

**BAZI NON STEROİDAL ANTIİNFLAMATUVAR  
İLAÇLARIN RATLARDA ORAL UYGULAMA  
SONRASI KAN ADRENALİN DÜZEYLERİ ÜZERİNE  
ETKİSİ**

**Alptuğ ATİLA**

**ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI  
Tez Yöneticisi:**

**Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU**

**DOKTORA TEZİ  
ERZURUM – 2011  
HER HAKKI SAKLIDIR**

T. C.  
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
ECZACILIK FAKÜLTESİ  
ANALİTİK KİMYA  
ANABİLİMDALI

**BAZI NON STEROİDAL ANTİİNFLAMATUVAR İLAÇLARIN RATLARDA  
ORAL UYGULAMA SONRASI KAN ADRENALİN DÜZEYLERİ ÜZERİNE  
ETKİSİ**

Arş. Gör. Alptuğ ATİLA

**TEZ YÖNETİCİSİ**  
Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU

**Doktora Tezi**  
ERZURUM-2011  
T.C.  
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ

Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU'nun danışmanlığında Alptuğ ATIL A tarafından hazırlanan bu çalışma 15.07.2011 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından, Analitik Kimya Anabilim Dalı'nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.


Başkan: Prof. Dr. Mehmet TÜFEKÇİ

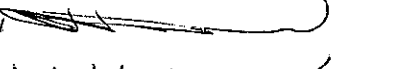
Üye : Prof. Dr. Hasan Bastı ŞENTÜRK


Üye : Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU


Üye : Prof. Dr. Halis SÜLEYMAN

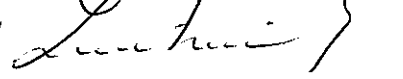
Üye : Doç. Dr. Zuhale GÜVENALP

imza 

imza 

imza 

imza 

imza 

Yukardaki sonucu onaylarım

(İmza)

Prof Dr. İsmail CEYLAN

Enstiti Müdürü

İÇİNDEKİLER.....	I
TEŞEKKÜR.....	VII
ÖZET.....	VIII
SUMMARY.....	X
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XII
TABLOLAR DİZİNİ.....	XV
KISALTMALAR.....	XVII
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Non Steroidal Antiinflamatuvar İlaçlar.....	3
2.2. NSAİİ'lerin Etki Mekanizmaları.....	3
2.3. Parasetamol (Asetaminofen) .....	5
2.3.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri .....	6
2.4. Etodolak .....	6
2.4.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri .....	7
2.5. Hormonlar.....	7
2.5.1. Hormonların Fizikokimyasal Özellikleri ve Sınıflandırılması .....	8
2.5.1.1. Katekolaminler.....	8
2.5.1.2. Adrenalin (Epinefrin) .....	8
2.5.2.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri .....	9
2.6. Kanın Yapısı ve Özellikleri .....	9
2.7. Adrenalin ile İlgili Yapılan Çalışmalar .....	10

2.8. Etodolak ile İlgili Yapılan Çalışmalar.....	13
2.9. Parasetamol (Asetaminofen) ile İlgili Yapılan Çalışmalar.....	15
2.10. Spektroskopik Yöntemler.....	17
2.10.1. Işığın Absorplanması.....	18
2.10.1.1. Atomik Absorpsiyon Spektrumları.....	19
2.10.1.2. Moleküler Absorpsiyon Spektroskopisi.....	20
2.10.2. Lambert-Beer Kanunundan Sapmalar.....	22
2.11. Kromatografik Yöntemler.....	23
2.11.1. Kromatografik Yöntemlerinin Sınıflandırılması.....	24
2.11.2. Kromatografide Temel Olan Fiziksel ve Kimyasal Olaylar.....	25
2.11.2.1. Dağılma Kromatografisi.....	25
2.11.2.2. Adsorpsiyon Kromatografisi.....	25
2.11.2.3. İyon Değişirme Kromatografisi.....	25
2.11.2.4. Boyut-Elleme Kromatografisi.....	26
2.12. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) .....	26
2.12.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Cihazı.....	28
2.12.1.1. Kolonlar.....	28
2.12.1.2. Pompalar.....	29
2.12.1.3. Enjektörler.....	30
2.12.1.4. Dedektörler.....	30
2.12.1.4.1. UV-Görünür Bölge Dedektörler.....	30
2.12.1.4.2. Floresans Dedektörler.....	31

2.13. Sıvı Kromatografisi- Kütle Spektrometresi (LC-MS) .....	31
2.13.1. Kütle Spektrometresi (MS) .....	32
2.13.1.1. Numune Giriş Sistemi .....	33
2.13.1.2. İyon Kaynağı .....	33
2.13.1.3. Kütle Analizörü .....	35
2.13.1.4. Dedektör.....	35
2.12.1.5. Vakum Sistemleri.....	36
2.13.2. LC-MS'in Uygulamaları.....	37
2.13.2.1. Farmakokinetik.....	37
2.13.2.2. Proteomiks.....	37
2.13.2.3. İlaç geliştirme.....	38
2.14. Geçerlilik Testi (Validasyon) .....	39
2.14.1. Doğruluk, Kesinlik ve Tekrarlanabilirlik .....	39
2.14.2.Örneklerin Kararlılığı (Stabilite) .....	40
2.14.3. Doğrusallık ve Kalibrasyon Eğrisi .....	40
2.14.4.Seçicilik .....	41
2.14.5.Duyarlılık .....	41
2.14.6.Tayin alt sınırı (Limit of Quantification, LOQ) .....	41
2.14.7.Gözlenebilme (teşhis) sınırı (Limit of Dedection, LOD) .....	41
2.14.8.Tutarlılık .....	41
2.14.9.Geri Kazanım .....	41
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	42

3.1. Kimyasal Maddeler ve Cam Malzemeler.....	42
3.2.Kullanılan Cihazlar.....	42
3.2.1. HPLC Sistemi .....	43
3.3.Yöntemler.....	43
3.3.1. Etodolak İçin Yöntem Şartları .....	43
3.3.1.1. UV Dedektörlü Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC-UV) Yöntem Şartları.....	43
3.3.1.2. Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi (LC-MS) Yöntem Şartları.....	44
3.4. Adrenalin için Yöntem Şartları.....	44
3.4.1. Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektroskopisi (LC-MS) Yöntem Şartları.....	45
3.4.2. Adrenalin'in Plazmadan Sıvı-Sıvı Ekstraksiyon Prosesi.....	45
3.4.3. Floresans Dedektörlü Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC-FL)Yöntem Şartları.....	46
3.4.4. Adrenalin'in Plazmadan Katı Faz Ekstraksiyon Prosesi.....	46
4. BULGULAR.....	47
4.1. HPLC-UV Yöntemi.....	47
4.1.1. Etodolak İn-Vitro Çalışması.....	47
4.1.1.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanması .....	47
4.1.1.2.Yöntemin Geçerlilik Testi (Validasyonu) .....	48
4.1.1.2.1. Doğrusallık-Çalışma Aralığı .....	48

4.1.1.2.2. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Tayin Alt Sınırı (LOQ) .....	49
4.1.1.2.3. Doğruluk, Kesinlik ve Tekrarlanabilirlik .....	49
4.1.1.2.4. Kararlılık (Stabilite) .....	50
4.1.1.2.5. Geri Kazanım.....	51
4.1.1.2.6. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması .....	53
4.2. LC-MS Yöntemi .....	54
4.2.1. Etodolak İn-Vitro Çalışması .....	54
4.2.1.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanması .....	54
4.2.1.2. Yöntemin Geçerlilik Testi (Validasyonu) .....	55
4.2.1.2.1. Doğrusal Aralık ve Kalibrasyon Eğrisi .....	55
4.2.1.2.2. Doğruluk, Kesinlik ve Tekrarlanabilirlik .....	57
4.2.1.2.3. Kararlılık (Stabilite) .....	58
4.2.1.2.5. Geri Kazanım .....	58
4.2.1.2.6. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması .....	60
4.3. Etodolak Plazma Çalışması .....	61
4.3.1. Plazma Standart Çözeltilerin Hazırlanması .....	61
4.3.2. Yöntemin Geçerlilik Testi (Validasyonu) .....	63
4.3.2.1. Doğrusallık ve Çalışma Aralığı .....	63
4.3.2.2. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Tayin Alt Sınırı (LOQ) .....	64
4.3.2.3. Doğruluk, Kesinlik ve Tekrarlanabilirlik .....	64
4.3.2.4. Geri Kazanım .....	65
4.3.2.5. Kararlılık (Stabilite) .....	66



4.4. Adrenalin İnsan Plazma Çalışması .....	67
4.4.1. Plazma Standart Çözeltilerin Hazırlanması .....	67
4.4.2. Yöntemin Geçerlilik Testi (Validasyonu) .....	68
4.4.2.1. Doğrusallık ve Çalışma Aralığı .....	68
4.4.2.2. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Tayin Alt Sınırı (LOQ) .....	70
4.4.2.3. Doğruluk, Kesinlik ve Tekrarlanabilirlik .....	70
4.4.2.3. 5. Plazmadan Geri Kazanım .....	71
4.5. Adrenalinin Ratlara Uygulaması .....	72
4.5.1. Rat Plazma Standart Çözeltilerin Hazırlanması .....	72
4.5.2.Yöntemin Geçerlilik Testi (Validasyonu) .....	73
4.5.2.1. Doğrusal Aralık ve Kalibrasyon Eğrisi .....	73
4.5.2.2.Tayin Alt Sınırı (LOQ) .....	73
4.5.2.3.Plazmadan Geri Kazanım .....	73
4.5.2.4. Deneysel Hayvanları .....	73
4.6.2.5. Deneysel Hayvanları ile Çalışma .....	73
4.6.2.6. Parasetamol ve Etodolak'ın Adrenalin Üzerine Etkisi .....	75
5. TARTIŞMA ve SONUÇ .....	76
6.KAYNAKLAR.....	83

## TEŞEKKÜR

Doktora çalışmalarımın bir ürünü olarak yaptığım bu tezin hazırlanmasında emeği olan, benim en iyi şekilde yetişmem için çalışan, bilgi ve deneyimleriyle sürekli destek olan Sayın Hocam Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU'na

Doktoram süresince gerek yaptığım çalışmalar da, gerek özel hayatımda hep yanımda olan sevgili arkadaşım Murat ÖZTÜRK'e

Tezimin ilerlemesinde yol gösteren tez izleme jüri üyeleri Sayın Prof. Dr. Halis SÜLEYMAN ve Sayın Prof. Dr. Hülya AKSOY'a,

Doktora tez deneylerimde bana yardımcı olan Ömer Faruk KOÇAK'a ,

Hayvan deneylerinin yapılması esnasında yardımcı olan Sayın Doç. Dr. Zekai HALICI' ya,

Ayrıca bu günlere gelmemi çok isteyen sevgili aileme teşekkürü bir borç bilirim.

**ÖZET****BAZI NON STEROİDAL ANTİİNFLAMATUVAR İLAÇLARIN RATLARDA  
ORAL UYGULAMA SONRASI KAN ADRENALİN DÜZEYLERİ ÜZERİNE  
ETKİSİ**

Ağrı, ateş ve inflamasyonu azaltmada kullanılan Non-steroidal anti-inflamatuar ilaçlar (NSAİİ) analjezik, antipiretik ve antiinflamatuvar etki gösterirler. NSAİİ'ler den olan etodolak'ın farmasötik preparatlarda ve plazmada miktar analizi için HPLC-UV ve LC-MS yöntemleri geliştirilip geçerlilik testleri yapıldı. Ayrıca, insan plazmasında adrenalin analizi için LC-MS yöntemi ve rat plazmasında adrenalin analizi için HPLC-FL yöntemi geliştirilip geçerlilik testleri yapıldı. HPLC-FL (360 nm uyarma, 490 nm yayma dalga boyu) yöntemiyle NSAİİ ilaçlardan etodolak ve parasetamol'ün ratlara oral olarak verildikten sonra ratlarda adrenalin düzeyindeki değişimler incelendi.

HPLC-FL çalışmasında, rat plazmasından adrenalin katı-faz ekstraksiyon yöntemiyle ekstrakte edildi ve kromatografik ayırmada asetonitril-su (80-20, h/h) hareketli fazı ve C<sub>18</sub> kolon (5 µm, 250 x 4,6 mm) kullanıldı. HPLC-FL yönteminin plazmadan ortalama geri kazanım değeri % 98'in üzerinde ve tayin edilebilme sınırı da (LOQ) 0,01 ng mL<sup>-1</sup> olarak tespit edildi. Yapılan analizler sonucunda parasetamol'ün kontrol grubuna göre adrenalin miktarını azalttığı, etodolak'ın adrenalin miktarını artırdığı belirlendi. İnsan plazmasında adrenalinin belirlenmesi için kullanılan LC-MS yönteminde elektron sprey pozitif moda ürün iyon olarak 161,1 iyonu ile analizler gerçekleştirildi. Güniçi ve günler arası bağıl standart sapma değeri % 7,00'den küçük, yöntemin plazmadan ortalama geri kazanım değeri % 83,57 olarak belirlendi.

HPLC-UV ve LC-MS yöntemleri kullanılarak farmasötik preparatlarda etodolak'ın miktar analizi gerçekleştirildi. Her iki yöntem etodolak etkin maddesini içeren etol fort ve tadolak tabletlere uygulandı. Yöntemlerin günüçi ve günler arası bağıl standart sapma değeri sırasıyla % 7,50 ve % 10'dan küçük, her iki yöntemin ortalama geri kazanım değeri yaklaşık olarak % 98 olarak tespit edildi. İnsan plazmasında etodolak'ın analizinde kullanılan LC-MS yönteminin günüçi ve günler arası bağıl standart sapma değeri % 11,0' den küçük ve ortalama geri kazanım değeri % 90,67 olarak belirlendi.

**Anahtar Kelimeler:** Adrenalin, etodolak, parasetamol, HPLC, LC-MS

**SUMMARY**

**EFFECT OF SOME NON STEROIDAL ANTI INFLAMMATORY DRUGS ON  
BLOOD ADRENALINE LEVELS OF RATS AFTER ORAL  
ADMINISTRATION**

Non steroidal anti inflammatory drugs (NSAIDs) have analgesic, antipyretic and anti inflammatory effects in treatment of pain, fever and inflammation. Validation and development of HPLC-UV and LC-MS methods for determination of etodolac as a NSAID in pharmaceutical preparations and plasma was done. Besides, the development and validation of LC-MS method for adrenalin analysis in human plasma and HPLC-FL method for adrenalin analysis in rat plasma was done. Changes in adrenalin levels of rats were analyzed after etodolac and paracetamol were given to rats orally through HPLC-FL method (360 nm excitation, wavelength 490 nm).

In HPLC-FL study, adrenalin in the rat plasma was extracted with solid-phase extraction method and in chromatographic analysis, acetonitrile water (80-20, h/h) as mobile phase and C<sub>18</sub> colon (5  $\mu$ m, 250 x 4,6 mm) were used. Average recovery value of HPLC-FL method was found as higher than 98% and limit of quantification (LOQ) was determined as 0.01 ng ml<sup>-1</sup>. According to the result of analysis, paracetamol decreases adrenalin level and etodolac increases adrenalin level in comparison with the control group. In LC-MS method which is used in the analysis of adrenaline levels in human plasma, analysis was carried out with 161.1 product ion with electrospray ionization in the positive mode. Intra-day and inter day relative standard deviation values were determined as lower than 7.00%; and average recovery value of the method was determined as 83.57%.

Quantity analysis of etodolac in pharmaceutical preparations was carried on using HPLC- UV and LC- MS methods. Both methods were applied on etol fort and tadolac tablets that involve etodolac agents. Both methods' intra-day and inter-day relative standard deviation values are lower than 7.50% and 10% respectively, average recovery values of both methods were determined as approximately 98%. Intra-day and inter-day relative standard deviation values of LC- MS method, which is used in the analysis of etodolac in human plasma, were determined as lower than 11,0% and average recovery value was determined as 90,67%.

**Key Words:** Adrenalin, etodolac, paracetamol, HPLC, LC-MS

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Parasetamol'ün kimyasal yapısı.....	5
Şekil 2.2.Etodolak'ın kimyasal yapısı.....	6
Şekil 2.3. Hormonların salgılanma diyagramı.....	7
Şekil 2.4. Adrenalin'in kimyasal yapısı.....	9
Şekil 2.5. Elektromanyetik ışınların sistematik olarak tanımlanması.....	19
Şekil 2.6. Bir molekül için elektronik, titreşimsel ve dönme enerji seviyelerini gösteren enerji diyagramı.....	20
Şekil 2.7.Absorblayan bir çözeltiye giren $P_0$ şiddetindeki ışın demetinin $P$ şiddetine düşmüş olarak çıkması.....	21
Şekil 2.8.Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi cihazının şematik görünüş.....	28
Şekil 2.9.Sıvı Kromatografisi- Kütle Spektrometresi cihazının şematik gösterimi.....	38
Şekil 4.1. HPLC-UV sisteminde, $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ derişiminde parasetamol (IS) içeren $0,08, 0,5, 1, 2,5, 5$ ve $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ derişimlerinde etodolak çözeltilerinin kromatogramları.....	47
Şekil 4.2. HPLC-UV yöntem kalibrasyon eğrisi.....	48
Şekil 4.3. Etodolak içeren Etol Fort tabletin HPLC-UV kromatogramları....	52
Şekil 4.4. Etodolak içeren Tadolak tabletin HPLC-UV kromatogramları.....	53
Şekil 4.5. İnternal standart içeren $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ derişimdeki farmasötik preparat ve standart çözeltilinin HPLC-UV kromatogramları.....	54

Şekil 4.6. LC-MS sisteminde, 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ derişiminde internal standart içeren 0,08 , 0,5, 1, 2,5 , 5 ve 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ derişimlerinde etodolak çözeltilerinin kromatogramları.....	55
Şekil 4.7. Etodolak 'a ait MS spektrumu.....	55
Şekil 4.8. LC-MS yöntem kalibrasyon eğrisi.....	56
Şekil 4.9. Etodolak içeren etol fort tablet çözeltilisine üç farklı derişimde standart eklenmiş çözeltilerin LC-MS kromatogramları.....	59
Şekil 4.10. Etodolak içeren tadolak tablet çözeltilisine üç farklı derişimde standart eklenmiş çözeltilerin LC-MS kromatogramları.....	60
Şekil 4.11. İnternal standart içeren 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ derişimdeki farmasötik preparat ve standart çözeltilinin LC-MS kromatogramları.....	61
Şekil 4.12. Boş insan plazmasına ait kromatogram.....	62
Şekil 4.13. LC-MS sisteminde 0,9 $\mu\text{g mL}^{-1}$ internal standart içeren 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ etodolak'a ait kromatogram.....	62
Şekil 4.14. Etodolak 'a ait MS spektrumu.....	63
Şekil 4.15. LC-MS sisteminde plazmadan ekstrakte edilen etodolak çözeltilerinden elde edilen kalibrasyon eğrisi.....	63
Şekil 4.16. Boş insan plazmasına ait kromatogram.....	67
Şekil 4.17. LC-MS sisteminde 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ internal standart içeren 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ adrenalin'a ait kromatogram.....	68
Şekil 4.18. Adrenalin 'e ait MS spektrumu.....	68
Şekil 4.19. LC-MS yönteminin plazmadan ekstrakte edilen adrenalin'in kalibrasyon eğrisi.....	69
Şekil 4.20. Adrenalin ve IS' ye ait kromatogram.....	73



Şekil 4.21. Rat plazmasında endojen olarak görülen adrenalin ve IS' ye ait kromatogram.....	74
Şekil 4.22. Parasetamol verilen ratların plazmasındaki adrenalin ve IS' ye ait kromatogram.....	75
Şekil 4.23. Etodolak verilen ratların plazmasındaki adrenalin ve IS'a ait kromatogram.....	75

## TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 4.1. Etodolak' a ait kalibrasyon eğrisi ile ilgili istatistiki bilgiler.....	49
Tablo 4.2. HPLC-UV yönteminin gün-içi ve günler-arası doğruluk ve kesinlik değerleri.....	50
Tablo 4.3. Etodolak'ın HPLC-UV yöntemle belirlenen kararlılık (stabilite) değerler.....	51
Tablo 4.4. Farmasötik preparatların HPLC-UV yöntemiyle elde edilen günüçi ve günler arası geri kazanım değerleri.....	52
Tablo 4.5. Etodolak' a ait kalibrasyon eğrisi ile ilgili istatistiki bilgiler.....	56
Tablo 4.6. LC-MS yönteminin gün-içi ve günler-arası doğruluk ve kesinlik değerleri.....	57
Tablo 4.7. Etodolak'ın LC-MS yöntemle belirlenen kararlılık (stabilite) değerler.....	58
Tablo 4.8. Farmasötik preparatların LC-MS yöntemiyle elde edilen günüçi ve günler arası geri kazanım değerleri.....	59
Tablo 4.9. LC-MS yöntemiyle plazma çözeltilerden elde edilen kalibrasyon eğrisinin istatistiksel analiz değerleri .....	64
Tablo 4.10. LC-MS yönteminin etodolak plazma çözeltilerinin günüçi ve günler arası kesinlik ve doğruluk değerleri .....	65
Tablo 4.11. LC-MS yönteminin plazmadan geri kazanım değerleri.....	66
Tablo 4.12. Etodolak'ın LC-MS ile belirlenen kararlılık (stabilite) değerleri..	66
Tablo 4.13. Plazma çalışmasında adrenali'e ait kalibrasyon eğrisi ile ilgili istatistiki bilgiler.....	69

Tablo 4.14. Plazma çalışmasında $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ derişiminde isoprotrenol içeren adrenalin'in 3 farklı konsantrasyondaki gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk değerleri .....	71
Tablo 4.15. LC-MS yöntemiyle adrenalin plazma geri kazanım değerleri ....	72

**KISALTMALAR**

g	Gram
mg	Mili Gram
$\mu$ g	Mikro Gram
ng	Nano Gram
pg	Piko Gram
L	Litre
mL	Mili Litre
$\mu$ L	Mikro litre
akb	Atomik K $\ddot{u}$ tle Birimi
M	Molar
mM	Mili Molar
nm	Nano metre
cm	Santi metre
mm	Mili metre
$^{\circ}$ C	Santigrat Derece
torr	1 mm civa y $\ddot{u}$ ksekliđine eřdeđer olan basınç (Torricelli)
atm	Atmosfer basınç birimi
eV	Elektro Volt
R:	Korelasyon Katsayısı
S <sub>a</sub>	Regrasyon eğrisindeki kaymanın standart sapması
S <sub>b</sub>	Regrasyon eğrisindeki eğimin standart sapması

HPLC-UV	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi-Ultra Viole Dedektör
GC-MS	Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi
MS	Kütle Spektrometrisi
LC-MS	Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometrisi
m/z	Kütle/Yük
HPLC-FL	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi-Fluoresans Dedektör
HPLC-ECD	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi-Elektro Kimyasal Dedektör
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
HPLC-SCX	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Güçlü Katyon Değiştiricisi
LOD	Teşhis Edilme Alt Sınırı (Limit of Detection)
LOQ	Tayin Edilme Alt Sınırı (Limit of Quantification)
IS	İnternal Standart
GİS	Gastro İntestinal Sistem
X	Ortalama Değer
SS	Standart Sapma
BSS	Bağıl Standart Sapma
BH	Bağıl Hata
K	Kromatografi
KK	Kağıt Kromagrafi
İTK	İnce Tabaka Kromatografisi
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

İnflamasyonla seyreden hastalıkların tedavisinde en çok tercih edilen ilaçlardan biriside non-steroidal antiinflamatuvar (NSAI) ilaçlardır<sup>1,2</sup>. NSAI'lerin etkileri arasında analjezik, antipiretik ve antiinflamatuvar etkiler bulunmaktadır. Bu nedenle ağrı, ateş ve inflamasyonla seyreden birçok hastalığın tedavisinde narkotik analjeziklere ve steroid yapıdaki antiinflamatuvar ilaçlara göre oldukça avantajlıdır<sup>1,3</sup>. İnflamasyonun dört ana belirtisi olan ağrı, ateş, kızarıklık ve ödem semptomlarının giderilmesinde bu üç etkinin bir arada bulundurulması ile sağlanır<sup>4</sup>. NSAI'lerin etki mekanizmaları hakkında birçok görüş öne sürülmüştür; bunlar siklooksijenaz (COX) ve lipoksijenaz (LO) ürünlerinin sentezinin inhibisyonu, toksik oksijen radikallerinin ve lizozomal enzim salınımının engellenmesi, nötrofil agregasyon adhezyon ve kemotaksinin önlenmesi, oksidatif fosforilasyonun kenetsizlenmesi, metalloproteaz, anandamid hidrolaz, fosfodiesteraz tip IV enzimlerinin inaktivasyonu, platelet aktivatör faktör, histamin ve sitokinler gibi inflamasyon mediyatörlerinin oluşumunun azaltılması şeklinde sıralanabilir<sup>1,5-9</sup>. Çeşitli çalışmalar ilaçların antiinflamatuvar etki mekanizmalarında böbreküstü bezi hormonlarının rolü olduğunu göstermiştir<sup>10</sup>. Diklofenak sodyum ve kalsiyum kanal blokörleri gibi bazı ilaçların antiinflamatuvar etki mekanizmasında böbrek üstü bezinin hormonları etkilidir<sup>11</sup>. Bir araştırmada adrenalectomi sonrası indometazin, diklofenak sodyum, ibuprofen, nimesülid, tenoksikam ve aspirin gibi NSAI'lerin antiinflamatuvar etkilerinin kaybolduğu ortaya konulmuştur<sup>12</sup>. Bu çalışmalar doğrultusunda, NSAI'lerin analjezik etki mekanizmasında da böbreküstü hormonlarının rolünün olabileceği düşünülmektedir. Parasetamol ve etodolak non-steroidal antiinflamatuvar etki gösteren ilaçlardır<sup>13</sup>.

Bu çalışmada öncelikle insan plazmasında adrenalin analizi için LC-MS (Sıvı Kromatografisi-Kütle spektrometrisi) yöntemi ve rat plazmasında adrenalin analizi için HPLC-FL (Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi-Fluoresans Dedektör) yöntemi geliştirilip geçerlilik testlerinin yapılması, HPLC-FL yöntemiyle ratlarda NSAİİ ilaçlardan olan etodolak ve parasetamol'ün adrenalin üzerine etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu çalışmalara ilaveten etodolak'ın plazmada miktar analizi için LC-MS yöntemi ve ayrıca farmasötik preparatlarda miktar analizi için HPLC-UV (Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi-Ultraviyole Dedektör) ve LC-MS yöntemlerinin geliştirilip geçerlilik testlerinin yapılması ve bu yöntemlerle etodolak etkin maddesi içeren tabletlerde etodolak miktar tayinin yapılması amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

Ağrı noniseptif bir duyudur ve genellikle doku zedelenmesine bağlı olarak gelişir. Akut ağrı daima nosiseptif niteliktedir, neden olan durum ile ağrı arasında zaman, yer ve şiddet bakımından yakın bir ilişki vardır. Kanser ağrısı veya romatizmal ağrılarda olduğu gibi kronik süreç izleyen ağrılar da genellikle nosiseptif niteliktedir. Bazı olgularda ise kronik ağrı deaferentasyon ağrısı şeklindedir. Deaferentasyon ağrısı periferik ve santral sinir sisteminde ağrı yollarının tümör gibi bir neden ile tahrip olması sonucu gelişir ve bazen ağrılı bölgede sempatik innervasyon bozukluğunu gösteren ciltte renk değişikliği, sıcaklık azalması ve kıl kaybı gibi değişiklikler olur (postherpetik nöraljide olduğu gibi); fakat talamik sendrom (santral ağrı) ve periferik nöropatilerde sempatik komponent belirgin değildir. Ağrıyı açıklayabilecek organik bir neden olmaksızın ortaya çıkan psikojenik somatik şikâyetlere somatoform bozukluk denir. Var olan organik lezyona göre şiddet ve süre bakımından orantısız derecede abartılmış ağrı anormal hastalık davranışı şeklinde adlandırılır ve birinciden daha sık görülür<sup>14,15</sup>.

### 2.1. Non Steroidal Antiinflamatuvar İlaçlar

İnflamasyonla seyreden hastalıkların tedavisinde en çok kullanılan ajanlardan olan NSAİİ'ler ağrı, ateş, kızarıklık ve ödemin giderilmesinde etkilidir<sup>3,16</sup>. Narkotik analjezikler gibi bağımlılık yapmamaları ve etkilerine karşı tolerans gelişmemesi NSAİİ'leri öncelikli kullanılan ilaçlar haline getirmiştir<sup>3,17</sup>.

### 2.2. NSAİİ'lerin Etki Mekanizmaları:

NSAİİ'ler COX ve lipooksijenaz (LO) ürünlerinin sentezinin inhibe ederek, toksik oksijen radikalleri ve lizozomal enzim salınımını engelleyerek, nötrofil agregasyonu, adezyon kuvvet ve kemotaksisi önleyerek, oksidatif fosforilizasyonun uncouplingine



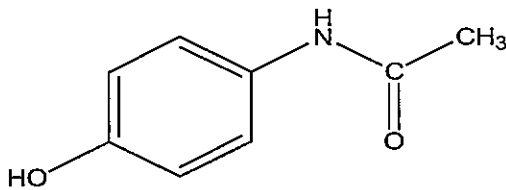
neden olarak antiinflamatuvar etkilerde bulunurlar. NSAİİ'ler, prostaglandin sentezini, siklooksijenaz yolunu inhibe ederek önlerler. Ancak lökotrien oluşumunu önleyemezler çünkü lipooksijenaz yolunu inhibe edemezler. Aspirin hem COX-1 hem de COX-2 enzim sentezini kovalent bağ yaparak inhibe eder. Geri dönüşlü siklooksijenaz inhibitörü olan tüm diğer NSAİİ'lerin primer olarak etkisi ilacın farmakokinetik klirensi ile ilişkilidir. Yarılanma ömürlerine göre NSAİİ'ler kabaca yarılanma ömrü 6 saatten kısa ve 10 saatten uzun olan iki gruba ayrılır.

Aspirin ve diğer NSAİİ'lerin terapötik dozlarda insan vücudunda prostaglandin biosentezini azalttığına ilişkin birçok önemli kanıtlar vardır<sup>18</sup>. Bu ilaçların siklooksijenazı inhibe edebilme potansiyelleri ile antiinflamatuvar etkinlikleri arasında anlamlı bir korelasyon görülmüştür<sup>19</sup>. Buna rağmen *invivo* ortamı taklit edemeyen deneysel ortamların kullanılmasına bağlı olduğu düşünülen bazı istisnalar bulunmaktadır<sup>20</sup>. NSAİİ'lerin primer terapötik etkisinin prostaglandin sentez inhibisyonu ile oluştuğu birçok bulgu ile gösterilmiştir. Ayrıca NSAİİ'ler supresör T lenfositlerini sitimüle eder ve böylece yardımcı T lenfositlerin IL-1 salgılamalarını baskılar. İnflamasyonda aktive olan makrofaj ve fibroblastlar IL-1' den başka sitokinler de salgılamaktadır. IL-6, TNF ve interferon da inflamasyonda rol oynayan diğer medyatörlerdendir. IL-1 ve IL-6 yapımı ve salınımının NSAİİ tarafından inhibe edildiği çeşitli araştırmalarda gösterilmektedir. İnflamatuvar eklem hastalıklarında sinoviyal dokuda ve kartilaj yüzeylerinde çeşitli mediyatörler ve proteolitik enzimler salınan polimorf nüveli lökosit sayısı artmaktadır. Bu enzimler inflamasyonun başlamasına ve aynı zamanda periartiküler kemiğin yıkımına sebep olmaktadır. NSAİİ ilaçların etki mekanizmalarından biriside lizozomal membran stabilizasyonu sağlayıp lizozomal enzimlerin salınımını önlemektir. Bu etkiyi, cAMP düzeyini artırarak ve

lizozomal enzim salınımını inhibe ederek gerçekleştirdikleri ileri sürülmektedir<sup>21,22</sup>. NSAİ ilaçların iltihaplı dokuda serbest oksijen radikallerinin oluşmalarını inhibe ettikleri veya oluşmaları bağlayarak inaktive ettikleri çeşitli araştırmalarda gösterilmiştir<sup>22</sup>. Nötrofil agregasyonu, adezyon ve kemotaksisinin önlenmesi, NADPH oksidaz ve fosfolipaz C aktivitesinin antagonizma edilmesi NSAİ'lerin antiinflamatuvar etkilerine katkıda bulunan diğer özellikleridir<sup>23,24</sup>.

### 2.3. Parasetamol (Asetaminofen)

Analjezik ve antipiretik etkinliği bakımından aspirine alternatif bir ilaçtır<sup>25</sup>. Ancak antiinflamatuvar etkinliği olmadığı için aspirin gibi inflamasyon hadiselerinin tedavisinde kullanılmaz. Vücut tarafından çok iyi tolere edilir ve çok az yan etkiye sahiptir. Ancak aşırı doz alınması öldürücü sonuçlar doğurabilir. İnflamasyonlu dokularda peroksidaz içeriği yüksektir. Asetaminofenin yüksek peroksit içeren ortamlarda siklooksijenazı inhibe edemez ve antiinflamatuvar etkinliği düşüktür<sup>26</sup>. Beyin gibi peroksitlerin az olduğu ortamlarda antipiretik etkinliğinin varlığı da siklooksijenaz inhibisyonu sağlamasına bağlanmaktadır. Asit baz dengesini bozamaz. Gastrik irritasyona neden olmaz. Trombositlere, kanama zamanına ve ürik asit atımına etkisi yoktur. Tamamı GİS' den emilir ve yarılanma ömrü 2 saattir. Analjezik ve antipiretik etkisinden dolayı özellikle aspirinin kontrendike olduğu durumlarda kullanımı uygundur<sup>27</sup>. İntoksikasyonunda ağır karaciğer hasarı oluşur<sup>28</sup>. Methemoglobinemi, hemolitik anemi, nefropati, larinks ödemi ve bronkospazm çok nadir görülen yan etkileridir<sup>4,29</sup>. Parasetamol'ün kimyasal yapısı Şekil 2.1'de verilmiştir.



2.1.: Parasetamol'ün kimyasal yapısı

### 2.3.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

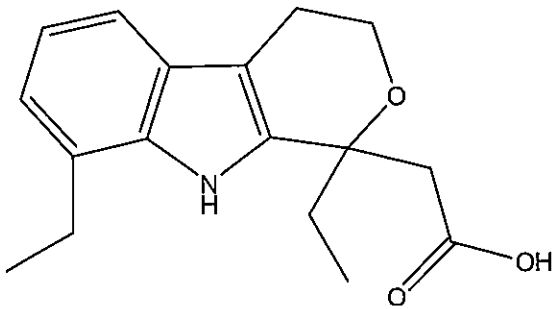
Metanol, asetonitril ve su içinde iyi çözünür

Molekül kütlesi 151,17 g mol<sup>-1</sup>

Erime noktası 169 °C

### 2.4. Etodolak

Etodolak'ın kimyasal yapısı 1,8-dietil-1,3,4,9-tetra hidroprano-[3,4-b] indol-1-asetik asit şeklindedir. Analjezik, antiinflamatuvar ve antipiretik etki gösteren NSAİ ilaçlardandır<sup>30,31</sup>. Etodolak iyi bir şekilde tolere edilir<sup>32</sup>. Ratlarda yapılan etodolak çalışmalarında gastrik irritasyon için terapatik indeks diğer NSAİİ'lere göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Günde iki defa 100-300 mg etodolak verilen hastalarda aspirin ve plesebo'ya göre çok daha etkin olduğu gözlenmiştir. Sağlıklı yetişkinlerde oral uygulandığında çok iyi bir şekilde absorbe edilir ve yaklaşık 1 sat içinde plazma pik derişimine ulaşır. Diğer NSAİİ'ler gibi plazma proteinlerine yüksek oranda (% 99,3) bağlanır. Etodolak karaciğerde inaktif metabolitlerine parçalandıktan sonra böbrek yolu ile vücuttan atılır<sup>33-35</sup>. Etodolak'ın kimyasal yapısı Şekil 2.2'de verilmiştir



Şekil 2.2.:Etodolak'ın kimyasal yapısı

### 2.4.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

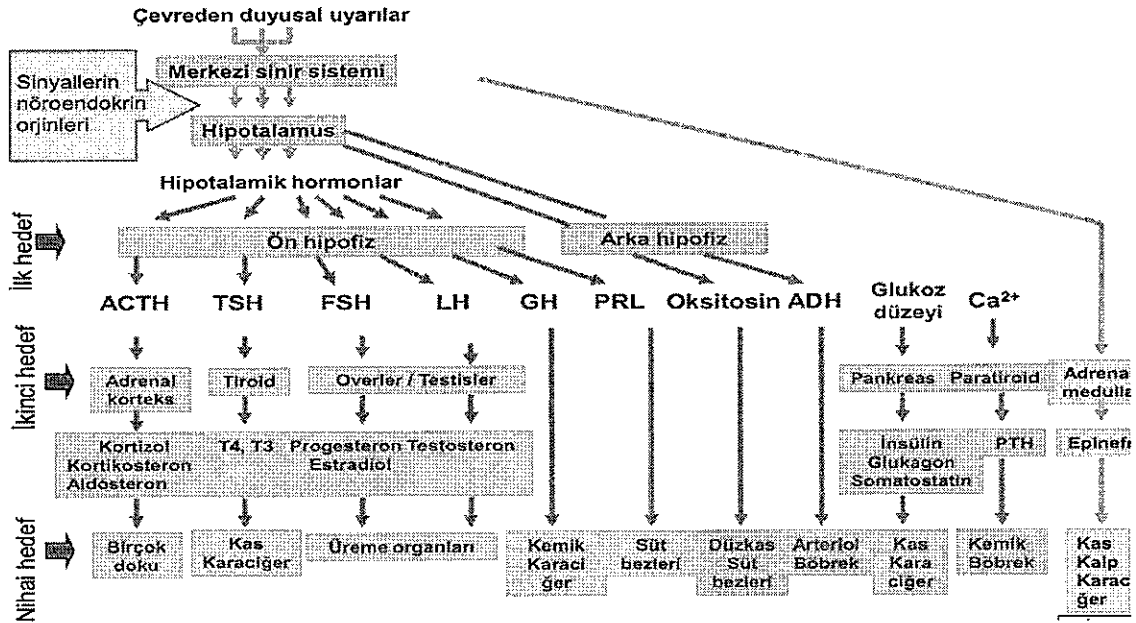
Metanol, asetonitril ve su içinde iyi çözünür

Molekül kütlesi 287,35 g mol<sup>-1</sup>

Erime noktası 145-148 °C

### 2.5. Hormonlar

Endokrin sistemi çeşitli doku fonksiyonlarının kontrolü, integrasyonu ve koordinasyonundan sorumlu bulunmaktadır. Bu fonksiyonlarını sinir sistemi ile sıkı etkileşim ve işbirliği içinde yapan endokrin sistem organizmanın canlılığını ve sağlığını korumasını sağlamaktadır. Hormonlar endokrin sistemde dokular arası haberleşmeyi sağlayan kimyasal moleküllerdir<sup>36</sup>. Hormonların salgılanmasını gösteren diyagram Şekil 2.3' de verilmiştir.



Şekil 2.3: Hormonların salgılanma diyagramı

### 2.5.1. Hormonların Fizikokimyasal Özellikleri ve Sınıflandırılması

Hormonlar kimyasal yapılarına ve fizikokimyasal özelliklerine göre üç gruba ayrılırlar.

1-) Peptid hormonlar

2-) Steroid hormonlar

3-) Amino asit hormonlar (katekolaminler, iyodotironinler)

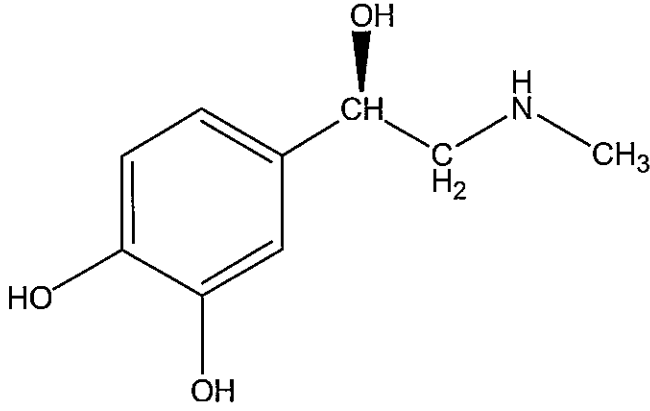
Birinci ve üçüncü gruptaki hormonlar suda iyi çözünürken, ikinci gruptakiler lipitte iyi çözünürler<sup>37</sup>.

#### 2.5.1.1. Katekolaminler

Amino asit yapılı hormonlardan olan katekolaminler birçok hastalığın teşhisinde ve sempatik sinir sisteminin değerlendirilmesinde çok önemlidirler. Sempatik sinir uçlarında ve adrenal medullada biyosentezi yapılan, biyolojik olarak aktif olan adrenalin, noradrenalin ve dopamin nörotransmitter olarak da çok önemli rol oynarlar<sup>38,39</sup>.

#### 2.5.1.2. Adrenalin (Epinefrin)

Adrenalin (Epinefrin), böbreküstü bezlerinin iç kısımları tarafından öz bölgede salgılanan bir hormondur. Doğada bu hormonun görevi, organizmayı acil harekete hazırlamaktır. Etkisini, nabzın atışı, kanın iç organlar ve deriden kaslara sevk edilmesi, karaciğerdeki glikojenin glikoza değişmesi ve böylelikle, acil bir enerji kaynağı sağlanması şeklinde gösterir. Heyecan ve korku durumunda adrenalin salgılanması artar. Kan damarları genişletir. Acı hissini azaltır. Göz bebeklerinin büyümesiyle göze alınan ışık artar, daha net ve hızlı görüş sağlanır<sup>40</sup>. Adrenalin'in kimyasal yapısı Şekil 2.4'de verilmiştir.



Şekil 2.4:Adrenalin'in kimyasal yapısı

### 2.5.2.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Adrenalin suda iyi çözünen hormonlardan biri olup kimyasal yapısı 4-[(1R)-1-hidroksi-2-(metil amino) etil] benzen-1,2- diol şeklindedir.

- 0,1 M HCl içinde iyi çözünür
- Molekül kütlesi 183,204 g mol<sup>-1</sup>
- Erime noktası 215 °C

### 2.6. Kanın Yapısı ve Özellikleri

Özgül ağırlığı 1.055-1.065 olan kan, sulu ortamda hareket halindeki özelleşmiş hücrelerden oluşan kompleks bir dokudur. Viskozitesi sudan yaklaşık 5-6 kat daha fazladır. Hacim olarak yetişkin vücut ağırlığının % 8' ini oluşturan kanın miktarı 5-6 litredir. Çocuklarda yetişkinlere göre kan/vücut ağırlığı daha fazladır<sup>36</sup>.

**Serum:** Antikoagülan eklenmeden kanın bekletilmesi sonucu hücresel elemanlar koagüle olmakta ve üstte sarı berrak kısım olan serum kalmaktadır.

**Plazma:** Damardan alınan kana antikoagülan eklenerek santrifüj edilince üstteki berrak sıvı fibrinojen içeren plazmadır.

**Plazma Bileşimi:** Plazma elektrolitler, besin maddeleri, metabolitler, proteinler

vitaminler, iz elementler ve hormonları içeren sulu bir çözeltilidir. Plazmada çözülmüş halde bulunan bileşiklerin derişimleri, hücre sitoplazmasındaki derişimlerinden farklıdır.

**Kanın Görevleri:** Kanın görevleri  $O_2$ ,  $CO_2$ , besinler, vitaminler, elektrolitler ve metabolizma ürünleri gibi birçok maddenin taşınması, homeostaz, tamponlama, sinyal taşınması (hormonlar), vücudun yabancı molekül ve hücrelerden korunması, onkotik basıncın düzenlenmesi, suda çözünmeyen maddelerin taşınması, pıhtılaşma (fibrinoliz) ve bazı maddelerin böbrekten atılmasını engelleme şeklinde özetlenebilir<sup>36</sup>.

### 2.7. Adrenalin ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Fotopoulou ve arkadaşları<sup>38</sup>, katekolaminlerin insan idrarında HPLC-FLD ile analizi için terbium (III) klorid ile EDTA'yı stokiyometrik oranda karıştırdıktan sonra alkali çözeltilisi ilave ederek post kolon türevlendirmesi yapmışlardır. Adrenalin için yöntemin tayin limitinin  $4 \times 10^{-8}$  mol  $l^{-1}$  ve ortalama geri kazanımını ise % 106,3 olarak belirlenmiştir.

Fu –Nan ve arkadaşları<sup>39</sup>, HPLC-CL yöntemiyle insan serumunda adrenalin, noradrenalin ve dopaminin eş zamanlı olarak miktar analizini yapmışlardır. Çalışmada, ters faz  $C_{18}$  kolon ve 0,01 M potasyum dihidrojen fosfat- metanolden (92:8, h/h) oluşan hareketli faz kullanılmıştır. Adrenalin için yöntemin  $1 \times 10^{-8}$  -  $5 \times 10^{-6}$  g  $mL^{-1}$  derişim aralığında doğrusal ve teşhis limitinin  $4 \times 10^{-9}$  g  $mL^{-1}$  olduğu belirlenmiştir.

Ueyama ve arkadaşları<sup>41</sup> insan ve kemirgenlerin plazmasında adrenalin ve noradrenalinin ölçülmesi için ultra filtrasyon yöntemi ile birleştirilmiş HPLC-ECD yöntemini kullanmışlardır. Çalışmada, % 0,05 sodyum disülfid ve % 0,001 EDTA içeren pH'ı 3'e ayarlanmış 0,1 M fosfat tamponu-asetonitrilden (98:2, h/h) oluşan hareketli faz

ve ters faz (EIKOMPAK SC5-ODS 3X150 mm ) kolon kullanılmıştır. Yöntemin her iki bileşik için 20-400 pg mL<sup>-1</sup> derişim aralığında doğrusal olduğu belirlenmiştir.

Patel ve arkadaşları<sup>42</sup> elektrokimyasal dedektörlü HPLC yöntemiyle biyolojik dokularda serotonin, adrenalin ve dopamini içeren katekolaminlerin analizini gerçekleştirmişlerdir. Doku örnekleri 0,1 M perklorik asit ile soğuk buz kullanılarak homojenize edilmiştir. 2 mM dekan sülfonik asit sodyum tuzu ilave edilmiş olan pH'ı 3,2'ye ayarlanmış sodyum sitrat tamponu-asetonitrilden (82,5:17,5, h/h) oluşan hareketli faz kullanılmıştır.

Hay ve arkadaşları<sup>43</sup> Domuz ve ratların idrarında total katekolaminlerin ve metoksi katekolaminlerin analizini yapmışlardır. Katekolaminleri ve metoksi katekolaminleri saflaştırırken iyon değişim kromatografisi kullanarak iki basamaklı işlem uygulamışlardır. Katekolaminler katyon değişimi, metoksi katekolaminler anyon değişimi işlemi ile saflaştırılmışlardır. Elde edilen elüantlar elektrokimyasal dedektörlü HPLC yöntemiyle analiz edilmişlerdir.

He ve arkadaşları<sup>44</sup> HPLC-ECI yöntemiyle koyun plazmasında katekolaminlerin analizini yapmışlardır. Adrenalin için yöntemin tayin limitini 12 ng mL<sup>-1</sup> ve 25,82 - 1030 pg mL<sup>-1</sup> derişim aralığında doğrusal olduğu belirlenmiştir. Çalışmada ters faz C<sub>18</sub> kolon ve pH'ı 3,25'e ayarlanmış (% 0,005 sodyum asetat-% 0,02 EDTA-% 0,013 sodyum heptanosülfat) tampon-asetonitrilden (98:2, h/h) oluşan hareketli faz kullanılmıştır.

Westerman ve arkadaşları<sup>45</sup> insan plazması ve idrarında adrenalin, noradrenalinin analizi için HPLC-ECD yöntemi ve non-kompetatif enzim immünü assay (ELISA)'i yöntemini kullanmış ve birbiriyle karşılaştırmışlardır. Çalışma sonucunda ELISA yönteminin daha doğru, hassas, kesin ve spesifik olduğu tespit edilmiştir. HPLC



yöntemiyle de elde edilen sonuçlar arasında yüksek derecede anlamlı bir korelasyonun olduğu belirlenmiştir.

Liu L ve arkadaşları<sup>46</sup> insan idrarında katekolaminler ve onların metabolitlerini HPLC-FLD yöntemiyle aynı zamanda tayin ederek bu maddeler ile alzheimer hastalığı ile arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Çalışmada türevlendirme işlemiyle analiz gerçekleştirilmiştir. Türevlendirme 0,1 M potasyum hekzano ferrat ile yapılmıştır. Çalışmada adrenalin için yöntemin tayin limitinin 0,2 ng mL<sup>-1</sup> ve 2,5-200 ng mL<sup>-1</sup> derişim aralığında doğrusal olduğunu belirlemişlerdir.

Allen ve arkadaşları<sup>47</sup>, katı faz ekstraksiyonu yöntemini kullanarak insan plazmasından adrenalin ekstre ettiikten sonra miktar analizini LC-MS-MS yöntemiyle gerçekleştirmişlerdir. Adrenalin için alıkonma zamanı 1,85 dakika ve insan plazmasında yöntemin 50-2000 pg mL<sup>-1</sup> derişim aralığında doğrusal olduğu belirlenmiştir.

Ji ve arkadaşları<sup>48</sup>, insan plazmasında adrenalin ve noradrenalinin belirlenmesi için UPLC-MS/MS yöntemini geliştirmişlerdir. Bu çalışmada toplam analiz süresini 3,5 dakika olarak belirlemişlerdir. Adrenalin ve noradrenalin için yöntemin 0,05-25 ng mL<sup>-1</sup> derişim aralığında doğrusal olduğu tespit edilmiştir.

Kushnır ve arkadaşları<sup>49</sup>, LC-MS-MS yöntemi ile insan idrarında katekolaminlerin analizini gerçekleştirmişlerdir. Adrenalin için elektron sprey iyonizasyon yapıp *m/z* 184>107 iyonları kullanılmıştır. Gün içi ve günler arası kesinlik değerlerinin % 7,1 den küçük, doğruluk değerinin ise % 100,8-108,5 arasında olduğu tespit edilmiştir.

Chan ve arkadaşları<sup>50</sup> insan idrarında yapmış oldukları çalışmada HPLC/APCI-MS yöntemini kullanarak katekolaminler (adrenalin, noradrenalin, dopamin) ve metanefrinler'in (metanefrin, normetanefrin) miktar analizini yapmışlardır. Çalışmada

moleküler iyon piki olan 184 iyonu, ters faz C<sub>18</sub> kolon, formik asit ile pH'ı 3'e ayarlanmış 50 mM amonyum format çözeltisi hareketli faz ve 0,8 mL dak<sup>-1</sup> akış hızı kullanılmıştır. Adrenalin için yöntemin tayin limitinin 5 ng mL<sup>-1</sup> olduğu tespit edilmiştir.

## 2.8. Etodolak ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Boni ve arkadaşları<sup>32</sup>, HPLC yöntemiyle romatoid artiritli hastalarda etodolakin farmakokinetiğini çalışmışlardır. Çalışmada yöntemin 0,2-50 mg L<sup>-1</sup> derişim aralığında doğrusal ve plazmaya 0,6, 12,5 ve 40 mg L<sup>-1</sup> derişimlerinde etodolak katımı yapıldıktan sonra geri kazanım çalışmasıyla yöntemin ortalama geri kazanım değerlerinin % 85,1-94,8 arasında olduğu belirlenmiştir. Hastalara etodolak verildik den 0, 0,5, 1, 1,5, 2, 4, 8, 12, 24, 30 ve 36. saat sonra kan numuneleri toplanmış ve etodolak analizi gerçekleştirilerek farmakokinetik parametreler tespit edilmiştir.

Shi ve arkadaşları<sup>51</sup> rat plazmasında etdolak'ın R-(-) ve S-(+) enantiyomerlerinin belirlenmesi için HPLC-UV yöntemini geliştirmişlerdir. Çalışmada plazma numuneleri 1M HCl ile asitlendirildik den sonra etil asetat ile sıvı faz ekstraksiyonu yapılmış, 280 nm dalga boyu ve 1 mL dak<sup>-1</sup> akış hızı kullanılmıştır. Etodolak'ın S-(+) enatiyomeri için yöntemin 0,5-50 mg L<sup>-1</sup> ve R-(-) enantiyomeri için ise 2-200 mg L<sup>-1</sup> derişim aralığında doğrusal olduğu tespit edilmiştir.

Ak ve arkadaşları<sup>52</sup>, farmasötik preparatlarda etodolak'ın belirlenmesi için elektroforetik yöntem kullanmışlardır. Etodolak için yöntemin teşhis limitinin 3,2 x 10<sup>-6</sup> M ve tayin limitinin ise 9,7 x 10<sup>-6</sup> M olduğu belirlenmiştir.

Garcia ve arkadaşları<sup>53</sup>, farmasötik preparatlarda etodolak'ın antioksidant özelliğinden yararlanarak sequensal injeksiyon yöntemini geliştirip geçerlilik testleri yapmıştır.

Yılmaz ve arkadaşları<sup>54</sup>, cam karbon elektrodlu voltametrik yöntemle farmasötik preparatlarda etodolak miktar analizini yapmışlardır.

Ulu<sup>30</sup> yapmış olduğu çalışmada spektrofotometrik yöntemle farmasötik preparatlarda etodolak ve diklofenak 7-floro-4-nitrobenzo-2-okza-1,3-diazole (NBDF) maddesi ile türevlendirerek miktar analizini gerçekleştirmiştir. NBDF ile türevlendirilmiş etodolak için 461 nm eksitasyon dalga boyu ve 521 nm emisyon dalga boyu olarak belirlemiştir.

Amer ve arkadaşları<sup>55</sup> yapmış oldukları çalışmada etodolak'ın bakır (II) ve demir (III) kompleksleri oluşturularak farmasötik preparatlarda spektrofotometrik analizini yapmışlardır.

Gouda ve arkadaşları<sup>56</sup> *o*-fenantrolin, bipiridil ve asidik ortamlarda Fe<sup>+3</sup> ile etodolak'ın oluşturulduğu komplekslerin spektrofotometrik olarak farmasötik preparatlarda analizi gerçekleştirilmiştir.

Kousy<sup>57</sup>, farmasötik formülasyonlar içinde aseklofenak ve etodolak'ın miktar tayini için spektrofotometrik ve spektrofotometrik yöntemlerini geliştirmiş ve geçerlilik testleri yapılmıştır. Spektrofotometrik yöntemde, demir (III) klorür ve sülfirik asit çözelti içerisinde p-dimetilaminobenzaldehit ile etodolak reaksiyona sokularak 591,5 nm dalga boyunda absorbans veren renkli bir bileşik oluşturulduktan sonra analiz işlemleri gerçekleştirilmiştir. Spektrofluorometri yönteminde ise etodolak etanol içinde çözülerek 235 nm eksitasyon dalga boyu ve 345 nm emisyon dalga boyunda analizler gerçekleştirilmiştir.

Dongre ve arkadaşları<sup>58</sup>, tablet dozaj formlarında etodolak ve asetaminofen'in eş zamanlı olarak belirlenmesi için ters faz HPLC yöntemini geliştirmişlerdir. Çalışmada % 0,005' lik ortofosforik asit- asetonitrilden (50:50, h/h) oluşan hareketli faz, 274 nm

dalga boyu ve izokratik elüsyon kullanılmıştır. Alıkonma zamanı, asetaminofen için 1,32 dakika ve etodolak için ise 4,24 dakika olarak belirlenmiştir.

Saleh ve arkadaşları<sup>59</sup> çalışmalarında farmasötik preparatlarda etodolak miktar analizi ve etodolak'ın parçalanma ürünlerinin analizi için HPLC ve birinci türev spektrofotometri yöntemlerini geliştirip geçerlilik testleri yapılmıştır. HPLC çalışmasında C<sub>18</sub> kolon, metanol-su-asetik asit (70:30:0,1, h/h/h) oluşan hareketli fazı, 1 mL dak<sup>-1</sup> akış hızı ve 254 nm dalga boyundan oluşan kromatografik parametreler kullanılmıştır.

Lee ve arkadaşları<sup>60</sup>, sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemini kullanarak insan plazmasında etodolak'ın belirlenmesi için LC-MS-MS yöntemini geliştirip geçerlilik testlerini yapmışlardır. Çalışmada elektron sprej pozitif moda etodolak için m/z: 287,99>172,23 iyonları, ters faz C<sub>18</sub> kolon ve formik asit ile pH'ı 3,5'a ayarlanmış 10 mM amonyum format içeren su-asetonitrilden (65:35, h/h) oluşan hareketli faz kullanılmıştır. Yöntemin tayin limitinin 0,1 µg mL<sup>-1</sup> ve 0,1-25 µg mL<sup>-1</sup> derişim aralığında doğrusal olduğu belirlenmiştir.

Strickmann ve Balschke<sup>61</sup>, idararda etodolak ve onun metaboliti olan 5-hydroxy etodolac analizi için HPLC yöntemini kullanmışlardır. Bu çalışmada C<sub>18</sub> kolon, asetonitril-asetik asitden oluşan hareketli faz, gradient elüsyon, 1 mL dak<sup>-1</sup> akış hızı ve 10 µL enjeksiyon hacminden oluşan kromatografik parametreleri kullanmışlardır.

## 2.9. Parasetamol (Asetaminofen) ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Milenkova ve arkadaşları<sup>62</sup> parasetamol, psedofedrin HCl ve dekstromethorfan HBr'nin tabletlerde eş zamanlı olarak miktar analizi için HPLC yöntemini geliştirmişlerdir. Analizde, 214 nm dalga boyu, 25°C sıcaklık, 1 mL dak<sup>-1</sup> akış hızı ve

pH'ı 3,5'e ayarlanmış 0,05 M potasyum dihidrojen fosfat tamponu-tetrahidrofurandan (88:12, h/h) oluşan hareketli faz çalışma parametreleri kullanılmıştır.

Qil ve arkadaşları<sup>63</sup>, asetaminfen, kafein ve klorfeniramin maleat içeren tabletlerde eş zamanlı olarak analizleri için HPLC yöntemini geliştirmişlerdir. Kromatografik ayrımlar CN kolonda (150 x 50 mm, 5 µm) ve toplam 10 dakika analiz süresinde 223 nm dalga boyunda analizler yapılmıştır.

Pawar ve arkadaşları<sup>64</sup>, tablette aseklofenak, parasetamol ve klorzokzazon'un miktar analizi için HPLC yöntemini geliştirmişlerdir. Çalışmada, ters faz C<sub>18</sub> kolon (250mm x 4,6 mm, 5 µm), pH ı 5,55' e amonyak ile ayarlanmış 10 mM potasyum dihidrojen fosfat tamponu-asetonitrilden oluşan (60:40, h/h) hareketli faz, 1mL dak<sup>-1</sup> akış hızı ve 10 µL enjeksiyon hacmi parametreleri kullanılmıştır.

Campanero ve arkadaşları<sup>65</sup>, HPLC yöntemiyle parasetamol verilmiş gönüllülerin plazmasında asetaminofen'in analizini yapmışlar ve farmakokinetik parametreleri tespit etmişlerdir. Çalışmada internal standart olarak *p*-propionamidofenil, 242 nm dalga boyu, C<sub>8</sub> ters faz kolon, pH'ı 3,0 ayarlanmış potasyum dihidrojenfosfat-asetonitrilden oluşan hareketli fazını ve 1 mL dak<sup>-1</sup> akış hızı parametrelerini kullanılmıştır. Gün içi ve günler arası kesinlik değeri % 8,93'den küçük, plazmadan geri kazanım değeri ortalama olarak % 90,32 ve plazma içindeki asetaminofen'in -20°C de 24 aydan daha fazla karalı olduğu belirlenmiştir.

Hewavitharana ve arkadaşları<sup>66</sup>, fare idrarında parasetamol ve iki majör metabolitinin belirlenmesi için LC-MS-MS yöntemini geliştirmişlerdir. Elektron sprey pozitif mod kullanılarak 152> 110 iyonları ile analizler yapılmıştır. Farelere 250 mg kg<sup>-1</sup> parasetamol uygulandıktan sonra toplanan idrarlar 10000 g de 5 dakika santrifüj yapıp LC-MS-MS sistemine verilip analizleri gerçekleştirilmiştir.

Zhu ve arkadaşları<sup>67</sup>, insan plazmasında asetaminofen ve tramadolün eş zamanlı analizi için LC-ESI-MS yöntemini geliştirmişlerdir. Yapılan çalışmada metanol (% 0,5 formik asit) -10 mM amonyum asetat tamponundan (60:40, h/h) oluşan hareketli faz kullanılmıştır. Asetaminofen için gün-içi ve günler arası kesinlik değeri % 12,3'den küçük ve plazmadan asetaminofenin geri kazanım değeride % 83,6-85,3 arasında tespit edilmiştir.

## 2.10. Spektroskopik Yöntemler

Spektroskopik yöntemler; atomik ve moleküler spektroskopiye dayanan geniş bir analitik yöntemler grubudur. İnorganik ve organik bileşiklerin kalitatif, kantitatif analizlerinde, asit-baz denge sabitlerinin ve molekül yapılarının aydınlatılmasında spektroskopik yöntemler sıklıkla kullanılmaktadır. Spektroskopi kavramı önceleri görünür bölge ışınının çeşitli dalga boylarına ayrılıp spektrumlarının elde edilmesi için kullanılırken günümüzde ise elektromanyetik ışınların madde ile etkileşimini inceleyen genel bir bilim dalı olarak tanımlanmaktadır. Önceleri sadece elektromanyetik ışına ile madde arasındaki etkileşimlerle ilgilenilirdi; ancak bugün için spektroskopinin kapsamı madde ve diğer enerji türleri arasındaki etkileşimleri de içerecek şekilde genişletilmiştir. Elektromanyetik dalga uzayda çok büyük bir hızla hareket eden dalga ve parçacık yapısında bulunan, pek çok yapıya girebilen bir enerji şeklidir<sup>68</sup>.

Elektromanyetik dalganın madde (atom ya da moleküller) tarafından soğurulması veya yayılması inceleniyorsa sırasıyla, soğurma (absorpsiyon) veya yayılma (emisyon) spektroskopileri olarak adlandırılır. Işının moleküller tarafından soğurulması moleküldeki atomların türüne, düzenlenmesine, moleküllerin şekline, büyüklüğüne vb. özelliklerine bağlı olduğundan spektroskopik yöntemler maddelerin yapılarının ve stereo kimyasal özelliklerinin bulunması, tanınması ve saflık kontrolü gibi çok geniş bir

alandan uygulanmaktadır. Spektroskopik çalışmalarda madde üzerine 110 nm den 300000 nm'ye kadar değişen çeşitli dalga boylarında ışınlar gönderilebilmektedir. Bütün bu dalga boylarını verecek ve hangi dalga boylarının absorplandığını tespit edecek tek bir cihaz yapmak mümkün olmadığından, belirli dalga boyları arasında çalışan cihazlar geliştirilmiştir. 110-1000 nm dalga boylarındaki ışınlarla çalışan cihazlara ultraviyole ve görünür alan, 2500-25000 nm dalga boylarında çalışan cihazlara infrared ve dalga boyları yüzlerce metreye kadar değişen radyo dalgalarıyla çalışan cihazlara da nükleer manyetik rezonans cihazları denir. Bu cihazların geçerli oldukları alan spektroskopilerine de sırasıyla Ultraviyole ve Görünür Bölge (UV-Gör. Böl.), Infrared (IR titreşim) ve Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) spektroskopileri adı verilir<sup>68,69</sup>. Analitik amaçlar için önemli spektral bölgelerin dalga boyu ve dalga sayısı aralıklarını gösteren diyagram Şekil 2.5' de verilmiştir.

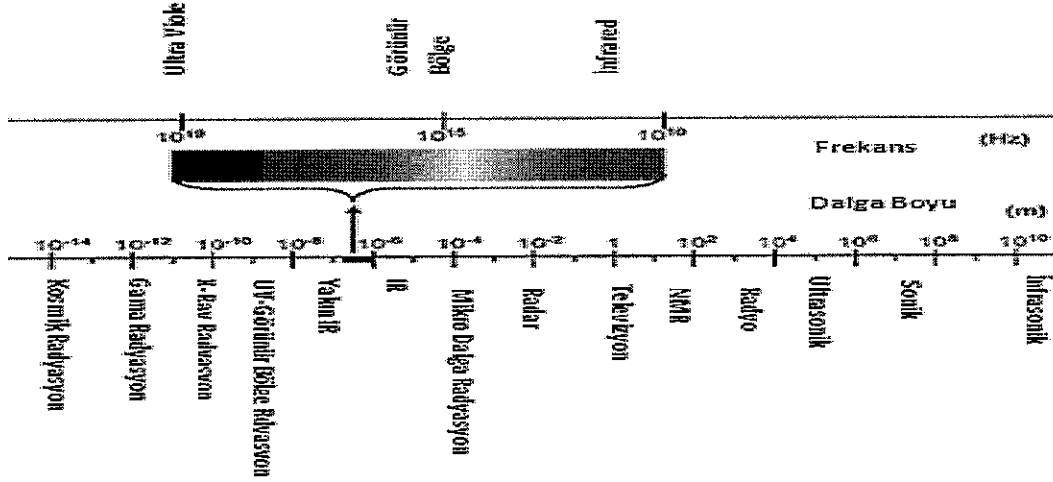
### 2.10.1. Işının Absorplanması

Çeşitli dalga boylarında ışın içeren bir demet, saydam ve şeffaf bir ortamdan geçirilirse, içinden bazı dalga boylarının kaybolduğu görülür. Buna ışının absorplanması denir. Absorpsiyonla ışın enerjisi, maddenin iyon, atom, moleküllerine aktarılır. Böylece ışın enerjisini absorplamış olan iyon, atom veya moleküller uyarılmış hale geçerler. Uyarılmış bir atom veya molekül  $10^{-8}$  saniye kadar yaşayabilir. Sonra absorpladığı ışın enerjisini geri vererek tekrar eski haline veya temel haline döner. Madde tarafından absorplanan ışın enerjisinin geri verilmesi, genellikle ısı şeklinde olur ve madde az çok ısınır. Bazı maddelerde ise absorplanan ışın enerjisi daha uzun dalga boylu ışınlar halinde yayınlanır. Buna fotoluminesans olayı denir. Bu olayın çok kısa süreli olanına floresans, daha uzun süreli olanına fosforesans adı verilir<sup>68-70</sup>.

Bir maddenin temel haliyle uyarılmış halleri arasındaki enerji farkları, başka bir

maddeninkinden farklı olduğundan, her maddenin kendine özgü bir absorpsiyon spektrumu vardır. Absorpsiyon spektrumları genel olarak iki kısma ayrılır<sup>70</sup>.

1. Atomik Absorpsiyon Spektrumları
2. Moleküler Absorpsiyon Spektrumları



Şekil 2.5: Elektromanyetik ışınların sistematik olarak tanımlanması

### 2.10.1.1. Atomik Absorpsiyon Spektrumları

Polikromatik UV veya Görünür Bölge ışını civa veya sodyum gazı gibi tek atomlu bir ortamdan geçirilirse demetten bazı ışınların kaybolduğu görülür. Sodyum buharından ışın geçirildiğinde sarı ışının kaybolduğu görülür. Sarı ışının sodyum atomları tarafından adsorplanması, sodyum atomlarında 3s enerji seviyesinde bulunan bir elektronun sarı ışını absorplayarak 3p enerji seviyesine çıkmasıyla açıklanabilir.

Atomlarda, en dış tabaka elektronları ultraviyole ve görünür bölge ışınlarla uyarıldıkları halde, iç tabaka elektronları uyarılamaz. İç tabaka elektronlarını uyarabilmek için X-ışınları kullanılır. X-ışınları görünür bölge ışınlarından daha fazla enerjilidirler.

Atomların en dış tabaka elektronlarının uyarılması üzerine kurulmuş olan spektroskopi dalına atomik absorpsiyon, en iç tabaka elektronlarının uyarılması üzerine



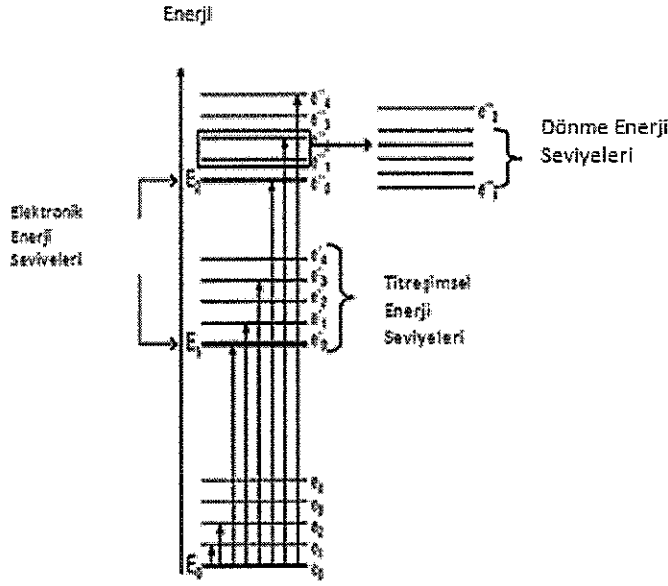
kurulmuş olan spektroskopisi dalına da X-ışınları spektroskopisi denir<sup>69,70</sup>.

### 2.10.1.2. Moleküler Absorpsiyon Spektroskopisi

Moleküller, UV, görünür ve infrared ışınları ile uyarıldıkları zaman, kuantlaşmış 3 tip geçiş vardır. Bunlar elektronik geçişler ve ışın ile oluşturulabilen titreşim ve dönme geçişleridir. Bir molekülün toplam enerjisi  $E_T$ ;

$$E_T = E_{\text{elektronik}} + E_{\text{titreşim}} + E_{\text{dönme}}$$

dir. Elektronik geçiş enerjisi; molekülün çeşitli dış orbitallerindeki elektronlarla ilişkin enerji, titreşim enerjisi; atomlar arası titreşimlere ilişkin enerji, dönme enerjisi ise molekül ağırlık merkezi etrafında dönmesine ilişkin enerjidir<sup>69,70</sup>. Titreşim ve dönme geçişleri çok atomlu moleküller için geçerlidir (Şekil 2.6).



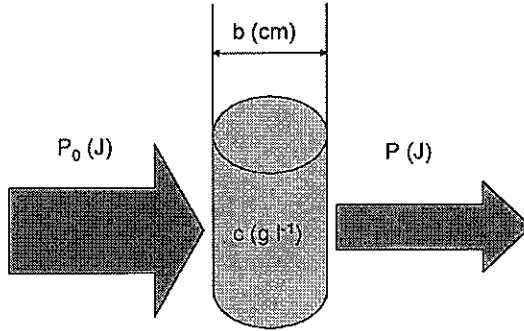
Şekil 2.6: Bir molekül için elektronik, titreşimsel ve dönme enerji seviyelerini gösteren enerji diyagramı

Elektronik geçişler dalga boyları 200-800 nm arasında olan ultraviyole ve görünür alan ışınlarıyla gerçekleşir.

Moleküler absorpsiyon spektroskopisinin, atomik absorpsiyon spektroskopisinden ayrılan en önemli yanı; atomik absorpsiyon spektroskopisinde birbirinden farklı dalga

boylarında keskin çizgiler meydana gelmesine karşılık, moleküler absorpsiyon spektroskopisinde, birçok dalga boylarını içine alan geniş absorpsiyon bantlarının meydana gelmesidir. Bir molekülün UV-Görünür alan spektrumu, molekülün bağ elektronlarından birinin bir foton enerjisini absorplayarak bir üst elektronik seviyeye geçmesi şeklinde açıklanabilir.

Bir maddenin çözeltisinden monokromatik bir ışın demeti geçirildiğinde, demette bulunan bazı ışınlar madde tarafından absorplanır ve ışın demeti çözeltiden şiddetinden bir miktar kaybederek çıkar<sup>69,70</sup> (Şekil 2.7) .



Şekil 2.7: Absorblayan bir çözeltiye giren  $P_0$  şiddetindeki ışın demetinin  $P$  şiddetine düşmüş olarak çıkması

Çözeltiye  $P_0$  şiddetinde giren ışın çözeltiyi  $P$  şiddetinde terk eder. Fotonlarla ışın absorblayan atom veya moleküller arasındaki etkileşimin sonucu olarak ışının gücü  $P_0$  'dan  $P$  'ye düşmüş olur. Buna göre ışın demetinin ortamdaki geçme oranına geçirgenlik ( $T$ ) adı verilir<sup>69-71</sup> .

$$T = \frac{P}{P_0}$$

Şeklinde gösterilir.

Geçirgenliğin eksi logaritması absorbans ( $A$ ) olarak adlandırılır ve absorbans

$$A = -\log_{10} T = -\log \frac{P}{P_0}$$

şeklinde formüle edilir. Çalışmalarda absorplanan ışın miktarı ya geçirgenlik ya da absorbans olarak verilir. Geçirgenlik, genellikle yüzde olarak verilir:

$$\% T = \frac{P}{P_0} 100$$

Bir çözeltinin absorbansı, ışının çözelti içinde aldığı yolla (b) ve çözeltide absorpsiyon yapan taneciklerin derişimiyle (c) doğru orantılıdır. Bu ilişki Lambert-Beer kanunu olarak adlandırılır:

$$A = \epsilon \cdot b \cdot c$$

şeklinde verilir ve burada derişim molar cinsinden alındığında  $\epsilon$  *molar absorbans* ya da *molar absorptivite katsayısı* olarak adlandırılır.

Lambert Beer Kanunu aşağıdaki denklem ile de ifade edilebilir<sup>68-70</sup>.

$$P = P_0 \cdot 10^{-\epsilon \cdot b \cdot c}$$

### 2.10.2. Lambert-Beer Kanunundan Sapmalar

Lambert-Beer kanunu sadece çok seyreltik çözeltilere uygulanabilen bir kanundur. Bunun nedeni yüklü taneciklerin birbirinin yük dağılımını etkilemeleri veya değiştirmeleridir. Yük dağılımı değişen bir taneciğin absorplama kabiliyeti çok değişir. Bu da derişimle absorbans arasındaki lineer bağıntının bozulmasına neden olur. Absorplayan maddenin derişimi düşük olabilir fakat yanında bulunan maddelerin derişimi yüksek olursa yine sapma gözlenebilir. Kanundan sapmalar ortamda yüklü tanecikler bulunduğu zaman daha da büyük olur. Sapmalar<sup>68,69</sup>;

1- Cihazdan gelen sapmalar

2- Kimyasal maddelerden gelen sapmalar

3- Analizci hatasından gelen sapmalar

şeklinde üçe ayrılabilir.

## 2.11. Kromatografik Yöntemler

Kromatografi, karmaşık karışımlardaki kimyasal bileşimlerin ayrılması, tanınması ve tayini için yaygın olarak kullanılan birçok farklı yöntemi içeren bir analitik yöntemler topluluğudur<sup>68,71</sup>. Diğer ayırma yöntemlerinden hiç birisi kromatografik yöntemler kadar etkili olmayıp uygulamada yaygın bir şekilde kullanılmazlar. Bu nedenle de kromatografik yöntemler daha çok araştırma amacıyla kullanılır. Çok değişik sistem ve tekniğe uygulandığından dolayı kromatografi teriminin tam olarak tanımını yapmak oldukça zordur. Bununla birlikte tüm kromatografik tekniklerde bir sabit faz bir de hareketli faz vardır. Gaz veya sıvı olan hareketli faz yardımıyla bir karışımdaki bileşenler sabit bir faz üzerinden geçirilirken farklı göç hızlarından yararlanarak bileşenlerin ayrılması sağlanır. Bu bilgiler ışığında kromatografinin genel bir tanımını yapmaya çalışırsak; bir karışımdaki bileşenler sabit bir ortama ilave edilip bunların belirli bir hareketli faz yardımıyla yüzey adsorpsiyonu, dağılma, iyon değiştirme ve boyut elenme özelliklerine bağlı olarak, sabit ortamdan ayrılma yöntemlerine kromatografi denir.

Kromatografi ilk olarak yirminci yüzyılın başında Rus bilim adamı botanikçi Michail Tswett tarafından bulunmuştur. Tswett yeşil yapraklardan elde ettiği çözeltiyi toz haline getirilmiş kalsiyum karbonatla doldurulmuş cam bir kolondan geçirerek çözeltilde bulunan klorofil ve ksantofil gibi renkli maddeleri kolonda renkli bantlar şeklinde ayırmayı başarmıştır. Bu renkli bantlardan esinlenerek yaptığı işlemi kromatografi olarak isimlendirmiştir. Kromatografi (Chromatography: Chroma renk, graphy ise yazılım) renkli yazılım demektir<sup>71</sup>.

### 2.11.1. Kromatografik Yöntemlerinin Sınıflandırılması

Kromatografi; sabit faz, hareketli faz ve ayırma şekillerine göre değişik şekillerde sınıflandırılırlar<sup>69,71</sup>. Bunlar:

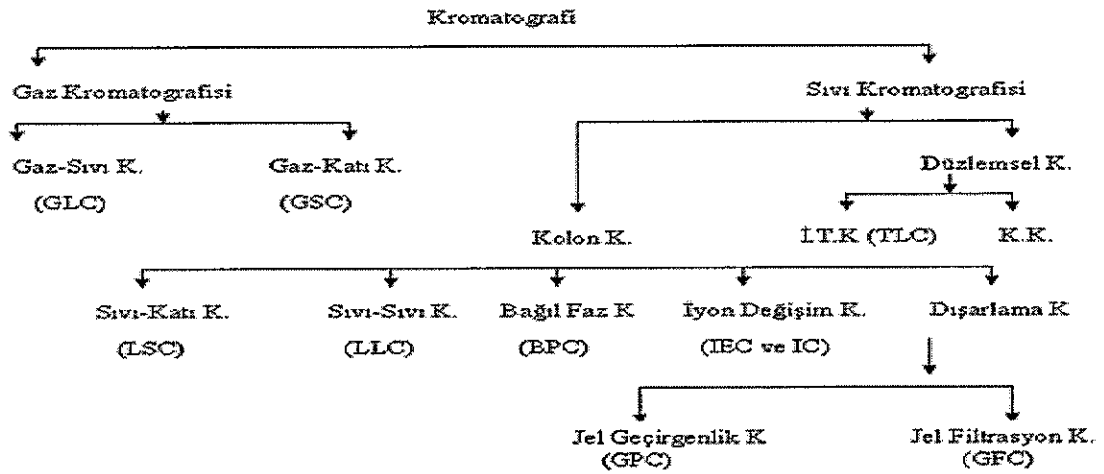
#### 1. Teorik Sınıflandırma

- a- Paylaşım Kromatografisi
- b- Adsorpsiyon Kromatografisi
- c- Boyut Eleme Kromatografisi
- d- İyon Değişim Kromatografisi

#### 2. Pratik Sınıflandırma

- a- Kağıt Kromatografisi
- b- İnce Tabaka Kromatografisi
- c- Kolon Kromatografisi
- d- Gaz Kromatografisi
- e- Sıvı Kromatografisi

#### 3. Hareketli ve Durgun Fazlara Göre Sınıflandırma



### 2.11.2. Kromatografide Temel Olan Fiziksel ve Kimyasal Olaylar

Kromatografik yöntemlerde maddelerin ayrılmasında etkin olan dört ayrı mekanizma mevcuttur. Bunlar aşağıda özetlenmiştir<sup>68,69,71</sup>.

**2.11.2.1. Dağılma Kromatografisi:** Dört ayrı tip sıvı kromatografi içinde en yaygın olarak kullanılanıdır. Bu kromatografi tekniğinde birbiriyle karışmayan iki sıvı tabaka mevcuttur. Bunlardan birincisi hareketli faz diğeri ise özel bir teknikle katı bir destek üzerine tutturulmuş sıvı tabakaya sahip sabit fazdır. Bu teknikte ayırma, iki farklı sıvı (sabit faz ve hareketli faz) içerisinde karışımdaki bileşenlerin farklı çözünme oranlarından yararlanarak sağlanmaktadır. Dağılma kromatografisinde hareketli ve sabit fazların birbiriyle karışmaması için her iki sıvının polarlıklarının birbirinden farklı olması gerekmektedir. Bu farklılıktan yararlanarak da dağılma kromatografisi Normal Faz Kromatografisi ve Ters Faz Kromatografisi olmak üzere ikiye ayrılır. Sabit faz polar ve hareketli fazda apolar olan tekniğe Normal Faz Kromatografisi, sabit faz apolar hareketli faz ise polar olan tekniğe de Ters Faz Kromatografisi denir.

**2.11.2.2. Adsorpsiyon Kromatografisi:** Bir karışımdaki maddelerin katı destek üzerinde farklı kuvvetlerde tutunması prensibine göre birbirlerinden ayrıldıkları kromatografi olarak adlandırılır ve ilk keşfedilen kromatografi çeşididir. Hareketli fazın polarlığı katı destek üzerinden tutunmuş olan maddenin kolon içerisinde hareket hızını belirler.

**2.11.2.3. İyon Değişirme Kromatografisi:** Bir katı maddenin yapısında bulunan iyonları, temasta bulunduğu çözelti içindeki aynı cinsten yüklü başka iyonlarla bir dengeye göre değiştirmesi özelliğine dayanan bir kromatografik yöntemdir. Bu amaçla kullanılan katı maddeler, çözelti ortamında hiç çözünmeyen büyük molekülü doğal veya yapma maddelerdir. Bunlarda organik ve inorganik diye ikiye ayrılır. Organik iyon

değiştiriciler (bunlara reçineler de denir) suda ve birçok organik çözücüde hiç çözünmeyen, yapılarında sayılamayacak kadar çok anyon ve katyon taşıyan büyük moleküllü maddelerdir. Bunlar hem anyon, hem katyon değiştirmede ve hatta selektif iyon değiştirmede kullanılır.

**2.11.2.4. Boyut-Eleme Kromatografisi:** Jel-Geçirgenlik veya Jel-Süzme kromatografisi adı da verilen boyut-eleme kromatografisi, özellikle yüksek mol kütleli maddelere uygulanabilen önemli bir tekniktir. Boyut-eleme kromatografisi için dolgu maddeleri, çözünen madde ve çözücü moleküllerinin içine difüzlenebileceği düzgün bir gözenek ağı içeren küçük boyutlu silis veya polimer taneciklerinden meydana gelmiştir. Gözenekler içinde küçük moleküller etkin bir şekilde yakalanabilmekte, büyük moleküllerde gözenek dışında kaldığından dolayı hareketli faz akımı ile kolondan kolaylıkla elüe edilebilmekte ve daha sonrada gözeneklerde tutulan küçük moleküllerde hareketli faz akımı ile yüzeyden kolaylıkla uzaklaştırılabilmektedir. Gözenek içinde ortalama kalma süresi, analit molekülünün etkin büyüklüğüne bağlıdır<sup>71</sup>.

## **2.12. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)**

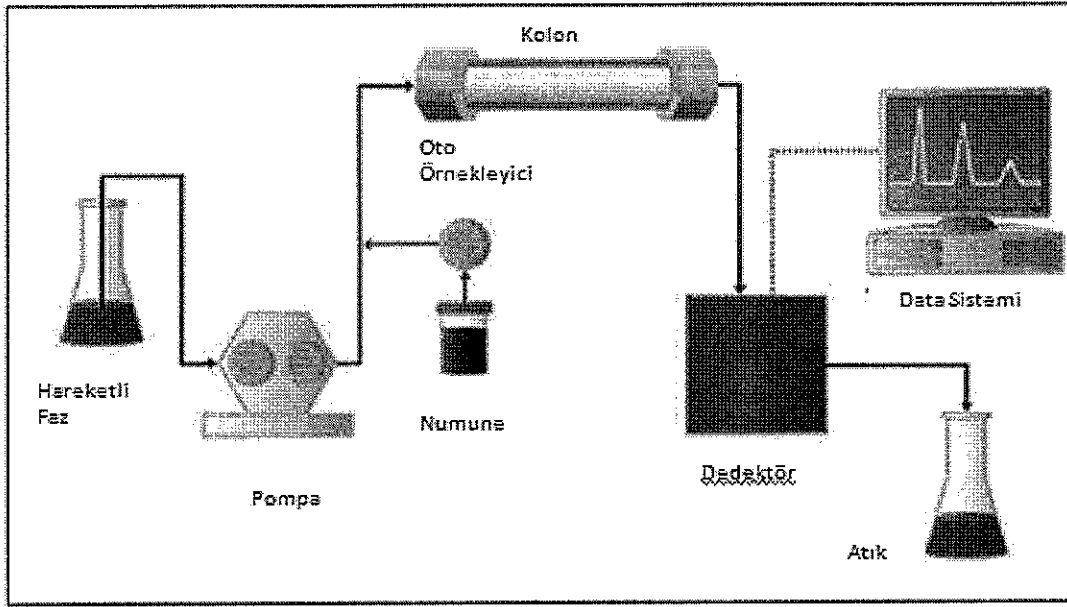
Klasik sıvı kromatografisinde numune bir çözücü (hareketli faz) yardımıyla bir kolon içerisinden geçirilmesi suretiyle numunedeki bileşenlerin bantlar halinde ayrılmaları ile yapılmaktadır. Bantların daha iyi ayrılmaları için daha uzun kolonlar kullanılabilir. Böyle durumlarda saatlerce beklemek gerekir. Alternatif olarak da kolondaki dolgu maddesi inceltir. Bu yapıldığı zamanda yine çok uzun süre beklemek gerekir. Bunları gören bilim adamları kullanılan kolonların ebatlarını küçültüp içerisindeki sabit fazın tane büyüklüğünü de kullanılan kolona göre küçültmüşlerdir. Hareketli fazın kolon içerisindeki akış süresini azaltmak için basınç uygulanmış ve böylece basınç sıvı kromatografisi kullanılmaya başlanmıştır. Böylece bileşiklerin

saflaştırma sürelerinin azalması kolon kromatografisi ile izolasyon çalışmalarını başlamıştır. Yüksek Basınç Sıvı Kromatografisi (High Pressure Liquid Chromatography: HPLC) 1970'li yılların ortalarında geliştirilmiştir. Kolon paketleme materyallerinin geliştirilmesi ve on-line dedektörlerin ilavesiyle hızlı bir ilerleme meydana gelmiştir. 1980 yılından sonra HPLC kimyasal bileşiklerin ayrılmasında yaygın bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır. Bu teknik üzerinde yapılan birçok çalışmayla günümüzde teknik bilgilere ulaşılmış olup oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Günümüzde Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography) terimi kullanılmaktadır. HPLC yöntemin bu kadar yaygın olmasının sebepleri, duyarlılığı, doğru kantitatif tayinlere kolaylıkla uyarlanabilir olması, uçucu olmayan türlerin veya sıcaklıkla kolayca bozunabilen türlerin ayrılmasına uygun olması ve hepsinden de önemlisi sanayinin birçok dalının ve halkın birinci derece ilgilendiği maddelere geniş bir şekilde uygulanabilirliğidir<sup>68,69</sup>.



### 2.12.1.Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Cihazı

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi cihazı, çözücü tankı, pompa, enjektör, kolon, dedektör ve kaydedici olmak üzere altı ana bölümden oluşan bir sistemdir (Şekil 2. 8).



Şekil 2.8: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi cihazının şematik görünüşü

#### 2.12.1.1. Kolonlar

Sıvı kromatografi kolonları sistemin en önemli kısımlarından biri olup normal olarak düzgün iç çaplı paslanmaz çelik borulardan imal edilir. Ancak bazen kalın cidarlı cam borularda kullanılır. Tipik bir HPLC kolonun çapı 3-4 mm, uzunluğu 10-40 cm dir. Dolgu maddesi olarak kullanılan silikajel parçacıklarının boyutları 5-10  $\mu\text{m}$  dir. Günümüzde en çok kullanılan kolonlar 25 cm uzunluğunda, 4,6 mm iç çapında ve 5  $\mu\text{m}$  tanecik büyüklüğüne sahip dolgu maddesi doldurulmuş kolonlardır. Böyle bir kolonun bir metresinde 40000-50000 kadar tabaka bulunur. Son zamanlarda iç çapı 1-4,6 mm ve uzunluğu 3-7,5 cm olan yüksek performanslı mikro kolonlar da üretilmeye başlanmıştır.

Böyle kolonların dolgu maddelerinin parçacık boyutları 3-5  $\mu\text{m}$  dir. Tabaka sayısı 100000 'e kadar çıkmaktadır. Bu mikro kolonlar ile az miktarda çözücü ile hızlı bir şekilde ayırım yapılabilir. Bu şekilde ayırım yapılabilir.

Analitik kolonların ömrünü uzatmak için analitik kolondan önce ön (klavuz ya da guard) kolon denilen kolonlar kullanılır. Bu kolonlar analitik kolonlara göre daha ucuz olup bunların görevi hem hareketli faz hem de numune içerisinde bulunan muhtemel kirleri ve partikülleri tutarak uzaklaştırmaktır. Emniyet kolonun dolgusunun bileşimi ile analitik kolonunki benzer olmalıdır<sup>68,69,71</sup>.

#### 2.12.1.2. Pompalar

Pompalar, sıkıca doldurulmuş kolon içinden hareketli fazın akışını sağlayan aletlerdir. Her birinin kendine göre üstünlük ve sakıncaları bulunan üç tip pompa vardır<sup>68,69,71</sup>.

*Pistonlu pompalar*; cihazların % 90'ında kullanılan pompalardır. Motor kontrollü bir pistonun ileri ve geri hareketiyle çözücünün pompalandığı küçük bir silindirden meydana gelmiştir. Bu pompaların üstünlüğü; küçük iç hacimleri, yüksek çıkış basıncı, gradiyent elüsyona uyarlanmaya hazır oluşları ve kolon geri basıncından ve çözücü viskozitesinden büyük ölçüde bağımsız olan sabit akış hızlarıdır. Pulsu (hava veya gaz kabarcığı) bir akış ürettiklerinden dolayı sakıncalıdır

*Sürgülü pompalar*; bir kademeli motordan güç alan vidalı güdüm mekanizması ile kumanda edilen pompalardır. Viskoziteden ve geri basınçtan bağımsız bir akış üretirler, pulsuz akış üretirler. Sakıncası sınırlı çözücü kapasitesi ve çözücü değiştirilmesinde karşılaşılan güçlüklerdir.

*Pnömatik pompalar*; en basit pompalardır. Akış pulsuzdur ancak kapasitesi sınırlı olup, çıkış basıncı düşüktür.

### 2.12.1.3. Enjektörler

İlk zamanlarda HPLC sistemine numune verme sistemi şırınga ile enjeksiyondur. Bu amaçla 100 atm basınca kadar dayanıklı mikro şırıngalar kullanılır. Bu tekniğin avantajı basitliğidir. Ne yazık ki, şırınga ile enjeksiyonun tekrarlanabilirliği nadiren % 2-3'den daha iyidir. Çoğu zaman da daha kötüdür.

Günümüzde numune giriş sarımlarının kullanılması esasına dayanan otomatik enjeksiyon sistemleri en yaygın olarak kullanılan yöntemlerdir. Birçok sıvı kromatografisi cihazının ayrılmaz bir parçası olan bu sarımlar, değiştirilebilir nitelikte olup 5  $\mu\text{L}$  - 500  $\mu\text{L}$  arasında değişen hacimlerde numune enjeksiyonu yapabilmektedir<sup>69,71</sup>.

### 2.12.1.4. Dedektörler

Hareketli faz ile taşınarak kolon çıkışına gelen numunelerin ışık enerjisini elektrik enerjisine çevrilip tanınmasına yardımcı olan cihazlardır. Sıvı kromatografi dedektörleri temel olarak iki tiptir. Birinci tip dedektörler, hareketli fazın kırma indisi, dielektrik sabiti veya yoğunluğu gibi, analit tarafından değiştirilebilen yığın özelliklerine göre cevap veren dedektörlerdir. İkinci tip dedektörler ise, analitin UV-Görünür bölge absorbanı, floresans şiddeti veya difüzyon akımı gibi hareketli fazın sahip olmadığı analit ile ilgili özelliklere cevap veren dedektörlerdir<sup>68,69,71</sup>.

#### 2.12.1.4.1. UV-Görünür Bölge Dedektörler

UV-Görünür Bölge dedektörlerde, dedektöre gelen madde üzerine belli bir dalga boyunda belli bir şiddette sahip ışın gönderilmekte madde gelen ışını absorplaması sonrasında çıkan ışının şiddetinin ölçülmesi esasına göre çalışan dedektörlerdir. Bunlar iki tiptir.

Filtreli Ultraviyole Absorbans dedektörleri: Sabit dalga boylu basit bir dedektör

olup, dalga boyunun seçimi için farklı interferanslı filtreler kullanılır. Bu dedektörlerde genellikle UV kaynağı olarak civa lambası kullanılır. Bunlardan en yaygın kullanılanı 254 nm deki ışın demeti filtreyle ayrılarak kullanılır. Bunun dışında alternatif ışık kaynakları ile daha değişik dalga boylarını gözlemekte mümkündür.

Monokromatörlü Ultraviyole Absorbans dedektöleri: Değişken dalga boylu dedektörler olup, bir monokromatör vasıtasıyla 108-400 nm arasında döteryum lamba veya 400-800 nm arasında bir tungsten lamba kullanılarak istenilen dalga boyunda çalışma imkânını verirler. Maddenin maksimum absorpsiyonunun bulunduğu dalga boyunda çalışma olanağı sağlayan bu dedektörler, hassasiyet artırdığı için ve düşük dalga boyunda çalışabildiği için son derece kullanışlıdır<sup>68,69,71</sup>.

#### **2.12.1.4.2. Floresans Dedektörler**

HPLC’de kullanılan floresans dedektörler, fluorometre ve spektrofluorometrelerde kullanılan dedektörlerin aynısıdır. Floresans özellik, uyarıcı ışına 90 derece açı ile yerleştirilmiş bir fotoelektrik dedektör yardımıyla gözlenmektedir. En basit dedektörler de, uyarıcı ışık kaynağı olarak civa lambası ve yayılan ışınların belli bir bandını izole etmek için birkaç filtre kullanılır. Gelişmiş cihazlarda kaynak olarak ksenon lambası ve floresans ışınmasını izole etmek için optik ağ monokromatör kullanılır. Floresans yöntemlerin en büyük özelliği diğer yöntemlere göre 10 kat daha hassas olmasıdır. Bu üstünlük bir çok maddenin kantitatif analizine izin vermiştir. Floresans özelliğe sahip ilaçlar, doğal ürünler, klinik numuneler ve petrol ürünleri gibi maddelerin analizinde oldukça fazla tercih edilen yöntemlerdendir<sup>68,69,71</sup>.

#### **2.13. Sıvı Kromatografisi- Kütle Spektrometrisi (LC-MS)**

Sıvı Kromatografisi – Kütle Spektroskopisi (LC-MS) ya da diğer bir ifadeyle

HPLC-MS cihazı sıvı kromatografisinin fiziksel ayırma özellikleri ile kütle analizine olanak tanıyan MS teknolojisinin birleşmesiyle oluşan sistemdir. LC-MS birçok amaç için kullanılan yüksek seçiciliğe ve hassasiyete sahip çok güçlü bir tekniktir. Genellikle belli bir karışım içerisinde istenen bir kimyasal maddenin miktarını belirlemek için kullanılır (Şekil 2.9).

Kütle spektroskopisinde single quadrapole, triple quadrapole, ion trap, TOF ve Q-TOF gibi farklı dedektör kullanılmaktadır.

Uzun bir süre boyunca sıvı kromatografisi için sabit bir akış hızı sağlamak ve gaz kromatografisi için gaz akışı sağlamak zordur. Elektrosprey iyonizasyon yöntemi bu zorluğu yenmiştir. Interface genel olarak elektrosprey kaynağı ya da bunun değişik bir versiyonu olan nanosprey kaynağıdır. Bunlara ek olarak atmosferik basınç kimyasal iyonizasyon interface'i de kullanılmaktadır. Çok değişik depozisyon ve kurutma teknikleri de kullanılmaktadır. Bunların içinde en çok kullanılanı MALDI'dir. LC-MS-EI tekniği HPLC nano sistemi ile elektron iyonizasyon kütle spektroskopisinin birleşimidir<sup>69,73</sup>.

### 2.13.1. Kütle Spektrometrisi (MS)

Kütle Spektrometrisi (MS) uzun yıllardan beri kullanılmakta olup ilk kez bir kütle spektrumu 1898'de Wien tarafından elde edilmiştir. 1905'de ise Thompson kararlı izotopların bulunduğunu göstermek için yapmış olduğu deneyde farklı pozitif iyonların kütle/yük ( $m/z$ ) oranına göre farklı parabolik yörünge kat ettiğini göstermiştir. MS' in LC ve GC dedektörü olarak kullanılmasının nedeni toplanacak bilgilerin çokluğudur. Bütün organik bileşik sınıflarına ve tüm organik bileşiklerde ortak bir fiziksel özellik olan kütleyle cevap verebilmesi en büyük özelliğidir.

Kütle Spektrometrisini temel şekilde açıklarsak; gaz fazındaki numune, yüksek

enerjili elektronlarla çarpışarak elektronlarını kaybederek pozitif yüklü çeşitli iyonlar haline dönüşmektedir. Hızlandırılan bu katyonlar manyetik ve/veya elektrik alanında saptırılmaktadır. İyonların sapması kütlelerine, yüklerine ve hızlarına bağlıdır. Eğer yük, hız ve saptırıcı güç sabit ise, sapma ağır parçacıklarda az hafif parçacıklarda çok olacaktır<sup>73-76</sup>.

Kütle Spektrometrisi, evrensel, kütle bağımlı ve yıkıcı (parçalayan) bir dedektördür. Her numune için sinyal verir. Kütle Spektrometrisi şu kısımlardan oluşur.

1. Numune giriş sistemi
2. İyon kaynağı
3. Kütle analizörü
4. Dedektör
5. Vakum Sistemleri

#### **2.13.1.1. Numune Giriş Sistemi**

Numune giriş sisteminin amacı çok az miktardaki numuneyi numune giriş sisteminin içine almaktır. Bu kısım vakum altında bulunur ve numune alma esnasında vakum düşmez. Numunenin cihaza alınması başlıca üç şekilde yapılır<sup>75,76</sup>.

- a. Buharlaştırarak
- b. Doğrudan
- c. Kromatografi düzeneğinden geldiği gibi

#### **2.13.1.2. İyon Kaynağı**

Moleküllerin iyonlaştığı bölümdür. Bir molekül, atom veya iyondan bir elektron uzaklaşması olayına iyonizasyon denir. İyonlaştırma teknikleri; gaz, sıvı ve katı gibi maddenin farklı fiziksel durumuna ve maddenin ısısal kararlılığına bağlı olarak seçilir.

Gazlar ve sıvılar için elektron ve foton bombardımanlı iyonlaştırma; katılar için ise termal, lazer desorpsiyon, atom bombardımanı, elektrik boşalım ve alan desorpsiyon iyonlaşma uygundur. Günümüzde en çok kullanılan iyonlaştırma teknikleri elektron iyonizasyon ve kimyasal iyonizasyondur<sup>74-76</sup>.

**Elektronik İyonizasyon (EI):** EI kısaca analit molekülünün enerjili elektronlarla bombardıman edildiği iyonizasyon yöntemi olarak tanımlanır. Sıcak bir flamandan çıkan elektronlar bölme boyunca odaklanacaklar ve 70 eV' luk bir potansiyele sahip bir elektrot tarafından çekileceklerdir. Böylece her bir elektron 70 eV'luk bir enerji kazanır ve ortama giren numune ile çarpışarak bir seri parçalanma tepkimeleri oluşur. Moleküldeki bağların kırılması tüm pozitif ve negatif iyonların oluşmasını sağlayabilecektir. Çoğu organik molekül için pozitif iyon oluşumu enerji açısından daha çok tercih edilir. Elektronun sahip olduğu enerji bütün bağları kırmak için yeterli enerjidir. 70 eV'luk enerjinin kullanılması kararlı, tekrarlanabilir ve moleküle özgü kütle spektrumlarının oluşmasını sağlar.

Elektron bombardımanı ile oluşan iyonların bağlı büyüklükleri, iyonize edici elektronların enerjileri ve iyonizasyonun olduğu sıcaklığa bağlıdır<sup>74-76</sup>.

**Kimyasal İyonizasyon (CI):** Genellikle düz zincirli alkan, alken veya alkoller gibi homolog bileşikler EI ile kararlı moleküler iyonlara sahip pozitif tanımlama yapılamayacak kadar küçük bağlı çokluğa sahiptirler. CI' nın esası iyon-molekül tepkimelerine dayanır. Yüksek enerjili iyonlar çarpıştıkları moleküle ya proton aktarırlar ya da ondan hidrür ve elektron koparırlar. Kimyasal iyonlaşmalı kütle spektrometrisinde (CI-MS), iyon kaynağına reaktif gaz verilerek yüksek basınç elde edilmektedir. Reaktif gaz numune molekülleri ile iç etkileşime girecek reaktif iyonlarını oluşturmak üzere elektron demeti tarafından iyonize edilmektedir. Ortamdaki yüksek

basıncın etkisiyle reaktif iyon ile numune iç etkileşime girer. EI' ya göre enerji daha düşüktür<sup>75-77</sup>.

### 2.13.1.3. Kütle Analizörü

İyon kaynağından çıkan iyonlaşma ürünleri analizöre yönlendirilir. Analizör, kütle/yük (m/z) oranlarına göre maddelerin ayırımının sağlandığı bölümdür<sup>75-78</sup>.

Bugün en çok kullanılan kütle analizörleri şunlardır;

- a. Manyetik sektörlü kütle analizörü
- b. Uçuş zamanlı kütle analizörü
- c. Kuadropol kütle analizörü.

### 2.13.1.4. Dedektör

Kütle analizörlerinden geçen iyonlar elektron çoğaltıcı dedektöre ulaşır. Elektron çoğaltıcıda çarpışmadan dolayı oluşan akım önce analog voltaja, sonra da dijital sinyale dönüşür. En çok kullanılan dedektörler dizi dinot elektron çoğaltıcı ve devamlı dinot elektron çoğaltıcılardır. Bunlar sinyali  $10^7$  değerine kadar artırabilirler. Bu da fentoamper gibi çok düşük iyon akımlarının kaydedilmesini sağlar.

MS'den milisaniye aralıklarla gelen verilerin hızla kaydedilmesi ve depolanması gereklidir ki bu da bir bilgisayarla kolayca sağlanabilmektedir. LC-MS ve GC-MS sistemleri, ara bağlantı ve veri toplama basamaklarındaki problemlerin çözülmesinden sonra, daha yaygın kullanılmaya başlanmıştır. Bunlardan başka aletin kalibrasyonun otomatik yapılıp, sonuçlarının alınabilmesi, analiz koşullarının kolayca girilmesi, aletin kontrolünün yapılıp verilerin alınabilmesi, analiz sonrası veri değerlendirmelerinin yapılabilmesini bilgisayar sağlamaktadır<sup>76-78</sup>.



Kütle spektrometrisi ile analizlerde 3 tip iyon tarama şekli vardır:

1. Toplam iyon taraması (TIC): Bir analiz sırasında ayırım yapmadan tüm iyonların 10-800 akb aralığında taratılması ile gerçekleştirilir.
2. Seçilen iyon taraması (SIM): Aranılan bileşik için en karakteristik olan, kararlı ve çokluğu fazla olan m/z değerleri seçilip, taratılır. Seçici iyon taramasında seçilen iyonların tarama süresi (dwell time) analizci tarafından seçilir.
3. Tek iyon taraması: Tek iyon taratılır. Çok hassastır, ancak kesin tanımlama yapılamaz.

#### 2.12.1.5. Vakum Sistemleri

MS cihazı  $10^{-6}$ - $10^{-8}$  torr civarında çalışmaktadır. MS' de vakum sisteminin olmasını gerektiren nedenler şöyle sıralanabilir<sup>76,78,79</sup>:

1. Flaman yüksek basınçtaki oksijen altında ısıtılırsa yükseltgenip yanabilir.
2. Basınç arttıkça kütledeki çoğaltıcı, kaynak ve analizörde yüksek voltaj kırılmaları olabilir.
3. Kütle spektrometrisinin iyon kaynağında bulunan gaz, spektral geri zemine katılabilir (örn; su, azot ve oksijenden gelebilecek m/z:18, 28 ve 32).
4. Kütle spektrometrisinde düşük basınç sağlamanın en önemli nedeni, analiz edilen iyonlar arasındaki çarpışmayı en aza indirmektir. Çünkü iyon sürekli diğer moleküller ve yüzeyler ile çarpışıyorsa, iyonları belli bir yolda yönlendirmek için kullanılan güçler yararsız olacaktır.
5. Yüksek basınç ile analizörün, iyon kaynağının ve odakların (slit) kirlenmesi artmaktadır.

6. Yüksek basınç ile spektrum almak ve yorumlamak zordur.
7. Basınç artarken iyon kaynağına doğru olan elektron akımı düzeltmeleri zorlaşır.
8. Vakum sistemi analizörün işlemini gerçekleştirmesi için gereken moleküler ortalama yolu sağlar.

Bu nedenlerden dolayı MS için vakum sistemleri çok önemlidir. MS de cihaz içindeki basıncı  $10^{-6}$  torr civarında tutmak için değişik pompalar kullanılır. Bunlardan en çok kullanılanları pompalar, turbo moleküler ve difüzyon pompalarıdır.

### 2.13.2. LC-MS'in Uygulamaları

#### 2.13.2.1. Farmakokinetik

LC-MS ilaç ile ilgili olan çalışmalarda oldukça sık başvurulan bir yöntemdir. Bundan dolayı farmakokinetik ve biyoanaliz çalışmalarında yaygın bir kullanımı vardır. Bu çalışmalarda en kısa sürede ilacın kanda veya organlarda tayinini yapmak çok önemlidir. MS hassasiyetinin, analiz süresinin ve seçiciliğinin UV'ye göre çok daha üst düzeyde olması dolayısıyla tercih edilmektedir<sup>74-79</sup>.

MS kullanımında ki en büyük avantajlardan biri de MS-MS'in kullanılmasıdır. Dedektör sadece belli bir iyonun ölçülmesine programlanabilir. İşlem genelde bir seçim işlemidir fakat görüldüğünden daha komplekstir. Ölçülen değer operatör tarafından seçilen molekül parçalarıdır. LC-MS tekniğinde eğer hiçbir iyon interferesi yoksa metot çok hızlıdır. MS-MS yöntemi ile analiz süresi bir dakika ve altına düşürülebilmiştir. Bu analiz süresi HPLC'nin ortalama 10 dakikalık analiz süresiyle karşılaştırıldığında oldukça hızlı görünmektedir<sup>74-79</sup>.

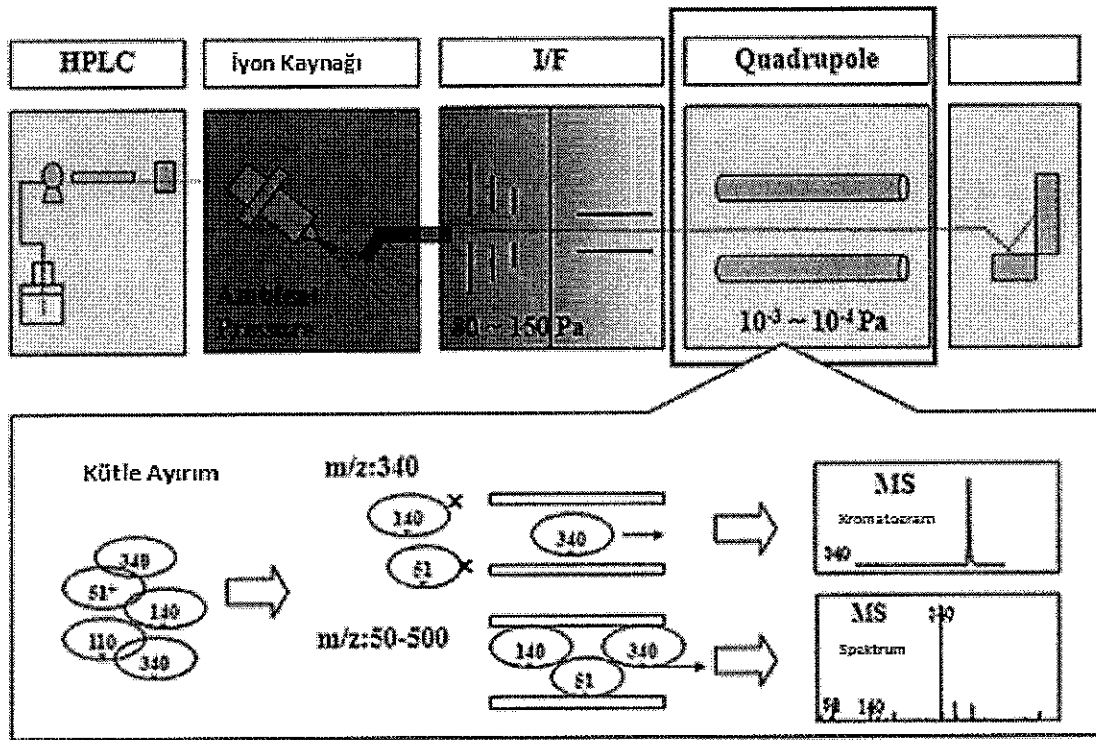
#### 2.13.2.2. Proteomiks

LC-MS proteomiks çalışmalarda da kullanılarak karışım içindeki maddeler teşhis

ve tayin edilir. Denatürasyonu sonucunda çıkan ürünlerin kütle spektroskopisi fingerprint (parmak izi) ya da tandem MS-MS yöntemi ile her bir peptidin sırasının belirlenmesi gibi uygulamalar vardır. LC MS/MS yöntemi yüksek çözünürlükteki kütle spektroskopilerinde dahi çakışan molekülerin analizinde kullanılır. SDS-PAGE jel ya da HPLC-SCX'te ayrımı yapıldıktan sonra biyolojik sıvılar ve serumlardaki 1000 kadar proteinin analizi LC MS/MS ile yapılabilir<sup>74-80</sup>.

### 2.13.2.3. İlaç geliştirme

LC-MS cihazları ilaç geliştirmenin birçok aşamasında kullanılmaktadır. Örneğin Peptit Mapping, Glikoprotein Mapping, doğal ürün dereplikasyonu, bioafinite taraması, In vivo ilaç araştırmaları, metabolik stabilite araştırmaları, metabolit tayini, safsızlık tayini, bozulan ürünlerin tayini, kantitatif araştırmalar ve kalite kontrol çalışmalarında kullanılmaktadır<sup>77,79,80</sup>.



Şekil 2.9: Sıvı Kromatografisi- Kütle Spektrometrisi cihazının şematik gösterimi

## 2.14. Geçerlilik Testi (Validasyon)

Geçerlilik Testi (Validasyon), ürünlerin değerlendirme prosesinde, kalitatif veya kantitatif analizlerde seçilen yöntem yada yöntemlerin bu analiz işlemlerinde uygulanabilir olduğunu göstermek için yapılan testlerin tümüdür<sup>81,82</sup>. Seçilen analitik yöntemin geçerliliğini göstermek için kullanılan parametreler:

1. Doğruluk
2. Kesinlik
3. Saklanan örneklerin kararlılığı (Stabilite)
4. Doğrusallık
5. Tekrarlanabilirlik
6. Seçicilik
7. Duyarlılık Limiti
8. Tutarlılık
9. Geri kazanım

Farmasötik preparatlarda ve biyolojik ortamlarda etkin maddelerin miktarlarının belirlenmesinde uygulanan yöntemlerin geçerlilik testlerinin yapılmış olması gerekmektedir.

### 2.14.1. Doğruluk, Kesinlik ve Tekrarlanabilirlik

Doğruluk, bir analitik yöntemde sonuçların gerçek değere yakınlığı olarak ifade edilir. Bu da bağıl veya mutlak hata ile verilir. Kesinlik ise, analitik bir işlemde belirlenmiş koşullar altında alınan ölçüm sonuçlarının birbirine yakınlığı olarak ifade edilir ve % BSS (bağıl standart sapma) ile verilir. Tekrarlanabilirlik, farklı koşullarda aynı yöntemle hazırlanan örneklerden elde edilen sonuçların birbiriyle uyumu ifade eder. Kesinlik çalışmasından elde edilen değerler tekrarlanabilirlik çalışması olarak da

kabul edilebilmektedir<sup>81,82</sup>.

**i) Gün-içi kesinlik:** Birbirinden bağımsız biçimde hazırlanmış numunelerin aynı gün içerisinde tekrarlayan analiz sonuçlarının birbirine yakınlığı (n=6, n: ölçüm sayısı) % BSS değeri ile verilir.

**ii) Günler-arası kesinlik:** Birbirinden bağımsız biçimde hazırlanmış numunelerin farklı günler (en az altı gün) içerisinde tekrarlayan analiz (en az n=6) sonuçlarının birbirlerine olan yakınlık ölçüsüdür. Bu çalışmayla elde edilen değerler aynı zamanda yöntemin uygulanabilirliğinin de bir ölçüsüdür.

#### **2.14.2. Örneklerin Kararlılığı (Stabilite)**

Saklanan örneklerin analiz süresince bozunmadan sabit kaldığından emin olmak için yapılan testlere kararlılık (stabilite) denilmektedir. Saf analit, analit çözeltisi ve/veya analit içeren kan örneklerinin normal laboratuvar koşullarında nem, sıcaklık, hava ve örneklerin dondurulup-eritilmesi (-20°C bekletilmesi) gibi etkilere maruz kaldığında analitin bozunmadan sabit kaldığı süre tespit edilmeli ve aynı zamanda elde edilen bilgilerin literatür bilgileri ile de desteklenmesi gerekmektedir<sup>81,82</sup>.

#### **2.14.3. Doğrusallık ve Kalibrasyon Eğrisi**

En düşük derişimden en yüksek derişime doğru bir seri çözelti hazırlanarak yöntemin doğrusal olduğu aralığa yöntemin doğrusallığı denir. Yöntemin doğrusal olduğu aralık belirlendikten sonra çözeltinin derişimine karşı elde edilen cevaplar grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi türetilir. Ağırlıklı ve ağırlıksız en küçük kareler yöntemi uygulanarak kalibrasyon eğrisinin regresyon analizi yapılarak standart eğrinin doğru denklemi ve regresyon katsayısı elde edilir. Kalibrasyon doğrusunun eğimi, doğrusallığın matematiksel bir ölçüsüdür<sup>82</sup>.

#### **2.14.4. Seçicilik**

Numunede bulunabilecek interferanslar ve bilinen parçalanma ürünlerinin varlığında bir analitin ölçülebilme yeteneğidir.

#### **2.14.5. Duyarlılık**

Analitik yöntemin en düşük derişimdeki analitleri saptayabilmesinin bir ölçüsüdür.

#### **2.14.6. Tayin alt sınırı (Limit of Quantification, LOQ)**

Belirlenen deney koşulları altında, analitik yöntemin tayin alt sınırı değeri numune içindeki analitin uygun doğruluk ve kesinlik ile tayin edilebildiği en düşük derişimdir. Kromatografik çalışmalarda tayin alt sınırı pik alanının gürültü alanına oranının 8 olduğu derişim olarak belirlenir<sup>81,82</sup>.

#### **2.14.7. Gözlenebilme (teşhis) sınırı (Limit of Dedection, LOD)**

Bir analitik işlemin gözlenebilme (teşhis) sınırı, bir örnekteki incelenen bileşiğin belirlenebilen en düşük miktarıdır. Ancak burada belirlenen derişim kantitatif tayin için tam olarak kesinlik ifade eden bir değer olmayıp sadece bir sınır değeridir. Kromatografik çalışmalarda, gözlenebilme sınır değeri elde edilen pik alanının gürültü pik alanına oranının 3 olduğu derişim olarak ifade edilir<sup>82</sup>.

#### **2.14.8. Tutarlılık**

Yöntemin farklı deney koşullarında, farklı alet, farklı analist, farklı laboratuvar, farklı koşullarda hazırlanan reaktiflerle ve farklı günlerde aynı yöntemle analiz sonucunda elde edilen bulguların birbiriyle uygunluk derecesidir. Analiz sonuçları birbiriyle uyumlu ise analitik yöntemin uygulanabilirliğini ve tekrarlanabilirliğini gösterir<sup>81,82</sup>.

#### **2.14.9. Geri Kazanım**

Analiz sonucunda bulunan değer gerçekteki değere oranı olarak ifade edilir.

### **3. MATERYAL ve YÖNTEM**

#### **3.1. Kimyasal Maddeler ve Cam Malzemeler**

Etodolak (Novagenix, Türkiye)

Parasetamol (Sigma-Aldrich )

Adrenalin (Sigma-Aldrich)

İsoproterenol (Sigma-Aldrich)

Etol Fort ( Nobel ilaç)

Tadolak ( Saba ilaç)

Parol (Atabay ilaç)

Pental (İ.E Ulagay)

Asetonitril (HPLC saflık, Merck, Almanya)

Deiyonize Su

Formik Asit (Riedel-de Haën, Almanya)

3- Kloro Asetik Asit (Merck, Almanya)

Deney tüpü

Vial ve insert

Otomatik pipet (10-100 µL, 100-1000 µL ve 1000- 5000 µL)

#### **3.2.Kullanılan Cihazlar**

Etüv (Memmert)

Ultrasonik banyo (Elma LC 30)

Terazi (Metler Toledo)

Santrifüj (Hettich, RPM x 100)

Karıştırıcı (Vorteks, IKA)

Vakum pompası (Phenomenex)

### 3.2.1. HPLC Sistemi

MS-dedektör	(Agilent 6120 Quadrupole)
UV-dedektör	(Agilent 1200 serisi)
FL-dedektör	(Agilent 1100 serisi )
Degazer	(Agilent 1200 serisi )
Pompa	(Agilent 1200 serisi)
Kolon	( Ace C <sub>18</sub> kolon, 5 $\mu$ m, 250 x 4,6 mm)
Otosampler	(Agilent 1200 serisi )
Autosampler vial	(Agilent 1,8 mL Screw cap)

### 3.3.Yöntemler

#### 3.3.1. Etodolak İçin Yöntem Şartları:

##### 3.3.1.1. UV Dedektörlü Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC-UV)

##### Yöntem Şartları:

Sabit Faz	Ace C <sub>18</sub> kolon (5 $\mu$ m, 250 x 4,6 mm)
Hareketli faz	Asetonitril- su (80:20, h/h)
Akış hızı	1 mL dak <sup>-1</sup>
Kolon sıcaklığı	25 ° C
Enjeksiyon hacmi	10 $\mu$ L
Analiz süresi	5 dak
Dalga boyu	272 nm



### 3.3.1.2. Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi (LC-MS) Yöntem Şartları:

Sabit Faz	Ace C <sub>18</sub> kolon (5 µm, 250 x 4,6 mm)
Hareketli faz	Su (% 0,1'lik formik asit)- Asetonitril (20-80, h/h)
Akış hızı	1 mL dak <sup>-1</sup>
Kolon sıcaklığı	25 ° C
Enjeksiyon hacmi	10 µL
Analiz süresi	5 dak
İyonizasyon	Elektron sprej
Ürün iyon	172,3
Kurutma gaz akış hızı	10 l dak <sup>-1</sup>
Püskürtme basıncı	40 psi
Kurutma gaz sıcaklığı	300 °C
Parçalama voltajı	100 V
Kurutma sıcaklığı	250 °C
Kapiler voltaj	4000 V
Korana current	5 µa
Şarj voltaj	2000 V

### 3.3.2. Etodolak'ın Plazmadan Sıvı-Sıvı Ekstraksiyon Prosesi

- 0,5 mL boş insan plazması santrifüj tüplerine koyuldu ve bu tüplerin her birine % 10'luk TCA çözeltisinden 1 mL ve 0,3 mL asetonitril eklendi.
- 45 saniye vortekslendi
- 2000 rpm 'de 10 dakika santrifüjlendi
- Üst faz alındı
- 45 µm gözenek büyüklüğüne sahip filtreden süzöldü
- Viallere konuldu
- 10 µL LC-MS'e enjekte edildi

### 3.4. Adrenalin için Yöntem Şartları:

#### 3.4.1. Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektroskopisi (LC-MS) Yöntem Şartları:

Sabit Faz	Ace C <sub>18</sub> kolon (5 µm, 250 x 4,6 mm)
Hareketli faz	Su (% 0,1'lik formik asitli)- Asetonitril (10-90, h/h)
Akış hızı	1 mL dak <sup>-1</sup>
Kolon sıcaklığı	25 ° C
Enjeksiyon hacmi	10 µL
Analiz süresi	5 dak
İyonizasyon	Elektron sprey
Ürün iyon	161,1
Kurutma gaz akış hızı	5 l dak <sup>-1</sup>
Püskürtme basıncı	60 psi
Kurutma gaz sıcaklığı	150 °C
Parçalama voltajı	97 V
Kurutma sıcaklığı	200 °C
Kapiler voltajı	2500 V
Korana current	1 µa
Şarj voltajı	2000 V

#### 3.4.2. Adrenalin'in Plazmadan Sıvı-Sıvı Ekstraksiyon Prosesi

- 0,5 mL boş insan plazması santrifüj tüplerine koyuldu ve bu tüplerin herbirine % 10'luk TCA çözeltisinden 1 mL ve 0,3 mL 1 M HCl eklendi
- 45 saniye vortekslendi
- 2000 rpm'de 10 dakika santrifüjlendi
- Üst faz alındı
- 45 µm gözenek büyüklüğüne sahip filtreden süzüldü
- Viallere konuldu
- 10 µL LC-MS'e enjekte edildi

### 3.4.3. Floresans Dedektörlü Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC-FL) Yöntem Şartları:

Sabit Faz	Ace C <sub>18</sub> kolon (5 µm, 250 x 4,6 mm)
Hareketli faz	Asetonitril- su (80-20,h/h)
Akış hızı (mL dak <sup>-1</sup> )	1,2
Kolon sıcaklığı (°C)	25
Enjeksiyon hacmi (µL)	100
Analiz süresi (dak)	18
Dalga boyu (nm)	Ex: 360 Em: 490

### 3.4.4. Adrenalin'in Plazmadan Katı Faz Ekstraksiyon Prosesi

- 0,6 mL plazma 1,4 mL dilisyon çözeltisi ile seyreltildi
- 1:10 oranında su ile seyreltilmiş internal standart çözeltisinden dilüe edilmiş plazmanın üzerine 0,1 mL ilave edildi
- Ekstraksiyon için Eureka katı faz kartuşları kullanıldı
- Katı faz kartuşu sırasıyla 3 farklı çözelti kullanılarak şartlandırıldı
- Plazma çözeltisi kartuşa ilave edildi
- Adrenalin ile birlikte kartuşa tutunmuş olan safsızlıkları gidermek için kartuş dan 2 defa 1 mL yıkama çözeltisi geçirildi
- Adrenalin'i ayırmak için 0,4 mL elüsyon çözeltisi ilave edildi
- 0,02 mL türevlendirme çözeltisi, 0,02 mL reaksiyonu başlatma çözeltisi ilave edildi
- 70°C de 15 dakika bekletilerek inkübe edildi.

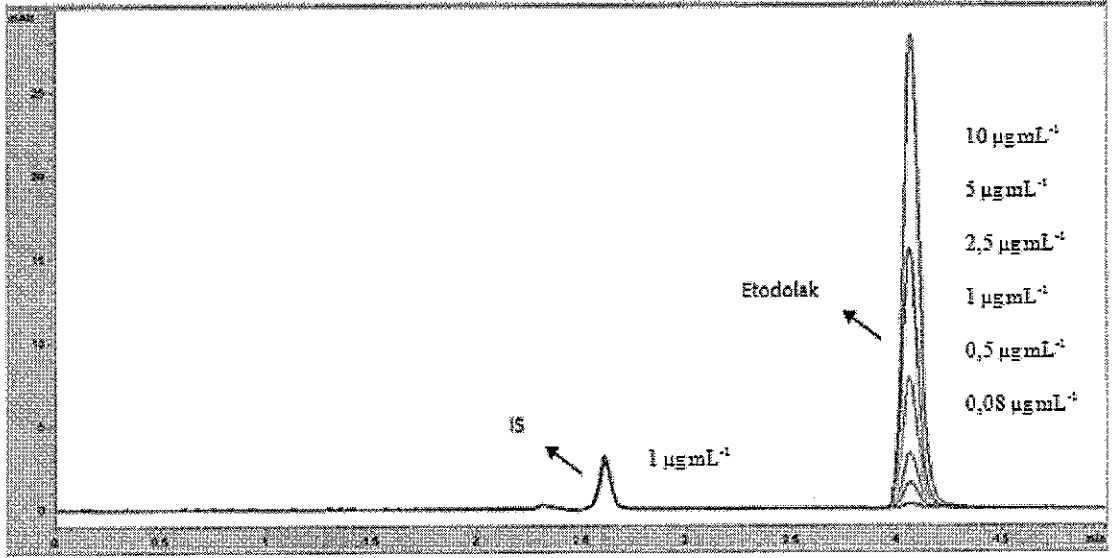
## 4. BULGULAR

### 4.1. HPLC-UV Yöntemi

#### 4.1.1. Etodolak İn-Vitro Çalışması

##### 4.1.1.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanması

HPLC-UV ile yapılan çalışmalarda, 10 mg etodolak hassas terazi ile doğru bir şekilde tartıldıktan sonra 100 mL analitik saflıkda asetonitril de çözülerek  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  derişimde etodolak stok çözeltisi hazırlandı. Bu stok çözeltilerden belirli hacimlerde alınıp analitik saflıkda asetonitril ile seyreltilerek 0,08, 0,5, 1, 2,5, 5 ve  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  derişimlerinde standart çalışma çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilere  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  derişiminde internal standart (IS) olarak parasetamol çözeltisi eklendi ve elde edilen çözeltiler HPLC-UV sistemine enjekte edilerek 272 nm dalga boyunda kromatogramları alındı (Şekil 4.1).

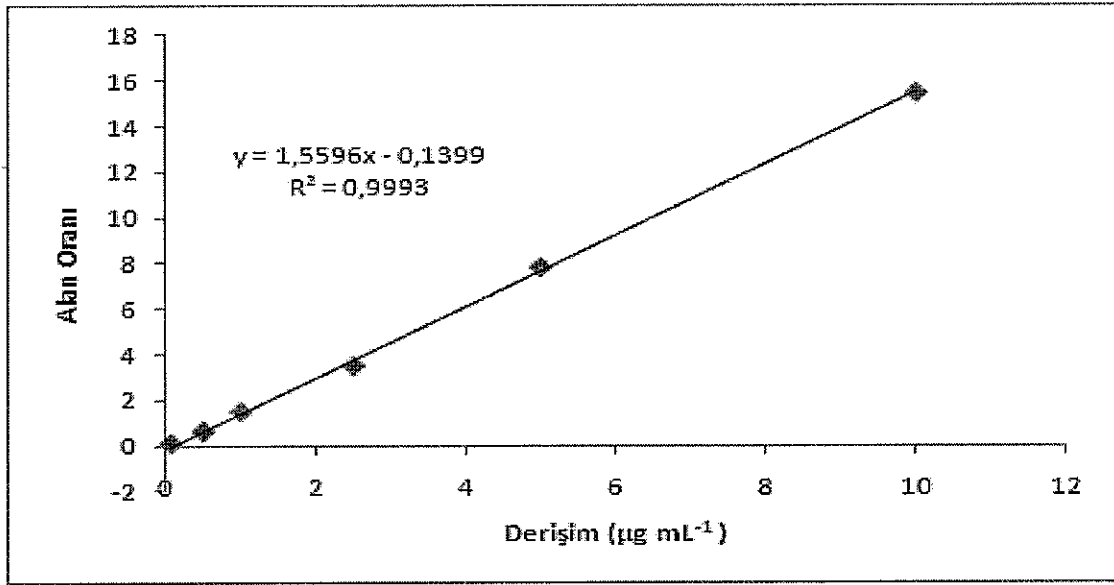


Şekil 4.1: HPLC-UV sisteminde,  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  derişiminde parasetamol (IS) içeren 0,08, 0,5, 1, 2,5, 5 ve  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  derişimlerinde etodolak çözeltilerinin kromatogramları

#### 4.1.1.2. Yöntemin Geçerlilik Testi (Validasyonu)

##### 4.1.1.2.1. Doğrusallık-Çalışma Aralığı

0,08-10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  derişim aralığında etodolak' ın derişimine karşı IS (parasetamol) ve etodolak pik alanın pik alan oranlarının grafiğe geçirilmesiyle kalibrasyon eğrisi elde edildi (Şekil 4.2).



Şekil 4.2: HPLC-UV yöntem kalibrasyon eğrisi

HPLC-UV yöntemiyle elde edilen kalibrasyon eğrilerinin regresyon eşitliklerinin istatistiksel analiz sonuçları Tablo 4.1' de verildi.

Tablo 4.1: Etodolak' a ait kalibrasyon eğrisi ile ilgili istatistiki bilgiler

Parametreler	HPLC-UV Yöntemi
Çalışma Aralığı ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	0,08-10
Regrasyon Eğrisi Denklemi	$1,5596x-0,1399$
$S_a$ : Regrasyon eğrisindeki kaymanın standart sapması	$1,5 \times 10^{-2}$
$S_b$ : Regrasyon eğrisindeki eğimin standart sapması	$2,2 \times 10^{-2}$
R: Korelasyon Katsayısı	0,9997

#### 4.1.1.2.2. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Tayin Alt Sınırı (LOQ)

Kalibrasyon eğrisinin en küçük değerinden daha küçük derişimler de bir seri çözelti hazırlandı ve kromatogramları alındı. Kromatogramlar da sinyal/gürültü oranının 3 olduğu derişim gözlenebilme sınırı (LOD), 8 olduğu derişim ise tayin alt sınırı (LOQ) olarak belirlendi. Yöntemin LOD ve LOQ değerleri sırasıyla  $0,03 \mu\text{g mL}^{-1}$  ve  $0,08 \mu\text{g mL}^{-1}$  olarak tespit edildi.

#### 4.1.1.2.3. Doğruluk, Kesinlik ve Tekrarlanabilirlik

Yöntemin doğruluğu, kesinliği ve tekrarlanabilirliği günüçi ve günler arası değişkenlerle belirlendi. Gün-içi ve günler-arası çalışmada, kalibrasyon eğrisi içine düşen internal standart içeren üç farklı  $0,1, 4,5$  ve  $9,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  derişimde hazırlanan etodolak kalite kontrol çözeltilerinin günüçi (aynı yöntem ve aynı laboratuvar şartlarında 1 günde 6 kez) ve günler arası (aynı yöntemle farklı 6 günde 6 kez) analizleri ile doğruluk ve kesinlik değerleri elde edildi. Analiz sonuçlarının ortalaması, standart sapması (SS), bağıl standart sapması (BSS) ve bağıl hatası (BH) belirlendi. Kesinlik yüzde bağıl standart sapma (% BSS) ve doğruluk da yüzde bağıl hatayla (% BH) verildi (Tablo 4. 2).

Tablo 4.2: HPLC-UV yönteminin gün-içi ve günler-arası doğruluk ve kesinlik değerleri

Eklenen ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Güniçi				Günler Arası			
	Bulunan Değer ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	X $\pm$ SS	% BSS	% BH	Bulunan Değer ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	X $\pm$ SS	% BSS	% BH
0,1	0,11	0,11 $\pm$ 0,008	7,27	10,0	0,09	0,09 $\pm$ 0,005	5,56	-9,1
	0,12				0,09			
	0,12				0,10			
	0,12				0,09			
	0,11				0,09			
	0,10				0,10			
4,5	4,28	4,55 $\pm$ 0,17	3,73	1,1	4,62	4,59 $\pm$ 0,10	2,18	2,0
	4,45				4,63			
	4,55				4,60			
	4,71				4,72			
	4,63				4,41			
	4,70				4,55			
9,5	10,38	10,37 $\pm$ 0,12	1,16	9,2	9,95	9,90 $\pm$ 0,28	2,83	4,2
	10,50				9,49			
	10,31				10,05			
	10,16				9,77			
	10,45				9,82			
	10,44				10,31			

X: Ortalama Değer, S: Standart Sapma, BSS: Bağıl Standart Sapma, BH: Bağıl Hata

#### 4.1.1.2.4. Kararlılık (Stabilite)

Etodolak stok ve çalışma çözeltilerinin çalışma süresince kararlı (stabil) kaldığı süreyi HPLC-UV yöntemiyle belirlemek amacıyla kararlılık çalışması gerçekleştirildi. Bunun için etodolak'ın iki farklı derişimde hazırlanan çözeltileri oda sıcaklığı, 4 ve -20 °C'de 24 ve 72 saat süreyle bekletildi. Bu süreler sonunda çözeltilerin pik alanları ölçüldü ve elde edilen değerler standart çözeltilerin hemen okunan değerleri ile kıyaslanarak sonuçlar yüzde geri kazanım olarak Tablo 4.3 'de verildi.

Tablo 4.3: Etodolak'ın HPLC-UV yöntemle belirlenen kararlılık (stabilite) değerler

Eklenen ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Oda sıcaklığı 24 saat	Oda sıcaklığı 72 saat	4 °C 24 saat	4 °C 72 saat	-20 °C 24 saat	-20 °C 72 saat
1,0	95,4 $\pm$ 2,6	102,3 $\pm$ 5,2	96,41 $\pm$ 3,4	100,4 $\pm$ 3,9	95,6 $\pm$ 2,8	103,6 $\pm$ 6,6
9,0	97,2 $\pm$ 1,7	99,6 $\pm$ 4,3	97,88 $\pm$ 3,1	96,5 $\pm$ 2,9	97,8 $\pm$ 3,1	99,3 $\pm$ 4,2

#### 4.1.1.2.5. Geri Kazanım

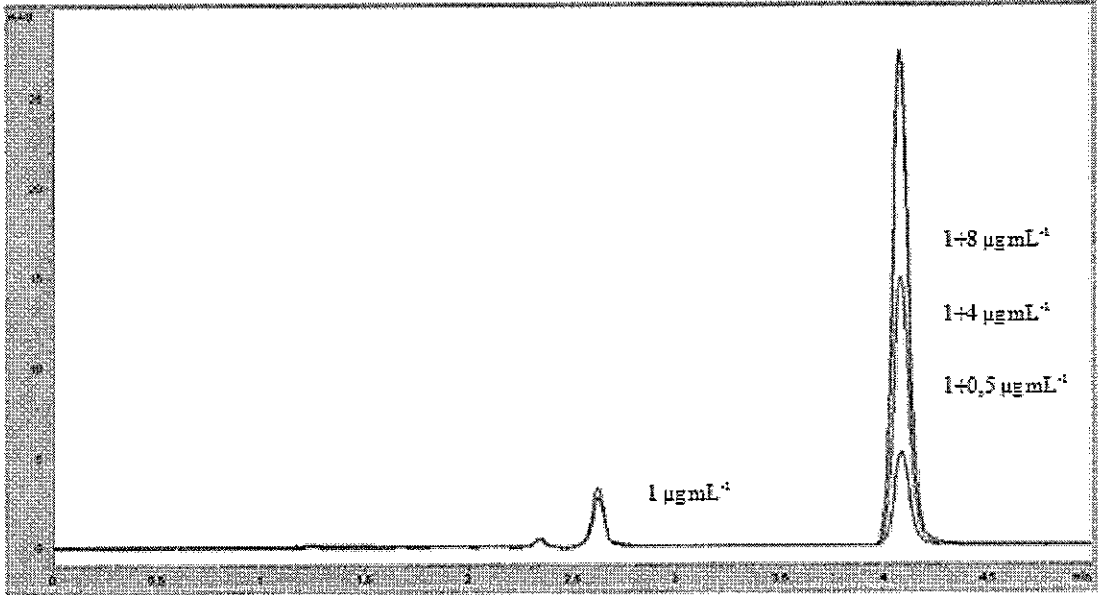
Farmasötik preparattan geri kazanım çalışmaları standart ekleme yöntemi ile yapıldı. Etol Fort ve tadolak preparatlarından  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  derişimde tablet çözeltileri hazırlandı ve kromatogramları alındı. Sonra bu tablet çözeltilerine 3 farklı derişimdeki etodolak standart çalışma çözeltileri eklendi ve bu çözeltilerin günüçi ve günler arası kromatogramları alındı.

% Analitik Geri Kazanım: [Bulunan Miktar-Eklenen Standart Madde Miktarı / Tablet Çözeltisi] x 100, denkleminde % analitik geri kazanım değerleri bulundu (Tablo 4.4., Şekil 4.3. ve Şekil 4.4.).

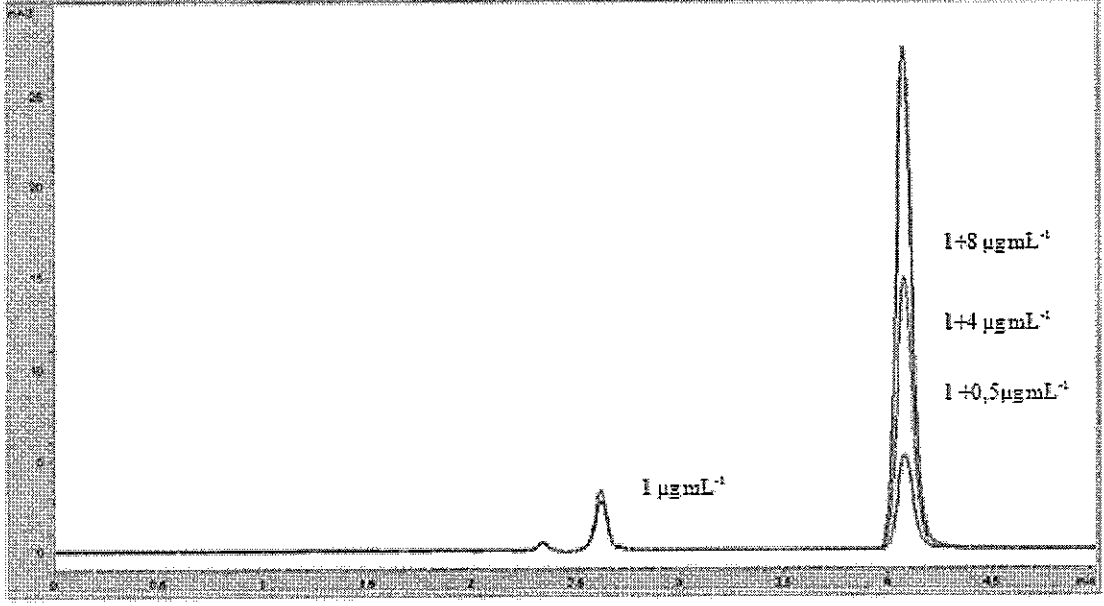


Tablo 4.4: Farmasötik preparatların HPLC-UV yöntemiyle elde edilen günüçi ve günler arası geri kazanım değerleri

Günüçi Geri Kazanım					
Tablet	Eklenen Standart Çözelti ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Tablet Çözeltisi ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Bulunan $\pm$ SS ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Geri Kazanım (%)	BSS %
Etol Fort	0,5	1	1,51 $\pm$ 0,02	101	1,32
	4		4,99 $\pm$ 0,08	99	1,60
	8		8,99 $\pm$ 0,29	99	3,23
Tadolak	0,5	1	1,48 $\pm$ 0,04	98	2,70
	4		4,99 $\pm$ 0,08	99	1,60
	8		8,98 $\pm$ 0,24	98	2,67
Günler arası Geri Kazanım					
Etol Fort	0,5	1	1,47 $\pm$ 0,02	97	1,36
	4		5,01 $\pm$ 0,10	101	1,99
	8		8,99 $\pm$ 0,27	99	3,00
Tadolak	0,5	1	1,48 $\pm$ 0,02	98	1,35
	4		4,97 $\pm$ 0,08	97	1,61
	8		8,96 $\pm$ 0,31	96	3,46



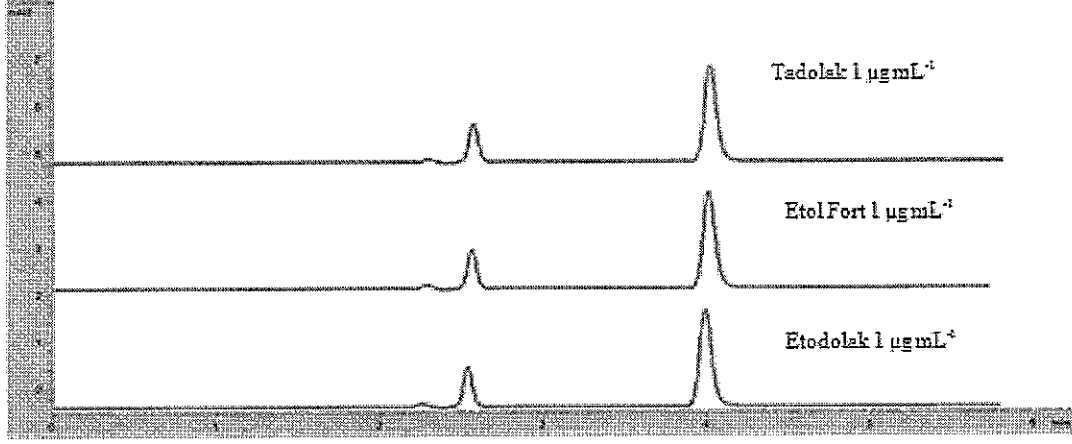
Şekil 4.3 : Etodolak içeren Etol Fort tabletin HPLC-UV kromatogramları



Şekil 4.4:Etodolak içeren Tadolak tabletin HPLC-UV kromatogramları

#### 4.1.1.2.6. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması

Geliştirilen ve geçerlilik testleri yapılan yöntemin uygulanabilir olduğunu görmek amacıyla etodolak içeren farmasötik preparatlarda etkin madde miktar analizi yapıldı. Bu amaçla etodolak içeren Etol Fort ve Tadolak tabletlerden  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  derişimde stok çözeltiler hazırlandı. Bu tablet çözeltilerinden  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  derişimde tablet çözeltileri hazırlanıp kromatogramları alındı ve standart çözeltilerin kromatogramları ile karşılaştırıldı. Farmasötik preparatlardan elde edilen kromatogramlar Şekil 4.5’de verildi.



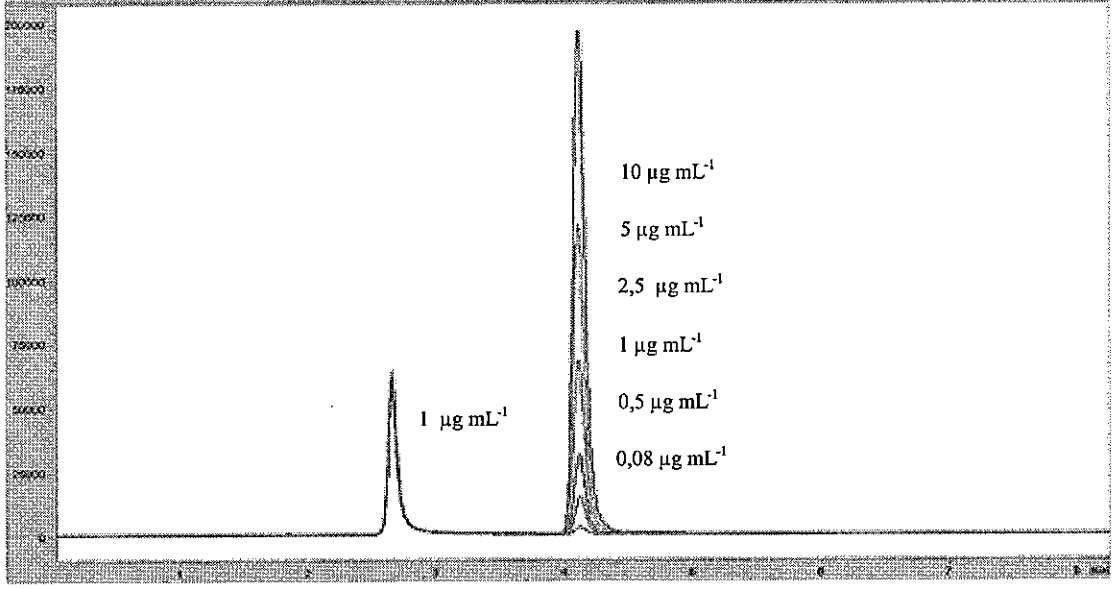
Şekil 4.5: İnternal standart içeren  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  derişimdeki farmasötik preparat ve standart çözeltinin HPLC-UV kromatogramları

## 4.2. LC-MS Yöntemi

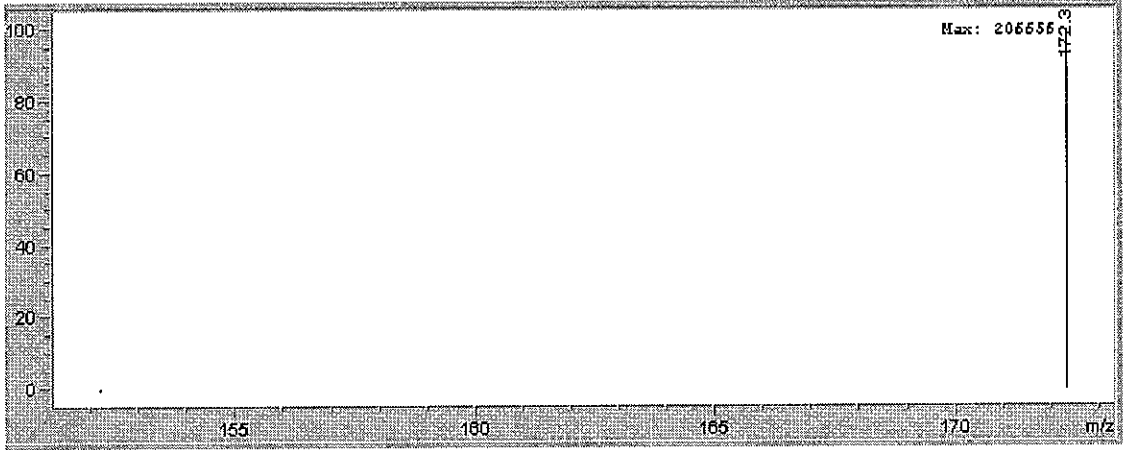
### 4.2.1. Etodolak İn-Vitro Çalışması

#### 4.2.1.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanması

LC-MS ile yapılan çalışmalarda, 10 mg etodolak 100 mL analitik saflıkda asetonitril de çözülerek  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  derişimde etodolak stok çözeltisi hazırlandı. Bu stok çözeltiden belirli hacimlerde alınıp analitik saflıkda asetonitril ile seyreltilerek 0,08 , 0,5 , 1, 2,5 , 5 ve  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  derişimlerinde  $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  derişiminde internal standart (parasetamol) içeren standart çalışma çözeltileri hazırlandı ve LC-MS sistemine enjekte edilerek kromatogramları (Şekil 4.6) ve spektrumları alındı (Şekil 4.7).



Şekil 4.6: LC-MS sisteminde,  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  derişiminde internal standart içeren  $0,08$  ,  $0,5$  ,  $1$  ,  $2,5$  ,  $5$  ve  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  derişimlerinde etodolak çözeltilerinin kromatogramları

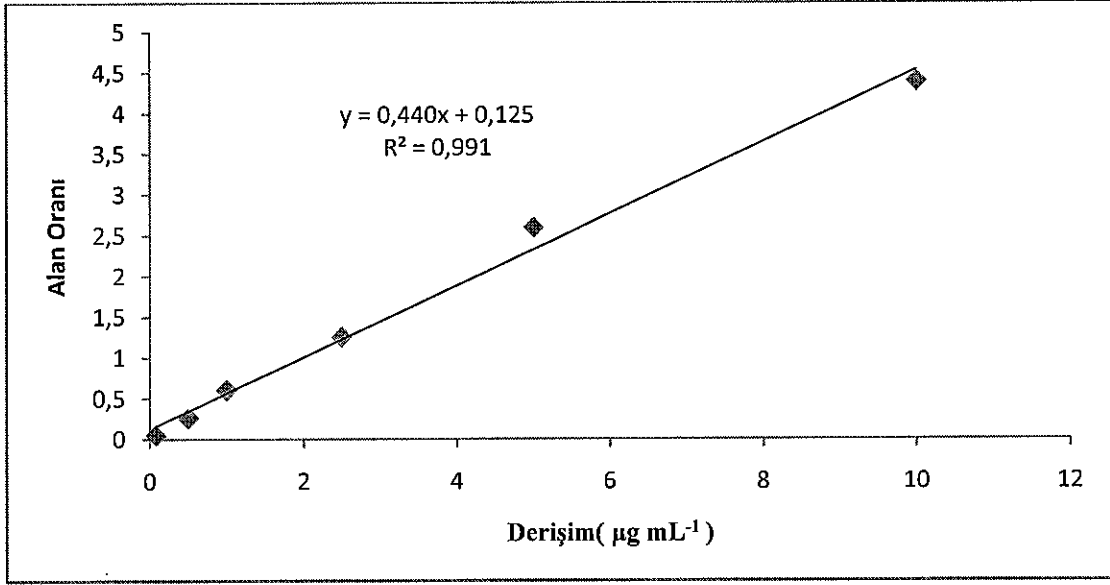


Şekil 4.7: Etodolak 'a ait MS spektrumu

#### 4.2.1.2.Yöntemin Geçerlilik Testi (Validasyonu)

##### 4.2.1.2.1. Doğrusal Aralık ve Kalibrasyon Eğrisi

LC-MS çalışmasında,  $0,08$ - $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  derişim aralığında etodolak' ın derişimine karşı IS (parasetamol) ve etodolak pik alanın pik alan oranlarının grafiğe geçirilmesiyle kalibrasyon eğrisi elde edildi (Şekil 4.8).



Şekil 4.8: LC-MS yöntem kalibrasyon eğrisi

LC-MS yöntemiyle elde edilen kalibrasyon eğrilerinin regresyon eşitliklerinin istatistiksel analiz sonuçları Tablo 4.5' de verildi.

Tablo 4.5: Etodolak' a ait kalibrasyon eğrisi ile ilgili istatistiki bilgiler

Parametreler	LC-MS Yöntemi
Çalışma Aralığı (µg mL <sup>-1</sup> )	0,08-10
Regresyon Eğrisi Denklemi	$y=0,4404x+0,1256$
$S_a$ : Regresyon eğrisindeki kaymanın standart sapması	$1,6 \times 10^{-2}$
$S_b$ : Regresyon eğrisindeki eğimin standart sapması	$3,1 \times 10^{-3}$
R: Korelasyon Katsayısı	0,9959

#### 4.2.1.2.2. Doğruluk, Kesinlik ve Tekrarlanabilirlik

Yöntemin doğruluğu, kesinliği ve tekrarlanabilirliği gün-içi ve günler-arası değişkenlerle belirlendi. Güniçi ve günler-arası çalışmada, kalibrasyon eğrisi içine düşen internal standart içeren üç farklı 0,1, 4,5 ve 9,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  derişimde hazırlanan etodolak kalite kontrol çözeltilerinin güniçi (aynı yöntem ve aynı laboratuvar şartlarında 1 günde 6 kez) ve günler arası (aynı yöntemle farklı 6 günde 6 kez) analizleri ile doğruluk ve kesinlik değerleri elde edildi. Analiz sonuçlarının ortalaması, standart sapması (SS), bağıl standart sapması (BSS) ve bağıl hatası (BH) belirlendi. Kesinlik yüzde bağıl standart sapma (% BSS) ve doğruluk da yüzde bağıl hatayla (%BH) verildi (Tablo 4. 6).

Tablo 4.6: LC-MS yönteminin güniçi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri

Eklenen ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Güniçi				Günler Arası			
	Bulunan Değer ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	X $\pm$ SS	% BSS	% BH	Bulunan Değer ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	X $\pm$ SS	% BSS	% BH
0,1	0,09	0,09 $\pm$ 0,009	10,0	-10,0	0,09	0,09 $\pm$ 0,005	5,55	-10,0
	0,09				0,09			
	0,11				0,10			
	0,11				0,09			
	0,09				0,10			
	0,10				0,09			
4,5	4,44	4,49 $\pm$ 0,05	1,11	-0,22	4,62	4,58 $\pm$ 0,07	1,53	1,78
	4,57				4,65			
	4,48				4,53			
	4,46				4,49			
	4,52				4,55			
	4,51				4,66			
9,5	9,64	9,51 $\pm$ 0,20	2,10	0,11	9,19	9,68 $\pm$ 0,32	3,31	1,89
	9,82				9,89			
	9,29				9,86			
	9,36				9,85			
	9,43				9,93			
	9,49				9,34			

X: Ortalama Değer, SS: Standart Sapma, BSS: Bağıl Standart Sapma, BH: Bağıl Hata

#### 4.2.1.2.3. Kararlılık (Stabilite)

Etodolak stok ve çalışma çözeltilerinin çalışma süresince kararlı (stabil) kaldığı süreyi LC-MS yöntemiyle belirlemek amacıyla kararlılık çalışması gerçekleştirildi. Bunun için etodolak'ın iki farklı derişimde hazırlanan çözeltileri oda sıcaklığı, 4 ve -20 °C'de 24 ve 72 saat süreyle bekletildi. Bu süreler sonunda çözeltilerin pik alanları ölçüldü ve elde edilen değerler standart çözeltilerin hemen okunan değerleri ile kıyaslanarak sonuçlar yüzde geri kazanım olarak Tablo 4.7 'de verildi.

Tablo 4.7: Etodolak'ın LC-MS yöntemle belirlenen kararlılık (stabilite) değerler

Eklenen ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Oda sıcaklığı 24 saat	Oda sıcaklığı 72 saat	4 °C 24 saat	4 °C 72 saat	-20 °C 24 saat	-20 °C 72 saat
1,0	94,3±3,5	97,3±4,2	98,6±2,8	98,8±3,9	95,4±2,1	98,7±5,5
9,0	94,5±2,0	98,6±3,3	103,3±3,1	101,2±2,9	95,5±4,5	102,7±4,7

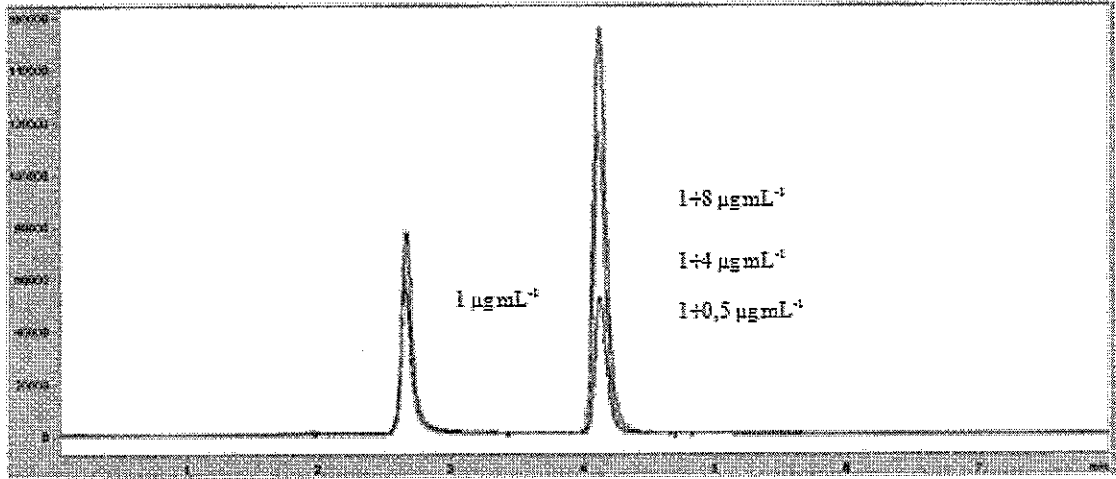
#### 4.2.1.2.5. Geri Kazanım

Farmasötik preparattan geri kazanım çalışmaları standart ekleme yöntemi ile yapıldı. Etol Fort ve tadolak preparatlarından  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  derişimde tablet çözeltileri hazırlandı ve kromatogramları alındı. Sonra bu tablet çözeltilerine 3 farklı derişimdeki etodolak standart çalışma çözeltileri eklendi ve bu çözeltilerin gün-içi ve günler arası kromatogramları alındı.

% Analitik Geri Kazanım:  $[\text{Bulunan miktar} - \text{Eklenen Standart Madde Miktarı} / \text{Tablet Çözeltisi}] \times 100$ , denkleminde % analitik geri kazanım değerleri bulundu (Tablo 4.8.; Şekil 4. 9 ve Şekil 4. 10).

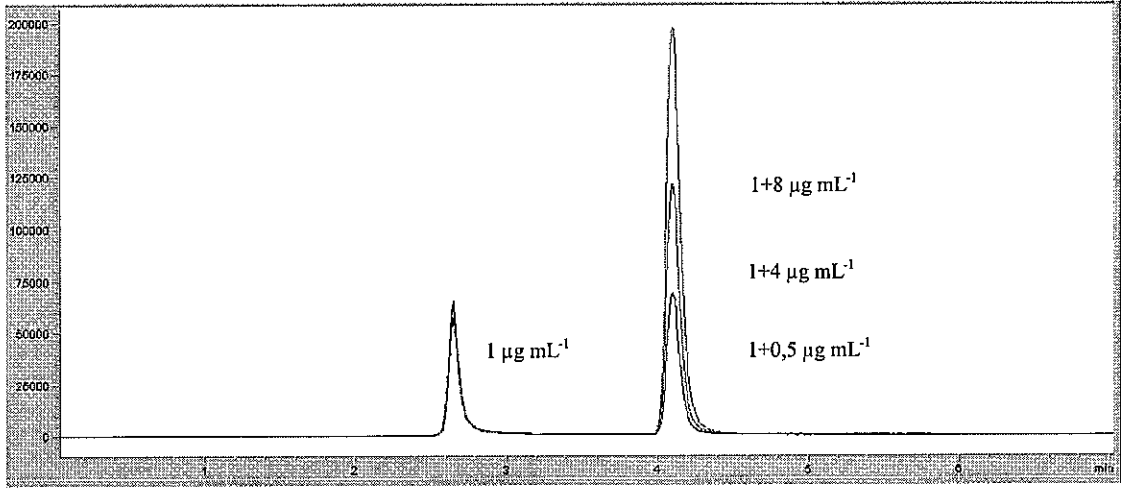
Tablo 4.8: Farmasötik preparatların LC-MS yöntemiyle elde edilen günüçi ve günler arası geri kazanım değerleri

Günüçi Geri Kazanım					
Tablet	Eklenen Standart Çözelti ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Tablet Çözeltisi ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Bulunan $\pm$ SS ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Geri Kazanım (%)	BSS %
Etol Fort	0,5	1	1,52 $\pm$ 0,02	102	1,32
	4		4,96 $\pm$ 0,09	96	1,82
	8		8,99 $\pm$ 0,28	99	3,12
Tadolak	0,5	1	1,51 $\pm$ 0,03	101	1,99
	4		4,98 $\pm$ 0,09	98	1,81
	8		8,98 $\pm$ 0,31	98	3,45
Günler arası Geri Kazanım					
Etol Fort	0,5	1	1,47 $\pm$ 0,02	97	1,36
	4		4,95 $\pm$ 0,10	95	2,02
	8		8,99 $\pm$ 0,26	99	2,89
Tadolak	0,5	1	1,53 $\pm$ 0,03	103	1,96
	4		4,99 $\pm$ 0,10	99	2,00
	8		8,98 $\pm$ 0,28	98	3,12



Şekil 4.9: Etodolak içeren etol fort tablet çözeltisine üç farklı derişimde standart eklenmiş çözeltilerin LC-MS kromatogramları

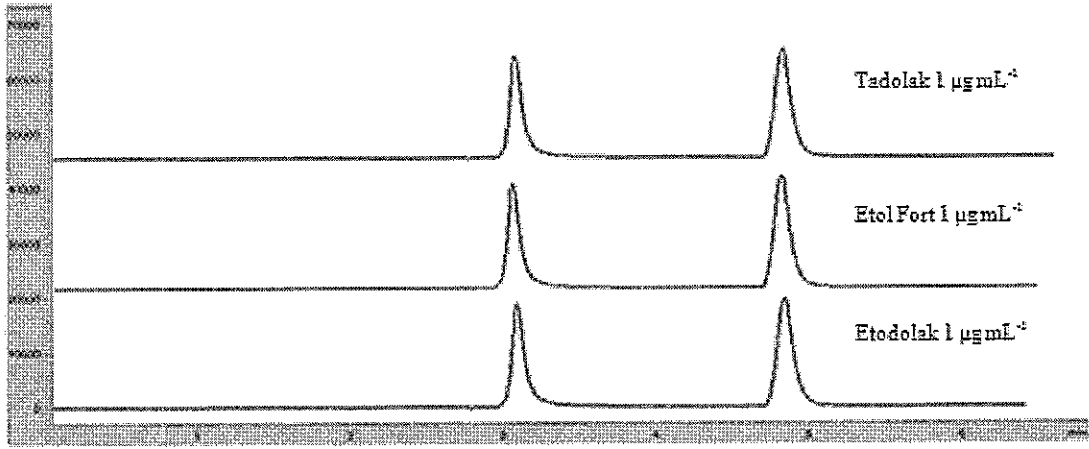




Şekil 4.10: Etodolak içeren tadolak tablet çözeltisine üç farklı derişimde standart eklenmiş çözeltilerin LC-MS kromatogramları

#### 4.2.1.2.6. Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması

Geliştirilen ve geçerlilik testi (validasyonu) yapılan LC-MS yönteminin uygulanabilir olduğunu görmek amacıyla etodolak içeren farmasötik preparatlarda etkin madde miktar analizi yapıldı. Bu amaçla etodolak içeren Etol Fort ve Tadolak tabletlerden  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  derişimde stok çözelti hazırlandı. Bu stok çözeltilerden  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  derişimde tablet çözeltileri hazırlandı ve bu çözeltilerin LC-MS kromatogramları alındı. Tablet çözeltilerinden elde edilen kromatogramlar standart çözeltilerin kromatogramları ile karşılaştırıldı. Farmasötik preparatlardan elde edilen kromatogramlar Şekil 4. 11’de verildi.

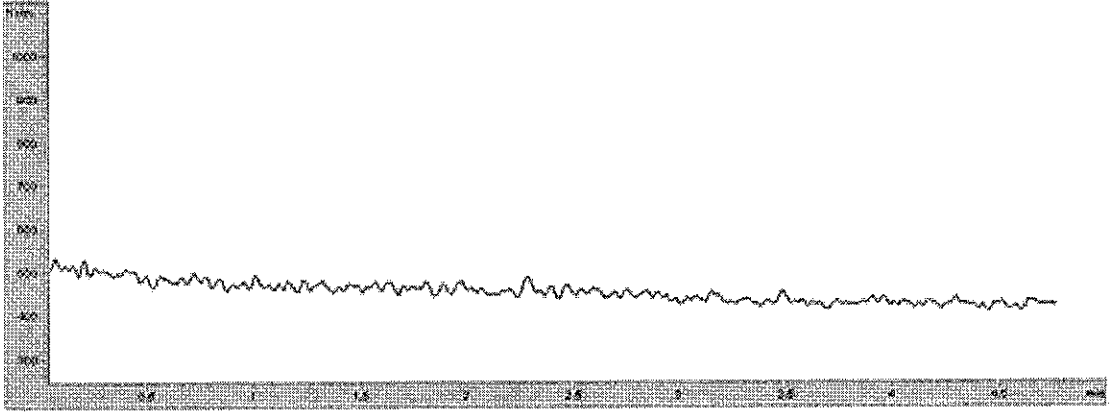


Şekil 4.11: İnternal standart içeren  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  derişimdeki farmasötik preparat ve standart çözeltilinin LC-MS kromatogramları

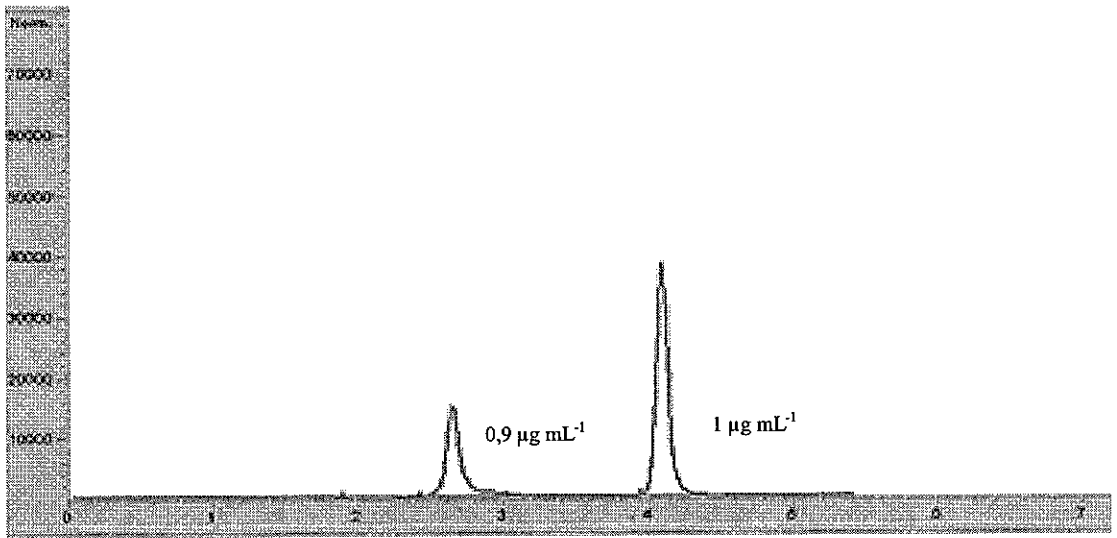
### 4.3. Etodolak Plazma Çalışması

#### 4.3.1. Plazma Standart Çözeltilerin Hazırlanması

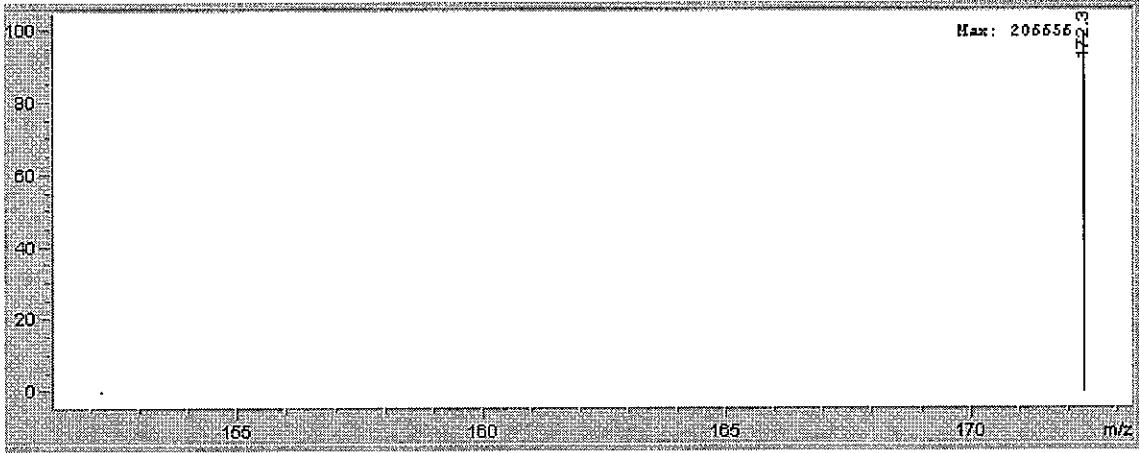
Atatürk Üniversitesi, Yakutiye Araştırma Hastanesi Kan Alma Merkezinden temin edilen boş plazmanın  $0,5 \text{ mL}$ ' sine  $0,03, 0,1, 0,5, 1, 2,5$  ve  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  derişimlerde standart etodolak çözeltilisi ve  $0,9 \mu\text{g mL}^{-1}$  derişimde internal standart olarak kullanılan parasetamol çözeltilisi eklendi (spike edildi), karıştırıldı ve Bölüm 3.3.2. de belirtildiği şekilde ekstraksiyon yapıldı. Aynı şekilde boş plazma da ekstraksiyon yapıldı. Ekstraktlar LC-MS sistemine enjekte edildi. Ekstrakte edilmiş kör plazma (Şekil 4. 12) ve içerisinde  $0,9 \mu\text{g mL}^{-1}$  derişimde internal standart ile  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  derişimde etodolak çözeltilisine ait olan kromatogramlar verildi (Şekil 4. 13). Ayrıca etodolak 'a ait kütle spektrumu da Şekil 4.14 de verildi.



Şekil 4.12: Boş insan plazmasına ait kromatogram



Şekil 4.13: LC-MS sisteminde  $0,9 \mu\text{g mL}^{-1}$  internal standart içeren  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  etodolak'a ait kromatogram

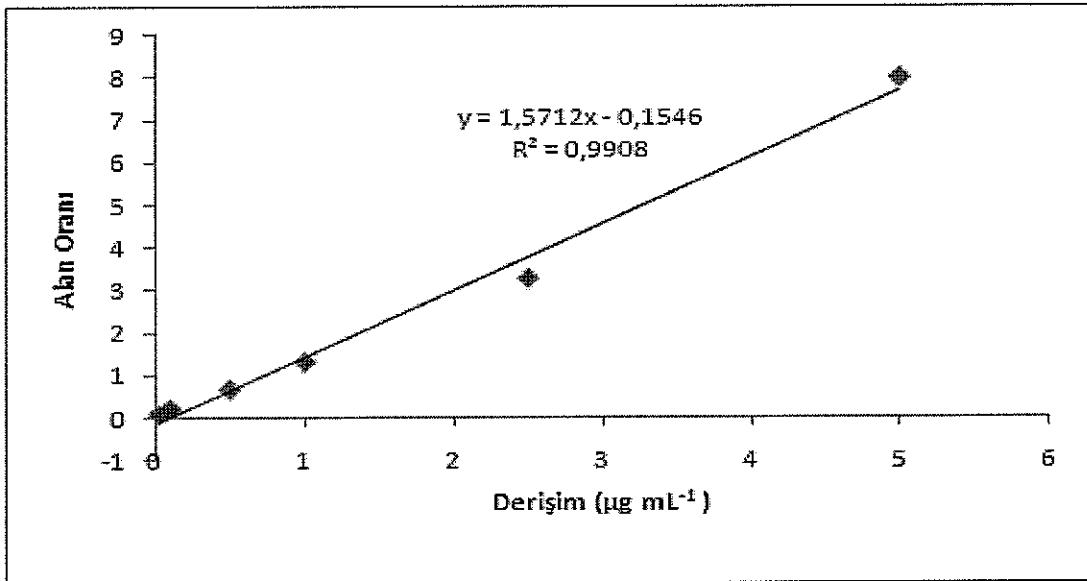


Şekil 4.14: Etodolak 'a ait MS spektrumu

### 4.3.2. Yöntemin Geçerlilik Testi (Validasyonu)

#### 4.3.2.1. Doğrusallık ve Çalışma Aralığı

Plazmaya ekleme yapıp plazmadan Bölüm 3.3.2'de verilen ekstraksiyon sonucundan elde edilen çözeltilerin  $0,03-5 \mu\text{g mL}^{-1}$  derişim aralığında etodolak derişimine karşı internal standartın (parasetamol) ve etodolak pik alan oranları grafiğe geçirilmesi ile kalibrasyon eğrisi elde edildi (Şekil 4.15).



Şekil 4.15: LC-MS sisteminde plazmadan ekstrakte edilen etodolak çözeltilerinden elde edilen kalibrasyon eğrisi

LC-MS yöntemiyle elde edilen kalibrasyon eğrisinin regresyon eşitliklerinin istatistiksel analiz sonuçları Tablo 4.9' da verildi.

Tablo 4.9: LC-MS yöntemiyle plazma çözeltilerden elde edilen kalibrasyon eğrisinin istatistiksel analiz değerleri

Parametreler	LC-MS Yöntemi
Çalışma Aralığı ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	0,03-5
Regrasyon Eğrisi Denklemi	$1,5712x-0,1546$
$S_a$ : Regrasyon eğrisindeki kaymanın standart sapması	$6 \times 10^{-2}$
$S_b$ : Regrasyon eğrisindeki eğimin standart sapması	$3,3 \times 10^{-2}$
Korelasyon Katsayısı ( R )	0.9953

#### 4.3.2.2. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Tayin Alt Sınırı (LOQ)

Kalibrasyon eğrisinin en küçük değeri olan  $0,03 \mu\text{g mL}^{-1}$  den daha küçük derişimlerde bir seri çözeltiler hazırlandı ve LC-MS kromatogramları alındı. Kromatogramlardan sinyal/gürültü (S/G) oranı 3 olduğu derişim gözlenebilme sınırı (LOD) ve 8 olan derişimde tayin alt sınırı (LOQ) değerleri olarak belirlendi. Yöntemin LOD ve LOQ değerleri sırasıyla  $0,015 \mu\text{g mL}^{-1}$  ve  $0,03 \mu\text{g mL}^{-1}$  olarak tespit edildi.

#### 4.3.2.3. Doğruluk, Kesinlik ve Tekrarlanabilirlik

Plazma çalışmasında, yöntemin doğruluğu, kesinliği ve tekrarlanabilirliği günüçi ve günler arası değişkenlerle belirlendi. Kalibrasyon eğrisi içine düşen üç farklı derişimde ( $0,06$  ,  $1,5$  ve  $4,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) kalite kontrol çözeltilerinin ve plazmadan ekstraksiyon ile elde edilen plazma kalite kontrol çözeltilerinin günüçi (aynı yöntem ve aynı laboratuvar şartlarında 1 günde 6 kez) ve günler arası (aynı yöntemle farklı 6 günde 6 kez) analizleri ile doğruluk ve kesinlik değerleri elde edildi. Analiz sonuçlarını ortalaması, standart sapması, bağıl standart sapması ve bağıl hatası belirlendi. Kesinlik yüzde bağıl standart sapma (% BSS) ve doğruluk da yüzde bağıl hata (% BH) ile verildi (Tablo 4.10).

Tablo 4.10: LC-MS yönteminin etodolak plazma çözeltilerinin günüçi ve günler arası kesinlik ve doğruluk değerleri

Eklenen ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Günüçi				Günler Arası			
	Bulunan Değer ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	X $\pm$ SS	% BSS	% BH	Bulunan Değer ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	X $\pm$ SS	% BSS	% BH
0,06	0,06	0,055 $\pm$ 0,006	10,90	-8,33	0,06	0,055 $\pm$ 0,006	10,90	-8,33
	0,06				0,06			
	0,05				0,05			
	0,06				0,06			
	0,05				0,05			
	0,05				0,05			
1,5	1,42	1,43 $\pm$ 0,02	1,40	-4,67	1,43	1,46 $\pm$ 0,03	2,06	-2,67
	1,46				1,49			
	1,41				1,42			
	1,41				1,45			
	1,43				1,48			
	1,46				1,46			
4,5	4,61	4,47 $\pm$ 0,21	4,70	-0,67	4,44	4,43 $\pm$ 0,04	0,90	-1,56
	4,06				4,49			
	4,58				4,43			
	4,45				4,37			
	4,64				4,47			
	4,49				4,40			

#### 4.3.2.4. Geri Kazanım

Plazmadan geri kazanım çalışmasında, kalibrasyon eğrisi türetilmesinde kullanılan etodolak çözeltileri plazmaya eklendi, karıştırıldı ve ekstraksiyonları yapıldı. Ekstraksiyon sonrasında elde edilen çözeltilerin pik alan oranları, standart çözeltilerden elde edilen pik alan oranları değerleri ile kıyaslanarak sonuçlar plazmadan yüzde geri kazanım olarak Tablo 4.11’de verildi.

Tablo 4.11: LC-MS yönteminin plazmadan geri kazanım değerleri

Etkin Madde	Eklenen	Bulunan $\pm$ SS	% GK	% BSS
Etodolak	0,03	0,03 $\pm$ 0,003	90,0	11,11
	0,1	0,09 $\pm$ 0,01	91,0	7,69
	0,5	0,46 $\pm$ 0,03	92,0	6,52
	1	0,88 $\pm$ 0,05	87,5	5,82
	2,5	2,34 $\pm$ 0,17	93,4	7,32
	5	4,50 $\pm$ 0,25	90,1	5,53

#### 4.3.2.5. Kararlılık (Stabilite)

Kararlılık (stabilite) çalışması, plazma içerisinde etodolak'ın hangi ortamda ne kadar süreyle kararlı olduğunu LC-MS yöntemiyle belirlemek amacıyla yapıldı. Bunun için 0,5 ve 4  $\mu\text{g mL}^{-1}$  derişimde hazırlanan etodolak çözeltisi plazmaya eklendi ve plazma örnekleri oda sıcaklığı, 4 ve  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 24 ve 72 saat süreyle bekletildi. Bu süreler sonunda plazma örnekleri ekstrakte edildi, kromatogramları alındı ve pik alan oranları okundu. Okunan değerler plazmadan hemen ekstrakte edilen pik alan oranlarıyla kıyaslanarak sonuçlar yüzde geri kazanım olarak Tablo 4.12'de verildi.

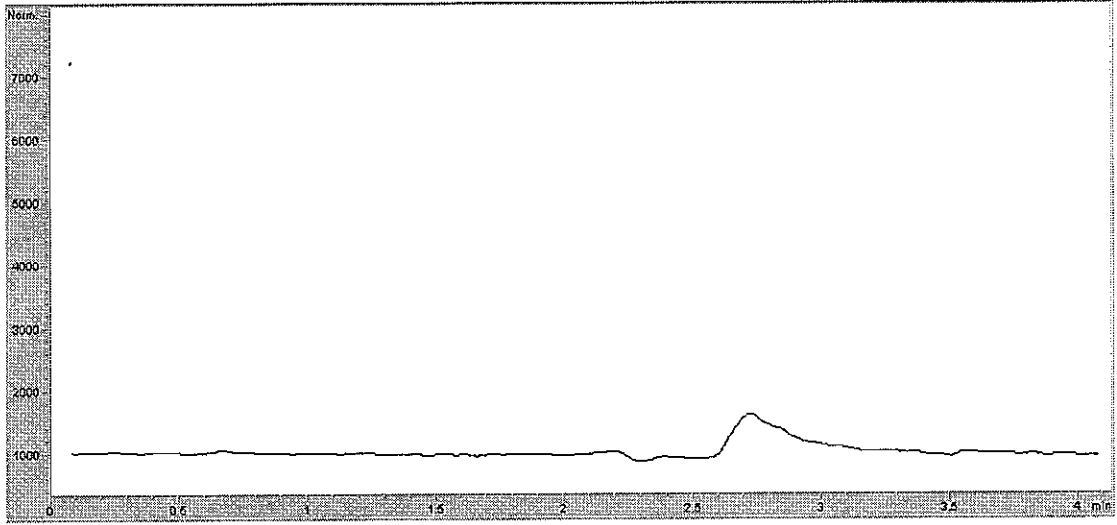
Tablo 4.12: Etodolak'ın LC-MS ile belirlenen kararlılık (stabilite) değerleri

Eklenen ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Oda sıcaklığı 24 saat	4 $^{\circ}\text{C}$ 24 saat	4 $^{\circ}\text{C}$ 72 saat	-20 $^{\circ}\text{C}$ 24 saat	-20 $^{\circ}\text{C}$ 72 saat
0,5	96,3 $\pm$ 4,6	95,2 $\pm$ 5,4	96,5 $\pm$ 2,6	97,9 $\pm$ 6,2	102,9 $\pm$ 4,2
4,0	97,2 $\pm$ 3,3	101,6 $\pm$ 3,1	98,2 $\pm$ 3,1	97,1 $\pm$ 4,1	96,3 $\pm$ 3,9

#### 4.4. Adrenalin İnsan Plazma Çalışması

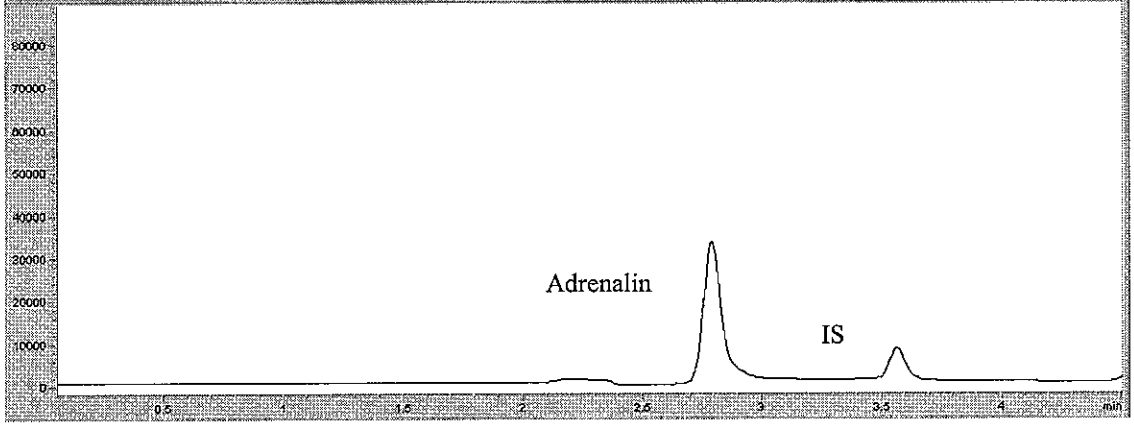
##### 4.4.1. Plazma Standart Çözeltilerin Hazırlanması

Atatürk Üniversitesi, Yakutiye Araştırma Hastanesi Kan Alma Merkezinden temin edilen boş plazmanın 0,5 mL'sine 0,1, 0.25, 0.5, 1, 2.5 ve 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  derişimlerde adrenalin ve 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  derişimde internal standart olarak kullanılan isoprotrenol eklendi (spike edildi), karıştırıldı ve Bölüm 3.4.2' de belirtildiği şekilde ekstraksiyon yapıldı. Ayrıca boş plazmada aynı şekilde ekstrakte edildi. Ekstraktlar LC-MS sistemine enjekte edildi ve kromatogramları ve spektrumları alındı. Boş plazma kromatogramı Şekil 4.16, 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  derişimde internal standart ve 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  derişimde adrenalin içeren plazma çözeltisinin kromatogramı Şekil 4. 17'de ve adrenalin'e ait kütle spektrumu da Şekil 4. 18'de verildi.

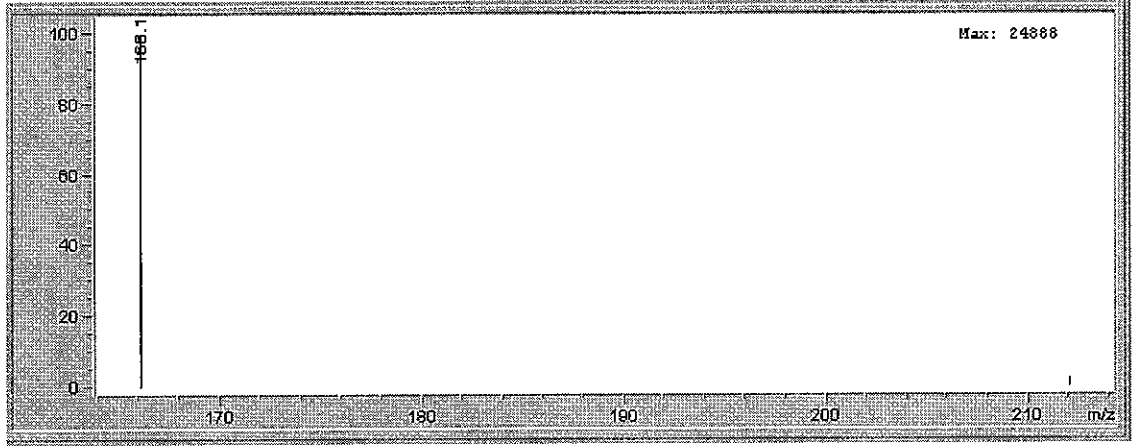


Şekil 4.16: Boş insan plazmasına ait kromatogram





Şekil 4.17: LC-MS sisteminde  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  internal standart içeren  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  adrenalin'a ait kromatogram

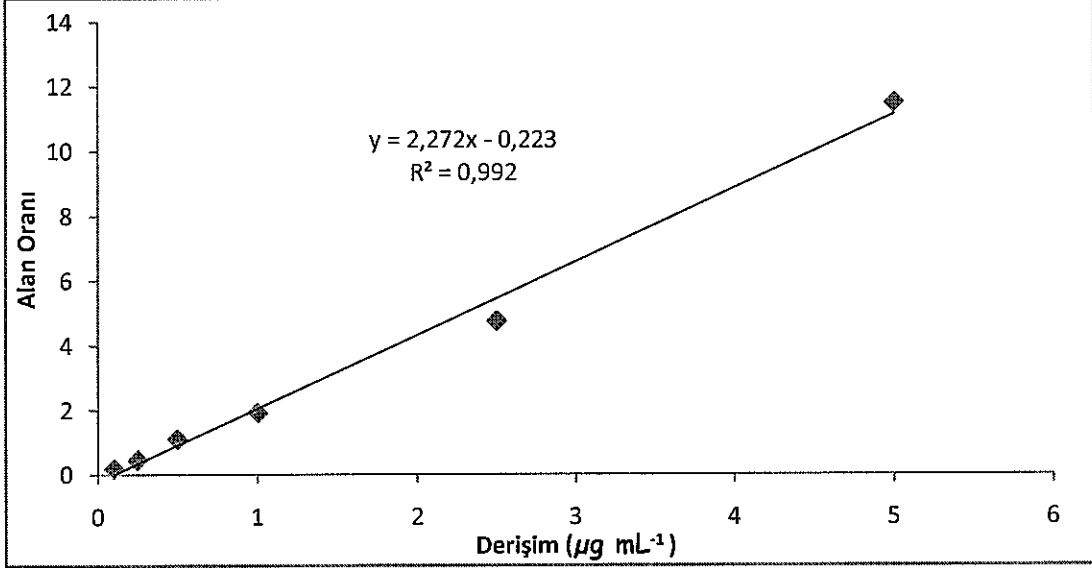


Şekil 4.18: Adrenalin 'e ait MS spektrumu

#### 4.4.2. Yöntemin Geçerlilik Testi (Validasyonu)

##### 4.4.2.1. Doğrusallık ve Çalışma Aralığı

Plazmaya ekleme ve ekstraksiyon sonucunda elde edilen  $0,1-5 \mu\text{g mL}^{-1}$  derişim aralığındaki adrenalin derişimine karşı internal standart (isoprotrenol) ve adrenalin pik alan oranlarının grafiğe geçirilmesi ile kalibrasyon eğrisi elde edildi (Şekil 4.19).



Şekil 4.19: LC-MS yönteminin plazmadan ekstrakte edilen adrenalin'in kalibrasyon eğrisi

LC-MS sisteminde plazmadan ekstraksiyon sonrasında elde edilen çözeltilerden türetilen kalibrasyon eğrisinin regresyon eşitliklerinin istatistiksel analiz sonuçları Tablo 4.13' de verildi.

Tablo 4.13: Plazma çalışmasında adrenalin'e ait kalibrasyon eğrisi ile ilgili istatistiksel bilgiler

Parametreler	LC-MS Yöntemi
Çalışma Aralığı (µg mL <sup>-1</sup> )	0,1-5µg mL <sup>-1</sup>
Regrasyon Eğrisi Denklemi	Y=0,023x-0,223
S <sub>a</sub> : Regrasyon eğrisindeki kaymanın standart sapması	3,5x10 <sup>-2</sup>
S <sub>b</sub> : Regrasyon eğrisindeki eğimin standart sapması	2,4x10 <sup>-3</sup>
Korelasyon Katsayısı ( R )	0,9961

#### 4.4.2.2. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Tayin Alt Sınırı (LOQ)

Kalibrasyon eğrisinin en küçük değeri olan  $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$  den daha küçük derişimlerde bir seri çözelti hazırlandı ve kromatogramları alındı. Kromatogramlarda sinyal/gürültü (S/G) oranı 3 olduğu derişim gözlenebilme sınırı (LOD) ve 8 olan derişimde tayin alt sınırı (LOQ) olarak belirlendi. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0,5 ve  $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$  olarak tespit edildi.

#### 4.4.2.3. Doğruluk, Kesinlik ve Tekrarlanabilirlik

Adrenalin LC-MS yöntemiyle plazma çalışmasında, yöntemin doğruluğu, kesinliği ve tekrarlanabilirliği günüçi ve günler arası değerlerle belirlendi. Kalibrasyon eğrisi içine düşen üç farklı derişimde ( $0,25$ ,  $2$  ve  $4,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) kalite kontrol çözeltileri plazmaya eklenip ekstrakte edildikten elde edilen plazma kalite kontrol çözeltilerinin günüçi (aynı ve aynı laboratuvar şartlarında 1 günde 6 kez) ve günler arası (aynı yöntemle farklı 6 günde 6 kez) analizleri ile doğruluk ve kesinlik değerleri elde edildi. Analiz sonuçlarının ortalamaları, standart sapmaları, bağıl standart sapmaları ve bağıl hataları belirlendi. Kesinlik yüzde bağıl standart sapma (% BSS) ve doğruluk da yüzde bağıl hata ile Tablo 4.14'da verildi.

Tablo 4.14: Plazma çalışmasında  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  derişiminde isoprotrenol içeren adrenalin'in 3 farklı konsantrasyondaki günüçi ve günler arası kesinlik ve doğruluk değerleri

Eklene n ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Günüçi				Günler Arası			
	Bulunan Değer ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	X $\pm$ SS	% BSS	% BH	Bulunan Değer ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	X $\pm$ SS	% BSS	% BH
0,25	0,23 0,22 0,24 0,24 0,23 0,24	0,23 $\pm$ 0,008	3,48	8,00	0,22 0,24 0,23 0,21 0,25 0,25	0,23 $\pm$ 0,016	6,96	8,00
2,0	1,82 1,91 1,89 1,87 1,85 1,89	1,87 $\pm$ 0,03	1,60	-6,50	1,89 1,89 1,87 1,94 1,88 1,82	1,88 $\pm$ 0,04	2,13	-6,00
4,5	4,52 4,46 4,45 4,56 4,48 4,50	4,49 $\pm$ 0,04	0,89	-0,22	4,47 4,41 4,39 4,44 4,32 4,53	4,43 $\pm$ 0,07	1,58	-1,56

#### 4.4.2.3. 5. Plazmadan Geri Kazanım

Plazmadan geri kazanım çalışmasında, kalibrasyon eğrisi türetilmesinde kullanılan adrenalin çözeltileri plazmaya eklendi, karıştırıldı ve ekstraksiyonları yapıldı. Ekstraksiyon sonrasında elde edilen çözeltilerin pik alan oranları standart çözeltilerden elde edilen pik alan oranlarıyla kıyaslanarak sonuçlar yüzde geri kazanım olarak Tablo 4.15'de verildi.

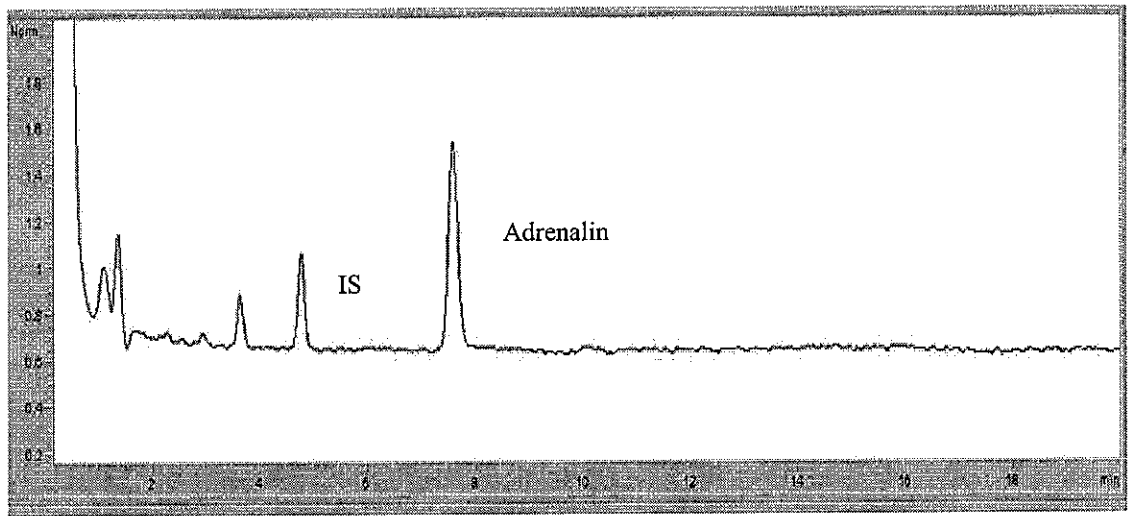
Tablo 4.15: LC-MS yöntemiyle adrenalin plazma geri kazanım değerleri

Etkin Madde	Eklenen ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Bulunan ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	% Geri Kazanım	% BSS
Adrenalin	0,1	0,08 $\pm$ 0,01	80	3,33
	0,25	0,20 $\pm$ 0,02	80,4	7,46
	0,5	0,41 $\pm$ 0,02	82	5,61
	1,0	0,84 $\pm$ 0,06	84	6,67
	2,5	2,20 $\pm$ 0,17	88	7,68
	5,0	4,35 $\pm$ 0,28	87	6,39

#### 4.5. Adrenalinin Ratlara Uygulaması

##### 4.5.1. Rat Plazma Standart Çözeltilerin Hazırlanması

Atatürk Üniversitesi, Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edilen rat plazmalarına kontrol ve kalibratör olarak adrenalin ve 10 da 1 oranında seyreltilmiş internal standart çözeltileri ilave edildi ve Bölüm 3.4.4' de belirtildiği şekilde Eureka Lab division'dan temin edilen katı faz ekstraksiyon kartuşları ile ekstraksiyonları yapıldı. Ekstraktlar Floresans dedektörlü Yüksek Performans Sıvı Kromatografi (HPLC-FL) sistemine enjekte edildi ve kromatogramları alındı (Şekil 4.20).



Şekil 4.20: Adrenalin ve IS' ye ait kromatogram

#### 4.5.2.Yöntemin Geçerlilik Testi (Validasyonu)

##### 4.5.2.1. Doğrusal Aralık ve Kalibrasyon Eğrisi

HPLC-FL ile yapılan analizlerde adrenalinin 0,01-80 ng mL<sup>-1</sup> derişim aralığında doğrusal olduğu belirlendi.

##### 4.5.2.2.Tayin Alt Sınırı (LOQ)

LOQ değeri 0,01 ng mL<sup>-1</sup> olarak tespit edildi.

##### 4.5.2.3.Plazmadan Geri Kazanım

Plazmadan geri kazanım çalışmasında ortalama geri kazanım % 98'den büyük olarak belirlendi.

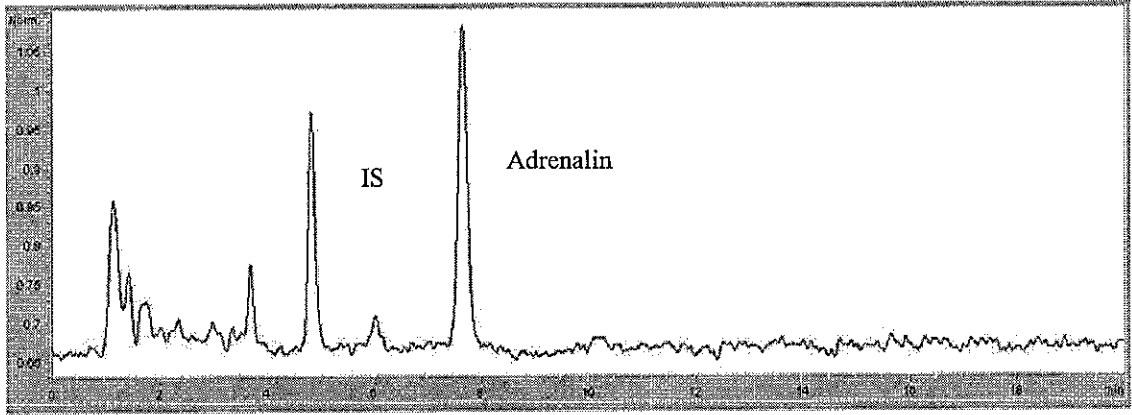
##### 4.5.2.4. Deney Hayvanları

Çalışmada kullanılan ratlar, Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edildi. Deney için ağırlıkları 200-210 g arasında değişen toplam 18 adet Albino Wistar türü erkek rat kullanıldı. Hayvanlar deney öncesi gruplar halinde laboratuarda normal oda sıcaklığında (22°C) barındırıldı ve beslendi. Çalışmanın bütün aşamalarının etik kurallara uygun olduğu Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır.

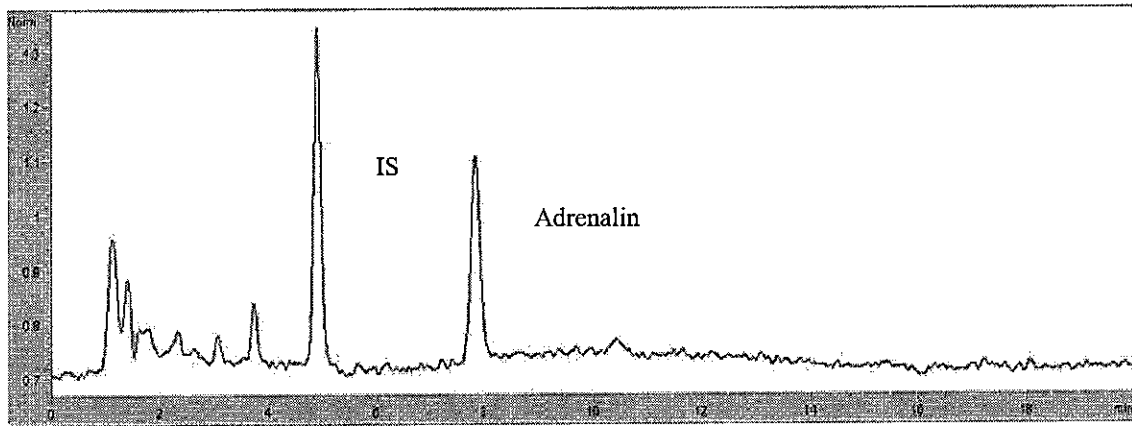
##### 4.6.2.5. Deney Hayvanları ile Çalışma

Bu çalışmamızda, ratlar her biri altı hayvandan oluşan 3 gruba ayrıldı. Ratların bir grubuna (n-6) 500 mg kg<sup>-1</sup> dozda parasetamol ve ikinci gruba (n-6) 200 mg kg<sup>-1</sup> dozda etodolak oral yoldan sonda ile uygulandı. Kontrol grubuna ise (n-6) sadece çözücü olarak distile su verildi. Bir saat sonra tüm hayvanlar Tiyopental sodyum ile anestezi edilerek EDTA'lı tüplere kanları alındı. 2000 rpm 'de 15 dakika santrifüj yapılarak plazmaları ayrıldı. Ekstraksiyon işlemi yapıldıktan sonra numuneler HPLC-FL sistemine enjekte edildi. Her hangi bir ilaç verilmeyen ratlardan elde edilen endojen

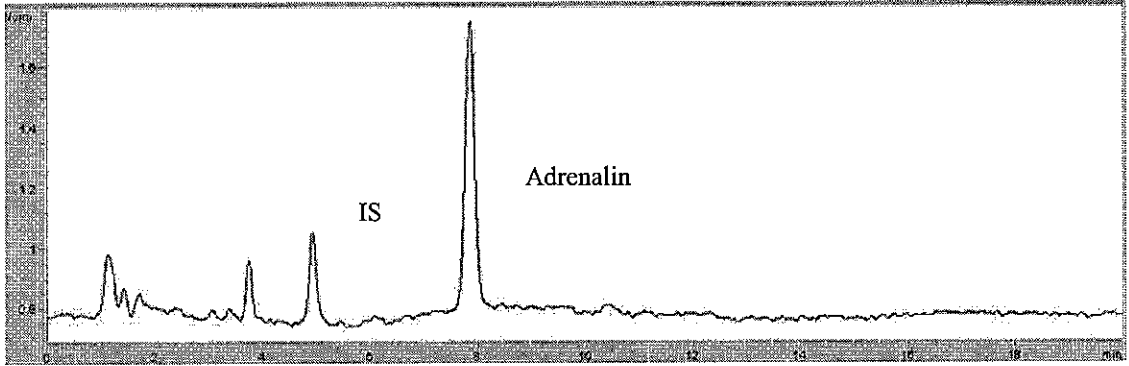
adrenalinini gösteren kromatogram Şekil 4.21'de verildi. Parasetamolün adrenalin üzerine olan etkisinin incelendiği kromatogram Şekil 4.22'de, etodolak'ın adrenalin üzerine etkisinin incelendiği kromatogram Şekil 4.23'de verildi.



Şekil 4.21: Rat plazmasında endojen olarak görülen adrenalin ve IS' ye ait kromatogram



Şekil 4.22: Parasetamol verilen ratların plazmasındaki adrenalin ve IS' ye ait kromatogram



Şekil 4.23: Etodolak verilen ratların plazmasındaki adrenalin ve IS'a ait kromatogram

#### 4.6.2.6. Parasetamol ve Etodolak'ın Adrenalin Üzerine Etkisi

Ratlar üzerinede yapılan çalışmada üç farklı grup oluşturulmuştur. Birinci grup kontrol grubu herhangi bir muameleye tabi tutulmayan ratlardır. İkinci grup oral yoldan parasetamol verilen ratlardır. Üçüncü grup etodolak yine oral yoldan etodolak verilen ratlardır. Bir saat sonra alınan kanlardan elde edilen plazma ile yapılan çalışmada parasetamol verilen ratlarda adrenalin miktarının düştüğü ve etodolak verilen ratlarda ise arttığı tespit edildi.



## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Analitik kimya, madde numunelerinin bileşimini tanıma ve tayin etmede kullanılan yöntemler topluluğudur. Herhangi bir maddeyi analiz etmek için kullanılacak analitik tekniklerin avantajlarını ve sınırlamaları hakkında yeteri kadar bir bilgi donanımına sahip olmak gerekir. Ayrıca çalışılacak konu ile ilgili iyi bir literatür taramasının yapılmış olması da gerekmektedir. Her hangi bir konuda hangi analitik cihazın, hangi yöntemin kullanılacağını söylemek doğru değildir. Koşullara bağlı olarak kullanılacak teknikler değişebilmektedir. Bundan dolayı analitik kimya çalışmaları çok büyük bir çeşitlilik arz eder. Analitik yöntem geliştirme yapıldıktan sonra da bu yöntemin uygulanabilir olduğunu göstermek için yöntemin geçerlilik testlerinin (validasyonunun) yapılması ve seçilen yöntemin bir değer ifade edebilmesi için de, yöntemin doğruluk, kesinlik, tekrarlanabilirlik, seçicilik, spesifiklik, hassaslık ve analiz süresinin kısa olması gibi geçerlilik test parametrelerinin incelenmesi gerekmektedir. İlaç endüstrisinde, analizin yapılacağı ortama (farmasötik preparat veya biyolojik sıvılar) göre literatür bilgilerine de dayanarak analitik yöntem seçiminin yapılması gerekmektedir.

Bu çalışmada, insan plazmasında adrenalin analizi için LC-MS yöntemi ve rat plazmasında adrenalin analizi için HPLC-FL yöntemleri geliştirilip geçerlilik testlerinin yapılması, HPLC-FL yöntemiyle ratlarda NSAİİ ilaçlardan olan etodolak ve parasetamol'ün adrenalin üzerine etkisinin incelenmesi ve ayrıca etodolak'ın plazmada miktar analizi için LC-MS yöntemi ve farmasötik preparatlarda miktar analizi için HPLC-UV ve LC-MS yöntemlerinin geliştirilip geçerlilik testlerinin yapılması amaçlanmıştır.

Kromatografi, karışım halinde bulunan ve birbirine yakın özellik gösteren

bileşenlerin ayrılmasında, tanınmasında ve tayininde yaygın olarak kullanılan birçok farklı yöntemi içeren bir analitik yöntemler topluluğudur<sup>62,65</sup>.

Bu yöntemler topluluğundan, Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (HPLC) ve Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi yöntemi geniş kullanım alanı, doğruluk, kesinlik, tekrarlanabilirlik, seçicilik, duyarlılık ve sonuçların hızlı elde edilebilmesi gibi diğer yöntemlere göre birçok üstün yanları vardır. Ayrıca nanogram seviyesinde bile miktar analizi yapılabilmesinden dolayı hem farmasötik preparatlarda hem de biyolojik ortamlarda miktar analizlerinde kullanılmaktadır.

### **Adrenalin**

Adrenalin hekimlikte damarları daraltma, bronşları açma, kanamaları kesme vb. amaçlarla kullanılan, kan şekerinin yükselmesine yol açan böbrek üstü bezlerinin salgıladığı önemli bir hormondur. Bu nedenle adrenalinin insan plazmasında miktar analizi için LC-MS yöntemi rat plazmasında belirlenmesi için HPLC-FL yöntemi geliştirilip geçerlilik testleri yapıldı. Yapılan literatür taramasında idrar, serum ve plazmada adrenalin'in miktar analizi için fluoresans, kemilüminesans, elektrokimyasal ve kütle dedektörlü HPLC yöntem bilgilerine ulaşılmıştır<sup>41-50</sup>. Yapılan çalışmalarda asetat tampon+metanol hareketli fazı<sup>38,43,46</sup>, potasyum hidrojen ftalat+metanol hareketli fazı<sup>40</sup>, sodyum disülfid ve EDTA içeren fosfat tamponu+asetonitril hareketli fazı<sup>41</sup>, sodyum sitrat tamponu+asetonitril hareketli fazı<sup>42</sup>, EDTA ve sodyumheptansülfat içeren asetat tampon+asetonitril<sup>44</sup> hareketli fazları, C<sub>18</sub> kolon ve katı faz ekstraksiyon işlemi kullanılmıştır. Ayrıca literatürde mevcut olan yöntemlerin çalışma aralığı 20-400 pg mL<sup>-1</sup>, 25,82 - 1030 pg mL<sup>-1</sup>, 2,5-200 ng mL<sup>-1</sup>, 50-2000 pg mL<sup>-1</sup>, 0,05-25 ng mL<sup>-1</sup> ve 1x10<sup>-8</sup>-5x10<sup>-6</sup> g mL<sup>-1</sup> olarak verilmektedir<sup>38,41,44,46,47</sup>.

Bu çalışmada, rat plazmasında adrenalini analizi için floresans dedektörlü (360 nm uyarma, 490 nm yayma dalga boyu) HPLC yöntemi kullanıldı. Bu analizde rat plazmasından adrenalini katı-faz ekstraksiyon yöntemiyle ekstrakte edildi ve kromatografik ayırmada asetonitril-su (80-20, h/h) hareketli fazı ve C<sub>18</sub> kolon (5 µm, 250 x 4,6 mm) kullanıldı. HPLC-FL yönteminin plazmadan ortalama geri kazanım değeri % 98'in üzerinde ve tayin edilebilirlik sınırı da (LOQ) 0,01 ng mL<sup>-1</sup> olarak belirlendi. İkinci olarak insan plazmasında adrenalini analizi için LC-MS yöntemi geliştirildi ve geçerlilik testleri yapıldı. Yapılan literatür taramasında adrenalini plazmadan ekstraksiyonu için sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemine ulaşılamadı. Bu nedenle LC-MS çalışmasında plazmada adrenalini ekstraksiyonunda Bölüm 3.4.2'de ayrıntıları verilmiş olan ve bizim tarafımızdan geliştirilen sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi kullanıldı. Ekstraksiyon sonucunda edilen ekstraktlar LC-MS sistemine enjekte edildi ve ayırım ters faz C<sub>18</sub> kolon (5 µm, 250 x 4,6 mm) ve % 0,1 formik asitli içeren su-asetonitril (10-90, h/h) hareketli fazıyla gerçekleştirildi. Yöntemin gözlenebilirlik sınırı (LOD) değeri 0,05 µg mL<sup>-1</sup>, tayin alt sınırı (LOQ) değeri ise 0,1 µg mL<sup>-1</sup> ve plazmadan ortalama geri kazanım % 83,57 olarak belirlendi. Güniçi ve günler arası kesinlik belirlenmesinde yüzde bağıl standart sapma (% BSS) ve doğruluk belirlenmesinde bağıl hata değerleri, sırasıyla % 7,00 ve % 8,00'den küçük olarak tespit edildi. Her iki yöntemde isoprotrenol internal standart kullanıldı ve LC-MS yönteminin çalışma aralığı 0,1-5 µg mL<sup>-1</sup> ve HPLC-FL yönteminin çalışma aralığı da 0,01-80 ng mL<sup>-1</sup> olarak belirlendi.

Ayrıca parasetamol ve etodolak'ın adrenalini üzerine etkisini belirlemek için ratların ilk grubuna (n-6) 500 mg kg<sup>-1</sup> dozda parasetamol ve ikinci grubuna (n-6) 200 mg kg<sup>-1</sup> dozda etodolak oral yoldan uygulandı. Kontrol grubuna ise (n-6) çözücü olarak distile

su verildi.1 saat sonra ratlardan kan örnekleri EDTA'lı tüplere alındı ve plazmaları ayrıldıktan sonra ekstraksiyon işlemi uygulandıktan sonra çözeltilerde adrenalin HPLC-FL yöntemiyle analiz edildi. Çalışma sonucunda parasetamol'ün kontrol grubuna göre adrenalin miktarını azalttığı, etodolak'ın adrenalin miktarını artırdığı belirlendi. NSAİİ'lerin antiinflamatuvar etki mekanizmalarında böbrek üstü bezinin rolü olduğu düşünülmektedir. Daha önce yapılan bir çalışmada indometazin, diklofenak, aspirin ve nimesulid verilen ratlarda adrenalin seviyelerinin düştüğü belirlenmiş olup; analjezik etkilerinden bunun sorumlu olduğu düşünülmüştür<sup>12,83</sup>. Bizim çalışmamızda kullandığımız parasetamol adrenalin seviyesini düşürürken, etodolak önceki çalışmaların tersine adrenalin seviyesini artırmıştır.

### **Etodolak**

Etodolak antiinflamatuvar, analjezik ve antipiretik özellikler gösteren enflamasyonlu dokuda prostaglandin sentezini inhibe ederek ağrı reseptörlerinin, enflamasyonun mediatörleri olan histamin, serotonin ve kininlere karşı duyarlılığını azaltan ve önleyen non-steroidal antiinflamatuvar (NSAİİ) ilaçlardan birisidir. Bu çalışmada etodolak'ın farmasötik preparatlarda miktar analizi için HPLC-UV ve LC-MS yöntemleri geliştirilip, geçerlilik testleri yapıldı ve her iki yöntemin uygulanabilir olduğunu göstermek için etodolak etkin maddesini içeren piyasada mevcut olan Tadolak ve EtoI Fort tabletlerde miktar analizi gerçekleştirildi.

Yapılan literatür araştırmasında farmasötik preparatlarda etodolak miktar analiziyle ilgili olarak kapiler elektroforetik<sup>52</sup>, sequential injeksiyon<sup>53</sup>, voltametik<sup>54</sup>, spektrofluorometrik<sup>30</sup>, spektrofotometrik<sup>55-57</sup> ve UV dedektörlü HPLC<sup>58,59</sup> yöntemlerine ulaşılmıştır. Spektrofotometrik çalışmalarda etodolak genellikle farklı ortamlarda türevlendirilerek miktar analizleri gerçekleştirilmiştir. Farmasötik preparatlarda HPLC

yöntemiyle etodolak miktar analizine yönelik iki çalışmaya ulaşılmıştır<sup>58,59</sup>. Bu çalışmaların birincisinde etodolak ve asetaminofen iksi birlikte HPLC yöntemiyle tabletlerde miktar analizi gerçekleştirilmiştir<sup>58</sup>. Bu çalışmada C<sub>18</sub> kolon, astitonitril-ortofosforik asit (50:50, h/h) hareketli fazı, 274 nm dalga boyu ve 1 mL dak<sup>-1</sup> akış hızından oluşan kromatografik parametreler kullanılmıştır. Diğer çalışmada da zorlanmış parçalanma işlemi sonrasında parçalanmış ürünler ile etodolak'ın analizi için HPLC yöntemi ve aynı anda birinci türev spektrofotometrik yöntem kullanılmıştır<sup>59</sup>. Bu çalışmada da C<sub>18</sub> kolon, metanol-su-asetik asitten (70:30:0,1, h/h/h) oluşan hareketli faz, 254 nm dalga boyu ve 1 mL dak<sup>-1</sup> akış hızından oluşan kromatografik parametreler kullanılmıştır. Biz çalışmamızda, HPLC-UV yönteminde ters faz C<sub>18</sub> kolon (5 µm, 250 x 4,6 mm), % 0,1 formik asit içeren su-asetonitrilden (20-80,h/h) oluşan hareketli faz, 272 nm dalga boyu ve 1 mL dak<sup>-1</sup> akış hızından oluşan kromatografik parametreleri kullandık. LC-MS yöntemiyle yapılan çalışmada da HPLC sistemindeki kromatografik parametrelerle aynı parametreler ve Bölüm 3.3.1'de belirtilen MS parametreleri kullanıldı. Yapılan literatür araştırmasında LC-MS yöntemiyle biyolojik sıvılarda (plazma, idrar ve serumda) etodolak çalışması mevcut iken farmasötik preparatlarda etodolak miktar analizi ile ilgili bir çalışmaya ulaşamadık. Burada kullanılan çalışma parametreleri tarafımızdan geliştirilmiştir. Literatürdeki HPLC çalışmalarında birinci yöntemin çalışma aralığı 72-168 µg mL<sup>-1</sup>, alıkonma zamanı 1,32 dak, geri kazanım % 101,32 ve günüçi günler arası bağıl standart sapma (% BSS) % 2,0 den küçük olduğu tespit edilmiştir<sup>59</sup>. İkinci çalışmada ise yöntemin çalışma aralığı 2,4-16 µg mL<sup>-1</sup>, alıkonma zamanı 8,71 dak, ortalama geri kazanım % 101, LOD değerini 0,03 µg mL<sup>-1</sup>, LOQ değerini de 0,1 µg mL<sup>-1</sup> ve doğruluk çalışmasında % BSS ise % 2,8'den küçük olarak tespit edilmiştir<sup>60</sup>. Çalışmamızın HPLC-UV yönteminde çalışma aralığı

0,08-10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , her iki tablet için ortalama geri kazanım değeri % 98,5, alıkonma zamanı 4,1 dak, gözlenebilme sınırı (LOD) değeri 0,03  $\mu\text{g mL}^{-1}$  ve tayin alt sınırı (LOQ) değeri ise 0,08  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , günüçi ve günler arası doğruluk çalışmasında yüzde bağıl standart sapma % 7,5 den küçük olarak belirlendi. Bu çalışmada internal standart olarak da parasetamol kullanıldı ve 5 dakika gibi kısa sürede kromatografik ayırım tamamlandı. LC-MS çalışmasında ise yöntemin çalışma aralığı 0,08-10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , her iki tablet için ortalama geri kazanım değeri % 98,75, alıkonma zamanı 4,1 dak, LOD değeri 0,012  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , LOQ değeri ise 0,026  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , günüçi ve günler arası doğruluk çalışmasında ise % BSS değeri % 10'dan küçük olarak belirlendi. LC-MS yöntemi farmasötik preparatlarda internal standart kullanılarak etodolak analizi için literatür bilgilerine göre yeni bir yöntem olduğundan dolayı bu yöntemin spesifikliğı, hassasiyeti ve kısa sürede analiz süresinden dolayı bir çok avantaja sahiptir. HPLC-UV ve LC-MS yöntemleri ilaç endüstrisinde kalite kontrol amaçlı olarak kullanılabilir olduğu söylenebilir.

Yapılan literatür taramasında plazma ve idrarda etodolak'ın belirlenmesi için HPLC<sup>51</sup> ve LC-MS<sup>60,61</sup> çalışmalarına ulaşılmıştır. Strickman ve arkadaşları<sup>61</sup> idrarda etodolak ve metaboliti 5-hydroxy etodolak'ı belirlemek için kütle dedektörlü HPLC yöntemini kullanmışlardır. Bu çalışmada ters faz C<sub>18</sub> kolon, asetik asit-asetonitrilden oluşan hareketli faz ve 1 mL dak<sup>-1</sup> akış hızı parametrelerini kullanmışlardır. Bu çalışmanın kromatografik ayırma süresi 28 dakika olarak verilmektedir. Lee ve arkadaşları<sup>60</sup> da LC-MS yöntemiyle insan plazmasında etodolak miktar analizini gerçekleştirmişlerdir. 10 mM amonyum format içeren su-asetonitril den oluşan hareketli fazı ve C<sub>18</sub> kolon çalışma parametrelerini kullanmışlardır. Bu çalışmada yöntemin çalışma aralığı 0,1-25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , plazmadan geri kazanım % 90, tayin alt sınırı (LOQ) değeri ise 0,1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  ve

güniçi günler arası bağıl standart sapma (% BSS) % 7,0 den küçük olduğu tespit edilmiştir. Shi ve arkadaşları<sup>51</sup> rat plazmalarında etodolak'ın enantiyomerlerini ayırıp analiz etmek ve farmakokinetik parametreleri belirlemek için ters faz HPLC yöntemini geliştirmişlerdir. Bu çalışmada ise yöntemin çalışma aralığı 0,5-200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , plazmadan geri kazanım ortalama olarak % 73, tayin alt sınırı (LOQ) değeri ise 0,1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  ve güniçi günler arası bağıl standart sapma (% BSS) % 7,0 den küçük olduğu tespit edilmiştir. Bizim LC-MS plazma çalışmasında ters faz  $\text{C}_{18}$  kolon (5  $\mu\text{m}$ , 250 x 4,6 mm), (% 0,1 formik asitli su-asetonitril (20-80, h/h) hareketli faz ve 1 mL  $\text{dak}^{-1}$  akış hızından oluşan kromatografik parametreler ve Bölüm 3.3.1'de verilen MS parametreleri kullanıldı. Yöntemin çalışma aralığı 0,03-5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , plazmadan ortalama geri kazanım % 90,67, alıkonma zamanı 4,1 dak, yöntemin gözlenebilme sınırı (LOD) değeri 0,015  $\mu\text{g mL}^{-1}$  ve tayin alt sınırı (LOQ) değeri ise 0,03  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , güniçi ve günler arası bağıl standart sapma (% BSS) değeri % 11'den küçük olarak tespit edildi. Ayrıca bu çalışmada plazmadan etodolak ekstraksiyonu için basit bir sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi de geliştirilip uygulandı. Geliştirilip geçerlilik testleri yapılan LC-MS yönteminin plazmadan etodolak miktar analizinde başarıyla uygulanacağı sonucuna varılmıştır. Ayrıca bu yöntem diğer yapılan çalışmalara göre daha hassastır.

## 6. KAYNAKLAR

1. Suleyman H, Demircan B, Karagoz Y. Anti-inflammatory and side effects of cyclooxygenase inhibitors. *Pharmacol Rep* 2007; 59:247-58.
2. Thompson PW, Tee L, McBride J, Quincey D, Liddiard GS. Long-term NSAID use in primary care: changes over a decade and NICE risk factors for gastrointestinal adverse events. *Rheumatology*. 2005;44:1308-10.
3. Amadio P, Jr., Cummings DM, Amadio P. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Tailoring therapy to achieve results and avoid toxicity. *Postgrad Med*. 1993;93:73-6, 9-81, 5-8 passim.
4. Burke A, Smyth E, Fitz Gerald GA. Analgesic-antipyretic agents: Pharmacotherapy of gout. In: Brunton LL, editor. *Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. 11<sup>th</sup> ed. New-york, Mc Graw-Hill, 2006. p. 671 -717.
5. Kullich WC, Niksic F, Klein G. Effect of nimesulide on metalloproteinases and matrix degradation in osteoarthritis: A pilot clinical study. *Int J Clin Pract*. 2002:24-9.
6. Dallegri F, Bertolotto M, Ottonello L. A review of the emerging profile of the anti-inflammatory drug oxaprozin. *Expert Opin Pharmacol*. 2005;6:777-85.
7. Bevilacqua M, Vago T, Baldi G, Renesto E, Dallegri F, Norbiato G. Nimesulide Decreases Superoxide Production by Inhibiting Phosphodiesterase Type-IV. *Eur J Pharm-Molec Ph*. 1994;268:415-23.
8. Tool ATJ, Verhoeven AJ. Inhibition of the Production of Platelet-Activating-Factor and of Leukotriene B-4 in Activated Neutrophils by Nimesulide Due to an Elevation of Intracellular Cyclic Adenosine-Monophosphate. *Arzneimittel-Forsch*. 1995;45-2:1110-4.
9. Le Filliatre G, Sayah S, Latournerie V, Renaud JF, Finet M, Hanf R. Cyclooxygenase and lipoxygenase pathways in mast cell dependent-neurogenic inflammation



- induced by electrical stimulation of the rat saphenous nerve. *Brit J Pharmacol.* 2001;132:1581-9.
10. Suleyman H, Demirezer LO, Kuruuzum A, Banoglu ZN, Gocer F, Ozbakir G, Gepdiremen A. Antiinflammatory effect of the aqueous extract from *Rumex patientia* L-roots. *J Ethnopharmacol.* 1999;65:141-8.
11. Suleyman H, Halici Z, Hacimuftuoglu A, Gocer F. Role of adrenal gland hormones in antiinflammatory effect of calcium channel blockers. *Pharmacol Rep.* 2006;58:692-9.
12. Suleyman H, Halici Z, Cadirci E, Hacimuftuoglu A, Bilen H. Indirect role of beta(2)-adrenergic receptors in the mechanism of anti-inflammatory action of NSAIDS. *J Physiol Pharmacol.* 2008;59:661-72.
13. Mycek J.M., Harvey A.R., Champe C.C. *Lippincott's Illustrated Review Pharmacology.* Tercüme: Oktay Ş, Berkman K, Onat F, Gören Z, Atagündüz P, Farmakoloji, ikinci baskı, İstanbul. Nobel tıp kitapçevleri, 1998:410-412
14. Kayaalp SO. *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*, 1 cilt, sekizinci baskı. Ankara: Hacettepe TAŞ, 1998: 981
15. Amadio P, Jr. Peripherally acting analgesics. *Am J Med.* 1984;77:17-26.
16. Mitchell JA, Akarasereenont P, Thiemermann C, Flower RJ, Vane JR. Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90:11693-7.
17. Melli M, Kayaalp SO. Non-steroidal antiinflamatuvar ilaçlar. In: Kayaalp SO, editor. *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*. 11. Baskı, Ankara, Hacettepe-Taş, 2005. p. 837-70.
16. Kearns GL, Leeder JS, Wasserman GS. Acetaminophen overdose with therapeutic intent. *J Pediatr.* 1998;132:5-8.

17. Lorenzetti BB, Ferreira SH. Mode of analgesic action of dipyron: direct antagonism of inflammatory hyperalgesia. *Eur J Pharmacol.* 1985;114:375-81
18. Livingston A. Mechanism of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2000;30:773-81.
19. Vane J, Botting R. Inflammation and the mechanism of action of anti-inflammatory drugs. *Faseb J.* 1987;1:89-96
20. Mitchell JA, Akarasereenont P, Thiemermann C, Flower RJ, Vane JR. Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90:11693-7.
21. Shinde UA, Phadke AS, Nair AM, Mungantiwar AA, Dikshit VJ, Saraf MN. Membrane stabilizing activity - a possible mechanism of action for the anti-inflammatory activity of Cedrus deodara wood oil. *Fitoterapia.* 1999;70:251-7.
22. Mccord JM, Roy RS. The Patho-Physiology of Superoxide - Roles in Inflammation and Ischemia. *Can J Physiol Pharm.* 1982;60:1346-52.
23. Abramson SB, Weissmann G. The Mechanisms of Action of Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs. *Arthritis Rheum.* 1989;32:1-9.
24. Brooks PM, Day RO. Drug-Therapy - Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs - Differences and Similarities. *New Engl J Med.* 1991;324:1716-25.
25. Smith HS. Potential analgesic mechanisms of acetaminophen. *Pain Physician.* 2009;12:269-80.
26. Katzung B, editor. Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs, Disease-Modifying Antirheumatic Drugs, Nonopioid Analgesics, & Drugs Used in Gout. *Basic and clinical pharmacology.* 9<sup>th</sup> ed. New York, Lange, McGraw-Hil 2004. p. 806-49.
27. Amadio P, Jr. Peripherally acting analgesics. *Am J Med.* 1984;77:17-26.

28. Kearns GL, Leeder JS, Wasserman GS. Acetaminophen overdose with therapeutic intent. *J Pediatr.* 1998;132:5-8.
- 29.Çadircı E. Bazı non-steroidal antiinflamatuvar ilaçların analjezik etki mekanizmasında beta-2 adrenerjik reseptörlerin indirekt rolü. Atatürk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakoloji Anabilim Dalı, Doktora tezi,2009
- 30.Ulu ST, New and Sensitive Spectrofluorimetric Method for the Determination of Non-Steroidal Anti inflammatory Drugs, Etodolac and Diclofenac Sodium in Pharmaceutical Preparations through Derivatization with 7-fluoro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3- diazole. *Journal of Food and Drug Analysis.* 2010;19: 94-101
- 31.Ak DD, Kutluk BK, Tunçel M, Enein HYA, Capillary electrophoretic method for the determination of etodolac in pharmaceutical tablet formulation. *J.Liq Chrom. Rel.Technol.* 2001; 24:773-780
32. Boni JP, Korth-Bradley JM, Martin P, Simcoe DK, Richards LS, Rennebohm R, Walson PD, Pharmacokinetics of Etodolac in Patients with Stable Juvenile Rheumatoid Arthritis *Clinical Therapeutics.* 1999; 21:1715-1724
- 33.Martel RR, Klicius J, Comparison in rats of the anti-inflammatory and gastric irritant effects of etodolac with several clinically effective anti-inflammatory drugs. *Inflammation Research.*1982; 12: 295-297
34. Vetter G, Placchi M, Joubert L, Comparative efficacy of etodolac and placebo in rheumatoid arthritic patients. *International Journal of Clinical Pharmacology Therapy and Toxicology,*1982; 20: 240-245
35. Ferdinandi ES, Sehgal SN, Demerson CA, Dubuc J, Zilber J, Dvornik D, Cayen MN, Disposition and biotransformation of <sup>14</sup>C-etodolac in man. *Xenobiotica,* 1986; 16, 153-166

36. Onat T, Emerk K, Sözmen E.Y. İnsan Biyokimyası. Ankara: Palme Yayıncılık, 2002:437
37. Kayaalp SO. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, 2. cilt, sekizinci baskı. Ankara: Hacettepe TAŞ, 1998: 1223
38. Fotopoulou MA, Ioannou PC, Post-column terbium complexation and sensitized fluorescence detection for the determination of norepinephrine, epinephrine and dopamine using high-performance liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*.2002;462:179-185
39. Fu-Nan Chen, Ying-Xue Zhang, Zhu-Jun Zhang Simultaneous Determination of Epinephrine, Noradrenaline and Dopamine in Human Serum Samples by High Performance Liquid Chromatography with Chemiluminescence Detection. *Chinese journal of chemistry*. 2007;25: 942-946
40. <http://tr.wikipedia.org/wiki/Adrenalin> (Çevrim içi)
41. Ueyama J, Kitaichi K, Iwase M, Takagi K, Takagi K, Hasegawa T Application of ultrafiltration method to measurement of catecholamines in plasma of human and rodents by high-performance liquid chromatography. *Journal of chromatography B*, 2003;798: 35-41
42. Patel BA , Arundell M, Parker KH, Yeoman MS, O'Here D. Simple and rapid determination of serotonin and catecholamines in biological tissue using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of Chromatography B*. 2005; 818: 269-276
43. Hay M, Mormede P. Determination of catecholamines and methoxycatecholamines excretion patterns in pig and rat urine by ion-exchange liquid chromatography with electrochemical detection .1997;703; 15-23

44. He H, Stein C.M.,Christman B, Wood A.J.J. Determination of catecholamines in sheep plasma by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection: comparison of deoxyepinephrine and 3,4-dihydroxybenzylamine as internal Standard. *Journal of Chromatography B*. 1997;701: 115-119
45. Westermann J, Hubl W, Kaiser N, Salewski L. Simple, rapid and sensitive determination of epinephrine and norepinephrine in urine and plasma by non-competitive enzyme immunoassay, compared with HPLC method. *Clin. Lab*, 2002;48:61-71
46. Liu L, Li Q, Li N, Ling J, Liu R, Wang Y, Sun L, Chen XH, Bi K. Simultaneous determination of catecholamines and their metabolites related to Alzheimer's disease in human urine. *J.Sep. Sci*. 2011;34:1198-1204
47. [www.enthalpy.com/pdf/Enthalpy\\_ASMS](http://www.enthalpy.com/pdf/Enthalpy_ASMS) Poster 2007.(Çevrim içi)
48. Ji C, Walton J, Su Y, Tella M. Simultaneous determination of plasma epinephrine and norepinephrine using an integrated strategy of a fully automated protein precipitation technique, reductive ethylation labeling and UPLC–MS/MS. *Analytica Chimica Acta*. 2010;670: 84-91
49. Kushnir MM, Urry FM, Frank EL, Roberts WL, Shushan B. Analysis of Catecholamines in Urine by Positive- Ion Electrospray Tandem Mass Spectrometry. *Clinical Chemistry*. 2002;48(2):323-331

50. Chan ECY, Ho PC. High-performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometric method for the analysis of catecholamines and metanephrines in human urine. *Rapid Communications in mass Spectrometry*. 2000;14:1959-1964
51. Shi J-M, Lai S-G, Xu C-J, Duan G-L, Li D . Pharmacokinetic difference between *S*-(+)- and *R*-(-)-etodolac in rats. *Acta Pharmacol Sin*. 2004; 25(8), 996-999.
52. Ak D.D., Kutluk Ö.B., Tunçel M., Aboul-Enein H.Y. Capillary electrophoretic method for the determination of etodolac in pharmaceutical tablet formulation, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 2001; 24(6), 773-780.
53. Garcia JB, Sraiva ML.MFS., Lima JLFC. Determination and antioxidant activity evaluation of etodolac, an anti-inflammatory drug, by sequential injection analysis, *Analytica Chimica Acta*. 2006; 573: 371-375.
54. Yılmaz S., Uslu B., Özkan S.A. Anodic oxidation of etodolac and its square wave and differential pulse voltametric determination in pharmaceuticals and human serum. *Talanta*. 2001;54 :351-360
55. Amer SM, Et- Saharty YS, Metwally FH, Younes KM. Spectrophotometric Study of Etodolac Complexes with Copper (II) and Iron (III). *Journal of AOAC International*. 2005; 88(6): 1637-1643
56. Gouda AA, Hassan WS. Spectrophotometric determination of etodolac in pure form and pharmaceutical formulations. *Chemistry Central Journal*. 2008; 2 (7): 1-8
57. Kousy NME. Spectrophotometric and spectrofluorimetric determination of etodolac and aceclofenac. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 1999; 20:185-194

58. Dongre VG, Sweta B. Shah SB, Bayes GS, Phadke M, Jadhav VK. Simultaneous Determination of Etodolac and Acetaminophen in Tablet Dosage Form by RP-LC. *Chromatographia*. 2009;69:94-101
59. Saleh OA, El-Azzouny AA, Aboul-Enein HY, Badawey AM, Rashed MS. Development and Validation of Stability-Indicating High Performance Liquid Chromatographic (HPLC) and DD<sub>1</sub>- Spectrophotometric Assay for Etodolac in Bulk Form and in Pharmaceutical Dosage Form. *Journal of Liquid Chromatography Related Technologies*. 2009; 32: 2584-2599
60. Lee HS, Kang IM, Lee HW , ,Seo JH, Ryu JH, Choi SJ , Lee MJ, Jeong SY, Cho YW, Lee KT. Development and validation of a high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the determination of etodolac in human plasma. *Journal of Chromatography B*. 2008;863: 158-162.
61. Strickman D.B., Blaschke G., Isolation of unknown metabolite of the non-steroidal anti-inflammatory drug etodolac and its identification as 5-hydroxy etodolac, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2001;25: 977-984.
62. Milenkova K, Dimitrovska A, Ugrinova L, Jolevska ST. Simultaneous determination of paracetamol, pseudoephedrine hydrochloride and dextromethorphan hydrobromide in tablets by HPLC. *Bulletin of the Chemists and Technologists of Macedonia*. 2003; 22: 33-37
63. Qil ML, Wang P, Leng YX, Gu JL, Fu RN. Simple HPLC Method for Simultaneous Determination of Acetaminophen, Caffeine and Chlorpheniramine Maleate in Tablet Formulations. *Chromatographia*. 2002;56:295-298

64. Pawar UD, Naik AV, Sulebhavikar AV, Datar TA, Mangaonkar KV. Simultaneous Determination of Aceclofenac, Paracetamol and Chlorzoxazone by HPLC in Tablet Dose Form. *E-Journal of Chemistry*. 2009; 6(1): 289-294
65. Campanero MA, Calahorra A, Quetglas EG, Ocariz AL, Honorato J. Rapid liquid chromatographic assay for the determination of acetaminophen in plasma after propacetamol administration: application to pharmacokinetic studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 1999;20: 327-334
66. Hewavitharana AK, Lee S, Dawson PA, Markovich D, Shaw PN. Development of an HPLC–MS/MS method for the selective determination of paracetamol metabolites in mouse urine. *Analytical Biochemistry*. 2008;374; 106-111
67. Zhu T, Ding L, Guo X, Yang L, Wen A. Simultaneous Determination of Tramadol and Acetaminophen in Human Plasma by LC–ESI–MS. *Chromatographia*. 2007; 66: 171–178
68. Skoog DA, Holler FJ, Timothy A.N. Principles of Instrumental Analysis. Tercüme: Kılıç E, Köseoğlu F., Yılmaz H., Enstrümental Analiz İlkeleri, Ankara. Bilim Yayıncılık, 1998 , 299-351, 725-764
69. Gündüz T. İnstrümental Analiz, Altıncı Baskı. Ankara :Gazi Kitapevi, 2002: 1225
70. Wiberg K., Multivariate spectroscopic methods for the analysis of solutions. Department of Analytical Chemistry, Arrhenius Laboratory, Stockholm University, 2004 [www.anchem.su.se/downloads/diss.pdf](http://www.anchem.su.se/downloads/diss.pdf) 2004, 6, 8.
71. Skoog DA, Holler FJ, Timothy A.N. Principles of Instrumental Analysis. Tercüme: Kılıç E, Köseoğlu F., Yılmaz H., Enstrümental Analiz İlkeleri, Ankara. Bilim Yayıncılık, 1998 , 299-351, 675-777.
72. Constatin E., Schnell, A. Mass Spectrometry. London: Ellis Horwood ltd., 1990: 41



73. Suelter, C.H., Watson, J.T. (Eds) Practical Aspects of Gas Chromatography-Mass Spectrometry. New York: John Wiley and Sons Ltd.,1990:2-42.
74. Chapman, J.R. Practical Organic Mass Spectrometry. London : John Wiley and Sons Ltd., 1985: 27-37.
75. James K. Hardey, "Mass Spectrometry for Chromatographers" , The University of Akron copyright (C) 2004 , ( <http://ull.chemistry.uakron.edu/gcms/> ).
76. Brian M. "Introduction to Mass Spectrometry (MS)" The Chemistry Hypermedia Project, Copyright © 2000 by Brian M. (<http://www.chem.vt.edu/chem-ed/>).
77. Tunçbilek İ. Gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi tekniği kullanılarak doping amacıyla kullanılan hidroksietil nişastanın (hes) idrardan analizi üzerine bir çalışma. Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans tezi Ankara, 2005.
78. Constantin, E. Schnell, A. Mass Spectroscopy, Ellis Horwood Ltd. London, 1990: 41.
79. Atila A. Prilocaine HCl'nin biyoanalitik yöntem validasyonu. Atatürk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans tezi,2006
80. [http://en.wikipedia.org/wiki/Liquid\\_chromatography\\_mass\\_spectrometry](http://en.wikipedia.org/wiki/Liquid_chromatography_mass_spectrometry)
81. Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation, U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Center for Veterinary Medicine (CVM) May 2001 BP (<http://www.fda.gov/cder/guidance/4252fml.htm>) .
82. Validation of Analytical Procedures. Proceedings of the International Conference on Harmonisation (ICH). Commission of the European Communities, 1996.

83. Cadirci E, Suleyman H, Hacimuftuoglu A, Halici Z, Akcay F. Indirect role of beta2-adrenergic receptors in the mechanism of analgesic action of nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Crit Care Med.* 2010 S;38(9):1860-7.

## ÖZGEÇMİŐ

18.08.1979 yılında Erzurum da doğdum. İlkokulu İsmet PaŐa İlk Okulu, ortaokulu Őair Nefi Ortaokulu ve liseyi Erzurum Lisesin de tamamladım. Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümün den mezun olduktan sonra 2003 yılında Hocam Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU ile Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesinde yüksek lisansa başladım. 2006 yılında yüksek lisans eğitimimi tamamladım aynı yıl doktora devam etmeye hak kazanıp eğitimimi 2011 yılında tamamladım.



T.C.  
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ  
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

Sayı : B.30.2.ATA.0.23.85-77  
Konu : Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararı.

28.06.2011  
ERZURUM


ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
ECZACILIK FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA

25240 – Kampus / ERZURUM

**İlgi : 28.06.2011 tarih ve B.30.2.ATA.0.22.02.02/596 sayılı yazı.**

İlgide kayıtlı yazıda belirtildiği üzere, Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulumuzun 30.01.2009 tarih ve 1 sayılı oturumunda alınan 3 sayılı kararı gereğince, Fakülteniz Analitik Kimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof.Dr.Yücel KADIOĞLU'nun yürütücülüğünde, Analitik Kimya Anabilim Dalı laboratuvarında yürütülen “**Bazı Non Steroidal Antiinflamatuvar İlaçların Tavşanlarda Oral Uygulama Sonrası Kan Adrenalin Düzeyleri Üzerine Etkisi**” başlıklı araştırma çalışmasının içeriğinin değiştirilmeden isminin “**Bazı Non Steroidal Antiinflamatuvar İlaçların Ratlarda Oral Uygulama Sonrası Kan Adrenalin Düzeyleri Üzerine Etkisi**” olarak değiştirilmesi Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulumuzun 28.06.2011 tarih ve 6 sayılı Oturumunda incelenmiş ve aşağıya çıkarılan 41 no'lu kararı ile araştırmanın Etik Kurallara uygun olduğuna mevcudun oy birliğiyle karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini arz ederim.

  
Prof. Dr. Mustafa ATASEVER  
Başkan

**Toplantı Tarihi : 28.06.2011**

**Toplantı Sayısı : 6**

**KARAR NO : 41-** Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulumuzun 30.01.2009 tarih ve 1 sayılı oturumunda alınan 3 sayılı kararı gereğince, Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dekanlığı, Analitik Kimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof.Dr.Yücel KADIOĞLU'nun yürütücülüğünde, Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı laboratuvarında yürütülen “**Bazı Non Steroidal Antiinflamatuvar İlaçların Tavşanlarda Oral Uygulama Sonrası Kan Adrenalin Düzeyleri Üzerine Etkisi**” başlıklı araştırma çalışmasının içeriğinin değiştirilmeden isminin “**Bazı Non Steroidal Antiinflamatuvar İlaçların Ratlarda Oral Uygulama Sonrası Kan Adrenalin Düzeyleri Üzerine Etkisi**” olarak değiştirilmesi ile ilgili Eczacılık Fakültesi Dekanlığının 28.06.2011 tarih ve 596 sayılı yazıları görüşüldü.

Yapılan görüşmelerden sonra; adı geçen araştırma çalışmasının içeriğinin değiştirilmeden isminin “**Bazı Non Steroidal Antiinflamatuvar İlaçların Ratlarda Oral Uygulama Sonrası Kan Adrenalin Düzeyleri Üzerine Etkisi**” olarak yürütülmesinin, etik kurallarına uygun olduğunun, mevcut oy birliği ile kabulüne; karar verildi.

**Adres : Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dekanlığı. 25240 – Kampus/ERZURUM**

**Telefon : 0-442-236 08 80**

**Fax : 0-442-236 08 81**

**e-mail: hadyek@atauni.edu.tr**