

**GÜLSÜM ÇIÇEK**

**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**İSTANBUL-2019**



**T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**( YÜKSEK LİSANS TEZİ )**

**PREGABALİNİN FARMASÖTİK PREPARATLARDA  
ANALİZİ İÇİN YENİ BİR HPLC YÖNTEMİ**

**GÜLSÜM ÇİÇEK**

**DANIŞMAN  
PRO.DR.SIDIKA TOKER**

**ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI  
ANALİTİK KİMYA PROGRAMI**

**İSTANBUL-2019**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAYI**

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı, . Analitik Kimya Programında Yüksek Lisans öğrencisi Gülsüm ÇİÇEK tarafından Prof.Dr.Sıdika TOKER'in danışmanlığında hazırlanan "PREGABALİNİN FARMASÖTİK PREPARATLARDA ANALİZİ İÇİN YENİ BİR HPLC YÖNTEMİ" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından. 22/08/2019 tarihinde yapılan tez savunma sınavında başarılı bulunmuş ve Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.



**Jüri Başkanı**  
Prof.Dr.A.Olcay Sağırlı  
İ.Ü Eczacılık Fakültesi  
Analitik Kimya Anabilim Dalı



**Jüri-Danışman**  
Prof. Dr. Sıdika TOKER  
İ.Ü.Eczacılık Fakültesi  
Analitik Kimya Anabilim Dalı



**Jüri**  
Doç.Dr.Ş.Evrim Tekkeli  
Bezmialem Vakıf Üniversitesi,  
Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya  
Anabilim Dalı

**BEYAN**

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

GÜLSÜM ÇİÇEK

(İmza)



## İTHAF

Aileme ithaf ediyorum...



## TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının yapılmasına olanak sağlayan İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı'na;

Çalışmamım her aşamasında bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösteren çalışmama destek olan danışman hocam Prof. Dr. Sıdıka Ertürk Toker'e;

Destek ve yardımlarını esirgemeyen Doç.Dr.Sena Çağlar Andaç, Arş.Göv.Dr.Gamze Ergin Kızılçay, Arş.Göv.Dr.Ece Merve Yılmaz, Anabilim Dalı Öğretim Üyelerine ve araştırma görevlilerine ;

Bu güne kadar bana emeği geçen bütün hocalarıma;

Bütün hayatım boyunca beni destekleyen,her zaman yanımda olan babam,annem,ablalarım ve kardeşlerime teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI .....	<b>ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.</b>
BEYAN .....	iii
İTHAF .....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER .....	vi
TABLolar LİSTESİ .....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	x
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ .....	xi
ÖZET.....	xiii
iii	
ABSTRACT.....	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Pregabalin.....	3
2.1.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri .....	3
2.1.2. Farmakolojik Özellikleri .....	4
2.1.3. Analiz Yöntemleri .....	5
2.1.3.1. HPLC-UV Yöntemi ile Analizleri .....	5
2.1.3.2. LC-MS/MS Yöntemi ile Analizleri .....	7
2.1.3.3. Spektrofotometrik Yöntemler ile Analizleri .....	9
2.1.3.4. Diğer Yöntemler ile Analizleri .....	11
2.2. FMOC Hakkında Genel Bilgi ve Bu Belirteçle Yapılan Çalışmalar.....	13
2.2.1. FMOC Hakkında Genel Bilgi .....	13
2.2.2. Analiz Yöntemleri.....	13
3.GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	27
3.1.Kimyasal Maddeler ,Çözücüler ve Çözeltiler.....	27
3.1.1.Kimyasal Maddeler ve Çözücüler.....	27
3.1.2.Çözeltiler.....	28
3.2.Aletler ve Diğer Gereçler.....	29

3.3. Analiz Yöntemini Geliştirilmesi ile ilgili Çalışmalar.....	30
3.3.1. Türevlendirme için Reaksiyon Koşullarının İncelenmesi.....	30
3.3.1.1. Fmoc Miktarının Belirlenmesi.....	30
3.3.1.2. pH.....	30
3.3.1.3. Sıcaklık.....	31
3.3.1.4. Reaksiyon Süresi.....	31
3.3.1.5. Glisin Miktarı.....	31
3.3.1.6. Asetonitril/Su Oranı.....	32
3.3.1.7. Türevin Stabilitesi.....	32
3.3.2. Pregabalin'in Türevlerinin HPLC ile Analizi.....	32
3.3.2.1. Dedektör Dalga Boyları Seçimi .....	32
3.3.2.2. Hareketli Faz, Akış Hızı, Kolon Sıcaklığı.....	32
3.3.2.3. İç Standart Seçimi.....	33
3.4. HPLC Yönteminin Validasyonu.....	33
3.4.1. Seçicilik.....	33
3.4.2. Doğrusallık.....	33
3.4.3. Doğruluk.....	34
3.4.4. Gün İçi ve Günler Arası Tekrarlanabilirlik.....	35
3.4.5. Tayin sınırı (LOQ) ve Gözlenebilme sınırı (LOD).....	35
3.5. Kapsülde Pregabalin Miktar Tayini.....	35
3.5.1. HPLC Yöntemi.....	35
3.5.2. Kıyas Yöntemi.....	36
4. BULGULAR.....	37
4.1. Analiz Yönteminin Geliştirilmesi ile ilgili Çalışmalar.....	37
4.1.1. Pregabalin ile Fmoc Arasındaki Reaksiyon Koşullarının İncelenmesi.....	37
4.1.1.1. Fmoc Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	37



4.1.1.2.pH.....	38
4.1.1.3. Sıcaklık.....	39
4.1.1.4.Reaksiyon süresi.....	40
4.1.1.5. Glisin Miktarı.....	41
4.1.1.6. Asetonitril/Su Oranı.....	42
4.1.1.7 Türevin Stabilitesi.....	43
4.1.2. PRE'nin HPLC İle Analizi.....	44
4.1.2.1. Kromatografi Koşullarının Belirlenmesi.....	44
4.1.2.2. İç Standart Seçimi.....	44
4.2.Yöntem Validasyon.....	45
4.2.1.Seçilik.....	45
4.2.2.Doğrusallık.....	45
4.2.3.Doğruluk.....	48
4.2.4.Gün İçi ve Günler Arası Tekrarlanabilirlik.....	49
4.2.5. Tayin sınırı (LOQ) ve Gözlenebilme sınırı (LOD).....	50
4.3. Geliştirilen Yöntemin Kapsüllerde PRE Tayinine Uygulanması ve Sonuçların Kıyas Yöntemi ile Elde Edilenlerle Karşılaştırılması .....	50
5.TARTIŞMA.....	52
KAYNAKLAR.....	55
HAM VERİLER.....	74
FORMLAR.....	75
ETİK KURUL KARARI.....	76
PATENT HAKKI İZİNİ.....	77
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	78
ÖZGEÇMİŞ.....	79

## TABLolar LİSTESİ

<b>Tablo 2.1:</b> FMOc ile Floresans Dedektörlü HPLC kullanılarak Farmasötik Preparat/Biyolojik Ortamlarda Yapılan Tayinler.....	14
<b>Tablo 2.2:</b> FMOc ile Spektrofotometrik Dedektörlü HPLC kullanılarak Farmasötik Preparatlarda/Biyolojik Ortamlarda Yapılan Tayinler.....	24
<b>Tablo 2.3:</b> FMOc ile yapılan diğer çalışmalar.....	26
<b>Tablo 4.1:</b> FMOc konstrasyonuna göre türevin pik alanı değişimi.....	37
<b>Tablo 4.2:</b> Çeşitli pH'larda oluşan PRE-FMOc türevinin pik alanları.....	38
<b>Tablo 4.3:</b> PRE-FMOc türevinin çeşitli sıcaklıklardaki pik alanları.....	39
<b>Tablo 4.4:</b> PRE-FMOc türevlerinin çeşitli sürelerde pik alanları.....	40
<b>Tablo 4.5:</b> Değişik glisin miktarlarından oluşan PRE-FMOc türevlerine ait pik alanları.....	41
<b>Tablo 4.6:</b> Değişik asetonitril-su oranlarından oluşan PRE-FMOc türevlerine ait pik alanları..	42
<b>Tablo 4.7:</b> Oda sıcaklığında ve karanlıkta bekletilen PRE-FMOc türevinin stabilitesi.....	43
<b>Tablo 4.8:</b> PRE'nin 0.5-6 µg/mL konstrasyon aralığında sulu çözeltide hazırlanan ölçü eğrilerine ait pik alan oranları değerleri ve istatistik veriler.....	46
<b>Tablo 4.9:</b> Tablo 4.8 daki ölçü eğrilerinin regresyon analizlerine ait parametreler.....	46
<b>Tablo 4.10:</b> PRE'nin kapsülde geri kazanımı.....	49
<b>Tablo 4.11:</b> PRE'nin gün içi kesinliği.....	49
<b>Tablo 4.12:</b> PRE'nin gün içi kesinliği.....	50
<b>Tablo 4.13:</b> 150 mg PRE içeren kapsüllerin analiz sonuçları ve sonuçların istatistiki olarak değerlendirilmesi.....	51

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1:PRE'nin molekül yapısı.....	3
Şekil 2.2: PRE'nin sulu ortamda 210 nm deki UV-Spektrumu .....	4
Şekil 2.3: FMOC'un molekül yapısı.....	13
Şekil 4.1:PRE ile FMOC arasındaki reaksiyon.....	37
Şekil 4.2:PRE-FMOC türevinin oluşumu üzerine belirteç miktarının etkisi .....	38
Şekil 4.3:PRE-FMOC türevinin oluşumu üzerine pH'nın etkisi.....	39
Şekil 4.4: PRE-FMOC türevinin oluşumu üzerine sıcaklığın etkisi.....	40
Şekil 4.5: PRE-FMOC türevinin oluşumu üzerine süresinin etkisi.....	41
Şekil 4.6: PRE-FMOC türevinin oluşumu üzerine glisin miktarının etkisi.....	42
Şekil 4.7: PRE-FMOC türevinin oluşumu üzerine asetonitril/su oranının etkisi.....	43
Şekil 4.8:Gabapentin'in molekül yapısı.....	44
Şekil 4.9: Boş çözelti enjeksiyonuna ait bir kromatogram.....	45
Şekil 4.10: Mobil faz enjeksiyonuna ait bir kromatogram.....	45
Şekil 4.11:PRE' nin 0.5-6 µg/mL konstrasyon aralığında sulu çözeltide hazırlanan ölçü eğrisi.....	47
Şekil4.12:Doğrusallık konstrasyonlarından 6 µg/mL pregabalin türevine ait kromatrogram.....	47
Şekil 4.13:Doğrusallık konstrasyonlarından 3 µg/mL pregabalin türevine ait kromatrogram.....	48
Şekil 4.14:Doğrusallık konstrasyonlarından 0,5 µg/mL pregabalin türevine ait kromatrogram.....	48

**SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ**

PRE:Pregabalin

GABA:Gabapentin,  $\gamma$ -aminobütirik asit

HPLC (LC):Yüksek performanslı(basınçlı) sıvı kromatografisi

UPLC:Ultra performanslı sıvı kromatografisi

FMOc:9-Fluorenilmetil kloroformat

LOD:Gözlenebilme Sınırı

LOQ:Tayin Sınırı

NBD-F:4-floro-7-nitrobenzofurazan

NBD-Cl:4-kloro-7-nitrobenzofurazan

IS:İç Standart

ACN: Asetonitril

LC: Sıvı kromatografisi

GC:Gaz Kromatografisi

LC-ESI/MS:Elektrosprey İyonizasyonlu Kütle Spektrometrisi/Sıvı Kromatografisi

GC-MS:Kütle Spektrofotometrik Dedektörlü Gaz Kromatografisi

$\lambda_{max}$ :Maksimum dalga boyu

MS:Kütle Spektrometrisi

CE-TOF-MS: Uçuş Zamanlı Analizörlü Kütle Spektrometresi/Kapiler Elektroforez

LLE:Sıvı-sıvı ekstraksiyon

SPME:Katı faz mikro ekstraksiyon

SPE:Katı faz ekstraksiyon

DLLME: Dispersif sıvı-sıvı mikro ekstraksiyon

Eks:Ekstraksiyon

Ext:Eksitasyon

Emi:Emisyon

Dak:Dakika

$\mu$ :Mikro

$\mu$ mol:Mikromol

ng:Nanogram

pg:Pikogram

ppm:Milyonda bir

mM: milimolar

DAD:Diyod Sıralı Dedektör

UV:Ultraviyole (Mor ötesi)

MeCN:Asetonitril

$K_2HPO_4$ :Di-potasyumhidrojen fosfat

$KH_2PO_4$ :Potasyum dihidrojen fosfat

$NH_4Ac$ : Amonyum asetat

mg:Miligram

mL:Mililitre

$\mu$ L:Mikrolitre

RP:Ters faz kolon

ODS( $C_{18}$ ): Oktadesil silan

HPLC/ESI-MS: Elektrosprey İyonizasyonlu Kütle Spektrometrisi/Sıvı Kromatografisi

THF:Tetrahidrafuran

TEA:Trietilamin

RSD:Bağıl Standart Sapma

S,SD:Standart sapma

$C_8$ :Oktil

o- $H_3PO_4$ :Ortafosforik asit

OPA:o-ftaldialdehid

h:Hacim

## ÖZET

Çiçek, G. (2019). Pregabalinin Farmasötik Preparatlarda Analizi İçin Yeni Bir Hplc Yöntemi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı. Yüksek Lisans. İstanbul.

Pregabalin epilepsi, nöropatik ağrılar, anksiyete bozukluğu, sosyal anksiyete bozukluğu ve kısmi başlangıçlı nöbetlerde ek tedavinin parçası olarak kullanılan bir ilaçtır. Bu çalışmada molekül yapısının doymuş olması sebebiyle yeterli ışık absorpsiyonu göstermeyen pregabalinin kapsüllerde tayini için florimetrik dedektörün kullanıldığı bir yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi geliştirilmiştir. Yöntem, Pregabalin'in içerdiği primer amin grubunun 9- fluorenilmetil kloroformat belirteci ile verdiği reaksiyona dayanmaktadır. Bu yöntemde maddenin FMOC belirteci ile reaksiyon verdiği optimum koşullar; asetonitril/su faz oranının 4 olduğu pH:9 tamponlu ortamda 60°C sıcaklıkta 5 dakika süre ısıtmayla elde edilmiştir. Pregabalin-FMOC türevinin kromatografik analizi C<sub>18</sub> kolonda; 20 mM potasyum fosfat tamponu (pH:3.9)-asetonitril (70:30, h/h) hareketli fazı ile 1.0 mL/dak akış hızında gerçekleşmiştir. İç standart olarak gabapentin kullanılmış ve türevin takibi floresans dedektör ile 260 nm eksitasyon 315 nm emisyon dalga boylarında yapılmıştır. Maddenin doğruluk aralığı 0.5-6.0 µg/mL, gözlenebilme ve tayin sınırı sırasıyla 0,039 µg/mL ve 0,117 µg/mL olarak bulunmuştur. Geliştirilen yöntem pregabalinin kapsüllerdeki analizine başarıyla uygulanmış ve sonuçlar Student-t ve Fisher-F testleri uygulanarak istatistiksel olarak farmakope yöntemi ile elde edilenlerle karşılaştırılmıştır.

Anahtar Kelimeler : Pregabalin, FMOC, HPLC-fluoresans dedektör, Türevlendirme, İlaç Analizi

## ABSTRACT

Çiçek,G. (2019). A New HPLC Method for the Analysis of Pregabalin in Pharmaceutical Preparations. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Analytical Chemistry. Master Thesis. İstanbul.

Pregabalin is a drug used as an adjunctive treatment in epilepsy, neuropathic pain, anxiety disorder, social anxiety disorder and partial onset seizures. In this study, a high performance liquid chromatography method was developed for the determination of pregabalin in tablets which does not show sufficient light absorption due to saturated molecular structure. The method is based on the reaction of the primary amine group of Pregabalin with the 9-fluorenylmethyl chloroformate reagent. In this method, the optimum conditions in which the substance reacts with the Fmoc reagent are; acetonitrile / water phase ratio of 4: pH: 9 buffer medium at 60 ° C was obtained by heating for 5 minutes. Chromatographic analysis of pregabalin-Fmoc derivative was carried out in C18 column with 20 mM potassium phosphate buffer (pH: 3.9) - acetonitrile (70:30, v / v) at a flow rate of 1.0 mL / min. Gabapentin was used as the internal standard and the derivatives were monitored by fluorescence detector at 260 nm excitation and 315 nm emission wavelengths. The linearity range of the substance was 0.5-6.0 µg / mL, the limit of observability and determination were 0.039 µg / mL and 0.117 µg / mL, respectively. The developed method was successfully applied to the analysis of pregabalin in tablets and the results were compared with those obtained by the pharmacopoeia methods by applying Student-t and Fisher-F tests.

Key Words: Pregabalin, Fmoc, HPLC-fluoresans dedektor, Derivatization, Drug Analysis

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Pregabalin (PRE) epilepsi, nöropatik ağrılar, anksiyete bozukluğu, sosyal anksiyete bozukluğu ve kısmi başlangıçlı nöbetlerde genellikle birleşik tedavinin bir parçası olarak kullanılır.

Epilepsi nöbeti (yada krizi), beyin normal aktivitesinin, sinir hücrelerinde geçici olarak meydana gelen anormal elektriksel aktivite sonucu bozulması ile oluşan klinik bir durumdur. Epilepsi yaygın bir hastalıktır. Ülkemizde ve dünyada görülme sıklığı, % 0,5 ile %1 arasındadır. Cinsiyetler arasında epilepsi hastalığının görülme oranında herhangi bir farklılık yoktur. Epilepsi herhangi bir yaş ve zamanda ortaya çıkabilmektedir; fakat ilk 16 yaşa kadar ve 65 yaşından sonra görülme sıklığı artmaktadır. Çocuklarda 16 yaşa kadar en fazla görülen nörolojik hastalık epilepsidir. Halk arasında “Sara Hastalığı” olarak da bilinen epilepsi, kendini epileptik nöbetler ile göstermektedir. Epileptik nöbet gerçekleştiğinde hastada kısa süreli bilinç kaybı veya farklı özelliklerde belirtiler olmaktadır [1].

Anksiyete bozukluğu; bireyde ortaya çıkan kaygı, korku gibi durumlara bedensel ve davranışsal tepkilerin de eklenmesi ile ortaya çıkan klinik tablodur. Kişi, kaygı duygusuyla birlikte olaylar karşısında aşırı tepkiler vermektedir. Kişinin kendine olan güven yetersizliği, kendisini yeteneksiz birisi olarak algılaması ve bunun gibi olumsuz düşüncelerin ortaya çıkması olaylar karşısında daha orantısız tepkiler vermesini arttırmaktadır. Anksiyete bozukluğu tanısı alan bireylerde genel bir huzursuzluk, çabuk sinirlenme, gergin duruş, yerinde duramama gibi davranışlar söz konusudur. Hastaların sesinde heyecanlı bir titreklilik mevcuttur. Düşünce içeriğinde ise belirli bir bozukluk söz konusu olmayıp endişeler fazladır. Anksiyete bozukluğu alt başlıklara ayrılarak sınıflandırılır. Bunlar panik bozukluğu, obsesif kompulsif bozukluk, yaygın anksiyete bozukluğu, özgül fobi, sosyal fobi, travma sonrası stres bozukluğu, akut stres bozukluğu genel tıbbi duruma bağlı anksiyete bozukluğudur [2].

PRE doymuş molekül yapısı nedeniyle UV-visibl alanda yeterli ışık absorpsiyonu göstermemektedir. Bu nedenle rutin ilaç laboratuvarlarında ilaç analizlerinde en fazla kullanılan yöntem olan yüksek performanslı sıvı kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) yöntemi ile kolaylıkla analizi yapılamamaktadır. UV-visibl veya diyot sıralı dedektörlü HPLC ile 200-210 nm de



yapılmış ve yayınlanmış yöntemler olmakla beraber bu yöntemlerde çalışılan dalga boyları pregabalinin maksimum dalga boyları değil de absorpsiyonunun artış çizgisinde olan dalgaboyları olduğundan doğruluk ve tekrarlanabilirliği iyi olamayan sonuçlar vermesi muhtemeldir.

Bu çalışmada PRE'nin kapsulde tayini için, doğru, güvenilir, seçici ve hassas bir floresans dedeksiyonlu HPLC yöntemi geliştirilmesi amaçlanmıştır. Geliştirilen yöntem primer ve sekonder aminlerin türevlendirilmesinde sık kullanılan 9-Fluorenilmetil kloroformat (FMOC) belirteci ile PRE'nin floresans gösteren bir türev oluşturmasına dayanmaktadır. Bu yöntem rutin ilaç laboratuvarlarında PRE'nin doğru, kesin ve hassas sonuçlarla kolaylıkla analiz edilmesine olanak sağlayacak yeni bir HPLC yöntemidir.

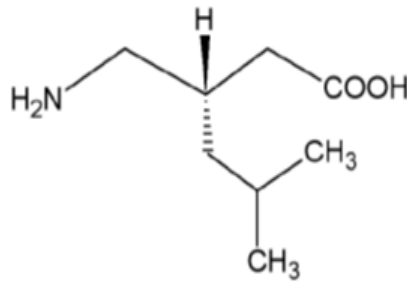
## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Pregabalin

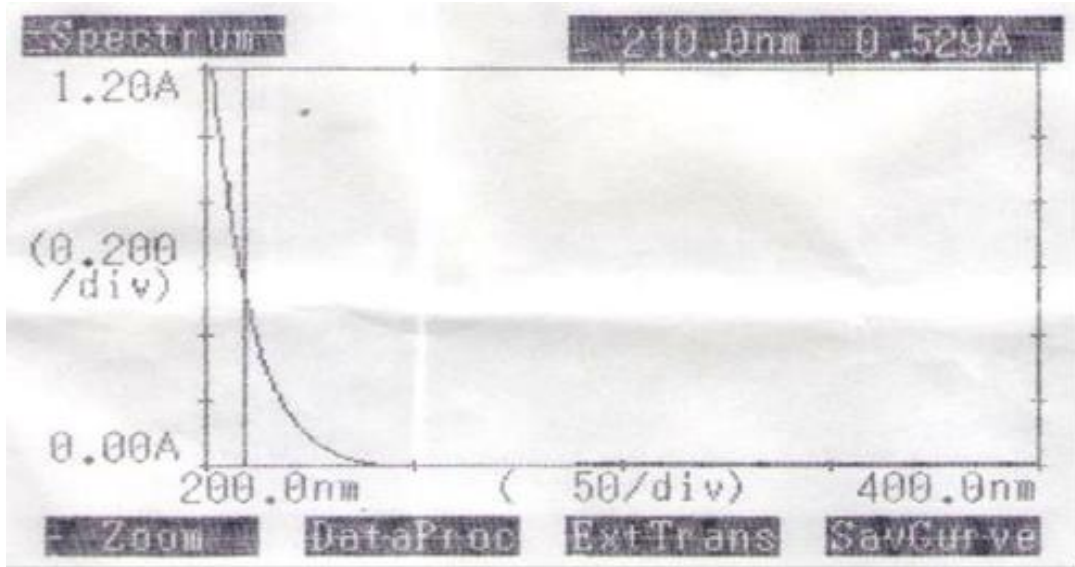
Pregabalin 1980'li yıllarda Richard B. Silverman tarafından kan-beyin bariyerini geçebilmesi için  $\gamma$ -aminobütirik asit (GABA) yapısına alifatik yan zincir eklenmesiyle, lipofilik bir analog olarak sentezlenmiştir. 2004 yılında ABD'de diyabetik nöropatik ağrı, postherpetik nevralji ve epilepsi tedavisinde ek ilaç endikasyonlarını almıştır. Aynı yıl, Avrupa'da da periferik nöropatik ağrı ve epilepsi tedavisinde ek ilaç endikasyonları almıştır. 2007 yılında ABD'de fibromiyalji tedavisi amacıyla ilk endikasyon alan ilaç olmuştur. 2012 yılında spinal kord zedelenmesine bağlı nöropatik ağrı tedavisi için endikasyonu onaylanmıştır [3].

#### 2.1.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikler

PRE kimyasal adı; (S)-3-(aminometil)-5-metil heksanoik asitdir. Beyaz renkte,  $pK_{a1}$ 'i 4,2 ve  $pK_{a2}$ 'si 10,6 olan kristal bir katıdır. Kapalı formülü  $C_8H_{17}NO_2$  olan pregabalinin molekül ağırlığı 159.229 g/mol dir. Suda, bazik ve asidik sulu çözeltilerde çözünür. Kaynama noktası  $274^{\circ}C$ , erime noktası  $186-188^{\circ}C$  arasındadır [4-9].



Şekil 2-1: Pregabalin'in molekül yapısı



**Şekil 2.2: PRE'nin sulu ortamda 210 nm deki UV-Spektrumü [9]**

### 2.1.2. Farmakolojik Özellikleri

PRE Farmakoterapötik olarak antiepileptikler grubundadır. Pregabalin, santral nöral ağ içinde epilepsi nöropatik ağrı,anksiyete gibi durumlarda aktivite gösteren, yeni tanımlanmış etki mekanizması olan bir bileşiktir. PRE analjezik, antikonvülsan ve anksiyolitik etkileri olan nörotransmitter GABA'nın bir analogudur. PRE diyabetik periferik nöropati, postherpetik nevralji, genelleştirilmiş hastaların tedavisinde çalışılmıştır. Anksiyete bozukluğu ve sosyal anksiyete bozukluğu ve kısmi başlangıçlı nöbet geçiren erişkinlerde ek tedavi olarak kullanılır. PRE presinaptik voltaj bağımlı kalsiyum kanallarının  $\alpha 2-\delta$  alt ünitelerine bağlanıp, bu etkiyle kalsiyum kanal yapısında konformasyonel değişikliğe neden olarak hücre içine kalsiyum girişini azaltır. Bu sayede aşırı uyarılmış nöronlarda noradrenalin, glutamat, P-maddesi ve kalsitonin geniyle ilişkili peptid gibi nöroeksitatuvar nörotransmitterlerin salıverilmesini azaltır ve hücrenin normal fizyolojik duruma dönmesini sağlar. Belirlenen endikasyonlarda ağız yoluyla alınan günlük doz yetişkinlerde 150-600 mg dır. Sağlıklı gönüllülerde yapılan çalışmalarda PRE'nin oral biyoyararlanımı %90 dır [3,10,11].

Kan-beyin bariyeri ve hücre zarını, L-amino asit taşıma sistemi olan özel L-transport sistemi ile geçmektedir.Kısa bir dağılım fazı sonrası yaklaşık 1,3 saatte maksimum konsantrasyona ulaşır, ortalama yarı ömür 4,6-6,8 saattir. İnsanlarda pregabalin'in %98'i değişmeden, %0,9'u N-metillenmiş türevi olarak idrar yoluyla, %0,1 den az bir kısmının ise feçesle atıldığı bildirilmiştir. PRE tedavisi alanlarda en

fazla görülen yan etkiler baş dönmesi ve uyku hali, daha az; baş ağrısı, vertigo, ataksi, kilo alma ve ağız kuruluğu şeklindedir. Görülen yan etkiler 300 mg/gün üzerindeki dozlarda doza bağımlı olarak artmaktadır [11].

### 2.1.3. Analiz Yöntemleri

#### 2.1.3.1. HPLC Yöntemi ile Analizleri

Potluri, H. ve arkadaşları [12] yoğun ve kombine ilaç formülasyonlarında nortriptylin ve PRE'nin yan yana tayini için bir HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Bu çalışmada karışım C<sub>18</sub> (250mm x 4.6 mm, 5m) kolonda, perklorik asit (% 0,1) ve asetonitril (55:45) içeren mobil faz ile ayrılmıştır. Dedeksiyon UV dedektör ile 210 nm'de gerçekleştirilmiştir. PRE için doğrusallık aralığı 37,5-225 µg/ml ve geri kazanımı % 100.59-101.74 aralığında bulunmuştur.

Yoshikawa, N. ve arkadaşları [13] insan plazmasındaki PRE tayini için UHPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Analiz bazik ortamda 60°C de 1 dakika süre ile 4-floro-7-nitrobenzofurazan (NBD-F) belirteci ile reaksiyona dayanmaktadır. Elüsyon C<sub>18</sub> kolonunda, fosfat tamponu (pH 2)-metanol-asetonitril (60:20:20) izokritik mobil faz sistemi ile gerçekleşmiştir. Türev 470 nm eksitasyon ve 530 nm emisyon dalga boylarında takip edilmiştir. Yöntemin doğrusallığı 0,05-10 µg/mL ve geri kazanımı % 98.3-99.8 aralığında bulunmuştur.

Martinc, B. ve arkadaşları [14] plazmada gabapentin, PRE, vigabatrin ve topiramatin yan yana analiz için floresans dedektörlü bir HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Analitleri türevlendirmesi 4-kloro-7-nitrobenzofurazan (NBD-Cl) ile bazik ortamda gerçekleştirilmiş, PRE için doğrusallık aralığı 0.375–30.0 µg/mL olarak tayin edilmiştir. Dedeksiyonda sırasıyla uyarma ve emisyon dalga boyu olarak 470 ve 530 nm kullanılmıştır.

Souri, E.ve arkadaşları [15] PRE'nin farmasötik dozaj formalarında tayini için yine HPLC yöntemi geliştirmişler. Sabit faz olarak Nova-Pak C<sub>18</sub> kolonunun ve mobil faz olarak asetonitril-(50mM) sodyum dihidrojen fosfat tamponunun (60:40; h/h) kullanıldığı yöntemde türevlendirme ajanı olarak 1-fluoro-2,4-dinitrobenzen kullanılmıştır. Doğrusallık aralığı 1.0-100.0 µg/mL olan yöntemin gün içi ve günler arası kesinlik değerleri %0.84-1.98 arasında bulunmuştur. Dedeksiyon UV dedektör ile 360 nm'de gerçekleştirilmiştir.

Kasawar, GB. ve arkadaşları [16] kapsüllerdeki PRE'ni tayin etmek için bir HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Analizde sabit faz olarak C<sub>8</sub> kolonu, mobil faz olarak fosfat tamponu (pH 6.9)-asetonitril (95:05, h/h) kullanmışlardır. Yöntemin doğrusallık aralığı 0.5-1.5 mg/mL, LOQ değeri ise 0,6 mg/mL bulunmuştur. Dedeksiyon diyot sıralı dedektör ile 200 nm de gerçekleştirilmiştir.

Martinc, B. ve arkadaşları [17] PRE'in farmasötik dozaj formlarında fluorescamin ile türevlendirerek HPLC yöntemi ile tayinini yapmışlardır. Türevlendirme oda sıcaklığında 5 dakika gerçekleştirilmiş ve türevin ayrılması C<sub>18</sub> kolonda ve mobil faz olarak %0.2 trietilenamin karışımı içeren metanol-su (10:90, h/h) karışımı ile sağlanmıştır. Yöntemin doğrusallık aralığı 0,125-250 µg/mL olarak bulunmuş ve yöntemde iç standart olarak 3-Aminopentanoik asit kullanılmıştır.

Gujral, RS. ve arkadaşları [18] PRE'in farmasötik formülasyonlarda ve insan idrarında tayini için ters fazlı bir HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Analizde C<sub>18</sub> kolon, asetonitril ve metanol-(0,02M) di-potasyumhidrojen fosfat tamponu (pH 7.0) (3:1:16, h/h/h) hareketli fazı kullanılmıştır. Yöntemin doğrusallığı 0,75-6,00 µg/mL aralığında LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0,669 ve 0,221 µg/mL olarak bulunmuştur. Dedeksiyonu UV dedektör ile 210 nm'de gerçekleştirilmiştir.

Chen, X. ve arkadaşları [19] PRE'in optik saflığını belirlemek için bir HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Yöntemde PRE N-5-floro-2,4-dinitrofenil-5-L-alanin ile türevlendirilmiş, türevlendirme reaksiyonu pH 7'de 40°C de bir saat bekletilerek gerçekleştirilmiştir. Türevin ayrılması C<sub>18</sub> kolonda, fosfarik asit-asetonitril (55:45, h/h) mobil fazı ile gerçekleşmiş ve yöntemin doğrusallık aralığı  $5.01 \times 10^{-6}$ – $1.02 \times 10^{-4}$  g/mL arasında bulunmuştur. Dedeksiyon UV dedektör ile 340 nm'de gerçekleştirilmiştir.

Jadhav, AS. ve arkadaşları [20] PRE'in R enantiyomerini Marfey'in reaktifi ile türevlendirerek LC yöntemi ile tayin etmişlerdir. Türevlendirme oda sıcaklığında 5 dakikada gerçekleşmiş ve yöntemde stasyonier faz olarak C<sub>18</sub> kolon ve mobil faz olarak ortofosforik asit (pH 3.5)-asetonitril (60:40, h/h) karışımı kullanılmıştır. Yöntemin doğrusallığı 750-7500 ng/L arasındadır. Türevin dedeksiyonu 340 nm de gerçekleştirilmiştir.

Vermeij, TAC. ve arkadaşları [21] serumdaki PRE, gabapentin ve vigabatrin'i o-ftaldialdehid (OPA) ile türevlendirerek yan yana HPLC yöntemi ile analiz etmişlerdir. Yöntemde iç standart olarak Norvalin kullanılmış, reaksiyon borat tamponlu (pH 10)

ortamda 1 dakika bekletme ile gerçekleşmiştir. PRE'in doğrusallık aralığı 0.13-40 mg/L ve LOD değeri 0,044 mg/L dir. Analizde C<sub>18</sub> kolon, metanol-asetonitril-fosfat tamponu karışımı mobil faz kullanılmış ve dedeksiyonun uyarma ve emisyon dalga boyları sırasıyla 330 ve 450 nm de gerçekleşmiştir.

Parameswari, SA. ve arkadaşları [22] kombine tablet formlarında epalrestat ve PRE'nin yan yana analizi için basit, hassas, doğru ve kararlı bir RP-HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Yöntemde mobil faz olarak %0.1 orto fosforik asit-asetonitril (55:45 h/h), sabit faz olarak STD Discovery kolonu kullanılmıştır. Pregabalin için sonuçların 18.75-112.5 µg/mL aralığında doğrusal olduğu bulunmuştur. Dedeksiyon PDA dedektör ile 244 nm'de gerçekleştirilmiştir.

### **2.1.3.2. LC-MS/MS Yöntemi ile Analizleri**

Karinen, R. ve arkadaşları [23] kandaki antiepileptik ilaçlar ve iki aktif metabolitinin tespiti için ters fazlı UPLC-MS-MS yöntemini geliştirmişlerdir. Analiz asidik ortamda yapılmış ayrılma Acquity UPLC® BEH Fenil (2.1 mm x 100 mm, 1.7 µm) kolonunda 5 Mm amonyum bikarbonat tamponu(pH 7.9)-metanol mobil faz ile gradyan elüsyon yaparak ayrılma gerçekleştirilmiştir. PRE için doğrusallık aralığı 0.4-16 mg/L olarak bulunmuştur. Yöntemin LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0.080 mg/L, 0.20 mg/L'dir.

Kostic, N. ve arkadaşları [24] kurutulmuş kan ve plazma noktalarında PRE'in saptanması için bir LC-MS-MS yöntemi geliştirmişlerdir. Yöntemde ön işlem olarak sıvı-sıvı ekstraksiyonu yapılmış, ekstraksiyon bazik ortamda gerçekleştirilmiştir. İç standart olarak 4-aminosikloheksankarboksilik asit kullanılmıştır. Stasyonier faz olarak YMC-Pack C<sub>18</sub> kolon (50mm×4.0mm, 3µm) ve mobil faz olarak asetonitril-(%0,15) formik asit (85:15, h/h) karışımı kullanılmıştır. Doğrusallık aralığı kurutulmuş kan noktaları için 0.200–20.0 µg/mL ve kurutulmuş plazma örnekleri için 0.400–40.0 µg/mL olarak bulunmuştur.

Hegstad, S. ve arkadaşları [25] idrarda süistimal edilerek kullanılmış ilaçların tespiti için UPLC-MS-MS yöntemi geliştirmişlerdir. Analizde Stasyonier faz olarak Acquity HSS T3 kolonu (2.1 mm ID × 100 mm, 1.8 µm) kullanılmış, mobil faz olarak methanol-asetonitril-isopropanol-su-formik asit karışımı gradiyet program ile uygulanmıştır. Pregabalin için doğrusallık aralığı 500-10000 ng/mL ve LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 30 ng/mL,100 ng/mL dir.

Pauly, C. ve arkadaşları [26] saçlarda PRE tespiti için UPLC-MS-MS yöntemi geliştirmişlerdir. Stasyonier faz olarak C<sub>18</sub> kolunu (1.7 µm, 2.1 mm×100 mm) mobil faz olarak su-asetonitril kullanılmışlardır. Yöntemin doğrusalılık aralığı 50-1600 pg/mg dır.

Kostic, N. ve arkadaşları [27] vigabatrin, PRE ve gabapentinin tespiti için bu analitleri kloroformat ile türevlendirdikten sonra LC-MS-MS ile tayini için bir yöntem geliştirmişlerdir. Sabit faz olarak XDB-C<sub>8</sub> kolon ve mobil faz olarak asetonitril-%0.1 formik asit kullanmışlardır. Yöntemin doğrusalılığı 40.0 ng/mL-10.0×10<sup>3</sup> ng/mL aralığındadır.

Chahbouni, A. ve arkadaşları [28] serumdaki gabapentin, PRE ve vigabatrinin tayini için UPLC-MS yöntemi geliştirmişlerdir. Sabit faz olarak C<sub>18</sub> kolon, mobil faz olarak da %0,1 formik asit eklenmiş amonyum asetat-asetonitril karışımı kullanmışlardır. Bu yöntemde PRE için çalışma aralığı 0.06-50 mg/L'dır. Geri kazanım oranı ise %90-%107 arasında değişmektedir.

Dahl, SR. ve arkadaşları [29] tam kan ve idrar örneklerinde gamma-hidroksibutirat, beta-hidroksibutirat, 1,4-bütanol-diol, PRE ve gama-butirolakton tayini için bir UPLC-MS-MS yöntemi geliştirmişlerdir. Yöntemde sabit faz olarak HSS T3 kolonu, mobil faz olarak %2 formik asit-metanol karışımı kullanmışlardır. PRE için çalışma aralığı 0.8–105 mg/L ve LOQ değeri 0.004 µg/mL dır.

Dzygiel, P. ve arkadaşları [30] sıçan plazmasında katı faz ekstraksiyonu yaparak PRE, sildenafil ve aktif desmetil metabolitinin eş zamanlı tayini için LC-MS-MS yöntemi geliştirmişlerdir. Bu yöntemde C<sub>18</sub> kolonu kullanılmış PRE için çalışma aralığı 70-10.000 ng/mL olarak bulunmuştur.

Oertel, R. ve arkadaşları [31] serumdaki gabapentin, PRE ve vigabatrin tayini için bir LC-MS yöntemi geliştirmişlerdir. Stasyonier faz olarak amide-80 kolonu, mobil faz olarak asetonitril-amonyum asetat-formik asit karışımli gradiyet program kullanmışlardır. PRE için ortalama doğruluk değeri % 100,3 ve ortalama kesinlik değeri ise %3,2 olarak bulunmuştur.

Mandal, U. ve arkadaşları [32] plazmadaki PRE'i belirlemek için bir LC-MS-MS yöntemi geliştirmişler. İç standardat olarak gabapentin kullanmışlar, maddeleri C<sub>18</sub> kolonda, formik asitli metanol-su (98:2, h/h) karışımışle ayırmışlardır. Yöntemde PRE için çalışma aralığı 0.10– 15.00 µg/mL olarak bulunmuştur.

Vaidya, V. ve arkadaşları [33] plazmadaki PRE belirlenmesi için bir LC-MS-MS yöntemi geliştirmişlerdir. Analizde C<sub>18</sub> kolon ve asetonitril-2mM ammonyum asetat (80:20, h/h) karışımli mobil faz kullanılmıştır. Numune hazırlanırken protein çöktürme yöntemi kullanılmış, çalışma aralığı 10.000–10000.000 ng/mL ve LOQ değeri ise 10.000 ng/mL olarak bulunmuştur.

Sorensen, LK.ve arkadaşları [34] adli tıpta tam kandaki terapötik gama-aminobutirik asit analoglarının tayini için elektrosprey iyonizasyonlu MS dedektör içeren ultra performanslı sıvı kromatografisi yöntemi geliştirmişler. Numune hazırlamada sıvı-sıvı ekstraksiyonu, stasyonier faz olarak BEH Amid (1.7 um, 2.1 mm x 100 mm) ve mobil faz olarak ammonyum asetat-asetonitril karışımı kullanılmıştır. Yöntemin LOQ değeri 0.02–0.04 mg/L ve doğrusallık aralığı 1-50 mg/L dir.

### **2.1.3.3. Spektrofotometrik Yöntemler ile Analizleri**

Patel ND. ve arkadaşları [35] metilokbalin, alfa lipoik asit ve PRE içeren çok bileşenli dozaj formunun analizinde maddelerin eş zamanlı belirlenmesi için yeni ve kolay birinci derece türev spektroskopik bir yöntem geliştirmişlerdir. Türevlendirme belirteci olarak bromokresol yeşili kullanmışlar ve PRE için 338 nm dalga boyunda ölçümleri yapmışlardır. Çalışma aralığını 10-14 µg/mL, LOD ve LOQ değerlerini sırasıyla 5.0915 µg/mL ve 15.4290 µg/mL olarak bulmuşlardır.

Gouda, AA. ve arkadaşları [36] gabapentin ve PRE'in saf formlarda ve farmasötik formülasyonlarda belirlenmesi için spektrofotometrik bir yöntem geliştirmişlerdir. Analiz yöntemi ilaçların kromojenik reaktifler olan kinalizarin ve alizarin kırmızısı ile metanolik ortamda verdiği yük transfer kompleksinin oluşumuna dayanmaktadır. Sırasıyla kinalizarin ve alizarin kırmızısı-PRE kompleksleri için maksimum dalga boyları 572 ve 538 nm bulunmuştur. Sırasıyla kinalizarin ve alizarin kırmızısı-PRE için çalışma aralığı 0.5–10 µg/mL ve 0.4–8.0 µg/mL ve LOD değeri sırasıyla 0.124 µg/mL ve 0.238 µg/mL dir .

Walash, MI. ve arkadaşları [37] kapsüllerdeki PRE tayini için spektrofluorimetrik yöntem geliştirmişler. Analiz pH 10'daki borat tomponu çözeltisi ile PRE'in fluoreskamin ile oda sıcaklığında oluşturduğu türeve dayanmaktadır. Ölçme dalga boyları uyarma ve emisyon olarak sırasıyla 390 nm 487 nm dir. Yöntemin doğrusallık aralığı 0,01-0,3 µg/mL ve LOD değeri ise 0,0017 µg/mL dir.



Walash, MI. ve arkadaşları [38] kapsüllerdeki PRE tayini için iki spektrofotometrik yöntem geliştirmişler. Yöntem 1 de PRE 1,2-naftokinon-4-sülfonat sodyum ile borat tamponu (pH 10) lu ortamda 50°C de 5 dakika ısıtılarak reaksiyona sokulmuş ve 473 nm de ölçüm yapılmıştır. Yöntem 2’de ise borat tamponu (pH 9,5) ortamında 2,4-dinitrofluorobenzen (DNFB) belirteci kullanarak 70°C de 20 dakika reaksiyon süresinde oluşan türevler 373 nm de ölçülmüştür. Yöntem 1 ve 2 in sırasıyla çalışma aralıkları ve LOD değerleri 2-25 µg/mL, 0.5-8 µg/mL, 0.15 µg/mL ve 0.13 µg/mL dir.

Armagan, O. [39] farmasötik preparatlarda PRE tayini için üç ayrı spektrofotometrik yöntem geliştirmiştir. İlk iki yöntemde PRE sırasıyla n-elektron verici 2,3-dikloro-5,6-disiyano-1,4-benzokinon ve  $\pi$ -elektron alıcı 7,7,8,8 - tetrasiyanoquinondimetan ile reaksiyona sokulmuştur. Bu reaksiyonlardan renkli kompleks türleri oluşmuş ve oluşan ürünler sırasıyla 494 ve 841 nm’de spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Bu iki yöntemde PRE’in çalışma aralığı sırasıyla 2.0-30.0 µg/mL ve 1.5-10 µg/mL dir. Üçüncü yöntem PRE’in ninhidrin ile reaksiyonuna dayanmaktadır. Maksimum dalga boyu 573 nm ve çalışma aralığı 40.0-180.0 µg/mL dir.

Onal, A. ve arkadaşları [40] PRE’in toz ilaç ve farmasötik prepatlarda tayini için spektrofotometrik ve spektrofluorimetrik iki yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntemlerde 7-kloro-4-nitrobenzo furazon (NBD-Cl) belirteci kullanarak pregabalin türevlendirilmiştir. Reaksiyon borat tamponlu (pH 9,5) ortamda 80°C de 10 dakika bekletme ile gerçekleşmiştir. Çalışma aralığı spektrofotometrik ve spektrofluorimetrik yöntem için sırasıyla 0.5–7.0 g/mL ve 40–400 ng/mL dir.

Santosh G.S. ve arkadaşları [9] PRE’in toz ilaç ve farmasötik formlarda tayini için UV spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir. Bu çalışma pregabalin suda çözülmüş ve 210 nm’de ölçüm yapılmıştır. Çalışma aralığı 6–14 µg/ml ve korelasyon katsayısı 0.9986 dir.

Sowjanya, K. ve arkadaşları [41] PRE’in toz ilaç ve farmasötik formlarda tayini için iki yöntem geliştirmişlerdir. Yöntem 1 de pregabalin alkali ortamda 1,2-naftokinon-4-sülfonik asit sodyum belirteci ile reaksiyona sokularak turuncu renkli ürünler vermiştir. PRE için maksimum dalga boyunun ( $\lambda_{max}$ ) 485 nm olduğu görülmüş ve çalışma aralığı ise 5-45 µg/mL olarak bulunmuştur. Yöntem 2’de ise maddenin 2,4-

dinitrofenilhidrazin ile oksidasyonuna ve oksitlenmiş ürünün yoğun bir şekilde renkli kromojen elde etmek için PRE ile birleştirilmesine dayanmaktadır. Reaksiyon ürünü  $\lambda_{\max}$  461 nm de gözlenmiş ve çalışma aralığı 50-450  $\mu\text{g/ml}$  konstrasyon aralığında bulunmuştur.

Bali, A. ve arkadaşları [42] PRE'in saf formda ve kapsüllerde tayini için spektrofotometrik bir yöntem geliştirmişlerdir. Yöntemde pH 7,4 olan fosforik asit ortamında ninhidrin belirteci kullanılarak 70-75°C de 20 dakika bekletilerek türevler oluşturulmuştur. Yöntemin çalışma aralığı 50-1000  $\mu\text{g/mL}$ , LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 6.0  $\mu\text{g/mL}$  ve 20  $\mu\text{g/mL}$  dir. Maksimum absorbans 402.6 nm'dir.

#### 2.1.3.4. Diğer Yöntemler ile Analizleri

Harnisch, H. ve arkadaşları [43] dansil klorür ile türevlendirme üzerine PRE'in kiral saflığını tayini için bir kapiler elektroforez yöntemi geliştirmişlerdir. Yöntemin tayin aralığı 0.80–15.9  $\mu\text{g/mL}$ , ortalama doğruluk değeri ise % 100.9  $\pm$  5.0 dır.

Tafesse, TB. ve arkadaşları [44] insan plazmasında bulunan PRE'nin tayini için bir gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi yöntemi geliştirmişlerdir. Bu çalışmada HP kolonu ile ayırma sağlanmış, doğrusal aralığı 0.36–10  $\mu\text{g/ml}$  ve doğruluk değeri ise %98.26  $\pm$  4.19 olarak bulunmuştur.

Zeid, AM. ve arkadaşları [45] insan plazmasında ve idrarda gabapentin ve PRE'in eş zamanlı tayini için 4-floro-7-nitro-2,1,3-benzoksadiazol (NBD-F) belirteci ile türevlendirerek mikroçip bazlı elektrokinetik kromatografik yöntem geliştirmişlerdir. Türevler bazik ortamda 60°C de 5 dakika ısıtma ile elde edilmiş ve yöntemin doğrusal aralığı 0,01-0,50  $\mu\text{g/mL}$  olarak bulunmuştur.

Hlozek, T. ve arkadaşları [46] insan serumunda gabapentin, PRE ve vigabatrin yan yana tayini için bir GC-MS yöntemi geliştirmişlerdir. Türevlendirme belirteci olarak heksil kloroformat kullanmışlar ve yöntemin doğrusal aralığı PRE için 0,5–50 mg/L, doğruluk aralığı ise % 97.9-109.3 olarak bulunmuştur.

Gholivand, MB. ve arkadaşları [47] PRE tayini için bir biyosensör yöntemi geliştirmişlerdir. Bu çalışmadaki bobin serum albümininin grafit/camsı karbon elektrot üzerine immobilizasyonuna dayalı olarak hesaplamalı olarak tasarlanmış bir impedimetrik PRE biyosensörü hazırlanmış ve başlangıç karakterizasyonu ve deneysel gözlemlerle tamamlayıcı olarak hesaplama yöntemleri geliştirilmiştir. Çalışma aralığı

10.0 nM ve 280.0 nM dır. Yöntemin LOD değeri 3 nM olarak bildirilmiş ve dedeksiyon UV dedektör ile 280 nm'de gerçekleştirilmiştir.

Alghamdi, AF. [48] grafit çalışma elektrodu kullanarak oluşturduğu PREG-Cu (II) kompleksini ticari ilaçlarda ve biyolojik örneklerde PRE tayininde kullanmıştır. Bu çalışmada PRE miktarının belirlenmesi için kare dalga voltametrik yöntemi kullanılmış ve PRE için çalışma aralığı  $5.10^{-8}$ - $1.10^{-6}$  mol/L, LOD değeri ise  $6.5 \times 10^{-9}$  mol/L olarak bulunmuştur.

Martinc, B. ve arkadaşları [49] farmasötik dozaj formlarında p-aminobütirik asit antiepileptik analoglarının belirlenmesi için mikropilaka floresans okuyucu kullanarak bir yöntem geliştirmişlerdir. Türevlendirme beliteci olarak fluorescamine kullanmışlar PRE için doğrusallık aralığını 0.75 ile 30.0 µg /mL, doğruluk aralığını ise % 96.6 - % 103.5 olarak bulmuşlardır. Yöntemde uyarma ve emisyon dalga boyları olarak sırasıyla 395 ve 476 nm kullanılmıştır.

Rodriguez, J. ve arkadaşları [50] insan idrarındaki PRE'nin belirlenmesi için bir CE-TOF-MS yöntemi geliştirmişlerdir. Yöntemin doğrusallık aralığı 0,1-100 µg/mL, LOD değeri ise 0.03 µg/mL olarak bulunmuştur.

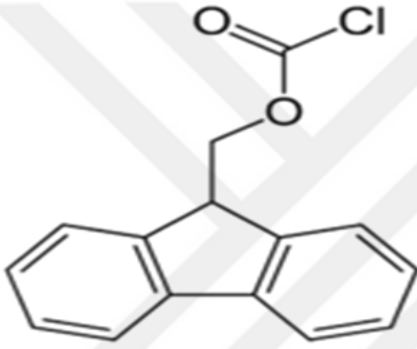
Mudiam, MKR. ve arkadaşları [51] PRE'in tayini için bir GC-MS yöntemi geliştirmişlerdir. Bu çalışmada PRE etil kloroformat ile türevlendirilerek idrar ve farmasötik formülasyonlarda analiz edilmiştir. Örnek temizleme işlemi olarak katı faz mikroekstraksiyonu (SPME) ve dispersif sıvı-sıvı mikro ekstraksiyonu (DLLME) yöntemleri kullanmışlardır. SPME ve DLLME in işlemleri ile yapılan yöntemlerde LOD değerleri sırasıyla 0.019 µg/mL ve 0.022 µg/mL dir. Çalışma aralığı ise 0.08–0.8 g/mL dir.

Themelis, DG. ve arkadaşları [52] gabapentin ve PRE'in farmasötik formlarda tayini için ilk sıralı enjeksiyon testi bildirmişlerdir. Analitler, yüksek floresans türevleri oluşturmak üzere borat tamponu (pH 9,5) çözeltisinde nükleofilik bir reaktif olarak N-asetil sisteinin varlığında o-ftalaldehit ile reaksiyona sokulmuştur. Reaksiyon su banyosunda 15 dakika tamamlanmıştır. Bu yöntemde PRE için çalışma aralığı 210-8000 µg/L, LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 70 µg/L ve 210 µg/L dir.

## 2.2. FMOC Hakkında Genel Bilgi ve Bu Belireteçle Yapılan Çalışmalar

### 2.2.1 FMOC Hakkında Genel Bilgi

Kimyasal adı 9-Fluorenilmetil kloroformat (FMOC) dır. FMOC belirtecinin kapalı formülü  $C_{15}H_{11}ClO_2$ , molekül ağırlığı 258,70 g/mol [50], erime noktası 62-64°C, kaynama noktası 393.9°C dir [53]. FMOC beyaz kristal yapıya sahip olup asetonytril ve asetonda kolaylıkla çözünen bir tozdur. FMOC primer ve sekonder aminlerle kolon öncesi türevlendirmelerde kullanılarak çoğu maddenin spektrofotometrik ve fluorimetrik dedeksiyonuna imkan vermiştir [54]. (Şekil 2.3).



Şekil 2.3: FMOC'un molekül yapısı

### 2.2.2. Analiz Yöntemleri

Literatürde FMOC belirteci kullanarak türevlendirme reaksiyonuna dayanan birçok ilaç analiz yöntemi vardır. FMOC ile yapılan çalışmaların çoğu HPLC, fluorimetrik ve spektrofluorimetrik yöntemle yapılmış tayin yöntemleridir. FMOC'ün kullanıldığı ilaç analiz yöntemleri Tablo 2.1'de özetlenmiştir.

**Tablo 2-1: FMOC ile Fluoresans Dedektörlü HPLC kullanılarak Farmasötik Preparat/Biyolojik Ortamlarda Yapılan Tayinler**

Madde	Matriks	Ön işlem	Reaks. ort./ısı	Mobil faz	İS	Kolon	Dalga boyu	Aralık	Ref.
Alendronat	İdrar	SPE	Sodyum karbonat (pH 11,9)	Asetonitril(ACN)-MeOH/sitrat/fosfat (20:15:65, h/h/h)	Pamidronate	C <sub>18</sub>	Ext:260 Emi:310	3.5–300 ng/mL	55
Efedrin Norephedrin	Plazma	LLE	Sodyum karbonat	ACN-Su (52:48, h/h)	Psödoefedrin	C <sub>18</sub>	Ext:264 Emi:313	0-300 ng/mL	56
Poliaminler	Süt	LLE	Potasyum borat (pH 10.4)	Su-ACN (40:60, h/h)	1-12 Diaminodekan	C <sub>18</sub>	Ext:264 Emi:313	0,5-5 nmol/mL	57
1-deoksi- nojirimisin	Morus alba yaprakları	SPE	Potasyum borat (pH 8.5)	ACN –0.1% sulu Asetik asit (1:1, h/h)		C <sub>18</sub>	Ext:254 Emi:322	0.3 -30 µg/mL	58
Eritromisin(Er) Roksitromisin(Ro) Azitromisin(Az) Klaritromisin(K)	Serum	LLE	Fosfat (pH 7.5)	ACN-fosfat (pH 7.5) (3:2, h/h)	Roksitromisin	C <sub>18</sub>	Ext:255 Emi:315	Er:0.320-16.1 Ro:3.24-19.4 K:(0.190-19.4 mg/L	59
Galaktoz Laktoz Glukozu	Kan		65°C'de 3 saat	Asetik asit- ACN–THF-TEA	Xylose alcoholic	C <sub>18</sub>	Ext:270 Emi:320	200-3200 mg/mL	60
Topiramatin	Serum	LLE	Borat (pH 7.8)	Fosfat (pH 2.2) MeOH (52:48, h/h)	Amantadine	CN	Ext:260 Emi:315	20–5000 ng/mL	61

Madde	Matriks	Ön işlem	Reaks. ort./ısı	Mobil faz	İS	Kolon	Dalga boyu	Aralık	Ref.
Gabapentin	Serum	LLE	60°C'de 10 dak Fosfat (pH 7)	MeOH-fosfat (pH 7) (73:27, h/h)	Azitromisin	C <sub>18</sub>	Ext:260 Emi:315	0.03–20µg/mL	62
Etilendiamin disukinik asid	Bitki	SPE	60°C de 10 dak EDTA (pH 11.5)	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (pH 6.8)-ACN		C <sub>18</sub>	Ext:265 Emi:313	0.01–10 µmol	63
Aminoaseton	Sıçan karaciğeri/ ince bağ.		Potasyum borat ( pH 10)	Sodyum asetat (pH 2.85)- MeOH-ACN		C <sub>18</sub>	Ext:254 Emi:630	0.01-5 µg /ml	64
Hidroksipirolin	Sıçan akçığıeri		Borat (pH 9.5)	Sodyum Asetat (pH 4.3)	Sarkozin	C <sub>18</sub>	Ext:265 Emi:316	25–500 µg/mL	65
Azitromisin	Serum	LLE	62°C ACN–fosfat (3:1, h/h; pH 8.5)	MeOH- Fosfat (pH 4.3) (70:30, h/h)	Amantadine	C <sub>8</sub>	Ext:260 Emi:315	10–1000 ng/mL	66
Amfetaminler	İdrar ve tablet	SPME	Borat (pH 10), Oda ısısı	ACN-Su		C <sub>18</sub>	Ext:264 Emi:313		67
Dimetilamin	Su	SPME	Borat (pH 10.0)	ACN		C <sub>18</sub>	Ext:264 Emi:313	1.0–10.0 µg/mL	68
Gentamisin sülfat	Bakteri plazma	SPE	Borat (pH 8.9) oda ısısı 15 dak	ACN -Su (90:10, h/h)		C <sub>18</sub>	Ext:270 Emi:315	0,2-5 mg/L	69
Glifosat	Su ve çimen	SPE	Borat (pH 9 )	ACN-Su (55-45 h/h)		Polimerik Amino	Ext:315 Emi:266	0.1-100 µg /L	70

Madde	Matriks	Ön işlem	Reaks. ort./ısı	Mobil faz	İS	Kolon	Dalga boyu	Aralık	Ref.
Glifosat(G) Aminometil-fos. asit(AMPA)	Domates	SPE	Borat Oda sıcaklığı 30 dak	ACN		C <sub>18</sub>	Ext:270 Emi:315	G;5-50 µg /g AMPA;6-40µg /g	71
Poliaminler	Omurilik BOS İskelet kası Mikrodiyaliz		Borat (pH 9.0) Oda sıcaklığı	A:Asetat (pH 4,2)- ACN (80:20, h/h) B: Asetat (pH 4,2) -ACN (95:5 h/h)	1.6-hekza metilen amin	C <sub>8</sub>	Ext:260 Emi:314		72
Arginin Sitirulin Prolin 5-NH <sub>2</sub> valerik as.	Keçideki lumen sıvısı		Potasyum asetat (pH 10)	A: ACN-sitrat (Ph 7.2) (85:15, h/h) B: Sitrat (pH 5.4)-ACN (60:40, h/h)		C <sub>18</sub>	Ext:263 Emi:611	0.00-1000 µmol	73
Vertilmisin	Sıçan plazması	LLE	Borat (pH 8) Oda sıcaklığı 15 dak	Su-ACN (5:95, h/h)	Netilmisin	C <sub>18</sub>	Ext:263 Emi:315	0,02-45 mg/L	74
Amino asitler	Plazma		Borat Oda sıcaklığı 3 dak.	A: Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (pH 7.8) B: 45% ACN, 45% MeOH,10% su	S-karboksi metil-L-sistein	C <sub>18</sub>	Ext:266 Em :305	5-2500 µmol/L	75
Fitometaloforlar	Arpa		Borik asit (pH 10.2)	Asetat (pH 7.2) -ACN		C <sub>18</sub>	Ext:266 Emi:305	15 -370 pmol	76
Alifatik aminler	Musluk/nehir atık su	SPME	Borat (pH 9)	ACN -Su		C <sub>18</sub>	Ext:264 Emi:313	5.0–25.0 µg/mL	77

Madde	Matriks	Ön işlem	Reaks. ort./ısı	Mobil faz	İS	Kolon	Dalga boyu	Aralık	Ref.
Domonik asit	Plankton	LLE	Borat	ACN -Su		LC-18,	Ext:264 Emi:313	0.02–10 ng/μL	78
Dimetilamin boran			Borat	ACN –Su (75:25 h/h)		C <sub>18</sub>	Ext:264 Emi:314	0.01–0.50 mg/l	79
Amino asitler	Bitki dokusu	SPE	Borat Oda sıcaklığı	A: Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (pH 7.8) B:MeOH- ACN-su	ABA,Norvalin Sarcosin	C <sub>18</sub>	Ext:340 Emi:450	4.5–450 μmol / L	80
Fumonisin B1-B2		SPE	Borik asit (pH 7.5) Oda sıcaklığı	Sitrat tampon (pH 4.7)-ACN		C <sub>18</sub>	Ext:263 Emi:313	0.04-2.5 μg/mL	81
Glifosat	Toprak, çamur	SPE	Oda sıcaklığı 4 saat	ACN – %2 fosforik asit		C <sub>18</sub>	Ext:254 Emi:301	0.005 –0.5 mg/L	82
Amino asitler	Kırkayak	LLE	Oda sıcaklığı	Fosfat(pH 7.8)- ACN -MeOH		C <sub>18</sub>	Ext:340 Emi:450	10-400 μg/mL	83
Fosfatidilserin	Süt tozu	LLE	Borat (pH 10.4)	CHCl <sub>3</sub> /MeOH/su A: (80:19.5:0.5,h/h/h) B: (60:34:5.5:0.5,h/h/h)		RX-SIL	Ext:265 Emi:305	100–1000 μg/mL	84
Kolistin	Plazma	SPE	Karbonat (pH10)	ACN-THF -Su (82:2:16, h/h/h),	Polymiksin B1	C <sub>18</sub>	Ext:260 Emi:315	0.3–6.0 μg/mL	85
Topiramet	Serum	SPE	50°C 15 dak Borat (pH 8.8)	Fosfat (pH 2.5) – ACN (60:40, h/h)	Amantadin hidroklorür	CN	Ext:260 Emi:315	0.01-40 mg/mL	86



Madde	Matriks	Ön işlem	Reaks. ort./ısı	Mobil faz	İS	Kolon	Dalga boyu	Aralık	Ref.
Glutatyon	Sıçan	LLE	Borat (pH 9) Oda sıcaklığı 15 dak	MeOH-Fosfat (pH 3.2) (40:60, h/h)		C <sub>18</sub>	Ext:260 Emi:315	0.813- 0.025µmol/m	87
domoik asit	Deniz suyu	LLE	Borat (pH 9.5) Oda sıcaklığı 30 sn	ACN -0.1% TFA	Dihidro kanaik asit	C <sub>18</sub>	Ext:260 Emi:313	1-40 nM	88
Tirozin amino asit	Mısır	SPE	Borat (pH 9.9) Oda sıcaklığı	A: Asetat-TEA-THF B: Asetat-MeOH-ACN		C <sub>18</sub>	Ext:340 Emi:450	0,1-1000,0 mg / L	89
Arginin Glutamin β-alanin	Capsul		Sodyum borat (pH 8.5)	A: Sitrata (pH 4.1)-ACN (70:30, h/h) B: Su -ACN (20:80, h/h)		ODS	Ext:262 Emi:310		90
Biyojenik aminler	Çay	SPE	Borat (pH 8.5)	Sodyum asetat -ACN	1,6-diamino heksan	C <sub>18</sub>	Ext:263 Emi:313	2,5-100 µmol	91
Valproik asit	Serum	LLE	Borat (pH 9.3) 60°C de 10 dak	ACN -MeOH (78:22 h/h)	Sertraline	ODS	Ext:265 Emi:315	0.01-32 µg / mL	92
Poliaminler	<i>Arabidopsis thaliana</i> bitkisi	SPE	Borat (pH 7.9)	ACN-Su	Diamino heptan	C <sub>18</sub>	Ext:265 Emi:320		93

Madde	Matriks	Ön işlem	Reaks. ort./ısı	Mobil faz	İS	Kolon	Dalga boyu	Aralık	Ref.
AMFA, Glifosat, Glufosinat,	Toprak	LLE	Borat (pH 9), Oda sıcaklığı	Fosfarik asit - ACN	Glufosinate, Glufosinate	C <sub>18</sub>	Ext:260 Emi:310		94
Memantin hidroklorür	Sıçan plazması		Borat (pH 10) Oda sıcaklığı 30 dak	ACN -Su	Amantadin hidroklorür	C <sub>18</sub>	Ext:263 Emi:315	0.025-5.0 µg /mL	95
Etilmisin	Sıçan plazması	LLE	Borat (pH 7.3) Oda sıcaklığı 35 dak.	ACN / Su (87:13 h/h)	Neomisin	C <sub>8</sub>	Ext:265 Emi:315	0.038-9.69 µg /mL	96
Glifosat Gufosinat	Böcek ilacı	SPE	Borat tamponu	Fosforik asit-ACN	Nitrophenol-d4	C <sub>18</sub>	Ext:260 Emi:310		97
Fumonisin B2	<i>Aspergillus niger</i> (mantar)	LLE	Borik asit (pH 9) Oda sıcaklığı	ACN /Su/Asetik asit (60:40:1, h/h/h),		C <sub>18</sub>	Ext:420 Emi 500	1-200 µg /L	98
Nortriptiline	Plazma	LLE	Borat (pH 9.5) Oda sıcaklığı 20 dak	ACN /Su (85/15, h/h)		C <sub>18</sub>	Ext:260 Emi:310	5-5000 ng/mL	99
Amikasin	Sıçan plazması		Borat (pH 7.3) Oda sıcaklığı 20 dak	ACN /su (35/65 h/h)	Isepamisin	C <sub>8</sub>	Ext:265 Emi:315	0.45-21.60 mg/mL	100
Amino asitler	Plazma		Borat (pH 9)	A:Asetat/THF/ACN (15:3:2, h/h/h) B:ACN/THF (17/3,h/h).		C <sub>18</sub>	PDA:262 Ext:254 Emi:313		101

Madde	Matriks	Ön işlem	Reaks. ort./ısı	Mobil faz	İS	Kolon	Dalga boyu	Aralık	Ref.
Metilamin(MA) Aminoaseton(AA)	İnsan kanı ve idrar	LLE	Borat (pH 10.4) Oda sıcaklığı	Fosfat- ACN	Etilenamin	C <sub>18</sub>	Ext:254 Emi:630	MA:0.31-46.5 AA:0.73- 36.5ng/inj.	102
Tramadol Ana metabolitler	İlaç ve serum	LLE	Borat (pH 7.5) 60°C'de 10 dak	TEA içeren fosfat-MeOH (54:46; h/h )	Oseltamivir fosfat	CLC- ODS	Ext:265 Emi:315	0.01-12.8 µg/mL	103
Serbest aminoasitler	Tütün		Oda sıcaklığı	Fosfat-MeOH-ACN (20:50:30, h/h).	Norvalin	C <sub>18</sub>	Ext:340 Emi:450	5-80 µg/mL	104
Amino asitler ve aminler	Peynir	SPE	Borat (pH 11)	A:ACN-Asetat-su (10:5:85, h/h) B:MeOH-Asetat-Su (55:8:37, h/h) C:ACN-Asetat-Su (55/5/40, h/h) D: ACN		C <sub>18</sub>	DAD:334- 262 Ext:337 Emi:454	6.25-1000 pM / inj.	105
Dimetilamin	Katyonik polimerler	SPME	Borat (pH 11.5)	ACN -Su			DAD:206 Ext:264 Emi:313	0.2-2.0 µg/mL	106
Trietilentetramin Asetil/ Diasetil trietilentetramin	Serum		Sodyumtetraborat (pH 9.6)	ACN - Amonyum asetat	Hekzanmetilen diamin-di hidroklorür	C <sub>18</sub>	Ext:263 Emi:317	0.0625-5 mg/L	107
Amino asitler	Karaciğer	SPE	Borat (pH 8.8)	A: Asetat B:Asetat-ACN-MeOH C:MeOH, D: ACN	1,7- diaminoheptan	C <sub>18</sub>	Ext:263 Emi:313	5-1400 pmol	108

Madde	Matriks	Ön işlem	Reaks. ort./ısı	Mobil faz	İS	Kolon	Dalga boyu	Aralık	Ref.
Trimetazidin	Plazma	LLE	Borat (pH 8) 50°C de 20 dak	ACN-MeOH-Asetat	Fluoxetin HCl	C <sub>18</sub>	Ext:265 Emi:311	15–667 ng/ml	109
Amino asitler biyojenik aminler	Karaciğer dokusu	SPE	Borat (pH 9.3–11.3)	A:0.1M Asetat- ACN- MeOH(46:44:10, h/h/h) B:MeOH C: ACN	1,7-Diamino heptan	C <sub>18</sub>	DAD:334- 262 Ext:337 Emi:454		110
Amino asitler	Arı poleni		Borat (pH 9) Oda sıcaklığı 3 dak	A:ACN-formik asit B:ACN-Su-formik asit C:ACN-Su	γ-Aminobutrik asit	C <sub>18</sub>	Ext:279 Emi:380	0.05–50 pmol	111
Poliaminler amino asitler	Üzüm ve şarab	SPE	Borat Oda sıcaklığı 3 dak	A:ACN -Octonal2 B:ACN-Fosforikasit- N,N-Dimetilsiklo heksamin-Su		C <sub>18</sub>	Ext:263 Emi:313		112
Glukosamin sülfat	Plazma	Çökt.	Borat (pH 8) 30°C'de 30 dak	ACN -Su (30/70 h/h)	Vertilmisin sülfat	C <sub>18</sub>	EXT:263 Emi:315	0.1-10mg /mL	113
Gukosamin sülfat	Plazma	Çökt.	Borat (pH 8.0) 30°C'de 30 dak	ACN -Su		C <sub>18</sub>	Ext:263 Emi:315	0.1-10.0 µg/mL	114
Trimetilamin	Su ve hava	SPME	Borat (pH 8.0) Oda sıcaklığı 30 dak	ACN -Su		C <sub>18</sub>	Ext:264 Emi:313	1-10 µg/mL	115

Madde	Matriks	Ön işlem	Reaks. ort./ısı	Mobil faz	İS	Kolon	Dalga boyu	Aralık	Ref.
Malonaldehid	Plazma		50°C'de 4 saat	ACN /Su		C <sub>18</sub>	Ext: 270 Emi:310		116
Amioasitler	Fermente karides atığı	LLE	Borat (pH 8.0) Oda sıcaklığı 5 dak	A:Amonyum fosfat B: MeOH-Su C: ACN -Su		C <sub>18</sub>	Ext:270 Emi:316		117
Aminometil-fosfonik asit Glifosat	Böcek ilacı	SPE	Borat (pH 9)	ACN -Fosfat (35:65, h/h)		NH <sub>2</sub> kolon	Ext:262 Emi:316	0.1-500 mg/mL	118
Alendronat sodyum	Plazma	SPE	Sodyum karbonat (pH11.9)	CAN-MeOH-sitrat- Pirofosfat (32:68, h/ h)	Pamidronat	C <sub>18</sub>	Ext:260 Emi:310	1-100 ng/mL	119
Biyojenik aminler Ornitin Lisinin	Fare dokusu		Borat oda sıcaklığı 2 dak	A:Asetat-ACN-MeOH (46:44:10, h/h/h) B: ACN C:MeOH	1,7-Diamino heptan	C <sub>18</sub>	Ext:337 Emi:454 DAD:334/262		120
Formalaldehit propiyonaldehit, n-bütiraldehit			60°C de 30 dak	A: ACN - Amonyum format B: ACN				0.08–16.65 µmol/L	121
Dimetilamin	Su	SPME	Borat pH 10 oda sıcaklığı	ACN -su		C <sub>18</sub>	Ext:264 Emi:313	1.0-10.0 µg / mL	122
Metilamin	Sulu matriksler	SPME	Borat (pH 10) oda sıcaklığı	ACN -su		C <sub>18</sub>	Ext:264 Emi:313	2.5-10.0 µg/mL	123

Madde	Matriks	Ön işlem	Reaks. ort./ısı	Mobil faz	İS	Kolon	Dalga boyu	Aralık	Ref.
Kreatin		SPME	Borat (pH 8)			C <sub>18</sub>	Ext:280 Emi:305		124
1-deoksinojir	<i>Morusalba</i> <i>L.</i> (beyaz dut)	SPE	Borat pH 8.5 20°C de 20 dak	ACN-Asetik asit		C <sub>18</sub>	Ext:254 Emi:322	0.3-30 µg/mL	125
Peptid ve amino asitler	Yün ve bira		Borat (pH 9.5) oda sıcaklığı 1 dak			C <sub>18</sub>	Ext:293 Emi:360		126
Heksafluoro izopropanol	İdrar		Borat (pH 12.5) oda sıcaklığı	ACN -Su		C <sub>18</sub>	Ext:265 Emi:311	0,4-9,6 nmol/mL	127
Glikozat ve aminometilfosfonik asit	Suda	LLE	Borat oda sıcaklığı	Fosfat-ACN		NH <sub>2</sub>	Ext:260 Emi:310	0,05-1 µg/L	128
Eritromisin ve oleandomisin	Et, karaciğer, böbrek, süt ve yumurta	SPE LLE	Fosfat pH 7.5 45°C de 1 saat	Fosfat- ACN	Roksitromisin	C <sub>18</sub>	Ext:260 Emi:305		129
Fitometoforlar	Arpa kökü		Borik asit (pH 10,2)	Sodyum asetat- ACN		C <sub>18</sub>	Ext:266 Emi:305	15-370 pmol	130
Arginin,Sitrulin Ornitin,Prolin 5-aminovalerik as.	Keçi lumen sıvısı	LLE	Borat (pH 10)	A: ACN -Sodyum sitrat B ACN -Sodyum sitrat		C <sub>18</sub>	Ext:263 Emi:611	0,0-1000,0 µM	131

LLE:Sıvı Sıvı Ekstraksiyonu SPE:Katı Faz Ekstraksiyonu SPME:Katı Faz Mikro Ekstraksiyon ACN :Asetonitril MeOH:Metanol THF:Tetrahidrofur

TEA:Trietilamin

**Tablo2.2: FMOC ile Spektrofotometrik Dedektörlü HPLC kullanılarak Farmasötik Preparatlarda/Biyolojik Ortamlarda Yapılan Tayinler**

Madde	Matriks	Ön işlem	Reaks. ort./ısı	Mobil faz	İS	Kolon	Dalga boyu	Aralık	Ref.
Glukozamin	Kitin örnekleri		Borat (pH 7), 20°C 30 dak	Su- ACN		C <sub>8</sub>	UV:254	50-500 µg /mL	132
Sülfametazin	Biyolojik sıvı ve doku	LLE	Sodyum bikarbonat (pH 8)	MeOH-Fosfat		C <sub>18</sub>	UV:254		133
Amino şekerler	Bataklık kömürü Toprak humik asit		Borat 55°C de 1 saat	Amonyum format -MeOH		C <sub>18</sub>	PDA: 280	0.017 - 0.407 mg/l	134
D ve L amino asitler	Çay	SPE	Borikasit pH 9 oda sıcaklığı	ACN -TFA		C <sub>18</sub>	UV:265		135
Karbamazepin (1) Topiramamat (2) Valproik asit (3)	Fare beyini	LLE SPE	Borat pH 9.3 60°C'de 10 dak	MeOH- Asetat -Su- Dietilamin		C <sub>18</sub>	PDA: 200-400	(1):0.1-3, (2):0.6 -60, (3):0.5-20	136
Sitrülin ve metabolik AA	Plazma	Çöktr.	Borat (pH 9.2) Oda sıcaklığı	Fortmat -ACN	Aminobutrik asit	C <sub>18</sub>	UV: 260	2 - 100 µM	137
Hidroksilamin	Vorinostat ilacı		Borat (pH 8) 0°C de 20 dak.	MeOH- Formik asit (85:15, h/h)		PFP column	UV :264	20 -100 ng/mL	138
Sitrülin ve metabolik AA	Plasma	LLE	Borat (pH 9.20) oda sıcaklığı 1 dak	Amonyum format- ACN		C <sub>18</sub> RP-18	UV: 260		140
Metil, dimetil, ve trimetilamin	Hava (bataklık gazları)		Oda sıcaklığı	ACN:Su		C <sub>18</sub>	UV:262		141

Madde	Matriks	Ön işlem	Reaks. ort./ısı	Mobil faz	İS	Kolon	Dalga boyu	Aralık	Ref.
Prolin	Bal ve arı sütü	SPE				C <sub>18</sub>		369-1930µg/g	142
Sistein	Allium türü bitkiler (sarımsak,soğan, arpacık ve pırasa)		Borat oda sıcaklığı 5 dak	Sodyum asetat-MeOH	S-izobutilsistein S-oksit	C <sub>18</sub>	UV:265	0.01–2.0 mM	143
Glifosat	Toprak	SPE	Borat 40°C de 24 saat	Fosfat-ACN		C <sub>18</sub>	UV: 206	0.10-0.70 mg/L	144
Polimiksin B	Plazma	SPE	Karbonat (pH 10) Oda sıcaklığı	ACN /THF/ Su		C <sub>18</sub>	UV :210	0.125-4.00 mg/l	145
Hidroksiprolin	Hepatik Fibrozisli Tavşanların idrarı			MeOH-Sodyum asetat	3, 4-dehidro-L-prolinin	C <sub>18</sub>	DAD:262	5.0-200 µmol/L	146
Lisil hidroksilaz	Protein	SPE	sodyum karbonat ve trisin	A:TFA içeren su B: TFA içeren ACN		C <sub>18</sub>	DAD:220		147
Sülfonamidler	Bal	SPE	Borat (pH 8)	Sodyum asetat-ACN		C <sub>18</sub>	UV:263		148
Sülfonamidinler	hayvan dokusu (	SPE	Borat	Asetat -ACN		C <sub>18</sub>	UV: 263		149
Glukozamin sülfat	Tablet, kapsül, besin takviyeleri	LLE	50°C'de 30 dak	TFA içeren su-ACN		ODS-3	UV:265		150

LLE:Sıvı Sıvı Ekstraksiyonu SPE:Katı Faz Ekstraksiyonu SPME:Katı Faz Mikro Ekstraksiyon ACN :Asetonitril MeOH:Metanol THF:Tetrahidrofur TEA:Trietilamin



**Tablo 2.3: FMOC ile yapılan diğer çalışmalar**

Yöntem	Madde	Matriks	Reaks ort/ısı	Kolon/Mobil faz/Dalga boyu	Referans
CE-UV: kapiler elektroforez	Amino asitler	Çarkifelek meyve suları	Borat (pH 9.4)	UV:265	151
HPLC/MS/MS	Amino asitler	<i>Arabidopsis thaliana</i> bitkisi	Fosfat (pH 6) Oda sıcaklığı	C <sub>18</sub>	152
HPLC/MS/MS	Fito hormonlar 1-aminosiklo propan-1- karboksilik asit	<i>Arabidopsis thaliana</i> bitkisi	Sodyum borat (pH 7.9)	RP <sub>18</sub>	153
LC-MS/MS	Topiramet	İlaç	Borat (pH 7.8), 70°C	ODS, Fosfat(pH2,3)- ACN(48:52, h/h)	154
HPLC-MS/MS	Glyphosat AMPA	Toprak	Tetraborat tamponu Oda sıcaklığı 15 saat	C <sub>18</sub> A:99% NH <sub>4</sub> Ac- 1%ACN B:1%NH <sub>4</sub> Ac-99% ACN	155
CE/MS/MS	l- ve d-karnitin		Karbobat pH 10.4, 45°C'de 60 dak	DAD:254	156
HPLC/ESI-MS	Nikotinamid	Pirinç, 0.1 - 5 mg/L		C <sub>18</sub>	157
CE-ESI MS	Glikoproteinlerin	Monoklonal antikorlar	Fosfat (pH 8.5)		158
LC/APCI/MS	Aminler	Atık su	%30ACN (formik asit içeren)	C <sub>18</sub>	159
HPLC-MS-MS	Alifatik aminler	Atık su Toprak	Borat (pH 9)	C <sub>18</sub> A:Asetik asit (pH3.7) B: ACN	160

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışması İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'nda 2019 yılında gerçekleştirilmiştir.

#### 3.1 Kimyasal Maddeler, Çözücüler ve Çözeltiler

##### 3.1.1. Kimyasal Maddeler ve Çözücüler

Çalışmada aşağıdaki kimyasal maddeler ve çözücüler kullanılmıştır:

PRE (Abdi İbrahim, İstanbul, Türkiye)

ALYSE 150 mg kapsül (Abdi İbrahim, İstanbul, Türkiye)

Gabapentin (Abdi İbrahim, İstanbul, Türkiye)

Fmoc (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Almanya)

Borik asit (analitik saflıkta) (Merck, Darmstadt, Almanya)

Potasyum klorür (analitik saflıkta) (Labor Kimya, Türkiye)

Sodyum hidroksit (analitik saflıkta) (Merck, Darmstadt, Almanya)

Potasyum hidrojen fosfat (analitik saflıkta) (Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Almanya)

Potasyum dihidrojen fosfat (analitik saflıkta) (Merck, E.Merck, Darmstadt, Almanya)

Glisin (analitik saflıkta) (Merck, Merck KGaA 64271 Darmstadt, Almanya)

Asetonitril (HPLC saflıkta) (Merck, Merck KGaA 64271 Darmstadt, Almanya)

Trietilamin (HPLC saflıkta) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Almanya)

Ortofosforik asit (%85 ağırlık) (analitik saflıkta),

Ultra saf su (HPLC saflıkta)

### 3.1.2. Çözeltiler

#### 1 .PRE Çözeltileri

Stok çözelti:

10 mg pregabalin tartıldı, 10 mL'lik balonjojede distile su ile çözülerek hacmine tamamlandı (1 mg/mL).

*Stok çözeltinin su ile seyreltilmesi sonucu hazırlanan standart çözeltiler:*

Analiz koşulların belirlenmesi ve ölçü eğrilerinin hazırlanmasında konsantrasyonu 250 µg/mL ve 60, 50, 40, 30, 20, 10, 5 µg/mL olan standart çözeltiler kullanıldı.

#### 2. FMOC Çözeltileri

Reaksiyonunun koşullarını belirlenmesinde, ölçü eğrilerinin oluşturulmasında, kapsül çözeltisinde yapılan analizlerde günlük olarak asetonitril ile hazırlanmış FMOC çözeltisi kullanıldı. 3 mg FMOC tartıldı, 10 mL lik balonjojede asetonitril ile çözülerek hacmine tamamlandı (300 µg/mL ).

#### 3. Gabapentin Çözeltisi

Ölçü eğrilerin oluşturulmasında ve kapsül çözeltisi ile yapılan analizlerde gabapentinin suda çözündürülmesi ile hazırlanmış 80 µg/mL konsantrasyonundaki çözeltiler kullanıldı.

#### 4. Borat tamponu Çözeltisi

pH 7.0, 8.0, 9.0 ve 10.0 olan 0,1 N tampon çözeltileri hazırlamak için 0,062 g borik asit ve 0,075 g potasyum klorür 5 mL suda çözündürüldü, gerekli miktarda 0,1 M NaOH ilavesi ile çözeltinin pH'sı istenen değere getirildi ve hacmi 10 mL'ye tamamlandı.

#### 5. Glisin Çözeltisi

100 mg glisin tartıldı, 10 mL lik balonjojede distile su ile çözülerek hacmine tamamlandı (10 mg/mL).

#### 6. 0.1 M NaOH Çözeltisi

4 g NaOH tartıldı, 1000 mL balonjojede kaynatılmış soğutulmuş distile su ile hacmine tamamlandı.

### 7.Potasyum Fosfat Tampon çözeltileri

pH 3,9 olan 0,02 M tampon çözeltisi hazırlamak için 1.360 g potasyum dihidrojenfosfat ve 0.348 g dipotasyum fosfat tartıldı, sırasıyla 500 mL ve 100 mL balonjojede distile su ile çözülerek hacmine tamamlandı. Gerekli miktarda o-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> ilavesi ile çözeltinin pH sı istenen değere getirildi.

### 8.Mobil Faz Çözeltisi

Mobil faz olarak 0,02 M potasyum fosfat tamponu (pH 3,9) ve asetonitril (70:30, h/h) karışımına trietilamin 1ml/L ilave edilerek kullanıldı.

## 3.2. Aletler ve Diğer Gereçler

### 1.HPLC aleti ( Shimadzu LC-20AT)

LC 20 AT Pompa

RF-10AXL Fluorimetrik detektör

DGU-20A<sub>5</sub> Gaz giderme ünitesi

SIL-20 AC Otomatik örnekleyici

Analitik kolon (C18, 5µm, 250 x 4,6 mm I.D. Luna)

CTO-10AS<sub>VP</sub> Kolon fırını

SPD-M20A Diyot array dedektör

### 2.UV lamba

### 3.Ultra saf su cihazı (PURELAB Option)

### 4. pH metre (Seven Excellence)

### 5. Vorteks Mikser (Velp Scientifica)

### 6. Su banyosu (ULTRASONIC LC 30 H)

### 7.Terazir (DENVER INSTRUMENT)

### 8.Otomatik pipetler (Eppendorf 100-1000 µL ve 10-100 µL)

### 9.Vida kapaklı, yuvarlak tabanlı cam tüpler (12 cm)

### 10. Balonjojeler (isolab 5, 10, 100 ve 1000 mL)

### 11. Dereceli ve transfer pipetler (solab)

12. Enjektör (Hamilton, düz uçlu, 25 µL).

13. ETÜV (Heraeus)

14. Süzgeç kağıtları (Mavi bantlı)

15. Yazılımlar

MS Office Word Programı

MS Office Excel Programı

### **3.3. Analiz Yönteminin Geliştirilmesi ile İlgili Çalışmalar**

#### **3.3.1. Türevlendirme için Reaksiyon Koşullarının İncelenmesi**

Yapılan literatür araştırmalarında alifatik amin grubu maddeleri ile FMOC arasındaki reaksiyonun ısıtılarak, alkali ortamda, belli miktardaki su asetonitril oranında yürüdüğü, reaksiyonun bitirilmesi için bir ekstraksiyon işlemi ya da aminoasit çözeltisi kullanıldığı görülmüştür. Bu araştırmalardan yola çıkarak FMOC ile PRE'nin arasındaki reaksiyonun kantitatif olarak hangi şartlarda ilerlediğini belirlemek amacıyla yapılan denemeler aşağıda belirtilmiştir.

##### **3.3.1.1. FMOC Miktarının belirlenmesi**

Konsantrasyonu 50 µg/mL olan PRE çözeltisinden 100'er µL kapaklı cam tüplere alındı. Üzerlerine 100 µL'er 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 µg/mL olan FMOC çözeltisinden, 25 µL'er pH 7 potasyum fosfat tamponu ve 450 µL asetonitril ilave edildi ve yaklaşık 30 sn girdap karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra 60°C de 10 dakika ısıtıldı, soğulduktan sonra üzerine 10'er µL 4 mg/mL glisin, 315'er µL mobil faz tamponu olan 20 mM potasyum fosfat eklendi ve karıştırıldı. 5'er dakika sonunda her bir karışımın 25 µL' si HPLC sistemine enjekte edilerek analiz edildi. Bulunan sonuçlar Bölüm 4.1.1.1. de verilmiştir.

##### **3.3.1.2. pH**

Konsantrasyonu 50 µg/mL olan PRE çözeltisinden 100'er µL kapaklı cam tüplere alındı. Üzerlerine 100'er µL 300 µg/mL olan FMOC çözeltisinden 25 µL'er pH 7, 8, 9, 10 olan potasyum fosfat tamponu ve/veya borat tamponu çözeltilerinden ve 450 µL asetonitril ilave edildi ve yaklaşık 30 sn girdap karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra 60°C de 10 dakika ısıtıldı soğulduktan sonra üzerine 10 µL'er 10 mg/mL glisin, 315 µL

mobil faz tamponu olan 20 mM potasyum fosfat eklendi ve karıştırıldı. 5'er dakika sonunda her bir karışımın 25 µL'si HPLC sistemine enjekte edilerek analiz edildi. Bulunan sonuçlar Bölüm 4.1.1.2. de verilmiştir.

### 3.3.1.3. Sıcaklık

Konsantrasyonu 50 µg/ml PRE çözeltisinden 100'er µL kapaklı cam tüplere alındı. Üzerlerine 100'er µL 300 µg/ml olan FMOC çözeltisinden 25'er µL pH 9 olan 0,1 N borat tamponu ve 450 µL asetonitril ilave edildi ve yaklaşık 30 sn girdap karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra 30, 40, 50, 60, 70 °C de 10 dakika ısıtıldı, soğutulduktan sonra üzerine 10 µL'er 10 mg/mL glisin, 325 µL mobil faz tamponu olan 20 mM potasyum fosfat çözeltisi eklendi ve karıştırıldı. 5'er dakika sonunda her bir karışımın 25 µL'si HPLC sistemine enjekte edilerek analiz edildi. Bulunan sonuçlar Bölüm 4.1.1.3. de verilmiştir.

### 3.3.1.4.Reaksiyon Süresi

Konsantrasyonu 50 µg/ml PRE çözeltisinden 100'er µL kapaklı cam tüplere alındı. Üzerlerine 100'er µL 300 µg/ml olan FMOC çözeltisinden 25'er µL pH 9 olan 0,1 N borat tampon ve 450 µL asetonitril ilave edildi ve yaklaşık 30 sn girdap karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra 60°C de 0, 5, 10, 15, 20 dakika ısıtıldı, soğutulduktan sonra üzerine 10'er µL 10 mg/ml glisin ve 325 µL mobil faz tamponu olan 20 mM potasyum fosfat çözeltisi eklendi ve karıştırıldı. 5'er dakika sonunda her bir karışımın 25 µL'si HPLC sistemine enjekte edilerek analiz edildi. Bulunan sonuçlar Bölüm 4.1.1.4. de verilmiştir.

### 3.3.1.5.Glisin Miktarı

Konsantrasyonu 50 µg/ml PRE çözeltisinden 100'er µL kapaklı cam tüplere alındı. Üzerlerine 100'er µL 300 µg/ml olan FMOC çözeltisinden 25'er µL pH 9 olan 0,1 N borat tampon ve 450 µL asetonitril ilave edildi ve yaklaşık 30 sn girdap karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra 60 °C de 5 dakika ısıtıldı, soğutulduktan sonra üzerine 5,10, 20, 30, 40 µL, 10 mg/ml glisin çözeltisi ve toplam hacim 1 mL olacak şekilde mobil faz tamponu olan 20 mM potasyum fosfat karışımı eklendi ve karıştırıldı. 5'er dakika sonunda her bir karışımın 25 µL' si HPLC aletine enjekte edilerek analiz edildi. Bulunan sonuçlar Bölüm 4.1.1.5. de verilmiştir.

### 3.3.1.6. Asetonitril Su Oranı

Konsantrasyonu 50 µg/ml PRE çözeltilisinden 100'er µL kapaklı cam tüplere alındı. Üzerlerine 100'er µL, 300 µg/ml olan FMOC çözeltilisinden 25'er µL 0,1 N borat tamponu pH 9 çözeltilisi ve her birine asetonitril su oranı 1, 2, 3, 4, 5 kat olacak şekilde değişen hacimlerde asetonitril ilave edildi ve yaklaşık 30 sn girdap karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra 60 °C de 5 dakika ısıtıldı, soğutulduktan sonra üzerine 10 µL glisin çözeltilisi (10 mg/ml) ve toplam hacim 1 mL olacak şekilde mobil faz tamponu olan 20 mM potasyum fosfat karışımı eklendi ve karıştırıldı. 5'er dakika sonunda her bir karışımın 25 µL' si HPLC sistemine enjekte edilerek analiz edildi. Bulunan sonuçlar Bölüm 4.1.1.6. de verilmiştir.

### 3.3.1.7. Türevin Stabilitesi

Konsantrasyonu 50 µg/ml PRE çözeltilisinden 100' er µL kapaklı cam tüplere alındı. Üzerlerine 100'er µL, 300 µg/ml olan FMOC çözeltilisinden 25'er µL 0,1 N borat tamponu pH 9 çözeltilisi, 400 µL acetonitril ilave edilerek çözelti 30 saniye girdap karıştırıcıda karıştırıldı. Su banyosunda 60 °C'de 5 dakika süre ile ısıtıldıktan sonra 10 µL 10 mg/ml lik glisin çözeltilisi ve 365 µL mobil faz tamponu olan 20 mM potasyum fosfat çözetisi ilave edildi. 15 saniye girdap karıştırıcıda karıştırılmasını takiben 5 dakika bekletildi. Oluşan türevler oda sıcaklığında ve karanlıkta 12 ve 24 saat bekletildikten sonra HPLC aletine enjekte edilerek analiz edildi. Her bir karışımın 25 µL'si 1.0 mL/dak. akış hızındaki 25 °C deki C<sub>18</sub> kolona uygulandı. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.1.1.7. da verilmistir.

## 3.3.2. Pregabalın'ın Türevlerinin HPLC ile Analizi

### 3.3.2.1. Dedektör Dalga Boyları Seçimi

FMOC türevlerinin HPLC ile yapılan literatür çalışmalarında dikkate alınarak, eksitasyon dalga boyu 260 nm, emisyon dalga boyu 315 nm olarak belirlendi.

### 3.3.2.2. Hareketli Faz , Akış Hızı, Kolon Sıcaklığı

C<sub>18</sub>, 5 µm partikül çaplı kolonlarda çeşitli oranlarda asetonitril-10mM orto fosfarik asit (pH 2,4), metanol-50 mM potasyum fosfat tamponu (pH 3,9), asetonitril-50 mM potasyum fosfat tamponu (pH 3,9) ve asetonitril-20 mM potasyum fosfat tampon (pH 3,9; 3,8; 4,0) karışımlı mobil fazlar izokratik olarak 1,0 mL/dak ve 1,5 mL/dak akış hızlarında 25°C deki kolon sıcaklığında denedi. Daha sonra mobil faz belirlendikten

sonra 23°C, 25°C ve 27°C de kolon sıcaklığı çalışması yapıldı. Analizin mobil fazı ve akış hızı belirlendi. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.1.2.1.yer almaktadır.

### **3.3.2.3.İç Standart Seçimi**

Türevlendirme gibi benzeri ön işlemlerden ve enjeksiyonlardan gelebilecek hataları azaltmak amacıyla memantin ve gabapentin ilaç maddelerinin yöntemimizde İS olarak kullanılıp kullanılmayacağı araştırıldı. Bu iki madde PRE için belirlenmiş reaksiyon koşullarında ayrı ayrı FMOC ile türevlendirilmeye çalışıldı. Reaksiyon karışımları, PRE-FMOC türevine ait Bölüm 4.1.2.1.de belirlenen kromatografi koşullarında HPLC ile analiz edildi. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.1.2.2. de verilmiştir.

### **3.4.HPLC Yönteminin Validasyonu**

Yöntem validasyonu, metodun ilgili performans kriterlerine uygunluğunun saptanması için metot parametrelerinin belirlenip incelendiği bir geçerlilik çalışmasıdır. [161].

İlaç uygulamaları için Uluslararası Harmonizasyon Konferansı (ICH, International Conference Harmonization Q2(R1) kılavuza göre validasyon yapıldı [162].

#### **3.4.1.Seçicilik**

Bir analitik yöntemin seçiciliği beklenen fiziksel ve kimyasal girişimler veya engelleyiciler varlığında sadece amaçlanan bileşen veya bileşenleri doğru şekilde ölçebilme yeteneğidir[162].

Yöntemin seçiliğinin tayini amacıyla madde içermeyen reaksiyon çözeltilerinden kapsüldeki yardımcı maddelerden ve hareketli fazdan gelebilebilecek bir girişim olup olmadığı incelendi. Sonuçlar Bölüm 4.2.1'de gösterilmiştir.

#### **3.4.2. Doğrusallık ( Sulu Çözeltide Ölçü Eğrisinin Hazırlanması)**

Doğrusallık aralığı, geliştirilen yöntemin kabul edilebilir duyarlılık, tekrarlanabilirlik sonuçlar verdiği kontrasyon aralığıdır [162].

Doğrusallık çalışmalarında seyreltmeler ile azalan konsantrasyonlarda dedektör cevabının doğrusal olması istendiğinden maddenin değişen konsantrasyonları ile elde edilen verilerden oluşan eğrinin regresyon analizi yapıldı. Korelasyon katsayısı, y (ordinat)-kesim noktası, eğrinin eğimi hesaplanarak eğri denklemi elde edildi. Analitik



çalışmalarda minimum 5 noktadan doğrusallığın gösterilmesi ve korelasyon katsayısının 0.99 dan büyük olması istenir[161].

Stok zeltinin seyreltilmesi ile hazırlanan 60, 50, 40, 30, 20, 10, 5  $\mu\text{g/ml}$  konstrasyondaki zeltilerden her birinden 100'er  $\mu\text{L}$  kapaklı cam tüplere alınır ve üzerlerine 50  $\mu\text{L}$ 'er 80  $\mu\text{g/ml}$  İS zeltisinden 100  $\mu\text{L}$ 'er 300  $\mu\text{g/ml}$  FMOC zeltisi, 25  $\mu\text{L}$ 'er 0,1N pH 9 borat tamponu, 600  $\mu\text{L}$  acetonitril ilave edilerek zelti 30 saniye girdap karıştırıcıda karıştırılır. Su banyosunda 60  $^{\circ}\text{C}$ 'de 5 dakika süre ile ısıtıldı. Soğutulduktan sonra 10  $\mu\text{L}$  10 mg/ml glisin zeltisi ve mobil faz tamponu olan 20 mM potasyum fosfat zetisi ilave edildi. 15 saniye girdap karıştırıcıda karıştırılmasını takiben 5 dakika bekletildi. Her bir karışımın 25  $\mu\text{L}$ 'si 1.0 mL/dak. akış hızındaki 25  $^{\circ}\text{C}$  deki  $\text{C}_{18}$  kolona uygulandı.

Asetonitril/20 mM potasyum fosfat tamponu (pH 3.9)-1mL/L trietilamin mobil faz sistemi ile izokratik elüsyon yapılan analizlerde fluorimetrik dedektörle 260 nm eksitasyon, 315 nm emisyon dalga boylarında belirlenen piklerin alanları lld. Her konsatrasyon için 5 kez çalışılarak bulunan PRE-FMOC pik alanları, IS-FMOC pik alanlarına oranlandı. Ortalama pik alan oranları değerlerine karşılık konsatrasyon değerleri arasında ölçü eğrileri hazırlandı. l eğrilerinin regresyon analizlerine ait sonuçlar Bölüm 4.2.2'de bildirilmistir.

### 3.4.3 .Doğruluk

Bir analitik yöntemin doğruluğu, yöntem ile elde edilen analiz sonuçlarının gerçek değerlere olan yakınlığıdır. Doğrusal aralık içinde yer alan 3 farklı konsatrasyonun doğruluğu tekrarlı analiz yapılarak belirlenmeli ve % geri kazanım bağlı ortalama hata olarak verilmelidir[162].

Geliştirilen yöntemin doğruluğunu saptamak için standart katma yöntemi uygulandı. Geliştirilen yöntemin doğruluk çalışması için zeltiye 10, 20 ve 30  $\mu\text{g/ml}$ 'lik konstrasyonlarında hazırlanan pregabalin 100  $\mu\text{L}$  ve 1,5 $\mu\text{g}/10\mu\text{L}$ 'lik konsatrasyonda hazırlana kapsüldeki zeltisi katılmasıyla yapıldı. Elde edilen alan değerleri ölçü eğrisi denkleminde yerine konularak konstrasyon değerleri bulundu. Bu konstrasyonları teorik konstrasyonlara bölümü sonucu ortaya çıkan yüzde geri kazanımlar aşağıdaki denkleme göre hesaplandı ve sonuçlar Bölüm 4.2.3'de bildirildi.

$$\% \text{ GERİKAZANIM} = \text{Bulunan kons.} / \text{Eklene kons} * 100$$

GERİ kazanım sonuçlarını ortalama, standart sapma ve bağıl standart sapma değerleri hesaplandı.

#### **3.4.4.Gün içi ve Günler Arası Tekrarlanabilirlik**

Bir analitik yöntemin kesinliği ölçüm sonuçlarının birbirlerine yakınlığını olarak ifade edilir [162].

Üç farklı konstrasyonda (1, 2, 3 µg/mL ) pregabalin çözeltileri alındı ve bölüm 3.4.2'de anlatıldığı gibi çalışıldı. Analizler aynı gün ve 3 farklı günde yapıldı. Her bir örnek için en az 3 kez çalışıldı. Sonuçlar Bölüm 4.2.4'de bildirildi.

#### **3.4.5. Tayin sınırı (LOQ) ve Gözlenebilme sınırı (LOD)**

Bir analitik yöntemin gözlenebilme sınırı (LOD), analiz yapılan örneğin belirlediği fakat kantitatif sınırlar içerisine girmeyen en düşük derişimdir. Tayin sınırı ise analizi yapılan örneğin kabul edilebilir düzeyde kesin ve doğru olarak miktarının tayin edilebileceği doğrusallık sınırları içerisine giren veya doğrusallığın en alt derişimini oluşturan düzeyidir. LOD ve LOQ değerleri doğrudan veya hesapla bulunabilir. Doğrudan sinyal/gürültü oranları sırasıyla 3:1 ve 10:1 olacak şekilde belirlenebilir veya aşağıdaki formüllerle hesaplanabilir. Bu tez çalışmasında aşağıdaki formüllerle hesaplanan sonuçlar Bölüm 4.2.5'te bildirildi.

$$LOD = 3 \times SD/M$$

$$LOQ = 10 \times SD/M$$

SD: Ölçü eğrisindeki kesim noktalarının standart sapması

M: Eğimlerin ortalaması

### **3.5.Kapsülerde PRE Miktarı Tayini**

#### **3.5.1. HPLC Yöntemi**

10 adet ALYSE® kapsül 150 mg tek tek tartıldı. 1 kapsül ağırlığına denk gelecek toz karışım 100 mL'lik bir balonjojeye aktarıldı ve su ile hacmine tamamlandı, 30 dakika ultrasonik banyoda tutuldu. Sonra mavi bantlı süzgeç kağıdından süzüldü. Bu çözeltinin bir kısmı 0.45 µm lik filtreden süzüldü. Bu çözeltiden 250 µl alındı ve suyla 10 mL'ye seyreltildi. Bu çözeltinin 100 µL si ile Bölüm 3.4.2. de anlatıldığı gibi

çalışıldı. Kapsüllerdeki PRE miktarı daha önceden hazırlanan ölçü eğrisine ait doğru denkleminde hesaplandı. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.3.e verilmiştir.

### 3.5.2. Kıyas Yöntemi

Kıyas yöntemi olarak 'Indian Pharmacopea 2010' dan alınan HPLC yöntemi kullanıldı. Kıyas yönteminde de yukarıdaki yöntemde adı geçen HPLC cihazı kullanıldı. Yönteme ait kromatografik koşulları aşağıdaki gibidir:

Kolon : Luna C18 (250 mm x 4.6 mm x 5 µm)

Mobil faz : Potasyum dihidrojen fosfat (pH 6)/ Metanol/ Asetonitril (92:5:3, h/h/h)

Akış hızı : 1 ml/dak

Dedektör dalga boyu : 205 nm

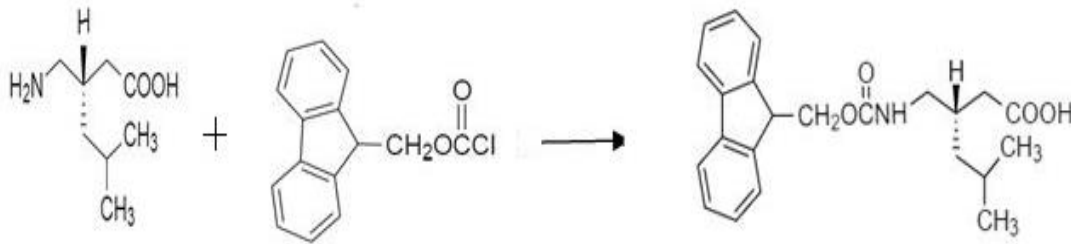
Yukarıdaki koşullarda 5.0, 10.0, 20.0, 30.0, 40.0, 50.0 ve 60.0 µg/mL doğrusallık konsantrasyonlarında n= 5 olacak şekilde enjeksiyonlar yapıldı. Elde edilen alanlardan doğru denklemi  $y = 1.252 C + 0.033$  olarak hesaplandı. Yukarıda elde edilen kapsül tozu kullanılarak elde edilen çözeltilerin sisteme enjeksiyonundan elde edilen alanlar doğru denkleminde yerine konarak tablet miktar tayini hesaplandı. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.3.de verilmiştir.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Analiz Yönteminin Geliştirilmesi ile ilgili Çalışmalar

#### 4.1.1. PRE ile Fmoc Arasındaki Reaksiyon Koşullarının incelenmesi

PRE-Fmoc türevinin oluşumu üzerine, reaksiyon süresi, sıcaklık, asetonitril-su oranı, belirteç miktarı, pH ve ilave edilen glisin miktarı gibi parametrelerin etkisi incelendi. PRE ile Fmoc arasındaki reaksiyon Şekil 4.1 de görülmektedir.



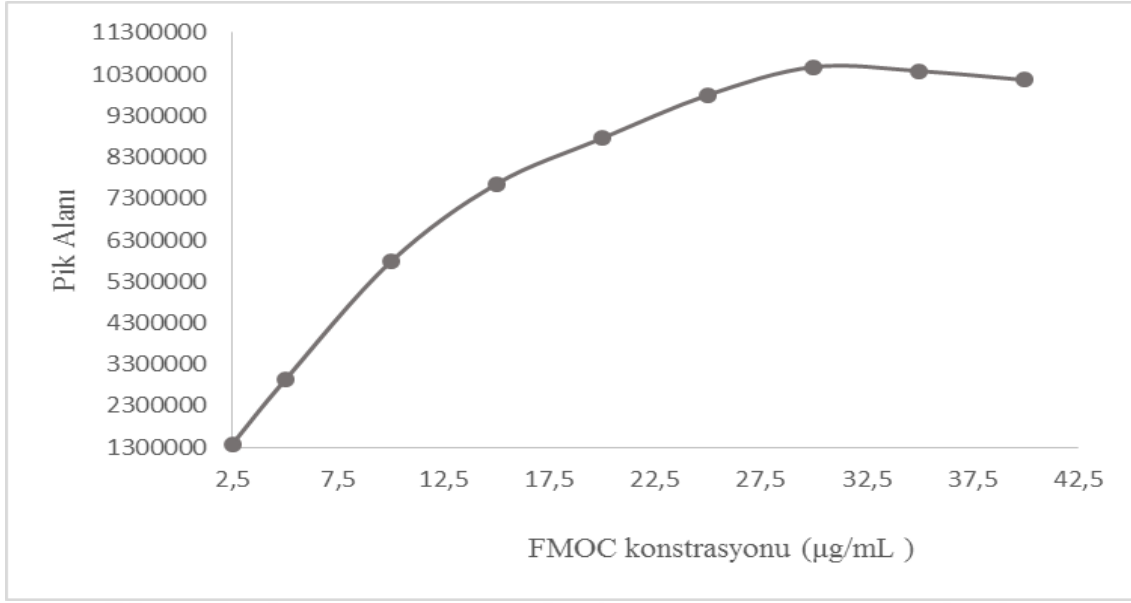
Şekil 4.1: PRE ile Fmoc arasındaki reaksiyon

#### 4.1.1.1. Fmoc Konsantrasyonunun belirlenmesi

PRE-Fmoc türevinin kantitatif olarak oluşması için en uygun Fmoc konsantrasyon miktarını belirlemek amacı ile Bölüm 3.3.1.1.de anlatıldığı gibi çalışıldı. Oluşan türevlere ait pik alanlarının, 400-25 µg/mL arasındaki Fmoc konsantrasyonuna karşı gösterdiği değişim Tablo 4.1 ve Şekil 4.2 de görülmektedir. Bu sonuçlara göre 300 µg/mL Fmoc çözeltisinden 100 µL ilave edildiğinde (30 µg) en iyi sonuçlara ulaşıldığı saptanmıştır.

Tablo 4.1:Fmoc konsantrasyonuna göre türevin pik alanı değişimi

Fmoc (µg/mL)	40	35	30	25	20	15	10	5	2,5
Pik Alanı	10.161.854	10.380.047	10.477.143	9.800.043	8.755.421	7.653.896	5.773.382	2.920.125	1.367.576



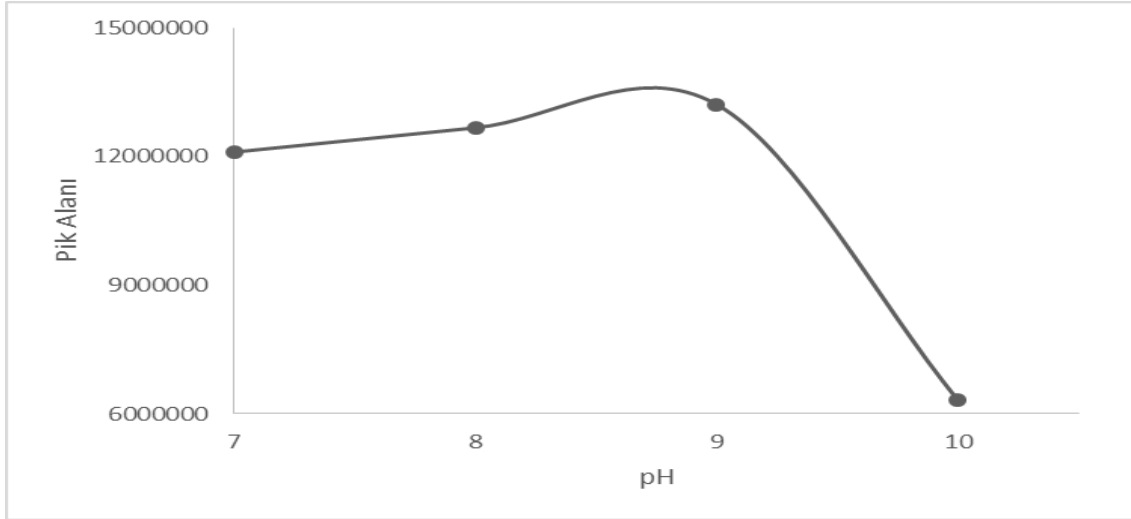
**Şekil 4.2: PRE-FMOC türevinin oluşumu üzerine belirteç miktarının etkisi**

#### 4.1.1.2.pH

PRE ile FMOC arasındaki reaksiyonun en iyi hangi pH değerinde yürüdüğünü belirlemek amacıyla pH 7-10 arasında hazırlanmış bir seri tampon çözelti ile Bölüm 3.3.1.2.de anlatıldığı gibi çalışıldı. Yapılan denemeler sonucunda reaksiyonda en yüksek verimin pH 9 da elde edildiği görüldü. Sonuçlar Tablo 4.2 ve Şekil 4.3 de gösterilmiştir.

**Tablo 4.2: Çeşitli pH'larda oluşan PRE-FMOC türevlerinin pik alanları**

pH	7	8	9	10
Pik Alanı	12.108.225	12.674.545	13.220.331	6.320.029



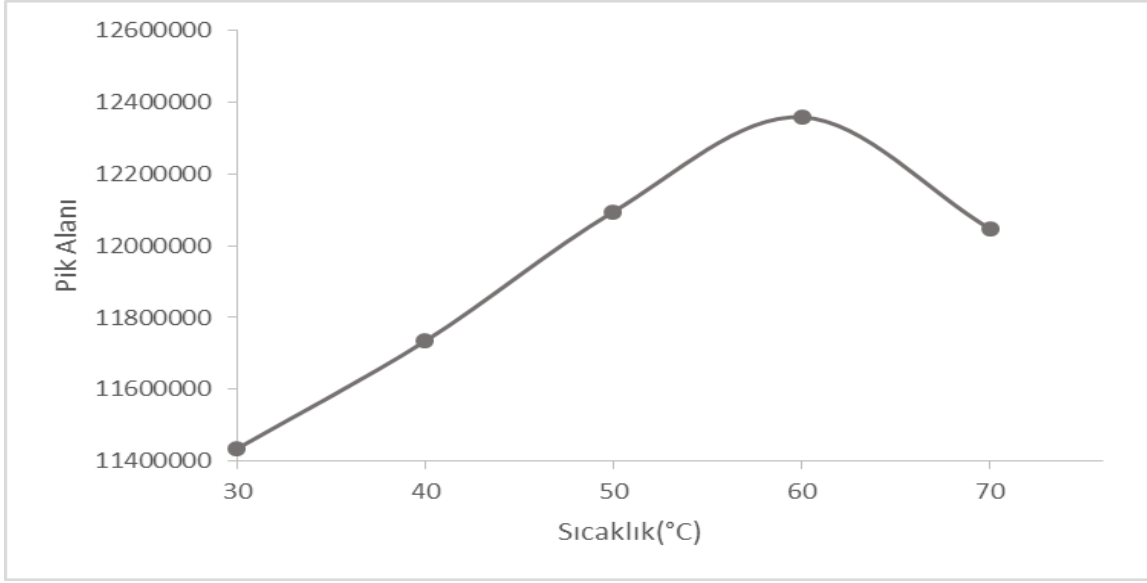
**Şekil 4.3: PRE-FMOC türevinin oluşumu üzerine pH'nın etkisi**

#### 4.1.1.3. Sıcaklık

PRE-FMOC türevinin kantitatif olarak oluşması için en uygun sıcaklığı saptamak amacıyla 30, 40, 50, 60 ve 70°C sıcaklıklarda Bölüm 3.3.1.3. de anlatıldığı gibi çalışıldı. Yapılan denemeler sonucunda reaksiyonun en iyi 60°C de yürüdüğü saptandı. Sonuçlar Tablo 4.3 ve Şekil 4.4 de gösterilmiştir.

**Tablo 4.3: PRE-FMOC türevlerinin çeşitli sıcaklıklardaki pik alanları**

Sıcaklık(°C)	30	40	50	60	70
<b>Pik Alanı</b>	11.433.639	11.734.409	12.095.828	12.359.360	12.047.357



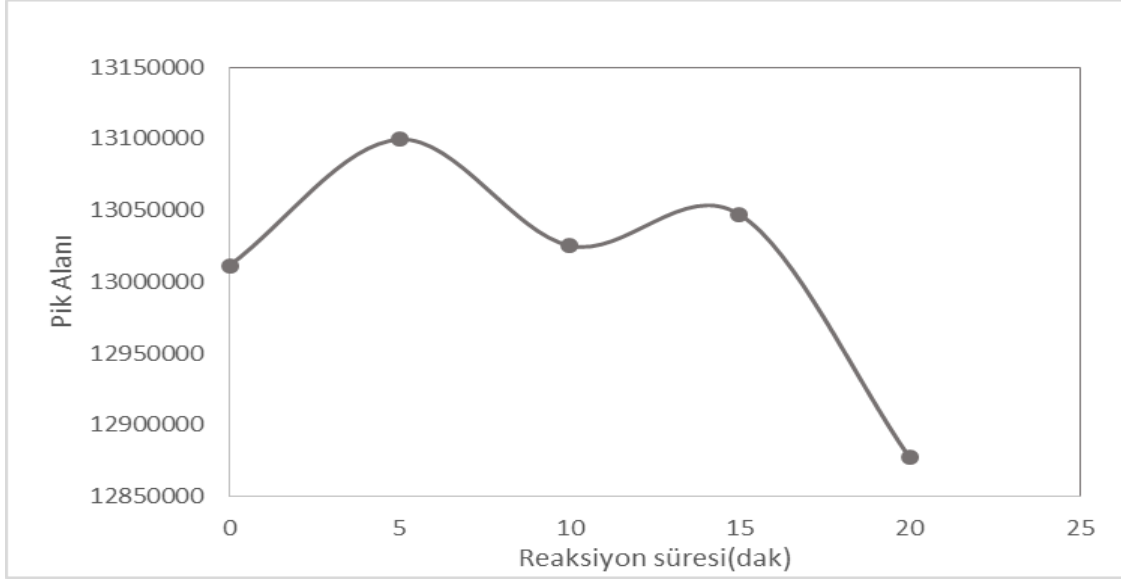
**Şekil 4.4: PRE-FMOC türevinin oluşumu üzerine sıcaklığı'nın etkisi**

#### 4.1.1.4. Reaksiyon süresi

PRE-FMOC türevinin kantitatif olarak oluşması için en uygun reaksiyon süresini saptamak amacıyla 60 °C de 0, 5, 10, 15 ve 20 dakika bekleme süreleri ile Bölüm 3.3.1.4.de anlatıldığı gibi çalışıldı. Oluşan türevlere ait pik alanlarının, reaksiyon süresine karşı gösterdiği değişim izlendi. En iyi reaksiyon veriminin 5 dakikada elde edildiği görüldü. Sonuçlar Tablo 4.4 ve Şekil 4.5 de gösterilmiştir.

**Tablo 4.4:PRE-FMOC türevlerinin çeşitli sürelerde pik alanları**

Reaksiyon süresi(dak.)	0	5	10	15	20
Pik alanı	13.011.487	13.099.556	13.025.327	13.047.127	12.877.171



**Şekil 4.5: PRE-FMOC türevinin oluşumu üzerine sürenin etkisi**

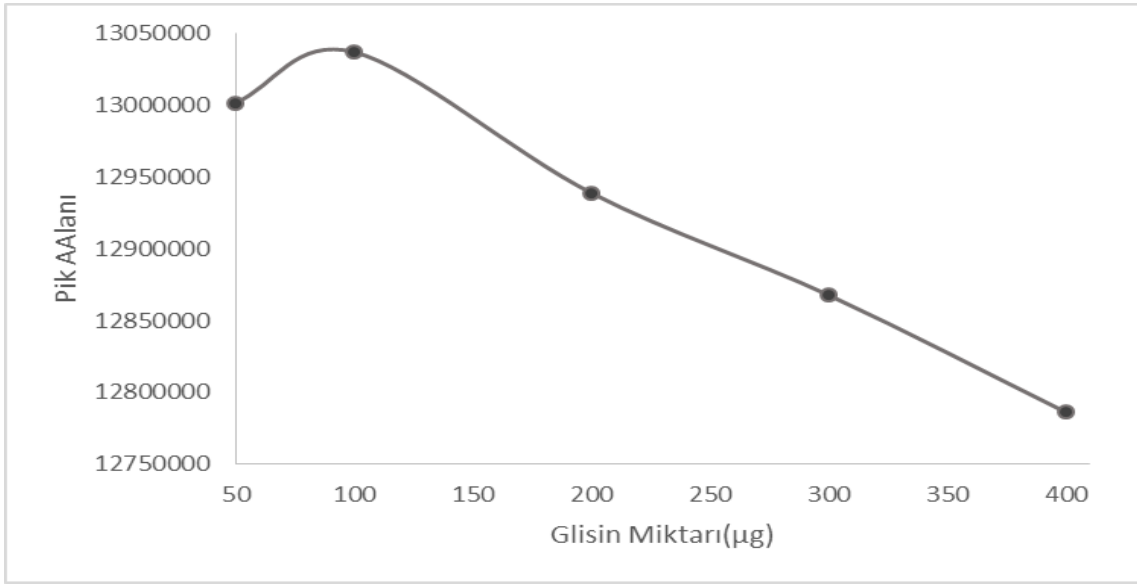
#### 4.1.1.5. Glisin Miktarı

Reaksiyonun Bölüm 3.3.1.5. de anlatıldığı gibi yürütülmesinin ardından 10 mg/mL glisin çözeltisinden 5,10, 20, 30, 40  $\mu$ L'lik hacimler ilave edildi ve 30 saniye girdap karıştırıcıda karıştırıldı. 1 dakika beklemenin ardından türevler HPLC sistemine enjekte edildi. Alınan sonuçlar incelendiğinde reaksiyonun en iyi 10  $\mu$ l (100  $\mu$ g) glisin ilavesi ile yürüdüğü saptandı. Sonuçlar Tablo 4.5 ve Şekil 4.6 de gösterilmiştir.

**Tablo 4.5: Değişik glisin miktarlarından oluşan PRE-FMOC türevlerine ait pik alanları**

Glisin Miktarı ( $\mu$ g)	50	100	200	300	400
Pik Alanı	13.001.896	13.037.269,5	12.938.958,5	12.867.665	12.785.942,5





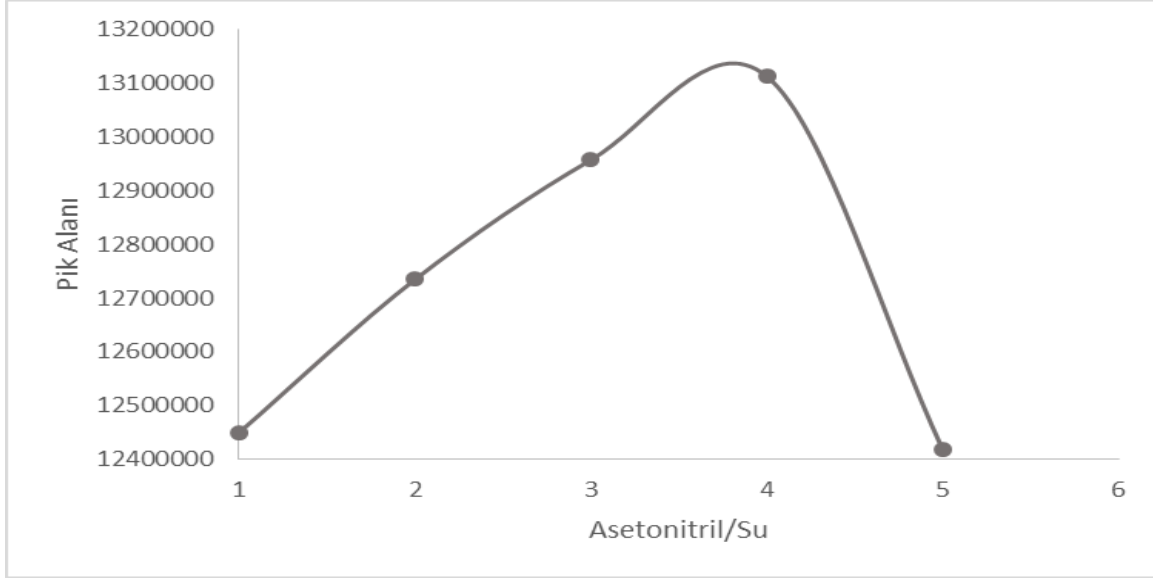
**Şekil 4.6:PRE-FMOC türevinin oluşumu üzerine glisin miktarının etkisi**

#### 4.1.1.6. Asetonitril Su Oranı

PRE ile FMOC arasındaki reaksiyonun en iyi şekilde yürümesi için gerekli asetonitril su oranını belirlemek amacıyla oran 1, 2, 3, 4, 5 olacak şekilde Bölüm 3.3.1.6. da anlatıldığı gibi çalışıldı. Tablo 4.6 de değişik oranlardaki türevlerin pik alanları, Şekil 4.7 de ise bu veriler sonucu oluşturulmuş grafik görülmektedir. Veri sonuçlarına göre optimum asetonitril su oranının 4 olduğu belirlenmiştir.

**Tablo 4.6: Değişik asetonitril su oranlarında oluşan PRE-FMOC türevlerine ait pik alanları**

Asetonitril/su	1	2	3	4	5
Pik alanı	12.449.610	12.734.877	12.957.645	13.113.144	12.417.212



**Şekil 4.7: PRE-FMOC türevinin oluşumu üzerine asetonitril/su oranının etkisi**

#### 4.1.1.7. Türevin Stabilitesi

PRE-FMOC türevinin dayanıklılığını incelemek için Bölüm 3.3.1.7’de anlatıldığı gibi çalışıldı. Oda sıcaklığında ve karanlıkta belirli aralıklarda bekletilen türevlere ait pik alanları Tablo 4.7 de verilmiştir. Elde edilen veriler incelendiğinde türevin oda sıcaklığında karanlıkta ve +4°C’de karanlıkta 24 saat boyunca dayanıklı kaldığı belirlenmiştir.

**Tablo 4.7:Oda sıcaklığında ve karanlıkta bekletilen PRE-FMOC türevinin stabilitesi**

Süre(saat)	Pik Alanı		
	Başlangıç	12 saat sonra	24 saat sonra
Oda sıcaklığında/Gün ışığında	13.212.330	12.781.496	12.527.145
Oda sıcaklığında/Karanlıkta	13.209.831	13.148.498	13.103.617
+4°C’de /Karanlıkta	13.210.581	13.209.941	13.207.697

#### 4.1.2. PRE'nin HPLC ile Analizi

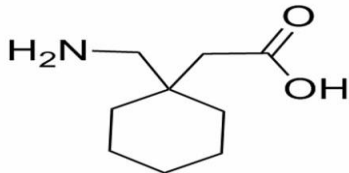
PRE'nin FMOC ile oluşturduğu türevin HPLC ile analizini gerçekleştirebilmek amacıyla kolon, dedektör dalga boyları, hareketli faz sistemi, akış hızı ve kolon sıcaklığı gibi kromatografik parametreler belirlendi. Sonra bulunan optimum reaksiyon koşullarında çalışılarak İS madde analiz yapıldı. Yöntemin validasyonu yapıldı ve geliştirilen yöntem maddenin kapsüllerdeki analizlerine uygulandı. Elde edilen sonuçlar bu bölümde verilmistir.

##### 4.1.2.1. Kromatografi Koşullarının Belirlenmesi

5 µm partikül çaplı 250 mm uzunluğunda, 4,60 mm iç çaplı bir C<sub>18</sub> kolonda çeşitli oranlarda asetonitril-10 mM orto-fosforik asit (pH 2,4), asetonitril-50 mM potasyum fostat tamponu (pH 3,9), metanol-50 mM potasyum fostat tamponu (pH 3,9), asetonitril-20 mM potasyum fostat tamponu (pH 3,9) karışımları izokratik kullanılarak denenmiştir. Bu denemeler sonucunda en iyi ayrılmanın oda sıcaklığında izokratik elüsyon 70:30 h/h oranında mobil faz olarak asetonitril-20 mM potasyum fostat tamponu (pH 3,9) kullanılmasıyla 1 mL/dak akış hızında gerçekleştiği saptanmıştır. Türevin retansiyon zamanı 8,4'dak dır.

##### 4.1.2.2. İç Standart Seçimi

PRE-FMOC türevinin gerek sulu çözeltide gerekse kapsül tayini için en uygun iç standardı belirlemek üzere 3.3.2.3.'de adı geçen maddelerle denemeler yapıldı. Gabapentin dışındaki maddeler türev oluşturmasına rağmen PRE türevi için geliştirilen kromatografi koşullarında düşük ayırma faktör değerleri gösterdiği gözlemlendi. Sonuç olarak en uygun İS olarak alıkonma zamanı 9,7 dakika olan gabapentin (Şekil 4.8) seçildi.

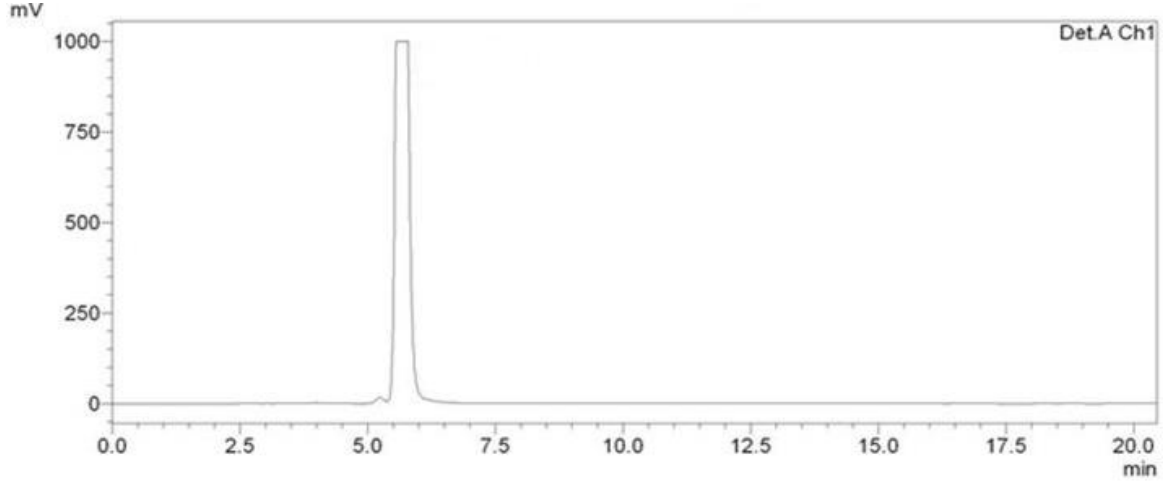


Şekil 4.8: Gabapentin'in molekül yapısı

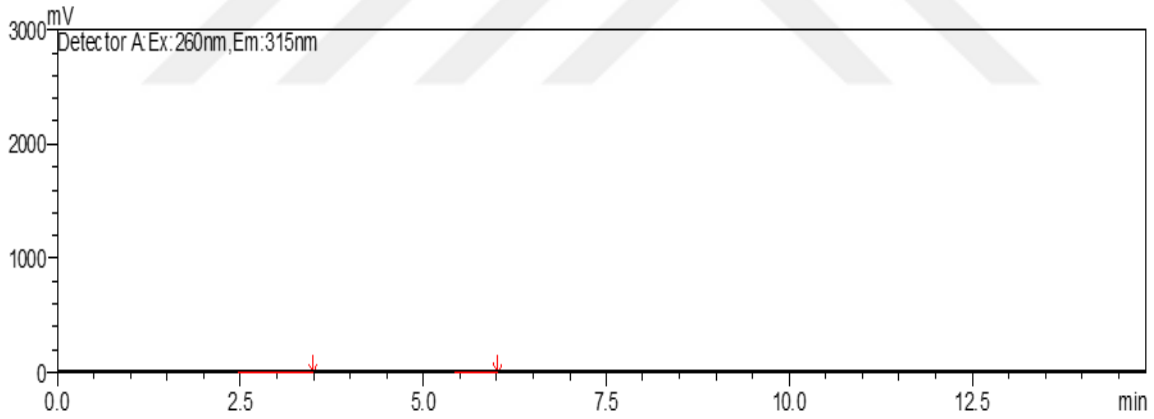
## 4.2.Yöntem Validasyonu

### 4.2.1. Seçicilik

Yöntemin seçiciliği için yapılan madde içermeyen reaksiyon karışımı ve mobil faz enjeksiyonundan Şekil 4.9 ve 4.10'daki gibi kromatogramlar elde edildi.



**Şekil 4.9:Madde içermeyen reaksiyon karışımı enjeksiyonuna ait bir kromatogram**



**Şekil 4.10: Mobil faz enjeksiyonuna ait bir kromatogram**

Ayrıca pik saflığına da bakıldı ve girişim olmadığı görüldü.

### 4.2.2.Doğrusallık (Sulu Çözeltide Hazırlanan Ölçü Eğrisinin Regresyon Analizi)

0,5-6  $\mu\text{g/mL}$  konsantrasyon aralığında 7 farklı konsantrasyondaki standart çözeltiler Bölüm 3.4.2. de anlatıldığı gibi çalışıldı. Her konsantrasyona karşı elde edilen ortalama pik alan oranı değerleri yardımıyla 0.5-6  $\mu\text{g/mL}$  aralığında Şekil 4.9 da görülen ölçü eğrisi çizildi. Pik alan oranları ortalamaları ( $\bar{A}$ ), standart sapma (s) ve bağıl

standart sapma (RSD) değerleri ve en küçük kareler yöntemi kullanılarak alan oranı değerlerinden hesaplanan ortalama doğru denklemi,  $A = mC + b$  [ $m =$  eğim,  $b =$  kesim noktası,  $C =$  konsantrasyon] ve ortalama korelasyon katsayısı ( $r$ ) Tablo 4.6 da verilmistir. Tablo 4.7 de ise 5 kez çalışma sonucu elde edilen her bir ölçü eğrisinin regresyon analizine ait parametreler yer almaktadır.

**Tablo 4.8: PRE'nin 0.5-6 ug/mL konsantrasyon aralığında sulu çözeltide hazırlanan ölçü eğrilerine ait pik alan oranları değerleri ve istatistik verileri**

NO	1	2	3	4	5	6	7
C ( $\mu\text{g/mL}$ )	0.5	1	2	3	4	5	6
A <sub>1</sub> /IS	0,142699	0,286241	0,525085	0,816807	1,083543	1,315693	1,55453
A <sub>2</sub> /IS	0,143838	0,287131	0,529641	0,816837	1,083417	1,316548	1,554991
A <sub>3</sub> /IS	0,144718	0,294595	0,53268	0,822656	1,08955	1,319683	1,558782
A <sub>4</sub> /IS	0,144165	0,293626	0,531074	0,82218	1,089189	1,318619	1,557907
A <sub>5</sub> /IS	0,142098	0,285222	0,525011	0,816621	1,082805	1,312605	1,5435807
A/IS ort	0,143504	0,289363	0,528698	0,81902	1,085701	1,31663	1,553958
s	0,001078	0,004399	0,003501	0,003107	0,003363	0,002755	0,006082
RSD(%)	0,751103	1,520402	0,662265	0,379407	0,309762	0,209254	0,391368

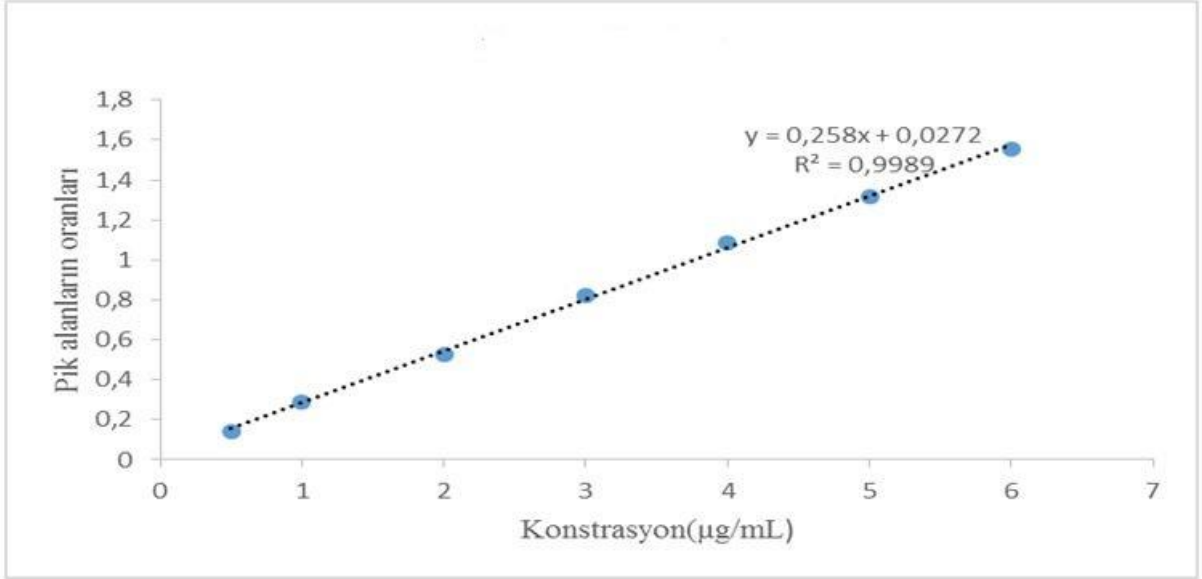
Ortalama alan oran ( $\bar{A}$ ) değerlerinde hesaplanan doğru denklemi  $A=0,258C+0,0272$   
( $R^2=0,9989$ )

RSD:Bağıl standart sapma SD:Standart sapma A/IS:Pregabali alanı/iç standart alanı

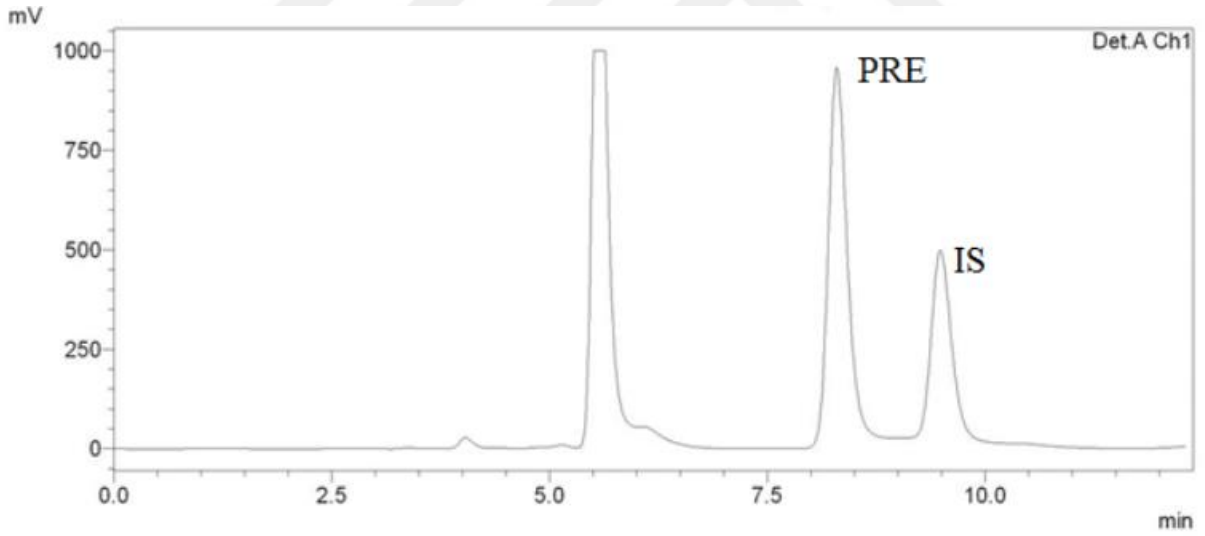
**Tablo 4.9:Tablo 4.8 daki ölçü eğrilerinin regresyon analizlerine ait parametreler**

	1	2	3	4	5	ortalama
m	0,2584	0,2581	0,2582	0,2582	0,257	0,0272
b	0,0242	0,0261	0,0302	0,0294	0,026	0,258
r	0,9990	0,9991	0,9989	0,9988,	0,9987	0,9989

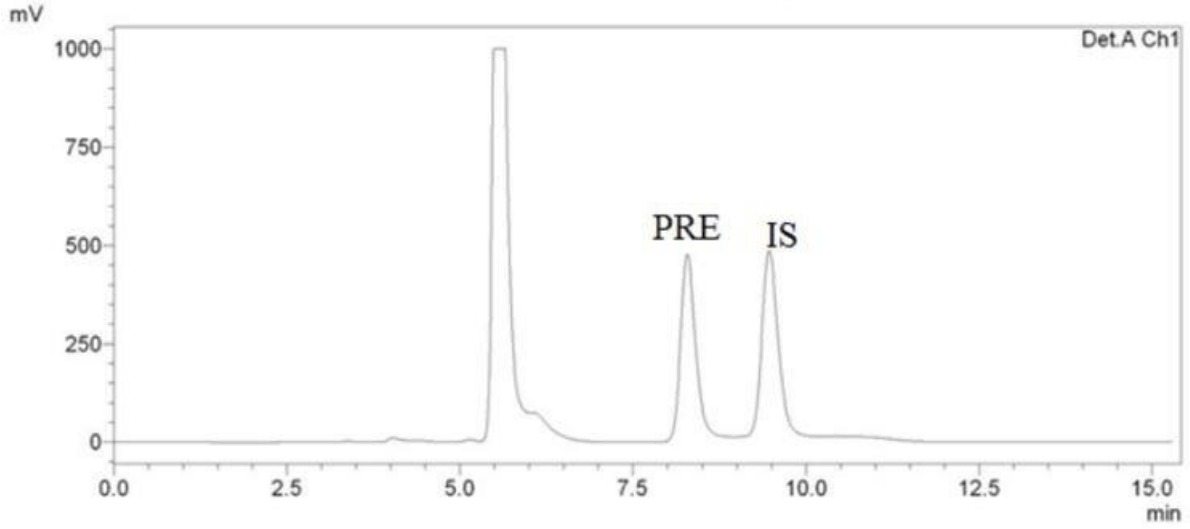
m:Eğim b:Kesim noktası r:regresyon katsayısı



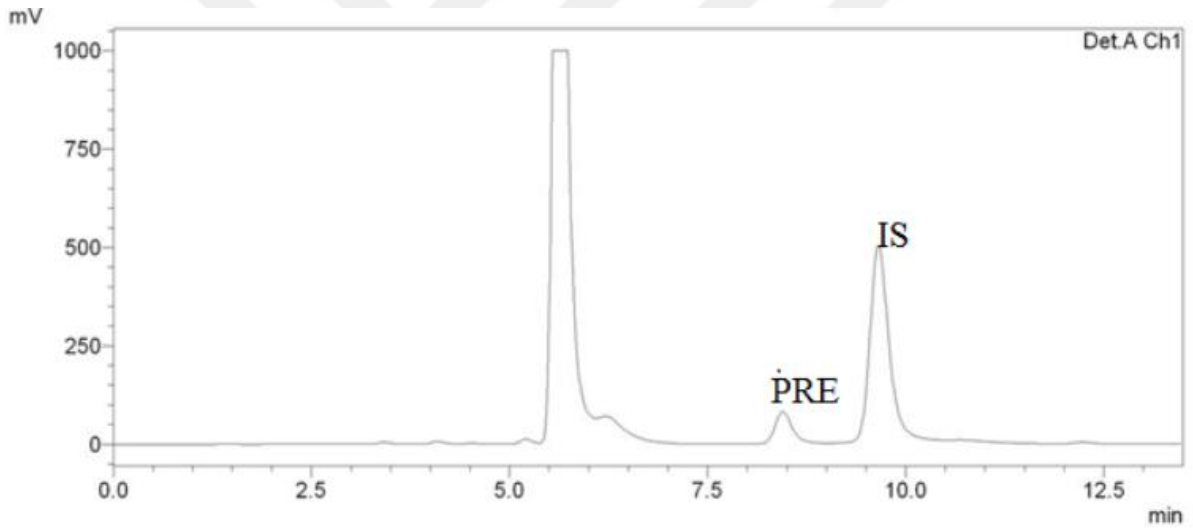
Şekil 4.11:PRE' nin 0.5-6 µg/mL konstrasyon aralığında sulu çözeltide hazırlanan ölçü eğrisi



Şekil 4.12:Doğrusallık konstrasyonlarından 6 µg/mL pregabalin türevine ait kromatogram



**Şekil 4.13:Doğrusallık konstrasyonlarından 3 µg/mL pregabalin türevine ait kromatogram**



**Şekil 4.14: Doğrusallık konstrasyonlarından 0,5 µg/mL pregabalin türevine ait kromatogram**

#### 4.2.3. Doğruluk

Üç farklı konstrasyonda PRE'nin doğruluk çalışması bölüm 3.4.3.'de anlatıldığı gibi çalışıldı. Sonuçlar tablo 4.10 da verilmiştir.

**Tablo 4.10: PRE'nin kapsül'den geri kazanımı**

Alınan Konsantrasyon ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) <sup>1</sup>	İlave edilen Konsantrasyon ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ )	Bulunan Konsantrasyon ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) (Ortalama $\pm$ SD <sup>2</sup> )	RSD <sup>3</sup> (%)	Geri Kazanım (%)
1,5	1,0	1,04 $\pm$ 0,135	0,001	103,93
	2,0	2,01 $\pm$ 0,140	0,003	100,66
	3,0	2,99 $\pm$ 0,116	0,003	99,57
ORT : % 101.39				

<sup>1</sup> Alyse® kapsül, her her kapsülde 150 mg PRE içerir.

<sup>2</sup>SD: Standart sapma

<sup>3</sup>RSD: Relatif standart sapma

#### 4.2.4. Gün içi ve Günler arası kesinlik

Üç farklı konsantrasyonda (1,2, 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) gün içi ve günler arası çalışıldı. Herbir örnek için 3 kez çalışıldı. Bölüm 3..4.4 de anlatıldığı gibi çalışılmıştır.

**Tablo 4.11: PRE'nin gün içi kesinliği**

	1,00	2,00	3,00
Bulunan Konsantrasyon ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ )	1,055	2,004	3,189
	1,054	2,003	3,188
	1,032	1,972	3,185
	1,036	1,972	3,185
	1,007	1,989	3,180
	1,003	1,998	3,170
Ortalama	1,042	1,989	3,183
Standart sapma(s)	0,008	0,015	0,007
Bağılstandart sapma(RSD)	0,829	0,762	0,221



**Tablo 4.12: PRE'nin günler arası kesinliği**

	1,00	2,00	3,00
	1,055	2,004	3,188
Bulunan	1,054	2,003	3,177
Konstrasyon (µg / mL)	1,032	1,975	3,083
	1,036	1,974	3,081
	1,007	1,923	3,059
	1,003	1,929	3,059
Ortalama	1,031	1,968	3,107
Standart sapma(S)	0,022	0,035	0,058
Bağlı standart sapma(RSD%)	2,164	1,782	1,894

#### 4.2.5. Tayin sınırı (LOQ) ve Gözlenebilme sınırı (LOD)

Yöntemin LOQ ve LOD değerleri Bölüm 3.1.5 de anlatıldığı gibi sırasıyla 0,039 µg/mL ve 0,117 µg/mL olarak bulunmuştur.

#### 4.3. Gelistirilen Yöntemin kapsüllerde PRE Tayinine Uygulanması ve Sonuçların Kıyas Yöntemi ile Elde Edilen Sonuçlarla Karşılaştırılması

10 adet ALYSE® kapsüller 150 mg pregabalin içeren Bölüm 3.5.1. de anlatıldığı gibi geliştirilen HPLC yöntemiyle analiz edildi. Bulunan sonuçları kıyaslamak amacıyla kapsüller HPLC-UV yöntemiyle analiz edildi. Her iki yöntem ile elde edilen sonuçlar ve 6 adet tayin üzerinden hesaplanan ortalama ( $\bar{A}$ ), standart sapma (s), RSD ve %95 olasılık düzeyinde güven aralığı [ $\bar{A} \pm (t.s/n)$ ] değerleri Tablo 4.13 te verilmiştir.

Geliştirilen yöntem ve kıyas yöntemi ile elde edilen sonuçların ortalamalar yönünden karşılaştırılması student (t) testi, standart sapmalar yönünden karşılaştırılması

ise Fischer (F) testi uygulanarak yapıldı. Tablo 4.13 deki sonuçlar incelendiğinde hesaplanan t- ve F- değerleri %95 olasılık düzeyi ve 6 deneme için ilgili cetvellerde bildirilen değerlerden daha küçük olduğundan geliştirilen HPLC yöntemi ile kıyas yöntemi arasında gerek doğruluk gerekse kesinlik bakımından anlamlı bir fark olmadığı belirlendi.

**Tablo 4.13: 150 mg PRE içeren kapsüllerin analiz sonuçları ve sonuçların istatistiki olarak değerlendirilmesi**

n	Geliştirilen HPLC Yöntemi		Farmakope Yöntemi	
	mg/tablet	%	mg/tablet	%
1	150,71	100,47	150,96	100,64
2	149,88	101,34	152,83	101,88
3	150,99	99,92	153,83	102,55
4	151,99	98,69	148,44	98,96
5	152,01	100,66	147,66	98,44
6	148,04	101,32	155,02	103,35
$\bar{A}$	150,60	100,40	151,45	100,97
s	0,99		1,98	
RSD	0,99		1,96	
Güven Aralığı	3,013		3,015	
Güven Sınırları	148,927-152,953		148,905-152,935	
t=0,259	n <sub>1</sub> =n <sub>2</sub> =6		t <sub>tablo</sub> =2,228	
F=1,38	P=0,05		F <sub>tablo</sub> =4,28	

$\bar{A}$ :Ortalama değer s:Standar Sapma RSD:Bağıl Standart Sapma

## 5. TARTIŞMA

Pregabalin farmakoterapötik olarak antiepileptikler grubunda yer alan bir ilaç maddesidir. Santral nöral ağ içinde epilepsi, , nöropatik ağrı, anksiyete gibi durumlarda aktivite gösteren, yeni tanımlanmış etki mekanizması olan bir bileşiktir. Ağız yoluyla alınan günlük doz yetişkinlerde 150-600 mg dır [1,8,9].

PRE doymuş yapısı nedeniyle yeterli ışık absorpsiyonu göstermemektedir. Bu nedenle bu maddenin analizlerinde yaygın olarak kütle dedeksiyonuna veya türevlendirmeye dayanan LC metodları çok sayıda kullanılmıştır. Bu çalışmada da, PRE'nin farmasötik preparatlardaki tayinine olanak sağlayan ve florimetrik dedeksiyona dayanan yeni bir HPLC yöntemi geliştirilmiştir. Yöntemde ileride yapacağımız biyolojik sıvı analizlerine de olanak sağlaması açısından hassas bir belirteç aranmış ve PRE' nin türevlendirme çalışmalarında daha önce kullanılmamış olan ve hassas türevler oluşturan FMOC belirteci tercih edilmiştir.

FMOC belirtecinin başka maddeler ile yapılan türevlendirme çalışmalarında, reaksiyonunun alkali ortamda, oda sıcaklığında veya ısı uygulanarak yürüdüğü, ortamdaki su/organik faz oranının reaksiyonda önemli rol oynadığı, belirteç fazlasının ortamdan uzaklaştırılması gerektiği ve bunun için aminoasit çözeltileri ilavesi veya ekstraksiyon gibi yöntemlerin kullanıldığı görülmüştür. Bu bilgiler ışığında FMOC ve PRE arasındaki reaksiyonun optimum koşulları incelenmiştir.

Daha önce yapılan literatür çalışmalarında türev çözeltilisinin maksimum  $\lambda_{ex}$  ve  $\lambda_{em}$  dalgaboylarının sırasıyla 260 nm ve 315 nm olduğu gözlenmiş ve türevlerin takibinin bu dalga boyunda yapılmasına karar verilmiştir.

Sonra C<sub>18</sub> kolonda çeşitli oranlarda asetonitril-10 Mm orto-fosforik asit (pH 2,4), asetonitril-50 mM potasyum fostat tamponu (pH 3,9), metanol-50 mM potasyum fostat tamponu (pH 3,9), asetonitril-20 mM potasyum fostat tamponu (pH 3,9) karışımları izokratik kullanılarak denenmiştir. Bu denemeler sonucunda en iyi ayrılmanın oda sıcaklığında izokratik elüsyon 70:30 h/h oranında mobil faz olarak asetonitril-20 mM potasyum fostat tamponu (pH 3,9) kullanılmasıyla 1 mL/dak akış hızında gerçekleştiği saptanmıştır. Türevin retansiyon zamanı 8,4'dak dır.

Reaksiyonun en verimli şekilde yürüdüğü pH değerini bulmak için pH 7 ile 10 arasında tampon çözeltiler hazırlanmış ve bu pH larda oluşturulan türevlerin analizleri yapılmıştır. Alınan sonuçlarda pH 7 den 9 kadar pregabalin pik alanının arttığı pH 10 da ise pregabalin pik alanının azaldığı gözlenmiştir. Oluşan türevlerde en yüksek pik alanına pH 9 da ulaşılmıştır.

Reaksiyonun en iyi yürüdüğü sıcaklığı bulmak için 30, 40, 50, 60, 70°C' lerdeki sıcaklıklarda analizler yapılmış en yüksek pik alanına 60°C ulaşılmıştır.

Optimum reaksiyon süresini belirlemek için reaksiyonlara 60°C de 0, 5, 10, 15, 20 dakika bekletilerek devam edilmiştir. Yapılan ölçüm sonuçlarında alan değerlerinin birbirine çok yakın bulunduğu görülmüş ve zaman kaybını önlemek amacıyla 60°C de 5 dakika ısıtmanın yeterli olduğu görülmüştür.

Reaksiyonu durdurmak için 10 mg/mL'de glisin çözeltisinden 5, 10, 20, 30, 40'ar µL lik hacimler reaksiyon çözeltisine eklenmiş pik alanlarında önemli ölçüde değişiklik gözlenmediği için 10 mg/mL'lik çözeltiden 10 µL eklemeye karar verildi.

Pregabalin molekül yapısında primer amin (3-aminometil) grubu bulunmaktadır. Pregabalin ile FMOC arasındaki reaksiyonun primer amin (-NH<sub>2</sub>-) grubu üzerinden oluştuğu bilinmektedir.

FMOC ve PRE arasındaki reaksiyon organik ve sulu faz oranı çalışmalarında en iyi sonuçun organik faz/su oranı 4 olduğunda elde edildiği saptanmıştır.

İS madde olarak gabapentin belirlenmiştir. Analiz sonuçları PRE-FMOC türevlerine ait pik alanlarının, gabapentin-FMOC türevlerine ait pik alanlarına oranlanması ile değerlendirilmiştir.

Ölçü eğrisi floresans türevlerin izin verdiği 0,5-6 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanmıştır. Daha yüksek konsantrasyonlarda doğrusallık bozulduğu için bu aralık alınmıştır. Konsantrasyona karşılık pik alanı oranı değerleri yardımıyla doğru denklemleri çalışılmış ve en küçük kareler yöntemi uygulanarak hesaplamalar yapılmıştır. Ardından yöntemin validasyon çalışmaları tamamlanmış ve geliştirilen yöntem 150 mg pregabalin içeren kapsüllerin (ALYSE®) analizine uygulanmış ve elde edilen sonuçlar farmakope yöntemi ile elde edilenlerle istatistik yöntemleri kullanılarak karşılaştırılmıştır. İki yöntemden elde edilen sonuçların standart sapmalar kullanılarak karşılaştırılması Fischer (F) testi, ortalamalar kullanılarak karşılaştırılması Student (t) testi yardımı ile

yapılmıştır. Hesaplanan t- ve F- değerleri ilgili cetvellerde bildirilen teorik değerlerden daha küçük bulunmuş ve bu nedenle geliştirdiğimiz yöntem ve kıyas yöntemi arasında ortalamalar ve standart sapmalar açısından anlamlı bir fark olmadığına karar verilmiştir. Bunun anlamı yöntemimizin doğruluk ve kesinliğinin kıyaslanan farmakope yöntemi kadar iyi ve yeterli olduğudur.

Özet olarak farmasötik preparatlarda PRE miktar tayini için MS yöntemlere göre daha ucuz, son derece duyarlı, tekrarlanabilirliği ve doğruluğu yeni bir yöntem geliştirilmiştir. PRE ile FMOC arasındaki reaksiyonun kısa sürede oluşması, ön işlem içermesine rağmen doğruluk ve kesinliğinin yüksek olması başlıca avantajlarıdır. Geliştirilen ve valide edilen bu yöntem rutin farmasötik analizlerde rahatlıkla kullanılabilir niteliktedir.



## KAYNAKLAR

- [1] <http://www.yeditepepilepsisiz.com/epilepsi/>
- [2] Ezgi SEVİNÇ, Bipolar Bozukluk İle Anksiyete Bozuklukları Komorbiditesi. Üsküda Üniversitesi Sosyal Bilimleri Enstitüsü Klinik Psikolojik Anabilim Dalı. 2014.
- [3] Available from: Yök tez:  
Tarkan Mustafa YAMANOĞLU. Pregabalin İle Morfin Arasındaki Etkileşmenin Kronofarmakolojisi. 2015.
- [4]. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5486971#section=Experimental-Properties>
- [5]. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5486971#section=Chemical-and-Physical-Properties>
- [6]. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5486971#section=InChI-Key>
- [7]. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5486971#section=Names-and-Identifiers>
- [8]. <http://www.drugs.ie/downloadDocs/2017/Pregabalin%20FactSheet%20Revision%20-%204.pdf>.
- [9] Santosh G. Shep, S.R. Lahoti., Sikar Road. Development and Validation of UV Spectrophotometric Method Of Pregabalin In Bulk And Pharmaceutical Formulation. *International Journal of PharmTech Research CODEN (USA)*. 2013, **5**: 1264-1270.
- [10] [http://www.journalagent.com/tjn/pdfs/TJN\\_14\\_3\\_161\\_171.pdf](http://www.journalagent.com/tjn/pdfs/TJN_14_3_161_171.pdf)
- [11] Daniel M. Tassone, PharmD; Eric Boyce, PharmD; Jennifer Guyer, PharmD; and Donald Nuzum, PharmD . Pregabalin: A Novel 7-Aminobutyric Acid Analogue in the Treatment of Neuropathic Pain, Partial-Onset Seizures, and Anxiety Disorders. *Clinical Therapeutics*. 2007, **29**: 26-48.
- [12] Potluri, H., Battula, SR., Yeturu, S. Validated Stability Indicating Rp-Hplc Method For Simultaneous Determination Of Nortriptyline And Pregabalin In Bulk And Combined Dosage Formulations. *International Journal Of Pharmaceutical Sciences And Research*. 2017, **62**: 3490-3495.

- [13] Yoshikawa, N., Naito, T., Yagi, T., Kawakami, J. A Validated Fluorometric Method for the Rapid Determination of Pregabalin in Human Plasma Applied to Patients With Pain. *Ther Drug Monit.* 2016, **38**: 628-633.
- [14] Martinc, B., Roskar, R., Grabnar, I., Vovk, T. Simultaneous determination of gabapentin, pregabalin, vigabatrin, and topiramate in plasma by HPLC with fluorescence detection. *Journal Of Chromatography B-Analytical Technologies In The Biomedical And Life Sciences.* 2014, **962**: 82-88.
- [15] Souri, E., Eskandari, M., Tehrani, M. Barazandeh., Adib, N., Ahmadkhaniha, R. HPLC Determination of Pregabalin in Bulk and Pharmaceutical Dosage Forms After Derivatization with 1-Fluoro-2,4-dinitrobenzene. *Asian Journal of Chemistry* 2013, **25**: 7332-7336.
- [16] Kasawar, GB., Farooqui, MN. Development and Validation of HPLC Method for the Determination of Pregabalin in Capsules. *Indian Journal Of Pharmaceutical Sciences.* 2010, **72**: 517-519.
- [17] Martinc, B., Grabnar, I., Mrhar, A., Vovk, T. Rapid High-Performance Liquid Chromatography Method for Determination of Pregabalin in a Pharmaceutical Dosage Form Following Derivatization with Fluorescamine. *Journal Of Aoac International.* 2010, **93**: 1069-1076.
- [18] Gujral, RS., Haque, SM., Kumar, S. A novel method for the determination of pregabalin in bulk pharmaceutical formulations and human urine samples. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* .2009, **3**: 327-334.
- [19] Chen, X., Zhang, D., Deng, J., Fu, X. Determination of optical impurity of pregabalin by HPLC with pre-column chiral derivatization. *Journal Of Chromatographic Science.* 2008, **46**: 42-44.
- [20] Jadhav, AS., Pathare, DB., Shingare, MS. Validated enantioselective LC method, with precolumn derivatization with Marfey's reagent, for analysis of the antiepileptic drug pregabalin in bulk drug samples. *Chromatographia.* 2007, **65**: 253-256.
- [21] Vermeij, TAC., Edelbroek, PM. Simultaneous high-performance liquid chromatographic analysis of pregabalin, gabapentin and vigabatrin in human serum by precolumn derivatization with o-phthalaldehyde and fluorescence detection. *Journal Of*

*Chromatography B-Analytical Technologies In The Biomedical And Life Sciences*.2004,**810**: 297-303.

[22]Parameswari,SA.,Arunamma,G.Stability Indicating Rp-Hplc Method For Simultaneous Determination Of Epalrestat And Pregabalin In Bulk And Tablet Dosage Form. *International Journal Of Pharmaceutical Sciences And Research*.9: 2018,1844-1850.

[23] Karinen, R., Vindenes, V., Hasvold, I., Olsen, Kirsten M., Christophersen, AS., Oiestad, E. Determination of a selection of anti-epileptic drugs and two active metabolites in whole blood by reversed phase UPLC-MS/MS and some examples of application of the method in forensic toxicology cases. *Drug Testing And Analysis*.2015,**7**: 634-644.

[24] Kostic, N., Dotsikas, Y., Jovic, N., Stevanovic, G.,Malenovic, A., Medenica, M. Quantitation of pregabalin in dried blood spots and dried plasma spots by validated LC-MS/MS methods. *Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis*.2015,**109**:79-84.

[25] Hegstad, S., Hermansson, S., Betner, I., Spigset, O., Falch, BMH. Screening and quantitative determination of drugs of abuse in diluted urine by UPLC-MS/MS. *Journal Of Chromatography B-Analytical Technologies In The Biomedical And Life Sciences*.2014, **947**: 83-95.

[26] Pauly, C., Yegles, M., Schneider, S. Pregabalin Determination in Hair by Ultra-High-Performance Liquid ChromatographyTandem Mass Spectrometry. *Journal Of Analytical Toxicology*.2013, **37**: 676-679.

[27] Kostic, N., Dotsikas, Y., Malenovic, A., Stojanovic, BJ., Rakic, T., Ivanovic, D., Medenica, M. Stepwise optimization approach for improving LC-MS/MS analysis of zwitterionic antiepileptic drugs with implementation of experimental design. *Journal Of Mass Spectrometry*.2013, **48**: 875-884.

[28] Chahbouni, A., Sinjewel, A., den Burger, JCG., Vos, RM., Wilhelm, AJ., Veldkamp, AI. Swart, EL. Rapid Quantification of Gabapentin, Pregabalin, and Vigabatrin in Human Serum by Ultrapformance Liquid Chromatography With Mass-Spectrometric Detection. *Therapeutic Drug Monitoring*.2013,**35**: 48-53.



- [29] Dahl, SR., Olsen, KM., Strand, DH. Determination of gamma-hydroxybutyrate (GHB), beta-hydroxybutyrate (BHB), pregabalin, 1,4-butane-diol (1,4BD) and gamma-butyrolactone (GBL) in whole blood and urine samples by UPLC-MSMS. *Journal Of Chromatography B-Analytical Technologies In The Biomedical And Life Sciences*.2012,**885**: 37-42.
- [30] Dzygiel, P., Fraier, D. Simultaneous Determination of Pregabalin, Sildenafil and Its Active Metabolite in Rat Plasma Utilising SPE Followed by LC-MS-MS. *Chromatographia*.2011,**73**: 1177-1182.
- [31] Oertel, R., Arenz, N., Pietsch, J., Kirch, W. Simultaneous determination of three anticonvulsants using hydrophilic interaction LC-MS. *Journal Of Separation Science*.2009,**32**: 238-243.
- [32] Mandal, U., Sarkar, AK., Gowda, KV., Agarwal, S., Bose, A., Bhaumik, U., Ghosh, D., Pal, TK. Determination of pregabalin in human plasma using LC-MS-MS. *Chromatographia*.2008,**67**: 237-243.
- [33] Vaidya, V., Yetal, SM., Roy, SMN., Gomes, NA., Joshi, SS. LC-MS-MS determination of pregabalin in human plasma. *Chromatographia*.2007,**66**: 925-928.
- [34] Sorensen, LK., Hasselstrom, JB. Determination of Therapeutic gamma-Aminobutyric Acid Analogs in Forensic Whole Blood by Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography-Electrospray Tandem Mass Spectrometry. *Journal Of Analytical Toxicology*. 2014,**38**: 177-183.
- [35] Patel, N. D., Rajyaguru, H. ,Patel, P. B. Development And Validation Of First Order Derivative Spectrophotometric Method For Simultaneous Estimation Of Pregabalin, Methycobamin, And Alpha Lipoic Acid In Multicomponent Dosage Form. *International Journal Of Pharmaceutical Sciences And Research*. 2016,**7**: 2458-2464.
- [36] Gouda, AA., Al Malah, Z. Development and validation of sensitive spectrophotometric method for determination of two antiepileptics in pharmaceutical formulations. *Spectrochimica Acta Part A-Molecular And Biomolecular Spectroscopy*.2013, **105**: 488-496.
- [37] Walash, MI.,Bella, F., El-Enany, N., El-Maghrabey, MH. Simple and sensitive spectrofluorimetric method for the determination of pregabalin in capsules through derivatization with fluorescamine. *Luminescence*.2011,**26**: 342-348.

- [38] Walash, Ml., Belal, FF., El-Enany, NM., El-Maghrabey, MH. Utility of certain nucleophilic aromatic substitution reactions for the assay of pregabalin in capsules. *Chemistry Central Journal*.2011,**36**:
- [39] Armagan O. Development and Validation of Selective Spectrophotometric Methods for the Determination of Pregabalin in Pharmaceutical Preparation. *Chinese Journal Of Chemistry*.2009,**27**: 781-786.
- [40] Onal, A., Sagirli, O. Spectro photo metric and spectrofluorimetric methods for the determination of pregabalin in bulk and pharmaceutical preparation. *Spectrochimica Acta Part A-Molecular And Biomolecular Spectroscopy*.2009,**72**: 68-71.
- [41]Sowjanya, K.,Thejaswini, J. C.,Gurupadayya, B. M.,Priya, M. Indu. Spectrophotometric determination of pregabalin using 1,2-naphthoquinone-4-sulfonic acid sodium and 2,4-dinitrophenyl hydrazine in pharmaceutical dosage form. *Pharmacia Lettre*.2011,**3**: 47-56.
- [42] Bali,A.,Gaur p. A novel method for spectrophotometric determination of pregabalin in pure form and in capsules. *US National Library of Medicine National Institutes of Health*.2011.
- [43] Harnisch, H., Chien, YH., Scriba, GKE. Capillary Electrophoresis Method for the Chiral Purity Determination of Pregabalin Derivatized with Dansyl Chloride. *Chromatographia*.2018, **81**: 719-725.
- [44] Tafesse, TB., Mazdeh, FZ., Chalipour, A., Tavakoli, M., Hajimahmoodi, M. Gas Chromatography-Mass Spectrometry Determination of Pregabalin in Human Plasma Using Derivatization Method. *Chromatographia*.2018, **81**: 501-508.
- [45] Zeid, AM., Kaji, N., Nasr, JJM., Belal, FF., Baba, Y.,Walash, MI. Stacking-cyclodextrin-microchip electrokinetic chromatographic determination of gabapentinoid drugs in pharmaceutical and biological matrices. *J Chromatogr A*.2017, **1503**: 65-75.
- [46] Hlozek, T.,Bursova, M., Coufal, P., Cabala, R. Gabapentin, Pregabalin and Vigabatrin Quantification in Human Serum by GC-MS After Hexyl Chloroformate Derivatization. *J Anal Toxicol*.2016, **40**: 749-753.

- [47] Gholivand, MB., Jalalvand, AR., Goicoechea, HC. Developing a novel computationally designed impedimetric pregabalin biosensor. *Electrochimica Acta*.2014,**133**: 123-131.
- [48] Alghamdi, A.F. Development of Square Wave Voltammetric Method for the Electrochemical Determination of Pregabalin as Pregabalin-Cu(II) Complex Using Graphite Electrode. *Moroccan Journal Of Chemistry*. 2016,**4**: 853-861.
- [49] Martinc, B., Vovk, T. A Simple High-Throughput Method for Determination of Antiepileptic Analogues of gamma-Aminobutyric Acid in Pharmaceutical Dosage Forms Using Microplate Fluorescence Reader. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*.2013,**61**:1009-1014.
- [50] Rodriguez, J.,Castaneda, G., Munoz, L. Direct determination of pregabalin in human urine by nonaqueous CE-TOF-MS. *Electrophoresis*.2013,**34**: 1429-1436.
- [51] Mudiam, MKR., Chauhan, A., Jain, R., Ch, R., Fatima, G., Malhotra, E., Murthy, RC. Development, validation and comparison of two microextraction techniques for the rapid and sensitive determination of pregabalin in urine and pharmaceutical formulations after ethyl chloroformate derivatization followed by gas chromatography-mass spectrometric analysis. *Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis*.2012,**70**:310-319.
- [52] Themelis, DG., Tzanavaras, PD., Boulimari, Ea. Generic Automated Fluorimetric Assay For The Quality Control Of Gamma Aminobutyric Acid-Analogue Anti-Epileptic Drugs Using Sequential Injection. *Analytical Letters*.2010,**43**:905-918.
- [53].[https://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:NvaAySR9K2gJ:https://en.wikipedia.org/wiki/Fluorenylmethyloxycarbonyl\\_chloride+&cd=3&hl=tr&ct=clnk&gl=tr](https://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:NvaAySR9K2gJ:https://en.wikipedia.org/wiki/Fluorenylmethyloxycarbonyl_chloride+&cd=3&hl=tr&ct=clnk&gl=tr)
- [54] Şerife Evrim Tekkeli, Memantinin tayini için yeni bir yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi.İstanbul Üniv.,Sağlık Bilimleri Enstitüsü,Analitik Kimya Analim Dalı.2007.
- [55] Ptacek P., Klima J., Macek J. "Determination of alendronate in human urine as 9-fluorenylmethyl derivative by high performance liquid chromatography." *Journal of Chromatography B* 2s002, **767**: 111-116.

- [56] Aymard G., Labarthe B., Warot D., Berlin I., Diquet B. Sensitive determination of ephedrine and norephedrine in human plasma samples using derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate and liquid chromatography. *Journal of Chromatography B* .2000, **744**: 25-31.
- [57] Bellagamba F., Moretti V.M., Mentasti T. Albertini A. High-performance liquid chromatographic determination of polyamines in milk as their 9-fluorenylmethoxycarbonyl derivatives using a column-switching technique. *Journal of Chromatography A* 1997, **791**: 79–84.
- [58] Kim J.W., Kim S.U., Lee H.S., Kim I., Ahn M.Y., Ryu K.S. Determination of 1-deoxynojirimycin in *Morus alba* L. leaves by derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate followed by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* .2003, **1002**: 93-99.
- [59] Torano J.S. Guchelaar H.J. Quantitative determination of the macrolide antibiotics erythromycin, roxithromycin, azithromycin and clarithromycin in human serum by high-performance liquid chromatography using pre-column derivatization with 9-fluorenylmethoxyoxycarbonyl chloride and fluorescence detection. *Journal of Chromatography B* .1998 ,**720**: 89-97.
- [60] Yuh Y.S., Chen J.L., Chiang C.H. Determination of blood sugars by high pressure liquid chromatography with fluorescent detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 1998 ,**16**: 1059–1066.
- [61] Bahrami G., Mirzaeei S., Kiani A. Sensitive analytical method for Topiramate in human serum by HPLC with pre-column fluorescent derivatization and its application in human pharmacokinetic studies. *Journal of Chromatography A*. 2004 ,**813**: 175–180.
- [62] Bahrami G., Kiani A. Sensitive high-performance liquid chromatographic quantitation of gabapentin in human serum using liquid–liquid extraction and precolumn derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate. *Journal of Chromatography B* .2006, **835**: 123-126.
- [63] Tandy S., Schulin R., Suter M. J. F., Novack B. Determination of [S,S]-ethylenediamine disuccinic acid (EDDS) by high performance liquid chromatography after derivatization with FMOC. *Journal of Chromatography A* 2005, **1077**: 37-43.

- [64] Kazachkov M., Yu P.H.. Novel HPLC procedure for detection and quantification of aminoacetone, a precursor of methylglyoxal, in biological samples. *Journal of Chromatography B*. 2005, **824**: 116–122.
- [65] Hutson P.R., Crawford M.E., Sorkness R.L. Liquid chromatographic determination of hydroxyproline in tissue samples. *Journal of Chromatography B*. 2003, **791**: 427–430.
- [66] Bahrami G., Mohammadi B. A new on-line, in-tube pre-column derivatization technique for high performance liquid chromatographic determination of azithromycin in human serum. *Journal of Chromatography B*. 2006, **830**: 355-358.
- [67] Pericás C.C., Falcó P.C., Hernández R.H. Application of solid-phase microextraction combined with derivatization to the determination of amphetamines by liquid chromatography. *Analytical Biochemistry*. 2004, **333**: 328-335.
- [68] Pericás C.C., Hernández R.H., Falcó P.C. A new selective method for dimethylamine in water analysis by liquid chromatography using solid-phase microextraction and two-stage derivatization with o-phthalaldehyde and 9-fluorenylmethyl chloroformate. *Talanta*. 2005, **66**: 139–145.
- [69] Stead D.A., Richards R.M.E. Sensitive fluorimetric determination of gentamicin sulfate in biological matrices using solid-phase extraction, pre-column derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate and reversed phase high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B* 1996, **675**: 295-302.
- [70] Nedelkoska T.V., Low G.K.C. High-performance liquid chromatographic determination of glyphosate in water and plant material after pre-column derivatisation with 9-fluorenylmethyl chloroformate. *Analytica Chimica Acta*. 2004, **511**: 145–153.
- [71] Llasera M.P.G., Almaraz L.G., Avila L.E.V., Alvarez A.P. Matrix solid-phase dispersion extraction and determination by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection of residues of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in tomato fruit. *Journal of Chromatography A*. 2005, **1093**: 139–146.
- [72] Ekegren T., Trolin C.G. Determination of polyamines in human tissues by precolumn derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate and high-performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry* 2005, **338**: 179-185.

- [73] Sultana H, Onodera R., Or-Rashid M:M., Wadud S. Convenient method for the determination of arginine and its related compounds in rumen fluid by reversedphase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B* 2001, **755**: 321–329.
- [74] Liu Z., Sha Y., Huang T., Yang B., Duan G.L. High-performance liquid chromatographic determination of vertilmicin in rat plasma using sensitive fluorometric derivatization. *Journal of Chromatography B*. 2005, **828**: 2–8.
- [75] Schwarz E.L., Roberts, W.L., Pasqualia M. Analysis of plasma amino acids by HPLC with photodiode array and fluorescence detection. *Clinica Chimica Acta* .2005, **354**: 83–90.
- [76] Wheal M:S., Heller L.I., Norvell W.A., Welch R.M., Reversed-phase liquid chromatographic determination of phytometallophores from Strategy II Fe-uptake species by 9-fluorenylmethyl chloroformate fluorescence. *Journal of Chromatography A*. 2002, **942**: 177–183.
- [77] Hernandez R.H., Pericas C.C., Andres J.V., Falco P.C. An evaluation of solid phase microextraction for aliphatic amines using derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate and liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2006, **1104**: 40-46.
- [78] Dursun F., Ünlü S., Yurdun T. Determination of Domoic Acid in Plankton Net Samples from Golden Horn Estuary, Turkey, Using HPLC with Fluorescence Detection. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*.2008,**100**: 457–462.
- [79] Muniraj S., Lee H.K., Hsieh C., Jen J.F. Microwave-assisted decomplexation and in-situ headspace in-syringe dynamic derivatization of dimethylamine borane with high performance liquid chromatography-fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*. 2018,**1537**:21-26.
- [80] Zheng N., Xiao H., Zhang Z., Gao X., Zhao X. Rapid and sensitive method for determining free amino acids in plant tissue by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Acta Geochim*.2017,**36**:680-696.
- [81] Smith L.L., Francis K.A., Johnson J.T., Gaskill C.L. Quantitation of fumonisin B1 and B2 in feed using FMOC pre-column derivatization with HPLC and fluorescence detection. *Food Chemistry*.2017,**243**:174-179.

- [82] Suna L., Konga D., Gud W., Guoa W., Taea W., Shana Z., Wang Y., Wanga N. Determination of glyphosate in soil/sludge by high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2017,**1502**: 8-13.
- [83] Cho G., Han K., and Yoon J. Stability Test and Quantitative and Qualitative Analyses of the Amino Acids in Pharmacopuncture Extracted from *Scolopendra subspinipes mutilans*. *J Pharmacopuncture*. 2015,**18**: 44-55.
- [84] Lin Q., Zhang J., Pei W., Zhang C., Yew J. Determination of phosphatidylserine in milk-based nutritional products using online derivatization high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2015,**1381**: 260-263.
- [85] Chepyala D., Tsai I., Sun H., Lin S., Kuo C. Development and validation of a high-performance liquid chromatography-fluorescence detection method for the accurate quantification of colistin in human plasma. *Journal of Chromatography B*. 2015,**980**: 48-54.
- [86] Bolner A., Riva V.D., Galloni E., Perini F. Therapeutic Drug Monitoring of Topiramate with a new HPLC Method, SPE Extraction and High Sensitivity Pre-Column Fluorescent Derivatization. *Clin Lab*. 2014,**60**: 919-923.
- [87] Hami Z., Amini M., Kiani A., Ghazi-Khansari M. High Performance Liquid Chromatography Coupled with Pre-column Derivatization for Determination of Oxidized Glutathione Level in Rats Exposed to Paraquat. *Iran J Pharm Res*. 2013,**12**: 911-916.
- [88] Deveze A., Delmas D. Selective liquid chromatographic determination of trace domoic acid in seawater and phytoplankton: improvement using the ophthalaldehyde/9-fluorenylmethylchloro-formate derivatization. *Limnology And Oceanography: Methods*. 2013,**11**: 327-336.
- [89] Xiaoying Z., Mingfeng W., Baokun Z., Liang H., Tougen L. Shuying W., Wei Z. Simultaneous analysis of AY and amino acids in corn oligopeptides by HPLC-fluorescence detector with OPA/FMOC-Cl pre-column derivatization. *Journal of Food Agriculture and Environment*. 2013,**11**: 86-90.
- [90] Baxter J.H., Johns P.W. Determination of Free Arginine, Glutamine, and  $\beta$ -alanine in Nutritional Products and Dietary Supplements. *Food Analytical Method*. 2012,**5**: 821-827.

- [91] Brueckner H., Flassig S., Kirschbaum J. Determination of biogenic amines in infusions of tea (*Camellia sinensis*) by HPLC after derivatization with 9-fluorenylmethoxycarbonyl chloride (Fmoc-Cl). *Amino Acids*, 2012, **42**: 877-885.
- [92] Mohammadi B., Majnooni M.B., Khatabi P. M., Jalili R., Bahrami G. 9-Fluorenylmethyl chloroformate as a fluorescence-labeling reagent for derivatization of carboxylic acid moiety of sodium valproate using liquid chromatography/tandem mass spectrometry for binding characterization: A human pharmacokinetic study. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2012, **880**: 12-8.
- [93] Fellenberg C., Ziegler J., Handrick V., Vogt T. Polyamine homeostasis in wild type and phenolamide deficient *Arabidopsis thaliana* stamens. *Frontiers In Plant Science.* 2012, **3**:
- [94] Druart C., Delhomme O., Vaufleury A., Ntcho E., Mille M. Optimization of extraction procedure and chromatographic separation of glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid in soil. *Analytical And Bioanalytical Chemistry.* 2011, **399**: 1725-1732.
- [95] Xie, M., Zhou, W., Tong, X. High-performance liquid chromatographic determination of memantine hydrochloride in rat plasma using sensitive fluorometric derivatization. *Journal Of Separation Science.* 2011, **34**: 241-246.
- [96] Chang XJ., Yu ZP., Determination of Etimicin in Rat Plasma using 9-Fluorenylmethyl Chloroformate Precolumn Derivatization by HPLC with Fluorescence Detection. *Journal Of The Brazilian Chemical Society.* 2011, **22**: 1246-1252.
- [97] Delhomme O., Raepel C., Briand, O., Millet, M., Analytical method for assessing potential dermal exposure to pesticides of a non-agricultural occupationally exposed population. *Analytical And Bioanalytical Chemistry.* 2011, **399**: 1325-1334.
- [98] Abrunhosa, L., Calado, T., Resende, T., et al. A Fluorescence-LC Method With Nda Pre-Column Derivatization For Fumonisin B2 determination In Black Aspergilli Cultures. *Journal Of Liquid Chromatography & Related Technologies.* 2011, **34**: 1594-1603.
- [99] Almudever, P., Peris, J.E. Garrigues, T., Diez, O., Melero, A., Alos, M. Quantification of nortriptyline in plasma by HPLC and fluorescence detection. *Journal*



*Of Chromatography B-Analytical Technologies In The Biomedical And Life Sciences*.2010,**878**: 841-844.

[100] Chang, XJ. Peng, JD.,Liu, SP. A Simple and Rapid High Performance Liquid Chromatographic Method with Fluorescence Detection for the Estimation of Amikacin in Plasma -Application to Preclinical Pharmacokinetics. *Journal Of The Chinese Chemical Society*.2010,**57**:34-39.

[101] Jambor, A., Molnar-Perl, I. Quantitation of amino acids in plasma by high performance liquid chromatography:Simultaneousdeproteinizationand derivatization with9-fluorenylmethyloxycarbonyl chloride. *Journal Of Chromatography A*.2009, **1216**: 6218-6223.

[102] Mao SY., Yu, PH., A fluorometric high-performance liquid chromatography procedure for simultaneous determination of methylamine and aminoacetone in blood and tissues. *Analytical Biochemistry*. 2009, **384**: 20-26.

[103] Bahrami G., Mohammadi B. Enhancement of Fluorescence Intensity of Tramadol and Its Main Metabolites in LC Using Pre-Column Derivatization with 9-Fluorenylmethyl Chloroformate.*Chromatographia*. 2008, **68**: 935-940.

[104] Zhu X.L.,Zhu Q.S., Gao Y., Fast Analysis of Free Amino Acids in Tobacco by HPLC with Fluorescence Detection and Automated Derivatization. *Journal of the Chinese Chemical Society*.2008,**55**:1094-1100.

[105] Koros A., Varga, Z., Molnar-Perl I. Simultaneous analysis of amino acids and amines as their o-phthalaldehyde-ethanethiol-9-fluorenylmethyl chloroformate derivatives in cheese by high-performance liquid chromatography. *Journal Of Chromatography A*. 2008,**1203**: 146-152.

[106] Prieto-Blanco M.C., Chafer-Pericas C., Lopez-Mahia, P., Campins-Falco P. Automated on-line in-tube solid-phase microextraction-assisted derivatization coupled to liquid chromatography for quantifying residual dimethylamine in cationic polymers. *Journal Of Chromatography A*. 2008,**1188**:118-123.

[107] Othman A., Lu J., Sunderland T., Cooper G.J.S. Development and validation of a rapid HPLC method for the simultaneous determination of triethylenetetramine and its two main metabolites in human serum. *Journal Of Chromatography B-Analytical Technologies In The Biomedical And Life Sciences*. 2007, **860**: 42-48.

- [108] Hanczko R., Jambor A., Perl A., Molnar-Perl I. Advances in the omicron-phthalaldehyde derivatizations comeback to the omicron-phthalaldehyde-ethanethiol reagent. *Journal Of Chromatography A*. 2007, **1163**: 25-42.
- [109] Khedr, Alaa., Sheba M.A., Darwish I.A. Sensitive determination of trimetazidine in spiked human plasma by HPLC with fluorescence detection after pre-column derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate. *Journal Of Chromatography B-Analytical Technologies In The Biomedical And Life Sciences*. 2007, **856**:337-342.
- [110] Koros A., Hanczko R., Jambor A. Et.al. Analysis of amino acids and biogenic amines in biological tissues as their o-phthalaldehyde/ethanethiol/fluorenylmethyl chloroformate derivatives by high-performance liquid chromatography - A deproteinization study. *Journal Of Chromatography A*. 2007, **1149**:46-55.
- [111] You J., Liu L., Zhao W., et.al. Study of a new derivatizing reagent that improves the analysis of amino acids by HPLC with fluorescence detection: application to hydrolyzed rape bee pollen. *Analytical And Bioanalytical Chemistry*. 2007, **387**:2705-2718.
- [112] Bauza Thierry., Kelly MT., Blaise Alain. Study of polyamines and their precursor amino acids in Grenache noir and Syrah grapes and wine of the Rhone Valley. *Food Chemistry*. 2007, **105**:405-413.
- [113] Huang T., Deng CH., Chen N., Liu Z., Duan G.L. High performance liquid chromatography for the determination of glucosamine sulfate in human plasma after derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate. *Journal Ofng Separation Science*. 2006, **29**:2296-2302.
- [114] Zhang LJ., Huang TM., Fang XL., Li XN., Wang QS., Zhang ZW., Sha XY. Determination of glucosamine sulfate in human plasma by precolumn derivatization using high performance liquid chromatography with fluorescence detection: Its application to a bioequivalence study. *Journal Of Chromatography B-Analytical Techno-Logies In The Biomedical And Life Sciences*. 2006, **842**:8-12.
- [115] Chafer-Pericas C., Campins-Falco P., Herraez-Hernandez R. Comparative study of the determination of trimethylamine in water and air by combining liquid chromatography and solid-phase microextraction with on-fiber derivatization. *TALANTA*. 2006, **69**:716-723.

- [116] Mao JJ., Zhang HW., Luo J., et.al. New method for HPLC separation and fluorescence detection of malonaldehyde in normal human plasma. *Journal Of Chromatography B-Analytical Technologies In The Biomedical And Life Sciences*.2006,**832**: 103-108.
- [117] Lopez-Cervantes-J., Sanchez-Machado DI., Rosas-Rodriguez JA.,Analysis of free amino acids in fermented shrimp waste by high-performance liquid chromatography. *Journal Of Chromatography A*. 2006,**1105**:106-110.
- [118] Corbera M., Hidalgo M., Salvado V., Extraction and preconcentration of the herbicide glyphosate and its metabolite AMPA using anion-exchange solid phases. *Microchimica Acta*. 2006,**153**:203-209.
- [119] Yun MH., Kwon K. High-performance liquid chromatography method for determining alendronate sodium in human plasma by detecting fluorescence: Application to a pharmacokinetic study in humans. *Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis*. 2006,**40**:168-172 .
- [120] Hanczko R., Koros A., Toth F., Molnar-Perl I. Behavior and characteristics of biogenic amines, ornithine and lysine derivatized with the o-phthalaldehyde-ethanethiol-fluorenylmethyl chloroformate reagent. *Journal Of Chromatography A*. 2005, **1087**:210-222.
- [121] You JM., Zhang HF., Shi YW., Zhao XN., Chen XM. Development of a sensitive fluorescent derivatization reagent 1,2-benzo-3,4-dihydrocarbazole-9-ethoxy carbonylhydrazine and its application for determination of aldehydes from alcoholic beverage using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection and enhance mass spectrometric identification. *Talanta*. 2005,**66**:982-992.
- [122] Chafer-Pericas C., Herraiez-Hernandez R., Campis-Falco P. A new selective method for dimethylamine in water analysis by liquid chromatography using solid-phase microextraction and two-stage derivatization with o-phthalaldialdehyde and 9-fluorenylmethyl chloroformate. *Talanta*. 2005,**66**:1139-1145.
- [123] Herraiez-Hernandez, R., Chafer-Pericas, C., Campins-Falco, P. Analysis of methylamine by solid-phase microextraction and HPLC after on-fibre derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate. *Analytica Chimica Acta*. 2004,**513**:425-433.

[124] Whitehead TL., Holmes WE., Flores BJ., Leidensdorf JW. Using solid-phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry and high performance liquid chromatography with fluorescence detection to analyze fluorescent derivatives of the biogenic amines creatine and creatinine. *Spectroscopy Letters*. 2004,**37**:95-103.

[125] Kim JW., Kim SU., Lee HS., Kim I., Ahn MY., Ryu KS. Determination of 1-deoxynojirimycin in *Morus alba* L. leaves by derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate followed by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal Of Chromatography A*.2003,**1002**:93-99.

[126] You JM., Shan YC., Zhen L., Zhang L., Zhang L. Determination of peptides and amino acids from wool and beer with sensitive fluorescent reagent 2-(9-carbazole)-ethyl chloroformate by reverse phase high-performance liquid chromatography and liquid chromatography mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*. 2003,**313**:17-27.

[127]Buratti M., Valla C., Xaiz D., Brambilla G., Colombi A. Determination of hexafluoroisopropanol, a sevoflurane urinary metabolite, by 9-fluorenylmethyl chloroformate derivatization. *Journal Of Chromatography B-Analytical Technologies In The Biomedical And Life Sciences*.2002,**776**:237-243.

[128] Le Bot B., Colliaux K., Pelle D., Briens C., Seux R., Clement M. Optimization and performance evaluation of the analysis of glyphosate and AMPA in water by HPLC with fluorescence detection. *Chromatographia*.2002,**56**:161-164.

[129] Edder P., Coppex L., Cominoli A., Corvi C. Analysis of erythromycin and oleandomycin residues in food by high-performance liquid chromatography with fluorometric detection. *Food Additives & Contaminants*.2002, **19**: 232-240.

[130] Wheal MS., Heller LI., Norvell WA., Welch RM. Reversed-phase liquid chromatographic determination of phytometallophores from Strategy II Fe-uptake species by 9-fluorenylmethyl chloroformate fluorescence.2002, *Journal Of Chromatography A*.2002,**942**:177-183.

[131] Sultana H. Onodera R., Or-Rashid MM., Wadud S. Convenient method for the determination of arginine and its related compounds in rumen fluid by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal Of Chromatography B*. 2001,**755**:321-329.

- [132] Zhu X., Cai J., Yang J., Su Q. Determination of glucosamine in impure chitin samples by high-performance liquid chromatography. *Carbohydrate Research*.2005, **340**:1732–1738.
- [133] Liang G.S., Warren L.B., Reginald F.C. Isolation of the 9-fluorenylmethyl chloroformate derivative in the determination of sulphamethazine. *Mikrochimica Acta*.1998, **128**:31-36.
- [134] Beño E.,Góra R.,Hutta M.Development of a precolumn derivatization HPLC method with diode-array detection for the determination of amino sugars in peat and soil humic acids.*Journal of Separation science*. 2018,**41**:809-990.
- [135] Wang X., Wu H., Luo R., Xia D., Jiang Z., Han H. Separation and detection of free D- and L-amino acids in tea by off-line two-dimensional liquid chromatography.*Royal Society of Chemistry*.2017,**43**:6131-6138.
- [136] Wróblewski K. Petruczynik A.,Radzik I.Czuczwar S.J, And M. Hajnos M.W. Determination of Selected Antiepileptic Drugs in Mouse Brain Homogenates by HPLC–DAD. *Acta Chromatographica*.2017,**29**:219–234.
- [137] Acquaviva A., Romero L. M., Castells C.B., Analysis of citrulline and metabolic related amino acids in plasma by derivatization and RPLC. Application of the extrapolative internal standard calibration method. *Microchemical Journal* .2016,**129**:29–35.
- [138] Song M., Wu S.,Lu P., Qiao Y., and Hanga T. A selective and sensitive pre-column derivatization HPLC method for the trace analysis of genotoxic impurity hydroxylamine in active pharmaceutical ingredients.*Royal Society of Chemistry* 2016,**8**:8352-8361.
- [139] Boonchiangma S., Ratchakrut P., Chanthai S., Srijaranai S. Reversed Phase Chromatographic Analysis of 13 Amino Acids in Honey Samples. *Chromatographia* .2015,**78**:923–927.
- [140] Acquaviva A.,Romero L.,a CastellsC., Ramis-Ramos G.,Herrero-Martinez J.M. Reliable and simple analytical methods for determination of citrulline and metabolically related amino acids by liquid chromatography after derivatization: comparison between monolithic and core–shell columns. *Royal Society of Chemistry*.2014,**6**:5830-5837.

- [141] Iqbal M A.,Szulejko J.E., and Kim K. Determination of methylamine, dimethylamine, and trimethylamine in air by high-performance liquid chromatography with derivatization using 9-fluorenylmethylchloroformate.*Analytical Methods*.2014,**6**:5697-5707.
- [142] Koichi S., Jun K.,Yasuhiro S.,Yusuke I.,Rie I.,Masakazu H. Determination of Proline Enantiomers in Honey and Royal Jelly by LC-UV. *Journal Of Aoac International*.2011, **2**: 482-486.
- [143] Kubec, R. Dadakova, E.,Chromatographic methods for determination of S-substituted cysteine derivatives-A comparative study. *Journal Of Chromatography A*.2009,**1219**: 6957-6963.
- [144] Peruzzo P.J., Porta A.A., Ronco A.E. Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina. *Environmental Pollution*. 2008, **156**:61-66.
- [145] Cao G., Ali F.E.A., Chiu F.,Zavascki A.P., N.R.L., Li J. Development and validation of a reversed-phase high-performance liquid chromatography assay for polymyxin B in human plasma. *Journal Of Antimicrobial Chemotherapy*.2008,**62**: 1009-1014.
- [146] Xia L., Liang YZ., Wang P. Determination of urinary hydroxyproline in rabbits of hepatic fibrosis after administration by high performance liquid chromatography with pre-column derivatization. *Chinese Journal Of Analytical Chemistry*. 2008,**36**:811-814.
- [147] Cudic M., Patel D.A., Lauer-Fields J.L., Brew K., Fields G.B. Development of a convenient peptide-based assay for lysyl hydroxylase. *BIOPOLYMERS*.2008,**90**: 330-338 .
- [148] Zou, QH., Wang J., Wang, XF., Liu Y., Han J., Xie MX. Application of matrix solid-phase dispersion and high-performance liquid chromatography for determination of sulfonamides in honey. *Journal Of Aoac International*. 2008,**91**: 252-257.
- [149] Zou G.H., Xie M.X., Liu Y., Wang J., Song Jia., Gao Hui., Gao H. Determination of sulphonamides in animal tissues by high performance liquid chromatography with pre-column derivatization of 9-fluorenylmethyl chloroformate. *Journal Of Separation Science*. 2007,**30**: 2647-2655.

- [150] Zhou JZQ., Waszkuc T., Mohammed F., Determination of Glucosamine in Raw Materials and Dietary Supplements Containing Glucosamine Sulfate and/or Glucosamine Hydrochloride by High-Performance Liquid Chromatography with FMOC-Su Derivatization: *Collaborative Study. Journal Of Aoac International*. 2005,**88**:1048-1058.
- [151] Passos, Heloisa Moretti; Cieslarova, Zuzana; Colnaghi Simionato, Ana Valeria. CE-UV for the characterization of passion fruit juices provenance by amino acids profile with the aid of chemometric tools. *Electrophoresis*. 2016,**13**:1923-1929.
- [152] Ziegler J., Abel S. Analysis of amino acids by HPLC/electrospray negative ion tandem mass spectrometry using 9 fluorenylmethoxycarbonyl chloride (Fmoc Cl) derivatization. *Amino Acids* .2014,**46**:2799–2808.
- [153] Ziegler J., Qwegwer J., Schubert M., Ericksonb J.L., Schattat M., Bürstenbinder K., Grubba C. D., Abel S. Simultaneous analysis of apolar phytohormones and 1-aminocyclopropan-1-carboxylic acid by high performance liquid chromatography/electrospray negative ion tandem mass spectrometry via 9-fluorenylmethoxycarbonyl chloride derivatization. *Journal of Chromatography A*. 2014, **1362**:102-109.
- [154] Mohammadi B., Tammari E., Fakhri S., Bahrami G. Applicability of LC–MS/MS to optimize derivatization of topiramate with FMOC-Cl using reacted/intact drug ratio. *Journal of Chromatography B*. 2013,**928**:32-36.
- [155] Todorovic G.R., Mentler A., Popp M., Hann M., Köllensperger G., Rampazzo N. & Winfried E.H. Blum W.E.H. Determination of Glyphosate and AMPA in Three Representative Agricultural Austrian Soils with a HPLC-MS/MS Method. Soil and Sediment Contamination: *An International Journal*. 2013,**22**:332-350.
- [156] Sanchez-Hernandez L., Garcia-Ruiz, C., Crego A.L., Luisa Marina M. Sensitive determination of D-carnitine as enantiomeric impurity of levo-carnitine in pharmaceutical formulations by capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry. *Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis*. 2010,**53**:1217-1223.
- [157] Cao ZY., Mou RX., Chen MX. Determination of Nicotinamide in Rice by Pre-column Derivatization and High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Chinese Journal Of Analytical Chemistry*. 2009, **37**:1037-1040.

- [158] Nakano M., Higo, D., Arai E., Nakagawa T., Kakehi K., Taniguchi, N., Kondo, A. Capillary electrophoresis-electrospray ionization mass spectrometry for rapid and sensitive N-glycan analysis of glycoproteins as 9-fluorenylmethyl derivatives. *Glycobiology*.2009,**19**:135-143.
- [159] You J., Zhao W., Liu LJ., Zhao X., Suo Y., Wang H., Li Y., Ding C. Determination of amines using 2-(11H-benzo[a]carbazol-11-yl) ethyl chloroformate (BCEC-Cl) as labeling reagent by HPLC with fluorescence detection and identification with APCI/MS. *TALANTA*. 2007,**72**: 914-925.
- [160] Zhao X., You J., Suo Y. Determination of aliphatic amines from soil and wastewater of a paper mill by pre-column derivatization using HPLC and tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). *Journal Of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 2007, **30**: 1963-1979.
- [161] Yılmaz A. Kimyasal Analizlerde Metod Validasyonu ve Verifikasyonu. Türklab
- [162].[https://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q2\\_R1/Step4/Q2\\_R1\\_Guideline.pdf](https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf)



**HAM VERİLER**

**FORMLAR**



## ETİK KURUL KARARI



**PATENT HAKKI İZİNİ**

## İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI



### PREGABALİNİN FARMASÖTİK "PREPARATLARDA ANALİZİ İÇİN" YENİ BİR HPLC YÖNTEMİ

ORIJINALLIK RAPORU

% **13**

BENZERLİK ENDEKSİ

% **5**

İNTERNET  
KAYNAKLARI

% **2**

YAYINLAR

% **12**

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

<b>1</b>	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	% <b>4</b>
<b>2</b>	Submitted to Marmara University Öğrenci Ödevi	% <b>2</b>
<b>3</b>	dronuryaman.com İnternet Kaynağı	% <b>1</b>
<b>4</b>	Submitted to Anadolu University Öğrenci Ödevi	% <b>1</b>
<b>5</b>	acikarsiv.ankara.edu.tr İnternet Kaynağı	% <b>1</b>
<b>6</b>	Submitted to Ankara University Öğrenci Ödevi	% <b>1</b>
<b>7</b>	www.science.gov İnternet Kaynağı	% <b>1</b>
<b>8</b>	Submitted to TechKnowledge Turkey Öğrenci Ödevi	% <b>1</b>

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

<b>Adı</b>	Gülsüm	<b>Soyadı</b>	ÇİÇEK
<b>Doğ.Yeri</b>	Kars	<b>TC KimNo</b>	
<b>Uyruğu</b>	T.C	<b>Tel</b>	
<b>Email</b>	kudus_toprak@hotmail.com		

### Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
<b>Yük.Lis.</b>	İstanbul Üniveristesi	
<b>Lisans</b>	Yıldız Teknik Üniversitesi	2013

Program	Kullanma becerisi
microsoft word	iyi
excel	iyi

### Sertifikalar:

Pedagojik Formasyon Eğitimi Sertifikası(2014)

New trends in biosensors,bioanalysis,biofuelcells-biosupercapacitors (Euroanalysis 2019 Conference)(2019)

Sample preparations and solid phase microextraction (Euroanalysis 2019 Conference)(2019)

### Özel İlgi Alanları (Hobileri):

Karikatür çizmek