

**T.C.  
UŞAK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜŐÜ**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**SERTRALİN, FLUOKSETİN, SİTALOPRAM VE ESSİTALOPRAMIN KAPİLER  
ELEKTROFOREZ YÖNTEMİ İLE EŞ ZAMANLI TAYİNİ İÇİN METOT  
OPTİMİZASYONU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ELVAN ÖZSOY**

**OCAK 2017**

**UŞAK**

**T.C.  
UŞAK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜŐÜ**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**SERTRALİN, FLUOKSETİN, SİTALOPRAM VE ESSİTALOPRAMIN KAPİLER  
ELEKTROFOREZ YÖNTEMİ İLE EŞ ZAMANLI TAYİNİ İÇİN METOT  
OPTİMİZASYONU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ELVAN ÖZSOY**

**OCAK 2017**

**UŞAK**

Elvan ÖZSOY tarafından hazırlanan "*Sertralin, Fluoksetin, Sitalopram ve Essitalopramın Kapiler Elektroforez Yöntemleri ile Eşzamanlı Tayini için Metot Optimizasyonu*" adlı bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

(Yrd. Doç. Dr., Senem ŞANLI) .....

Tez Danışmanı, Uşak Üniversitesi Kimya Anabilim Dalı

Bu çalışma, jürimiz tarafından oy birliği ile Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Berkant KAYAN .....

(Kimya Anabilim Dalı, Aksaray Üniversitesi)

Yrd. Doç. Dr. Senem ŞANLI .....

(Tez Danışmanı, Uşak Üniversitesi Kimya Anabilim Dalı)

Yrd. Doç. Dr. Onur GÜNEŞER .....

(Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Uşak Üniversitesi)

Yrd. Doç. Dr. İbrahim BULDUK .....

(Kimya Anabilim Dalı, Uşak Üniversitesi)

Yrd. Doç. Dr. Özgür TARHAN .....

(Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Uşak Üniversitesi)

Tarih: 06/01/2017

Bu tez ile Uşak Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans derecesini onamıştır.

Prof.Dr.Lütfullah TÜRKMEN .....

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## **TEZ BİLDİRİMİ**

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

**Elvan ÖZSOY**

# SERTRALİN, FLUOKSETİN, SİTALOPRAM VE ESSİTALOPRAMIN KAPİLER ELEKTROFOREZ YÖNTEMİ İLE EŞ ZAMANLI TAYİNİ İÇİN METOT OPTİMİZASYONU

(Yüksek Lisans Tezi)

ELVAN ÖZSOY

UŞAK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ocak 2017

## ÖZET

Kapiler Elektroforez son yıllarda ilaç analizlerinde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Diğer analitik metotlara göre üstünlükleri bulunmaktadır. Yüksek ayırma gücü, kolay miktar hesabı, kısa analiz süreleri, çok az hacimde örneğin kullanılması, basit yöntem geliştirme imkanı ve otomatik cihaz gelişimi, yöntemin en önemli avantajlarıdır. Farklı ilaç etken maddelerinin eşzamanlı tayini, miktar analizleri kapiler elektroforez yöntemi ile yapılabilmektedir.

İlgili tez çalışmamızda amaç; son 20 yılda kullanımı hızla artan antidepresan ilaç etken maddelerinden sertralin, fluoksetin, sitalopram ve essitalopramın kapiler elektroforez yöntemi tayinleri için metot geliştirmektir. Çalışmanın ikinci aşamasında ise geliştirilen yöntem, sertralinin ilaç preparatlarından tayininde kullanılacaktır. Ayrıca yöntem geçerliliğinin tespiti için doğruluk, kesinlik, duyarlılık ve doğrusallık gibi validasyon parametreleri incelenecektir.

**Anahtar Kelimeler:** Antidepresan, Ayırma, İlaç Etken Madde, Kapiler Elektroforez, Sertralin, Fluoksetin, Sitalopram, Essitalopram

**Sayfa Adedi:** 57

**Tez Yöneticisi:** Yrd. Doç. Dr. Senem ŞANLI

**SIMULTANEOUS DETERMINATION OF SERTRALIN, FLUOXETIN,  
CITALOPRAM AND ESCITALOPRAM BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS  
(MASTERS THESIS)**

**ELVAN ÖZSOY  
UŞAK UNIVERSITY  
SCIENCE INSTITUTE**

**January 2017**

**ABSTRACT**

Capillary electrophoresis is a widely used method for drug analysis in recent years. They have important superiorities over other analytical methods. High separation power, easy quantification calculation, short analysis time, use of sample in quite low facility volume, possibility of simple method development and automatic device development are the most important advantages of this method. Simultaneous determination of different drug substances and quantitative analysis can be achieved by capillary electrophoresis method.

The purpose of our study was to develop a method has been developed for the determination of sertraline, fluoxetine, citalopram and escitalopram using capillary electrophoresis from antidepressant drugs which have been increasingly used in the last 20 years. In the second step of our study, the developed method was used to determine sertraline in drug preparations. In addition some parameters such as accuracy, precision, sensitivity and linearity were examined for the validation of the method used.

**Key Words:** Antidepressant, Separate, Capillary electrophoresis, Pharmaceutical Active Ingredients, Sertraline, Fluoxetine, Citalopram, Escitalopram

**Number of pages:** 57

**Dissertation manager:** Assistant Professor, Senem ŞANLI

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca ilminden yararlandığım, öğrencisi olmaktan onur duyduğum, her türlü yardım ve fedakârlığı sağlayan, bilgi, tecrübe ve güler yüzü ile çalışmama ışık tutan, ayrıca tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu sabır ve hoşgörülerinden dolayı danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Senem Şanlı'ya en derin şükranlarımı sunarım.

Tez çalışmasının gerçekleştirildiği Uşak Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliğine teşekkür ederim

Yine eğitimim ve laboratuvar çalışmalarım boyunca değerli tecrübelerini esirgemeyen diğer hocalarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışması 2015/TP006 numaralı BAP projesi ile desteklenmiştir. Uşak Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje birimine teşekkürü borç bilirim.

Maddi ve manevi destekleri ile beni bu günlere getiren değerli aileme ve her konuda sabırla manevi desteğini hayat boyu hissettiğim sevgili eşim Fatih Özsoy'a teşekkürlerimi sunarım.

**Elvan ÖZSOY**

# İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEZ BİLDİRİMİ .....	i
ÖZET .....	ii
ABSTRACT .....	iii
TEŞEKKÜR .....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ÇİZELGELERİN LİSTESİ .....	vii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	viii
TABLoların LİSTESİ .....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	xi
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Antidepresan İlaçların Tarihçesi.....	2
1.2. Depresif Bozukluk .....	3
1.2.1. Depresyon tedavisi.....	4
1.2.2. Antidepresan İlaçların Sınıflandırılması .....	4
1.2.3. Selektif Serotonin Reuptake İnhibitörleri (SSRI) .....	5
1.2.4. Antidepresan İlaç Etken Maddelerinin Ortak Yönleri .....	6
1.2.5. SSRI'ların Farmakolojik Ve Moleküler Etki Mekanizmaları.....	6
1.3. Çalışılan Antidepresanların Kimyasal Yapı Ve Formülleri.....	12
2. KURAMSAL TEMELLER.....	13
2.1. Kapiler Elektroforez .....	13
2.1.1. Kapiler Elektroforezin Temel İlkeleri.....	19
2.2.2. Elektroosmotik Akış (EOF) .....	21
2.2.3. Elektroosmotik Akışı Etkileyen Faktörler .....	23
2.2.4. Band Genişlemesi .....	24
2.2.5. Joule Isınması.....	25
2.2.6. Kapiler Elektroforez Türleri.....	25
2.2. Metot Validasyonu.....	31
2.2.1. Validasyon Parametrelerinin Tayini .....	32
Doğruluk.....	32
Kesinlik.....	32
Seçicilik .....	32
Teşhis Sınırı (LOD).....	33
Tayin Alt Sınırı (LOQ).....	33
Doğrusallık .....	33



3. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	34
4. MATERYAL ve METOD .....	37
4.1. Genel Bilgi.....	37
4.1.1. Kullanılan Cihaz ve Ekipmanlar .....	37
4.1.2. Kullanılan Kimyasallar .....	38
4.1.3. Kullanılan Çözeltiler .....	39
4.1.4. Miktar Tayininde Kullanılan İlaç Preparatı .....	39
4.2. Kapiler Elektroforez Yöntemi İle Sertralin, Fluoksetin, Citalopram ve Escitalopram'ın Tayinleri İçin Optimum Koşulların Belirlenmesi İçin Yapılan Çalışmalar.....	39
4.3. Sertralinin İlaç Preparatlarındaki Miktar Tayini İçin Yapılan Çalışmalar .....	40
4.3.1. İç Standart Metodu.....	40
4.3.2. Sertralinin Lustral 50 mg ilacından miktar analizi.....	40
5. BULGULAR .....	41
5.1. Sertralin Fluoksetin Citalopram ve Escitalopramın Kapiler Elektroforezde Tayini için Metot Optimizasyonuna ait bulgular.....	41
5.2. Sertralinin İlaç Preparatlarındaki Miktar Tayinine Ait Bulgular.....	43
5.3. Sertralinin Kapiler Elektroforez yöntemi ile tayini için metot validasyonu.....	47
5.3.1. Kalibrasyon Çalışması .....	47
5.3.2. Duyarlılık ve Doğrusallık .....	48
5.3.3. Kesinlik ve Doğruluk.....	49
5.3.4. Tabletlerde Sertralin Miktar Tayini Sonuçları .....	50
6. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	51
KAYNAKLAR.....	52
ÖZGEÇMİŞ.....	57

## ÇİZELGELERİN LİSTESİ

	<b>Sayfa</b>
Çizelge 1.1. SSRI'ların Farmakokinetik Özellikleri .....	7
Çizelge 2.1. Kapiler Elektroforezde Kullanılan Dedektör Çeşitleri.....	29
Çizelge 4.1. Çalışmada kullanılan ilaç etken maddeler ve özellikleri.....	38
Çizelge 4.2. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler.....	38
Çizelge 5.1. Doğrusallık ve Duyarlılık Parametreleri .....	48
Çizelge 5.2. Sertralinin Kapiler Elektroforez yöntemi ile analizine ait gün içi bulgular ....	49
Çizelge 5.3. Sertralinin Kapiler Elektroforez yöntemi ile analizine ait günler arası bulgular .....	49
Çizelge 5.4. Ticari Tabletde (Lustral) sertralin miktar tayin sonuçları .....	50
Çizelge 5.5. Ticari Tabletde (Lustral) katkı yapılan sertralin miktar tayin sonuçları .....	50

## ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil 1.1. Antidepresan ilaçların sınıflandırılması .....	5
Şekil 2.1. Kapiler elektroforez cihazının gösterimi.....	14
Şekil 2.3. Eritilmiş silika kapilerin boyuna kesiti. ....	16
Şekil 2.4. Elektroforetik ve elektrozmotik hızların göç zamanı üzerine etkisi .....	20
Şekil 2.5. Kapiler yüzeyinde oluşan çift tabaka ve elektroosmotik akış.....	21
Şekil 2.6. Kapiler kolonda EOF ve parabolik akış.....	23
Şekil 2.7. Kapiler Zone Elektroforez .....	26
Şekil 2.8. Kapiler Elektroforez cihazının bölümleri.....	27
Şekil 5.1. Sertralinin (5 ppm) 205 nm’de elektroferogramı .....	41
Şekil 5.2. Citalopramın (5ppm) 205 nm’de elektroferogramı.....	42
Şekil 5.3. Escitalopramın (5 ppm) 205 nm’de elektroferogramı.....	42
Şekil 5.4. Fluoksetinin (5 ppm) 205 nm’de elektroferogramı.....	42
Şekil 5.5. Sertralin(1), Fluoksetin(2), Citalopram(3)'ın 5 ppm'lik karışım çözeltisinin elektroferogramı .....	43
Şekil 5.6. Sertralin(1), Fluoksetin(2), Escitalopram(3)'ın 5 ppm'lik karışım çözeltisinin elektroferogramı .....	43
Şekil 5.7. 8 ppm’lik Sertralinin ilaç preparatından hazırlanan çözeltisine 4 ppm’lik Citalopram çözeltisi ilavesi ile elde edilen elektroferogram .....	44
Şekil 5.8. 8 ppm’lik Sertralin çözeltisine ilave edilen 2 ppm’lik Citalopram katkı çözeltisinin (geri kazanım) elektroferogramı .....	44
Şekil 5.9. 2 ppm’lik Sertralin(1)'e 4 ppm’lik Citalopram(2) ilavesi ile elde edilen kalibrasyon çözeltisinin elektroferogramı .....	44
Şekil 5.10. 4 ppm’lik Sertralin(1)'e 4 ppm’lik Citalopram(2) ilavesi ile elde edilen kalibrasyon çözeltisinin elektroferogramı .....	45
Şekil 5.11. 8 ppm’lik Sertralin(1)'e 4 ppm’lik Citalopram(2) ilavesi ile elde edilen kalibrasyon çözeltisinin elektroferogramı .....	45
Şekil 5.12. 12 ppm’lik Sertralin(1)'e 4 ppm’lik Citalopram(2) ilavesi ile elde edilen kalibrasyon çözeltisinin elektroferogramı .....	45
Şekil 5.13. 2 ppm’lik Sertralin(1)'e 4 ppm’lik Citalopram(2) ilavesi ile elde edilen gün içi çalışmasının elektroferogramı .....	46

<b>Şekil 5.14.</b> 8 ppm'lik Sertralin(1)'e 4 ppm'lik Citalopram(2) ilavesi ile elde edilen .....	46
gün içi çalışmasının elektroferogramı .....	46
<b>Şekil 5.15.</b> 2 ppm'lik Sertralin(1)'e 4 ppm'lik Citalopram(2) ilavesi ile elde edilen .....	46
gün arası çalışmasının elektroferogramı .....	46
<b>Şekil 5.16.</b> 8 ppm'lik Sertralin(1)'e 4 ppm'lik Citalopram(2) ilavesi ile elde edilen .....	47
gün arası çalışmasının elektroferogramı .....	47
<b>Şekil 5.17.</b> Sertralinin Kapiler Elektroforez yöntemi ile oluşturulan kalibrasyon grafiği ..	48

## TABLO LİSTESİ

**Tablo**

**Sayfa**

**Tablo 1.1.** Çalışılan etken maddelerinin kimyasal yapıları, formül ve adlandırılmaları ... 12

## SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

<u>Simge/Kısaltma</u>	<u>Açıklama</u>
BSS	Bağıl standart sapma
°C	Santigrat derece
CE	Kapiler elektroforez
CECK	Kapiler elektroforez kromatografisi
CGE	Kapiler jel elektroforez
CYP	Mikrozomal sitokrom P450 enzimleri
CZE	Kapiler zone elektroforez
DAD	Diyot array dedektör
DNA	Deoksiribonükleik asit
$\epsilon$	Dielektrik sabiti
ECA	Epidemiyolojik havza alanı
EKG	Elektrokardiografi
EOF	Elektroozmotik akış
EPS	Ekstrapiramidal sendrom
GABA-B	$\gamma$ -Aminobütirik asit
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
ITP	İzotakoforez
K	Dağılma katsayısı
kV	Kilovolt
LOD	Teşhis sınırı
LOQ	Tayin alt sınırı
LPME	Sıvı faz mikro ekstraksiyonu
M	Molar
MAO	Monoamin oksidaz enzimi
MECK	Misel elektrokinetik kromatografisi
mL	Mililitre
mbar	Milibar

mM	Milimolar
$\mu$ A	Mikroamper
$\mu$ g	Mikrogram
$\mu$ e	Elektroforetik hareketlilik
$\mu$ EOF	Elektroosmotik hareketlilik
$\mu$ m	Mikrometre
$\mu$ L	Mikrolitre
MS	Kütle spektrometresi
$\eta$	Çözelti viskozitesi
N	Normal
NaOH	Sodyum hidroksit
NA	Noradrenalin
ng	Nanogram
nL	Nanolitre
nm	Nanometre
NSRI	Noradrenalin geri alım inhibitörleri
ppb	Milyarda bir kısım
ppm	Milyonda bir kısım
RNA	Ribonükleik asit
S	Standart sapma
SiO <sup>-</sup>	Silanoat
SiOH	Silanol
SSRI	Selektif serotonin geri alım inhibitörleri
SSS	Santral sinir sistemi
TSA	Trisiklik antidepresan
UV-VIS	Morötesi-görünür bölge
W	Watt
WHO	Dünya sağlık örgütü
$v$ EOF	Elektroosmotik akış hızı
$\zeta$	Zeta potansiyel
5-HT	Serotonin

## 1. GİRİŞ

Elektroforez, potansiyel fark oluşturulan bir alanın tesiriyle artı ve eksi yüklü taneciklerin bu alanın içinde tampon çözelti eşliğinde herbir taneciğin kendine özgü mobilite hızı esasına göre yapılan ayırma sonucu gerçekleşen bir analiz tekniğidir. Bu teknik, ilaç etken maddeleri, inorganik anyon ve katyonlar, vitaminler, aminoasitler, karbonhidratlar, peptitler, proteinler, nükleik asitler gibi çok sayıda bileşiğin miktar analizinde ve eşzamanlı ayrılmasında kullanılmaktadır. Organik ve biyokimyasal yüklü büyük çaplı taneciklerin ayrıştırılması ve analizlerinde yine bu yöntem başarılı bir şekilde uygulanmaktadır. Bu analiz tekniği, iyi bir ayırma tekniği olmasına rağmen, yapılan araştırmalar ve çalışmalar göstermiştir ki uzun analiz süreleri, elde edilen verimin düşüklüğü, veri aktarımı ve miktar analizi sıkıntıları yaşanmıştır. Yaşanan olumsuzluklar nedeniyle daha iyi bir teknik için jel tabaka sistemi yerine dar tüp yada kapiler sistemleri geliştirilmiş ve kullanılmaya başlanmıştır. Küçük çaplı kapiler kolonun anti-konvektif yapıda olması numune hacminin azaltılmasına olanak vermekte, kapilerle sıvı hareketli alan arasında meydana gelebilecek sıcaklık geçişine izin vermemektedir. Bu durum yüklenen numune çözelti viskozitesinin ve elektriksel alan uygulanan çözelti ortamının hareketinin kontrol altına alınması bakımından önem teşkil eder, jel tabaka sistemi ise bu ihtiyacı karşılayamamaktadır. Kapiler elektroforez; jel elektroforez, gaz kromatografisi, yüksek performanslı sıvı kromatografisi tekniklerinin avantajlı özelliklerinin birleşmesinden geliştirilmiş çağdaş bir metottur. Kapiler elektroforez tekniğinin; yüksek ayırım gücü (birçok bileşiği eş zamanlı analiz edebilme kabiliyeti), analizin daha çabuk yapılması, incelenen numune miktarının diğer yöntemlere göre az olması, çalışmanın düşük maliyeti bulunması, kararlılığın yüksek olması, yavaş akışkan mobil sistem ve veri aktarımında iyi bir olanak sağlaması gibi üstünlükleri vardır. Kapiler elektroforez son yıllarda geliştirilmiş ve bugün araştırma ve analiz alanında uygulanan bir tekniktir. Eş zamanlı olarak birçok maddenin analizine imkan sağlaması, az hacimli numune çözeltisi ile analizin yapılması ve mikromoleküler maddelerin analizine imkan vermesi bu yöntemin farmakolojik çalışma alanlarında da uygulanmasını sağlamıştır.

Gerçekleştirdiğimiz laboratuvar analizinde, son 20 yılda kullanımı hızla artan antidepresan ilaçlardan sertralin, fluoksetin, sitalopram ve essitalopramın kapiler elektroforez yöntemi



tayinleri için metot geliştirmektir. Çalışmanın ikinci aşamasında ise geliştirilen yöntem, sertralinin ilaç preperatlarından tayininde kullanılacaktır. Ayrıca yöntem geçerliliğinin tespiti için doğruluk, kesinlik, duyarlılık ve doğrusallık gibi validasyon parametreleri incelenecektir.

### **1.1. Antidepresan İlaçların Tarihçesi**

Ruhsal bozukluklarda insan davranışlarını düzenlemek için birtakım maddeler çok eski zamanlardan beri kullanılmıştır. Eski ağlarda bitki ve çeşitli maddelerden oluşturulan karışımlar ruhsal hastalıklara karşı tütün, afyon, esrar, kokain gibi maddeler ilaç olarak kullanılmıştır. Günümüzde ise psikoaktif ilaç olarak tanınan maddeler insan psikolojisini etkilemek, ağrıyı azaltmak veya keyif vermek amacıyla sürekli kullanılmaktadır.

Modern psikofarmakoloji 20. yüzyılın ikinci yarısında başlamış ve büyük bir hızla gelişmiştir. 19. yüzyılın sonlarından bu döneme kadar ruhsal bozuklukların tedavisinde afyon türevleri, bromürler, paraldehit, barbitüratlar kullanılmıştır. 20. yüzyılın başında, hastaları toplumdan uzaklaştıran ve yabancılaştıran akıl hastanesi rnekleri, Avrupa lkeri ve ABD 'de yaygınlaşmış ve bu örnek diğer ülkelere de yayılmıştır. Her biri binlerce hastayı yıllarca toplumdan uzak tutan, en iyi koşullarda bile yeterli bakım ve tedaviyi sağlayamayan bu hastaneler, birçok hastanın hastalığının sürekli hal aldığı ve ömür boyu kaldıkları kurumlar olmuşlardır. Yüzyılın ikinci yarısında bu hastanelere karşı tepkiler artmaya başlamış ve psikofarmakoloji klinik psikiyatride geniş uygulama alanı bulurken, bir yandan da temel bilimlerde beyin biyokimyası, fizyolojisi alanında büyük gelişmelere yol açmıştır. Çalışmalarda psikofarmakoloji, nrokimya ve nörofizyoloji tıp biliminin en önemli uygulama ve araştırma konuları arasına girmiştir [1].

Ruhsal bozukluklar sınıflandırmasında bulunan depresif bozukluk (depresyon), Dünya Sağlık rgt (WHO) kayıtları göstermiştir ki ülkelerin ekonomilerine en çok zarar veren hastalıklar arasındadır [2]. Bu hesaplama, bireylerin sosyoekonomik durumları, işlevsellik verimlilik azalması ve yardım gereksinimleri esas alınarak sonuçlandırılmış çalışmalardır. Depresyon, lkemizde de Ulusal Hastalık Yükü ve Maliyet Etkililik çalışmalarının neticesinde dördüncü hastalık olarak tespit edilmiştir [3]. Çoğu batı ülkesinde de durum

böyledir ve antidepresanların reçete edilmesi yaygınlaşmıştır. Genellikle Selektif Serotonin Geri Alım İnhibitörleri (SSRI) ve son kuşak antidepresan ilaçlar tedavide çok fazla kullanılmaya başlanmıştır [4]. SSRI grubu antidepresanlar genellikle Trisiklik Antidepresan (TSA)'lara oranla daha çok tercih edilirler ve etki düzeylerinin de benzer olması tercihi artırmaktadır [5,6].

Amerika Birleşik Devletleri'nde Epidemiologic Catchment Area (ECA) çalışmalarına göre majör depresyon sıklığı % 3-5,8, bir yıllık prevalans % 2,6-6,2'dir. Hayat boyu risk erkekler için % 3-12, kadınlar için % 10-26 olarak verilmektedir. Genel toplumda yaşam boyu prevalans % 15 kadardır [7,8].

## **1.2. Depresif Bozukluk**

Depresyon, çok semptomlu bir ruhsal bozukluktur. Depresyonun başlıca belirtileri, keyifsizlik, beklentinin azalması, negatif düşüncenin artması, hayatındaki günlük işleri yerine getirememeye, yaşamdan zevk almama gibi hayat konforunu azaltan durumlardır. Depresyondan bahsedebilmek için bu belirtilerin aralıksız iki üç hafta, hergün ve günün tüm saatlerinde yaşanıp yaşanmadığına karar verilmelidir. Bu belirtilerin yanında iştahta değişimler görülür. Özellikle iştah azalması, vakaların bazılarında ise tatlıya karşı aşırı istek olur. Görülen diğer bir belirtisi de uyku problemleridir. Uykuya geçişte zorlanma, uykudan aniden uyanma, sabahları vaktinden önce sıkıntılı bir şekilde uyanma yaşanır. Depresyon yaşayan insanların bazılarında ise sürekli uyuma hali mevcuttur. Hastalarda psikomotor aktivitelerde değişiklikler gözlenir. Psikomotor ajitasyon (kıpır kıpır olma) veya psikomotor reterdasyon (yavaş yavaş hareket etme, yavaş konuşma, işe gitmeme gibi) görülür. Hastalar enerji kaybı, halsizlik, yorgunluk, bitkinlikten yakınır. Pişmanlık ve suçluluk duyguları ile içlenirler. Kendilerini işe yaramaz hissederler. Değersizlik ve suçluluk duyguları gerçeği değerlendirme yetisini bozabilir. Bilinçsel bozukluk olarak hastalar unutkanlıktan yakınır. Konsantrasyon güçlüğü ve dikkat kaybı nedeniyle günlük işlerini yapamaz hale gelirler. Hastaların intiharı düşündükleri gözlemlenmiştir.

Majör depresyon tanısı koyulabilmesi için hastada yukarıdaki belirtilerden beş tanesinin bulunması gerekmektedir. Hastada görülen belirtiler iki hafta boyunca hergün ve gün

boyunca sürüyorsa depresyondan söz edilir. Depresyonda, Santral Sinir Sistemi (SSS)'de norepinefrin, serotonin ve dopaminin azaldığı gözlenmiştir. Kolinerjik sistemde göreceli artış saptanır [9].

### **1.2.1. Depresyon tedavisi**

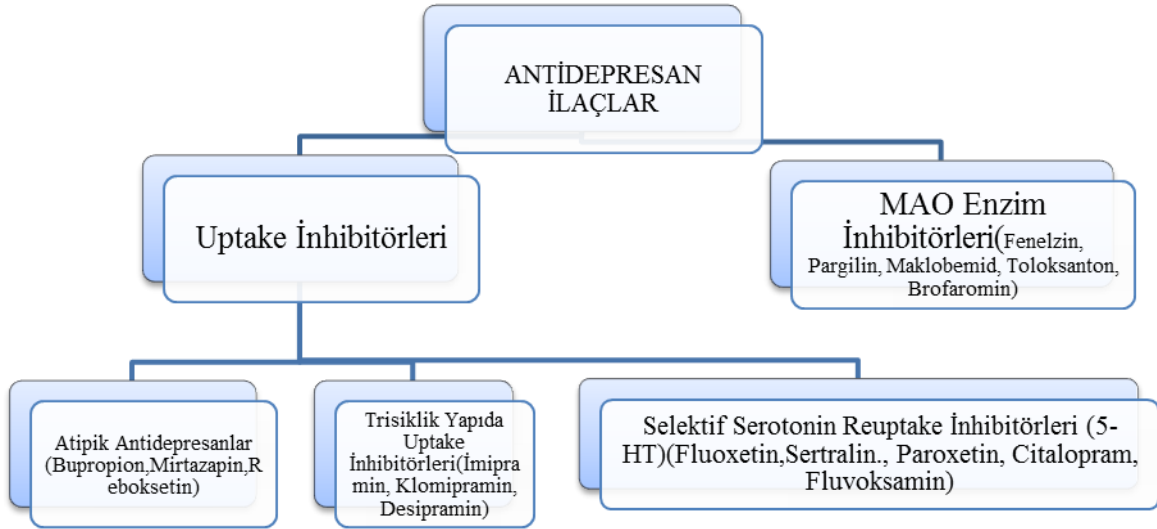
Depresyon etiolojisinde, amin nörotransmitterlerin (serotonin, noradrenalin) santral sinir sisteminde azalmasına bağlı sinaptik iletinin baskılanması ana rol oynar. Depresyon tedavisinde kullanılan ilaçlar temelde serotonin ve noradrenalinin nörona alımını inhibe eden ilaçlar (SSRI, NSRI, TAD) ile santral sinir sisteminde yıkımını sağlayan monoamin oksidaz (MAO) enziminin inhibitörleridir (maklobemid vb). Otoresptör blokajı yaparak sinaptik aralığa serotonin ve noradrenalin salınımını artıran ilaçlarda (mirtazapin vb) mevcuttur [10].

Bu ilaçları sınıflandıracak olursak;

1. Serotonin (5-HT) ve noradrenalinin (NA) SSS'de nörona alımını bloke eden ilaçlar (SSRI, NSRI, TAD)
2. 5-HT ve NA'nin metabolizmasını inhibe eden ilaçlar (MAO inhibitörleri)
3. 5-HT ve NA reseptör blokajı yapan ilaçlar (Mirtazapin vb.)

### **1.2.2. Antidepresan İlaçların Sınıflandırılması**

Antidepresan ilaçların sınıflandırılmasında detaylı olarak sadece tez çalışmamızda kullanılan Seçici Serotonin Geri Alım İnhibitörleri (SSRI)'leri anlatılacaktır.



Şekil 1.1. Antidepresan ilaçların sınıflandırılması

### 1.2.3. Selektif Serotonin Geri Alım İnhibitörleri (SSRI)

Özgül serotoninin geri alımını engelleyen antidepresanlardır. SSRI grubu ilaçlar depresyon hastalığında, kaygı denetim hastalıklarında, obsesyon bozukluklarında, fazla yada az yiyecek tüketimi gibi durumlarda, duyu durum bozukluğu hastalıklarında tedavi amacıyla reçete edilen ilaçlar arasındadır [11]. SSRI'lar depresyon tedavisinde etkin olmaları bakımından farklılık yaratmazken metabolizma, yarı-ömür, plazma seviyesinin doğrusal olması, yaşa bağlı metabolizma farklılıkları ve CYP enzimleri açısından farmakokinetik değişiklikler göstermektedir. Bu gruptaki ilaçlar genel olarak klinik vakalarda sorun teşkil etmemekte ve yaşlılarda güvenilir bir şekilde tedavide uygulanmaktadırlar. SSRI ilaçları, kardiyovasküler sistem üzerinde etkilerinin olmaması, antikolinerjik etkilerinin azlığı nedeniyle ve görülen ilaç yan etkilerinin azlığı sebebiyle kullanım açısından diğer grup ilaçlara göre daha sık kullanılmaktadır [12,13]. Depresyon tedavisinde kullanılacak ilaç seçimi yapılırken dikkat edilecek hususlar ilacın etkin oluşu, yan etkilerinin az olması ve ilacın güvenilirliğidir. Serotonin geri alım inhibitörleri ve çift etkili (serotonin-noradrenalin) depresyon ilaçları, TSA ve MAOI'lerine kıyasla az yan etkileri bulunması nedeniyle çoğu vakada etkinlik bakımından diğer ilaçlarla karşılaştırılabilir seviyededir. SSRI grubu ilaçların bu gibi üstünlükleri bulunduğundan trisiklik antidepresanlar tercih edilmemeli, dirençli vakalarda ilave ilaç olarak ya da tek başlarına kullanılmalıdırlar.

Yapılan araştırmalarda iki nörotransmitter üzerinden etki eden depresyon ilaçlarının etki mekanizmasında daha başarılı sonuçlara ulaşıldığı gibi bu durum henüz kesinleşmemiştir. Major depresyon hastalığının atipik veya melankolik alt tiplerine kıyasla antidepresan ilaç tercihi farklılaşabilmektedir. Tipik olmayan depresyon vakaları hakkında yapılan çalışmalar oldukça azdır, MAOI'lerin üstünlüklerine ait sonuçlar bulunmaktadır. TSA'lar ve çift etkili ilaçlardan venlafaksin iyi olduğunu gösteren çalışmalar bulunmakla beraber paroksetin, sertralin ve moklobemidin de etkili olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır [14]. İlaç seçiminde vurgulanması gerekli görülen diğer bir durumda çoklu ilaç kullanımında mühim olan sitokrom izoenzimleri sebebiyle olan ilaç etkileşmeleridir. Depresyonda kullanılan ilaçların klinik vakalarda diğer ilaçlarla etkileşmelere sebep olabilecek durumları göz önünde bulundurulmalıdır [15,16].

#### **1.2.4. Antidepresan İlaç Etken Maddelerinin Ortak Yönleri**

SSRI'ların meydana getirdikleri ilaç sınıfının beş ünlü üyesi vardır ve bu ilaçlar ABD ve birçok ülkede antidepresan içeren reçetelerin çoğunluğunu oluşturur. Bunlar fluoksetin, sertralin, paroksetin, fluvoksamin ve citalopramdır. Bu beş SSRI'dan her biri, farklı bir kimyasal aileye ait olsa da, hepsinin çok önemli ortak farmakolojik özelliği, serotoninin gerialımını selektif ve güçlü bir şekilde inhibe etmeleridir. Bu etkileri, noradrenalin gerialımı veya alfa 1, histamin 1 veya muskarinik kolinerjik reseptörler üzerindeki etkilerinden çok daha güçlüdür.

Bu nedenle SSRI'lar klinik uygulamalarda büyük ölçüde yerlerini aldıkları trisiklik antidepresanlara göre önemli ayırıcı özellikleri paylaşırlar. Şöyle ki, SSRI'lar, trisiklik antidepresanlardan daha seçici ve daha güçlü serotonin gerialım inhibisyonu özellikleri taşırlar. SSRI'lar trisiklik antidepresanların istenmeyen farmakolojik özelliklerine sahip olmadıklarından, bu özelliklerle ilişkili yan etkilerden de kurtulmuşlardır [17].

#### **1.2.5. SSRI'ların Farmakolojik Ve Moleküler Etki Mekanizmaları**

Her ne kadar klasik olarak SSRI'ların presinaptik akson terminalindeki etkileri sürekli vurgulanmışsa da, son zamanlardaki araştırmalar, serotonin nöronlarının somatodendritik

ucunda gerçekleşen olayların, terapötik etkilerinin açıklanmasında daha önemli olabileceklerini göstermiştir. Postsinaptik serotonin nöronlarında gelişen olayların, akut yan etkilere ve bu yan etkilere karşı zamanla gelişen toleransa aracılık etmeleri mümkündür [17].

**Çizelge 1.1.** SSRI'ların farmakokinetik özellikleri [18].

	<i>Sitalopram</i>	<i>Fluoksetin</i>	<i>Fluvoksamin</i>	<i>Paroksetin</i>	<i>Sertralin</i>
Otoinhibisyon	Yok	Var	Var (hafif)	Var	Yok
Ana bileşik yarı ömrü 26saat (tek doz sonrası)	33 saat	1,9 gün	15 saat	10 saat	26 saat
Ana bileşik yarı ömrü (çoklu doz sonrası)	33 saat	5,7 gün	22 saat	21 saat	26 saat
Aktif metabolit yarı ömrü	3 saat	7 - 9 gün	-	-	62 – 104 saat
Plazma protein bağlanması	% 80	% 95	% 80	% 95	% 95
Kararlı düzeye ulaşması için gereken zaman (gün)	6-7	30-60	3-5	4-5	4-5
En yüksek plazma konsantrasyonuna ulaşması için gereken zaman (saat)	4	6 - 8	5 (1 - 8)	5 (0,5 - 11)	2 - 4

SSRI'lar yapıları bakımından heterojen olan gruplardır. Fluoksetin bir fenilpropilamin türevidir, paroksetin bir fenilpiperidin türevidir, sertralin ise bir naftilamin bileşimidir. Sitalopram ise dimetilaminopropil yan zinciri olan trisiklik bir yapıdadır. SSRI'ların bilinen sedasyon belirtileri bulunmamaktadır. Ancak kaygı bozukluklarında TCA/HCA'lara göre üstünlükleri olduğu düşünülmektedir. SSRI'ların klinik vakalarda depresyon tedavisine

etkileri açısından diğer ilaçlara göre üstünlükleri bulunmamasına rağmen, yan etki insidansı ve çeşitliliği bakımından farklılıklar gösterirler. Yine CYP enzim sistemindeki farklı etkileri nedeniyle de ilaç etkileşimleri birbirlerinden değişiktir. Farklı farmakokinetik özellikleri, kullanım şekillerinde de farklılıklar yaratır. Örneğin, fluvoksamin, diğerlerine göre daha kısa yarılanma ömrüne sahip olduğundan, bir günde iki kez aynı miktarda kullanılması uygun olmasına rağmen, fluoksetin gibi türlerde ve diğer SSRI'larda yarılanma süreleri 24 saat gibi uzun bir süre olduğundan günde bir defa kullanılmaları gerekmektedir. SSRI'ların, suicidal düşünce ve davranışları tedavisinde ve alkol madde bağımlılığında diğer depresyon ilaç gruplarına kıyasla daha başarılı oldukları görülmektedir. SSRI'ların etkileri diğerlerine göre daha çabuk meydana gelse de, TCA'lara oranla daha etkili sonuçlar vermediği bazı araştırmacılar tarafından belirtilmektedir. Şiddetli olmayan vakalarda ve nörolojik kaynaklı hastalıklarda kullanılması önerilir. Lakin, bu çalışmalarındaki sonuçlar netlik kazanmamış olup tartışılmaktadır. Bu ilaçların sürekli kullanımı betaadrenoreseptör ve 5-HT<sub>2</sub> reseptör sayı ve duyarlılığında eksilmeye neden olur. Ancak bu durumlarda değişiklikler gösterebilir [18].

### Fluoksetin

Depresyon tedavisinde kullanılabildiği gibi obsesif kompulsif bozuklukta ve blumia nervozada da başarılı tedaviler gösteren çalışmalar vardır. Unipolar depresyonlarda sinirlilik durumlarını en aza indirdiği düşünülmektedir. Fluoksetin, grubundaki başka ilaçlar gibi beta adrenoreseptör sayı ve duyarlılığında eksilmeye neden olmaz. Ancak GABA-B ve beta 1 reseptör sayı ve duyarlılığını yükseltir. Serotonin geri emilimine kuvvetli oranda engel olur. Etkili doz miktarı günde 20-80 mg'dır. Bu dozun yaşlı hastalarda daha az ayarlanması önerilir. Tesiri çabuk görülür. Fluoksetin ilacının ve etkin bozunma ürününün güçlü olması ve yarılanma ömrünün uzun olması sebebiyle ilacın alınmasındaki aksaklıklar problem değildir. Bu sebeplerden dolayı çekilme belirtileri oluşma durumu söz konusu değildir. Fakat bu özelliği diğer serotonin üzerinden etki eden antidepressanlarla kombinasyonunu olanaksız kıldığı üzere, farklı ilaca geçişte belirli bir zaman beklemek gerekir. Eğer bu süre beklenilmezse, "Santral Serotonin Sendromu" adı verilen istenmeyen bir duruma yol açar. Diğer ilaçlara oranla uyarıcı bir etkisi mevcuttur. Uyarıcı etki yapılan hayvan deneyi çalışmalarında amfetamin ve kokain ihtiyacını azalttığı

gösterilmiştir. Aynı zamanda bazı duyarlı kişilerde, akatizi ve diğer ekstrapiramidal sendrom (EPS) semptomlarına benzer reaksiyonlar ortaya çıkarabilir. Diğer SSRI'lara bağlı serotonerjik etki artışı, nigrostriatal ve tuberoinfundibular nöronlarda inhibisyona dolayısıyla EPS bulgularına sebep oluşturur. Fluoksetinin oluşturduğu EPS yan tesirinin, beta adrenoreseptör iletimindeki artışa bağlı olduğu düşünülmektedir. İştahsızlık ve kilo vermeye sebep olmaktadır. Fluoksetin, genellikle CYP 2D6 enzimini çalışmasını engellediğinden, CYP 2D6 enzimi ile yıkılan ilaç gruplarıyla etkileşime girer. Türkiye’de Fluoksetin, 20 mg’lık kapsül formu ile (Prozac, Depreks, Fulsac, Florak, Zedprex vb) tüketiciye sunulmuştur.

### Fluvoksamin

Fluvoksamin, SSRI grubun ilaçları arasında daha çok obsesif kompulsif bozuklukta kullanımı başarılı bulunmuş bir antidepresandır. Günde kullanılması gereken doz 50-300 mg'dır. Tedavi dozu ilk başta 50 mg/gün olarak belirlenmelidir. Ancak bazı yan etkilere bakılarak doz artımına gidilebilir. Depresyonda genellikle günde 100-150 mg civarında bir doz kullanılır. Obsesif kompulsif bozukluklarda ise, bu dozun iki katı kadar bir doz kullanılması gerekir. İlaç seviyesi tedavi dozuna beş on gün gibi bir sürede ulaştığı düşünüldüğü için klinik etkinin bir haftada başladığı görüşü hakimdir. Ancak bu durumun kesinliği kanıtlanmamıştır. Fluvoksaminin yarılanma ömrü 24 saatten az olması nedeniyle bir günde eşit miktarlarda iki doz şeklinde kullanılması önerilmektedir. Fluvoksaminin, uyarıcı ve EPS yapıcı etkileri mevcuttur. Türkiye’de fluvoksaminin ticari adı Faverin olup 50 ve 100 mg’lık tablet formu ile satışa sunulmaktadır.

### Sertralin

Sertralinin serotonin gerialımına etkisi, fluoksetinle karşılaştırıldığında 5 kat daha etkili olduğu düşünülmektedir. Trombosit hücrelerinde de sertralin serotonin gerialımını engel olmaktadır. Obsesif kompulsif bozukluklarda da kullanılmaktadır. Panik atak vakalarında ise günlük doz 25- 50 mg gibi düşük dozlarda kullanılır. Fluoksetin ve fluvoksaminde görülen EPS etkisi, sertralinde seyrek oranda görülmektedir. Kullanılan etkili doz miktarı, günde 50- 200 mg olup (yaşlı hastalarda günde 50-100 mg), tedaviye mutlaka 50 mg /gün



dozuyla başlanmalıdır. Majör depresyon dışında bu doz genellikle etkili olur. Ancak, majör depresyonlarda ve obsesyonda yüksek dozlarda (günlük doz 200 mg) kullanılması gerekmektedir. Sertralin, günde iki kez bir doz şeklinde aç veya tok olarak kullanılabilir. Tedavide başarı genellikle 15-30 gün arasında görülse de, depresyon belirtilerinde ilk bir haftadan sonra az düzeyde iyileşme olmaktadır. Böbrek ve karaciğer yetmezliği olan hastalarda kullanımında dikkat edilmesi gerekmektedir. Tedavi dozlarında sinir sistemi çalışmasını ve kardiyovasküler işlevselliği bozmaz ayrıca EKG'de herhangi bir değişikliğe yol açmaz. Karaciğerde CYP-450 enzim inhibisyonuna neden olmadığından dolayı, farklı ilaçlarla birlikte güvenli şekilde kullanılabilir. Ancak serotonerjik iletimi arttıran diğer ilaçlarla toksik serotonin sendromuna sebep olabilmektedir. İlaç değişikliği yapılması gerekiyorsa, sertralin bırakılmalıdır daha sonra yeni ilaca başlamak için 15 gün beklenmelidir. Sertralin, Türkiye'de 50 - 100 mg'lık tablet ve kapsül formlarında (Lustral, Serdep, Seralin, Selectra) satışa sunulmuştur.

### Paroksetin

Paroksetin fluoksetin, fluvoksamin ve sertraline oranla seçicilik özelliği daha yüksek olan bir bileşiktir. Klinik vakalarda etkisini beta adrenoreseptör duyarlılığını eksilterek yapmaz ancak serotonin otoreseptör duyarlılığını eksilterek yaptığı iddia edilmektedir. Paroksetinin günlük tedavi dozu 20-60 mg'dır. Yaşlı hastalarda günlük doz 40 mg'dan fazla olmaması gerekmektedir. Renal, hepatik ve kardiyovasküler sistem hastalıkları olan vakalarda günlük dozun 20-30 mg'ı geçmemesine dikkat edilmelidir. Sedatif etkisi olmadığı gibi, uyku bozukluklarına sebep olabileceğinden yatmadan önce kullanımı fazla önerilmemektedir. Alınan yiyeceklerle etkileşime girmediği için ve bulantı ihtimaline karşı sabah kahvaltısıyla beraber alınması önerilmektedir. Yapılan klinik çalışmalarda, paroksetinin diğer SSRI'lara göre, majör depresyon vakalarında daha başarılı olduğu düşünülmektedir.

### Sitalopram

SSRI grubu antidepresanların içinde seçiciliği en belirgin etken madde sitalopramdır. Panik atakta ve psikojenik ağrı durumlarında daha tesirli olduğundan, analjezik tedavi gücü depresyon tedavi gücünden daha hızlıdır ve daha az dozlarda başlamaktadır. Alkol

bağımlılığı durumlarında uzun bir tedavi sonrası alkol alma isteğinde ve alkol kullanımında belirli seviyede azalmalar gösterdiği iddia edilmektedir. Tedaviye başlama dozu genellikle günlük 20 mg'dır. Günlük doz 20 ile 40 mg olmasına rağmen bazı vakalarda en çok 60 mg da kullanılabilir. Renal ve hepatik yetmezliği olan hastalar ile yaşlılarda günlük doz 40 mg olarak ayarlanmalıdır. Sitalopramın tablet formu Cipram 20 mg olarak satışa sunulmaktadır.

SSRI grubu antidepresanların etkileri TCA'lara kıyasla daha çabuk görülse de tedavi etlinlikleri 2 haftaya varan sürelerde ortaya çıkar. Ancak, en yüksek etki için ya da tedavi başarısını izlemek için 2 ay gibi uzun bir süre beklemeye gerek yoktur. Hastaların SSRI grubu antidepresanlara farklı cevap verdikleri de görülmektedir. SSRI grubu ilaçlardan birine tedavi başarı gösterirken diğer bir çeşidine tedavi başarısı göstermeyebilir. Sıklıkla bütün SSRI grubu antidepresanların yan etkileri arasında uyku bozukluğu, iştahsızlık, kilo verilmesi, kendini huzursuz hissetme gibi olumsuz durumlar bazı vakalarda belirgin şekilde görülürken, bazı vakalarda bu durumlarla karşılaşılabilir. Seyrekte olsa hastaların bir kısmında yeterli sürelerde ve tedavi etkin dozlarda kullanılmalarına karşın, yan etkilere engel olunamamış yani yan etkiler azalmamış ise ilacı bırakıp yeni ilaca geçmek yerine, alınan doz bir ay gibi bir süre içinde yan etkilerin azaltılması için en az miktara indirilmelidir. Görülen yan etkiler nedeniyle ilaçların kullanıma düşük dozlarda başlanıp, eğer gerekiyorsa zaman içinde yüksek dozlara çıkılması gerektiği araştırmacılar tarafından vurgulanmaktadır [19-26].

### 1.3. Çalışılan Antidepresanların Kimyasal Yapı Ve Formülleri

Aşağıda çalışılan 4 farklı antidepresan ilaç etken maddesinin (sertralin, fluoksetin, citalopram ve escitalopramın) kimyasal yapıları ve formülleri verilmiştir.

**Tablo 1.1.** Çalışılan etken maddelerinin kimyasal yapıları, formül ve IUPAC adlandırılmaları [59,60,61,62]

	Formül ve Adlandırma	Kimyasal Yapı
<b>Sertralin</b>	(1 <i>s</i> ,4 <i>s</i> )-4-(3,4-dichlorophenyl) 1,2,3,4-tetrahydro- <i>n</i> -methyl-1-naphthalenamine hydrochloride C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> Cl <sub>3</sub> N	
<b>Fluoksetin</b>	( <i>RS</i> )- <i>N</i> -methyl-3-phenyl-3-[4-(trifluoromethyl)phenoxy]propan-1-amine C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> F <sub>3</sub> NO	
<b>Citalopram</b>	( <i>RS</i> )-1-[3-(Dimethylamino)propyl]-1-(4-fluorophenyl)-1,3-dihydroisobenzofuran-5-carbonitrile C <sub>20</sub> H <sub>21</sub> FN <sub>2</sub> O	
<b>Escitalopram</b>	( <i>S</i> )-1-[3-(Dimethylamino)propyl]-1-(4-fluorophenyl)-1,3-dihydroisobenzofuran-5-carbonitrile C <sub>20</sub> H <sub>21</sub> FN <sub>2</sub> O	

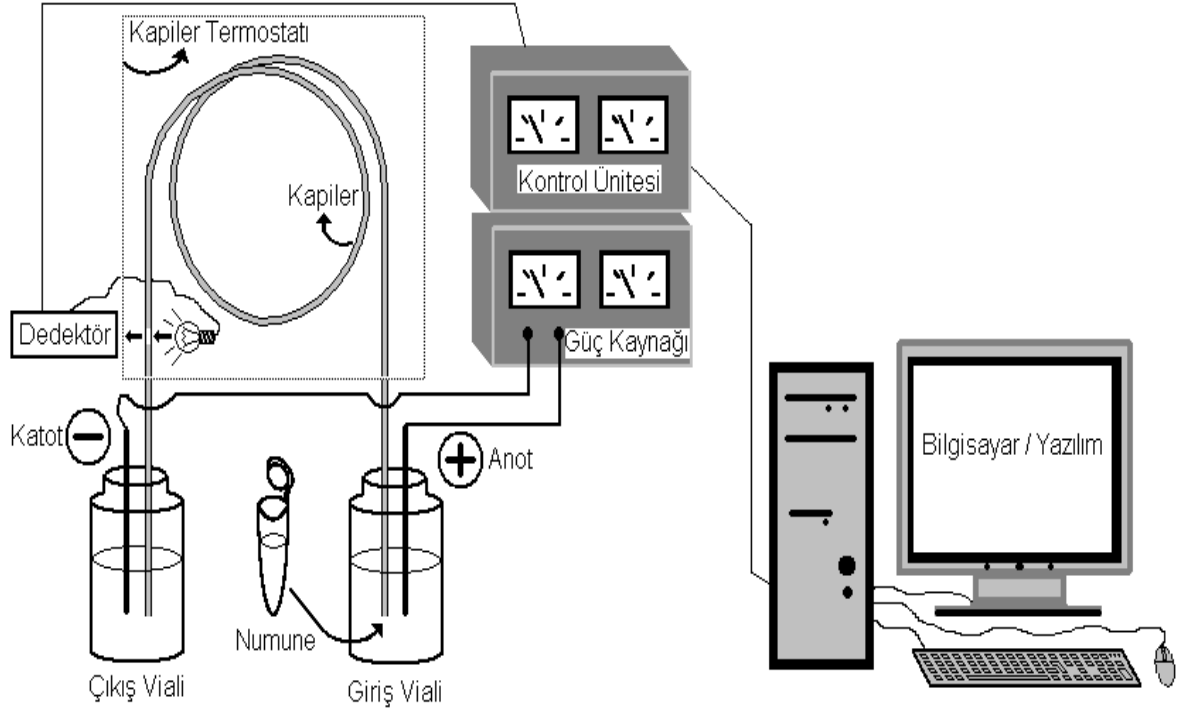
## **2. KURAMSAL TEMELLER**

Kapiler elektroforez 1990'lı yıllarda gelişen, günümüzde de çeşitli bilim alanlarındaki analizlerde uygulanan bir yöntemdir [27]. CE tekniği gıda analizleri, farmakolojik uygulamalar, biyobilim, çevresel uygulamalar ve adli tıp uygulamaları gibi geniş uygulama alanlarına sahiptir. CE'in geniş uygulama alanlarının yanında inorganik iyonların ayırımında da iyon kromatografiye alternatif olarak yaygın kullanıldığı görülmektedir [28,29]. Kapiler elektroforez birkaç kromatografik tekniğin ve jel elektroforezin üstün niteliklerinin biraraya gelmesiyle üretilmiş modern bir metottur. CE, kromatografik yöntemlerin iyi yönlerine sahip olduğu gibi, eş zamanlı ayırma analizlerine olanak sağlaması, analizin az bir zaman diliminde gerçekleştirilebilmesi, analiz için gerekli örnek miktarının az olması, joule ısını etkin bir şekilde dağıtabilme yeteneği, analiz maliyetinin düşüklüğü, yüksek kararlılık, yavaş akışkan faz tüketimi ve verilerin kolay alınabilmesi gibi birçok avantajları bulunan kolay ve karmaşık olmayan bir sistemdir [30]. CE tekniğinde iyon analizi, tampon çözelti geçirilen kapiler kolona elektrik alan uygulanmasıyla birlikte iyonların göç hızları farklılığına dayanmaktadır. İyonların göç hızlarındaki farklılık, yükleri ve kütleleri ile belirlenen kendi elektroforetik mobilitelerine bağlıdır. Kapilerin bir ucundan verilen iyonlar güçlü elektroosmotik akış (EOF) ile kapilerin diğer ucuna sürüklenerek dedektörden sırayla geçerler. CE, kısa analiz süresi ve 0,1 ile 10 nL gibi az miktarda numune gereksinimi ile maddelerin tayinine imkan vermektedir. Ayırma ortamı küçük iç çapa sahip kapiler kolonda gerçekleştiğinden, dedeksiyon hacmini sınırlandırmaktadır [31].

### **2.1. Kapiler Elektroforez**

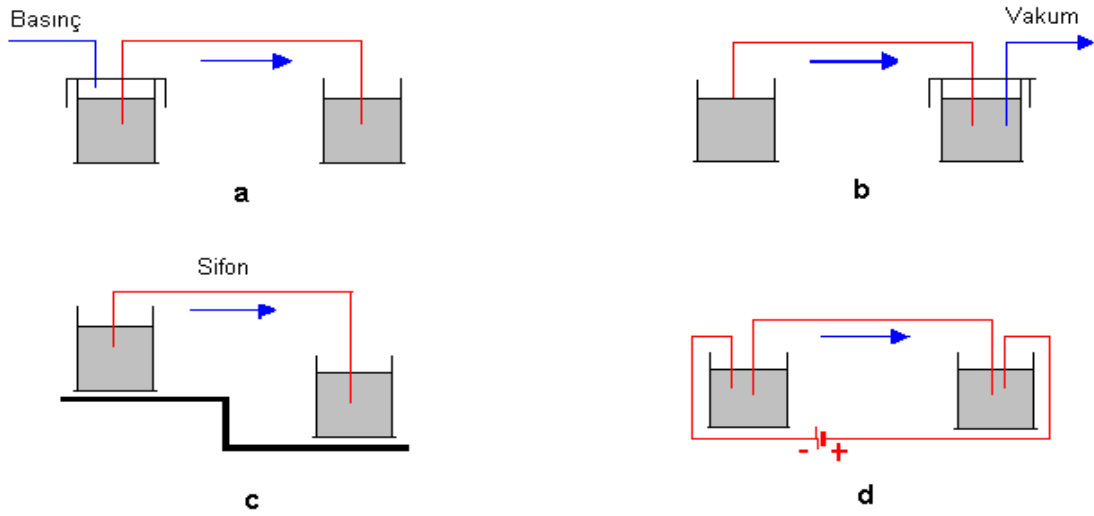
Kapiler elektroforez (CE) cihazı; yüksek voltaj güç kaynağı, giriş ve çıkış viyalleri, kapiler, dedektör ve bilgisayardan oluşmaktadır. Farklı cihaz sistemlerinde kapilerdeki ısınmayı önlemek ve kapiler sıcaklığını kontrol altında tutmak için termostat bulunmaktadır. Bir kapiler elektroforez analizinde izlenen adımlar; kapilerin ön yıkaması, kapiler ile giriş ve çıkış viyallerinin çalışma tamponu ile doldurulması, kapilerin tampon ile şartlandırılması, numunenin kapilere enjeksiyonu ve elektriksel alan uygulanmasını içermektedir. Numunenin içinden alınan maddeler kapiler kolon içinde hareket etmektedirler. Dedektörden geçerken gözlemlenmekte, veriler bilgisayara gönderilmektedir. Veriler,

dedektör cevabının zamana karşı grafiği olan elektroferogramlar şeklinde elde edilmektedir.



Şekil 2.1. Kapiler elektroforez cihazının şematik gösterimi

Numune enjeksiyon çözeltisinin kapiler kolon içine alınması hidrodinamik veya elektrokinetik olarak yapılmaktadır. Hidrodinamik enjeksiyon, daha çok kullanılan enjeksiyon yöntemidir ve üç şekilde yapılabilmektedir. Bu yöntemlerden ilki, kapilerin giriş kısmında bulunan numune vialine basınç uygulanmasıdır. Genelde basınç 50 mbar civarında olup 1 ile 5 saniye arası uygulanır. Daha sonra numune vialı çıkarılıp çalışma tamponu vialı takılır ve voltaj uygulanarak analize devam edilir. Hidrodinamik enjeksiyonun ikinci yolu, numune vialı kapilerin giriş kısmındayken, çıkış kısmındaki tampon vialine vakum uygulanmasıdır. Uygulanan vakumla istenen miktardaki numune kapilere girince vakum kesilir, numune vialı çıkarılıp çalışma tamponu vialı takılır ve voltaj uygulanarak analize devam edilir. Üçüncü hidrodinamik enjeksiyon yönteminde, sifon etkisinden yararlanır. Kapilerin giriş kısmına takılan numune vialı, çıkıştaki tampon vialinden daha yükseğe yerleştirilir. Yerçekiminin etkisiyle, numune kapilerin içine girer. Ardından numune vialı çıkarılıp çalışma tamponu vialı takılır ve voltaj uygulanarak analize devam edilir.

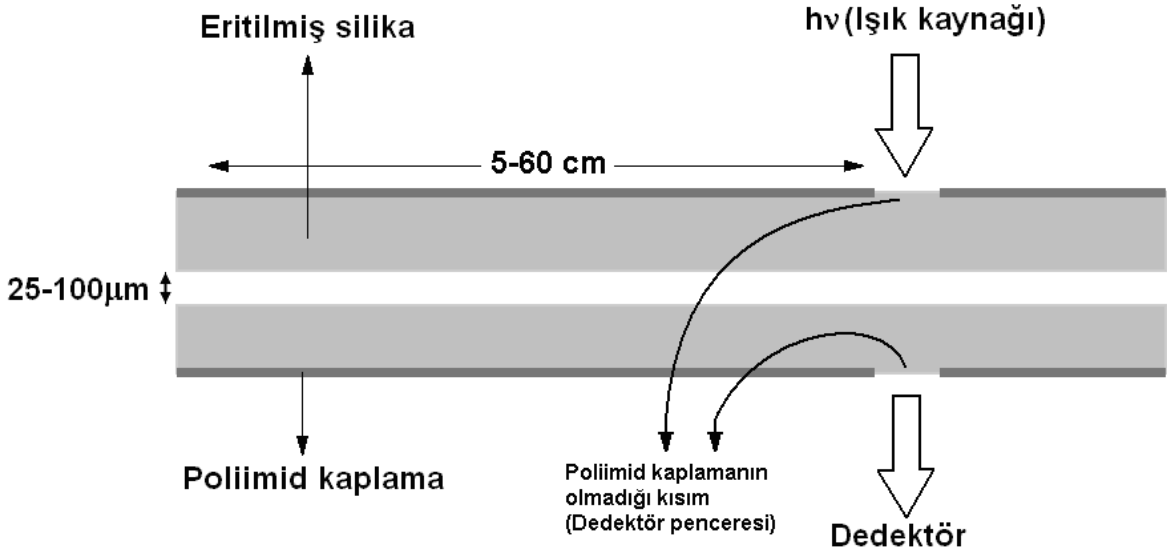


**Şekil 2.2.** Kapiler elektroforezde enjeksiyon sistemleri: a, b, c) Hidrodinamik enjeksiyon, d) Elektrokinetik enjeksiyon.

Elektrokinetik enjeksiyonda kapilerin giriş kısmına numune vialı yerleştirildikten sonra, numune vialiyile çıkış kısmındaki çalışma tamponu vialı arasına voltaj uygulanır. Oluşan elektrik alanın etkisiyle numunedeki iyonlar kapiler içine hareket etmeye başlar. Bu voltajın uygulanmasıyla birlikte numune vialı çıkarılıp tampon vialı takılır ve voltaj uygulanarak analize devam edilir.

Kapiler elektroforezde kullanılacak kapiler kolonun türü, boyu ve çapı, uygulanacak metot, analiz edilecek numune örneği, istenen ayırıcılık ve uygun analiz zamanına göre belirlenmektedir. Kapilerden istenen, kısa analiz zamanıyla, yeterli ve uygun ayırımı yapabilmesidir. Kapiler kolonun üretildiği materyalin elektrik iletkenliğini sağlamaması, kimyasal olarak inert olması ve dedektörle uyumlu olması (örneğin UV dedektör için kapilerin ışınları absorplamaması) gerekmektedir.

Eritilmiş silika son yıllarda en çok kullanılan kapiler materyalidir. Kolay deforme olduğu için dış yüzeyi poliimid ile kaplanmıştır ve sağlamlaştırılmıştır. UV dedektör kullanılacaksa, ışık yolunu kapatmaması için poliimid kaplama bu bölgeden kaldırılıp bir pencere açılması gerekmektedir.



Şekil 2.3. Eritilmiş silika kapilerin boyuna kesiti.

Pyreks kapiler, eritilmiş silika kapilere göre daha sağlam olması ve dedektör penceresi açmaya gerek göstermemesine rağmen 280 nm'nin altında çalışılmama gibi bir dezavantaja sahiptir. Teflon kapilerde homojen iç çap elde edilemez ve ısı iletkenliği düşük olduğundan yüksek voltaj uygulanamaz. Bu nedenlerden dolayı eritilmiş silika, pyreks ve teflondan daha sık kullanılan bir kapiler malzemesidir. Genellikle iç çapı 25- 100 µm olan eritilmiş silika kapiler kolon tercih edilmektedir. Geniş çaplı kapiler kolonlarda yüksek ısı oluşmakta ve kapilerin iç duvarıyla merkezi arasında ısı farkı çok fazla olmaktadır. Küçük çaplı kapiler kullanılması ile UV-VIS absorbans veya floresans gibi dedektörlerde ışık yolunun küçülmesi nedeniyle absorbans düşmekte ve pik yüksekliği azalmaktadır. Aynı zamanda çok küçük çaplı kapilerin partiküllerle tıkanma ihtimali bulunmaktadır.

Kapiler kolon ile yapılan analizlerden tekrarlanabilir sonuçlar almak için ilk çalışmadan önce ve her analizden önce şartlandırma çalışmasının yapılması gerekmektedir. Silika yüzeyinin yapısı, CE'de moleküllerin hızlarına etki eden kuvvetlerden biri olan elektroozmotik akış (EOF) üzerinde oldukça etkilidir. Kapilerin şartlandırılmasıyla kapilerin iç çeperindeki silanol gruplarının iyonlaşma oranı, dolayısıyla EOF, her analizde aynı kalacaktır. Kapiler yeni ise 1 N NaOH, ardından 0,1 N NaOH, saf su ve daha sonra da çalışma tamponu geçirilerek şartlandırma işlemi yapılır. Aynı zamanda her analizden önce 0,1 N NaOH, saf su ve çalışma tamponu geçirilerek kapilerin aynı şartlanması sağlanmış olur. Gün sonunda kapilerden saf su geçirilerek kapilerin yıkanması

sağlanmalıdır. Birkaç gün içinde cihaz açılmayacaksa kapiler içinde mikroorganizma üremelerine engel olmak için hava geçirilerek kurutulmuş şekilde bırakılması faydalı olur.

Kapiler Elektroforez’de tekrarlanabilir sonuçlar elde etmek için kapiler sıcaklığının kontrol altında tutulması önemlidir. Sıcaklığın değişmesiyle doğruluk, göç zamanı, enjeksiyon hacmi ve dedektör cevabı değişir. Ayrıca numunenin içindeki bileşiklerin bozunmasına da sebep olabilir. Kapiler sıcaklığının kontrolü, kapilerinde içinde bulunduğu kaset bölümünde, istenen sıcaklığa termostatlı sistem ile ayarlanmış havanın fan ile üflenmesiyle sağlanmaktadır.

Elektroforez için gerekli olan voltaj, akım veya yüksek voltaj güç kaynağı ile sağlanmaktadır. Pek çok CE ayırımı sabit voltajda gerçekleştirilir, bu nedenle güç kaynağı sabit akım ve sabit güç uygulayabilme özelliğine sahip olmalıdır. Voltaj 30 kV'a kadar, akım 300  $\mu$ A'e kadar ve güç 6 W'a kadar uygulanabilir. Ayrıca gerektiği zaman uygulanan elektrik alanın yönü (giriş vial katot, çıkış vial anot) değiştirilebilir.

CE'de en çok kullanılan dedektörler UV-VIS absorbans (direkt ve indirekt), floresans (direkt ve indirekt), lazerle indüklenmiş floresans, kütle spektrometrisi, iletkenlik, amperometri (direkt ve indirekt), radyometrik ve kırılma indisi dedektörleridir. UV-VIS absorbans dedektörleri CE'ye uygulanabilirlikleri sebebiyle yaygın olarak kullanılırlar. Gözlenebilme sınırı genellikle  $10^{-5}$ - $10^{-7}$  M aralığındadır. Tek bir dalga boyunda veya dizi diyot dedektör kullanılarak birçok dalga boyunda absorbans alınabilir. Absorbans dedektörlerinde kapilerin kendisi dedektör hücresi olarak görev yapar. Bunun için erimiş silika kapilerin dış kısmındaki poliimid koruyucu kaplamanın bir kısmı yakma, çözme ve kazıma ile uzaklaştırılır. Ancak, bu durumda ışın yolunun uzunluğu kapiler iç çapından (50 ile 100  $\mu$ m) fazla olamaz ve bu da derişim cinsinden gözlenebilme sınırını kısıtlar. Işın yolunun arttırılması için “z” veya baloncuk şeklinde dedektör hücresine sahip kapilerler kullanılarak duyarlılık arttırılabilir [32].

Elektroforez, İsveçli kimyacı Arne Tiselius tarafından geliştirilen, yüklü moleküllerin akışkan sıvı ortamında elektrik alanı uygulanarak ayrılması yöntemidir. Yüklü moleküllerin elektroforetik hızlarının farklılığı, ayırımı sağlar [33]. Elektroforez birçok analitik ayırma çalışmalarına uygulanmaktadır. Elektroforezin en belirgin özelliği, biyoteknoloji endüstrisinde biyolojik ve biyokimyasal araştırma ve çalışmalarda yüklü moleküllerin ayrılmasını sağlamasıdır. Elektroforetik ayırma birbirinden farklı iki formatta



gerçekleştirilir; birincisi tabaka (slab) elektroforez ve ikincisi kapiler elektroforezdir. Tabaka yönteminde moleküllerin ayrılması, gözeneklerinde tampon çözelti bulunan yarı katı, gözenekli bir ince jel tabakası kullanılarak yapılmaktadır. Analiz edilen numuneler, bir damla veya bant şeklinde jel tabaka üzerine eklenir, doğru akım potansiyeli belli bir süre uygulanır. Ayırma işlemi gerçekleştirildikten sonra potansiyel kesilir [34].

Partiküllerin hareketliliği esasına dayanan ilk elektroforetik yöntem, protein araştırmaları için Tisellus tarafından 1937 yılında kullanılmıştır. Tisellus bu buluşuyla nobel ödülü almıştır. Daha sonra elektroforetik yöntem geliştirilmiş ve günümüzde çeşitli elektroforetik türler kullanılmaya başlanmıştır. Kapiler elektroforez de bu türlerden birisidir. 1981 yılında Jongerson ve Lukacs 75 µm iç çaplı kapilerde ayırma yaparak yöntemin teorisini ortaya koymuşlardır [35].

Kapiler elektroforez (CE), küçük hacimdeki örneklerde bulunan yüklü parçacıkların hızlı ve etkili şekilde ayrılmalarını sağlayan modern bir analitik yöntemdir. Ayırım, kapiler içindeki elektroforetik ortamda bulunan yüklü parçacıkların elektroforetik hızlarındaki farklılık esasına göre yapılmaktadır [36].

CE yöntemi, klasik elektroforezin ayırma tekniği ile kromatografik yöntemlerin cihaz tasarımlarının birleşmesinden oluşmaktadır. CE büyük bir hızla gelişim gösteren güvenilir bir ayırma yöntemidir. Bu yöntem ile inorganik katyon ve anyonlar gibi en küçük iyonlardan, DNA gibi büyük molekül ağırlığına sahip moleküllere kadar çeşitli moleküllerin kantitatif ve kalitatif olarak analizi mümkündür. Ayrıca başta inorganik anyon ve katyonlar olmak üzere aminoasitler, ilaçlar, vitaminler, karbonhidratlar, peptitler, proteinler ve başka pekçok türlerin analizi yapılabilmektedir. Bu teknik, karmaşık olmayan kolay düzenek yapısı, yüksek ayırma gücü, analiz hızı, küçük hacimde numune gereksinimi, düşük maliyeti ve kullanım kolaylığı gibi daha birçok avantaja sahiptir [37]. Geliştirilen kapiler elektroforez yöntemi, son yıllarda ilaç, ziraat, adli tıp, genetik, biyolojik, tarım gibi çok geniş uygulama alanlarında kullanılabilme olanağına sahip bir yöntemdir. Bu gibi avantajlı yönlerinden dolayı, CE tekniğinin gelecek yıllarda birçok yöntemin yerini alacağı düşünölmektedir.

### 2.1.1. Kapiler Elektrofrezin Temel İlkeleri

Elektroforetik ayırma, elektrik alan uygulanan kapiler kolon içerisindeki iyonların göç hızlarındaki farklılıklara bağlıdır. Kapiler kolon içerisindeki bir iyonun hızı şu eşitlik yardımıyla bulunabilir. (Eş.2.1)

$$v = \mu_e \cdot E \quad (2.1)$$

$$E = V/L \text{ (Volt/cm)} \quad (2.2)$$

Bu denklemde  $v$  iyon hızı,  $\mu_e$  elektroforetik hareketlilik ve  $E$  uygulanan elektrik alan (V/cm) olarak tanımlanır [38]. Elektrik alan; Eş.2.2'de görüldüğü üzere kullanılan kapiler boyu ( $L$ ) ve uygulanan voltaja ( $V$ ) göre değişir. Elektroforetik hareketlilik ( $\mu_e$ ), iyonun özelliğine ve bulunduğu ortam koşullarına bağlıdır. Bir başka değişle  $\mu_e$  her iyon için karakteristiktir. Elektroforetik hareketlilik, uygulanan elektrik kuvvet ile doğru ( $FE$ ) ve ortamın sürtünme kuvveti ( $FF$ ) ile ters orantılıdır. Bu iki kuvvetin  $\mu_e$ 'ye etkisi Eş.2.3 gösterildiği gibidir.

$$\mu_e \propto \frac{\text{Elektrik kuvveti } (F_E)}{\text{Sürtünme kuvveti } (F_F)} \quad (2.3)$$

Uygulanan elektrik kuvvetine ve iyonun sürtünme kuvvetine ait eşitlik Eş.2.4 ve Eş.2.5'de verilmiştir.

$$FE = q \cdot E \quad (2.4)$$

$$FF = -6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r \cdot v \quad (2.5)$$

Eşitliklerdeki  $q$  iyon yükü,  $\eta$  çözelti viskozitesi,  $r$  iyon yarıçapı ve  $v$  iyon hızı olarak tanımlanır. Sabit elektrik alan uygulandığında elektroforez süresince  $FE$  ve  $FF$  kuvvetleri dengeye gelerek sabit bir durum oluşturur. Bu noktada bu iki kuvvet birbirine eşit fakat zıt yönlüdür, bu duruma ait eşitlik Eş.2.6.'de verilmiştir.

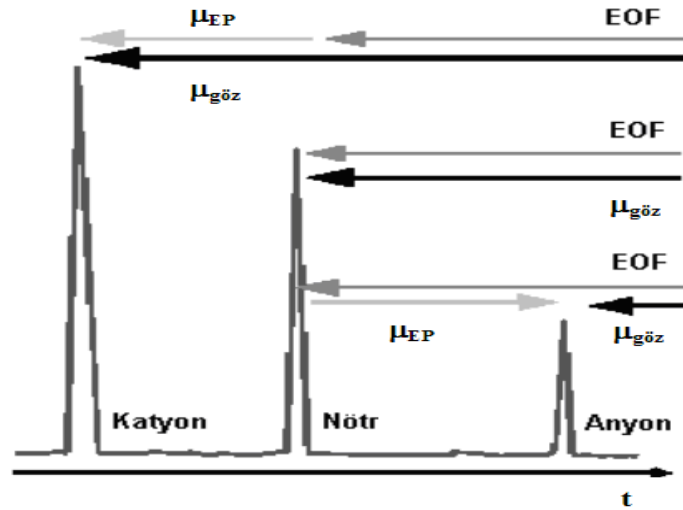
$$FE = FF \text{ ise, } q \cdot E = 6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r \cdot v \quad (2.6)$$

Elde edilen Eş.2.6 ifadesi Eş.2.1'da yerine konduğunda elektroforetik hareketliliği veren son Eş.2.7 elde edilmektedir.

$$\mu_e = \frac{q}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r}$$

(2.7)

Viskozite sabit olduğunda, ayırmada q ve r oranı (q/r) etkili olacaktır. Çözelti içindeki moleküller bu orana bağlı olarak elektrik alanda değişik hızlara sahip olurlar. Küçük ve çok yüklü türler yüksek mobilitelere sahipken, büyük ve az yüklü türler düşük mobilitelere sahiptir [39]. Çözünmüş olan yüklü moleküller, farklı elektroforetik mobilitelere sahip oldukları için birbirlerinden ayrılırlar. Nötral çözünen moleküller, birbirlerinden değil, yüklü çözünen moleküllerden ayrılırlar. Yüksek mobilitelere sahip, daha fazla yüklü ve boyut olarak daha küçük katyonlar kapiler kolondan ilk olarak geçerler. Kapiler kolondan en son, fazla yüklü küçük anyonlar birbirlerinden farklı tip kapiler elektroforez yöntemi ile geçerler [40]. Şekil 2.4'de bir elektroferogram görülmektedir. Nötral çözünen maddeler birbirlerinden farklı tip kapiler elektroforez yöntemleri ile kolay bir şekilde ayrılırlar.



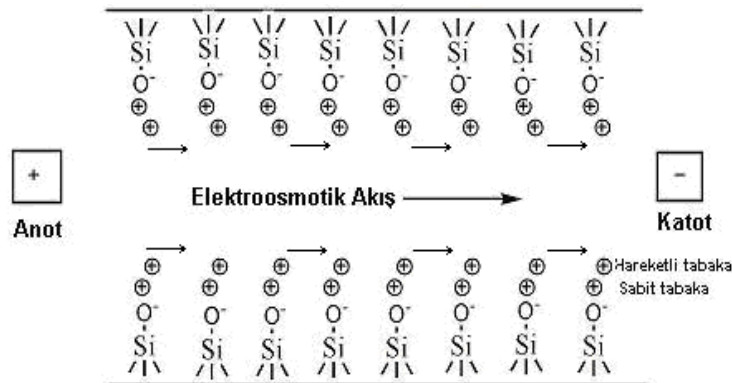
**Şekil 2.4.** Elektroforetik ve elektroozmotik hızların göç zamanı üzerine etkisi: (EOF: elektroozmotik akış,  $\mu_{EP}$ : elektroforetik hareketlilik,  $\mu_{göz}$ : gözlenen hareketlilik, t: zaman).

## 2.2.2. Elektroosmotik Akış (EOF)

CE uygulamasının temel unsurlarından biri de elektroosmotik veya elektroendoosmotik akış (EOF)' dir [39]. Kapiler elektroforezde genellikle eritilmiş silika kapiler kullanılır. Eritilmiş silika kapilerin iç yüzeyi silanol grupları (SiOH) ile kaplıdır. Kapiler iç yüzeyindeki silanol gruplarının NaOH ve KOH ile muamele edilmesi neticesinde SiOH, SiO<sup>-</sup>'a iyonize olur. Konvansiyonel CZE çalışmalarında iyonların göç hareketinde EOF'un baskın olması için silanol gruplarının iyonize olduğu pH  $\geq$  3 tamponlarla çalışılması tavsiye edilir. Kapiler kolondan çalışma tamponu geçirildiğinde eksi yüklü kapiler duvarı, çalışma tamponundaki katyonları çeker. Böylece kapiler duvarının yakınında elektriksel bir çift tabaka ve bu tabaka sonucunda bir potansiyel farkı (zeta potansiyeli) oluşur.

Şekil 2.5'de gösterildiği üzere kolon çeperine yakın bölgedeki artı yüklü iyonlar hareket etmezken çeperden uzaklaştıkça çeperle artı yüklü tanecikler arasındaki elektrostatik çekim kuvveti zayıflar. Kapilere uygulanan elektriksel alanın iyonlar üzerindeki kuvveti daha güçlü hale gelir ve artı yüklü iyonlar beraberce katoda doğru hareket ederler. Bu toplu göç kapiler içindeki tamponun katoda doğru yönelmesine neden olur. Bu akışa elektroosmotik akış (EOF) denir [41,42].

Özet olarak tampon çözelti içeren bir kapiler tüpe yüksek bir potansiyel uygulandığında, genellikle bir elektroosmotik akış oluşur. Bu akış sebebiyle çözücü katot veya anoda doğru hareket eder. Şekil 2.5'de görüldüğü gibi elektroosmotik akışın nedeni silika ile çözelti ara yüzeyinde oluşan elektriksel çift tabakadır [43].



Şekil 2.5. Kapiler yüzeyinde oluşan çift tabaka ve elektroosmotik akış

Elektroosmotik akışın hızı,  $v_{EOF}$ , Eş. 2.8 ile hesaplanır.

$$v_{EOF} = E \cdot \mu_{EOF} \quad (2.8)$$

$v_{EOF}$  : Elektroosmotik akış hızı (cm/sn)

E : Elektriksel alan (V/cm)

$\mu_{EOF}$  : Elektroosmotik hareketlilik ( $\text{cm}^2/\text{V}\cdot\text{sn}$ )

Ayrıca elektroosmotik akışın hızı,  $v_{EOF}$ , Eş.2.9 ile de hesaplanabilir.

$$v_{EOF} = \frac{\epsilon \cdot \zeta \cdot E}{4 \cdot \pi \cdot \eta} \quad (2.9)$$

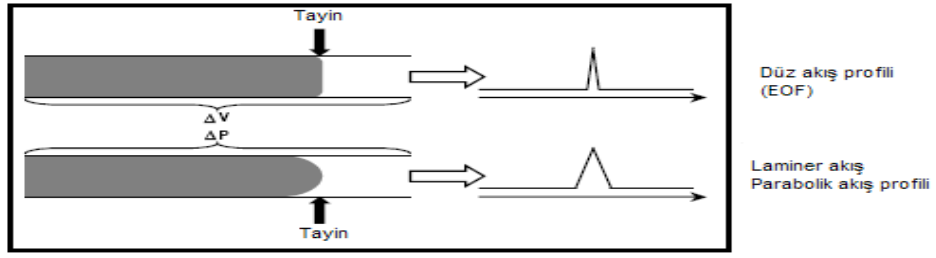
Eşitliğin sağ tarafındaki değişkenler elektroosmotik akışta da değişikliklere sebep olurlar. Burada  $\epsilon$  tamponun dielektrik sabiti,  $\zeta$  zeta potansiyeli, E (volt/cm) elektrik alanı ve  $\eta$  tamponun viskozitesidir.

Elektroosmotik hareketlilik,

$$\mu_{EOF} = \frac{\epsilon \cdot \zeta}{4 \cdot \pi \cdot \eta} \quad (2.10)$$

Elektroosmotik hareketlilik; dielektrik sabiti, Eş.2.10'da görüldüğü üzere viskozite, pH ve konsantrasyon (zeta potansiyelinden etkilenir) gibi tamponların karakteristik özelliklerine bağlıdır ve uygulanan elektrik alanından bağımsızdır.

Kapiler elektroforezde EOF; kullanılan tampon çözeltinin özelliklerine, ayırımın yapıldığı sıcaklığa ve uygulanan potansiyele göre farklılık göstermektedir [44]. Elektroosmotik akış, kapiler içinde parabolik olmayan düz kesitli bir dizi çözelti akışına sebep olur. Sıvı kromatografi tekniklerinde ise akış basıncının etkisi altında parabolik kesitlidir (Şekil 2.6). Bu gibi sebeplerle elektroosmotik akış, sıvı kromatografisinden farklı olarak bant genişlemesine önemli bir derecede etki etmemektedir ve kapiler elektroforez de bu nedenle dar bantlı ve dik pikler elde edilmektedir [39].



Şekil.2.6. Kapiler kolonda EOF ve parabolik akış

### 2.2.3 Elektroosmotik Akışı Etkileyen Faktörler

Elektroosmotik akış hızı kapiler elektroforez tekniğinde, elektroforezin gerçekleşmesini direk etkilediği için kontrol altında tutulmalıdır. EOF hızının yüksek olduğu durumlarda pikler çakışır ve ayırım gerçekleşmez. EOF hızı düşük olduğu durumlarda piklerin ayırım gücü azalmaktadır. CE tekniğinde elektroosmotik akış, çalışmada kullanılan tampon çözeltilerin özelliklerine (dielektrik sabiti, viskozitesi ve dolayısıyla zeta potansiyeli büyüklüğü) çalışılan sıcaklığa göre değişim sergilemektedir. Kapiler kolonda kullanılan tampon çözeltiler, kimyasal yapı farklılıkları nedeniyle değişik birer mobilitelere sahiptirler. Bu gibi sebeplerle kolon içerisinde en uygun akışı sağlamak için tampon çözelti karışımları da kullanılabilir [39].

EOF, uygulanan elektrik alanın değiştirilmesine bağlı olarak orantılı bir şekilde değişiklik gösterir. Elektriksel alanın azaltılmasıyla verim ve ayırıcılık azalabilir. Elektriksel alanın artırılmasıyla joule ısınması meydana gelebilir. Elektroosmotik akışı etkileyen önemli etkilerden biri de tampon çözeltinin pH'ıdır. Tampon çözelti pH'ının artması ile kapiler iç duvarında bulunan SiOH yapılarının SiO<sup>-</sup> 'a iyonizasyonu yüksek oranda olacaktır. Kapiler yüzey yükünde oluşan artış, zeta potansiyelinin ve bunun sonucunda da EOF'ın artmasına sebep olur. Tampon çözeltinin iyonik gücünün veya derişiminin artması zeta potansiyelini düşürür ve EOF'ı azaltır. Tampon çözeltinin derişiminin düşük olması ise, analiz süresinin azalmasına neden olur fakat tampon derişimi numune derişiminden fazla değilse elektriksel iletkenlikte problem oluşturur. Sıcaklık artışı, tampon viskozitesinin azalmasına, dolayısıyla da EOF'nin artmasına neden olur. Sıcaklık sürekli kontrol altında tutulmalıdır, çünkü sıcaklıktaki artış numunenin bozulmasına, pik genişlemesine, tampon kaynamasına

ve tekrarlanamayan göç zamanlarına neden olur [41,42]. Bir diğer etken organik değiştiricidir. Zeta potansiyeli ve viskoziteyi değiştirir. (genelde EOF' ı azaltır)

#### 2.2.4 Band Genişlemesi

Ayrırma etkinliği HPLC de olduğu gibi CE'de de teorik plaka sayısıyla gösterilir. Eş. 2.11'de görüldüğü üzere band genişliğinin artması ayırırma etkinliğini düşürür.

$$N = 5,54 \cdot (t / w^{1/2})^2 \quad (2.11)$$

Band genişlemesine neden olan etkenlerden en önemlisi difüzyondur. Kapilerin çapı küçük olduğu için, kapiler çapı boyunca difüzyon ihmal edilebilir, ancak kapiler boyunca difüzyon oluşabilir. Difüzyon ve N arasındaki eşitlik (2.12.) şöyledir:

$$\sigma^2 = 2Dt = 2DIL / \mu e.V \quad (2.12)$$

Eş.2.11 ve 2.12 yardımıyla teorik plaka sayısı ve difüzyon arasında bir eşitlik (2.13) verilebilir.

$$N = \mu e.V.l / 2DL = \mu e.E.L / 2D \quad (2.13)$$

Bu eşitlikten de görüldüğü üzere teorik plaka sayısı, difüzyon katsayısı arttıkça azalır. Büyük molekül kütlelerine sahip maddeler daha küçük difüzyon katsayılarına sahip olmaları nedeniyle daha yüksek plato sayıları ile ayrılabilirler. Ayrıca Eş.2.12'de görüldüğü üzere analiz süresi azaldıkça difüzyon sebebiyle pik genişlemesi azalacaktır. Kapiler elektroforezde yüksek voltaj etkisiyle ayrırmalar genellikle çok kısa bir zaman diliminde tamamlandığından pikler dik ve simetriktir. Band genişlemesine sebep olan diğer etkiler; sıcaklık, tampon viskozitesinde yerel değişimler sebebiyle pik genişlemesi, enjeksiyon hacmi, büyük hacimlerde difüzyon nedeniyle pik genişlemesi, örneklerin çepere adsorpsiyonu, pik şekillerinde bozulmalar, elektrodispersiyon (örnek ve tampon çözelti arasındaki iletkenlik farklılıkları) ve pik şekillerinin üçgen halinde görölmesidir [45].

### 2.2.5. Joule Isınması

Kapiler elektroforezde uygulanan yüksek voltaj ve bundan dolayı uygulanan yüksek akım kapilerin ısınmasına sebep olur. Bu durum kapiler elektroforez çalışmalarında joule ısınması olarak adlandırılır ve sonuçları olumsuz etkileyen bir durumdur. Joule ısınması kapiler içindeki sıvının soğutulmasını engeller, sıcaklık kapiler içinde yükselir ve bu yükseliş pik genişlemesine, tekrarlanamayan ayırım zamanına, numunenin yapısının bozulmasına veya tamponun kaynaması sonucu elektriksel iletkenliğin bozulmasına sebep olur. Bu gibi olumsuzlukları önlemek için çalışmalarda en uygun potansiyel değeri seçilmelidir [42,46].

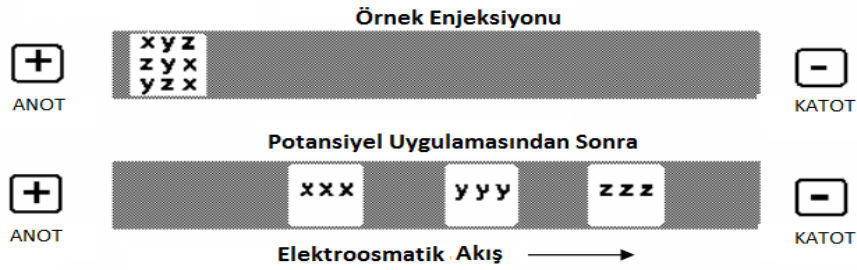
### 2.2.6 Kapiler Elektroforez Türleri

Kapiler elektroforezin en çok kullanılan tipi kapiler zone (kuşak) elektroforez (CZE)'dir. CZE'de ayırım, elektrolit çözeltisi ile doldurulmuş kapiler kolonda, uygulanan elektrik akım altında, maddelerin değişik göç sürelerine sahip olmasına dayanmaktadır. Kapilerin bir polimer veya jel çözeltisi ile doldurulduğu CE türü ise kapiler jel elektroforez (CGE)'dir. CGE'de ayırım büyük molekül yapısına sahip maddelerin moleküler büyüklüklerine göre oluşmaktadır. Nötr moleküllerin ayırımı için geliştirilen CE türleri genellikle kapiler elektrokromatografi (CEKC) adını almaktadır. En yaygın elektrokromatografi çeşidi ise misel elektrokromatografi (MEKC)'dir. MEKC'de molekül ayırımı ise, elektrolit çözeltisine ilave edilen yüzey aktif maddenin meydana getirdiği misel adı verilen oluşumlar ile çözücü arasında yüksüz maddelerin farklı paylaşım esasına dayanır. İzoelektrik odaklanma kapiler elektroforez metodu daha çok proteinlerin analiz çalışmasında kullanılır. Geliştirilen bu metotta ayırım, proteinlerin farklı pH'larda izoelektrik nokta farklılıklarından yararlanarak gerçekleştirilir. Kapiler elektrokromatografi tam bir kromatografidir. Kapiler duvarın iç yüzeyi ortalama 1 µm çaplı sabit fazla doldurulur. Analizi yapılan moleküller uygulanan elektrik voltaj altında sabit fazda tutunmaları esasına göre ayrılırlar. Diğer bir CE yöntemi izotakoforez (ITP)'dir. ITP'de numune değişik iyon hareketliliğine sahip iki elektrolit çözeltisi arasında ortama verilir.



## Kapiler Zone Elektroforez

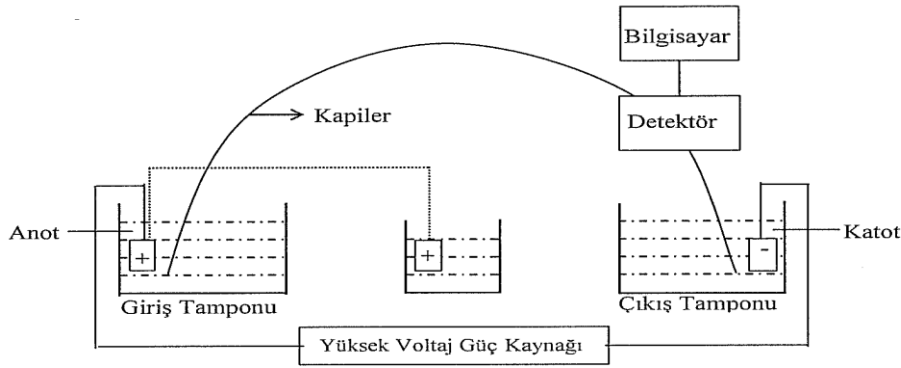
Geniş bir uygulama alanına sahip olan kapiler zone elektroforezin kolay bir çalışma tekniği vardır. Bu yöntemde tampon çözelti, kapiler kolonun her bölgesinde aynı özellikte olup eşit bir şekilde dağılır. Uygulanan voltaj etkisi ile kapiler kolondaki parçacıklar farklı mobilitelerine göre zonlara ayrılır. Bu zonlar arasında tam bir ayırım gerçekleştirilebildiği gibi zonların örtüşme ihtimalleri de vardır. Tam bir ayırım gerçekleştirilmiş zonlar arasında tampon mevcuttur [47]. Kapiler kolon içerisinde oluşan bu zonlar kolon içerisinde ileriye doğru hareket ederek dedektöre ulaşırlar zonların analizi gerçekleşmiş olur. Şekil 2.7.'de bu durum gösterilmiştir.



Şekil 2.7. Kapiler Zone Elektroforez

## Kapiler Elektroforez Cihazının Bölümleri

Bir kapiler elektroforez cihazı; kapiler, dedektör, yüksek voltaj güç kaynağı, numune viali, giriş ve çıkış vialleri ve bilgisayardan oluşur. Genel olarak CE cihazının bölümleri şekil 2.8.'de gösterilmiştir [40].



**Şekil 2.8.** CE cihazının bölümleri

Kapilerin başlangıç kısmı numune vialinin içerisine konular, çalışılan örnek kapilerden içeri verilir, sonra kapiler girişi kaynak vialine yerleştirilir. Kaynak ve hedef vialeri arasında elektrik alanı uygulanır. Numunenin içinde çözülmüş olan maddeler kapilerden göç ettikleri için, bunlar dedektör aracılığı ile belirlenirler ve ayırımı gerçekleştirilen bu maddelerin elektroferogramları bilgisayara gönderilir. Elde edilen elektroferogramlar, dedektör yanıtının zamana karşı belirtildiği ve pikler şeklinde gösterildiği sonuçlardır. Elde edilen elektroferogram, zamana karşı dedektör yanıtlarının grafiğidir. Numune içinde yer alan farklı çözülmüş maddeler, kapilerden farklı oranlarda göç ettikleri için, dedektörden farklı sürelerde geçerler. Ayrılan bileşenler pik olarak farklı göç zamanları ile elektroferogramda belirirler. Göç zamanları piklerin maksimum yaptığı yerde ölçülür. Bu süre elektroferogramda dakika olarak gösterilir.

#### Yüksek Voltaj Güç Kaynağı:

Kapiler üzerinde elektrik alan güç kaynağının varlığında oluşturmaktır. Güç kaynaklarının çoğu ya sabit potansiyel, ya sabit akım ya da sabit güç modunda çalışır ve polariteyi tersine çevirme özelliğine sahiptir. Gerilimler 30 kV'a kadar, akımlar 300  $\mu$ A'e kadar ve güçte 6 W'a kadar çıkabilir. Gerçekleştirilen çalışmanın güvenilirliği ve doğruluğu, uygulanan voltajın kararlılığıyla doğrudan ilişkilidir. Eş.1.2'den de görüldüğü üzere potansiyel değişimiyle elektrik alan da değişir. Elektrik alanın değişimi, göç zamanından, alan tekrarlanırlığına birçok önemli parametrenin değişmesine sebep olmaktadır

## Kapiler

Kapiler Elektroforezde kullanılan kapilerlerin iç çapı 25-100 µm olup; dış çapı 150-520 µm arasındadır. Kapilerin uzunluğu genellikle 50-75 cm arasında tercih edilir. Günümüzde en sık kullanılan kapiler materyali eritilmiş silikadır. Dış kısmı poliimid ile kaplanıp sağlanmıştır ve kolay kırılma durumu böylelikle engellenmiştir. Dedektör olarak UV dedektör kullanılacaksa, ışık yolunun kapanmaması için poliimid kaplama bu bölgeden kaldırılıp pencere açılması gerekir.

Pyreks kapiler, eritilmiş silika kapilere göre daha sağlam olması ve dedektör penceresi açmaya gerek göstermemesi gibi bir üstünlüğü olmasına rağmen dalga boyu 280 nm'nin altında çalışılmama olumsuzluğu gösterir. Teflon kapilerde ise iç çapın homojenliği sağlanamaz bu nedenle de ısı iletkenliği düşük olacağından yüksek voltaj uygulanamaz. Bu gibi sebeplerle eritilmiş silika, pyreks ve teflondan daha çok tercih edilen bir kapilerdir. Genellikle çalışmalarda iç çapı 25-100 µm olan eritilmiş silika kapiler yaygın olarak kullanılmaktadır. Kapilerin büyük çaplı olması durumunda yüksek ısı açığa çıkmakta ve kapilerin iç çeperiyle merkezi arasındaki ısı farkı çok yüksek olmaktadır. Kapilerin küçük çaplı kullanılması ile de UV-VIS absorbans veya floresans gibi dedektörlerde ışık yolunun azalması sebebiyle absorbans azalmakta ve pik yüksekliği düşmektedir. Aynı zamanda çok küçük çaplı kapilerin partiküllerle tıkanma ihtimali gibi olumsuzluklarla karşılaşılabilir.

Kapiler kolonun iç çapının ve boyunun değiştirilmesi; göç zamanı, sıcaklık, adsorpsiyon, dedeksiyon limiti, enjeksiyon hacmi ve ayırma etkinliğinde farklılıklara sebep olur.

## Dedektörler:

Kapiler elektroforezde kullanılan dedektör çeşitleri Çizelge 2.1.'de verilmiştir [39]. En yaygın kullanılan dedektörler UV-VIS ve floresans dedektörlerdir. Absorbans dedektörleri CE'e uygulama üstünlükleri sebebiyle sıklıkla kullanılırlar. Çalışmalarda tespit sınırı genellikle  $10^{-5}$ - $10^{-7}$  M aralığındadır. Tek bir dalga boyunda veya dizi diyot dedektör kullanılarak birçok dalga boyunda absorbans alınabilir. Absorbans dedektörlerinde kapilerin kendisi dedektör hücresi olarak görev yapar. Bunun için erimiş silika kapilerin dış kısmındaki poliimid koruyucu kaplamanın bir kısmı yakma, çözme ve kazıma ile

uzaklaştırılır. Ancak, bu durumda ışın yolunun uzunluğu kapiler iç çapından (50 ile 100 µm) fazla olamaz ve bu da derişim cinsinden gözlenebilme sınırını kısıtlar. Işın yolunun arttırılması için "z" şeklinde veya baloncuk şeklinde dedektör hücresine sahip kapilerler kullanılarak duyarlılık arttırılabilir.

**Çizelge 2. 1. Kapiler Elektroforezde Kullanılan Dedektör Çeşitleri**

<b>Dedektör</b>	<b>LOD(mol/L)</b>
UV absorpsiyon	$10^{-5}$ - $10^{-8}$
İndirekt UV	10-100 kat<UV
Floresans	$10^{-7}$ - $10^{-9}$
Lazer indüklenmiş floresans	$10^{-14}$ - $10^{-16}$
Amperometri	$10^{-10}$ - $10^{-11}$
Kütle spektrometresi	$10^{-8}$ - $10^{-9}$

Kaynak ve Hedef Vialler:

Kaynak viali ifadesinden, bazen giriş viali veya giriş rezervuarı anlaşılmalıdır ve hedef viali ifadesinden ise çıkış viali veya çıkış rezervuarı anlaşılmalıdır. Genellikle kaynak viali, kapiler ve hedef viali aynı tampon çözeltiyle doldurulmaktadır. Tampon çözelti seçimi CE'de en önemli değişken parametrelerden biridir. Tampon çözeltinin pH'ındaki veya konsantrasyonundaki minimal değişiklikler, çözünen madde göçü oranları ve göç zamanlarında önemli farklılıklara neden olur. Bu sebeple tampon değiştiğinde; kaynak vialini, hedef vialini değiştirilen tamponla çok iyi yıkamak gerekir ve kapileri iyi bir biçimde şartlandırmak gereklidir.

### Enjeksiyon:

Örneğin kapiler içerisine alınması enjeksiyon olarak adlandırılır. Örnek vialleri genellikle birkaç  $\mu\text{L}$ 'den birkaç mL'ye kadar hacime sahiptir. Gerçekleştirilen enjeksiyon hacmi 2-20 nL arasında olmaktadır. Kapilere sadece birkaç nL enjekte edildiği için az miktarda bir örnek yeterli olmaktadır. Yüksek hacimlerde çalışmak pik şekillerinin bozulmasına, band genişlemesine, rezolüsyonun azalmasına neden olmaktadır. Numune enjeksiyonu, numune vialinin kapilerin başlangıç kısmına yerleştirilmesi ile mümkün olur. Kapilerin pozitif elektrottaki kısmı numune vialine yerleştirilir. Örneklerin kapilere enjeksiyonu 2 farklı yöntemle gerçekleştirilir. Bu yöntemler hidrodinamik ve elektrokinetik enjeksiyon yöntemleridir. Yaygın olarak kullanılan enjeksiyon yöntemi hidrodinamik enjeksiyon sistemi olup üç şekilde yapılabilmektedir. Bunlardan ilki, kapilerin giriş tarafına konulan numune vialine basınç uygulanmasıdır. Genellikle basınç 50 mbar civarında 1 ile 5 saniye arasında olmaktadır. Daha sonra numune viali çıkarılıp çalışma tamponu viali takılır ve voltaj uygulanarak analiz gerçekleştirilir. Hidrodinamik enjeksiyonun ikinci yolu, numune viali kapilerin başlangıç kısmındayken, çıkış kısmındaki tampon vialine vakum uygulanmasıdır. Uygulanan vakumla enjeksiyonu yapılan numune kapilere girince vakum ortadan kaldırılır ve numune viali çıkarılıp çalışma tamponu viali takılır. Voltaj uygulanarak analize devam edilir. Hidrodinamik enjeksiyonun üçüncü yönteminde ise, sifon etkisinden faydalanılır. Kapilerin çıkıştaki tampon viali giriş kısmındaki numune vialinden, daha yükseğe yerleştirilir. Numune yerçekiminin etkisiyle kapilerin içine girer. Daha sonra numune viali çıkarılıp çalışma tamponu viali takılır ve voltaj uygulanarak analize devam edilir.

Bir diğer enjeksiyon tipi olan elektrokinetik enjeksiyon ise, örnek viali ile çıkış tampon viali arasına çok kısa süreli ve çalışma voltajından daha düşük bir voltaj uygulanmasıyla yapılır. Tekrarlanabilirlik, hidrodinamik enjeksiyona göre daha azdır. Enjekte edilen madde miktarı analitlerin elektroforetik hareketliliklerine bağlıdır [48]. Jel ile doldurulmuş kapilerlerde hidrodinamik enjeksiyonlar çalışmaz. Bu sebeple bu gibi durumlarda elektrokinetik enjeksiyon sistemi tercih edilir. Üretilen, kullanıma hazır olan, cihazlarda pek çok vialin yüklenebileceği oto örnekleme sistemi mevcuttur. Autosampler sistemleri sayesinde örnekler yukarıda anlatılan enjeksiyon yöntemlerinden biriyle kapiler içine enjeksiyon sağlanmaktadır.

## Dataların Oluşturulması ve Değerlendirilmesi:

Kromatografik yöntemlerde olduğu gibi kapiler elektroforez de iyi bir kantitatif analiz tekniğidir. Bu teknikte pik yükseklikleri ve pik alanları derişimle orantılıdır. Kantitatif analiz, her bir ilgili bileşimin bilinen derişimlerini içeren standart çözeltisinin enjeksiyonu sonucunda oluşan sonuç piklerinin her birinin yüksekliklerinin veya alanlarının ölçülüp değerlendirilmesi ile yapılır. Sonraki aşamada örnek bileşenlerinin bilinmeyen derişimlerini içeren bir örnek ortama gönderilir ve pik alanları veya yükseklikleri ölçülüp değerlendirilir. Standart çözeltilerin sonuç piklerinden elde edilen alan ve yüksekliklerin örnek çözeltilerin sonuç pikleri ile karşılaştırılmasıyla örneği oluşturan bileşenlerin konsantrasyonları analiz edilebilir.

### **2.2. Metot Validasyonu**

Metot validasyonu, metodun geçerliliğinin sağlanması (validasyonu), metodun performans kriterlerinin belirlenmesi ve metodun bilimsel olarak tüm koşullarda uygulanabileceğinin garanti altına alınması için yapılan kontrollerdir. Başka bir ifadeyle belirli koşulların yasal gereklilikler, üretim (proses) gereklilikleri, sonuçlanacak analiz değerleri açısından objektif kanıtların ortaya konmasıyla ve deneysel çalışma ve sonuçlarla ispatlanmasıdır [49].

Metot validasyonunda gerekli parametreler şunlardır.

- Spesifiklik (Specificity) ve Seçicilik (Selectivity),
- Kesinlik (Precision),
- Tekrarlanabilirlik (Repeatibility),
- Tekrar elde edilebilirlik (Reproducibility),
- Doğruluk (Accuracy),
- Lineerlik (Linearity),
- Ölçüm aralığı (Range),
- Referans standartlar ile karşılaştırma,
- Kararlılık (stability),
- Tutarlılık (consistency),

- Tayin Limiti (Limit of Detection,LOD),
- Ölçüm Limiti (Limit of Quantitation,LOQ),
- Sağlamlık (Robustness/Ruggedness)

### **2.2.1. Validasyon Parametrelerinin Tayini**

#### Doğruluk

Analiz sonuçlarından elde edilen değerlerin doğru veya gerçek değere yakınlığının ölçüsüne doğruluk denir. Doğruluk parametresi incelenerek, herhangi bir sistemik hata veya geliştirilen metotla ulaşılan değerlerin doğru değerden sapmaları hakkında bilgi almaya olanak sağlar. Doğruluk, numunenin hazırlanma aşamasından kaynaklanan hataların etkilerini görmemizi sağlar. Geri kazanım faktörünün hesaplanmasında kullanılan kalibrasyon eşitliğinin, analiz sonuçlarıyla elde edilen doğrusallık olarak verilen eşitlikle aynı olması gereklidir. Analiz ortamına katkı yapılan analitin, analiz yapılan ortamdan hangi oranda geri alınabildiğini gösterir [50].

#### Kesinlik

Analiz için geliştirdiğimiz metodun uygulama alanındaki şartlarda tekrarlanabilirliğinin ölçüsüdür. Analiz sonucunda ulaşılan sonuçların birbirine yakınlığının ölçüsüdür. Bulunan kesinlik sonuçları %BSS veya %VK (varyasyon katsayısı) olarak tanımlanmalıdır. Kesinlik parametresini belirlemek için analizi yapılan her bir çözelti derişim düzeyi için çalışma, en az 5-6 kez yinelenerek ard arda yapılmalıdır. Ulaşılan sonuçların en az 5 tanesinin sonucunun % Bağıl Standart Sapması, teorik değer %15'inden daha fazla sapmamalıdır [50].

#### Seçicilik

Geliştirilmiş olan metodun seçiciliği, aynı ortamda bulunabilen diğer maddelerin analizi istenen maddeden ayrılarak ölçülebilme yeteneğidir. Burada anlatılmak istenen girişim yapabilecek diğer bileşenlerin yanında analiz edilmek istenilen maddenin ölçülebilmesi o

yöntemin seçiciliğidir. Validasyon parametrelerinin anlamlı olması için seçicilik parametresi geliştirilen analiz yönteminde çok önemlidir [50].

#### Teşhis Sınırı (LOD)

Analizi yapılan maddenin elektroferogramdaki pikinin ve yerinin belirlediği ancak miktar analizi sınırları içerisinde bulunmayan en alt derişimidir. Teşhis sınırı birkaç yoldan hesaplanabilir. Çalışılan analiz deneylerinden ulaşılan sonuçların kullanıldığı hesaplamalardan bulunabileceği gibi, doğrudan gözlenerek de bulunabilir. Teşhis sınırı (LOD) değeri için kullanılan formül aşağıda verilmiştir [50].

$$LOD = (3.3 \times S) / m$$

#### Tayin Alt Sınırı (LOQ)

Analizi yapılan bileşenin kabul görebilir seviyede, kesin ve doğru olarak miktarının tayin edilebileceği, doğrusallık aralığı dışında olan veya aralığın en alt sınırını meydana getiren konsantrasyon seviyesidir. Tayin alt sınırı yapılan analizlerle ulaşılan sonuçların kullanıldığı hesaplamalardan bulunabildiği gibi, doğrudan gözlenerek de bulunabilir. Tayin alt sınırı (LOQ) değeri için kullanılan formül aşağıda verilmiştir [50].

$$LOQ = (10 \times S) / m$$

#### Doğrusallık

Doğrusallık konsantrasyona karşı çözünen analit cevabının geliştirilen yöntemde doğru orantılı olarak değişmesi ve çizilen grafikte cevabın düz bir çizgi üzerinde yer almasıdır. Korelasyon (r) ve tayin (r<sup>2</sup>) katsayısı doğrusallığı veren parametrelerdir. Farklı konsantrasyonlardaki analitin elektroferogramlarından elde edilen cevap değerlerine karşı konsantrasyon miktarları regresyon tayini ile matematiksel olarak hesaplanabilir. Analizi yapılan maddenin cevap değerleri çizilen kalibrasyon grafiğinin doğrusu üzerinde ne kadar



fazla yer alıyorsa ve  $r$  veya  $r^2$  değerleri 1'e ne kadar yakınsa doğrusallık sağlanmış demektir [50].

### 3. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Labat ve ark. (2002) milnacipran, venlafaksin, mirtazapın, sitalopram, fluoksetin, sertralin, paroksetin, fluvoksamin ve üç metaboliti, desmethylcitalopram, desmethyilmirtazapın, desmethylvenlafaksinın eşzamanlı tayini için kapiler elektroforez cihazında miseller elektrokinetik kapiler elektroforez metodu geliőtirmişlerdir. Misel oluőturma 20 mM sodyum borat tamponunda 20 mM sodyumdodesil sülfat ile hazırlanan tampon çözelti ile yapılmıştır. Çözelti % 15'i izopropanol ve saf su ile tamamlanmıştır ve Ph 8,55'de tutulmuştur. Kapiler birleştirilmiş silika kapilerdir ve 60 cm×75µm ID boyutlarındadır. Dedektör DAD dedektördür. Çalışma 25 kV voltaj, 40°C sıcaklıkta, enjeksiyon 0,5 p.s.i ve 15 sn'de hidrodinamik enjeksiyon sistemi ile yapılmıştır. Bu şartlarda antidepresanların göç zamanı 11 dk'dan az sürmüştür.  $R > 0,995$ , LOD değeri 10,20 ng/mL, LOQ değeri 20,30 ng/mL dir. Bu yöntem posmortem vakalarda kan ve idrarda bu bileşenlerin saptanmasını sağlamıştır [51].

Flores J.Rodriguez ve ark. (2004) fluoksetin ve metaboliti norfluoksetinin kapiler elektroforez yöntemi ile analizi için metot geliőtirip bu metot valide edilmiştir. Bu iki molekülün ayrıştırılması 230 nm dalga boyunda sağlanmıştır. Uygulanan voltaj 25 kV'dur. Sıcaklık 25 °C ve kapiler boyutu 60 cm×75 µm'dir. Tampon çözelti metanol asetonitril içinde 15 mM amonyum asetat dir. İç standart olarak paroksetin kullanılmıştır. LOD 10 µg/L dir. Bu metot insan idrarında klinik olarak fluoksetin ve ana metabolitinin seviyelerinin saptanmasında kullanılmıştır [52].

Fermenton Catai, Ana Paulo ve ark. (2009) SSRI grubu ilaçlardan 4 antidepresan fluoksetin, sertralin, sitalopram ve paroksetinin ayrımı kapiler elektroforez yöntemi ile sağlanmıştır. Bu dört ilaç farklı pH değerlerinde enjekte edilerek göç zamanları incelenmiştir. Tampon çözelti olarak 1,25 M fosfat kullanılmış ve ayrıca organik modifier olarak da asetonitril çözeltisi ilave edilmiştir. LOQ 15-30 ng/ mL'dir. Geliştirilen metodun standart sapması % 10,3 civarındadır. Geliştirilen bu metot, plazmada terapötik ilaç moniterizasyonunda başarılı bir şekilde uygulanmaktadır [53].

Sungthong Bunleu, ve ark. (2007) s-enantiomeri içeren essitalopramın saflığının incelenmesi için tanımlama ve belirleme çalışması kapiler elektroforez yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Tampon madde olarak 20 mM fosfat kullanılarak pH 2,5'a ayarlanmıştır. Uygulanan voltaj 20 kV olup sıcaklık 28 °C dir. Tüm bileşikler için dedeksiyon limiti % 0,02 -0,05 arasında değişmektedir [54].

Nevado J.J. Berzas ve ark. (2000) kapiler elektroforez ile farmasötik preparatlarda fluoksetin ve fluvoksaminin eş zamanlı tayini için yöntem geliştirme ve geçerlilik çalışmasında, fluoksetin ve fluvoksamin tespiti için bir kapiler bölge elektroforezi (CZE) yöntemi önerilmiştir. Kantitatif ayırma için en uygun koşullar araştırılmıştır. PH 9,3'e ayarlanmış 40 mM borat tamponu, hidrodinamik enjeksiyon ve 8 kV ayırma voltajından oluşan bir tampon çözeltisi kullanılmış ve bu koşullar altında analiz süresi 2,5 dakikadan yavaş olmuştur. Doğrulama yönteminin temel özellikleri incelenip tartışılmıştır. Fluoksetin ve fluvoksamin için 1,0 mg/L dedeksiyon limiti elde edildi. Geliştirilen yöntem hızlı ve duyarlıdır ve CZE tarafından farmasötik preparatlarda fluoksetin ve fluvoksamin konsantrasyonlarının belirlenmesine ilişkin ilk rapor budur. Ayrıca önerilen yöntem, nominal içeriklerine göre 97,75 ve 102,95 arasında geri kazanımı olan dokuz farmasötik preparata uygulanmıştır [55].

Mandrioli Roberto ve ark. (2004) plazmada antidepresan mirtazapin ve aktif metabolitinin kapiler elektroforez vasıtasıyla enantioselektif olarak belirlenmesi araştırılmıştır. Mirtazapinin ve ana aktif metaboliti N-desmetilmirtazapinin enantioseparasyonu ve analizi için insan plazmasında kapiler elektroforetik bir yöntem geliştirilmiştir. Yöntem optimizasyonu için kiral selektör tipi ve konsantrasyonu, tampon pH'sı ve kapiler sıcaklığı gibi birkaç deney parametresi araştırılmıştır. Analitlerin temel enantio ayrılması, 50 mM fosfat tamponundan oluşan bir arka plan elektrolit içerisinde çözündürülmüş karboksimetil-a-siklodekstrin kullanılarak erimiş silis kılcalında (50 µm çap, 48,5 cm toplam uzunluk; 8,5 cm etkili uzunluk) 2,5 dakika içinde gerçekleştirilmiştir. Tampon çözelti pH'sı 2,5 UV dalga boyu 205 nm'de ayarlandı. Plazma örneklerinin, hidrofilik-lipofilik balans kartuşları (60mg, 3mL) ile katı faz ekstraksiyonu kullanılarak numuneye metanol ile elüte edildikten sonra enjeksiyondan 37.5 kez konsantre edilerek dikkatli bir ön çalışma geliştirildi. Ekstraksiyon verim değerleri çok tatmin edicidir, mirtazapin için

ortalama %89, N-desmetilmirtazapin için %73'tür. Metodun bazı insan plazma örneklerine uygulanması tatmin edici sonuçlar vermiştir [56].

Nevado J.J. Berzas ve ark. (2005) farmasötik formülasyonlarda rasemik sitalopramın kapiler elektroforez ile enantiomerik belirlenmesi, doğrulama ve sağlamlık çalışmalarını gerçekleştirmişlerdir. Kiral selektor karboksimetil- $\mu$ -siklodrekstrin (CM- $\mu$ -CD) kullanılarak rasemik sitalopramın (R - (-) ve S - (+) sitalopramın) enantiomerik ayrılmasına imkan veren bir kirale kapiler elektroforez (CE) yöntemi geliştirilmiştir. Siklodrekstrin (CD) ve tampon konsantrasyonları, tampon pH, voltaj, enjeksiyon basıncı, gibi ayırım üzerindeki kimyasal ve enstrümantal parametrelerin etkisi araştırılmıştır. Rasemik karışımın iyi bir kirale ayırımına, kaynaştırılmış silisli bir kılcal kullanılarak ve % 0.15 CM- $\mu$  içeren bir fosfat tampon çözeltisi (20 mM, pH 7), arka plan elektroliti CD şıral seçici olarak kullanılmıştır. Ayırım 15°C, 30 kV ve hidrodinamik enjeksiyonda normal polarite modunda gerçekleştirilmiştir. Yöntemin doğruluğu (% 98-101), tespit ve tayin limitleri (0.06 ve 0.2 mg/L) belirlenmiştir. Ayrıca, Youden ve Steinner tarafından önerilen istatistiksel bir muamele ile yedi faktör (iç parametreler) için 15 deneyden oluşan bir matris kullanan Plackett-Burman faktöryel deney tasarımı kullanılarak sağlamlık testi yapılmıştır. Önerilen yöntem hızlı, duyarlı, ucuzdur ve ayrıca kapsamlı bir doğrulama çalışması ve ayrıntılı sağlamlık testi ile değerlendirilmiştir. Bu onaylanmış ve sağlam yöntemin kapsamı dört farmasötik formülasyonun analizinde kanıtlanmıştır. Bunlardan ikisi (son zamanlarda İspanya'da mevcuttu), sadece S - (+) - sitalopram'ı (essitalopram) aktif madde olarak içeriyordu. Onların toplam içeriği açısından % 101 ile % 103 arasında geri kazanımı sağlandı. Diğer iki farmasötik tür için yöntem, mevcut rasemik karışımdaki her iki kirale izomerin ayrıştırılmasını ve analizini sağlamıştır [57].

Halvorsen Trine Gronhaug ve ark. (2001) citalopramın likid faz mikro ekstraksiyonu ve kapiler elektroforezi çalışmasında, sıvı faz mikro ekstraksiyonu (LPME) için yeni geliştirilen bir yöntemle, insan plazmasında antidepresan ilaç citalopramın ve ana metabolit N-desmetilitalopramının kapiler elektroforezi (CE) değerlendirildi. Citalopram ve ana metaboliti, gözenekli bir polipropilen boşluk fibrinin gözeneklerinde hareketsiz kılınmış heksil eter vasıtasıyla 1 ml'lik plazma örneklerinden ve içi boş fibrin (alıcı aşama) içinde bulunan 25 ml'lik 20 mM fosfat tamponuna (pH 2.75) ekstrakte edildi. Ekstraksiyondan önce, bazik ilaçların LPME'sini sağlamak için numuneler kuvvetli alkali

yapılmıştır. Numune ve alıcı faz hacimleri arasındaki yüksek oran ve yüksek bölümlenme katsayılarından dolayı citalopram ve ana metaboliti, 25-30 arası bir faktörle zenginleştirildi. Buna ek olarak, örnek temizleme LPME sırasında tuzlar, proteinler ve endojenik maddelerin çoğunluğu heksil eter tabakasına nüfuz edemedi. Ekstraktlar sulu olduğu için direkt olarak CE cihazına enjekte edildi. Plazmada citalopram ve ana metaboliti için tayin limitleri sırasıyla 16.5 ng/ml ve 18 ng/ml iken tespit limitleri sırasıyla 5 ng/ml ve 5.5 ng/ml bulunmuştur. Bu, citalopram ve ana metabolitinin terapötik aralıkta LPME-CE tarafından analiz edilmesini sağlamış ve algılama limitleri, daha önce bildirilen HPLC yöntemleriyle karşılaştırılabilir bulunmuştur [58].

## **4. MATERİYAL ve METOD**

### **4.1. Genel Bilgi**

Bu bölümde sertralin, fluoksetin, citalopram ve escitalopramın kapiler elektroforez yöntemi ile tayinlerinde kullanılan cihaz ve kimyasallar belirtilmiştir.

#### **4.1.1. Kullanılan Cihaz ve Ekipmanlar**

Aşağıda çalışmada kullanılan cihazlar ve gereçler belirtilmiştir.

- Kapiler Elektroforez Cihazı (Agilent Technologies G7100A)
- Kapiler Dedektörü (DAD)
- Kapiler Kolonu (56 cm×50 µm ID column)
- Saf Su Cihazı (Millipore Direct-Q 3UV ; 0,22 µm) ; saf suyun temini için kullanılmıştır.
- Hassas Terazî (Mettler Toledo) ; Katı maddelerin ölçümünde kullanılmıştır.
- Manyetik Karıştırıcı (Falc R.P.M.) ; Çözelti pH'larının ayarlanması sırasında homojenizasyon için kullanılmıştır.
- pH Metre ve elektrot (Mettler Toledo, Hanna HI 1332 Ag/AgCl kombine cam elektrot, Hanna Ins) ; Çözelti pH'larının ayarlanmasında kullanılmıştır.

- Vorteks (IKA Genius 3) ; Enjeksiyon öncesi örneklerin homojenizasyonunun sağlanmasında kullanılmıştır.
- Ultrasonik Banyo (P Selecta Ultrasons H-D, Bandelin) ; Çözeltilerin hazırlanması aşamasında homojenizasyonun sağlanmasında kullanılmıştır.

#### 4.1.2. Kullanılan Kimyasallar

Çalışmalar esnasında kullanılan ilaç etken maddeler ve özellikleri Çizelge 4.1.'de yer almaktadır. Kullanılan kimyasal maddeler ise Çizelge 4.2.'de verilmiştir.

**Çizelge 4.1.** Çalışmada kullanılan ilaç etken maddeler ve özellikleri

Bileşik Özellikleri	Kapalı Formülü	Molekül Ağırlığı	pKa
Sertralin	C <sub>17</sub> H <sub>17</sub> Cl <sub>2</sub> N	306,229 g/mol	9,48
Fluoksetin	C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> F <sub>3</sub> NO	345,791 g/mol	9,80
Citalopram	C <sub>20</sub> H <sub>21</sub> FN <sub>2</sub> O	324,392 g/mol	9,78
Escitalopram	C <sub>20</sub> H <sub>21</sub> FN <sub>2</sub> O	324,392 g/mol	9,78

**Çizelge 4.2.** Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler

Adı	Kullanım amacı	Açıklama
Sodyum Hidroksit	pH ayarlamasında kullanılmıştır.	Merck, analitik saflıkta
Metanol	Çözelti hazırlamada çözücü olarak kullanılmıştır.	Merck, analitik saflıkta
Borik asit	pH ayarlamasında kullanılmıştır.	Merck, analitik saflıkta
Fosforik asit	Tampon çözelti hazırlanmasında kullanılmıştır.	Merck, analitik saflıkta

### 4.1.3. Kullanılan Çözeltiler

- 20 mM fosfat tampon çözeltisi: 14,65 M derişimli fosforik asitten 136 µl alınıp suyla 100 ml'ye tamamlandı. pH 3,5'e ayarlandı. Metot optimizasyonu çalışmalarında tampon çözelti olarak kullanılmıştır.
- 100 ppm sertralin, fluoksetin, citalopram, escitalopram çözeltileri hazırlandı. Her bir standart maddeden 0,01 g hassas terazide tartılıp 100 ml metanolde çözüldü. Her bir stok çözeltiden seyreltmeler yapılarak 5 ppm'lik çözeltileri hazırlanmıştır. Her bir ilaç etken maddesi metot optimizasyonu tayin çalışmalarında kullanılmıştır.

Tüm çözeltiler +4°C 'de buzdolabında saklanmıştır ve çalışma öncesi oda sıcaklığına getirilmiştir.

### 4.1.4. Miktar Tayininde Kullanılan İlaç Preparatı

Sertralin ilaç preparatından miktar tayininde Pfizer ilaç firmasının Lustral adlı ilacı kullanılmıştır. Her bir tablet 50 mg sertraline eşdeğer 55,95 mg sertralin HCl içerir.

## 4.2. Kapiler Elektroforez Yöntemi İle Sertralin, Fluoksetin, Citalopram ve Escitalopram'ın Tayinleri İçin Optimum Koşulların Belirlenmesi İçin Yapılan Çalışmalar

CE ile bu bileşiklerin tayini için optimum koşulların tespitinde, göç zamanının belirlenmesinde önemli parametreler olan, tampon çözelti ve pH'sı, sıcaklık, enjeksiyon modu ve süresi ve ayırma voltajı taranarak optimize edilmiştir.

Çalışma tamponu olarak öncelikle borat tamponu kullanılmış olup pik şekli ve elektroforetik mobilite dikkate alınarak fosfat tamponu tercih edilmiştir. Hazırlanan 20 mM fosfat çözeltisi tampon olarak kullanılmıştır. Çözelti pH'sı 3,5 olarak ayarlanmış olup optimizasyon için pH 3, 3,5 ve 4'te çalışmalar yapılmış olup optimum pH 4 olarak belirlenmiştir. Kolon olarak 56 cm × 50 µm ID kapiler kolonu kullanılmıştır. Kapiler kolon aynı kalmak üzere, yapılan hidrodinamik enjeksiyon ile 100 mbar basınçta enjeksiyon süreleri 1sn, 3sn, 5sn olarak çalışılmış ve optimum sürenin 5 sn olduğu belirlenmiştir.

Kolon sıcaklığı 25°C olarak seçilmiştir. Yapılan bu çalışma DAD dedektörü ile gerçekleştirilmiş olup 205, 220, 240 nm dalga boylarında çalışılmıştır. Standart maddelerin maksimum absorbans yaptığı dalga boyu 205 nm olarak belirlenmiştir. Analitler üzerinde uygulanan gerilimin etkisi 25, 27, 29 kV olarak incelenmiş, analitlerin en iyi ayrımının gözlemlendiği 29 kV optimum olarak seçilmiştir. Çalışmalarda her enjeksiyon arası CE'de ara şartlama yapılmıştır. Optimize edilen koşullarda her bir standart madde ve karışım çözeltilerinin elektroferogramları bulgular bölümünde gösterilmiştir.

### **4.3. Sertralinin İlaç Preparatlarındaki Miktar Tayini İçin Yapılan Çalışmalar**

#### **4.3.1. İç Standart Metodu**

Kalibrasyon grafiğinin çizilmesinde iç standart metodu kullanılmıştır. İç standart kalibrasyon standartına sabit miktarda ilave edilen bir maddedir. İç standartlar çeşitli rastgele ve sistematik hataları dengelerler. Standartlardan alınan ölçme sonuçları standartlardaki analit konsantrasyonlarına göre grafiğe alınır. Örnek için elde edilen analit sinyali/iç standart sinyali oranından kalibrasyon eğrisi kullanılarak analitin konsantrasyonu hesap edilir.

#### **4.3.2. Sertralinin Lustral 50 mg ilacından miktar analizi**

Elde edilen elektroferogramlar sonucunda sertralin ve citalopramın karışım çözeltilisinin analizinde bu iki maddeye ait piklerin iyi bir ayrımının sağlanması nedeniyle iç standart olarak citalopram maddesi kullanılmıştır. Bu analize ait elektroferogram bulgular bölümünde gösterilmiştir.

Lustral adlı ilaç preparatında sertralin analizi için yapılan çalışmada, 10 adet tablet havanda ezildikten sonra hassas terazide tartılıp tartım sonucunun 1/10 u 100 ml suda çözüldü. Çözelti 30 dk ultrasonik banyoda tutuldu. 500 ppm'lik bu çözülden 8 ppm'lik çözelti hazırlandı ve 4 ppm citalopram iç standartı ilave edildi. CE için optimize edilen 100 mbar 5 sn, 29 kV, 25°C, pH 4'te, 205 nm dalga boyu, 56 cm × 50 µm ID kapiler kolonu ile, bu analit çözelti 10 kez enjeksiyon yapılarak sonuç piklerinin herbirinin alanlarının ölçülüp standartlardan elde edilen kalibrasyon grafiği yardımıyla analit çözelti derişimi

8 ppm olarak bulundu. Ayrıca ilaçtan hazırlanan 8 ppm konsantrasyonundaki çözeltiye 2 ppm sertralin standartı ve 4 ppm sitalopram iç standartı eklenip bu katkı çözeltisinin 10 kez enjeksiyonu yapılarak sonuç piklerinin herbirinin alanları ölçülüp standartlardan elde edilen kalibrasyon grafiği yardımıyla katkı çözeltisinin derişimi 10 ppm olarak bulundu.

## 5. BULGULAR

### 5.1. Sertralin, Fluoksetin, Citalopram ve Escitalopramın CE'de Tayini için Metot Optimizasyonuna ait bulgular

Kolon Uzunluğu ve Çapı: 56 cm x 50 µm ID kapiler

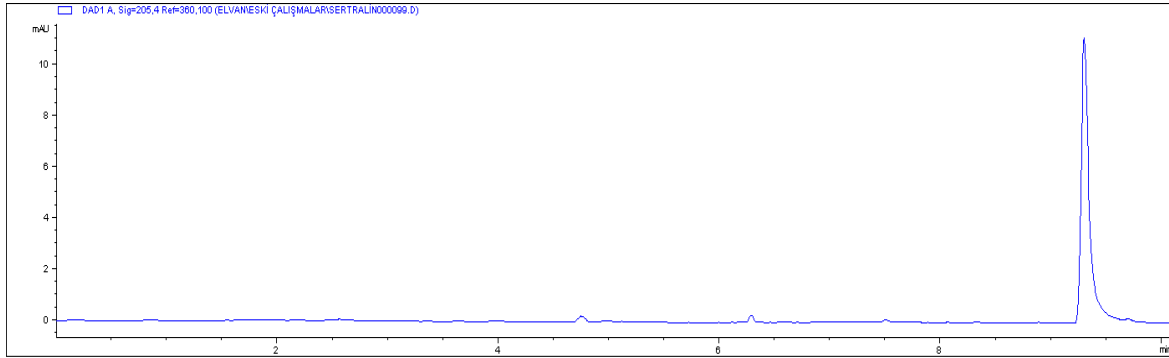
Elektrolit Çözelti (Çalışma Tamponu): 20 mM fosfat tamponu, pH = 4

Enjeksiyon basıncı ve süresi: 100 mBar, 5 saniye

Voltaj: 29 kV

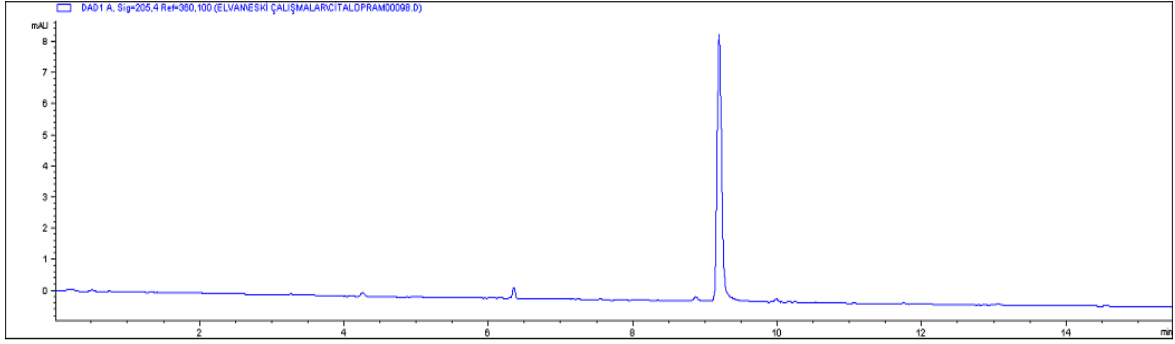
Dedektör: DAD dedektör

Belirtilen koşullarda elde edilen elektroferogramlar Şekil 5.1., 5.2., 5.3., 5.4., 5.5., 5.6.'da gösterilmiştir.

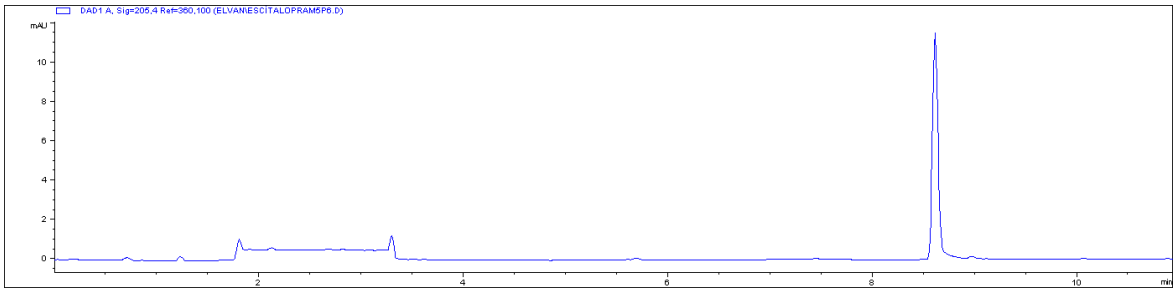


Şekil 5.1. Sertralinin (5 ppm) 205 nm'de elektroferogramı

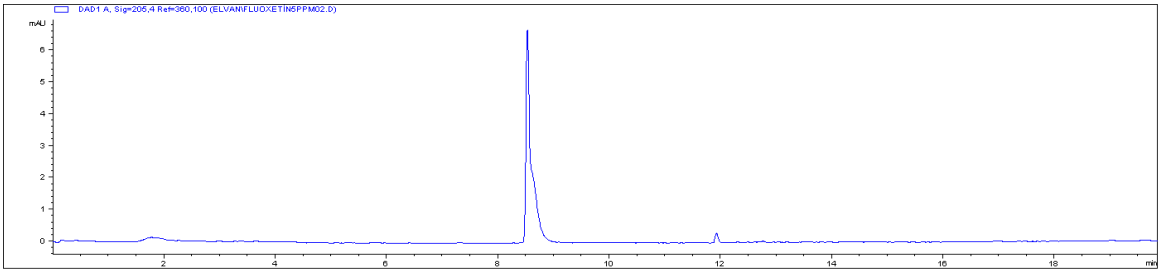




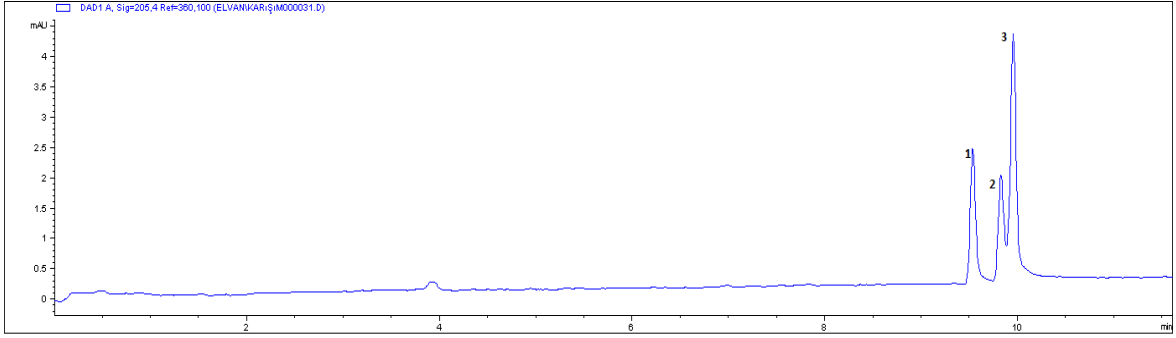
Şekil 5.2. Citalopramın (5ppm) 205 nm’de elektroferogramı



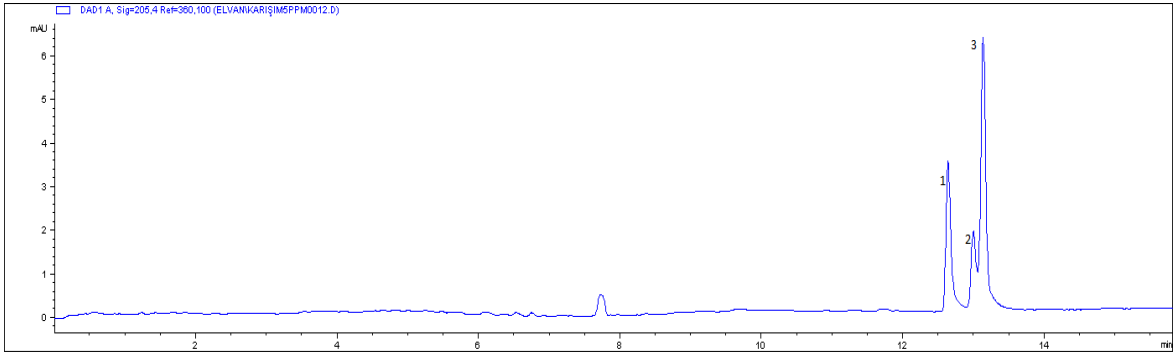
Şekil 5.3. Escitalopramın (5 ppm) 205 nm’de elektroferogramı



Şekil 5.4. Fluoksetinin (5 ppm) 205 nm’de elektroferogramı



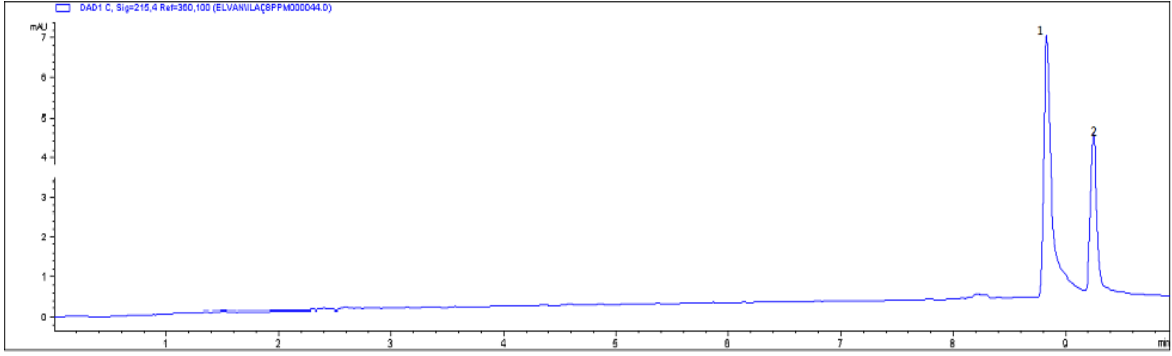
**Şekil 5.5.** Sertralin(1), Fluoksetin(2), Citalopram ve Escitalopram(3)'ün 5 ppm'lik karışım çözeltisinin elektroferogramı (205 nm)



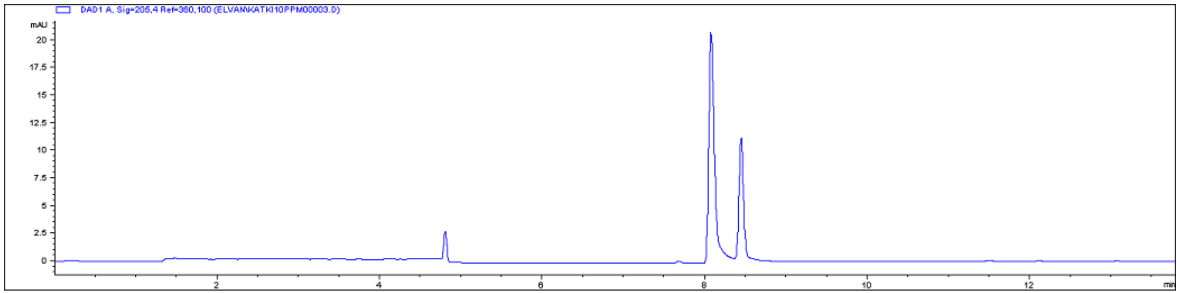
**Şekil 5.6.** Sertralin(1), Fluoksetin(2), Citalopram ve Escitalopram(3)'ün 5 ppm'lik karışım çözeltisinin elektroferogramı (205 nm)

## 5.2. Sertralinin İlaç Preparatlarındaki Miktar Tayinine Ait Bulgular

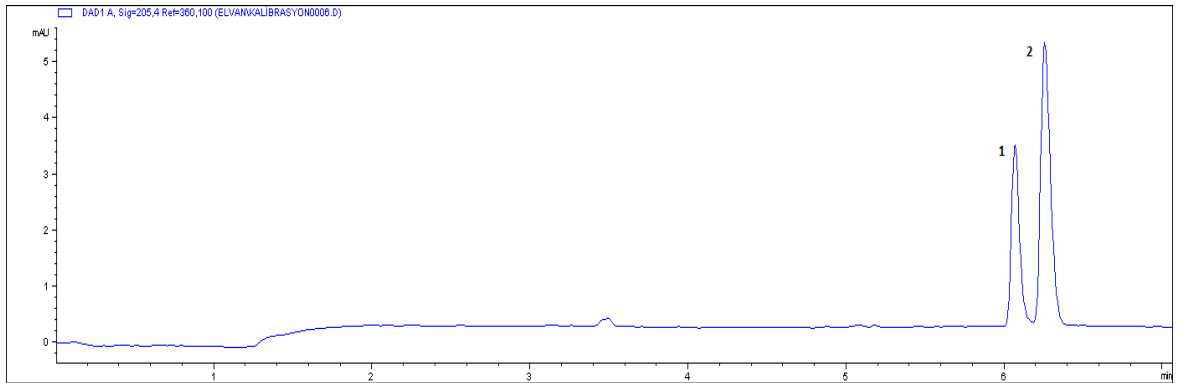
Sertralinin miktar tayini bölüm 4.3.'de anlatıldığı gibi yapılmıştır. Bu çalışmaya ait elektroferogramlar aşağıdaki gibidir.



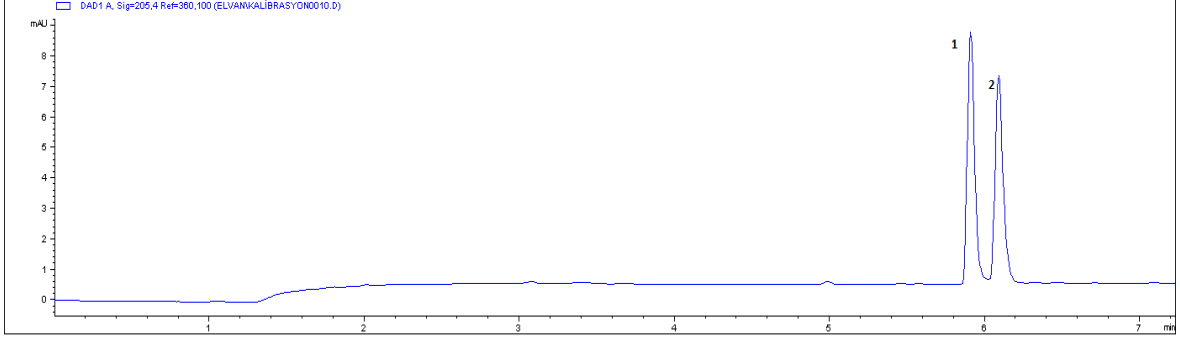
**Şekil 5.7.** 8 ppm'lik Sertralinin ilaç preparatından hazırlanan çözeltisine 4 ppm'lik Citalopram çözeltisi ilavesi ile elde edilen elektroferogram



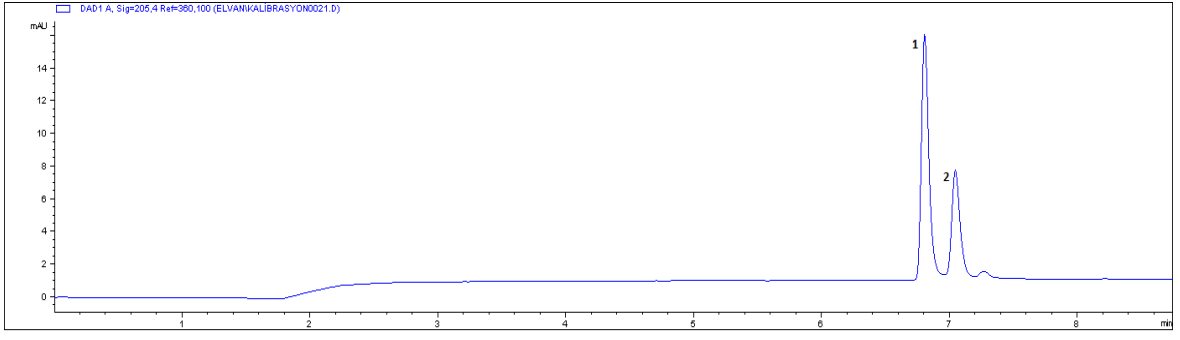
**Şekil 5.8.** 8 ppm'lik Sertralin çözeltisine ilave edilen 2 ppm'lik Citalopram katkı çözeltisinin (geri kazanım) elektroferogramı



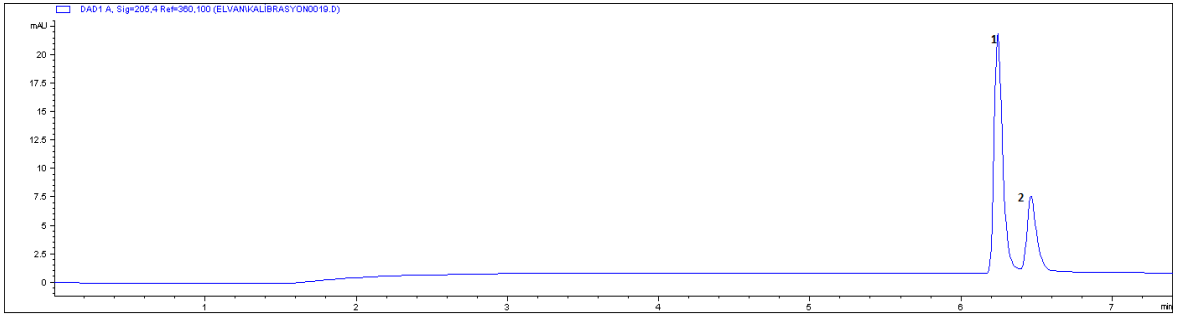
**Şekil 5.9.** 2 ppm'lik Sertralin(1)'e 4 ppm'lik Citalopram(2) ilavesi ile elde edilen kalibrasyon çözeltisinin elektroferogramı (205 nm)



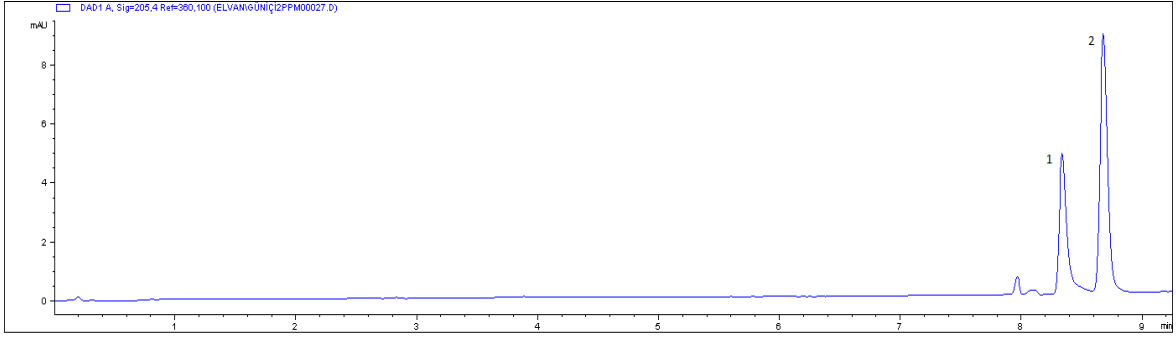
**Şekil 5.10.** 4 ppm'lik Sertralin(1)'e 4 ppm'lik Citalopram(2) ilavesi ile elde edilen kalibrasyon çözeltisinin elektroferogramı (205 nm)



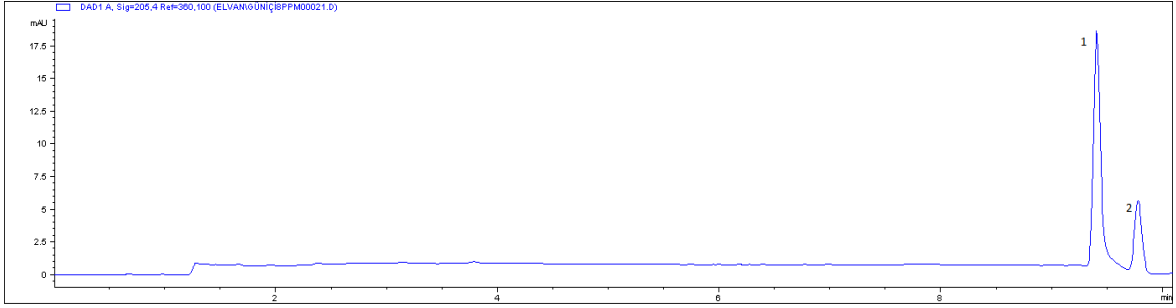
**Şekil 5.11.** 8 ppm'lik Sertralin(1)'e 4 ppm'lik Citalopram(2) ilavesi ile elde edilen kalibrasyon çözeltisinin elektroferogramı (205 nm)



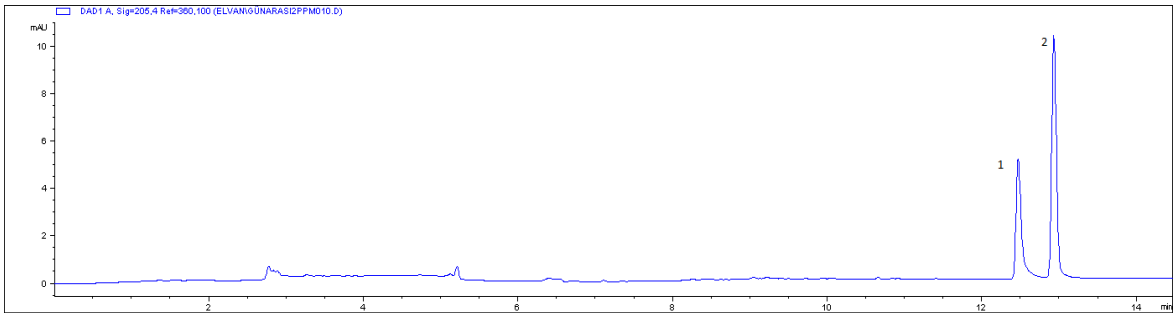
**Şekil 5.12.** 12 ppm'lik Sertralin(1)'e 4 ppm'lik Citalopram(2) ilavesi ile elde edilen kalibrasyon çözeltisinin elektroferogramı (205 nm)



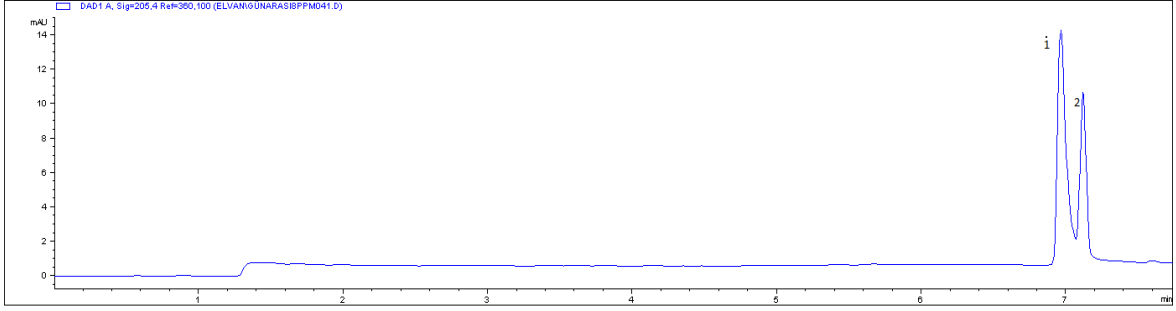
**Şekil 5.13.** 2 ppm'lik Sertralin(1)'e 4 ppm'lik Citalopram(2) ilavesi ile elde edilen gün içi çalışmasının elektroferogramı (205 nm )



**Şekil 5.14.** 8 ppm'lik Sertralin(1)'e 4 ppm'lik Citalopram(2) ilavesi ile elde edilen gün içi çalışmasının elektroferogramı



**Şekil 5.15.** 2 ppm'lik Sertralin(1)'e 4 ppm'lik Citalopram(2) ilavesi ile elde edilen gün arası çalışmasının elektroferogramı



**Şekil 5.16.** 8 ppm'lik Sertralin(1)'e 4 ppm'lik Citalopram(2) ilavesi ile elde edilen gün arası çalışmasının elektroferogramı

### 5.3. Sertralinin CE yöntemi ile tayini için metot validasyonu

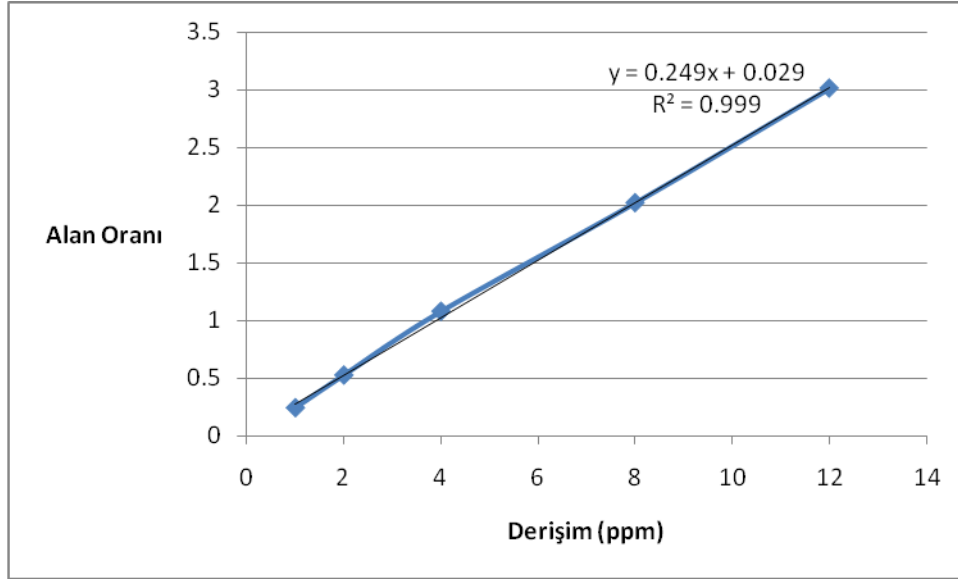
CE yönteminin optimizasyonu gerçekleştirildikten sonra kalibrasyon grafiği çizilmiş ve yöntem geçerliliğini göstermek amacı ile doğrusallık, kesinlik, doğruluk, teşhis sınırı ve tayin alt sınırı için hesaplamalar yapılmıştır.

#### 5.3.1. Kalibrasyon Çalışması

Kalibrasyon grafiğinin çizilmesinde iç standart metodu kullanılmıştır. İç standart kalibrasyon standartına sabit miktarda ilave edilen bir maddedir. İç standartlar çeşitli rastgele ve sistematik hataları dengelerler. Standartlardan alınan ölçme sonuçları standartlardaki analit konsantrasyonlarına göre grafiğe alınır. Örnek için elde edilen analit sinyali/iç standart sinyali oranından kalibrasyon eğrisi kullanılarak analitin konsantrasyonu hesap edilir.

Sertralinin CE yöntemi ile tayini için yapılan bu çalışmada iç standart olarak citalopramın 4 ppm' lik çözeltisi kullanılmıştır. Sertralin standartı 1, 2, 4, 8, 12 ppm lik konsantrasyonlarda hazırlanmış ve citalopram 4 ppmlik iç standartı bu çözeltilere ilave edilmiştir ve her bir konsantrasyondaki kalibrasyon çözeltileri CE'de 5 kez enjeksiyon yapılmıştır. Şekil 5.17. de belirtildiği üzere bileşik için belirlenen aralıkta yüksek korelasyonlu bir doğru elde edilmiş ve analit için konsantrasyona (mg/L) karşı ortalama

pik alanı oranı değerleri kullanılarak oluşturulan kalibrasyon grafiğinin regresyon denklemi  $y=0,249x+0,029$  olup regresyon katsayısı  $R^2=0,999$  dir.



Şekil 5.17. Sertralinin CE yöntemi ile oluşturulan kalibrasyon grafiği

### 5.3.2. Duyarlılık ve Doğrusallık

Sertralinin ilaç etken maddesi standartının CE-DAD yöntemi ile analizinde gözlenebilme sınırı (LOD) 0,295 ppm ve tayin limiti (LOQ) kabul edilen BSS sınırları içinde (<%2) 0,894 ppm olarak hesaplanmıştır (Çizelge 5.1.)

Çizelge 5.1. Doğrusallık ve Duyarlılık Parametreleri

Regresyon Denklemi	$y=0,249x+0,029$
Regresyon Katsayısı ( $R^2$ )	0,999
Lineer Aralığı (ppm)	1-12 (n=5)
Gözlenebilme Sınırı (ppm)	0,295
Tayin Alt Sınırı (ppm)	0,894

### 5.3.3. Kesinlik Ve Doğruluk

Ölçüm sonuçlarının birbirine yakınlığının göstergesi olan doğruluk ve kesinlik için gün içi ve günler arası çalışmalar yapılmıştır. Gün içi çalışmalarda sertralinin 2 ve 8 ppm konsantrasyonlarında çözeltileri hazırlanmış ve bu çözeltilerin aynı gün 5 tekrarlı enjeksiyonu gerçekleştirilmiştir. Günler arası çalışmada farklı üç günde 5 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlarda doğruluk yüzde bağıl hata ve yüzde ortalama geri kazanım olarak ifade edilmiştir. Kesinlik sonuçları ise, bağıl standart sapma (% BSS ), ortalama ve standart sapma olarak verilmiştir.

**Çizelge 5.2.** Sertralinin CE yöntemi ile analizine ait gün içi bulgular

Çalışılan sertralin derişimleri(mg/L)	$\bar{x}(n=5)$	% ort. geri kazanım	Standart sapma	%Bağıl standart sapma
2	2,005	100,267	0,011	0,590
8	7,992	99,907	0,025	0,318

$\bar{x}$ : ortalama, n: deney sayısı, SD: standart sapma, %BSS: % Bağıl standart sapma

**Çizelge 5.3.** Sertralinin CE yöntemi ile analizine ait günler arası bulgular

Çalışılan sertralin derişimleri(mg/L)	$\bar{x}(n=5)$	% ort. geri kazanım	Standart sapma	% Bağıl standart sapma
2	2,008	100,413	0,014	0,722
8	8,007	100,094	0,035	0,444

x: ortalama, n: deney sayısı, SD: standart sapma, %BSS: % Bağıl standart sapma



#### 5.3.4. Tabletlerde Sertralin Miktar Tayini Sonuçları

Sertralinin ilaç preparatlarından miktar tayini önceki bölümlerde anlatılan yol izlenmiş olup sonuçlar Çizelge 5.4 ve 5.5'de gösterilmiştir.

**Çizelge 5.4.** Tablette sertralin miktar tayin sonuçları

Tablette belirtilen sertralin miktarı (mg/L)	8,000
Bulunan ortalama miktar ( $\bar{x}$ (n=10)(mg/L))	8,009
% Ortalama geri kazanım	100,121
Standart sapma	0,022
%Bağıl standart sapma	0,278

**Çizelge 5.5.** Tablette katkı yapılan sertralin miktar tayin sonuçları

Tablette eklenen sertralin miktarı (mg/L)	2,000
Bulunan ortalama miktar ( $\bar{x}$ (n=10)(mg/L))	9,996
% Ortalama geri kazanım	99,969
Standart sapma	0,026
%Bağıl standart sapma	0,261

## 6. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada SSRI grubu antidepresan ilaçlardan sertralin, fluoksetin, sitalopram ve essitalopramın CE yöntemi ile tayinleri için kapiler elektroforez yöntemi kullanılmıştır. Belirlenen optimum koşulda, sertralinin ilaç preparatından miktar tayini gerçekleştirilmiştir.

Çalışmanın ilk aşamasında sertralin, fluoksetin, sitalopram ve essitalopramın CE'de tayinleri için metot optimize edilmiştir. Bu amaçla 56 cm × 50 µm ID kapiler kolonu kullanılmıştır ve 25°C sıcaklıkta çalışılmıştır. Tampon çözelti olarak pH'sı 4 olan 20 mM fosfat tamponu kullanılmıştır. Enjeksiyon basıncı ve süresi 100 mbar ve 5 sn, voltaj 29 kV olarak koşullar optimize edilmiştir. Bu çalışmalara ait standart maddelerden hazırlanan çözeltilerin elektroferogramları bulgular bölümünde gösterilmiştir. Çalışmanın ikinci aşamasında sertralinin ilaç preparatlarından miktar analizi belirlenen optimum koşullarda gerçekleştirilmiştir.

Çalışılan yöntem sertralin, fluoksetin, sitalopram ve essitalopram ilaç etken maddelerinin CE'de tayin edilebileceğini göstermiştir. Sertralinin miktar analizine ait LOD 0,2953 mg/L, LOQ 0,894 mg/L'dir. Regresyon katsayısı,  $R^2$  0,999 olup doğrusallık sağlanmıştır. Ancak eş zamanlı ayırım çalışmalarında essitalopram ve sitalopramın ayırımının gerçekleştirilemediği görülmüştür. Essitalopram sitalopramın s-enantiomeri olduğundan piklerin çakışacağına dikkat çekilip, çalışmanın bu duruma göre planlanması önerilmektedir.

Metotla ilgili validasyon parametreleri saptanmış ve elde edilen parametreler ışığında yöntemin uygulanabilir olduğu bulunmuştur. Geliştirilen ve yöntem geçerlilik hesaplamaları yapılmış olan metot, sertralin içeren ilaç preparatlarına uygulanmış ve etken maddelerin analizinde kullanılabileceği görülmüştür. Bu yöntemin geçerliliğinin sağlanması yapılan validasyon çalışmalarında; doğrusallık, duyarlık, kesinlik, geri kazanım vb. parametreler incelenmiş ve istatistiksel değerlendirmeleri yapılmıştır.

Sonuç olarak son yıllarda kullanımı hızla artan depresyon tedavisinde kullanılan SSRI grubu ilaçların kapiler elektroforez yöntemi ile kolay, doğru, hızlı bir şekilde analizlerinin ve miktar tayinlerinin yapılabileceği gösterilmiştir.

## KAYNAKLAR

- [1] Öztürk, O. M., Uluşahin, A., 2008, "Ruhsal Bozukluklarda İlaç Sağaltımı", Ruh Sağlığı ve Bozuklukları, 2.Cilt, *Nobel Tıp Kitapevleri*, Ankara, 821-893.
- [2] Preventing Suicide: a resource for primary health care workers. Geneva:World Health Organization ; 2000. 17 p.
- [3] Sağlık Bakanlığı Başkent Üniversitesi Refik Saydam Hıfzısıhha Mektebi Müdürlüğü (Türkiye), 2004, "Ulusal Hastalık Yüku ve Maliyet Etkililik Çalışması, Final Raporu.
- [4] Onur, E., Yemez B., Polat, S., Gürz, N.Y., Cimilli C., 2007, "Konsultasyon Liyezon Psikiyatrisi Uygulamaları ve Farmakoterapi Tercihlerindeki Değişim" *Klinik Psikofarmakoloji Bülteni*, 17(4): 73-167
- [5] Cipriani, A., Barbui, C., Brambilla P., Furukawa T.A., Hotopf, M., Geddes, J.R., 2006, "Are All Antidepressants Really The Same? " *JClin Psychiatry*, 67(6): 64-850
- [6] Çetin, M., Açikel, C., 2009, "Meta Analizler Işığında Bütün Antidepresanlar Aynı mıdır? ", *Klinik Psikofarmakoloji Bülteni*, 19(2): 87-92
- [7] Köroğlu, E., 1996, Amerikan Psikiyatri Birliği: Mental Bozuklukların Tanısal ve Sayımsal El Kitabı, *Hekimler Yayın Birliği*, Ankara.
- [8] Tezvaran, Z., Akan, H., İzbrak, G., 2010, "Birinci Basamak Sağlık Hizmetlerinde Depresyon Yönetimi" *Turkish Family Physician*, 1(3): 1-7
- [9] İşçi, Asil., 2007, "Psikiyatri", Küçük Stajlar, *Tusem Tıbbi Yayıncılık*, Ankara, 233-236.
- [10] Yılmaz, C.M.,2007, "Antidepresanlar" Farmakoloji, *Tusem Tıbbi Yayıncılık*, Ankara, 170-180
- [11] Haddad, P., 1998, "The SSRI Discontinuation Syndrome", *J psychopharmacol*, 12(3): 305-313
- [12] Feighner, J.P., Cohn, J.B., 1985, "Double- Blind Comparative Trials of Fluoxetine and Doxepin in Geriatric Patients With Major Depressive Disorders" *JClin Psychiatry*, (46):20-25

- [13] Fredericson, O.K., Toft, B. Christophersen, L. ve ark., 1985, "Kinetics of Citalopram in Elderly Patients", *Psychopharmacol*, (86): 253-257
- [14] Kennedy, S.H., Lam, W.R., Nutt D.J., ve ark., 2004, "Treating Depression Effectively, Applying Clinical Guidelines" *Thomson Publishing*, Hampshire, U.K.
- [15] Baziere, S., 2003, Psychotropic Drug Directory, *Fivepin Publishing*, Bath.
- [16] Yüksel, N., 2003, "Antidepresan İlaçlar" Psikofarmakoloji, *Çizgi Tıp Yayınevi*, Ankara 169-264
- [17] Stahl, S.M., 2003, "Seçici Serotonin Gerialım İnhibitörleri", Temel Psikofarmakoloji, Çeviri Editörleri: Taneli, B., Taneli, Y., *Yelkovan Yayıncılık*, İstanbul, 220-230.
- [18] Preskorn, S.H., 1996, Clinical Pharmacology of Selective Serotonin Reptake İnhibitors, *Professional Communications Inc*.
- [19] Yüksel, N., 1998, Psikofarmakoloji, *Bilimsel Tıp Yayınevi*, Ankara.
- [20] Bernstein, J.G., 1995, "Handbook of Drug Therapy in Psychiatry", Part 1 and Part 2 Mosby-Year Book, Inc. Missouri.
- [21] Kaplan, H.I., Sadock, B.J., Grebb, A.J., 1994, "Synopsis of Psychiatry" Behavioral Sciences Clinical Psychiatry, Baltimore.
- [22] Güç, O., 1996, "Antidepresan Tedavi: Selektif Serotonin Reuptake İnhibitörleri" *Hacettepe Tıp Dergisi*, (27): 77-80
- [23] Janicak, P.G., Davis, J.M., Preskorn, S.H., Principles and Practice of Psychopharmacotherapy, Baltimore.
- [24] Grahame-Smith, D.G., 1992, Serotonin in Affetive Disorders, Selektive Serotonin İnhibitors in Psychiatric Practice, *Int Clin Psychopharmacol*, 6(4): 5-13
- [25] Aberg-Wistedt, A., 1989, The Antidepressants Effects of 5-HT Uptake İnhibitors, *BJ Psychiatry*, 155(8): 32-40

[26] Newhouse, P.A., 1996, Use of Serotonin Selektive Reuptake İnhibitors in Geriatric Depression, *J Clin Psychiatry*, 57(5): 12-22

[27] [http://www.chemsoc.org/chembytes/ezone/2000/altria\\_nov00.htm](http://www.chemsoc.org/chembytes/ezone/2000/altria_nov00.htm)

[28] Timerbaev, A.R.,1995. Metal Ion Analysis by Capillary Electrophoresis: New Possibilities in Separation and Detection, *J.Capillary Electrophoresis*, 2, 14-23.

[29] Fritz, J.S., 2000. Recent Developments in the Separation of Inorganic and Small Organic Ions by Capillary Electrophoresis, *J.Chromatography A.*,884, 261-275.

[30] Desai M. J., Armstrong D.W., 2003. Separation, Identification, and Characterization of Microorganisms by Capillary Electrophoresis, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67, 38-51.

[31] Polesello S., Valsecchi M. S., 1999. Electrochemical detection in the capillary electrophoresis analysis of inorganic compounds, *J.Chromatography A*, 834,103–116.

[32] Büyükağa, M., 2010, "Bazı Benzoksazolon Türevlerinin Asitlik Sabitlerinin (Pka) Ultraviyole Spektroskopisi, Potansiyometri Ve Kapiler Elektforez Teknikleri İle Belirlenmesi" Yüksek Lisans Tezi, *Yakın Doğu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Lefkoşa*, 20-30

[33] Weinberger, R., 2004, "Practical Capillary Electrophoresis 2<sup>nd</sup> edition", *Academic Pres*, San Diego, 125.

[34] Pico, Y., Fekete, A., Kopplin, P. S., 2007, "Food Toxicants Analysis: Techniques, Strategies and Developments", *Elsevier*, Amsterdam, 561.

[35] Jorgenson, J. W., and Lukacs, K. D., 1981, "Zone Electrophoresis in Open- Tubular Glass Capillaries", *Anal. Chem.*, 53(8), 1298-1302.

[36] Li, S. F. Y., 1992, "Capillary Electrophoresis 1<sup>st</sup> edition", *J.of Chrom. Library vol 52, Elsevier*, Netherland.

[37] Jorgenson, J. W., 1986, "Electrophoresis", *Anal. Chem.*, 58(7), 743A-760A.

[38] Lunte, S. M., Radzik, D. M., 1996, "Pharmaceutical and Biomedical Applications of Capillary Electrophoresis", vol 2, *Elsevier*, England, 5-30.

[39] Heiger, D. N., 1992, "High Performance Capillary Electrophoresis: An Introduction", *Hewlett-Packard Company*, France, 136.

[40] Baker, D. R., 1995, "Capillary Electrophoresis 1<sup>st</sup> edition", *John Wiley & Sons Inc.*, New Jersey, 1-51.

[41] Smith, N. W., Evans, M. B., 1994, "Capillary Zone Electrophoresis in Pharmaceutical and Biomedical Analysis", *J. Pharmaceut. Biomed.*, 12(5): 579-611.

[42] Ahuja, S., Jimidar, M., 2008, "Capillary Electrophoresis Methods for Pharmaceutical Analysis", *Elsevier*, USA, 18-30.

[43] MacTaylor, C. E., Ewing, A. G., 1997, "Critical review of recent developments in fluorescence detection for capillary electrophoresis", *Electrophoresis*, 18(12-13): 2279-90.

[44] Chen, D. Y., Dovichi, N. J., 1994, "Yoctomole detection limit by laser-induced fluorescence in capillary electrophoresis", *J. Chromatogr. B*, 657(2): 265-69.

[45] Engelhardt, H., Beck, W., Schmitt, T., 1994, "Capillary Electrophoresis", Vieweg, Braunschweig, 8.

[46] Tang, G. Y., Yang, C., Gong, H. Q., Chai, J. C., Lam, Y. C., 2006, "Numerical Simulation of Joule Heating Effect on Sample Band Transport in Capillary Electrophoresis", *Anal. Chim. Acta*, 561(1-2): 138-149.

[47] Skoog, D. A., Holler, F. J., Nieman, T. A., 1998, "Enstrümental Analiz İlkeleri birinci baskı", Çeviri Editörleri: Kılıç, E., Köseoğlu, F., Yılmaz, H., *Bilim Yayıncılık*, Ankara.

[48] Bjerregaard, C. and Michaelsen, S., 1999, "Chromatography and Capillary Electrohoresis in Food Analysis", *Paston Prepress*, Denmark.

[49] Eurochem Working Groups, 1998. The Fitness for purpose of analitical metods a laboratory guide to metod validation and related topic.

[50] Doğrukol D, Doç. Dr. Lütfi Genç. " Kromatografik Yöntemler " , BİBAM Yayınları, Eskişehir, 1-132.

[51] Labat, L., Deveaux, M., Dallet, P., Dubost, J.P. " Seperation of new antidepressants and their metabolites by micellar electrokinetic capillary chromatography " *Journal of Chromatography B*, 77317-23 (2002)

[52] Flores, J.R., Nevado, J.J.B., Penalvo, G.C., Diez, N.M." Development and validation method for determination of fluoxetine and its main metabolite norfluoxetine by nonaqueous capillary electrophoresis in human urine " *Talanta* 65: 163–171 (2005)

[53] Catai, A.P.F., Carrilho, E., Lancas, F.M., Queiroz, M.E.C., " Fast Separation Of Selective Serotonin Reuptake Inhibitors Antidepressants In Plasma Sample By Nonaqueous Capillary Electrophoresis " *Journal Of Chromatography A*,1216:5779-5782 (2009)

[54] Sungthong, B., Jac, P., Scriba, G.K.E., "Development And Validation Of A Capillary Electrophoresis Method For The Simultaneous Determination Of Impurities Of Escitalopram Including The R-Enantiomer"*Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis* 46:959-965(2008)

[55] Nevado, J.J.B., Salcedo, A.M.C., Llerena, M.J.V., Nueva E.A., "Method development and validation for the simultaneous determination of fluoxetine and fluvoxamine in pharmaceutical preparations by capillary electrophoresis" *Analytica chimica Acta*, 417(2000) 169-176

[56] Mandrioli, R., Pucci, V., Sabbioni, C., Bartoletti, C., Fanali, S., Raggi, M.A., "Enantioselective determination of the novel antidepressant mirtazapine and its active demethylated metabolite in human plasma by means of capillary electrophoresis" *Journal of Chromatography A*, 1051(2004)253-260

[57] Nevado, J.J.B., Cabanillas, C.G., Llerena, M.J.V., Rabelo, V.R., "Enantiomeric determination, validation and robustness studies of racemic citalopram in pharmaceutical formulations by capillary electrophoresis" *Journal of Chromatography A*,1072(2005) 249-257

[58] Halvorsen, T.G., Bjergaard, S.P., Rasmussen, K.E.," Liquid-phase microextraction and capillary electrophoresis of citalopram an antidepressant drug" *Journal of Chromatography A*,909(2001) 87-93

[59] <https://www.drugbank.ca/drugs/DB01104>

[60] <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00472>

[61] <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00215>

[62] <https://www.drugbank.ca/drugs/DB01175>

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Soyadı, Adı : ÖZSOY, Elvan  
Uyruğu : T.C.  
Doğum tarihi ve yeri : 15.10.1978 Uşak  
Medeni hali : Evli  
Telefon : 0 505 7754656  
e-mail : elvanozsoy@hotmail.com

### Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Lisans	ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ	2000
Lise	UŞAK SAĞLIK MESLEK LİSESİ	1996

### İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2010-2016	UŞAK HALK SAĞLIĞI LABORATUVARI	Kimyager

### Yabancı Dil

İngilizce