



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



BETA AGONİST İLAÇ ETKEN MADDELERİN KİRAL DAVRANIŞLARININ İNCELENMESİ

Mehmet GÜMÜŞTAŞ

**ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Sibel A. ÖZKAN**

2016- ANKARA

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BETA AGONİST İLAÇ ETKEN MADDELERİN
KİRAL DAVRANIŞLARININ İNCELENMESİ**

Mehmet GÜMÜŞTAŞ

**ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Sibel A. ÖZKAN**

**Bu araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü'nün
12L336003 numaralı projesi ile desteklenmiştir.**

2016-ANKARA

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Beta Agonist İlaç Etken Maddelerin Kiral Davranışlarının İncelenmesi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikri tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Mehmet GÜMÜŞTAŞ

Tarih: 22.02.2016

İmza:

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Analitik Kimya Anabilim Dalı'nda Mehmet GÜMÜŞTAŞ tarafından hazırlanan "Beta Agonist İlaç Etken Maddelerin Kiral Davranışlarının İncelenmesi" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 22.02.2016



Prof. Dr. Nilgün GÜNDEN GÖĞER
Gazi Üniversitesi
Jüri Başkanı



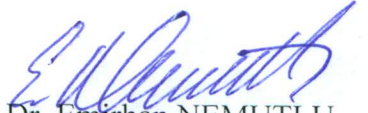
Prof. Dr. Sibel A. ÖZKAN
Ankara Üniversitesi
Üye



Prof. Dr. Bengi USLU
Ankara Üniversitesi
Üye



Prof. Dr. Sinan SÜZEN
Ankara Üniversitesi
Üye



Doç. Dr. Emirhan NEMUTLU
Hacettepe Üniversitesi
(Raportör)

Tez hakkında alınan jüri kararı Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Prof. Dr. Zafer KARAER
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyanı	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	viii
Simgeler ve Kısaltmalar	x
Şekiller	xiv
Çizelgeler	xxii
1. GİRİŞ	1
1.1. Stereokimya	5
1.1.1. Geometrik İzomerler	6
1.1.1.1. Geometrik İzomerlerin E ve Z Adlandırma Sistemi	8
1.1.2. Optik İzomerler, Kiral Moleküller ve Enantiyomerler	8
1.1.2.1. Enantiyomerlerin Özellikleri: Optikçe Aktivlik	11
1.1.2.2. Enantiyomerlerin Adlandırılması ve Cahn Ingold Prelog (CIP) Sistemi	13
1.1.3. Kiral Bileşiklerin Biyolojik Önemi	15
1.1.3.1. Kiral Farmasötik Bileşikler	19
1.1.4. Enantiyomerlerin Ayrılması	24
1.1.4.1. Enantiyomerlerin Ayrılmasında Kullanılan Yöntemler	26
1.1.4.1.1. Tercihli Kristalizasyon	26
1.1.4.1.2. Pasteur Yöntemi (Diastereomer Kristalizasyonu)	27
1.1.4.2. Kinetik Ayırma Yöntemleri	28
1.1.4.3. Enantiyomerlerin Ayrımında Kullanılan Aletli Analiz Yöntemleri	29
1.1.4.3.1. Gaz Kromatografisi	29
1.1.4.3.2. Süperkritik Akışkan Kromatografisi	30
1.1.4.3.3. Kapiler Elektroforez	31
1.1.4.3.4. Kapiler Elektrokromatografi	33
1.2. Beta Agonist İlaçlar ile İlgili Genel Bilgiler	35
1.2.1. Otonom Sinir Sistemi İlaçları	35
1.2.1.1. Sempatomitik İlaçlar	35
1.2.1.1.1. Katekolaminler	39
1.2.1.1.2. Sempatomitik Aminler (Katekolamin Olmayanlar)	39
1.2.1.1.2.1. Alfa-Mimetik İlaçlar	40
1.2.1.1.2.2. Beta-Mimetik İlaçlar	41
1.2.1.1.2.3. Amfetaminler	42
1.3. Tez Kapsamında Kullanılan Etken Maddelerle İlgili Bilgiler	43
1.4. Tez Maddeleri ile Yapılmış Literatürdeki Çalışmalar	47
2. GEREÇ VE YÖNTEM	51
2.1. Gereç	51
2.1.1. Kullanılan Etken Maddeler	51
2.1.2. Kullanılan Araç ve Gereçler	52
2.1.3. Kullanılan Sabit Fazlar	52

2.1.4.Kullanılan Kimyasal Maddeler	53
2.1.5.Standart Madde Çözeltilerinin Hazırlanışı	54
2.1.6.Farmasötik Dozaj Şekli Çözeltilerinin Hazırlanışı	54
2.1.7.Geri Kazanım Çalışmaları için Çözeltilerin Hazırlanışı	55
2.1.8.Hareketli Faz Çözeltilerinin Hazırlanışı	55
2.1.9.Fraksiyonların Toplanması	56
2.2.Yöntem	57
2.2.1.Kromatografi	57
2.2.1.1.Dağılma(Partisyon) Kromatografisi	60
2.2.1.1.1. Ters-Faz Sıvı Kromatografisi	60
2.2.1.1.2. Normal-Faz Sıvı Kromatografisi	62
2.2.2.Yüksek Başarımlı Sıvı Kromatografisi (YBSK)	63
2.2.3.Kiral Bileşen Analizlerinde YBSK'nin Rolü	69
2.2.3.1.Enantiyomerlerin Sıvı Kromatografisi ile Ayrılmasında Kullanılan Malzemeler	70
2.2.3.2.Polisakkarit Temelli Kiral Sabit Fazlar	72
2.2.3.2.1. Polisakkarit Türevlerinin Çeşitleri	72
2.2.3.2.2.Fenile Bağlanan Fonksiyonel Grupların Polisakkarit Esterler ve Fenilkarbamatlara Etkileri	73
2.2.3.2.3. Kiral Sabit Fazın Optimizasyonu	77
2.2.3.2.4. Hareketli Faz Optimizasyonu	80
2.2.3.2.5. Ayrımların Ölçeklendirilmesi	82
2.2.3.2.5.1. Analitik Ölçekli Ayrımlar	82
2.2.3.2.5.2. Preparatif Ölçekli Ayrımlar	83
2.2.3.2.6. Kiral Kromatografik Yöntemlere Özgü Dedektörler	85
2.2.3.3.Kromatografide Temel Parametreler ve Sistem Uygunluk Testleri (SUT)	88
2.2.4.Kromatografik Analizlerde Yöntem Geçerlik Testleri	92
2.2.4.1.Validasyonun Genel İşlemleri	93
2.2.4.2.Validasyon Karakteristikleri	94
2.2.4.2.1. Seçicilik	95
2.2.4.2.2. Doğrusallık ve Aralık	96
2.2.4.2.3. Teşhis Sınırı (TS, LOD) ve Tayin Alt Sınırı (TAS, LOQ)	97
2.2.4.2.4. Kesinlik	98
2.2.4.2.5. Doğruluk (Geri Kazanım)	100
2.2.4.2.6. Sağlamlık	102
2.2.4.2.7. Tutarlılık	102
2.2.4.2.8. Stabilitate	103
3.BULGULAR	105
3.1.Etken Maddelerin Saflığı	105
3.2.Bütoksamine Ait Sonuçlar	105
3.2.1.Bütoksamine Ait Polar Organik Faz ile Yapılan Çalışmalar	106
3.2.2.Bütoksamine Ait Normal Faz ile Yapılan Çalışmalar	106
3.2.3.Bütoksamine Ait Sulu Organik Faz Karışımı ile Yapılan Çalışmalar	111
3.3.İzoksuprine Ait Sonuçlar	113
3.3.1.İzoksuprine Ait Polar Organik Faz ile Yapılan Çalışmalar	113
3.3.2.İzoksuprine Ait Normal Faz ile Yapılan Çalışmalar	113
3.3.3.İzoksuprine Ait Sulu Organik Faz Karışımı ile Yapılan Çalışmalar	120

3.4.Klenbuterole Ait Sonuçlar	124
3.4.1.Klenbuterole Ait Polar Organik Faz ile Yapılan Çalışmalar	124
3.4.2.Klenbuterole Ait Normal Faz ile Yapılmış Çalışmalar	124
3.4.3.Klenbuterole Ait Sulu Organik Faz Karışımı ile Yapılan Çalışmalar	133
3.5.Klenpenterole Ait Sonuçlar	135
3.5.1.Klenpenterole Ait Polar Organik Faz ile Yapılan Çalışmalar	135
3.5.2.Klenpenterole Ait Normal Faz ile Yapılan Çalışmalar	135
3.5.3.Klenpenterole Ait Sulu Organik Faz ile Yapılan Çalışmalar	139
3.6.Ritodrine Ait Sonuçlar	140
3.6.1.Ritodrine Ait Polar Organik Faz ile Yapılan Çalışmalar	140
3.6.2.Ritodrine Ait Normal Faz ile Yapılan Çalışmalar	140
3.6.3.Ritodrine Ait Sulu Organik Faz Karışımı ile Yapılan Çalışmalar	148
3.7.Simbuterole Ait Sonuçlar	148
3.7.1.Simbuterole Ait Polar Organik Faz ile Yapılan Çalışmalar	148
3.7.2.Simbuterole Ait Normal Faz ile Yapılan Çalışmalar	149
3.7.3.Simbuterole Ait Sulu Organik Faz Karışımı ile Yapılan Çalışmalar	154
3.8.Terbutaline Ait Sonuçlar	154
3.8.1.Terbutaline Ait Polar Organik Faz ile Yapılan Çalışmalar	154
3.8.2.Terbutaline Ait Normal Faz ile Yapılan Çalışmalar	155
3.8.3.Terbutaline Ait Sulu Organik Faz Karışımı ile Yapılan Çalışmalar	158
3.9.Tulobuterole Ait Çalışmalar	158
3.9.1.Tulobuterole Ait Polar Organik Faz ile Yapılan Çalışmalar	158
3.9.2.Tulobuterole Ait Normal Faz ile Yapılan Çalışmalar	159
3.9.3.Tulobuterole Ait Sulu Organik Faz Karışımı ile Yapılan Çalışmalar	164
3.10.Farmasötik Dozaj Şekillerinin Analizi için Yöntem Geliştirilmesi	164
3.10.1.Klenbuterol Analizi için Çalışmalar	164
3.10.1.1.Optimizasyon Çalışmaları	164
3.10.1.2.Klenbuterol Enantiyomerlerinin Analizi için Yöntem Geçerlilik Testleri	167
3.10.1.3.Geliştirilen Yöntemin Klenbuterol İçeren Farmasötik Dozaj Şekline Uygulanması	169
3.10.2.Ritodrin Analizi için Çalışmalar	170
3.10.2.1.Optimizasyon Çalışmaları	170
3.10.2.2.Ritodrin Enantiyomerlerinin Analizi için Yöntem Geçerlilik Testleri	173
3.10.2.3.Geliştirilen Yöntemin Ritodrin İçeren Farmasötik Dozaj Şekline Uygulanması	175
3.10.3.Terbutalin Analizi için Çalışmalar	176
3.10.3.1.Optimizasyon Çalışmaları	176
3.10.3.2.Terbutalin Enantiyomerlerinin Analizi için Yöntem Geçerlilik Testleri	179
3.10.3.3.Geliştirilen Yöntemin Terbutalin İçeren Farmasötik Dozaj Şekline Uygulanması	181
4.TARTIŞMA	183
4.1.Tez Kapsamındaki Bileşiklerin Enantiyomerlerinin Ayrımı	183
4.1.1.Polisakkarit Türünün Etkisi	188
4.1.2.Hareketli Fazın Etkisi	190
4.1.3.Hareketli Faza Eklenen Asidik ve Bazik Katkı Maddelerinin Etkisi	192
4.2.Optimize Edilen Koşulların Piyasa Preparatlarına Uygulanması	199
4.3.Literatür Çalışmaları ile Karşılaştırma	199

5.SONUÇ ve ÖNERİLER	202
ÖZET	205
SUMMARY	206
KAYNAKLAR	207
ÖZGEÇMİŞ	218

ÖNSÖZ

Piyasada bulunan ilaçların yarısından fazlası kiral bileşikler içermektedir. Aynı molekül şekline sahip bu bileşikler farmakolojik, farmakokinetik ve toksikolojik açıdan birbirlerinden farklı etkiler göstermektedir. Bu sebeple, rasemik karışımlardaki istenmeyen enantiyomerin uzaklaştırılması, gerek klinik açıdan gerekse ilaç endüstrisi açısından çok büyük önem taşımaktadır. Bu çalışmada model grup olarak seçilen β -agonist ilaç etken maddelerin kiral davranışları incelenmiş ve altı farklı polisakkarit temelli kiral kolon kullanılarak enantiyomerlerinin birbirinden ayrımı YBSK yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Ayrımları gerçekleştirilen bileşiklerin farklı koşullar altında enantiyomerik tersinirlikleri de incelenerek alıkonma mekanizmaları aydınlatılmaya çalışılmıştır. Geliştirilen yöntemlerin piyasa preparatlarına uygulanabilirliği de gösterilmiştir.

Akademik hayatımın şekillenmesine büyük katkı sağlayan, her yönüyle örnek aldığım, yüksek lisans ve doktora eğitimimin her aşamasında bilimsel desteğini hiç esirgemeyen, her türlü zorluğu aşmamda sabrı, ilgisi ve desteğiyle bana güç veren, anne sıcaklığıyla her zaman manevi desteğini hissettiren çok değerli hocam Prof. Dr. Sibel A. ÖZKAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Doktora tezim boyunca destek ve yardımlarını hiç esirgemeyen, bana ailesinden biri gibi davranıp manevi desteğini hep hissettiren değerli hocam Prof. Dr. Bezhan CHANKVETADZE'ye en içten teşekkürlerimi sunarım.

Değerli bilgi ve deneyimlerini esirgemeyip, bana yol gösteren, destekleyici yaklaşımıyla beni kardeşi gibi gören, her zaman yanımda olan, manevi desteğini hep hissettiğim değerli hocam Prof. Dr. Bengi USLU'ya en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarımın Tiflis ayağında yardımlarını esirgemeyen sevgili Lali CHANKVETADZE, George JIBUTI, Anna ve Gela GOGOLASHVILI, Lasha

GIUNASHVILI, Iza MATARASHVILI ve tüm ekip ile desteğini hiç esirgemeyen sevgili Cem ERKMEN'e teşekkür ederim.

Doktora öğrenimime sağladıkları katkılardan dolayı Analitik Kimya Anabilim Dalı'nın öğretim üyelerine teşekkürlerimi sunarım.

Değerli arkadaşlarım Dr. M. Gökhan ÇAĞLAYAN, Dr. Çiğdem KARAASLAN, Merve Eylül KIYMACI, Dr. Burçin BOZAL-PALABIYIK, Yrd. Doç. Dr. Ceyda Tuba ŞENGEL TÜRK ve Yrd. Doç. Dr. Ulya BADILLI'ya yardım ve destekleri için teşekkür ederim. Anabilim dalımda bulunan arkadaşlarım Dr. Burcu DOĞAN-TOPAL, Dr. Özgür ÜSTÜNDAĞ, Nurgül KARADAŞ-BAKIRHAN, Sevinç KURBANOĞLU, Engin ER, Z. Ceren ERTEKİN-ÖZKAN'a desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca sonsuz ilgi ve sevgileri ile verdiğim her kararda bana destek olan, bana her zaman inanan, güvenen, hep yanımda olan anneme, babama ve ablama yaşamıma kattıkları tüm güzellikler için çok teşekkür ederim.

Akademik hayatımın en başından beri hep yanımda olan, birlikte tüm zorlukların üstesinden geldiğim, en zor zamanlarda bile anlayışı, sevgisi ve desteğini eksik etmeyen değerli eşim Ayşen GÜMÜŞTAŞ'a bu zorlu hayatı benimle paylaştığı, bana inandığı, güvendiği ve beni yalnız bırakmadığı için çok teşekkür ederim.

Tez çalışması Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Ofisi tarafından 12L336003 numaralı proje ile desteklenmiştir.

SİMGELER VE KISALTMALAR

AC	Alternatif akım
ACN	Asetonitril
AMP	Adenozin monofosfat
As	Pik asimetrisi
ATC	Anatomik ve terapötik kimyasal
ATP	Adenozin trifosfat
α	Seçicilik
BH	Bağıl hata
BSS	Bağıl standart sapma
BUT	Bütoksamin
CAD	Charged Aerosol Dedektör
CIP	Chan Ingold Prelog
CM	Karboksi metil
cm	Santimetre
d	Dekstrotatori (Polarize ışığı saat yönünde çeviren madde)
DAD	Foto diyot dizi dedektörü
DEA	Dietil amin
dk	Dakika
DPI	Dairesel polarize ışık
E	Enantiyomerik oran
ee	Enantiyomerik aşırılık
EK	Elektrokimyasal
ELSD	Evaporative Light Scattering (Buharlaştırmalı ışık saçılımı)
EMA	European Agency for the Evaluation of Medicinal Products
FA	Formik asit
FD	Floresans dedektör
FDA	Food and Drug Administration (Gıda ve İlaç İdaresi Kurumu)
FDD	Foto diyot dizi

FTIR	Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi
g	Gram
GB	Görünür bölge
GD	Gerçek değer
GK	Gaz kromatografisi
GKK	Gaz-katı kromatografisi
GSK	Gaz-sıvı kromatografisi
HP	Hidroksi propil
HPTLC	Yüksek basınçlı ince tabaka kromatografisi
ICH	International Council for Harmonisation (Uluslararası Uyum Konseyi)
IPA	İzopropanol
IR	Kızılötesi
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
i.d.	İç çap
IZO	İzoksuprin
k	Kapasite faktörü
KAK	Kritikaltı akışkan kromatografi
KE	Kapiler elektroforez
KEK	Kapiler elektrokromatografi
KI	Kırılma indisi
KLB	Klenbuterol
KLP	Klenpenterol
KN	Kaynama noktası
KS	Kütle spektrometri
KSF	Kiral sabit faz
KZE	Kapiler zon elektroforez
L	Litre
l	Levorotatori (Polarize ışığı saat yönünün tersi yönünde çeviren madde)
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
m	Eğim

M	Molar
MALLS	Multi Angle Laser Light Scattering (Çoklu açılı lazer ışık saçılımı)
MEK	Mikroemulsiyon elektrokinetik kromatografi
MeOH	Metanol
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
MSS	Merkezi sinir sistemi
N	Etkin tabaka sayısı
nm	Nanometre
NFSK	Normal faz sıvı kromatografisi
P'	Polarite indeksi
r	Korelasyon katsayısı
R^2	Tanımlayıcılık katsayısı
RIT	Ritodrin
Rs	Ayrım gücü
SD	Siklodekstrin
SIM	Simbuterol
SK	Sıvı kromatografi
SS	Standart sapma
SUT	Sistem Uygunluk Testi
T	Kuyruklanma faktörü
t	Zaman
t_0	Ölü zaman
TAS	Tayin alt sınırı
TEA	Trietil amin
TER	Terbutalin
TFA	Trifloroasetik asit
TFSK	Ters faz sıvı kromatografisi
TLC	İnce tabaka kromatografisi
t_R	Alıkonma zamanı

TS	Teşhis Sınırı
TUL	Tulobuterol
UBSK	Ultra başarılı sıvı kromatografisi
USP	United States Pharmacopeia (Amerikan Farmakopesi)
UV	Ultra viyole
W	Pik taban genişliği
YBSK	Yüksek başarılı sıvı kromatografisi

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Ayna görüntüsüne örnek olarak, Michelangelo Caravaggio'nun suya bakan Narsis tablosu (https://tr.wikipedia.org/wiki/Narkissos_(mitoloji)).	2
Şekil 1.2. cis-1,2-Dikloroeten ve trans-1,2-Dikloroeten	6
Şekil 1.3. İzomerlerin sınıflandırılması	7
Şekil 1.4. Simetrik ve simetrik olmayan örnekler	9
Şekil 1.5. Elin ayna görüntüsü ve bunun moleküler düzeyde örneklenmesi(sol), elin üst üste çakışmaması (sağ).	9
Şekil 1.6. Tetrahedral karbon atomu içeren (stereo merkez olarak karbon atomunun bulunduğu) kiral molekül ve örneği Bütoksamin (üst), stereo merkez olarak kükürtün bulunduğu sülfoksit yapısı ve örneği Adrafinil (alt).	10
Şekil 1.7. Polarimetre cihazı	12
Şekil 1.8. R/S isimlendirmesine ait örnek	15
Şekil 1.9. Asparjin molekülü: L-asparjin (sol), D-asparjin (sağ)	16
Şekil 1.10. S-(+) Karvon (sağ) ve R-(-) Karvonun (sol) molekül şekli.	16
Şekil 1.11. R ve S limonen molekülünün şekilleri	17
Şekil 1.12. R ve S olean molekülünün şekilleri	17
Şekil 1.13. Talidomit trajedisine genel bakış	18
Şekil 1.14. İlaç reseptör ilişkisine enantiyomerik modelleme	20
Şekil 1.15. Silika parçacıklarla doldurulmuş kapiler bir kolon	33
Şekil 1.16. Laminer (a) ve elektroozmotik akış (b)	34
Şekil 1.17. Sempatomimetik ilaçların sınıflandırılması	38
Şekil 1.18. Alfa-mimetik ilaçların sınıflandırılması	41
Şekil 1.19. Beta-mimetik ilaçların sınıflandırılması	42
Şekil 2.1. Kromatografik ayırımın temeli ve Mikhail Tswett	57
Şekil 2.2. Kromatografik sistemin sınıflandırılması (Sewell ve ark., 1987).	59
Şekil 2.3. Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi cihazının şematik görünüşü	65

Şekil 2.4. YBSK kolonu, Katı çekirdek parçacık içeren kolonda akış (üst), tamamen gözenekli parçacıklardan oluşmuş kolonda akış (alt)	66
Şekil 2.5. Amiloz ve selülozlara ait fenilkarbamat türelerinin moleküler şekli	75
Şekil 2.6. Aynı maddenin farklı hareketli faz koşullarına, TFSK (ters faz) ve NFSK (normal faz) ait kromatogram (Zhou ve ark., 2010).	81
Şekil 2.7. Chirobiotic T ve Chirobiotic TAG kiral kolonları (250 mm x 4,6 mm) ve hareketli faz olarak metanol ve asidik katkı maddesinin kullanıldığı Propranolol ayrımı için yapılmış çalışma.	86
Şekil 2.8. Trimeprazine ait dariesel dikroizm dedektörü (A), UV dedektör (B) ve kırılma indisi dedektörü (C) kullanılarak yapılmış çalışma (Sanchez ve ark., 2012).	88
Şekil 2.9. YBSK cihazından alınmış örnek bir kromatogram	89
Şekil 2.10. USP ve ICH'e göre gerçekleştirilmesi gereken validasyon parametreleri.	94
Şekil 2.11. Sinyal/Gürültü oranının şekilsel ifadesi (Ozkan ve ark., 2015).	98
Şekil 2.12. Kesinlik ve doğruluk parametrelerinin şekilsel ifadesi	102
Şekil 3.1. Bütoksamine ait molekül şekli	105
Şekil 3.2. Kolon: Cellulose 1 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:Ipa:FA (80:20:0,1); n-hekzan:Ipa:DEA (80:20:0,1); n-hekzan:Ipa:FA:DEA (80:20:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya).	107
Şekil 3.3. Kolon: Cellulose 2 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:Ipa:FA (80:20:0,1); n-hekzan:Ipa:DEA (80:20:0,1); n-hekzan:Ipa:FA:DEA (80:20:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya).	107
Şekil 3.4. Kolon: Cellulose 3 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:Ipa:FA (80:20:0,1); n-hekzan:Ipa:DEA (80:20:0,1); n-hekzan:Ipa:FA:DEA (80:20:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya).	108
Şekil 3.5. Kolon: Cellulose 4 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:Ipa:FA (80:20:0,1); n-hekzan:Ipa:DEA (80:20:0,1); n-hekzan:Ipa:FA:DEA (80:20:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya).	108
Şekil 3.6. Kolon: Amylose 1 (250 x 4.6 mm; 5 µm); hareketli faz: n-hekzan:Ipa:FA (80:20:0,1); n-hekzan:Ipa:DEA (80:20:0,1); n-hekzan:Ipa:FA:DEA (80:20:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya).	109
Şekil 3.7. Kolon: Amylose 2 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:Ipa:FA (80:20:0,1); n-hekzan:Ipa:DEA (80:20:0,1); n-hekzan:Ipa:FA:DEA (80:20:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya).	109
Şekil 3.8. Kolon: Cellulose 1 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: MeOH:H ₂ O:DEA (97:3:0,1); (95:5:0,1); (90:10:0,1) (yukarıdan aşağıya).	111
Şekil 3.9. Kolon: Cellulose 1 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: MeOH:H ₂ O:DEA (85:15:0,1); (80:20:0,1); (70:30:0,1); (60:40:0,1) (yukarıdan aşağıya).	112

- Şekil 3.10.** İzoksuprine ait molekül şekli 113
- Şekil 3.11.** Kolon: Cellulose 1 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:Ipa:FA (80:20:0,1); n-hekzan:Ipa:DEA (80:20:0,1); n-hekzan:Ipa:FA:DEA (80:20:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya). 114
- Şekil 3.12.** Kolon: Cellulose 2 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:Ipa:FA (80:20:0,1); n-hekzan:Ipa:DEA (80:20:0,1); n-hekzan:Ipa:FA:DEA (80:20:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya). 115
- Şekil 3.13.** Kolon: Cellulose 3 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:Ipa:FA (80:20:0,1); n-hekzan:Ipa:DEA (80:20:0,1); n-hekzan:Ipa:FA:DEA (80:20:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya). 115
- Şekil 3.14.** Kolon: Cellulose 4 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:Ipa (80:20:); n-hekzan:Ipa:FA (80:20:0,1); n-hekzan:Ipa:DEA (80:20:0,1); n-hekzan:Ipa:FA:DEA (80:20:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya). 116
- Şekil 3.15.** Kolon: Amylose 1 (250 x 4.6 mm; 5 µm); hareketli faz: n-hekzan:Ipa (80:20); n-hekzan:Ipa:FA (80:20:0,1); n-hekzan:Ipa:DEA (80:20:0,1); n-hekzan:Ipa:FA:DEA (80:20:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya). 117
- Şekil 3.16.** Kolon: Amylose 2 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:Ipa (80:20); n-hekzan:Ipa:FA (80:20:0,1); n-hekzan:Ipa:DEA (80:20:0,1); n-hekzan:Ipa:FA:DEA (80:20:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya). 118
- Şekil 3.17.** Kolon: Cellulose 1 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: MeOH:H₂O:DEA (100:0:0,1); (95:5:0,1); (90:10:0,1) (yukarıdan aşağıya). 120
- Şekil 3.18.** Kolon: Cellulose 1 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: MeOH:H₂O:DEA (85:15:0,1); (80:20:0,1); (70:30:0,1); (60:40:0,1) (yukarıdan aşağıya). 121
- Şekil 3.19.** Kolon: Cellulose 4 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: MeOH:H₂O:DEA (95:5:0,1); (90:10:0,1); (70:30:0,1) (yukarıdan aşağıya). 122
- Şekil 3.20.** Kolon: Cellulose 2 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: MeOH:H₂O:DEA (95:5:0,1); (85:15:0,1); (70:30:0,1) (yukarıdan aşağıya). 122
- Şekil 3.21.** Klenbuterole ait molekül şekli 124
- Şekil 3.22.** Kolon: Cellulose 1 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:Ipa:FA:DEA (80:20:0,1:0,1); (90:10:0,1:0,1); (95:5:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya). 125
- Şekil 3.23.** Kolon: Cellulose 2 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:Ipa:FA:DEA (80:20:0,1:0,1); (90:10:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya). 126
- Şekil 3.24.** Kolon: Cellulose 4 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:Ipa:FA:DEA (80:20:0,1:0,1); (90:10:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya). 126
- Şekil 3.25.** Amylose 1 (250 x 4.6 mm; 5 µm); hareketli faz: n-hekzan:Ipa:FA:DEA (80:20:0,1:0,1); (90:10:0,1:0,1); (95:5:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya). 127
- Şekil 3.26.** Amylose 2 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:Ipa:FA:DEA (80:20:0,1:0,1); (95:5:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya). 127

- Şekil 3.27.** Kolon: Cellulose 2 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:Ipa:FA (90:10:0,1); n-hekzan:Ipa:DEA (90:10:0,1); n-hekzan:Ipa:FA:DEA (90:10:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya). 128
- Şekil 3.28.** Kolon: Cellulose 3 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:Ipa:FA (90:10:0,1); n-hekzan:Ipa:DEA (90:10:0,1); (yukarıdan aşağıya). 128
- Şekil 3.29.** Kolon: Cellulose 4 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:Ipa:DEA (90:10:0,1); n-hekzan:Ipa:DEA (95:5:0,1); n-hekzan:Ipa:DEA:FA (90:10:0,1:0,1); (yukarıdan aşağıya). 129
- Şekil 3.30.** Kolon: Amylose 1 (250 x 4.6 mm; 5 µm); hareketli faz: n-hekzan:Ipa (80:20:); n-hekzan:Ipa:FA (80:20:0,1); n-hekzan:Ipa:DEA (80:20:0,1); n-hekzan:Ipa:FA:DEA (80:20:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya). 130
- Şekil 3.31.** Kolon: Amylose 2 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:Ipa:FA (90:10:0,1); n-hekzan:Ipa:DEA (90:10:0,1); n-hekzan:Ipa:FA:DEA (90:10:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya). 131
- Şekil 3.32.** Kolon: Cellulose 4 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: MeOH:H₂O:DEA (95:5:0,1); (70:30:0,1) (yukarıdan aşağıya). 133
- Şekil 3.33.** Kolon: Cellulose 2 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: MeOH:H₂O:DEA (95:5:0,1); (70:30:0,1) (yukarıdan aşağıya). 134
- Şekil 3.34.** Klenpenterole ait molekül şekli 135
- Şekil 3.35.** Kolon: Cellulose 2 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:Ipa:FA (80:20:0,1); n-hekzan:Ipa:DEA (80:20:0,1); n-hekzan:Ipa:FA:DEA (80:20:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya). 136
- Şekil 3.36.** Kolon: Cellulose 4 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:Ipa (80:20); n-hekzan:Ipa:FA (80:20:0,1); n-hekzan:Ipa:FA:DEA (80:20:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya). 137
- Şekil 3.37.** Kolon: Amylose 1 (250 x 4.6 mm; 5 µm); hareketli faz: n-hekzan:Ipa:FA (80:20:0,1); n-hekzan:Ipa:DEA (80:20:0,1); n-hekzan:Ipa:FA:DEA (80:20:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya). 137
- Şekil 3.38.** Kolon: Cellulose 2 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: MeOH:H₂O:DEA (95:5:0,1); (70:30:0,1) (yukarıdan aşağıya). 139
- Şekil 3.39.** Kolon: Cellulose 4 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: MeOH:H₂O:DEA (95:5:0,1); (70:30:0,1) (yukarıdan aşağıya). 139
- Şekil 3.40.** Ritodrine ait molekül şekli 140
- Şekil 3.41.** Cellulose 2 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:Ipa:FA (70:30:0,1); n-hekzan:Ipa:DEA (70:30:0,1); n-hekzan:Ipa:FA:DEA (70:30:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya). 141
- Şekil 3.42.** Cellulose 4 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:Ipa:FA (70:30:0,1); n-hekzan:Ipa:DEA (70:30:0,1); n-hekzan:Ipa:FA:DEA (70:30:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya). 142

- Şekil 3.43.** Amylose 1 (250 x 4.6 mm; 5 µm); hareketli faz: n-hekzan:Ipa:FA (70:30:0,1); n-hekzan:Ipa:DEA (70:30:0,1); n-hekzan:Ipa:FA:DEA (70:30:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya). 142
- Şekil 3.44.** Cellulose 2 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:Ipa:FA (65:35:0,1); n-hekzan:Ipa:DEA (65:35:0,1); n-hekzan:Ipa:FA:DEA (65:35:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya). 143
- Şekil 3.45.** Cellulose 4 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:Ipa:FA (65:35:0,1); n-hekzan:Ipa:DEA (65:35:0,1); n-hekzan:Ipa:FA:DEA (65:35:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya). 143
- Şekil 3.46.** Cellulose 2 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:Ipa:FA (60:40:0,1); n-hekzan:Ipa:DEA (60:40:0,1); n-hekzan:Ipa:FA:DEA (60:40:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya). 144
- Şekil 3.47.** Cellulose 4 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:Ipa:FA (60:40:0,1); n-hekzan:Ipa:DEA (60:40:0,1); n-hekzan:Ipa:FA:DEA (60:40:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya). 144
- Şekil 3.48.** Cellulose 2 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:Ipa:DEA:FA (60:40:0,1:0,1); n-hekzan:Ipa:DEA:FA (65:35:0,1:0,1); n-hekzan:Ipa:DEA:FA (70:30:0,1:0,1); n-hekzan:Ipa:DEA:FA (80:20:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya). 146
- Şekil 3.49.** Cellulose 4 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:Ipa:DEA:FA (60:40:0,1:0,1); n-hekzan:Ipa:DEA:FA (65:35:0,1:0,1); n-hekzan:Ipa:DEA:FA (70:30:0,1:0,1); n-hekzan:Ipa:DEA:FA (80:20:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya). 146
- Şekil 3.50.** Cellulose 3 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:Ipa:DEA (60:40:0,1); n-hekzan:Ipa:DEA (70:30:0,1); n-hekzan:Ipa:DEA (80:20:0,1) (yukarıdan aşağıya). 147
- Şekil 3.51.** Simbuterole ait molekül şekli 148
- Şekil 3.52.** Cellulose 1 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:Ipa:DEA (80:20:0,1); n-hekzan:Ipa:FA:DEA (80:20:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya). 149
- Şekil 3.53.** Cellulose 2 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:Ipa:FA (70:30:0,1); n-hekzan:Ipa:DEA (70:30:0,1); n-hekzan:Ipa:FA:DEA (70:30:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya). 150
- Şekil 3.54.** Cellulose 2 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:Ipa:FA (80:20:0,1); n-hekzan:Ipa:DEA (80:20:0,1); n-hekzan:Ipa:FA:DEA (80:20:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya). 150
- Şekil 3.55.** Cellulose 3 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:Ipa:DEA (80:20:0,1); n-hekzan:Ipa:FA:DEA (80:20:0,1:0,1) ; n-hekzan:Ipa:FA (70:30:0,1); n-hekzan:Ipa:FA:DEA (70:30:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya). 151
- Şekil 3.56.** Cellulose 4 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:Ipa:FA (80:20:0,1); n-hekzan:Ipa:DEA (80:20:0,1); n-hekzan:Ipa:FA:DEA (80:20:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya). 151
- Şekil 3.57.** Amylose 1 (250 x 4.6 mm; 5 µm); hareketli faz: n-hekzan:Ipa:FA (80:20:0,1); n-hekzan:Ipa:DEA (80:20:0,1); n-hekzan:Ipa:FA:DEA (80:20:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya). 152
- Şekil 3.58.** Amylose 2 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:Ipa:FA (70:30:0,1); n-hekzan:Ipa:DEA (70:30:0,1); n-hekzan:Ipa:FA:DEA (70:30:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya). 152
- Şekil 3.59.** Terbutaline ait molekül şekli 154

- Şekil 3.60.** Cellulose 2 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:Ipa:FA (70:30:0,1); n-hekzan:Ipa:DEA (70:30:0,1); n-hekzan:Ipa:FA:DEA (70:30:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya). 155
- Şekil 3.61.** Cellulose 4 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:Ipa:FA (70:30:0,1); n-hekzan:Ipa:DEA (70:30:0,1); n-hekzan:Ipa:FA:DEA (70:30:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya). 156
- Şekil 3.62.** Cellulose 2 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:Ipa:FA:DEA (65:35:0,1:0,1); n-hekzan:Ipa:FA:DEA (70:30:0,1:0,1); n-hekzan:Ipa:FA:DEA (80:20:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya). 157
- Şekil 3.63.** Cellulose 4 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:Ipa:FA:DEA (70:30:0,1:0,1); n-hekzan:Ipa:FA:DEA (80:20:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya). 157
- Şekil 3.64.** Tulobuterole ait molekül şekli 158
- Şekil 3.65.** Cellulose 1 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:Ipa:FA (80:20:0,1); n-hekzan:Ipa:FA:DEA (80:20:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya). 159
- Şekil 3.66.** Cellulose 2 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:Ipa:FA (80:20:0,1); n-hekzan:Ipa:DEA (80:20:0,1); n-hekzan:Ipa:FA:DEA (80:20:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya). 160
- Şekil 3.67.** Cellulose 4 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:Ipa:FA (80:20:0,1); n-hekzan:Ipa:DEA (80:20:0,1); n-hekzan:Ipa:FA:DEA (80:20:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya). 160
- Şekil 3.68.** Amylose 1 (250 x 4.6 mm; 5 µm); hareketli faz: n-hekzan:Ipa:FA (80:20:0,1); n-hekzan:Ipa:FA:DEA (80:20:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya). 161
- Şekil 3.69.** Amylose 2 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:Ipa:FA (80:20:0,1); n-hekzan:Ipa:FA:DEA (80:20:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya). 161
- Şekil 3.70.** Amylose 1 (250 x 4.6 mm; 5 µm); hareketli faz: n-hekzan:Ipa:FA:DEA (80:20:0,1:0,1); n-hekzan:Ipa:FA:DEA (85:15:0,1:0,1); n-hekzan:Ipa:FA:DEA (90:10:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya). 163
- Şekil 3.71.** Cellulose 1 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:Ipa:FA:DEA (80:20:0,1:0,1); n-hekzan:Ipa:FA:DEA (85:15:0,1:0,1); n-hekzan:Ipa:FA:DEA (90:10:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya). 163
- Şekil 3.72.** KLB standartlarına ait, değişen derişimlerde elde edilen kromatogram: hareketli faz (a), 10 µg mL⁻¹ (b), 40 µg mL⁻¹ (c), 100 µg mL⁻¹ (d), 300 µg mL⁻¹ (e). 167
- Şekil 3.73.** KLB enantiyomerlerine ait 4-300 µg mL⁻¹ derişim aralığında elde edilen kalibrasyon grafikleri ve denklemleri. 168
- Şekil 3.74.** KLB dozaj şekline ait geri kazanım sonuçlarını içeren kromatogram: % 25 (a), % 50 (b), % 100 (c). 169
- Şekil 3.75.** RIT standartlarına ait, değişen derişimlerde elde edilen kromatogramı: hareketli faz (a), 5 µg mL⁻¹ (b), 25 µg mL⁻¹ (c), 100 µg mL⁻¹ (d), 250 µg mL⁻¹ (e). 173
- Şekil 3.76.** RIT enantiyomerlerine ait 5-500 µg mL⁻¹ derişim aralığında elde edilen kalibrasyon grafikleri ve denklemleri. 174
- Şekil 3.77.** RIT dozaj şekline ait geri kazanım sonuçlarını içeren kromatogram: % 25 (a), % 50 (b), % 100 (c). 175

Şekil 3.78. TER standartlarına ait, değişen derişimlerde elde edilen kromatogramı: Hareketli faz (a), 100 µg mL ⁻¹ (b), 200 µg mL ⁻¹ (c), 300 µg mL ⁻¹ (d), 400 µg mL ⁻¹ (e).	179
Şekil 3.79. TER enantiyomerlerine ait 10-500 µg mL ⁻¹ derişim aralığında elde edilen kalibrasyon grafikleri ve denklemleri.	180
Şekil 3.80. TER dozaj şekline ait geri kazanım sonuçlarını içeren kromatogram: % 25 (a), % 50 (b), % 100 (c).	181
Şekil 4.1. Kullanılan sabit fazların kimyasal yapıları	183
Şekil 4.2. Kiral sabit fazların enantiyomerleri ayırma başarısı.	184
Şekil 4.3. BUT, Cellulose 1 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:Ipa:DEA (80:20:0,1) (üst); MeOH:H ₂ O:DEA (85:15:0,1) (alt)	185
Şekil 4.4. IZO'ya ait fraksiyonlama örneği: Kolon: Lux Amylose 1 (250 x 4.6 mm; 5 µm), hareketli faz: n-hekzan:Ipa:DEA, (80:20:0,1), 25 °C, 2 mL dk ⁻¹ akış hızı.	186
Şekil 4.5. Fraksiyonlama sonrasında yapılan klenbuterol analizine ait kromatogram: Amylose 1 (250 x 4.6 mm; 5 µm); hareketli faz: n-hekzan:Ipa:FA:DEA, (90:10:0,1:0,1), 25 °C, 1 mL dk ⁻¹ akış hızı. Madde karışımı 1.enantiyomer:2,enantiyomer, 2:1 (alan/alan).	186
Şekil 4.6. Doğal polisakkaritlerden amiloz (sol), selüloz (sağ)	188
Şekil 4.7. KLB, Cellulose 4 (250 x 4.6 mm; 3 µm) (üst); hareketli faz: n-hekzan:Ipa:DEA (95:5:0,1), Cellulose 3 (250 x 4.6 mm; 3 µm) (alt); hareketli faz: n-hekzan:Ipa:DEA (90:10:0,1).	189
Şekil 4.8. TUL, Amylose 1 (250 x 4.6 mm; 5 µm) (üst); Amylose 2 (250 x 4.6 mm; 3 µm) (alt); hareketli faz: n-hekzan:Ipa:FA (80:20:0,1); 25 °C, 1 mL dk ⁻¹ .	189
Şekil 4.9. RIT, kolon: Cellulose 2 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:Ipa:DEA:FA (60:40:0,1:0,1); n-hekzan:Ipa:DEA:FA (65:35:0,1:0,1); n-hekzan:Ipa:DEA:FA (70:30:0,1:0,1); n-hekzan:Ipa:DEA:FA (80:20:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya).	191
Şekil 4.10. SIM, Amylose 1 (250 x 4.6 mm; 5 µm); hareketli faz: n-hekzan:Ipa:FA (80:20:0,1); n-hekzan:Ipa:DEA (80:20:0,1); n-hekzan:Ipa:FA:DEA (80:20:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya).	193
Şekil 4.11. KLP, Kolon: Cellulose 2 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:Ipa:FA (80:20:0,1); n-hekzan:Ipa:DEA (80:20:0,1); n-hekzan:Ipa:FA:DEA (80:20:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya).	194
Şekil 4.12. TUL, Cellulose 4 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:Ipa:FA (80:20:0,1); n-hekzan:Ipa:DEA (80:20:0,1) (yukarıdan aşağıya).	194
Şekil 4.13. BUT, Cellulose 4 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:Ipa:FA (80:20:0,1); n-hekzan:Ipa:DEA (80:20:0,1) (yukarıdan aşağıya).	195
Şekil 4.14. IZO, Amylose 1 (250 x 4.6 mm; 5 µm); hareketli faz: n-hekzan:Ipa:FA (80:20:0,1); n-hekzan:Ipa:DEA (80:20:0,1) (yukarıdan aşağıya).	195
Şekil 4.15. IZO, Amylose 1 (250 x 4.6 mm; 5 µm); hareketli faz: n-hekzan:Ipa:FA (80:20:0,1); n-hekzan:Ipa:DEA (80:20:0,1) (yukarıdan aşağıya).	195

Şekil 4.16. KLB, kolon: Amylose 2 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:Ipa:DEA (90:10:0,1); n-hekzan:Ipa:FA:DEA (90:10:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya). 196

Şekil 4.17. SIM, Cellulose 2 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:Ipa:FA (80:20:0,1); n-hekzan:Ipa:DEA (80:20:0,1); n-hekzan:Ipa:FA:DEA (80:20:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya). 197

Şekil 4.18. IZO, Kolon: Cellulose 3 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:Ipa:FA (80:20:0,1); n-hekzan:Ipa:DEA (80:20:0,1); n-hekzan:Ipa:FA:DEA (80:20:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya). 197

Şekil 4.19. IZO, Kolon: Amylose 1 (250 x 4.6 mm; 5 µm); hareketli faz: n-hekzan:Ipa (80:20); n-hekzan:Ipa:FA (80:20:0,1); n-hekzan:Ipa:DEA (80:20:0,1); n-hekzan:Ipa:FA:DEA (80:20:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya). 198

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Enantiyomerler ve diastereomerlerin farklılıkları	10
Çizelge 1.2. Etkin maddelerde enantiyomerlerin etkisi (Ariens, 1984; Mcconathy ve Owens., 2003; Nguyen ve ark., 2006; Patocka ve Dvorak, 2004; Uckun ve Suzen, 2009)	22
Çizelge 1.3. Dünyada piyasada bulunan rasemik ve tek enantiyomer formdaki ilaçlar (Erb, 2006)	23
Çizelge 1.4. Kiral ilaç geliştirilirken gereklilikler.	24
Çizelge 1.5. Sempatomimetik ilaç grubuna dahil olan etken maddeler.	37
Çizelge 1.6. Tez kapsamında kullanılan etken maddelerle ilgili kimyasal, fiziksel, farmakolojik ve farmakokinetik özellikler ile birlikte molekül formülleri	44
Çizelge 1.7. Tez kapsamında kullanılan ilaç etken maddeleriyle yapılmış literatür çalışmaları.	47
Çizelge 2.1. Kullanılan etken maddeler.	51
Çizelge 2.2. Piyasa preparatı bulunan etken maddeler.	51
Çizelge 2.3. Kullanılan analitik kolonlar.	53
Çizelge 2.4. Çözeltilerin hazırlanmasında kullanılan kimyasal maddeler.	53
Çizelge 2.5. En sık kullanılan kolon dolgu materyalleri	61
Çizelge 2.6. Sıklıkla Kullanılan Çözücülerin Bazı Fiziksel Özellikleri	62
Çizelge 2.7. Ters ve Normal-faz sıvı kromatografi tekniklerinin karşılaştırılması	62
Çizelge 2.8. Piyasaya sürülmüş kolonlar ile ilgili önemli gelişmeler	66
Çizelge 2.9. Kolon Verimliliğine Etkiyen Değişkenler	67
Çizelge 2.10. Piyasada bulunan KSF'ler ve kullanılışları	70
Çizelge 2.11. SUT parametreleri ve açıklamaları	90
Çizelge 2.12. Hızlandırılmış bozunma koşulları ve uygulanış biçimleri	104
Çizelge 3.1. BUT için normal faz koşullarına ait sistem uygunluk testi sonuçları.	110
Çizelge 3.2. BUT için sulu polar organik faz koşullarına ait sistem uygunluk testi sonuçları.	112
Çizelge 3.3. IZO için normal faz koşullarına ait sistem uygunluk testi sonuçları.	119

Çizelge 3.4. IZO için sulu polar organik faz koşullarına ait sistem uygunluk testi sonuçları.	123
Çizelge 3.5. KLB için, kolon olarak Amylose 1, hareketli faz olarak 80:20; n-hekzan:IPA, (h/h) karışımının farklı katkı maddeleri kullanılarak yapılmış çalışmalarında elde edilen sistem uygunluk testi sonuçları.	130
Çizelge 3.6. KLB için, hareketli faz olarak n-hekzan:IPA:DEA:FA karışımının farklı bileşimleri kullanılarak elde edilen sistem uygunluk testi sonuçları.	132
Çizelge 3.7. KLB için, 90:10 (n-hekzan:IPA, (h/h)) karışımının farklı katkı maddeleri kullanılarak yapılmış çalışmalarında elde edilen sistem uygunluk testi sonuçları.	132
Çizelge 3.8. KLB için sulu polar organik faz koşullarına ait sistem uygunluk testi sonuçları.	134
Çizelge 3.9. KLP için normal faz koşullarına ait sistem uygunluk testi sonuçları	138
Çizelge 3.10. KLP için sulu polar organik faz koşullarına ait sistem uygunluk testi sonuçları.	139
Çizelge 3.11. RIT için normal faz koşullarına ait katkı maddelerinin farklı hareketli faz bileşimleri üzerine etkisini gösteren sistem uygunluk testi sonuçları.	145
Çizelge 3.12. RIT için Cellulose 2 ve Cellulose 4 kolonlarda, hareketli faz olarak n-hekzan:IPA:DEA:FA karışımının farklı bileşimleri kullanılarak ortaya çıkan sistem uygunluk testi sonuçları	147
Çizelge 3.13. RIT için Cellulose 3 kolonda, hareketli faz olarak n-hekzan:IPA:DEA karışımının farklı bileşimleri kullanılarak elde edilen sistem uygunluk testi sonuçları	147
Çizelge 3.14. SIM için, 70:30 (n-hekzan:IPA, (h/h)) karışımının farklı katkı maddeleri kullanılarak yapılmış çalışmalarında elde edilen sistem uygunluk testi sonuçları	153
Çizelge 3.15. SIM için, 80:20 (n-hekzan:IPA, (h/h)) karışımının farklı katkı maddeleri kullanılarak yapılmış çalışmalarında elde edilen sistem uygunluk testi sonuçları	153
Çizelge 3.16. TER için, 70:30 (n-hekzan:IPA, (h/h)) karışımının farklı katkı maddeleri kullanılarak yapılmış çalışmalarında elde edilen sistem uygunluk testi sonuçları	156
Çizelge 3.17. TER için Cellulose 2 ve Cellulose 4 kolonda, hareketli faz olarak n-hekzan:IPA:DEA:FA karışımının farklı bileşimleri kullanılarak elde edilen sistem uygunluk testi sonuçları.	157
Çizelge 3.18. TUL için, 80:20 (n-hekzan:IPA, (h/h)) karışımının farklı katkı maddeleri kullanılarak yapılmış çalışmalarında elde edilen sistem uygunluk testi sonuçları	162
Çizelge 3.19. TUL için Amylose 1 ve Cellulose 1 kolonda, hareketli faz olarak n-hekzan:IPA:DEA:FA karışımının farklı bileşimleri kullanılarak elde edilen sistem uygunluk testi sonuçları.	163
Çizelge 3.20 KLB analizi için belirlenen optimum koşullar	166
Çizelge 3.21. KLB analizine ait optimum koşullardaki sistem uygunluk testi sonuçları	166

Çizelge 3.22. KLB enantiyomerlerinin kalibrasyon grafiğine ait regresyon analizi ve yöntem geçerlilik testi sonuçları.	168
Çizelge 3.23. KLB içeren Ventipulmin® şurup çözeltisinden elde edilen analiz bulgularının sonuçları.	170
Çizelge 3.24. RIT analizi için belirlenen optimum koşullar	172
Çizelge 3.25. RIT analizine ait optimum koşullardaki sistem uygunluk testi sonuçları	172
Çizelge 3.26. RIT enantiyomerlerinin kalibrasyon grafiğine ait regresyon analizi ve yöntem geçerlilik testi sonuçları.	174
Çizelge 3.27. RIT içeren Pre-Par ® ampul çözeltisinden elde edilen analiz bulgularının sonuçları	176
Çizelge 3.28. TER analizi için belirlenen optimum koşullar	178
Çizelge 3.29. TER analizine ait optimum koşullardaki sistem uygunluk testi sonuçları	178
Çizelge 3.30. TER enantiyomerlerinin kalibrasyon grafiğine ait regresyon analizi ve yöntem geçerlilik testi sonuçları.	180
Çizelge 3.31. TER dozaj şekline ait geri kazanım sonuçlarını içeren kromatogram: % 25 (a), % 50 (b), % 100 (c).	182
Çizelge 4.1. Kullanılan sabit fazların enantiyomerleri ayırma başarısı	184
Çizelge 4.2. Her bir analite göre enantiyomerik tersinirliğin görüldüğü kolonlar.	190
Çizelge 4.3. Çalışılan bileşiklerin analizlerine ait SUT ve yöntem geçerlilik testi sonuçları.	199

1. GİRİŞ

1848 yılında Fransız kimyager ve biyolog Louis Pasteur'un sodyum amonyum tartarat kristal izomerlerini ayırmasıyla birlikte kirallik (kiralite) kavramını keşfetmesinden sonra kiral bileşikler nesillerdir kimya alanındaki çalışanlar için ilham kaynağı olmuştur (Pasteur, 1901 ve Chankvetadze, 2013a).

Kiralite, akademik açıdan heyecan verici ve ilgi çekici bir konu olduğu gibi, ilaç gıda, kimya, ziraat gibi sanayi dallarında da büyük ilgi çekmiş ve hızla gelişmiştir. 2001 yılında William S. Knowles ve Ryoji Noyori tarafından yapılan kiral olarak katalizlenmiş hidrojenasyon reaksiyonları çalışması ve K. Barry Sharpless tarafından yapılan kiral olarak katalizlenmiş oksidasyon reaksiyonları konulu çalışmalar bahsi geçen araştırmacılara Nobel Kimya ödülünü kazandırmıştır. Her iki çalışmanın da odağında bu katalizörleri kullanarak saf enantiyomerik ilaç etken madde ve kimyasalların üretilmesi yatmaktadır (Borman, 2001; Liu ve Liu, 2002 ve Chankvetadze, 2007).

Günümüzde piyasaya sürülmüş olan ve kullanılan ilaçların yarısından fazlası kiral bileşiklerden oluşmaktadır. Bu kiral bileşiklerin neredeyse %90'ı rasemik halde ve eşit miktarda bulunan iki enantiyomeri içermektedir. Enantiyomerler kimyasal yapıları aynı, uzaydaki yerleşimleri sebebiyle birbirinin ayna görüntüsü olan fakat birbirleri ile çakışmayan stereoizomerlerdir (Şekil 1.1.) (Rentsch, 2002).



Şekil 1.1. Ayna görüntüsüne örnek olarak, Michelangelo Caravaggio'nun suya bakan Narsis tablosu ([https://tr.wikipedia.org/wiki/Narkissos_\(mitoloji\)](https://tr.wikipedia.org/wiki/Narkissos_(mitoloji))).

Rasemik ilaçların içerdiği her bir enantiyomer biyolojik aktiviteleri (farmakolojik, toksikolojik, farmakokinetik ve metabolik, vb.) bakımından farklılıklar göstermektedir. Bu farklılıklar bir enantiyomerde iyileştirici etki olarak karşımıza çıkarken, aynı bileşiğe ait diğer enantiyomer mutajenik etkiler gösterebilmektedir. Biyolojik aktivitedeki farklılıklar ile ilgili birçok dramatik hatta ölümcül hasarlara yol açmış örnekler mevzuatlarda bulunmaktadır. Dünyada birçok ülkenin düzenleyici kılavuzları incelendiğinde bir enantiyomerin diğer enantiyomere ait safsızlık olarak nitelendirildiği de görülmektedir (EMA, 1998 ve Chankvetadze, 2013a). Bu sebeplerden ötürü istenmeyen bir enantiyomerin dozaj şeklinden ayrılması konusunda, kiral ayırma yöntemleri gerek ilaç endüstrisi gerek klinik çalışmalar alanında giderek önem kazanmaktadır. İstenmeyen (etkisiz veya mutajenik etkilere sebep olan) enantiyomer formülasyondan uzaklaştırıldığında doğru tedavi yaklaşımının sağlanması mümkün olmaktadır (Walter ve Netscher, 1996; Katzung, 2004 ve Nguyen ve ark., 2006).

Amerikan gıda ve ilaç idaresi kurumu (FDA) rasemik ilaçların piyasaya sürülmeden önce her bir enantiyomerinin vücuttaki etkisinin ayrı ayrı gösterilmesi ve bu ilaçların saf enantiyomerik halde geliştirilip üretilmesi gerekliliğini tavsiye etmektedir. Bu ilaçların üretimiyle ilgili olarak nelere dikkat edileceği konusunda da

5 Ocak 1992 yılında yayımladıkları “Yeni Stereoizomerik İlaçların Geliştirilmesi” adlı kılavuz bulunmaktadır (US FDA, 1992 ve Liu ve Liu, 2002).

Her bir enantiyomer kiral olmayan (akiral) ortamlarda eşit serbest enerjiye sahiptir ve birbirlerinden ayrılamazlar. Ayrılmaları için kiral bir reaktif ile kovalent veya kovalent olmayan etkileşim içerisinde olmalıdırlar. Bu reaktif enantiyomerik olarak zenginleştirilmiş ya da kiral ayrımı sağlayan saf bir madde olabilir. Bunların yanı sıra kiral sabit faz (KSF) veya hareketli faza eklenen bir katkı maddesi ile stereo seçici bir katalizör de ayırma da rol oynayabilir.

Kiral seçici reaktifin işlevine bağlı olarak enantiyomerik ayırma teknikleri farklı şekillerde sınıflandırılabilir. Bu sınıflandırma ilerleyen kısımlarda detaylı olarak anlatılacak olup tez kapsamında çalışılan enantiyomerlerin ayrımı yüksek başarımlı sıvı kromatografisi (YBSK) ile KSF kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sıvı kromatografi kullanarak enantiyomerlerin ayrılması için de farklı yollar mevcuttur. Bunlardan dolayı (indirekt) ayırmalar ve hareketli faza eklenen kiral katkı maddeleri ile yapılan çalışmalar 1980’lerden önce uygulanmış olup günümüzde sadece tarihsel bir önem taşımaktadır (Chankvetadze, 2013a).

Tez kapsamında kullanılan YBSK tekniğinin enantiyomerlerin ayrılmasındaki avantajları kısaca aşağıdaki şekilde özetlenebilir:

- ✓ Gelişmeye çok açık bir tekniktir; yüzlerce KSF geliştirilmiş ve geliştirilebilmektedir. Bunun en belirgin sebebi, çok düşük kiral bağlanma yeteneğine sahip kiral seçiciler bile birçok kiral maddeyi etkin bir biçimde ayırabilmektedir.
- ✓ YBSK kullanılarak kiral seçici %100 saf olmasa bile, her bir enantiyomer ayrı ayrı ve saf olarak elde edilebilmektedir.
- ✓ Ayırım boyunca tersinir tepkimeler ve faz geçişleri olmadığı için analitik ve preparatif amaçlı kullanılabilir.

- ✓ YBSK kullanımının bize preparatif olarak sağladığı en önemli avantaj, kiral seçici kaybı olmadan ve kiral seçiciden analite bir bulaşma riski olmadan enantiyomerlerin saf olarak elde edilebilmesidir. Enantiyoayrımın yanı sıra kiral bileşiklerde bulunabilecek diğer safsızlıklar da bu yöntem aracılığı ile uzaklaştırılabilmektedir.

Enantiyomerlerin YBSK yöntemi ile ayrılmasına ilişkin detaylı bilgi gereç ve yöntem bölümünde anlatılacaktır. Bu konuyla ilgili birçok derleme makalesi, kitap ve kitap bölümü de yayımlanmıştır (Blaschke ve Chankvetadze, 2000; Davankov, 1989; Ahuja, 2000; Gubitz ve Schmid, 2004; Cox, 2005; Subramanyan, 2007; Ahuja, 2010; Francotte, 2006; Maier ve Lindner, 2006; Chankvetadze, 2001; Maier ve ark., 2001 ve Lammerhofer, 2010).

İlaç etken maddelerinin miktar tayini için daha hassas ve seçici tayin süreçlerinin geliştirilmesi ve bu maddelerin mekanizmalarının aydınlatılması geliştirilen ilaçların etkinliğinin arttırılması için son derece önemlidir. Günümüzde insan sağlığını tehdit eden pek çok hastalığın tedavisinde kullanılan ilaç etken maddelerinin rasemik şekilde piyasada olduğu düşünülünce, bu bileşiklerin her bir enantiyomerinin hassas şekilde analizinin yapılmasının ve yine bu enantiyomerlerin farmakolojik, farmakokinetik, toksikolojik, vb. etkilerinin araştırılmasının bu hastalıkların tedavideki kimyasal sürecinin anlaşılmasına yardımcı olacağı düşünülmektedir. Böylece hastalara daha etkin bir tedavi yaklaşımı uygulamasının önü açılacağı gibi gereksiz safsızlıkların vücuda daha az giriş yapması ile birlikte yan etkilerin azalması sağlanacaktır.

Tez kapsamında model olarak seçilen ilaçlar “Beta Agonist” türevi ilaçlardır. Anatomik ve terapötik kimyasal (ATC) sınıflandırmaları incelendiğinde birçok farklı hastalığa tedavi olarak önerildikleri görülmektedir. Bu ilaç etken maddelerinden seçilen sekiz bileşik (bütoksamin, izoksuprin, klenbuterol, klenpenterol, ritodrin, simbuterol, terbutalin ve tulobuterol) üzerinde çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

Tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmaların amacı, öncelikle seçilen bileşiklerin altı farklı polisakkarit temelli kiral kolon kullanılarak, çeşitli hareketli faz koşullarında ve bileşimlerinde sistematik görüntüleme çalışmalarının yapılmasıdır. Daha sonra yapılan bu çalışmalarda enantiyomerik alıkonma sırasına kiral seçicinin kimyasal yapısının, hareketli faz türünün ve bileşiminin, hareketli faza eklenen asidik ve/veya bazik katkıların etkisinin incelenerek enantiyomerlerin ayrıldığı en uygun koşulların bulunması, son olarak farmasötik dozaj şekilleri temin edilen bileşiklerin tamamen valide edilmiş analiz metotları geliştirilerek piyasa preparatlarına uygulanmasıdır.

1.1. Stereokimya

Kiral bileşikler ve enantiyomerler ile ilgili detaylı bilgilerden önce bazı temel tanımların ve sınıflandırmanın bilinmesi gerekmektedir.

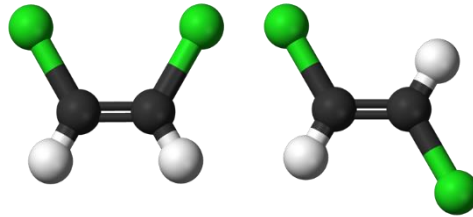
Aynı molekül formülüne sahip, farklı bileşiklere genel olarak izomer denir. İzomerler, yapı izomerleri ve stereoizomerler olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır. Yapı izomerleri, atomların birbirine farklı bir sıra ile bağlanmaları sebebiyle farklılaşan izomerlerdir. Stereoizomerler ise atomlarının uzaydaki düzenlemeleri ile farklılaşırlar, yapı izomerleri gibi değillerdir.

Stereoizomerler de geometrik ve optik izomerler olmak üzere iki ana sınıfa ayrılabilirler. Bunlardan optik izomerler başlığı altında enantiyomerler ve diastereomerler incelenmektedir. Tez kapsamında incelenen enantiyomerler, molekülleri birbirinin ayna görüntüsü olan fakat birbirleriyle çakışmayan stereoizomerlerdir. Diastereomerler ise molekülleri birbirinin ayna görüntüsü olmayan

stereoizomerlerdir. Bahsi geçen tanımlara ait örneklere Şekil 1.2 ve Şekil 1.3. de yer verilmiştir.

1.1.1. Geometrik İzomerler

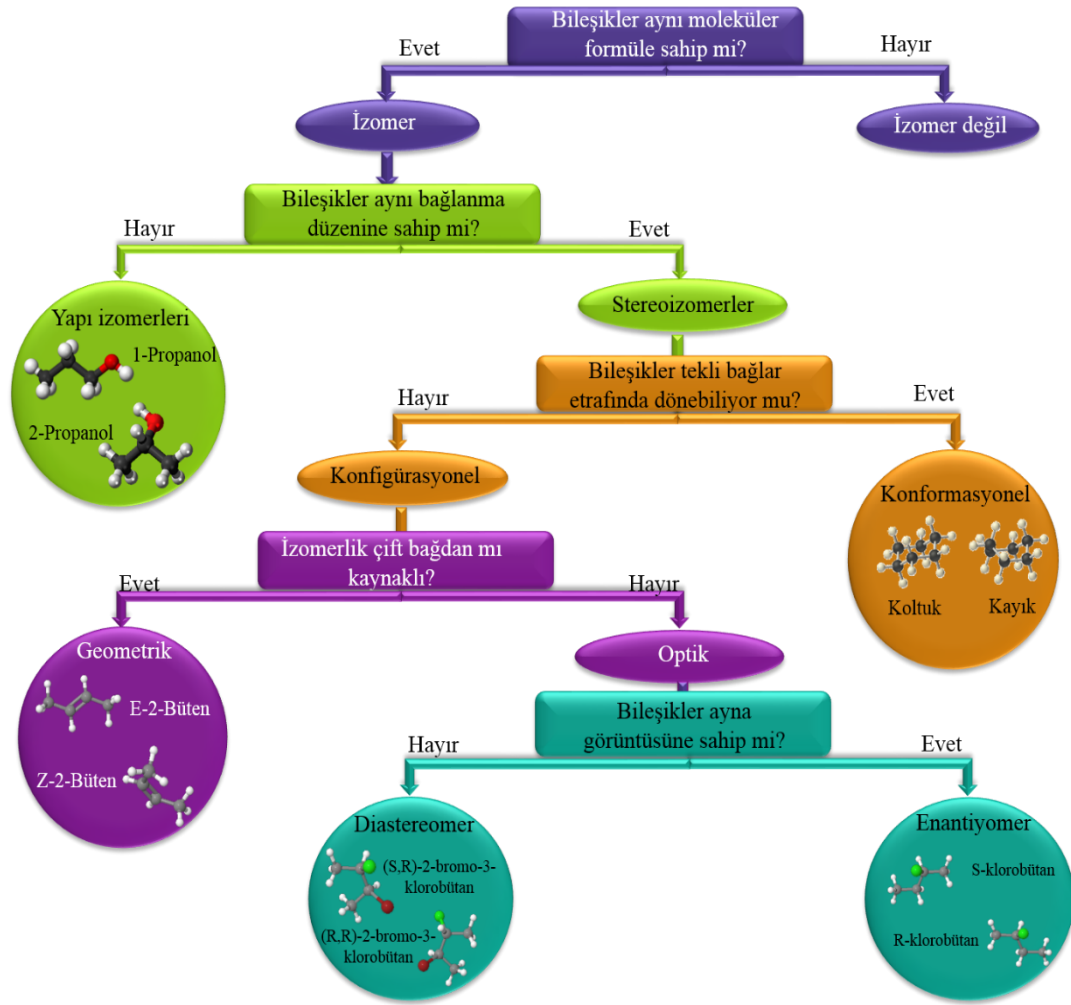
Geometrik izomeri alkenler ve halkalı bileşiklerde görülen izomeri şeklidir. Sigma bağı içeren moleküller dönebilirken, pi bağı içerenlerin dönebilmesi için bağı kopması gerekir. Bu yüzden de pi bağı karbonlara bağlanan gruplar uzayda dönmez ve birbirlerine göre sabit kalırlar. Bu noktada geometrik izomerinin olması için pi bağı oluşturarak karbonlardan birisinin aynı grupları bulundurmaması gerekmektedir. Örneğin bir karbon atomuna iki tane hidrojen ya da iki tane etil grubu bağlanmamalıdır. Şekil 1.2’de 1,2-Dikloroeten molekülü gösterilmiştir. Bu molekül de benzer aynı grup, yeşil ile gösterilen hidrojenler, bağı aynı tarafında olduğu zaman *cis* yapıda, bağı karşıt taraflarında konumlandığı zaman ise *trans* yapıdadır deriz. Cis ve trans tanımlamaları Latince kökenli olup sırasıyla aynı tarafta ve çapraz anlamlarına gelmektedir.



Şekil 1.2. cis-1,2-Dikloroeten ve trans-1,2-Dikloroeten

Cis ve trans yapıları sahip moleküller atomların sırası ve çift bağı bulunduğu konum aynı olduğu için yapı izomeri olmazlar ve farklı fiziksel özellikler gösterirler. Özetle bu bileşikler atomlarının uzaydaki dizilimi farklı olan, aynı yapıya sahip farklı bileşiklerdir (stereo izomer). Cis ve trans yağ asitleri incelendiğinde, trans yağ asitlerinin daha doğrusal olduğu gözlemlenmiştir. Bu dizilim sonucunda erime noktası

daha yüksek, daha kararlı bir molekül ortaya çıkmıştır. Doymamış yağ asitlerinden olan Elaidik asit (trans) ve oleik asit (cis) birbirinin izomeri olan iki moleküldür. Elaidik asit margarinlerde bol miktarda bulunurken, oleik asit ise zeytinyağında bulunmaktadır. Bununla birlikte, çift bağ içermedikleri için doymuş yağ asitlerinde izomerlikten bahsedilemez (Thomas, 2000).



Şekil 1.3. İzomerlerin sınıflandırılması

1.1.1.1. Geometrik İzomerlerin E ve Z Adlandırma Sistemi

Geometrik izomerlerin cis ve trans olarak adlandırılması her zaman kolay olmayabilir özellikle de çift bağlı karbonlara üç veya dört farklı grup bağlandığında bu bileşikler cis veya trans izomer olarak değerlendirilemez. Her bir moleküle göre bu farklı isimlendirmeler çıkacağından karışıklığa sebep olacaktır. Bu yüzden IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) tarafından E ve Z adlandırılma sistemi önerilmiştir. Sistemin temeli karbonlara bağlı moleküllerin veya atomların önceliğine dayanmaktadır. Yüksek öncelikli atom veya gruplar karşıt tarafta ise izomer, Almanca Entgegen yani karşıt veya çapraz anlamı taşıyan (*E*) harfi ile ifade edilirken yüksek öncelikli atom veya grupların aynı tarafta bulunması durumunda Zusammen yani birlikte anlamı taşıyan (*Z*) harfi ile gösterilmektedir. Bu isimlendirmeler yapılırken belirli kurallara uyulmalıdır. Örneğin çift bağlı her bir karbondaki iki atom farklı ise, öncelik ilgili karbonlara doğrudan bağlanmış tek atomların atom numaralarına bakılarak belirlenir. Daha büyük atom numaralı olan atom daha önceliklidir. Bu adlandırmanın daha ayrıntılı kuralları organik kimya kitaplarından incelenebilir (Solomons ve Fryhle, 2002).

1.1.2. Optik İzomerler, Kiral Moleküller ve Enantiyomerler

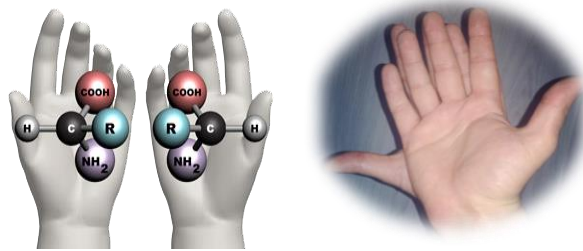
Simetri iki veya daha fazla boyutlu geometrik şekiller için ilginç özelliklerdendir (Jozwiak ve ark., 2012). Asimetri ise günlük yaşantımızda daha çok karşılaşılabileceğimiz bazen de acı verici şekilde beliren durumlardandır. Bunun en güzel örneği İngiltere'den Fransa'ya arabayla geçen birinin İngiliz Kanalı üzerinde şeritlerin bir anda ters yönde akmaya başlamasıdır. Latin alfabesinde de simetrik ve asimetrik karakterler bulunmaktadır (Şekil 1.4.), bunlardan bazıları ayna görüntüsü ile birebir örtüşürken (A ve Y) bazılarının da (S, E ve N) ayna görüntüleri asimetrik olup

tam tersi biçimde gözükmetedir. Asıl simetri ve asimetri 3 boyutlu nesnelerde ve moleküllerin 3 boyutlu hallerinde karşımıza çıkmaktadır.



Şekil 1.4. Simetrik ve simetrik olmayan örnekler

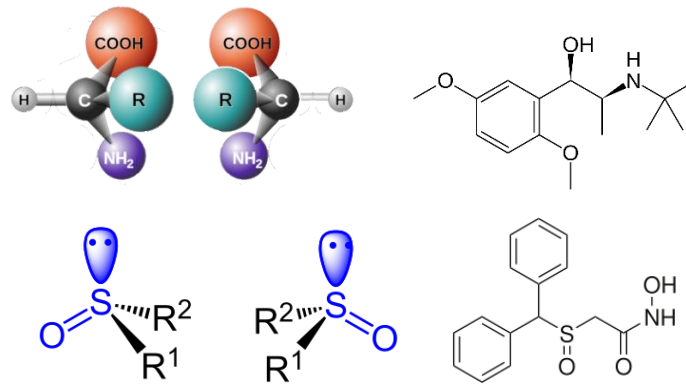
Kiral kelimesinin kökeni Yunanca *cheir* kelimesine dayanmaktadır ve bu kelimenin İngilizce karşılığı “handedness” olup Türkçe’ye el seçiciliği olarak geçen bu kelime nesnelerin ve moleküllerin bir el seçiciliğine sahip olduğunu vurgular ve bu özelliğe sahip olan bileşiklere kiral sahip olmayanlara ise kiral olmayan (akiral) bileşikler denir. El seçiciliğinden kasıt bir elimizin ayna görüntüsünün kendisiyle örtüşmemesine dayanır. Sol elimizin ayna görüntüsü sağ eldir ve bunlar üst üste geldiğinde çakışmazlar (Şekil 1.5.).



Şekil 1.5. Elin ayna görüntüsü ve bunun moleküler düzeyde örneklenmesi(sol), elin üst üste çakışmaması (sağ).

Bir kiral molekülü tanımlarken ayna görüntüsü ile aynı olmayan moleküller tanımlanır. Enantiyomerler de yalnızca molekülleri kiral olan bileşiklerde görülmektedir (Solomons ve Fryhle, 2002). Bu moleküllerin en bilinen örneği

tetrahedral karbon atomuna bağlanmış dört farklı grup içeren moleküllerdir (Şekil 1.6.). Asimetrik merkez (stereo merkez) olma özelliği sadece karbona ait bir özellik olmayıp fosfor, kükürt ve azotun da asimetrik merkez olarak bulunduğu kiral bileşikler mevcuttur. Düzgün dörtyüzlü atomlar, kiral atomlar veya asimetrik atomlar olarak kullanılan terimler kavramsal karışıklığa yol açtığı için stereo merkez terimi Mislow ve Siegel tarafından literatüre kazandırılmış ve kabul görmüştür (Mislow ve Siegel, 1984).



Şekil 1.6. Tetrahedral karbon atomu içeren (stereo merkez olarak karbon atomunun bulunduğu) kiral molekül ve örneği Bütoksamin (üst), stereo merkez olarak kükürtün bulunduğu sülfoksit yapısı ve örneği Adrafinil (alt).

Enantiyomerler, molekülleri birbirinin ayna görüntüsü olan fakat birbiriyle çakışmayan stereoizomerlerdir. Diastereomerler ise molekülleri birbirinin ayna görüntüsü olmayan stereoizomerlerdir. Enantiyomerler ve diastereomerler arasındaki diğer farklılıklar aşağıdaki çizelgede gösterilmektedir.

Çizelge 1.1. Enantiyomerler ve diastereomerlerin farklılıkları

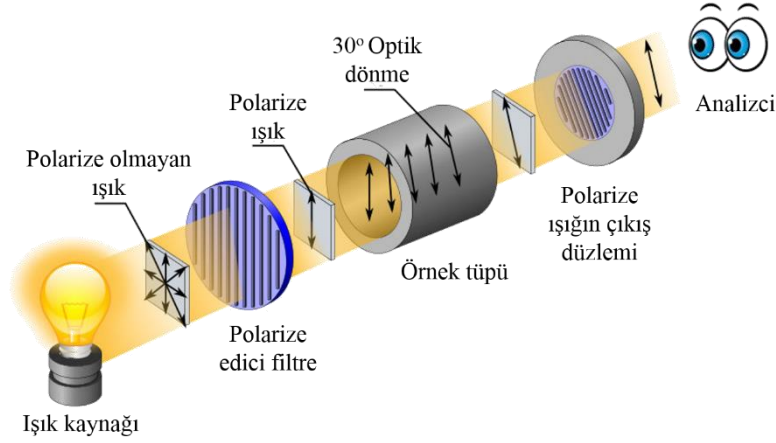
Enantiyomerler	Diastereomerler
Ayna görüntüleri birbiri ile çakışmayan moleküllerdir	Molekülleri birbirinin ayna görüntüsü olmayan stereoizomerlerdir
4 farklı grubun bağlandığı, genellikle karbon olan (N, P ve S de olabilir) bir adet kiral merkez içerir	Bir stereo merkez içermez
Fiziksel özellikleri (erime noktası, kaynama noktası gibi) tamamen aynıdır	Fiziksel özellikleri farklılık gösterir
Ayrılmaları zordur: Sadece kiral bir seçici varlığında ayırım gerçekleşir	Ayrılmaları kolaydır, akiral bir sabit faz kullanarak bile ayrılabilirler
Optikçe aktiftirler	Optikçe aktif değildirler

1.1.2.1. Enantiyomerlerin Özellikleri: Optikçe Aktiflik

Daha önce de bahsedildiği gibi enantiyomerler, aynı erime ve kaynama noktasına sahiptirler. Ayrıca farklı çözünürlük, farklı kırılma indisi gibi özellikleri de yoktur. Çünkü bunlar gibi özelliklerin çoğu iki molekül arasında etkili olan moleküller arası kuvvetlerin büyüklüğüne bağlıdır ve birbirinin ayna görüntüsü olan moleküller için bu kuvvetler aynı olmaktadır (Solomons ve Fryhle, 2002). Enantiyomerlerin farklılığını gözlemlemenin bir yolu da, onların düzlem-polarize ışığa karşı olan davranışlarını incelemektir. Polarize ışın, bir enantiyomer içerisinden geçirilirse polarizasyon düzlemi döner. Ayrıca, ayrı enantiyomerler polarize ışık düzlemini eşit miktarda, fakat farklı yönlerde çevirirler. Enantiyomerlerin polarize ışık üzerindeki etkilerinden dolayı oluşturdukları ayrı enantiyomerlere “optikçe aktif bileşikler” denir. Polarlayıcı (polarize edici) filtreden geçen ışığın elektriksel alanının tek bir düzlemde titreşmesi ile meydana gelen ışına düzlem polarize ışık bu ışının optikçe aktif bileşikler üzerindeki etkisinin ölçülmesini sağlayan cihaza da polarimetre denir.

Polarimetre temel olarak bir ışık kaynağı (genellikle sodyum lambası), bir polarlayıcı, optikçe aktif maddeyi veya çözeltiyi ışık demetinde tutmak için bir numune kabı (tüp), bir analizleyici ve polarlanmış ışık düzleminin kaç derece döndüğünü ölçmek için bir ölçekten oluşmaktadır (Şekil 1.7.). Polarimetrenin tüpü boşsa, ya da optikçe aktif olmayan bir madde varsa düzlem polarize ışığın ve analizleyicinin eksenini cihaz 0° ’i okuduğunda, tam olarak paralel olacak ve gözlemci geçen ışığın maksimum miktarını algılayacaktır. Tüp optik olarak aktif madde çözeltisi içeriyorsa tüpten geçerken ışığın polarlanma düzlemi dönecektir. Işığın maksimum parlaklığını ortaya çıkarmak için, gözlemci ya saat yelkovanı yönünde ya da saat yelkovanı yönünün tersinde analizleyici eksenini çevirmek zorunda kalacaktır. Eğer analizleyici kısım saat yönünde çevrilirse, artı (+) olarak saat yönünün tersinde çevrilirse, çevrilme eksi (-) olarak söylenir. Polarize ışığı saat yönünde çeviren maddelere *dekstrotatori* ve saat yönünün tersi yönünde çeviren maddelere de

levorotatori denir. Latince’de *dexter* (sağ), *laevus* (sol) anlamına gelmektedir ve (*d*) ve (*l*) harfleri ile sembolize edilirler.



Şekil 1.7. Polarimetre cihazı

Bir enantiyomere ait çözelti içerisinde ışık geçerken, polarlanma düzleminin çevrilme derecesi karşılaştığı kiral moleküllerin, tüpün uzunluğuna, enantiyomerin derişimine, sıcaklığa ve kullanılan ışığın dalga boyuna bağlıdır. *Özgül çevirme* ($[\alpha]$) terimi de ölçülen çevrilmeleri, standardize etmek için kullanılır. $[\alpha] = \alpha / c \cdot l$ eşitliği kullanılarak hesaplanan eşitlikte α , gözlenen çevirmeyi, c , g mL^{-1} cinsinde derişimi ve l ise desimetre cinsinden numune tüpünün uzunluğunu ifade etmektedir. $[\alpha]^{30} = -1,08^\circ$ yazıldığı zaman genellikle $\lambda=589,6 \text{ nm}$ ’lik sodyum lambasının kullanıldığı, 1 dm tüp içerisinde, 30°C sıcaklık altında $1,0 \text{ g mL}^{-1}$ derişimde bir maddenin olduğu ve saat yönünün tersi yönde $1,08^\circ$ ’lik bir çevrilme meydana geldiği ifade edilmektedir. (+) veya (-) ya da (*d*) veya (*l*) şeklinde polarize ışığın çevrilmesi ile enantiyomer konfigürasyonları arasında zorunlu ve belirli bir ilişki yoktur. R-2-Metil-1-bütanol, polarize ışığı sağa çevirirken (+), R-1-Kloro-2-metilbütan polarize ışığı saat yönünün tersine çevirmektedir. Bu iki maddenin uzaydaki dizilişleri aynı olmakla birlikte polarize ışık düzleminin çevrilme yönü üzerinde zıt etkiye sahiptirler (Solomons ve Fryhle, 2002).

Rasemik bileşikler, her iki enantiyomerini de eşit miktarda (50:50) içeren bileşiklerdir. Polarimetre içerisine bir rasemik karışıma ait çözelti koyulduğunda hem R formu hem de S formunu eşit miktarda içerdiği için bir enantiyomerin her çevrimi için diğer enantiyomer molekülü, ayna görüntüsü yöneliminde olacaktır. Dolayısıyla bütün bu çevrilmeler birbirini etkisiz kılacağından, bu çözelti optikçe aktif olmayacaktır. Bu yüzden rasemik karışımlar ifade edilirken başlarına ($\pm$) simgesi getirilir.

1.1.2.2. Enantiyomerlerin Adlandırılması ve Cahn Ingold Prelog (CIP) Sistemi

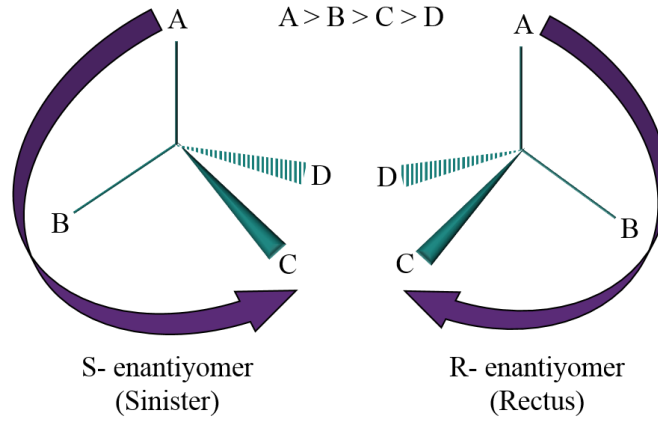
20. yüzyılın ortalarında Stereokimya alanında 3 önemli gelişme olmuştur. Bunlardan ilki, Barton tarafından yapılan çalışma ile organik moleküllerin yapılarının ve dizilimlerinin aydınlatılmasının önemi vurgulanmıştır (Barton, 1950). Bu makaleden çıkan sonuçlar Barton'un Nobel ödülü almasını sağlamıştır. İkinci gelişme ise 1951 yılında Bijvoet tarafından yayımlanan "X Işınları kullanılarak optik olarak aktif bileşiklerin kesin dizilimlerinin belirlenmesi" başlıklı makale ile ortaya çıkmıştır (Bijvoet ve ark., 1951). Bu makaleye göre bir kiral bileşenin enantiyomerinin hangisi olduğu belirlenebilmekteydi. Bijovet makalesinde "Adlandırma ile ilgili sorular bizim çalışmamızın kapsamına girmemektedir... Adlandırma ile ilgili sorunlar şimdilik verilmiş dizilimleri ilgilendirmektedir. Eğer mümkünse açıklayıcı bir konfigürasyon sistemi gerekmektedir." açıklamasını yapmıştır ve üçüncü büyük gelişme de adlandırma ile ilgili ortaya atılmıştır. 1955 yılında İngiliz bilim insanı Cahn ve Ingold İsviçreli bilim insanı Vladimir Prelog ile ortak çalışmalar yapmaya başlamışlardır. 1975 yılında organik moleküller ve reaksiyonların stereokimyası alanında yaptıkları çalışmalardan ötürü Nobel Ödülü kazanmışlardır. Bu çalışmalar enantiyomerlerin Cahn Ingold ve Prelog adlandırılması olarak da bilinen R ve S şeklinde isimlendirilmesinde önayak olmuştur.

Adlandırma yapılırken önceliğin sadece atom numarasına göre belirlenmesi her zaman mümkün olmamaktadır. Yukarıda bahsedildiği gibi IUPAC adlandırması yapacak olursak iki enantiyomer aynı ada sahip olacaktır. Bu istenmeyen bir durumdur, çünkü her iki bileşik kendine ait farklı bir ada sahip olmalıdır. Ayrıca sadece adı verildiğinde bileşik doğru yazılabilmelidir. Bu yüzden CIP sistemi ile bir seri kural geliştirilmiş ve IUPAC tarafından da benimsenerek kullanılmaktadır.

- ✓ İlk olarak stereomerkeze doğrudan bağlı olan atomun atom numaralarına bakılır, atom numarası en büyük atomun önceliği en yüksektir. (İzotoplar söz konusu ise kütlesi büyük olan izotop önceliği alır.
- ✓ Stereomerkeze doğrudan bağlı olan atomlar için öncelik belirlenemezse bu grupların sonraki atomlarına bakılır. Bu atomlara da aynı atomlar bağlı ise, zincir boyunca ilk farklı durum önceliği belirler. Bu noktada atom numaralarının toplamına bakılmaz en büyük önceliğe sahip tek atom aranır.
- ✓ Eğer çift bağ veya üçlü bağ içeren moleküller varsa çift bağlı atomlar iki tek bağlı atom gibi, üç bağlı atomlar üç tek bağlı atom gibi düşünülerek öncelik belirlenmesi gerçekleştirilir.
- ✓ Öncelik sırasına göre her bir grup isimlendirilir a, b, c, d gibi. En küçük atom numaralı gruba en düşük öncelik verilir ve bu sırasıyla yükselerek devam eder.

Şekil 1.8’de verilen örnek incelendiğinde en düşük önceliğe sahip grubun d olarak isimlendirildiğini görülmektedir. Yukarıdaki kurallar sistemine bağlı kalarak sağ tarafta bulunan molekülde saat yönüne doğru bir geçiş sol tarafta bulunan molekülde de saat yönünün tersine bir ilerleyiş görülmektedir. Saat yönüne bir ilerleme söz konusuysa bu bileşik Latince *rectus* (sağ) dan türeyen (*R*) harfi ile gösterilir. Eğer

ilerleme saat yönünün tersine oluyorsa bu bileşik *sinister* (sol) dan türetilen (S) harfi ile gösterilmektedir.



Şekil 1.8. R/S isimlendirmesine ait örnek

1.1.3. Kiral Bileşiklerin Biyolojik Önemi

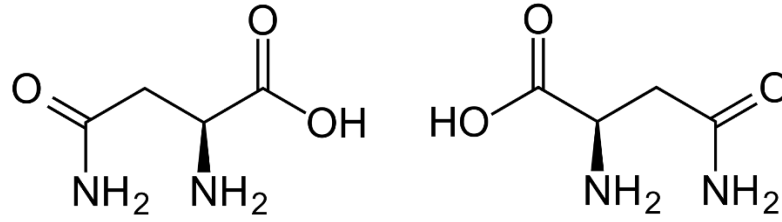
Vladimir Prelog “*Dünya kiraldir ve bir süreklilik içerisinde, bulabildiğiniz her yerde simetrinin tadını çıkarın*” diyerek kiralite olgusunun doğa ve insana dair birçok alanda esas olduğunu vurgulamıştır.

Her bir enantiyomer biyolojik olarak farklılık gösterir. Bu farklılıklar arasında:

- ✓ Tat
- ✓ Koku
- ✓ Toksisite
- ✓ Farmakolojik etkiler bulunmaktadır.

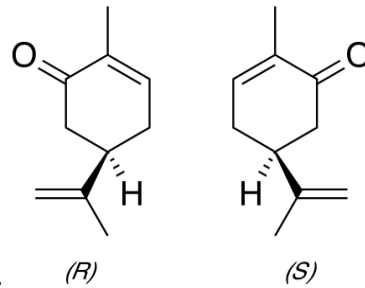
Doğal proteinleri oluşturan yirmi aminoasitten glisin hariç hepsi kiraldir. Bu aminoasitlerden birisi olan asparjinin L formu (Şekil. 1.9. sol) kuşkonmaz bitkisinde

(*Asparagus officinalis*) bol miktarda bulunmaktadır. Araştırmalar göstermektedir ki L asparjin acı tattan sorumlu iken, D asparjin tatlıdır (Ohloff, 1986).



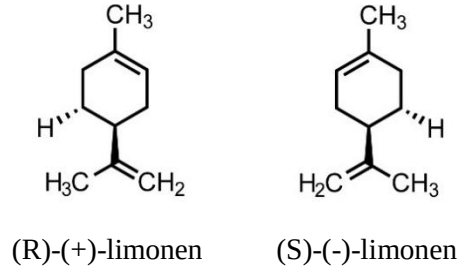
Şekil 1.9. Asparjin moleküllü: L-asparjin (sol), D-asparjin (sağ)

Buna benzer bir diğ r örnekte karvon (Şekil, 1,10) molekülüne aittir. Eski Romalılar döneminde tedavi amaçlı kullanılan bu molekül günümüzde daha çok gıda ve aroma sanayinde kullanılmaktadır (Shallenberger, 1992). Karvon molekülünün R-(-) formu nane tadını almamızı sağlarken, S-(+) formu kimyon tadına sebep olmaktadır. Tat ve koku değişimi gözlenebilen 285’den fazla enantiyomerik çift (570’den fazla enantiyomer) bulunmaktadır (Bernreuther ve ark., 1997 ve Bentley, 2006).



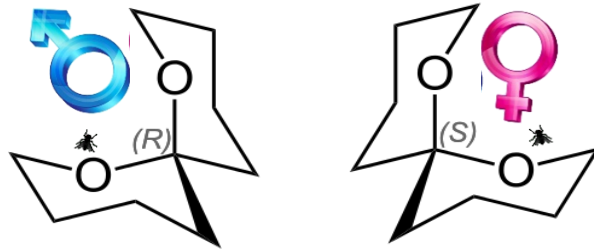
Şekil 1.10. S-(+) Karvon (sağ) ve R-(-) Karvonun (sol) molekül şekli.

Enantiyomerlerin koku üzerine olan etkilerinin en bilinen  rneği şekil 1.11’de gösterilen limonene bileşiğidir. Kozmetik dahil birçok alanda kullanılan limonenin R formu portakal esansı yayarken, S formu limon esansı yaymaktadır. Enantiyomerler sadece kokularda değişikliğe sebep olmayıp bunun yanı sıra esansın yoğunluğuna da etki etmektedir. Bazı bileşiklerde ise bir enantiyomer koku yayarken diğ eri tamamen kokusuz olabilmektedir (Chankvetadze, 2013a ve Bentley, 2006).



Şekil 1.11. R ve S limonen molekülünün şekilleri

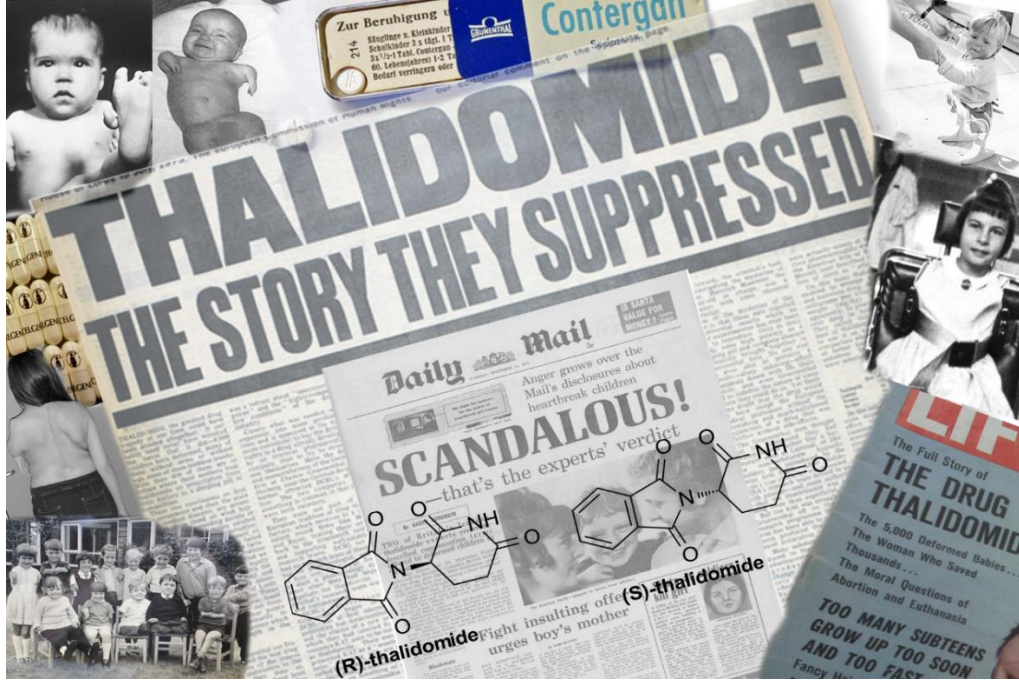
Enantiyomerlerin yaydığı farklı kokuların doğada çeşitli etkileri de vardır. Meyve sinekleri (*Bactrocera oleae* Gmelin) ve R,S-Olean (Şekil 1.12.) adlı feromon üzerinde yapılan araştırmalar sonucunda görülmüştür ki S-Olean dişi sinekleri etkilerken, R-Olean bu türün erkek türleri üzerinde etki etmektedir (Perron ve Albizati, 1989 ve Coric ve List, 2012).



Şekil 1.12. R ve S olean molekülünün şekilleri

Enantiyomerlerin biyolojik farklılıklarının farmakolojik ve toksikolojik olarak en belirgin gözlendiği alan şüphesiz kiral farmasötik bileşiklerdir. Bu farkındalık 1957 yılının Ekim ayında büyük bir trajediyle ortaya çıkmıştır (Meyring ve ark., 1999 ve Vargesson, 2015). Talidomit faciası olarak hafızalara kazınan bu olay Batı Almanya’da bir ilaç firması tarafından 1954 yılında tesadüfen bu bileşiğin bulunması ile başlamaktadır. Tablet olarak piyasaya sürülen Contegran® hamilelerde sabah bulantısı sorununu gidermek için kullanılmıştır. İlaç, üretimi yapılırken bazı toksik verilerle karşılaşılmış olsa da fareler üzerinde yapılan deneyler sonucunda kaydedeğer bir soruna rastlanılmamış ve piyasaya sürülmüştü. İletişim ağının yetersiz olması sebebiyle o yıllarda ilacı kullananlarda ortaya çıkan; uykuya eğilim, halsizlik, deride kızarıklıklar, mide ağrıları, uyuşma, sinirlilik, kulak çınlaması gibi yan etkiler

görülmeye başlansa da ilaç piyasadan toplatılamamıştı. Bu belirtileri takiben gerçekleşen doğumlarda anomalili bebekler dünyaya gelmişti. Bu anomalilerden bazıları normalden kısa, malforme, yüzgeç benzeri kol ve bacaklarla kendini gösteren fakomeli (phocomelia), sağırılık, körlük, cinsel organlarda deformasyonlardı (Şekil 1.13.).



Şekil 1.13. Talidomit trajedisine genel bakış

Talidomitin, anne ile fetus arasında yer alan plasental bariyeri geçip konjenital deformitelere yol açabilen bir teratojen olduğu Hamburg’lu bir çocuk doktoru olan Widukind Lenz tarafından kanıtlandı ve tüm dünyada piyasadan çekildi. Yaklaşık 50 ülke ve 10.000’in üzerinde bebek ilacın yarattığı anomalilerle dünyaya geldi ve bunların büyük çoğunluğu da yüksek mortalite oranı sebebiyle erişkin bir birey olamadan yaşama veda etti (Chankvetadze, 2007; Chankvetadze, 2013a ve Vargesson, 2015).

Türkiye’de Talidomit mağduru hiç bir birey görülmemesindeki en büyük unsurun 1957 yılında ülkemizde amniyotik sıvıda ilk kök hücreyi geliştirmeyi başaran

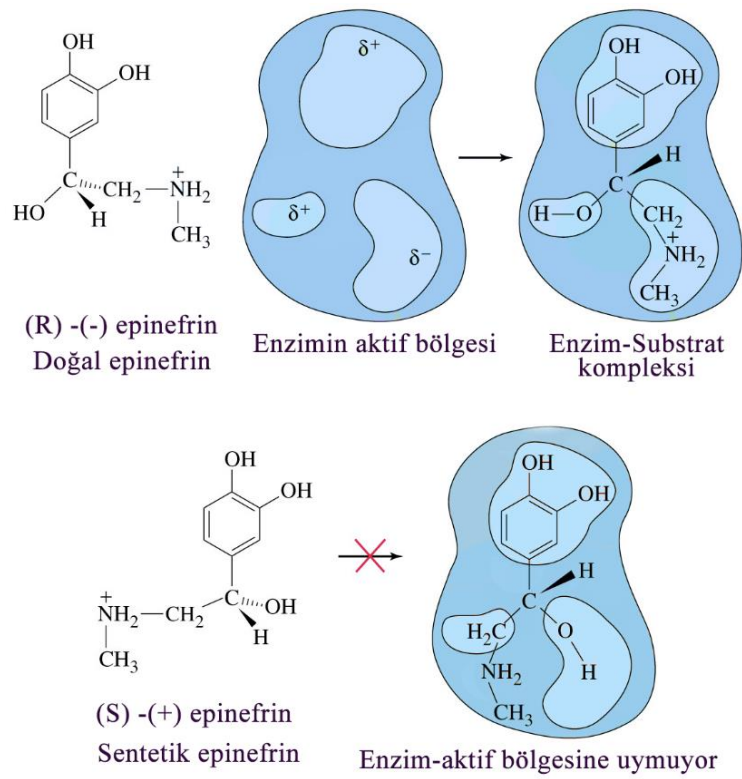
Ord. Prof. Dr. Süreyya Tahsin Aygün'ün Sağlık Bakanlığı'nı uyarması sonucu ilacın ülkemize girişini engellemesidir (Dinçer, 1982). Talidomit trajedisi kiral ilaçların öneminin anlaşılmasındaki en büyük etken olmuş ve ilaç üreticilerini tek enantiyomer içeren ilaçların üretimine yönlendirmiştir.

1.1.3.1. Kiral Farmasötik Bileşikler

Kiral moleküller ilaç etken maddelerin birçoğunda bulunmaktadır. 1926 yılında İskoç farmakolog Arthur Robertson Cushny, kiral bileşiklerin enantiyoseçimliliğini farmakolojik ve metabolizma açısından önemini son 40 yılı baz alarak derlemiştir (Cushny, 1926). Bu derleme farmakolojik açıdan enantiyoseçimliliğin önemini ifade eden ilk ve en kapsamlı derleme olma özelliğini taşımaktaydı. Daha sonra 1984 yılında Simonyi 'nin yaptığı bir araştırmada İsveç'te kliniklerde kullanılan 666 tane ilaçtan 355'inin bir stereomerkeze sahip olduğu ve bunlardan 181 tanesinin de tek enantiyomerden oluştuğu rapor edilmiştir (Simonyi, 1984).

Eski çağlardan beri süre gelen ve bitki özütlerinden elde edilen bileşiklerde de kirallik söz konusudur. Bunlardan bazılarının kökeni 5000 yıla uzanmaktadır. *Ephedra sinica* adlı bitkiden türetilen (1R, 2S ve 1S, 2R) efedrin molekülü iki adet kiral merkez içermektedir, fakat bu bitki içerisinde yalnız 1R, 2S dizilimli izomeri mevcuttur. Yüzlerce yıl boyunca birçok alanda kullanılan bu molekül tıp literatürüne 1920 yılında girmiştir. Astım tedavisinde ve bazı depresyon tedavilerinde de kullanılan ilaç günümüzde çoğunlukla gıda takviye ürünlerinin içerisinde kilo verme ve vücut geliştirme amacıyla tercih edilmektedir. 1990 yılının başlarında bir çok yan etkisi bildirilen bu molekül ve bu yapıya benzer yapıda molekülleri içeren ilaçların 2004 nisan ayı itibariyle gıda takviyelerinde kullanımı FDA tarafından yasaklanmıştır (Gal, 2006). Bu kiral molekülün 1R, 2S dizilimi efedrin olarak adlandırılırken, 1S, 2R dizilimi psödoefedrin olarak bilinmektedir.

20. yüzyılın başlarında ilaç üretiminde ve kullanımında kiralitenin araştırılması önemli bir unsur haline almıştır. Birçok bileşikte de enantiyoseçimliliğin olduğu gözlenmiştir. 1933'te Easson ve Stedman enantiyoseçici ilaç reseptör ilişkisine esas oluşturacak bir model rapor etmişlerdir (Easson ve Stedman, 1933). Bu model epinefrin molekülünün R formunun baskılayıcı etkisi yüzünden, doğal ortamda daha fazla seçimli olduğunu göstermekteydi. Epinefrin molekülü baz alındığında Şekil 1.14 ilaç reseptör ilişkilerinin enantiyomerler açısından modellenmiş halini göz önüne sermektedir.



Şekil 1.14. İlaç reseptör ilişkisine enantiyomerik modelleme

Sonuç olarak molekülde bulunan üç grup, amino grubu, alifatik hidroksil grubu ve elektronca zengin aromatik halka kiral reseptör üzerinde bulunan üç bütünleyici bölgeyle etkileşmektedir. Uzaydaki yönelmesi dikkate alındığında R-epinefrindeki 3 grup reseptör üzerine tam olarak yerleşmektedir. Fakat diğer enantiyomeri incelediğimiz zaman reseptör ve molekülün birbiriyle bütünleşemediği dolayısıyla da etkilişimin olmadığı görülmektedir. Bu yüzden her iki enantiyomerin farklı biyolojik etkileri görülmektedir. Epinefrin ile başlayan bu 3 nokta etkileşim modeli daha sonra

genişletilerek tüm kiral ilaçların biyolojik enantiyoseçimliliğini (ilaç-reseptör etkileşimi, enzim substrat bağlanması, proteinlerin bağlanması) göstermek için kullanılmıştır (Ariens, 1989). Bununla birlikte 3 nokta etkileşim modeli kromatografide de kiral bileşenler ve kiral sabit fazlar arasındaki enantiyoseçimli etkileşimlerin açıklanmasında da rol oynamaktadır (Chankvetadze, 2013a ve Chankvetadze, 2013b).

Morfin bileşiğinin kimyasal şekli 1923 yılında önerilmekle birlikte sentezlenmesi 1952 yılında gerçekleştirilmiştir. Bu moleküle ait kongifrasyon ise 1955 yılında önerilmiştir (Gal, 2006). (+) Morfin 1960 yılında sentezlenebilmiştir ve doğal olarak bulunan (-) morfine oranla analjezik etksinin daha fazla olduğu kanıtlanmıştır.

Sıtma tedavisinde kullanılan kinin molekülü ve atomların bu moleküle bağlanması 20. yüzyılın başlarında rapor edilmiştir. Fakat setereokimyası açıklanamamıştır. 1821 yılında piyasaya sürülmüş olmasına rağmen birçok çalışma grubu birkaç yüzyıl boyunca stereoseici sentezini gerçekleştirmeye çalışmıştır. 2001 yılında, kinin molekülünün izolasyonunu takip eden 181. yılda stereoseici sentez mümkün olmuştur (Stork ve ark., 2001).

İbuprofen ve Ketoprofen de günümüzde kullanılan popüler kiral değişimli ilaç etken maddelerdendir. Steroid olmayan anti-enflamatuar ilaç etken maddelerin çoğu 2-arilpropiyonik asit türevleri olarak bilinmektedir bu grubun bir diğer adlandırılma şekli ise profenlerdir. Bu grup çoğunlukla ağrı kesici olarak ve iltihapların tedavisi için kullanılmaktadır. Fakat bu grubun rasemik karışımları kullanıldığında birçok yan etki görüldüğü rapor edilmiştir. Bu yan etkilerin etki ettiği kısımlar, gastrointestinal, böbrek, kemikler ve ciğerler olarak bildirilmiştir.

S(+) ketoprofen üzerindeki çalışmalar sonucunda rasemik karışımına oranla çok daha etkin olduğu bulunmuştur. Enantiyomerik formu rasemik karışımına göre üç önemli avantaja sahiptir. Bunlar, çok daha düşük doz kullanımıyla daha etkin bir tedavi, daha hızlı vücuda etki etme ve sindirim sistemine daha az zarar vermesidir.

İbuprofenin yalnızca (S) izomeri etkindir. (R) izomeri vücutta yavaş yavaş (S) izomerine dönmesine rağmen iltihap önleyici bir etkiye sahip değildir. Yalnızca (S) izomerlerinden oluşmuş bir ilaç, rasemattan oluşan ilaca göre çok daha hızlı etki gösterir (Solomons ve Fryhle, 2002). Bu ve bunun gibi diğer örnekler aşağıdaki çizelgede etkileriyle birlikte gösterilmiştir. Enantiyomerlerin oldukça farklı etkilere sahip olduğu daha birçok örnek mevcuttur.

Çizelge 1.2. Etkin maddelerde enantiyomerlerin etkisi (Ariens, 1984; Mcconathy ve Owens., 2003; Nguyen ve ark., 2006; Patocka ve Dvorak, 2004; Uckun ve Suzen, 2009)

Etkin madde adı	Etkisi
Metildopa	S enantiyomeri etki gösterirken, R enantiyomeri etkisizdir.
Penisilamin	S enantiyomeri etki gösterirken, R enantiyomeri etkisizdir ve mutajenik etkiye yol açar.
Bupivakain	S enantiyomeri daha az kardiyotoksik etkiye sahiptir.
Etomidat	R izomeri 15 kat daha etkili olup, S izomeri hipnotik etkilere sebep olmaktadır.
Ketamin	S izomeri 2-4 kat daha etkili olup, R izomeri beklenmedik endişelenmeye ve sanrılara sebep olmaktadır.
Talidomit	S enantiyomeri teratojenik etki gösterirken, R enantiyomeri sedatif etki göstermektedir.
Etambutol	S,S enantiyomeri tüberküloz etkiye sahipken, R,R enantiyomeri görme kaybına sebep olur.
Amlodipin	S (-) izomeri 1000 kat daha etkili olup, R (-) izomeri etkisizdir.
Naproksen	Bir enantiyomeri ağrı kesici özellik gösterirken, diğeri karaciğer zehirlenmesine yol açmaktadır.
Metorfan	L formu ağrı kesici özellik gösterirken, D formu öksürük baskılayıcıdır.
Labetalol	S,R-formu α -adrenajik reseptörleri bloke ederken, R,R-formu β -adrenajik reseptörleri bloke eder. S,S- ve R,S izomerleri ise etkisizdir.
Prilokain	R enantiyomeri hızlı metabolize olurken, S enantiyomeri daha yavaş metabolize olmaktadır.
Sitalopram	S (+) enantiyomeri etki gösterirken, R (-) enantiyomeri etkisizdir.
Propranolol	L formu etkili iken, D formu etkisizdir.

2003 yılında Downton ve Clark'ın yaptığı araştırmaya dayanarak 2002 yılında kardiyovasküler ilaç satışları temel alındığında ilk beş ilacın dört tanesi saf enantiyomerik haldedir (Downton ve Clark, 2003). Bu ilaçlardan amlodipin içeren beşincisi de 2007 yılından itibaren S-amlodipin (levamlodipin) olarak piyasaya sürülmüştür. Pharmacy Times sitesine göre 2015 yılında satışı gerçekleştirilen ilaçlardan en yüksek ciroya sahip on ilacın dokuzu kiral moleküllerden oluşmaktadır. Bu ilaçların da beş tanesi tek enantiyomer olarak satılmaktadır

(PharmacyTimes, 2015). Dünyada piyasada bulunan hem rasemik hem de tek enantiyomer halindeki ilaçlara verilmiş bazı örnekler çizelgede listelenmiştir (Çizelge 1.3).

Çizelge 1.3. Dünyada piyasada bulunan rasemik ve tek enantiyomer formdaki ilaçlar (Erb, 2006)

Etken madde ve rasemik piyasa preparatı	Etken madde ve tek enantiyomer
Amlodipin (Norvasc)	Levamlodipin (EsCordi Cor)
Amfetamin (Benzedrine)	Dekstroamfetamin (Dexedrine)
Bupivakain (Marcain)	Levobupivakain (Chirocaine)
Setirizin (Zyrtec / Reactine)	Levosetirizin (Xyzal)
Sitalopram (Celexa / Cipramil)	Essitalopram (Lexapro / Ciprallex)
Fenfluramin (Pondimin)	Deksfenfluramine (Redux)
Formoterol (Foradil)	Arformoterol (Brovana)
Ibuprofen (Advil / Motrin)	Deksibuprofen (Seractil)
Ketamin (Ketalar)	Esketamin (Ketanest S)
Ketoprofen (Actron)	Deksketoprofen (Keral)
Metilfenidat (Ritalin)	Deksmetilfenidat (Focalin)
Milnasipran (Ixel / Savella)	Levomilnasipran (Fetzima)
Modafinil (Provigil)	Armodafinil (Nuvigil)
Ofloksasin (Floxin)	Levofloksasin (Levaquin)
Omeprazol (Prilosec)	Esomeprazol (Nexium)
Salbutamol (Ventolin)	Levalbuterol (Xopenex)
Zopiklon (Imovane / Zimovane)	Eszopiklon (Lunesta)

Birçok rasemik ilacın etkileri incelenmeye devam edilmektedir. Saf enantiyomerlerden üretilen ilaçların birçok avantajı vardır. Bunlar:

- ✓ Tek bir enantiyomerden kaynaklı birçok istenmeyen farmakodinamik etkiler ve toksik etkiler giderilmiş olacak,
- ✓ Hastaya daha düşük dozlar verilerek metabolizmasına, böbreklere ve karaciğere daha az yüklemeye olacak,
- ✓ İki veya daha fazla ilacın kullanımı, hastalık veya fizyoloji ile ilgili daha kolay tanı ve tedavi uygulanacak,
- ✓ İlaç etkileşimleri azalacak,
- ✓ Enantiyomerler arası etkileşimlerden kaçınılmış olacak,
- ✓ Biyoçevrilmelerden (Vücut içerisinde rasemik formun bir enantiyomere dönmesi) kaçınılmış olacak,
- ✓ Toksikite ve farmakokinetik etkilerin görüntülenmesi daha kolay bir hal alacaktır (Chhabra ve ark., 2013; Davies ve Teng, 2003).

Bu nedenle, enantiyomerik olarak saf ilaçların geliştirilmesi, enantiyomer seçimli sentezler ve rasemik ilaçların ayrımının yapılarak analiz metodlarının geliştirilmesi günümüz araştırmalarında ve gelecekte önemli yer teşkil etmektedir.

1.1.4. Enantiyomerlerin Ayrılması

Kiral ilaç geliştirmek üzere yola çıkılırken belirli bir strateji izlenmektedir ve bazı enantiyoayrım tekniklerine ihtiyaç duyulmaktadır. Her basamak için gerekli enantiyomer türü ve miktarı ile yaklaşık maliyeti derecelendirilmiş olarak aşağıdaki çizelgede sunulmaktadır (Çizelge 1.4.).

Çizelge 1.4. Kiral ilaç geliştirilirken gereklilikler.

İlaç geliştirme basamağı	Gerekli enantiyomer	Miktar	Maliyet
Keşif	Her iki enantiyomer	1 mg-50 g	Düşük
Pilot geliştirme	Her iki enantiyomer	100 g-10 kg	Düşük
Tamamen geliştirme	Aktif enantiyomer	5-100 kg	Orta
Üretim	Aktif enantiyomer	Tonlarca	Yüksek

Enantiyomer olarak saf farmasötik preparatların, pestisitlerin ve insektisitlerin sentezlenmesi için kullanılan saf enantiyomerler başlıca üç kaynaktan elde edilir (Chankvetadze, 2013a ve Sheldon, 1993). Bunlardan birincisi, tek enantiyomer şeklinde doğal olarak bulunan karbonhidrat ve alkaloit türevi kiral moleküllerin bitkilerden özütleme yoluyla ya da rasemik halde bulunan maddelerin kristalizasyon veya kinetik ayırma yollarıyla elde edilmesidir. İkinci olarak, karbonhidrat kaynaklarından fermentasyon ile mikroorganizmalar vasıtasıyla elde edilmesidir. Bu proses, laktik asit, ve L- amino asit gibi basit yapılı kiral moleküller ile antibiyotikler, ve vitaminler gibi daha kompleks moleküllerin üretilmesi için önemli bir kaynaktır. Son olarak, kiral veya prokiral başlangıç maddelerinden hareketle kimyasal ve/veya biyokimyasal olarak asimetric sentez yoluyla sentezlenmesidir. Bu bağlamda geliştirilen kiral havuz terimi de doğal olarak bulunan ürünlerin ve onların türevlerinin

sentezini ifade etmektedir. Bu moleküller konfigürasyon dönüşümü gibi kimyasal etkileşimlerle sentetik ürünlere dönüştürülür (Chankvetadze, 2013a ve Sheldon, 1993).

Enantiyomerik ayırma için kullanılacak yöntemi belirlemeden önce bazı soruların cevaplanması gerekir,

- ✓ Geliştirilecek yöntem analitik mi, preparatif mi olacak?
- ✓ Çalışılacak bileşikler farmasötik mi olacak yoksa biyomedikal ürünlerle mi çalışılacak?
- ✓ Günlük kaç numunenin analizi yapılacak?
- ✓ Numune bu analizlere uygun mu? (Deney hayvanları ile mi çalışılacak, pediatrik örnekler mi kullanılacak ya da tek hücre analizi mi yapılacak?)
- ✓ Numune kimyasal açıdan saf mı?
- ✓ Analitlerin fiziksel ve kimyasal özellikleri biliniyor mu?
- ✓ Numune hangi ortamda ne kadar çözünabiliyor?
- ✓ Numunenin çeşitli etkilere karşı kararlılığı biliniyor mu? (Çözücü, sıcaklık, vs.)

Bu soruların cevapları verildikten sonra analiz için hangi yöntemin seçileceğine karar vermek daha da kolay olacaktır. Unutulmamalıdır ki enantiyomerler, aynı kaynama noktasına ve sıradan çözücüler içinde aynı çözünürlüğe sahiptirler. Bu yüzden kristallendirme ve damıtma gibi organik bileşiklerin ayırımında kullanılan geleneksel yöntemler rasemik yapıya uygulandığında başarısız olmaktadır. Bu noktada geleneksel yöntemlerin dışında aletli analiz yöntemleri tercih edilmektedir. Bu yöntemlerden ilerleyen bölümlerde bahsedilecektir.

1.1.4.1. Enantiyomerlerin Ayrılmasında Kullanılan Yöntemler

Rasemik karışımların ve prokiral maddelerin ayrılmasında ve saf enantiyomerlerin eldesinde temel olarak aşağıdaki tekniklere başvurulur (Ghanem ve Aboul-Enein, 2005).

- ✓ Kristalizasyon
 - Tercihli kristalizasyon
 - Diastereomer kristalizasyonu
- ✓ Kinetik Ayırma
 - Enzimatik
 - Kimyasal
- ✓ Aletli Analiz teknikleri
 - Gaz kromatografi
 - Yüksek başarımlı sıvı kromatografi
 - Süperkritik Akışkan Kromatografi
 - Kapiler elektroforez
 - Kapiler elektrokromatografi

1.1.4.1.1. Tercihli Kristalizasyon

Genellikle endüstriyel ölçekte yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. İlaç endüstrisinde yaygın olarak enfeksiyon önleyici özelliği ile bilinen kloramfenikol ve kardiyovasküler bir etken madde olan α -metil-L-dopa üretimi tercihli kristalizasyon yöntemi kullanılarak yapılmaktadır (Ghanem ve Aboul-Enein, 2005). Bu yöntem eşit miktarda iki enantiyomerin kristallerinin mekanik karışımını içeren rasematlara (konglomerat) uygulanabilir. Fakat bu şekilde bulunan ilaç etken maddeleri pek de yaygın değildir (%20 <). Bu yöntemin başarısı konglomerat şeklindeki rasemik karışımın enantiyomerlerden herhangi birinden daha çözünür olmasına bağlıdır.

1.1.4.1.2. Pasteur Yöntemi (Diastereomer Kristalizasyonu)

Enantiyomerleri ayırmak için en geçerli yöntemlerden biri, rasemik yapıyı diğer bir bileşiğin tek enantiyomeriyle tepkimeye sokmaktır. Bu işlem, bir rasemik yapıyı bir diastereomerler karışımına çevirir ve diastereomerlerin farklı erime noktası, farklı kaynama noktası, farklı çözünürlüğe sahip olması nedeniyle diastereomerler geleneksel yolla ayrılabilirler. Diastereomerik yeniden kristallendirme böyle bir işlemdir.

Louis Pasteur'un 1848'de tartarik asit tuzlarının rasemik şeklini ayırması, enantiyomerik ayrımların başlangıcı olmuştur. Pasteur'un gerçekleştirdiği bu ayrımla birlikte stereokimya terimi ortaya çıkmıştır işte bu yüzden Pasteur stereokimyanın kurucusu olarak nitelendirilmektedir.

(+)-Tartarik asit şarap üretim prosesinde üretilen yan ürünlerden birisidir. Pasteur rasemik tartarik asidin sodyum amonyum tuzunun kristal yapısını incelemiş ve iki tip kristale ait görüntü olduğu sonucuna varmıştır. Birisi (+)-tartarik asidin sodyum amonyum tuzunun kristalleriyle aynı özellik gösterirken, diğerinin görüntüsünün ilk kristallerin çakışmayan ayna görüntüleri idi. İncelemelerinin ilerleyen safhasında, bir pens ve büyüteç yardımıyla her iki tip kristali de ayıran Pasteur bu kristalleri ayrı ayrı suda çözerek çözeltileri polarimetre altında incelemiştir. Birinci incelediği örnekte kristaller polarize ışığı sağa çevirmektedir ve kristallerin (+)-tartarik asidin sodyum amonyum tuzuyla aynı olduğu görülmüyordu. İkinci tip kristallerin çözeltisi ise polarize ışığı eşit miktarda fakat zıt yöne doğru çevirmektedir. İkinci tip kristaller, (-)-tartarik asidin sodyum amonyum tuzuydular. Kristallerin kiralılığı, kristaller çözelti içinde çözündükleri için kendiliğinden kayboluyor fakat optikçe aktiflik devam ediyordu. Bu yüzden Pasteur, moleküllerin kendilerinin kiral olması gerektiği sonucuna vardı. Bu keşfin ardından da 1874'te Van't Hoff ve Le Bel tarafından karbonun düzgün dörtyüzlü yapısı önerilmiştir. Pasteur'un bulduğu bu

yöntem çok sayıda organik bileşiğin sahip olacağı bir özellik olmadığı için enantiyomerlerin çoğunun bu yöntemle ayrılabilmesi mümkün olmamaktadır (Solomons ve Fryhle, 2002).

1.1.4.2. Kinetik Ayırma Yöntemleri

Diğer bir yöntem ise enzimlerle ayırmadır. Enzim, rasemik yapıdaki enantiyomerlerden birini seçimli olarak başka bir bileşiğe dönüştürür ve daha sonra tepkimeye girmemiş enantiyomer ve yeni bileşik ayrılır.

Bu yönteme ise kinetik ayırma adı verilir. Bu yöntem bir kiral bileşen varlığında iki enantiyomerin farklı hızlarda reaksiyon vermesine dayanır. Bu kiral bileşen enzim veya mikroorganizma gibi bir biyokatalizör olabileceği gibi kiral bir metal kompleksi gibi bir kemokatalizör de olabilir. Kinetik ayırma rasemik karışımdaki enantiyomerlerden birinin diğerinden daha hızlı ürüne dönüşmesiyle sağlanmaktadır. Kinetik ayırma yapılırken katalizör olarak en çok kullanılan enzim lipazlardır. Dinamik kinetik ayırma da, kinetik ayırma ile rasemizasyon prosesi beraber gerçekleşmektedir. Dinamik kinetik ayırmanın tek farkı (S) enantiyomeri proses boyunca izomerleşir, başlangıç (R) substratının tamamı (R) ürününe dönüşebilir ve böylece % 100 verime ulaşılabilir.

Bu tepkimelerde özellikle bazı kavramlar ortaya çıkmaktadır. Enantiyomerik aşırılık (ee) terimi herhangi bir bileşiğin enantiyomerik saflığının ifade ediliş biçimidir (Eşitlik 1.1). Burada R ve S ilgili enantiyomerleri göstermektedir.

$$\% ee = \frac{[R]-[S]}{[R]+[S]} \times 100 \quad (\text{Eşitlik 1.1})$$

Rasemik bir karışım için ee değeri “0” iken enantiyomerikçe saf bir bileşik için ee değeri “1”dir. Enzim katalizli tepkimelerin enantiyoseçimliliğini veya stereoseçimliliğini tanımlamak için enantiyomerik oran (E) parametresi kullanılır (Eşitlik 1.2). Enantiyoseçimli olmayan tepkimelerde E değeri “1” iken, kabul edilebilir bir ayırım için E değeri 20’den büyük olmalıdır (Ghanem ve Aboul-Enein, 2005). Eşitlik 1.2.’de c dönüşüm büyüklüğünü, s substratı, p ise ürünü ifade etmektedir.

$$E = \frac{\ln[(1-c)x(1-ee(S))]}{n[(1-c)x(1+ee(S))]} \times 100 \quad \text{ve} \quad c = \frac{ee_s}{ee_s + ee_p} \quad (\text{Eşitlik 1.2.})$$

1.1.4.3. Enantiyomerlerin Ayırımında Kullanılan Aletli Analiz Yöntemleri

Yukarıda listelenen aletli analiz yöntemleri avantaj ve dezavantajları bakımından incelenecek olup tez kapsamında kullanılan kiral YBSK yöntemi ile ilgili detaylı bilgi gereç ve yöntem kısmında anlatılacaktır.

1.1.4.3.1. Gaz Kromatografisi

Gaz kromatografisinde (GK) hareketli faz gaz olup sabit faz sıvı veya katı olabilir. GK sabit faz sıvı olduğunda, gaz-sıvı kromatografisi (GSK) sabit faz katı olduğunda gaz-katı kromatografisi (GKK) olarak isimlendirilir. GSK’de bileşenler hareketli faz ile sabit faz arasındaki dağılım farklılıkları sayesinde ayrılırlar. GKK ise genellikle gaz karışımlarının kromatografik analizinde kullanılır ve kullanım yaygınlığı GSK’ye göre oldukça azdır.

GK mol kütlesi 2-1000 g mol⁻¹ arasında olan organik ve anorganik gazların, kolayca buharlaşabilen sıvı ve katıların uçucu bir çözücü içinde çözünmüş haldeki örneklerini analiz etmek için kullanılır. GK çok kısa süre içinde uçucu bileşenlerin ayrılması ve analizi için yaygın olarak kullanılan bir teknik olmayı başarmıştır. Kapiler kolonların üretilmesinden sonra daha da yaygın olarak kullanılan gaz kromatografisi cihazlarının gelişimi, daha etkili biçimde nitel analiz yapılabilmesini sağlamıştır. Kiral bileşen analizlerinde gaz kromatografisi ile çalışmanın belirli artıları ve eksileri vardır. En büyük avantajı çok yüksek etkin tabaka sayılarına ulaşmasıdır. Diğer taraftan en ciddi dezavantajı sadece termal olarak dayanıklı bileşiklerin analizlerinin mümkün olmasıdır. Bunun yanı sıra sabit faz çeşitliliğinin sınırlı oluşu, hareketli faz açısından seçiciliğe kolay müdahale edilememesi ve preparatif ölçekli analizlerde kullanımının güç oluşu bu yöntemin kullanımını sınırlamaktadır.

1.1.4.3.2. Süperkritik Akışkan Kromatografisi

Süper kritik akışkan; bir madde, kritik sıcaklığının üzerine ısıtıldığı zaman elde edilen fiziksel haldir. Süperkritik akışkanlar hem gaz hem de sıvı özelliklerini bir arada gösterirler, difüzyon katsayıları yüksektir, sıkıştırılabilirlikleri yüksektir, sıcaklık ve basınçlarının yanı sıra yoğunlukları da yüksektir. Akışkan seçimi yapılırken, akışkan yüksek saflıkta olmalı, kararlı ve inert olmalıdır bunun yanı sıra yanıcı ve patlayıcı olmamalı ve toksik özellik göstermemelidir. Bunlara örnek olarak etilen, etan, karbondioksit ve triflormetan gibi maddeler verilebilir.

Süperkritik akışkan kromatografi yönteminde gaz ve sıvı kromatografik yöntemlerin avantajlı yönleri bir araya getirilmiştir. Hareketli faz olarak süper kritik bir akışkan kullanılır. Sabit faz, katı veya sıvı olabilir. En çok kullanılan hareketli faz ise yukarıda belirtilen özellikleri bünyesinde barındırdığı için karbondioksittir. Diğer tüm sıvı kromatografik kolonlar gibi süperkritik akışkan kromatografisi kolonları da

sabit fazla doldurulmuş paslanmaz çelikten meydana gelmektedir. Teknik olarak normal faz kromatografi tekniğiyle çok benzemektedir. Buna ek olarak süper kritik akışkanların düşük viskoziteye ve yüksek difüzyon hızına sahip olmaları bir avantajdır. Bu nedenle normal faz kolonları da kullanılabilir. Yöntemin geleneksel YBSK'ye göre belirli üstünlükleri vardır. Öncelikle daha yüksek etkin tabaka sayılarına ulaşılabilir. Bu etkin tabaka sayıları YBSK'den daha yüksek olmakla beraber gaz kromatografisi ve kapiler elektroforez tekniklerinden daha düşüktür. Sıcaklık ile bozulan numunelerle rahatlıkla çalışılabilmesi sağlar, preparatif olarak uygulamalar yapılabilir, atık yönetimi ve kullanılan hareketli faz açısından bakıldığında ise daha çevreci bir yöntemdir. Bunun yanı sıra dezavantajları arasında, hareketli faz seçiminin kısıtlı oluşu, hareketli faz içerisinde analit çözünürlüğünün sınırlı olması ve hareketli faz ile istenmeyen reaksiyonların meydana gelebilmesidir (Süper kritik koşullarda karbondioksit birincil ve ikincil aminlerle etkileşerek karbamik asitleri oluşturur).

1.1.4.3.3. Kapiler Elektroforez

Kapiler elektroforez (KE) diğer yöntemlere göre oldukça yeni olan ve YBSK ve jel elektroforezin çeşitli yönlerden birleşimine karşılık gelen bir ayırma teknolojisidir. Jel elektroforezde olduğu gibi ayırma bir elektriksel alanda bileşenlerin farklı göçlerine bağlı olarak gerçekleşir.

Elektroforezden farklı olarak ayırmalar genellikle sulu çözeltilerde bir jel ortamına gerek duyulmaksızın yapılır. KE teknikleri kapiler zon elektroforez, kapiler jel elektroforez, kapiler izotakoforez, kapiler izoelektrik odaklama, kapiler elektrokromatografi gibi çeşitli tekniklere ayrılmaktadır. Bu yöntemin yüksek seçicilik, hızlı ayırım, kapillerlerinin daha uzun ömürlü ve ucuz olması, az miktarda numune ve reaktiflere gerek duyulması, tayin sınırlarının oldukça düşük düzeylere kadar inebilmesi, ucuz olması, otomasyona uygunluk gibi pek çok üstünlükleri

bulunmaktadır. KE, polar ve apolar bileşiklerin, iyonik ve iyonik olmayan organik bileşiklerin, inorganik anyon ve katyonların, makro moleküllerin ve kiral bileşiklerin ayrılması ve teşhisi için kullanılır. Karışımlarda bileşiklerin kalitatif ve kantitatif tayini mümkündür.

En çok kullanılan KE yöntemi kapiler zon elektroforez (KZE) yöntemidir. Bu teknikte ayrılma, bileşiklerin elektroforetik hareketliliklerindeki farka bağlı olarak kapiler içinde farklı hızlarda göç etmesi ile meydana gelir. Elektroforetik hareketlilik başlıca bir iyonun kütle-yük oranına ve şekline bağlıdır. Katyonlar negatif yüklü elektrota (katot) doğru, anyonlar pozitif yüklü elektrota (anot) doğru göç ederler. Göç hızları yük/büyüklik oranına göre değişiklik gösterir. İki bileşiğin yüklerinin aynı olması koşulunda küçük olan büyük olana göre daha hızlı hareket eder. Büyüklükler aynı olduğu koşulda da yükü daha fazla olan daha hızlı hareket eder.

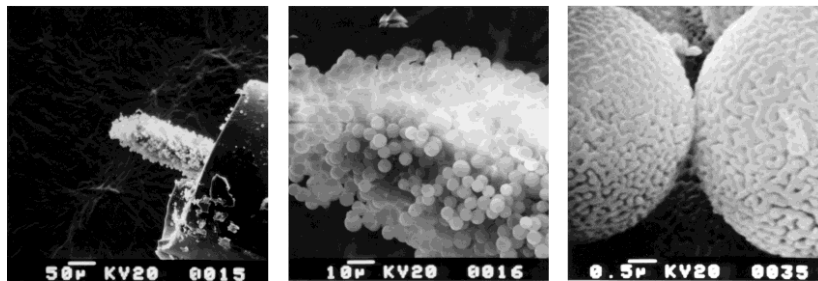
Diğer KE ayırma yöntemlerine göre KZE bazı üstünlükler taşır. Kapiler ve elektrot kapılarının tamamında tek bir tampon kullanılır ve numune kapilerin bir ucundan bir zon halinde alınır. Kapilerin hazırlanması için ayırma tamponu ile kapileri doldurmak yeterlidir. Kaplanmamış kapilerler ön yıkama ve şartlandırma basamakları gerektirir. Düşük maliyetli tampon ve tuzlar kullanıldığı için teknik ucuzdur. Ayırma seçiciliği tampon pH'sinin ayarlanması veya katkı maddelerinin kullanılması ile kolayca değiştirilebildiği için en çok kullanılan yöntemdir. KZE bir elektrolit çözeltisinde çözünebilen bütün iyonize bileşikler ayırmak için kullanılabilir. Peptit, protein gibi büyük biyomoleküller, kiral yapıları bileşikler ve küçük inorganik anyonlar için birçok uygulama bulunmaktadır (Blaschke ve Chankvetadze, 2000; Chankvetadze, 2001, Chankvetadze, 2007, Chankvetadze 2013a, Christian, 2004 ve Thormann ve ark., 2014).

Yöntemin başlıca avantajları; Alternatif bir ayırma mekanizması sunması, kromatografik yöntemlerin aksine çok yüksek etkin tabaka sayılarına ulaşılması, kiral

seçiciler yönünden çok çeşitli olması, seçiciliğin ayarlanmasında çok esnek olması, termodinamik olarak çok küçük bir seçicilik farkı olsa bile ayırmanın gerçekleşebilmesi, kiral seçicilerin karıştırılarak kullanılmasının mümkün oluşu ve son olarak da minyatürize bir teknik olduğu için az bir numuneyle bile analizler gerçekleştirilebilirken çevreye karşı çok daha duyarlı bir yöntem oluşudur. Yöntemin üstünlükleri yanı sıra gaz haline geçebilen moleküllerle çalışamaması ve preparatif ayırmalar için kullanılamaması gibi dezavantajları da bulunmaktadır. Ayrıca kromatografik metotlara nazaran analizcinin kapiler elektroforez konusunda yetkin olması, özellikle metodun geliştirilmesi ve geçerlilik testlerinin hatasız yapılması durumlarında çok büyük önem taşımaktadır.

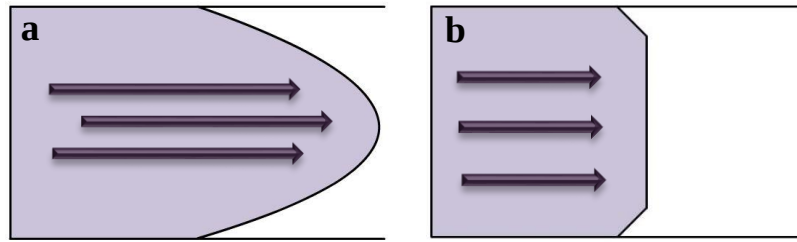
1.1.4.3.4. Kapiler Elektrokromatografi

Kapiler elektroforez cihazı ile uygulanabilen ve temel olarak küçük moleküllerin ayrılması için kullanılan bir kromatografik tekniktir. Bu yöntem sıvı kromatografinin seçiciliğini ve kapiler elektroforezin yüksek etkinliğini birleştiren bir tekniktir. KZE'nin aksine yüksüz bileşiklerin analizi de kapiler elektrokromatografi tekniği ile rahatlıkla gerçekleştirilebilmektedir. KE'den farklı olarak kolon olarak C18 gibi bir hidrofobik ligant ile türevlendirilen 1-7 μm boyutlarda poröz silika, core-shell veya monolit bir malzeme ile doldurulmuş silika kapilerler kullanılır (Şekil 1.15.)



Şekil 1.15. Silika parçacıklarla doldurulmuş kapiler bir kolon

Hareketli faz, sulu tamponlar ve asetonitril, metanol gibi bir organik çözücünün karışımından oluşan klasik YBSK ters faz çözeltileri olabilir, ancak organik çözücü içeriği yüksektir (% 50-100). Doldurulmuş kolonda bulunan silika yüzey, sisteme voltaj uygulandığında yüksek yoğunluklu iyonize silanol gruplarından dolayı yüksek bir elektroozmotik akış oluşturur. Bu tür bir akış geleneksel YBSK’de karşılaşılan laminar akış gibi parabolik bir yol izlemez (Şekil 1.16. a) tıpa şeklindeki (Şekil 1.16. b) doğası nedeniyle etkinlik değerleri YBSK’den daha yüksektir.



Şekil 1.16. Laminer (a) ve elektroozmotik akış (b)

Hareketli faz hem silika duvarı ile hem de dolgu materyalini oluşturan parçacıklı yüzeylerle temas halindedir. Ayrılacak bileşenlerin dolgu materyali ile hareketli faz arasındaki farklı partisyonu ve elektroforetik hareketliliği nedeniyle bu yöntem kullanıldığında KZE ve YBSK’ye göre daha üstün seçicilik sağlanır. KE ile analizi güç olan ve sulu ortamda çözünmeyen maddelerin özellikle nötral moleküllerin ayrılması için iyi bir seçenektir (Blaschke ve Chankvetadze, 2000; Chankvetadze, 2001; Chankvetadze, 2007; Chankvetadze 2013a; Christian, 2004; Thormann ve ark., 2014).

1.2. Beta Agonist İlaçlar ile İlgili Genel Bilgiler

1.2.1. Otonom Sinir Sistemi İlaçları

Otonom sinir sistemi, vücutta istek dışında çalışan organ ve dokuların fonksiyonlarını düzenlemektedir. Bu ilaçların bir grubu otonom sinir sistemiyle ilişkili yapılar üzerindeki reseptörleri aktive ederek etki ederken, bir grubu da bu reseptörleri bloke ederek etki eder. Efektör hücreler üzerindeki muskarinik reseptörleri aktive edenler, çeşitli efektör organlarda parasempatik sinir stimülasyonu sonucu oluşan etkilerin aynısını oluştururlar ve parasempatomimetik ilaçlar olarak isimlendirilirler. Diğer bir ilaç grubu olan muskarinik reseptörleri bloke eden ilaçlar organlarda parasempatik sinirlerin tonik etkisini azaltarak etki ederler ve parasempatolitik ilaçlar olarak adlandırılırlar. Efektör hücrelerin adrenerjik reseptörlerini aktive edenler sempatomimetik ilaçlar olarak adlandırılırken, adrenerjik reseptörleri bloke edenler adrenerjik reseptör blokerleri, adrenerjik sinir uçlarını bloke edenler adrenerjik nöron blokörleri olarak gruplandırılırlar. (Üstünes, 2016; Kayaalp, 2012 ve Sweetman, 2009).

1.2.1.1. Sempatomimetik İlaçlar

Sempatomimetik ilaçlar, efektör organları adrenerjik reseptörler üzerinden direkt veya indirekt olarak etkileyen ve sempatik sinir sisteminin bu organlardaki etkisini taklit eden ilaçlardır. Direkt etkili sempatomimetikler doğrudan adrenerjik reseptörleri uyarak etki gösterir (katekolaminler ve reseptör agonistleri). İndirekt etkili sempatomimetikler ise adrenerjik sinir ucuna nöronal uptake mekanizması ile girerek burada sitoplazmada depolanmış noradrenalinin salıverilmesine neden olur (tiramin ve b-feniletilamin). Etkileri vezikülden ekzositozu gerektirmez ve

kalsiyumdan bağımsızdır. Daha düşük oranda vezikül içerisinde depolanmış olan noradrenalin de boşaltır. Bu ilaç grubuna ait bileşikler çizelgede detaylı olarak gösterilmiştir (Çizelge 1.5) (Kayaalp, 2012).

Çizelge 1.5. Sempatomimetik ilaç grubuna dahil olan etken maddeler.

Katekolaminler	Katekolamin olmayanlar							MSS**ni stimüle edenler
	Alfa mimetik ilaçlar			Beta mimetik ilaçlar				
	Antihipotansif	Dekonjestan		Bronkodilatör	Vazodilatör	Tokolitik	Myokard stimülanı	
		Lokal	Sistemik					
Adrenalin	Efedrin	Nafazolin	Fenilpropanolamin	Terbutalin	İzoksuprin	Ritodrin	Dopeksamin	Amfetamin
Noradrenalin	Fenilefedrin	Ksilometazolin	Psödoefedrin	Salbutamol	Nilidrin	İzoksuprin		Dekstamfetamin
Etilnoradrenalin	Metaraminol	Tetrahidrozin		Salmeterol		Salbutamol		Metamfetamin
Dopamin	Metoksamin	Oksimetazolin		Formoterol				Mazindol
Dobutamin	Etilefedrin	İndanazolin		Fenoterol				Fentermin
Dopeksamin	Norfenefrin	Fenilefrin		Kalbuterol				Fenetilin
Dipivefrin	Oksedrin	Efedrin		Klenbuterol				Fenmetrazin
İzoproterenol	Nordefrin	Tuaminoheptan		Tulobuterol				
	Oktopamin	Metilheksamin						
	Heptaminol	Propilheksedrin						

* Merkezi sinir sistemi

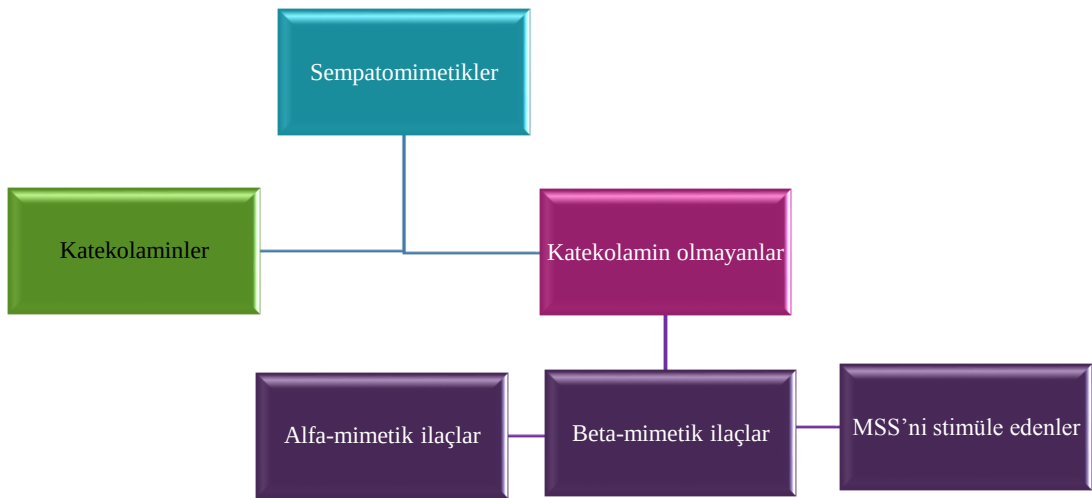
Bu ilaçların efektör hücre veya organlarda oluşturdukları etkinin türü ve derecesi;

- ✓ İlacın α_1 , α_2 , β_1 , β_2 ve β_3 reseptörlere karşı afinitesi
- ✓ Etkilenen hücre, doku veya organın reseptör bileşimi

olmak üzere iki faktöre bağlıdır. Ayrıca ilacın farmakokinetik özellikleri (dağılımı, biyotransformasyon şekli ve hızı, adrenerejik sinir ucuna alım derecesi gibi) de etki gücü ve süresine etki eder.

Sempatomimetik ilaçların oluşturduğu etkiler; vazokonstriksiyon, iskelet kaslarında vazodilatasyon, bronkodilatasyon, kardiyak stimülasyon, kalp hızında artış, miyokardiyal kasılmada artış ve aritmi eğilimi, hepatik glukojenoliz, yağ dokusundan serbest yağ asitlerinin salınması, insülin, renin ve hipofiz hormonlarını etkileme, santral sinir sisteminin uyarılması, hipopotasemi şeklinde sıralanabilir.

Sempatomimetik ilaçlar, katekolaminler ve katekolamin olmayanlar olmak üzere iki ana gruba ayrılırlar. Katekolamin olmayanlar ise alfa-mimetik ilaçlar, beta-mimetik ilaçlar ve merkezi sinir sistemini (MSS) stimüle edenler olarak gruplandırılabilir (Şekil 1.17.) (Üstünes, 2016; Kayaalp, 2012 ve Sweetman, 2009).



Şekil 1.17. Sempatomimetik ilaçların sınıflandırılması

1.2.1.1.1. Katekolaminler

Kimyasal olarak yapılarında 3-4 hidroksibenzen içeren bileşikler katekolamin olarak isimlendirilir. Katekolaminler, kan-beyin bariyerini, (beyin kapilleri etrafında endotel hücre tabakası) geçemeyen ilaçlardır. Adrenalin, noradrenalin, izoproterenol (izoprenalin), dobutamin, dopamin, dopamin analogları, dipivefrin ve etilnoradrenalin bu gruba dahil olan ilaçlardır. Dopamin prekürsörü olan levodopa da bu gruba katılır. Etkileri stereospesifiktir; birçoğunun L şeklinin periferik yapılar üzerindeki etkinliği, D şekillerininkinden çok daha fazladır. Dopamin ve dopamin benzerleri ufak dozlarda adrenerjik reseptörleri değil, dopaminerjik reseptörleri etkilemeleri nedeniyle diğerlerinden farklıdır; doz yükseltildiğinde diğer ilaçlar gibi adrenerjik reseptörleri de etkilerler.

Adrenalin, noradrenalin ve izoproterenol katekolaminlerin ve genelde semptomimetik ilaçların prototip ilaçlarıdır. Noradrenalin alfa-mimetik etkinlik gösteren, izoproterenol beta-mimetik etkinlik gösteren ve adrenalin hem alfa-mimetik ve hem de beta-mimetik etki kalıbı gösteren ilaçların prototipidir (Kayaalp, 2012 ve Sweetman, 2009).

1.2.1.1.2. Sempatomimetik Aminler (Katekolamin Olmayanlar)

Yapılarında hidroksil bileşiklerini taşımayan ve kan beyin bariyerini geçen sentetik ilaçlardır. Bu ilaçlar kan beyin bariyerini aşarak merkezi sinir sistemine de etki ederler.

- ✓ Alfa-mimetik ilaçlar,
- ✓ Beta-mimetik ilaçlar,
- ✓ MSS'yi stimüle edenler (amfetaminler ve amfetamin benzerleri)

olmak üzere üç ana gruba ayrılırlar.

Adrenerjik reseptörleri kısmen direkt olarak etkilerler ve aynı zamanda adrenerjik sinir ucuna girerek oradan salıverdikleri endojen noradrenalin aracılığı ile adrenerjik reseptörleri indirekt şekilde aktive ederler. Noradrenalin sitoplazma içindeki monoamin oksidazın etkisine açık olduğundan indirekt etkili sempatomimetik ilaçların etkisi; monoamin oksidaz inhibitörleri tarafından potansiyalize edilir. Monoamin oksidaz sitoplazmaya giren sempatomimetik ilacı da parçalar.

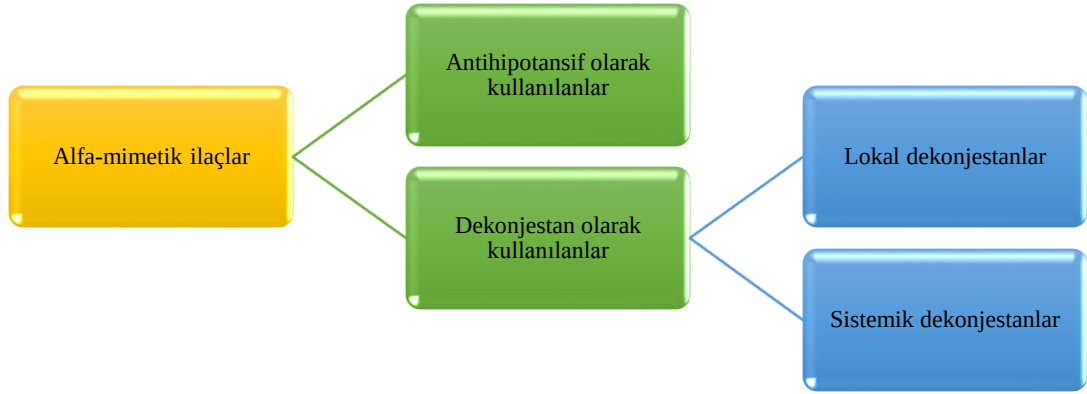
İlaç olarak verilip dolaşıma giren sempatomimetik aminlerin vücuttaki inaktivasyonunda karaciğer ve diğer yerlerdeki monoamin oksidaz tarafından yıkılma önemli rol oynar. Fenil halkaları katekol şeklinde olmadığından katekol-o-metiltransferaz enzimine genellikle dayanıklıdırlar. Fenil halkasında hidroksil bulunmayanlar (metamfetamin efedrin, amfetamin, fenilpropanolamin) fazla lipofiliktir, MSS'ye girer ve merkezi stimülan etki gösterirler.

Genel olarak sempatomimetik aminler ağız yoluyla alınmaya elverişli, vücutta katekolaminler gibi hızlı yıkılmayan ve daha uzun süre etkili ilaçlardır (Üstünes, 2016 ve Kayaalp, 2012).

1.2.1.1.2.1. Alfa-Mimetik İlaçlar

Bu gruptaki ilaçların bir kısmı saf alfa-mimetik (Şekil 1.18) etkinlik gösterir, geri kalanların ise beta-mimetik (Şekil 1.19) etkinliği de vardır. Saf alfa-mimetik etkinlik gösterenler direkt etki gösterir, diğerleri ise karma etki gösterirler; alfa-

mimetik etkinlik yanında, kalpteki β_1 -reseptörlere özgü az veya çok beta-mimetik etkinlik gösterme bunun bir sonucudur (Sweetman, 2009; Üstünes, 2016 ve Kayaalp, 2012).

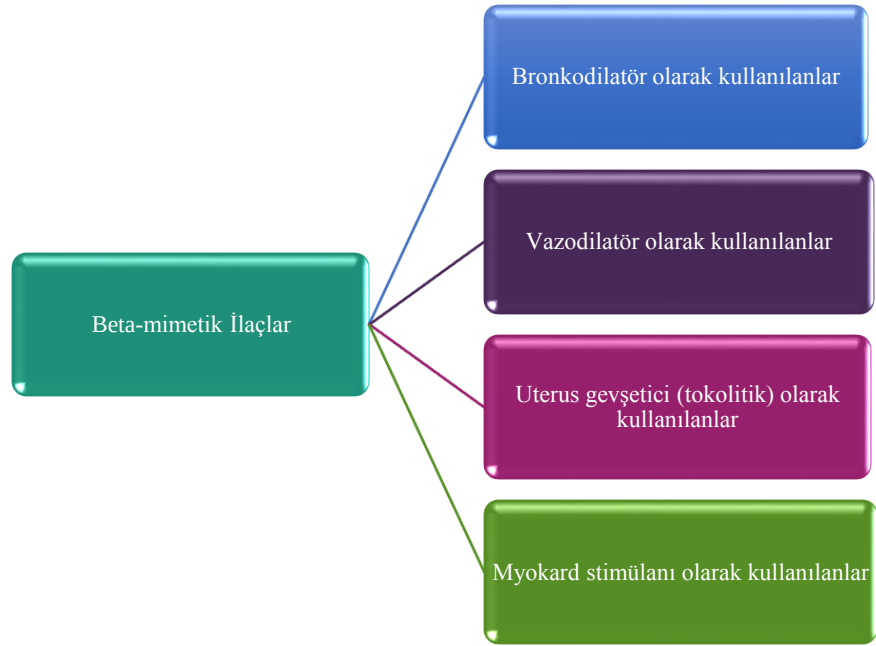


Şekil 1.18. Alfa-mimetik ilaçların sınıflandırılması

1.2.1.1.2.2. Beta-Mimetik İlaçlar

Beta-adrenerjik reseptörleri direkt olarak etkileyen selektif ilaçlardır; alfa-mimetik etkileri yoktur veya önemsiz derecededir. Birçoğu β_2 -reseptörleri oldukça selektif bir şekilde etkilerler. Düz kas hücre membranının dış yüzündeki β_2 -reseptörlerini uyararak adenilat siklaz enzimini aktive ederler. Bu enzim sitoplazmadaki adenosin trifosfatı (ATP) siklik adenosin monofosfata (AMP) çeviren enzimdir ve dolayısı ile siklik AMP miktarını artırır. Kalpteki β -reseptörler üzerindeki etkinlikleri nisbeten zayıftır.

Betamimetik ilaçların taşikardi, palpitasyon, aritmi ve miyokardın oksijen tüketiminde artma, tremor, kan basıncında yükselme, hipokalemi, hiperglisemi, hiperlaktikaside mi ve serbest yağ asidi düzeyinde artış gibi yan etkileri görülebilir. Bazı betamimetik ilaçlar, iskemik koroner hastalıklarında, hipertansiyon ve kalp yetmezliği gibi olgularda kontrendikedir. Klinik kullanışa temel oluşturan ana etkilerine göre 4 alt-gruba ayrılırlar (Şekil 1.19) (Üstünes, 2016; Kayaalp, 2012 ve Sweetman, 2009).



Şekil 1.19. Beta-mimetik ilaçların sınıflandırılması

1.2.1.1.2.3. Amfetaminler

Amfetaminler denilince amfetamin (rasemik) dekstroamfetamin, metamfetamin ve hidrokiamfetamin anlaşılır. Amfetaminlerin (hidrokiamfetamin hariç) hepsi ve amfetamin-benzeri ilaçların bir kısmı suistimal edilme ve bağımlılık oluşturma potansiyelleri nedeniyle uluslararası ve ulusal kontrole tabi ilaçlardır. Sempatomimetik etkileri yanında merkezi sinir sisteminde psikomotor stimülan ve

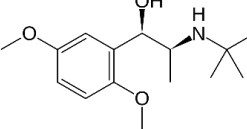
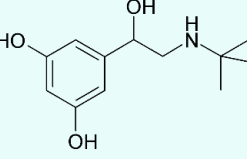
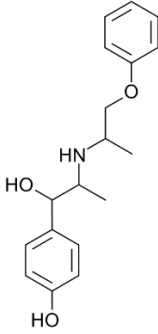
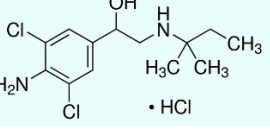
iştah kesici etki gösterir. Diğer sempatomimetik ilaçlara göre fazla lipofilik maddelerdir ve kan-beyin engelini kolayca aşarlar.

Amfetaminler ve amfetamin-benzeri ilaçlar, direkt etkiden ziyade indirekt sempatomimetik etkinlik gösterirler. Adrenerjik sinir uçlarına ve beyinde ayrıca dopaminerjik uçlara girerler. Noradrenalin ve dopamin salıverilmesine yol açmasının yanı sıra bu nörotransmitterlerin re-uptake'ini de inhibe ederler. Santral etkieri esas olarak dopamin etkinliğini güçlendirmelerine bağlıdır (Kayaalp, 2012 ve Üstünes, 2016).

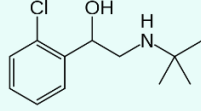
1.3. Tez Kapsamında Kullanılan Etken Maddelerle İlgili Bilgiler

Tez kapsamında kullanılan etken maddelerle ilgili kimyasal, fiziksel, farmakolojik ve farmakokinetik özellikler ile birlikte molekül formülleri aşağıdaki çizelgede özetlenmiştir (izelge 1.6).

Çizelge 1.6. Tez kapsamında kullanılan etken maddelerle ilgili kimyasal, fiziksel, farmakolojik ve farmakokinetik özellikler ile birlikte molekül formülleri

Etken Madde	Molekül Şekli	Molekül Formülü	Sistemik Adı	Fiziksel Özellikleri	Farmakolojik Özellikleri	Farmakokinetik Özellikler
Butoksamin		C ₁₅ H ₂₅ NO ₃	(1S,2S)-1-(2,5-dimethoxyphenyl)-2-(tert-butylamino)propan-1-ol	Kokusuz, beyaz renkte kristal yapıda bir tozdur. Alkol türevlerinde kolay çözünür.	-	-
Terbutalin		C ₁₂ H ₁₉ NO ₃	(RS)-5-[2-(tert-butylamino)-1-hydroxyethyl]benzene-1,3-diol	Kokusuz veya hafif asetik asit kokulu, beyazdan grimsi beyaza değişen renkte, kristal yapıda bir tozdur. Suda serbestçe çözünür, alkol ve metil alkolde hafifçe çözünür, kloroform ve eterde ise çözünmez.	Terbutalin oral ve parenteral bir bronkodilatördür. Beta-2 adrenerejik reseptörleri seçici olarak uyarak etki eden birkaç semptomimetik ajandan biridir. Klinikte temel olarak bronkospazm tedavisinde kullanılır.	Oral, parenteral veya inhalasyon yoluyla verilir. İnsanda teratojenik etkisi saptanmamıştır. Sistemik olarak verildiğinde karaciğerde kısmen metabolize edilir. İdrar yoluyla elimine olur. Çok az bir miktarı feçesle atılır.
İzoksuprin		C ₁₈ H ₂₃ NO ₃	4-{1-Hydroxy-2-[(1-methyl-2-phenoxyethyl)amino]propyl}phenol	Beyaz renkte, kokusuz, kristal yapıda bir tozdur.	Sempatik sistemini uyarıcı aminlere benzeyen, beta adrenerejik almaç agonisti olarak ve ayrıca, papaverin benzeri etkisi nedeniyle damarlarla döl yatağı düz kaslarının gevşemesine neden olur. Daha çok erken doğum ve yavru atmaların önüne geçmek için ayrıca, navikular hastalığın tedavisinde kullanılır.	-
Klenpenterol		C ₁₃ H ₂₀ Cl ₂ N ₂ O · HCl	1-(4-Amino-3,5-dichlorophenyl)-2-(1,1-dimethylpropyl)amino	Kokusuz, beyaz renkte kristal yapıda bir tozdur. Alkol türevlerinde kolay çözünür.	-	-

Tulobuterol



$C_{12}H_{18}ClNO$

(RS)-2-(tert-butylamino)-1-(2-chlorophenyl)ethanol

Beyaz veya beyazımsı renkte, kokusuz ve kristalize bir tozdur.

Uzun etkili, selektif beta-2 adrenerjik reseptör stimülanı bir bronkodilatördür. Kronik astım ve kronik bronşit tedavisinde kullanılır. Vasküler ve hava yolu düz kasları üzerinde seçici olmayan inhibitör etki gösterir ve aynı zamanda adrenerjik nörotransmisyona olanak sağlar. Beta-1 adrenoseptörleri aktive etmez ve doğrudan pozitif kronotropik etki göstermez. Türkiye Sağlık Bakanlığı tarafından bronşiyal astım, kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH) ve bronkospazm ile birlikte sekresyon artışı bulunan akciğer hastalıklarında öksürüğün semptomatik tedavisi için 12 Mayıs 2010 tarihinde onaylanmıştır.

Oral yoldan kullanılır. Gastrointestinal sistemden absorbe olur. Yetişkinlerde uygulamadan sonra 8 – 12 saat içerisinde doruk plazma konsantrasyonlarına ulaşır. Karaciğerde metabolize olur. En etkili metaboliti 4-hidroksitulobuteroldür. Büyük oranda idrarla ve çok az miktarda dışkıyla atılır.

1.4. Tez Maddeleri ile Yapılmış Literatürdeki Çalışmalar

Tez kapsamında kullanılan etken maddelere ait literatür araştırması yapıldığında, ilgili bileşiklerin farklı yöntemler kullanılarak gerçekleştirilmiş kiral analizleri aşağıdaki çizelgede özetlenmiştir.

Çizelge 1.7. Tez kapsamında kullanılan ilaç etken maddeleriyle yapılmış literatür çalışmaları.

Etken madde	Teknik	Kolon	Hareketli faz bileşimi	Dedektör	Analiz süresi (dk.)	Sistem uygunluk testi parametreleri			Yöntem geçerlilik testi parametreleri					Kaynak
						Rs	α	N	Doğrusallık (ngmL ⁻¹)	TS (ngmL ⁻¹)	TAS (ngmL ⁻¹)	Keskinlik (BSS %)	Doğruluk %	
Bütoksamin					-	1,51	1,09	38087 37810	-	-	-	-	-	
Klenbuterol	KAK	Chiralpak QD-AX 250 mm x 20 mm; 5 µm	CO ₂ %25 Metanol (100 mM formik asit ve 50 mM amonyum fosfat içeren) Gradient	FDD	12	1,73	1,10	39571 38913	-	-	-	-	-	Wolrab ve ark., 2013
İzoksuprin					-	1,12	1,07	32827 32889	-	-	-	-	-	

Bütoksamin	YBSK	150 mm x 4.6 mm	ACN:MeOH, 90:10 (h/h)	UV ve CAD	5	0,56-2,34	1,12 - 1,17	-	-	-	-	-	-	Hoffmann ve ark., 2008
İzoksuprin		Farklı deneysel kiral sabit fazlar	(50 mM FA ve 25 mM DEA)		9	0,01-3,74	1,00 - 3,69	-	-	-	-	-	-	
Klenbuterol	YBSK	Venusil MP-C18 (250 mm x 4,6 mm; 5 µm)	20 mM Amonyum asetat (pH: 6):MeOH, 40:60, (h/h), 100 mM borik asit ve 100 mM di-n-amil L-tartarat	UV	45	13,25	2,04	2903236428	-	-	-	-	-	Zou ve ark., 2015
Terbutalin					10	-	-	-	-	-	-	-	-	
Tulobuterol					30	-	-	-	-	-	-	-	-	
Klenbuterol	KE	50 cm x 50 µm iç çaplı, poliimid kaplı silika kapiler, 35 cm etkin uzunluk	5 mM β-SD içeren, 50 mM fosforik asit tamponu (pH: 2,24)	UV	20	-	-	-	-	-	-	-	-	Na ve ark., 2006
Klenbuterol	YBSK	β-SD ile türevlendirilm iş kolon (250 mm x 4,6 mm)	Hekzan:IPA:MeOH :TFA:TEA, 80:10:10:0.3:0.1, (h/h/h/h/h)	UV	17	0,5	1,03	-	-	-	-	-	-	Tang ve ark., 2015
Klenbuterol	KEK	50 cm x 75 µm iç çaplı metal-organik kompleksi ile kaplanmış silika kapiler, 43 cm etkin uzunluk	4 mM fosfat tamponu:ACN, 40:60, (h/h), pH: 7,0	UV	3	0,42	-	11001100	-	-	-	3,63	-	Fei ve ark., 2014

İzoksuprin	YBSK	Chiralpak AD (250 mm x 4,6 mm)	n-hekzan : IPA:TEA, 80:20:0,1, (h/h/h)	UV	15	-	-	-	-	-	-	-	-	Chankvetadze ve ark., 2002
	KE	60 cm x 50 µm iç çaplı silika kapiler, 50 cm etkin uzunluk	Farklı SD türevleri içeren, 100 mM trietanolamin tamponu, pH: 3,0'a fosforik asit ile ayarlanmıştır	UV	18	-	1,0- 1,29	-	-	-	-	-	-	
İzoksuprin Ritodrin	KE	48,5 cm x 20 µm iç çaplı silika kapiler, 40 cm etkin uzunluk	γ-SD içeren, 75 mM trietanolamin tamponu, pH: 2,5'e fosforik asit ile ayarlanmıştır,	UV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Denola ve ark., 2008
Ritodrin	YBSK	OD-RH (150 mm x 4,6 mm, 5 µm)	0,1 M KPF ₆ :ACN, 80:20, (h/h) pH: 5,5	FD	16	-	-	-	5-100	-	-	0,5- 13,8	73,8 - 95,9	Konda ve ark., 2010
Terbutalin	YBSK	250 mm x 4,0 mm β-SD türevi	Trietilamonyum fosfat:MeOH, 66:34, (h/h)	UV	-	1,78- 2,54	1,78 - 2,54	-	-	-	-	-	-	Varga ve ark., 2012
Terbutalin	YBSK	Chirobiotic V (250 mm x 4,0 mm)	Etanol içerisinde 2,5 mM amonyum nitrat, pH: 5,1	UV	10	-	1,28	-	-	-	-	-	-	Hashem ve ark., 2011
Terbutalin	YBSK	Chiralpak AD (250 mm x 4,6 mm, 10 µm)	Etanol:n- Hekzan:etansulfoni k asit, 10:90:0,2, (h/h/h)	UV	13	1,56	1,16	-	-	-	-	-	-	Ye ve Stringham, 2006
Terbutalin	SK- KS/KS	Astec Chirobiotic (250 mm x 4,6 mm, 5 µm)	20 mM Amonyum Asetat:MeOH, 10:90, (h/h), pH: 6,4	KS	18	1,6	-	-	1-800	0,4	1	2,3- 8,8	96,3 - 103,3	Luo ve ark., 2010

Klenbuterol	MEK	81 cm x 50 µm iç çaplı silika kapiler, 60 cm etkin uzunluk	40 mM sodyum tetraborat, %0,8 di-n-butyl	UV	7	1,87	-	19889	-	-	-	-	-	Wang ve ark., 2010
Tulobuterol			D-tartrate, %3,0 Tween-20 ve 60 mM sodyum dihidrojen fosfat		6	1,14	-	8 94959 13940 6 10780 6	-	-	-	-	-	
Klenbuterol	KE	48,5 cm x 75 µm iç çaplı silika kapiler, 40 cm etkin uzunluk	50 mM fosfat tamponu, pH:3,5	UV	23	7,65	-	-	-	-	-	-	-	Zhou ve ark., 2012
Tulobuterol					28	2,30	-	-	-	-	-	-	-	
Terbutalin	YBSK	Sumichiral OA-4900 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm)	n-hekzan, etil asetat, metanol, tri-fluoroasetik asit (240:250:25:1, h/h/h/h)	UV	13	1,62	-	8837 19571	-	-	-	3,08	97,5 - 110	Kim ve ark., 2001
	KE	80,5 cm x 50 µm iç çaplı silika kapiler, 72 cm etkin uzunluk	15 mM HP-β-SD içeren 100 mM Sodyum fosfat, fosforik asit, pH: 3,0		22	2,71	-	14523 76675	-	-	-	3,05	102,5 - 110	
Klenbuterol	YBSK	Chirex 3005 (250 mm x 4,6 mm)	n-hekzan:1,2-dikloroetan: metanol 54:38:8, (h/h/h).	UV	15	1,81	1,43	-	-	147	327	1,58 - 4,18	89,09 - 90,37	Song ve ark., 2003
Klenbuterol	YBSK	Chirex 3022 (250 mm x 4,6 mm)	n-hekzan:1,2-dikloroetan: etanol/TFA 80:10:10, (h/h/h).	UV	13	4,20	1,27	-	3144- 78616	-	31	1,60 - 4,50	90,00 - 92,00	Abou-Basha ve Aboul-Enein, 1996

KAK: Kritikaltı akışkan kromatografisi, CAD: Charged aerosol dedektör, ACN: Asetonitril, MeOH: Metanol, UV: Ultra viyole, FA: Formik asit, DEA: Dietil amin, YBSK: Yüksek başarımlı sıvı kromatografisi, KE: Kapiler elektroforez, SD: Siklodekstrin, IPA: İzopropanol, TFA: Trifluoroasetik asit, TEA: Trietil amin, KEK: Kapiler elektrokromatografisi, FD: Floresans dedektör, SK: Sıvı kromatografisi, KS: Kütle spektrometri, MEK: Mikroemülsiyon elektrokinetik kromatografisi, CM: Karboksit metilli, HP: Hidroksi propil, TS: Teşhis sınırı, TAS: Tayin alt sınırı, Rs: Ayrım gücü, N: Etkin tabaka sayısı, α: Seçicilik, FDD: Foto diyot dizi

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Kullanılan Etken Maddeler

Tez çalışmaları kapsamında kullanılan tüm kimyasallar, safsızlıklardan ileri gelebilecek bir hata oluşmaması için analitik ve/veya kromatografik saflıkta temin edilmiştir.

Çizelge 2.1. Kullanılan etken maddeler.

Standart madde	Firma
Bütoksamin	Sigma-Aldrich
İzoksuprin	Sigma-Aldrich
Klenbuterol	Sigma-Aldrich
Klenpenterol	Sigma-Aldrich
Ritodrin	Sigma-Aldrich
Simbuterol	Sigma-Aldrich
Terbutalin	Sigma-Aldrich
Tulobuterol	Sigma-Aldrich

Çizelgede bulunan standart maddelerden sadece üç tanesinin piyasa preparatı temin edilebilmiştir. Bu maddeler ve içerikleri aşağıdaki Çizelge 2.2’de belirtilmiştir.

Çizelge 2.2. Piyasa preparatı bulunan etken maddeler.

Standart madde	Firma	Piyasa Preparatı	Dozaj şekli	İçeriği
Klenbuterol	Boehringer Ingelheim	Ventopulmin®	Şurup	25 µg mL ⁻¹
Terbutalin	Astra Zeneca	Bricanyl Durules®	Tablet	5 mg
Ritodrin	Zentiva	Pre-Par®	Ampul	50 mg 5 mL ⁻¹

2.1.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

- ✓ YBSK sistemi: Agilent 1100 (Santa-Clara, CA, ABD)
- ✓ G1379A çözünmemiş gaz uzaklaştırıcı, G1311A dörtlü pompa, 61313A otomatik örnekleyici ve G1315B foto diyot dizi detektörü (FDD).
- ✓ Isıtıcıli manyetik karıştırıcı: Ikamag RH (Jange and Kungel IKA-Labor Technic)
- ✓ Hassas terazi: Labor Alliance ve Shimadzu Libror AEG –220
- ✓ pH metre: Model 526 (WTW, Avusturya) ve kombine elektrot sistemi (cam elektrot-referans elektrot)
- ✓ Ultrasonik banyo (Nüve, Türkiye)
- ✓ Mikro hacimli otomatik pipetler (Axygen®, Interlab, Türkiye)
- ✓ Farklı hacimlerde deney tüpleri, balon jojeler ve diğer sarf malzemeler

2.1.3. Kullanılan Sabit Fazlar

Çizelge 2.3’de görüntüleme, fraksiyonlama ve analiz aşamalarında kullanılan sabit fazlar listelenmiştir.

Çizelge 2.3. Kullanılan analitik kolonlar.

Kolon Kısa Adı	Uzunluğu (mm)	İç Çapı (mm)	Partikül Çapı (µm)	Kimyasal Adı	Firma
Cellulose 1	150	4.6	3.0	Selüloz tris (3,5-dimetil fenil karbamat)	Enantioseph GmbH (Münster, Almanya)
Cellulose 2	150	4.6	3.0	Selüloz tris (3-kloro-4-metil fenil karbamat)	Enantioseph GmbH (Münster, Almanya)
Cellulose 3	150	4.6	3.0	Selüloz tris (4-metil benzoat)	Enantioseph GmbH (Münster, Almanya)
Cellulose 4	150	4.6	3.0	Selüloz tris (4-kloro-3- metil fenil karbamat)	Enantioseph GmbH (Münster, Almanya)
Amylose 1	150	4.6	5.0	Amiloz tris(3,5-di metil fenil karbamat)	Enantioseph GmbH (Münster, Almanya)
Amylose 2	150	4.6	3.0	Amiloz tris(5-kloro-2- metil fenil karbamat)	Enantioseph GmbH (Münster, Almanya)
Cellulose 1	250	4.6	3.0	Selüloz tris (3,5-dimetil fenil karbamat)	Phenomenex (AYES, Türkiye)
Cellulose 2	250	4.6	3.0	Selüloz tris (3-kloro-4-metil fenil karbamat)	Phenomenex (AYES, Türkiye)
Cellulose 3	250	4.6	3.0	Selüloz tris (4-metil benzoat)	Phenomenex (AYES, Türkiye)
Cellulose 4	250	4.6	3.0	Selüloz tris (4-kloro-3- metil fenil karbamat)	Phenomenex (AYES, Türkiye)
Amylose 1	250	4.6	5.0	Amiloz tris(3,5-di metil fenil karbamat)	Phenomenex (AYES, Türkiye)
Amylose 2	250	4.6	3.0	Amiloz tris(5-kloro-2- metil fenil karbamat)	Phenomenex (AYES, Türkiye)

2.1.4. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Hareketli faz hazırlanması için seçilen organik çözücüler kromatografik saflıktadır. Diğer kimyasallar ise analitik saflıkta kullanılmıştır.

Çizelge 2.4. Çözeltilerin hazırlanmasında kullanılan kimyasal maddeler.

Kimyasal madde	Firma
Formik Asit	Sigma-Aldrich (Interlab, Türkiye)
Dietilamin	Sigma-Aldrich (Interlab, Türkiye)
Metanol	Sigma-Aldrich (Interlab, Türkiye)
Asetonitril	Sigma-Aldrich (Interlab, Türkiye)
2-Propanol	Sigma-Aldrich (Interlab, Türkiye)
Etanol	Sigma-Aldrich (Interlab, Türkiye)
n-Hekzan	Sigma-Aldrich (Interlab, Türkiye)

2.1.5. Standart Madde Çözeltilerinin Hazırlanışı

Tez kapsamında çalışılan tüm standart maddeler aynı derişimde ve aynı şekilde hazırlanmıştır: Hassas analitik terazi ile tartım sonucu bütün maddelerin derişimi metanol ile çözölerek 1 mg mL⁻¹ olarak ayarlanmış, hazırlandıktan sonra tam olarak çözünmeyi sağlamak amacıyla 5-10 dk. ultrasonik banyoda bekletilmiştir ve daha sonra gerekli seyreltmeler yapılarak, 5 µL enjeksiyon hacmi ile sisteme verilmiştir.

2.1.6. Farmasötik Dozaj Şekli Çözeltilerinin Hazırlanışı

Terbutalin içeren tablet çözeltisinin hazırlanması için, 10 adet Bricanyl[®] tablet (5 mg/tablet) hassas olarak tartılarak (711,5 mg) havanda toz haline getirilmiştir. Homojen olan tozdan 5 mg terbutaline eş değeri olacak miktarda tartım yapılarak (71,15 mg) 25 mL'ye metanol ile balon joje içerisinde tamamlanmış ve tam olarak çözünmeyi sağlamak amacıyla ultrasonik banyoda 5-10 dk. bekletilmiştir. Daha sonra çözelti selölöz şırınga filtreden (0,45 µm) geçirilerek viallere aktarılıp analiz edilmiştir.

Klenbuterol içeren şurup çözeltisinin hazırlanması için, 330 mL'lik Ventipulmin[®] şurup dozaj şeklinden (25 µg mL⁻¹) 10 mL alınarak üzerine metanol ilave edilmiştir. Tam olarak çözünmeyi sağlamak amacıyla ultrasonik banyoda 5-10 dk. bekletilmiştir. Elde edilen berrak çözelti şırınga filtreden (0,45 µm) geçirilerek vialle aktarılıp analiz edilmiştir.

Ritodrin içeren ampul çözeltisinin hazırlanması için, 1 adet Pre-par[®] ampul dozaj şekli (50 mg 5 mL⁻¹) alınarak 5 mg 25 mL⁻¹ olacak şekilde balon joje içerisinde

metanol ile çözülmüştür. Tam olarak çözünmeyi sağlamak amacıyla ultrasonik banyoda 5-10 dk. bekletilmiştir. Şırınga filtreden (0,45 µm) geçirilen çözelti vialerle aktarılıp analiz edilmiştir.

2.1.7. Geri Kazanım Çalışmaları için Çözeltilerin Hazırlanışı

Dozaj şekilleri içerisindeki katkı maddelerinin etken madde analizinde girişim etkisinin olup olmadığını anlamak amacıyla çalışılan dozaj şekilleri üzerinde geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla dozaj şekline ait stok çözeltinin bilinen miktarı üzerine farklı oranlarda (% 25 - % 100) saf etken madde ilavesi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara ait verilerden dozaj şekline ait bulunan etken madde miktarı sonucu çıkartılarak, tartılan saf madde miktarının ne kadarının tayin edilebildiği yani ne kadarının geri kazanılabildiği hesaplanmıştır.

2.1.8. Hareketli Faz Çözeltilerinin Hazırlanışı

Görüntüleme çalışmalarında öncelikle % 100'ünü içerecek şekilde metanol, asetonitril, izopropanol ve etanolün kendi başına, % 0,1'ine karşılık gelecek şekilde formik asit ilavesiyle, % 0,1'ine karşılık gelecek şekilde dietil amin ilavesiyle ve % 0,1'ine karşılık gelecek şekilde formik asit ve % 0,1'ine karşılık gelecek şekilde dietil aminin eş zamanlı ilavesiyle oluşan hareketli faz kullanılarak sekiz adet etken maddenin altı farklı kiral sabit faz kullanılarak davranışı incelendi.

Normal faz sıvı kromatografik analizler kapsamında n-hekzan ve izopropanolün farklı oranlarda karışımları hareketli faz olarak hazırlanmıştır. Asidik bir ortam

yaratmak için hazırlanan miktarın % 0,1'ine karşılık gelecek şekilde formik asit ilave edilmiştir. Bazik bir ortam yaratmak için hazırlanan miktarın % 0,1'ine karşılık gelecek şekilde dietil amin ilave edilmiştir. Nötr bir ortam için ise hazırlanan miktarın % 0,1'ine karşılık gelecek şekilde formik asit ve % 0,1'ine karşılık gelecek şekilde dietilamin birlikte eklenmiştir.

Çalışmanın diğer ayağında ise metanol ve asetoniitrili ayrı ayrı içeren hareketli fazlar üzerine belirli oranlarda su ilave edilerek, ayrımlarda suyun etkisi araştırılmıştır.

2.1.9. Fraksiyonların Toplanması

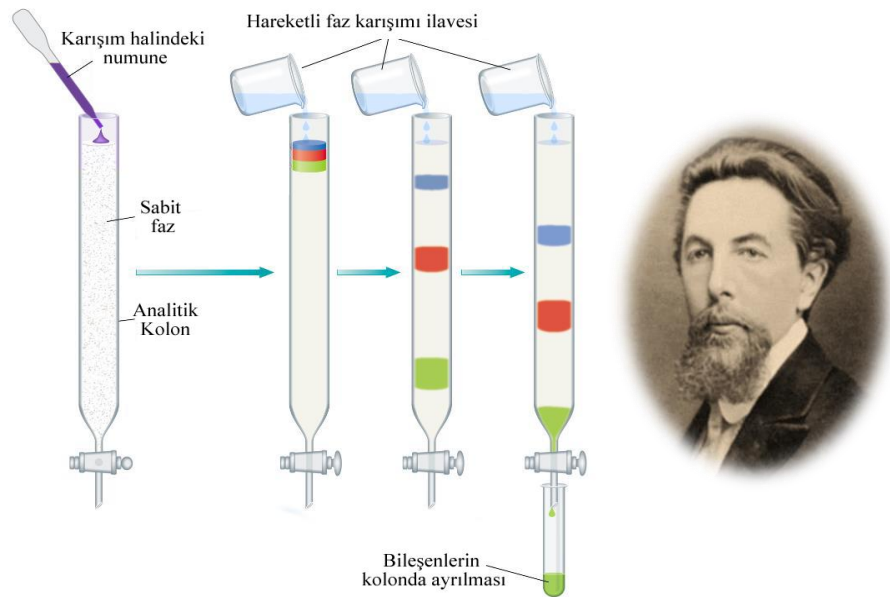
En iyi ayrımın gerçekleştiği kolon ve şartlarda her bir enantiyomer mikropreparatif olarak fraksiyonlarına ayrılarak saf halde elde edilmiştir. Fraksiyonlama işlemi normal faz koşullarında 1 - 2 mL dk⁻¹ akış hızı kullanılarak elde edilmiştir. Elde edilen fraksiyonlar belirlenen oranlarda karıştırılarak analizler tekrar yapılmak suretiyle enantiyomerik alıkonma sıraları belirlenmiştir.

2.2. Yöntem

2.2.1. Kromatografi

Fiziksel ve kimyasal özellikleri bakımından benzeyen maddelerin, karışımların, birbirinden ve bulundukları ortamdan ayrılmasını, tanınmasını ve miktarının tayin edilmesini sağlayan, içerisinde farklı teknikleri barındıran yöntemlerin genel adıdır (Skoog ve ark., 1998). Günümüzde, gelişmiş teknoloji sayesinde yüzden fazla maddeyi içeren bir karışımı oluşturan türlerin ayrı ayrı belirlenmesi (nitel analiz) ve karışımı oluşturan bileşenlerin miktar tayini (nicel analiz) işlemlerini hayata geçiren ve en çok kullanılan aletli analiz yöntemlerinden olmuştur.

Kromatografi terimi ve tekniği ilk olarak bir botanikçi olan Mikhail Tswett tarafından 1900'lü yılların başında kullanılmıştır (Şekil 2.1). Sıvı-katı adsorbsiyon kromatografisi diye nitelendirilecek olan basit bir sistem kullanarak bitki ekstraktlarında kullanılan klorofilleri ve ksantofilleri diğer pigmentlerden ayırmıştır.



Şekil 2.1. Kromatografik ayırmanın temeli ve Mikhail Tswett

Bütün kromatografik ayırmalarda örnek, gaz, sıvı veya süper kritik bir akışkan olan hareketli faz ile sistemde taşınır. Hareketli faz katı bir yüzeyde ya da kolonda sabitleştirilmiş hareketli faz ile karışmayan bir sabit faz içerisinde geçirilir. Bu iki fazın seçimi, örnek bileşenlerinin hareketli ve sabit fazlarda farklı oranlarda dağılmasını hedefler. Örnek içerisindeki bileşenler ile sabit faz arasında bazı fiziksel ve kimyasal etkileşimler olur. Örneğin kolon boyunca hareket etmesi sabit faz ve hareketli faz arasındaki kimyasal ve fiziksel dengelerin dağılımına bağlıdır. Bunlar çözünürlük, elektron çifti alıcı-verici etkileşimler, iyonik etkileşimler ve hidrojen bağı oluşumu gibi olaylardır (Hamilton ve Sewel, 1982; Bidlingmeyer, 1992 ve Gümüştaz, 2009)

Ayrıca en iyi koşulların sağlanabilmesi için, sabit faz yapısı, hareketli faz bileşimi ile pH'si ve sıcaklığın dağılıma etkisi ayarlanabilir.

Hollandalı kimya mühendisi Van Deemter kendi adını taşıyan ve kromatografik kolondaki ayırma olaylarını matematiksel olarak tanımlayan bir eşitlik bulmuştur (Bidlingmeyer, 1992 ve Fanali ve ark., 2013).

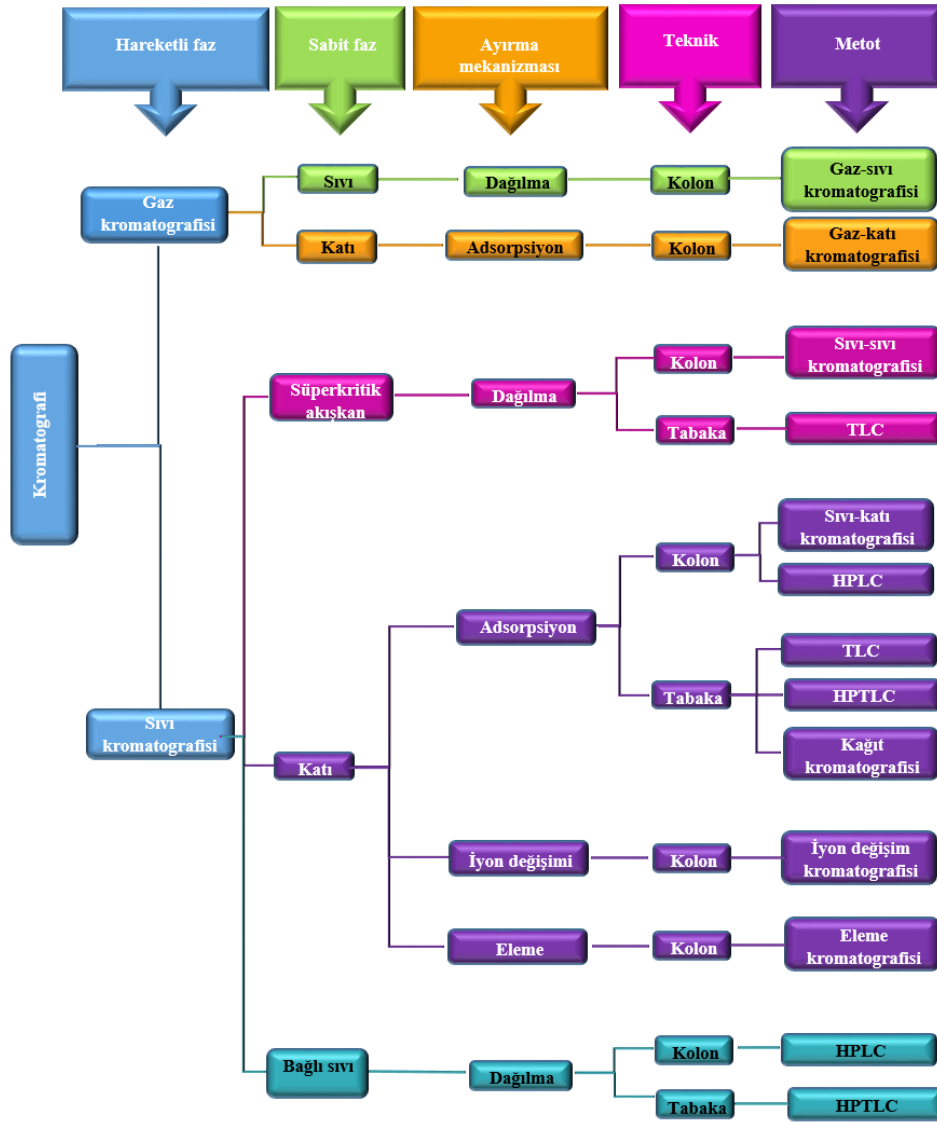
$$H=A+B/u+C_u \quad (\text{Eşitlik 2.1})$$

Eşitlik 2.1'de;

- H: Tabaka yüksekliği (cm)
- A: Çoklu akış yolları ve Eddy difüzyon
- B: Boyuna difüzyon
- C: Fazlar arasındaki kütle aktarımı,
- u: Çizgisel hızı ifade etmektedir.

Karışımda bulunan maddelerin kolon boyunca ayrılması ve hareketli faz akış hızıyla kolondan geçmesi Şekil 2.1'de gösterilmiştir.

Temel olarak kromatografik sistem iki ana grupta toplanır; hareketli fazın gaz ya da sıvı olmasına bağlı olarak sıvı/süper kritik akışkan ve gaz kromatografisi adını alır. Kromatografik yöntemler hareketli fazın gaz ya da sıvı olmasına, sabit fazın katı ya da sıvı olmasına, kromatografik ayırmanın mekanizmasına ve ayırma tekniğine göre isimlendirilirler (Adamovics, 1997; Tswett, 1903; Tswett, 1910; Dong, 2006; Dyson, 1998; Kromidas, 2008; Moldoveanu ve David., 2002; Snyder ve ark., 1997; Heftmann, 2004; Miller, 2009; Poole, 2002 ve Robards ve ark., 1995) (Şekil 2.2).



YBSK: Yüksek başarılı sıvı kromatografisi, TLC: İnce tabaka kromatografisi, HPTLC: Yüksek basınçlı ince tabaka kromatografisi

Şekil 2.2. Kromatografik sistemin sınıflandırılması (Sewell ve ark., 1987).

2.2.1.1. Dağılma(Partisyon) Kromatografisi

En yaygın kullanılan sıvı kromatografi yöntemidir ve sıvı-sıvı kromatografisi olarak da bilinir. Bu yöntemin temelinde birbirini ile karışmayan iki sıvı faz arasında maddelerin dağılması ilkesi yatar. Çoğu ilaç aktif madde, amino asitler, aflatoksinler, pestisitler, lipitler, steroidler, karbonhidratlar, vb gibi geniş bir uygulama alanına sahiptir.

Sabit faz katı yüzey üzerinde kolon dolgu maddesi üzerine kaplanarak tutturulmuş ince bir sıvı film tabakasıyken, diğer sıvı hareketli fazdır. Karışımdaki maddelerin sabit faz içerisinde kısmen çözünmesi gerçekleşir (solvofofik etki). Burada maddelerin sabit fazdaki çözünürlükleri fazla, hareketli faz içerisindeki çözünürlükleri ise az olmalıdır. Yoksa maddelerin ayrımı gerçekleşmez ve hareketli faz ile birlikte atılırlar.

Sabit faz ile hareketli faz farklı polariteye sahip olduklarında örnek molekülleri de farklı çözünürlüklere sahip olabilmektedirler. Bu iki fazın polarite farklılığına göre dağılma kromatografisi iki kısımda incelenebilir; bunlar ters-faz sıvı kromatografisi ve normal-faz sıvı kromatografisidir (Hamilton ve Sewel, 1982; Bidlingmeyer, 1992, Gümüştaş, 2009, Fanali ve ark., 2013).

2.2.1.1.1. Ters-Faz Sıvı Kromatografisi

Ters-faz sıvı kromatografisinde sabit faz apolar hareketli faz ise nispeten polar bir çözücüdür. Sıklıkla kullanılan kimyasal olarak bağlanmış fonksiyonel grup taşıyan

sabit fazlar çizelge 2.5’de verilmiştir. İlaç analizlerinde en sık tercih edileni ise oktadesil kolon dolgu maddeleridir.

Çizelge 2.5. En sık kullanılan kolon dolgu materyalleri

Materyal	Kimyasal Adı	Kısaltması
Oktil	Si-(CH ₂) ₇ -CH ₃	C ₈
Oktadesil	Si-(CH ₂) ₁₇ -CH ₃	C ₁₈
Fenil	Si-(CH ₂) ₃ -C ₆ H ₅	C ₆ H ₅
Siyanopropil	Si-(CH ₂) ₃ -CN	CN
Aminopropil	Si-(CH ₂) ₃ -NH ₂	NH ₂
Diol	Si-(CH ₂) ₃ -OCH(OH)-CH ₂ -OH	-
Pentafloro fenil	Si-(CH ₂) ₃ -C ₆ F ₅	PFP

Ters-faz sıvı kromatografisinde tampon çözeltilerin önemi de büyüktür. Hareketli faz bileşeni olan tampon çözeltilerini hazırlarken kullanılacak suyun oldukça saf olması gerekir. Bu yüzden çift distile edilmiş su kullanılmalıdır. Diğer önemli hareketli faz bileşenleri ise, suyla karışabilen organik (Metanol, su, asetonitril) çözücülerdir. Hareketli faz hazırlanırken kullanılan bazı organik çözücüler ile fiziksel parametreleri Çizelge 2.6. ‘da verilmiştir.

Ters-faz sıvı kromatografisinde polar özellikteki bileşikler kolonda tutunamadığı için genellikle apolar maddelerin ayrımı gerçekleştirilir. Uzun zincirli sabit fazlar (C₁₈) daha apolar maddelerin, kısa zincirli sabit fazlar (C₈, C₆, C₄) ise polar maddelerin ayrılmasında kullanılır. Buna göre polar maddeler uzun alkil zincirli sabit fazlarda daha az tutunurken, apolar maddelerde kısa zincirli sabit fazlarda daha az tutunurlar (Hamilton ve Sewel, 1982; Sewel ve ark., 1987; Bidlingmeyer, 1992; Meyer, 1988; Fanali ve ark., 2013 ve Gümüştas, 2009).

Çizelge 2.6. Sıklıkla Kullanılan Çözücülerin Bazı Fiziksel Özellikleri

Çözücü	KI	UV Gözlenebilme (nm)	Viskozite (cP)	KN (°C)	P'
n-Hekzan	1.375	210	-	68.7	0
Diklorometan	1.424	245	0.44	41	3.4
Tetrahidrofuran	1.408	222	0.55	65	4.2
Asetonitril	1.344	210	0.37	80.1	6.2
İzopropanol	1.38	210	2.30	82.4	4.3
Etanol	1.361	210	1.20	78.5	5.2
Metanol	1.329	210	0.60	65	6.6
Etilen glikol	1.427	210	19.90	198	5.4
Asetik asit	1.372	251	1.26	118.5	6.2
Su	1.333	<190	1.00	100	9.0

KI: Kırılma indeksi; UV gözlenebilme: Bu dalga boyunun altında çözücü kullanılamaz; KN: Kaynama noktası; P': Polarite indeksi, Rohrschneider's verileriyle hesaplanan.

2.2.1.1.2. Normal-Faz Sıvı Kromatografisi

Normal-faz sıvı kromatografisinde hareketli faz polaritesi sabit faz polaritesinden daha düşüktür. Polar sabit fazlar kullanılır. Hareketli faz içerisinde genelde metilen klorür, dietil eter, kloroform veya hekzan bulunmaktadır. En çok kullanılan sabit fazlar ise; silika ve alüminadır. En düşük polaritedeki bileşenler hareketli fazda çok çözündükleri için en önce sürüklenirler, hareketli fazın polaritesi arttıkça, sürüklenme zamanı azalır. Vitaminle, lipid, pestisit ve amin analizlerine uygulanabilmektedir. Ters ve normal-faz sıvı kromatografi tekniklerinin temel farkları Çizelge 2.7'de verilmiştir (Hamilton ve Sewel, 1982; Sewel ve ark., 1987; Bidlingmeyer, 1992; Meyer, 1988 ve Skoog ve ark., 1998).

Çizelge 2.7. Ters ve Normal-faz sıvı kromatografi tekniklerinin karşılaştırılması

İncelenen Özellik	Ters Faz	Normal Faz
Sabit faz polaritesi	Düşük	Yüksek
Hareketli faz polaritesi	Ortadan yükseğe	Düşükten ortaya
Kolonu terk etme sırası	En polar önce	En az polar önce
Hareketli fazın polarite artış etkisi	Elüsyon zamanını artırır	Elüsyon zamanını azaltır

İlaç etken maddeleri genellikle apolar yapıda oldukları için çoğunlukla ters-faz sıvı kromatografisi tercih edilmektedir. Ters-fazın diğer avantajları arasında, hareketli faz olarak kullanılan çözücülerin ucuz olması, sulu tampon çözeltilerin oranının yüksek tutulması böylece çevreye daha az zarar vermesi, uygulamanın daha kolay olması gibi sebepler de sıralanabilir.

YBSK bütün kromatografik hatta analitik ayırma teknikleri arasında en yaygın kullanılanıdır. Yöntemin bu kadar yaygın olmasının sebepleri arasında uçucu olmayan türlerin veya sıcaklık ile kolaylıkla bozulabilecek bileşiklerin ayrılmasına uygun olması, duyarlılığı, miktar tayinleri için kullanılabilir olması ve birçok bilim dalında (Biyokimya, Farmasötik Teknoloji, Botanik, Toksikoloji vs.) ve sanayide geniş bir şekilde uygulanabilirliğidir.

2.2.2. Yüksek Başarımli Sıvı Kromatografisi (YBSK)

Kromatografi, bir karışımda bulunan bileşenlerin birbirinden ayrılmasını gerçekleştiren ve bu sayede kalitatif ve kantitatif analizlerinin yapıldığı yöntemlerin genel adıdır. Temel olarak iki bileşenden oluşur. Bunlar, sabit faz ve hareketli fazdır. Hareketli fazın içerisinde yer alan bileşenler, sabit faza ait dolgu maddesiyle etkileşimleri sebebiyle, bir miktar tutulurlar. Bu tutulma, örnekteki farklı bileşenler için farklı miktarlarda olur. Böylece bileşenler sabit fazda farklı hızlarda ilerledikleri için, birbirinden ayrılmış biçimde sabit fazı farklı sürelerde terk ederler. Bu şekilde sabit fazdan çıkan bileşenler uygun bir dedektör yardımıyla ölçülerek konsantrasyonları orantısında zamana karşı y-ekseninde işaretlenerek kromatogram denilen grafikler elde edilir. Çıkan her bir bileşene ait sinyale de pik adı verilmektedir.

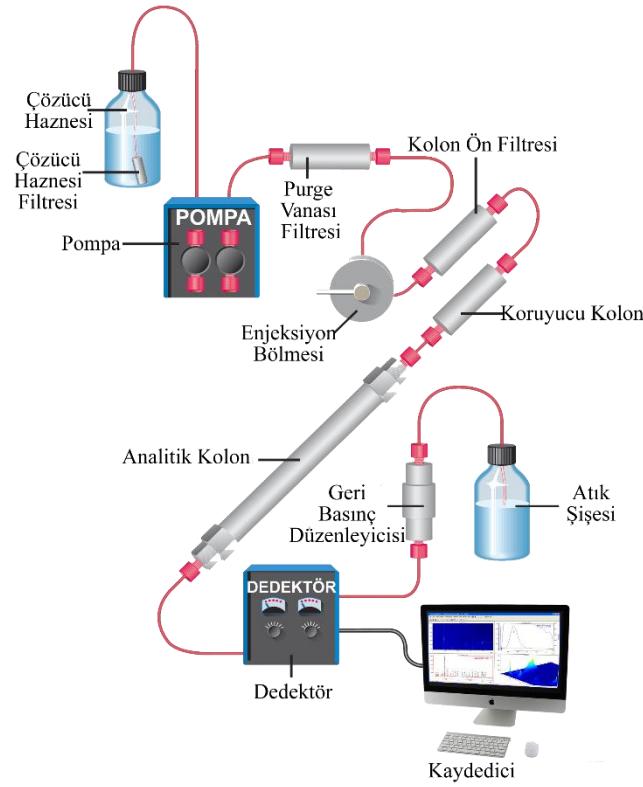
YBSK'nin diğer kromatografi türlerine göre birçok avantajı vardır:

- ✓ Öncelikle YBSK kolonu, yenileme işlemi gerekmeden birçok kez kullanılabilir.
- ✓ Tekrarlanabilirlik diğer yöntemlere göre daha yüksektir.
- ✓ Sadece nitel değil nicel analiz için de kullanılabilir.
- ✓ Yeni nesil kolon dolgu materyalleri ve cihazlar sayesinde analiz süresi birçok yönteme göre daha kısadır.
- ✓ Dedektör çeşitliliği sayesinde çok düşük miktardaki numuneleri bile hassas ve doğru olarak tayin etmemize olanak sağlar.
- ✓ Diğer kromatografi tekniklerine göre kullanıcının becerisine de daha az bağımlıdır.

Bir YBSK cihazı temel olarak 5 ana parçadan oluşmaktadır (Şekil 2.3.).

- ✓ Çözücü bölmesi
- ✓ Pompa
- ✓ Örnekleyici
- ✓ Kolon
- ✓ Dedektör

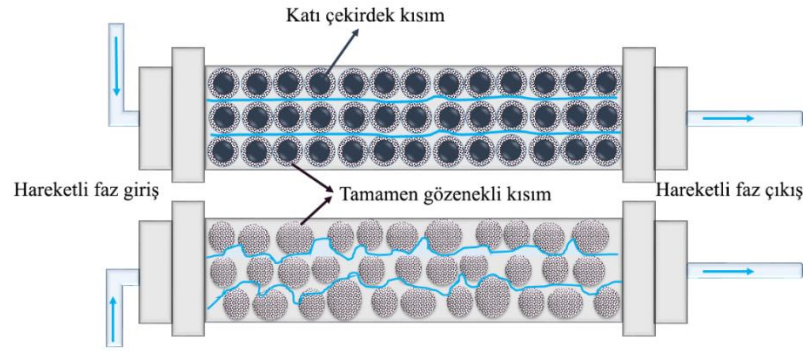
Yukarıda belirtilen bu parçalardan en önemli iki tanesi kolon ve detektörlerdir. Kolon, YBSK sisteminin kalbi olarak nitelendirilebilir genellikle paslanmaz çelikten imal edilir ve maddelerin ayrılmasının sağlandığı yerdir. Bu yüzden YBSK'de kolon dolgusu olarak kullanılan destek materyallerinin genel fiziksel ve kimyasal karakteristiklerini anlamak önemlidir. Kolon dolgu maddeleri genellikle silika ve alümina esastır ve fiziksel olarak incelendiğinde gözenekli (poröz), küresel (spherical), düzensiz (irregular), peliküler (pellicular) ve mikro çeşitlerinin olduğu görülmektedir. Geleneksel YBSK sistemlerinde çapları 2.5-10 µm arasında olan gözenekli parçacıkları içeren kolonların kullanıldığı bilinmektedir. Tipik bir YBSK kolonu Şekil 2.4'te görülmektedir.



Şekil 2.3. Yüksek başarımlı sıvı kromatografisi cihazının şematik görünüşü

Çizelge 2.8’de YBSK’nin keşfinden bugüne kadar geçen süre zarfında piyasa sürülen ve gelişme kaydedilen kolon ve kolon dolgu maddeleri listelenmiştir (Fanali ve ark., 2013). Çizelgeden de görüldüğü gibi YBSK performansını daha da arttırmak üzere bilim insanları sürekli bir araştırma ve geliştirmenin içerisindeyler. Bu araştırmalar ışığında sıvı kromatografisinin etkinliğini artırmak için kolon dolgu parçacıkların boyutları öncelikle giderek küçültülmüştür. Daha küçük parçacıkların kullanılması daha güzel ve çevreci analizlerin önünü açmıştır. Küçük parçacıkların yol açtığı en ciddi sorun cihazlarda oluşan yüksek basınçtır. Bu basınçlara dayanabilecek cihazların üretilmesi ile bu problemin de üstesinden gelindi. Ultra başarımlı sıvı kromatografisi (UBSK) olarak adlandırılan bu sistemler 15000 psi basınca dayanacak şekilde tasarlanmıştır. Bu cihazlar her ne kadar verimi arttırıp daha az miktarda çözücü sarfiyatına sebep olsa da yüksek maliyetler ile satışa sunulmuştur (Zalewski ve ark., 2014; Gumustas ve ark., 2013; Gumustas ve ark., 2014a; Gumustas ve ark., 2014b; Karadas-Bakirhan ve ark., 2015 ve Gumustas ve ark., 2015). Laboratuvarlarda yıllardır bulunan geleneksel YBSK sistemlerinin daha ekonomik oluşu ve her laboratuvarın bu

yeni teknolojiye yükselmek için imkanının olmayışı kolon parçacıklarının geliştirilmesine ve geleneksel olarak kullanılan tamamen gözenekli parçacıklara bir alternatif olarak katı çekirdek içeren gözenekli parçacıkların (core-shell) keşfine yol açmıştır. Core-shell kelimesine literatürde ilk kez 1960'lı yıllarda rastlanmaktadır (Lu ve ark., 2009; Lee ve ark., 2009; Guitton ve ark., 2009; Neue, 1997; Pasch ve Trathnigg, 1999; Iler, 1979; Unger, 1979; Song ve ark., 2009 ve Wilson ve ark., 2002) 1969 yılında Kirkland'ın ilk olarak "fused-core" terimini kullandığı görülmektedir. Bu parçacıkların asıl amacı difüzyon yolunu azaltarak kütle transferini en aza indirmektir. Şekil 2.4'te katı çekirdek içeren partiküllü kolonların ve tamamen gözenekli partiküllü kolonların farkı gösterilmektedir. Şekilde belirtilen düzenli hareketli faz akışı daha keskin pik şekillerine sebep olmakla birlikte daha etkin analizlere de olanak sağlamaktadır.



Şekil 2.4. YBSK kolonu, Katı çekirdek parçacık içeren kolonda akış (üst), tamamen gözenekli parçacıklardan oluşmuş kolonda akış (alt)

Çizelge 2.8. Piyasaya sürülmüş kolonlar ile ilgili önemli gelişmeler

Yıl ^a	Kolon	Açıklama	Firma
1967	Pellosil	Peliküler iyon değişim (40 µm)	Northgate
1969	Zipax	Gözenekli silika (40 µm)	DuPont
1971	MicroPak	Düzensiz gözenekli silika (5-10 µm)	Varian
1972	Zorbax	Küresel gözenekli silika (7 µm)	DuPont
1972	Permaphase	Silan fazı (7 µm)	DuPont
1973	µ Bondapak C18	Silan fazı (10 µm)	Waters
1978	SynChropak GPC100	Jel geçirgenlik kolonu	SynChrom
1988	Rx-silica	B tipi silika	DuPont
1989	StableBond	Kararlı bağlı faz	DuPont
1994	Hypcarb	Gözenekli grafit karbon	Hypersil
1996	ZirChrom PBD	Zirkonyum parçacıklar	Keystone ^b
2000	SilicaRod	Monolitik kolonlar	Merck
1999	XTerra	Hibrit parçacıklar (3-5 µm)	Waters
2003	Rapid Resolution	Gözenekli silika (1.8 µm)	Agilent
2004	Acquity	Gözenekli silika (1.7 µm)	Waters
2007	Halo	Katı çekirdek içeren partiküller (2.7 µm)	AMT ^c

^aTanıtm yılı, ^b Zirchrom tarafından üretilip, Keystone Scientific tarafından pazarlanmaktadır, ^cAdvanced Materials Technology.

Sıvı kromatografisinde kolon verimliliği, bir bileşiğin kolondan geçişi sırasında meydana gelen bant genişliğinin derecesi tarafından etkilenir. Bant genişlemesi ve dolayısıyla kolon verimliliğinin kaybı, çözünen bileşenlerin kolondan aşağıya göçleri sırasında yer alan çok sayıda kütle-aktarım işlemlerinin sonucudur. Bu hızları etkileyen bazı değişkenler kontrol edilebilir ve ayırmalar için kullanılabilir. Bu değişkenlerin en önemlileri Çizelge 2.9’da verilmektedir.

Çizelge 2.9. Kolon Verimliliğine Etkiyen Değişkenler

Değişken	Sembol	Genel Birim
Hareketli fazın doğrusal hızı	u	cm s ⁻¹
Hareketli fazda difüzyon katsayısı*	DM	cm ² s ⁻¹
Durgun fazda difüzyon katsayısı	DS	cm ² s ⁻¹
Kapasite faktörü	k	birimsiz
Dolgu parçacık çapı	dp	cm
Durgun fazda sıvı kaplamanın kalınlığı	df	cm

*Sıcaklık artışıyla ve viskozitenin azalmasıyla değişir.

Kolondan çıkan maddelerin derişimi kolon çıkışına yerleştirilen uygun bir dedektör ile ölçülür. Dedektörün işlevi numune derişimi ile orantılı elektriksel bir sinyal üretmektir ve bu sinyal derişimdeki artışla doğrusal olarak artmalıdır. Dedektör seçimi doğru ve hassas bir analiz yapabilmek için son derece önemlidir (Skoog ve ark., 1998; Hamilton ve Sewel, 1982; Bidlingmeyer, 1992; Sewel ve ark., 1987; Meyer, 1988 ve Scott, 1995). İdeal bir dedektör duyarlı olmalı, numuneye zarar vermemeli, karalı ve tekrarlanabilir sonuçlar vermelidir. Dedektör seçiminde hareketli faz ve kromatografik sınırlamalar değerlendirilerek duyarlılık ve seçiciliğe göre karar verilmesi gerekmektedir.

YBSK’de en çok kullanılan dedektör tipleri şunlardır:

1. Morötesi/Görünür bölge (UV/GB)
2. Kırılma indisi (Refraktif indeks, KI)
3. Floresans
4. Elektrokimyasal (EK)
 - a. Amperometrik Dedektörler

- b. Kulometrik (Yük ölçümü) Dedektörler
- c. İletkenlik (Kondüktometrik) Dedektörleri
- 5. Radyoaktivite
- 6. Işık saçılması
 - a. Çoklu Açılı Lazer Işık Saçılımı [Multi angle laser light scattering (MALLS)]
 - b. Buharlaştırılmalı Işık Saçılımı [Evaporative light scattering (ELSD)]
- 7. Kütle Spektrometri (KS)

Bu dedektör çeşitleri arasından ilaç analizlerinde en yaygın olarak kullanılan morötesi/görünür bölge absorpsiyonuna dayanan UV/GB dedektörler veya FDD dedektörlerdir.

FDD dedektörde ışın kaynağı olarak tungsten ve döteryum lambasının kaynak olduğu polikromatik ışın kullanılır. Işık kaynağından gönderilen polikromatik ışınlar akış hücresine gelir, bunlar optik ağ üzerinde dağılır ve çok sayıda diyottan oluşan foto diyot dizisi üzerine düşer.

FDD 190-950 nm dalga boyu aralığını 0,1 s aralıklarla tespit edebilmektedir. FDD ile birden fazla dalga boyunda analiz yapılabilmektedir. Cihaz üzerindeki yazılımlar sayesinde piklerin saflığına ve girişim yapıp yapmadığına bakılabilir FDD'nin UV/GB dedektöre göre en önemli üstünlüğü, piklerin bütün dalga boylarında ölçümleri aynı anda yapılabilmektedir ve en yüksek absorbans yapılan dalga boyları tek bir enjeksiyon ile saptanabilir.

2.2.3. Kiral Bileşen Analizlerinde YBSK'nin Rolü

Bilim insanlarının kiral bileşiklerin enantiyomerlerin ayrılmasına olan ilgisi ilk olarak preparatif amaçlarla ortaya çıkmıştır. Bu konu ile ilgili yapılan ilk fakat başarısızlıkla sonuçlanan çalışmalar Alman kimyager Willstatter tarafından rapor edilmiştir (Willstatter, 1904). Daha sonraki dönemlerde doğal kiral bileşiklerden elde edilen kiral seçiciler kullanılarak daha başarılı enantiyomer zenginleştirme yöntemleri denenmiştir (Henderson ve Rule, 1939; Prelog ve Wieland 1944). 1960'ların sonu 1970'lerin başlarındaysa Davankov ve Rogozhin amino asit enantiyomerlerinin ayrımı için ligand değişim kromatografisi metodu geliştirmiştir (Davankov ve Rogozhin, 1971).

1970'li yılların ortalarında Blaschke sentetik kiral poliakrilamitleri kiral sabit faz olarak kullanarak ilaçların enantiyomerlerini başarıyla ayırdığını rapor etmiştir. Bu ilaç etken maddeleri içerisinde hipnotik ilaç etken maddelerden olan glutetimit ve hexobarbital, diüretik olan klortalidon ve bazı kiral diazepinonlar bulunmaktadır. Bu maddeler içerisinde en iyi ayırım, eskiden sedatif olarak kullanılan talidomit ilaç etken maddesinin analizinde elde edilmiştir. Bu çalışma aynı zamanda her bir enantiyomerin ayrı ayrı farmakolojik ve toksik özelliklerinin incelendiği ilk çalışma olarak literatürde yerini almıştır (Blaschke, 1980). Aynı grup selüloz türevi kiral sabit fazların preparatif düzeydeki potansiyellerini yaptıkları çalışmalarla ortaya koymuşlardır. 1980'li yılların başlarında Pirkle ve arkadaşları dünya çapında kullanıma sahip sentetik fırça tipi (brush-type) kiral sabit fazları geliştirip YBSK yönteminde enantiyomerlerin ayrımı için kullanmışlardır (Pirkle ve ark., 1981). Kullanılan bu materyallerden birisi piyasaya sürülen ve pazarlanan ilk KSF olma özelliği de taşımaktadır. Çizelge 2.10'da sıvı kromatografisinde kullanılan ve piyasada mevcut KSF'lere ait ana gruplar görülmektedir. Bu grupların çoğu 1980 ve 1990 yılları arasında geliştirilmiş olup sıvı kromatografik analizlerde kiral bileşenlerin ayırımında analitik ve preparatif amaçlı kullanılmaktadır. KSF'ler protein temelli olabildikleri gibi (Allenmark ve ark., 1983), polisakkaritlerden (Okamoto ve ark., 1984), kiral sentetik polimerlerden (Blaschke ve

ark., 1986), siklodekstrinlerden (Hinze ve ark., 1985), makrosiklik antibiyotiklerden (Armstrong ve ark., 1994) ve kiral iyon değiştiricilerden (Maier ve Lindner., 2006 ve Lammerhofer, 2010) oluşturulabilirler. Yeni materyallerin ve bunları geliştirecek yeni teknolojilerle birlikte yeni enştrümanların gelişmesiyle, enantiyomerlerin preparatif ve analitik ölçekli ayrımı konusu akademik olarak ve pazarlanabilirlik ačíısından çekici bir konu olmaya devam etmektedir.

2.2.3.1. Enantiyomerlerin Sıvı Kromatografi ile Ayrılmasında Kullanılan Malzemeler

Sıvı kromatografik yöntemle enantiyoayrım uygulamalarında da KSF ile kaplanmış kiral kolonlar bu sistemin kalbi niteliğindedir. KSF, bir kiral seçici ile onunla etkileşmeyen bir taşıyıcıdan oluşmalıdır. Bu noktadaki her bileşen ayrım başarısına eşit olarak etki etmektedir. Literatür incelendiğinde yüzlerce kiral bileşiğin kiral seçici olarak kullanıldığı görölmektedir. Bunlardan en çok kullanımı olanlara kısaca değinilip tez kapsamında kullanılan polisakkarit temelli olanlar detaylı olarak anlatılacaktır. Temel olarak, herhangi bir kiral bileşiğin kovalent olmayan şekilde kiral bileşiklere etkileşim halinde bulunması, o bileşiğin sıvı kromatografide potansiyel bir kiral seçici olarak kullanılması için yeterlidir. Çizlege 2.10'da piyasada bulunan temel KSF'ler sınıflandırılmış ve uygunlukları yönünden tablolanmıştır.

Çizelge 2.10. Piyasada bulunan KSF'ler ve kullanılışları

Kiral Sabit Faz	Kapsadığı bileşikler	Farklı ayırım teknikleri ile uyumluluk	Preparatif ölçekli uyumluluk
Ligand değişim	1	1	2
Fırça (Brush/Pirkle) tipi	2	2	2
Siklodekstrinler	2	2	2
Polisakkaritler	3	3	3
Makrosiklik antibiyotikler	2	3	2
Proteinler	2	1	0
Anyon değiştirici materyaller	2	2	2

3: Çok iyi, 2: iyi, 1: az kullanılışlı, 0: uygun değil

Polisakkarit temelli KSF'ler yaygın kullanımı ve birçok hareketli faz ve analitle uyumluluğu açısından en etkin KSF'lerdir. Sıvı kromatografisi için geliştirilmiş en gelişmeye açık polisakkarit temelli KSF'ler, fenil karbamatların içerisinde, elektron alan ve veren gruplar bulunanlar, kovalent olarak tutturulmuş polisakkaritler, siklofruktan temelli malzemelerdir (Chankvetadze, 2013a).

Piyasada bulunan KSF'leri üreten ve pazarlayan üç ana firma bulunmaktadır. Bunlardan Phenomenex ve Daicel silika üzerine kaplanmış ya da kovalent bağlı polisakkarit türevlerini ve iyon değiştiricileri üretirken, Supelco/Sigmada siklofruktan temelli KSF'leri pazarlamaktadır. Yeni nesil KSF'lerin diğerlerine göre en önemli avantajı birçok analitin ayrımını gerçekleştirmesi ve dünya genelinde yaygın olarak kullanılmasıdır. Bununla birlikte birçok hareketli fazla olan uyumu ve alternatif bir seçimlilik sunması açısından da ayrıca önem taşımaktadır. Pazarda bulunan neredeyse tüm kiral kolonlar tamamen poröz silika veya organik/inorganik malzemeler (Lammerhofer, 2010; Mohammad ve ark.,1993 ve Sinner, 2000) üzerinde hazırlanırlar. Ayrıca core-shell silika parçacıklar ve monolitik parçacıkların kullanıldığı KSF'ler de bulunmaktadır (Chankvetadze, 2010 ve Chankvetadze 2013a).

Bu parçacıklardan monolitik silikanın taşıyıcı olarak kullanıldığı KSF'ler ile çok hızlı analizler yapılabilir. Chankvetadze ve ark., yaptıkları bir çalışmada monolitik silika üzerine kaplanmış % 6.6 (a/a) sellüloz tris (3,5-dimetilfenilkarbamat) kullanarak 2,2,2-trifloro-1-(9-antril) etanolün enantiyomerlerinin analizini 30 saniye gibi kısa bir sürede tamamlamışlardır. Bu deneysel çalışmalarla ayrımın ne kadar kısa sürede tamamlandığı görülse de monolitik silikaların piyasaya sürülebilmesi için biraz daha zamana ihtiyaç vardır (Chankvetadze ve ark., 2003).

Bir diğer yeni nesil silika parçacık olan core-shell partiküller de analitik ölçekli YBSK uygulamalarında yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (Gritti ve ark., 2007). Core-shell silika parçacıkların en önemli avantajı, parçacığın çok kısa bir difüzyon

yolu olmasıdır. Kısa difüzyon yolu çok yüksek etkinlikte analizlerin yapılmasını sağlamaktadır. Ayrıca çok düşük kütle transferi değeri ile birlikte yüksek akış hızında analizler de yapılabilmektedir (Lomsadze ve ark., 2012). Core-shell parçacıklı kiral kolonların avantajları yanında bazı dezavantajları da vardır. Tamamen poröz geleneksel parçacıklara göre daha az yüzey alanına sahiptirler. Bu yüzden de kiral selektörler yüzeye yüksek miktarlarda tutturulamazlar. Yüzey alanının küçüklüğü daha fazla numune yüklemesine (enjeksiyonuna) de yol açacağı için bu partiküller preparatif ölçekli uygulamalarda kullanıma uygun değildir.

2.2.3.2. Polisakkarit Temelli Kiral Sabit Fazlar

Bu tür kiral sabit fazların YBSK uygulamasına ait ilk çalışma polisakkarit fenilkarbamatlar ile yapılmıştır. Bu çalışma kapsamında birçok farklı polisakkarit yapısı (selüloz, amiloz, kitosan, ksilan, dekstran) incelenmiştir (Okamoto ve ark., 1984). Çalışmanın sonucunda kiral bileşikler ayırma becerisi, saf halde kolay olarak bulunması ve uygulamadaki basitliği sebebiyle en kullanışlı polisakkaritlerin selüloz ve amiloz olduğu rapor edilmiştir. Bunun yanı sıra özellikle kitosan fenilkarbamatların bir grup kiral bileşik üzerinde çok iyi ayırım gerçekleştirdiği gözlemlenmiş, fakat piyasaya sürülememiştir. Selüloz ve amiloz türevleri ise piyasaya sürülerek, analitik ve preparatif amaçlı olarak yaygın bir kullanıma ulaşmıştır (Ikai ve Okamoto, 2009).

2.2.3.2.1. Polisakkarit Türevlerinin Çeşitleri

Polisakkarit türevleri arasında yoğun olarak esterler ve karbamatlar üzerine yapılan çalışmalar bulunmaktadır. Bu türevlerin her ikisi de YBSK için kiral seçici olabilmektedir. Alkil, sikloalkil ve aril türevleri hem ester hem de karbamat serilerinde

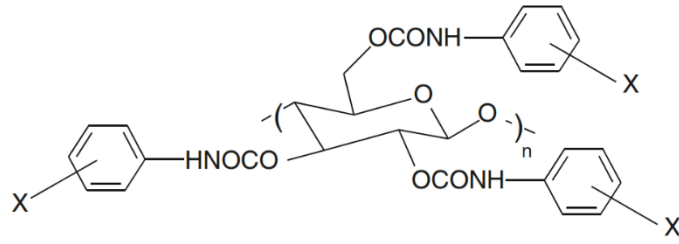
çalışılmıştır. Bunların içerisinde de aril türevlerinin en kullanışlı kiral seçiciler olduğu raporlanmıştır. Bunun yanı sıra polisakkaritlerin bazı alkil esterleri de geliştirilerek piyasaya sunulmuştur. Fakat bu materyallerin kullanıldığı kolonlar geniş bir yelpazeye hitap etmediği için yakında piyasadan kaldırılması öngörülmektedir. Selüloz türevi bazı sikloalkil fenilkarbamatlar ile ilginç kiral saptamalar yapılmıştır. Ayrıca çok düşük bir UV absorbansına sahip olması sebebiyle de ince tabaka kromatografisi kullanıcılarına hitap etmektedir (Ikai ve Okamoto, 2009). Fenil karbonat ve benzoilformat türevi olan selüloz ve amiloz yapıları da sentezlenmiş, fakat ester ve fenilkarbamat türevlerine nazaran daha düşük bir kiral seçicilik sundukları için kullanılmamışlardır.

2.2.3.2.2. Fenile Bağlanan Fonksiyonel Grupların Polisakkarit Esterler ve Fenilkarbamatlara Etkileri

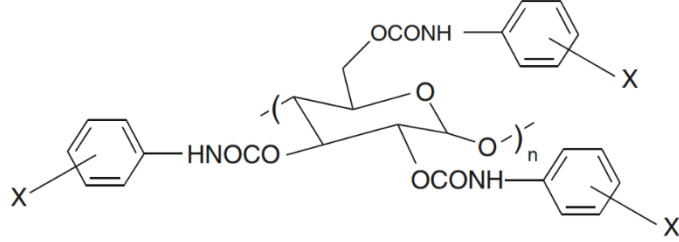
YBSK’da kullanılmak üzere geliştirilen polisakkarit temelli kiral seçicilerle ilgili çalışmalar uzun zamandır fenile bağlanan fonksiyonel gruplar ve bunların etkilerine yoğunlaşmıştır. Daha önce de belirtildiği gibi Okamoto ve arkadaşları polisakkaritlerin aromatik esterleri ve karbamatlarının kiral bileşiklerin ayırımındaki önemini yaptıkları çalışmalarla rapor etmişlerdir (Ikai ve Okamoto, 2009 ve Okamoto ve ark., 1984). Bu yapılardaki fenil gruplarına uygun pozisyonlarda bağlanan elektron alan veya elektron veren gruplar bağlandığında kiral seçici özelliklerinde kayda değer gelişmeler olduğu da görülmüştür (Okamoto ve ark., 1986 ve Okamoto ve ark., 1987a). Alkil grubu gibi elektron verici bir fonksiyonel gruba bağlanan benzoat türevlerinin kiral seçiciliğinin halojen veya triflorometil grubu gibi elektron alıcı bir gruba bağlanana göre daha iyi olduğu görülmüştür. Bu durum bağlanan fonksiyonel grupların selüloz türevlerindeki karbonil gruplarının elektron yoğunluğuna etkisi ile açıklanmaktadır. Elektron verici metoksi gruplarının kiral seçiciliği arttırıcı yönde bir etkisi olmadığı görülmekle beraber, araştırılan selüloz benzoatlar arasında 4-metilbenzoatın çok iyi bir kiral seçiciliği olduğu raporlanmıştır (Okamoto ve ark.,

1987b). Bu materyal silika yüzey üzerine kaplanarak analitik ve preparatif amaçlı olarak kullanılmak üzere Chiralcel TM ve Lux TM Cellulose 3 adı altında piyasaya sürülmüştür. Selüloz benzoatların aksine amiloz benzoatlar çok daha düşük bir kiral seçicilik sunmaktadır. Bu da amiloz türevlerinin konformasyonel stabilitelerinin çok düşük olması dolayısıyla çeşitli konformasyonel izomerlerine dönüşebilmeye açık oluşundan kaynaklanmaktadır. Yamamoto ve ark., tarafından yapılan çalışma ile selüloz 4-metilbenzoatın kiral seçiciliği silika yüzey üzerine kaplanırken, eklenen eklenti maddeleri ile kontrol altına alınabilir olduğunu göstermişlerdir. (Yamamoto ve ark., 2006).

Şekil 2.5'te selüloz ve amiloz karbamatlara ait kiral seçicilerin moleküler şekilleri özetlenmiştir. Selüloz fenilkarbamatların enantiyomer ayırma kapasitesi kayda değer bir şekilde fenile bağlı fonksiyonel gruplara bağlıdır (Okamoto ve ark., 1986). Okamoto ve grubunun yapmış olduğu çalışma sonucunda seçilen kiral bileşiklerin ayırım sonuçları değerlendirildiğinde halojenler gibi elektron verici veya alkil grupları gibi elektron alıcı bileşiklerin 4. pozisyonundan aromatik halkaya bağlanması ile birlikte elde edilen ayırım sonuçları, bir grubun bağlı olmadığı selüloz türevlerine oranla kat ve kat daha iyi bulunmuştur. Elektron alan gruplar fenil ile karşılaştığında, karbamat grubunun NH protonunun asitliği artar. Böylece elektron alıcı grup içeren çoğu analitin alıkonma süresi artar. Çünkü bu analitler NH grupları ile hidrojen bağı yaparak etkileşime girmek eğilimindedirler. Tam tersi olarak elektron veren gruplar fenile bağlandığında karbamat grubu üzerindeki karbonil oksijeninin elektron yoğunluğu artacaktır ve elektron vermeye yatkın gruplar bulunduran analitler bu tür selüloz türevleri ile çok kuvvetli bir etkileşime gireceklerdir.



Selüloz Karbamatlar



Amiloz Karbamatlar

a: 4-NO ₂	n: 4-CH ₃	z: 3-OCH(CH ₃) ₂
b: 4-CF ₃	o: 4-OPh	aa: 3,5-(OCH ₃) ₂
c: 4-I	p: 4-O-CH(CH ₃) ₂	ab: 3,5-(CH ₃) ₂
d: 4-Br	q: 4-OC ₂ H ₅	ac: 2,6-(OCH ₃) ₂
e: 4-Cl	r: 4-OCH ₃	ad: 3,4-(OCH ₃) ₂
f: 4-F	s: 2-Cl	ae: 3,5-Cl ₂
g: H	t: 2-CH ₃	af: 3,4-Cl ₂
i: 4-Ph	u: 2-OCH ₃	ag: 2,6-Cl ₂
j: 4-Si(CH ₃) ₃	v: 3-Cl	ah: 3,5-F ₂
k: 4-C(CH ₃) ₃	w: 3-CH ₃	ai: 3,5-(CF ₃) ₂
l: 4-CH(CH ₃) ₂	x: 3-OCH ₃	
m: 4-C ₂ H ₅	y: 3-OC ₂ H ₅	

Şekil 2.5. Amiloz ve selülozlara ait fenilkarbamat türelerinin moleküler şekli

Yapılan son çalışmalar göstermektedir ki, fenil grubuna bağlanan grupların yanı sıra bağlanmış oldukları kısımlar da polisakkarit fenilkarbamat türevlerinin enantiyomer ayırım gücünü ciddi bir biçimde etkilemektedir. *Meta* ve *para* pozisyonlarından bağlanmış gruplar *orto* pozisyonundan bağlanmış gruplara göre daha yüksek bir kiral ayırım gücü göstermektedir. Amiloz fenilkarbamatlar için, fenile bağlanmış metil ve klor gruplarının da kiral ayırımı arttırdığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Yamamoto ve ark., 2006). Bununla birlikte fonksiyonel grupların doğası ve bağlandığı bölgeler göz önüne alınırsa amiloz ve selüloz arasında bazı farklılıkların meydana geldiği görülmektedir. Her iki polisakkarit için en kullanışlı kiral seçicinin tris(3,5-dimetilfenilkarbamat) türevleri olduğu rapor edilmiştir. Selüloz tris(3,5-dimetilfenilkarbamat) silika üzerine kaplanarak ChiralcelTM OD, LuxTM

Cellulose 1, CelluCoat TM piyasa isimleri ile satışı sunulmuştur. Amiloz tris(3,5-dimetilfenilkarbamat) ise silika üzerine kaplanarak Chiralpak TM AD, Lux TM Amylose 1, AmyCoat TM isimleri ile piyasaya sunulmuştur. Selüloz ve amilozun fenilkarbamat türevlerinde glikoz birimleri ile komşu karbamat fonksiyonel grupları arasında molekül içi hidrojen bağ oluşumu görülmektedir. Bu yüzden fenile bağlı fonksiyonel gruplar kiral seçicilik ile birlikte polisakkarit türevlerinin farklı organik çözücüler içerisindeki çözünürlüğünü de etkilemektedir. Polisakkarit fenilkarbamatların YBSK analizlerinde kullanılmadan önce silika üzerine fiziksel olarak kaplanmaları için uygun bir çözücüde çözünmeleri gerekmektedir. Diğer taraftan YBSK analizlerinde kiral seçici olarak kullanılacak bir polisakkarit türevinin hareketli faz olarak seçilecek çözücülerde çözünmemesi gerekir. Örneğin selüloz tris(3,5-diklorofenilkarbamat)'in kiral seçiciliği bazı kiral bileşenler için selüloz tris(3,5-dimetilfenilkarbamat)'e oranla daha iyidir. Fakat bu kiral seçicinin n-hekzan/2-propanolün kullanıldığı normal faz YBSK koşullarındaki çözünme problemi (çözünerek silika üzerinden ayrılma) ortadan kaldırılana kadar KSF olarak kullanılamamıştır. Bu noktada karbamat fonksiyonel grubunun polisakkarit fenilkarbamatlarda iki işlevi olduğu söylenebilir:

- ✓ Çoğunlukla kiral analitlerle etkileşim sağlar
- ✓ Molekül içi hidrojen bağları yapması sebebiyle, aynı karbamat fonksiyonel grupları polisakkarit türevlerinin belirli organik çözücülerdeki çözünürlüğünü önemli derecede etkiler.

Yukarıda bahsedilen iki özellik YBSK yönteminde kullanılan KSF'ler için istenilen özelliklerdendir. Polisakkarit fenilkarbamatlar, serbest karbamat grupları ve molekül içi hidrojen bağ yapma karbamatlarla dengeli bir biçimde bulunduğu için en güvenilir kiral seçiciler arasında gösterilmektedir (Chankvetadze ve ark., 1993; Chankvetadze ve ark., 1994; Chankvetadze ve ark., 1995 ve Chankvetadze ve ark., 1997). Polisakkarit fenilkarbamatlar içerisindeki komşu karbamat grupları arasındaki hidrojen bağının varlığı fenilkarbamatlarda bulunan NH bölgesinin Kızılötesi (IR) spektrumu alınarak desteklenebilir. Bu tarz ölçümler fenil halkası üzerindeki elektron alan grupların molekül içi hidrojen bağının bozulmasını sağlarken, fenil halkası üzerindeki elektron veren grupların, karbamat fonksiyonel gruplarının molekül içi

hidrojen bağına dahil olduğunu desteklemektedir. Bu durum tris(3,5-diklorofenilkarbamat)'in n-hekzan/2-propanol içerisindeki yüksek çözünürlüğünü de açıklamaktadır.

Yukarıda bahsedilen açıklamalar doğrultusunda 1990'ların başında elektron alan ve veren grupların ikisini de bulunduran yeni bir seri selüloz ve amiloz fenilkarbamat geliştirilmiştir. Bu yeni seri için ön çalışmalar öncelikle selüloz türevleri üzerinde gerçekleştirilmiştir. Chankvetadze ve arkadaşları, FTIR kullanarak gerçekleştirdikleri çalışma sonucunda bu yeni seri selüloz türevinin kiral ayrımlar için çok daha kullanışlı olduğunu ortaya koymuştur (Chankvetadze ve ark., 1994). Denenen fonksiyonel gruplar arasında seçiciliği en iyi olan grubun 4-kloro-3-metil bağlı olan selüloz türevleri olduğu saptanmıştır. YBSK için kullanılmak üzere polisakkarit fenil karbamat türevi kiral seçiciler yeni seri amiloz türevleri için de Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) kullanarak test edilmiştir. FTIR sonuçları ve diğer analizler göstermektedir ki 5-kloro-2-metil bağlı fonksiyonel grup diğerlerine göre daha üstün ayırma yeteneğine sahiptir.

Yukarıda anlatılan fonksiyonel gruplarla türevlendirilmiş fenil karbamatlar piyasaya farklı isimlerle sürülmüştür. Bunlardan selüloz tris(3-kloro-4-metilfenilkarbamat), SepapakTM-2, LuxTM Cellulose-2 ve ChiralcelTM OZ isimleri ile piyasada mevcutken, selüloz tris(4-kloro-3-metilfenilkarbamat) da SepapakTM-4, LuxTM Cellulose-4 ve ChiralcelTM AY isimleri ile pazara sunulmuştur.

2.2.3.2.3. Kiral Sabit Fazın Optimizasyonu

Kiral sabit faz, kiral seçici ve bir inert taşıyıcı (silika, vs.) gibi iki ana bileşenin farklı yollarla bir araya gelmesiyle oluşmaktadır. Bir taşıyıcıya kiral seçicinin

bağlanmasına ait ilk yöntem polisakkarit türevini bir taşıyıcının yüzeyine (genellikle poröz bir silika) kaplamakla başlamıştır. Bu tekniğin en belirgin avantajı kiral seçici ve taşıyıcı arasında kovalent bir bağ gerekmediği için polisakkaritin tris türevinin kullanılabilir olmasıdır. Buna ek olarak kaplama yöntemi daha kolay bir yöntem olup, kiral sabit faz içerisindeki kiral selektör içeriği ayarlanabilmekte ve taşıyıcı yüzeyinin veya polisakkarit türevinin ön aktifleştirme gibi bir yöntem ihtiyacı duymamaktadır. Kaplama yöntemiyle ilgili karşılaşılan en önemli problem ise, bu şekilde oluşturulmuş KSF'lerin çözücülere karşı çok sınırlı bir stabiliteye sahip olmasıdır. Bu yüzden uzun yıllardır bilim insanları, polisakkarit türevlerini silika yüzeyine performans kaybı olmaksızın kovalent şekilde bağlamanın yolları üzerine araştırmalar yapmaktadır. 1987 yılında Okamoto ve arkadaşları polisakkarit türevlerini silika yüzeyine kovalent olarak bağlayarak bu alandaki ilk çalışmaya imza atmışlardır (Okamoto ve ark., 1987b). Bu çalışmada az sayıda türevlendirilmemiş hidroksil grupları bağlı selüloz türevi bir KSF 3-aminopropil ile fonksiyonlandırılmış, silika jelle diizosiyanat çapraz bağlayıcısıyla bağlanmıştır. Bu bağlanmada beklenen durum, selülozun hidroksil grupları ile silikadaki NH gruplarının birbiri ile etkileşime girmesiydi. Bu çalışmadan sonra Minguillon ve arkadaşları ile Okamoto ve arkadaşları da buna benzer çalışmalar yapmışlardır (Franco ve ark., 2001; Yashima ve ark., 1994). Ancak yukarıdaki yöntemler kullanılarak elde edilen kovalent bağlı KSF'ler silika üzerine fiziksel kaplama yöntemiyle elde edilenlerden daha düşük ayırma yeteneği göstermiştir.

Chankvetadze ve ark., γ -glikidoksipropil ile fonksiyonlandırılmış silika jel ile az sayıda türevlendirilmemiş hidroksil grubu içeren selüloz türevlerini kovalent olarak bağlamışlardır (Chankvetadze, 2013a). Bu yöntem kullanılarak kovalent olarak bağlanmış türevler oluşturma işlemi çok daha esnek ve kolay yapılmaktaydı. Okamoto ve ark., da bu yöntemi geliştirerek polisakkarit türevlerini % 1-2 trietoksisilil gruplarının molekül içi polikondenzasyonunu kullanarak etkin bir şekilde bağlamışlardır (Ikai ve ark., 2006). Geliştirilen yöntem ile kovalent bağlanan KSF'ler ile yapılan çalışmaların, geleneksel kaplama yöntemlerinden daha iyi bir kiral seçicilik sağladığı gözlemlenmiştir. Yazarlara göre, geliştirdikleri immobilizasyon (bağlanma) tekniği ile üretilen KSF'ler üretime kolaylık getirip, yüksek bağlanma kapasitesi ve

kiral ayırım becerisi sunmakla birlikte birçok polisakkarit türevine de uygulanabilmektedir. Günümüzde birçok çözücü ile uyumlu değişik KSF'ler piyasaya farklı isimler ve markalar altında sürülmüştür. Daicel firmasının Chiralpak™ IA ve Chiralpak™ IB kolonları ile Phenomenex firmasına ait Lux™ Amylose-1 ve Lux™ Cellulose-1 kolonları kiral sabit faz olarak Amiloz (3-5-dimetilfenilkarbamat) ve Selüloz (3-5-dimetilfenilkarbamat) içermektedir. Bunların dışında farklı olarak Daicel'e ait Chiralpak™ IC kolonu da Selüloz (3-5-diklorofenilkarbamat)da piyasada bulunmaktadır. Bu immobilize edilmiş KSF'ler çok geniş bir analit ve çözücü yelpazesinde kullanılabilirken, alternatif bir seçicilik mekanizması ve enantiyomer sıralarının yer değiştirmesi açısından da çok kullanışlıdır. Bu özellikler analitik ve preparatif amaçla kullanım için birçok avantaj sunduğu gibi kullanım sırasında dikkat edilmesi gereken noktalar da mevcuttur. Kovalent bağlı kiral sabit fazlarla oluşturulmuş kolonlar ile ilgili gerek üretici reklamları gerekse bazı yayınlarda yanlış bilgiler yer almaktadır. Bu bilgilerden en önemlisi aynı materyalden elde edilmiş kovalent bağlı kolonlar ile silika yüzeyine kaplanmış hallerinin aynı sonuçları vereceğidir ve bu ifade gerçek değildir. Kaplama yöntemi ve çapraz bağlama yöntemi arasında kimyasal açıdan da farklılıklar vardır. Literatürde bulunan bazı örneklerle göre kovalent bağlı kolonlarla ayırım gerçekleştirilebilirken kaplanmış kolonlarla aynı analit üzerinde ayırım olmamaktadır. Bunun tersi durumlar da mevcuttur (Ghanem ve Naim, 2006). Yine yapılmış bir başka çalışmada kovalent bağlanmış ve silika yüzeyine tutturulmuş hem selüloz hem de amiloz temelli 3-5(dimetilfenilkarbamat)ın enantiyoayrım sırasında enantiyomerlerin yer değiştirdiği rapor edilmiştir (Vanthuyne ve ark., 2005). Bu değişimin sebebi kaplanmış veya kovalent bağlı polisakkarit türevlerinin konformasyonlarındaki farklılık veya katılığın (esnemezlik) kiral tutunmada çelişki yaratmasından kaynaklanması olabilir. Ama böyle bir sonucun asıl sebebinin bu iki tip KSF'nin kimyasal bileşimlerinin farklılığından kaynaklanması daha olası gözükmemektedir.

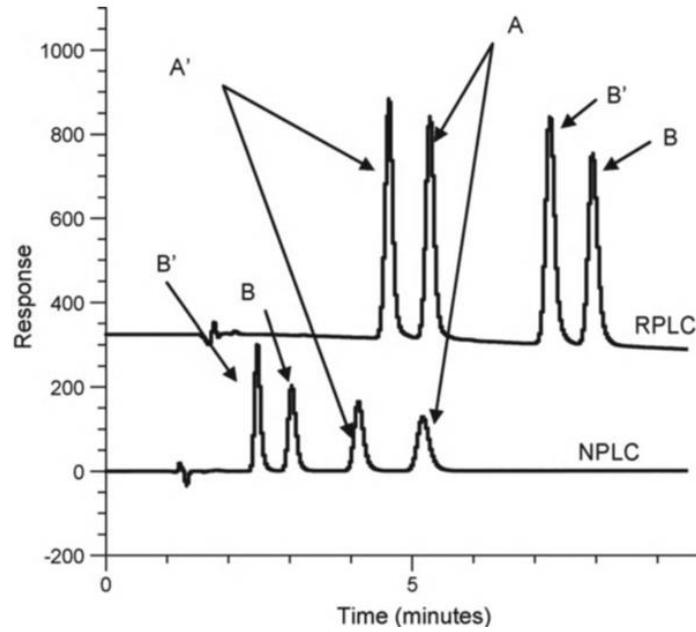
2.2.3.2.4. Hareketli Faz Optimizasyonu

Yüzeye kaplanmış polisakkarit fenilkarbamat türevleri ile ilgili yapılan enantiyoayırma ait ilk çalışmalarda normal faz çözücülerini kullanılmıştır. Daha sonra gerçekleşen çalışmalarda da selüloz triasetat türevi bir KSF’de ayırma yapmak için etanolün hareketli faz olarak kullanıldığı çalışmalar da mevcuttur. Okamoto ve ark., asetonitril ve su karışımını hareketli faz olarak kullandıkları çalışmalarında bu karışımın kullanılabilir olduğunu, fakat polisakkarit fenilkarbamatlar için çok da güven vermediğini belirtmişlerdir. Günümüzde polisakkarit temelli KSF’ler normal faz, ters faz ve polar organik faz ayırma koşullarında kullanılabilir. Bahsedilen her bir ayırma şeklinin farklı uygulamalarda kendine has avantajları bulunmaktadır. Örneğin farmasötik bileşenlerin ve preparatif ölçekli enantiyoayırma çalışmalarında normal faz sıvı kromatografi tekniğinin ters faza göre daha iyi olduğu bilinmektedir. Polar organik hareketli fazlar (asetonitril, metanol, etanol, 2-propanol ve asidik bazik katkılar) kullanılarak yapılan analitik ve preparatif ölçekli çalışmalarda da analiz süreleri ciddi ölçüde kısalmaktadır.

Bir kiral kolonun her üç hareketli faz çeşidinde de analiz için kullanılması büyük bir avantaj sağlamaktadır. Bu yüzden polisakkarit temelli KSF’ler yaygın olarak kullanılmaktadır. Phenomenex gibi bazı firmalar tüm hareketli faz koşullarına ek olarak süperkritik akışkan kromatografi yöntemi ile de uyumlu kolonlar üretmektedir. Daicel gibi bazı firmalar da her bir ayırma tekniğine özel ayrı ayrı kolonlar üretmektedir.

Hareketli fazın doğru seçilmesinin önemi ile ilgili şu örnek verilebilir: İlk kiral görüntüleme çalışmalarında kullanılan ve 1980 yılında sentezlenen selüloz tris(3,5-diklorofenilkarbamat) yüksek kiral tutunma kabiliyeti sebebiyle yoğun bir şekilde kullanılmaktaydı (Okamoto ve ark., 1986). Fakat bu materyali pazarlanabilir hale getirmenin önünde çözünme problemi yatıyordu. Sentezledikleri bu KSF n-

hekzan/IPA normal faz karışımında silika kaplı yüzeyden ayrılarak çözünmekteydi. Bu yüzden de ters faz veya polar organik faza yönelmişlerdi. Bunun hemen akabinde selüloz tris(3,5-diklorofenilkarbamat) temelli bir kiral kolon 2005 yılında Alman Sepaserve firması tarafından piyasaya SepapakTM-5 adıyla sürülmüştür ve bu kolon kullanılarak bazı kiral bileşiklerin enantiyomerleri için çok ciddi seçicilik ve ayırım gücü değerlerine ulaşılan sonuçlar rapor edilmiştir (Chankvetadze ve ark., 2000). Kullanılan bu KSF'nin kovalent bağlı bir muadili de daha sonra Daicel tarafından piyasaya sürülmüştür. Literatürde polisakkarit temelli kolonların ters fazla (Peng ve ark., 2010) ve polar organik fazlar (Dossou ve ark., 2009) kullanılarak yapılmış birçok çalışmaya rastlamak mümkündür. Bir kiral kolonun avantajı özellikle kimya ve ilaç sanayisi gibi önemli sektörlerde üretim anında görüntüleme yapılması istendiğinde hem sulu hem de susuz ortamda sağladığı ayırma kapasitesi ile orantılıdır (Şekil 2.6.).



Şekil 2.6. Aynı maddenin farklı hareketli faz koşullarına, TFSK (ters faz) ve NFSK (normal faz) ait kromatogram (Zhou ve ark., 2010).

Yukarıdaki şekilde verilen örnekte görüldüğü gibi kiral başlangıç maddesi olan B ürününü ve reaksiyon sonucunda oluşan A ürününün enantiyomerleri ile birlikte eş zamanlı analizi ters faz (TFSK) ve normal faz (NFSK) koşullarında gerçekleştirilmiştir. Enantiyomerlerin alıkonma sırası ve etkinliklerine göre ihtiyaç duyulan hareketli fazın seçilebilmesi bizim için bir avantaj sağlamaktadır (Zhou ve ark., 2010).

2.2.3.2.5. Ayrımların Ölçeklendirilmesi

2.2.3.2.5.1. Analitik Ölçekli Ayrımlar

Sıvı kromatografik tekniklerle enantiyomerlerin ayrımı tartışmasız çok güncel bir konudur. Aslında bu alanda yapılan çalışmalardan tek bir kiral merkez içeren moleküllerin ayrımı artık çok zor gözükmemektedir. Şimdilik görülen asıl zorluk birden fazla kiral merkeze sahip setereoizomerlerin bunlara ait kiral metabolitlerin, sentetik safsızlıklarının ve bozunma ürünlerinin eş zamanlı analizlerini yapabilmektir. Bu ayrımları yaparken daha önce de bahsedildiği gibi üç farklı hareketli faz türü kullanılabilir. Bunlar arasından normal faz kullanımı sulu ortamda kararsız olan veya az çözünen bileşikler için özellikle de preparatif uygulamalarda avantaj sağlanmaktadır. Polar organik fazlar ise analiz sürelerini çok kısalttığı, keskin pik şekilleri elde edildiği ve sinyal/gürültü oranını azalttığı için tercih edilmektedir. Ters faz kullanıldığında ise özellikle vücut sıvıları ile yapılan analizlerde çok etkin ayrımlar yapılabilir. Vücut sıvılarının direkt olarak enjekte edilebilmesi setereoseçici ilaç-reseptör ilişkilerini aydınlatmak için kullanılabilir. Daha önce bahsi geçen KSF türlerinden Pirkle tipi, sentetik polimerler ve polisakkarit temelli olanlar enantiyomerlerin ayrımını normal faz koşullarında yapmak için geliştirilmişlerdir. Halbuki kiral ligant değişim malzemeleri, proteinler ve siklodekstrin türevi KSF'ler sulu organik veya tamamen sulu tampon içeren hareketli fazlarda kullanılmaktadır. Daha sonra yapılan çalışmalar ile bahsi geçen çoğu KSF'nin hem organik hem de sulu organik faz ile analizlerinin mümkün olduğu gösterilmiştir (Peng ve ark., 2010).

Sıvı kromatografik ayrımlar kiral kolonun boyutuna bağlı olarak değişen ölçeklerde analizler için kullanılabilir. Kiral kolonun çapı birkaç mikrometreden, 10-20 cm aralığına kadar değişen boyutlarda olabilir. Analitik ölçekli çalışmalarda kolon çapını azaltmanın sağladığı avantajlar arasında;

- ✓ Daha az KSF ve silika jel harcanması,
- ✓ Daha düşük miktarda, yüksek saflıkta organik çözücü harcanması,
- ✓ Çevreye daha az zarar verilmesi,
- ✓ Daha düşük numune hacmi kullanılması,
- ✓ Gelişmiş analitik sonuçlar elde edilmesi (yüksek etkin tabaka sayısı, keskin pik şekilleri, kısa analiz süreleri) bulunmaktadır.

2.2.3.2.5.2. Preparatif Ölçekli Ayrımlar

Kiral havuz, diastereomerik kristalizasyon ve kinetik ayırma teknikleri kiral bileşenlerin saf enantiyomerlerini pazarlamak üzere elde etmek için kullanılan esas yöntemlerdir. Enantiyoseçici sentezler de bu yolda hızla gelişmeye devam eden teknolojilerdendir. Kromatografik teknikler ise yukarıda bahsedilen tekniklere rakip olarak görülmektedir. Bunu destekleyici görüşler aşağıda belirtilmiştir.

- ✓ Rasematların kromatografik ayrımı, klasik yöntemlerle elde edilemeyen kiral bileşenlerin saf enantiyomerlerini elde etmek için geliştirilmiştir.
- ✓ İlaçların bilinen ilk sistematik preparatif enantiyomer ayrımı çapraz bağlanmış kiral poliakrilamidler kullanılarak düşük basınç sıvı kromatografik yöntem kullanılarak 1970'li yıllarda gerçekleştirilmiştir.
- ✓ Birçok kiral ilaç etken madde saf enantiyomerleri halinde sıvı kromatografi tekniği kullanılarak elde edilmiştir.
- ✓ İlaç geliştirme çalışmalarının ilk basamaklarında biyomedikal çalışmaların (metabolizması, farmakokinetiği, ilaç-reseptör ilişkileri, toksisitesi, kararlılığı, vs.) doğru yapılması için her iki enantiyomere de saf olarak ihtiyaç duyulmaktadır. Her iki enantiyomere de saf olarak ihtiyaç duyulduğunda kristalizasyon teknikleri ile kromatografi birlikte kullanılarak birçok avantaj elde edilebilir. Bu işlemi gerçekleştirmek enzimatik kinetik ayırma, kiral havuz temelli tekniklerle, enantiyoseçimli sentez kullanılarak veya asimetrik kataliz

ile mümkün olmamaktadır. Özellikle son iki tekniğin verimi çok iyi olsa da kural olarak sadece bir enantiyomer kullanılabilir.

- ✓ Kiral kromatografi alanında yeni gelişmeler ve teknolojilerin ilerlemeye devam etmesi kromatografi tekniğini saf enantiyomerlerin elde edilmesinde geleneksel yöntemlere bir alternatif olarak görmemizi sağlamaktadır.

Preparatif ölçekli ayrımlarda enantiyoseçicilik, kapasite ve stabilite olmazsa olmaz gerekliliklerdendir. Bu özelliklerden her biri birçok bakış açısı tarafından karakterize edilirler. Örneğin seçicilik, birçok bileşiği kapsamayı ve yaygın kullanılmasını ifade ederken, stabilite mekanik dayanıklılık ve kullanım sırasında çözücülere karşı olan dayanıklılığı ifade etmektedir. Bu yüzden üretim boyutuna geçmeden önce, üretimin gerekliliklerinin iyi analiz edilmesi gerekir. Bu gereklilikler, üretimin miktarı, fiyatı, saflığı, verimi ve bir ya da her iki enantiyomerin gerekli olup olmadığıdır. Bunlar analiz edildikten sonra aşağıdaki basamaklar takip edilerek metot geliştirilir (Strube ve ark., 1997).

- ✓ Farklı kolonlar kullanılarak yeterli seçiciliğe sahip kolon seçilir.
- ✓ Rasematın stabilitesi belirlenir.
- ✓ Enantiyomerlerin alıkonma sırası belirlenir.
- ✓ Hareketli ve sabit faz birleşimleri optimize edilir.
- ✓ Adsorbsiyon izotermi dikkate alınır.
- ✓ Ayrım için farklı hesaplama yöntemleri kullanılarak simülasyonları gerçekleştirilir.
- ✓ Üretim tekniği seçilerek maliyet hesabı yapılır.

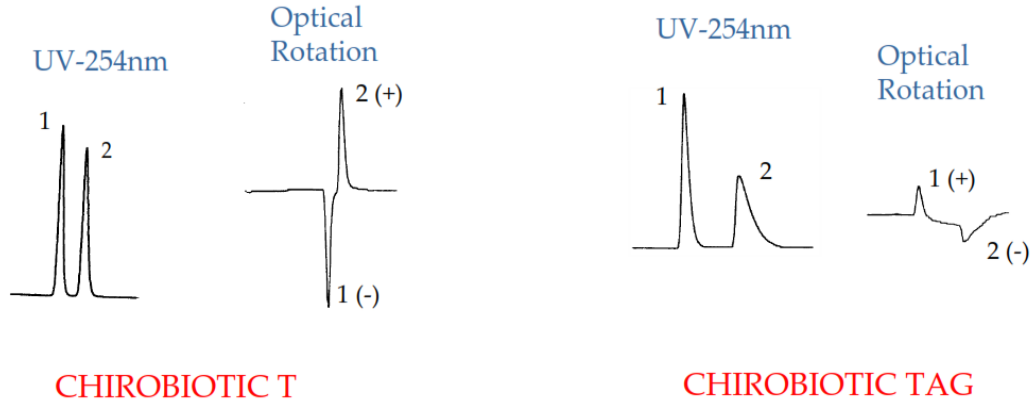
Analitik ayrımlarda olduğu gibi burada da yüksek pik etkinliği büyük önem taşımaktadır. Ayrıca yüksek akış hızları uygulanabilmesi de üretimi arttıran bir diğer etmendir. Sonuç olarak preparatif kromatografi, kiral bileşenlerin enantiyomerlerinin büyük ölçekli ve saf halde elde edilmesi için çok güçlü bir tekniktir.

2.2.3.2.6. Kiral Kromatografik Yöntemlere Özgü Dedektörler

Kiral bileşiklere özgü kullanılan detektörlerden optik çevirme dağılımı ve dairesel dikroizm dedektörlerinin her ikisinin de çalışma prensibi, polarize ışının optikçe aktif taneciklerle etkileşimine dayanır. Optik çevirme yönteminde bir bileşiğin moleküler çevirmesinin dalga boyuna bağımlılığını ölçer. Herhangi bir dalga boyundaki optik çevirme, bir maddenin d ve l dairesel polarize ışın için gösterdiği kırılma indisi farkına, yani "daireysel aralık" ($n_l - n_d$) a bağlıdır. Bu değer dalga boyunun fonksiyonu olarak özel bir şekilde değişir (Skoog ve ark., 2007 ve Llyod ve Goodall, 1989). Tersine, optikçe aktif bir bileşiğin bu iki tip dairesel polarize ışık için gösterdiği molar absorbtivitelere farklıdır; dairesel dikroizm ise bu gerçeğe dayanır. Burada ($\epsilon_l - \epsilon_d$)'nin dalga boyuna bağımlılığı incelenir. ϵ_l ve ϵ_d , l ve d için molar absorbtivitelere ifade etmektedir.

Optik çevirme dağılımı için UV ve görünür ışık bölgelerinde, doğrudan, optik çevirme dağılım eğrilerini veren çeşitli spektropolarimetreler geliştirilmiştir. Bu cihazlarda, uygun bir monokromatörden gelen ışın, bir polarize edici, örnek ve bir analizörden geçerek fotoçoğaltıcı bir tüple (dedektör) algılanır. Dedektörden çıkan sinyal yükseltilir, sonra, örneğin yaptığı çevirmeyi dengeleyecek şekilde analizörün ve kaydedici kalemin konumunu ayarlama kullanılır. Gözle ayarlanan polarimetrelerde olduğu gibi, analizörün sıfırlama konumunu belirlemek gerekir Bazı tip cihazlarda polarize edici, düşük frekansta küçük bir açıyla salınır. Dedektörün yükseltici (amplifier) sistemi oluşan alternatif akım (AC) sinyalini algılar ve sinyal, sıfırlama noktası civarında simetrik oluncaya kadar analizörü ayarlar. Başka tip spektropolarimetrelerde, iki takım polarize edici, çift-ışın demetli spektrometreler kullanılır. İki analizör birbirinden birkaç derece farklı olacak şekilde dengelenir ve her iki demet de örnekten geçirilir. İki demetin güçleri arasındaki oran elektronik olarak kıyaslanır, örneğin çevirmesini belirleyen bir ölçme alınır. Şekil 2.7.'de Propranolol etken maddesine ait UV ve polarimetrik dedektöre ait sonuçlar görülmektedir. İki

farklı kiral kolonun kullanıldığı çalışma da polarimetrik dedektör sayesinde enantiyomerlerin yer değiştirmiş olduğu görülmektedir.



Şekil 2.7. Chirobiotic T ve Chirobiotic TAG kiral kolonları (250 mm x 4,6 mm) ve hareketli faz olarak metanol ve asidik katkı maddesinin kullanıldığı Propranolol ayrımı için yapılmış çalışma.

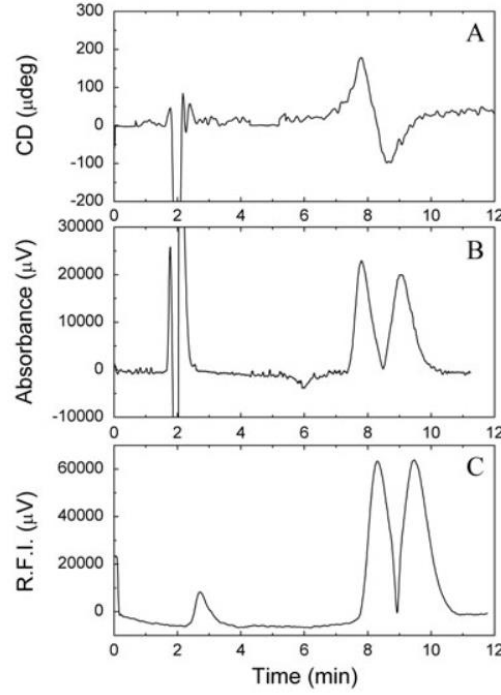
Polarimetrik dedektörler kiral bir molekülün düzlem polarize ışığın + veya – yönde çevrilmesiyle ilgili bilgi vermektedir. Polarimetrik dedektörler,

- ✓ Sadece optik olarak aktif bileşikler için kullanılmaktadır.
- ✓ UV dedektörün tespit edemediği (UV absorbansı olmayan ya da çok düşük UV absorbansı olan) maddeler eğer optik olarak aktifse bu dedektör yardımıyla tespit edilebilmektedir.
- ✓ Gradient çalışmaya uygundur.
- ✓ Çalışılan analitin optik saflığı hakkında bilgi verir (Skoog ve ark., 2007 ve Sanchez ve ark., 2012).

Özellikle UV absorbansı olmayan maddelerin (monosakkaridler, aromatik olmayan amino asitler gibi) tayin edilebilmesi dairesel dikroizm dedektörüne göre büyük bir avantaj sağlamaktadır.

Dairesel dikroizm spektroskopisi moleküllerin dairesel dikroizmini bir dalga boyu aralığında ölçebilen spektroskopik bir tekniktir. Bu dedektörü anlamak için daha önce de bahsedilen polarizasyona ait temelin iyi bilinmesi gerekmektedir. Düzlemsel

(lineer) polarize ışık, tek bir düzlemde titreşerek ilerleyen ışıktır ve bütün polarize ışıklar, birbirine dik (dikey ve yatay) iki lineer polarize bileşenin toplamıdır (Skoog ve ark., 2007). Eğer iki polarize ışık aynı fazda değilse sonuç düzlemsel polarize olmaz. Örneğin, bir polarize ışık diğerine oranla çeyrek faz farklıysa, sonuç spiral şeklinde olacaktır ve bilindiği üzere dairesel polarize ışık oluşacaktır (DPI). Spiraller, right-handed (sağ dairesel kutuplu) veya left-handed (sol dairesel kutuplu) olabilir ve birbiri ile çakışmayan ayna görüntüleri vardır. Düzlemsel polarize ışığı dairesel polarize ışığa dönüştüren optik plakaya çeyrek-dalga plaka denir. Örneğin dikey ve yatay polarize ışıkların görünen kırılma indisleri farklıdır. Uygun yönlendirilmiş bir plaka, düzlemsel polarize ışığı, ışık yolundaki bir düzlemsel bileşeni diğerine göre çeyrek dalga yavaşlatarak, dairesel polarize ışığa dönüştürür. Bu da, sağ veya sol dairesel kutuplu ışığın oluşmasına sebep olmaktadır. Dairesel dikroizm sol ve sağ dairesel kutuplu ışının absorbanlarının farkıdır. Dairesel dikroizm dedektörüne dairesel dikroizm spektropolarimetresi veya dairesel dikrograf da denmektedir. Dairesel dikroizm dedektörlerinde, statik çeyrek-dalga plaka yerine amaçları aynı olan foto-elastik modülatör denilen özel optik eleman kullanılır. Bu çeyrek dalga plaka, düzlemsel polarize ışığın dikey bileşenini geciktirerek (veya tam tersi), sol veya sağ dairesel olarak kutuplanmış ışık üretir. Numunenin diğer tarafında ise bir ışık detektörü vardır. Eğer ışık yolunda uygun bir numune yoksa detektöre çarpan ışık sabit değerde olur. Eğer ışık yolunda dairesel dikroik bir numune varsa, kaydedilen ışık yoğunluk değeri sol ve sağ kutup için farklı olacaktır böylece de enantiyomerik farklılıklar ortaya çıkacaktır. Bu yöntemde ölçümler, spektrumun görünür ve UV bölgesinde gerçekleştirilir. Şekil 2.8.'de de dairesel dikroizm dedektörü, UV dedektör ve kırılma indisi dedektörü kullanılarak trimeprazine ait yapılmış bir çalışmanın kromatogramları gösterilmiştir (Skoog ve ark., 2007 ve Sanchez ve ark., 2012).

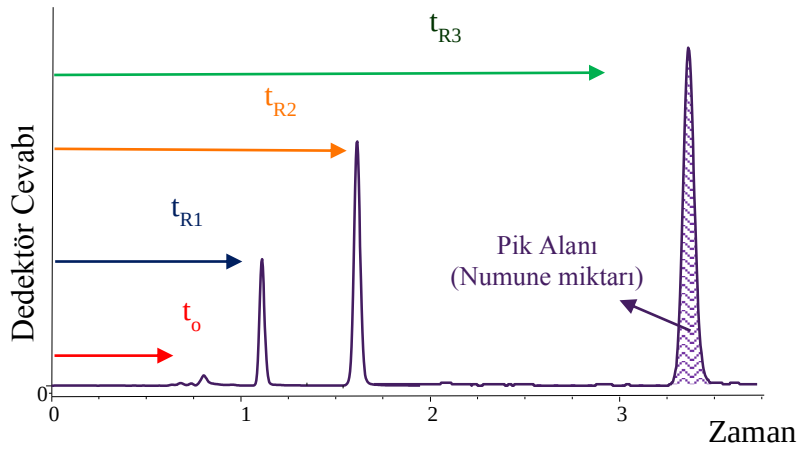


Şekil 2.8. Trimeprazine ait dariesel dikroizm dedektörü (A), UV dedektör (B) ve kırılma indisi dedektörü (C) kullanılarak yapılmış çalışma (Sanchez ve ark., 2012).

2.2.3.3. Kromatografide Temel Parametreler ve Sistem Uygunluk Testleri (SUT)

YBSK sisteminin gözle izlenebilen parametreleri, alıkonma zamanı, pik alanı/pik alan oranı, pikin şekli gibi parametrelerdir. Kromatogramda ilk izlenebilen parametre pik şeklidir. İdeal pik şekli keskin, iki tarafında eşit ve dar olanıdır (Şekil 2.9). Numune kolona enjekte edildikten sonra, dedektöre gelir ve kromatogramda sinyal bir pik olarak görülür. Bu sinyalin çıkış zamanı alıkonma zamanı (t_R) olarak adlandırılır ve nitel analizler için belirleyici rol oynar. Numune içeriğinde bulunan her bir analit farklı alıkonma zamanlarına sahiptir. Hareketli faza ait piklerin çıktığı zaman ise ölü zaman veya ölü hacim (t_0) olarak adlandırılır (Fanali ve ark., 2013 ve Kromidas, 2005). Ölü zamanı belirlemek için ters faz sıvı kromatografik yöntemlerde urasil, potasyum bromür gibi polarlığı çok yüksek olan bileşikler kullanılmaktadır.

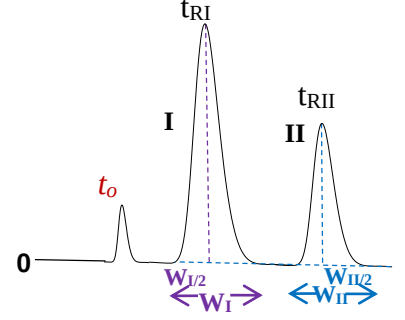
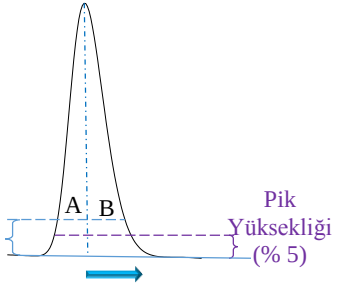
Kromatografik ve diğer ayırma yöntemlerinde, yöntemin yeterli doğruluk ve kesinlikte olduğunu belirtebilmek için Uluslararası Uyum Konseyi (The International Council for Harmonisation (ICH)) Amerikan Gıda ve İlaç Birliği (FDA) ve Amerikan Farmakopesi (USP) ve diğer farmakopeler tarafından yapılması önerilen testlerdir. Bu testlerin gerçekleştirilmesiyle kromatografik bir sistemin analize ne ölçüde uygun olduğu kanıtlanmış olur. Ayrıca sistemde akış hızından, pH'den, hareketli faz bileşiminden kaynaklı en ufak bir farklılık için, sistem uygunluk testlerinin bu yeni sistem için tekrar gözden geçirilmesi gerekmektedir (Chan ve ark., 2004; Grdinic ve Vukovic, 2004; Hajicostas, 2003; Hibbert, 2007; Huber, 2007; ICH-Q2A, 2005; ICH-Q2B, 2005; Kromidas, 2005; Prichard ve Barvick, 2007; Swartz ve Krull, 1997; Torbeck, 2007; US FDA, 1983; US FDA, 2000; USP 37, 2014 ve Werner ve ark., 2006, European Pharmacopoeia, 2014).



Şekil 2.9. YBSK cihazından alınmış örnek bir kromatogram

Bir kromatogramın yorumlanmasında ve SUT parametrelerini (Çizelge 2.11) karşılayıp karşılamadığının gösterilmesinde temel olarak alıkonma zamanı ve pik genişliğinden faydalanılır. Aşağıdaki çizelgede Amerikan Farmakopesi tarafından tanımlanan SUT parametreleri hesaplama yöntemleri ve kabul edilebilirlik sınırları gösterilmiştir (USP 37, 2014).

Çizelge 2.11. SUT parametreleri ve açıklamaları

SUT parametresi	Sembolü	Kabul edilebilirlik sınırı	Formülü	Açıklama
Kapasite faktörü	k	$1 \leq k \leq 10$	$k = \frac{t_R - t_0}{t_0}$	
Seçicilik faktörü	α	$\alpha > 1$	$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t_{R_2} - t_{R_0}}{t_{R_1} - t_{R_0}}$	
Ayrım gücü	R_s	$R_s > 1,5$	$R_s = 1,18 \times \frac{(t_2 - t_1)}{W_{0,5} + W_{p0,5}}$	
			$R_s = 2 \times \frac{(t_2 - t_1)}{W_1 + W_2}$	
			$R_s = (1/4) \sqrt{N} \times [(\alpha - 1)/\alpha] \times [k_2/(1 + k_2)]$	
Kuyruklanma faktörü	T	$2 \leq$	$A_s = \frac{B}{A}$	
Pik asimetrisi	A_s	$0,95 \leq A_s \leq 2$	$T = \frac{A + B}{2A}$	
Teorik tabaka sayısı	N	$N > 2000$	$N = 16 \left[\frac{t_R}{W} \right]^2$	
Pik alanının tekrar edilebilirliği	% BSS	% BSS < 1,5	$\%BSS = \frac{SS}{X} \times 100$	Genel ayırmalarda < 1,5 Biyolojik numunelerde < 5 Eser element analizinde 5 - 15

Çizelge 2.11 incelendiğinde, t_R bileşene, t_0 , kolonda tutunmayan türe ait alıkonma zamanlarıdır. k değerinin büyük oluşu, bileşenin sabit fazda iyi tutulduğu için kolon boyunca yavaş ilerlediğini belirtmektedir. k çok küçükse, bileşik, çözücü pikinden ayrılamaz; k çok büyürse analiz süresi çok uzun sürer. Seçicilik (α), kullanılan sabit faz ve hareketli fazın özelliğine bağlı olarak değişiklik gösterir ve daima 1'den büyüktür.

Kolonun en önemli parametresi teorik tabaka sayısıdır. Kolondan çıkan pikin sivri ve dar olması ve piklerin birbirlerinden iyi ayrılması ile ilgilidir. N 'nin sayısal değeri, analizi yapılan maddenin cinsine bağlı olduğu gibi, deney koşullarına örneğin, akış hızı, sıcaklık, kolon kalitesi, dolumun tek biçimliliği gibi çeşitli faktörlere de bağlıdır.

Kromatografik işlemlerde kolon etkinliği ve çözücü etkinliğinin ortak etkisi ayırma gücü (rezolüsyon) kavramıyla ifade edilir. Ayırma gücünün hesaplanmasında, kapasite faktörü, tabaka sayısı ve seçicilik kullanılmaktadır. Birbirini takip eden iki pik için R değeri 1,5 iken tam ayırmanın gerçekleştiği kabul edilir.

Kuyruklanma ve asimetri faktörü incelenen madde pikinin eğriliğini, herhangi bir tarafa dayalı olup olmadığını veya keskinliğini belirleyebilmek amacı ile kullanılan bir faktördür. Uzun süre kullanılan kolonlarda Kuyruklanma daha çok görülür. Asimetri Faktörü (As) de pik omuzlanması veya kuyruklanmasını gösteren bir diğer değerdir. Pik asimetrisi, pikin taban yüksekliğinin % 10'u civarından, kuyruklanma faktörü ise % 5'i civarından ölçülür.

Bir kromatografik yöntemde analizi yapılan madde piki alanının veya yüksekliğinin, çalışılan koşullardaki tekrarlanabilirliği de yöntemin kesinliğinin bir diğer ifadesidir. Analizi yapılan madde çözeltisinin en az 5-6 defa sisteme ardı ardına

verilmesinden sonra elde edilen pik alanları veya yüksekliklerinin bağıl standart sapması (% BSS) hesaplanarak gösterilir.

2.2.4. Kromatografik Analizlerde Yöntem Geçerlik Testleri

Araştırma geliştirme ve kalite kontrolde kullanılan tüm analiz teknik ve uygulanmalarının, doğru, tekrarlanabilir, hassas ve belirlenen parametreler içerisinde ölçülebilir olması etkin ve güvenilir bir kalite kontrol sistemi için çok önemlidir. Yöntem geçerliliği (validasyon) bu özelliklerin uluslararası standartlarda olduğunu gösterdiği için günümüzün en önemli konulardan biri olmuştur (Crowter, 2001; Ermer, 2005; Haider, 2002; Hartmann ve ark., 1998; ICH-Q2A, 2005; ICH-Q2B, 2005; Kromidas, 2005; Lee, 2004; US FDA, 1983; US FDA, 2000 ve USP 37, 2014).

Analitik yöntemler, ilaç etken maddelerin, saf hallerinin, farmasötik preparatlar içerisinde ve/veya biyolojik numunelerden analizlerinde kullanılan yöntemlerdir. Bu yöntemler kullanılırken ilaç saf halde olabilir veya bunun yanı sıra metabolitleri ile çeşitli safsızlıkları ile birlikte bulunabilirler. Bu işlemlerin yapılabilmesi için iyi karakterize edilmiş, güvenilir sonuçların elde edilebileceği tamamen geçerli olacak analitik yöntemlerin geliştirilmesi şarttır. Geliştirilmiş olan rutin bir analizi etkileyecek pek çok faktör vardır. Bu faktörlere örnek olarak, analizi yapan kişi, yapılanların zamanlaması, kullanılan sarf malzemeler ve cihazlar vb. verilebilir.

2.2.4.1. Validasyonun Genel İşlemleri

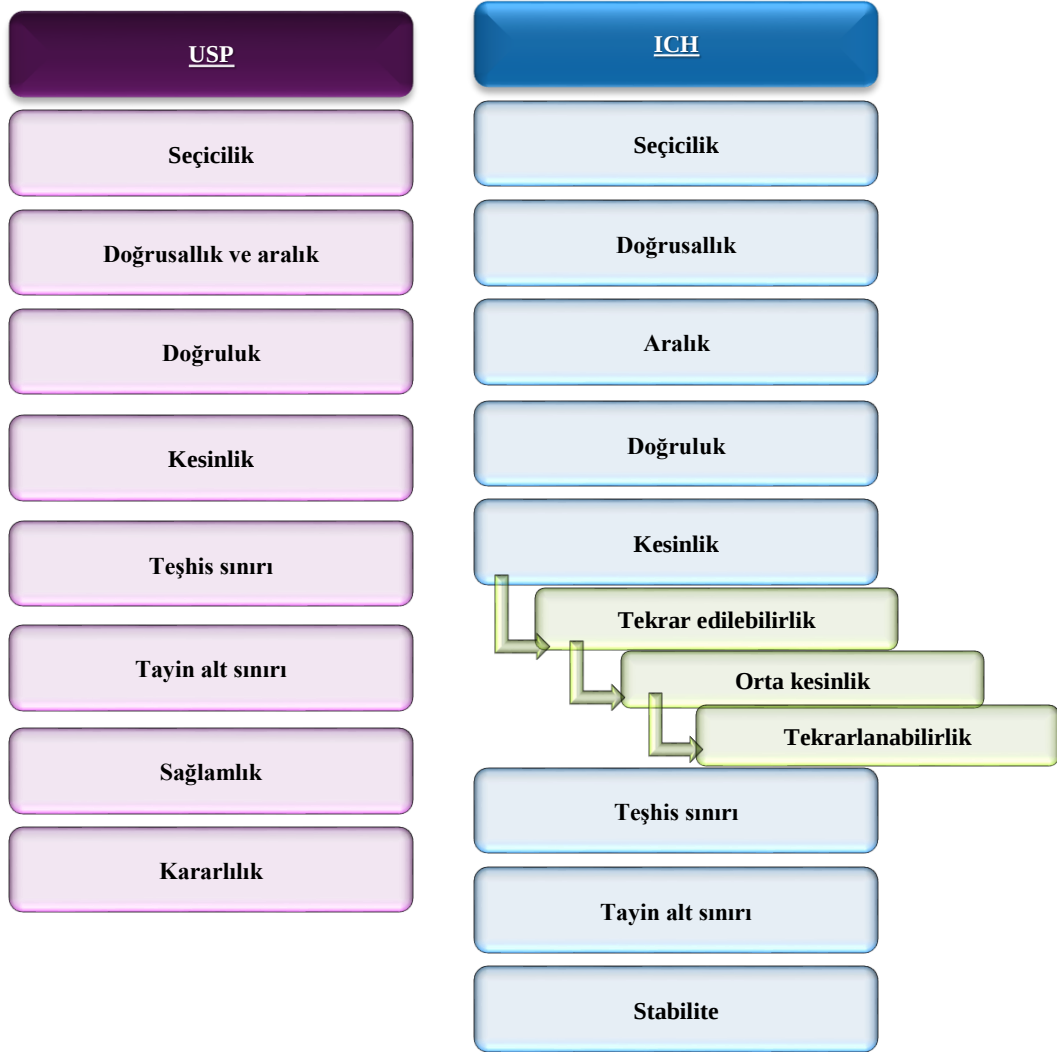
Validasyon herhangi bir analitik işlemin güvenilirliğini ortaya koymak için de kullanılır ve bir laboratuvarın analitik verilerinin güvenilir olduğunu anlayabilmek için o laboratuvarda kullanılan yöntemlerin validasyonu şarttır (Ozkan, 2012). Validasyonun geçerliliği için aşağıda belirtilen işlemlerin ve tanımlamaların yapılması gereklidir (Haider, 2002; Hartmann ve ark., 1998; Kromidas, 2005; USP 37, 2014; US FDA, 1983; US FDA, 2000; Ozkan, 2012 ve Ozkan ve ark., 2015).

- ✓ Cihaz/Ekipman Kalite Kontrolü: Bu kontrole bütün cihazların donanımsal ve yazılımsal kontrolleri yapılır,
- ✓ Rutin analizde kullanılacak bir analizin veya yöntem parametrelerinde herhangi bir değişiklik yapılan metodun validasyonu,
- ✓ Ayırma yöntemlerinin validasyonu için gerekli olan ve çalışma sırasında, günler arasında ve numunelerin analizleri sırasında uygulanan Sistem Uygunluk Testleri (SUT) ve ilgili parametrelerinin saptanması.

ICH (International Council on Harmonization: Uluslararası uyum konseyi) ve Farmakopeler tarafından stabilite, işlem analizleri, tanıma, saflık, ilaç etken maddesinin etkinliğini, salım testleri ve kabul testleri gibi basamaklar için detaylı bilgiler verebilen yeni analitik yöntemlere gerekli validasyon parametreleri ve bu parametrelerin sahip olması gereken değerler önerilmiş ve kabul edilmiştir. Validasyon, tek başına bir yöntemin uygulanması için düşünülmemelidir. Bir analitik yöntem kullanımı süresince her zaman ve her yerde geçerliliğini korumalıdır. Bir analiz yöntemi, etkinlik parametreleri ile karakterize edilir. Bu etkinlik değerleri çeşitli kılavuzlar ve farmakopelerde belirtilen değerleri sağlamalıdır. (Chan ve ark., 2004; Crowter, 2001; ICH-Q2A, 2005; ICH-Q2B, 2005; Lee, 2004; USP 37, 2014; Riley ve Rosanske, 1996; Swartz ve Krull, 1997; Snyder ve ark., 1997; Ahuya ve Scypinski, 2001; Lunte ve Radzik, 1996; Adamovics, 1997; Braggio ve ark., 1996; Shabir, 2003; Papadoyannis ve Samanidou, 2004; Ermer, 2001; Mc Dowell, 1999; Ermer ve Miller, 2005; De Bievre ve Gunzler, 2005 ve Vessman, 1996).

2.2.4.2. Validasyon Karakteristikleri

Aşağıdaki şekilde (Şekil 2.10.) farklı kılavuzlara göre yapılması gereken validasyon parametreleri listelenmiştir.



Şekil 2.10. USP ve ICH'e göre gerçekleştirilmesi gereken validasyon parametreleri.

2.2.4.2.1. Seçicilik

Sıvı kromatografik bir yöntemin seçiciliği, analizi yapılacak numunede var olan ve analizi yapılacak maddeyle girişim yapabilecek diğer bileşenlerin (safsızlık, bozunma ürünleri veya ortamdan gelebilecek) yanında analiz edilmek istenilen maddenin ölçülebilme kabiliyetidir. Kromatografik sistemlerin validasyonu için birinci derecede önemli bir parametredir çünkü seçiciliğin olmadığı bir yöntemde başka hiçbir parametrenin önemi yoktur.

Özellikle stabilite tayini (kısa veya uzun süreli stabilite ile hızlandırılmış bozunma çalışmaları) çalışmalarında yapılması kesinlikle zorunlu olan bir parametredir. Seçicilik yeterli düzeyde değilse, yöntemin doğrusalılığı, doğruluğu ve kesinliği hakkında bir yanlış bilgiler elde edilir.

SUT parametrelerinden biri olan seçicilik katsayısı (α) ve ayırım gücü (R_s) değeri kromatografik çalışmalarda bize seçicilik hakkında bilgi vermektedir. Seçiciliğin saptanabilmesi için birkaç farklı yol izlenebilir:

- ✓ Bütün bilinen veya girişim yapmasından şüphelenilen maddeler (benzer maddeler, dozaj şekli içerisindeki yardımcı maddeler gibi) aynı anda kolona enjekte edilir ve geliştirilen yöntemle analiz edilir ve ayırım gücü değerlerine bakılır ($R_s \geq 2,0$ olmalıdır).
- ✓ Geliştirilen kromatografik yöntemin şartlarında ufak değişiklikler yapılır, (çözelti bileşimi, tampon çözelti pH'si, sıcaklık gibi) Bu değişikliklerin pik performansına olan etkileri takip edilir.
- ✓ Kullanılan FDD dedektörü ile yazılım vasıtasıyla pik saflıkları kontrol edilir. Mevcut sinyalin altında bir sinyal daha olup olmadığından emin olunabilir. (Barwick ve Ellison, 2005; Bliener, 2006; Branch, 2005; Casro ve ark., 2005; Chan, 2004; Chan ve ark., 2004; Christian, 2004; Crowter, 2001; Ermer ve Ploss, 2005; Görög, 2007; Grdinic ve Vukovic, 2004; Gumustas ve Ozkan,

2011; Haider, 2002; Hartman ve ark., 1998; Hibbert, 2007; ICH-Q2A, 2005; ICH-Q2B, 2005; Konieczka, 2007; Lee, 2004; Majcen, 2003; Prichard ve Barvick, 2007; Riley ve Rosanske, 1996; Shabir, 2003; Snyder ve ark., 1997; Switaj-Zawadka ve ark., 2005; Thompson ve ark., 2002 ve Van Locco ve ark., 2002).

2.2.4.2.2. Doğrusallık ve Aralık

Doğrusallık analit derişimi veya içeriğinin bir fonksiyonu olarak ortaya konan sinyallerin grafiksel olarak gözlemlenmesiyle değerlendirilir. Eğim (m), kesişim (n) ve korelasyon (r) veya tanımlayıcılık (R^2) katsayısı doğrusallığı veren parametrelerdir.

Bunlar analit derişiminin ölçülen sinyallere karşı regresyon analizleri kullanılarak matematiksel olarak hesaplanır. Doğrusallık, korelasyon katsayısı 0,999 ve üzerinde ise sağlanmış demektir.

Doğrusallığı belirleyebilmek için stok çözeltiden en az 5 değişik derişimin hazırlanması ve analiz sonuçlarının hazırlanan çözelti derişimlerine karşı grafiğe geçirilmesi gerekir. Grafiğe geçirilen noktalar eklenen eğilim çizgisi üzerine denk gelmeli veya çok yakınından geçmelidir. Böylelikle r veya R^2 değerleri de 1'e yaklaşmış olacaktır. Bu işlemler raporlanırken eğim ve kesişim değerlerinin % BSS'leri veya standart hataları da hesaplanarak verilmelidir.

Aralık, doğruluğu ve duyarlılığı yeterli kabul edilen bir yöntemin geçerli olduğu alt ve üst sınırlar arasında yer alan derişim aralığı olarak adlandırılmaktadır. Her nicel yöntemde çalışma aralığı mutlaka belirlenmelidir. Genellikle çalışmalarda en iyi

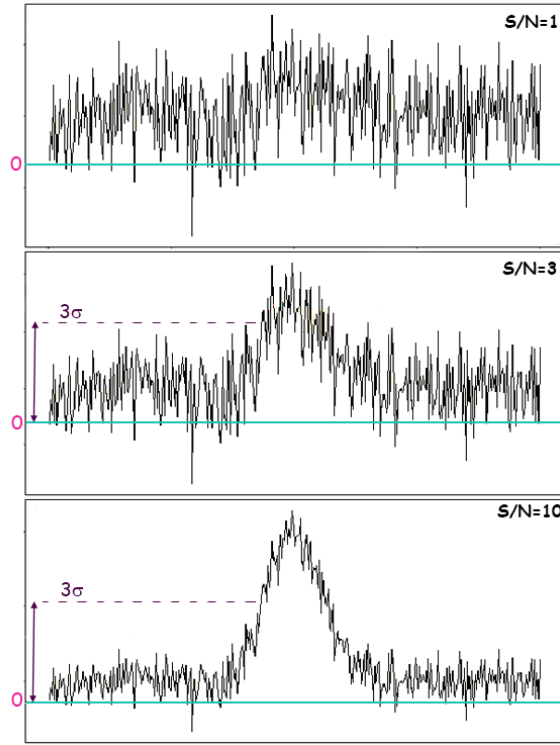
performansı veren çalışma aralığı hedeflenen seviyelerin % 50'si ile % 150'si arasındadır (Ozkan, 2012; Gumustas ve Ozkan, 2011 ve Ozkan ve ark., 2015). Çalışma aralığı seçilen yöntemin karakteristiğine göre değişebilir.

2.2.4.2.3. Teşhis Sınırı (TS, LOD) ve Tayin Alt Sınırı (TAS, LOQ)

Bir numune içinde analizi yapılacak bileşenin (analit) teşhis edilebilen, ancak kabul edilebilir bir belirsizlikle miktar tayini yapılamayan en düşük derişimi TS olarak ifade edilir. TAS ise doğru bir şekilde tayin edilebilen cevabı veren en küçük analit derişimini ifade eder. Bu değerler birkaç yolla bulunabilir veya hesaplanabilir. Bunlar, görsel değerlendirme, sinyal-gürültü oranı ve cevabın standart sapması ve eğim kullanılarak hesaplanması yöntemleridir.

Görsel yöntem ile hazırlanabilecek en düşük derişimdeki çözelti hazırlanır ve sisteme enjekte edilir bu işlem bileşenin sinyalinin belirlediği fakat alan okumasının yapılamadığı en düşük seviyenin saptanmasına kadar devam eder.

İkinci yöntem için yapılan deneylerden elde edilen kromatogramlardaki sinyal/gürültü oranları kullanılır. Bunun için analitin bilinen düşük derişimdeki çözeltilerinden elde edilen cevaplar, şahit (kör) çözelti cevapları ile karşılaştırılır. Sinyalin gürültüye oranının 3 olduğu derişim TS ve 10 olduğu derişim TAS olarak kabul edilir (Şekil 2.11.).



Şekil 2.11. Sinyal/Gürültü oranının şekilsel ifadesi (Ozkan ve ark., 2015).

$$TS = \frac{3.3 \times s}{m} \text{ ve } TAS = \frac{10 \times s}{m} \quad (\text{Eşitlik 2.2.})$$

Eşitlik 2.2’de s standart sapmayı, m ise ilgili kalibrasyon doğrusunun eğimini ifade etmektedir. Bu eşitlikler aynı zamanda eğri fonksiyonuna bağlı olarak TS, TAS ve duyarlılık arasındaki ilişkiyi de göstermektedir (Gumustas ve Ozkan, 2011 ve Ozkan, 2012).

2.2.4.2.4. Kesinlik

Analiz için geliştirilen sıvı kromatografik yöntemin gerçek çalışma koşullarındaki tekrarlanabilirliğinin ölçüsüdür (Şekil 2.12.). Sonuçlar yüzde bağıl standart sapma (% BSS) olarak raporlanır.

Kesinlik üç seviyede incelenir:

- ✓ Enjeksiyonlar arası tekrarlanabilirlik (tekrar edilebilirlik),
- ✓ Orta kesinlik,
- ✓ Tekrar elde edilebilirlik

Kısa sürelerde aynı numune veya çözeltiler kullanılarak aynı şartlar altında elde edilen kesinlik parametresi *tekrarlanabilirlik* olarak ifade edilir. Kromatografik çalışmalarda enjeksiyonun tekrarlanabilirliği olarak da adlandırılır. Elde edilecek % BSS değeri ≤ 1.0 olmalıdır. Bu değer eser element analizlerinde, biyolojik numunelerde ve safsızlık tayinlerinde % 5'e kadar kabul edilebilir seviyededir.

Orta kesinlik, laboratuvar içi deneysel farklılıkları belirtir. Çalışmalar arası, deneyler arası veya gün içi kesinlik olarak da tanımlanabilir. Analit çözeltisi aynı günde ve/veya farklı analizciler tarafından hazırlanır. Hazırlanan çözeltilerin her birinden en az 3'er defa ölçüm yapılır. Sonuçlar %BSS kullanılarak ifade edilir ve % BSS ≤ 2 olmalıdır. Eğer biyolojik numunelerle çalışılıyorsa bu kesinlik derecesini veren % BSS değerleri % 10-15'e kadar çıkabilmektedir.

Tekrar elde edilebilirlik, kromatografik yöntemlerin farklı şartlarda, farklı günlerde, farklı laboratuvarlardaki kullanımının kesinliğini belirtir. Tekrar elde edilebilirlik kriteri % BSS ≤ 2 olmalıdır. Ancak safsızlık veya eser madde analizlerinde bu oran % 10-15'e kadar kabul edilebilir seviyededir.

2.2.4.2.5. Doğruluk (Geri Kazanım)

Doğruluk, validasyon çalışmalarının en zor ve en kilit parçasıdır. Analiz sonucu elde edilen değerin gerçek (referans) değere yakınlığının ölçüsüdür (Şekil 2.12.). Sonuçlar ortalama % geri kazanım cinsinden ifade edilir. Ortama ilave edilen saf analitin, analiz yapılan ortamdan hangi oranda geri alınabildiğinin göstergesidir. Geri kazanım çalışmaları en az 3 değişik derişim için yapılır; bunlar genellikle hedef değerin % 25, % 50 ve % 100'üne eşdeğer olacak derişim değerleri seçilerek kullanılır. Seçilen herbir derişim değeri için minimum 5 tekrarlı analiz yapılmalıdır ve bunun sonucunda geri kazanım sonuçları % 100'üne kadar yakınsa yöntemin o kadar doğru olduğu düşünülür.

Doğruluk bir takım yaklaşımlarla saptanıp, gösterilebilir. Bunlar:

- ✓ Kesin doğrusallık ve seçicilik,
- ✓ Elde edilen sonuçların, geçerli ve bağımsız başka bir yöntem ile kıyaslanması,
- ✓ Analizi yapılacak gerçek numuneye uygulanması,
- ✓ İlaç numunesine veya matris ortamına etken maddeyi standart ekleme ile ilave edip, geri kazanımının bulunmasıdır.

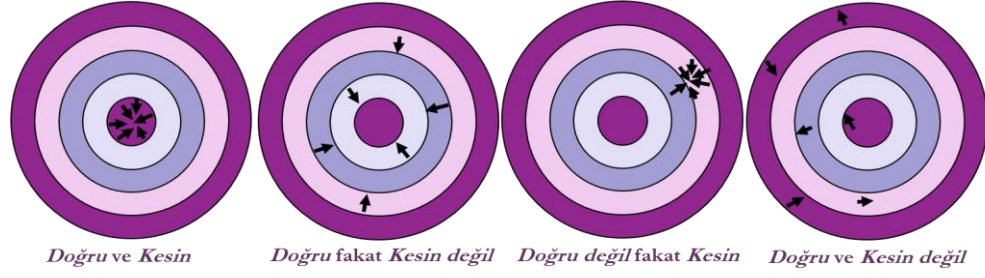
Kör matriks ortamına analizi yapılan maddenin ilavesi: Matriks etkisi olan numunelerle çalışıldığı zaman tercih edilir. Analitin boş ortama farklı derişimlerde eklenmesiyle gerçekleştirilir. Bu analizlere örnek olarak ilaç etken madde analizleri için, etken madde içermeyen fakat yardımcı maddelerin olduğu ortam kullanılabilir. Genellikle % 50, 75, 100, 125 ve 150 oranında madde ilavesi yapılır ve her seviyede en az 3'er ölçüm yapılır. Sonuçlar % geri kazanım olarak ifade edilir ve % BSS ve/veya % bağıl hata (BH) (% Bias) ile beraber raporlanır.

Referans standart bir yöntem kullanarak sonuçların kıyaslanması: Geliştirilen analiz yöntemi ile 3 farklı derişimde, 3'er ölçüm alınır ve bu değerler % geri kazanım değerlerine çevrildikten sonra tümü bir araya getirilir. Her iki yönteme ait analiz sonuçları istatistiksel olarak kıyaslanır. Bu işlem yapılırken Student t ve F testleri kullanılır. t testi ile iki yöntemle elde edilen sonuçların ortalamaları arasındaki farklar, F testi ile de standart sapmalar arasındaki farklar karşılaştırmalı olarak rapor edilir. Bulunan değerler, teorik değerler ile karşılaştırılır, karşılaştırma sonucunda hesaplanarak elde edilen değerler çizelgede yer alan teorik değerlerden küçükveya bu değere yakın ise geliştirilen yöntemin en az referans olarak kabul edilen yöntem kadar hassas olduğu kanısına varılır. Sonuçların ortalamaları, aşağıdaki eşitliklerde görülen % bağıl standart sapma (% BSS) ve/veya % bağıl hata (BH) (% Bias) ile beraber verilir.

$$\% BSS = \frac{SS}{\bar{X}} \times 100 \qquad \% BH = \frac{GD - \bar{X}}{GD} \times 100 \quad (\text{Eşitlik 2.3.})$$

Eşitlik 2.3'de, GD: Gerçek Değer, SS: Standart Sapma ve $\bar{X}$: Ortalama Değeri ifade eder.

Standart ekleme yöntemi ile saf madde ilavesi: Boş bir matriks bulunmayan durumlarda bu yöntem sıklıkla tercih edilir. Analizi yapılacak maddenin bilinen ve değişik miktarları matriks içerisinde yer alan ve miktarı bilinmeyen veya daha önce tayin edilmiş aynı maddenin üzerine ilave edilir. Asıl numunedeki etken madde derişimi deney verilerinden matematiksel olarak hesaplanır. Genellikle % 25, 50, 100 oranında madde ilave etmek iyi bir yaklaşımdır. Genellikle, katkı maddelerinin ve yardımcı maddelerin bilinmediği durumlarda kullanılır. Sonuçların ortalamaları, % BSS ve/veya % BH ile beraber raporlanır.



Şekil 2.12. Kesinlik ve doğruluk parametrelerinin şekilsel ifadesi

2.2.4.2.6. Sağlamlık

Geliştirilen bir kromatografik yöntemin analiz parametrelerindeki ufak değişimlerden etkilenmeden kalabilme kapasitesidir. Bu parametreler organik çözücü yüzdesi, pH, iyonik güç, dalga boyu, akış hızı ve sıcaklık gibi etkenlerdir (ICH Q2B, 2005).

2.2.4.2.7. Tutarlılık

Tutarlılık, kullanılan yöntemin gerçek pratik koşullar altında tekrar edilebilirliğinin saptanmasıdır ve tekrar edilebilirlik ve tekrar elde edilebilirlik gibi değerlerle de yakından alakalıdır (Heyden ve Massart, 1996). Bunun için çalışma, aynı laboratuvarında bulunan farklı analizciler, farklı cihazlar tarafından gerçekleştirilmelidir. Bunun yanında kullanılan reaktif ve çözücülerin markalarının ve üretim serilerinin değiştirilmesi gibi normal analiz koşullarının değiştirilmesi, aynı marka ve modele sahip yeni bir kolon kullanarak tekrarlanması gereklidir. Özellikle yöntemin farklı bir laboratuvarında gerçekleştirildiği durumlarda bu parametre son derece önemlidir ve elde edilen sonuçlar % BSS değeri ile ifade edilir (Ozkan, 2012).

2.2.4.2.8. Stabilite

Bu parametre genellikle çalışılan analitlerin kararlılığı ile alakalıdır. Analitin farklı koşullar altında ne kadar süre kararlı kalabildiğini bize gösterir. Stabilite alışmaları sonucunda yöntemin seçiciliği de tekrar denenmiş olur. Özellikle meydana gelebilecek bozunma ürünlerinin etken madde yanında tayin edilebildiğinin bir göstergesidir. 4 farklı şekilde stabilite çalışmaları yapılabilmektedir:

- ✓ Kısa süreli stabilite
- ✓ Uzun süreli stabilite
- ✓ Dondurma-özme stabilitesi
- ✓ Hızlandırılmış bozundurma alışmaları

Kısa süreli stabilite çalışmalarında farklı derişim seviyelerinden alınan örnekler oda sıcaklığında özölür ve 4-24 saat aralığında bu ortamda kalması sağlanır. Bu işlem sonrasında sonuçlar taze hazırlanmış çözelti ile karşılaştırılır.

Uzun süreli stabilite çalışmalarında kullanılan etken maddenin ne kadar süre kararlı kaldığı ölçölür. 3, 6 ve 12 aylık zaman dilimlerinde ölçümler alınır ve taze çözelti sonuçları ile karşılaştırılır.

Dondurma-özme stabilitesi üç döngü üzerinden gerçekleştirilir. Üç farklı derişimdeki çözelti istenilen sıcaklıkta 24 saat süre ile dondurulur. Daha sonra kendiliğinden özölmesi için beklenir ve bu işlem 2 defa daha tekrarlandıktan sonra analiz yapılarak sonuçlar karşılaştırılır.

Hızlandırılmış bozunma çalışmaları kullanılarak etken maddenin hızlı bir biçimde bozulması sağlanır ve bu sayede safsızlıkların veya bozunma sonucu oluşan

ürünlerin analize etkisi incelenir. Bu çalışmalarda incelenen parametreler Çizelge 2.12’de tablolanmıştır.

Çizelge 2.12. Hızlandırılmış bozunma koşulları ve uygulanış biçimleri

Bozunma koşulu	Uygulanış biçimi	Açıklama
Sıcaklık	Çözelti	Sabit sıcaklıkta tutulabilen su banyosuna yerleştirilen analit çözeltisi 10 °C’lik artışlarla 0,5-1 saat süre ile bekletilir ve analizi yapılır.
	Katı	Belirli miktarda madde tartılır ve sıcaklığı ayarlanmış etüve yerleştirilir. 6 ve 24 saat sonra çözülerek analiz edilir.
Nem	Katı	% 75 ve daha yüksek oranlardaki nemde tutulan belirli sürelerde tutulan maddenin çözeltisi hazırlanarak analiz edilir
Işık	Katı ve Çözelti	254 nm veya 365 nm altında bekletilen numuneler 6 ve 24 saat sonra analiz edilir.
		1,2 milyon lüks saatlik floresan ışık altında 25 °C ve % 60 nem altında bekletilen numuneler analiz edilir.
Asit hidrolizi	Çözelti	0,1 M ve 1,0 M HCl çözeltisinde hazırlanan madde belirli sürelerle analiz edilerek kontrol edilir.
Baz hidrolizi	Çözelti	0,1 M ve 1,0 M NaOH çözeltisinde hazırlanan madde belirli sürelerle analiz edilerek kontrol edilir.
Yükseltgeme	Çözelti	% 3 ve % 30 oranında H ₂ O ₂ çözeltisinde hazırlanan madde belirli sürelerle analiz edilerek kontrol edilir.

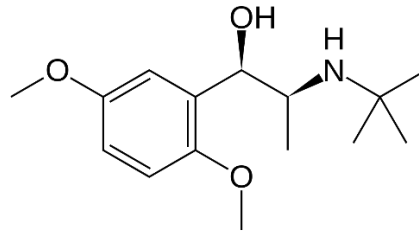
3. BULGULAR

3.1. Etken Maddelerin Saflığı

Tez kapsamında kullanılan Bütoksamin (BUT), İzoksuprin (IZO), Klenbuterol (KLB), Klenpenterol (KLP), Ritodrin (RIT), Simbuterol (SIM), Terbutalin (TER) ve Tulobuterol (TUL) Sigma Aldrich (Müni, Almanya) firmasından temin edilmiştir. Kromatografik sonuçlara dayanarak maddeye ait sinyallerin haricinde bir sinyal gözlemlenmemiştir. Maddelere ait sinyallerin spektrumları da incelenmiş ve literatür verileriyle kıyaslanmıştır. Bu yüzden herhangi ek bir saflaştırılmaya gerek duyulmadan maddeler olduğu gibi deneylerde kullanılmıştır.

3.2. Bütoksamine Ait Sonuçlar

BUT (Şekil 3.1.)'e ait çalışmalar gereç ve yöntem kısmında belirtilen 6 farklı kiral kolon kullanılarak polar organik faz, normal faz ve sulu organik hareketli faz karışımları kullanılarak gerçekleştirilmiştir.



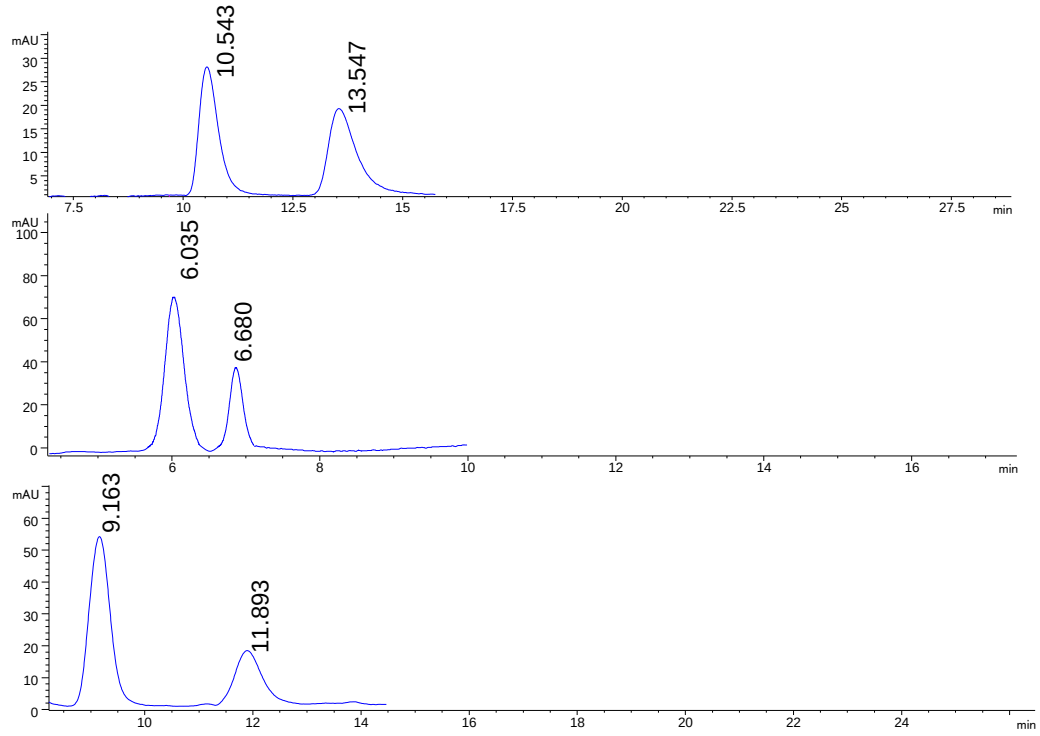
Şekil 3.1. Bütoksamine ait molekül şekli

3.2.1. Bütoksamine Ait Polar Organik Faz ile Yapılan Çalışmalar

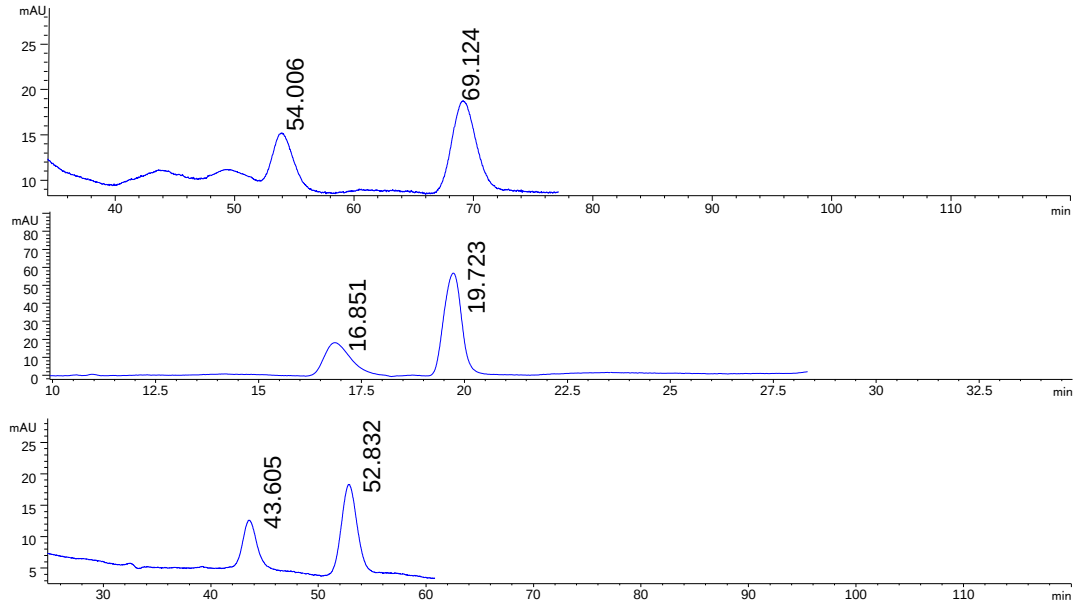
Polar organik hareketli fazlar ile analizlere başlanmış bu sayede analiz süresini kısaltıp daha etkin ayrımlar elde edilmesi planlanmıştır. Metanol, asetonitril, etanol ve izopropanolün hareketli faz olarak kullanıldığı çalışmalarda BUT enantiyomerlerine ait ayırım gözlenmemiştir. Bunun üzerine herbir çözücü için ayrı ayrı asidik (% 0,1 formik asit (FA) ilavesiyle), bazik (% 0,1 dietilamin (DEA) ilavesiyle) ve de hem asidik hem de bazik (% 0,1 formik asit ve % 0,1 dietilamin) katkı maddeleri eklenerek analizler üzerine etkisi incelenmiştir. Bahsedilen polar organik hareketli faz koşullarında hiçbir ayırım gerçekleşmemiştir.

3.2.2. Bütoksamine Ait Normal Faz ile Yapılan Çalışmalar

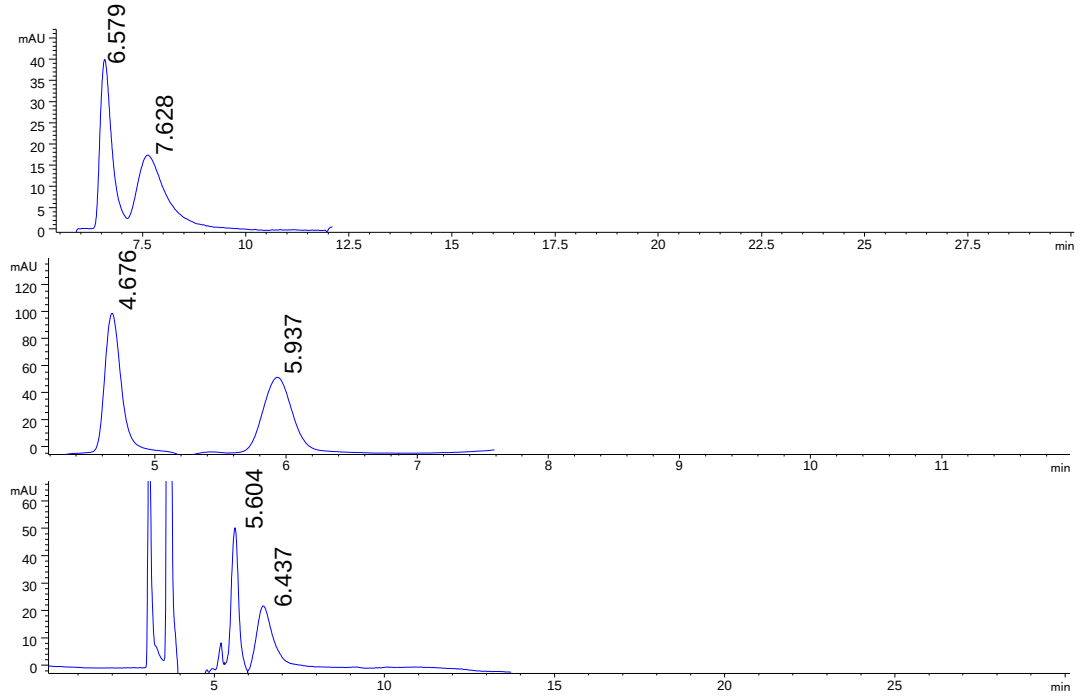
Polar organik fazlar kullanılarak ayırım gerçekleştirilememesi sonucunda normal faz çözücüler ile ayrımların yapılması öngörülmüştür. Normal faz çözücü karışımı olarak n-hekzan ve izopropanolün (IPA) farklı oranlarda (90:10; 80:20; 70:30; (h/h)) hazırlanan karışımları kullanılmıştır. Hiç bir katkı eklenmeden sadece n-hekzan ve izopropanol ile yapılan analizlerde pik şekilleri çok yayvan olmakla birlikte bozulmuştur. Bu karışımlara ayrı ayrı asidik (% 0,1 formik asit ilavesiyle), bazik (% 0,1 dietilamin ilavesiyle) ve de hem asidik hem de bazik (% 0,1 formik asit ve % 0,1 dietilamin) katkı maddeleri eklenerek analizler 6 farklı kolon ile 25 °C sıcaklık, 5 µL enjeksiyon hacmi, 225 nm dalga boyunda dakikada 1 mL akış hızında gerçekleştirilmiştir. Enantiyomerik alıkonma sırasında değişim olup olmadığını görmek için fraksiyonlama yapılmış, elde edilen saf enantiyomerlerden bir tanesi standart ekleme yoluyla 2 katına çıkartılmıştır (Şekil 3.2 - 3.7). Sonuçlara ait sistem uygunluk testi parametreleri Çizelge 3.1’de sunulmuştur.



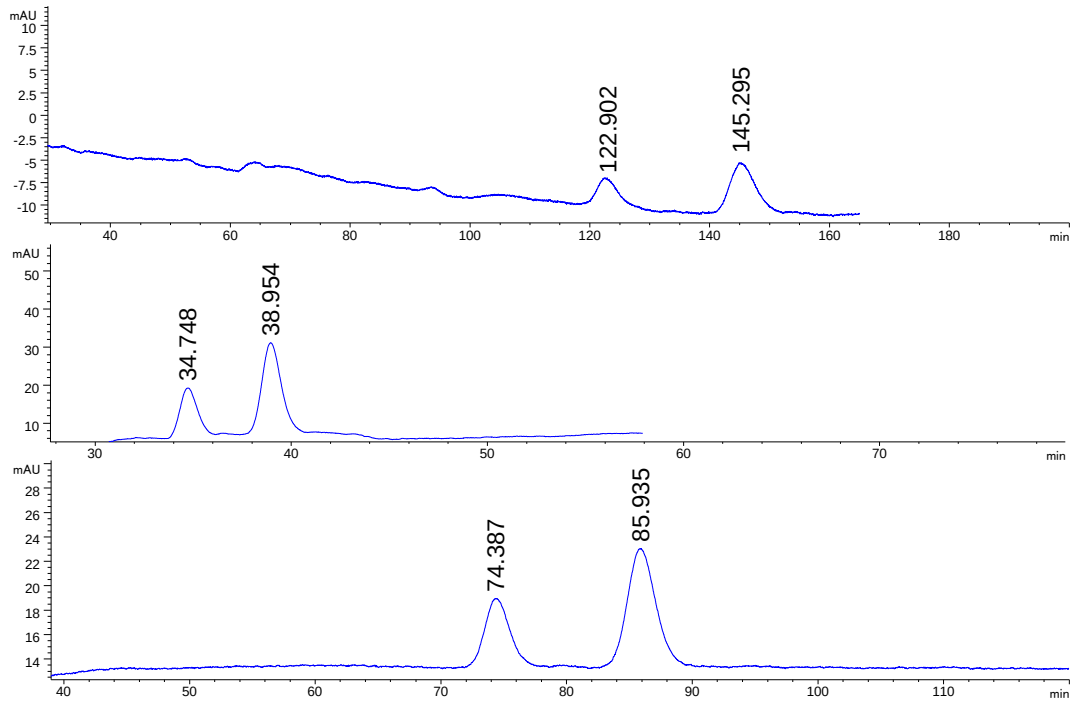
Şekil 3.2. Kolon: Cellulose 1 (250 x 4.6 mm; 3 μ m); hareketli faz: n-hekzan:Ipa:FA (80:20:0,1); n-hekzan:Ipa:DEA (80:20:0,1); n-hekzan:Ipa:FA:DEA (80:20:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya).



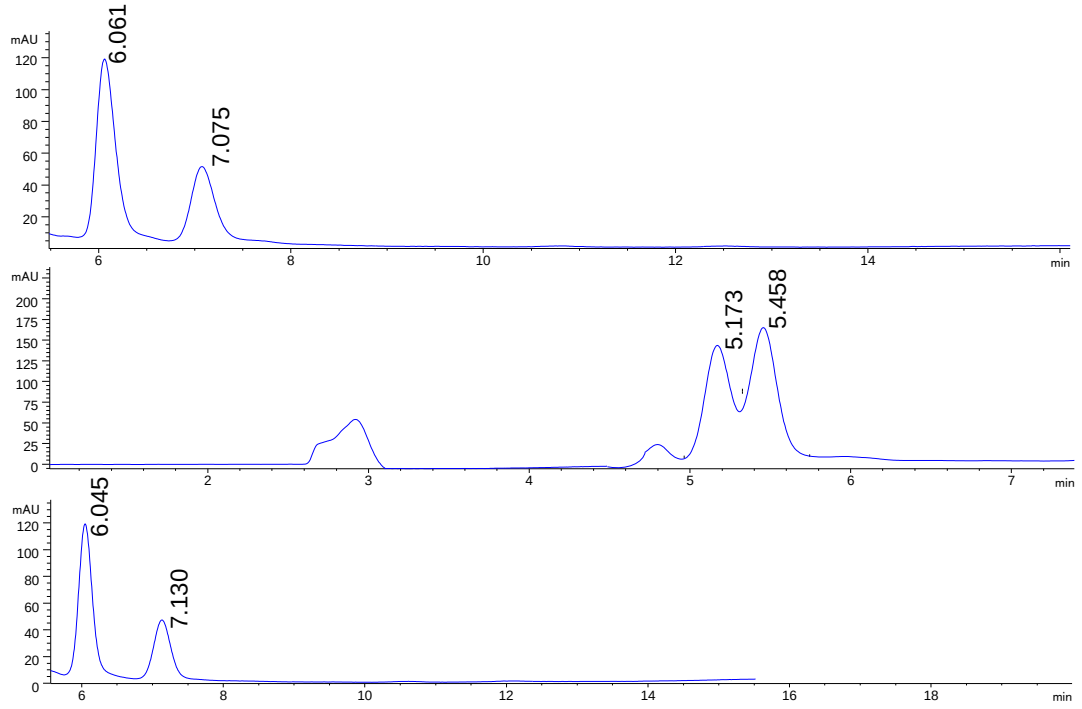
Şekil 3.3. Kolon: Cellulose 2 (250 x 4.6 mm; 3 μ m); hareketli faz: n-hekzan:Ipa:FA (80:20:0,1); n-hekzan:Ipa:DEA (80:20:0,1); n-hekzan:Ipa:FA:DEA (80:20:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya).



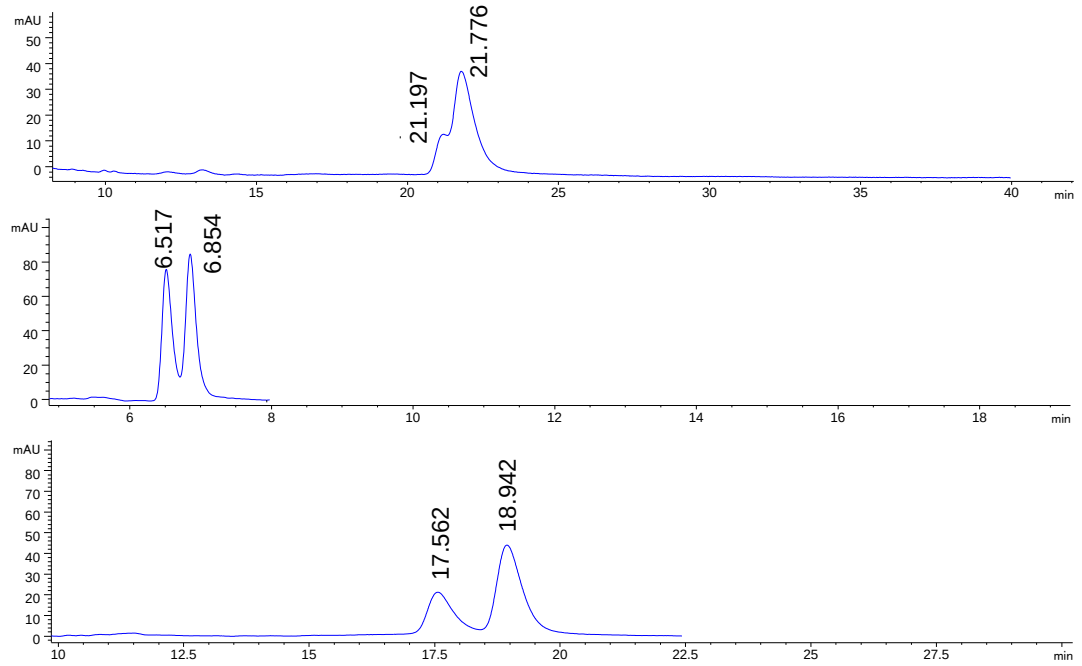
Şekil 3.4. Kolon: Cellulose 3 (250 x 4.6 mm; 3 μ m); hareketli faz: n-hekzan:Ipa:FA (80:20:0,1); n-hekzan:Ipa:DEA (80:20:0,1); n-hekzan:Ipa:FA:DEA (80:20:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya).



Şekil 3.5. Kolon: Cellulose 4 (250 x 4.6 mm; 3 μ m); hareketli faz: n-hekzan:Ipa:FA (80:20:0,1); n-hekzan:Ipa:DEA (80:20:0,1); n-hekzan:Ipa:FA:DEA (80:20:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya).



Şekil 3.6. Kolon: Amylose 1 (250 x 4.6 mm; 5 µm); hareketli faz: n-hekzan:Ipa:FA (80:20:0,1); n-hekzan:Ipa:DEA (80:20:0,1); n-hekzan:Ipa:FA:DEA (80:20:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya).



Şekil 3.7. Kolon: Amylose 2 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:Ipa:FA (80:20:0,1); n-hekzan:Ipa:DEA (80:20:0,1); n-hekzan:Ipa:FA:DEA (80:20:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya).

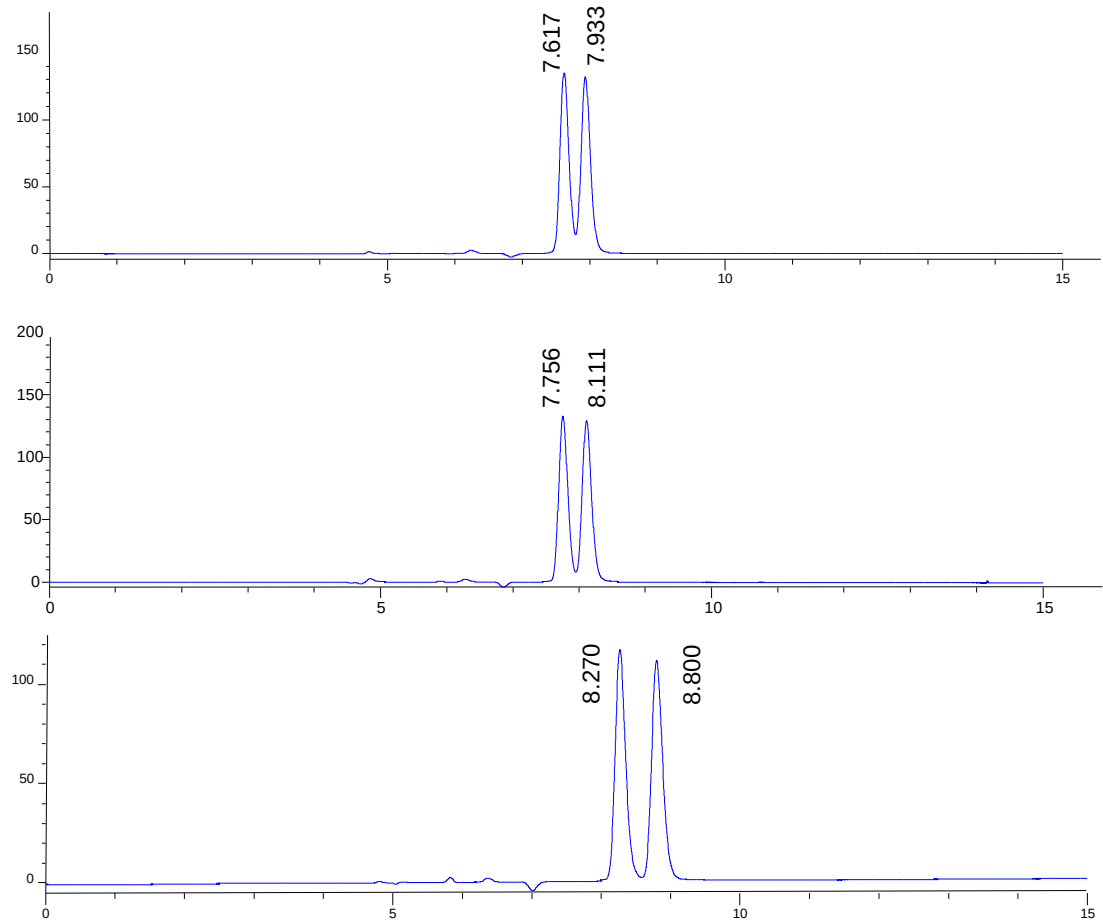
Çizelge 3.1. BUT için normal faz koşullarına ait sistem uygunluk testi sonuçları.

Kolon	80:20:0,1 (n-hekzan:IPA:FA)						80:20:0,1 (n-hekzan:IPA:DEA)						80:20:0.1:0,1 (n-hekzan:IPA:FA:DEA)					
	t ₁	t ₂	N1	N2	Rs	α	t ₁	t ₂	N1	N2	Rs	α	t ₁	t ₂	N1	N2	Rs	α
Cellulose 1	10,54	13,54	2868	2334	3,14	1,30	6,03	6,68	6891	8020	2,19	1,11	9,16	11,89	2637	2825	3,39	1,30
Cellulose 2	54,00	69,12	4572	5536	4,37	1,28	16,85	19,72	3272	9484	2,88	1,17	43,61	52,83	5640	6194	3,68	1,21
Cellulose 3	6,58	7,63	2787	684	1,26	1,16	4,68	5,93	7354	3454	4,05	1,27	5,60	6,43	3524	918	1,35	1,15
Cellulose 4	122,90	145,30	5446	5264	3,05	1,18	34,75	38,95	6965	7297	2,41	1,12	74,38	85,94	6611	6872	2,95	1,16
Amylose 1	6,06	7,07	4664	4209	2,56	1,17	5,17	5,45	4315	4654	0,90	1,06	6,05	7,13	4843	4275	2,77	1,18
Amylose 2	21,19	21,77	-	-	-	1,00	6,51	6,85	9267	5391	0,69	1,03	17,56	18,94	5384	6733	1,47	1,08

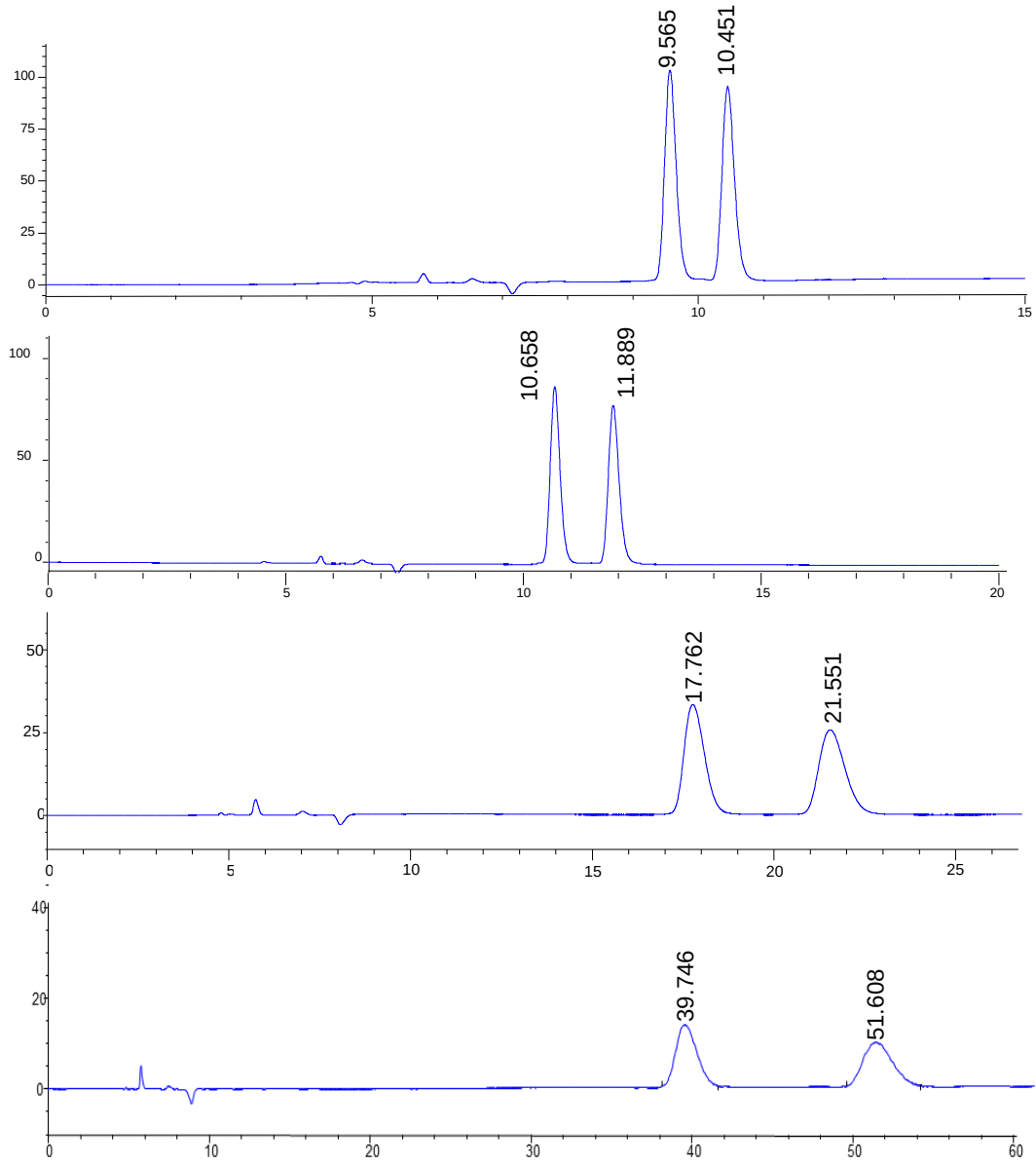
*Kırmızı ile işaretlenen sonuçlarda, standart ekleme yapılarak miktarı artırılan enantiyomerin yeri belirtilmektedir.

3.2.3. Bütoksamine Ait Sulu Organik Faz Karışımı ile Yapılan Çalışmalar

Normal faz koşullarında ayrımlar gerçekleştirildikten sonra sulu organik faz karışımları ile de ayrımlar gerçekleştirilmeye çalışılmıştır. Bu bağlamda, metanol (MeOH) ile belirli oranlarda su (% 3 - 40) karıştırılarak ve bu karışımlara % 0,1 DEA ilave edilerek altı farklı kolonda analizler yapılmıştır. Analizler sonucunda sadece Cellulose 1 kolonunda ayırım gerçekleşmiş, diğer kolonlarda ise enantiyomerler ayrılmayarak kolonu beraber terketmişlerdir. Analize ait diğer koşullar ise, 25 °C sıcaklık, 0,7 µL enjeksiyon hacmi, 225 nm dalga boyunda ve dakikada 0,5 mL akış hızı olacak şekilde ayarlanmıştır (Şekil 3.8 ve 3.9). Sonuçlara ait sistem uygunluk testi parametreleri Çizelge 3.2’de tablolanmıştır.



Şekil 3.8. Kolon: Cellulose 1 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: MeOH:H₂O:DEA (97:3:0,1); (95:5:0,1); (90:10:0,1) (yukarıdan aşağıya).



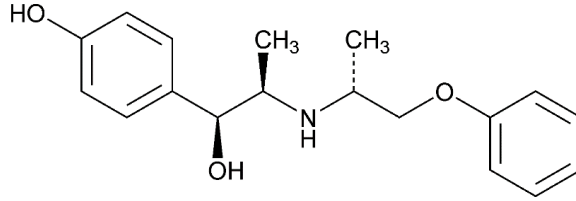
Şekil 3.9. Kolon: Cellulose 1 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: MeOH:H₂O:DEA (85:15:0,1); (80:20:0,1); (70:30:0,1); (60:40:0,1) (yukarıdan aşağıya).

Çizelge 3.2. BUT için sulu polar organik faz koşullarına ait sistem uygunluk testi sonuçları.

Hareketli faz bileşimi (MeOH/H ₂ O/DEA)	Cellulose 1					
	t ₁	t ₂	N1	N2	Rs	α
97/3/0,1	7,61	7,93	15114	15641	1,26	1,04
95/5/0,1	7,76	8,11	14843	15331	1,37	1,05
90/10/0,1	8,27	8,80	14057	14419	1,85	1,06
85/15/0,1	9,57	10,45	13677	14053	2,68	1,09
80/20/0,1	10,66	11,89	13102	13227	3,13	1,12
70/30/0,1	17,76	21,55	4634	4158	3,18	1,21
60/40/0,1	39,75	51,61	4018	3571	3,97	1,30

3.3. İzoksuprine Ait Sonuçlar

IZO'ya (Şekil. 3.10) ait çalışmalar gereç ve yöntem kısmında belirtilen 6 farklı kiral kolon kullanılarak polar organik faz, normal faz ve sulu organik hareketli faz karışımları kullanılarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.10. İzoksuprine ait molekül şekli

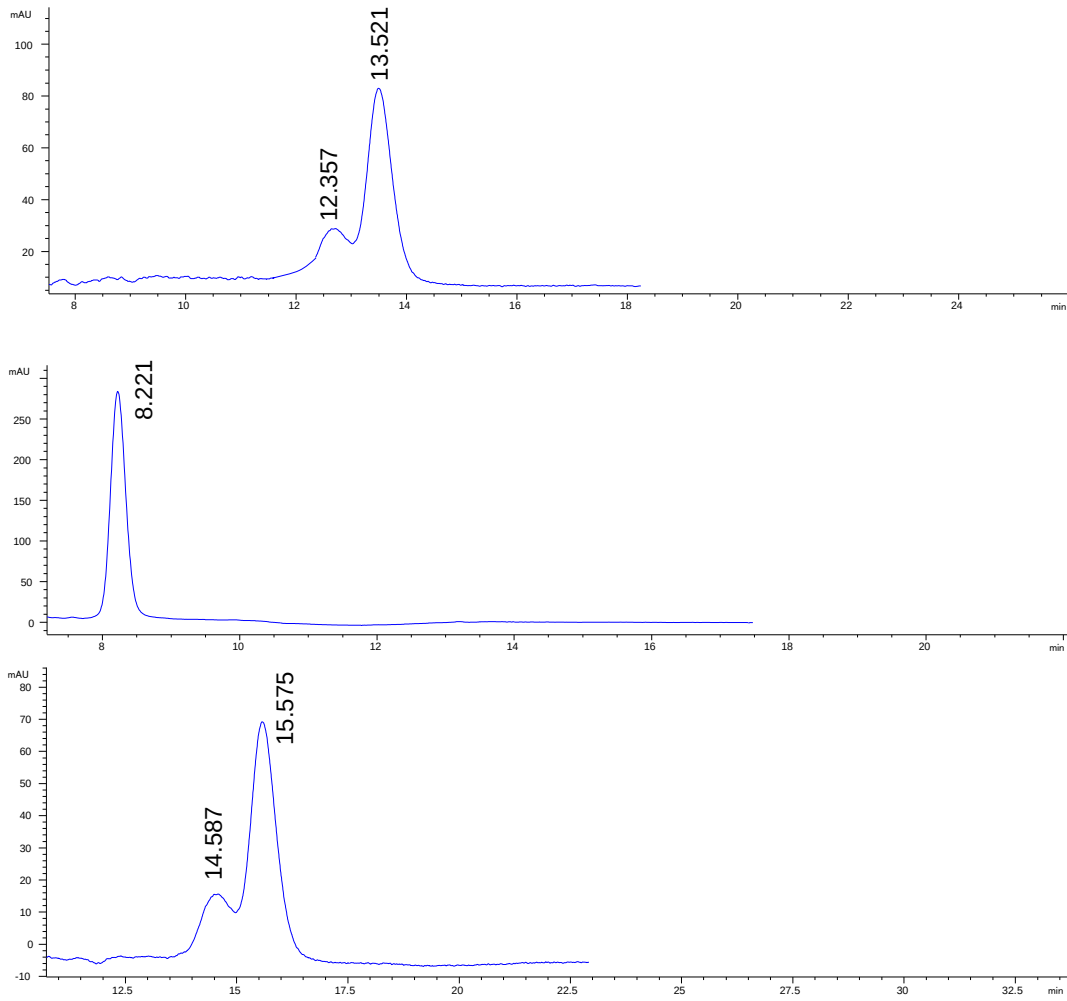
3.3.1. İzoksuprine Ait Polar Organik Faz ile Yapılan Çalışmalar

IZO için de polar organik hareketli fazlar ile analizlere başlanmış bu sayede analiz süresini kısaltıp daha keskin pik şekilleri elde edilmesi düşünülmüştür. Metanol, asetoneitril, etanol ve izopropanolün hareketli faz olarak kullanıldığı çalışmalarda IZO enantiyomerleri birbirlerinden hiçbir koşulda (asidik (% 0,1 FA ilavesiyle), bazik (% 0,1 DEA ilavesiyle) ve de hem asidik hem de bazik (% 0,1 FA ve % 0,1 DEA) katkı maddeleri eklenerek) ayrılmamışlardır.

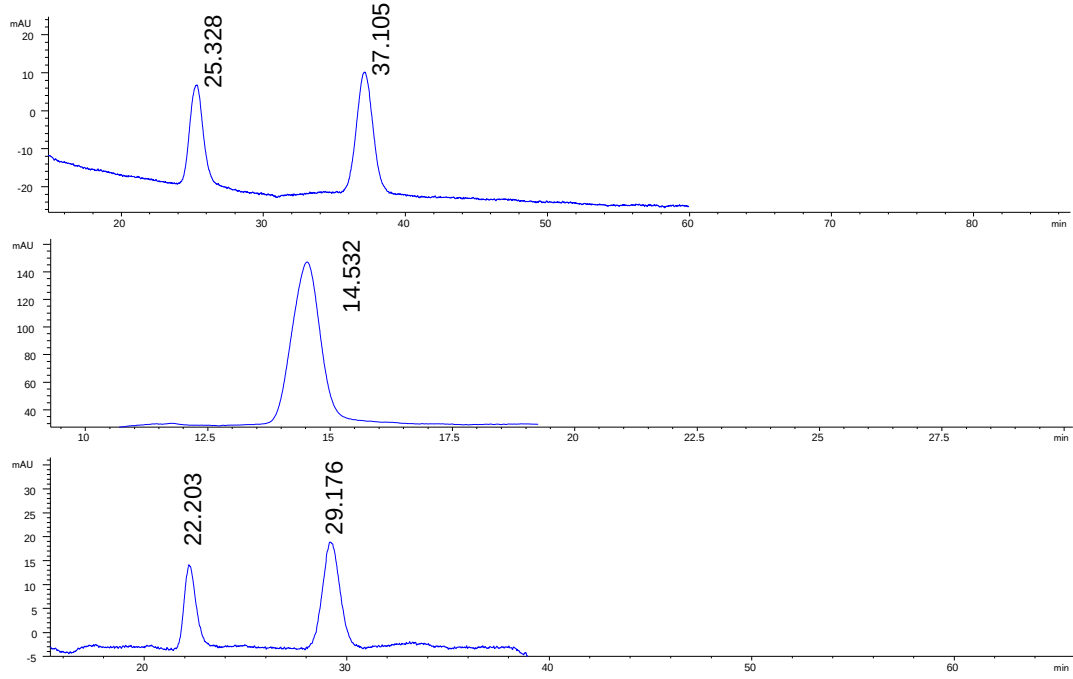
3.3.2. İzoksuprine Ait Normal Faz ile Yapılan Çalışmalar

Polar organik fazlar kullanılarak enantiyomerler ayırlamadığı için normal faz çözücüler ile ayrımların yapılması öngörülmüştür. Normal faz çözücü karışımı olarak farklı oranlarda (90:10; 80:20; 70:30; (h/h)) n-hekzan ve IPA karışımları

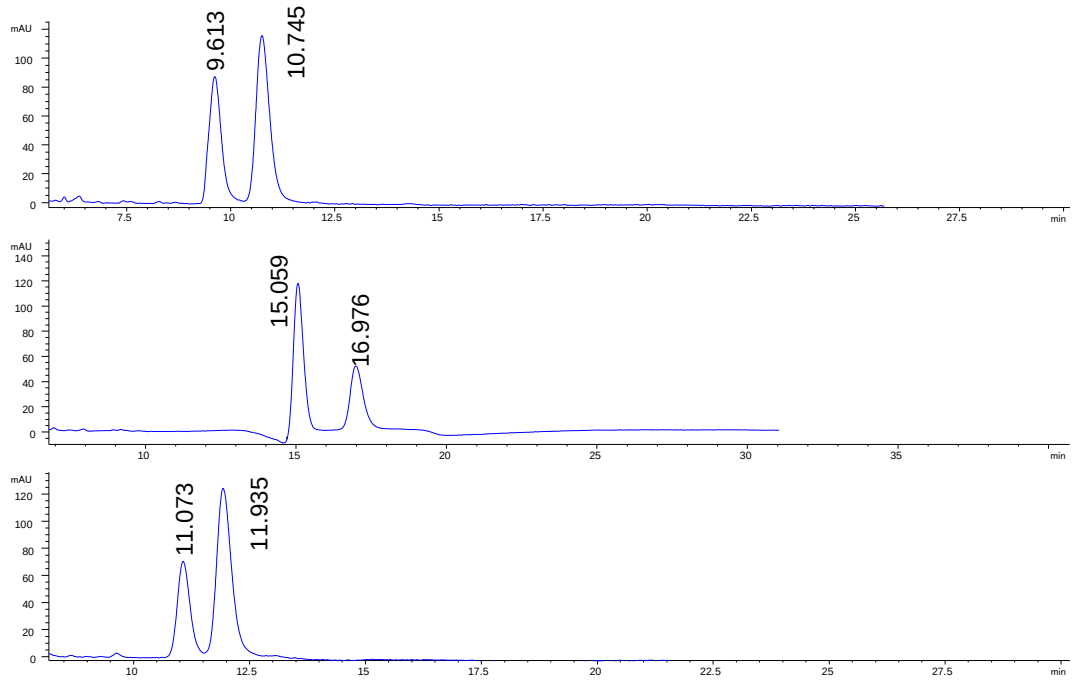
hazırlanmıştır. Ayrıca karışımlara ayrı ayrı asidik (% 0,1 FA ilavesiyle), bazik (% 0,1 DEA ilavesiyle) ve de hem asidik hem de bazik (% 0,1 FA ve % 0,1 DEA) katkı maddeleri eklenerek analizler 6 farklı kolon ile 25 °C sıcaklık, 5µL enjeksiyon hacmi, 225 nm dalga boyunda, dakikada 1 mL akış hızı ile gerçekleştirilmiştir. Enantiyomerik alıkonma sırasında değişim olup olmadığını görmek için fraksiyonlama yapılmış elde edilen saf enantiyomerlerden bir tanesi standart ekleme yoluyla 2 katına çıkartılmıştır (Şekil 3.11 - 3.16). Sonuçlara ait sistem uygunluk testi parametreleri Çizelge 3.3’de sunulmuştur.



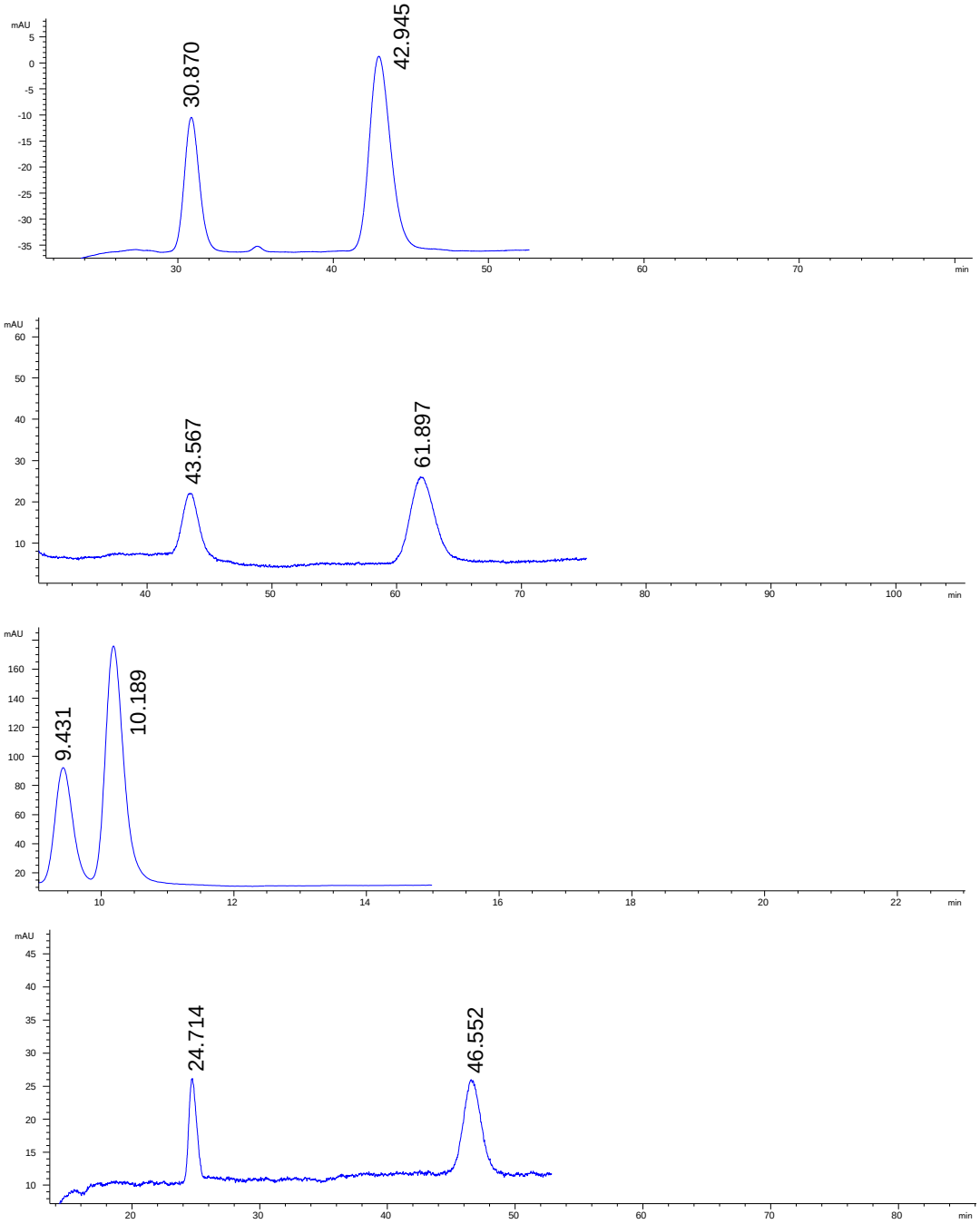
Şekil 3.11. Kolon: Cellulose 1 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:İpa:FA (80:20:0,1); n-hekzan:İpa:DEA (80:20:0,1); n-hekzan:İpa:FA:DEA (80:20:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya).



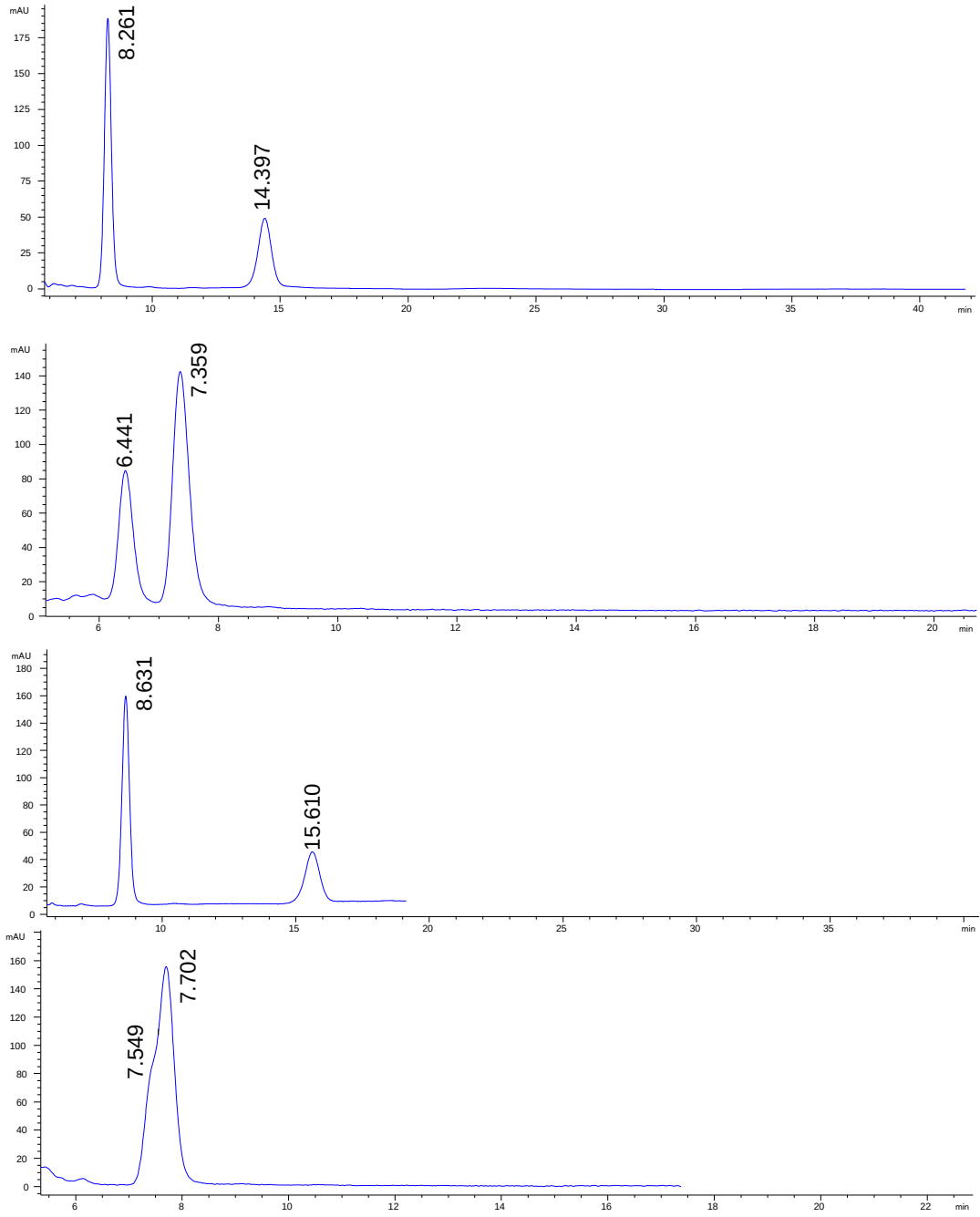
Şekil 3.12. Kolon: Cellulose 2 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:Ipa:FA (80:20:0,1); n-hekzan:Ipa:DEA (80:20:0,1); n-hekzan:Ipa:FA:DEA (80:20:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya).



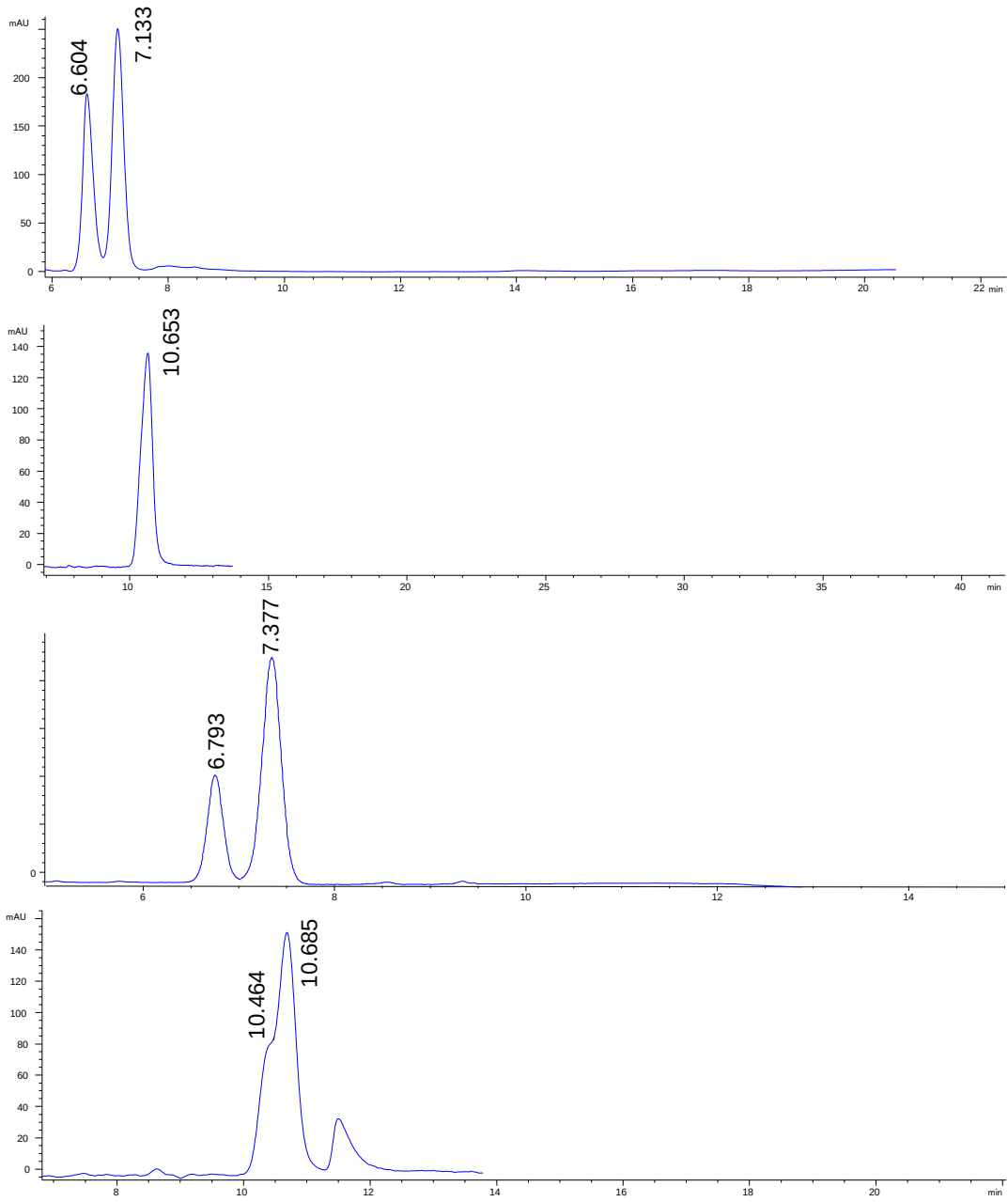
Şekil 3.13. Kolon: Cellulose 3 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:Ipa:FA (80:20:0,1); n-hekzan:Ipa:DEA (80:20:0,1); n-hekzan:Ipa:FA:DEA (80:20:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya).



Şekil 3.14. Kolon: Cellulose 4 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:Ipa (80:20:); n-hekzan:Ipa:FA (80:20:0,1); n-hekzan:Ipa:DEA (80:20:0,1); n-hekzan:Ipa:FA:DEA (80:20:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya).



Şekil 3.15. Kolon: Amylose 1 (250 x 4.6 mm; 5 µm); hareketli faz: n-hekzan:İpa (80:20); n-hekzan:İpa:FA (80:20:0,1); n-hekzan:İpa:DEA (80:20:0,1); n-hekzan:İpa:FA:DEA (80:20:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya).



Şekil 3.16. Kolon: Amylose 2 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:Ipa (80:20); n-hekzan:Ipa:FA (80:20:0,1); n-hekzan:Ipa:DEA (80:20:0,1); n-hekzan:Ipa:FA:DEA (80:20:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya).

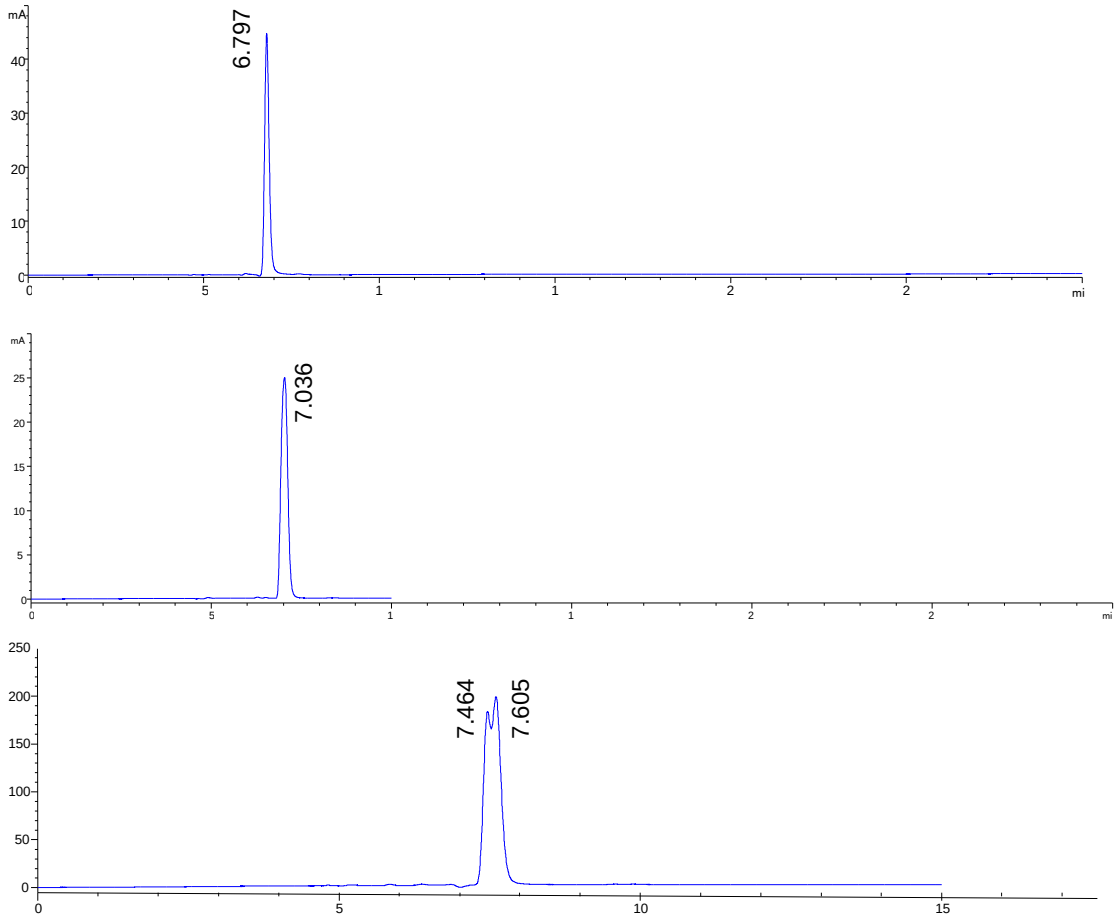
Çizelge 3.3. IZO için normal faz koşullarına ait sistem uygunluk testi sonuçları.

Kolon	80:20 (n-hekzan:IPA)						80:20:0,1 (n-hekzan:IPA:FA)						80:20:0,1 (n-hekzan:IPA:DEA)						80:20:0,1:0,1 (n-hekzan:IPA:FA:DEA)					
	t ₁	t ₂	N1	N2	Rs	α	t ₁	t ₂	N1	N2	Rs	α	t ₁	t ₂	N1	N2	Rs	α	t ₁	t ₂	N1	N2	Rs	α
Cellulose 1	8,31	8,31	-	-	-	1,00	12,36	13,52	663	3154	0,81	1,09	8,22	8,22	-	-	-	1,00	14,59	15,57	-	-	0,90	1,05
Cellulose 2	15,71	18,98	4808	5666	3,4	1,21	25,33	37,11	3461	4655	6,03	1,46	14,53	14,53	-	-	-	1,00	22,20	29,18	6668	5047	5,10	1,31
Cellulose 3	13,30	13,30	-	-	-	1,01	9,61	10,75	4897	5221	1,97	1,12	15,10	16,98	9345	7437	2,71	1,13	11,07	11,93	7776	6827	1,59	1,08
Cellulose 4	30,81	42,95	4819	4750	5,64	1,39	43,56	61,90	5071	4606	6,01	1,42	9,43	10,19	5997	6999	1,55	1,08	24,71	46,55	7318	5336	11,77	1,88
Amylose 1	8,26	14,40	4601	3751	8,58	1,74	6,44	7,36	3459	3334	1,93	1,14	8,63	15,61	4485	3668	9,01	1,81	7,55	7,70	-	-	-	1,01
Amylose 2	6,60	7,13	6355	6193	1,52	1,08	10,65	10,65	-	-	-	1,0	6,79	7,38	9977	8065	1,95	1,09	10,46	10,68	-	-	-	1,01

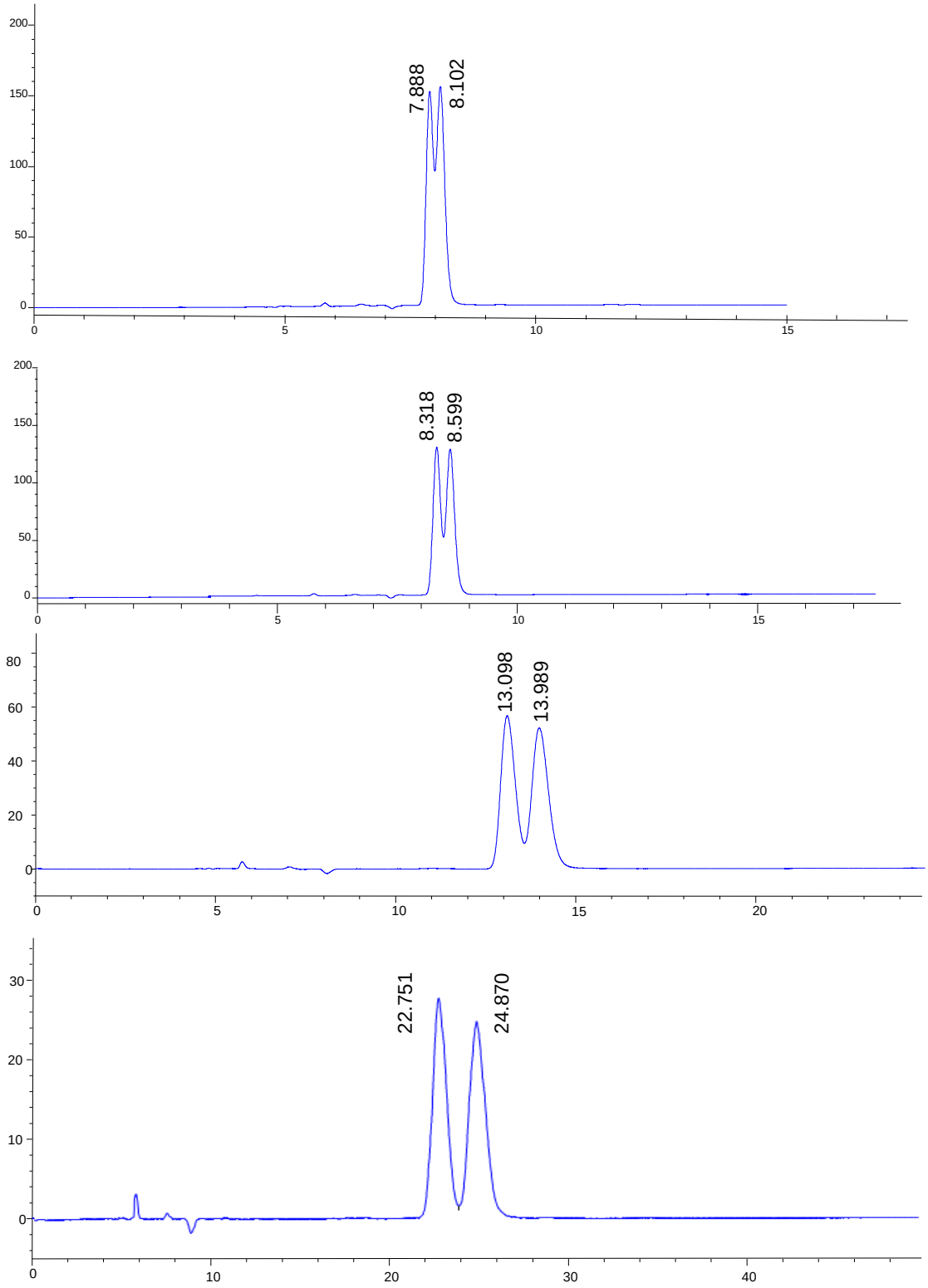
*Kırmızı ile işaretlenen sonuçlarda, standart ekleme yapılarak miktarı artırılan enantiyomerin yeri belirtilmektedir.

3.3.3. İzoksuprine Ait Sulu Organik Faz Karışımı ile Yapılan Çalışmalar

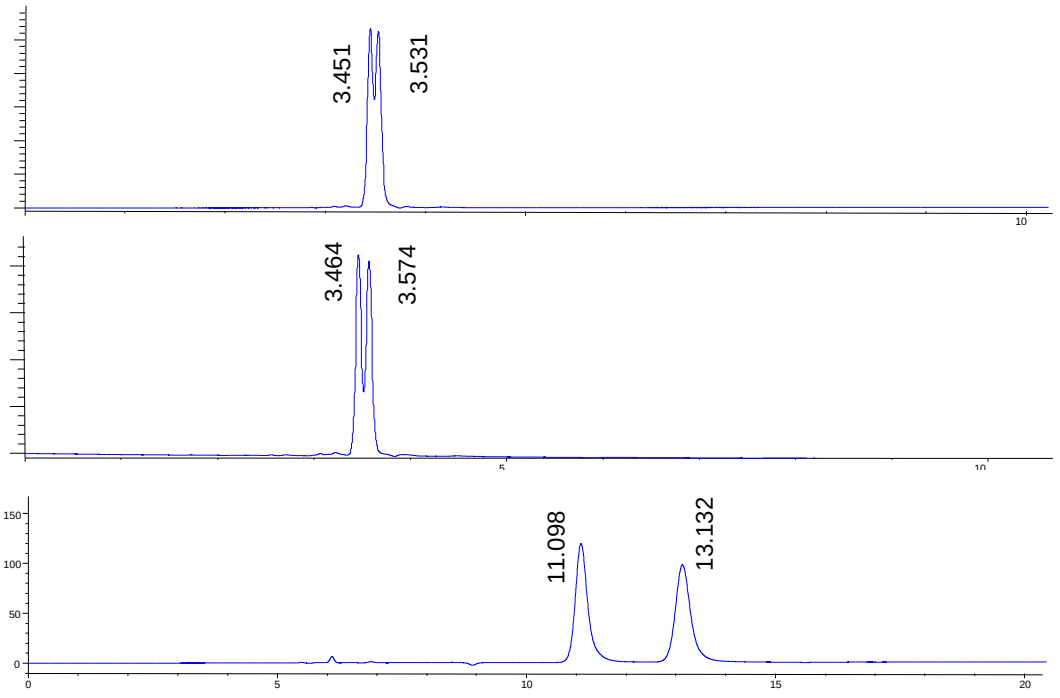
Normal faz koşullarında ayrımlar gerçekleştirildikten sonra sulu organik faz karışımları ile de analizler optimize edilmeye çalışılmıştır. Metanolün belirli oranlarda su (% 0 - 30) ile karıştırılması ve bu karışımlara % 0,1 DEA ilave edilmesiyle 6 farklı kolonda analizler yapılmıştır. Analizler sonucunda Cellulose 1, Cellulose 2 ve Cellulose 4 kolonlarında ayırım gerçekleşmiş, diğer kolonlarda ise enantiyomerler ayrılmamıştır. Analize ait diğer koşullar ise, 25 °C sıcaklık, 0,4 µL enjeksiyon hacmi, 225 nm dalga boyunda ve dakikada 0,5 mL akış hızı olacak şekilde ayarlanmıştır (Şekil 3.17 - 3.20). Sonuçlara ait sistem uygunluk testi parametreleri Çizelge 3.4’de sunulmuştur.



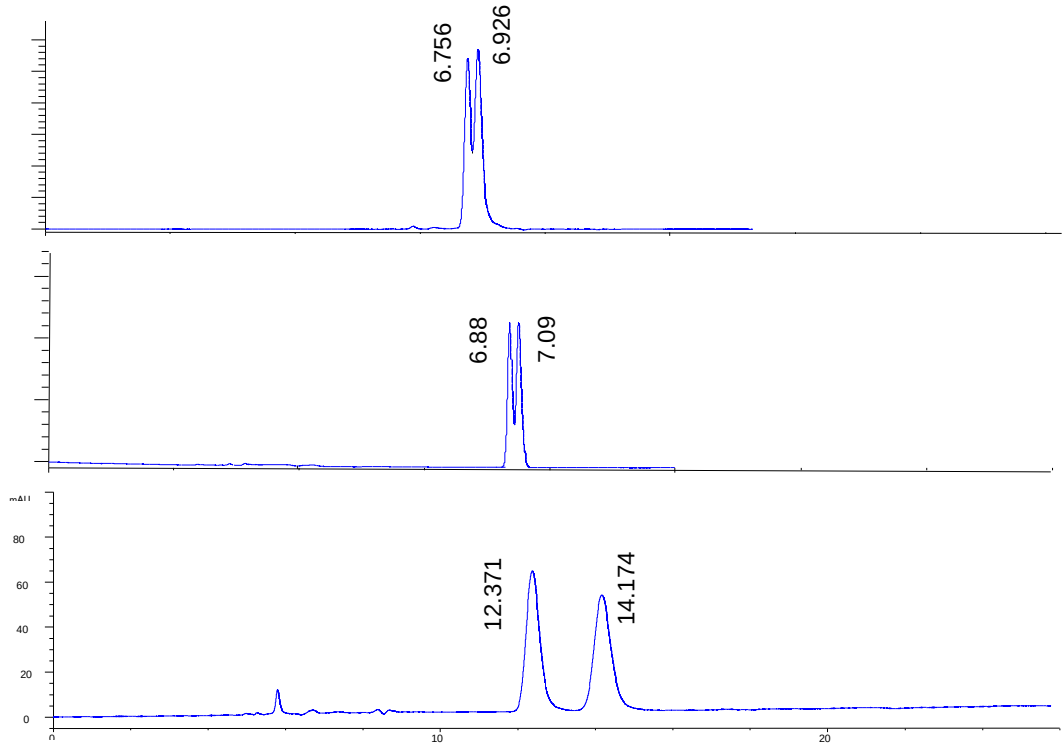
Şekil 3.17. Kolon: Cellulose 1 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: MeOH:H₂O:DEA (100:0:0,1); (95:5:0,1); (90:10:0,1) (yukarıdan aşağıya).



Şekil 3.18. Kolon: Cellulose 1 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: MeOH:H₂O:DEA (85:15:0,1); (80:20:0,1); (70:30:0,1); (60:40:0,1) (yukarıdan aşağıya).



Şekil 3.19. Kolon: Cellulose 4 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: MeOH:H₂O:DEA (95:5:0,1); (90:10:0,1); (70:30:0,1) (yukarıdan aşağıya).



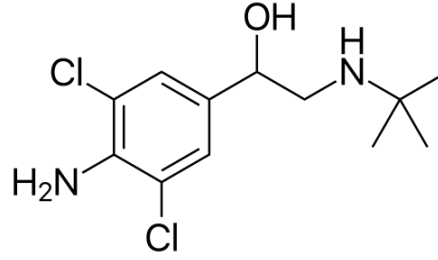
Şekil 3.20. Kolon: Cellulose 2 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: MeOH:H₂O:DEA (95:5:0,1); (85:15:0,1); (70:30:0,1) (yukarıdan aşağıya).

Çizelge 3.4. IZO için sulu polar organik faz koşullarına ait sistem uygunluk testi sonuçları.

Hareketli faz bileşimi (MeOH/H ₂ O/DEA)	Cellulose 1						Cellulose 2						Cellulose 4					
	t ₁	t ₂	N1	N2	Rs	α	t ₁	t ₂	N1	N2	Rs	α	t ₁	t ₂	N1	N2	Rs	α
100/0/0,1	6,79	6,79	-	-	-	1,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
97/3/0,1	7,03	7,03	-	-	-	1,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
95/5/0,1	7,04	7,04	-	-	-	1,00	6,76	6,93	17562	15406	0,79	1,03	3,45	3,53	13115	12781	0,65	1,02
90/10/0,1	7,46	7,60	16294	10784	0,53	1,02	6,58	6,76	12204	8693	0,63	1,03	3,46	3,57	15340	14617	0,95	1,03
85/15/0,1	7,89	8,10	10182	8583	0,65	1,03	6,88	7,09	11753	10230	0,96	1,03	-	-	-	-	-	-
80/20/0,1	8,32	8,60	11199	10157	0,86	1,03	-	-	--	-	-	-	-	-	-	-	-	-
70/30/0,1	13,1	13,99	4622	4266	1,09	1,07	12,37	14,17	5795	4986	2,48	1,15	11,09	13,13	10563	9527	4,19	1,18
60/40/0,1	22,75	24,87	3745	3520	1,34	1,09	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

3.4. Klenbuterole Ait Sonuçlar

KLB'ye (Şekil. 3.21) ait çalışmalar gereç ve yöntem kısmında belirtilen 6 farklı kiral kolon kullanılarak polar organik faz, normal faz ve sulu organik hareketli faz karışımları kullanılarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.21. Klenbuterole ait molekül şekli

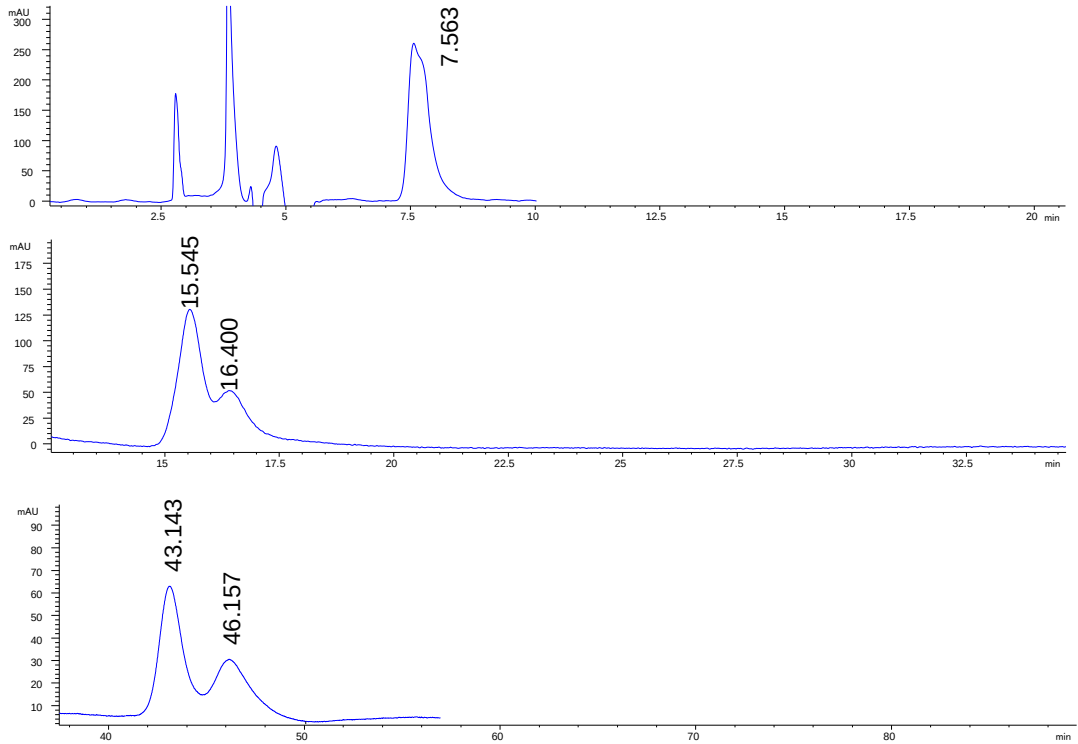
3.4.1. Klenbuterole Ait Polar Organik Faz ile Yapılan alışmalar

KLB için de öncelikle polar organik hareketli fazlar ile analizlere başlanmış bu sayede analiz süresini kısaltıp daha keskin pik şekilleri elde edilmesi düşünülmüştür. Metanol, asetonitril, etanol ve izopropanolün hareketli faz olarak kullanıldığı çalışmalarda IZO enantiyomerleri birbirlerinden hiçbir koşulda (asidik (% 0,1 FA ilavesiyle), bazık (% 0,1 DEA ilavesiyle) ve de hem asidik hem de bazık (% 0,1 FA ve % 0,1 DEA) katkı maddeleri eklenerek) ayrılmamışlardır.

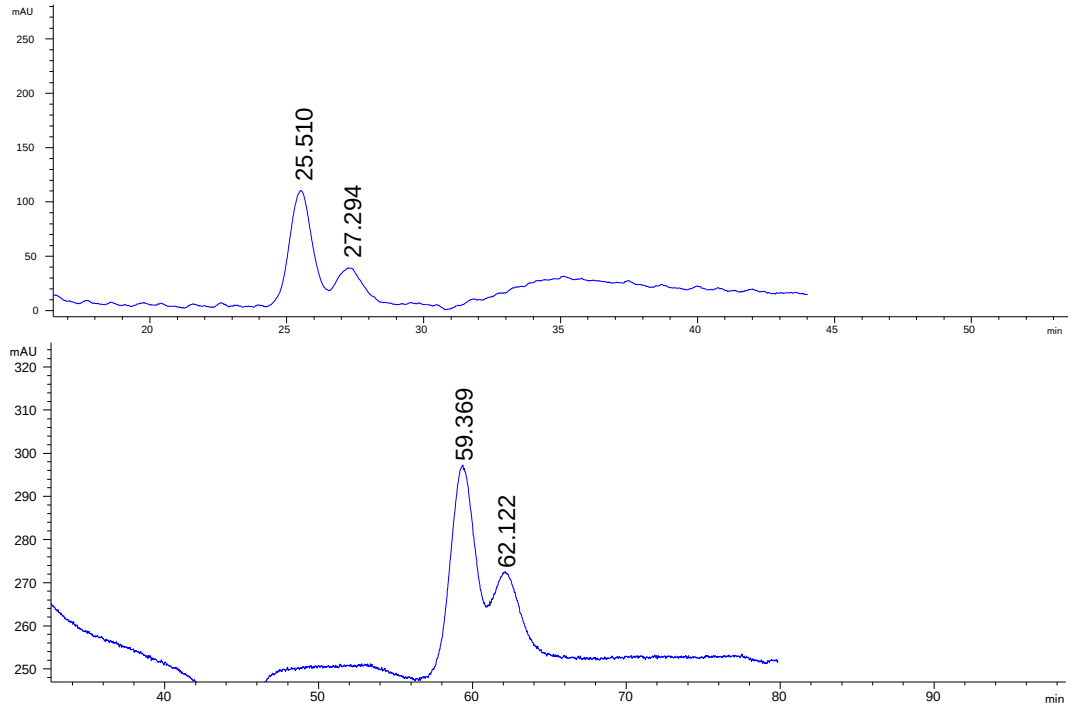
3.4.2. Klenbuterole Ait Normal Faz ile Yapılmış alışmalar

Polar organik fazlar kullanılarak enantiyomerler ayrılamadığı için normal faz çözücüler ile ayrımlar gerçekleştirilmiştir. Normal faz çözücü karışımı olarak farklı

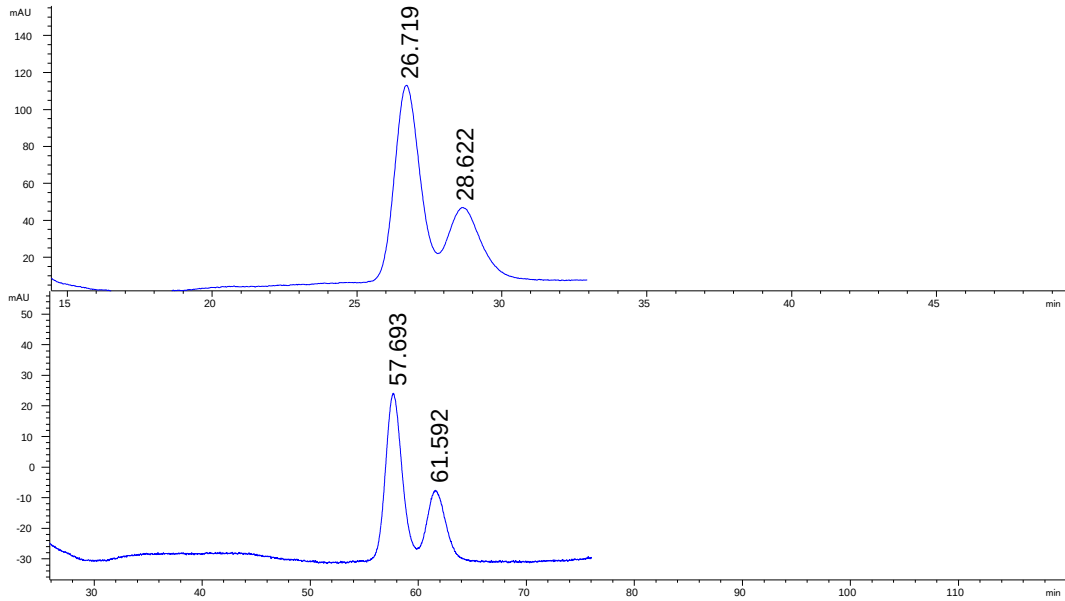
oranlarda (95:5; 90:10; 80:20; 70:30; (h/h)) n-hekzan ve IPA karışımları hazırlanmıştır. Hareketli faz optimizasyonuna ait enantiyomerlerin ayrımının sağlandığı kromatogramlar aşağıda gösterilmiştir (Şekil 3.22 - 3.26). Ayrıca enantiyomerlerin ayrıldığı hareketli faz koşullarında karışımlara ayrı ayrı asidik (% 0,1 FA ilavesiyle), bazik (% 0,1 DEA ilavesiyle) ve de hem asidik hem de bazik (% 0,1 FA ve % 0,1 DEA) katkı maddeleri eklenerek analizler 6 farklı kolon ile 25°C sıcaklık, 5µL enjeksiyon hacmi, 215 nm dalga boyunda, dakikada 1 mL akış hızı ile gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.27 - 3.31). Enantiyomerik alıkonma sırasında değişim olup olmadığını görmek için fraksiyonlama yapılmış elde edilen saf enantiyomerlerden bir tanesi standart ekleme yoluyla 2 katına çıkartılmıştır. Sonuçlara ait sistem uygunluk testi parametreleri Çizelge 3.5 - 3.7’de verilmiştir.



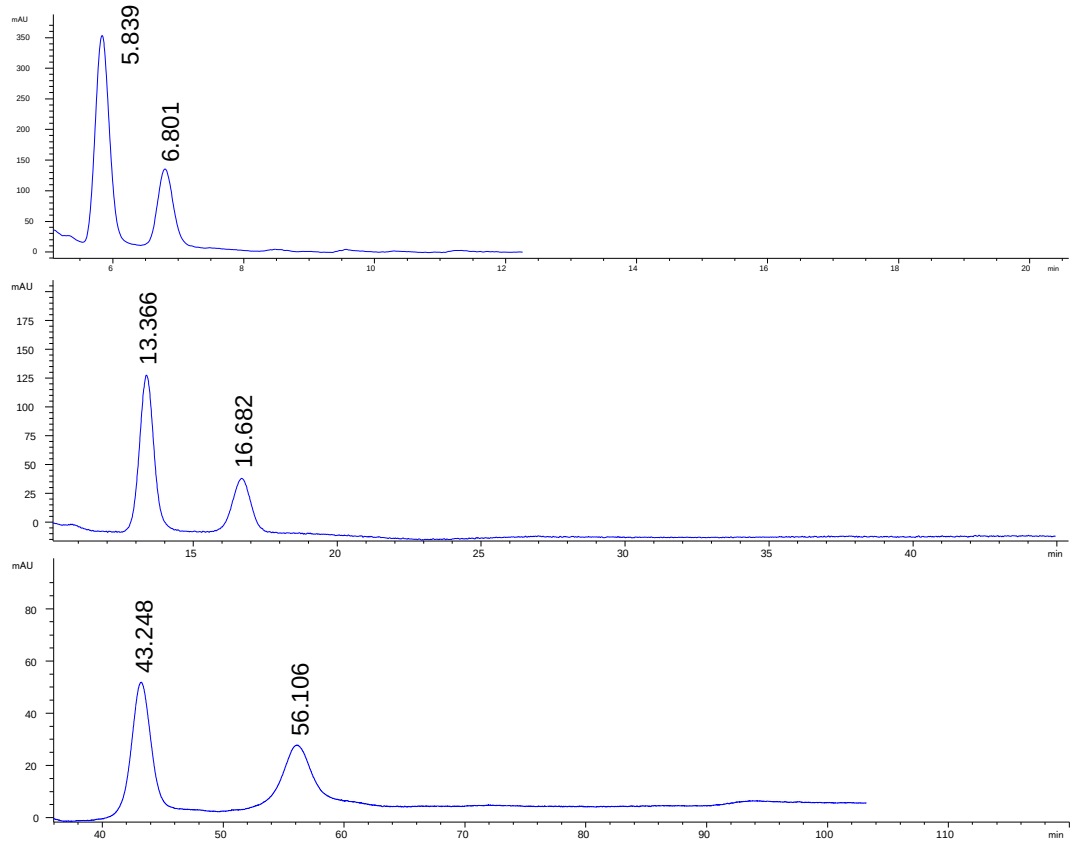
Şekil 3.22. Kolon: Cellulose 1 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:İpa:FA:DEA (80:20:0,1:0,1); (90:10:0,1:0,1); (95:5:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya).



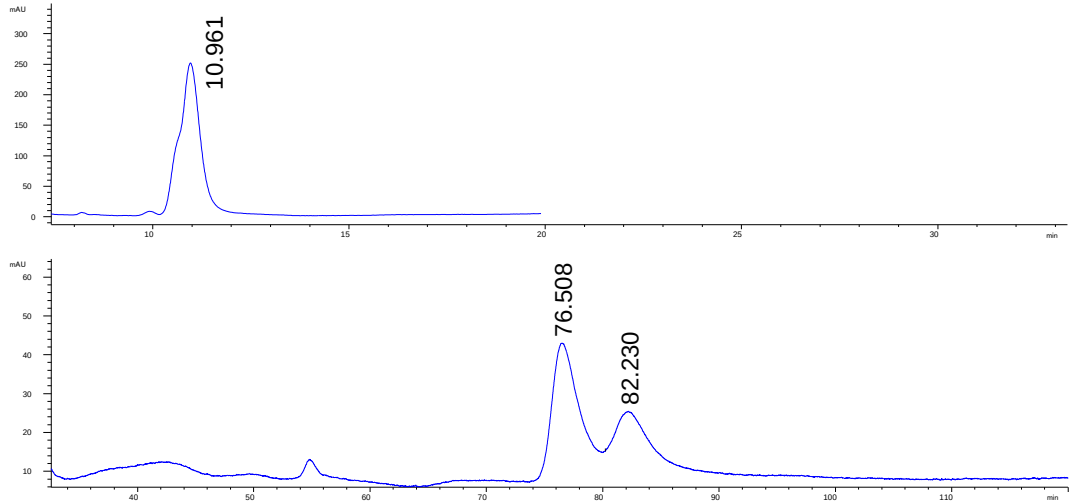
Şekil 3.23. Kolon: Cellulose 2 (250 x 4.6 mm; 3 μ m); hareketli faz: n-hekzan:İpa:FA:DEA (80:20:0,1:0,1); (90:10:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya).



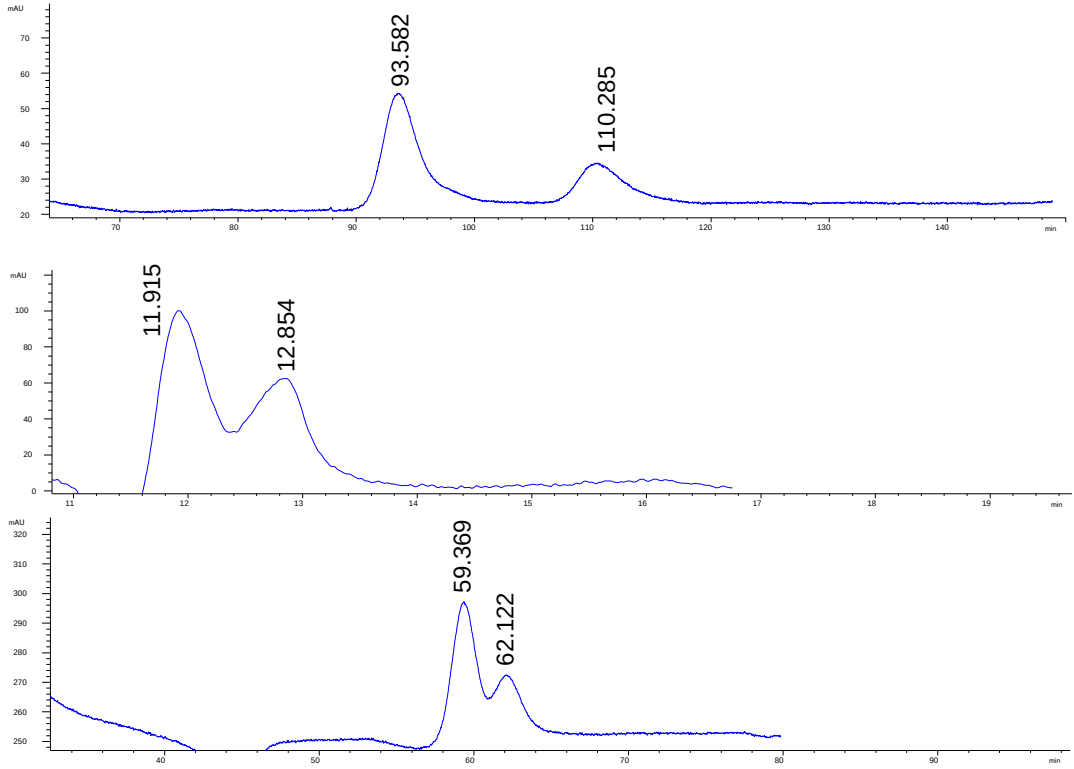
Şekil 3.24. Kolon: Cellulose 4 (250 x 4.6 mm; 3 μ m); hareketli faz: n-hekzan:İpa:FA:DEA (80:20:0,1:0,1); (90:10:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya).



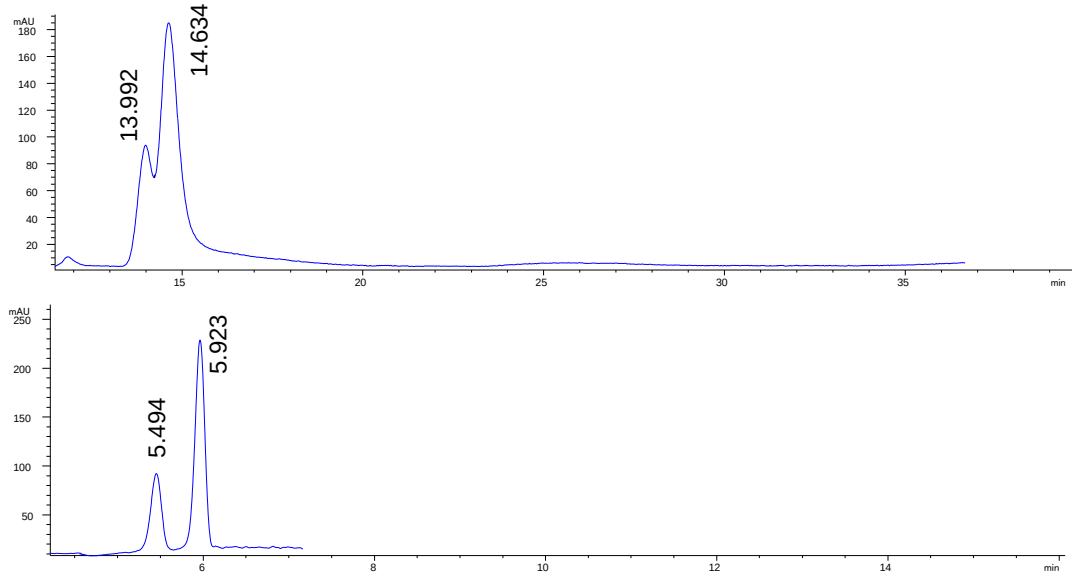
Şekil 3.25. Amylose 1 (250 x 4.6 mm; 5 µm); hareketli faz: n-hekzan:İpa:FA:DEA (80:20:0,1:0,1); (90:10:0,1:0,1); (95:5:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya).



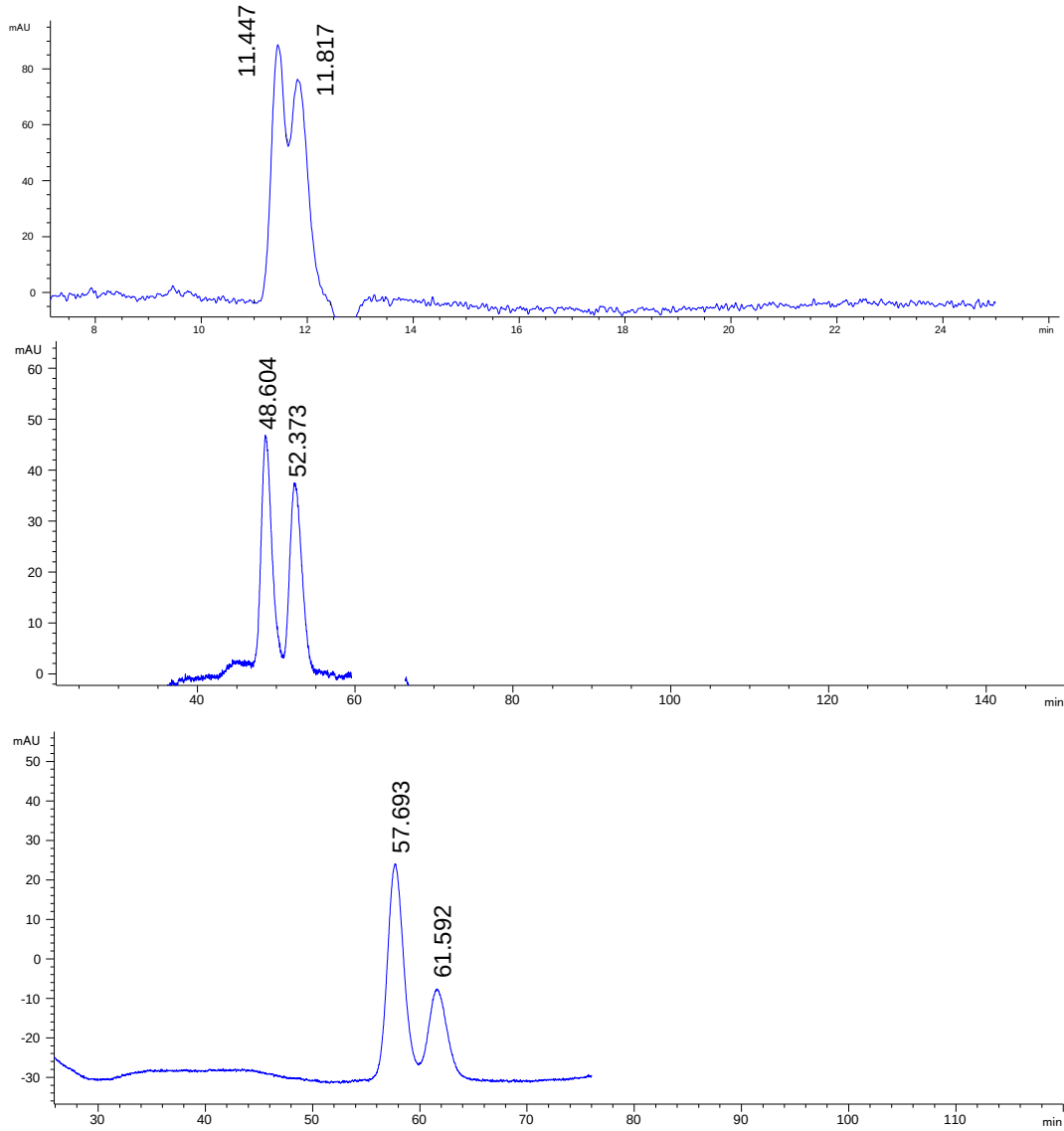
Şekil 3.26. Amylose 2 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:İpa:FA:DEA (80:20:0,1:0,1); (95:5:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya).



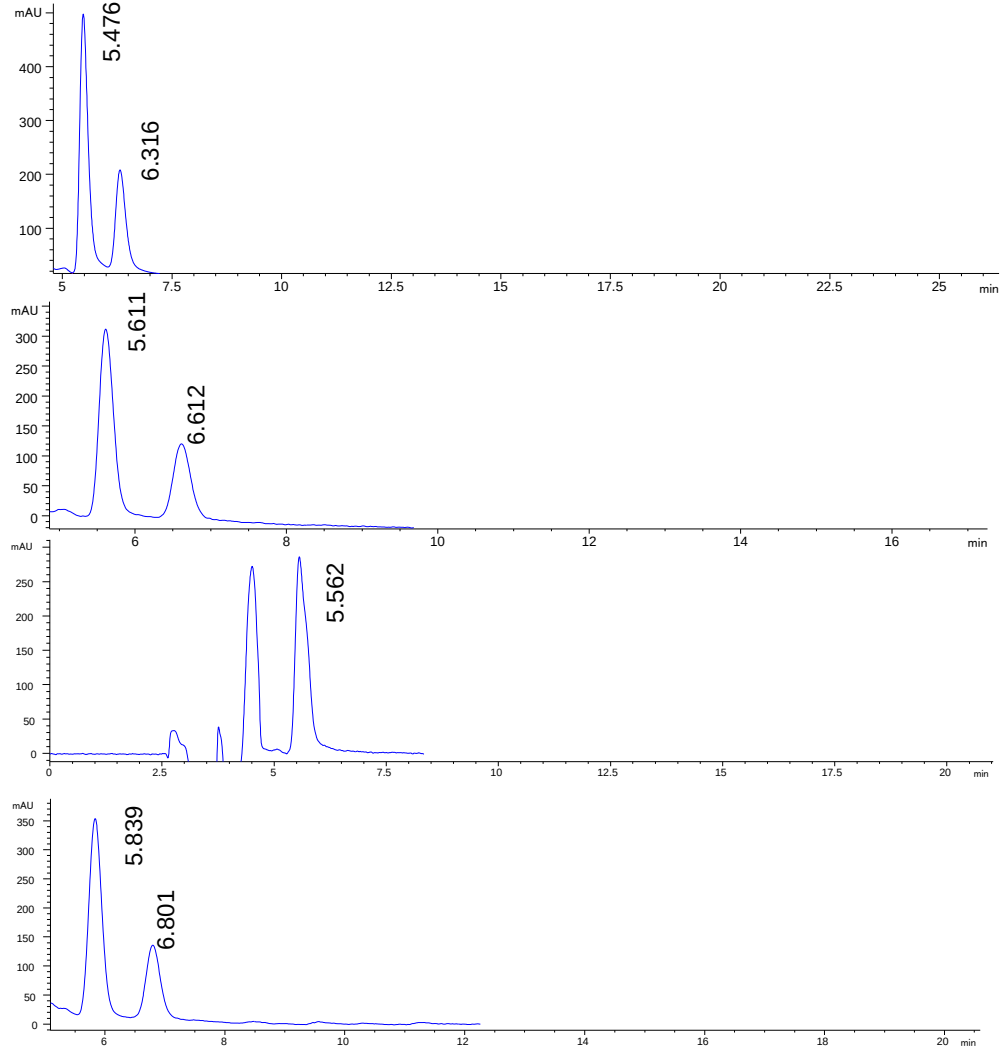
Şekil 3.27. Kolon: Cellulose 2 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:Ipa:FA (90:10:0,1); n-hekzan:Ipa:DEA (90:10:0,1); n-hekzan:Ipa:FA:DEA (90:10:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya).



Şekil 3.28. Kolon: Cellulose 3 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:Ipa:FA (90:10:0,1); n-hekzan:Ipa:DEA (90:10:0,1); (yukarıdan aşağıya).



Şekil 3.29. Kolon: Cellulose 4 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:Ipa:DEA (90:10:0,1); n-hekzan:Ipa:DEA (95:5:0,1); n-hekzan:Ipa:DEA:FA (90:10:0,1:0,1); (yukarıdan aşağıya).

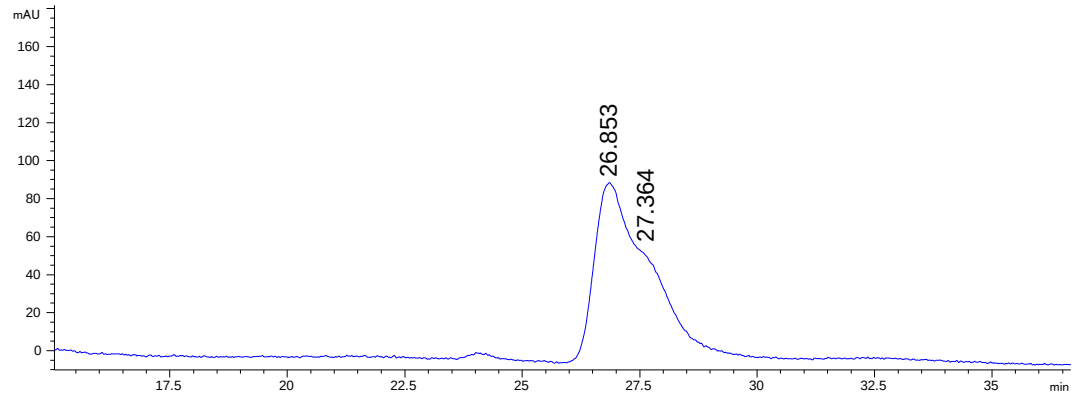
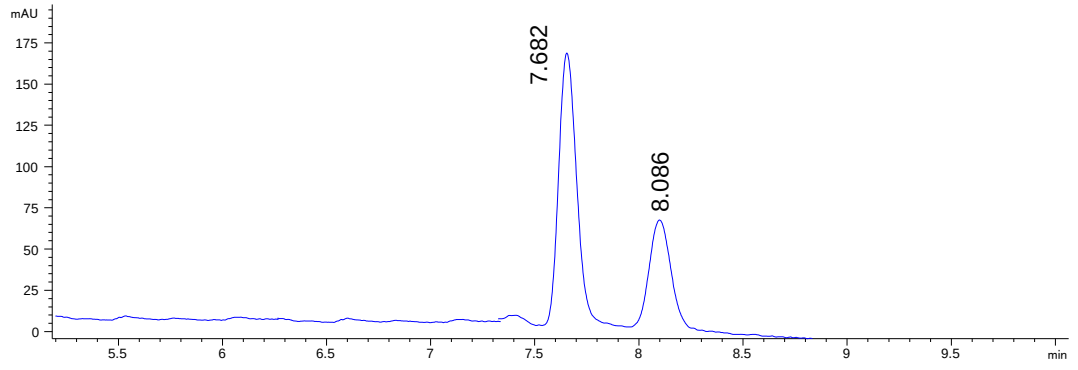
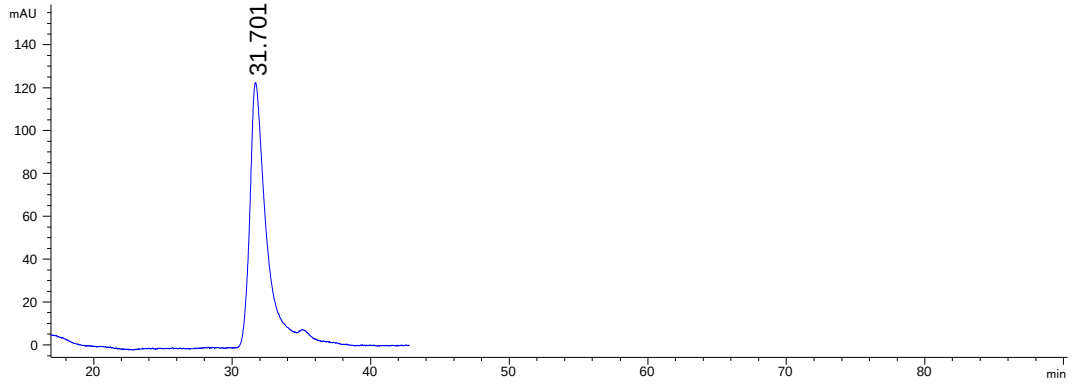


Şekil 3.30. Kolon: Amylose 1 (250 x 4.6 mm; 5 µm); hareketli faz: n-hekzan:İpa (80:20:); n-hekzan:İpa:FA (80:20:0,1); n-hekzan:İpa:DEA (80:20:0,1); n-hekzan:İpa:FA:DEA (80:20:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya).

Çizelge 3.5. KLB için, kolon olarak Amylose 1, hareketli faz olarak 80:20; n-hekzan:IPA, (h/h) karışımının farklı katkı maddeleri kullanılarak yapılmış çalışmalarında elde edilen sistem uygunluk testi sonuçları.

Hareketli Faz Bileşimi	Amylose 1					
	t ₁	t ₂	N ₁	N ₂	Rs	α
80:20:0,1 (n-hekzan:IPA:FA)	5,61	6,61	4084	3875	2,58	1,18
80:20:0,1 (n-hekzan:IPA:DEA)	5,56	5,56	-	-	-	1,00
80:20:0,1:0,1 (n-hekzan:IPA:FA:DEA)	5,84	6,80	3469	3889	2,31	1,16

*Kırmızı ile işaretlenen sonuçlarda, standart ekleme yapılarak miktarı artırılan enantiyomerin yeri belirtilmektedir.



Şekil 3.31. Kolon: Amylose 2 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:Ipa:FA (90:10:0,1); n-hekzan:Ipa:DEA (90:10:0,1); n-hekzan:Ipa:FA:DEA (90:10:0,1,0,1) (yukarıdan aşağıya).

Çizelge 3.6. KLB için, hareketli faz olarak n-hekzan:IPA:DEA:FA karışımının farklı bileşimleri kullanılarak elde edilen sistem uygunluk testi sonuçları.

	80:20:0,1:0,1						90:10:0,1:0,1						95:5:0,1:0,1					
	t ₁	t ₂	N ₁	N ₂	Rs	α	t ₁	t ₂	N ₁	N ₂	Rs	α	t ₁	t ₂	N ₁	N ₂	Rs	α
Cellulose 1	7,56	7,56	-	-	-	1,01	15,55	16,40	3802	2929	0,77	1,06	43,14	46,16	6165	2711	1,05	1,07
Cellulose 2	25,51	27,29	4517	3370	1,05	1,07	59,37	62,12	5802	4499	0,81	1,05	-	-	-	-	-	-
Cellulose 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cellulose 4	26,72	28,62	4413	2829	1,01	1,07	57,69	61,59	6801	5623	1,28	1,07	-	-	-	-	-	-
Amylose 1	5,84	6,80	3469	3889	2,31	1,16	13,37	16,68	3568	3207	3,19	1,25	43,25	56,11	3614	3131	3,73	1,30
Amylose 2	10,96	10,96	-	-	-	1,01	-	-	-	-	-	-	76,51	82,23	5757	5485	1,35	1,07

*Kırmızı ile işaretlenen sonuçlarda, standart ekleme yapılarak miktarı artırılan enantiyomerin yeri belirtilmektedir.

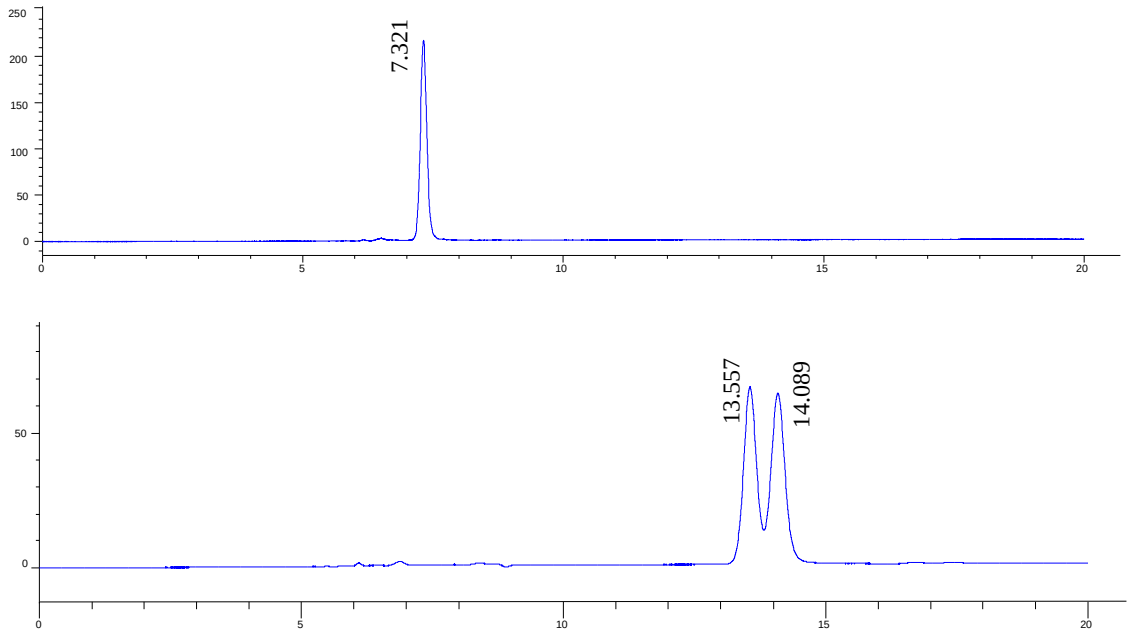
Çizelge 3.7. KLB için, 90:10 (n-hekzan:IPA, (h/h)) karışımının farklı katkı maddeleri kullanılarak yapılmış çalışmalarında elde edilen sistem uygunluk testi sonuçları.

	90:10:0,1 (n-hekzan:IPA:FA)						90:10:0,1 (n-hekzan:IPA:DEA)						90:10:0,1:0,1 (n-hekzan:IPA:FA:DEA)					
	t ₁	t ₂	N ₁	N ₂	Rs	α	t ₁	t ₂	N ₁	N ₂	Rs	α	t ₁	t ₂	N ₁	N ₂	Rs	α
Cellulose 2	93,58	110,29	4699	3523	2,59	1,18	11,92	12,85	-	-	-	-	59,37	62,12	5802	4499	0,81	1,05
Cellulose 3	13,99	14,63	-	-	-	-	5,49	5,92	10646	9684	1,89	1,08	-	-	-	-	-	-
Cellulose 4	-	-	-	-	-	-	11,45	11,82	-	-	-	-	57,69	61,59	6801	5623	1,28	1,07
Amylose 1	13,77	17,49	3695	3329	3,50	1,27	8,91	8,91	-	-	-	1,00	13,37	16,68	3568	3207	3,19	1,25
Amylose 2	31,70	31,70	-	-	-	1,00	7,68	8,09	17336	16841	1,67	1,05	26,85	27,36	-	-	-	-

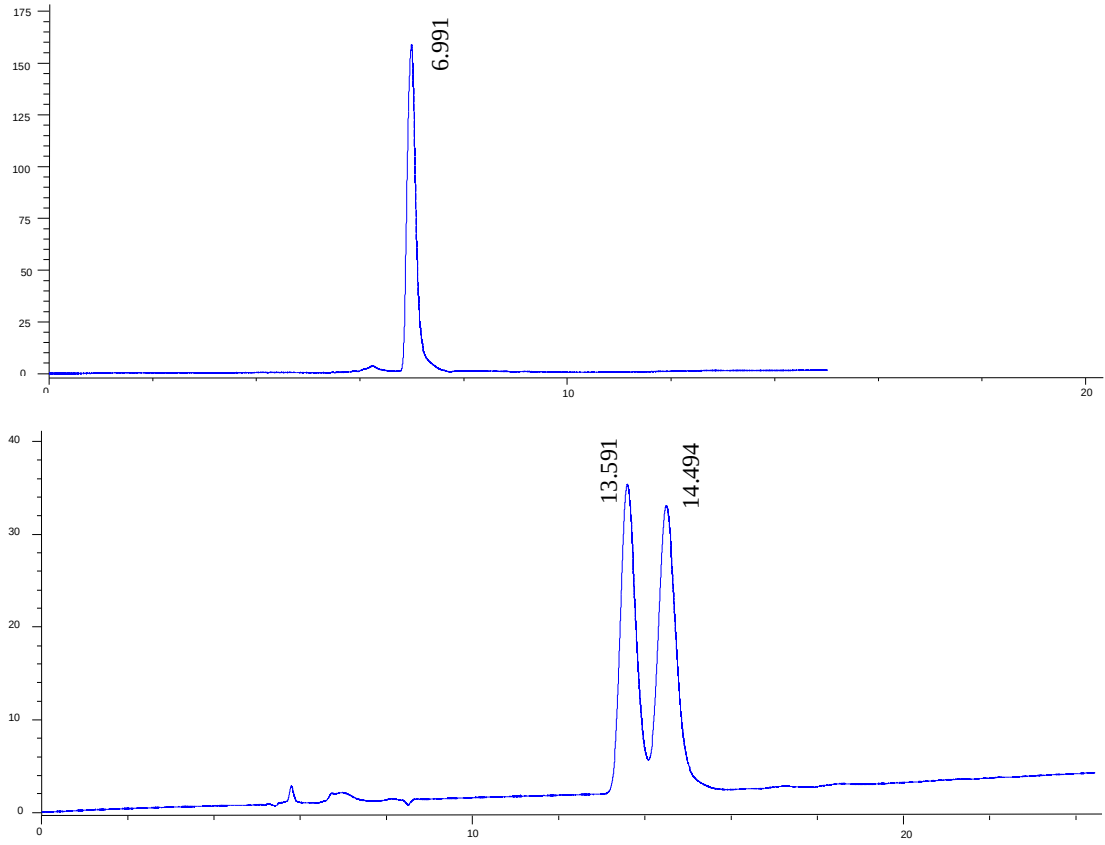
*Kırmızı ile işaretlenen sonuçlarda, standart ekleme yapılarak miktarı artırılan enantiyomerin yeri belirtilmektedir.

3.4.3. Klenbuterole Ait Sulu Organik Faz Karışımı ile Yapılan Çalışmalar

Normal faz koşullarında ayrımlar gerçekleştirildikten sonra sulu organik faz karışımları ile de analizler optimize edilmeye çalışılmıştır. MeOH'nin ile belirli oranlarda su (% 0 - 30) ile karıştırılması ve bu karışımlara % 0,1 DEA ilave edilmesiyle 6 farklı kolonda analizler yapılmıştır. Analizler sonucunda, Cellulose 2 ve Cellulose 4 kolonlarında ayırım gerçekleşmiş fakat taban tabana bir ayırım olmamıştır. Diğer kolonlarda ise enantiyomerler ayrılmamıştır. Analize ait diğer koşullar ise, 25 °C sıcaklık, 0,1 µL enjeksiyon hacmi, 215 nm dalga boyunda ve dakikada 0,5 mL akış hızı olacak şekilde ayarlanmıştır (Şekil 3.32 ve 3.33). Sonuçlara ait sistem uygunluk testi parametreleri Çizelge 3.8'de sunulmuştur.



Şekil 3.32. Kolon: Cellulose 4 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: MeOH:H₂O:DEA (95:5:0,1); (70:30:0,1) (yukarıdan aşağıya).



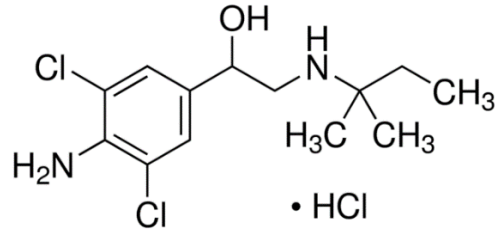
Şekil 3.33. Kolon: Cellulose 2 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: MeOH:H₂O:DEA (95:5:0,1); (70:30:0,1) (yukarıdan aşağıya).

Çizelge 3.8. KLB için sulu polar organik faz koşullarına ait sistem uygunluk testi sonuçları.

Hareketli faz bileşimi (MeOH/H ₂ O/DEA)	Cellulose 4						Cellulose 2					
	t ₁	t ₂	N1	N2	Rs	α	t ₁	t ₂	N1	N2	Rs	α
95/5/0,1	7,32	7,32	16701	-	-	1,00	6,99	6,99	8761	-	-	1,00
70/30/0,1	13,6	14,1	13713	13228	1,11	1,04	13,59	14,5	6587	6011	1,27	1,07

3.5. Klenpenterole Ait Sonuçlar

KLP'ye (Şekil. 3.34.) ait çalışmalar gereç ve yöntem kısmında belirtilen 6 farklı kiral kolon kullanılarak polar organik faz, normal faz ve sulu organik hareketli faz karışımları kullanılarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.34. Klenpenterole ait molekül şekli

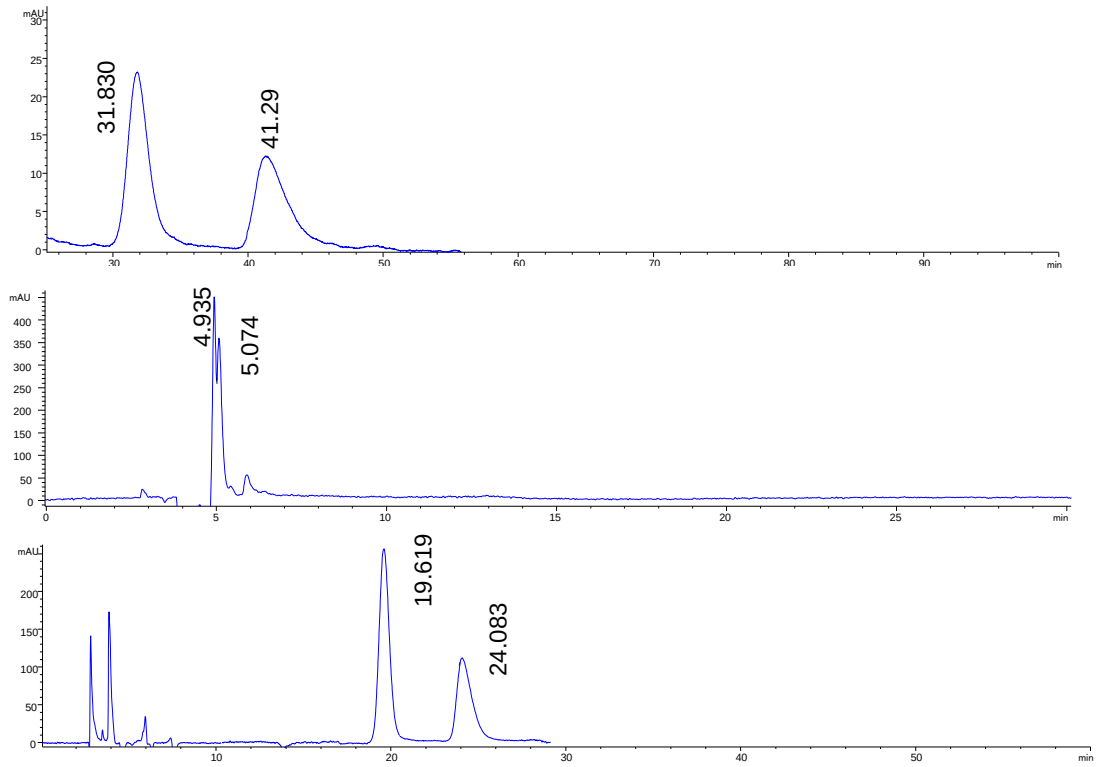
3.5.1. Klenpenterole Ait Polar Organik Faz ile Yapılan alışmalar

KLP için polar organik hareketli fazlar ile analizler gerçekleştirilmiş olup analizlerde metanol, asetonitril, etanol ve izopropanol hareketli faz olarak kullanılmıştır. Çalışmalarda, KLP enantiyomerlerinin birbirlerinden ayrımları, asidik (% 0,1 FA ilavesiyle), bazik (% 0,1 DEA ilavesiyle) ve de hem asidik hem de bazik (% 0,1 FA ve % 0,1 DEA) koşullarda sağlanamamıştır.

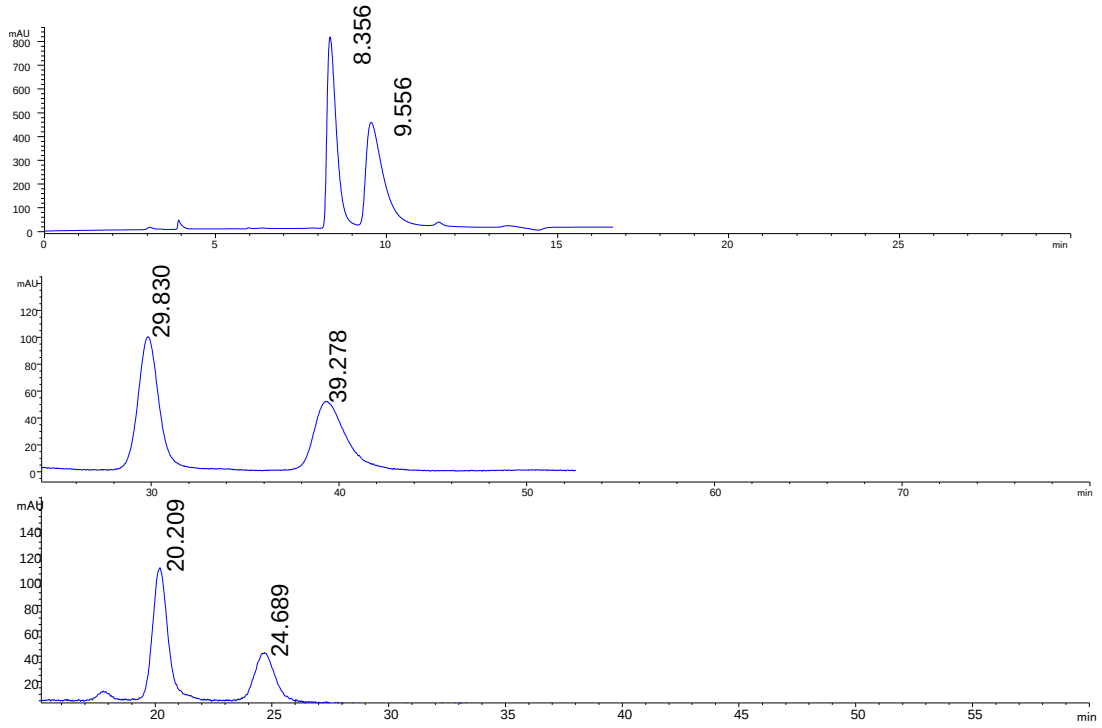
3.5.2. Klenpenterole Ait Normal Faz ile Yapılan alışmalar

Polar organik fazlar kullanılarak enantiyomerler ayrılamadığı için normal faz çözücüler ile ayrımların yapılması ngrlmştr. Normal faz çözücü karışımı olarak

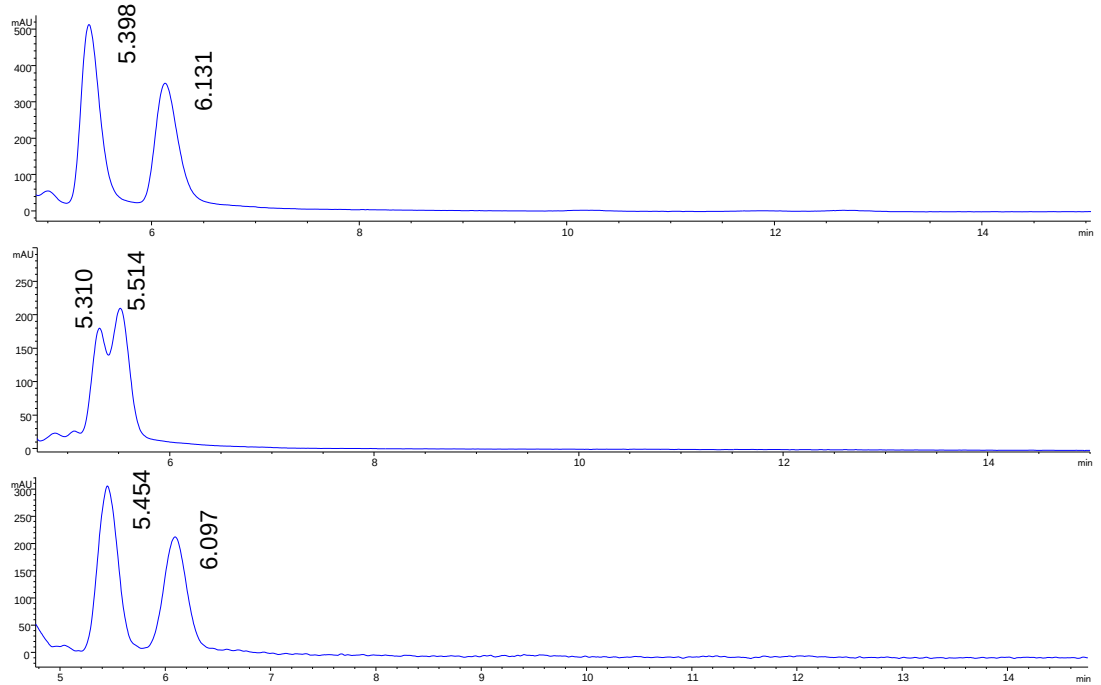
farklı oranlarda (90:10; 80:20; 70:30; (h/h)) n-hekzan ve IPA karışımları hazırlanmıştır. Ayrıca karışımlara ayrı ayrı asidik (% 0,1 FA ilavesiyle), bazik (% 0,1 DEA ilavesiyle) ve de hem asidik hem de bazik (% 0,1 FA ve % 0,1 DEA) katkı maddeleri eklenerek analizler 6 farklı kolon ile 25 °C sıcaklık, 5 µL enjeksiyon hacmi, 215 nm dalga boyunda, dakikada 1 mL akış hızı ile gerçekleştirilmiştir. Enantiyomerik alıkonma sırasında değişim olup olmadığını görmek için fraksiyonlama yapılmış elde edilen saf enantiyomerlerden bir tanesi standart ekleme yoluyla 2 katına çıkartılmıştır (Şekil 3.35. - 3.37.). Cellulose 1, Cellulose 3 ve Amylose 2 kolonlarında enantiyomerler birbirlerinden tam olarak ayrılmamışlardır. Sonuçlara ait sistem uygunluk testi parametreleri Çizelge 3.9'da verilmiştir.



Şekil 3.35. Kolon: Cellulose 2 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:İpa:FA (80:20:0,1); n-hekzan:İpa:DEA (80:20:0,1); n-hekzan:İpa:FA:DEA (80:20:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya).



Şekil 3.36. Kolon: Cellulose 4 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:Ipa (80:20); n-hekzan:Ipa:FA (80:20:0,1); n-hekzan:Ipa:FA:DEA (80:20:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya).



Şekil 3.37. Kolon: Amylose 1 (250 x 4.6 mm; 5 µm); hareketli faz: n-hekzan:Ipa:FA (80:20:0,1); n-hekzan:Ipa:DEA (80:20:0,1); n-hekzan:Ipa:FA:DEA (80:20:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya).

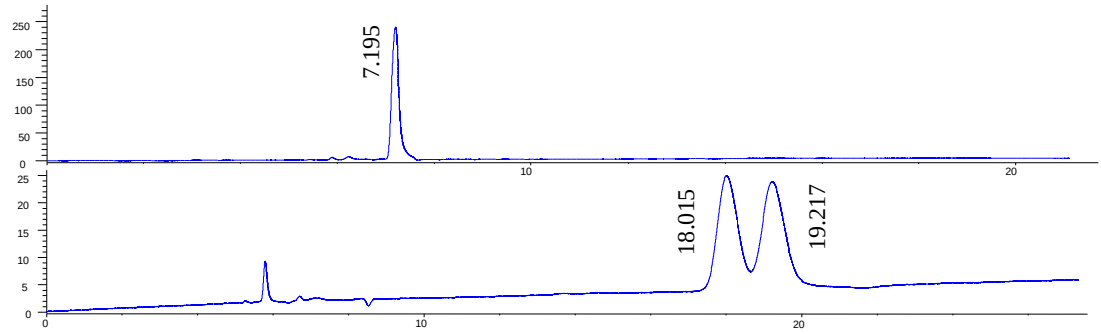
Çizelge 3.9. KLP için normal faz koşullarına ait sistem uygunluk testi sonuçları

Kolon	80:20:0,1 (n-hekzan:IPA:FA)						80:20:0,1 (n-hekzan:IPA:DEA)						80:20:0,1:0,1 (n-hekzan:IPA:FA:DEA)					
	t ₁	t ₂	N ₁	N ₂	Rs	α	t ₁	t ₂	N ₁	N ₂	Rs	α	t ₁	t ₂	N ₁	N ₂	Rs	α
Cellulose 2	31,83	41,29	2062	1566	2,74	1,30	4,94	5,07	8508	7163	0,61	1,03	19,62	24,08	4520	3514	3,36	1,24
Cellulose 4	29,83	39,28	5536	3122	4,17	1,31	5,67	6,11	-	-	0,50	1,03	20,21	24,69	4893	3877	3,26	1,22
Amylose 1	5,40	6,13	4420	3899	2,04	1,14	5,31	5,51	5623	3535	0,63	1,04	5,45	6,10	3796	3782	1,71	1,12

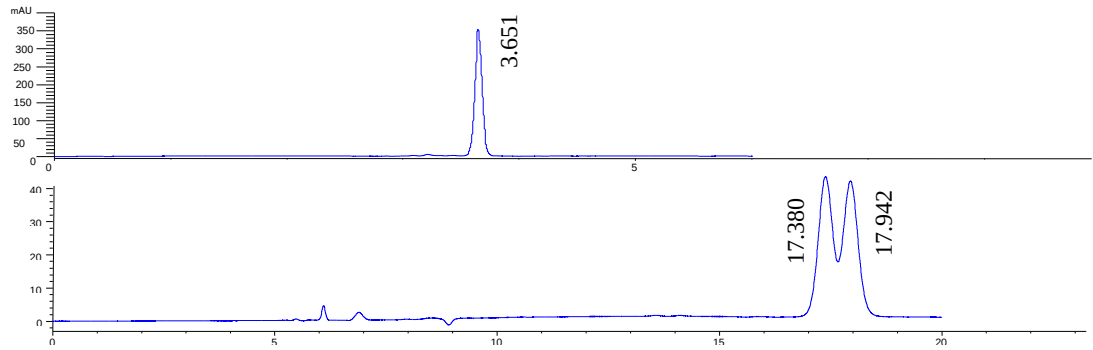
*Kırmızı ile işaretlenen sonuçlarda, standart ekleme yapılarak miktarı artırılan enantiyomerin yeri belirtilmektedir.

3.5.3. Klenpenterole Ait Sulu Organik Faz ile Yapılan Çalışmalar

Sulu organik faz karışımları ile analizler optimize edilmeye çalışılmıştır. MeOH'nin belirli oranlarda su (% 0 - 30) ile karıştırılması ve bu karışımlara % 0,1 DEA ilave edilmesiyle 6 farklı kolonda analizler yapılmıştır. Analizler sonucunda, Cellulose 2 ve Cellulose 4 kolonlarında ayırım gerçekleşmiş fakat taban tabana bir ayırım olmamıştır. Diğer kolonlarda ise enantiyomerler ayrılmamıştır. Analize ait diğer koşullar ise, 25 °C sıcaklık, 0,3 µL enjeksiyon hacmi, 215 nm dalga boyunda ve dakikada 0,5 mL akış hızı olacak şekilde ayarlanmıştır (Şekil 3.38 ve Şekil 3.39). Sonuçlara ait sistem uygunluk testi parametreleri Çizelge 3.10'da tablolanmıştır.



Şekil 3.38. Kolon: Cellulose 2 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: MeOH:H₂O:DEA (95:5:0,1); (70:30:0,1) (yukarıdan aşağıya).



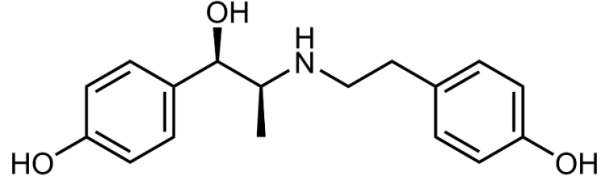
Şekil 3.39. Kolon: Cellulose 4 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: MeOH:H₂O:DEA (95:5:0,1); (70:30:0,1) (yukarıdan aşağıya).

Çizelge 3.10. KLP için sulu polar organik faz koşullarına ait sistem uygunluk testi sonuçları.

Hareketli faz bileşimi (MeOH/H ₂ O/DEA)	Cellulose 2						Cellulose 4					
	t ₁	t ₂	N1	N2	Rs	α	t ₁	t ₂	N1	N2	Rs	α
95/5/0,1	7,20	7,20	16701	-	-	1,00	3,65	3,65	16526	-	-	1,00
70/30/0,1	18,02	19,22	4964	4650	1,12	1,07	17,38	17,94	11743	11431	0,86	1,03

3.6. Ritodrine Ait Sonuçlar

RIT'a (Şekil. 3.40) ait çalışmalar gereç ve yöntem kısmında belirtilen 6 farklı kiral kolon kullanılarak polar organik faz, normal faz ve sulu organik hareketli faz karışımları kullanılarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.40. Ritodrine ait molekül şekli

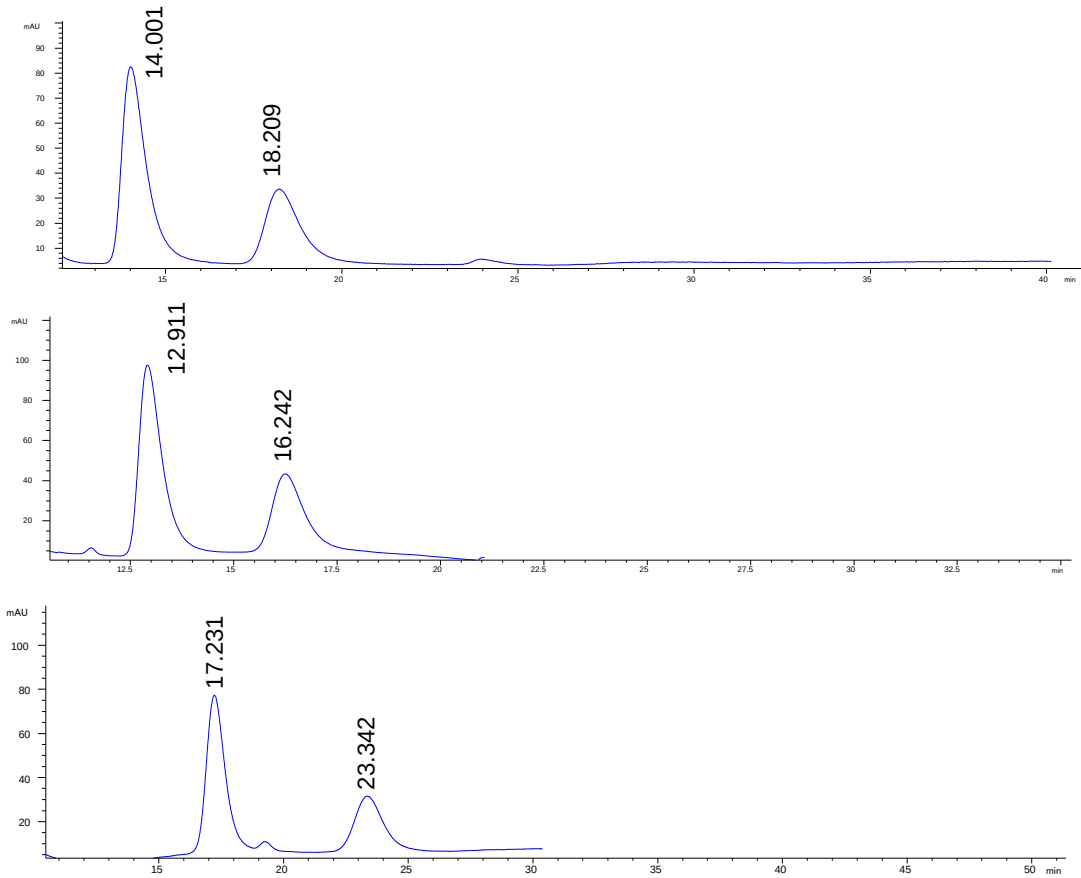
3.6.1. Ritodrine Ait Polar Organik Faz ile Yapılan alışmalar

Polar organik hareketli fazlar ile analizlere başlanmış bu sayede analiz süresini kısaltıp daha etkin ayrımlar elde edilmesi planlanmıştır. Metanol, asetonitril, etanol ve izopropanolün hareketli faz olarak kullanıldığı çalışmalarda RIT enantiyomerlerine ait ayırım gözlenmemiştir. Bunun zerine her bir çözücü için ayrı ayrı asidik (% 0,1 formik asit (FA) ilavesiyle), bazik (% 0,1 dietilamin (DEA) ilavesiyle) ve de hem asidik hem de bazik (% 0,1 formik asit ve % 0,1 dietilamin) katkı maddeleri eklenerek analizler üzerine etkisi incelenmiştir. Bahsedilen polar organik hareketli faz koşullarında hiçbir ayırım gerçekleşmemiştir.

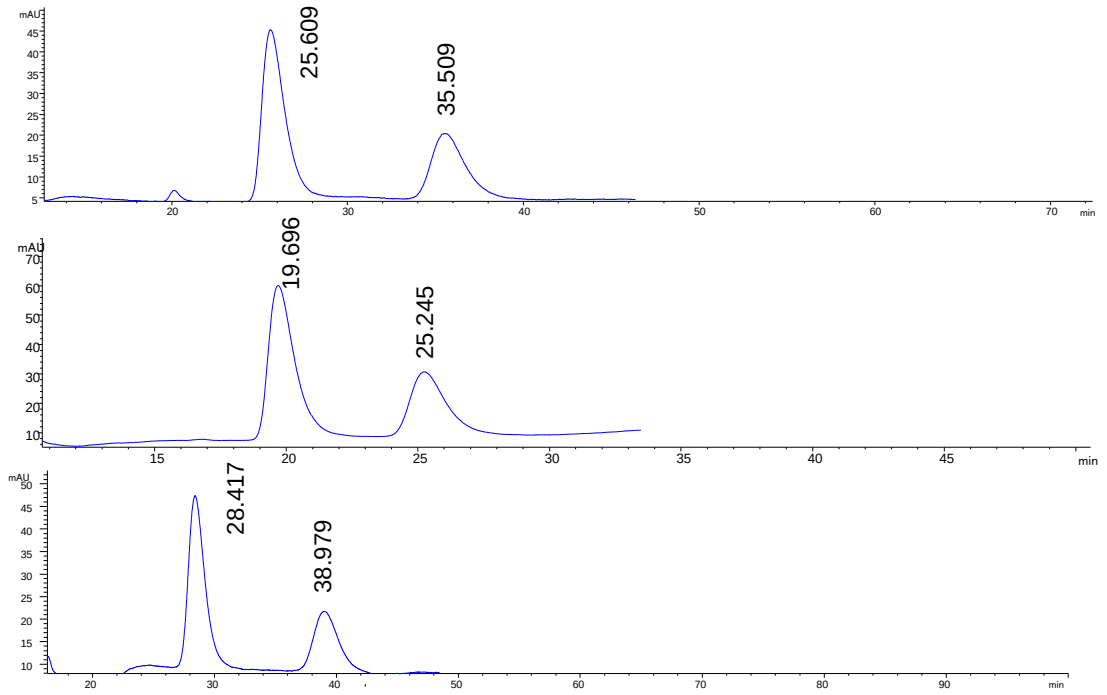
3.6.2. Ritodrine Ait Normal Faz ile Yapılan alışmalar

Polar organik fazlar kullanılarak enantiyomerler ayrılamadığı için normal faz çözücüler ile ayrımların yapılması öngörülmüştür. Normal faz çözücü karışımı olarak farklı oranlarda (90:10; 80:20; 70:30; 65:35; 60:40; 55:45; (h/h)) n-hekzan ve IPA

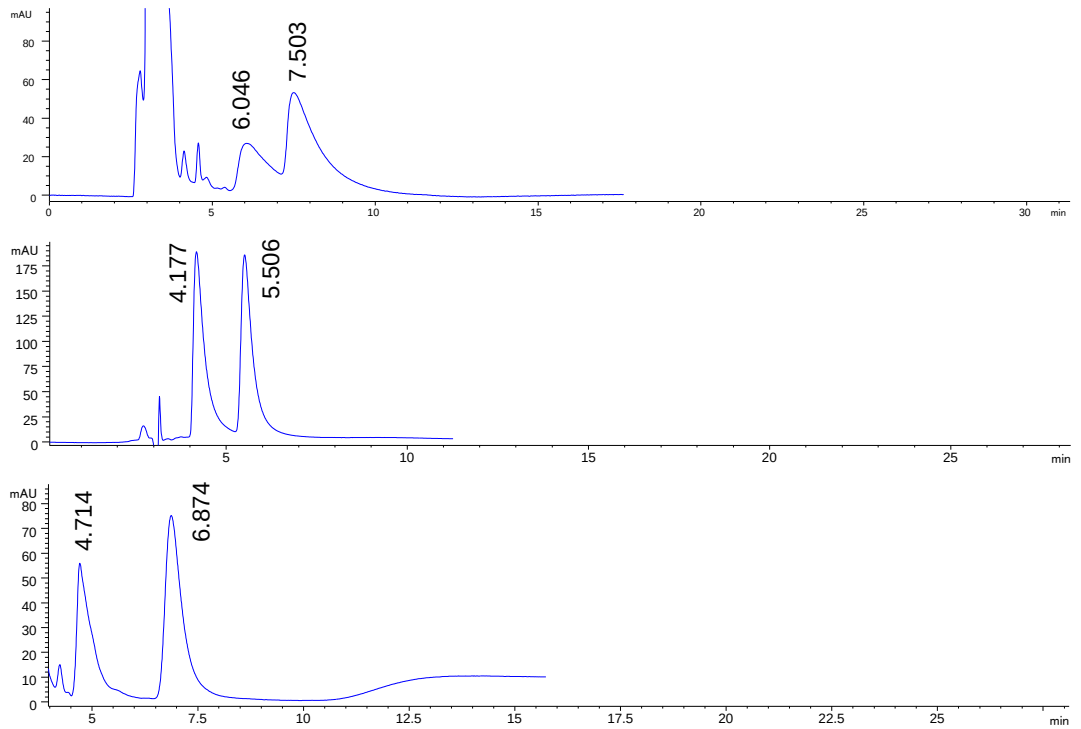
karışımları hazırlanmıştır. Ayrıca karışımlara ayrı ayrı asidik (% 0,1 FA ilavesiyle), bazik (% 0,1 DEA ilavesiyle) ve de hem asidik hem de bazik (% 0,1 FA ve % 0,1 DEA) katkı maddeleri eklenerek analizler 6 farklı kolon ile 25 °C sıcaklık, 5 µL enjeksiyon hacmi, 225 nm dalga boyunda, dakikada 1 mL akış hızı ile gerçekleştirilmiştir. Enantiyomerik alıkonma sırasında değişim olup olmadığını görmek için fraksiyonlama yapılmış elde edilen saf enantiyomerlerden bir tanesi standart ekleme yoluyla 2 katına çıkartılmıştır (Şekil 3.41 - 3.50). Cellulose 1 ve Amylose 2 kolonlarında enantiyomerler birbirlerinden tam olarak ayrılmamışlardır. Katkı maddelerinin değişik hareketli fazlardaki etkisi Şekil 3.41 - 3.47 arasında gösterilmektedir. Bununla birlikte hareketli faz bileşiminin etkisi de Şekil 3.48 - 3.50 arasındaki kromatogramlarda ifade edilmektedir. Sonuçlara ait sistem uygunluk testi parametreleri Çizelge 3.11 - 3.13 'te verilmiştir.



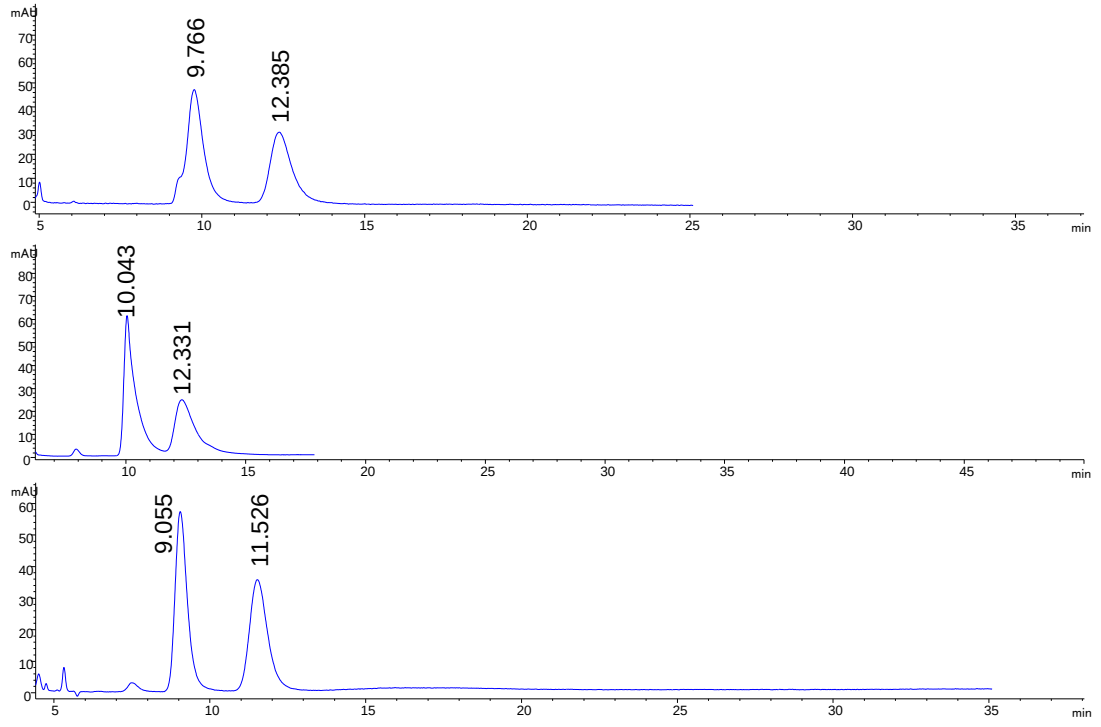
Şekil 3.41. Cellulose 2 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:İpa:FA (70:30:0,1); n-hekzan:İpa:DEA (70:30:0,1); n-hekzan:İpa:FA:DEA (70:30:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya).



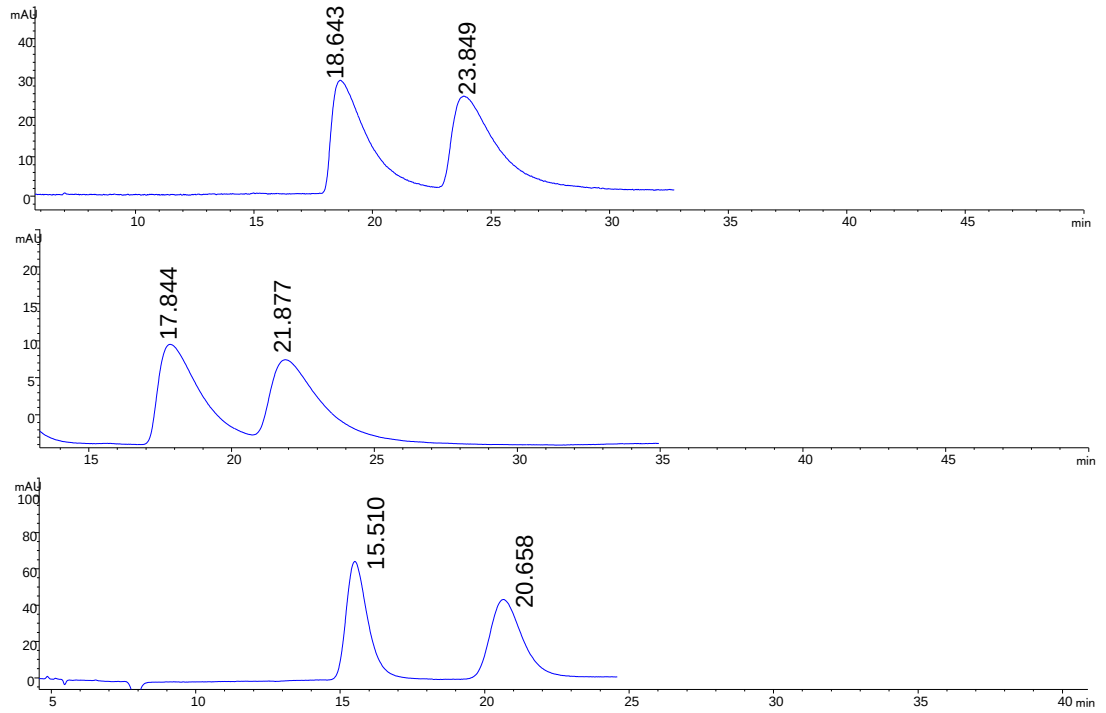
Şekil 3.42. Cellulose 4 (250 x 4.6 mm; 3 μ m); hareketli faz: n-hekzan:Ipa:FA (70:30:0,1); n-hekzan:Ipa:DEA (70:30:0,1); n-hekzan:Ipa:FA:DEA (70:30:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya).



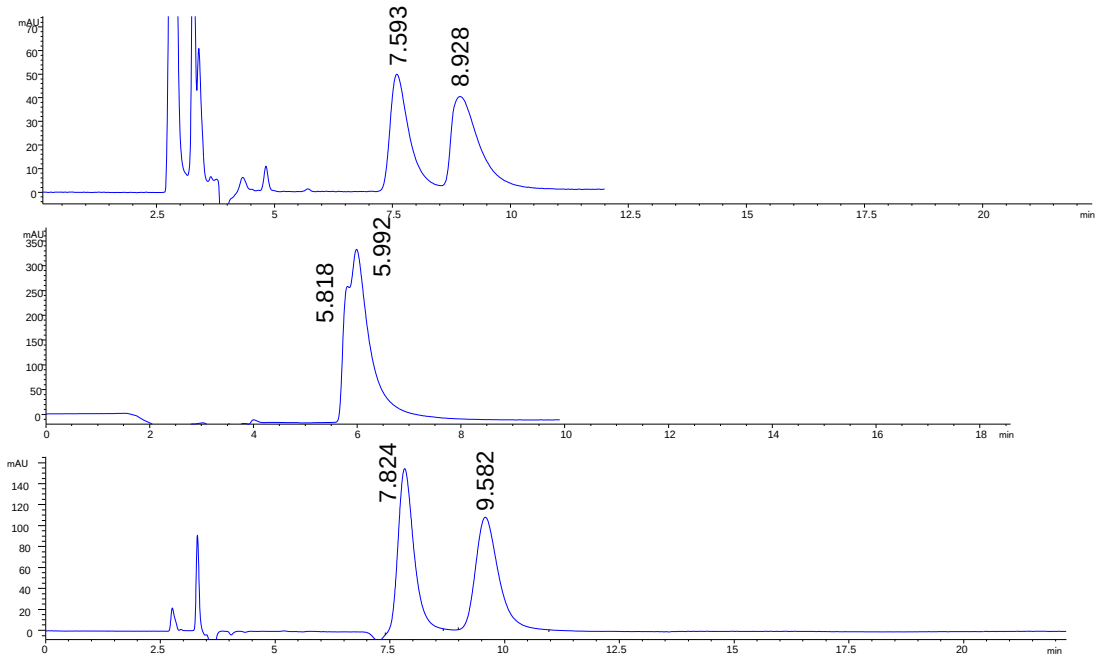
Şekil 3.43. Amylose 1 (250 x 4.6 mm; 5 μ m); hareketli faz: n-hekzan:Ipa:FA (70:30:0,1); n-hekzan:Ipa:DEA (70:30:0,1); n-hekzan:Ipa:FA:DEA (70:30:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya).



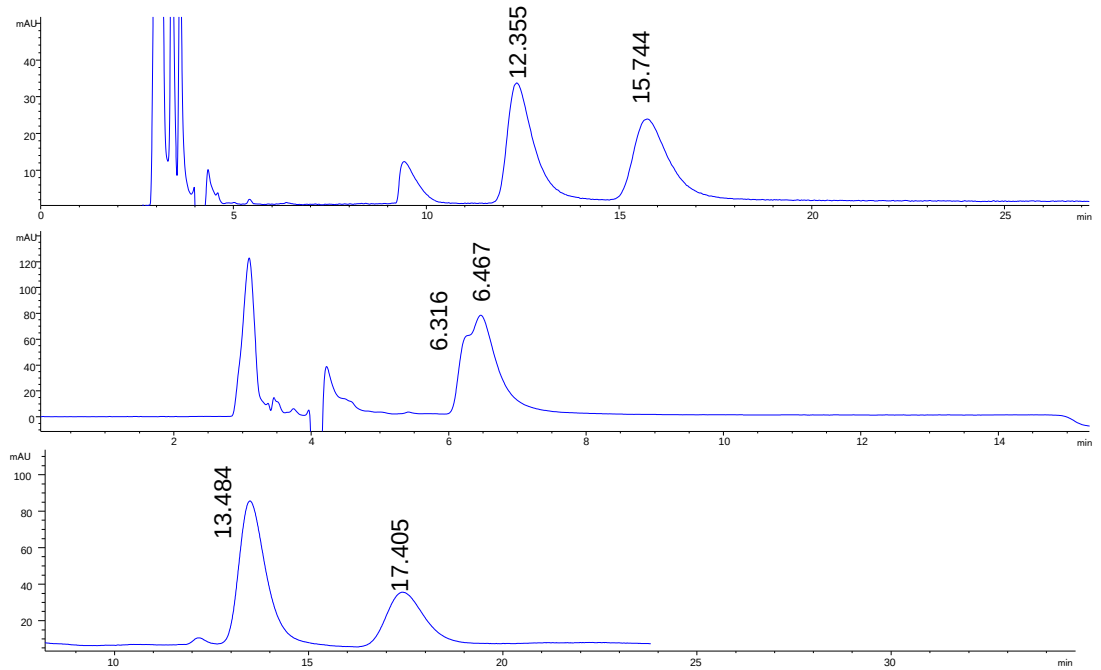
Şekil 3.44. Cellulose 2 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:Ipa:FA (65:35:0,1); n-hekzan:Ipa:DEA (65:35:0,1); n-hekzan:Ipa:FA:DEA (65:35:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya).



Şekil 3.45. Cellulose 4 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:Ipa:FA (65:35:0,1); n-hekzan:Ipa:DEA (65:35:0,1); n-hekzan:Ipa:FA:DEA (65:35:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya).



Şekil 3.46. Cellulose 2 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:Ipa:FA (60:40:0,1); n-hekzan:Ipa:DEA (60:40:0,1); n-hekzan:Ipa:FA:DEA (60:40:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya).

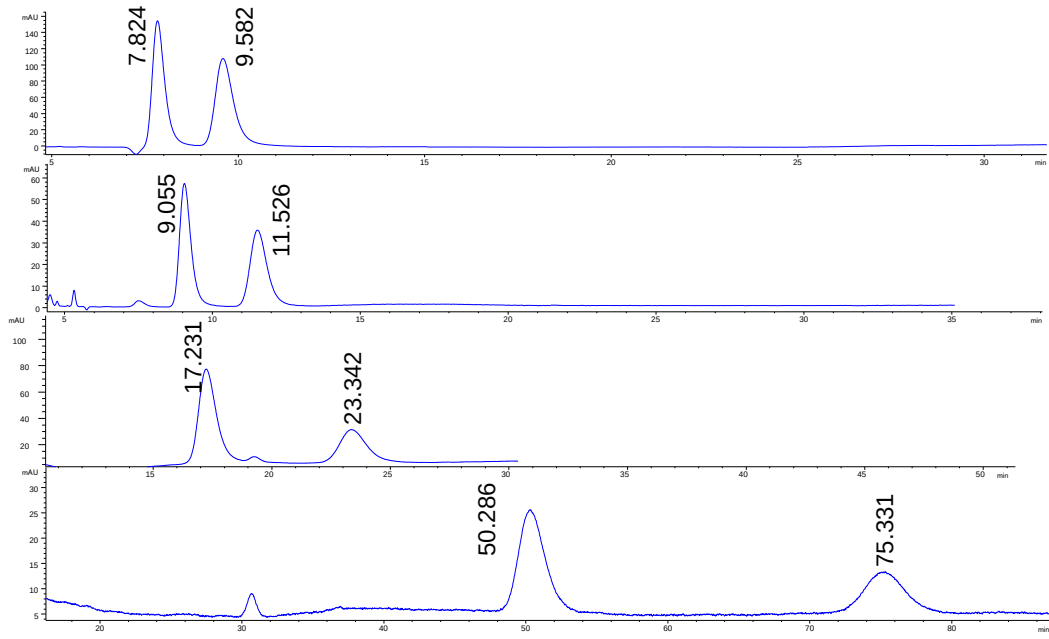


Şekil 3.47. Cellulose 4 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:Ipa:FA (60:40:0,1); n-hekzan:Ipa:DEA (60:40:0,1); n-hekzan:Ipa:FA:DEA (60:40:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya).

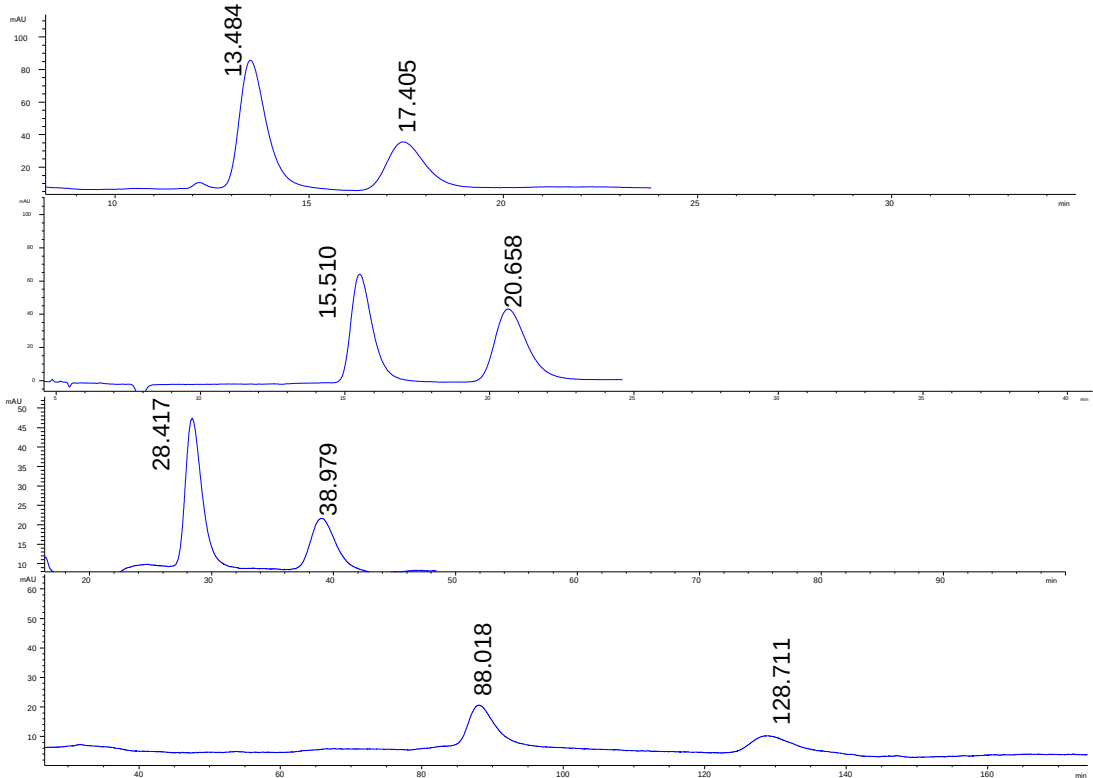
Çizelge 3.11. RIT için normal faz koşullarına ait katkı maddelerinin farklı hareketli faz bileşimleri üzerine etkisini gösteren sistem uygunluk testi sonuçları.

Hareketli Faz	Cellulose 2						Cellulose 4						Amylose 1					
	t ₁	t ₂	N ₁	N ₂	Rs	α	t ₁	t ₂	N ₁	N ₂	Rs	α	t ₁	t ₂	N ₁	N ₂	Rs	α
60:40:0,1 (n-hekzan:IPA:FA)	7,59	8,93	1900	1241	1,56	1,18	12,36	15,74	1759	1554	2,44	1,27	-	-	-	-	-	-
60:40:0,1 (n-hekzan:IPA:DEA)	5,82	5,99	11033	1479	0,41	1,03	6,32	6,47	7015	1560	0,31	1,02	-	-	-	-	-	-
60:40:0,1:0,1 (n-hekzan:IPA:FA:DEA)	7,82	9,58	2889	1880	2,40	1,23	13,48	17,41	1943	1532	2,61	1,29	-	-	-	-	-	-
65:35:0,1 (n-hekzan:IPA:FA)	9,77	12,39	2058	1838	2,59	1,27	18,64	23,85	812	904	1,80	1,28	-	-	-	-	-	-
65:35:0,1 (n-hekzan:IPA:DEA)	10,04	12,33	2843	1273	2,14	1,23	17,84	21,88	750	947	1,48	1,23	-	-	-	-	-	-
65:35:0,1:0,1 (n-hekzan:IPA:FA:DEA)	9,06	11,53	2747	2000	2,87	1,27	15,51	20,66	2228	1717	3,11	1,33	-	-	-	-	-	-
70:30:0,1 (n-hekzan:IPA:FA)	14,00	18,20	2175	1743	2,87	1,30	25,61	35,51	1889	1679	3,39	1,39	6,05	7,50	198	348	0,87	1,24
70:30:0,1 (n-hekzan:IPA:DEA)	12,91	16,24	2683	2246	2,81	1,26	19,69	25,25	1965	1751	2,64	1,28	4,18	5,51	1098	1748	2,59	1,32
70:30:0,1:0,1 (n-hekzan:IPA:FA:DEA)	17,23	23,34	2613	2096	3,60	1,35	28,42	38,98	2198	1760	3,43	1,37	4,71	6,87	1065	1609	3,41	1,46
80:20:0,1 (n-hekzan:IPA:FA)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
80:20:0,1 (n-hekzan:IPA:DEA)	22,41	25,16	3704	2899	1,65	1,12	26,36	29,38	1714	1408	1,11	1,12	9,96	12,56	754	1487	1,89	1,26
80:20:0,1:0,1 (n-hekzan:IPA:FA:DEA)	50,28	75,33	3502	3257	5,76	1,50	88,02	128,71	2774	2377	4,71	1,46	8,66	15,40	955	1264	4,71	1,78

*Kırmızı ile işaretlenen sonuçlarda, standart ekleme yapılarak miktarı artırılan enantiyomerin yeri belirtilmektedir.



Şekil 3.48. Cellulose 2 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:Ipa:DEA:FA (60:40:0,1:0,1); n-hekzan:Ipa:DEA:FA (65:35:0,1:0,1); n-hekzan:Ipa:DEA:FA (70:30:0,1:0,1); n-hekzan:Ipa:DEA:FA (80:20:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya).

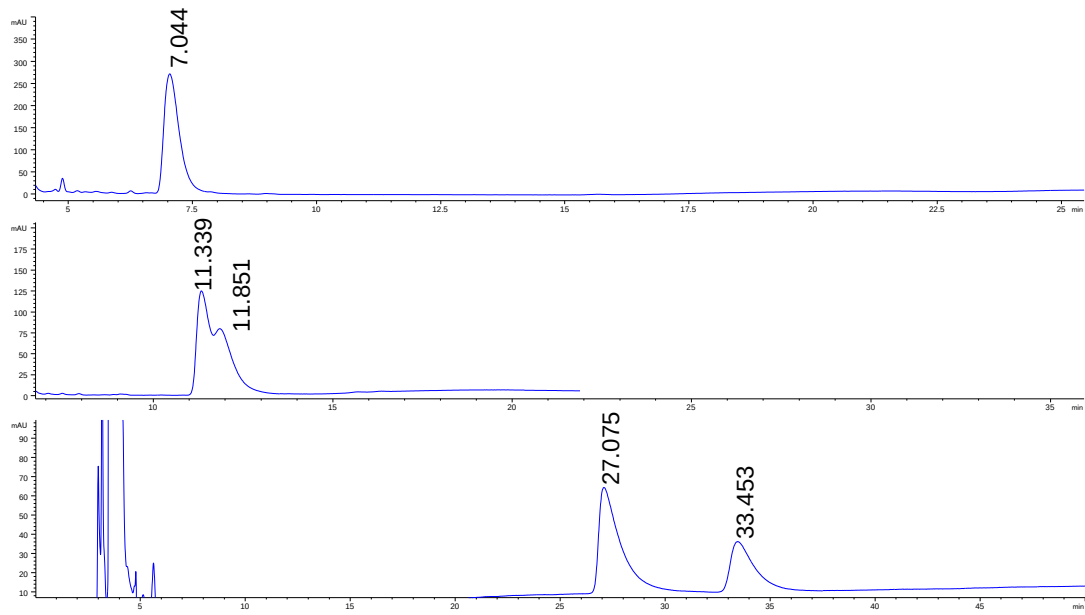


Şekil 3.49. Cellulose 4 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:Ipa:DEA:FA (60:40:0,1:0,1); n-hekzan:Ipa:DEA:FA (65:35:0,1:0,1); n-hekzan:Ipa:DEA:FA (70:30:0,1:0,1); n-hekzan:Ipa:DEA:FA (80:20:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya).

Çizelge 3.12. RIT için Cellulose 2 ve Cellulose 4 kolonlarda, hareketli faz olarak n-hekzan:IPA:DEA:FA karışımının farklı bileşimleri kullanılarak ortaya çıkan sistem uygunluk testi sonuçları

Hareketli Faz	Cellulose 2						Cellulose 4					
	t ₁	t ₂	N ₁	N ₂	Rs	α	t ₁	t ₂	N ₁	N ₂	Rs	α
60:40:0,1:0,1	7,82	9,58	2889	1880	2,40	1,23	13,48	17,41	1943	1532	2,61	1,29
65:35:0,1:0,1	9,06	11,53	2747	2000	2,87	1,27	15,51	20,66	2228	1717	3,11	1,33
70:30:0,1:0,1	17,23	23,34	2613	2096	3,60	1,35	28,42	38,98	2198	1760	3,43	1,37
80:20:0,1:0,1	50,28	75,33	3502	3257	5,76	1,50	88,02	128,7	2901	2342	4,73	1,46

*Kırmızı ile işaretlenen sonuçlarda, standart ekleme yapılarak miktarı artırılan enantiyomerin yeri belirtilmektedir.



Şekil 3.50. Cellulose 3 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:İpa:DEA (60:40:0,1); n-hekzan:İpa:DEA (70:30:0,1); n-hekzan:İpa:DEA (80:20:0,1) (yukarıdan aşağıya).

Çizelge 3.13. RIT için Cellulose 3 kolonda, hareketli faz olarak n-hekzan:IPA:DEA karışımının farklı bileşimleri kullanılarak elde edilen sistem uygunluk testi sonuçları

Hareketli Faz	Cellulose 3					
	t ₁	t ₂	N ₁	N ₂	Rs	α
60:40:0,1	7,04	7,04	-	-	-	1,00
70:30:0,1	11,34	11,85	3063	2636	0,59	1,05
80:20:0,1	27,07	33,45	4061	4403	3,43	1,24

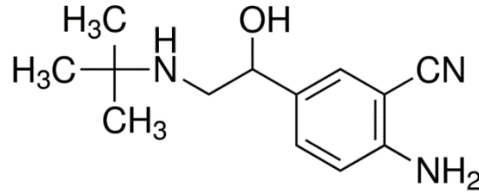
*Kırmızı ile işaretlenen sonuçlarda, standart ekleme yapılarak miktarı artırılan enantiyomerin yeri belirtilmektedir.

3.6.3. Ritodrine Ait Sulu Organik Faz Karışımı ile Yapılan Çalışmalar

RIT için sulu organik faz karışımları ile analizler optimize edilmeye çalışılmıştır. Metanolün belirli oranlarda su (% 0 - 30) ile karıştırılması ve bu karışımlara % 0,1 DEA ilave edilmesiyle 6 farklı kolonda analizler yapılmıştır. Analizler sonucunda, kullanılan kolonlar ile ayırım gerçekleşmemiştir.

3.7. Simbuterole Ait Sonuçlar

SIM'e (Şekil. 3.51.) ait çalışmalar gereç ve yöntem kısmında belirtilen 6 farklı kiral kolon kullanılarak polar organik faz, normal faz ve sulu organik hareketli faz karışımları kullanılarak gerçekleştirilmiştir.



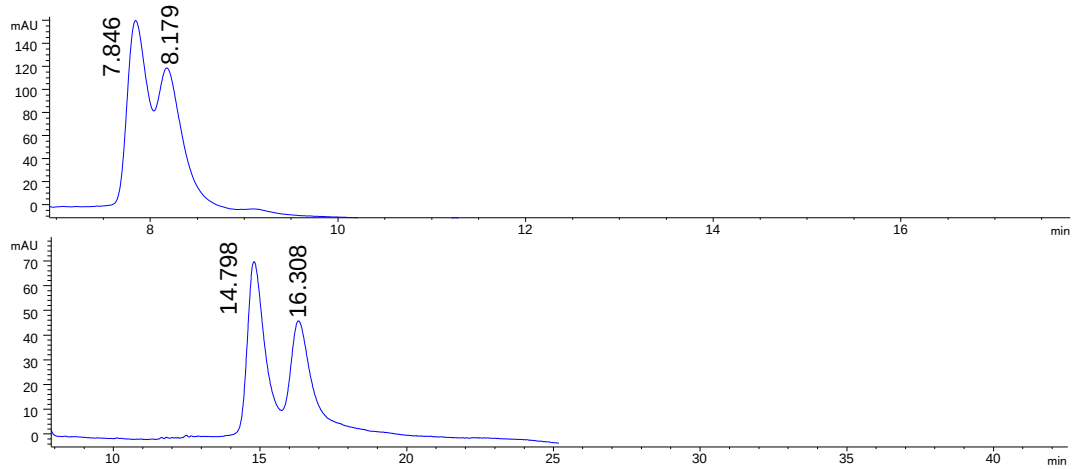
Şekil 3.51. Simbuterole ait molekül şekli

3.7.1. Simbuterole Ait Polar Organik Faz ile Yapılan Çalışmalar

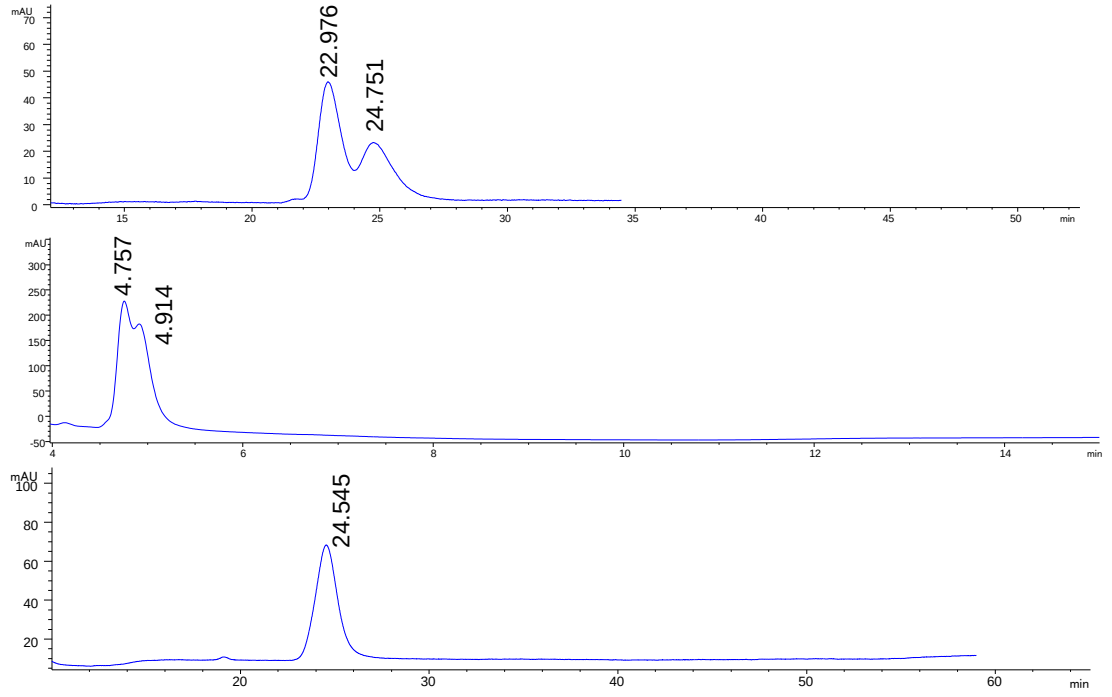
SIM için de öncelikle polar organik hareketli fazlar ile analizlere başlanmıştır. Metanol, asetonitril, etanol ve izopropanolün hareketli faz olarak kullanıldığı çalışmalarda SIM enantiyomerleri birbirlerinden hiçbir koşulda (asidik (% 0,1 FA ilavesiyle), bazik (% 0,1 DEA ilavesiyle) ve de hem asidik hem de bazik (% 0,1 FA ve % 0,1 DEA) katkı maddeleri eklenerek) ayrılmamışlardır.

3.7.2. Simbuterole Ait Normal Faz ile Yapılan Çalışmalar

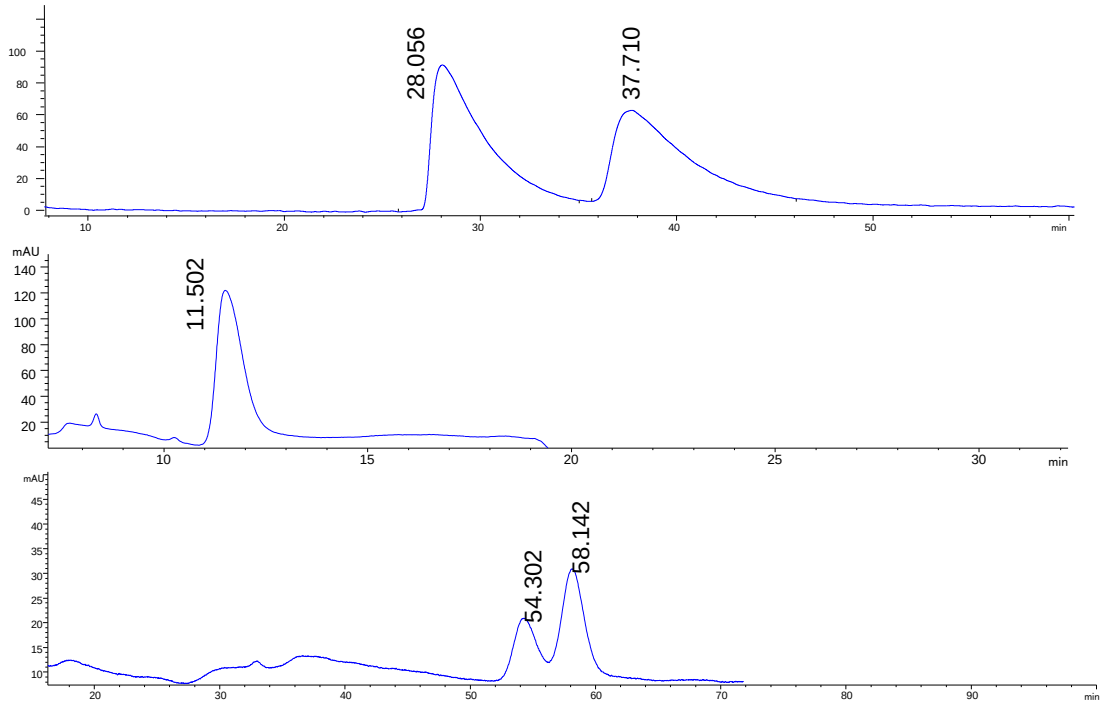
Polar organik fazlar kullanılarak enantiyomerler ayırlamadığı için normal faz çözücüler ile ayrımların yapılması öngörülmüştür. Normal faz çözücü karışımı olarak farklı oranlarda (80:20; 70:30; 60:40; (h/h)) n-hekzan ve IPA karışımları hazırlanmıştır. Ayrıca karışımlara ayrı ayrı asidik (% 0,1 FA ilavesiyle), bazik (% 0,1 DEA ilavesiyle) ve de hem asidik hem de bazik (% 0,1 FA ve % 0,1 DEA) katkı maddeleri eklenerek analizler 6 farklı kolon ile 25 °C sıcaklık, 5 µL enjeksiyon hacmi, 225 nm dalga boyunda, dakikada 1 mL akış hızı ile gerçekleştirilmiştir. Enantiyomerik alıkonma sırasında değişim olup olmadığını görmek için fraksiyonlama yapılmış elde edilen saf enantiyomerlerden bir tanesi standart ekleme yoluyla 2 katına çıkartılmıştır. Enantiyomerlerin ayırımına ait kromatogramlar Şekil 3.52 - 3.58 arasında gösterilmektedir. Sonuçlara ait sistem uygunluk testi parametreleri Çizelge 3.14 ve 3.15 'te sunulmuştur.



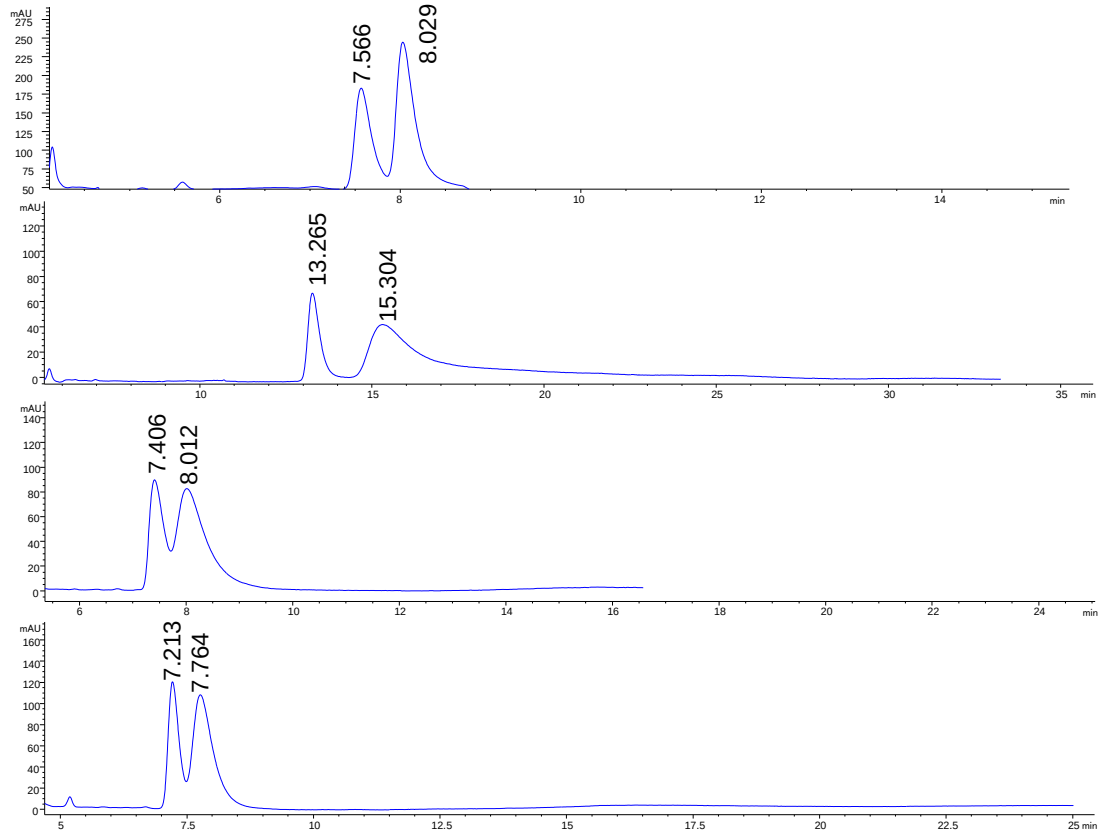
Şekil 3.52. Cellulose 1 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:İpa:DEA (80:20:0,1); n-hekzan:İpa:FA:DEA (80:20:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya).



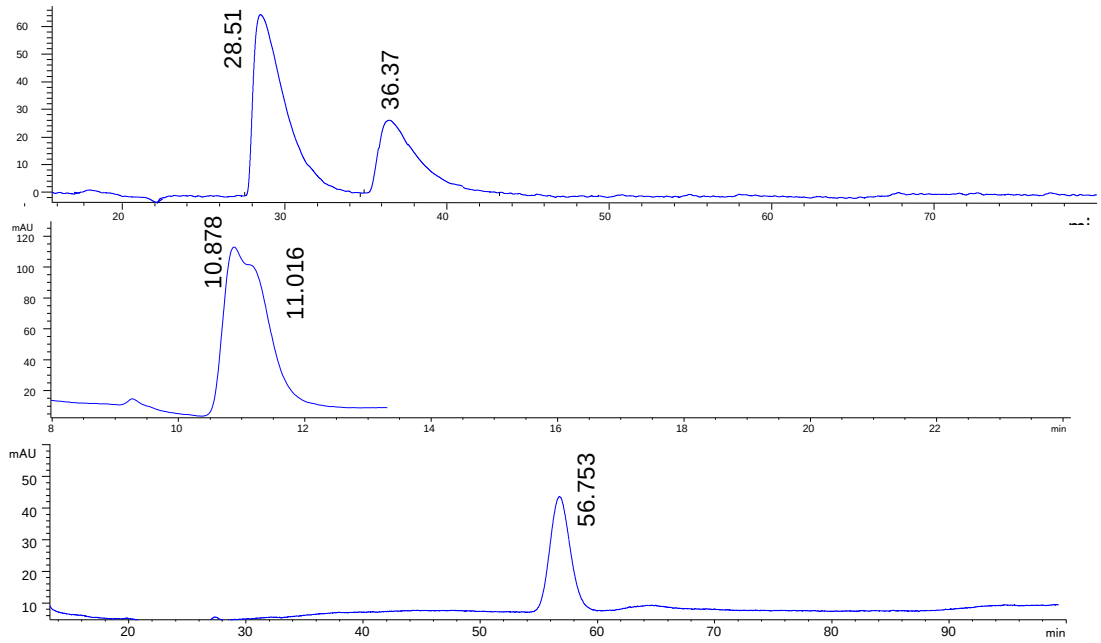
Şekil 3.53. Cellulose 2 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:İpa:FA (70:30:0,1); n-hekzan:İpa:DEA (70:30:0,1); n-hekzan:İpa:FA:DEA (70:30:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya).



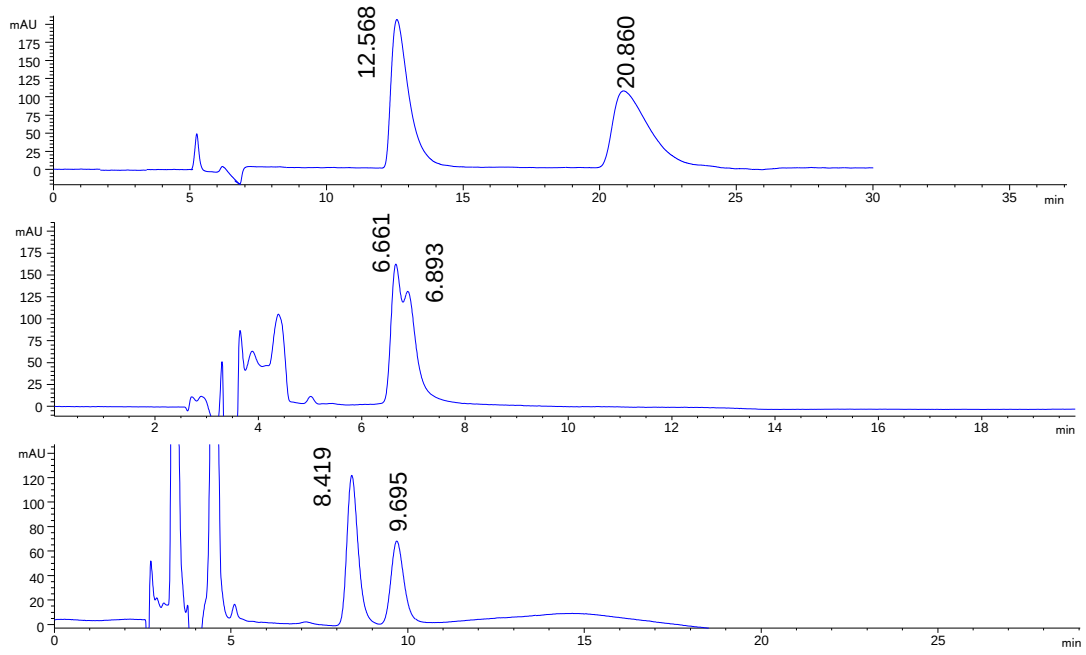
Şekil 3.54. Cellulose 2 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:İpa:FA (80:20:0,1); n-hekzan:İpa:DEA (80:20:0,1); n-hekzan:İpa:FA:DEA (80:20:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya).



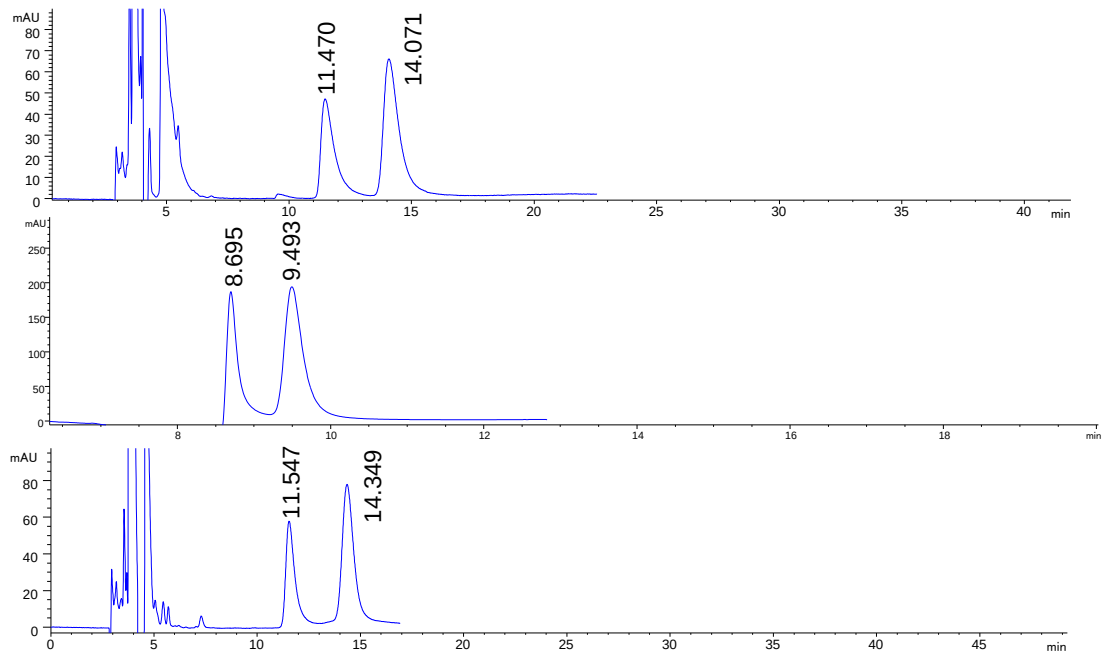
Şekil 3.55. Cellulose 3 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:Ipa:DEA (80:20:0,1); n-hekzan:Ipa:FA:DEA (80:20:0,1:0,1) ; n-hekzan:Ipa:FA (70:30:0,1); n-hekzan:Ipa:FA:DEA (70:30:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya).



Şekil 3.56. Cellulose 4 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:FA (80:20:0,1); n-hekzan:Ipa:DEA (80:20:0,1); n-hekzan:Ipa:FA:DEA (80:20:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya).



Şekil 3.57. Amylose 1 (250 x 4.6 mm; 5 µm); hareketli faz: n-hekzan:İpa:FA (80:20:0,1); n-hekzan:İpa:DEA (80:20:0,1); n-hekzan:İpa:FA:DEA (80:20:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya).



Şekil 3.58. Amylose 2 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:İpa:FA (70:30:0,1); n-hekzan:İpa:DEA (70:30:0,1); n-hekzan:İpa:FA:DEA (70:30:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya).

Çizelge 3.14. SIM için, 70:30 (n-hekzan:IPA, (h/h)) karışımının farklı katkı maddeleri kullanılarak yapılmış çalışmalarında elde edilen sistem uygunluk testi sonuçları

Kolon	70:30:0,1 (n-hekzan:IPA:FA)						70:30:0,1 (n-hekzan:IPA:DEA)						70:30:0,1:0,1 (n-hekzan:IPA:FA:DEA)					
	t ₁	t ₂	N ₁	N ₂	Rs	α	t ₁	t ₂	N ₁	N ₂	Rs	α	t ₁	t ₂	N ₁	N ₂	Rs	α
Cellulose 1	8,12	8,87	1392	1177	0,68	1,08	-	-	-	-	-	1,00	7,94	8,57	2365	1934	0,91	1,08
Cellulose 2	22,97	24,75	3130	1422	0,83	1,08	4,76	4,91	4139	3734	0,51	1,03	24,55	24,55	-	-	-	1,00
Cellulose 3	7,41	8,01	3140	1057	0,80	1,08	10,07	-	-	-	-	1,00	7,21	7,76	5220	1864	0,98	1,08
Cellulose 4	24,71	25,38	2168	2456	0,63	1,05	7,06	-	-	-	-	1,00	24,95	24,95	-	-	-	1,00
Amylose 1	10,50	10,50	-	-	-	1,00	-	-	-	-	-	1,00	5,09	5,61	3466	3141	1,40	1,10
Amylose 2	11,47	14,07	2439	2678	2,58	1,23	8,70	9,49	17065	8206	2,32	1,09	11,55	14,35	3815	3391	3,23	1,24

*Kırmızı ile işaretlenen sonuçlarda, standart ekleme yapılarak miktarı artırılan enantiyomerin yeri belirtilmektedir.

Çizelge 3.15. SIM için, 80:20 (n-hekzan:IPA, (h/h)) karışımının farklı katkı maddeleri kullanılarak yapılmış çalışmalarında elde edilen sistem uygunluk testi sonuçları

Kolon	80:20:0,1 (n-hekzan:IPA:FA)						80:20:0,1 (n-hekzan:IPA:DEA)						80:20:0,1:0,1 (n-hekzan:IPA:FA:DEA)					
	t ₁	t ₂	N ₁	N ₂	Rs	α	t ₁	t ₂	N ₁	N ₂	Rs	α	t ₁	t ₂	N ₁	N ₂	Rs	α
Cellulose 1	15,52	15,52	-	-	-	1,00	7,84	8,18	4056	3884	0,65	1,04	14,79	16,31	3089	2842	1,32	1,10
Cellulose 2	28,06	37,71	592	544	1,74	1,37	11,50	11,50	-	-	-	-	54,30	58,14	3776	4777	1,11	1,07
Cellulose 3	9,68	9,68	-	-	-	1,00	7,56	8,03	8340	8185	1,35	1,06	13,26	15,30	7522	715	1,43	1,15
Cellulose 4	28,51	36,37	1078	1224	2,06	1,30	10,88	11,02	-	-	-	1,02	56,75	56,75	-	-	-	1,00
Amylose 1	12,57	20,86	1911	1207	4,66	1,78	6,66	6,89	4684	3764	0,55	1,03	8,42	9,70	3534	3483	2,08	1,15
Amylose 2	11,13	12,33	1456	1224	1,15	1,16	9,02	9,02	-	-	-	1,00	21,95	27,48	4794	5491	4,01	1,25

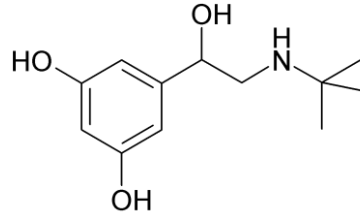
*Kırmızı ile işaretlenen sonuçlarda, standart ekleme yapılarak miktarı artırılan enantiyomerin yeri belirtilmektedir.

3.7.3. Simbuterole Ait Sulu Organik Faz Karışımı ile Yapılan Çalışmalar

SIM için sulu organik faz karışımları ile analizler optimize edilmeye çalışılmıştır. Metanolün belirli oranlarda su (% 0 - 30) ile karıştırılması ve bu karışımlara % 0,1 DEA ilave edilmesiyle 6 farklı kolonda analizler yapılmıştır. Analizler sonucunda, kullanılan kolonlar ile ayırım gerçekleşmemiştir.

3.8. Terbutaline Ait Sonuçlar

TER'e (Şekil. 3.59.) ait çalışmalar gereç ve yöntem kısmında belirtilen 6 farklı kiral kolon kullanılarak polar organik faz, normal faz ve sulu organik hareketli faz karışımları kullanılarak gerçekleştirilmiştir.



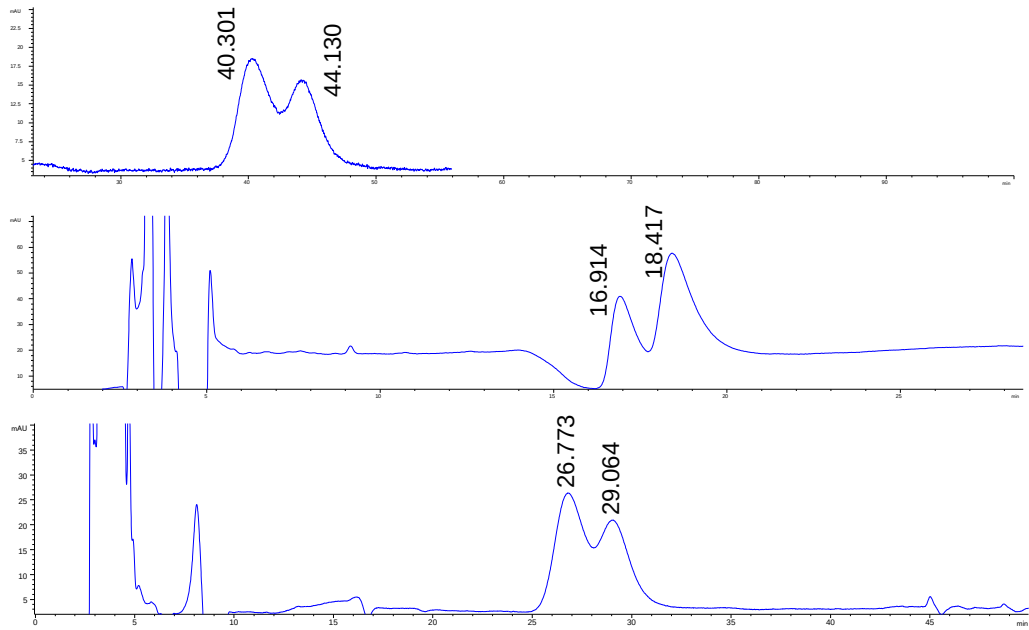
Şekil 3.59. Terbutaline ait molekül şekli

3.8.1. Terbutaline Ait Polar Organik Faz ile Yapılan Çalışmalar

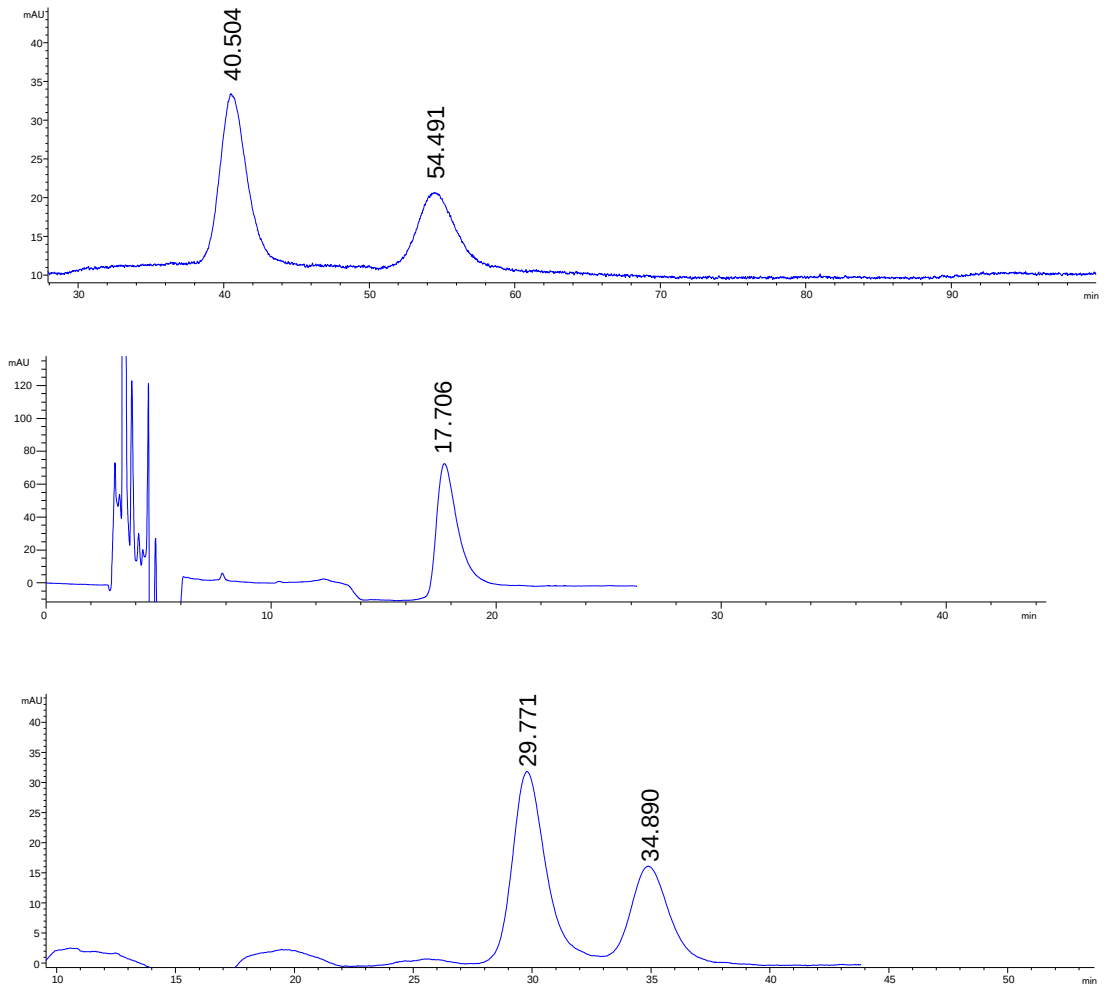
TER için de öncelikle polar organik hareketli fazlar ile analizlere başlanmıştır. Metanol, asetonitril, etanol ve izopropanolün hareketli faz olarak kullanıldığı çalışmalarda TER enantiyomerleri birbirlerinden hiçbir koşulda (asidik (% 0,1 FA ilavesiyle), bazik (% 0,1 DEA ilavesiyle) ve de hem asidik hem de bazik (% 0,1 FA ve % 0,1 DEA) katkı maddeleri eklenerek) ayrılmamışlardır. Bunun üzerine normal faz kullanarak enantiyomerlerin ayırımı optimize edilmeye çalışılmıştır.

3.8.2. Terbutaline Ait Normal Faz ile Yapılan Çalışmalar

Normal faz çözücü karışımı olarak farklı oranlarda (80:20; 70:30; 60:40; (h/h)) n-hekzan ve IPA karışımları hazırlanmıştır. Ayrıca karışımlara ayrı ayrı asidik (% 0,1 FA ilavesiyle), bazik (% 0,1 DEA ilavesiyle) ve de hem asidik hem de bazik (% 0,1 FA ve % 0,1 DEA) katkı maddeleri eklenerek analizler 6 farklı kolon ile 25 °C sıcaklık, 5 µL enjeksiyon hacmi, 225 nm dalga boyunda, dakikada 1 mL akış hızı ile gerçekleştirilmiştir. Enantiyomerik alıkonma sırasında değişim olup olmadığını görmek için fraksiyonlama yapılmış elde edilen saf enantiyomerlerden bir tanesi standart ekleme yoluyla 2 katına çıkartılmıştır. Analizler de Cellulose 1, Amylose 1 ve Amylose 2 kolonlarında hiçbir ayırım olmamış ve enantiyomerler kolonu birlikte terk etmişlerdir. Cellulose 3'te ise enantiyomerler tam olarak ayırlanamamıştır. Cellulose 2 ve Cellulose 4'e ait kromatogramlar Şekil 3.60 - 3.63 arasında gösterilmektedir. Sonuçlara ait sistem uygunluk testi parametreleri Çizelge 3.16 ve 3.17 'te verilmiştir.



Şekil 3.60. Cellulose 2 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:İpa:FA (70:30:0,1); n-hekzan:İpa:DEA (70:30:0,1); n-hekzan:İpa:FA:DEA (70:30:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya).

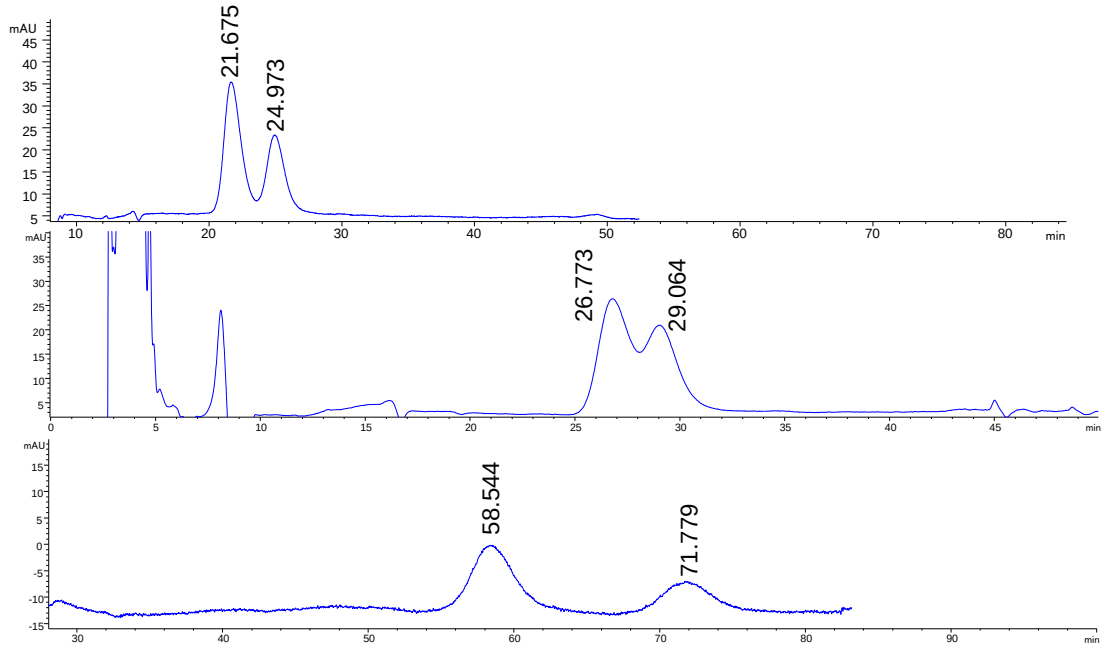


Şekil 3.61. Cellulose 4 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:Ipa:FA (70:30:0,1); n-hekzan:Ipa:DEA (70:30:0,1); n-hekzan:Ipa:FA:DEA (70:30:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya).

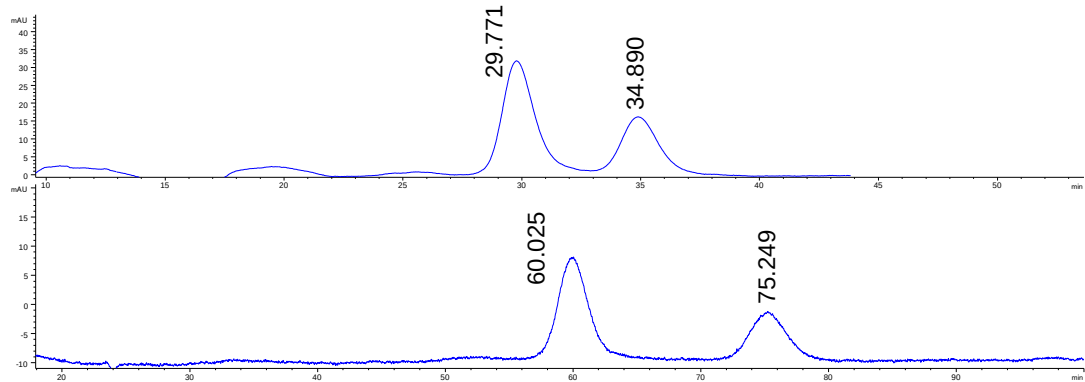
Çizelge 3.16. TER için, 70:30 (n-hekzan:IPA, (h/h)) karışımının farklı katkı maddeleri kullanılarak yapılmış çalışmalarında elde edilen sistem uygunluk testi sonuçları

Hareketli Faz	Cellulose 2						Cellulose 4					
	t ₁	t ₂	N ₁	N ₂	Rs	α	t ₁	t ₂	N ₁	N ₂	Rs	α
70:30:0,1 (FA)	40,30	44,13	785	1096	0,69	1,10	40,50	54,49	2382	2088	3,45	1,35
70:30:0,1 (DEA)	16,90	18,42	2338	1463	0,80	1,10	17,71	17,71	-	-	-	1,00
70:30:0,1:0,1 (FA:DEA)	26,77	29,06	982	1362	0,70	1,10	29,77	34,89	2412	2549	1,97	1,17

*Kırmızı ile işaretlenen sonuçlarda, standart ekleme yapılarak miktarı artırılan enantiyomerin yeri belirtilmektedir.



Şekil 3.62. Cellulose 2 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:İpa:FA:DEA (65:35:0,1:0,1); n-hekzan:İpa:FA:DEA (70:30:0,1:0,1); n-hekzan:İpa:FA:DEA (80:20:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya).



Şekil 3.63. Cellulose 4 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:İpa:FA:DEA (70:30:0,1:0,1); n-hekzan:İpa:FA:DEA (80:20:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya).

Çizelge 3.17. TER için Cellulose 2 ve Cellulose 4 kolonda, hareketli faz olarak n-hekzan:İPA:DEA:FA karışımının farklı bileşimleri kullanılarak elde edilen sistem uygunluk testi sonuçları.

Hareketli Faz	Cellulose 2						Cellulose 4					
	t ₁	t ₂	N ₁	N ₂	Rs	α	t ₁	t ₂	N ₁	N ₂	Rs	α
65:35:0,1:0,1	-	-	-	-	-	-	24,14	32,74	2455	2225	3,63	1,36
70:30:0,1:0,1	26,77	29,06	982	1362	0,70	1,10	29,77	34,89	2412	2549	1,97	1,17
80:20:0,1:0,1	58,54	71,78	1801	1784	2,15	1,23	60,02	75,25	3143	3236	3,18	1,25

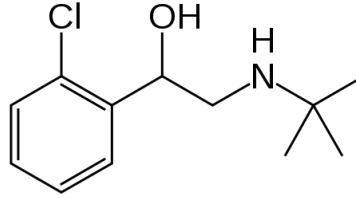
*Kırmızı ile işaretlenen sonuçlarda, standart ekleme yapılarak miktarı artırılan enantiyomerin yeri belirtilmektedir.

3.8.3. Terbutaline Ait Sulu Organik Faz Karışımı ile Yapılan Çalışmalar

TER için sulu organik faz karışımları ile analizler optimize edilmeye çalışılmıştır. Metanolün belirli oranlarda su (% 0 - 30) ile karıştırılması ve bu karışımlara % 0,1 DEA ilave edilmesiyle altı farklı kolonda analizler yapılmıştır. Analizler sonucunda, kullanılan kolonlar ile ayırım gerçekleşmemiştir.

3.9. Tulobuterole Ait Çalışmalar

TUL'a (Şekil. 3.64.) ait çalışmalar gereç ve yöntem kısmında belirtilen altı farklı kiral kolon kullanılarak polar organik faz, normal faz ve sulu organik hareketli faz karışımları kullanılarak gerçekleştirilmiştir.



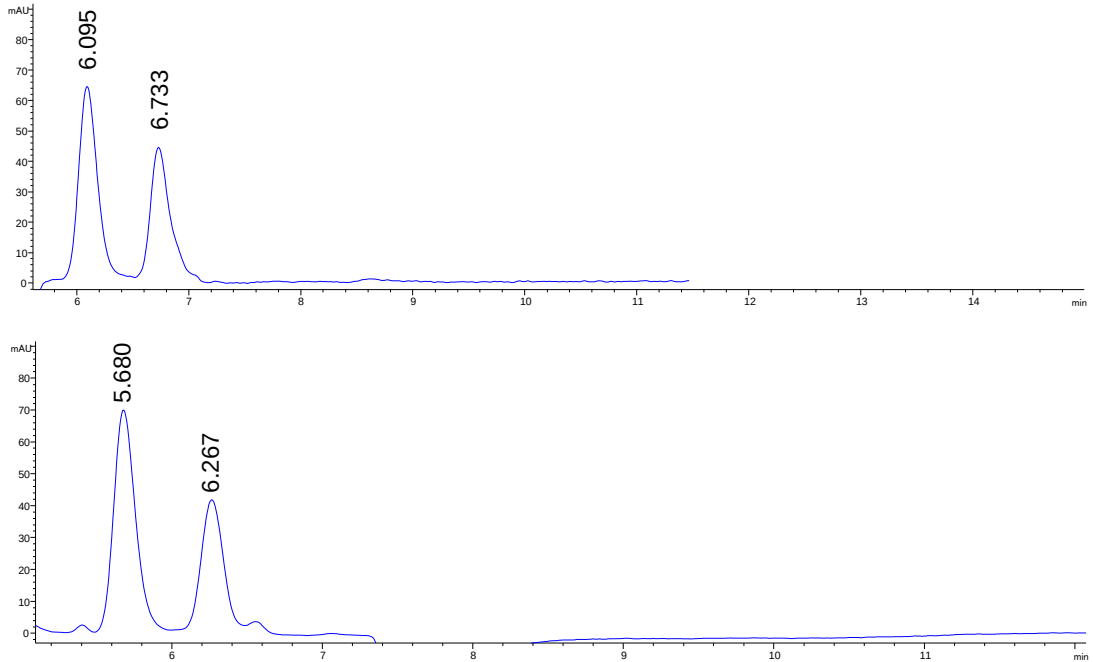
Şekil 3.64. Tulobuterole ait molekül şekli

3.9.1. Tulobuterole Ait Polar Organik Faz ile Yapılan Çalışmalar

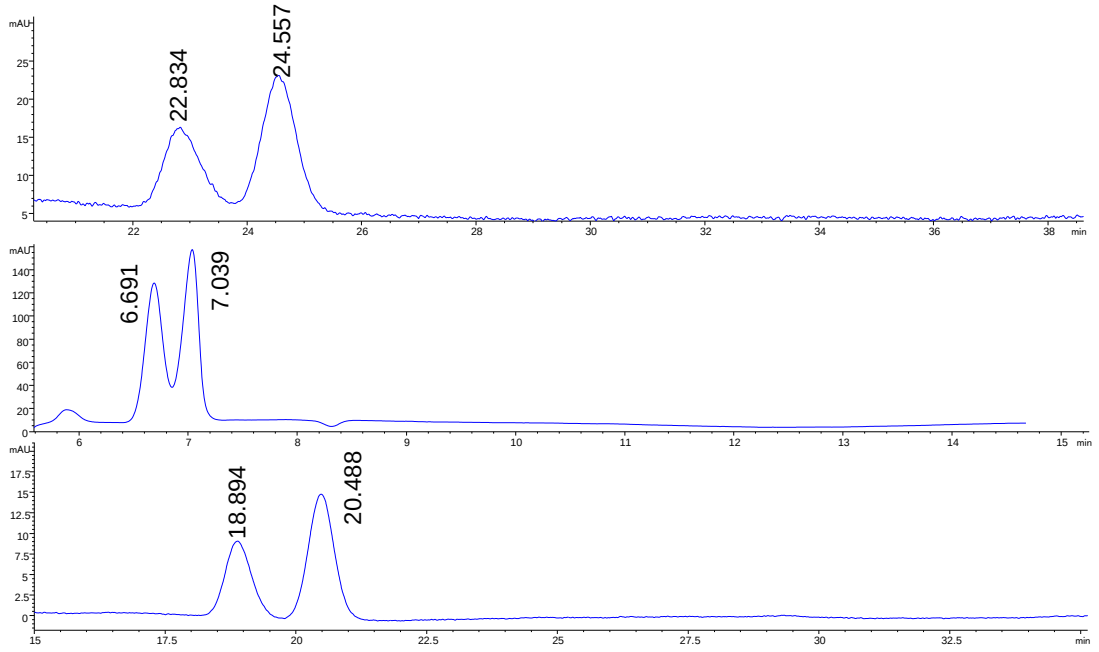
TUL için öncelikle polar organik hareketli fazlar ile analizlere başlanmıştır. Metanol, asetonitril, etanol ve izopropanolün hareketli faz olarak kullanıldığı çalışmalarda TUL enantiyomerleri birbirlerinden hiçbir koşulda (asidik (% 0,1 FA ilavesiyle), bazik (% 0,1 DEA ilavesiyle) ve de hem asidik hem de bazik (% 0,1 FA ve % 0,1 DEA) katkı maddeleri eklenerek) ayrılmamışlardır.

3.9.2. Tulobuterole Ait Normal Faz ile Yapılan Çalışmalar

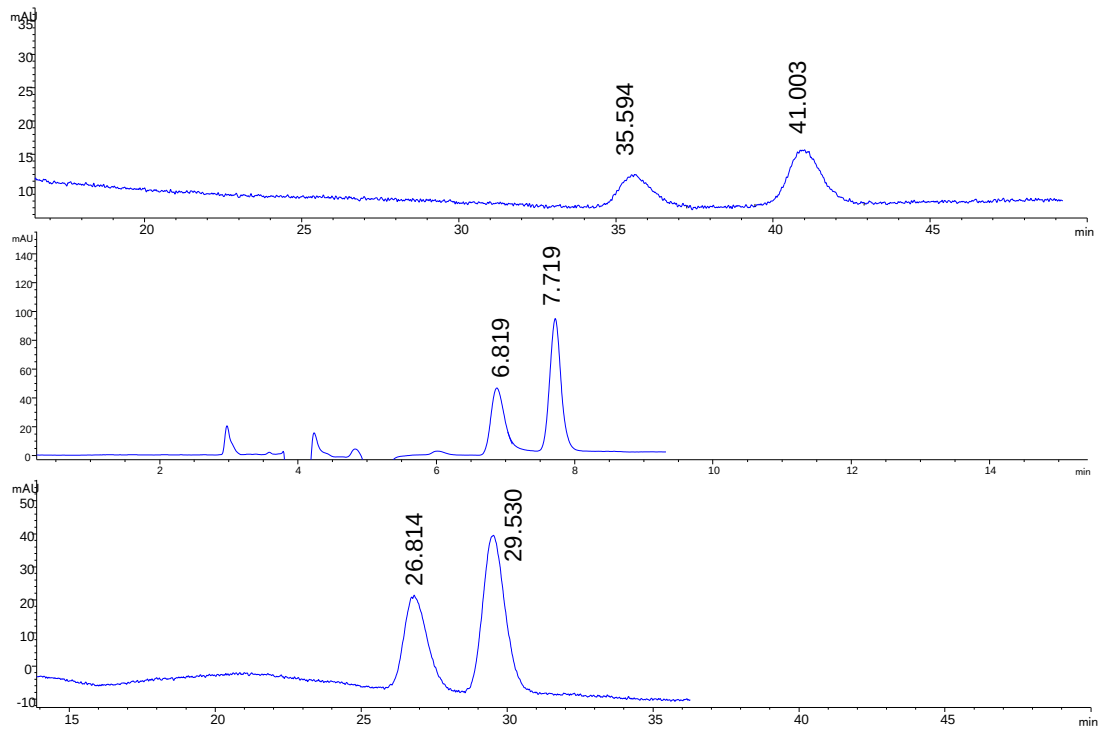
Polar organik fazlar kullanılarak enantiyomerler ayırlamadığı için normal faz çözücüler ile ayrımların yapılması öngörülmüştür. Normal faz çözücü karışımı olarak farklı oranlarda (90:10; 85:15; 80:20; (h/h)) n-hekzan ve IPA karışımları hazırlanmıştır. Ayrıca karışımlara ayrı ayrı asidik (% 0,1 FA ilavesiyle), bazik (% 0,1 DEA ilavesiyle) ve de hem asidik hem de bazik (% 0,1 FA ve % 0,1 DEA) katkı maddeleri eklenerek analizler altı farklı kolon ile 25 °C sıcaklık, 5 µL enjeksiyon hacmi, 225 nm dalga boyunda, dakikada 1 mL akış hızı ile gerçekleştirilmiştir. Enantiyomerik alıkonma sırasında değişim olup olmadığını görmek için fraksiyonlama yapılmış elde edilen saf enantiyomerlerden bir tanesi standart ekleme yoluyla 2 katına çıkartılmıştır Enantiyomerlerin ayırımına ait kromatogramlar Şekil 3.65 - 3.71 arasında gösterilmektedir. Belirlenen koşullarda Amylose 2 ve Cellulose 3 kolonlarla taban tabana ayırım sağlanamamıştır. Sonuçlara ait sistem uygunluk testi parametreleri Çizelge 3.18 ve 3.19 'da sunulmuştur.



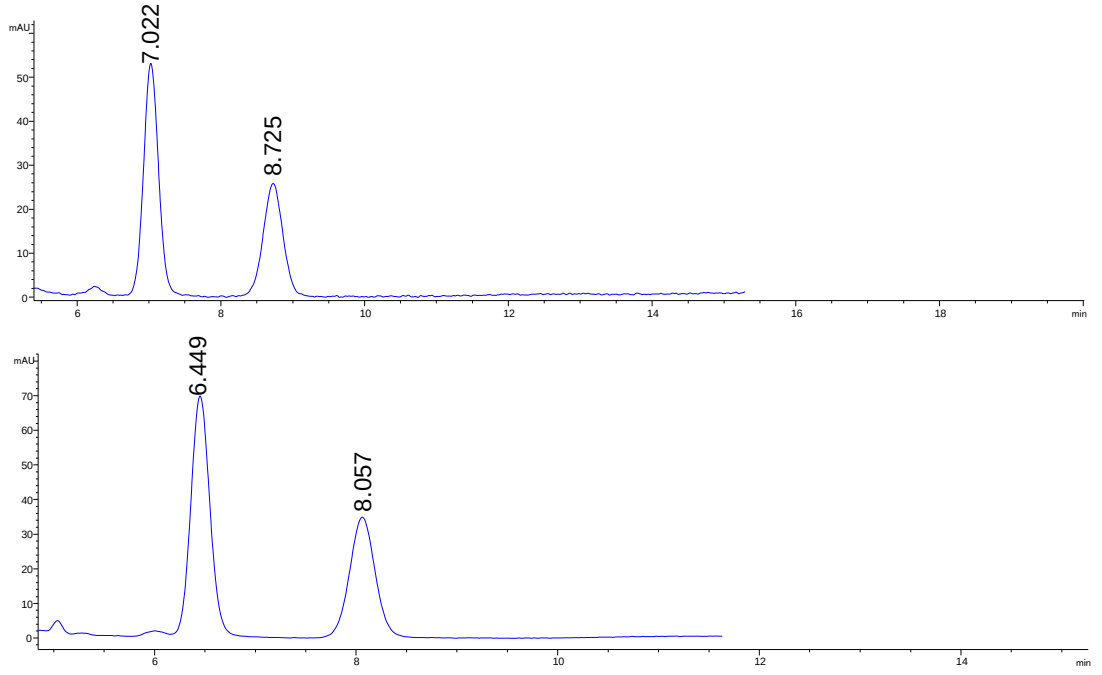
Şekil 3.65. Cellulose 1 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:İpa:FA (80:20:0,1); n-hekzan:İpa:FA:DEA (80:20:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya).



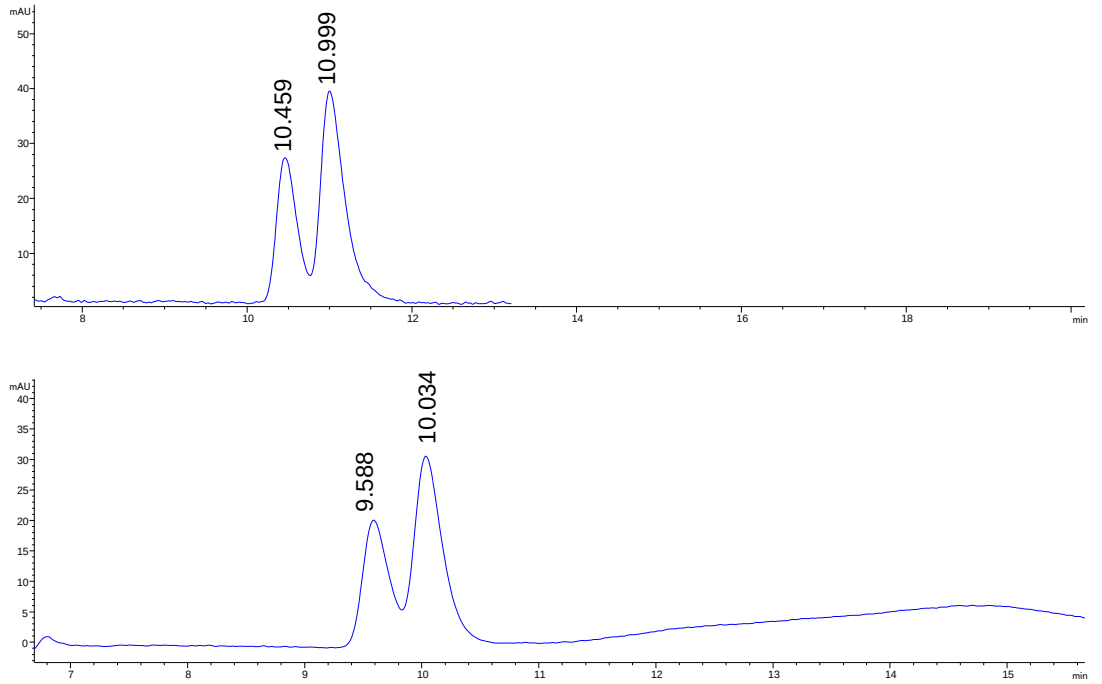
Şekil 3.66. Cellulose 2 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:İpa:FA (80:20:0,1); n-hekzan:İpa:DEA (80:20:0,1); n-hekzan:İpa:FA:DEA (80:20:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya).



Şekil 3.67. Cellulose 4 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:İpa:FA (80:20:0,1); n-hekzan:İpa:DEA (80:20:0,1); n-hekzan:İpa:FA:DEA (80:20:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya).



Şekil 3.68. Amylose 1 (250 x 4.6 mm; 5 μ m); hareketli faz: n-hekzan:İpa:FA (80:20:0,1); n-hekzan:İpa:FA:DEA (80:20:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya).

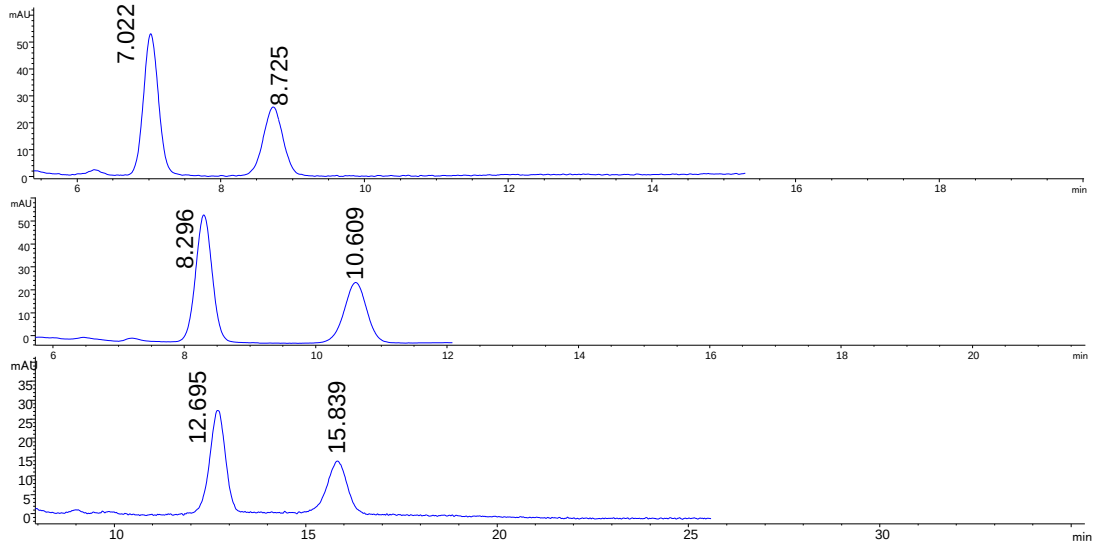


Şekil 3.69. Amylose 2 (250 x 4.6 mm; 3 μ m); hareketli faz: n-hekzan:İpa:FA (80:20:0,1); n-hekzan:İpa:FA:DEA (80:20:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya).

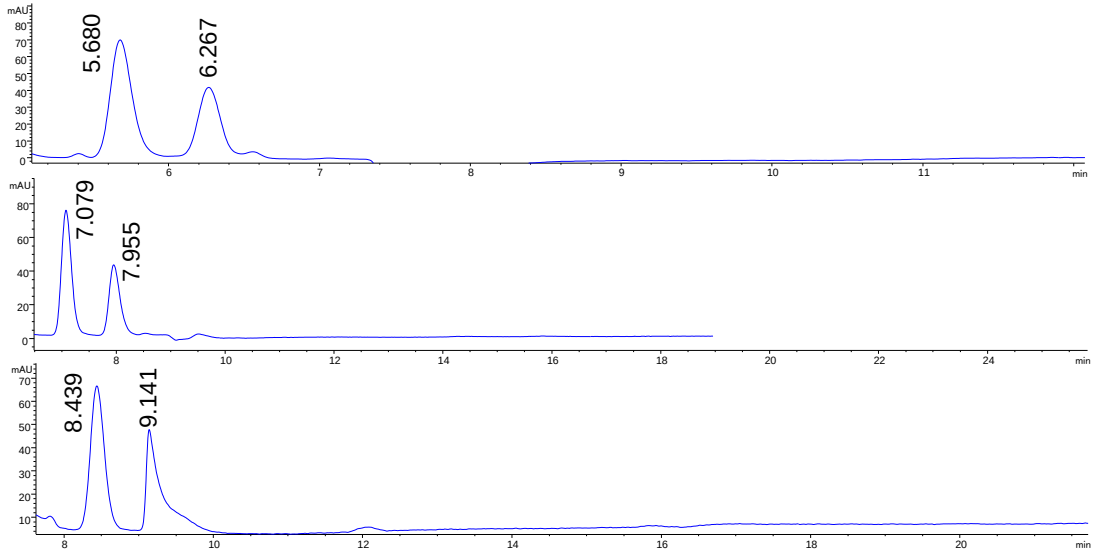
Çizelge 3.18. TUL için, 80:20 (n-hekzan:IPA, (h/h)) karışımının farklı katkı maddeleri kullanılarak yapılmış çalışmalarında elde edilen sistem uygunluk testi sonuçları

Kolon	80:20:0,1 (n-hekzan:IPA:FA)						80:20:0,1 (n-hekzan:IPA:DEA)						80:20:0,1:0,1 (n-hekzan:IPA:FA:DEA)					
	t ₁	t ₂	N ₁	N ₂	R _s	α	t ₁	t ₂	N ₁	N ₂	R _s	α	t ₁	t ₂	N ₁	N ₂	R _s	α
Cellulose 1	6,10	6,73	6595	8360	2,14	1,10	-	-	-	-	-	-	5,68	6,27	7602	8865	2,22	1,10
Cellulose 2	22,83	24,56	5839	7296	1,47	1,08	6,69	7,04	7654	17123	1,20	1,05	18,89	20,49	6617	7878	1,72	1,08
Cellulose 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cellulose 4	35,59	41,00	5529	6766	2,76	1,15	6,82	7,72	6032	11273	2,80	1,13	26,81	29,53	5389	7185	1,90	1,10
Amylose 1	7,02	8,73	5531	4792	3,86	1,24	-	-	-	-	-	-	6,45	8,06	5633	4933	4,00	1,25
Amylose 2	10,46	10,99	7917	7232	1,09	1,05	-	-	-	-	-	-	9,59	10,03	8148	8394	1,03	1,05

*Kırmızı ile işaretlenen sonuçlarda, standart ekleme yapılarak miktarı artırılan enantiyomerin yeri belirtilmektedir.



Şekil 3.70. Amylose 1 (250 x 4.6 mm; 5 µm); hareketli faz: n-hekzan:İpa:FA:DEA (80:20:0,1:0,1); n-hekzan:İpa:FA:DEA (85:15:0,1:0,1); n-hekzan:İpa:FA:DEA (90:10:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya).



Şekil 3.71. Cellulose 1 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:İpa:FA:DEA (80:20:0,1:0,1); n-hekzan:İpa:FA:DEA (85:15:0,1:0,1); n-hekzan:İpa:FA:DEA (90:10:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya).

Çizelge 3.19. TUL için Amylose 1 ve Cellulose 1 kolonda, hareketli faz olarak n-hekzan:IPA:DEA:FA karışımının farklı bileşimleri kullanılarak elde edilen sistem uygunluk testi sonuçları.

Hareketli Faz	Amylose 1						Cellulose 1					
	t ₁	t ₂	N ₁	N ₂	Rs	α	t ₁	t ₂	N ₁	N ₂	Rs	α
80:20:0,1:0,1	7,02	8,73	5633	4933	400	1,25	5,68	6,27	7602	8865	222	1,10
85:15:0,1:0,1	8,30	10,61	5230	4724	429	1,28	7,08	7,76	7259	7866	253	1,12
90:10:0,1:0,1	12,70	15,84	4682	4432	3,71	1,25	8,44	9,14	9647	17591	226	1,08

*Kırmızı ile işaretlenen sonuçlarda, standart ekleme yapılarak miktarı artırılan enantiyomerin yeri belirtilmektedir.

3.9.3. Tulobuterole Ait Sulu Organik Faz Karışımı ile Yapılan Çalışmalar

TUL için sulu organik faz karışımları ile analizler optimize edilmeye çalışılmıştır. MeOH'nin ile belirli oranlarda su (% 0 - 30) ile karıştırılması ve bu karışımlara % 0,1 DEA ilave edilmesiyle 6 farklı kolonda analizler yapılmıştır. Analizler sonucunda, kullanılan kolonlar ile ayırım gerçekleşmemiştir.

3.10. Farmasötik Dozaj Şekillerinin Analizi için Yöntem Geliştirilmesi

Görüntüleme çalışmaları tamamlanan ve enantiyomerik alıkonma sıraları belirlenen etken maddelerden sadece KLB, RIT ve TER'in dozaj şekilleri piyasadan temin edilebilmiştir. Bu maddelerin analizleri için optimizasyon çalışmaları gerçekleştirildikten sonra optimize edilen koşullar kullanılarak yöntem geçerlilik testleri ICH kılavuzuna göre yapılmıştır. Yöntem geçerlilik testlerinin tamamlanmasının ardından piyasadan temin edilebilen dozaj şekillerine geliştirilen yöntemler uygulanmıştır.

3.10.1. Klenbuterol Analizi için Çalışmalar

3.10.1.1. Optimizasyon Çalışmaları

Görüntüleme çalışmaları gerçekleştirilirken gereç ve yöntem kısmında bahsedilen 6 adet kiral kolon ile farklı hareketli faz çeşitleri ve bileşimleri kullanılarak optimizasyon çalışmaları başlatılmıştır. Polar organik fazlar ile yapılan denemeler

sonucunda enantiyomerlerin ayrımı gerçekleşmemiştir. Organik faza su ilavesiyle yapılan çalışmalarla da istenilen enantiyomerik ayırım sağlanamadığı için normal faz çözücü karışımları ile analizler yapılmıştır. Hareketli faz bileşimini oluşturmak için izopropanol ile % 70'ten 95'e kadar değişen oranlarda n-hekzan içeren karışımlar hazırlanmıştır. Bu karışımlara enantiyomerlerin ayrıldığı hareketli faz koşullarında ayrı ayrı asidik (% 0,1 FA), bazik (% 0,1 DEA) ve hem asidik hem de bazik (% 0,1 FA ve % 0,1 DEA) katkı maddeleri eklenerek bunların da ayırma etkisi incelenmiştir. Bölüm 3.4.2'de bu kısım ile ilgili detaylı bilgi verilmiştir. Denenen kolonlar içinde kısa zamanda en etkin ayrımı sağlayan kolon Amylose 1 (250 x 4,6 mm; 5 µm) olduğu için diğer denemeler bu sabit faz üzerinde yoğunlaşmıştır. Asidik ve bazik katkı maddelerinin etkisi de araştırılmış ve eşit miktarda asit ve bazı aynı anda içeren hareketli faz ile yapılan çalışmalarda çok daha keskin pik şekilleri elde edilmiştir. Bu aşamadan sonra hareketli faz yüzdesinin optimizasyon çalışmaları sonucunda çözücü bileşimi olarak % 20 izopropanol kullanıldığında analiz süresinin açık bir şekilde kısaldığı görülmekte fakat kısalan analiz süresi ile birlikte ayırım gücünde de azalmalar gözlenmektedir. İzopropanol oranı % 10 olarak kullanıldığında ise analiz süresi neredeyse 2,5 kat artmaktadır. Bu yüzden optimum hareketli faz olarak 85:15:0,1:0,1 (h/h/h/h), n-hekzan:izopropanol:FA:DEA içeren hareketli faz bileşimi ile analizlerin yapılması uygun bulunmuştur.

Kolon limitleri de göz önüne alınarak sıcaklığın enantiyomerlerin alıkonması üzerine etkisi de incelenmiştir. Bu amaçla kolon sıcaklığı 25-45 °C arasında değiştirilerek analizler yapılmıştır. Beklendiği gibi sıcaklığın artmasıyla bileşiklerin alıkonma süreleri azalmış pik şekilleri daha simetrik hale gelmiştir. Bu sebeplerden ötürü 40 °C çalışma sıcaklığı olarak belirlenmiştir. Sistemin basıncı göz önüne alınarak akış hızı dakikada 1,0-1,7 mL olacak şekilde değiştirilmiş ve bu sayede analiz süresinin daha da kısaltılması amaçlanmıştır. Sıcaklığın artırılması sonucunda hareketli faz viskozitesinin azalmasıyla birlikte sistem basıncı düşmüştür. Basıncın düşmesi ile de akış hızının artırılması, kolon ve sistem için bir sorun oluşturmamıştır. Sistemin ve kolonun sınırları ölçüsünde akış hızı dakikada 1,5 mL olacak şekilde optimize edilmiştir.

Dalga boyu seçimi yapılırken bileşiğin UV spektrumu incelenmiş ve kullanılan çözücülerden ve dozaj şeklinin yardımcı maddelerinden en az girişimin olacağı düşünülen dalga boyu olarak 240 nm seçilmiştir. Enjeksiyon hacminin optimizasyonu için yapılan çalışmalarda ise 2 - 10 µL aralığındaki hacimler sisteme verilmiş, ancak yüksek enjeksiyon hacminin kolonda aşırı yüklemeye bağlı kuyruklanmaya sebep olduğu görülmüştür. Bu nedenle enjeksiyon hacmi 5 µL olarak belirlenmiştir.

Optimize edilen tüm koşullar Çizelge 3.20’de özetlenmiş, bu koşullar altında yapılan analize ait sistem uygunluk testi sonuçları da verilmiştir. (Çizelge 3.21).

Çizelge 3.20 KLB analizi için belirlenen optimum koşullar

Parametreler	Optimum Şartlar
Kolon	Amylose 1 (250 x 4,6 mm; 5 µm)
Mobil faz kompozisyonu (h/h/h/h)	n-Hekzan:IPA:FA:DEA, (85:15:0,1:0,1)
Sıcaklık (°C)	40
Akış hızı (mL dk⁻¹)	1,5
Enjeksiyon hacmi (µL)	5
Dalga boyu (nm)	240

Çizelge 3.21. KLB analizine ait optimum koşullardaki sistem uygunluk testi sonuçları

Parametreler	Klenbuterol	
	EN*1	EN2
Alıkonma zamanı (dk.)	4,65	5,60
Kapasite faktörü (k)	0,90	1,24
Ayırma gücü (Rs)	-	2,60
Kolon etkinliği (N)	3277	3123
Seçicilik (α)	-	1,44
Kuyruklanma faktörü (T)	1,02	1,01
Simetri faktörü	1,00	0,99
% BSS (alıkonma zamanı için)	0,06	0,03

* Enantiyomer

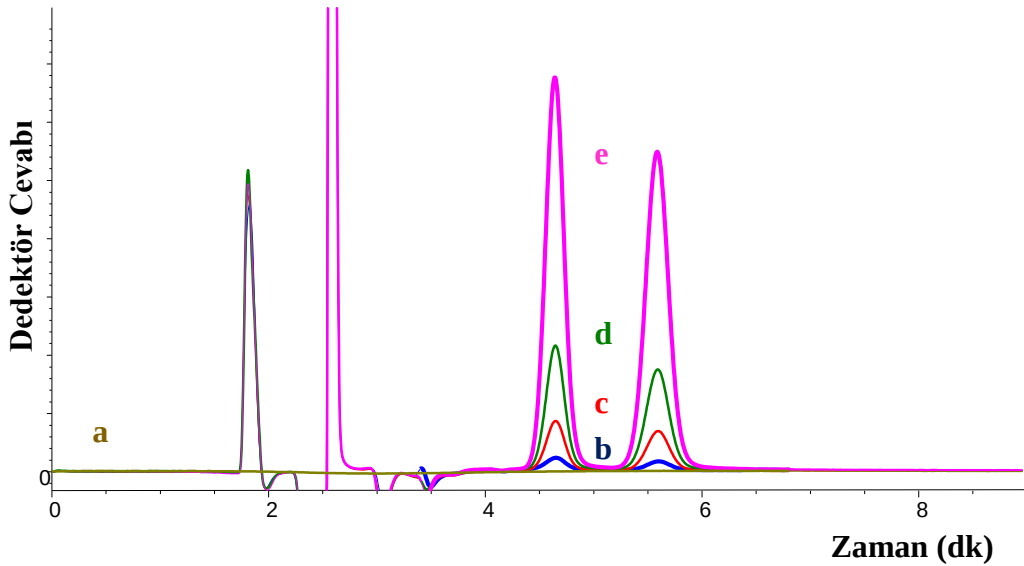
3.10.1.2. Klenbuterol Enantiyomerlerinin Analizi için Yöntem Geçerlilik Testleri

Yöntem geçerlilik testleri gereç ve yöntem başlığı altında (Bölüm 2.2.4) anlatılan prosedürlere göre yapılmıştır. Bu doğrultuda öncelikle miktar tayini çalışmaları için kalibrasyon grafikleri oluşturulmuş ve her iki enantiyomer için 4,0-300,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (n=8) derişimleri aralığında doğrusallık saptanmıştır. KLB enantiyomerleri için ayrı ayrı, derişimin bir fonksiyonu olarak pik alanlarının grafiğe geçirilmesiyle elde edilen doğru denklemleri ve tanımlayıcılık katsayısı (R^2) değerleri aşağıdaki gibidir.

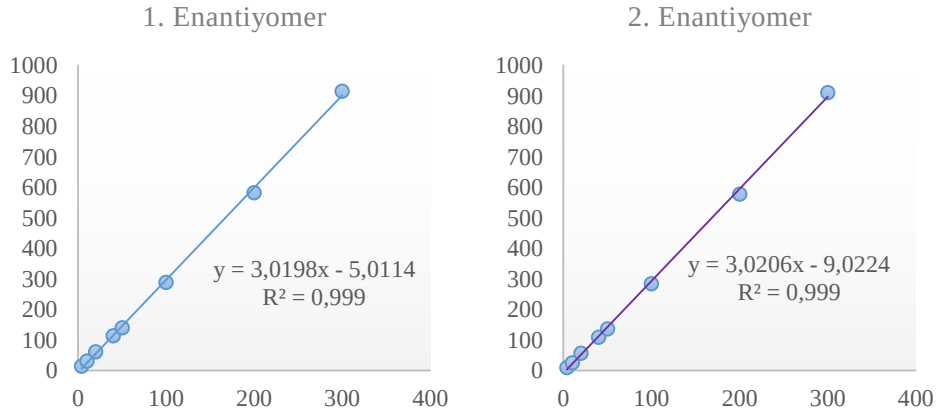
$$y=3,0198 x -5,0114; (R^2=0,999) (n=8) \text{ (Enantiyomer 1)}$$

$$y=3,0206 x -9,0224; (R^2=0,999) (n=8) \text{ (Enantiyomer 2)}$$

Optimize edilen koşullar altında bazı standart madde çözeltilerini içeren kromatogram Şekil 3.72’de verilmiştir. Bu verilerle elde edilen kalibrasyon grafiği ve denklemleri Şekil 3.73’te gösterilmiştir.



Şekil 3.72. KLB standartlarına ait, değişen derişimlerde elde edilen kromatogram: hareketli faz (a), 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (b), 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (c), 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (d), 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (e).



Şekil 3.73. KLB enantiyomerlerine ait 4-300 $\mu\text{g mL}^{-1}$ derişim aralığında elde edilen kalibrasyon grafikleri ve denklemleri.

Optimize edilen koşullar kullanılarak elde edilen kalibrasyon grafiğine ait regresyon analizi sonuçları ve hesaplanan yöntem geçerlilik testi parametreleri Çizelge 3.22’de özetlenmiştir. Teşhis ve tayin alt sınırı hesaplarında Bölüm 2.2.4’te bahsedilen Eşitlik 2.2 kullanılmıştır.

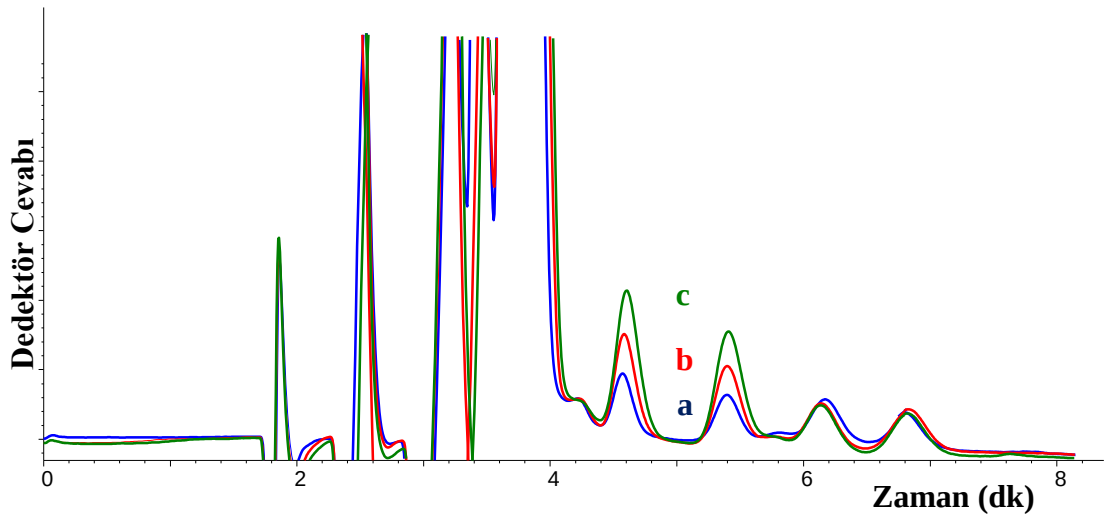
Çizelge 3.22. KLB enantiyomerlerinin kalibrasyon grafiğine ait regresyon analizi ve yöntem geçerlilik testi sonuçları.

Parametreler	Klenbuterol	
	EN 1	EN 2
Doğrusal aralık ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	4-300	4-300
Eğim	3,020	3,021
Kesişim	-5,011	-9,022
Tanımlayıcılık katsayısı (R^2)	0,999	0,999
Eğimin standart hatası	$3,86 \times 10^{-2}$	$3,84 \times 10^{-2}$
Kesişimin standart hatası	5,190	5,170
Teşhis sınırı ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,237	0,252
Tayin alt sınırı ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,718	0,760
Gün içi tekrar edilebilirlik (% BSS)*	0,155	0,102
Günler arası tekrar edilebilirlik (% BSS)*	0,169	0,131

* 5 değer üzerinden hesaplanmıştır.

3.10.1.3. Geliştirilen Yöntemin Klenbuterol İçeren Farmasötik Dozaj Şekline Uygulanması

Şurup formülasyonundan (Ventipulmin[®]) KLB'nin miktar tayini için Bölüm 2.1.6'da açıklanan prosedür doğrultusunda çözeltiler hazırlanarak optimize edilen kromatografik koşullar altında analizleri gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.74) Elde edilen piklerin altında kalan alan değerleri kalibrasyon denkleminde yerlerine yazılmış ve şurup içerisindeki KLB miktarı hesaplanmıştır.



Şekil 3.74. KLB dozaj şekline ait geri kazanım sonuçlarını içeren kromatogram: % 25 (a), % 50 (b), % 100 (c).

Ayrıca şurup içerisinde bulunan katkı maddelerinin (gliserin, poli etilen glikol 4000, vs.) geliştirilen kromatografik yöntem üzerine etkisinin araştırılması amacıyla geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla yapılan geri kazanım çalışmalarında standart ekleme yöntemi kullanılmıştır. Bilinen miktarlarda hazırlanmış olan şurup formülasyonu çözeltisi üzerine bilinen miktarlarda hazırlanan standart KLB çözeltileri farklı oranlarda (% 25 - 100) ilave edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 3.23'te özetlenmiştir.

Çizelge 3.23. KLB içeren Ventipulmin® şurup çözeltisinden elde edilen analiz bulgularının sonuçları.

Parametreler		EN 1			EN 2	
Etiket miktarı ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		25,00			25,00	
Bulunan miktar ($\mu\text{g mL}^{-1}$)*		24,82			24,80	
% Bağlı standart sapma		1,56			2,01	
% Bağlı hata		0,18			0,20	
İlave edilen standart ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	6,25	12,50	25,00	6,25	12,50	25,00
Bulunan miktar ($\mu\text{g mL}^{-1}$) *	6,13	12,57	25,12	6,31	12,63	25,22
% Geri kazanım*	98,06	100,58	100,46	100,98	101,10	100,88
% Bağlı standart sapma	1,95	0,66	0,71	2,02	1,83	0,75
% Bağlı hata	1,94	-0,58	-0,46	-0,98	-1,10	-0,88

* 5 değer üzerinden hesaplanmıştır.

3.10.2. Ritodrin Analizi için Çalışmalar

3.10.2.1. Optimizasyon Çalışmaları

Görüntüleme çalışmaları gerçekleştirilirken gereç ve yöntem kısmında bahsedilen 6 adet kiral kolon ile farklı hareketli faz çeşitleri ve bileşimleri kullanılarak optimizasyon çalışmaları başlatılmıştır. Polar organik fazlar ile yapılan denemeler sonucunda enantiyomerlerin ayrımı gerçekleşmemiştir. Organik faza su ilavesiyle yapılan çalışmalarla da istenilen enantiyomerik ayırım sağlanamadığı için normal faz çözücü karışımları ile analizler yapılmıştır. Hareketli faz bileşimini oluşturmak için izopropanol ile % 55'ten 90'a kadar değişen oranlarda n-hekzan içeren karışımlar hazırlanmıştır. Bu karışımlara enantiyomerlerin ayrıldığı hareketli faz koşullarında ayrı ayrı asidik (% 0,1 FA), bazik (% 0,1 DEA) ve hem asidik hem de bazik (% 0,1 FA ve % 0,1 DEA) katkı maddeleri eklenerek bunların da ayırma etkisi incelenmiştir. Bölüm 3.6.2'de bu kısım ile ilgili detaylı bilgi verilmiştir. Denenen kolonlar içinde

Cellulose 2, Cellulose 3 ve Cellulose 4 (250 x 4,6 mm; 3 µm) kolonlarda ayrımlar analiz için uygun bulunmuştur. Analiz süreleri değerlendirildiğinde kısa zamanda en etkin ayrımı sağlayan kolon Cellulose 2 (250 x 4,6 mm; 3 µm) olduğu için diğer denemeler bu sabit faz üzerinde yoğunlaşmıştır.

Asidik ve bazik katkı maddelerinin etkisi de araştırılmış ve eşit miktarda asit ve bazı aynı anda içeren hareketli faz ile yapılan çalışmalarda ayırım gücü değerleri daha yüksek çıktığı ve daha keskin pik şekilleri elde edildiği için hareketli faz içerisine hem asit hem de baz ilave edilmiştir. Bir sonraki adımda hareketli faz yüzdesinin optimizasyon çalışmaları yapılmış sonucunda çözücü bileşimi olarak %45 izopropanol kullanıldığında analiz süresinin açık bir şekilde kısaldığı görülmekte fakat kısalan analiz süresi ile birlikte ayırım gücünde de azalmalar gözlenmektedir. İzopropanol oranı %20 olarak kullanıldığında ise analiz seçilen hareketli faz bileşimine göre 6 kat daha uzun sürede tamamlanmaktadır. Bu yüzden optimum hareketli faz olarak 65:35:0,1:0,1 (h/h/h/h), n-hekzan:izopropanol:FA:DEA içeren hareketli faz bileşimi ile analizlerin gerçekleştirilmesine karar verilmiştir.

Kolon limitleri de göz önüne alınarak sıcaklığın enantiyomerlerin alıkonması üzerine etkisi de incelenmiştir. Bu amaçla kolon fırını sıcaklığı 25-45 °C arasında değiştirilerek analizler yapılmıştır. Beklendiği gibi sıcaklığın artmasıyla bileşiklerin alıkonma süreleri azalmış pik şekilleri daha simetrik hale gelmiştir. Bu sebeplerden ötürü 40 °C çalışma sıcaklığı olarak belirlenmiştir. Sistemin basıncı göz önüne alınarak akış hızı dakikada 1,0-1,7 mL olacak şekilde değiştirilmiş ve bu sayede analiz süresinin daha da kısaltılması amaçlanmıştır. Sıcaklığın arttırılması sonucunda hareketli faz viskozitesinin azalmasıyla birlikte sistem basıncı düşmüştür. Basıncın düşmesi ile de akış hızının arttırılması kolon ve sistem için bir sorun oluşturmamıştır. Sistemin ve kolonun sınırları ölçüsünde akış hızı dakikada 1,5 mL olacak şekilde optimize edilmiştir.

Dalga boyu seçimi yapılırken bileşiğin UV spektrumu incelenmiş ve kullanılan çözücülerden ve dozaj şeklinin yardımcı maddelerinden en az girişimin olacağı düşünülen dalga boyu olarak 225 nm seçilmiştir. Enjeksiyon hacminin optimizasyonu için yapılan çalışmalarda ise 2-10 μL aralığındaki hacimler sisteme verilmiş, ancak yüksek enjeksiyon hacminin kolonda aşırı yüklemeye bağlı kuyruklanmaya sebep olduğu görülmüştür. Bu nedenle enjeksiyon hacmi 5 μL olarak belirlenmiştir.

Optimize edilen tüm koşullar Çizelge 3.24’de özetlenmiş, bu koşullar altında yapılan analize ait sistem uygunluk testi sonuçları da tablolanmıştır (Çizelge 3.25.).

Çizelge 3.24. RIT analizi için belirlenen optimum koşullar

Parametreler	Optimum Şartlar
Kolon	Cellulose 2 (250 x 4,6 mm; 3 μm)
Mobil faz bileşimi (h/h/h/h)	n-Hekzan:IPA:FA:DEA, (65:35:0,1:0,1)
Sıcaklık ($^{\circ}\text{C}$)	40
Akış hızı (mL dk^{-1})	1,5
Enjeksiyon hacmi (μL)	5
Dalga boyu (nm)	225

Çizelge 3.25. RIT analizine ait optimum koşullardaki sistem uygunluk testi sonuçları

Parametreler	Ritodrin	
	EN*1	EN2
Alıkonma zamanı (dk)	6,06	7,50
Kapasite faktörü (k)	1,63	2,26
Ayrırma gücü (Rs)	-	2,87
Kolon etkinliği (N)	2234	2851
Seçicilik (α)	-	1,38
Kuyruklanma faktörü (T)	1,30	1,27
Simetri faktörü	0,79	0,78
% BSS (alıkonma zamanı için)	0,08	0,08

* Enantiyomer

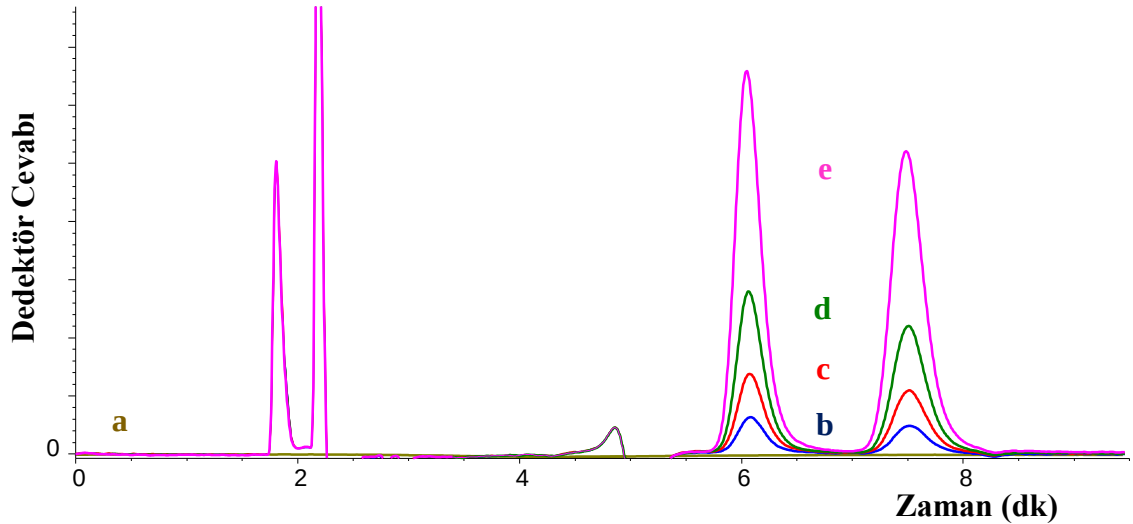
3.10.2.2. Ritodrin Enantiyomerlerinin Analizi için Yöntem Geçerlilik Testleri

Yöntem geçerlilik testleri gereç ve yöntem başlığı altında (Bölüm 2.2.4) anlatılan prosedürlere göre yapılmıştır. Bu doğrultuda öncelikle miktar tayini çalışmaları için kalibrasyon grafikleri oluşturulmuş ve her iki enantiyomer için 5,0 - 500,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (n=7) derişimleri aralığında doğrusallık saptanmıştır. RIT enantiyomerleri için ayrı ayrı, derişimin bir fonksiyonu olarak pik alanlarının grafiğe geçirilmesiyle elde edilen doğru denklemleri ve tanımlayıcılık katsayısı (R^2) değerleri aşağıdaki gibidir.

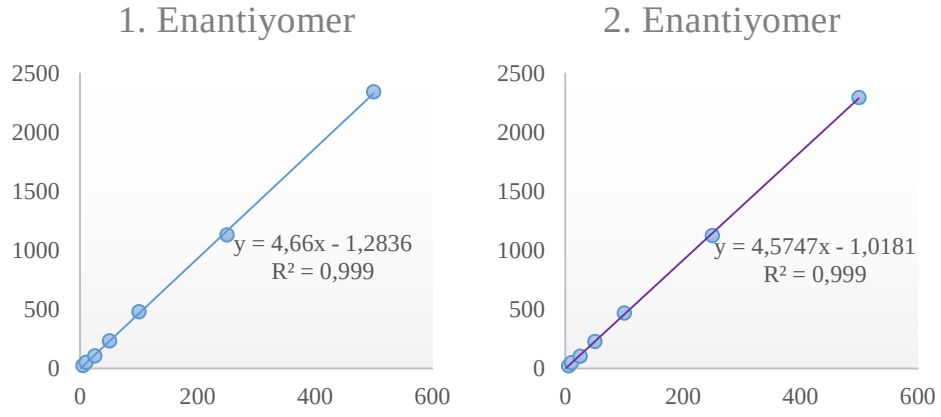
$$y=4,6600 x -1,2836; (R^2=0,999) (n=7) \text{ (Enantiyomer 1)}$$

$$y=4,5747 x -1,0181; (R^2=0,999) (n=7) \text{ (Enantiyomer 2)}$$

Optimize edilen koşullar altında bazı standart madde çözeltilerini içeren kromatogram Şekil 3.75'te verilmiştir. Bu verilerle elde edilen kalibrasyon grafiği ve denklemleri Şekil 3.76'da gösterilmiştir.



Şekil 3.75. RIT standartlarına ait, değişen derişimlerde elde edilen kromatogramı: hareketli faz (a), 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (b), 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (c), 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (d), 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (e).



Şekil 3.76. RIT enantiyomerlerine ait 5-500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ derişim aralığında elde edilen kalibrasyon grafikleri ve denklemleri.

Optimize edilen koşullar kullanılarak elde edilen kalibrasyon grafiğine ait regresyon analizi sonuçları ve hesaplanan yöntem geçerlilik testi parametreleri Çizelge 3.26’da özetlenmiştir. Teşhis ve tayin alt sınırı hesaplarında Bölüm 2.2.4’te bahsedilen Eşitlik 2.2 kullanılmıştır.

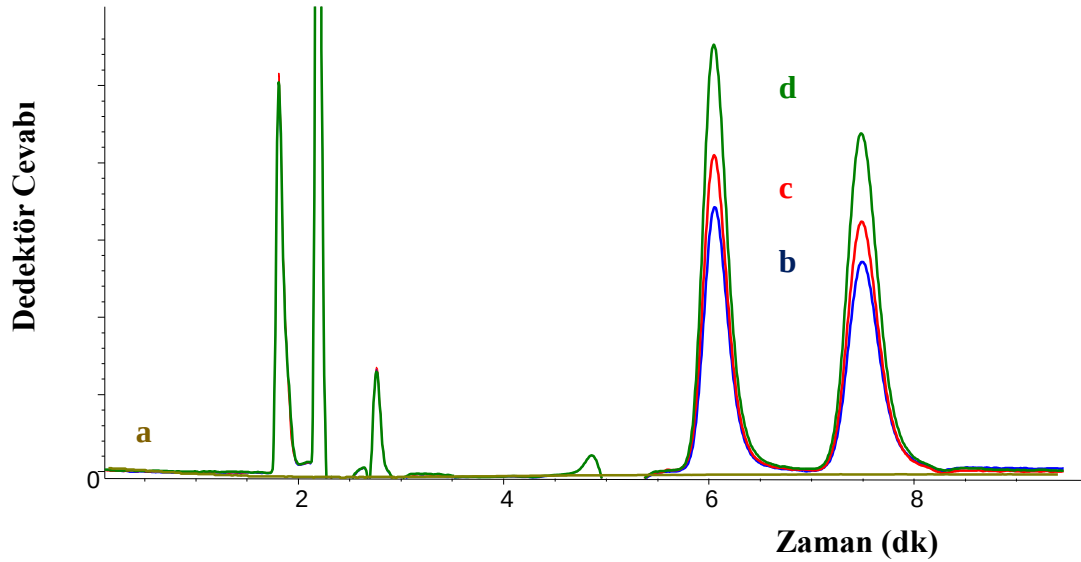
Çizelge 3.26. RIT enantiyomerlerinin kalibrasyon grafiğine ait regresyon analizi ve yöntem geçerlilik testi sonuçları.

Parametreler	Ritodrin	
	EN 1	EN 2
Doğrusal aralık ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	5-500	5-500
Eğim	4,660	4,575
Kesişim	-1,283	-1,018
Tanımlayıcılık katsayısı (R^2)	0,999	0,999
Eğimin standart hatası	$4,13 \times 10^{-2}$	$2,48 \times 10^{-2}$
Kesişimin standart hatası	8,904	5,355
Teşhis sınırı ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,578	0,630
Tayin alt sınırı ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	1,735	1,891
Gün içi tekrar edilebilirlik (% BSS)*	0,650	1,058
Günler arası tekrar edilebilirlik (% BSS)*	1,765	1,923

* 5 değer üzerinden hesaplanmıştır.

3.10.2.3. Geliştirilen Yöntemin Ritodrin İçeren Farmasötik Dozaj Şekline Uygulanması

Ampul formülasyonundan (Pre-Par[®]) RIT'in miktar tayini için Bölüm 2.1.6'da açıklanan prosedür doğrultusunda çözeltiler hazırlanarak optimize edilen kromatografik koşullar altında analizleri gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.77.) Elde edilen piklerin altında kalan alan değerleri kalibrasyon denkleminde yerlerine yazılmış ve ampul dozaj şekli içerisindeki RIT miktarı hesaplanmıştır.



Şekil 3.77. RIT dozaj şekline ait geri kazanım sonuçlarını içeren kromatogram: % 25 (a), % 50 (b), % 100 (c).

Ayrıca ampul dozaj şekli içerisinde bulunan safsızlıkların ve katkı maddelerinin (sodyum metabisülfid, sodyum klorür, asetik asit, sodyum hidroksit) geliştirilen kromatografik yöntem üzerine etkisinin araştırılması amacıyla geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla yapılan geri kazanım çalışmalarında standart ekleme yöntemi kullanılmıştır. Bilinen miktarlarda hazırlanmış olan ampul formülasyonu çözeltisi üzerine bilinen miktarlarda hazırlanan standart RIT çözeltileri farklı oranlarda (% 25 - 100) ilave edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 3.27'de özetlenmiştir.

Çizelge 3.27. RIT içeren Pre-Par[®] ampul çözeltisinden elde edilen analiz bulgularının sonuçları

Parametreler		EN 1			EN 2	
Etiket miktarı (mg mL ⁻¹)		50,0			50,0	
Bulunan miktar (mg mL ⁻¹)*		49,63			49,44	
% Bağlı standart sapma		1,01			0,71	
% Bağlı hata		0,73			1,11	
İlave edilen standart (µg mL ⁻¹)	12,50	25,00	50,00	12,50	25,00	50,00
Bulunan miktar (µg mL ⁻¹)*	12,66	25,21	51,80	12,66	25,29	51,67
% Geri kazanım*	101,31	100,82	103,61	101,30	101,17	103,33
% Bağlı standart sapma	1,17	1,27	0,44	1,85	1,99	0,53
% Bağlı hata	-1,31	-0,82	-3,61	-1,30	-1,17	-3,33

* 5 değer üzerinden hesaplanmıştır.

3.10.3. Terbutalin Analizi için Çalışmalar

3.10.3.1. Optimizasyon Çalışmaları

Görüntüleme çalışmaları gerçekleştirilirken gereç ve yöntem kısmında bahsedilen 6 adet kiral kolon ile farklı hareketli faz çeşitleri ve bileşimleri kullanılarak optimizasyon çalışmaları başlatılmıştır. Polar organik fazlar ile yapılan denemeler sonucunda enantiyomerlerin ayrımı gerçekleşmemiştir. Organik faza su ilavesiyle yapılan çalışmalarla da istenilen enantiyomerik ayırım sağlanamadığı için normal faz çözücü karışımları ile analizler yapılmıştır. Hareketli faz bileşimini oluşturmak için izopropanol ile % 60'tan 80'e kadar değişen oranlarda n-hekzan içeren karışımlar hazırlanmıştır. Bu karışımlara enantiyomerlerin ayrıldığı hareketli faz koşullarında ayrı ayrı asidik (% 0,1 FA), bazik (% 0,1 DEA) ve hem asidik hem de bazik (% 0,1 FA ve % 0,1 DEA) katkı maddeleri eklenerek bunların da ayırma etkisi incelenmiştir.

Bölüm 3.8.2’de bu kısım ile ilgili detaylı bilgi verilmiştir. Denenen kolonlar içinde Cellulose 2 ve Cellulose 4 (250 x 4,6 mm; 3 µm) kolonlarda ayrımlar analiz için uygun bulunmuştur. Analiz süreleri değerlendirildiğinde en etkin ayrımı sağlayan kolon Cellulose 4 (250 x 4,6 mm; 3 µm) olduğu için diğer denemeler bu sabit faz üzerinde yoğunlaşmıştır.

Asidik ve bazik katkı maddelerinin etkisi de araştırılmış ve sadece asit ilave edildiğinde ayrım gücü 1,5 kat artmıştır fakat analiz süresi de 1,5 kat uzamıştır. Eşit miktarda asit ve bazı aynı anda içeren hareketli faz ile yapılan çalışmalarda enantiyomerler kabul edilebilir ölçüde ayrıldığı ve analiz süresini kısalttığı için hareketli faz içerisine her iki katkı maddesi de ilave edilmiştir. Bir sonraki adımda hareketli faz yüzdesinin optimizasyon çalışmaları yapılmış ve çözücü bileşimi olarak % 30 izopropanol kullanıldığında ayrımın gücünün arttığı gözlenmiştir. İzopropanol oranı % 20 olarak kullanıldığında ise analiz seçilen hareketli faz bileşimine göre çok daha uzun sürede tamamlanmaktadır. Bu yüzden optimum hareketli faz olarak 70:30:0,1:0,1 (h/h/h/h), n-hekzan:izopropanol:FA:DEA içeren hareketli faz bileşimi ile analizlerin gerçekleştirilmesine karar verilmiştir.

Kolon limitleri de göz önüne alınarak sıcaklığın enantiyomerlerin alıkonması üzerine etkisi de incelenmiştir. Bu amaçla kolon sıcaklığı 25-45 °C arasında değiştirilerek analizler yapılmıştır. Beklendiği gibi sıcaklığın artmasıyla bileşiklerin alıkonma süreleri azalmış pik şekilleri daha simetrik hale gelmiş ve pikler arasındaki ayrım bir miktar artmıştır. Bu sebeplerden ötürü 40 °C çalışma sıcaklığı olarak belirlenmiştir. Sistemin basıncı göz önüne alınarak akış hızı dakikada 1,0 - 2,0 mL olacak şekilde değiştirilmiş ve bu sayede analiz süresinin daha da kısaltılması amaçlanmıştır. Sıcaklığın artırılması sonucunda hareketli faz viskozitesinin azalmasıyla birlikte sistem basıncı düşmüştür. Basıncın düşmesi ile de akış hızının artırılması kolon ve sistem için bir sorun oluşturmamıştır. Sistemin ve kolonun sınırları ölçüsünde akış hızı dakikada 1,9 mL olacak şekilde optimize edilmiştir.

Dalga boyu seçimi yapılırken bileşiğin UV spektrumu incelenmiş ve kullanılan çözücülerden ve dozaj şeklinin yardımcı maddelerinden en az girişimin olacağı düşünülen dalga boyu olarak 225 nm seçilmiştir. Enjeksiyon hacminin optimizasyonu için yapılan çalışmalarda ise 2 - 10 µL aralığındaki hacimler sisteme verilmiş, ancak yüksek enjeksiyon hacminin kolonda aşırı yüklemeye bağlı kuyruklanmaya sebep olduğu görülmüştür. Bu nedenle enjeksiyon hacmi 5 µL olarak belirlenmiştir.

Optimize edilen tüm koşullar Çizelge 3.28’de özetlenmiş, bu koşullar altında yapılan analize ait sistem uygunluk testi sonuçları da tablolanmıştır (Çizelge 3.29).

Çizelge 3.28. TER analizi için belirlenen optimum koşullar

Parametreler	Optimum Şartlar
Kolon	Cellulose 4 (250 x 4,6 mm; 3 µm)
Mobil faz bileşimi (h/h/h/h)	n-Hekzan:IPA:FA:DEA, (70:30:0,1:0,1)
Sıcaklık (°C)	40
Akış hızı (mL dk⁻¹)	1,9
Enjeksiyon hacmi (µL)	5
Dalga boyu (nm)	225

Çizelge 3.29. TER analizine ait optimum koşullardaki sistem uygunluk testi sonuçları

Parametreler	Terbutalin	
	EN*1	EN2
Alıkonma zamanı (dk)	14,89	19,28
Kapasite faktörü (k)	1,99	2,85
Ayırma gücü (Rs)	-	3,19
Kolon etkinliği (N)	2569	2505
Seçicilik (α)	-	1,44
Kuyruklanma faktörü (T)	1,49	1,38
Simetri faktörü	0,71	0,75
% BSS (alıkonma zamanı için)	0,11	0,28

* Enantiyomer

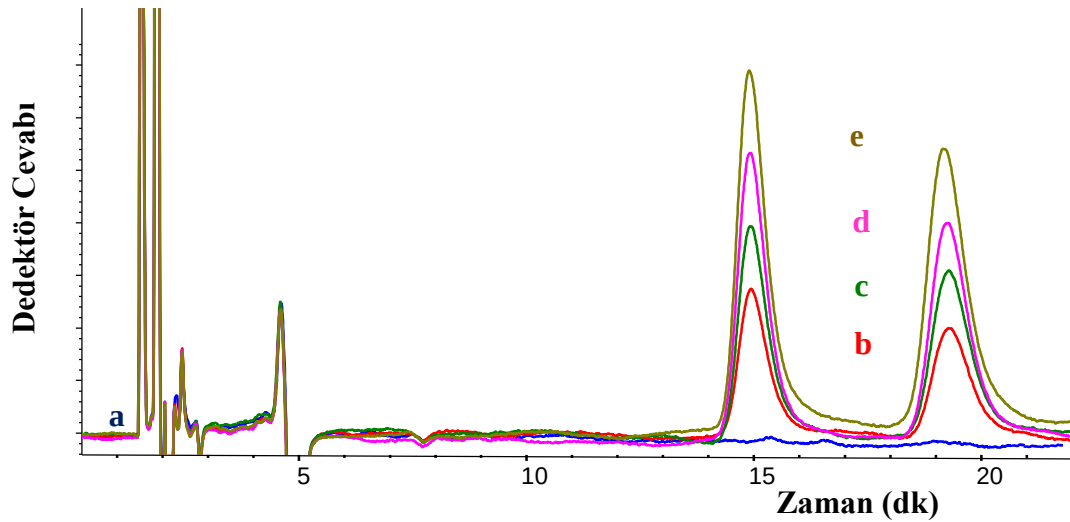
3.10.3.2. Terbutalin Enantiyomerlerinin Analizi için Yöntem Geçerlilik Testleri

Yöntem geçerlilik testleri gereç ve yöntem başlığı altında (Bölüm 2.2.4) anlatılan prosedürlere göre yapılmıştır. Bu doğrultuda öncelikle miktar tayini çalışmaları için kalibrasyon grafikleri oluşturulmuş ve her iki enantiyomer için 10,0 - 500,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (n=8) derişimleri aralığında doğrusallık saptanmıştır. TER enantiyomerleri için ayrı ayrı, derişimin bir fonksiyonu olarak pik alanlarının grafiğe geçirilmesiyle elde edilen doğru denklemleri ve tanımlayıcılık katsayısı (R^2) değerleri aşağıdaki gibidir.

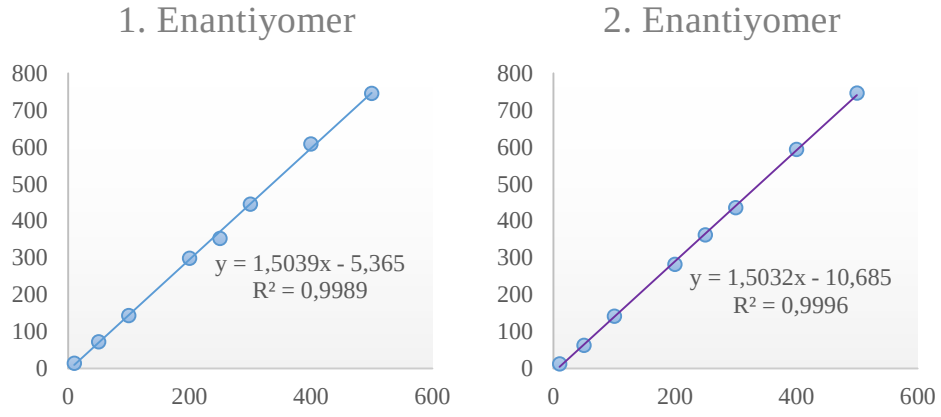
$$y=1,5039 x -5,365; (R^2=0,999) (n=8) \text{ (Enantiyomer 1)}$$

$$y=1,5032 x -10,685; (R^2=0,999) (n=8) \text{ (Enantiyomer 2)}$$

Optimize edilen koşullar altında bazı standart madde çözeltilerini içeren kromatogram Şekil 3.78’de verilmiştir. Bu verilerle elde edilen kalibrasyon grafiği ve denklemi Şekil 3.79’da gösterilmiştir.



Şekil 3.78. TER standartlarına ait, değişen derişimlerde elde edilen kromatogramı: Hareketli faz (a), 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (b), 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (c), 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (d), 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (e).



Şekil 3.79. TER enantiyomerlerine ait 10-500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ derişim aralığında elde edilen kalibrasyon grafikleri ve denklemleri.

Optimize edilen koşullar kullanılarak elde edilen kalibrasyon grafiğine ait regresyon analizi sonuçları ve hesaplanan yöntem geçerlilik testi parametreleri Çizelge 3.30’da özetlenmiştir. Teşhis ve tayin alt sınırı hesaplarında Bölüm 2.2.4’te bahsedilen Eşitlik 2.2 kullanılmıştır.

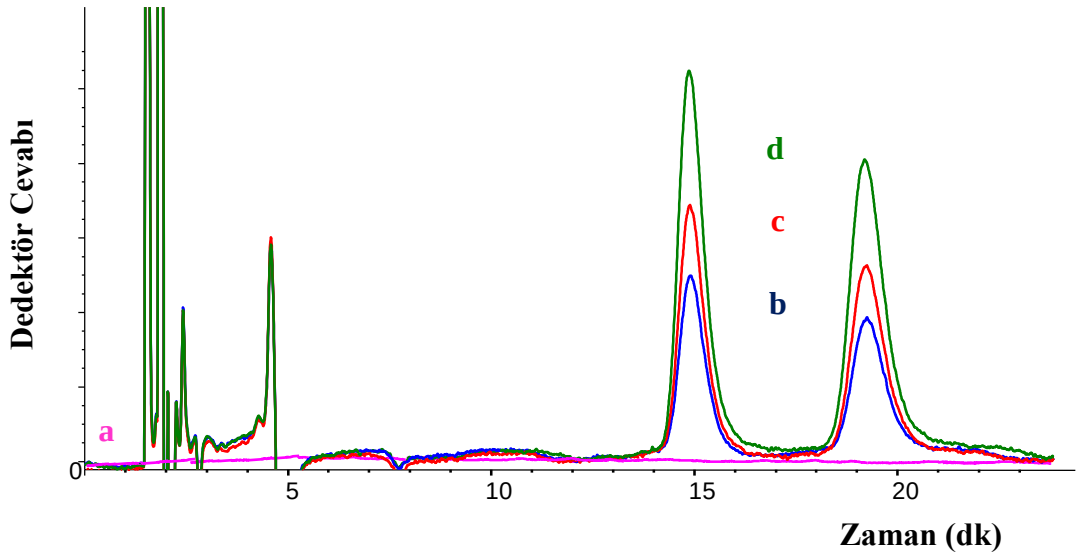
Çizelge 3.30. TER enantiyomerlerinin kalibrasyon grafiğine ait regresyon analizi ve yöntem geçerlilik testi sonuçları.

Parametreler	Terbutalin	
	EN 1	EN 2
Doğrusal aralık ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	10-500	10-500
Eğim	1,504	1,503
Kesişim	-5,365	-10,685
Tanımlayıcılık katsayısı (R^2)	0,999	0,999
Eğimin standart hatası	$2,06 \times 10^{-2}$	$1,29 \times 10^{-2}$
Kesişimin standart hatası	5,710	3,570
Teşhis sınırı ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	1,196	2,517
Tayin alt sınırı ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	3,589	7,552
Gün içi tekrar edilebilirlik (% BSS)*	0,683	0,742
Günler arası tekrar edilebilirlik (% BSS)*	0,757	1,835

* 5 değer üzerinden hesaplanmıştır.

3.10.3.3. Geliştirilen Yöntemin Terbutalin İçeren Farmasötik Dozaj Şekline Uygulanması

Tablet formülasyonundan (Bricanyl Durules®) TER'in miktar tayini için Bölüm 2.1.6'da açıklanan prosedür doğrultusunda çözeltiler hazırlanarak optimize edilen kromatografik koşullar altında analizleri gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.80.) Elde edilen piklerin altında kalan alan değerleri kalibrasyon denkleminde yerlerine yazılmış ve ampul dozaj şekli içerisindeki TER miktarı hesaplanmıştır.



Şekil 3.80. TER dozaj şekline ait geri kazanım sonuçlarını içeren kromatogram: % 25 (a), % 50 (b), % 100 (c).

Ayrıca tablet dozaj şekli içerisinde bulunan safsızlıkların ve katkı maddelerinin geliştirilen kromatografik yöntem üzerine etkisinin araştırılması amacıyla geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla yapılan geri kazanım çalışmalarında standart ekleme yöntemi kullanılmıştır. Bilinen miktarlarda hazırlanmış olan tablet formülasyonu çözeltisi üzerine bilinen miktarlarda hazırlanan standart TER çözeltileri farklı oranlarda (% 25 - 100) ilave edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 3.31'de özetlenmiştir.

Çizelge 3.31. TER dozaj şekline ait geri kazanım sonuçlarını içeren kromatogram: % 25 (a), % 50 (b), % 100 (c).

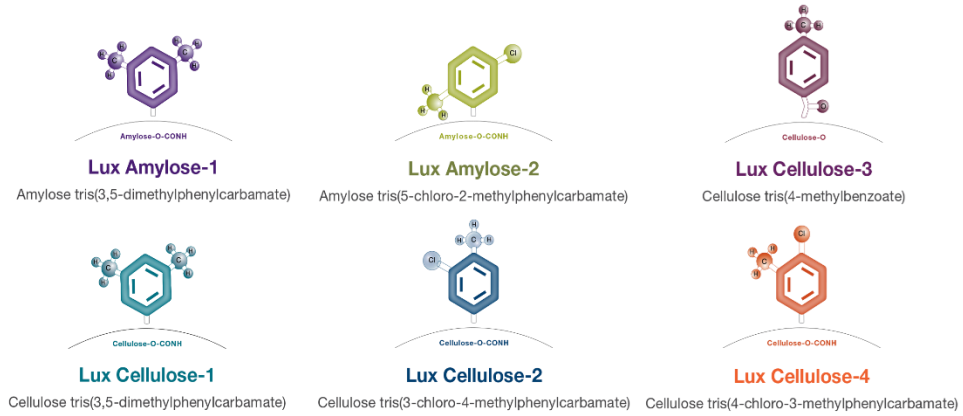
Parametreler		EN 1			EN 2	
Etiket miktarı (mg mL ⁻¹)		5,00			5,00	
Bulunan miktar (mg mL ⁻¹)*		4,98			5,13	
% Bağlı standart sapma		1,38			0,81	
% Bağlı hata		0,35			-2,65	
İlave edilen standart (mg mL ⁻¹)	1,25	2,50	5,00	1,25	2,50	5,00
Bulunan miktar (mg mL ⁻¹)*	1,22	2,43	4,95	1,23	2,47	4,86
% Geri kazanım*	97,31	97,23	99,12	98,73	98,94	97,14
% Bağlı standart sapma	1,27	0,29	0,65	0,99	0,75	0,55
% Bağlı hata	2,69	2,77	0,88	1,27	1,06	2,86

* 5 değer üzerinden hesaplanmıştır.

4. TARTIŞMA

4.1. Tez Kapsamındaki Bileşiklerin Enantiyomerlerinin Ayrımı

Tez çalışması kapsamında kiral beta agonist türevi maddeler sınıfına dahil olan bütoksamin (BUT), izoksuprin (IZO), klenbuterol (KLB), klenpenterol (KLP), ritodrin (RIT), simbuterol (SIM), terbutalin (TER) ve tulobuterol (TUL) etken maddelerinin kiral davranışları yüksek başarımlı sıvı kromatografi tekniği (YBSK) ile altı farklı polisakkarit temelli kiral kolon (Şekil 4.1) kullanılarak incelenmiştir.



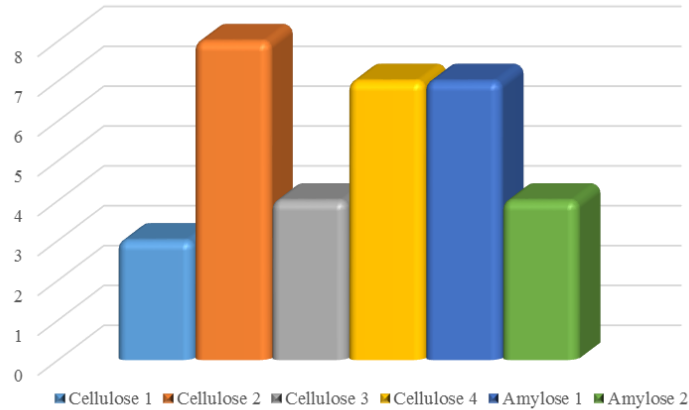
Şekil 4.1. Kullanılan sabit fazların kimyasal yapıları

Hareketli faz olarak polar organik çözücüler, sulu polar organik karışımlar (ters faz) ve normal faz çözücü karışımları farklı bileşimlerde kullanılmıştır. Ayrıca hareketli faza eklenen asidik ve bazik katkıların enantiyomerlerin ayırımına olan etkisi de araştırılmıştır. Bu koşullar kullanılarak yapılan analizler ile enantiyomerlerin ayrıldığı en uygun koşullar bulunmuştur. Polar organik faz (metanol, asetonitril, izopropanol, etanol) ve bunlara ilave edilen asidik, bazik katkıları kullanarak gerçekleştirilen analizlerde (her bir madde için 96 farklı koşul) hiçbir ayırım elde edilememiştir. Bunun üzerine normal faz koşullarında (n-hekzan ve izopropanolün farklı bileşimleri kullanılarak) yapılan analizler (madde başına en az 24 farklı koşul)

sonucunda seçilen kiral maddelerin ayrımları asidik ve bazik katkıların ilavesiyle gerçekleştirilmiştir. Sulu organik faz kullanıldığında (metanol ve farklı oranlarda su ile dietilamin karışımı) ise bazı maddeler için ayırım sağlanmış fakat maddelerin çoğu ayrılmamıştır. Kullanılan sabit ve hareketli fazlarda taban tabana ($R_s \geq 1,50$) ayırımı sağlanan madde sayıları ve kolonların başarısı Çizelge 4.1’de ve Şekil 4.2’de özetlenmiştir. Çizelge ve şekilden de anlaşılacağı gibi kolonların, tez kapsamında kullanılan maddelerin enantiyomerlerini ayırma başarısı Lux Cellulose 2 > Lux Cellulose 4 = Lux Amylose 1 > Lux Amylose 2 > Lux Cellulose 3 > Lux Cellulose 1 şeklindedir.

Çizelge 4.1. Kullanılan sabit fazların enantiyomerleri ayırma başarısı

Kolon	n-hekzan:IPA FA	n-hekzan:IPA DEA	n-hekzan:IPA FA/DEA	Polar Organik	Ters Faz	Ayrılan Enantiyomer Sayısı
Cellulose 1	2	1	2	-	2	3
Cellulose 2	7	2	6	-	1	8
Cellulose 3	2	4	1	-	-	4
Cellulose 4	7	4	6	-	1	7
Amylose 1	6	2	6	-	-	7
Amylose 2	1	3	2	-	-	4

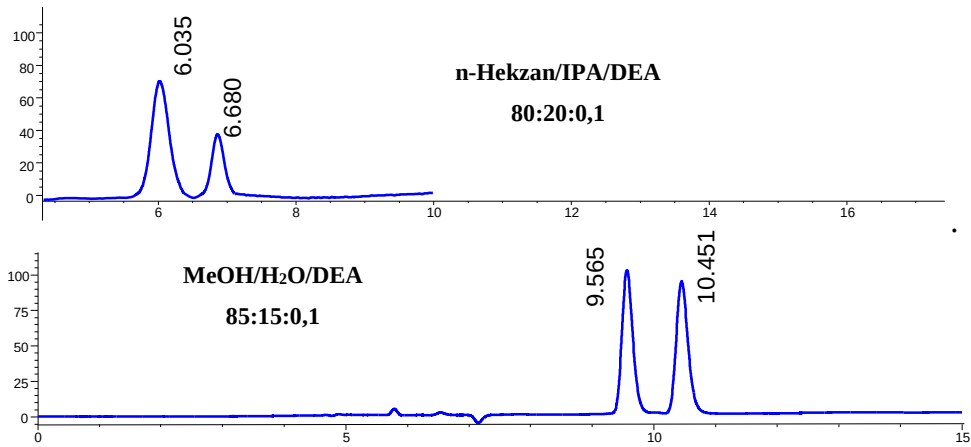


Şekil 4.2. Kiral sabit fazların enantiyomerleri ayırma başarısı.

Hareketli faz olarak sulu polar organik faz kullanmak enantiyomerlerin ayırmasına bazı avantajlar sağlamaktadır. Bu avantajların başında analizlerin kısa sürede tamamlanması gelmektedir. Ayrıca çok yüksek sinyal/gürültü oranı ve yüksek etkin tabaka sayılarına ulaşılabilir. Birçok polar analitin de polar çözücülerde,

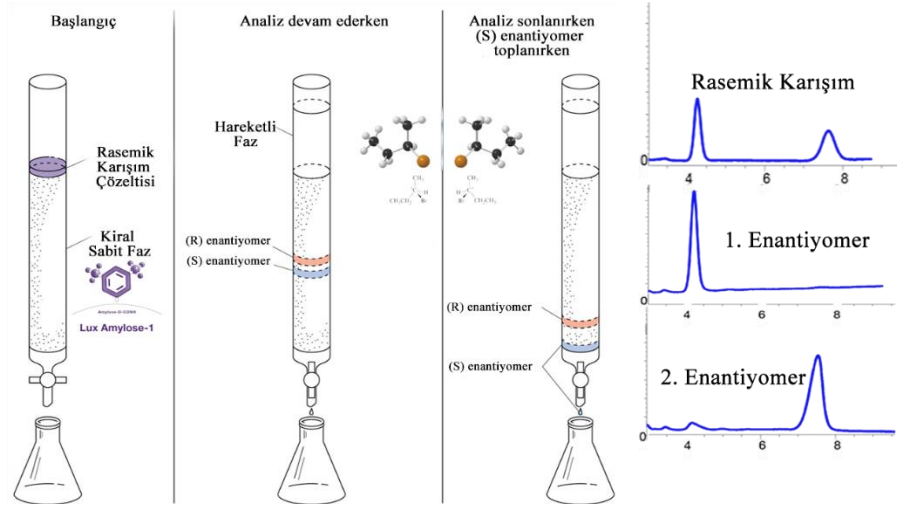
normal faz çözücülerine oranla daha iyi çözüldüğü bilinmektedir. (Chankvetadze, 2013a ve Jibuti ve ark., 2012).

Bu avantajları elde etmek amacıyla yapılan çalışmalarda metanol ve su karışımının kullanıldığı sulu polar organik hareketli fazlarda enantiyomerik ayırma ait başarı yüzdesi normal faza göre çok düşük kalmıştır (Çizelge 4.1). Yine de ayırım yapılabilen koşullar literatür verilerini destekler niteliktedir. Bütoksamin için normal faz koşulları ile ters faz koşullarında seçicilik değerleri çok yakın olan iki analiz karşılaştırıldığında, sulu polar organik çözücü karışımı kullanılan analizlerde ayırım gücünün daha da artarak etkin tabaka sayılarının 2 katına çıktığı görülmektedir (Şekil 4.3).



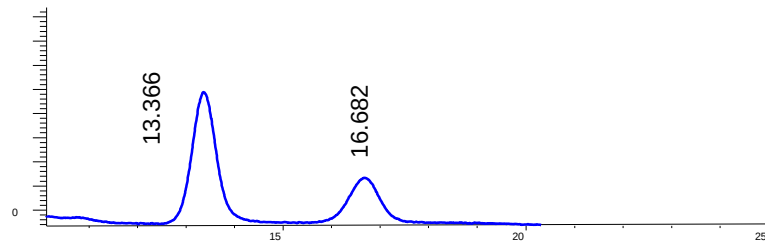
Şekil 4.3. BUT, Cellulose 1 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:İpa:DEA (80:20:0,1) (üst); MeOH:H₂O:DEA (85:15:0,1) (alt)

Çalışmaların ikinci aşamasında ise rasemik halde bulunan etken maddeler kullanılarak saf enantiyomerler elde edilmiştir. Rasemik karışımlardan saf enantiyomerlerin fraksiyonlarına ayrılması için de YBSK tekniğinden faydalanılmıştır. Sekiz bileşik için analiz süresinin kısa ve ayırım gücünün yüksek olduğu koşullar kullanılarak enantiyomerler saf bir şekilde elde edilmiştir. Enantiyomerlerin saflığının kontrolü de optimize edilmiş koşullar altında toplanan fraksiyonların sisteme yeniden enjekte edilmesiyle sağlanmıştır (Şekil 4.4) (Chankvetadze, 2013a; Chankvetadze 2013b ve Thormann ve ark., 2014).



Şekil 4.4. IZO'ya ait fraksiyonlama örneği: Kolon: Lux Amylose 1 (250 x 4.6 mm; 5 µm), hareketli faz: n-hekzan:İpa:DEA, (80:20:0,1), 25 °C, 2 mL dk⁻¹ akış hızı.

Tez çalışmasının üçüncü aşamasında ise fraksiyonlarına ayrılan enantiyomerlerden miktarı bilinen bir karışım oluşturularak ayırımın gerçekleştiği sabit faz ve hareketli faz koşullarında analizler tekrar edilmiştir. Enantiyomerlerden birinin miktarı diğerinin iki katına çıkarılarak yapılan bu analizlerin asıl amacı, kiral sabit faz üzerinde bulunan polisakkarit temelli kiral seçicinin polisakkarit çeşidinin, bu yapıya bağlanan fonksiyonel grupların çeşidinin, bağlanma pozisyonlarının, hareketli faz türünün ve bileşiminin, asidik ve bazik katkı maddelerin enantiyomerik alıkonma sırasına olan etkilerinin belirlenmesidir (Chankvetadze, 2013a; Lammerhofer, 2010 ve Lomsadze ve ark., 2012).



Şekil 4.5. Fraksiyonlama sonrasında yapılan klenbuterol analizine ait kromatogram: Amylose 1 (250 x 4.6 mm; 5 µm); hareketli faz: n-hekzan:İpa:FA:DEA, (90:10:0,1:0,1), 25 °C, 1 mL dk⁻¹ akış hızı. Madde karışımı 1.enantiyomer:2,enantiyomer, 2:1 (alan/alan).

Enantiyomerlerin analizi sırasında, bir enantiyomerin diğeri ile yer değiştirmesi (enantiyomerik tersinirlik), anlaşılması güç olan kiral etkileşim mekanizması için moleküler düzeyde bazı tahminlerin yapılmasını sağlayabilmektedir. Bunun yanı sıra

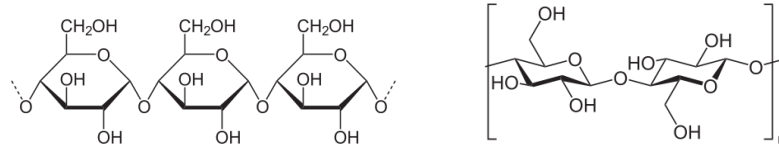
enantiyomerlerin ayırım sırasının saptanması pratikte de bizim için büyük önem arz etmektedir. Özellikle ilaç endüstrisinde enantiyomerik safsızlıkların insan sağlığına çok ciddi etkileri olduğu bilinmektedir (Chankvetadze, 2013a; Lammerhofer, 2010 ve Lomsadze ve ark., 2012). Bu olayların en başında ise binlerce insanı etkileyen talidomit trajedisi yer almaktadır. Sadece kiral bileşikler için değil, kiral olmayan bileşiklere ait safsızlık analizlerinin de çok önemli olduğu bilinmektedir (Gumustas ve ark., 2013, ve Gumustas ve ark., 2014a). İlaç etken maddelerde bulunan safsızlıkların çok daha hassas, doğru ve kesin bir şekilde tayininin yapılması için safsızlığın etken maddeden daha önce kolondan ayrılması tercih edilir. Bunun bir diğer açıklaması da kromatografik çalışmalarda elde edilen piklerin genellikle kolondan kuyruklanmış bir şekilde ayrılmalarıdır. Örneğin, bir enantiyomerik safsızlığın % 1 olduğunu ve daha geç alıkonduğunu düşündüğümüzde, bu safsızlığı ana enantiyomer yanında tayin etmek kuyruklanma yüzünden imkansız bir hal alacaktır. Eğer bu enantiyomer birinci pik olarak kolondan ayrılmış olsaydı tayinini yapmak çok daha kolay olacaktı (Lammerhofer, 2010 ve Okamoto, 2002). Ayrıca pilot üretimler için tercih edilen preparatif çalışmalarda enantiyomerlerin alıkonma sıralarının belirlenmesi ile birlikte enantiyomerik safsızlığın, etken maddeden çok daha kolay bir şekilde ayrılarak bertaraf edilebildiği rapor edilmiştir (Chankvetadze, 2013a ve Okamoto, 2002). Bu nedenlerden dolayı tez kapsamında kullanılan altı farklı polisakkarit temelli kolonun hareketli faz çeşidinin ve hareketli faza ilave edilen asidik ve/veya bazik katkı maddelerinin enantiyomerik alıkonma sırasına etkileri üzerinde de durulmuştur.

Çalışmalarda kullanılan altı kolondan dört tanesi selüloz, iki tanesi amiloz türevidir. Ayrıca beş kolon polisakkarit karbamat temelli iken bir tanesi benzoat temelli yapıya sahiptir (Cellulose 3). Karbamat türevi olanlardan iki tanesi fenil fonksiyonel grupları üzerinde metil gruplarını içerirken geri kalan üç tanesi fenil fonksiyonel grubu üzerinde klor ve metil gruplarının karışımlarını içermektedir. Kiral seçicilerdeki bu çeşitlenme değişik hareketli fazlar ve katkı maddelerini içeren sistemlerde iyi bir ayırım yapılmasını sağlamaktadır. Dolayısıyla bu kısımda öncelikle polisakkarit yapısının enantiyomerik tersinirliğe olan etkileri tartışılacak daha sonra polisakkarit türevinin (karbamat türevinin benzoata karşı) etkileri incelenecektir.

Bununla birlikte karbamat yapılarına bağlanan grupların ve bu grupların bağlandığı pozisyonların tersinirlik üzerine etkileri gösterilecektir. Son olarak da hareketli fazda bulunan izopropanol yüzdesi ile asidik ve bazik katkı maddelerinin eklenmesinin enantiyomerik tersinirliğe olan etkisi tartışılacaktır.

4.1.1. Polisakkarit Türünün Etkisi

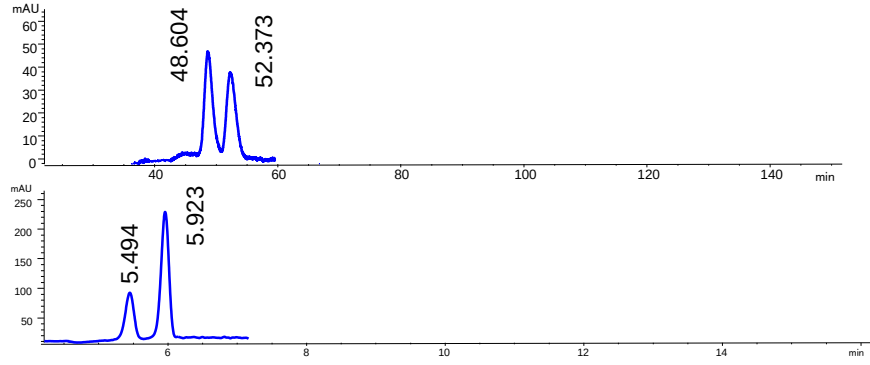
Tez kapsamında kullanılan kolonlar doğal polissakkaritlerden (Şekil 4.6) oluşmuştur. Polisakkaritler molekül bakımından doğrusal olup, zincir şeklinde moleküllerden oluşmaktadır. Yapı taşı olan glikoz anhidrit birimleri birbiri ile 1-4 glukozidik bağlarıyla bağlanmıştır. 1,4 bağlanma şeklini α üzerinden gerçekleştirirse amiloz, β üzerinden gerçekleştirirse selüloz adını almaktadır. Bu bağlanma şekilleri polisakkaritlerin ve türevlerinin ikincil yapılarındaki değişimlere de sebep olmaktadır.



Şekil 4.6. Doğal polisakkaritlerden amiloz (sol), selüloz (sağ)

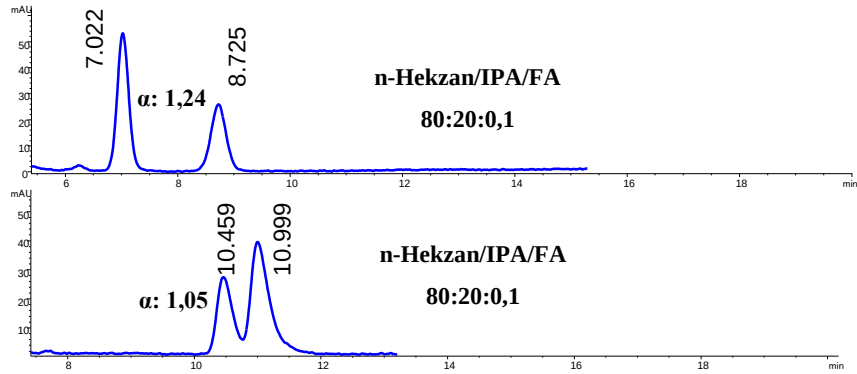
Çalışılan beta agonist türevlerinde kolonun kimyasal yapısına bağlı değişikliklerden dolayı karşılaşılan enantiyomerik tersinirlikler Çizelge 4.2’de özetlenmiştir. Amylose 1 ve Cellulose 1 kolonlar polisakkarit formunun farklı olması dışında tamamen aynı fonksiyonel gruplara sahiptir. Literatür de yapılan çalışmalarda polisakkarit formunun değişmesiyle enantiyomerik tersinirliğin görüldüğü çalışmalar mevcuttur (Mskhiladze ve ark., 2013; Gegenava ve ark., 2014; Chankvetadze, 2013a ve Mosiashvili ve ark., 2013). Tez kapsamında çalışılan bileşiklerden IZO bu enantiyomerik tersinirliğin görüldüğü örneklerdendir. İşaretlenmiş enantiyomer Amylose 1 kolonda daha önce alıkonurken Cellulose 1 kolonda tam tersi gerçekleşmiştir (Çizelge 4.2).

Cellulose 3 kolonun benzoat türevi, diğer selüloz yapıdaki kolonların da fenil karbamat türevi olduğu düşünüldüğünde polisakkarit türevlerinin değiştirilmesiyle enantiyomerik tersinirlik KLB ve SIM örneklerinde karşımıza çıkmaktadır. Her iki etken madde için de işaretlenmiş enantiyomer, kolonu diğerinden sonra terk etmiştir. Şekil 4.7’de KLB enantiyomerlerine ait örnek görülmektedir.



Şekil 4.7. KLB, Cellulose 4 (250 x 4.6 mm; 3 µm) (üst); hareketli faz: n-hekzan:İpa:DEA (95:5:0,1), Cellulose 3 (250 x 4.6 mm; 3 µm) (alt); hareketli faz: n-hekzan:İpa:DEA (90:10:0,1).

Fenil fonksiyonel grubuna bağlanmış sübstitüentlerin enantiyomerik tersinirliğe sebep olabileceğini gösteren örneklerle de karşılaşılmıştır. Amiloz temelli karbamat türevi kolonlardan Amylose 1’de fenile iki adet metil grubu bağlıyken, Amylose 2’de metil ve klor bağlıdır. BUT, IZO, SIM ve TUL örneklerinde enantiyomerik tersinirlik görülmüştür. Aşağıdaki şekilde TUL’a ait örnek verilmiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. TUL, Amylose 1 (250 x 4.6 mm; 5 µm) (üst); Amylose 2 (250 x 4.6 mm; 3 µm) (alt); hareketli faz: n-hekzan:İpa:FA (80:20:0,1); 25 °C, 1 mL dk⁻¹.

Literatürlerde rastlanan bir diğer enantiyomerik tersinirlik örneği de Cellulose 2 ve Cellulose 4 kolonlar arasında görülmektedir (Gegenava ve ark., 2014). Bu kolonlar kimyasal olarak tamamen aynı yapıdadırlar. Tek farkları fenile bağlanmış klor ve metil gruplarının yer değiştirmesidir. Yaptığımız çalışmalarda bu kolonlarla yapılan analizlerde enantiyomerik tersinirliğe rastlanılmamıştır.

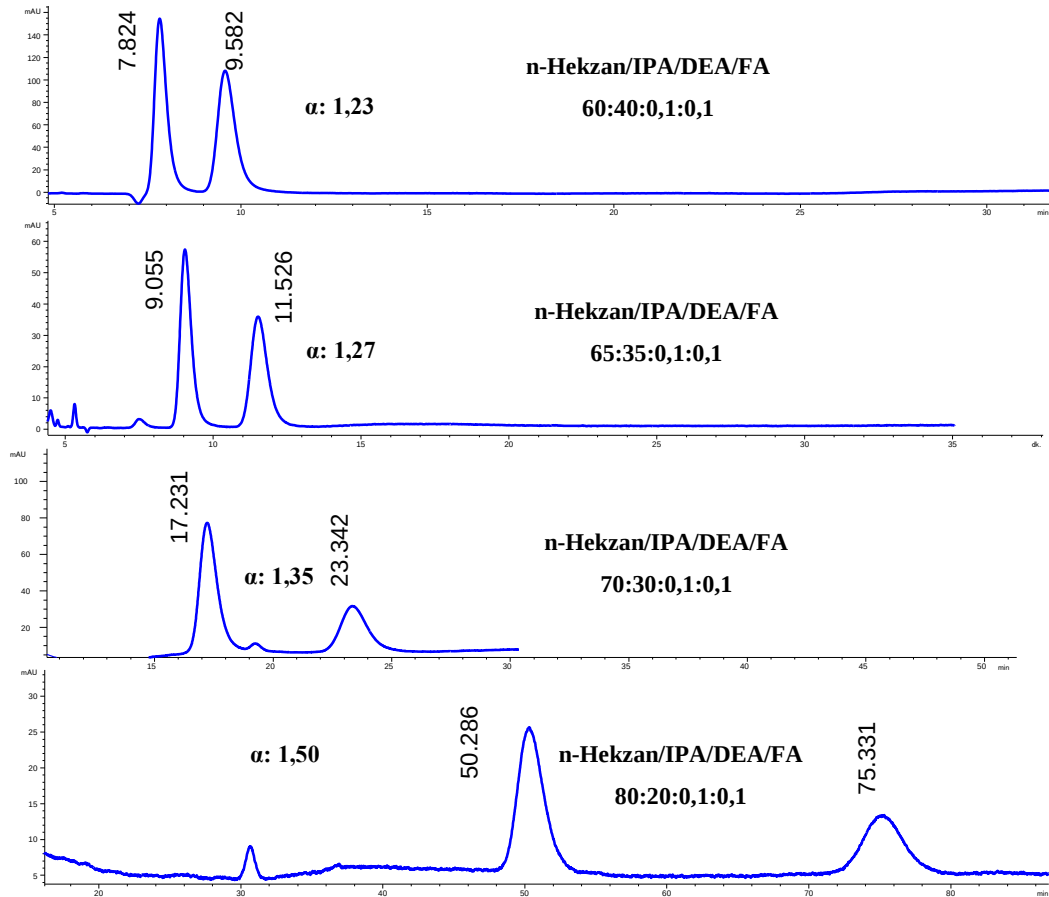
Çizelge 4.2. Her bir analite göre enantiyomerik tersinirliğin görüldüğü kolonlar.

İşaretlenmiş Enantiyomer Önde	İşaretlenmiş Enantiyomer Sonda	Analit
Cellulose 1, Cellulose 3, Amylose 1	Cellulose 2, Cellulose 4, Amylose 2	Bütoksamin
Amylose 1	Cellulose 1, Cellulose 2, Cellulose 3, Cellulose 4, Amylose 2	İzoksuprin
Cellulose 1, Cellulose 2, Cellulose 4, Amylose 1, Amylose 2	Cellulose 3	Klenbuterol
Polisakkarit yapısına bağlı tersinirlik gözlenmemiştir		Klenpenterol
Cellulose 2, Cellulose 3, Cellulose 4	Amylose 1	Ritodrin
Cellulose 1, Cellulose 2, Cellulose 4, Amylose 1	Cellulose 3, Amylose 2	Simbuterol
Polisakkarit yapısına bağlı tersinirlik gözlenmemiştir		Terbutalin
Cellulose 1, Amylose 1	Cellulose 2, Cellulose 4, Amylose 2	Tulobuterol

4.1.2. Hareketli Fazın Etkisi

Çalışmalar boyunca üç farklı hareketli faz çeşidi kullanılmıştır. Kullanılan hareketli fazlar içerisinde enantiyomerik tersinirliğin incelenmesi, ayırım başarı oranı en yüksek olması sebebiyle normal faz koşullarında gerçekleşmiştir. Genel olarak bakıldığında hareketli faz hidrokarbon temelli çözücüsüne (n-hekzan) ilave edilen polar modifiye edicinin (2-propanol) miktarı enantiyomerik tersinirliğin görülmesine yol açmamıştır. Fakat analiz süresi ve maddelerin ayırım güçlerine çok ciddi etkiler göstermiştir. Bu örneklerden RIT için Cellulose 2 kolon kullanılarak yapılan analizlerde polar modifiye edici olan IPA'yı azaltmak ayırım gücünü 2 kattan daha da fazla arttırırken, analiz süresini 7 kat uzatmıştır (Şekil 4.9). Buna benzer bir diğer

örnek tüm kimyasal yapısı aynı olup sadece fenile bağlı sübstitüentlerinin yeri değişik olan Cellulose 4 ile yapılmış RIT analizinde görülmüştür. Sübstitüentlerin bağlanma yerleri değiştiği anda analiz süresi neredeyse Cellulose 2 kolonun analiz süresine göre 2 kat daha uzamıştır (Şekil 3.49). Aynı madde için Cellulose 3 kolon kullanıldığında % 40 IPA içeren çözeltide maddeler birleşerek kolonu terk ederken, % 30 IPA içeren çözelti kullanıldığında enantiyomerlerin Rs değeri 0,59 olmaktadır. IPA miktarı % 20'ye düşürüldüğünde ise ayırım gücü 6 katına çıkarak maddelerin ayırımı gerçekleşmiştir (Şekil 3.50). Simbuterol için yapılan çalışmalar incelendiğinde azalan IPA miktarı ile yine ayırım gücüne olan etki açıkça görülmektedir (Çizelge 3.14 ve Çizelge 3.15). Buna benzer diğer örnekler bulgular bölümünden incelenebilir.



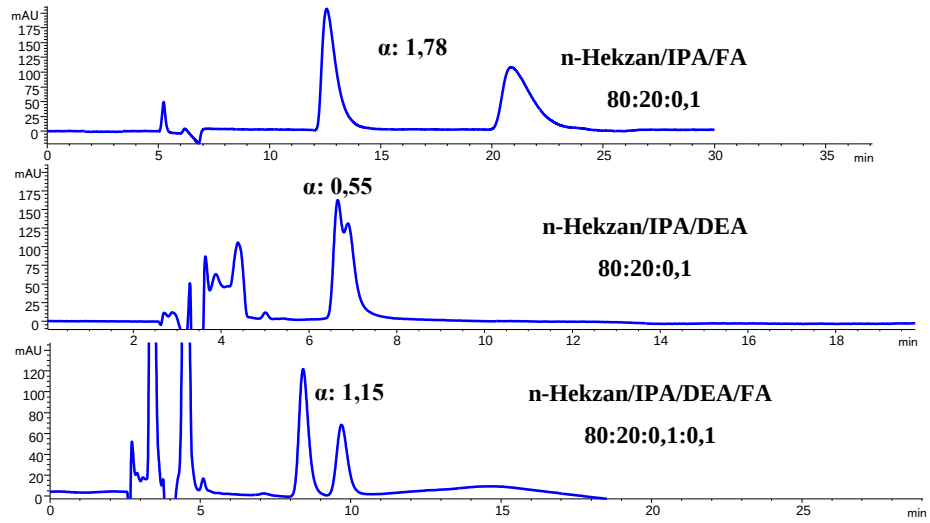
Şekil 4.9. RIT, kolon: Cellulose 2 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:İpa:DEA:FA (60:40:0,1:0,1); n-hekzan:İpa:DEA:FA (65:35:0,1:0,1); n-hekzan:İpa:DEA:FA (70:30:0,1:0,1); n-hekzan:İpa:DEA:FA (80:20:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya).

4.1.3. Hareketli Faza Eklenen Asidik ve Bazik Katkı Maddelerinin Etkisi

Asidik ve/veya bazik katkı maddelerinin hareketli faza eklenmesi enantiyomerlerin ayrılmasında çok önemli bir rol oynamaktadır (Mskhiladze ve ark., 2013). Literatürde bunların örneğine çok sık olmamakla birlikte rastlanılmaktadır. Bu yüzden asidik ve/veya bazik katkı maddelerinin enantiyomerik ayırma ve enantiyomerik alıkonma sırasına etkisinin araştırılması önemli bir konu başlığı olmaktadır (Jibuti ve ark., 2012 ve Chankvetadze 2013a). Enantiyomerlerin alıkonma sıralarının değişimi yukarıda bahsedildiği gibi kiral seçicilerin değiştirilmesiyle mümkün olmaktadır. Ancak hangi kolonların kullanılacağı tahmin edilmesi polisakkarit KSF'lerin enantiyomerik alıkonma mekanizması tam aydınlatılamadığı için, şu anki bilgi birikimiyle çok mümkün olmamaktadır. Bununla birlikte bu değişimi sağlamak için en az iki kolona ihtiyaç duyulmaktadır. Bu açıdan bakıldığında bu durum fazladan maliyetler getirmektedir. Katkı maddeleri ile değişen seçiciliğin ve enantiyomerik alıkonma sıralarının tespit edilmesi sayesinde tek bir kolonda sadece katkı maddesi değiştirilerek enantiyomerik tersinirliğe ulaşmak mümkün olmaktadır.

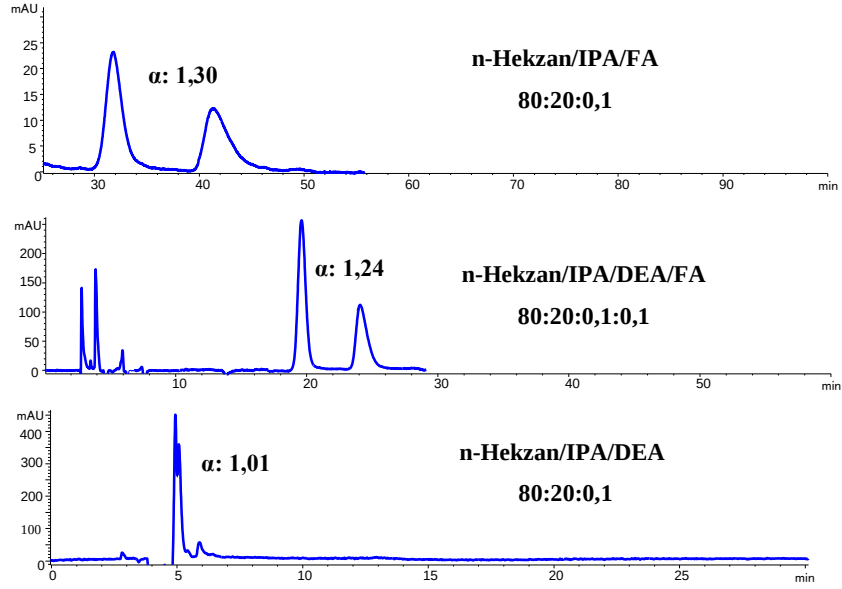
Bazik analitlerin analizi yapılırken eklenen asidik katkı maddelerinin seçiciliği azaltacağı beklenebilecek bir durum olabilir. Ayrıca hareketli faza ilave edilen bazik katkı maddelerinin KSF yüzeyindeki enantiyoseçici olmayan asidik bölgelerle kuvvetli etkileşimleri maskeleyeceğine inanılmaktadır. Bu durum da enantiyoseçiciliğin artışına yol açmaktadır (Ye ve Stringham., 2001). Buna ek olarak ilave edilen bazik katkı maddeleri bazik analitlerin iyonlaşmasını baskılayabilmektedir. Böylece bu analitlerin polisakkarit temelli KSF'ler üzerindeki hidrofobik gruplar ile etkileşimi de pekiştirilmektedir (Mosiashvili ve ark., 2013). Asidik katkı maddelerinin bazik katkı maddeleri üzerine ilave edilmesi bu etkileri yok edebilmekte olup, hareketli faza hiçbir katkı maddesi ilave edilmemiş gibi bir etkiye sebep olmaktadır. Tez kapsamında yapılan çalışmalarda, enantiyomerik alıkonmanın daha karmaşık olduğu ve sadece maskeleme etkileriyle açıklanamayacağı da anlaşılmıştır.

Yapılan tez çalışmaları sırasında yukarıdaki açıklamaların tam tersi durumlarla karşılaşmıştır. Asidik katkı maddesi olan formik asitin % 0,1 oranında ilavesiyle çoğu koşulda seçiciliğin çok ciddi bir şekilde arttığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.10 ve 4.11).



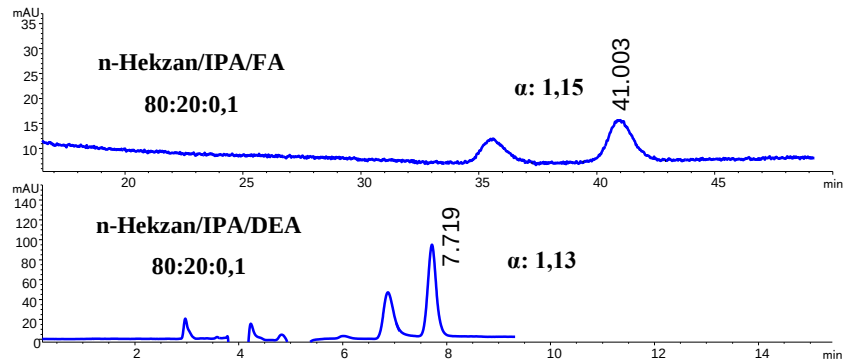
Şekil 4.10. SIM, Amylose 1 (250 x 4.6 mm; 5 µm); hareketli faz: n-hekzan:İpa:FA (80:20:0,1); n-hekzan:İpa:DEA (80:20:0,1); n-hekzan:İpa:FA:DEA (80:20:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya).

Tüm maddeler için yapılan analizler gibi SIM ve KLP analizinde de DEA bazik katkı maddesi içeren çözücüye eşit miktarda FA ilave edilmiştir. Şekil 4.10 ve 4.11'deki sonuçlara göre bazik katkı maddesi ile birbirinden ayrılamayan enantiyomerler üzerine asidik katkı maddesi olarak eşit miktarda FA ilavesiyle ayrılmışlardır. Benzer etkiler analizi yapılan diğer maddelerde de karşımıza çıkmıştır (BUT (Şekil 3.6), IZO (Şekil 3.12 ve 3.16), KLB (Şekil 3.30), KLP(Şekil 3.37 ve 4.11), RIT (Şekil 3.46 ve 3.47), SIM (Şekil 3.54 ve 4.10), TER (Şekil 3.61),TUL (Şekil. 3.66)). Ye ve Stringham'ın yaptıkları çalışmalarında bu durumu bazik analit ve asidik katkı maddesi arasında gerçekleşen iyon çiftleri oluşumuna ve KSF yüzeyindeki enantiyoseçici olmayan bölgelerin asidik katkı maddesi tarafından maskeleyme etkisine dayandırmışlardır (Ye ve Stringham, 2006).

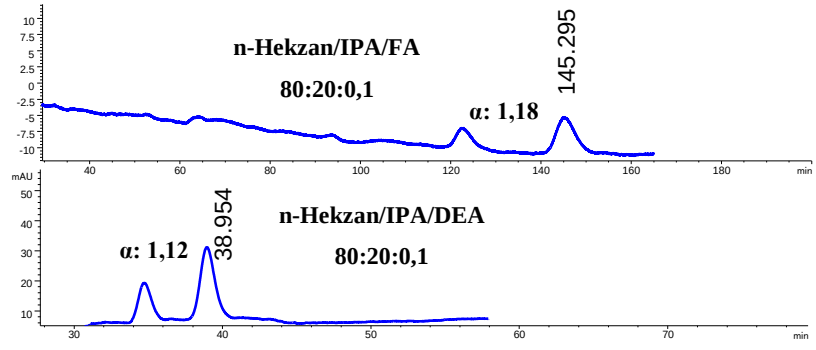


Şekil 4.11. KLP, Kolon: Cellulose 2 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:İpa:FA (80:20:0,1); n-hekzan:İpa:DEA (80:20:0,1); n-hekzan:İpa:FA:DEA (80:20:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya).

Tek başına hareketli faza eklenmiş olan bazik katkı maddesi analiz süresini, seçicilikte neredeyse hiç azalma olmaksızın, bazı örnekler için ciddi bir biçimde kısaltmıştır (Şekil 3.3, 3.42, 4.12, 4.13). Fakat daha önce de bahsedildiği gibi tek başına eklenen bazik katkı maddesi seçicilikte düşüslere hatta ayırım olmamasına sebep olmuştur. Şekil 4.12’de TUL’a ait kromatogramdan da görüleceği gibi sadece % 0,1 oranında DEA eklendiği zaman analiz süresi 6 kat ve Şekil 4.13’teki BUT analizinde ise 4 kat kısaltılmıştır.

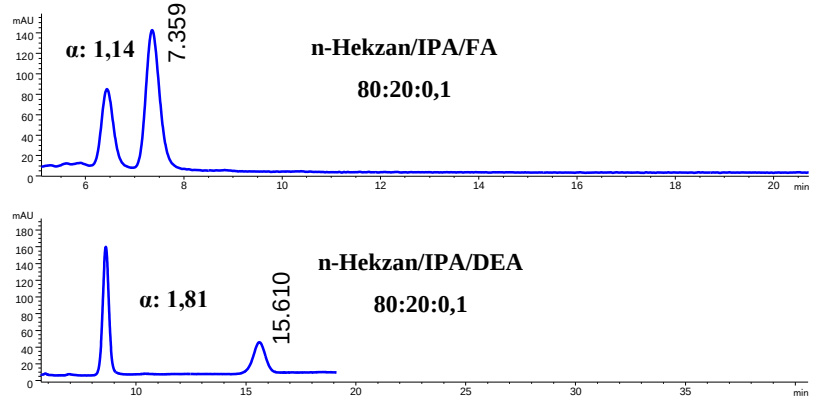


Şekil 4.12. TUL, Cellulose 4 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:İpa:FA (80:20:0,1); n-hekzan:İpa:DEA (80:20:0,1) (yukarıdan aşağıya).

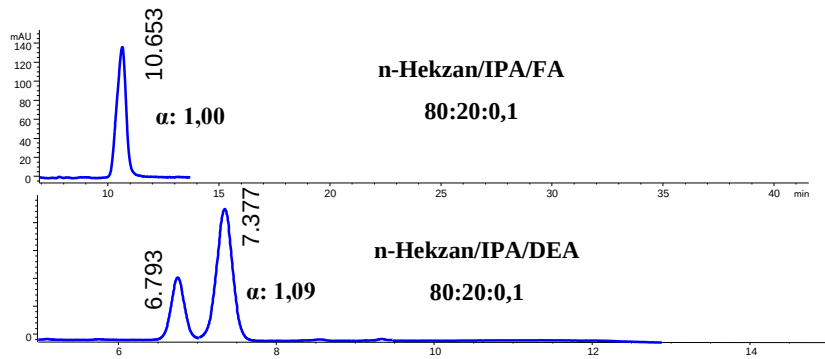


Şekil 4.13. BUT, Cellulose 4 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:İpa:FA (80:20:0,1); n-hekzan:İpa:DEA (80:20:0,1) (yukarıdan aşağıya).

Bu etkileşimlerin yanı sıra sadece bazik katkı maddesi kullanıldığında ayırımın sağlanabildiği (Şekil 3.31 ve 4.14) veya seçiciliğin çok ciddi oranda arttığı (Şekil 4.15) örneklerle de karşılaşılmıştır.



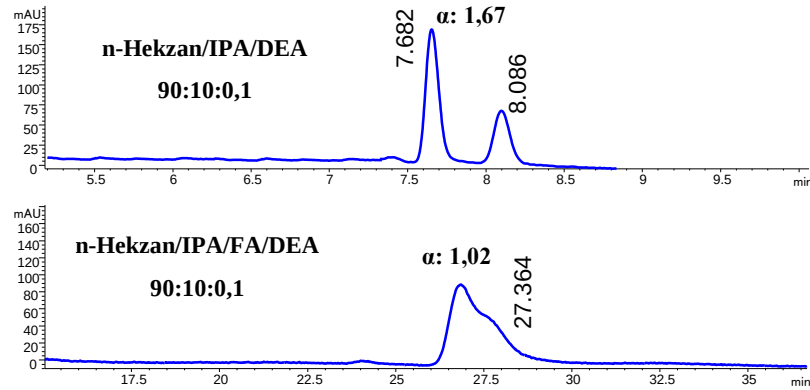
Şekil 4.14. IZO, Amylose 1 (250 x 4.6 mm; 5 µm); hareketli faz: n-hekzan:İpa:FA (80:20:0,1); n-hekzan:İpa:DEA (80:20:0,1) (yukarıdan aşağıya).



Şekil 4.15. IZO, Amylose 1 (250 x 4.6 mm; 5 µm); hareketli faz: n-hekzan:İpa:FA (80:20:0,1); n-hekzan:İpa:DEA (80:20:0,1) (yukarıdan aşağıya).

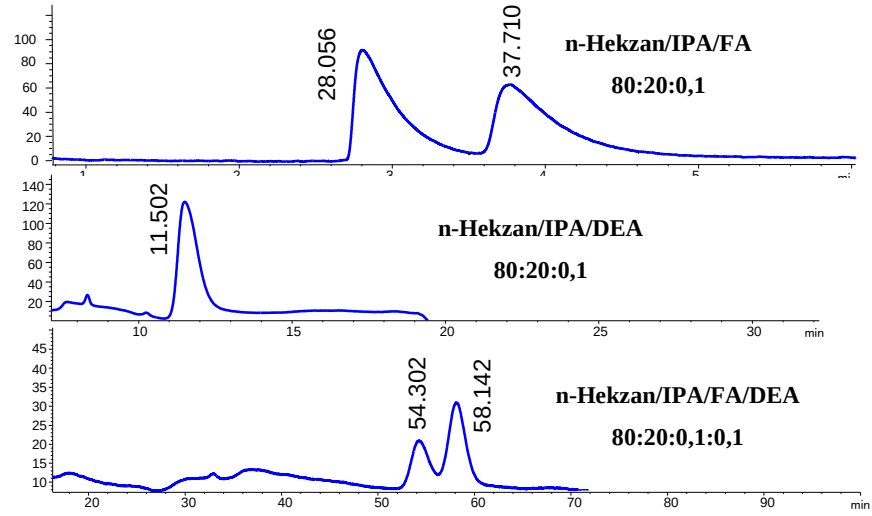
Asidik ve bazik katkı maddelerinin beraber kullanıldığı koşulların genelinde tek başına asidik katkı maddesi kullanılan analizlere oranla süre kısalmış ve etkin tabaka sayılarında artış görülerek pik şekilleri daha da keskin hale gelmiştir (Şekil 4.10 ve 4.11). Bulgular kısmında bulunan neredeyse tüm çizelgelerden ve şekillerden bu durum rahatlıkla görülebilmektedir. Bazı istisnai durumlarda (Şekil 3.27) analiz süresi yarıya düşerken seçiciliğin kaybolduğu durumlarla da karşılaşmıştır.

Başka bir istisnai durum ise yukarıda bahsedilen tek başına bazik katkı maddesi kullanıldığında enantiyomerik ayırım gerçekleşirken, bazik katkı maddesi ile asidik katkı maddesinin bir arada bulunduğu durumlarda seçiciliğin kaybedilmesi olmuştur (Şekil 3.4, 3.15, 3.16). Klenbuterol analizinde Amylose 2 kolon kullanıldığında karşımıza çıkan bu duruma ait kromatogram aşağıda verilmiştir (Şekil 4.16).



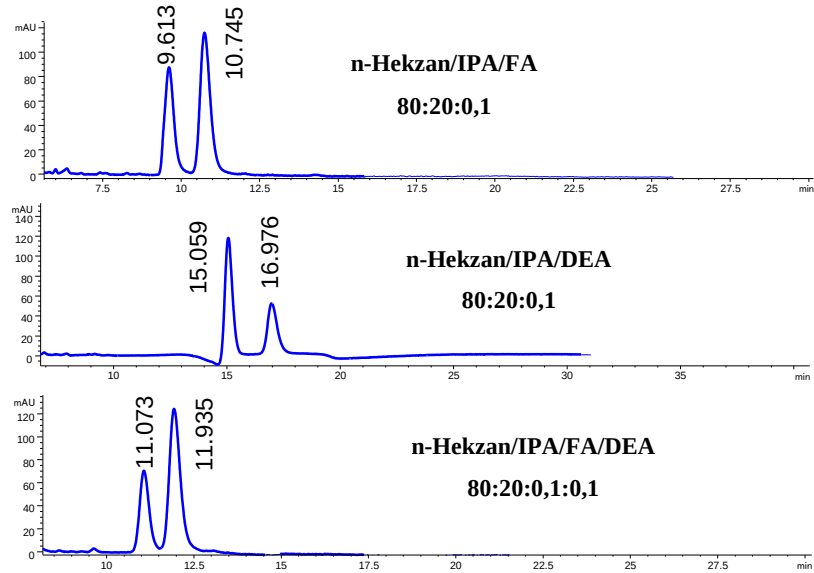
Şekil 4.16. KLB, kolon: Amylose 2 (250 x 4.6 mm; 3 μ m); hareketli faz: n-hekzan:İpa:DEA (90:10:0,1); n-hekzan:İpa:FA:DEA (90:10:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya).

Asidik ve bazik katkı maddelerinin ayırma etkisi dışında, enantiyomerik tersinirliğe sebep olup olmadığı da araştırılmıştır. Şekil 4.17’de SIM analizine ait sonuçlar incelendiğinde Cellulose 2 kullanılan koşullarda hareketli faza % 0,1 oranında FA ilavesi ile işaretlenmiş enantiyomer kolonu ilk olarak terk etmiştir. Tek başına % 0,1 oranında DEA ilave edildiği zaman her iki enantiyomer de birleşerek kolondan ayrılmıştır. FA ve DEA katkı maddelerinin her ikisinin de aynı anda ilave edildiği hareketli faz kullanıldığında işaretlenmiş enantiyomer yer değiştirerek kolonda daha çok alıkonmuştur (Şekil 4.17).



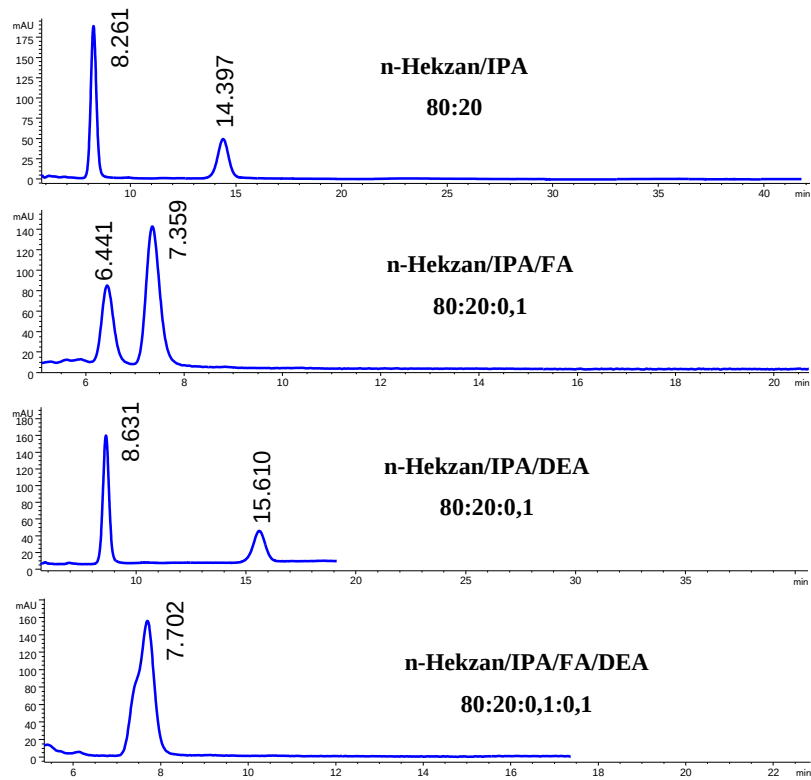
Şekil 4.17. SIM, Cellulose 2 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:İpa:FA (80:20:0,1); n-hekzan:İpa:DEA (80:20:0,1); n-hekzan:İpa:FA:DEA (80:20:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya).

IZO analizi incelendiğinde (Şekil 4.18) Cellulose 3 kolon kullanılarak yapılan analizde FA ilave edilmiş hareketli faz ile işaretli enantiyomerin kolonu önce terk ederken, sadece DEA ilavesi yapılan koşulda tersinirlik göstererek işaretli enantiyomerin kolondan daha önce çıktığı görülmektedir. DEA üzerine ilave edilen eşit miktarda FA ilavesi ile işaretli enantiyomer tekrar yer değiştirerek kolondan sonra ayrılmıştır (Şekil 4.18).



Şekil 4.18. IZO, Kolon: Cellulose 3 (250 x 4.6 mm; 3 µm); hareketli faz: n-hekzan:İpa:FA (80:20:0,1); n-hekzan:İpa:DEA (80:20:0,1); n-hekzan:İpa:FA:DEA (80:20:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya).

Aynı madde ile Amylose 1 kolon kullanılarak yapılan çalışmada hiçbir katkı maddesi ilave edilmemiş koşulda işaretli enantiyomer kolonu ilk sırada terk etmektedir. % 0,1 oranında FA ilavesiyle enantiyomerik sırada tersinirlik gözlenerek, işaretli enantiyomerin kolondan daha geç alıkonulduğu görülmüştür. % 0,1 oranında DEA ilavesi tek başına yapıldığında, hiç bir katkı eklenmemiş hareketli fazın kullanıldığı sıralama değişmemiş, aksine seçicilik daha da artmıştır. Her iki katkı maddesinin eşit miktarlarda ilave edildiği koşulda ise enantiyomerler birleşerek kolonu neredeyse beraber terk etmişlerdir (Şekil 4.19).



Şekil 4.19. IZO, Kolon: Amylose 1 (250 x 4.6 mm; 5 µm); hareketli faz: n-hekzan:Ipa (80:20); n-hekzan:Ipa:FA (80:20:0,1); n-hekzan:Ipa:DEA (80:20:0,1); n-hekzan:Ipa:FA:DEA (80:20:0,1:0,1) (yukarıdan aşağıya).

4.2. Optimize Edilen Koşulların Piyasa Preparatlarına Uygulanması

Çalışmaların son aşamasında ise farmasötik dozaj şekilleri temin edilen bileşiklerin (KLB, RIT ve TER) enantiyomerlerinin analizlerinin yapılması için akış hızı, sıcaklık, dalga boyu gibi diğer parametreleri optimize edilmiştir. İlgili maddelerin piyasadaki preparatlarından (Ventipulmin[®], Pre-par[®] ve Bricanyl durules[®]) analizleri için SUT ve yöntem geçerlilik testleri tamamlanmış, duyarlı ve seçici metotlar geliştirilmiştir (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. Çalışılan bileşiklerin analizlerine ait SUT ve yöntem geçerlilik testi sonuçları.

Etken madde	Kolon	Süre (dk.)	SUT parametreleri			Yöntem geçerlilik testi parametreleri				
			Rs	α	N	Doğrusallık ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	TS	TAS	Keskinlik (BSS %)	Doğruluk %
KLB	Amylose 1	6	2,6	1,4	3277	4-300	0,2	0,7	0,15	98,1-101,1
RIT	Cellulose 2	8	2,9	1,4	2234	5-500	0,5	1,7	0,8	100,8-103,6
TER	Cellulose 4	20	3,2	1,4	2570	10-500	1,2	3,6	0,7	97,14-99,12

4.3. Literatür Çalışmaları ile Karşılaştırma

Literatür araştırmaları sonucunda polisakkarit temelli kiral sabit fazlar kullanılarak yapılan 3 adet çalışma bulunmuştur. Bu çalışmalar IZO (Chankvetadze ve ark., 2002) RIT (Konda ve ark., 2010) ve TER (Ye ve Stringham, 2006) için gerçekleştirilmiştir (Çizelge 1.7). Yapılan analizlerin hiçbirinde kiral sabit faz çeşidinin etkisi, hareketli faz etkisi ve hareketli faza eklenen asidik ve bazik katkı maddelerin etkisi incelenmemiştir.

Amylose 1 kolonun eşdeğeri sayılan Chiralpak AD (250 mm x 4,6 mm) kolon kullanılarak yapılan YBSK çalışmasında UV dedektör ile IZO analizi yapılmıştır. Analiz süresi bakımından tez çalışmasında yapılabilecek olan 2 kat daha uzun süren analize ait yöntem geçerlilik testi çalışmaları gerçekleştirilmemiştir. Karşılaştırma yöntemi olarak kullandıkları KE yöntemi ile detaylı bir optimizasyon koşullarının belirlendiği çalışmada optimize edilen koşullara ait analiz süresi de tez çalışmasından 2 kat daha uzun sürmüştür. Bu yöntem için de yöntem geçerlilik testleri yapılmamıştır. Lux Cellulose 1 kolonun eşdeğeri sayılan Chiral Cel OD-RH (150 mm x 4,6 mm, 5 µm) kolon kullanılarak, floresan dedektör ile yapılan RIT analizinde kullanılan kolonun tez kapsamında kullanılabilecek olan daha kısa olduğu görülmüştür. Buna rağmen 2 kat daha uzun sürede ve daha dar bir doğrusallık ile yaptıkları analiz sonuçlarında kesinlik ve doğruluk değerleri de tez çalışmasından daha düşük bulunmuştur (Çizelge 1.7). Amylose 1 kolonun eşdeğeri sayılan Chiralpak AD (250 mm x 4,6 mm, 10 µm) kullanılarak gerçekleştirilen TER analizinde, UV dedektör kullanılarak analiz 13 dakikada tamamlanmıştır. Enantiyomerler arasındaki ayrım gücünü tez çalışmasına göre yarı yarıya daha düşük bulmuşlardır. Ayrıca çalışmada yöntem geçerlilik testleri yapılmamıştır.

Bu çalışmaların haricinde miktar tayini üzerine farklı tekniklerin ve şartların kullanıldığı çalışmalar Çizelge 1.7’de özetlenmiştir. Çalışmaların geneline bakıldığında detaylı bir yöntem geçerlilik testi yapılan çalışmanın çok az olduğu görülmüştür. Luo ve ark., tarafından SK-KS/KS yöntemi kullanılarak yapılan TER analizinde çok hassas bir dedektör olan KS dedektörünün kullanıldığı durumda bile tez çalışmasına göre hassasiyeti 3 kat arttırabilmişlerdir (Luo ve ark., 2010). 18 dakikada tamamladıkları analize göre tez çalışması sonuçlarının daha doğru ve kesin olduğu da görülmektedir. Kim ve ark., tarafından TER için yapılan bir başka analizde KE ve YBSK yöntemleri karşılaştırmalı olarak kullanılmıştır (Kim ve ark., 2001). 13 dakikada tamamlanan TER analizinde enantiyomerler arasındaki ayrım gücü tez çalışmasının yarısı olarak rapor edilmiştir. Rapor edilen diğer sonuçlara göre tez çalışmasının daha doğru ve kesin olduğu görülmüştür. Song ve ark., ve Abou-Basha

ve ark., tarafından yapılan KLB analizlerinde analiz süreleri tez çalışmasından 2 kat daha uzundur (Abou-Basha ve Aboul-Enein, 1996 ve Song ve ark., 2003). Seçicilik değerlerinin hemen hemen tez çalışması ile aynı olduğu analizlerde yöntemlerin kesinliği ve doğruluğu tez çalışmasından daha düşük olarak raporlanmıştır. TS değerleri Song ve ark., tarafından yapılan analizle eşdeğer bulunmasına karşın Abou-Basha ve ark., tarafından yapılan çalışma daha hassas olarak raporlanmıştır.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Tez kapsamında kiral beta agonist türevi maddelerden, BUT, IZO, KLB, KLP, RIT, SIM, TER ve TUL etken maddelerinin kiral davranışları incelenmiştir.

Altı farklı polisakkarit temelli kolonun kullanıldığı YBSK çalışmalarında hareketli faz olarak polar organik faz, sulu polar organik faz ve normal faz çözücü karışımları farklı bileşimlerde kullanılmıştır. Ayrıca hareketli faza eklenen asidik ve/veya bazik katkı maddelerinin enantiyomerlerin ayırımına olan etkisi ile birlikte enantiyomerik alıkonma sıralarının değişimi de araştırılmıştır.

Yapılan analizler sonucunda polar organik fazlarla ayırım sağlanmazken normal faz çözücülerin ayırma potansiyeli, su içeren polar organik faza göre daha yüksek bulunmuştur. Cellulose 1 (iki analit), Cellulose 2 (bir analit) ve Cellulose 4 (bir analit) kolonların sulu polar organik faz ile ayırımlarda diğer kolonlara göre üstünlük sağladığı ve toplamda üç analitin ayırımı için kullanılabileceği de gözlemlenmiştir. Normal faz koşullarında Cellulose 2 (sekiz analit), Cellulose 4 (yedi analit) ve Amylose 1 (yedi analit) kolonlar ile daha çok analitin enantiyomerleri birbirinden ayrılmıştır. Bununla birlikte tez kapsamında çalışılan sekiz bileşiğin de ayırımı farklı kolonlar kullanılarak normal faz koşullarında başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir.

Ayrımlar gerçekleştirildikten sonra fraksiyonlarına ayrılan enantiyomerlerden miktarı bilinen bir karışım oluşturularak kiral sabit fazın kimyasal yapısının, hareketli faz türünün ve bileşiminin, asidik ve/veya bazik katkı maddelerin enantiyomerik alıkonma sırasına olan etkileri de araştırılmıştır.

Maddelerin neredeyse hepsinde kiral seçici değiştiğinde enantiyomerlerin yer değiştirmeleri gözlemlenmiştir. Hareketli fazın bileşiminin enantiyomerik alıkonma sırası üzerine etkisi de araştırılmış, polar çözücü bileşiminin değişmesiyle enantiyomerlerin alıkonma sırasında yer değiştirme olmadığı görülmüştür. Ayrıca asidik ve/veya bazik katkı maddelerin ilavesinin enantiyomerik alıkonmaya etkileri de tez kapsamında araştırılmış ve asidik ve/veya bazik katkı maddelerinin enantiyomerik alıkonma sırasında etkisi olduğu tespit edilmiştir. Örneğin SIM analizinde Cellulose 2 kolonun kullanıldığı asidik ortamda işaretlenen enantiyomer kolonu önce terk ederken bazik ortamda enantiyomerler kolonu birleşerek beraber terk etmişlerdir. Asit ve bazın eşit miktarda ilavesi söz konusu olduğunda ise işaretleme yapılmayan enantiyomer kolondan önce ayrılmıştır. Aynı madde için tam tersi bir durum Cellulose 1 kolonda gözlenmiştir.

Bu sonuçlar ışığında çalışılan maddelerin enantiyomerik alıkonma sırasına etki eden faktörler önem sırasına göre;

- ✓ Kiral sabit fazda kullanılan polisakkarit türü (selüloz veya amiloz temelli oluşu),
- ✓ Polisakkarite bağlanan fonksiyonel grupların türü (karbamat veya benzoat türevi oluşu),
- ✓ Fenil gruplarına bağlanmış sübstitüentlerin türü ve bağlanma pozisyonları,
- ✓ Asidik ve/veya bazik katkı maddelerinin etkisi şeklinde sıralanmıştır.

Ayrıca tez kapsamında yapılan mekanistik çalışmalara ek olarak piyasa preparatı temin edilebilen beta agonist maddelerin analizleri için de yöntem geliştirilerek bu bileşiklere ait analizlerin yöntem geçerlilik testleri de ICH kılavuzuna göre gerçekleştirilmiştir. KLB, RIT ve TER için elde edilen optimum koşullar sırasıyla Çizelge 3.20, 3.24 ve 3.28’de özetlenmiştir. Optimize edilen koşulların SUT parametreleri hesaplanarak (Çizelge 3.21, 3.25 ve 3.29) ICH kılavuzundaki referans değerlere uygun oldukları belirlendikten sonra bu koşullar altında gerçekleştirilen

analizlere ait kalibrasyon grafikleri oluşturulmuştur. KLB, RIT ve TER için doğrusal aralık sırasıyla 4 - 300 µg mL⁻¹, 5 - 500 µg mL⁻¹ ve 10 - 500 µg mL⁻¹ olarak bulunmuş ve her bir kalibrasyon denkleminde ait R² değeri 0,999 ve üzeri olarak hesaplanmıştır. Elde edilen diğer sonuçlar ile yöntem geçerlilik parametrelerine ait veriler Çizelge 3.22, 3.26 ve 3.30'da verilmiştir. Yöntem geçerliliği ispatlanan analizler piyasada bulunan farmasötik dozaj şekillerine uygulanmış ve yüksek geri kazanım değerleri elde edilmiştir (Çizelge 3.23, 3.27 ve 3.31). Elde edilen değerler % 97,23 - 103,6 arasında değişmektedir. Yüksek geri kazanım değerleri geliştirilen yöntemlerin temin edilen ilaçlar içerisinde bulunan yardımcı maddeler ve olası safsızlıklardan etkilenmediğini göstermektedir. Yapılan miktar tayini çalışmalarının literatürde bulunan çalışmalardan farklı yönleri;

- ✓ FDD dedektörlü YBSK sistemi kullanılmış olması,
- ✓ Farklı polisakkarit temelli kiral seçiciler kullanılmasıdır.

Sonuç olarak geliştirilen yöntemlerin piyasa preparatlarına da uygulanabilirliği gösterilerek kalite kontrol ve araştırma geliştirme laboratuvarlarında kullanılabilecek seçici, duyarlı, hızlı, hassas ve kolay yöntemler geliştirilmesi ile de literatüre katkı sağlanmıştır.

Elde edilen enantiyomerlerin kesin konfigürasyonların belirlenmesi ile mekanizma aydınlatma çalışmaları daha da anlam kazanacaktır. Enantiyomerler saf olarak elde edildikten sonra her bir enantiyomer üzerinde yapılacak toksikolojik ve farmakokinetik çalışmaların in-vitro ve in-vivo ortamlarda gerçekleştirilmesiyle, aktif enantiyomer belirlenerek aktif olmayanların ve toksik etki gösteren enantiyomerlerin ortamdan uzaklaştırılması sağlanabilecektir. Bu da saf enantiyomerik ilaç üretimi için önemli bir adım atılmasını sağlayacaktır.

ÖZET

Beta Agonist İlaç Etken Maddelerin Kiral Davranışlarının İncelenmesi

Tez kapsamında sekiz kiral beta agonist türevi etken maddenin enantiyomerlerinin ayrımı altı farklı polisakkarit temelli kiral YBSK kolonu ile çeşitli polar organik faz, normal faz ve sulu polar organik faz çözücülerini kullanılarak çalışılmıştır. Analitlere ait enantiyomerlerin başarılı bir şekilde ayrımının yanı sıra, çalışmada asıl vurgulanan nokta kiral seçici ve hareketli faz bileşimlerinin hatta hareketli faza ilave edilen asidik veya bazik katkı maddelerinin enantiyomerlerin alıkonma sırasına olan etkilerinin araştırılmasıdır. Enantiyomerlerin alıkonma sırasının tersinirliği oldukça ilgi çekici bir konudur. Bu bağlamda polisakkarit türü (selüloz veya amiloz), türevlerin tipi (karbamat veya benzoat yapılarını içermesi), fenil karbamatlar üzerindeki fonksiyonel gruplar ve bağlandıkları konum ayrıca hareketli fazın bileşimindeki polar çözücünün (2-propanol) miktarı ve formik asit ve dietilamin gibi katkı maddelerinin alıkonma sırası üzerine etkisi incelenmiştir. Buna ek olarak geliştirilen yöntemler, piyasadan temin edilebilen dozaj şekillerinin (klenbuterol, ritodrin ve terbutalin) analizi için yöntem geçerlilik testleri kapsamında YBSK kullanılarak tamamen valide edilmiştir. Geliştirilen yöntemlerin tekrar edilebilir ve uygulanabilir olduğu gösterilmiştir. Yüksek geri kazanım değerleri geliştirilen yöntemlerin temin edilen ilaçlar içerisinde bulunan yardımcı maddeler ve katkı maddelerinden etkilenmediğini göstermektedir.

Anahtar Sözcükler: Enantiyomer alıkonma sırası, enantiyomer ayrımı, kiral beta agonist, polisakkarit temelli kiral sabit fazlar, YBSK.

SUMMARY

Investigation of Chiral Behaviors of Beta Agonist Active Pharmaceutical Ingredients

Scope of this thesis, the separation of enantiomers of eight chiral beta agonist derivatives was studied on six different polysaccharide-based chiral HPLC columns with various polar organic phase, normal-phase and aqueous polar organic phase eluents. Along with the successful separation of analyte enantiomers, the emphasis of this study was on the effect of the chiral selector and mobile phase composition as well as of the effect of acidic and basic additives on the elution order of enantiomers. The interesting phenomena is reversal of enantiomer elution order function of the polysaccharide backbone (cellulose or amylose), type of derivative (carbamate or benzoate), nature and position of the substituent(s) in the phenylcarbamate moiety. Furthermore, the polar modifier composition of the mobile phase (2-propanol), and the effect of additives like formic acid and diethyl amine were investigated on this perspective. In addition, the determination of the active pharmaceutical ingredients that can be found from the market (clenbuterol, ritodrine and terbutaline) were fully validated by evaluation of the validation parameters by using HPLC. The developed methods were demonstrated to be highly feasible and reproducible. High percentage recovery suggested that the optimized methods were free from the interferences of the commonly used excipients and additives in the formulations of the supplied drugs.

Keywords: Chiral beta agonist, enantiomer elution order, enantiomer separation, HPLC, polysaccharide based chiral stationary phases

KAYNAKLAR

- ABOU-BASHA LI, ABOUL-ENEIN HY (1996). Direct enantioselective separation of clenbuterol by chiral hplc in biological fluids. *Biomedical Chromatography*, **10**: 69-72.
- ADAMOVIĆ JA (1997). *Chromatographic Analysis of Pharmaceuticals*. Marcel Dekker, New York.
- AHUJA S (2000). *Chiral separations by chromatography*. Oxford University Press, Oxford, England.
- AHUJA S (2010). *Chiral separation methods for pharmaceutical and biotechnological products*. John Wiley and Sons, New York.
- AHUJA S, SCYPINSKI S (2001). *Handbook of Modern Pharmaceutical Analysis*, Academic Press, New York.
- ALLENMARK S, BOMGREN B, BOREN H (1983). Direct liquid chromatographic separation of enantiomers on immobilized protein stationary phases. III. Optical resolution of a series of N-aroyl D, L-amino acids by high-performance liquid chromatography on bovine serum albumin covalently bound to silica. *J Chromatogr*, **64**: 63-68.
- ARIENS EJ (1984). Stereochemistry, a basis for sophisticated nonsense in pharmacokinetics and clinical pharmacology. *European Journal of Clinical Pharmacology*, **26**: 663-668.
- ARIENS EJ (1989). Racemates an Impediment in the Use of Drugs and Agrochemicals. In: *Medicinal Chemistry: Chiral Separations by HPLC*. Krstulovic AM (Ed.). 548p. Ellis Horwood Ltd., Chichester, England, UK.
- ARMSTRONG DW, TANG Y, CHEN S, ZHOU Y, CHEN C, BAGWILL J-R (1994). Macrocyclic antibiotics as a new class of chiral selectors for liquid chromatography. *Anal Chem*, **66**: 1473-1484.
- BARTON DHR (1950). The conformation of the steroid nucleus. *Experientia*, **50**: 390-394.
- BARWICK VJ, ELLISON SLR (Eds.) (2005). The evaluation of measurements uncertainty from method validation studies. In: *Validation in Chemical Measurement*, Eds.: De Bievre P, Gunzler H, Springer- Verlag Pub., Heidelberg.
- BENTLEY R (2006). The Nose as a stereochemist enantiomers and odor. *Chemical Reviews*, **106**: 4099-4112.
- BERNREUTHER A, EPPERLEIN U, KOPPENHOEFER B. (1997) Enantiomers: why they are important and how to resolve them. In: *Techniques for analyzing food aroma*, Ed.: Marsili R, Marcel Dekker, New York.
- BIDLINGMEYER BA (1992). *Practical HPLC Methodology and Applications*. John Wiley & Sons, Inc., New York, USA. 69-200.
- BIJVOET JM, PEERDEMAN AF, VAN BOMMEL AJ (1951). Determination of the absolute configuration of optically active compounds by means of X-Rays. *Nature*. **168**: 271-272.
- BLASCHKE G (1980). Chromatographic Resolution of Racemates. *New Analytical Methods* (17). *Angewandte Chemie International Edition in English*, **19**: 13-24.
- BLASCHKE G, BROCKER W, FRANKEL W (1986). Enantiomeric resolution by HPLC on silica-gel bound, optically active polyamides. *Angew Chem Int Ed Engl*, **25**: 830-831.
- BLASCHKE G, CHANKVETADZE B (2000). Resolution of racemic mixtures. In: *New trends in synthetic medicinal chemistry*. Ed.: Gualtieri F, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, p.: 139-73.
- BLIENER DM (2006). *Validating Chromatographic Methods: A Practical Guide*. Danvers, Wiley- Interscience Pub.
- BORAN S (2001). Asymmetric catalysis wins. Chemistry Nobel honors Knowles, Noyori, Sharpless for chiral syntheses. *Chemical & Engineering News*. **79(42)**: 5.

- BRACH SK (2005). Guidelines from the International Conference on Harmonisation (ICH). *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **38**: 798-805.
- BRAGIO S, BARNABY RJ, GROSSI P, CUGOLA M (1996). A strategy for validation of bioanalytical methods. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **14**: 375-388.
- CASRO M, BOLFARINE H, GALEA-ROJAS MM, CASTILHO V (2005). An exact test for analytical bias detection. *Anal. Chim. Acta*, **538**: 375.
- CHAN CC (Ed.) (2004). Potency Method Validation. In: *Analytical Method Validation and Instrument Performance Verification*, Eds.: Chan CC, Lam H, Lee YC, Zhang XM, Wiley- Interscience Pub., New Jersey.
- CHANKVETADZE B (2001). Enantioseparation of chiral drugs and current status of electromigration techniques in this field. *J Sep Sci.*, **24**: 691-705.
- CHANKVETADZE B (2007). Enantioseparations by using capillary electrophoretic techniques. The story of 20 and a few more years. *J. Chromatography A*, **1168**: 45-70.
- CHANKVETADZE B (2010). Monolithic chiral stationary phases for liquid-phase Enantioseparation techniques. *J Sep Sci*, **33**: 305-314.
- CHANKVETADZE B (2013a). Chapter 4, Liquid Chromatographic Separation of Enantiomers. In: *Liquid Chromatography*. Eds.: Fanali S, Haddad PR, Poole CF, Schoenmakers P, Lloyd D, Elsevier, Amsterdam, p: 75-91.
- CHANKVETADZE B (2013b). Enantioseparations by High-Performance Liquid Chromatography Using Polysaccharide-Based Chiral Stationary Phases: An Overview. In: *Chiral Separations*. Ed.: Scriba GKE. Humana Press., New York, USA.
- CHANKVETADZE B, BURJANADZE N, BLASCHKE G (2002). Enantioseparation of chiral vasodilator drug isoxsuprine in high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **27**: 153-159.
- CHANKVETADZE B, CHANKVETADZE L, SIDAMONIDZE S, KASASHIMA E, YASHIMA E, OKAMOTO Y (1997). 3-Fluoro-, 3-bromo-, and 3-chloro-5-methylphenylcarbamates of cellulose and amylose as chiral stationary phases for HPLC enantioseparation. *J Chromatogr A*, **787**: 67-77.
- CHANKVETADZE B, YAMAMOTO C, OKAMOTO Y (2000). Extremely high enantiomer recognition in HPLC separation of racemic 2-(benzylsulfinyl) benzamide using cellulose tris (3,5-dichlorophenylcarbamate) as a chiral stationary phase. *Chem Lett*, **29**: 1176-1177.
- CHANKVETADZE B, YAMAMOTO C, OKAMOTO Y (2003). Very fast enantioseparation in high performance liquid chromatography using cellulose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate) coated on monolithic silica support. *Chem Lett*, **32**: 850-851.
- CHANKVETADZE B, YASHIMA E, OKAMOTO Y (1993). Tris(chloro- and methyl-disubstituted phenylcarbamate)s of cellulose as chiral stationary phases for chromatographic enantioseparation. *Chem Lett*, **24**: 617-620.
- CHANKVETADZE B, YASHIMA E, OKAMOTO Y (1994). Chloro-methyl-phenylcarbamate derivatives of cellulose as chiral stationary phases for high performance liquid chromatography. *Chromatogr A*, **670**: 39-49.
- CHANKVETADZE B, YASHIMA E, OKAMOTO Y (1995). Dimethyl-, dichloro- and chlorethyl-phenylcarbamate derivatives of Amylose as chiral stationary phases for high performance liquid chromatography. *J Chromatogr A*, **694**: 101-109.
- CHHABRA N, ASERI ML, PADMANABHAN D (2013). A review of drug isomerism and its significance. *International Journal of Applied and Basic Medical Research*, **3**: 16-18.
- CHRISTIAN GD (Eds.) (2004). Analytical Chemistry. 6th Ed., John Wiley & Sons Inc., New Jersey.

- CORIC I, LIST B (2012). Asymmetric spiroacetalization catalysed by confined Bronsted acids. *Nature*, **483**: 315-319.
- COX GB (2005). Preparative enantioselective chromatography. Blackwell Publishing, Oxford, UK.
- CROWTER J.B. (Ed.) (2001). Validation of Pharmaceutical Methods. In: *Handbook of Modern Pharmaceutical Analysis*, Eds.: Ahuja S, Scypinski S, Academic Press, San Diego.
- CUSHNY AR (1926). Biological Relations of Optically Isomeric Substances. The Williams and Wilkins Company, USA, p.: 37.
- DAVANKOV VA (1989). Ligand-exchange phases. In: *Chiral separations by HPLC* Ed.: Krstulovic AM, Ellis Horwood Limited, New York, p.: 175-93.
- DAVANKOV VA, ROGOZHIN SV (1971). Ligand chromatography as a novel method for the investigation of mixed complexes: stereoselective effects in α -amino acid copper (II) complexes. *J Chromatogr*, **60**: 280-283.
- DAVIES NM, TENG XW (2003). Importance of chirality in drug therapy and pharmacy practice: Implication of psychiatry. *Adv Pharm.* **1**: 242-252.
- De BIEVRE P, GUNZLER H (Eds.) (2005). Validation in Chemical Measurement. Springer pub., New York.
- DEÑOLA NL, QUIMING NS, CATABAY AP, SAITO Y, JINNO K (2008). Effects of alcohols on CE enantioseparation of basic drugs with native γ -CD as chiral selector. *Journal of Separation Science*, **31**: 2701-2706.
- DİNÇER F (1982). Ord. Prof. Dr. Süreyya Tahsin Aygün'ün hayatı ve bilimsel çalışmaları, *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. **29**: 256-276.
- DONG MW (2006). Modern HPLC for Practicing Scientists. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- DOSSOU KSS, CHIAP P, CHANKVETADZE B, SERVAIS AC, FILLET M, CROMMEN J (2009). Enantiomer resolution of basic pharmaceuticals using cellulose tris(4-chloro-3-methylphenylcarbamate) as chiral stationary phase and polar organic mobile phases. *J Chromatogr A*, **1216**: 7450-7455.
- DOWNTON C, CLARK I. (2003). Statins - the heart of the matter. *Nat Rev Drug Discov*, **2**: 343-344.
- DYSON N (1998). Chromatographic Integration Methods. 2nd Ed., Cambridge: Royal Soc. of Chemistry, UK.
- EASSON LH, STEDMAN E (1933). Studies on the relationship between chemical constitution and physiological action: Molecular dissymmetry and physiological activity. *Biochemical Journal*, **27**: 1257-1266.
- EMEA (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products), Investigation of chiral active substances (1998). In: Note for guidance by the European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. London, UK.
- ERB S (2006). Single-enantiomer drugs poised for further market growth. *Pharm Tech*.
- ERMER J (2001). Validation in pharmaceutical analysis Part 1: An integrated approach. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **24**: 755-767.
- ERMER J (Ed.) (2005). Fundamentals of Validation in Pharmaceutical Analysis. In: *Method Validation in Pharmaceutical Analysis*, Eds.: Ermer J, Miller JH., Wiley VCH Publishers, Weinheim.
- ERMER J, MILLER JHMcB (2005). Method Validation in Pharmaceutical Analysis. 1st Ed., WileyVCH Pub., Weinheim.
- ERMER J, PLOSS HJ (2005). Validation in pharmaceutical analysis. Part II: Central importance of precision to establish acceptance criteria and for verifying and improving the quality of analytical data. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **37**: 859.

- European Pharmacopoeia (2014) 8th Ed. Council of Europe, Strasbourg.
- FANALI S, HADDAD PR., POOLE C, SCHOENMAKERS P and LLOYD DK (2013). Liquid Chromatography: Fundamentals and Instrumentation. Elsevier, USA.
- FEI Z-X, ZHANG M, XIE S-M, YUAN L-M (2014). Capillary electrochromatographic fast enantioseparation based on a chiral metal–organic framework. *Electrophoresis*, 35: 3541-3548.
- FRANCO P, SENSO A, OLIVEROS L, MINGUILLON C (2001). Covalently bonded polysaccharide derivatives as chiral stationary phases in highperformance liquid chromatography. *J Chromatogr A*, **906**: 155-170.
- FRANCOTTE E (2006). Isolation and production of optically pure drugs by enantioselective chromatography. In: *Chirality in drug research* Eds.: Francotte E, Lindner W, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, p.: 155-88.
- GAL J (2006). Chiral Drugs from a Historical Point of View. In: *Chirality in Drug Research*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- GEGENAVA M, CHANKVETADZE L, FARKAS T, CHANKVETADZE B (2014). Enantioseparation of selected chiral sulfoxides in high-performance liquid chromatography with polysaccharide-based chiral selectors in polar organic mobile phases with emphasis on enantiomer elution order. *J Sep Sci*, **37 (9-10)**: 1083-1088.
- GHANEM A, ABOUL-ENEIN HY (2005). Application of lipases in kinetic resolution of racemates. *Chirality*, **17**: 1-15.
- GHANEM A, NAIM L (2006). Immobilized versus coated amylose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate) chiral stationary phases for the enantioselective separation of cyclopropane derivatives by liquid chromatography. *Chromatogr A*, **1101**: 171-178.
- GÖRÖĞ S (2007). The changing face of pharmaceutical analysis. *Trac-Trends Anal. Chem.*, **26**: 12-17.
- GRDINIC V, VUKOVIC J (2004). Prevalidation in pharmaceutical analysis, part 1, Fundamentals and critical discussion. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **35**: 489-512
- GRITTI F, CAVAZZINI A, MARCHETTI N, GUIOCHON G (2007). Comparison between the efficiencies of columns packed with fully and partially porous C18-bonded silica materials. *J. Chromatogr. A* **1157**: 289-303.
- GUBITZ G, SCHMID MG (2004). Chiral Separations: Methods and Protocols. Humana Press, Totowa, NJ.
- GUITTON J, COSTE S, GUFFON-FOUILHOUX N, COHEN S, MANCHON M, GUILLAUMONT M (2009). Rapid quantification of miglustat in human plasma and cerebrospinal fluid by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*. **877 (3)**: 149–154.
- GÜMÜŞTAŞ M (2009). Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim İnhibitörü Ve Kalsiyum Kanal Blokörü Kombinasyonu İlaçların Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Yöntemi İle Aynı Anda Analizi. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Ankara.
- GUMUSTAS M, COSKUN G, OZKAN SA (2015). Selective and sensitive determination of repaglinide in pharmaceuticals by voltammetric and LC methods. *Rev. Roum. Chim.* **60**: 477-490.
- GUMUSTAS M, KURBANOGLU S, USLU B, OZKAN SA (2013). UPLC versus HPLC on drug analysis: Advantageous, applications and their validation parameters. *Chromatographia*. **76(21-22)**: 1365-1427.
- GUMUSTAS M, OZKAN SA (2011). The role of and the place of method validation in drug analysis using electroanalytical techniques. *The Open Analytical Chemistry Journal*, **5**: 1-21.
- GUMUSTAS M, SENDEL-TURK CT, HASCICEK C, OZKAN SA (2014a). Optimization of a validated stability-indicating RP-LC method for the determination of fulvestrant from polymeric based nanoparticle systems, drugs and biological samples. *Biomedical Chromatography*. **28**: 1409-1417.

- GUMUSTAS M, USLU B, OZKAN SA, ABOUL-ENEIN H (2014b). Validated Stability-Indicating HPLC and UPLC Assay Methods for the Determination of Entacapone in Pharmaceutical Dosage Forms. *Chromatographia*. **77**: 1721-1726.
- HAIDER SI (Ed.) (2002). Pharmaceutical Master Validation Plan. CRC Press, New York, p.: 155-161.
- HAJICOSTAS E (2003). Validation of Analytical Methods. Springer-Verlag Pub., Berlin.
- HAMILTON RJ, SEWEL PA (1982). Introduction to HPLC. 2nd Ed., Chapman and Hall, New York. 1-160.
- HARTMANN C, SMEYERS-VERBEKE J, MASSART DL, McDOWALL RD (1998). Validation of bioanalytical chromatographic methods. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **17**: 193.
- HASHEM H, TRÜNDELBERG C, ATTEF O, JIRA T (2011). Effect of chromatographic conditions on liquid chromatographic chiral separation of terbutaline and salbutamol on Chirobiotic V column. *Journal of Chromatography A*, 1218: 6727-6731.
- HEFTMANN E (ed.) (2004). Chromatography, Part A: Fundamentals and Techniques, Part B: Applications. 6th Ed., Elsevier, Amsterdam.
- HENDERSON GM, RULE HG (1939). A new method of resolving a racemic compound. *J Chem Soc*, 1568-1573.
- HEYDEN YV, MASSART DL (1996). Review of the Use of Robustness and Ruggedness in Analytical Chemistry. In: *Robustness of Analytical Chemical Methods and Pharmaceutical*, Eds.: Hendricks MMWB, De Boer JH, Smilde AK, Technologies Products. Elsevier, Amsterdam.
- HIBBERT DB (2007). Quality Assurance in the Analytical Chemistry Laboratory. Oxford University Press, Inc., New York.
- HINZE WI, RIEHL TE, ARMSTRONG DW, DEMOND W, ALAK A, WARD T (1985). Liquid chromatographic separation of enantiomers using a chiral b-cyclodextrin-bonded stationary phase and conventional aqueous-organic mobile phases. *Anal Chem*, **57**: 237-242.
- HOFFMANN CV, PELL R, LÄMMERHOFER M, LINDNER W (2008). Synergistic effects on enantioselectivity of zwitterionic chiral stationary phases for separations of chiral acids, bases, and amino acids by HPLC. *Analytical Chemistry*, 80: 8780-8789.
- [https://tr.wikipedia.org/wiki/Narkissos_\(mitoloji\)](https://tr.wikipedia.org/wiki/Narkissos_(mitoloji)).
- HUBER L (2007). Validation and Qualification in Analytical Laboratories. 2nd Ed., Informa Healthcare USA, Inc., New York.
- IKAI T, OKAMOTO Y (2009). Structure control of polysaccharide derivatives for efficient separation of enantiomers by chromatography. *Chem Rev*, **109**: 6077-6101.
- IKAI T, YAMAMOTO C, KAMIGAITO M, OKAMOTO Y (2006). Efficient immobilization of cellulose phenylcarbamate bearing alkoxysilyl group onto silica gel by intermolecular polycondensation and its chiral recognition. *Chem Lett*, **35**: 1250-1251.
- ILER RK (1979). The Chemistry of Silica: Solubility, Polymerization, Colloid and Surface Properties and Biochemistry of Silica. John Wiley & Sons, New York.
- International Conference on Harmonization (ICH) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology (2005). Geneva. Q2A (R1)
- International Conference on Harmonization (ICH) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology (2005). Geneva. Q2B (R1).
- JIBUTI G, MSKHILADZE A, TAKAISHVILI N, KARCHKHADZE M, CHANKVETADZE L, FARKAS T, CHANKVETADZE B (2012). HPLC separation of dihydropyridine derivatives enantiomers with emphasis on elution order using polysaccharide-based chiral columns. *Journal of Separation Science*, **35**: 2529-2537.

- JOZWIAK K, LOUGH WJ, WAINER IW (2012). Drug Stereochemistry: Analytical Methods and Pharmacology, 3rd Ed., CRC Press., New York, USA.
- KARADAS-BAKIRHAN N., GUMUSTAS M, USLU B, OZKAN SA (2015). Simultaneous determination of amlodipine besylate and rosuvastatin calcium in binary mixtures by voltammetric and chromatographic techniques. *Ionics*. 1-12, DOI:10.1007/s11581-015-1534-8.
- KATZUNG BG (2004). The Nature of Drugs. In: Basic and Clinical Pharmacology. 9th. Ed., Lange Medical Books/McGraw Hill, New York, p.: 3-5.
- KAYAALP O (2012). Akılcı Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. Pelikan Tıp ve Teknik Kitapçılık Tic. Ltd. Şti., Sıhhiye, Ankara.
- KIM KH, KIM HJ, KIM JH, LEE JH, LEE SC (2001). High-performance liquid chromatographic and capillary electrophoretic methods for the quantitation of the (S)-terbutaline in (R)-terbutaline. *Chromatographia*, **53**: 334-337.
- KONDA A, SOMA M, ITO T, YAKEUCHI Y, TODA T, HAYAKAWA T, INOTSUME N (2010). Stereoselective analysis of ritodrine diastereomers in human serum using HPLC. *Journal of Chromatographic Science*, **48**: 503-506.
- KONIECZKA P (2007). The Role of and the Place of Method Validation in the Quality Assurance and Quality Control (QA/QC) System. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **37(3)**: 173-190.
- KROMIDAS S (2008). HPLC Made to Measure: A Practical Handbook for Optimization. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- KROMIDAS S (Ed.) (2005). More Practical Problem Solving in HPLC. Wiley- VCH Verlag GmbH & CoK GaA Pub. , Weinheim.
- LAMMERHOFER M (2010). Chiral recognition by enantioselective liquid chromatography: mechanisms and modern chiral stationary phases. *J Chromatogr A*, **1217**: 814-856.
- LEE HW, JI HY, KIM HY, PARK ES, LEE KC, LEE HS (2009). Determination of metoclopramide in human plasma using hydrophilic interaction chromatography with tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.* **877 (18-19)**: 1716-1720.
- LEE YC (Ed.) (2004). Method Validation for HPLC Analysis of Related Substances in Pharmaceutical Drug Products. In: *Analytical Method Validation and Instrument Performance Verification*. Eds.: Chan CC, Lam H, Lee YC, Zhang XM, Wiley-Interscience Pub., New Jersey.
- LIU JT, LIU RH (2002). Enantiomeric composition of abused amine drugs: chromatographic methods of analysis and data interpretation. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. **54(1-3)**: 115-146.
- LLOYD DK, GOODALL DM (1989). Polarimetric detection in high-performance liquid chromatography. *Chirality*, **1**: 251-264.
- LOMSADZE K, JIBUTI G, FARKAS T, CHANKVETADZE B (2012). Comparative high-performance liquid chromatography enantioseparations using polysaccharide based chiral stationary phases prepared by coating of totally porous and core-shell silica particles. *J Chromatogr A*, **1234**: 50-55.
- LU S, TRAN BN, NELSEN JL, ALDUS KM (2009). Quantitative analysis of mitragynine in human urine by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.* **877 (24)**: 2499-2505.
- LUNTE SM, RADZIK DM (1996). Pharmaceutical and Biomedical Applications of Capillary Electrophoresis. Elsevier Science Ltd, New York.
- LUO W, ZHU L, DENG J, LIU A, GUO B, TAN W, DAI R (2010). Simultaneous analysis of bambuterol and its active metabolite terbutaline enantiomers in rat plasma by chiral liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **52**: 227-231.

- MAIER NM, FRANCO P, LINDNER W (2001) Separation of enantiomers: needs, challenges, perspectives. *J Chromatogr A*, **906**: 3-33.
- MAIER NM, LINDNER W (2006). Stereoselective chromatographic methods for drug analysis. In: *Chirality in drug research*. Eds.: Francotte E, Lindner W, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, p.: 189-260.
- MAJCEN N (2003). A need for clearer terminology and guidance in the role of reference materials in method development and validation. *Accred. Qual. Assur.*, **8**: 108-122.
- McCONATHY J, OWENS MJ (2003). Stereochemistry in drug action. Primary care companion. *The Journal of Clinical Psychiatry*, **5**: 70-73.
- McDOWALL RD (1999). The role of laboratory information management systems (LIMS) in analytical method validation. *Anal. Chim. Acta*, **391**: 149-158.
- MEYER RV (1988). Practical HPLC. John Wiley & Sons, Toronto, Canada, 35-42.
- MEYRING M, STRICKMANN D, CHANKVETADZE B, BLASCHKE G, DESIDERIO C, FANALI S (1999). Investigation of the in vitro biotransformation of R-(+)-thalidomide by HPLC, nano-HPLC, CEC and HPLC-APCI-MS. *Journal of Chromatography B. Biomedical Sciences and Applications*. **723**: 255-264.
- MILLER JM (2009). Chromatography: Concepts and Contrasts. 2nd Ed., John Wiley & Sons, Ltd, Chichester.
- MISLOW K, SIEGEL J (1984). Stereoisomerism and local chirality. *Journal of the American Chemical Society*. **106(11)**: 3319-3328.
- MOHAMMAD J, LI Y-M, EL-AHMAD M, NAKAZATO K, PETTERSSON G, HJERTEN S (1993). Chiral recognition chromatography of B-blockers on continuous polymer beds with immobilized cellulase as enantioselective protein. *Chirality*, **5**: 464-470.
- MOLDOVEANU SC and DAVID V (2002). Sample Preparation in Chromatography. Elsevier Science Ltd., Amsterdam, Oxford, New York.
- MOSIASHVILI L, CHANKVETADZE L, FARKAS T, CHANKVETADZE B (2013). On the effect of basic and acidic additives on the separation of the enantiomers of some basic drugs with polysaccharide-based chiral selectors and polar organic mobile phases. *Journal of Chromatography A*, **1317**: 167-174.
- MSKHILADZE A, KARCHKHADZE M, DADIANIDZE A, FANALI S, FARKAS T, CHANKVETADZE B (2013). Enantioseparation of chiral antimycotic drugs by HPLC with polysaccharide-based chiral columns and polar organic mobile phases with emphasis on enantiomer elution order. *Chromatographia*, **76**: 1449-1458.
- NA N, HU Y, OUYANG J, BAEYENS WRG, DELANGHE JR, TAES YEC, XIE M, CHEN H, YANG Y (2006). On the use of dispersed nanoparticles modified with single layer β -cyclodextrin as chiral selector to enhance enantioseparation of clenbuterol with capillary electrophoresis. *Talanta*, **69**: 866-872.
- NEUE UD (1997). HPLC Columns: Theory, Technology, and Practice. JohnWiley & Sons, Inc., New York.
- NGUYEN LA, HE H, PHAM-HUY C (2006). Chiral drugs: An Overview. *International Journal of Biomedical Science*. **2(2)**: 85-100.
- OHLOFF G (1986). Chemistry of odor stimuli. *Experientia*. **42(3)**: 271-279.
- OKAMOTO M (2002). Reversal of elution order during the chiral separation in high performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **27 (3-4)**: 401-407.
- OKAMOTO Y, ABURATANI R, HATADA K (1987a). Chromatographic chiral resolution XIV. Cellulose tribenzoate derivatives as chiral stationary phase for high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr*, **389**: 95-102.

- OKAMOTO Y, ABURATANI R, MIURA S, HATADA K (1987b). Chiral stationary phases for HPLC: cellulose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate) and tris(3,5-dichlorophenylcarbamate) chemically bonded to silica gel. *J Liq Chromatogr*, **10**: 1613-1628.
- OKAMOTO Y, KAWASHIMA M, HATADA K (1984). Useful chiral packing materials for high-performance liquid chromatographic resolution of enantiomers: phenylcarbamates of polysaccharide coated on silica gel. *J Am Chem Soc*, **106**: 5357-5359.
- OKAMOTO Y, KAWASHIMA M, HATADA K (1986). Controlled chiral recognition of cellulose triphenylcarbamate derivatives supported on silica gel. *J Chromatogr*, **363**: 173-186.
- OZKAN SA (2012). *Electroanalytical Methods in Pharmaceutical Analysis and Their Validation*. HNB Pub., USA, ISBN: 978-0-9664286-7-4.
- OZKAN SA, KAUFFMAN JM, ZUMAN P (2015). *Electroanalysis in Biomedical and Pharmaceutical Sciences: Voltammetry, Amperometry, Biosensors, Applications*. Springer Heidelberg, New York.
- PAPADOYANNIS IN, SAMANIDOU VF (2004). Validation of HPLC instrumentation. *J. Liq. Chromatogr. Rel. Tech.*, **27**: 753-783.
- PASCH H and TRATHNIGG B (1999). *HPLC of Polymers*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- PASTEUR L (1901). On the asymmetry of naturally occurring organic compounds. In: *The Foundations of Stereo Chemistry: Memoirs by Pasteur, Van't Hoff, Le Bel, and Wislicenus*. Ed.: Richardson GM, American Book Co., New York, p.: 1-33.
- PATOCKA J, DVORAK A (2004). Biomedical aspects of chiral molecules. *Journal of Applied Biomedicine*. **2**: 95-100.
- PENG L, JAYAPALAN S, CHANKVETADZE B, FARKAS T (2010). Reversed phase chiral HPLC and LC/MS analysis with tris(chloromethylphenylcarbamate) derivatives of cellulose and amylose as chiral stationary phases. *J Chromatogr A*, **1217**: 6942-6955.
- PERRON F, ALBIZATI KF (1989). Chemistry of spiroketals. *Chemical Reviews*. **89**: 1617-1661.
- PHARMACYTIMES (2015). <http://www.pharmacytimes.com/news/10-best-selling-brand-name-drugs-in-2015>.
- PIRKLE WH, FINN JM., SCHREINER JL, HAMPER BC (1981). A widely useful chiral stationary phase for the high-performance liquid chromatography separation of enantiomers. *Journal of the American Chemical Society*, **103**: 3964-3966.
- POOLE CF (2002). *The Essence of Chromatography*. Elsevier, Amsterdam.
- PRELOG V, WIELAND P (1944). Über die Spaltung der Tröger'schen Base in optische Antipoden, ein Beitrag zur Stereochemie des dreiwertigen Stickstoffs. *Helvetica Chimica Acta*, **27**: 1127-1134.
- PRICHARD E, BARVICK V (2007). *Quality Assurance in Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons Pub. UK.
- RENTSCH KM (2002). The importance of stereoselective determination of drugs in the clinical laboratory. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. **54(1-3)**: 1-9.
- RILEY CM, ROSANSKE TW (Eds.) (1996). *Development and Validation of Analytical Methods*. Pergamon Press, Oxford.
- ROBARDS K, JACKSON PE and HADDAD PR (1995). *Principles and Practice of Modern Chromatographic Methods*. Academic, London, San Diego.
- SÁNCHEZ FG, NAVAS DÍAZ A, SÁNCHEZ TORREÑO E, AGUILAR A, MEDINA LAMA I, ALGARRA M (2012). Determination of enantiomeric excess by chiral liquid chromatography without enantiomerically pure starting standards. *Biomedical Chromatography*, **26**: 1241-1246.

- SCOTT RPW (1995). *Techniques of Chromatography*. Marcel Dekker, Inc., New York.
- SEWEL PA, CLARKE B, KEALEY D (1987). *Chromatographic Separations*. John Wiley and Sons Inc., London, UK, 13-80.
- SHABIR GA (2003). Validation high performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *J. Chromatogr. A*, **987**: 57-66.
- SHALLENBERGER RS (1992). *Taste Chemistry*. Springer Science & Business Media, Geneva, New York.
- SHELDON RA (1993). *Chirotechnology: Industrial Synthesis of Optically Active Compounds*. Marcel Dekker, New York.
- SIMONYI M (1984). On chiral drug action. *Medicinal Research Reviews*, **4**: 359-413.
- SINNER FM, BUCHMEISER MR (2000). Ring-opening metathesis polymerization: access to a new class of functionalized, monolithic stationary phases for liquid chromatography. *Angew Chem Int Ed*, **39**: 1433-1436.
- SKOOG DA, HOLLER FJ, CROUCH SR (2007). *Principles of Instrumental Analysis*, Thomson Brooks/Cole.
- SKOOG DA, HOLLER FJ, NIEMAN TA (1998). *Principles of Instrumental Analysis*. 5th Ed., Brooks/Cole Thompson Learning, USA.
- SNYDER LR, KIRKLAND JJ, GLAYCH JL (1997). *Practical HPLC Method Development*, 2nd Ed., John Wiley & Sons Inc., New York.
- SOLOMONS G, FRYHLE G (2002). *Organik Kimya*. Literatür yayıncılık, Beyoğlu, İstanbul.
- SONG W, PABBISETTY D, GROEBER EA, STEENWYK RC, FAST DM (2009). Comparison of fused-core and conventional particle size columns by LC-MS/MS and UV: application to pharmacokinetic study. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **50** (3): 491-500.
- SONG Y, WANG D, HU Y, CHEN X, JIAO Y, HOU D (2003). Direct separation and quantitative determination of clenbuterol enantiomers by high performance liquid chromatography using an amide type chiral stationary phase. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **31**: 311-319.
- STORK G, NIU D, FUJIMOTO A, KOFT ER, BALKOVEC JM, TATA JR, DAKE GR (2001). The first stereoselective total synthesis of quinine. *Journal of the American Chemical Society*, **123**: 3239-3242.
- STRUBE J, ALTENHONER U, MEURER M, SCHMIDT-TRAUB H, SCHULTE M (1997). Dynamic simulation of simulated moving-bed chromatographic processes for the optimization of chiral separations. *J Chromatogr A*, **769**: 81-92.
- SUBRAMANYAN G (2007). *Chiral separation techniques: a practical approach*. Wiley-VCH, Weinheim, Germany.
- SWARTZ ME, KRULL IS (1997). *Analytical Method Development and Validation*. Marcel Dekker, New York.
- SWEETMAN SC (Ed.) (2009). *Martindale: The Complete Drug Reference* (36th Ed.). Pharmaceutical Press, London.
- SWITAJ-ZAWADKA A, KONIECZKA P, PRZYK E, NAMIESNIK J (2005). Calibration in metrological approach. *Anal. Lett.*, **38**: 353-376.
- TANG J, PANG L, ZHOU J, TANG W (2015). Enantioseparation tuned by solvent polarity on a β -cyclodextrin clicked chiral stationary phase. *Journal of Separation Science*, **38**: 3137-3144.
- THOMAS A (2000). *Fats and Fatty Oils*. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. Wiley-VCH, Verlag GmbH & Co. KGaA.

- THOMPSON M, ELLISON SLR, WOOD R (2002). Harmonized guidelines for validation of. methods of analysis. *Pure Appl. Chem.*, **74**: 835-855.
- THORMANN W, CHANKVETADZE L, GUMUSTAS M, CHANKVETADZE B (2014). Dynamic computer simulation of electrophoretic enantiomer migration order and separation in presence of a neutral cyclodextrin. *Electrophoresis*, **35**: 2833-2841.
- TORBECK LD (Ed.) (2007). Pharmaceutical and Medical Device Validation by Experimental Design. Informa Healthcare USA, Inc., New York.
- TSWET MS (1903). On the new form of adsorption phenomena and its application in biochemical analysis. *Proc. Warsaw Natural Biol. Soc.*, **14**: 20-39.
- TSWET MS (1910). Chromophils in animal and plant world. *Doctor of Science Dissertation*, Warsaw, 379.
- UCKUN Z, SUZEN HS (2009). Quantitative determination of citalopram and its metabolite desmethycitalopram in plasma by high performance liquid chromatography. *FABAD J. Pharm. Sci.* **34**: 195-201.
- UNGER KK (1979). Porous Silica, Its Properties and Use as Support in Column Liquid Chromatography. Elsevier Science Ltd., Amsterdam, Oxford, New York.
- US FDA Technical Review Guide: Validation of Chromatographic Methods, Center for Drug Evaluation and Research (1983). Rockville, MD.
- US FDA Technical Review Guide: Development of New Stereoisomeric Drugs (1992).
- US FDA, Analytical Procedures and Method Validation: Chemistry, Manufacturing and Controls, Federal Notices (2000). 5, 776.
- USP 37-NF 32 (2014) (The United States Pharmacopeia). The Official Compendia of Standards. United States Pharmacopeial Convention, Rockville.
- ÜSTÜNES L (Ed.) (2016). RxMediaPharma interaktif ilaç bilgi kaynağı. GEMAŞ Genel Mühendislik Mekanik San. ve Tic. A.Ş., Bornova, İzmir.
- VAN LOCCO J, ELSKENS M, CROUX C, BEERNAERT H (2002). Linearity of calibration curves: use and misuse of correlation coefficient. *Accred. Qual. Assur.*, **7**: 281-285.
- VANTHUYNE N, ANDREOLI F, FERNANDEZ S, ROUSSEL C (2005). Reversal of elution order with immobilization of chiral selector. Poster presentation on 17-th international symposium on chirality, Parma, Italy.
- VARGA G, FODOR G, ILISZ I, SZEMÁN J, VISY J, SZENTE L, PÉTER A (2012). Comparison of separation performances of novel β -cyclodextrin-based chiral stationary phases in high-performance liquid chromatographic enantioseparation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **70**: 71-76.
- VARGESSON N (2015). Thalidomide-induced teratogenesis: History and mechanisms. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*. **105(2)**: 140-156.
- VESSMAN J (1996). Selectivity or specificity? Validation of analytical methods from the perspective of an analytical chemist in the pharmaceutical industry. *J.Pharm.Biomed.Anal.*, **14**: 867-869.
- WALTHER W, NETSCHER T (1996). Design and development of chiral reagents for the chromatographic determination of chiral alcohols. *Chirality*. **8**: 397-401.
- WANG Y, YOUNG DJ, TAN TTY, NG S-C (2010). "Click" immobilized perphenylcarbamated and permethylated cyclodextrin stationary phases for chiral high-performance liquid chromatography application. *Journal of Chromatography A*, **1217**: 5103-5108.

- WERNER F, VERA D, GERHILD D (2006). Quality Assurance in Analytical Chemistry, Applications in Environmental, Food and Materials Analysis, Biotechnology and Medical Engineering. Wiley-VCH, Weinheim.
- WILLSTATTER R (1904). Über einen versuch zur theorie des farbens. *Ber Dtsch Chem Ges*, **37**: 3758-3760.
- WILSON NS, DOLAN JW, SNYDER LR, CARR PW, SANDER LC (2002). Column selectivity in reversed-phase liquid chromatography: III. The physico-chemical basis of selectivity. *J. Chromatogr. A*. **961** (2): 217-236.
- WOLRAB D, MACÍKOVÁ P, BORAS M, KOHOUT M, LINDNER W (2013). Strong cation exchange chiral stationary phase: A comparative study in high-performance liquid chromatography and subcritical fluid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1317: 59-66.
- YAMAMOTO C, YAMADA K, MOTOYA K, KAMIYA Y, KAMIGAITO M, OKAMOTO Y, ARATANI T (2006). Preparation of HPLC chiral packing materials using cellulose tris(4-methylbenzoate) for the separation of chrysanthemate isomers. *J Polym Sci A Polym Chem*, **44**: 5087-5097.
- YASHIMA E, FUKAYA H, OKAMOTO Y (1994). 3,5-Dimethylphenylcarbamates of Cellulose and amylose regioselectively bonded to silica gel as chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A*, **677**: 11-19.
- YE YK, STRINGHAM RW (2006). The effect of acidic and basic additives on the enantioseparation of basic drugs using polysaccharide-based chiral stationary phases. *Chirality*, **18**: 519-530.
- YE YK, STRINGHAM RW (2001). Effect of mobile phase acidic additives on enantioselectivity for phenylalanine analogs. *Journal of Chromatography A*, **927**: 47-52.
- ZALEWSKI P, TALACZYŃSKA A, KORBAN P, GARBACKI P, MIZERA M, CIELECKA-PIONTEK J (2014). An approach to transfer methods from HPLC to UHPLC techniques in some carbapenems. *Chromatographia*. **77**: 1483-1487.
- ZHOU J, YAO H, SHAO H, LI Y, ZHANG Z (2012). Enantioseparation of β -agonists with carboxymethyl- β -cyclodextrin by CE. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 35: 50-58.
- ZHOU L, ANTONUCCI V, BIBA M, GONG X, GE Z (2010). Simultaneous enantioseparation of a basic active pharmaceutical ingredient compound and its neutral intermediate using reversed phase and normal phase liquid chromatography with a new type of polysaccharide stationary phase. *J Pharm Biomed Anal*, **51**: 153-157.
- ZOU Y, WANG L, LIU Q, LIU H, LI F (2015). Enantioseparations of 11 amino alcohols using di-n-amyl l-tartrate-boric acid complex as chiral mobile phase additive by RP-HPLC. *Chromatographia*, 78: 753-761.

ÖZGEÇMİŞ

I. Bireysel Bilgiler

Adı: Mehmet

Soyadı: Gümüştas

Doğum yeri ve tarihi: Ankara, 25.11.1985

Uyruğu: TC

Medeni durumu: Evli

Askerlik durumu: Askerlik yükümlülüğü bulunmamaktadır.

İletişim adresi ve telefonu: Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı, Kat:4, 06100, Tandoğan, ANKARA. / 0312 2033179.

II. Eğitimi

Derece	Alan	Üniversite	Yıl
Doktora	Analitik Kimya ABD	Ankara Üniversitesi	2010-
Yüksek lisans	Analitik Kimya ABD	Ankara Üniversitesi	2008-2010
Lisans	Kimya Bölümü	Süleyman Demirel Üniversitesi	2004-2008

Yabancı dili: İngilizce

III. Unvanları

Unvanı	Üniversite	Bölüm	Yıl
Kimyager	-	-	2008
Araştırma Görevlisi	Hitit Üniversitesi	Kimya Bölümü	2009-2010
Uzman Kimyager	-	-	2010
Araştırma Görevlisi	Ankara Üniversitesi	Analitik Kimya ABD	2010-

IV. Bilimsel İlgi Alanları

Uluslararası hakemli dergilerde yayınlanan makaleler (SCI ve SCI Expanded)

1. Gumustas, M., Ozkan, S.A., Electrochemical evaluation and determination of antiretroviral drug fosamprenavir using boron-doped diamond and glassy carbon electrodes. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397(1), 189-203, 2010.
2. Kul, D., Gumustas, M., Uslu, B., Ozkan, S.A., Electroanalytical characteristics of antipsychotic drug ziprasidone and its determination in pharmaceuticals and serum samples on solid electrodes. *Talanta*, 82(1), 286-295, 2010.
3. Shirinzadeh H., Yilmaz A.D., Gumustas M., Suzen S., Ozden S., Ozkan, S.A., Electrochemical behaviour of indole-3-carboxaldehyde isonicotinoyl hydrazones: Discussion on possible biological behavior. *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening*, 13(7), 619-627, 2010.
4. Gumustas, M., Şanlı, S., Şanlı, N., Ozkan, S.A., Determination of pKa values of some antihypertensive drugs by liquid chromatography and simultaneous assay of lercanidipine and enalapril in their binary mixtures. *Talanta*, 82(4), 1528-1537, 2010.
5. Sanli, N., Sanli, S., Sizer, U., Gumustas, M., Ozkan, S.A., Determination of pKa values of cefdinir and cefixime by LC and spectrophotometric methods and their analysis in pharmaceutical dosage forms. *Chromatographia*, 73(11-12), 1771-1776, 2011.
6. Sanli, S., Sanli, N., Gumustas, M., Karadas, N., Özkan, S.A., Aboul Enein, H.Y., Simultaneous estimation of ceftazidime and ceftizoxime in pharmaceutical formulations by HPLC method. *Chromatographia*, 74(7-8), 549-558, 2011.
7. Karadas, N., Sanli, S., Gumustas, M., Ozkan, S.A., Voltammetric and RP-LC assay for determination of benidipine HCl. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 66, 116-125, 2012.
8. Gumustas, M., Sanli, S., Sanli, N., Ozkan, S.A., Development and validation of a liquid chromatographic method for concurrent assay of weakly basic drug verapamil and amphoteric drug trandolapril in pharmaceutical formulations. *Journal of Food and Drug Analysis*, 20(3), 588-596, 2012.
9. Gumustas, M., Karadas, N., Ozkan, S.A., Validated electroanalytical and RP-LC assay of ertapenem in its pharmaceutical dosage form. *Revue Roumaine de Chimie*, 58(7-8), 679-690, 2013.
10. Bozal-Palabiyik, B., Kurbanoglu, S., Gumustas, M., Uslu, B., Ozkan, S.A., Electrochemical approach for the sensitive determination of anticancer drug epirubicin in pharmaceuticals in the presence of anionic surfactant. *Revue Roumaine de Chimie*, 58(7-8), 647-658, 2013.
11. Bozal B., Gumustas, M., Dogan-Topal, B., Uslu B., Ozkan S.A., Fully validated simultaneous determination of bisoprolol fumarate and hydrochlorothiazide in their dosage forms using different voltammetric, chromatographic, and spectrophotometric analytical methods. *Journal of AOAC International*, 96(1), 42-51, 2013.
12. Kurbanoglu, S., Gumustas, M., Ozkan, S.A., Simultaneous estimation and validation of some binary mixtures of antihypertensive drugs by RP-LC methods using two new generation silica columns. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 72, 198-201, 2013.
13. Gumustas, M., Özkan, S.A., A validated stability-indicating RP-LC method for the simultaneous determination of amlodipine and perindopril in tablet dosage form

and their stress degradation behaviour under ICH-recommended stress conditions. *Journal of AOAC International*, 96(4), 751-757, 2013.

14. Ashrafi, A.M., Gumustas, M., Vytşas, K., Nematollahi D., Uslu, B., Mikysek, T., Jirasko, R., Ozkan, S.A., Determination and detailed mechanism study of antiviral drug fosamprenavir using carbon paste electrode in the presence of Triton X-100. *Electrochimica Acta*, 109, 381-388, 2013.

15. Gumustas, M., Kurbanoglu, S., Uslu, B., Ozkan, S.A., UPLC versus HPLC on drug analysis: Advantageous, applications and their validation parameters. *Chromatographia*, 76(21-22), 1365-1427, 2013.

16. Kurbanoglu, S., Gumustas, M., Uslu, B., Ozkan, S.A., A sensitive and selective RP-LC method for the simultaneous determination of the antihypertensive drugs, enalapril, lercanidipine, nitrendipine and their validation. *Chromatographia*, 76(21-22), 1477-1485, 2013.

17. Suzen, S., Tekiner-Gulbas, B., Shirinzadeh, H., Uslu, D., Gurer-Orhan, H., Gumustas, M., Ozkan, S.A., Antioxidant activity of indole-based melatonin analogues in erythrocytes and their voltammetric characterization. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 28(6), 1143-1155, 2013.

18. Kurbanoglu, S., Bozal-Palabiyik, B., Gumustas, M., Şanlı, S., Uslu, B., Ozkan S.A., Development and validation of a stability-indicating RP-LC method for the determination of anticancer drug epirubicin in pharmaceuticals. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 37(11), 1583–1596, 2014.

19. Kurbanoglu, S., Gumustas, M., Ozkan, S.A., Simultaneous determination and validation of some binary mixtures of antihypertensive drugs using ratio derivative spectrophotometric method. *Journal of Analytical Chemistry*, 69(10), 935-941, 2014.

20. Kilicarslan M., Gumustas M., Yildiz S., Baykara T. Preparation and Characterization of Chitosan-Based Spray-Dried Microspheres for the Delivery of Clindamycin Phosphate to Periodontal Pockets, *Current Drug Delivery*, 11, 98-111, 2014.

21. Gumustas M., Sengel-Turk C., Hascicek C., Ozkan S.A., Optimization of a Validated Stability-Indicating RP-LC Method for the Determination of Fulvestrant from Polymeric Based Nanoparticle Systems, *Drugs and Biological Samples, Biomedical Chromatography*, 28, 1409-1417, 2014.

22. Thormann W, Chankvetadze L, Gumustas M, Chankvetadze B., Dynamic computer simulation of electrophoretic enantiomer migration order and separation in presence of a neutral cyclodextrin, *Electrophoresis*, 35, 2833-2841, 2014.

23. Gumustas, M., Uslu, B., Ozkan, S.A., Aboul-Enein H.Y., Validated stability-indicating HPLC and UPLC assay methods for the determination of entacapone in pharmaceutical dosage forms. *Chromatographia*, 77, 1721-1726, 2015.

24. Kaskatepe B., Yildiz S., Gumustas M., Ozkan S.A. Biosurfactant production of in kefir and fish meal. *Brazilian Journal of Microbiology*. 46, 855-859, 2015.

25. Kiymaci, M.E., Gumustas, A., Gumustas, M., Akin, A., Ozkan, S.A., Comparative Study For The Determination Of Gemifloxacin By HPLC And Microbiological Methods From Pharmaceutical Preparations And Biological Samples. *Current Pharmaceutical Analysis*, 11, 193-200, 2015.

26. Canan Hascicek, Ceyda T. Sengel-Turk, Mehmet Gumustas, Sibel A. Ozkan, Filiz Bakar, Net Das-Evcimen, Ayhan Savaser and Yalcin Ozkan, Influence of Polymer Molecular Weight on in-vitro Characteristics and Cytotoxicity of Fulvestrant Loaded Nanoparticles, *Current Drug Therapy*, 9, 239-249, 2014.

27. Kaskatepe B., Yildiz S., Gumustas M., Ozkan S.A. Rhamnolipid production by *Pseudomonas putida* IBS036 and *Pseudomonas pachastrellae* LOS20 with using pulps. *Current Pharmaceutical Analysis*. Baskıda.
28. Karadas, N, Gumustas, M., Uslu, B., Ozkan, S.A., Simultaneous Determination of Amlodipine Besylate and Rosuvastatin Calcium in Binary Mixtures by Voltammetric and Chromatographic Techniques, *Ionics*. 22, 277-288, 2016.
29. Gumustas, M., Coskun, G., Ozkan, S.A., Selective and sensitive determination of repaglinide In pharmaceuticals by voltammetric and LC methods, *Revue Roumanie de Chimie*, 60 (5-6), 477-490, 2015.
30. Ozen, G., Gumustas, M., Satana Kara, E., Gunden Goger, N., Uslu, B., Ozkan, S.A., Quantitative determination of isoconazole nitrate and diflucortolone valerate in pharmaceutical creams by UPLC, HPLC and improved derivative UV spectrophotometry, *Revue Roumanie de Chimie* , 60(5-6), 527-536, 2015.
31. Kurbanoglu, S., Bozal-Palabiyik, B., Gumustas, M., Uslu, B., Ozkan S.A., Investigation of voltammetric behavior and electroanalytic determination of anticancer epirubicin via glassy carbon electrode using differential pulse and square wave voltammetry techniques, *Revue Roumanie de Chimie* , 60(5-6), 491, 2015.
32. Gumustas, M., Çiçek Polat, D., Kılıç, C.S., Akalın, K., Ozkan, S.A., Coşkun, M., Comparison of Seeds of *Colchicum speciosum* Steven and *Gloriosa superba* Linn. in respect to Colchicine and Colchicoside Contents via RP-LC, *Nat. Prod. Commun* (Baskıda).
33. Gumustas, M., Sengel-Turk, T., Badilli, U., Amasya, G., Ozkan, S.A., Tarimci, N., Optimization of stability indicating LC method for the sensitive in vitro determination from solid lipid nanoparticles and ex vivo analysis from rat skin of Etofenamate, *Current Pharmaceutical Analysis* (Baskıda).

Uluslararası hakemli dergilerde yayınlanan makaleler

1. Gumustas, M., Özkan, S.A., The role of and the place of method validation in drug analysis using electroanalytical techniques. *The Open Analytical Chemistry Journal*, 5, 1-21, 2011.
2. Gumustas, M., Ozkan, S.A., Development and validation of an RP-LC method for the determination of granisetron in dosage forms. *Asian Chemistry Letters*, 16(1), 23-30, 2011.
3. Gumustas, M., Özkan, S.A., Simple, sensitive and reliable LC-DAD method of gemifloxacin determination in pharmaceutical dosage forms. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 9(2), 161-170, 2012.
4. Demiralay, C.E, Gumustas, M., Canbay H., Validation of method for simultaneous determination of paracetamol and phenylephrine in pharmaceutical formulation by reversed phase liquid chromatography, *Pharmacie Globale (IJCP)*, 2(6), 9, 2011.

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (Proceeding) basılan bildiriler

1. Mehmet GUMUSTAS, Senem ŞANLI, Nurullah ŞANLI, S.A. OZKAN 'Simultaneous Determination of Enalapril and Lercanidipine by HPLC-DAD Technique in Pharmaceutical Dosage Forms'(ISC 2010), 12-16 Eylül 2010, Valensiya, İSPANYA.Abstract P-270, 2010

2. Mehmet GUMUSTAS, Burcin Bozal, Burcu Dogan-Topal, Sibel A. OZKAN, Bengi Uslu 'Optimization of LC Methods for the Simultaneous Determination of Bisoprolol and Hydrochlorothiazide in Their Pharmaceutical Dosage Forms'(ISC 2010), 12-16 Eylül 2010, Valensiya, İSPANYA.Abstract P-288, 2010
3. Mehmet GUMUSTAS, Sibel A. OZKAN 'Development of a Validated LC Method For The Simultaneous Determination Of Amlodipine and Perindopril in Their Commercial Dosage Forms'(ISC 2010), 12-16 Eylül 2010, Valensiya, İSPANYA. Abstract P-304, 2010.
4. Mehmet GUMUSTAS, Sibel A. OZKAN 'Electrochemical Evaluation and Determination of Antiretroviral Drug Fosamprenavir in Pharmaceutical Dosage Forms and Biological Samples'(Euro Analysis 2009), 06-10 Eylül 2010, Innsbruck, AVUSTURYA.Abstract P-123, 2009
5. Mehmet GUMUSTAS, Sibel A. ÖZKAN Electrochemical Oxidation of Antiretroviral Drug Fosamprenavir at Glassy Carbon Electrode and Its Direct determination in Pharmaceutical Dosage Forms by Square Wave and Differential Pulse Voltammetry (5 th Blacksea Basin Conference on Analytical Chemistry), Fatsa/ORDU)
6. Mehmet GUMUSTAS, Sibel A. ÖZKAN Anodic voltammetry of antiretroviral drug fosamprenavir at boron-doped diamond and glassy carbon electrodes and its determination (8 th International Electrochemistry Meeting), Çolaklı/ANTALYA)
7. Hanif SHIRINZADEH, Mehmet GÜMÜŞTAŞ, Seçkin ÖZDEN, Sibel SÜZEN, Sibel A. ÖZKAN, Synthesis and investigation of electrochemical behaviour of n-methylindole-3-carboxaldehyde izonicotinoyl hydrazone(9th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS-9), AnkaraUniversity/ANKARA,23-26 Haziran 2009)
8. Senem ŞANLI, Mehmet GÜMÜŞTAŞ, Meltem SAVAŞ, Nurullah ŞANLI, Güleren ALSANCAK, The UV-spectroscopy method for determination of dissociation constants of several cephalosporins in water (International Symposium on Drug Research and Development, Hacettepe University/ANKARA, 4-7 Mayıs 2009)
9. Mehmet GUMUSTAS, Sibel A. OZKAN A Novel Sensor for Antibiotic Drug Ertapenem Based on Electrochemical Oxidation Using Boron Doped Diamond Electrode (ISE 2011), 8-11 Mayıs 2011, Turku, Finlandiya, Abstract P-20,2011.
10. Bengi Uslu, Burcin Bozal, Mehmet Gumustas, Burcu Dogan Topal, Sibel A. Ozkan Analytical Applications Of Voltammetric Methods For The Simultaneous Determination Of Bisoprolol Fumarate And Hydrochlorothiazide In Their Dosage Forms, (ISE 2011), 8-11 Mayıs 2011, Turku, Finlandiya, Abstract P-114,2011.
11. Mehmet GUMUSTAS, Sibel A. OZKAN Development Of Validated Rp-Hplc Method For The Estimation Of Gemifloxacin From Tablet Dosage Form (DRD 2011), 27-29 Mayıs 2011, Antalya, Türkiye, Abstract P-043,2011.
12. Mehmet GUMUSTAS, Sibel A. OZKAN Determination Of Granisetron By HPLC-DAD Technique In Pharmaceutical Dosage Forms (DRD 2011), 27-29 Mayıs 2011, Antalya, Türkiye, Abstract P-044,2011.
13. Nurgül Karadaş, Mehmet GUMUSTAS, Sibel A. Özkan, Electrochemical Oxidation of Benidipine at Glassy Carbon Electrode and Its Direct Determination in Pharmaceutical Dosage Forms, (9.Uluslararası Elektrokimya Kongresi), 25-29 Eylül 2011, İzmir, Türkiye, Abstract P-012, 2011
14. Sevinç Tunçağıl, Mehmet GUMUSTAS, Burçin Bozal, Bengi Uslu, Sibel A. Özkan, Electrochemical Behavior of Epirubicin at Boron-Doped Diamond Electrode

and Its Determination in the Presence of Surfactants, (9.Uluslararası Elektrokimya Kongresi), 25-29 Eylül 2011, İzmir, Türkiye, Abstract P-044, 2011

15. Sevinç Tunçağıl, Mehmet GUMUSTAS, Burçin Bozal, Bengi Uslu, Sibel A. Özkan, Understanding Electrochemical Mechanism of Epirubicin on Glassy Carbon Electrode via Model Pharmaceutials, (9.Uluslararası Elektrokimya Kongresi), 25-29 Eylül 2011, İzmir, Türkiye, Abstract P-072, 2011

16. Sevinç Tunçağıl, Mehmet Gumustas, Burçin Bozal, Bengi Uslu, Sibel A. Özkan, Determination of anticancer drug epirubicine in pharmaceutical preparations via glassy carbon electrode, (14. International Conference on Electrochemistry), 3-7 Haziran 2012, Portoroz, Slovenya, Abstract P2-9, 214, 2012.

17. Gokce Coskun, Mehmet Gumustas, Sibel A. Özkan, Electrochemical behavior and determination of antidiabetic drug repaglinide at glassy carbon electrode (14. International Conference on Electrochemistry), 3-7 Haziran 2012, Portoroz, Slovenya, Abstract P2-10, 215, 2012.

18. Hanif Shırnzadeh, Çiğdem Karaaslan, Betül Tekiner-Gulbas, Ayse Didem Yılmaz, Mehmet Gumustas, Sibel A. Özkan, Sibel Suzen, Investigation on electrochemical behavior of indole-hydrazones. (10th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS-10), AnkaraUniversity/ANKARA,26-29 Haziran 2012), Abstract P125, 200, 2012.

19. Mehmet Gumustas, Senem Şanlı, Nurullah Şanlı, Sibel A. Özkan, Simultaneous determination of trandolapril and verapamil in pharmaceutical formulations. 10th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS-10), AnkaraUniversity/ANKARA,26-29 Haziran 2012), Abstract P196, 272, 2012.

20. Ceyda Sibel Kılıç, Abdullah Kaya, Halil Solak, Mustafa Işıloğlu, Fahrettin Gücin, Mehmet Gumustas, Maksut Coşkun, Psilocin and psilocibin content of some Psathyrella spp. Growing in Turkey, 10th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS-10), AnkaraUniversity/ANKARA,26-29 Haziran 2012), Abstract P298, 375, 2012.

21. Mehmet Gumustas, Ceyda Sibel Kılıç, Abdullah Kaya, Halil Solak, Mustafa Işıloğlu, Fahrettin Gücin, Maksut Coşkun, Psilocin And Psilocibin Contents Of Some Panaeolus Spp. Growing In Turkey, 13th International Congress of the Society of Ethnopharmacology, September 2-6, 2012 in Graz, Austria

22. M. Kılıçarslan, M. Gumustas, T. Baykara, Effect of drug/polymer ratio on the characteristics of clindamycin phosphate loaded spray dried chitosan Microspheres prepared for periodontal administration. 16th IPTS on September 10 – 12, 2012 in Antalya, Turkey. Abstract P31, 170-172.

23. Sevinc Tuncagil, Mehmet Gumustas, Sibel A. Ozkan, Simultaneous estimation and validation of some binary mixtures of antihypertensive drugs by RP-LC method. 1 st International Conference on Analytical Chemistry RO-ICAC 2012, September 18-21, 2012 in Targoviste, Romania.

24. Lali Chankvetadze, Mehmet Gumustas, Sibel A.Ozkan, Salvatore Fanali, Bezhan Chankvetadze, Application of Novel Core-shell Type Polysaccharide-based Chiral Stationary Phases for Separation of Enantiomers in Nano Liquid Chromatography and Capillary Electrochromatography, 29th International Symposium on Micro Scale Bioseparations (MSB 2013), 10-14 March, 2013, Charlottesville, VA, ABD.

25. A. M. Ashrafi, M. Gumustas, K. Vytras, D. Nematollahi, B. Uslu, T. Mikysek, R. Jirasko, S. A. Ozkan, Determination and mechanism study of antiviral drug

fosamprenavir using carbon paste electrode in the presence of Triton X- 100, 24 th International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis,PBA 2013, Bologna, Italy.

26. Lali Chankvetadze, Mehmet Gumustas, Sibel A.Ozkan, Salvatore Fanali, Bezhan Chankvetadze, Application of Novel Core-shell Type Polysaccharide-based Chiral Stationary Phases for Separation of Enantiomers in Nano Liquid Chromatography and Capillary Electrochromatography, 6th Black Sea Basin Conference on Analytical Chemistry (6BBCAC), 10-14 Eylul, 2013, Trabzon, Turkiye, P160.

27. Mehmet Gumustas, Sibel A. Ozkan, Bezhan Chankvetadze, HPLC separation of enantiomers of chiral β -agonist derivatives using polysaccharide based chiral columns, ITP 2013, 6-9 October 2013, Tenerife, Spain. PS1-23, 145.

28. Merve Eylul Bozkurt, Aysen Gumustas, Mehmet Gumustas, Ahmet Akin, Sibel A. Ozkan, microbiological and HPLC method for the determination of gemifloxacin in pharmaceutical preparations and biological samples, ITP 2013, 6-9 October 2013, Tenerife, Spain, PS1-26, 148.

29. Sevinc Kurbanoglu, Mehmet Gumustas, Bengi Uslu, Sibel A. Ozkan, A novel sensitive and selective RP-LC method for the simultaneous determination of the antihypertensive dugs, enalapril-lercanidipine, ITP 2013, 6-9 October 2013, Tenerife, Spain, PS2-16, 213.

30. Mehmet Gumustas, Sibel A.Ozkan, Lali Chankvetadze, Bezhan Chankvetadze, Application of Novel Core-shell Type Polysaccharide-based Chiral Stationary Phases for Separation of Enantiomers in Nano Liquid Chromatography, 30th International Symposium on Micro Scale Bioseparations (MSB 2014), 27 April-1 May, 2014, Pecs, Hungary. P-24, 95.

31. Mehmet Gumustas, Sibel A. Ozkan, Bezhan Chankvetadze, Enantiomeric separation of chiral β -agonist derivatives with using normal phase eluents by HPLC, PBA 2014, 23-25 June 2014, Liege, Belgium. CS-13.

32. Nurgul Karadas, Mehmet Gumustas, Bengi Uslu, Sibel A.Ozkan,, Simultaneous determination of amlodipine and rosuvastatin in pharmaceuticals by LC and voltammetric techniques, PBA 2014, 23-25 June 2014, Liege, Belgium. PQ-21.

33. Gokce Coskun Abbasoglu, Mehmet Gumustas, Sibel A. Ozkan, A comperative determination study of repaglinide by HPLC, UPLC and electrochemical methods. 2 nd International Conference on Analytical Chemistry RO-ICAC 2014, September 17-21, 2014, Targoviste, Romania.

34. Aysen Gumustas,Merve Eylul Bozkurt, Mehmet Gumustas, Ahmet Akin, Sibel A. Ozkan,Comperative study fort he determination of gemifloxacin by HPLC and microbiological methods from pharmaceutical preparations and biological samples. 2 nd International Conference on Analytical Chemistry RO-ICAC 2014, September 17-21, 2014, Targoviste, Romania. S4-P02.

35. Canan Hascicek, Ceyda Tugba Sengel Turk, Mehmet Gumustas, Sibel. A Ozkan, Ayhan Savaser, Yalcin Ozkan, Fabrication of Fulvestrant loaded modified released nanoparticles: comparison of copolymer molecular weight, 13 th European symposium on controlled drug delivery, April 16-18, 2014, Egmond aan Zee, Netherlands. 121-122.

36. Canan Hascicek, Ceyda Tugba Sengel Turk, Filiz Bakar, Net Das-Evcimen, Mehmet Gumustas, Sibel. A Ozkan, Ayhan Savaser, Yalcin Ozkan, Fulvestrant loaded PLGA nanoparticles: influence of polymer copolymer composition on in-vitro

properties and anti-proliferative potencies against MCF-7 breast cancer cells, 17 th International Pharmaceutical Technology symposium, September 8-10, 2014, Antalya, 203.

37. Canan Hascicek, Ceyda Tugba Sengel Turk, Filiz Bakar, Net Das-Evcimen, Mehmet Gumustas, Sibel A Ozkan, Ayhan Savaser, Yalcin Ozkan, Fabrication of Fulvestrant loaded modified released nanoparticles: effect of copolymer molecular weight on particle characteristics, 4 th International Meeting on Pharmacy Pharmaceutical Sciences (IMPPS-4), September 18-21, 2014, Istanbul, PP 138.

38. B. Kaskatepe, S. Yildiz, M. Gumustas, S.A. Ozkan, rhamnolipid production by pseudomonas spp. In pulps, 11th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS 2015), June 9-12, 2015, Ankara, Turkey, OP-32, 60.

39. M. Gumustas, M.G. Caglayan, F. Onur, S.A. Ozkan, Development of a capillary electrophoresis method for the determination of emtricitabine, rilpivirine and tenofovir from biological samples, 11th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS 2015), June 9-12, 2015, Ankara, Turkey, P-31, 95.

40. Mehmet Gumustas, Bengi Uslu, Sibel A. Ozkan, Optimization and validation of a RP-LC method for the sensitive determination of antazoline and tetrahydrozoline, 26th International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis (PBA 2015), July 5-8, 2015, P23.

41. Mehmet Gumustas, M. Gokhan Caglayan, Feyyaz Onur, Sibel A. Ozkan, Determination of emtricitabine, rilpivirine and tenofovir from biological samples with using LC and CE methods, 26-th International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis (PBA 2015), July 5-8, 2015, P24.

42. Gulin Amasya, Mehmet Gumustas, Ceyda Tuba Sengel-Turk, Ulya Badilli, Sibel A. Ozkan, Nilufer Tarimci, Optimization of sensitive and selective RP-LC method for the determination of etofenamate from rat skin, The European Conference on Analytical Chemistry 18, Euroanalysis 2015, September 6-10, Bordoex, France, 2015, P272.

43. Aysen Gumustas, Mehmet Gumustas, B. Bugra Barut, Sibel A. Ozkan and Bengi Uslu, the effect of core-shell particles on chromatographic determination and optimization of dutasteride and tamsulosin, 43rd Symposium of HPLC and related techniques (HPLC 2015), September 21-25, Beijing, China, 2015, pp. 165, P12.

44. Mehmet Gumustas, M. Gokhan Caglayan, Sibel A. Ozkan, chromatographic investigation and simultaneous determination of some antiviral pharmaceuticals from biological samples, International multidisciplinary symposium on Drug Research & Development 15 (DRD 2015), October 15-17, Eskisehir, Turkey, pp. 96, P26.

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan bildiri kitabında basılan bildiriler

1. Mehmet GUMUSTAS, Senem ŞANLI, Nurullah ŞANLI, Sibel A. ÖZKAN, Fosamprenavir'in farmasötik dozaj formlarından RP-HPLC yöntemiyle miktar tayini, Kromatografi Sempozyumu 2009 Trabzon.

2. Mehmet GUMUSTAS, Sibel A. OZKAN Oseltamivir'in Farmasötik Dozaj formlarından Ters Faz YPSK Yöntemiyle Miktar Tayini (Kromatografi 2011), 7-10 Eylül 2011, Diyarbakır, Türkiye,

3. Sevinç Tunçağıl, Mehmet Gumustas, Sibel A. Özkan, Yeni nesil kolonlarla antihipertansif ilaç etken maddeler için eş zamanlı tayin yöntemleri ve validasyonu, 6. Ulusal Analitik Kimya Kongresi (3-7 Eylül Antakya) Abstract P254, 296, 2012.

4. Mehmet Gumustas, Ceyda Sibel Kılıç, Abdullah Kaya, Halil Solak, Mustafa Işıloğlu, Fahrettin Gücin, Maksut Coşkun, Türkiye’de yetişen bazı inocybe (inocybaceae) türlerinin psilosin ve psilosibin içeriği, BIHAT 2012, 10-13 Ekim, Antalya, Türkiye.
5. Mehmet Gumustas, Derya Cicek Polat, Arabaci Anul S., Ceyda Sibel Kılıç, Akalin K., Maksut Coşkun, Colchicum speciosum Steven ve Gloriosa superba Linn. Türleri Tohumlarının YBSK Yöntemi ile Kolşisin ve Kolşikozit İçerikleri Açısından Karşılaştırılması, BIHAT 2012, 10-13 Ekim, Antalya, Türkiye
6. Mehmet Gumustas, Ceyda Tugba Sengel Turk, Canan Hascicek, Sibel. A Ozkan, Kanser tedavisinde kullanılan Fulvestrant’ın ters faz sıvı kromatografik yöntemle analizi, Kromatografi 2013, 19-22 Haziran 2013, Bursa, Türkiye.
7. Mehmet Gumustas, Sibel A. Özkan, Bezhan Chankvetadze, Separation of chiral β -agonist derivative enantiomers using High Performance Liquid Chromatography, 7. Ulusal Analitik Kimya Kongresi (1-5 Eylül, Kahraman Maraş), 142, 2014.
8. Banu Kaşkatepe, Sulhiye Yıldız, Mehmet Gümüştaş, Sibel Aysıl Özkan. Hastane enfeksiyonu etkeni Pseudomonas aeruginosa suşlarında biyosüpfaktan üretimi. 36. Türk Mikrobiyoloji Kongresi. 12-16 Kasım 2014, Antalya
9. Mehmet Gumustas, Ceyda Tugba Sengel Turk, Canan Hascicek, Sibel. A Ozkan, Filiz Bakar, Net Das-Evcimen, Ayhan Savaser, Yalcin Ozkan, Fulvetrantin Ters Faz Sivi Kromatografik Yontemle Biyolojik Sivilar ve Polimerik Bazli Nanopartikullerden Analizi, 15. Ulusal Kromatografi Kongresi (Kromatografi 2015), 40, 8-10 Nisan 2015, Usak, Türkiye
10. Sevinc Kurbanoglu, Mehmet Gumustas, Sibel. A Ozkan, Antihipertansif Enalapril, Lerkandipin, Nitrendipin in TF-SK ile es zamanli Tayin Yontemleri ve Validasyonu, 15. Ulusal Kromatografi Kongresi (Kromatografi 2015), 138, 8-10 Nisan 2015, Usak, Türkiye.

Uluslararası konferanslarda yapılmış sözlü sunumlar

1. Mehmet Gumustas, Sibel A. Ozkan, Bezhan Chankvetadze, Separation of enantiomers of chiral beta-agonists in capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography 4th Annual Symposium on Physical and Analytical Chemistry, December 29 and 30, 2014 Tbilisi, Georgia. (Davetli, sözlü konuşmacı).
2. Mehmet Gumustas, Sibel A. Ozkan, Bezhan Chankvetadze, Comparative capillary electrophoresis and HPLC separation of enantiomers of selected chiral β -Agonists, 31st International Symposium on Micro Scale Bioseparations (MSB 2015), April 26-29, 2015, Pudong, Shanghai, China.
3. Mehmet Gumustas, Sibel A. Ozkan, Bezhan Chankvetadze, Separation the enantiomers of selected chiral β -agonists derivatives from the viewpoint of high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis, 26th International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis (PBA 2015), July 5-8, 2015. Tbilisi, Georgia.

Ulusal konferanslarda yapılmış sözlü sunumlar

1. Mehmet Gumustas, Bengi Uslu, Sibel A. Özkan, Antiparkinson etkili maddelerin farmasötik dozaj formundan HPLC yöntemiyle eş zamanlı miktar tayini, Ulusal Analitik Kimya Kongresi (3-7 Eylül Antakya) Sözlü sunum. 18, 27, 2012.

2. Mehmet Gumustas, Ceyda Tugba Sengel Turk, Canan Hascicek, Sibel. A Ozkan, Filiz Bakar, Net Das-Evcimen, Ayhan Savaser, Yalcin Ozkan, Fulvetrantin Ters Faz Sivi Kromatografik Yontemle Biyolojik Sivilar ve Polimerik Bazli Nanopartiküllerden Analizi, 15. Ulusal Kromatografi Kongresi (Kromatografi 2015), 8-10 Nisan 2015, Usak, Turkiye.

Yazılan kitaplar veya kitaplarda bölümler

1. Gümüştas, M., Özkan, S.A., Genç, L.(Ed.), *Elektrokimyasal Dedektörlü Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi*, Kromatografik Sistemler, Anadolu Üniversitesi BİBAM yayınları, 2011. ISBN:9789750608865
2. Uslu, B., Gümüştas, M., Savaşer, A., Özkan, Y., Özkan, S. A., Sözlük Dergisi, 3 (2), Analiz terimleri sözlüğü, 2012. ISSN:1308-1500
3. Özkan, S.A., Gümüştas, M., Tunçağıl, S., Gökçel, İ.(Ed.), 2. Uygulamalı Elektrokimya Lisansüstü Yaz Okulu Kitabında Bölüm: Elektrokimyasal analizlerde analitik yöntem optimizasyonu ve validasyonu, 95-118, 2012.
4. Tunçağıl, S., Gümüştas, M., Özkan, S.A., Gökçel, İ.(Ed.), 2. Uygulamalı Elektrokimya Lisansüstü Yaz Okulu Kitabında Bölüm: Anti Parkinson ilaç etken maddesi L-Dopa'nın elektrokimyasal analizi ve validasyonu, 263-275, 2012.
5. Gumustas M., Sengel-Turk C.T., Gumustas A., Ozkan S.A., Uslu B. Effect of Polymer-Based Nanoparticles on the Assay of Antimicrobial Drug Delivery Systems Nanostructures. In: *Therapeutic Medicine*. Vol II, Elsevier, New York, USA (Baskıda).
6. Sengel-Turk C.T., Gumustas M., Uslu B., Ozkan S.A. Nano-Sized Drug Carriers for Oral Delivery of Anti-Cancer Compounds and the Place of the Chromatographic Techniques Nanostructures. In: *Therapeutic Medicine* Vol I, Elsevier, New York, USA (Baskıda).

V. Bilimsel Etkinlikleri

Ödüller

1. PCCP and Turkish Chemical Society Ord. Prof. Dr. İlhami Civaoglu Award for Poster Presentation in 9th International Electrochemistry in Turkey (Poster Ödülü). Sevinç Tunçağıl, Mehmet GUMUSTAS, Burçin Bozal, Bengi Uslu, Sibel A. Özkan, Electrochemical Behavior of Epirubicin at Boron-Doped Diamond Electrode and Its Determination in the Presence of Surfactants.
2. Amerikan Kimya Derneği (American Chemical Society) En iyi Poster Ödülü, Mehmet Gumustas, Gokce Coşgun Abbasoglu, Sibel A. Ozkan "A comparative determination study of repaglinide by HPLC, UPLC and electrochemical methods" 2nd International Conference on Analytical Chemistry. Analytical Chemistry for a Better Life. Targoviste, September 17-21, 2014.

Projeler

1. "Melatonin Analogu Yeni Antioksidan İlaç Etken Maddeleri Geliştirilmesi: Biyolojik Aktivite, Sitotoksikite ve Olası Metabolitlerinin İn-vitro Elektrokimyasal Değerlendirilmeleri (109S099)", TÜBİTAK, Kasım 2009-Kasım 2011, Bursiyer.
2. "Akdeniz Bölgesi'nde Yetişen Psilosin ve Psilosibin Taşıyan Şapkaklı Mantar Türleri Üzerinde Araştırmalar (109T149)", TÜBİTAK, Mayıs 2009-Temmuz 2011, Bursiyer.

3. “Meme Kanseri Tedavisinde Kullanılmak Üzere Fulvestrant Yüklü Polimerik Nanopartiküler Sistemlerin Geliştirilmesi (112S290)”, TÜBİTAK, Kasım 2012-Kasım 2014, Bursiyer.

4. “Yeni nesil kolonlar kullanılarak bazı antiviral ilaçların sıvı kromatografik yöntemlerle eş zamanlı analizi ve optimizasyonu (12L336003)”, Ankara Üniversitesi BAP, Ocak 2013-Ocak 2104, Yardımcı araştırmacı.

5. “Dutasterit ve tamsulosin HCl’nin yeni nesil kolonlar kullanarak bazı sıvı kromatografik yöntemlerle eş zamanlı analizi ve optimizasyonu (15L0237004)”, Ankara Üniversitesi BAP, Haziran 2015-Haziran 2016, Yardımcı araştırmacı.

Verilen seminerler

1. Ultra Performanslı Sıvı Kromatografisi ve Uygulamaları
2. Süper Kritik Akışkan Kromatografisi
3. Elektrokimyasal Dedektörlü HPLC ve İlaç Analizlerindeki Uygulamaları

VI. Diğer Bilgiler

Kongre Organizasyon Üyelikleri

1. 2.Uygulamalı Elektrokimya Yaz Okulu (Çanakkale), Teknik Kurul Üyesi
2. ISOPS 10 (10th International Symposium on Pharmaceutical Sciences, Ankara) Sosyal Komite üyesi. 26-29 Haziran 2012.
3. 19 th EAFP Annual Conference 2013, Ankara, Sosyal Komite Uyesi. 16-18 Mayıs 2013.
4. ISOPS 11 (11th International Symposium on Pharmaceutical Sciences, Ankara) Sosyal Komite üyesi. 9-12 Haziran 2015.

Uluslararası Dergilerde Yayın Kurulu Üyelikleri

1. American Journal of PharmTech Research
2. UK Journal of Pharmaceutical and Biosciences.

Uluslararası Dergilerde Yapılan Hakemlikler

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Electrophoresis, Talanta, Instrumentation Science and Technology, International Journal of Electrochemistry, Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies, Journal of Analytical Methods in Chemistry, Spectroscopy Letters, Journal of AOAC International, Chromatography Research International, Journal of Electrochemical Society, Current Analytical Chemistry, Current Chromatography, Current Drug Therapy, Natural Product and Research, The Open Analytical Chemistry Journal, Science Journal of Analytical Chemistry, The Scientific World Journal. Current Pharmaceutical Analysis, Drug Development and Industrial Pharmacy, Arabian Journal of Chemistry.