

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

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**GALANTAMİN'İN İLAÇ PREPARATLARINDAN KAPİLER ELEKTROFOREZ  
YÖNTEMİ İLE TAYİNİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**HATİCE ÖZKURT**

**KASIM 2015**

**UŞAK**

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

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**GALANTAMİN'İN İLAÇ PREPARATLARINDAN KAPİLER ELEKTROFOREZ  
YÖNTEMİ İLE TAYİNİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**HATİCE ÖZKURT**

**UŞAK 2015**

## **Kabul ve Onay Sayfası**

Hatice ÖZKURT tarafından hazırlanan "Galantamin'in İlaç Preparatlarından Kapiler Elektroforez yöntemi ile Tayini " adlı bu tezin Yüksek Lisans Tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Doç. Dr. Erol ŞENER

Analitik Kimya Anabilim Dalı, Anadolu Üniversitesi .....

Kimya Anabilim Dalı, Uşak Üniversitesi

Doç. Dr. Nurullah ŞANLI .....

Kimya Anabilim Dalı, Uşak Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr. Hakan SERT .....

Kimya Mühendisliği, Uşak Üniversitesi

Tarih : .. / .. / 2015

Bu tez ile U.Ü. 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.

HATİCE ÖZKURT

**GALANTAMİN'İN İLAÇ PREPARATLARINDAN KAPİLER ELEKTROFOREZ  
YÖNTEMİ İLE TAYİNİ**

**(Yüksek Lisans Tezi)**

**HATİCE ÖZKURT**

**UŞAK ÜNİVERSİTESİ**

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**Kasım 2015**

**ÖZET**

Asetilkolin beynin bellek ile ilgili bölgelerinde önemli bir nörotransmitterdir. Alzheimer hastalığında asetilkolin azalması bellek bozukluğu ile paraleldir. Kolinerjik fonksiyonda düzelme sağlayan ajanlar kognitif fonksiyonlarda stabilizasyon veya düzelme sağlayabilir. Ancak, bu tedaviler hastalığın fizyopatolojik ilerlemesini durdurmaz. Bu amaçla, kullanılan temel ilaçlar asetilkolinesteraz inhibitörleridir. Galantamin, hafif ve orta şiddette Alzheimer hastalığının tedavisinde kullanılmaya başlanılan bir kolin esteraz inhibitörüdür. Hafif ve orta derecede şiddetli Alzheimer tipi demansın tedavisinde endikedir.

Bu çalışmamızda, piyasada bulunan farmasötik dozaj formlarından Galantamin'in tayinine yönelik kapiler elektroforez yöntemi geliştirilmiştir. Elde edilen % geri kazanım değerlerinin yüksek olmasından ilaç katkı maddelerinin yöntemi etkilemediği sonucuna varılmıştır. Galantamin için geliştirilen yöntemin doğruluğu, duyarlılığı, uygulanabilirliği ve seçiciliğini gösterebilmek için gerekli tüm validasyon parametreleri çalışılmıştır.

Bilim Kodu : 405.03.00.

Anahtar Kelimeler : Alzheimer, Kapiler Elektroforez, Galantamin, Asetilkolinesteraz İnhibitörleri

Sayfa Adedi : 89

Tez Yöneticisi : Doç. Dr. Nurullah ŞANLI

**DETERMINATION OF GALANTAMINE IN PHARMACEUTICAL  
PREPARATIONS BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS METHOD  
(MASTERS THESIS)**

**HATİCE ÖZKURT**

**UŞAK UNIVERSITY  
SCIENCE INSTITUTE**

**November 2015**

**ABSTRACT**

Acetylcholine is an important neurotransmitter in the brain regions associated with memory. Alzheimer's disease is parallel to acetylcholine decreased memory impairment. Cholinergic agents that provide improvement in function may provide stabilization or improvement in cognitive function. However, this treatment does not stop the progression of the disease pathophysiology. The main drugs used for this purpose are acetylcholinesterase inhibitors. Galantamine is a cholinesterase inhibitor that began to be used in the treatment of Alzheimer's disease. It is widely used for mild to moderately severe Alzheimer's dementia treatment.

In this study, capillary electrophoresis method have been developed for detection of Galantamin from commercially available pharmaceutical dosage forms. The high value of recovery percentage of the results showed that the excipients had not influence of the method. All necessary validation parameters were studied in order to show the accuracy, sensitivity, feasibility and specificity of the developed method for galantamine.

Science Code : 405.03.00.

Key Words : Alzheimer's, Kapilarelektroforez, Galantamine, Acetylcholinesterase İnhibitors

Page Number : 89

Adviser : Associate Professor, Nurullah ŞANLI

## TEŞEKKÜR

Tez konumu seçmemde bana yardımcı olan, tezimin her aşamasında bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşarak yardımlarını benden esirgemeyen tez danışmanım saygı değer hocam Doç. Dr. Nurullah ŞANLI'ya çok teşekkür ederim.

Tez çalışmasının gerçekleştirildiği Uşak Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliğine teşekkür ederim.

Bu tez çalışması 2015/TP001 numaralı proje kapsamında yapılmıştır. Katkılarından dolayı Uşak Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP)' a teşekkür ederim.

Bana her zaman inanan, destek olan ve her türlü imkânı sağlayan ilgi ve emeklerini hiçbir zaman benden esirgemeyen canım aileme sonsuz teşekkür ederim.

Hatice ÖZKURT  
Kimyager,  
Kimya Öğretmeni

## İÇİNDEKİLER

<b>ÖZET .....</b>	<b>ii</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>iii</b>
<b>TEŞEKKÜR.....</b>	<b>iv</b>
<b>İÇİNDEKİLER.....</b>	<b>v</b>
<b>ŞEKİLLER LİSTESİ .....</b>	<b>ix</b>
<b>ÇİZELGELER LİSTESİ .....</b>	<b>xi</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR.....</b>	<b>xii</b>
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
1.1. Alzheimer Hastalığının Tarihçesi .....	1
1.2. Alzheimer Hastalığının Tanımı .....	2
1.3. Alzheimer Hastalığının Epidemiyolojisi .....	2
1.4. Alzheimer Hastalığının Etyolojisi ve Risk Faktörleri .....	3
1.5. Alzheimer Hastalığı Histopatolojisi ve Patofizyolojisi .....	6
1.6. Alzheimer Hastalığında Tanı Yöntemleri.....	8
1.7. Alzheimer Hastalığında Klinik .....	13
1.8. Alzheimer Hastalığında Tedavi .....	15
<b>2. KURAMSAL TEMELLER .....</b>	<b>18</b>
2.1.1. Kapiler Elektroforez .....	18
2.1.2. Elektroforez .....	19
2.1.3. Kapiler Elektroforez (CE) Cihazı ve Çalışma Prensibi .....	22
2.1.4. Kapiler Kolon .....	23
2.1.5. Elektroosmotik Akış (EOF) .....	23
2.1.6. Zeta Potansiyeli .....	24
2.1.7. EOF' ın Şematik Gösterimi .....	27



2.1.8. EOF' ı Kontrol Etme Yöntemleri .....	29
2.1.9. CE ve HPLC' de Akış Profilleri .....	30
2.1.10. Bant Genişlemesinin Kaynakları .....	32
2.1.10.1. Dispersiyon.....	32
2.1.10.2. Joule Isınması ve Sıcaklık Gradienti .....	32
2.1.10.3. Boyuna Difüzyon.....	34
2.1.10.4. Örnek Verilmesi .....	34
2.1.10.5. Duvar Adsorpsiyonu.....	36
2.1.10.6. Elektrodispersiyon .....	37
2.1.11. CE' de Kullanılan Tamponlar.....	37
2.1.12. Kapiler Elektroforez Çeşitleri .....	39
2.1.12.1. Kapiler Bölge Elektroforez (CZE).....	39
2.1.12.2. Kapiler Jel Elektroforez (CGE) .....	39
2.1.12.3. Kapiler İzotakofrez (CITP).....	40
2.1.12.4. Kapiler İzoelektrik Odaklama (CIEF) .....	41
2.1.12.5. Miselli Elektrokromatografi (MEKC).....	42
2.1.12.6. Kapiler Elektrokromatografi (CEC) .....	44
2.1.13. Elektroferogram.....	47
2.1.14. Dedektör .....	48
2.1.14.1. Absorbans Dedektör .....	49
2.1.14.2. Floresans Dedektör.....	49
2.1.14.3. Kütle Spektrometrik Dedektör. ....	49
2.1.14.4. Elektrokimyasal Tayin .....	50
2.2. Metodun Geçerli Kılınması (Validasyon Parametreleri).....	50
2.3. Sistem Uygunluk Testi Parametrelerinin Tayini .....	51
2.3.1. Doğruluk.....	51

2.3.2. Kesinlik .....	52
2.3.3. Seçicilik .....	52
2.3.4. Teşhis sınırı (LOD) .....	52
2.3.5. Tayin alt sınırı (LOQ) .....	53
2.3.6. Doğrusallık .....	53
2.3.7. Aralık .....	53
2.3.8. Duyarlılık .....	53
2.3.9. Sağlamlık .....	54
2.3.10. Tutarlılık .....	54
2.3.11. Kararlılık .....	54
<b>3. KAYNAK ARAŞTIRMASI .....</b>	<b>55</b>
3.1. Kapiler Elektforez Yöntemi ve Galantamin ile Yapılan Çalışmalar .....	55
3.2. Çalışmada Kullanılan Maddelerin Kimyasal, Fiziksel, Farmokolojik, .....	
Farmokinetik Özellikleri .....	57
3.2.1. Galantamin Hidrobromür .....	57
3.2.2. Fiziksel Özellikleri .....	57
3.2.3 Farmokolojik Özellikler .....	58
3.2.4. Farmokinetik Özellikler .....	59
3.2.5. Metabolizma .....	59
3.2.6. Eliminasyon .....	59
3.2.7. Emilim ve Dağılım .....	60
3.2.8. Metoprolol (iç standart) .....	60
3.2.9. Fiziksel Özellikleri .....	61
<b>4. MATERYAL VE YÖNTEM .....</b>	<b>62</b>
4.1. Genel Bilgi .....	62
4.1.1. Kullanılan Cihazlar ve Gereçler .....	62

4.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler .....	63
4.1.3. Kullanılan Çözeltiler .....	64
4.1.4. Kullanılan Farmasötik Preparat.....	64
4.2. Ön Çalışmalar .....	64
4.2.1. Tampon Çözelti, pH ve Konsantrasyon Seçimi .....	64
4.2.2. Enjeksiyon için Basınç ve Süre Seçilmesi .....	64
4.2.3. Analitler Üzerinde Uygulanan Gerilimin Etkisi.....	65
4.2.4. İç Standardın Belirlenmesi .....	65
4.2.5. Optimum Çalışma Koşulları.....	67
<b>5. ARAŞTIRMA SONUÇLARI .....</b>	<b>69</b>
5.1. Standart Maddelerin Saflık Kontrolü.....	69
5.2. Tekrarlanabilirlik Çalışmaları.....	69
5.3. Kalibrasyon Çalışmaları.....	70
5.4. Duyarlılık ve Doğrusallık .....	71
5.5. Geri Kazanım Çalışmaları.....	72
5.5.1. Galantamin için Elde Edilen Doğruluk ve Kesinlik Değerleri.....	72
5.6. Farmasötik Tabletlerde Galantaminin Miktar Tayini .....	72
5.7. Tabletlerde Galantamin Miktar Tayini Sonuçları .....	73
<b>6. BULGULAR ve TARTIŞMA .....</b>	<b>75</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>77</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>89</b>

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Yüklü partiküle elektrik alan varlığında etki eden kuvvetler .....	19
Şekil 2.2. Bir elektroforetik ayırmada yüklü (pozitif, negatif) türlerin yük/yarıçap..... oranlarına göre dağılımı (t : zaman). .....	21
Şekil 2.3. CE cihazının şematik gösterimi (Hareketli faz : çalışma tamponu).....	22
Şekil 2.4. Bir CE kolonunun basit gösterimi .....	23
Şekil 2.5. Stern teorisine göre elektriksel çift tabaka yapısının şematik gösterimi ....	24
Şekil 2.6. Kapiler iç yüzeyinde silanol gruplarının iyonlaşmasının pH ile değişimi..	25
Şekil 2.7. A)Negatif yüklü türün mobilitesi B)Nötral türlerin mobilitesi C) Pozitif.... yüklü türlerin mobilitesinin şematik gösterimi.....	26
Şekil 2.8. EOF'ın şematik gösterimi .....	27
Şekil 2.9. EOF'ın ters yönlü şematik gösterimi .....	28
Şekil 2.10. a) Dedektörün katot tarafında olduğu CE ayırımı b) Dedektörün anot..... tarafında olduğu CE ayırımı .....	29
Şekil 2.11. Hidrodinamik akış görünümü.....	31
Şekil 2.12. Elektroosmotik akış görünümü .....	31
Şekil 2.13. Joule ısınması ve sıcaklık gradienti.....	33
Şekil 2.14. Elektrokinetik enjeksiyon yöntemi.....	35
Şekil 2.15. Hidrodinamik enjeksiyon yöntemi .....	36
Şekil 2.16. Örnek iyonları ve ayırım tamponunun iletkenlik farklılığından dolayı..... örnek bölgesinin genişlemesi .....	37
Şekil 2.17. Kapiler bölge elektroforez yönteminde ayırımın şematik gösterimi.....	39
Şekil 2.18. Kapiler jel elektroforez yönteminde ayırımın şematik gösterimi.....	40
Şekil 2.19. Kapiler izotakoforez yönteminde ayırımın şematik gösterimi .....	41
Şekil 2.20. Kapiler izoelektrik odaklama yönteminde ayırımın şematik gösterimi..	42
Şekil 2.21. Anyonik ve katyonik misellerin gösterimi .....	43
Şekil 2.22.Miselli elektrokinetik kromatografi yönteminde ayırımın şematik..... gösterimi.....	43
Şekil 2.23. MEKC de elektroferogram.....	44
Şekil 2.24. CEC'nin CE ve HPLC' ye göre avantajları.....	45
Şeki 2.25. CEC'de kullanılan kapiler kolon.....	46

Şekil 2.26. CEC yönteminde ayırımın şematik gösterimi.....	46
Şekil 2.27. Tipik bir elektroferogramın görünümü.....	48
Şekil 3.1. Galantamin HBr'nin kimyasal formülü.....	57
Şekil 3.2. Metaprolol'ün kimyasal formülü.....	60
Şekil 4.1. Oseltamavir bileşiği için çalışma koşullarında elde edilen elektroferogram. (Çalışma dalga boyu 226 nm olarak belirlenmiştir).....	65
Şekil 4.2. Lamuvidin bileşiği için çalışma koşullarında elde edilen elektroferogram.. (Çalışma dalga boyu 289 nm olarak belirlenmiştir).....	66
Şekil 4.3. Valgansiklovir bileşiği için çalışma koşullarında elde edilen elektroferogram. (Çalışma dalga boyu 289 nm olarak belirlenmiştir).....	66
Şekil 4.4. Galantamin ve Metaprolol karışımı için çalışma koşullarında elde edilen elektroferogram.(Çalışma dalga boyu 226 nm olarak belirlenmiştir).....	66
Şekil 4.5. Galantamin ve Metaprolol karışımı (10 ppm) için çalışma koşullarında elde edilen elektroferogram.(Çalışma dalga boyu 226 nm).....	66
Şekil 4.6. 10 ppm Galantamin için çalışma koşullarında elde edilen spektroskopi verisi.....	67
Şekil 4.7. 10 ppm Metaprolol için çalışma koşullarında elde edilen spektroskopi verisi.....	68
Şekil 5.1. Galantamin için IR Spekturumu.....	69
Şekil 5.2. Kalibrasyon Grafiği.....	71
Şekil 5.3. Galantamin içeren Reminyle adlı farmasötik preparattan 210 nm dalga boyundan elde edilen elektroforegram (Çalışma koşulları: 10 mM Borat tamponu, pH = 9,2; 100 mBar,3saniye;30kV.....	73
Şekil 5.4. Galantamin ilacı için çalışma koşullarında elde edilen elektroferogram..... Çalışma dalga boyu 226 nm olarak belirlenmiştir. Çalışma koşulları: 10 mM Borat tamponu, pH = 9,2; 100 mBar, 3 saniye; 30 kV.....	73

## ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge 1.1. NINCDS-ADRDA Alzheimer Hastalığının Klinik Tanı Kriterleri.....	9
Çizelge 1.2. DSM-IV Alzheimer Tipi Demans için Tanı Kriterleri.....	11
Çizelge 2.1. EOF' ı kontrol etme yöntemleri .....	30
Çizelge 2.2. Joule ısınması ve sıcaklık gradientlerini kontrol etme yöntemleri .....	33
Çizelge 2.3. CE' de yaygın kullanılan tamponlar .....	38
Çizelge 2.4. Kapiler Elektroforez Çeşitleri .....	47
Çizelge 2.5. CE'de yaygın olarak kullanılan tayin yöntemleri ve tayin limitleri .....	48
Çizelge 4.1. Kullanılan cihazlar ve gereçler.....	62
Çizelge 4.2. Çalışılan bileşikler ve özellikleri.....	63
Çizelge 4.3. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler.....	63
Çizelge 5.1. Galantamin ve metaprolool için elde edilen göç zamanları ve pik alanları. (5 ppm Galantamin ve 10ppm metaprolool).....	70
Çizelge 5.2. Doğrusallık ve duyarlılık parametreleri .....	71
Çizelge 5.3. Galantamin için Geri Kazanım Sonuçları .....	72
Çizelge 5.4. Tabletlerde Galantamin Miktar Tayini Sonuçları .....	74

## SİMGELER ve KISALTMALAR

### Simgeler

kV	Kilovolt
mm	Milimetre
mL	Mililitre
µg	Miligram
mµ	Milimolar
µm	Mikrometre
nL	Nanolitre
nm	Nanometre
pI	İzoelektronik Nokta
r <sup>2</sup>	Tanımlayıcılık Katsayısı
t <sub>R</sub>	Alıkonma Zamanı

### Kısaltmalar

Aβ	Beta Amiloid Peptid
AChE	Asetilkolinesteraz Enzimi
AH	Alzheimer Hastalığı
APP	Amiloid Prekürsör Protein
APOE-ε4	Apolipoprotein E-ε4
BSS	Bağıl Standart Sapma
BT	Bilgisayarlı Tomografi
CE	Kapiler Elektroforez
CEC	Kapiler Elektrokromatografi

CCE	Şıral Kapiler Elektroforez
CZE	Kapiler Bölge Elektroforez
CGE	Kapiler Jel Elektroforez
CIEF	Kapiler İzoelektrik Odaklama
CITP	Kapiler İzotakoforez
DSM-IV-TR	Diagnostic and Statistical Manual of Mental sorders, fourth edition
EOF	Elektroosmotik Akış
EC	Elektrokimyasal Dedeksiyon
FDA	Food and Drug Administration
GC	Gaz Kromatografisi
HPLC	Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi
IC	İyon Kromatografi
IR	Kızıl Ötesi
MMSE	Mini Mental Durum Muayenesi
MEKC	Miselli Elektrokinetik Kromatografi
MRG	Manyetik Rezonans Görüntüleme
NINCDS-ADRDA	National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke-Alzheimer's Disease and Related Disorders Association
PDA	Photo Diode Array
PET	Pozitron Emisyon Tomografisi
SS	Standart Sapma
SSS	Santral Sinir Sistemi
TDAA-Cl	Tetradodesilamonyum Klorür
VK	Validasyon Katsayısı





## 1. GİRİŞ

Alzheimer hastalığı (AH) başta hatırlama olmak üzere kognitif işlevleri bozan, duygulanımı etkileyen ilerleyici dejeneratif bir hastalıktır. Hastalarda kognitif, davranışsal ve işlevsel azalma sağlık sistemi ve bakıcılara önemli derecede yük getirir. Alzheimer hastalığı büyüyen medikal, sosyal ve ekonomik bir problemdir [1].

Bakım veren; hastaya fiziksel, sosyal, ekonomik, duygusal yönden destek sağlamaktan sorumlu olan kişidir. Hastaların bakım sürecini herhangi bir ücret almadan üstlenen ve hastanın evdeki yaşam kalitesini yükselten bakım verenler genelde hasta yakınlarıdır. Yapılan araştırmalarda Alzheimer hastalarının büyük bir çoğunluğunun evlerinde yaşadığı ve aile bireyleri tarafından bakım verildiği gösterilmiştir. Amerika’da evde bakım verilen AH’nın %80’ine aile üyeleri bakmaktadır. Bu durum özellikle gelişmekte olan ülkelerde çok daha belirgindir [2].

Birey için demansı olan bir yakınına bakım vermek büyük oranda stresli olup psikiyatrik ve fiziksel hastalıklara yol açabilen bir süreç olduğu belirtilmiştir. Bakım verenlerde sosyal ilişkilerde zayıflama, izolasyon, iş bırakma gibi ekonomik sorunlarda artmanın yanı sıra fiziksel sağlık problemleri ve ölüm oranlarının da arttığı belirtilmiştir [3]. Bu yüzden, bakım verenlerde bakım verme yükünü belirlemek ve azaltmak önemli bir sağlık sorunu haline gelmiştir.

### 1.1. Alzheimer Hastalığının Tarihçesi

Alzheimer hastalığı (AH) kortikal demansların en sık görüleni ve en sık bilinenidir. Alzheimer Hastalığı bugünkü anladığımız şekliyle ilk kez 1906 yılında Alois Alzheimer tarafından tanımlanmıştır. İlerleyici bilinç kaybı, kişilik değişikliği ve konuşma bozukluğu olan 51 yaşındaki “Auguste D.” adlı hastayı 4.5 yıl klinik olarak takip eden Alzheimer, hastanın klinik özelliklerini tanımlamış sonrasında da beyinde oluşan makroskopik ve mikroskopik değişiklikleri detaylı olarak tarif etmiştir. Birlikte çalıştığı Emil Kraepelin klinikopatolojik özellikleri ile ayrıntılı olarak tanımlanan bu tabloya Alzheimer adının verilmesini önermiştir [4, 5].

## **1.2. Alzheimer Hastalığının Tanımı**

Alzheimer hastalığı, merkezini limbik sistem dejenerasyonuna bağlı yakın bellek bozukluğunun oluşturduğu, sinsi başlangıçlı, yavaş seyirli bir tempoyla neokortikal tutulumun da katılmasıyla diğer kognitif işlevlerin de bozulduğu bir demans sendromudur [6]. AH hastanın günlük yaşam aktivitelerini yapma yeteneğini önemli derecede etkileyen ve DSM-IV-TR (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, fourth edition) ölçütlerine uyumlu hafıza ve etkilenen bir diğer kognitif alanda global azalma ile karakterize klinik bir sendromdur [7].

Alzheimer hastalığı karakteristik klinik ve patolojik özellikleriyle ilerleyici nörodejeneratif bir hastalıktır. Ağır bellek bozukluğu ile beraber dil, idarecilik, karar verme işlevlerinde, dikkat, oryantasyon ve kişilikte bozukluklar, edinilmiş entellektüel becerilerde ilerleyici kayıp ile kendini gösterir. Hafıza ve kognitif işlevlerde bozukluk, günlük yaşam aktivitelerinde ilerleyici gerileme, çeşitli nöropsikiyatrik semptomlar ve davranış bozukluklarıyla karakterizedir [8].

Alzheimer hastalığı (AH) yaşa bağımlı ve geri dönüşümsüz bir beyin hastalığıdır. Yaşlılarda, demans türleri arasında en sık görülenidir. Alzheimer hastalığının klinik tanısı demansa yol açabilecek diğer nedenlerin ekarte edilmesi ile yapılmaktadır. Kesin tanısı ise ancak postmortem dönemde nöropatolojik inceleme ile mümkündür [9].

## **1.3. Alzheimer Hastalığının Epidemiyolojisi**

Alzheimer hastalığı demansın en sık nedenidir ve prevalansının 2040'a kadar hızla artacağı tahmin edilmektedir. Demans vakalarının yaklaşık olarak 2/3'ünü oluşturur [10]. Amerika Birleşik Devletleri'nde 2000 yılında yaklaşık olarak 4,5 milyon Alzheimer hastası varken, 2050'de bu rakamın 13 milyondan fazla olacağı öngörülmektedir [11]. Amerika Birleşik Devletleri'nde 2009'da yapılan değerlendirmelerde en sık 6. ölüm nedeni olarak belirtilmektedir. Demans için sağlık harcamaları 2011'de 183 milyar dolar ve 2050'de tahminen 1,1 trilyon dolar olması öngörülmektedir. Evre ilerledikçe ve özellikle son evrede bakım evi masrafları nedeniyle harcamalar en fazla seviyeye ulaşmaktadır [12]. Bu yüzden Alzheimer hastalığı büyüyen medikal, sosyal ve ekonomik bir problemdir.

Yaş AH için en önemli risk faktörüdür ve hastalığın prevalansı 65 yaşından sonra her beş yılda bir katlanarak artmaktadır. Genellikle 60 yaşından sonra başlar ve prevalansı 75 yaşından sonra belirgin olarak artar. Yapılan prevalans çalışmalarının metaanalizinde AH prevalansı 65-70 yaş arasında %4-5 olarak bildirilmiştir [13]. Amerika’da AH insidansı 60-64 yaş arasında yılda 1/1000 ve 85 yaşın üstünde 25/1000’dir. Benzer şekilde başka bir çalışmada Amerika Birleşik Devletleri’nde 65-85 yaş arasında prevalansı %5,7-%10, 85 yaş ve üzerinde %25 - %45 olarak tahmin edilmektedir. İnsidans yaş ile birlikte artmasına rağmen prevalans piki 8.dekatta görülür. Alzheimer hastalarının yaklaşık %43’ü 75-85 yaş arasındadır [14].

Türkiye’de yapılan kapsamlı bir prevelans çalışmasında 70 yaş üzerinde AH prevalansı %16, demans prevalansı ise %20 bulunmuştur. Bu yüzde ülkemizin demografik yapısına uygulandığında Türkiye’de 300 ile 350 bin civarında Alzheimer hastası olduğu düşünülmektedir [15]. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Geriatri Ünitesi polikliniğine başvuran 65 yaş üstü 1255 hastanın taranması yoluyla yapılan bir çalışmada hastaların %8,2’sinde AH ve %4,8’inde Alzheimer dışı demans saptanmıştır. Demans tanısı alan tüm hastaların %67,3’ü AH tanısı almıştır [16].

#### **1.4. Alzheimer Hastalığının Etyolojisi ve Risk Faktörleri**

Alzheimer hastalığındaki etyopatolojik mekanizma tam olarak saptanamamıştır. Alzheimer hastalığı için en önemli risk faktörü yaştır. Altmış beş yaşın üzerinde prevalans her 5 yılda 2 katına çıkar [17]. Alzheimer hastalığı, özellikle ileri yaşlarda kadınlarda daha sık görülür. Yapılan meta analiz çalışmarında, AH’nın ileri yaşlarda kadınlarda daha sık görülmeye eğilimli olduğu ve kadınların erkeklere oranının 1.2/1 ile 1.5/1 arasında olduğu bildirilmiştir [18].

Aile öyküsü de major bir risk faktörüdür. EURODEM çalışmasında ailede birinci derecede bir akrabada demans olanlarda, AH rölatif riski 3,5 bulunurken, 2 ya da daha fazla akrabasında demans olanlarda bu oranın 7,5’a çıktığı görülmüştür [19].

Kalıtsal AH nadir olup olguların %5’den azından sorumludur. Tipik olarak yaşamın erken döneminde başlar ve 40 - 50’li yaşlar arasında demansa neden olur. Otozomal dominant

geçişli ailesel ve erken başlangıçlı olgularda Kromozom 21'de bulunan Amiloid Prekürsör Protein (APP), kromozom 14'deki Presenilin-1 ve kromozom 1'deki Presenilin-2 genlerinde mutasyonlar bildirilmiştir [20, 21].

Otozomal dominant aile hikayesi olmayan fakat birinci derece akrabaları etkilenmiş olan bireylerin yaşlarına göre AH geliştirme riskleri 2-4 kat artar. İki ya da daha fazla sayıda birinci derece demanslı akrabası olan fertlerin normallere göre AH geliştirme risklerinin 40 kez daha fazla olduğu ileri sürülmüştür [22]. Presenilin 1, presenilin 2, Apolipoprotein E-ε4 (APOE-ε4), amiloid prekürsör protein gibi AH ile ilişkilendirilmiş olan çoklu genetik lokalizasyonların AH'nin pek çok metabolik veya yapısal anormalliklerindeki patolojik ekspresyonunda en son ortak nokta olduğu ileri sürülmektedir. On dokuzuncu kromozomdaki APOE-ε4 alleli geç başlangıçlı familyal ve sporadik AH için artmış risk teşkil eder [23].

Birçok çalışma AH prevalansının kadınlarda erkeklere göre daha fazla olduğunu göstermektedir. Ancak bu prevalans farklılığı genellikle kadınlarda yaşam beklentisinin daha uzun olmasıyla açıklanmaktadır. Bununla birlikte, östrojen beyinde bir nörotrofik faktör olarak işlev görmekte ve kadınlar menopoz sonrası östrojensiz kalmaktadırlar. Bu durum yaşamın ikinci yarısında bir nörotrofik faktörden yoksun kalan kadınların neden demans için daha fazla risk taşıdıklarının açıklamalarından biri olabilir. Nitekim, epidemiyolojik çalışmalarda postmenopozal dönemde östrojen replasmanı kullanan kadınlarda kullanmayanlara göre demans prevalansının daha düşük olması bu varsayımı destekler niteliktedir. EURODEM araştırmasında da kadın cinsiyetin 85 yaş ile birlikte bir risk faktörü olarak belirlediğini, 90 yaş üzerinde bu riskin daha da arttığı bildirilmiştir [19].

Eğitim düzeyi ile AH arasında bir ilişki olmadığını gösteren epidemiyolojik çalışmalar olmasına rağmen, bugün için düşük eğitim düzeyinin bir diğer risk faktörü olduğu fikri kabul görmektedir. Klinik, nörogörüntüleme ve postmortem çalışmalarla desteklenmiş olan yüksek eğitim düzeyinin hastalığın ortaya çıkış eşiğini arttırdığı fikri, daha fazla nöral etkinlik ve kapasite ile kompensasyon yeteneğinin artmasına neden olan kognitif rezerv hipotezi ile açıklanmaktadır. Kognitif rezerv stabil değildir, dolayısıyla hayat boyunca gelişebilir. Kognitif rezerv hipotezine dayanarak, herhangi bir düzeyde kognitif kaybı olan yüksek eğitim düzeyli olgularda nöropatolojik değişikliklerin daha ağır olması öngörülebilir [23].

Bilinç kaybına neden olan kafa travması hikayesi ile AH arasındaki ilişki, travmanın amiloid prekursor protein ekspresyonunda artışa ve buna bağlı olarak da amiloid beta birikimine neden olduğu hipotezi ile açıklanmıştır. Kafa travması ile AH arasında ilişki olduğunu gösteren çalışmalar (EURODEM gibi) olduğu gibi aksini savunanlar da vardır (Rotterdam ve Kanada Sağlık ve Yaşlanma Çalışması gibi). APOE-ε4 aleli yokluğunda kafa travması öyküsünün AH için risk faktörü olmadığı, ancak APOE-ε4 aleli varlığında ise hem AH riskini 10 kat arttırdığı hem de AH'nın başlangıç yaşı üzerine etkisi olduğu öne sürülmektedir [6, 19, 24].

AH için risk faktörleri olarak en sık çalışılan mesleki ajanlar organik çözücüler, pestisitler, elektromanyetik alan, alüminyum ve kurşundur. Bunların arasından pestisitlerin ve elektromanyetik alan maruziyetinin AH riskini arttırdığına dair güçlü kanıtlar vardır. Elektrikçiler, tamirciler, santral operatörleri, kaynakçılar, marangozlar, terziler gibi elektrikli aletlerle çalışanlar aşırı düşük frekanslı elektromanyetik alan maruziyeti için risk altındaki meslek gruplarıdır [6, 15].

Sigara ve alkol kullanımının AH gelişimi için risk faktörü olarak kabul edilmesi hala tartışmalıdır. Çoklu etnik, popülasyon temelli yeni bir prospektif kohort çalışma, orta yaş döneminde iki ve/veya daha fazla paket/gün sigara içenlerde AH riskinin anlamlı olarak arttığını göstermiştir [24-26]. Benzer şekilde nörogörüntüleme çalışmalarında da sigara kullanımının gri cevher doku kaybına neden olduğu gösterilmiştir [6].

Orta yaş döneminde ağır alkol kullanımının özellikle ApoEε4 aleli taşıyanlarda AH riskini üç kat arttırdığı bildirilmiştir. Bir çalışmada ise, ApoEε4 aleli taşıyanlarda ağır alkol ve sigara kullanımının AH başlangıç yaşını erkene çektiği belirtilmiştir [6].

Özgeçmişte 10 yıla kadar geriye giden tedavi gerektirmiş depresyon öyküsünün AH riskini arttırdığına dair çalışmalar vardır. Amiloid ilişkili depresyonun ApoEε4 alelinden bağımsız bir risk faktörü olduğunu gösteren bulguların yanı sıra, depresyonun kesitsel olarak kognitif kayba neden olduğu ancak zaman içerisinde gelişen kognitif kaybın depresyonla açıklanamayacağı bildirilmiştir. AH ve depresyon arasındaki ilişki, her ikisinin de patogenezlerinde ortak paylaştıkları azalmış nörotropik faktörler ve nöroinflamatuvar süreçler ile ilişkilendirilmektedir [27].

Epidemiyolojik, nörogörüntüleme ve nöropatolojik çalışmalardan elde edilen sonuçlar, vasküler risk faktörlerinin (sigara kullanımı, obezite, yüksek total kolesterol düzeyi) ve vasküler morbiditenin (yüksek kan basıncı, inme, diyabet, sessiz beyin enfarktleri ve beyaz cevher lezyonları) vasküler demans dışında AH için de risk faktörü olduğunu göstermiştir. Aynı zamanda yüksek homosistein düzeyinin de bağımsız bir risk faktörü olduğu gösterilmiştir [28, 29].

Ailede down sendromu öyküsü de AH riskini 2 ila 3 misli arttırmaktadır. Otuz beş yaşın altında iken down sendromlu çocuk doğuran annelerin AH riski, diğer tiplerde mental retarde çocuklar doğuran annelere göre 5 misli artmıştır. Down sendromlu çocukların babalarında ise AH için ayrıca bir risk söz konusu değildir. Bu bulgu, AH geliştirmek ve 35 yaşının altında down sendromlu çocuk doğurmak arasında paylaşılan bir genetik yatkınlık olasılığı yönünde tartışılmıştır [30].

### **1.5. Alzheimer Hastalığı Histopatolojisi ve Patofizyolojisi**

AH patofizyolojik olarak nörodejeneratif bir hastalıktır ve seçici nöron kaybıyla karakterizedir. Nöron kaybı tipik olarak limbik sistemde başlayıp yavaş yavaş diğer paralimbik bölgelere ve primer duysal ve motor kortekse yayılır. Hastalığın bellek bozukluğu ile olan tipik başlangıç ve sonraki klinik seyrini de bu patolojik yayılım belirler. Kesin tanısı sadece beyin otopsisini veya biyopsiyle neokorteksin etkilenen bölgelerinde belli sayıda nöritik plaklar görüldüğünde konulabilir [31]. Nöritik plaklar; beta-amiloid fibrilleri, distrofik nöritler, reaktif astrositler, fagositik hücreler ve dejenere hücrelerden kaynaklanan veya nöronlardan salınan diğer proteinler ve protein fragmanları ile birlikte kümelenmiş beta-amiloid peptidlerden oluşur [32]. Hastalığın tipik patolojik bulguları hücre ve sinaps kaybı yanında hücreler arası alanda amiloid proteininden oluşan plakların, hücre içinde ise hiperfosforilize olmuş tau proteininden oluşan içciklerin saptanmasıdır [33].

Çevresel faktörlerin, hücre yaşlanmasının ya da genetik mutasyonların sonucunda bir hücre duvarı proteini olan amiloid prekursor proteinin (APP) normal yıkım süreci değişime uğramaktadır. Normalde hücre membranı dışına sarkan uç parçası kesilip sekrete edilen APP'nin normal yıkımının bozulması sonucu oluşan parçalar birbirleriyle "beta-tabakası"

tipinde bağlantılar kurarak çözünemez hale gelip plaklar şeklinde çökmektedirler. Bunlar lokal olarak indüklenmiş mikroglial hücre aktivasyonu ve serebral akut faz reaksiyonunun uyarılmasını içeren kronik inflamatuvar cevabı tetikler [34]. Aktive mikroglial hücreler potansiyel olarak nörotoksik proinflamatuvar sitokinleri (IL-6 gibi), reaktif oksijen ve nitrojen türlerini ve proteolitik enzimleri salar, bu da nöronal hasarı artırır [35]. Beta-amiloid fibrilleri aynı zamanda direk nörotoksik etki gösterir [36].

Çözünebilir, toplanmış amiloid fibrilleri nöronal membranlara girdiği zaman lipid peroksidasyonu, protein oksidasyonu ve reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin oluşumunu artırır. Serbest radikal hasarından kaynaklanan oksidatif stres oluşur [37]. Oksidatif stres hücre potansiyelinin kaybı ve azalmış nöronal canlılıkla sonuçlanır. Oksidatif stres, amiloid beta ve hiperfosforile taunun çözünebilir durumdan çözünemez hale geçmesine neden olur. Bunun sonucu bu maddeler agrege olur ve senil plaklar ile nörofibriler yumakları oluştururlar [38].

Hücre içi tau proteininin hiperfosforilize olup çökmesi amiloid plakların oluşmasına sekonderdir. Tau proteini aksonal iskeleti oluşturan mikrotübüllerin ana yapı taşıdır. Mikrotübüller hücre gövdesinden hücre uzantılarına ve uzantılardan hücre gövdesine madde transportunu sağlayan ana sistemdir. Tau proteini hiperfosforolize olunca yapısı bozulur, mikrotübüller işlev göremez hale gelirler, bu da hücre işlev bozukluğu ve ölümü ile sonuçlanır [33].

Alzheimer hastalığının biyokimyasında en belirgin kayıp kolinerjik sistemdedir. Serebral korteks ve limbik sistemin kolinerjik innervasyonunu sağlayan nukleus basalis, meynert ve diğer önbeyin kolinerjik çekirdeklerinde hücre kaybı, korteksin kolinerjik innervasyonunu gösteren asetilkolin transferaz ve asetilkolin esteraz enzimlerinde azalma, in vivo olarak da kolinerjik terminalleri işaretleyen radyonükleotid işaretleyicilerde azalma saptanır. Bunun yanında noradrenalin, serotonin gibi diğer asendan monoaminerjik nörotransmitter sistemlerinde de göreceli olarak daha az olmakla birlikte kayıplar göze çarpar [39].

Presenilin 1, presenilin 2 ve APP genlerinde farklı ailelerden birden fazla mutasyon tanımlanmış olup, tüm bu mutasyonların ortak özelliği sonuçta senil plakların ana komponenti olan ve APP'nin sekretaz enzimleri ile kesimi ile oluşan beta amiloid peptid ve uzun beta amiloid peptid (A $\beta$ ) sentezinin arttırılmasıdır [20]. Bu mutasyonlara sahip



bireylerin plazmalarında normal bireylere ve sporadik Alzheimer hastalarına oranla daha yüksek konsantrasyonda 42 aminoasitlik uzun beta amiloid peptidinin bulunduğu gösterilmiştir. Yine bu bireylerin deri hücre kültürünün, kültür ortamına daha fazla 42 aminoasitlik A $\beta$  peptidini saldığı görülmüştür [40]. APP mutasyonuna sahip transgenik farelerde 42 aminoasitlik A $\beta$ 'nin 14, 40 aminoasitlik A $\beta$ 'nin ise 5 kat arttığı gösterilmiştir [41].

### **1.6. Alzheimer Hastalığında Tanı Yöntemleri**

Alzheimer hastalığı merkezini limbik sistem dejenerasyonuna bağlı yakın bellek bozukluğunun oluşturduğu, sinsi başlangıçlı, yavaş seyirli bir süreçle neokortikal tutulumun da katılmasıyla diğer kognitif işlevlerin de bozulduğu bir demans sendromudur. Tanı için gerekli kriterler; afazi, apraksi, agnozi veya yürütücü fonksiyonlarda bozulma ile sonuçlanan diğer kognitif alanlardan en az birinin yıkımı ile birlikte hafıza yıkımını gerektirir. En önemlisi bu yıkım hastanın mesleki veya sosyal yaşantısını etkilemeye yetecek kadar şiddetli ve kademeli şekilde ilerleyici olmalıdır. Günlük yaşam aktivitelerini bozan sinsi başlangıç, yavaş seyirli en az iki kognitif bozukluk olmalıdır [42]. Alzheimer hastalığının tanısı temel olarak klinik bir tanıdır. Tanı için en önemli unsurlar hasta yakınlarından alınan ayrıntılı bir anamnez ve hastanın eğitim ve sosyal durumuna uygun bir mental muayenedir. Anamnezde özellikle belirtilerin ortaya çıkış şekli ve hızı, bulgu ve belirtilerin kronolojisi önemlidir. Alzheimer hastalığı tipik olarak sinsi başlayan, başlangıçta sıklıkla normal yaşlanma şeklinde yorumlanan unutkanlıktır. Bu çerçevede en sık görülen belirtiler soru tekrarları, eşya kayıpları ve yakın olayların hiç yaşanmamış gibi silinmesidir [6, 43].

Alzheimer hastasında mental muayene için en sık kullanılan tarama testi mini mental durum muayenesidir (MMSE) [44, 45]. Tam puanı 30 olan MMSE'de 27 üstünün normal 24 puanın altının ise patolojik olduğu kabul edilir. Ancak MMSE yaş, hastalık öncesi zihinsel kapasite ve eğitime bağlıdır. Amnezi nöropsikolojik muayenede en göze çarpan, santral bulgudur. Bunun yanında, hastanın evresine bağlı olarak zaman ve yer oryantasyonunda bozukluk, dikkat testlerinde aksamalar, nadir kelimelerden zaman içinde daha sık kelimelere kadar uzanan isim bulma zorluğu, giderek cümle kurma ve kompleks

cümleleri anlama bozukluğu, erken-orta dönemlerden itibaren görsel-uzaysal işlevlerde bozukluk, ve değişik derecelerde yürütücü işlev bozuklukları (soyut düşünme testlerinde somutlaştırma, iç görü ve ön görü bozuklukları, mental problemleri çözmede zorluklar) görülür [6].

MMSE yanında tarama amaçlı kullanılan en hassas testlerden biri “Saat Çizme Testi” dir. Saat çizme testinde hastadan bir saat çizmesi ve rakamları içerisine yerleştirmesi ve sorulan saati akrep ve yelkovanla göstermesi istenir. Saat testi daha ilk dönemlerden itibaren planlama bozuklukları gösterir [45].

Alzheimer hastalığının klinik tanısı için yayınlanmış olan ve bugün yaygın biçimde kullanılan NINCDS-ADRDA (National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke-Alzheimer’s Disease and Related Disorders Association) ve DSM-IV (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4<sup>th</sup> edition) kriterlerinin her ikisi de bir takım nüanslarına karşın özetle yukardaki koşulların doldurulmasını AH’ye özgü tipik sendromun tanısı için zorunlu tutmaktadırlar. American Academy of Neurology AH tanısında yayımlanan NINCDS-ADRDA kriterlerinin ve daha ziyade klinik olarak uygulanabilen DSM-IV’ün kullanılması tavsiye etmektedir. Böyle bir tabloya yol açabilecek sekonder nedenlerin (sistemik, nörolojik, psikiyatrik) ekarte edilebiliyor olması da her ikisi için zorunlu dışlama kriteridir [31].

### **Çizelge 1.1. NINCDS-ADRDA Alzheimer Hastalığının Klinik Tanı Kriterleri**

- I. MUHTEMEL Alzheimer Hastalığı klinik tanı kriterleri:
  - Klinik muayene ile saptanan, Mini-Mental Test, Blessed Demans Ölçeği ya da benzer bir test ile dokümente edilen ve nöropsikolojik testlerle doğrulanan demans tablosu,
  - İki ya da daha fazla kognitif süreçte bozulma,
  - Bilinç bozukluğu yok,
  - Başlangıç 40-90 yaşları arasında, büyük sıklıkla da 65 yaşından sonra,
  - Bellek ya da diğer bilişsel süreçlerde ilerleyici bozukluğa yol açabilecek sistemik ya da beyne ait başka bir hastalık yok.
- II. MUHTEMEL Alzheimer Hastalığı tanısı şunlarla desteklenir:

- Dil (afazi), motor yetenekler (apraksi) ve algı (agnozi) gibi özgül kognitif işlevlerde ilerleyici bozulma,
- Günlük yaşam aktivitelerinde bozulma ve davranış biçiminde değişme,
- Ailede benzer bozukluk öyküsü (özellikle patolojik olarak kanıtlanmışsa),
- Laboratuarda:

Standart tekniklerle normal lomber fonksiyon,

EEG'nin normal olması yada yavaş dalga aktivitesinde artış gibi non-spesifik değişiklikler,

BT'de serebral atrofiye ilişkin bulgular ve seri incelemelerde bu bulguların ilerleyişi.

III. Alzheimer hastalığı dışındaki nedenler dışlandıktan sonra, MUHTEMEL Alzheimer Hastalığı tanısı ile uyumlu olabilecek diğer klinik özellikler:

- Hastalığın seyrinde platolar,
- Depresyon, uykusuzluk, inkontinans, hezeyan, illüzyon ve halüsinasyonlar, verbal, emosyonel ya da fiziksel katastrofik patlamalar, cinsel bozukluklar ve kilo kaybı gibi eşlik eden bulgular,
- Bazı hastalarda, özellikle hastalığın ileri dönemlerinde, kas tonusunda artış, miyoklonus ya da yürüme güçlüğü gibi diğer nörolojik bozukluklar,
- Hastalığın ileri evresinde nöbetler,
- Yaş için normal BT.

IV. MUHTEMEL Alzheimer Hastalığı tanısını belirsizleştiren ya da ihtimal dışına çıkaran özellikler:

- İnme tarzında ani başlangıç
- Hemiparezi, duysal kayıp, görme alanı defektleri ve inkoordinasyon gibi fokal nörolojik bulguların hastalığın erken evrelerinde bulunması
- Nöbetler ya da yürüyüş bozukluklarının, daha başlangıçta ya da hastalığın çok erken evrelerinde bulunması.

V. MÜMKÜN Alzheimer Hastalığı tanı kriterleri:

- Demansa neden olabilecek diğer nörolojik, psikiyatrik ya da sistemik bozukluklar olmaksızın, başlangıç, prezantasyon ya da klinik seyirde varyasyonların bulunması durumunda konulabilir,
- Demansa neden olabilecek, ancak demansın nedeni gibi görünmeyen ikinci bir sistemik ya da beyin hastalığının bulunması durumunda konulabilir,
- Diğer belirlenebilir nedenlerinin dışlandığı, tek ve yavaş ilerleyici bir bilişsel bozukluğun bulunması durumunda, araştırma çalışması amaçlı olarak kullanılabilir.

#### VI. KESİN Alzheimer Hastalığı tanısı kriterleri:

- Muhtemel Alzheimer Hastalığı klinik kriterleri;
- Biyopsi ya da otopsiyle elde edilen histopatolojik kanıtlar.

#### **Çizelge 1.2. DSM-IV Alzheimer Tipi Demans için Tanı Kriterleri**

A. Birden fazla bilişsel alanı içeren bozukluk kendini aşağıdaki iki maddeyi de kapsayacak şekilde gösterir :

(1) Bellek bozukluğu (yeni bir bilgi öğrenme ve öğrenilmiş eski bir bilgiyi hatırlama yeteneğinin bozulması)

(2) Aşağıda sıralanan bilişsel bozuklardan en az biri:

(a) Afazi (dil bozukluğu)

(b) Apraksi (motor işlevlerin normal olmasına karşın belirli motor eylemlerin yerine getirilmesi yeteneğinde bozulma)

(c) Agnozi (duysal işlevlerin salim olmasına karşın nesnelere tanımakta güçlük)

(d) Yürütücü işlevlerde bozulma (planlama, organize etme, sıralama, soyutlama)

B. A1 ve A2 kriterlerinde tanımlanan bilişsel bozukluklar toplumsal ve mesleki işlevselliği ciddi biçimde bozmakta ve eski işlevsellik düzeyine göre anlamlı bir gerilemeyi temsil etmektedir.

C. Seyir, sinsi başlangıç ve yavaş ilerleyici kognitif yıkım özelliklerindedir.

D. A1 ve A2 kriterlerinde tanımlanan bilişsel bozukluklar aşağıda sıralanan nedenlerden herhangi birine bağlı değildir:

(1) Bellek ve diğer bilişsel işlevlerde ilerleyici bozulmaya neden olabilecek merkez sinir sistemine ait diğer durumlar (örn. serebrovasküler hastalık, Parkinson hastalığı, Huntington hastalığı, subdural hematoma, normal basınçlı hidrosefali, beyin tümörü)

(2) Demansa neden olabileceği bilinen sistemik durumlar (örn. Hipotiroidizm, B12 vitamini ya da folik asit eksikliği, niyasin eksikliği, hiperkalsemi, nörosifiliz, HIV enfeksiyonu)

(3) İlaçlar ve madde kullanımı ile ilgili durumlar

E. Bozukluk deliryum seyri dışında ortaya çıkmıştır.

F. Bozukluk başka bir eksen hastalığı ile açıklanabilir nitelikte değildir.

Alzheimer hastalığının tanısında nörogörüntüleme yöntemlerinin önemi büyüktür. İntrakraniyal tümör, subdural hematoma, normal basınçlı hidrosefali gibi geri döndürülebilir demans sebeplerinin ve enfarkt alanlarının saptanmasının yanında global serebral atrofi, temporal bölgede ve hipokampusta atrofi, entorinal korteks atrofisi, sulkuslarda genişleme gibi Alzheimer hastalığına özgü sayılabilecek bulguların saptanması tanıda yardımcıdır. Demans tanısı alan her hastada en az bir kez nörogörüntüleme yöntemleri (bilgisayarlı tomografi veya manyetik rezonans görüntüleme) yapılması önerilmektedir [46].

Alzheimer hastalığının değerlendirilmesinde manyetik rezonans görüntüleme (MRG) ve bilgisayarlı tomografi (BT) tetkiklerinin rutin olarak kullanılması tartışmalıdır [46, 47]. Ancak özellikle yeni başlangıçlı, hızlı seyirli, fokal nörolojik bulgular gösteren ve erken yaşta başlayan demans tablolarında AH dışındaki demans nedenlerinin ekartasyonu için bu yöntemlere başvurulmalıdır. Alzheimer hastalığında, BT ve MRG de yaşa göre belirgin diffuz kortikal atrofi ve ventriküllerde genişleme, nonspesifik bulgular yanında izlenen en tipik bulgulardır. Bazen MRI'da yine yaşa göre hipokampus ve temporal lob hacminde atrofi izlenebilir. Alzheimer hastalığında pozitron emisyon tomografisinin (PET) yeri ile ilgili çalışmalarda, tetkikin sensitivitesi % 63 ve spesifitesi % 93 olarak bulunmuştur. Ancak şu anda rutin kullanıma girmemiştir [46, 48].

## 1.7. Alzheimer Hastalığında Klinik

Hafif evredeki demanslı hasta verimliliğini yitirir. Yaratıcılık gerektirmeyen tekdüze işler başlangıçta sürdürülebilse de mesleğini yapmakta belirgin güçlükler yaşar. Yakın geçmişe ait olayların hatırlanmasındaki güçlük, aynı soruların tekrarlanması, kelime bulma güçlükleri yakınların dikkatini çeken başlıca özelliklerdir. Yabancı mekanlarda kaybolabilir. Araba kullanırken sinyalizasyona dikkatsizlik, tepkilerde yavaşlama, yönleri karıştırma gibi güçlükler başlar. Banka işleri, fatura ödemeleri gibi mali işlerde hatalar olmaktadır. Banka kartı, cep telefonu gibi yenilikleri öğrenip kullanmayı başaramaz. Hobiler (dikiş-nakış, bahçecilik, sanatsal uğraşlar, yetenek oyunları vb.) sürdürülemez olmuştur. Çamaşır, bulaşık gibi ev işlerinde becerikliliğini bir ölçüde yitirmiştir. Okumak ve gazete televizyon aracılığıyla aktüaliteye ilgi azalmıştır. Giyinmek, yıkanmak, sofrayı alıştırma ve temel hijyende sıklıkla bir sorun yoktur. İritabilite, duygulanımda küntleşme ve inkar eğilimi ile kendiliğindenliğin azalması dışında davranışsal belirtiler yoktur ve sosyal uygunluk iyi korunmuştur. Uyku kalitesi bozulmaya başlar. Cinsel ilgi ve iştah bozulur. Eksikliklerin farkedilmesinin de katkısıyla bazı olgularda depresyon belirtileri ön planda olabilir. Ancak depresyon sıklıkla keder ifadesi gibi afektif belirtilerden çok, isteksizlik gibi motivasyonel belirtilerle kendini gösterir. Muayenede yakın bellek ön planda olmak üzere, görselmekansal bozukluk, uzak bellekte bozulmalar, adlandırma güçlükleri, dikkat, soyutlama ve planlamada bozulmalar saptanır. Hafif evre AH da MMSE skoru kabaca 20-26 arasında olabilir [6].

Orta evre demansda, hasta ev dışındaki bağımsızlığını tümüyle yitirmiştir. Gözetimle sokağa çıkabilir ama yalnız kaldığı takdirde yolunu bulamaz. Başkalarının evinde odaları karıştırabilir. Yeni öğrenme artık hemen hiç mümkün olamamaktadır. Anlama, okuma ve yazma giderek bozulur; bu evrenin sonlarına doğru imzası tanınmaz olabilir. Birinci derece yakınları hakkındaki bilgiyi genellikle korusa da, torunlarının sayısı, isimleri, okulları gibi bilgileri karıştırmaktadır. Evdeki işlevselliği son derece yüzeyselleşmiştir. Giyinme sırasında mevsime ya da günün saatine uygun giysiyi seçmede zorlanma, giysilerin sırasını karıştırma (gömleğin üzerine iç çamaşırı gibi), düğmeleri yanlış ilikleme gibi güçlükler başlar. Sofrada öncelikle bıçağı kullanamaz olduğunda yemeklerinin önceden kesilmesi gerekir. Giderek döküp saçarak yemek belirginleşir. Çatal bıçağı karıştırmak, sıvıları çatala almaya çalışmak gibi hatalar görülebilir. Yıkanmakta öncelikle sıcak suyu soğuk suya

ayarlamakla başlayan yardım gereksinimi ortaya çıkar. Sfinkter kontrolü seyrek gece kaçırımları dışında sorunsuzdur. Tuvalet mekaniği, elini yüzünü yıkamak gibi işlevleri kendi başına yapabilir. Davranışsal belirtiler ön planda olmaya başlar. Hırsızlık, terkedilme ve sadakatsizlik hezeyanları olabilir. Uyku uyanıklık ritiminde bozulma belirginleşmiştir. Gece sık uyanmalar ve gündüz sık uyuklamalarla geçer. Dilsel işlevlere ait bulguların ağırlaşması dile dayanan testlerin yapılamaz olmasına neden olabilir. Bu evrede MMSE skoru 10-19 arasında değişir [6]. Ağır demans evresinde bellekte artık sadece parçacıklar söz konusudur. Yakınıni (eşi, çocuğu) anne babasıyla karıştırabilir. Giyinmek, yıkanmak, yemek gibi temel günlük yaşam aktivitelerinde tam bir gözetim gerekmektedir. Evrenin sonlarında yutma güçlüğü de ortaya çıkar. Kelime hazinesi son derece fakirleşmiştir. Evrenin sonlarında tüm verbal yetenekler yitirilir. Ambulasyon zorlaşır ve giderek oturmak dahi mümkün olmaz hale gelir. Televizyondaki kişileri ev içindeymiş gibi sanıp konuşmak, aynadaki kendi hayaliyle yabancıymış gibi konuşmak gözlenebilir. Ambulasyonun korunduğu sırada amaçsız dolaşma, amaçsız tekrarlayıcı hareketler izlenebilir. Tuvalet mekaniğinde bozulmalar (idrar ya da gaita sonrası uygun biçimde temizlenme, sifonu çekme sorunları), idrar kaçırma giderek belirginleşir. Ağır evredeki hastaların muayenesi son derece güçtür ve mümkün olamayabilir, yapılabildiğinde ise global bir yıkım saptanır. Nörolojik muayenede tonus değişiklikleri, yürüyüş bozuklukları şeklinde bulgular saptanabilir . Bu evrede MMSE 0-9 arasındadır [6].

Alzheimer hastalığının doğal seyri kronik progresif bir seyirdir. Hastalık spontan ya da tedavi altında aylar süren duraksamalar gösterse dahi yıllar içinde sürekli ilerler ve geç evreye ulaşan tüm hastalar tüm zihinsel işlevlerini yitirerek tam bakım hastası haline gelirler. Hastalığı evreleyen birçok ölçüt olmakla beraber klinikte en çok işe yarayan hastalığı işlevsellik açısından kabaca üçe ayırmaktır: Erken evrede hastalar ya kendiliklerinden ya da hatırlatma ve yönlendirme ile günlük işlevlerini yapabilirler. Orta evre hastalarda yönlendirme yeterli olmaz, temizlik, giyinme-soyunma, yemek yerken et kesme gibi işlevler için yardım gerekir. İleri evre hastalar ise tüm günlük yaşam aktiviteleri açısından bağımlı hale gelirler, bu evrede sıklıkla idrar ve dışkı inkontinansı ortaya çıkar, terminal safhadaki hastalar ise yürüme işlevlerini de yitirirler ve yatağa bağımlı hale gelirler. Bu evredeki hastalar bile iyi bir bakımla yıllarca yaşayabilirler. Hayatın sonlanması malnütrisyon, dehidratasyon, enfeksiyonlar gibi sistemik sebeplerden olur. Hastaların teşhisten itibaren ortalama yaşam süreleri ortalama 7-9 yıldır [49, 50].

## 1.8. Alzheimer Hastalığında Tedavi

Alzheimer hastalığının bugün için kesin tedavisi yoktur. Kullanılan tedaviler hastalık seyrini kısmen yavaşlatmaya yönelik semptomatik tedavilerdir. AH'nın patogeneğinde öne çıkan iki nörotransmitter asetilkolin ve glutamattır. Kullanılmakta olan tedaviler kolinerjik eksikliği gidermeye ve glutamat toksisitesini önlemeye yöneliktir [51].

AH'nın spesifik farmakolojik tedavisinde iki grup ilaç kullanılmaktadır. Kolinerjik nöronlardaki progressif kayıp, büyük ölçüde bilişsel bozukluklardan sorumlu tutulmaktadır. Birinci grubu beyinde azalan asetilkolin miktarını yükseltmeyi hedefleyen kolinesteraz inhibitörleri oluşturur [52]. Bu ilaçlar asetilkolini sinaptik aralıkta yıkararak etkisini sonlandıran kolinesteraz enzimlerini inhibe ederler. Bu inhibisyon sonucu asetilkolinin sinaptik aralıkta kalış süresi, dolayısıyla da post-sinaptik etkisi uzar. Bu grupta tüm dünyada kullanılan üç ilaç bulunmaktadır, bunlar kullanıma çıkış sırasıyla donepezil , rivastigmin ve galantamindir [5, 53, 54]. Her üçüyle yapılan geniş kapsamlı, randomize, kontrollü çalışmalar AH'da etkinliklerini göstermiştir. Bir meta analiz çalışmasında AH'da kolinesteraz inhibitörlerinin etkinlikleri, yan etkileri birbirleriyle kıyaslamalı olarak değerlendirilmiş ve etkinlikleri açısından aralarında anlamlı bir fark saptanmamıştır [55]. İlaçların efektif dozları, donepezil için 5 ila 10 mg, rivastigmin için 6 ila 12 mg, galantamin için 16 ila 24 mg'dır [56, 57].

Alzheimer hastalığının tedavisinde kullanılan tüm kolinesteraz inhibitörleri, doz yeterince yükseltildiğinde, periferik yan etkilere yol açar. Ne yazık ki, bu ilaç sınıfının pek çok üyesi için, en yüksek etkinliğin gözlendiği inhibisyon düzeyi yan etkilerin yararlı etkiler karşısında ağır basmaya başladığı noktaya yakındır. Bu yan etkiler arasında en sık karşılaşılanlar dispepsi, bulantı, kusma, ishal ve yüzde ateş basmasıdır. Daha az görülen yan etkiler arasında baş dönmesi, baş ağrısı ve burun akıntısı bulunmaktadır. Kolinesteraz inhibisyonu çok ileri bir noktaya vardığında bradikardi, kaslarda seğirme ve ekstrapramidal semptomlar ortaya çıkar. İkinci kuşak asetilkolinesteraz inhibitörleri olan donepezil, rivastigmin ve galantamin genellikle daha yüksek düzeyde kolinesteraz inhibisyonu sağlayıp, daha az sayıda kolinerjik yan etkiye yol açar. Bunun muhtemel nedenleri arasında yarı ömürlerinin uzun olması, asetilkolinesteraz spesifisitelerinin yüksekliği ve santral sinir sistemindeki etki bölgeleri bulunmaktadır [55, 58].



Kolinesteraz inhibitörleri ile ilgili bildirilen en sık yan etkiler bulantı, kusma, ishal, kilo kaybı, insomnia, kas krampları, bradikardi, senkop ve yorgunluktur.

Genel olarak yan etkiler hafiftir ve ilacın kesilmesi ile geri dönüşlüdür. Kullanımda olan üç ilaca ayrı ayrı bakıldığında benzer yan etki profiline sahip oldukları görülmekle birlikte, rivastigminin gastrointestinal yan etkilerinin biraz daha sık olduğu söylenebilir. Ancak her üç ilaçta da ilacın düşük dozda başlanması, dozun yavaş yavaş artırılması ve ilacın yemekler ile birlikte alınması yan etkileri azaltmaktadır. Bradikardi ve kalp bloğu kolinesteraz inhibitörleri tedavilerinde çok nadir gözlenen yan etkiler olmasına rağmen bu konuda tedbirli olunmalı, negatif kronotropik ajanlarla birlikte kullanılmamalıdır. Bu konuda rivastigmin en güvenilir ajan olarak görülmektedir. Her üç ilaçta da ilaç etkileşimleri oldukça azdır. Rivastigminin p450 ile ilişkisinin olmaması bir avantaj gibi gözükse de donepezilin de bu sistem üzerinden bir ilaç etkileşimi henüz tarif edilmemiştir. Bazı ilaçlar galantaminin biyoyararlanımını etkileyebilmektedir [58].

Alzheimer hastalığı tedavisinde diğer hedef nörotransmitter glutamattır ve tedavide kullanılan ikinci grup ilaç voltaj bağımlı, nonkompetitif, selektif, orta derecede afinite gösteren bir NMDA reseptör antagonisti olan memantindir. Presinaptik glutamaterjik terminallerden, membran instabilitesi sonucu sızan, postsinaptik NMDA reseptörlerinde glutamat hiperkativitesini inihibe ederek etki ettiği düşünülmektedir. Memantin tek başına kullanılabildiği gibi kolinesteraz inhibitörleri ile kombine edilerek kullanılabilir [59]. Memantin global durum, kognisyon ve fonksiyonlar üzerine plaseboya göre anlamlı düzeyde pozitif etkileri olduğu saptanmış ayrıca ajitasyon, irritabilite, anormal motor davranış, yeme değişiklikleri gibi nöropsikiyatrik semptomlar üzerine yararlı etkileri bildirilmiştir [60].

Klinik çalışmaların çoğunda memantin hiçbir yan etkisi plasebodan daha fazla bulunmamıştır [61]. Günlük 5 mg dozunda başlanır ve doz kademeli olarak artırılarak günde 2 kez 10 mg dozuna çıkarılır. En sık saptanan yan etkiler ajitasyon, üriner inkontinans, üriner infeksiyon ve insomnidir. Ancak çalışmalarda tüm bu yan etkiler plasebo ile benzer oranlardadır [62].

Gingko biloba deriveleri, pirasetam ve benzeri nootropikler, östrojenler, NSAID'ler ve steroidler, statinler, antioksidanlar, çeşitli vitaminler klinik çalışmalarda denenmiş, bir

kısmı için bazı retrospektif veya prospektif çalışmalarda etkinlik işaretleri bulunmuş olsa da bugün için hiçbiri AH'nın tedavisi ya da korunmasında önerilmemektedir [63, 64].

Psikotik semptomu olan AH larda antipsikotik ilaç ihtiyacı ortaya çıkmaktadır. Psikotik semptomların tedavisinde ilaç kullanımıyla birlikte; psikolojik yardım, hastanın güvenliğini sağlamak üzere çevrenin düzenlenmesi ve davranış tedavisi standart yaklaşım olmalıdır [65]. Atipik antipsikotikler tipik antipsikotiklere göre öncelikli olarak önerilmekle birlikte çeşitli yan etkilerden bağımsız değildir. Atipik antipsikotikler arasında klozapin, olanzapin, risperidon, ketiapin ve ziprasidon yer almaktadır. Yaşlılardaki özellikle demansiyel psikozda ketiapin (25-100 mg), olanzapin (2.5-5 mg), risperidon (0.5-1 mg) sıklıkla düşük dozlarda kullanılmaktadır. Daha az ekstrapiramidal sistem belirtileri ve tardiv diskinezi riskinin azaltılması önemli avantajlardır. Geleneksel antipsikotiklerin değişik derecelerde dopaminerjik, alfa-adrenerjik, antikolinergik ve antihistaminik etkileri vardır. Dopaminerjik etkinin (özellikle D2 blokajı) terapötik etkiden ve tremor, bradikinezi, akatizi, rijidite ve distonik reaksiyonlar gibi ekstrapiramidal yan etkilerden sorumlu olduğu bilinmektedir [66]. Yapılan randomize plasebo kontrollü çalışmalarda atipik antipsikotik kullanan demans hastalarında serebrovasküler olaylar yaklaşık 3 kat daha fazla saptanmıştır [67]. Ayrıca yaşlılarda bu ilaçların mortaliteyi artırabileceği gösterilmiş ve Food and Drug Administration (FDA) tarafından prospektüslere bu ibare eklenmiştir [68, 69].

Her üç kolinesteraz inhibitörü ilacın da (donepezil, rivastigmin, galantamin) demansa bağlı davranış bozukluklarına etkinliğini gösteren çalışmalar vardır [70, 71]. Ancak rivastigmin bütirikolinesteraz enzimini de inhibe ettiğinden daha etkin olduğu söylenebilir. Özellikle halüsinasyon, sanrı gibi psikotik semptomlarda rivastigmin daha üstüdür. Rivastigmin diğer ilaçlarda gösterilememiş olan psikotrop ilaçların kullanımında azalma sağlamaktadır. Demansiyel psikoz hasta yakınlarına ve bakıcılara önemli yük getirmektedir.

Hastanın ve yakınlarının sosyal ve psikolojik olarak desteklenmesi de tedavide yarar sağlamaktadır [72].

## 2. KURAMSAL TEMELLER

Kapiler elektroforez (CE); Gaz Kromatografisi (GC), Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (HPLC) ve Jel Elektroforezi'in iyi özelliklerinin birleşiminden geliştirilmiş modern bir yöntemdir. Kapiler elektroforez bu tekniklerin avantajlarını içermesiyle beraber sahip olduğu üstünlükler; yüksek ayırım gücü (yüzlerce bileşiği aynı anda tayin edebilme yeteneği), kısa analiz zamanı, analiz için az miktarda örnek ihtiyacı, joule ısını etkin bir şekilde dağıtabilme yeteneği, analizin ucuz olması, yüksek kararlılık, düşük çözücü tüketimi ve otomasyona imkan tanınması sayılabilir [73]. CE 1990'ın ilk yıllarında gelişen, günümüzde ise çoğu alanlardaki analizlere uygulanan bir yöntemdir [74]. Bu tekniğin kullanımının yaygınlaşması son yıllardaki makale sayısındaki artıştan da görülmekte olup, gıda analizleri, farmokolojik uygulamalar, biyobilim, çevresel uygulamalar ve adli tıp uygulamaları gibi geniş uygulama alanlarına sahiptir. CE' in geniş uygulama alanlarının yanında inorganik iyonların ayırımında da son yıllarda hızla gelişen bir analitik teknik olduğu ve iyon ayırımlarının sağlandığı bir teknik olan iyon kromatografiye (IC) alternatif olarak yaygın kullanıldığı görülmektedir [75,76]. Kapiler elektroforez yönteminde iyon analizi, tamponla doldurulmuş bir 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. Kapiler elektroforez oldukça hızlı ve çok küçük hacimdeki 0,1 ile 10 nL numunelerde yüksek ayırım gücüne sahiptir. Ayırma ortamı küçük iç çapa sahip kapiler kolonda gerçekleştiğinden, dedeksiyon hacmini sınırlandırmaktadır [77]. Ayrıca, duyarlılığın ve minyaturizasyonun gerçekleşmesi için potansiyometrik dedektörün kullanıldığı sistemler de geliştirilmiştir[78].

### 2.1.1. Kapiler Elektroforez

Kapiler Elektroforez, bir elektrik alan etkisi altında bir kolon boyunca bileşenlerin tampon akışı ile sürüklenmesiyle hareket hızlarının farkına dayanan hızlı ve etkin bir ayırma tekniğidir. Klasik elektroforezdeki ayırma ortamının, kapiler içerisine taşınmasıyla birlikte CE' de elektroforetik uygulama alanlarının çok geniş bir alana yayılmasına neden

olmuştur. Bundan dolayı sadece makromoleküllerin değil küçük moleküllerin de ayırımında kullanılan etkili bir yöntemdir. Aynı zamanda katyonların, anyonların ve miseller elektrokromatografi tekniğinin kullanılması ile birlikte nötral moleküllerinde tek bir analizle ayrılması ve tayini gerçekleştirilebilmektedir.

### 2.1.2. Elektroforez

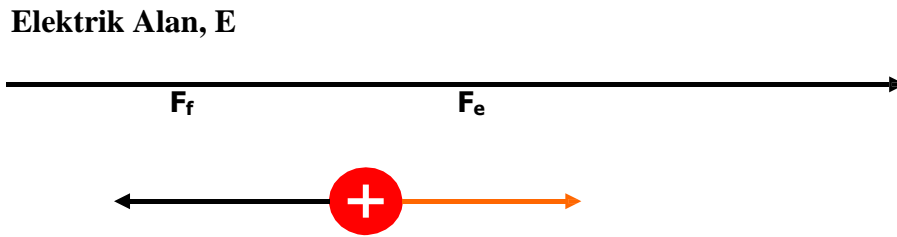
Bir elektrik alanın etkisi altında yüklü partiküllerin sıvı ya da yarı katı bir ortam içerisinde göç etmesi anlamına gelmektedir. Bir iyonun göç hızı aşağıdaki eşitlikle verilir :

$$v = \mu_{ep}E \quad (2.1.)$$

$$v = \text{İyonun göç hızı}$$

$$\mu_{ep} = \text{Elektroforetik mobilite}$$

$E$  = Uygulanan elektrik alan Mobilite, verilen bir iyon ve ortam için karakteristiktir. Mobilite, bir elektrik alan tarafından verilen kuvvet ve onun ortam boyunca bir sürtünme kuvveti tarafından belirlenmektedir.



**Şekil 2.1.** Yüklü partiküle elektrik alan varlığında etki eden kuvvetler

$$\infty \mu_{ep} \mu (\text{Elektrik kuvveti} / \text{sürtünme kuvveti})$$

Yüklü partikül üzerine etkiyen elektrostatik kuvvet, partikülün net yükü ve çözeltideki elektrik kuvveti ile doğru orantılıdır.

Elektrik alan kuvveti:

$$F_e = qE \quad (2.2)$$

ve sürtünme kuvveti:

$$F_f = -6\pi\eta r v \quad (2.3)$$

eşitliği ile verilmektedir. Burada,  $q$  iyonun yükü,  $\eta$  çözeltinin viskozitesi,  $r$  iyonun yarıçapı,  $v$  ise iyonun hızıdır.

İlerlemiş göç hareketinden sonra, zıt elektrostatik kuvvet ve sürtünme kuvvetleri belli bir noktada dengeye ulaştığı düşünülürse, partikül sabit hızla çözelti içinde hareket eder ve 2.4 eşitliğine ulaşılır;

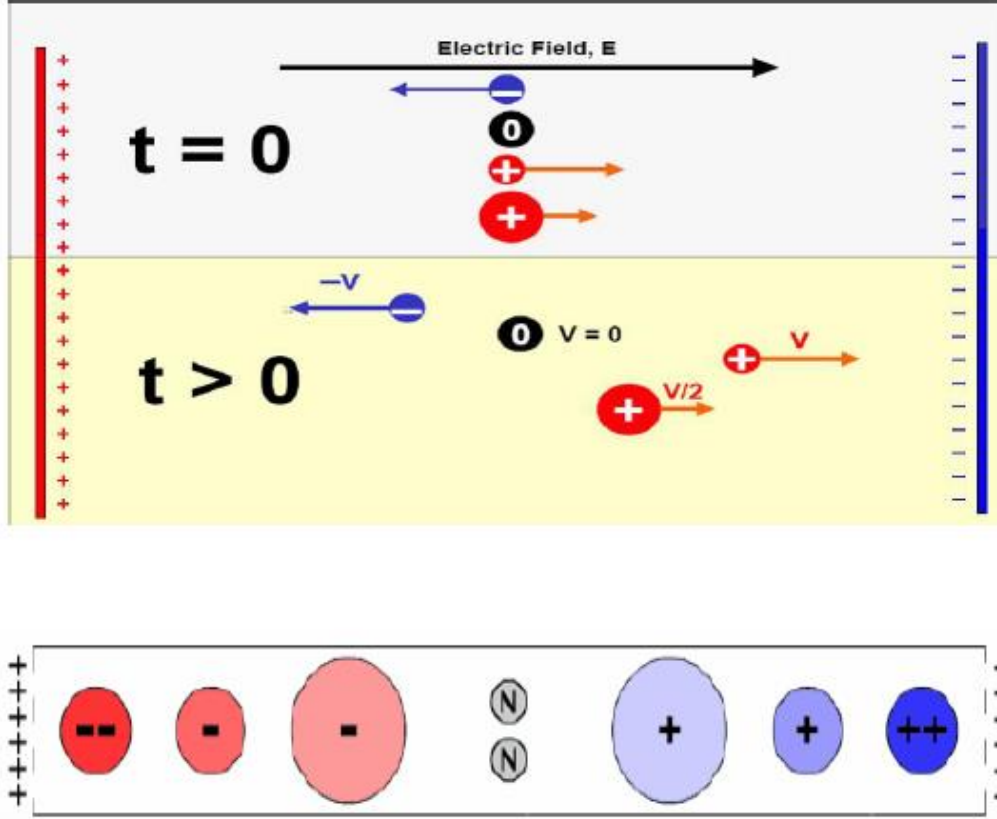
$$F_E = F_F$$

$$q.E = 6\pi\eta r v \quad (2.4)$$

Bu denklemlerden hareket ederek elektroforetik mobilite için denklem 2.5 elde edilir.

$$M_{ep} = \frac{q}{6r\pi\eta} \quad (2.5)$$

Elektroforetik hız iyonun yükü ile doğru orantılı, iyonun hidrodinamik yarıçapı ve çevreleyen ortamın viskozitesi ile ters orantılıdır. Küçük iyonlar daha az sürtünmeye maruz kalır ve böylece daha büyük olana göre ortamda daha hızlı hareket eder. Benzer olarak iyon yükü büyük olan, elektrot tarafından daha fazla çekilir ve ortam boyunca daha hızlı hareket eder [79]. Elektroforetik mobilite verilen iyon veya çözünen için karakteristik bir özelliktir ve daima sabittir. Farklı iyon ya da çözünenler farklı elektroforetik hıza sahiptirler. Elektroforetik mobilitadaki farklılıktan dolayı elektroforez kullanılarak iyonlar ve çözünenlerin ayırımı mümkündür [80]. Tipik bir elektroforetik ayırmada, kolonda yük/yarıçap oranı daha büyük olanlar ilk önce göç eder, daha az oranda olanlar ise devam ederler. Kolondaki elüsyonun şematik gösterimi Şekil 2.2' de gösterilmektedir.



**Şekil 2.2.** Bir elektroforetik ayırmada yüklü (pozitif, negatif) türlerin yük/yarıçap oranlarına göre dağılımı (t : zaman).

Yüksek yüklü türler = yüksek mobilite

En az yüklü türler = düşük mobilite

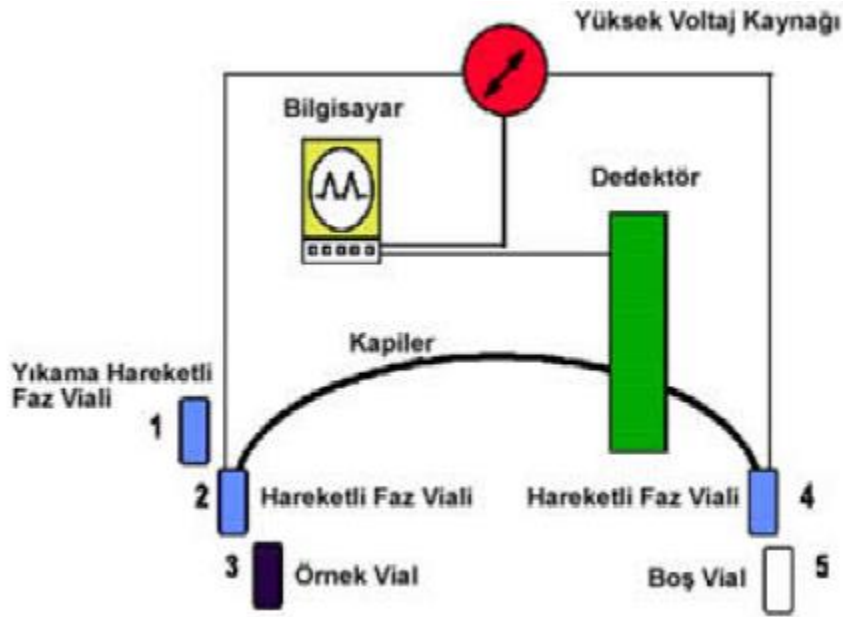
Nötral türler = sıfır mobilite

x-yüklü küçük türler = yüksek mobilite

x-yüklü büyük türler = düşük mobilite

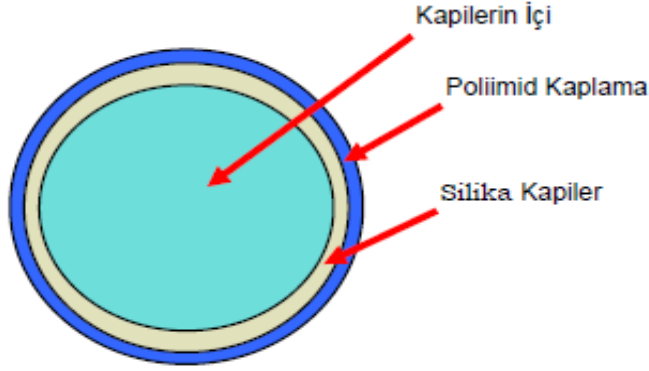
### 2.1.3. Kapiler Elektroferez (CE) Cihazı ve Çalışma Prensibi

Kapiler elektroferez işleminin gerçekleşmesi için gerekli olan enstrüman oldukça basittir. Kapiler elektroferez sisteminin basit gösterimi Şekil 2.3' de verilmektedir. Sistemin ana bileşenleri; kapilerin içine girdiği iki hareketli faz veya tampon kabı, yüksek voltaj kaynağı (1-60 kv), yüksek voltajı ileten tampon haznelerinde bulunan iki elektrot, elektroosmotik akış ve elektroforetik süreçlerin meydana geldiği bir kapiler kolon ve bir dedektörden oluşmaktadır. CE' in çalışma prensibi ise; kapilerin iki ucu platin elektrotların bulunduğu tampon veya hareketli faz çözeltilerini içeren kaplara yerleştirilir ve sisteme bir dış kaynaktan 60 kV' a kadar yüksek voltaj uygulanır. Burada, tampon çözeltinin akışı ile, analit molekülleri sahip oldukları elektroforetik mobiliteye göre göç eder ve kapilerin bir ucunda dedeksiyon işlemi gerçekleştirilir [81].



Şekil 2.3. CE cihazının şematik gösterimi (Hareketli faz : çalışma tamponu)

#### 2.1.4. Kapiler Kolon



Şekil 2.4. Bir CE kolonunun basit gösterimi

Genellikle 10-75  $\mu\text{m}$  iç çap, 350-400  $\mu\text{m}$  dış çap ölçülerine sahip silika kapilerler kullanılmaktadır. Silika kapilerin yaygın olarak kullanılmasının nedeni UV/görünür ışığı geçiren, bükülebilir ve sağlam olduğundan tercih edilmektedir. Gaz kromatografi (GC) kolonlarına benzer şekilde kapiler koruyucu bir tabaka olan poliimid ile kaplanarak kuvvetli ve kolay tutulur hale getirilir [82]. Dedeksiyon için poliimidin birkaç milimetrelük kısmı yakılarak kapilerde optik pencere açılabilir. Silika kapiler kadar yaygın olmasa da cam, plastik, teflon kapilerler de kullanılmaktadır.

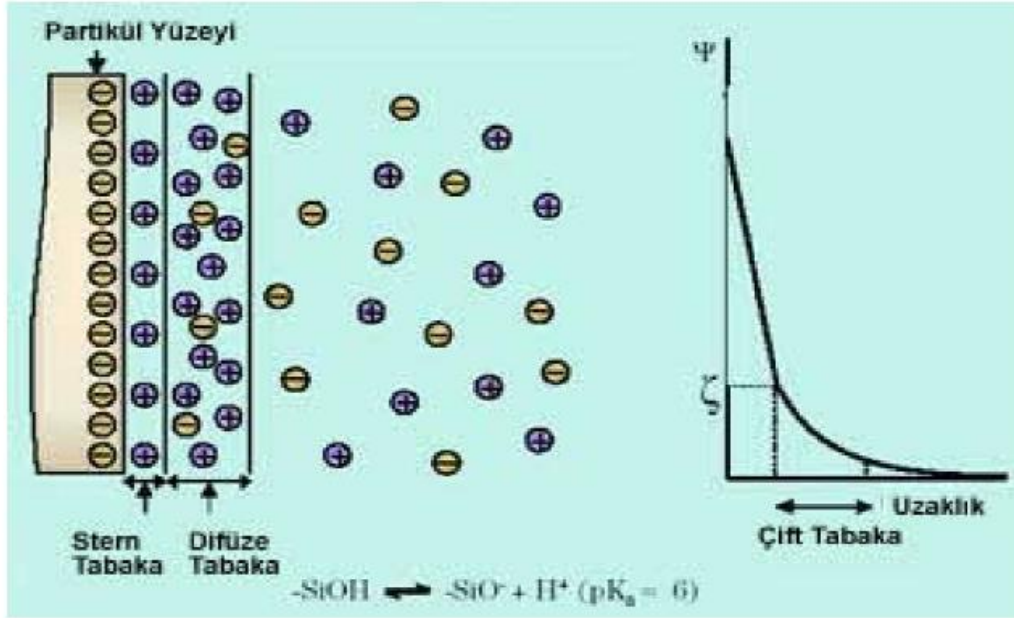
Kapilerin kullanıma hazırlanması, tekrarlanabilir sonuçlar alınması açısından çok önemli olup ayırma elektroosmotik akış hızına bağlı ve bu da kapiler yüzeyine göre değiştiği için deney öncesi hazırlık önemlidir. Yeni kapiler genellikle 1M NaOH ile en az yarım saat yıkanarak aktif hale getirilir. Çalışmaya başlarken kapilerin tamponla belirli bir süre dengeye gelmesine izin verilmelidir [83].

#### 2.1.5. Elektroosmotik Akış (EOF)

Hareketli faz içeren bir kapiler tüpe bir elektrik alanının uygulanması sonucu pH' a bağlı olarak silika kapilerinin iç yüzeyindeki silanol gruplarının (ya da herhangi bir iyonlaşabilen grupların) iyonlaşması nedeniyle negatif yüklüdür. Kapilerin çeperinde bulunan silanol grupları, iyonik hareketliliğin bir sonucu olarak tampondan pozitif yüklü



iyonları çeker ve derhal bir zıt yüklenme meydana gelir [84]. Kapilerin iç yüzeyinde bir elektriksel tabaka oluşur ve bu tabaka iki kısımdan oluşmaktadır. Kapiler yüzeyinde oluşan bu elektriksel tabaka Şekil 2.5’ de verilmiştir.



Şekil 2.5. Stern teorisine göre elektriksel çift tabaka yapısının şematik gösterimi

(1) Yüzeğe yakın olan yoğun iç tabakaya “Stern Tabaka” denilmektedir. Bu tabakada yüzeyden uzaklaştıkça potansiyel mesafe ile doğrusal ilişki olarak azalmaktadır.

(2) Stern tabakanın dış yüzeyinde bir difüze tabaka meydana gelmektedir. Burada kapiler kolondan uzaklaştıkça ortaya çıkan potansiyel üstel olarak azalmaktadır. Kapiler yüzeyindeki ve yüzeğe yakın çözültideki bu yük yoğunluğu elektrikselsel çift tabaka olarak adlandırılmaktadır.

### 2.1.6. Zeta Potansiyeli

Stern tabaka ve difüze tabaka arasındaki potansiyel, zeta potansiyeli ( $\zeta$ ) olarak adlandırılmaktadır ve 0-100 mV arasında değerler almaktadır.

EOF hızı ve uygulanan elektrik alanındaki ilişki aşağıdaki eşitlik tarafından verilmektedir.

$$V_o = \frac{\epsilon \zeta E}{\eta} \quad (2.6)$$

Eşitlikte;

$\epsilon$  = elüentin dielektrik sabiti

$\zeta$  = zeta potansiyeli

E = elektrik alan kuvveti

$\eta$  = viskozite

Açıkça görülüyor ki EOF yüzey yük yoğunluğu, elektrik alan kuvveti, elektriksel çift tabakanın kalınlığı ve ayırım ortamının viskozitesine bağlıdır [85].

Zeta potansiyeli kapiler duvarı üzerinde asidik silanol gruplarının iyonlaşması tarafından büyük ölçüde yönetildiğinden dolayı, EOF' ın derecesi elektrolitin pH sına bağlı olarak değişecektir. pH 4 un altında iyonizasyon düşüktür ve bu yüzden EOF önemli değildir. pH 9 un üstünde ise silanol grupları tamamen iyonize olur ve EOF önemlidir [86].

Şekil 2.6' da kapiler iç yüzeyinde silanol gruplarının iyonlaşmasının pH ile değişimi verilmektedir [87] .



**Şekil 2.6.** Kapiler iç yüzeyinde silanol gruplarının iyonlaşmasının pH ile değişimi

Elektroosmotik akış hızı (EOF), elektriksel alan kuvveti (E) ile orantılı olup aşağıdaki eşitlikle ifade edilir:

$$v_o = \mu_o \cdot E \quad (2.7)$$

$\mu_o$  = Elektroosmotik mobilite

$v_o$  = Elektroosmotik akış hızı

E = Elektriksel alan kuvveti

Kapilerde analitler kendi yüklerine göre göçseler bile, elektroosmotik akış hızı bütün pozitif, nötral ve hatta negatif tanecikleri kapilerin aynı tarafına sürüklemeye yetecek kadar büyüktür. Elektroosmoz olması durumunda, bir iyonun hızı, onun elektroforetik hızı ve elektroosmoz akış hızının toplamıdır.

$$\mu_{APP} = \mu_o \pm \mu_{EP} \quad (2.8)$$

$\mu_{APP}$  = Görünen mobilite

$\mu_{EP}$  = Elektroforetik mobilite

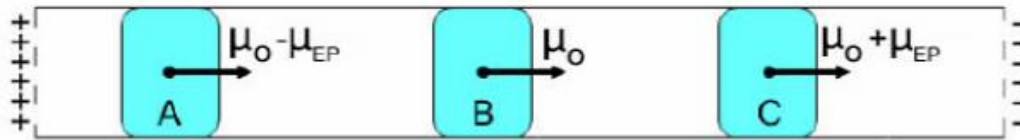
Nötral türler elektrik alanın varlığından etkilenmezler, bu yüzden elektroforetik hızları sıfırdır. Kapiler kolonda EOF hızı ile sürüklenirler ve  $\mu_{APP}$   $\mu_o$ ' e eşit olur.  $\mu_{APP}$  değeri iyonların yüküne bağlı olarak  $\mu_o$  dan ya küçük ya da büyük olacaktır. Pozitif yüklü iyonlar EOF akış ile aynı yönde sürüklendikleri için iyonun göç hızı  $\mu_o$ 'den büyük, negatif yüklü iyonlar ise EOF akış yönüne ters hareket ettikleri için  $\mu_o$ ' den küçük olacaktır.

Pozitif, negatif iyonlar ve nötral partiküllerin hareket hızları şu şekilde gösterilebilir.

$$\text{Pozitif iyonlar için ; } v = (\mu_o + \mu_{EP}). E \quad (2.9)$$

$$\text{Negatif iyonlar için ; } v = (\mu_o - \mu_{EP}). E \quad (2.10)$$

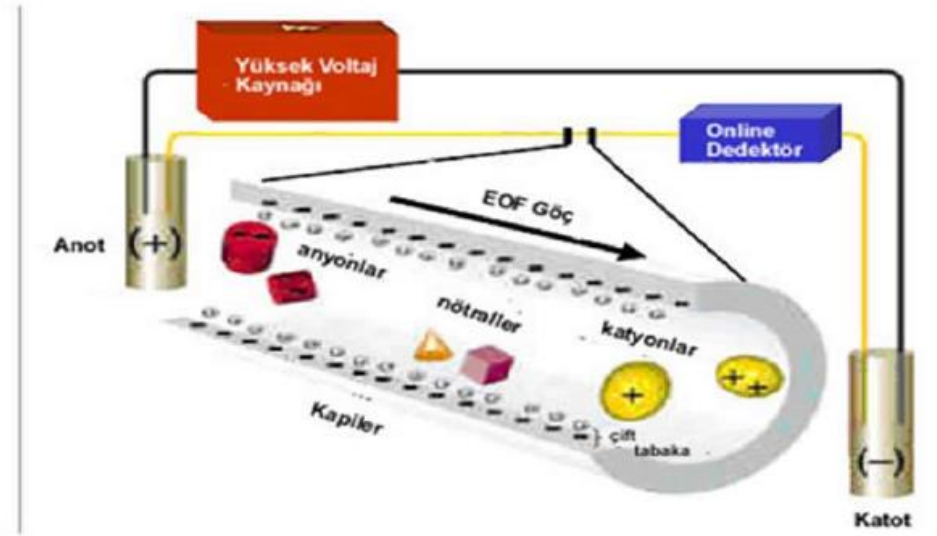
$$\text{Nötral partiküller için ; } v = \mu_o. E \quad (2.11)$$



**Şekil 2.7.** A) Negatif yüklü türün mobilitesi B)Nötral türlerin mobilitesi C) Pozitif yüklü türlerin mobilitesinin şematik gösterimi

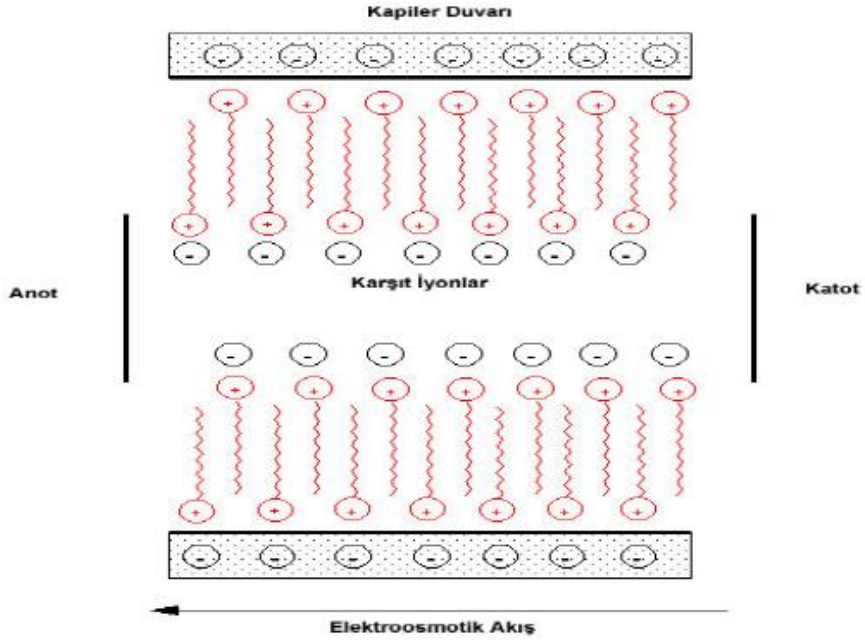
### 2.1.7. EOF' ın Şematik Gösterimi

Elektrik alanın uygulanması ile birlikte katyonlar katot yönünde hareket eder. Bu katyonlar solvatize olduklarından tampon çözeltisi içerisindeki çözücü molekülleriyle birlikte hareket edeceğinden çözeltideki bütün türler katoda doğru hareket eder ve elektroosmotik akış meydana gelir. Böylece bütün tanecikler aynı noktadan geçtiği için bunlar tayin edilebilir.



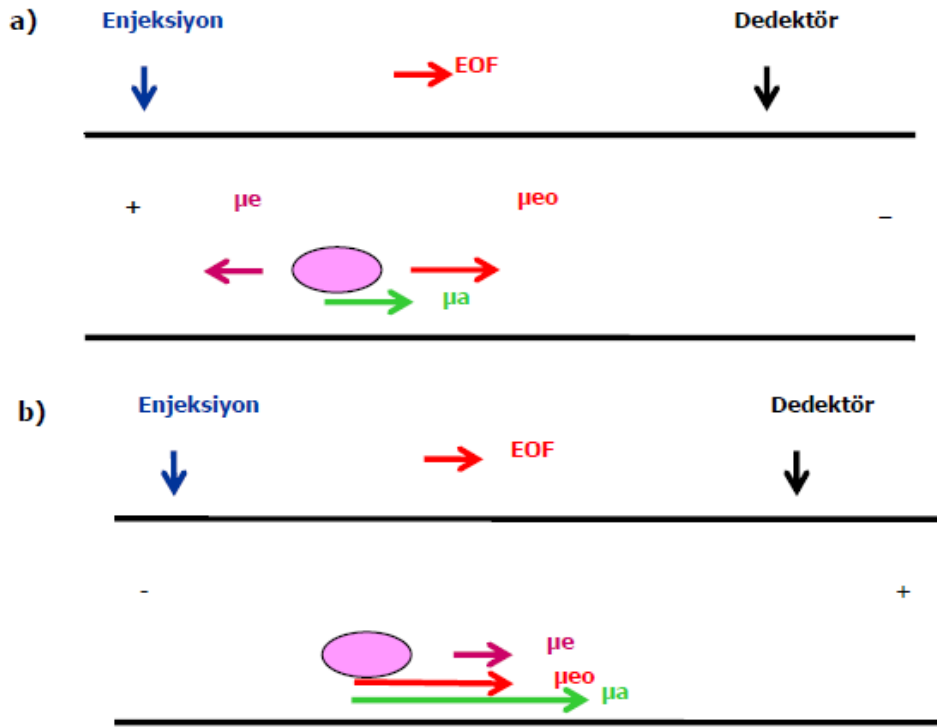
Şekil 2.8. EOF' ın şematik gösterimi [78]

Sadece EOF' ın büyüklüğünü değil, aynı zamanda yönünü de değiştirmek mümkündür. Anyonların analizi için göç zamanını azaltmak amacıyla elektroosmotik akış yönünü ters çevrilebilir. Bunu gerçekleştirmek için tampon çözelti içerisine bir katyonik yüzey aktif madde ilave edilerek gerçekleştirilebilir. Kapilerin iç yüzeyinde yüzey aktif madde adsorblanır ve kapilerin iç yüzeyi pozitif yükle yüklenmiş olur. Böylece, tamponun anyonları kapilerin iç yüzeyine yakın bir yerde birikir ve elektroosmotik akış yönü anoda doğru çevrilmiş olur.



**Şekil 2.9.** EOF' ın ters yönlü şematik gösterimi

Şekil 2.10' da A ya bakıldığında dedektörün katot tarafında olduğu CE ayırımı, B de ise dedektörün anot tarafında olduğu bir CE ayırımı gösterilmektedir. A şıkında enjeksiyon anot tarafında dedektör ise katot tarafında, EOF yönü ise katot yönündedir. CE de bir anyonun analizi gerçekleştirildiğinde onun elektroforetik hızı ve EOF ters yönde olduğundan, anyonun görünen hızı EOF hızından daha az olmaktadır. Bu da anyonların ayırımı gerçekleştiğinde analiz süresini arttırmaktadır. Bu problemi ortadan kaldırmak için EOF ters çevrilir ve Şekil 2.10' da B'de gösterilmektedir. Enjeksiyon katot tarafında, dedektör anot tarafında olacak şekilde yer değiştirir. Anyonun elektroforetik hızı ve EOF hızı aynı yönde olduğu için anyonun görünen hızı EOF hızından büyük olmaktadır. Böylece anyonların analizi daha kısa sürede gerçekleştirilmiş olmaktadır.



**Şekil 2.10.** a) Dedektörün katot tarafında olduğu CE ayırımı b) Dedektörün anot tarafında olduğu CE ayırımı

### 2.1.8. EOF' ı Kontrol Etme Yöntemleri

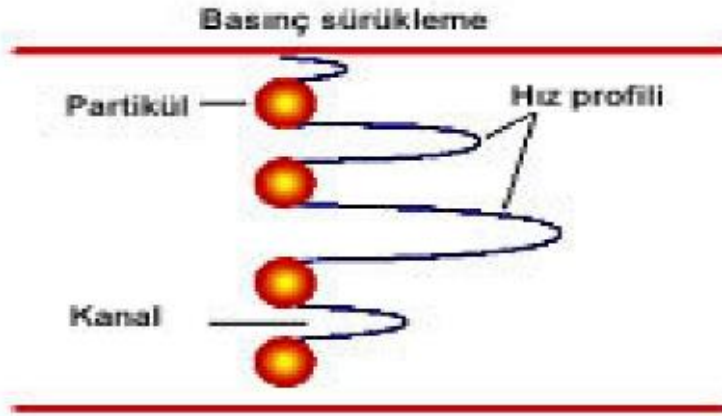
Kapiler elektroforez de EOF hızı elektroforezin gerçekleşmesini sağlayan çok önemli bir olay olduğundan kontrol edilmelidir. Eğer EOF hızı yüksek olursa pikler üst üste biner ve ayırım sağlanamaz, çok yavaş olursa da ayırım gücü düşmektedir. EOF kontrolü tampon viskozitesinde ya da kapiler yüzeyindeki yük değişiminde değişiklik yapmayı gerektirir. Bunu yapmak için birkaç metod vardır. Başarılı ayırımlar için EOF optimize edilmelidir [88].

**Çizelge 2.1.** EOF' 1 kontrol etme yöntemleri

<b>DEĞİŞKEN</b>	<b>SONUÇ</b>	<b>YORUM</b>
Elektrik alanı	EOF da orantılı bir değişiklik	Azaltıldığında verim ve ayırıcılık azalabilir. Arttırıldığında joule ısınması olabilir.
Tampon pH sı	Düşük pH da EOF azalırken yüksek pH da artar	EOF yi değiştirmek için en iyi yoldur. Çözünenin yükü ve yapısını değiştirebilir.
İyonik şiddet veya tampon derişimi	Arttırıldığında zeta potansiyel ve EOF yi azaltır	Yüksek iyonik şiddet yüksek akımları ve joule ısısını oluşturur. Düşük iyonik şiddet örnek adsorpsiyonu ile sonuçlanabilir. İletkenlik örnek iletkenliğinden farklı ise pik şeklini bozabilir. Azaltılırsa örnek yığılmasını sınırlar.
Sıcaklık	Viskoziteyi değiştirir	Sıcaklık enstrümanla birlikte kontrol edilebildiği için oldukça kullanışlıdır.
Organik değiştirici	Zeta potansiyeli ve viskoziteyi değiştirir.(genelde EOF' 1 azaltır)	Kompleks değiştirir, etkiler, deneysel olarak belirlenmelidir. Seçiciliği değiştirebilir.
Yüzey aktif madde	Hidrofobik ve/veya iyonik etkileşimlerle kapiler duvarına adsorplanır	Anyonik yüzey aktifler EOF'1 arttırabilir. Katyonikler EOF' 1 tersine çevirebilir veya azaltabilir. Seçiciliği önemli derecede değiştirebilir.
Nötral hidrofilik polimer	Hidrofobik etkileşimlerle kapiler duvarına adsorplanır	Yüzey yükünü koruyarak ve viskoziteyi arttırarak EOF' 1 azaltır
Kovalent bağlanma	Kapiler duvarına kimyasal bağlanma	Birçok değişiklik mümkündür. Kararlılık problemi vardır.

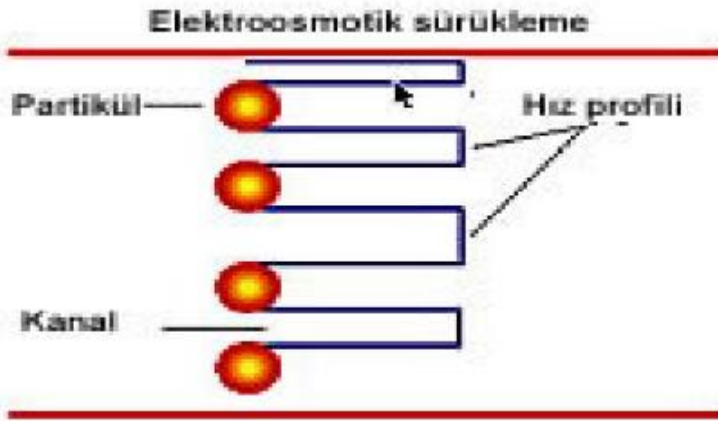
### 2.1.9. CE ve HPLC' de Akış Profilleri

HPLC'de hareketli fazın sürüklenmesi bir mekanik pompa yardımıyla olmaktadır. Hareketli faz kolon duvarlarındaki sürtünmeden dolayı bir parabolik akış meydana gelir ve bu akıştan dolayı hareketli fazın hızı merkezde büyük fakat duvarın bitişiğinde hız merkeze oranla daha düşüktür. Bunun sonucu olarak bant genişlemesinden dolayı ayırım gücü düşmektedir [86,89,90].



Şekil 2.11. Hidrodinamik akış görünümü

Bununla birlikte CE’de kapilere bir elektrik alan uygulanması sonucu EOF den dolayı düz bir akış görünümüne sahiptir. Çünkü kapiler duvarındaki yük dengeli bir şekilde dağıtılmıştır. Kapiler boyunca hareketli fazın hızı değişmemektedir. Düz bir akış görünümünden dolayı HPLC’deki gibi bant genişlemesine etki etmez ve yüksek ayırım gücü meydana gelmektedir [86, 89, 90].



Şekil 2.12. Elektroosmotik akış görünümü



## 2.1.10. Bant Genişlemesinin Kaynakları

### 2.1.10.1. Dispersiyon

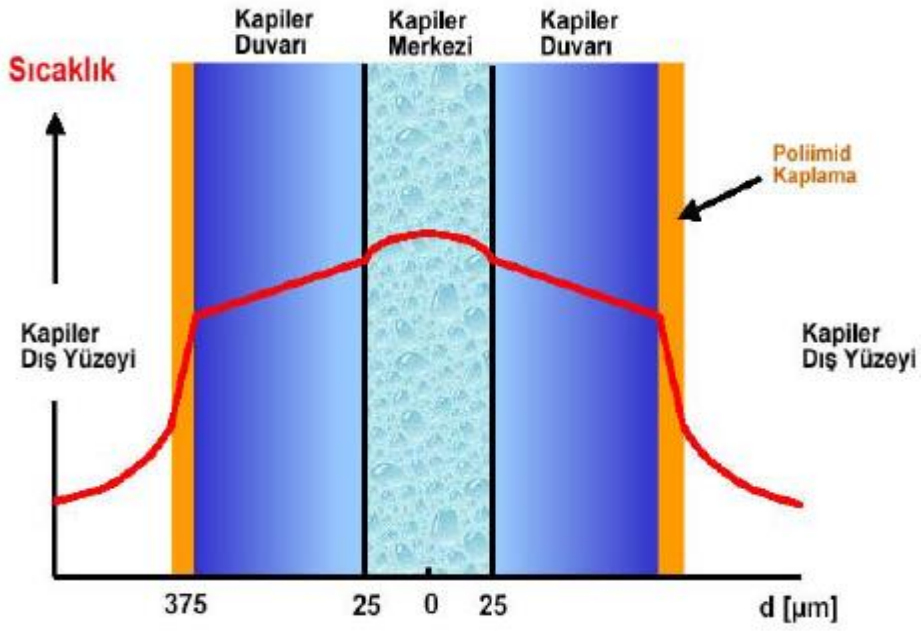
Kapiler elektroforezde farklı analitler uygulanan voltaj ile analit mobilitelerindeki farklılıklara dayanarak bölgeler şeklinde ayrılırlar. Analitleri çözmek için bu bölgeler tamamen birbirlerinden ayrılmaları gerekmektedir. Dispersiyon, zon içindeki analit hızındaki farklar sonucunda oluşmaktadır ve farklı analitler diğerlerinin içinde sürüklenirler ve böylece ayırım gerçekleşmemektedir.

### 2.1.10.2. Joule Isınması ve Sıcaklık Gradienti

Joule ısınması, çözeltinin akım geçişine direncinin bir sonucudur. Üretilen ısı H, elektrotlar arasında uygulanan potansiyel V, elektrik akımı I ve zaman t ile doğru orantılıdır.

$$H = V \times I \times t \quad (2.12)$$

Eğer ısı sistemden uzaklaştırılmazsa ayırıcılığı azaltmaktadır [90]. Sistemde ısının artması ile değişik sıcaklık gradientleri, viskositede meydana gelen değişiklikler ve bunları takiben bant genişlemesi meydana gelmektedir. Kapiler duvarı boyunca ısının termal dağılımı, kapiler duvarından kapiler merkezine doğru gidildikçe daha yüksek sıcaklıklarda meydana gelmektedir. Düzlemsel elektroforezde joule ısınması etkin bir şekilde dağıtılmadığından dolayı yüksek potansiyellerin uygulanmasını sınırlandırmaktadır. CE'de kullanılan kapilerin bir avantajı olarak; yüksek yüzey / hacim oranına sahip olduğu için ısıyı iyi dağıtır ve yüksek potansiyeller uygulanabilir hale gelir [91].



Şekil 2.13. Joule ısınması ve sıcaklık gradienti

Çizelge 2.2’ de joule ısınması ve sıcaklık gradientlerini kontrol etme yöntemleri gösterilmektedir [78].

Çizelge 2.2. Joule ısınması ve sıcaklık gradientlerini kontrol etme yöntemleri

Değişken	Etkisi
Elektrik alanını azaltmak	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Üretilen ısı orantılı olarak azalır.</li> <li>• Verimi ve ayırıcılığı azaltır.</li> </ul>
Kapiler iç çapını azaltmak	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Akımda etkili bir düşüş,</li> <li>• Duyarlılık azalır.</li> <li>• Örnek adsorpsiyonun artışına neden olabilir.</li> </ul>
Tamponun iyonik şiddetini veya derişimini azaltmak	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Akımda orantılı bir düşüş,</li> <li>• Örnek adsorpsiyonun artışına neden olabilir.</li> </ul>
Aktif sıcaklık kontrolü	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Isıyı sabit kılar ve oluşan ısıyı kapilerden uzaklaştırır.</li> </ul>

### 2.1.10.3. Boyuna Difüzyon

CE oldukça yüksek verimliliğinin sonucu büyük bir ayırım gücüne sahiptir. CE ve kromatografi gibi diğer yüksek ayırım gücüne sahip tekniklerinin ayırma etkinliği Van Deemter eşitliği tarafından biçimlendirilir. Ayırımın kantitatif bir ölçüsü olarak birbiri ile bağlantılı iki terim kullanılmaktadır. Bunlar; (1) tabaka yüksekliği; H ve (2) tabaka sayısı;

$$N = L'/H \quad (2.13)$$

$L'$ = Kapilerin enjeksiyon ucu ile dedektör arasındaki mesafe

Bir kolonda, tabakaların sayısının artması ve tabaka yüksekliğinin azalmasıyla kolon verimliliği artmaktadır.

$$H = \cancel{A} + \frac{B}{\mu_x} + \cancel{C}\mu_x \quad (2.14)$$

Burada A(eddy difüzyon), B(boyuna difüzyon) ve C(kütle aktarımına karşı gösterilen direnç) sabitlerdir. CE de denklemde tabaka yüksekliğine katkısı olan üç terimin ikisi yok edilir. Bunlar A ve  $C\mu_x$  terimidir. Çünkü tek bir faz olduğundan sıvı düzenli bir şekilde taşındığından bu terimler yok edilir. Bu durumda ideal şartlar altında bant genişlemesinin esas kaynağı boyuna difüzyon terimidir.

Yüksek elektrik alan uygulandığında kapiler içerisinde analitler dedektöre daha kısa sürede ulaşacakları için difüzyon süreleri o kadar kısa olmaktadır. Protein, DNA gibi büyük molekül ağırlıklı maddeler küçük moleküllere göre daha az dispersiyona uğramaktadır.

### 2.1.10.4. Örnek Verilmesi

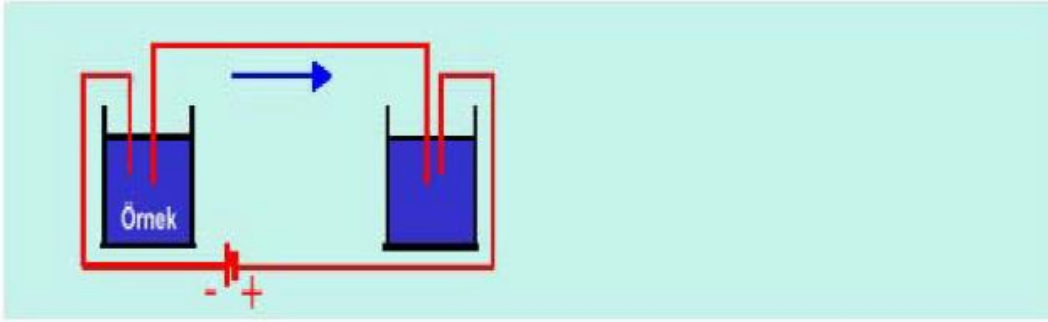
CE' de kullanılan küçük hacimli örneklerin verimli ve tekrarlanabilir bir şekilde kolona verilmelidir ve yüksek verim elde etmek için kullanılan enjeksiyon metotları bant genişlemesine etki etmemelidir [92]. Bunun sonucunda CE' de numune enjeksiyonu yapabilmek için iki yöntem vardır. Bunlar;

1 - Elektrokinetik enjeksiyon

2 - Hidrodinamik enjeksiyon

Elektrokinetik enjeksiyonunda; kapilerin bir ucu ve buna bağlı elektrot tamponun bulunduğu bölümden çıkarılıp numunenin bulunduğu kap içerisine konur ve belirli bir süre potansiyel uygulanarak numune kapiler içersine alınmış olur.

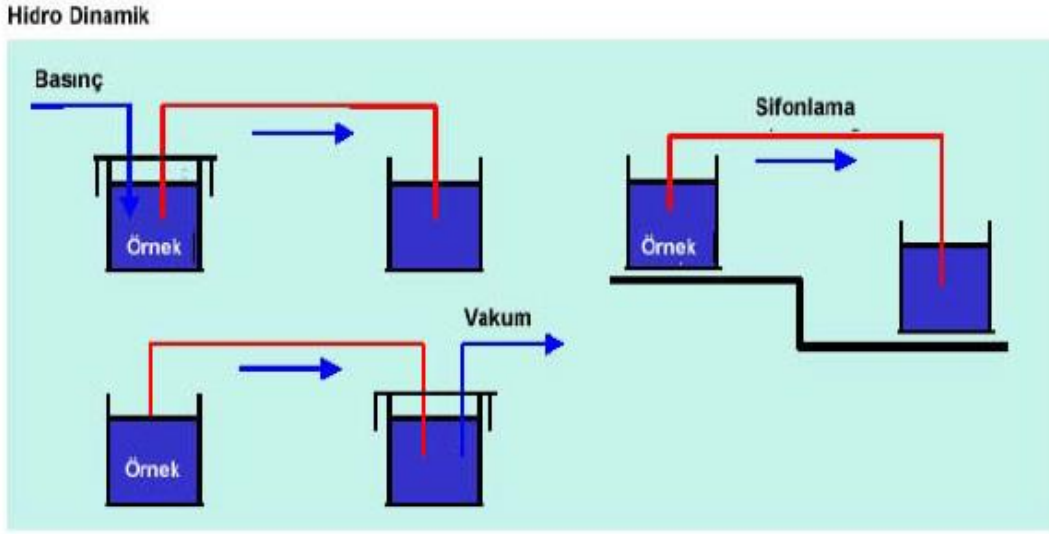
#### Elektrokinetik



şekil 2.14. Elektrokinetik enjeksiyon yöntemi

Hidrodinamik enjeksiyonda ise örnek, uygulanan bir basınc yardımı ile kapiler içine alınır. Kapilerin giriş çıkışı arasında bir basınc farkı uygulandığında örneğin belli miktarı (nanolitre seviyesinde) kapiler içine akar. Hidrodinamik enjeksiyon cihaz modeline göre üç şekilde yapılabilir. Bunlar;

- rnek kısmına kontrollü basınc uygulanır.
- rnek, kapilerin diğer ucuna uygulanan kontrollü bir vakum ile kapilerin içerisine alınır.
- Kapilerin giriş çıkışı arasındaki yükseklik farkı uygulanmasıyla bir basınc elde edilir.



Şekil 2.15. Hidrokinamik enjeksiyon yöntemi

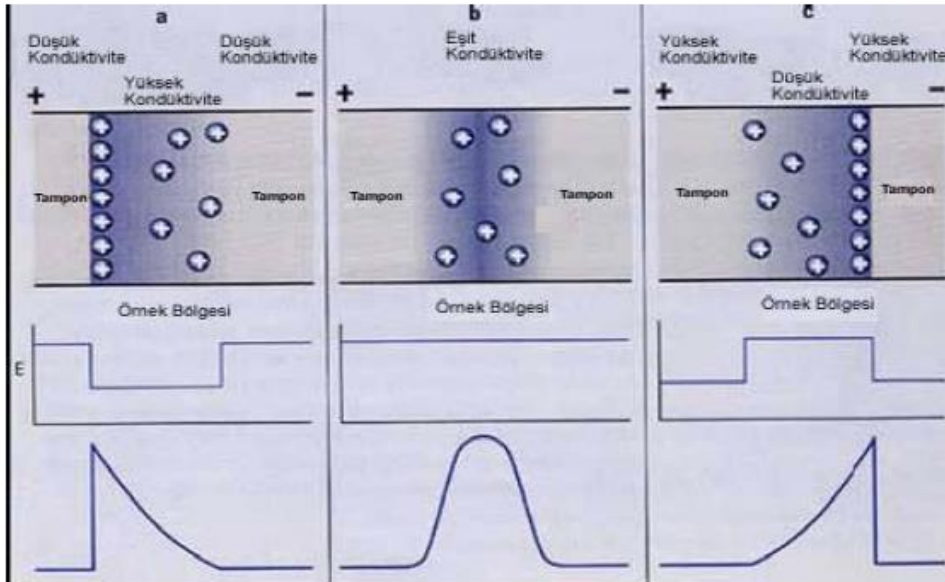
#### 2.1.10.5. Duvar Adsorpsiyonu

Çözünenler ve duvar arasındaki etkileşim ayırma etkinliğini düşürmeye neden olmaktadır. Duvar ve çözünen etkileşiminin çoğu katyonik çözünenler ve negatif yüklü duvar arasındaki iyonik etkileşimden oluşur. Dar kapillerinin kullanımı büyük yüzey alanı/ hacim oranına sahip olduğundan bu etkileşimi azaltmaktadır. Adsorpsiyon genellikle, düşük difüze olan çok yüklü gruplar içeren protein, peptidler gibi büyük moleküllerde gözlenmektedir. Çözünen ve duvar etkileşimini azaltmak için çeşitli yaklaşımlar mevcuttur. En basit yaklaşım sürüklenen tamponun modifikasyonunu içerir. Örneğin tampon konsantrasyonu artırılarak kapiler duvarının yükü düşürülerek duvar ve çözünen etkileşimleri azalmaktadır. Bununla birlikte yüksek iyonik kuvvet EOF yi azaltır, çözünenin kapilerdeki harcadığı zaman miktarı artar. Ayrıca akımdaki bir artışa neden olur ve bunu takiben ayırmanın verimini azaltan joule ısınması meydana gelir. Diğer basit yaklaşım bir pH değişiminin kullanılmasıdır. Düşük pH da silanolların hepsi protonlanır ve herhangi bir iyonik etkileşimi önleyen yüksüz bir durum oluşur.

### 2.1.10.6. Elektrodispersiyon

Örnek iyonları ve ayırım tamponunun iletkenlik farklılığının başlıca etkileri pik şekillerinde çarpıklık ve partiküllerin belirli yerde odaklanmasına neden olmaktadır.

Örnek bölgesi tampondan daha yüksek mobiliteye sahip olduğunda, örnek bölgesinin ön kenarı difüze olacak ve arka kısmı sivrilecektir. Tersine, örnek bölgesi tampondan düşük mobiliteye sahip olduğunda ise ön uç sivri, arka uç difüze olmuş biçimde hareket edecektir. İletkenlikler eşit olduğunda, piklerde çarpıklık görülmeyecektir. Şekilde 2.16' da tampon iyonları ve örnek iyonlarının iletkenlik farklılığından dolayı örnek bölgesinin genişlemesi şematik olarak görülmektedir.



Şekil 2.16. Örnek iyonları ve ayırım tamponunun iletkenlik farklılığından dolayı örnek bölgesinin genişleme

### 2.1.11. CE' de Kullanılan Tamponlar

Tampon hem EOF hem de pH ve konsantrasyon gibi faktörler ile analitleri etkiler. CE' de kullanılan tamponların özellikleri;

- Seçilen pH aralığında iyi bir tampon kapasitesi
- Dedeksiyon dalga boyundaki küçük absorban (UV dedektör)

- Akım üretimini en aza indirmek için düşük mobilite (yani; büyük, en az yüklü iyon)

sahip olmalıdırlar. Tablo 2.3' de yaygın olarak kullanılan tamponların pKa değerleri verilmektedir. Tris ve borat gibi biyolojik tamponlar, genellikle çok büyük ve bu yüzden yüksek konsantrasyonlarında fazla akım üretmediklerinden dolayı özellikle kullanışlıdır. Dezavantajı da kuvvetli bir UV absorbans özellik göstermeleridir.

**Çizelge 2.3.** CE' de yaygın kullanılan tamponlar

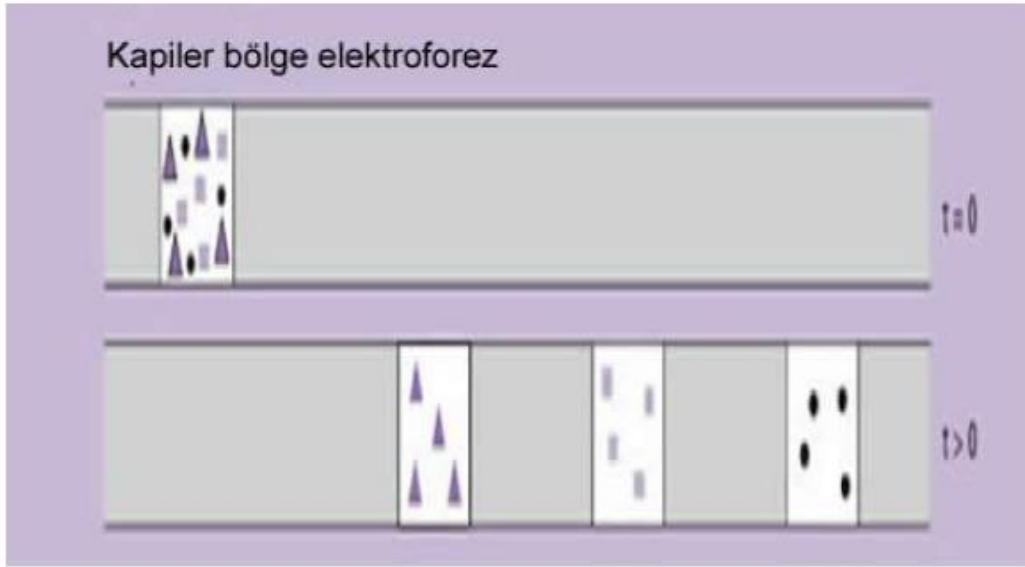
<i>İsim</i>	<i>pK<sub>a</sub></i>
Fosfat	2,12
Sitrat	3,06
Format	3,75
Suksinat	4,19
Sitrat	4,74
Asetat	4,75
Sitrat	5,40
Suksinat	5,57
MES	6,15
ADA	6,60
İmidazol	7,00
Fosfat	7,21
HEPES	7,55
Trisin	8,15
Tris	8,30
Morpholine	8,49
Borat	9,24
CHAPSO	9,60
Fosfat	12,32

### 2.1.12. Kapiler Elektroferez Çeşitleri

Kapiler elektroforetik ayırma birkaç değişik şekilde sınıflandırılmaktadır. Kapiler elektroferez prensibi ile çalışan bu teknikler, kapiler bölge elektroferez (CZE), kapiler jel elektroferez (CGE), kapiler izoelektrik odaklama (CIEF), kapiler izotakoferez (CITP), miselli elektrokromatografi (MEKC) ve kapiler elektrokromatografi (CEC)' dir.

#### 2.1.12.1. Kapiler Bölge Elektroferez (CZE)

Kapiler bölge elektroferez basitliği ve uygunluğundan dolayı CE'in en yaygın kullanılan tipidir. Uygulanan potansiyel ile karışımı oluşturan parçacıklar kendi yük/ yarıçap oranına göre sahip oldukları iyonik hareketliliklerine göre bölgelere ayrılırlar. Bununla birlikte, nötral türler elektroosmotik akış hızı ile hareket ettiklerinden dolayı ayrılamazlar.



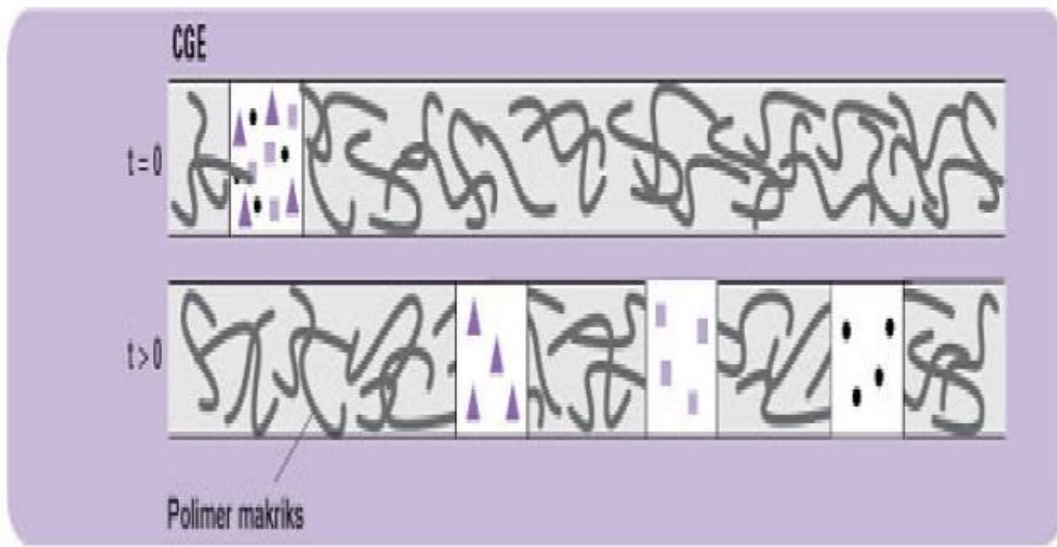
Şekil 2.17. Kapiler bölge elektroferez yönteminde ayırımın şematik gösterimi

#### 2.1.12.2. Kapiler Jel Elektroferez (CGE)

Kapiler jel elektroferez, gözenekli bir polimer matriks içerisinde protein ve nükleik asit gibi makromoleküllerin büyüklük ve şekillerine göre ayırımı esasına dayanır. Kullanılan gözenekli polimer maddeler moleküler elek etkisi yapmakta ve buna bağlı olarak polimerin



gözenek büyüklüğü ve analitin iyon büyüklüğüne bağlı olarak numunenin göçünü geciktirmektedir. Bu tip bir eleme etkisi, yaklaşık olarak aynı yüke sahip olan fakat büyüklükleri(hacimce) olan proteinler, DNA parçaları ve oligomerler gibi makromoleküllerin ayrılmasında önemli ölçüde faydalı olmuştur [93]. Kapiler elektroforezde yaygın olarak kullanılan jel tipi olarak, çapraz bağlayıcı reaktiflerin bulunduğu ortamda akrilamidin polimerleşmesiyle meydana gelmiş poliakrilamit polimeri kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra kapiler elektroforezde kullanılan diğer jel türleri, agaroz; metil selüloz ve polietilen glikoldür [91] .



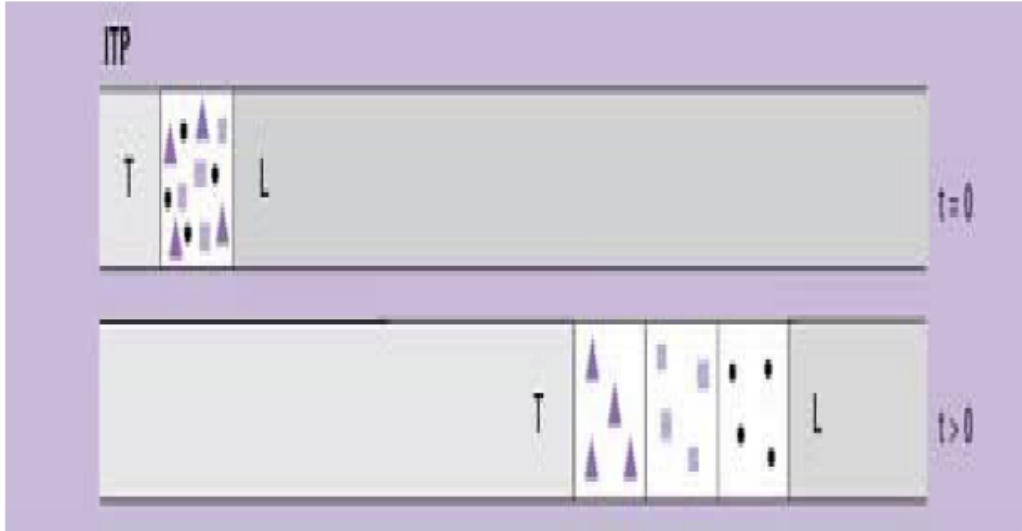
**Şekil 2.18.** Kapiler jel elektroforez yönteminde ayırımın şematik gösterimi

### 2.1.12.3. Kapiler İzotakofrez (CITP)

Kapiler izotakofrez, izotakofrezin kapiler içerisinde gerçekleşmesinden oluşmaktadır. İzotakofrez ise izo(aynı), tako(hız) ve forez(elektroforez) kelimelerinden meydana gelmektedir. İzotakofrez esnasında anyonlar ya da katyonların ayırımı mümkündür, fakat her ikisi aynı anda yapılamaz.

Ayırma işleminde numune iki tampon arasına enjekte edilir. Öndeki tampon hareketliliği numune içindeki en hızlı iyondan daha hızlı iyonlar ve sonraki tampon ise hareketliliği numune iyonlarından daha düşük iyonlar içerir.

Ayırım ortamına bir elektrik alan uygulandığında analit iyonları kendine özgü  $\mu E$  çarpımı ile verilen hızla hareket ederler. Numune bileşenleri sabit elektrik akımı ve sıcaklıkta birbirine yakın bantlara ayrılır. Ohm kuralına göre, elektrik alan şiddeti iyon bantlarının mobilitesi azalacağı için artar. Bantlar oluşuktan sonra numune bileşenleri aynı hızda hareket eder.



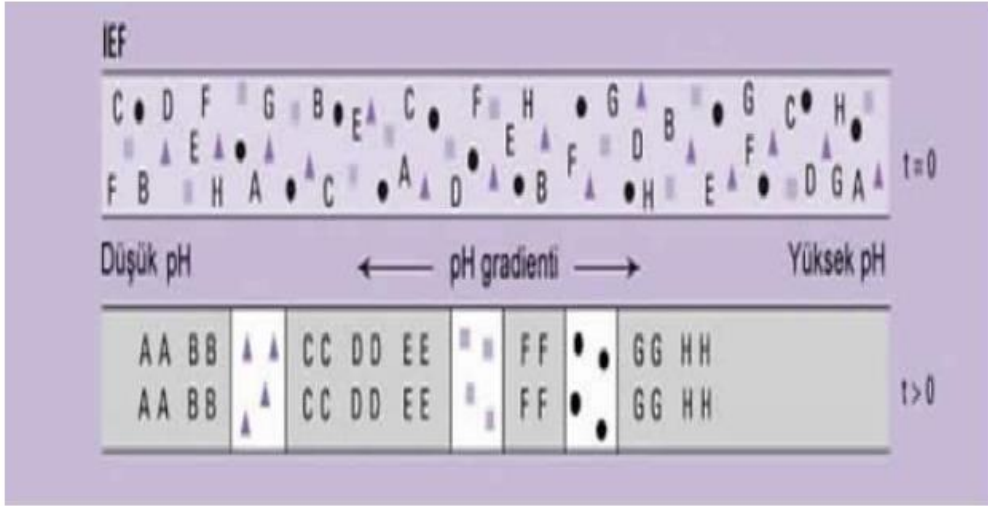
Şekil 2.19. Kapiler izotakofrez yönteminde ayırımın şematik gösterimi

#### 2.1.12.4. Kapiler İzoelektrik Odaklama (CIEF)

Kapiler izoelektrik odaklama amfoterik türlerin ayrılmasında kullanılmaktadır. Bir zayıf karboksilik asit grubu ve bir zayıf baz amino grubu içeren, çözeltilerinde hem proton alabilen hem de proton verebilen; proteinler, peptitler ve aminoasitlere amfiprotik madde denilmektedir.

Pozitif ve negatif iyonun her ikisini birden taşıyan türlere dipolar iyon denilmektedir. Anyonik ve katyonik formunun derişimleri birbirine eşit olduğu pH da bir elektrik alan uygulandığında örnek bileşenlerinin herhangi bir yönde hareket etmezler ve bir pH gradienti oluşmaktadır. Net bir hareketin olmadığı pH' ya izoelektronik nokta (pI) denir. Ayırım işlemi, örnek bileşenlerinin izoelektrik noktalarındaki (pI) farklılıklarını esas alır. Ayırma işleminde odaklanmış bantları tayin edebilmek için kapiler içeriğinin, kapilerin bir

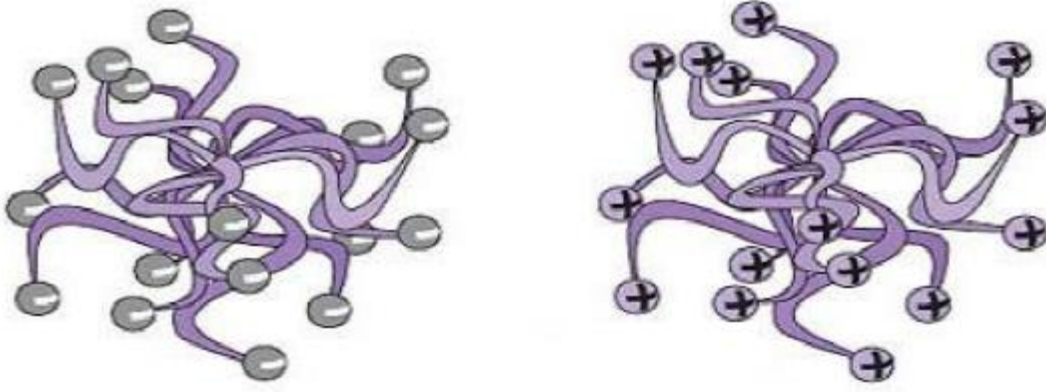
ucuna yerleştirilmiş olan dedektörden geçmesi gereklidir. Bu durum basınç farkıyla yapılabileceği gibi, elektrot bölmelerindeki çözeltinin değiştirilmesiyle de kolayca yapılabilir.



Şekil 2.20. Kapiler izoelektrik odaklama yönteminde ayırımın şematik gösterimi

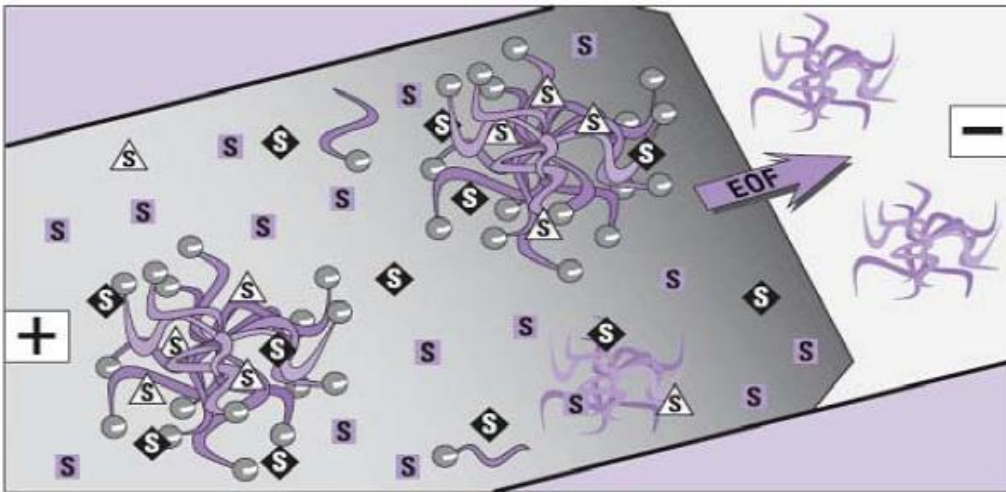
#### 2.1.12.5. Miselli Elektrokinetik Kromatografi (MEKC)

Miselli Elektrokinetik Kromatografi elektroforez ve kromatografi tekniklerinin birleşiminden oluşmaktadır. 1984’ de Terabe [94] tarafından geliştirilen CE tekniğinin en yaygın kullanılan bir çeşididir. Elektroforetik tekniklerde sadece yüklü moleküllerin analizi gerçekleşirken, MEKC yöntemi ile yüksüz çözünen maddelerin ayrılması mümkündür. Bu hareket eden tampon içerisine yüzey aktif maddelerin eklenmesi ile gerçekleşmektedir. Kapiler içerisine kritik misel derişimini aşacak şekilde yüzey aktif madde ilave edilir. Miseller genellikle hidrofobik kısmı iç tarafta ve iyonik kısımları su moleküllerine dönük olmak üzere küre şeklinde bir araya gelirler. Şekil 2.21’de anyonik ve katyonik miselerin gösterimi bulunmaktadır.

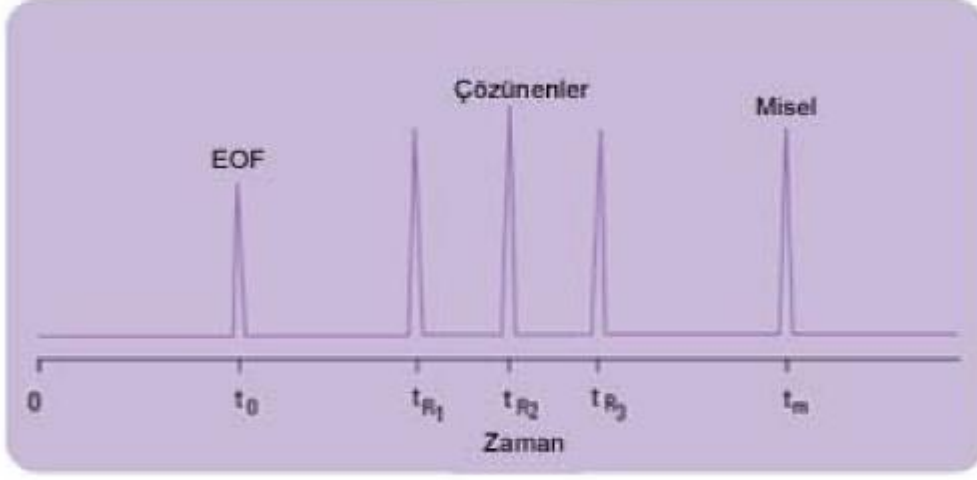


Şekil 2.21. Anyonik ve katyonik misellerin gösterimi

Miseller polar olmayan tanecikleri hidrokarbon kısmının içinde absorbe ederek ikinci bir faz meydana getirir, böylece apolar türler çözelti içerisinde çözünürleştirilmiş olur. Sodyum dodesil sülfat gibi anyonik yüzey aktif maddeler anoda doğru göç ederler. MEKC daha çok katoda doğru elektroosmotik akışla uygulanır. Genel olarak, SDS misellerin elektroforetik mobilitesi, elektroosmotik mobiliteden daha düşüktür ve yavaşça katoda doğru hareket ederler. Böylece bir tamponda hızlı hareket eden su faz ile yavaş hareket eden misel fazlarından meydana gelir. Böyle bir sisteme numune ilave edildiğinde, numune bileşenleri sulu faz ve miselin iç kısmı olan hidrokarbon fazı arasında dağılırlar. Buradaki dağılıma dengesi çözünen maddenin polaritesine bağlıdır.



Şekil 2.22. Miselli elektrokinetik kromatografi yönteminde ayırımın şematik gösterimi



Şekil 2.23. MEKC’de elektroforegram

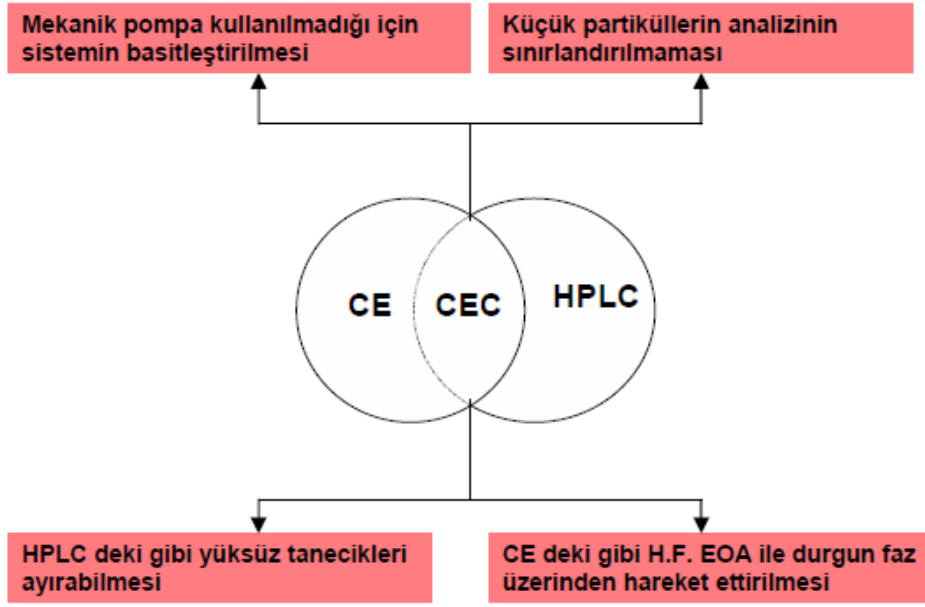
$t_0$  = Elektroosmotik akış zamanı

$t_m$  = Misel göç zamanı

$t_{R1}$ ,  $t_{R2}$ ,  $t_{R3}$  = Çözünenlerin göç zamanı

#### 2.1.12.6. Kapiler Elektrokromatografi (CEC)

Kapiler elektrokromatografi (CEC), kapiler elektroforez (CE) ve yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC)’ nin iyi özelliklerini birleştiren bir hibrit yöntemdir. Kapiler elektrokromatografi (CEC), bu iki tekniğinden bileşiminden oluştuğu için ayırma gücü artmaktadır. CEC’ nin kendini oluşturan bu iki tekniğe göre avantajları Şekil 2.24’de verilmektedir.



**Şekil 2.24.** CEC' nin CE ve HPLC' ye göre avantajları

Kapiler elektrokromatografi (CEC), elektrik alan etkisi altında bir kromatografik kolon boyunca sabit faz üzerinden bileşenlerin bir tampon ya da hareketli faz akışı ile sürüklenmesiyle hareket hızlarının farklılığına dayanan bir ayırma yöntemidir. CEC' de kolon boyunca analitlerin göçü üç adımda incelenebilir. Bunlar;

1. Tamponun elektroosmotik akışı ile analitlerin göçü,
2. Analitlerin elektroforetik mobiliteleri (yük / yarıçap oranına bağlı olarak) farklılığına bağlı olarak bileşenlerin göçü,
3. Analitlerin hareketli ve durgun fazlarda farklı oranlarda dağılmasına bağlı olarak bileşenlerin göçü.

CEC' de bir analitin analizi gerçekleştirildiğinde onun alıkonma zamanı 1. ve 2. madde de belirtilen elektroforetik göç ve 3. madde de belirtilen kromatografik alıkonmanın toplamıdır.

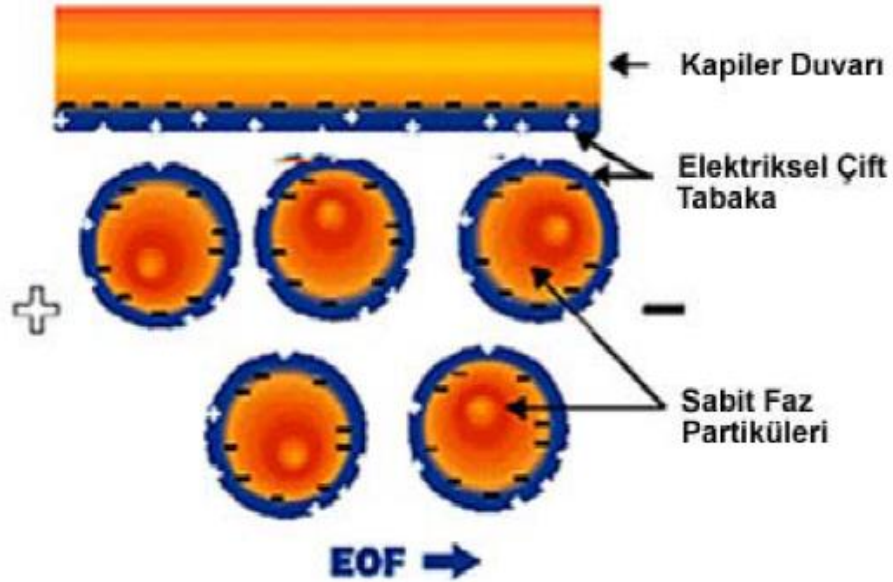
Alıkonma zamanı = elektroforetik göç + kromatografik alıkonma

CEC' de kullanılan kapilerler HPLC' de kaplanan materyal ile doldurulur.

Genellikle silika dolgulu kapilerler kullanılır ve böylece büyük negatif yük yoğunluğuna sahip olurlar. Bu ayrımı sürükleyen önemli bir EOF' ın üretimine izin verir. Şekil 2.25' de kapilerin şematik gösterimi bulunmaktadır.



Şekil 2.25. CEC' de kullanılan kapiler kolon



Şekil 2.26. CEC yönteminde ayrımın şematik gösterimi

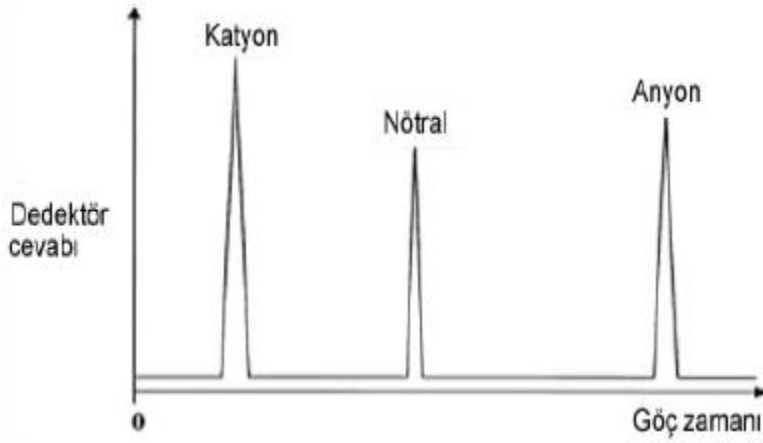
**Çizelge 2.4.** Kapiler Elektroforez Çeşitleri

Model	Ayrım Esası
Kapiler Bölge Elektroforez (CZE)	Analitlerin Çözeltideki Mobilitelerinin Farklılıkları
Kapiler Jel Elektroforez (CGE)	Makromoleküllerin Yüküne ve İyon Büyüklüğüne Göre Ayrılması
Kapiler İzotakoforez	Etkin Mobiliteleri Farklı; Ön ve Geri Elektrolit Arasında Kalan Analitin Farklı Hızlarda Hareketi ile Ayrılması
Kapiler İzoelektrik Odaklama	Protein ve Peptitlerin İzoelektrik Noktalarındaki Farklılığına Dayanarak Ayrılma
Miselli Elektrokinetik Kromatografi	Misel ile Hidrofobik ve İyonik Bileşiklerin Etkileşimi
Kapiler Elektrokromatografi	Analitlerin sabit faz ve hareketli faz arasındaki dağılım katsayıları ve elektroforetik mobilitelerinin farklılıkları

### 2.1.13. Elektroferogram

CE' de elde edilen pikler kromatografiden elde edilen piklere benzer ve elektroferogram olarak adlandırılır. Bir elektroferogram göç zamanına karşı dedektör cevabının bir grafiğidir. Katyonik, nötral, anyonik çözünenlerden oluşan üç bileşimli karışımının ayırımı için tipik bir elektroferogram görünümü Şekil 2.27' de verilmektedir [95].





Şekil 2.27. Tipik bir elektroferogramın görünümü

#### 2.1.14. Dedektör

Konsantrasyon değişiklerini elektriksel olarak görülebilir sinyallere dönüştüren araçlara dedektör denir. Dedektörlerin tipi, gücü ve ayırma etkinliği bakımından önemlidir.

Çizelge 2.5. CE’de yaygın olarak kullanılan tayin yöntemleri ve tayin limitleri

CEC’ de Türlerin Tayin Yöntemleri ve Tayin Limitleri	
Dedeksiyon teknikleri	Tayin Limitleri (mol)
Spektrofotometri	
Absorpsiyon	$10^{-15}$ - $10^{-13}$
Floresans	$10^{-7}$ - $10^{-9}$
Kolondan önce türevlendirme	$10^{-20}$ - $10^{-17}$
Kolonda türevlendirme	$8 \cdot 10^{-16}$
Kolondan sonra türevlendirme	$2 \cdot 10^{-17}$
UV (dolaylı)	$10^{-13}$ - $10^{-12}$
Floresans (dolaylı)	$5 \cdot 10^{-17}$
Termal mercekleler	$4 \cdot 10^{-17}$
Raman	$2 \cdot 10^{-15}$
Kütle spektrometri	$1 \cdot 10^{-17}$
Elektrokimyasal	
İletkenlik	$1 \cdot 10^{-16}$
Ampometri	$7 \cdot 10^{-19}$
Potansiyometri	

#### **2.1.14.1. Absorbans Dedektörü**

Kapiler elektroforezde en yaygın kullanılan dedektör absorbans dedektörleridir. Dedeksiyon hacmini nL veya daha az tutabilmek için dedeksiyon kolon üzerinden yapılmalıdır. Bunun için kapilerin içi kısmındaki polimiid koruyucu kaplamanın bir kısmı yakma, çözme veya kazma ile uzaklaştırılır ve bu kısım dedektör hücresi olarak görev yapar. Bu durum ışın yolunun uzunluğunu azaltır ve derişim cinsinden gözlenebilme sınırını azaltır. Absorbans ölçümlerinin duyarlılığını artırmak için kapilerinin ucunun 'z' şeklinde bükülmesi, kapilerin sonuna doğru bir baloncuk oluşturması ile gerçekleştirilebilmektedir. Böylece ışın yolu artmaktadır.

Kapiler elektroforez de, ayırımı yapılacak olan analit kromorfik veya floroforik grup içermiyorsa İndirek Spektrometrik dedeksiyon uygulanır. Ayrılacak madde UV/görünür alanda absorpsiyon göstermiyorsa, tampon içine UV/görünür alanda bir kromofor madde konulur. Örnek ayrılıp dedektörden geçerken kromofor ile yer değiştirip negatif şekilde pikler görülür.

#### **2.1.14.2. Floresans Dedektör**

Bu yöntemin tayin sınırı düşük olup, bütün bileşikler içinde sadece çok azı floresans özelliğe sahiptir. Yoğun ışın kaynağından faydalanarak gözlenebilme sınırlarını düşürmek amacıyla, küçük kapilerde uyarıcı ışını odaklamak için lazerli cihazlar tercih edilmektedir.

#### **2.1.14.3. Kütle Spektrometrik Dedektör**

Kütle spektrometrelili kapiler elektroforez protein, DNA parçaları ve peptitler gibi büyük doğal moleküllerin tayininde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu dedektör ile analiz edilecek maddenin kütlesi de tayin edilmiş olmaktadır.

#### **2.1.14.4. Elektrokimyasal Tayin**

Kapiler elektroforezde üç çeşit elektrokimyasal dedektör kullanılmaktadır. Bunlar; iletkenlik, amperometri ve potansiyometridir. Kapiler elektroforezin diğer konveksiyonel kromatografik metotlarla karşılaştırıldığında en önemli avantajlarından biri elektroforetik ayırım sistemlerinin minyatürizasyonu sınırlandırmamasıdır. 10 fL kadar düşük örnek hacimlerinin enjeksiyonuna izin verir. Küçük örnek hacmi ve küçük iç çap CE kapilerinin kullanılması dedeksiyon metodunun küçük hacim olmasını sınırlamaktadır. Tam olarak duyarlılık ve minyatürizasyonun yapılabilmesi başarılı bir şekilde elektrokimyasal dedeksiyon (EC) ile yapılabilmektedir [96].

Kapiler elektroforezde organik asitler ve inorganik iyonların analizi için UV- absorpsiyon ya da floresans dedektör uygun değildir. Çünkü bu tür bileşiklerin çoğu UV ışını absorplamazlar ve floresans aktivite göstermezler. Bu yüzden optik dedeksiyonlar dolaylı yapılmaktadır. Bu da duyarlılığın azalmasına neden olmaktadır. Henüz CE' de elektrokimyasal dedektörler sık kullanılmamasına rağmen bu tür bileşiklerin analizi için kullanımı uygundur. Amperometri çoğunlukla direkt olarak kullanılmaktadır (elektroaktif türlerde) ve çok düşük dedeksiyon limitleri başarıyla elde edilebilir. Konduktometrik dedektör elektrokimyasal dedektörlerin içinde daha çok evrenseldir, fakat onun duyarlılığı büyük zemin sinyalleri tarafından sınırlandırılmaktadır. Potansiyometrik dedektörler ise sadece anyon ve katyonlara cevap verdiklerinden dolayı konduktometrik dedektörden daha seçicidir [97].

Kapiler elektroforezde kullanılan PDA ve floresans dedektörler taşınabilirlik açısından kullanımı uygun değildir. Potansiyometrik dedektörler ise duyarlılığını kaybetmeksizin kolaylıkla minyatürize olabilirler ve mikro CE hücrelerinde kullanılırlar [98].

#### **2.2. Metodun Geçerli Kılınması (Validasyon Parametreleri)**

Metodun geçerli kılınması, metodun validasyonu, metodun performans özelliklerinin anlaşılması ve metodun bilimsel olarak her şart altında uygulanabileceğinin garanti altına alınması için yapılan kontrollerdir veya diğer bir ifadeyle belirli şartların, yasal gerekler, üretim (proses) gereklilikleri, istenilen değerler için objektif delillerin ortaya konmasıyla

ve deneylerle ispatlanmasıdır [99]. Validasyon sürecinin en önemli adımlarından biri metot performans parametrelerinin belirlenmesidir ki bunlar aşağıda verilmiştir:

- Spesifiklik (Specificity) ve Seçicilik(Selectivity),
- Kesinlik (Precision),
- Tekrarlanabilirlik (Repeatibility),
- Tekrar elde edilebilirlik (Reproducibility),
- Doğruluk (Accuracy),
- Lineerlik (Linearity),
- Ölçüm aralığı (Range),
- Referans standartlar ile karşılaştırma (Comparison with the reference standards),
- Kararlılık(stability),
- Tutarlılık(consistency),
- Tayin Limiti (Limit of Detection,LOD),
- Ölçüm Limiti (Limit of Quantitation,LOQ),
- Sağlamlık (Robustness/Ruggedness), [98]

### **2.3. Sistem Uygunluk Testi Parametrelerinin Tayini**

Cihazın validasyonu ve geliştirilen analitik yöntemin diğer validasyon parametrelerinin hesaplanmasından önce en başta yapılabilmek üzere bulunması gereken değerlerdir.

#### **2.3.1. Doğruluk**

Analizler sonucu elde edilen değerlerin doğru veya gerçek değere yakınlığının ölçüsü doğruluk olarak tanımlanır. Doğruluk herhangi bir sistemik hata veya geliştirilen yöntemle elde edilen değerlerin doğru değerden sapmaları hakkında fikir verir. Doğruluk, numunenin hazırlanışının etkisini ölçer. Geri kazanımın hesaplanmasında kullanılan kalibrasyon eşitliğinin, esas analizde doğrusallık olarak verilen eşitlikle aynı olması gereklidir. Ortama ilave edilen analitin, analiz yapılan ortamdan hangi oranda geri alınabildiğini gösterir [100].

### 2.3.2. Kesinlik

Analiz için geliştirilen sıvı kromatografik yöntemin gerçek çalışma koşullarındaki tekrarlanabilirliğinin ölçüsüdür. Analizi yapılan ilaç etken maddesinin geliştirilen sıvı kromatografik yöntemle elde edilen sonuçlarının birbirine yakınlığının ölçüsüdür. Sonuçlar %BSS veya %VK (validasyon katsayısı) olarak ifade edilirler.

Ölçüm yapılan her bir derişim düzeyi için en az 5-6 tayin yapılmalıdır. Elde edilen sonuçların en az 5 tanesinin sonucunun %BSS'sı teorik değerin %15'inden daha fazla sapmamalıdır. Kesinlik üç kısımda hesaplanır.

Tekrarlanabilirlik (enjeksiyon arası): Kısa zaman dilimindeki aynı işlem koşulları altındaki (aynı anda hazırlanmış çözelti, hareketli faz, kolon şartları vb.) kesinliği ifade eder.

Orta kesinlik: Aynı günde, farklı çözeltiler hazırlanıp analiz edilerek saptanan bir kesinlik derecesidir.

Tekrar edilebilirlik: Geliştirilen sıvı kromatografik yöntemin farklı şartlarda, farklı günlerde, farklı laboratuvarlardaki kullanımının kesinliğini belirtir [100].

### 2.3.3. Seçicilik

Sıvı kromatografik bir yöntemin seçiciliği, analizi yapılacak numunede var olan ve analizi yapılacak maddeyle girişim yapabilecek diğer bileşenlerin yanında analiz edilmek istenilen maddenin ölçülebilme kabiliyetidir. Seçiciliği olmadığı veya yeterli olmadığı bir kromatografik analiz yönteminin diğer performans parametreleri de anlamsızdır [100].

### 2.3.4. Teşhis sınırı (LOD)

Analizi yapılan örneğin kromatogramdaki pikinin ve yerinin belirlediği ama miktar tayini sınırları içerisine girmeyen en alt derişimidir. Birkaç yolla bulunabilir. Yapılan deneylerden elde edilen sonuçların kullanıldığı hesaplamalardan bulunabildiği gibi, doğrudan gözlenerek de bulunabilir. Hesaplamak için kullanılan formül eşitlikde verilmiştir [100].  $LOD = (3.3 \times "SD") / m$

### **2.3.5. Tayin alt sınırı (LOQ)**

Analizi yapılan maddenin kabul edilebilir düzeyde kesin ve doğru olarak miktarının tayin edilebileceği, doğrusallık aralığı dışında olan veya aralığın en alt sınırını oluşturan derişim düzeyidir. Yapılan deneylerden elde edilen sonuçların kullanıldığı hesaplamalardan bulunabildiği gibi, doğrudan gözlenerek de bulunabilir. Hesaplamak için kullanılan formül eşitlikde verilmiştir [100].

$$LOQ = (10 \times "SD") / m$$

### **2.3.6. Doğrusallık**

Derişime karşı analit cevabının geliştirilen yöntemde doğru orantılı olarak değişmesi ve çizilen grafikte cevabın düz bir çizgi üzerinde yer almasıdır. Korelasyon (r) ve tayin ( $r^2$ ) katsayısı doğrusallığı veren parametrelerdir.

Değişik derişimdeki analitin kromatogramlarından elde edilen cevap değerlerine karşı derişim miktarları regresyon analizi ile matematiksel olarak hesaplanır. Doğrusallık analit cevap değerleri çizilen doğru üzerinde ne kadar yer alıyorsa ve r veya  $r^2$  değerleri 1'e ne kadar yakınsa sağlanmış demektir [100].

### **2.3.7. Aralık**

Aralık yeterli doğruluk ve duyarlıkta doğrusallığa sahip yöntemin geçerli olduğu alt ve üst sınırlar arasında yer alan derişim aralığıdır [100].

### **2.3.8. Duyarlılık**

Duyarlılık, doğrusallığın geçerli olduğu aralıktaki doğru denkleminin eğimidir [100].

### **2.3.9. Sağlamlık**

Geliştirilen bir kromatografik yöntemin analiz parametrelerindeki ufak değişimlerden etkilenmeden kalabilme kapasitesidir. Bu parametreler, hareketli faz kompozisyonunda bulunabilen organik çözücünün yüzdesi, pH, iyonik güç, sıcaklık vb. etkenlerdir [100].

### **2.3.10. Tutarlılık**

Yöntemin gerçek kullanım koşulları altında tekrar edilebilirliğinin bir ölçüsüdür. Bunun için geliştirilen bir çalışmanın, aynı laboratuvarında farklı analizciler tarafından, farklı laboratuvarında benzer cihazlarda, reaktif ve çözücülerin markaları değiştirilerek, farklı günlerde, farklı sıcaklıklarda yapılması gibi normal test parametrelerinin değiştirilmesi, HPLC yönteminde kolon değişimi ile deneylerin tekrarlanması sonucunda saptanır [100].

### **2.3.11. Kararlılık**

Kararlılık, Amerikan Farmakopisi tarafından yapılması zorunlu bir validasyon parametresi olarak tanımlanmakla birlikte, tekrar edilebilir ve güvenilir sonuçların elde edilebilmesi için tavsiye edilen bir validasyon basamağıdır. Kararlılıklarını belirli bir süre koruyabilen numune, standart madde ve çözücülerle tekrarlanabilen, doğru ve kesin sonuçlar elde edilir. Kararlılık çalışması için ne kadar süreye ihtiyaç duyuluyorsa (1 gün, 1 hafta, 1 ay, 1 yıl) o kadar süre içerisinde gerçekleştirilmelidir [100].

### 3. KAYNAK ARAŞTIRMASI

#### 3.1. Kapiler Elektroferez Yöntemi ve Galantamin ile Yapılan Çalışmalar

Marek Bajda ve arkadaşları asetilkolinesteraz inhibitörlerin mikroanaliz tekniği ile elektroforetik olarak hızlı bir şekilde analizi üzerine çalışmalar yapmışlardır. Hafif ve orta derecedeki Alzheimer hastalığında meydana gelen bilişsel açıklıkları asetilkolinesteraz inhibitörleri ve bütirilkolinesterazın semptomatik tedavilerini etkili bir yöntem olarak tanıtmışlardır. Donepezil, rivastigmin ve galantamin beyindeki kolinerjik sinir iletimini arttırarak öğrenme ve belleğin geliştirilmesi amacıyla kullanılmıştır. Asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesteraz inhibitör aktivitesi Spektrofotometrik Ellmanis testine göre ölçülmüştür. Bu yöntem enzimatik yarımla süreçleriyle ürün arasındaki reaksiyona dayanır. Çalışmada kemilüminesans yöntemi kullanılmıştır. Asetilkolinesteraz faaliyeti hidroliz n-kolin ürününün birikmesi sonucu üretilen ışık emisyonunun artışı temeli ile belirlenmiş ve hareketsizleştirilmiş bir enzim reaktörü olan (IMER) kullanılarak kinetik parametreler ve eylem mekanizması değerlendirilmiştir [101].

M. Jimidar ve arkadaşları, yöntem geçerliliği ve kimyasal kalite kontrolü için enantioseçici CE yönteminin sağlamlık testini yapmışlardır. Galantamin HBr etken maddesinin en önemli stereoizomerik safsızlık miktarının tayininde şiral kılcal elektroferez yönteminin doğrulanması için ICH prosedürünün uygulanması tartışılmıştır. Buradaki yaklaşımda kiral bileşiklerin analizi, yüksek ayırma verimliliği nedeniyle şiral kapiler elektroferez (CCE) yöntemi ile elde edilmiştir. Kılcal elektroferez (CE) ve HPLC gibi teknikler gerekli olan doğrulamaları yapmak için seçilen ilk tekniklerdir. Bu makalede Galantamin HBr en önemli stereoizomerik safsızlığın miktarının tayini için CCE yönteminin doğrulanması konusunda ICH yönteminin uygulanmasını ele alan bir ilaç maddesidir. Özgüllük, doğruluk, hassasiyet, miktar tayini, sağlamlık, doğrusalık ICH kurallarına göre değerlendirilmiştir [102].

Roelof Mol ve arkadaşları tarafından miseller elektrokinetik kromatografi-elektrosprey iyonizasyonu kütle spektrometrisi ile Galantamin ve İpratripium numunelerinde ilaç safsızlıkları tespit edilmiştir. Sodyum fosfat, asetonitril ve sodyum dodesilsülfat gibi farklı tamponlar ve çözücüler kullanılarak MEKC-MS analizi ile Galantamin



numunesinin safsızlıkları ve bozulma ürünleri çalışılmıştır. Galantamin safsızlıklarının karakterizasyonu MS/MS ile belirlenmiştir. Sunulan yöntemin ilaç maddelerinin küçük safsızlıklarının belirlenmesi ve yapısının açıklanması için iyi bir potansiyeli olduğu belirtilmiştir [103].

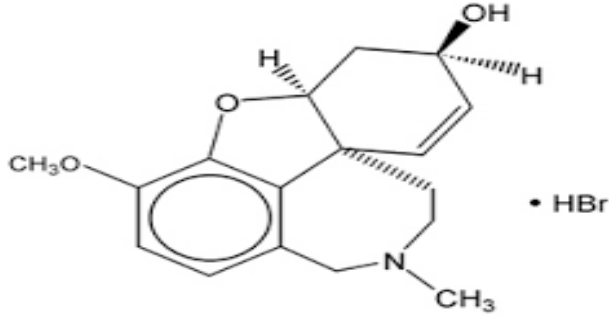
Vadde Ravinder ve arkadaşları tarafından Galantaminin enantiyomerik ayrılması için geçerli bir şiral LC yöntemi çalışılmıştır. Şiral R-Galantamin ve S-Galantamin için hızlı ve duyarlı izokritik ayırma için HPLC metodu geliştirilmiştir. Rezölüsyonu 3 ten büyük olan R ve S Galantamin formları Alzheimer hastalığı için iyi bir çözünürlük göstermiştir. Sıcak ortamda n-hekzan, izopropanol ve dietilamin mobil faz olarak (80:20:0.2 oranında) kullanılmıştır. Akış hızı dakikada 0.8 mL ve elüsyon 289 nm de gerçekleşmiştir. Bu metotta R-Galantamin ve S-Galantamin ilaç formülasyonlarından ayırımı yapılmıştır. Metotta R-Galantamin seviyeleri 0.21 ve 0.84 µg/mL olarak bulunmuştur [104].

Akbar Islamnezhad ve arkadaşları tarafından standart yöntemler için bir alternatif olarak, basit camı karbon elektrot üzerinde Galantaminin hızlı diferansiyel voltametrik darbe ile belirlenmesi olmuştur. Sulu ortamda Galantaminin elektrokimyasal davranışı döngüsel ve diferansiyel voltametri ile incelenmiştir. Voltamogramları µA autolab FRA2 potansiyostat-galvanostat ile kaydedilmiştir. Üç elektrotlu sistem çalışma elektrodu, zıt elektrot ve referans elektrot olarak Ag/AgCl ye kadar bir platin çubuk gibi camı bir karbon ile birlikte kullanılmıştır. Tüm testler oda sıcaklığında ve N<sub>2</sub> atmosferi altında gerçekleştirilmiştir. Yüksek pH değeri Galantaminin zirve potansiyelini etkilemiştir. En iyi analitik cevap pH 2'de alınmıştır. Katodik tepe akımları optimize edilmiş deneysel koşullar altında 0.1-10 mµ aralığında Galantamin konsantrasyonlarıyla orantılı bir şekildedir. Tespit limiti 0.02 mµ olduğunda Galantamin pik potansiyeli ve pik akımın potansiyel tarama hızına etkisi araştırılmıştır. V<sub>1</sub> tarama hızının V<sub>2</sub> tarama hızına karşı en yüksek akımlarının difüzyon kontrollü bir işlem için çok benzer, doğrusal olduğu görülmüştür. Önerilen yöntem, başarıyla ticari tablet analizine uygulanmıştır [105].

## 3.2. Çalışmada Kullanılan Maddelerin Kimyasal, Fiziksel, Farmakolojik, Farmokinetik Özellikleri

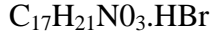
### 3.2.1. Galantamin Hidrobromür

**Formül:**



Şekil 3.1. Galantamin HBr' nin kimyasal formülü

**Kapalı formül:**



**Sistemik adı:**

(4aS,6R,8aS)-4a,5,9,10,11,12-hekzahidro-3-metoksi-11-metil-6H-benzofuro[3a,3,2-ef][2]benzazepin-6-ol hidrobromid [106].

### 3.2.2. Fiziksel Özellikleri:

Galantamin Hidrobromür beyaz veya hemen hemen beyaza yakın bir renkte toz halinde bulunur. Su içinde yavaş yavaş çözünür. Tersinir, rekabetçi bir asetilkolinesteraz inhibitörüdür. 25°C'nin altındaki oda sıcaklığında saklanmalıdır. Molekül ağırlığı 368,27 g'dır [107].

### 3.2.3. Farmakolojik Özellikler:

Tersiyer bir alkaloid olan galantamin asetilkolinesteraz enziminin (AChE) kompetitif ve seçici bir inhibitörüdür. Kesin etkisi bilinmemesine rağmen, galantaminin terapötik etkisini kolinerjik işlevi artırarak gösterdiği sayılmaktadır. Asetilkolinin yıkımından sorumlu enzim olan asetilkolinesterazı inhibe eder ve asetilkolin düzeyinin artmasını sağlar. İlaç bu etkisini kolinesteraz enzimini reversibl olarak inhibe ederek gösterir. Kolinesteraz enziminin blokajı asetilkolin'in hidrolizinin reversibl olarak inhibisyonuna neden olur. Eğer bu mekanizma doğru ise, galantamin'in etkisi hastalık süreci ilerledikçe ve işlevsel kolinerjik nöronların sayısı azaldıkça giderek zayıflayabilir .

Galantamin hidrobromür SSS'de bulunan antikolinesteraz'a, periferdeki butilkolinesteraza göre çok daha yüksek afinite gösterir. Hâlbuki organofosfatlar, akridinler, karbamatlar, fizostigmin ve kuvarterner amonyum yapılı antikolinesteraz ilaçlar (ambenonyum, neostigmin, piridostigmin gibi) her iki enzime de eşit afinite gösterirler. Ancak kuvarterner amonyum yapısındaki antikolinesteraz inhibitörleri mutad dozlarda kullanıldıklarında kan beyin engelini aşamazlar ve bu nedenle esas olarak periferdeki kolinesteraz enzimini etkilerler.

Serebral kortekste asetilkolin düzeylerinin artması düşünme, öğrenme ve hafızada sağlanan olumlu gelişmelerden sorumlu tutulmaktadır. Bu mekanizma sağlam kolinerjik nöronların varlığını gerektirir. Alzheimer hastalığının ilerlemesi sağlam kolinerjik nöronların sayısının azalmasına neden olduğundan, galantamin hidrobromür'ün bu tür olgulardaki etkinliği daha düşüktür. Galantamin hidrobromür tedavisinin demansa yön veren gidişatı etkilediğine işaret eden herhangi bir bulgu yoktur .

Klinik çalışmalar: 5-6 ay süreli plasebo kontrollü klinik çalışmalarda galantaminin etkili dozları günde 16- 24 ve 32 mg'dır. Günde 16 mg ve 24 mg dozlarının en iyi yarar/risk oranına sahip olduğu kanısına varılmış ve idame dozlar olarak önerilmiştir. Galantaminin etkinliği hastalığın üç büyük semptom kompleksinin değerlendirildiği sonuç ölçütleri ve bir global ölçek kullanılarak gösterilmiştir: ADAS-Cog (kavrama ölçümün temel alan bir performans testi), PDA ve ADCS-AdL-Anketi (gündelik yaşamın temel ve araçlı aktivitelerinin ölçümü), Nöropsikiyatrik Anket (davranış bozukluğunu ölçen bir ölçek) ve

CIBIC plus (hasta ve hasta yakını ile yapılan görüşmeye dayalı olan ve bağımsız bir hekim tarafından yapılan global bir değerlendirme) [108].

#### **3.2.4. Farmokinetik Özellikler:**

Galantamin alkali bir bileşik olup iyonizasyon sabiti (pKa) 8.2'dir. Hafif derecede lipofilik olan galantaminin n-oktanol/tampon solüsyon (pH 12) ile arasındaki dağılım katsayısı 1.09'dur. Suda (pH 6) çözünürlüğü 31 mg/mL'dir. Galantaminin üç şiral merkezi olmakla birlikte S, R, S formları doğal olarak oluşan formlarıdır. Galantamin yıkımı sırasında ortaya çıkan metabolitlerden bazılarının in vitro olarak aktif olduğu fakat in vivo olarak önemli bir etkinliğe sahip olmadığı gösterilmiştir [108].

#### **3.2.5. Metabolizma**

Galantaminin en az %75'i karaciğerde sitokrom (CYP) 450 izoenzimleri yolu ile metabolizma olur. In vitro çalışmalar CYP2D6'nın O-desmetilgalantamin, CYP3A4'ün N-oksid-galantaminin oluşmasında yer aldığını göstermiştir. İdrar ve feçesteki total radyoaktivitenin atılım seviyesi zayıf ve hızlı metabolize ediciler arasında farklı bulunmamıştır. Zayıf ve hızlı metabolize edicilerden alınan plazma örneklerindeki radyoaktivitenin büyük çoğunluğunu değişmemiş galantamin ve onun glukuronid metaboliti oluşturduğu gözlenmiştir. Tek doz uygulama sonrası zayıf ve hızlı metabolize edicilerin plazmalarında, galantamin aktif metabolitlerine (norgalantamin, ve O-desmetilgalantamin, O-desmetil-norgalantamin) konjuge olmamış formda saptanmamıştır. Çoklu doz uygulama sonrası, hastaların plazmalarında norgalantamin saptanmıştır ancak toplam galantamin düzeyinin %10'undan fazlasına rastlanmamıştır [108].

#### **3.2.6. Eliminasyon**

Galantaminin plazma konsantrasyonu bi-eksponansiyel olarak azalır. Sağlıklı kişilerde terminal yarı ömrü 7-8 saattir. Hedef popülasyondaki tipik oral klerens analizinde kişiler arası saptanan %30'luk farkla yaklaşık 200 ml/dak'dır. Tek oral doz 4 mg H-galantaminin

uygulanmasından yedi gün sonra, radyoaktivitenin %90-97'si idrardan, %2.2-6.3'ü feçesten elde edilmiştir. Galantamin oral uygulanmasından sonra, 24 saat içinde dozun %18-22'si değişmemiş olarak idrarla atılmıştır. Renal klerens  $68.4 \pm 22.0$  ml/dak. (toplam plazma klerensinin %20-25'i)'dir [108].

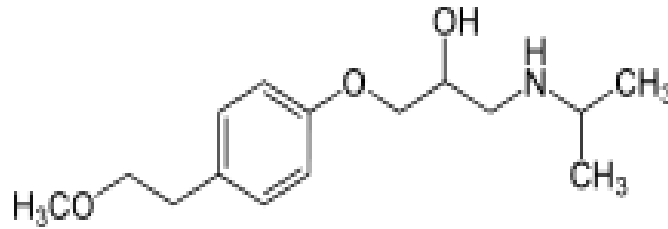
### 3.2.7. Emilim ve Dağılım

Emilimi hızlıdır, oral solüsyon ve tablet alınmasından yaklaşık 1 saat sonra  $t_{maks}$ 'a ulaşılır. Galantaminin biyoyararlanımı yüksektir ( $\%88.5 \pm 5.4$ ). Yiyecekler emilim miktarını etkilemeden (EAA) emilim hızını geciktirir ( $t_{maks}$ ) ve  $C_{maks}$ 'ını %25 oranında düşürür. Ortalama dağılım hacmi 175 L'dir. Plazma proteinlerine %18 oranında bağlanır.

Galantaminin günde iki defa 12-16 mg tekrarlayan dozlarının tablet olarak uygulanmasından sonra ortalama taban ve tepe plazma konsantrasyonları 29-97 ng/mL ile 42-137 ng/mL arasındadır. Galantamin, günde iki defa 4-16 mg doz aralığında doğrusal farmakokinetik gösterir. Günde iki defa 12 mg ya da 16 mg alan hastalarda 2-6 ay arasında galantamin birikimi gözlenmemiştir [108].

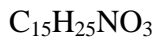
### 3.2.8. Metoprolol (iç standart):

**Formül:**



Şekil 3.2. Metoprolol'ün kimyasal formülü

**Kapalı Formül:**



**Sistematik adı:**

(RS)-1-(İzopropilamino)-3-[4-(2-metoksietil)fenoksi]propan-2-ol

**3.2.9. Fiziksel Özellikleri:**

Metoprolol tartarat yaklaşık 120 ° C (248 ° F), çok düşük bir erime noktasına sahiptir ve süksinat formu olarak erime noktası yaklaşık 136 ° C (277 ° F) dir. Düşük erime noktalarına sahip olan ilaçların üretim ortamında çalışılması zor ve çözünürlük problemlerinden dolayı, metoprolol her zaman, tuzları halinde sentezlenir. Serbest baz, mumsu beyaz bir katıdır ve tartarat tuzu ince kristaldir. Etken madde, metoprolol süksinat veya (100 mg metoprolol tartarat 95 mg metoprolol süksinata karşılık gelir) metoprolol tartarat olarak da kullanılmaktadır [109].

Metoprolol bağırsağın tüm kısımlarından emilmektedir. Emilim hızlı ve tamdır. Tabletlerin alınmasından yaklaşık 1,5-2 saat sonra kanda doruk plazma derişimine ulaşmaktadır. Yoğun ilk geçiş metabolizması nedeniyle, metoprololün oral tek dozun yaklaşık %50'si sistemik dolaşıma katılmaktadır. Yarı ömrü doza bağımlı olmayıp, tekrarlanan dozla değişmemektedir. Plazmadaki metoprololün yaklaşık %10'u proteinlere bağlanmaktadır. Metoprololün ortalama eliminasyon yarı ömrü 3-4 saattir; metabolizması yavaş çalışanlarda yarı ömrü 7-9 saat arasındadır. Dozun yaklaşık %95'i idrarla atılmaktadır [110].

## 4. MATERYAL VE YÖNTEM

### 4.1. Genel Bilgi

Bu bölümde Galantaminin Kapiler Elektroferez yöntemi tayininde kullanılan cihazlar ve kimyasallar hakkında bilgi verilmiştir.

#### 4.1.1. Kullanılan Cihazlar ve Gereçler

Çizelge 4.1'de çalışmada kullanılan cihazlar ve gereçler belirtilmiştir.

**Çizelge 4.1.** Kullanılan cihazlar ve gereçler

Adı	Kullanım Amacı	Açıklama
Kapiler elektroferez Cihazı	Galantamin'in analiz çalışmalarında kullanılmıştır.	Agilent Technologies 7100
Kapiler Elektroferez Kolonu	Galantamin'in analiz çalışmalarında kullanılmıştır.	Agilent Technologies
Kapiler Elektroferez Dedektörü	Galantamin'in analiz çalışmalarında kullanılmıştır.	PDA
Ultrasonik Banyo	Çözeltilerin hazırlanmasında kullanılmıştır.	Bandelin SONOREX
Vortex	Çözeltilerin homojenizasyonunda kullanılmıştır.	İKA Genius 3
Hassas Terazi	Katı maddelerin ölçümünde kullanılmıştır.	Mettler Toledo
pH metre	pH ölçümünde kullanılmıştır.	Mettler Toledo Seven Multi
pH elektrodu	pH ölçümlerinde kullanılmıştır.	Mettler Toledo InLab Expert Pro
Saf su cihazı	Kullanılacak saf suyun temini için kullanılmıştır.	Millipore Direct-Q 3UV

#### 4.1.2. Kullanılan kimyasal maddeler

Deneyleerde kullanılan bütün kimyasal maddeler, analitik veya HPLC saflıktadır. Bu çalışmada kullanılan bileşikler Çizelge 4.2’de verilmiştir.

**Çizelge 4.2.** Çalışılan bileşikler ve özellikleri

<b>Bileşik özellikleri</b>	<b>Maksimum Absorbans Yaptığı Dalga Boyu</b>	<b>Kapalı Formülü</b>	<b>Molekül Ağırlığı</b>
Galantamin HBr	UV@ 210 nm	C <sub>17</sub> H <sub>21</sub> N <sub>03</sub> .HBr	368.3 g/mol
Metaprolol	UV@ 226 nm	C <sub>15</sub> H <sub>25</sub> N <sub>03</sub>	267,36 g/mol

Çalışmada yararlanılan diğer kimyasal maddeler ve özellikleri Çizelge 4.3'te belirtilmiştir.

**Çizelge 4.3.** Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler

<b>Adı</b>	<b>Kullanım amacı</b>	<b>Açıklama</b>
Sodyum hidroksit	pH ayarlamasında kullanılmıştır.	Merck, analitik saflıkta
Hidroklorik asit	pH ayarlamasında kullanılmıştır.	Merck, analitik saflıkta
Borik asit	Tampon olarak kullanılmıştır.	Merck, analitik saflıkta
Fosforik asit	Tampon olarak kullanılmıştır.	Merck, analitik saflıkta



#### **4.1.3. Kullanılan Çözeltiler**

Çalışılan bileşiklerden Galantamin ultra saf suda çözülerek 100 ppm'lik stok çözeltileri hazırlanmış ve +4°C'de muhafaza edilmiştir. Metoprolol ise 0,001 g alınıp 10 mL suda çözülüp 100 ppm stok çözeltisi hazırlanmış +4°C'de muhafaza edilmiştir. Her bir stok çözeltiden istenilen derişimde seyreltmeler yapılmış ve hazırlanan çalışma çözeltilerinden kapiler elektroforez cihazına enjekte edilmiştir.

#### **4.1.4. Kullanılan Farmasötik Preparat**

Galantamin etken maddesini içeren ilaç formülasyonunun miktar tayini yapabilmek amacı ile Janssen Clag Türkiye İlaç firmasından temin edilen Reminyle® isimli ilaç kullanılmıştır. Her tablet 8 mg Galantamin etken maddesi içermektedir. Yardımcı maddeler olarak; Jelatin, Dietil ftalat, Etil selüloz, Hipromeloz, Polietilen Glikol, Titanyum dioksit, Sükroz, mısır nişastası, kırmızı demir oksit içermektedir.

### **4.2. Ön Çalışmalar**

#### **4.2.1. Tampon Çözelti, pH ve Konsantrasyon Seçimi**

Yapılan çalışmada tayin etmek istediğimiz analitler için öncelikle fosfat tamponu kullanılmış ve çalışmaya fosfat tamponu ile başlanmıştır. Fakat pik şekli ve elektroforetik mobilite dikkate alınarak Borat tamponu tercih edilmiştir. Çalışılan tabletteki analitin sulu çözeltileri zayıf bazik özellik göstermektedir. Bu yüzden bazik bir tamponla çalışılmıştır. Bu amaçla pH 9-9,5 aralığında olan 5-10-20 mM Borat tamponu çözeltileri hazırlanmıştır. Bu çözeltiler içerisinde pH 9,2 olan 10 mM Borat tamponu galantamin ve iç standart olarak kullanılan metoprolol'ün ayrılması için uygun bulunmuştur.

#### **4.2.2. Enjeksiyon için Basınç ve Süre Seçilmesi**

Kapiler analizlerinde hidrodinamik enjeksiyon yapılmıştır. Enjeksiyon süresini belirlemek için farklı süreler (3, 5, 10 s) denenmiştir. Enjeksiyon süresi arttıkça pik alanları artmakta,

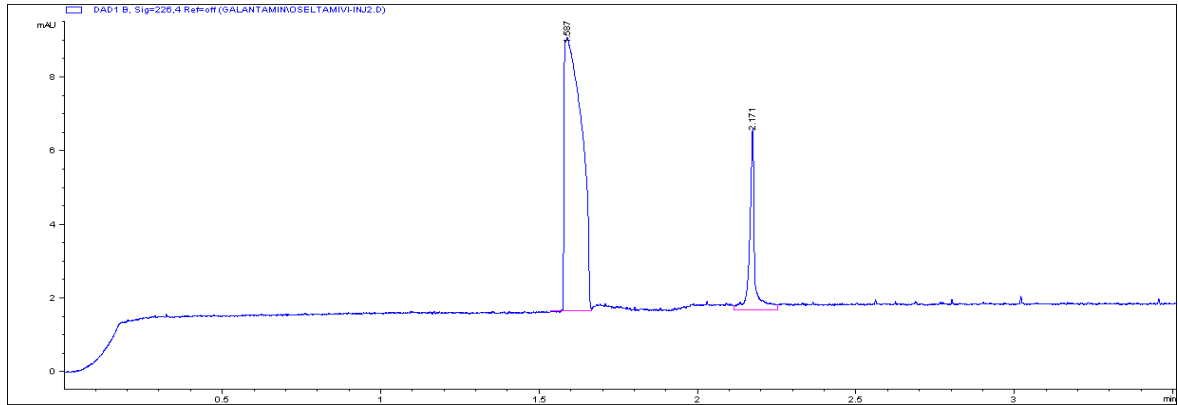
fakat pik genişlemesine neden olmaktadır. Pik şekilleri daha keskin ve simetrik oldukları için, 100 mbar enjeksiyon basıncında en uygun enjeksiyon süresinin 3 s olduğuna karar verilmiştir.

#### 4.2.3. Analitler Üzerinde Uygulanan Gerilimin Etkisi

Analitler üzerinde uygulanan gerilimin etkisi, 18, 24, 26 ve 30 kV olarak incelenmiştir. Uygulanan gerilimi artırarak daha kısa sürede göç ve keskin pikler elde edilir. Ancak, daha yüksek uygulanan gerilim yüksek akım ve artan joule ısıtma sergiler. Ancak 30 kV gerilim iyi bir pik verimi verdiği ve joule ısınması oluşmadığı için makul analiz değeri olarak seçilmiştir. Bu koşulda akım 300  $\mu$ A dir. Kaset sıcaklığı 25°C dir.

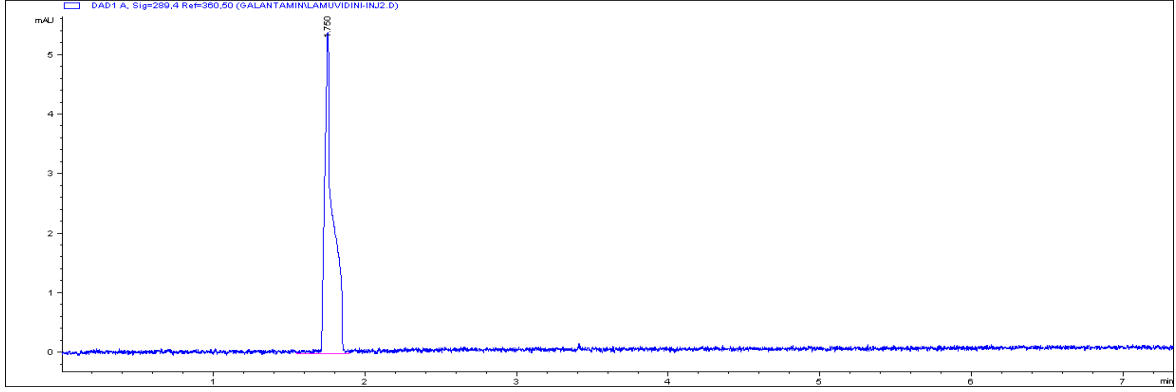
#### 4.2.4. İç Standardın Belirlenmesi

Galantamin analizi sırasında kullanılacak iç standart seçimi için, Oseltamivir, Lavumidin, Valgansiklovir ve Metaprolool bileşikler denenmiştir. Seçicilik, pik şekli ve analiz süresi göz önüne alındığında iç standart olarak Metaprolool'un kullanılması uygun görülmüştür. Elde edilen elektroferogramlar Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3 ve Şekil 4.4'de verilmektedir.

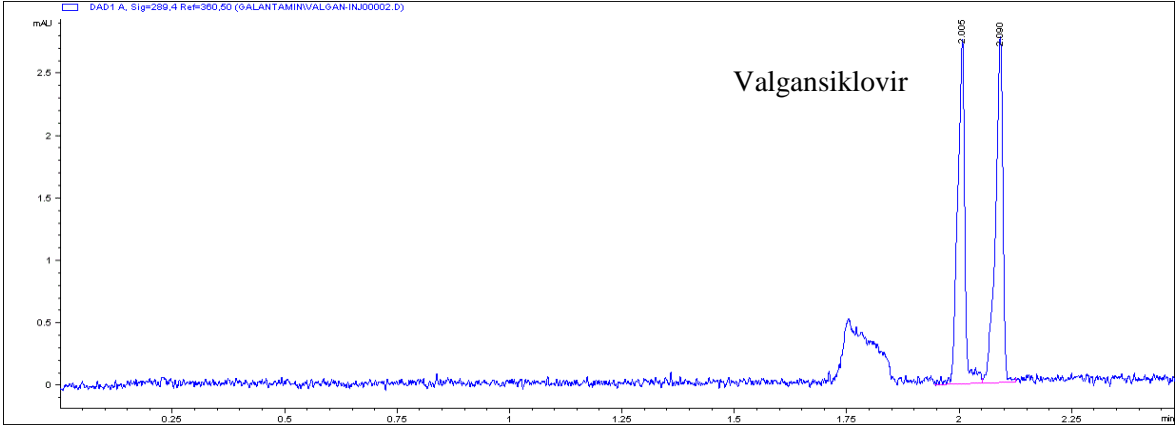


**Şekil 4.1.** Oseltamavir bileşiği için çalışma koşullarında elde edilen elektroferogram.

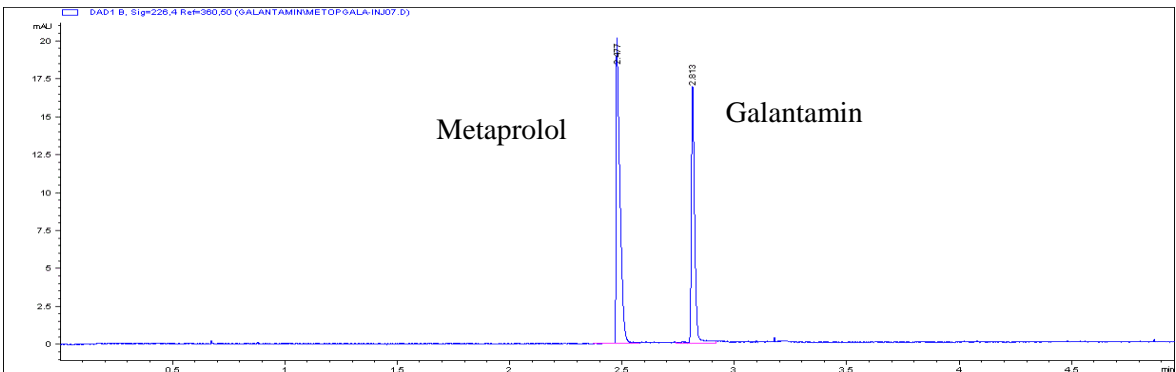
Çalışma dalga boyu 226 nm olarak belirlenmiştir.



**Şekil 4.2.**Lamuvidin bileşiği için çalışma koşullarında elde edilen elektroferogram.  
Çalışma dalga boyu 289 nm olarak belirlenmiştir.



**Şekil 4.3.**Valgansiklovir bileşiği için çalışma koşullarında elde edilen elektroferogram.  
Çalışma dalga boyu 289 nm olarak belirlenmiştir.



**Şekil 4.4.**Galantamin ve Metoprolol karışımı için çalışma koşullarında elde edilen elektroferogram. Çalışma dalga boyu 226 nm olarak belirlenmiştir.

Elde edilen elektroferogramlar incelendiğinde Oseltamivir, Lavumidin ve Valgansiklovir bileşikleri için pik şekillerinin uygun olmadığı veya piklerin ikiye yarıldığı gözlenmiştir. Galantamin ve metoprolol karışımının net bir şekilde ayrıldığı gözlemlenmiştir.

#### 4.2.5. Optimum Çalışma Koşulları

Kolon Uzunluğu ve Çapı: 55 cm (etkin uzunluğu 45 cm) x 50 µm ID kapiler

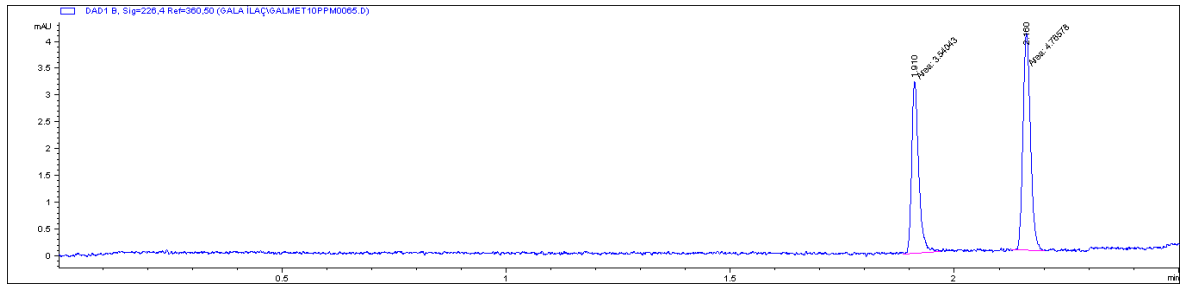
Elektrolit Çözelti (Çalışma Tamponu): 10 mM Borat tamponu, pH = 9,2

Enjeksiyon basıncı ve süresi: 100 mBar, 3 saniye

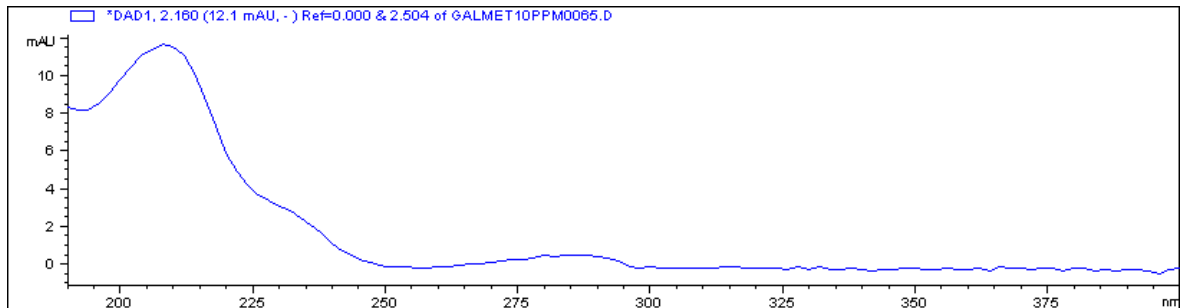
Voltaj: 30 kV

Dedektör: PDA Dedektör (210 nm Galantamin, 226 nm Metoprolol)

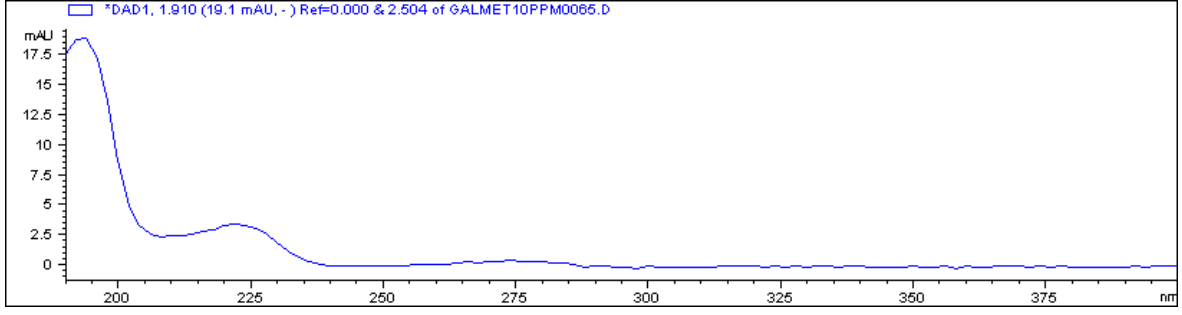
Belirtilen koşullarda elde edilen elektroferogramlar Şekil 4.5, 4.6, 4.7' de gösterilmiştir.



**Şekil 4.5.** Galantamin ve Metoprolol karışımı (10 ppm) için çalışma koşullarında elde edilen elektroferogram. Çalışma dalga boyu 226 nm.



**Şekil 4.6.** 10 ppm Galantamin için çalışma koşullarında elde edilen spektroskopi verisi.

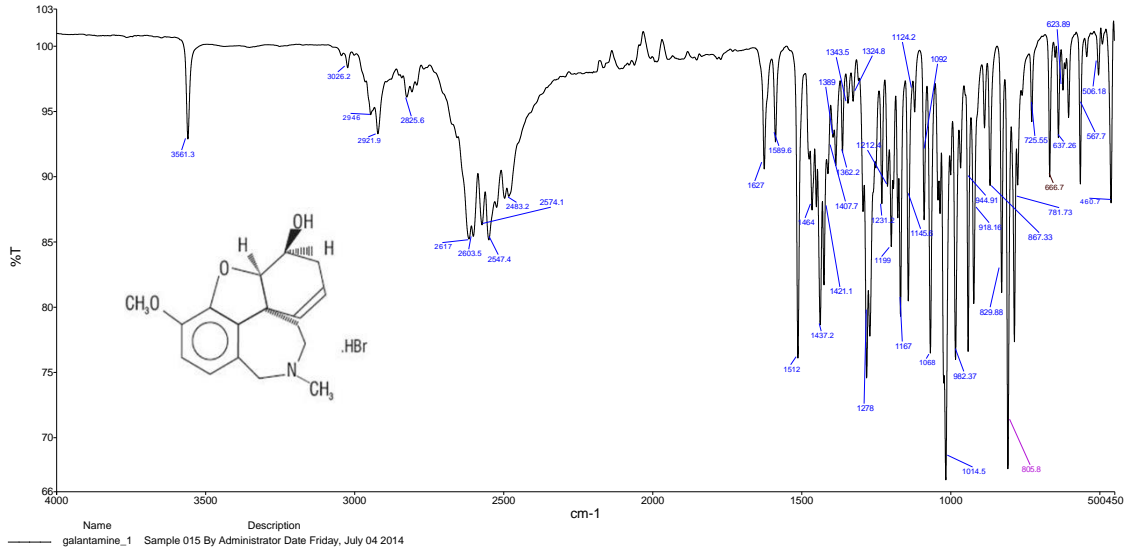


**Şekil 4.7.** 10 ppm Metoprolol için çalışma koşullarında elde edilen spektroskopi verisi.

## 5. ARAŞTIRMA SONUÇLARI

### 5.1. Standart Maddelerin Saflık Kontrolü

Deneylerde kullanılan standart maddeler analitik safliktadır. Ancak, bu maddelerin çabuk bozunması (ışıkta, havadan vs) nedeniyle saflik kontrolleri IR spektrumları alınarak yapılmıştır. Galantamin için elde edilen infrared spektrumu incelendiğinde 2480-3561  $\text{cm}^{-1}$  aralığında çıkan pikler O-H, N-H, C-H gerilme titreşmeleridir. 1014-1627  $\text{cm}^{-1}$  ve 460-982  $\text{cm}^{-1}$  de çıkan pikler parmak izi bölgesinde tek bağ gerilme ve eğilme titreşmeleri ve daha karışık molekül titreşmeleridir. Bu sonuçlardan Galantaminin bu çalışmayı etkileyebilecek herhangi bir safsızlık içermediği sonucuna varılmıştır. Galantaminin IR spektrumu Şekil 5.1. de verilmiştir.



Şekil 5.1. Galantamin için IR spektrumu

### 5.2. Tekrarlanabilirlik Çalışmaları

Hazırlanan standart çözeltinin optimum koşullarda 5 kez ölçümü yapılmıştır. Her bir analit için, pik alanı ve göç zamanına göre ortalama, standart sapma ve bağıl standart sapma (RSD) değerleri hesaplanmıştır. Bulunan değerler Çizelge 5.1’de verilmektedir.

**Çizelge 5.1.** Galantamin ve Metaprolol için elde edilen Göç Zamanları ve Pik Alanları (5 ppm Galantamin ve 10 ppm Metaprolol)

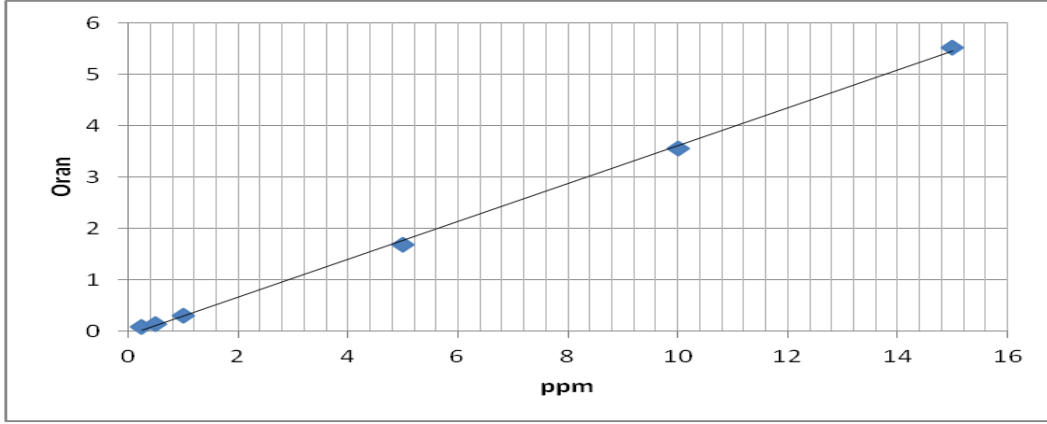
	<b>Göç Zamanı</b>	<b>Pik Alanı</b>
Galantamin	2,210	6,041
	2,211	6,285
	2,211	6,080
	2,209	6,141
	2,209	6,184
Ortalama	2,210	6,146
Standart Sapma	$8,94 \cdot 10^{-4}$	0,085
%BSS	0,041	1,384
Metaprolol	1,947	3,366
	1,947	3,497
	1,948	3,459
	1,947	3,414
	1,947	3,502
Ortalama	1,947	3,448
Standart Sapma	$4,0 \cdot 10^{-4}$	0,052
%BSS	0,021	1,497

Elde edilen BSS değerleri 2,6'dan küçüktür. Bu da yöntemin tekrarlanabilirliğini göstermektedir.

### **5.3. Kalibrasyon Çalışmaları**

Galantamin ve metaprololün CE ile analizi yönteminde doğrusal aralığın ve kalibrasyon doğrusunun saptanmasında 0,25 ppm ile 15 ppm arasında farklı konsantrasyonlarda çözeltiler mobil faz ile hazırlanmış ve en az 3 kez enjekte edilmiştir. Kalibrasyon doğrusu, her bir derişim değeri için elde edilen alan oranlarının, derişim değerine karşı grafiğe geçirilmesiyle elde edilmiştir. Geliştirilen CE yönteminde çalışılan bileşikler için 0,25 ppm ile 15 ppm derişimleri arasında doğrusallık saptanmıştır. Galantamin analizi için optimize

edilen CE yönteminde kalibrasyon fonksiyonu  $y= 0,3672 x + 0,0624$ ;  $R^2= 0,9992$  olarak bulunmuştur. Kalibrasyon grafiği Şekil 5.2’de verilmektedir.



Şekil 5.2 Kalibrasyon Grafiği

#### 5.4. Duyarlılık ve Doğrusallık

Galantamin CE-DAD yöntemi ile analizinde gözlenebilme sınırı (LOD) 0,0268 ppm ve tayin limiti (LOQ) kabul edilen BSS sınırları içinde (<%2) 0,0812 ppm olarak hesaplanmıştır (Çizelge 5.2.).

Çizelge 5.2. Doğrusallık ve Duyarlılık Parametreleri

Regresyon Denklemi*	$y= 0,3672 x + 0,0624$
Regresyon Katsayısı (R)	0,9996
Lineer Aralığı (ppm)	0,25-15 (n=6)
Eğimin Standart Sapması	0,00505
Kesimin Standart Hatası	0,03861
Gözlenebilme Sınırı (ppm)	0,0268
Tayin Alt Sınırı (ppm)	0,0812

\*  $y = ax + b$ ; x : (ppm) biriminde derişim, y: galantamin alan oran değerleri, a : eğim, b :kesişim.



## 5.5. Geri Kazanım Çalışmaları

### 5.5.1. Galantamin için elde edilen Doğruluk ve Kesinlik değerleri

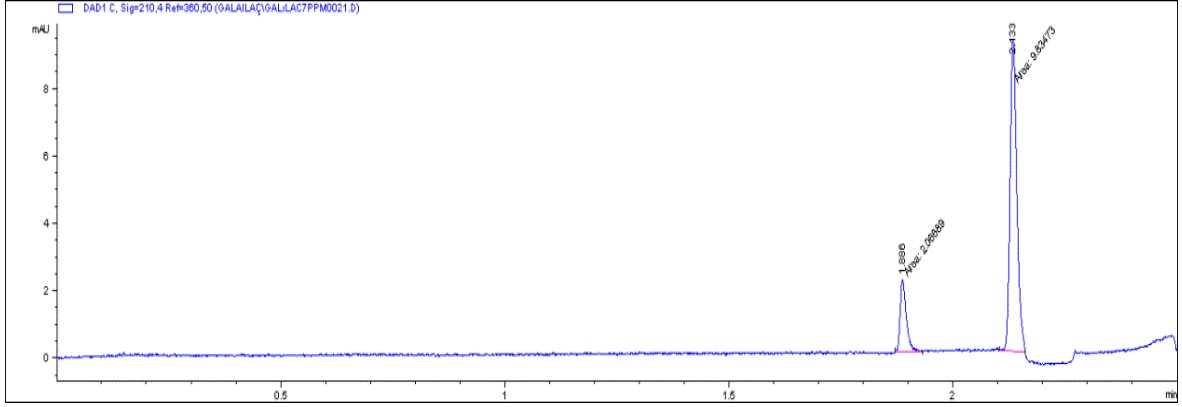
Bileşiklerin tayini için kesinlik ve doğruluk çalışmaları; 1, 5 ve 10 ppm konsantrasyonlarında gerçekleştirilmiş, gün içi ve günler arası (n=5) değerlendirme sonuçları Çizelge 5.3’de verilmiştir.

**Çizelge 5.3.**Galantamin için Geri Kazanım Çalışması Sonuçları

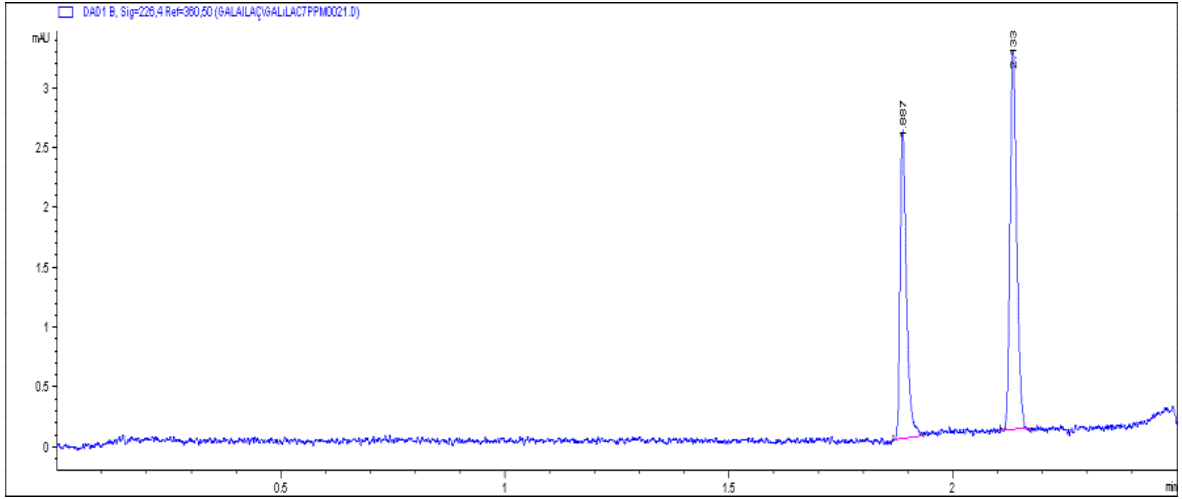
Derişim ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Gün içi	Günler arası
	%Geri Kazanım	%Geri Kazanım
Galantamin		
1 ppm	100,937 $\pm$ 0,149	99,937 $\pm$ 0,823
5 ppm	100,529 $\pm$ 1,060	99,975 $\pm$ 1,585
10 ppm	99,142 $\pm$ 0,478	99,336 $\pm$ 0,548

## 5.6. Farmasötik Tabletlerde Galantaminin Miktar Tayini

Galantamin etken maddesini içeren ilaç formülasyonunun miktar tayini yapabilmek amacı ile Janssen Clag Türkiye İlaç firmasından temin edilen Reminyle<sup>®</sup> isimli ilaçtan 10 adet tablet ezilerek tartılmıştır. Ortalama bir tabletin ağırlığı tartılarak tablet çözeltileri hazırlanmış ve analiz edilmiştir. Geri kazanım çalışmalarında, saf galantamin içeren ilaç formülasyon çözeltilisinin analizi yapılmıştır. Elde edilen piklerin alan değerleri, ilgili kalibrasyon fonksiyonlarında yerine konularak tabletlerin içerdiği galantamin miktarları hesaplanmıştır.



**Şekil 5.3.** Galantamin içeren Reminyle adlı farmasötik preparattan 210 nm dalga boyundan elde edilen elektroferogram. Çalışma koşulları: 10 mM Borat tamponu, pH = 9,2; 100 mBar,3saniye;30kV.



**Şekil 5.4.** Galantamin ilacı için çalışma koşullarında elde edilen elektroferogram. Çalışma dalga boyu 226 nm olarak belirlenmiştir. Çalışma koşulları: 10 mM Borat tamponu, pH = 9,2; 100 mBar, 3 saniye; 30 kV.

### 5.7. Tabletlerde Galantamin Miktar Tayini Sonuçları

Tabletlerde Galantamin miktar tayini için önceki bölümlerde anlatılan yol izlenmiş ve sonuçlar Çizelge 5.4' de gösterilmiştir.

**Çizelge 5.4.** Tabletlerde Galantamin Miktar Tayini Sonuçları

Tablet No.	Bulunan Miktar (mg/tablet)	Belirtilen Miktar (8 mg/tablet)
1.	8,2196	$X_{ort} = 8,0736$
2.	8,0157	$SD^* = 0,1350$
3.	7,8779	$\%RSD^{**} = 1,6718$
4.	8,1728	$t.SD/\sqrt{n} = 0,1552$
5.	8,0818	Güven Aralığı = 7,9386 - 8,2086 $p = 0,05$

SD: SS, RSD\*: BSS

## 6. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada son yıllarda sıklıkla kullanılan bir teknik olan kapiler elektroforez yöntemi ile Galantamin'in farmasötik ilaç formlarından tayini yapılmıştır. Deneylere başlamadan önce galantamin standart maddesinin saflığını araştırmak amacı ile FTIR spekturumları alınmıştır. Sonuçta elde edilen bulgulara göre çalışılan maddenin bu çalışmayı etkileyecek herhangi bir safsızlık içermediği sonucuna varılmıştır.

Bu çalışmanın ilk aşamasında, Galantamin ve Metoprolol (IS) ikili karşımının kapiler elektroforez yöntem ile analizleri için gerekli parametreler saptanmış ve bu parametreler kullanılarak da analizleri yapılmıştır. Bu amaçla kolon olarak 55 cm (etkin uzunluğu 45 cm) x 50 µm ID kapiler, 300 µA gerilim, sıcaklık 25°C, pH= 9,2 olan Borat tamponu, PDA dedektör (210 nm Galantamin, 226 nm Metoprolol), enjeksiyon basıncı ve süresi 100 mBar ve 3 saniye, voltaj 30 kV olarak en iyi koşullar saptanmıştır. Hızlı, duyarlı ve tamamen validasyonu yapılmış olan bu yöntemi kullanarak farmasötik dozaj formlarından miktar tayini gerçekleştirilmiştir.

Geliştirilen yöntemlerin sistem uygunluk parametreleri saptanmış ve elde edilen parametreler ışığında yöntemin uygulanabilir olduğu bulunmuştur. Geliştirilen ve yöntem geçerlilik hesaplamaları yapılmış olan yöntem, Galantamin içeren farmasötik dozaj formlarına uygulanmış ve etken maddelerin analizinde kullanılabileceği görülmüştür. Bu yöntemlerin geçerliliğinin kanıtlanması amacıyla gerekli yöntem geçerlilik testleri için kaynaklarda bildirilen parametreler seçilmiş ve ilgili geçerlilik kriterleri kabul edilmiştir. Bu amaçla validasyon çalışmalarında; doğrusalılık, aralık, duyarlık, kesinlik, geri kazanım, tekrarlanabilirlik vb. parametreler incelenmiş ve istatistiksel değerlendirmeleri yapılmıştır. Tablet içerisinde yer alan yardımcı maddelerin (excipient) analiz yöntemi üzerindeki etkilerini inceleyebilmek için geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre tablet katkı maddelerinin analizi etkilemediği sonucuna varılmıştır.

Sonuç olarak elde edilen tüm veriler ışığında, bu ilaçların analizi için hızlı, duyarlı, kesin, kolay, doğru ve herhangi bir ön ayırma işlemine gerek duyulmayan bir analiz yöntemi geliştirilmiş ve piyasa preparatlarından analizine başarılı bir şekilde uygulanabildiği istatistiksel olarak gösterilmiştir.

Tez çalışması sonuçları, yalnızca tıp ve kimya alanında çalışan araştırmacıların değil aynı zamanda biyokimya ve eczacılık alanında çalışmalar yapan araştırmacıları da ilgilendirmektedir. Ayrıca, Alzheimer hastalığı ve Alzheimer tedavisi günümüzün önemli konuları olması nedeniyle bilgi birikimi oluşmasına yardımcı olacaktır.

## KAYNAKLAR

[1] Sadik K, Wilcock G. ,2003, "The increasing burden of Alzheimer disease" , *Alzheimer Dis Assoc Disord*,17 Suppl 3:S75-79.

[2]. Quinn C, Clare L, Woods RT,2012, "What predicts whether caregivers of people with dementia find meaning in their role?" *Int J Geriatr Psychiatry*.

[3]. Germain S, Adam S, Olivier C, Cash H, Ousset PJ, Andrieu S, et al., 2009,"Does cognitive impairment influence burden in caregivers of patients with Alzheimer's disease?" *J Alzheimers Dis*;17(1):105-114.

[4]. Maurer K, Volk S, Gerbaldo H.,1997,"Auguste D and Alzheimer's disease" *Lancet*;349(9064):1546-1549.

[5]. Rösler M, Anand R, Cicin-Sain A, Gauthier S, Agid Y, Dal-Bianco P, et al.,1999, "Efficacy and safety of rivastigmine in patients with Alzheimer's disease: international randomised controlled trial", *BMJ*;318(7184):633-638.

[6].İnternet: Gürvit Ğ.H. "Demans Sendromu, Alzheimer Hastalığı ve Alzheimer Dışı Demanslar",[www.itfnöroloji.com](http://www.itfnöroloji.com).

[7]. Lyketsos CG, Colenda CC, Beck C, Blank K, Doraiswamy MP, Kalunian DA, et al., 2006,"Position statement of the American Association for Geriatric Psychiatry regarding principles of care for patients with dementia resulting from Alzheimer disease",*Am J Geriatr Psychiatry*;14(7):561-572.

[8]. Cummings JL., 2004,"Alzheimer's disease", *N Engl J Med*;351(1):56-67.

[9]. Jellinger KA.,1996,"Diagnostic accuracy of Alzheimer's disease: a clinicopathological study", *Acta Neuropathol*;91(2):219-220.

[10]. Cummings JL, 2002,"Cole G. Alzheimer disease",*JAMA*;287(18):2335-2338.

- [11]. Hebert LE, Scherr PA, Bienias JL, Bennett DA, Evans DA.,2003,"Alzheimer disease in the US population: prevalence estimates using the 2000 census",*Arch Neurol*;60(8):1119-1122.
- [12]. Mitchell SL, Black BS, Ersek M, Hanson LC, Miller SC, Sachs GA, et al.,2012, "Advanced Dementia: State of the Art and Priorities for the Next Decade",*Ann Intern Med*;156(1\_Part\_1):45-51.
- [13]. Lobo A, Launer LJ, Fratiglioni L, Andersen K, Di Carlo A, Breteler MM, et al.,2000,"Prevalence of dementia and major subtypes in Europe: A collaborative study of population-based cohorts",*Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. Neurology*;54(11 Suppl 5):S4-9.
- [14]. Van Duijn CM.,1996,"Epidemiology of the dementias: recent developments and new approaches",*J Neurol Neurosurg Psychiatry*;60(5):478-488.
- [15]. Gurvit H, Emre M, Tinaz S, Bilgic B, Hanagasi H, Sahin H, et al.,2008,"The prevalence of dementia in an urban Turkish population",*Am J Alzheimers Dis Other Demen*;23(1):67-76.
- [16]. Ariogul, S., Cankurtaran, M., Halil, M., Yavuz, B.B., Dagli, N., Cankurtaran, E.S.,2004, " Dementia in the geriatric population [Poster]", *20 th International Conference of Alzheimer Disease International, Kyoto*
- [17]. Bachman DL, Wolf PA, Linn RT, Knoefel JE, Cobb JL, Belanger AJ, et al.,1993,"Incidence of dementia and probable Alzheimer's disease in a general population: the Framingham Study", *Neurology*;43(3 Pt 1):515-519.
- [18]. Gao S, Hendrie HC, Hall KS, Hui S.,1998,"The relationships between age, sex, and the incidence of dementia and Alzheimer disease: a meta-analysis",*Arch Gen Psychiatry*;55(9):809-815.
- [19]. Van Duijn CM, Clayton DG, Chandra V, Fratiglioni L, Graves AB, Heyman A, et al.,1994,"Interaction between genetic and environmental risk factors for Alzheimer's disease: a reanalysis of case-control studies",*EURODEM Risk Factors Research Group. Genet Epidemiol*;11(6):539-551.

- [20]. Hardy J.,1997,"Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease",*Trends Neurosci*;20(4):154-159.
- [21]. St George-Hyslop PH.,2000," Molecular genetics of Alzheimer's disease",*Biol Psychiatry*;47(3):183-199.
- [22]. Hofman A, Schulte W, Tanja TA, van Duijn CM, Haaxma R, Lameris AJ, et al., 1989,"History of dementia and Parkinson's disease in 1st-degree relatives of patients with Alzheimer's disease",*Neurology*;39(12):1589-1592.
- [23]. Huang W, Qiu C, von Strauss E, Winblad B, Fratiglioni L.,2004,"APOE genotype, family history of dementia, and Alzheimer disease risk: a 6-year follow-up study",*Arch Neurol*;61(12):1930-1934.
- [24]. Reitz C, den Heijer T, van Duijn C, Hofman A, Breteler MM.,2007,"Relation between smoking and risk of dementia and Alzheimer disease: the Rotterdam Study",*Neurology*;69(10):998-1005.
- [25]. Rusanen M, Rovio S, Ngandu T, Nissinen A, Tuomilehto J, Soininen H, et al.,2010, "Midlife smoking, apolipoprotein E and risk of dementia and Alzheimer's disease: a population-based cardiovascular risk factors, aging and dementia study",*Dement Geriatr Cogn Disord*;30(3):277-284.
- [26]. Rusanen M, Kivipelto M, Quesenberry CP, Zhou J, Whitmer RA.,2011,"Heavy smoking in midlife and long-term risk of Alzheimer disease and vascular dementia", *Arch Intern Med*;171(4):333-339.
- [27]. Ganguli M, Du Y, Dodge HH, Ratcliff GG, Chang CC.,2006,"Depressive symptoms and cognitive decline in late life: a prospective epidemiological study", *Arch Gen Psychiatry*;63(2):153-160.
- [28]. Kivipelto M, Helkala EL, Laakso MP, Hänninen T, Hallikainen M, Alhainen K, et al., 2001," Midlife vascular risk factors and Alzheimer's disease in later life: longitudinal, population based study",*BMJ*;322(7300):1447-1451.



- [29]. Launer LJ, Ross GW, Petrovitch H, Masaki K, Foley D, White LR, et al., 2000, "Midlife blood pressure and dementia: the Honolulu-Asia aging study", *Neurobiol Aging*;21(1):49-55.
- [30]. Schupf N, Kapell D, Lee JH, Ottman R, Mayeux R.,1994," Increased risk of Alzheimer's disease in mothers of adults with Down's syndrome",*Lancet*;344(8919):353-356.
- [31]. McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM.,1984, "Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease",*Neurology*;34(7):939-944.
- [32]. Cummings JL, Vinters HV, Cole GM, Khachaturian ZS.,1998,"Alzheimer's disease: etiologies, pathophysiology, cognitive reserve, and treatment opportunities", *Neurology*;51(1 Suppl 1):S2-17; discussion S65-17.
- [33]. Alonso AC, Grundke-Iqbal I, Iqbal K.,1996, "Alzheimer's disease hyperphosphorylated tau sequesters normal tau into tangles of filaments and disassembles microtubules", *Nat Med*;2(7):783-787.
- [34]. Eikelenboom P, Veerhuis R.,1999, "The importance of inflammatory mechanisms for the development of Alzheimer's disease",*Exp Gerontol*;34(3):453-461.
- [35]. Kalaria RN.,1999, "Microglia and Alzheimer's disease",*Curr Opin Hematol*;6(1):15-24.
- [36]. Pike CJ, Cummings BJ, Cotman CW.,1992, "Beta-Amyloid induces neuritic dystrophy in vitro: similarities with Alzheimer pathology",*Neuroreport*;3(9):769-772.
- [37]. Butterfield DA, Drake J, Pocernich C, Castegna A.,2001, "Evidence of oxidative damage in Alzheimer's disease brain: central role for amyloid beta peptide",*Trends Mol Med*;7(12):548-554.

- [38]. Varadarajan S, Yatin S, Aksenova M, Butterfield DA.,2000, "Review: Alzheimer's amyloid beta-peptide-associated free radical oxidative stress and neurotoxicity",*J Struct Biol*;130(2-3):184-208.
- [39]. Citron M.,2004, "Strategies for disease modification in Alzheimer's disease",*Nat Rev Neurosci*;5(9):677-685.
- [40]. Borchelt DR, Thinakaran G, Eckman CB, Lee MK, Davenport F, Ratovitsky T, et al., 1996, "Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate Abeta1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo",*Neuron*;17(5):1005-1013.
- [41]. Adams C.,1997, "Alzheimer's disease research: a game of connect the dots",*Gerontology*;43(1-2):8-19.
- [42]. Cankurtaran M, Yavuz BB, Halil M, Dagli N, Cankurtaran ES, Ariogul S.,2005, "Are serum lipid and lipoprotein levels related to dementia?",*Arch Gerontol Geriatr*;41(1):31-39.
- [43]. Dugu M, Neugroschl J, Sewell M, Marin D.,2003, "Review of dementia", *Mt Sinai J Med*;70(1):45-53.
- [44]. Souder E, Beck C.,2004, "Overview of Alzheimer's disease",*Nurs Clin North Am*;39(3):545-559.
- [45]. Marquis S, Moore MM, Howieson DB, Sexton G, Payami H, Kaye JA, et al., 2002, "Independent predictors of cognitive decline in healthy elderly persons",*Arch Neurol*;59(4):601-606.
- [46]. Gifford DR, Holloway RG, Vickrey BG.,2000, "Systematic review of clinical prediction rules for neuroimaging in the evaluation of dementia",*Arch Intern Med*;160(18):2855-2862.
- [47]. Pinsky LE, Burke W, Bird TD.,2001, "Why should primary care physicians know about the genetics of dementia?",*West J Med*;175(6):412-416.

- [48]. Garde E, Mortensen EL, Krabbe K, Rostrup E, Larsson HB.,2000, “ Relation between age-related decline in intelligence and cerebral white-matter hyperintensities in healthy octogenarians: a longitudinal study”,*Lancet*;356(9230):628-634.
- [49]. Lussier D, Bruneau MA, Villalpando JM.,2011, “ Management of end-stage dementia”,*Prim Care*;38(2):247-264, viii.
- [50]. Ouldred E, Bryant C.,2008, “Dementia care. Part 3: end-of-life care for people with advanced dementia”,*Br J Nurs*;17(5):308-314.
- [51]. Farlow MR, Evans RM.,1998, “Pharmacologic treatment of cognition in Alzheimer's dementia”,*Neurology*;51(1 Suppl 1):S36-44; discussion S65-37.
- [52]. Sirviö J.,1999, “Strategies that support declining cholinergic neurotransmission in Alzheimer's disease patients”,*Gerontology*;45 Suppl 1:3-14.
- [53]. Rogers SL, Friedhoff LT.,1996, “The efficacy and safety of donepezil in patients with Alzheimer's disease: results of a US Multicentre, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial”,*The Donepezil Study Group. Dementia*;7(6):293-303.
- [54]. Tariot PN, Solomon PR, Morris JC, Kershaw P, Lilienfeld S, Ding C.,2000, “A 5-month, randomized, placebo-controlled trial of galantamine in AD”,*The Galantamine USA-10 Study Group. Neurology*;54(12):2269-2276.
- [55]. Birks J.,2006, “Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease”,*Cochrane Database Syst Rev* (1):CD005593.
- [56]. Hake AM, Farlow MR.,2001, “New concepts in the drug therapy of Alzheimer's disease”,*Expert Opin Pharmacother*;2(12):1975-1983.
- [57]. Hake AM.,2001, “ Use of cholinesterase inhibitors for treatment of Alzheimer disease”,*Cleve Clin J Med*;68(7):608-609, 613-604, 616.

[58]. Zekeriya Ülger, Burcu Balam Yavuz, Meltem Halil, Mustafa Cankurtaran, Servet Arıoğul, 2009, “ Alzheimer Hastalığı Tedavisinde Kullanılan İlaçlar”, *Akademik Geriatri Dergisi* Cilt 1 Sayı 1 Mart).

[59]. Danysz W, Parsons CG, Mobius HJ, Stoffler A, Quack G.,2000, “Neuroprotective and symptomatological action of memantine relevant for Alzheimer's disease--a unified glutamatergic hypothesis on the mechanism of action”, *Neurotox Res*;2(2-3):85-97.

[60]. Gauthier S, Wirth Y, Möbius HJ.,2005, “Effects of memantine on behavioural symptoms in Alzheimer's disease patients: an analysis of the Neuropsychiatric Inventory (NPI) data of two randomised, controlled studies”, *Int J Geriatr Psychiatry*;20(5):459-464.

[61]. Pomara N, Ott BR, Peskind E, Resnick EM. ,2007, “ Memantine treatment of cognitive symptoms in mild to moderate Alzheimer disease: secondary analyses from a placebo-controlled randomized trial”, *Alzheimer Dis Assoc Disord*;21(1):60-64.

[62]. Ott BR, Blake LM, Kagan E, Resnick M, Group ftMM-M-AS. ,2007, “Open label, multicenter, 28-week extension study of the safety and tolerability of memantine in patients with mild to moderate Alzheimer's disease”, *J Neurol*;254(3):351-358.

[63]. Behl C.,2005, “Oxidative stress in Alzheimer's disease: implications for prevention and therapy”, *Subcell Biochem*;38:65-78.

[64]. Birks J, Grimley Evans J. ,2007, “Ginkgo biloba for cognitive impairment and dementia”, *Cochrane Database Syst Rev* (2):CD003120.

[65]. Conn D, Thorpe L.,2007, “Assessment of behavioural and psychological symptoms associated with dementia”, *Can J Neurol Sci*;34 Suppl 1:S67-71.

[66]. Masand PS, Narasimhan M.,2006, “Improving adherence to antipsychotic pharmacotherapy”, *Curr Clin Pharmacol*;1(1):47-56.

[67]. Mazzucco S, Cipriani A, Barbui C, Monaco S.,2008, “Antipsychotic drugs and cerebrovascular events in elderly patients with dementia: a systematic review”, *Mini Rev Med Chem*;8(8):776-783.

[68]. Kales HC.,2008, “ New use of antipsychotic drugs in elderly people with dementia may increase the mortality risk”,*Evid Based Ment Health*;11(2):54.

[69]. Kales HC, Kim HM, Zivin K, Valenstein M, Seyfried LS, Chiang C, et al.,2012, “Risk of mortality among individual antipsychotics in patients with dementia”,*Am J Psychiatry*;169(1):71-79.

[70]. Carrasco MM, Agüera L, Gil P, Morínigo A, Leon T.,2011, “Safety and effectiveness of donepezil on behavioral symptoms in patients with Alzheimer disease”,*Alzheimer Dis Assoc Disord*;25(4):333-340.

[71]. Rodda J, Morgan S, Walker Z.,2009, “Are cholinesterase inhibitors effective in the management of the behavioral and psychological symptoms of dementia in Alzheimer's disease? A systematic review of randomized, placebo-controlled trials of donepezil, rivastigmine and galantamine”, *Int Psychogeriatr*;21(5):813-824.

[72]. Salzman C, Jeste DV, Meyer RE, Cohen-Mansfield J, Cummings J, Grossberg GT, et al.,2008, “ Elderly patients with dementia-related symptoms of severe agitation and aggression: consensus statement on treatment options, clinical trials methodology, and policy”,*J Clin Psychiatry*;69(6):889-898.

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

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

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

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

[77] Polesello S., Valsecchi M. S., 1999, “Electrochemical detection in the capillary electrophoresis analysis of inorganic compounds, *J.Chromatography A*”, 834,

103–116.

[78]Gürsoy,E.,2007 “ Kapiler elektroforez ve potansiyometrik belirleme” Yüksek lisans Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun 3-30.

[79]İnternet:[http://www.chemsoc.org/ExemplarChem/entries/2003/leeds\\_chromatography/chromatography/migration.htm](http://www.chemsoc.org/ExemplarChem/entries/2003/leeds_chromatography/chromatography/migration.htm)

[80] Xu Y., 1996, “Tutorial: Capillary Electrophoresis”, The Chemical Educator, Vol.1, No:2.

[81] James, P. Landers, 1997, “Handbook of Capillary Electrophoresis, Boca Raton”, New York, Washington.

[82]İnternet:[http://www.chemsoc.org/ExemplarChem/entries/2003/leeds\\_chromatography/chromatography/cec.htm](http://www.chemsoc.org/ExemplarChem/entries/2003/leeds_chromatography/chromatography/cec.htm).

[83] Nutku, M.S. , 1999, “ İnorganik Anyonların, Organik Asitlerin ve DNA Parçalarının Kapiler Elektroforez ile Ayırımında Polielektrolit Kullanımı”, Doktora Tezi, *İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, İstanbul, 23 s.

[84] Simpson, D.C. , 2002, “ Combining Capillary Electrochromatography with Ion Trap Accumulation and Time-of-Flight Mass Spectrometrys”, Doctor Thesis, *School of Chemistry College of Science and Engineering University, Edinburgh*, 239 p.

[85] Piraino,S.M., 2003, “Preparing Packed Capillaries for use in Capillary electochromatography: Studies of mobility, dispersion ve reproducibility” ,Doctor Thesis, *The Florida State University Colloge of Arts and Sciences*,

Florida, 77 p.

[86] İnternet:<http://www.rsc.org/pdf/books/capelectrosc.pdf>.

[87]İnternet:[http://www.chemsoc.org/ExemplarChem/entries/2003/leeds\\_chromatography/chromatography/eof.htm](http://www.chemsoc.org/ExemplarChem/entries/2003/leeds_chromatography/chromatography/eof.htm).

[88] Heiger, D.N., Hewlett Packard GmbH, 1992, “ High Performance Capillary Electrophoresis”, Germany, 24.

[89] David Heigher, Gordon Ross, Monika Dittmann ve Gerard Rozing, 1996, “Capillary Electrochromatography, A Powerful, Emerging Chromatographic Tool” , 5(9), 35-37.

[90] İnternet:[http://www.uam.es/personal\\_pdi/ciencias/manchi/elec-cap/iupac.pdf](http://www.uam.es/personal_pdi/ciencias/manchi/elec-cap/iupac.pdf).

[91] Heiger D., 2000, “High Performance Capillary Electrophoresis-An İntroduction, Agilent Technologies”, Germany, 131 p.

[92] Sam F.Y.Li, 1992, “Capillary electrophoresis, Principles, Practices and Applications, Elsevier Science Publishers, Netherlands”, 31.

[93] Skoog D.A., Holler F.J., Nieman T.A., 1998, “ Enstrumental Analiz İlkeleri”, 788, 592, 593.

[94] Terabe, S., Otsuka, K., Ichikawa, K.; Tsuchiya, A.; Ando,1984, “T. Anal. Chem”, 56, 111-113

[95]İnternet: <http://bachem.snu.ac.kr/~sicho>.

[96] Polesello S., Valsecchi S.M., 1999, “Electrochemical detection in the capillary electrophoresis analysis of inorganic compounds, Journal of Chromatography A”, 834, 103–116.

[97] Poels I., Nagels N.J., 1999, “Conducting polymer and oligomer micro-electrodes for the potentiometric detection of anions in capillary electrophoresis, Analytica Chimica Acta”, 401, 21–27

[98] Poels I., Nagels N.J., 1998, “Potentiometric detection in capillary electrophoresis with a conducting oligomer electrode, Analytica Chimica Acta”, 385, 417-422.

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

[100] Doğrukol D, Doç. Dr. Genç L. "Kromatografik Yöntemler", *BİBAM Yayınları*, Eskişehir, 1-132.

[101]İnterner:[http://ptf.content-manager.pl/pub/File/Acta\\_Poloniae/2009/4/357.pdf](http://ptf.content-manager.pl/pub/File/Acta_Poloniae/2009/4/357.pdf)

[102]İnternet:<http://www.lcgceurope.com/lcgceurope/data/articlestandard/lcgceurope/182002/17295/article.pdf>

[103]İnternet:<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S157002320600506X>

[104]İnternet:<http://link.springer.com/article/10.1365/s10337-007-0484-3#page-1>

[105]İnternet:[http://www.abechem.com/No.%202-2013/2013,%205%202\\_2,%20255-264.pdf](http://www.abechem.com/No.%202-2013/2013,%205%202_2,%20255-264.pdf)



[106] İnternet:<http://www.rxlist.com/razadyne-er-drug.htm>

[107]İnternet:<http://www.rxlist.com/razadyne-er-drug.htm>

[108]İnternet:<http://www.ilacrehberi.com/v/beklamen-4-mg-14-efervesan-tablet-c>

[109]İnternet:<https://en.wikipedia.org/wiki/Metoprolol1b0/kub/farmakolojik-ozellikler/>

[110]İnternet:<http://www.ilacabak.com> 2011, <http://www.medicinenet.com> 2011

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : HATİCE ÖZKURT  
Uyruğu : T.C  
Doğum tarihi ve yeri :08.02.1990. ANTALYA  
Medeni hali : BEKAR  
e-mail : haticeozkurt5@gmail.com

### Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Lisans	BİNGÖL ÜNİVERSİTESİ	2013
Formasyon	AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ	2015
Lise	ANTALYA GAZİ ANADOLU LİSESİ(Y.D.A)	2008

### Yabancı Dil

İNGİLİZCE

### Katınılan Kongre ve Sempozyumlar

Hatice Özkurt “Galantamin’in İlaç Preparatlarından Kapiler Elektroforez Yöntemi ile Tayini” 7. Ulusal Analitik Kimya Kongresi

Teorik ve Uygulamalı Temel Kromatografi Kursu Pamukkale Üniversitesi

