJ, Ceba MR. Estimation of performance characteristics of an analytical method using the data set of the calibration experiment. Analytical Letters 1993; 26(6): 1243-1258.
171. Guidelines for the validation of analytical methods for active constituent, agricultural and veterinary chemical products [online]. Australian Pesticides, veterinary Medicines Authority; 2004. Available from: <http://www.apvma.gov.au>.
172. Santoro MIRM, Cho HS, Kedor-Hackmann ERM. Enantiomeric Separation and Quantitative Determination of Atenolol in Tablets by Chiral High-Performance Liquid Chromatography. Drug Development and Industrial Pharmacy 2000; 26(10): 1107–1110.
173. Santoro MIRM, Cho HS, Kedor-Hackmann ERM. Enantiomeric Separation and Quantitative Determination of Propranolol in Tablets by Chiral High-Performance Liquid Chromatography. Drug Development and Industrial Pharmacy 2001; 27(7): 693–697.
174. Hermansson J, Grahn A. Optimization of The Separation of Enantiomers of Basic Drugs Retention Mechanisms And Dynamic Modification of the Chiral Bonding Properties on an α_1 -acid glycoprotein column. Journal of Chromatography A 1995; 694: 57-69.
175. Tran CD, Dotlich M. Enantiomeric Separation Of Beta-Blockers By High Performance Liquid Chromatography. 1995; 72: 71-73.
176. Williams KL, Sander LC, Wise SA. Comparison of Liquid and Supercritical Fluid Chromatography for The Separation of Enantiomers on Chiral Stationary Phases. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 1996; 15: 1789-1799.

177. Phinney KW, Sander LC. Preliminary Evaluation of A Standart Reference Material for Chiral Stationary Phases used in Liquid and Supercritical Fluid Chromatography. *Anal Bioanal Chem* 2002; 372: 101-108.

178. Bosáková Z, Cuřínová E, Tesařová E. Comparison of vancomycin-based stationary phases with different chiral selector coverage for enantioselective separation of selected drugs in high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 2005; 1088: 94-103.

9. ÖZGEÇMİŞ

Adı	Hilal
Soyadı	Torul
Doğum tarihi	21/01/1985
Doğum yeri	Varto / MUŞ
Eğitim durumu	GAZİ ÜNİVERSİTESİ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Ana Bilim Dalında yüksek lisans eğitimi 2007-2009 GAZİ ÜNİVERSİTESİ Eğitim Fakültesi Kimya Öğretmenliği Bölümünde lisans eğitimi 2002-2007
Yabancı dili	İngilizce
Aldığı burslar	Tübitak eğitim bursu (yüksek lisans) Türk Eğitim Vakfı başarı bursu (ortaöğretim, lisans)

10. TEŞEKKÜR

Danışmanlığımı yürüten ve desteğini esirgemeyen sayın Prof. Dr. Tefik Orbey hocama,

Tez çalışmamın oluşturulmasında ve yürütülmesinde engin bilgi ve tecrübesiyle bana yön veren ayrıca bildiği her konuda beni de bilgilendiren sayın hocam Doç.Dr. Uğur Tamer'e,

Tecrübe ve bilgisini esirgemeyen sayın Doç.Dr. Nusret Ertaş hocama,

Her konuda bilgisini ve manevi desteğini esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız sayın Prof. Dr. Nilgün Göğçer hocama,

Güler yüzüyle destek olan ve her zaman yardıma açık olan sayın Doç.Dr Hasan Basan hocama,

Her koşulda bana yardımcı olan Arş. Gör. H. Eda Şatana, Uzm. Şebnem Yılmaz, Arş. Gör. Sezen Yarımkaaya, Yrd. Doç. Dr. Aysel Berkkan hocalarıma,

Çalışmalarım sırasında yanımda olan ve bana destek veren arkadaşlarım Ali İhsan Seçkin, Çiğdem Kanbeş, Yusuf Gündoğdu, Erhan Temür, Övgü Ergüner, Deniz Koçdan, Arzu Menteş'e ve okul dışında da bana destek olan arkadaşlarıma,

Her türlü işimizi tez elden yürüten sekreterimiz Cennet Güvenci'ye,

Son olarak da gerçekleştirmek istediğim her işte bana güvenen ve destek olan, üzüntülerimi ve sevinçlerimi paylaştığım aileme saygılarımı sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca yüksek lisans eğitimi yapmam için beni destekleyen TÜBİTAK'a teşekkür ederim.