



T.C

SIVAS CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ESER DÜZEYDE KAPTOPRİL TAYİNİ İÇİN
ZENGİNLEŞTİRME SONRASI KROMATOĞRAFİK
YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ**

RUKİYE KUZUCUOĞLU

20169150003

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI

SIVAS-2020

T.C
SİVAS CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ESER DÜZEYDE KAPTOPRİL TAYİNİ İÇİN
ZENGİNLEŞTİRME SONRASI KROMATOGRFİK
YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ

RUKİYE KUZUCUOĞLU
20169150003

YÜKSEK LİSANS TEZİ
ANALİTİK KİMYA ANA BİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. HALİL İBRAHİM ULUSOY

SİVAS-2020

“Eser Düzeyde Kaptopril Tayini İçin Zenginleştirme Sonrası Kromatografik Yöntem Geliştirilmesi” adlı **Yüksek Lisans** Tezi, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzuna uygun olarak hazırlanmış ve jürimiz tarafından Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Analitik Kimya** Ana Bilim Dalında **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan

Prof.Dr. Gültekin GÖKÇE



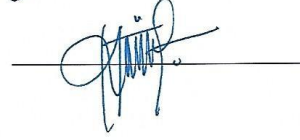
Üye

Doç.Dr. Erkan YILMAZ



Üye (Danışman)

Doç.Dr. Halil İbrahim ULUSOY



ONAY

Bu tez çalışması, .../.../... tarihinde Enstitü Yönetim Kurulu tarafından belirlenen ve yukarıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Zübeyde AKIN POLAT

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

YÖNERGE

Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 18.02.2015 tarihli ve 4/4 sayılı kararı ile kabul edilen Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzuna göre hazırlanmıştır.



Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (CÜBAP) Komisyonu tarafından ECZ-051 nolu proje kapsamında desteklenmiştir.



Bütün hakları saklıdır.

Kaynak göstermek koşuluyla alıntı ve gönderme yapılabilir.

© Rukiye KUZUCUOĞLU, 2020

Hayatıma anlam katan biricik kızım ESİLA HÜMA'ma...



KATKI BELİRTME ve TEŞEKKÜR

Tez çalışmam sürecinde, baştan sona her aşamada bana yol gösteren, desteğini ve yardımlarını esirgemeyen, her konuda bilgi ve teşvikleriyle yanımda olan, araştırma için çok değerli düşüncelerini, zamanını ve ilgisini benimle paylaşan, öğrencisi olmaktan gurur duyduğum çok sevdiğim, değerli ve saygı değer hocam Doç. Dr. Halil İbrahim ULUSOY'a

Bu çalışmayı ECZ-051 kod numarası ile finansal olarak destekleyen Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Komisyon Başkanlığı'na,

Deneysel çalışmalar sırasında, bana laboratuvar imkânlarını sonuna kadar açan Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı'na,

Yüksek lisans çalışmam sırasında bana sabır gösteren, bana olan inaçları ile daima yanımda olan, maddi, manevi destekleri için özellikle Sevgili Annem Müşerref ÇAYLAK'a, Sevgili Babam Bahattin ÇAYLAK'a ve Kardeşlerim İbrahim ÇAYLAK Rabia ÇAYLAK, İHSAN ÇAYLAK ve Ramazan ÇAYLAK'a

Ve Kayıtsız şartsız her konuda sevgisiyle her daim yanımda olan biricik eşim Çağlar KUZUCUOĞLU'a ve güzel kızım Esila Hüma KUZUCUOĞLU'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

ESER DÜZEYDE KAPTOPRİL TAYİNİ İÇİN ZENGİNLEŞTİRME SONRASI KROMATOĞRAFİK YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ

RUKİYE KUZUCUOĞLU

Yüksek Lisans Tezi

Analitik Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Halil İbrahim ULUSOY

2020, 43+xiv sayfa

Bu tez çalışmasında, yüksek tansiyon ve bazı kalp yetmezliği durumlarında kullanılan etkili bir anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) inhibitörü olan Kaptopril'in duyarlı tayini için zenginleştirme sonrası analitik yöntem geliştirilmiştir. Önerilen yöntemde kaptopril molekülleri öncelikle bulutlanma noktası ekstraksiyonu (CPE) ile zenginleştirilmiş daha sonra HPLC-DAD sistemi ile tayin edilmiştir. Model çözeltiler üzerinden yürütülen optimizasyon çalışmalarında, DAD detektör kullanılarak 220 nm dalga boyunda analizler yapılmıştır. Deneysel çalışmaların ilk basamağında, kaptopril molekülleri pH:3.0 tamponu varlığında ve sodyum sülfatla sağlanan yüksek elektrolit ortamında noniyonik surfaktanlar polietilen glikol 6000(PEG 6000) ve polietilen glikol (PEG 8000)'in surfaktanca zengin fazına çekilmiştir. Faz ayrımı santrifüjlüme ile sağlandıktan sonra asetonitril ile seyreltilen örnekler 0.45 µm gözenekli PTFE filtreden süzülüş ve viallere aktarılarak HPLC cihazına yerleştirilmiştir. Zenginleştirme işleminin tüm parametreleri tek tek optimize edilmiş daha sonra tayin sınırı, doğrusal aralık ve zenginleştirme faktörü gibi analitik özellikler belirlenmiştir. Optimize edilmiş koşullar altında elde edilen doğrusal aralık 50.0-800.0 ng mL⁻¹, tayin sınırı ise 14.28 ng mL⁻¹ olarak bulunmuştur. Yöntemin kesinliği 300 ng mL⁻¹ derişimli çözeltilerle 5 tekrarlı yapılan ölçümlerden sonra bağıl standart sapma (BSS) cinsinden % 4.45 nin altında olarak hesaplanmıştır.

Anahtar kelimeler: Kaptopril, Polietilen Glikol, HPLC, Bulutlanma noktası ekstraksiyonu

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF A CHROMATOGRAPHICAL METHOD AFTER PRE-CONCENTRATION FOR DETERMINATION OF CAPTOPRIL AT TRACE LEVELS

RUKİYE KUZUCUOĞLU

Master Thesis

Department of Analytical Chemistry

Supervisor: Assoc. Prof. Halil İbrahim ULUSOY

2020, 43+xiv pages

In this thesis, pre-concentration and determination method was developed for sensitive determination of Captopril molecules, an effective angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor used in high blood pressure and some heart failure cases. In the proposed method, captopril molecules were firstly enriched with cloud point extraction (CPE) and then determined by HPLC-DAD system. In the analytical validation studies carried out on model solutions, analyzes were made at 220 nm wavelength using DAD detector. At the beginning of the experimental studies, captopril molecules were entrapped into the surfactant-rich phase of polyethylene glycol 6000 (PEG 6000) and polyethylene glycol (PEG 8000) as nonionic surfactant in the presence of pH: 3.0 buffer and high electrolyte medium provided with sodium sulfate. After phase separation by centrifugation, the diluted samples with acetonitrile were transferred to vials and filtered through a 0.45 mm porous PTFE filter. Then, they were placed on the HPLC system. All parameters of the enrichment process were individually optimized and then analytical properties such as determination limit, linear range and enrichment factor were determined by using model solutions. The linear range obtained under optimized conditions was in the range of 50-800 ng mL⁻¹ and the limit of detection of the method was 14.28 ng mL⁻¹. Recovery experiments were carried out by using spiked (300 ng mL⁻¹) model solutions and the relative standard deviations (RSD) were less than 4.45% obtained from 5 replicate measurements.

Keywords: Captopril, Polyethylene Glycol, HPLC, Cloud point extraction

İÇİNDEKİLER

ONAY.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
YÖNERGE.....	ii
KATKI BELİRTME ve TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
GENEL BİLGİLER.....	1
1.1.Kaptopril	1
1.1.1.Fizikokimyasal Özellikleri	2
1.1.2.Kaptopril Teşhisi	3
1.1.3.Farmakokinetik Özellikleri	3
1.1.4.Kaptoprilin endikasyonları ve kontrendikasyonları	4
1.1.6.İlacın Türkiye'deki ve Dünyadaki satılan preparatları.....	4
1.2. Zenginleştirme yöntemleri.....	5
1.2.1.Katı faz ekstraksiyon yöntemi.....	6
1.2.2.Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu İle Zenginleştirme	7
1.2.3. İyon Değiştirme Yöntemi.....	7
1.2.4. Birlikte çöktürme mikroekstraksiyonu.....	7
1.2.5. Manyetik temelli katı faz ekstraksiyonu (MSPE).....	8
1.2.6. Bulutlanma noktası mikroekstraksiyonu (CPE).....	9
1.3.Kromatografik Ayırma Yöntemleri	14
1.3.1.Kromatografide Kullanılan Bazı Kavramlar	14
1.3.2. Kromatografinin Sınıflandırılması	15
1.4.1.Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi(HPLC).....	17
MATERYAL VE YÖNTEM	20
2.1.Kullanılan Reaktifler.....	20
2.2. Kullanılan Cihazlar	21
2. 3. Kaptopril için Doğrudan Tayin Koşulları.....	21
2.4 Önerilen Yöntem.....	24
DENEYSEL ÇALIŞMALAR ve TARTIŞMA	26
3.1 Deneysel Çalışmaların Temel Yaklaşımı	26

3. 2. Bulutlanma Noktası Ekstraksiyonu Yöntemi	26
3. 2. 1. pH etkisi	26
3. 2. 3. Elektrolit Etkisi	28
3. 2. 4. İnkübasyon Süresinin Etkisi.....	29
3. 2. 5. Sürfaktanca zengin fazın analize hazırlanması	30
3.4 Yöntemin Analitik Performans Ölçütleri.....	32
3. 5. Gerçek Örneklerin Analizi.....	34
4. DEĞERLENDİRME	35
KAYNAKLAR.....	37
ÖZGEÇMİŞ.....	41



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.Kaptoprilin kimyasal yapısı	2
Şekil1.2. Manyetik katı faz ekstraksiyon yöntemi.....	7
Şekil1.3. Misel oluşumun gösterimi.....	8
Şekil1.4. Farklı yapıda oluşan miseller.....	9
Şekil.1.5. CPE işleminin şematik gösterim	10
Şekil.1.6. Kromatografik Yöntemlerin Sınıflandırılması.....	13
Şekil.1.7. HPLC Cihazının Temel Bölümleri	14
Şekil 2.1. Kaptopril için CPE öncesi elde edilen kromatogram	8
Şekil.2.2. Kaptopril için DAD dedektörde elde edilen UV-VIS Spektrumu.....	19
Şekil .2.3. Doğrudan tayin için kalibrasyon grafiği.....	20
Şekil .2.4. Önerilen yöntemin şematik gösterimi.....	22
Şekil 3.1. Önerilen yöntem üzerine pH etkisi.....	24
Şekil 3.2. Önerilen yöntem üzerine tampon çözelti hacminin etkisi.....	25
Şekil 3.3. Noniyonik surfaktan miktarı.....	26
Şekil 3.4. Önerilen yöntem üzerine elektrolit etkisi.....	27
Şekil 3.5. Önerilen yöntem üzerine inkübasyon süresinin etkisi.....	28
Şekil 3.6. SRP için kullanılan çözücüler.....	29
Şekil 3.7. SRP için kullanılan çözücü hacmi optimizasyonu.....	30
Şekil 3.8. Optimum koşullar altında elde edilen kalibrasyon doğrusu.....	31

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 HPLC çalışma koşulları.....	18
Çizelge2.2.HPLC ile doğrudan tayin sonuçları.....	19
Çizelge 3.1. Önerilen yöntemin analitik parametreleri.....	31



KISALTMALAR DİZİNİ

BN	: Bulutlanma Noktası
SPE	: Katı faz Ekstraksiyonu
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
LC	: Sıvı Kromatografisi
GC	: Gaz Kromatografisi
MSPE	: Manyetik Temelli Katı Faz Ekstraksiyonu
SRP	: Sürfaktanca Zengin Fazın
ADE (ACE)	: Anjiotensin- dönüştürücü Enzim

GENEL BİLGİLER

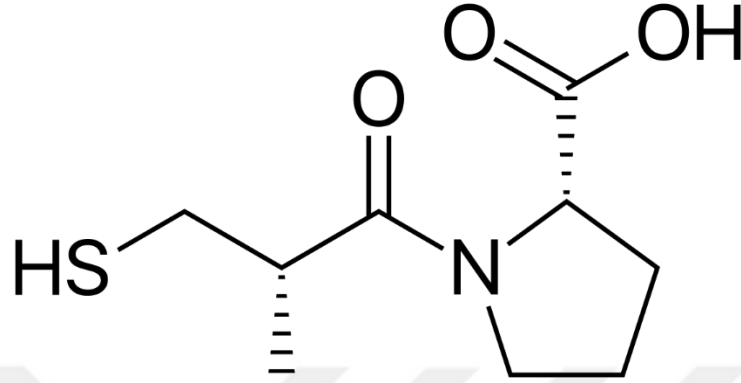
1.1.Kaptopril

Kaptopril, 1975 yıllarında Amerikan Squibb ilaç firmasında çalışan üç araştırmacı tarafından keşfedilmiştir. Araştırmacılar Miguel Ondetti, Bernard Rubin ve David Cushman tarafından geliştirilip 1977 de FDA'ya onaylatılıp, 1980 yılında ilk kez Capoten tablet halinde tedavide kullanılmaya başlanmıştır. Ayrıca tedaviye giren ilk oral anjiotensin dönüştürücü ADE (ACE) (Anjiotensin- dönüştürücü Enzim) inhibitörüdür[1].Fakat böbreklerimizin sentezlediği enzim olan renin, Anjiotensin I'in yapımında yer alır.

Anjiotensin dönüştürücü enzimleri (ACE), kardiyovasküler hastalıkların tedavi yöntemlerinde (kalp yetmezliği , hipertansiyon , koroner arter hastalıkları vb..) aktif olarak kullanılmaya başlanmıştır)İndikatörün etkin mekanizması belirlenmemektedir, ancak renin anjiotesin aldosteron sistemini inhibe ederek tepki gösterdiği tahmin edilmektedir. Renin, böbreklerimizde sentezlenen bir enzim türüdür. Kana karıştıktan sonra anjiotensin I 'in yapımında görev yapar. Ve anjiotensin I ADE tarafından anjiotensin II ye dönüşür. Anjiotensin II güçlü damarları daraltmaya yarayan bir madde olup, adrenal korteksteki aldosteron yapımında da görev olarak sodyum ile sıvı retansiyon (idrarda tutunmaya, idrar yapamamaya) sebep olur.

Kaptopril ADE indikatörü inhibe ederek anjiotensin I'in anjiotensin II' ye çevrilmesini engelleyerek koruma altına alır. Ağız yoluyla alınması nedeniyle hızlı bir şekilde emilimi gerçekleşir. Kaptopril alınmasıyla birlikte yaklaşık 1 saat sonra doruk plazma seviyesine ulaşmış olur. Biyolojik olarak yarılanma ömrü 2-5 saat civarındadır [2]. Yarı ömrü kısa olduğundan dolayı günde sadece 2 defa kullanılabilir. Yiyeceklerde

ağız yoluyla alındığından dolayı biyo yaralanmalarını %25-30 civarında azalttığı için yemeklerden yaklaşık olarak 1 saat önce temin edilmesi istenmektedir [3].



Şekil 1.1. Kaptopril molekülünün kimyasal yapısı

Kapropetil'in kimyasal yapısı Şekil 1.1'de verilmektedir. IUPAC adlandırmasına göre, (S)-1-(3-merkpto-2-metil-1-oksopropil)-L-prolin(2S)-1-(3-Merkpto-2-metilpropionil)-L-proli olarak bilinen molekülün kısaca D-2-Metil-3-merkptopropanoil-L-prolin olarak adlandırılabilir[4]. Kapalı formülü kısaca $C_5H_{15}NO_3$ olarak verilir ve yapısında elementel olarak % 49.75 C, % 6.96 H, % 6.45 N,% 22.9 O ve % 14.76 S bulunmaktadır. Molekül ağırlığı 217.29 g/mol dür [5].

1.1.1.Fizikokimyasal Özellikleri

Kaptopril kendine özgü beyaz rengi ve kristalize yapısıyla toz halindedir ve kükürte benzer. Suda, alkolde, kloroformda, metanol ve metil klorür gibi yapılarda serbest halde çözülebilir. Kaptopril molekülünün, pK_{a1} değeri:3.7 ve pK_{a2} değeri:9.8 dir. $\log P$ (oktanol-su partiyon katsayısı):0.34 ve erime noktası:105-108°C dir [6,7,8,9].

1.1.2.Kaptopril Teşhisi

Kaptopril molekülünün teşhisi için; erime noktası tayini, IR absorpsiyon spektrumu, kolorimetrik analiz ve kromatografik yöntemler kullanılabilir. Erime noktası tayininde, kuru kapiler tüpe 4-6 mm yüksekliğinde kolon oluşturulacak şekilde kaptopril koyularak erime sıcaklığı tayin aletine konulur. Maddede ki son partikülü'nün sıvı faza geçtiği sıcaklık bize erime derecesini göstermektedir. Kaptopril erime sıcaklığı 105-108 °C dir [10]. İnce tabaka kromatografi ile tayin yapılabilen kaptopril tabakayı kaplama materyalinde Silika jel GR kullanılarak hazırlanan test çözeltileri ve referans olan çözeltiler tabakaya baskı yapılarak sürüklenmeye bırakılır. Sürüklenme sonrası da test çözeltisinde lekeler oluşur. Oluşan bu lekeler pozisyon, renk ve boyut olarak referans çözeltideki lekelerle benzememektedir[11].

1.1.3.Farmakokinetik Özellikleri

Kaptopril ağız yoluyla alındığı için gastrointestinal sistemde %70 oranında emilim sağlar ve 15 dk içerisinde kan ölçümlerinde görülebilir. Gastrointestinal sistemde besin olduğu durumda emilim %3 azalmaktadır. İlaç vücuda alındıktan sonra 1-2 saat içerisinde etkisini göstermekte ve dolaşım esnasında %30 lük dilimi plazma proteinlerine bağlanarak vücutta dağılım hacmi 0.7 L/kg 'dır. Kaptopril vücudumuza kısa sürede yayılmasına rağmen sinir sistemi ve anne sütüne geçme olanağı oldukça düşüktür[12].

Emilimi sağlanan dozun %95'i idrar yoluyla dışarı atılır. Kaptoprilin kalan kısmı disülfit ve kaptopril-sistein disülfit olarak vücuttan atılır. İlacın etki süresi doza bağlı olarak genellikle 2 ile 8 saat için geçerlidir[13].Hipertansiyon tedavi yönteminde ilk olarak günde 2-3 kez 25 'mg verilir. Kaptopril tedavisinde ise idrar sökücü

(diüretikler) olarak kullanılmamanın yanı sıra günlük doz üç defa 50 mg'ı aşmamak gerekir[14].

1.1.4.Kaptoprilin endikasyonları ve kontrendikasyonları

Hipertansiyon başlangıcında, kalp yetmezliğinde, sol ventrikül disfonksiyonu gibi sonuçlar olabilir [15], kontredikasyonları ise kaptoprile duyarlı hastalarda böbrek yetmezliği olan ayrıca immun sistemi hastalıkları olan insanlarda kullanılırken çok dikkat edilmelidir.

1.1.5.Kaptoprilin ilaç etkileşimleri;

İçerisinde Nonsteroid antienflamatuvar bulunduran ilaç türleri indometazin ve estrogen, kaptoprilin antihipertansif etkilerini azaltarak, diüretikler, betablokerler, metildopa, kalsiyum antagonistleri gibi diğer antihipertansif ajanlarla bir arada kullanıldığında antihipertansif etki artışına dikkat edilmelidir.[16]

1.1.6.İlacın Türkiye'deki ve Dünyadaki satılan preparatları

- Kapril 25 mg tablet (Mustafa Nevzat İlaç San)
- Kaptoril 25 mg tablet (Deva) Lopril 12,5 mg tablet (Bristol Myers Squibb)
- Lopril 25 mg tablet (Bristol Myers Squibb)[17]
- ACE- Hemmer (RAN- Almanya)
- Acenorm (Alphapharm- Avustralya, Azupharma- Almanya)
- Capoten (Arikhin- Rusya) (Bristol Myers Squibb- Brezilya, İtalya, Portekiz, İspanya, Hollanda, Norveç, Yeni Zelanda, İsveç, İngiltere, Avustralya, Belçika, Şili, Çek Cumhuriyeti, Danimarka, Finlandiya, Yunanistan, Hong Kong, İrlanda, Rusya, Güney Afrika Cumhuriyeti, Singapur, Tayland, Malezya) (Par- ABD) (SquibbKanada)
- Capotena (Bristol Myers Squibb- Meksika)

- Capotril (Neo Quimica- Brezilya)
- Capti (Genpharm- İsrail)

1.2. Zenginleştirme yöntemleri

Geçmişten günümüze matriks örneklerinin analizinde hassas, duyarlı ve uygulanabilir halde olması oldukça önemli bir hale gelmiştir. Analiz etmede hassasiyeti yüksek cihazlar geliştirilmesine rağmen, cihazlar çoğu zaman matriks ortamının analizinde başarı sağlayamamıştır. Analiz edilecek türlerin derişimlerinin çok küçük olduğu durumlarda, eğer örnek matrikse birçok potansiyel girişimci tür içeriyorsa bu tür analizler oldukça zor hale gelir. Böle bir ortamda hedef türlerin duyarlı ve doğru analizlerini yapabilecek bir analitik yaklaşım geliştirilmesi oldukça önemli ve zordur. Bu sebeple bazı işlemler yapılarak matris ortamındaki analitleri ayırarak zenginleştirme yapılabilmelidir. Yapılacak olan bu işlemler genel olarak damıtma, katı yüzeye tutunma ve ekstraksiyon şeklinde olmalıdır[18].

Ekstraksiyon işlemlerinde genellikle sıvı-sıvı, katı-sıvı ve katı faz yöntemi kullanılmaktadır. Zenginleştirme yöntemlerinin amacı aslında büyük hacimli eser bileşenlerin küçük hacme düşürülmesi işlemidir.

Bu süreç zarfında örnekteki ilk maddelerin bir kısmının örnekten ayrılması ve örneğe yabancı maddelerin eklenmesi orijinal matriksi analiz için daha uygun bir şekle dönüştürür[19]. Ayırt etme işlemleri çoğu zaman, farklı iki faz oluşumu ve maddenin faz değiştirme şeklidir. Bu iki fazlardan birinde analiz edilecek madde diğer fazda ise bozucu etkiye sahip olan madde toplanır. Fiziksel yöntemlerle ayrılan bu iki fazdan girişimci maddenin derişimi tayin edilecek maddenin vereceği analize temelde ki tepkimelere zarar vermeyecek düzeye indirgenmiş olur[20]. En yaygın olarak kullanılan zenginleştirme yöntemleri elektrolit zenginleştirme, iyon değiştirme, adsorpsiyon ile zenginleştirme, birlikte çöktürme, uçuculaştırma ve ekstraksiyondur.

Ekstraksiyon yöntemlerinin değerlendirilmesinde en önemli değişkenler;

- Geri kazanım
- Zenginleştirme katsayısı
- Uygulanabilirliği
- Örnek miktarı gibi etkenler

Ekstraksiyon yöntemleri aşağıdaki gibi gösterilebilir [21].

- Sıvı-sıvı mikroekstraksiyonu
- Manyetik temelli katı faz ekstraksiyonu
- Katı faz mikroekstraksiyonu
- Birlikte çöktürme mikroekstraksiyonu
- Uçurma ile zenginleştirme
- Elektrolitik zenginleştirme
- İyon değiştiriciler ile zenginleştirme
- Bulutlanma noktası ekstraksiyonu

1.2.1.Katı faz ekstraksiyon yöntemi

Katı faz ekstraksiyon (SPE, SPME) yöntemi, matriksdeki bileşenleri ergitilmiş silika üzerine, polimerik kaplı fibere ekstrakte eden basit, duyarlı, sabit faz ile kaplı organik çözücüden bağımsız olan bir örnek hazırlama yöntemidir[22]. Polimerik adsorban ile kaplanmış ergitilmiş silika SPE enjektörünün üzerinde apolar ve polar özelliğe sahip olan fiber kaplamadan oluşmaktadır. SPE enjektörüne yapılacak olan analiz matriks yerleştirilir daha sonra piston aşağıya doğru itilerek fiber iğnenin ucundan çıkması için yardımcı olunur. Analitik bileşenlerin fibere adsorbe olması sağlandıktan sonra ekstraksiyon işlemi böylelikle tamamlanmış olur ve fiber tekrar geri çekilir. Böylelikle

örnek hazırlama yöntemlerine göre daha hızlı, avantajlı, hassas, uygulanabilirliği kolay, çözücü gereksinimine gerek duyulmayan bir yöntemdir.

1.2.2.Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu ile Zenginleştirme

Gerekli şartlara sahip olan çözücü içerisinde çözünmesi sağlanan kimyasal maddelerin başka bir sıvı faz içerisine aktarılmasıdır. Oldukça hızlı ve kolay olduğu için çok tercih edilen bir yöntemdir. Yöntemi iki farklı şekilde uygulayabiliriz. İlk yöntemde ana bileşen organik faza alınırken eser türler sulu fazda kalır. İkinci yöntem olarak ise eser türler şelatları ve ya iyon çifti kompleksleri halinde organik faza alınır. Genel olarak ikinci yöntem tercih edilir [23].

1.2.3. İyon Değiştirme Yöntemi

Bu yöntem ile suda çözünmeyen katı bir maddenin yapısında bulunan iyonları, temasta bulunduğu çözelti içindeki aynı cins yüklü (pozitif iyonların pozitifle, negatif iyonların negatifle) başka iyonlarla denge değiştirmesidir. Böylelikle kullanılan katı maddeler çözelti ortamın da çözülmeye yatkındır. Ayrıca bu maddeler doğal, yapay, organik ve inorganik olabilirler.

İnorganik olanlar; killer ve zeolitlerdir.

Organik olanlar; reçinelerdir (Polimerik bileşikler).

1.2.4. Birlikte çöktürme mikro-ekstraksiyonu

Bu yöntemde temel amaç, organik ve inorganik yapıları türlerin yüzey alanı oldukça büyük bir çökelek oluşturup, oluşan bu çökelek üzerine hedef türün tutunmasına olanak sağlamaktır. İnorganik çökelek olarak genellikle şelat kompleksleri kullanılır [24].

Örnek olarak hazırlanan çözeltiye süzme ve santrifüjle kolayca ayrılabilir miktarda çökelek oluşmasını sağlayacak şekilde çöktürücü reaktiften eklenmelidir. Çöktürücü reaktifimizin suda zor çözünen apolar tür metal şelatları oluşturan organik yapıya sahip çöktürücüler kullanılmalıdır[25].

Bu amaçla kullanılacak ideal bir çökelekte aranan özellikler;

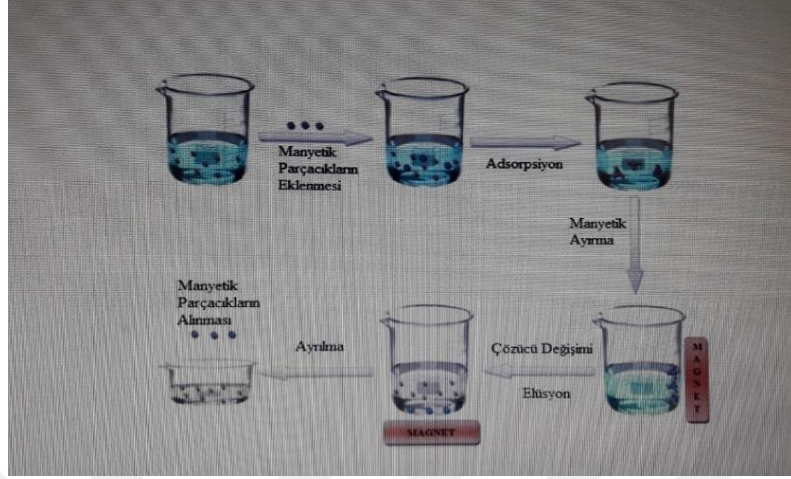
- Çökeleğin çözeltilerden kolay ayrılması,
- Hedef türlerin kolay ayrılması ve tutunmanın seçimli olması,
- Çözünürlük çarpımının küçük olması

1.2.5. Manyetik temelli katı faz ekstraksiyonu (MSPE)

Son zamanlarda manyetik yapıya sahip adsorban madde kullanımına dayalı olarak katı faz ekstraksiyon yöntemine başlanmıştır.1973 yılında Robinson ve arkadaşları tarafından keşfedilmiştir.(MSPE) Safarikova ve Safarik tarafından 1999 yılında Analitik ölçümlerde de kullanılmaya başlanmıştır[26].

Çözeltimizin içerisinde manyetik partikül bulunan ve genellikle Fe_3O_4 ve türevlerini içermektedir. Ortamda ki uygun bulunan fonksiyonel gruplar polimerizasyon ile hareketsiz hale getirilerek analitler manyetik partiküllerin yüzeyine adsorbe edilir. Son olarak manyetik alan (mıknatıs)ile sulu çözeltilerden ayrılır. Eğer matriks çözeltimiz birden fazla ise yöntem tercih edilmemelidir. Katı faz ekstraksiyona göre manyetik partiküller'in uygulanması daha kolay ve basittir. Manyetik temelli katı faz ekstraksiyonunda dolgu maddesine ve doldurulan bir kolona ihtiyaç bulunmamaktadır. Matriks çözeltinin içerisinde bulunan hedef analit ile diğer bileşenlerin ayrımı hariç, manyetik alan yani mıknatıs ile uygulanabilirliği hızlı ve kolay bir şekilde uygulanmaktadır. Manyetik alan kullanımı ile madde yüzeyinde adsorbe edilen analitlerin ayrılması kolaylaşır, organik çözücülerin kullanımı azaltılıp, toksit ve

tehlikeli atıkların oluşumu minimum seviyeye getirilebilir[27]. Manyetik katı faz ekstraksiyonunun uygulaması Şekil 1.2’de görülmektedir.



Şekil1.2. Manyetik katı faz ekstraksiyon yöntemi[28]

1.2.6. Bulutlanma noktası mikroekstraksiyonu (CPE)

Hiroto Watanabe ve arkadaşları tarafından 1976 yılında keşfedilmiştir. Ve böylelikle analitik kimyacılar tarafından çokça kullanılmaya başlanmıştır. Son yıllarda en çok metal iyonlarının zenginleştirilmesi ve matriksten ayrılması amacıyla kullanılarak, 2000’li yıllardan sonra hızla gelişmeye başlamıştır[29].

Bu yöntem mikroekstraksiyonu noniyonik surfaktanın sıcaklık artışına bağlı olarak çözünürlüğünü kaybederek bulutlanmasıdır. Bulutlanma sıcaklığında oluşan fazın ayırımında, ortamda yer alan organik yapılar surfaktanca zengin olan fazın içerisinde kararlı hale gelirler. Faz ayırımında surfaktanca zengin miktarda olan hedef tür-ligand kompleksi ile birlikte ayrılırlar. Temel olarak ayrılması gereken analitin ortamdaki organik karakterli yapıları surfaktanca fazla faz içerisinde kararlı hale gelmektedir. Faz ayırımı gerçekleştiğinde surfaktanca fazla olan faz hedef tür-ligand kompleksi ile birlikte ayrılır.

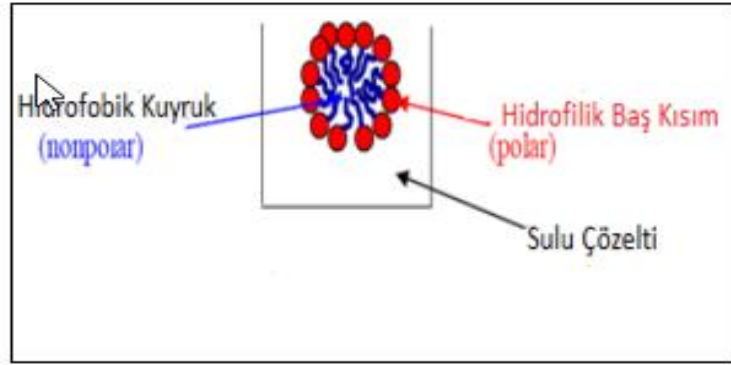
Temel amaç ortamdan ayrılması beklenen analitin ortamda ki sulu çözeltisinde hidrofobik moleküllerinin oluşmasından sonra yüzey aktif maddelerin hidrofilik (suyu seven) ve hidrofobik(suyu sevmeyen yapıların uç özelliklerini kullanarak miseller oluşturmasıdır. Bulutlanma sıcaklığı olarak adlandırılan sıcaklığa kadar ısıtıldığında bulanıklaşması ile ortaya çıkan iki ayrı fazdan biri surfaktan bakımından zengin olup, diğer fazın ise hacimce daha fazla olan suludur. Oluşan fazların daha kolay ayrılması için santrifüj uygulanarak birkaç dakika buz banyosunda bekletilmelidir[30].

Sulu faz bir enjektör yardımıyla ayrılarak surfaktan bakından zengin olan fazımız uygun bir çözücü yardımı ile seyreltilerek uygun duruma getirilir ve cihazda okumaya bırakılır.

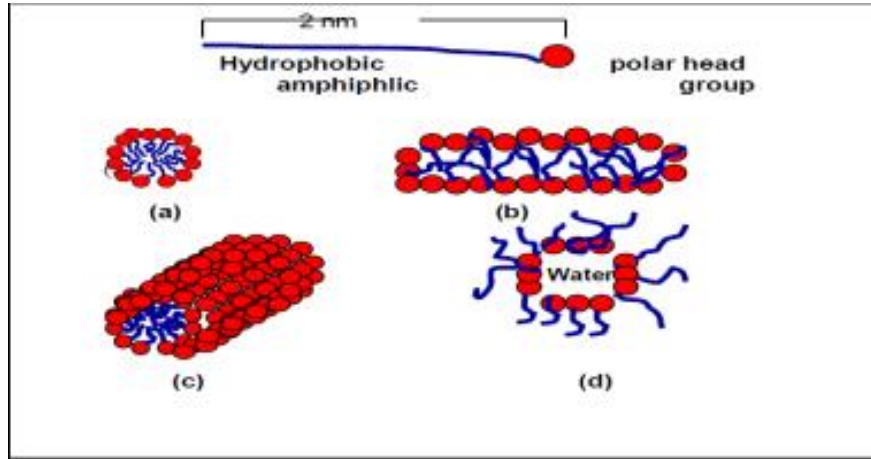
Bulutlanma noktası ekstraksiyonun belirgin özellikleri; basit, çevreci bir yöntem oluşu, yüksek zenginleştirme faktörü, birçok tayin yöntemine uyumlu olması, düşük maliyet sahip olması gibi sıralama yapılabilir. Ortamda bulunan surfaktanlar iki ana kısımda oluşmaktadır. Hidrofilik baş kısmı ve hidrofobik uç kısmı olmak üzere iki 'ye ayrılır. Amfifilik özelliğe sahip olmasından dolayı su ve organik çözücülerde çözünebilir. Polar uçları hidrojen bağı yaparak, apolar uçları ise hidrokarbon zincirlerini oluşturmaktadırlar. Surfaktanlar sulu çözeltilerinde polar kısmı dışarda ve hidrokarbon kuyruk kısmı içerde kalacak şekilde misel adı verilen küresel yapılar oluşmaktadır. Oluşan bu yapılar küresel, silindirik, çift tabakalı ve elipsoidik şekillere sahip olabilir. Genel olarak misellerin yapıları; surfaktan molekülünün geometrisine, derişimine, sıcaklığına, ph ve iyonik şiddet gibi koşullara bağlıdır. Ortamda bulunan surfaktanlar iki ana kısımda oluşmaktadır. Hidrofilik baş kısmı ve hidrofobik uç kısmı olmak üzere iki 'ye ayrılır. Amfifilik özelliğe sahip olmasından dolayı su ve organik çözücülerde çözünebilir. Polar uçları hidrojen bağı yaparak, apolar uçları ise hidrokarbon zincirlerini oluşturmaktadırlar. Surfaktanlar sulu çözeltilerinde polar kısmı dışarda ve

hidrokarbon kuyruk kısmı içerde kalacak şekilde misel adı verilen küresel yapılar oluşmaktadır. Oluşan bu yapılar küresel, silindirik, çift tabakalı ve elipsoidal şekillere sahip olabilir.

Genel olarak misellerin yapıları; surfaktan molekülünün geometrisine, derişimine, sıcaklığına, pH ve iyonik şiddet gibi koşullara bağlıdır.



Şekil.1.3. Misel oluşumun gösterimi



Şekil 1.4. Farklı yapıda oluşan miseller[31]

1.2.6.1.CPE yönteminin uygulanışı

CPE ekstraksiyonu hormonların, enzimlerin, proteinlerin ayrılması, organik kirlenmelerin ve metallerin zenginleştirilmesi ayrıca tayin yöntemi için

uygulanmaktadır[32]. Noniyonik surfaktan çözeltilisine bulutlanma noktası (BN) kritik sıcaklığın üzerine ısıtılma yapıldığında çözelti iki faz ayrılır.

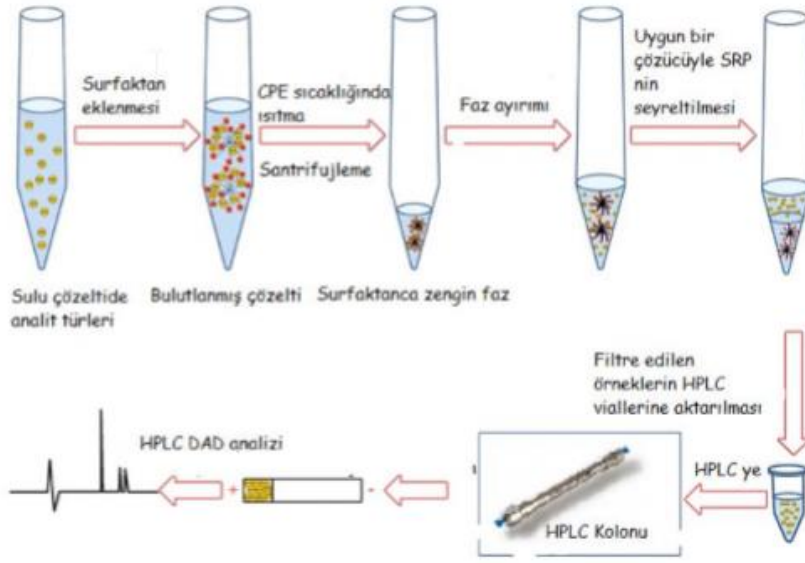
Ayrılan fazlardan birinin hacmi küçük surfaktanca zengin faz, ikinci faz ise surfaktan derişiminin kritik misel değişimine eşit olduğu büyük hacimlerde sulu fazdır. Ayırma aşamasında surfaktanlar misellerinin bulutlanma noktası olarak tanımlanan sıcaklığa kadar ısıtıldığında çözeltilinin bulanıklaşmasıdır[33]. Organik bileşikler ile hidrofobik ligandlar bir araya gelerek metal iyonları misellerin hidrofobik kısımları ile etkileşir. Böylelikle bulutlanma noktası hidrofobik yapıya sahip metal-ligant bileşiğın küçük hacimdeki surfaktanca zengin fazda toplanır. Yapılan bütün işlemler her ne kadar sıvı-sıvı ekstraksiyon işlemine benzesede tek fark, organik fazın homojen bir çözeltilinin daha sonrada heterojen bir karışıma çevrilmesiyle sulu fazın içinde üretilmesidir[34].

Bulutlanma noktası ekstraksiyonunda verimi artırmak oluşacak bağlara bağlıdır. Oluşan bağ kuvvetli ise ortamda ki surfaktanca zengin faz içerisine alınan madde miktarının artmasıyla verimde de artma gerçekleşir. Özütleme verimi ayrıca eklenen tuz miktarına, türüne, bulunduğu ortamın sıcaklığına, kompleksleştirici türüne, ortamın pH'ına ve eklenen bileşenlere göre değişiklik sağlamaktadır. İşlemimizin kısa sürede gerçekleşmesi için santrifüj edilmelidir.

1.2.6.2. CPE'nin deneysel aşamalar

Bulutlanma noktası ekstraksiyonu, kritik misel derişiminin üstündeki non-iyonik bir surfaktan çözeltilisinin belli bir sıcaklığa kadar ısıtıldığında önce çözeltilinin bulanması, sonra iki farklı faza ayrılmasıyla gerçekleşir. Bu faz ayrılması anyonik surfaktanlarda ise yüksek asidik derişimlerde olur[35]. Ekstraksiyon işleminin ilk evreleri ya hedef türlerini organik yapılarına bağlı olarak doğrudan ya da uygun bir reaktif ile tercihen hidrofobik kompleksleri oluşturularak surfaktan faza geçişi sağlanılır. Moleküllerin yüksek verimde hidrofobik faza geçebilmesi için ortamın pH 'inin kontrol edilmesi

gerekir. Oluşan kompleks sonucu ortama surfaktan eklenir. Eğer gerekiyorsa ortama ikinci bir surfaktan ve faz ayrımı için gerekli olan elektrolit eklenebilir. Daha sonra ki aşamada kullanılan su banyosu örneklerin sıcaklığı bulutlanma noktası sıcaklığına yükseltilir. Bulutlanma gerçekleştikten sonra santrifüj yardımıyla faz ayrımı yapılır[36]. Yöntemin uygulanışı Şekil 1.5 de görülmektedir.



Şekil.1.5. CPE işleminin şematik gösterim

1.2.6.3.CPE yönteminin avantajları

- Yöntemin uygulandığı çalışmalarda yüksek verim elde edilmesini sağlamaktadır.
- Yüzey aktif maddelerin biyolojik, gıda ve çevresel örneklere kolaylıkla uygulanabilmesi,
- Maliyetinin düşük olması,
- Çevre dostu olması.
- Yöntem uygulanırken harcanan zamanın göreceli olarak az olmasıdır,
- İşlemin uygulanışı basittir

1.2.6.4.CPE yönteminin dezavantajları

- Yapılacak olan çalışmada en uygun şartlar, geniş, kapsamlı bir araştırma yapılmadan deneye devam edilirse, istediğimiz sonuç elde edilmeyebilir. Çünkü CPE birçok parametreye bağlı olarak gerçekleşen çok duyarlı bir yöntemdir.
- Çalışma esnasında santrifüj işleminde sıcaklık değerlerinde düşme olmakta ve ekstraksiyon veriminde azalma gözlenebilmektedir.
- Verim kaybının engellemek için bulutlanma noktası sıcaklığı düşük olan surfaktan seçilmesi gerekir.
- CPE ekstraksiyonu metodunda faz ayırımının ardından viskozitesi yüksek olan yüzey aktif maddece zengin fazın ölçümü başka bir sorun oluşturmaktadır. Bu sorun değişik çözücü sistemleri ile ya da mikro dalga çözücü sistemleri ile çözüme kavuşturulmaktadır[38].

1.3.Kromatografik Ayırma Yöntemleri

Kromatografi, Örnek içerisinde ki maddelerin, hareketli, sabit iki faz arasında yayılımlarına bağlı olarak, farklı zaman diliminde ortamı terk etmeleri esasına dayanan kalitatif ve kantitatif analiz yapılmasını sağlayan yöntemlerin bir bütünüdür[39].

1.3.1.Kromatografide Kullanılan Bazı Kavramlar

Sabit(Durgun faz, durgun faz, stasyoner faz): Mobil(hareketli) faz içerisine gelen örneğe ait bileşenlerin etkileşmesi ve belirli bir zaman alıkondukları fazdır.

Hareketli faz(sürükleyici faz, mobil faz) :Sabit fazın arasından ve üzerinden geçiyorsa bu faza hareketli faz denir Hareketli fazda daima 'sıvı' veya gazdan oluşmaktadır.

Dağılma sabitleri: Kolonların farklı türleri ayırma gücü, türlerin kolon içerisinde hareketi ve hızlarının oranına bağlıdır. Örnek bileşenler kolondan geçtiğinde sabit ve hareketli faz arasında dağılma farklı oranlardadır. Her bir bileşenlerin kolon içerisinde sabit ve hareketli faz arasındaki dengeyi meydana getirir.

Alıkonma zamanı: Hareketli fazdan gelen, örnek bileşenlerin sabit faz ile etkileşime girerek belirli oranda yavaşlatılmasıyla, sabit faz içerisinde tutulmasını sağlamak, sabit fazı daha uzun sürede terk etmesidir. Alıkonma zamanına göre tayin yapılır.

Alıkonma Faktörü: Sabit fazda ki madde miktarının mobil fazda ki madde miktarına oranlanmasıdır. 'k' ile gösterilir.

Bant Genişliği: Kromatogramdaki her bandın biri bir bileşene aittir. Bu bantlar çoğunlukla üçgen ve simetrik görünüme sahiptir. Üçgen bant zemin çizgisi üzerinde ki taban uzunluğu bant genişliğini ifade ederken, bu genişlik mobil faz içerisinde ki(hareketli faz)bileşenin detektöre girdiği an ve detektörden çıktığı an arasında ki zaman farkıdır.

Elüsyon: Kolon içerisinden sürekli taze çözücü geçirilmesi ve örnek bileşenlerin sabit faz üzerinde yıkanarak taşınmaları işlemidir.

Elüent: Elüsyon amacı ile kullanılan ve hareketli fazı oluşturan taze çözücüye denir.

1.3.2. Kromatografinin Sınıflandırılması

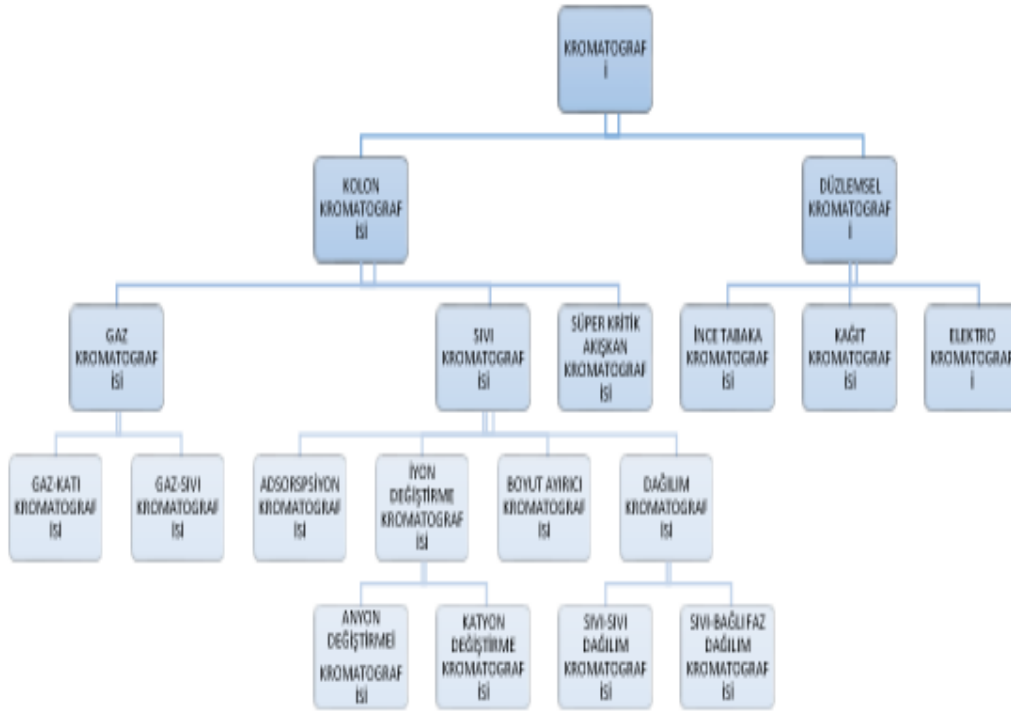
Günümüzde onlarca temel kromatografik yöntemlere nazaran hemen her gün yeni bir katılımlarla Kromatografik yöntemlerin sayısı artmıştır. Her ne kadar farklı yöntemlerde olsa kromatografi kısacası, sabit ve hareketli fazların arasında ki yarış olarak özetlenebilir. Sonuç olarak var olan bu yarışta sabit faza konulan karışım üzerinden hareketli(mobil)faza geçişi yapılırken iki faz ile farklı şekil, miktar, fiziksel

ve kimyasal etkileşimlere girerler. Böylelikle karışımdaki bileşenler, hareketli(mobil) faz tarafından sürüklenerek, diğer bir yandan sabit faz tarafından tutulmaya çalışır. Bu şekilde karışımdaki bileşenler sabit faz farklı sürelerde terk ederek birbirinden ayrılmış olurlar[40].

Kromatografinin sınıflandırılmasını çeşitli şekilde olabilir. Bu sınıflandırmalar;

- a) Kromatografik ortamın fiziksel şekline göre,
- b) Örneğin kromatografik ortama verilmiş biçimine göre,
- c) Kromatografik ayırma mekanizmasına göre,
- d) İki fazın polarlık durumlarına göre,
- e) İki fazın fiziksel haline göre, yapılabilir. Bu sınıflandırmaya temel teşkil bir

diyagram Şekil 1.6'da verilmektedir [41].



Şekil.1.6. Kromatografik Yöntemlerin Sınıflandırılması

1.4.1.Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

HPLC (High Performance Liquid Chromatography) çoğu alandaki analizlerde ayırmada tercih edilen yöntemdir. HPLC ile analiz edilecek madde miktarı nano gram hatta piko seviyelerine kadar değişebilir. Yöntem uçucu bileşikler ve türevleri, basit bir filtreleme sonrasında sulu örnekler doğrudan analiz edilir. Genel olarak termal kararlılığı düşük bileşiklere uygulanmaktadır[42].

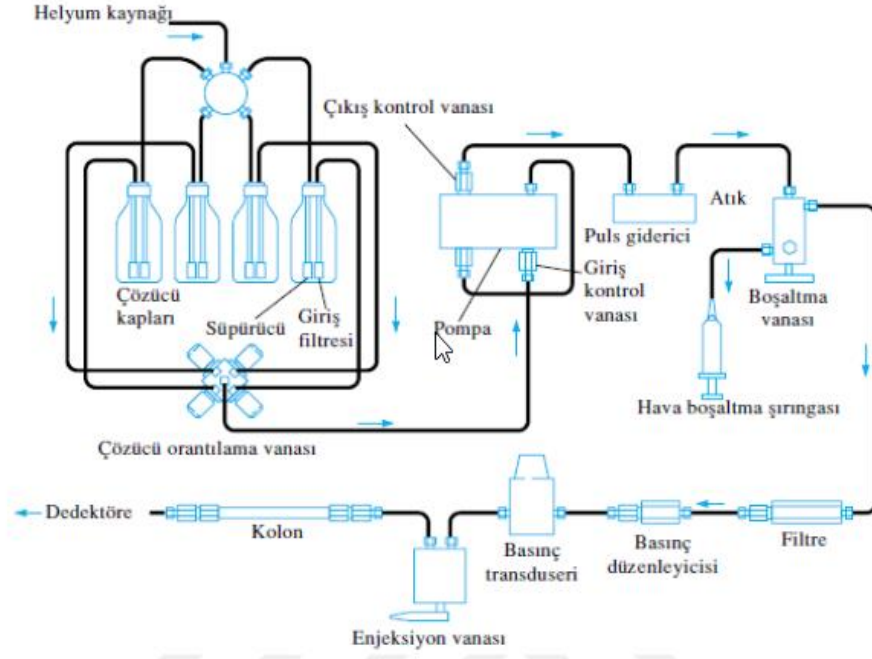
HPLC metodunun uygulamaları genel olarak, fizyolojik örneklerdeki amino asitler, farmosötik dozaj şeklindeki ilaçlar, sentetik yan ürünler veya bozulma ürünleri düzeylerinin ölçülmesi, karışımdaki bileşenlerin saflaştırılması, polimerlerin ayrılması ve molekül ağırlıklarının tayinleridir[43].

HPLC kromatografisi genel olarak birbirini destekleyen ve tamamlayan ayırma metotlarını içerir. Bu metotlar;

- Dağılma (sıvı-sıvı) kromatografisi
- İyon değiştirme kromatografisi
- Boyut eleme (jel filtrasyon) kromatografisi
- Adsorpsiyon (sıvı-katı) kromatografisidir.

1.4.1.2. HPLC cihazı

Sıvı kromatografisi sisteminde ki tanecik boyutları 2-10 µm bulunan dolgu maddeleri ile doldurulmuş olan kolonlarda uygun sıvı akış hızları elde etmek için çok fazla basınç ve bunu sağlayabilecek pompaya ihtiyaç vardır. Yüksek basınç uygulanmasını sağlayan pompa sistemleri diğer ekipmanlara göre pahalı ve karmaşık bir yapıya sahiptir[44]. HPLC cihazının temel kısımları Şekil 1.7’de verilmektedir.



Şekil.1.7.HPLC Cihazının Temel Bölümleri [45]

Hareketli faz bölmeleri; mümkün olduğu kadar etkin hızlı bir şekilde karışımı ayırmak için, hareketli faz kendine uygun sabit bir fazla etkileşime girmelidir. Hareketli faz seçilirken bazı kriterlere göre ön çalışmalar yapılır. Bunlar; UV geçirgenlik, kırılma indisi, kaynama noktası, saflık, örnek çözelti bileşenlerine karşı inertlik, korozyon direnci, viskozite, toksisite ve maliyettir. Tercihen mobil faz dedektör aktif olmamalıdır. Aksi takdirde istenmeyen zemin etkileri, ekstra pikler kromatogram da gözlemlenebilir[46].

Pompa Sistemleri, pompalarda bulunmasını istenilen en önemli özellik kararlı akış hızıdır. HPLC sistemindeki pompalar; hareketli fazı oluşturan çözücü karışımlarının kolon ve dedektör içerisinde sabit ve değişen hızlarda, belirli basınç altında geçişini sağlamaktır. HPLC de üç tip pompa kullanılmaktadır. Bunlar; pistonlu pompalar, şırınga tipi pompalar ve sabit basınçlı pompalardır[47].

Numune Enjeksiyon Sistemleri; en yaygın kullanılan yöntem numunenin kolona lup ile enjeksiyon edilmesidir. Sıvı kromatografi cihazları genel olarak 5 -500 µl'lik

numune enjeksiyonuna uygun olarak üretilmektedir. Kullanılan sıvı kromatografisinde dedektör'ün hassasiyeti, kolon kapasitesi, kromatografi cihazının türü(yüksek performanslı- ultra performanslı sıvı kromatografi) , çözücünün numuneye ait pik şekli üzerindeki etkisi gibi çok fazla etkenler, numune enjeksiyon hacminin belirlenmesinde dikkat edilmesi gereken yerlerdir[48].

Kolonlar, HPLC 'nin sisteminin ayrılma mekanizmasını oluşturan en önemli husustur. Kolonda gerçekleşen ayırma dolgu maddesinin verimliliğini etkileyen değişkenler ise kolon dolgu maddesinin fiziksel özellikler, parçacık boyutu ve kolon uzunluğudur[49]

Dedektörler, Sıvı kromatografi dedektörleri iki şekli vardır. Yığın özelliği dedektörleri, hareketli fazın kırılma indisi, dielektrik sabiti veya yoğunluğu gibi, analit tarafından değiştirilen yığın özelliklerine yanıt veren dedektörlerdir. Analit özelliği dedektörleri ise analitin UV absorbansı, floresans şiddeti veya difüzyon akımı gibi hareketli fazın sahip olmadığı bazı özelliklerine yanıt veren dedektörlerdir.

HPLC'de en sık kullanılan dedektörler şunlardır:

- Kütle spektroskopisi dedektörleri
- Floresans dedektörleri
- Kırılma indisi dedektörleri
- Elektrokimyasal dedektörleri
- İletkenlik dedektörleri

MATERYAL VE YÖNTEM

2.1.Kullanılan Reaktifler

Yapılan deneysel çalışmalar sırasında kullanılan reaktiflerin hepsi analitik saflıkta olup Merck ve Sigma firmalarından satın alınmıştır ayrıca kullanılan çözeltilerin hepsi MES Milipure DeskUp cihazından elde edilen ve iletkenliği 5 $\mu\text{S}/\text{cm}$ nin altında olan ultra saf su ile hazırlanmıştır.

- **pH 2.0-10.0 Britton Robinson (BR) Tamponu:** 2.470 g borik asit, 2.700 mL fosforik asit ve 2.300 mL asetik asit karıştırılıp su ile çözüldükten sonra toplam hacim bir litreye tamamlanmış ve 0.200M NaOH kullanılarak istenilen pH'a ayarlanmıştır.
- **%20 (a/h) lik PEG6000 (Poli etilen glikol) Çözeltisi:** Yüksek saflıktaki kimyasaldan 20.0 g tartılarak çözüldükten sonra su ile 100 mL'ye tamamlandı ve karanlık ortamda saklandı.
- **%20 (a/h) lik PEG8000 (Poli etilen glikol) Çözeltisi:** Yüksek saflıktaki kimyasaldan 20.0 g tartılarak çözüldükten sonra su ile 100 mL'ye tamamlandı ve karanlık ortamda saklandı.
- **% 20 (a/h) lik Na₂SO₄ stok Çözeltisi:** Analitik saflıktaki sodyum sülfattan 50 g tartılarak beherde bir miktar su yardımıyla ısıtarak çözülüp daha sonra balon jöjeye alınarak ve saf su ile hacmi 250.00 mL'ye tamamlandı.
- **%50'lik Metil alkol Stok Çözeltisi:** Mezür yardımı ile 50 ml metil alkol ve 50 ml saf sudan alınır ve cam şişeye aktarılır.
- **1000 ppm 100 ml Kaptopril:** 50 mg Kaptopril tartılıp üzerine 50 ml metil alkol eklenerek çözünme işlemi tamamlandı.
- **Sentetik İdrar Çözeltisi:** 6.25 g üre, 0.27 g CaCl₂.2H₂O, 0.25 g NH₃Cl, 0.4 g KCl, 0.35 g Na₂SO₄, 0.35 g KH₂PO₄, 0.73 g NaCl tartılarak bir miktar distile suda çözülüp hacmi balon jöjede 250 mL 'ye tamamlandı. Daha sonra çözeltinin pH'ı 0.1 M HCl ve NaOH çözeltileriyle pH'ı 6 ' ya ayarlandı ve amber renkli şişeye aktarıldı.

2.2. Kullanılan Cihazlar

Bütün Kromatografik ölçümlerde Shimadzu (Prominence) HPLC (Kyoto, Japan) cihazı kullanılmıştır. Kullanılan HPLC cihazı; LC 20 AD kuaterner pompa, SPD-M20 A PDA dedektör, DGU-20A vakum gaz giderici ve CTO10 AS VP kolon fırını donanımlarına sahiptir ve yapılan bütün ayırma ve tayinler ters faz C18 kolonu (Inertsil ODS-3, 250 mm × 4,6 mm, 5 µm) üzerinden, kromotogramların değerlendirilmesi ise LC Solution 2,0 yazılımı üzerinde gerçekleştirilmiştir.

- pH metre (Mettler Toledo S220-K Seven Compact, UK)
- Santrifüj (Universal-320, Hettich Centrifuges, DJB Labcare Ltd. Newport Pagnell, Buckinghamshire, England).
- Vorteks (Jeotech, Korea)
- Ultrasonik Su Banyosu (Kudos, China)
- Sıcak Su Banyosu (Mikrotest, Türkiye)

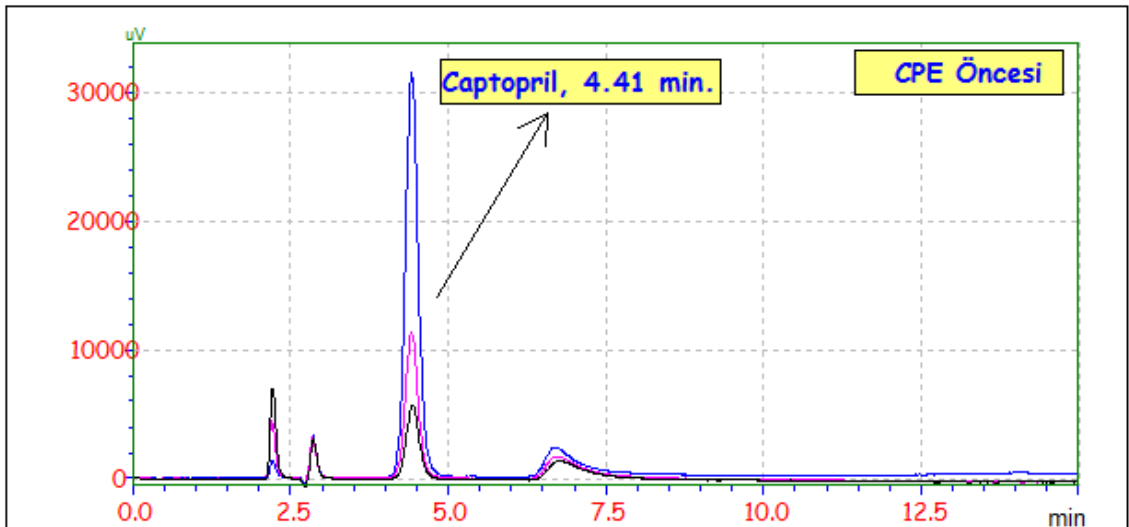
2. 3. Kaptopril için Doğrudan Tayin Koşulları

Zenginleştirme deneyleri öncesinde HPLC cihazı üzerinden hazırlanan standart çözeltiler kullanılarak doğrudan tayin koşulları optimize edildi. Luna OMEGA C-18 kolonu kullanılarak yürütücü faz bileşimini belirlemek üzere, etanol, metanol, çeşitli pH larda tampon çözeltiler ve asetonitril gibi organik eluentler ile hem izokratik hem de gradient modda analizler yapıldı. Yapılan deneyler sonucunda en ideal yürütme koşulu % 70 lik metil alkol çözeltisinin pH sınırının %10'luk H₃PO₄ ile pH 3 ayarlanması ile oluşan çözelti ile elde edildi.

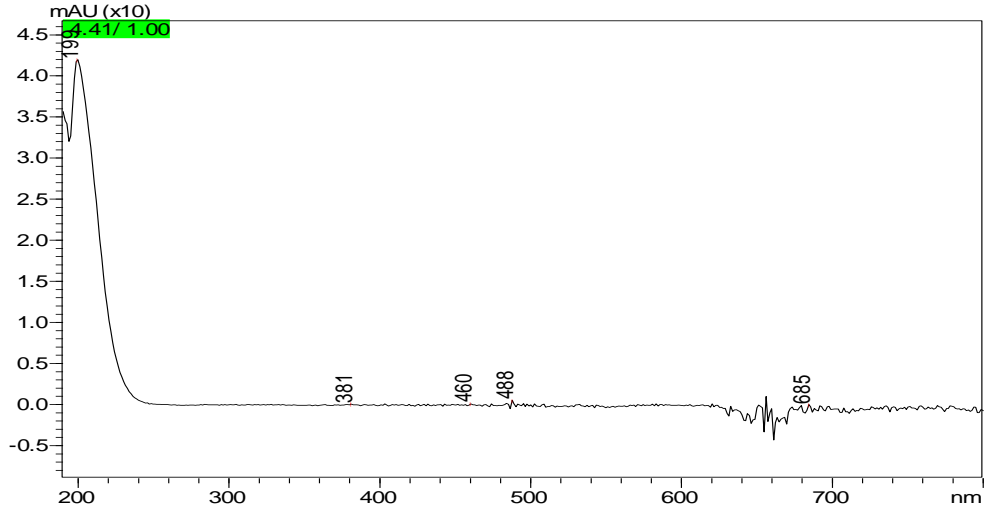
Çizelge 2.1 HPLC çalışma koşulları

Parametre	Değer
HPLC Modu	İzokratik
Eluent	% 70 Metil Alkol pH'ı 3. 0'e ayarlanmış
Eluent Akış Hızı	1 mL/dk
Yürütme Süresi	15 dk
Kolon	C18- Luna Omega (250 mm×4.6 5.0 µm)
Kolon Sıcaklığı	30 ° C
Enjeksiyon Hacmi	10 µL
Sistem Basıncı (yaklaşık)	120 bar

Yapılan deneyler sonucunda elde edilen ideal HPLC çalışma koşulları Çizelge 2.1 de verilmiştir. Stok Kaptopril standart çözeltisi kullanılarak 1-2-5-10 ve 20 ppm kalibrasyon çözeltileri hazırlandı ve optimize edilmiş koşullarda her bir standartın 3 tekrarlı olacak şekilde pik alanları okutuldu. Bu işlem sırasında artan standart derişimi ile orantılı pik alanı artışını gösteren kromatogram Şekil 2.1'de verilmiştir.



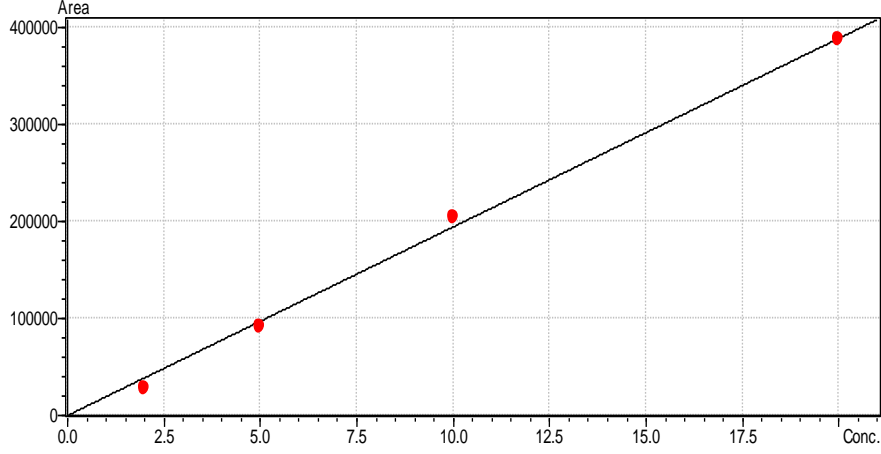
Şekil 2.1. Kaptopril için CPE öncesi elde edilen kromatogram



Şekil 2.2. Kaptopril için DAD dedektörde elde edilen UV-VIS Spektrumu

Kromatogramda görülen pikin kaptoprile ait olduğunun doğrulanması için, literatür verileri ve DAD dedektör üzerinden alınan bu pike ait UV-VIS spektrum kıyaslandı. Şekil 2.2’de görüldüğü gibi spektrumda kaptopril türünün maksimum soğurum dalga boyu 199 nm’de olarak görülse de, HPLC cihazındaki tayinler girişimci türlerden daha az etkilenmek ve daha düzgün bir zemin sinyali elde etmek adına 220 nm de yapılmıştır.

Hazırlanan kalibrasyon standartları ile derişe karşı pik alanı dikkate alınarak oluşturulan kalibrasyon eğrisi Şekil 2.3 deki gibidir. Ayrıca bu deneylerden elde edilen kalibrasyon verileri Çizelge 2.2.’de verilmiştir.



Şekil 2.3. Doğrudan tayin için kalibrasyon grafiği

Çizelge 2.2 HPLC ile doğrudan tayin sonuçları

Parametre	Kaptopril
Alıkonma Süresi, dk	4.41
Maksimum Soğurum λ 'ları	220 nm
Kalibrasyon Aralığı	1.0-20.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$
Tayin Sınırları	0.32 $\mu\text{g mL}^{-1}$
% BSS	4.72
R ²	0.9986
Tekrar sayısı	3

2.4 Önerilen Yöntem

Eser düzeydeki kaptopril moleküllerinin CPE yöntemi ile zenginleştirilmesini öngören deneysel işlemlerde, kullanılan surfaktanların türü ve miktarı, elektrolit etkisi, pH, sıcaklık, surfaktanca zengin faz için uygun çözücü seçimi gibi deneysel değişkenlerin hepsi tek tek çalışılmış ve optimize edilmiştir. Bu işlemin sonunda önerilen yöntemde; 1.0 mL kaptopril içeren model çözelti üzerine, pH 3.00 BR tamponundan 2 mL, non iyonik surfaktanlar PEG6000 veya PEG 8000'in % 20'lik

çözeltilerinden 1.0 mL, ve son olarak % 20 lik sodyum sülfat çözeltisinden 10.0 mL eklenmiş ve falkon tüpünün hacmi 15.0 mL ye tamamlanmıştır. Daha sonra 50 C'ye getirilmiş su banyosunda 20 dk bekletilen örnekler, bulanık çözelti oluşumundan sonra 4000 rpm de 5 dk santrifujlenmiş ve bu sayede surfaktanca zengin faz (SRP) ayrılmıştır. Bu işlemin sonunda yoğunluğu daha az olan surfaktanca zengin faz tüpün üst kısmında toplanmış, alt kısımda yer alan sulu faz ise bir enjektör yardımıyla kolayca ortamdan çekilmiştir. Sulu faz ayrıldıktan sonra SRP üzerine 400 ACN eklenerek seyreltilmiş ve 0.45 µm lik enjektör ucu filtre ile süzülerek HPLC viallerine aktarılmıştır. Zenginleştirilmiş örneklerin kaptopril içerikleri HPLC cihazı ile tayin edildi.

DENEYSEL ÇALIŞMALAR ve TARTIŞMA

3.1 Deneysel Çalışmaların Temel Yaklaşımı

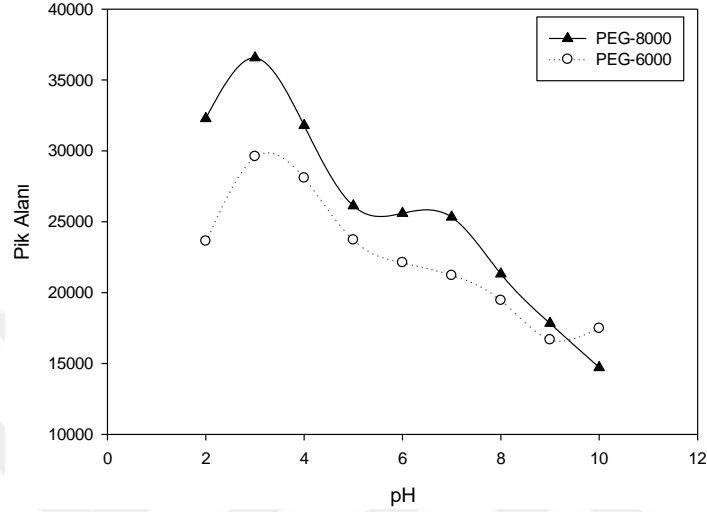
Önerilen tez çalışması ile gerçek örneklerde eser düzeyde bulunan ve hem miktarlarının azlığı hem de matriks bileşenlerin etkisiyle doğrudan tayini zor olan bir antihipertansif ilaç türü olan kaptopril molekülünün duyarlı tayini için, bulutlanma noktası ekstraksiyonu temelli bir zenginleştirme işlemi takiben HPLC-DAD sistemi analiz içeren bir analitik yöntem geliştirilmiştir. CPE deneylerinde hedef moleküllerinin zenginleştirildikleri ortam çoğunlukla noniyonik bir surfaktan varlığında oluşan misellerdir. Misel oluşumu için hem surfaktan derişimi hem de çözelti sıcaklığı yeterli bir seviyede olmalıdır. Non iyonik surfaktanların pek çoğu ile ön denemeler yapıldı ancak, çoğunda belirgin faz ayrımı gözlenirse bile HPLC sistemi üzerinden yapılacak tayinlerde net kromatogramlar gözlenemedi. Çünkü pek çok noniyonik surfaktan UV bölgede güçlü absorbans sinyaline sahiptir. Yapılan ön denemelerde sadece polietilen glikol serisi iki surfaktan olan PEG 6000 ve PEG 8000 ile olumlu sinyaller alındığı gözlemlendiğinden çalışmalara her iki surfaktan ile karşılaştırmalı olarak devam edildi ve optimizasyonlar her ikisi için de tekrar edildi.

3.2. Bulutlanma Noktası Ekstraksiyonu Yöntemi

3.2.1. pH etkisi

CPE deneyi üzerine etki eden temel faktörlerden biri ortamın pH değeridir. Çünkü hedef moleküllerin ortamdaki formları, surfaktan moleküllerinin oluşturdukları misellerin yapıları ve ortamdaki diğer bütün dengeler pH dan etkilenir. Geliştirilen yönteme pH etkisi görmek için 300 ng mL⁻¹ analit içeren model çözeltiler yardımıyla pH sı değişen bir seri çözelti hazırlandı. BR tampon serisi ile pH 2-10 arasında hazırlanan çözeltiler CPE işlemine tabi tutuldu ve zenginleştirme sonrası her birinin optimize

edilmiş HPLC koşullarında pik alanları kaydedildi. Şekil 3.1 de görüldüğü gibi çalışılan her iki noniyonik surfaktan türü için de pH 3.0 ortamında daha iyi sonuçlar elde edilmiştir. Bu nedenle sonraki deneyler pH 3.0 de sürdürüldü.



Şekil 3.1. Önerilen yöntem üzerine pH etkisi

[Deneysel koşullar: 15 mL final hacimde, 2.00 mL BR tamponu, 300 µL 50 ppm Kaptopril, 1 mL % 20'lik PEG-6000 veya PEG-8000, 8 mL %20'lik Na₂SO₄]

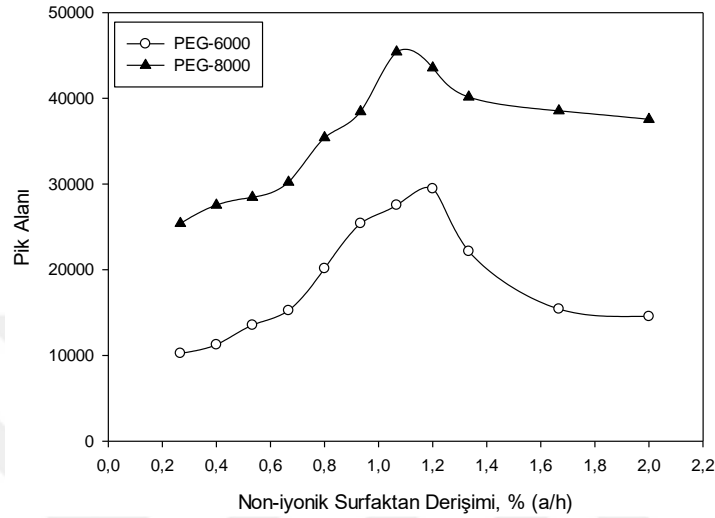
3. 2. 2. Noniyonik surfaktan derişiminin etkisi

Bulutlanma noktası ekstraksiyonu performansını etkileyen en önemli değişkenlerden biri kullanılacak surfaktanların türü ve miktarıdır. Zenginleştirme işlemi sırasında hedef moleküller doğrudan misel fazına çekildiği için, oluşacak misel kararlılığı ve analit moleküllerinin bu misele geçme yatkınlığı doğrudan surfaktanlara bağlıdır. Surfaktan derişimi belli bir kritik değerinin altında (CMC) kaldığında misel oluşumu için yeterince başlatıcı monomer bulunamazken, derişim fazla olduğunda ise surfaktanca zengin fazın hacmi artmakta bu da zenginleştirme etkinliğini azaltmaktadır. Daha önceki yapılan deneysel gözlemlere göre PEG6000 ve PEG8000 ile daha iyi sinyaller elde edilmiştir. Bu nedenle bu aşamada her noniyonik surfaktanın

da miktarı 15 mL lik final hacimli tüplerde % (a/h) 0.2-2.0 aralığında taranmıştır.

Şekil 3.2 de görüldüğü gibi bu tarama sonucunda optimum değer PEG6000 için % 1.2

iken PEG8000 için % 1.0 olarak optimize edilmiştir.

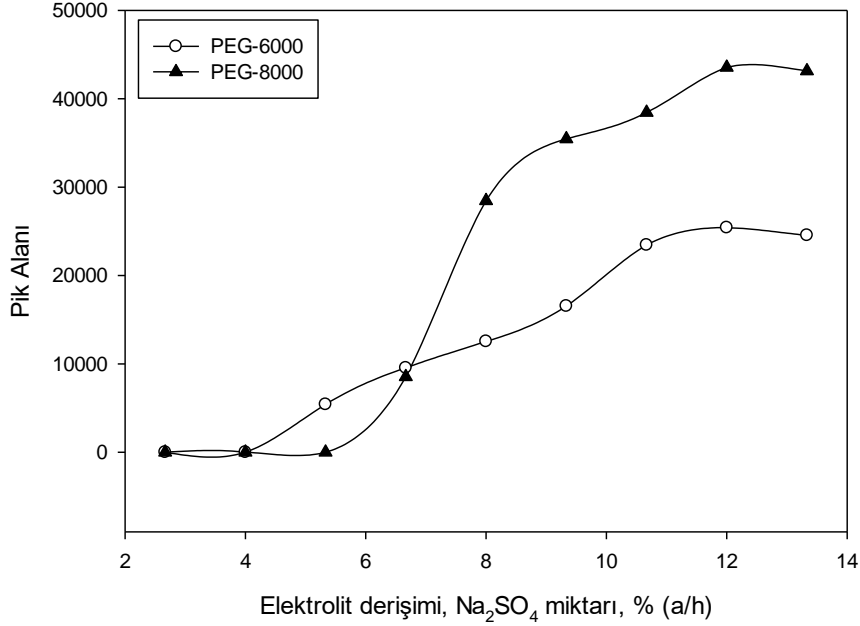


Şekil 3.3. Noniyonik surfaktan miktarının geliştirilen CPE yöntemine etkisi

3. 2. 3. Elektrolit Etkisi

Birçok makro molekülde olduğu gibi surfaktan içeren çözeltilerde de yüksek elektrolit derişimi çözünürlüğü azaltmakta ve misel oluşumunu teşvik etmektedir. Bu da zenginleştirme işleminin etkinliğini artıran bir faktördür. Salting-out etkisi olarak bilinen bu etkiyle surfaktan moleküllerinin bulunduğu ortamda miseller daha kolay ve hızlı oluşur. Ayrıca oluşan surfaktanca zengin fazın, sulu fazdan ayrılması kolaylaşır. Bu amaçla, NaCl, KCl, KNO₃, Na₂ SO₄ veya NaNO₃ gibi kuvvetli elektrolitlerden herhangi biri kullanılabilir. Ortamın iyon şiddetini daha fazla artırma potansiyeli dikkate alınarak deneylerde Na₂ SO₄ kullanılmıştır. Elektrolit derişimin etkisini bulmak üzere % 20 (a/h) lik Na₂ SO₄ kullanarak final hacimde % 2.1-13.8 aralığında tarama yapılmıştır. Şekil 3.4'de görüldüğü gibi, yeterince elektrolit derişimi

sağlanmadığında faz oluşumu gerçekleşmediğinden ilk hacimlerde hiç sinyal elde edilememiş ve en sinyallerin her iki surfaktan için %12 değerinde elde edildiği görülmüştür.

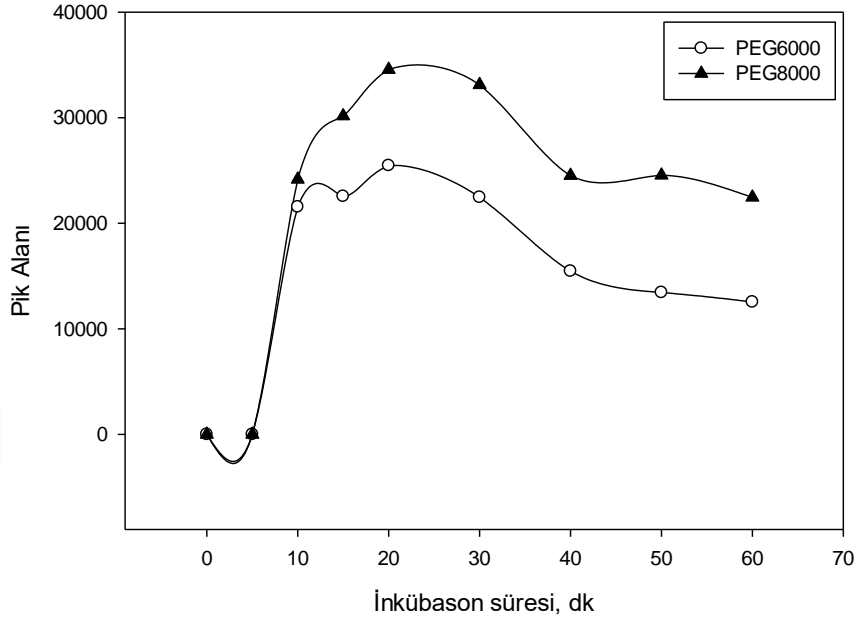


Şekil 3.4. Önerilen yöntem üzerine elektrolit etkisi

3. 2. 4. İnkübasyon Süresinin Etkisi

Bulutlanma noktası Ekstraksiyonu deneylerinde etkin ve yeterli misel oluşumu ancak ortam sıcaklığı belli bir değerin üzerinde olursa mümkün olabilmektedir. Literatür bilgileri ve yaptığımız ön denemeler ışığında 50 °C lik bir su banyosu sıcaklığında misel oluşumu gözlenmiştir. Çalışılan hedef molekül bir ilaç etken maddesi olduğundan daha yüksek sıcaklıklarda çalışmaktan sakınılmıştır. Kaptopril molekülünün bulutlanma noktası ekstraksiyonuna inkübasyon süresinin etkisini optimize etmek amacıyla örnekler 50 C lik su banyosuna yerleştirilmiş ve zamanın etkisi 0-60 dakika aralığında taranmıştır. Şekil 3.5’de görüldüğü gibi her surfaktan içinde 20 dk lık bir inkübasyon süresinin yeterli olduğu anlaşılmaktadır. Daha uzun

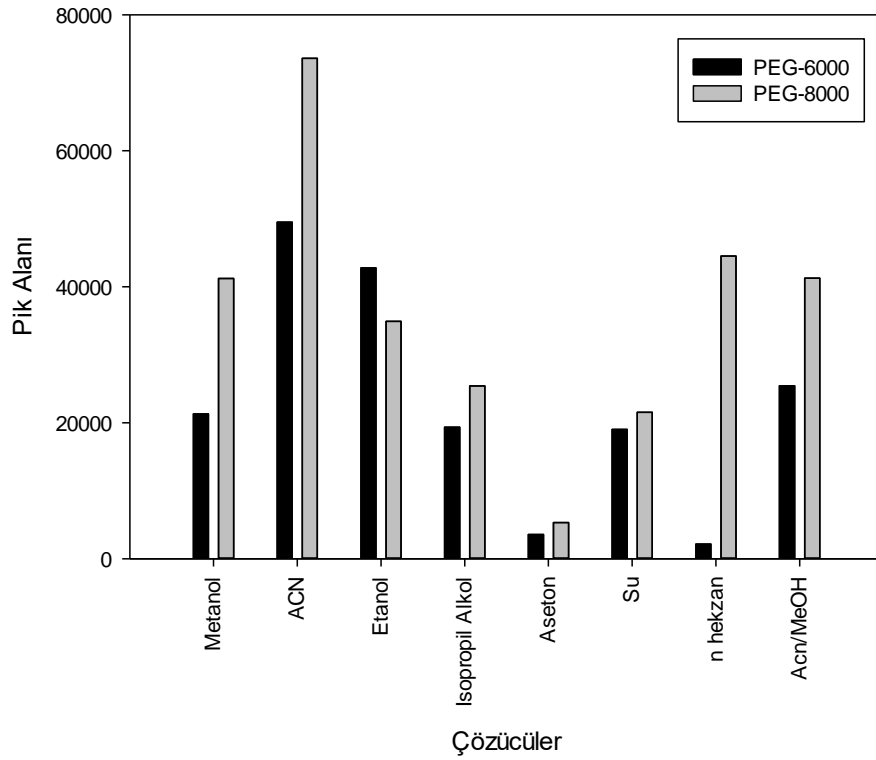
süre bekletildiğinde sinyallerde azalma sıcaklık nedeniyle molekülde oluşan bozulmaya bağlı olarak pik yarımları ile kendini göstermiştir.



Şekil 3.5. Önerilen yöntem üzerine inkübasyon süresinin etkisi

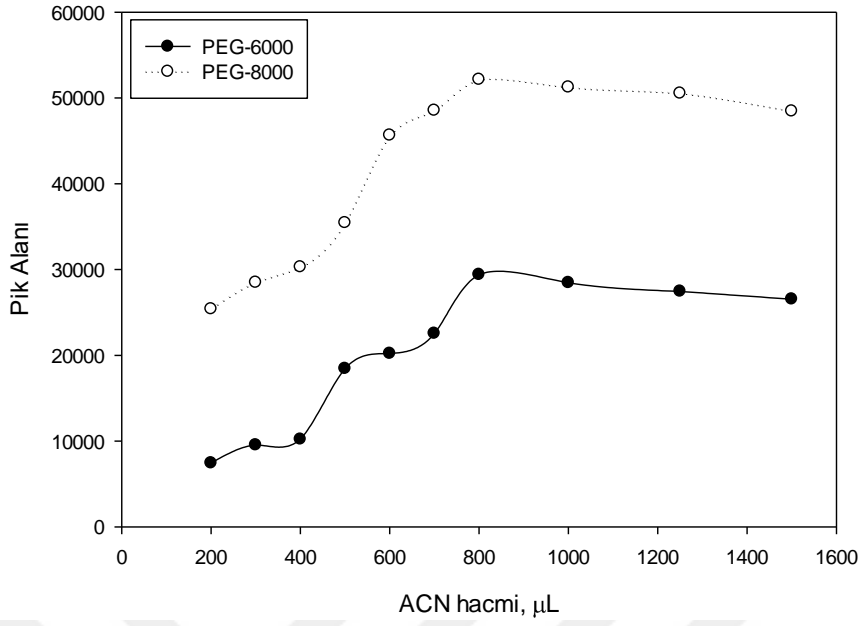
3. 2. 5. Sürfaktanca zengin fazın analize hazırlanması

CPE deneylerinde geneldi bir enjektör yardımıyla ayrılan SRP, birçok analize cihazına doğrudan sunmak için oldukça viskozdur. Ayırma işlemi sonunda mutlaka uygun bir çözücü ile seyreltilir oluşan miseller tekrar çözülür. Bu aşamada seçilecek çözücü kritik bir etkindir. Hem analit moleküllerinin yapısını bozmayacak hem de kullanılan tayin cihazı ile uyumlu olup onun yapısını bozmayacak özellikte olması gerekir. CPE sırasında oluşan misellerin hidrofobik yapısı da dikkate alınarak pek çok organik çözücü ile deneyler tekrar edildi. Bu aşamada her bir çözüğenden 1 mL ekleyerek elde edilen pik alanları birbiri ile kıyaslanmıştır. Şekil 3.6 da görüldüğü gibi en sinyaller Asetonitril organik çözücüsü ile elde edilmiştir.



Şekil 3.6. SRP için kullanılan çözücülerin etkisi

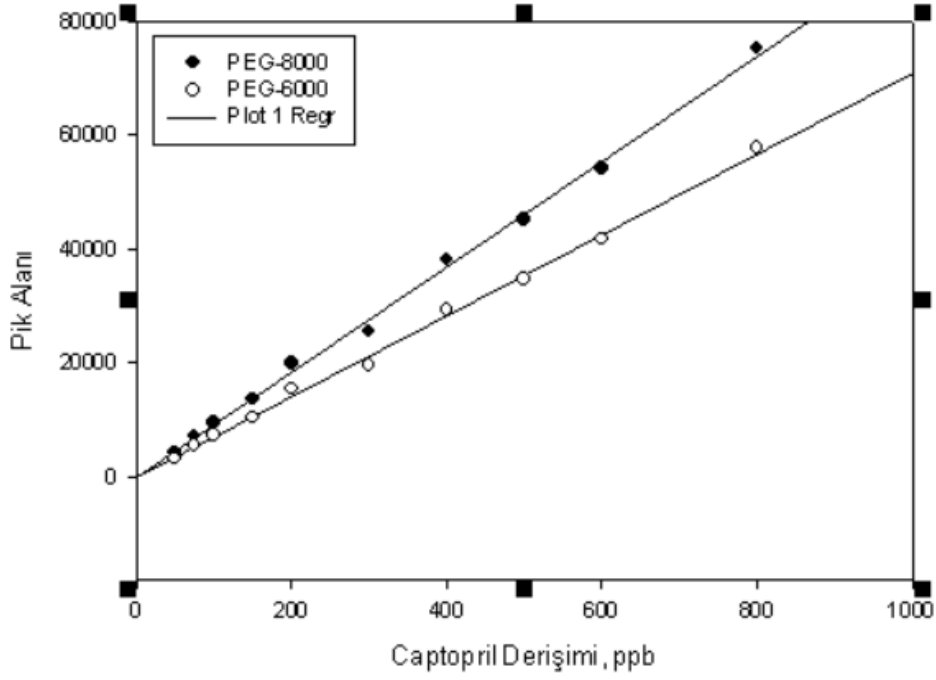
SRP için en uygun çözücünün türü seçildikten sonra bir sonraki en önemli basamak bu çözücünün miktarının, ne kadar kullanılacağına belirlenmesidir. Tahmin edileceği üzere zenginleştirme işleminin başarısı doğrudan son hacimde okunan sinyallere bağlı olduğundan bu parametre oldukça önemlidir. Yüksek zenginleştirme katsayısı elde edebilmek için çözücü hacminin mümkün en az miktarda olması gerekir. Çünkü çözücünün hacim arttıkça zenginleştirme katsayısı azalır. Bilindiği üzere, HPLC'nin mikro viallerine 100 µL örnek konulabilmektedir. Ancak düşük miktarlarda çözücü ile surfaktanca zengin fazın çözünmesi tam olamadığı gibi viallere koymadan önce süzme işlemi de yapılamamaktadır. Bu nedenle SRP için kullanılacak Asetonitril hacmi 200-2000 µL arasında taranmış ve Şekil 3.7 de görüldüğü gibi en iyi sinyaller 800 µL ile elde edilmiştir. Bu nedenle sonraki deneyle bu hacimle sürdürülmüştür.



Şekil 3.7. SRP için kullanılan çözücü hacmi optimizasyonu

3.4 Yöntemin Analitik Performans Ölçütleri

Bulutlanma noktası ekstraksiyonu için en uygun deneysel koşulların belirlenmesinin ardından, doğrusal çalışma aralığını belirlemek amacıyla, farklı derişimlerdeki kaptopril içeren model çözeltiler hazırlanmış ve herbiri geliştirilen CPE yöntemine tabi tutulmuştur. 220 nm de DAD dedektör yardımıyla izlenen analitik sinyaller yardımıyla kaptopril molekülleri için doğrusal çalışma aralığı $50.0-800.0 \text{ ng mL}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. Geliştirilen yöntemin bütün analitik parametreler topluca Çizelge 3.1’de sunulmuştur.



Şekil 3. 8. Optimum koşullar altında elde edilen kalibrasyon doğrusu

Çizelge 3.1 Önerilen yöntemin analitik parametreleri

Parametre	CPE Öncesi		CPE Sonrası	
Doğrusal aralık	1.00-20.00 $\mu\text{g mL}^{-1}$		50.00-800.00 ng mL^{-1}	
Seçme sınırı	0.29 $\mu\text{g mL}^{-1}$		15.42 ng mL^{-1}	
Nicelleştirme sınırı	0.96 $\mu\text{g mL}^{-1}$		46.42 ng mL^{-1}	
BSS (%) (300 ng mL^{-1} için)	4.78		2.75	
Kalibrasyon Duyarlılığı	1.75		57.58	
Korelasyon Katsayısı (R^2)	0.9972		0.9972	
Zenginleştirme Faktörü ^a	-		18.75	
İyileştirme Faktörü ^b	-		33.10	

^a Zenginleştirme faktörü; başlangıçtaki sulu faz hacminin (15 mL), zenginleştirme sonrası elde edilen hacme (0.8 mL) oranı alınarak hesaplandı.

^b CPE sonrası elde edilen kalibrasyon duyarlılığının CPE öncesi kalibrasyon duyarlılığına oranı

3. 5. Geliştirilen Yöntemin Doğruluğu için Geri Kazanım Çalışmaları

Eser düzeydeki kaptopril türlerinin analizi için bulutlanma noktası ekstraksiyonu temelli olarak geliştirilen yöntem, iki farklı derişimde hazırlanan sentetik idrar çözeltilerine uygulandı. Örnekler, Kesim 2.1' de anlatıldığı şekilde hazırlanmış ve geliştirilen CPE-HPLC yöntemi ile analiz edilmiştir. Ayrıca yöntemin doğruluğunu saptamak için, her bir örneğe 250 ve 500 ng mL⁻¹ miktarlarında standartlar ekleyip geri kazanım değerleri hesaplanmış ve sonuçlar Çizelge 3.2'de sunulmuştur.

Çizelge 3.2. Önerilen yöntemle sentetik idrar örneklerinde kaptopril analizi

Örnek	Eklenen ng mL ⁻¹	Bulunan ^{a,b} ng mL ⁻¹	% BSS	% Geri Kazanım
Sentetik İdrar Çözeltisi I	-	Tayin edilemedi	-	-
	250.0	258.5±13.5	5.2	103.4
	500.0	495.1±25.5	5.1	99.0
Sentetik İdrar Çözeltisi II	-	Tayin edilemedi	-	-
	250.0	268.7±11.7	4.4	107.5
	500.0	517.4±19.8	3.8	103.4

^a% 95 güven düzeyinde, üç tekrarlı ölçüm için bulunan ortalama değer±standart sapma

^b Örnek hazırlama işlemleri sonrası elde edilen 15 mL lik çözeltideki derişimler

4. DEĞERLENDİRME

Ayırma ve zenginleştirme yöntemleri literatürde inorganik ve organik türlerin duyarlı tayinleri için oldukça sık bir şekilde kullanılmaktadır. Temelde katı faz veya sıvı faz destekli bu yöntemlerde eser düzeydeki hedef türler hem bir başka faza alınarak olası girişimcilerin bulunduğu matris ortamından uzaklaştırılmakta hem de alınan yeni fazı hacmi daha az olduğu için bu sayede zenginleşmektedir. Özellikle analit derişiminin çok az seviyede olduğu biyolojik örnekler için bu yöntemler oldukça önemli avantajlar sağlamaktadırlar. Katı faz temelli ekstraksiyonu yöntemleri eğer ticari olarak sağlanan bir katı faz kullanılmayacaksa, yapılacak çalışmaya özgü bir katı elde edilmesi/sentezlenmesi süreci gerektirirler. Bu da her zaman mümkün olmaya bilmektedir. Ancak bulutlanma noktası ekstraksiyonunda hedef moleküller ticari olarak kolayca bulunabilen bir surfaktan ortamına çekilmekte ve analizler bu sayede kolayca yapılabilmektedir. Ayrıca kullanılan surfaktanların çoğunlukla %2-20'lik arası çözeltilerden çoğunlukla 0.5 ila 1 mL arasında her bir örnek için harcanmaktadır ki bu da analiz maliyetini azaltan etkenlerden biridir.

İlaç etken maddelerinin özellikle kompleks biyolojik ortamlarda analizleri oldukça zor bir görevdir. Bu amaçla çoğunlukla kompleks analiz düzenekleri ve pahalı cihazlar kullanılır. Bu analizleri temel laboratuvar ekipmanları ve her laboratuvarında bulunabilecek klasik bir HPLC sistemi ile gerçekleştirebilmek adına, bir ön işlem olarak bulutlanma noktası ekstraksiyonu uygulanmış ve model çözeltilerdeki eser düzeydeki kaptopril molekülleri zenginleştirildikten sonra HPLC-DAD sistemi ile tayin edilmiştir. Bulutlanma noktası ekstraksiyonuna etki eden bütün değişkenler (pH, surfaktan türü ve derişimi, elektrolit etkisi, surfaktanca zengin faz için çözen seçimi)

tek tek çalışılmış ve optimize edilmiştir. Geliştirilen CPE-HPLC-DAD temelli yöntemin analitik validasyonu yapılmış ve tüm parametreler Çizelge 3.1’de sunulmuştur. Bu çalışma kaptopril moleküllerinin zenginleştirme sonrası kromatografik tayinlerinin yapıldığı bir yöntem ilk kez uygulanmıştır. Yöntem, kaptopril moleküllerinin düşük derişimlerini her laboratuvarında bulunabilecek basit bir ön uygulama sistemi ile geleneksel HPLC sistemlerinin tayine edebileceği seviyelere çıkarmaktadır. Bu yönüyle tez çalışması literatüre önemli bir katkı sağlayacaktır.



KAYNAKLAR

- [1] Ondetti MA, Rubin B, Cushman DW (1977). Design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme: new class of orally active antihypertensive agents. *Science* 196: 441-4.
- [2] Kılınçer, C, Zileli M (2006): Görsel Analog Hasta Tatmini Skalası. *Trakya Univ Tip Fak Derg*, 23(3):113-118.
- [3] Pfeffer JM, Pfeffer MA, Braunwald E (1985). Influence of chronic captopril therapy on the infarcted left ventricle of the rat. *Circ Res*, 57, 84-95.
- [4] USP (United States Pharmacopeia) *National Formulary*, 2003, USP 26/NF 21, United States Pharmacopeial Convention, (Ed), Inc, Toronto- Canada The Merck Index (1996) 12 th edition, Merk& Co, Inc, USA; 1996.
- [5] USP (United States Pharmacopeia) *National Formulary*, 2003, USP 26/NF 21, United States Pharmacopeial Convention, (Ed), Inc, Toronto- Canada The Merck Index (1996) 12th edition, Merk& Co, Inc, USA; 1996
- [6] Martindale (2007) The Complete Drug Reference, 35th Edition, *The Pharm. Pres*, London.
- [7] The Merck Index (1996) 12th edition, Merk& Co, Inc, USA; 1996.
- [8] Moss GP, Gullick DR, Cox PA, Alexander C, Ingram MJ, Smart JD, Pugh WP (2006) Design, synthesis and characterization of captopril prodrugs for enhanced percutaneous absorption, *Journal of Pharmacy and pharmacology*, 58, 2: 167-177.
- [9] British Pharmacopeia (1998), Vol 1, The Stationary Office, London.
- [10] USP (United States Pharmacopeia) *National Formulary*, 2003, USP 26/NF 21, United States Pharmacopeial Convention, (Ed), Inc, Toronto- Canada.
- [11] British Pharmacopeia (1998), Vol 1, The Stationary Office, London.
- [12] Drug Affecting the Cardiovascular System; Antihypertansives (2005), Lippincott's Illustrated Review's, 4 th edition, Harvey RA, Champe PC (Eds), Lippincott Williams & Wilkins, USA.)
- [13] Katzung BG (2007). Cardiovascular and renal Drugs, Anti hipertansive agents, Basic and clinical pharmacology, The McGraw-Hill Companies, USA.
- [14] Physicians' Desk Reference (1998), PDR Staff, Medical Economics, Medical Economics Company, USA.

- [15] Remington: The science and practise of pharmacy, (1995) Vol II. Mack Publishing Company, Easton, Penysylvania.
- [16] Physicians' Desk Reference (1998), PDR Staff, Medical Economics, Medical Economics Company, USA.
- [17] Farmalister, Türkiye Tıbbi İlaç Rehberi (2008), Farma tıp Yayıncılık Ed. Bilal Güneş, Ankara.
- [18] Alver ED (2012). Microextraction methods. *Sigma*, 30, 75-90.
- [19] Gökçaya N (2014). Bazı eser metallerin bulutlanma noktası ekstraksiyonu ile tayini, Yüksek Lisans Tezi, Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Denizli.
- [20] Henden E, Yüksel Ü (2002), "Ayırma Teknikleri ve Kromatografide Temel Kavramlar", Kimyasal Eser Analiz Yaz Okulu II, E.Ü. Fen Fakültesi, İzmir.
- [21] Yavuz O, Aksoy A (2006). Örnek hazırlamada katı faz ekstraksiyonu metodu. *FÜ Sağlık Bil. Dergisi*, 20(3), 259-269.
- [22] Frazey PA (1998). Solid-phase microextraction with temperature-programmed desorption for the analysis of iodination disinfection byproducts. *Analytical chemistry*, 70(3), 638-644.
- [23] Ulusoy HI (2015). Simple and useful method for determination of inorganic selenium species in real samples based on UV-VIS spectroscopy in a micellar medium. *Analytical Methods*, 7 (3):953-960.
- [24] Baytak S, Türker AR (2005). The use of *Agrobacterium tumefaciens* immobilized on Amberlite XAD-4 as a new biosorbent for the column preconcentration of iron (III), cobalt (II), manganese (II) and chromium (III). *Talanta*, 65(4):938-945.
- [25] Aydın F. (2008). Birlikte Çöktürme ve Katı Faz Özütlemesi ile Bazı Ağır Metal İyonlarının Zenginleştirilmeleri, Doktora Tezi, Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kayseri, 7(8), 26.
- [26] Safarikova M, Safarik I (1999). Magnetic solid-phase extraction. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 194(1-3): 108-112.
- [27] Spietelun A, Marcinkowski L, Guardia M, Namiesnik J (2013). Recent developments and future trends in solid phase microextraction techniques towards green analytical chemistry. *Journal of Chromatography A*. 1321: 1-13.
- [28] Kayıkçı S (2019). Glyphosate bileşiğinin sulu çözeltilerden moleküler baskılanmış katı faz ekstraksiyonu ve GC-MS analizi validasyonu

- [29] Ulusoy S (2015). Eser düzeydeki B1 ve B2 vitaminlerinin bulutlanma noktası ekstraksiyonu sonrası kromatografik tayinleri, Doktora Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Sivas.
- [30] Pohl P (2009). Suitability of solid phase extraction and flame atomic absorption spectrometry for manganese partitioning in red wines. *Food chemistry*, 114(3):996-1001.
- [31] Stalikas CD (2002). Micelle-mediated extraction as a tool for separation and preconcentration in metal analysis, *Trends in Analytical Chemistry*, 21(1), 343-350
- [32] Pohl P (2009). Suitability of solid phase extraction and flame atomic absorption spectrometry for manganese partitioning in red wines. *Food Chemistry*, 114(3):996-1001.
- [33] Stalikas CD (2002). Micelle-mediated extraction as a tool for separation and preconcentration in metal analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 21(5), 343-355.
- [34] Ulusoy S (2015). Eser düzeydeki B1 ve B2 vitaminlerinin bulutlanma noktası ekstraksiyonu sonrası kromatografik tayinleri, Doktora Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Sivas
- [35] Hinze WL, Pramauro E (1993). A critical review of surfactant-mediated phase separations (cloud-point extractions): theory and applications. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 24(2):133-177
- [36] Ulusoy S (2015). Eser düzeydeki B1 ve B2 vitaminlerinin bulutlanma noktası ekstraksiyonu sonrası kromatografik tayinleri, Doktora Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Sivas.
- [37] Komaromy-Hiller G Calkins, N. and Wandruszka, R. (1996). Changes in polarity and aggregation number upon clouding of a nonionic detergent: effect of ionic surfactants and sodium chloride . *Langmuir*, 12:916–920.
- [38] Giokas DL, Antelo J, Paleologos EK, Aree F and Karayannis MI (2002). Copper fractionation with dissolved organic matter in natural waters and wastewater—a mixed micelle mediated methodology (cloud point extraction) employing flame atomic absorption spectrometry. *J. Environ. Monitor.* 4: 505–510.
- [39] Ulusoy S (2015). Eser düzeydeki B1 ve B2 vitaminlerinin bulutlanma noktası ekstraksiyonu sonrası kromatografik tayinleri, Doktora Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Sivas.

- [40] Şeker ME (2006). Türkiyede bulunan bazı üzüm türlerinin çekirdeklerindeki e-vitamini miktarının HPLC ile tayini.
- [41] Ulusoy S (2015). Eser düzeydeki B1 ve B2 vitaminlerinin bulutlanma noktası ekstraksiyonu sonrası kromatografik tayinleri, Doktora Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Sivas.
- [42] McMaster MC (2007). HPLC A Practical User's Guide, Second Edition, John Wiley&Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.
- [43] Settle FA (1997). Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry, Pirentice Hall PTR.
- [44] Skoog DA, Holler FJ and Nieman TA (1998). Principles of Instrumental Analysis, Fifth Edition, Harcourt Brace & Company, USA.
- [45] Douglas A. Skoog FJ (2004). Enstürmental Analiz Ders Kitabı, Bilim Yayıncılık, Ankara.
- [46] Merey G (2016). İlaç kimyası ve endüstriyel uygulamaları.
- [47] Rieux L, Sneekes EJ, Swart R, Swartz M (2011). Nano LC: principles, evolution, and state-of-the-art of the technique. LC GC North America, 29(10)
- [48] Zhang B, Li X, Yan B (2008). Advances in HPLC detection—towards universal detection. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 390(1):299-301.
- [49] Peres GT, Rath S, Reyes FGR (2010). A HPLC with fluorescence detection method for the determination of tetracyclines residues and evaluation of their stability in honey. *Food Control* 21:620–625.
- [50] Wang LF, Peng JD, Liu LM (2008). A reversed-phase high performance liquid chromatography coupled with resonance Rayleigh scattering detection for the determination of four tetracycline antibiotics. *Analytica Chimica Acta* 630:101–106.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı: Rukiye KUZUCUOĞLU

Doğum Yeri ve Tarihi: 16/01/1990 SİVAS

Medeni Hali: Evli

Yabancı Dil: İngilizce

İletişim Adresi: Cumhuriyet Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Bölümü, 58140-Sivas

Eğitim Bilgileri

Lise :Atatürk lisesi, 2007

Lisans Cumhuriyet Üniversitesi, 2015

Yüksek Lisans Cumhuriyet Üniversitesi, devam ediyor

Kongrelerde Sunulmuş Bildiriler

- Farmakolojik Örneklerde Kaptopril Tayini için HPLC-DAD Temelli Yöntem Geliştirilmesi , 9.Ulusal Analitik Kimya Kongresi, Konya, Türkiye, 19 - 23 Eylül 2018
- A Method Development for Sensitive Aspartame Determination, 17.Kromatografi Kongresi, Çorum, Türkiye, 20 - 22 Eylül 2017
- Sensitive Determination of Tetracycline by HPLC-DAD After Micelle Mediated Extraction , 17. Kromatografi Kongresi, Çorum, Türkiye, 20 - 22 Eylül 2017
- A ve E Vitaminlerinin Eş Anlı Zenginleştirilmesi İçin CPE Yöntemi, XV. Ulusal Spektroskopi Kongresi, Yalova, Türkiye, 17 - 19 Mayıs 2017

Katıldığı Kongreler: XV. Ulusal Spektroskopi Kongresi, Yalova Üniversitesi, 15-19 Mayıs 2017

Görevli Olduğu Kongreler

Esan 2018 Uluslararası Eser Analiz Kongresi, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, 2023 Haziran 2018,

Projeler

ECZ-051 CÜBAP Projesi “Eser Düzeyde Kaptopril Tayini İçin Zenginleştirme Sonrası Kromatografik Yöntem Geliştirilmesi”