



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**YARIŞ ATLARININ İDRAR ÖRNEKLERİNDE BAZI İLAÇ ETKİN
MADDELERİNİN EŞZAMANLI ANALİZLERİ İÇİN SIVI
KROMATOĞRAFİSİ-KÜTLE SPEKTROMETRESİ VE/VEYA GAZ
KROMATOĞRAFİSİ-KÜTLE SPEKTROMETRESİ İLE METOT
GELİŞTİRİLMESİ VE ANALİTİK METOT VALİDASYONU**

EYLEM FUNDA GÖKTAŞ
DOKTORA TEZİ

ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi AYŞEN KURT CÜCÜ

2019-İSTANBUL



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**YARIŞ ATLARININ İDRAR ÖRNEKLERİNDE BAZI İLAÇ ETKİN
MADDELERİNİN EŞZAMANLI ANALİZLERİ İÇİN SIVI
KROMATOĞRAFİSİ-KÜTLE SPEKTROMETRESİ VE/VEYA GAZ
KROMATOĞRAFİSİ-KÜTLE SPEKTROMETRESİ İLE METOT
GELİŞTİRİLMESİ VE ANALİTİK METOT VALİDASYONU**

EYLEM FUNDA GÖKTAŞ

DOKTORA TEZİ

ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi AYŞEN KURT CÜCÜ

2019-İSTANBUL

TEZ ONAY FORMU

Kurum : Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Program türü : Doktora

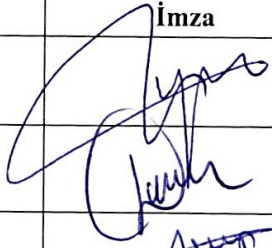
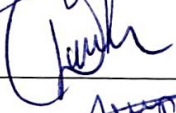
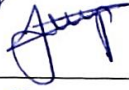
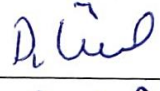

Anabilim Dalı : Analitik Kimya

Tez Sahibi : Eylem Funda Göktaş

Sınav Tarihi ve Saati : 24/10/2019 – 13.30

Tez Başlığı : Yarış Atlarının İdrar Örneklerinde Bazı İlaç Etkin Maddelerinin Eşzamanlı Analizleri İçin Sıvı Kromatografisi- Kütle Spektrometresi ve/veya Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi ile Metot Geliştirilmesi ve Analitik Metot Validasyonu

Bu çalışma, içerik ve kalite bakımından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

	Ünvan, Adı-Soyadı (Kurum adı)	İmza
Danışman	Dr.Öğ.Üyesi Aysen Kurt Cücü (MÜ Ecz.Fak. Analitik Kimya ABD)	
Üye	Doç.Dr. Dilek Bilgiç Alkaya (MÜ Ecz.Fak. Analitik Kimya ABD)	
Üye	Prof.Dr. Serap Sağlık Aslan (İÜ Ecz.Fak. Analitik Kimya ABD)	
Üye	Prof.Dr. Durişehvar Ünal (İÜ Ecz.Fak. Analitik Kimya ABD)	
Üye	Dr.Öğr.Üyesi Gülbin Erdoğan (MÜ Ecz.Fak. Analitik Kimya ABD)	

ONAY

Bu tez, yukarıda isimleri bulunan jüri üyeleri tarafından "Marmara Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliği" nin ilgili maddeleri uyarınca kabul edilmiş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun30.10.2019.....tarih ve54.....sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Feyza ARICIOĞLU
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü ✓

Prof. Dr.
Aysen GARCALI KELES



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 çalışmayla 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 haklarımı ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

02/10/2019

Eylem Funda GÖKTAŞ

İmza

TEŐEKKÜR

Doktora çalışmam sũresince beni bilgi ve deneyimleri ile yœnlendiren ve destekleyen değerli danışman hocalarım Prof. Dr. Gũler YALÇIN, Dr. Filiz ARIœZ ve Dr. œęr. Őyesi Ayşen KURT CũCũ'ye,

Yaptığım bũtũn çalışmalarda bilgileri, tecrũbesi ve yardımıyla bana yol gœsteren ve teővik eden değerli laboratuvar sorumlum Veteriner Hekim Erol KABİL'e,

Yardımları ve dostluklarıyla her zaman yanımda olan kıymetli arkadaşlarım Pendik Veteriner Kontrol Enstitũsũ Doping Laboratuvarı alıőanlarına,

Tez çalıőmalarım sırasında 2211-C œncelikli Alanlara Yœnelik Yurt içi doktora burs programı kapsamında destek veren TũBİTAK'a,

Her zaman bũyũk œzveri, sevgi ve gũvenleriyle bana gũ veren annem Benhur ŐNVER KũREKİ, babam Cafer KũREKİ ve kardeőim Uzm. Dr. Fulya KũREKİ'ye,

Her anımda yanımda olan motivasyon kaynaklarım ve değerli ailem; eőim Onur GœKTAŐ'a ve biricik kızım İklım GœKTAŐ'a

Sonsuz teőekkũrlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR ve SİMGELER.....	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	viii
TABLolar LİSTESİ.....	x
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ.....	3
4. GENEL BİLGİLER.....	7
4.1. İlaç Etkin Maddelerle İlgili Genel Bilgiler	9
4.2. Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi	22
4.3. Sıvı Kromatografisi- Kütle Spektrometresi	27
4.4. Validasyon	31
4.4.1 Metodu geçerli kılma parametreleri.....	33
4.4.1.1 Spesifiklik/seçicilik	33
4.4.1.2 Doğruluk-geri kazanım	34
4.4.1.3 Tekrarlanabilirlik.....	34
4.4.1.4 Laboratuvar içi tekrar üretilebilirlik.....	35
4.4.1.5 Kesinlik	35
4.4.1.6 Karar (Kesinlik) limiti (CC_{α})	36
4.4.1.7 Tespit yeteneği (CC_{β}).....	36
4.4.1.8 Kalibrasyon eğrisi	37
4.4.1.9 Sağlamlık (minör değişiklikler)	37
4.4.1.10 Stabilitate	39
5. GEREÇ ve YÖNTEM	41
5.1. Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler	41
5.2. Kullanılan Kimyasallar	42

5.3. Kullanılan Sertifikalı Standartlar ve İç Standartlar	42
5.4. Yöntem.....	44
5.4.1 Gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC-MS) kullanılarak analiz edilen maddeler ve analiz metodu	45
5.4.1.1 Çalışma karışımının hazırlanması	45
5.4.1.2 İç standardın hazırlanması.....	46
5.4.1.3 Bazik hidroliz	46
5.4.1.4 Ekstraksiyon	46
5.4.2 Sıvı kromatografisi – kütle spektrometresi (LC-MS/MS) kullanılarak analiz edilen maddeler ve analiz metotları.....	48
5.4.2.1 Çalışma karışımının hazırlanması	48
5.4.2.2 İç standart karışımının hazırlanması	49
5.4.2.3 Hidroliz	50
5.4.2.4 Ekstraksiyon.....	51
5.4.2.5 LC-MS/MS cihaz şartları	52
6. BULGULAR.....	57
6.1.Gaz kromatografisi-Kütle Spektrometresiyle Metot Geliştirme Çalışmaları.....	59
6.1.1 Türevlendirme yönteminin belirlenmesi	59
6.1.2 Türevlendirici karışım çalışması	62
6.1.3 Sıcaklık dereceli elüsyon çalışması.....	62
6.1.4 Sabit faz çalışması.....	65
6.1.5 Akış hızı çalışması.....	66
6.1.6 Inlet sıcaklık çalışması.....	69
6.1.7 Çözücü gecikme zamanı çalışması	69
6.1.8 SIM (Selective Ion Monitoring) metot çalışması	70
6.1.9 Bazik hidroliz ve enzimatik hidroliz çalışması.....	72
6.1.10 Bazik hidroliz süresi çalışması	73
6.1.11 Sodyum hidroksit ilave miktar çalışması	74
6.1.12 pH belirleme çalışması	75
6.1.13 Fosfat tampon konsantrasyonu belirleme çalışması	76
6.1.14 Elüsyon çözücüsü çalışması	77

6.2. GC-MS Metot Validasyonu	79
6.2.1 Spesifikklik-seçicilik.....	79
6.2.2 Doğrusallık.....	80
6.2.3 Doğruluk ve geri kazanım	82
6.2.4 Tekrarlanabilirlik.....	83
6.2.5 Laboratuvar içi tekrar üretilebilirlik	83
6.2.6 Kesinlik.....	83
6.2.7 Karar limiti (CC_{α}) ve tespit yeteneği (CC_{β}).....	84
6.2.8 Sağlamlık (minör değişiklikler).....	84
6.2.9 Stabilite	86
6.2.10 AORC kriterleri.....	86
6.3. Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresiyle Metot Geliştirme Çalışmaları.....	91
6.3.1 Hareketli faz çalışması	94
6.3.2 Enzimatik hidroliz çalışmaları	98
6.3.3 Hidroliz sonrası idrar çalışması.....	98
6.3.4 Ekstraksiyon öncesi pH ayarlama	100
6.3.5 Asidik metot optimizasyon çalışmaları	102
6.3.6 Bazik metot optimizasyon çalışmaları.....	102
6.4. Dekametazon ve Betametazon Epimerlerinin Ayrılması	103
6.5. LC-MS/MS Metotları Validasyon Çalışması.....	110
6.5.1 Spesifikklik-seçicilik.....	110
6.5.2 Doğrusallık.....	112
6.5.3 Doğruluk ve geri kazanım	116
6.5.4 Tekrarlanabilirlik.....	116
6.5.5 Laboratuvar içi tekrar üretilebilirlik	117
6.5.6 Kesinlik.....	117
6.5.7 Karar limiti (CC_{α}) ve tespit yeteneği (CC_{β}).....	117
6.5.8 Sağlamlık (minör değişiklikler).....	118
6.5.9 Stabilite	119
6.5.10 AORC kriterleri.....	120

7. TARTIŞMA ve SONUÇ	127
8. KAYNAKLAR	130
9. EKLER	138
9.1 Ek 1 Makale	138
9.2. Ek 2 Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü İzni	151
9.3. Ek 3 Etik Kurul İzni	152
10. ÖZGEÇMİŞ	153

KISALTMALAR ve SİMGELER

IFHA	International Federation of Horseracing Authorities (Uluslararası At Yarışları Federasyonu)
IABRW	International Agreement on Breeding, Racing and Wagering (Uluslararası Islah, Yarış ve Bahis Sözleşmesi)
ILAC	International Laboratory Accreditation Cooperation (Uluslararası Laboratuvar Akreditasyon İşbirliği)
HEPS	2-(1-hidroksietil) promazin sulfoksit
4 MAA	4 metil amino antipirin
NSAID	Non-steroidal Antiinflamatuvar İlaçlar
ESI	Elektrospray İyonizasyon
MS	Kütle spektrometresi
GC-MS	Gaz kromatografisi-kütle spektrometresi
LC-MS/MS	Sıvı kromatografî ardışık kütle spektrometresi
LC-TOF/MS	Sıvı kromatografisi-uçuş zamanlı kütle spektrometresi
LC-ESI/MS	Sıvı kromatografisi/elektrospray iyonizasyonlu-kütle spektrometresi
GC-HRMS	Gaz kromatografisi-yüksek rezolüsyonlu kütle spektrometresi
TMAH	Trimetilfenil amonyum hidroksit çözeltisi
BSTFA	N,O-Bis(trimethylsilil) trifloroasetamit
TMCS	Trimetilklorosilan
MSTFA	N-Metil-N-(trimethylsilil) trifloroasetamit
HMDS	Hekzametildisilazan

TFA	Trifloroasetik asit
PTV	Programmable Temperature Vaporization (Programlanabilir Sıcaklık Buharlaşması)
EI	Elektron etki iyonizasyonu
PCI	Pozitif kimyasal iyonizasyon
NCI	Negatif kimyasal iyonizasyon
FI	Alan iyonlaştırma
SRM	Selected Reaction Monitoring (Seçilmiş Reaksiyon Görüntüleme)
AORC	Association of Official Racing Chemists (Yarış Kimyagerleri Birliği)
DMRM	Dynamic Multiple Reaction Monitoring (Dinamik Çoklu Reaksiyon İzleme)
SIM	Selective Ion Monitoring (Seçilmiş İyon Görüntüleme)
ISL	International Screening Limit (Uluslararası Tarama Limiti)
PFPA	Pentafloropropiyonik anhidrit
CV	Coefficient of variation (Varyasyon katsayısı)
amu	Atomik kütle birimi
ppt	parts per trillion (trilyon başına kısım)
CC _α	Karar (Kesinlik) limiti
CC _β	Tespit yeteneği
SD	Standard deviation (Standart sapma)

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Elektron impakt kaynağının yapısı.....	25
Şekil 2. Elektron impakt kaynağındaki bazı reaksiyonlar ile parçalanma iyonlarının oluşumu	26
Şekil 3. Tek MS kuadrupol kütle analizörü.....	26
Şekil 4. HPLC kolon dolgu materyali iç yapısı.....	28
Şekil 5. Elektrospray iyonizasyon	29
Şekil 6. Triple kuadrupol MS/MS cihazının şeması	30
Şekil 7. Yöntemin şematik gösterimi	45
Şekil 8. N-Fenilantranilik asidin türevlendirilmiş ve türevsiz kromatogramı.....	61
Şekil 9. Sıcaklık dereceli elüsyon çalışması sonucu GC-MS Scan mod çalışma kromatogramı	64
Şekil 10. 0,8 mL/dk akış hızları kromatogramı.....	67
Şekil 11. 1,4 mL/dk akış hızları kromatogramı.....	68
Şekil 12. Fenilbutazon pik şeklinde bozulma.....	69
Şekil 13. SCAN mod stok standart karışım ve iç standart GC-MS kromatogramı	70
Şekil 14. SIM mod çalışma kromatogramı (1) N-Fenilantranilik asit, (2) Naproksen Metil, (3) Fluniksin Metil, (4) Diklofenak-H ₂ O dimetil, (5) Ketoprofen Metil, (6) Eltenak-H ₂ O dimetil, (7) Meklofenamik dimetil, (8) Fenilbutazon Metil, (9) Vedaprofen Metil, (10) Dembreksin, (11) Karprofen di Metil.	71
Şekil 15. Bazik hidroliz ve enzimatik hidroliz karşılaştırılması	72
Şekil 16. 15, 30 ve 60 dk hidroliz sürelerinde elde edilen kromatogramlar (GC-MS SIM mod).....	73
Şekil 17. NaOH'in 50, 100 ve 200 µL ilavesi ile oluşan hidroliz reaksiyonu kromatogramı (GC-MS SIM mod)	74
Şekil 18. pH 5, 6, 7 ve 8'e ayarlanan örneklerin kromatogramı (GC-MS SIM mod).....	76
Şekil 19. Elüsyon çözücüsü deneme çalışması kromatogramı (GC-MS SIM mod)	78
Şekil 20. Katkı yapılmış idrar örneği birarada SIM mod kromatogramı (1) N-Fenilantranilik asit, (2) Naproksen Metil, (3) Fluniksin Metil, (4) Diklofenak-H ₂ O	

dimetil, (5) Ketoprofen Metil, (6) Eltenak-H ₂ O dimetil, (7) Meklofenamik dimetil, (8) Fenilbutazon Metil, (9) Vedaprofen Metil, (10) Karprofen dimetil	79
Şekil 21. Blank örnek ile katkılanmış örnek karşılaştırılması.....	80
Şekil 22. Naproksen ve fluniksin linearitesi.....	81
Şekil 23. Diklofenak ve Ketoprofen linearitesi	81
Şekil 24. Eltenak ve Meklofenamik asit linearitesi	81
Şekil 25. Fenilbutazon ve Vedaprofen linearitesi	82
Şekil 26. Karprofen linearitesi.....	82
Şekil 27. GC-MS ile analiz edilen ilaç etkin maddelere matris etkisi.....	88
Şekil 28. Moulard ve arkadaşları tarafından yapılan çalışma şartları kullanılarak elde edilen kromatogram	91
Şekil 29. Standart karışım analiz sonucu LC-MS/MS pik görüntüleri ve iyon oranları .	94
Şekil 30. Bazik ekstraksiyon metodu sonuçları	97
Şekil 31. Deksametazon ve betametazon ayrılması a) betametazon katkılı örnek, b) deksametazon katkılı örnek, c) deksametazon ve betametazon katkılı örnek kromatogramı	104
Şekil 32. Asidik metot DMRM toplam iyon kromatogramı	105
Şekil 33. İdrar örneğine ISL'e eşdeğer katkı yapıp asidik metotla LC-MS/MS'de analiz edildiğinde elde edilen pikler ve iyon oranları.....	107
Şekil 34. İdrar örneğine ISL'e eşdeğer katkı yapıp bazik metotla LC-MS/MS'de analiz edildiğinde elde edilen pikler ve iyon oranları	109
Şekil 35. Asidik ve bazik metot kullanılarak blank örnek ile katkı yapılmış örneğin karşılaştırılması.....	112
Şekil 36. LC-MS/MS ile analiz edilen ilaç etkin maddelerinin linearite eğrileri.....	116
Şekil 37. LC-MS/MS ile analiz edilen ilaç etkin maddeleri için matris etkisi	122

TABLolar LİSTESİ

Tablo 1 . Teröpatik özellikte olan maddeler ve uluslararası tarama limitleri	5
Tablo 2. İlaç etkin maddeler ve özellikleri	7
Tablo 3. Element-kütle bölümleri aralığında niceliksel yöntemler için tekrar üretilebilirlik verilerinin CV değerleri.....	35
Tablo 4. Element kütle fraksiyonu aralığındaki kantitatif metotlar için CV'ler.....	36
Tablo 5. Youden planı	38
Tablo 6. Kullanılan cihazlar ve malzemeler	41
Tablo 7. Kullanılan kimyasallar ve üretici firmaları.....	42
Tablo 8. Sertifikalı standartlar ve iç standartların özellikleri	43
Tablo 9. GC-MS çalışma standardı karışımı.....	45
Tablo 10. GC çalışma koşulları	47
Tablo 11. MSD-SIM mod çalışma koşulları.....	47
Tablo 12. SIM grupları, seçilen iyonlar ve gruplarda aranan ilaç etkin maddeler.....	48
Tablo 13. LC-MS/MS çalışma standardı karışımı	48
Tablo 14. LC-MS/MS iç standart karışımı	50
Tablo 15. LC-MS/MS optimizasyon verileri	52
Tablo 16. Asidik metot dereceli elüsyonu	53
Tablo 17. Asidik metot cihaz şartları	54
Tablo 18. Bazik metot dereceli elüsyonu.....	54
Tablo 19. Bazik metot cihaz şartları	54
Tablo 20. Analiz metotlarına göre valide edilen ilaç etkin maddeler	55
Tablo 21. Stok karışım çözeltisi	57
Tablo 22. İç standart karışım çözeltisi	58
Tablo 23. Türevlendirici-Metanol karışım miktarı karşılaştırılması.....	62
Tablo 24. GC-MS deneme metodu sıcaklık dereceli elüsyonu 1.....	63
Tablo 25. GC-MS deneme metodu sıcaklık dereceli elüsyonu 2.....	63
Tablo 26. GC-MS deneme metodu sıcaklık dereceli elüsyonu 3.....	63
Tablo 27. GC-MS deneme metodu sıcaklık dereceli elüsyonu 4.....	64
Tablo 28. Kolon deneme çalışması sonuçları	65

Tablo 29. Akış hızı çalışması sonuçları	66
Tablo 30. MSD-SCAN mod çalışma koşulları	70
Tablo 31. NaOH'in 15, 30 ve 60 dk bekleme sürelerinin pik alanları.....	73
Tablo 32. NaOH'in 50, 100 ve 200 µL ilave edilerek yapılan hidrolizlerinin pik alanları	75
Tablo 33. pH değerleri sırasıyla 5, 6, 7 ve 8'e ayarlanarak yapılan çalışmanın pik alanları	76
Tablo 34. Fosfat tampon konsantrasyonu 0,5 M, 1 M ve 2 M'a ayarlanarak yapılan çalışmanın pik alanları.....	77
Tablo 35. Elüsyon çözücüsü deneme çalışması pik alanları.....	78
Tablo 36. Sağlamlık testi etki faktörleri	84
Tablo 37. Youden sağlamlık testi planı	85
Tablo 38. Sağlamlık etki tablosu	85
Tablo 39. AORC iyon oranı kabul kriterleri.....	87
Tablo 40. GC-MS ile analiz edilen ilaç etkinlerin iyon oranları.....	87
Tablo 41. GC-MS ile analiz edilen ilaç etkin maddelerin validasyon sonuçları	89
Tablo 42. Hareketli faz çalışması	95
Tablo 43. Asidik metot için ayrılacak örnek miktarı tespiti	99
Tablo 44. Bazik metot için ayrılacak örnek miktarı tespiti.....	99
Tablo 45. Asidik metot pH çalışması.....	100
Tablo 46. Bazik metot pH çalışması	101
Tablo 47. Asidik metot sağlamlık testi etki faktörleri	118
Tablo 48. Bazik metot sağlamlık testi etki faktörleri.....	118
Tablo 49. Asidik metot sağlamlık etki tablosu	118
Tablo 50. Bazik metot sağlamlık etki tablosu.....	119
Tablo 51. Asidik ve bazik metot ile analiz edilen ilaç etkin maddelerin iyon oranları	120
Tablo 52. Asidik ve bazik metotla analiz edilen ilaç etkin maddelerin iç standart doğrulamalı matriks etkisi sonuçları.....	121
Tablo 53. LC-MS/MS ile yapılan analizlerin metot validasyon sonuçları	123

Yarış atlarının idrar örneklerinde bazı ilaç etkin maddelerinin eşzamanlı analizleri için sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi ve/veya gaz kromatografisi-kütle spektrometresi ile metot geliştirilmesi ve analitik metot validasyonu

Öğrencinin Adı: Eylem Funda GÖKTAŞ

Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Ayşen KURT CÜCÜ

Anabilim Dalı: Analitik Kimya Anabilim Dalı

1. ÖZET

Amaç: Bu çalışmada uluslararası tarama limiti belirlenmiş olan teröpatik özellikteki yasaklı maddelerin eşzamanlı olarak, farklı hidroliz, ekstraksiyon teknikleri ve LC-MS/MS ve/veya GC-MS cihazları ile geliştirilen ve Avrupa Komisyonu'nun 2002/657/EC direktifi ve AORC kriterlerine göre valide edilen metotlar kullanılarak tespiti amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışılan maddelerin kimyasal yapıları ve pKa değerleri birbirinden çok farklıdır. Karboksilik asit yapısında olan NSAID özellikte maddeler bazik hidroliz, katı faz ekstraksiyonu ve metil türevlendirmesi uygulanarak GC-MS'de analiz edilmiştir. Asidik ve bazik özellikte olan maddeler ise C18 ve C8 özellikte farklı kartuşlar ve elüsyon çözeltileri kullanılıp, farklı kolon ve dereceli elüsyonlarla LC-MS/MS'de analiz edilmişlerdir.

Bulgular: İlaç etkin maddelerin eşzamanlı analizlerinde epimer olan deksametazon ve betametazon uygulanan dereceli elüsyonla tutunma zamanlarına göre birbirinden ayrılarak tespit edilebilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde furosemid enzimatik hidrolizde parçalandığından, ipratropium ve N-butilskopolamonyum'un ise pKa değerleri yüksek olması nedeniyle farklı bir ekstraksiyon gerektirdiğinden kriterlere uygun olarak tespit edilememiştir. Bunlar dışında kalan 24 madde limit seviyesinde en uygun yöntemle tespit edilmiştir.

Sonuçlar: Bu çalışmayla yeni, geniş çalışma aralığına uygun ve yeniliklere kolayca adapte edilebilen, tekrarlanabilirliği yüksek, kararlı ve seçici üç metot geliştirilmiş ve valide edilmiştir.

Anahtar Sözcükler: İlaç etkin madde, Doping kontrol, Ekstraksiyon, Kromatografi, Validasyon

Method development and analytical method validation by liquid chromatography-mass spectrometry and/or gas chromatography-mass spectrometry for simultaneous analysis of some drug-active materials in equine urine samples

Student Name: Eylem Funda GÖKTAŞ

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Ayşen KURT CÜCÜ

Department: Analytical Chemistry

2. SUMMARY

Objective: In this study, it was aimed to simultaneously detection of the prohibited therapeutic substances with the international screening limit by using different hydrolysis, extraction techniques and LC-MS/MS and/or GC-MS devices and validated according to European Commission's 2002/657/EC directive and AORC criteria.

Material and Methods: The studied substances chemical structure and pKa values are very different in each other. NSAIDs with the carboxylic acid structure were analyzed by applying basic hydrolysis, solid phase extraction and methyl derivatization with GC-MS. The acidic and basic materials were analyzed by using cartridges with C18 or/and C8 properties or different elution solutions and analyzed by LC-MS/MS with different columns and gradients.

Results: During the method development studies for the simultaneous analysis of drug active substances, the epimers dexamethasone and betamethasone could be determined by separating them according to their retention times. When the results were examined, furosemide was degraded in enzymatic hydrolysis, ipratropium and N-butylscopolammonium couldn't be determined in accordance with the validation criteria because of the high pKa values required different extraction. Out of these substances, 24 drugs were determined at the limit level by using optimal methods.

Conclusion: With this study; new, suitable for a wide working range, easily adaptable to innovations, high repeatability, stable and selective three methods have been developed and validated.

Keywords: Drug active substances, Doping control, Extraction, Chromatography, Validation

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Doping yarışlarda organizmanın gücünü kural dışı bir şekilde etkileyerek mantüpile etmek amacıyla kullanılan ilaç veya yöntemlerin genel adıdır. Bu amaçla hem insanlar hem de hayvanlar üzerinde bu yasaklı maddeler kullanılabilir. Doping etkisi gösteren farklı farmakolojik özellikte bir çok yasaklı madde söz konusu olduğundan doping analizi oldukça geniş kapsamlı ve zor bir çalışma alanına sahiptir. Uluslararası At Yarışları Federasyonu (IFHA) yarışlarda yer alacak atların sağlıklı olmalarını ve kendi kalıtsal güçleri ile yarışmaları gerektiğini bildirmektedir (<https://www.ifhaonline.org/resources/DetectionTimes.pdf>, Erişim tarihi: 31 Temmuz 2019). Özellikle hayvanlarda kullanılan doping maddeleri hem performansı artırıcı hem de azaltıcı etkileri olan maddeler olabileceğinden yasaklı madde sayısı insan dopingine göre oldukça fazladır. Doping etkisi olan yasaklı madde sayısının oldukça fazla olması birçok ilaç etkin maddenin analizinin bir arada, yüksek seçicilik, tekrarlanabilirlik ve kararlılıkla yapılmasının gerekliliğini arttırmaktadır.

At yarışçılığında; kural ve mevzuatların birleştiği, araştırma ve onayların verildiği uluslararası bir mekanizma bulunmamaktadır (Wong ve Wan, 2014). Bu organizasyon görevini kısmen yapan IFHA at yarışçılığı için rehber dokümanlar yayımlar (<https://www.ifhaonline.org/>, Erişim tarihi: 31 Temmuz 2019). Bu dökümanların amacı atın doğuştan gelen özelliklerinin aksine, bir ata avantaj sağlayabilecek veya at yarışında dezavantajlı olmasına neden olacak maddelerin kullanımını kontrol ederek at yarış bütünlüğünü ve atın refahını korumaktır. Ulusal kurumlar kendi kurallarına ve istisna durumlara sahip olmalarına rağmen çoğu yarış kurumları IFHA prensiplerini kabul eder ve ulusal mevzuatlarını buna adapte eder. Ulusal kurumların IFHA dökümanlarına uyum sağlayıp sağlamaması kendi sorumluluklarındadır ve bir zorunluluk değildir. Ülkemizde yarış atlarında doping analizi Tarım ve Orman Bakanlığı'na bağlı olan Etlik Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü ve Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü tarafından yapılmaktadır. Türkiye'de IFHA kuralları kabul edilmiştir ve yasaklı maddeler ile ilgili mevzuatların çoğunluğu bu döküman rehber alınarak oluşturulmuştur (http://www.ykk.gov.tr/Ekler/2016Agreement_YasakliIlaclar.pdf, Erişim tarihi: 31 Temmuz 2019). Bunun dışında Türkiye IFHA'nın grupları arasında Asya grubunda yer

aldığından Asya Yarış Federasyonu'nun belirlemiş olduğu kurallar da uygulanmaktadır (<http://www.asianracing.org/asian-screening-limits-asls-for-controlling-equine-therapeutics>, Erişim tarihi: 31 Temmuz 2019).

Ülkemizde ve dünyadaki doping laboratuvarlarının büyük çoğunluğunda kabul edilen IFHA kuralları gereği at yarışlarındaki atlarda doping kontrolü yapılırken laboratuvarların uyması gereken kurallar belirlenmiştir. IFHA rehber dokümanı olan 'Uluslararası Islah, Yarış ve Bahis Sözleşmesi' (IABRW) yeni bilimsel veriler ışığında, üyelerin de kabulleri ve onayları ile sürekli güncellenmektedir (<https://www.ifhaonline.org/resources/ifAgreement.pdf>. Erişim tarihi: 31 Temmuz 2019). Rehber dökümandaki maddelerden endojen olarak bulunanlar, yem ve çevresel bulaşanlar için eşik değer; teröpatik özellikte olan maddeler için ise uluslararası tarama limitleri belirlenmiştir. Diğer maddeler ise yarış öncesinde, sonrasında ve herhangi bir anda saptanmamalıdır.

Teröpatik maddeler ruhsatlı olarak satılan tedavi edici olarak kullanılan ilaç etkin maddeleri ifade etmektedir ve yarış sonrası alınan örnekte kalan miktar belirlenen tarama limiti değerinin tespit edilebilir değerinden düşükse pozitif kabul edilmeyebilir. Bu değerler nitel değerlerdir ve bu değer altında negatif üstünde ise pozitif kabul edilebileceği belirtilmiştir. Bu kabuller IFHA tarafından öneri olarak verilmiştir ve uygulayıp uygulamamak ülkelerin kendi otoritelerine bırakılmıştır. Fakat tarama limiti olan teröpatik özellikteki bu ilaç etkin maddelerin 2 ya da daha fazlasının bir arada limit değerinin altında dahi kullanılması durumunda limit değeri ortadan kalkar ve örnek pozitif olarak değerlendirilir. IFHA tarafından 'Uluslararası Tarama Limitleri ile Kontrol Edilen Yasal Terapötik Maddeler İçin Tespit Süreleri' yayınlanarak söz konusu ilaç etkinlerin atılım ve kullanım süreleri belirtilip ata uygulama süresi için öneriler sunulmuştur. Bu maddeler belirtilen şekilde kullanıldığı sürece tedavi amaçlı kullanılabilir (<https://www.ifhaonline.org/resources/DetectionTimes.pdf>, Erişim tarihi: 6 Ağustos 2019).

IFHA kurallarında belirtildiği üzere doping analiz laboratuvarlarının Uluslararası Laboratuvar Akreditasyon İşbirliği (ILAC) G7 dökümanında belirtilen gerekliliklere göre valide metotlar kullanılarak analiz yapması ve akredite olması gerekmektedir

(International Laboratory Accreditation Cooperation, Accreditation Requirements and Operating Criteria for Horseracing Laboratories, ILAC-G7:02/2016) (<https://www.ifhaonline.org/resources/ifAgreement.pdf>. Erişim tarihi: 31 Temmuz 2019). Bu nedenle belirlenen limit değerlerinde analiz yapmak ve yapılan çalışmaları bu yönde valide etmek doping laboratuvarları için oldukça büyük bir önem taşımaktadır.

Bu çalışmada amaç uluslararası tarama limiti olan teröpatik maddelerin (Tablo 1) idrar örneklerinden ekstraksiyonu ve eşzamanlı tayinleri için yeni metotlar geliştirmek ve geliştirilen metotları valide etmektir. Bu maddelerin tek bir tanesi idrar örneğinde bulunabileceği gibi iki, üç ya da daha fazlasında bir arada uygulanmış olması durumu söz konusu olabilmektedir. Dolayısıyla minimum sayıda analizle çok sayıda maddenin kantitatif olarak doğru, güvenilir ve tekrarlanabilir tayini mümkün hale gelebilecektir. Teze konu olan bu maddeler için toplu ya da birkaç grup halinde analizlerine ilişkin çalışmaların yeterli olmadığı yapılan literatür taramalarında ortaya çıkmıştır.

Tablo 1 . Teröpatik özellikte olan maddeler ve uluslararası tarama limitleri

(<https://www.ifhaonline.org/default.asp?section=IABRW&area=1&slimits=>, Erişim tarihi:6 Ağustos 2019)

Teröpatik Madde	Uluslararası Tarama Limiti (Atın idrarında ng/mL)
Furosemid	50
Fluniksin	100
Meloksikam	10
Dipiron (4-metilamino antipirin ile kontrol edilir)	1000
Triamsinolon Asetonid	0,5
İpratropium	0,25
Betametazon	0,2
Lidokain (3'-hidroksi lidokain ile kontrol edilir)	10
Mepivakain(3'-hidroksi mepivakain ile kontrol edilir)	10
Dembreksin	100
Ketoprofen	100
N-butilskopolamonyum	25
Diklofenak	50
Karprofen	100
Vedaprofen	50
Meklofenamik Asit	250
Naproksen	250
Bromheksin (Ambroksol ile kontrol edilir)	200
Fenilbutazon	100

Asepromazin (HEPS ile kontrol edilir)	10
Eltenak	50
Detomidin (3'-hidroksi detomidin ile kontrol edilir)	2
Butorfanol	1
Romifidin	1
Salbutamol	0,5
Dantrolen* (5-hidroksi dantrolen ile kontrol edilir)	1
Deksametason	0,2
Omeprazol*	0,5
Metokarbamol**	100

*Hidroliz edilmemiş idrarda

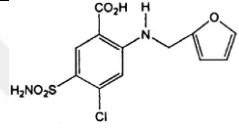
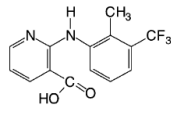
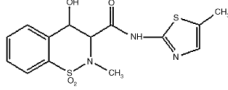
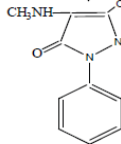
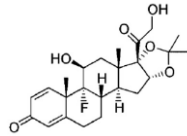
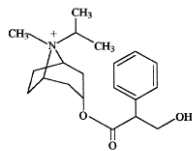
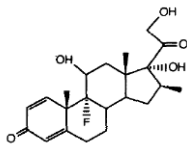
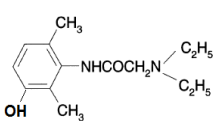
** Asya Yarış Federasyonu tarama limiti

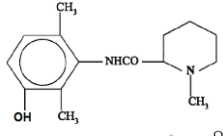
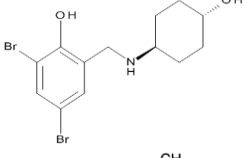
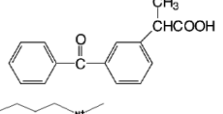
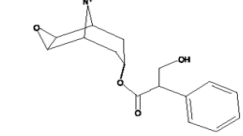
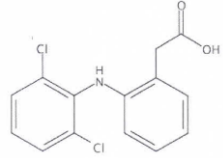
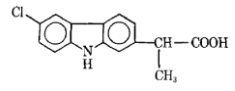
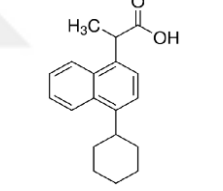
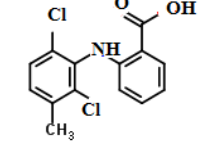
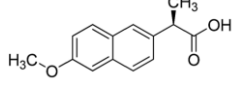
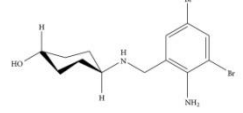
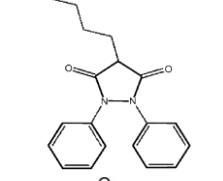
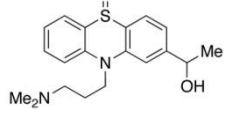
Bu tez çalışmasında ilgili literatür bilgilerinin ışığında birbirinden farklı kimyasal ve farmakolojik özelliklere ve tarama limiti değerlerine sahip olan ve geniş bir pH aralığında çalışmayı gerektiren ilaç etkin maddelerin basitleştirilmiş örnek hazırlama işlemleri; en az ekstraksiyonla en uygun cihaz belirlenerek maksimum verim elde edilecek şekilde yüksek tekrarlanabilirlik ve seçicilikte kantitatif olarak tespit edilebilmesi için üç yöntem geliştirilmiş, karşılaştırılmış ve geliştirilen yöntemler Avrupa Komisyonu 2002/657/EC dökümanına ve AORC kriterlerine uygun olarak valide edilmiştir.

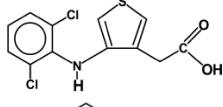
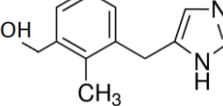
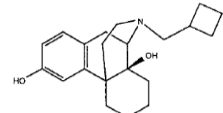
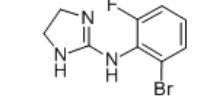
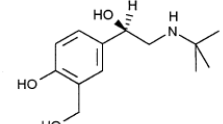
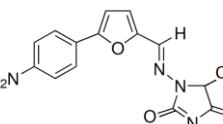
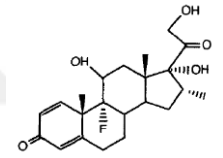
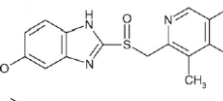
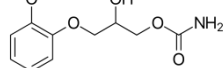
4. GENEL BİLGİLER

Çalışmaya konu olan teröpatik etkili uluslararası tarama limiti olan maddeler birbirlerinden farklı özellik gösteren ilaç gruplarında yer almaktadırlar ve pKa değerleri oldukça farklıdır. Bu maddeler, pKa değerleri ve kimyasal yapıları Tablo 2’de gösterilmiştir.

Tablo 2. İlaç etkin maddeler ve özellikleri

Teröpatik Madde	İlaç Etkin Madde Özelliği	pKa	Kapalı Formül	Açık Formül
Furosemid	Diüretik	3,9	C ₁₂ H ₁₁ ClN ₂ O ₅ S	
Fluniksın	NSAID	5,8	C ₁₄ H ₁₁ F ₃ N ₂ O ₂	
Meloksikam	NSAID	4,0	C ₁₄ H ₁₃ N ₃ O ₄ S ₂	
4-Metilamino antipirin	NSAID	9,3	C ₁₂ H ₁₅ N ₃ O	
Triamsinolon Asetonid	Kortikosteroid	12,8	C ₂₄ H ₃₁ FO ₆	
İpratropium	Bronkodilatör/Mus korinik Antagonist	15,1	C ₂₀ H ₃₀ BrNO ₃	
Betametazon	Kortikosteroid	12,4	C ₂₂ H ₂₉ FO ₅	
3'-hidroksilidokain	Lokal Anestezik	7,4	C ₁₄ H ₂₂ N ₂ O ₂	

3'-hidroksimepivakain	Lokal anestetik	7,6	$C_{15}H_{22}N_2O_2$	
Dembreksin	Mukolitik	-	$C_{13}H_{17}Br_2NO_2$	
Ketoprofen	NSAID	5,9	$C_{16}H_{14}O_3$	
N-butilskopolamonyum	Parasempatetik	15,1	$C_{21}H_{30}BrNO_4$	
Diklofenak	NSAID	4,1	$C_{14}H_{11}Cl_2NO_2$	
Karprofen	NSAID	4,4	$C_{15}H_{12}ClNO_2$	
Vedaprofen	NSAID	4,7	$C_{19}H_{22}O_2$	
Meklofenamik Asit	NSAID	3,8	$C_{14}H_{11}Cl_2NO_2$	
Naproxen	NSAID	4,1	$C_{14}H_{14}O_3$	
Ambroksal	Mukolitik	8,2	$C_{13}H_{18}Br_2N_2O$	
Fenilbutazon	NSAID	4,5	$C_{19}H_{20}N_2O_2$	
2-(1-hidroksietil) promazin sulfoksit (HEPS)	Sedatif	-	$C_{19}H_{24}N_2O_2S$	

Eltenak	NSAID	4,1	C ₁₂ H ₉ Cl ₂ NO ₂ S	
3'-hidroksidetomidin	Sedatif	7,1	C ₁₂ H ₁₅ N ₂ O	
Butorfenol	Opioid	8,6	C ₂₁ H ₂₉ NO ₂	
Romifidin	Tranquiliser /Sakinleştirici	8,7	C ₉ H ₉ BrFN ₃	
Salbutamol	Bronkodilatör	10,3	C ₁₃ H ₂₁ NO ₃	
5-hidroksidantrolen	Kas gevşetici	7,5	C ₁₄ H ₁₀ N ₄ O ₆	
Deksametason	Kortikosteroid	12,1	C ₂₂ H ₂₉ FO ₅	
Omeprazol	Proton pompası inhibitörü	14,7	C ₁₇ H ₁₉ N ₃ O ₃ S	
Metokarbamol	Kas gevşetici	13,1	C ₁₁ H ₁₅ NO ₅	

4.1. İlaç Etkin Maddelerle İlgili Genel Bilgiler

Tarama limiti olan maddelerin önemli bir kısmını Non-steroidal anti-inflamatuvar ilaçlar (NSAID) oluşturmaktadır. NSAID'ler genellikle zayıf organik asit maddeleridir ve ağrı, ateş ve inflamasyon etkilerini azaltırlar. Yaygın olarak yumuşak doku, kas-iskelet sistemi ve abdominal inflamasyon, ağrı, insan ve veteriner cerrahisinde antibiyotik tedavisine yardımcı (destekleyici) olarak kullanılırlar (Jedziniak ve ark., 2012). Bunlar plazma proteinlerine (>%95) yoğun olarak bağlanır. Karaciğerden ilk geçiş etkileri düşüktür. Çoğu karaciğerde oksidasyon ve konjugasyon ile metabolize olur ve idrarla

atılırlar. NSAID'ler akut doz aşımı veya uzun süreli tedaviden sonra bazı yan etkilere (gastrointestinal ülserasyon, renal etkiler, cilt reaksiyonları, merkezi sinir sistemi etkileri vs.) neden olabilir (Smolinske ve ark.,1990). Buna ek olarak, NSAID'lerin kullanımının atların performansını etkilemesi ve yanlış kullanımının doğuracağı olumsuz etkiler nedeniyle uluslararası tarama limiti belirlenerek kullanımı kısıtlanmıştır.

Heterojen molekül yapılarından dolayı NSAID'ler kimyasal yapılarına göre karboksilik asit (Salisilik asit ve esterleri, asetik asit, propiyonik asitler, fenamik asitler), enolik asitler (pirolozonlar, oksikamlar), asidik olmayan bileşikler ve koksibler olmak üzere sınıflandırılmaktadır (Saraf, 2008).

Aşağıda çalışılan ilaç etkin maddeler hakkında kısa bilgiler yer almaktadır.

Fenilbutazon: Enolik asit türevi olan fenilbutazon pirazolon sınıfında NSAID özellikte bir ilaç etkin maddedir. İdrarda metabolize olmamış halde, oksidasyon ve glukronik asitle konjugasyon sonucu oksifenilbutazon, hidroksifenilbutazon ve hidroksioksifenilbutazon metabolitleri halinde bulunur (Aarbakke, 1978). Atlarda kullanılan en etkili NSAID'lerden biridir. Analiz sırasında oksidasyonla yıkılma görüldüğünden analizinde askorbik asit kullanımı yaygındır (Jedziniak ve ark., 2010).

Fluniksın: Bir nikotinik asit türevi olan fluniksın kas iskelet bozukluklarında ve atlarda kolik ile ilişkili visseral ağrının hafifletilmesinde kullanılan bilinen en güçlü siklooksijenaz inhibitörü ve dolayısıyla en güçlü antiinflamatuvar ajandır (Sams ve ark., 1999). Fluniksın COX-1 ve COX-2'nin her ikisini de inhibe edebilmektedir (Brideau ve ark., 2001). Fluniksın (meglumin) zayıf asit karakterde olduğundan yüksek oranda (yaklaşık %99) plazma proteinlerine bağlanır ve 2-4 saat sonrasında değişmeden ve hidroksilli metaboliti halinde atılır (Soma ve ark., 1988). Fluniksın'ın polar asidik grubu türevlendirilerek gaz kromatografisinde daha iyi bir kromatografik davranış sağladığı görülmüştür (Johansson ve Anlér, 1988).

Ketoprofen: Propiyonik asit türevi olan ketoprofen plazma proteinlerine yaklaşık %99 oranında bağlanarak taşınır ve karaciğerde glukronik asitle birleşme tepkimesine uğrayıp idrarla atılır. Yaklaşık %50'si değişmeden atılırken kalan kısmı ya hidroksillendikten sonra ya da direkt glukronid formuna dönüşerek atılır (Rençber ve ark.,

2009). Ketoprofen çeşitli lezyon kaynaklı topallamayı maskeleyebilen analjezik etkisi dolayısıyla atlarda kullanılmaktadır (Benoit ve ark., 1992).

Naproksen: Propiyonik asit türevidir. Yapısal olarak ketoprofen ve ibuprofen'e benzemektedir. Naproksen oral yolla alındıktan sonra kısmen 6-O-desmetil metabolitine dönüşür ve sonra her iki bileşik glukronik asit ya da sülfat konjugatları şeklinde ya da değişmeden idrarla atılır (Kiang ve ark., 1989). Önerilen dozlarda kullanıldığında, naproksen atlarda etkili bir NSAID'dir fakat birkaç gün tedavi uygulanarak kullanımı doğrudur (Plumb, 1999).

Meklofenamik asit: Antranilik asit türevidir. %99'un üzerinde plazma proteinine bağlanır. Atlarda oksidasyonla daha sonra inaktif bir karboksil metabolitine dönüşebilen aktif bir hidroksimetil metabolitine dönüşür ve etkisini yavaş gösterir (Ruiz ve ark., 1998).

Karprofen: Propiyonik asit türevi bir ilaç etkin maddedir. Analjezik özelliği etkin antiinflammatuvar özelliği zayıftır (Bertone ve Horspool, 2004). Asimetrik karbon atomu içerir ve iki izomeri R (+) ve S (-) bulunmaktadır. Sindirim sisteminden hızlı bir şekilde emilir ve biyoyararlanımı %90'ın üzerindedir (McKellar ve ark., 1994). Düşük oranda hidroksi metabolitlerine dönüşür, serbest halde atılır ve majör metaboliti karprofen glukronil esterdir (https://www.ema.europa.eu/en/documents/mrl-report/carprofen-summary-report-1-committee-veterinary-medicinal-products_en.pdf, Erişim tarihi: 01 Ağustos 2019). Birçok NSAID özellikteki ilacın aksine karprofenin yarılanma ömrü uzundur (14-31 saat) (Lees ve ark., 1994, McKellar ve ark., 1991).

Vedaprofen: Propiyonik asit türevi bir NSAID'dir. Farklı farmakokinetik özelliklere sahip R (-) ve S (+) enantiyomerleri mevcuttur. COX1 enzimini inhibe eder (Bertone ve Horspool, 2004). En bol metaboliti hem plazma hem idrarda hidroksilli olan metabolitidir; ancak metabolitler vedaprofenden 2,5 - 20 kat daha az aktiftirler ve ortalama olarak verilen dozun %95'i, uygulamadan sonraki ilk 10 saat içerisinde elimine edilir (https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-discussion/quadrisol-epar-scientific-discussion_en.pdf), Erişim tarihi: 1 Ağustos 2019).

Eltenak: Atlarda kullanımı güvenli ve etkili olan asetik asit türevi bir NSAID'dir (Prügner ve ark., 1991). Diğer NSAID'lara benzer özellikler gösterir. Eltenak ile ilgili detaylı bilgiler literatürde çok azdır.

Diklofenak: Fenil asetik asit türevi bir NSAID'dir. Diklofenak başlıca serum albumini olmak üzere (%99,4), serum proteinlerine % 99,7 oranında bağlanır. Verilen dozun yaklaşık %60'ı esas molekülün glukuronid konjugatı şeklinde ve çoğu glukuronid konjugatlarına dönüşen metabolitleri halinde idrarla atılır. Metabolitleri diklofenaktan çok daha az derecede aktiftirler. %1'inden daha azı değişmemiş ilaç şeklinde atılır (<https://www.ilacprospektusu.com/ilac/127/voltaren-sr-75-mg-20-tablet>, Erişim tarihi:1 Ağustos 2019).

Meloksikam: Meloksikam enolik asit türevi, genellikle eklem tedavilerinde kullanılan NSAID özellikte bir siklojenaz-2 (COX-2) inhibitörüdür. Vücutta emilimi yüksektir nerdeyse %99,5'i plazma proteinlerine bağlanır, idrar ve dışkılarından atılan dört biyolojik olarak aktif olmayan ana metabolitlere metabolize olur (Türk ve ark., 1996). İdrarda %10'dan daha azı değişmeden meloksikam olarak kalır (https://www.ema.europa.eu/en/documents/mrl-report/meloxicam-summary-report-2-committee-veterinary-medicinal-products_en.pdf, Erişim tarihi:1 Ağustos 2019).

Metilamino antipirin: Metamizol ağrı kesici ve ateş düşürücü özellikte pirazolon türevi bir NSAID ilaç etkin maddesidir. Bu özelliği büyük oranda hızla aktif metaboliti olan 4-MAA'e biyotransformasyonundan kaynaklanmaktadır (Yoshioka ve ark., 1981). Oral uygulamadan sonra yaklaşık %100 emilerek biotransformasyona uğrar. Gastrointestinal sistemde hızla ve hemen hemen tamamen emilerek enzimatik olarak hidrolize ihtiyaç olmadan 1-2 saatte 4-MAA'e dönüşür ve plazmada ve idrarda metamizol olarak tespit edilemez (Nikolova ve ark., 2012).

Furosemid: Furosemid antranilik asit türevi olan kuvvetli bir idrar söktürücüdür, %90 üzerinde plazma proteine (daha çok albumin) bağlanır, karaciğerde metabolize olur, yarılanma ömrü 0,5-2 saattir ve atılım yolu idrardır (https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2016/018667s0361bl.pdf, Erişim Tarihi:1 Ağustos 2019). Furosemid kanı böbreklere yönlendirerek atın hava yollarındaki aşırı kanamayı sınırlar (<https://www.peta.org/issues/animals-in-entertainment/horse->

[racing-2/horse-racing-industry-cruelty/drugs/](#), Erişim tarihi: 1 Ağustos 2019). İlaç verilen atlar vücutlarındaki suyun yüzde 2'sini kaybeder, bu da onlara yaklaşık 9 kilo ağırlık avantajı sağlamaktadır. Furosemid idrar ürettiğinden bir atın vücut sistemine girmiş diğer ilaçların varlığını (özellikle yasadışı ilaç etkin maddeleri) maskeleyebilmektedir (Dirikolu ve ark., 2003).

Triamsinolon asetonid: Anti-inflamatuvar tedavisinde kullanılan bir glukokortikosteroiddir. Yüksek oranda plazma proteinine bağlanırken bağlanmamış olan kısmı daha aktiftir. Karaciğerde aktif olmayan glukuronid ve sülfat metabolitlerine dönüşür. İdrar analizlerinde, ana bileşik (enjekte edilen dozun %20'si), 6β-hidroksitriamsinolon (%25) ve tanımlanmamış, ancak bir glukuronid veya sülfat gibi görünmeyen üçüncü bir bileşik (<%5) halinde tespit edilmiştir (<https://www.healthcouncil.nl/binaries/healthcouncil/documents/advisory-reports/2013/04/05/triamcinolone-triamcinolone-acetonide-evaluation-of-the-effects-on-reproduction-recommendation-for-classification/advisory-report-triamcinolone-triamcinolone-acetonide-evaluation-of-the-effects-on-reproduction-recommendation-for-classification.pdf>, Erişim tarihi: 9 Ekim 2019).

Betametazon ve deksametazon: Astım, dermatit gibi alerjik ve deri hastalıkları, eklem ağrıları için kullanılan kortikosteroid özellikte ilaç etkinlerdir. 16-metil grubunun deksametazon için alfa, betametazonda beta ya bağlı olması dışında yapısal bir farklılıkları yoktur ve birbirlerinin epimeridirler. Farmakolojik etkileride birbirine paraleldir (https://www.ema.europa.eu/en/documents/mrl-report/betamethasone-summary-report-committee-veterinary-medicinal-products_en.pdf, Erişim tarihi: 1 Ağustos 2019). Plazma proteinlerine yüksek oranda bağlanırlar. İdrarla değişmeden ve metabolitleriyle beraber atılırlar.

İpratropium: Kuaterner amin yapısında bulunan antikolinergik bir ajandır. Plazma proteinine minimal düzeyde bağlanır ve uygulanan dozun büyük bir kısmı değişmeden atılır (https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2006/021527s0051bl.pdf, Erişim tarihi: 1 Ağustos 2019).

Lidokain: Lidokain bir amid lokal anesteziiktir ve N-dealkilizasyonla bir çok metabolitine monoetilglisineksilidin, 3 hidroksi lidokain, 2,6-dimetil anilin, 4-hidroksi lidokain ve konjugatları dönüşürken %10 u değişmeden atılır (Harkins ve ark., 1998).

Mepivakain: Rasemik tersiyer amid yapısında bir lokal anesteziiktir. Proteine lidokainden daha fazla bağlanır. %60 civarı idrarla 3-hidroksi mepivakain konjugatı olarak atılırken, az bir kısmı değişmeden atılır (https://www.ema.europa.eu/en/documents/mrl-report/mepivacaine-summary-report-committee-veterinary-medicinal-products_en.pdf, Erişim tarihi: 1 Ağustos 2019).

Dembreksin: Dembreksin solunum mukusunun viskozitesini azaltan anti-tusif etkili mukolitik bir ajandır. Hayvanlarda oral kullanımda hızlıca ve hemen hemen tamamen adsorbe edilir. Plazmada hızlıca, idrarda ise glukronid ve sülfat tuzları konjugelerine metabolize olarak elimine olur (https://www.ema.europa.eu/documents/mrl-report/dembrexine-summary-report-committee-veterinary-medicinal-products_en.pdf, Erişim tarihi: 1 Ağustos 2019).

Ambroksol: Bromheksin'in N-desmetilasyon ve hidroksilasyon sonucu hızlıca oluşan farmakolojik aktif metaboliti olan mukolitik özellikte bir ilaç etkin maddedir. Bu nedenle idrarda tarama yapılırken ambroksol kullanılmaktadır (Uboh ve ark., 1991).

N-butilskopolamonyum: N-butilskopolamonyum kuaterner amonyum yapısında, atlarda spazmodik kolik ve diğer karın ağrısı biçimlerinin tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir ilaçtır (Bertone, 2002). >%5'i idrarla değişmeden atılır.

2-(1-hidroksietil)promazin sulfoksit (HEPS): Sedatif özellikte olan Asepromazin'in konjuge olmayan majör metabolitidir.

Detomidin: Sedatif ve analjezik etkili ve atlarda yaygın olarak kullanılan bir ilaç etkin maddedir. Detomidin karboksilik asit ve hidroksidetomidin glukronide dönüşerek metabolize olur ve idrarla atılır.

Butorfanol: Opioid analjezik özelliktedir. Uygulama sonrasında tamamen absorplanır ve plazma proteinlerine bağlanır. Karaciğerde hidroksibutorfanol ve norbutorfanol ile metabolize edilir ve bu metabolitler çoğunlukla ana ilacın % 5'i ile birlikte idrarla atılır.

Romifidin: Kas gevşetici ve sakinleştirici olarak kullanılır. Karaciğer (sitokrom P450 enzimleri) tarafından 4-hidroksiromifidin içine ve ayrıca idrarla atılan glukuronid konjugatı içine metabolize edilir (Hsu, 2008).

Salbutamol: Kısa etkili β -adrenarjik reseptör agonisti ilaçtır. Salbutamol'ün bir kısmı değişmeden ve sülfat konjuge metaboliti halinde idrar yoluyla atılır (Morgan ve ark., 1986).

Dantrolen: Kas gevşetici olarak kullanılmaktadır. Hızlıca 5-hidroksi dantrolen'a metabolize olur (DiMaio Knych ve ark., 2011).

Omeprazol: Asit pompası inhibitörüdür. Gastrit ülser vb. hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Sulfon ve hidroksiomeprazol'e metabolize olur (Cederberg ve ark., 1989).

Metokarbamol: Kas gevşetici olarak kullanılmaktadır. Metokarbamol metabolitleri çoğunlukla idrarda ve düşük ana iyon oranıyla metabolize olur (Hsu, 2008).

NSAID özellikte olan ilaç etkin maddeleri yapılarında bulunan karboksilik asit grupları nedeniyle serbest halde tespit etmek güçtür (Nagamatsu ve ark., 2012). Ayrıca –COOH grubu nedeniyle ESI-MS bulunan sıvı kromatografi cihazlarında pozitif iyonizasyonla sonuç vermemekte, negatif iyonizasyonla ise düşük miktarlarda görülebilir olduğundan bu maddelerin analizinde türevlendirme işlemi uygulanıp GC-MS'de analiz yapmanın seçiciliği ve verimliliği arttırdığı tespit edilmiştir (Kretschmer ve ark., 2011, El Haj ve ark., 1999). Bu nedenle yapılan birçok çalışmada farklı türevlendiriciler ve teknikler uygulanmıştır. González ve arkadaşları tarafından 1996 yılında at idrar ve plazmasında gaz kromatografisiyle 17 NSAID'in tespiti çalışılmıştır. Biyolojik matriksin pH'sı asidik yapılmış (2-3) daha sonra dietil eterle sıvı-sıvı ekstraksiyon uygulanmıştır. Sonrasında iyi bir kromatografik ayrılma için potasyum karbonat varlığında metil iyodürle türevlendirme yapılarak GC-MS'e enjekte edilmiştir. Sadece karboksilik asit ve enolik asit grupları olan bileşikler için (diklofenak, fluniksin, naproksen ve fenilbutazon) 60°C'de inkübasyona ihtiyaç duyulmadan, fenolik ve hidroksiamid grupları içerenler (oksifenilbutazon, salisilik asit ve ibuproksam) ise 60°C'de 90 dk inkübe edilerek türevlendirilmiştir (González ve ark., 1996).

2001 yılında Maurer ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada ekstaktif metilleme yöntemi uygulandıktan sonra GC-MS ile asidik ilaçların ve zehirlerin tarama analizi yapılmıştır. Ekstraktif metilleme için alınan idrar örneğine tetraheksilamonyum (THA) hidrojen sülfat içeren fosfat tampon (pH 12) ilave edildikten sonra toluen içerisinde metil iyodürde ilave edilip 50°C de 30 dk bekletilip metilleme işlemi uygulanmıştır. Türevlendirme işlemi özellikle duyarlı asidik bileşiklerin tespiti için gerekli bir işlemdir. Bazı NSAID'lerin geri kazanımı hidroliz ile azaldığından türevlendirme işleminin öncelikli olarak yapılması avantaj sağlamıştır ve glukronidler bu aşamada ayrılmıştır (Maurer ve ark., 2001).

2006 yılında Popot ve arkadaşları tarafından at dışkısında hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu kullanılarak nonsteroidal anti-inflammatuar ilaçların tespiti yapılmıştır. 2 yaşından küçük olan atlardan idrar almak oldukça güç olduğu için dışkı üzerinden çalışma yapılmıştır. Hızlandırılmış çözücü sistemi olarak Dionex ASE 200 sistemi kullanılmıştır. Alınan örnekler Fontainebleau kumu ile karıştırılıp sırasıyla yağ uzaklaştırma ve katı faz ekstraksiyonu yapılmıştır. Sonrasında TMAH/Metanol türevlendirmesi yapılarak GC-MS'e enjekte edilmiştir. LOD değerleri naproksen, selekoksib, karprofen, diklofenak ve fluniksine <10 ng/mL, ketoprofen ve vedaprofen 10 ng/mL, fenilbutazon ve meklofenamik asit ise 20 ng/mL olarak tespit edilmiştir (Popot ve ark., 2006).

Metilleme ile türevlendirme dışında sililleme tekniğinde uygulanmaktadır. 1999 yılında El Haj ve arkadaşları yaygın olarak kullanılan NSAID'lerin (Salisilik asit, asetilsalisilik asit, ibuprofen, mefenamik asit, tiaprofenik asit, diklofenak, naproksen, diflunisal, indometasin, ketoprofen) farmasotik dozaj formlarında ve yarış atlarının idrarında sililleme ile türevlendirilerek GC-MS'le analiz etmişlerdir. İdrarda GC-MS analizlerinde NSAID'ler metil esterleri halinde, karboksilleştirilmiş, susuzlaştırılmış veya asetilleştirilmiş halde bulunabilirler. Türevlendirme işlemi BSTFA (%1 TMCS) ile 60°C'de 20 dk bekletilerek yapılmıştır. İdrardan ilaçların ayrılabilmesi için asidik ve bazik şartlar ısıda bekletme gibi işlemler uygulanmıştır. Sonrasında ise etil asetat/hekzan karışımı ile sıvı-sıvı ekstraksiyon uygulanmıştır. Karboksilik asit grubu içeren NSAID'ler BSTFA (+%1 TMCS) ile mono-trimetilsilil türevlerine dönüşmüşlerdir. -COOH ve -OH grubu içerenler ise ditrimetilsilil türevlerine dönüşmüşlerdir (El Haj ve ark., 1999).

2008 yılında Sebök ve arkadaşları atık sularda ibuprofen, naproksen, ketoprofen ve diklofenak'ın trimetilsilil türevlerinin gaz kromatografisiyle tespit ve tayin edilmesi için 4 farklı sililleme çözücüsü kullanılarak analitik ve mali yönden en uygun olarak kullanılabilen türevlendirici belirleme çalışması yapmışlardır. Katı-faz ekstraksiyonundan sonra 3 farklı türevlendirici (HMDS+TFA, BSTFA, MSTFA) sıcaklıkları ve bekleme süreleri değiştirilerek çalışılmış ve sonuçlar değerlendirilmiştir. Yapılan sıcaklık ve bekleme süresi çalışmasında en uygun sıcaklığın 70°C'de 90 dk beklemesiyle elde edildiği görülmüştür. Türevlendirici olarak MSTFA ve BSTFA'nın aynı etkiyi gösterdiği HMDS+TMS'nin ise benzer etkinlikte olmasına rağmen fiyat olarak daha uygun olduğu görülmüştür (Sebök ve ark., 2008).

Sililleme için kullanılan çözeltiler kolonun ayırma gücünü zayıflatmakta ve kolona zarar verebilmektedir. 2012 yılında Nagamatsu ve arkadaşları tarafından TMS (trimetilsilil) türevlendirmesi yapılmıştır. Bunun için önce BSTFA+%1 TMCS türevlendiricisi kullanılmıştır ancak çözeltinin asidik kuvvetinin fazla olması nedeniyle (pH 2) kolon zarar görmüştür. Bu nedenle türevlendirmenin daha düşük sıcaklıklarda (60°C) sağlanabildiği ve pH'sı yaklaşık 4 civarı olan MSTFA türevlendirici olarak kullanılmıştır. MSTFA'nın yüksek viskozitesi nedeniyle piklerde bölünme oluşmasının engellenmesi içinde türevlendirme sonrasında n-heptan enjekte edilerek kolonun zarar görmesi kısmen engellenmiştir (Nagamatsu ve ark., 2012).

1997 yılında Hirai ve arkadaşları tarafından insan idrarında 12 NSAID'in analizi için yapılan çalışmada asidik, bazik ve enzimatik hidrolizin karşılaştırılması yapılmıştır. Çalışılan maddelerden diklofenak'ın asidik hidrolizde indometasin'in bazik hidrolizde kayb olduğu, enzimatik hidrolizde ise geri kazanımda düşüş olduğu görülmüştür (Hirai ve ark., 1997).

2012 yılında Hu ve arkadaşları domuz kasında 30 NSAID kalıntısının UHPLC-MS kullanılarak eşzamanlı analizi için yaptıkları çalışmada hareketli faz olarak formik asit kullanıldığında ESI+ modunda NSAID'lerin iyonizasyonunu arttırdığı ve ESI- modda ise amonyum asetatın pH'yı değiştirerek iyonizasyonu arttırdığı görülmüştür. Bazı negatif iyon modunda çalışılan NSAID'larda ise karboksilik asit gruplarının deprotona olarak pozitif iyon modda tespit edilebilir hale geldiği görülmüştür (Hu ve ark., 2012).

Numune yoğunluğu çok fazla olan doping, adli tıp, gıda kontrol ve toksikoloji laboratuvarları için çok sayıda ve farklı özellikte ilaç etkin maddenin eş zamanlı olarak yüksek seçicilik ve düşük tespit limitleriyle taranabilmesi önemlidir. Bu ihtiyaçlar doğrultusunda gelişen teknolojiyle bu şekilde toplu taramalar yapmak mümkün hale gelmiştir. 2011 yılında Moulard ve arkadaşları tarafından yüksek rezolüsyonlu ve yüksek kütle hassasiyetli orbitrap kütle spektrometresiyle at idrarında 235'ten fazla ana kütle taranmıştır. Seçilen 20 etkin analitin validasyonu yapılmıştır ve maddelerin LOD değerleri 0,05-20 ng/mL aralığındadır. Bu cihazla aynı zamanda tam tarama yapıldığı için geriye dönük olarak analiz yapmakta mümkündür (Moulard ve ark., 2011).

Yasaklı maddelerin tespiti ucu açık bir alan olduğundan tespit edilecek maddeleri kısıtlamak oldukça güçtür. Doping kontrol laboratuvarlarında fazla sayıda ilaç etkin maddenin eş zamanlı olarak düşük seviyelerde ve hassas olarak taranması analiz yükünü hafifletmesi ve geniş bir skalada çalışma olanağı sağlaması için bu özellikte tarama yapabilmek önemlidir. Bu mantıkla 2006 yılında Ho ve arkadaşları tarafından at idrarında anabolik steroidler, kortikosteroidler ve asidik ilaçların taranması için iki tane yüksek verimlilikte LC-MS/MS metodu bildirilmiştir (Ho ve ark., 2006). Proteaz ve β -glukuronidaz ilave edilip 65°C de 3,5 saat inkube edilerek yapılan enzimatik hidroliz sonrasında katı faz ekstraksiyon karışık-mod C8-katı katyon değişim kartuşuyla gerçekleştirilmiştir. At idrarında iki fraksiyonla çalışılarak asidik/nötral özellikte maddeler ayrı bazik özellikte maddeler ayrı elüe edilip analiz edilmiştir. Bu çalışmayla kimyasal ve farmakolojik olarak birbirinden farklı olan maddelerin tek seferde analizleri yapılabilmektedir. Hidroliz basamağında proteazın kullanılması katı faz ekstraksiyonunda tıkanmanın önlenmesi açısından oldukça önemlidir ve proteaz kullanılarak bunun önüne geçildiği çalışmalarda görülmüştür (Yu ve ark., 2008, Wong ve ark., 2011). Kartuşla katı faz ekstraksiyonu yapılırken ilk fraksiyon (Diklorometan/Etanol) ile asidik/nötral özellikte maddeler ikinci fraksiyon ile (Etilasetat/Diklorometan/izopropilalkol+%2 amonyak) bazik özellikte maddeler elüe edilmiştir. Sonrasında bir kısmı türevlendirilerek GC-MS'e bir kısmı LC-MS'e enjekte edilerek 200'ün üzerinde ilaç etkin maddenin taraması yapılabilmektedir. Kesinlik değerleri %20-40 aralığındadır ve rutin kullanılan bir tarama için yeterli düzeydedir.

2005 yılında Leung ve arkadaşları tarafından at idrarında kortikosteroidler ve bazik ilaçların LC-MS/MS ile taranması için yaptıkları çalışmada alınan 3 mL örnek üzerine 1 mL potasyum fosfat tamponu (0,1 M-pH 6) ilave edildikten sonra pH'ı 6'ya ayarlanmıştır. Proteaz ve β -glukronidaz ilavesinden sonra 65°C'de 3,5 saat bekletilerek enzimatik hidroliz gerçekleştirilmiştir. Sonrasında tekrar potasyum fosfat tamponu ilavesiyle seyreltilen örnek sırasıyla metanol, su ve pH 6 fosfat tamponu ile şartlandırılan Bond Elut SPE kartuşundan geçirilmiştir. Kartuş fosfat tamponu ve asetik asitle yıkandıktan sonra diklorometan/etilasetat (4/1) karışımı ile ilk fraksiyonu kortikosteroidlerin tespiti için elüe edilmiştir. Sonra uçurulup çözülerek LC-MS/MS'te analiz edilmiştir. Aynı kartuş metanolla yıkanıp kurutulduktan sonra %2 amonyak içeren etilasetat/diklorometan/izopropil alkol (5:4:1) karışımıyla elüe edilerek bazik ilaç etkinlerin tespiti için uçurulup viale alınarak LC-MS/MS'e enjekte edilmiştir. Hareketli fazda A:10 mM amonyum asetat (pH 6,8) ve B: Metanol kullanılmıştır. Analiz sonucunda 19 kortikosteroid ve 48 bazik ilaç etkinin analizi rutin analizde uygulanabilir kesinlikle tespit edilebilmiştir. Kortikosteroidler 20-250 ng/mL aralığında %2-11 kesinlikle, bazik ilaçlar ise 20-800 ng/mL aralığında %5-17 kesinlikle tespit edilmiştir (Leung ve ark., 2005).

Deksametazon ve betametazon ilaç etkin maddeleri birbirlerinin epimeridirler ve aralarında ki fark C-16 grubuna birbirinin ayna görüntüsü olacak şekilde bağlanmış olmalarından kaynaklanmaktadır. Bu nedenle bu maddelerin analizini birarada yapmak ayırtetmek açısından güçtür. Yapılan çalışmaların çoğunda bu maddeler analiz edilirken ayrı ayrı katkı yapılarak analiz edilmiştir (Ho ve ark., 2006, Mazzarino ve Botrè 2006, Mazzarino ve ark., 2010, Wong ve ark., 2011). Ya da yapılan analizler sadece bu iki maddenin birbirinden ayrılması üzerine daha hassas kromatografik yöntemler (Luo ve ark., 2005) veya epimer maddelerin ayrılmasında kiral kolon kullanılarak analiz edilmiştir (Karatt ve ark., 2018). 2001 yılında Tang ve arkadaşları tarafından 23 kortikostreoid özellikle maddenin tespiti için yapılan çalışmada ise dereceli elüsyonda ve hareketli faz oranlarında yapılan değişikliklerle deksametazon ve betametazon tutunma zamanları birbirinden ayrılarak analiz edilebilmiştir ancak başka maddelerin tespiti güçleşmiştir (Tang ve ark., 2001).

İnsan idrarında da doping etkili maddelerin tespiti benzer şekilde yapılmaktadır. Atlarda ki uygulamadan farklı olarak doping etkili maddeler ve tarama limiti değerleri WADA tarafından belirlenen listede mevcuttur ve liste yenilendikçe eklenen maddeler tarama metotlarına dahil edildiğinden uygulanan metotların yeniliklere açık olması önemlidir. 2007 yılında Kolmonen ve arkadaşları tarafından insan idrarında doping etkili maddeler için LC-TOF/MS kullanılarak genel bir tarama metodu geliştirilmiştir. Taranan 124 madde arasında β -bloklayıcılar, narkotikler, β 2-andronerjik agonistler, anti-östrojenik aktiviteliler, diüretikler ve kannabinoid özellikte olan maddeler bulunmaktadır (Kolmonen ve ark., 2007). Yine yarışlarda antidoping analizi için 2018 yılında Abushareeda ve arkadaşları tarafından yüksek rezolüsyonlu sıvı kromatografisiyle kapsamlı bir tarama metodu geliştirilmiş ve valide edilmiştir. Bu çalışmada idrar örneği β -glukronidaz ilave edilip 50°C'de 1,5 saat bekletilerek hidroliz edilmiştir. Hidroliz sonrasında pH 9-10'a ayarlanıp etil asetatla sıvı-sıvı ekstraksiyona tabi tutulmuştur. Son basamakta vialde örnek 200 μ L hareketli faz ile çözüldükten sonra 20 μ L idrar örneği direkt olarak vialde eklenmiş ve sonrasında cihaza enjekte edilmiştir. Bu uygulamayla bütün sülfat türevleri, tam haliyle steroidler ve ilaç etkinler tespit edilebilmiştir. 304 analit minimum gereken performans seviyesinin yarısında tespit edilebilmiştir (1-100 ng/mL) (Abushareeda ve ark., 2018).

β -agonist özellikte olan maddeler uzun süreli ve yüksek dozda kullanım durumunda anabolik olarak protein sentezi ve liposiz yan etkilerini oluşturduğundan doping kontrolünde kullanımı kısıtlı ya da yasak maddeler kategorisinde yer almaktadır. 2011 yılında Garcia ve arkadaşları tarafından LC-ESI/MS ile 9 β -agonist özellikte olan ilaç etkin maddenin analizi için geliştirilen metotta karışık modda CSDAU katı faz ekstraksiyon kartuş kullanılarak pg/mL seviyesinde tespit sağlanabilmiştir. Çalışmanın hidroliz basamağında hem proteaz hem de β -glukronidaz kullanılarak enzimatik hidroliz yapılmıştır. Ekstraksiyon otomatik SPE robotuyla gerçekleştirilmiştir. Metodun validasyonu uygulanırken AORC kriterleride göz önünde bulundurularak en az 3 iyon üzerinden tanımlama yapıp RRT değerlerinin ± 2 aralığında olmasına dikkat edilmiştir. At idrarı için limiti olan maddelerden biri olan Salbutamol 20 pg/mL düzeyinde tespit edilebilir olarak bulunmuştur. Kesinlik değerleri ≤ 15 ve matris etkisi $\leq 20,4$ olarak tespit edilmiştir (Garcia ve ark., 2011).

2011 yılında Wong ve arkadaşları tarafından at idrarında anti-diabetik, siklojenaz-2 inhibitörü, sedatif, kortikosteroid, anabolik steroid ksantinler gibi farklı sınıflarda 140 ilaç etkin maddenin analizi yapılmıştır. Enzimatik hidroliz esnasında tiyazidler, pirazollar, pemolin, omeprazol gibi bazı maddelerin büyük oranda çözündüğü tespit edildiğinden yapılan çalışmada idrar örneği bir kısmı hidroliz edilip bir kısmında hidroliz edilmeden aynı kartuş ve ekstraksiyon tekniği kullanılarak ekstakte edildikten sonra birleştirilip analiz edilmiştir. Ekstraksiyon için geniş bir aralıkta çalışma özelliğinde olan polimer yapıda Abs elut-Nexus kartuş kullanılmıştır. Hesaplanan %relatif standart sapma değerleriyle metodun kesinliği ve pozitif örneklerle yapılan çalışmalarda uygulanabilirliği ortaya konmuştur (Wong ve ark., 2011).

2013 yılında Kioussi ve arkadaşları tarafından yapılan LC-TOF/MS, GC-HRMS ve GC-MS cihazları kullanılarak 350 analitin taraması genel tarama metoduyla gerçekleştirilmiştir. Analitlerin farklı fizikokimyasal özellikte, polarite aralığında, molekül büyüklüğünde, çözünürlükte ve farmasotik yapıda oluşu farklı cihazlarla çalışmayı gerektirmiştir. Örnek alındıktan sonra pH 4,8-5,5 aralığında ayarlanıp glukronidaz/arilsülfataz enzimi ilave edilip 50°C'de 3 saat bekletilerek enzimatik hidrolize tabii tutulduktan sonra pH 9,0-10,0 ayarlanıp etilasetatla sıvı-sıvı ekstraksiyon uygulandıktan sonra organik faz farklı fraksiyonlara ayrılıp bir kısmı metiliodür ile türevlendirilerek GC-MS'e verilirken bir kısmında LC-TOF/MS'e enjekte edilmiştir. İdrardan 2,5 mL daha alınıp SPE uygulanmış ve elde edilen örnek MSTFA/NH₄I/1-PrSH (N-metil-N-trimetilsililtrifluoroasetamit/amonyum iyodür/1-Propanethiol) (1000:2:3, h/a/a) ile türevlendirilerek GC-HRMS'e enjekte edilmiştir. Geniş bir aralıkta yapılan bu çalışmayla 60 analitin validasyonu yapılmıştır. LC-TOF/MS ile geniş pH aralığında olan analitler tespit edilebilirken, GC-MS ile daha çok NSAID özellikte olan maddeler GC-HRMS ile ise çoğunlukla anabolik steroid özellikteki maddeler tespit edilmiştir (Kioussi ve ark., 2013).

4.2. Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi

Kromatografi bir karışımda bulunan maddelerin biri sabit diğeri hareketli faz olmak üzere iki fazlı bir sistemde fiziksel ve kimyasal özelliklerindeki farklardan yararlanılarak ayrılması ve saflaştırılması yöntemidir. Bu yöntemde ayırma yüzeyi geniş, katı bir destek üzerinde hareketsiz duran bir faz ile hareketli faz arasında, ayrılması istenen bileşiklerin göç etme hızlarının farklı olmasından yararlanılarak yapılır. Ayrılması istenen karışım, destek katısı ve üzerindeki sabit fazla doldurulmuş cam veya metal bir kolondan geçirilerek ayırma işlemi gerçekleştirilir. Bir karışımda gaz halinde bulunan veya kolayca buharlaştırılabilen, yüksek sıcaklıklara dayanıklı, molekül ağırlığı 500 amu'dan küçük olan ve daha çok apolar özellikteki bileşenlerin birbirinden ayrılması amacıyla gaz kromatografisi (GC) yöntemi kullanılır. Kütle spektrometresi, yüksek duyarlılığı ve tarama çabukluğu ile gaz kromatografisi ile ayrılmış halde elde edilen düşük konsantrasyondaki maddelerin yapısı hakkında bilgi edinmek için en uygun yöntemlerden biridir. Bir karışımdaki organik bileşikler gaz kromatografisi ile ayrıldıktan sonra tanınmaları mümkün olabilmektedir. İki tekniğin birleştirilmesi, doğal ve sentetik organik karışımdaki bileşiklerin yapı analizi için son derece uygun bir yöntem oluşturmaktadır. Gaz kromatografisi ile birkaç saniyede ayrılan kütle spektrumları alınıp tanımlanabilmektedir

(https://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile.php/51394/mod_resource/content/0/MASS%20spektroskopisi%20-%20Pratik.pdf, Erişim tarihi: 6 Ağustos 2019). Kütle spektrometresinde örnek sırasıyla buharlaştırılır, iyonlaştırılır ve oluşan iyonlar kütle/yük (m/e veya m/z) değerlerine göre ayrılarak kaydedilir. Kaydedilen kütle/yük oranları örnek içerisindeki maddeler için ayırt edici özelliktir ve çoklu karışımlardaki maddeleri nanogram düzeylerinde bu değerlerle ayırtmak mümkündür.

Gaz kromatografisi-kütle spektrometresi otomatik-numune enjeksiyon kısmı, enjeksiyon bloğu, fırın (kolon), iyonlaştırma sistemi, kütle spektrometresi ve kaydedici kısımlarından oluşmaktadır.

Taşıyıcı gaz olarak genellikle, helyum, argon, hidrojen, karbondioksit, azot gibi inert özellikte gazlar kullanılır. Hangisinin kullanılacağı analiz edilecek örneklere, cihazın

dedektörüne ve gazın saflığına bağlı olarak değişebilmektedir. Genellikle helyum gazı kullanılmaktadır.

Numune enjeksiyon kısmı örneğin katı, sıvı veya gaz oluşuna göre değişiklik göstermektedir. Her faza göre farklı sistemler mevcuttur. Enjeksiyon aşamasında önemli olan örneği bir defada buhar fazından kolona aktarabilmektir aksi durumda yavaş veya fazla miktarda enjeksiyon ile geniş pikler ve ayırma gücünde azalma görülebilir.

Enjeksiyon bloğuda kolon tiplerine ve analiz edilecek maddelerin özelliklerine göre değişiklikler gösterebilmektedir. En yaygın olarak kullanılan enjeksiyon blokları split, splitless ve PTV (Programable Temperature Vaporization)'dir. Isıtılıp buharlaşan örnek split enjeksiyonda sadece küçük bir oranı analiz amacı ile kolona geçer ve derişik örneklere uygulanır. Splitless enjeksiyonda ise örneğin %95'den fazlası kolona geçer ve seyreltik örneklerde, özellikle safsızlık analizlerinde uygulanır. PTV ise zaman ve iş kaybına engel olmak için temiz örneklere uygulanan bir enjeksiyon yöntemidir.

Kolonlar dolgulu ve kapiler kolonlar olmak üzere ikiye ayrılmıştır.

Dolgulu kolonlar: Cam, paslanmaz çelik, bakır veya alüminyumdan yapılmış, 2-4 mm iç çap ve 2-6 m uzunluğunda, partikül çapları 37-44 µm ile 250-354 µm arasında değişen partiküllü bir katı destekle doldurulmuş kolonlardır. Yaygın olarak kullanılan partikül desteği diatomlu topraktır. Bu parçacıklar çok gözeneklidir ve hareketli faz ile sabit faz arasında yoğun temas sağlarlar ve aktif bölgeler olarak işlev gören silanol grupları (-SiOH) içerirler. ([https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Book%3A_Analytical_Chemistry_2.0_\(Harvey\)/12_Chromatographic_and_Electrophoretic_Methods/12.4%3A_A_Gas_Chromatography](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Book%3A_Analytical_Chemistry_2.0_(Harvey)/12_Chromatographic_and_Electrophoretic_Methods/12.4%3A_A_Gas_Chromatography), Erişim tarihi: 28 Ekim 2019). Uzun ömürlüdürler, daha yüksek sıcaklıklarda kullanılabilirler ancak etkinlikleri kapiler kolonlara göre daha düşüktür.

Kapiler kolonlar: Kapiler tüpten (0,3-0,5 mm iç çap) yapılmış ve içi 1 µL kadar kalınlıkta sıvı ile kaplanmış, uzun (10-100 m veya daha fazla) kolonlardır. Bu nedenle teorik plaka sayıları çok yüksek olduğundan verimleri yüksektir (http://besergil.cbu.edu.tr/26_BOLUM_9.pdf, Erişim tarihi: 28 Ekim 2019). Kapiler kolonlar üç ana tiptedir.

- İç yüzeyi özel bir sıvı ile kaplanmış olan kolonlar (WCOT), tipik olarak 0,25 µm kalınlığında ince bir sabit faz tabakası, kılcalın iç duvarında kaplanır.

-Gözenekli bir tabaka açık boru biçiminde olan kolonda (PLOT), gözenekli bir katı destek (alümina, silika jel ve moleküler elekler) kılcalın iç duvarına tutturulur.

- Sabit fazı veya dolgu maddesi özel bir sıvı ile kaplanmış olan kolonlar (SCOT), dolgu maddesi olan gözenekli katı maddenin yüzeyi ve gözenekleri özel bir sıvıyla kaplanır. Hareketli faz bu şekilde yüzeyi kaplanmış olan gözenekli katı parçacıklar arasından kolayca geçebilir (<https://www.foodelphi.com/tag/gaz-kromatografi-cihazinin-kisimlari/>, Erişim tarihi: 28 Ekim 2019).

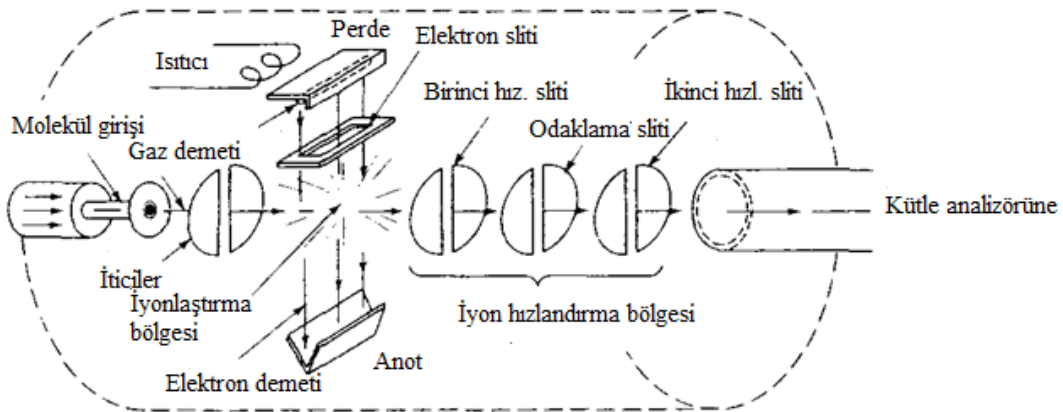
Ayrılmanın sağlanması kaynama noktası farklı olan maddeler için kolona önemli derecede bağlı olmasada benzer kaynama noktasına sahip maddelerin ayrılmasında kolon dolgusu içeriğindeki madde ile analitin etkileşiminin farklı olması önemlidir. Bu nedenle kolon dolgu materyalleri analizi yapılacak maddelere göre farklı polarite ve yapılarda olan kolon tipleri seçilerek analiz edilebilir. Sabit bir faz seçilirken çözünenlerle kimyasal olarak reaksiyona girmemesine, düşük uçuculukta ve sıcaklığa bağlı olarak bozunmamasına, numunenin bileşenlerine uygun bir polaritede olmasına dikkat edilir. Dolgu materyallerinin yapısı polisiloksana bağlanan farklı gruplar ya da polietilen glikol yapılarından oluşur. Yaygın olarak kullanılan sabit fazlar; skualen (apolar-düşük kaynama noktalı alifatik hidrokarbonlar), polidimetil siloksan (düşük polar-alkaloitler, amino asit türevleri, ilaçlar, böcek ilaçları, fenoller, steroidler), fenilmetil polisiloksan (%50 fenil, %50 metil-ortapolarite-alkaloitler, ilaçlar, böcek ilaçları, poliromatik hidrokarbonlar, poliklorlu bifeniller), siyanopropilfenilmetil polisiloksan (%50 siyanopropil, %50 fenilmetil-polar-nitritler, pestisitler, steroidler), polietilen glikol (polar-aldehitler, esterler, eterler, fenoller)'dür. Kolonlar isimlendirilirken markası ve bağlı molekül içeriği belirtilerek isimlendirilir. Örneğin; DB5MS-DB:Agilent J&W markası, 5MS: %5 difenil %95 dimetilpolisiloksan içeriğini, BP624-BP:SGE markası, 624:%6 siyanopropifenil %94 dimetilpolisiloksan içeriğini, DB-Wax: DB: J&W markası, Wax: polietilenglikol içeriğini tanımlamıştır.

Kolon, sıcaklığın kontrol edilebilir olduğu bir fırın içerisinde yer alır. Kaynama noktalarına bağlı olarak sıcaklık değerlerinde değişiklikler yapıp analitlerin kolondaki farklı tutunma zamanlarında ayrılması sağlanır.

Kolondan çıkan analit iyonizasyon bölmesine gelir. Uçucu bileşikler için Elektron İmpakt İyonizasyon (EI), Pozitif Kimyasal İyonizasyon (PCI), Negatif Kimyasal İyonizasyon (NCI) ve Alan İyonlaştırma (FI) kaynaklarından örneğe göre uygun olanı kullanılarak iyonlaşma sağlanabilmektedir (Skoog ve West, 1981). Elektron impakt iyonlaşma mol kütlesi 10^3 daltondan küçük ve termal bozunmaya uğramayan örneklerle uygulanan ve gaz kromatografide en yaygın kullanılan iyonlaşma yöntemidir. İyonlaşma odasına giren gaz halindeki maddenin basıncı $10^{-6} - 10^{-5}$ mmHg olacak şekilde ayarlandıktan sonra kızgın tungsten veya renyum filamentten oluşan ve 90° lik bir açı ile gelen, 70 eV' luk enerjiye sahip e^- lar tarafından bombardımana uğratılır. Bombardıman sonucu gaz halindeki moleküllerden $1 e^-$ 'un ayrılması ile moleküler iyon meydana gelir (https://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile.php/51394/mod_resource/content/0/MASS%20spektroskopisi%20-%20Pratik.pdf, Erişim tarihi: 6 Ağustos 2019).

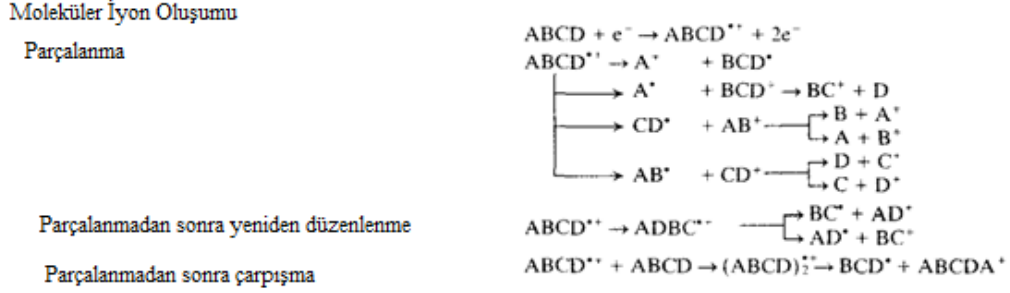


M analit molekül M^+ ise moleküler iyondur. Elektron bombardımanı ile oluşan pozitif iyonlar, hızlandırıcıları geçerek son hızlarına ulaşırlar. Böylece pozitif yüklü iyonlar büyük bir hızla m/e^- değerlerine göre spektrometrenin analizör kısmına ulaşırlar (Şekil 1).



Şekil 1. Elektron impakt kaynağının yapısı (Silverstein ve Webster, 1998)

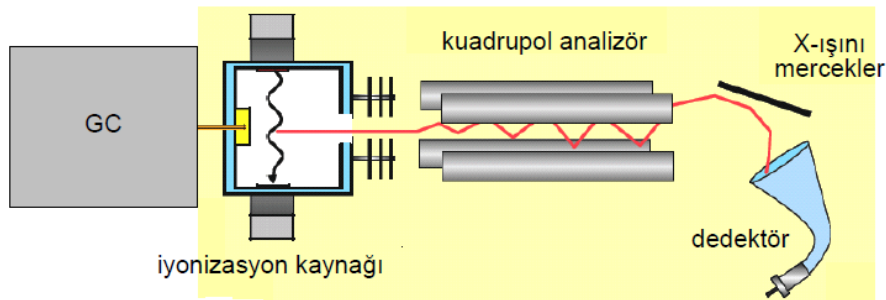
Küçük kütleli ve yüksek kinetik enerjiye sahip olan iyonlar çarptıkları moleküllerin öteleme enerjilerinde bir artış sağlarlar ve moleküller yüksek titreşim ve dönme seviyelerine uyarılıp yoğun parçalanmaya neden olurlar. Oluşan parçalanma iyonları her madde için karakteristiktir ve kütle spektrumunu oluşturur (Şekil 2).



Şekil 2. Elektron impakt kaynağındaki bazı reaksiyonlar ile parçalanma iyonlarının oluşumu (Skoog ve West, 1981).

İyon kaynağından çıkarak parçalanmış maddeler kütle analizörüne geçerler. Kütle analizörleride ölçülen özelliğe ve maddeye göre farklı kütle/yük aralığında ve rezolüsyonda değişkenlik göstermektedir.

Gaz kromatografi cihazlarında yaygın olarak kullanılan kütle analizörleri kuadrupol kütle spektrometreleri ve iyon tuzaklı analizörlerdir. Tek MS kuadrupol kütle analizörlerinde örnek kromatografi kolonundan çıktıktan sonra, kütle spektrometrenin girişinde bulunan bir transfer hattından geçer ve bir elektron-şok iyon kaynağıyla (EI) iyonlaştırılır, parçacıklara ayrılır. Ayrılan iyonlar bilgisayar sisteminde kromatograma dönüşürler (Şekil 3) (Skoog ve West, 1981).



Şekil 3. Tek MS kuadrupol kütle analizörü (http://besergil.cbu.edu.tr/kutle_1.pdf, Erişim tarihi: 6 Ağustos 2019)

Kromatogramda görülen pikler kütüphane taraması olan bir cihazda tarandığında mevcut spektrum ile karşılaştırma yapılarak maddenin ne olduğunu tespit etmek mümkün hale gelir. Maddelerin ne olduğu belirlendikten sonra aynı şekilde örneklerin miktarı da kantitatif olarak tespit edilebilir.

4.3. Sıvı Kromatografisi- Kütle Spektrometresi

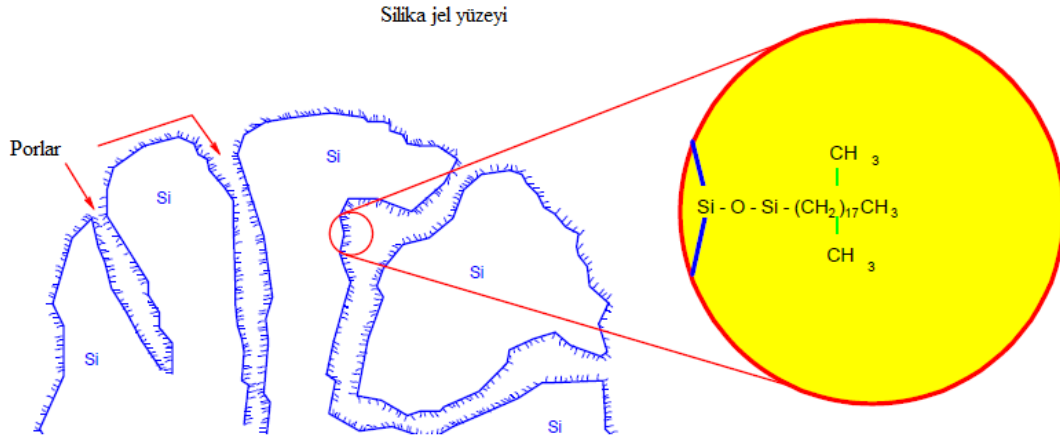
Yüksek performanslı sıvı kromatografisinin kütle spektrometresi ile kombinasyonu duyarlılığı, çok düşük tespit limitlerinde analize imkan sağlaması, kolonun ve hareketli fazın değiştirilebilmesi, çok fazla ve farklı maddeye uygulanabilir olması gibi avantajları sayesinde en yaygın kullanılan enstrümental cihazlardandır. Tipik bir sıvı kromatografisi cihazı hareketli faz çözeltilerinin bulunduğu cam veya çelikten haznelere, pompalar, enjektör, kolon ve dedektör kısımlarından oluşmaktadır.

Hareketli faz olarak kullanılan çözücüler analiz edilecek olan maddelere göre farklı polaritelerde ve değişken pKa değerlerine uyumlu olarak hazırlanabilmektedir. Tipik bir sıvı kromatografi cihazı için 4 farklı hareketli faz haznesi ve bu hareketli fazların değişken oranlarda verilmesini sağlayan pompalar bulunmaktadır. Hareketli faza uzanan ucunda hareketli faz içerisinden gelebilecek gazdan kaynaklı küçük kabarcıkları, partikülleri ve tozları engelleyen filtre bağlı kanallardan, pompa sistemine doğru akış sağlanır. Tek bir çözücü ile yapılan ayırmalar izokratik daha fazla çözücü ile değişken oranlarda yapılan elüsyon ise gradiyent elüsyon olarak adlandırılır. Özellikle çoklu maddelerin analizinde gradiyent elüsyon kullanılarak kısa sürede etkin ayrılma sağlanabilmektedir.

HPLC sistemlerinde kullanılan pompalar 1) 400 atm'ye kadar basınç üretimi, 2) puls içermeyen basınç çıkışı, 3) 0,1-10 mL/dk akış hızı, 4) %0,5 ve üzeri tekrarlanabilirlikle akış kontrolü, 5) paslanmaz çelik ya da teflondan sızdırmaz ve dayanıklı parçalara sahip olmalıdır. Her biri farklı özelliklere sahip pompalar olmakla birlikte en yaygın olarak pistonlu pompalar kullanılır. Pistonlu pompalar motor kontrolü olan pistonla ileri geri hareket yaparak çözücünün içeriye giriş ve çıkışını sağlar. Bu pompaların avantajları iç

hacimlerinin küçük, çıkış basınçlarının yüksek olması ve kolon geri basıncı ve çözücü viskozitesinden bağımsız akış hızları olmasıdır.

Örnekler autosampler bölümüne yerleştirilerek verilen isimle cihaza kaydedilir. Otomatik enjeksiyon sistemiyle yaklaşık 1-50 µL aralığında enjeksiyon yapılarak akış sistemiyle kolona gönderilir. Sıvı kromatografisinde düzgün iç çaplı, paslanmaz çelikten yapılmış yaklaşık 600 psi basınca kadar dayanıklı olan ve içerisindeki dolgu materyalinin çeşidine ve boyutlarına göre farklılıklar gösteren analitik kolonlar kullanılır.

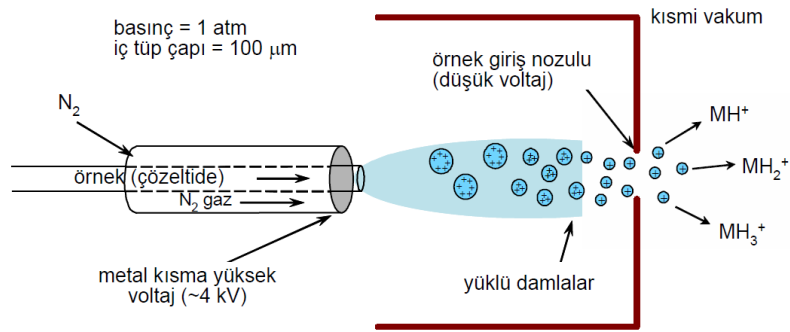


Şekil 4. HPLC kolon dolgu materyali iç yapısı

Kolon dolgu maddesinin temelinde silika bulunmaktadır (Şekil 4). Kolonun ters-faz ya da normal faz olma özelliğine bağlı olarak silikaya bağlı gruplar değişmektedir. Normal fazlı kolonlarda dolgu materyalleri polar özellikteyken hareketli fazda apolar organik çözücüler kullanılmaktadır. Normal fazda kolon dolgu materyali olarak silika yüzeyine -siyano, -amino, -diol grupları bağlanarak kolona polar özellik kazandırılırken hareketli fazda hekzan, oktanol gibi apolar çözücüler kullanılır. Ters fazda ise silikaya -C8 (n-oktil), -C18 (n-oktadesil), siyanopropil, aminopropil gibi alkil zincirli apolar gruplar bağlanmıştır. Hareketli faz olarak su, metanol, asetonitril, izopropanol, tetrahidrofuran gibi polar özellikte çözücüler kullanılır. Normal fazlı kolonlarla daha çok yapısal izomerler, organik/su fazında çözünmeyen, yağda çözünen maddelerin analizi yapılabilirken, ters faz kolonlarıyla çok farklı özelliklere sahip maddelerin analizinin yapılması mümkün olduğundan genellikle ters faz kolonları kullanılır. Kullanılan kolon

dolgu materyallerinin boyutları küçüldükçe ayrılma kolaylaşırken, zamandan ve kullanılan çözücünden tasarruf sağlanmaktadır. Bu alanda teknoloji kolon dolgu maddelerinin yapıları üzerine yapılan çalışmalarla ilerlemektedir. Kolonlar iç çapları 1-4,6 mm ve tanecik boyutları 1,5-5 µm boyutlarına kadar küçültülmektedir. Kolonlar bir fırın bölmesinin içerisine yerleştirilmiştir ve ayrılmanın sağlanabilmesindeki sıcaklık etkisi göz önünde bulundurulularak kontrol edilebilmektedirler.

Kolondan ayrılan analitler kütle spektrometresi bölümüne geçer. Kütle spektrometresinde ilk olarak analitin gaz haline geçirilerek iyonlaşması sağlanır. İyonlaştırma kaynakları örneğin önce buharlaştırılıp sonra iyonlaştırılmasına (Elektron İmpakt (EI), Kimyasal İyonlaştırma (CI), Alan İyonlaştırma (FI)) ya da katı veya sıvı örneğin gaz haline getirilerek iyonlaştırılmasına göre (Alan desorpsiyonu (FD), Elektrosprey iyonlaştırma (ESI), Matriks yardımcı iyonlaştırma (MALDI), plazma desorpsiyonu (PD), Hızlı atom bombardımanı (FAB), İkincil iyon kütle spektrometri (SIMS), Termosprey iyonlaştırma (TS)) olarak çeşitlenmiştir (Skoog, 1998).



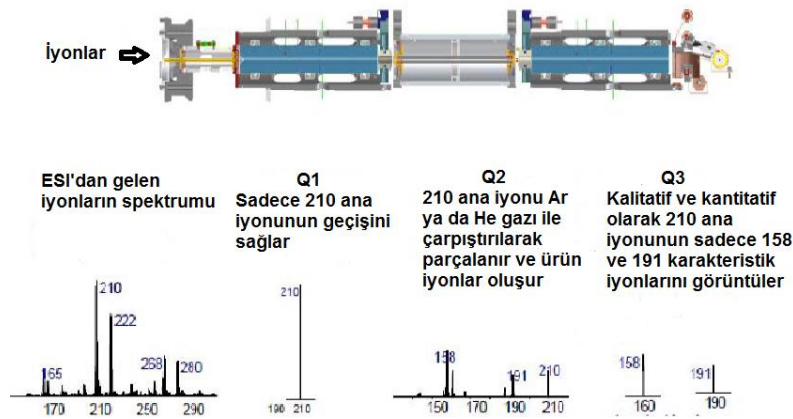
Şekil 5. Elektrosprey iyonizasyon (http://besergil.cbu.edu.tr/kutle_1.pdf, Erişim tarihi: 6 Ağustos 2019)

Polar ve uçucu olmayan analitler için elektrosprey iyonizasyon tekniği yaygın olarak kullanılan yumuşak parçalama özelliğine sahip ve atmosfer basıncıyla çalışılan bir tekniktir (Şekil 5). Örnek iğne benzeri bir kapiler ile pompalanır ve bu sırada etrafındaki elektroda göre birkaç kilovolt potansiyel uygulanır. Oluşan küçük ve elektrik yüklü damlacıkların çözücülerini kapiler içerisinde uzaklaştırılarak damlacıklar küçülmüş olur, yük yoğunlukları artar ve gaz fazına geçerler (Skoog, 1998). Bu aşamada maddenin yapısına bağlı olarak MH⁺ veya MH⁻ iyonları oluşmuştur. ESI, özellikle buharlaştırılması

ve iyonlaştırılması güç olan proteinler gibi büyük biyolojik moleküller için faydalı bir iyonizasyon tekniğidir.

İyon haline gelmiş olan analitler analizör kısmına hareket ederler. Kütle analizörleri, iyonları kütle/yük (m/z) oranlarına göre ayırıp toplar. İyonların hareketleri manyetik ve/veya elektriksel alan ile gerçekleşmektedir. Hareket eden yüklü parçacık momentuma ($kütle \cdot hız$) ve kinetik enerjisine göre diğer parçacıklardan ayrılmaktadır (Dass, 2007). Teknolojik çalışmalar iyonizasyondan analizör bölümüne gelen analit miktarının artırılabilmesi ve analizör kısmında oluşan iyonların ayrışması üzerine yenilenerek devam etmektedir. Triple kuadrupol (Q3), uçuş zamanlı (TOF), orbitrap gibi kütle spektrometresi analizörleri yüksek seçicilik, tekrarlanabilirlik ve hassasiyetle çalıştıklarından son yıllarda yaygın olarak kullanılmaktadır.

Kuadrupol 4 paralel silindirik çubuktan oluşmaktadır. İki çubuk negatif iki çubuk pozitif değişebilir doğru akım kaynağına bağlıdır. Kütle spektrumu oluşturmak için çubuklar arasındaki boşluğa 5-10 V'luk akım uygulanarak iyonlar hızlandırılır ve uygulanan doğru ve alternatif akımla beraber belli bir m/z oranı dışında kalan bütün iyonlar boşluklara çarpıp nötralleşerek uzaklaşırken diğerleri ilerlemeye devam ederler (Skoog, 1998). Bu aşamada yumuşak parçalanmayla ana iyonlar ve ürün iyonlar oluşur. Kuadrupol sisteminde iyon kaynağında iyonlaşan analitlerin Q1 bölümünde sadece ana iyonları Q2 bölümüne gönderilir. Q2 bölümünde ise ana iyonlar parçalanarak ürün iyonları oluşur ve Q3'e gönderilir. Q3'te sadece ana iyonla özgül olan karakteristik iyonlar ayrılarak dedektöre gönderilir (Şekil 6).



Şekil 6. Triple kuadrupol MS/MS cihazının şeması

Bu teknikle maddeler sadece ana iyonları değil parçalanma iyonlarına göre tespit edilebildiği için seçicilik ve hassasiyet oldukça yüksek olduğundan çok düşük konsantrasyonlarda tespit yapabilmek mümkündür. Bu özelliği sayesinde ana iyonu aynı olan maddelerde tespit edilebilir.

Kütle spektrometreleriyle hem tam tarama (SCAN) hem de seçilmiş iyonların taranması (SIM) yapılabilir. Tam tarama genel bir taramadır ve belirlenen m/z aralığında analiz boyunca tarama yapılır bu nedenle genelde nitel analizlerde kullanılır. SIM modu taramada ise taranacak kütleler ve zaman aralığı belirlenerek kısıtlama yapılır ve daha seçici analiz sağlanır. LC-MS/MS cihazlarında bu tarama SRM (Selected Reaction Monitoring) ya da DMRM (Dynamic Multiple Reaction Monitoring) olarak adlandırılan yöntemlerle yapılır. Bu modlarda belirli zaman aralığında ana iyon ve parçalanma iyonları, pozitif/negatif olarak parçalanması, uygulanan voltaj değeri ve parçalama enerjisi değerleri (optimizasyon verileri) tanımlanması durumunda çok daha seçici analizler yapmak mümkündür.

4.4. Validasyon

Validasyon bir metodun, ölçüm prosedürünün, bir cihazın veya sistemin belirlenen amaçlara uygunluğunun ve performansının belirlenmesi için objektif olarak yapılan test ve ölçme işlemlerinin yazılı delillerle kanıtlanmasıdır. Metod validasyonunun amacı seçilen metodun istenen amaca uygun nitelikte (performansta, kalitede) sonuç verdiğini test etmek ve metodun rutin kullanımı sırasında istenen performansı sağlamasının koşullarını belirleyip kontrol altında tutmaktır. Bir laboratuvarında kullanılacak her türlü metod, rutin analiz için kullanılmadan önce laboratuvar koşullarında analiz yapan kişiler tarafından valide edilmesi gerekmektedir. Belli bir kalite sistemine uygun çalışan laboratuvarların kullandıkları metotları valide etmeleri gerekmektedir.

Doping laboratuvarlarında analiz sonucunda ortaya çıkabilecek bir yanlış pozitif ya da yanlış negatif sonuç itirazlara, yargı sürecine ve mağduriyete sebep olabilmektedir. Bu nedenle analizlerin güvenilirliği, tekrarlanabilirliği ve performansı çok büyük önem

taşımaktadır. Dolayısıyla metotların valide olması hem analistler hem de sonucun etkileyeceği kişiler açısından bir gerekliliktir.

Doping laboratuvarları için oluşturulmuş temel bir kılavuz olmamakla beraber Avrupa Komisyonunun 2002/657/EC komisyon kararının 96/23/EC konsey direktifi ve ILAC G7 tarafından yayınlanan AORC'nin gereklilikleri olarak belirlenmiş olan MS kriterleri göz önünde bulundurularak validasyon çalışmaları yapılmaktadır. Her iki kılavuz örnek alınarak yapılacak validasyon çerçevesinde uygulanacak gereklilikler aşağıda sıralanmıştır.

Kütle spektrometrik tayin için performans kriterleri ve gereklilikler (<http://www.aorc-online.org/documents/aorc-ms-criteria-modified-23-aug-16>, Erişim tarihi:6 Ağustos 2019)

- GC-MS prosedürleri için, kromatografik ayırma kapiler kolonlar, LC-MS prosedürler için LC kolonları kullanılarak yapılmalıdır.
- İnceleme altındaki analit için minimum kabul edilebilir alıkonma zamanı kolonun boş hacmine karşılık gelen alıkonma zamanının iki katıdır.
- Analitin alıkonma zamanı kalibrasyon standardınıkiyle örtüşmelidir.
- Kütle fragmanları seçilmiş-iyon (SIM) kullanılarak analiz yapıldığında, veriyi yorumlamak için minimum dört tanımlama noktası gereklidir. LC-MS/MS'te ise en az 2 tanımlama noktası gerekir.
- Analitik enstrümana ekstraktların enjekte edilme sırası: boş reaktif, uygun-olan kontrol örneği, tayin edilecek örnek/ örnekler, tekrar uygun-olan kontrol örneği ve son olarak uygun-olmayan kontrol örneği şeklinde olmalıdır.
- AORC'nin kriterlerine göre uygun bir iç standart kullanıldığında, test örneğindeki analitin Relatif alıkonma zamanı (RRT), referans numunedeki değerden gaz kromatografisinde $\% \pm 1$, sıvı kromatografisinde $\% \pm 2$ 'den daha fazla değişmemelidir.
- AORC kriterlerine göre iyon oranları MS için $\% \pm 10-30$, MS/MS için ise $\% \pm 20-40$ (ilk iyon % 100 kabul edildiğinde) aralığında olmalıdır ve herbir analit için S/N oranı 3:1 oranının üzerinde olmalıdır.

Metot validasyon parametreleri kantitatif bir analiz için sırasıyla seçicilik, doğruluk-geri kazanım, tekrarlanabilirlik, laboratuvar içi tekrar üretilebilirlik, CC_{α} (Karar sınırı), CC_{β} (Tespit yeteneği), sağlamlık ve stabilite açısından değerlendirilmelidir.

4.4.1 Metodu geçerli kılma parametreleri

4.4.1.1 Spesifiklik/seçicilik

Spesifiklik, bir metodun ölçülen analit ile diğer maddeler arasında ayırt etme yeteneği demektir. Analitik metotlar için, analit ve yakından ilgili maddeler (izomerler, metabolitler, degradasyon ürünleri, kendi doğasından gelen maddeler, matris bileşenleri gibi) arasında ayırım yapma gücü önemlidir. Girişimi kontrol etmek için iki yaklaşım vardır;

Bunun için potansiyel girişim yapabilecek maddeler seçilmeli ve ilgili boş örnekler olası girişimin varlığını saptamak için ve girişimin etkisini tahmin etmek için analiz edilmelidir:

- örnekte olabilecek ilgili madde ile kimyasal olarak ilintili bileşikler (metabolitler, türevler vs.) veya diğer maddeler seçilip kontrol edilir
- bütünü temsil eden uygun sayıda ($n \geq 20$) boş örnek analiz edilir ve hedef analitin alınacağı ilgili alandaki herhangi bir girişim (sinyaller, tepeler, iyon izleri) kontrol edilir;

Böylece yöntemin söz konusu analitin tespit edilip edilemediği ve başka kimyasal olarak benzer yapıda olan maddelerin varlığında analitin tespit edilebilirliğinin kontrolü yapılmış olacaktır.

4.4.1.2 Doğruluk-geri kazanım

Doğruluk elde edilen deney sonuçlarının gerçek değere yakınlığının ifadesidir. Doğruluk sadece sertifikalı referans materyal (CRM) aracılığıyla belirlenebilmektedir. Standart referans materyal yoksa geri kazanım değeri hesaplanarak belirlenir. Geri kazanım, analitik prosedür sırasında geri kazanılan bir maddenin gerçek konsantrasyonunun yüzdesi anlamına gelir. Limitli maddeler için söz konusu limit değerinin 0,5xISL, ISL, 1,5xISL ve 2xISL oranında boş olduğu bilinen idrar örneğine katkı yapılarak 3 gün 6 paralel olarak yapılan çalışma sonucunda gün içi ve günler arası geri kazanım değerleri her seviye için hazırlanan matriks standart kalibrasyon eğrisine göre aşağıdaki eşitlikle hesaplanmalıdır.

$$\% \text{ Geri kazanım} = 100 \times \frac{\text{Ölçülen Değer}}{\text{Gerçek Değer}}$$

Geri kazanım değerleri sadece $\pm \%10$ ' luk hedef değer içinde olduğunda kabul edilebilir.

4.4.1.3 Tekrarlanabilirlik

Tekrarlanabilirlik, aynı laboratuvarında aynı analist tarafından aynı test cihazında aynı test ürünüde aynı test yöntemi ile bağımsız test sonuçlarının elde edildiği duyarlılık anlamına gelir. Tekrarlanabilirlik çalışması limitli maddeler için söz konusu limit değerinin 0,5xISL, ISL, 1,5xISL, 2xISL oranında boş olduğu bilinen idrar örneğine katkı yapılarak 3 gün 6 paralel olarak yapılan çalışma sonucunda gerçekleştirilir. Katkı yapılan örneklerin ortalama konsantrasyonları, standart sapmaları ve sapma katsayıları (%) her seviye için hesaplanmalıdır.

4.4.1.4 Laboratuvar içi tekrar üretilebilirlik

Laboratuvar içi tekrar üretilebilirlik, en az 2 farklı koşulda (farklı analist, farklı çevresel koşullar, farklı ekipman, farklı sıcaklık koşulları, farklı reaktif grupları veya çözücüler vb.) gerçekleştirilmelidir. Limitli maddeler için söz konusu limit değerinin 0,5xISL, ISL ve ISLx1,5 oranında boş olduğu bilinen idrar örneğine katkı yapılarak 6 paralel çalışma yapılmalıdır. 2 farklı şartta elde edilen sonuçların standart sapması (SD_{wlr}) ve varyasyon katsayısı (CV) hesaplanarak elde edilir.

2002/657/EC direktifine göre nicel yöntemlerin kesinliği bir referans veya katkı yapılmış materyalin tekrarlanmış analizi için sapma katsayısı (CV) üretilebilirlik koşulları altında, değişimin iç laboratuvar katsayısı Horwitz denklemince hesaplanan düzeyi aşmamalıdır. 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 'ın altında limitli olan maddeler için üretkenlik CV'si(%) ≤ 16 , 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 'ın altında ise CV (%) ≤ 23 olması gerekir (Tablo 3).

Tablo 3. Element-kütle bölümleri aralığında niceliksel yöntemler için tekrar üretilebilirlik verilerinin CV değerleri

Kütle bölümü	CV (%)
1 $\mu\text{g}/\text{kg}$	*
10 $\mu\text{g}/\text{kg}$	*
100 $\mu\text{g}/\text{kg}$	23
1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$	16

* 100 $\mu\text{g} / \text{kg}$ 'dan daha düşük kütle bölümleri için Horwitz Denklemine uygulanması kabul edilemez yüksek değerler verir. Bu nedenle, 100 $\mu\text{g} / \text{kg}$ 'ın altındaki konsantrasyonların CV'leri mümkün olduğu kadar düşük olacaktır.

4.4.1.5 Kesinlik

Kesinlik, önceden belirlenen koşullar altında elde edilen bağımsız test sonuçları arasındaki yakınlığı ifade etmektedir. Kesinlik ölçütü genellikle belirsizlik (imprecision) olarak ifade edilir ve test sonuçlarının standart sapması olarak hesaplanır. Laboratuvarda tekrarlanabilirlik koşulları altında gerçekleştirilen bir numunenin tekrarlı analizi durumunda, ortalamanın laboratuvar içi varyasyon katsayısı (CV) aşağıdaki değerleri aşmamalıdır (Tablo 4).

Tablo 4. Element kütle fraksiyonu aralığındaki kantitatif metotlar için CV'ler

Kütle fraksiyonu	CV (%)
$\geq 10 \mu\text{g}'$ dan $100 \mu\text{g}'$ a kadar	20
$> 100 \mu\text{g}'$ dan $1000 \mu\text{g}'$ a kadar	15
$\geq 1000 \mu\text{g}$	10

3 gün 3 seviye (0,5xISL, ISL,1,5xISL ve 2xISL) 6 paralel olacak şekilde yapılan çalışma sonuçlarından gün içi ve günler arası kesinlik değerleri %CV olarak aşağıdaki formüle göre hesaplanır.

$$\%CV = \text{Standart Sapma} / \text{Ortalama Değer} \times 100$$

4.4.1.6 Karar (Kesinlik) limiti (CC_{α})

Bir örneğin uygun olmadığına α hata olasılığıyla ulaşılabilecek limit ve üzeri demektir olarak tanımlanmıştır. Limit değeri belirlenen maddeler için CC_{α} , izin verilen limitte analitlerle katkılanmış her matriks başına en az 20 boş materyal analiz ederek oluşturulabilir. Limit değerine karşılık gelen konsantrasyon ile laboratuvar içi tekrar üretilebilirliğinin standart sapmasının 1,64 katının toplamı karar limitine eşittir ($\alpha = \% 5$).

$$CC_{\alpha} = C_{ISL} + 1,64 * SD$$

C_{ISL} : Uluslararası tarama limiti değeri

SD: Limit değerinde katkı yapılarak analiz edilmiş örneklerin konsantrasyonlarının standart sapması

4.4.1.7 Tespit yeteneği (CC_{β})

Bir örnekte β hata olasılığıyla saptanabilen, tanımlanabilen ve/veya miktarsal olarak belirlenebilen en küçük miktardaki madde içeriği olarak tanımlanmıştır. Limit değeri

belirlenen maddeler için CC_{β} değeri metodun izin verilen limit konsantrasyonunu $1 - \beta$ istatistiksel doğrulukla saptayabildiği konsantrasyondur.

Limitli maddeler için CC_{β} karar limitinde analitle/ analitlerle katkılanmış her matriks başına en az 20 boş materyal analiz ederek oluşturulabilir ve aşağıdaki formüle göre hesaplanır ($\beta = \% 5$).

$$CC_{\beta} = CC_{\alpha} + 1,64 * SD$$

CC_{α} : Metodun karar limiti

SD: Limit değerinde katkı yapılarak analiz edilmiş örneklerin konsantrasyonlarının standart sapması

4.4.1.8 Kalibrasyon eğrisi

Miktar tayini için kalibrasyon eğrileri oluşturulurken

- eğrinin oluşturulmasında en az beş düzey (sıfır dahil) kullanılmalıdır,
- eğrinin çalışma aralığı tarif edilmelidir,
- eğrinin matematik formülü ve verinin eğriye uyumunun iyiliği tarif edilmelidir.
- eğrinin parametreleri için kabul edilebilirlik aralığı tarif edilmelidir

Bu direktifin yerine getirilmesi için sıfır dahil 0,5xISL, ISL, 1,5xISL ve 2xISL olmak üzere 5 seviyede 6 paralel çalışma yapılır. Her bir madde için çizilen grafiklerde korelasyon katsayısı değeri hesaplanır.

4.4.1.9 Sağlamlık (minör değişiklikler)

Bu gibi çalışmalar laboratuvarlar tarafından minör mantıklı varyasyonların etkisinin ve bunların sonuçlarının gözlenmesi için uygulanır. Ön araştırma çalışmaları, ölçüm

sonuçlarını etkileyebilen, örneğin ön muamele, temizleme ve analiz faktörleri seçilerek yapılmalıdır. Bu gibi faktörler laboratuvarda olabilen birçok faktörün yanı sıra analizi yapanı, reaktif ve ömrünü, solventleri, standartları ve örnek ekstraktlarını, ısıtma oranını, sıcaklığı, pH değerlerini içine alabilir. Bu faktörler laboratuvarlar arasında karşılaşılan sapmalarla örtüşen bir büyüklük sırasında modifiye edilmelidir (Commission Decision, 2002/657/EC).

- Sonuçları etkileyebilecek olası faktörler tanımlanır,
- Her faktör minör düzeyde değiştirilir,
- Youden yaklaşımı (AOAC-I Peer Verified Methods, Policies and Procedures, 1993, Youden ve Steiner, 1975) kullanılarak bir kuvvetlilik testi yapılır. (Youden yaklaşımı gerekli zamanı ve çabayı minimumda tutar. Youden yaklaşımı bir fraksiyonel faktoriyel tasarımıdır. Farklı faktörler arasında etkileşim tespit edilemez).
- Bir faktörün ölçüm sonuçları önemli ölçüde etkileyen bir faktör bulunduğunda, bu faktörün kabul edilebilirlik limitleri konusunda karar vermeye yönelik ilave deneyler yapılır,
- Sonuçları önemli derecede etkileyen faktörler metot protokolünde açık olarak tanımlanmalıdır.

Temel düşünce bir defada bir alternatif üzerinde çalışmak değil fakat bir defada birkaç varyasyonu devreye sokmaktır. Örnek olarak nominal değerler hafifçe değiştirildiğinde sonuçları etkileyebilen yedi farklı faktörün nominal değerler A, B, C, D, E, F ve G ise bunların alternatif değerleri küçük a, b, c, d, e, f ve g olarak tanımlanır. Bu 2^7 veya 128 farklı olası kombinasyonun etkisinin irdelendiği anlamına gelmektedir.

Büyük ve küçük harfler arasında bir denge olan bu kombinasyonların sekizinin bir alt setini seçmek mümkündür (Tablo 5). Seçilmiş faktörlerin (A-G) bir kombinasyonunu kullanacak olan sekiz tayin yapılmalıdır.

Tablo 5. Youden planı

Faktör	1	2	3	4	5	6	7	8
A/a	A	A	A	A	a	a	a	a
B/b	B	B	b	b	B	B	b	b
C/c	C	c	C	c	C	c	C	c

D/d	D	D	d	d	d	d	D	D
E/e	E	e	E	e	e	E	e	E
F/f	F	f	f	F	F	f	f	F
G/g	G	g	g	G	g	G	G	g

Oluşturulan tablo ve belirlenen faktörler kullanıldığında her etkinin tespiti için 3 paralel çalışma yapıp sonuçlar aşağıdaki değerlerin hesaplanmasıyla yorumlanır.

Sağlamlık değerlerinin yorumlanması için hesaplanması gereken parametreler;

D: $Y_+ - Y_-$

Y_+ : +faktörün uygulandığı değerler

Y_- : - faktörün uygulandığı değerler

C: Analitin konsantrasyonu

Etki: if $D > 1,4 * SD_{wIR}$

SD_{wIR} : Laboratuvar içi tekrar üretilebilirliğin standart sapması

Hesaplanan etki değeri değeriyle değişen parametrelerin analiz üzerine etkili olup olmadığı dolayısıyla metodun söz konusu analite uygulanan minör değişikliğe karşı sağlam olup olmadığı tespit edilmiş olur (Reeuwijk ve Houba, 1998).

4.4.1.10 Stabilité

Saklama veya analiz sırasında gözlenen örnekteki analitin veya matriks bileşeninin kararlılığının yetersiz olması analiz sonuçlarının çıktılarında önemli sapmalara neden olabilir. Valide edilmiş bir metodun uygulanabilirliğinin kontrolünün tespiti standart üzerinden yapılıyorsa söz konusu standardın hangi sıcaklıkta ve ne kadar süreyle stabil kaldığının bilinmesi önemlidir. Aynı şekilde analitin örnek içerisinde ne kadar süreyle tespit edilebilir halde olduğu, hangi sıcaklıkta ve ne kadar süreyle tutulması durumunda

degradasyonun oluşup oluşmayacağıın belirlenmesi analiz kalitesi ve uygulanabilmesi açısından gereklidir. Analitin çözelti içerisindeki stabilitesini belirlemek için;

- Analitin/analitlerin taze stok çözeltileri hazırlanır, limit değeri belirlenmiş analitler için limit seviyesine takabül edecek şekilde seyreltme yapılarak +4°C, -20°C, +20°C gün ışığında +20°C karanlıkta saklanmak ve üç paralel çalışmak üzere çözelti katkı yapılarak hazırlanır ve belirtildiği şekilde etiketlenip saklanır.
- Uygulanan metotla önce taze hazırlanmış çözeltinin analit içeriği belirlenir.
- Saklama süresi bir, iki, üç ve dört hafta gerekirse daha uzun, örneğin tanımlama ve/veya miktar tayini sırasında ilk degradasyon olguları gözlemlenebilinceye kadar seçilmelidir. Maksimum saklama zamanı ve optimum saklama koşulları kaydedilir.
- Her koşuldaki analitin/ analitlerin konsantrasyonunun hesaplanması analiz anında taze hazırlanmış analit çözeltisini kullanarak %100 olarak yapılmalıdır.

$$\text{Kalan analit (\%)} = C_i \times 100 / C_{\text{taze}}$$

C_i = zaman noktasındaki konsantrasyon

C_{taze} = taze çözeltinin konsantrasyonu

Matriks içindeki analitin/ analitlerin stabilitesinin belirlenmesi için;

- Mümkün olduğunca, hedef olan örnekleri içeren referans örnekler kullanılmalıdır. Mümkün değilse, analitle katkılanmış matriks kullanılmalıdır.
- Eğer hedef olan materyal mümkün değilse, biraz boş materyal alınır ve homojenize edilir. Tazeyken 1., 2., 3., 4., ve mümkünse 20. haftada üç paralel olarak analiz edilebilecek şekilde örnek katkılanır. Öncelikle taze karışım 3 paralel olacak şekilde analiz edilir. Sonrasında örnekler +4° C, -20°C +20°C ışıkta ve karanlıkta olacak şekilde muhafaza edilir ve belirlenmiş zamanlarda analiz edilerek stabilitesi kontrol edilir (Comission Decision, 2002/657/EC).

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler

Çalışmada kullanılan cihazlar ve malzemeler Tablo 6’da gösterilmiştir.

Tablo 6. Kullanılan cihazlar ve malzemeler

CİHAZ ADI	MARKASI MODELİ
pH ayarlama cihazı	Mettler Toledo, USA
Katı faz ekstraksiyon cihazı	Gilson Aspec 274, USA
pH metre	Sartorius, Almanya
Saf su sistemi	Elga-Veolia Water Solutions&Technologies, UK
Soğutmalı santrifüj	Thermo Scientific Heraeus 5500i, Almanya
Vorteks karıştırıcı	Allsheng MTV-100, Çin
Analitik terazi	Sartorius, Almanya
Buzdolabı	Sanyo Medicoool (MPR-414F), Japonya
Derin dondurucu	Sanyo Biomedical (MDF-U537D), Japonya
Ultrasonik su banyosu	WiseClean, Kore
Azot altında uçurma sistemi	Biotage Turbo Vab LV, İsviçre
Etüv	Megaterm 1200-P, Romanya
Kuru blok ısıtma sistemi	Techne DB-3D, UK
Otomatik pipetler	Eppendorf Multipette Xstream, Almanya
Mikropipetler	(10, 20, 200, 1000, 5000, 10000 µL) Eppendorf, Almanya
SPE Kartuşları	UCT Xtract C18 (500 mg/3mL) CLEAN SCREEN® DAU503 C8(500 mg/3mL) UCT, USA
Pipet uçları	Isolab, Almanya
Plastik tüpler	Sarstedt, Almanya
Vialler	Alwsci Tech., Çin
LC-MS/MS	Agilent 1200 serisi elektrospay iyonizasyon (ESI) kaynağı bağlantılı 6460 triple-quadrupole kütle spektrometresi, Agilent J&W, USA.
Sıvı kromatografi kolonu	Sunfire C18 2.1x150 mm ve 3.5 µm partikül çaplı, Waters, USA Xbridge BEH C18, 2.1x150 mm ve 3.5 µm partikül çaplı, Waters, USA
GC-MS	Agilent 7890A GC - Agilent EI iyonizasyon, Agilent 5975C kütle spektrometresi ve 7683 Agilent autosampler. Mass Hunter Software, Agilent J&W, USA.

Gaz kromatografi kolonu	Bağılı fazlı kapiler DB-5MS (25m x 0.20mm i.d, 0.33 µm film kalınlığı olan kolon, Agilent J&W, USA).
-------------------------	--

5.2. Kullanılan Kimyasallar

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler Tablo 7’de gösterilmiştir.

Tablo 7. Kullanılan kimyasallar ve üretici firmaları

Kimyasalın adı	Üretici Firma
Metanol	J.T. Baker, Polonya
Asetonitril	Merck, Almanya
Diklorometan	Fisher Scientific, UK
Kloroform	J.T. Baker, Polonya
Formik asit	Merck, Almanya
Etil asetat	J.T. Baker, Polonya
Asetik asit	Sigma Aldrich, Almanya
Amonyum hidroksit solüsyonu (%25-30)	Sigma Aldrich, Almanya
n-Hegzan	VWR, Fransa
Sodyum Hidroksit (%32)	Fisher Scientific UK
TMAH (~0,5 M (CH ₃) ₃ N(OH)C ₆ H ₅ metanol içerisinde, GC türevlendirmesi için)	Sigma Aldrich, Almanya
Hidroklorik asit (1M %3)	J.T. Baker, Polonya
MSTFA	CovaChem, USA
BSTFA+%1TMCS	Sigma Aldrich, Almanya
PFPA	Sigma Aldrich, Almanya
Amonyumbikarbonat	Honeywell, USA
Potasyum dihidrojen fosfat	Merck, Almanya
Amonyum sülfat≥99	Sigma Aldrich, Almanya
Beta-glukronidaz (Helix Pomatia Type HP 2)	Sigma Aldrich, Almanya
Proteaz (Type 1≥units/mg katı)	Sigma Aldrich, Almanya

Kullanılmış olan kimyasalların tamamı analitik saflıktadır. Sulu çözeltiler deiyonize su kullanılarak hazırlanmıştır.

5.3. Kullanılan Sertifikalı Standartlar ve İç Standartlar

Çalışmada kullanılan sertifikalı standartlar ve iç standartlar Tablo 8’de gösterilmiştir.

Tablo 8. Sertifikalı standartlar ve iç standartların özellikleri

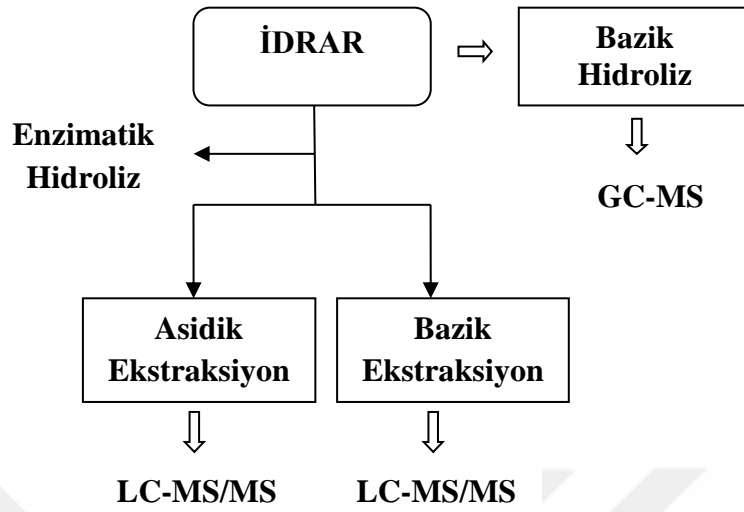
Sertifikalı Standart	CAS no	Marka	Saflık ≥	Çözücü
Furosemid	54-31-9	CHIRON AS	%99,5	Metanol
Fluniksin	38677-85-9	Sigma Aldrich	%98	Metanol
Meloksikam	71125-38-7	CHIRON AS	%99	DMSO
4-Metilaminoantipirin	519-98-2	Cayman Che.	%98	Metanol
Triamsinolon Asetonid	76-25-5	CHIRON AS	%99	Metanol
İpratropium	22254-24-6	TRC	%97	Etil asetat
Betametazon	378-44-9	CHIRON AS	%99,5	Metanol
3'-hidroksilidokain	34604-55-2	TRC	%98	Metanol
3'-hidroksimepivakain	37055-90-6	TRC	%98	Metanol
Dembreksin	52702-51-9	CHIRON AS	%99,5	Metanol
Ketoprofen	22071-15-4	CHIRON AS	%99,1	Metanol
N-butilskopolamonyum	149-64-4	TRC	%98	Metanol
Diklofenak	15307-86-5	CHIRON AS	%98,9	Metanol
Karprofen	53716-49-7	Sigma Aldrich	%99,7	Metanol
Vedaprofen	71109-09-6	Sigma Aldrich	%99	Metanol
Meklofenamik Asit	6385-02-0	CHIRON AS	%99,9	Metanol
Naproksen	22204-53-1	CHIRON AS	%99,5	Metanol
Ambroksal	23828-92-4	CHIRON AS	%99,5	Metanol
Fenilbutazon	50-33-9	CHIRON AS	%98,2	Metanol
2-(1-hidroksietil)promazin sülfoksit (HEPS)	73644-42-5	TRC	%98	Metanol
Eltenak	72895-88-6	TRC	%98	Metanol
3'-hidroksidetomidin	1794759-72-0	TRC	%98	Metanol
Butorfanol	58786-99-5	CHIRON AS	%99,76	Metanol
Romifidin	65896-16-4	CHIRON AS	%97,9	Metanol
Salbutamol	51022-70-9	CHIRON AS	%95,9	Metanol
5-hidroksidantrolen	52130-25-3	TRC	%98	DMSO/Metanol
Deksametason	50-02-2	CHIRON AS	%99	Metanol
Omeprazol	73590-58-6	CHIRON AS	%99,5	Metanol
Metokarbamol	532-03-6	TCI	%98	Metanol
Furosemid-d5(furfuril-d5)	1189482-35-6	CHIRON AS	%99	Metanol
Meloksikam-d3	942047-63-4	TRC	%98	Metanol
4-Metilamino-d3-antipirin	1246820-06-3	TRC	%98	Metanol
3-OH Lidokain-d5	1286482-71-0	TRC	%98	Metanol
3-OH Mepivakain-d5	1346597-79-2	TRC	%97	Metanol
Ketoprofen-d3	159490-55-8	TRC	%98	Metanol
Skopolamin d3	N/A	CHIRON AS	%98	Metanol
Hidrobromid trihidrat				
Diklofenak-d4	153466-65-0	CHIRON AS	%99	Metanol

Karprofen-d3	1173019-42-5	TRC	%98	Metanol
Vedaprofen-d3	1185054-34-5	TRC	%98	Metanol
Naproksen-d3	958293-77-1	CHIRON AS	%99	Metanol
Fenilbutazon-d9	1189479-75-1	TRC	%96	Metanol
Hidroksietil promazin sülfoksit-d4-maleat (HEPS-d4)	N/A	Frontier Bio.	%99	Metanol
Eltenak- ¹³ C,d3	72895-88-6	TRC	%98	Metanol
3-OH-Detomidin- ¹⁵ N ₂ - d2-HCl	1346603-61-9	TRC	%98	Metanol
Romifidin-HCl-d4	1329834-57-2	TRC	%95	Metanol
OH-Dantrolen-d4	1217225-15-4	TRC	%98	DMSO/Metanol
Deksametazon- 4,6alfa,21,21-d4	N/A	CHIRON AS	%98	Metanol
Omeprazol-d3	934292-92-2	CHIRON AS	%99,5	Metanol
Methokarbamol-d3	1346600-86-9	CHIRON AS	%98	Metanol
N-Fenil Antranilik asit	91-40-7	Sigma Aldrich	%97	Metanol
Salbutamol d9	1173021-73-2	TRC	%98	Metanol
Fluniksın d3	1015856-60-6	Sigma Aldrich	%98	Metanol

Temin edilen sertifikalı standartlardan mevcut miktarlarına bağlı olarak sertifikalarında belirtilen ya da belirtilmemiş olanlar uygun çözücüsü ile çözülerek 1000,100 veya 10 µg/mL'lik stok standartlar hazırlanmıştır.

5.4. Yöntem

İlaç etkin maddelerin tespiti için geliştirilen yöntemler şema halinde gösterilmiştir (Şekil 7). İdrar örneği NSAID özellikle maddelerin GC-MS ile tespiti için ayrıldıktan sonra enzimatik hidroliz için ayrıca örnek alınmıştır. Enzimatik hidroliz tamamlandıktan sonra asidik ve bazik ekstraksiyon için bölünüp 2 farklı LC-MS/MS yöntemiyle analiz edilmiştir.



Şekil 7. Yöntemin şematik gösterimi

5.4.1 Gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC-MS) kullanılarak analiz edilen maddeler ve analiz metodu

5.4.1.1 Çalışma karışımının hazırlanması

Bu yöntemle analiz edilen maddelerin stok çözeltilerinden örnek üzerine katkı yapıldığında uluslararası tarama limiti değerine tekabül edecek şekilde alınarak ‘GC-MS çalışma standardı karışımı’ hazırlanmıştır (Tablo 9).

Tablo 9. GC-MS çalışma standardı karışımı

Sertifikalı standart	Stok standart kons. (µg/mL)	Stok standarttan alınacak miktar (µL)	Toplam karışım kons. (µg/mL)	5 ml numuneye 50 µL eklendiğinde kons. (ng/mL)
Fluniksin	1000	0,05	10	100
Ketoprofen	1000	0,05	10	100
Diklofenak	1000	0,025	5	50
Karprofen	1000	0,05	10	100

Vedaprofen	1000	0,025	5	50
Meklofenamik Asit	1000	0,125	25	250
Naproksen	1000	0,125	25	250
Fenilbutazon	1000	0,05	10	100
Eltenak	1000	0,025	5	50

Çalışma standart karışımı için stok standartlardan tabloda belirtildiği kadar alınıp 10 mL'lik amber cam bir şişeye konulup 5,0 mL olacak şekilde metanol eklenerek etiketlenmiştir. Bu karışımdan 50 µL alınıp toplam 5,0 mL örneğe ilave edildiğinde örnekteki konsantrasyonu limit değerine tekabül eder.

5.4.1.2 İç standardın hazırlanması

Bu metotta iç standart olarak N-Fenilantranilik asit kullanılmıştır. N-Fenilantranilik asidin 1000 µg/mL'lik stok çözeltisinden 100 µL alınarak metanolle 10 mL'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan 10 µg/mL'lik çözeltiden 50 µL alınarak 5 mL'lik örneğe eklendiğinde örnekteki iç standart konsantrasyonu 100 ng/mL'ye tekabül edecektir.

5.4.1.3 Bazik hidroliz

Alınan 5,0 mL'lik örneğe 5.4.1.2'ye göre hazırlanan iç standarttan 50 µL ilave edildikten sonra %32'lik NaOH'ten 50 µL ilave edilip 1 dk karıştırılmış ve 1 saat hidroliz için bekletilmiştir.

5.4.1.4 Ekstraksiyon

Hidroliz tamamlandıktan sonra örneğe pH'sı 6'ya ayarlanmış 1 M fosfat tamponundan (136,06 g KH₂PO₄ hassas terazide tartılıp balon jöjeye koyulup deiyonize su ile çözülür ve 1 L'ye tamamlanır) 4,0 mL ilave edilmiştir. Örneğin pH'sı %12,5 luk HCl çözeltisi kullanılarak pH metre ile 6 (±0,02)'ya ayarlanmıştır. Örnek tekrar karıştırıldıktan sonra 3600 rpm'de 20 dk santrifüj edilmiştir. Örnek katı faz ekstraksiyon robotunun örnek bölümüne yerleştirilmiştir. Kartuş (UCT Xtract C18) 2 mL metanol ve

2,0 mL deiyonize su ile şartlandırdıktan sonra 10 mL hacimde örneğin tamamı kartuştan geçirilmiştir. Yıkama basamağında 3,0 mL deiyonize su geçirilmiştir ve 2 dakika kurutma yapılmıştır. Sonra 6,0 mL hekzan geçirilip ve 2 dakika kurutma yapılmıştır. Analitler 2x3,0 mL kloroform geçirilerek elüsyon yapılmıştır. Elüsyon çözeltisi 45°C’de azot altında uçurulduktan sonra 2x150 µL diklormetan ilave edilip 30 saniye karıştırılıp vialer alınmıştır ve etüvde 55°C (±2)’de kurutulmuştur. Daha sonra 50 µL 20:80 TMAH:MeOH ilave edilip 3 dk karıştırılmıştır ve GC-MS cihazına enjekte edilmiştir. Cihazın çalışma koşulları Tablo 10’da gösterilmiştir.

Tablo 10. GC çalışma koşulları

Gaz kromatografi	Agilent 7890 A GC
Oto Örnekleyici (ALS)	Agilent 7683 Oto örnekleyici (150 örnek)
Kapiler Kolon	DB-5MS (25m, 0,20mm, 0,33µm film kalınlığı) (Agilent 128-5522)
Bölünmeli/bölünmesiz enjeksiyon bloğu sıcaklığı	Bölünmesiz 300°C
Enjeksiyon Hacmi	1,0 µL
Inlet basıncı, Inlet Akış	27,977 psi (sabit basınç), 1,4 mL/dk
Kolon sıcaklık programı	100°C (0,5 dk), 20 °C/dk artış ile 185°C (0 dk), 4°C/dk artış ile 230°C (0 dk), 20°C/dk artış ile 300°C (5 dk), post temp: 325°C (5 dk)

Tablo 11’de MSD-SIM (seçilmiş iyon taranması) mod çalışma koşulları gösterilmiştir.

Tablo 11. MSD-SIM mod çalışma koşulları

Acquisition mode	SIM
Çözücü gecikme süresi	4,5 dk
Electron Multiplier offset	Delta EMV 358, Applied EMV 1476, Gain Factor 5
Transfer line	280°C
MS quadrapole	150°C
MS source	230°C
SIM parametreleri	8 grup

SIM grupları, seçilen iyonlar ve gruplarda aranan ilaç etkin maddeler ise Tablo 12’de gösterilmiştir.

Tablo 12. SIM grupları, seçilen iyonlar ve gruplarda aranan ilaç etkin maddeler

Sıra No	Başlama zamanı (dk)	Cycle/s (tarama/s)	Seçilen iyonlar	İlaç etkin maddeler	Dwell (%) ve rezolüsyon
1	10,94	2,3630	195,227,167,139	N-Fenilantranilik asit	100, yüksek
2	12,09	1,2090	185,244,170,141 295,263,310,251	Naproksen Metil Fluniksin Metil	100, yüksek
3	14,01	2,3643	270,305, 290, 242	Diklofenak di Metil	100, yüksek
4	14,14	2,3592	209,268,105,191	Ketoprofen Metil	100, yüksek
5	14,27	2,3635	248,311,233,276	Eltenak-H ₂ O di Metil	100, yüksek
6	16,89	1,2080	242,309,277,214 183,322,266,77	Meklofenamik Metil Fenilbutazon Metil	100, yüksek
7	18,15	3,0972	237,296,155,165	Vedaprofen Metil	100, yüksek
8	19,51	2,3619	242,301,207,227	Karprofen di Metil	100, yüksek

5.4.2 Sıvı kromatografisi – kütle spektrometresi (LC-MS/MS) kullanılarak analiz edilen maddeler ve analiz metotları

5.4.2.1 Çalışma karışımının hazırlanması

Bu yöntemle analiz edilen maddelerin stok çözeltilerinden örnek üzerine katkı yapıldığında uluslararası tarama limiti değerine tekabül edecek şekilde alınarak ‘LC-MS/MS çalışma standardı karışımı’ hazırlanmıştır (Tablo 13).

Tablo 13. LC-MS/MS çalışma standardı karışımı

Sertifikalı standart	Stok standart kons. (µg/mL)	Stok standarttan alınacak miktar (µL)	Toplam karışım kons. (µg/mL)	14 ml numuneye 140 µL eklendiğinde Kons. (ng/mL)
Furosemid	1000	0,025	5	50
Fluniksin	1000	0,05	10	100
Meloksikam	1000	0,005	1	10

4-metilaminoantipirin	1000	0,05	10	100
Triamsinolone Asetonid	10	0,025	0,05	0,5
İpratropium	10	0,0125	0,025	0,25
Betametazon	10	0,01	0,02	0,2
3' hidroksilidokain	100	0,05	1	10
3' hidroksimepivakain	100	0,05	1	10
Dembreksin	1000	0,05	10	100
Ketoprofen	1000	0,05	10	100
N-Butilskopolamonyum	1000	0,0125	2,5	25
Diklofenak	1000	0,025	5	50
Karprofen	1000	0,05	10	100
Meklofenamik Asit	1000	0,125	25	250
Ambroksol	1000	0,1	20	200
HEPS	100	0,05	1	10
3' hidroksidetomidin	100	0,01	0,2	2
Eltenak	1000	0,025	5	50
Butorfanol	100	0,005	0,1	1
Romifidin	10	0,05	0,1	1
Salbutamol	10	0,025	0,05	0,5
5-hidroksidantrolen	10	0,05	0,1	1
Deksametazon	10	0,01	0,02	0,2
Omeprazol	1	0,25	0,05	0,5
Metokarbamol	1000	0,05	10	100

Çalışma standart karışımı için stok standartlardan tabloda belirtildiği kadar alınıp 10 mL'lik amber cam bir şişeye konulmuştur ve 5,0 mL olacak şekilde metanol eklenerek etiketlenmiştir. Bu karışımdan 140 µL alınıp toplam 14 mL örneğe ilave edildiğinde örnekteki konsantrasyonu limit değerine tekabül eder.

5.4.2.2 İç standart karışımının hazırlanması

Bu yöntemle analiz edilen maddelerin stok çözeltilerinden örnek üzerine katkı yapıldığında uluslararası tarama limiti değerine tekabül edecek şekilde alınarak 'LC-MS/MS iç standart karışımı' hazırlanmıştır (Tablo 14).

Tablo 14. LC-MS/MS iç standart karışımı

İç standart	Stok standart kons. (µg/mL)	Stok standarttan alınacak miktar (µL)	Toplam karışım kons. (µg/mL)	14 mL numuneye 140 µL eklendiğinde kons. (ng/mL)
Skopolamin-d3 hidrobromid trihidrat	1000	0,025	5	50
Furosemid-d5 (furfuril-d5)	1000	0,05	10	100
rac Albuterol-d9	1000	0,0125	2,5	25
Diklofenak-d4 (fenil-d4)	1000	0,025	5	50
HEPS-d4	10	0,125	0,25	2,5
5-hidroksi Dantrolen-d4	500	0,1	10	100
4-Methylamino-d3 Antipirin	1000	0,05	10	100
3-Hidroksi Mepivakain-d3	1000	0,025	5	50
3-Hidroksi Lidokain-d5	1000	0,0125	2,5	25
rac Ketoprofen-d3	1000	0,025	5	50
rac Karprofen-d3	1000	0,025	5	50
Romifidin-d4 HCl	1000	0,025	5	50
Meloksikam-d3	500	0,05	5	50
3-Hidroksi Detomidin-15N2,d2 HCl	1000	0,0125	2,5	25
5-Hidroksi Omeprazol-d3	1000	0,025	5	50
Eltenak-13C,d3	1000	0,0125	2,5	25
Omeprazol-d3 (benzimidazol-4,6,7-d3)	1000	0,05	10	100
Metokarbamol-d3 (metoksi-d3)	1000	0,05	10	100
Deksametazon-4,6alfa,21,21-d4	1000	0,0125	2,5	25
Fluniksın-d3	100	0,125	2,5	25

İç standart karışımı için stok standartlardan tabloda belirtildiği kadar alınıp 10 mL'lik amber cam bir şişeye konulmuş 5,0 mL olacak şekilde metanol eklenerek etiketlenmiştir. Bu karışımdan 140 µL alınıp toplam 14 mL örneğe ilave edildiğinde tablodaki numune konsantrasyon değerine tekabül eder.

5.4.2.3 Hidroliz

İdrar örneğinden 14,0 mL alınıp pH ayarlama cihazı ile uyumlu olan örnek tüplerine konulmuştur. Üzerine spatülle katı 1,0 g amonyum sülfat ilave edilmiştir. Daha sonra 140 µL iç standart karışımından ilave edilmiştir. Daha sonra enzimatik hidroliz için 150 µL β-glukronidaz ve 200 µL proteaz enzimleri ilave edilmiştir. Örnek karıştırılmış ve

otomatik pH ayarlama cihazına koyulmuştur. Üzerine 2,8 mL 1 M pH'sı 6 olan fosfat tampon ilave edilip pH 6'ya ayarlanmış ve etüvde 1,5 saat inkübe edilmiştir.

5.4.2.4 Ekstraksiyon

Hidrolizi tamamlanan örnekten 8,0 mL asidik, 7,0 mL bazik hidroliz için ayrılarak 15,0 mL'lik plastik tüplere alınmıştır.

Asidik ekstraksiyon: Hidroliz edilmiş 8,0 mL örnek üzerine 2,0 mL saf su, 2,5 mL 1 M pH'sı 8 olan fosfat tampon koyulup pH 8'e ayarlanıp 4400 rpm 20 dk santrifüj edilmiştir. Örnek katı faz ekstraksiyon cihazının örnek bölümüne yerleştirilmiştir. Kartuş (UCT Xtract C18) 3,0 mL metanol ve 3,0 mL deiyonize su ile şartlandırıldıktan sonra örneğin tamamı kartuştan geçirilmiştir. Yıkama basamağında 6,0 mL deiyonize su geçirilmiştir ve 2 dakika kurutma yapılmıştır. Sonra 8 mL hekzan geçirilmiş ve 2 dakika kurutma yapılmıştır. Analitler 3,0 mL 99:1 Diklorometan/Etanol karışımından geçirilerek elüsyon yapılmıştır. Elüsyon çözeltisi 45°C'de azot altında uçurulduktan sonra 2x150 µL metanol ilave edilip 30 saniye karıştırılıp viale alınıp etüvde 55°C (±2)'de kurutulmuştur. Viale hareketli faz çözücüsünden 50 µL konularak çözülüp karıştırılmış ve LC-MS/MS cihazına 'Asidik Metot Cihaz Şartları' kullanılarak enjekte edilmiştir.

Bazik ekstraksiyon: Hidroliz edilmiş 7,0 mL örnek üzerine 1,5 mL saf su, 2,0 mL 1 M pH 6 Fosfat tampon ilave edilip 4400 rpm 20 dk santrifüj edilmiştir. Örnek katı faz ekstraksiyon cihazının örnek bölümüne yerleştirilmiştir. Kartuş (CSDAU-mix-mode) 3,0 mL metanol, 3,0 mL deiyonize su ve 2,0 mL 1M pH 6 fosfat tampon ile şartlandırıldıktan sonra örneğin tamamı kartuştan geçirilmiştir. Yıkama basamağında 3,0 mL 1 M asetik asit geçirilmiş ve 5 dakika kurutma yapılmıştır. Sonra 5,5 mL metanol geçirilmiş ve 5 dakika kurutma yapılmıştır. Analitler 10,0 mL 97:3 Etil asetat/%32 amonyak karışımı geçirilerek elüsyon yapılmıştır. Elüsyon çözeltisi 45°C'de azot altında uçurulduktan sonra 2x150 µL metanol ilave edilip 30 saniye karıştırılıp viale alınmış ve etüvde 55°C (±2)'de kurutulmuştur. Viale hareketli faz çözücüsünden 50 µL konularak çözülüp karıştırılıp ve LC-MS/MS cihazına 'Bazik Metot Cihaz Şartları' kullanılarak enjekte edilmiştir.

5.4.2.5 LC-MS/MS cihaz şartları

Çalışmada kullanılan LC-MS/MS cihaz verileri Tablo 15’de gösterilmiştir.

Tablo 15. LC-MS/MS optimizasyon verileri

Sertifikalı standart adı	Molekül Ağırlığı	Polarite	Ana İyon	Kapiller Voltaj	1. Parçalanma İyonu	1. Çarpışma Enerjisi	2. Parçalanma İyonu	2. Çarpışma Enerjisi
Furosemid	330	Negatif	329	88	284,9	5	204,9	15
Fluniksin	296	Pozitif	297,2	130	279	21	264	33
Meloksikam	351	Pozitif	352,2	100	141	15	115	16
4-metilamino antipirin	217	Pozitif	218,1	100	97,1	6	56,1	8
Triamsinalon asetonid	434	Pozitif	435,4	100	415,2	2	397,1	10
İpratropium	331	Pozitif	332,1	120	166,2	26	124	32
Betametazon	392	Pozitif	393,4	100	373	2	355	6
3-OH Lidokain	250	Pozitif	251	90	86	15	58	25
3-OH Mepivakain	262	Pozitif	263,2	90	98,2	19	70,1	45
Dembreksin	379	Pozitif	380	100	262,7	25	81	25
Ketoprofen	254	Pozitif	255,2	110	209,1	5	105	19
N-butilskopolamonyum	361	Pozitif	360,2	150	194	16	103	50
Diklofenak	296	Pozitif	296,2	90	250	5	215	13
Karprofen	273	Negatif	274,1	90	228	9	193	31
Vedaprofen	282	Pozitif	283	240	250,9	25	57	25
Meklofenamik asit	296	Pozitif	296,1	90	278	13	243	21
Naproksen	230	Pozitif	231,2	90	133	17	105	31
Ambrosol	378	Negatif	377	100	261,9	14	183	18
Fenilbutazon	308	Pozitif	309,1	130	188	13	160	17
HEPS	344	Pozitif	345,2	90	314	21	300	19
Eltenak	302	Pozitif	302	90	284	1	256	5
Butorfanol	327	Pozitif	328,4	140	310,2	20	157,2	46
Detomidin-OH	203	Pozitif	203,1	110	185,1	20	81,1	20
Romifidin	258	Pozitif	258,2	100	178,1	35	160,1	38
Salbutamol	239	Pozitif	240,3	90	222	2	147,9	12
5-OH Dantrolen	330	Negatif	329,1	110	230	10	202	15
Deksametazon	392	Pozitif	393,4	90	373,2	2	355,2	5
Omeprazol	345	Pozitif	346,3	90	198	5	151,1	15
Metokarbamol	241	Pozitif	242,1	80	163,1	6	118	4
Furosemid-d5(furfuril-d5)	335	Negatif	334	90	289,9	11	206,1	31
Meloksikam-d3	354	Pozitif	355,1	120	141	39	115	9
4-Metiamino-d3-antipirin	220	Pozitif	221,2	80	187	7	159	9
3-OH Lidokain-d5	255	Pozitif	256,2	100	91,2	17	63,2	41
3-OH Mepivakain-d5	265	Pozitif	266,2	90	101,1	17	73,1	37
Ketoprofen-d3	257	Pozitif	258,1	110	212	7	105	17

Skopolamin d3	441	Pozitif	307,2	90	159,1	11	141	27
Diklofenak-d4	300	Pozitif	300,1	100	219	11	218,1	41
Karprofen-d3	276	Negatif	275	80	231	13	228	41
Vedaprofen-d3	285	Pozitif	286,2	120	158,2	15		
Naprosken-d3	233	Pozitif	234,1	100	188,1	9	173,1	27
Fenilbutazon-d9	317	Pozitif	318,3	140	256,3	17	212,3	21
HEPS-d4	464	Pozitif	349,3	90	318	19	304	21
Eltenak- ¹³ C,d3	306	Pozitif	306	100	259	7	224	17
3-OH-Detomidin- ¹⁵ N ₂ -d2-HCl	242	Pozitif	207,1	90	189,1	9	83,1	41
Romifidin-HCl-d4	298	Pozitif	262	120	182	33	164	41
OH-Dantrolen-d4	334	Negatif	335	60	219	13	164	41
Deksametazon-4,6alfa,21,21-d4	396	Pozitif	397,2	100	377,3	1	359,2	5
Omeprazole-d3	348	Pozitif	349,1	90	198,1	5	136	45
Methocarbamol-d3	244	Pozitif	245,1	80	166,1	7	118	3
N-Fenil Antranilik asit	213	Negatif	212	170	168	6	165,8	22
Salbutamol d9	248	Pozitif	249,3	100	231,1	3	167	6

Asidik Metot Cihaz Şartları: Tablo 16 ve Tablo 17’de asidik metot dereceli elüsyon ve cihaz şartları gösterilmiştir.

Hareketli Faz A: Deiyonize su + %0,1 Formik Asit

Hareketli Faz B: Asetonitril + %0,1 Formik Asit

Enjeksiyon hacmi: 10,0 µL

Kolon fırın sıcaklığı: 35°C

Kullanılan kolon: SunFire C18 (2,1 mm, 150 mm, 3,5 µm 80Å)

Tablo 16. Asidik metot dereceli elüsyonu

Zaman	A	B	Akış	Basınç
1 0,00 dk	80,0	20,0	0,300 mL/dk	600,00 bar
2 5,00 dk	80,0	20,0	0,300 mL/dk	600,00 bar
3 20,00 dk	50,0	50,0	0,300 mL/dk	600,00 bar
4 25,00 dk	0,0	100,0	0,300 mL/dk	600,00 bar
5 27,00 dk	0,0	100,0	0,300 mL/dk	600,00 bar
6 27,01 dk	80,0	20,0	0,300 mL/dk	600,00 bar
7 31,00 dk	80,0	20,0	0,300 mL/dk	600,00 bar

Tablo 17. Asidik metot cihaz şartları

Kaynak Parametreleri			
Parametre	Değer (+)	Değer (-)	
Gaz Sıcaklığı (°C)	325	325	
Gaz akış (L/dk)	10	10	
Nebulizer (psi)	50	50	
Sheath Gaz Isıtıcı	350	350	
Sheath Gaz Akış	12	12	
Kapiler (V)	4500	3500	
VCharging	1500	1500	

Bazik Metot Cihaz Şartları: Tablo 18 ve Tablo 19’da bazik metot dereceli elüsyon ve cihaz şartları gösterilmiştir.

Hareketli Faz A: Deiyonize su + %5-5 mM Amonyumbikarbonat-pH 9

Hareketli Faz B: Metanol

Enjeksiyon hacmi: 10,0 µL

Kolon fırın sıcaklığı: 55°C

Kullanılan kolon: XBridge® C18 (2,1 mm, 150 mm, 3,5 µm 80 Å)

Tablo 18. Bazik metot dereceli elüsyonu

Time	A	B	Akış	Basınç
1 5,00 dk	95,0	5,0	0,300 mL/dk	600,00 bar
2 12,00 dk	65,0	35,0	0,300 mL/dk	600,00 bar
3 18,00 dk	10,0	90,0	0,300 mL/dk	600,00 bar
4 22,00 dk	5,0	95,0	0,300 mL/dk	600,00 bar
5 22,10 dk	95,0	5,0	0,300 mL/dk	600,00 bar
6 26,00 dk	95,0	5,0	0,300 mL/dk	600,00 bar

Tablo 19. Bazik metot cihaz şartları

Kaynak Parametreleri		
Parametre	Değer (+)	Değer (-)
Gaz Sıcaklığı (°C)	325	325
Gaz Akış (L/dk)	10	10
Nebulizer (psi)	50	50
Sheath Gaz Isıtıcı	350	350
Sheath Gaz Akış	12	12
Kapiler (V)	4500	3500
VCharging	1500	1500

Yukarıda anlatılan ekstraksiyon yöntemleri ve cihaz şartları kullanılarak oluşturulan metotlarla Avrupa Komisyonunun 2002/657/EC direktifine ve AORC'nin MS kriterlerine göre validasyon çalışması yapılmıştır. Validasyon çalışması sonucunda hangi ilaç etkin maddelerinin hangi metotla valide edildiği veya edilemediği Tablo 20'de özet halinde belirtilmiştir.

Tablo 20. Analiz metotlarına göre valide edilen ilaç etkin maddeler

İlaç Etkin Madde	Asidik	Bazik	NSAID	Açıklama
Furosemid	-	-	-	Hidroлиз sırasında yıkımlandığı için tespit edilememiştir.
Fluniksin	√	√	√	Her üç metottada tespit edilebilir ancak asidik ve NSAID metotta valide edilmiştir.
Meloksikam	√	-	-	Asidik metotta valide edilmiştir.
4-Metilaminoantipirin	√	-	-	Asidik metotta valide edilmiştir.
Triamsinolon Asetonid	√	-	-	Asidik metotta valide edilmiştir.
İpratropium	-	-	-	Asidik metotta tespit edilebilir ancak validasyonun geçerliliği için gerekli kriterler sağlanamamıştır.
Betametazon	√	-	-	Asidik metotta valide edilmiştir.
Lidokain OH	√	√	-	Asidik metotta valide edilmiştir.
Mepivakain OH	√	√	-	Asidik metotta valide edilmiştir.
Dembreksin	√	-	-	Asidik metotta valide edilmiştir.
Ketoprofen	√	√	√	Her üç metottada tespit edilebilir ancak asidik ve NSAID metotta valide edilmiştir.
N-butilskopolamonyum	-	-	-	Asidik metotta tespit edilebilir ancak validasyonun geçerliliği için gerekli kriterler sağlanamadı.
Diklofenak	√	-	√	Asidik ve NSAID metotta valide edilmiştir.
Karprofen	√	-	√	Asidik ve NSAID metotta valide edilmiştir.
Vedaprofen	-	-	√	Nsaid metotta valide edilmiştir.
Meklofenamik Asit	-	-	√	Nsaid metotta valide edilmiştir.
Naproksen	-	-	√	Nsaid metotta valide edilmiştir.
Ambroksal	-	√	-	Bazik metotta valide edilmiştir.
Fenilbutazon	-	-	√	Nsaid metotta valide edilmiştir.
HEPS	√	√	-	Bazik metotta valide edilmiştir.
Eltenak	√	-	√	Asidik ve NSAID metotta valide edilmiştir.

3'-hidroksidetomidin	-	√	-	Bazik metotta valide edilmiştir.
Butorfanol	√	√	-	Bazik metotta valide edilmiştir.
Romifidin	√	√	-	Asidik metotta valide edilmiştir.
Salbutamol	-	√	-	Bazik metotta valide edilmiştir.
Dantrolen OH	-	-	-	Hidrolizsiz metotta tespit edileceğinden analiz edilmedi.
Deksametason	√	-	-	Asidik metotta valide edilmiştir.
Omeprazol	-	-	-	Hidrolizsiz metotta tespit edileceğinden analiz edilmemiştir.
Metokarbamol	√	√	-	Asidik metotta valide edilmiştir.



6. BULGULAR

Standartların eş zamanlı olarak kaç tanesinin bir arada tayininin yapılabileceğinin tespiti için analizi yapılacak ilaç etkin maddelerin karışımını içeren 5,0 mL'lik bir 'Stok Karışım Çözeltisi' hazırlanmıştır (Tablo 21).

Tablo 21. Stok karışım çözeltisi

Sertifikalı standart adı	Stok standart konsantrasyonu (µg/mL)	Stok standarttan alınacak miktar (mL)	Toplam karışım kons. (µg/mL)
Furosemid	1000	0,025	5
Flunüksin	100	0,5	10
Meloksikam	100	0,05	1
4-metilaminoantipirin	100	0,5	10
Triamsinilon asetonid	10	0,025	0,05
İpratropium	10	0,0125	0,025
Betametazon	10	0,01	0,02
3'-hidroksilidokain	100	0,05	1
3'-hidroksimepivakain	100	0,05	1
Dembreksin	1000	0,05	10
Ketoprofen	1000	0,05	10
N-butilskopolamonyum	100	0,125	2,5
Diklofenak	1000	0,025	5
Karprofen	1000	0,05	10
Vedaprofen	1000	0,025	5
Meklofenamik Asit	1000	0,125	25
Naproksen	1000	0,125	25
Ambroksal	1000	0,1	20
Fenilbutazon	1000	0,05	10
HEPS	100	0,05	1
3'-hidroksidetomidin	100	0,01	0,2
Eltenak	1000	0,025	5
Butorfanol	10	0,05	0,1
Romifidin	10	0,05	0,1
Salbutamol	10	0,025	0,05
5-hidroksidantrolen	10	0,05	0,1
Deksametazon	10	0,01	0,02
Omeprazol	1	0,25	0,05
Metokarbamol	1000	0,05	10

Aynı şekilde iç standartlar içinde bir 'İç Standart Karışımı Çözeltisi' hazırlanmıştır (Tablo 22).

Tablo 22. İç standart karışım çözeltisi

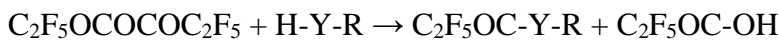
İç Standart	İç standart konsantrasyonu (µg/mL)	İç standarttan alınacak miktar (mL)	Toplam iç standart karışım konsantrasyonu (µg/mL)
Furosemid-D5 (furfuril-D5)	1000	0,05	5
Fluniksin D3	100	0,5	5
Meloksikam-D3	1000	0,05	5
4-Metilamino-D3 antipirin	1000	0,05	5
3'-hidroksilidokain-D5	1000	0,05	5
3'-hidroksimepivakain-D3	1000	0,05	5
Ketoprofen-D3	1000	0,05	5
Diklofenak-D4(fenil-D4)	1000	0,05	5
Karprofen-D3	1000	0,05	5
Vedaprofen-D3	1000	0,05	5
Naproksen-D3 (α metil-D3)	1000	0,05	5
Fenilbutazon-D9	1000	0,05	5
2-(1-hidroksietil)promazin sulfoksit D4 (HEPS-D4)	10	0,5	0,5
Eltenak-13C-D3	1000	0,05	5
3'-hidroksidetomidin-15N2-D2-HCl	1000	0,05	5
Romifidin-D4 HCl	1000	0,05	5
5-hidroksidantrolen-D4	500	0,1	5
Deksametason-4,6 alfa 21.21-D4	1000	0,05	5
Omeprazol-D3 (benzimidazol 4,6,7-D3)	1000	0,05	5
Metokarbamol-D3 (metoksi D3)	1000	0,05	5
N-Fenil Antranilik asit	1000	0,05	5
Salbutamol D9	1000	0,05	5

6.1.Gaz kromatografisi-Kütle Spektrometresiyle Metot Geliştirme Çalışmaları

6.1.1 Türevlendirme yönteminin belirlenmesi

Karboksilik asit grubu içeren NSAID özellikte maddelerin analizlerinin türevlendirme yönteminden yararlanılarak tespit edilebileceği bilgisiyle (El Haj ve ark., 1999; Kretschmer ve ark., 2011; Nagamatsu ve ark., 2012) ve diğer özelliklere sahip ilaç etkin maddelerinde bu yöntemle tespit edilip edilmeyeceğini görebilmek amacıyla farklı türevlendiriciler denenerek optimum türevlendirme yöntemi belirlenmeye çalışılmıştır. Bunun için ‘Stok Karışım Çözeltisi’ ve ‘İç Standart Karışım’ çözeltilerinden 50’şer µL alınarak önce türevlendirilmemiş haliyle 100°C’den 300°C ye 8°C’lik artış sıcaklık dereceli elüsyonu kullanılarak 0,8 mL/dk akış hızında cihaza enjeksiyon yapılmış ve GC-MS’teki kütüphane taraması sonucunda sadece fenilbutazon yıkımlanmış parçası azobenzen elde edilmiş, diğer ilaç etkin maddelerden hiçbiri gözlenmemiştir. NSAID özellikte maddeleri serbest şekilde GC- MS cihazıyla analiz etmek güç olduğundan, 2012 yılında Orata tarafından karboksilik asit grupları içeren maddelerin türevlendirilmesi için önerilen ve literatür çalışmalarında NSAID özellikte ilaç etkin maddelerin türevlendirilmesinde kullanılan PFPA, TMAH, BSTFA+%1TMCS ve MSTFA türevlendiricileri ile denemeler yapılmıştır.

Açıl türevlendirmesi: PFPA ile türevlendirme yapmak için 50 µL stok karışım çözeltisi + 50 µL iç standart karışım çözeltisi kuru blokta uçurulmuş ve üzerine 50 µL PFPA ilave edilip cihaza enjekte edilmiştir. Olası reaksiyonda karboksilik asitli gruba metil grubu bağlanması beklenmiştir (Orata, 2012).

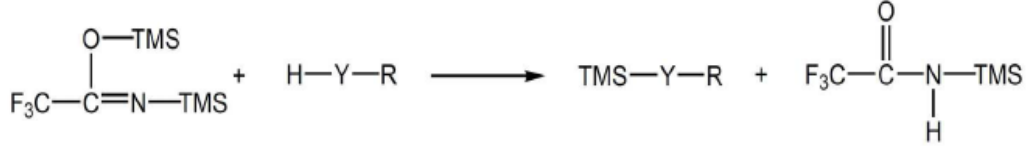


PFPA türevlendirmesi Y = O, NH, NR', R, R' = Alk, Ar.

Bu türevlendirmeyle herhangi bir ilaç etkin maddenin türevlenmesi sağlanamamıştır.

Silil türevlendirmesi: MSTFA ile türevlendirme yaparken 50 µL stok karışım çözeltisi+50 µL iç standart karışım çözeltisi kuru blokta uçurulmuş ve üzerine 50 µL MSTFA ilave edilip literatürlerde genellikle uygulandığı gibi 80°C’de 30 dk kuru blokta

bekletilip cihaza enjekte edilmiştir (Hines ve ark., 2004). Beklenen sililleme reaksiyonu aşağıda gösterilmiştir (Orata, 2012).

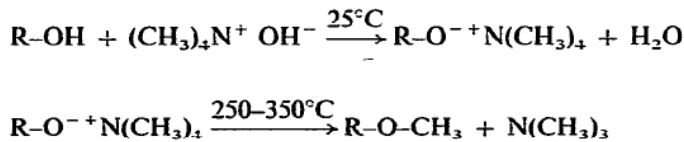


N-metil-N-(trimetilsilil)trifloroasetamid TMS =Si(CH₃)₃, Y = O, S, NH, NR[`], COO, R, R[`] = Alk, Ar.

MSTFA ile yapılan türevlendirme sonucunda Naproksen, Fluniksin, Meklofenamik asit, Fenilbutazon, 2-(1-hidroksietil)promazin, Dembreksin, trimetilsilil türevi şeklinde pik vermiştir.

BSTFA + % 1 TMCS ile türevlendirme yaparken 50 µL stok karışım çözeltisi kuru blokta uçurulmuş ve üzerine 50 µL BSTFA + % 1 TMCS ilave edilip literatürlerde genellikle uygulandığı gibi 60°C'de 30 dk kuru blokta bekletilip ve cihaza enjekte edilmiştir (Migowska ve ark., 2012, Sams ve ark., 1999). Elde edilen kromatogramda Naproksen, Fluniksin, Meklofenamik asit, Fenilbutazon, Dembreksin, Diklofenak, Vedaprofen ve Karprofen trimetilsilil türevi şeklinde pik vermiştir.

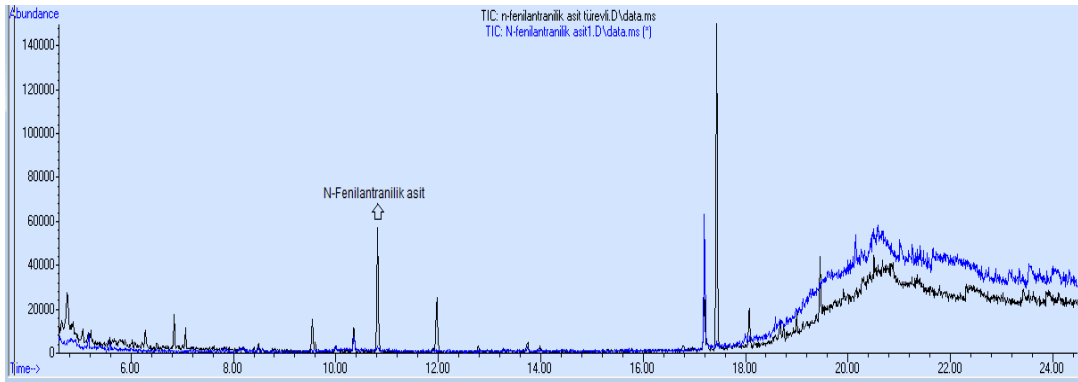
Metil türevlendirmesi: TMAH (0,5 M Trimetilamonyum hidroksit metanol içerisinde) ile türevlendirme yaparken 50 µL stok karışım çözeltisi + 50 µL iç standart karışım çözeltisi kuru blokta uçurulmuş ve üzerine 50 µL TMAH ilave edilip literatürlerde genellikle uygulandığı gibi direkt olarak cihaza enjekte edilmiştir (Popot ve ark., 2006, Wasfi ve ark., 1998). TMAH ile pirolitik alkilleme türevlendirme reaksiyonu aşağıda gösterilmiştir.



Oda sıcaklığında asidik bileşikler kuaterner amonyum grubuyla tuz oluştururlar. Sonrasında cihaza enjeksiyon yapıldığında inlette 250-350°C'lik sıcaklıkta metilleme reaksiyonu gerçekleşmektedir (Hulshoff ve Förch, 1981).

TMAH ile yapılan metil türevlendirmesi sonucunda Naproksen, Fluniksin, Meklofenamik asit, Fenilbutazon, Ketoprofen, Diklofenak, Eltenak, Vedaprofen ve Karprofen metil ya da dimetil türevleri halinde N-fenilantranilik asit ise metil bağlanmadan pik vermiştir.

Yapılan türevlendirmeler sonucunda iç standart karışım çözeltisinde yer alan standartlardan döteryum bağlı olan iç standartların türevlenmediği görülmüştür. Türevlendirme denemeleri sonucunda MSTFA, BSTFA + %1 TMCS ve TMAH ile yapılan türevlendirme sonucunda NSAID özellikle ilaç etkin maddelerin birçoğunun analiz edilebilmesi için uygun olduğu görülmüştür. Fakat MSTFA ve BSTFA + %1 TMCS daha çok maddenin türevlenmesini sağlayabilen türevlendirme çözeltileri olduğundan ve idrarla analiz yapıldığında ortamda bu türevlendiricilerin türevlendirebildiği ve endojen olarak bulunabilecek maddeler mevcut olacağından girişim etkisi fazla olacaktır. Bu durum analiz edilmek istenen ilaç etkin maddelerin tespit edilmesini engelleyebilecek bir durum oluşturabilir. Bu nedenle türevlendirme çözeltisi olarak daha spesifik olduğu görülen TMAH ile türevlendirme yapılması daha uygun bulunmuştur. Ayrıca iç standart olarak da TMAH ile yapılan türevlendirme sonucunda görülen, doping etkili madde özelliği taşımayan, NSAID özellikte maddelere benzer yapıda ve kütlede olan N-Fenil antranilik asitte iç standart olarak tercih edilmiştir. Şekil 8'de N-Fenilantranilik asidin türevlendirilmiş ve türevsiz kromatogramı gösterilmiştir.



Şekil 8. N-Fenilantranilik asidin türevlendirilmiş ve türevsiz kromatogramı

6.1.2 Türevlendirici karışım çalışması

TMAH direkt olarak ve metanolle farklı oranlarda karıştırılarak kuru blokta uçurulmuş olan stok karışım çözeltisi üzerine ilave edilip cihaza enjekte edilerek uygun TMAH-Metanol karışım miktarının bulunması için çalışmalar yapılmıştır. Bunun için TMAH-Metanol karışım oranı sırasıyla 20:80, 50:50 ve direkt TMAH (0,5 M Trimetilamonyum hidroksit metanol içerisinde) olacak şekilde enjeksiyon yapılarak analiz sonuçları incelenmiştir. Sonuçlar ilaç etkin maddelerin ayrılma sonuçlarına göre aşağıdaki Tablo 23’de değerlendirildiği gibi elde edilmiştir.

Tablo 23. Türevlendirici-Metanol karışım miktarı karşılaştırılması

İlaç Etkin Madde Adı	TMAH	TMAH/MeOH	TMAH/MeOH
		20/80	50/50
N-Fenil antranilik asit	√	√	√
Naproksen	√	√	
Fluniksin		√	
Diklofenak	√		
Ketoprofen		√	
Eltenak	√		
Meklofenamik asit		√	
Fenilbutazon		√	
Vedaprofen	√		
Dembreksin	√		
Karprofen		√	

Sonuçlara göre en uygun türevlendirici karışımın TMAH-MeOH 20:80 olduğunda elde edildiği görülmüştür. Özellikle Fenilbutazon’un metanol miktarı arttığında daha düzgün pik verdiği, Diklofenak ve Eltenak’ta ise TMAH miktarı arttığında daha düzgün pik verdiği gözlemlenmiştir.

6.1.3 Sıcaklık dereceli elüsyon çalışması

50 µL stok karışım çözeltisi ve 50 µL 10 ppm N-Fenil antranilik asit kuru blokta uçurulup TMAH/MeOH (20:80) ile çözülüp metot çalışması yapılmıştır. Popot ve

arkadaşlarının 2006 yılında, Wasfi ve arkadaşlarının 1998 yılında ve Yılmaz ve arkadaşlarının 2014 yılında yaptıkları çalışmalar geliştirilerek uygulanan metot çalışmasına DB 5MS (25 m, 0,2 mm, 0,33 μ m'lik) kolonla tam tarama modunda 0,8 mL/dk'lık akış hızı kullanılarak tablodaki sıcaklık değişimiyle, inlet sıcaklığı 300°C, iyon kaynağı sıcaklığı 280-230 °C olarak ayarlanmıştır. Çözücü gecikme süresi 7 dk olarak uygulanmıştır (Tablo 24).

Tablo 24. GC-MS deneme metodu sıcaklık dereceli elüsyonu 1

	Artış (°C/dk)	Sıcaklık (°C)	Bekleme (dk)	Toplam Süre (dk)
Metot		100	0,5	0,5
	8	305	8	34,125

Ayrılmanın 200-285°C aralığında olduğu görüldüğünden bu aralıktaki artış değeri azaltılıp kalan zamanlarda daha yüksek bir artışla çalışılmıştır (Tablo 25).

Tablo 25. GC-MS deneme metodu sıcaklık dereceli elüsyonu 2

	Artış (°C/dk)	Sıcaklık (°C)	Bekleme (dk)	Toplam Süre (dk)
Metot		100	0,5	0,5
	15	185	0	6,167
	5	285	0	26,167
	15	300	5	32,167

Yapılan bu sıcaklık dereceli elüsyonuyla Naproksen ve Flunixin piklerinin ayrıldığı fakat Diklofenak ve Ketoprofen piklerinin birbirine girişim yaptığı görüldüğünden onların ayrılması için çalışmaya devam edilmiştir (Tablo 26).

Tablo 26. GC-MS deneme metodu sıcaklık dereceli elüsyonu 3

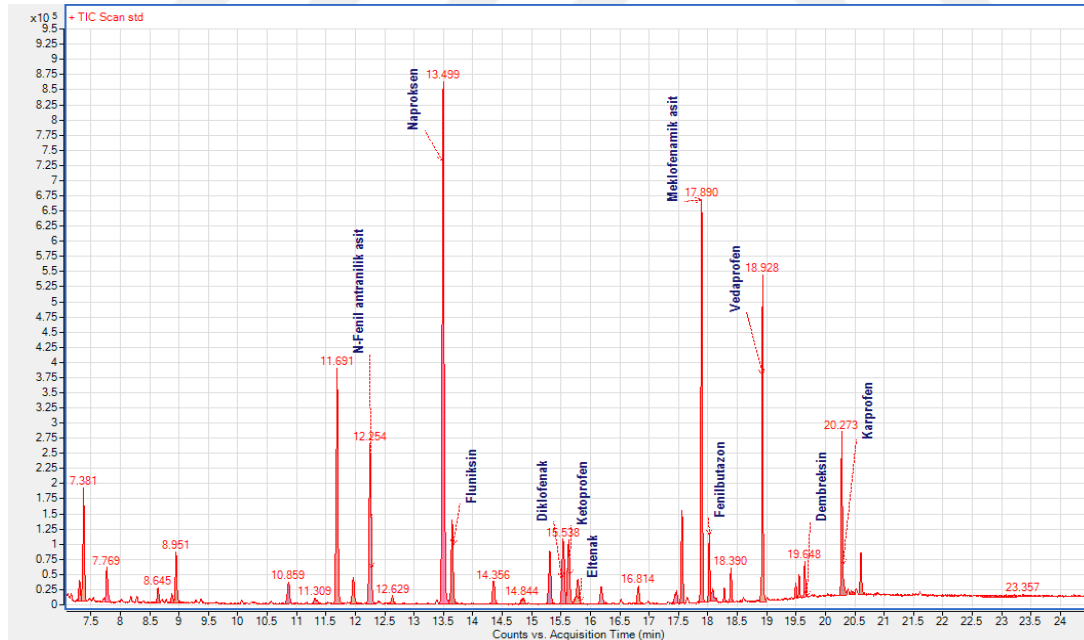
	Artış (°C/dk)	Sıcaklık (°C)	Bekleme (dk)	Toplam Süre (dk)
Metot		100	0,5	0,5
	15	185	0	6,17
	6	230	0	13,66
	1	235	0	18,66
	8	285	0	24,91
	20	300	5	30,66

Tablo 26'daki sıcaklık dereceli elüsyon uygulandığında Diklofenak ve Ketoprofen'in de ayrılabilirdiği ayrıca Karprofen'in de son kısımdaki hızlı artışla ön kısma doğru çekilerek daha düzgün bir pik elde edildiği görülmüştür. Bu çalışmadan yola çıkılarak birkaç sıcaklık denemesi daha yapıldıktan sonra aşağıdaki Tablo 27'deki sıcaklık dereceli elüsyonu uygulanarak 11 ilaç etkin madde birbirinden ayrılmış ve daha kısa bir metot elde edilmiştir.

Tablo 27. GC-MS deneme metodu sıcaklık dereceli elüsyonu 4

	Artış (°C/dk)	Sıcaklık (°C)	Bekleme (dk)	Toplam Süre (dk)
		100	0,5	0,5
Metot	20	185	0	4,75
	4	230	0	16
	20	300	5	24,5

Bu sıcaklık dereceli elüsyonu uygulanarak yapılan enjeksiyon sonrası elde edilen Tam Taramalı çalışma sonucu aşağıdaki gibidir (Şekil 9).



Şekil 9. Sıcaklık dereceli elüsyon çalışması sonucu GC-MS Scan mod çalışma kromatogramı

Kromatogramda ilaç etkin maddelerin absorpsiyonlarının birbirinden farklı olması türevlendirmeden kaynaklanmaktadır. Çünkü bazı maddeler hem metil, hem dimetil

şeklinde türevlenmekte ve her biri farklı oranlarda bulunmaktadır. Kromatogramda işaretlenmiş olanlar en yüksek absorbands gösterdiği ve mevcut kütüphanenin tanımlayabildiği türevlenmiş halleridir.

6.1.4 Sabit faz çalışması

Uygun kolon belirlenmesi için analizi yapılan maddelerin tespit edilmesi için uygun özelliğe sahip ve daha önceki çalışmalarda da kullanılan 30 m, 0,25 mm, 0,25 µm'lik kolonla çalışma yapılmıştır (Popot ve ark., 2006). 25 m, 0,2 mm, 0,33 µm'lik kolonda sıcaklık dereceli elüsyon çalışması yapılırken kullanılan ilk sıcaklık dereceli elüsyon 30m'lik kolona uygulandığında piklerin absorbands değerlerinin 25m'lik kolona göre bazı piklerde daha fazla alana sahip olduğu görülmüş ancak diklofenak, ketoprofen ve eltenak piklerinin iç içe girdiği gözlenmiştir. Daha sonra sıcaklık dereceli elüsyonu değiştirilerek bu maddelerin ayrılmasına çalışılmış fakat tam bir ayrılma sağlanamadığı gibi piklerin şekillerinin de analiz süresinin uzamasıyla bozulduğu görülmüştür. Bu nedenle daha çok madde yeterli ayrılmayla tespit edilebildiği için 25 m'lik kolon kullanılmaya karar verilmiştir. Aynı sıcaklık dereceli elüsyonu kullanılarak yapılan çalışma sonucunda elde edilen ilaç etkin maddelerin absorbands değerleri karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 28'de görülmektedir.

Tablo 28. Kolon deneme çalışması sonuçları

İlaç Etkin Madde Adı	25m kolon Pik alanı	30m kolon Pik alanı
N-Fenil antranilik asit	58 428 90	7 715 572
Naproksen Metil	79 365 44	9 525 333
Fluniksin Metil	27 023 42	3 067 223
Naproksen dimetil	414 441	ND
Diklofenak –H ₂ O dimetil	1 105 436	ND
Ketoprofen Metil	2 672 728	3 966 448
Eltenak-H ₂ O dimetil	823 752	ND
Ketoprofen dimetil	498 101	398 411
Eltenak dimetil	158 607	390 757
Meklofenamik dimetil	722 970	ND
Meklofenamik metil	6 451 597	878 386
Fenilbutazon dimetil	1 712 063	2 389 721

Vedaprofen Metil	3331159	4107303
OH-Vedaprofen dimetil	193753	39975
Fenilbutazon Metil	360826	1513250
Dembreksin	1178956	1165782
Karprofen dimetil	3621900	7351855

6.1.5 Akış hızı çalışması

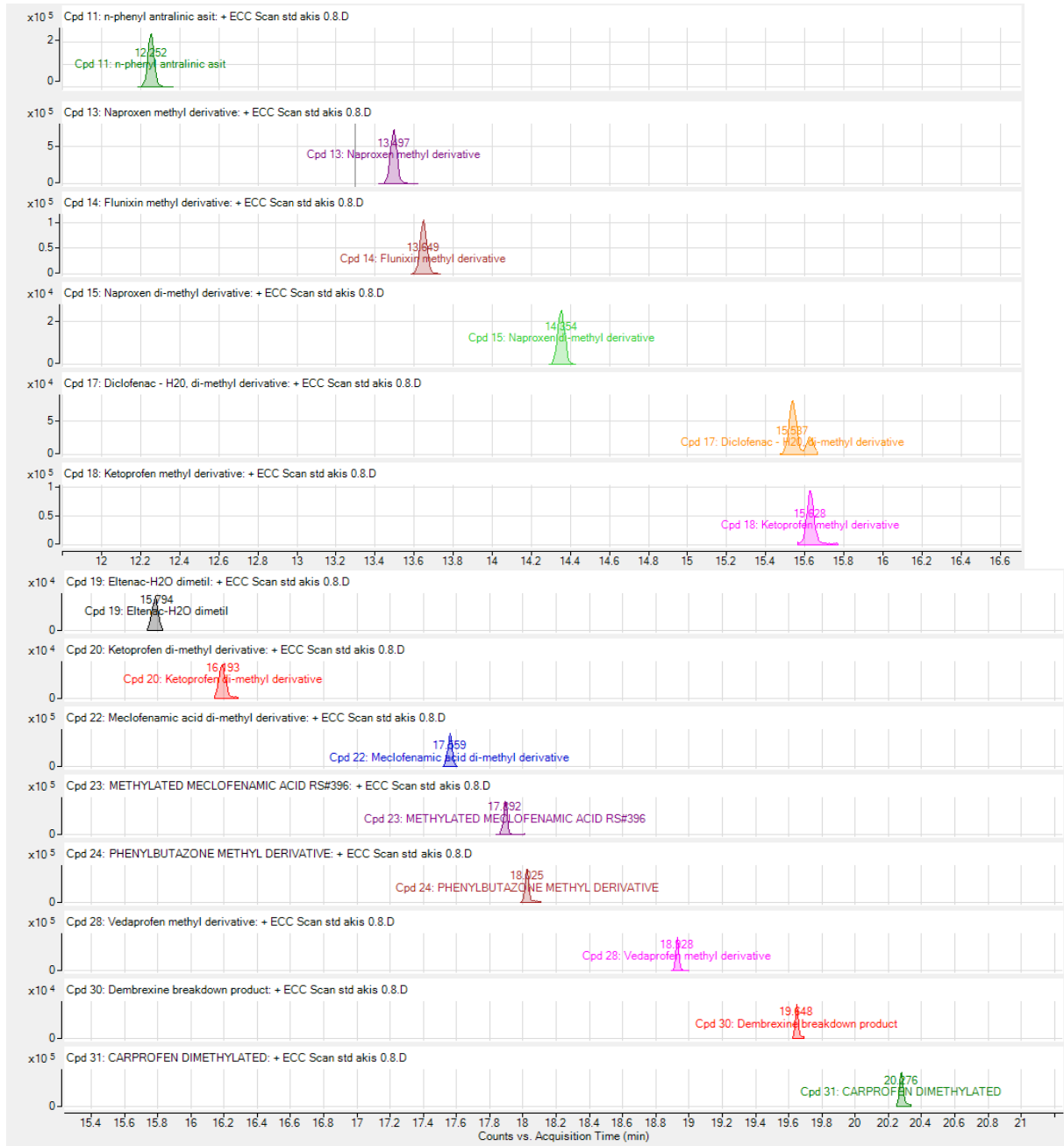
0,8 mL/dk akış hızı uygulanarak yapılan metot belirleme çalışmasına akış 0,7-1,5 aralığında değiştirilerek optimizasyon çalışması yapılmıştır. 0,7 mL/dk akış hızı uygulandığında piklerde bozulma gözlemlendiğinden bu akış hızının altında deneme yapılmamıştır. 0,1 mL/dk artış uygulanarak yapılan çalışmalarda 1,5 mL/dk akış hızına kadar absorbans değerlerinin arttığı, piklerde ayrılmanın daha düzgün hale geldiği ve pik şekillerinde düzelmeler olduğu görülmüştür. 1,5 mL/dk'lık akış hızından sonra belirgin şekilde bozulmalar meydana geldiği ve absorbans değerleri arasında büyük farkların oluşmadığı gözlenmiştir. Akış hızı 0,8 mL/dk ve 1,4 mL/dk olduğundaki absorbans değerleri karşılaştırılması Tablo 29'da verilmiştir. Tablodaki pik alanı değerlerine bakıldığında akış hızı 1,4 mL/dk olduğundaki akışın 0,8 mL/dk olduğundaki değerlerden 3-5 kat daha fazla olduğu görülmektedir. Elde edilen veriler sonucunda optimum akış hızının 1,4 mL/dk olduğu görülmüştür.

Tablo 29. Akış hızı çalışması sonuçları

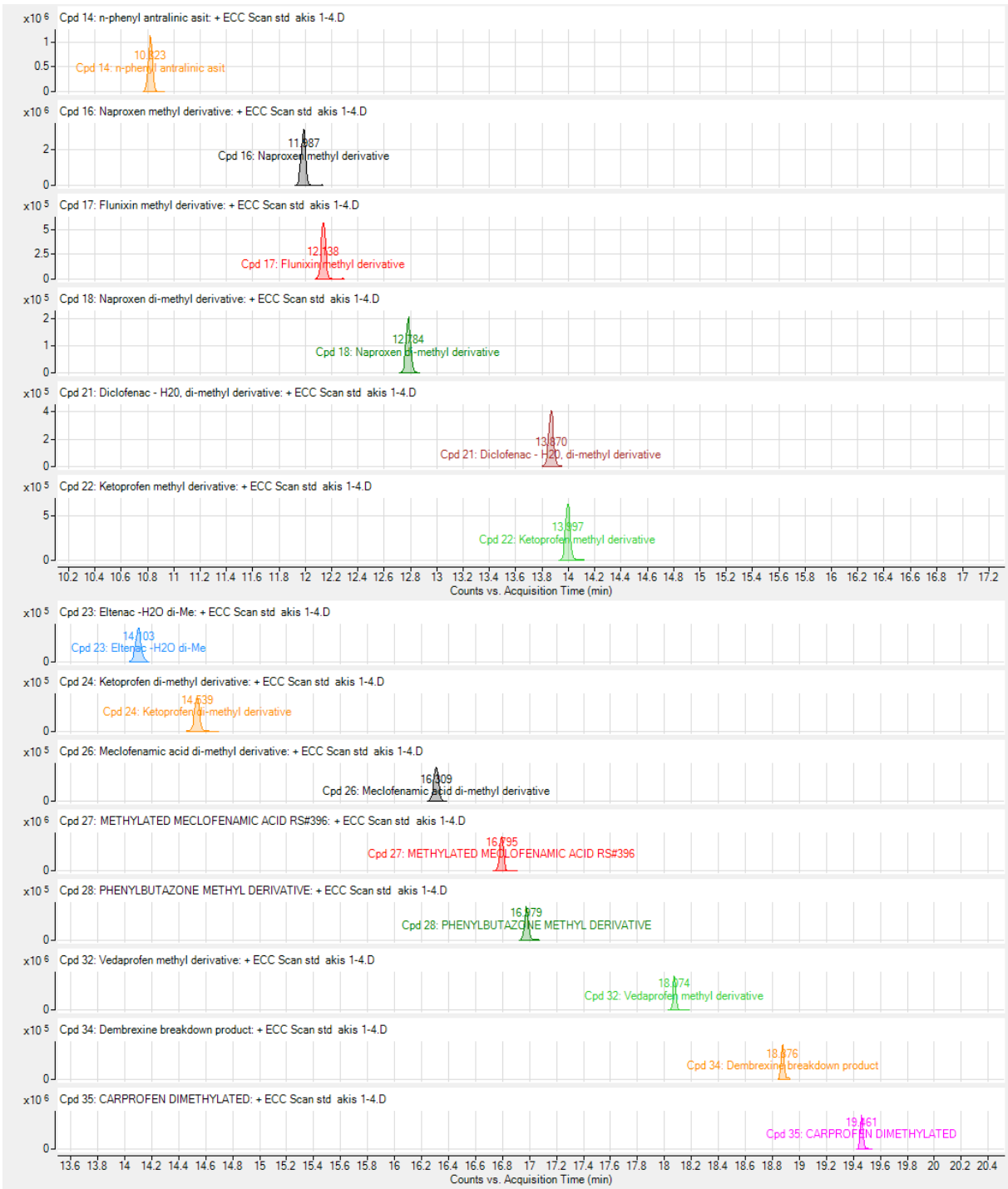
İlaç Etkin Madde Adı	Akış 0,8 mL/dk Pik alanı	Akış 1,4 mL/dk Pik alanı
N-Fenil antranilik asit	4 511 019	1 574 999
Naproksen Metil	712 697	2 546 324
Fluniksın Metil	109 670	461 634
Naproksen dimetil	12 952	38 452
Diklofenak-H ₂ O dimetil	70 908	281 263
Ketoprofen Metil	118 805	462 641
Eltenak-H ₂ O dimetil	20 307	100 406
Ketoprofen dimetil	19 507	53 551
Eltenak dimetil	20 088	55 970
Meklofenamik dimetil	59 898	131 521
Meklofenamik metil	389 167	1 207 918
Fenilbutazon dimetil	48 368	176 042
Vedaprofen Metil	212 893	629 300

Dembreksin	40 309	99 775
Fenilbutazon Metil	41 315	39 991
Karprofen dimetil	354 296	957 668

Akış hızı 0,8 mL/dk ve 1,4 mL/dk olduğundaki kromatogramlar ise Şekil 10 ve 11’de gösterilmiştir.



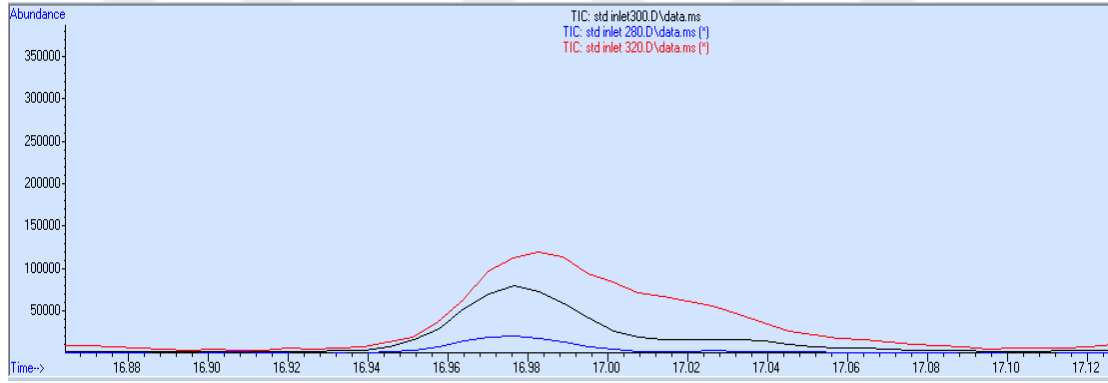
Şekil 10. 0,8 mL/dk akış hızları kromatogramı



Şekil 11. 1,4 mL/dk akış hızları kromatogramı

6.1.6 Inlet sıcaklık çalışması

Türevlendirme inlet bölümünde olduğundan inlet sıcaklık değeri 260-330°C arasında değiştirilerek optimum değer belirlenmeye çalışılmıştır. 280°C'nin altında pik şekillerinden türevlendirmenin düzgün şekilde gerçekleşmediği görülmüştür. 280°C'nin üzerinde 330°C'ye kadar piklerin daha düzgün, ayrılmasının uygun ve absorbansın sıcaklıkla arttığı görülmüştür. 330°C'de pik şekilleri ciddi şekilde bozulmaya başladığından (özellikle Fenilbutazon) bu sıcaklığın altındaki sıcaklıklara bakıldığında 300°C'nin optimum değer olduğuna kanaat getirilmiştir (Şekil 12).



Şekil 12. Fenilbutazon pik şeklinde bozulma

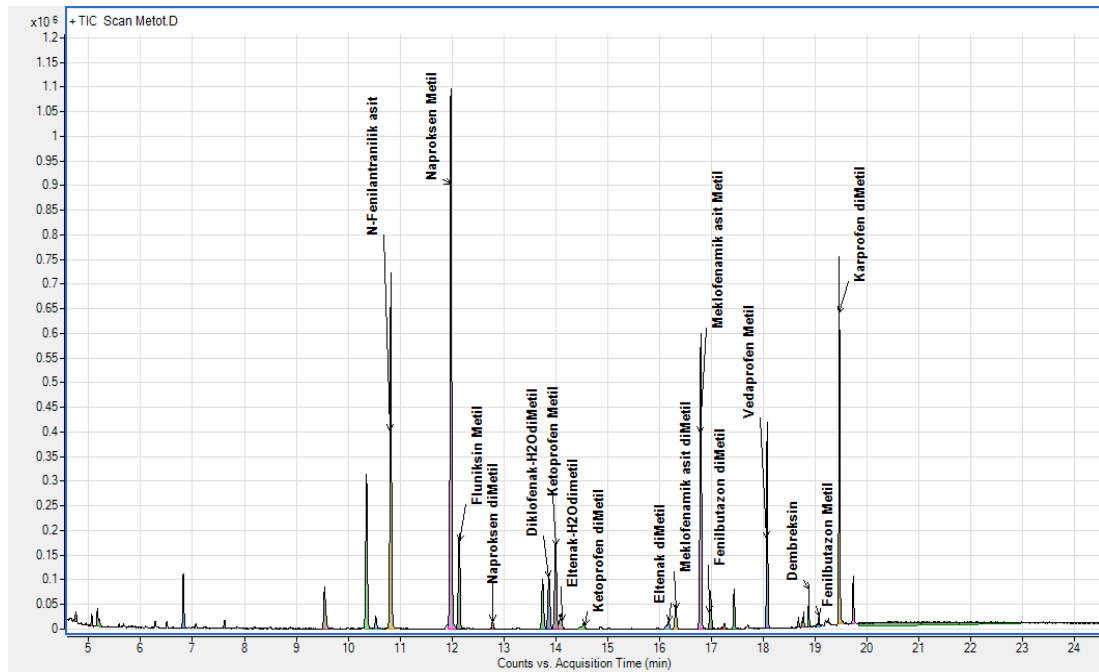
6.1.7 Çözücü gecikme zamanı çalışması

Türevlendirilmiş standart karışım çözeltisi ile gecikme zamanı belirlenmeden enjeksiyon yapılmış ve yüksek absorbans oluşturan çözücü kaynaklı piklerin 4,5 dk'ya kadar geldiği tespit edilmiştir.

Türevlendirici karışım, sıcaklık dereceli elüsyonu, inlet sıcaklığı, hareketli faz akış hızı, kolon ve çözücü gecikme zamanı belirlendikten sonra sadece GC-MS'te optimize edilen yöntemle stok standart karışım çözeltisi (Tablo 21) ve iç standarttan (N-Fenilantranilik asit 10 µg/mL) 50 µL alınıp kuru blokta uçurulup TMAH/MeOH (20:80) ile türevlendirilip enjeksiyon yapılmıştır. Tam Tarama modu (SCAN) çalışma koşulları ve sonucunda elde edilen kromatogram Tablo 30 ve Şekil 13'de görülmektedir.

Tablo 30. MSD-SCAN mod çalışma koşulları

Acquisition mode	Scan (50-600 amu)
Çözücü gecikme süresi	4,5 dk
Electron Multiplier offset	Delta EMV 100, Applied EMV 1159, Gain Factor 0,7
Transfer line	280°C
MS quadrapole	150°C
MS source	230°C

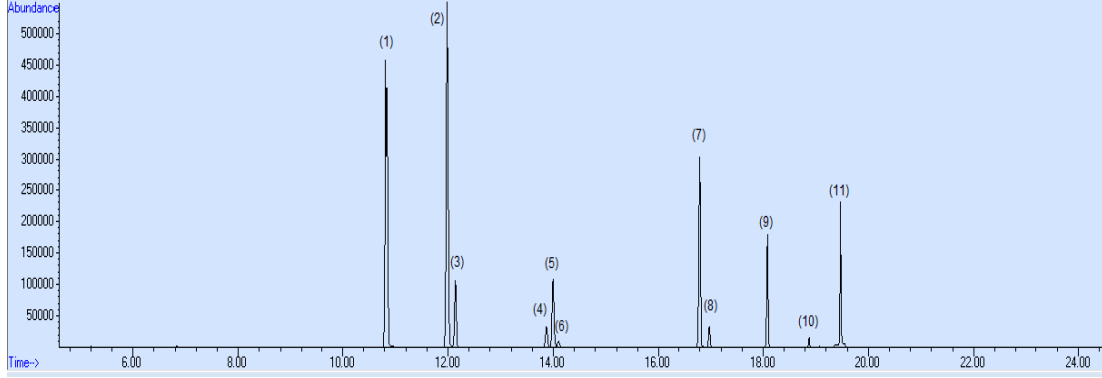


Şekil 13. SCAN mod stok standart karışım ve iç standart GC-MS kromatogramı

6.1.8 SIM (Selective Ion Monitoring) metot çalışması

GC-MS cihazı iki farklı modda çalışmakta olup, bunlardan biri SCAN diğeri SIM modudur. SCAN diğeri bir ifadeyle tam tarama modunda belli bir kütle aralığında (örneğin 50-500 amu) kütle dedektörü sürekli tarama yapmaktadır. SIM (Selective Ion Monitoring Mode) yani seçici iyon modunda ise, belli kütlelerde tarama yapmaktadır. Bu sebeple, SIM modu SCAN'a göre daha duyarlıdır. SIM mod çalışılırken düşük absorban veren 2. türevler çalışmaya dahil edilmemiştir.

SIM mod çalışma sonucu kromatogramı Şekil 14'te görülmektedir.



Şekil 14. SIM mod çalışma kromatogramı (1) N-Fenilantranilik asit, (2) Naproksen Metil, (3) Fluniksin Metil, (4) Diklofenak-H₂O dimetil, (5) Ketoprofen Metil, (6) Eltenak-H₂O dimetil, (7) Meklofenamik dimetil, (8) Fenilbutazon Metil, (9) Vedaprofen Metil, (10) Dembreksin, (11) Karprofen di Metil.

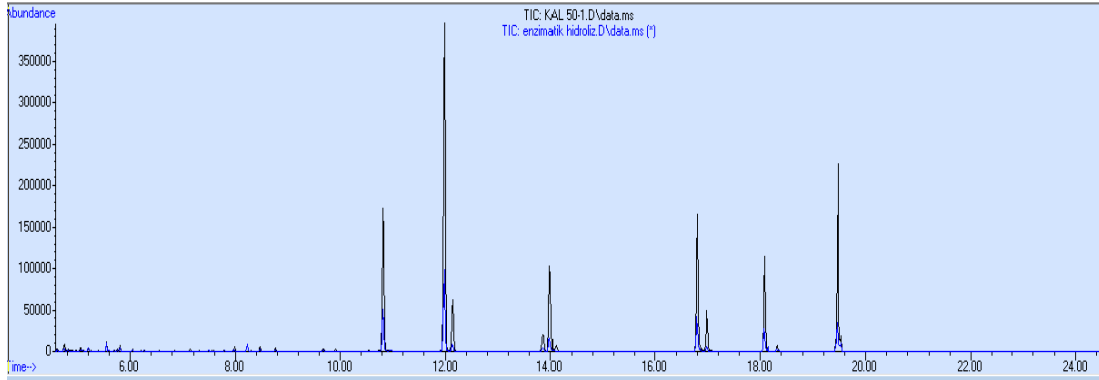
Stok standart karışım çözeltisiyle cihazda metot çalışması tamamlandıktan sonra at idrarında 10 adet NSAID özellikte ki ilaç etkin maddenin tespit edilebilmesi için yapılacak hidroliz ve katı faz ekstraksiyon basamaklarının belirlenmesi için çalışılmıştır.

Etkin bir ayrılmanın sağlanabilmesi ve idrar örneğinden ilaç etkin maddelerin maksimum seviyede elde edilebilmesi için maddelerin molekül yapıları, polariteleri ve pKa değerleri önemlidir. İlaç etkin maddelerin molekül yapısı, farmakolojik özelliği ve pKa değerlerine bakıldığında (Tablo 2) GC-MS'le TMAH türevlenmesi sonucunda elde edilen ilaç etkin maddelerin pKa değerlerinin 4-5 civarında olduğu görülmektedir. Bu nedenle bu maddeleri iyonize ya da non-iyonize olarak elde edebilmek için pH değeri 3 veya altında ya da 6 veya üzerinde tutulması önemlidir.

Hidroliz ve ekstraksiyon metotları uygulanmadan önce yapılan literatür çalışmalarında enzimatik hidroliz veya çoğunlukla bazik hidroliz uygulandığı görülmüştür (Caturla ve Cusido, 1992, Hirai ve ark., 1997). Bu nedenle hidrolizde bu iki yöntem denenmiştir. Ekstraksiyon yönteminde ise 2006 yılında Popot ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada uygulanan katı faz ekstraksiyon metodu modifiye edilmiştir (Popot ve ark., 2006).

6.1.9 Bazik hidroliz ve enzimatik hidroliz çalışması

Bu çalışmada 5,0 mL at idrarına 50 µL stok standart karışım çözeltisi ve 50 µL N-Fenilantranilik asit (10 µg/mL ara stoktan) ilave edilmiştir. Katkı yapılan örnek üzerine 100 µL %32'lik NaOH çözeltisinden ilave edilip 1 dk vortexle karıştırılmış ve 30 dk oda ısısında bekletilmiştir. Daha sonra örnek üzerine 0,5 M pH'sı 6 olan fosfat tampon ilave edilip % 12,5 luk HCl çözeltisi kullanılarak pH 6'ya ayarlanmış ve 20 dk 3600 rpm'de santrifüj edilmiştir. Literatürlerde bazik hidrolize alternatif olarak enzimatik hidrolizle çalışmalar yapıldığı bilgisi ve bu çalışmanın devamında diğer ilaç etkin maddelerin analizi için enzimatik hidroliz uygulanacağından bu yöntem de denenmiştir. Bunun için 5,0 mL idrar üzerine 50 µL stok karışım çözeltisi ve 50 µL iç standart (N-Fenilantranilik asit) ilave edildikten sonra 50 µL beta glukronidaz ve 50 µL proteaz enzimi ilave edilmiştir (Jedziniak ve ark., 2016, Garcia ve ark., 2011). Üzerine 3,0 mL 1 M pH sı 6 olan fosfat tampon ilave edildikten sonra HCl ile pH'sı 6'ya ayarlanıp 60°C etüvde 1,5 saat inkübe edilmiş ve 20 dk 3600 rpm'de santrifüj edilmiştir. Daha sonra bazik hidrolizde uygulanan ekstraksiyonun aynısı uygulanarak türevlendirilip GC-MS cihazına enjekte edilmiştir. Enzimatik hidroliz çalışması sonucunda elde edilen analiz sonucu bazik hidrolizde elde edilen kromatogramla karşılaştırılması Şekil 15'dedir.



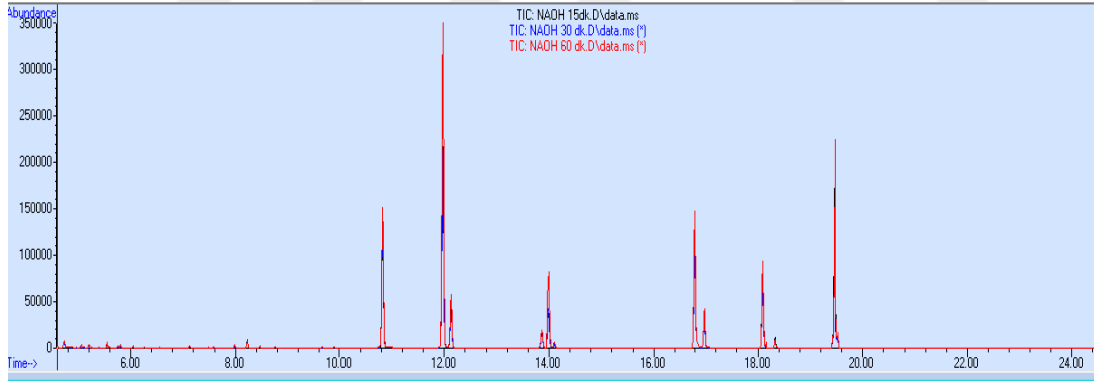
Şekil 15. Bazik hidroliz ve enzimatik hidroliz karşılaştırılması

Şekil 15'de mavi renkli kromatogram enzimatik hidroliz siyah renkli olan ise bazik hidrolizli çalışmanın GC-MS SIM mod çalışma kromatogramları görülmektedir. Şekilde de açıkça görüldüğü gibi enzimatik hidrolizle yapılan çalışma da bazik hidrolize göre bazı

ilaç etkin maddelerinin hiç tespit edilemediği (eltenak) ya da çok düşük konsantrasyonda tespit edilebildiği görülmüştür. Bu nedenle çalışmalar bazik hidrolizle yapılmaya devam edilmiştir.

6.1.10 Bazik hidroliz süresi çalışması

NaOH ilave edildikten sonra bekleme süresinin belirlenmesi için çalışma yapılmıştır. Bunun için toplamda 5,0 mL olacak şekilde iç standart'tan 50 µL ve stok karışım çözeltilisinden 50 µL ilave edilmiş olan idrar örneğine 100 µL %32'lik NaOH ilave edildikten sonra sırasıyla 15 dk, 30 dk ve 60 dk bekletilmiştir. Bekleme süreleri tamamlandıktan sonra geri kalan çalışma hidroliz metotları çalışılırken uygulandığı gibi yapılarak nihayetinde GC-MS cihazına enjekte edilmiştir. Elde edilen sonuçların kromatogramlarının karşılaştırılması Şekil 16'da görüldüğü gibidir.



Şekil 16. 15, 30 ve 60 dk hidroliz sürelerinde elde edilen kromatogramlar (GC-MS SIM mod)

NaOH ilave edilip sırasıyla 15 dk, 30 dk ve 60 dk beklendikten sonraki kromatogramların pik alanları Tablo 31'de görülmektedir.

Tablo 31. NaOH'in 15, 30 ve 60 dk bekleme sürelerinin pik alanları

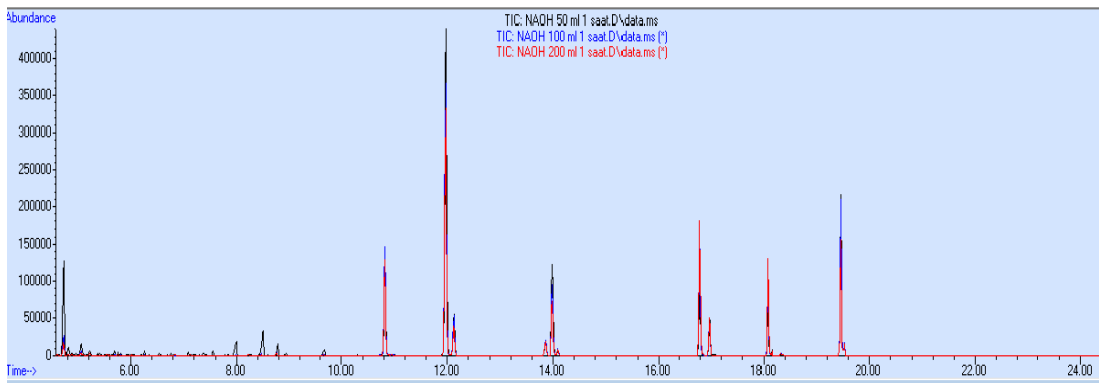
İlaç Etkin Madde Adı	15 dk Pik alanı	30 dk Pik alanı	60 dk Pik alanı
N-Fenil antranilik asit	308 544	304 048	335 167
Naproksen Metil	521 503	511 007	791 352
Fluniksin Metil	99 333	100 096	139 430

Diklofenak –H ₂ O dimetil	39 402	38 352	49 866
Ketoprofen Metil	113 685	114 563	221 509
Eltinak-H ₂ O dimetil	10 850	10 118	14 522
Meklofenamik metil	285 979	255 077	318 241
Fenilbutazon dimetil	89 130	77 829	92 081
Vedaprofen Metil	168 985	142 670	174 869
Karprofen dimetil	236 675	202 614	275 893

Kromatogramda da belirgin şekilde görüldüğü gibi en uygun bekleme süresi 60 dk'dır. Çalışmalara NaOH ilavesinden sonra 60 dk bekletilerek devam edilmiştir.

6.1.11 Sodyum hidroksit ilave miktar çalışması

Bazik hidroliz için ilave edilen NaOH'in uygun miktarının belirlenmesi için de bir çalışma yapılmıştır. Bunun için toplamda 5,0 mL olan iç standart'tan 50 µL ve stok karışım çözeltisinden 50 µL ilave edilmiş olan idrar örneğine sırasıyla 50, 100 ve 200 µL %32'lik NaOH ilave edilip karıştırılmıştır. Optimum bekleme süresi olarak tespit edilen 60 dk bekletilmiş ve sonraki çalışmalar aynı şekilde uygulanıp GC-MS cihazına enjekte edilmiştir. Elde edilen kromatogramlar Şekil 17'de verilmiştir.



Şekil 17. NaOH'in 50, 100 ve 200 µL ilavesi ile oluşan hidroliz reaksiyonu kromatogramı (GC-MS SIM mod)

NaOH'in 50, 100 ve 200 µL ilave edilerek yapılan hidroliz reaksiyonu kromatogramların pik alanları Tablo 32'de görülmektedir.

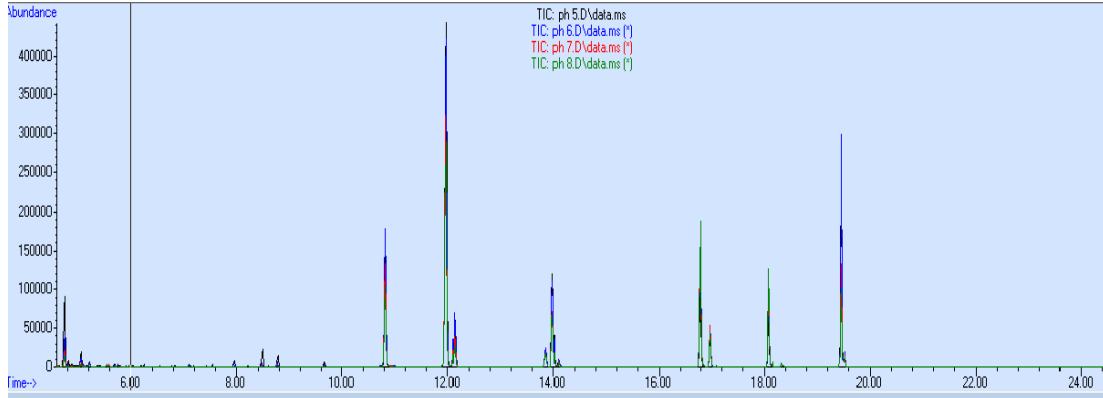
Tablo 32. NaOH'in 50, 100 ve 200 µL ilave edilerek yapılan hidrolizlerinin pik alanları

İlaç Etkin Madde Adı	50 µL Pik alanı	100 µL Pik alanı	200 µL Pik alanı
N-Fenil antranilik asit	289 795	317 544	277 439
Naproksen Metil	1 046 554	898 290	786 974
Fluniksin Metil	131 270	125 295	91 882
Diklofenak –H ₂ O dimetil	45 705	50 817	47 270
Ketoprofen Metil	320 725	236 837	186 701
Eltinak-H ₂ O dimetil	12 912	17 047	14 556
Meklofenamik metil	200 137	297 568	371 576
Fenilbutazon dimetil	102 039	98 568	99 768
Vedaprofen Metil	101 284	155 296	203 306
Karprofen dimetil	281 966	265 354	275 893

Elde edilen sonuçlar arasında belirgin şekilde fark olmadığı fakat alan değerleri belirlendiğinde 50 µL NaOH ilavesinin yeterli olduğu görülmüştür. Bundan sonraki çalışmalara da %32 lik NaOH'ten 50 µL ilave edilerek bazik hidroliz yapılmıştır.

6.1.12 pH belirleme çalışması

Hidroliz aşamasından sonra ilaç etkin maddelerin iyonize olabilmeleri için optimize pH değeri belirleme çalışmaları yapılmıştır. Bunun için optimum şartlar belirlenip yapılan hidroliz aşamasından sonra örnekler 0,5 M'lık pH'sı 6 olan fosfat tampon çözeltisinden 4,0 mL ilave edildikten sonra pH değerleri sırasıyla 5, 6, 7 ve 8'e ayarlanıp ekstraksiyon aynı şekilde uygulanıp GC-MS cihazına enjekte edilmiştir. Elde edilen kromatogramlar ve sonuçların pik alanı karşılaştırılması aşağıdaki Şekil 18 ve Tablo 33'de görüldüğü gibidir.



Şekil 18. pH 5, 6, 7 ve 8'e ayarlanan örneklerin kromatogramı (GC-MS SIM mod)

Tablo 33. pH değerleri sırasıyla 5, 6, 7 ve 8'e ayarlanarak yapılan çalışmanın pik alanları

İlaç Etkin Madde Adı	pH 5 Pik alanı	pH 6 Pik alanı	pH 7 Pik alanı	pH 8 Pik alanı
N-Fenil antranilik asit	321 939	394 081	291 940	231 548
Naproksen Metil	1 057 825	999 743	775 400	699 653
Fluniksin Metil	140 903	166 759	89 641	64 808
Diklofenak-H ₂ O dimetil	51 402	60 735	49 080	44 477
Ketoprofen Metil	310 689	280 752	182 416	170 168
Eltenak-H ₂ O dimetil	18 820	18 104	10 259	8 778
Meklofenamik metil	217 722	365 713	363 425	375 229
Fenilbutazon dimetil	89 946	105 073	103 992	91 697
Vedaprofen Metil	107 819	171 741	176 254	200 477
Karprofen dimetil	296 041	368 179	176 742	137 466

Sonuçlar incelendiğinde pik alanlarının pH değeri arttıkça genel olarak düştüğü, Meklofenamik Asit ve Vedaprofen'de ise arttığı, pH 5'te değerlerin en düşük seviyede olduğu görülmüştür. Genel olarak bakıldığında ise pH 6 değerinin ideal olduğu tespit edilmiş ve ekstraksiyondan önce pH değerinin 6'ya ayarlanmasına karar verilmiştir.

6.1.13 Fosfat tampon konsantrasyonu belirleme çalışması

Fosfat tamponun pH'sının belirlenmesinden sonra iyonizasyon içinde etkili olan tampon konsantrasyonunun belirlenmesi için çalışma yapılmıştır. Bunun için fosfat tampon konsantrasyonu 0,5 M, 1 M ve 2 M olacak şekilde hazırlanıp pH değeri 6'ya

ayarlanıp santrifüj edilip ekstraksiyon aşamasına geçilerek analiz edilmiştir. Yapılan çalışmanın sonuçları aşağıdaki Tablo 34’de görülmektedir.

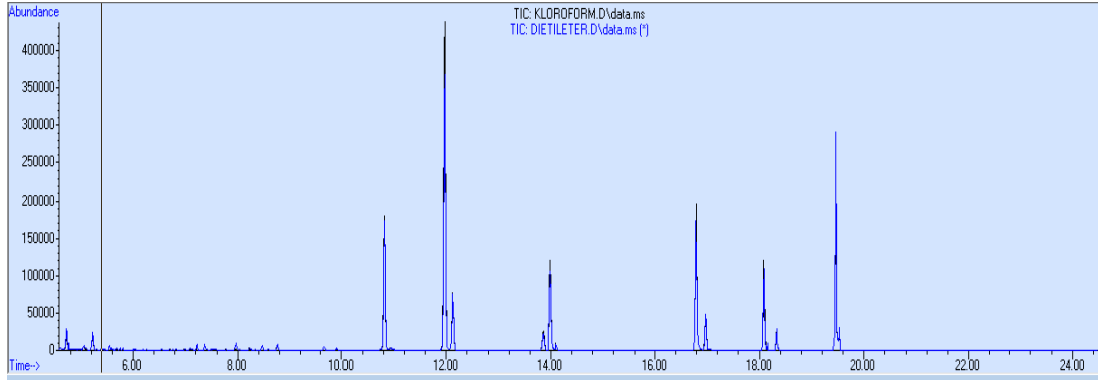
Tablo 34. Fosfat tampon konsantrasyonu 0,5 M, 1 M ve 2 M’a ayarlanarak yapılan çalışmanın pik alanları

İlaç Etkin Madde Adı	0,5 M Pik alanı	1 M Pik alanı	2 M Pik alanı
N-Fenil antranilik asit	283 458	296 094	306 710
Naproksen Metil	522 363	571 244	559 818
Fluniksin Metil	78 053	93 299	98 805
Diklofenak –H ₂ O dimetil	44 267	41 179	44 800
Ketoprofen Metil	80 610	103 534	100 770
Eltenak-H ₂ O dimetil	12 025	15 066	15 163
Meklofenamik metil	278 943	277 769	286 765
Fenilbutazon dimetil	84 861	91 699	103 024
Vedaprofen Metil	163 377	156 115	164 452
Karprofen dimetil	188 513	221 647	237 617

1 M ve 2 M’in birbirine oldukça yakın sonuçlar verdiği dolayısıyla malzemeden tasarruf sağlanması için 1 M’lık fosfat tampon kullanılması uygun görülmüştür.

6.1.14 Elüsyon çözücüsü çalışması

En uygun elüsyon çözücüsünün belirlenmesi için apolar özelliği yüksek olan kloroform (1,04 D) ve dietiler (1,15 D) çözücülerini denenmiştir. Bunun için belirlenen optimum şartlar kullanılarak 2 ayrı örnek hazırlanmış ve ekstraksiyonda elüsyon basamağında örneklerden biri kloroform diğeri ise dietileterle elüsyon yapılmıştır. Elde edilen kromatogramlar ve sonuçların pik alanı karşılaştırılması Şekil 19 ve Tablo 35’de görüldüğü gibidir.



Şekil 19. Elüsyon çözücüsü deneme çalışması kromatogramı (GC-MS SIM mod)

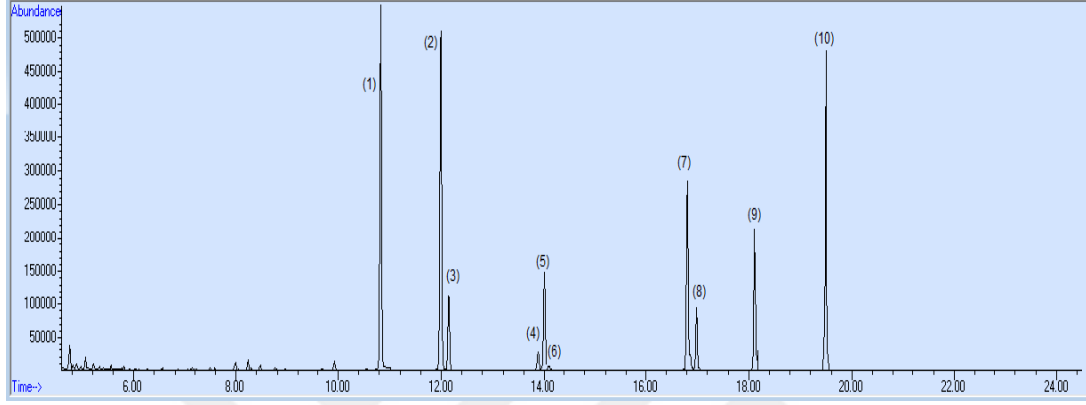
Tablo 35. Elüsyon çözücüsü deneme çalışması pik alanları

İlaç Etkin Madde Adı	Dietileter elüsyonu	Kloroform elüsyonu
	Pik alanı	Pik alanı
N-Fenil antranilik asit	386 842	402 537
Naproxen Metil	898 650	1 065 359
Fluniksin Metil	177 419	181 219
Diklofenak-H ₂ O dimetil	60 558	64 478
Ketoprofen Metil	267 119	313 286
Eltenak-H ₂ O dimetil	17 483	17 266
Meklofenamik metil	372 314	400 553
Fenilbutazon dimetil	104 668	103 356
Vedaprofen Metil	185 475	209 072
Karprofen dimetil	382 318	351 665

Sonuçlara bakıldığında kloroformla yapılan denemenin dietiletere göre daha etkin bir elüsyon sağladığı görülmektedir. Bu nedenle elüsyon çözücüsü olarak kloroform kullanılmaya devam edilmiştir.

2006 yılında Popot ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmadaki ekstraksiyon metodu modifiye edilerek uygulanan ekstraksiyon kısmı 5.4.1.4 bölümünde anlatıldığı şekilde uygulanmıştır. Analiz sonucunda Naproxen, Fluniksin, Diklofenak, Ketoprofen, Eltenak, Meklofenamik asit, Fenilbutazon, Vedaprofen ve Karprofen belirlenmiş olan limit seviyelerinde tespit edilebilmiştir. Dembreksin ise tespit edilememiştir. Dembreksin'in bu yöntemle ekstrakte edilememesi diğer ilaç etkin maddelerden farklı olarak Mukolitik özellikte bir madde olmasından kaynaklandığı düşünülebilir. Dembreksin tespiti için LC-MS/MS cihazı ile yapılan çalışmalarda tespit edilebildiği için

GC-MS'le yapılan çalışmada görülebilmesi için ekstra çalışmaya gidilmemiştir. 5,0 mL idrarda limit seviyesine tekabül eden 50 µL stok karışım çözeltisi ilave edilmiş örneğe uygulanan hidroliz ve ekstraksiyon sonucu elde edilen analizin SIM mod çalışma sonucu Şekil 20'de görülmektedir.



Şekil 20. Katkı yapılmış idrar örneği birarada SIM mod kromatogramı (1) N-Fenilantranilik asit, (2) Naproksen Metil, (3) Flunüksin Metil, (4) Diklofenak-H₂O dimetil, (5) Ketoprofen Metil, (6) Eltenak-H₂O dimetil, (7) Meklofenamik dimetil, (8) Fenilbutazon Metil, (9) Vedaprofen Metil, (10) Karprofen dimetil

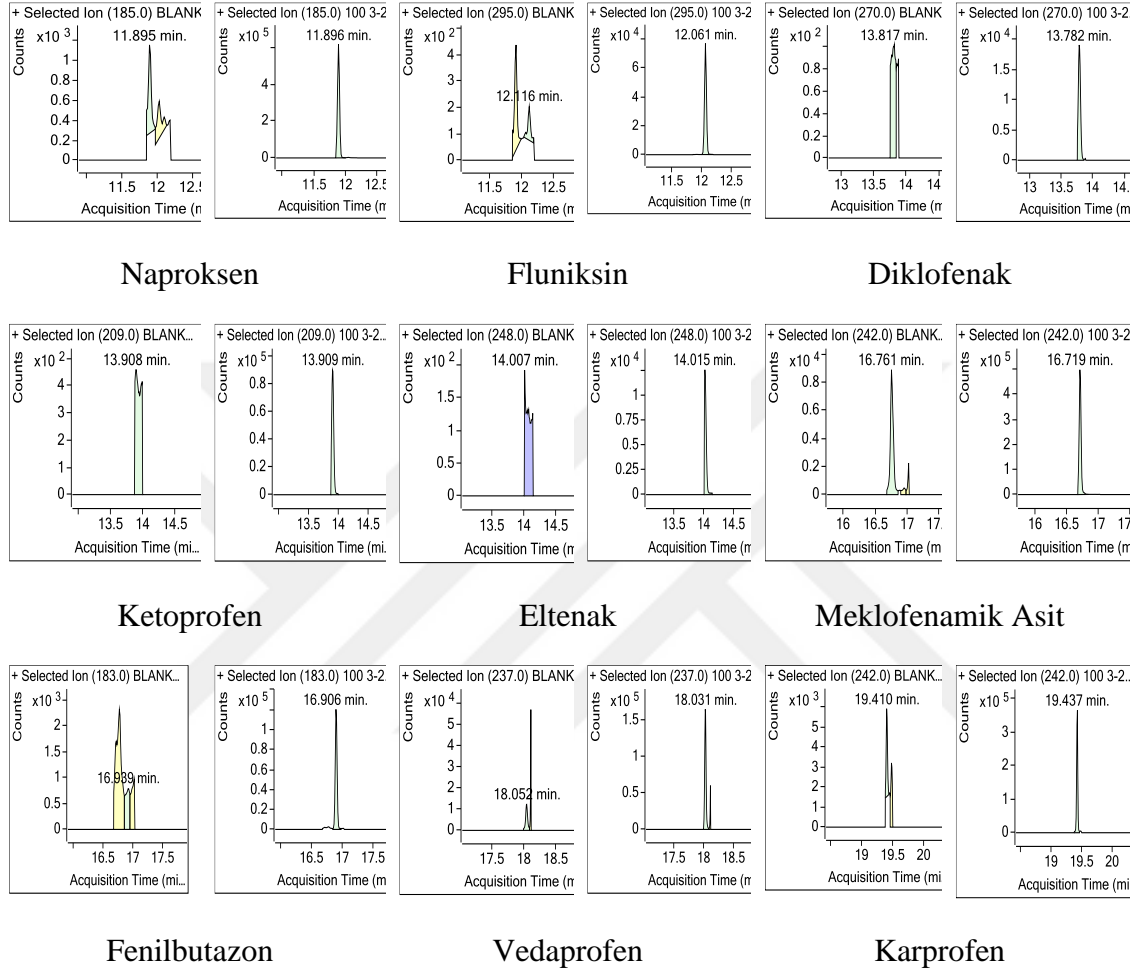
Optimize edilmiş metotla yapılan çalışma sonucunda kromatogramda görüldüğü gibi 9 ilaç etkin madde ve iç standardın belirlenmiş limit seviyesinde tespit edilebildiği görülmüştür. Bu metot uygulanarak validasyon çalışması yapılmıştır.

6.2. GC-MS Metot Validasyonu

6.2.1 Spesifiklik-seçicilik

Metodun seçiciliğinin ve spesifikliğinin kontrolü iki yaklaşım kullanılarak yapılmıştır. Bunlardan ilki için örnek içerisine NSAID özellikte başka maddeler (Niflumik asit, Tolfenamik asit, Antipirin, Etodolak, Flufenamik asit, Ibuprofen, Ketorolak, Mefenamik asit, Nabumeton, Nimesulid, Bufeksamak) analiz edilen maddelerle birlikte ilave edilmiştir. Yapılan analiz sonucunda diğer maddelerin herhangi bir girişim etkisi yapmadığı tespit edilmiştir. İkinci olarak 20 farklı ata ait blank örnek

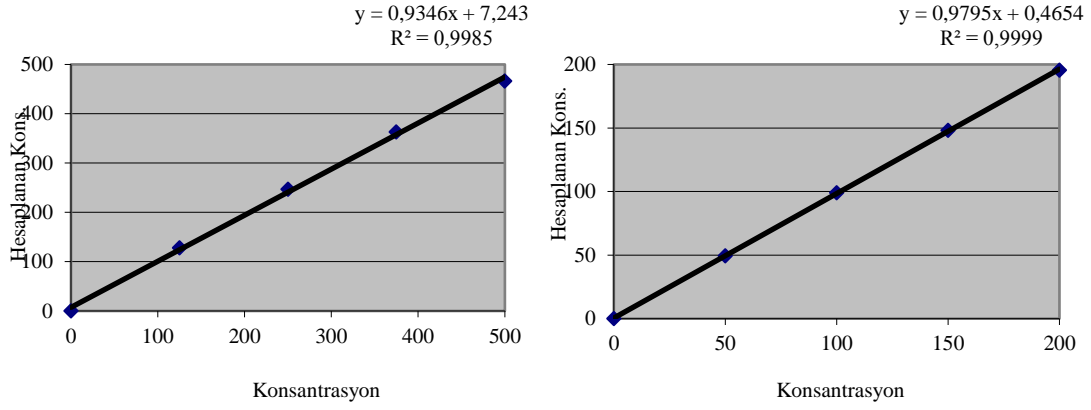
analiz edilmiş ve analizi yapılan maddelerin alıkonma zamanında tespitine engel olabilecek herhangi bir eşleşme görülmemiştir.



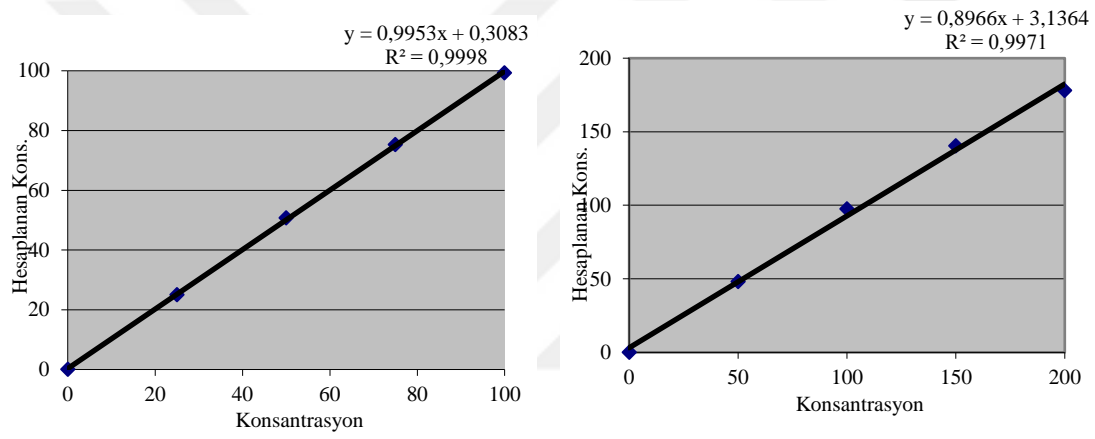
Şekil 21. Blank örnek ile katkılanmış örnek karşılaştırılması

6.2.2 Doğrusallık

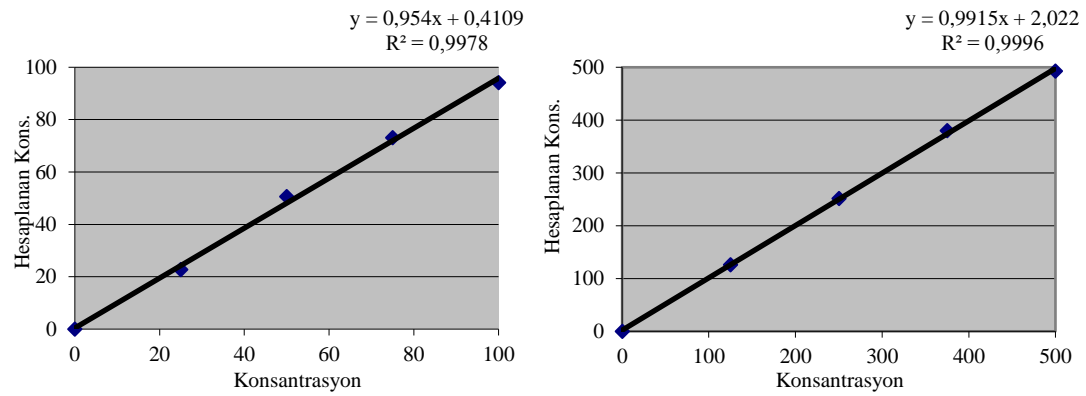
Lineer ölçüm aralığını belirlemek için blank ve dört farklı konsantrasyonda (0,5xISL, ISL, 1,5xISL, 2xISL) 6 şar örneğe katkı yapılarak enjeksiyon yapılmıştır. Sonuçlar katkı yapılan örneklerden elde edilen linearite kullanılarak hesaplanmıştır (Şekil 22, 23, 24, 25, 26).



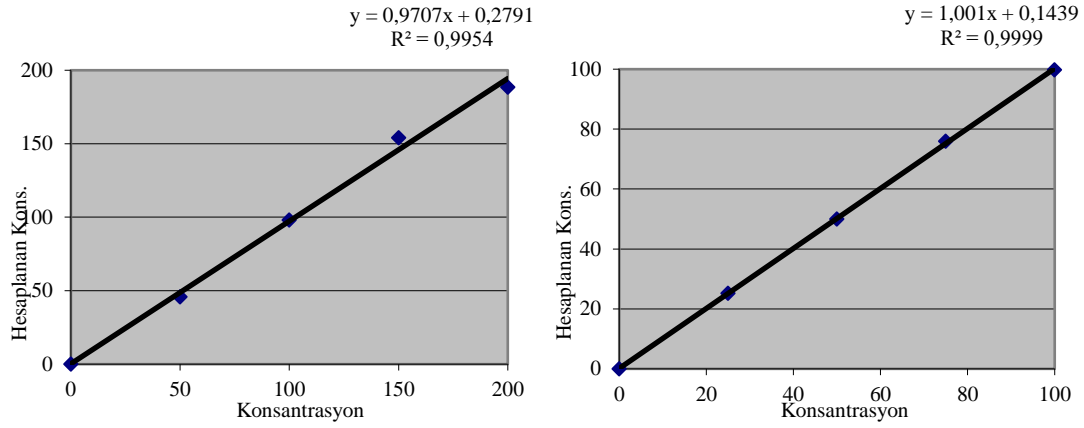
Şekil 22. Naproksen ve flunixin linearitesi



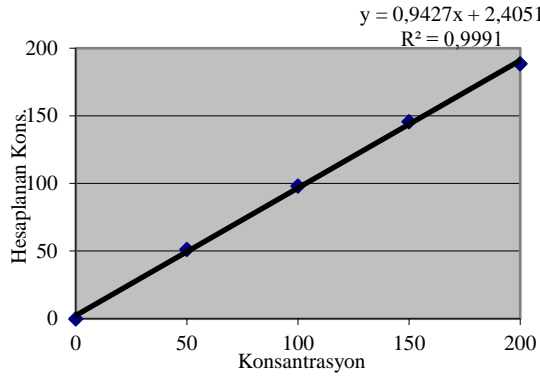
Şekil 23. Diklofenak ve Ketoprofen linearitesi



Şekil 24. Eltenak ve Meklofenamik asit linearitesi



Şekil 25. Fenilbutazon ve Vedaprofen linearitesi



Şekil 26. Karprofen linearitesi

Doğrusallık eğrileri incelendiğinde korelasyon katsayılarının çalışılan bütün maddeler için 0,9954 ve üzeri olduğu görülmüştür.

6.2.3 Doğruluk ve geri kazanım

Doğruluk elde edilen deney sonuçlarının gerçek değere yakınlığının ifadesidir. Doğruluk referans materyal olmadığı için geri kazanım değeri hesaplanarak belirlenmiştir. Limit değerinin 0,5xISL, ISL ve 1,5xISL, 2xISL oranında boş olduğu bilinen idrar örneğine katkı yapılarak 3 gün 6 paralel olarak yapılan çalışma sonucunda

gün içi ve günler arası geri kazanım değerleri aşağıdaki eşitlikle hesaplanmıştır (Tablo 41).

$$\% \text{ Geri kazanım} = 100 \times \frac{\text{Ölçülen Değer}}{\text{Gerçek Değer}}$$

Validasyon sonucunda hesaplanan geri kazanım değerleri \pm %10'luk hedef değer içerisindedir.

6.2.4 Tekrarlanabilirlik

Tekrarlanabilirlik limit değerinin 0,5xISL, ISL, 1,5xISL ve 2xISL oranında boş olduğu bilinen idrar örneğine aynı kişi tarafından aynı şartlarda katkı yapılarak 3 gün 6 paralel olarak yapılan çalışma sonucunda elde edilmiştir. katkı yapılan örneklerin ortalama konsantrasyonları, standart sapmaları ve sapma katsayıları (%) her seviye için hesaplanmıştır (Tablo 41).

6.2.5 Laboratuvar içi tekrar üretilebilirlik

Laboratuvar içi tekrar üretilebilirlik, farklı analist ve farklı sıcaklık koşullarında limit değerinin 0,5xISL, ISL, 1,5xISL ve 2xISL oranında boş olduğu bilinen idrar örneğine katkı ile 6 paralel çalışma yapılarak standart sapması (SD_{wLR}) ve varyasyon katsayısı (CV) hesaplanarak elde edilmiştir. Hesaplanan CV değerleri 1,75-12,25 aralığındadır ve 2002/657/EC direktifine göre belirlenmiş olan kriterleri sağlamaktadır (Tablo 3).

6.2.6 Kesinlik

3 gün 3 seviye (0,5xISL, ISL, 1,5xISL ve 2xISL) 6 paralel olacak şekilde yapılan çalışma sonuçlarından gün içi ve günler arası kesinlik değerleri %CV olarak

hesaplandığında 1,81-19,24 aralığında ve kriterlere uygun olduğu görülmüştür (Tablo 41).

6.2.7 Karar limiti (CC_{α}) ve tespit yeteneği (CC_{β})

ISL seviyesinde farklı günlerde farklı boş örneklere katkı yapılmış 24 ayrı çalışma gerçekleştirilerek CC_{α} ve CC_{β} değerleri aşağıdaki formüle göre hesaplanarak Tablo 41’de belirtilmiştir.

$$CC_{\alpha} = C_{ort} + 1,64 * SD$$

$$CC_{\beta} = CC_{\alpha} + 1,64 * SD$$

Hesaplanan bu değerler için değeri CC_{α} ’nın altında tespit edilen örneklerde sonuç negatif üzerinde tespit edilen örnekler içinse sonuç pozitifdir.

6.2.8 Sağlık (minör değişiklikler)

Bu çalışma, numune hazırlığında ve analiz sürecinde oluşturulacak bazı küçük değişikliklerin sonuçların üzerine etkisini gözlemlemek için yapılmıştır. Numune hazırlama aşamasında ölçüm sonuçlarını etkileyebilecek faktörler olarak hidroliz süresi, ilave edilen NaOH miktarı, numunenin pH sı, santrifuj süresi, kloroform miktarı (elüsyon için), vialle aktarırken kullanılan çözeltilinin cinsi, türevlendirme sıcaklığının etkisi incelenmiştir. Her değiştirilen etken için 3’er adet numune hazırlanmış ve 2^7 yani 128 etki farklı olası kombinasyonun etkisi değerlendirilmiştir. Youden yaklaşımını kullanarak pürüzlük testi yapılmıştır. Her bir değişken etken için ayrı ayrı etkiler hesaplanmış ve Tablo 36’da gösterilmiştir.

Tablo 36. Sağlık testi etki faktörleri

FAKTÖR	+	-
A-Hidroliz süresi	60 dk	15 dk
B- İlave edilen NaOH miktarı	50	100
C- pH	6	8

D-Santrifüj süresi	15 dk	5 dk
E-Kloroform ile elüsyon miktarı	6 mL	3 mL
F-Viale alırken kullanılan çözelti	Diklorometan	Metanol
G-Türevlendirme Sıcaklığı	300	200

Aşağıdaki Tablo 37'ye göre tek tek ve kombine değişiklikler yapılarak sonuçlardaki değişimler izlenmiştir.

Tablo 37. Youden sağlamlık testi planı

Numune No	Parametreler						
	A	B	C	D	E	F	G
1-3	+	+	+	+	+	+	+
4-6	+	+	-	+	-	-	-
7-9	+	-	+	-	+	-	-
10-12	+	-	-	-	-	+	+
13-15	-	+	+	-	-	+	-
16-18	-	+	-	-	+	-	+
19-21	-	-	+	+	-	-	+
22-24	-	-	-	+	+	+	-

Değişimler aşağıdaki formüllere göre her bir analit için hesaplanmıştır.

D : (Y+) - (Y-)

Y+ : (+) işaretli etkenlerin ortalama sonuçları

Y- : (-) işaretli etkenlerin ortalama sonuçları

C : Analitin belirlenen miktarı

SD_{wlr} : Laboratuvar içi örnek üretilebilirlik çalışmasında elde edilen standart sapma

Önemlilik : $D > 1.4 * SD_{wlr}$ olduğu durumda değişimin anlamlı olduğu varsayılmıştır.

Tablo 38. Sağlamlık etki tablosu

	NAP	FLU	DIC	KET	ELT	MEC	PBZ	VPF	CRF
A-Hidroliz süresi	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B- İlave edilen NaOH miktarı	-	-	-	-	-	-	-	+	-
C- pH	-	-	+	-	+	+	+	+	-
D-Santrifüj süresi	-	-	+	-	-	-	-	+	-
E-Kloroform ile elüt miktarı	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F-Viale alırken kullanılan çözelti	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G-Türevlendirme Sıcaklığı	-	-	+	-	+	+	+	+	+

Etkiler Tablo 38’de belirtildiği şekildedir. Youden testi, parametrelerin herhangi bir analit üzerinde önemli bir etkisi olmadığını ortaya koymuştur. Diklofenak, Eltenak, Meklofenamik asit, Fenilbutazon ve Vedaprofen'e eklenen NaOH, pH ve türevlendirme sıcaklığı sonuçları etkilemiştir. Karprofen'de, sadece türevlendirme sıcaklığındaki değişiklikler sonuçları etkilemiştir. pH 8 (Y-) 5 analitin pik alanlarını arttırırken, türevlendirme sıcaklığı (Y-) faktörünün değişmesi 6 analitinkini düşürmüştür. Ancak, mevcut yöntemin optimizasyon ve doğrulama sonuçları; yöntemin, seçilen parametrelerde hafif değişimler için yeterli ve sağlam olduğunu göstermiştir.

6.2.9 Stabilité

Stok standardın stabilitesi: Çalışılan ilaç maddelerini içeren çalışma çözeltileri hazırlanıp 0. Gün değerleri olarak alınmak üzere analiz edilmiş ve geri kalan çalışma çözeltilerinden +4°C, -20°C, +20°C karanlıkta ve ışıktaki muhafaza edilmek üzere eşit miktarda bölünerek ayrılmıştır. Farklı sıcaklıklarda saklanan çözeltiler sırasıyla 1., 2., 3., 4. hafta analiz edilmek üzere stabilite çalışması planlanmıştır. Stabilité çalışmasında sonuçlanan 4 haftalık çalışma sonucunda çalışılan ilaç etkin maddelerin çalışma çözeltilerinde 4°C ve -20°C’de stabil olduğu görülmüştür.

Matriks stabilitesi: Çalışılan ilaç etkin maddeler ve iç standarttan ISL seviyesine tekabül edecek şekilde boş olduğu bilinen örnek içerisine katkı yapılarak karıştırılmış ve 0. Gün değerleri olarak alınmak üzere analiz edilmiştir. Geri kalan katlı yapılmış örnekler +4°C, -20°C, +20°C karanlıkta ve ışıktaki muhafaza edilmek üzere eşit miktarda bölünerek muhafaza edilmek üzere ayrılmıştır. Farklı sıcaklıklarda saklanan çözeltiler sırasıyla 1., 2., 3., 4. hafta ve 3. ayda analiz edilmek üzere stabilite çalışması planlandı. Stabilité çalışmasında sonuçlanan 4 haftalık çalışma sonucunda çalışılan ilaç etkin maddelerin matriks içerisinde +4°C ve -20°C’de stabil olduğu görülmüştür.

6.2.10 AORC kriterleri

İyon oranları: Yapılan analizde elde edilen spektrumda iyon oranları Tablo 39’a göre değerlendirilmiştir.

Tablo 39. AORC iyon oranı kabul kriterleri (The Association of Official Racing Chemists (2015) AORC Guidelines for the Minimum Criteria for Identification by Chromatography and Mass Spectrometry. <http://www.aorc-online.org/documents/aorc-ms-criteria-modified-23-aug-16/>)

R.A. of matched ion in reference spectrum	Full-scan single-stage MS:	Full-scan MS/MS & related techniques:
	Acceptable R.A. in test spectrum (10% absolute or 30% relative)	Acceptable R.A. in test spectrum (20% absolute or 40% relative)
100% (Base Peak)	70-100%	60-100%
90%	63-100%	54-100%
80%	56-100%	48-100%
70%	49-91%	42-98%
60%	42-78%	36-84%
50%	35-65%	30-70%
40%	28-52%	20-60%
30%	20-40%	10-50%
20%	10-30%	0-40%
10%	0-20%	0-30%
5%	0-15%	0-25%
1%	0-11%	0-21%

Tablo 40. GC-MS ile analiz edilen ilaç etkinlerinin iyon oranları

Analiz Edilen Madde	Ana İyon	P1	İyon Oranı	%	P2	İyon Oranı	%	P3	İyon Oranı	%
Naproksen	185	244	26,6	99	141	21,6	101,5	170	15,4	104,7
Flunüksin	295	263	96,4	98,5	251	40,7	99,7	310	29,7	97,4
Diklofenak	270	305	98,7	100	290	71,7	100,7	242	76	102,3
Ketoprofen	209	105	113,9	102,9	268	28,7	100,2	191	28,9	97,3
Eltinak	248	311	47,6	102,1	233	35,8	106,6	-	-	-
Meklofenamik asit	242	309	23,6	96,2	277	9	96,4	-	-	-
Fenilbutazon	183	322	25,2	91,8	118	26,2	80,8	-	-	-
Vedaprofen	237	155	127,8	106,4	296	45,2	91,7	-	-	-
Karprofen	242	301	49,1	91,2	207	67,5	113,5	-	-	-
N-Fenil antranilik asit (IS)	195	227	45,8	99	167	45,5	98,1	139	12,7	114,9

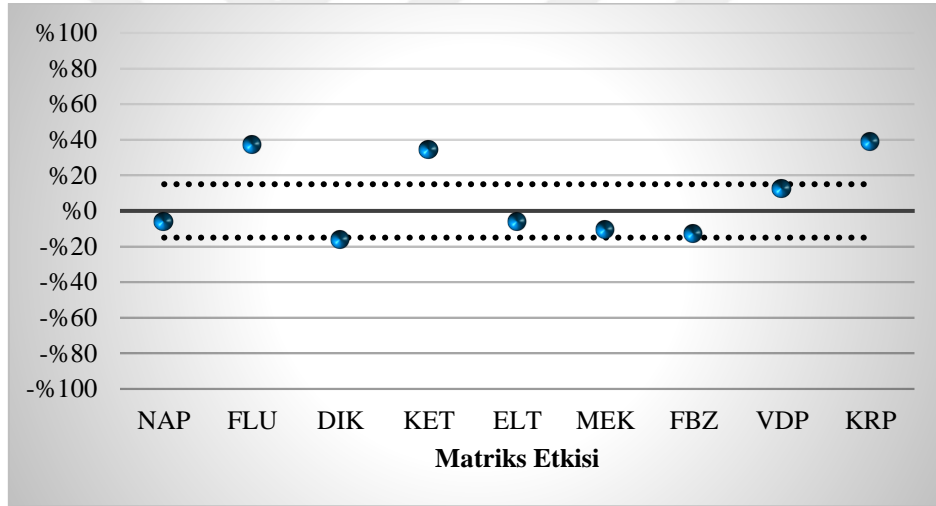
Tablo 39 göre yapılan değerlendirmede iyon oranı değerlerinin belirlenen kritere uygun olduğu Tablo 40’da görülmektedir.

Relatif Alıkonma Zamanı (RRT): Uygun bir iç standart kullanılarak hesaplanır; RRT ‘Numunedeki analitin RRT ile Referanstaki Analitin RRT’si % ± 1 ’den fazla sapmamalıdır’ kuralına göre değerlendirme yapılır ve sonuçlar buna göre yorumlanır (Tablo 41).

Matriks etkisi: Matriks etkisinin hesaplanması için ekstrakte edilen blank numuneye uçurma işleminden sonra 50 µL mix standart eklenip analiz edilir. Yine aynı konsantrasyondaki standart karışımı cihaza enjekte edilerek elde edilen alanlar aşağıdaki formüle göre hesap edilir.

$$\%ME=(\text{ekstraksiyon sonrası katkılanan numunenin alanı})/(\text{karışım standardının alanı})$$

Matriks etkisi \pm %15 üzerinde olan maddelerde matriksin analiz üzerinde etkisi olduğu kabul edilmektedir (Márta ve ark., 2018, Yılmaz ve ark., 2009) Yapılan hesaplama göre flunüksin, ketoprofen ve karprofen maddeleri üzerinde iyon zenginleştirme diklofenak üzerinde ise küçük bir oranda iyon baskılama yönünde matriksin etkisinin olduğu tespit edilmiştir (Şekil 27, Tablo 41).



Şekil 27. GC-MS ile analiz edilen ilaç etkin maddelere matriks etkisi

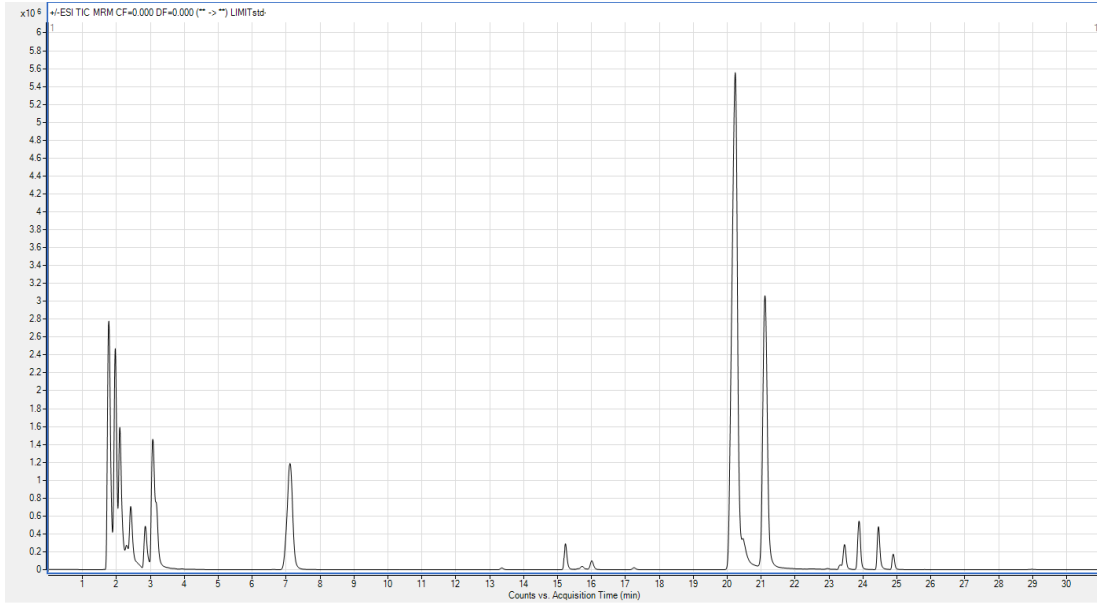
Tablo 41. GC-MS ile analiz edilen ilaç etkin maddelerin validasyon sonuçları

Uluslararası Tarama Limitli Maddeler	Katkılı Kons. (ng/mL)	Kor. Var. (R ²)	Gün içi (n=6)			Günler arası (n=6)			Lab. İçi tekrarüretilebilirlik (% CV)	CC α (ng/mL) (α =%5)	CC β (ng/mL) (β =% 5)	RRT	Matriks Etkisi (%)
			Ölçülen Kons. (ORT \pm SD) (ng/mL)	Keskinlik CV (%)	Geri Kazanım (%)	Ölçülen Kons. (ORT \pm SD) (ng/mL)	Keskinlik CV(%)	Geri Kazanım (%)					
Naproksen	125,00	0,998	127,87 \pm 7,26	5,68	102,30	125,37 \pm 10,37	8,27	100,29	6,89	267,24	284,48	1,11	94,19
	250,00		246,82 \pm 10,66	4,32	98,73	250,27 \pm 10,47	4,18	100,11	4,41				
	375,00		363,45 \pm 15,68	4,31	96,92	370,92 \pm 15,92	4,29	98,91	6,16				
	500,00		466,35 \pm 27,37	5,87	93,27	482,71 \pm 24,17	5,01	96,54					
Fluniksin	50,00	0,999	49,33 \pm 1,23	2,49	98,66	49,08 \pm 1,78	3,63	98,16	3,35	105,56	111,12	1,12	136,86
	100,00		99,10 \pm 2,39	2,41	99,10	101,05 \pm 3,59	3,55	101,05	3,04				
	150,00		148,22 \pm 4,08	2,76	98,81	149,49 \pm 3,12	2,09	99,66	4,03				
	200,00		195,43 \pm 4,86	2,48	97,71	199,21 \pm 6,27	3,15	99,60					
Diklofenak	25,00	0,999	25,00 \pm 0,41	1,63	100,23	25,08 \pm 1,16	4,61	100,31	2,53	53,01	56,02	1,28	83,71
	50,00		50,71 \pm 1,08	2,14	101,42	50,59 \pm 2,09	4,12	101,18	1,81				
	75,00		77,85 \pm 1,42	1,82	100,41	75,65 \pm 1,37	1,81	100,86	1,75				
	100,00		99,28 \pm 1,47	1,48	99,28	99,51 \pm 1,88	1,89	99,51					
Ketoprofen	50,00	0,997	48,08 \pm 4,47	9,30	96,17	49,32 \pm 5,31	10,77	98,64	8,81	112,41	124,83	1,29	134,26
	100,00		97,58 \pm 8,07	8,27	97,58	99,00 \pm 3,59	3,62	99,00	9,15				
	150,00		140,24 \pm 9,60	6,85	93,49	146,61 \pm 9,36	6,38	97,74	9,03				
	200,00		178,07 \pm 14,92	8,38	89,03	188,91 \pm 14,41	7,63	94,46					
Eltinak	25,00	0,997	22,78 \pm 3,22	14,13	91,13	25,97 \pm 5,00	19,24	103,90	12,85	56,75	63,50	1,30	93,78
	50,00		50,61 \pm 5,20	10,27	101,22	50,66 \pm 4,44	8,76	101,31	8,14				
	75,00		73,05 \pm 7,15	9,79	97,40	75,84 \pm 6,48	8,54	101,11	8,47				
	100,00		94,12 \pm 6,12	6,50	94,12	94,10 \pm 5,32	5,65	94,10					
Meklofenamik asit	125,00	0,999	125,86 \pm 9,85	7,83	100,69	126,44 \pm 10,73	8,49	101,15	7,35	264,99	279,99	1,56	89,58
	250,00		251,19 \pm 9,69	3,86	100,47	251,65 \pm 9,97	3,96	100,66	4,32				

	375,00		379,67 ± 18,06	4,76	101,25	377,79 ± 17,62	4,66	100,74	4,89				
	500,00		492,81 ± 19,20	3,90	98,56	500,50 ± 22,80	4,56	100,10					
Fenilbutazon	50,00	0,994	45,89 ± 2,98	6,50	91,78	49,43 ± 4,17	8,43	98,86	8,76				
	100,00		98,21 ± 3,81	3,88	98,21	98,12 ± 3,82	3,90	98,12	4,32	106,69	113,38	1,57	87,08
	150,00		154,04 ± 6,27	4,07	102,69	156,19 ± 8,59	5,50	104,13	4,03				
	200,00		188,59 ± 11,94	6,33	94,29	190,05 ± 9,69	5,10	95,03					
Vedaprofen	25,00	0,999	25,22 ± 1,20	4,76	100,89	24,96 ± 1,73	6,95	99,82	7,30				
	50,00		50,02 ± 1,22	2,44	100,03	50,56 ± 2,23	4,40	101,12	2,27	53,23	56,46	1,68	112,31
	75,00		75,98 ± 2,24	2,95	101,31	76,58 ± 3,09	4,04	102,11	2,95				
	100,00		99,74 ± 2,19	2,20	99,74	101,32 ± 3,85	3,80	101,32					
Karprofen	50,00	0,999	51,21 ± 3,40	6,64	102,41	48,53 ± 4,35	8,95	97,05	5,83				
	100,00		98,07 ± 2,84	2,90	98,07	100,30 ± 3,59	3,58	100,08	5,77	108,33	116,66	1,81	138,69
	150,00		145,66 ± 8,23	5,65	97,10	151,21 ± 8,02	5,30	100,80	7,71				
	200,00		188,46 ± 10,63	5,64	94,23	197,33 ± 11,22	5,68	98,66					

6.3. Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresiyle Metot Geliştirme Çalışmaları

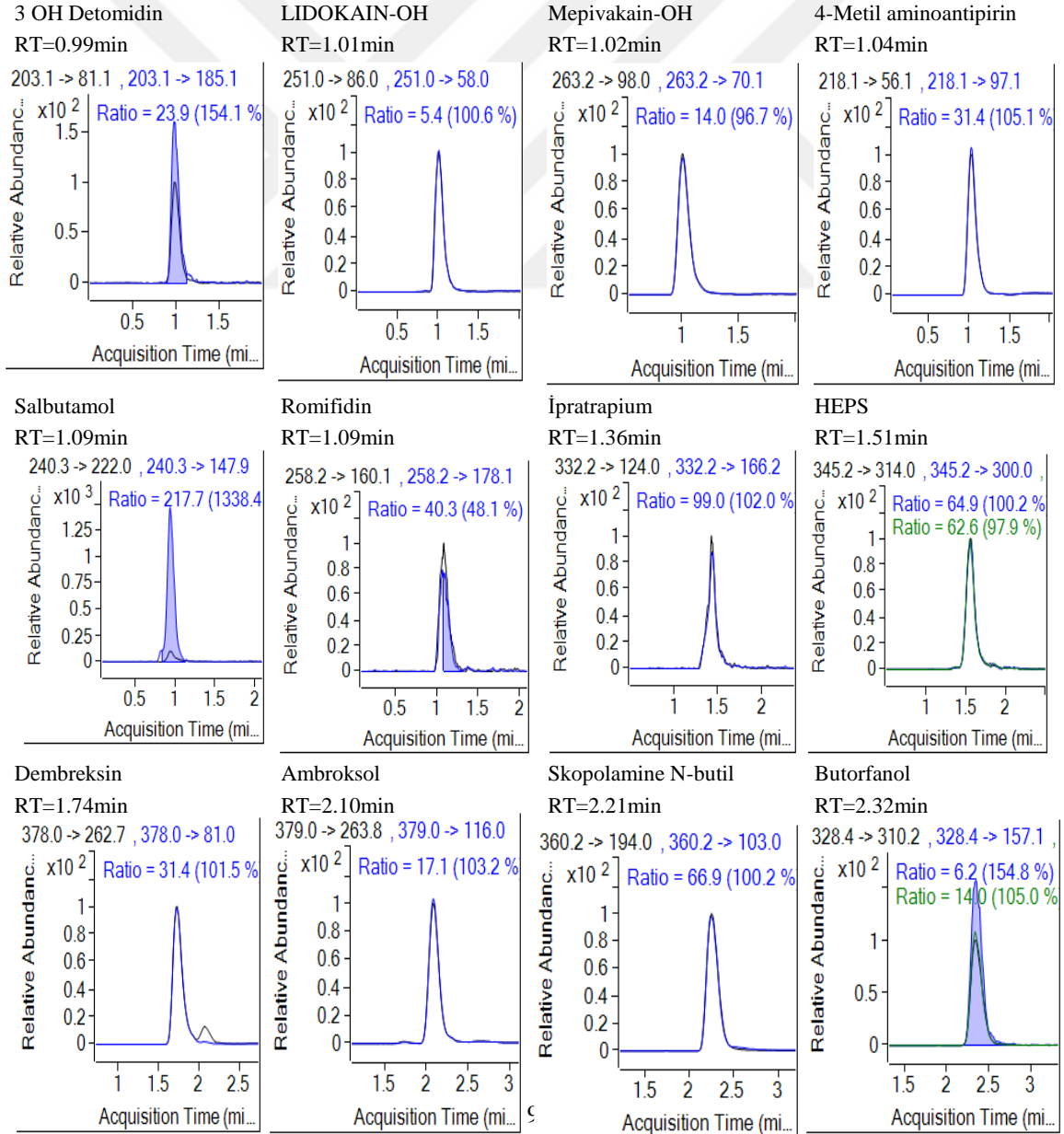
Teröpatik özellikte ve limit değeri olan ilaç etkin maddelerinin özellikleri molekül yapıları ve pH değerleri birbirlerinden oldukça farklı olduğu için geniş bir çalışma aralığına ihtiyaç vardır. Bu ilaç etkin maddelerin bir arada analizlerinin yapıldığı çalışmalar incelendiğinde ve pKa değerlerine bakıldığında hem asidik hem de bazik çalışma yapılması gerekeceği düşünülmüştür. 2011 yılında Moulard ve arkadaşları tarafından yapılan yüksek rezolüsyon ve kütle taraması özelliğine sahip Orbitrap kütle spektrometresi ile atlarda doping kontrolü çalışmasında limitli grubuna giren birçok maddenin analizinin asidik çalışma koşullarında yapılabildiği görülmüştür ve bu çalışma modifiye edilmeye çalışılmıştır. Bu amaçla, ilaç etkin maddelerin karışımını içeren 5 mL'lik bir stok karışım çözeltisi (Tablo 13) ve iç standart karışım çözeltisinden (Tablo 14) 50'şer µL alınıp, kuruluğa kadar uçurulmuş ve 50 µL Deiyonize su/Asetonitril (80:20) karışımı ile çözülüp MRM modunda enjeksiyon yapılmıştır. Elde edilen kromatogram Şekil 28'de görülmektedir.



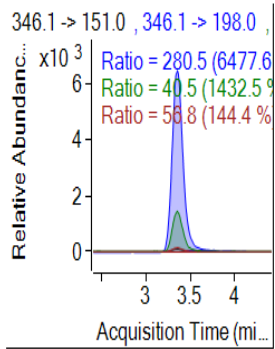
Şekil 28. Moulard ve arkadaşları tarafından yapılan çalışma şartları kullanılarak elde edilen kromatogram

MRM modu çalışma sonucunda elde edilen tutunma zamanları belirlenerek daha hassas sonuç elde edebilmek amacıyla DMRM moduna geçilmiştir. DMRM modunda

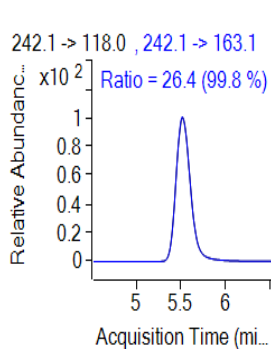
yapılan enjeksiyon sonucunda ilaç etkin maddelerden Fenilbutazon, Vedaprofen dışındaki maddelerin standartlarının tespit edilebildiği görülmüştür. Bu maddelerin tespit edilememesinin nedeni olarak daha önce belirtildiği gibi NSAID özellikte maddelerin ESI modunda ve türevlendirilmeden tespit edilememeleri olduğu düşünülmüştür. Maddelerin pik görüntüleri Şekil 29'da görülmektedir.



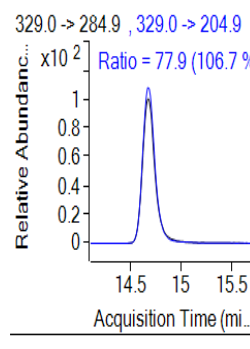
Omeprazol
RT=3.41min



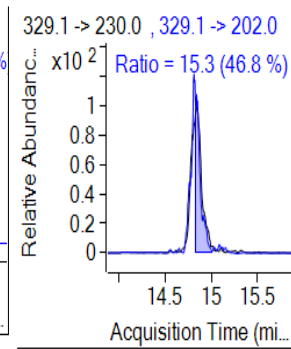
Metokarbamol
RT=5.52min



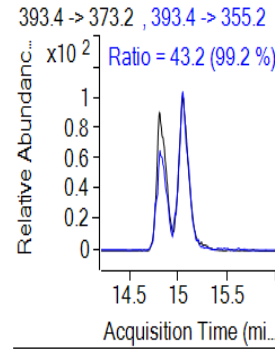
Furosamid
RT=14.74min



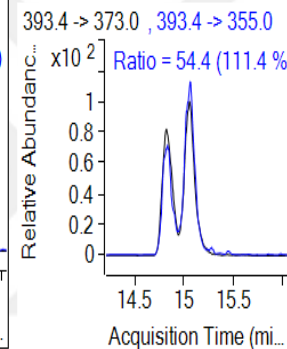
5-Hidroksi Dantrolen
RT=14.88min



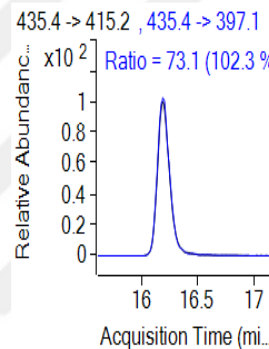
Deksametazon
RT=15.05min



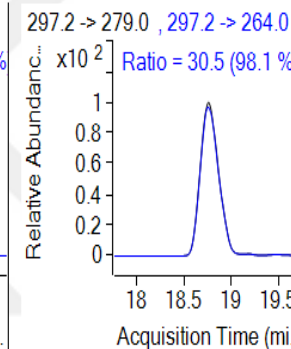
Betametazon
RT=15.05min



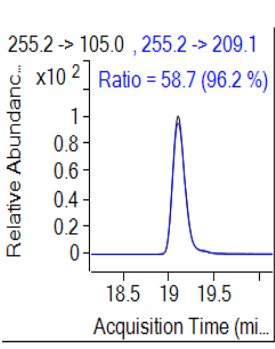
Triamsinolon Asetonid
RT=16.19min



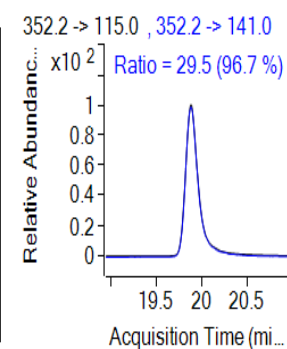
Fluniksini
RT=18.77min



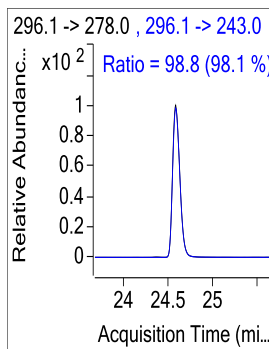
Ketoprofen
RT=19.14min



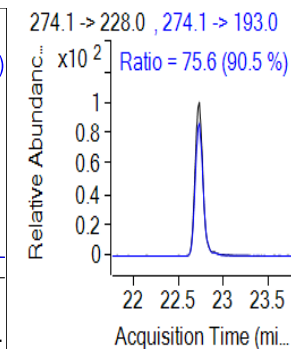
Meloksikam
RT=19.95min



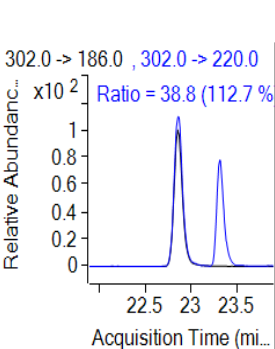
Naprosken
RT=20.88min



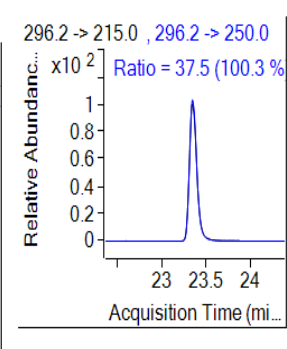
Karprofen
RT=22.76min



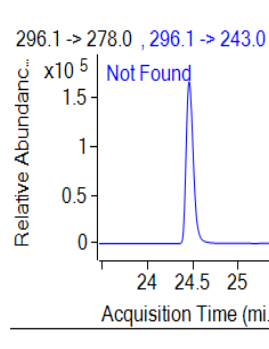
Eltenak
RT=22.89min



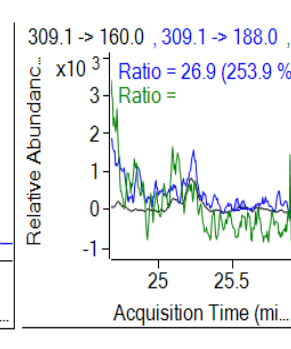
Diklofenak
RT=23.38min

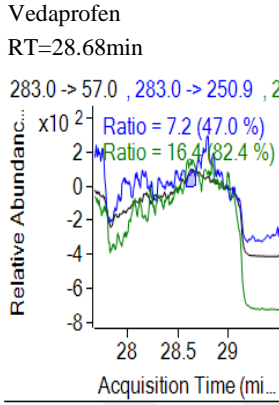


Meklofenamik Asit
RT=24.47min



Fenilbutazon
RT=25.69min





Şekil 29. Standart karışım analiz sonucu LC-MS/MS pik görüntüleri ve iyon oranları

Söz konusu maddelerin ekstraksiyon sonucunda bir arada tespit edilip edilemeyeceğinin belirlenebilmesi için 2011 yılında Moulard ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmadaki ekstraksiyon kullanılarak deneme yapılmıştır. Çalışma sonucuna göre İpratropium, Salbutamol, 3 OH Detomidin, HEPS, 5-OH Dantrolen, Omeprazol, Naproksen, Vedaprofen ve Fenilbutazon ilaç etkin maddelerinin limit seviyesinde tespit edilemediği görülmüştür. Cihazın hareketli fazında bazı değişiklikler yapılarak tespit edilemeyen maddelerin tespit edilip edilmeyeceği ya da tespit edilen piklerin daha simetrik olarak elde edilmesi için çalışmalar yapılmıştır.

6.3.1 Hareketli faz çalışması

Öncelikle hareketli faz bileşiminde değişiklikler yapılarak tespit edilemeyen maddelerin analiz edilebilmesi için çalışmalar yapılmıştır. Bunun için 4 farklı hareketli fazda [1) Metanol+%0,1 Asetik asit-Deiyonize Su+%0,1 Asetik asit, 2) Metanol+%0,1 Formik asit-Deiyonize Su+%0,1 Formik asit, 3) Asetonitril+%0,1 Asetik asit-Deiyonize Su+%0,1 Asetik asit, 4) Asetonitril+%0,1 Formik asit- Deiyonize Su+%0,1 Formik asit] boş örnek limit seviyeye tekabül edecek şekilde katkı yapıp önceki çalışmada yapılan

ekstraksiyon uygulanarak deneme yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 42’de görülmektedir.

Tablo 42. Hareketli faz çalışması

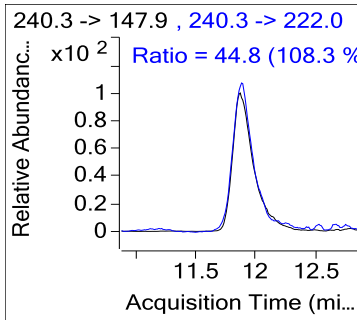
	MeOH+%0,1AA- Su+%0,1AA	MeOH+%0,1FA- Su+%0,1FA	ACN+%0,1AA- Su+%0,1AA	ACN+%0,1FA- Su+%0,1FA
Furosemid	-	-	-	1898
Fluniksin	3 859 971	137 536	4 676 786	5 511 877
Meloksikam	111 617	9 295	225 217	414 672
4-MAA	532 357	103 505	440 965	370 036
Triamsinolon Asetonid	679	-	3 406	9 229
İpratropium	-	-	-	6275
Betametazon	-	-	-	1080
3-OH Lidokain	17 871	10 324	-	191 455
3-OH Mepivakain	661 983	133 291	1 410 013	503 955
Dembreksin	2 990 480	45 467	441 855	505 144
Ketoprofen	54 439	12 062	163 007	271 771
N-butilskopolamonyum	172 988	5 387	122 824	410 668
Diklofenak	8 451	4 952	85 583	66 876
Karprofen	678	221	2 591	4 079
Vedaprofen	35 350	258 745	24 837	-
Meklofenamik asit	19 067	7 696	151 570	589 391
Naproksen	-	-	-	-
Ambroksol	2 977 926	36 381	1 331	505 809
Fenilbutazon	17 728	-	5 950	-
HEPS	364 301	3 651	165 914	69 491
3-OH detomidin	19 482	-	-	7 630
Eltenak	3 567	-	11 348	21 887
Butarfanol	147 732	2 188	62 601	172 076
Romifidin	4 772	414	2 891	2 616
Salbutamol	-	-	-	-
Deksametazon	-	-	-	929
Metokarbamol	316 821	4 610	602 026	763 180
Omeprazol	117 186	1 338	79 924	-
5-OH Dantrolen	-	-	-	-

Yapılan hareketli faz çalışmasına göre 3-OH detomidin, HEPS, Omeprazol, Fenilbutazon gibi asidik ekstraksiyonla tespit edilemeyen ilaç etkin maddelerin Metanol-

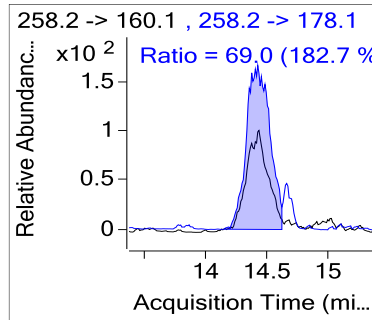
Su kullanılan hareketli fazda tespit edilebildiği görülmüştür. Bu nedenle bu maddelerin farklı bir yöntemle tespit edilmesi gerekmektedir.

Sonuçlara göre Asetonitril+% 0,1 Formik asit / Su+%0,1 Formik asit hareketli fazları kullanılarak yapılan çalışma sonuçlarında pik şekilleri daha düzgün ve daha fazla sayıda ilaç etkin maddenin tespit edilebildiği görülmüştür. Daha sonra bu hareketli faz kullanılarak dereceli elüsyonda deneme çalışmalarıyla daha etkin bir ayrılma ve analiz süresini kısaltma çalışmaları yapılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda dereceli elüsyonda yapılan değişikliklerle analiz süresi 20 dk'ya kadar düşürülerek daha kısa sürede çalışılan ilaç etkinlerin belirlenen seviyelerde tespit edilebileceği görülmüştür ancak deksametazon ve betametazonun ayrılması sağlanamadığından bu değişikliğe gitmeye gerek olmadığı düşünülmüştür.

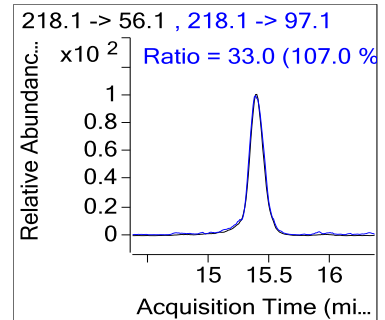
Asidik ekstraksiyonla yeterli düzeyde tespit edilemeyen maddeler ve çalışma aralığının genişletilmesi için 2011 yılında Garcia ve arkadaşları tarafından bazik şartlarda ekstraksiyon çalışması kullanılarak yapılan denemede Salbutamol, 3 OH Detomidin, Butarfanol, HEPS, Romifidin ve Ambroksol ilaç etkin maddelerinin pik alanları daha iyi olarak tespit edildiğinden bu maddeler içinde bazik şartların ekstraksiyon yöntemi kullanılarak analiz edilmesinin uygun olduğu görülmüştür (Şekil 30).



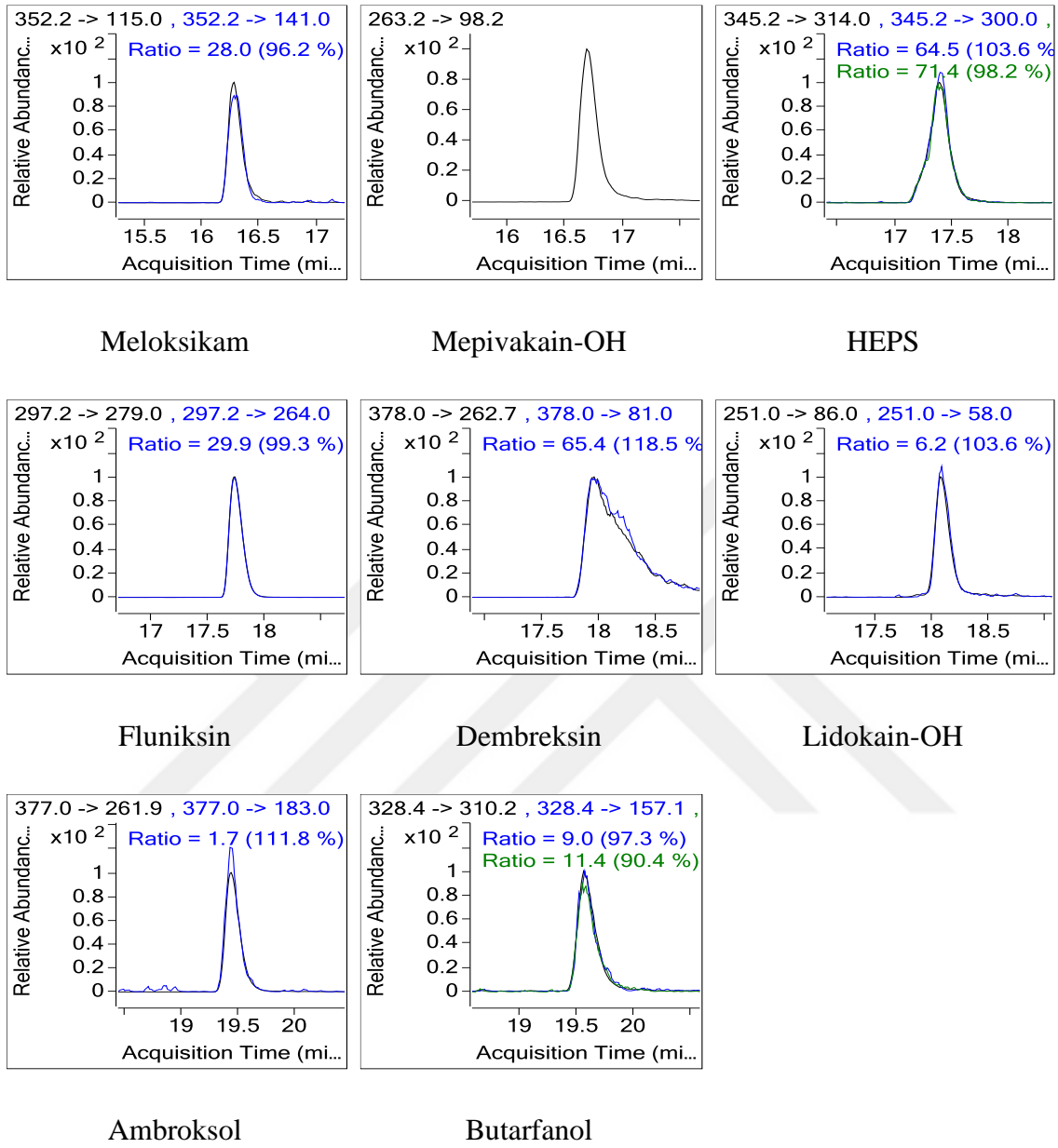
Salbutamol



Romifidin



4-MAA



Şekil 30. Bazik ekstraksiyon metodu sonuçları

Hem asidik hem bazik ekstraksiyon yapılarak vialde birleştirme yoluna gidilmiş ve asidik metotta kullanılan LC-MS/MS yöntemiyle analiz edilmiştir ancak hareketli faz ya da kolon gibi etkenler dolayısıyla asidik metotta tespit edilemeyen maddeler bu yolla tespit edilememiştir. Bu nedenle bazik metotla yapılan ekstraksiyon sonrasında farklı bir kolon ve metanol-su karışımı hareketli faz kullanılarak 2011 yılında Garcia ve arkadaşları tarafından çalışılan metot modifiye edilmiştir.

Böylece alınan idrar örneği enzimatik hidrolizden sonra asidik ve bazik metotta çalışılmak üzere ikiye ayrılıp farklı yöntemlerle analiz edilmiştir. Kullanılan metotlar için hidroliz, ekstraksiyon ve cihaz basamaklarında optimizasyon çalışmaları yapılmıştır.

6.3.2 Enzimatik hidroliz çalışmaları

Hidroliz edilmiş idrar örneğinde ilaç etkin maddelerin serbest hale geçmesini sağlamak için uygulanan bir yöntemdir. Bu aşamada glukronid ya da sülfat bağlı olan ilaç etkinleri beta glukronidaz ilavesi ve sıcakta inkübe edilerek serbest hale geçirilmeye çalışılır. Elimizde ilaç etkin maddelerin standartları mevcut olduğundan bu aşamada gerçekleşecek değişimleri tespit etmek olanaklı değildir. Bu basamakta yapılan uygulamaların optimizasyonu için parçalanması güç olan Morfin-3-glukronid örnek içerisine katılarak hidroliz basamağı optimize edilmiştir. Bunun yanında idrardaki tuzların çöktürülmesi için katı amonyum sülfat ve proteinlerin parçalanması içinde proteaz enzimi kullanılmıştır. Aşağıda sıralanan çalışmalar uygulanmıştır.

- Amonyumsülfatsız, 1 g amonyum sülfat, 2 g amonyum sülfat
- β -Glukronidazsız, 50 μ L, 100 μ L, 150 μ L ve 200 μ L ilave edilerek
- Proteazsız, 50 μ L, 100 μ L, 150 μ L ve 200 μ L ilave edilerek
- 55°C’de 60, 90 ve 120 dk bekletilerek

Elde edilen sonuçlara göre 1 g amonyum sülfat, 200 μ L proteaz, 150 μ L β -glukronidaz ekleyip 2,8 mL 1 M pH’sı 6 olan fosfat tampon 6 ilave edilip karışımın pH sı 6’ya (NaOH/HCl ilavesiyle) ayarlanıp 55°C’de 90 dk inkübe edildiğinde hidrolizin yeterli olduğu tespit edilmiştir.

6.3.3 Hidroliz sonrası idrar çalışması

Hidroliz basamağı tamamlandıktan sonra idrar asidik ve bazik ekstraksiyonların yapılması için bölünmüştür. Bölünürken alınacak miktarların belirlenmesi için sırasıyla

asidik metot için 5, 6, 7, 8 ve 9 mL bazik metot için 4, 5, 6, 7 ve 8 mL alınarak ekstrakte edilmiştir. Alınan miktara göre ilaç etkin maddeler için örnek miktarına göre pik alanları belirtilmiştir (Tablo 43,44).

Tablo 43. Asidik metot için ayrılacak örnek miktarı tespiti

	5,0 mL	6,0 mL	7,0 mL	8,0 mL	9,0 mL
Salbutamol	1 366	2 100	1 954	4 385	4248
Furosemid	741	3 702	911	3 734	17 107
Deksametazon	2 143	2 685	2 538	3 644	3 610
Betametazon	2 620	2 905	4 223	4 317	4 445
Triamsinolon Asetonid	6 302	5 904	7 452	7 014	6 544
Meloksikam	267 255	366 456	196 382	381 771	256 920
Fluniksin	530 216	3 151 139	447 218	3 884 549	4 560 068
Karprofen	16 036	17 782	11 208	15 896	11 414
Ambroksol	652 214	586 417	559 524	788 226	883 061
Ketoprofen	716 452	1 099 749	581 627	1 221 523	1 275 985
Diklofenak	48 203	82 377	34 199	74 777	59 121
Meklofenamik Asit	153 763	95 152	180 225	130 664	54 611
Romifidin	1 911	2 140	2 102	3 072	2 563
Dembreksin	157 118	548 621	294 994	871 457	951 238
4-Metilamino Antipirin	210 050	467 277	446 419	885 700	911 098
İpratropium	1 950	4 652	3 241	5 533	6 275
N-butilskopolamonyum	188 027	264 632	232 467	223 176	240 990
Butorfanol	125 699	151 134	135 113	185 770	182 340
Metokarbamol	1 121 873	1 710 233	1 445 923	2 106 771	2 211 418
Mepivakain-OH	211 874	530 232	372 119	859 717	818 646
Lidokain-OH	237 931	327 512	360 780	474 422	470 447
3 OH Detomidin	4 486	7 223	4 419	11 012	10 461
HEPS	11 621	13 197	12 806	15 393	22 805
Eltenak	10 158	20 910	6 498	18 434	15 532

Tablo 44. Bazik metot için ayrılacak örnek miktarı tespiti

	4,0 mL	5,0 mL	6,0 mL	7,0 mL	8,0 mL
Salbutamol	18 923	62 320	71572	86791	59386
Meloksikam	27 782	101 245	286 149	159806	125850
Fluniksin	13 801 685	22 950 768	25 134 128	26 443 648	22 776 510
Ambroksol	3 781 479	7 305 337	8782665	8 864 472	6 658 012
Meklofenamik Asit	25 789	41 483	36 388	39 501	36 713
Romifidin	8 054	19 551	16 637	20 132	15 806
Dembreksin	123 624	241 182	286 658	291 427	223 225

3 OH Detomidin	12 3561	220 821	247 617	253 158	197 999
4-Metilamino Antipirin	2 406 923	4 970 492	5 697 205	6 528 981	3 935 780
Butarfanol	294 248	751 776	892 086	1 266 384	1 124 461
Metokarbamol	3 174	7 424	8 729	6 113	6 297
Mepivacaine-OH	4 616 060	9 756 080	10 974 552	12 054 929	9 687 895
Lidokain-OH	2 738 311	6 112 573	7 245 419	8 168 064	6 531 141
HEPS	73 772	217 397	244 106	317 851	318 191

Elde edilen sonuçlara göre asidik metot için hidroliz sonrasında 8,0 mL bazik metot için ise 7,0 mL alındığında ilaç etkin maddelerin tespit edilebilir olduğu görülmüştür. Örnek miktarı arttırıldığında analitlerin responselarının artması beklenir ancak pik şekillerinin bozulması, yayılması ve tutunmanın artması gibi durumlar olduğundan seçilen miktarlar yeterli görülmüştür.

6.3.4 Ekstraksiyon öncesi pH ayarlama

Hidroliz basamağından sonra pH değeri değiştirilerek etkisi araştırılmıştır. Asidik metot için pH 6, 7 ve 8, bazik metot içinse 5, 6 ve 7'ye ayarlanarak ilaç etkin maddelerin alan değerleri karşılaştırılmıştır (Tablo 45,46).

Tablo 45. Asidik metot pH çalışması

	pH 6	pH 7	pH 8
Salbutamol	7 571	6 087	5 248
Furosemid	8 597	301	698
Deksametazon	820	789	2 206
Betametazon	1 095	1 045	2 464
Triamsinolon Asetonid	4 660	7 881	5 626
Meloksikam	225 028	324 434	392 489
Fluniksin	5 441 609	4 980 273	4 196 612
Karprofen	7 413	11 980	8 653
Ambroksol	1 432 971	1 119 011	1 316 300
Ketoprofen	566 831	306 925	829 427
Diklofenak	80 701	141 251	105 372
Meklofenamik Asit	51 813	336 895	93 378
Romifidin	1 036	1 636	3 369
Dembreksin	515 318	553 746	662 445
4-Metilamino Antipirin	1 017 831	1 775 738	1 037 302
İpratropium	1 834	1 721	2 798
N-butilskopolamonyum	216 449	76 140	415 677

Butorfanol	126 495	129 160	108 845
Metokarbamol	602 871	492 519	1 326 648
Mepivakain-OH	124 982	182 080	903 119
Lidokain-OH	87 821	218 229	755 735
3 OH Detomidin	2 115	910	8 483
HEPS	12 967	7 258	40 157
Eltenak	17 226	21 991	20 978

Tablo 46. Bazik metot pH çalışması

	pH 5	pH 6	pH 7
Salbutamol	74 077	81 774	95 726
Meloksikam	88 818	302 328	72 624
Fluniksin	24 696 773	27 268 910	25 408 501
Ambroksol	7 594 723	11 021 480	12 179 895
Meklofenamik Asit	65 308	44 447	26 508
Romifidin	14 751	18 425	20 099
Dembreksin	281 010	408 131	442 935
3 OH Detomidin	230 356	246 429	236 735
4-Metilamino Antipirin	7 119 087	5 452 135	6 498 015
Butarfanol	639 728	1 169 118	1 497 930
Metokarbamol	7 582	6 821	11 655
Mepivacaine-OH	10 752 870	12 035 183	12 700 041
Lidokain-OH	7388759	8140877	8721251
HEPS	268254	367872	491180

Tablo 45'deki sonuçlar incelendiğinde asidik metot için uygulanması gereken pH değerinin 8 olduğu açık bir şekilde görülmektedir. pH 7'de 4-MAA ve Meklofenamik asit çok daha iyi tespit edilebilmiştir ancak diğer ilaç etkin maddeler özellikle limit değeri düşük olan deksametazon ve betametazon pH 8'de tespit edildiğinden ekstraksiyondan önce pH fosfat tampon ve NaOH ilavesiyle 8'e ayarlanmıştır.

Bazik metotla yapılan çalışma değerlendirildiğinde (Tablo 46) pH 7'de daha yüksek alan değerleri elde edildiği ancak değerler arasında çok önemli farklar olmadığından hidroliz sonrasında tekrar bir pH ayarlama basamağına ihtiyaç duyulmaması için pH 6'da çalışılmaya devam edilmiştir.

6.3.5 Asidik metot optimizasyon çalışmaları

Asidik metodun ekstraksiyon ve cihaz analiz basamaklarında bazı değişiklikler yapılarak etkileri incelenmiştir.

- Ekstraksiyon basamağında elüsyon çözeltisinde kullanılan 99:1 diklorometan/etanol oranı 50:50 olacak şekilde değiştirilmiş ancak alınan elüsyon kirli olduğundan ve cihazda olası çıkarabileceği sıkıntılardan dolayı bu oran değiştirilmemiştir.
- Elüsyon çözeltisi 3,0 mL yerine 6,0 mL ilave edilip geri kazanımın artırılabilirliği düşünülerek analiz edilmiştir. Ancak anlamlı bir etkisi görülmediğinden 3,0 mL ile elüsyon alınmaya devam edilmiştir.
- Cihaz analiz basamağında 0,3 mL/dk ile 0,4 mL/dk akış uygulandığı zaman oluşabilecek farklılıklar denenmiş ve 0,3 mL/dk'lık akışın maddelerin çoğu için daha etkin bir ayrılma sağladığı gözlenmiştir.
- Kolon sıcaklığındaki değişikliğin etkisinin tespiti için kolon sıcaklığı 30°C, 35°C ve 40°C'ye ayarlanarak aynı örnek analiz edilmiştir. Sonuçlar arasında belirgin farklılıklar gözlenmezken 35°C'de ve 40°C'de birbirine oldukça yakın değerler elde edilmiş bu nedenle kolon sıcaklığında herhangi bir değişiklik yapılmamıştır.

6.3.6 Bazik metot optimizasyon çalışmaları

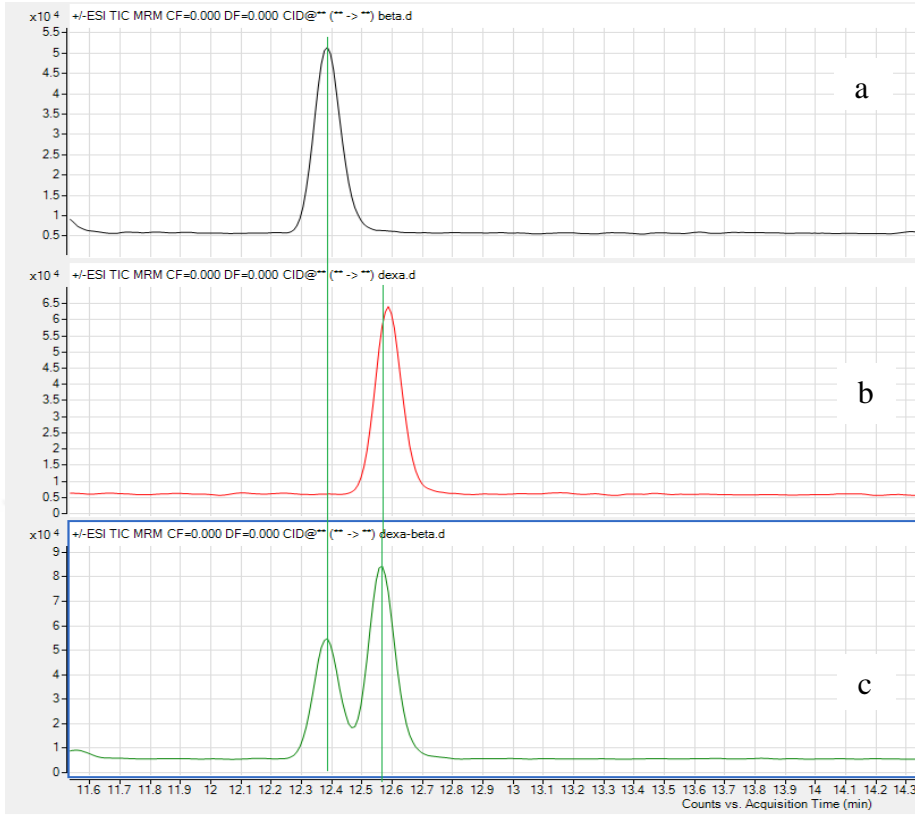
2011 yılında Garcia ve arkadaşları tarafından çalışılmış olan ekstraksiyon ve cihaz metodunda değişiklikler yapılarak asidik metotla tespit edilemeyen maddelerin tespiti sağlanmış ve yeni bir metot geliştirilmiştir.

- Hareketli fazda metanol-su+%0,1 formik asit yerine, 2006 yılında Popot ve arkadaşları tarafından uygulanan Metanol-pH 9, 5 mM amonyum bikarbonat tamponu ve kolon kullanılmıştır. Tespit edilmesi gereken maddeler için dereceli elüsyonda değişiklikler yapılarak çalışılmış ve en uygun dereceli elüsyon belirlenmiştir (Tablo 18, 19).

- Ekstraksiyon basamağında yıkama aşamasında 3,0 mL 1 M asetik asit ve 5,5 mL metanol yerine 6,0 mL Asetik asit ve 8,0 mL metanol geçirilerek yıkama etkisi belirlenmeye çalışılmıştır. Sonuçlar değerlendirildiğinde değerlerin birbirine oldukça yakın olduğu görüldüğünden yıkama çözücü miktarlarının artırılmasına ihtiyaç duyulmamıştır.
- Elüsyon çözeltisi olarak diklorometan/izopropilalkol/amonyum çözeltisi (78:20:2) (UCT, 2012) ile elüsyon yapılarak etkisi değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar birbirine yakın olarak bulunduğu için elüsyon çözeltisi değiştirilmemiştir.

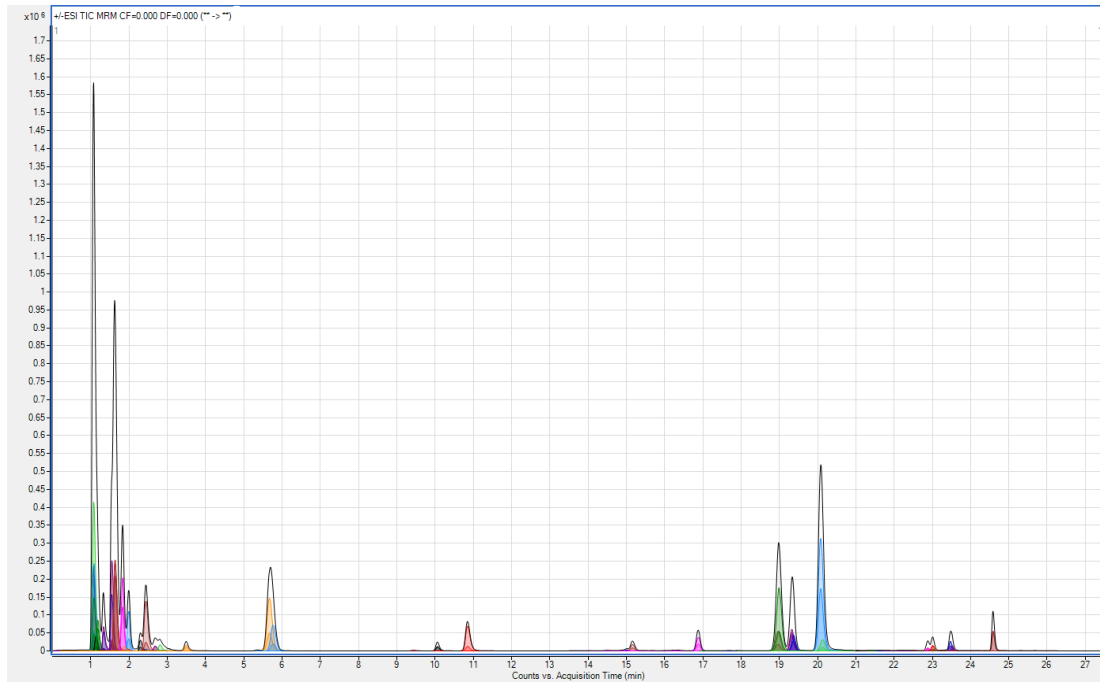
6.4. Deksametazon ve Betametazon Epimerlerinin Ayrılması

Deksametazon ve betametazon birbirinin epimeri olan aynı özelliklere sahip ilaç etkinlerdir. Bu özellikteki maddelerin birbirinden ayrılabilmesi için yapılan literatür çalışmalarında tutunma zamanından, iyon oranlarından ve farklı özellikte kolonlar kullanılarak ayrılma sağlanmıştır. Yapılan çalışmada dereceli elüsyonun etkisiyle maddeler birbirinden ayrılmıştır ve bir arada bulunduğu çift pik vermektedirler. Hangi pikin hangi ilaç etkin maddeye ait olduğunun tespiti için deksametazon ve betametazon standardı önce tek tek sonra birarada örneğe katılarak analiz edilmiştir (Şekil 31).

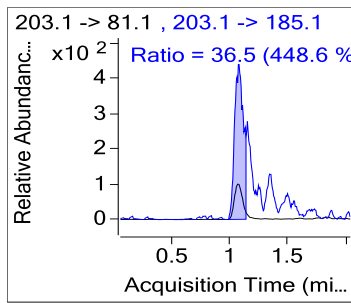


Şekil 31. Deksametazon ve betametazon ayrılması a) betametazon katkıli örnek, b) deksametazon katkıli örnek, c) deksametazon ve betametazon katkıli örnek kromatogramı

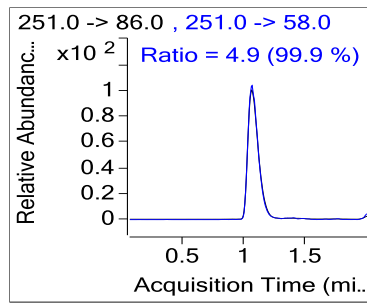
Optimizasyon çalışmaları tamamlandıktan sonra boş bir idrar örneğine ISL'ne tekabül edecek katkı yapıldıktan sonra nihai yöntemle analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar her iki metot için aşağıdaki şekillerde elde edilmiştir (Şekil 32, 33, 34).



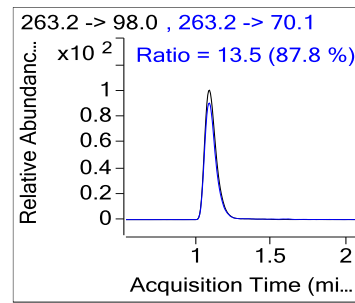
Şekil 32. Asidik metot DMRM toplam iyon kromatogramı



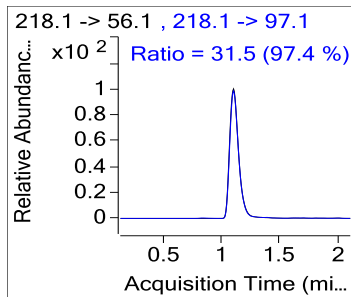
3 OH Detomidin



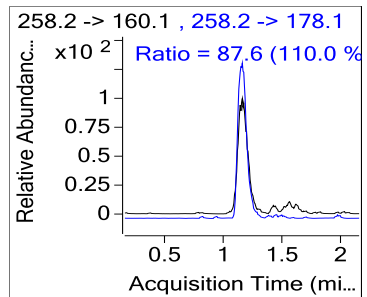
3 OH Lidokain



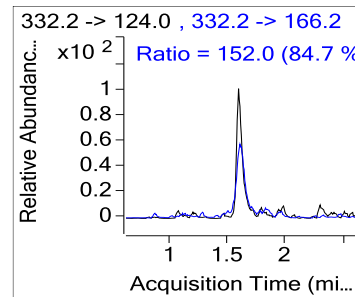
3 OH Mepivakain



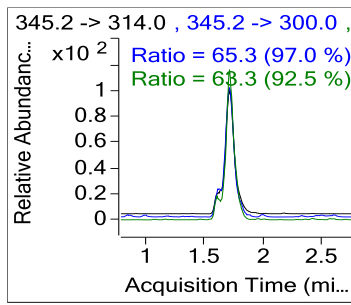
4-MAA



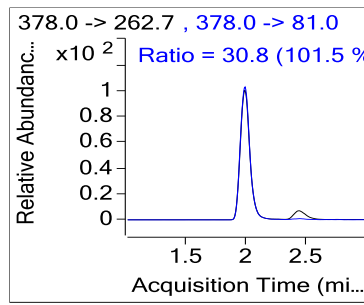
Romifidin



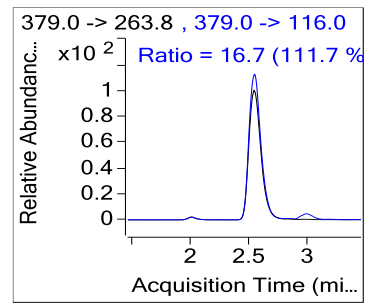
Ipratropium



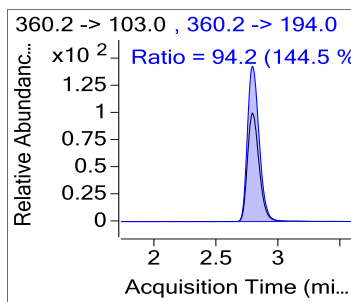
HEPS



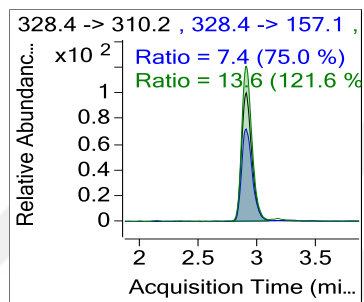
Dembreksin



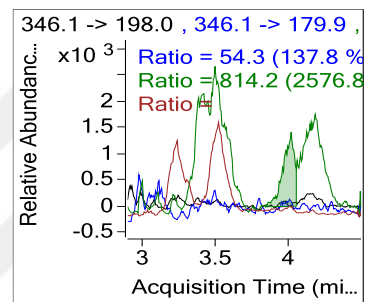
Ambroksol



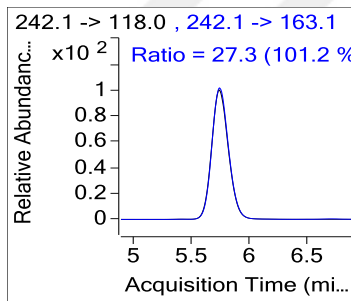
N-butylskopolamonyum



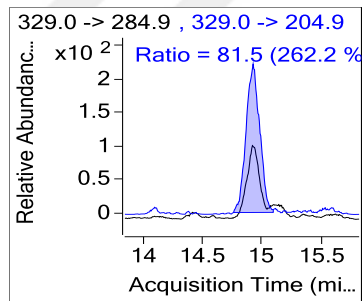
Butarfanol



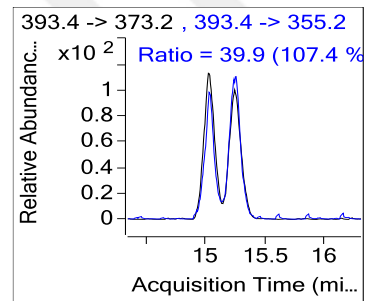
Omeprazol



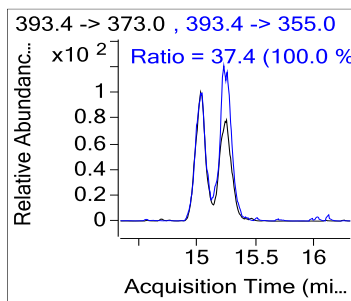
Metokarbamol



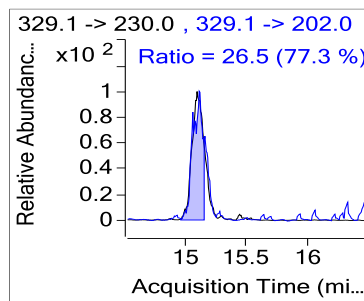
Furosemid



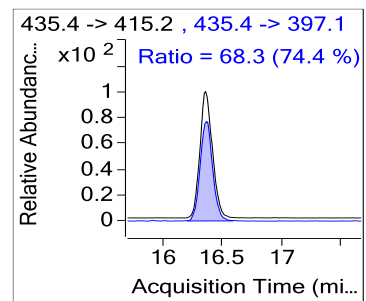
Deksametazon



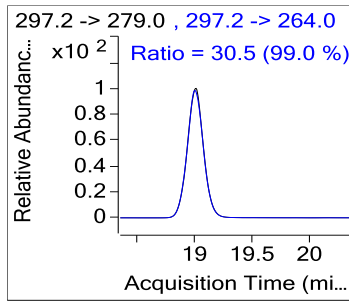
Betametazon



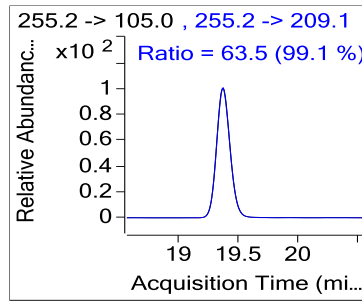
5-OH Dantrolen



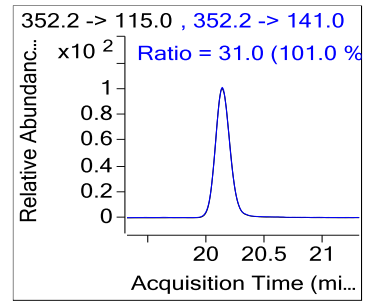
Triamsinolon Asetonid



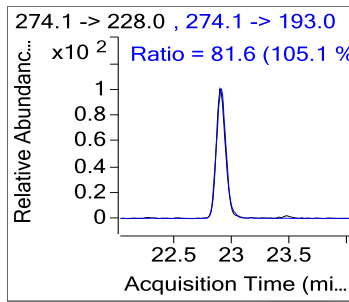
Fluniksın



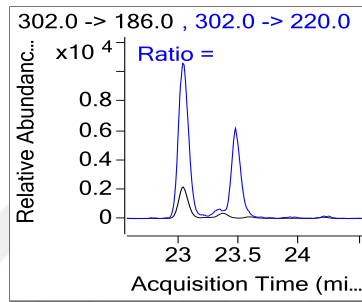
Ketoprofen



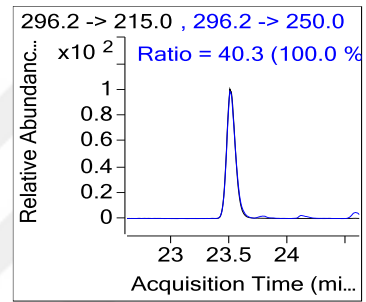
Meloksikam



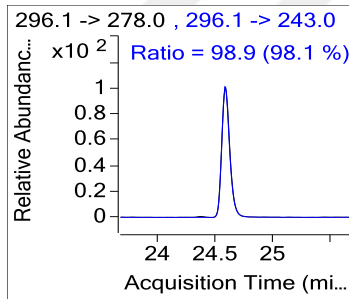
Karprofen



Eltenak

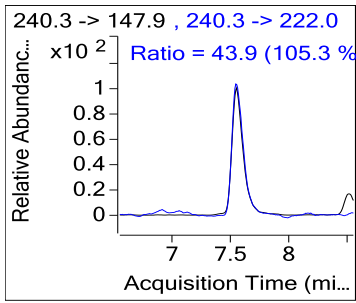


Diklofenak

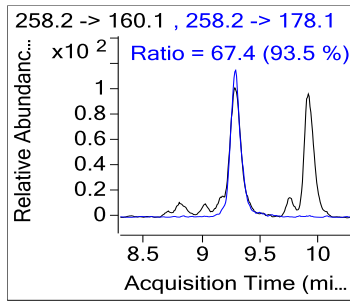


Meklofenamik asit

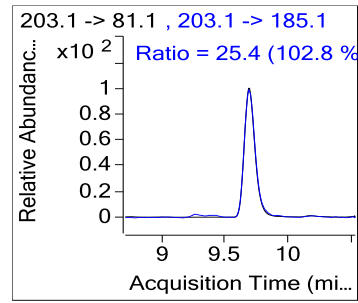
Şekil 33. İdrar örneğine ISL'e eşdeğer katkı yapıp asidik metotla LC-MS/MS'de analiz edildiğinde elde edilen pikler ve iyon oranları



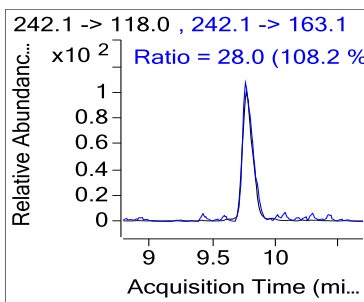
Salbutamol



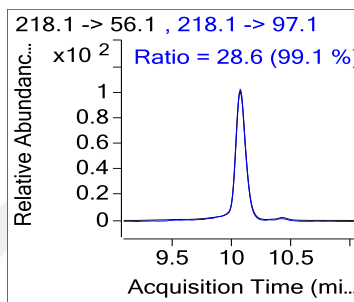
Romifidin



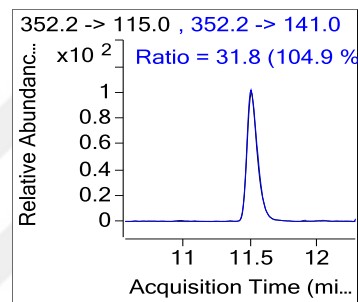
3 OH Detomidin



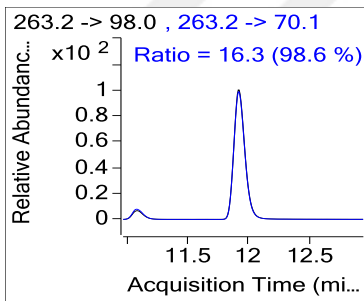
Metokarbamol



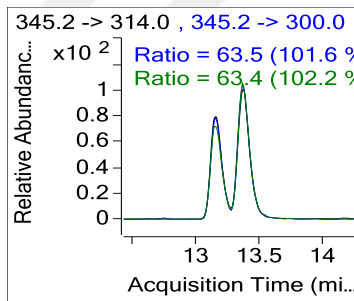
4-MAA



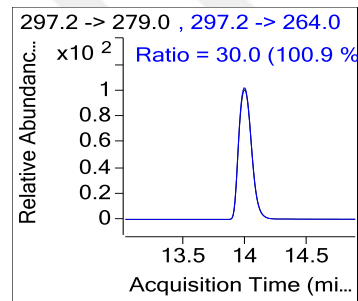
Meloksikam



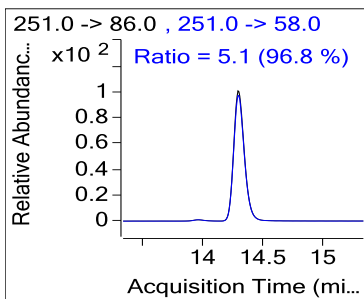
3 OH Mepivakain



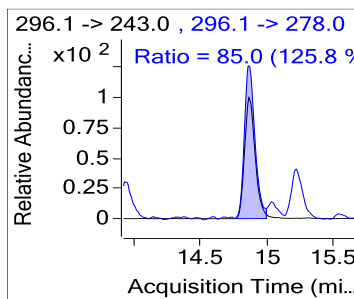
HEPS



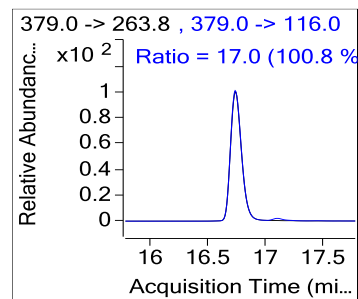
Fluniksinn



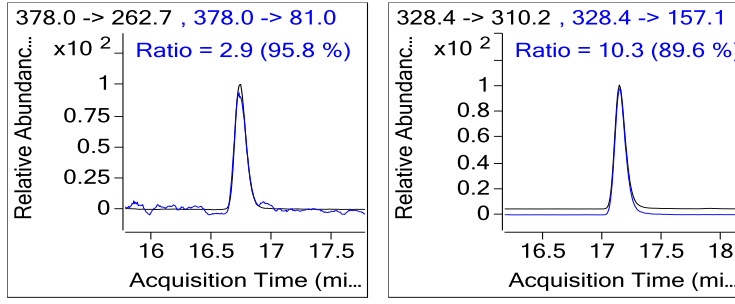
3 OH Lidokain



Meklofenamik asit



Ambroksol



Dembreksin

Butorfanol

Şekil 34. İdrar örneğine ISL'e eşdeğer katkı yapıp bazik metotla LC-MS/MS'de analiz edildiğinde elde edilen pikler ve iyon oranları

5-OH Dantrolen ve Omeprazol hidroliz edilmemiş idrar için limitli olan maddeler olduğundan bu maddelerin tespitinde idrarın hidrolize tabii olmaması gerekmektedir çünkü daha önceki çalışmalarda bu maddelerin enzimatik hidrolizle çözündüğü tespit edilmiştir (Wong ve ark., 2011). Bu nedenle bu maddeler için çalışma yapılırken hidroliz edilmemiş idrar kullanılması gerekmektedir. Hidroliz edilmiş idrarda bu maddeler tespit edilememiştir ancak aynı metotlarla enzimatik hidroliz işlemi uygulanmadan yapılan çalışmayla tespit edilebilmişlerdir. Ancak validasyonda hidroliz işlemi uygulandığından bu maddeler validasyonun dışında tutulmuştur.

Furosemid standardı cihazda asidik metot şartlarında tespit edilebilir olmasına rağmen hidroliz basamağında yıkımlanmaya uğradığı için tespit edilememiştir. Hidrolizde yıkımlandığını tespit etmek amacıyla hidrolizin uygulanmadığı sıvı-sıvı ekstraksiyon metoduyla analiz edilmiş ve asidik metot şartlarında cihaza enjekte edildiğinde tespit edilebilmiştir.

İpratrapium ve N-butilskopolamonyum asidik metotta düşükte olsa sinyal verdiği için analiz edilebilmektedir ancak validasyonda gerekli kriterleri sağlayamadığı için valide edilememiştir. İpratrapium ve N-butilskopolamonyum kuaterner amonyum grubu içeren bir yapıya sahiptir, pKa değerleri 12'nin üzerindedir ve asidik metotta kullanılan kolonda fazla tutunmamaktadır. Dolayısıyla bu maddelerin analizi için başka bir yönteme ihtiyaç olduğu açıktır.

Naproksen Fenilbutazon ve Vedaprofen sadece GC-MS'te türevlendirilerek tespit edilebilmektedirler. Meklofenamik asit asidik metottada tespit edilebilir olmasına rağmen validasyon kriterleri sağlanamamıştır.

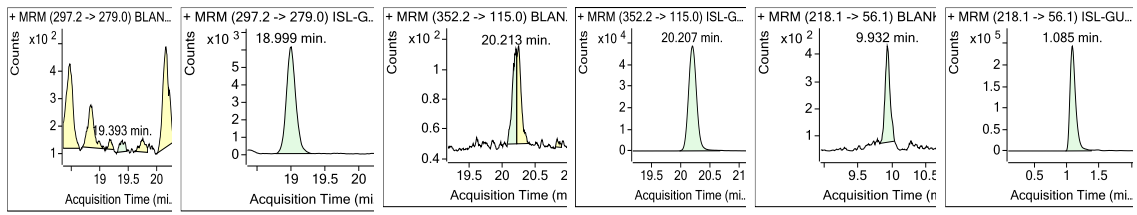
Fluniksin ve Ketoprofen uygulanan her üç metottada tespit edilebilmektedir. Ancak validasyonları Karprofen, Diklofenak ve Eltenak'ta olduğu gibi asidik ve NSAID metotla yapılmıştır.

6.5. LC-MS/MS Metotları Validasyon Çalışması

Fluniksin Meloksikam, 4-MAA, Triamsinolon, Betametazon, OH-Lidokain, OH-Mepivakain, Dembreksin, Ketoprofen, Diklofenak, Karprofen, Deksametazon Metokarbamol ve Eltenak'ın validasyonu asidik metot; Ambroksol, HEPS, OH-Detomidin, Salbutamol ve Romifidin'in validasyonu ise bazik metot kullanılarak yapılmıştır.

6.5.1 Spesifiklik-seçicilik

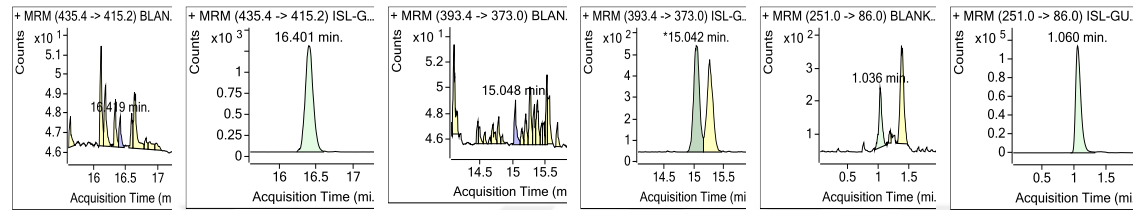
Metodun seçiciliğinin ve spesifikliğinin kontrolü için örnek içerisinde farklı özelliklerde ilaç etkin maddeler (niflumik asit, tolfenamik asit, antiprin, etodolak, flufenamik asit, ibuprofen, ketorolak, mefenamik asit, nabumeton, nimesulid, bufeksamak, prednisolon, alprazolam, fenobarbital, budesonit, kafein, klorsilazin, cimbuterol, dermorfin, diazepam, edrafonyum, fenspirid, kortisol, metandriliol, morfin, ketorolak) eklenerek birlikte analiz edilmiştir. Yapılan analiz sonucunda diğer maddelerin herhangi bir girişim etkisi yapmadığı tespit edilmiştir. İkinci olarak 20 farklı ata ait blank örnek analiz edilmiş ve analizi yapılan maddelerin alıkonma zamanında tespitine engel olabilecek herhangi bir eşleşme görülmemiştir (Şekil 35).



Flunixin

Meloxicam

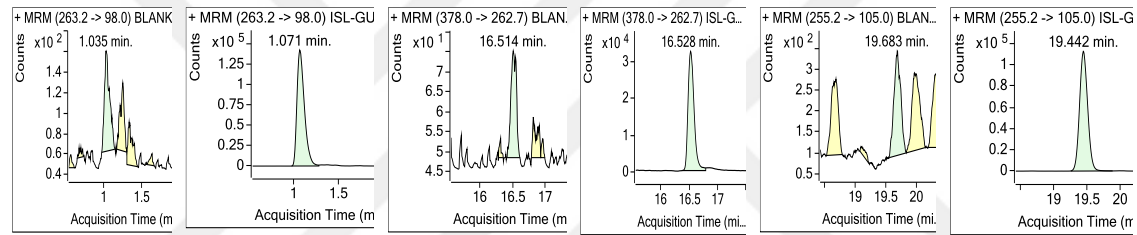
4-MAA



Triamsinolon

Betametazon

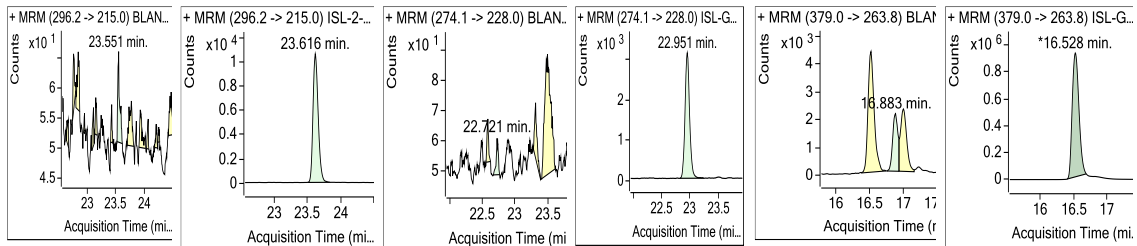
Lidokain OH



Mepivakain OH

Dembreksin

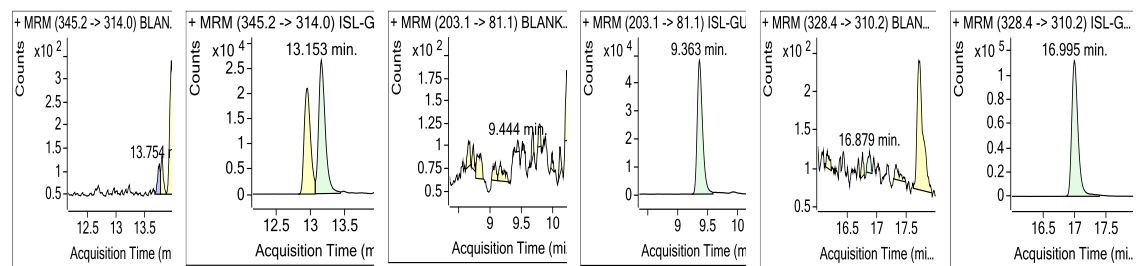
Ketoprofen



Diklofenak

Karprofen

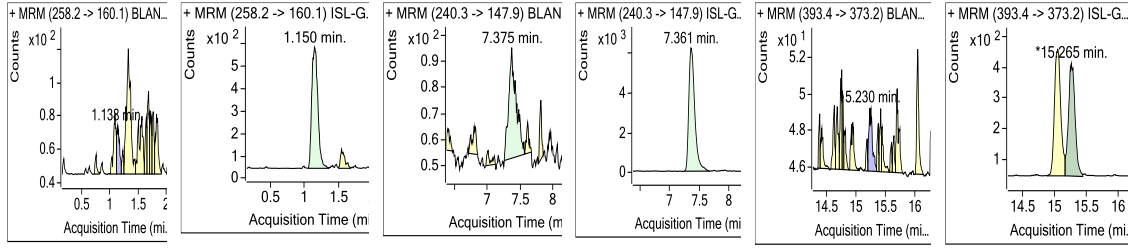
Ambroksol



HEPS

OH Detomidin

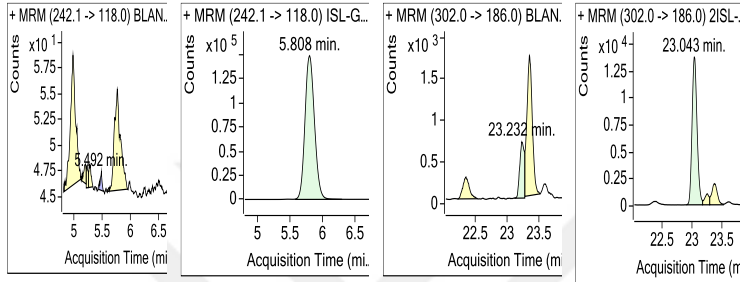
Butorfanol



Romifidin

Salbutamol

Deksametazon



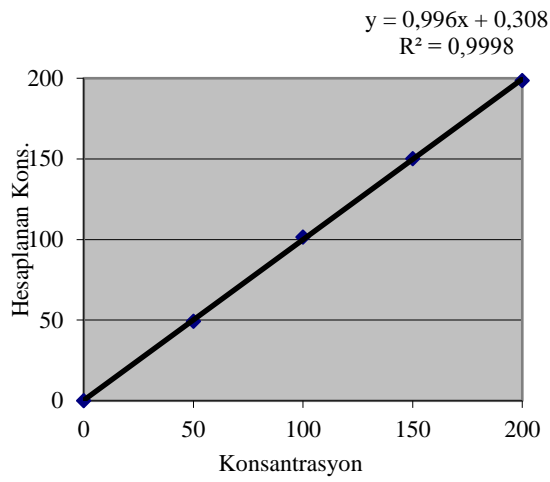
Metokarbamol

Eltenak

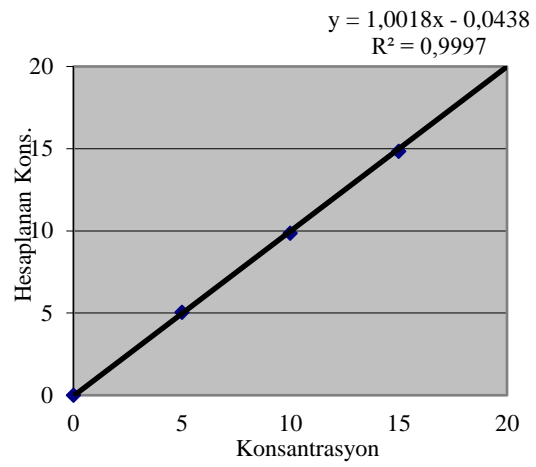
Şekil 35. Asidik ve bazik metot kullanılarak blank örnek ile katkı yapılmış örneğin karşılaştırılması

6.5.2 Doğrusallık

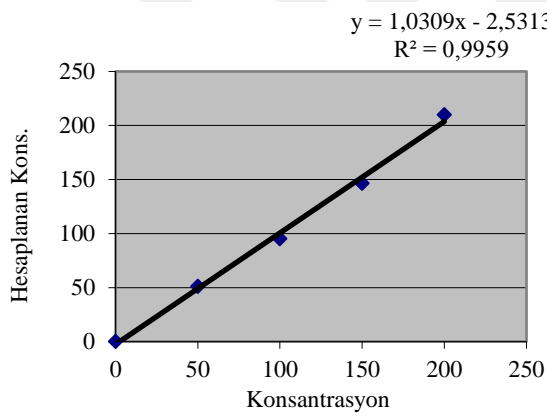
Lineer ölçüm aralığını belirlemek için blank ve dört farklı konsantrasyonda (0,5xISL, ISL, 1,5xISL, 2xISL) 6'şar örneğe katkı yapılarak enjeksiyon yapılmıştır. Sonuçlar katkı yapılan örneklerden elde edilen linearite kullanılarak hesaplanmıştır (Şekil 36).



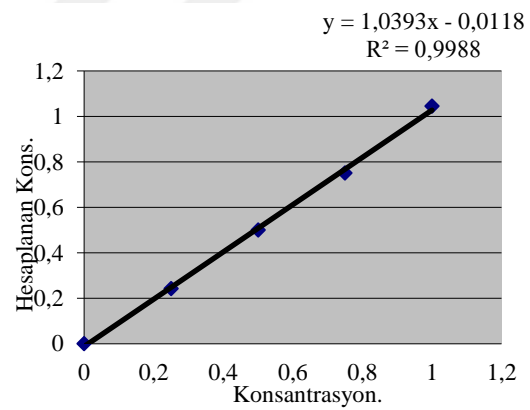
Flunixin



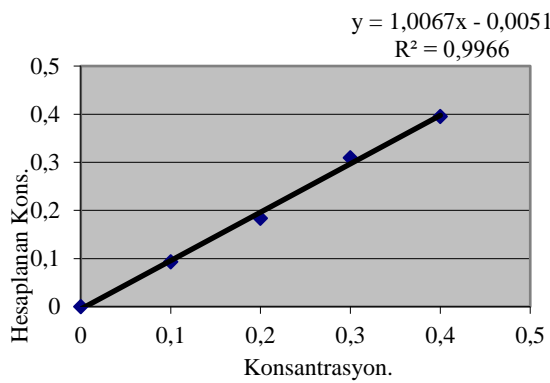
Meloksikam



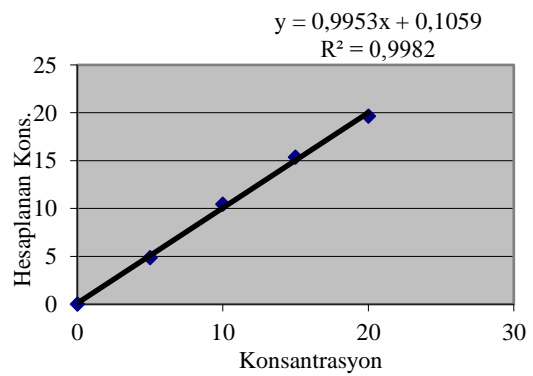
4-MAA



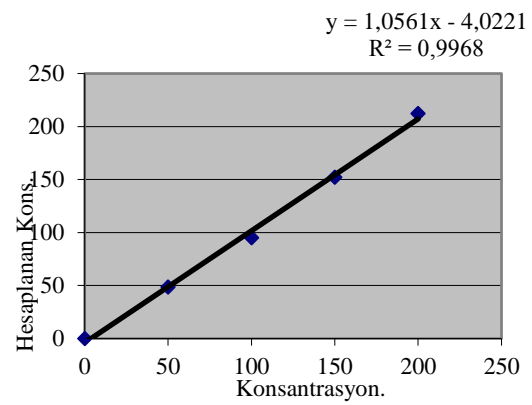
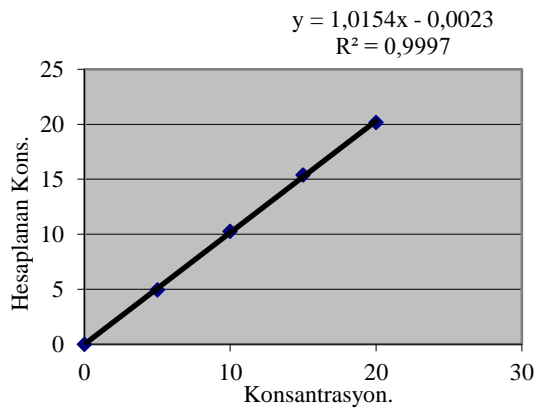
Triamsinolon Asetonid



Betametazon

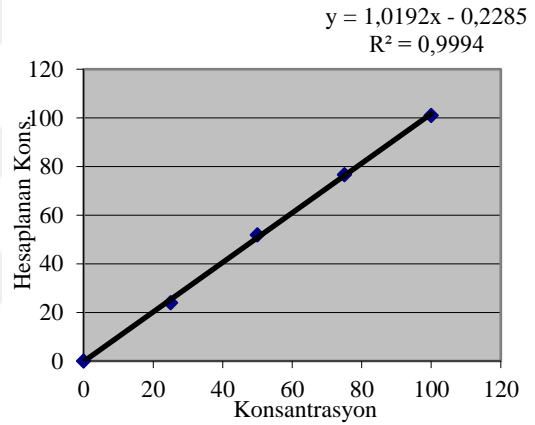
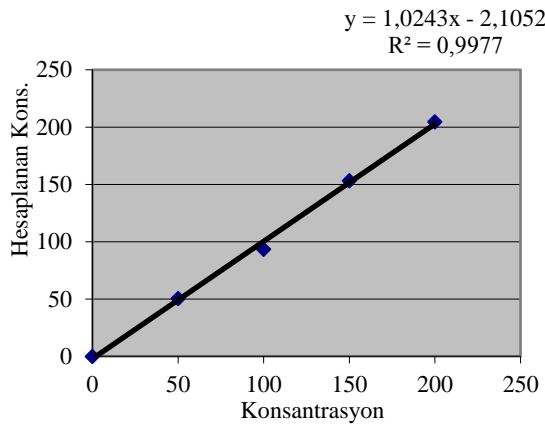


Lidokain OH



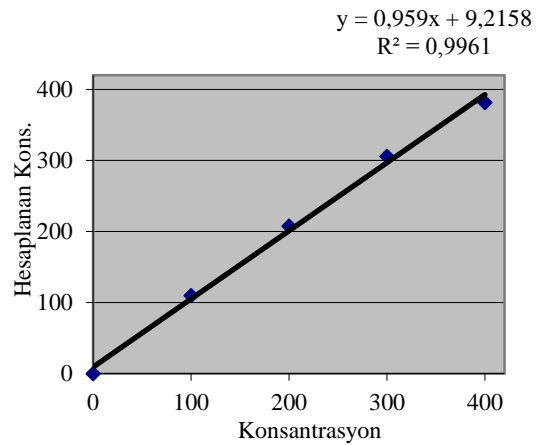
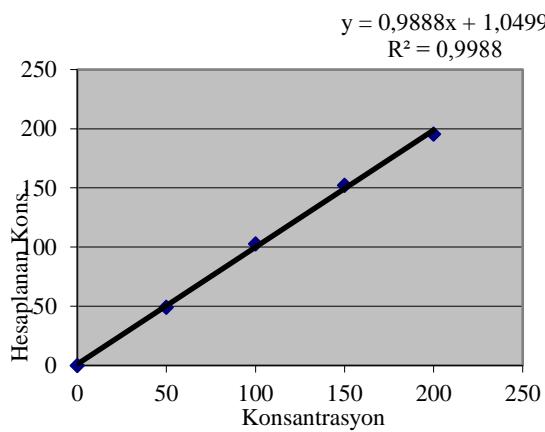
Mepivakain OH

Dembreksin



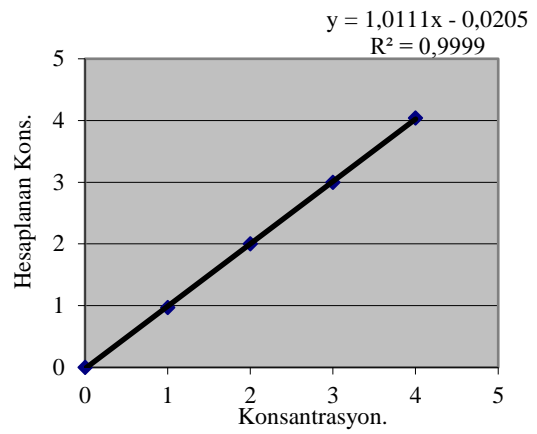
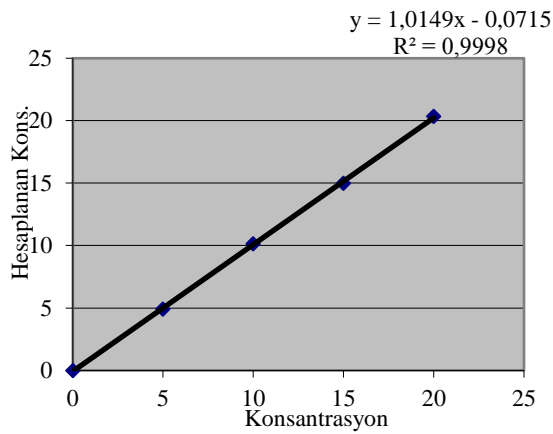
Ketoprofen

Diklofenak



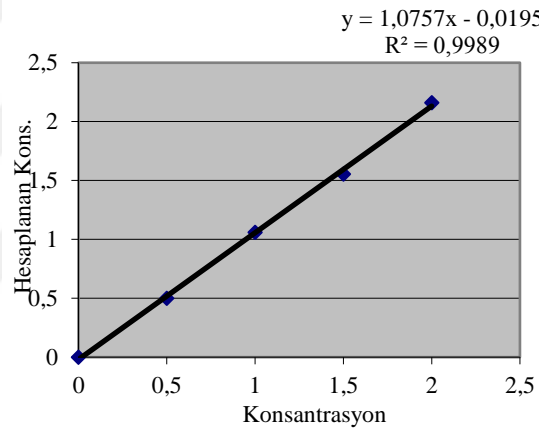
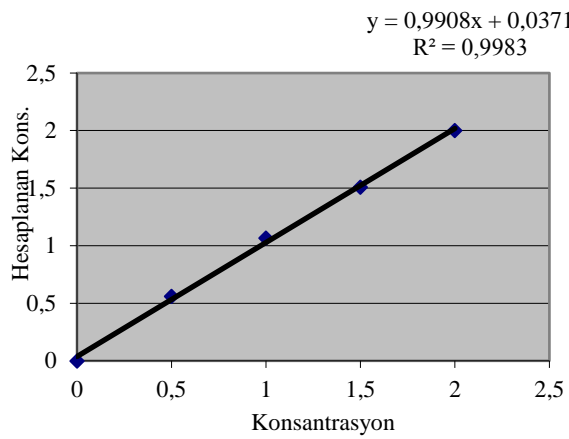
Karprofen

Ambroksol



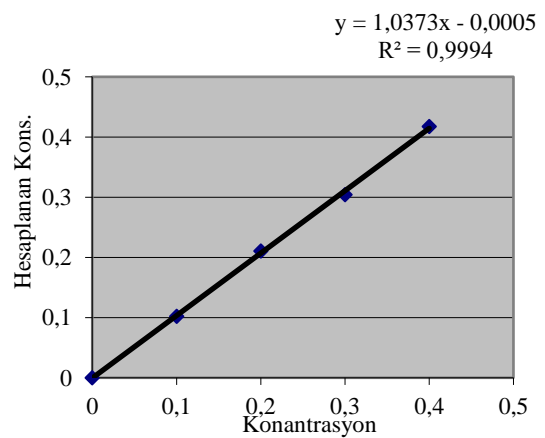
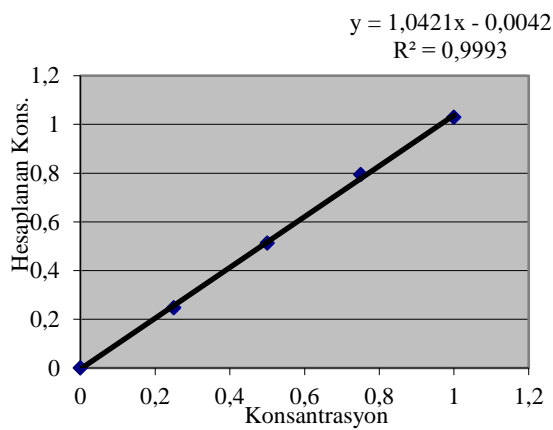
HEPS

Detomidin OH



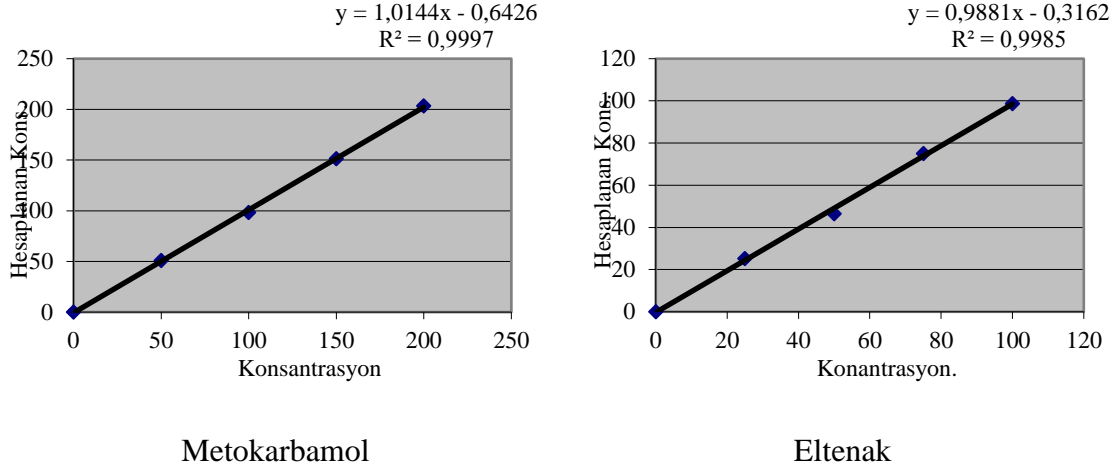
Butorfanol

Romifidin



Salbutamol

Deksametazon



Şekil 36. LC-MS/MS ile analiz edilen ilaç etkin maddelerinin linearite eğrileri

Doğrusallık eğrileri incelendiğinde korelasyon katsayılarının çalışılan bütün maddeler için 0,9959 ve üzerinde olduğu görülmüştür (Şekil 36).

6.5.3 Doğruluk ve geri kazanım

Geri kazanım limit değerinin 0,5xISL, ISL, 1,5xISL ve 2xISL oranında boş olduğu bilinen idrar örneğine katkı yapılarak 3 gün 6 paralel olarak yapılan çalışma sonucunda hesaplanan geri kazanım değerleri $\pm \%10$ ' luk hedef değer içerisinde olduğu görülmüştür (Tablo 53).

6.5.4 Tekrarlanabilirlik

Tekrarlanabilirlik limit değerinin 0,5xISL, ISL, 1,5xISL ve 2xISL oranında boş olduğu bilinen idrar örneğine aynı kişi tarafından aynı şartlarda katkı yapılarak 3 gün 6 paralel olarak yapılan çalışma sonucunda elde edilmiştir. Katkı yapılan örneklerin ortalama konsantrasyonları, standart sapmaları ve sapma katsayıları (%) her seviye için hesaplanmıştır (Tablo 53).

6.5.5 Laboratuvar içi tekrar üretilebilirlik

Laboratuvar içi tekrarüretilebilirlik, farklı analist ve farklı sıcaklık koşullarında limit değerinin 0,5xISL, ISL ve 1,5xISL oranında boş olduğu bilinen idrar örneğine katkı yapılarak 6 paralel çalışma yapılarak standart sapması (SD_{wLR}) ve varyasyon katsayısı (CV) hesaplanarak elde edilmiştir. Elde edilen değerler 2002/657/EC direktifine göre belirlenmiş olan kriterleri sağlamaktadır (Tablo 3).

6.5.6 Kesinlik

3 gün 3 seviye (0,5xISL, ISL, 1,5xISL ve 2xISL) 6 paralel olacak şekilde yapılan çalışma sonuçlarından gün içi ve günler arası kesinlik değerleri %CV olarak hesaplandığında kriterlere uygun olduğu görülmüştür (Tablo 4). Özellikle iç standardı kendisinin döteryumlu hali olan maddeler için %CV değerlerinin ve standart sapmalarının oldukça düşük olduğu belirgin şekilde görülmektedir (Tablo 53).

6.5.7 Karar limiti (CC_{α}) ve tespit yeteneği (CC_{β})

ISL seviyesinde farklı günlerde farklı boş örneklere katkı yapılarak 24 ayrı çalışma gerçekleştirilmiş, CC_{α} ve CC_{β} değerleri aşağıdaki formüle göre hesaplanarak Tablo 49'da belirtilmiştir.

$$CC_{\alpha} = C_{ort} + 1,64 * SD$$

$$CC_{\beta} = CC_{\alpha} + 1,64 * SD$$

Hesaplanan bu değerler için değeri CC_{α} 'nın altında tespit edilen örneklerde sonuç negatif üzerinde tespit edilen örnekler içinse sonuç pozitifdir.

6.5.8 Sağlamlık (minör değişiklikler)

Numune hazırlama aşamasında ölçüm sonuçlarını etkileyebilecek faktörler asidik ve bazik metot için aşağıdaki tablolarda belirlenmiştir. Her değiştirilen etken için 3'er adet numune hazırlanmış ve 2^7 yani 128 etki farklı olası kombinasyonun etkisi değerlendirilmiştir. Her bir değişken etken için ayrı ayrı etkiler hesaplanmıştır (Tablo 47, 48).

Tablo 47. Asidik metot sağlamlık testi etki faktörleri

Asidik Metot Faktör	+	-
A- Beta glukuronidaz miktarı	150 µL	50 µL
B- Enzimatik hidroliz sıcaklığı	55°C	70°C
C- Enzimatik hidroliz süresi	90 dk	30 dk
D- Ekstraksiyon numune pH'sı	8	6
E- Ekstaksiyon yıkama miktarı	Su 6,0 mL+Hekzan 8,0 mL	Su 3,0 mL+Hekzan 4,0 mL
F- Elüsyon çözeltisi miktarı	3,0 mL	6,0 mL
G- Cihaz kolon sıcaklığı	35°C	40°C

Tablo 48. Bazik metot sağlamlık testi etki faktörleri

Bazik Metot Faktör	+	-
A-Beta glukuronidaz miktarı	150 µL	50 µL
B- Enzimatik hidroliz sıcaklığı	55°C	70°C
C- Enzimatik hidroliz süresi	90 dk	30 dk
D- Ekstraksiyon pH sı	6	8
E- Elüsyon çözeltisi miktarı	10,0 mL	5,0 mL
F- Elüsyon solüsyonu farkı	Etil asetat/amonyum Diklorometan/IPA/Amonyum 97:3	50:17,8:2,2
G- Cihaz enjeksiyon miktarı	5 µL	10 µL

Tablo 49. Asidik metot sağlamlık etki tablosu

	FLU	MEL	4-MAATRI	BET	LIDOHMEPOH	DEM	KET	DİK	KAR	DEK	MKB	ELT	ROM
A- β-glu miktarı	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+
B- Enz. Hid. Sic.	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+
C- Enz. Hid. Süre.	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+
D- pH	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+
E- Eks. Yık. mik.	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+
F- Elüs. çöz. hacmi	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
G- Kolon sic.	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+

Tablo 49'a bakıldığında asidik metotla yapılan sağlamlık çalışması sonucunda benzer yapıya ve etkiye sahip olan betametazon, deksametazon ve triamsinolonun sağlamlık testinden aynı şekilde etkilendiği görülmüştür. Romifidin ve Dembreksin'in pH 6'ya ayarlanıp analiz edildiğinde olumsuz etkilendiği ve bu ilaç etkin için pH'nın sağlamlığı etkilediği açıktır. Ayrıca Romifidin'de hidroliz sıcaklığındaki artış sonuçlarda kararsızlık oluşturmuştur. Lidokain OH enzimatik hidroliz süresinin artışından olumsuz etkilenmiştir. Ayrıca pH 6'da yapılan çalışmada analiz sonuçlarını negatif olarak etkilemiştir. Genel olarak sonuçlar metodun sağlamlığını ortaya koymaktadır.

Tablo 50. Bazik metot sağlamlık etki tablosu

	AMB	HEPS	DET-OH	BUT	SAL
A-Beta glukuronidaz miktarı	-	-	+	+	+
B- Enzimatik hidroliz sıcaklığı	-	-	-	+	+
C- Enzimatik hidroliz süresi	-	-	+	+	+
D- Ekstraksiyon pH sı	-	-	-	+	+
E- Elüsyon çözeltisi miktarı	-	-	-	+	+
F- Elüsyon solüsyonu farkı	-	-	+	+	+
G- Cihaz enjeksiyon miktarı	-	-	+	+	+

Bazik metodun etkileri incelendiğinde sadece Ambroksol'un değişen şartlardan etkilenmediği görülmüştür. OH Detomidin'i β -Glukronidaz miktarının azalması olumsuz etki olduğu görülürken, hidroliz süresi, farklı elüsyon çözeltisi ve enjeksiyon miktarı etkili gözükmesine rağmen konsantrasyonda önemli değişikliklere neden olmamıştır. Salbutamol, romifidin ve butarfanol'ü etkileyen en önemli faktör ise pH'dır. Bu ilaç etkinleri için pH değerinin artması olumlu etki oluşturmuştur. Sonuçların tamamı incelendiğinde ufak etkenler dışında metodun sağlam olduğu görülmüştür (Tablo 50).

6.5.9 Stabilité

LC-MS/MS kullanılarak analiz edilen ilaç etkinlerin standartlarından bazıları bitmiştir. Bu nedenle metodun stabilite çalışması biten ilaç etkinlerin standartları yeniden temin edildiğinde yapılabilecektir.

Ancak söz konusu ilaç etkin maddelerden bazıları at kanında asidik metodun cihaz şartları kullanılarak analiz edilmiştir ve dolayısıyla stabilitesi için tahmini bilgiler verebilecektir. Yapılan bu önceki çalışmada kanda limit seviyesi olan Meloksikam, fluniksin, karprofen, asepromazin, lidokain, dembreksin, mepivakain, n-butilskopolamonyum ve butarfanol için çalışma çözeltisinde ve matrikste 2002/657/EC direktifinde belirtildiği şekilde planlanarak +4°C, -20°C, +20°C ışıktaki ve karanlıkta olmak üzere stabilite çalışması yapılmıştır. Yapılan çalışmaya göre ilaç etkin maddeler çalışma çözeltisinde -20°C’de stabildir. Ancak +20°C ışıktaki ve karanlıkta sapmalar meydana gelmiştir. Matriks içerisinde ise yine +20°C’de kısa sürede bozunmalar olmuştur. Örneklerin kısa sürede ve hızlıca analiz edilmesi gerektiği görülmüştür.

6.5.10 AORC kriterleri

İyon oranları: Yapılan analizde elde edilen sonuçlarda iyon oranları Tablo 39’a göre değerlendirilir. Elde edilen sonuçlar Tablo 51’de görülmektedir.

Tablo 51. Asidik ve bazik metot ile analiz edilen ilaç etkin maddelerin iyon oranları

Analiz Edilen Madde	Ana İyon	P1	İyon Oranı	%	P2
Lidokain OH	251	86	5	108,3	58
Mepivakain OH	263,2	98	14	85,4	70,1
4-Metilaminoantipirin	218,1	56,1	31,3	99,2	97,1
Romifidin	258,2	160,1	72,3	100,2	178,1
HEPS	345,2	314	63,1	101	256
Dembreksin	378	262,7	30,1	99,5	81
Ambroksol	379	263,8	16,7	99,2	116
Butorfanol	328,4	310,2	12	104,6	157,1
Metokarbamol	242,1	118	26,9	100,4	163,1
Betametazon	393,4	373	38,8	115,6	355
Deksametazon	393,4	373,2	43,4	116,8	335,2
Triamsinolon asetonid	435,4	415,2	69,6	95,9	397,1
Fluniksin	297,2	279	30,4	97,5	264
Ketoprofen	255,2	105	63,6	99,8	209,1
Meloksikam	352,2	115	30,6	99,8	141
Karprofen	274,1	228	88,3	115,6	193
Eltenak	302	186	37	94,5	220
Diklofenak	296,2	215	40,1	93,4	250
Salbutamol	240,3	147,9	48,8	116,9	222

Detomidin OH	203,1	81,1	25,74	104,1	185,1
--------------	-------	------	-------	-------	-------

Tablo 39'a göre yapılan değerlendirmede iyon oranı değerlerinin belirlenen kritere uygun olduğu görülmektedir.

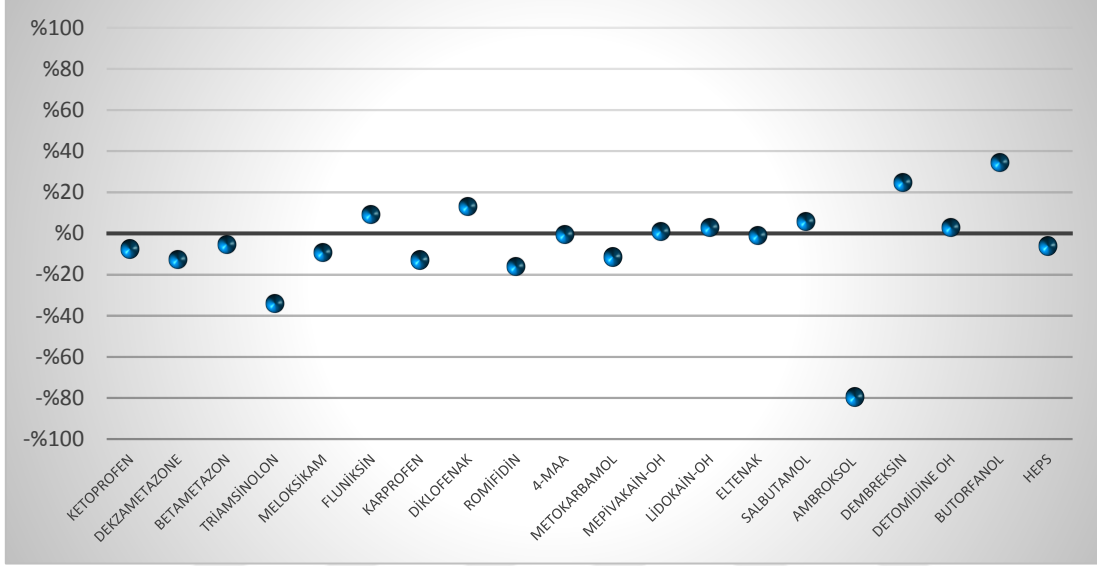
Relatif alıkonma zamanı (RRT): Uygun bir iç standart kullanılarak RRT 'Numunedeki analitin RRT ile Referanstaki Analitin (Spk) RRT'si $\pm 2\%$ den fazla sapmamalıdır' kuralına göre değerlendirme yapılır ve sonuçlar bu aralıkta olmalıdır (Tablo 53).

Matriks etkisi: Matriks etkisinin hesaplanması için ekstrakte edilen blank numuneye uçurma işleminden sonra 50 μL mix standart eklenip analiz edilir ve eş miktarda enjekte edilen standart karışımda enjekte edilip %ME formülüne göre hesaplama yapılmıştır (Tablo 52).

Tablo 52. Asidik ve bazik metotla analiz edilen ilaç etkin maddelerin iç standart doğrulamalı matriks etkisi sonuçları

	IS doğrulamalı matriks etkisi (%)
Fluniksin	109,00
Meloksikam	90,57
4-MAA	99,31
Triamsinolon	65,66
Betametazon	94,55
OH Lidokain	102,66
OH Mepivakain	100,77
Dembreksin	124,51
Ketoprofen	92,17
Diklofenak	112,77
Karprofen	87,00
Ambroksol	20,41
HEPS	93,63
OH Detomidin	102,81
Butarfanol	134,19
Romifidin	83,91
Salbutamol	105,47
Deksametazon	87,19
Metokarbamol	88,40
Eltinak	98,91

Yapılan hesaplama göre Dembreksin ve Butorfanol maddeleri üzerinde iyon zenginleştirme Triamsinolon, Ambroksol üzerinde ise önemli derecede iyon baskılama yönünde matriksin etkisinin olduğu tespit edilmiştir (Şekil 37).



Şekil 37. LC-MS/MS ile analiz edilen ilaç etkin maddeleri için matriks etkisi

Tablo 53. LC-MS/MS ile yapılan analizlerin metot validasyon sonuçları

Analit	İç standart (IS)	IS kons. ng/mL	Yük. Kons. ng/mL	Kor. Kat. (R ²)	Gün içi (n=6)			Günler arası (n=6)			Lab. içi Tekrar Üre. (%) CV	CC α (ng/mL) (α =%5)	CC β (ng/mL) (β =%1)	RRT
					Ölç. Kons. (ORT \pm SD) (ng/mL)	Kesinlik CV (%)	Geri Kazanım (%)	Ölç.Kons. (ORT \pm SD) (ng/mL)	Kesinlik CV (%)	Geri Kazanım (%)				
Fluniksin	Fluniksin d3	25	50,00	0,999	49,36 \pm 0,23	0,46	98,71	49,70 \pm 2,21	4,45	99,41	2,58	109,61	119,22	1,00
			100,00		101,43 \pm 1,96	1,93	101,43	101,11 \pm 3,41	3,38	101,11	7,08			
			150,00		150,14 \pm 1,72	1,15	100,09	151,40 \pm 2,92	1,93	100,93	9,30			
			200,00		198,60 \pm 2,27	1,14	99,30	197,31 \pm 3,51	1,78	98,66				
Meloksikam	Meloksikam d3	50	5,00	0,999	5,04 \pm 0,03	0,60	100,83	5,06 \pm 0,17	3,29	101,23	11,32	12,50	15,01	1,00
			10,00		9,85 \pm 0,34	3,45	98,46	9,62 \pm 0,50	5,24	96,18	15,73			
			15,00		14,83 \pm 0,24	1,60	98,89	14,48 \pm 0,91	6,28	96,52	9,49			
			20,00		20,15 \pm 0,32	1,58	100,74	20,26 \pm 0,54	2,68	101,29				
4-MAA	4-MA-D3-Antipirin	100	50,00	0,995	51,09 \pm 0,47	0,92	102,07	51,39 \pm 2,47	4,80	102,77	11,14	112,35	124,70	1,00
			100,00		95,25 \pm 1,67	1,75	95,25	96,12 \pm 3,25	3,38	96,12	9,62			
			150,00		149,07 \pm 6,17	4,14	97,69	145,11 \pm 7,61	5,25	96,74	4,20			
			200,00		200,30 \pm 2,41	1,20	100,15	211,46 \pm 12,26	5,80	105,73				
Triamsinolon	Romifidin-d4	50	0,25	0,998	0,23 \pm 0,03	13,09	91,88	12,26 \pm 0,04	0,31	101,50	23,11	0,75	0,99	14,42
			0,50		0,50 \pm 0,08	15,49	99,27	0,48 \pm 0,07	13,50	96,46	34,26			
			0,75		0,84 \pm 0,10	11,56	112,53	0,75 \pm 0,14	19,01	100,13	19,27			
			1,00		1,05 \pm 0,09	8,20	104,55	1,10 \pm 0,10	8,72	110,00				
Betametazon	Deksametazon-d4	25	0,10	0,996	0,09 \pm 0,01	15,90	93,74	0,10 \pm 0,01	10,11	95,52	26,03	0,25	0,30	0,99
			0,20		0,22 \pm 0,01	5,23	108,96	0,21 \pm 0,03	12,82	106,57	8,37			
			0,30		0,32 \pm 0,04	12,28	107,91	0,31 \pm 0,03	11,02	102,55	17,67			
			0,40		0,37 \pm 0,06	16,10	93,50	0,37 \pm 0,04	11,07	93,26				

OH Lidokain	3-OH Lidokain-d5	25	5,00	0,998	4,86 ± 0,19	3,86	97,19	4,87 ± 0,19	3,99	97,41	8,53	11,24	12,47	1,00
			10,00		10,45 ± 0,20	1,95	104,46	10,37 ± 0,49	4,69	103,69	8,37			
			15,00		15,35 ± 0,55	3,56	102,35	15,53 ± 0,82	5,25	103,52	11,67			
			20,00		19,64 ± 0,71	3,62	98,18	19,07 ± 1,56	8,20	95,33				
OH Mepivakain	3-OH Mepivakain-d3	50	5,00	0,999	4,94 ± 0,17	3,47	98,81	4,98 ± 0,19	3,90	99,53	3,34	10,76	11,53	1,00
			10,00		10,27 ± 0,38	3,67	102,70	10,17 ± 0,37	3,66	101,73	5,36			
			15,00		15,38 ± 0,40	2,63	102,57	15,24 ± 0,45	2,94	101,58	5,77			
			20,00		20,16 ± 0,58	2,86	100,81	19,86 ± 1,03	5,17	99,31				
Dembreksin	Romifidin-d4	50	50,00	0,996	48,53 ± 2,25	4,64	97,05	46,57 ± 7,96	17,09	93,15	12,62	120,93	141,86	1,75
			100,00		95,01 ± 14,12	14,86	95,01	106,64 ± 12,68	11,89	96,45	13,81			
			150,00		152,22 ± 11,06	7,26	101,48	148,80 ± 9,30	6,25	99,20	8,27			
			200,00		208,84 ± 15,89	7,61	104,42	204,00 ± 15,86	7,77	102,00				
Ketoprofen	Ketoprofen d3	50	50,00	0,997	51,21 ± 0,62	1,20	102,42	50,79 ± 2,29	4,52	101,58	11,30	127,20	154,40	1,00
			100,00		94,64 ± 1,99	2,10	94,64	92,77 ± 11,62	12,53	92,77	19,68			
			150,00		148,42 ± 2,08	1,40	98,95	146,70 ± 9,90	6,75	97,80	7,41			
			200,00		211,63 ± 6,71	3,17	105,82	212,10 ± 10,03	4,73	106,05				
Diklofenak	Diklofenak d4	50	25,00	0,999	23,98 ± 0,89	3,73	95,91	25,11 ± 1,86	7,42	100,45	6,68	55,20	60,41	1,00
			50,00		51,93 ± 3,28	6,32	103,86	50,59 ± 3,28	6,49	101,18	5,88			
			75,00		76,73 ± 0,00	3,50	102,31	75,83 ± 2,82	3,72	101,11	3,86			
			100,00		101,03 ± 3,12	3,09	101,03	99,50 ± 4,15	4,17	99,50				
Karpofen	Karpofen d3	50	50,00	0,998	49,09 ± 2,73	5,56	98,19	49,26 ± 3,36	6,82	98,53	9,53	114,68	129,36	1,00
			100,00		102,66 ± 8,41	8,19	102,66	105,14 ± 6,83	6,50	105,14	10,69			
			150,00		152,29 ± 10,28	6,75	101,52	154,08 ± 8,23	5,34	102,72	11,51			
			200,00		195,60 ± 15,41	7,88	97,80	192,56 ± 12,35	6,42	96,28				
Ambroksol	3 OH Lidokain d5	25	100,00	0,996	110,07 ± 14,19	12,89	110,07	102,25 ± 16,73	16,36	102,25	16,38	239,22	278,44	1,17
			200,00		207,49 ± 10,25	4,94	103,74	216,92 ± 27,17	12,53	108,46	5,39			

			300,00		305,97 ± 13,03	4,26	101,99	305,61 ± 28,14	9,21	101,87	6,70				
			400,00		381,55 ± 53,27	13,96	95,39	384,11 ± 50,21	13,07	96,03					
HEPS	HEPS-d4	2,5	5,00	0,999	4,92 ± 0,35	7,07	98,43	4,93 ± 0,27	5,58	98,52	3,42	10,71	11,42	1,00	
			10,00		10,13 ± 0,58	5,70	101,34	10,11 ± 0,44	4,39	101,10	4,28				
			15,00		15,31 ± 0,33	2,16	99,97	15,19 ± 0,51	3,35	101,26	3,59				
			20,00		19,98 ± 0,66	3,30	99,91	20,43 ± 0,67	3,28	102,14					
OH Detomidin	3 OH Detomidin-d5	25	1,00	0,999	0,97 ± 0,05	5,03	96,89	0,93 ± 0,07	8,05	92,79	11,04	2,13	2,26	1,00	
			2,00		2,00 ± 0,06	3,14	100,00	1,96 ± 0,07	3,67	98,11	5,16				
			3,00		3,00 ± 0,08	2,64	99,95	3,01 ± 0,08	2,63	100,39	2,69				
			4,00		4,07 ± 0,04	0,93	101,66	4,03 ± 0,07	1,73	100,68					
Butarfanol	3 OH Lidokain d5	25	0,50	0,998	0,56 ± 0,05	8,77	112,08	0,49 ± 0,09	18,18	97,28	14,09	1,39	1,78	1,21	
			1,00		1,07 ± 0,09	8,53	106,72	0,98 ± 0,13	13,73	97,85	10,13				
			1,50		1,51 ± 0,10	6,77	100,63	1,46 ± 0,15	10,40	97,11	7,35				
			2,00		2,00 ± 0,07	3,33	100,12	1,95 ± 0,19	9,62	97,35					
Romifidin	Romifidin d4	50	0,50	0,998	0,50 ± 0,08	15,26	100,31	0,52 ± 0,07	12,87	104,86	17,01	1,24	1,48	0,99	
			1,00		1,06 ± 0,06	6,09	106,18	1,00 ± 0,07	7,28	100,47	14,98				
			1,50		1,56 ± 0,10	6,13	103,71	1,51 ± 0,14	9,04	100,84	10,83				
			2,16		2,16 ± 0,17	7,93	108,11	2,20 ± 0,13	6,06	109,78					
Salbutamol	Salbutamol d9	25	0,25	0,999	0,25 ± 0,02	7,05	99,21	0,25 ± 0,02	9,44	100,93	7,17	0,58	0,67	1,03	
			0,50		0,51 ± 0,01	2,89	102,50	0,49 ± 0,05	11,25	97,41	4,50				
			0,75		0,79 ± 0,04	4,68	105,93	0,78 ± 0,05	6,07	103,83	4,17				
			1,00		1,03 ± 0,06	5,90	102,93	1,01 ± 0,07	7,03	100,87					
Deksametazon	Deksametazon d4	25	0,10	0,999	0,10 ± 0,01	6,68	102,21	0,11 ± 0,01	9,57	105,13	9,11	0,23	0,26	1,00	
			0,20		0,21 ± 0,03	14,39	105,40	0,21 ± 0,02	8,74	104,73	11,95				
			0,30		0,30 ± 0,02	7,60	101,41	0,30 ± 0,02	5,47	100,71	6,85				
			0,40		0,42 ± 0,05	12,05	104,41	0,41 ± 0,03	7,69	101,69					
Metokarbamol		100	50,00	0,999	50,91 ± 0,35	0,68	101,82	51,20 ± 2,02	3,95	102,39	7,44	112,10	124,20	1,01	
			100,00		98,41 ± 1,98	2,01	98,41	98,42 ± 3,47	3,53	98,42	7,78				

	Metokarbamol d3		150,00	151,24 ± 1,71	1,13	100,82	147,29 ± 4,52	3,07	98,20	3,44				
			200,00	203,45 ± 2,89	1,42	101,72	203,82 ± 5,44	2,67	101,91					
Eltenak	Eltenak-13C-d3	25	25,00	25,27 ± 0,99	3,92	101,08	25,27 ± 0,99	3,92	101,08					
			50,00	46,50 ± 7,22	15,53	92,99	50,30 ± 5,06	10,06	100,61	11,17	57,23	64,45	1,00	
			75,00	75,07 ± 1,60	2,14	100,09	75,07 ± 1,60	2,14	100,09					
			100,00	98,62 ± 0,87	0,88	98,62	98,62 ± 0,87	0,88	98,62					

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmaya konu olan doping etkisi gösteren ilaç etkin maddelerin çok fazla sayıda olması, bunlara sürekli yeni maddelerin eklenmesi ve ayrıca bu maddelerin eser düzeylerde tespit edilmesi gerekliliği, hassasiyeti ve doğruluğu yüksek seçici metotlarla çalışılması gerekliliğini doğurmuştur. Bu nedenle bu alanda yapılan çalışmalar genellikle fazla sayıda ilaç etkin maddenin eş zamanlı olarak kısa sürede tespiti üzerinedir. Ancak tarama limiti belirlenmiş ilaç etkin maddelerin bazılarının limit değerleri ppt düzeyindedir ve maddeler çok farklı özellikler göstermektedir. Bu nedenle bu maddelerin eş zamanlı olarak tek ekstraksiyon, kolon ve/veya cihazla tespitini tek bir tarama ile yapmak oldukça güçtür. Bu çalışmada uluslararası tarama limiti belirlenmiş olan ilaç etkin maddelerin en doğru, seçici ve tekrarlanabilir olarak tespiti için farklı hidroliz, ekstraksiyon, kolon, hareketli faz ve cihazlar kullanılarak limit seviyesinde analizleri yapılarak valide edilmiştir.

Tüm bu ihtiyaç ve zorluklara ilişkin yeni çözümler üretmek amacıyla, bu çalışmada gaz kromatografisi-kütle spektrometresinde geliştirilen metotla türevlendirme inlet kısmında gerçekleştiği için diğer türevlendiricilerin kullanıldığı literatür çalışmalarındaki sıcakta bekletme basamağını uygulamaya gerek olmadığından zaman alıcı bu uygulamaya gerek kalmamıştır (El Haj ve ark., 1999; Maurer ve ark., 2001; Sebök ve ark., 2008). Ayrıca sililleme yönteminin kullanıldığı çalışmalarda türevlendiriciler kolona zarar verdiği için metanolle seyreltilerek kullanılan türevlendirme yöntemiyle bu çalışmada kolonun zarar görmesi de önlenmiştir (Nagamatsu ve ark., 2002).

Hirai ve arkadaşları tarafından 1997 yılında NSAID özelliğinde maddelerle yapılan çalışmaya benzer şekilde asidik ve enzimatik hidrolizin etkisi çalışılmış ve aynı şekilde enzimatik hidrolizde geri kazanımın oldukça düştüğü ve bazı maddelerinde tespit edilemediği gözlenmiştir.

Yapılan optimizasyon çalışmalarıyla metot ideal hale getirilip daha önce bir arada çalışılmamış olan NSAID özelliğinde naproksen, fluniksin, diklofenak, ketoprofen, eltenak, meklofenamik asit, fenilbutazon, vedaprofen ve karprofen'nin eşzamanlı olarak

analizi için bir yöntem geliştirilmiştir. Analiz sırasında oksidasyonla bozunabilme özelliğinde olan fenilbutazon (Jedziniak ve ark., 2010) uygulanan yöntemle herhangi bir ilave kimyasala gerek duyulmadan tespit edilebilmiştir. Ayrıca sıvı kromatografisiyle iyonizasyon ve/veya karboksilik asit içermesi gibi nedenlerle tespit edilemeyen naproksen, fenilbutazon ve vedaprofenin seçici olarak analizi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen validasyon verileri incelendiğinde GC-MS kullanılarak uygulanan bu yöntemde CV değerleri ve CC α değerleri sıvı kromatografisiyle elde edilen validasyon verilerine göre çok daha az sapmayla tespit edilebilmiştir.

Ayrıca bu çalışmada analiz edilen ilaç etkin maddeleri farklı farmakojik, kimyasal yapı, polarite ve pKa özelliklerine sahip olduğundan tespitleri geniş bir çalışma aralığı gerektirmektedir. Literatür çalışmaları incelendiğinde çok sayıda ilaç etkin maddenin eş zamanlı analizi için farklı gruplara farklı ekstraksiyon teknikleri ve farklı cihazlarla analiz yapılarak çalışıldığı görülmüştür (Ho ve ark., 2006; Kioussi ve ark., 2013; Leung ve ark., 2005). Ayrıca ilaç etkinler için belirlenmiş olan limit değerleride birbirinden çok farklıdır. Tam tarama analizlerinde 200 ve üzeri maddenin analizi yapıldığı için belirlenen maddelerden bazıları limit değerinden daha yüksek konsantrasyonda tespit edilebilmektedir (Moulard ve ark., 2011). Bu nedenle bu maddeleri seçici olarak tespit edebilmek için gaz kromatografisi ile türevlendirme uygulanarak analiz edilmeyen analitler sıvı kromatografisi kullanılarak analiz edilmiştir. LC-MS/MS cihazıyla asidik/nötral ve bazik özellikte ekstraksiyonlar yapılarak farklı kolon ve hareketli fazlar kullanılarak analizler yapıp iki yöntem geliştirilmiştir. Bu amaçla Moulard ve arkadaşları tarafından 2011 yılında yapılan çalışma modifiye edilerek asidik yöntem, Garcia ve arkadaşları tarafından 2011 yılında beta agonist grubu ilaç etkinlerle ilgili yapılan çalışma modifiye edilerekte bazik yöntem geliştirilip farklı farklı analiz edildikten sonra valide edilmiştir.

Asidik yöntemde uygulanan çalışmayla fluniksin, ketoprofen, diklofenak, karprofen ve eltenak gibi NSAID özellikte olan ilaç etkinlerin analizleri de yapılarak valide edilmiştir ve karşılaştırılmıştır. Ancak bu yöntemde elde edilen validasyon değerleri incelendiğinde bu maddelerin GC-MS ile geliştirilen yöntemde daha iyi kesinlikle sonuç verdiği görülmüştür. Ayrıca meloksikam, 4-MAA, triamsinolon, OH-lidokain, OH-mepivakain, dembreksin, romifidin, metokarbamol, deksametazon ve betametazon olmak

üzere 14 ilaç etkin maddenin analizi ve validasyonu asidik ekstraksiyonun uygulandığı yöntemle eşzamanlı olarak tespiti ve validasyonu da gerçekleştirilmiştir.

Asidik metotla; daha önceki çalışmalarda ayrı ayrı analiz edilerek (Ho ve ark., 2006; Mazzorino ve Botre, 2006; Mazzarino ve ark., 2010; Wong ve ark., 2011), kiral kolon kullanılarak (Karatt ve ark., 2018) daha seçici bir yöntemle ya da dereceli elüsyonda değişiklik yapılarak (Tang ve ark., 2001) ayrılabilen deksametazon ve betametazon epimerlerinin eş zamanlı olarak tespiti ve validasyonu da gerçekleştirilmiştir.

Asidik metotla kuarterner amonyum özelliğinde olan ipratropium ve N-butilskopolamonyum'un tespiti yapılabilmektedir ancak bu maddeler yapılan validasyon çalışmasında geçerlilik kriterlerine uymayan sonuçlar verdiği için valide edilememişlerdir.

Bazık metot yöntemiyle Ambroksol, HEPS, OH-Detomidin, Butorfanol ve Salbutamol ilaç etkin maddelerinin uluslararası tarama limitinde tespiti ve validasyonu sağlanmıştır.

Geliştirilen metotlar için matriks etkileri de incelenmiştir. Sonuçlara bakıldığında matriks etkilerinin bazı maddeler için etkili olduğu ve matriks etkilerinin uygun iç standart kullanılarak düşük seviyeye getirilebildiği tespit edilmiştir.

Sonuç olarak çalışmayla IFHA tarafından uluslararası tarama limiti belirlenmiş olan 29 ilaç etkin maddenin 24 tanesinin tespiti ve validasyonu 2002/657/EC direktifleri ve AORC kriterlerine uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen üç metotta yeniliklere uygun, tekrarlanabilirliği yüksek ve kolay uygulanabilir metotlardır ve bu metotlar doğrulama metodu olarak kullanılabilir ve yeniliklere açık özelliktedirler.

8. KAYNAKLAR

Aarbakke J. Clinical pharmacokinetics of phenylbutazone. *Clin Pharmacokinet.* 1978;3(5):369-380.

Abushareeda W, Vonaparti A, Saad KA, Almansoori M, Meloug M, Saleh A, Aguilera R, Angelis Y, Horvatovich PL, Lommen A, Alsayrafi M, Georgakopoulos C. High resolution full scan liquid chromatography mass spectrometry comprehensive screening in sports antidoping urine analysis. *J Pharm Biomed Anal.* 2018;151:10-24.

AOAC-I Peer Verified Methods, Policies and Procedures, AOAC International, 2200 Wilson Blvd., Suite 400, Arlington, Virginia USA: 1993, p:2201-3301.

Benoit E, Jaussaud P, Besse S, Videmann B, Courtot D, Delatour P, Bonnaire Y. Identification of a benzhydrolic metabolite of ketoprofen in horses by gas chromatography-mass spectrometry and high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 1992;583(2):167-173.

Bertone JJ, Horspool LJ. *Equine clinical pharmacology.* 1st ed. USA: Saunders Ltd; 2004.

Bertone JJ. Clinical field efficacy and safety study of buscopan in horses. *Proc Am Ass Equine Practnrs.* 2002;48, 370-374.

Brideau C, Van Staden C, Chan CC. In vitro effects of cyclooxygenase inhibitors in whole blood of horses, dogs, and cats. *Am J Vet Res.* 2001;62(11):1755-1760.

Caturla MC, Cusido E. Solid-phase extraction for the high-performance liquid chromatographic determination of indomethacin, suxibuzone, phenylbutazone and oxyphenbutazone in plasma, avoiding degradation of compounds. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 1992;581(1):101-107.

Cederberg C, Andersson T, Skånberg I. Omeprazole: pharmacokinetics and metabolism in man. *Scand J Gastroenterol.* 1989;24 (Suppl 166):33-42.

Commission Decision 2002/657/EC, Off. J. Eur. Commun. L22. 2002;8.

Dass C. *Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry*, Canada: John Wiley and Sons; 2007, p:3-194.

DiMaio Knych HK, Arthur RM, Taylor A, Moeller BC, Stanley SD. Pharmacokinetics and metabolism of dantrolene in horses. *J Vet Pharmacol Ther.* 2011;34(3):238-246.

Dirikolu L, Lehner AF, Hughes C, Karpiesiuk W, Camargo FC, Harkins JD, Woods WE, Bosken JM, Boyles J, Troppmann A, Fisher M, Tobin T. Detection, quantification, and pharmacokinetics of furosemide and its effects on urinary specific gravity following IV administration to horses. *Vet Ther.* 2003;4(4):350-363.

El Haj BM, Al Ainri AM, Hassan MH, Bin Khadem RK, Marzouq MS. The GC/MS analysis of some commonly used non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in pharmaceutical dosage forms and in urine. *Forensic Sci Int.* 1999;105(3):141–153.

Garcia P, Paris AC, Gil J, Popot MA, Bonnaire Y. Analysis of β -agonists by HPLC/ESI-MSⁿ in horse doping control. *Biomed Chromatogr.* 2011;25(1-2):147-154.

González G, Ventura R, Smith AK, de la Torre R, Segura J. Detection of non-steroidal anti-inflammatory drugs in equine plasma and urine by gas chromatography-mass spectrometry, *J Chromatogr A.* 1996;719:251-264.

Harkins JD, Mundy GD, Woods WE, Lehner A, Karpiesiuk W, Rees WA, Dirikolu L, Bass S, Carter WG, Boyles J, Tobin T. Lidocaine in the horse: its pharmacological effects and their relationship to analytical findings. *J Vet Pharmacol Ther.* 1998;21(6):462-476.

Hines S, Pearce C, Bright J, Teale P. Development and validation of a quantitative gas chromatography–mass spectrometry confirmatory method for phenylbutazone in equine plasma. *Chromatographia.* 2004;59 (Suppl 1):109-114.

Hirai T, Matsumoto S, Kishi I. Simultaneous analysis of several non-steroidal anti-inflammatory drugs in human urine by high-performance liquid chromatography with normal solid-phase extraction. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1997;692(2):375-388.

Ho EN, Leung DK, Wan TS, Yu NH. Comprehensive screening of anabolic steroids, corticosteroids, and acidic drugs in horse urine by solid-phase extraction and liquid chromatography–mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2006;1120(1-2):38-53.

Hsu WH. *Handbook of Veterinary Pharmacology*. 1 st ed. Iowa: John Wiley and Sons; 2008.

Hu T, Peng T, Li XJ, Chen DD, Dai HH, Deng XJ, Yue ZF, Wang GM, Shen JZ, Xia X, Ding SY, Zhou YN, Zhu AL, Jiang HY. Simultaneous determination of thirty non-steroidal anti-inflammatory drug residues in swine muscle by ultra-high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2012;1219:104-113.

Hulshoff A, Förch AD. Alkylation with alkyl halides as a derivatization method for the gas chromatographic determination of acidic pharmaceuticals. *J Chromatogr A*. 1981;220(3):275-311.

Jedziniak P, Olejnik M, Pietruk K, Protasiuk E, Szprengier-Juszkiewicz T, Żmudzki J. Simultaneous determination of residues of non-steroidal anti-inflammatory drugs and glucocorticosteroids in animal muscle by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Anal. Methods*. 2016;9(6):1837-1848.

Jedziniak P, Szprengier-Juszkiewicz T, Olejnik M, Żmudzki J. Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs residues in animal muscles by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta*. 2010;672(1-2):85-92.

Jedziniak P, Szprengier-Juszkiewicz T, Pietruk K, Śledzińska E, Żmudzki J. Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs and their metabolites in milk by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*. 2012;403(10):2955-2963.

Johansson M, Anlér EL. Gas chromatographic analysis of flunixin in equine urine after extractive methylation. *J Chromatogr*. 1988;427(1):55-66.

Karatt TK, Sayed R, Nalakath J, Perwad Z, Albert PH, Abdul Khader KK. Separation and identification of the epimeric doping agents–Dexamethasone and betamethasone in

equine urine and plasma: A reversed phase chiral chromatographic approach. *Steroids*. 2018;140:77-82.

Kiang CH, Lee CA, Kushinsky ST. Isolation and identification of 6-desmethylnaproxen sulfate as a new metabolite of naproxen in human plasma. *Drug Metab Dispos*. 1989;17(1):43-8.

Kioussi MK, Lyris EM, Angelis YS, Tsivou M, Koupparis MA, Georgakopoulos CG. A generic screening methodology for horse doping control by LC–TOF-MS, GC–HRMS and GC–MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2013;941:69-80.

Kolmonen M, Leinonen A, Pelander A, Ojanperä I. A general screening method for doping agents in human urine by solid phase extraction and liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry. *Anal Chim Acta*. 2007;585(1):94-102.

Kretschmer A, Giera M, Wijtmans M, de Vries L, Lingeman H, Irth H, Niessen WM. Derivatization of carboxylic acids with 4-APEBA for detection by positive-ion LC-ESI-MS (/MS) applied for the analysis of prostanoids and NSAID in urine. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2011;879(17-18):1393-1401.

Lees P, McKellar Q, May SA, Ludwig B. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of carprofen in the horse. *Equine Vet J*. 1994;26(3):203-208.

Leung GN, Chung EW, Ho EN, Kwok WH, Leung DK, Tang FP, Wan TS, Yu NH. High-throughput screening of corticosteroids and basic drugs in horse urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2005;825(1):47-56.

Luo Y, Uboh CE, Soma LR, Guan F, Rudy JA, Tsang DS. Resolution, quantification and confirmation of betamethasone and dexamethasone in equine plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2005;19(6):825-832.

Márta Z, Bobály B, Fekete J, Magda B, Imre T, Szabó PT. Simultaneous determination of ten nonsteroidal anti-inflammatory drugs from drinking water, surface water and

wastewater using micro UHPLC-MS/MS with on-line SPE system. *J Pharm Biomed Anal.* 2018;160:99-108.

Maurer HH, Tauvel FX, Kraemer T. Screening Procedure for Detection of Non-Steroidal Anti-inflammatory Drugs and their Metabolites in Urine as Part of a Systematic Toxicological Analysis Procedure for Acidic Drugs and Poisons by Gas Chromatography- Mass Spectrometry after Extractive Methylation. *J Anal Toxicol.* 2001;25(4):237-244.

Mazzarino M, Botrè F. A fast liquid chromatographic/mass spectrometric screening method for the simultaneous detection of synthetic glucocorticoids, some stimulants, anti-oestrogen drugs and synthetic anabolic steroids. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2006;20(22):3465-3476.

Mazzarino M, de la Torre X, Botre F, Gray N, Cowan D. A rapid screening LC-MS/MS method based on conventional HPLC pumps for the analysis of low molecular weight xenobiotics: application to doping control analysis. *Drug Test Anal.* 2010;2(7):311-322.

McKellar QA, Bogan JA, von Fellenberg RL, Ludwig B, Cawley GD. Pharmacokinetic, biochemical and tolerance studies on carprofen in the horse. *Equine Vet J.* 1991;23(4):280-284.

McKellar QA, Delatour P, Lees P. Stereospecific pharmacodynamics and pharmacokinetics of carprofen in the dog. *J Vet Pharmacol Ther.* 1994;17(6):447-454.

Migowska N, Caban M, Stepnowski P, Kumirska J. Simultaneous analysis of non-steroidal anti-inflammatory drugs and estrogenic hormones in water and wastewater samples using gas chromatography–mass spectrometry and gas chromatography with electron capture detection. *Sci Total Environ.* 2012;441:77-88.

Morgan DJ, Paull JD, Richmond BH, Wilson-Evered E, Ziccone SP. Pharmacokinetics of intravenous and oral salbutamol and its sulphate conjugate. *Br J Clin Pharmacol.* 1986;22(5):587-593.

- Moulard Y, Bailly-Chouriberry L, Boyer S, Garcia P, Popot MA, Bonnaire Y. Use of benchtop exactive high resolution and high mass accuracy orbitrap mass spectrometer for screening in horse doping control. *Anal Chim Acta*. 2011;700(1-2):126-136.
- Nagamatsu K, Kudo K, Usumoto Y, Tsuji A, Nishi H, Ikeda N. Rapid screening of 18 nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) using novel NAGINATA™ gas chromatography-mass spectrometry software. *Forensic Toxicol*. 2012;30(1):11-18.
- Nikolova I, Tencheva J, Voinikov J, Petkova V, Benbasat N, Danchev N. Metamizole: a review profile of a well-known “forgotten” drug. part 1: pharmaceutical and nonclinical profile. *Biotechnol. Equip*. 2012;26(6):3329-3337.
- Orata F. Derivatization reactions and reagents for gas chromatography analysis. In: Mohd MA, eds. *Advanced Gas Chromatography Progress in Agricultural, Biomedical and Industrial Applications*. 1 st ed. London: IntechOpen Limited; 2012, p:83-108.
- Plumb DC. *Veterinary Drug Handbook*. 3rd ed. Iowa: Iowa State University Press; 1999.
- Popot MA, Donval A, Bonnaire Y, Huau J. Use of accelerating solvent extraction for detecting non-steroidal anti-inflammatory drugs in horse feces. *J Anal Toxicol*. 2006;30(5):323-330.
- Prügner W, Huber R, Lühmann R. Eltenac, a new anti-inflammatory and analgesic drug for horses: clinical aspects. *J Vet Pharmacol Ther*. 1991;14(2):193-199.
- Reeuwijk LP van, Houba, VJG. Guidelines for quality management in soil and plant laboratories. *FAO Soils Bulletin*: Rome; 1998, p:143.
- Rençber S, Karavana SY, Özyazici M. Bioavailability file: ketoprofen. *Fabad J. Pharm. Sci*. 2009;34(4):203-216.
- Ruiz TP, Lozano CM, Tomás V, Carpena J. Analysis of binary mixtures of flufenamic, meclofenamic and mefenamic acids by derivative synchronous fluorescence spectrometry. *Talanta*. 1998;47(3):537-545.

Sams RA, Gerken DF, Ashcraft SM. Detection and identification of flunixin after multiple intravenous and intramuscular doses to horses. *J Anal Toxicol.* 1999;23(5):372-379.

Saraf S. NSAIDs Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs: An Overview. 1st ed. India: PharmaMed Press; 2008.

Sebök Á, Vasánits-Zsigrai A, Palkó G, Zárny G, Molnár-Perl I. Identification and quantification of ibuprofen, naproxen, ketoprofen and diclofenac present in waste-waters, as their trimethylsilyl derivatives, by gas chromatography mass spectrometry. *Talanta.* 2008;76(3):642-650.

Silverstein RM, Webster FX, Kiemle DJ. *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, 6th ed. New York: Wiley; 1998, p:4.

Skoog DA, Holler F J, Nieman TA. *Principles of Instrumental Analysis*, 5th ed. Belmont California: 1998.

Skoog DA, West DM. *Principles of Instrumental Analysis*, 2nd ed. 1981.

Smolinske SC, Hall AH, Vandenberg SA, Spoerke DG, McBride PV. Toxic effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in overdose. *Drug Saf.* 1990;5(4):252-274.

Soma LR, Behrend E, Rudy J, Sweeney RW. Disposition and excretion of flunixin meglumine in horses. *Am J Vet Res.* 1988;49(11):1894-1898.

Tang PW, Law WC, Wan TS. Analysis of corticosteroids in equine urine by liquid chromatography–mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 2001;754(1):229-244.

Türk D, Roth W, Busch U. A review of the clinical pharmacokinetics of meloxicam. *Br J Rheumatol.* 1996;35 (Suppl 1):13-16.

Uboh CE, Rudy JA, Soma LR, Fennell M, May L, Sams R, Railing FA, Shellenberger J, Kahler M. Characterization of bromhexine and ambroxol in equine urine: effect of furosemide on identification and confirmation. *J Pharm Biomed Anal.* 1991;9(1):33-39.

UCT, LLC CSDAU application note. 2731 Bartram Road: Bristol, PA; 2012.

Wasfi IA, Hadi AA, Alkathieri NA, Barezaiq IM, El Ghazali M, Boni NS, Zorob O. Identification of a flunixin metabolite in camel by gas chromatography–mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1998;709(2):209-215.

Wong CH, Tang FP, Wan TS. A broad-spectrum equine urine screening method for free and enzyme-hydrolysed conjugated drugs with ultra performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta.* 2011;697(1-2):48-60.

Wong JK, Wan TS. Doping control analyses in horseracing: a clinician's guide. *Vet J.* 2014;200(1):8-16.

Yilmaz B, Arslan S, Akba V. Gas chromatography–mass spectrometry method for determination of metoprolol in the patients with hypertension. *Talanta.* 2009;80(1):346-351.

Yilmaz B, Sahin H, Erdem AF. Determination of naproxen in human plasma by GC–MS. *J Sep Sci.* 2014;37(8):997-1003.

Yoshioka S, Ogata H, Shibazaki T, Ejima A. The analgesic effects of the decomposition products of sulpyrine, N-[2-(5-hydroxymethyl-2, 3, 4, 5-tetrahydro-2, 3, 4-trihydroxy) furyl] methyl-N-methylantipyrine and Antipyrinyl-4-peroxide. *Chem Pharm Bull.* 1981;29(4):1179-1881.

Youden WJ, Steiner, EH. *Statistical Manual of the AOAC–Association of Official Analytical Chemists, AOAC-I, Washington DC: 1975, p:35.*

Yu NH, Ho EN, Tang FP, Wan TS, Wong AS. Comprehensive screening of acidic and neutral drugs in equine plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2008;1189(1-2):426-434.

9. EKLER

9.1 Ek 1 Makale

Ankara Univ Vet Fak Derg, 66, 363-372, 2019
DOI: 10.33988/auvfd.538782

Determination and stability of some international screening limited drugs in equine blood by LC-MS/MS

Eylem Funda GÖKTAŞ^{1,a,✉}, Erol KABİL^{1,b}, Ertuğrul GÜNEŞ^{1,c}, Serol KORKMAZ^{1,d}, Tuba Asena KADIOĞLU^{1,e}, Ayşen KURT CÜCÜ^{2,f}

¹İstanbul Pendik Veterinary Control Institute, Doping Control Laboratory; ²Marmara University, Faculty of Pharmacy, Department of Analytical Chemistry, İstanbul, Turkey.

^aORCID: 0000-0002-1269-8114; ^bORCID: 0000-0002-0339-0353; ^cORCID: 0000-0001-9872-1882;
^dORCID: 0000-0001-8970-6883; ^eORCID: 0000-0003-2048-9854; ^fORCID: 0000-0001-9527-4730.

✉Corresponding author: eylemfundagoktas@gmail.com
Received date: 13.03.2019- Accepted date: 10.07.2019

Abstract: Stability of some international screening limited therapeutic substances for doping control in equine blood has been investigated with a validated method by using LC-MS/MS after chemical hydrolysis with orthophosphoric acid. Whole blood samples were extracted with a WAX cartridge on auto-SPE. Stability test of the drug substances performed at the same time in working solution and matrix at +4°C, -20°C, +20°C in dark and +20°C in light conditions for 1, 2, 3 and 4 weeks. For short-time stability, the effects of 6 h storage at +55°C was also investigated. Repeated data were statistically analyzed with ANOVA. All substances in working solution were stable at -20°C and +4°C. In the blood matrix, higher temperatures (+20°C) in light and dark caused degradation of substances at the end of four weeks and short-term study (P< 0.05). In conclusion, these international screening limited substances in blood matrix could be unstable related to temperature and storage time, although in working solution they could be mostly stable in various temperatures for four weeks.

Keywords: Doping control, equine blood, LC-MS/MS, stability.

Uluslararası tarama limiti olan bazı ilaçların at kanında LC-MS/MS ile tayini ve stabilitesi

Özet: Doping kontrolü amacıyla uluslararası tarama limiti kapsamında olan bazı terapötik maddelerin at kanında valide bir metotla LC-MS/MS cihazı kullanılarak stabilitesi araştırılmıştır. Tam kan örneklerinde ortofosforik asitle kimyasal hidroliz sonrasında bir WAX kartuş kullanılarak otomatik katı faz ekstraksiyonuyla ekstrakte edilmiştir. Etken maddelerinin stabilite testi, çalışma çözeltisinde ve matris içerisinde +4°C, -20°C, +20°C karanlıkta ve +20°C gün ışığında 1, 2, 3 ve 4 hafta için eşzamanlı olarak çalışılmıştır. Kısa zamanlı stabilite çalışması +55°C'de 6 saat saklamanın etkisini kapsayacak şekilde araştırılmıştır. Yapılan tekrarlı analizler ANOVA ile istatistiksel olarak

değerlendirilmiştir. Çalışma çözeltisindeki tüm maddeler -20°C ve 4°C'de stabildi. Işıktaki ve karanlıkta yüksek sıcaklık, dört hafta sonunda ve kısa süreli çalışmada kan matriksindeki maddelerin bozunmasına neden olmuştur ($P < 0.05$). Sonuç olarak, bu uluslararası tarama limitli maddeler sıcaklık ve zamana bağlı olarak kan matriksinde stabil olmayabilirken, çalışma çözeltisinde farklı sıcaklıklarda dört hafta boyunca çoğunlukla stabildir.

Anahtar sözcükler: At kanı, doping kontrol, LC-MS/MS, stabilite.

Introduction

Most of the doping laboratories that control the samples collected from racing horses are conducting the analysis of prohibited substances according to the International Agreement on Breeding, Racing and Wagering (IABRW) guidance document, which is determined and updated by International Federation of Horseracing Authorities (IFHA) (7). There is no limit level for prohibited substances, however, some endogenous substances in horse metabolism, feed or environmental contaminants have a threshold and therapeutic substances with international screening limits should be analyzed at their specified value as a requirement. The limits for substances are regulated based on therapeutic effects on equines health and prevent their misuse (26). Most of the samples taken from equines are urine and/or blood. When determining the limit values and substances, the type of the sample and drug metabolism are considered. The studied therapeutic substances and the international screening limits in blood are shown in Table 1.

Post-race samples are separated into two parts as called A and B (7). Sample A is transported as quickly as possible for doping control. Sample B stored under suitable conditions is analyzed if sample A is detected as positive. According to the current legislation, blood samples are not frozen and stored in the refrigerator (+4°C) unless separated to serum or plasma (7, 26). The time elapsed between the analysis of sample A and B; the storage conditions of sample B, the description of the effect of temperature changes during transport and consequently knowing the stability of the positive detected substance are critical for the proper interpretation results of the analysis (20). If sample A is identified as positive, sample B should be identifiable in the same manner. In biological fluids sample during storage and transportation, drug concentration could be decreased or increased related to temperature, pH, thermal or

chemical degradation, hydrolysis, enzymatic metabolism, compound interference, microbiological or matrix effects (9, 11). Due to these effects, confirmatory analysis with sample B, reported as positive before, could be determined as negative. Especially for limited substances, the storage conditions and time are crucial for the quantitative drug presence in the sample to avoid false positive/negative results (9, 11, 24, 25). So, the stability knowledge of the substances in the sample gives vital information about reporting time.

In previous studies, short or long-term stability were conducted in urine (6, 22, 23, 24, 25), whole blood (1, 2, 5, 8, 12), plasma or serum (1, 2, 19) for doping control (10, 18, 19, 24, 25), trace element analysis (21) and toxicological researches (4, 5, 6). Nevertheless, there are few studies were focused on the threshold or limited doping agents except some anabolic steroids (10, 18), diuretics (24) and caffeine (25) in urine matrix. Beside of previous studies, we aimed to analyze the international screening limited Flunixin, Meloxicam, Demborexine, NButylscopolammonium, Carprofen, Butorphanol, Lidocaine, Mepivacaine, Acepromazine, 7 deuterated internal standards (IS) with the validated method by LCMS/MS and evaluate firstly their stability in diluted working standard and equine blood matrix at different temperatures and conditions in four week period. In addition to that, short-term stability of 6 h storage at +55°C was investigated as a simulation of hot-day storage effects.

Material and Methods

Chemicals and standard solutions: Flunixin, Flunixin d3 and Carprofen obtained from Sigma Aldrich (Schnelldorf, Germany); Meloxicam, Demborexine, Butorphanol tartrate, Scopolamine d3 Hydrobromide trihydrate and Cortisol-9,11,12,12 d4 purchased from Chiron (Chiron AS, Trondheim Norway); Meloxicam d3, Carprofen-d3, 3-OH

Lidokain-d5, 3-OH Mepivacaine-d3, Acepromazine, N-Butylscopolammonium provided from TRC (Toronto Research Chemicals, North York ON, Canada); Mepivacaine obtained from EDQM (Strasbourg, France); Lidocaine was purchased from LGC (Molsheim France). All standards purity was $\geq 98\%$. Water was purified with an Elga-purelab flex water purification system (Elga-Veolia Water Solutions&Technologies, UK). n-Hexane was obtained from VWR Chemicals (VWR International Fontenay Sous Bois, France), Ethyl acetate and Methanol were obtained from J.T. Baker (Gliwice, Poland). Potassium dihydrogen phosphate and orthophosphoric acid, acetonitrile (ACN) and formic acid (FA) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Acetic acid was obtained from Sigma Aldrich (Schnellendorf, Germany). All chemicals were of HPLC grade purity. The solid-phase extraction (SPE) cartridge Oasis Wax (3 cc Vac Cartridge, 60 mg Sorbent per Cartridge, 60 μm Particle Size, 100/pk) were obtained from Waters, USA. For sample preparation auto-pipette (Eppendorf Multipette Xstream), vortex mixer (Allsheng MTV-100), laboratory centrifuge (Thermo Scientific Heraeus Cryofuge 5500i), nitrogen evaporator (Biotage Turbo Vab LV), SPE system auto-SPE (Gilson Aspec 274) were used. For storage, Sanyo Medicool (MPR414F) refrigerator and Sanyo Biomedical (MDF-U537D) freezer were used. Blood samples taken from race horses which were

determined as negative in the doping control laboratory were used. Permission of the ethics committee was received for this study (Local Ethical Committee for Experimental Animals of Pendik Veterinary Control Institute 03/2019).

Preparation of solutions and instrument conditions: Primary stock standard solutions were prepared in methanol at a concentration of 1 mg mL^{-1} (Carprofen, Dembrexine, Flunixin, Acepromazine, Lidocaine, Mepivacaine, N-Butylscopolammonium, Butorphanol, Meloxicam d3 (IS), 3 Hydroxy Lidocaine d5 (IS), 3 Hydroxy Mepivacaine d3 (IS), Carprofen d3 (IS) and Scopolamine d3 Hydrobromide trihydrate (IS)), $100\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ (Flunixin d3 and Cortisol d4) except 1 mg mL^{-1} Meloxicam in DMSO. The working standard mix solution was prepared by dilution of suitable aliquots of primary stock standard solutions and used to spike the blood samples. Cortisol d4 was used as an internal standard for Dembrexine, Acepromazine and Butorphanol. The working solution mix (10 mL) was contained $0.1\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ Flunixin, $0.1\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ Meloxicam, $0.1\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ Carprofen, $0.002\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ Acepromazine, $0.002\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ Lidocaine, $0.5\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ Dembrexine, $0.005\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ Mepivacaine, $0.01\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ N-Butylscopolammonium, $0.002\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ Butorphanol. Internal standard mix solution (10 mL) was contained $5\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ concentration of deuterated IS.

Table 1. International screening limits (ISL) of nine drugs recommended by IFHA's Advisory Council on Equine Prohibited Substances and Practices, March 2016 (7).

Substance	ISL (ng/mL in plasma)
Flunixin (FLU)	1
Meloxicam (MEL)	1
Dembrexine (DEM)	5
N-Butylscopolammonium (SCO)	0.05
Carprofen (CAR)	100
Butorphanol (BUT)	0.01
Lidocaine (LID)	0.05
Mepivacaine (MEP)	0.05
Acepromazine (ACE)	0.02

Table 2. Optimisation data of drug substances and internal standards in MRM mode.

Compound Name	Precursor ion	Fragmentor	Product ion	Collision energy	Polarity
Meloxicam	352.2	100	141	15	Positive
			115	16	
Flunixin	297.2	130	279	21	Positive
			264	33	
Carprofen	274.1	90	228	9	Positive
			193	31	
Acepromazine	327.3	150	254.1	20	Positive
			222.1	40	
			86.1	20	
Lidocaine	235.3	100	86.1	11	Positive
			58.1	33	
Dembrexin	378	100	262.7	25	Positive
			81	25	
Mepivacaine	247.3	110	98.1	16	Positive
			70.1	48	
N-Butylscopolammonium Bromide	360.2	150	194	16	Positive
			103	50	
Butorphanol	328.4	140	310.2	20	Positive
			157.1	46	
Cortisol D4	367.2	120	121	21	Positive
			97	41	
Flunixin D3	300.1	140	282.1	21	Positive
			264.1	35	
Scopolamine D3 Hyrobromid trihydrate	307.2	90	159.1	11	Positive
			141	27	
3-OH Mepivacaine-D3	266.2	110	101.1	17	Positive
			73.1	37	
3-OH Lidocaine-D5	256.2	100	91.2	17	Positive
			63.2	41	
Carprofen-d3	275	80	231	13	Negative
			228	41	
Meloxicam-d3	355.1	120	141	39	Positive
			115	9	

LC-MS/MS analyses were performed on an Agilent series 1200 liquid chromatography (Santa Clara, CA, USA) coupled to 6460 triple-quadrupole mass spectrometer, equipped with an

electrospray ionization (ESI) source. The study was modified by Moulard et al. (14) LC MS/MS method. For separation, Sunfire C18 column (Waters, USA) with dimension 2.1x150 mm and

particle size 3.5 μm was used. The gradient was applied with H_2O -0.1 % FA (phase A) and ACN-0.1 % FA (phase B). The initial conditions of the gradient kept until 5 min was 80 % A and 20 % B. The phase A was decreased to 50 % at 20 min, and at 25 min to 0 %. Such conditions were maintained until 27 min and the system was reequilibrated with initial compositions of the mobile phase. The total run-time of the method was 31 min. The flow rate was 0.3 mL min^{-1} , the injection volume was 20 μL , and the column temperature was 35°C. The ESI interface conditions with multiple reaction monitoring (MRM) modes were; the gas temperature 325°C, gas flow 10 L min^{-1} (N_2), sheath gas temperature 350°C, sheath gas flow 12 L min^{-1} , capillary voltage 3.5 kV in negative mode and 4.5 kV in positive mode, nebulizer gas 50 psi and max. pressure limit was 600 bar. Diagnostic ions of drug substances were detected in MRM mode as listed in Table 2.

Sample preparation: The study was modified by Popot et al. (16) extraction method. 3 mL whole blood samples plasma into 15 mL polypropylene tube after centrifuge at 4400 rpm for 15 min 30 μL of IS mix, 100 μL orthophosphoric acid and 1.5 mL deionized water was added, mixed in the vortex for 10 min for hydrolysis. Then, 2.5 mL phosphate buffer (0.5 M, pH 6.5) was added and pH adjusted to 6 with 5 % HCl. The sample was mixed again and centrifuged (3500 rpm, 15 min). The tubes were placed into auto-SPE and preconditioned (2 mL deionized water, 2 mL methanol). The sample was loaded on the cartridge, washed with 3 mL deionized water/methanol (95/5) and dried for 2 min under vacuum then eluted from the cartridge with 3 mL ethyl acetate/methanol-2 % acetic acid (50/50) and evaporated to dryness (N_2 , 45°C). The dry residue dissolved with 2x100 μL methanol, transferred into a glass vial and dried again. 50 μL mobile phase solution (80/20 H_2O -0.1 % FA/ACN-0.1 % FA) added and mixed for 3 min before injected to LC MS-MS.

Stability studies: Stability design have been demonstrated according to 2002/657/EC Commission Decision (3, 15). For this purpose; 60 mL drug-free blood sample was collected and spiked with mix standard solution and IS mix solution on ISL levels and shaken for 10 min. After that 3 mL of blood sample was taken and analyzed

as fresh solution data for matrix stability. For each storage period, 15 mL of blood sample divided into glass bottles and stored at $+4\pm 2^\circ\text{C}$ (in the refrigerator), $20\pm 2^\circ\text{C}$ (deep freeze), $+20\pm 2^\circ\text{C}$ in light and $+20\pm 2^\circ\text{C}$ in dark at climate room and temperature controlled with a data logger. The same application was designed for the working solution mix stability with the separation of 750 μL of standard mix solutions to different storage conditions and fresh solution analyzed as initial data for stability test. The aliquots were tested with three replicates after 1, 2, 3 and 4 weeks' storage (estimated reporting time). Short-term stability was evaluated as the influence of 6 h storage at $+55\pm 2^\circ\text{C}$ for simulating the transfer effects on hot days. 6 mL of drug-free whole blood spiked with 60 μL mix standard solution. 3 mL was kept in an incubator at $+55\pm 2^\circ\text{C}$ for 6 h and the other 3 mL kept at $+4^\circ\text{C}$. Then both of them were analyzed together ($n=3$).

The stability test was designed according to 2002/657/EC, but there is no criterion for the assessment of stability in the guideline. Therefore, for the estimation of the instability of drugs while for the evaluation of degradation over a time period the $\pm 15\%$ precision acceptance criterion was used (20). In many other stability studies, the results were interpreted according to this criterion (9, 12, 13, 17, 23). The results outside the specified criteria are shown on the lines of the graphics. Analysis of Variances (ANOVA) was used for statistical evaluation of the effect of temperature, light-darkness and time of the storage by comparing the initial concentration and measured concentration at varying temperature using SPSS software package (SPSS version 21 for Windows).

Results

Results of the method for quantitation of some ISL drugs were shown in Figure 1 at the limit level spiked for each drug. The method was used in our laboratories routine analyses and validated according to 2002/657/EC (3). The validation summary for studied substances were shown in Table 3. In the results of validation data, CV % values were calculated as 1.5-7.2 % for precision and 1.619.7 % for with-in laboratory reproducibility (Table 2).

For estimation of the results, responses of substances were shown depend on temperature and time in Figure 2 and 3. Initial and end of four weeks concentrations were statistically compared in Table 4. Over four weeks, all substances in working

deviated out of the criterion of $\pm 15\%$ (Figure 2, $P < 0.05$).

In blood matrix, while all substances were stable at $+4^{\circ}\text{C}$ for four weeks (Figure 3, $P > 0.05$), N-Butylscopolammonium was significantly degraded at 4th week (Table 4, $P < 0.05$). There were significant differences in all substances at $+20^{\circ}\text{C}$ in both light and dark conditions when comparing initial data with 4th week data (Table 4, $P < 0.05$). In addition, N Butylscopolammonium,

solution were stable in conditions of $+4^{\circ}\text{C}$ and -20°C ($P > 0.05$). But N-Butylscopolammonium in the light condition of $+20^{\circ}\text{C}$ after 3rd week and Dembrexin in both of light and dark conditions of $+20^{\circ}\text{C}$ after 2nd week

Acepromazine and Carprofen were significantly unstable at -20°C during four weeks (Figure 3, $P < 0.05$).

When blood samples were stored at $+55^{\circ}\text{C}$ during six hours for short-term stability, substances (except Flunixin and Carprofen) were degraded at an amount of up to 50 %. Though, Flunixin and Carprofen were increased at high temperature (Figure 4).

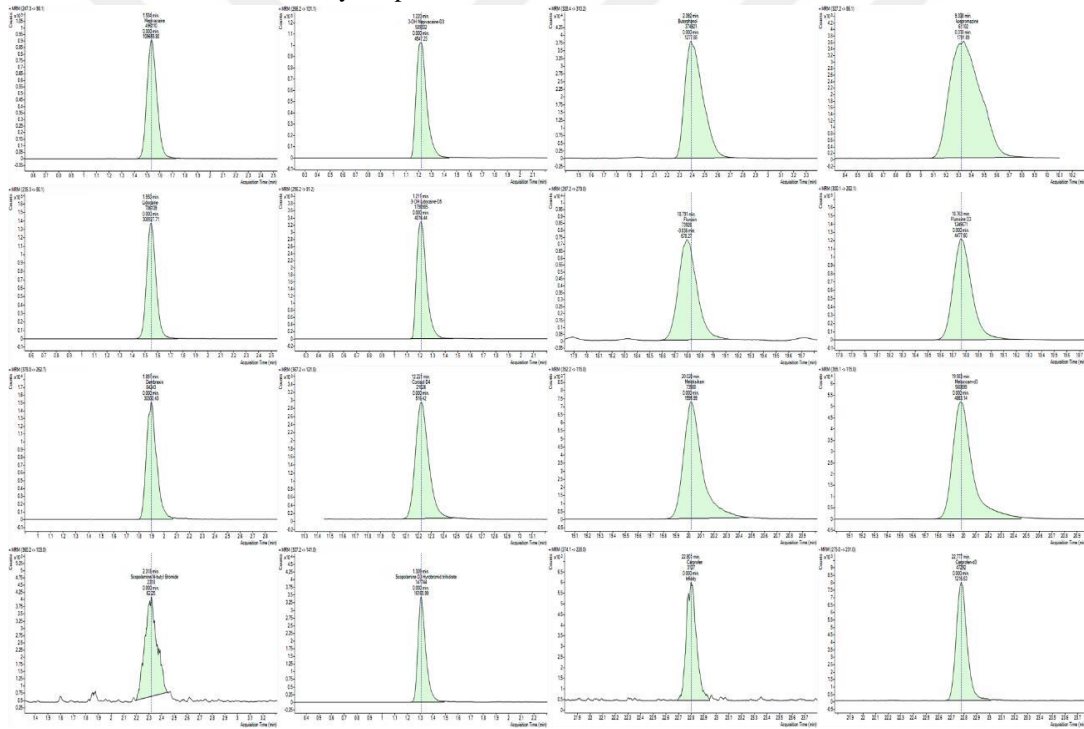


Figure 1. Chromatograms of spiked equine blood samples at ISL levels and internal standards.

Table 3. Results of method validation.

Substances	Conc. spiked (ng/mL)	Interday (n=6)		Intraday (n=18)		Within lab. reproducibility CV (%) ^b	CC α (ng/mL) ($\alpha=1\%$)	CC β (ng/mL) ($\beta=5\%$)
		Conc. measured (mean \pm SD)(ng/mL)	Precision CV (%) ^a	Conc. measured (mean \pm SD)(ng/mL)	Precision CV (%) ^a			
MEP	0.05	0.0494 \pm 0.0015	3.1235	0.0496 \pm 0.0013	2.5585	3.0827	0.0522	0.0544
LID	0.05	0.0487 \pm 0.0010	1.9965	0.0494 \pm 0.0012	2.4186	2.4747	0.0520	0.0540
DEM	5.00	5.0397 \pm 0.0799	1.5863	5.0243 \pm 0.0841	1.6733	1.6530	5.1385	5.2769
SCO	0.05	0.0492 \pm 0.0008	1.6536	0.0492 \pm 0.0019	3.9028	4.7741	0.0537	0.0575
BUT	0.01	0.0108 \pm 0.0006	5.4450	0.0103 \pm 0.0007	7.1511	7.8057	0.0113	0.0126
ACE	0.02	0.0195 \pm 0.0014	7.2780	0.0205 \pm 0.0033	16.2990	19.7906	0.0250	0.0300
FLU	1.00	1.0272 \pm 0.0375	3.6550	0.9970 \pm 0.0404	4.0536	3.6661	1.0596	1.1192
MEL	1.00	0.9429 \pm 0.0550	5.8288	0.9992 \pm 0.0778	7.7836	5.5974	1.1140	1.2279
CAR	100.00	101.6593 \pm 6.0112	5.9131	100.2595 \pm 7.3812	7.3621	7.8057	113.9520	127.9039

^a For ≥ 10 -100 ng/mL CV(%) shall be not exceed 20. For mass fractions lower than 100 ng/mL the application of the Horwitz Equation gives unacceptable high values. Therefore, the CVs for concentrations lower than 100 ng/mL shall be as low as possible.

^b For 100 ng/mL CV(%) shall be not exceed 23. For mass fractions lower than 100 ng/mL the application of the Horwitz Equation gives unacceptable high values. Therefore, the CVs for concentrations lower than 100 ng/mL shall be as low as possible.

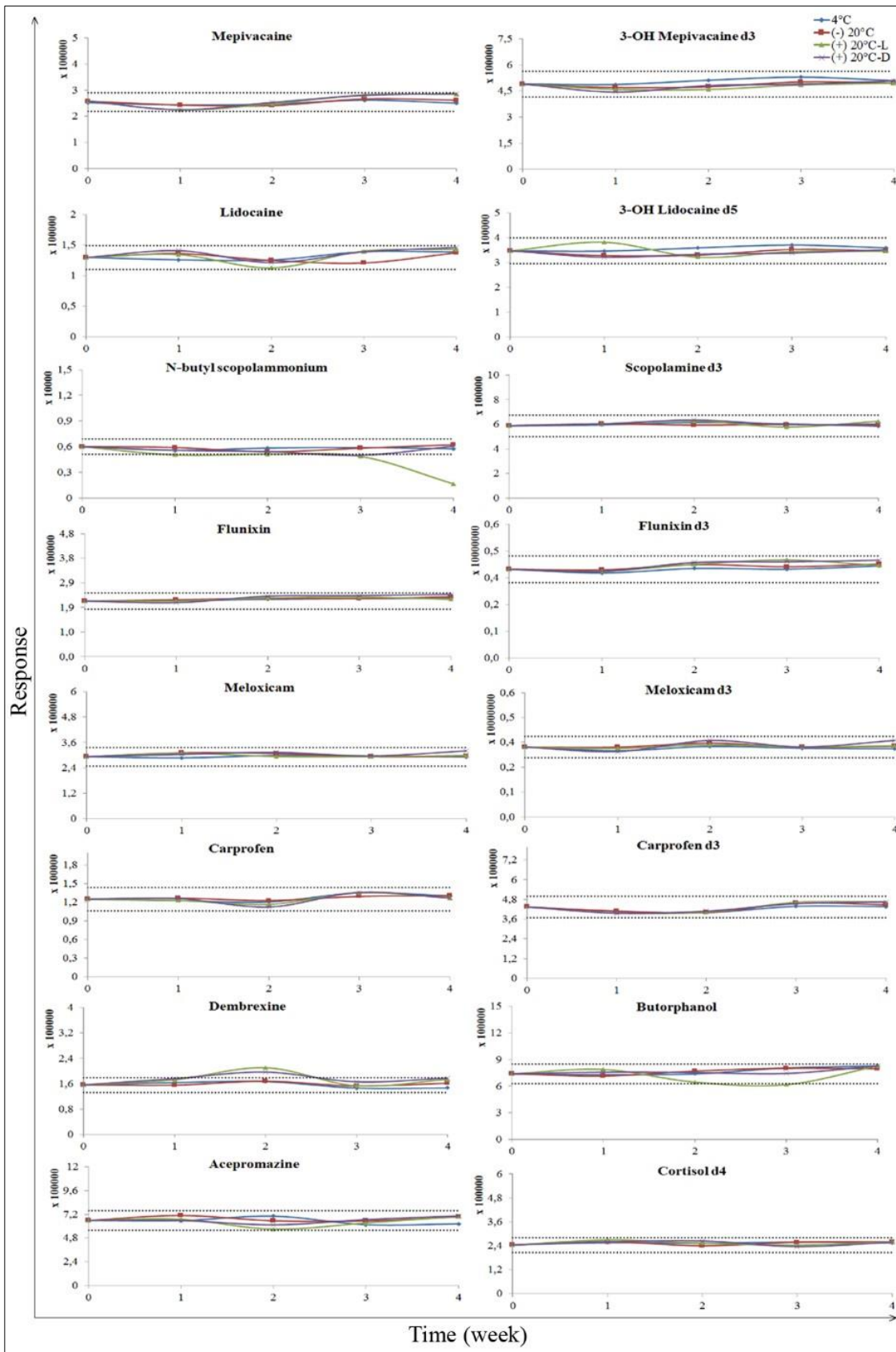


Figure 2. Stability results of working solution mix of nine ISL substances and their internal standards.

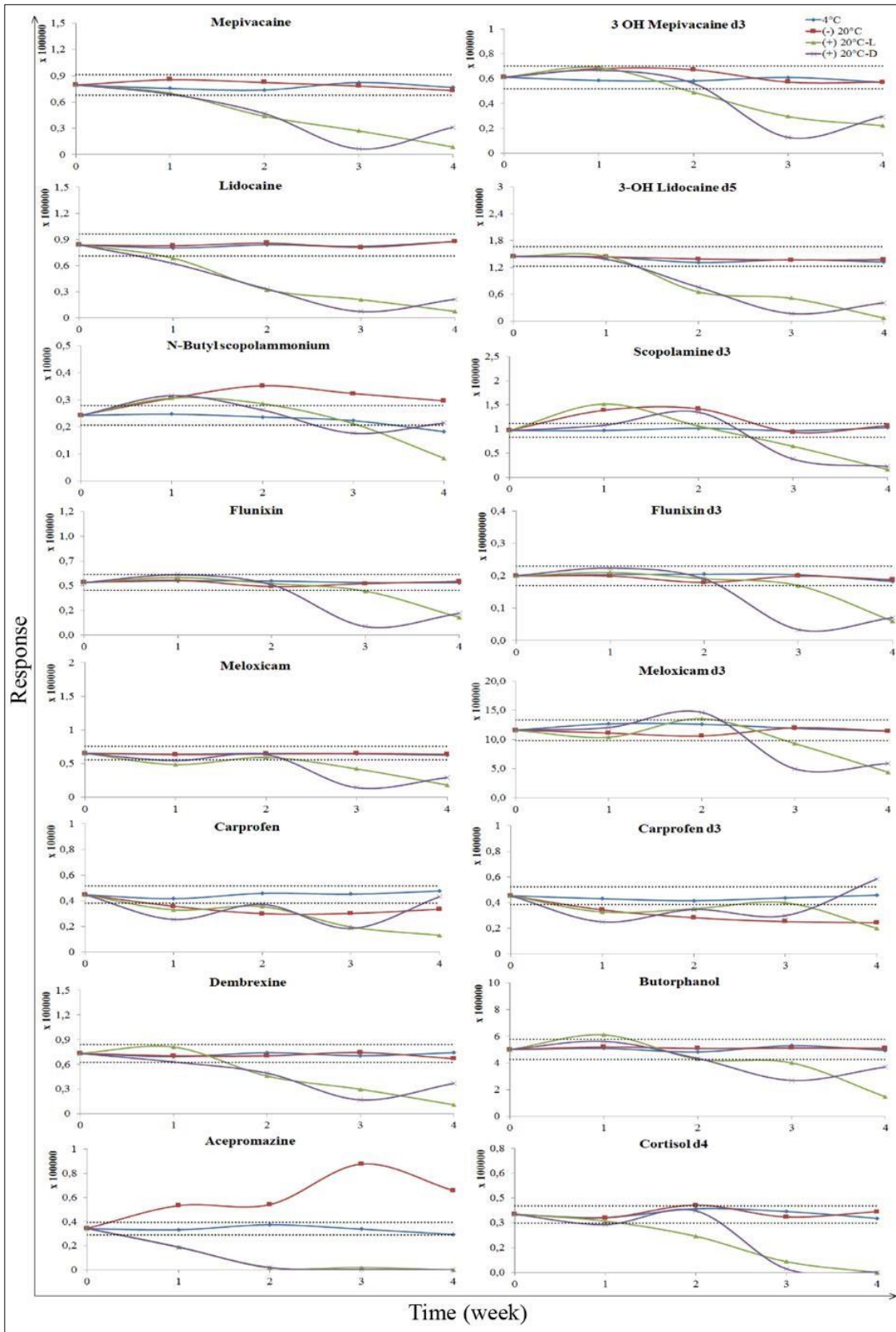


Figure 3. Nine ISL substances and their IS's stability results in blood matrix.

Table 4. The effects of different storage conditions on stability after four weeks.

Substances	Matrix (mean±SD) (ng/mL)					Working Solution (mean±SD) (ng/mL)				
	Initial	+4°C	-20°C	+20°C-Light	+20°C-Dark	Initial	+4°C	-20°C	+20°C-Light	+20°C-Dark
MEP	0.057±0.008	0.062±0.001	0.063±0.002	0.029±0.001 ^a	0.034±0.001 ^a	0.050±0.001	0.051±0.001	0.051±0.001	0.052±0.001	0.052±0.001
LID	0.043±0.005	0.04±0.001	0.043±0.001	0.017±0.002 ^a	0.024±0.001 ^a	0.051±0.002	0.051±0.001	0.051±0.001	0.051±0.001	0.051±0.001
DEM	3.067±0.142	3.016±0.077	2.992±0.025	0.02±0.001 ^a	0.05±0.001 ^a	5.198±0.169	5.108±0.038	5.104±0.050	5.104±0.129 ^a	5.222±0.069
SCO	0.066±0.006	0.047±0.003 ^a	0.076±0.001 ^a	0.035±0.004 ^a	0.059±0.001 ^a	0.049±0.001	0.051±0.001	0.050±0.001	0.035±0.001 ^a	0.050±0.001
BUT	0.008±0.001	0.008±0.001	0.008±0.001	0.001±0.000 ^a	0.005±0.000 ^a	0.010±0.001	0.010±0.001	0.011±0.001	0.011±0.001	0.011±0.001
ACE	0.015±0.001	0.016±0.001	0.025±0.003 ^a	0.008±0.005 ^a	0.005±0.001 ^a	0.019±0.001	0.020±0.001	0.021±0.001	0.020±0.001	0.020±0.001
FLU	0.991±0.010	0.99±0.011	0.995±0.005	0.738±0.055 ^a	0.005±0.001 ^a	1.018±0.055	1.022±0.021	1.031±0.016	1.032±0.009	1.050±0.023
MEL	1.008±0.069	1.015±0.009	1.015±0.013	0.615±0.046 ^a	0.707±0.037 ^a	0.978±0.012	1.001±0.017	1.001±0.012	1.007±0.021	1.036±0.021
CAR	107.430±12.180	98.592±3.215	72.473±1.874 ^a	33.500±5.168 ^a	85.746±1.686 ^a	103.188±8.020	108.325±4.961	109.825±3.483	108.173±2.917	107.583±2.884

^a Significant difference (P<0.05) when compared to the initial data mean.

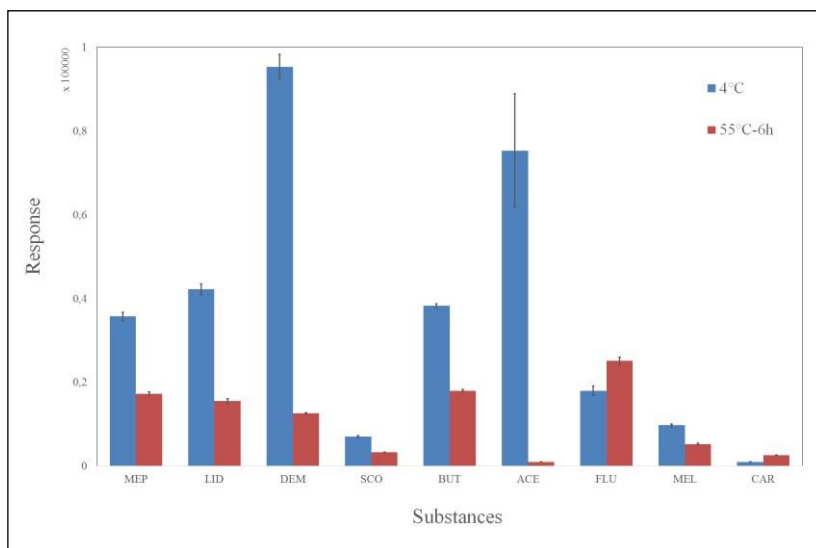


Figure 4. Short-term stability of ISL substances.

Discussion and Conclusion

The stability knowledge of standards used as references and working solutions at different storage conditions is requisite to check the analysis method and to compare the spiked sample with real sample. For this reason, the stability of both working solution and internal standards used in this study was examined and compared unlike previous studies. Results of this study found out that substances in working solution were stable and matrix effects were clearly occurred related to storage temperature and time. But, at 4th week N-Butylscopolammonium in working solution was degraded at +20°C in light. Van der Merwe et al. (22) similarly reported that substances can be affected by light.

In blood matrix stability study, reproduction of microorganisms has occurred in the samples kept in +20°C light and dark after 2nd week. The stability of the substances significantly degraded in +20°C conditions in a short time like other studies on urine and blood (19, 22, 24). It could be a result of thermal or microbiological degradation (11). Considering the short-term stability study, the samples have a negative effect if the samples are above +20°C, hence the results may be misleading.

There were deviations from the criterion value ($\pm 15\%$) at -20°C for Acepromazine, Carprofen and NButylscopolammonium. Acepromazine showed a negligible increase in concentration overtime during the storage at -20°C (Figure 3). This effect

could be reinvestigated. The materials used as internal standard are showed similar effects. These results demonstrated that blood samples should not be frozen as indicated on legislation (7). The previous study for 10-week stability in the blood, a decrease of Carprofen (30% at -20°C) and Meloxicam (70% at +20°C) occurred similar to our study, and it was stated that the time between the analyses of A and B samples was 4 weeks as a proposal (19). However, the instability of N-Butylscopolammonium after the 3rd week, some antipsychotic drugs after 1st week (17) and diuretics after 4th week (24) showed that the analysis time between sample A and B should be kept as short as possible because the substances were differently affected at storage conditions.

Short-term stability demonstrated the high temperature decreased all ISL substances except Flunixin and Carprofen (24). Schenk et al. (19) suggested that the temperature may increase some substances with protein participation. So, the increase of Flunixin and Carprofen might be related to thermo-hydrolysis of proteins in blood matrix.

The best of our knowledge, this is the first report about the stability of ISL substances based on limit value in whole equine blood related to different temperatures, time and light conditions. It was presented the effects of temperature and time on substances in matrix by the comparison of working solution and matrix stabilities. In accordance with results, samples might be stored and transported at +4°C in dark condition and

immediately analyzed to avoid false negative/positive results. Future studies about the stability of doping agents may be increased for correct interpretation.

Acknowledgements

This study was supported by funds from the Republic of Turkey Ministry of Agriculture and Forestry, İstanbul Pendik Veterinary Control Institute.

Conflict of Interest


The authors declared that there is no conflict of interest.

References

1. **Atanasov VN, Stoykova S, Runiov A, et al** (2012): *Stability of diazepam in blood samples at different storage conditions and in the presence of alcohol*. *Forensic Sci Int*, **215**, 159-163.
2. **Clauwaert KM, Van Boclaer JF, De Leenheer AP** (2001): *Stability study of the designer drugs "MDA, MDMA and MDEA" in water, serum, whole blood, and urine under various storage temperatures*. *Forensic Sci Int*, **124**, 36-42.
3. **Commission Decision** (2002): Concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. European Commission, 2002/657/EC.
4. **Dugan S, Bogema S, Schwartz RW, et al** (1994): *Stability of drugs of abuse in urine samples stored at -20°C*. *J Anal Toxicol*, **18**, 391-396.
5. **Giorgi SN, Meeker JE** (1995): *A 5-year stability study of common illicit drugs in blood*. *J Anal Toxicol*, **19**, 392-8.
6. **Hippenstiel MJ, Gerson B** (1994): *Optimization of storage conditions for cocaine and benzoylecgonine in urine: a review*. *J Anal Toxicol*, **18**, 104-109.
7. **International Federation of Horseracing Authorities** (2019): International agreement on breeding, racing and wagering and appendixes (February 2019). <https://www.ifhaonline.org/resources/ifAgreement.pdf> (14 February 2019).
8. **Jane Ellis M, Livesey JH, Evans MJ** (2003): *Hormone stability in human whole blood*. *Clinical Biochem*, **36**, 109– 112.
9. **Jiménez C, Ventura R, Segura J, et al** (2004): *Protocols for stability and homogeneity studies of drugs for its application to doping control*. *Anal Chim Acta*, **515**, 323331.
10. **Jiménez C, de la Torre R, Segura J, et al** (2006): *Stability studies of testosterone and epitestosterone glucuronides in urine*. *Rapid Commun Mass Spectrom*, **20**, 858-864.
11. **Jiménez C, de la Torre R, Ventura M, et al** (2006): *Stability studies of amphetamine and ephedrine derivatives in urine*. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, **843**, 84-93.
12. **Kita K, Ishii T, Hotta K, et al** (2018): *A dried blood spot assay with UPLC-MS/MS for the simultaneous determination of E6005, a phosphodiesterase 4 inhibitor, and its metabolite in human blood*. *J Pharm Biomed Anal*, **157**, 208-216.
13. **Moody DE, Monti KM, Spanbauer AC** (1999): *Longterm stability of abused drugs and antiabuse chemotherapeutical agents stored at -20°C*. *J Anal Toxicol*, **6**, 535-40.
14. **Moulard Y, Bailly-Chouriberry L, Boyer S, et al** (2011): *Use of benchtop exactive high resolution and high mass accuracy orbitrap mass spectrometer for screening in horse doping control*. *Anal Chim Acta*, **700**, 126-136.
15. **Peris-Vicente J, Esteve-Romero J, Carda-Broch S** (2015): *Validation of analytical methods based on chromatographic techniques: An overview*. 1757-1808. In: LA Jared, A Berthod, VP Estévez, AM Stalcup (Ed), *Analytical Separation Science*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Germany.
16. **Popot MA, Garcia P, Hubert C, et al** (2014): *HPLC/ESIMS(n) method for non-amino bisphosphonates: application to the detection of tiludronate in equine plasma*. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, **958**, 108116.
17. **Saar E, Gerostamoulos D, Drummer OH, et al** (2012): *Assessment of the stability of 30 antipsychotic drugs in stored blood specimens*. *Forensic Sci Int*, **215**, 152-158.
18. **Saudan C, Entenza JM, Baume N, et al** (2006): *Shortterm stability of testosterone and epitestosterone conjugates in urine samples: quantification by liquid chromatography-linear ion trap mass spectrometry*. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, **844**, 168-174.
19. **Schenk I, Machnik M, Guddat S, et al** (2008): *Stability of a representative selection of drugs in horse blood*. 225-235. In: E Houghton, FI Keskin, JF Wade, N Yazıcıoğlu (Ed), *Proceeding of the 17th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians*, Antalya, Turkey.
20. **Shah VP, Midha KK, Dighe S, et al** (1992): *Analytical methods validation: Bioavailability, bioequivalence, and pharmacokinetic studies*. *J Pharm Sci*, **81**, 309-312.
21. **Tevis DS, Jarrett JM, Jones DR, et al** (2018): *Assessing the stability of Cd, Mn, Pb, Se, and total Hg in whole human blood by ICP-DRC-MS as a function of temperature and time*. *Clin Chim Acta*, **485**, 1-6.






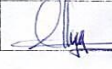
22. **Van der Merwe PJ, Pieterse JW** (1994): *Stability of zeranol, nandrolone and trenbolone in bovine urine*. *Analyst*, **119**, 2651-2653.
23. **Van der Merwe PJ, Grobbelaar E** (2003): *Stability of 19norandrosterone and 19-noretiocholanolone glucuronide in urine under various storage conditions*. *SA Sports Medicine*, **15**, 14-17.
24. **Van Eenoo P, Lootens L, Spaerkeer A, et al** (2007): *Results of stability studies with doping agents in urine*. *J Anal Toxicol*, **31**, 543-548.
25. **Ventura R, Jiménez C, Closas N, et al** (2003): *Stability studies of selected doping agents in urine: caffeine*. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, **795**, 167177.
26. **Wong JK, Wan TS** (2014): *Doping control analyses in horseracing: a clinician's guide*. *Vet J*, **200**, 8-16.

9.3. Ek 3 Etik Kurul İzni



MARMARA ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

PROJE ONAY FORMU

BAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU	111.2016.mar	ÇALIŞMA: BİLİMSEL OLARAK		
	PROJE ADI	Yarış Atlarının İdrar Örneklerinde Bazı İlaç Etkin Maddelerinin Eşzamanlı Analizleri İçin Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi ve/veya Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi İle Metot Geliştirilmesi ve Analitik Metot Validasyonu			
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ ADI	Yrd. Doç. Dr. Filiz ÖZDEMİR	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ ADI		
	ARAŞTIRMA MERKEZİ	DEHAMER			
	DESTEKLEYİCİ				
KARAR BİLGİLERİ	TARİH: 14.11.2016 Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekece, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve gerçekleştirilmesinde sakınca bulunmadığı için kurumumuzca onaylanmasına oy birliği ile karar verilmiştir. Onay sonrasında yapılacak her türlü proje değişiklikleri (katılımcılar, başlık vb.) veya protokol değişikliklerinin Etik Kurula bildirilerek proje onayının yenilenmesi gerekmektedir.				
ETİK KURUL BİLGİLERİ					
ÇALIŞMA ESASI	Deney hayvanları ile yapılacak olan bilimsel araştırma, test, sağlık hizmetleri uygulamaları ve eğitim-öğretim gibi temel etkinliklerde kullanılan yöntem ve materyaller ile ilgili etik standartları gözetmek, etik ilkeler doğrultusunda görüş bildirmek, araştırma önerilerini incelemek ve sertifikası olmayanların deney hayvanı kullanmalarını engellemektir.				
ÜYELER					
Ünvanı/ Adı/ Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu/ Ek Üyeliği	Onaylanan Proje ile İlişkisi	Toplantıya Katılım	İmza
Prof.Dr. Göksel ŞENER	Farmakoloji	M.Ü. Eczacılık Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Başkanı	Var Yok	Evet Hayır	
Prof.Dr. Levent KABASAKAL	Farmakoloji	M.Ü. Eczacılık Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Üyesi	Var Yok	Evet Hayır	
Prof.Dr. Ayşen YARAT	Biyokimya	M.Ü. Diş Hekimliği Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Üyesi	Var Yok	Evet Hayır	
Prof.Dr. Serap ŞİRVANCI	Histoloji Embriyoloji ABD	M.Ü. Tıp Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Üyesi	Var Yok	Evet Hayır	
Prof.Dr. Rezzan GÜLHAN	Farmakoloji	M.Ü. Tıp Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Üyesi	Var Yok	Evet Hayır	
Doç.Dr. Gürkan SERT	Tıp Tarihi ve Etik	M.Ü. Tıp Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Üyesi	Var Yok	Evet Hayır	
Vet. Dr. Dilek ÖZBEYLİ	Veteriner Hekim	M.Ü. Tıp Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Üyesi	Var Yok	Evet Hayır	
Bio. Arif GÜMÜŞ	Biyoloji	Sivil Toplum Kuruluşu Üyesi ve Kurumla ilişkisi olmayan TC vatandaşı üye	Var Yok	Evet Hayır	
Cihanşah MURATOĞLU	Serbest Danışmanlık	Kurumla ilişkisi olmayan TC vatandaşı üye	Var Yok	Evet Hayır	

10. ÖZGEÇMİŞ

Adı	Eylem Funda	Soyadı	Göktaş
Doğum Yeri	Ankara	Doğum Tarihi	14.03.1986
Uyruğu	T.C.	Tel	02163901280
E-mail	eylemfundagoktas@gmail.com		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora	Marmara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü	2019
Yüksek Lisans	Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü	2011
Lisans	Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi	2008
Lise	Kalaba Anadolu Lisesi	2004

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl-Yıl)
Kimyager	Elazığ Veteriner Kontrol Enstitüsü	2011-2012
Kimyager	Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü	2012-Halen

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*

İngilizce	İyi	İyi	İyi
-----------	-----	-----	-----

Yabancı Dil Sınav Notu #								
YDS	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
73,75								

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	75,92	75,95	65,59
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendiriniz.