



T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**NİSERGOLİN'İN SAFSIZLIKLARI OLAN
10-METOKSİ-6-METİLERGOLİN-8 β -METANOL-
5-BROMO-3-PİRİDİNKARBOKSİLAT (1-DN) VE
10-METOKSİ-1, 6-DİMETİLERGOLİN-8 β -METANOL-
5-KLORO-3-PİRİDİNKARBOKSİLAT (5-CN)
İÇİN HPLC VE DİOD DİZİ DEDEKTÖR KULLANILARAK
MİKTAR TAYİNİ YÖNTEMİ GELİŞTİRİLMESİ**

124020

F. NURAY YÜKTAŞ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

124020

ANALİTİK KİMYA
ANABİLİM DALI

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
BÜYÜK MANTARCIYIN MERKEZİ**

DANIŞMAN
Doç. Dr. Güler YALÇIN

İSTANBUL - 2003

I. ÖNSÖZ

Bu çalışmanın ortaya çıkmasında büyük desteği ve emeği olan danışmanım Doç. Dr. Güler Yalçın'a teşekkür eder, sonsuz şükranlarımı sunarım.

Her konuda değerli fikirlerinden ve desteklerinden dolayı Analitik Kimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Emre Dölen ve Eczacılık Fakültesi Dekanı Prof. Dr. Mürşit Pekin'e teşekkür eder, saygılarımı sunarım.

İlgi ve destekleri için Merkezi Araştırma Laboratuvarı Başkanı Prof. Dr. Jülide Akbuğa ve yardımcısı Prof. Dr. Türkan Yurdun'a teşekkür eder, saygılarımı sunarım.

Tezime standart ve etken madde imkanı sağlayan Pharmacia Upjohn ve Deva İlaç San. A. Ş'ne, deneylerim sırasında yakın ilgi ve desteğini gördüğüm Arş. Gör. Deniz Çıkla Yılmaz'a, her türlü destek ve yardımlarından dolayı Analitik Kimya Anabilim Dalı öğretim üyelerine ve araştırma görevlilerine, çalışma arkadaşım Arş. Gör. Dr. Fatma Özaydın'a çok teşekkür ederim.

Manevi destekleriyle her zaman yanımda olan aileme ve bu tezin yazılma aşamasında desteğini gördüğüm kardeşim Turgay Yüктаş'a çok teşekkür ederim.

II. İÇİNDEKİLER

I. ÖNSÖZ	II
II. İÇİNDEKİLER	III
III. KISALTMALAR VE SİMGELER	VI
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	5
4.1. 10-Metoksi-1,6-dimetilergolin-8 β -metanol-5-bromo-3-piridin- karboksilat, Nisergolin (NIC) in Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri	5
4.2. 10-Metoksi-6-metilergolin-8 β -metanol-5-bromo-3-piridin- karboksilat (1-DN)	6
4.2.1. Kimyasal Özellikleri	6
4.2.2. Farmakolojik Özellikleri	6
4.3. 10-Metoksi-1,6-dimetilergolin-8 β -metanol-5-kloro-3-piridin- karboksilat (5-CN)	7
4.3.1. Kimyasal Özellikleri	7
4.3.2. Farmakolojik Özellikleri	7

5. GEREÇ VE YÖNTEM	8
5.1. Kimyasal Maddeler	8
5.2. Gereçler	8
5.3. Çözeltiler	9
5.3.1. Stok Standart Çözeltiler	9
5.3.2. Seyreltik Standart Çözeltiler	9
5.3.3. NIC Hammadde Aşırı Yükleme Çözeltisi	9
5.3.4. Hareketli Faz Çözeltileri	10
5.4. Yöntemler	10
5.4.1. HPLC Yönteminin Koşulları	10
5.4.2. Pik Performans Parametreleri	11
5.4.3. Kullanılan İstatiksel Yöntemler	12
6. BULGULAR	15
6.1. Ön Denemeler	15
6.1.1. Hareketli Fazın Saptanması (λ : 254 nm)	15
6.1.1.1. Hareketli Faz Bileşen Oranının Saptanması	16
6.1.1.2. Hareketli Faz pH ının Saptanması	18
6.1.2. Uygun Dalga Boyunun Saptanması	20
6.1.3. Saptanan Hareketli Faz Sistemi ve Dalga Boyunda (λ : 285 nm) Hareketli Faz Oranları	21
6.1.4. İyon Çifti Kromatografisi Denemeleri	24
6.1.4.1. 10 mM OSASS İçeren Hareketli Faz Denemeleri	24
6.1.4.2. 4 mM OSASS ve 6 mM TBAHS İçeren Hareketli Faz Denemeleri	26
6.2. 1-DN için Ölçü Eğrisinin Hazırlanması	32
6.3. 5-CN için Ölçü Eğrisinin Hazırlanması	33

6.4. Geliştirilen Yöntemlerin İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi	34
6.4.1. 1-DN için Ölçü Eğrilerinin Regresyon Analizi	34
6.4.2. 5-CN için Ölçü Eğrilerinin Regresyon Analizi	35
6.4.3. 1-DN için Gözleme (Dedeksiyon) ve Kantitatif Tayin Limiti	36
6.4.4. 5-CN için Gözleme (Dedeksiyon) ve Kantitatif Tayin Limiti	36
6.5. Geliştirilen Yöntemlerin Etken Madde Analizine Uygulanması	37
6.5.1. Plasebo Tablette 1-DN in Geri Kazanımı	37
6.5.2. Etken Madde (NIC) İçindeki 1-DN Miktarının Bulunması	38
6.5.3. Plasebo Tablette 5-CN in Geri Kazanımı	39
6.5.4. Etken Madde (NIC) İçindeki 5-CN Miktarının Bulunması	41
7. TARTIŞMA VE SONUÇ	42
8. KAYNAKLAR	45
9. ÖZGEÇMİŞ	48

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

III. KISALTMALAR VE SİMGELER

ACN	: Asetonitril
5-CN	: 10-metoksi-1,6-dimetilergolin-8 β -metanol-5-kloro-3-piridinkarboksilat
DAD	: Diod dizi dedektör
DMF	: Dimetilformamid
1-DN	: 10-metoksi-6-metilergolin-8 β -metanol-5-bromo-3-piridinkarboksilat
HPLC	: Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
k'	: Kapasite faktörü
NaAc	: Sodyum asetat
NH ₄ Ac	: Amonyum asetat
NIC	: 10-metoksi-1, 6-dimetilergolin-8 β -metanol-5-bromo-3-piridin karboksilat, Nisergolin
OSASS	: 1- Oktansulfonik asit sodyum tuzu
R	: Ayırma gücü
RSD	: Bağlı standart sapma
S	: Standart sapma
T	: Kuyruklanma faktörü
TBAHS	: Tetrabutilamonyum hidrojen sülfat
UV	: Ultraviyole

1. ÖZET

Nisergolin in safsızlıkları olan 10-metoksi-6-metilergolin-8 β -metanol-5-bromo-3-piridinkarboksilat (1-DN) ve 10-metoksi-1,6-dimetilergolin-8 β -metanol-5-kloro-3-piridinkarboksilat (5-CN) için yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ve Diod dizi dedektör kullanılarak miktar tayini yöntemi geliştirildi.

Kromatografik koşullar: Kolon: Phenomenex, Luna, 5 μ m, C18 (2), 250 x 4,6 mm. Hareketli faz : 4 mM 1-oktansulfonik asit sodyum tuzu ve 6 mM tetrabutilamonyum hidrojen sülfat içeren 0,1 M amonyum asetat (pH : 5,9) / asetonitril; 1-DN için (62 : 38); 5-CN için (64 : 36). Akış hızı: 1,0 ml / dak. Dedektör: Agilent 1100 Model DAD, λ : 285 nm, bant genişliği : 4 nm.

1-DN :

Konsantrasyon aralığı : $0,032 \cdot 10^{-5}$ M – $3,828 \cdot 10^{-5}$ M, $y = 116,88x + 0,2773$ ($r^2 = 0,99989$); dedeksiyon limiti : $0,012 \cdot 10^{-5}$ M; kantitatif tayin limiti : $0,041 \cdot 10^{-5}$ M.

5-CN :

Konsantrasyon aralığı : $0,034 \cdot 10^{-5}$ M – $4,092 \cdot 10^{-5}$ M, $y = 104,24x + 0,7486$ ($r^2 = 0,99996$); dedeksiyon limiti : $0,014 \cdot 10^{-5}$ M; kantitatif tayin limiti : $0,046 \cdot 10^{-5}$ M.

Geri kazanım 1-DN için % 100,65 ve 5-CN için % 100,32 dir. 30 mg NIC / tablette bulunan 1-DN miktarı $209,65 \mu\text{g}$ / tablettir (% 0,70). 30 mg NIC / tablette bulunan 5-CN miktarı $27,62 \mu\text{g}$ / tablettir (% 0,09).

2. SUMMARY

DEVELOPMENT OF A QUANTIFICATION METHOD FOR THE IMPURITIES OF NICERGOLINE, 10-METHOXY-6-METHYLERGOLINE-8 β -METHANOL- 5-BROMO-3-PYRIDINECARBOXYLATE (1-DN) AND 10-METHOXY-1, 6-DIMETHYLERGOLINE-8 β -METHANOL- 5-CHLORO-3-PYRIDINECARBOXYLATE (5-CN) BY HPLC AND DIODE ARRAY DETECTOR

A quantification method was developed for the impurities of nicergoline, 10-methoxy-6-methylergoline-8 β -methanol- 5-bromo-3-pyridinecarboxylate (1-DN) and 10-methoxy-1, 6-dimethylergoline -8 β -methanol-5-chloro-3-pyridinecarboxylate (5-CN) by high performance liquid chromatography and Diode array detector.

Chromatographic conditions: Column: Phenomenex, Luna, 5 μ m, C18 (2), 250 x 4,6 mm. Mobile phase: 0,1 M ammonium acetate solution containing 4 mM 1-octanesulfonicacid sodium salt and 6 mM tetrabutylammonium hydrogen sulfat (pH : 5,9) / acetonitrile (62 : 38) for 1-DN and (64 : 36) for 5-CN. Flow rate: 1,0 ml / min. Detector: Agilent 1100 Model DAD, λ : 285 nm, band width : 4 nm.

1-DN :

Concentration range : $0,032 \cdot 10^{-5}$ M – $3,828 \cdot 10^{-5}$ M, $y = 116,88x + 0,2773$ ($r^2 = 0,99989$); limit of detection : $0,012 \cdot 10^{-5}$ M; limit of quantification : $0,041 \cdot 10^{-5}$ M.

5-CN :

Concentration range : $0,034 \cdot 10^{-5}$ M – $4,092 \cdot 10^{-5}$ M, $y = 104,24x + 0,7486$ ($r^2 = 0,99996$); limit of detection : $0,014 \cdot 10^{-5}$ M; limit of quantification : $0,046 \cdot 10^{-5}$ M.

The recovery was 100,65 % for 1-DN and 100,32 % for 5-CN. The amount of 1-DN in 30 mg NIC / tablet was 209,65 μ g / tablet (0,70 %) and the amount of 5-CN in 30 mg NIC / tablet was 27,62 μ g / tablet (0,09 %).

TEKİRSEK ÖZETİM KURULU
DOKÜMANLAMA MERKEZİ

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Nisergolin, 10-metoksi-1, 6-dimetilergolin-8 β -metanol-5-bromo-3-piridinkarboksilat (NIC) ilk kez Farmitalia Carlo Erba'da geliştirilmiş yarı sentetik bir ergolin türevidir. İlaç etken maddesi olan NIC in iki safsızlığı vardır : 10-metoksi-6-metilergolin-8 β -metanol-5-bromo-3-piridinkarboksilat (1-DN) ve 10-metoksi-1,6-dimetilergolin-8 β -metanol-5-kloro-3-piridinkarboksilat (5-CN) (10, 18).

Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ve Diod dizi dedektör (DAD) kullanılarak, 1-DN ve 5-CN için pik performans parametrelerinin uygun olduğu bir miktar tayini yönteminin geliştirilmesi amaçlanmıştır. NIC in USP ve BP gibi farmakopelerde monografi ve dolayısıyla safsızlık miktar tayini yöntemi bulunmamaktadır. Geliştirilen miktar tayini yöntemi pazarda bulunan farmasötik preparatlara uygulanabileceği için ilaç sanayine katkısı olacaktır.

Ultraviyole (UV) dedektör yerine, pik performans parametrelerini hesaplayan sisteme bağlı olduğu için ve aynı anda iki dalga boyunda sonuç verdiği için Diod dizi dedektör kullanılmıştır.

NIC, alfaadrenerjik bloke edici aktivitesi nedeniyle vazoaaktif özelliklere sahiptir (1, 2, 11). Damarları genişleterek sistemik kan basıncını düşürür, periferel kan akışını artırır; beyin metabolizmasını geliştirmek için klinikte kullanılmaktadır (8). Bir çalışmada sıçan nörofillerinde serbest radikal üretimini ve sıçanlarda beyin otooksidasyonunu inhibe ederek antioksidan etkiye sahip olduğu gösterilmiştir; bu nedenle beyine ve sinirsel bozukluklara ait hastalıklar için kullanılmaktadır (21).

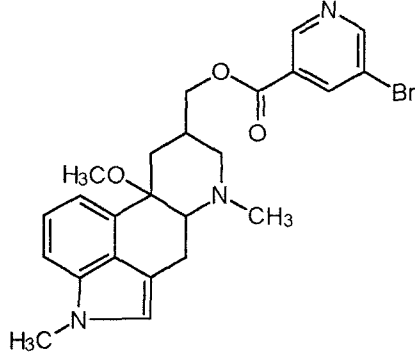
Flieger, M. ve arkadaşları tarafından 5-CN NIC in safsızlığı olarak tanımlanmıştır; 1-DN, 5-CN, NIC C18 kolon ve su-asetonitril-trietilamin (1084:895:21) hareketli faz sisteminde çalışılmış ve kapasite faktörü (k') değerleri sırasıyla 9,40 , 16,00 ve 18,25 olarak saptanmıştır ; buna karşın miktar tayini yöntemi bildirilmemiştir (10). Seçilmiş iyon izleme (SIM) modundaki atmosferik basınç iyonizasyon kütle spektrometri (API-MS) detektörü ile HPLC kullanılarak insan plazması ve idrarında NIC ve üç

metabolitinin ayrılması ve tayinlerinde internal standart olarak 5-CN kullanılmıştır (5). İnce tabaka kromatografisi / İkinci iyon kütle spektrometrisi (TLC / SIMS) kullanılarak NIC' in miktar tayininde internal standart olarak 5-CN kullanılmıştır (6). Banno, K ve Horimoto, S'nin çalışmasında (4), NIC ve safsızlıklarının (1-DN ve 5-CN) HPLC / API-MS dedektörle miktar tayini yapılmıştır. Aynı çalışmada UV dedektörle de (λ : 254 nm) kromatogramları gözlemişlerdir.



4. GENEL BİLGİLER

4.1. 10-Metoksi-1,6-dimetilergolin-8β-metanol-5-bromo-3-piridin-karboksilat, Nisergolin (NIC) in Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri



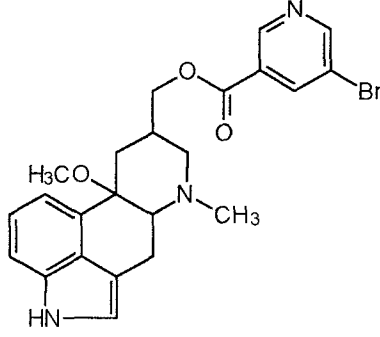
Şekil-1. NIC in açık formülü

Kapalı Formülü	: C ₂₄ H ₂₆ BrN ₃ O ₃
Molekül Ağırlığı	: 484,40 g / mol
Rengi	: Sarımsı beyaz
Görünümü	: Kristalize toz.
Çözünürlüğü	: Suda çözünmez; etanol ve kloroformda çözünür; eterde az çözünür.
Erime Noktası	: 136 - 138 °C (17)

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

4.2. 10-Metoksi-6-metilergolin-8β-metanol-5-bromo-3-piridin- karboksilat (1-DN)

4.2.1. Kimyasal Özellikleri



Şekil-2. 1-DN in açık formülü

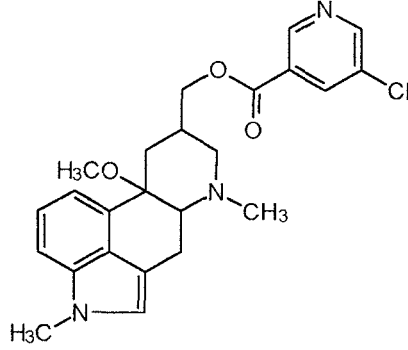
Kapalı Formülü : C₂₃H₂₄BrN₃O₃
Molekül Ağırlığı : 470,37 g / mol

4.2.2. Farmakolojik Özellikleri

NIC e çok benzer kimyasal yapıda ester bileşiği olan 1-DN ona benzer farmakolojik özelliğe ve aktiviteye sahiptir. 1-DN in akut toksisitesi 97,5 mg / kg'dır, bu NIC in toksisitesinin yaklaşık 2 katıdır. Hayvan ve insan plazmalarında 1-DN in konsantrasyonunun çok düşük olduğu rapor edilmiştir. Bu nedenle 1-DN yan etki göstermez (18).

4.3. 10-Metoksi-1,6-dimetilergolin-8β-metanol-5-kloro-3-piridin- karboksilat (5-CN)

4.3.1. Kimyasal Özellikleri



Şekil-3. 5-CN in açık formülü

Kapalı Formülü : C₂₄H₂₆ClN₃O₃

Molekül Ağırlığı : 439,94 g / mol

4.3.2. Farmakolojik Özellikleri

NIC e çok benzer kimyasal yapıda ester bileşiği olan 5-CN ona benzer farmakolojik özelliğe ve aktiviteye sahiptir. 5-CN in akut toksisitesi 202,9 mg / kg'dır, bu NIC in toksisitesine yakındır (18).

5. GEREÇ VE YÖNTEM

5.1. Kimyasal Maddeler

10-metoksi-1,6-dimetilergolin-8 β -metanol-5-bromo-3-piridinkarboksilat (NIC), 10-metoksi-6-metilergolin-8 β -metanol-5-bromo-3-piridinkarboksilat (1-DN), 10-metoksi-1,6-dimetilergolin-8 β -metanol-5-kloro-3-piridinkarboksilat (5-CN) standartları ve NIC etken maddesi Pharmacia Upjohn ve Deva İlaç San. A. Ş. firmalarından bağış olarak verilmiştir. Amonyum asetat (NH₄Ac) Riedel deHaen firmasından, sodyum asetat (NaAc), dimetilformamid (DMF), asetik asit, tetrabutylamonyum hidrojen sülfat (TBAHS) Merck firmasından, 1- oktansulfonik asit sodyum tuzu (OSASS) Sigma firmasından, HPLC safılıkta asetonyitril (ACN) Lab- Scan firmasından sağlanmıştır.

5.2. Gereçler

Tartımlar için Shimadzu / AEX- 200G terazi, pH ölçümleri için Mettler Toledo / MP 220 pH metre ve Mettler Toledo InLab 413 elektrodu, pH metrenin kalibrasyonu için pH : 4,01 ve pH : 7,00 (Mettler Toledo) tampon çözeltiler kullanıldı. Spektrofotometrik ölçümler için Shimadzu 2100S model spektrofotometre ve 1 cm geçiş yollu kuartz küvetler kullanıldı. Küçük hacimleri ölçmek için Genex beta 50 μ L ve Eppendorf 1000 μ L.lik otomatik pipetler kullanıldı. Çözeltilerin hazırlanmasında Ikamag Rh model manyetik karıştırıcı, distile su için GFL / 2004 ve Millipore / Milli-Q-RG cihazları kullanıldı. Volumetrik kaplar distile su ile standardize edilmiştir.

HPLC sisteminde ise Agilent 1100 model pompa, Rheodyne 7725i model enjeksiyon sistemi, 20 μ L ve 50 μ L.lik loop, Agilent 1100 model DAD dedektör, Phenomenex-Luna C18 (2) (250 x 4,6 mm I.D.) partikül büyüklüğü 5 μ m olan bir kolon ve aynı yapıda bir ön kolon, çözeltilerdeki gazın uzaklaştırılma işlemleri için Agilent 1100 model vakum gaz uzaklaştırıcı sistemi, hareketli fazın süzülmesi için AFO- 0503, 0,2 μ m, 47 mm naylon filtreler, örneklerin süzülmesi için 0,2 μ m naylon filtreler, örneklerin sisteme enjeksiyonu için Hamilton 500 μ L.lik enjektör kullanıldı. Sonuçlar Agilent Chemstation programı kullanılarak hesaplandı.

5.3. Çözeltiler

5.3.1. Stok Standart Çözeltiler

NIC, 1-DN, 5-CN Stok Çözeltileri : Her bir maddeden 30,0 mg tartılarak 100 mL 0,1 M NH₄Ac (pH : 6,0) / ACN (62 : 38) çözeltisinde çözüldü.

5.3.2. Seyreltik Standart Çözeltiler

NIC, 1-DN, 5-CN Seyreltik Çözeltileri : Her bir stok çözeltiden 400 µL alınarak 0,1 M NH₄Ac (pH : 6,0) / ACN (62 : 38) ile 10 mL.ye tamamlandı.

NIC, 1-DN, 5-CN Standart Karışımı : Her bir stok çözeltiden 400 µL alınarak 10 mL. lik balon jode karıştırıldı , 40 µL DMF eklendi ve 0,1 M NH₄Ac (pH : 6,0) / ACN (62 : 38) ile hacmine tamamlandı.

5.3.3. NIC Hammadde Aşırı Yükleme Çözeltisi

71,0 mg NIC 100 mL.lik balon jode 0,1 M NH₄Ac (pH : 6,0) / ACN (62 : 38) ile çözüldü. 400 µL DMF eklendi ve 0,1 M NH₄Ac (pH : 6,0) / ACN (62 / 38) ile hacmine tamamlandı.

5.3.4. Hareketli Faz Çözeltileri

Çözelti 1 (0,1 M asetik asit) : 5,8 mL glisial asetik asit bidistile su ile 1 L.ye tamamlandı.

Çözelti 2 (0,1 M NaAc) : 8,2 g NaAc bidistile suda çözülerek 1 L. ye tamamlandı.

0,1 M NaAc çözeltisi (pH : 4,0) : 820 mL çözelti 1 ve 180 mL çözelti 2 karıştırıldı.

0,1 M NaAc çözeltisi (pH : 5,0) : 296 mL çözelti 1 ve 704 mL çözelti 2 karıştırıldı.

0,1 M NH₄Ac çözeltisi (pH : 6,0) : 7,7080 g NH₄Ac bidistile suda çözülerek 1 L. ye tamamlandı. 0,1 M asetik asit ile çözeltinin pH ı 6,0 a ayarlandı.

10 mM OSASS içeren 0,1 M NH₄Ac çözeltisi (pH : 6,0) : 2,1630 g OSASS ve 7,7080 g NH₄Ac bidistile suda çözülerek 1 L. ye tamamlandı. 0,1 M asetik asit ile çözeltinin pH ı 6,0 a ayarlandı.

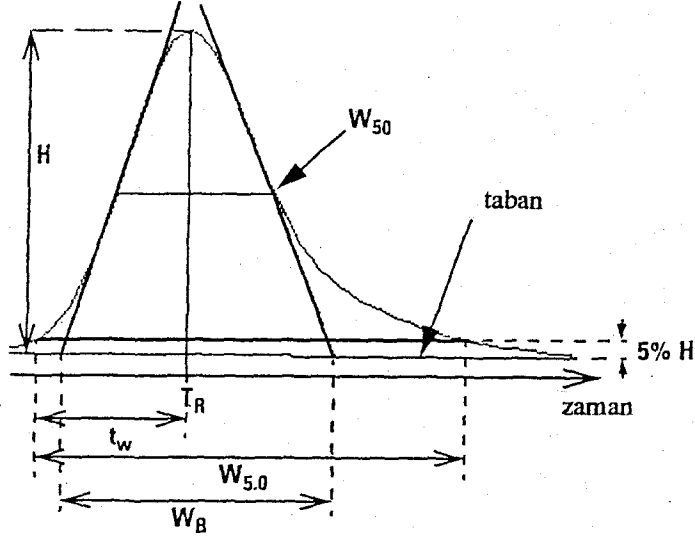
4 mM OSASS ve 6 mM TBAHS içeren 0,1 M NH₄Ac çözeltisi (pH : 5,9) : 0,8652 g OSASS; 2,0372 g TBAHS ve 7,7080 g NH₄Ac bidistile suda çözülerek 1 L. ye tamamlandı.

5.4. Yöntemler

5.4.1. HPLC Yönteminin Koşulları

Kolon	: Phenomenex, Luna, 5 μ m, C18 (2), 250 x 4.6 mm
Hareketli faz	: Bölüm 5.3.4.deki hareketli faz çözeltileri / ACN
Akış hızı	: 1.0 mL / dak.
Detektör	: Agilent 1100 Model DAD λ : 254 nm veya 285 nm, bant genişliği : 4 nm
Enjeksiyon hacmi	: 50 μ L veya 20 μ L

5.4.2. Pik Performans Parametreleri (22)



Şekil-4. Pik performans parametreleri

Kapasite Faktörü (k') :

$$k' = \frac{T_R - T_0}{T_0}$$

T_R : Pik alıkonma zamanı (dak)

T₀ : Ölü zaman (dak)

Kuyruklanma Faktörü (T) :

$$T = \frac{W_{5.0}}{2t_w}$$

W_{5.0} : Ölçülen pik yüksekliğinin % 5 indeki pik genişliği (dak)

t_w : Ölçülen pik yüksekliğinin % 5 indeki, pik başlangıç ve alıkonma zamanı arasındaki uzaklık (dak)

**T.C. YÜKSEK ÖZETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

Ayırma Gücü (R) :

$T_{R(1)} < T_{R(2)}$ olmak üzere,

$$R = \frac{2(T_{R(2)} - T_{R(1)})}{W_{B(2)} + W_{B(1)}}$$

$T_{R(1)}$ ve $T_{R(2)}$: 1. ve 2. pike ait alıkonma zamanı (dak)

$W_{B(1)}$ ve $W_{B(2)}$: 1. ve 2. pike ait pik taban genişliği (dak)

5.4.3. Kullanılan İstatiksel Yöntemler (16)

Standart Sapma (S):

$$S = \sqrt{\frac{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

Bağıl Standart Sapma (RSD):

$$RSD = 100 \frac{S}{\bar{x}}$$

Bu denklemlerde kullanılan terimlerin açıklamaları:

x_i : x değerleri

\bar{x} : x değerlerinin ortalaması

n : ölçüm sayısı

Konsantrasyona karşı dedektör cevabı grafiği çizilerek hazırlanan ölçü eğrisinde en küçük kareler yöntemiyle elde edilen doğrunun denklemi aşağıdaki formüllerle hesaplanır:

Doğrunun eğimi:
$$b = \frac{\sum_i \{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}$$

Doğrunun kayım değeri:
$$a = \bar{y} - b\bar{x}$$

$y = bx + a$ denkleminde hesaplanan a ve b değerleri yerine koyularak doğru denklemi bulunur.

Korelasyon katsayısı
$$r = \frac{\sum_i \{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\left\{ \left[\sum_i (x_i - \bar{x})^2 \right] \left[\sum_i (y_i - \bar{y})^2 \right] \right\}^{1/2}}$$

olarak hesaplanır.

$S_{y/x}$: Doğrunun y değerleri yönünde rastgele hataları

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}}$$

Gözleme (dedeksiyon) Limiti $= y_B + 3S_B$

Kantitatif Tayin Limiti $= y_B + 10S_B$

Bu denklemlerde kullanılan terimlerin açıklamaları:

x_i : x değerleri

y_i : y değerleri

\bar{x} : x değerlerinin ortalaması

\bar{y} : y değerlerinin ortalaması

n-2: Serbestlik derecesi sayısı

\hat{y}_i : deneysel x değerlerine bağlı olarak eğrinin regresyon denkleminde hesaplanan y değeri

$y_B = a$

$S_B = S_{y/x}$

Güven Aralığı (μ) :

$$\mu = \bar{x} \pm t \times S / (n)^{1/2}$$

μ : güven aralığı

\bar{x} : ortalama değer

t : istatistiksel faktör

S : standart sapma

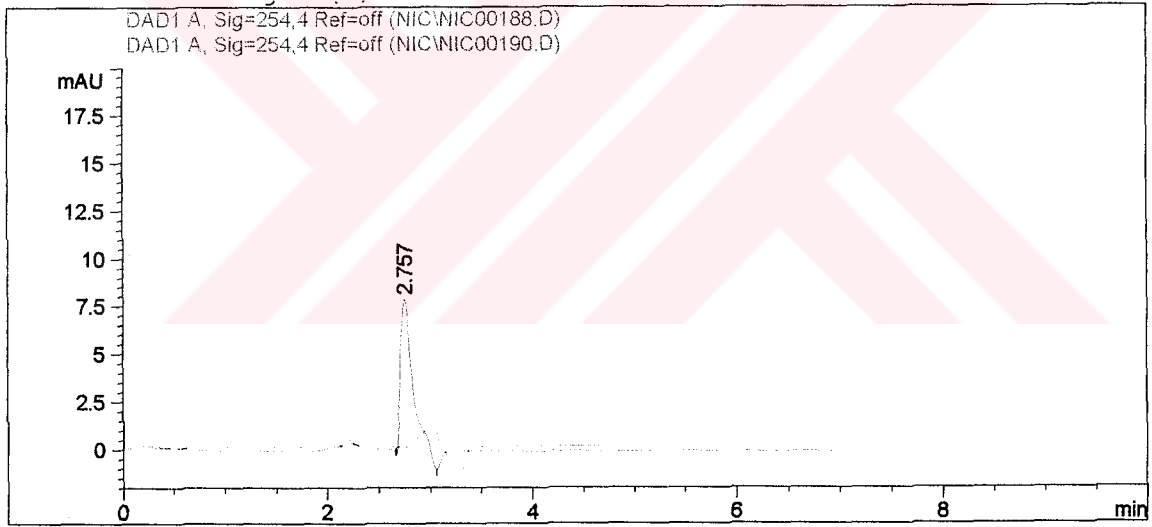
n : ölçüm sayısı

6.BULGULAR

6.1. Ön Denemeler

6.1.1. Hareketli Fazın Saptanması (λ : 254 nm)

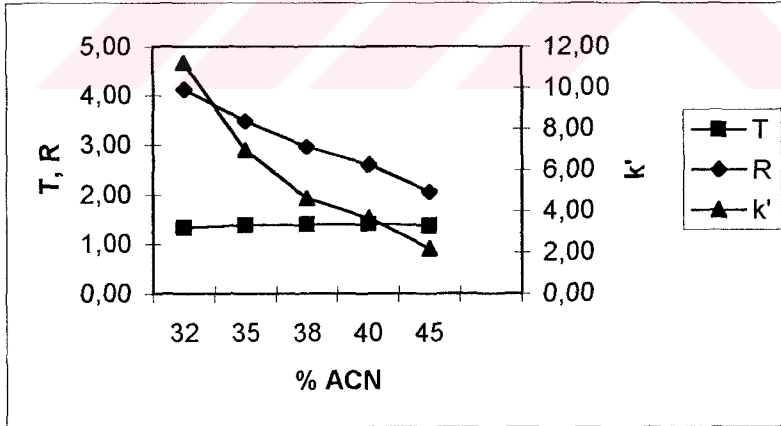
Banno ve ark. (4) C18 kolon (150 x 4,6 mm i.d.) ve λ : 254 nm olan sistemde, hareketli faz olarak 0,1 M NH_4Ac (pH : 6,0) / ACN (70 / 30) ile çalışmışlar, NIC ve safsızlıkları için birbirinden kalitatif açıdan ayrılmış pikler elde etmişlerdir. Buna karşın, bu sistemin UV dedektör ile kantitatif analizi tartışılmamıştır. Bu çalışmada Banno ve ark.nın (4) çalışması temel alınmış, yöntemde önemli ölçüde değişiklikler yapılmıştır. DMF alıkonmayan madde olarak kullanılmıştır ve bu pike ilişkin alıkonma zamanı ölü zaman olarak değerlendirilmiştir (Şekil-5.).



Şekil-5. pH : 6,0 hareketli faz sisteminde boş ve DMF'nin kromatogramları. Boş (—), DMF (—). Kolon : Phenomenex, Luna, 5 μm , C18 (2) 250 x 4,6 mm. Hareketli faz : 0,1 M NH_4Ac (pH : 6,0) / ACN (62 : 38). Akış hızı : 1,0 mL / dak. Dedektör : Agilent 1100 Model DAD λ : 254 nm, bant genişliği : 4 nm. Örnek hacmi : 50 μL

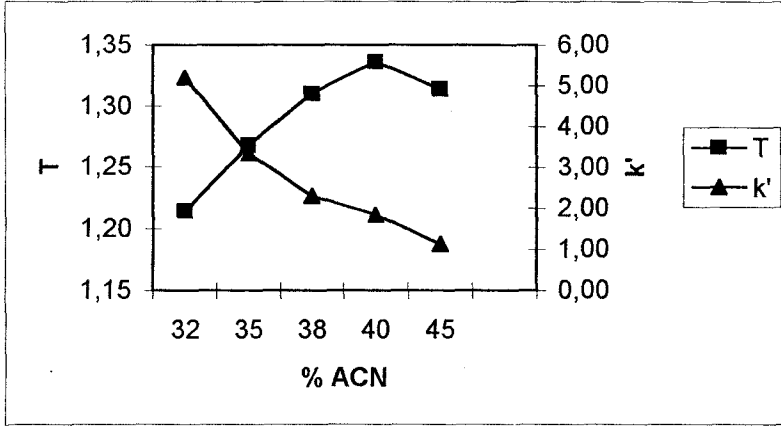
6.1.1.1. Hareketli Faz Bileşen Oranının Saptanması

Uzunluğu fazla olan kolonların, teorik plaka sayısının ve ayırma gücünün yüksek olmasına neden olduğu göz önüne alınarak kolon 250 mm olarak seçilmiştir. Kolon uzunluğunda yapılan bu değişiklik alıkonma zamanlarında önemli bir artışa neden olmuştur. Bu nedenle öncelikle hareketli faz oranını belirlemek için aşağıdaki çalışmalar yapılmıştır. Hareketli faz 0,1 M NH₄Ac (pH : 6,0) / ACN' in Şekil 6, 7, 8 de belirtilen farklı oranlarında çalışılmıştır ve NIC, 1-DN, 5-CN için en uygun kapasite faktörü (k'), kuyruklanma faktörü (T) ve ayırma gücü (R) kıyaslanmıştır. k' değerleri 1-5 (19); T değerleri 1,000 (22); $R \geq 2,000$ olmalıdır (20). R için 2,000 den büyük uygun değerler elde edilmiştir (Şekil-6). T değerleri 1,000 den büyük olup aralarında anlamlı bir fark gözlenmemiştir (Şekil-6, 7, 8). Bu nedenle k' nın 1-5 arasında olanı ve R değerleri arasında en yüksek olanı göz önüne alınarak diğer bileşenlerden uygun bir ayrılmanın sağlandığı hareketli faz oranı 62 : 38 olarak saptanmıştır.

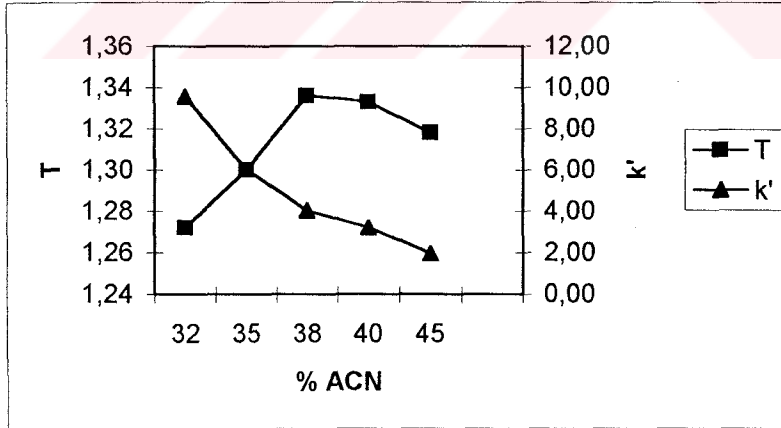


Şekil-6. NIC için 0,1 M NH₄Ac (pH : 6,0) / ACN hareketli fazının farklı oranlarında k' , T ve R nin kıyaslanması.

*R : NIC ve 5-CN arasındaki ayrılmaya ilişkin.



Şekil-7. 1-DN için 0,1 M NH_4Ac (pH : 6,0) / ACN hareketli fazının farklı oranlarında k' ve T nin kıyaslanması.



Şekil-8. 5-CN için 0,1 M NH_4Ac (pH : 6,0) / ACN hareketli fazının farklı oranlarında k' ve T nin kıyaslanması.

6.1.1.2. Hareketli Faz pH'nin Saptanması

NIC in mide pH'ında (4) ve sulu alkali çözeltilerinde (6) bozunduğu bilinmektedir. Bu nedenle NIC, 1-DN, 5-CN için en uygun T ve R'nin seçilmesi için pH 4,0; 5,0 ve 6,0 olan hareketli faz sistemleri ile çalışılmıştır.

NIC, 1-DN, 5-CN standart karışımına ait sonuçlar Tablo-1. de verilmiştir.

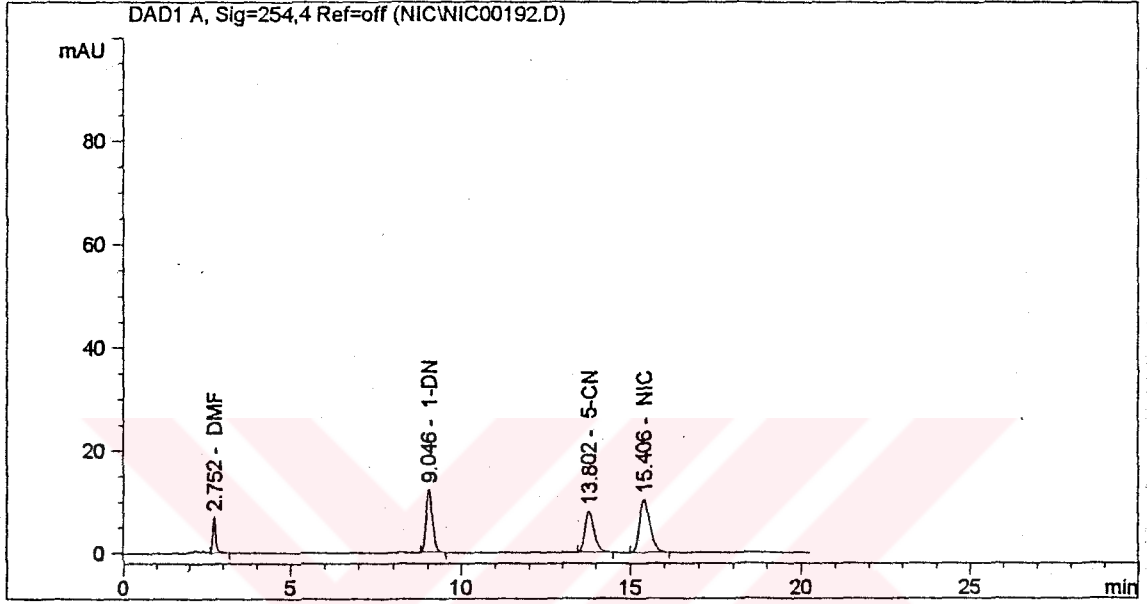
Tablo-1. Farklı pH'teki hareketli fazlarda NIC, 1-DN ve 5-CN'e ait k', T ve R değerleri

HAREKETLİ FAZ	ORAN	1-DN		5- CN		NIC		R (5-CN/NIC)
		k'	T	k'	T	k'	T	
0,1 M NH ₄ Ac / ACN (pH : 6,0)	62:38	2,291	1,310	4,024	1,336	4,605	1,393	2,957
0,1 M NaAc / ACN (pH : 5,0)	62:38	1,969	1,334	3,226	1,408	3,677	1,515	2,598
0,1 M NaAc / ACN (pH : 4,0)	62:38	1,594	1,422	2,617	1,595	3,000	1,592	2,368

Tablo-1.deki sonuçlara göre, T değerleri 1,300 den büyük bulunmuştur. Buna karşın $R \geq 2,000$ temel alındığında $R_{5-CN/NIC}$: 2,957 değeri uygun bulunarak pH : 6,0 hareketli faz sistemi olarak seçilmiştir.

pH : 6,0 hareketli faz sisteminde NIC, 1-DN, 5-CN standart karışımının kromatogramı Şekil-9.da verilmiştir.

**İC YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**



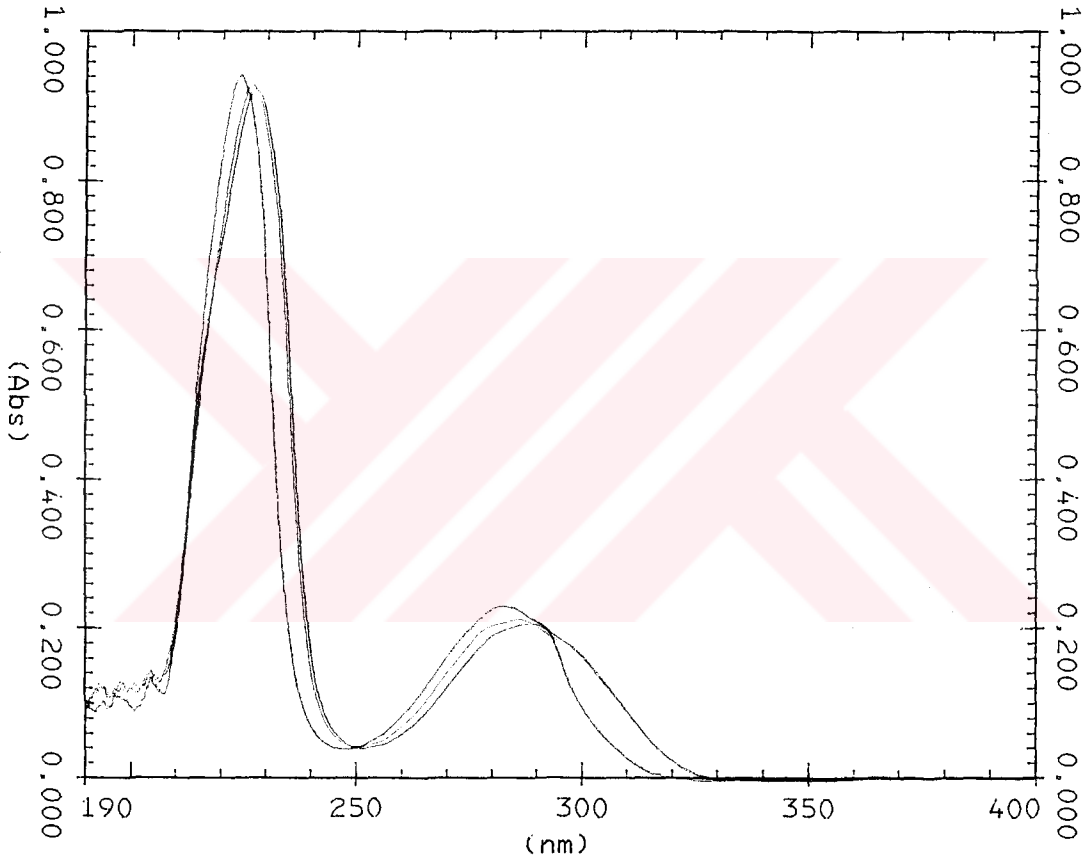
Şekil-9. pH : 6,0 hareketli faz sisteminde NIC, 1-DN, 5-CN standart karışımının kromatogramı. Kolon : Phenomenex, Luna, 5 µm, C18 (2) 250 x 4,6 mm. Hareketli faz : 0,1 M NH₄Ac (pH : 6,0) /ACN (62 : 38). Akış hızı : 1,0 mL / dak. Dedektör : Agilent 1100 Model DAD λ : 254 nm, bant genişliği : 4 nm. Örnek konsantrasyonu : 1-DN, 5-CN, NIC için 12,0 µg / mL. Örnek hacmi : 50 µL.

Sonuç olarak, bileşen oranı 62 : 38 , pH : 6,0 olan hareketli faz sisteminde kuyruklanma hariç bütün parametrelerin uygun olduğu gözlenmiştir.

6.1.2. Uygun Dalga Boyunun Saptanması

Ön denemeler sonucunda, uygun dalga boyunun saptanması için her üç maddenin de absorpsiyon spektrumları alınmıştır. Boş çözelti olarak 0,1 M NH₄Ac (pH : 6,0) / ACN (62 / 38) çözeltisi kullanılmıştır. Alınan spektrumlar Şekil-10. da verilmiştir.

HPLC 'de yapılan çalışmalarda 226 nm.de gürültü girişimi gözleendiği için 285 nm uygun dalga boyu olarak saptanmıştır.



Şekil-10. 1-DN, 5-CN, NIC (her biri 12,0 µg / mL) nin 0,1 M NH₄Ac (pH : 6,0) / ACN (62 / 38) çözeltisindeki absorpsiyon spektrumları.
1-DN (---), 5-CN (—), NIC (---).

1-DN in 282,4 nm deki molar sönüm katsayısı (ϵ) : 8941,18 L mol⁻¹ cm⁻¹ , 5-CN in 286,1 nm deki molar sönüm katsayısı (ϵ) : 7765,57 L mol⁻¹ cm⁻¹ ve NIC in 287,2 nm deki molar sönüm katsayısı (ϵ) : 8266,13 L mol⁻¹ cm⁻¹ olarak saptanmıştır.

6.1.3. Saptanan Hareketli Faz Sistemi ve Dalga Boyunda (λ : 285 nm) Hareketli Faz Oranları

Pik performans parametrelerinin dalga boyu değişikliğinden nasıl etkilendiklerini belirlemek amacıyla , daha önce belirlenen pH : 6,0 hareketli faz sisteminin farklı oranlarında ve λ : 285 nm. de Tablo-2. de verilen koşullarda çalışılmıştır.

a) NIC, 1-DN, 5-CN Standart karışımı kromatogramlarının değerlendirilmesi NIC, 1-DN, 5-CN Standart karışımına ait sonuçlar Tablo-2. de verilmiştir.

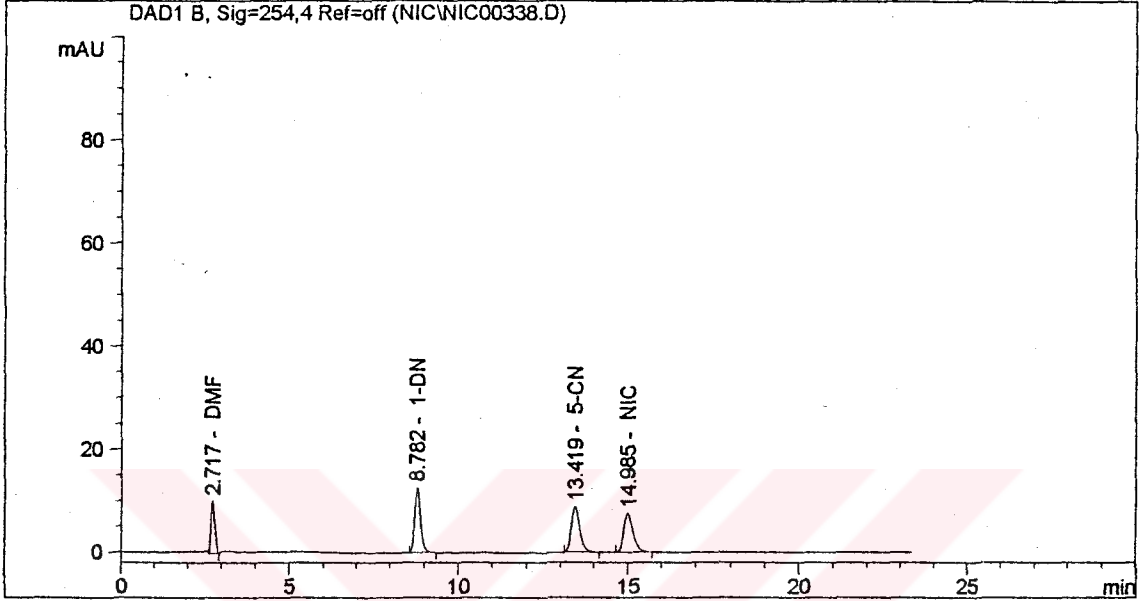
Tablo-2. 0,1 M NH₄Ac (pH : 6,0) / ACN hareketli fazının farklı oranlarında NIC, 1-DN ve 5-CN e ait k', T ve R değerleri

HAREKETLİ FAZ ORANI*	1-DN		5-CN		NIC		R (5-CN / NIC)
	k'	T	k'	T	k'	T	
60 : 40	1,787	1,328	3,066	1,365	3,493	1,430	2,903
62 : 38	2,234	1,359	3,934	1,387	4,509	1,396	3,191
65 : 35	3,367	1,312	5,938	1,371	6,885	1,376	3,937
68 : 32	5,186	1,284	9,376	1,373	11,004	1,380	4,667

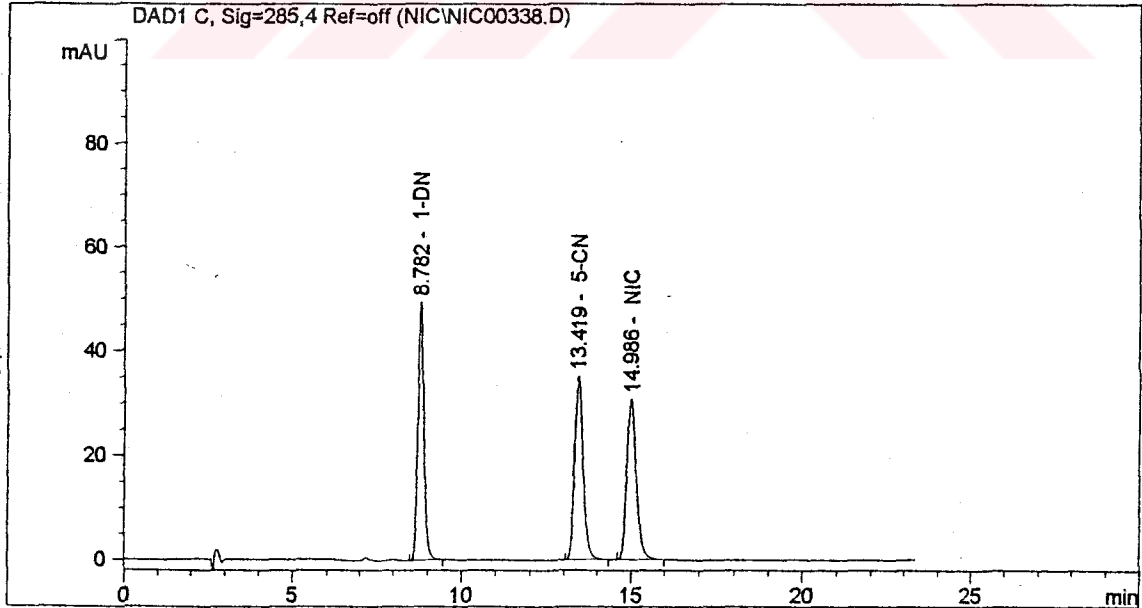
* : 0,1 M NH₄Ac (pH : 6,0) / ACN hareketli faz oranı

Tablo-2. deki sonuçlara göre; R için 2,000 den büyük uygun değerler elde edilmiştir, T değerleri arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir ve 1,000 den büyüktür. Bu nedenle k' değerleri göz önüne alınmış ve diğer bileşenlerden uygun bir ayrılmanın sağlandığı koşul 62 : 38 olarak saptanmıştır (k' = 1-5). Dalga boyunun değişmesi pik alanlarını arttırmış, buna karşın pik parametrelerinde anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir.

Sonuç olarak; 285 nm deki en uygun kromatogram 254 nm ile saptanan koşullarla aynı koşullarda alınmıştır. Aşağıdaki kromatogramlardan dalga boyu değişikliğinin pik alanlarını yaklaşık 4 katı arttırdığı gözlenmektedir (Şekil-11, 12).



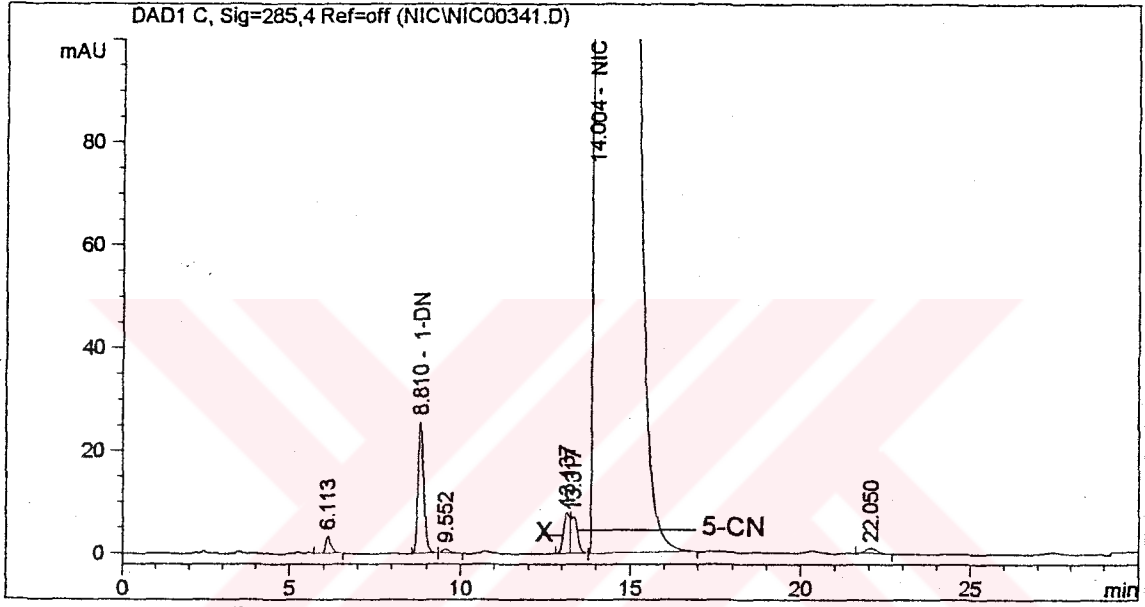
Şekil-11. λ : 254 nm de NIC, 1-DN, 5-CN standart karışımının kromatogramı. Dedektör: Agilent 1100 Model DAD λ : 254 nm, bant genişliği : 4 nm. Diğer koşullar Şekil-9.daki gibi.



Şekil-12. λ : 285 nm de NIC, 1-DN, 5-CN standart karışımının kromatogramı. Dedektör: Agilent 1100 Model DAD λ : 285 nm, bant genişliği : 4 nm. Diğer koşullar Şekil-9.daki gibi.

b) NIC hammadde aşırı yükleme kromatogramlarının değerlendirilmesi

Tablo-2. de verilen koşullarda, sisteme NIC hammadde aşırı yükleme çözeltisi enjeksiyonu yapıldığında, bilinmeyen bir safsızlık pikinin 5-CN ile girişim yaptığı gözlenmiştir (Şekil-13.).



Şekil-13. NIC hammadde aşırı yüklemesinin kromatogramı. Dedektör : Agilent 1100 Model DAD λ : 285 nm, bant genişliği : 4 nm. Örnek konsantrasyonu : NIC için 0,71 mg / mL. Diğer koşullar Şekil-9.daki gibi.

6.1.3.a. daki sonuçlara göre her üç maddeye ilişkin T değerleri 1,000 den büyük olduğundan ve 6.1.3.b. deki girişim sorununun giderilmesi için hareketli faza iyon çifti oluşturan madde katılması planlanmıştır.

**TC YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
BİLİMİN VE TEKNOLOJİNİN
BİLİMİN VE TEKNOLOJİNİN
BİLİMİN VE TEKNOLOJİNİN**

6.1.4. İyon Çifti Kromatografisi Denemeleri

6.1.4.1. 10 mM OSASS İçeren Hareketli Faz Denemeleri

Bu çalışmada T lerin azaltılması ve Bölüm 6.1.3.b. de belirtilen safsızlık pikinin 5-CN ile girişiminin ortadan kaldırılması amaçlanmıştır (Şekil-13.).

Tablo-3. de verilen farklı oranlardaki hareketli faz sistemleri ile çalışılmıştır.

a) NIC, 1-DN, 5-CN Standart karışımı kromatogramlarının değerlendirilmesi Standart karışımına ait sonuçlar Tablo-3. de verilmiştir.

Tablo-3. 10 mM OSASS içeren 0,1 M NH₄Ac (pH : 6,0) / ACN hareketli fazının farklı oranlarında NIC, 1-DN ve 5-CN e ait k', T ve R değerleri

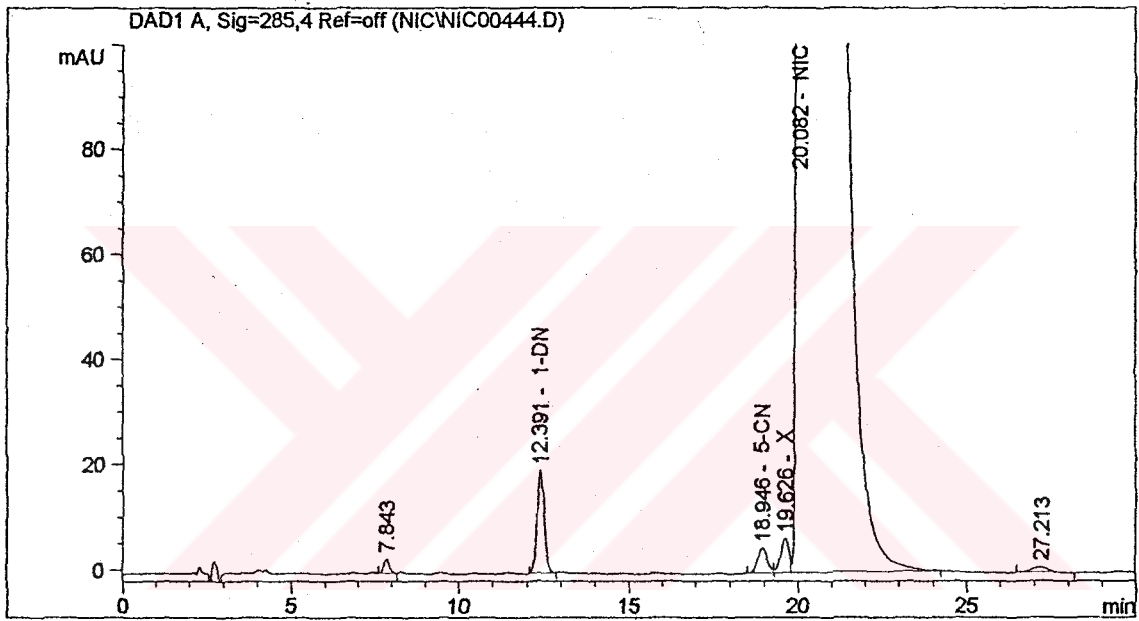
HAREKETLİ FAZ ORANI*	1-DN		5-CN		NIC		R (5-CN / NIC)
	k'	T	k'	T	k'	T	
58 : 42	2,122	1,256	3,514	1,282	3,975	1,272	2,970
60 : 40	2,672	1,244	4,436	1,295	5,034	1,263	3,286
62 : 38	3,580	1,229	6,044	1,266	6,916	1,248	3,723
64 : 36	4,928	1,207	8,433	1,252	9,706	1,250	4,171

* : 10 mM OSASS içeren 0,1 M NH₄Ac (pH : 6,0) / ACN hareketli faz oranı

Tablo-3. deki sonuçlara göre; R için 2,000 den büyük uygun değerler elde edilmiştir. Tablo-2. deki iyon çifti içermeyen hareketli fazla alınan yüksek T değerlerine göre T değerlerinde bağıl olarak önemli bir azalma gözlenmiştir. Örneğin; NIC için önceki koşulda 1,396 (Tablo-2) olan T değeri bu koşulda 1,248 e düşmüştür (Tablo-3). Buna karşın k' lerde artış olmuştur.

b) NIC hammadde aşırı yükleme kromatogramlarının değerlendirilmesi

Tablo-3. de verilen koşullarda, sisteme NIC hammadde aşırı yükleme çözeltisi enjeksiyonu yapıldığında, bilinmeyen safsızlık pikine ilişkin girişimin devam ettiği gözlenmiştir (Şekil-14).



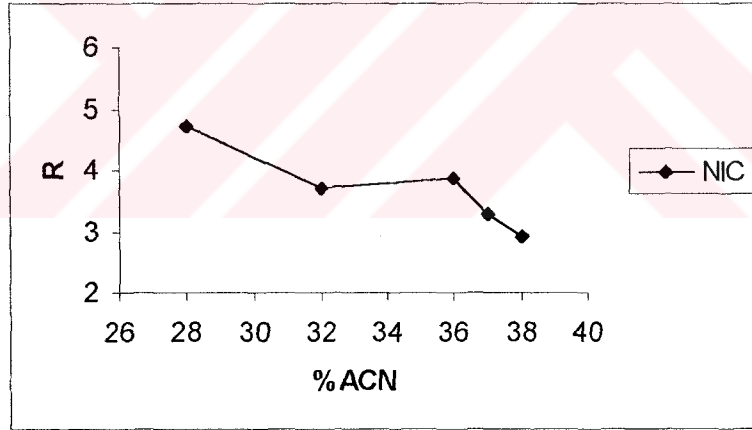
Şekil-14. NIC hammadde aşırı yüklemesinin kromatogramı. Hareketli faz: 10 mM OSASS içeren 0,1 M NH₄Ac (pH : 6,0) / ACN (62 : 38). Dedektör : Agilent 1100 Model DAD λ : 285 nm, bant genişliği : 4 nm. Örnek konsantrasyonu : NIC için 0,71 mg / mL. Diğer koşullar Şekil-9.daki gibi.

6.1.4.2. 4 mM OSASS ve 6 mM TBAHS İçeren Hareketli Faz

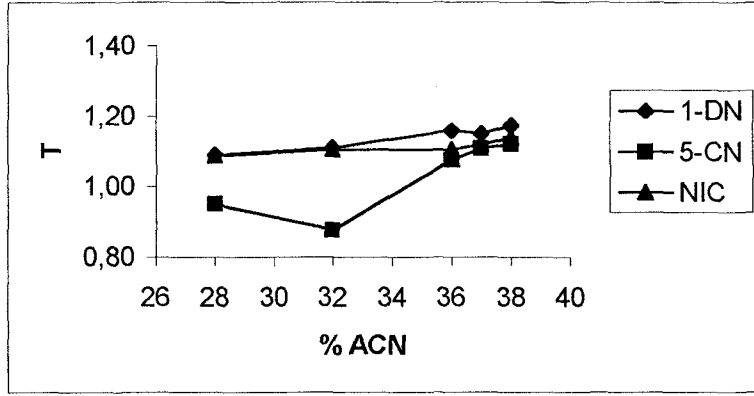
Denemeleri

Her bir madde için k' lerin ve 1,200 den fazla olan T değerlerinin azaltılması amacıyla, ayrıca girişim sorununu ozmek için farklı oranlardaki hareketli faz ve ACN sistemleri ile çalışılmıştır.

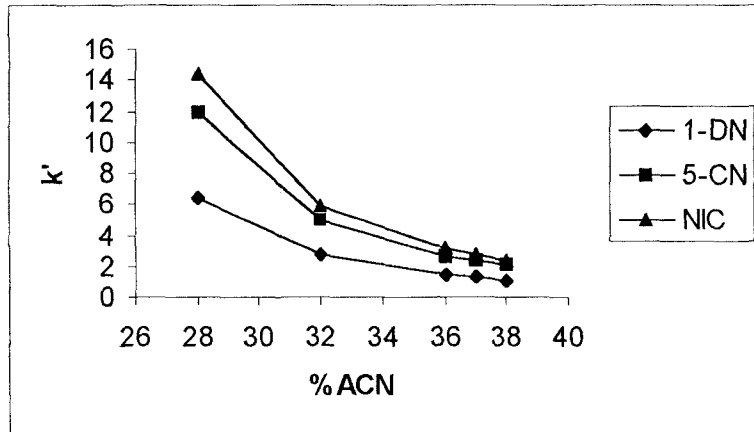
a) NIC, 1-DN, 5-CN Standart karışımı kromatogramlarının değerlendirilmesi Standart karışımına ait sonuçlar Şekil-15.a, b, c de verilmiştir.



Şekil-15.a. 4 mM OSASS ve 6 mM TBAHS içeren 0,1 M NH_4Ac (pH : 5,9) / ACN hareketli fazının farklı oranlarında NIC e ait R değerleri.

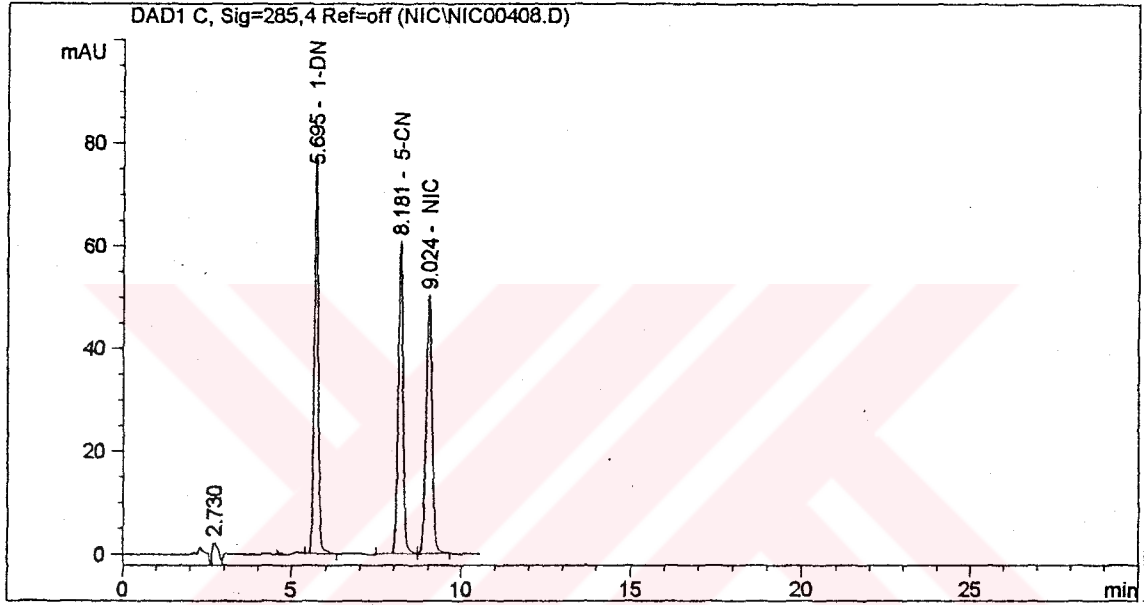


Şekil-15.b. 4 mM OSASS ve 6 mM TBAHS içeren 0,1M NH_4Ac (pH : 5,9) / ACN hareketli fazının farklı oranlarında NIC, 1-DN ve 5-CN e ait T değerleri.



Şekil-15.c. 4 mM OSASS ve 6 mM TBAHS içeren 0,1M NH_4Ac (pH : 5,9) / ACN hareketli fazının farklı oranlarında NIC, 1-DN ve 5-CN e ait k' değerleri.

Şekil-15.a, b, c deki sonuçlara göre; $R > 2,000$ olduğu, k' lerin bağıl olarak düştüğü ve en uygun hareketli faz oranının daha önce saptanan 62 : 38 (Bölüm.6.1.3.a) ile aynı olduğu (Şekil-15.c), buna karşın T değerlerinin bağıl olarak iyileştiği ve 1,200'ün altına düştüğü gözlenmiştir (Şekil-15.b.). En uygun kromatogram Şekil-16. da verilmiştir.

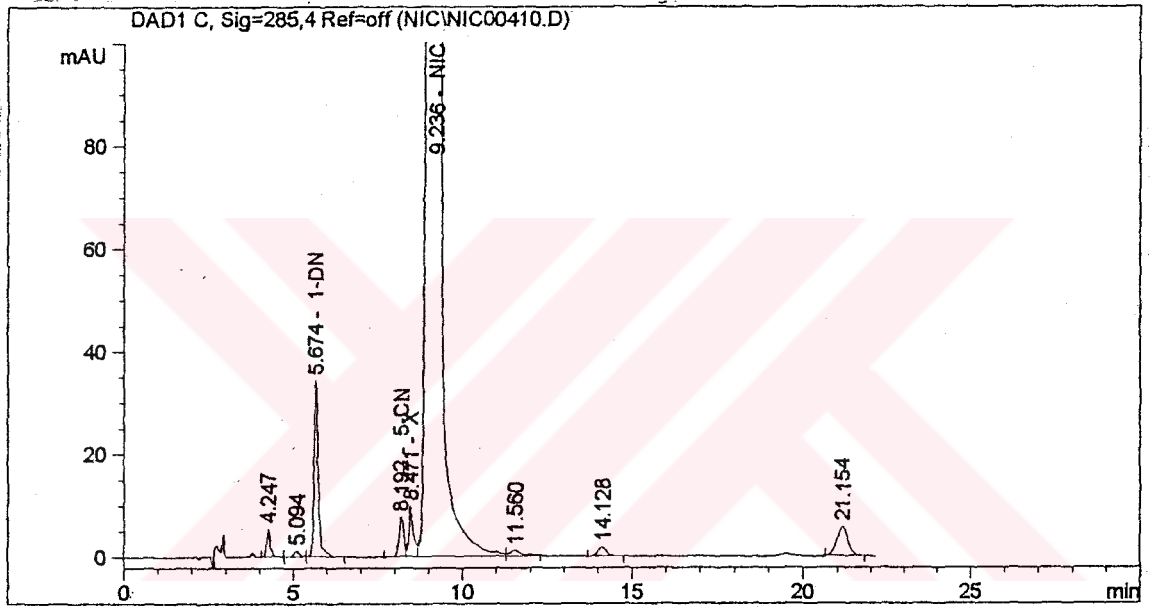


Şekil-16. NIC, 1-DN, 5-CN standart karışımının kromatogramı. Hareketli faz: 4 mM OSASS ve 6 mM TBAHS içeren 0,1 M NH_4Ac (pH : 5,9) / ACN (62 : 38). Dedektör : Agilent 1100 Model DAD λ : 285 nm, bant genişliği : 4 nm. Diğer koşullar Şekil-9.daki gibi.

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

b) NIC hammadde aşırı yükleme kromatogramlarının değerlendirilmesi

Sisteme NIC hammadde aşırı yükleme çözeltisi enjeksiyonu yapıldığında, standartlarla alınan sonuçların uygun olmasına karşın, daha önce belirtilen 5-CN e ilişkin girişim sorununun devam ettiği gözlenmiştir. Buna ilişkin kromatogram Şekil-17.de verilmiştir.

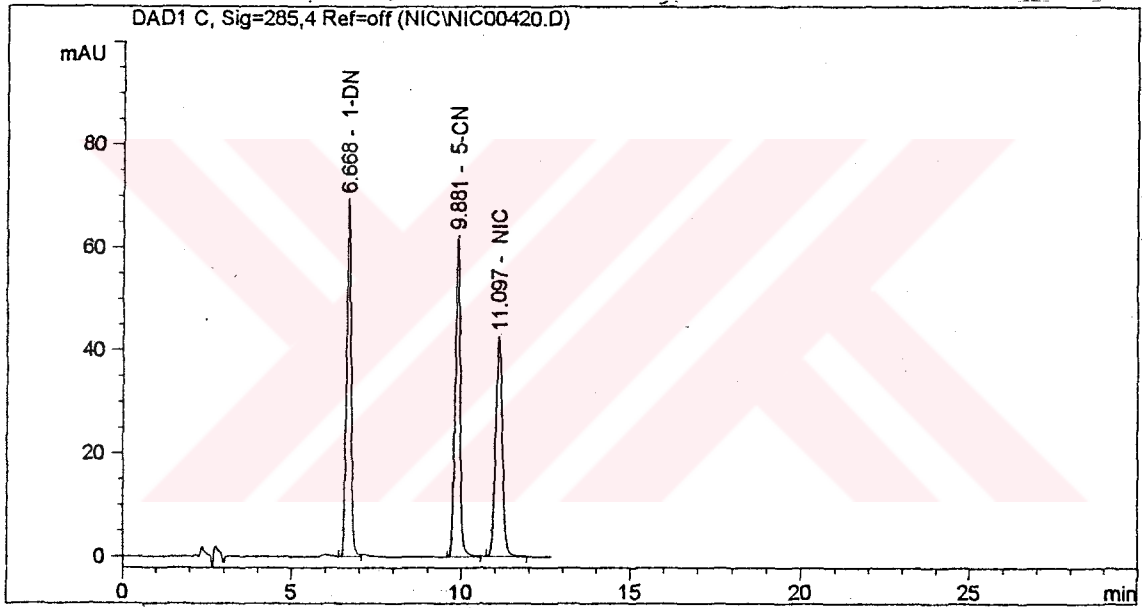


Şekil-17. NIC hammadde aşırı yüklemesinin kromatogramı. Hareketli faz: 4 mM OSASS ve 6 mM TBAHS içeren 0,1 M NH₄Ac (pH : 5,9) / ACN (62 : 38). Dedektör : Agilent 1100 Model DAD λ : 285 nm, bant genişliği : 4 nm. Örnek konsantrasyonu : NIC için 0,71 mg / mL. Diğer koşullar Şekil-9.daki gibi.

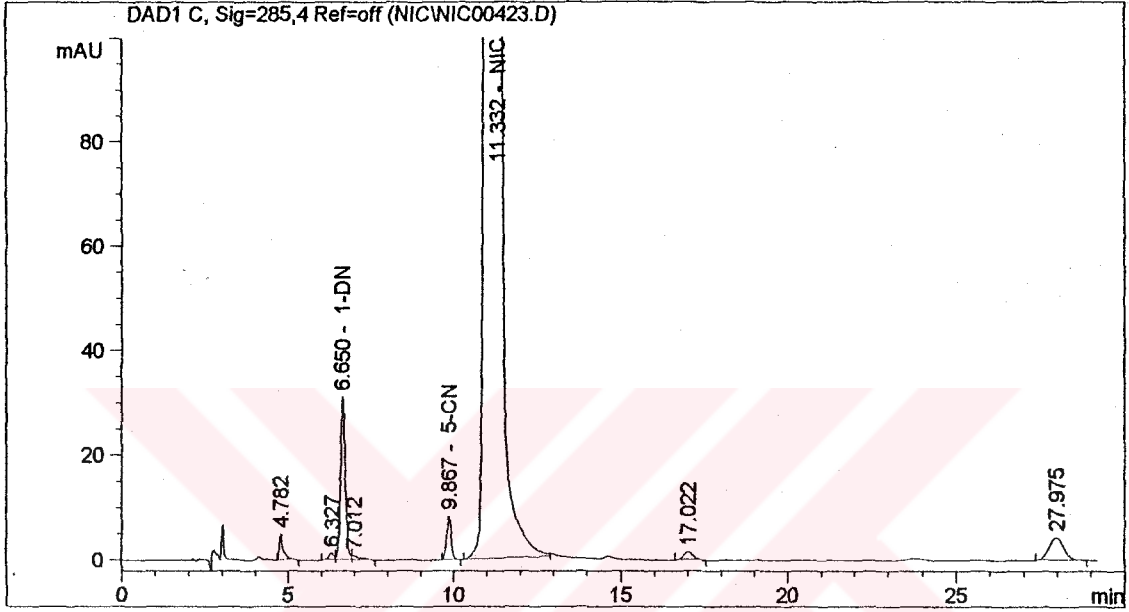
Şekil-17. deki koşulların 1-DN nin kantitatif analizi için uygun olduğuna karar verilmiştir. Daha sonraki çalışmalar bu kromatografik koşullarda yapılmıştır.

Buna karşın 5-CN e girişim sorunu Şekil-17. de görüldüğü gibi devam ettiğinden bu safsızlığın tayini için 4 mM OSASS ve 6 mM TBAHS içeren 0,1 M NH₄Ac (pH : 5,9) / ACN (64 : 36) sistemi daha uygun bulunmuştur. Buna ilişkin kromatogramlar Şekil-18 ve 19. da verilmiştir.

1-DN ve 5-CN için her iki hareketli faza ilişkin pik parametreleri Şekil-15.a, b, c de verilmiştir.



Şekil-18. NIC, 1-DN, 5-CN standart karışımının kromatogramı. Hareketli faz: 4 mM OSASS ve 6 mM TBAHS içeren 0,1 M NH₄Ac (pH : 5,9) / ACN (64 : 36). Dedektör : Agilent 1100 Model DAD λ : 285 nm, bant genişliği : 4 nm. Diğer koşullar Şekil-9.daki gibi.

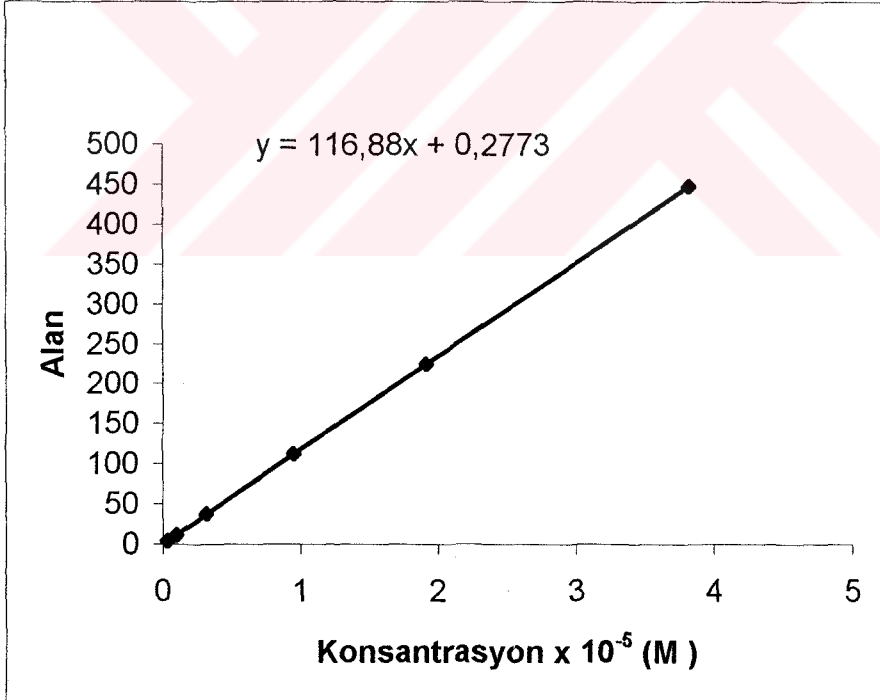


Şekil-19. NIC hammadde aşırı yüklemesinin kromatogramı. Hareketli faz: 4 mM OSASS ve 6 mM TBAHS içeren 0,1M NH₄Ac (pH : 5,9) / ACN (64 : 36). Dedektör : Agilent 1100 Model DAD λ : 285 nm, bant genişliği : 4 nm. Örnek konsantrasyonu : NIC için 0,71 mg / mL. Diğer koşullar Şekil-9.daki gibi.

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOĞRULAMA MERKEZİ

6.2. 1-DN için Ölçü Eğrisinin Hazırlanması

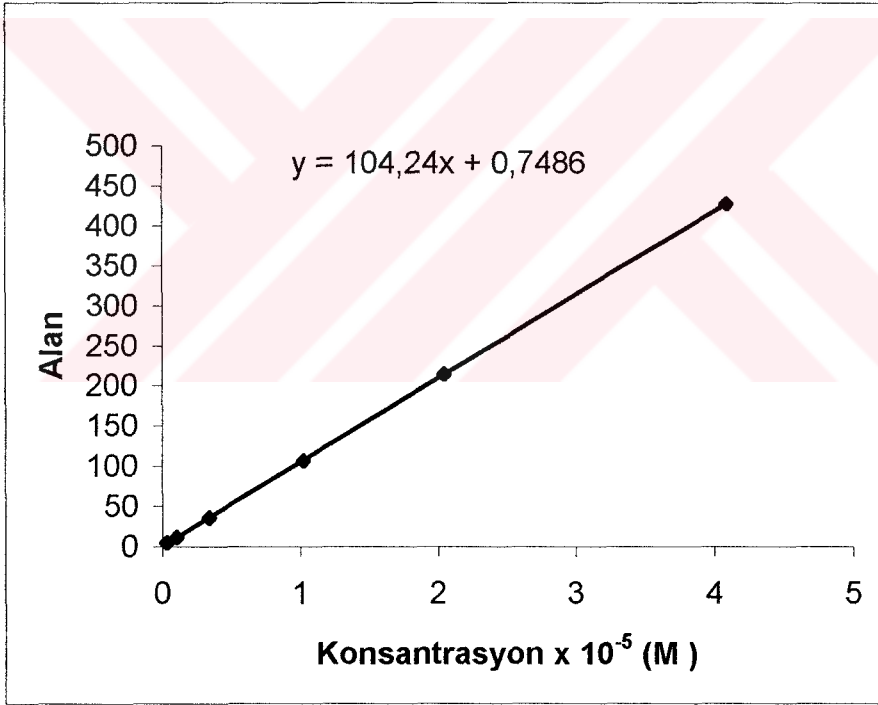
Bölüm 5.3.1.de anlatıldığı gibi hazırlanan 1-DN stok çözeltisinden ($6,38 \times 10^{-4}$ M) 5,15,50,150,300,600 μ L 10 mL'lik balon jöjelere alındı. Her birine 40 μ L DMF eklendi ve 0,1 M NH_4Ac (pH : 6,0) / ACN (62 / 38) ile 10 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan çözeltiler 4 mM OSASS ve 6 mM TBAHS içeren 0,1 M NH_4Ac (pH : 5,9) / ACN (62 / 38) hareketli fazı ile 285 nm (bant genişliği : 4 nm) de C18 kolon kullanılarak 1,0 mL / dak akış hızında 20 μ L enjeksiyon hacminde elue edildi. Bu çalışmalarda her enjeksiyon üç kez yapıldı. Her bir konsantrasyon değeri için 1-DN in pik alanı konsantrasyon değerlerine karşı grafiğe geçirildi (Şekil -20). Çalışma farklı günlerde 3 kez tekrarlandı. Sonuçlar Bölüm 6.4.1.de verilmiştir.



Şekil-20. 4 mM OSASS ve 6 mM TBAHS içeren 0,1 M NH_4Ac (pH : 5,9) / ACN (62 / 38) hareketli fazında 1-DN e ait dedektör alan sinyalinin konsantrasyona karşı grafiği (λ : 285 nm , bant genişliği : 4 nm)

6.3. 5-CN için Ölçü Eğrisinin Hazırlanması

Bölüm 5.3.1. de anlatıldığı gibi hazırlanan 5-CN stok çözeltisi ($6,82 \times 10^{-4}$ M) kullanılarak Bölüm 6.2.de anlatıldığı gibi çalışıldı. Farklı olarak hareketli faz oranı 64 / 36 olarak alındı. Her bir konsantrasyon değeri için 5-CN in pik alanı konsantrasyon değerlerine karşı grafiğe geçirildi (Şekil -21). Çalışma farklı günlerde 3 kez tekrarlandı. Sonuçlar Bölüm 6.4.2. de verilmiştir.



Şekil-21. 4 mM OSASS ve 6 mM TBAHS içeren 0,1 M NH₄Ac (pH : 5,9) / ACN (64 / 36) hareketli fazında 5-CN e ait dedektör alan sinyalinin konsantrasyona karşı grafiği (λ : 285 nm , bant genişliği : 4 nm)

6.4. Geliştirilen Yöntemlerin İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

Yapılan çalışmalar sonucu elde edilen ölçü eğrilerine en küçük kareler yöntemi uygulanarak en uygun doğru denklemi saptandı. Ölçü eğrilerinin hazırlanmasında 6 farklı konsantrasyonda çalışıldı ve her bir konsantrasyon için yapılan 3 enjeksiyona ait ortalama alan değerleri (\bar{A}_n), her bir ayrı çalışma için ortalama pik alanı (\bar{A}), standart sapma (S) ve bağıl standart sapma (RSD) değerleri Tablo-4., Tablo-6. da, bu verilerden elde edilen regresyon sonuçları Tablo-5., Tablo-7. de verilmiştir.

6.4.1. 1-DN için Ölçü Eğrilerinin Regresyon Analizi

Tablo-4. 1-DN için pik alan değerleri

Örnek No	$C \times 10^{-5}$ (M)	\bar{A}_1	\bar{A}_2	\bar{A}_3	\bar{A}	S	RSD
1	0,032	3,90657	3,77599	3,46801	3,71686	0,225	6,058
2	0,096	11,14123	11,27430	10,48512	10,96688	0,422	3,852
3	0,319	40,53880	37,78206	35,72838	38,01641	2,414	6,349
4	0,957	110,85012	116,53339	109,69960	112,36104	3,659	3,256
5	1,914	223,02496	228,25631	222,08814	224,45647	3,324	1,481
6	3,828	447,04878	445,88427	449,26495	447,39933	1,717	0,384

$$y = bx + a$$

$$y = 116,88x + 0,2773$$

$$r^2 = 0,99989$$

Ölçü eğrisine ait regresyon analizi sonuçları (a = kayım, b = eğim) Tablo-5. de verilmiştir.

Tablo-5. Tablo-4 deki ölçü eğrilerinin regresyon analizi

	1	2	3	Ortalama
a	0,6731	1,6421	-1,4832	0,2773
b	116,49	116,66	117,50	116,88
r^2	0,99993	0,99977	0,99996	0,99989

6.4.2. 5-CN için Ölçü Eğrilerinin Regresyon Analizi

Tablo-6. 5-CN için pik alan değerleri

Örnek No	C x 10 ⁻⁵ (M)	\bar{A}_1	\bar{A}_2	\bar{A}_3	\bar{A}	S	RSD
1	0,034	5,39104	4,64192	4,60541	4,87946	0,443	9,087
2	0,102	11,52803	11,43917	11,56519	11,51079	0,065	0,563
3	0,341	36,01123	36,67284	34,77746	35,82051	0,962	2,686
4	1,023	105,12222	108,37595	107,08310	106,86042	1,638	1,533
5	2,046	213,69738	214,43537	214,64495	214,25923	0,498	0,232
6	4,092	428,52851	429,81238	423,67047	427,33712	3,240	0,758

$$y = bx + a$$

$$y = 104,24x + 0,7486$$

$$r^2 = 0,99996$$

Ölçü eğrisine ait regresyon analizi sonuçları (a = kayım, b = eğim) Tablo-7. de verilmiştir.

Tablo-7. Tablo-6 daki ölçü eğrilerinin regresyon analizi

	1	2	3	Ortalama
a	0,4240	0,8840	0,9379	0,7486
b	104,44	104,75	103,52	104,24
r ²	0,99994	0,99999	0,99995	0,99996

6.4.3. 1-DN için Gözleme (Dedeksiyon) ve Kantitatif Tayin Limiti

1-DN için Gözleme (Dedeksiyon) ve Kantitatif Tayin Limiti Bölüm 5.4.3.de verilen bağıntılar kullanılarak hesaplandı. Sonuçlar Tablo-8. de verilmiştir.

Tablo-8. 1-DN için Gözleme (Dedeksiyon) ve Kantitatif Tayin Limiti

Konsantrasyon Aralığı	Gözleme (Dedeksiyon) Limiti	Kantitatif Tayin Limiti
$(0,032-3,828) \cdot 10^{-5} M$	$0,012 \cdot 10^{-5} M$	$0,041 \cdot 10^{-5} M$

6.4.4. 5-CN için Gözleme (Dedeksiyon) ve Kantitatif Tayin Limiti

5-CN için Gözleme (Dedeksiyon) ve Kantitatif Tayin Limiti Bölüm 5.4.3.de verilen bağıntılar kullanılarak hesaplandı. Sonuçlar Tablo-9. da verilmiştir.

Tablo-9. 5-CN için Gözleme (Dedeksiyon) ve Kantitatif Tayin Limiti

Konsantrasyon Aralığı	Gözleme (Dedeksiyon) Limiti	Kantitatif Tayin Limiti
$(0,034-4,092) \cdot 10^{-5} M$	$0,014 \cdot 10^{-5} M$	$0,046 \cdot 10^{-5} M$

6.5. Geliştirilen Yöntemlerin Etken Madde Analizine Uygulanması

6.5.1. Plasebo Tablette 1-DN in Geri Kazanımı

Beş tablete karşılık gelen miktarlarda plasebo tablet (5 x 103,9 mg) + (5 x 30,0 mg) 1-DN tartıldı ve porselen havanda on dakika karıştırıldı. Karışımdan bir tablete karşılık gelen 0,1339 g tartım alındı ve 100 mL'lik balon jöjeye konuldu. 0,1 M NH₄Ac (pH : 6,0) / ACN (62 / 38) ile hacmine tamamlandı. 30 dak manyetik karıştırıcıda karıştırıldı ve 0,2 µm naylon filtreden geçirildi. Buradan alınan 150 µL süzüntüye 40 µL DMF eklendi ve 0,1 M NH₄Ac (pH : 6,0) / ACN (62/ 38) ile 10 mL'ye tamamlandı. Bu işlemler 3 tartım için tekrarlandı. Hazırlanan çözeltiler 4 mM OSASS ve 6 mM TBAHS içeren 0,1 M NH₄Ac (pH : 5,9) / ACN (62 / 38) hareketli fazı ile 285 nm (bant genişliği : 4 nm) de C18 kolon kullanılarak 1,0 mL / dak akış hızında 20 µL enjeksiyon hacminde elue edildi. Her enjeksiyon üç kez yapıldı. Hesaplamalar 30 mg 1-DN ve plasebo tablet üzerinden yapıldı. Sonuçlar Tablo-10. da verilmiştir. İstatistiksel değerlendirme Tablo-11. de yapılmıştır.

Tablo-10. 30 mg 1-DN / plasebo tablette bulunan 1-DN miktarı ve geri kazanımı

n	1-DN (x) (mg / plasebo tablet)	Plasebo tablette 1-DN in geri kazanımı (%)
1	30,13	100,43
2	30,33	101,10
3	30,13	100,43

Tablo-11. Tablo-10. daki sonuçların istatiksels olarak değersendirilmesi

\bar{x}	30,20
S	0,12
RSD	0,38
n	3,00
$\pm t \times S / (n)^{1/2}$	$\pm 0,29$
Güven sınırları (% 95)	29,91-30,48

6.5.2. Etken Madde (NIC) İçindeki 1-DN Miktarının Bulunması

Etken madde (NIC) den 90,0 mg tartım alınarak 40 µL DMF eklendi ve 0,1 M NH₄Ac (pH : 6,0) / ACN (62 / 38) ile 100 mL.ye tamamlandı. 30 dak manyetik karıştırıcıda karıştırıldı ve 0,2 µm naylon filtreden geçirildi. Bu işlemler 3 tartım için tekrarlandı. Hazırlanan çözeltiler 4 mM OSASS ve 6 mM TBAHS içeren 0,1 M NH₄Ac (pH : 5,9) / ACN (62 / 38) hareketli fazı ile 285 nm (bant genişliği : 4 nm) de C18 kolon kullanılarak 1,0 mL / dak akış hızında 20 µL enjeksiyon hacminde elue edildi. Her enjeksiyon üç kez yapıldı. Hesaplamalar 30 mg NIC içeren tablet üzerinden yapılmıştır. Sonuçlar Tablo-12. de verilmiştir. İstatiksels değersendirme Tablo-13. de yapılmıştır.

Tablo-12. 30 mg NIC / tablette bulunan 1-DN miktarı ve yüzdesi

n	NIC içindeki 1-DN miktarı (x) (µg / tablet)	NIC içindeki 1-DN % (ağ / ağ)
1	207,78	0,69
2	211,82	0,71
3	209,34	0,70

Tablo-13. Tablo-12. deki sonuçların istatistiksel olarak değerlendirilmesi

\bar{x}	209,65
S	2,04
RSD	0,97
n	3,00
$\pm t \times S / (n)^{1/2}$	$\pm 5,06$
Güven sınırları (% 95)	204,59-214,70

6.5.3. Plasebo Tablette 5-CN in Geri Kazanımı

Beş tablete karşılık gelen miktarlarda plasebo tablet (5 x 103,9 mg) + (5 x 30,0 mg) 5-CN tartıldı ve porselen havanda on dakika karıştırıldı. Karışımdan bir tablete karşılık gelen 0,1339 g tartım alındı ve 100 mL.lik balon jöjeye konuldu. 0,1 M NH₄Ac (pH : 6,0) / ACN (62 / 38) ile hacmine tamamlandı. 30 dak manyetik karıştırıcıda karıştırıldı ve 0,2 µm naylon filtreden geçirildi. Buradan alınan 300 µL süzüntüye 40 µL DMF eklendi ve 0,1 M NH₄Ac (pH : 6,0) / ACN (62/ 38) ile 10 mL.ye tamamlandı. Bu işlemler 3 tartım için tekrarlandı. Hazırlanan çözeltiler 4 mM OSASS ve 6 mM

TBAHS içeren 0,1 M NH₄Ac (pH : 5,9) / ACN (64 / 36) hareketli fazı ile 285 nm (bant genişliği : 4 nm) de C18 kolon kullanılarak 1,0 mL / dak akış hızında 20 µL enjeksiyon hacminde elue edildi. Her enjeksiyon üç kez yapıldı.Hesaplamalar 30 mg 5-CN ve plasebo tablet üzerinden yapıldı. Sonuçlar Tablo-14. de verilmiştir. İstatiksel değerlendirme Tablo-15. de yapılmıştır.

Tablo-14. 30 mg 5-CN / plasebo tablette bulunan 5-CN miktarı ve geri kazanımı

n	5-CN (x) (mg / plasebo tablet)	Plasebo tablette 5-CN in geri kazanımı (%)
1	30,61	102,03
2	29,68	98,93
3	30,00	100,00

Tablo-15. Tablo-14. deki sonuçların istatiksel olarak değerlendirilmesi

\bar{x}	30,10
S	0,47
RSD	1,57
n	3,00
$\pm t \times S / (n)^{1/2}$	$\pm 1,17$
Güven sınırları (% 95)	28,92-31,27

6.5.4. Etken Madde (NIC) İçindeki 5-CN Miktarının Bulunması

Etken madde (NIC) den 90,0 mg tartım alınarak 40 µL DMF eklendi ve 0,1 M NH₄Ac (pH : 6,0) / ACN (62 / 38) ile 100 mL'ye tamamlandı. 30 dak manyetik karıştırıcıda karıştırıldı ve 0,2 µm naylon filtreden geçirildi. Bu işlemler 3 tartım için tekrarlandı. Hazırlanan çözeltiler 4 mM OSASS ve 6 mM TBAHS içeren 0,1 M NH₄Ac (pH : 5,9) / ACN (64 / 36) hareketli fazı ile 285 nm (bant genişliği : 4 nm) de C18 kolon kullanılarak 1,0 mL / dak akış hızında 20 µL enjeksiyon hacminde elue edildi. Her enjeksiyon üç kez yapıldı. Hesaplamalar 30 mg NIC içeren tablet üzerinden yapılmıştır. Sonuçlar Tablo-16. da verilmiştir. İstatiksel değerlendirme Tablo-17. de yapılmıştır.

Tablo-16. 30 mg NIC / tablette bulunan 5-CN miktarı ve yüzdesi

n	NIC içindeki 5-CN miktarı (x) (µg / tablet)	NIC içindeki 5-CN % (ağ / ağ)
1	27,33	0,09
2	28,06	0,09
3	27,48	0,09

Tablo-17. Tablo-16. daki sonuçların istatiksel olarak değerlendirilmesi

\bar{x}	27,62
S	0,39
RSD	1,40
n	3,00
$\pm t \times S / (n)^{1/2}$	$\pm 0,96$
Güven sınırları (% 95)	26,67-28,58

7. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada NIC in safsızlıkları olan 1-DN ve 5-CN için aynı kromatografik sistemin farklı oranları kullanılarak pik performans parametrelerinin uygun olduğu bir miktar tayini yöntemi geliştirilmiştir.

İlave madde içermeyen bir hareketli faz (0,1 M NH₄Ac / ACN) farklı oranlarda ve pH larda (pH : 4,0; 5,0; 6,0) kullanılmış, sonuçlar pik performans parametreleri açısından kantitatif analize uygun bulunmamıştır.

1-DN ve 5-CN (Şekil-2, 3) halka azotu taşıyan bazik özellikte maddelerdir. Bilindiği gibi bazik maddelerin ters faz HPLC sisteminde ayrılmasında sorunlar vardır (7, 12, 23). Bu sorunların çözümü için çeşitli yöntemler önerilmiştir. Bunlar arasında “end-capped” kolonların (15) kullanılması, hareketli faza trietilamin veya yüzey aktif madde ilavesi vardır. Trietilamin toksik bir maddedir ve uçucu olması nedeniyle her zaman tekrarlanabilir sonuçlar alınamamaktadır. Bu çalışmada “end-capped” kolon ve bir katyonik ajan olan OSASS kullanılmış, buna karşın pik performans parametrelerinde istenilen değerlere ulaşamamıştır.

Son yıllardaki bazı çalışmalarda ise anyonik ve katyonik yüzey aktif maddeler birlikte kullanılmış, yüksek bir ayırma gücü ile tekrarlanabilir sonuçlar ve silanol gruplarına bağlı olmayan bir kolon etkinliği rapor edilmiştir (9). Li ve Fritz, ters faz HPLC sisteminde hareketli faz ilave maddesi olarak yüzey aktif maddelerin ikili ve üçlü karışımlarını kullanmışlar, tek ilave madde içeren veya hiç ilave madde içermeyen karışımlara oranla seçiciliği yüksek sistemler elde etmişlerdir (13). Literatürde anyonik ve katyonik ajanların birlikte kullanıldığı ve birbirine çok benzer yapıdaki cisplatin ve ilişkin bileşiklerin etkin bir şekilde ayrıldığı çalışmalarda rapor edilmiştir (3, 14). Bu çalışmalardaki sistemler temel alınarak yapılan çalışmada, pik performans parametreleri açısından kantitatif analize uygun sonuçlar elde edilmiştir. Bu sonuçlar Tablo-18 de verilmiştir.

Tablo-18. 4mM OSASS ve 6mM TBAHS içeren 0.1M NH₄Ac (pH : 5,9) / ACN hareketli fazının farklı oranlarında NIC, 1-DN ve 5-CN e ait k', T ve R değerleri

HAREKETLİ FAZ ORANI*	1-DN		5-CN		NIC		R (5-CN / NIC)
	k'	T	k'	T	k'	T	
62 : 38	1,114	1,174	2,038	1,120	2,350	1,139	2,920
64 : 36	1,458	1,158	2,643	1,075	3,090	1,106	3,854

* : 4mM OSASS ve 6mM TBAHS içeren 0.1M NH₄Ac (pH : 5,9) / ACN hareketli faz oranı

Bazik maddeler bilindiği gibi asidik ortamda iyonize halde bulunurlar. pH : 6,0 da çalışılan maddeler bağıl olarak iyonize haldedirler. Diğer yandan hareketli faza katılan anyonik ve katyonik ajan kolonun apolaritesini artırmaktadır (12). Buna bağlı olarak iyonize moleküller ilave madde içermeyen hareketli fazla karşılaştırılırsa k' değerleri azalmaktadır. Sonuç olarak 4mM OSASS ve 6mM TBAHS içeren 0.1M NH₄Ac (pH : 5,9) / ACN hareketli fazı ve C18 kolon kullanılarak pik performans parametreleri açısından uygun bir tayin yöntemi geliştirilmiştir.

Bu yöntem kullanılarak yapılan analiz sonuçlarında 1-DN ve 5-CN in ilaç maddesi içindeki oranları % 0,70 ve % 0,09 değerleriyle farmakopeye göre izin verilen % 2,00 nin altında bulunmuştur.

1-DN için önerilen tayin reçetesi:

Etken madde (NIC) den 90,0 mg tartım alınarak 40 µL DMF eklenir ve 0,1 M NH₄Ac (pH : 6,0) / ACN (62 / 38) ile 100 mL'ye tamamlanır. 30 dak manyetik karıştırıcıda karıştırılır ve 0,2 µm naylon filtreden geçirilir. Hazırlanan çözelti aşağıdaki kromatografik koşullarda çalışılır.

Kolon	: Phenomenex, Luna, 5µm, C18 (2), 250 x 4.6 mm
Hareketli faz	: 4 mM OSASS ve 6 mM TBAHS içeren 0,1 M NH ₄ Ac (pH : 5,9) / ACN (62 / 38)
Akış hızı	: 1.0 mL / dak.
Dedektör	: Agilent 1100 Model DAD λ : 285 nm (bant genişliği : 4 nm)
Enjeksiyon hacmi	: 20 µL

Kromatogramdan elde edilen 1-DN pik alanından doğru denklemi kullanılarak ve geri kazanım dikkate alınarak 1-DN konsantrasyonu hesaplanır. Bu sonuç kullanılarak 30 mg NIC içeren tablete göre 1-DN miktarı hesaplanır.

5-CN için önerilen tayin reçetesi:

Etken madde (NIC) den 90,0 mg tartım alınarak 40 µL DMF eklenir ve 0,1 M NH₄Ac (pH : 6,0) / ACN (62 / 38) ile 100 mL'ye tamamlanır. 30 dak manyetik karıştırıcıda karıştırılır ve 0,2 µm naylon filtreden geçirilir. Hazırlanan çözelti aşağıdaki kromatografik koşullarda çalışılır.

Kolon	: Phenomenex, Luna, 5µm, C18 (2), 250 x 4.6 mm
Hareketli faz	: 4 mM OSASS ve 6 mM TBAHS içeren 0,1 M NH ₄ Ac (pH : 5,9) / ACN (64 / 36)
Akış hızı	: 1.0 mL / dak.
Dedektör	: Agilent 1100 Model DAD λ : 285 nm (bant genişliği : 4 nm)
Enjeksiyon hacmi	: 20 µL

Kromatogramdan elde edilen 5-CN pik alanından doğru denklemi kullanılarak ve geri kazanım dikkate alınarak 5-CN konsantrasyonu hesaplanır. Bu sonuç kullanılarak 30 mg NIC içeren tablete göre 5-CN miktarı hesaplanır.

8. KAYNAKLAR

1. Arcari G., Bernardi L., Bosisio G., Coda S., Fregnan G. B., Glasser A.H.: 10- Methoxyergoline derivatives as-adrenergic blocking agents. *Experienta.*, 28: 819-820, 1972.
2. Arcari G., Dorigotti L., Fregnan G. B., Glasser A. H.: Vasodilating and alpha-receptor blocking activity of a new ergoline derivative. *Br. J. Pharmacol.*, 34: 700, 1968.
3. Arıöz F., Dölen E., Yalçın G.: Determination of cisplatin, transplatin and amminetri-chloroplatinate by high performance liquid chromatography in one run using 4-methyl-2-thiouracil as derivatizing agent. *Chromatographia.*, 49 (9/10): 562-566, 1999.
4. Banno K., Horimoto S.: Separation and quantitation of nicergoline and related substances by high- performance liquid chromatography / atmospheric pressure ionization mass spectrometry. *Chromatographia.*, 31 (1/2): 50-54, 1991.
5. Banno K., Horimoto S., Mabuchi M.: Assay of nicergoline and three metabolities in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr.*, 568: 375-384, 1991.
6. Banno K., Matsuoka M., Takahashi R.: Quantitative analysis by thin-layer chromatography with secondary ion mass spectrometry. *Chromatographia.*, 32 (3/4) : 179-181, 1991.
7. Bartha A., Stahlberg J., Vigh G.: Rationalization of the selection of the type of the organic modifier(s) for selectivity optimization in reversed-phase ion-pair chromatography. *J. Chromatogr.*, 485: 403-419, 1989.
8. Brossi A.: *The Alkoloids, Chemistry and Pharmacology*. Vol. 38, s. 142, Academic Press, Inc., San Diago, 1990.
9. De Schutter J. A., De Moerloose P.: Polar contributions of the stationary phase to the reversed-phase ion-pair high-performance liquid chromatographic separation of quaternary ammonium drugs. *J. Chromatogr.*, 437: 83-95, 1988.
10. Flieger M., Cerny A., Rehacek Z., Sedmera P., Stuchlik J., Vokoun J.: Liquid chromatography of semisynthetic ergot preparations I. Nicergoline. *J. Chromatogr.*, 284: 219-225, 1984.

11. Heitz C., Descombes J. J., Miller R. C., Stoclet J. C.: Alpha-adrenoceptor antagonistic and calcium antagonistic effects of nicergoline in the rat isolated aorta. *Eur. J. Pharmacol.*, 123: 279-285, 1986.
12. Helboe P.: Controlling the retention of clopenthixol and other basic drug substances by reversed-phase ion-pair chromatography on bonded-phase materials using two counter-ions of opposite charge. *J. Chromatogr.*, 523: 217-225, 1990.
13. Li X., Fritz J. S.: Mixed surfactants as mobile phase additives for the separations of organic compounds by HPLC. *Anal. Chem.*, 68: 4481-4488, 1996.
14. Macka M., Borak J.: Chromatographic behaviour of some platinum (II) complexes on octadecylsilica dynamically modified with a mixture of a cationic and an anionic amphiphilic modifier. *J. Chromatogr.*, 641: 101-113, 1993.
15. McCalley D. V.: Influence of organic solvent modifier and solvent strength on peak shape of some basic compounds in high-performance liquid chromatography using a reversed-phase column. *J. Chromatogr.*, 708: 185-194, 1995.
16. Miller J. N., Miller J. C.: *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*. Fourth edition, s. 42-44, 107-123, 254, Dorset Press, Great Britain, 2000.
17. Moffat A. C., Jackson J. V., Moss M. S., Widdop B.: *Clarke's isolation and identification of drugs*. Second edition, s. 805, The Pharmaceutical Press, London, 1986.
18. Shintomi K., Ikezawa K., Ishizuka T., Itakura T., Narita H., Ogawa Y., Yamada K., Yamaguchi I., Yoshimoto K.: Pharmacological effects of nicergoline and its metabolites, decomposition products and impurities in animals. *J. Pharmacobio-Dyn.*, 10: 35-48, 1987.
19. Skoog D. A., Leary J. J.: *Principles of Instrumental Analysis*. Fourth edition, s. 584, Saunders College Publishing, USA, 1992.
20. Snyder L. R., Glajch J. L., Kirkland J. J.: *Practical HPLC method development*. Second edition, s. 13-14, Wiley-Interscience Publication, USA, 1997.
21. Tanaka M., Hirai S., Okamoto K., Yoshida T.: Antioxidant properties of nicergoline; inhibition of brain auto-oxidation and superoxide production of neutrophils in rats. *Neuroscience Lett.*, 248: 68-72, 1998.
22. *The United States Pharmacopeia*. USP 26, s. 2134-2136, Taunton MA, USA, 2003.

23. Vervoort R. J. M., Hindriks H., Maris F. A.: Comparison of high-performance liquid chromatographic methods for the analysis of basic drugs. *J. Chromatogr.*, 623: 207-220, 1992.



9. ÖZGEÇMİŞ

1960 yılında Ankara'da doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi 1977 yılında Ankara'da tamamladım. 1982 yılında Orta Doğu Teknik Üniversitesi-Fen ve Edebiyat Fakültesi-Kimya Bölümü'nden mezun oldum.

1982-1991 yıllarında Tek İlaç San. A. Ş.-Kalite Kontrol Laboratuvarı'nda çalıştım. 1992-1994 yıllarında Koçak İlaç A. Ş, Atabay İlaç ve Kimya San. A. Ş.-Kalite Kontrol Laboratuvarı'nda çalıştım. 1994 yılı ağustos ayında Marmara Üniversitesi-Eczacılık Fakültesi-Merkezi Araştırma Laboratuvarı'nda çalışmaya başladım.

2000 yılında Marmara Üniversitesi-Sağlık Bilimleri Enstitüsü-Analitik Kimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans programına başladım. Halen Marmara Üniversitesi-Eczacılık Fakültesi-Merkezi Araştırma Laboratuvarı'nda çalışmaktayım.

SAGLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

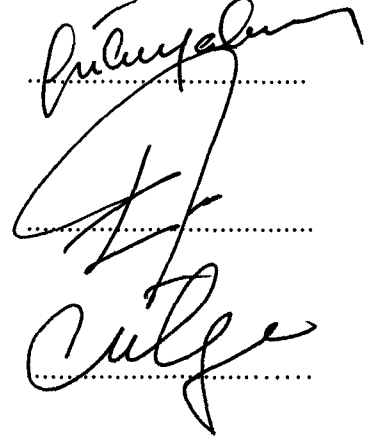
Yüksek Lisans öğrencisi Nuray YÜKTAŞ'ın, çalışması jürimiz tarafından Analitik Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans tezi olarak uygun görülmüştür.

İMZA

Tez Danışmanı : Doç.Dr.Güler YALÇIN
Üniversitesi : Marmara

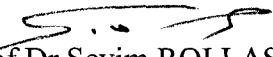
Üye : Prof.Dr.Emre DÖLEN
Üniversitesi : Marmara

Üye : Prof.Dr.Mert ÜLGEN
Üniversitesi : Marmara



ONAY

Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun 06... / 08... / 2003 tarih ve 10... sayılı kararıyla onaylanmıştır.


Prof.Dr.Sevim ROLLAS
Müdür

**İ.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**